

循环 DNA 和 HBV-DNA 载量与原发性肝癌的相关性探讨

张雪峰^{1,2} 王 斌^{1△} 钱冬萌^{1△} 吴宝叶² 石海英² 刘淑清² 闫 安² 高红梅²
闫丽娟² 康 燕² 李宝华²

(1 青岛大学医学院微生物学教研室 山东 青岛 266071 2 滨州医学院附属医院无棣医院 山东 滨州 251900)

摘要 目的 探讨血浆 DNA 和 HBV-DNA 载量在病毒性肝炎肝硬化后原发性肝癌(PHC)的诊断价值。方法 用 RT-PCR 方法随访检测 HBsAg 阳性且经彩色 B 超诊断为肝硬化的患者,每 6 个月检测一次患者的血液循环 DNA 和 HBV-DNA 载量,直到经临床症状、彩色 B 超、CT 诊断为原发性肝癌为止。结果 在 PHC 中,循环 DNA 61.3 ± 31.9 ng/ml,健康对照组 20.3 ± 9.9 ng/ml,两组差异显著 ($P < 0.01$);而 HBV-DNA 载量,在 PHC 确诊时多数处于较低水平, $78\% \leq 105$ copies/ml,与 PHC 确诊前有明显差异 ($P < 0.01$)。PHC 未发生淋巴结转移者循环 DNA 51.2 ± 17.9 ng/ml,淋巴结转移者循环 DNA 73.9 ± 23.7 ng/ml,两者存在差异 ($P < 0.05$);而 HBV-DNA 载量有无淋巴结转移无明显差异。结论 联合检测血液循环 DNA 和 HBV-DNA 载量对 PHC 的预测、预后价值明显,且方法简单,易于开展。

关键词 原发性肝癌 血循环 DNA HBV-DNA

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)19-3713-03

Correlation of Circulating DNA and HBV-DNA Load and Primary Liver Cancer

ZHANG Xue-feng^{1,2}, WANG Bin^{1△}, QIAN Dong-meng^{1△}, WU Bao-ye², SHI Hai-ying², LIU Shu-qing², YAN An², GAO Hong-mei²,
YAN Li-juan², KANG Yan², LI Bao-hua²

(1 Department of microbiology, Qingdao university Medical College, Shandong 266071;
2 Affiliated Hospital of Binzhou Medical College Wudi Hospital, Binzhou 251900)

ABSTRACT Objective: To explore the diagnosis value of plasma DNA and HBV-DNA load for PHC after viral hepatitis cirrhosis. **Methods:** Follow-up with RT-PCR to test the hepatitis cirrhosis patients by Color B ultrasonic diagnosis who HBsAg is positive. To test the patients with blood circulating DNA and HBV-DNA load every six months, until diagnosis of PHC by the clinical symptoms, color B ultrasonic and CT. **Results:** Blood circulating DNA is 61.3 ± 31.9 ng/ml in PHC, health control group is 20.3 ± 9.9 ng/ml, two groups have significant difference ($P < 0.01$), and HBV-DNA load is low level, $78\% \leq 105$ copies/ml, and have obvious difference with PHC who has not diagnosed ($P < 0.01$). The blood circulating DNA of PHC who has not occurred lymph node metastasis is 51.2 ± 17.9 ng/ml, who has occurred lymph node metastasis is 73.9 ± 23.7 ng/ml, differences exist between them ($P < 0.05$); But HBV-DNA load has no obvious difference between patients with or without lymph node metastasis. **Conclusion:** United detecting of the blood circulating DNA and HBV-DNA load for the forecasting and prognosis value of the PHC is obvious, and the method is simple, and easy to carry out.

Key words: PHC; Blood circulating DNA; HBV-DNA
Chinese Library Classification: R735.7 **Document code:** A
Article ID: 1673-6273(2011)19-3713-03

前言

正常人血液循环中存在一定含量的 DNA,属于细胞外游离 DNA。早在 1977 年 Leon 等^[1]发现并首次报道了肿瘤患者血浆中 DNA 水平远高于正常人,而且研究证实肿瘤细胞 DNA 与血浆中 DNA 存在一致的基因改变^[2,3]。所以,监测血浆^[4]DNA 有助于反映肿瘤的生物学变化,为肿瘤的早期诊断和随访提供帮助。HBV-DNA 载量的多少反映了病毒在机体内的复制情况^[5,6],人们常常认为与机体的免疫状况有关^[7,8],往往忽略一个最基本的问题,就是病毒复制的场所在肝硬化后不断减少。我们知道,

肝细胞是乙型肝炎病毒赖以生存和复制的场所,病毒性肝炎患者,由于病毒反复的复制,导致肝细胞不断的损伤,在长期的炎性刺激下,最终导致肝硬化,直至肝癌。原发性肝癌(primary hepatic cancer, PHC)是当前世界上最常见的病死率高的恶性肿瘤之一,其中 90%为肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC),与肝炎病毒感染有密切关系,特别是肝炎后肝硬变。由于 HCC 患者一旦出现症状多为晚期,一般病程仅 3 个月~6 个月^[9]。因此,早发现、早诊断、早治疗,特别是早期预防,对改善患者存活率具有重要的价值。本文通过随访研究发现,联合检测血液循环 DNA 和 HBV-DNA 对 PHC 的预测、预后价值明显,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 一般材料

本组病例资料为 2006 年 7 月至 2011 年 2 月随访的在本院普外、消化及传染病门诊及住院的连续肝病患者,符合本文

作者简介 张雪峰(1971-) 男,硕士研究生,主要研究方向 肿瘤发病机制
△通讯作者 王斌,钱冬萌,电话 :18853230072,
E-mail: qdmb688@163.com
(收稿日期 2011-05-23 接受日期 2011-06-18)

研究条件的共 51 例 ,男性 33 例(65%) ,女性 18 例(35%) ,平均确诊年龄为 56± 16.9 岁 ,其中证实有淋巴结转移者 27 例 (53%)。均按《中国常见恶性肿瘤诊治规范第二分册》原发性肝癌诊断标准,并经手术或介入及病理证实为原发性肝癌。正常对照组 49 例(健康体检 :经内科、心电图、B 超等检查无肝病 史 ,肝、心、肾均正常 ,常见病毒性肝炎病原体均阴性)。

1.2 仪器

Roche 公司 Lightcycler 实时荧光定量 PCR 仪。

1.3 试剂

Roche 公司配套产品。

1.4 检测方法

用 RT-PCR 方法随访检测 HBsAg 阳性且经彩色 B 超诊断为肝硬化的患者 ,每半年检测一次患者的血液循环 DNA 和 HBV-DNA 载量 ,直到经临床症状、彩色 B 超、CT 诊断为原发性肝癌为止。

1.5 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示 ,用 SPSS14.0 软件处理数据 ,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 PHC 患者确诊前后血浆 DNA 定量检测结果(见表 1)

本研究对 51 例符合条件的 PHC 患者确诊前后血浆 DNA 结果进行了对比分析。结果表明 :PHC 患者确诊后检测值与确诊前 12 个月、18 个月、24 个月比较存在显著差异 $P < 0.01$;确诊前 6 个月与确诊前 12 个月、18 个月、24 个月比较差异也有统计学意义 $P < 0.05$;确诊后检测值与确诊前 6 个月比较差异有统计学意义 $P < 0.05$;健康对照组为 $20.3 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$,与确诊前 12 个月、18 个月、24 个月比较差异均无统计学意义 $P > 0.05$,但与确诊前 6 个月比较差异有统计学意义 $P < 0.05$ 。

表 1 PHC 患者确诊前后血浆 DNA 定量检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The plasma DNA testing results before and after PHC patients are diagnosed

确诊前检测月份 The months before diagnosed	24 个月 24 months	18 个月 18 months	12 个月 12 months	6 个月 6 months	确诊后 After diagnosed
血浆 DNA(ng/ml) Plasma DNA(ng/ml)	22.9± 10.7▲●*	24.5± 11.5▲●*	27.3± 13.8▲●*	42.2± 21.4#	61.3± 31.9

Note : ▲ $P < 0.01$ the patients of PHC after diagnosed compared with diagnosed 12 months, 18 months and 24 months before ; ● $P < 0.05$ diagnosed 6 months before compared with diagnosed 12 months, 18 months and 24 months before ; # $P < 0.05$ after diagnosis compared with diagnosed 6 months before ; * $P > 0.05$ health control group is $20.3 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$, compared with diagnosed 12 months, 18 months and 24 months before ; $P < 0.05$ health control group compared with diagnosed 6 months before.

2.2 PHC 患者确诊前后 HBV-DNA 载量检测结果(见表 1)

本研究对 51 例符合条件的 PHC 患者确诊前后 HBV-DNA 载量也进行了对比分析。结果显示 :PHC 患者确诊后 HBV-DNA 载量检测值与确诊前 6 个月、12 个月、18 个月、24 个月比较差异均有较显著的统计学意义 $P < 0.01$,确诊前 6

个月与确诊前 12 个月、18 个月比较差异均无统计学意义 $P > 0.05$;确诊前 6 个月与确诊前 24 个月比较差异有统计学意义 , $P < 0.05$;HBV-DNA 载量 ,在 PHC 确诊时多数处于较低水平 , $78\% \leq 10^5 \text{ copies/ml}$,其中有 8 例(16%) $\leq 0.5 \times 10^3 \text{ copies/ml}$, 还有 4 例(8%)用 ELISA 法检测 HBsAg 转阴。

表 2 PHC 患者确诊前后 HBV-DNA 载量检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The HBV-DNA load before and after PHC patients are diagnosed

确诊前检测月份 The months before diagnosed	24 个月 24 months	18 个月 18 months	12 个月 12 months	6 个月 6 months	确诊后 After diagnosed
HBV-DNA 载量(copies/ml) Plasma DNA load($\times 10^5$ copies/ml)	120± 40▲	61± 23▲●	31± 14▲●	41± 19▲	1.1± 0.7

Note : ▲ $P < 0.01$ the patients of PHC after diagnosed compared with diagnosed 6 months,12 months, 18 months and 24 months before ; ● $P > 0.05$ diagnosed 6 months before compared with diagnosed 12 months, 18 months before ; # $P < 0.05$ diagnosed 6 months before compared with diagnosed 24 months before, The HBV-DNA load of the most PHC patients after diagnosed is low level, $78\% \leq 10^5 \text{ copies/ml}$, eight patients of them (16%) $\leq 0.5 \times 10^3 \text{ copies/ml}$, and four patients of them(8%)test HBsAg by ELISA have turned to negative.

3 讨论

3.1 血液循环 DNA 的来源与临床应用价值

我们知道 ,正常人和肿瘤患者血清中都存在游离的 DNA^[10] ,正常人血液循环中 DNA 来源于淋巴细胞或其它有核细胞。而肿瘤患者血清中的大量 DNA 来自以下几种途径:首先是外周血中肿瘤细胞溶解排出。Miyazono^[11]等研究发现 ,胰腺癌患者

1 ml 血浆有 1000 个肿瘤细胞 ,这些细胞溶解后 ,其 DNA 必将进入血液循环。其次是病灶部位肿瘤细胞的坏死或凋亡。由于在具有较多坏死组织的肿瘤或进展期伴转移的病人血清中发现了大量的 DNA ,由此推断血清 DNA 有可能来自肿瘤细胞的坏死。最近也有研究表明 ,凋亡也是血液循环 DNA 的来源之一 ,Gicona 等^[4]应用凝胶电泳法检测胰腺癌病人血浆 ,发现血浆 DNA 呈现凋亡细胞所特有的条带。Jahr S 等^[12]也通过实验证

实了肿瘤细胞的坏死或凋亡是血清 DNA 的主要来源。再者,肿瘤组织细胞可能不断释放 DNA 进入血液循环。Stroun 等^[13]通过用结核菌素刺激淋巴细胞证实了这一点。本次研究中,PHC 患者确诊后血浆 DNA 检测值与确诊前 12 个月、18 个月、24 个月比较,差异有明显的统计学意义 $P < 0.01$;确诊前 6 个月与确诊前 12 个月、18 个月、24 个月比较差异也有统计学意义, $P < 0.05$;确诊后检测值与确诊前 6 个月比较差异有统计学意义 $P < 0.05$ 。健康对照组为 $20.3 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$,与确诊前 12 个月、18 个月、24 个月比较差异均无统计学意义 $P > 0.05$,但与确诊前 6 个月比较差异有统计学意义 $P < 0.05$ 。PHC 未发生淋巴结转移者循环 DNA $51.2 \pm 17.9 \text{ ng/ml}$,淋巴结转移者循环 DNA $73.9 \pm 23.7 \text{ ng/ml}$,两者存在差异($P < 0.05$)^[14]。由此可见,PHC 患者确诊前 6 个月时血浆 DNA 检测值即明显升高,可以作为预测原发性肝癌和判断有无淋巴结转移的一个有价值的实验室指标。

3.2 PHC 患者中 HBV-DNA 载量处于较低水平,与肝硬化程度成负相关,具有一定的预测价值

PHC 患者血清中 HBV-DNA 载量处于较低水平,可能与患者肝硬化的程度成负相关^[15]。我们知道,病毒性肝炎患者,由于病毒反复的复制,导致肝细胞不断的损伤,在长期的炎性刺激,最终导致肝硬化,直至肝癌。肝硬化后,肝脏实质被大量的纤维结缔组织所替代,使 HBV 赖以生存复制的场所减少,导致 HBV-DNA 载量处于较低水平^[16]。本组研究发现,PHC 患者确诊后 HBV-DNA 载量检测值与确诊前 6 个月、12 个月、18 个月、24 个月比较差异均有较显著的统计学意义 $P < 0.01$;确诊前 6 个月与确诊前 12 个月、18 个月比较差异均无统计学意义 $P > 0.05$;很明显,HBV-DNA 载量在 PHC 确诊时多数处于较低水平, $78\% \leq 105 \text{ copies/ml}$,其中有 8 例(16%) $\leq 0.5 \times 10^3 \text{ copies/ml}$,还有 4 例(8%)用 ELISA 法检测 HBsAg 转阴。由此可见,肝脏硬化程度愈重,HBV-DNA 载量越低,HBV-DNA 载量与肝硬化程度成负相关。研究还发现,51%(26/51)的病例在确诊前半年左右乙型肝炎有复制活跃后再次下降的趋势。一般来说,随着肝硬变的不断加重,正常的肝细胞不断被破坏减少,到后期,乙型肝炎复制表面上虽不是明显活跃,但对正常的肝细胞损坏却很严重。因此,HBV-DNA 载量的升高,可能是促发肝癌的一个重要因素,应该引起人们的重视。这与一些报道不尽相同,可能与研究方法和患者的免疫状况有关,有待进一步研究。

通过本文的研究表明:在 PHC 中,循环 DNA 为 $61.3 \pm 31.9 \text{ ng/ml}$,与健康对照组($20.3 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$)有显著性差异($P < 0.01$)。PHC 未发生淋巴结转移者循环 DNA $51.2 \pm 17.9 \text{ ng/ml}$,淋巴结转移者循环 DNA $73.9 \pm 23.7 \text{ ng/ml}$,两者存在差异($P < 0.05$)。而 HBV-DNA 载量,在 PHC 患者确诊后与确诊前 6 个月、12 个月、18 个月、24 个月比较差异均有显著性差异 $P < 0.01$ 。由此可见,联合检测血液循环 DNA 和 HBV-DNA 对 PHC 的预测、预后价值明显,极大地提高了阳性率,而且方法简单,易于开展。

参考文献(References)

- [1] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1977,37(3): 646-650
- [2] Gormally E, Gaboux E, Vincis P, et al. Circulating free DNA is h plas-

ma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance[J]. Mutat Res, 2007,635:105-117

- [3] Pang JZ, Qin LX, Ye QH, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma: concordance with the primary tumor [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006,21:A181-A182
- [4] Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls[J]. Pancreas, 1998,17(1):89-97
- [5] 曹红卫.乙型肝炎病毒 DNA 荧光定量 PCR 检测及其意义[J].第三军医大学学报,2001,23(7):866-868
Cao Hong-wei. Detection of HBV DNA with fluorescence quantitative PCR and its clinical significance [J]. Journal of Third Military Medical University,2001,23(7):866-868 (In Chinese)
- [6] 朱学海.荧光定量 PCR 技术检测 HBV-DNA 的临床应用[J].岭南医学检验与临床,2003,3(2):30
Zhu Xue-hai. Clinical application of fluorescence quantitative PCR detect HBV DNA [J]. Lingnan Medical Laboratory and Clinic,2003,3(2):30(In Chinese)
- [7] Benedict C, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis[J]. Nat Immunol 2002;3:1013-1013
- [8] Pasquetto V, Wieland S, Chisari FV. Intracellular hepatitis B virus nucleocapsids survive cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis [J]. J Virol 2000;74:9792-9796
- [9] 李亚峰,孙其山,陈丽华.血清 AFU 测定对肝细胞癌的早期诊断[J].淮海医药,2003,21(3):189-190
Li Ya-feng, Sun Qi-shan, Chen Li-hua. Early diagnosis of Hepatocellular Carcinoma by detection of serum AFU [J]. Journal of huaihai medicine, 2003, 21(3):189-190(In Chinese)
- [10] Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn E M, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease[J]. Cancer(Phila), 1983, 51: 2116-2120
- [11] Miyazono F, Takao S, Natsugoe S, et al. Molecular detection of circulating cancer cells during surgery in patients with biliary-pancreatic cancer [J]. Am J Surg, 1999, 177(6):475-479
- [12] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. Cancer Res, 2001,61(4):1 659-1665
- [13] Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 906:161-168
- [14] Silva J M, Garcia J M, Dominguez G, et al. Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy [J]. Ann Surg Oncol, 2002, 9(1):71-76
- [15] 唐振华,高勇. HA、LN、C、PC 与 HBV-DNA 含量联合检测在肝纤维化诊断中的临床意义[J].安徽医学,2002,28(6):38-40
Tang Zhen-hua, Gao Yong. The clinical significance of HA, LN, C, PC and HBV-DNA content United detection in liver fibrosis diagnosed[J]. Anhui Medical Journal, 2002, 28(6):38-40(In Chinese)
- [16] 赖菁,柯伟民,顾琳.乙型肝炎血清 HBV-DNA 含量与肝纤维化、实质病变程度的关系[J].胃肠病学和肝病杂志,2009,18(3):210-212
Lai Jing, Ke Wei-min, Gu Lin. The relationship of serum HBV-DNA level, liver fibrosis and the pathological degree of liver parenchyma in Hepatitis B [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2009,18(3):210-212(In Chinese)