

闽南肝癌高发区肝细胞癌与 HBV 复制的相关性分析

张忠英¹, 李玉华¹, 尹震宇², 林永财³, 王效民²

(1. 厦门中山医院中心实验室, 厦门 361004; 2. 厦门中山医院肝胆外科, 厦门 361004;
3. 厦门中山医院检验科, 厦门 361004)

摘要: 目的 分析闽南肝癌高发区乙型肝炎病毒(HBV)复制与原发性肝细胞癌(PHCC)的关系。方法 用实时荧光定量聚合酶链反应(PQ-PCR)技术测定 61 例 PHCC 患者、407 例不同病程的 HBV 感染者及 17 例健康人血清中 HBV DNA 的含量,对照分析 HBV 标志物(HBVM),同时检测 PHCC 患者抗-HCV-IgG 和 HCV RNA。结果 PHCC 组 HBV DNA 阳性率高达 80.3% (49/61),高于其他肝病组,差异具显著性($P < 0.02$),HBV DNA 含量各组间差异无显著性。PHCC 组抗-HCV-IgG 和 HCV RNA 阳性率为 0。结论 闽南肝癌高发区 PHCC 患者 HBV DNA 阳性率较高,HBV 感染并持续复制,可能是该地区 PHCC 的主要致病因素。

关键词: 荧光定量; 乙型肝炎病毒 DNA; 原发性肝细胞癌

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** A

闽南地区是我国肝癌高发区之一,弄清该地区肝癌的主要致病因素对肝癌防治十分重要。我们采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术对原发性肝细胞癌(PHCC)患者、乙型肝炎病毒(HBV)感染者及健康人,进行 HBV DNA 定量分析,旨在了解闽南肝癌高发区 PHCC 患者和 HBV 感染者中 HBV 的复制情况,初步探讨 HBV 复制与 PHCC 发生的关系。

材料和方法

一、病例来源

本组 485 例,其中肝硬化 32 例,男 24 例,女 8 例,年龄 20~84 岁;慢性乙型肝炎 44 例,男 23 例,女 21 例,年龄 28~75 岁;无症状 HBV 携带者 32 例,男 18 例,女 14 例,年龄 21~52 岁(以上患者均符合 2000 年全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的诊断标准);PHCC 患者 61 例,其中男 51 例,女 10 例,年龄 27~74 岁(根据病理和/或 CT 和 AFP 诊断);正常对照组 17 例,男 10 例,女 7 例,年龄 28~65 岁,5 项 HBV 标志物(HBVM)均阴性,肝功能正常;正常体检时发现 HBVM 阳性,无明确诊断 299 例,男 167 例,女 132 例,年龄 19~62 岁。

二、方法

1. HBV DNA 定量 采用 FQ-PCR 法。荧光定量 PCR 仪(美国 PE 公司生产);HBV DNA 定量试剂盒由深圳 PG 公司提供,结果以拷贝数/ml 表示。

严格按照说明书操作,同时用 1.4×10^4 , 1.4×10^5 , 1.4×10^6 , 1.4×10^7 , 1.4×10^8 拷贝/ml 的阳性参控品扩增,以拷贝数的对数为横坐标,Ct 值为纵坐标,绘制标准曲线。

2. 丙型肝炎病毒(HCV)RNA 定量 FQ-逆转录(RT)-PCR 法。试剂盒由深圳 PG 公司提供,严格按照说明书操作,结果以拷贝数/ml 表示。

3. 抗-HCV-IgG 定性 采用 ELISA,厦门新创公司产品,Bio-Rad 550 型酶标仪测定。

4. 数理统计 HBV DNA 拷贝数以其对数值计算平均值($10^{\bar{x} \pm s}$ 拷贝/ml),阴性结果不参与平均值计算,用 Microsoft Excel 软件统计。平均值差异性用 t 检验,阳性率的比较用 χ^2 分析。

结 果

一、HBV DNA 定量的标准曲线 HBV DNA 拷贝数对数值从 18.4 至 33.72 呈线性关系,标准曲线拟合度可达 0.999,每次实验的标准曲线拟合度均在 0.99 以上。485 份测定血清中,95 份 HBeAg 阳性血清的 HBV DNA 阳性率达 100%,17 份 HBV 5 项标志物全阴性血清,无 1 例 HBV DNA 阳性。373 份 HBeAg 阴性的 HBV 感染者血清中,156 份 HBV DNA 阳性,阳性率 41.8%。

二、PHCC 组 HBV DNA 阳性率 高于肝硬化组、慢乙肝组和无症状携带组,差异具显著性。但是,各疾病组之间,HBV DNA 含量差异无显著性($P > 0.05$)。详见表 1。



表 1 各肝病组 HBV DNA 含量及阳性率

组别	HBsAg		HBV DNA		
	例数	阳性例数	拷贝数/ml 平均值	阳性例数	阳性率 (%)
肝癌组	61	2	$10^{4.55 \pm 1.44}$	49	80.3%
肝硬化组	32	8	$10^{5.00 \pm 1.11}$	18	56.3%*
慢乙肝组	44	6	$10^{4.54 \pm 1.38}$	24	54.5%**
无症状携带者	32	2	$10^{4.07 \pm 1.55}$	15	46.9%**

与肝癌组比较* $P < 0.02$; ** $P < 0.01$

三、PHCC 患者 HCV 检测结果 对 28 例 PHCC 患者测定 HCV RNA 含量和抗-HCV-IgG, 结果全阴性。

四、PHCC 患者术前、后 HBV DNA 含量变化

8 例 PHCC 患者在肝癌组织切除术前, 及术后(第 20 天左右)测定 HBV DNA 含量, 除 1 例略微升高外, 7 例术后 HBV DNA 含量均有不同程度下降。

FQ-PCR 技术, 是近年发展起来的 DNA 直接定量方法。具有特异性强、灵敏度高(fg 水平)和测定范围广($10 \sim 10^9$ 拷贝/ml)等优点。用实时 FQ-PCR 进行血清 HBV DNA 定量分析, 能发现 HBV 低水平复制($< 10^5$ 拷贝/ml)^[1]。在 373 份 HBsAg 阴性的血清中, 用该法检测 HBV DNA 的阳性率达 41.8%。Loeb 等^[1]认为, 出现 HBsAg 阴性而 HBV DNA 阳性的现象, 可能原因是 pre-C 基因突变, 终止合成 HBsAg, 或合成能力下降, 因此不表达或少表达 HBsAg, 但病毒复制仍在进行。本研究 156 例 HBsAg 阴性/HBV DNA 阳性的结果支持 Loeb 等人的上述论点。

闽南地区是我国肝癌高发区之一, 肝癌年死亡率约 40/10 万, 高于本省其他地区和全国平均水平。该地区成人 HBsAg 阳性率达 15% 以上, HCV 感染率却低于 0.5%。PHCC 患者(均来自闽南地区)HBVM 阳性率高达 100% (61/61), 在接受抗-HCV-IgG 和 HCV RNA 检测的 28 例 PHCC 患者中, 二项指标阳性率均为 0%。提示 HBV 感染是该地区 PHCC 的主要致病因素之一。我们调查的 468 例 HBV 感染者, HBV DNA 总阳性率高于赖宏芳等^[2]和严立等^[3]的报道。PHCC 组 HBV DNA 阳性率较

其他各肝病组高, 与感染初期不同的是, 此时 HBV 复制多为低水平复制($< 10^5$ 拷贝/ml)^[4]。

HBV 感染与原发性肝癌(PHCC)的相关性已得到普遍认同, 苏建家等^[5]用 HBV 感染树鼯时发现, HBV DNA 持续阳性的树鼯于感染后第 83 周出现肝细胞癌。病毒复制可增加基因突变和整合入肝细胞的机会, HBV DNA 整合入肝细胞是肝细胞癌变机制的分子生物学基础, HBV 复制与肝细胞不典型增生有关^[1, 6-7]。本组 HBV 感染者的 HBV DNA 阳性率较高和 PHCC 患者 HBV DNA 阳性率明显高于其他肝病组的结果提示: HBV 感染并持续复制, 可能是闽南地区原发性肝细胞癌高发的主要因素之一。换言之, HBV DNA 持续复制, 可能是乙型肝炎演变为肝癌的危险因素。

参考文献

- [1] Loeb K, Jerome K, Goddard J, et al High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan-fluorogenic detection system [J]. Hepatology, 2000, 32(3): 626-629
- [2] 赖宏芳, 付晓野, 董玉琳 荧光探针定量 PCR 检测 HBV DNA [J] 上海医学检验杂志, 2000, 15(1): 18-19
- [3] 严立, 何芳, 张玉洪 乙肝病毒标志物常见模式与 HBV DNA 检出量的比较分析 [J] 重庆医科大学学报, 2000, 25(2): 169-170
- [4] 程刚, 何蕴韶, 周新宇 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒 [J] 中华医学检验杂志, 1999, 22(3): 135-138
- [5] 苏建家, 覃柳亮, 李媛 HBV 和 AFB1 在树鼯肝癌发生中的作用 [J] 中国癌症杂志, 2000, 10(2): 155-158
- [6] Hunt C, McGill J, Allen M, et al Clinical relevance of hepatitis B viral mutations [J] Hepatology, 2000, 31(5): 1037-1044
- [7] Brunetto M, Oliveri F, Colombatto P, et al Hepatocellular carcinoma and infections with multiple hepatitis viruses Princess-Takamatsu-Symp [J] 1995, 25: 61-66

(收稿: 2001-03-23 修回: 2001-06-01)

(本文编发: 范基农)