

HBV 表面抗原 preS1 激活 Wnt 信号通路 导致肝癌发生的机制研究

袁 杰¹, 熊 希², 李云静², 谭华炳², 刘志新^{1,3}, 王 娅⁴, 邱雪梅⁴, 李 哲¹, 杨 靖^{1,2}

摘要:目的 探究 HBV 表面抗原 preS1 促使正常肝细胞向癌化肝细胞发展的具体机制。**方法** 分析临床样本和细胞模型中 HBV 表面抗原 preS1 与肝癌发生的相关性和内在机制。**结果** 临床标本分析发现, HBV 携带者肝癌组织切片中 CD133+ 肝癌干细胞数量高于对照组。进一步研究发现, HBV 的表面膜蛋白 preS1 可以上调肝细胞癌化相关因子。利用免疫共沉淀技术, 我们发现 preS1 与 β -catenin 存在相互作用。preS1 通过抑制 β -catenin 的磷酸化激活 Wnt 信号通路。**结论** HBV 表面抗原 preS1 通过抑制 β -catenin 的磷酸化, 激活 Wnt 信号通路, 促进正常肝细胞向癌化肝细胞转化。

关键词:乙型肝炎病毒; preS1; 肝癌; Wnt 信号通路

中图分类号:R373.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2019)10-0922-06

HBV surface antigen preS1 induce hepatocellular carcinoma occurrence though Wnt signaling pathway

YUAN Jie¹, XIONG Xi², LI Yun-jing², TAN Hua-bing², LIU Zhi-xin^{1,3},
WANG Ya⁴, QIU Xue-mei⁴, LI Bei¹, YANG Jing^{1,2}

(1. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

2. Department of Infectious Disease, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

3. Department of Respiratory, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

4. Pathogen biology laboratory, School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract: There is a great number of HBV carriers in China. Those people infected with HBV are more likely to develop hepatocellular carcinoma than normal population. We found that the number of CD133 positive liver cancer stem cells in the liver tissue section of HBV carriers was higher than that of the control group. Further studies showed that preS1 could upregulate the related factors of hepatocyte carcinogenesis. Using the technique of immunoprecipitation, we found the interaction between preS1 and β -catenin. preS1 activates Wnt signaling pathway by inhibiting β -catenin phosphorylation, leading to liver cell carcinoma. The results of this study will deepen our understanding of the cancerization of liver cells, and provide a theoretical basis for the prevention and treatment of liver cancer caused by HBV infection in the future.

Keywords: Hepatitis B Virus; preS1; primary hepatocellular carcinoma; Wnt signaling pathway

湖北省自然科学基金资助课题(No. 2018CFB093), 湖北医药学院青年人才启动金资助课题(No. 2017QDJZR08), 湖北省教育厅自然科学基金资助课题(No. B2018117), 湖北省大学生创新创业训练计划项目(No. 201810929004)

通讯作者:杨 靖, Email: yangjing780228@foxmail.com;

ORCID: 0000-0002-5271-6866

作者单位:1. 湖北医药学院基础医学院医学微生物教研室, 十堰

442000;

2. 湖北医药学院附属人民医院肝病研究所, 十堰
442000;

3. 湖北医药学院附属人民医院呼吸内科, 十堰 442000;

4. 湖北医药学院基础医学院病原学综合实验室, 十堰
442000

Hubei Provincial Natural Science Foundation (No. 2018CFB093), Cultivating Project for Young Scholar at Hubei University of Medicine (No. 2017QDJZR08), Natural Science Foundation of Hubei Education Department(No. B2018117), Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Hubei Province(No. 201810929004)

Corresponding author: YANG Jing, Email: yangjing780228@foxmail.com

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)属嗜肝性 DNA 病毒科, 其基因组由不完全闭合环状双

链 DNA(Relaxed circular DNA, rcDNA)组成,长约3 200 对碱基^[1]。HBV 感染分急性和慢性感染,全球约有 20 亿人感染过 HBV,其中大约 3.5 亿是慢性感染者。每年死于慢性乙肝(Chronic hepatitis B, CHB)引起的肝纤维化(Liver fibrosis)、肝硬化(Liver cirrhosis)及肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的人数约有 78 万^[2]。我国是 HBV 感染大国,不仅 HBV 携带者基数大(约 1.2 亿左右),而且 HBV 携带者极易转化为 HCC 患者,每年导致大量的死亡病例^[3]。因此,研究 HBV 感染导致 HCC 的分子机制对于防治病毒感染至关重要。

HBV 感染与肝癌发生具有正相关关系^[4],但是学术界对于 HBV 病毒如何导致肝细胞癌化目前并没有一致结论。目前的文献资料关于此方面的阐述主要集中在 3 个方面:① HBV 基因组整合到宿主基因组的关键位置导致宿主基因组抑癌基因的失活或者是原癌基因基因的活化^[5-7];② HBV 感染细胞造成宿主细胞的炎症反应,进而激活下游信号通路,导致肝细胞癌化^[8-9];③ HBV 进入细胞之后病毒 DNA 编码的结构蛋白、分泌蛋白,或者通过表观遗传导致宿主基因突变和染色体重排等^[10-12]。

HBV 在细胞中有 2 种存在方式,即游离型和整合型。HBV 阳性的肝细胞癌患者中几乎均可检测到 HBV 基因组整合^[13]。HBV 基因整合至宿主基因组中有利于其持久感染,长期的慢性炎症可导致肝细胞生命周期改变和增殖,这增加了宿主基因组 DNA 终端的数量,从而有利于 HBV 基因组整合到宿主基因组中。在有些案例中,HBV 基因组整合与肝癌发生具有一定的相关性,但是研究者仍需要更加坚实的临床高通量测序数据来进行深入分析^[14]。

检测急性和慢性 HBV 感染者可在外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PB-MC)中检测到游离和整合的病毒基因组^[15]。Shi 等^[16]曾报道 HBV 基因组特定位点的整合可导致 T 细胞缺陷。HBV 除引起肝脏细胞的炎症反应之外,亦可以引发外周血淋巴细胞持续性的炎症反应。但是,目前仍未见报道 HBV 感染与血液系统的癌症发生具有相关性。

HBV 基因组进入肝细胞中之后,自身也可以表达一系列的蛋白。虽然经过几十年的研究,很多蛋白的功能仍未能得到完整的阐释,但有证据显示,

HBV DNA 表达合成成熟的 preS/S 和 X 蛋白触发级联信号可导致肝细胞恶变^[17]。

近期,有研究报道 HBV 的表面膜蛋白 preS1 可促使正常肝细胞向癌化肝细胞发展^[18]。在已有研究结果的基础上,我们进一步研究发现 preS1 通过抑制 β -catenin 的磷酸化激活 Wnt 信号通路,进而促进正常肝细胞向癌化肝细胞转化。本研究旨在能为 HBV 感染与肝癌发生的机制研究提供新的思路和线索,为未来临床基因诊断和治疗肝癌奠定理论依据。

1 材料和方法

1.1 临床组织标本 12 例肝癌患者的石蜡包埋肝脏肿瘤组织标本来源于湖北医药学院附属人民医院病理科。其中,6 例标本是 HBsAg 阳性,6 例标本是 HBsAg 阴性。肝脏肿瘤组织经 4% 甲醛溶液固定,修块、脱水、浸蜡、包埋、切片,免疫组化染色,光学显微镜下观察肿瘤切片情况,并拍照记录。所有的人体组织材料的使用均通过湖北医药学院伦理审查委员会批准。

1.2 细胞培养 L02 肝脏细胞系, HepG2 肝癌细胞系和 HEK293T 细胞系购自中国典型培养物保存中心(China center for Type Culture Collection, CCTCC),用含 10% 胎牛血清(Gibco Life Technologies, USA)、双抗(青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/mL)(Gibco Life Technologies, USA)的 DMEM 高糖培养基(Gibco Life Technologies, USA),于 5% CO₂ 的恒温培养箱中 37℃ 培养。

1.3 载体构建和引物合成 慢病毒载体 pWPXLD (Addgene plasmid # 12258)、pLKO.1-TRC (Addgene plasmid # 10878) 及辅助质粒均购自 Addgene 公司。preS1 基因全长使用 PCR 扩增后,连接入 pWPXLD 载体的多酶切位点 *Pme*I(NEB, # R0560S) 和 *Bam*HI(NEB, # R0136S) 之间。根据文献^[18],一段 preS1 shRNAs 序列构建入 pLKO.1-TRC 载体的 *Age*I(NEB, # R0552S) 和 *Eco*RI (NEB # R0101S) 酶切位点之间。所有的构建过程均参照载体说明书进行。preS1 基因 PCR 引物序列和 shRNA 序列均为华大基因合成,具体序列信息见表 1。

表 1 引物序列信息
Tab.1 Information of primer

引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	引物用途
preS1 F	AGCTTTGTTAACATGGGAGGTTGGTCTTC	62	载体构建
preS1 R	GCGGGATCCCTTGTCATCATCGCCTTG-TAGTCGGCCTGAGGATGACTGTCTC	62	载体构建
preS1 shRNA F	CCGGGATTCTTCCCGATCACCAGTTG-GACTCGAGTCCAACGGTGATCGGGAAAGAATCTTTTG	—	载体构建
preS1 shRNA R	AATTCAAAAAGATTCTTCCGATCAC-CAGTTGGACTCGAGTCCAACGGTGATCGGGAAAGAATC	—	载体构建
ALDH1 F	AAAGAAGCTGCCGGAAAAG	58	QRT-PCR
ALDH1 R	CCCCATGGTGTGCAAATTCA	58	QRT-PCR
OCT4 F	AGAACATGTGTAAGCTGCGG	58	QRT-PCR
OCT4 R	GGTCGCTTCTCTTCGGG	58	QRT-PCR
SOX2 F	AGCTCGCAGACCTACATGAA	58	QRT-PCR
SOX2 R	TGGAGTGGGAGGAAGAGGTA	58	QRT-PCR
FGF20 F	TTAGAGGTGTGGACAGTGGT	58	QRT-PCR
FGF20 R	AGTGCCACAAAATACCTGCG	58	QRT-PCR
DKK1 F	AGGTTCTGTTGTCTCCGGT	58	QRT-PCR
DKK1 R	CTCCACAGTAACAACGCTGG	58	QRT-PCR
WISP1 F	GACTTTACCCCAGCTCCACT	58	QRT-PCR
WISP1 R	GTAGTCACAGTAGAGGCC	58	QRT-PCR
CCND1 F	GCATGTTCGTGGCCTCAAG	58	QRT-PCR
CCND1 R	CGTGTTCGGATGATCTGT	58	QRT-PCR
GAPDH F	TCGTGGAAGGACTCATGACC	58	QRT-PCR
GAPDH R	ATGATGTTCTGGAGAGCCC	58	QRT-PCR

1.4 慢病毒包装和感染 构建完成的慢病毒质粒使用 293T 细胞系进行包装。每个 6 cm 的培养皿, 使用 Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) 转染 12 mg 的目的质粒, 加上 6 mg 的辅助质粒 pMD2G, 12 mg 的辅助质粒 psPAX2。转染后的 48 h 和 72 h 收集细胞培养物上清, 并使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤、分装后, 于 -80 ℃ 超低温冰箱备用。培养的 L02 和 HepG2 细胞系使用包装好的慢病毒进行感染, 并使用流式细胞术分选或是嘌呤霉素筛选阳性细胞。

1.5 免疫印迹分析 使用加入了蛋白酶抑制剂的 (complete protease inhibitor cocktail, Roche, USA) RIPA 裂解液裂解收集的细胞。使用 Bradford 蛋白定量试剂盒 (Bio-Rad, USA) 对提取的总蛋白溶液进行定量, 并使用 SDS-PAGE 进行电泳分离, 并转至 NC 膜 (Nitrocellulose Membrane)。与相应的一抗孵育之前, NC 使用含 5% 脱脂奶粉和 0.1% 的吐温 20 的 PBS 溶液进行封闭。使用 Bio-

Rad 凝胶图像成像仪显影, 并保存实验结果。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析 用 TRIZOL 试剂提取细胞总 RNA, 用 TaKaRa 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成为 cDNA, 具体步骤按照产品说明书进行。QRT-PCR 检测使用 BIO-RAD CFX96 和 SYBR RT-PCR kits (ROCHE, USA) 荧光定量试剂盒进行。反应体系为: 10 μL SYBR Green PCR master mix, 5 μL 稀释 10 倍的 cDNA 模板和 5 μL 稀释 10 倍的正反引物混合物。反应程序为: 95 ℃, 3 min; 95 ℃, 20 s, 58 ℃, 20 s, 72 ℃, 20 s, 采集荧光信号, 运行 45 个循环; 65 ℃ 至 95 ℃ 绘制溶解曲线。QRT-PCR 所使用的引物使用 Primer Premier 5.0 软件进行设计, 具体所使用引物序列请见表 1。

1.7 免疫共沉淀 稳定过表达带 FLAG 标签 preS1 蛋白的 L02-preS1 细胞系使用加入了蛋白酶抑制剂的 (complete protease inhibitor cocktail, Roche, USA) RIPA 裂解液冰上裂解 1 h。细胞裂解产物高速离心 (15 000 g, 15 min, 4 ℃) 去除未溶

解的细胞碎片。收集的上清加入 anti-FLAG 标签抗体($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 4°C 孵育过夜,然后再加入 $30 \mu\text{L}$ 的可以吸附 IgG 的 proteinA 琼脂糖珠(CST, #9863) 4°C 孵育 2 h。使用 RIPA 溶液漂洗 5~7 次。然后高温洗脱吸附的蛋白,使用 SDS-PAGE 或是 Western-Blot 进行检测。

1.8 数据处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。两两检验采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV 促进肝癌发生的临床肝癌样本分析 通过对 6 例 HBV 阳性的肝癌标本和 6 例 HBV 阴性的肝癌样本进行石蜡切片和免疫组化染色分析,我们发现 HBV 携带者 CD133 阳性的肝癌干细胞数量要多于对照组(图 1)。基于对临床样本的分析,我们推测 HBV 可以表达某些因子促进肝癌干细胞的产生。

2.2 preS1 促进肝癌发生的细胞模型分析 近期,已有研究报道 preS1 可以促进正常肝脏细胞向癌化肝脏细胞转化^[18]。为了进一步深入研究 preS1 促

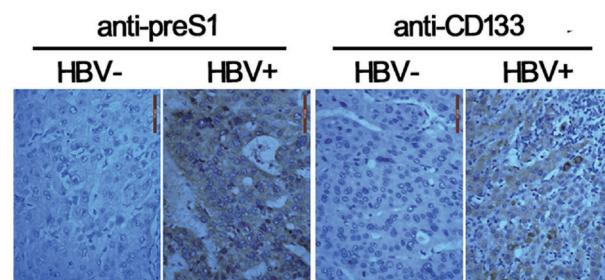
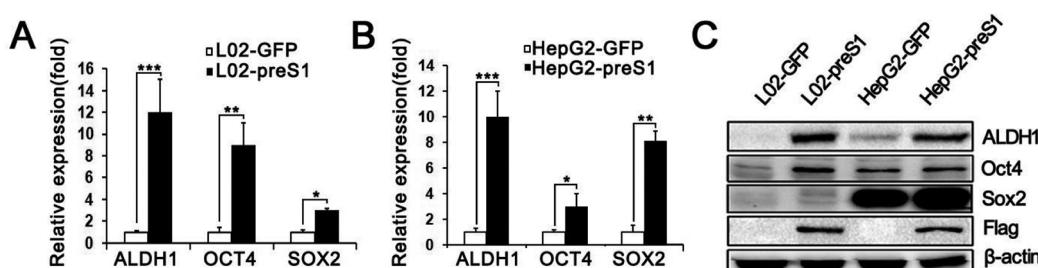


图 1 肝癌病理切片免疫组化染色的显微照相图片

Fig. 1 A micrographic picture of immunohistochemical staining of the pathological section of liver cancer

进肝细胞癌化的具体机制,我们利用慢病毒转染技术构建了稳定过表达 preS1 的肝脏细胞模型。与对照组 L02-GFP 相比,L02-preS1 细胞中癌症细胞相关基因 ALDH1、Oct4 和 Sox2 在 mRNA 水平上调表达(图 2A)。在细胞模型 HepG2-preS1 中,我们可以得到类似的结果(图 2B)。Western-Blot 结果显示,L02-preS1 和 HepG2-preS1 中 ALDH1、Oct4 和 Sox2 的表达水平均因为 preS1 的过表达而上调(图 2C)。以上结果证实,在肝细胞中过表达 preS1 可以促进癌症相关因子的上调表达。



Graphs show means \pm SD, $n = 3$; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$.

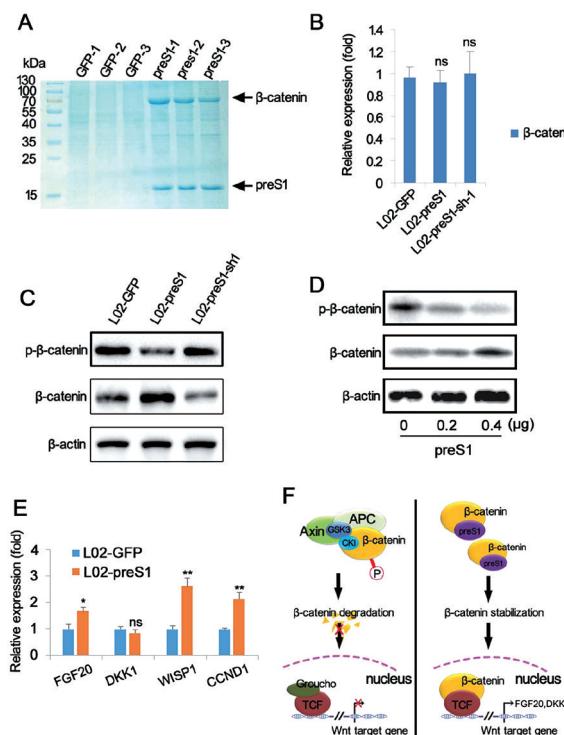
图 2 在肝细胞系 L02 和肝癌细胞系 HepG2 中稳定过表达 preS1 可上调表达肿瘤标志分子 ALDH1、Oct4 和 Sox2

Fig.2 Stable over-expression of preS1 in hepatocyte line L02 and hepatoma cell line HepG2 can up regulate the expression of tumor markers ALDH1, Oct4 and Sox2

2.3 preS1 促进肝癌发生的内在机制分析 虽然已有报道 preS1 促进肝癌产生,但是研究者对其内在机制仍缺乏了解。我们通过免疫共沉淀技术获取了能与 preS1 相互作用的蛋白。免疫共沉淀产物经过 SDS-PAGE 电泳分离,主要条带经质谱分析,发现 preS1 与 β -catenin 存在相互作用(图 3A)。我们进一步对 preS1 稳定过表达和下调表达细胞模型进行 QRT-PCR 分析。令人意外的是,在过表达和下调表达 preS1 之后,在 mRNA 水平并未检测到 β -catenin 的表达变化(图 3B)。我们进一步使用 West-

ern-Blot 分析 β -catenin 磷酸化水平的变化。结果显示:过表达 preS1 之后,磷酸化的 β -catenin 表达量降低,而非磷酸化的 β -catenin 表达量升高;而使用 RNA 干扰下调 preS1 的表达量, β -catenin 的磷酸化水平可以得到恢复(图 3C)。为了进一步证实上述结果,我们使用不同浓度梯度 preS1 过表达质粒($0, 0.2, 0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$)转染 L02 细胞,并在转染 48 h 之后检测磷酸化 β -catenin 和非磷酸化 β -catenin 表达量。结果显示:随着 preS1 过表达质粒转染浓度的增加,磷酸化 β -catenin 的表达量逐步降低,而

非磷酸化的 β -catenin 表达量逐步升高(图 3D)。FGF20、DKK1、WISP1 和 CCND1 是 Wnt 信号通路中可以被 β -catenin 激活的关键下游基因^[22]。我们结果显示:与对照组(L02-GFP)相比,preS1 稳定过表达肝细胞系(L02-preS1)在 mRNA 水平上调表达 FGF20、WISP1 和 CCND1(图 3E)。以上结果说明,preS1 可以通过抑制 β -catenin 磷酸化,进而提高细胞内未磷酸化 β -catenin 的浓度,从而激活 Wnt 信号通路。



Graphs show means \pm SD, $n = 3$; ns: no significant difference; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$.

图 3 preS1 通过结合 β -catenin,抑制 β -catenin 磷酸化,从而激活 Wnt 信号通路

Fig.3 preS1 activates Wnt signaling pathway by binding to β -catenin and inhibiting phosphorylation of β -catenin

3 讨 论

CD133 作为肝癌干细胞的表面标志物已得到研究者的公认^[19]。ALDH1、Sox2 和 Oct4 作为细胞内部表达的关键肿瘤干细胞标志分子,也广泛用于肝癌干细胞的筛选和标记^[20]。我们对临床肝癌标本进行免疫组化分析发现,HBV 携带者病理切片标本中 CD133 阳性细胞数量要多于未感染 HBV 的对照组(图 1)。我们利用慢病毒技术,构建了稳定过表达 HBV 表面膜蛋白 preS1 的肝细胞模型。与

对照组相比,过表达 preS1 的肝细胞模型中 ALDH1、Sox2 和 Oct4 在 mRNA 水平和蛋白水平均得到了上调表达(图 2)。相对于肝癌细胞模型 HepG2,在正常肝细胞模型 L02 中过表达 preS1,肝癌细胞肿瘤标志物的表达水平上调更加明显。

已有报道显示,preS1 的表达对于正常肝细胞向癌化肝细胞的转化具有重要作用^[18],但是肝癌发生过程中与 preS1 相互作用的下游因子及信号通路仍未见报道。利用建立的 L02-preS1 稳定过表达细胞系,结合免疫共沉淀技术我们获取了能与 preS1 相互作用的蛋白。使用 SDS-PAGE 电泳分离之后,对主要条带进行质谱分析后发现,preS1 在蛋白层面可以和 β -catenin 相互作用(图 3A)。我们利用慢病毒 RNAi 载体 pLKO.1-TCR,在过表达 preS1 的 L02 细胞系中下调表达 preS1。令我们意外的是,下调表达 preS1, β -catenin 在 mRNA 水平的表达量并没有变化(图 3B)。随后,我们使用 Western-Blot 对 β -catenin 的蛋白水平进行了检测。我们发现在 L02 肝细胞模型中过表达 preS1, β -catenin 的磷酸化水平受到抑制。而下调 preS1 的表达量, β -catenin 的磷酸化水平可以得到恢复(图 3C)。通过不同浓度梯度的 preS1 过表达质粒转染肝细胞系 L02,我们进一步证实了 preS1 的表达可以抑制 β -catenin 的磷酸化,上调非磷酸化 β -catenin 的表达水平(图 3D)。 β -catenin 作为 Wnt 信号通路上的关键蛋白,对于癌症干细胞的发育至关重要。在经典的 Wnt 信号通路中,APC、Axin、GSK3 和 CKI 可组成复合物,降解磷酸化的 β -catenin,阻止 β -catenin 和转录因子 TCF 结合,抑制 Wnt 信号通路开启^[21]。 β -catenin 和转录因子 TCF 结合会激活下游基因(如 FGF20、DKK1、WISP1、CCND1 等)的表达^[22],从而开启 Wnt 信号通路。本研究也证实过表达 preS1 可以抑制 β -catenin 的磷酸化,激活 FGF20、WISP1 和 CCND1 的表达(图 3E)。

结合已发表的研究结果^[18],并对本次的研究结果进行分析之后,我们提出如下观点:preS1 与 β -catenin 的结合可抑制 β -catenin 的磷酸化,未磷酸化的稳态 β -catenin 在细胞内积聚,与下游 TCF 转录因子结合,激活 Wnt 信号通路,并促进肝细胞癌化(图 3F)。本研究旨在能够促进我们对 HBV 导致的肝癌的机制理解,并为将来防治 HBV 引起的肝癌奠定理论基础。

利益冲突:无

引用本文格式:袁杰,熊希,李云静,等.HBV 表面抗原 preS1 激活 Wnt 信号通路导致肝癌发生

机制研究[J].中国人兽共患病学报,2019,35(10):922-927. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.123

参考文献:

- [1] Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5):S13-21. DOI: 10.1002/hep.22881
- [2] Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 386 (10003): 1546-1555. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61412-X
- [3] Liu C, Chang L, Ji HM, et al. Prevalence of HBV DNA among 20 million seronegative blood donations in China from 2010 to 2015 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 (1):36464. DOI: 10.1038/srep36464
- [4] Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347 (21):168-174. DOI: 10.1056/NEJM200211213472119
- [5] Zhao LH, Liu X, Yan HX, et al. Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 12992. DOI: 10.1038/ncomms12992
- [6] Thomas T, Magdalena A, Budzinska A, et al. Urban HBV DNA integration: molecular mechanisms and clinical implications [J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 75. DOI: 10.3390/v9040075
- [7] Chauhan R, Churchill ND, Mulrooney-Cousins PM, et al. Initial sites of hepadnavirus integration into host genome in human hepatocytes and in the woodchuck model of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogenesis*, 2017, 6 (4): e317. DOI: 10.1038/oncsis.2017.22
- [8] Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer [J]. *Cell*, 2004, 118(6):671-674. DOI: 10.1016/j.cell.2004.09.005
- [9] Jin YM, Yun C, Park C, et al. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases [J]. *J Viral Hepat*, 2001, 8(5):322-330. DOI: 10.1046/j.1365-2893.2001.00308.x
- [10] Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV-and HCV-associated hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2):123-135. DOI: 10.1038/nrc3449
- [11] Kekule AS, Lauer U, Meyer M, et al. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator [J]. *Nature*, 1990, 343(6257):457-461. DOI: 10.1038/343457a0
- [12] Fu S, Zhou RR, Li N, et al. Hepatitis B virus X protein in liver tumor microenvironment [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 15371-15381. DOI: 10.1007/s13277-016-5406-2
- [13] Murakami Y, Saigo K, Takashima H, et al. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas [J]. *Gut*, 2005, 54 (8): 1162-1168. DOI: 10.1136/gut.2004.054452
- [14] Bonilla Guerrero R, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(5):760-777. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.02.005
- [15] Murakami Y, Minami M, Daimon Y, et al. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen [J]. *J Med Virol*, 2004, 72(2): 203-214. DOI: 10.1002/jmv.10547
- [16] Shi Y, Lan Y, Cao F, et al. Infected hematopoietic stem cells and with integrated HBV DNA generate defective T cells in chronic HBV infection patients [J]. *J Viral Hepat*, 2014, 21 (7): e39-e47. DOI: 10.1111/jvh.12236
- [17] Liu ZX, Dai XC, Wang TC, et al. Hepatitis B virus PreS1 facilitates hepatocellular carcinoma development by promoting appearance and self-renewal of liver cancer stem cells [J]. *Cancer Lett*, 2017, 400(1):149-160. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.04.017
- [18] Ma S, Lee TK, Zheng BJ, et al. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway [J]. *Oncogene*, 2008, 27 (12): 1749-1758. DOI: 10.1038/sj.onc.1210811
- [19] Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 49(1): 318-329. DOI: 10.1002/hep.22704
- [20] Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-11205. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.012
- [21] Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(14): 4042-4045. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2316
- [22] Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, et al. Wnt/β-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells [J]. *Science*, 2012, 336 (6088): 1549-1554. DOI: 10.1126/science.1218370