

EB病毒感染与口腔鳞状细胞癌的关系^①

丁学强^{1②} 朱振宇² 王安训 冯崇锦 黎炽彬

(中山医科大学 1附属第一医院口腔科; 广州, 510080; 2生物化学教研室)

摘要 应用聚合酶链反应 (PCR) 技术对石蜡包埋的 60 例口腔鳞状细胞癌 (以下简称鳞癌) 和 40 例正常口腔粘膜标本进行 EB 病毒的 DNA (EBV-DNA) 检测, 探讨 EBV 与口腔鳞癌间的关系。口腔鳞癌中高分化 40 例, 中分化 10 例, 低分化 10 例。结果显示 60 例口腔鳞癌中 20 例 EBV-DNA 检测阳性, 检出率为 33.3%, 其中高分化 13 例, 中分化 3 例, 低分化 4 例; 正常组 4 例检测阳性, 检出率为 10%。经 χ^2 检验 $\chi^2 = 7.16$, 两组间差异有显著性 ($P < 0.01$), 同时对各病损部位、年龄组和组织分化间的 EBV-DNA 检出率进行统计学处理, 差异均无显著性 ($P > 0.05$)。该研究结果提示口腔鳞状上皮组织的 EBV 感染极可能参与了口腔粘膜的癌变过程。

关键词 口腔肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 聚合酶链反应; 疱疹病毒-型, 人

中图分类号 R 78, R 373

口腔鳞状细胞癌 (以下简称鳞癌) 是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤。近年来国外一些学者对口腔鳞癌的病因学进行了多方面的研究, 发现 EBV 的感染对口腔鳞癌的发病有密切的关系。本研究应用 PCR 技术检测石蜡包埋口腔鳞癌和正常口腔粘膜标本中 EBV-DNA 的阳性检出率, 借以探讨 EBV 感染在口腔鳞癌发生中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

我院 1992~1996 年间经病理确诊为口腔鳞癌的 石蜡包埋组织标本共 60 例作为实验组。从正常口腔粘膜石蜡包埋标本中随机抽取 40 例作为对照组。口腔鳞癌依组织分化分为高分化 40 例, 中分化 10 例, 低分化 10 例。患者男女性别比 2:1, 年龄 27~82 岁, 平均 53 岁。分成 20~40 岁、41~60 岁、大于 60 岁 3 组。

1.2 方 法

1.2.1 模板 DNA 的抽提 石蜡包埋约 4 mm 厚切片 1~2 块放入 500 μ L 离心管中, 400 μ L 二甲苯脱蜡两次, 400 μ L 无水乙醇脱水, h(乙醇) = 0. 去残留杂物, 风干后加入裂解缓冲液 300 μ L, 56 $^{\circ}$ C 水浴轻摇 8~10 h, 10000 r/min, 5 min 离心, 直接取 1~2 μ L 上清液作模板。

1.2.2 PCR 扩增 总体积为 30 μ L, 其中模板 1~2 μ L (以 Raji 细胞 DNA 为阳性对照模板), 引物 I、II 号各 8 pmol/L, dNTPs 20 μ mol/L, Taq polymerase 1 U, 无菌双蒸水加至 30 μ L 用液体石蜡 50 μ L 封顶。稍加离心混匀后, 即按下列温度和时间循环: 93 $^{\circ}$ C, 30 s; 50 $^{\circ}$ C, 30 s; 70 $^{\circ}$ C, 60 s 共循环 25 次, 最后在 70 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳扩增产物 取 15 μ L PCR 扩增产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色后, 在紫外线分析仪下以出现 1068 bp 扩增条带者为扩增阳性。

2 结 果

2.1 实验组与正常组 EBV-DNA 检出率比较

实验组阳性 (图 1 所示) 检出率为 33.3% (20/60), 正常组阳性检出率为 10% (4/40)。经 χ^2 检验, $\chi^2 = 7.16$, $P < 0.01$, 两者间差异有显著性意义。

2.2 不同分化程度 EBV-DNA 检出率比较

口腔鳞癌高分化组阳性检出率为 32.5% (13/40), 中分化组阳性检出率为 30% (3/10), 低分化组阳性检出率为 40% (4/10), 各组间 χ^2 检验, 结果 $P > 0.05$, 相互间差异无显著性意义。

① 中山医科大学科研基金资助课题; ② 第一作者, 195 年出生, 男, 副主任医师

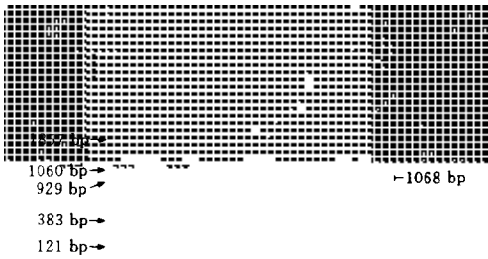


图 1 EBV-DNA 酶基因片段 PCR 扩增产物电泳

1. Raji 细胞 DNA 为扩增阳性对照; 2. pBR322 / BstNI : 1857 bp, 1060 bp, 929 bp, 383 bp, 121 bp 3- 10. 石蜡标本扩增结果, 其中 3, 6, 7, 10 为扩增阳性 (对 6 号标本再次扩增显示阳性); 4, 5, 8, 9 为扩增结果阴性

2.3 不同年龄组 EBV-DNA 检出率比较

口腔鳞癌 20~ 40 岁组阳性检出率为 23% (3/12), 41~ 60 岁组阳性检出率为 34% (9/26), > 60 岁组阳性检出率为 36% (8/22), 各组间 χ^2 检验, 结果 $P > 0.05$, 相互间差异无显著性意义。

2.4 不同病损部位 EBV-DNA 检出率比较

口腔鳞癌不同病损部位 EBV-DNA 检测结果如表 1 χ^2 检验, 结果 $P > 0.05$, 差异无显著性意义。

表 1 口腔鳞癌不同发病部位 EBV-DNA 检测结果

口腔鳞癌部位	舌	口底	颊部	牙龈	唇	硬腭
例数	31	7	12	2	6	2
EBV-DNA(+)	12	3	4	-	1	-
阳性检出率 (%)	38.7	-	-	-	-	-

3 讨论

EBV 是一种嗜 B 细胞的人疱疹病毒, 当感染 EBV 后, 个别细胞在不断分裂和增殖过程中, 在某些辅助因子作用下, 可发生染色体易位而导致恶性转化^[1]。EBV 的感染已被证实存在于正常人中, 且与很多疾病的发生有关。Mao^[2]等的研究均发现口腔鳞状上皮组织中有 EBV 存在, 他们认为 EBV 感染可能与口腔鳞癌的发生有关, 但由于例数太少, 未进行统计学处理。后来 Horiucki^[3]等对不同程度口腔上皮增生性疾病进行 EBV-DNA 检测, 结果口腔鳞癌 EBV-DNA 的检出率为 50%, 良性和恶性肿瘤之间的差异具有显著性意义。Mao 等和 Horiucki 等

均发现 EBV 的感染与年龄、性别、部位及组织分化无关, 这一结果与本研究结果相似。

本研究中, 口腔鳞癌和正常组之间的 EBV 检出率分别为 33.3% 和 10%, 经 χ^2 检验两组间差异有显著性意义。这再次证明 EBV 的感染与口腔鳞癌的发生有一定关系, 它可能在癌变中起一定的作用。但该研究的检出率明显低于 Mao^[2]和 Horiucki^[3]的检出率, 其中的原因可能是多方面的。Deacon^[4]认为在应用 PCR 技术时使用新鲜组织其检出率明显高于使用石蜡包埋组织, 这与本研究的结果相符合。选择新鲜正常组织标本进行 PCR 检测, 其检出率为 25%, 而石蜡标本为 10%。而且 Mao^[2]认为应用多样本检测可明显提高阳性检出率, 这一现象在本研究中也得到证实; 有一多标本患者仅有一标本可检出 EBV。影响检出率还有一个原因可能是 PCR 检测时扩增的基因组不同, 因此, 采用 PCR 对 EBV-DNA 进行检测时, 应注意各组间的可比性。

由于 EBV 在人群中的感染极普遍, 它可感染正常人的成熟角化细胞^[3], 而且正常或恶性的口腔上皮存在着 EBV 受体^[5], 因此我们可以推测, 口腔局部组织感染 EBV 后形成潜伏感染, 在某些条件作用下可发生恶性转化, 从而导致癌变。

参 考 文 献

- 郭辉玉. EB 病毒. 见: 陆德源主编. 医学微生物学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 344-345
- Mao E J, Smith C J. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 1993, 22: 12
- Horiucki K, Mishima K, Ichijima K, et al. Epstein-Barr virus in the proliferative diseases of squamous epithelium in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1995, 79(1): 57
- Deacon E M, Mathews J B, Potts A J C, et al. Detection of Epstein-Barr virus antigens and DNA in major and minor salivary glands using immunocytochemistry and polymerase chain reaction possible relationship with Sjogren's syndrome. *J Pathol*, 1991, 163: 351
- Talacko A A, Teo C G, Griffin B E, et al. Epstein-Barr virus receptors but not viral DNA are present in normal and malignant oral epithelium. *J Oral Pathol Med*, 1991, 20: 20

(1996-09-24 收稿 1997-01-10 修回)

(下转第 153 页)

extrahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C
different patterns of response to interferon treatment.
Hepatology, 1993, 18(5): 1050

4 Hagiwara H, Hayashi N, Fusamoto H, *et al.*
Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA

relationship between the various stages of the carrier
states or the response to interferon therapy.
Gastroenterology, 1993, 28(suppl 5): 48

(1996-03-1 收稿 1996-12-2 修回)

CONSTRUCTION OF A PLASMID WHICH CAN TRANSCRIBE A MUTANT HCV-RNA AS THE COMPETITIVE TEMPLATE IN QUANTITATIVE RT-PCR

Lu Ling Wang Bin

(The Research Center of Molecular Medicine, Sun Yat-sen
University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

A 238 bp HEV-cDNA was amplified from plasma of a patient positive to anti-HEV IgM. It was inserted into the *Nco*I site of HCV 5' NCR sequence cloned into the vector pSP72. A plasmid pSnc-e was recombined that can transcribe a mutated HCV-RNA serving as the competitive RNA template for quantitative RT-PCR assay. The pSnc-e was determined by PCR and restrictive site analysis.

Subject headings cloning /molecular; polymerase chain reaction/methods; hepatitis C virus /genetics

(上接第 14 页)

RELATIONSHIP OF EPSTEIN-BARR VIRUS IN SQUAMOCELLULAR CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY

Ding Xueqiang¹ Zhu Zhenyu² Wang Anxun¹ Feng Chongjin¹ Li Chibin¹

(1 Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences,
Guangzhou, 510080 2 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences)

In this study, for inquiring into the relationship of EBV in squamocellular carcinoma of the oral cavity, using polymerase chain reaction (PCR), we detected Epstein-Barr virus (EBV) DNA in paraffin embedded specimens from sixty patients with squamocellular carcinoma of the oral cavity and forty biopsy tissues of normal oral mucosa from the mouth cavity in 40 cases. The results showed that the EBV DNA positive rate was 33.3% (20/60) in the experimental group (*i. e.* oral cancer group), among which 32.5% (13/40) was the EBV DNA positive rate from 40 patients with well-differentiated squamocellular carcinoma, 30% (3/10) within the medium differentiated group was the EBV DNA positive rate, 40% (4/10) was the EBV DNA positive rate from 10 poorly differentiated cases; and 10% (4/40) in the control group. There was significant difference between experimental group and control group ($\chi^2 = 7.16, P < 0.01$); but there were no significant difference ($P > 0.05$) among the lesion sites, age groups and histodifferentiation by statistical test. These results suggested that EBV infection of oral squamous epithelium might take part in carcinogenic or development of oral squamocellular carcinoma.

Subject headings mouth neoplasms; carcinoma, squamous cell; polymerase chain reaction; herpesvirus 4, human