

三、讨论

慢性重型肝炎晚期患者病情危重, 在进行体外人工肝治疗中更易发生并发症, 如严重的过敏反应、血流动力和内环境紊乱, 从而增加治疗风险并影响远期疗效。本组 MARS 治疗前均不需投用激素和预防性抗凝药物, 治疗中血流动力学指标增加并稳定改善, 治疗后除了有轻微一过性的血小板减少外, 未发现有任何严重不良反应, 血液相容性较满意, MARS 以其良好的血流动力学稳定作用以及对重型肝炎患者的肝脏、肾脏、脑等多脏器和系统功能的明显治疗效果, 使得该种治疗的安全性和

有效性非常具有临床应用优势。

研究引入 MELD 进行了初步的尝试。根据治疗前对应的病死率预测看, 超过 40 分的患者其 3 个月病死率为 100%, 但是经过阶段 MARS 治疗, MELD 分值明显降至平均 28.5, 其预计病死率降为 76% 左右, 这与研究最后的患者转归十分接近。MELD 作为新的终末期肝病预后评估模式, 预后评分模式科学合理, 有临床实用价值。

(收稿日期: 2002-07-24)

(本文编辑: 谢娜)

# 原发性肝癌患者外周血 $\gamma$ - 谷氨酰转移酶 mRNA-H 亚型的检测

韩国庆 秦成勇

R73 B

**【关键词】** 癌, 肝细胞,  $\gamma$  - 谷氨酰转移酶  
**Detecting the  $\gamma$  - glutamyltransferase mRNA-H in the peripheral blood of primary hepatocellular carcinoma patients.** HAN Guo-qing, QIN Cheng-yong.

**【Key words】** Carcinoma, hepatocellular;  $\gamma$  - Glutamyltransferase  
**【First author's address】** Center of Liver Diseases, Shandong Hospital, Jinan 230021, China

及时发现外周血中的肿瘤细胞, 不仅对判断肿瘤的转移、复发具有重要价值, 对指导临床制定治疗措施亦有重要意义。以逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测原发性肝癌(HCC)患者外周血  $\gamma$  - 谷氨酰转移酶 mRNA-H 亚型 (GGT mRNA-H), 寻找血循环中肝癌细胞、预测肝癌血行播散及甲胎蛋白 (AFP) 阴性肝癌诊断方面的意义。

### 一、资料与方法

1. 检测对象: 原发性肝癌患者 38 例, 男 30 例, 女 8 例, 年龄 23-68 岁, 均经病理、影像学及血清 AFP 检查确诊。对照组 42 例, 其中肝转移癌 7 例 (原发病为胃癌者 3 例, 结肠癌 3 例, 前列腺癌 1 例)。急性肝炎 6 例, 慢性病毒性肝炎 15 例, 肝硬化 8 例, 健康志愿者 6 例。

2. 标本收集和 RNA 抽提: 各组于晨起空腹抽外周静脉血 5 ml, 枸橼酸钠抗凝, 以淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (PMNC)。收集 18 例手术切除及肝穿刺获得的肝癌组织。标本冻存于 -80℃。用 TRIzol 试剂提取 PMNC 及肝癌组织总 RNA。

3. RT-PCR 反应: 以 RNA 为模板, 合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应引物序列为<sup>[1]</sup>: 正义 5' -GG

ATTCTCCCAGAGATTGCC-3', 反义 5' -GAAGGTCAA GGGAGGTTACC-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。反应条件为: 预变性 94℃ 3 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 58℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 8 min, 得到反应终产物, 13 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下观察。预期 PCR 产物片段为 300 bp。

4. 统计学分析: 采用  $\chi^2$  检验, 四格表确切概率法及等级相关分析法。

### 二、结果

1. 外周血 GGTmRNA-H 的表达: 38 例肝癌患者中, 16 例外周血检出 GGTmRNA-H, 阳性率为 42.1%。而 7 例肝转移癌、2 例急性慢性肝炎、8 例肝硬化及 6 例健康人外周血 GGTmRNA-H 均为阴性。

2. 外周血 GGTmRNA-H 表达与肝癌分期及临床病理参数的关系: 在 38 例肝癌患者中, I 期 2 例, GGTmRNA-H 阳性 1 例, II 期 11 例, 阳性 3 例, III 期 16 例, 阳性 6 例; IV 期 9 例, 阳性 6 例。GGTmRNA-H 阳性率与肝癌临床分期呈显著相关性,  $r_s = 1.00, P = 0.001$ 。38 例肝癌患者按不同的临床参数进行分组, 检测结果, 见表 1。可见有肝内转移、门静脉癌栓及远处转移组外周血的阳性率显著高于无肝内转移、门静脉癌栓和远处转移组。

3. 外周血 GGTmRNA-H 与 AFP 之间的关系: AFP < 25  $\mu\text{g/L}$  的 5 例患者中有 2 例外周血 GGTmRNA-H 阳性, AFP 在 25~200  $\mu\text{g/L}$  之间的 15 例患者中发现阳性者 6 例, AFP > 200  $\mu\text{g/L}$  的 18 例患者, 有 8 例阳性, 可见血清 AFP 值的高低与肝癌患者外周血 GGTmRNA-H 的阳性率无相关关系 ( $\chi^2 = 0.059, P > 0.05$ )。

4. 原发性肝癌组织 GGTmRNA-H 的表达: 18 例肝癌癌组织中有 17 例检出 GGTmRNA-H, 该 17 例阳性者中有 8 例外周血检出 GGTmRNA-H, 1 例癌组织阴性患者的外周血

基金项目: 山东省科委科技项目基金资助 (2001BB1DBA4)

作者单位: 250021 济南, 山东大学临床医院山东省立医院肝病中心

表 1 外周血  $\gamma$ -谷氨酰转移酶 mRNA-H 亚型与临床参数的关系 (例, %)

临床参数	例数	$\gamma$ -谷氨酰转移酶 mRNA-H(+)
肿瘤大小 < 5 cm	9	3 (33.3)
≥ 5 cm	29	13 (44.8)
肝内转移无	18	4 (22.2)
有	20	12 (60.0)*
门脉癌栓无	25	6 (24.0)
有	13	10 (76.9)**
远处转移无	32	10 (31.3)
有	6	6 (100.0)

Fisher 精确概率, \*  $P = 0.017$ , \*\*  $P = 0.003$

GGTmRNA-H 也阴性。

### 三、讨论

应用逆转录聚合酶链反应技术, 扩增肿瘤患者外周血肿瘤细胞“标志性”靶 RNA 来证实血中肿瘤细胞的存在, 是新近发展起来的检测外周血和骨髓中肿瘤细胞的新技术<sup>[2]</sup>。GGTmRNA 亚型转化与肝细胞癌变有密切的关系, GGTmRNA-H 亚型是 HCC 的特异性 GGTmRNA 类型<sup>[1]</sup>。

结果显示, 42.1% 的肝癌患者外周血 GGTmRNA-H 阳性, 而肝转移癌、肝炎、肝硬化及健康人外周血 GGTmRNA-H 均为阴性。而且外周血 GGTmRNA-H 的阳性率与肝癌 TNM 分期有显著相关性, TNM 分期越晚, 其阳性率越高。因此 GGTmRNA-H 阳性提示 HCC 患者在临床分期上偏于后期, 预后较差。研究资料还表明, 原发性肝癌外周血 GGTmRNA-H

的阳性率在有肝内转移、门静脉癌栓及远处转移组的阳性率显著高于无肝内转移、门静脉癌栓和远处转移组, 有远处转移的 HCC 患者, 其外周血中全部检出 GGTmRNA-H 阳性, 提示检测 HCC 患者外周血 GGTmRNA-H 表达对估计有无血行播散和远处转移有重要价值。对外周血 GGTmRNA-H 阳性而影像学尚未发现转移证据的患者, 应视为转移高危患者, 进行综合治疗, 并严密随访, 以及早发现转移病灶。肝癌直径 < 5 cm 与 > 5 cm 的两组患者, 外周血 GGTmRNA-H 阳性率差异无显著性, 这表明肝癌细胞血行播散在早期即已经开始, 即使是小肝癌, 其血行播散也不容忽视, 这与临床上小肝癌术后复发、转移率较高相一致。

研究结果显示, 血清 AFP 的高低与外周血 GGTmRNA-H 的阳性率无相关性, 检测外周血中 GGTmRNA-H 可以作为 AFP 阴性或低值 HCC 的有价值的补充诊断方法, 临床上联合检测血清 AFP 及外周血 GGTmRNA-H 两项指标, 将可提高肝癌的确诊率。

### 参 考 文 献

- 1 韩国庆, 秦成勇. 肝组织谷氨酰转移酶 mRNA 亚型对肝细胞癌变的测定及其意义. 中华肝病杂志, 2002, 10: 126-128.
- 2 Pfeleiderer C, Zoubek A, Gruber B, et al. Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR. Int J Cancer, 1995, 64: 135-139.

(收稿日期: 2002-10-16)

(本文编辑: 袁平戈)

## 抗-HBs 阳性者血清乙型肝炎病毒 DNA 检测的价值

黄利华 蒋跃明 黄祖瑚 吴红亚 扬小娟

AB<sub>1</sub> β

【关键词】 脱氧核糖核酸, 肝炎病毒, 乙型; 聚合酶链反应, 套式; 乙型肝炎表面抗体; 基因变异

Value of detecting HBV DNA with nested-PCR in the sera from patients with anti-HBs positive. HUANG Li-hua, JIANG Yue-ming, HUANG Zu-hu, WU Hong-ya, YANG Xiao-juan.

【Key words】 DNA, hepatitis B virus; Nested polymerase chain reaction; Anti-HBs; Gene mutation

【First author's address】 Hospital for Infectious Diseases in Wuxi, Wuxi 214007, China

有研究表明抗-HBs 的出现并不标志乙型肝炎病毒 (HBV) 复制的停止。套式聚合酶链反应 (PCR) 既能保持常规 PCR 的特异性又能提高检测灵敏度, 因而受到关注。

### 一、资料与方法

基金项目: 无锡市 2000 年科学技术发展计划项目 (WZ2000 192)

作者单位: 214007 江苏省无锡市传染病医院

1. 对象: 64 例均为 1999 年 6 月~2000 年 12 月江苏省无锡市传染病医院门诊及住院的患者, 急性肝炎 (AH) 6 例、慢性肝炎 (CHB) 47 例、慢性无症状携带者 (AsC) 11 例; 为表述方便, 设定 HBV 血清标志物 (HBVM) 1~5 项排列顺序为 (1) 乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg), (2) 抗-HBs, (3) 乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg), (4) 抗-HBe 和 (5) 抗-HBc, 以出现阳性的序号为该模式的代码, 如模式代码 123 代表 HBsAg, 抗-HBs, HBeAg 均阳性而抗-HBe 和抗-HBc 均阴性, 余类推。

2. 方法: (1) HBV 标志物以 IMx 系统检测, IMx 全自动快速免疫发光分析仪及试剂由美国 Abbott 公司提供。(2) 套式 PCR 检测 HBV DNA 及序列分析: 将 100  $\mu$ l 血清用经典酚氯法常规提取 HBV DNA 作模板, 加入引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 在扩增体系中扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳与鉴定后, 再加入引物 P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub> 第 2 次扩增。产物经琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭显色后在紫外灯下观察, 在 513 bp 处存在荧光条带为阳性。鉴定后 GIAquick 纯化