

HCC 癌组织和癌旁组织中 HCV RNA 检测及半定量分析^①

彭晓谋^② 彭文伟 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院病毒性肝炎研究室; 广州, 510630)

提 要 HCV 相关 HCC 癌组织能检出 HCV RNA 负链,但许多学者检测不到或对其检测方法的准确性产生怀疑。作者收集13例 HCV 相关 HCC 标本,采用严格的负链检测方法和 PCR 半定量方法系统地比较了 HCC 癌组织和癌旁组织中 HCV 总 RNA 和负链的检出情况及其数量关系。HCC 癌组织和癌旁组织中,HCV RNA 负链检出率分别为30.8%(4/13)和69.2%(9/13),平均滴度分别为3.5和29.2,两者平均相差8.4倍(0~100倍)。癌组织中 HCV RNA 负链只有癌旁组织中 HCV 总 RNA 的1/91.6。本研究结果提示,HCC 癌组织中的确能检出 HCV RNA 负链,但水平较低。这种可能存在的低水平 HCV 复制对 HCC 的影响可能不大。因而,临床观察和流行病学研究所揭示的 HCV 与 HCC 相关的基础可能存在于 HCC 发生过程的早期,即启动或早期克隆扩增阶段。

主题词 癌,肝细胞; RNA,病毒/分析

中图分类号 R 512.63

许多资料表明,丙型肝炎病毒(HCV)与肝细胞癌(HCC)有着密切的关系^[1]。近来采用 PCR 技术从 HCC 癌组织和癌旁组织中扩增出了 HCV RNA 的正、负链^[2,3],提示 HCV 可能在 HCC 癌组织中复制。这无疑在认识 HCV 与 HCC 关系方面进了一大步。但有的学者仍认为在 HCC 癌组织中 HCV RNA 的数量太低或检不出负链而持否定态度^[4]。日本学者从 HCV 相关 HCC 癌组织建立的细胞株中,用 PCR 和原位杂交也未能检出 HCV RNA^[5]。另外,负链检测方法因受逆转录酶灭活不全、二级结构引导逆转录和 TaqDNA 聚合酶可能具有逆转录活性等因素的影响,其准确性受到怀疑^[6]。因而,作者采用严格的负链检测方法和半定量分析方法,比较了 HCC 癌组织和癌旁组织中 HCV 总 RNA 及负链的检出情况和数量关系,进一步探讨了 HCV 与 HCC 相关的机制。

1 材料与方 法

1.1 标本收集

70例 HCC 手术切除标本收集于本校附属第一医院和肿瘤医院。由有经验的病理专业人员小心分离出癌组织和癌旁组织分别储存于液氮中,供细胞总 RNA 抽提用。患者均来自于南方地区,广东55例,湖南9例,江西2例,海南2例,福建1例,广西1例。

1.2 细胞总 RNA 提取

细胞总 RNA 提取参照 Chomczynski 等的一步酸性异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提法^[7]。提取的总 RNA 溶于 TE 液中,用紫外分光光度计测定其纯度和含量,并稀释至0.1g/L, -40℃保存。

1.3 HCV 总 RNA 检测

HCV 总 RNA 检测采用参照 Lin 等建立

① 美国中华医学基金会(CMB)部分资助课题; ② 第一作者,1963年出生,男,博士研究生,主治医师

的一管巢式 PCR 方法^[9]。所用引物序列如下: NC₁ 5'-CTGTG AGGAA CTA CT GTCTT-3', 28~47, 正义; NC₂ 5'-CATGG TGCAC GGTCT ACGAG-3', 308~327, 反义; NC₃ 5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3', 46~65, 正义; NC₄ 5'-AACACTACTCG-GCTAGCAGT-3', 229~248, 反义。具体操作如下: 于 5 μL 细胞总 RNA 溶液上, 加一滴石蜡油, 95℃, 变性 5 min, 冰浴中速冷, 加入 RT-PCR I 反应液 5 μL 至反应液中各成分的终浓度为 10 mmol/L Tris·HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶, 0.01 mmol/L DTT, 0.3 mmol/L dNTPs, M-MLV 逆转录酶 50U 和 Taq DNA 聚合酶 1U (GIBCO BRL 产品), RNasin 8U (华美产品), 引物 NC₁ 和 NC₂ 各 10 pmol, 于 37℃ 逆转录 45 min, 接 94℃ 变性 3 min, 再接 94℃, 40 s, 57℃, 40 s, 72℃, 1 min 循环 30 次。第 2 次 PCR 是于 PCR I 反应管中加入 10 μL PCR 反应液 (10 mmol/L Tris·HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L dNTPs, TaqDNA 聚合酶 1.5 U, 引物 NC₃ 和 NC₄ 各 20 pmol) 后, 改复性温度为 61℃ 并按上述条件循环 30 次。采用 2% 琼脂糖凝胶常规分析产物。产物大小为 203 bp。

1.4 HCV RNA 负链检测

负链检测严格按照 Willems 等意见, 采用 95℃, 5 min 破坏模板上的二级结构, 100℃, 5 min 灭活逆转录酶, 在加 TaqDNA 聚合酶前, 用 RNase A (BM 产品) 彻底消化 RNA 模板。具体操作参照 HCV 总 RNA 检测方法并作上述改进。

1.5 HCV RNA 半定量分析

HCV RNA 半定量分析参照 Gil 等方法^[9], 采用终点滴定法进行分析。先将组织总 RNA 液倍比稀释成 1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 然后按上述 HCV 总 RNA 或负链的检测方法进行检测。以出现阳性反应的最高稀释倍数作为滴度。HCV RNA 半定量结果用每微克细胞总 RNA 的滴度表示。计算

方法为 2×1/终点稀释倍数。

2 结果

2.1 HCV RNA 检测结果

70 例 HCC 标本中, 血清抗 K-HCV 阳性或/和组织中检出 HCV RNA 者 13 例, 阳性率 18.6%。其中, 血清抗-HCV 阳性率 14.8% (9/61), HCV RNA 阳性率 11.1% (1/9)。组织中 HCV RNA 检出情况见表 1。癌组织中, HCV 总 RNA 检出率 12.8% (9/70), 负链检出率 5.7% (4/70)。癌旁组织中, HCV 总 RNA 检出率 15.7% (11/70), 负链检出率 11.4% (8/70)。13 例 HCV 相关 HCC 中, 癌组织的 HCV 总 RNA 检出率 69.2%, 负链检出率 30.8%, 癌旁组织的 HCV 总 RNA 检出率 84.6%, 负链检出率 61.5%。

2.2 HCV RNA 半定量结果

HCV RNA 半定量分析的典型 PCR 产物电泳分析结果见图 1, 全部数据见表 1。癌组织中, HCV 总 RNA 滴度 0~2×10², 平均 23.1,

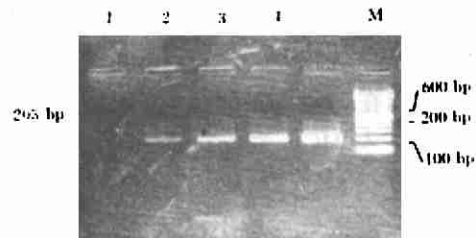


图 1 HCC 组织中 HCV RNA 半定量分析

标本为 HCC₃₀ 的癌旁组织, 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, M 为 100 bp Ladder (GIBCO BRL 产品), 1~5 泳道的稀释度分别为 1:10⁴, 1:10³, 1:10², 1:10 和 1

负链滴度 0~2×10², 平均 3.5。癌旁组织中, HCV 总 RNA 滴度 0~2×10⁴, 平均 317, 负链滴度为 0~2×10³, 平均 29.2。癌组织和癌旁组织中 HCV RNA 负链的滴度相差 0~100 倍, 平均 8.4 倍。癌组织中 HCV 总 RNA 和负链分别只有癌旁组织中 HCV 总 RNA 的 1/

13.7和1/91.6。采用等级相关分析法统计分析显示,癌组织中 HCV 总 RNA 和负链检出与癌旁组织中 HCC 总 RNA 和负链检出高度相关,其相关系数分别为0.8462和0.8166, P 值均 <0.005 。

2.3 HCV RNA 检测结果与临床资料的关系

根据患者长期生活地区的 HCC 死亡率的不同,70例 HCC 患者中,49例来源于高度流行区(发病率显著高于全国平均水平),21例来源于中度流行区(发病率与全国平均水

平无显著差异)。它们中 HCV 相关 HCC 例数分别为9例和4例,组织中 HCV 总 RNA 平均滴度分别为374和200,两者之间均无显著差异。癌旁组织肝硬化程度与 HCV RNA 检测及半定量分析结果见表2。70例 HCC 中,癌旁组织有不同程度肝硬化者为85.7%,其中 HCV 相关者为92.3%,HCV 无关者为84.2%。HCV 相关 HCC 的平均年龄42.4岁,无关 HCC 的平均年龄44.9岁,两者无显著差异。性别也与 HCV RNA 检测结果无关。

表1 HCC 组织中 HCV RNA 半定量分析结果

标本号	血清		癌组织 HCV RNA		癌旁组织 HCV RNA	
	抗-HCV	HCV RNA	总 RNA	负链	总 RNA	负链
HCC ₃	+	+	2×10	2	2×10^2	2×10
HCC ₈	+	ND ¹⁾	2×10	2	2×10^3	2×10^2
HCC ₁₂	-	ND	-	-	2×10^2	-
HCC ₁₉	+	ND	2×10^2	2×10	2×10^4	2×10^3
HCC ₂₅	+	ND	-	-	-	-
HCC ₃₂	+	ND	-	-	2×10	-
HCC ₃₈	+	ND	2×10^2	-	2×10^3	2×10
HCC ₄₃	-	ND	2×10	-	2×10^2	2
HCC ₄₉	+	ND	2×10	-	2×10	2×10
HCC ₅₉	+	ND	2	-	2×10	-
HCC ₆₀	+	ND	-	-	-	-
HCC ₁₀₅	ND	ND	2×10^2	2×10^2	2×10^4	2×10^2
HCC ₁₀₉	ND	ND	2×10	-	2×10^2	2×10

1)未检测

表2 HCV 总 RNA 滴度与肝硬化的关系

	例数	癌旁组织肝硬化 ¹⁾				总分	$\bar{x} \pm s$	$P^{2)}$
		0	1	2	3			
HCV 无关 HCC	57	9	22	22	4	78	1.37 ± 0.84	
HCV 相关 HCC	13	1	3	5	4	25	1.92 ± 0.95	>0.05
HCV 总 RNA 滴度								
0	2	0	1	1	0	3	1.50 ± 0.71	>0.05
$2 \times 10^{1-2}$	7	1	2	2	2	12	1.71 ± 1.11	>0.05
$2 \times 10^{3-4}$	4	0	0	2	2	10	2.50 ± 0.58	<0.05

1)根据早、中、晚期,参照 Knodell 计分方式; 2)与 HCV 无关组进行 t 检验

3 讨 论

日本 HCC 中,抗-HCV 检出率为 54.6%。我国的检出率为 11%~27.1%^[10]。临床配对研究表明,抗-HCV 阳性是 HCC 的独立危险因素,其相对危险率为 7.3^[11]。PCR 技术问世后,HCV 感染与 HCC 的紧密关系得到了进一步证实。HCC 患者血液中,HCV RNA 检出率为 23%^[10]。癌组织和癌旁组织中,HCV RNA 检出率分别为 4.1%和 10.2%^[3]。本次结果显示,抗-HCV 检查出率为 14.8%,癌组织和癌旁组织中,HCV RNA 检出率分别为 12.8%和 15.7%,抗-HCV 或/和组织 HCV RNA 检出率为 18.6%。进一步采用半定量的方法分析发现,HCV 总 RNA 在上述两组织中的数量不同。癌组织和癌旁组织中,HCV 总 RNA 滴度平均相差 13.7 倍。以上结果提示,部分 HCC 患者存在 HCV 感染,其癌组织中 HCV RNA 的数量远比癌旁组织低。

国内、国外都有文献报道癌组织中可检出 HCV RNA 负链^[2,3]。负链的存在标志着 HCV 在癌组织中复制。然而,Willems 等认为负链的检测方法受许多因素影响,解释结果需谨慎^[6]。我们严格按 Willems 等的建议操作,仍有部分患者能检出低水平的 HCV RNA 负链,这表现癌组织中 HCV RNA 负链确实存在,但水平非常低。这种低水平的负链可能有以下来源:①血液或血液中的淋巴细胞;②癌组织中的浸润炎症细胞或其它正常细胞;③HCC 癌细胞。采用免疫组织化学或 PCR 技术能从上述细胞中检出 HCV 抗原或核酸^[9-13]。进一步采用原位杂交或原位 PCR 可明确这一点。癌组织负链的检出与癌旁组织负链高度相关,提示 HCV RNA 负链在癌组织中存在或 HCV 在癌组织中复制不是独立事件。

根据本文的结果,HCC 癌组织中,即使有 HCV 感染或复制,也是低水平的。由于

HCC 系肝细胞经过启动、促进和进展等多个步骤后形成的癌细胞克隆。这种庞大的克隆中个别细胞存在 HCV 感染或复制,对整个 HCC 消长的影响不会太大。因而,我们认为流行病学和临床观察研究所揭示的 HCV 与 HCC 的相关基础可能存于细胞克隆形成的早期,即启动或早期克隆扩增过程。高水平 HCV RNA 与肝硬化计分升高正相关提示 HCV 感染有促进肝硬化形成的趋势,肝硬化可能是 HCV 与 HCC 相关的中介因素之一。

参 考 文 献

- 1 Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Seminars In Liver Disease*, 1995, 15: 64
- 2 Gerber MA. Relation of hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 1993, 17 Suppl :S108
- 3 周元平,彭文伟,姚集鲁,等. HCC 组织中 HCV RNA 正链和负链的检测分析. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3):239
- 4 Takeda S, Shibata M, Morishima T, *et al.* Hepatitis C virus infection in hepatocellular carcinoma; detection of plus-strand and minus-strand viral RNA. *Cancer*, 1992, 70:2255
- 5 Yoshizawa K, Kiyosawa K, Usuds S, *et al.* New hepatocellular carcinoma cell line SUHC-1 established from a patient with hepatitis C virus RNA in serum. *Jpn J Cancer Res*, 1992, 83:871
- 6 Willems M, Moshage H, Yap SH. PCR and detection of negative HCV RNA strands. *Hepatol*, 1993, 17(3):526
- 7 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162:156
- 8 Lin HJ, Shi N, Mizokami M, *et al.* Polymerase chain reation for hepatitis C virus RNA using a single tube for reverse transcription and serial rounds of amplification with nested primer pairs. *J Med Virol*, 1992, 38:220
- 9 Gil B, Qian C, Riezu-Boj JI, *et al.* Hepatic and ex-

- trahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C: different patterns of response to interferon treatment. *Hepatology*, 1993, 18:1050
- 10 蒋明德, 曾维政, 楚人俊, 等. 肝细胞癌患者血清丙型肝炎病毒抗体和丙型肝炎病毒 RNA 的研究. *中华医学杂志*, 1993, 73(3):131
- 11 Di Biseglie AM, Order SE, Klein JL, *et al.* The role of chronic viral hepatitis in hepatocellular carcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol*, 1991, 86:335
- 12 Blight K, Lesniewski R, Labrooy J, *et al.* Localization of hepatitis C virus proteins in infected liver tissue by immunofluorescence. *Gastroenterologia Japonica*, 1993, 28 Suppl 5:55s
- 13 梁英锐, 吴名耀, 林莹, 等. 丙型肝炎抗原在肝炎、肝癌组织中的表达. *中华医学杂志*, 1994, 76(8):476

(1995-12-26收稿 1996-08-20修回)

DETECTION AND SEMI-QUANTIFICATION OF HCV RNA IN CANCEROUS AND PERICANCEROUS TISSUES OF HCC

Peng Xiaomou Peng Wenwei Yao Jilu

(Department of Viral Hepatitis Research, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

HCV RNA minus-strands have been detected in cancerous tissues of HCV-related HCCs. Many authors, however, could not detect or doubted the accuracy of the methods in the detection of HCV RNA minus-strands. Using strict HCV RNA minus-strand detection and semiquantification methods, we compared the total HCV RNA and HCV RNA minus-strands in cancerous and pericancerous tissues of HCC cases in our 13 cases of HCV-related HCCs. HCV RNA minus-strands were detected in 30.8% and 69.2% from cancerous and pericancerous tissues of these cases respectively. The average titers were 3.5 and 29.2 respectively. The amount of HCV RNA minus-strands in cancerous tissues were 8.4 times smaller than those of HCV RNA minus-strands and 91.6 times smaller than those of the total HCV RNA in their own pericancerous tissues. These results suggested that HCV RNA minus-strands existed in HCC tissues indeed, but the levels might very low. The effect of this low level replication of HCV on the oncogenesis of HCC might be limited. Thus, the base of the relationship between HCV and HCC, which has been demonstrated by means of clinical researches and epidemiological investigations, possibly depends upon the early stage of the hepatocarcinogenesis, namely initiation or early clone expansion stage.

Subject headings carcinoma, hepatocellular; RNA, viral/analysis