维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):325-329
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

肝癌中HBV和HCV基因和抗原的分布及意义*

王文亮,王春杰,师建国,王冰枫

(第四军医大学病理学教研室,陕西西安 710032)

Distribution and Significance of HCV and HBV Genes and Their Related Antigens in Hepatocellular Carcinoma

WANG Wen-liang, WNAG Chun-jie, SHI Jian-guo, WANG Beng-fung

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

Abstract: HCV RNA and HBV X gene were detected by in situ hybridization and HCV core、C33c antigens and HBxAg were localized by immunohistochemical method. Results showed(1) The positive rate of HCV RNA and HBV X gene were 40%(55/136) and 82% (112/136) in HCC respectively, both of them were positive simultaneously, 34%(46/136). HCV RNA was localized in the cytoplasm of cancerous cells and hepatocytes, the positive cells distributed in scatter, local or diffusion pattens. The distribution of HBV X gene in HCC cancerous cells showed cytoplasm, nuclear and nuclear-cytoplasm, the positive cells distributed just as that of HCV RNA. (2) The positive rates of HCV C33c and core antigens in HCC were 81%(133/164) and 86%(141/164) respectively, and C33c antigen was localized in the cancerous cells intracytoplasmically, either in the form of focal or diffuse in distribution, some were access to the nuclear membrane. Not only was HCV core antigen positive stain distributed in the nuclei of the cancerous cell but it was also found in the cytoplasm, C33c antigen positive cells were focal in distribution in HCC. Core antigen nuclear positive cell was observed more aften in cancerous tissues, and cytoplasmic positive cell was predominant in paracancerous tissues. (3) The detection rate of HBxAg in HCC was 75%(123/164), C33c and HBxAg positive simultaneously were 63%(103/164). HCV infection is familiar in HCC of our country, HBV and HCV overlapping infection accounted for a certain proportion in cases studied, which might play an important role in the development of HCC.

Key words: Liver neoplasm; HCV; HBV; Antigen; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization

摘要:采用原位分子杂交方法检测HCV RNA及HBV X基因;采用免疫组织化学方法研究HCV核心抗原,非结构区C33c抗原及HBxAg在肝细胞肝癌中的定位及分布。结果表明(1)HCV RNA、HBV X基因在肝细胞肝癌组织检出率分别为40%(55/136)和82%(112/136)。HCV RNA定位于癌细胞的胞浆内,阳性细胞呈散在、灶状及弥漫分布三种形式;HBV X基因在肝癌细胞中的分布呈胞浆型、核型及核浆型,阳性细胞也呈上述三种分布形式;(2)HCV C33c抗原、核心抗原在肝细胞肝癌中的阳性率为81%(133/164)及86%(141/164)。C33c抗原定位于癌细胞及肝细胞的胞浆内;核心抗原既定位于癌细胞核中、又可定位于胞浆中。C33c抗原阳性细胞以灶状分布为主;而核心抗原阳性细

收稿日期:2000-11-10,修回日期:2001-04-25

* 基金项目:国家自然科学基金资助课题(39400155)

作者简介:王文亮(1934-),男,辽宁省籍,教授,研究方向为肝炎病毒与肝癌发病关系的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞在癌组织以弥漫核阳性常见，在癌旁肝组织以胞浆阳性为主；(3)HBxAg在肝细胞肝癌中的检出率为75%(123/164)，C33c和HBxAg二者同时阳性占63%(103/164)。HCV感染在我国肝细胞肝癌中比较普遍，HCV和HBV重叠感染占相当比例，可能在肝细胞肝癌的发生中起着重要作用。

关键词：肝肿瘤；丙型肝炎病毒；乙型肝炎病毒；抗原；免疫组织化学；原位分子杂交

中图分类号：R7375.7 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125(2001)04-0325-05

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus，HCV)与肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma HCC)的关系日趋引起各国学者的关注，目前已有大量的研究证明HCV感染与HCC的发生密切相关[1-6]，但多为检查血清HCV相关抗体或RT-PCR法检测组织中的HCV RNA，缺乏形态学依据，不能很好地反映HCV感染与肝脏病变的关系。本文应用原位分子杂交及免疫组织化学方法对164例肝细胞肝癌及其癌旁肝组织中的HCV RNA，C33c抗原、核心抗原(Core antigen，C)的分布进行了研究，同时结合HBV感染情况，分析HBV和/或HCV与HCC发生的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

164例HCC组织为西京医院1986～1997年外科手术切除标本，并经病理证实，其中76例带有癌旁肝组织。所有标本均经10%福尔马林固定，脱水，常规石蜡包埋，制备5μm厚连续切片。

1.2 试剂来源

含HCV 5′非编码区的cDNA，pGEM质粒，含HBV X基因的pMM15等质粒、抗HCV核心区抗原2B株单克隆抗体，由北京军事医学科学院基础医学研究所逯好英教授惠赠，抗HCV C33c 2B6株单克隆抗体由北京医科大学肝病研究所惠赠，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，地高辛随机引物标记试剂盒购自德国Boehringer Mannheim公司。

1.3 探针制备及原位杂交

含HCV 5′非编码区cDNA pGEM质粒及含HBV X基因的pMM15质粒提取及酶切片段回收参照分子克隆实验指南进行[7]，分别得到257bp的HCV非编码区片段及584bp的HBV X基因，探针标记按说明书标准操作，原位杂交参阅文献[8]略加改进，主要在于调整探针浓度。

1.4 免疫组化染色

抗HCV核心抗原2B株单克隆抗体按1:300稀释，抗HCV C33c抗原2B6株单克隆抗体按1:150稀释，抗HBxAg多克隆抗体按1:200稀释，其余操作按Vector说明书进行。

1.5 对照实验

阳性对照选自血清HCV RNA阳性肝穿组织，阴性对照选择HCV RNA及抗体阴性肝穿组织，此外，无论是原位杂交，还是免疫组化，均设计了替代、空白对照，以保证结果的特异、可靠。

2 结果

2.1 HCV RNA、HBV X基因在HCC中的分布

HCV RNA、HBV X基因在HCC中的检出率分别为40%(55/136)及82%(112/136)，二者同时阳性占34%(46/136)。阳性杂交信号为紫蓝素，细颗粒状，HCV RNA位于癌细胞的胞浆内，呈灶状或弥漫分布(见封3彩图版1-A)，HBV X基因以胞浆阳性为主，也可见核阳性或核浆阳性(见封3彩图版1-B)，阳性细胞呈散在、灶状或弥漫分布。

2.2 HCV C33c、核心抗原及HBxAg在HCC中的分布

应用抗HCV C33c、核心抗原单克隆抗体及抗HBxAg多克隆抗体对164例HCC组织及76例癌旁肝组织进行相关抗原检测，阳性物质为棕黄色均匀细颗粒状，C33c抗原位于癌细胞及肝细胞胞浆内，紧靠核周，在胞浆内呈局灶或弥漫分布(见封3彩图版1-C)。C33c阳性细胞呈散在、局灶、弥漫三种分布形式，癌组织中以散在，局灶型分布为多见，癌旁肝组织中以弥漫阳性为主。HCV核心抗原既定位于肝细胞或癌细胞核中，又可定位于这些细胞的胞浆中，不同病例，或以胞浆阳性为主，或以胞核阳性为主，或二者同时阳性；但在肝细胞肝癌组织中，HCV核心抗原以弥漫胞核阳性多见(见封3彩图版1-D)，癌旁肝组织中多为HCV核心抗原胞浆阳性。HBxAg的阳性主要分布于癌细胞及肝细胞胞浆内(见封3彩图版1-E)，但在部分病例可见肝细胞及癌细胞核阳性，在同一切片双标记观察HBxAg和HCV C33c抗原阳性细胞有部分重叠(见封3彩图版1-F)，二者阳性细胞分布并不完全一致。无论是HCV

维普资讯 http://www.cqvip.com

C33c、核心抗原还是HBxAg,在HCC组织的不同标本或同一标本的不同区域,均有二者表达的强弱不等。阴性对照实验为阴性,阳性对照实验为阳性。

2.3 HCV C33c抗原、核心抗原及HBxAg在HCC中的检出率及相互关系

三种抗原在HCC中的检出率见表1。经统计学X^2检验,C33c抗原在HCC癌组织及其癌旁肝组织的检出率无显著差异($P>0.05$),核心抗原在HCC癌组织中的检出率明显高于其在癌旁肝中的检出率($P>0.01$),而HBxAg在癌旁肝中的阳性率显著高于癌组织($P>0.05$);在HCC癌组织中,HCV核心抗原的检出率明显高于C33c抗原及HBxAg的检出率($P>0.05$);在癌旁肝组织中,HBxAg的阳性率明显高于C33c及核心抗原的阳性率($P>0.01$)。在所研究HCC病例中,三种抗原阳性率无显著差异($P>0.05$)。

表1 HCV C33c、核心抗原(C)及HBxAg在HCC及其癌旁肝中的检出率

病理诊断	例数	C33c	C	HBxAg	C33c和HBxAg
癌组织	164	102(62%)	123(75%)	105(64%)	69(42%)
癌旁肝组织	76	49(65%)	37(48%)	69(91%)	42(55%)
癌及癌旁肝	164	133(81%)	141(86%)	123(75%)	103(63%)

3 讨论

应用原位分子杂交及免疫组织化学方法对HCV RNA及其相关抗原的检测,国内外仅有少数报道[9-13],且仅为对抗HCV抗体阳性小样本肝穿组织进行检测。本文是对大样本HCC组织中HCV RNA、C33c、核心抗原和HBV X基因及HBxAg的分布进行了研究。实验中设计了严格对照,证明结果是特异可靠的。HCV RNA可定位于HCC的癌细胞胞浆中,进一步证实了前人的工作,此外,本实验中HCV RNA在HCC中的检出率为40%,略高于以往用RT-PCR检测血清HCV RNA的结果,但较HCV C33c抗原及核心抗原的检出率明显为低,分析其主要原因是存在RNA的降解丢失,可能是组织蜡块保存较久,造成RNA的降解。

C33c抗原、核心抗原是目前HCV抗体检测试剂盒中的主要组成成分,C33c抗原是HCV基因表达产物中一个重要的优势表位抗原,它由HCV NS3基因编码,NS3基因编码的蛋白为一多功能蛋白质,具有丝氨酸蛋白酶、核苷三磷酸酶及解旋酶等多种酶的活性[1],尤其是解旋酶,它可能参与HCV RNA复制时RNA基因组的展开。核心抗原由HCV的结构基因编码表达,富含碱性氨基酸,表明核心蛋白可能和病毒RNA结合构成核衣壳。C33c抗原、核心抗原在HCC中的高表达,揭示HCV在癌细胞中的增殖复制是活跃的,这从另一侧面证实了HCV RNA在肝细胞、肝癌细胞中复制的结果[11]。

应用抗HCV C33c、核心抗原两种单克隆抗体对HCC中HCV相关抗原进行检测,结果显示C33c抗原位于肝癌细胞或肝细胞胞浆内,核心抗原在肝细胞及癌细胞中既有胞核阳性,也有胞浆阳性,或二者同时阳性。核心抗原阳性肝细胞及癌细胞多呈弥漫分布。有研究表明,核心蛋白的99~102氨基酸之间可能存在着一个DNA结合域,并且在核心蛋白中还可能存在着几个核定位信号及几个蛋白激酶A和C的认别位点,说明核心蛋白可能是一种基因调节蛋白[14,15]。HCV核心蛋白转基因鼠研究证明核心蛋白能直接诱导HCC的发生[15,16]。因此,核心蛋白核阳性的出现,为分析其致病机理提供了新的思路。

HBxAg在HCC中的分布与文献报道基本一致[17-19]。本文研究结果,HCV C33c抗原、核心抗原与HBxAg在HCC中的阳性率比较无显著差异,但其混合感染为63%,而在164例HCC中伴有HCV和/或HBV感染为95%,揭示HCV和HBV是我国HCC发生的主要生物致病因素。以往国内外研究表明,HBV是HCC发生的主要致病因素之一,近年来对HCV与HCC发病关系的研究表明,HCV在HCC发生中具有重要作用,特别是在日本尤为重要[9,12]。目前许多研究者认为HBV和HCV混合感染或重叠感染是HCC发生的重要原因之一[20-28]。

人原发性HCC的发生是一个多因素、多阶段极其复杂的过程。HBV和/或HCV长期慢性感染是其致病因素之一。综合分析,我国HCC发生的可能机理如下:(1)HBV和/或HCV感染引起肝细胞的反复损伤坏死和增生,最后导致肝细胞癌变[16];(2)HBV X基因整合到肝细胞基因组,通过插入突变、染色体重排或HBV X基因表达产物的反式激活作用引起肝细胞基因表达的改变[29-32]。有资料表明X蛋白可形成一个新的、非常小的蛋白激酶,它一方面可以通过增加细胞内原癌基因表达产物c-myc、c-fos的活性,另一方面,X相关蛋白激酶活性能通过磷酸化改变许多细胞内蛋白的功能状况,使肿瘤抑制基因Rb-1、p53的失活等,从而起动或促进恶性转化[33];(3)HCV核心抗原可能影响细胞基因组的表达调

维普资讯 http://www.cqvip.com

控,并进而影响细胞的增生、分化导致肝细胞癌变[6];(4)HCV 基因表达产物通过干扰细胞内第二信使传递途径而改变细胞基因表达,或通过生产因子(IGF-Ⅱ、TGF-α 等)、癌基因、DNA 结合蛋白的激活而间接影响细胞的生长、分化等[11,35]。在不同个体的 HCC 发生中,可能以某一种致癌方式为主,或者几种方式同时存在协同作用而致癌变的发生。HBV 和 HCV 在 HCC 中的真正作用机制及其相互关系,有待于通过细胞转染及动物模型建立等,以便进一步在分子水平阐明 HBV 和 HCV 的致癌机理。

参考文献

[1] Houghton M, Weiner A, Han J, *et al*. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease[J]. Hepatology, 1991, 14(2): 381 – 388.

[2] Di-Bisceglie A M, Order S E, Klein J L, *et al*. The role of chronic viral hepatitis in hepatocellular carcinoma in the United States[J]. Am J Gastroenterol, 1991, 86(3): 335 – 338.

[3] Bukh J, Miller R H, Kew M C, *et al*. Hepatitis C virus RNA in southern African blacks with hepatocellular carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(5): 1848 – 1851.

[4] Di-Bisceglie A M. Hepatitis C and hepatocelluadr carinoma[J]. Semin Liver Dis, 1995, 15(1): 64 – 69.

[5] Colombo M. The role of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma [J]. Recent Results Cancer Res, 1998, 154: 337 – 344.

[6] Dutta U, Kench J, Byth K, Khan M H, Lin R, Liddle C, Farrell CC. Hepatocellular proliferation and development of hepatocellular carcinoma: a case-control study in chronic hepatitis C[J]. Hum Pathol, 1998, 29(11): 1279 – 1284.

[7] J.萨姆布鲁克,E.F.弗里奇,T.曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1992.24 – 27.

[8] 王春杰,邓平非,张雯,等.应用原位杂交及免疫组化检测肝活检组织中流行性出血热病毒 RNA 及抗原[J].中国病毒学,1993,8(3):213 – 217.

[9] Tsutsumi M, Urashima S, Takada A, *et al*. Detection of antigens related to hepatitis C virus RNA encoding the NS3 region in the livers of patients with chronic type C hepatitis[J]. Hepatology, 1994, 19(2): 265 – 272.

[10] Blight K, Rowland R, Hall P D, *et al*. Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology[J]. Am J Pathol, 1993, 143(6): 1568 – 1573.

[11] Gerber M A, Shieh Y S, Shim K S, *et al*. Detection of replicative hepatitis C virus sequences in hepatocellular carcinoma[J]. Am J Pathol, 1992, 141(6): 1271 – 1277.

[12] Ohishi M, Sakisaka S, Harada M, *et al*. Detection of hepatitis-C virus and hepatitis-C virus replication in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization[CD]. Scand J Gastroenterol, 1999, 34(4): 432 – 438.

[13] 王春杰,王文亮,王伯云.肝硬变中丙型肝炎病毒 C33c 抗原及 HBxAg 的分布及意义[J].中国病毒学,1995,10(2):135 – 140

[14] Ray R B, Steele R, Meyer K, *et al*. Transcriptional repression of p53 promotor by hepatitis C virus core protein[J]. J Biol Chem, 1997, 272(17): 10983 – 10986.

[15] Moriya K, Fujie H, Shintani Y, *et al*. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice[J]. Nature Medicine, 1998, 4(9): 1065 – 1068.

[16] Huang S N, Chisari F V. Strong, sustained hepatocellular proliferation precedes hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic mice[J]. Hepatology, 1995, 21(3): 620 – 626

[17] 王文亮, London WT, Feitelson MA. 慢性肝炎、肝硬变和原发性肝癌内 HBxAg 的表达及意义[J]. 第四军大学学报, 1992, 13(2): 88 – 92.

[18] Wang W L, Lindon W T, Feitelson M A. Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer[J]. Cancer Res. 1991, 51(18): 4971 – 4977.

[19] Su Q, Schroder C H, Hofmann W J, *et al*. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV – infected human livers and hepatocellular carcinomas[J]. Hepatology, 1998, 27(4): 1109 – 1120.

[20] Idilman R, De-Maria N, Colationi A, *et al*. Pathogenesis of hepatitis B and C-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Viral Hepat, 1998, 5(5): 285 – 299

[21] Zhang J Y, Dai M, Wang X, *et al*. A case-control study of hepatitis B and C virus infection as risk factors for hepatocellular carcinoma in Henan, China[J]. Int J Epidemiol, 1998, 27(4): 574 – 578.

[22] Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect to hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 1998, 75(3): 347 – 354.

[23] Tsai J F, Jeng J E, Ho M S, *et al*. Effect of hepatitis C and B virus infection on risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. Br J Cancer, 1997, 76(7): 968 – 974.

[24] Edamato Y, Tani M, Kurata T, *et al*. Hepatitis C and B virus infections in hepatocellular carcinoma. Analysis of direct detection of viral genome in paraffin embedded tissues[J]. Cancer. 1996, 77(9): 1787 – 1791.

[25] Tsai J F, Chang W Y, Jeng J E, *et al*. Hepatitis B and C virus infection as risk factors for liver cirrhosis and cirrhotic hepatocellular carcinoma: a case-control study[J]. Liver. 1994, 14(2): 98 – 102.

[26] Tsai J F, Chang W Y, Jeng J E, *et al*. Effects of hepatitis C and B viruses infection on the development of hepatocellular carcinoma[J]. J Med Virol. 1994, 44(1): 92 – 95.

[27] Goritsas C P, Athanasiadou A, Arvaniti A, *et al*. The leading role of hepatitis B and C viruses as risk factors for the development of hepatocellular carcinoma. A case control study[J]. J Clin Gastroenterol, 1995, 20(3): 220 – 224.

[28] Suga M, Senota A, Arima K, *et al*: Prevalence of HBV and HCV infection in Japanese patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 1994, 41(5): 438 – 441.

[29] Andrisani O M, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review) [J]. Int J Oncol, 1999, 15(2): 373 – 379.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[30] Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, *et al*. Possible contribution to hepatocarcinogenesis of X transcript of hepatitis B virus in Japanese patients with hepatitis C virus[J]. Hepatology, 1999, 29(5): 1429 - 1434.

[31] Zhu M, London W T, Duan L X, *et al*. The value of hepatitis B x antigen as a prognostic marker in the development of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 1993, 55(4): 571 - 576.

[32] Koike K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis[J]. Intervirology, 1995, 38(3 - 4): 134 - 142.

[33] Feitelson M A. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 1998, 5(4): 367 - 374.

[34] Ryder S D, Koskinas J, Rizzi PM, *et al*. Hepatocellular carcinoma complicating autoimmune hepatitis: role of hepatitis C virus[J]. Hepatology, 1995, 22(3): 718 - 722.

[35] Schirmacher P, Rogler C E, Dienes H P. Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis[J]. Virchows Archiv B Cell Pathol, 1993, 63(2): 71 - 78.

维普资讯 http://www.cqvip.com

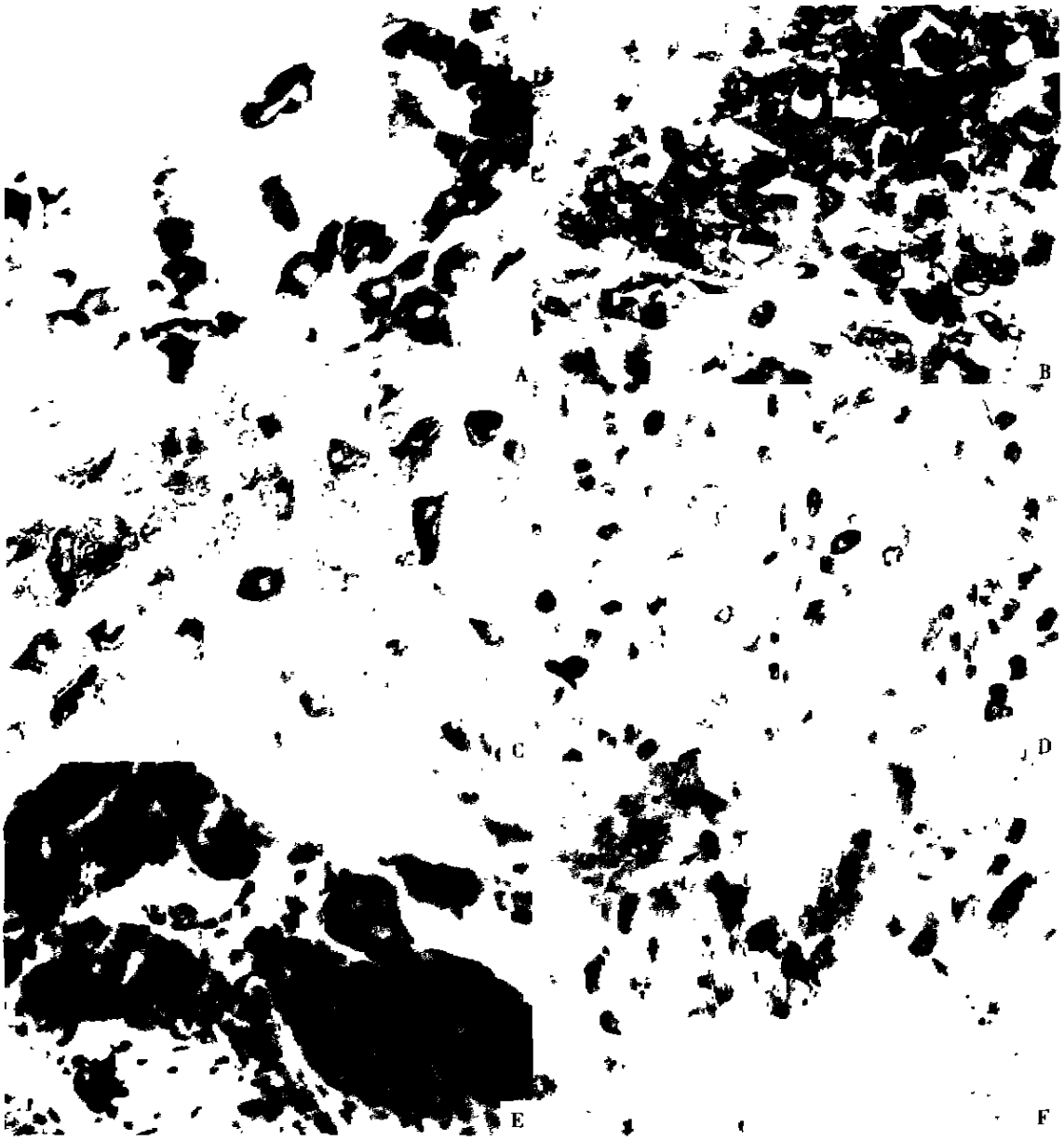

图1　HCV RNA、C33c抗原、HBV X基因、HBxAg在HCC组织中的分布

A,HCC组织、HCV RNA阳性信号位于癌细胞浆内，阳性细胞呈局灶型分布（ISH × 400）；B,HCC组织,HBV X基因阳性信号位于癌细胞核、浆内、阳性细胞呈局灶型分布（USH × 400）；C,HCC组织,HCV C33c抗原位于癌细胞浆内，阳性细胞呈局灶型分布（ABC × 400）;D,HCC组织，HCV核心抗原位于癌细胞核内，阳性细胞呈弥漫型分布（ABC × 400）;E,HCC组织，HBxAg阳性物质位于癌细胞浆内，阳性细胞呈局灶型分布（ABC × 400）;F,HCC组织，HBxAg和C33c阳性物质位于癌细胞及肝细胞浆内，HBxAg呈棕色、C33c呈紫色，阳性细胞呈局灶型分布（ABC双染色 × 400）。

Fig.1 Distribution of HCV RNA,C33c antigen,HBV X gene,core antigen and HBxAg in HCC tissues.

A,The Positive signals of HCV RNA are localized in the cytoplasm of cancerous cells,its positive cells are distributed in local patten(ISH × 400);B,The positive signals of HBV X gene are localized in the nuclei and the cytoplasm of cancerous cells,its positive cells were focal in distribution(ISH × 400);C,The HCV C33c antigens are localized in the cytoplasm of cancerous cells, its positive cells are local in distribution(ABC × 400);D,The HCV core antigens are localized in the nuclei,its positive cells are diffuse in distribution (ABC × 400);E,The HBxAg positive substances are loacalized in the cytoplasm of cancerous cells, its postive cells are local in distribution(ABC × 400);F,The positive substances of HBxAg and C33c antigen are localized in the cytoplasm of cancerous and hepatocytic cells,HBxAg positive is showed as brown color and C33c as purple,its positive cells are local in distrbution(ABC double stining × 400).

Note: ISH=*In situ* hybridization;ABC=Avitin biotin-peroxidase complex technique.