

EB病毒基因在鼻咽癌组织 转录表达的研究

陈小君 易 青

(肿瘤研究所)

刘 克 拉

(肿瘤医院)

提 要 本研究在转录水平上,利用转录载体 PGEM-2 与两种 EB 病毒基因片段(LMP 和 EBER-1)分别构建重组质粒,以 SP⁶和 T⁷RNA 聚合酶合成含有³⁵S 标记的单链反义 RNA(Antisense RNA 或 cRNA)和正义 RNA(sense RNA),并分别与经病理确诊的鼻咽癌组织 40 例进行组织原位杂交,结果显示与 40 例鼻咽癌组织原位杂交后,LMP 单链反义 RNA 有 36 例呈阳性,其阳性率为 90%;EBER-1 反义 RNA 40 例均呈阳性,阳性率为 100%;两种基因片段的单链正义 RNA 均为阴性。

关键词 鼻咽癌; EB 病毒; 基因表达; 转录载体; RNA 探针; 原位杂交

中图分类号 R 730; R 231.3

已有较多的报道表明人鼻咽癌的发生与 EB 病毒密切相关^[1~6],本项研究在转录水平上,利用转录载体 PGEM-2 与两种 EB 病毒基因片段(LMP 和 EBER-1)分别构建重组质粒,以 SP⁶和 T⁷RNA 聚合酶合成含有³⁵S 标记的单链反义 RNA(Antisense RNA 或 cRNA)和正义 RNA(sense RNA),并分别与经病理确诊的鼻咽癌活检组织进行原位杂交。拟进一步了解鼻咽癌的发生与 EB 病毒的相关性,并为鼻咽癌的诊断及致癌机理研究提供有意义的资料。

材 料 和 方 法

探针制备 用转录载体 PGEM-2 与 EB 病毒基因片段 EBER-1 和 LMP 分别构建重组质粒,以 SP⁶和 T⁷RNA 聚合酶合成含有³⁵S 标记的单链反义 RNA(Antisense 或 cRNA),和正义 RNA(sense RNA)转录反应按 Haper 等^[7]和 Johnson 等^[8,9]叙述的方法和步骤稍加修改。

组织制备 鼻咽癌组织来自病理确诊的门诊鼻咽活检组织,每例约 0.5 cm 直径组织块,

实验时将组织块分别置于已硅烷化试管中,加入下列溶液进行固定:0.5 ml 4% 聚甲醛/0.1% 脱氧胆酸/三硝基甲苯(Triton-×100),置室温 15 min,移去管中溶液,分别加入 0.5 ml PBSM (用 PBS + 5 mmol/L MgCl₂)置室温孵育 10 min,移去管中溶液,每管分别加入 0.5 ml 0.2 mol/L Tris-HCl, pH 7.5 / 0.1 mol/L 甘氨酸(用 DEPC 水配成)置室温 30 min。

组织原位杂交 先移去上述各管所有溶液,每管分别加入 50 μl 100% 去离子甲酰胺、12 μl 5 mol/L NaCl、10 μl 10×TE pH 7.5、10 μl 10% SDS、1 μl 1 mol/L DIT (dithiothreitol), 1.7 μl 15 mg/ml E. coli-tRNA、1 μl 100×Denhardt's 溶液,10 μg PEG 800,³⁵S 标 RNA 探针 2 × 10⁶cpm,加 DEPC 水至 100 μl,混匀于 50℃ 水浴孵育过夜,然后用下列溶液洗去未杂交的 RNA 探针,各管加入 0.3 ml PBSM 混匀后移去各管溶液,加入 0.5 ml PBSM 于室温 5 min,重复两次。移去各管溶液。各管加入 0.5 ml 2×SSC/50% 甲酰胺/10 mol/L DTT/0.05% 三硝基甲苯,于 37℃ 水浴 30 min。移

去各管溶液,用70%、80%、95%乙醇依次脱水,石蜡包埋切片,脱蜡。

放射自显影 将已脱蜡、干燥的切片用 Kodak NTB₂核乳胶和0.6 mol/L醋酸铵,于40℃水浴中配成1:1液体,浸片,取出于室温中干燥,收集装入黑盒中4℃曝光3d~14d,用KODAK D 19显影和定影液定影。干燥后用Giemsa染色置于光镜下观察细胞的银粒,每个细胞有5个银粒以上为阳性。

结 果

本研究用RNA-RNA组织原位杂交,研究EB病毒基因在鼻咽癌组织转录水平的表达,两种基因片段(LMP和EBER-1)的转录产物反义RNA分别与40例鼻咽癌组织杂交,结果LMP有36例为阳性,阳性率为90%,EBER-1有40例阳性,阳性率为100%(见附表,图1、2),两种基因片段的转录产物正义RNA与鼻咽癌组织杂交均为阴性(见附表、图3、图4)。

附表 EB病毒基因转录产物RNA探针
与鼻咽癌组织原位杂交结果

| 基因片段 | 鼻咽癌 例数 | 结 果 | |
|--------|-----------|-----|------------|
| | | 阳性 | 阳性率 (%) |
| LMP | Antisense | 40 | 36 90 |
| | sense | 40 | 0 0 |
| EBER-1 | Antisense | 40 | 40 100 |
| | sense | 40 | 0 0 |

讨 论

国内外研究已提示EB病毒感染与鼻咽癌的发生密切相关^[1~6];EB病毒可在体外感染并转化B淋巴细胞,使其形成永生细胞株,在所有鼻咽低分化鳞癌的癌组织中,可找到EB病毒的DNA^[10]和EB病毒核抗原(EBNA)^[11],有些癌组织中也发现LMP抗原,在有的鼻咽癌上皮细胞株及裸鼠移植瘤中可找到EB病毒的DNA,用人鼻咽癌活检组织的DNA

(EB病毒基因组阳性)转染正常Rat-1细胞可使其发生恶性变。在转化细胞的DNA中用Southern分子杂交法证明有EB病毒的DNA片段存在^[14],但从转录水平去研究EB病毒基因在鼻咽癌组织中的表达,国内尚未见有报道。本项研究报告EB病毒基因在鼻咽癌组织中有转录的表达。不同的EB病毒基因片段在40例鼻咽癌组织中表达的阳性率不同,LMP基因为90%,EBER-1基因为100%。本研究结果进一步证明鼻咽低分化鳞癌的发生与EB病毒有密切相关,EB病毒作为鼻咽癌致癌因素之一是很有可能的,从而为鼻咽癌的诊断和致癌机理提供有意义的资料。另一方面。本实验采用RNA探针进行组织块原位杂交,比以往用DNA探针进行原位杂交的方法更为准确,特异性更高。

(本文图见插页2)

参 考 文 献

1. Glaser R, et al. Superinfection of epithelial nasopharyngeal carcinoma cell with Epstein-Barr virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1976;73:760
2. Sixby JW, et al. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. New Engl. J. Med 1984;310:1225
3. Brichacek B, et al. Presence of Epstein-Barr virus DNA in carcinomas of the palatine tonsil. JNCI 1984;72:809
4. Wolf H, et al. Persistence of EBV in the parotid gland. J. Virol 1984;51:705
5. Sixbeg JW, et al. Human epithelial cell expression of an Epstein-Barr virus receptor. J. Gene Viral 1987;68:805
6. 胡利富,等. EB病毒基因片段的生物学活性-I 转染后的复制与表达研究. 癌症 1989; 8(5):338
7. Harper M, et al. Detection of HTLV-III-infected lymphocytes in lymph node and peripheral blood from AIDS patients by in situ hybridization. Proc Natl. Acad. Sci. 1986;183:772
8. Johnson MT, Johnson BA. Efficient syn-

- thesis of high specific activity (35s) labelled human betaglobin pre-mRNA. *Bio-techniques* 1984;2:156
9. Go J, et al. A study of myc-related gene expression in small Cell Lung Cancer by in situ hybridization. *American Journal of Pathology* 1988;132(1):13
10. 李锦添, 等. EB病毒DNA在鼻咽病变中的表现. *癌症* 1993;12(1):36
11. 黄平, 等. 鼻咽癌血清中EB病毒核抗原-1和核抗原-2抗体的研究. *中山医科大学学报* 1992;16(1):16
12. Hiroshi Sato, et al. Amplification of Epstein-Barr virus (EBV)DNA by superinfection with a strain of EBV derived from nasopharyngeal carcinoma. *American Society for Microbiology* 1988;62(9):3288
13. Brenda DS, et al. Combination of immuno-cytochemistry and in situ hybridization in the same tissue section of rat pituitary. *The Journal of Histochemistry Cytochemistry* 1986;34(1):39
14. 陈小君, 等. 人鼻咽癌DNA对Rat 1细胞株的转化活性及其基因表达的研究. *中山医科大学学报* 1990;11(4):21
(1992-04-08收稿 1993-03-13修回)

STUDY ON THE EXPRESSION OF EBV GENE AT THE TRANSCRIPTION LEVEL IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA TISSUES

Chen Xiaojun Yi Qing

(Tumor Institute)

Liu Kela

(Tumor Hospital)

The present study focuses on the transcription level. Recombined plasmids were constructed by using transcript vector PGEM-2 and on different occasions, either of the 2 kinds of EBV gene fragments, viz. LMP and EBER-1. ³⁵S labelled single strand antisense RNA and sense RNA were synthesized through the use of SP⁶ and T⁷ RNA polymerase. Respective in situ hybridizations of these RNAs were conducted with tissues of 40 pathologically diagnosed cases of nasopharyngeal carcinoma. Results showed that the positive rate of LMP single strand antisense RNA was 90% (36/40) and that of EBER-1 antisense RNA 100% (40/40) in nasopharyngeal carcinoma tissues. However, the single strand sense RNAs of the two fragments were both negative.

Key words nasopharyngeal carcinoma; EBV gene expression; transcript vector; riboprobe; in situ hybridization

EB病毒基因在鼻咽癌组织转录表达的研究 (正文见第197页)



图1 EB病毒探针与鼻咽癌组织原位杂交阳性

EBER 1探针(Antisense RNA)与鼻咽癌组织原位杂交后细胞中显现银粒(Giemsas × 400)



图2 EB病毒探针与鼻咽癌组织原位杂交阳性

LMP探针(Antisense RNA)与鼻咽癌组织原位杂交后细胞中显现银粒(Giemsas × 400)



图3 EB病毒探针与鼻咽癌组织原位杂交阴性

EBER 1探针(sense RNA)与鼻咽癌组织原位杂交后细胞中未见银粒(Giemsas × 400)

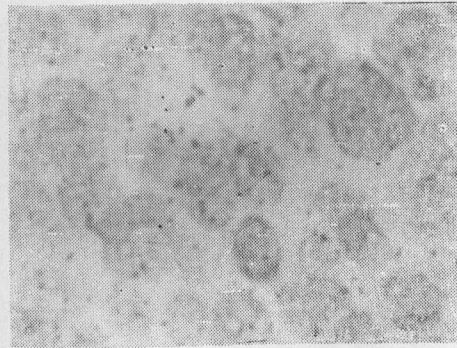


图4 EB病毒探针与鼻咽癌组织原位杂交阴性

LMP探针(sense RNA)与鼻咽癌组织原位杂交后细胞中未见银粒(Giemsas × 400)