

。 临床研究。

## 肝病患者中丙型肝炎病毒感染的免疫组化检测<sup>①</sup>

张立伐<sup>②</sup> 彭文伟 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院传染科; 广州, 510630)

**摘要** 以 HCV NS3区单克隆抗体, LSAB法检测了 116 例各类肝病肝组织 (其中肝细胞癌 52 例, 肝炎后肝硬化 16 例, 慢性肝炎 40 例, 体质性黄疸 8 例) 及 6 份正常肝组织 (作为对照) 中 HCV 抗原的表达状况, 结果表明, HCV 抗原在肝细胞癌、肝炎后肝硬化及慢性肝炎中检出率分别为 13. 5% (7/52)、12. 5% (2/16)、10% (4/40), 而在体质性黄疸及正常肝组织中未检出 HCV 抗原。HCV 抗原可见于癌细胞或癌周肝细胞的胞浆或胞核中, 实验结果支持 HCV 与肝细胞癌的关联, HCV 感染对促使肝病的加重也具有一定影响。肝细胞癌中, 胞核型 HCV 抗原表达较多见。癌周组织中 HCV 抗原检出率高于癌组织, 提示 HCV 可能主要作用于癌前病变, 在肝细胞癌发生的初始阶段起作用, 促使正常细胞恶性化。

**关键词** 肝炎病毒组, 丙型; 癌, 肝细胞; 免疫组织化学

**中图分类号** R 512. 63

肝细胞癌 (HCC, hepatocellular carcinoma) 是目前居我国癌症死因第 3 位的常见恶性肿瘤, 其病因及发病机理尚未完全明了。丙型肝炎病毒 (HCV, hepatitis C virus) 与 HCC 的关联已获得较多血清学方面的支持依据<sup>[1,2]</sup>, 但是直接在细胞水平上检测 HCC 等肝病组织中 HCV 抗原的研究迄今报道甚少, 少数的有关免疫组化研究报道也因使用多克隆抗体及研究的标本量较少而可能受到非特异因素的干扰。本文使用单克隆抗体, LSAB法对包括 HCC 在内的 116 例各类肝病患者的癌组织或肝组织标本进行 HCV 抗原的免疫组化检测, 以期对 HCC 等肝病患者中 HCV 的感染状况以及 HCV 感染与 HCC 的关系作一细胞水平的探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 病例及标本

全部组织标本来自中山医科大学附属肿瘤医院腹外科, 1993 年 4 月~ 1994 年 2 月原发性肝癌住院患者的手术标本及新疆医学院附属第一医院病理科, 1986~ 1990 年存档肝活检石蜡标本。患者的临

床资料见表 1 根据病理检查、临床资料及实验室检查作出诊断。

#### 1.2 实验试剂

HCV NS3区单克隆抗体, 美国 Bionikes 公司产品, 中国预防医学科学院病毒学研究所提供; LSAB (标记链亲和素-生物素) 试剂盒购自 DAKO 公司; 抗-HBs 单克隆抗体购自同济医科大学临床免疫研究室。

#### 1.3 免疫组化检测方法

石蜡切片常规脱蜡入水, 0. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇溶液阻断 20 min, PBS 洗, 加 HCV NS3 单克隆抗体, 4℃ 过夜, 余步骤按 DAKO LSAB 试剂盒说明操作, DAB 显色。

阴性对照包括无关抗体 (抗-HBs) 或 PBS 替代第 1 抗体; 略去第 1 抗体孵育步骤; 正常肝组织对照。

### 2 结果

#### 2.1 各组肝病组织中 HCV 抗原的检出率

肝细胞癌 52 例, 检出 7 例 (13. 5%); 肝炎后肝

<sup>①</sup> 美国中华医学基金会 (CMB) 及国家自然科学基金资助课题; <sup>②</sup> 第一作者, 1961 年出生, 男, 博士, 主治医师; 现在暨南大学医学院附属医院感染科 (广州, 510632)

硬化 16 例中检出 2 例 (12.5%); 慢性肝炎 40 例中检出 4 例 (10%); 体质性黄疸及正常肝组织中未检出 HCV 抗原。阴性对照中, 以抗 -HBs 作为第 1 抗体

虽有一定检出率, 但与 HCV NS3 抗体所检出各例并无明显重叠, 其余各阴性对照均无阳性显示。

表 1 116 例肝病患者的临床资料

| 组别     | 例数 | 男女    | 年龄(岁)<br>( $\bar{x} \pm s$ ) | ALT(IU/L)<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|----|-------|------------------------------|----------------------------------|
| 肝细胞癌   | 52 | 41/11 | 46 $\pm$ 2                   | 126 $\pm$ 93                     |
| 肝炎后肝硬化 | 16 | 10/6  | 42 $\pm$ 6                   | 17 $\pm$ 68                      |
| 慢性肝炎   | 40 | 28/12 | 35 $\pm$ 9                   | 269 $\pm$ 51                     |
| 体质性黄疸  | 8  | 5/3   | 23 $\pm$ 1                   | 76 $\pm$ 45                      |

## 2.2 HCV 抗原在组织中的分布状况

HCV 抗原的表达可见于 HCC 癌细胞或癌周肝细胞的胞核或胞浆中, 7 例阳性中胞核型表达 5 例, 胞核和/或胞浆表达 2 例, 以胞核型表达更多见。其余各组肝病, 不同类型表达无显著差异。阳性细胞呈单个散在分布或少量聚集分布。HCV 抗原在癌组织中的检出率为 5.8% (3/52), 在癌周组织中的检出率为 12.5% (6/48), HCV 抗原在癌周组织中的检出率显著高于癌组织。

后, 对 HCV 的相容性降低。HCC 组及肝硬化组 HCV 抗原的检出率高于慢性肝炎、体质性黄疸、正常肝组织, 提示随肝病的加重, HCV 感染的影响也愈益明显。众所周知, HCV 作为一种非逆转录 RNA 病毒, 其蛋白合成及病毒装配只应在胞浆中完成, 因此, 胞核中 HCV 抗原的检出似乎与本身的增殖周期无关, 是否作为一种反式调节因子进入宿主细胞核中影响宿主细胞基因的调控、表达, 从而导致细胞癌变, 尚待进一步研究。

## 3 讨论

自从应用 ELISA 和 PCR 技术检测 HCV 抗体和 HCV RNA 以来, 已有较多报道认为 HCV 感染是 HCC 发生的一种重要危险因素<sup>[3,4]</sup>, 尤其在乙型肝炎病毒感染非流行区, 如日本及欧洲, HCV 感染与 HCC 的关系已受到高度重视, 即便在以乙型肝炎病毒感染为主的我国, HCV 与 HCC 的关联也得到一些初步的支持依据, 但是有关的研究几乎都集中在血清学调查方面。通过从细胞水平检测 HCV 抗原以阐明 HCV 感染与 HCC 的关系迄今甚少报道, 已有的少量报道也因使用直接从丙型肝炎患者血清获取的多克隆抗体而使实验结果在特异性方面有所局限<sup>[5]</sup>, 研究结果也颇不一致。我们使用 HCV NS3 单克隆抗体、LSAB 法检测到 HCC 癌及癌周肝组织中均有 HCV 抗原的表达, 支持 HCV 感染与 HCC 关联。HCC 癌周肝组织中 HCV 抗原的检出高于癌组织, 与 Ohkoshi 等所做 HCV RNA 检测结果相类似<sup>[6]</sup>, 这一现象给我们两方面的提示: HCV 可能主要作用于癌前病变, 在肝细胞癌发生的初始阶段起作用, 促使正常细胞恶性化; 一旦细胞恶变之

## 参 考 文 献

- 1 Caporaso N, Romano M, Marmo R, *et al.* Hepatitis C infection is an additive risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Hepatol*, 1991, 12: 367
- 2 Nalpas B, Driss F, Pol S, *et al.* Association between HCV and HBV infection in hepatocellular carcinoma and alcoholic liver disease. *J Hepatol*, 1991, 12: 70
- 3 Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *Recent Prog Hepatol*, 1992, 15(5): 948
- 4 周元平, 彭文伟, 姚集鲁. HCC 组织 HCV RNA 正链和负链的检测分析. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3): 14
- 5 师明霞, 朱世能, 陆世伦, 等. 人肝病组织中丙型肝炎病毒抗原的显示. *上海医科大学学报*, 1992, 19(2): 94
- 6 Ohkoshi S. Detection of hepatitis C virus RNA in sera and liver tissues of non-A, non-B hepatitis patients using the polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res*, 1990, 81(9): 862

(1996-03-19 收稿 1996-09-13 修回)

# IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF HCV INFECTION IN PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND OTHER LIVER DISEASES

Zhang Lifa Pen Wenwei Yao Jlu

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital,  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Using labelled streptavidin-biotin (LSAB) method with monoclonal antibody to NS3 region of HCV genome, we detected the expression of HCV antigen in the liver tissues of different liver diseases (HCC, 52 cases; cirrhosis, 16 cases; chronic hepatitis, 40 cases; constitutional jaundice, 8 cases) and 6 normal liver samples as negative control. The results showed that in the three groups of HCC, cirrhosis and chronic hepatitis, the positive rates of HCV antigen were respectively 13.5% (7/52), 12.5% (2/16), and 10% (4/40), while in the samples from patients with constitutional jaundice and normal liver samples, no HCV antigen was found. HCV antigen could be seen in the nuclei or/and cytoplasm of carcinoma cells and/or pericancerous hepatocytes. The results supported the view that HCV is associated with HCC and HCV infection enhances the development of liver diseases. In HCC, HCV antigen was more often seen in nuclei than in cytoplasm. The positive rate of HCV antigen in pericancerous tissues was higher than in cancerous tissues, and this result indicated that HCV affects the initiative period of HCC and induces the malignant phenotypic alteration of hepatocytes.

**Subject headings** hepatitis viruses, type C; carcinoma, hepatocellular; immunohistochemistry

## · 简 讯 ·

### 姚志彬教授再获殊荣——广东省第 4 届丁颖科技奖

姚志彬教授是中山医科大学一位年轻的博士生导师,继 1993 年被评为“中国首届中青年医学科技之星”、1996 年入选“国家跨世纪人才培养计划”、“千百十工程省级学科带头人”后,最近又被评为“广东省第 4 届丁颖科技奖”获奖者。

姚志彬教授现年 43 岁,主要从事脑衰老和老年性痴呆治疗的基础研究。先后承担了自然科学基金 4 项、博士点基金 1 项、卫生部基金 2 项、跨世纪人才基金 1 项、省青年基金 1 项、省“五个一”科教兴医工程重点项目 1 项。在脑衰老研究方面,提出衰老脑在发生退化的同时,存在相当的可塑性代偿,指出设法提高老年脑的可塑性是延缓脑衰老的重要途径;发现老年性记忆减退与突触的可塑性降低有密切关系;首次证实神经生长因子促进老年脑中胆碱系统损伤后的轴突抽芽和突触重构;发现某些中药对老年痴呆模型有较好的治疗作用。上述成果分别获得国家教委科技进步 2、3 等奖各 1 项,省医药卫生科技进步 2、3 等奖各 1 项,发表论文 70 多篇。获广东省优秀学术著作出版基金会推荐和资助,主编《脑研究前沿》,并参与编专著 7 部。现任中山医科大学解剖学教研室主任、中国解剖学会理事、全国神经解剖专业委员会委员、广东省解剖学会秘书长、广东省神经科学会理事,是美国神经科学会委员。多年来他立足本职,努力工作,勇于开拓,执着追求,在一个一个成绩、一个一个荣誉面前从不骄不躁,正如他最喜欢的人生格言“淡泊以明志,宁静以致远”。为中山医科大学再创辉煌、为祖国医疗卫生事业的发展,辛勤耕耘,努力奉献。他认为获取成功的秘诀是“不断地思考,踏实地工作”。他注意了基础研究面向临床,目前他主要从事老年性痴呆的基因治疗和中药治疗老年性痴呆的研究和开发。

(冯世容)