

以 Rta2/3 为抗原用于鼻咽癌病人检测的初步研究

任军 张晓梅 张晓光 李红霞 周玲 曾毅

【摘要】 目的 在大肠杆菌中表达 EBV 的早期基因 *BRLF1*, 并纯化这个重组蛋白。用纯化的蛋白作为抗原与鼻咽癌(NPC)病人血清中的特异性抗体发生反应, 以寻找新的 NPC 筛检或诊断标志物。方法 用表达和纯化的 *BRLF1* 基因 C 端 2/3 部分蛋白(Rta2/3)建立间接 ELISA 方法, 检测了 59 份 NPC 患者血清中的抗 Rta IgG 抗体, 同时 59 份健康者血清作对照。结果 59 份 NPC 患者血清中 50 份阳性, 而 59 份健康者对照血清中只有 7 份阳性。NPC 组的阳性率与健康对照组之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。此方法的灵敏度为 84.7%, 特异性为 88.1%。结论 (1) 检测人血清中的抗 Rta-IgG 可以作为 NPC 诊断的重要标志物之一。(2) 如果检测抗 Rta-IgG 与检测 Zebra IgG 抗体试验联合使用, 用于 NPC 的筛检和诊断能够进一步提高灵敏度或特异性。

【关键词】 EBV; *BRLF1*; 鼻咽癌

Studies on antibody response to recombinant Rta protein in patient with nasopharyngeal carcinoma REN Jun, ZHANG Xiao-mei, ZHANG Xiao-guang, LI Hong-xia, ZHOU Ling, ZENG Yi. Institute for Viral Disease Control and Prevention, China Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China
Corresponding author: ZHOU Ling, Email: zhouling@doctor.com.cn

【Abstract】 Epstein-Barr virus is a ubiquitous gamma herpesvirus that infects more than 90% of human population. EBV is associated with a spectrum of nasopharyngeal carcinoma(NPC). IgA/VCA and IgA/EA in serum can be used in NPC screening and diagnosis. It is known that IgG antibodies directed against Zebra encoding by *BZLF1* is one of diagnostic parameter for NPC. It should be researched whether the specific antibody against the other EBV early antigen can be used in NPC screening and diagnosis. **Objective** To express early gene *BRLF1* in *E. coli*, purify the recombinant protein, and use it as antigen to detect specific antibody response in patient with NPC in order to search for new screening or diagnostic parameter for NPC. **Methods** The C-terminal two-thirds of *BRLF1*(Rta2/3) were prepared and were used as antigen in indirect ELISA. Serum samples were derived from 59 patients with NPC and 59 healthy volunteers. **Results** Significant difference between the NPC group and healthy control group was revealed($P < 0.01$). Among the 59 patients with NPC, 50 showed positive results in specific IgG antibody detecting, while in healthy control group, only 7 cases showed positive results. The sensitivity of the assay is 84.7% and the specificity is 88.1%. **Conclusion** IgG antibody against Rta can be one of important diagnostic parameter for NPC. The sensitivity or the specificity can be improved if the assay was combined with the assay of IgG antibodies against Zebra in NPC screening. Therefore the assay can be used in screening and diagnosing for NPC.

【Key words】 Epstein-Barr virus(EBV); *BRLF1* gene; Nasopharyngeal carcinoma(NPC)

Epstein-Barr(EB)病毒属于疱疹病毒科 γ 亚科, 在人群中传播广泛, 90% 以上的成年人携带此病毒, 但一般并不发病。只有病毒由潜伏期被激活进入裂解周期, 才与多种恶性肿瘤的发生高度相关^[1]。EB 病毒的感染与许多人类肿瘤密切相关^[2], 如非洲儿

童 Burkitt's 淋巴瘤(BL)、鼻咽癌(NPC)、何杰金病(HD)以及各种免疫抑制病人和移植病人的淋巴细胞增生紊乱引起的淋巴瘤(PTLD)等。其中 NPC 是我国南方一些省(自治区)的常见恶性肿瘤之一, 发病率高, 有些地区可高达(10~50)/10 万; 病死率也很高。血清学普查表明, NPC 患者血清中抗 VCA(病毒衣壳抗原)、EA(早期抗原)抗体的滴度不仅明显高于普通人群和患其他类型头部肿瘤的人群, 而且与肿瘤的发生过程密切相关^[3,4]。由于在 NPC 的早期对病人进行治疗可以使 NPC 病人的生存期明显延长, 所以开发出敏感性和特异性更高的试验方法

基金项目:“十五”国家科技攻关计划课题(编号 2001BA703B07)

作者单位:100052 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室

任军, 张晓梅同为第一作者

通讯作者: 周玲, Email: zhouling@doctor.com.cn, 电话: 010-83535320

应用于 NPC 高危人群的筛检和早期诊断具有很高的实用价值。中国疾病预防控制中心病毒病所肿瘤病毒室用 EBV 的早期蛋白 Zebra 作为抗原建立间接 ELISA 方法,检测人血清中的抗 Zebra 蛋白^[5,6]的 IgG 抗体,使鼻咽癌筛检方法更易于标准化和更适于大量样本的筛检。我们在此基础上尝试使用其他病毒抗原作为新的筛查依据。

BRLF1 (BamH I 片段 R, 左向第一读码框) 是 EBV 立早基因之一,在 EBV 由潜伏周期向裂解周期转换的过程中发挥重要作用。Feng 等^[7]在大肠杆菌中表达了 Rta 融合蛋白,并用 Western blot 方法鉴定出 Rta 蛋白的 IgG 表位主要位于蛋白的 C 端 2/3 部分。本文作者在大肠杆菌中表达并纯化了不含任何外源标签的 Rta 蛋白的 C 端部分(179~605 位氨基酸, Rta2/3),用纯化的蛋白作为抗原建立间接 ELISA 法检测人血清中的特异性抗体。

材料和方法

包被用蛋白抗原: Rta 和 Zebra 由本室制备保存。

血清与抗体: 封闭用 FBS 为 Gibco 公司产品。HRP-标记羊抗人 IgG 由北京艾奥公司惠赠。羊抗人 IgA 为中杉金桥公司进口分装产品。27 份 NPC 病人血清和 27 份健康者血清由广西疾控中心提供。32 份 NPC 病人血清和 32 份健康者血清由广东汕头大学医学院提供。

以 Rta2/3 蛋白为抗原间接 ELISA 法检测人血清: 用包被液(Na_2CO_3 0.15 g, NaHCO_3 0.29 g, 加去离子水至 100 ml) 稀释 Rta2/3 蛋白样品至 100 ng/孔。4℃包被过夜(16~18 h)。用含 10% FBS 的 PBS 封闭液 37℃封闭 2 h。人血清用封闭液 1:100 稀释, 37℃湿盒内保温 1~2 h。用 4 份 NPC 病人混合血清作为阳性对照血清,以不加入血清之封闭液作为阴性对照。每份样本做 2 孔。HRP 标记的羊抗人 IgG 按 1:20 000 用封闭液稀释(HRP 标记羊抗人 IgA 按 1:10 000 稀释), 37℃湿盒内保温 1 h。显色液 A、B 每孔各加入 50 μl , 37℃湿盒内显色 15 min。加入终止液 S 每孔 50 μl 。酶标仪 450 nm 波长读出每孔吸光度(A)值。计算每份血清的 2 孔 A 值的平均值作为该样本的值。

Cutoff 值的设定: 结果判定的 cutoff 值 = 健康者对照组阴性血清样本的 A 值的平均值 + 2 × 标准差。检测抗 Rta-IgG 抗体 IgG 的测定以 A = 0.22 作为 cutoff 值。检测抗 Zebra IgG 抗体以 0.45 作为 cut-

off 值。IgA 的测定以 0.07 作为结果判定的 cutoff 值。

统计学方法: 各组间 A 值均数的比较用 Cox 法 *t'* 检验分析。cutoff 值判定阳性标本例数后,用卡方检验分析各组间阳性率。

结 果

以纯化的 Rta2/3 蛋白作为抗原建立间接 ELISA 法,检测 NPC 病人血清和健康者对照血清。每份标本做 2 孔,所得 A 值取平均值作为该标本的实测值,所得数据见表 1。

表 1 Rta2/3 蛋白间接 ELISA 法检测血清* 中 IgG 和 IgA 的 A 平均值和标准差

Table 1. The average and STD of A value of IgG and IgA against Rta2/3 by indirect ELISA

	NPC (n = 27)	Healthy (n = 27)
A value($\bar{x} \pm s$)/IgG	1.03 ± 0.80	0.19 ± 0.17
A value($\bar{x} \pm s$)/IgA	0.23 ± 0.27	0.054 ± 0.008

*: NPC and the comparative healthy blood serum are provided by Guangxi Center for Disease Control and Prevention

经 Cox 法 *t'* 检验分析,无论是检测 IgG 还是检测 IgA, NPC 病人组 A 均数与健康对照组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

间接 ELISA 法检测抗 Rta-IgG 以 A 值 0.22 作为 cutoff 值,检测抗 Rta-IgA 以 A 值 0.07 作为 cutoff 值。间接 ELISA 法检测抗 Zebra-IgG 以 A 值 0.45 作为 cutoff 值。分别计算阳性例数和阴性例数,结果见表 2。

表 2 间接 ELISA 法检测 NPC 病人及健康者血清* 中的 Rta 和/或 Zebra 的抗体

Table 2. Detection of antibodies against Rta and/or Zebra in NPC and healthy serum by indirect ELISA

	NPC (n = 59)		Healthy (n = 59)	
	+	-	+	-
IgG/Rta	50(84.7%)	9(15.3%)	7(11.9%)	52(88.1%)
IgA/Rta	26(44.1%)	33(55.9%)	0(0%)	59(100%)
IgG/Zebra	53(89.8%)	6(10.2%)	6(10.2%)	53(89.8%)
IgG/R or Z [#]	57(96.6%)	2(3.4%)	11(18.6%)	48(81.4%)
IgG/R and Z [△]	47(79.7%)	12(20.3%)	2(3.4%)	57(96.6%)

*: NPC and the comparative healthy serum are provided by Guangxi Center for disease Control and Prevention and The Medical Institute of Guangdong Shantou University. #: The criterion judging whether IgG/R or Z is positive: either IgG/Rta or IgG/Zebra is positive. The result is regarded as negative when both IgG/Rta and IgG/Zebra are negative. △: The criterion judging whether IgG/R and Z are positive: the result is regarded as positive when both IgG/Rta and IgG/Zebra are positive. Otherwise they are negative. The figures in brackets in the table show the percentages of positive or negative samples

根据表 2 中的数据,计算各种方法用于 NPC 筛检时的敏感性、特异性和阳性预测值、阴性预测值。

结果如表 3。

表 3 检测抗 Rta 和/或 Zebra 抗体的 NPC 筛检试验的评价指标

Table 3. Sensitivity, specificity and positive expected value, negative expected value in screening by indirect ELISA

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
IgG/Rta	84.7	88.1	87.7	85.3
IgA/Rta	44.1	100	100	64.1
IgG/Zebra	89.8	89.8	89.8	89.8
IgG/R or Z	96.6	81.4	83.8	96.0
IgG/R and Z	79.7	96.6	95.9	82.6

结果显示,如果在 NPC 筛检时同时检测抗 Rta-IgG 和 Zebra-IgG 的抗体,两者都为阳性时判定结果为阳性与单独使用 Zebra 和 Rta 相比可以大大提高阳性预测值;两者有一个是阳性即判定结果为阳性时与单独使用 Zebra 和 Rta 相比可以大大提高阴性预测值。

讨 论

BRLF1 是 EBV 的立早基因之一,在 EBV 由潜伏周期向裂解周期转换的过程中发挥重要作用。*BRLF1* 基因不含有内含子,由 3.3 kb mRNA 翻译出 Rta 蛋白。Rta 蛋白由 605 个氨基酸组成,N 端的 232 个氨基酸为 DNA 结合区域,与转录激活相关的区域位于 C 末端。作为一种反式激活因子,它可以调节 EBV 早期/晚期基因的表达。在潜伏有 EBV 的上皮细胞中,Rta 的表达可以引起 D 型早期抗原(EA-D)的产生,也可以激活 *BZLF1* 和 *BMRF1* 的表达,还可能参与裂解期病毒基因组的复制。本研究用 Rta 的 C 端 2/3 部分(Rtac2/3, 179 ~ 605 位氨基酸)包含了 Rta 蛋白主要的 IgG 表位。

用 Rta2/3 蛋白作为抗原建立间接 ELISA 法检测人血清中的特异 IgG 和 IgA。实验结果表明,检测血清中的抗 Rta IgA 时,NPC 组 A 值均值 0.23 ± 0.27 明显高于健康组 0.054 ± 0.008 ,而且统计学分析表明二者之间差异有统计学意义($P < 0.01$),但灵敏度仅 44.1%,用于 NPC 筛检的意义不大。在检测抗 Rta IgG 时,NPC 组 A 均值(1.03 ± 0.80)明显高于健康对照组(0.19 ± 0.17);经统计学分析,NPC 组与健康对照组之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。用文

中的间接 ELISA 法检测血清中的抗 Rta IgG 抗体用于 NPC 筛检,灵敏度达 84.7%,特异性 88.1%,阳性预测值 87.7%,阴性预测值 85.3%。因此,本方法有助于 NPC 的筛检。文献报道^[8],目前国内鼻咽癌高发地区基层医务部门仍多采用免疫酶法检测血清中的 IgA/VCA 和 IgA/EA 抗体,IgA/VCA 的灵敏度和特异性均达到 90% 左右;IgA/EA 的特异性很高,达到 98% 左右,而灵敏度为 50%。本文的方法在灵敏度和特异性方面与 IgA/VCA 免疫酶法相差不多,但此方法更适于大量样本的筛查。

Rtac2/3 蛋白与 Zebra 蛋白联合使用,如果并联使用(IgG/Rta 和 IgG/Zebra 其中有一个是阳性即为阳性,二者都阴性判断为阴性),则 59 例 NPC 中 57 份阳性(灵敏度达到 96.6%);阳性预测值 83.8%,阴性预测值达到 96.0%。如果串联使用(IgG/Rta 和 IgG/Zebra 皆为阳性判断为阳性,二者之一有一个阴性即判断为阴性),59 份健康血清中只有 2 份阳性(特异性达 96.6%);阳性预测值达到 95.9%。而单独检测抗 Zebra IgG 抗体的阳性预测值和阴性预测值均为 89.8%(如表 3 所示)。所以间接 ELISA 法检测抗 Rta-IgG 抗体可以作为检测 EB 病毒的另一个新的指标,用于 NPC 的筛检和诊断,能够增加诊断的准确性,并且能够给检验者和临床医生提供更多的信息。

参 考 文 献

- 1 金奇. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社. 2001, 787-809.
- 2 Rikson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. in: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Fields virology, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996, 2397-2446.
- 3 区宝祥, 曾毅. 鼻咽癌病因和发病学的研究. 北京: 人民卫生出版社. 1985, 1-10.
- 4 Zeng Y, Pi GH, Deng H, et al. Epstein-Barr virus seroepidemiology in China. AIDS Res, 1986, 2 (Suppl 1): s7-5.
- 5 曾毅, Jean-claude Nicolas, Guy de The, et al. Epstein-Barr 病毒相关疾病的 IgG/Z 抗体检测. 病毒学报, 1992, 8(3): 218-222.
- 6 李稻, 曾毅, Cochet Chantal, 等. 鼻咽癌病人血清中 IgG/Zebra 抗体的 ELISA 法检测. 病毒学报, 1994, 10(1): 78-80.
- 7 Feng P, Ren EC, Liu D, et al. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene *BRLF1*. in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 10): 2417-2433.
- 8 张天泽. 肿瘤学. 天津: 科学技术出版社, 2005, 1090-1109.

(收稿日期: 2005-12-13)