

· 实验研究 ·

鼻咽癌血清中EB病毒核抗原-1和核抗原-2抗体的研究

黄平¹ 吴荫棠¹ 郭辉玉² 汪慧民¹

(1.肿瘤研究所 2.微生物和免疫学教研室)

提 要 用抗补体免疫荧光法检测鼻咽癌患者和对照人群中EB病毒核抗原-1(EBNA-1)和EB病毒核抗原-2(EBNA-2)抗体的水平。鼻咽癌组中两种抗体滴度都升高,以EBNA-1抗体上升明显;且EBNA-1抗体与总EBNA抗体水平的变化趋势相一致。鼻咽增生性病变组中EBNA-2抗体略占优势,该组中EBNA-2抗体水平升高可能与潜伏状态的EB病毒激活或再感染的早期阶段有关。

关键词 EB病毒; EB病毒核抗原; 鼻咽癌

中图分类号 R739.63

EB病毒核抗原(Epstein-Barr virus nuclear antigen, EBNA)是引起B淋巴细胞转化并维持转化的重要蛋白^[1],目前发现至少有6种抗原成分^[2~4]。在传染性单核细胞增多症中,EBNA-2抗体先于EBNA-1抗体出现;约1年以后,EBNA-1抗体水平超过EBNA-2抗体水平,同时EBNA-2抗体下降^[5]。最近资料显示,鼻咽癌肿瘤组织中仅表达EBNA-1^[6]。作者用抗补体免疫荧光法(Anti-complement immunofluorescence, ACIF)检测鼻咽癌、鼻咽粘膜增生性病变、其它肿瘤和健康人群中的EBNA-1和EBNA-2抗体水平,以了解鼻咽癌与这两种抗体之间的关系。

材料与方 法

抗原制备 抗原细胞有3株,包括:①Raji细胞株,携带EBV DNA基因,表达EBNA-1,2,3,4,6;②DG细胞株,由BamHI K转染,表达EBNA-1;③FA细胞株,由BamHI WYH转染,表达EBNA-2。细胞常规培养于15%小牛血清的RPMI 1640培养液中,两株转染细胞的培养液中另加真菌酚酸0.01mg/L(Sigma)。细胞离心洗涤后,制成单层涂片。自然干燥,

甲醇-丙酮(1:1)固定,置-20℃冰箱中存放备用。

血清收集 静脉取血,血清分离后灭活分装,-20℃冰箱保存。收集的血清分成下列4组:①鼻咽癌组,患者均初诊且未经治疗,经鼻咽部活检组织病理学确诊,结合临床表现及辅助检查结果,根据“广州鼻咽癌分期法(1981)”分成5期,共195份。②鼻咽增生性病变组,包括鼻咽增生性结节、鼻咽腺样体增殖和鼻咽粘膜炎症改变。该组经病理活检证实为非肿瘤性病变,且无明显临床表现,共55份。③其它肿瘤组,包括头颈部肿瘤(9例),肺癌(8例),非何杰金淋巴瘤(3例),甲状腺癌(2例),皮肤癌(1例)、淋巴瘤(1例)、毛细血管瘤(1例),尚未确诊的转移性肿瘤(6例),共30份。④健康对照组,包括定期体检健康人(22人)和鼻咽癌普查人群(18人),共40份。

ACIF 方法^[7] 待检血清对倍稀释,分别加于Raji,DG和FA涂片上,置37℃湿盒中,45分钟后洗涤,然后加入人血清补体(1:10)作用45分钟。洗涤后滴加抗人C₃荧光抗体(Dako),孵育30分钟。Evans blue复染后,用90%甘油封片,荧光显微镜观察。

结 果

各组血清总EBNA抗体水平如表1所示。经病理组织学确诊的195份鼻咽癌患者血清中,总EBNA抗体滴度从1:40至1:5120。健康对照组的总EBNA抗体水平明显低于其它各组,85.0%(34/40)的健康人群总EBNA抗体滴

度在1:20至1:80范围内。鼻咽癌组,鼻咽增生性病组,其它肿瘤组和健康对照组中总EBNA抗体几何平均滴度(GMT)分别为1:293.8,1:97.5,1:105.6和1:32.9。统计学检验结果显示,鼻咽癌组与其它3组比较,抗体滴度之间有显著性差异。

表1 鼻咽癌和对照组中总EBNA抗体的水平

	病例数	抗体滴度(病例数)										GMT	
		<1:5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280		1:2560
鼻咽癌I期	37				1	7	16	5	2	3	2	1	1:235.3
鼻咽癌II期	86				3	8	33	17	8	7	7	3	1:312.4
鼻咽癌III期	49				1	9	15	9	6	4	4	1	1:294.0
鼻咽癌IV、V期	23					1	8	7	5	1	1		1:350.3
鼻咽癌(合计)	195				5	25	72	38	21	15	14	5	1:293.8
鼻咽增生性病	55	1	1	1	1	11	13	18	6	3			1:97.5
其它肿瘤	30					8	8	9	4	1			1:105.0
健康人群	40	4	1	0	7	9	18	1					1:32.9

表2和表3分别列出了EBNA-1抗体和EBNA-2抗体的检测结果。两种抗体水平的变化具有如下特点:①鼻咽癌组中EBNA-1抗体滴度介于1:10至1:640;EBNA-2抗体有3份阴性,最高滴度为1:160。而健康人群中,两种抗体最高滴度分别是1:40和1:20,并分别有11份和10份抗体阴性。②鼻咽癌组中EBNA-1抗体水平显著地高于其它3组,统计学检验均有显著性差异。③鼻咽癌,鼻咽增

生性病和其它肿瘤组中两种抗体水平均高于健康人群中相应抗体水平,统计学检验均有显著性差异。④EBNA-1抗体在鼻咽癌各期中的消长趋势与总EBNA抗体水平相平行;四组中EBNA-1抗体滴度与总EBNA抗体滴度比较,具有一定程度的相关性。⑤鼻咽增生性病组中两种抗体水平平均显著地高于健康人群组,其中EBNA-2抗体水平接近鼻咽癌组的相应抗体水平,统计学检验两者无显著性差异。

表2 鼻咽癌和对照组中EBNA-1抗体水平

血清组	病例数	抗体滴度(病例数)									GMT
		<1:5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
鼻咽癌I期	37			5	10	8	8	4	2		1:41.5
鼻咽癌II期	86			13	11	21	26	8	3	1	1:45.1
鼻咽癌III期	49			6	8	17	10	4	4		1:46.1
鼻咽癌IV、V期	23			1	4	7	9	1	1		1:50.9
鼻咽癌(合计)	195			25	36	53	53	17	10	1	1:45.1
鼻咽增生性病	55	4	11	14	17	8	1				1:11.6
其它肿瘤	30	2	4	8	10	5	1				1:13.3
健康人群	40	11	12	11	5	1					1:4.8

表3 鼻咽癌和对照组中EBNA-2抗体水

血清组	病例数	抗体滴度 (病例数)							GMT
		<1:5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	
鼻咽癌 I 期	37	1	2	6	15	5	6	2	1:23.5
鼻咽癌 II 期	86	2	13	19	21	18	12	1	1:18.7
鼻咽癌 III 期	49		5	14	17	7	4	2	1:19.2
鼻咽癌 IV、V 期	23		1	4	8	6	3	1	1:25.5
鼻咽癌(合计)	195	3	21	43	61	36	25	6	1:20.4
鼻咽增生性病变	55	4	9	13	10	12	6	1	1:15.2
其它肿瘤	30	1	9	8	10	2			1:10.4
健康人群	40	10	18	7	5				1:4.5

每份血清中抗EBNA-1/抗EBNA-2滴度的比值因组而异(表4)。鼻咽癌组中约2/3血清的比值>1而1/3的比值≤1;其它肿瘤组和健康人群中的比值接近1,而鼻咽增生性病组中约2/3血清的比值<1。鼻咽癌各期之间的比值差距不明显。这结果显示,在两种EBNA抗体都升高的同时,大多数鼻咽癌血清中EBNA-1抗体占优势,而大多数鼻咽增生性病变血清中EBNA-2抗体占优势。

表4 血清中EBNA-1抗体和EBNA-2抗体滴度比较

血清组	病例数(n)	抗EBNA-1>抗EBNA-2(n ₁)	抗EBNA-1<抗EBNA-2(n ₂)	比例(n ₁ /n ₂)
鼻咽癌	195	131	64	2.04:1
鼻咽增生性病变	55	17	38	1:2.23
其它肿瘤	30	15	15	1:1
健康人群	40	18	22	1:1.22

讨 论

根据血清流行病学调查,我国南方居民3~5岁年龄的人群中98%已出现EB病毒诱导的补体结合抗体,并维持终生^[8]。从健康人群血清的检测中发现,大多数人血清的总EBNA抗体维持较低水平(<1:160);与此对照,85.0%(165/195)的鼻咽癌患者血清中总EBNA抗体滴度达到1:160或更高,这结果提

示EB病毒在鼻咽癌患者体内有明显的激活现象。

一般认为,EBNA-1和EBNA-2是与B淋巴细胞转化和维持转化有着最密切关系的两种EB病毒抗原。最近报道,鼻咽癌肿瘤组织中只检出EBNA-1和LMP两种抗原^[6]。鼻咽癌组中EBNA-1抗体水平明显地高于另外3组,这与总EBNA抗体变化趋势是一致的。本实验中鼻咽癌血清的EBNA-2抗体维持较高的滴度,意味着在鼻咽癌患者体内明显地表达EBNA-2。根据迹象分析,EBNA-2抗体水平升高可能与患者免疫力低下导致潜伏于B淋巴细胞中的EBV激活或EBV再感染的早期阶段有关。

Henle等报告,传染性单核细胞增多症血清中EBNA-2抗体先于EBNA-1抗体出现;第2年后,EBNA-1抗体逐渐超过EBNA-2抗体水平。如果此时抗EBNA-1/抗EBNA-2的比例仍小于1,则为慢性传染性单核细胞增多症,反映着EBV在患者体内处于活跃状态^[6]。某些鼻咽增生性病变中的EBNA-1抗体和EBNA-2抗体的滴度类似于慢性传染性单核细胞增多症。有观点认为,某些鼻咽增生性病变可能是鼻咽癌的癌前阶段。鼻咽增生性病变中EBNA-2抗体水平升高也许与相应抗原的转化作用加强有关。

在鼻咽癌的早期诊断中,VCA-IgA和EA-IgA的检测已作为重要的辅助诊断指标。EBNA

-1和EBNA-2是EB病毒发挥细胞转化作用的蛋白抗原,与抗原相关的抗体能否作为检测鼻咽癌前病变的重要指标,有待于深入研究。

(本实验的细胞株由瑞典 Karolinska 医学院的 George Klein 教授提供,在此表示衷心感谢)

参 考 文 献

1. Sample J, et al. Nucleotide sequences of mRNAs as encoding Epstein-Barr virus nuclear proteins: A probable transcriptional initiation site. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83(7):5096
2. Hennessy K, et al. Definitive identification of a member protein 3 family. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83(8):5693
3. Rowe DT, et al. Novel nuclear antigens recognized by human sera in lymphocytes latently infected with Epstein-Barr virus. Virology 1987;156(2):153
4. Dillner J, et al. An Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen 5 (EBNA-5) preferential expression in lymphoblastoid cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83(9):6641
5. Henle W, et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen 1 (EBNA-1) and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84(1):570
6. Fahraeus R, et al. Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 1988;42(2):329
7. Reedmen BM, et al. Cellular location of an Epstein-Barr virus (EBV) associated complement fixing antigen in producer and nonproducer lymphoblastoid cell lines. In J Cancer 1973;11(3):499
8. 李振权,等. 鼻咽癌临床与实验研究. 第1版. 广州:广州科技出版社, 1983;105~107
(1990-05-02收稿 1991-11-5修回)

INVESTIGATION ON ANTI-EBNA₁ AND ANTI-EBNA₂ ANTIBODIES IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA (NPC)

Huang Ping¹ Wu Yintang¹ Guo Huiyu² Wang Huiming¹

(1. Cancer Research Institute 2. Department of Microbiology and Immunology)

All of 195 sera from different stages of NPC patients contained antibody to EBNA₁ (GMT: 1:45.1). Antibody to EBNA₁ was significantly higher in NPC group than in the three groups: Nasopharyngeal Hyperplastic Lesion (NPHL), Other Tumor and Health Control. 192 sera out of 195 contained antibody to EBNA-2 (GMT: 1:20.4), which was higher in NPC group than in Health Control, but there was no significant difference in titers of anti-EBNA₂ between NPC and NPHL groups. Since EBNA₁ and EBNA₂ are associated with cell transformation and EBNA₂ usually appears in the early stage of EBV latent infection and/or reinfection, a long-term follow-up study on antibodies to EBNA₁ and EBNA₂ in the NPHL patients might provide prospective observation on the development of NPC.

Key word Epstein-Barr virus(EBV); Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA); nasopharyngeal carcinoma (NPC)