

10.3779/j.issn.1009-3419.2000.04.07

EBV 感染、p53、Bcl-2、C-myc 基因表达与肺癌关系研究

夏和顺 吴建平 陈春梅 毛永荣 朱剑 常青 糜克永 赵军理 张明和

【摘要】 目的 研究肺癌组织中 EBV 感染率以及 p53、Bcl-2 和 C-myc 基因的表达,分析 EBV 和 p53、Bcl-2、C-myc 基因表达的关系。方法 检测 48 例手术切除肺癌标本,18 例癌旁支气管粘膜组织,2 例肺转移平滑肌肉瘤,1 例结核瘤,14 例正常肺组织中 EBV DNA 及 p53、Bcl-2、C-myc 基因表达。用 PCR 法检测新鲜组织的 EBV DNA,间接原位 PCR 法观察 EBV 阳性信号在细胞中的反应部位,免疫组化(SABC)法检测 p53、Bcl-2、C-myc 在肺癌中的表达。结果 25 例(52.08%)肺癌标本呈 EBV DNA 阳性,其中鳞癌的阳性率(75%)最高。EBV DNA 阳性和肺癌组织学分型有关($P < 0.01$)。癌旁支气管粘膜组织和肺组织 EBV DNA 阳性率分别为 61.11%和 28.57%($P < 0.01$)。免疫组化分析表明 p53、Bcl-2 和 C-myc 在肺癌组织中表达率分别为 54.17%、37.5%和 75%,其中 p53 和 Bcl-2 表达与组织学分型有关($P < 0.05$)。肺癌组织中 EBV DNA 阳性者的 p53、Bcl-2、C-myc 表达阳性率较阴性者明显增高($P < 0.05$)。结论 肺癌中有较高的 EBV 感染率。EBV 感染可能在肺癌的发生中起重要作用,这种作用可能是通过激活某些癌基因实现的。

【关键词】 肺肿瘤 EB 病毒 EBV DNA 病因 癌基因

【中图分类号】 R734.202;R734.204

The relationship between Epstein-Barr virus infection and expression of p53, Bcl-2 and C-myc gene in lung cancer XIA Heshun*, WU Jianping, CHEN Chunmei, MAO Yongrong, ZHU Jian, CHANG Qing, MI Keyong, ZHAO Junli, ZHANG Minghe. * Pathology Department of Hubei Cancer Hospital, Wuhan, Hubei 430079, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the infection rate of EBV and the expression of p53, Bcl-2 and C-myc gene in lung cancer, to explore the relation between EBV and oncogenesis of lung cancer, and the relation between EBV and expression of p53, Bcl-2 and C-myc. **Methods** Forty-eight cases of excised specimen of lung cancer, 2 of lung metastatic leiomyosarcoma, 1 of tuberculoma, 18 of paraneoplastic bronchial mucosa tissue, and 14 of normal lung tissue were analyzed. EBV DNA of the fresh tissue was detected with PCR, and indirect in situ PCR was used to observe the reaction site of EBV DNA, and immunohistochemistry (SABC) was used to detect the expression of p53, Bcl-2, and C-myc gene. **Results** Twenty-five cases of the 48 lung cancer had positive staining of EBV DNA and 75% of squamous cell carcinoma showed positive staining of EBV DNA. The positive staining of EBV DNA was closely related to histological classification of lung cancer ($P < 0.01$). The positive rate of EBV DNA in paraneoplastic bronchial mucosa tissues and normal pulmonary tissues was 61.11% (11/18) and 28.5% (4/14) respectively ($P < 0.01$). The positive rate of p53, Bcl-2 and C-myc expression in lung cancer tissues was 54.17%, 37.5% and 75% respectively. The expression of p53 and Bcl-2 was closely related to histological classification ($P < 0.05$). The positive rate of p53, Bcl-2 and C-myc expression in patients with positive EBV DNA was significantly higher than that in patients with negative EBV DNA ($P < 0.05$). **Conclusion** Lung cancer has high EBV infection. EBV infection may play an important role in the oncogenesis of lung cancer, which might bring about through activating some oncogenes.

【Key words】 Lung neoplasms EBV EBV DNA Pathogenesis Oncogene

作者单位:430079 武汉,湖北省肿瘤医院病理科(夏和顺、吴建平、陈春梅、毛永荣、朱剑、常青);中国科学院武汉病毒所(糜克永、赵军理);湖北省肿瘤研究所(张明和)

爱波司坦 - 巴尔病毒 (EBV) 是一种癌基因 DNA 病毒,研究认为它与某些肿瘤发生有关^[1,2],在肺癌中它主要和肺淋巴上皮样癌有关^[3,4]。肺癌的发生、演

变及恶性程度与某些癌基因激活、抑癌基因的丢失导致凋亡缺陷和受阻有密切关系,这些基因中研究较多且具重要作用的有 p53、Bcl-2 和 C-myc 等基因。本研究用分子生物学的方法对 48 例肺癌患者癌组织及其相关组织中 EBV 感染及 p53、Bcl-2 及 C-myc 基因表达及它们在肺癌发生中的作用进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 组织标本 收集 48 例肺癌患者的癌组织,同时收集 18 例癌旁支气管粘膜组织及 14 例癌旁肺组织。患者中男性 31 例,女性 17 例,年龄 34~63 岁,平均 47 岁。其中鳞癌 20 例,腺癌 22 例(包括 3 例细支气管肺泡癌),非典型性类癌 3 例,小细胞肺癌 2 例,大细胞肺癌 1 例。原发瘤直径 < 3 cm 者 4 例, > 3 cm 者 44 例。

期 26 例, 期 18 例, 期 4 例。另选 2 例肺转移性平滑肌肉瘤,1 例肺结核瘤及其支气管粘膜组织作为对照组织。

1.2 EBV DNA 的普通 PCR 检测 取新鲜组织裂解后,常规酚/氯仿提取 DNA。EBV DNA 引物参照文献^[1]的序列设计,两对引物分别为:

gp220 (BamHI L region) 5'-GGCTGGTGTCACCGGTGTA-3', 5'-CCTTAGGAGGAACAAGTCCC-3', 扩增片段长度 239 bp;

EBNA1 (BamHI W Region) 5'-GTCATCATCATCCGGGICTC-3', 5'-TTCGGGTGGAACCTCCTTG-3', 扩增片段长度 269 bp。

30 μ l PCR 反应液中,含 1 \times PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs, 1U Taq DNA 聚合酶,上、下游引物各 0.5 μ mol/L,模板 5 μ l,上覆 30 μ l 无菌矿物油。扩增程序为 94 预变性 5 分钟,94 60 秒,55 60 秒,72 60 秒,共 35 个循环,最后 72 延伸 3 分钟。反应结束后取 5 μ l PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,透射紫外仪上观察结果,在 Marker 的 237 bp 及 269 bp 附近处有 DNA 条带者为阳性。阳性对照为 B95-8 转化细胞。

1.3 间接原位 PCR 检测 用间接原位 PCR 法对普通 PCR 法检测出的 12 例 EBV 阳性和 2 例阴性肺癌病例的石蜡切片进行检测,分析 EBV DNA 在癌组织中的反应部位。将原位载玻片在 0.1 NHCl 中浸泡过夜,蒸馏水清洗,晾干,用 1% APES - 丙酮溶液处理 30 秒,丙酮中 5 分钟,晾干。组织切片厚 4 μ m,经预处理后,进行 PCR 原位扩增。100 μ l 原位 PCR 反应液中,含 1 \times PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 300 μ mol/L dNTPs, 10 U Taq DNA 聚合酶,上、下游引物各 1 μ mol/L。每张切片加 80~100 μ l 反应液,使组织切片被完全覆盖。扩增程序同普通 PCR,经 20 个循环,最后 72 延伸 10 分钟。将

1.2 中常规 PCR 扩增的特异性 EBV DNA 片段用长臂光敏生物素标记成探针,杂交探针浓度为 1 μ g/ml,AV-VP 亲合,NBT 和 BCIP 显色,核固红复染。胞核中出现黄棕色到兰黑色颗粒者为阳性。

1.4 免疫组织化学方法分析 免疫组织化学方法使用 SABC 法。p53 阳性着色为胞核呈棕黄色,Bcl-2 阳性为胞浆呈棕黄色,C-myc 阳性为细胞核或胞浆染色呈棕黄色。

1.5 统计学处理 统计方法采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 EBV DNA 普通 PCR 检测结果 48 例肺癌组织中有 25 例(52.08%) EBV DNA 阳性(图 1、2),其中鳞癌的阳性率为 75% (15/20),腺癌为 36.36% (8/22),非典型性类癌为 33.33% (1/3),大细胞肺癌为 100% (1/1),小细胞肺癌为 0(0/2)。EBV DNA 阳性率在鳞癌中较高,与其它组织类型之间(大细胞肺癌除外)的差异有显著性($\chi^2 = 6.31, P < 0.06$)。EBV DNA 阳性者中临床分期属 期者有 18 例(18/26,69.23%), 期者 6 例(6/18,33.33%), 期者 1 例(1/4,25%),不同期别间阳性率差异有显著性($P < 0.05$)。

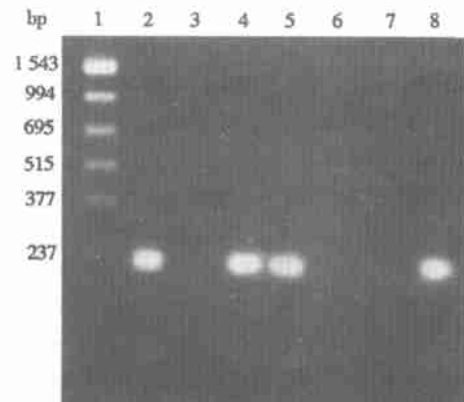


图 1 EBV P1P2 DNA 引物(BamHI L region)扩增产物电泳图

1:PCR marker;2:阳性对照;3:阴性对照;4、5、8:阳性;6、7:阴性。

Fig 1 The electrophoresis photograph of amplification product of EBV DNA P1P2 polymer(BamHI L region)

1: PCR marker; 2: positive control; 3: negative control; 4, 5 and 8: EBV DNA positive; 6 and 7: EBV DNA negative.

18 例癌旁支气管粘膜组织中,11 例(61.11%) EBV DNA 阳性,14 例癌旁肺组织中,4 例(28.57%) EBV DNA 阳性,两者之间阳性率差异有显著性($P < 0.01$)。

2 例肺转移性平滑肌肉瘤和 1 例肺结核瘤中均未发现 EBV DNA 扩增,但它们的支气管粘膜组织中 EBV DNA 呈阳性反应。

2.2 间接原位 PCR 法结果 12 例 EBV DNA PCR 阳

性病例中 10 例间接原位 PCR 呈阳性,阳性信号强弱不等,从棕黄色到兰黑色,定位于胞核中,有靠核边倾向。2 例阴性病例未发现阳性信号。

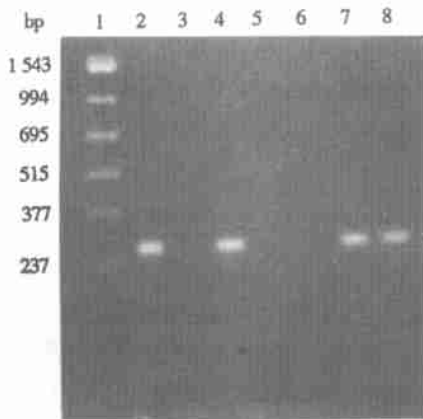


图 2 EBV P3P4 DNA 引物(BamHI W region)扩增产物电泳图
1:PCR marker;2:阳性对照;3:阴性对照;4、7、8:阳性;5、6:阴性。

Fig 2 The electrophoresis photograph of amplification product of EBV DNA P3P4 polymer (BamHI W region)

1: PCR marker; 2: positive control; 3: negative control; 4, 7 and 8: EBV DNA positive; 5 and 6: EBV DNA negative.

2.3 免疫组织化学分析结果 p53、Bcl-2 和 C-myc 免疫组织化学染色法检测结果见表 1。48 例肺癌标本中,26 例(54.17%) p53 阳性,18 例(37.5%) Bcl-2 阳性,36 例(75%) C-myc 阳性(图 3、4)。p53 和 Bcl-2 基因表达在组织学分型间差异有显著性($P < 0.01$)。p53、Bcl-2、C-myc 基因在患者性别、肿瘤大小、临床分期、淋巴结有无转移间差异没有显著性。

表 1 不同组织中 p53、Bcl-2 和 C-myc 免疫组化法分析结果

Tab 1 Comparison of p53, Bcl-2 and C-myc expression in different lung tissues

Lung tissue	N	No. of cases		
		p53 positive (%)	Bcl-2 positive (%)	C-myc positive (%)
Lung cancer	48	26(54.16)	18(37.50)	36(75)
Squamous epithelial cancer	20	14(70)	4(20)	18(90)
Adenocarcinoma	22	10(45.45)	11(50)	16(72.73)
Atypical carcinoid	3	1(33.33)	1(33.33)	2(66.67)
Large cell lung cancer	1	1(100)	0	0
Small cell lung cancer	2	0	2(100.00)	0
Bronchial mucosa	21	0	2(100.00)	0
Pulmonary tissue	14	0	2(14.28)	2(14.28)
Metastatic leiomyosarcoma	2	1(50.00)	0	0
Tuberculosis	1	0	0	0

癌旁支气管粘膜组织、肺组织,以及肿瘤间质和肺结核瘤中 p53 均呈阴性,仅 1 例(50%)肺转移性平滑

肌肉瘤 p53 呈阳性;9 例癌旁支气管粘膜组织基底细胞呈 Bcl-2 阳性,间质中淋巴组织 Bcl-2 呈阳性反应,但生发中心中淋巴母细胞呈阴性反应(图 5);C-myc 在支气管粘膜及肺组织中部分呈阳性反应。

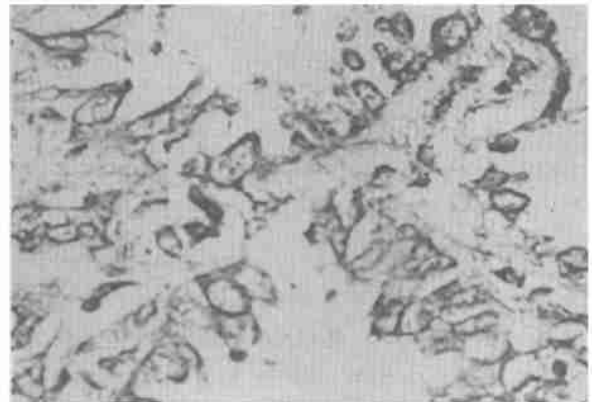


图 3 细支气管肺泡细胞癌,胞浆内 Bcl-2 阳性 x400 SABC 法

Fig 3 Alveolar-bronchial carcinoma with positive Bcl-2 protein immunohistochemical staining in cytoplasm x200 SABC

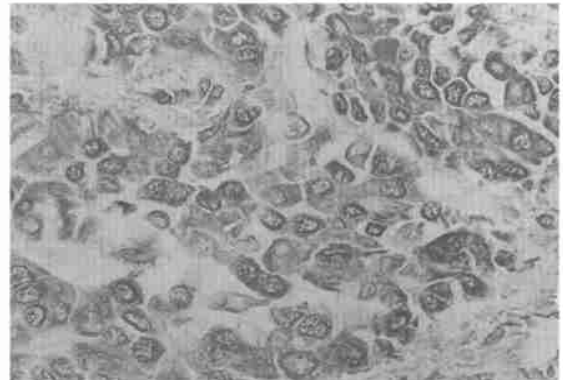


图 4 低分化腺癌,胞核和胞浆内 C-myc 阳性 x400 SABC 法

Fig 4 Low differentiated squamous cell carcinoma with positive C-myc protein immunohistochemical staining in nucleus and cytoplasm x400 SABC

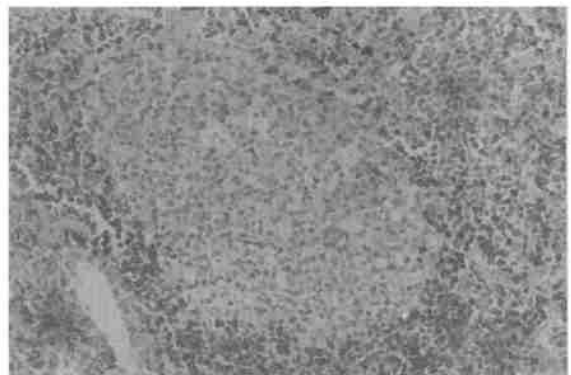


图 5 肺内淋巴组织 Bcl-2 染色反应,淋巴小结亮区呈阴性反应,暗区呈阳性反应 x200 SABC 法

Fig 5 Bcl-2 protein immunohistochemical staining results in pulmonary lymphatic tissue. The light region of lymphonodule showed negative and dark zone showed positive x200 SABC

2.4 EBV DNA 阳性和 p53、Bcl-2、C-myc 表达的关系
在 25 例 EBV DNA 阳性的病例中,18 例(72%)为 p53 阳性,13 例(52%)为 Bcl-2 阳性,23 例(92%)为 C-myc 阳性。在 EBV DNA 阴性病例中 p53、Bcl-2 和 C-myc 基因的表达分别为 34.78%、21.73%和 69.56%,明显低于 EBV DNA 阳性者中的表达率。

3 讨论

EBV 是一种癌基因病毒,与许多肿瘤发生有关^[1-4]。EBV DNA 有 9 个基因能编码 EBV 核抗原(EBNA)和 3 个潜在膜蛋白,其中 EBNA1 是 EBV 相关恶性肿瘤中唯一始终表达的蛋白质,具有和 DNA 结合能力,而且还有较强的 RNA 结合能力,它在所有含病毒基因组的细胞中均可被检出,EBV DNA 在低分化鼻咽癌中出现的概率几乎是 100%^[1]。我们结合文献设计两对 EBV DNA 引物,用 PCR 方法来检测 48 例原发性肺癌组织标本中 EBV DNA。结果发现 25 例 EBV DNA 阳性,间接原位 PCR 反应证实 EBV DNA 阳性信号位于胞核中。其中鳞癌的阳性率最高,较多癌旁支气管粘膜组织和部分癌旁肺组织中发现 EBV DNA 阳性,2 例肺转移性平滑肌肉瘤和 1 例肺结核瘤中 EBV DNA 阴性,但其支气管粘膜组织中 EBV DNA 也呈阳性反应。这些结果说明 EBV 在肺癌组织中有很高的感染率,EBV 有可能在肺癌发生中发挥重要作用。

p53 在肺癌中的表达率为 43%~75%^[6,7],p53 免疫组织化学研究表明本组有 54.16% p53 呈阳性反应,反应为胞核型。其中鳞癌的阳性率显著高于腺癌,EBV DNA 阳性者中 p53 表达较阴性者明显升高。

Henderson 等^[8]和 Finke 等^[9]证明 Bcl-2 过度表达是由 Lmp-1 介导所致,在淋巴系统 EBV DNA 阳性肿瘤中已被证明有 Bcl-2 过度表达。Chen 等^[4]发现 EBV-1 阳性的“肺淋巴上皮样癌”中全部表达 Bcl-2,与其它组织学类型间有显著性差异。Bcl-2 在正常支气管粘膜上皮基底细胞选择性地阳性,似乎表明 Bcl-2 可以延长基底细胞生命期^[10],从而导致另外的危险因素发生,如 EBV 感染。本组结果发现 EBV DNA 阳性和 EBV DNA 阴性患者中 Bcl-2 表达差异有显著性,提示 EBV 感染和 Bcl-2 高表达有一定的联系。

原癌基因 C-myc 在细胞的生长和凋亡过程中均发挥作用。在永生化的 B 淋巴细胞中,C-myc 基因表达异常,目前仍未发现有肺癌中 EBV 和 C-myc 基因关系的研究报道。本组 48 例患者中 36 例免疫组织化学 C-myc 呈阳性反应,反应以胞核为主,部分细胞胞浆也

呈阳性反应。EBV DNA 阳性病例中 C-myc 表达率显著高于阴性病例,提示 EBV 与 C-myc 之间可能有关。

在恶性肿瘤癌基因的研究中,不少学者提出了多基因协同作用的假设,认为在肿瘤的发生、发展的各阶段,至少有二个或二个以上的功能不同的异常激活的癌基因各自发挥不同的作用,并在时间和空间上相互配合、协同加强了细胞的癌变。在决定细胞是增生还是凋亡,需要 p53、Bcl-2 和 C-myc 三者的存在,更重要的是三者出现在时间和量上的精确调节。本研究结果说明 p53、C-myc、Bcl-2 三个癌基因均在肺癌的发生中起了一定的作用。此外,EBV DNA 阳性者和阴性者中 p53、Bcl-2、C-myc 的表达差异有显著性,但由于本组病例数较少,EBV 感染与 p53、Bcl-2、C-myc 是否存在相关关系还需进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Shao X, He Z, Chen Z, et al. Expression of an Epstein-Barr-virus receptor and Epstein-Barr-Virus-dependent transformation of human nasopharyngeal epithelial cells. *Int J Cancer*, 1997, 71(5) 750-755.
- 2 Wong MP, Chung LP, Yuen ST, et al. In situ detection of Epstein-Barr virus in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol*, 1995, 177(3) 233-240.
- 3 Kasai K, Sato Y, Kameya T, et al. Incidence of latent infection of Epstein-Barr virus in lung cancer--an analysis of EBV, expression in lung cancers by in situ hybridization. *J Pathol*, 1994, 174(3) 257-265.
- 4 Chen FF, Yan JJ, Lai WW, et al. Epstein-Barr virus-associated non-small cell lung carcinoma. Undifferentiated "lymphoepithelioma-like" carcinoma as a distinct entity with better prognosis. *Cancer*, 1998, 82(12) 2334-2342.
- 5 Telenti A, Marshall WF, Smith TF. Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(10) 2187-2192.
- 6 Kishimoto Y, Murakami Y, Shirashi M, et al. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas of the lung. *Cancer Res*, 1992, 52(17) 4799-4804.
- 7 高振强,高志萍,张晓彬. 肺癌中 p53 基因突变类型和可能致癌因素. *中华预防医学杂志*, 1997, 31(2) 88-91.
- 8 Henderson S, Rowe M, Gegory C, et al. Induction of Bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 proteins infected B-cells from programmed cell death. *Cell*, 1991, 65(7) 1107-1115.
- 9 Finke J, Fritzen R, Terns P, et al. Expression of Bcl-2 in Burkitt lymphoma cell lines: Induction by latent Epstein-Barr virus genes. *Blood*, 1992, 80(2) 459-469.
- 10 Walker C, Roberson L, Myokow M, et al. Expression of the Bcl-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer*, 1995, 72(1) 164-169.

(收稿:1999-11-17 修回:2000-02-19)

(本文编辑 张世雯)