

142-146

6046(5)

第8卷第2期  
1993年6月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol.8 No.2  
Jun, 1993用PCR技术检测活检组织和鼻咽  
上皮细胞内EB病毒基因

汪慧民 陈军 吴秋良\* 简少文 李满枝 吴荫棠

(中山医科大学肿瘤研究所, 广州 510060)

提 要

R373.11

选用 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 基因组内部重复序列 1 (IR1) 片断作为多聚酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增引物, 用于检测了 31 例不同病例活检组织和 4 例新鲜鼻咽组织经体外培养 6 周以上的新生上皮细胞内 EBV 基因, 其中检出 EBV DNA: 高分化鼻咽癌 5/5, 低分化鼻咽癌 4/4, 何杰金氏病 5/5, 非何杰金氏病 0/2, 头颈其他肿瘤 1/6, 鼻咽慢性炎症 0/5, 正常鼻咽组织 0/4; 新生上皮细胞 DNA 抽提物; 低分化鼻咽癌 2/2, 炎症 0/1, 正常人胚鼻咽上皮 0/1; 携带 EBV 基因组细胞系 (Raji, B<sub>1</sub>, -3 各 1) 2/2, 致淋巴细胞转化之 B<sub>95-1</sub> 病毒为 10<sup>-4</sup>, PCR 检测 10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup> 均阳性, 10<sup>-7</sup> 未检出。结果表明 EBV 与鼻咽癌与何杰金氏病有关, 常规石蜡包埋切片仅 8<sup>μ</sup>m × 0.1mm<sup>2</sup>, 贮存时间至三年仍可用于 PCR 检测 EBV DNA, 证实 PCR 是一种快速、灵敏和特异检测 EBV 基因组的方法, 可作为肿瘤和疾病病毒病因回顾性调查研究的有力手段。

关键词: EB病毒 鼻咽癌 何杰金氏病 多聚酶链反应

聚合酶链反应 鼻咽癌

EB 病毒 (Epstein-Barr Virus EBV) 是一种广泛存在的人类疱疹病毒, 可引起活动性与潜伏性感染, 除与传染性单核细胞增多症、免疫缺损致死性淋巴组织增生病、AIDS 患者口部“毛”状白斑病等有关外, 还与 Burkitt's 淋巴瘤, 鼻咽癌 (Nasopharyngeal Carcinoma NPC) 有关, 近来已提出与何杰金氏病 (Hodgkin' Disease, HD) 发病有关<sup>[1-4]</sup>。

电镜发现几乎所有 EBV 颗粒的结构都是有缺陷的, 迄今尚无有效的培养系统, 病毒感染力只能用人和其他灵长类的淋巴细胞转化试验检测, 在这些细胞中, 病毒产量也很低, 因而对于 EBV 感染的诊断, 一般是基于血清学证据, 而血清学只是感染的间接标志, 当抗体免疫低下时, 则很难于用血清学结果解析, 近年已发展用 EBV 核酸探针作分子杂交检测人体内病毒 DNA, 由于其敏感性和要求一定条件的组织标本, 如组织内 EBV 基因组的拷贝数很低等, 都受到一定限制。本文用多聚酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术成功地检测了 NPC、HD 等活检组织中 EBV DNA, 证明该法有其优越性和说明问题的独特性。

本文于 1992 年 8 月 19 日收到, 11 月 21 日修回。

\* 中山医科大学肿瘤医院病理科

本文承蒙本校微生物教研室郭辉玉教授指正, 特此致谢!

## 材料和方法

### 一、标本来源

1. 病理切片: 经病理确诊的低分化和高分化 NPC, 非何杰金氏病, 头颈其他肿瘤, 慢性鼻咽粘膜炎症和正常人鼻咽活检组织, 以及 HD 淋巴结组织, 常规福尔马林固定, 石蜡包埋, 组织块 0.1~0.5mm<sup>2</sup>, 厚 8μm, 其中 2 例低分化 NPC 为 1989 年保存的石蜡组织块, 余均为 1992 年 3~5 月包埋组织。

2. 体外培养了鼻咽活检新生上皮细胞: NPC 低分化鳞癌 2 例, 鼻咽炎症 1 例, 正常人胚鼻咽 1 例。

3. 纯化 EBV-B<sub>95-1</sub> 病毒: 致淋巴细胞转化滴度 10<sup>-4</sup>。

携带 EBV 基因组细胞系: Raji 和 B<sub>95-1</sub>。

### 二、DNA 抽提

取上述各种病例石蜡包埋组织各一片, 分别放入 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 二甲苯脱蜡, 无水乙醇脱水。70% 乙醇除去残留杂物, 干燥后, 加 TE 缓冲液 500μl, 再加蛋白酶 K 至 300μg/ml, 42℃ 作用 24 小时, 加入 0.5% SDS, 37℃ 3 小时, 酚抽提 DNA, 乙醇沉淀, 溶于 100μl TE。

### 三、DNA 扩增

1. 选择 EBV 基因组的内部重复序列 1 (IR1) 的 Bam H1 W 片段, 寡核苷酸 5'CCAGACA-GCAGCCAATTGTC' 3、5'GGTAGAAGACCCCTCTTAC'3 作引物对, 进行酶扩增。

2. PCR 扩增反应: PCR 扩增仪型号为 Perkin-cetus DNA Thermal Cycler 480。在 0.5ml Eppendorf 管内进行, 模板 DNA 为上述抽提的标本液及对照液, 每种 2μl, 一对引物各为 25P mol/L, 加入 4 种 dNTP, 每种 200μmol/L, 94℃ 作用 5 分钟, 加入 Taq DNA 多聚酶 (上海细胞生物所产) 2.5U/100μl (0.5μl) 混匀后, 液面加入 300μl 石蜡油, 防止水分蒸发, 扩增反应进行 30 个循环 (94℃ 1 分钟变性, 50℃ 1 分钟退火, 72℃ 1 分钟 30 秒延伸), 最后一次延伸为 72℃ 5 分钟。

3. 凝胶电泳分析扩增产物: 经上述方法扩增的产物及标准 marker 各取 60μl 在 2% agarose 上进行电泳, 溴化乙锭染色, 紫外光下观察, 分析结果, 每次检测均设有已知阳性与阴性对照。

## 结果

### 一、特异性检测(表 1)

1. 应用人乳头瘤病毒 (Human Papilloma Viruses, HPV) 通用引物对 EBV-B<sub>95-1</sub> 细胞及抽提的 DNA 进行扩增反应, 未出现任何扩增带。

2. 用本引物对扩增 B<sub>95-1</sub> 病毒 DNA 及携带 EBV 基因组之细胞系 (Raji 及 B<sub>95-1</sub>) 均有一条阳性扩增带出现,

表 1 PCR 特异性检测  
Table 1. Specific Detection of PCR

淋巴细胞转化试验 Lymphocyte transformation test	PCR 结果 PCR Result	
	EBV-Bam H1 W	HPV 引物
EBV-B <sub>95-1</sub>	10 <sup>-4</sup> (+)	+(129bp)
	10 <sup>-5</sup> (+)	+(129bp)
	10 <sup>-6</sup> (+)	+(129bp)
	10 <sup>-7</sup> (+)	—
B <sub>95-1</sub> 细胞 B <sub>95-1</sub> cell	ND	+(129bp)
正常人胚鼻咽上皮细胞 Normal Human embryonic nasopharyngeal epithelial cells	ND	—

位于 129bp 处, 正常胚鼻咽上皮细胞 DNA 抽提物无任何扩增带出现。由表 1 可见, 此 EBV 引物沉淀带具特异性, 且灵敏度高。

二、体外培养鼻咽上皮细胞 EBV-DNA 扩增, 培养六周以上新生的上皮细胞, 结果列表 2。

表 2 鼻咽组织体外培养新生上皮细胞 PCR 检测  
Table 2. Detection of in vitro Nasopharyngeal Tissue Regenerative Epithelial cells by PCR

上皮细胞来源 Epithelial sources	EBV DNA(+)数/标本数 No. containing EBV DNA/sample No.
低分化 NPC Poorly differentiated NPC	2/2
鼻咽粘膜炎症 Chronic inflammatory nasopharynx	0/1
正常人胚鼻咽 Normal human embryonic nasopharyngeal epithelial cells	0/1

三、各种不同病例常规石蜡包埋组织切片 EBV-DNA 扩增, 共 31 例提取 DNA 进行 PCR 检测。结果如表 3。

表 3 不同病例石蜡切中 EBV DNA 的 PCR 检测  
Table 3. Detection of EBV DNA extracted from Paraffin Blocks by PCR

诊 断 Diagnosis	活检组织 Biopsied tissues	EBV DNA(+)数/活检数 No. containing EBV DNA/sample No.
高分化 NPC Differentiated NPC	鼻 咽	5/5
低分化 NPC Poorly differentiated NPC	鼻 咽	4/4
头颈部其他肿瘤 Other head & neck tumors	鼻 咽	1/6
何杰金氏病 Hodgkin's disease (混合细胞型) (Mixed cellularity)	淋巴结	5/5
(淋巴细胞稍减型) (Lymphocyte depletion)		4/5
非何杰金氏病 Non-Hodgkin's lymphoma		1/5
鼻咽粘膜慢性炎症 Chronic inflammatory nasopharynx		0/2
正常鼻咽组织 Normal nasopharyngeal tissue		0/5
EBV-B <sub>19</sub> -s 细胞 EBV-B <sub>19</sub> -s cells		0/4
正常人胚鼻咽上皮细胞 Normal human embryonic nasopharyngeal epithelial cells		1/1
		0/1

扩增产物电泳分析结果如图版 VII 1。阳性扩增带均在 129bp 处。

## 讨 论

PCR 扩增靶序列选用 EBV 基因组的 IR1, 主要基于<sup>[1]</sup>, 第一, 此区段含有 7~12 个相同序列 (W 片段) 其敏感性要比此病毒基因组其他的独特单一序列为高, 第二, IR1 是高度保守的, 适于作为 EBV DNA 中同源核苷酸序列, 不会因为靶序列的缺失或异源性而引起假阴性结果。已知在 IR1 内某些核苷酸片段同于其它病毒的 DNA, 如 Papova 组病毒的起始序列<sup>[6]</sup>, 为排除 EBV 靶序列与其 DNA 的交叉反应, 我们首先将所合成的引物与 HPV 通用引物均用于扩增 EBV-B<sub>95-1</sub> 细胞, 未发现二者有任何同源序列。

最近有文献报道采用福尔马林固定, 石蜡包埋活检组织进行 PCR 检测, 取得良好结果<sup>[6,7]</sup>。本文收集的 31 份活检切片, 均系常规福尔马林固定, 石蜡包埋的, 仅 8 $\mu$ m $\times$ 0.1—0.5mm<sup>2</sup> 即可用作 PCR 检测, 并选用了 1989 年 3 月和 1992 年 3~5 月保存的低分化 NPC 各 2 例石蜡包埋块进行比较, 二者均可检出 EBV DNA, 所获结果无差异, 证实常规石蜡组织块贮存至三年仍可用 PCR 方法检测 EBV DNA, 为对 NPC、HD 的病因学及其它肿瘤病毒病因作回顾性调查研究提供了丰富标本来源及实验方法。

检测 NPC 11 例, 其中 5 例高分化, 6 例低分化鳞癌中 4 例为活检组织及 2 例新鲜组织块新生的上皮细胞, 均检出有 EBV DNA 存在, 特别后者, 细胞经培养 6 周以上时间, 其间又不断换液, 完全可排除淋巴细胞存在带来的干扰, 由此证实 NPC 发生与 EBV 关系密切, 5 例高分化 NPC 经重复检测仍为阳性, 因临床病例少, 未取到鼻咽活检作上皮细胞培养, 虽不能完全排除标本内浸润有淋巴细胞而引起阳性反应, 但与 Pagano<sup>[8]</sup>和 Hawkin's<sup>[9]</sup> 等报道高分化 NPC 的癌细胞含有 EBV DNA 相符, 可能因 PCR 法敏感, 癌细胞中存在的 EBV 拷贝可经扩增而检出率增高。

值得注意的是, 我们检测了 5 例 HD 病人淋巴结, EBV DNA 均为阳性, 为排除切片操作时可能的污染, 又重做, 每切一例标本后, 均仔细处理刀片, 抽提, 扩增后这 5 例仍全部阳性, 5 例中 4 例混合细胞型, 1 例淋巴细胞稍减型, 实验结果表明这两型发病与 EBV 有关。已知何杰金氏病是一种以淋巴增殖性紊乱为特点的疾病, 国外最近报道提出 EBV 可能参与 HD 的致病作用, 流行病学已表明该病可能由 EBV 感染引起<sup>[2,10]</sup>, 由于当前检测方法不够敏感, 以及组织标本中缺乏恶性细胞, 已造成 HD 病人组织内检测 EBV DNA 的困难, 有关这方面的报道国内甚为罕见, 特别是应用 PCR 技术检测尚未见报道, 国外报道 HD 中 EBV DNA 约有 30~60% 为阳性, 我们用 PCR 检测虽全部阳性, 由于病例和型别所限, 尚需进一步探索。对非何杰金氏病仅作两例, 均阴性, 与 Hisashi 等报道<sup>[11]</sup>其 EBV DNA 低是一致的。

## 参 考 文 献

- (1) Weiss L, et al., 1987, *Am. J. Pathol.*, 129: 86—91.
- (2) Mueller N., 1987, *Yale J. Biol. Med.*, 60: 321—332.
- (3) Weiss MD, et al., 1989, *Am. J. Surg. Pathol.*, 13(8): 626—631.
- (4) Ooka T., 1985, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 39: 59—66.
- (5) Cheung A, et al., 1982, *J. Virol.*, 44: 286—294.

- (6) Stephen C. et al., 1990, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, V. 114: 711—714.  
 (7) Anna-Luise A. et al., 1990, *Modern Pathology*, V. 3(4): 435—441.  
 (8) Joseph S. et al., 1984, *Medical Virology III* by Elsevier Science Publishing, PP. 189—191.  
 (9) Hawkins E. et al., 1980, *Pathology*, V. 21: 805—810.  
 (10) Herbst H. et al., 1990, *Am. J. Pathol.*, 137: 13—18.  
 (11) Hisashi U. et al., 1990, *Jpn. J. Cancer, Res.*, 81: 272—278.

## Detection of Epstein-Barr Virus Gene in Biopsied Tissue and Nasopharyngeal Epithelial Cells by Polymerase Chain Reaction

Wang Huimin Chen Jun Wu Qiuliang  
Jian Shaowen Li Manzhi Wu Yintang

(Cancer Institute, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

The amplifying target sequence for Polymerase Chain Reaction (PCR) was chosen within the Internal Repeat I (IR1) of EBV genome. We used PCR of the primers to detect 31 biopsied specimens of different disease and 4 nasopharyngeal epithelial cultures. EBV genomes were detected in differentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) biopsies 5/5, poorly differentiated NPC 4/4, Hodgkin's Disease (HD) 5/5, non-Hodgkin's Disease (NHD) 0/2. Other head and neck tumors 1/6, chronic inflammatory nasopharyngeal 0/5, normal nasopharyngeal epithelial 0/1. The cell lines (Raji & B<sub>95-3</sub>) contain EBV genome 2/2, while the lymphocyte-transforming dose of EBV (B<sub>95-3</sub>) virions was 10<sup>-4</sup> their dilution to 10<sup>-1</sup> and 10<sup>-6</sup> could be found positive by PCR. This method confirmed that EBV was closely associated to the carcinogenesis of NPC and HD (mixed cellularity lymphocyte type and lymphocyte depletion type). Our study further demonstrate that DNA extracted from preserved paraffin blocks can be used for DNA extraction and amplification by PCR with high sensitivity and speciality, therefore, this method could be used in retrospective studies for viral pathogenicity of human tumors and diseases.

**Key words,** Epstein-Barr virus Nasopharyngeal carcinoma Hodgkin's disease Polymerase chain reaction