维普资讯 http://www.cqvip.com

29—33

第11卷第1期 中国病毒学 Vol.11 No.1
1996年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1996

人原发性肝内胆管细胞癌中 HCV RNA 及其 NS3 区抗原的分布及意义*

王春杰 王文亮 王伯云
(第四军医大学病理学教研室,西安 710032)

提要 应用原位分子杂交及免疫组化方法,使用地高辛标记 HCV 5′非编码区探针及抗 HCV NS3 区 C33c 单克隆抗体,对 35 例人原发性肝内胆管细胞癌(PIC)和癌旁肝组织内 HCV RNA 及其 NS3 抗原进行检测,结果发现 HCV RNA 在 PIC 中的阳性率为 83%,HCV RNA 定位于癌细胞胞浆中,个别病例并在淋巴细胞、肝窦内皮细胞和枯否氏细胞中发现阳性信号。HCV NS3 区 C33c 抗原在 PIC 的阳性率为 89%,阳性反应主要位于癌细胞胞浆内或肝细胞胞浆内。阳性细胞在癌组织中以灶性分布为主,在癌旁肝以弥漫分布为主。HBxAg 在本组病例的阳性率为 77%。结果提示:在肝内胆管细胞癌的发生中,除 HBV 以外,HCV 感染与其发生也有密切关系,是其致病因素之一。

关键词 肝内胆管细胞癌,丙型肝炎病毒,乙型肝炎病毒,抗原,原位分子杂交

近年来,通过临床学、流行病学及分子生物学等研究证明,丙型肝炎病毒(HCV)感染与人原发性肝细胞癌的发生有密切关系[1],是继 HBV 之后又一重要生物致癌因素。在日本在致癌作用方面 HCV 似乎比 HBV 更为重要[2]。在原发性肝癌中,肝细胞肝癌较多见,而肝内胆管细胞癌(包括肝胆管细胞混合型癌)较少见,占 8%左右。长期以来,国内外对人原发性肝内胆管细胞癌(primary intrahepato-cholangiocarcinoma, PIC)的发病机理不清楚,亦很少有人去研究。我国早年有人报道,肝内胆管细胞癌的发生与华支睾吸虫感染有关。华支睾吸虫在肝内胆管傍居,能刺激小胆管上皮增生,而引起二级胆管细胞癌[3,4]。我们曾发现在肝内胆管细胞癌中有较高的 HBV 感染率[5],提示 HBV 感染可能与肝内胆管细胞癌的发生有关。本研究采用原位分子杂交及免疫组化技术在肝内胆管细胞癌及癌旁肝组织内检测 HCV RNA 及其 NS3 抗原,结合 HBV 的感染情况,探讨 HCV 感染在肝内胆管细胞癌发生中的可能作用。

材料与方法

1 标本来源 35 例人原发性肝内胆管细胞癌(简称 PIC)及癌旁肝组织标本均来自西安地区手术切除或肝穿刺标本,全部组织都经病理检查证实。所有标本都经 10%福尔马林固定,石蜡包埋,制备 5 μm 厚连续切片。病理检查:35 例 PIC 标本中 30 例为肝内胆管细胞癌,5 例为肝胆管细胞混合型癌。肝内胆管细胞癌呈管状腺样结构,多为立方状细胞围绕成小的管腔,有少许粘液分泌。有的病例为团块状排列,癌细胞较小,胞浆少许。纤维结缔组织较丰富,腺管状结构及细胞团块不规则分布于纤维间质中。混合型癌表现为腺管状结构和肝细胞条索状或团块状分布,并相互有过渡现象,有个别病例偶见胆汁分泌。癌细胞有一定的异型性,但核分裂像比较少见。在 35 例 PIC 中,21 例伴有癌旁肝组织,其中慢性迁延性肝炎(CPH)7 例,慢性活动性肝炎

本文于 1995 年 3 月 9 日收到,7 月 20 日修回
* 本文为国家自然科学基金资助项目(No:39270744)

维普资讯 http://www.cqvip.com

(CAH) 14例，CAH中有2例同时伴有肝硬变。

2 **试剂来源** 含HCV 5′非编码区cDNA的$pGEM_2$质粒由北京军事医学科学院提供。抗HCV C33c 2B 6株单克隆抗体腹水由北京医科大学肝病研究所陶其敏教授惠赠，兔抗HBxAg多克隆抗体由美国费城Fox chase癌症中心提供，ABC试剂盒购自Vector-Lab。地高辛标记试剂盒购自德国Boehringer Mannheim公司。

3 **HCV RNA的原位分子杂交检测** 常规提取质粒酶切回收5′-非编码区cDNA片段，地高辛随机引物法标记探针。简要原位杂交步骤：①常规脱蜡，逐级酒精至水。② 0.2mol/L HCl 30min。③蛋白酶K 4 μg/ml 37℃消化15min。④4%多聚甲醛后固定15min。⑤双蒸水洗后逐级酒精脱水。⑥加含地高辛标记HCV cDNA杂交液，95℃水浴锅变性15min后速冷，置42℃杂交16h。⑦杂交后2×SSC彻底振洗。⑧加2%正常羊血清封闭1h。⑨加抗地高辛抗体-碱性磷酸酶复合物室温2h。100 mmol/L Tris－HCl，150mmol/L NaCl，pH7.5缓冲液振洗30 min，之后用pH 9.5缓冲液平衡pH值，NBT、BCIP显色，及时终止，脱水透明封片，光镜检查。

4 **HCV NS3区C33c抗原及HBxAg的检测** 切片常规脱蜡至水，用0.3% H_2O_2阻断内源酶，之后用正常血清封闭以清除非特异染色，加抗HCV C33c 2B 6株单克隆抗体或抗HBxAg多克隆抗体，4℃ 18小时，PBS振洗后加生物素化二抗，37℃孵育1小时，PBS振洗后加ABC复合物37℃1小时，最后PBS充分振洗，DAB显色，苏木素复染，脱水透明封片。

5 **对照实验** 无论是原位分子杂交还是免疫组化染色均设立了尸检正常肝组织对照及替代、空白对照，HCV RNA血清阳性，患者肝穿组织对照以保证结果的特异、可靠。

结 果

1 **PIC及癌旁肝中HCV RNA的分布** 我们用地高辛标记HCV 5′非编码区cDNA对35例PIC及其21例癌旁肝组织进行定位检测，HCV RNA在癌组织中及癌旁肝中的阳性率分别是65.7%(23/35)及76.2%(16/21)，累计阳性率为82.9%(29/35)。统计学分析HCV RNA在癌组织中及癌旁肝中的阳性率无显著差异。HCV RNA-cDNA杂交紫兰色阳性信号位于癌细胞胞浆内或胞核中，呈均匀细颗粒状(图1、图2)。癌旁肝以胞浆阳性为主。癌组织中阳性细胞以灶状分布为主，癌旁肝阳性细胞则弥漫分布较多见。23例HCV RNA杂交阳性癌组织病例有10例为癌细胞核阳性，其中5例有癌旁肝组织，4例癌旁肝为胞浆阳性，只有1例癌旁肝细胞呈现核阳性，并在此例中发现有汇管区淋巴细胞阳性，同时也有肝窦性内皮细胞或枯否氏细胞阳性(图3、图4)，阴性对照实验为阴性。

2 **PIC及其癌旁肝中HCV C33c抗原及HBxAg的检测** 对35例PIC及其21例癌旁肝中HCV C33c抗原的检测表明C33c在二者的阳性率分别为60%(21/35)及100%(21/21)。累计阳性率为88.6%(31/35)。统计学处理表明C33c抗原在癌旁肝的阳性率明显高于其在癌组织中的阳性率($P<0.01$)。棕黄色均匀细颗粒状阳性物质位于癌细胞胞浆中。阳性细胞在癌组织中以灶状分布为主(图5)。在癌旁肝中以弥漫分布较多见，且癌旁肝阳性信号一般较强(图6)。肝窦内皮细胞、枯否氏细胞、淋巴细胞未见阳性反应。HBxAg在PIC及其癌旁肝的阳性率分别为74.3%(26/35)及76.2%(16/21)，统计学处理二者无显著差异($P>0.05$)。HBxAg阳性物质呈棕黄色颗粒状，均匀分布于癌细胞或癌周肝细胞的胞浆内，有时可见核阳性，阳性对照为阳性，阴性对照为阴性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 1　HCV RNA 原位杂交，示阳性信号位于癌旁肝细胞胞浆内，阳性细胞呈灶状分布（×400）

Fig 1　The HCV RNA was detected in the cytoplasm of pericancerous tissues hepatocyte by *in situ* hybridization, the positive cells distribute logally.（×400）

维普资讯 http://www.cqvip.com

图2 HCV RNA 原位杂交，示阳性信号位于 PIC 的癌细胞胞核中（×400）
Fig 2 The HCV RNA was detected in the nuclei of cancerous cells in PIC by *in situ* hybridization.（×400）
图3 HCV RNA 原位杂交，示汇管区淋巴细胞呈杂交阳性（×200）
Fig 3 The HCV RNA was detected in the lymphocyte of portal area by *in situ* hybridization.（×200）
图4 HCV RNA 原位杂交，示癌旁肝细胞胞核弱阳性及肝窦内皮细胞/或枯否氏细胞阳性（×400）
Fig 4 The HCV RNA was detected in the nuclei of pericancerous hepatocyte, sinusoidal cell/or kupffer's cells by in situ hybridization.（×400）
图5 PIC 组织，示 HCV NS3 C3 3c 抗原阳性，阳性物质位于癌细胞胞浆内 ABC 法（×200）
Fig 5 HCV NS3 C3 3c antigen was detected in the cytoplasm of cancerous cells in PIC. ABC method.（×200）
图6 PIC 组织，示癌旁 HCV NS3 区 C3 3c 抗原阳性，阳性物质位于肝细胞胞浆内 ABC 法（×200）
Fig 6 HCV NS3 C3 3c antigen was detected in the cytoplasm of hepatocyte in peri-PIC tissues. ABC method. ×200

3 PIC 中 HCV RNA，C33c 及 HBxAg 的检出率 结果如表所示。

表 PIC 中 HCV RNA、C33c 及 HxAg 的检出情况

Table: The detection of HCV RNA, C33c antigen, and HBxAg in PIC and its pericancerous tissues

病理诊断 Diagnosis	病例数 Cases number	HCV RNA	C33c	HBxAg	C33c+HBxAg
癌组织 Cancerous	35	23	21	26	17
癌旁肝 Pericancerous	21	16	21	16	16

讨 论

在人原发生肝癌中，PIC 较为少见，有关其病因及发病机理的研究甚少。候宝璋（1956，1965）曾报道华支睾吸虫与其发病有密切关系，认为是由于虫体游动引起的机械性刺激及胆汁和虫体中的酪氨酸酶产生的化学刺激所致[3,4]。我们曾对 20 例 PIC 及其癌旁肝组织进行了 HBV 抗原检测，其检出率为 85%，且 HBxAg 检出率最高，在 80% 以上[5]。慢性 HCV 感染与 PIC 发生的关系如何，目前尚未见报道。本组 PIC 患者无华支睾吸虫感染史，其癌及癌旁肝组织内亦无华支睾吸虫感染的特征。本研究表明在癌及癌旁肝组织内，HCV RNA 及其 NS3 区抗原的阳性率分别是 82.9% 及 88.6%；HBxAg 检出率为 77.1%；21 例癌旁肝组织 14 例为 CAH，7 例为 CPH；说明为 HCV 和/或 HBV 感染后状态。这一结果表明，肝内胆管细胞癌（PIC）的发生除与 HBV 有密切关系外，慢性 HCV 感染可能也起重要作用，或者 HBV、HCV 相互影响而加速 PIC 的发生，但二者究竟如何相互作用有待深入研究。

最近 HCV 致肝细胞肝癌是人们研究的热点，但至今尚未发现 HCV 致癌的直接证据。目前普遍认为 HCV 可能通过其表达产物间接影响细胞的增殖分化，或通过 HCV 长期慢性感染而致病[1]。HCV 在 PIC 中如何起作用更不清楚。就我们的结果来分析，部分癌组织出现 HCV RNA 核阳性，说明 HCV 可进入细胞核，但 HCV 是 RNA 病毒，且没有 DNA 的中间体，很难以整合的形式解释其核阳性。但我们的研究支持以下的假说：HCV 可能利用宿主基因组或核装置进行复制，或者部分病毒颗粒象 HBV 那样在感染细胞的细胞核中贮存起来[6]。这容易引起 HCV 的长期慢性感染，并同时伴有较高的 HBV 感染。在 35 例 PIC 中，25 例 HCV、C33c 和 HBxAg 同时阳性占 71.42%，C33c 或 HBxAg 阳性 33 例（94.2%），只有 2 例 HBV 或 HCV 感染指征阴性。虽然肿瘤的发生是多因素的，但我们结果表明，本地区 PIC 的发生，绝大多数与 HCV、HBV 密切相关，该结果提示发展 HBV、HCV 疫苗和有效的抗病毒治疗，是降低 PIC 发生的有效途径。

在本研究中，绝大多数病例在癌组织及癌旁肝组织内均有 C33c 的表达。癌旁组织内

维普资讯 http://www.cqvip.com

C33c 的阳性率明显高于癌组织，这可能是由于癌细胞本身增生活跃、代谢旺盛，反而在一定程度上抑制了 HCV RNA 的表达。在 PIC 及癌旁肝中高 HCV 感染，表明 HCV 与 PIC 的发生有密切关系。结合 HBV 感染状况，综合分析两种病毒在我国原发性肝癌发病中的作用机制，乃是下步应解决的课题。

致谢　北京医科大学肝病研究所陶其敏教授、郭建平、高建恩老师提供抗 HCV C33c 单克隆抗体，在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

1 Houghton M. Weiner A Han J. et al. Moleculary biology of the hepatitis C virus: implications for diagnosis. development and control of viral disease. Hepatology, 1991;14:381～388

2 Tanaka K. Hirohata T. Koga S. et al. Hepatitis C and hepatitis B in the etiology of hepatocellular carcinoma in the Japanese population. Cancer Res, 1991;51:2842～2847

3 Hmu PC. Hepatic clonorchiasis and carcinoma of the bile duct in dog. J Path Bact, 1965;89:365

4 Hou PC. The relationship between primary carcinoma of the liver and infestation with clonorchiasis sinensis J Path Bact, 1956;72:239

5 胡敏，王文亮. 人原发性肝内胆管细胞癌发病因素的探讨。癌症，1994;13(2):156～158

6 Nouri Aria KT. Sallie R Sangar D. et al. Detection of genomic and intermediate replicative strands of hepatitis C virus in liver tissue by *in situ* hybridization. J Clin Invest, 1993;91:2226～2234

Detection of HCV RNA and its NS3 Antigen in Human Primary Intrahepato-cholangiocarcinoma Tissues

Wang Chunjie　Wang Wenliang　Wang Boyun

(*Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an* 710032)

HCV RNA and its NS3 region C33c antigen were detected by *in situ* hybridization with digoxgenin-11-dUTP labeled HCV 5′ non coding region cDNA probe and immunohistochemical methods with monoclonal antibody against recombinant HCV C33c protein in 35 cases of primary intrahepato-cholangiocarcinoma (PIC) tissues. The positive rate of HCV RNA in PIC was 83% (29/35) and the HCV RNA was localized in the cytoplasm and/or nucleus of cancerous cell and hepatocytes. In one case, HCV RNA was also detected in the nuclus of lymphocyte and sinusoidal cell/or kupffer's cells. The positive rate of HCV NS3 region C33c antigen was 89% (31/35) in PIC, the positive reaction was found in the cytoplasm of cancerous cell and hepatocytes, the positive cells distributed in local and diffusely. HBxAg was also detected in 77% (37/45) of the patients studied. Our results suggest that HCV infection has closely relationship with the development of PIC except HBV infection. HCV infection may play an important role in the carcinogenesis of PIC.

Key words　Bile duct neoplasm, HBV, HCV, RNA, Antigen, *in situ* hybridization