

· 基础研究 ·

# 鼻咽癌患者唾液和血清及外周血白细胞中 EBV-DNA 的定量检测

张丽卫<sup>1</sup>, 罗碧强<sup>2</sup>, 窦晓清<sup>2</sup>, 邓意红<sup>2</sup>, 曾志梅<sup>2</sup>, 李建忠<sup>2</sup>, 明小兵<sup>3</sup>, 陈贤明<sup>1,2</sup>

(1. 福建医科大学福总临床医学院耳鼻咽喉头颈外科, 福建福州 350025; 2. 南京军区福州总医院耳鼻咽喉头颈外科, 福建福州 350025; 3. 南京军区福州总医院医学分子实验中心, 福建福州 350025)

**摘要:** 目的 对鼻咽癌患者唾液、血清及外周血白细胞中的 EBV-DNA 进行检测, 分析唾液、血清、外周血白细胞中 EB 病毒的 DNA 含量与鼻咽癌的相关性。方法 对 40 例初诊鼻咽癌患者和 50 例正常人的唾液、血清及外周血白细胞中的 EBV-DNA 进行荧光聚合酶链反应 (FQ-PCR) 检测。结果 EBV-DNA 在鼻咽癌患者血清中的检出率为 67.5%, 显著高于正常人血清中的 EBV-DNA 检出率 2% ( $\chi^2 = 44.48, P < 0.001$ ); 鼻咽癌患者的唾液、外周血白细胞 EBV-DNA 检出率与正常人相比, 无显著性差异; 鼻咽癌患者和正常人的唾液 EBV-DNA 拷贝数与外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数呈正相关性; 鼻咽癌患者血清 EBV-DNA 拷贝数与 TNM 分级有关, 分级越晚含量越高。结论 EB 病毒长期存在于多数人的唾液中, 也可存在于外周血 B 淋巴细胞中。血清 EBV-DNA 检测在鼻咽癌的临床诊断中具有较高的敏感性和特异性, 有助于鼻咽癌的早期诊断; 血清 EBV-DNA 拷贝数与 TNM 分级有关, 可在分子水平对鼻咽癌的 TNM 分级进行补充。

**关键词:** 鼻咽癌; EB 病毒脱氧核糖核酸; 血清; 唾液; 外周血白细胞

中图分类号: R739.63

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)01-0024-04

## Quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA in saliva, blood serum and peripheral blood cells in patients with nasopharyngeal carcinoma

ZHANG Li-wei, LUO Bi-qiang, DOU Xiao-qing, et al.

(Department Of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Fuzhou General Hospital, Clinical Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China)

**Abstract:** **Objective** To quantitatively analyze DNA levels of Epstein-Barr virus (EBV) in saliva, blood serum, and peripheral blood cells (PBCs) of nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients, and to investigate the relationship between EBV-DNA levels and NPC. **Methods** EBV-DNA levels in samples of saliva, blood serum and PBCs from 40 primary NPC patients and 50 controls were quantitatively detected with real-time quantitative PCR (FQ-PCR) respectively. **Results** The detective rate of EBV-DNA in blood serum from NPCs (67.5%) was significantly higher than that in the controls 2% ( $\chi^2 = 44.48, P < 0.001$ ). The differences of EBV-DNA detective rates in the saliva, PBCs between the NPCs and control group were statistically insignificant. Saliva EBV-DNA level was correlated with PBCs EBV-DNA load in both NPCs and the control. In NPC patients, blood serum EBV-DNA level was significantly increasing with the advance in TNM stage. **Conclusion** Epstein-Barr virus may exist in saliva and peripheral blood B lymphocyte in most normal people. With high sensitivity and specificity, the blood serum EBV-DNA examination may be helpful in the early diagnosis of NPC, and also facilitate the TNM staging

作者简介: 张丽卫, 男, 硕士研究生。

通讯作者: 陈贤明, Email: fzchxming@sina.com.

of NPC in clinical practice.

**Key words:** Nasopharyngeal neoplasm; EBV-DNA; Saliva; Blood serum; Peripheral blood cell

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是来源于鼻咽黏膜上皮的恶性肿瘤,最常见于我国南方。EB 病毒是一种人类致瘤性 DNA 疱疹病毒,与鼻咽癌的发生密切相关<sup>[1-2]</sup>。几乎所有的鼻咽癌组织中均可检测到 EB 病毒的 DNA。近年来,有学者报道<sup>[3-4]</sup>在鼻咽癌患者的血清或血浆中能检测到 EB 病毒的 DNA,并且和正常人之间有明显的差异。本研究应用荧光定量 PCR 方法检测鼻咽癌高发区福建地区的鼻咽癌患者与正常人群唾液、血清、外周血白细胞的 EB 病毒 DNA,分析唾液、血清、外周血白细胞中 EB 病毒的 DNA 含量与鼻咽癌的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取南京军区福州总医院病理确诊的初诊鼻咽癌者 40 例,其中男 35 例,女 5 例;年龄 22 ~ 75 岁,平均年龄 48.4 岁。按照 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 标准确定临床分期,其中 I 期 2 例、II 期 11 例、III 期 13 例、IV 期 14 例;根据肿瘤 TNM 分级,T1 期 6 例、T2 期 17 例、T3 期 7 例、T4 期 10 例。同期选取 50 名健康志愿者做对照组,其中男 36 例,女 14 例;年龄 18 ~ 75 岁,平均 41.02 岁。所有研究对象均知晓本次实验目的,经医院伦理委员会同意并自愿参加本次检测。

### 1.2 标本收集

唾液收集时间段一般为上午 9 ~ 11 时,鼻咽癌患者唾液在治疗前收集。收集标本前 5 min 用清水漱口,吐出一部分唾液。收集时患者采取坐位,头前倾低位,张口,唾液在无刺激的状态下自然分泌,从下唇流出。流出的混合性全唾液用无菌试管收集,收集量一般为 2 ~ 3 ml,收集完后封口,立即送实验室,放入 -80℃ 低温冰箱中待测。正常对照成员唾液的收集与鼻咽癌患者唾液的收集方法相同。

### 1.3 EBV-DNA 检测

EBV 核酸扩增荧光检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,实时荧光定量 PCR 仪为 ABI Prism 7500 型。所扩增的目的基因来

自 EBV-DNA 的 BamHI-W 片段。上、下游引物分别为:5'-GTAGAAGGCCATTTTCCAC-3'和 5'-TTTCTACGTGACTCCTAGCC-3'。探针的序列为 5'-(FAM) ACCACCGTGCCAGATGG (TAM-RA)-3'。检测步骤、结果判断以及质量控制方法按试剂盒说明。

### 1.4 统计学分析

用 SPSS13.0 统计学软件包进行统计分析。两组样本相关性用 Spearman 等级相关分析;两独立样本均数间的差异用 Mann-Whitney 检验;多组独立样本均数间差异用 Kruskal-Wallis 检验。上述各检验均为非参数检验。样本率(或构成比)的比较用卡方检验。

## 2 结果

### 2.1 鼻咽癌患者与对照组唾液中 EBV-DNA 检出结果

鼻咽癌患者唾液 EBV-DNA 检出率为 47.5% (19/40),对照组唾液 EBV-DNA 检出率为 54% (27/50)。两者唾液 EBV-DNA 检出率比较,差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.376$ ,  $P = 0.540$ )。鼻咽癌患者唾液 EBV-DNA 拷贝数和对照组唾液 EBV-DNA 拷贝数比较,差异无统计学意义 ( $Z = -0.929$ ,  $P = 0.176$ )。

### 2.2 鼻咽癌患者与对照组血清中 EBV-DNA 检出结果

鼻咽癌患者血清 EBV-DNA 检出率为 67.5% (27/40),对照组血清 EBV-DNA 检出率为 2% (1/50),两者的检出率差异具有统计学意义 ( $\chi^2 = 44.48$ ,  $P < 0.001$ )。鼻咽癌患者血清 EBV-DNA 拷贝数(中位值为 1235 拷贝/ml)与对照组血清 EBV-DNA 拷贝数(中位值为 0 拷贝/ml)比较,差异具有统计学意义。

### 2.3 鼻咽癌患者与对照组外周血白细胞中 EBV-DNA 检出结果

鼻咽癌患者外周血白细胞 EBV-DNA 检出率为 25% (10/40),对照组外周血白细胞 EBV-DNA 检出率为 20% (10/50),两者的检出率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.321$ ,  $P = 0.571$ )。鼻咽癌患者外周血白细胞 EBV-DNA

拷贝数与对照组外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数相比,差异无统计学意义( $Z = -0.335, P = 0.369$ )。

#### 2.4 鼻咽癌患者与对照组唾液、血清、外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数的相关性

鼻咽癌患者的唾液 EBV-DNA 拷贝数与外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数具有正相关性( $r = 0.442, P = 0.004$ );鼻咽癌患者的血清 EBV-DNA 拷贝数与唾液 EBV-DNA 拷贝数无相关性( $r = 0.016, P = 0.922$ );鼻咽癌患者的血清 EBV-DNA 拷贝数与外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数无相关性( $r = 0.248, P = 0.123$ );对照组唾液与外周血白细胞中的 EBV-DNA 拷贝数具有正相关性( $r = 0.364, P = 0.009$ )。

#### 2.5 鼻咽癌患者唾液、血清、外周血白细胞中 EBV-DNA 拷贝数与临床分期和 TNM 分级的关系

鼻咽癌患者治疗前血清 EBV-DNA 荧光定量 PCR 检测, I + II、III、IV 期鼻咽癌患者治疗前血清 EBV-DNA 拷贝中位浓度分别为 0、1350、2635 拷贝/ml;血清 EBV-DNA 拷贝数与临床分期有关( $\chi^2 = 12.124, P = 0.002$ ),分期越晚含量越高。鼻咽癌 T3 + T4 级患者血清 EBV-DNA 拷贝中位浓度为 2040 拷贝/ml,显著高于鼻咽癌患者 T1 + T2 级患者血清 EBV-DNA 拷贝中位浓度 649.5 拷贝/ml( $Z = -2.561, P = 0.005$ );鼻咽癌患者 T 分级越高,血清 EBV-DNA 拷贝数越多,差异具有统计学意义。

### 3 讨论

EB 病毒是传染性单核细胞增多症的病原,尤为重要是它与鼻咽癌发生密切相关。原发感染后,EB 病毒在体内可终生存在。笔者实验发现,正常人的唾液及外周血白细胞中都可检测到 EBV-DNA,且具有较高的检出率,尤其是唾液中的检出率达到 54%。Kazufumi 等<sup>[5]</sup>研究中也发现了这一点。在大量鼻咽癌癌旁上皮病变中观察到,正常上皮中未见 EB 病毒阳性细胞,含 EB 病毒阳性细胞只出现在上皮呈异型性改变灶和随后发生的原位癌灶中<sup>[6]</sup>。韩安家等<sup>[7]</sup>发现鼻咽癌细胞中的 EB 病毒与正常 EB 病毒携带者和 B95-8 细胞株的

EB 病毒不一样,绝大多数是 30 bp 缺失的 LMPI 序列。说明鼻咽上皮细胞只有在先发生异型性改变的前提下再感染 EB 病毒的变异毒株,EB 病毒才在鼻咽上皮癌变中起作用。因此,单纯的 EB 病毒感染并不能认为是一种癌前状态。笔者实验还发现鼻咽癌患者和对照组的唾液 EBV-DNA 拷贝数与外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数呈正相关性。EB 病毒首先感染口咽部 B 淋巴细胞,在非鼻咽癌的活检切片中常可见到浸润于鼻咽正常上皮细胞之间或上皮下组织中的 EB 病毒阳性 B 淋巴细胞<sup>[8]</sup>。这些 EB 病毒阳性 B 淋巴细胞可游离出上皮组织,黏附于上皮表层,排泄到唾液中,或者沿淋巴系统进入血液循环。因此,在 EB 病毒携带者的唾液中可以检测到 EB 病毒 DNA,且其拷贝数与外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数呈正相关。

笔者发现鼻咽癌患者唾液、外周血白细胞中的 EBV-DNA 检出率和拷贝数与正常人无显著差异性。EB 病毒与鼻咽癌密切相关,笔者认为:① EB 病毒感染存在溶解感染和潜伏感染两种方式。溶解感染可释出病毒颗粒,进而感染周边异型上皮细胞与 B 淋巴细胞,将感染扩大,但临床检测发现鼻咽癌患者癌组织中癌细胞内的 EB 病毒基本上处于潜伏期<sup>[9-10]</sup>。②从鼻咽癌患者相对正常鼻咽黏膜到癌旁再到癌组织,潜伏感染的 EB 病毒拷贝数呈数量级递增。应用 EBER-1 探针进行原位分子杂交检测 EB 病毒发现<sup>[11]</sup>:鼻咽癌患者相对正常黏膜上皮细胞未检测到 EBER-1 的表达信号;在癌旁的不典型增生细胞、异型细胞可检测到 EBER-1 的表达信号,但明显较癌细胞的信号弱。这一动态变化说明鼻咽癌组织中 EB 病毒主要潜伏感染于癌细胞,而不是淋巴细胞中。因此,鼻咽癌患者唾液、外周血白细胞中的 EBV-DNA 检出率和拷贝数与对照组差异无统计学意义。

笔者实验发现鼻咽癌患者血清中的 EBV-DNA 检出率为 67.5%,与以往研究<sup>[12]</sup>的检出率相当,而正常人血清中的 EBV-DNA 检出率只有 2%,差异具有统计学意义( $\chi^2 = 44.48, P < 0.01$ ),说明鼻咽癌患者体内的 EB 病毒在不断地释放入血。笔者进一步分析发现,鼻咽癌患者的血清 EBV-DNA 拷贝数与唾液 EBV-DNA 拷贝数、外周血白细胞 EBV-DNA 拷贝数

无相关性,说明血清中 EBV-DNA 可能属于肿瘤源性的 DNA 片段。至于血清 EBV-DNA 是肿瘤细胞自然繁殖后释放到血清的还是肿瘤细胞被破坏消灭后释放到血清的尚不清楚。本研究对鼻咽癌患者进行临床分期,分析发现 I + II、III、IV 期鼻咽癌患者血清 EBV-DNA 拷贝中位浓度分别为 0、1350、2635 拷贝/ml,血清 EBV-DNA 水平与临床分期有关,分期越晚含量越高,与 Lin 等<sup>[13]</sup>报道相似,认为血清 EBV-DNA 可在分子水平对鼻咽癌的 TNM 分级进行补充。鼻咽癌患者原发癌灶 T1 + T2/T3 + T4 与血清 EBV-DNA 拷贝数存在显著差异性,与其他研究<sup>[14-15]</sup>结果一致。认为血清 EBV-DNA 对鼻咽癌患者临床分期具有重要的临床意义,可协助鼻咽癌患者进行临床诊断。

综上所述,EB 病毒长期存在于多数人的唾液中,也可存在于外周血 B 淋巴细胞中,并不能认为是一种癌前状态;只有在 EB 病毒感染发生异型改变的鼻咽上皮可视为癌前状态;血清 EBV-DNA 检测在鼻咽癌的临床诊断中具有较高的敏感性和特异性,有助于鼻咽癌的早期诊断;鼻咽癌血清中的 EBV-DNA 可能属于肿瘤源性的 DNA 片段,可在分子水平对鼻咽癌的临床分期和肿瘤 TNM 分级进行补充。

#### 参考文献:

- [1] Niedohitek G, Melal N, Deleeluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies[J]. *Int J Exp Pathol*, 2001, 82(3): 149 - 170.
- [2] Chen DL, Huang TB. A case-control study of risk factors of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 1997, 117(1): 17 - 22.
- [3] Mai SJ, Zong YS, Zhang M, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in plasma/serum: a useful serological indicator for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Med J*, 2002, 115(12): 1895 - 1897.
- [4] 李宇红,邵建永,冯惠霞,等. 鼻咽癌患者血浆游离 EBV-DNA 定量检测及其临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(8): 421 - 424.
- [5] Kazufumi I, Yukio S, Yoshiko H, et al. Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children [J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(2): 115 - 120.
- [6] 宗永生,扬伟,张昌卿,等. 用原位杂交技术探讨 EB 病毒在鼻咽癌发生中的作用[J]. *中华病理学杂志*, 1993, 22(6): 330 - 332.
- [7] 韩安家,宗永生,张敏,等. 鼻咽癌中 EB 病毒 BamHI“f”变异和潜伏膜蛋白 1 基因 XhoI 缺失型的分析[J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(6): 534 - 538.
- [8] Zong YS, Zhang JX, Li Z, et al. Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal lymphoid hyperplasia [J]. *Chin Med J (Eng)*, 1999, 112(9): 845 - 849.
- [9] Lees JF, Goodeve AC, Arrand JE, et al. Detection of EBV DNA in post-nasal space biopsy tissue from asymptomatic EBV-seropositive individuals [J]. *J Med Virol*, 1992, 37(1): 30 - 38.
- [10] 宗永生,林素暇,张敏,等. 鼻咽癌前期病变中的 EB 病毒感染 [J]. *癌症*, 2006, 25(2): 136 - 142.
- [11] 蒋卫红,赵索萍,尹志华,等. 定量和定位检测 EB 病毒在鼻咽癌组织中的感染状态 [J]. *癌症*, 2005, 24(7): 796 - 800.
- [12] 廖勇,罗志强. 血浆 EB 病毒 DNA 定量测定对鼻咽癌的诊断价值[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2007, 13(3): 186 - 188.
- [13] Lin JC, Wang WY, Chen KY, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr Virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(24): 2461 - 2470.
- [14] 张玉,郜红艺,冯惠霞,等. 鼻咽癌患者血浆和外周血白细胞 EB 病毒 DNA 定量分析[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(12): 982 - 986.
- [15] 侯雪,张力,赵充,等. 血浆 EB 病毒 DNA 浓度预测鼻咽癌远处转移的研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2006, 25(7): 785 - 792.

(修回日期:2011-12-27)

## · 消息 ·

### 版权说明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。该社著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我社上述声明。