

论 著  
(基础研究)

## HBV X 基因突变促进肝癌发生的生物学机制

张 琪, 唐慧娴, 韩一芳, 叶福强, 王太武, 吕 恒, 张锦海

**【摘要】 目的** 探讨乙型肝炎病毒(HBV) X 基因(HBx)羧基末端四个突变位点 C1653T、T1753C 及 A1762T/G1764A 致癌的生物学机制。 **方法** 利用体外基因合成和定点突变构建野生型和复合突变型 HBx 重组质粒, 转染至人肝癌细胞 HepG2 筛选稳定表达细胞株。通过绘制细胞生长曲线(CCK8 法)、平板克隆形成实验、划痕实验、Transwell 侵袭实验比较转染空载体(Vector)、野生型 HBx(WT)和突变型 HBx(Combo)细胞的增殖、迁移和侵袭能力。 **结果** 细胞生长曲线结果显示 WT 和 Combo 细胞的生长速率明显快于 Vector( $P<0.01$ ), 但 WT 和 Combo 之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。平板克隆形成实验结果提示 Combo 细胞的克隆形成率显著高于 WT( $31.90\%$  vs  $16.00\%$ ,  $P<0.01$ ), 而 WT 略高于 Vector( $12.46\%$ ,  $P<0.05$ )。划痕实验结果显示 Combo 细胞 48 h 迁移距离显著高于 WT 细胞( $P<0.01$ ), 而 WT 细胞显著高于 Vector 细胞( $P<0.01$ )。Transwell 侵袭实验结果显示 Combo 细胞穿过小室的细胞数最多[( $227.80\pm 17.85$ )个], 其次为 WT 细胞[( $181.75\pm 10.06$ )个], Vector 细胞最少[( $85.72\pm 3.19$ )个], 三者两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。 **结论** 野生型和突变型 HBx 均可显著增强 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 且突变型 HBx 促进细胞恶性生物学行为的能力显著强于野生型 HBx, 这为明确 HBV 致癌机制提供了一定的依据。

**【关键词】** HBV X 基因; 病毒突变; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭**【中图分类号】** R373.2**【文献标志码】** A**【文章编号】** 1672-271X(2019)04-0337-06**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.04.001

## Biological mechanisms of HBV X gene mutations in promoting hepatocellular carcinoma

ZHANG Qi<sup>1</sup>, TANG Hui-xian<sup>2</sup>, HAN Yi-fang<sup>1</sup>, YE Fu-qiang<sup>1</sup>, WANG Tai-wu<sup>1</sup>, LÜ Heng<sup>1</sup>, ZHANG Jin-hai<sup>1</sup>

(1. Center for Disease Control and Prevention of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the biological functions of four mutations (C1653T, T1753C, and A1762T/G1764A) locating in the C-terminal region of hepatitis B virus (HBV) X gene (HBx) in hepatocarcinogenesis. **Methods** Recombinant constructs containing wild-type and compound mutations of HBx were constructed by gene synthesis and site-directed mutagenesis. Stable transfection was carried out in human hepatoma cell line HepG2. CCK-8 assay was used to draw the growth curves of the transfected cells. The proliferation, migration, and invasion abilities of cells transfected with empty vector (Vector), wild-type HBx (WT), and compound mutations of HBx (Combo) were evaluated by colony formation assay, wound healing assay, and transwell method. **Results** Cell growth curves revealed that the growth rates of WT and Combo cells were significantly higher than that of Vector cells ( $P<0.01$ ), but there was no difference between WT and Combo cells ( $P>0.05$ ). The colony formation rate of Combo cells ( $31.90\%$ ) was significantly higher than that of WT cells ( $16.00\%$ ) ( $P<0.01$ ), while it was slightly higher for WT cells when compared to Vector cells ( $12.46\%$ ) ( $P<0.05$ ). Wound healing assay showed that the migration distance of Combo cells in 48h was significantly higher than WT cells ( $P<0.01$ ), while it was significantly higher in WT cells than that in Vector cells ( $P<0.01$ ). Similarly, transwell assay turned out that the most number of invasive cells was observed in Combo cells ( $227.80\pm 17.85$ ), followed by WT cells ( $181.75\pm 10.06$ ), and then Vector cells ( $85.72\pm 3.19$ ), and the differences between the three groups were all significant ( $P<0.05$ ).

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20150094)

作者单位:210002 南京, 东部战区疾病预防控制中心(张 琪、韩一芳、叶福强、王太武、吕 恒、张锦海); 211198 南京, 中国药科大学药学院(唐慧娴)

通信作者:张锦海, E-mail: ahoi@163.com

**Conclusion** Wild-type and mutated HBx can both significantly enhance the proliferation, migration, and invasion ability of HepG2 cells, and the mutational HBx can further strengthen malignant biological behavior than wild-type HBx, which provided evidence for the mechanism of HBV-induced hepatocarcinogenesis.

**【Key words】** hepatitis B virus X gene; viral mutation; cell proliferation; cell migration; cell invasion

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,在我国约 80%~90% 的肝细胞癌是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染导致的<sup>[1]</sup>。HBV X 基因(核苷酸位点 1374~1838)编码的 HBx 蛋白是病毒分泌的包含 154 个氨基酸的一个多功能调节蛋白,和肝细胞的恶性转化密切相关<sup>[2-3]</sup>。流行病学研究发现,HBx 区突变可显著增加肝癌的发生风险<sup>[4-6]</sup>,体外功能研究提示 HBx 可能通过多位点联合突变的形式促使细胞发生恶性转化<sup>[7-8]</sup>,然而对于哪些位点突变才是促进肝癌发生过程中的关键突变尚未明确。C1653T(H94Y)、T1753C(I127T)及 A1762T/G1764A(K130M/V131I)是位于 HBx 基因羧基末端和核心启动子(basal core promoter, BCP)区重叠区域的四个突变,多个研究已证实这些突变位点与 HCC 的发生发展具有密切的联系,是 HCC 发展的独立危险因素,可作为联合检测肝癌的指标<sup>[9-10]</sup>,然而这四个突变位点致癌的生物学机制尚不清楚。因此,本研究通过体外构建包含 C1653T、T1753C 及 A1762T/G1764A 四个突变位点的真核表达载体来探究 HBx 区联合突变对肝癌细胞恶性生物学行为的影响,探索 HBV 突变的致癌机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** pcDNA3.1/myc-His(-)B 载体、Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。快速定点突变试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗购自美国 Gibco 公司。96 孔板、6 孔板和 Transwell 小室购自美国康宁公司。结晶紫染色液、Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂、姬姆萨快速染色试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒构建** 体外合成 C2 型 HBV 的 HBx 基因野生型序列,并通过 XhoI 及 KpnI 酶切位点克隆至真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B,通过测序验证

重组质粒的正确性。设计 C1653T、T1753C 及 A1762T/G1764A 的定点突变引物,见表 1,利用快速定点突变试剂盒对野生型重组质粒分别进行定点突变,构建包含 4 个突变位点的突变型重组质粒,测序验证其正确性。

表 1 定点突变引物序列

突变位点	引物序列(5'-3')
C1653T	正向:CTTGCCCAAGGCTCTTATATAAGAGGACTC
	反向:ATAAGACCTTGGGCAAGACCTGGTGGGC
T1753C	正向:AGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAAAGGT
	反向:GTCTCCTCCCCAACTCCTCCAGTCTT
A1762T/ G1764A	正向:GGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTAC-TAGGAGGCT
	反向:AGCCTCCTAGTACAAAGATCATTAAACCTA-ATCTCCTCCC

**1.2.2 细胞转染** 用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素/链霉素双抗的 DMEM 培养基在 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 条件下培养人肝癌细胞 HepG2,培养至对数生长期消化细胞,以 5×10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种 6 孔板,按照试剂说明书利用 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染 pcDNA3.1/myc-His(-)B 空载体(Vector)、野生型重组质粒(WT)及突变型重组质粒(Combo),并设转染试剂空白对照孔。转染 48 h 后进行遗传霉素硫酸盐(G418)筛选。

**1.2.3 稳定转染细胞株的挑选和鉴定** 使用 G418 筛选 2 周后,将平皿中筛选出的单克隆团分别接种于 6 孔板中继续扩大培养,Trizol 法抽提 RNA,使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(大连 Takara)反转录成 cDNA,用 T7、BGH 通用引物进行 PCR 扩增,体系如下:10×PCR Buffer 5 μL, dNTP (2.5 mM) 4 μL, T7/BGH (10 μM) 1 μL, rTaq 0.6 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 36.4 μL,反应条件:95℃ 3 min; 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 40 s, 30 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物进行凝胶电泳,将存在目的条带的扩增产物送上海生工进行测序验证。挑选鉴定正确的细胞克隆,使用荧光染料 SYBR 法测定 HBx 基因的表达量,引物序列为:HBx-

FP: ACGTCCTTTGTCTACGTCCCGTCG, HBx - RP: TGCATGGTGCTGGTGAACAGACC, 扩增体系为: SYBR Premix Ex Taq II 10  $\mu$ L, HBx-FP/RP (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 挑选 HBx 基因表达量高的克隆进行后续实验。

**1.2.4 细胞生长曲线测定** 以  $2 \times 10^3$  个/孔的密度接种 96 孔板, 每种细胞平行接种 5 孔, 并设培养基空白对照孔, 制作 7 块相同的 96 孔板, 每天在固定时间取出一块 96 孔板, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 细胞培养箱孵育 2 h 后, 酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度值, 计算同一细胞各孔平均值。连续测定 7 d 后, 在 Excel 中以天数为横轴, 450 nm 吸光度为纵轴绘制生长曲线图。

**1.2.5 平板克隆形成实验** 每孔接种 500 个细胞于 6 孔板中, 每种细胞平行接种 3 孔, 放入培养箱中常规培养, 每隔 3 d 换一次液。当出现肉眼可见的克隆时, 终止培养, 加入甲醇固定 15 min, 用姬姆萨快速染色试剂盒染色 20 min, 洗净干燥后进行计数, 计算细胞克隆形成率。

克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数  $\times$  100%

**1.2.6 划痕实验** 按  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种 6 孔板, 培养箱过夜培养。待细胞汇合度达 90% 时用吸头在培养皿底部垂直划直线, 成一字划痕。用 PBS 轻轻洗去划下的细胞, 加入不含血清的 DMEM 培养基继续培养。每种细胞平行接种 3 孔, 每孔取固定的观察点, 在 0 h 和 48 h 进行拍照, 采用 Photoshop 软件测量划痕的宽度, 计算各组细胞 3 个观察点的平均迁移距离。

细胞迁移距离 = 0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度

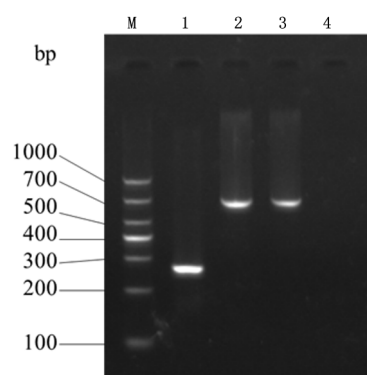
**1.2.7 Transwell 侵袭实验** 用 Matrigel Matrix 基质胶 (美国 BD) 包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 加入含 0.2% BSA 的 DMEM 培养基 (不含血清) 水化基底膜。用含 0.2% BSA 的 DMEM 培养基重悬细胞, 调整细胞密度至  $10^5$  个/mL, 取 200  $\mu$ L 细胞悬液加入包被好的 Transwell 小室内, 在 24 孔板下室中加入 500  $\mu$ L 含血清的培养基, 每种细胞设 3 个复孔, 放入培养箱中常规培养 48 h。取出小室, 擦去内层细胞后, 甲醇固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 洗净干燥后在显微镜下随机取 5 个视野, 计数小室下室面的细胞数, 取平均值。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 对数据进行统计分析, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间

比较采用  $t$  检验, 计数资料用百分率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 稳转细胞株的鉴定** 经过 2 周 G418 筛选, 平皿中出现耐药的细胞克隆团, 扩大培养后分别进行 RNA 抽提、反转录和 PCR 扩增, 产物进行凝胶电泳, 见图 1。Vector 在 270 bp, WT 和 Combo 在 700 bp 左右有条带的克隆提示稳转成功, 而未转染成功的细胞克隆无条带。测序结果提示产物序列和转染的质粒序列保持一致, 证明成功构建了各质粒的稳定转染细胞株。SYBR 法测定 WT 和 Combo 各阳性克隆 HBx 基因的表达量, 显示 HBx 扩增的 Ct 值介于 18~22 之间, 挑选表达量最高的细胞进行后续实验。



M: Marker; 1: Vector; 2: WT; 3: Combo; 4: 阴性对照

图1 稳转细胞 cDNA PCR 扩增凝胶电泳图

**2.2 细胞生长曲线测定** 细胞生长曲线结果显示, 前 1~4 d 细胞处于潜伏期, 随后进入对数生长期, WT 和 Combo 的生长速率明显快于 Vector ( $P < 0.01$ ), 但 WT 和 Combo 之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。

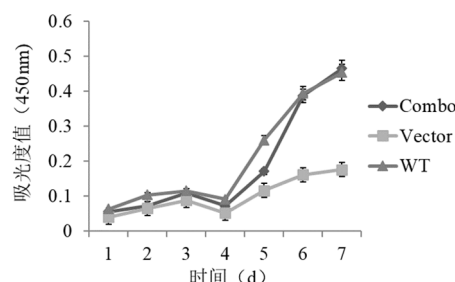
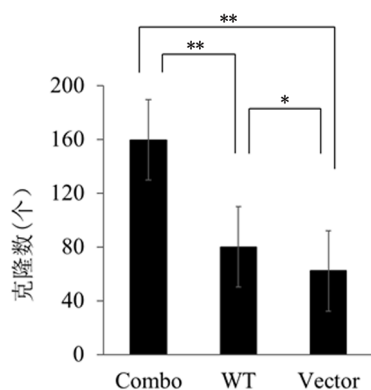


图2 各组细胞株的生长曲线图



**2.3 平板克隆形成实验** 经过 2 周的培养, 6 孔板底部出现肉眼可见的细胞克隆。Vector 细胞的克隆数为  $(62.25 \pm 5.02)$  个, 克隆形成率为 12.45%; WT 细胞的克隆数为  $(80.00 \pm 4.55)$  个, 克隆形成率为 16.00%, 显著高于 Vector 细胞 ( $P < 0.05$ ); Combo 细胞的克隆数为  $(159.50 \pm 12.58)$  个, 克隆形成率为 31.90%, 显著高于 Vector 细胞及 WT 细胞 ( $P < 0.01$ ); 见图 3。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 3 各组细胞株的平板克隆形成实验培养 2 周后的细胞克隆数比较

**2.4 划痕实验** 倒置显微镜下观察, Vector 细胞在 48 h 后迁移距离为  $(0.82 \pm 0.04)$  mm, WT 细胞为  $(1.29 \pm 0.09)$  mm, WT 细胞显著高于 Vector 细胞 ( $P < 0.01$ ); Combo 细胞迁移距离为  $(1.91 \pm 0.09)$  mm, 显著高于 Vector 和 WT 细胞 ( $P < 0.01$ ); 见图 4、图 5。

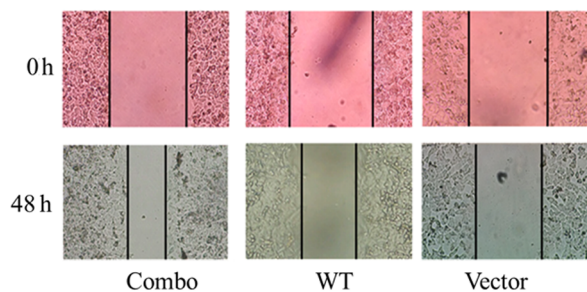
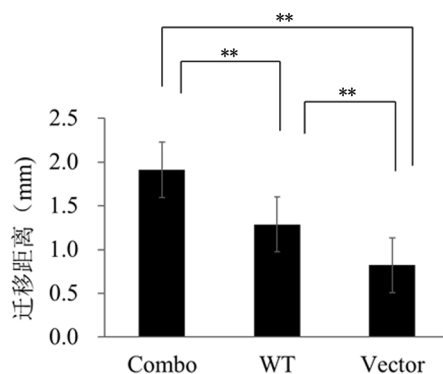


图 4 各组细胞株的划痕实验结果

**2.5 Transwell 侵袭实验** Vector 细胞在 48 h 后迁移到 Transwell 小室下室面的细胞数为  $(85.72 \pm 3.19)$  个, WT 细胞为  $(181.75 \pm 10.06)$  个, WT 细胞显著高于 Vector 细胞 ( $P < 0.01$ ); Combo 细胞迁移数为  $(227.80 \pm 17.85)$  个, 显著高于 WT 细胞 ( $P < 0.05$ ) 和 Vector 细胞 ( $P < 0.01$ ); 见图 6、图 7。



\*\* $P < 0.01$

图 5 各组细胞株 48 h 的迁移距离比较

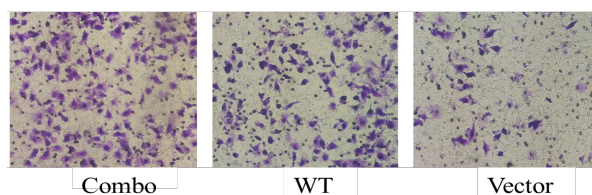
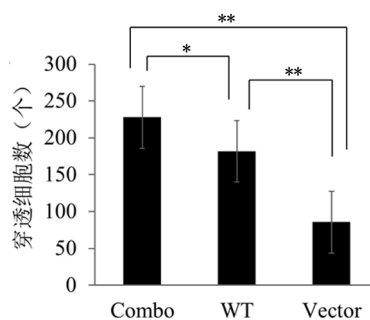


图 6 各组细胞株的 Transwell 侵袭实验结果 (结晶紫染色  $\times 100$ )



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 7 各组细胞株 48 h 后迁移的细胞数目比较

### 3 讨论

HBx 是一种多功能调节蛋白, 一方面可通过在细胞核内直接结合 CREB/ATF、HIF1 $\alpha$ 、p53 等转录成分来直接控制病毒和宿主基因的转录, 另一方面, HBx 还可和 JAK/STAT、NF- $\kappa$ B 及 MAPK 等信号通路相互作用, 间接调控基因转录, 发挥广泛的生物学功能<sup>[11-12]</sup>。近年来, 研究者发现相对于野生型 HBx 来说, 突变型 HBx 可能和肝癌的发生更为相关。Tu 等<sup>[13]</sup>发现在肝癌组织中, 整合型 HBx 常存在羧基末端缺失型 HBx, 缺失的氨基酸可从 3 个到 74 个不等, 功能实验证实, 相对于全长型 HBx 来说,

这种缺失型 HBx 失去了转录激活功能和抑制细胞增殖和转化的功能。此外,其他研究者也报道,C 末端缺失 24 个氨基酸的 HBx 可通过激活转录因子 *C-Jun* 来显著增加 HepG2 细胞的侵袭和转移能力<sup>[14]</sup>,缺失 27 个氨基酸的 HBx 可显著增强 *NF-κB*、*survivin*、*TERT* 的转录活性及 c-Myc 和 PCNA 的表达,从而促进细胞增殖<sup>[15]</sup>。这些研究结果均表明 HBx 的羧基末端在控制细胞增殖、侵袭和转化过程中发挥了关键的作用。

本研究选取的 C1653T(H94Y)、T1753C(I127T) 及 A1762T/G1764A(K130M/V131I) 四个突变位点均位于 HBx 羧基末端的转录激活区域(aa51-154)<sup>[16]</sup>,其中 C1653T(H94Y) 位于损伤特异性 DNA 结合蛋白 1 (DDB1) 的结合区域(aa88-100)<sup>[17]</sup>,而 T1753C(I127T) 及 A1762T/G1764A(K130M/V131I) 则位于 P53 蛋白的结合区域(aa101-154)<sup>[18]</sup>,且四个突变位点均造成了氨基酸的改变,因此,这些位点的突变很可能通过改变 HBx 蛋白的功能从而促进肝癌的发生。由于 HBV C2 型是我国最主要的流行株,且是肝癌发生的独立危险因素<sup>[19-20]</sup>,因此本研究通过体外基因合成的方式构建了 HBV C2 型 HBx 的野生型重组质粒,并通过定点突变构建了包含四个突变位点的突变型重组质粒,相对于从患者体内直接扩增 HBx 序列进行质粒构建来说,剔除了其他突变位点的干扰,研究结果更有针对性。通过细胞生长曲线绘制及平板克隆形成实验,发现野生型和复合突变型 HBx 可显著增强 HepG2 细胞的增殖和克隆形成能力,且复合突变型 HBx 的克隆形成能力显著强于野生型 HBx。关于 HBx 对细胞生长的影响,不同研究得出的结论并不一致。Sirma 等<sup>[21]</sup>在人正常肝细胞系 ChangLiver 中发现野生型 HBx 而非突变型 HBx 可显著抑制细胞的克隆形成,而 Siddiqui 等<sup>[22]</sup>在肝癌细胞系 Huh7 中发现野生型 HBx 和携带 A1762T/G1764A(K130M/V131I) 双突变的突变型 HBx 均可显著增强 Huh7 细胞的克隆形成能力。出现这种现象的原因一方面可能和不同细胞系具有不同的遗传背景有关,另一方面可能和转染的 HBx 序列异质性密切相关<sup>[23]</sup>。细胞迁移和侵袭能力是评估细胞恶性生物学表型的重要指标,本研究通过划痕实验和 Transwell 侵袭实验比较了野生型和复合突变型 HBx 对 HepG2 细胞迁移和侵袭能力的影响,结果与 Sze 等<sup>[14]</sup>和 Chen 等<sup>[24]</sup>报道的一致,转染野生型 HBx 的细胞株相对于转染空载体的细胞株细胞迁移和侵袭能力均增强,且转染突变型 HBx 的

细胞株迁移和侵袭能力显著强于野生型,证明 HBx 羧基末端的突变可显著增强细胞的恶性表型,促进细胞发生恶性转化。

综上所述,本研究通过构建稳定表达野生型 HBx 和复合突变型 HBx 细胞株,证实了 C1653T、T1753C、A1762T/G1764A 四个突变位点不仅在流行病学上和肝癌的发生密切相关,在生物学上可通过促进细胞增殖、侵袭和转移来增强细胞的恶性生物学表型,为 HBV 致癌机制的研究提供了基础,后续还需对这些突变位点影响的细胞信号通路进行进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] Petruzzello A. Epidemiology of hepatitis B virus and hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma[J]. *Open Virol J*, 2018, 12 (Suppl-1, M3): 26-32.
- [2] 郭双平, 翟宇强, 王文亮, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与核转录因子 NF-κB 在肝癌细胞程序性死亡中的作用[J]. *医学研究生学报*, 2005, 15(1): 1-5.
- [3] Ahuja R, Kapoor N, Kumar V. The HBx oncoprotein of hepatitis B virus engages nucleophosmin to promote rDNA transcription and cellular proliferation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853 (8): 1783-1795.
- [4] Park Y, Jang J, Yoo S, et al. Combinations of eight key mutations in the X/preC region and genomic activity of hepatitis B virus are associated with hepatocellular carcinoma [J]. *J Viral Hepat*, 2014, 21(3): 171-177.
- [5] Qu L, Zhang H, Liu J, et al. Potential susceptibility mutations in C gene for hepatitis B-related hepatocellular carcinoma identified by a two-stage study in Qidong, China [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1708.
- [6] Lee D, Lyu H, Chung Y, et al. Genomic change in hepatitis B virus associated with development of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(23): 5393-5399.
- [7] Ai-qahtani AA, Ai-anazi MR, Nazir N, et al. Hepatitis B virus X gene mutations and their association with liver disease progression in HBV-infected patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105115-105125.
- [8] Huang Y, Tai A, Tong S, et al. HBV core promoter mutations promote cellular proliferation through E2F1-mediated upregulation of S-phase kinase-associated protein 2 transcription [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(6): 1068-1073.
- [9] Yin J, Xie J, Liu S, et al. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(1): 81-92.
- [10] Liu S, Zhang H, Gu C, et al. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-

- analysis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(15): 1066-1082.
- [11] Neuveut C, Wei Y, Buendia M. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4): 594-604.
- [12] Xu Q, Gu S, Liang J, *et al*. The biological function of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Res*, 2019, 27(4): 509-514.
- [13] Tu H, Bonura C, Giannici C, *et al*. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(21): 7803-7810.
- [14] Sze K, Chu G, Lee J, *et al*. C-terminal truncated hepatitis B virus X protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by C-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 131-139.
- [15] Zhang H, Shan C, Li N, *et al*. Identification of a natural mutant of HBV X protein truncated 27 amino acids at the COOH terminal and its effect on liver cell proliferation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(4): 473-480.
- [16] Tang H, Delermaa L, Huang F, *et al*. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication[J]. *J Virol*, 2005, 79(9): 5548-5556.
- [17] Hodgson A, Hyser J, Keasler V, *et al*. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binding to DDB1 is required but is not sufficient for maximal HBV replication[J]. *Virology*, 2012, 426(1): 73-82.
- [18] Huo T, Wang X, Forgues M, *et al*. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 2001, 20(28): 3620-3628.
- [19] Yin J, Zhang H, He Y, *et al*. Distribution and hepatocellular carcinoma-related viral properties of hepatitis B virus genotypes in mainland China: a community-based study[J]. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 2010, 19(3): 777-786.
- [20] Chen QY, Harrison TJ, Sabin CA, *et al*. The effect of HBV genotype C on the development of HCC differs between wild-type viruses and those with BCP double mutations (T<sup>1762</sup>A<sup>1764</sup>) [J]. *Hepatology*, 2014, 58(2): e16214.
- [21] Sirma H, Giannini C, Poussin K, *et al*. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx[J]. *Oncogene*, 1999, 18(34): 4848-4859.
- [22] Siddiqui ZI, Farooqui SR, Azam SA, *et al*. A comparative study of hepatitis B virus X protein mutants K130M, V131I and KV130/131MI to investigate their roles in fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *J Viral Hepat*, 2017, 24(12): 1121-1131.
- [23] Lin X, Xu X, Huang Q, *et al*. Biological impacts of “hot-spot” mutations of hepatitis B virus X proteins are genotype B and C differentiated[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(30): 4703-4708.
- [24] Chen Z, Tang J, Cai X, *et al*. HBx mutations promote hepatoma cell migration through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(10): 1380-1389.

(收稿日期: 2019-01-21; 修回日期: 2019-03-25)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)