

· 临床论著 ·

肝细胞癌患者石蜡包埋肝组织HBV ccc DNA的检测

胡双烨 徐晨 赵雨来 李智彬 徐东平 刘永明 杨媛 赵景民 成军 苏何玲 侯俊 钟彦伟

【摘要】 目的 检测肝细胞癌患者肝组织中乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA (HBV ccc DNA), 探讨其在肝细胞癌发生、发展中的意义。**方法** 选取20例肝细胞癌患者的癌及癌旁组织, 经10%福尔马林固定、石蜡包埋、连续切片, 采用0.05%多聚赖氨酸进行处理。经不降解质粒的ATP依赖的DNA酶(PSAD酶)消化后, 应用原位滚环扩增(in situ RCA)结合原位跨缺口PCR扩增技术检测肝组织中ccc DNA的表达。**结果** 20例肝癌患者标本中有17例检测到HBV ccc DNA阳性信号, 为蓝色或紫蓝色并呈团块状, 定位于细胞核。肝癌患者癌及癌旁组织HBV ccc DNA阳性率分别为10% (2/20) 和85% (17/20), 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 肝细胞癌患者癌旁组织病毒复制水平高于癌组织。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 共价闭合环状DNA; 肝细胞癌

Detection of HBV ccc DNA in FFPE liver tissues of patients with hepatocellular carcinoma HU Shuang-ye, XU Chen, ZHAO Yu-lai, LI Zhi-bin, XU Dong-ping, LIU Yong-ming, YANG Yuan, ZHAO Jing-min, CHENG Jun, SU He-ling, HOU Jun, ZHONG Yan-wei. Guilin Medical College, Guilin 541004, China
Corresponding author: ZHONG Yan-wei, Email: zhongyanwei@126.com

【Abstract】 Objective To detect the intrahepatic covalently closed circular DNA (ccc DNA) in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC) and to investigate its significance in progression of HCC. **Methods** The paired tumor and adjacent non-tumor tissues of 20 cases with HCC were selected, respectively. The samples were fixed by 10% formaldehyde, paraffin imbedded and treated with 0.05% poly-L-Lysine. The liver tissue sections were treated by plasmid-safe ATP-dependent DNase (PSAD) and the expression of intrahepatic ccc DNA was detected by in situ rolling circle amplification (RCA) combined with in situ polymerase chain reaction (PCR) targeting the gap region. **Results** HBV ccc DNA was expressed in 17 of 20 subjects and located in the nuclear compartment with clustering, staining blue or blue-violet. The positive rate of HBV ccc DNA in HCC and their adjacent tissues were 10% (2/20) and 85% (17/20), respectively, with significant difference ($P < 0.01$). **Conclusion** The level of HBV replication in the tumor-adjacent tissues was higher than that of the tumor tissues of patients with HCC.

【Key words】 Hepatitis B virus; Covalently closed circular DNA; Hepatocellular carcinoma

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第5大恶性肿瘤, 位居肿瘤相关性死亡的第三位^[1]。全世界每年约53万例HCC患者, 其中约60%由HBV感染引起^[2]。在我国, HBV感染是HCC发生的主要危险因素^[3], 约90%的HCC患者为HBV长期携带者。共价闭合环状DNA (covalently closed

circular DNA, ccc DNA) 是HBV生命周期中重要的复制中间体, 是乙型肝炎病毒mRNA和前基因组RNA (pregenomic RNA) 的原始合成模板, 以稳定的HBV ccc DNA池的形式持续存在于肝细胞核, 处于不断更新和变化的动态平衡之中, 其数量能够维持在既能保证病毒复制但又不会造成细胞溶解的范围。研究表明, 慢性乙型肝炎进展到终末期, 随着病毒复制的减少, HBV ccc DNA成为肝内HBV DNA的主要存在形式^[4-5]。HCC常发生在HBV感染终末阶段, 因此, 检测肝癌患者肝内HBV ccc DNA对于了解HCC的发病机制具有重要意义。以往对于

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.02.002

基金项目: 首都医学发展科研基金 (No. 2009-3057)

作者单位: 541004 桂林市, 桂林医学院 (胡双烨、刘永明、苏何玲); 解放军第302医院全军传染病研究所 (徐晨、赵雨来、李智彬、徐东平、杨媛、赵景民、侯俊、钟彦伟); 首都医科大学附属北京地坛医院 (成军)

通讯作者: 钟彦伟, Email: zhongyanwei@126.com

HBV ccc DNA的检测多选择外周血单核细胞或肝组织标本, 采用Southern blot、选择性PCR或荧光定量PCR等检测法。但以上方法均不能解决在高rcDNA (relaxed circular DNA) 背景条件下出现的假阳性问题。本研究应用原位滚环扩增 (rolling circular amplification, RCA) 结合原位PCR扩增技术检测肝癌患者癌及癌旁组织中HBV ccc DNA的表达, 再通过免疫组织化学的显色方法在显微镜下观察其在肝组织内的定位及分布情况, 将扩增产物直接与肝组织细胞特征紧密联系, 在分子水平上将组织形态与基因表达相联系, 以此来探讨HBV ccc DNA在肝细胞癌患者肝组织中的表达及意义。

资料与方法

一、研究对象

收集中国人民解放军第302医院2011年9月至2012年9月行手术切除的肝细胞癌患者20例, 其中男性15例, 女性5例, 年龄32~67岁 (平均年龄48.25岁)。入组患者血清HBsAg均为阳性, 临床资料见表1。每例肝癌患者取癌组织和癌旁组织, 所有标本均经10%福尔马林固定, 石蜡包埋后5 μ m连续切片, 经0.05%多聚赖氨酸处理后使用。HCC诊断均经术后病理证实。选取非乙型肝炎病毒感染肝组织为阴性对照。

二、主要试剂及仪器

不降解质粒的ATP 依赖的DNA酶 (Plasmid-Safe™ ATP-dependent DNase, EPIBIO公司产品); phi29DNA聚合酶 (NEB公司); Taq DNA聚合酶 (TaKaRa公司); 碱性磷酸酶标记的抗地高辛酶标复合物 (SIGMA公司); NBT/BCIP (nitro-blue-tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, 四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐) 染色试剂盒、蛋白酶K (博士德生物公司)。相关引物由上海生工生物工程有限公司合成及标记。原位PCR仪为美国Thermo PX2型。

三、方法

1. 组织切片预处理: 组织切片60℃烘烤2 h后,

常规脱蜡至水后, 蛋白酶K消化处理。

2. PSAD酶消化: 按照说明所述该酶所需环境及温度, 设定反应体系为: PSAD酶0.2 μ l, 反应缓冲液1 μ l, ATP溶液0.4 μ l, H₂O 13.4 μ l。30℃消化30 min, 70℃灭酶活性30 min。

3. 滚环扩增 (rolling circular amplification, RCA) 反应及跨缺口原位PCR扩增 (in situ PCR) 反应: 根据我国常见的HBV基因型B、C基因组全序列, 参照文献设计4对引物^[6]。将引物结合体系滴加在以PSAD酶消化处理过的组织切片上。反应体系含4对HBV ccc DNA引物和phi29 buffer。95℃、5 min后向组织切片滴加RCA反应液加盖片并放入湿盒。反应条件为30℃恒温扩增16 h。扩增结束后, 4%多聚甲醛37℃固定10 min, 乙醇梯度脱水, 室温干燥。将含有地高辛标记引物的PCR反应液滴加至切片上, 94℃预变性5 min; 94℃、60 s, 55℃、60 s, 72℃、90 s, 30个循环。扩增结束后用4%多聚甲醛37℃固定10 min, 乙醇梯度脱水。

4. 信号检测: 切片经5% BSA封闭后, 滴加碱性磷酸酶标记的抗-地高辛 (抗-Dig-AP), 37℃孵育2 h。NBT-BCIP显色按检测试剂盒说明书操作, 暗处室温显色0.5~2 h后水洗以中止反应, 0.1%核快红复染, 中性树胶封片镜检。

5. 特异性验证: 设置无引物、无地高辛标记引物、无Phi29酶和DNA聚合酶反应体系, 以非乙型肝炎病毒感染肝组织作为阴性对照组; 选择HBsAg、HBeAg和HBcAb均阳性, HBV DNA > 10⁶ IU/ml, 原位杂交法阳性且肝组织活检标本免疫组织化学HBsAg弥漫阳性的标本作为阳性对照组。

6. 肝组织中HBV ccc DNA表达的半定量评价: 在组织切片中任意选定5~10个区域, 高倍镜 (400倍) 下根据切片中阳性信号表达数量/该片中估算的细胞总量, 比例 > 1%记为阳性。

四、统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件, 采用Fisher精确检验比较肝细胞癌患者癌及癌旁组织间HBV ccc DNA阳性表达率, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表1 入组患者的临床资料

组别	例数	性别 (男/女)	手术年龄 (岁)	HBV DNA (IU/ml)
HBeAg阳性组	5	4/1	50.10 (45~65)	2.88×10^7 ($1.49 \times 10^2 \sim 1.44 \times 10^8$)
HBeAg阴性组	15	11/4	45.20 (32~67)	4.08×10^5 ($44.40 \sim 2.45 \times 10^6$)

结 果

一、HBV ccc DNA的特异性检测

阴性对照组均未见阳性信号表达。阳性对照标本显示强阳性信号,为紫蓝色且呈团块状,定位于细胞核,而胞膜及胞浆未见表达。

二、肝癌患者肝组织中HBV ccc DNA的表达

20例肝癌患者标本中有17例(85%)检测到HBV ccc DNA阳性信号,为紫蓝色呈团块状,定位于细胞核。其中肝细胞癌及癌旁组织中HBV ccc DNA阳性率分别为10%(2/20)和85%(17/20);阴性率分别为90%(18/20)和15%(3/20),差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

讨 论

流行病学调查显示,HBV感染与HCC的发生密切相关。Yu等^[7]认为HBV DNA负荷和活跃复制与HCC的发生密切相关。HBV ccc DNA是HBV持续感染的关键因素,HBV复制取决于感染的ccc DNA数和肝细胞转换的动态,探讨其在HCC中的作用对于深入了解HCC的发病机制有重要意义。以往对于肝癌患者肝组织HBV ccc DNA的报道多为定量研究,不能直观地显示其在细胞水平的定位情况。原位滚环扩增(RCA)反应是一种体外等温核酸扩增法,其特点是只能有效扩增闭合环状DNA,从而消除整合HBV DNA的影响。本研究应用PSAD酶消化以消除HBV rcDNA的影响,用RCA消除整合HBV DNA的影响,并在RCA扩增产物的基础上进行原位跨缺口PCR扩增,提高了扩增的特异性及灵敏度,可直接观察HBV ccc DNA在肝组织内的定位与分布情况,为探索两者间的关系提供了一条新的途径。

以往研究对肝癌患者癌及癌旁HBV ccc DNA表达水平的观点不一。Wong等^[4]应用侵入式方法对HBsAg表达阳性的HCC患者癌及癌旁组织中HBV ccc DNA进行定量检测,结果显示癌组织中HBV ccc DNA和总HBV DNA载量均高于癌旁组织,且HBV ccc DNA是癌组织中HBV DNA存在的主要形式。但这种方法不能排除整合DNA的干扰。而潘爱萍等^[8]采用实时荧光定量PCR法(RT-PCR)检测发现ccc DNA在癌旁组织中的表达水平高于癌组织,但差异无统计学意义。

本研究发现癌旁组织中HBV ccc DNA阳性表达率为85%(17/20),高于癌组织10%(2/20),且

差异具有统计学意义。HBV ccc DNA是病毒活跃复制状态的重要指标,由此推测癌及癌旁组织中病毒复制情况不同,癌组织中病毒复制水平可能低于癌旁组织。而病毒复制减弱可能与HBV DNA整合有关。HBV DNA与宿主细胞基因组的整合是HBV致癌作用的关键^[9]。HCC患者病史一般较长,多由慢性乙型肝炎进展至肝硬化并最终导致HCC,发生病毒DNA整合入肝脏基因组概率增加。Bonilla等^[10]发现HBV相关性肝细胞癌中,85%~95% HBV DNA在宿主基因中发生了整合。整合影响HBV的复制,而整合型HBV不再参与复制,HBV在HCC中整合越多,游离病毒颗粒越少,复制水平则越低^[11]。Wang等^[12]用Southern blot分析检测了23对HCC患者肝癌组织及相应癌旁组织中HBV S基因序列的整合情况,结果表明癌组织HBV DNA的整合量显著高于癌旁组织(83% vs 4%),同时发现癌旁组织中的游离病毒也显著高于癌组织(61% vs 13%)。本研究采用RCA技术,消除了整合DNA的影响,所选取的20例HCC患者均为乙型肝炎相关性肝细胞癌,HBV ccc DNA在癌旁组织的阳性检出率显著高于癌组织,提示整合导致游离型病毒复制减低,且癌旁组织整合的量少于癌组织;推测HCC中癌旁组织游离病毒复制水平高于癌组织,导致HBV ccc DNA阳性表达率高于癌组织。

HBV ccc DNA被认为是肝脏发生病理性改变的重要原因。本研究20例HCC患者中有17例肝组织检测到HBV ccc DNA的表达,初步发现HCC患者HBV ccc DNA癌旁组织阳性检出率高于癌组织,可见HCC患者病毒复制有其自身特点。Liaw等^[13]研究表明,抗病毒治疗能显著降低组织内HBV ccc DNA水平和HCC的发生。因此,通过抗病毒治疗方式等来清除肝组织中HBV ccc DNA,对于减少肝细胞癌的发生具有积极的临床意义。

参 考 文 献

- 1 Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biologie*, 2010, 58(4): 273-277.
- 2 Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, et al. Viral hepatitis B. *Lancet*, 2003, 362(9401): 2089-2094.
- 3 Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2009, 286(1): 52-59.
- 4 Wong DK, Yuen MF, Poon RT, et al. Quantification of hepatitis B

- virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*,2006,45(4):553-559.
- 5 Wong DK, Yuen MF, Yuan H, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*,2004,40(3):727-737.
- 6 Zhong YW, Han JQ, Zou ZS, et al. Quantitation of HBV covalently closed circular DNA in micro formalin fixed paraffin-embedded liver tissue using rolling circle amplification in combination with real-time PCR. *Clin Chim Acta*,2011,412(21-22):1905-1911.
- 7 Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst*,2005,97(4):265-272.
- 8 潘爱萍, 黄古叶, 陈晶, 等. 乙型肝炎病毒ccc DNA与HBx蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义. *世界华人消化杂志*, 2009,17(7):712-715.
- 9 Brechot C, Pourcel C, Louise A, et al. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*,1980,286(5772):533-535.
- 10 Bonilla Guerrero R, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*,2005,42(5):760-777.
- 11 王涛, 王一. 乙型肝炎病毒整合及致癌机制的研究进展. *医学综述*, 2005,11(12):1087-1089.
- 12 Wang Y, Wu MC, Sham JS, et al. Different expression of hepatitis B surface antigen between hepatocellular carcinoma and its surrounding liver tissue, studied using a tissue microarray. *J Pathol*,2002,197(5):610-616.
- 13 Liaw YF. Hepatitis B virus replication and liver disease progression: the impact of antiviral therapy. *Antivir Ther*,2006,11(6):669-679.
- (收稿日期: 2012-11-02)
(本文编辑: 孙荣华)

胡双焯, 徐晨, 赵雨来, 等. 肝细胞癌患者石蜡包埋肝组织HBV ccc DNA的检测[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(2): 177-180.

中华医学会