

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)21-1932-02

胃癌患者 EB 病毒感染与 Cyclin D1 基因表达的相关性

李淑英¹, 张科², 周天戟¹ (华北煤炭医学院¹ 生物科学系微生物学科² 成人教育学院函授科 河北唐山 063000)

Relativity between EBV infection and expression of Cyclin D1 in gastric carcinoma patients

Li Shu-Ying¹, ZHANG Ke², ZHOU Tian-Ji¹¹Department of Microbiology, ²Department of Correspondence in Adult Education College, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

【Abstract】 AIM: To investigate the relativity between the Epstein-Barr Virus (EBV) infection and the expression of Cyclin D1 in gastric carcinoma (GC) patients. **METHODS:** EBER₁ in 217 cases of GC was detected with *in situ* hybridization. Then, EBV positive and negative GC cases were selected for analysis of the expression of Cyclin D1 by immunohistochemistry. **RESULTS:** In 217 GC cases there were 23 cases with EBER₁ positive expression. The expression of Cyclin D1 was higher in the EBV positive GC than that in the EBV negative ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** EBV infection in GC may upregulate the expression of Cyclin D1.

【Keywords】 herpesvirus 4, human; stomach neoplasm; oncogene protein

【摘要】目的:研究胃癌患者癌组织中 EB 病毒(EBV)感染与 Cyclin D1 表达的关系。方法:原位杂交法检测胃癌患者石蜡标本中 EBV 编码的小 RNA(EBER₁);免疫组化法检测 EBV 阳性胃癌[EBV(+)]及 EBV 阴性胃癌[EBV(-)]标本细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达状况。结果:胃癌患者癌组织标本 217 例中 23 例 EBER₁(+);EBV(+)组 Cyclin D1 蛋白表达显著高于 EBV(-)组($P < 0.01$)。结论:EBV 感染可能上调 Cyclin D1 表达。

【关键词】 疱疹病毒 4 型 人;胃肿瘤;癌基因蛋白质类

【中图分类号】 R735.2 **【文献标识码】** A

0 引言

EB 病毒(EBV)可诱发癌基因突变导致肿瘤的发生。如鼻咽癌、机会性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤等。有研究认为,EBV 感染与胃癌的发生密切相关,但机制

未明。我们探讨唐山地区 EBV 感染与胃癌患者细胞周期素 Cyclin D1 表达的相关性如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2001/2003 唐山市工人医院胃癌手术切除标本 130 例;唐山市开滦医院胃癌手术切除标本 47 例;遵化市人民医院(2003)胃癌手术切除标本 21 例;华北煤炭医学院附属医院(2004)胃癌手术切除标本 19 例。标本 HE 染色后行组织病理学观察并做出诊断。同时取相应癌旁组织作对照。

1.2 方法 采用美国 PanPath 公司生产的 EBER₁ 原位杂交试剂盒进行原位杂交:石蜡切片经二甲苯脱蜡,乙醇梯度水化,胃酶消化后,与地高辛标记的 EBER₁ 寡核苷酸探针(地高辛标记的 EBER₁ 寡核苷酸探针,包括 antisense 探针 5'-AGACACCGTCCTAC-CACCCGGGACTTGTA-3'; sense 探针:5'-TCTGTG-GCAGGAGTGCTGGCCCTGAACAT-3')进行杂交反应,洗去剩余探针,用碱性磷酸酶标记地高辛抗体孵育,NBT/BCIP 液显色,甲基绿复染,中性树胶封片,镜检观察。EBER₁(+)细胞核呈深蓝色,在核内及核仁中均可见 EBER₁ 表达,而 EBER₁(-)细胞不着色呈甲基绿复染的颜色。采用 Power Vision™ 二步法免疫组化法检测 Cyclin D1 蛋白的表达。使用的 Cyclin D1 鼠抗人 mAb 购自北京中山生物技术有限公司。在染色切片上于细胞核见到均匀棕黄色颗粒分布判为阳性(+),阴性结果不显色,经苏木精复染后,细胞核显示复染的蓝色,对每例切片随机地在 100 倍显微镜下取 10 个视野,录入 GD-6 多媒体彩色图像分析系统,测定 Cyclin D1 蛋白表达的平均面积(average area, AA)、平均光密度(mean optical density, MOD)、积分光密度(integral optical density, IOD)值。

统计学处理:以 Excel 建立数据库,应用 SPSS 11.0 统计分析软件进行统计学分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

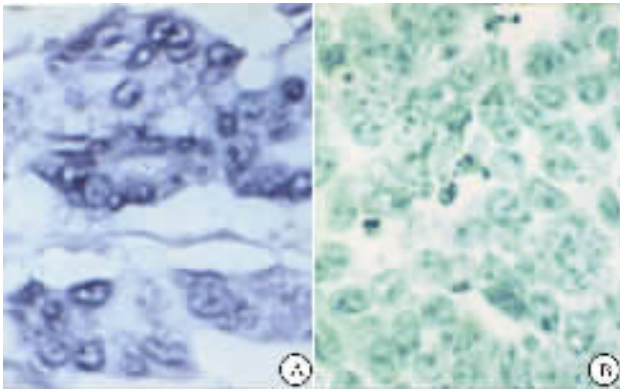
2.1 EBER₁ 原位杂交 EBER₁ 阳性信号几乎表达

收稿日期 2005-12-19; 接受日期 2006-03-09

基金项目 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司函 2000 1479)

通讯作者 李淑英, 硕士, 副教授, Tel (0315) 3725918 Email zhangke-shuying@sina.com

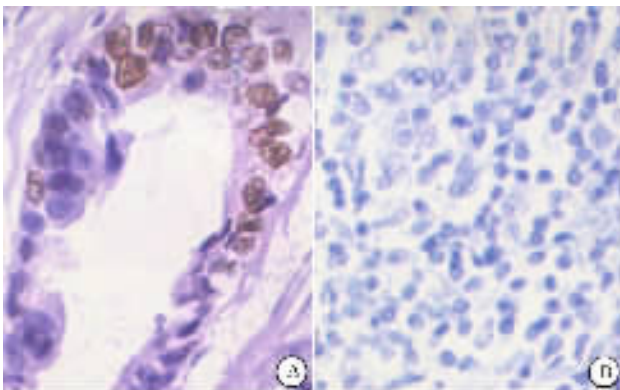
在所有癌细胞中,阳性信号表达有的可见癌细胞核,核仁,而 EBER₁(-)细胞不着色呈复染的绿色(图1)。217例胃癌组织标本检测到23例 EBER₁(+)阳性率为10.6%。相应癌旁组织均未检测到EBV感染,二者 EBER₁阳性率有差异($\chi^2=24.2, P<0.01$)。



A 阳性 B 阴性。

图1 胃癌组织 EBER₁ 表达 ISH ×200

2.2 免疫组化染色 Cyclin D1(+)细胞在染色切片上于细胞核呈棕黄色颗粒,阴性结果不显色,经苏木精复染后,细胞核呈复染的蓝色(图2)。23例 EBV(+)标本有 Cyclin D1 表达 21例(91.3%),194例 EBV(-)标本有 Cyclin D1 表达 160例(82.5%),两者相差显著($P<0.01$,表1)。



A 阳性 B 阴性。

图2 胃癌组织 Cyclin D1 表达 IHC ×200

表1 胃癌组织中 Cyclin D1 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AA	MOD	IOD
EBV(+)	23	54.5 ± 12.2	7.4 ± 0.9	2.9 ± 0.7
EBV(-) ^b	194	38.0 ± 11.5	4.6 ± 1.5	1.7 ± 0.8

^b $P<0.01$ vs EBV(+). AA:平均面积;MOD:平均光密度;IOD:积分光密度。

3 讨论

在 EBV 与胃癌相关性研究中,认为胃癌细胞内存在 EBER₁者为 EBV(+).本研究217例癌组织标本,有23例癌组织细胞核内及核仁中有 EBER₁(+),而癌旁正常组织无 EBER₁表达,提示 EBV 感染与胃癌发生有密切关系。EBV 感染发生在胃癌形成早期,感染 EBV 的肿瘤细胞单克隆增生,从而导致 EBV(+)组织中几乎所有癌细胞均有 EBER₁表达。

大量研究资料证实^[1-4]在生理状态下,细胞进入 S 期后,Cyclin D1 迅速分解。如果 Cyclin D1 基因激活,Cyclin D1 持续高表达,将导致 G1 期缩短,提前进入 S 期,使细胞增殖失控,最终形成肿瘤;并且 Cyclin D1 在差分化型胃癌中的阳性表达率明显高于分化型,即胃癌的分化程度越差,Cyclin D1 表达越高,细胞增殖越快。在胃癌发展不同阶段,Cyclin D1 表达随胃癌恶性程度的增强,基因的异常表达有增强的趋势,提示 Cyclin D1 在胃癌的发生、发展及癌变过程中起重要作用。本研究中,23例 EBV(+)胃癌癌组织 Cyclin D1 表达阳性 21例,Cyclin D1(+)率为 91.3%,EBV(-)组阳性率为 82.5%;免疫组化图像分析结果显示,EBV(+)中 Cyclin D1 蛋白的 AA、MOD 和 IOD 均显著高于 EBV(-)组;提示 EBV 感染可能导致 Cyclin D1 蛋白高表达,使细胞周期失控,导致肿瘤的发生。Dittmer 等^[5]报道,某些病毒能在宿主细胞主动编码内源性 cyclin,称为病毒编码的 cyclin(v-cyclin),v-cyclin 不仅有宿主细胞 G1 期 cyclin 的特点,而且能使细胞周期失调,v-cyclin 表达可逆转很多细胞因子引起的 G1 期阻滞,甚至促进 G0 期细胞进入细胞周期。v-cyclin 与细胞周期调节因子之间可能有相互作用,与病毒的生存和宿主细胞分裂、分化及恶性转化密切相关。可以推测,EBV 感染宿主细胞后,EBV 编码的 Cyclin D1 与宿主细胞内源性 Cyclin D1 同源,引起胃黏膜上皮细胞 Cyclin D1 高表达,使细胞周期异常,导致肿瘤的发生与发展。

【参考文献】

- [1] 周斌,胡晓莺,张淮,等.小鼠前胃癌变黏膜中 EGFR, Cyclin D1, VEGF 表达的相互关系[J].第四军医大学学报,2003,24(11):990-992.
- [2] 吴继锋,绍晋晨,王道斌,等.细胞周期调控因子在胃癌组织中的表达及意义[J].癌症,2005,24(2):175-179.
- [3] 刘红,刘倩,王文奇.胃癌组织中 CyclinD1 和 VEGF 的表达及意义[J].实用肿瘤杂志,2004,19(1):27-29.
- [4] 杨玉珍,黄曼玲,李小兰,等.细胞周期蛋白在胃肠癌中的表达及临床意义[J].胃肠病学和肝病学杂志,2005,14(4):394-397.
- [5] Dittmer DP. Transcription profile of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in primary Kaposi's sarcoma lesions as determined by real-time PCR arrays[J]. Cancer Res, 2003, 63(9):2010-2015.