

头颈胸鳞状细胞癌组织EB病毒基因表达与临床病理特征的相关性

王林, 张碧颖, 蒋念

(中山大学孙逸仙纪念医院病理科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】分析发生在头颈和胸部的鳞状细胞癌组织中EB病毒的表达情况,并分析其临床病理学特征。【方法】收集头颈胸鳞状细胞癌组织123例,利用原位杂交技术和免疫组织化学SP法检测EBV及Ki67蛋白的表达,结合临床病理学资料(性别、年龄、组织学分级、淋巴结转移、远处转移、肿瘤部位及肿瘤直径)进行回顾性分析。【结果】EBV阳性表达率在癌组织明显高于正常粘膜上皮组织($P = 0.007$)。女性患者EBV感染率19.2%高于男性患者3.1%($\chi^2 = 8.781, P = 0.011$);50岁以下组EBV感染率18.8%高于50岁以上组2.2% ($\chi^2 = 10.666, P = 0.004$);有5~10个淋巴结转移组EBV感染率24.2%高于其他组0% ($Z = -3.548, P = 0.000$);无远处器官转移组EBV感染率22.2%高于有远处转移组3.8% ($\chi^2 = 8.567, P = 0.016$);Ki67增殖指数在70%以下组较70%以上组的EBV阳性率更高(8/76 vs. 0/47, $Z = -2.291, P = 0.022$)。EBV感染阳性组和阴性组在组织学分化、肿瘤部位、肿瘤直径方面的差异没有统计学意义。回归分析结果显示年龄小于50岁、Ki67指数低于70%和高淋巴结转移为鳞癌患者伴EBV感染的高危因素。【结论】EBV感染与头颈胸鳞癌的发生有关。EB病毒相关的头颈胸鳞癌多发生于女性、50岁以下且淋巴结转移率高,但远处器官转移少见。

关键词: EBV; 鳞癌; 原位杂交; 免疫组化

中图分类号: R739.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2020)06-0924-06

Correlation between EB Virus Gene Expression and Clinicopathological Features in Head, Neck and Chest Squamous Cell Carcinoma

WANG Lin, ZHANG Bi-ying, JIANG Nian

(Department of Pathology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Correspondence to: WANG Lin; E-mail: 2786688450@qq.com

Abstract: 【Objective】 To study the expression of EB virus gene in head, neck and chest squamous cell carcinoma (HNSCC), revealing the clinicopathological significance. 【Methods】 Using in situ hybridization and S-P immunohistochemical technique, we examined the expression of EBV and Ki67 protein in 123 cases of HNSCC. The pathological characteristics such as sex, age, histologic grade, lymph node metastasis, distant metastasis, situation and size were analyzed retrospectively. 【Results】 The positive expression rate of EBV in HNSCC group was significantly higher than that in the normal mucosal epithelial group ($P = 0.007$). EBV positive HNSCC in female patients was 19.2%, markedly higher than 3.1% in male patients ($\chi^2 = 8.781, P = 0.011$). EBV positive HNSCC in the group under 50 years old was 18.8% (6/32), significantly higher than 2.2% in the group over 50 years old ($\chi^2 = 10.666, P = 0.004$). The infection rate of EBV was 24.2% in 5~10 lymph nodes metastasis groups, significantly greater than other groups 0% ($Z = -3.548, P = 0.000$). EBV infection rate in the group without distant organ metastasis was 22.2%, higher than 3.8% with distant organ metastasis ($\chi^2 = 8.567, P = 0.016$). The group with the Ki67 proliferation index less than 70% showed higher positivity of EBers than the group with Ki67 more than 70% (8/76 vs. 0/47, $Z = -2.291, P = 0.022$). There were not any

收稿日期: 2020-07-06

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031800116)

作者简介: 王林, 通信作者, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 头颈和消化系统肿瘤病理, E-mail: 2786688450@qq.com

statistically significant differences in histological differentiation, tumor situation and tumor diameter between EBV positive and negative groups. Regression analysis showed that age below 50 years old, the Ki67 index less than 70% and the more lymph node metastasis was elevated risk factors for EBV infection. 【Conclusion】 EBV infection is associated with HNC-SCC. EBV-associated HNCSCC is more frequent in female patients under 50 years of age with more lymph node metastasis, while distant metastasis is less common.

Key Words: Epstein-Barr Virus(EBV); squamous cell carcinoma; in situ hybridization; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2020, 41(6):924-929]

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)在人类许多恶性肿瘤的发生和发展中扮演了重要的角色^[1-3]。EBV相关恶性肿瘤是世界范围内一个重要的健康问题,在东南亚和中国的发病率较高,具有鲜明的地域特点。目前检测EBV感染最敏感和高特异的方法是原位杂交法检测EBV编码的小RNA(EBER)。除了已知的鼻咽癌的发病与EBV感染紧密相关以外,国内外仅有少数针对其他头颈和胸部发生的肿瘤与EBV感染相关的研究。例如有报道在涎腺^[4]、肺^[5]及口腔^[6]发生的部分鳞状细胞癌与EB病毒感染有关,但多采用血清学或免疫组化方法或小样本资料。鉴于以往的报道仅证实部分鳞癌患者存在EB病毒感染,对其临床病理学特征并未做进一步分析。为了明确头颈胸部鳞状细胞癌与EB病毒感染之间的关系,本研究收集大宗病例应用原位杂交的方法检测头颈胸鳞状细胞癌中的EBV基因,并分析其与肿瘤临床病理特征的相关性,为下一步开展病毒相关肿瘤的靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病例来源 所有标本均来自中山大学孙逸仙纪念医院2015年10月至2019年11月手术治疗的头颈胸鳞癌(不包含鼻咽癌)患者,其中鳞癌组织及其对应的癌旁正常黏膜各123例。所有肿瘤组织标本均按世界卫生组织诊断标准,经病理科证实为鳞状细胞癌,癌旁组织为正常黏膜或炎性病变。鳞癌患者均为首次发病,手术前均未接受过放疗及化疗。本研究经医学伦理委员会认可并且患者均知情同意。

1.1.2 主要试剂 采用的EBER杂交试剂盒、SP检测试剂盒及Ki67鼠抗人单克隆抗体均购买自北京

中杉金桥生物技术公司,Ki67工作浓度为1:100。DAB显色液购自福州迈新生物技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标本处理 所有标本均经40 g/L多聚甲醛固定,常规石蜡包埋。切取厚4 μm的涂胶白片用于免疫组织化学及原位杂交检测。

1.2.2 免疫组织化学检测及结果判定 按照SP试剂盒操作步骤进行免疫组织化学染色,DAB显色,镜下观察控制阳性细胞呈棕色终止反应。设定阳性对照(扁桃体组织)和空白对照,光学显微镜下进行观察,拍照计数。Ki67以上皮细胞胞核内出现棕黄色颗粒为阳性表达,阳性染色均呈黄色或棕褐色。采用双盲法统计实验结果,由两人阅片,每张切片随机选取10个区域,记录阳性细胞所占百分比,取平均值。根据Ki67阳性细胞百分数分为3级:10%以下为1+,11%~70%为2+,70%以上为3+。

1.2.3 EB病毒原位杂交 按照EBER杂交试剂盒操作步骤进行,上皮细胞胞核内出现棕黄色颗粒为阳性表达,阳性染色均呈黄色或棕褐色。原位杂交评分标准镜下阳性细胞范围≤10%为阴性;>10%为阳性表达。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计学软件包进行统计学分析,计量资料(肿瘤直径)数据用均数±标准差表示。两组计量资料比较,符合正态分布及方差齐性的数据采用独立样本 t 检验。若以上条件不满足则采用非参数秩和检验、卡方检验或确切概率法。检验水准定为双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 头颈胸鳞癌组织EBV感染与正常组织比较

原位杂交结果显示EBV主要在细胞核中表达

(图1),正常黏膜上皮和鳞癌组织中的EBV阳性表达率分别为0(0/123)和6.5%(8/123),后者明显高于正常黏膜上皮组织(Fisher's exact $P=0.007$,表1),差异有统计学意义。

2.2 头颈胸鳞癌组织增殖指数与正常组织比较

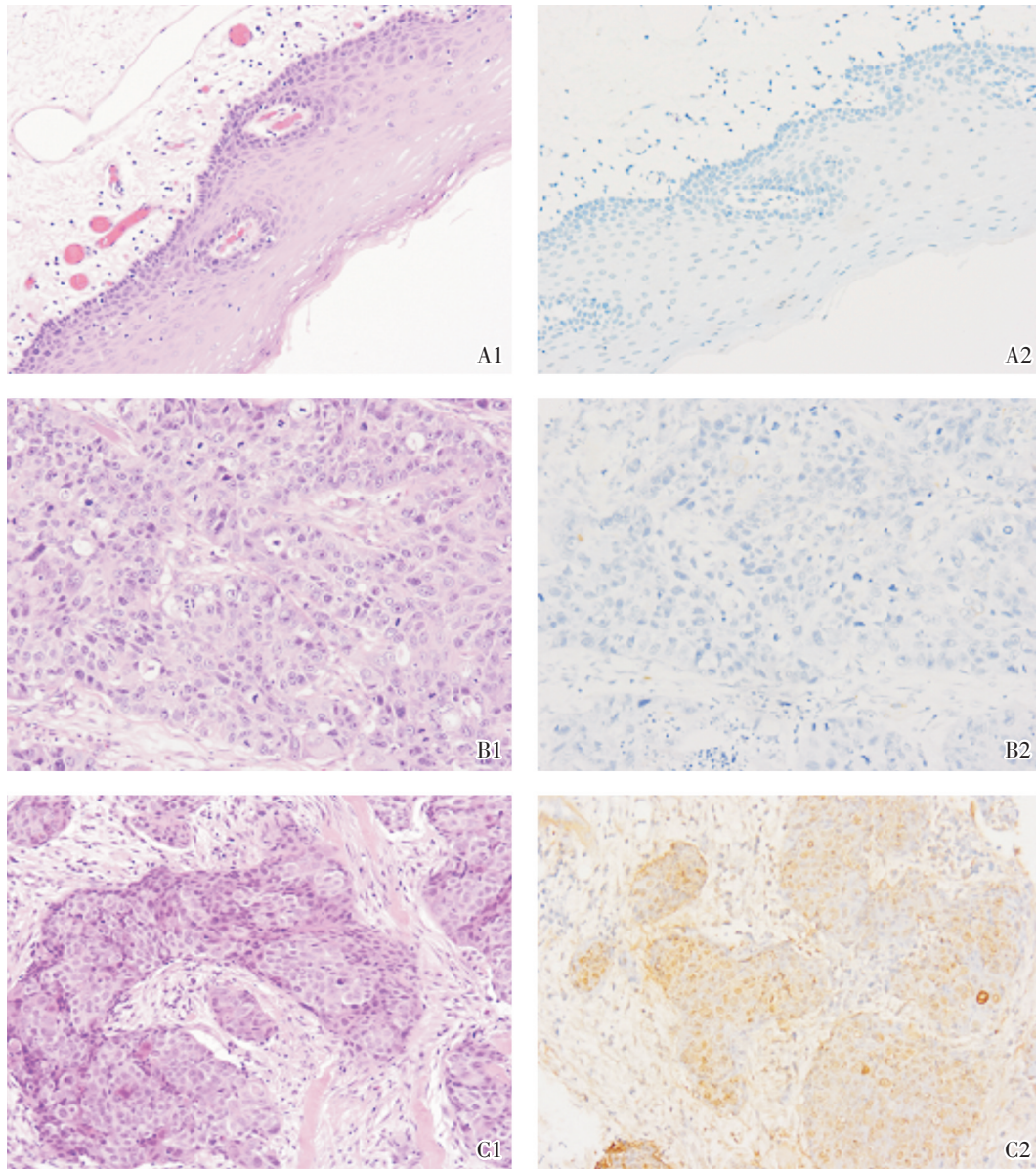
增殖指数Ki67主要在细胞核中表达。正常黏膜上皮和鳞癌组织中的Ki67阳性表达情况见表1,后者明显高于正常黏膜上皮组织($\chi^2=2.381$, $P=0.000$;表1),差异有统计学意义。

表1 正常黏膜和头颈胸鳞癌组织中的EBER和Ki67阳性表达比较

Table 1 The expression of EBER and Ki67 in normal mucosa and HNCSCC ($n=123$)

Type	EBV		Ki67 expression		
	positive	negative	1	2	3
Normal	0	123	123	0	0
HNCSCC	8	116	2	74	47
P	0.007		< 0.0001		

Fisher's exact was used.



A: Normal squamous mucosa was stained with Hematoxylin-Eosin (A1) and EBER in situ hybridization (A2); B, C: squamous cell carcinoma was stained with Hematoxylin-Eosin (B1, C1) and EBER in situ hybridization (B2 positive, C2 negative). 200 ×

图1 头颈胸鳞状细胞癌病理学形态及EBER表达

Fig.1 The pathological morphology of HNCSCC and EBER in situ hybridization

2.3 头颈胸鳞癌组织EBV感染与增殖指数Ki67表达水平的关系

EBV感染阳性组和阴性组对应的肿瘤细胞增殖指数Ki67阳性情况见表2,各组间差异具有统计学意义($Z = -2.166, P = 0.030$)。Ki67阳性1+和2+组较3+组对EBV更易感($Z = -2.291, P = 0.022$)。

2.4 EBV感染与头颈胸鳞癌组织基本情况的关系

根据病例组123例的基本情况(包括性别、年龄、组织学分级、淋巴结转移、远处转移、肿瘤部位、肿瘤直径)进行分层分析发现,在头颈胸鳞癌组织中,女性患者EBV感染率19.2%(5/26)高于男性患者3.1%(3/97),差异有统计学意义($\chi^2 = 8.781, P = 0.011$);50岁以下组EBV感染率18.8%

(6/32)高于50岁以上组2.2%(2/91),差异有统计学意义($\chi^2 = 10.666, P = 0.004$);有5~10个淋巴结转移组EBV感染率24.2%(8/33)高于其他组0%(0/90),差异有统计学意义($Z = -3.548, P = 0.000$);无远处器官转移组EBV感染率22.2%(4/18)高于远处器官转移组3.8%(4/105),差异有统计学意义($\chi^2 = 8.567, P = 0.016$);Ki67增殖指数在70%以下组较70%以上组的EBV阳性率更高(8/76 vs. 0/47, $Z = -2.291, P = 0.022$)。在组织学分化、肿瘤部位方面均无差异($P > 0.05$,表2)。EBV感染阳性组肿瘤直径均值(4.238 ± 1.057)cm,EBV感染阴性组肿瘤直径均值(4.385 ± 0.242)cm,差异无统计学意义($t = 0.120, P = 0.905$)。

表2 头颈胸鳞癌组织EBER的表达水平与临床病理特征的关系

Table 2 Correlations between the expression level of EBER and the clinico-pathological features in 123 cases of head, neck and chest squamous cell carcinoma

Groups	Total	EBER		χ^2/Z	P
		+	-		
Sex				8.781	0.011 ¹⁾
male	97	3	94		
female	26	5	21		
Age group				10.666	0.004 ¹⁾
< 50	32	6	26		
≥ 50	91	2	89		
Histologic grade				3.269	0.195 ²⁾
well	5	0	5		
middle	29	0	29		
low	89	8	81		
Lymph node metastasis				-3.548	0.000 ³⁾
0	45	0	45		
1 ~ 2	28	0	28		
3 ~ 4	9	0	9		
5 ~ 10	33	8	25		
≥ 10	3	0	3		
Distant metastasis				8.567	0.016 ¹⁾
yes	18	4	14		
no	105	4	101		
Situation				3.191	0.363 ²⁾
head	48	2	46		
neck	23	2	21		
esophagus	17	0	17		
chest	35	4	31		
Ki67 index				-2.166	0.030 ³⁾
1+	2	0	2		
2+	74	8	66		
3+	47	0	47		

¹⁾ Fisher's exact; ²⁾ Chi-square test; ³⁾ Z test; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

2.5 头颈胸鳞癌EBV感染危险因素的Logistic回归分析

为研究头颈胸鳞癌合并EBV感染的危险因素,采用Logistic回归分析方法,用进入法逐步筛选变量。年龄小于50岁、Ki67指数低于70%和高淋巴结转移为EBV感染的高危因素($P < 0.05$;表3)。

3 讨论

EB病毒属疱疹病毒家族,由双链DNA,衣壳和脂质双层膜组成。它是Epstein、Achong和Bar三位科学家于1964年在伯基特淋巴瘤患者的培养细胞中发现的。EBV可能通过呼吸道传播并感染上皮细胞^[1-2]。EBV感染细胞后即在宿主细胞中潜伏下来,对机体的免疫功能造成干扰,并可以刺激细胞增殖和转化从而导致癌症发生。其相关肿瘤致癌机制可能是EB病毒将致癌基因片段导入宿主细胞中或者整合于基因组内,使宿主细胞表达癌基因相关转录因子或蛋白等产物,干扰宿主细胞的基因转录和蛋白质代谢,最终引起肿瘤发生;第二种可能是病毒本身并不携带癌基因,但与其与宿主细胞基因组整合后影响抑癌基因的功能,使其修复及清除功能丧失,致使感染的细胞转化和永生^[3,7-8]。

目前已有研究发现胃癌^[9]、子宫颈癌^[10]等的发生与EBV感染有关。头面部、颈部或胸部是鳞状细胞癌好发部位,除了早已证实的鼻咽癌与EBV感染密切相关外,其他头面部、颈部或胸部发生的鳞状细胞癌与EBV的关系如何?目前国内国外仅有少量相关报道,例如,朱国臣等^[4]报道有10例涎腺肿瘤血清学检测EB-VCA-IgA阳性率较高(83.3%),并提示EBV感染的发生可能与种族、地理等因素有关。有研究^[5]发现在EBV感染的肺淋巴上皮瘤样癌中存在参与宿主-病毒反作用

的I型干扰素基因的高频缺失,可能通过影响NF- κ B、JAK/STAT和细胞周期途径发挥作用。Budhy^[6]对27例口腔鳞状细胞癌患者进行了EBER原位杂交检测,结果显示17例有EBV感染,可能通过影响P53基因失活从而抑制BCL-2基因的活化。为进一步证实头面部、颈部或胸部发生的鳞状细胞癌与EBV感染的关系及了解其病理学特征,本研究选取了123例头面部、颈部和胸部发生的鳞状细胞癌组织,并与其周围正常粘膜上皮对比,采用原位杂交的方法发现鳞癌组织EBER阳性率高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义。这一研究结果进一步证实了EBV感染对于头颈胸部鳞状上皮组织的癌变具有重要的作用,支持以上结论。

目前国内有关EBV与头颈胸鳞癌关系的研究较少,仅证实部分鳞癌患者存在EBV感染,对其临床病理学特征并未做进一步分析。至于EBV是独立的致癌因素,还是在其他高危致癌因素下促进肿瘤的发生,以及其具体的致癌机制尚待深入研究。鉴于以往研究仍存在方法学(采用血清学或免疫组化方法)或样本量(小样本资料)方面的缺陷,本研究针对大宗病例样本进行研究,采用更加特异的原位杂交方法检测EB病毒基因在头颈胸鳞癌组织中的表达状况,并结合病例临床病理学特征(包括性别、年龄、组织学分级、淋巴结转移、远处转移、肿瘤部位、肿瘤直径)进行分层分析。我们的研究结果发现:在性别方面,女性患者EBV感染率高于男性患者;在年龄段方面,50岁以下组EBV感染率高于50岁以上组,提示鳞癌患者合并EBV感染可能有一定的性别和年龄段的倾向性。

本研究发现有5~10个淋巴结转移组EBV感染率高于其他组,无远处器官转移组EBV感染率高于有远处器官转移组;Ki67增殖指数在70%以

表3 头颈胸鳞癌EBV感染危险因素的Logistic回归分析
Table 3 Logistic regression analysis of the risk factors for EBV infection in HNCSCC

Variables	Regression Coefficient	Standard Error	Wald χ^2	P	OR	95.0% CI for OR
Age	2.400	1.081	4.932	0.026	11.025	(1.326, 91.683)
Ki67	2.514	1.064	5.582	0.018	12.352	(1.535, 99.400)
Lymph node metastasis	-2.512	0.914	7.544	0.006	0.081	(0.014, 0.487)

下组较70%以上组的EBV阳性率高,差异有统计学意义。结合以往研究显示,Ki67增殖指数高往往代表肿瘤细胞生长活跃,提示肿瘤细胞具有较高的恶性度^[11]。因此根据本组资料结果分析,EBV感染的鳞癌病例虽有较多淋巴结转移,但增殖活性总体不高且远处转移的几率偏低,总体来讲伴有EBV感染可能预示有较好的预后。

我们对相关研究结果进一步做Logistic回归分析,显示鳞癌患者的年龄小于50岁、Ki67指数低于70%和高淋巴结转移为EBV感染的高危因素($P < 0.05$),揭示了EBV感染与肿瘤生物学特征具有一定的相关性。至于EBV协同或抑制肿瘤细

胞的局部侵袭或远处转移的相关机制,仍有待更多分子生物学实验进一步证实。此外,本研究显示EBV感染阳性组和阴性组鳞癌在组织学分化和肿瘤大小方面的差异没有统计学意义($P > 0.05$),可能受限于样本量有限,尚需积累更多病例进行验证。

本研究结果为头颈胸鳞癌的病毒靶向治疗提供了强有力的佐证和新的治疗思路,提示免疫治疗及病毒靶向治疗在EBV相关恶性肿瘤的治疗中具有较好的应用前景,可能有助于提高患者的生存率或者改善患者的生活质量。

参考文献

- [1] 姚孟薇,谢莹. EB病毒感染上皮细胞机制的研究进展[J]. 广东医学, 2015, 36(3):472-474.
Yao MW, Xie Y. Advances in the mechanism of Epstein-Barr virus infection on epithelial cells [J]. J Guangdong Med, 2015, 36(3):472-474.
- [2] Shannon-low C, Rowe M. Epstein Barr virus entry; kissing and conjugation[J]. Curr Opin Virol, 2014, 4:78-84.
- [3] 赖辉红,马廉. EB病毒相关恶性肿瘤研究进展[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2013, 18(6):245-248.
Lai HH, Ma L. Research progress of Epstein-Barr virus-associated malignancies [J]. J Chin Pediatr Blood Cancer, 2013, 18(6):245-248.
- [4] 朱国臣,孙晓峰,肖大江. 涎腺淋巴上皮癌12例临床分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 31(14):1093-1096.
Zhu GC, Sun XF, Xiao DJ. Analysis of the lymphoepithelial carcinoma of the salivary gland: 12 cases report [J]. J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg (Chin), 2017, 31(14):1093-1096.
- [5] Shaodong H, Dongbing L, Shuzhen L, et al. The genomic landscape of Epstein-Barr virus-associated pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma [J]. Nat Commun, 2019, 10(1):3108.
- [6] Budhy TI. Molecular grading of oral squamous cell carcinomas infected with EBV [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(7):1793-1796.
- [7] Li SY, Wang Z, Zhou L, et al. Meta-analysis of the relationship between Epstein-Barr virus infection and clinic pathological features of patients with gastric carcinoma [J]. Science China Life Sciences, 2010, 53(4):524-530.
- [8] 吴克复,马小彤,郑国光,等. 病毒的致癌作用和治癌作用[J]. 白血病·淋巴瘤, 2012, 21(6):321-324.
Wu KF, Ma XT, Zheng GG, et al. Viral oncogenesis and tumor virotherapy [J]. J Leukemia Lymphom, 2012, 21(6):321-324.
- [9] Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review) [J]. Int J Oncol, 2015, 46(4):1421-1434.
- [10] de Lima MAP, Neto PJN, Lima LPM, et al. Association between Epstein-Barr virus (EBV) and cervical carcinoma: a meta-analysis [J]. Gynecol Oncol, 2018, 148(2):317-328.
- [11] Ahmed MW, Kayani MA, Shabbir G, et al. Expression of PTEN and its correlation with proliferation marker Ki-67 in head and neck cancer [J]. Int J Biol Markers, 2016, 31(2):e193-e203.

(编辑 余菁)