DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.025

原发肝癌 AFP基因的表达与血清 HBsAg关系的观察

罗元辉* 房殿春 鲁 荣 门荣甫 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 630038

提 要 目的: 探讨 AFP mRNA的表达与 HBV感染的关系。方法: 采用逆转录 PCR技术对 31例原发肝癌组织中 AFP mRNA的表达进行了观察。结果: 31例肝癌组织有 26例(83.9%)检出 AFP mRNA,阳性者中有 7例同时伴有癌旁肝组织 AFP mRNA的表达,此 7例患者均伴有明显的肝硬化。肝癌组织 AFP mRNA检出率在血清 HBsAg阳性组(86.9%),伴有肝硬化组(87.0%)和血清 AFP> 30 ng/ml组(100%)分别显著高于血清 HBsAg阴性组(50%)、无伴有肝硬化组(50.0%)和血清 AFP≤ 30 ng/ml组(46.02%)($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论: 肝癌组织 AFP mRNA的表达可能与 HBV感染,肝细胞再生修复有关。

关键词 肝肿瘤; 甲胎蛋白 mRNA; 逆转录 PCR
中图法分类号 R735.7

甲胎蛋白(AFP)是一种主要由胎肝细胞和卵黄囊产生的大分子糖蛋白,出生后 AFP蛋白的合成逐渐停止,但当肝细胞发生癌变时,这种胚胎抗原的基因被激活,可重新产生大量 AFP。因此检测血清 AFP的产生水平对原发肝癌的诊断有重要意义。血 AFP水平的升高可能与肝癌细胞 AFP基因在 mRNA水平上的改变有关。为阐明肝癌组织 mRNA表达及意义,本研究采用逆转录 PCR技术对原发肝癌组织中 AFP mRNA的表达进行了观察。

1 材料和方法

1.1 标本收集和 RNA提取

31例原发肝细胞癌为我院 1994年 1月至 1996年 6月手术切除标本。手术切下肿瘤后立即收集癌组织和癌旁肝组织,剔除出血、坏死部分后,-80℃冻存备用。采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取肝癌和癌旁肝组织总 RNA[1]。经紫外分光和甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定,证明制备的 RNA未受到明显的污染和降解。

1.2 逆转录反应

反应体积 20μl,含 RNA 5μg, 3′端 AFP mRNA外引物 10 pmol/L,各种 dNTP 1 mmol/L, RNasin 20U及 MLV逆转录酶 200U(GIBCOBKL), 37℃反应 1 h。

1.3 巢式 PCR

1.3.1 第一轮 PCR 取上述逆转录反应产物 10μl加 10 ml PCR反应液(含 3′端外引物 15 pmol/L, 5′端外引物 20 pmol/L,各种 dNTP 200μmol/L, Taq DNA聚合酶 1.5 U,华美公司)。先在 DNA循环仪(Perkin Elmer Cetus, 2400型)上 93℃变性 6 min,然后进入 PCR循环,循环参数为 93℃ 40s, 52℃ 40s, 72℃ 60s,循环 40次。

1.3.2 第二轮 PCR 取第一轮扩增产物 3μl加 PCR反应液 17μl(含 3′端及 5′端内引物各 15 pmol/L,各种 dNTP 200 μmol/L, Taq DNA聚合酶 1.5 U)循环参数为 93℃ 40s, 52℃ 40s, 72℃ 60s,循环 40次。最后在 72℃继续反应 10 min。所用引物参照文献[2]由上海细胞生物研究所合成,引物序列如下:

外引物 5′-ACTGAATCCAGAACACTGCATAG-3′
5′-TGCAGTCAATGCATCTTTCACCA-3′
内引物 5′-TGGAATAGCTTCCATATTGGATTC-3′
5′-AAGTGGCTTCTTGAACAAACCGG-3′

1.4 结果分析

取第二轮 PCR扩增产物 10μl, 2%琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,紫外光下观察并照像。AFP mRNA阳性者可见 101 bp电泳条带。

1.5 统计分析

采用 χ^2检验,分析各组间差异。

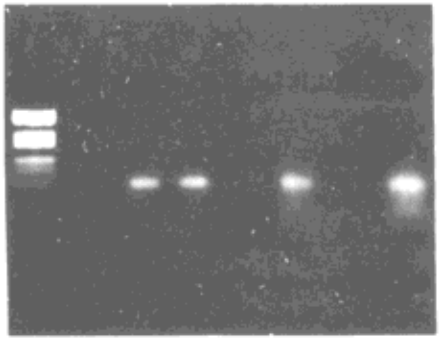
2 结果

2.1 原发肝癌及癌旁肝组织 mRNA的表达

AFP mRNA阳性肝组织经巢式 PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳,可见清晰的产物带型,电泳位置符合预测值,见附图。31例原发肝癌组织检出 AFP mRNA 26例,阳性率为 83.9%。26例 AFP mRNA阳性肝癌中有 7例同时有癌旁肝组织 AFP mRNA的表达,此 7例患者均伴有明显的肝硬化。

* 罗元辉 女, 53岁,副主任技师

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



附图 原发肝癌 **AFP mRNA**的表达 例 2 3 5 7检出 AFP mRNA M:分子量标记

Fig Expression of AFP mRNA in hepatocellular carcinoma. AFP mRNA was detected in cases 2, 3, 5, 7

2.2 AFP mRNA表达与血清 AFP和 HBsAg的关系

将 31例原发肝癌按血清 HBsAg和 AFP水平进行分组,原发肝癌 AFP mRNA的表达与以上参数的关系见附表。

附表 **AFP mRNA**表达与血清 **AFP**和 **HBsAg**的关系

Tab The relation of AFPl mRNA expression in hepatocellular carcinoma with serum HBsAg and AFP

Group	*n*	AFP mRNA	
		Negative	Positive
HBsAg			
Negative	8	4	4(50.0%)
Positive	23	3	20(87.0%)*
AFP			
≤ 30 ng/ml	13	7	6(46.2%)
> 30 ng/ml	18	0	18(100.0%)△

*: $P<0.05$ *vs* HBsAg negative;
△: $P<0.01$ *vs* AFP≤ 30 ng/ml

由附表可见,AFP mRNA检出率在血清 HBsAg阳性组(87.0%)和 AFP> 30 ng/ml组(100%)分别显著高于 HBsAg阴性组(50.0%)和 AFP≤ 30 ng/ml组(46.2%)($P<0.05$~0.01)

3 讨论

Emerson和 Di等[3,4]报告原发肝细胞癌 AFP mRNA表达的阳性率为 80%,本组为 83.9%,说明大部分原发肝细胞癌 AFP基因呈激活状态,其产物 mRNA的表达明显增高。本研究还显示血清 AFP水平≤ 30 ng/ml者肝癌组织中 hAFP mRNA表达者为 46.2%,而血清 AFP水平> 30 ng/ml者 hAFP mRNA阳性检出率为 100%,提示肝癌组织 AFP基因表达可导致血清 AFP水平升高,此与 peng等[5]结果一致。大量研究证明 AFP基因激活具有异质性,表现为基因转录和翻译等不同水平的活化。从本研究结果看,31例原发肝癌中 AFP mRNA表达阳性率为 83.9%,而血清 AFP阳性率为 58.1%,提示 AFP基因转录水平活化频率高于翻译水平的频率。

乙肝病毒感染与原发肝癌的发生有密切关系。但乙肝病毒感染与原发肝癌组织 hAFP mRNA表达的关系文献中却鲜见报道。Muguti等[6]报道血清 HBsAg(+)的原发肝癌患者血清 AFP水平显著高于 HBsAg(-)患者,认为 AFP水平因 HBsAg状态不同有显著差异。Lee等[7]研究亦证明,血清 AFP水平增高多见于血清 HBsAg(+)患者,认为检测 HBsAg(+)患者的 AFP对原发肝癌的诊断更具有价值。本研究采用巢式逆转录 PCR技术对原发肝细胞癌组织的 AFP mRNA进行检测发现,血清 HBsAg阳性组 AFP mRNA的检出率为 87.0%,显著高于 HBsAg阴性组(50.0%),提示 AFP mRNA的表达可能与 HBV感染有一定关系。HBV致使原发肝癌 AFP mRNA重新表达的确切机理尚不清楚,但根据以往研究推测 HBV复制造成肝细胞损伤,随之发生的肝细胞再生和修复,促进了 AFP合成增加,可能是造成 HBsAg阳性和 HBsAg阴性患者肝癌组织 AFP mRNA表达显著不同的重要原因,HBV致原发肝癌 AFP mRNA重新表达的机制可能是由于 HBV整合致 AFP基因 5′端低甲基化所致[5,8]。

Di Bisceglie等[4]对原发肝癌癌旁组织进行原位杂交和免疫组化染色结果表明,表达有 AFP mRNA阳性杂交信号和 AFP抗原的癌旁肝细胞是一类具有癌前期生物活性的细胞,它的出现有可能与癌的进展和逃避机体免疫监视有一定关联。本研究结果显示,26例 AFP mRNA阳性肝癌中有 7例同时有癌旁肝组织 AFP mRNA的表达,且此 7例患者均伴有明显的肝硬化。大量研究表明,多数原发肝癌的发生是循乙型肝炎→肝硬化→肝癌的途径进行演变。Oka[9]研究血清 AFP在监测肝硬化癌变方面的意义发现,AFP < 20 ng/ml肝硬化 5年随访的癌变率为 26%,而> 20 ng/ml者 5年癌变率为 46%。说明癌旁 AFP mRNA阳性细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

是具有癌前性质的细胞,这些细胞已具有了胚胎或原发肝癌的某些特征,这种胚胎抗原基因的表达可先于HCC的发生,因此通过活检样品检测肝硬化组织AFP mRNA的表达可能有助于预测肝癌的早期发生。

参考文献

1 王东旭,房殿春,罗元辉等.胃癌组织 DCC基因杂合缺失和mRNA表达研究.中华肿瘤杂志, 1996; 16(5): 331

2 Komeda T, Fukuda Y, Sando T *et al*. Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood. Cancer, 1995; 75(9): 2214

3 Emerson J A, Vacher J, Cirillo L A *et al*. Lesions from the reexpression of the α-fetoprotein gene in the adult liver. Hepatology, 1993; 18(4): 1009

4 Di Bisceglie A M, Dusheiko G M, Paterson A C *et al*. Detection of alpha-foetoprotein messenger RNA in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma tissue. Br J Cancer, 1986; 54(5): 779

5 Peng S Y, Lai P L, Chu J S *et al*. Expression and hypomethylation of α-Fetoprotein gene in unicentric and multicentric human hepatocellular carcinomas. Hepatology, 1993; 17(1): 35

6 Muguti G, Tait N, Richardson A *et al*. Alpha-fetoprotein expression in hepatocellular carcinoma: A clinical study. J Gastroenterol Hepatol, 1992; 7(4): 374

7 Lee H S, Chung Y H, Kim C Y. Specificities of serum α-Fetoprotein in HBsAg+ and HBsAg- patients in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 1991; 14(1): 68

8 Chen J Y, Hsu H C, Lee C S *et al*. Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma: methylation of integrated viral DNA. J Virol methods, 1988; 19(2): 257

9 Oka H, Tamori A, Kruoki T *et al*. Prospective study of α-Fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma, Hepatology, 1994; 19(1): 61

(收稿: 1996-12-20;修回: 1997-05-10)

(编辑　仇玉福)

A study of the relationship between expression of AFP gene and serum HBsAg in patients with primary hepatocellular carcinoma

Luo Yuanhui, Fang Dianchun, Lu Rong, Men Rongpu, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To study the relationship between expression of AFP gene and serum HBsAg. Methods: The expression of human alpha-fetoprotein mRNA (AFP mRNA) was examined with nest reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in 31 surgically resected specimens of primary hepatocellular carcinoma. Results: AFP mRNA was positive in 26 out of 31 specimens (83.9%). Of the 26 positive specimens, 7 with obvious liver cirrhosis exhibited AFP mRNA expression in juxtacarcinomatous tissue. The frequency of expression of AFP mRNA was significantly higher in specimens of serum HBsAg positive and serum AFP> 30ng/ml than in those of serum HBsAg negative and serm AFP< 30ng/ml respectively ($P < 0.01$). Conclusion: The expression of AFP mRNA may be related to HBV infection and regeneration of hepatic cells.

Key words primary liver cancer; AFP mRNA; RT-PCR.

《急性肝衰竭》　书　讯

《急性肝衰竭》系顾长海等45位专家教授编著,全书58章约70万字,本书从临床实际出发,着重反映国内外急性肝衰竭特别是重型病毒性肝炎的研究治疗进展。本书由四川科学技术出版社出版,统一书号: ISBN 75364-3558-4/R.769,定价33元。欲购者请与本刊王红小姐联系。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net