

用原位 PCR研究石蜡包埋肝组织中微量 HCV RNA^①

周元平^{1,2} 彭文伟¹ 姚集鲁¹ 张志刚² 罗光汉³ 邓子德¹ 顾秀华¹

(中山医科大学附属第三医院 1 传染病科 2 病理科; 广州, 510630

3 广西医科大学附属第一医院传染病科; 南宁, 530027)

摘要 为定位分析石蜡包埋肝组织中微量 HCV RNA, 改良建立了原位 PCR检测技术, 并对 17例丙型肝炎相关的肝细胞癌患者癌组织和癌周肝组织石蜡包埋切片进行检测。结果显示: 该技术的特异性可靠, 敏感性高于原位杂交法; 两种组织切片 HCV RNA阳性率分别为 41.2% 和 70.6%, 阳性信号主要呈胞浆型分布; 在癌细胞中核型和核膜型分布比例较癌周肝组织明显增高, 提示 HCV 可能与宿主细胞基因存在着相互作用。

主题词 聚合酶链反应 方法; 肝炎病毒, 丙型 遗传学; 肝肿瘤 遗传学

中图分类号 R 512.6; 735.7

组织中潜伏病毒和低拷贝病毒的定位检出, 在发病机理研究中具有重要价值, 原位杂交需 20个拷贝以上的靶基因存在才能检出的低敏感性极大地限制它在这一领域的应用^[1]。丙型肝炎病毒 (HCV) 为低拷贝病毒, 肝癌组织中含量更少。由于检出困难, HCV 在肝癌组织中的定位、分布、病毒的致癌机理尚未阐明, 积累的资料甚少。针对这种情况, 我们改良建立了用原位聚合酶链反应 (PCR) 定位检测肝癌组织中 HCV RNA的方法, 取得了满意结果, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

17例血清 HCV 标记物阳性的肝细胞癌 (HCC) 患者为本校各附属医院 1992~1995年的住院病人, 手术后病理检查确诊。男 15例, 女 2例, 平均年龄 (48.9±10.6)岁。均经血清学抗-HCV 和 或 HCV RNA检测为阳性 (抗-HCV 阳性 13例, HCV RNA阳性 10例, 双阳性 6例), 检测方法同前文报道^[2]。

对照分为两类: ① HCV 标记物阳性的丙型肝炎肝穿标本 15例 (其中抗 HCV 阳性 12例, HCV RNA阳性 11例, 双阳性 8例)。② HCV 标志阴性组, 含血清 HBsAg 和 HBV DNA阳性而 HCV 标志物阴性的 HCC患者 5例, 以及 HCV、HBV 标志均阴性的尸检肝组织 5例。

1.2 标本制备

HCC组织标本于手术时取得, 丙型肝炎组织标本为肝穿活检标本, 均以 4% 中性缓冲多聚甲醛固

定, 常规石蜡包埋切片, 片厚 5 μ m, 贴于 3-氨基丙基-乙氧基硅烷 (APES) 处理的载片上, 60 $^{\circ}$ C 烘片 3 h, 4 $^{\circ}$ C 冰箱短期保存待检。

1.3 试剂和仪器

HCV 引物位于 5' 非编码区, SP1 为正义引物, SP2 为反义引物, 其核苷酸位置和序列同前文^[2]报道。AMV 逆转录酶, dNTPs 均为 Life Technologies 公司产品; Taq DNA 聚合酶, DNaseI (RNase free), 标记物地高辛 (Dig-11-dUTP) 及其检测试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品; MJ/PTC-100 型热循环仪及原位 PCR 扩增载板为 MJ Research 公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 原位 PCR 按 Lau^[3]方法改良建立: ① 石蜡切片常规脱蜡入水, 20 μ g/mL 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 消化 10 min, 4% 多聚甲醛再固定, 二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理的 PBS 洗涤, 甩干后在 37 $^{\circ}$ C 湿盒中用 DNaseI (1 U/mL) 消化过夜。② 逆转录, 反应体积 20 μ L, 含 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 4 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L 引物 SP1 20 pmol/L, RNasin 2 U/ μ L, AMV 逆转录酶 15 U。逆转录条件为 42 $^{\circ}$ C 30 min; 甩弃逆转录反应液后进行 PCR 反应。③ PCR, 反应体积 50 μ L, 含 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 4.5 mmol/L, 引物 SP1 SP2 各 20 pmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 其中 7% 的 dTTP 由 Dig-11-dUTP 取代, Taq 酶 2 U, 加盖硅化盖玻片, 指甲油密封。热循

① 国家教委博士点基金和 CMB 资助课题; ② 第一作者, 1955 年出生, 博士, 副研究员

环条件为:首先 94°C 3 min,之后按 94°C 45 s, 55°C 90 s, 72°C 90 s,共 25 个循环后 72°C 延伸 5 min ④ 显示,原位扩增后洗片、封闭、Anti-Dig-AP亲和、再洗片,NBT-BCIP显色均按检测试剂盒说明书操作,显色良好后水洗中止反应,封片镜检。

1.4.2 方法学对照实验 采用原位杂交方法,cDNA探针长 221 bp,位于 HCV 5'端 NC区,地高辛标记,由北京市肝炎研究所提供,按常规方法操作

2 结果

2.1 方法的特异性

经设置下列对照:①正常肝组织和单纯 HBV 标志阳性的肝组织各 5份;②RNA酶 37°C 消化 1 h;③人乳头瘤病毒 (HPV 16)特异性引物替代 HCV 引物;④省略逆转录酶;⑤省略 Dig-11-dUTP 正常肝组织和单纯 HBV 标志阳性的肝组织均未发现阳性信号,以阳性肝组织的连续切片经②~⑤处理后亦未见阳性信号(图 1) 表明本研究所建立的原位 PCR方法特异性可靠。

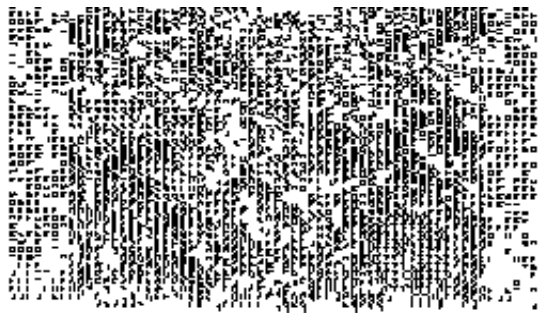


图 1 血清抗 HCV、HCV RNA 均阴性的对照肝组织未见阳性信号 $\times 200$

2.2 方法的敏感性

用原位 PCR法检测了 17例肝癌组织和癌周肝组织中的 HCV RNA,其中 10例用原位杂交法进行了对照检测,结果见表 1 可见原位 PCR法的检测敏感性高于原位杂交法。阳性信号的定位、分布则两种方法相似。

表 1 原位 PCR和原位杂交对 HCV RNA 检出率的比较

	原位 PCR			原位杂交		
	例数	阳性数	阳性率(%)	例数	阳性数	阳性率(%)
肝癌组织	17	7	41.2	10	2	20.0
癌周组织	17	12	70.6 ¹⁾	10	3	30.0 ¹⁾

1) $t^2 = 4.20$ $P < 0.05$

2.3 肝组织中 HCV RNA 检出率和分布

用原位 PCR检测 49份组织标本,显示 HCV 基因阳性信号的有 30份,其中肝癌组织阳性率为 41.2% (7/17),癌周肝组织阳性率为 70.6% (12/17),丙型肝炎肝组织阳性率为 73.3% (11/15),以不同的阳性细胞百分率表示阳性信号强度,各类组织中 HCV RNA 检测情况见表 2 HCV RNA 阳性细胞以散在、3~5 个成簇分布为主,少数为弥漫性分布(图 2 图 4)。阳性信号为紫蓝色,呈块状(图 2) 或颗粒网状(图 3 4)。在癌周肝组织和肝炎肝组织中,阳性信号主要定位于肝细胞浆(图 2),绕核呈弧形分布的核膜型亦较多见,位于细胞核内的核型分布则偶见。在肝癌组织中,阳性信号仍以胞浆型分布为主(图 3),但核型、核膜型分布的比较少癌周肝组织明显增高,在 7例 HCV RNA 阳性的肝癌组织中,4例见到核型、核膜型分布。

表 2 HCC和肝炎组织中 HCV RNA 原位扩增检出情况 (例数)

例数	HCV RNA					
	-	+	++	+++	++++	
肝癌组织	17	10	6	1	0	0
癌周组织	17	5	7	3	2	0
肝炎组织	15	4	7	3	1	0

阳性分级: - 未检出; + < 5%; ++ 5~25%; +++ 26~50%; ++++ > 50%



图 2 癌周肝组织,原位 PCR见 HCV 阳性细胞呈簇状分布,阳性信号位于胞浆内 $\times 400$



图 3 肝癌组织,原位 PCR中的 HCV 阳性信号主要定位于胞浆内 $\times 400$

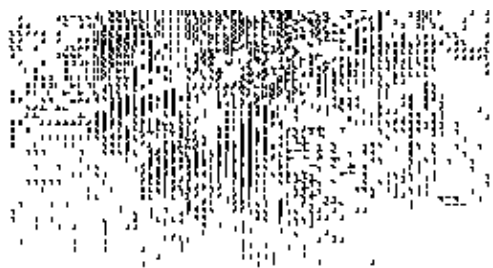


图 4 肝癌组织核型、核膜型阳性信号
× 400

3 讨论

原位 PCR 是近年来出现的一项新技术,它把常规 PCR 的高度敏感性和原位杂交的细胞定位性结合起来,在组织切片或细胞涂片上定位显示微量靶基因。我们在研究中证实,肝癌组织中微量的 HCV RNA 能够可靠地在石蜡包埋切片中定位检出。这一方法为潜伏病毒和低复制病毒的定位研究提供了有力手段。

与常规 PCR 相比较,原位 PCR 在技术操作上复杂得多,在模板处理、扩增载体和阳性产物的显示等主要环节上差别明显:原位 PCR 不需抽提模板,避免了抽提过程的损失和靶基因被阴性细胞基因所稀释,但需要全套病理切片处理技术,玻片应特殊处理,以防在苛刻的热循环和洗涤过程中脱片,适当消化应给予特别注意,过度消化破坏形态学结构,消化不足又导致待测 RNA 暴露不足。我们体会定下消化时间后(如 10 min),用不同的蛋白酶 K 浓度进行预消化,以确定每批标本的最佳条件是一种较好的选择;用 DNase 预处理切片可明显降低背景,提高检出率;原位 PCR 的逆转录和扩增反应均在切片上进行,较高的镁离子浓度是必须的,通常较常规 PCR 高出 1 倍以上,这可能和某些组织位点结合镁离子而使其在反应液中的浓度下降有关;PCR 循环数宜适度减少,循环过多,扩增产物溢出细胞外,导致非特异性背景并使阳性细胞连成块状,造成计数困难,循环数偏少则阳性信号浅,敏感性下降。我们体会以 20~25 次左右为宜;地高辛素是扩增时掺入的信号分子,敏感性与同位素相似,又避免了生物素作为标记物时组织切片中内源性生物素的干扰。尚

可通过控制 Dig-11-dUTP 与 dTTP 的比例控制适当的掺入量,以获得理想结果,这一比例以 1:15 较佳。原位 PCR 的阳性信号需在显微镜下细胞轮廓内观察并计数,这种特点使得污染引起的假阳性易于识别和排除。

采用原位 PCR 技术, HCV RNA 在不同肝病组织中的检出率分别为癌周肝组织 70.6%, 肝癌组织 41.2%, 肝炎肝组织 73.3%。其中血清 HCV 标记物双阳性的 HCC 患者癌周肝组织和肝炎患者肝组织, HCV RNA 检测全部阳性。这一结果高于 Lau 等^[3]报道 66.6% (4/6) 的检出率,可能与 Lau 等采用的循环数偏少有关。而采用原位杂交法检测丙型肝炎肝组织中 HCV RNA, 王福生等^[4]报道检出率为 45.8%, 表明原位 PCR 的检出灵敏度较原位杂交明显为高。本研究中同时进行的原位杂交对照实验亦证实两种方法的阳性检出率存在显著差异,以原位 PCR 法为优。

研究 HCV 基因在细胞内的定位分布有助于阐明 HCV 的生物学特性和致病、致癌机理。我们检测的 32 例 49 份肝组织标本,来自 17 例肝癌患者和 15 例肝炎患者,他们均为血清抗-HCV 和(或) HCV RNA 阳性,原位 PCR 结果显示, HCV RNA 主要定位于肝细胞胞浆,这与 Negro^[5]、Lau^[3]等的研究基本一致,表明 HCV 主要在肝细胞胞浆内存在和复制。但在肝癌细胞,我们发现核型和核膜型分布比例较癌周肝组织明显增高,显示 HCV 可能进入核内,这是否提示 HCV 与宿主细胞基因组存在相互作用,与 HCV 的致癌机理有关,有待深入研究。

参 考 文 献

- 1 Gu J. Principles and applications of *in situ* PCR. Cell Vision, 1994, 1(1): 8
- 2 周元平,彭文伟,姚集鲁. 肝癌组织中丙型和乙型肝炎病毒基因状况研究. 中华肝脏病杂志, 1995, 3(4): 202
- 3 Lau G K K, Fag J W S, Wu P C *et al.* Detection of hepatitis C virus genome in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue by *in situ* reverse transcription polymerase chain reaction. J Med Virol, 1994, 44: 406
- 4 王福生,韩风连,王松山,等. 应用非同位素原位杂交检测肝组织中丙型肝炎病毒基因的分布. 中华实验和临

床病毒学杂志, 1995, 9(4): 314

histopathology. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:

5 Negro F D, Pacchioni Y, Shimizu R H, *et al.* Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by *in situ* hybridization and comparison with

2247

(1996-05-16收稿 1996-10-09修回)

DETECTION ON HCV RNA IN PARAFFIN-EMBEDDED LIVER TISSUES BY *IN SITU* POLYMERASE CHAIN REACTION

Zhou Yuanping¹ Peng Wenwei¹ Yao Jilu¹ Zhang Zhigang² Luo Guanghan³ Deng Zhide¹ Gu Xiuhua¹

(1 Department of Infectious Diseases, 2 Pathology, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630, 3 Department of Infectious Diseases, Guangxi Medical University, Nanning, 530027)

In order to localize a trace of HCV RNA in tissue sections from patients with hepatocellular carcinoma (HCC), a technique of *in situ* polymerase chain reaction was developed and carried out in paraffin embedded sections of cancerous and pericancerous liver tissues from 17 HCC patients. The results showed that the specificity of the technique was satisfactory. The positive rates of HCV RNA in sections of cancerous and pericancerous liver tissues were 41.2% and 70.6% respectively. The positive signals mainly localized in cytoplasm. But in cancerous tissues, the positive signals in nuclei and nuclear membrane were significantly increased. These results further support the association between HCC and HCV infection and suggest the interaction between HCV gene and host genome.

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

· 新成果 ·

幽门螺杆菌及其相关性疾病系列研究

课题负责 胡品津

(中山医科大学附属第一医院消化内科; 广州, 510080)

该成果以幽门螺杆菌 (HP) 各种检测手段的建立和完善为起点, 幽门螺杆菌与胃癌关系的流行病学研究为重点, 进而开展 HP 治疗上的临床研究和免疫预防的动物实验。该系列研究包括: ① 引进并改良 ¹⁴C-尿素呼气试验, 并进一步将该试验与血清学结合用于疗效监测和随访。② 在中国各年龄组普通人群中进行 HP 流行病学调查, 明确提出 5 岁以内儿童是获得 HP 感染的关键年龄。③ 对 HP 与胃癌关系的系列研究包括胃癌 HP 检出率的病例对照研究, 胃癌高低发区人群胃镜及血清学调查, 胃癌高低发区连续胃镜病例 HP 相关性胃炎模式分析等。④ 提出高效安全的小剂量三联疗法根除 HP 方案及其它疗法。⑤ 首次报道 HP 可免疫预防, 阐明了主要机制, 证明口服疫苗可取得高效持久免疫力。该研究为 HP 的诊断、治疗和预防提供了切实可行的新方法, 具有重要理论意义和实用价值。1996 年获广东省科技进步二等奖。

(陈丽芳)