

定量 PCR 分析 HBsAg 阳性肝癌患者 手术前后血清 HBV DNA 变化^①

陈涛¹ 周元平² 区庆嘉¹ 邓庆丽¹ 张复春³ 姚集鲁²

(中山医科大学 1 孙逸仙纪念医院外科; 广州, 510120 2 传染病学教研室
3 广州市第八人民医院肝炎研究室)

摘要 目的: 明确外科手术对 HBsAg 阳性肝癌患者乙型肝炎病毒(HBV)复制的影响。方法: 以常规聚合酶链反应(PCR)方法检测了 20 例 HBV 血清学标志阳性肝癌患者血清中的 HBV DNA; 应用荧光能量转移定量聚合酶链反应(QPCR)测定肝癌手术切除前后病人血清中 HBV DNA 量的变化情况。结果: 在部分肝癌病人(40%)血清中可以检测到 HBV DNA; 外科手术后较术前病人血清 HBV DNA 拷贝数增高($P < 0.01$)。结论: 乙型肝炎病毒仍然在大部分肝癌病人体内进行着活跃的复制; 外科干预在部分病人中引起病毒复制增加。

主题词 肝炎病毒; 乙型/遗传学; 肝肿瘤/遗传学; 聚合酶链反应/方法

中图分类号 R 735.7; 512.6

DETECTION OF HBV DNA IN SERA FROM HCC PATIENTS POSITIVE FOR HBsAg BEFORE AND AFTER OPERATION BY QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION

Chen Tao¹ Zhou Yuanping² Ou Qingjia¹ Deng Qingli¹ Zhang Fuchun³ Yao Jilu²

(1 Department of Surgery, Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120

2 Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital 3 8th Municipal People's Hospital of Guangzhou)

Abstract Objective: To clarify the activity trend of hepatitis B virus (HBV) in patients with hepatocellular carcinoma positive for HBsAg and the effect of surgical interventions on HBV. **Methods:** We detected HBV DNA in serum from 20 cases before and after operation by quantitative polymerase chain reaction. **Results:** The results showed that the positive rate of HBV DNA was 40% (8/20) and the titer of HBV DNA in sera one week after operation were significantly higher than before operation ($P < 0.01$). **Conclusions:** It was suggested that hepatitis B virus still strongly replicated in some HCC patients and surgical interventions may result in promoting the process of HBV replication.

Subject headings hepatitis B virus/genetics; liver neoplasms/genetics; polymerase chain reaction / methods

乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阳性的肝癌患者手术后常见肝炎活动,使患者近期死亡率增加。外科手术对乙型肝炎病毒(HBV)复制的影响,国内外均未见介绍。应用荧光能量转移定量 PCR 技术,本文对肝癌患者手术前后血清 HBV DNA 水平进行了定量和动态研究,现报告如下。

1 材料与amp;方法

1.1 对象

1996年10月~1997年6月在中山医科大学各附属医院住院的肝癌患者,随机取 HBsAg 阳性男17例,女3例作为研究对象。血清标本分装后,

-30 °C 保存备检。

1.2 病毒血清学标志和丙氨酸转氨酶检测

采用常规 ELISA 方法进行乙肝标志物检测 (中山医科大学中山生物工程公司试剂盒, 其中 HB_eAg 采用深圳月亮湾生物工程公司检测试剂盒); 丙氨酸转氨酶活性 $a_{ALT}/\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ 采用改良赖氏法检测。

1.3 血清 HBV DNA 常规 PCR 检测

采用华美生物工程公司提供的乙型肝炎病毒 PCR 诊断试剂盒 (HBV DNA PCR KIT), 按说明书操作, 扩增 HBV 的 C 区片段。产物为 270 bp 的 DNA 片段。

1.4 血清 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测

采用美国 Biotronics 公司提供的 DNA 扩增仪 (AG-9600 Thermal station)、荧光阅读仪 (AG-9600 AMPLISENSOR MINILYZER)、586 型计算机及

配套 ASAP 软件; 荧光信号试剂及标化 HBV DNA 由美国 Biotronics 公司提供。不对称扩增引物 1 为 5'-TGCTCGTGTACAGGCGGGGT-3', 引物 2 为 5'-GAGGCATAGCAGCAGGATGAAGAG-3', 荧光信号引物为 5'-TCGCTGGAAGTGTCTGCGGGT-3'。DNA 定量结果分析按每毫升血清中检出 3.2 kb HBV DNA 定为一个拷贝 (copy), 结果以指数 $N = \lg(\text{copies, DNA } 3.2 \text{ kb, } 1 \text{ mL serum})$ 表示。

1.5 统计学方法

配对 *t* 检验。

2 结 果

2.1 肝癌患者中乙型肝炎病毒标志物 (HBV M) 及 HBV DNA PCR 定性

20 例肝癌病人术前血清 HBV M 及血清 HBV DNA 阳性情况见表 1。

表 1 肝癌患者手术前血清 HBV M 及 HBV DNA 状况

Table 1 Status of HBV M and HBV DNA in sera from HCC patients before operation

HBV M (n = 20)						Positive cases(%)	HBV DNA ¹⁾ (n = 20)	
HBsAg	anti-HBs	HBeAg	anti-HBe	HbCAg	anti-HbC		Positive cases(%)	
+	-	-	+	-	+	12 (60)	3 (25)	
+	-	-	-	-	+	4 (20)	1 (25)	
+	-	+	-	-	+	2 (10)	2 (100)	
+	-	+	-	+	+	2 (10)	2 (100)	
Total						20 (100)	8 (40)	

1) results of conventional PCR

在肝癌病人 HBV 各种血清学标志物中, 感染标志组合表现为 HBsAg、抗-HBe、抗-HBc 阳性的情况为最常见, 占乙肝标志阳性例数的 60%, 与文献报道一致。40% 病人血中可以检出 HBV DNA, 说明肝癌病人仍有病毒复制能力。另外发现血清 HBV DNA 较 HBeAg 阳性率(20%)高。

2.2 定量 PCR 方法动态检测外科手术前、后血清 HBV DNA 及血清 ALT 变化情况

2.2.1 手术前、后血清 HBV DNA 量的变化 20 例病人用定量 PCR 方法检测血清 HBV DNA, 手术前 HBV DNA 拷贝数($10^{\bar{x} \pm s}$)为 $10^{(4.82 \pm 2.43)}$, 手术后为 $10^{(6.67 \pm 2.11)}$, $P = 0.000391 (< 0.01)$ 。20 例中除 6 例无明显变化外, 14 例有显著变化, 指数 *N* 结果列于表 2。

表 2 肝癌患者手术前后血清 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测

Table 2 The changes of serum HBV DNA in 14 patients before and after operation ($N^{1)/1}$)

Case number	Concentration of HBV DNA before operation	Concentration of HBV DNA one week after operation
1	6.63	8.91
2	3.00	6.99
3	3.00	6.71
4	8.06	8.75
5	3.00	6.64
6	9.68	10.16
7	3.00	7.46
8	3.00	5.26
9	6.31	6.39
10	3.00	5.35
11	7.36	8.25
12	3.00	4.77
13	7.31	8.39
14	7.31	8.39

1) $N = \lg(\text{copies, DNA } 3.2 \text{ kb, } 1 \text{ mL serum})$

两例患者手术前及手术后 1~2 周血清 HBV

DNA 含量动态变化见图 1。

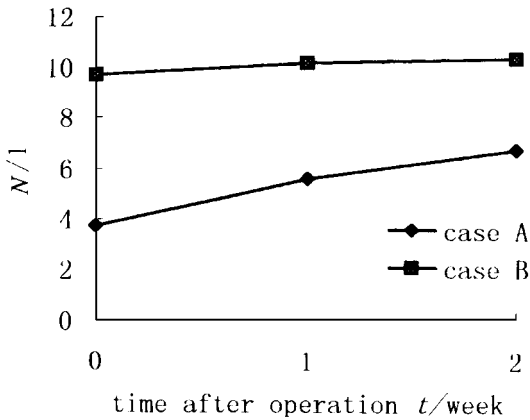


图 1 2 例肝癌患者手术前后 HBV DNA 的动态变化

Fig. 1 Kinetic changes of HBV DNA in sera of two patients before one week and two weeks after operation

$N = \lg(\text{copies DNA } 3.2 \text{ kb, } 1 \text{ mL serum})$

2.2.2 手术前后血清 ALT 水平变化 结果见表 3。

表 3 20 例肝癌患者手术前后血清 ALT 水平变化

Table 3 Changes of serum ALT in 20 cases before and after operation ($\bar{x} \pm s$) $a_{\text{ALT}}/\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$

Before operation	One week after operation	P
1.21 ± 0.89	4.66 ± 1.11	< 0.01

3 讨论

3.1 HBV 的存在状态

过去认为肝癌病人 HBV 基本上处于非活跃状态^[1]。Shafritz 等 1986 年报道肝癌组织均存在 HBV DNA 的整合; 一般认为整合的病毒处于非活动状态。尽管 Suzuki (1986) 用免疫电镜等观察到肝癌细胞浆中存在 Dane 颗粒, 说明肝癌阶段的 HBV 仍然活跃地进行着复制。可是这种观点没有引起学术界的足够重视。以至目前肝癌的治疗基本忽视了针对 HBV 的措施。本研究发现: 20 例病人经过常规 PCR 方法检查, 血清 HBV DNA 阳性率为 40%, 高于这些患者的 HBeAg 阳性率。在抗-HBe 阳性的个体中也有部分检测出 HBV DNA; 进一步以定量 PCR 方法检查血清 HBV DNA, 由于其敏感性更高, 阳性检出率相应提高 (14/20)。虽然此阳性率较慢性乙型肝炎患者 (CAH) 低, 但足以说明 HBV 在部分肝癌病人体内仍然处于复制状态。提示

我们对肝癌病人仍然要注意 HBV 对疾病的影响。

3.2 定量 PCR 方法监测外科干预对 HBV 的影响

外科手术对 HBV 复制的影响国内外均未见介绍。本文采用定量 PCR 方法对此进行了探讨。以往对 PCR 的评价多认为它是较敏感的定性检测法, 由于不能进行精确的基因定量, 其应用受到限制。到 90 年代初期, 设计出了几种定量 PCR 方法 (Hagiwara 等 1993, Yun 等 1994, Ranki 等 1995)^[2-4]。本实验采用信号引物能量转移^[5,6]定量 PCR 法, 较一般 PCR 检测 HBV DNA 敏感性提高了 1 万倍。有作者^[7,8]采用并认为该定量方法具有良好的临床应用价值。本实验采用该方法测定了 20 例肝癌病人手术前后血清 HBV DNA 含量变化, 发现手术后病人血清 HBV DNA 滴度普遍增高 ($P < 0.01$)。对其中两名病人进行动态观察, 发现术后 1 周病毒拷贝数即升高, 2 周后升高更甚。研究表明: 外科干预可能激活了病人体内的病毒复制过程。该过程可以在外科处理后短期内 (1 周) 表现出来, 两周后仍持续升高。而此时恰恰为病人手术的恢复早期, 必然严重影响到病人的安全恢复。因此我们在治疗肝癌的同时一定要密切注意病毒的活动并加以防范, 否则可能招致不良后果。本研究同时检测了病人手术前后血清 ALT 的变化, 发现手术后 ALT 有明显升高 ($P < 0.01$)。对此的解释, 过去人们一般认为是由于外科处理造成肝脏创伤所致, 病人体内所带的病毒活动方面所造成的可能危害被忽视。本研究结果提示病毒经过外科手术后可被激活, 加重肝脏的损害, ALT 升高, 严重者影响到病人手术顺利恢复, 应当引起临床医师的重视。

参 考 文 献

- 1 Beasley R P. Hepatitis B virus (the major etiology of hepatocellular carcinoma). *Cancer*, 1988, 61: 1942
- 2 Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, *et al*. Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy. *Gastroenterology*, 1993, 104: 877
- 3 Yun Z B, Lundeberg J, Johanson B, *et al*. Colorimetric detection of competitive PCR products for quantification of hepatitis C viremia. *J Viral Methods* 1994, 47: 1
- 4 Ranki M, Schatzl H M, Zachoval R, *et al*. Quantification of

(下转第 134 页)

6 Cooper T G. The human epididymis; Is it necessary? *Int J Androl*, 1993, 16: 245

7 Mathieu C, Guerin J, Cognat M, *et al*. Motility and fertilizing capacity of epididymal human spermatozoa in normal and pathological cases. *Fertil Steril*, 1992, 57: 871

8 Schoysman R J, Bedford J M. The role of the human epididymis in sperm maturation and sperm storage as reflected in the consequence of epididymovasostomy. *Fertil Steril*, 1986, 46: 293

9 Silber S J, Van Steirteghem A C, Liu J, *et al*. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection obtained from testicle biopsy. *Hum Re-*

prod 1995, (10)1: 148

10 Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6: 25

11 Liu J, Lissens W, Silber S J, *et al*. Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis F508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm. *JAMA*, 1994 (272)23: 1858

12 李 满, 庄广伦, 王长希, 等. 睾丸精子抽提结合卵母细胞单精子显微注射治疗无精症的不育症. *生殖医学杂志*, 待发表

(1997-11-12 收稿 1998-03-12 修回)

(上接第 130 页)

4 hepatitis B virus DNA over a wide range from serum for studying viral replicative in response to treatment and in recurrent infection. *Hepatology*, 1995, 21: 1492

5 Ozaki H, McLaughlin L W. The estimation of distances between specific backbone labeled sites in DNA using fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 5205

6 Wang C N, Wu K Y, Wang H T. Quantitative PCR us-

ing the Amplisensor Assay. In: Dieffenbach C W, Dveksler G S eds. *PCR primer; a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1995: 193

7 董惠卿, 张复春, 蔡晓莉, 等. 定量聚合酶链反应检测血清乙型肝炎病毒 DNA 及其意义. *广东卫生防疫*, 1996, 22: 1

8 张复春, 吴婉芬, 董惠卿, 等. 定量 PCR 检测血清 HBV DNA 及其临床应用. *中华传染病杂志*, 1997, 15: 25

(1997-07-15 收稿 1998-04-02 修回)

(上接封 3 页)

瘤中呈阳性反应,而在表皮及其他附属器和其他附属器肿瘤中则为阴性。CEA 在汗腺肿瘤的腺腔面、管腔面及其内的分泌物中染色最强,同时也可注意到以向导管方向分化的汗腺肿瘤或瘤体中的导管样结构,才常见明显的 CEA 着色,而其外围的实性细胞团则呈阴性。这也从一个侧面说明 CEA 可能主要是由汗腺管、腺腔内层细胞所分泌的。我们的染色结果及特点也与 Penneys 等人的结果相似^[2]。同时,我们也发现,汗腺恶性肿瘤中 CEA 除可见腔膜型着色外,随着肿瘤恶性程度的增加,可出现胞浆型形态不规则的着色。我们认为由于 CEA 是一种糖蛋白,随着肿瘤恶性程度的增加,它们的癌变造成细胞器结构、功能异常,使 CEA 的合成、转运、分泌等功能障碍,从而出现胞浆内不规则着色。因此,其 CEA 着色类型、形态的异常也在一定程度上反映了肿瘤的生物性质与预后,与吴继锋等人在胃癌及皮脂腺癌中发现的结果有相似之处^[1,3]。

CEA 在胚胎早期出现,并较稳定地存在于汗

腺及汗腺肿瘤中,是一种对诊断汗腺来源肿瘤有帮助的标记物;CEA 阳性有助于对汗腺肿瘤及其它皮肤来源肿瘤的鉴别^[2]。因大小汗腺肿瘤中都存在 CEA,故它不能鉴别大小汗腺的肿瘤。本研究中部分汗腺肿瘤中 CEA 染色阴性,可能与标本的处理、保存及染色过程中 CEA 抗原的破坏、遮盖或抗原暴露不好等因素有一定关系。因此,在临床免疫病理诊断中,必要时可用不同处理方法多做几次染色,以降低假阴性率。

参 考 文 献

1 吴继锋, 杨光霖, 董聿明, 等. 胃癌癌胚抗原的分布型式与组织类型及组织发生分型的关系. *临床与实验病理学杂志*, 1994, 10(1): 28

2 Penneys N S, Nadjj M, Morales A R. Carcinoembryonic antigen in benign sweat gland tumors. *Arch Dermatol*, 1982, 118: 225

3 李建军, 佟菊贞. 皮脂腺肿瘤凝集素亲和组化研究. *临床皮肤科杂志*, 1994, 23(6): 305

(1997-10-10 收稿 1997-12-10 修回)