

鼻咽癌 EB 病毒 Rta/IgG 抗体检测的诊断价值

郑裕明, 蔡永林, 成积儒, 李军, 莫永坤, 高健全, 董智荣, 钟青燕

【摘要】 目的 通过检测血清中的 EB 病毒 Rta/IgG 抗体, 评价其在鼻咽癌诊断上的价值。方法 收集 211 例未经治疗的鼻咽癌患者, 413 例对照组 (包括 203 例相似症状的非鼻咽癌病例和 210 例健康体检者) 的血清, 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 Rta/IgG 抗体。应用受试者工作特征 (ROC) 曲线对结果进行分析评价。结果 鼻咽癌组的 Rta/IgG 抗体 rA 值中位数明显高于对照组 ($P < 0.001$)。Rta/IgG 抗体检测诊断鼻咽癌的 ROC 曲线下面积为 0.933, 最佳截断点时敏感度为 90.5%, 特异度为 90.1%。结论 采用 ELISA 方法检测血清中 Rta/IgG 抗体可以作为检测 EB 病毒的一个新指标, 并可作为鼻咽癌诊断的重要标志物之一。

【关键词】 鼻咽肿瘤; 疱疹病毒 4 型, 人; 抗体, 肿瘤

Evaluation of detection of Epstein-Barr virus Rta/IgG in nasopharyngeal carcinoma ZHENG Yu-ming, CAI Yong-lin, CHENG Ji-ru, LI Jun, MO Yong-kun, GAO Jian-quan, DONG Zhi-rong, ZHONG Qing-yan. Central Laboratory, Wuzhou Red Cross Hospital, Guangxi 543002, China

Corresponding author: ZHENG Yu-ming, Email: zhengym2000@hotmail.com

【Abstract】 Objective This study was aimed to investigate the clinical value of Epstein-Barr virus (EBV) Rta/IgG in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). Methods Serum samples derived from 211 untreated patients with NPC, 413 subjects including 203 non-NPC ENT patients and 210 healthy volunteers as control were examined for the presence of antibodies directed against Rta/IgG by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Receiver operating characteristic (ROC) curve was applied to perform methodical evaluation of this tumor marker. Results The rA value median of Rta/IgG in NPC group was significantly higher than one in control group ($P < 0.001$). The area under ROC was 0.933. The sensitivity and specificity of this marker were 90.5% and 90.1%, respectively, when the best cutoff value was defined. Conclusion Rta/IgG detected with ELISA method is a new target of EBV, and may be one of important marker for NPC diagnosis.

【Key words】 Nasopharyngeal neoplasms; Herpesvirus 4, human; Antibodies, neoplasms

Epstein-Barr (EB) 病毒属 γ 疱疹病毒, 全球接近 95% 的成人感染该病毒, 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。其中鼻咽癌与 EB 病毒关系最为密切, 通过对肿瘤上皮细胞中的病毒基因组与抗原的检测证实了二者的密切相关性^[1,2]。EB 病毒的立即早期基因 BRLF1 与 BZLF1 表达的 Rta 与 Zta 蛋白是 EB 病毒进入裂解期的关键蛋白^[3]。Feng 等^[4,5]对 Rta 蛋白的研究提示, 它可作为早期 EB 病毒复制的监测指标, 并在鼻咽癌患者体内可检测出高水平

的 Rta/IgG 抗体, 从而为鼻咽癌、B 淋巴细胞瘤等与 EB 病毒关系密切的疾病早期诊断提供了可能性。本研究旨在采用 ELISA 方法检测人血清中的 Rta/IgG 抗体, 评价这一标志物在鼻咽癌诊断上的价值。

1 对象与方法

1.1 标本来源 收集 2006 年 11 月至 2008 年 11 月在梧州市红十字会医院肿瘤科住院的未经治疗鼻咽癌患者 211 例, 所有患者均经鼻咽活检病理检查确诊, 病理类型以非角化性癌为主 (200/211, 占 94.8%)。其中男性 156 例, 女性 55 例; 年龄 22 ~ 83 岁, 平均 48.4 岁; 按照福州 92 分期法, I 期 4 例, II 期 25 例, III 期 74 例, IVa 期 96 例, IVb 期 12 例。对照组 413 例包括非鼻咽癌的其他相似症状病例 203 例 (如鼻出血、耳鸣、眩晕、耳炎、鼻炎或其他头颈部肿瘤等), 以及 210 例健康体检者; 其中男性 245 例,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2009.04.015

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅计划课题 (Z2008472); 梧州市科技计划项目 (200801063)

作者单位: 543002, 广西梧州市红十字会医院中心实验室, 梧州市肿瘤防治研究所

通信作者: 郑裕明, Email: zhengym2000@hotmail.com

女性 168 例, 年龄 6 ~ 82 岁, 平均 40.8 岁。抽取每个研究对象 4 ml 外周血, 分离血清置于 -70℃ 冷冻保存。

1.2 实验方法 Rta/IgG 抗体检测试剂盒由同昕生物技术(北京)有限公司提供。使用 Rta 蛋白抗原性最强的两个片段 GST-R185I 和 GST-R150I 的等比混合物作为诊断抗原, 采用间接 ELISA 方法检测人血清中 Rta/IgG。每份标本做 2 孔。血清按 1:9 稀释后每孔加 100 μ l, 37℃ 温育 30 min; 充分清洗后每孔加 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体, 37℃ 温育 30 min; 充分清洗后加入 TMB 底物 100 μ l, 37℃ 显色 10 min; 加入 2 mol/L H₂SO₄ 100 μ l 终止反应。酶标仪 450 nm 波长读出每孔吸光度(A)值。取每个标本双孔的平均值为该标本的 A 值, 标本的 A 值除以该反应板阳性对照的 A 值即为该样品的相对 A 值(rA 值), 具体按照 Cheng^[6] 的方法进行。

211 例鼻咽癌患者同时应用本实验室建立的免疫酶法检测 EB 病毒 VCA/IgA 抗体, 滴度 \geq 1:10 判为阳性。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件对变量进行正态性检验, 率的比较采用卡方检验, 组间抗体 rA 值比较采用成组设计两样本比较的秩和检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。应用 MedCalc 9.5 软件, 采用受试者工作特征(ROC)曲线确定 Rta/IgG 抗体检测的临界值, 计算相应的敏感度、特异度、阳性似然比、阴性似然比及约登指数等评价指标。

2 结果

两组的抗体 rA 值分布情况见表 1。经正态性检验(Kolmogorov-Smirnov test), 两组数据均属非正态分布($z = 1.678, 3.770; P = 0.007, 0.000$)。

表 1 鼻咽癌组和对照组的 Rta/IgG 抗体 rA 值分布情况

Tab.1 The distribution of rA value of Rta/IgG in NPC and control

组别 Group	例数 NO. cases	抗体 rA 值范围 Range of antibody rA values	中位数 (四分位数间距) M(Q ₁ ~ Q ₃)
鼻咽癌组 NPC	211	0.186 ~ 2.756	1.369 (0.616 ~ 2.065)*
对照组 Control	413	0.157 ~ 2.313	0.308 (0.252 ~ 0.399)

*两组抗体 rA 值比较经 Mann-Whitney 秩和检验, 差异有统计学意义($z = 17.708, P = 0.000$)

* The significant difference was found in antibody rA values between two groups by Mann-Whitney test ($z = 17.708, P = 0.000$)

图 1 显示, Rta/IgG 抗体检测诊断鼻咽癌的 ROC 曲线下面积为 0.933(95% 可信区间 0.910 ~ 0.951), 有统计学意义($z = 35.002, P = 0.0001$)。

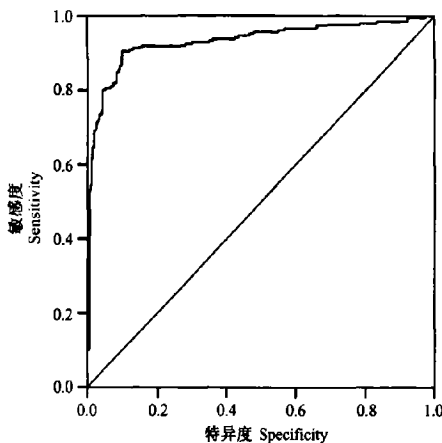


图 1 Rta/IgG 抗体检测诊断鼻咽癌的 ROC 曲线
Fig.1 The ROC of detection of Rta/IgG in NPC diagnosis

根据 ROC 曲线, 以约登指数最大为原则, 确定 Rta/IgG 抗体 rA 值的临界值为 0.49。计算 Rta/IgG 抗体检测诊断鼻咽癌的敏感度为 90.5% (95% 可信区间 85.7% ~ 94.1%), 特异度为 90.1% (95% 可信区间 86.8% ~ 92.8%), 阳性似然比为 9.12、阴性似然比为 0.11, 约登指数为 0.81。以 0.49 为临界值的两组 Rta/IgG 抗体水平散点分布情况见图 2。

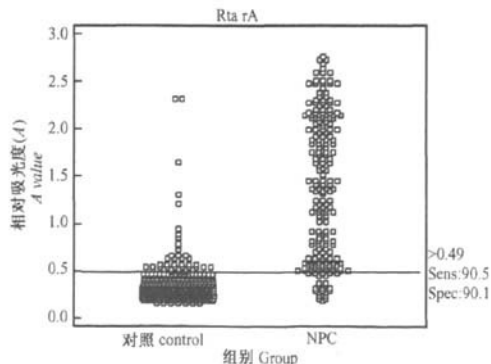


图 2 鼻咽癌组与对照组的 Rta/IgG 抗体 rA 值分布
(临界值 = 0.49)

Fig.2 The distribution of rA value of Rta/IgG in NPC and control while cutoff value was 0.49

鼻咽癌组 VCA/IgA 抗体阳性率为 98.1% (207/211), 与 Rta/IgG 抗体阳性率(90.5%)比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 11.310, P = 0.001$)。4 例 VCA/IgA 抗体阴性患者的 Rta/IgG 抗体均为阳性。

3 讨论

EB 病毒是一种普遍存在于人类的疱疹病毒,人感染后形成终身潜伏性感染。EB 病毒至少编码 60 种病毒蛋白,病毒组分复杂,筛选合适的病毒蛋白组分作为血清学试验的抗原基质对提高试剂的灵敏度和特异性十分重要。BRLF1 基因是 EB 病毒的立即早期基因之一,在 EB 病毒由潜伏周期向裂解周期转换的过程中发挥重要作用。BRLF1 位于 EB 病毒基因组 ORF50, 103 366 ~ 105 183, 长度为 1818 bp, 编码转录激活蛋白 Rta。Rta 蛋白可以激活多种病毒基因的启动子,如 BMLF1、BARF1、BALF5 等,从而在 B 淋巴细胞以及上皮细胞中有效的激活 EB 病毒进入裂解复制状态。因此 BRLF1 基因表达的 Rta 蛋白是 EB 病毒进入裂解复制状态必需的激活元件。同时,Rta 蛋白对宿主细胞生长增殖具有调控作用,可能对肿瘤的发生发展起到了一定的影响。用 RT-PCR 的方法对主要的 EB 病毒裂解基因在鼻咽部活检组织(包括肿瘤组织和正常组织)当中的表达情况进行研究,发现在鼻咽癌样本和对照中 BZLF1、BALF2 和 BCLF1 均能检出,只有 BRLF1 在鼻咽癌样本中检测出,而正常组织中未能检出^[4]。这一结果暗示了 BRLF1 基因在鼻咽癌发生发展中的重要作用。

本研究所使用的试剂是筛选 BRLF1 基因中抗原决定簇丰富且抗原性高、与人类蛋白质没有同源性的区域,即 BRLF1-185I 和 BRLF1-150I 两个片段,并用分子克隆的方法构建出融合的原核表达载体;通过大肠埃希菌进行表达制备,使用亲和层析与 HPLC-分子筛两种纯化方法联合纯化,获得 GST-R185I 和 GST-R150I 两种重组融合蛋白质;将两种融合蛋白混合作为抗原,建立人血清中 Rta/IgG 的

ELISA 检测方法^[5]。

本研究实验结果显示,鼻咽癌组的 Rta/IgG 抗体 rA 值中位数明显高于对照组。Rta/IgG 抗体检测诊断鼻咽癌的准确性(ROC 曲线下面积)为 93.3%,敏感度为 90.5%,特异度为 90.1%,表明其有良好的诊断价值,与任军等^[7]应用 RtaC2/3 蛋白为抗原用于鼻咽癌患者检测的结果相似。与传统的免疫酶法 VCA/IgA 抗体检测相比,Rta/IgG 的灵敏度稍低,但 4 例 VCA/IgA 抗体阴性患者的 Rta/IgG 抗体均为阳性,显示这两种方法间存在互补性。

因此,采用间接 ELISA 方法检测血清中 Rta/IgG 抗体可以作为检测 EB 病毒的一个新指标,用于鼻咽癌的诊断和筛检可能提高诊断的准确性,并能作为临床诊治提供更多的信息。

致谢:衷心感谢中山大学公共卫生学院柳青教授在统计学处理方面给予的帮助。

4 参考文献

- [1] Armitage RJ, Rowe DJ, Beverly PC. A new antigen identified by the monoclonal antibody UCHB 1 delivers a costimulatory signal to a subset of human B cells. *Eur J Immunol*, 1988, 18: 67.
- [2] Lee MA, Diamond ME, Yates JL. Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 1999, 73: 2974.
- [3] 任军,周玲,曾毅. EBV 立即早期基因 BRLF1 和 BZLF1 的研究进展. *国外医学病毒学分册*, 2005, 12: 125-128.
- [4] 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: 2417-2423.
- [5] Feng P, Chan SH, Rachel Soo MY, et al. Antibody response to Epstein-Barr virus Rta protein in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 2001, 92: 1872-1880.
- [6] Cheng WM, Chan KH, Chen HL, et al. Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV antibody spectrum. *Int J Cancer*, 2002, 97: 489-492.
- [7] 任军,张晓梅,张晓光,等. 以 RtaC2/3 为抗原用于鼻咽癌病人检测的初步研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26: 1057-1059.

(收稿日期:2009-05-08)

鼻咽癌EB病毒Rta/IgG抗体检测的诊断价值

作者: [郑裕明](#), [蔡永林](#), [成积儒](#), [李军](#), [莫永坤](#), [高健全](#), [董智荣](#), [钟青燕](#), [ZHENG Yu-ming](#), [CAI Yong-lin](#), [CHENG Ji-ru](#), [LI Jun](#), [MO Yong-kun](#), [GAO Jian-quan](#), [DONG Zhi-rong](#), [ZHONG Qing-yan](#)

作者单位: [梧州市肿瘤防治研究所, 广西梧州市红十字会医院中心实验室, 543002](#)

刊名: [中华实验和临床病毒学杂志](#) 

英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL VIROLOGY](#)

年, 卷(期): 2009, 23 (4)

参考文献(7条)

1. [Armitnge BJ, Rowe DJ, Beverly PC](#) A new antigen identified by the monoclonal antibody UCHB 1 delivers a eostimulatory signal to a subset of human B cells 1988
2. [Lee MA, Diamond ME, Yatos JL](#) Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus 1999
3. [任军, 周玲, 曾毅](#) EBV立即早期基因BRLF1和BZLF1的研究进展[期刊论文]-[国外医学病毒学分册](#) 2005(12)
4. [Feng P, Ren EC, Liu D](#) Expression of Epstein-Barr virus lyric gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis 2000
5. [Feng P, Chan SH, Rachel Soo MY](#) Antibody response to Epstein-Barr virus Rta protein in patients with nasopharngeal carcinoma 2001
6. [Chang WM, Chan KH, Chen HL](#) Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV antibody spectrum[外文期刊] 2002
7. [任军, 张晓梅, 张晓光](#) 以Rtac2/3为抗原用于鼻咽癌病人检测的初步研究[期刊论文]-[中华微生物学和免疫学杂志](#) 2006

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhsyhlcbdx200904015.aspx