

腮腺淋巴上皮瘤样癌中 EB病毒基因的表达

刘克拉¹ 宗永生²

(中山医科大学 1肿瘤医院病理科 2病理教研室; 广州, 510060)

摘要 采用原位杂交和免疫组化技术,检测 20例腮腺淋巴上皮瘤样癌 (LELC)组织中 EB病毒编码的小 RNA (EBERs)、潜伏感染膜蛋白 (LMP1)、溶解感染期立即早期基因编码蛋白 ZEBRA 早期基因编码蛋白 EA-D 晚期基因编码蛋白 VCA 和 MA 结果 EBERs 阳性率为 100% (20/20), LMP1 阳性率为 85% (17/20), ZEBRA 均为阴性, EA-D 阳性率 85% (17/20), VCA 阳性率 60% (12/20), MA 阳性率为 0.5% (1/20) 阳性信号限于癌细胞, 癌周正常组织和间质细胞均阴性, 说明在我国南方鼻咽癌高发区, 腮腺 LELC 的发生发展与 EB 病毒感染密切相关, 本文还对 EB 病毒基因的腮腺 LELC 中表达的生物学意义作了初步探讨。

关键词 腮腺肿瘤 病理学; 癌, 鳞状细胞 病理学; 疱疹病毒 4型, 人

中图分类号 R 730.2

腮腺淋巴上皮瘤样癌 (Lymphoepithelioma-like carcinoma, LELC) 又称恶性淋巴上皮病变 (Malignant lymphoepithelial lesion, MLEL), 是一种少见的恶性肿瘤, 文献报道多见于鼻咽癌高发区格陵兰岛的爱斯基摩人。近年来发现它与 EB 病毒感染有关。在我国南方, 腮腺 LELC 的发生发展是否与 EB 病毒相关, EB 病毒基因在该组织中的表达和在鼻咽癌中的表达特征及生物学意义有何异同, 迄今未见报道。本研究用原位杂交和免疫组化技术, 检测 20 例腮腺 LELC 的 EB 病毒编码的小 RNA (EBERs) 和潜伏感染膜蛋白 (LMP-1)、ZEBRA EA-D VCA 及 MA 结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1988年 1月至 1995年 12月中山医科大学肿瘤医院病理科腮腺癌手术切除标本, 参照 WHO 涎腺肿瘤组织学分类标准复查病理切片, 形态符合淋巴上皮瘤样癌 (LELC) 诊断标准的有 20 例。患者均生活于广东地区, 其中男 12 例, 女 8 例, 平均年龄为 50.25 岁, 平均病期为 13.4 个月, 所有病例经临床和病理检查排除了鼻咽癌转移至腮腺区淋巴结的可能。取石蜡包埋组织作 4 μ m 厚连续切片 HE 染色、免疫组化及原位杂交。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交检测 荧光素标记 EBV-EBERs 寡核苷酸探针 (Y017) 和原位杂交检测试剂盒 (K046) 均系 Dako 公司产品。切片贴附于 3-氨基丙基三乙氧硅烷 (APES) 处理过的载玻片上脱蜡, 杂交前经 0.1 mg/mL 蛋白酶 K (proteinase K) 37 $^{\circ}$ C 30 min 处理后, 滴加探针, 以盖玻片封固, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱内 2 h 后, 用含有 Triton X-100 的 TBS 洗去盖玻片, 再加联有碱性磷酸酶的抗异硫氰酸单抗 (Anti-FITC/AP), 放室温 1 h, 以碱性磷酸酶底物 BCIP/NBT 显示探针特异性杂交位点。经甲基绿复染后用中性树胶封片观察。阳性信号为细胞核内紫蓝色颗粒。用已知 EBERs 阳性的鼻咽癌组织作阳性对照。

1.2.2 免疫组化检测 采用常规 LSAB 法。LSAB 显示试剂盒 (K681) 为 Dako 公司产品。单克隆抗体 LMP-1 (OT17-2)、EA-D (OT13-B, P138)、VCA (OT15-E, P18) 和 MA (OT-6, gp350/220) 均由 Organon Teknika 公司 Dr. JM Middeldorp 惠赠, 稀释度分别为 1:100 1:400 1:200 和 1:200。ZEBRA (Clone BZ.1) 为 Dako 公司产品。组织切片放 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液中经微波处理 10 min 修复抗原。阳性标准: 细胞胞浆或胞膜出现棕黄色细颗粒。以 B95-8 细胞株涂片作为阳性对照。

2 结果

病变均位于单侧, 肿物直径 2~7 cm 光镜下腮

① 第一作者, 1956 年出生, 男, 硕士, 主治医师, 病理教研室在职博士生

腺 LELC 的病理形态特征: 癌细胞较大, 异型性明显, 多数癌细胞为多角形, 胞界不清呈合体状, 可见巨核和多核瘤细胞, 也可杂有少量梭形和小圆形癌细胞, 核大呈空泡状, 有 1 个或多个明显的嗜酸性核仁, 病理核分裂相多见。其中 7 例癌细胞呈弥散分布 (Schminke 型), 13 例癌细胞呈巢状或片状分布 (Regaud 型), 其中 6 例部分癌细胞有鳞状细胞分化特征, 2 例少部分癌细胞呈腺样排列。在癌巢间及癌细胞间有大量淋巴细胞浸润, 其中也可见较多的浆细胞和组织细胞 (图 1. 1)。

原位杂交 EBERs 阳性率 100% (20/20), 阳性信号在典型的 LELC 中表达最强, 在伴有鳞状细胞和腺样分化者表达较弱, Schminke 型和 Regaud 型两者阳性表达无明显差别, 癌周正常腺泡及导管上皮细胞和间质淋巴细胞均为 EBERs 阴性。EBERs 阳性信号位于癌细胞核内, 呈核仁区、核周边及核内弥散 3 种分布形式 (图 1. 2)。免疫组化检测癌细胞显示 LMP-1 阳性者 17 例, 占 85% (17/20), 绝大多数阳性细胞呈胞膜和胞浆阳性, 阳性细胞在癌组织中呈灶性分布 (图 1. 3)。EA-D 阳性者 17 例, 占 85% (17/20), 大多数阳性细胞胞浆内的阳性颗粒沿核周分布, 少数弥散呈树枝状分布 (图 1. 4)。VCA 阳性者 12 例, 占 60% (12/20), MA 阳性者占 0. 5% (1/20), 两者阳性颗粒均位于胞浆, 阳性细胞散在分布于癌组织中 (图 1. 5, 图 1. 6)。20 例 LELC 组织中 ZEBRA 均为阴性。各种抗体在癌周正常腺泡腺管上皮及间质细胞均为阴性。

3 讨论

目前已知 EBERs 是 EB 病毒潜伏感染细胞中 EB 病毒基因转录最丰富的 RNA, 因此采用原位杂交检测 EBERs 具有较高的敏感性。我们所检测的 20 例腮腺 LELC 组织中 EBERs 均为阳性, 说明在腮腺 LELC 细胞中存在 EB 病毒潜伏性感染。最近研究表明, EBERs 可以与宿主细胞中干扰素诱导的蛋白激酶 (interferon-inducible protein kinase PKP) 结合并抑制其活性, 而后者在正常情况下对细胞的增殖具有限速作用, 而后者在正常情况下对细胞的增殖具有限速作用, PKP 的失活可使细胞的增殖活性增强^[1]。我们观察腮腺 LELC 的细胞形态发现, 在典型的 LELC 中, EBERs 阳性信号较强且多呈弥漫分布, 癌细胞密集, 多呈合体状, 异型性较大, 见较多病理核分裂, 核仁明显; 而在伴有鳞状或腺样分化的 LELC 中, EBERs 阳性信号则较弱, 且多分布于核仁

区或核周边区, 也提示 EBERs 表达的强弱可能与细胞的增殖和分化程度有关。

LMP1 是 EB 病毒潜伏感染时所表达的 1 种膜蛋白。体外实验表明, LMP1 可抑制上皮细胞的终末分化及改变上皮细胞的表型, 还可通过诱导 Bcl-2 的作用而抑制细胞的凋亡^[2], 但它在体内对上皮细胞的作用还不清楚。与鼻咽未分化癌中 LMP1 阳性检出率 (22% ~ 63%) 相比^[3], 本组腮腺 LELC 中 LMP1 的检出率 (88%) 较高, 考虑 LMP1 在不同组织中表达的差异可能与宿主细胞对其表达的调控不同有关。有研究表明, 腮腺导管上皮细胞是 EB 病毒持续感染的场所, EB 病毒可通过唾液分泌进入口腔及咽部, 进而感染这些部位的上皮组织^[4], 提示腮腺导管上皮细胞对 EB 病毒可能具有易感性, 对 EB 病毒基因表达的调控也可能存在某些特殊性。我们在腮腺 LELC 组织周围的正常导管及腺泡上皮细胞内未检测到 EB 病毒基因表达阳性信号, 推测 EB 病毒基因产物的大量表达仅发生于细胞恶性转化时或转化后, 但不排除导管上皮细胞在其癌变之前就已存在 EB 病毒的感染及其基因的低拷贝表达。Raab-Traub 等^[5]曾对爱斯基摩人腮腺 LELC 中 EB 病毒基因的末端片端片段作 RFLP 和 Southern 杂交, 结果表明存在单克隆性的 EB 病毒游离体, 说明 EB 病毒的感染发生于细胞癌变并呈单克隆性增殖生长之前, 而 EB 病毒则随着细胞的单克隆性增殖而不断复制, 其基因产物大量表达。本文结果与此相符, 提示在广东地区, EB 病毒感染及其基因表达产物对腮腺 LELC 发生发展起了一定的作用。

关于腮腺 LELC 中 EB 病毒溶解性感染复制基因的表达状况, 目前尚未见文献报道。我们选择了 4 种针对 EB 病毒复制周期各个阶段有代表性的立即早期基因产物 (ZEBRA)、早期基因产物 (ED-A) 和晚期基因产物 (VCA MA) 的特异性抗体, 对 20 例腮腺 LELC 组织中 EB 病毒复制周期抗原表达进行检测, 结果显示 ZEBRA 均为阴性, EA-D 阳性者占 85% (17/20), VCA 和 MA 的阳性率分别为 60% (12/20) 和 0. 5% (1/20), 表明在部分腮腺 LELC 中 EB 病毒可由潜伏状态进入溶解性感染, 至于 EB 病毒是否能够完成整个复制周期并产生病毒颗粒或仅仅是 1 种顿挫性复制, 有待进一步研究阐明。可以推测, 在部分腮腺 LELC 患者血清中 VCA 和 EA 等抗体滴度增高^[6], 是由这些复制基因表达产物刺激机体免疫系统所致。立即早期基因 BZLF1 编码的 ZEBRA 蛋白是触发 EB 病毒由复制状态进入复制周期的关键

因素,本文 20例腮腺 LELC组织中 ZEBRA均为阴性。Niedobitek等曾用免疫组化检测 18例鼻咽癌组织中 ZEBRA的表达,结果也均为阴性。我们认为这可能是由于 ZEBRA在细胞中的半衰期很短,故免疫组化方法难以检出。

国内关于腮腺 LELC的报道较少,目前尚缺乏系统资料对我国各地区腮腺 LELC的发病率进行比较。我们对 20例腮腺 LELC的资料分析至少表明,在广东这一鼻咽癌高发区,腮腺 LELC的发生占有相当的比例。据报道,格陵兰岛的爱斯基摩人腮腺 LELC发病率较高,而该地区也正是鼻咽癌高发区^[7]。鼻咽癌和腮腺 LELC的发生都具有较明显的地域性和种族性,两者在病理组织形态学上也极为相似,而 EB病毒与鼻咽癌和腮腺 LELC两者均存在相关性,其间是否存在某种必然联系,值得探讨。推测 EBV在这 2种肿瘤发生发展中存在某种相同的作用机制,可能由于遗传因素,使鼻咽粘膜上皮细胞和腮腺导管上皮细胞对 EB病毒具有易感性,EB病毒感染上皮细胞后,在某种相同的致癌微环境影响下,宿主细胞内的 EB病毒基因及其编码产物逐渐参与细胞的恶性转化并使之发展为具有相同病理形态特征的淋巴上皮瘤样癌。

(本文图见封 3)

参 考 文 献

1 Clemens M J. Functional significance of Epstein-

Barr virus-encoded small RNAs. *Epstein-Barr Virus Report*, 1994, 1(5): 107

2 Hendevson S, Rowe M, Gregory C, *et al.* Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects in-infected fect-ed B cells from programmed cell death. *Cell*, 1991, 65(7): 1107

3 Niedobitek G, Young LS, Sam CK, *et al.* Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Am J Pathol*, 1992, 140(4): 879

4 Wolf H, Haus M, Wilmes E. Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J Virol*, 1984, 51(3): 795

5 Raab-Traub N, Rajadurai P, Flynn K, *et al.* Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. *J Virol*, 1991, 65(12): 7032

6 Saw D, Lau WH, John HC, *et al.* Malignant lymphoepithelial lesion of the salivary gland. *Hum Pathol*, 1986, 17(9): 914

7 Albeck H, Bentzen J, Ockelmenn HH, *et al.* Familial clusters of nasopharyngeal and salivary gland carcinoma in Greenland natives. *Cancer*, 1993, 72(1): 196

(1996-10-12收稿 1996-11-16修回)

EXPRESSION OF EPSTEIN-BARR VIRUS GENE IN LYMPHOEPITHELIOMA-LIKE CARCINOMA OF THE PAROTID GLAND

Liu Kela¹ Zong Yongsheng²

(1 Department of Pathology, Tumor Hospital; 2 Department of Pathology; Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Twenty cases of lymphoepithelioma-like carcinoma(LELC) in the parotid gland were studied for Epstein-Barr virus(EBV) gene expression using in situ hybridization and immunohistochemistry. The results showed that positive signal of EBV encoded small RNAs(EBERs) could be found in the nuclei of tumor cells in 100% cases of parotid gland LELC. Latent membrane protein(LMP1), were detected on membrane and in cytoplasm

of tumor cells in 85% cases. No positive staining of immediate early gene products ZEBRA were found in all cases. Early gene products EA-D were positive in 85% cases. The expression rate of late gene products VCA and MA in 20 cases was 60% and 0.5% respectively. In the positive cases, the positive signals were located in the neoplastic epithelial cells, not in the normal epithelial cells and lymphoid cells. The results confirmed a consistent association between EBV and parotid gland LELC in Guangdong, a high prevalent area of nasopharyngeal carcinoma in China. The biological significance of EBV gene expression in the parotid gland LELC was discussed.

Subject headings parotid gland neoplasms /pathology; carcinoma, squamous /pathology; herpesvirus 4, human

(上接第 16页)

MUTATION ANALYSIS OF P16 GENE IN LEUKEMIAS

Li Wei Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Using PCR-SSCP followed by DNA direct sequencing and multiple PCR, 18 cases of chronic myelogenous leukemia (CML), 9 acute myelogenous leukemia, 6 acute lymphoblastic leukemia (ALL), 2 multiple myeloma (MM), and one K562 cell line, were investigated for point mutation and deletion of the P16 gene, which encoding a cyclin dependent kinase 4/6 inhibitor. 5 cases of CML and one case of MM presented bandshifts in SSCP analysis. One case of SSCP(+) CML was verified by direct sequencing to be a C/G transition in codon 151, which resulted in missense mutation of Pro \rightarrow Arg. No deletion was found by multiple PCR in all cases. According to the positions of the detected mutations, although there was relatively high mutation frequency of P16 gene in CML (27.8%, 5/18), it may not lead to P16 inactivation. It seemed that P16 gene mutation did not play prominent role in leukemic cancerogenesis.

Subject headings leukemia /genetics; mutation; genes, suppressor, tumor /genetics; sequence analysis, DNA

腮腺淋巴上皮瘤样癌中 EB病毒基因的表达 (正文见第 17页)



图 1 腮腺淋巴上皮瘤样癌的病理形态及 EB病毒基因的表达

- 1.1 腮腺淋巴上皮瘤样癌的病理形态特征与鼻咽未分化癌类同 HE 5×10
- 1.2 癌细胞核 EBERs表达阳性,间质淋巴细胞阴性 ISH 5×10
- 1.3 癌细胞胞膜和胞浆 LMPI表达阳性 IHC 5×10
- 1.4 癌细胞胞浆 EA-D表达阳性 IHC 5×10
- 1.5 癌细胞胞浆 VCA表达阳性 IHC 5×10
- 1.6 少量癌细胞胞浆呈 MA阳性 IHC 5×10