

镍、硒对 Epstein-Barr 病毒 抗原表达的效应*

罗慧玲 吴荫棠 李满枝

(肿瘤研究所病毒室)

提 要 本文应用间接免疫荧光技术, 研究微量元素镍和硒在试管内对 Epstein-Barr virus (EBV) 多种抗原表达的影响及其相互关系。结果表明, $1 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与无细胞毒性的 Na_2SeO_3 ($\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$) 对 EBV 多种抗原的表达呈现促进和抑制两种完全相反的生物学效应, 但在相同的浓度和时间作用下, Ni 显示出增加 B_{95-8} 细胞壳抗原 (VCA) 而降低 $\text{P}_3\text{HR-1}$ 细胞 VCA 的两种相反作用, 此外 Se 对 EBV 抗原的抑制较 Ni 的促进作用强烈而持久, 同时 Se 对致癌物 Ni 和巴豆油, 正丁酸诱导的 EBV 抗原表达均有明显的拮抗作用。

关键词 镍, 硒, Epstein-Barr virus, 抗原表达

中图分类号 R739.63

广东省是世界鼻咽癌 (NPC) 的高发区, 广东 NPC 的环境病因学调查研究表明, NPC 高发区大米、饮水中镍 (Ni) 含量高于低发区, 高发区 NPC 死亡率与当地大米、饮水中镍含量呈正相关, NPC 患者血清和头发的镍量高于正常人, 而硒 (Se) 含量却偏低^[1-3]。这提示 NPC 患者体内的镍和硒的含量可能与癌的发生、发展有关。众多的研究表明 EBV 与 NPC 密切相关, 为探讨 Ni、Se 对体内潜伏感染的 EBV 的生物学效应, 本文选用 EBV 基因组阳性的细胞株为靶细胞, 应用间接免疫荧光技术, 研究试管内 Ni、Se 对 EBV 多种抗原表达的影响及其之间相互制约的关系。

材 料 与 方 法

试剂的配制 无水 Na_2SeO_3 (广州化学试剂厂), $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (英国产), 均用三蒸水分别配成 $100 \mu\text{g/ml}$ 、 $400 \mu\text{g/ml}$, 正丁酸配成 0.8 mol/L 水溶液, 高压灭菌, 巴豆油溶于无水乙醇配成 1 mg/ml , 以上母液保存于 4°C 备用, 实验时用培养液稀释至所需浓度。

* 本研究由学校科学基金资助

细胞株 携带 EBV 基因组的 Raji、 B_{95-8} 、 $\text{P}_3\text{HR-1}$ 细胞是 3 株不同生物学特性的类淋巴母细胞株, 按常规培养, 末次传代后 24h 检查活细胞在 90% 以上, 方用于实验。

实验方法 将实验用的细胞调整成 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 与药物作用, 置 37°C 培养, 按实验要求取样:

1. 细胞毒性试验 用染料排斥法计算死活细胞数, 并设空白对照。

2. EB 病毒抗原的检测 将收获的细胞制成抗原涂片, 采集多个 NPC 病人的高滴度抗 EBV 抗体, 混合血清即为检测用的抗体。以间接免疫荧光法分别测定 EBV 的早期抗原 (EA)、壳抗原 (VCA)、膜抗原 (MA) 的阳性细胞, 每标本计算 500 个细胞以上, 求出阳性率。

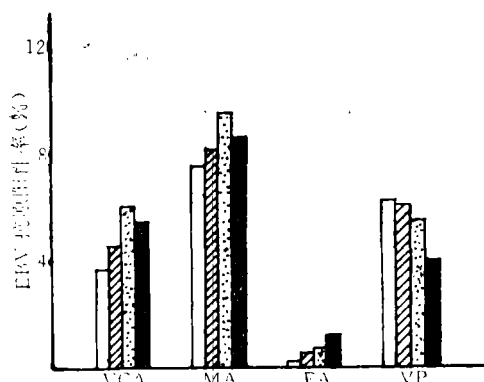
以上实验结果为 3 次以上实验的平均数。

结 果

$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对 EBV-EA、VCA、MA 表达的影响

在 72 h 内, $1 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 对试管培养的 B_{95-8} 细胞株的 VCA、MA 表达有明显的促进作用, 并具有激发 Raji 细胞产生 EA 的能力。然而,

Ni 对 P₃HR-1 细胞株的 VCA 表达却显示了明显的抑制 (附图)。



附图 NiSO₄ · 6H₂O 对 EBV 抗原表达的影响 (72 小时)

注:

□ 对照 ▨ Ni, 1 µg/ml
 ▩ Ni, 10 µg/ml ■ Ni, 20 µg/ml
 VCA, MA, 靶细胞 B₉₅₋₈ 细胞
 EA: 靶细胞为 Raji 细胞
 VP: P₃HR-1 细胞表达 VCA

Na₂SeO₃ 对 EBV 抗原表达的明显抑制

1. 细胞毒性测定 用 0.1、0.5、1.0 µg/ml Na₂SeO₃ 培养细胞 72 h, 其中, 0.1 µg/ml Se, Raji 细胞存活率为 88.08%; 0.5 µg/ml Se, B₉₅₋₈ 细胞为 97.78%, 与两株细胞的对照 92.23%, 97.92% 相比较 (P > 0.05), 表明对细胞无明显毒性作用。故分别选 ≤ 0.1 µg/ml、0.5 µg/ml 为无细胞毒性浓度进行以下实验。

2. Se 明显抑制自发和诱导的 EBV 抗原的表达 从表 1 可见, Se 对自发和巴豆油、正丁酸联合诱导的 EBV 抗原表达显示中等度和较强的抑制作用, 即使是 0.01 µg/ml 如此低浓度的 Se 也有抑制反应。Se 对 EBV 抗原抑制强度呈浓度效应。在 VCA、MA 表达中, 相同浓度的 Se 对诱导抗原的抑制比自发抗原的抑制更为明显。

Na₂SeO₃ 拮抗 NiSO₄ · 6H₂O 诱导的 EBV 抗原

经细胞毒性测定 0.1 µg/ml 的 Se 与 10 µg/ml

表 1 Na₂SeO₃ 抑制自发和诱导的 EBV 抗原表达 (72 小时)

抗原	靶细胞	自发抗原阳性率 (%)			诱导抗原阳性率 (%)		
		0	Na ₂ SeO ₃ (µg/ml)		400ng 巴豆油 + 4mol/L 正丁酸		
			0.01	0.1	400ng 巴豆油 + Na ₂ SeO ₃ (µg/ml)	0.01	0.1
VCA	B ₉₅₋₈	5.16	4.14 (-19.77)	3.72 (-27.91)	12.16	6.18 (-49.18)	4.68 (-61.51)
MA	B ₉₅₋₈	8.01	7.77 (-3.00*)	6.52 (-18.60*)	18.03	8.83 (-51.03)	7.12 (-60.15)
EA	Raji				14.34	9.28 (-35.29)	7.15 (-50.14)

括号内“-”表示抑制率 (%)

*实验组与对照组 x² 检验 P > 0.05, 其余各组 P < 0.01 或 < 0.001

的 Ni 以及 1.0 µg/ml Se 与 5 µg/ml Ni 共同培养 B₉₅₋₈ 细胞 48 h, 细胞存活率分别为 91.5% 和 90.30%, 空白对照为 94.10%。0.1 µg/ml Se 与 10 µg/ml Ni 共培育 Raji 细胞 72 h, 细胞存活率为 90.61%, 对照组是 92.23%, 可见, 以上 Se 与 Ni 共培育的浓度均无明显的细胞毒性 (均 P > 0.05)。

如表 2 所示, 低浓度的 Se (0.1 µg/ml) 与 Ni 共培育组中, 除 1 µg/ml 的 Ni 组外, 其余两组的 VCA 阳性率均高于对照组的 4.70%, 可见低浓度的抑制效应不能完全抵消 Ni 的促进作用。但在高浓度组 (1.0 µg/ml) 的 Se, 不仅完全抵消 Ni 的促进作用, 而且还显著降低 VCA 的正常表达。相同浓度的实验组对 MA 表达所

表2 Na₂SeO₃拮抗NiSO₄诱导EBV抗原

抗原	Na ₂ SeO ₃ (μg/ml)	抗原阳性率(%)				抗原抑制率(%)		
		NiSO ₄ ·6H ₂ O(μg/ml)				NiSO ₄ ·6H ₂ O(μg/ml)		
		0	1	5	10	1	5	10
VCA*	0	4.70	5.54	6.65	6.91			
	0.1		4.25	4.96	5.44	23.29 ^A	25.41 ^{AA}	21.27 ^{AA}
	1.0		1.73	2.25	**	68.80	66.20	
MA	0	7.87	8.79	9.98	11.17			
	0.1		5.51	5.82	6.62	37.32	41.68	46.73
	1.0		2.58	2.89	**	70.65	71.04	—
EA	0	<0.1	0.67	0.94	1.04			
	0.1		0.24	0.26	0.34	64.18	72.34	68.27

*VCA MA 阳性率是以 B_{05-s} 为靶细胞药物作用48h的结果

EA 阳性率是以Raji为靶细胞药物作用72h的结果

**此浓度有细胞毒, 未做

^A实验组与对照组χ²检验P<0.05, ^{AA}实验组与对照组χ²检验P<0.01, 其余各组与对照组χ²检验P<0.001

显示的拮抗作用更为明显。72 h Se 拮抗 Ni 激发 Raji 细胞表达 EA 的效应也很强。

Na₂SeO₃ 预处理对 Ni 激发 EBV 抗原的影响

无细胞毒性的 Se, 预处理 B_{05-s}、Raji 细胞 24 h 后, 充分洗去药物, 再加 1 ~ 20 μg/ml

Ni, 分别激发 48 h、72 h 诱导 VCA、EA。结果见表 3, Se 预处理靶细胞非常有效地抑制 Ni 诱导 EBV 抗原的表达, 尤以 EA 明显。可见 Se 对 EBV 抗原的抑制远比 Ni 的促进作用强烈而持久。

表3 Na₂SeO₃预处理对NiSO₄诱导EBV抗原的抑制*

Na ₂ SeO ₃ (μg/ml)	VCA阳性率(%)				P	EA阳性率(%)				P
	NiSO ₄ ·6H ₂ O(μg/ml)					NiSO ₄ ·6H ₂ O(μg/ml)				
	1	5	10	20		1	5	10	20	
0	5.54	6.65	6.91	6.20		0.67	0.94	1.01	1.10	
0.01	—					0.08	0.17	0.17	0.03	<0.001
	—					(-88.06)	(-81.91)	(-83.91)	(-97.27)	
0.1	5.08	5.68	6.37	5.46	>0.05	0.08	0.11	0.08	0.03	<0.001
	(-8.30)	(-14.58)	(-7.81)	(-11.30)		(-88.06)	(-88.30)	(-90.30)	(-97.27)	
1.0	2.49	3.15	3.50	3.00	<0.001	**				
	(-54.50)	(-52.63)	(-49.35)	(-51.61)		—				

*VCA.EA阳性率是Se预处理B_{05-s}、Raji细胞24 h后, 分别以Ni激发48、72 h的结果。括号内(-)表示抑制率。

**药物浓度有细胞毒, 未做

讨 论

众所周知, Ni 是具有致癌作用的元素, 在不同动物实验中都成功地诱发肿瘤, 动物诱发的 NPC 的实验同样证实 Ni 的促癌作用^[4]。相反, Se 被公认为具有抑制病毒诱发肿瘤和化学致癌物的作用, 能显著地预防和抑制动物自发性和实验性肿瘤的发生、发展^[5~7]。在二亚硝基哌嗪诱发大鼠 NPC 中, 口饲 Na_2SeO_3 水溶液能明显地降低 NPC 的发生^[8]。环境病因调查发现, 广东 NPC 高发区饮水和大米中 Ni 含量显著高于低发区, NPC 患者血、头发 Ni 含量较健康人高, 而 Se 的水平却偏低。我们的实验表明, Ni 和 Se 对携带 EBV 基因组的细胞株的 EBV 抗原表达分别呈现明显的促进与抑制两种完全相反的生物学效应^[9~11]。B₉₅₋₈ 细胞是产生转化性 EBV 的类淋巴母细胞株, 固有的 VCA 抗原是病毒的结构蛋白, 而 MA 抗原则是病毒囊膜上的组分, 通常只有少数细胞呈现 VCA、MA 阳性反应。在 Ni 作用下, 所携带的 EBV 基因被激活, VCA、MA 阳性细胞显著地增加。Raji 细胞是带 EBV 基因, 不产病毒的细胞株, 在正常培养条件下, 仅表达核抗原 (EBNA), 只有当致癌物或促癌物激发下方可诱导出现在病毒复制早期的 EA, 而 Ni 具有这种能力。这些都显示了 Ni 对 EBV 基因的活化作用。然而 Ni 对 EBV-DNA 缺乏 Bam HIN H 和 Y 部份复杂结构的 P₃HR-1 细胞株的 VCA 表达却呈现抑制反应, 显示了 Ni 对细胞株间反应的差异性。

我国 95% 以上人群在 3~5 岁就感染 EBV, 並以潜伏感染的方式携带终生, 始终维持低水平的 EBV 抗体。NPC 患者血清中能检出多种高滴度的特异性抗 EBV-IgA 抗体, 抗体水平随病情恶化而升高^[12]。说明患者体内癌细胞 EBV 基因表达是十分活跃的, 假若具有使细胞恶性转化能力的 EBV 是 NPC 的其中病因, NPC 高发区人群从环境中长期摄入较高含量的 Ni, Ni 则可能作为诱癌的协同因素, 激发易感人群中潜伏感染的 EBV, 促进 EBV 基因组

的整合和表达, 从而可能有利于 EBV 感染鼻咽上皮细胞及使其恶性化。

实验结果表明, 无细胞毒性的 Se 能有效地阻遏 EBV 自身的 VCA、MA 的表达, 并对化学致癌物镍、巴豆油、正丁酸诱导的 EBV 抗原有明显的拮抗作用, 而且 Se 对 EBV 的抑制远比 Ni 的促进作用强烈而持久。以上提示, Se 兼有对 EBV 基因的强烈抑制和拮抗致癌物激发抗原表达的双重作用。若在 EBV 基因表达活跃的人群或患者中, 适量补 Se, 可能有助于体内 EBV 的抑制。

NPC 的病因目前尚未完全明瞭, 若深入探讨 Ni 和 Se 对 EBV 基因表达、细胞恶性转化的作用、对致癌和促癌过程的阻断, 将为 NPC 病因和化学防治提供有益的资料。

参 考 文 献

1. 张 桥, 等. 鼻咽癌高、低发区大米中 9 种微量元素含量与鼻咽癌的关系. 见: 现代微量元素研究. 北京: 中国环境科学出版社, 1987; 9~13
2. 黄家琛, 等. 鼻咽癌高发区四会县与低发区五华县环境中微量元素含量的比较. 见: 现代微量元素研究. 北京: 中国环境科学出版社, 1987; 14~19
3. 黄家琛, 等. 鼻咽癌高发区四会县鼻咽癌病人与健康人血清及头发中硒含量测定. 癌症 1986; 5(1): 13
4. 区宝祥, 等. 微量元素在诱发大鼠鼻咽癌中的促癌作用. 广东医学 1980; 1(2): 32
5. Clement IP. Selenium inhibition of chemical carcinogenesis. Federation Proc 1985; 44: 2573
6. Griffin AC. Role of selenium in the chemoprevention of cancer. In: George Klein, et al. Advances Cancer Research. New York: Academic Press, 1979; 29: 419
7. Milner JA. Effect of selenium on virally induced and transplantable tumor models. Federation Proc 1985; 44: 2568
8. 王辉云, 等. 硒预防鼻咽癌的实验研究. 中华预防医学杂志 1992; 26(5): 281
9. Yintang WU, et al. Effect of nickel sul-

- fate on cellular proliferation and Epstein-Barr virus antigen expression in lymphoblastoid cell line. *Cancer Letter* 1986; 32:171
10. 罗慧玲, 等. 亚硒酸钠对 Epstein-Barr 病毒抗原表达影响的研究. *癌症* 1986;5(4): 341
11. 罗慧玲, 等. 微量元素亚硒酸钠与硫酸镍对 Epstein-Barr 病毒壳抗原表达影响的研究. *癌症* 1991;1(10):4
12. 刘育希, 等. 鼻咽癌与 EB 病毒的多种抗体. *癌症* 1984;3(4):243
- (1992-09-01 收稿 1993-03-15 修回)

EFFECTS OF TRACE ELEMENT NICKEL AND SELENIUM ON EXPRESSION OF EPSTEIN— BARR VIRUS ANTIGENS

Luo Huiling Wu Yintang Li Manzhi

(Tumor Institute)

The influences and relationship between trace element nickel and selenium on expression of Epstein-Barr virus (EBV) antigens were studied in vitro by indirect immunofluorescence staining.

The results showed that $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and non-toxic doses of Na_2SeO_3 ($\leq 0.5\mu\text{g}/\text{ml}$) were exhibited entirely inverse effects of promotion and inhibition respectively on expression of EBV antigens. At same doses and same time, Ni exerted inverse types of EBV-VCA expression, increasing VCA in B95-8 cells, while decreasing VCA in P₃ HR-1 cells. Moreover the inhibitory effect of Se on expression of EBV antigen is stronger and persisting longer than the promotive effect of Ni. Se has markedly resistive effect for the carcinogenesis of Ni, croton oil and n-butyric acid.

Key words nickel; selenium; Epstein Barr virus; antigen expression