

• 论 著 •

EB 病毒 DNA 定量检测在鼻咽癌临床分期中的诊断价值*

管振祺¹, 何凤屏^{1△}, 邱世洁^{2#}, 张相国¹, 马占忠¹, 刘玉兰¹, 郭艳乐¹, 张河林¹, 张 思¹

(1. 汕头大学医学院附属粤北人民医院, 广东汕头 512026; 2. 广东医科大学, 广东汕头 523770)

摘要:目的 探讨 EB 病毒(EBV)DNA 定量检测在鼻咽癌患者不同临床分期中的诊断价值。方法 选取广东省汕头大学医学院附属粤北人民医院 2013 年 3 月至 2015 年 12 月 500 例病理诊断为鼻咽癌的患者作为研究组,同时选取 200 例健康体检人群作为对照组。2 组同时采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)方法检测血浆 EBV-DNA 的表达量,并对 2 组之间及临床 TNM 分期 I、II 与 III、IV 的结果进行比较;再将其分别与酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测的血清 EBV 病毒壳抗原免疫球蛋白 A (VCA-IgA)检测结果进行比较。结果 荧光定量 PCR 方法检测 EBV-DNA 表达量中,研究组阳性率 75.00%,对照组阳性率 9.00%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 拷贝数与临床 TNM 分期呈正相关,差异有统计学意义($P < 0.05$);鼻咽癌分期越晚,血浆 EBV-DNA 拷贝数越高。结论 血浆 EBV-DNA 水平与鼻咽癌患者临床 TNM 分期有显著相关性,可作为评估鼻咽癌患者临床分期的 1 种辅助性分子生物指标,具有较高应用价值。

关键词:鼻咽癌; EB 病毒; 荧光定量聚合酶链式反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.21.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)21-2961-03

Diagnostic value of Epstein-Barr virus DNA detection in the clinical staging of patients with nasopharyngeal carcinoma*

GUAN Zhenqi¹, HE Fengping^{1△}, QIU Shijie^{2#}, ZHANG Xiangguo¹,

MA Zhanzhong¹, LIU Yulan¹, GUO Yanle¹, ZHANG Helin¹, ZHANG Si¹

(1. Yuebei People's Hospital Affiliated to Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 512026,

China; 2. Guangdong Medical University, Shantou, Guangdong 523770, China)

Abstract: Objective To discuss the diagnostic value of Epstein-Barr virus DNA (EBV-DNA) detection in the clinical TNM staging of patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** A total of 500 patients with NPC were selected as research group from March 2013 to December 2015 analyzed. At the same time, 200 healthy people were chosen as control group. By real time quantitative PCR, the level of EBV-DNA in plasma was detected in all the subjects and compared between the two groups as well as between I, II, III and IV staging. In addition, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), serum EBV coat antigen-IgA (VCA-IgA) were detected. **Results** The positive rate of plasma EBV-DNA in research group (75.00%) was significantly higher than that of control group (9.00%, $P < 0.05$). The copy numbers of plasma EBV-DNA in patients with NPC was positively correlated with TNM staging ($P < 0.05$), the later the TNM staging, the more the copy numbers of plasma EBV-DNA. **Conclusion** The plasma level of EBV-DNA is correlated with TNM staging of patients with NPC. Detection of plasma EBV-DNA is valuable for the diagnosis of NPC which can be used as an auxiliary molecular biological index for TNM staging.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; Epstein-Barr virus; TNM staging; real time quantitative PCR

大量研究证实,EB 病毒(EBV)与鼻咽癌关系密切^[1]。目前,EBV 采用于临床的检验指标包括病毒壳抗原免疫球蛋白 A (VCA-IgA)、早期抗原免疫球蛋白 A (EA-IgA)、EBV 特异性 DNA 酶(EBV-DNAse)抗体水平及血浆 EBV-DNA 定量测定^[2-3]。其中血浆 EBV-DNA 定量测定是近年发展起来的 EBV 血清学标志物检测技术^[3],但 EBV-DNA 与鼻咽癌分期尚不清楚。本研究对广东省汕头大学医学院附属粤北人民医院(后简称粤北人民医院)200 例初治、300 例复诊的鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 定量测定结果进行分析,并探讨其在鼻咽癌临床分期的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 3 月至 2015 年 12 月在粤北人民医院病理确诊为鼻咽癌患者 500 例作为研究组(初治 200 例、复诊 300 例),年龄 23~75 岁;男 307 例,女 193 例。所有

的患者按照 TNM 分期标准和世界卫生组织 2002 标准进行分型^[4],其中 I 型 8 例(占总数 1.6%),II 型 39 例(占总数 7.8%),III 型 453 例(占总数 90.6%)。500 例患者中 T₁ 期 52 例,T₂ 期 93 例,T₃ 期 218 例,T₄ 期 137 例;N₀ 期 104 例,N₁ 期 160 例,N₂ 期 197 例,N₃ 期 39 例;M₀ 期 471 例,M₁ 期 29 例。同期选取本院健康体检人群 200 例作为对照组,年龄 25~65 岁。本研究得到医院伦理委员会批准和受检者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 EBV-DNA 检测试剂盒购自达安基因股份有限公司,采用 TapMan 荧光探针基因聚合酶链式反应(PCR)扩增法,检测方法参考试剂说明书。VCA-IgA 检测试剂盒购自北京贝尔生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 分别用促凝管和乙二胺四乙酸(EDTA)

* 基金项目:华南肿瘤学国家重点实验室开放基金(HN2014-07);广东省韶关市卫生和计划生育局立项项目(Y15070)。

作者简介:管振祺,男,主管技师,主要从事分子肿瘤学方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:fengphe@hotmail.com。# 共同第一作者。何凤屏,女,主任技师,主要从事分子肿瘤学方面的研究。

抗凝管抽取患者静脉血 2 mL, 全血经 3 000 r/min 离心, 分离获得血清, -20 °C 保存备用。根据试剂盒说明书操作进行 DNA 提取。EBV-DNA 定量测定均采用荧光定量 PCR 法^[3]。DNA 水平大于 1×10³ copy/mL 判断为阳性^[4], DNA 水平小于或等于 1×10³ copy/mL 判断为阴性。

1.3.2 EBV-VCA-IgA 检测 (ELISA 法) 采用 ELISA 方法检测血清中 VCA-IgA, Cut-off 值小于 0.08 为阴性, 大于或等于 0.08 且小于或等于 0.80 为弱阳性 (可疑), 大于 0.80 为阳性。具体步骤: 取出试剂盒置室温平衡 30 min, 将 20×洗涤液用蒸馏水做 20 倍稀释。取出包被板, 做好标记, 留 1 个孔作空白对照, 将板条固定于板架上, 剩余板条用不干胶密封并放入密封袋中保存。阴性对照孔 3 个, 阳性对照孔 1 个, 各加入 100 μL 对照血清。空白对照孔 1 个空置, 其余每个孔加入 100 μL 样品稀释液, 每个孔加入待测样品 10 μL, 将反应板轻轻震荡使样品混匀。用封板膜封板后, 置 37 °C 温箱中反应 30 min。温育后, 吸干孔内液体, 用洗涤液洗板 5 次, 每次浸泡 30~60 s。每孔加入 100 μL 酶标工作液, 空白孔除外。用封板膜封板后, 置 37 °C 温箱中反应 30 min。用洗涤液洗板 5 次, 每次浸泡 30~60 min。每孔加入终止液 50 μL, 轻轻震荡混匀。酶标仪 450 nm 比色测量 Cut-off 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析处理。血浆 EBV-DNA 拷贝数及阳性率采用非参数检验方法 (Kruskal-Wallis) 和 χ^2 检验。比较不同 T 分期、N 分期、M 分期的 EBV-DNA 拷贝数。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组检测结果 研究组荧光定量 PCR 方法的阳性率均显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。研究组 ELISA 方法的阳性率均显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。研究组荧光定量 PCR 方法的阳性率高于 ELISA 方法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 IgA 抗体和 EBV-DNA 在研究组和对照组阳性率比较 (%)

| 组别 | n | VCA-IgA 阳性率 | EBV-DNA 阳性率 |
|-----|-----|-------------|-------------|
| 研究组 | 500 | 60.00* | 75.00* |
| 对照组 | 200 | 18.00 | 9.00* |

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 EBV 阳性率与鼻咽癌患者临床分期的关系 500 例鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 定量测定 EBV 阳性率为 78.5% (392/500), 其中强阳性 72 例 (14.4%), 阳性 230 例 (46.0%), 弱阳性 90 例 (18.0%)。比较不同 T 分期的 EBV-DNA 拷贝数, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 37.31, P = 0.000$), 见表 2。比较不同 N 分期的 EBV-DNA 拷贝数, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 61.77, P = 0.000$), 见表 3。比较不同 M 分期的 EBV-DNA 拷贝数, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 71.82, P = 0.000$), 见表 4。

表 2 T 分期与 EBV-DNA 定量测定关系 (copy/mL)

| T 分期 | EBV-DNA 定量中位数 | EBV-DNA 定量四分位数间距 | χ^2 | P |
|------------------|---------------|------------------|----------|-------|
| T ₁ 期 | 0 | 4 200 | 37.31 | 0.000 |
| T ₂ 期 | 600 | 13 700 | | |
| T ₃ 期 | 2 300 | 19 500 | | |
| T ₄ 期 | 7 200 | 42 800 | | |

表 3 N 分期与 EBV-DNA 定量测定关系 (copy/mL)

| N 分期 | EBV-DNA 定量中位数 | EBV-DNA 定量四分位数间距 | χ^2 | P |
|------------------|---------------|------------------|----------|-------|
| N ₀ 期 | 0 | 4 500 | 61.77 | 0.000 |
| N ₁ 期 | 400 | 7 400 | | |
| N ₂ 期 | 4 800 | 35 000 | | |
| N ₃ 期 | 13 000 | 65 000 | | |

表 4 M 分期与 EBV-DNA 定量测定关系 (copy/mL)

| M 分期 | EBV-DNA 定量中位数 | EBV-DNA 定量四分位数间距 | χ^2 | P |
|------------------|---------------|------------------|----------|-------|
| M ₀ 期 | 1 400 | 18 500 | 71.82 | 0.000 |
| M ₁ 期 | 13 000 | 135 000 | | |

2.3 2 种方法在不同临床分期检测结果的比较 在 TNM 分期中, EBV-DNA 阳性率 (92.80%) 高于 VCA-IgA (69.40%), ELSIA 方法检测 III 期和 IV 期鼻咽癌患者 VCA-IgA 阳性率分别为 64.00% 和 82.60%, 而 PCR 方法检测 III 期和 IV 期鼻咽癌患者 EBV-DNA 阳性率分别为 93.10% 和 94.00%, 2 种方法比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 2 种方法 III 期、IV 期结果分别与 I 期比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 2 种方法 III 期、IV 期结果分别与 II 期比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。EBV-DNA 阳性率随着临床分期增高而增高, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); VCA-IgA 阳性率在各临床分期比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 5 2 种方法在不同临床分期检测结果的比较 [n (%)]

| 临床分期 | n | VCA-IgA 阳性 | EBV-DNA 阳性 |
|------|-----|----------------------|----------------------|
| I | 52 | 12(23.07) | 46(88.50)* |
| II | 93 | 67(72.00) | 85(91.30)* |
| III | 218 | 180(82.60)* Δ | 203(93.10)* Δ |
| IV | 137 | 88(64.00)* Δ | 130(94.00)* Δ |
| 合计 | 500 | 347(69.40) | 464(92.80) |

注: 与 I 期比较, * $P < 0.05$; 与 II 期比较, $\Delta P < 0.05$; 与 VCA-IgA 阳性比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

鼻咽癌是 1 种与 EBV 密切相关的恶性肿瘤。目前临床应用广泛的 EBV 的血清标志物检测指标有 VCA-IgA、EA-IgA、EBV-DNase 和血浆 EBV-DNA 定量测定。前 3 种方法较早用于临床, 但单项检测均存在一定的局限性, 联合检测有较高敏感性和特异性, 对鼻咽癌普查、早期诊断有临床意义^[5-6]。血浆 EBV-DNA 定量测定较晚用于临床, 但对鼻咽癌的诊断及预后预测有更大优势^[7-9]。

TNM 分期指导下的个体化综合治疗已成为肿瘤治疗的规范。由于核磁共振成像 (MRI) 广泛用于临床及对鼻咽癌生物学行为的不断了解, 国内确立了基于 MRI 的鼻咽癌“中国 2008TNM 分期”, 不过目前关于鼻咽癌临床分期均缺乏分子生物学指标。本研究 500 例患者资料中, 鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 拷贝数与 T 分期显著相关 ($\chi^2 = 37.31, P = 0.000$)。随着 T 分期的进展, 血浆 EBV-DNA 拷贝数越高, T₃ 期、T₄ 期患者血浆 EBV-DNA 拷贝数显著高于 T₁ 期、T₂ 期, 其机制可能是受 EBV 感染机体内, 血浆 EBV-DNA 拷贝数高低直接反映了 EBV 复制的活跃程度, 随着原发灶的增大, 血浆 EBV-DNA 拷贝数随之增大^[10]。笔者结果提示 T₂ 与 T₃ 期, T₃ 与

T₁ 期组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Zhang 等^[11]也证实 EBV-DNA 拷贝数与 T 分期有显著正相关关系。

鼻咽癌患者在初诊时有 65.00%~80.00% 患者发现癌细胞转移。本研究中鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 拷贝数与 N 分期有显著相关性 ($\chi^2 = 61.77, P = 0.000$)，笔者认为随 N 分期的递增，患者血浆 EBV-DNA 拷贝数增高，N0 分期 EBV-DNA 拷贝数最低，N3 分期 EBV-DNA 拷贝数最高。有学者报道血浆 EBV-DNA 拷贝数与 N 分期呈正相关关系，从另一个角度说明血浆 EBV-DNA 拷贝数越高，淋巴转移越广泛。本研究发现，鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 拷贝数与 M 分期有显著相关性 ($\chi^2 = 71.82, P = 0.000$)，研究结果显示 M1 分期 EBV-DNA 拷贝数高于 M0 分期 ($P < 0.05$)，其机制可能与血浆 EBV-DNA 拷贝数与转移的肿瘤负荷有关，EBV-DNA 可能由肿瘤细胞释放进入外周血，随着病情的进展，血浆中 EBV-DNA 拷贝数会相应增加，Zhang 等^[11]报道鼻咽癌远处转移患者血浆 EBV-DNA 拷贝数显著高于无远处转移者。

本研究评价荧光定量 PCR 和 ELISA 2 种方法对鼻咽癌的诊断价值。荧光定量 PCR 具有常规 PCR 的高敏感性，能克服常规 PCR 技术不能定量及易污染问题；此外，采用荧光探针，可直接检测到 PCR 扩增中荧光信号变化，实现实时荧光定量检测。研究中发现，荧光定量 PCR 方法测定 EBV 感染阳性率显著高于 ELISA 血清学方法，且阳性率随着鼻咽癌进展而增加。近年来，有学者认为荧光定量 PCR 法对鼻咽癌分期诊断有较高的敏感性^[12]，可作为鼻咽癌预后评价指标之一，而 ELISA 方法对鼻咽癌分期诊断敏感性较低。笔者研究显示，ELISA 方法检测 EBV 感染阳性率显著低于荧光定量 PCR 方法且对分期并不敏感。ELISA 方法作为医院免疫室常规检测方法，与荧光定量 PCR 方法比较价格相对低廉、无需特殊设备，但操作较繁琐、主观性强，只适用于大规模人群筛查。

综上所述，血浆 EBV-DNA 拷贝数与鼻咽癌 TNM 的临床分期呈正相关，鼻咽癌 TNM 分期越高，患者血浆 EBV-DNA 拷贝数越高。因此，血浆中 EBV-DNA 拷贝数可在分子水平上反映鼻咽癌患者的病情程度，对鼻咽癌的预后评价具有较大的临床意义^[13]。

参考文献

- [1] Liu LT, Tang LQ, Chen QY, et al. The prognostic value of plasma Epstein-Barr viral DNA and tumor response to neoadjuvant chemotherapy in Advanced-Stage nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, 93(4):862-869.
- [2] Wille CK, Nawandar DM, Panfil AR, et al. Viral genome methylation differentially affects of BZLF1 to activate Epstein-Barr virus lytic gene expression and viral replication[J]. *J Virol*, 2013, 87(2):935-950.
- [3] 陈文学, 邹学森, 李金高, 等. 血浆 EB 病毒 DNA 检测对鼻咽癌诊断的价值研究[J]. *实用癌症杂志*, 2014, 29(12):1526-1528.
- [4] 罗耀凌, 陈浩, 彭颂国, 等. 联合检测 EB 病毒不同抗体及 EB 病毒 DNA 在鼻咽癌血清学诊断中的价值[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(44):3516-3519.
- [5] Liu Z, Ji MF, Huang QH, et al. Two Epstein-Barr virus-related serologic antibody tests in nasopharyngeal carcinoma screening: results from the initial phase of a cluster randomized controlled trial in southern China[J]. *Am J Epidemiol*, 2013, 177(3):242-250.
- [6] Liu WL, Guo XZ, Zhang LJ, et al. Prognostic relevance of Bmi-1 expression and autoantibodies in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:467.
- [7] Hui EP, Ma BB, Chan KC, et al. Clinical utility of plasma Epstein-Barr virus DNA and ERCC1 single nucleotide polymorphism in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*, 2015, 121(16):2720-2729.
- [8] Zheng XH, Lu LX, Li XZ, et al. Quantification of Epstein-Barr virus DNA load in nasopharyngeal brushing samples in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma in southern China[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(9):1196-1201.
- [9] Shao JY, Li YH, Gao HY, et al. Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer*, 2004, 100(6):1162-1170.
- [10] Sun PL, Chen C, Cheng YK, et al. Serologic biomarkers of Epstein-Barr virus correlate with TNM classification according to the seventh edition of the UICC/AJCC staging system for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 271(9):2545-2554.
- [11] Zhang L, Tang LQ, Chen QY, et al. Plasma Epstein-Barr viral DNA complements TNM classification of nasopharyngeal carcinoma in the era of intensity-modulated radiotherapy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5):6221-6230.
- [12] Zhao FP, Liu X, Chen XM, et al. Levels of plasma Epstein-Barr virus DNA prior and subsequent to treatment predicts the prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(5):2888-2894.
- [13] Chan KA. Plasma Epstein-Barr virus DNA as a biomarker for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chin J Cancer*, 2014, 33(12):598-603.

(收稿日期:2016-02-01 修回日期:2016-04-21)

(上接第 2960 页)

- [6] promoter polymorphisms and susceptibility to atrial fibrillation in elderly Han Chinese patients with essential hypertension[J]. *J Int Cytok Res*, 2012, 32(11):542-547.
- [9] Heresi GA, Aytakin M, Hammel JP, et al. Plasma interleukin-6 adds prognostic information in pulmonary arterial hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2014, 43(3):912-914.

- [10] Hsu EC, Kulp SK, Huang HL, et al. Integrin-linked kinase as a novel molecular switch of the IL-6-NF- κ B signaling loop in breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37:430-442.

(收稿日期:2016-02-05 修回日期:2016-04-25)