

# 人肝癌组织中黄曲霉毒素和肝炎病毒基因检测分析<sup>①</sup>

周元平<sup>1</sup>② 彭文伟<sup>1</sup> 姚集鲁<sup>1</sup> 何光耀<sup>2</sup> 倪尔葭<sup>3</sup> 胡萍春<sup>3</sup>

(1 中山医科大学附属第三医院传染科,广州,510630

2 中山医科大学基础学院 3 中国科学院广州化学研究所)

**提 要** 以肝细胞癌(HCC)患者手术切除标本为研究材料,采用高效液相色谱荧光法检测组织中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>),嵌套式多聚酶链反应技术检测组织中的 HBV DNA 和 HCV RNA。在 69.2%(18/26例)的 HCC 患者中检出了 3.65~89.06 ng 不等的 AFB<sub>1</sub>/g 肝组织,HBV DNA 和 HCV RNA 检出率分别为 90.5%(57/63例)和 12.7%(8/63例)。其中,AFB<sub>1</sub>和 HBV DNA 重叠检出率为 61.5%(16/26例),HBV DNA 和 HCV RNA 重叠检出率为 7.9%(5/63例),4例 HCC 患者重叠检出了 AFB<sub>1</sub>、HBV DNA 和 HCV RNA,同步检测对照组 5例,无 1例出现这种情况。结果表明,上述 3种因素均与人类肝癌密切相关,并且可能存在协同致癌效应。

**主题词** 肝肿瘤/遗传学;黄曲霉毒素/分析;乙型肝炎病毒/遗传学;丙型肝炎病毒/遗传学;基因,病毒

**中图分类号** R735.7; 512.6

肝脏是黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)致癌的主要靶器官,也是 AFB<sub>1</sub>的代谢和储存器官<sup>[1]</sup>;乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)均为嗜肝病毒,其主要复制部位在肝脏,肝脏也是这两种病毒引起一系列病理损害,直至诱导细胞转化,形成癌变的主要器官。既往肝细胞癌(HCC)的病因探索多集中在动物实验、生态学和血清学研究方面,本研究以人 HCC 癌组织和癌周肝组织为研究材料,分析组织中 AFB<sub>1</sub>和这两种病毒基因的存在状况,探讨它们在人类 HCC 发生中的病因作用以及可能的协同作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

收集 1992年 4月~1994年 12月在本校各附属医院接受手术治疗的广东籍患者,癌组

和癌周肝组织标本于手术时采集,液氮中贮存,每例另取癌、癌周肝组织各 1份石蜡包埋常规病理检查。符合 HCC 病理诊断标准的入选病例共 63例,其中男 59例,女 4例,平均年龄(47.2±9.1)岁。

以 HBV、HCV 血清学标记均阴性的肾移植供者的肝组织 3例,肝血管瘤手术病人的肝组织 2例作对照组,均为非广东籍。

### 1.2 实验方法

1.2.1 组织中 AFB<sub>1</sub>的检测 每份标本称取 2g 左右液氮冻存组织进行检测,采用高效液相色谱荧光法,按 Siraj 抽提、检测方法改良建立,同前文献[2]报道。

1.2.2 组织中 HBV DNA 和 HCV RNA 的检测 组织中 DNA 或 RNA 的提取分别按文献[3,4]方法进行,采用嵌套式多聚酶链反应(PCR)技术检测 HBV DNA,逆转录嵌套式 PCR 技术检测 HCV RNA<sup>[4]</sup>。对 HCV

① CMB 资助课题; ② 第一作者,1955年出生,博士,讲师

RNA 检测阳性者同时作负链 HCV RNA 检测<sup>[4]</sup>。

1.2.3 统计学处理方法 计数资料的比较用卡方检验,计量资料的比较用秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 AFB<sub>1</sub>的检出

对26例 HCC 患者手术切除组织中的 AFB<sub>1</sub>作了高效液相色谱荧光法定量分析,如表1所示。69.2%(18/26)的 HCC 患者检出了3.65~89.06 ng 不等的 AFB<sub>1</sub>/g 肝组织,对照组仅2例检出了微量 AFB<sub>1</sub>(1.98ng 和 2.67ng AFB<sub>1</sub>/g),经秩和检验,差别有统计学显著性意义( $P < 0.05$ )。有6例 HCC 同时检测了癌组织中的 AFB<sub>1</sub>,除1份检出38.6 ng/g 组织外,其余仅检出微量 AFB<sub>1</sub>或未检出。

### 2.2 HBV DNA 和 HCV RNA 的检出

表1 HCC 组和对照组组织中 AFB<sub>1</sub>含量分析

ngAFB <sub>1</sub> /g	HCC 组		对照组 <sup>1)</sup>
	组织	癌组织(n)	癌周组织(n) <sup>1)</sup> 肝组织(n)
0	1	8	3
~5	2	1	2
~10	2	3	0
~20	0	1	0
~40	1	4	0
~60	0	6	0
>60	0	3	0
合计	6	26	5

1)  $t = 39.5, P < 0.05$

采用嵌套式 PCR 技术对63例 HCC 患者癌组织及癌周组织中 HBV DNA 和 HCV RNA 进行扩增检测,结果见表2。统计分析时发现,同一病人能在癌组织中检出 HBV DNA 或 HCV RNA 者,癌周肝组织中均能检出,反之则不一定。8例 HCV RNA 阳性的 HCC 患者,其癌周肝组织和癌组织分别有6例和2例检出负链 HCV RNA。对照组5例肝组织,HBV DNA 和 HCV RNA 检测均为阴性。

表2 63例 HCC 双份组织中 HBV DNA 和 HCV RNA 检出

	癌周肝组织		癌组织	
	例数(%)	HCC RNA 阳性数(%)	例数(%)	HCV RNA 阳性数(%)
HBV DNA 阳性	57(90.5) <sup>1)</sup>	5(7.9)	35(55.6) <sup>1)</sup>	2(3.2)
HBV DNA 阴性	6(9.5)	3(4.8)	28(44.4)	2(3.2)
合计	63(100)	8(12.7)	63(100)	4(6.3)

1)  $\chi^2 = 19.50 P < 0.001$

### 2.3 AFB<sub>1</sub>检出与 HBV DNA、HCV RNA 检出的关系

组织中 AFB<sub>1</sub>检出与 HBV DNA 检出的关系见表3。HBV DNA 与 AFB<sub>1</sub>重叠检出为61.5%(16/26)。在这26例 HCC 患者中有4例检测出组织中 HCV RNA,引人注目的是这4例 HCC 患者均同时检出 HBV DNA 和 AFB<sub>1</sub>,见表4。

表3 HCC 患者组织中 AFB<sub>1</sub>检出与 HBV DNA 检出的关系 n(%)

AFB <sub>1</sub> 检出情况	HBV DNA 检出情况		合计
	阳性	阴性	
检出	16(61.5)	2(8.3)	18(69.2)
未检出	7(26.9)	1(4.2)	8(30.8)
合计	23(88.5)	3(12.5)	26(100)

表4 癌周肝组织中3因子三重检出的 HCC 患者情况分析

病例	性别	年龄 (岁)	居住地	HCV RNA		HBV DNA	AFB <sub>1</sub> ngAFB <sub>1</sub> /g 组织
				正链	负链		
1	男	41	广东东莞	+	+	+	82.88
2	男	46	广东东莞	+	+	+	73.30
3	男	42	广东封开	+	+	+	30.37
4	男	43	广东潮州	+	+	+	6.14

### 3 讨 论

HCC 高发于我国东南沿海,居广东省癌症死亡率的首位<sup>[5]</sup>。HCC 的地理分布特点恰与黄曲霉毒素污染区相一致<sup>[6]</sup>。人们早就发现,在肝癌高发区,食品中 AFB<sub>1</sub> 的污染程度与肝癌死亡率相关;AFB<sub>1</sub> 可在多种动物中诱发肝癌。由于缺乏直接证据,AFB<sub>1</sub> 与人类肝癌的关系一直存在着争议<sup>[6,7]</sup>。作者以丙酮、氯仿为主要提取溶剂,以高效液相色谱荧光法检测广东 26 例 HCC 患者肝组织中的 AFB<sub>1</sub>,发现 18 例(69.2%)存在着不等量的 AFB<sub>1</sub>,显著高于对照组 AFB<sub>1</sub> 检出率,从而提示动物实验中证实的 AFB<sub>1</sub> 致肝癌作用,在人类也可能存在。

既往以 HBsAg 和抗 HCV 为标记,进行了较多的流行病学调查,提示我国 HCC 的发生与 HBV、HCV 感染相关<sup>[6]</sup>。HBV DNA、HCV RNA 是这两种病毒感染最直接和特异的指标。作者采用嵌套式 PCR 技术进行检测,发现 HCC 患者癌周肝组织中 HBV DNA 检出率高达 90.5%,HCV RNA 检出率为 12.7%,高于癌组织中 HBV DNA 检出率 55.6%,和 HCV RNA 检出率 6.3%。6 份癌周肝组织和 2 份癌组织中检出了 HCV 复制型核酸-负链 RNA。这些结果从组织中病毒基因水平上证实我国 HCC 的发生主要与 HBV 感染相关,HCV 感染亦为重要因素。

HCC 的发生是多因素、多步骤、多基因突变的结果,在已明确的致肝癌因素中,AFB<sub>1</sub>、HBV 和 HCV 位居前 3 位<sup>[6]</sup>,它们间的协同致癌作用是个值得注意的问题。Yan 等<sup>[8]</sup>以树鼯为动物模型,研究 HBV 与 AFB<sub>1</sub>

的协同致癌作用,表明 HBV 阳性、AFB<sub>1</sub> 阴性组 11.11% 出现肝癌,HBV 阴性、AFB<sub>1</sub> 阳性组 12.5% 出现肝癌,而双阳性组则 52.9% 出现肝癌。本研究中我们同步检测组织中的两种病毒核酸,在 63 例 HCC 患者肝组织中发现,HBV DNA、HCV RNA 重叠阳性率为 7.9%,占 HCV RNA 阳性 HCC 病例的 62.5%,而同步检测了 3 种损肝因素的 26 例 HCC,15.4% 同时检出了 HBV DNA、HCV RNA 和 AFB<sub>1</sub>。这些结果均提示,AFB<sub>1</sub>、HBV 和 HCV 可能存在着协同致癌作用。另一方面说明,一种损肝因素造成的肝损伤,可能削弱肝细胞的抵抗力,使其他损肝因子易于进入,或肝细胞对致病因子的清除能力减弱,造成数种致癌因子并存,多因素、多位点地启动或促进细胞转化,终致 HCC 的发生。3 种因子检测均为阳性的 4 例 HCC 患者,其平均年龄为(43±2.2)岁,低于本研究 HCC 病例组的平均年龄,似支持这 3 种致癌因素存在协同致癌作用的观点。

### 参 考 文 献

- 1 Groopman JD, Busby WF, Wogan GN. Nuclear distribution of aflatoxin B<sub>1</sub> and its interaction with histone in rat liver *in vivo*. *Cancer Res*, 1980,40:4343
- 2 周元平,何光耀,彭文伟,等. 高效液相色谱检测人肝组织中黄曲霉毒素. 色谱,1995,13(6):453
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 9:14
- 4 Peng WW, Zhou YP. Hepatitis C and liver cancer. In: *The impact of biotechnology on diagno-*

- sis, prevention and treatment of hepatitis B and C. Shanghai SMU Press:1993,40~43
- 5 Li JY, Liu BQ, Li GY, *et al.* Atlas of cancer mortality in the People's Republic of China. Shanghai; China Map Press, 1979. 96~99
- 6 汤钊猷. 原发性肝癌. 见:汤钊猷主编. 现代肿瘤学. 上海:上海医科大学出版社, 1993. 544~585
- 7 Campbell TC, Chen J, Liu C, *et al.* Nonassociation of aflatoxin with primary liver cancer in a cross-sectional ecological survey in the People's Republic of China. *Cancer Res*, 1990, 50:6882
- 8 Yan RQ, Su JJ, Huang DR, *et al.* Experimental primary liver cancer in tree shrews exposed to human hepatitis B virus and aflatoxin B<sub>1</sub>. *Chin J Cancer Res*, 1989, 1:1
- (1995-07-14收稿 1995-11-28修回)

## ANALYSIS OF AFLATOXIN B<sub>1</sub> AND GENOMES OF HEPATITIS VIRUSES IN LIVER TISSUES OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Zhou Yuanping<sup>1</sup> Peng Wenwei<sup>1</sup> Yao Jilu<sup>1</sup> He Guangyao<sup>2</sup> Ni Erjia<sup>3</sup> Hu Pingchun<sup>3</sup>

(1 Department of Infectious Diseases, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630; 2 Basic Medical School, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, 3 Guangzhou Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences)

Analysis was made by using human liver tissues from hepatectomy specimens of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) to detect aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) by high performance liquid chromatography (HPLC), and HBV DNA by nested PCR technique, and HCV RNA by reverse transcription nested PCR technique. AFB<sub>1</sub> was detected in 18 of 26 (69.2%) patients with HCC, ranging from 3.65~89.06ng/g liver tissue. The positive rates of HBV DNA and HCV RNA were 90.5% (57/63) and 12.7% (8/63) respectively. Among these patients, AFB<sub>1</sub> and HBV DNA were simultaneously detected in 61.5% (16/26), and HCV RNA and HBV DNA in 7.9% (5/63). Furthermore, AFB<sub>1</sub>, HBV DNA and HCV RNA were detected simultaneously in four patients with HCC. Whereas all of subjects of control group were negative for these three factors. These results suggested that AFB<sub>1</sub>, HBV and HCV were associated closely with human HCC, and these three factors might play a synergistic role in the oncogenesis of HCC.

**Subject headings** liver neoplasms/genetics; aflatoxin/analysis; hepatitis B virus/genetics; hepatitis C virus/genetics; gene, viral

更正:本刊1995年第3期 p58表1注释应为:1)开口运动男女比  $P < 0.05$ , 余各运动  $P > 0.05$