DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.03.021

地高辛标记探针原位杂交对肝细胞癌HBV DNA分布的研究

王 东 张新立 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室)重庆,630038

提 要 为了探讨HBV与肝细胞癌(HCC)发病的关系,作者应用地高辛标记HBV DNA探针原位杂交及免疫组化检测了80例HCC组织及癌周肝组织的HBV DNA、HBsAg。结果显示,癌周肝组织HBV阳性63例(79%),癌组织HBV阳性49例(60%),癌周阳性细胞数明显多于癌内。癌周HBV DNA,以复制型为主,而癌组织的HBV DNA大多属整合型。结果表明大多数HCC病例与HBV存在密切相关,而且整合型HBV DNA在HCC发生过程中有着重要的作用。

关键词 肝肿瘤;杂交;脱氧核糖核酸;病毒;乙型肝炎抗原

中图法分类号 R735.7

目前国内外已有许多研究发现乙型肝炎病毒(HBV)感染和肝细胞性肝癌(HCC)的发生密切相关,尽管进行了大量和多层次的研究,但其癌变的机理尚未完全阐明。分子生物学的研究表明肝炎病毒的致癌潜能可能与下面三个相互独立的过程有关:①病毒DNA整合到宿主的基因组中;②某种基因如X基因翻译产物对病毒基因和细胞基因有反式激活作用;③引起慢性肝为,从而启动细胞再生[1]。应用Southern blot可以确定肝组织中HBV DNA呈整合抑或游离状态,但对肝组织内HBV DNA不能精确定位。随着原位杂交技术的发展,很多学者应用此方法对HBV感染的肝组织内HBV DNA进行了广泛的研究,但大多数为同位素[2]或生物素标记的方法[3]。我们用地高辛标记的HBV探针在HCC组织及癌周肝组织的石蜡切片上进行原位杂交,试图从形态上了解HBV DNA在肝癌组织及癌周肝组织内的定位及其分布情况,并探讨HBV与HCC的发病关系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集1988~1993年本校西南医院肝癌手术切除标本80例。病理确诊HCC,每例均有肝癌组织及癌旁肝组织,标本以10%福尔马林固定,石蜡包埋连续切片,分别进行HE染色,HBsAg免疫组化染色及HBV DNA原位杂交。

1.2 HBV DNA原位杂交检测

1.2.1 Dig-HBV DNA探针制备 含有HBV DNA全基因(3.2 Kb)的质粒PBR322由日本JCRB Hishimoto. PhD惠赠。碱变性法大规模提取质粒DNA[4]。BamHI酶切后电洗脱法回收目的基因片段。使用Boehringer Mannheim公司提供的地高辛标记及检测试剂盒进行标记。

1.2.2 原位杂交 按文献[5]的方法并加以改进。石蜡切片60℃烤片48 h,常规脱蜡水化;0.2 mol/L HCl室温10 min水洗;Pronase E(0.1 mg/ml)37℃ 20~30 min;0.1%甘氨酸-PBS 5 min中止消化;4%多聚甲醛固定10 min,PBS冲洗;用新配制的含0.25%醋酐的0.1 mol/L三乙醇胺缓冲液酰化10 min;Denhart's液37℃ 30 min;逐级酒精脱水;滴加预变性的杂交液(50%去离子甲酰胺,10%硫酸葡聚糖,10 mg/ml鲱精DNA,5 × Denhart's液,5 × SSC,0.3 μg/ml Dig-HBV DNA 100℃沸水浴5 min,迅速至冰浴中3 min);盖盖玻片;95℃变性10 min,速冷后,42℃温箱过夜;用50%去离子甲酰胺(2×SSC配制)洗涤10 min,2次;2×SSC 10 min,2次;PBT 10 min,2次;滴加连接碱性磷酸酶的地高辛抗体1:5000,37℃,1 h;用NBT显色;0.5%甲基绿复染,封片观察。为保证待测标本中所检出的杂交信号确系HBV DNA,实验室中设置了无探针对照,正常肝组织对照,DNA酶I消化对照。

1.3 免疫组织化学(PAP法)检测肝癌组织及癌周肝组织内HBsAg

羊抗HBsAg,羊PAP均购自华美公司。具体步骤按Sternberger法进行,每批切片染色时均设HBsAg标准阳性片及阴性片进行对照。

2 结果

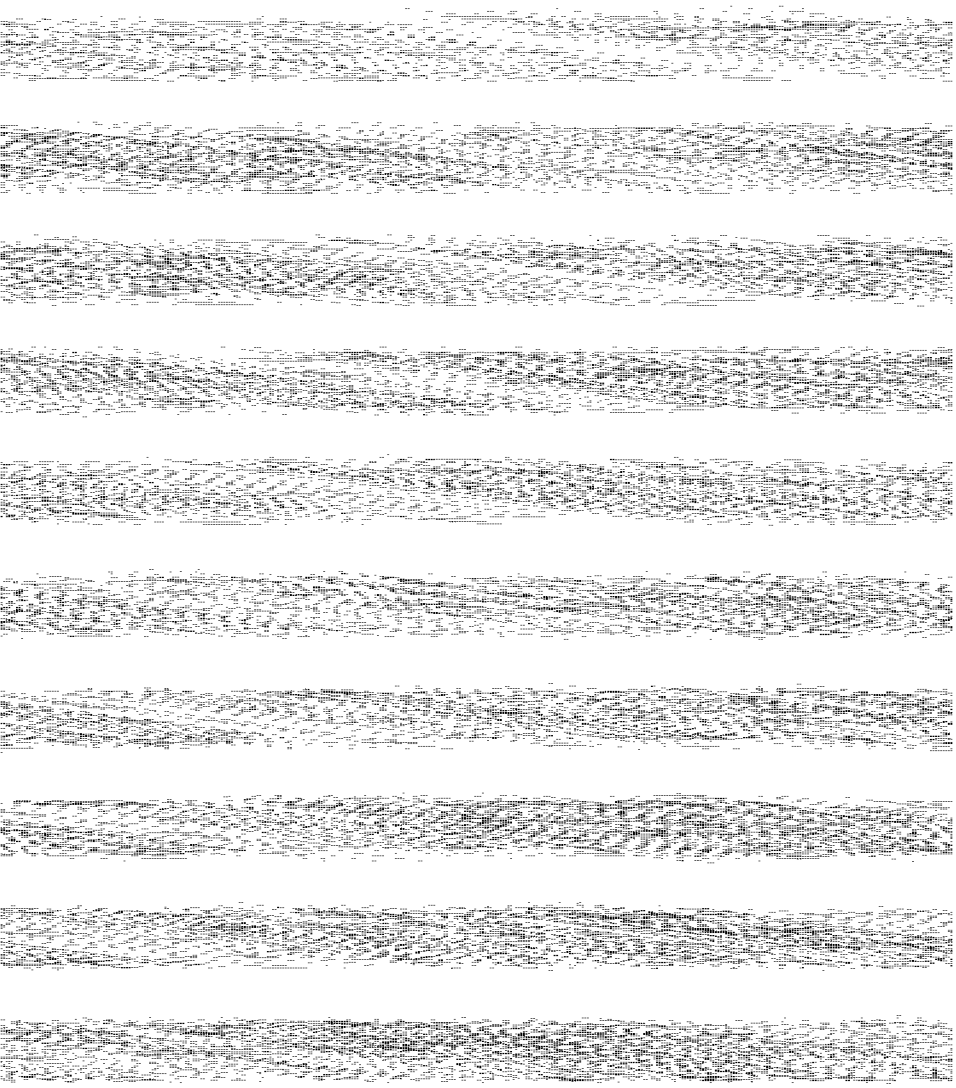
2.1 癌周肝组织及癌组织内HBV检出率

80例HCC中,癌周肝组织HBV阳性率为79%(63例),癌组织HBV DNA阳性率为60%(49例)。前者高于后者,但无统计学差异($P>0.05$)。癌周肝组织内HBsAg阳性率为66%,而肝癌组织中HBsAg阳性率为仅为13%。两者有显著差异。

2.2 癌周肝组织及癌组织内HBV DNA及HBsAg分布特点

地高辛标记探针杂交的HBV DNA阳性信号为紫色细颗粒状,主要分布于肝组织或癌细胞胞浆内,部分位于胞核内,胞浆内阳性颗粒较胞核内量多,在不同病例中,胞核或胞浆内的阳性分布情况不同,即使同一病例不同部位其分布也不相同。在癌周肝组织中,HBV DNA呈片状分布,常见于癌结节边缘的非癌肝组织中,也见于肝细胞变性坏死区域;而癌组织内HBV DNA阳性颗粒较癌周肝组织稀疏,HBV DNA不仅见于癌中心部,亦可见于癌周边部。胞浆内颗粒可单独存在,但当核内显阳性颗粒时,胞浆内必然呈阳性(图1)。

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



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

织 HBxAg 在50%～70%，皆低于癌周肝组织。本组肝癌组织 HBsAg 阳性率为13%与文献报告相符。肝癌组织中 HBV DNA 多以整合状态存在，而整合状态的 HBV DNA 常为 HBV 基因的部分片段，并伴有病毒基因的缺失、移位、倒置及整合位点处宿主 DNA 的丢失。因此在本研究中，肝癌组织内 HBsAg 阳性率显著低于癌周肝组织可能与此有关。同时表明用原位杂交检测 HBV DNA 较免疫组化能更客观地反映肝癌组织HBV的存在及其存在状态，具有重要的实用价值。

原位杂交技术将分子生物学和细胞形态学相结合，可以在肝组织切片上观察 HBV DNA 在肝组织内的定位和分布情况，这为探索 HBV 与 HCC 发生的关系提供了一种新的可靠方法。成功制备核酸探针及适当的蛋白酶消化是影响原位杂交结果的关键因素。为防止假阳性结果，实验中设置了较严格的对照。将切片组织用 DNase I 消化后，原来阳性杂交信号未见出现，而 RNase 消化则不影响原来的杂交结果，确证检测到的是 HBV DNA，而并非 mRNA。目前，同位素，荧光素和生物素是最常用的核酸探针标记物，但均有难以避免的缺点，不能广为应用。地高辛（又名异羟基洋地黄毒甙）是一种植物半抗原，与生物素不同，它在动物细胞中不存在，因此不产生背景染色，从而大大提高了 HBV DNA 探针检测的特异性及敏感性。与同位素标记比较，它不受半衰期限制，而且价廉省时，操作简便，组织结构清晰，利于观察和定位。我们的结果 HCC 组织中 HBV DNA 阳性率为79%，高于用生物素等制备探针的检测结果[3]。一方面可能与病例选择（本实验材料来源于 HBV 高感染区的 HCC）有关；另一方面与地高辛标记的高灵敏度有关。

参考文献

1 Schirmacher P, Rogler, Dienes H. Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis. Virchows Archiv B Cell Pathol, 1993; 63: 71

2 陆伦根，徐秉栋，彭 韬. 肝癌细胞癌 HBV DNA 的原位杂交研究. 中华病理学杂志，1993; 22(1): 13

3 Choi YJ. In situ hybridization using a biotinylated DNA probe on formalin-fixed liver biopsies with hepatitis B virus infections: in situ hybridization superior to immunohistochemistry. Modern Pathol, 1990; 3: 343

4 Sambrock J. Molcular Cloning, 2nd ed. New York: Cold Spring Herbor Lab Press, 1989; 9: 3～4

5 Lau JYN, Naourmov NV, Alexander JM et al. Rapid detection of hepatitis B virus DNA in liver tissue by in situ hybridization and its combination with immunohistochemistry for simultaneous detection of HBV antigens. J Clin Pathol, 1991; 44: 905

6 陈梅龄，Gerber MA, Thung SN 等. 用原位杂交技术对肝细胞肝癌 HBV DNA 分布的研究. 中华病理学杂志，1989; 18(3): 178

7 Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma molecular biology of its growth and relationship to hepatitis B virus in fection. Med Clin Nar Am, 1989; 73: 985

8 Omata M, Yokosuka O, Imazeki F et al. Correlation of hepatitis B virus DNA and antigens in the liver: a study in chronic liver disease. Gastroenterology, 1987; 92: 192

9 韩慧霞，王文亮，隋延仿等. 人原发性肝细胞癌及肝硬变内 HBV DNA 及 HBAg 的分布及意义. 第四军医大学学报，1993; 14(5): 367

（收稿：1994-06-09；修回：1995-03-16）

Identification of hepatitis B Virus-DNA in human hepatocellular carcinoma with *in situ* hybridization using a degoxigenin-labelled probe

Wang Dong, Zhang Xinli, Shi Jingquan (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract In order to study the relationship of hepatitis B virus (HBV) with hepatocellular carcinoma (HCC), HBV and HBsAg were detected in the sections of paraffin-embedded tissue specimens of 80 cases of HCC with in situ hybridization and immunohistochemical assay. It was found that the positive rate of HBV DNA was 79% (63/80) in the peri-carcinoma liver tissue and 60% (49/80) in the cancerous tissue. The number of HEV DNA positive cells was significantly larger in the peri-carcinoma tissue than in the cancerous tissue. HBV DNA might be of the replicative form in the peri-carcinoma tissue but of the integrated form in t he cancerous tissue. These findings suggest that the pathogenesis of HCC is closely related to HBV infection and HBV integration might play an important role in hepatocarcinogenesis.

Key words liver neoplasm; hybridization; DNA virus; hepatitis B antigen

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