

鼻咽癌患者 EB 病毒 Rta 蛋白的抗体反应

用于诊断的一种新的血清学参数

Antibody Response to Epstein–Barr Virus Rta Protein in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma

A New Serologic Parameter for Diagnosis

Ping Feng, M.D., M.Sc.¹
Soh Ha Chan, M.D., Ph.D.¹
Mel Yun Rachel Soo¹
Dingxiang Liu, Ph.D.²
Ming Guan, Ph.D.³
Ee Chee Ren, Ph.D.¹
Hualzhong Hu, M.D., Ph.D.¹

¹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, National University of Singapore, Republic of Singapore.

² Institute of Molecular Agrobiolgy, National University of Singapore, Republic of Singapore.

³ Genelabs Diagnostics, Republic of Singapore.

Address for reprints: Hualzhong Hu, M.D., Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, National University of Singapore, Block MD4/4A, 5 Science Drive 2, Singapore 117597, Republic of Singapore; Fax: (65) 776-6872; E-mail: michuhz@nus.edu.sg

Received October 9, 2000; accepted July 2, 2001.

通讯作者：胡怀忠，
传真：+65 776 6872
email: michuhz@nus.edu.sg

2000 年 10 月 9 日收到，2001 年 7 月 2 日接受

背景：鼻咽癌（NPC）与 EB 病毒（EBV）密切相关。本文作者曾表明 EB 病毒的直接早期基因 BRLF1，经常在鼻咽癌肿瘤中表达。同时在使用放射性免疫沉淀试验检测鼻咽癌血清时发现，针对 BRLF1 基因产品 Rta 的免疫球蛋白 G（IgG）抗体显著升高。为了简化和定量检测的方便，我们选择了酶联免疫吸附法（ELISA）来进行研究。

方法：使用免疫沉降法进一步确定了抗原域值。两个谷胱甘肽-S-转移酶（GST）重组 Rta 片段（R150-GST 和 R185-GST）被用作 ELISA 试验的抗原。用于检测抗体直接作用于 Rta 的血清标本来自 51 例鼻咽癌患者，115 例非鼻咽癌疾病的患者和 47 例健康志愿者。

结果：在鼻咽癌病人中，74.5%对 R150-GST 显示了阳性 IgG 反应，62.7%对 R185-GST 显示了阳性 IgG 反应，80.4 %对两个片段显示了阳性反应。与此相反，只有 8.5%的健康志愿者和 13.0%的对照组病人有阳性反应。当使用混合了两个重组 Rta 蛋白作为包被抗原时，相对应的阳性反应率在 NPC 病人中是 82.3%，健康志愿者为 10.6%，和对照病人组 14.8%。值得注意的是，51.0 %的鼻咽癌血清对免疫球蛋白 A（IgA）呈阳性反应，而对照病人组并没有显示出明显的反应。使用 Rta 蛋白的 IgG 反应检测鼻咽癌和传统的诊断血清标志物 EB 病毒早期抗原及病毒衣壳抗原的 IgA 反应检测鼻咽结果相关联。

结论：用于检测 IgG 抗体直接针对重组 Rta 蛋白的 ELISA 法简单、可靠，是筛选和诊断鼻咽癌病人的有效血清参数。

《Cancer》癌症 2001; 92:1872-80 © 2001 年美国癌症学会

关键词：EB 病毒，BRLF1 转录激活因子，鼻咽癌，ELISA 检测法，血清学试验

Epstein-Barr 病毒（EBV）的是一个无不在的 γ -单纯疱疹病毒。90 %以上的人口已

被感染并终身携带。EB 病毒基因组是一个含有 172, 000 碱基对（bp）的编码超过 100 个

基因的双链 DNA，其中包括至少 10 个潜伏基因和 80 多个裂解基因。EB 病毒与广泛的恶性肿瘤的淋巴细胞和上皮细胞密切相关，如 Burkitt 淋巴瘤，T 细胞淋巴瘤，霍奇金病，胃癌和鼻咽癌（NPC）。已确定 EB 病毒是导致鼻咽癌的最直接病因。100% 的未分化型鼻咽癌患者检测出 EB 病毒基因¹。鼻咽癌和 EB 病毒病因之间的联系最初建立在血清学证据之上。与相应的对照组相比，在鼻咽癌患者中，针对 EB 病毒早期抗原（EA）和病毒衣壳抗原（VCA）免疫球蛋白（IgA）抗体的血清滴度明显大得多²。这些血清学试验已证明具有诊断及预警价值^{3,4}。不管在那片地域，在几乎每一个鼻咽癌恶性上皮细胞中都证实了 EB 病毒基因的存在^{5,6}。病毒 DNA 的单克隆性表明，恶性化是从被 EB 病毒感染的一个祖细胞的克隆表达开始的⁷。人们已普遍接受，鼻咽癌患者的 EB 病毒感染是主要的诱因，并在肿瘤细胞中一直能检测到潜伏期基因的 mRNA（EBNA-1, LMP1, LMP2, 和 EBER）^{1,8}。大多数以往的研究都集中在鼻咽癌中的 EB 病毒潜伏抗原可能有致癌性。然而，越来越多的证据表明，EB 病毒在鼻咽癌中发生裂解感染时就能诱发这一肿瘤。这些证据包括从肿瘤细胞中分离出感染的 EB 病毒⁹，EB 病毒基因组的线性形式的存在⁷，从鼻咽癌病人的无细胞的血浆中检测出 EB 病毒 DNA，说明出大量病毒被释放到血液中¹⁰。最近，我们通过逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）证明了裂解的 EB 病毒基因 BRLF1（对 EB 病毒裂解周期开始至关重要即刻早期基因之一）经常在鼻咽癌活检组织中表达。此外，在鼻咽癌病人中也发现针对 BRLF1 转录激活子（Rta）的免疫球蛋白 G（IgG）抗体，这表明了 BRLF1 在蛋白层面的表达¹¹。

材料与方法

鼻咽癌和对照血清

血清样本取自新加坡国立大学医院和新加坡中央医院耳鼻喉科的未经治疗的病人。每个病人都已在知情同意书上签字。51 例病例来自病理组织上证实的未分化鼻咽癌。对照组的病人包括 115 个病理组织上确认的非鼻咽癌但有症状的患者，他们的症状包括，鼻出血，耳鸣，眩晕，中耳炎，鼻窦炎，和

鼻咽癌是鼻咽恶性肿瘤最常见的形式，每年有超过 8 万个新病例¹²。在鼻咽癌病人中也经常观察 EB 病毒潜伏和裂解抗原的体液免疫反应。都已经看到经常在鼻咽癌病人。虽然 EB 病毒特异性的 IgA 和 IgG 抗体没有多大治疗功效，但他们突出的血清学特点已大量应用在鼻咽癌患者的诊断和预警上。传统上使用间接免疫荧光法（IFA）来检测针对 EA 和 VCA 的 IgA 抗体。这种方法操作复杂，技术要求高。最近，利用各种病毒重组抗原的血清学试验已经发展起来。这些抗原包括 EB 病毒编码的碱性酶 DNase，DNA 聚合酶，胸苷激酶¹³，核苷酸还原酶¹⁴，膜抗原¹⁵，转录激活子 Zta¹⁶，和潜伏抗原 EBNA1¹⁷。然而，不同的实验室所作的血清试验的敏感性和特异性并不一致^{13,18,19}。迄今为止，传统的 IFA 用于检测针对 EA 和 VCA 的 IgA 抗体仍然是最可靠的鼻咽癌血清学标的物¹⁹。目前早期鼻咽癌患者经过放疗，5 年生存率可达 70-80%，而晚期患者生存率下降到 20-40%³。因此，发展一种更加敏感和方便的检测筛查方法将对高危人群大有裨益。

通过免疫沉淀法，我们以前已证明鼻咽癌病人体内 Rta 蛋白的 IgG 抗体比健康对照组有显著增加¹¹。在本项研究中，我们进一步探讨建立在 ELISA 方法上的 Rta 特异抗体对鼻咽癌的诊断价值。在 ELISA 试验中我们使用了在 Rta 中有抗体结合区域的两个重组蛋白作为抗原。鼻咽癌的和对照组的血清都进行了测试，结果表明，鼻咽癌中针对 Rta 蛋白的 IgG 抗体滴度显著高于对照组。这种 ELISA 测试敏感、特异，可能成为 NPC 有效的诊断和筛查参数。

血管舒缩性鼻炎。此外，还包括了 47 例健康志愿者。所有血清在零下 20 摄氏度存放，直到使用。

质粒的构建

载有 450bp C-末端片段 BRLF1 的质粒 pKT-R150C（图1）是从 pKT-R222C11 中通过

聚合酶链反应法 (PCR) 亚克隆得来的¹¹。所用引物是5'ATCCCATGGAATTCCCGTGGG CCAACCGG-3' (sense), and 5'TGCTCTAGA CTAATAAGCTGGTGTCAAAAATAG-3' (anti-sense) Nco I和Xba I限制性内切酶被引到引物中, 扩增片段被克隆在Nco I-Xba I消化的pKT载体里面。在tac启动子r的控制下, 由异丙基-β-D-硫代半乳糖苷引入, 两个额外的BRLF1内部截断R150I和R185I分别被亚克隆在 pGEX-5X-3 表达载体 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) 中 (图1)。pGEX-R150I含有一个450-bp大小的BRLF1基因内侧片段, 是从pKT-R222C质粒¹¹用Pvu II 和 Nde I切下来的, 包括核苷酸1153-1603。去掉DNA聚合酶Klenow片段的末端后嵌入Sma I线性化的质粒pGEX-5X-3 (图1)。质粒 pGEX-R185I是从pKT-R435C 质粒¹¹ 亚克隆的555bp大小的BRLF1内侧主干嵌入 pGEX-5X-3 质粒造成的 (图1)。Pvu II-Apa I-消化修饰的Klenow 片段进一步克隆到Sma I-线性化的 pGEX-5X-3质粒中。两个嵌入的片断由上游密码子启动克隆形成带有的谷胱甘肽-s-转移酶 (GST) 的融合蛋白, 并经测序证实。

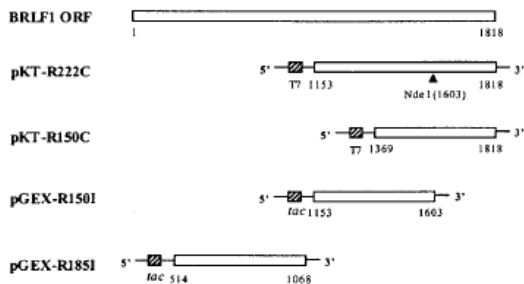


图1. 质粒构建。BRLF1 ORF818bp的立即早期基因BRLF1全长开放阅读框架。质粒pKT-R150C由pKT-R222C亚克隆用于体外转录和转译。pGEX-R150I和pGEX-R185I都含有BRLF1的内侧干性部分, 在细菌表达并生成两个重组谷胱甘肽-s-转移酶 (GST) 的融合蛋白: R150-GST和R185-GST。

体外转录, 转译和免疫沉降

按照制造商的说明和前面描述的程序¹¹, 在[³⁵S]蛋氨酸存在的情况下, 质粒pKT-R150C被转录和转译系统 (TnT) (Promega, Madison, WI) 在体外转录和转译, 以便生成一个150氨基酸, C-末端Rta蛋白质, R150C。通过无损检测线性质粒pKT -

R222, 蛋白R150I经TnT反应由Nde线性化质粒pKT-R222而获得 (图1)。免疫沉降试验则按照曾发表过的步骤进行¹¹。

重组R150-GST和R185-GST融合蛋白的表达和纯化

将pGEX-R150I, pGEX-R185I, 和pGEX-5X-3分别转化入大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)。重组克隆放入20毫升Luria-Bertani (LB) 浆液和100微克/毫升氨苄西林中37°C过夜生长。一升新鲜LB介质与过夜的培养菌按1: 100稀释后接种, 并在30°C条件下强力摇荡孵育直到光学密度水平从600纳米 (OD)₆₀₀达到0.6-0.8。然后添加IPTG (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 是最终浓度为0.1mM, 培养三小时。除非特别注明, 随后的所有步骤都在4°C进行。在X4000 g速率下离心10分钟后收获细胞, 并在100毫升裂解液 (磷酸盐缓冲液含1% Triton X-100和1mM 苯甲磺酰氟) 中再悬浮, 并经超声破碎。在X12000 g速率下离心15分钟后收集上清液, 再加入1毫升经由磷酸盐缓冲液平衡后的50%谷胱甘肽琼脂糖凝胶4B 研磨液 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)。经过30分钟室温下的不断旋转孵化后, 将配液装入一次性分离柱体 (Bio-Rad Laboratories), 用10毫升裂解液洗3次。通过室温下10分钟孵育, 用1-3毫升洗脱缓冲液 (50mM三盐酸, pH值8.0, 和10mM减少的谷胱甘肽; Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) 洗脱重组GST融合蛋白和免GST蛋白。使用Bio-Rad蛋白检测试剂盒 (Bio-Rad Laboratories) 提供的微孔板流程测定蛋白浓度。洗脱等分试样存放在-20摄氏度, 直到使用。

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹分析

为分析蛋白的表达, 须通过在溶液中煮沸5分钟将各收集的样本转性。溶液中含有2%十二烷基硫酸钠 (SDS); 1%β-巯基乙醇; 50mM的三盐酸, pH值为6.8; 10%的甘油; 和0.3%溴酚蓝。然后对重复SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 凝胶 (10%聚丙烯酰胺) 分离。经过电泳, 其中一个凝胶用考马斯亮蓝染色, 其他凝胶则移动到硝酸纤维素膜 (Stratagene, Cedar Creek, TX) 上进行

半干电泳转移细胞 (Bio-Rad Laboratories)。加入阻断缓冲液 (5%脱脂牛奶, 20mM三盐酸, 150mM氯化钠, 和0.1%吐温20, pH值7.6), 4°C过夜并平缓搅拌来培养剥离膜, 然后与1:10000稀释羊抗-GST多克隆抗体 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 在室温下搅拌一小时来反应。加入1:10000稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗羊免疫球蛋白 (Dako A/S, Glostrup, Denmark) 并培养1小时。使用发光蛋白印迹检测系统 (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) 在X光胶片上曝光来检测信号。

为确认重组Rta片段抗原, 使用我们在以往试验中已确定的4个IgG-Rta阳性血清样品和4个阴性血清样品来进行蛋白质印迹分析。把混合在一起的R150-GST, R185-GST, 和免GST加载到一个单一预备孔中, 使用SDS-PAGE来分离。经过电子转让和拦截, 将剥离膜切成条, 每个条分别与1:1000稀释的血清样品反应。列入抗GST抗体 (1:10,000稀释) 作为对照。使用1:1000稀释的HRP共轭兔F(ab')₂抗人IgG (Dako A/S) 或1:10000稀释兔抗羊球蛋白作为次要抗体。其余检测程序与上文所述一样。

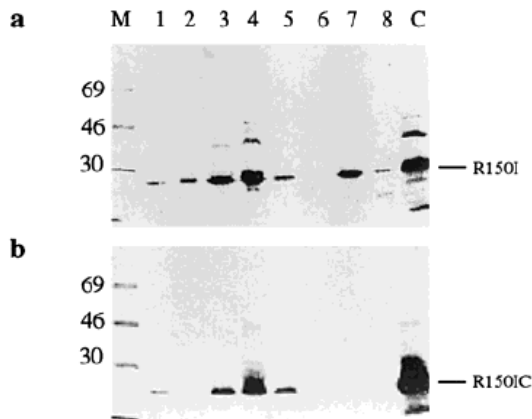


图2. 免疫沉降法确定Rta C-端抗原区域。(a) 由Nde线性化的pKT-R222C质粒 (见图1, C道) 在³⁵S]蛋氨酸 TnT 系统生成含 150 氨基酸 Rta 内侧干 (R150I)。在8个IgG-Rta阳性的血样中, 7个R150I呈阳性, 一个阴性, 这与以前使用R222C为抗原的实验相同¹¹。(b) pKT-150C质粒在体外转译生成含150个氨基酸的Rta C-端干型 (R150C) (C道)。在上述a所使用的血清样本中, 可以检测出识别这个区域的IgG抗体。仅有四个血清 (列1、3、4和5) 显示

这种蛋白的反应 (列1-8)。列M: 分子量标记物 (单位: kD)。

ELISA

分开使用或合并纯化的R150-GST和R185-GST来包被96孔聚苯乙烯微量板 (Immuno II; Dynatech, South Wundhanm, ME), 每孔100微升并在室温下孵化过夜 (16-18小时)。在pH值为9.6的碳酸盐缓冲液中预稀释成终浓度为1微克/毫升, 并用针对标准IgG-Rta阳性血清的滴定法测定最佳浓度。使用PBS辅以0.05%吐温20 (PBST) 来洗涤微量板5次, 再使用100微升/每孔的含有1%牛血清白蛋白 (Sigma, St. Louis, MO), 3%正常山羊血清, 1%脱脂牛奶的三基稀释液在室温下1小时来阻塞非特异性结合位点。再清洗板5次, 然后加入100微升在三基稀释液中的稀释血清 (1:50)。微量板在37°C孵育1小时之后, 用PBST清洗6次。在每个孔中加入100微升的1:500稀释的HRP标记的兔F(ab')₂抗人IgG或1:500稀释兔抗人IgA (Dako A/S) 并在37°C培育30分钟。用PBST清洗板子6次, 然后按0.5毫克/毫升的比例将酶基邻苯二胺 (Sigma) 溶解于0.1M的含过氧化氢的柠檬酸/磷酸盐缓冲液 (pH5.5) 中, 再将溶液以100微升/孔来形成比色反应。在黑暗中经过15分钟37°C的培养后, 加入50微升/孔的4N硫酸来停止反应。使用620纳米范围过滤器在490纳米处测量OD。每个测试列入IgG-Rta阳性和阴性对照血清。所有的测试都进行重试。R150-GST和R185-GST的抗体反应的截断点是在OD值0.20, 两者相结合的蛋白为0.33, 而IgA0.12。

IFA

如前所述使用IFA检测直接针对EB病毒EA和VCA的IgA抗体²⁰。

统计分析

ELISA OD差异表明组间比较是用未配对双尾student t 检验进行。使用卡方检验来比较NPC患者和两个对照组的重组Rta蛋白抗体检测阳性率。使用Spearman (斯皮尔曼)秩和检验来比较抗重组Rta蛋白的抗体和抗EA或VCA的IgA免疫滴度之间ELISA OD值的线性相关性。

结果

确定在Rta C-末端的抗原区域

我们以前介绍对鼻咽癌血清IgG抗体反应的抗原区域位于RtaC-末端的三分之二处。为进一步确定在222-氨基酸C-末端内的抗原区域,我们将这个区域划分成两个重叠片段,每个含有150氨基酸(图1, 2)。内部截断R150I是线性pKT-R222C质粒的TnT产品,而线性pKT-R222C质粒在TnT反应前已在原插入的三分之二处被Nde I切割过(图1, 2a, 列C)。通过亚克隆相应的BRLF1开放阅读框架到T7启动聚合酶pKT载体内来生成C-末端R150C,然后是在 $[^{35}\text{S}]$ 蛋氨酸存在的情况下的体外TnT系统(图2b, 列C)。这两种放射标记的重叠蛋白作为抗原,被用在以前已检查的8个血清样本的免疫沉降中。结果表明,对内部R150I蛋白的血清反应模式是与原来R222C片段一样的:7个阳性反应和一个阴性反应(图2A, 列1-8)。与之相反,在图2a列2, 7和8的对沉降R222C呈阳性反应的血清,没能沉降R150C片段(图2b)。很明显,在R222C区域,能与NPC血清反应抗体相结合的主要抗原表位位于R150I片段;因此,该片段在后来的实验中被用于开发ELISA。

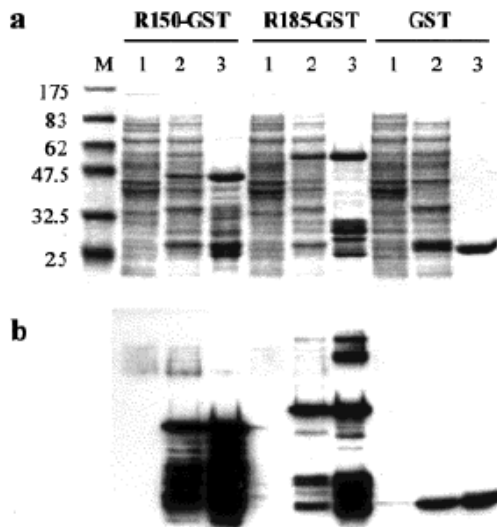


图3. SDS-PAGE和免疫印迹法对Rta-GST重组蛋白的表达和纯化的分析。(a)考马斯亮蓝染色的10%SDS-PAGE凝胶。(b)抗-GST抗体的免疫印迹分析。质粒pGEX-R150I, pGEX-R185I和pGEX-5X-3分别转移到BL21 (DE3)细胞中。用0.1mM的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷LB溶液表达GST重组蛋白

R150-GST, R185-GST和GST单体。列1和2示在引起表达前后的细胞裂解液的上清液提取物。重组蛋白经过谷胱甘肽琼脂糖4B基质亲和层析纯化(列3)。列M: 分子量标记物(单位: kD)。

重组蛋白 R150-GST 和 R185-GST 的表达和纯化

编码 R185I 和 R150I 的 BRLF1 开放阅读结构被分别克隆到 pGEX-5X-3 表达载体。然后在大肠杆菌中进行 GST 融合蛋白表达。图 3 表明, 45 分子量的 R150-GST 和 49.2 分子量的 R185-GST, 也就是来自从 27 分子量的 GST 的融合到 18 分子量的 R150I 或 22.2 分子量的 R185I, 被细胞裂解物上清液来检测, 而只有 27 分子量的 GST 蛋白从载体转化细胞中生成。使用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 基质的亲和层析能纯化重组蛋白。两个 GST 融合蛋白在纯化后能每升培养液产出 4-6 毫克。使用 IgG-Rta 阳性和阴性血清的蛋白质印迹分析能确定重组蛋白的抗原性。图 4 表明, R150-GST, R185-GST 和免 GST 蛋白的混合物被 SDS-PAGE 分离, 并作为对照被抗 GST 抗体检测出来(图 4, 列 C)。所有四个 IgG-Rta 阳性血清不需要与 GST 蛋白相互作用就能分辨这两个重组蛋白(图 4, 列 1-4), 而所有四个 IgG-Rta 阴性血清未能在蛋白质印迹分析中生成任何阳性信号(图 4, 列 5-8)。结果表明, 因为它们的代表抗原性而且没有与人体血清中 GST 的交叉反应, 重组 Rta-GST 融合蛋白可作为 ELISA 试剂的抗原来检测针对 Rta 的特异抗体。

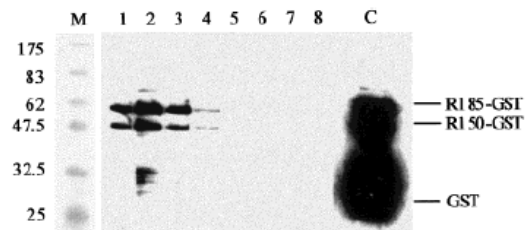


图 4. 免疫印迹分析确认 GST 重组 Rta 蛋白(R150-GST 和 R185-GST)具有抗原性。使用 10%聚丙烯酰胺凝胶和移动到硝酸纤维素膜将 R150-GST, R185-GST 和游离的 GST 分开。抗-GST 的抗体能与三个含 GST 的蛋白发生反应(列 1-4)。而四个 IgG-Rta 阴性的血清与这三个蛋白没有反应(列 5-8)。列 M: 分子量标记物(单位: kD)。

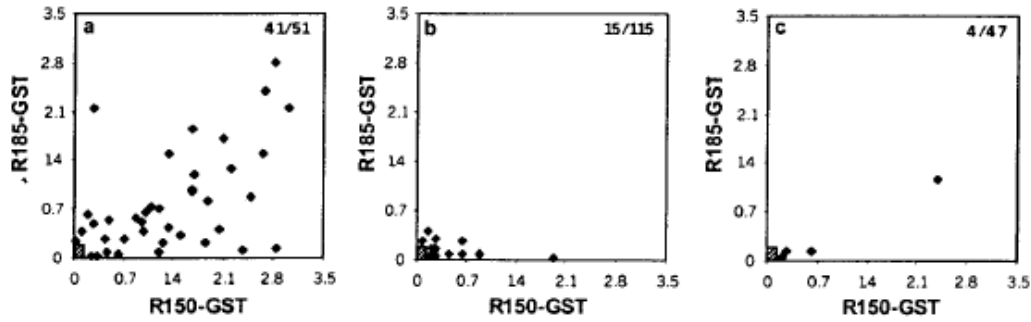


图 5. ELISA 检测两个重组 Rta 蛋白片段 (R150-GST 和 R185-GST) IgG 抗体反应。阴影部分显示阴性样品区, IgG-R150 和 IgG-R185 的 OD 值小于 0.20 (a) 51 例 NPC 患者血清中有 38 例为 IgG-R150 阳性, 32 例为 IgG-R185 阳性, 41 例对两者中的任一个反应阳性 (80.4%)。IgG-R150 平均 OD 值是 1.07 ± 0.92 ; IgG-R185f 是 0.61 ± 0.70 ($P < 0.05$)。 (b) IgG-R150 或 IgG-R185 在 115 例对照组病人血清中 15 例呈阳性 (13.0%), 13 例 R150-GST 有反应, 4 例对 R185-GST 有反应。 (c) 47 例正常人血清中仅 4 例呈 IgG-R150 阳性, 1 例 R185-GST 阳性。显然 NPC 患者的 Rta 抗体阳性率显著地高于对照组血清 ($P < 0.01$)。

表1 ELISA检测重组R150和R185-GST融合蛋白在NPC病人和对照组血清中的抗体

| Antibody | NPC (n = 51) | | Healthy controls (n = 47) | | Patient controls (n = 115) | |
|----------------------------------------|--------------|-----------------|---------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | Positive | Sensitivity (%) | Positive | Specificity (%) | Positive | Specificity (%) |
| IgG-R ₁₅₀ /R ₁₈₅ | 41 | 80.4 | 4 | 91.5 | 15 | 87.0 |
| IgG-R ₁₅₀₊₁₈₅ | 42 | 82.3 | 5 | 89.4 | 17 | 85.2 |
| IgA-R ₁₅₀₊₁₈₅ | 26 | 51.0 | 0 | 100.0 | 0 | 100.0 |
| IgA-EA | 43 | 84.3 | — | — | 2 | 98.3 |
| IgA-VCA | 49 | 96.1 | — | — | 36 | 68.7 |

NPC: nasopharyngeal carcinoma; IgG-R₁₅₀/R₁₈₅: Immunoglobulin G (IgG) antibodies responding to one of the two glutathione-S-transferase (GST) recombinant Rta protein fragments (R₁₅₀ and R₁₈₅); IgG-R₁₅₀₊₁₈₅: IgG antibodies responding to both GST recombinant Rta protein fragments; IgA: Immunoglobulin A; EA: early antigens; VCA: virus capsid antigens.

ELISA 检测针对 Rta 的抗体

为检测针对 Rta 的抗体, 重组蛋白按 100 纳克/孔的比例包被在 96 孔板上, 根据棋盘滴定法血清稀释为 1:50 (数据未显示)。首先, 确定是针对单个或两个 Rta 重组片段的不同的抗体反应, 然后将 R150-GST 或 R185-GST 被分开包被到 96 孔微量板, 用 ELISA 检测血清样品中的相应的 IgG 抗体 (IgG-R150 或 IgG-R185)。接着检测 51 例 NPC 患者, 115 例对照组患者和 47 例健康志愿者的血清: 结果显示在图 5 和表 1。ELISA OD 值大于 0.20 的定义为阳性, 图 5 阴影区表明两种蛋白血清阴性。NPC 患者中, 38 例 IgG-R150 (74.5%) 为阳性, 32 例 IgG-R185 (62.7% 为阳性)。平均 OD 值 (\pm 标准偏差) 分别为 IgG-R150 值 1.07 ± 0.92 , IgG-R185 值 0.61 ± 0.70 (图 5a, 表 1)。41 个血

清 (80.4%) 对两个重组蛋白中任一个有阳性反应, 其中 29 个血清 (70.7%) 对这两个蛋白都呈阳性反应。与此相反, 115 个对照患者的血清中只有 15 个 (13.0%) 对这两个 Rta 片段中任一个有阳性反应 (图 5b, 表 1), 其中 13 个样品对 IgG-R150 呈阳性 (11.3%), 4 个样品对 IgG-R185 呈阳性 (3.4%)。同样, 在 47 例健康志愿者血清中, 只有 4 个样本对 R150-GST 有阳性反应 (8.5%), 其中一人还 R185-GST 阳性 (图 5c, 表 1)。NPC 血清的阳性率明显高于对照血清 ($P < 0.01$)。这些结果表明, 与对照组和志愿者相比, NPC 患者确实有一个更高的针对 Rta 的 IgG 反应, 而将 R150-GST 和 R185-GST 可以简化测试同时保持其灵敏度。

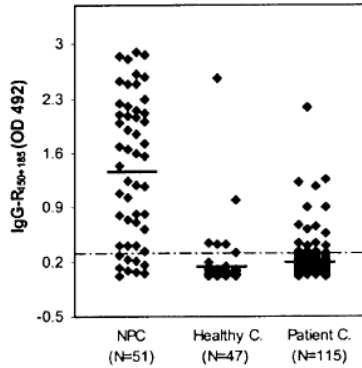


图6 ELISA 检测两个 GST 重组融合蛋白 IgG 抗体 (IgG-R1501185) 在 NPC 病人组、对照组和健康志愿者血样中的表达。用 R150-GST 和 R185-GST 混合物作为抗原包被酶标板。虚线代表判定临界 OD 值 (0.33)。

下一步, 我们把两个蛋白包被到 ELISA 板上作为抗原来确定血清对 R150-GST 和 R185-GST 蛋白混合物的反应。使用与前面同样的血清本来检测针对混合重组 Rta 蛋白 (定义为 IgG-R₁₅₀₊₁₈₅) 的 IgG 抗体: 实验结果显示在图 6 和表 1。在这项测试中 ELISA 截断点的 OD 值被定在 0.33。51 个 NPC 血清中 42 个 (82.3%) 对合并 Rta 蛋白有阳性反应, OD 平均±标准偏差值为 1.41±0.92 (表 1)。与此相反, 47 个健康志愿者中只有 5 个 (10.6%) 和 115 个对照组中的 17 个 (14.8%) 对 IgG-R₁₅₀₊₁₈₅ 呈阳性 (P<0.01), 两组平均 OD 值分别为 0.15 和 0.22 (P<0.01; 表 1)。在血清样本中检测了针对 R150-GST 和 R185-GST 合并蛋白的 IgA 抗体的存在 (定义为 IgA-R₁₅₀₊₁₈₅)。51 个 NPC 血清中 26 个 (51.0%) 对 IgA-R₁₅₀₊₁₈₅ 呈阳性反应 (截止点, 0.12), 但对对照组合健康组都没有显示任何一例阳性 IgA 抗 Rta 反应 (P<0.01; 表 1)。

讨论

我们在先前的研究中已经证明鼻咽癌患者血清中对抗 EBV 立即早期基因产物 Rta 蛋白的 IgG 抗体水平比较正常对照人有显著性的增高, 这一发现提示测定血清 Rta 蛋白的 IgG 抗体可以发展成为 NPC 的诊断参数¹³。在体

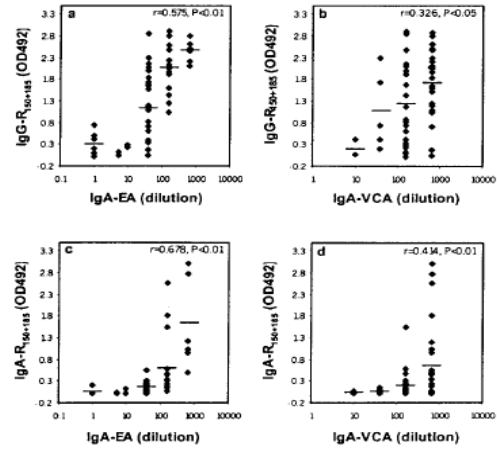


图7. 免疫球蛋白G抗体 (IgG-R1501185) 和免疫球蛋白A抗体 (IgA-R1501185) 对两个GST重组蛋白ELISA 反应与 IgA-EA, 或IgA-VCA在NPC血清中滴度的相关性。(a) IgG-R1501185 与 IgA-EA比较(b) IgG-R150-185与IgA-VCA的比较. (c) IgA-R150-185与 IgA-EA的比较. (d) IgA-R150-185与IgA-VCA的比较. 四对比较的结果均为正相关。

针对EB病毒裂解基因的IgA抗体产品, EA和VCA是目前使用的诊断NPC的血清参数。我们使用IFA检测了51个NPC血清和115个对照血清中IgA抗体滴度对EA和VCA的反应, 结果总结在表1。与IgG-R₁₅₀₊₁₈₅相比 (P>0.05), 84.3%的鼻咽癌患者IgA-EA呈阳性, 但只有1.7%的对照血清阳性, 显著低于同组的IgG-R₁₅₀₊₁₈₅ 阳性率 (P<0.01)。96.1%的鼻咽癌患者IgA-VCA呈阳性, 明显高于IgG-R₁₅₀₊₁₈₅ (P<0.01), 而对照组阳性率为31.3%, 显著高于R₁₅₀₊₁₈₅。R₁₅₀₊₁₈₅和 IgA-EA的ELISA OD值的相关性为 (相关系数 [r] = 0.575; P<0.01), 而R₁₅₀₊₁₈₅和IgA-VCA为 ([r]=0.326; P<0.05) (图7)。IgA-R₁₅₀₊₁₈₅ 与 IgA-EA 正相关 ([r]=0.678; P<0.01), 也与 IgA-VCA 正相关 ([r]=0.414; P<0.01; 图7)。

外转录实验中, 放射性标记的Rta可以用作免疫沉降法检测。但这种方法效率又低又昂贵, 免疫沉降法本身操作复杂, 难于量化¹³。因此本研究的目的是发展一个ELISA方法检测抗Rta抗体的技术。

在222氨基酸内Rta的抗原区定位在C-端的两个抗体结合区：R150I和R150C。所有能识别R222C的血清也能与内侧的主干型R150I发生反应，但只有部分血清能与位于C-端的主干型R150C发生反应。根据这些结果，R150I可作为R222C的替代部，而Rta的另一个片段，R185I能够结合抗体，这个作用在以前的文章中也曾描述过¹³。由大肠杆菌产生的重组融合蛋白具有Rta的抗原性，这也和以前的报道相吻合^{21, 22}。本研究的结果也证明融合蛋白的GST段在血清中不发生任何反应，因此没有把它从重组的蛋白片段中去掉。

纯化的R150-GST和R185-GST用来包被ELISA酶标板用于检测特异性的抗Rta抗体。为了进一步鉴别这两个抗原识别的抗体的性能，使用ELISA方法分别对针对R150-GST和R185-GST的IgG抗体进行检测。结果显示IgG抗体对两个蛋白质都有反应而且强烈。所以联合使用这两个Rta蛋白片段检测抗体会增加ELISA方法的敏感度。在本研究对NPC血清样本所作的检测中，IgG-R150+185检出阳性率为82.3%，在健康志愿者中阳性率仅为10.6%，在患有其他疾病的对照组病人中阳性率为14.8%。对IgA抗体的检测发现，NPC血清样本中IgA-R150+185检出阳性率为51.0%，而健康志愿者和患有其他疾病的对照组病人中阳性率为0。

传统的血清学检测NPC使用IgA-EA和IgA-VCA，因为他们具有相对较高的灵敏度

和特异性，但是所用的IFA方法很不方便。曾经做出很大努力设法使用简便的ELISA技术代替IFA技术，但都失败了，因为不能达到相应的灵敏度和特异性^{18,19}。而用Rta蛋白为抗原使用ELISA方法就总能在NPC检测到相应的抗体¹³。与EA和VCA相似，Rta在EBV裂解期复制表达，对抗体的反应应该有相似的表现。本文的实验结果不但证实了这一设想，而且揭示两种方法有很好的相关性。虽然IgG-R150+185对NPC检测的灵敏度与IgA-EA相当，但其特异性较低，因而在诊断鼻咽癌应用上IgG-R150+185似乎不能完全代替IgA-EA。然而重要的是虽然大多数NPC血清对EA和Rta的反应相当，但仍有12%的血清仅对其中一种起反应，这说明IgG-R150+185和IgA-EA两种指标有互补性。因此在NPC的血清学诊断方面，使用ELISA方法更为方便和可靠，并且联合检测IgG-R150+185和IgA-EA会更有利。还有就是为了NPC的筛查和临床诊断，临床实验室需要检测大量的血清，本文介绍的ELISA方法能大大减轻工作量。无论如何，对阳性结果的解释要十分的谨慎。最后，IgG-R150+185在监测NPC病人的治疗效果方面的有效性还有待进一步的研究。

本研究的初步结果显示，在EBV Rta蛋白中的多个抗原区和对各区的液态免疫反应是明显的和互补的。使用ELISA方法，无论是单独测定血清中IgG-R150+185水平还是联合测定IgG-R150+185和IgA-EA，都是有助于鼻咽癌诊断的有效的血清学检测指标。

参考文献:

1. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology, 3rd ed, vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:2397-446.
2. Henle G, Henle W. Epstein-Barr virus specific IgA serum antibody as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1976;17:1-7.
3. Vokes EE, Liebowitz DN, Weichselbaum RR. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 1997;350:1087-91.
4. De-Vathaire F, Sancho-Garnier H, De-The H, Pieddeloup C, Schwaab G, Ho JHC, et al. Prognostic value of EBV markers in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma (NPC): a multi-center follow-up study. *Int J Cancer* 1988;42: 176-81.
5. Wolf H, Zur-Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature* 1973;244: 245-47.
6. Huang DP, Ho JHC, Henle W, Henle G. Demonstration of Epstein-Barr virus associated nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies. *Int J Cancer* 1974;14:580-8.
7. Rabb-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986;47:883-89.
8. Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol* 1992;66:2689-97.
9. Trumper PA, Epstein MA, Giovannella BC, Finerty S. Isolation of infectious EB virus from the epithelial tumor cells of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1977;20:655-62.
10. Lo YMD, Chan LYS, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan ATC, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:1188-91.
11. Feng P, Ren EC, Liu D, Chan SH, Hu H. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. *J Gen Virol* 2000;81:2417-23.
12. Parkin DM, Stiemsward J, Muir CS. Estimates for the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull WHO* 1984;62: 163-82.

胡怀忠：“Rta-A New Serologic Parameter for Diagnosis” 译文

13. Littler E, Baylis SA, Zeng Y, Conway MJ, Mackett M, Arrand JR. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by means of recombinant Epstein-Barr virus proteins. *Lancet* 1991;337:685-9.
14. Gan YY, Fones-Tan A, Chan SH, Tsao SY, Li B, Tan WH. Molecular cloning and expression of Epstein-Barr virus antigens in the lambda gt11 expression vector: antibodies towards proteins from the BORF2 and BKRF4 reading frames in nasopharyngeal carcinoma patients. *Intervirology* 1994;37:233-5.
15. Uen WC, Luka J, Pearson GR. Development of an enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for detection IgA antibodies to the Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* 1988;41:479-82.
16. Yip TTC, Ngan RKC, Lau WH, Poon YF, Joab I, Cochet C, et al. A possible prognostic role of immunoglobulin-G antibody against recombinant Epstein-Barr virus BZLF-1 transactivator protein ZEBRA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1994;74:2414-24.
17. Foong YT, Cheng HM, Sam CK, Dillner J, Hinderer W, Prasad U. Serum and salivary IgA antibodies against a defined epitope of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA) are elevated in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1990;45:1061-4.
18. Liu MY, Chang YL, Ma J, Yang HL, Hsu MM, Chen CH, et al. Evaluation of multiple antibodies to Epstein-Barr virus as markers for detecting patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Med Virol* 1997;52:262-9.
19. Chan SH, Soo MY, Gan YY, Fones-Tan A, Sim PS, Chew CT. Epstein-Barr virus (EBV) antibodies in the diagnosis of NPC—comparison between IFA and two commercial ELISA kits. *Singapore Med J* 1998;39:263-5.
20. Feng P, Chan SH, Ooi EE, Soo MYR, Loh KS, Wang D, et al. Elevated blood levels of soluble tumor necrosis factor receptors in nasopharyngeal carcinoma: correlation with humoral immune response to lytic replication of Epstein-Barr virus. *Int J Oncol* 1999;15:167-72.
21. Thomas LM, Huntington PJ, Mead LJ, Wingate DL, Rogenson BA, Lew AM. A soluble recombinant fusion protein of the transmembrane envelope protein of equine infectious anemia virus for ELISA. *Vet Microbiol* 1992;31:127-37.
22. McCauliffe DP, Yin H, Wang LX, Lucas L. Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60 kDa Ro (SSA) proteins. *J Rheumatol* 1994;21:1073-80.