

# PCR 技术用于检测肝细胞癌石蜡包埋肝组织中的 HBV DNA\*

陈明\*\* 吕凌 姚集鲁 彭文伟

( 传染病学教研室 )

**提 要** 用多聚酶链反应 (PCR) 技术检测了 16 例肝细胞性肝癌 (HCC) 患者癌灶和癌旁双份组织石蜡包埋标本中的乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBV-DNA)。以 C 基因引物扩增 HBV-DNA, 32 份标本中检出率 71.87%。以新鲜冷冻肝标本作对照检出率 81.25%, 二者相比无显著性差别 ( $\chi^2 = 0.57$ ,  $P > 0.05$ )。以质粒提取 HBV-DNA 作灵敏度测定, PCR-EB 可达 10fg, PCR-SBH 可达 1 ag。应用非放射性的地高辛素标记探针作杂交灵敏度达  $^{32}\text{P}$  标记探针的水平。

**关键词** 多聚酶链反应; 乙型肝炎病毒; 脱氧核糖核酸; 肝细胞性肝癌; 石蜡标本

**中图分类号** Q75; R373.2; R735.7

我国是乙型肝炎病毒 (HBV) 感染和肝细胞性肝癌 (HCC) 的高发区。HBV-DNA 在肝细胞中整合对 HCC 的发病起着重要作用。近年来的研究集中于用分子生物学方法研究二者之间的关系<sup>[1-4]</sup>。石蜡包埋标本由于制作处理常导致组织所含 DNA 降解而不适用于一般的分子生物学方法进行研究。多聚酶链反应 (PCR) 技术的灵敏度很高, 即使是部分降解的 DNA 只要保留了待检测的一段目的基因序列就可以进行扩增, 产物尚可供多种方法作进一步研究分析。本文作者拟用 PCR 方法检测 HCC 患者新鲜冷冻和石蜡包埋肝标本中 HBV-DNA, 为利用石蜡组织块研究 HBV 与 HCC 之关系提供又一种分子生物学研究方法。

## 材 料 和 方 法

### 肝标本来源

16 例 HCC 患者均为中山医科大学附属肿瘤医院手术病人。诊断经病理证实。手术切除癌灶和癌旁组织, 去除血液分别置液氮冻存。

\* 本课题由美国中华医学基金会 (CMB) 资助。

\*\* 作者为国内访问学者, 现在徐州医学院附院传染科, 第 3、4 作者为导师

其 32 份标本, 每份取出一半作常规福尔马林固定, 石蜡包埋。

### 肝组织 DNA 抽提

冰冻肝标本在液氮中研磨, 以蛋白酶 K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 消化、酚/氯仿抽提、乙醇沉淀、真空干燥。-20 $^{\circ}\text{C}$  备用。石蜡包埋肝组织切 10 $\mu\text{m}$  厚 15 片, 1ml 二甲苯摇匀以去除残留石蜡, 用无水乙醇洗去二甲苯, 双蒸水 0.4ml 悬起组织碎片, 按冰冻标本方法消化抽提 DNA<sup>[5,6]</sup>。

### 引物选用

HBV-DNA C 基因区引物 C<sub>1</sub> 1730 5'-CTG GGAGGAGTIGGGGGAGGA G ATT -3', C<sub>2</sub> 2394R 5'-GGCGAGGGAGTTCTTCTTCTAGG GG-3', 扩增产物 665 bp。内对照引物选用人 DMD 基因 XP<sub>21</sub> 序列, P<sub>1</sub>F-GAAGATCTAGAC AGTGGATACATAACAAATGCATG, P<sub>2</sub>R-T TCTCCGAAGGTAATTGCCTCCCAGATCTGA GTCC, 扩增产物 536 bp。上述引物均由中国科学院合成。

### PCR 扩增

每 50 $\mu\text{l}$  反应体积中加引物 50 pmol, dNTP 各 0.2 mmol/L, DNA 多聚酶 1.5 u (复旦大学遗传所), 煮沸 5 min 变性的冻肝组织

DNA 0.1~1 $\mu$ g 或相当于3片石蜡切片的DNA, 盖 50  $\mu$ l 石蜡油。于热循环仪中变温循环, 先 93 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 再按 93 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min 变温 35 循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

### 产物分析

琼脂糖电泳溴化乙锭染色 (PCR-EB): 1% 琼脂糖含溴化乙锭 0.5mg/L, PCR 产物 10 $\mu$ l 加样, 电泳。以分子量标准 (BRL) 参照, 紫外线透射仪上观察荧光区带。Southern 印迹杂交 (PCR-SBH): 电泳后之凝胶以碱性处理, 中和。按 负极 $\rightarrow$ 滤纸 $\rightarrow$ 凝胶 $\rightarrow$ zeta-probe 尼龙膜 $\rightarrow$ 滤纸 $\rightarrow$ 正极方向组成转移三明治, 置电泳印迹转移装置中, 4 $^{\circ}$ C, 2.6V/cm, 5h<sup>[1]</sup>。取出尼龙膜碱性变性, 中和至 pH7.5, 80 $^{\circ}$ C, 1h 烘干。以地高辛素标记的 HBV-DNA 全基因探针按试剂盒 (上海医科大学) 的说明杂交。<sup>32</sup>P 标记探针: PCR 扩增 HBV-DNA C 基因区片段 (1860至1288, 位于 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> 扩增序列的内部) 429 bp, 纯化后以缺口平 移法制备 <sup>32</sup>P 标记探针, 按试剂盒 (BRL) 说明标记。按文献预杂交、杂交、洗膜、烘干后贴于 X 线胶片上, 置有增感屏的暗盒内, -40 $^{\circ}$ C 放射自显影 12 h<sup>[6]</sup>。

### 防止污染的操作规程

肝标本从取样, 冻存到固定、包埋均按无菌操作要求进行, 防止标本间污染。PCR 实验中 DNA 抽提、扩增、产物分析分室进行。每次实验前以紫外线消毒房间和台面。试剂无菌分装一次性使用。采用一次性吸头和塑料离心管。每次开试管盖之前先离心将液体甩至管底以防液体溅出。每批试验均设阴性对照。

## 结 果

### PCR 方法的灵敏度

以 pAM<sub>0</sub> 质粒提取 HBV-DNA 作模板, 以 0.1pg 开始渐次 10 倍稀释至 1 ag, 以 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> 作引物扩增。PCR-EB 可检出 10 fg, PCR-SBH 可检出 1 ag (图 1)。在质粒 HBV DNA 中加入 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> 扩增阴性的肝组织 DNA 0.1  $\mu$ g

再扩增, PCR-EB 可检出 10 fg, PCR-SBH 可检出 100 ag, 灵敏度有所下降。以地高辛素和以 <sup>32</sup>P 标记探针杂交灵敏度相同。

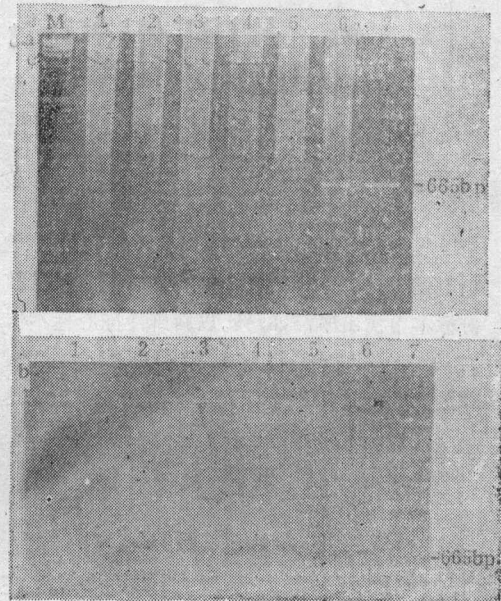


图 1 PCR 扩增质粒 HBV-DNA 灵敏度试验  
a. PCR-EB; 2~7 依次加入 HBV-DNA 10<sup>-6</sup>~10<sup>-1</sup>pg 1 用水作模板 M: 分子量标准;  
b. PCR-SBH; Southern 转移后以地高辛素标记探针杂交结果

### PCR 产物特异性

以 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> 引物分别扩增肝组织 DNA, 产物的电泳区带分别与预期的分子量大小相符。<sup>32</sup>P 和地高辛素标记的探针均与 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> 扩增产物杂交显阳性结果, P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> 产物显阴性结果 (图 1 图 2)。

16 例 HCC 患者的癌灶和癌旁肝组织的石蜡包埋和冰冻肝标本各 32 份均以 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> 扩增, 冰冻标本中阳性 81.25%, 石蜡标本中阳性 71.87%, 配对卡方检验二者之间无显著性差异 (表 1)。

石蜡包埋标本癌灶中 HBV DNA 检出 75% (12/16), 癌旁组织检出 68.75% (11/16)。其中双份标本均阳性 9 例, 均阴性 2 例。仅癌灶中阳性 3 例, 仅癌旁组织中阳性 2 例。共 14 例 HCC 患者肝组织中以 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> 引物

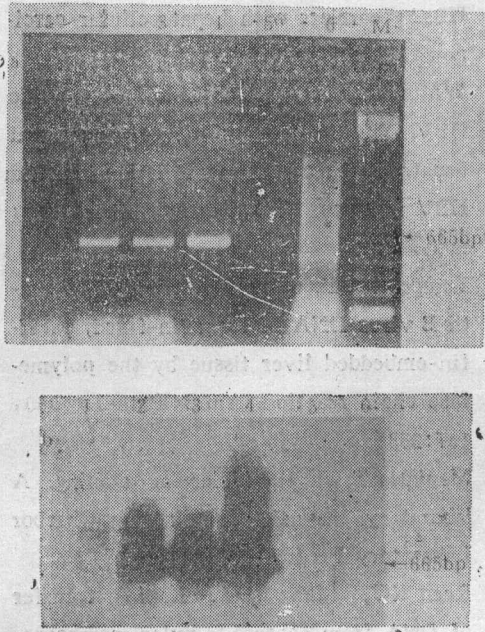


图2 石蜡包埋肝标本C基因引物扩增结果  
M: 123bp 的 DNA 分子量标准 (BRL)

a. 1~3 为 C 引物扩增产物的区带, PCR-EB3 无荧光区带, 4 为阳性对照, 5 为阴性对照, 6 为内对照引物扩增区带, M 为分子量标准; b. 以 <sup>32</sup>P 标记 C 基因区探针仅 1~4 显杂交带, 余阴性

表1 两种处理标本中HBV-DNA

检出结果比较

		石蜡包埋		合计
		+	-	
冰	+	21	5	26
冻	-	2	4	6
合计		23	9	31

$\chi^2 = 0.57 \quad P > 0.05$

扩增检出 HBV DNA。阴性的标本均以 P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> 扩增, 电泳有 536 bp 区带, 排除了假阴性。

### 讨 论

石蜡包埋标本中的 DNA 在标本制作过程中会降解, 一般不适于作分子生物学方法研究的材料。然而石蜡标本往往具有较完整的病理资料, 是用作回顾性研究的丰富的标本库, Imprain 等率先应用 PCR 方法检测了石蜡标

本中的人多瘤病毒<sup>[9]</sup>。此后在 DNA 模板提取纯化方法上有改进, 用于石蜡标本中 HIV 和 CMV 等病毒的研究。石蜡块中往往含有 DNA 多聚酶的抑制物可导致 PCR 扩增失败, 去除的方法有煮沸、过 sephadex G 50 柱等。本法在溶解石蜡时二甲苯的用量较多以尽量去除残留石蜡。15 片病理片中的组织碎片以 400 μl 双蒸水悬浮可得到充分地消化以除去蛋白。扩增之前煮沸 5 min 使 DNA 充分变性。这些措施均保证了 PCR 扩增得以成功。本文研究用 HBV DNA C 基因引物扩增检测了 32 份组织的新鲜冷冻和石蜡包埋标本中的 HBV-DNA, 结果表明这二种不同处理的标本中检出率之差别无显著性意义 ( $\chi^2 = 0.57, P > 0.05$ )。因此, 应用 PCR 方法可利用石蜡包埋标本研究 HCC 患者肝中的 HBV-DNA。

来自不同地区的报告 HCC 患者肝内 HBV-DNA 的检出率悬殊较大, 这种差别与当地 HBV 感染程度有关, 与检测时使用的方法不同也有关系。本组资料中在扩增质粒 HBV-DNA 时加入约相当于  $2 \times 10^4$  肝细胞的组织 DNA<sup>[10]</sup>, 灵敏度下降, PCR-SBH 检测时下降 100 倍, 提示在待测 DNA 含量很少时, 其他 DNA 会产生干扰。本组资料以 PCR-EB 可检出 500~1000 个 HBV 基因组/每 1000 个肝细胞, PCR-SBH 约可检出 1 个 HBV 基因组/每 1000 个肝细胞。有作者曾在血清学转换为抗-HBe 的患者肝组织中检测 HBV-DNA, 估计每个肝细胞内有 2 至 60 个拷贝, 并认为每个肝细胞内 HBV-DNA 含量超出 1 拷贝才会出现临床症状。而本文检测的灵敏度远远高于此水平, 提示 PCR 方法检测肝组织内的 HBV-DNA 灵敏度极高可用于亚临床型的 HBV 感染者的监测。

本文研究以 PCR-SBH 检测 HBV DNA 较 PCR-EB 的灵敏度提高  $10^4$  倍。同时采用了非放射性标记探针, 地高辛素标记 HBV DNA 探针作杂交灵敏度达 <sup>32</sup>P 标记探针的水平, 并与文献报告相仿<sup>[10]</sup>。地高辛素标记探针稳定, 保存有效期长, 无放射性污染, 无需防护设备。以上优点均有助于解决 PCR 方法中

试剂标准化和产物特异性的鉴定问题,有助于推进 PCR 方法由实验研究转向临床诊断的应用。

本组 16 例 HCC 患者血清中无 HBeAg, 而肝组织中用 C 引物扩增 HBV DNA 检出率为 71.87%, 提示 HBV DNA 的 C 基因片段在肝内存在, 而 HBeAg 的表达受阻。Lampertico 等对比 PCR 方法以 C 基因扩增时 HBV DNA 检出率和免疫组化时 HBeAg 的检出率之间无相关性<sup>[5]</sup>, 亦提示 C 基因存在并不意味着有表达。肝细胞中检出的 HBV DNA 会发生前 C 区的突变, 而使病毒的晚期复制中止, Hsu 等发现肝癌的转移灶中这种复制中止的 HBV-DNA 更多<sup>[1]</sup>。整合了 HBV-DNA 而又无 HBeAg 表达的肝细胞逃避了宿主的免疫系统的监视, 可能发生选择性克隆增生, 进一步恶变则可能发生 HCC。

#### 参 考 文 献

1. Hsu HC, et al. Clonality and clonal evolution of hepatocellular carcinoma with multiple nodules. *Hepatology* 1991;13(5):923
2. Lai MY, et al. Status of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma: a study based on paired tumor and nontumor liver tissues. *J Med Virol* 1988;25(3):249
3. Raimondo G, et al. Interrupted replication of hepatitis B virus in liver tissue of HBsAg carriers with hepatocellular carcinoma. *Virology* 1988;166(1):103
4. White YS, et al. Frequency of hepatic HBV DNA in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma: Relation to serum HBV markers. *Br J Cancer* 1990;61(6):909
5. Lampertico P, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1990;137:253
6. Maniatis T, et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring harbor Laboratory Press, 1982;382:389
7. Reed KC, Mann DA. Rapid transfer of DNA from agarose to nylon membrane. *Nucleic Acids Res* 1985;13:7207
8. Kwok, S Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339(18):237
9. Imprim CC, et al. *Biochem Biophys Res Commur* 1987;142(3):710
10. Shindo M, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in paraffin-embedded liver tissues in chronic hepatitis B or non A non B hepatitis using the polymerase chain reaction. *Hepatology* 1991;13:167

(1992-07-14收稿 1993-03-04修回)

# DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS DNA IN PARAFFIN-EMBEDDED LIVER TISSUES FROM HEPATOCELLULAR CARCINOMAS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Chen Ming Lu Ling Yao Jilu Peng Wenwei

( Department of Infectious Diseases )

PCR technique was used to detect HBV DNA in paraffin-embedded liver tissues to study the prevalence of HBV-DNA in tumorous and nearby nontumorous liver tissues from 16 hepatocellular carcinoma (HCC) patients. The positive rates in amplification of HBV DNA by C regions primers in paraffin-embedded samples and freshly frozen samples were 71.8% and 81.25% respectively ( $\chi^2 = 0.57, P > 0.05$ ). The detection limit with agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining (PCR-EB) was 10 fg, and with Southern blot hybridization was 1ag. The identification of postPCR amplification products using non-radioactive digoxigenin labelled probes for hybridization gave higher sensitivity and reached the same detecting level as  $^{32}P$  labelled probes.

**Key words:** polymerase chain reaction; hepatitis B virus; deoxyribonucleic acid; hepatocellular carcinoma; paraffin-embedded tissue



## 小儿股骨头无菌性坏死的发病机理研究

课题负责 刘尚礼 何天骥

( 孙逸仙纪念医院骨外科 )

小儿股骨头无菌性坏死 (legg-perthse disease 简称 LPD) 是并不少见的小儿致残性疾病。长期以来被认为是单纯动脉缺血所致的股骨头坏死。作者对小儿股骨头无菌性坏死的发病机理进行了研究, 论证了股骨头颈静脉回流障碍与骨内压增高是 LPD 发病机理的关键。这一新理论否定了单纯动脉缺血性坏死的传统观点; 在国内外首次创立了  $^{99m}Tc$ -MDP 动态骨显象对人体双侧股骨头血供的半定量测定; 在国内外首次成功建立了股骨头颈静脉回流障碍与骨内压增高的幼狗股骨头坏死模型, 并应用尸体解剖与骨髓造影相结合的方法, 研究了正常人体髋关节静脉的分布与正常回流路线; 还研制了带电脑的骨内压测定仪。该研究成果获 1992 年国家教委科技进步一等奖。

( 冯世容 )