

联合检测 EB 病毒相关抗体和抗原对诊断鼻咽癌的价值

罗耀凌^{1,2}, 欧国萍^{1,3}, 池沛冬^{1,2}, 梁永能^{1,2}, 刘宇辉^{1,2}, 黄马燕^{1,4}

Combined determination of Epstein-Barr virus-related antibodies and antigens for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma

Yao-Ling Luo,^{1,2} Guo-Ping Ou,^{1,3} Pei-Dong Chi,^{1,2} Yong-Neng Liang,^{1,2}

Yu-Hui Liu^{1,2} and Ma-Yan Huang^{1,4}

1. 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060
2. 中山大学肿瘤防治中心 检验科, 广东 广州 510060
3. 中山大学肿瘤防治中心 鼻咽癌科, 广东 广州 510060
4. 中山大学肿瘤防治中心 病理科, 广东 广州 510060

1. State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou, Guangdong, 510060, P. R. China
2. Department of Laboratory, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510060, P. R. China
3. Department of Nasopharyngeal Carcinoma, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510060, P. R. China
4. Department of Pathology, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510060, P. R. China

通讯作者: 罗耀凌

Correspondence to: Yao-Ling Luo
Tel.: 86.20.87343438
Fax: 86.20.87343198
Email: luoyaolingluo@126.com

收稿日期: 2008-05-12

修回日期: 2008-07-03

[Abstract] **Background and Objective:** With the development of molecular biology in recent years, many indexes for detecting Epstein-Barr virus (EBV) have been developed. This study was to evaluate the diagnostic value of combined determination of EBV-related antibodies and antigens, including VCA-IgA, EA-IgA, EBV-DNase antibody and EBV-DNA, in diagnosing nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods:** Serum and plasma samples from 160 untreated NPC patients and 76 healthy donors were collected. VCA-IgA and EA-IgA in the serum samples were detected by immunoenzyme staining method. Raji cells were stimulated by ortho-butanoic acid and croton oil to detect EBV-DNase antibody. The content of EBV-DNA in the plasma samples was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR). The diagnostic values of the indexes for NPC were evaluated. **Results:** The sensitivity and specificity for diagnosing NPC were 90.0% and 89.5% for VCA-IgA, 75.0% and 94.7% for EA-IgA, 76.3% and 90.8% for EBV-DNase antibody, 68.8% and 88.2% for EBV-DNA, and 98.8% and 84.2% for combined determination. The positive rates of VCA-IgA and EA-IgA had no relationship with clinical stage of NPC ($P>0.05$); nevertheless, the positive rates of EBV-DNase antibody and EBV-DNA were related with clinical stage ($P<0.05$). **Conclusions:** The sensitivity of VCA-IgA and the specificity of EA-IgA are the highest while detecting solely. Combined determination could improve the diagnostic sensitivity and accuracy for NPC. EBV-DNase antibody and EBV-DNA could be helpful to evaluate the course of disease and classify the clinical stage of NPC. **Key words:** nasopharyngeal neoplasm, diagnosis, EBV-DNase antibody, Epstein-Barr virus DNA, real-time fluorescence quantitative PCR

【摘要】 背景与目的: 近年来随着分子生物学的发展, 提供了多项 EB 病毒 (Epstein-Barr virus) 相关的检测指标。本研究通过同时检测 EB 病毒 VCA-IgA、EA-IgA、EBV-特异性 DNA 酶 (EBV-DNase) 抗体、EB 病毒 DNA (EBV-DNA), 评价联合检测对诊断鼻咽癌的价值。方法: 收集 160 例治疗前的鼻咽癌患者和 76 例健康成人的血清和血浆, 应用免疫酶染色法检测血清 VCA-IgA、EA-IgA; 用正丁酸与巴豆油激发 Raji 细胞方法检测 EBV-DNase 抗体; 用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative PCR, RQ-PCR) 分析血浆 EBV-DNA, 评估其在诊断鼻咽癌中的价值。结果: 单项检测时对鼻咽癌患者诊断的敏感性和特异性分别为: VCA-IgA 90.0%、89.5%, EA-IgA 75.0%、94.7%, EBV-DNase 抗体 76.3%、90.8%, EBV-DNA 68.8%、88.2%。联合检测的敏感性和特异性分别为 98.8% 和 84.2%。VCA-IgA、EA-IgA 阳性率与临床分期无关 ($P>0.05$), 各临床分

期中 EBV-DNase 抗体阳性率、EBV-DNA 水平与阳性率的差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论:VCA-IgA、EA-IgA、EBV-DNase 和 EBV-DNA 单项检测时 VCA-IgA 敏感性最高,EA-IgA 特异性最好;四项指标联合检测可提高鼻咽癌诊断的敏感性和准确度。EBV-DNase 抗体、EBV-DNA 有助于评估鼻咽癌病程和协助判断临床分期。

关键词:鼻咽肿瘤;诊断;EBV-特异性 DNA 酶抗体;EB 病毒 DNA;实时荧光定量聚合酶链反应

中图分类号:R739.6 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2009)01-0096-04

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的发生与 EB 病毒(Epstein-Barr Virus, EBV)感染密切相关^[1],研究发现绝大多数患者血清和血浆中存在抗 EBV 抗体和 EBV-DNA^[2-5],且这些抗体抗原的出现往往发生在临床肿瘤之前。近年来随着分子生物学的发展,特别是实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RQ-PCR)技术的应用,丰富了 EBV 相关抗体和抗原的检测指标,成为探索鼻咽癌临床诊治非常重要的非侵入性检测指标。国内外已有很多关于单个指标的检测报道^[3-9],但单个指标的检测对诊断鼻咽癌的敏感度和准确度均不甚理想,且由于鼻咽癌病变隐蔽,易漏诊、误诊,不易早期诊断,因此国内外都在寻找一种有效的诊断方法,联合检测 EBV VCA-IgA、EA-IgA、EBV-DNase 抗体、EBV-DNA 的报道少见,本研究同时检测这四项指标,旨在探讨其在鼻咽癌诊断和病程评估、临床分期中的价值。

1 资料与方法

1.1 血清(浆)标本

收集 2006 年 5 月至 2007 年 12 月在中山大学肿瘤防治中心经病理确诊的治疗前鼻咽癌 160 例,其中男性 116 例,女性 44 例,患者年龄 20~78 岁,中位年龄 49 岁;按 WHO 分类标准,未分化型非角化癌 149 例,分化型非角化癌 5 例,低分化鳞状细胞癌 6 例。按照鼻咽癌 '92 福州分期标准进行临床分期,Ⅰ期 8 例、Ⅱ期 27 例、Ⅲ期 72 例、Ⅳ期 53 例。另选取 76 例来源于本院体检中心的健康成人作为对照组。分别抽取鼻咽癌患者治疗前和对照人群的静脉血,离心分离血清和血浆(EDTA 抗凝),冰箱保存(2~8℃)。

1.2 主要试剂及仪器

VCA-IgA 和 EA-IgA 检测试剂盒购自中山生

物工程公司(产品号 TV021)。DNA 提取试剂盒购自北京 TIANGEN BIOTECH 公司(目录号 DP304)。EB 病毒引物及探针序列购自上海基康生物技术有限公司。Raji 细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。LS-6500 液闪仪为美国贝克曼库尔特公司产品。7900 型实时荧光定量 PCR 仪及 PCR 扩增结果自动分析软件 SDS(Version2.0)均为美国 ABI 公司产品。

1.3 检测方法

(1)VCA-IgA、EA-IgA 用免疫酶染色法检测,严格按试剂说明书操作,血清样本从 1:10 开始倍比稀释到 1:1 280。阳性细胞数达 15%以上的稀释倍数为该样本的抗体阳性滴度。VCA-IgA $\geq 1:40$ 、EA-IgA $\geq 1:10$ 为阳性。(2)EBV-DNase 抗体检测按陈海峰等^[10]报道的方法,以正丁酸与巴豆油激发的 Raji 细胞获得 DNA 酶抗原,检测血清 DNA 酶抗体水平即抗酶率。抗酶率=(1-待测血清 CPM 值/正常新鲜血清 CPM 值) $\times 100\%$ 。EBV-DNase 抗酶率 $> 30\%$ 为阳性。(3)血浆 EBV-DNA 检测应用荧光定量 PCR 原理,用血浆 DNA 提取试剂盒提取 DNA,在 ABI7900 型实时荧光定量 PCR 仪,对 EBV-DNA 的 *Bam*H1-W 区域(GenBank 序列号 V01555)进行扩增及检测。阳性模板由 EBV *Bam*H1-W 片段质粒克隆制成,并梯度稀释成 2.98×10^8 、 2.98×10^7 、 2.98×10^6 、 2.98×10^5 、 2.98×10^4 、 2.98×10^3 和 2.98×10^2 拷贝/mL,每次 PCR 反应各梯度阳性模板均与样本同时进行扩增,以绘制阳性标准曲线对样本定量。每次 PCR 反应均同时做多管阴性对照和空白对照。PCR 扩增结果用自动分析软件 SDS(Version2.0)进行分析。血浆 EBV-DNA 定量结果按公式换算: $C=Q \times (V_{DNA}/V_{PCR}) \times (1/V_{EXT})$,其中 C 为待测血浆 EBV-DNA 浓度(拷贝/mL),Q 为 PCR 反应得到的 EBV-DNA 浓度, V_{DNA} 为血浆抽提得到的 DNA 最终稀释量, V_{PCR} 为加入反应体系的点样量, V_{EXT} 为抽提 DNA 所用血浆体积。DNA 水平 $> 1 \times 10^3$ 拷贝/mL 判断为阳性。

1.4 统计学方法

用 SPSS10.0 统计学软件包进行统计分析,敏感度=鼻咽癌组的阳性例数/鼻咽癌组的总例数 $\times 100\%$ 。特异度=健康成人组的阴性例数/健康成人组的总例数 $\times 100\%$ 。阳性率的比较用卡方检验,多组独立样本均数间差异用 Kruskal-Wallis 检验。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 EB 病毒四项检测指标对鼻咽癌的诊断价值

76 例健康对照中四项指标检测结果阳性的例数分别为:VCA-IgA 8 例,EA-IgA 4 例,EBV-DNase 抗体 7 例,EBV-DNA 9 例;四项指标中至少一项

检测结果为阳性者 12 例。从表 1 可见,单独应用一项指标检测鼻咽癌患者时,以 VCA-IgA 的敏感度最高(90.0%),EA-IgA 的特异性最高(94.7%)。联合四项检测时,敏感度和准确度分别提高到 98.8%(158/160)和 94.1%(222/236);而特异度变化不大。

表 1 EB 病毒四项检测指标对鼻咽癌的诊断价值
Table 1 Diagnostic values of the four Epstein-Barr virus (EBV) detection indexes for nasopharyngeal carcinoma (NPC)

Index	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
VCA-IgA	90.0(144/160)	89.5(68/76)	89.8(212/236)	94.7(144/152)	81.0(68/ 84)
EA-IgA	75.0(120/160)	94.7(72/76)	81.4(192/236)	96.8(120/124)	64.3(72/112)
EBV-DNase antibody	76.3(122/160)	90.8(69/76)	80.9(191/236)	94.6(122/129)	64.5(69/107)
EBV-DNA	68.8(110/160)	88.2(67/76)	75.0(177/236)	92.4(110/119)	57.3(67/117)
Combination	98.8(158/160)	84.2(64/76)	94.1(222/236)	92.9(158/170)	97.0(64/ 66)

2.2 不同临床分期患者的 EB 病毒四项检测结果的比较

由表 2 可见,I、II、III、IV 期病例中 VCA-IgA 和 EA-IgA 阳性率之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。EBV-DNase 抗体阳性率在 I 期与 II、III、IV

期;II 期与 IV 期间差异均有统计学意义($P<0.05$)。EBV-DNA 阳性率在 I 期、II 期与 III、IV 期之间差异均有统计学意义($P<0.01$)。临床分期越晚,EBV-DNA 水平(拷贝数)越高(Kruskal-Wallis 检验, $P=0.005$)。

表 2 不同临床分期鼻咽癌患者的 EB 病毒四项检测指标的阳性率和 EBV-DNA 中位水平
Table 2 The positive rates of four EBV detection indexes and the median level of EBV-DNA in NPC patients at different clinical stages

TNM stage	Cases	VCA-IgA (%)	EA-IgA (%)	EBV-DNase antibody (%)	EBV-DNA (%)	Median EBV-DNA level (copies/mL)
I	8	87.5 (7/ 8)	50.0 (4/ 8)	12.5 (1/ 8)	25.0 (2/ 8)	1 460
II	27	92.6(25/27)	66.7(18/27)	63.0(17/27)	48.1(13/27)	28 400
III	72	87.5(63/72)	73.6(53/72)	79.2(57/72)	73.6(53/72)	79 350
IV	53	92.5(49/53)	84.9(45/53)	88.7(47/53)	79.2(42/53)	137 000

3 讨 论

鼻咽癌是中国南方人群常见的恶性肿瘤,虽然其具体发病机制目前仍然不明,但大量研究认为 EBV 与鼻咽癌的发生发展密切相关,用带 EBV 基因的 Raji 细胞经激活后抗原表达谱来看,其中至少含有 EA-D、EA-R、EBV 相关的 DNA 酶、DNA 多聚酶、胸腺激酶等。绝大多数鼻咽癌患者血清中有抗 EBV 各种抗原的抗体存在,鼻咽癌的血清学诊断应朝着多项指标联合应用的方向探索^[2,3]。近年来陆续有报道指出^[4,5],鼻咽癌患者血浆中存在可以检测到的肿瘤来源的 EBV-DNA,且含量变化与肿瘤病情、疗效、复发、转移相关。

本研究同时检测 EBV 相关抗原和抗体,评价

该四项检测对鼻咽癌诊断的价值,我们发现,单项检测中,VCA-IgA、EA-IgA、EBV-DNase 抗体、EBV-DNA 敏感度分别为:90.0%、75.0%、76.3%和68.8%,与以往的报道^[3,6,7]相一致,以 VCA-IgA 的敏感度最高,EA-IgA 的特异性最好,与张昌卿等^[3]报道的结果一致。而当四项指标联合检测时,敏感度可达 98.8%,准确度提高到 94.1%,而特异性无明显降低。我们认为抗体的形成是针对 EBV 编码的抗原,鼻咽癌组织中的 EBV 可以进入血循环中,既然在血循环中可以检测到 EBV 的 DNA,反映出血清也同时出现了 EBV 编码的抗原。从理论上讲,联合应用这四项指标进行检测可以同时反映出 EBV 在体内的抗体和抗原水平,因此可以明显提高血清学检测在鼻咽癌筛查和诊断中的价值。本组病例

只有 2 例全阴性,余下病例若是有一项检出阴性,其余三项至少一项都能检出阳性,也说明联合检测有互补作用,能提高其诊断价值,早期发现鼻咽癌,特别是在初次活检阴性而 EBV 检测阳性患者,更应高度警惕,必要时进行多次活检,以免误诊和漏诊。

临床分期是影响鼻咽癌预后的主要因素,尽管 VCA-IgA、EA-IgA 已用于鼻咽癌筛查和辅助诊断,但尚无证据证明其是判断临床分期、疗效及复发的可靠指标。原因主要是在于该两种抗体在人体内的半衰期较长,即使体内 EBV 清除后仍有较长时间维持在较高的浓度。本研究结果也显示,VCA-IgA 在各期阳性率无明显差异,而 EA-IgA 虽有差异,但无统计学意义,也充分说明上述观点。本研究证实,临床分期越晚,鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 中位水平和阳性率越高,EBV-DNase 抗体阳性率也随着临床分期升高而增加。这些结果均显示,血浆中 EBV 游离 DNA 含量与鼻咽癌分期相一致,很好地反映了鼻咽癌临床特征,其血浆含量与患者体内肿瘤负荷呈正相关,血浆 EBV-DNA 可能是由肿瘤细胞释放入外周血的结果,因而随着病情的进展,血浆中 EBV-DNA 含量也会出现相应的增加。EBV-DNase 的出现,提示了 EBV 处于病毒的增殖周期,其在受染机体内含量高低,直接反映了病毒复制的活跃程度,随着病灶的增大和浸润范围的增大,EBV-DNase 的表达亦相应增多。我们认为 EBV-DNA、EBV-DNase 抗体对患者临床分期有重要意义,能很好反映肿瘤消长,有助于评估鼻咽癌患者病程和有望成为分期系统的分子指标^[6,8]。

综上所述,我们认为联合检测各项指标有互补作用,可提高鼻咽癌的诊断效率,提高准确度,减少误诊和漏诊率。EBV-DNA、EBV-特异性 DNA 酶抗体是反映肿瘤消长情况灵敏可靠的指标,可用于鼻咽癌诊断、评估鼻咽癌病程和协助判断 TNM 临床分期。有报道这两项指标在治疗前后动态检测,对鼻咽癌的疗效、预后、转移和复发的判

断均有重要意义,并有助于阐明 EBV 在鼻咽癌发生发展中的机制^[9,11]。

[参 考 文 献]

- [1] Zeng MS, Li DJ, Liu QL, et al. Genomic sequence analysis of Epstein-Barr virus strain GD1 from a nasopharyngeal carcinoma patient [J]. J Virol, 2005,79(24):15323-15330.
- [2] Cheng WM, Chan KH, Chen HL, et al. Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV antibody spectrum [J]. Int J Cancer, 2002,97(4):489-492.
- [3] 张昌卿,宗永生,黄宝珍,等. 提高 EB 病毒血清学在诊断鼻咽癌中的效益 [J]. 中华肿瘤杂志, 2002,24(4):356-359.
- [4] Mutirangura A, Pornthanasakem W, Theamboonlers A, et al. Epstein-Barr viral DNA in serum of patient with nasopharyngeal carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 1998,4(3):665-669.
- [5] Lo YM, Chan LY, Lo KW, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Res, 1999,59(6):1188-1191.
- [6] 古模发,黎建军,陈新林,等. 特异性 DNA 酶抗体与鼻咽癌“92 分期法”中 TNM 的关系 [J]. 广东医学, 2006,27(10):1470-1471.
- [7] 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.
- [8] 张 玉,郇红艺,冯惠霞,等. 鼻咽癌病人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.
- [9] 李泽卿,王秋萍,田勇泉,等. 鼻咽癌患者放疗前后血清 EB 病毒特异性 DNA 酶抗体的变化 [J]. 医学研究生学报, 2001,14(5):406-408.
- [10] 陈海峰,黄 迪. 鼻咽癌患者血清中抗 Epstein-Barr 病毒特异性 DNA 酶体检测方法的探讨 [J]. 生物化学杂志, 1989,5(2):131-135.
- [11] 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]. 癌症, 2006,25(7):785-792.
- [12] 彭培建,赵 充,廖 海,等. 鼻咽癌患者血浆 EB 病毒 DNA 水平的动态变化与临床疗效的关系 [J]. 癌症, 2002,21(8):817-822.

[编辑:甘可建;校对:庄爱华]