

南宁地区肝细胞性肝癌中突变型 p⁵³蛋白表达 p⁵³ Mutation Protein Expression in Hepatocellular Carcinoma in Nanning District

邓卓霖 马韵 罗虹
Deng Zhuolin Ma Yun Luo Hong

(广西医科大学 南宁市滨湖路6号 530021)
(Guangxi Medical University, 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 用ABC免疫组织化学方法,对南宁地区居民中13例肝细胞性肝癌(HCC)的活检组织进行研究。发现其中8例有突变型 p⁵³蛋白呈强阳性表达,占HCC病例数64.3%。南宁地区某些县,如扶绥县是我国著名的HCC高发区,不但HBV感染率高,而且是全国少有的AFB₁高污染区,后者的作用不能忽视。与江苏启东和南部非洲HCC高发区一样,估计也会出现 p⁵³基因突变热点。

关键词 p⁵³蛋白 肝细胞性肝癌 黄曲霉毒素 B₁

Abstract Immunohistochemistry ABC method was used to study 13 biopsy cases of hepatocellular carcinoma (HCC) in Nanning prefectural district. Eight cases (64.3%) were found to have positive expression of p⁵³ mutation protein. Fu—Sui and its surrounding counties in the district are notorious for their high HCC incidence in China, not only high in infection of hepatitis B Verus (HBV) but also high in contamination of aflatoxin B₁ (AFB₁), and both are putative risk factors of HCC. The AFB₁ could injure the DNA and cause a mutational hotspot in the p⁵³ gene. Thus its effect should not be neglected.

Key words p⁵³ Protein, hepatocellular carcinoma, aflatoxin

南宁地区扶绥县是我国著名肝细胞性肝癌高发区^[1],其周围的县也有相似现象。国内外的研究都公认乙型肝炎病毒(HBV)和黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 协同作用是国 HCC 主要危险因素。最近有一些报道认为 AFB₁ 可能导致 p⁵³ 基因突变,产生突变型 p⁵³ 蛋白。这种蛋白比正常野生型 p⁵³ 蛋白的半衰期长,能用免疫组织化学方法检测出来^[2]。而野生型 p⁵³ 蛋白半衰期短,只有10多分钟,用免疫组织化学方法检测不到。所以 HCC 中检出 p⁵³ 蛋白提示 p⁵³ 基因已发生了突变,有诊断和预后的意义,也有非常重要的病因学意义。

1 材料及方法

广西医科大学病理教研室档案材料中取出1990年诊断肝癌的病例,选其中病历,切片和蜡块均保存比较完整者,经复查切片,确认肝细胞性肝癌病变比较典型,诊断没有异议,组织固定比较好,特别注意细胞核比较健全,无大量核固缩、溶解或碎裂现象,

且组织块较大并有癌旁肝组织的病例作研究。全部为活检病例,组织经福尔马林固定,固定时间在24小时内,石蜡包埋。其中属南宁地区居民13例,男8女5,年龄33~60岁,平均42.7岁,肿瘤最小者直径2 cm,最大者20 cm×16 cm×10 cm,癌肿直径小于3 cm者4例。

应用福建迈新生物技术公司出售的抗体及试剂;抗人 p⁵³ 蛋白单克隆抗体(产品编号 MAB0142),和链菌素亲生物蛋白——过氧化酶免疫组化染色试剂盒(S-PKit)。ABC法染色,组织未经蛋白酶消化。细胞内棕色颗粒状反应物定为阳性反应物。可疑病例经蛋白酶消化后重染为阴性。

PBS代替一抗作阴性对照,正常肝脏切片染色与肝癌及肝病作对照。

2 结果

癌细胞阳性反应,棕色颗粒反应物主要定位于细胞核内,集中于核膜内侧,使核轮廓特别突出,少数棕色颗粒分布于核周围胞浆中,共有下列4种情况:①整张切片中癌细胞呈弥漫性阳性反应,阳性细胞数占

75%以上;②分散灶状细胞阳性反应,阳性灶内高倍视野可见50%以上癌细胞核呈棕色颗粒状,阳性细胞主要集中于癌巢边缘,巢之中央因细胞变性或坏死而显阴性反应,其他阴性区域也主要由于癌细胞变性与坏死之故;③稀疏分布的单个阳性细胞;④全部细胞呈阴性反应,核呈暗淡兰色,胞浆境界不清。将上述①②定为阳性病例,③与④定为阴性病例,目的是避免假阳性。

HCC 阳性例的癌旁肝组织亦常呈阳性反应,但棕色颗粒状反应物主要定位于核周围胞浆中而不在核内。阳性细胞呈灶性分布,靠近癌组织。远离癌组织找不到阳性细胞。弥漫性胞浆黄色不作为阳性处理。所有对照全部阴性反应。

13例 HCC 及其癌旁肝组织免疫组化检测结果,发现8例强阳性,3男5女;另5例阴性全属男性,即64.3% HCC 标本中发现突变型 p⁵³蛋白呈强阳性表达。小于3 cm 的癌中2例阳性2例阴性。

与 HE 染色切片对照, p⁵³蛋白阳性例,癌细胞呈异常活跃增生,表现为核大,核浆比例1:1~5:1,核仁突出,核膜内侧染色质大量集中深染,核分裂相特多,每高倍视野1~16个,而且常出现多核及巨核瘤巨细胞。而 p⁵³蛋白阴性例虽也有个别增生异常活跃者,但相对来说比较平静,核仁不甚突出,核裂较少每高倍视野0~4个,尤其是瘤巨细胞不多见。

3 讨论

广西南宁地区的扶绥县与江苏启东县同为我国著名的肝癌高发区,我校原较长叶馥荪教授领导下,长期对该县肝癌进行综合性研究。发现 HBV、AFB₁和不洁水源是该地区肝癌的主要病因。南宁地区位于广西西南部,共13个县,本文病例来自其中8个县,主要分布于左右江流域,扶绥县地处中央,地理、气候和环境条件相近似,大部份属贫困山区,种植玉米较多,易受黄曲霉污染, AFB₁含量极高^[3]。

正常野生型 p⁵³基因位于17号染色体短臂,编码53 kd 的核结合蛋白,有抑制癌细胞生长功能。然而该基因最易发生突变,突变后产生的突变型 p⁵³蛋白失却抑癌作用,反而有致癌作用。最近 Hsu 及 Ostusk 等研究启东和非洲莫桑比克两地的 HCC,这两地都是 AFB₁高污染区,发现有一共同的基因突变位点在第七外显子249密码子的第3碱基上^[5~7]。称这突变点为 HCC 突变热点。这一新发现轰动一时。人类许多种癌症有 p⁵³基因突变,唯独 HCC 的基因突变是集中在一个热点上,许多地方的 HCC 都与 HBV 感染相关,唯独合并 AFB₁高摄入量的 HCC 才出现上述突变热

点,且肝癌的发病率最高,这一事实成立,使 AFB₁致肝癌的作用昭然若揭。最近有报道 AFB₁能使肝细胞内超氧化物歧化酶活力下降,而造成超氧阴离子自由基的过量堆积,有损于 DNA,可能是引起 p⁵³基因突变的主要原因^[4],但为何集中在一个位点则不明。

p⁵³蛋白阳性是否能代表基因突变?这问题曾有过争议,美国病理学杂志(J. Pathol)编辑部一再总结这个问题^[8]。大量研究资料确定 p⁵³蛋白稳定增加与 p⁵³基因突变明显相关。是否会出现假阳性或假阴性,关键在于结果判断上,需强调阳性细胞的数量比染色深浅度更为重要。本文中的阳性病例,阳性细胞数都在50%以上。稀疏分布的强阳性着色细胞未列入阳性病例内。我们在研究中还发现癌细胞的核是否保持完整非常重要,若核已发生了严重退行性变,就难于检出其中的 p⁵³蛋白了。例如现在外科医生在肝癌手术前2~3周,常作门脉大剂量灌注化疗,造成癌细胞广泛变性坏死,在取材和读片时宜注意,若检测 p⁵³蛋白不避开变性坏死区会出现假阴性。

4 结论与展望

我们在另一个 HCC 高发区,也是 HBV 高感染区,同时又是世界少有的 AFB₁高污染区(主要污染玉米),测得突变型 p⁵³蛋白异常高表达。与启东县和莫桑比克惊奇地相似,估计 p⁵³基因突变也会集中在其249密码上。地球上这三个遥遥相隔的地理位置上却在 HCC 的分子水平上有着小小共同点,这是肝癌的分子病理学上非常重要的发现。但仍需更多的研究,我们正在作基因突变点研究。

参考文献

- 1 Fsyeh Yeh FS, Mocc, Luos, et al. A serological case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Guangxi China. *Cancer Research*, 1985, 45: 872.
- 2 陈益, 汤钊猷, 李君, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染与肝细胞性肝癌中突变型 p⁵³蛋白的表达. *中华肿瘤杂志*, 1994, 16: 184~187
- 3 刘宗河, 莫志纯, 张丽生, 等. 肝癌户与非肝癌户成员从主粮中摄入黄曲霉毒素 B₁量调查. *广西医学院学报*, 1983, 3~4: 80~83
- 4 侯华新, 秦箐, 黎丹戎, 等. 黄曲霉毒素 B₁与超氧化物歧化酶的关系. *广西医学院学报*, 1993, 10 (4): 351~352
- 5 Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al. Mutational hotspot in the p⁵³ gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 1991, 350: 427~428.
- 6 Bressac B, Kew M, Wands J, et al. Selective G to T mutations of p⁵³ gene in hepatocellular carcinoma from southern Guangxi Sciences, Vol. 2 No. 1, February 1995

(责任编辑:莫鼎新、何启彬)

外伤性颅内血肿80例临床分析

何春良 (广西平南县人民医院外科 537300)

平南县人民医院1985~1994年收治的外伤性颅内血肿病例,就其诊断及治疗作临床分析如下。

1 临床资料 全组80例,男性63例,女性17例,年龄1.5~65岁;其中坠落伤30例,车祸伤40例,打击伤10例。作X线颅骨片检查45例,发现颅骨骨折30例,无骨折15例;作头颅A超检查28例,有中线波移位超过25 mm 15例,无明显移位13例;作CT扫描诊断颅内血肿30例。血肿类型:急性硬膜外血肿38例,急性硬膜下血肿25例,急性混合性血肿9例,亚急性硬膜下血肿8例。血肿部位:与头伤同侧血肿40例,在对侧血肿25例,两侧均有血肿15例。伤后12小时内手术治疗者68例,死亡14例,占20.6%;12小时以上手术者12例,死亡6例,占50%。

2 讨论 外伤性颅内血肿是颅脑损伤中最严重的并发症之一。要降低颅内血肿的死亡率关键在于早期诊断和早期手术治疗。

2.1 诊断方面 (1) 正确分析伤情 头颅CT扫描能给颅内血肿以最直观的确切诊断。没有CT诊断仪的基层医院必须认真了解病史,了解暴力性质和头皮损伤部位,以作正确诊断。减速性损伤,要注意有对冲伤的情形;挤压性损伤,不能忽略脑部损伤的复杂性^[1]。只有仔细分析头部着力点,致伤暴力性质,才能正确判断是否伤侧或者对冲侧有血肿。本组对冲侧血肿25例均是减速伤所致。拍摄颅骨片能了解骨折线走行范围及其与脑膜血管的关系,据此,可推测有无颅内血肿及血肿类型。本组有8例发现骨折线经过脑膜中动脉或前动脉及其分枝,手术均证实其有硬膜外血肿。头颅A超检查,本组15例有中线波移位25 mm以上,手术均证实一侧幕上有血肿。但也发现5例在额底、颞底血肿和4例双侧性血肿无中线波移位。

(2) 动态观察意识、瞳孔的变化 本组在住院期间有5例由清醒状态转入昏迷,手术探查有硬膜外血肿,意识变化时间最短的只有15分钟,最长的达72小时。我们体会到,凡精神状态变化十分显著,无论是抑制转入兴奋或兴奋转入抑制都有可能是颅内血肿的先兆;伤后进行性意识恶化,即应考虑到颅内血肿的可能。Goss昏迷分级评分能更好地提供参考。在观察期间一侧瞳孔发生了变化(大小及光反射改变)伴随意识、肢体的神经反射变化均有利于及早发现颅内血肿。

(3) 迟发的神经体征出现,常能提示颅内血肿发生之可能。本组有2例,住院时神志模糊,观察20分钟后一侧肢体出现抽搐,继后强直,该侧腹壁反射,提睾反射减弱,膝反射亢进,巴氏征阳性,手术证实为硬膜外血肿。

2.2 治疗 (1) 早期钻颅探查既是诊断又是治疗颅内血肿的积极态度 在缺乏先进检查手段的基层医院,对脑颅外伤后病情变化急剧,疑有颅内血肿者(特别是后颅窝血肿)应尽快钻颅探查,避免和减轻继发性脑干损害。钻颅简单、快速,早期血肿液尚不凝固很易被吸引清除及引流。有人指出^[2]:即使探查阴性也比等待神经定位征出现或强调全面检查而延长时间造成不良后果为好。

(2) 适当使用脱水剂及电解质液 颅脑损伤后一般均需使用脱水剂,但在观察期间尚未明确有无颅内血肿时盲目使用大剂量脱水剂(如甘露醇),有时会掩盖症状,影响血肿的早期诊断,甚至会延误抢救时间。本组曾有2例,伤后即大剂量使用甘露醇脱水,分别于48小时及72小时后才表现颅内血肿的指征,手术发现肿块很大,脑组织大范围凹陷,清除血肿后脑组织复原很慢,病情恢复较差;笔者尚遇到1例小儿,在清醒期间由于过分控制电解质液,而又较大量使用脱水剂,2天后突然出现昏迷及抽搐,疑为颅内血肿,钻颅探查结果阴性。殊不知血生化检查有严重低钾、钠、钙。后继相应补充,患儿脱险。曾有文献报告^[3]:晶体液有利于维持血容量和血浆渗透压,恢复细胞膜电位梯度和细胞功能,而高张晶体液在控制颅内压和预防脑水肿方面有突出的优点。因而脑外伤的治疗应防止过分控制钠盐等电解质,特别是使用脱水剂时电解质的补给必须附合生理之需要,否则对病情不利。

(3) 保持气道通畅,确保脑氧供 昏迷者常有痰涎或舌后坠阻塞气道,必要时应作气管切开通畅呼吸,并利吸痰。本组行气管切开12例均收到较好效果。笔者认为:只要昏迷时间长,呼吸道不易保持通畅,气管切开是一明智的做法。

(4) 加强监护及各种综合治疗,防治各种并发症,是提高脑外伤抢救成功率不可忽略的重要方面。

参考文献

- 薛庆澄主编. 神经外科学. 天津科技出版社, 1990: 134~135.
- 潘宏学. 小儿后颅窝血肿治愈6例报告. 中华小儿外科杂志, 1989; 10 (6): 366.
- 江学成. 对神经外科手术中输入液体的重新评价. 国外医学 (神经病学. 神经外科学分册), 1990 (1): 9.