

# 原发性肝癌患者外周血中肝细胞特异性 AFP mRNA 检测及意义

袁育红, 胡品津

(中山医科大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】寻找一种敏感的方法以检测原发性肝癌患者外周血中肝细胞特异性 AFP mRNA。【方法】巢式 RT-PCR 检测外周血有核细胞成分中 AFP mRNA。【结果】49 例肝癌中 17 例检出 AFP mRNA, 阳性率 35%, 其中 9 例证实有转移的 6 例阳性(67%)。19 例肝硬化、6 例急性肝炎、8 例慢性肝炎、5 例肝良性肿瘤、6 例肝内胆管癌、11 例肝转移癌、13 例健康对照组均为阴性。外周血细胞 AFP mRNA 的存在与肝内肿瘤灶的数目、是否有门静脉癌栓形成、远处器官转移与肿瘤的 TMN 分期密切相关, 与血清 AFP 浓度无关。【结论】检测肝癌患者外周血 AFP mRNA, 可帮助早期发现肝癌细胞的血行播散。

关键词: 肝肿瘤; 聚合酶链反应; 甲胎蛋白类; 肿瘤转移

中图分类号: R 735.7; 730.41

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)02-0144-04

## The Clinical significance of Detection of Hepatocellular Specific AFP mRNA in Peripheral Venous Blood from Patients with Hepatocellular Carcinoma

YUAN Yu-hong, HU Pin-jin

(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen  
University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】A sensitive method was attempted to detect the hepatocellular specific AFP mRNA in peripheral venous blood from patients with hepatocellular carcinoma. 【Methods】Reverse transcription coupled with two-step polymerase chain reaction (Nested RT-PCR) was used to detect AFP mRNA expression in the peripheral blood obtained from patients with HCC and control groups. 【Results】Detection of AFP mRNA expression was positive in 17 of 49 HCC patients (35%). 9 patients with clinically distant metastasis 6 were positive (67%). As control, AFP mRNA was not detected in samples from 19 cirrhosis, 6 acute hepatitis, 8 chronic hepatitis, 5 benign liver tumor, 6 intra-hepatobiliary carcinoma, 11 secondary liver cancer, and 13 normal healthy volunteers. The presence of AFP mRNA in blood seemed to be correlated with numbers of tumor foci in the liver, the presence of portal vein thrombosis, distant metastasis and TNM stages of HCC, but have no correlation with serum AFP level. 【Conclusions】The presence of AFP mRNA in peripheral blood may be used as an indicator of circulating HCC cells, which might predicate hematogenous spreading metastasis of tumor cells in HCC patients.

**Key words:** liver neoplasm; polymerase chain reaction; alpha fetoproteins; metastasis

原发性肝细胞癌(HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 由于肝癌细胞容易侵犯血管, 血行播散早, 切除和移植后复发率高。转移的肿瘤细胞有时长期处于休眠状态, 生长缓慢而未被发现<sup>[1]</sup>。因此

早期发现 HCC 患者周围血是否有肝癌细胞, 对判断肿瘤的转移和复发、指导临床治疗有重要价值。由于循环中癌细胞数目少, 鉴别良恶性细胞有困难, 使细胞学和免疫组织化学在检测转移癌细胞的

收稿日期: 1999-06-28

作者第 1 作者袁育红(1970-)女, 广东广州人, 博士, 讲师

© 2000 Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

应用受到限制<sup>[1]</sup>。逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)因敏感性高,特异性强已用于扩增组织特异性 mRNA,以检测实体肿瘤血循环中肿瘤细胞和微小转移<sup>[2]</sup>。我们采用巢式 RT-PCR 检测肝细胞特异的 AFP mRNA 在外周血有核细胞成分中的表达,探讨其在诊断肝癌细胞血源性播散的意义。

## 1 材料及方法

### 1.1 检测对象

原发性肝癌 49 例,男 42 例,女 7 例,中位年龄 53.6 岁,符合 1990 年《中国常见恶性肿瘤诊治规范》原发性肝癌诊断标准。其中临床确诊的肝外器官转移 9 例,6 例肺转移,2 例广泛腹膜转移,1 例盆腔转移。肝内胆管癌(病理证实)6 例;肝转移癌 11 例;肝硬化 19 例;急性肝炎 6 例,其中药物性肝炎、急性甲肝和乙肝各 2 例;慢性病毒性肝炎 8 例,其中丙肝 2 例,慢性乙肝 6 例;肝良性肿瘤 5 例,其中肝血管瘤 3 例,肝囊肿 2 例。例为 1996~1997 年住院病人。正常对照 13 例,男 8 例,女 5 例,中位年龄 41 岁。

### 1.2 细胞的 RNA 制备

取受检查者的新鲜肝素抗凝血 5 mL,采用分层密度梯度离心法获取外周血单个核细胞(PMNs),用改良的异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取总 RNA<sup>[3]</sup>。取 2 例手术切除 HCC 组织、癌旁组织、远处正常肝组织,2 例正常胃粘膜组织,人 HepG2 肝癌细胞株和人 MCF-7 乳腺癌细胞株抽提总 RNA。

### 1.3 嵌套 RT-PCR

cDNA 的合成:取 1  $\mu$ g 细胞总 RNA,65  $^{\circ}$ C 10 min 后移至冰浴,加入随机引物 1  $\mu$ L,各种 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L,AMV 逆转录酶 1  $\mu$ L,RNasin 10 U,10 $\times$  RT 缓冲液 2  $\mu$ L,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L,反应体积 20  $\mu$ L。42  $^{\circ}$ C 1 h 后 95  $^{\circ}$ C 5 min,-20  $^{\circ}$ C 保存。

嵌套 PCR:本实验以检测  $\beta$  微球蛋白( $\beta_2$ M) mRNA 为系统内参照,因其在大多数细胞中均有稳定的高表达。所用引物参照文献[4,5],由中科院上海生物工程研究中心合成,引物序列如下: $\beta_2$ M:正义链 5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3',反义链 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3';AFP 外引物:5'-CTCTTCAGCAAAGCAGACTTC-3'和 5'-

CTCTTCAGCAAAGCAGACTTC-3';AFP 内引物:5'-GCTGACACATTATTATCGGACAC-3'和 5'-AGCCT-CAAGTTGTTCTCTGT-3'。第 1 轮 PCR 取上述反应产物 5  $\mu$ L,分别扩增 AFP 和  $\beta_2$ MG。每 50  $\mu$ L 反应体系含:12.5 pmol AFP 含 3'端及 5'端外引物或 12.5 pmol  $\beta_2$ MG 3'端及 5'端引物;10 $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ L;10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L;25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L;Taq 酶 2 U。93  $^{\circ}$ C 变性 30 s,54  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,循环 35 次后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。第 2 轮 PCR 取上述 AFP 反应产物 5  $\mu$ L 作模板,加入 12.5 pmol 含 3'端及 5'端内引物,余反应体系和反应条件同前。阳性对照用 HepG2 肝癌细胞株和手术肝癌组织总 RNA,阴性对照用未做 RT 的总 RNA 做模板,空白对照以双蒸水代替。

### 1.4 结果分析

取第 2 轮 AFP PCR 扩增产物和  $\beta_2$ MG 扩增产物在 15 g/L 琼脂糖电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察。AFP mRNA 阳性者可见 282 bp,内对照  $\beta_2$ M 为 120 bp。PCR 的阳性结果以电泳扩增带为判断标准。统计分析用 SPSS for Windows 6.0 软件包在计算机上统计,用  $\chi^2$  检验分析组间差异。

## 2 结果

### 2.1 AFP mRNA 的检测结果

49 例 HCC 患者中,17 例 AFP mRNA 阳性,阳性率 35%。HCC 外的各种良恶性肝病和健康对照组均为阴性,与 HCC 组比较  $P$  均  $< 0.05$ 。手术切除的 2 例肝细胞癌组织中 1 例阳性,癌旁组织和远处正常肝组织 AFP mRNA 均为阴性。HepG2 人肝癌细胞株总 RNA 有 AFP mRNA 表达。2 例正常胃粘膜组织和 MCF-7 人乳腺癌细胞株表达阴性。所有外周血和组织 RNA 同时都有  $\beta_2$ M mRNA 阳性表达。

### 2.2 HCC 患者外周血 AFP mRNA 与临床参数的关系

根据手术和/或影像学如 CT、MRI、胸片等所得的临床参数,包括肿瘤的大小、肝内肿瘤灶的数目、是否有门静脉癌栓形成、淋巴结转移、远处器官转移和肿瘤的 TMN 分期对 HCC 患者进行分组,各组外周血中 AFP mRNA 阳性率见表 1。AFP mRNA 检出率与患者年龄、性别、肝炎病毒标志物、肿瘤在肝内的位置、肝功能 Child-Pugh 分级( $P <$

0.05)无关。

表1 HCC患者外周血AFP mRNA与临床参数的关系  
Table 1 Relationship between detection of AFP mRNA in the blood and various clinical parameters

	n	n (AFP mRNA,+)/1	r (AFP mRNA,+)/ (%)	P
<i>l</i> (Tumor size)/ cm				
<5	14	2	14	0.117
≥5	35	15	43	
<i>n</i> (tumor foci in liver)/ 1				
one	20	3	15	0.016
multi	29	14	48	
<i>n</i> (Portal vein thrombosis)/1				
Present	14	8	57	0.037
Absent	35	9	26	
<i>n</i> (Lymphaden metastasis)/1				
Present	9	2	22	0.629
Absent	40	15	38	
<i>n</i> (Distant metastasis)/1				
Present	9	6	67	0.026
Absent	40	11	28	
<i>n</i> (TNM stages)/1				
I+II	14	2	14	0.045
III+IV	35	15	43	

2.3 AFP mRNA与血清AFP质量浓度的关系

血清AFP质量浓度正常组的外周血AFP mRNA阳性率显著低于血清AFP升高组(46%, 16/35),  $P < 0.05$ (表2)。

表2 AFP mRNA阳性率与外周血清AFP质量浓度间的关系  
Table 2 Relationship between detection of AFP mRNA in the blood and serum AFP concentration

$\rho_{AFP} / (\mu\text{g/L})$	n (AFP mRNA) / 1		n (AFP mRNA,+) / (%)
	+	-	
< 20 <sup>1)</sup>	1	13	7
≥ 20 ~ 200 <sup>2)</sup>	6	7	46
≥ 200 ~ 400 <sup>3)</sup>	3	4	43
≥ 400 <sup>4)</sup>	7	8	47

AFP mRNA positive rates between group 1), 2) and 3),  $P > 0.05$

2.4 敏感性试验

将不同数量的HepG2细胞加入到 $1 \times 10^6$ 个MCF-7细胞中,提取总RNA并行RT-PCR,可检测到AFP mRNA的最低限是 $1 \times 10^6$ 个MCF-7细胞中混有10个HepG2细胞。

2.5 随访

16例HCC患者成功随访3~4个月,其中11例AFP mRNA阴性者,初治时无远处器官转移,随

访期间无1例发生远处器官转移。另外5例外AFP mRNA阳性患者,其中2例在初治时已有肺转移。另外3例在随访中未见远处器官转移。

3 讨论

聚合酶链反应(PCR)能快速扩增肿瘤细胞内特异基因或DNA片段,这种技术可查出 $100 \times 10^7$ 正常细胞中的一个异常细胞和组织学正常的骨髓的微小残余病变<sup>[6]</sup>。恶性肿瘤细胞能继续表达具有其起源组织特征的特异性标志物,检测组织特异性mRNA优于检测以蛋白为基础的试验。由于肝细胞和肝癌细胞会产生AFP,在外周血有核细胞成分中查到AFP mRNA则表明血循环中有恶性或良性肝细胞。近来国外陆续有该方法检测HCC微小转移的研究报道<sup>[7~10]</sup>。

Komeda<sup>[7]</sup>报道用巢式RT-PCR检测64例HCC外周血AFP mRNA,阳性率(36%)与本组(34.7%)相似。房殿春<sup>[8~9]</sup>用该方法检测31例HCC阳性率为48.4%,健康志愿者、转移性肝癌和肝脓肿全部阴性。Funaki<sup>[10]</sup>报道用更敏感的3步PCR法检测4例肝炎和1例健康志愿者均阴性。本研究的非HCC患者外周血、肝组织和胃粘膜组织均为阴性,与国内外的研究结论相似<sup>[7~10]</sup>。若有少量坏死肝细胞经过肺循环中巨噬细胞清除后仍进入血循环,则可检测到AFP mRNA。本研究阳性组与阴性组间的转氨酶高低无差异,说明AFP mRNA的阳性并非由肝细胞破坏释放引起。我们认为即使不能完全排除HCC时有良性肝细胞释放到血中,但其数量要足够大,才能在外周血中检出,而且良性肝细胞产生AFP mRNA的可能性较HCC细胞小<sup>[5]</sup>。因此认为外周血检出AFP mRNA对判断血中HCC细胞有非常高的特异性。

本方法能检出在 $1 \times 10^6$ 个细胞中混有的10个肿瘤细胞,以一般患者平均 $2 \times 10^6$ 个PMNs/mL计算,1 mL血中如混有≥20个HCC细胞即可检测出,即当循环中有 $10^4$ 个肿瘤细胞时即可检出。

有研究认为AFP mRNA阳性的患者肿瘤组织总体积、肿瘤最大直径明显增加与当肿瘤增大时肿瘤细胞释放入血中增加有关<sup>[5,7]</sup>。本组尽管肿瘤直径增加时AFP mRNA阳性的倾向性增加,但无显著性差异,与房殿春<sup>[8]</sup>的结果相似。临床确定有门静脉癌栓形成者,AFP mRNA阳性率明显较阴

性者高,与国内外<sup>[8,10]</sup>研究相似,提示阳性率与HCC细胞的血源性播散密切相关。本组有/无淋巴结转移组AFP mRNA阳性率无显著性差异。临床上确定有远处器官转移组的阳性率高于无远处器官转移组,与多组研究结果相似<sup>[5,7,8,10]</sup>。现认为周围血AFP mRNA阳性可作为血循环中有恶性或良性肝细胞标志,在HCC患者中,阳性预示癌细胞血源性转移。国内外的随访研究均认为阳性者发生远处转移的机会较阴性者大<sup>[10]</sup>。

AFP作为较特异的肿瘤标志物已被广泛用于HCC的诊断。但血清AFP浓度不能反映肝癌的转移<sup>[10]</sup>。有报道<sup>[5]</sup>AFP mRNA阳性的HCC血清AFP浓度明显高于阴性者。房殿春<sup>[8]</sup>报道AFP mRNA阳性与阴性组间血清AFP阳性率均无显著差异。本组HCC AFP mRNA阳性组和阴性组血清AFP平均质量浓度无显著性差异;AFP mRNA阳性率并不随血清AFP浓度上升而增加。AFP升高者AFP mRNA阳性率仅为46%,表明血中有分泌AFP的蛋白并不意味着血循环中有肝癌细胞,相反AFP mRNA阳性者17例中血清AFP升高者16例,提示血中有能产生AFP的细胞存在<sup>[10]</sup>。因此,检测外周血AFP mRNA比血清AFP在诊断HCC微小转移更有意义。

#### 参考文献:

- [1] Ghossein R A, Rosai J. Polymerase chain reaction on the detection of micrometastase and circulation tumor cells [J]. *Cancer*, 1996, 78(1): 10.

- [2] 孙青,丁彦青.肿瘤的微转移及检测[J].*国外医学肿瘤学分册*, 1998, 25(5): 279.
- [3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium-thiocyanate-phenolchloroform extraction[J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156.
- [4] 任红刚,史国刚,王景明,等.逆转录多聚酶链反应检测白血病多药耐药性基因表达[J].*中华内科杂志*, 1995, 34(7): 463.
- [5] Matsumura M, Niwa Y, Kato N, *et al*. Detection of  $\alpha$ -fetoprotein mRNA, and indicator of hemogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation; a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 1994, 20(6): 1418.
- [6] Negrin R S, Blume K G. The use of the polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease[J]. *Blood*, 1991, 78(2): 255.
- [7] Komeda T, Fukuda Y, Sando T, *et al*. Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood[J]. *Cancer*, 1995, 75(9): 2214.
- [8] 房殿春,罗云辉,鲁荣,等.原发性肝癌患者外周血AFP mRNA检测的临床意义. *免疫学杂志* [J], 1997, 13(1): 33.
- [9] 罗元辉,房殿春,鲁荣,等.应用逆转录聚合酶链反应检测原发性肝癌患者外周血肿瘤细胞[J]. *中华内科杂志*, 1998, 37(3): 168.
- [10] Funaki N, Tanaka J, Seto S, *et al*. Highly-sensitive identification of  $\alpha$ -fetoprotein mRNA in circulating peripheral blood of hepatocellular carcinoma patients[J]. *Life Sciences*, 1995, 57(17): 1621.

(编辑 黄小延)

## ·简讯·

### 中山一院骨科承办第六届全国骨肿瘤学习班暨研讨会

1999年11月30日~12月2日,受中华骨科学会骨肿瘤学组委托,中山一院骨科承办了第六届全国骨肿瘤学习班暨研讨会,会议在南海市西樵山举行。这次会议,汇集了全国20个省市、142位专家代表,其中副高以上职称74人。本届学习班研讨会邀请了国内长期从事骨肿瘤病理、影像学、临床及基础研究方面的知名专家教授31人,其中18位教授作了不同专题的讲座,不但详细介绍国内外在骨肿瘤临床及基础研究方面的新进展,还结合他们自己研究的丰富经验进行了讲解,使与会者获益匪浅。学习班显示了中山医科大学骨肿瘤中心在骨肿瘤临床、放射和病理三方面诊治的优势。李佛保、韩士英、丘钜世、黄兆民、孟俊非等教授们精彩的专题讲座,获一致好评,扩大了对外影响,同时,全国骨肿瘤学组初步决定在我院骨科设立全国骨肿瘤诊治中心。学习班同时还召开了多位委员参加的扩大研讨会,研讨了骨肿瘤诊断治疗的评估标准,支持《中华骨科杂志》推荐的化疗方案、国际保肢功能评定标准、合并症和各种重建方法的评估标准,并提出在今后的学术会上予以使用和推出修改意见,以逐渐形成我国自己的评定标准。

(谭美珍)