

HCV NS3 解旋酶在肝细胞癌组织中的表达及临床意义

Expression of HCV NS3 Helicase in Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Significance

HE Zuo-ping, YE Hong, LI Ying, LI Ming, BIAN Yi-xin

何作萍¹, 叶红², 李营², 李明², 边奕鑫^{2,3}

(1. 中山大学附属第五医院, 广东 珠海 519000; 2. 德州市人民医院, 山东 德州 253014; 3. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033)

摘要: [目的] 探讨丙型肝炎病毒 (hepatitis C Virus, HCV) 非结构蛋白 3 (non-structural protein 3, NS3) 解旋酶在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 组织内表达情况, 及与同期血清学指标的关系。[方法] 利用前期实验所获得的单克隆抗体 2E12 作为一抗, 采用免疫组化 SP 方法, 检测 30 例 HCV 相关肝癌组织和 30 例 HBV 相关肝癌组织 (对照组) 中 HCV NS3 解旋酶的表达情况, 并分析蛋白表达与同期血清学指标的相关性。[结果] HCV 肝癌组 HCV NS3 解旋酶的阳性表达率为 76.7% (23/30), 显著高于对照组的 26.7% (8/30) ($P < 0.05$)。HCV NS3 解旋酶的表达与 HCV 肝癌患者年龄、性别、基因亚型、AST、ALT、GGT 均无关 ($P > 0.05$), 与 HCV-RNA 定量相关, HCV-RNA 定量 $> 1000 \text{ IU/ml}$ 组 HCV NS3 解旋酶阳性率显著高于 HCV-RNA 定量 $\leq 1000 \text{ IU/ml}$ 组 (100% vs 56.3%, $P < 0.05$)。[结论] HCV NS3 解旋酶在 HCV 相关肝癌组织中表达升高, 其表达水平与 HCV-RNA 定量相关。

关键词: 肝肿瘤; HCV; NS3; 解旋酶

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2020)08-0742-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B016

原发性肝癌 (简称肝癌, primary hepatocarcinoma, PHC) 是常见恶性肿瘤之一^[1]。全球约 85% 的 PHC 病例发生在发展中国家, 约 55% 的 PHC 发生在中国^[2-3]。由于 PHC 预后较差, 大部分病例在发病一年内死亡^[4]。HCV 相关性肝癌的发生机制是近年来研究的热点, 但至今仍未完全明确; 致病因素主要倾向为 HCV 编码的病毒蛋白对正常肝细胞增殖代谢的影响。

NS3 基因位于 HCV 基因组 3079~4974 核苷酸区, 所编码的蛋白是一种具有多种生物学活性的非结构蛋白, 含 631 个氨基酸 (1027~1658aa)。NS3 N 端 1/3 称之为 NS3 Protease, 具有丝氨酸蛋白酶活性, 主要功能是与 NS4A 蛋白协同, 对 HCV 自身位点进行切割, 在 HCV 蛋白加工成熟过程中发挥重要作用^[5]。NS3 C 端 2/3 (181~631aa) 是另一功能蛋白, 称之为 HCV Helicase^[6], 具有 RNA 解旋酶和 NTP 酶活性。NTP 酶结合并水解 NTP, 为 RNA 解旋酶发挥

作用提供所需能量; RNA 解旋酶具有从 3' 端到 5' 端的方向性, 对 DNA-DNA 链、DNA-RNA 链具有同 RNA-RNA 链相同的解旋能力, 可使 HCV RNA 的二级结构打开以利于正、负链 RNA 的复制和翻译, 与 HCV 的复制和翻译有关。

目前研究主要集中在核心蛋白 core^[7]、NS3^[5] 和 NS5A^[6] 蛋白对于宿主肝细胞生长、恶性转变、凋亡诱导以及各种细胞信息传导途径产生的影响。但大多数的研究仅仅是在细胞水平和动物模型水平上得以验证。

本研究在前期实验的基础上, 利用抗 HCV NS3 解旋酶保守性表位单抗 2E12 (mAb 2E12), 检测 HCV NS3 解旋酶在肝癌组织内表达情况, 准确评估病毒感染复制情况, 并结合患者临床病理特征、同期血清学相关指标, 通过相关性研究, 探讨 HCV 感染 PHC 肝组织中病毒表达与肿瘤标志物、细胞免疫水平的相关性。

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2017BH113); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2017WS670)

何作萍, 叶红并列第一作者

通信作者: 边奕鑫, 副主任医师, 博士; 德州市人民医院检验科, 山东省德州市东方红路 1166 号 (253014); E-mail: bianyixin0311@163.com

收稿日期: 2020-01-06; **修回日期:** 2020-03-03

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 10 月至 2019 年 10 月, 经穿刺或

手术切除的 HCV 相关肝癌存档石蜡标本 30 例。其中,男性 23 例、女性 7 例,平均年龄 63.7 岁,抗 HCV 抗体阳性,抗 HBsAg 阴性。入组条件:(1)入院时检查抗 HCV 抗体阳性,抗 HBsAg 阴性;(2)行肝脏穿刺术、肝脏肿瘤切除术、肝脏部分切除术,术后病理学诊断为原发性肝癌;(3)肝组织均为术前或放化疗前取材。另外,选取 2012 年 10 月至 2019 年 10 月经穿刺或手术切除 HBV 相关肝癌存档石蜡标本 30 例为阴性对照。入组条件:(1)入院时检查抗 HBsAg 阳性,抗 HCV 抗体阴性;(2)行肝脏穿刺术、肝脏肿瘤切除术、肝脏部分切除术,术后病理学诊断为原发性肝癌;(3)肝组织均为术前或放化疗前取材。

1.2 方法

利用 mAb 2E12 作为一抗,Invitrogen 公司的 anti-MOUSE IgG+IgM (H&L)(GOAT) antibody 作为二抗,采用免疫组化 SP 方法,对全部标本进行抗原检测。采用预实验中阳性片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。同时,获取同期临床信息、病理指标和血清学指标。包括患者的年龄、性别、HCV 分型、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、 γ -谷氨酰转肽酶甲胎蛋白 (GGT)、甲胎蛋白(AFP)、HCV-RNA 定量等。

1.3 免疫组化判定标准

由两位病理医师进行双盲阅片,每张切片高倍视野($\times 400$ 倍)下随机选取 5 个视野,根据阳性细胞数的比例和阳性颗粒染色强度进行综合评估。细胞比例:“-”表示阳性细胞占 0~10%,为 0 分;“+”表示阳性细胞占 10%~25%,为 1 分;“++”表示阳性细胞占 25%~50%,为 2 分;“+++”表示阳性细胞占 50%~75%,为 3 分;“++++”表示阳性细胞占 75%以上,为 4 分。同时参考阳性颗粒的深浅,阳性颗粒染色强

度:细胞无显色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。然后两评分相加,总的评分 <2 分为阴性, ≥ 2 分为阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV NS3 解旋酶在肝癌组织内表达情况

HCV NS3 解旋酶在 HCV 相关肝癌组和对照组的阳性表达率分别为 76.7% (23/30) 和 26.7% (8/30%),实验组阳性率显著高于对照组($\chi^2=14.766$, $P<0.001$)(Figure 1)。

2.2 HCV NS3 解旋酶表达与肝癌临床病理特征的相关性

HCV NS3 解旋酶表达与肝癌患者年龄、性别、HCV 分型、AST、ALT、GGT、AFP 无关 ($P>0.05$),与 HCV-RNA 定量相关,HCV-RNA 定量 >1000 IU/ml 组 HCV NS3 解旋酶阳性率为 100%,HCV-RNA 定量 ≤ 1000 IU/ml 组 HCV NS3 解旋酶阳性率为 56.3%,差异有统计学意义($P<0.05$)(Table 1)。

3 讨论

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是 PHC 最常见的病理类型。HCC 发生、发展的危险因素很多,其中乙型肝炎病毒 (hepatitis B Virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C Virus, HCV) 感染是肝癌发生的重要危险因素,占 70% 以上^[3,8]。在欧美、日本等国家和地区,HCV 感染是主要的危险因

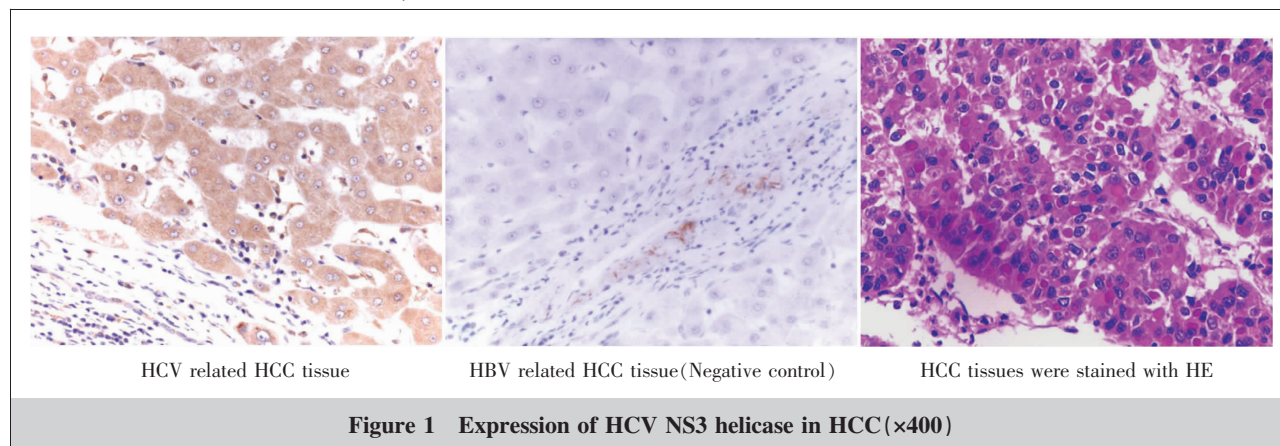


Figure 1 Expression of HCV NS3 helicase in HCC($\times 400$)

Table 1 The relationship between the expression of HCV NS3 helicase in liver cancer tissues and clinical features

Clinical features	n	HCV NS3 helicase positive(%)	χ^2	P
Gender				
Male	19	14(73.7)	0.294	0.618
Female	11	9(81.8)		
Age(years)				
<60	12	8(66.7)	1.081	0.299
≥60	18	15(83.3)		
AFP(ng/ml)				
≥400	16	11(68.8)	1.161	0.281
<400	14	12(85.7)		
Gene type				
2a	17	11(64.7)	3.033	0.082
1b	13	12(92.3)		
ALT				
+	17	13(76.5)	0.977	0.660
-	13	10(76.9)		
AST				
+	12	10(83.3)	0.480	0.488
-	18	13(72.2)		
GGT				
+	8	7(87.5)	0.692	0.406
-	22	16(72.7)		
RNA loads(IU/ml)				
>1000	14	14(100)	7.989	0.005
≤1000	16	9(56.3)		

素^[9-10]。在中国,HCV是仅次于HBV的第二大危险因素。由于HCV感染机制复杂以及诊断、治疗、预防的困难,HCV感染率持续上升,HCV感染的HCC发病人数逐年增多^[5,11-12]。

本研究在前期实验的基础上,利用抗HCV NS3解旋酶保守性表位单抗2E12(mAb 2E12),检测肝癌相关HCV NS3解旋酶^[13]。抗体检测HCV相关HCC组织相关蛋白具有统计学意义。mAb 2E12识别表位EP05,序列为205PTGSGKSTK213,位于HCV NS3解旋酶结构域I的模式I中,覆盖了对NS3解旋酶功能活性起到决定性作用的ATP结合位点(GSGKS),而且,EP05氨基酸序列在所有基因型的HCV中完全保守^[14]。在本研究中,mAb 2E12对1b型和2a型HCV检测差异无统计学意义,与其表位在HCV所有基因型中完全保守相一致。

HCV helicase,具有RNA解旋酶和NTP酶活性。NTP酶结合并水解NTP,为RNA解旋酶发挥作用提供所需能量,与HCV的复制和翻译有关。因此,可以推测出,当病毒大量复制时HCV解旋酶就会呈

现优势表达。本实验中,抗体对相关蛋白的检测与HCV-RNA定量呈正相关。

抗体对应相关蛋白的高检出率,证实mAb 2E12均可作为检测肝癌组织内HCV的诊断试剂。此外,HCV NS3解旋酶在HCV相关肝癌的发生发展过程中充分表达,为HCV相关肝癌的基础研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: results from the global burden of disease study 2015 [J]. JAMA Oncol, 2017, 3(12): 1683-1691.
- [3] Hagymasi K, Tulassay Z. Epidemiology, risk factors and molecular pathogenesis of primary liver cancer [J]. Orv Hetil, 2008, 149(12): 541-548.
- [4] Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C[J]. Oncogene, 2006, 25(27): 3834-3847.
- [5] Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, et al. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target [J]. J Biol Chem, 2010, 285(30): 22725-22731.
- [6] Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, et al. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation[J]. J Exp Med, 2002, 196(5): 641-653.
- [7] McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes[J]. J Viral Hepat, 2000, 7(1): 2-14.
- [8] Bertuccio P, Turati F, Carioli G, et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality [J]. J Hepatol, 2017, 67(2): 302-309.
- [9] Ng J, Wu J. Hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinomas in the United States: similarities and differences[J]. Hepat Mon, 2012, 12(10 HCC): e7635.
- [10] Kaneko R, Nakazaki N, Omori R, et al. The effect of new therapeutic and diagnostic agents on the prognosis of hepatocellular carcinoma in Japan-an analysis of data from the Kanagawa Cancer Registry [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(9): 2471-2476.
- [11] Baumert TF, Jühling F, Ono A, et al. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals[J]. BMC Med, 2017, 15(1): 52.
- [12] Kudo M. Recent trends in the management of hepatocellular carcinoma with special emphasis on treatment with regorafenib and immune checkpoint inhibitors[J]. Dig Dis, 2016, 34(6): 714-730.
- [13] Bian Y, Zhao S, Zhu S, et al. Significance of monoclonal antibodies against the conserved epitopes within non-structural protein 3 helicase of hepatitis C virus [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e70214.
- [14] Chevaliez S, Feld J, Cheng K, et al. Clinical utility of HCV core antigen detection and quantification in the diagnosis and management of patients with chronic hepatitis C receiving an all-oral, interferon-free regimen[J]. Antivir Ther, 2018, 23(3): 211-217.