

HCC 组织中 HCV RNA 正链和负链的检测分析^①周元平^② 彭文伟 姚集鲁 吕 凌

(中山医科大学病毒性肝炎研究室,广州,510630)

关键词 丙型肝炎病毒; 基因; 肝细胞癌**中图分类号** R512.63;735.7

利用高度敏感的逆转录套式 PCR 技术和特异性引物的限制作用,本研究室从肝细胞癌(HCC)癌组织和癌周肝组织中检测出丙型肝炎病毒(HCV)基因的正链和负链,现报道如下:

1 材料和方法

51 例 HCC(均经术后病理检查证实)术前取血,分离血浆除检测抗 HCV 外,分装后冻存于 -70℃。手术切除标本取癌组织和癌周肝组织各一份立即置液氮中冻存。组织和血浆中 RNA 的提取采用酸性硫酸胍-酚-仿一步法^[1]。所用套式引物位于 HCV 高度保守的 5'端非编码区,nt 位置为:外引物 1,7-26;外引物 2,328-309R;内引物 3,51-70;内引物 4,248-229R。HCV RNA 的逆转录,正链 cDNA 的合成,用外引物 2 限制;负链 cDNA 的合成用外引物 1 限制,cDNA 合成后 100℃水浴中 30min 以灭活逆转录酶,尔后备式 PCR 扩增过程及结果判读同本室前文报道^[2]。

2 结果

51 例 HCC 的 102 份组织中,有 6 例(11.8%)检测出 HCV RNA,其正、负链在各种标本中的检出情况见附表。5 例对照肝组织(肾移植供者和胆石症患者)正、负链检测全部阴性。

附表 6 例组织中 HCV RNA 阳性 HCC 患者
各种标本中正、负链检出情况

病例号	HCV RNA 正链			HCV RNA 负链		
	血浆	癌	癌外肝	血浆	癌	癌外肝
7	+	+	+	-	-	+
65	-	-	+	-	-	+
151	+	+	+	-	+	+
155	+	-	+	-	-	+
162	+	-	+	-	-	-
231	+	+	+	-	+	+

3 讨论

HCV 为单股正链 RNA 病毒,其复制无逆转录过程而以负链 RNA 为其复制模板,这种负链 RNA 不释放到细胞外。故负链 RNA 的检出可确切地反映 HCV 在某种组织细胞内存在并复制,而非来自血液的污染^[3,4]。采用外引物 1 作为逆转录引物,由于 HCV RNA 正链无其互补序列,所合成的 cDNA 具有负链特异性,然后完全灭活逆转录酶,再作套式 PCR 扩增,阳性结果即可反映负链的存在。我们用此技术在 5 例 HCC 癌外肝组织、2 例癌组织中检测到 HCV RNA 负链,说明 HCV 确实在 HCC 癌组织和癌周肝组织中存在并复制。这一结果为 HCV 感染与 HCC 关系的研究提供了进一步的病因证据。

参 考 文 献

- 1 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987,162:156
- 2 吕 凌,姚集鲁,彭文伟,等. 检测 HCV RNA 的 RT-PCR 技术改进与应用. *中山医科大学学报*, 1993,14(3):226
- 3 Houghton M, Weiner A, Han J, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses; Implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991,14(2):381
- 4 Takehara T. Detection of the minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction. Implications for hepatitis C virus replication in infected tissue. *Hepatology* 1992,15(3):387

(1994-04-12 收稿 1994-04-28 修回)

① 本课题由 CMB 资助

② 第一作者,36岁,男,讲师,博士研究生