

# 鼻咽癌患者放疗前后血淋巴细胞“自发性”转化的比较<sup>①</sup>

黄玫玲<sup>1</sup> 陈剑经<sup>1</sup> 姚庆云<sup>2</sup> 张 锋<sup>1</sup> 邝珠玑<sup>1</sup> 谷 丽<sup>1</sup>

(1 中山医科大学肿瘤防治中心; 广州, 510060 2 伯明翰大学肿瘤研究所)

**摘 要** 目的: 了解鼻咽癌患者体内 Epstein-Barr 病毒(EBV)的携带状况, 以及放疗后的变化。方法: 采集 33 名鼻咽癌患者放疗前后的外周血淋巴细胞进行体外培养, 培养液中加入免疫抑制剂环孢菌素 A(CSA), 观察携带 EBV 的 B 淋巴细胞“自发性”转化的情况。结果: 放疗前有 28 人出现明确的淋巴母细胞增殖集落, “自发性”转化的阳性率为 85%, 培养总孔数的“自发性”转化率为 32.7%, 均明显高于放疗后的 12% 及 1.7% ( $P < 0.005$ )。结论: 鼻咽癌患者放疗后外周血中感染 EBV 的 B 淋巴细胞的数量明显少于放疗前的数量, 从而“自发性”转化阳性率明显降低。

**主题词** 鼻咽肿瘤; 疱疹病毒 4 型, 人; 自发性转化<sup>②</sup>; 放射疗法

**中图分类号** R 739.63; R 373.9

## Comparison on “Spontaneous Transformation” of Lymphocytes between Nasopharyngeal Carcinoma Patients before and after Radiotherapy

Huang Meiling<sup>1</sup> Chen Jianjing<sup>1</sup> Yao Qingyun<sup>2</sup> Zhang Feng<sup>1</sup> Kuang Zhuji<sup>1</sup> Gu Li<sup>1</sup>

(1 Cancer Centre, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060

2 CRC Institute for Cancer Studies, University of Birmingham)

**Abstract Objective:** Study on the EBV carrier state in NPC (nasopharyngeal carcinoma) patients and its changes after radiotherapy. **Method:** A panel of 33 NPC patients was studied for detection of EBV infected B cells in their peripheral blood. These cultures were set up and maintained in the medium containing immunosuppressive drug cyclosporin A (CSA). Follow-up examinations were performed on these patients for comparison of “spontaneous transformation” rates before and after radiotherapy. **Results:** Definite proliferating colonies of lymphoblastoid cells appeared in 28 cases before radiotherapy. The positive rate of “spontaneous transformation” was 85% based on the number of patients and the “spontaneous transformation” positive rate was 32.7% based on the total number of culture wells. After radiotherapy, these two positive rates were 12% and 1.7% respectively. Both rates were significantly lower than those before radiotherapy ( $P < 0.005$ ). **Conclusion:** After radiotherapy, the number of EBV infected-B cells in the blood of NPC patients decreased, the positive rate of “spontaneous transformation” reduced significantly.

**Subject headings** nasopharyngeal neoplasms; herpesvirus 4, human; spontaneous transformation; radiotherapy

EB 病毒(EBV)在人群中感染率高达 90% 以上, 一旦感染后, 可终生潜伏。很多文献资料都指出 EBV 和鼻咽癌密切相关。从鼻咽癌活检组织培养中可以建立带 EBV 的长期传代淋巴母细胞株(LCLs); 携带 EBV 的外周血 B 淋巴细胞在体外也可转化, 形成 EBV 基因阳性的 B 淋巴母细胞株。作者曾采集 35 名血清 EBV 抗体阳性健康人的外周

血, 分离淋巴细胞体外培养, 应用 Yao 等所改进的实验方法<sup>[1]</sup>, 在培养液中加入免疫抑制剂环孢菌素 A(cyclosporin A, CSA), “自发性”转化的阳性率为 74%(26/35 人), 转化孔数占培养孔数的 17.8%(187/1 050 孔)<sup>[2]</sup>。本实验用同一方法进一步对 33 名鼻咽癌患者, 比较了放射治疗前及放疗后外周血淋巴细胞“自发性”转化率的变化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验对象

本院鼻咽癌病区住院病人 33 名,鼻咽组织活检诊断为鼻咽低分化鳞状细胞癌者 30 名,未分化癌 3 名。其中男 28 人,女 5 人,年龄 31~73 岁。

### 1.2 “自发性”转化实验

取外周血 5 mL,分离淋巴细胞,按 Yao 等所改进的实验方法培养 6~8 周<sup>[1,2]</sup>观察“自发性”转化的发生情况。每个发生“自发性”转化孔中的淋巴母细胞继代培养,建立可连续传代的 B 淋巴母细胞株。

### 1.3 Western 印迹法检测 EBV 的核抗原 (EBNA)<sup>[3]</sup>

用建立的“自发性”转化淋巴母细胞株制备检测样品。阳性对照用 B95-8 细胞株(1 型 EBV)、Ag876 细胞株(2 型 EBV);阴性对照用 BJAB 细胞株。经 75 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳 4 h,常规转印硝酸纤维素膜过夜。用人血清检测 EBNA1,单克隆抗体 PE2 检测 EBNA2,单克隆抗体 E3CA10 检测 EBNA3C。用<sup>125</sup>I 标记的 A 蛋白检测人血清。用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠免疫球蛋白 G 检测鼠单克隆抗体,通过化学发光法显相,观察结果。

### 1.4 血清 EBV 抗体测定

用免疫酶法检测血清中 EBV 的 IgA/VCA、IgA/EA 抗体。EB 病毒的特异性 DNA 酶抗体(EDAb)的检测,用中和率表示。

### 1.5 放射治疗

鼻咽原发灶采用<sup>60</sup>Co 外照射,每周 5 次,每次 200 Gy,总剂量 6 500~7 000 Gy。颈部转移淋巴结放射总剂量 5 500~6 000 Gy。

### 1.6 统计学处理

“自发性”转化的人数和孔数的比较采用卡方检验。

## 2 结 果

### 2.1 “自发性”转化

33 例 NPC 患者放疗前外周血淋巴细胞培养 6~8 周后,有 28 例出现明确的淋巴母细胞增殖集落,“自发性”转化的阳性率为 85%,转化孔数占培养孔数的 32.7%(308/942)。这些患者在放疗后进行复查,仅有 4 例出现“自发性”转化,阳性率为 12%,转化孔数占培养孔数的 1.7%(9/528)。放疗前明显高于放疗后( $P < 0.005$ )。增殖细胞集落一般在培养的第 4 周开始出现,少数最早可在第 3 周、最迟可在第 16 周开始出现。最初的增殖集落是由数个到数十个体积大、透明度高的淋巴母细胞组成,增殖细胞的胞浆常有不规则的突起,似伪足状。继续培养,集落增大,数量增多,甚至融合成片。在培养过程中,观察到集落的生长速度有 3 种情况:形状呈不规则地图状的集落增长最快;近似圆形的集落次之;细胞平铺于孔底单层生长的增长最慢。

### 2.2 放疗前后淋巴细胞“自发性”转化的比较

根据各例培养板上出现淋巴母细胞增殖集落的孔数,将实验结果分为 4 组:高转化组(50%以上的培养孔出现增殖集落)、中转化组(20%~50%)、低转化组(20%以下)、无转化组(培养 8 周未见转化)。

放疗前高转化组和中转化组淋巴细胞的“自发性”转化患者的比率明显高于放疗后,低转化组无差异,而放疗后无转化患者的比率则明显高于放疗前。转化孔数的比较在放疗前高转化组也明显高于放疗后,中、低转化组无差异(表 1)。

表 1 放疗前、后 33 名 NPC 患者淋巴细胞的“自发性”转化率

Table 1 “Spontaneous transformation” rates in cultured lymphocytes of 33 NPC patients before and after radiotherapy  $n$  (%)

Grouping based on degree of transformation	Number of patients			Number of wells transformed/wells cultured		
	B. R. <sup>1)</sup>	A. R. <sup>2)</sup>	$P$	B. R.	A. R.	$P$
High	7(21)	0(0)	$< 0.05$	140/210(66.7)	0/10(0)	
Medium	17(52)	1(3)	$< 0.01$	158/480(32.9)	4/16(25.0)	$> 0.05$
Low	4(12)	3(9)	$> 0.05$	10/102(9.8)	5/48(10.4)	$> 0.05$
None	5(15)	29(88)	$< 0.01$	0/150(0)	0/464(0)	
Total	28(85)	4(12)	$< 0.005$	308/942(32.7)	9/528(1.7)	$< 0.005$

1) Before radiotherapy 2) After radiotherapy

2.3 不同细胞浓度对淋巴细胞“自发性”转化的影响

出现增殖集落的孔数与所种植的细胞浓度有关。放疗前高转化组在  $1 \times 10^6$  细胞/孔时, 转化孔的阳性率高达 97.6%。随着种植的细胞浓度降低, 转化的阳性率也下降, 在  $6.25 \times 10^4$  细胞/孔时, 阳性率仅为 14.3%。中、低转化组的情况也相同。在

放疗后, 由于外周血中淋巴细胞数量明显减少, 不足种植  $1 \times 10^6$  细胞/孔的浓度, 故从  $5 \times 10^5$  细胞/孔浓度开始种植, 每一稀释度种 4 孔。高转化组没有转化增殖集落出现, 仅在中、低转化组见转化集落, 其转化的阳性率和放疗前相应细胞浓度的阳性率比较, 均无明显差别 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。

表 2 放疗前、后不同细胞浓度对淋巴细胞“自发性”转化率的影响

Table 2 Effect of seeding cell concentrations on the “spontaneous transformation” rates of lymphocytes before and after radiotherapy wells transformed/wells cultured(%)

Cells/well	High transformation		Medium transformation			Low transformation		
	B. R. <sup>1)</sup>	A. R. <sup>2)</sup>	B. R.	A. R.	P	B. R.	A. R.	P
$1 \times 10^6$	41/42(97.6)	—	50/72(69.4)	—		3/6(50.0)	—	
$5 \times 10^5$	41/42(97.6)	0(0)	54/102(52.9)	2/4(50.0)	>0.05	5/24(20.8)	3/12(25.0)	>0.05
$2.5 \times 10^5$	33/42(78.6)	0(0)	29/102(28.4)	1/4(25.0)	>0.05	1/24(4.2)	1/12(8.3)	>0.05
$1.25 \times 10^5$	19/42(45.2)	0(0)	15/102(14.7)	1/4(25.0)	>0.05	1/24(4.2)	1/12(8.3)	>0.05
$6.25 \times 10^4$	6/42(14.3)	0(0)	10/102(9.8)	0/4(0)	>0.05	0/24(0)	0/12(0)	

1) Before radiotherapy 2) After radiotherapy

2.4 “自发性”转化淋巴母细胞 EBV 核抗原测定

NPC 7、13 的 EBNA 1、EBNA 2 及 EBNA 3C 的相对分子质量与 1 型病毒株 B95-8 相符合。在同一患者中, 不同的“自发性”转化株之间并无差别。NPC 29 患者的 EBNA 1 相对分子质量虽然较低, 但 EBNA 2 和 EBNA 3C 的相对分子质量与 1 型对照相同(图 1)。

2.5 血清 EBV 抗体测定

33 例 NPC 患者血清 EBV 的 IgA/VCA 抗体均为阳性, 滴度自 1:40 到 1:1280, IgA/EA 抗体滴度自 1:10 到 1:160, DNA 酶抗体中和率自 34% 至 87% 不等。按外周血培养孔的“自发性”转化发生率, 将上述 3 项抗体检查的结果也分为相同的 4 个组, 未发现各组血清抗体滴度/抗体中和率有明显的不同。

3 讨论

人体感染 EBV 之后, 病毒在体内持续存在的重要证据是在外周血淋巴细胞培养中获得 EBV 基因阳性的淋巴母细胞株。本实验检测 33 名 NPC 患者外周血淋巴细胞培养 6~8 周后, 放疗前有 28 人出现“自发性”转化, 阳性率是 85%, 和健康人比较无差别 ( $P > 0.25$ )。但从转化孔数/培养孔数的比率来看, 放疗前 NPC 患者的转化比率(32.7%)明显高于健康人(17.8%) ( $P < 0.005$ ), 提示 NPC 患者血液中感染 EBV 的 B 淋巴细胞数量可能要比健康人多, 从而获得较高的淋巴细胞“自发转化”率。

33 例 NPC 患者在放疗后复查, 发生“自发性”转化的只有 4 人, 阳性率为 12%, 转化孔数占培养孔数的 1.7%, 无论从转化人数或是转化孔数来看,

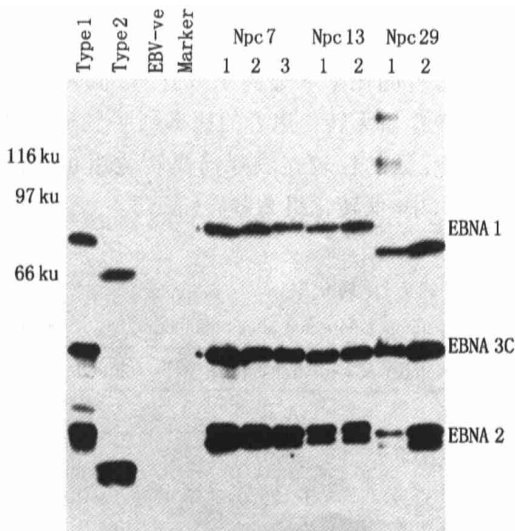


图 1 Western 印迹法分析从 NPC 患者淋巴细胞建立的 LCLs 的 EBV 型别

Fig. 1 Western blot analysis of EBV type harbored in LCLs derived from lymphocytes of NPC patients

均明显低于放疗前者。而且在放疗后, 没有 1 人在高转化组出现转化, 中转化组仅 1 人, 明显少于放疗前; 无转化组 29 人, 则明显多于放疗前。由此可见, 放疗后患者血中 EBV 感染的 B 淋巴细胞数量明显地比放疗前少。出现这种变化的原因, 考虑有下述的可能性: 报道指出<sup>[4]</sup>, EBV 首先是从 B 淋巴细胞中分离得到, 并在 B 淋巴细胞膜上发现了 EBV 的受体——2 型补体。EBV 除感染 B 淋巴细胞外, 还能感染有 EBV 受体表达的口咽上皮细胞。这些细胞表面 EBV 受体的表达与上皮细胞的分化程度有关。EBV 感染这类上皮细胞后, 在上皮底层的基底细胞群中呈潜伏感染状态。EBV 随上皮细胞的分化活化增殖, 并随着终末分化的上皮细胞脱落而释放有活性的病毒, 造成持续感染和终生释放病毒。放射治疗后, 鼻咽部的癌细胞、正常粘膜上皮细胞和淋巴细胞均会被杀伤<sup>[5]</sup>, 使 EBV 在口咽部潜伏和复制的“基地”被破坏, 进入血中携带 EBV 的淋巴细胞数量自然也就减少, 从而产生放疗后血淋巴细胞“自发性”转化率的明显下降。此外, 放疗后, 血中淋巴细胞数量明显减少, 从 5 mL 血中分离出的淋巴细胞不足种植  $1 \times 10^6$  细胞/孔的浓度, 也可能与导致“自发性”转化率降低有关。

基于 EBV 基因组中的 DNA 多态性, 可将 EBV 分为 1 型和 2 型。大多数来自东南亚高发病区的 NPC 患者, 体内携带 1 型 EBV<sup>[6]</sup>。本实验取自 3 名 NPC 患者 7 个淋巴母细胞株的抽提物作 Western 印迹法分析 EBNA 的电泳带型, 结果显示: NPC 患者血中 B 淋巴细胞感染的均属于 1 型 EBV, 在同一患者中所感染的病毒不仅同型, 而且也属同一病毒株。至于本研究建立的全部转化淋巴母细胞株感染 EBV 的情况, 将另文发表。

从血清 IgA/VCA、IgA/EA 和 DNA 酶抗体测定结果显示, 抗体滴度/中和率的高低和外周血 EBV 感染的水平似无直接关系。抗体阳性只能说明曾经有过 EBV 的感染, 而“自发性”转化试验才能显示体内 EBV 感染的现状。

本实验发现 1 名鼻咽癌患者, 病理诊断为高分化鳞癌, 血清 IgA//VCA 抗体滴度  $1:10$ , IgA/EA 抗体阴性, DNA 酶抗体中和率 39%。此例外周血淋巴细胞培养经 8 周未见“自发性”转化。今后如能积累较多的高分化鳞癌病例, 将有助于更好了解高分化 NPC 与 EBV 的关系。

### 参 考 文 献

- 1 Yao Q Y, Rickinson A B, Epstein M A. A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer*, 1985, 35(1): 35
- 2 黄玫玲, 冯凯涛, 姚庆云. Epstein-Barr 病毒血清抗体阳性健康人外周血体外培养“自发性”转化的研究. *病毒学报*, 1986, 2(2): 121
- 3 Yao Q Y, Tiemey R J, Croom-Carter D, *et al* . Frequency of multiple Epstein-Barr virus infections in T-cell-immunocompromised individuals. *J Virol*, 1996, 70(8): 4884
- 4 朱大栩. EB 病毒及其致癌机理的研究进展. *微生物学通报*, 1991, 18(2): 111
- 5 宗永生. 鼻咽癌的细胞病理学. 见: 区宝祥, 曾毅主编. 鼻咽癌病因和发病学的研究. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 76~86
- 6 Rickinson A B, Kieff E. Epstein-Barr Virus. In: Fields BN, Knipe D M, Howley P M, *et al* . *Virology*. Third Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. 2397~2446

(1998-02-02 收稿 1999-05-31 修回)