

· 研究报告 ·

EB病毒相关性疾病病理学研究的进展

宗永生¹, 吴秋良^{2,4}, 林素暇^{2,4}, 何洁华^{2,4}, 张昌卿^{3,4}

(中山大学 1. 中山医学院病理学教研室, 广东 广州 510089; 2. 中山大学附属肿瘤医院病理科, 广东 广州 510060; 3. 中山大学肿瘤防治中心实验研究部, 广东 广州 510060; 4. 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要: 报告作者及其同事在鼻咽癌高发的广州地区所做 EB 病毒相关性疾病病理学研究的进展。内容包括: EB 病毒病理生物学; EB 病毒相关性疾病病理学; 检测组织中的 EB 病毒; EB 病毒血清学。重点是 EB 病毒相关性疾病的病理学以及评估各种检测 EB 病毒相关性疾病患者组织和血清中 EB 病毒的方法。

关键词: EB 病毒; EB 病毒相关性疾病; 病理学; 血清学

中图分类号: R739

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0481-07

Advancement of Pathology of Epstein-Barr
Virus Related DiseasesZONG Yong-sheng¹, WU Qiu-liang², LIN Su-xia², HE Jie-hua², ZHANG Chang-qiang³

(1. Department of Pathology, SUN Yat-sen medical college, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China;

2. Department of pathology, Affiliated Tumor Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 3. Department of Experimental Research, Center of Tumor Prevention and Treatment, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;

4. State Key Laboratory of Oncology in Southern China)

Abstract: This paper briefly summarized the advancement of pathology of Epstein-Barr virus (EBV) related diseases by the author and his colleagues in Guangzhou, a high-incidence area of nasopharyngeal carcinoma (NPC). The content included pathobiology of EBV, pathology of EBV-related diseases, detection of EBV in tissues and EBV serology. The keynotes were pathology of EBV-related diseases and evaluating a variety of methods for detection of EBV in tissue and serum of patients suffering from EBV-related disease.

Key words: Epstein-Barr virus; EBV-related disease; pathology; serology

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(5):481-487, 492]

1 EB病毒病理生物学

我们的观察和实验结果同意下列学说,即:

EB 病毒先感染咽部和/或涎腺腺泡上皮细胞; B 淋巴细胞与感染了 EB 病毒的上皮细胞直接接触,才被 EB 病毒感染; 咽上皮和/或涎腺腺泡上皮细胞可再次感染另一株 EB 病毒; 人体血液和淋巴系统内可存在多个感染了 EB 病毒的 B 淋巴细胞株^[1]。广州地区的鼻咽癌死亡率明显高于潮汕地区 ($14.24/10^5$ vs $4.79/10^5$)^[2]。广州地区 30~59 岁人群中 7.36% (3 093/42 048) 的个体,血清呈 VCA-IgA 1 5 阳性^[3], 6.71% (2 822/42 048) 的个

体,血清呈 VCA-IgA 1 10 阳性^[2];而潮汕地区 30~59 岁人群中 6.59%(698/10 404) 的个体,血清呈 VCA-IgA 1 5 阳性, 2.36% (246/10 404) 的个体,血清呈 VCA-IgA 1 10 阳性^[2]。如果以血清中 VCA-IgA 抗体水平 1 5 阳性为再激活的指标,则不能反映与 EB 病毒密切相关的鼻咽癌的发病情况 (7.36% vs 6.71%); 如果以血清中 VCA-IgA 抗体水平 1 10 为再激活的指标,则能反映与 EB 病毒密切相关的鼻咽癌的发病情况 (6.71% vs 2.36%)。所以,EB 病毒被再激活的指标应该是 VCA-IgA 滴度达到 1 10 以上;也就是说,在免疫酶标检测板上至少要有两个孔的差异。我们在 15 年内对上述 42 048 例 30~59 岁的部分人群进行

收稿日期: 2005-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39730200-II)

作者简介: 宗永生(1927-),男,江苏宜兴人,教授,博士生导师,主要从事肿瘤病理学,特别是鼻咽癌病理学的研究,E-mail: yszong@tm.com

VCA-IgA 抗体水平的跟进研究,结果显示在鼻咽癌高发的广州地区,超过 50%的成人至少会有一次 EB 病毒被再激活的表现。只要有过一次的 EB 病毒再激活(或再感染),患鼻咽癌的风险性 12 倍 ($144.86/10^5$ vs $11.98/10^5$) 高于没有发生过曾经再激活或再感染者^[4]。我们最近的研究结果显示,有鼻咽癌家族史的个体,EB 病毒被再激活的频率增高了(尚未正式发表的材料)。我们最近在中山大学附属肿瘤医院的研究结果又显示,非鼻咽癌的癌症患者,EB 病毒被再激活的频率也增高了(尚未正式发表的材料)。EB 病毒被再激活是部分潜伏性感染的 B 淋巴细胞进入溶解性感染。这是细胞毒性 T 细胞一时调节不良所致,主要导致 IgG 抗体水平升高。广州地区超过 60%成人血清 VCA-IgA 1 10 阳性者在短期内即可转阴,不到 40%成人血清 VCA-IgA 1 10 阳性者可以持续一段时间。大约 35%的成人一生中血清中 EB 病毒被再激活仅 1~3 次。初步材料显示,不到 1%的广州地区成人血清可呈 VCA-IgA 1 10 持续阳性,但并不呈多种抗体阳性。鼻咽癌患者在发病前不但常呈 VCA-IgA 1 10 长期持续阳性,而且有多种抗体呈阳性^[5]。

2 EB 病毒相关性疾病病理学

2.1 传染性单核细胞增多症 (Infectious mononucleosis)

广州地区,绝大多数传染性单核细胞增多症患者为儿童;而在西方则多为青壮年。外周血中的所谓“单核细胞”多为 NK 细胞或细胞毒性 T 细胞。我们曾见到 1 例青年传染性单核细胞增多症患者,采用原位杂交和巢式 PCR 才被确诊^[6]。该例的经验告知:不要把淋巴结皮质旁区淋巴细胞增生误诊为淋巴瘤;EBERs 原位杂交对诊断很有帮助。个别患者由于免疫功能缺陷,完全丧失了 T 细胞的控制,甚至可以致死,称为致死性传染性单核细胞增多症。作者曾见到 2 例^[7]。这两例肝、脾和淋巴结中均可见 EBERs- 阳性的所谓“单核细胞”,即 NK 细胞和细胞毒性 T 细胞。

2.2 腭扁桃体淋巴组织增生 (Lymphoid hyperplasia of palatine tonsils)

最近我们做了两批各 30 多例腭扁桃体淋巴组织增生组织的 EB 病毒检测。EBERs 原位杂交染色,几乎 100%的切片中可见个别或少数 EBERs 阳性 B 淋巴细胞的存在。少数病例可见表面被覆上皮储备细胞和小涎腺腺泡上皮细胞 EBERs 阳性,即呈 EB 病毒潜伏性感染;而浅表层扁平鳞

状细胞却可呈 EA-D 原位杂交阳性,即呈 EB 病毒溶解性感染。巢式 PCR 显示,所检测到的 EB 病毒可以是 30 bp 缺失型 LMP1 株,也可以是野生型 LMP1 株(尚未正式发表的材料)。所以,EB 病毒携带者的结外淋巴组织中可见带潜伏感染 EB 病毒的 B 淋巴细胞;而口咽被覆上皮储备细胞中潜伏感染的 EB 病毒可随着细胞分化成熟而转变为溶解性感染。

2.3 鼻咽淋巴组织增生 (Nasopharyngeal lymphoid hyperplasia)

鼻咽癌高发区人群中患鼻咽淋巴组织增生者也较多,但经我们随访观察,认为它并不是鼻咽癌的癌前病变^[8]。我们采用 PCR 和 Southern blot 检测了 24 例血清 VCA-IgA 抗体滴度 1 20 并伴有鼻咽淋巴组织增生组织中的 EB 病毒 DNA, 22 例阳性 (91.7%)。22 例 EB 病毒 DNA 阳性的切片中 17 例 (77.3%, 17/22) 见 EBERs 阳性淋巴细胞^[9]。最近,我们又做了 2 批各 30 多例鼻咽淋巴组织增生的 EB 病毒检测。巢式 PCR 显示,几于 100%可检测到 EB 病毒 DNA,且多为 30 bp 缺失型 LMP1 株(尚未正式发表的材料)。

2.4 Burkitt 淋巴瘤 (Burkitt lymphoma)

在非洲呈地方性流行的 Burkitt 淋巴瘤几乎 100%都感染了 EB 病毒;但 EB 病毒不是 Burkitt 淋巴瘤唯一的病因。大约 30%~40%散发性 Burkitt 淋巴瘤感染了 EB 病毒。我们尚未发表的材料表明,在广州地区所见 60%~80%散发性 Burkitt 淋巴瘤病例有 EB 病毒感染。

2.5 鼻型结外 NK/T 细胞淋巴瘤 (Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type)

绝大多数鼻型结外 NK/T 细胞淋巴瘤病例 EB 病毒阳性,CD56 阳性,应属 NK 细胞的肿瘤;极少数病例 EB 病毒阳性,CD56 阴性,为细胞毒性 T 细胞表型。细胞毒性 T 细胞 EBERs 阳性。近年来的研究证实,EB 病毒也可原发感染细胞毒性 T 细胞。需与母细胞性 NK 细胞淋巴瘤鉴别,后者无 EB 病毒感染。我们在广州地区发现,上呼吸道的原发性鼻型结外 NK/T 细胞淋巴瘤十分多见,好发于鼻腔和鼻窦,其次为鼻咽。鼻腔、鼻窦的 NK/T 细胞淋巴瘤占该部位非 Hodgkin 淋巴瘤的 38.63% (17/44),而鼻咽的 NK/T 细胞淋巴瘤占该部位非 Hodgkin 淋巴瘤的 9.72% (7/72) (尚未正式发表的材料)。在鼻咽原发性非 Hodgkin 淋巴瘤中,100%

(7/7) 的鼻型结外 NK/T 细胞淋巴瘤有 EB 病毒感染; 其次为 T 细胞淋巴瘤 (81.8%, 18/22) 和 B 细胞淋巴瘤 (11.4%, 5/44)^[10]。鼻型结外 NK-T 细胞淋巴瘤是 型 EB 病毒潜伏感染, LMP1 的表达率与鼻咽癌相似, 为 64%。淋巴瘤细胞可以是小、中、大或多形性的淋巴细胞, 其中还掺杂较多的炎症细胞, 包括非肿瘤性的淋巴细胞。常伴有区域性坏死。EBERs 原位杂交有助于病理诊断。

2.6 经典的 Hodgkin 淋巴瘤 (Classical Hodgkin Lymphoma)

仅在部分经典的 Hodgkin 淋巴瘤中有 EB 病毒感染, 属 型潜伏感染, 表达 EBNA1、EBERs、LMP1, 不表达 EBNA2。约 75% 的混合细胞性 Hodgkin 淋巴瘤感染 EB 病毒, 10%~40% 的结节硬化性 Hodgkin 淋巴瘤感染 EB 病毒; 而富有淋巴细胞性的 Hodgkin 淋巴瘤和淋巴细胞缺乏性的 Hodgkin 淋巴瘤感染 EB 病毒的频率则介乎上述两者之间。作者在广州的经验亦是如此, 但未作统计学的分析。EBERs 原位杂交或 LMP1 免疫组化均可清楚地显示在反应性淋巴组织中的 Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) 细胞。EBERs 信号位于胞核内, 而 LMP1 则位于胞膜。可以用激光微切割将 Hodgkin/Reed-Sternberg 细胞单个取出来, 作 EB 病毒 DNA 的分析。

2.7 鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma)

EB 病毒感染的频率因组织学类型不同而异^[11]。鼻咽非角化性癌, 特别是鼻咽型未分化癌确与 EB 病毒感染密切相关, 在广州地区的感染率几乎为 100%。一般认为属 型潜伏感染, 表达 EBNA1、EBERs、LMP2A 和 LMP1, 不表达 EBNA2。可是, 我们在 36 例鼻咽非角化性癌中的 4 例切片中, 可见少数癌细胞表达 EBNA2。国外报道, 鼻咽角化性鳞状细胞癌不是 100% 感染 EB 病毒, 但在广州地区, 也几乎 100% (25/25) 有 EB 病毒感染^[12-14]。但是, 即使在广州地区, 确有极个别非角化性癌和角化性鳞状细胞癌呈 EB 病毒阴性者。张峰等^[15]于 1996 年首先在广州地区所见腺鳞癌中见到有 EB 病毒感染。继而张敏等^[11]报道 11 例腺鳞癌和黏液表皮样癌中的 9 例鳞状细胞癌成分有 EB 病毒感染。鼻咽原发性腺样囊性癌的少数癌细胞呈 EBERs 阳性^[16]; 而 5 例鼻咽原发性乳头状腺癌中却无 EB 病毒感染^[17]。无论是在非角化性癌或角化性鳞状细胞癌中, 虽然大多数癌细胞内的 EB 病毒是潜伏感染, 但确有少数癌细胞中的 EB 病毒可转为溶解性感染, 表达溶解性产物^[14]。我们在 15 个癌旁异

型上皮病变的 14 个中可检测到 EBER 阳性的异常上皮细胞和/或浸润性淋巴细胞^[1]。我们亦曾报道鼻咽原位癌中有 EB 病毒感染^[18-20]。因此, 鼻咽上皮细胞的 EB 病毒感染是癌变过程中侵袭前的事件。

2.8 鼻咽以外的淋巴上皮瘤样癌 (Extra-nasopharyngeal lymphoepithelioma-like carcinoma)

作者在广州地区 8 年内 (1989-1996 年) 见到鼻腔淋巴上皮瘤样癌 17 例, 上颌窦 3 例。所有 20 例鼻腔、鼻窦淋巴上皮瘤样癌的大部分癌细胞均呈 EBERs 和 EBNA1 阳性。LMP1、Zta、EA-D、VCA 和 MA 的表达率分别为 15% (3/20)、10% (2/20)、95% (19/20) 和 65% (15/20)^[21], 显示 EB 病毒呈溶解性激活状态的细胞较多。我们在广州地区 7 年 (1988-1994 年) 内所见 106 例扁桃体癌中有 15 例淋巴上皮瘤样癌, 占 14.2%。10 例癌细胞呈 EBERs 阳性 (66.6%)^[22]。在鼻咽癌高发在广州地区, 10 年内所见 125 例腮腺癌中就有 32 例是淋巴上皮瘤样癌。32 例淋巴上皮瘤样癌中都可 EBERs 阳性的癌细胞。表达 EBNA1、EBERs、LMP1、EA-D、VCA 和 MA 的频率分别为 100%、100%、84.4%、71.9%、68.8%、和 12.5%^[23]。需要特别注意的是, 不要把鼻咽癌转移至腮腺内淋巴结并扩展出来的癌误诊为原发于腮腺的淋巴上皮瘤样癌。EBERs 原位杂交可鉴别腮腺的良性淋巴上皮病变和恶性的淋巴上皮瘤样癌。韩安家等^[24]复查广州地区 3 663 例连续肺癌病理标本, 见淋巴上皮瘤样癌 32 例 (0.87%, 32/3 663)。32 例中见 30 例 (94%) 有 EBERs 阳性的癌细胞。30 例中 16 例 (53%) 表达 LMP1, 主要为潜伏 型 EB 病毒感染。30 例中有 7 例见个别表达 VCA 的癌细胞, 显示 EB 病毒的溶解性感染。我们曾见到几例食管淋巴上皮瘤样癌感染了 EB 病毒, 但尚未总结这方面的材料。文献中曾报道 4 例胸腺淋巴上皮瘤样癌细胞核 EBERs 阳性, 5 例胸腺淋巴上皮瘤样癌组织检测到 EB 病毒 DNA; 但买世娟等报道^[25]在广州所见 7 例胸腺的淋巴上皮瘤样癌中却未能检测到 EB 病毒。

2.9 喉癌 (Carcinoma of the larynx)

我们复习 8 年 (1987-1995 年) 158 例喉癌。发现 8 例未分化癌中, 7 例中有部分癌细胞呈 EBERs 阳性 (87.5%)。在 8 例未分化癌中, 有 1 例的形态学与淋巴上皮瘤样癌一致, 癌细胞呈 EBERs 阳性。12 例低分化鳞癌中 6 例有少数癌细胞也呈 EBERs 阳性 (50.0%)。7 例中等分化鳞癌中 2 例少数癌细胞阳性 (28.5%)。2 例高分化鳞癌癌细胞 EBERs

阴性^[26]。我们最近发现,42.86%喉癌患者血清中 EB 病毒 EA-IgG 呈阳性(尚未正式发表的材料),这尚需更多病例加以证实。

2.10 胃腺癌 (Adenocarcinoma of the stomach)

我们初步的研究结果显示,广州地区的胃腺癌的 EB 病毒感染率为 15.0% 左右。发生在胃上 1/3 部的腺癌 EB 病毒感染率较高。表达 EBERs、EBNA1 和 LMP2A (尚未正式发表的材料)。

3 组织中 EB 病毒的检测

3.1 原位杂交和免疫组化

EBERs (EB virus encoded RNAs) 是 EBER1 和 EBER2 的总称。EBER1 和 EBER2 是分别为 167 和 172 个的小核糖核酸 RNA。在所有已知的 EB 病毒潜伏感染中均有众多 EBERs 的表达,但偶亦可在溶解性感染中表达。可是,口腔白斑中的 EB 病毒在复制时却不表达 EBERs。EBER1 和 EBER2 这两个小 RNA 具有高度稳定的二极结构。因此,EBERs 或 EBER1 原位杂交法目前已成为检测组织切片中 EB 病毒潜伏感染的所谓“金标准”。阳性信号位于核内。

早期抗原 (early antigens) 有弥漫型 (EA-D) 和局限型 (EA-R) 之分。前者的蛋白弥漫地分布在细胞的核和浆内,后者局限在细胞浆内。有商品化的显示 EA-D mRNA 的原位杂交试剂盒,可以检测流产型和复制型溶解性感染。

EBNA1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen 1) 蛋白是 BKRF1 基因编码形成的蛋白质。EBNA1 和 oriP 是维持增殖细胞中病毒游离体所必需的。在鼻咽癌中, BKRF1 基因通过 Fp 表达 EBNA1 蛋白。这一促进子只有在 Zta 蛋白表达后才显示其活性。所以, EBNA1 蛋白和 Zta 蛋白的表达相互关联。阳性信号位于核内。EBNA1 免疫组化还不能替代 EBERs 原位杂交,因其容易产生非特异性核染色。

LMP1 (latent membrane protein 1) 被认为是病毒基因 (Viral oncogene) 蛋白。Chen HL 等的研究结果显示, JAK-STAT 信号传导通道在鼻咽癌中可以调控 LMP1 表达^[27]。LMP1 表达既可影响鼻咽癌细胞的增殖,又可影响其凋亡^[28]。LMP1 可以激活 Ets-1, 促进细胞的移动性能和 uPA 表达, 有利于瘤细胞浸润, 导致鼻咽癌容易转移; 又可以下调 β -catenin 表达, 从而抑制细胞分化^[29]。LMP1 单独地或与 EBNA2 一起维持大多数淋巴母细胞株的表型特征。LMP1 表达也与肿瘤细胞的恶性表型有

关。最好采用沸水预处理切片 5~10 min 后, 再进行免疫组化染色。阳性信号位于胞膜; 胞核着色是非特异性。

EBNA2 (Epstein-Barr virus nuclear antigen 2) 是由 EB 病毒核抗原 2 基因编码的 82 ku 的蛋白质。阳性信号位于核内。EBNA2 可应用于鉴别 EB 病毒阳性的淋巴瘤和由 EB 病毒引起的不典型性淋巴增生性疾病。前者常呈 EBNA2 阳性, 而后者则为阴性。

Zta (BamH1 Z transactivator) 或 ZEBRA (BamH1 Z Epstein-Barr Replication Activator) 是由含 3 个外显子的 BZLF1 片段编码的蛋白。阳性信号位于核内。表达 Zta 的细胞显示 EB 病毒感染开始进入溶解期。

3.2 EB 病毒的基因检测

3.2.1 LMP1 基因 张敏等^[30]采用巢式 PCR 检测 48 例鼻咽癌组织中 EB 病毒 LMP1 基因 C 末端, 显示 30 bp 缺失型 LMP1 (del-LMP1) 占 85.4% (41/48), 野生型 LMP1 (wt-LMP1) 仅 2.1% (1/48), del-LMP1/wt-LMP1 混合感染占 12.5% (6/48)。林素暇等^[31]的结果显示, 单独 del-LMP1 在鼻咽非角化性癌中的频率占 93.65% (59/63), wt-LMP1 亦仅 6.35% (4/63), 未发现 del-LMP1/wt-LMP1 混合感染。除 30 bp (密码子 346-355) 缺失外, 还有 4 个非同义和 1 个同义硷基替换。张敏等^[30]还发现, 鼻咽癌组织学类型不同, del-LMP1 的频率也不同, 见表 1。

表 1 鼻咽癌 4 种组织学类型 EB 病毒 LMP1 基因 C 末端的检测

Table 1 Detecting the C-terminus of EB virus LMP1 gene among 4 histological types of NPC

Histological type	%(n)		
	del-LMP1	del-LMP1/wt-LMP1	wt-LMP1
Non-keratinizing carcinoma	85.4(41/48)	12.5(6/48)	2.1(1/48)
Keratinizing squamous cell carcinoma	16.0(4/25)	56.0(14/25)	28(7/25)
Adenosquamous carcinoma &			
Mucoepidermoid carcinoma	44.4(4/9)	44.4(4/9)	11.1(1/9)
Adenocarcinoma	11.8(2/17)	70.6(12/17)	17.6(3/17)

EB 病毒 LMP1 基因 N 末端 (nt:169 287~169 446) Xho1 酶切位点的识别序列为 CTCGAG。Xho1 酶切位点的丢失出现了 CTCGAG CTAGAG; 因而第 17 密码子 CGA 变为 CUA, 其编码的精氨酸 (Arg) 变为亮氨酸 (Leu)。韩安家等^[32]的结果显示, 76.9% (30/39) 为 Xho1-loss, 17.9% 为 wt-Xho1,

5.1%(2/39)为 wt-Xho1/Xho1-loss 混合感染。林素暇等^[31,33]的结果, 79.4% (50/63) 为 Xho1-loss, 14.3% (9/63) 为 wt-Xho1, 6.3% (4/63) 为 wt-Xho1/Xho1-loss 混合感染。除 Xho1 酶切位点丢失外, 还有 5 个非同义和 3 个同义碱基替换。林素暇等^[31]联合检测 LMP1 基因 C 末端和 N 末端的结果见表 2。显示 79.4% (50/63)为 Xho1-loss/del-LMP1。无 1 例是 wt-Xho1/Xho1-loss/wt-LMP1, 说明 del-LMP1 可能是在 Xho1-loss 基础上发生的。

表 2 63 例鼻咽癌组织 EB 病毒 LMP1 基因变异

Table 2 Genomic variation of EB virus LMP1 gene in 63 NPC tissues

	NPC tissues			n
	wt-Xho1	wt-Xho1/Xho1-loss	Xho1-loss	
wt-LMP1	4	0	0	4
del-LMP1	5	4	50	59
Total	9	4	50	63

3.2.2 LMP2A 基因 林素暇等采用 PCR 扩增 LMP2A 第 1 外显子, 以异源双链-SSCP 筛选并测序检测变异型 LMP2A (mt-LMP2A)。66 例鼻咽癌组织中 62 例(93.94%)有突变, 称为突变型 LMP2A (mt-LMP2A); 而突变型 LMP2A 又可细分为几种亚型。材料正在总结中。

3.2.3 F 片段 (F-fragment) 采用 PCR 扩增鼻咽癌组织中 EB 病毒 F 片段 (198 bp), 再用 BamH1 限制性酶切。“f”变异型 EB 病毒呈 127 bp 和 71 bp 2 条带, 即出现了一个 BamH1 酶切位点的识别序列。Lung LM 等 1991 年报道^[34], 67.3% (33/49) 治疗前鼻咽癌活检中, 58.3% 漱口水中检测到“f”变异型 EB 病毒; 放疗后 3~4 年, 则又检测到 BamH1 F 原型了。韩安家等^[32]报道, 75% (30/40) 治疗前鼻咽癌活检中检测到“f”变异型, 25% (10/40) 为 BamH1 F 原型。林素暇等尚未发表的材料显示, 73.85% (48/65) 治疗前鼻咽癌活检为“f”变异型, 26.15% (17/65) 为 BamH1 F 原型。

3.2.4 鼻咽癌组织 EB 病毒基因变异类型的组合 韩安家等^[32]的材料显示, 56.4% (22/39) 为 BamH1 “f”/Xho1-loss。林素暇等尚未发表的材料见表 3。上述材料说明, 鼻咽癌组织中的 EB 病毒基因组既呈多样性又有一定的规律性; 而以 del-LMP1/Xho1-loss“f”/mt-LMP2A 占多数 (60.23%), 其次是 del-LMP1/Xho1-loss/F/mt-LMP2A (20.63%)。

表 3 63 例鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1、LMP2A 和 F 片段 DNA 序列变异的七种组合类型

Table 3 Seven combinations of sequence variations for EB virus LMP1, LMP2A and F-fragment in 63 NPCs

Combination	n (%)
del-LMP1/Xho1-loss/"f"/mt-LMP2A	38 (60.23)
del-LMP1/Xho1-loss/F/mt-LMP2A	13 (20.63)
del-LMP1/wt-Xho1/"f"/mt-LMP2A	4 (6.35)
del-LMP1/Xho1-loss/"f"/wt-LMP2A	4 (6.35)
wt-LMP1/wt-Xho1/F/mt-LMP2A	2 (3.17)
del-LMP1/wt-Xho1/F/mt-LMP2A	1 (1.59)
wt-LMP1/wt-Xho1/"f"/mt-LMP2A	1 (1.59)
Total	63 (100)

4 EB 病毒血清学

我们总结鼻咽癌患者 EB 病毒血清学有 4 个特点, 即: 呈多种抗 EB 病毒抗体阳性; 主要是 IgG 和 IgA 抗体, 特别是 IgA 抗体阳性; 抗体阳性在上皮侵袭前病变时已经发生, 一直持续到浸润癌形成及以后; 血清中有大量游离 EB 病毒, 放疗后拷贝数减少。

4.1 EA-IgG

间接免疫荧光法检测 194 例鼻咽癌患者, 未稀释血清的阳性率为 91.75%, 高滴度 (1:40) 阳性率为 41.57%, 几何平均滴度为 1:21.2。滴度的高低与癌巢周围浸润的浆细胞数量有关^[35]。张昌卿等^[36,37]和张玉等^[38]采用酶联免疫吸附法检测鼻咽癌患者血清 EA-IgG 抗体, 灵敏度达 87.50%~93.98%, 特异度达 87.93%~93.66%。所以, 检测 EA-IgG 仍然不失为一种较好的血清学诊断鼻咽癌的方法。应该指出的是, 这是采用 Raji 细胞培养液作为抗原来检测的, 而 Raji 细胞培养液中成份复杂, 不是单克隆性的 EA 抗原。

4.2 EA-IgA

张昌卿等^[36]采用免疫酶标法检测 EA-IgA 的结果, 灵敏度 89.84%, 特异度 88.18%。张玉等^[38]采用酶联免疫吸附法检测 EA-IgA, 其灵敏度为 78.79%。

4.3 VCA-IgA

张昌卿等^[36]采用免疫酶标的结果显示, 以 1:40 为诊断界点, 灵敏度 90.60%, 特异度 94.52%。买世娟等^[39,40]以 1:40 为诊断界点, 灵敏度 80.30%, 特异度 89.66%。胡维维等^[41]采用酶联免疫吸附法检测 VCA-p18-IgA, 灵敏度 70.59%, 特异度 70.45%。张玉等^[38]采用以 1:40 为诊断界点免疫酶标法或 1:5 稀释的酶联免疫吸附法, 灵敏度均为 96.97%。免

疫酶标法所检测的抗体,虽然主要为 VCA,但亦可包括 EA 和 Zta;而酶联免疫吸附片法所检测的抗体是单克隆的 VCA-p18 (BFRF3)。免疫酶标法所检测的 VCA-IgA 抗体水平与癌巢中浸润的浆细胞多少有关,与淋巴细胞数量无关^[42]。

4.4 VCA-IgG

我们多次采用酶联免疫吸附法试测鼻咽癌血清中的 VCA-P18-IgG,灵敏度仅为 51.41%~56.39%,特异度仅为 51.60%~56.82% 胡维维等^[41]再次检测 VCA-p18-IgG,灵敏度仍为 52.94%,特异度仍为 43.03%。所以,检测 VCA-p18-IgG 并不是一种血清学诊断鼻咽癌的好方法。

4.5 EBNA1-IgA

程等^[5]、张等^[37]、顾等^[43]和胡等^[41]采用酶联免疫吸附法检测血清中的 EBNA1-IgA 诊断鼻咽癌,其灵敏度在 85.0%~91.23%之间,特异度在 81.06%~87.93%之间。其灵敏度和特异度均较好,是目前推荐为血清学诊断的一种检测。

4.6 EBNA1-IgG

程等^[5]、顾等^[43]和胡等^[41]采用酶联免疫吸附法检测血清中的 EBNA1-IgG 诊断鼻咽癌,其灵敏度在 68.42%~83.0%之间,特异度在 68.97%~86.0%之间。3 次检测的结果不一致,尚需继续鉴定其效果。

4.7 Zta-IgG

程等^[5]、顾等^[43]和胡等^[41]采用酶联免疫吸附法检测血清中的 Zta-IgG 诊断鼻咽癌,其灵敏度在 79.0%~88.23%之间,特异度在 80.0%~87.88 之间。3 次检测的结果较一致,是目前推荐为血清学诊断的一种检测。

4.8 Zta-IgA

采用酶联免疫吸附法检测血清中的 Zta-IgA 诊断鼻咽癌,胡维维等^[41]的结果显示,灵敏度为 75.29%,特异度为 75.76%。结果并不理想。

4.9 外周血中单个核细胞中的 EB 病毒 DNA

买世娟等^[39,40]采用巢式 PCR 法检测外周血单个核细胞中的 EB 病毒 W-片段,灵敏度 81.82%,特异度 48.28%。张敏等^[30]检测外周血单个核细胞中的 EB 病毒 LMP1 基因羧基端,灵敏度 86.79%。林素暇等^[33],检测外周血单个核细胞中的 EB 病毒 LMP1 基因羧基端,灵敏度 88.3%。因为多数 EB 病毒携带者外周血单个核细胞中存有 EB 病毒感染的 B 淋巴细胞,且 PCR 法十分敏感,所以本检测并非是血清学诊断鼻咽癌的一种选择。

4.10 外周血清/血浆中的游离 EB 病毒

买世娟等^[39,40]报道,采用巢式 PCR 检测鼻咽癌患者外周血清/血浆中的游离 EB 病毒的 W 片段,约 7%~8%的正常成人血浆中可检测到 EB 病毒 DNA,其灵敏度为 84.85%,特异度为 89.66%。采用实时定量 PCR,能够计出 EB 病毒 DNA 拷贝数,既适用于血清学诊断鼻咽癌,又可作为对放疗效果的监控指标之一,是一种颇有前途的 EB 病毒检测法,值得进一步探讨。

4.11 外周血中两种以上抗体或/和 EB 病毒 DNA

我们多次的研究结果说明,在血清学诊断鼻咽癌方面,检测两种以上的指标较单独检测一个指标为好。见表 4。胡,等^[41]和 Chan KH,等^[45]均赞同同时采用酶联免疫吸附法检测血清中 Zta-IgG 和 EBNA1-IgA 的水平。血清定量游离 EB 病毒 DNA 的检测,在方法学规范化后,不但在血清学诊断鼻咽癌方面,而且在监控鼻咽癌放疗的疗效上,必将有较好的成效。

表 4 检测血清中两种以上抗 EB 病毒抗体和/或 EB 病毒 DNA

Table 4 Detecting more than 2 kinds of antibodies against EB virus and/or EB virus DNA

(%)

Author	Antibodies or EBV DNA detected (Method)	Sensitivity	Specificity
Zong YS ^[44]	EBNA1-IgA(ELISA) + Zta-IgG (ELISA)	79.67	98.28
Mai SJ, et al. ^[39,40]	VCA-IgA(IE) + plasma/serum EBV DNA	83.87	97.92
Zong YS ^[44]	EA-IgG(ELISA) + EBV DNA	78.78	98.27
Zhang Y, et al. ^[38]	VCA-IgA(IE) + EA-IgA (IE)	78.79
Zhang Y, et al. ^[38]	VCA-IgA(ELISA) + EA-IgG (ELISA)	84.85	...
Wu WW, et al. ^[41]	Zta-IgG(ELISA) + EBNA1-IgG (ELISA)	70.59	97.73
Wu WW, et al. ^[41]	Zta-IgG(ELISA) + EBNA1-IgA (ELISA)	72.94	96.21
Wu WW, et al. ^[41]	EBNA1-IgG(ELISA) + Zta-IgA (ELISA)	63.53	90.15
Wu WW, et al. ^[41]	EBNA1-IgA(ELISA) + Zta-IgA (ELISA)	62.35	96.21
Wu WW, et al. ^[41]	Zta-IgG (ELISA) + EBNA1-IgA (ELISA) + EBNA1-IgG (ELISA)	61.18	99.24
Wu WW, et al. ^[41]	Zta-IgG (ELISA) + EBNA1-IgG (ELISA) + Zta-IgA (ELISA)	60.0	99.24
Cheng, et al. ^[5]	EBNA1-IgA (ELISA) + EBNA1-IgG (ELISA) + Zta-IgG (ELISA)	92.0	93.0

参考文献:

- [1] Zhong BL, Zong YS, Lin Su-xia, et al. Epstein-Barr virus infection in preinvasive epithelial lesions of nasopharyngeal carcinoma (Article in English) [J]. 癌症 (稿件已接受).
- [2] 宗永生, 李锦源, 彭秀云, 等. 广东省两个地区鼻咽癌死亡率的比较及其与人群中 EB 病毒 IgA/VCA 抗体水平的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 1992, 14(2): 102-5.
- [3] Zong YS, Sham JS, Ng MH, et al. Immunoglobulin A against viral capsid antigen of Epstein-Barr virus and indirect mirror examination of the nasopharynx in the detection of asymptomatic nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer, 1992, 69 (1): 3-7.
- [4] Ji MF, Ou XT, Zong YS, et al. A follow-up survey of 42,048 subjects tested with Epstein-Barr viral serology in a high-incidence area of nasopharyngeal carcinoma [J]. The Chinese German Journal of Clinical Oncology, 2002, 1(4): 222-5.
- [5] Cheng WM, Chan KH, Chen HL, et al. Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV antibody spectrum [J]. Int J Cancer, 2002, 97 (4): 489-92.
- [6] 买世娟, 宗永生, 钟碧玲, 等. 原位杂交和巢式 PCR 辅助成人传染性单核细胞增多症[J]. 诊断病理学杂志, 2002, 9 (1): 42.
- [7] 陈光华, 宗永生, 陈峥嵘, 等. 重症传染性单核细胞增生症二例尸检 [J]. 中华病理学杂志, 2001, 30 (2): 155-6.
- [8] Zong YS, Zheng WJ. A morphologic and follow-up study on the nasopharyngeal lymphoid hyperplasia and its relation to the cancer [J]. Chin Med J Engl, 1989, 102(8): 625-9.
- [9] Zong YS, Zhang JX, Li Z, et al. Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal lymphoid hyperplasia [J]. Chin Med J Engl 1999, 112 (9): 845-9.
- [10] Zhang B, Zong YS, He JH, et al. Primary nasopharyngeal non-Hodgkin lymphoma and its relationship with Epstein-Barr virus infection [J]. Chin Med J Engl, 2003, 116 (6): 913-7.
- [11] Zhang M, Zong YS, He JH, et al. Comparison of Epstein-Barr virus infection and 30 bp-deleted LMP1 gene among four histological types of nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin Med J Engl. 2004, 117(4): 608-11.
- [12] Zong YS, Zhang JX, Chan KH, et al. Association of Epstein-Barr virus with keratinizing squamous cell carcinoma (KSCC) of the nasopharynx in Southern China [J]. Chin Med J (Taipei), 1996, 57 (6 supplement A): 157-8.
- [13] Zong YS, Zhang JX, Chan KH, et al. Association of Epstein-Barr virus with nasopharyngeal squamous cell carcinoma in the south of China (Article in English) [J]. 癌症, 1999, 18 (1): 9-19.
- [14] Zhang JX, Chen HL, Zong YS, et al. MH. Epstein-Barr virus expression within keratinizing nasopharyngeal carcinoma [J]. J Med Virol, 1998, 55(3):227-33.
- [15] Zhang F, Zhang CQ, Zhang JX, et al. Adenosquamous carcinoma of the nasopharynx containing EB virus, apropos of a case [J]. Chin J cancer research, 1996, 8 (1): 41.
- [16] 何洁华, 宗永生, 张敏, 等. 鼻咽原发性腺样囊性癌及其与 EB 病毒感染的关系 [J]. 中华病理学杂志, 2003, 32 (3): 234-7.
- [17] 何洁华, 宗永生, 张敏, 等. 鼻咽原发性乳头状腺癌并无 EB 病毒感染 [J]. 中华国际医学杂志, 2003, 3(3): 200-3.
- [18] Yeung WM, Zong YS, Chiu CT, et al. Epstein-Barr virus carriage by nasopharyngeal carcinoma in situ [J]. Int J Cancer, 1993, 53(5): 746-50.
- [19] 宗永生, 杨伟民, 张昌卿, 等. 用原位杂交技术探讨 EB 病毒在鼻咽癌发生中的作用 [J]. 中华病理学杂志, 1993, 22(6): 330-2.
- [20] 宗永生, 钟碧玲, 梁英杰, 等. 鼻咽癌变过程生物学特性研究的进展[J]. 癌症, 2002, 21(6): 686-95.
- [21] Zong YS, Liu KL, Zhong BL, et al. Epstein-Barr virus infection of sinonasal lymphoepithelial carcinoma in Guangzhou [J]. Chin Med J Engl, 2001, 114(2): 132-6.
- [22] 刘克拉, 张昌卿, 梁英杰, 等. 扁桃体淋巴上皮瘤样癌的病理特征及其与 EB 病毒的相关性 [J]. 中山医科大学学报, 1996, 17(3): 177-80.
- [23] Zong YS, Liu KL, Rao HL, et al. Association of Epstein-Barr virus with lymphoepithelioma-like carcinoma of the parotid gland (Article in English) [J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15 (5): 377-81.
- [24] Han AJ, Xiong M, Zong YS. Association of Epstein-Barr virus with lymphoepithelioma-like Carcinoma of the lung in southern China [J]. Am J Clin Pathol, 2000, 114(2):220-6.
- [25] 买世娟, 熊敏, 宗永生, 等. 胸腺肿瘤组织中 EB 病毒、细胞增殖和凋亡的检测 [J]. 中华病理学杂志, 1999, 28 (2): 89-92.
- [26] 刘克拉, 宗永生. EB 病毒基因在喉鳞状细胞癌中的表达[J]. 癌症, 1998, 17(1): 10-2.
- [27] Chen HL, Lee JM, Zong YS, et al. Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors [J]. J Virol, 2001, 75(6): 2929-37.
- [28] 李智, 宗永生. LMP1 表达对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(5): 340-3.
- [29] Lin SX, Zong YS, Lin HL, et al. Effects of EB virus encoded LMP1 on differentiation of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Chin J Cancer Res, 2003, 15 (4): 257-61. (下转第 492 页 to page 492)

- [7] Calabrese EJ. Hormesis--basic, generalizable, central to toxicology and a method to improve the risk-assessment process [J]. *Int J Occup Environ Health*, 2004, 10(4): 466-7.
- [8] 宋今丹. 医学细胞分子生物学[M]. 人民卫生出版社, 北京: 2003. 265-6.
- [9] Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. Coli*: to fold or refold [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, 66(3): 197-238.
- [10] 文 镜, 金宗濂. 肝癌细胞能量代谢中三种酶活力的比较研究[J]. *北京联合大学学报*, 1996, 10(2): 19-22.
- [11] Liu WJ, Shen Y, Ding J. Protein phosphatase 2A: its structure, function and activity regulation [J]. *Acta Biochim Poloni*, 2001, 44(4): 921-33.
- [12] Neumann F. Constitutive expression of human ribosomal protein L7 arrests the cell cycle in G1 and induces apoptosis in Jurkat T-lymphoma cells [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 230(2): 252-61.
- [13] Ruggero D, Grisendi S, Piazza F, et al. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification [J]. *Science*, 2003, 299(5604): 259-62.
- [14] Shimizu S, Nomura F, Tomonaga T et al. Expression of poly (ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance [J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(4): 821-5.

(编辑 张敏瑞)

(上接 487 页 from page 487)

- [30] 张 敏, 宗永生, 何洁华, 等. EB 病毒感染及 30 bp 缺失潜伏膜蛋白 1 基因在鼻咽部癌不同组织学类型中的比较 [J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(4): 342-6.
- [31] 林素暇, 宗永生, 张 敏, 等. 广州地区鼻咽非角化性癌中 EB 病毒 LMP1 基因的突变热点 [J]. *中华病理学杂志*.. (已投寄).
- [32] 韩安家, 宗永生, 张 敏, 等. 鼻咽癌中 EB 病毒 BamH1“f”变异和潜伏膜蛋白 1 基因 Xho1 缺失型的分析 [J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(6): 534-8.
- [33] Lin SX, Zong YS, Wu QL, et al. Loss of an Xho1-site within N-terminal region of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasopharyngeal carcinoma (Article in English) [J]. *癌症*, 2003, 22(11): 1147-51.
- [34] Lung ML, Lam WP, Sham J, et al. Detection of prevalence of the “f” variant of Epstein-Barr virus in Southern China [J]. *Virology*, 1991, 185(1): 67-71.
- [35] 宗永生, 张汝逢, 陈灼怀, 等. 鼻咽癌治疗前 EB 病毒 EA-IgG 滴度测定 [J]. *中华医学杂志*, 1980, 66(8): 488-9.
- [36] 张昌卿, 宗永生, 黄宝珍, 等. 提高 EB 病毒血清学在诊断鼻咽癌中的效益 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(4): 356-9.
- [37] 张昌卿, 宗永生, 孙 韵, 等. 联合检测 EBNA1-IgA 和 EA-IgG 在鼻咽癌血清学诊断中的价值 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(8): 482-4.
- [38] 张 玉, 张昌卿, 宗永生, 等. 酶联免疫吸附法检测血清 VCA-IgA 和 EA-IgA 诊断鼻咽癌 [J]. *广东医学*, 2003, 24(4): 371-3.
- [39] Mai SJ, Zong YS, Zhang M, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in plasma/serum: a useful serological indicator for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Med J Engl*. 2002, 115(12): 1895-7.
- [40] 买世娟, 宗永生, 张 敏, 等. 血浆/血清 EB 病毒 DNA 检测在鼻咽癌血清学诊断中的价值 [J]. *中华国际医学杂志*, 2002, 2(3): 189-92.
- [41] Hu WW, Zong YS, Li FP, et al. Comparison of six antibody assays against Epstein-Barr virus for serodiagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Med J Engl* (Submitted).
- [42] 李锦添, 宗永生. 鼻咽癌的病理改变与血清中 EB 病毒 VCA-IgA 抗体滴度的关系 [J]. *中华病理学杂志*, 1986, 15(2): 122-5.
- [43] Gu YL, Zhang CQ, Ng SP, et al. Study on sero-diagnosis of nasopharyngeal carcinoma using a dual antibody test against recombinant Epstein-Barr virus antigens [J]. *癌症*, 2003, 22(9): 903-6.
- [44] 宗永生. 鼻咽癌病理学研究. *中华病理学杂志* [J], 2003, 32(1): 65-8.
- [45] Chan KH, Gu YL, Ng F, et al. EBV specific antibody-based and DNA-based assays in serologic diagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(5): 706-9.

(编辑 黄小延)