DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1990.0055

原发型肝癌的HBV感染及肝内的HBVDNA*

吕　凌　彭文伟　何树初　谢彦博

（附属第三医院传染病科）

提　要　应用^{32}P标记的3.2kb克隆HBVDNA探针对36例原发型肝癌患者的血清和肝组织作HBV DNA斑点杂交，结果：血清、肝癌组织、癌近邻肝组织和癌远邻肝组织的阳性率分别为56%、91%88%和80%，皆高于国内外一些同类研究，说明其HBV感染率比一般认为的还要常见，尽管肝内良恶组织的HBV DNA阳性率未见显著差别。此外，尚对HBV 6项血清标记作了检测，结果HBsAg和PHSA·Re的阳性率均较高，分别为83%和75%，说明多数病例的HBV感染仍然处于病毒活动复制阶段。由于血清HBsAb阳性者，肝内HBV DNA全阳性，提示HCC阶段的“保护性抗体”并不能清除病毒感染。

关键词　原发型肝癌　乙肝病毒脱氧核糖核酸　斑点杂交　HBsAg　PHSA·Re

许多证据表明，乙型肝炎病毒(HBV)感染与原发型肝癌(HCC)有关。中国作为两者的高发区，这种相关更为密切[1]。以往国内对此大多进行血清学调查而缺乏可靠的分子生物学研究。为此，作者应用DNA杂交方法对36例HCC患者的血清和肝内组织进行HBVDNA检测，辅以HBV 6项血清标记测定，试图对原发型肝癌的HBV感染特点作一初步探讨。

材料与方法

研究对象　收集1986年5月至1986年12月在广州4所医院（中山一院、中山二院、肿瘤医院、华侨医院）外科手术的36例HCC病人的血清及肝组织标本。病人平均年龄46.6±9.8岁，男女比为6.2/1。每例无菌取血清2份及肝内组织1～3处，后者包括：①肝癌组织；②癌近邻（3cm内）肝组织；③癌远邻（4cm外）肝组织。组织去血污后剪碎纱布包裹立即液氮冻存。

实验方法

1．血清HBV标记检测　HBsAg、HBsAb PHSA·Re为RIA法，HBcAb、HBeAg、HBeAb为EISA法。

2．HBV DNA探针制备　自EcoR I酶切的重组质粒AM6（Dr. J Gerin赠予）中纯化3.2kb HBV DNA进行缺口翻译[2]。反应液含HBVDNA，dATP、dTTP、dGTP (BRL)，5′-(α-^{32}P)-dCTP(Amersham)，以及DNA聚合酶I/DNA酶I (BRL)。15℃孵育90分钟，过φ1×11cm G-50 Sephadex柱。收集液探针比放1.0×10^{8}cpm/μg，检测HBV DNA敏感性为0.5pg。

3．组织DNA提取　组织在液氮中压碎后用100μg/ml蛋白K消化、酚提、透析，再加100μg/ml胰RNA酶消化、酚提和透析。经分光光度计测定DNA浓度，置4℃备用[2]。

4．血清及组织DNA斑点杂交　40μl血清或20μg变性组织DNA抽滤于硝酸纤维膜上(S&S)，按Zhou-YZ所述方法进行杂交和放射自显影[3]。

实验结果

HBV血清标记　36例HCC，HBsAg阳性30例，即携带率83%，HBsAg阴性但HBsAb阳性4例，即既往HBV感染率11%。两者共计34例，有HBV感染证据者94%。HBcAb、

* 博士研究生论文之一部分

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

PHSA·Re 和 HBeAg 阳性均限于 HBsAg阳性者，前两者各 27 例，后者 3 例。HBeAb 阳性 5 例，4 例属 HBsAg 阳性、1 例属 HBsAb 阳性。上结果简述于表 1 。

表 1　36例HCC之HBV血清标记阳性率

HBV 标记	阳性例数	阳性率(%)
HBsAg	30	83
HBsAb	4	11
HBeAg	3	8
HBeAb	5	14
HBcAb	27	75
PHSA·Re	27	75
一个以上 HBV 标记	34	94

血清 HBV DNA　36例 HCC血清全部受

组织 HBV DNA　32例肝癌组织受测，阳性29例，阳性率91%。阳性中除 4 例为 HBsAg 阴性、HBsAb阳性病人（包括血清HBV DNA 阳性和阴性各 2 例）外，其余都是 HBsAg 阳性病人。同样可见 HBsAb 阳性者有HBV感染存在。33 例肝癌近邻肝组织受测，阳性 29 例，阳性率88%。20例肝癌远邻肝组织受测，阳性16例，阳性率80%。同一病例，如两种或三种组织受测，阴阳性结果基本一致。结果见表 2 。

表 2　HCC 患者血清与组织 HBVDNA 阳性率

HBVDNA	受测例数	阳性例数	阳性率(%)
血　清	36	20	56
肝癌组织	32	29	91
癌近邻肝组织	33	29	88
癌远邻肝组织	20	16	80

讨　论

HBV血清标记　流行病学资料表明HBsAg阳性率与 HCC 发病率正相关，高发区 HCC 患者 HBsAg 携带率为50～80%。如 Prince的测，阳性20例，阳性率56%。阳性中除 2 例是血清 HBsAg 阴性、HBsAb 阳性病人外，其余都是血清 HBsAg 阳性病人。可见 HBsAb 阳性者亦可有 HBV 感染存在。结果见表 2 。结果441例非洲患者63%、801例亚洲患者47%为 HBsAg 阳性[4]。本文结果阳性率为83%，高于上述结果，这是本文 HCC 的一个特点。Shafritz 曾发现100% 的 HCC 患者 HBV 血清标记阳性，但本文为94%阳性，提示另 6 % 的患者可能与 HBV 无关[2]。血清 HBeAg 和 PHSA·Re 是HBV 复制和传染性标记，后者更敏感。一般 HCC 病人 HBeAg 30～40% 阳性，本文结果低于此数，但 PHSA·Re 阳性达75%，似符合 HCC 患者常有 HBV 活动复制的观点[1]。这部份人作为传染源有一定的流行病学意义。

血清HBV DNA　一般HCC 病人的血清 HBV DNA阳性率约 16～23%[5,6]，我们前文为48%[7]，本文为56%，均高于上述报道，但低于前述 PHSA·Re 结果，这是本文 HCC 的另一特点。HCC 虽较 ASC 易呈血清HBV DNA 阳性以示病毒活动增殖，但由于属 HBV 感染的长期慢性（平均30年）阶段，病毒释至血清的 DNA 滴度会逐年下降终及低不可测，故致其阳性率不高[1]。

组织 HBV DNA　组织HBV DNA 是目前最敏感的 HBV标记。HBV 感染晚后阶段的 HCC，血清HBV 标记和 HBV DNA 可能已转阴，但肝内HBV DNA 则会持续存在[1]。综合一些研究来看，HCC 患者肝内 HBV DNA 阳性率约50～70%[3,8]，甚至一些全部 HBV血清标记皆阴性的 HCC 病例，阳性率亦可高达 75%[9]。本文结果为80～91%，高于上述报道，这是本文 HCC 的第三个特点，说明与 HBV 的关系比一般认为还要密切。但是本文肝内 HBV DNA阳性者血清 HBV 标记亦阳性，这又与上述报道有所不同，虽然少数病例其血清标记仅表现为 HBsAb。此外，本文肝癌组织与癌外肝组织的 HBV DNA 阳性率并无明显差别（$P>0.05$），说明肝内 HBV 的感

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

染程度大致相同。

HBsAb 与HBV DNA HBsAb 的出现表示病人可能已获对 HBV 的免疫力。但本文结果与此不符。我们发现 4 例 HBsAb 阳性 HCC，肝内均检出 HBV DNA，这说明 HBV依然存在。其中 2 例同时血清HBV DNA 阳性，说明病毒还在增殖。因此，本文 HCC 的最后一个特点就是血清 HBsAb 阳性并不意味 HBV 已被清除。

参 考 文 献

[1] Popper H, et al. Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. Hepatology 1987; 7(4):764.

[2] Shafritz DA and Kew MC. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. Hepatology 1981; 1(1):1.

[3] Zhou-YZ, et al. Integrated state of subgenomic fragments of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma from mainland China. JNCI 1987 79(2):223.

[4] Prince AM. Hepatiiis B virus and hepatocellular carcinoma: Molecular biology provides further evidence for an etiologic association. Hepatology 1981; 1(1):73.

[5] Lin HJ, et al. Serum hepatitis B viral DNA in HBsAg positive hepatocarcinoma treated with interferon or adriamycin. Br J Cancer 1986; 54(1):67.

[6] Lie-Injo-LE, et al. Quantitation of hepatitis B virus DNA in serum of patients with hepatoma. Cytobios 1987; 50(201): 101.

[7] 谢彦博，等. 生物素标记乙型肝炎病毒DNA探针的制备及应用. 中山医科大学学报 1987; 8(3):15.

[8] Hino O, et al. Relationship between serum and histochemical markers for hepatitis B virus and rate of viral integration in hepatocellular carcinoma in Japan. Int J Cancer 1985; 35:5.

[9] Brechot C, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. N Engl J Med 1985; 312(5):270.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

INFECTION OF HEPATITIS B VIRUS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA: AN ANALYSIS OF HBV DNA IN SERUM AND LIVER

Lu Ling Peng Wenwei Ho Shuchu Xie Yanbo

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital)

To investigate the hepatitis B virus (HBV) infection in hepatocellular carcinomas (HCCs), 36 patients with HCC were studied for HBV DNA in their sera and livers. By dot-blot hybridization with ^{32}P-probe of 3.2kb, HBV DNA was pick up from 20/36 (56%) of sera, 29/32 (91%) of cancerous, 29/33 (88%) of peri-cancerous and 16/20 (80%) of non-cancerous tissues. All the positivities were higher than that of some other reports when compared showing the closer correlation between HBV infection and HCC development in southern China. On the other hand, 6 serological HBV markers were also detected with respective positivities of HBsAg and PHSA.Re to be 83% (30/36) and 75% (27/36) suggesting the highly active replication of HBV in the majority of HCCs. Since HBsAb positive patients all had HBV DNA in their livers, the inability of this "protective" antibody to eliminate HBV infection was implied when HCC had developed.

Key words Hepatocellular carcinoma (HCC) HBV DNA Spot-blot HBsAg PHSA.Re

原位肝脏隔离灌注大剂量5-氟尿嘧啶的实验研究（摘要）

王 颖 区庆嘉 陈积圣 王 捷 张伯萌 赵善广 李瑞萍 黄石辉

（孙逸仙纪念医院外科）

陈镆铘

（孙逸仙纪念医院病理科）

用特制分流管隔离肝循环，以肝动脉为唯一灌注入路，常温灌注60分钟。19只猪随机分为3组。灌注液无5-氟尿嘧啶（5-FU）组4只猪死亡1只，余生存猪术后谷草转氨酶(GOT)、碱性磷酸酶(AKP)一过性升高，肝活检正常。5-FU(200mg/kg)灌注组9只猪，3只死于非5-FU毒性，余6只耐受灌注，肝活检见少量散在肝细胞坏死。灌注期间5-FU平均浓度在肝内为1671.6μg/ml，在体循环为5.1μg/ml。5-FU静脉滴注组6只猪全部2天内死亡。结果表明本方法有效地隔离肝循环，可进行肝脏局部大剂量化疗。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net