

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.03.014

EBVaGC 中 LMP1 和 BHRF1 的表达与血管生成 淋巴管生成的关联性研究

张伟^{1,2} 王爱亮³ 崔凯² 孙静³ 李胜^{2△}¹ 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250062;² 山东省肿瘤防治研究院, 济南 250117; ³ 济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029)

摘要 目的 探讨 EB 病毒相关性胃癌中 LMP1 和 BHRF1 的表达与血管生成、淋巴管生成的关系。方法 选取 EB 病毒相关性胃癌组织标本采用免疫组化方法检测 LMP1、BHRF1、VEGF-C、LYVE-1 和 CD34 的表达水平, 分析其可能存在的关系。结果 30 例 EBVaGC 组织中不同 TNM 分期、有无周围淋巴结转移的 LMP1 蛋白的表达阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); BHRF1 表达和 TNM 分期、有无周围淋巴结转移有关联 ($P < 0.05$)。VEGF-C 表达与周围淋巴结转移有关联 ($P < 0.05$); EBVaGC 中 MVD 在不同 TNM 分期之间有统计学意义 ($P < 0.05$); MLVD 与在不同 TNM 分期和有无周围淋巴结转移之间有统计学意义 ($P < 0.05$)。BHRF1 的表达与 MVD 无统计学关联, 而与 MLVD 有统计学关联 ($P < 0.05$)。VEGF-C 阳性表达的 19 例 EBVaGC 组织中, MVD 和 MLVD 均明显高于阴性组, 两组比较其差异具有显著的统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 EB 病毒相关性胃癌中 LMP1 的表达率低, BHRF1 的表达率高, 可能与 EB 病毒相关性胃癌较少发生淋巴结转移有关。VEGF-C 高表达说明 VEGF-C 可能参与 EBVaGC 的血管和淋巴管生成, 其高表达间接促进肿瘤细胞沿新生的淋巴管迁徙和转移。

关键词 EB 病毒; 胃癌; LMP1; BHRF1; 淋巴转移**中图分类号**: R735 **文献标识码**: B **文章编号**: 1000-9760(2013)06-200-04

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 与人类多种恶性肿瘤有关, 例如 Burkitt 淋巴瘤 (BL)、Hodokin 病 (HD)、鼻咽癌 (NPC) 及胃癌 (GC) 等^[1], 胃癌细胞内存在 EBV 者定义为 EBV 相关性胃癌 (EBVaGC)。EB 病毒潜伏膜蛋白基因 (LMP1) 和 EB 病毒早期编码基因 (BHRF1) 是公认的病毒致癌基因, EBV 编码的 BHRF1 蛋白在约 90% EBVaGC 组织中可检测到, 但未发现 LMP1 的表达^[2-3]。因此, 我们收集 EBV 相关胃癌组织, 利用免疫组化方法检测 LMP1、BHRF1、血管内皮生长因子 (VEGF-C)、淋巴细胞内皮标记物 (LYVE-1) 和高度糖基化的 i 型跨膜糖蛋白 (CD34) 的表达情况, 探讨与临床病理的关系, 从而初步了解其在 EBVaGC 中发生的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

所有患者均来自山东省籍贯并且三代居住在山东省内的当地汉族人群。所有病例均取自山东省肿瘤防治研究院和济宁医学院附属医院病理科

2008 年至 2012 年的手术标本, 采用标本均签署知情同意书。胃癌手术切除的胃癌组织标本 600 例 (含石蜡包埋组织), 选取经原位分子杂交检测鉴定 EB 病毒相关性胃癌 30 例。

1.2 方法

1.2.1 病理标本处理 标本经 10% 中性缓冲福尔马林固定、石蜡包埋。所有标本均以 4 μ m 连续切片, LMP1、BHRF1、VEGF-C、LYVE-1 和 CD34 单克隆抗体按 1:200 稀释, 以下操作步骤按试剂盒说明进行, 最后 DAB (二氨基联苯胺) 显色, 常规复染封片。用已知的阳性切片作阳性对照, 以 PBS 代替上述抗体作阴性对照。其中一张用苏木精-伊红染色, 光镜观察进行组织病理学分类。

1.2.2 免疫组织化学 (SP 法) 我们应用过氧化物酶标记的链霉素 (Streptavidin Peroxidase, SP) 免疫细胞化学方法对上述标本中 LMP1、BHRF1、VEGF-C、LYVE-1 和 CD34 的表达水平进行检测。

1.2.3 试剂 LMP1、BHRF1、VEGF-C、LYVE-1 和 CD34 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司 (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark), 均为浓缩型产品。S-P 试剂盒购自福州迈新公司。用已知的乳腺癌标本作为阳性对照, PBS

△ [通信作者] 李胜, E-mail: drlsheng@sohu.com

(磷酸盐缓冲液)代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 结果判定 阅片由两位病理科医师分别双盲阅片,LMP1、BHRF1、VEGF-C 均以细胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞信号;VEGF-C 以细胞膜和/或胞浆呈现棕黄色颗粒为阳性细胞。每例切片至少计数 10 个 400 倍视野,计数阳性细胞占所有细胞的百分数,阳性细胞数>25%为阳性,以阳性细胞数所占比例分为:<10%(-),11%~25%(+),25%~50%(++),>50%(+++)。染色强度判定:不着色(-),浅棕黄色(+),棕黄色(++),棕褐色(+++).综合阳性细胞数和染色强度对染色结果进行分析。

采用抗 CD34 多克隆抗体标记微血管内皮细胞,其标记的微血管的结果判定如下:先在低倍(×100 倍)镜下全面观察切片,寻找微血管高密度区,在 400 倍视野下,以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分有明显区别的、任何一个染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇作为一个微血管,只要结构不相连,其分支结构也作为一个血管进行计数;但管腔>8 个红细胞大小或带有肌层的血管均不计数。记录 5 个高倍视野内的微血管数,取其平均值作为每例的微血管密度(MVD)。

同样通过免疫组织化学方法显色,微淋巴管在光镜下为棕黄色细长管壁包绕的条索状或不规则形的管腔,以抗 LYVE-1 单克隆抗体标记微淋巴管内皮细胞,其标记的微淋巴管的结果判定如下:在低倍镜(×100 倍)下寻找 LYVE-1 阳性脉管密集区,换高倍镜(×400 倍)选取 5 个视野计数,取其平均值计算微淋巴管密度(MLVD)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件对实验数据进行分析。

2 结果

2.1 3 种 EBVaGC 临床病理因素不同水平的 LMP1、BHRF1、VEGF-C 的表达比较及 MVD 和 MLVD 量的比较

LMP1 位于细胞膜上及胞浆中,呈棕色颗粒状分布,胞核阴性,30 例 EBVaGC 中 6 例弱阳性,阳性率为 20%。BHRF1 位于细胞膜上及胞浆中,呈棕色颗粒状分布,30 例 EBVaGC 中 20 例呈阳性,阳性率为 66.67%。VEGF-C 表达阳性在镜下均表现为胞浆内出现棕黄色颗粒,19 例阳性,阳性率为 63.33%。

免疫组织化学染色中 CD34 主要定位于微血管内皮细胞,组织中微血管形态不规整,分布不均;癌灶边缘血管较密集,成簇状,部分呈发芽状,管腔相对规则,但微血管分布不均。

微淋巴管在光镜下为棕黄色细长管壁包绕的条索状或不规则形的管腔,LYVE-1 主要表达在癌巢周围间质脉管内皮细胞。癌巢组织内的淋巴管分布少,且管径小;癌旁周围组织淋巴管分布相对于癌巢内多,呈不规则形,并且有大量的淋巴细胞浸润。MLVD 阳性脉管多呈管腔状、条索状弥漫或散在分布在癌巢周围间质,常可见癌细胞浸润。

LMP1 在 30 例 EBVaGC 中 6 例阳性,阳性率为 20%。不同 TNM 分期的 LMP1 蛋白表达阳性率的差异无统计学意义($P>0.05$),有无周围淋巴结转移的 LMP1 蛋白表达阳性率的差异也无统计学意义($P>0.05$)。BHRF1 有 20 例阳性,阳性率为 66.67%,不同 TNM 分期的 BHRF1 表达阳性率的差异有统计学意义($P<0.05$)。有无周围淋巴结转移的 BHRF1 表达阳性率的差异有统计学意义($P<0.05$),提示 BHRF1 表达和 TNM 分期级、有无周围淋巴结转移有关联。VEGF-C 19 例阳性,阳性率为 63.33%,有无周围淋巴结转移的 VEGF-C 蛋白的表达阳性率差异有统计学意义($P<0.05$),提示 VEGF-C 蛋白的表达与 EBVaGC 的周围淋巴结转移($P<0.05$)有关联(表 1)。

2.2 形态计量学图像分析法测定 MVD、MLVD 结果比较

EBVaGC 中 MVD 在不同性别、有无周围淋巴结转移之间差异无统计学意义,而在不同的 TNM 分期之间差异有统计学意义。形态计量学图像分析法测定 MLVD 发现,EBVaGC 中 MLVD 在不同 TNM 分期和有无周围淋巴结转移之间差异有统计学意义(表 2)。

2.3 BHRF1 和 VEGF-C 的表达与 MVD 及 MLVD 之间的关系

30 例 EBVaGC 组织中 BHRF1 阳性表达者的 MVD 与阴性组无差别,说明 BHRF1 的表达与 MVD 无统计学的关联,而与 MLVD 有统计学的关联。在 VEGF-C 阳性表达的 19 例 EBVaGC 组织中,MVD 和 MLVD 均明显高于阴性组,两组比较其差异具有显著的统计学意义,说明 VEGF-C 可能参与 EBVaGC 的血管和淋巴管生成,其高表达间接促进肿瘤细胞沿新生的淋巴管迁徙和转移(表 3)。

表 1 3 种 EBVaGC 临床病理因素不同水平的 LMP1、BHRF1 和 VEGF-C 表达比较

临床病理因素	n	LMP1 表达			BHRF1 表达			VEGF-C 表达		
		阴性	阳性	P	阴性	阳性	P	阴性	阳性	P
性别 男	16	12	4	0.6567	4	12	0.4421	6	10	0.9193
女	14	12	2		6	8		5	9	
TNM 分期 I~II	13	12	1	0.1961	8	5	0.0069	8	5	0.0227
III~IV	17	12	5		5	15		5	14	
淋巴结转移 阴性	9	6	3	0.3287	6	3	0.0301	7	2	0.0039
阳性	16	18	3		4	17		4	17	

* : Fisher 确切概率

表 2 3 种 EBVaGC 临床病理因素不同水平的 MVD 和 MLVD 比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理因素	n	MVD	t	P	MLVD	t	P
性别 男	16	54.91±5.84	0.97	0.3402	6.22±4.08	1.6	0.1198
女	14	57.08±6.42			8.17±2.12		
TNM 分期 I~II	13	52.28±5.83	-3.31	0.0026	4.67±3.10	-4.45	0.0001
III~IV	17	58.71±4.82			9.02±2.26		
淋巴结转移 阴性	9	54.14±6.69	-1.05	0.3040	4.98±3.49	-2.46	0.0205
阳性	21	56.69±5.85			8.06±2.99		

表 3 不同 BHRF1 和 VEGF-C 水平 MVD、MLVD 表达情况的比较 ($\bar{x} \pm s$)

	n	MVD	t	P	MLVD	t	P
BHRF1 表达 阴性	10	30.60±9.49	0.31	0.7625	4.72±1.79	-3.46	0.0018
阳性	20	29.00±15.08			8.95±3.63		
VEGF-C 表达 阴性	11	18.20±9.04	-4.63	<0.0001	4.59±1.75	-3.67	0.001
阳性	19	36.09±10.80			8.99±3.73		

3 讨论

EBVaGC 是一个新出现的概念,因胃癌细胞中存在 EB 病毒而得名。据估计,全球每年新增 EBVaGC 患者多于 80 万人^[4],而全球 10% 的胃癌病例被证实与 EB 病毒相关^[5]。EBVaGC 在临床上表现为以男性为主,发病年龄较小,多发生在胃上部 and 胃体部,肿瘤直径较小。EBVaGC 较少发生淋巴结转移,5 年存活率可达 66.2%,比 EB 病毒非相关性胃癌(EBVnGC)高^[6]。

LMP1 是 EB 病毒编码的一种 6 次跨膜蛋白,与细胞粘附性改变、细胞外基质降解和肿瘤血管生成等均有密切的联系^[7]。EBVaGC 为 I 型潜伏感染,表达 EBNA1,EBERs 和 BARF0,部分病例表达 LMP2A4 种 I 型潜伏感染基因,而不表达 LMP1 和 EBNA2^[8]。本次实验结果显示在 30 例 EBVaGC 中 6 例呈弱阳性(阳性率 20%),与性别、

分期及有无周围淋巴结转移方面无统计学关联,说明在 EBVaGC 中 LMP1 呈低表达,对 EBVaGC 发生淋巴转移作用有限。

BHRF1 属 EB 病毒早期抗原,在 EB 病毒溶解复制周期的早期大量表达,和 Bcl-2 具有部分相同的蛋白序列,可能与 Bcl-2 一样能延缓细胞的终末分化,增加抵抗 DNA 损伤药物和促进细胞在无血清情况下生存,从而抑制细胞凋亡^[9]。在本次试验中,我们通过对 30 例 EBVaGC 标本的免疫组化染色证实,BHRF1 在 30 例 EBVaGC 中 20 例阳性(阳性为 66.67%),其高表达与 TNM 分期和周围淋巴结转移有统计学关联,表明 BHRF1 高表达可能促进 EBVaGC 病情进展。

本文通过形态计量学图像分析法测定 MLVD,发现在 EBVaGC 中 MLVD 与 TNM 分期和周围淋巴结转移关系密切(表 2),而 20 例 BHRF1 阳性患者与 10 例 BHRF1 阴性患者中

MLVD 平均值亦存在显著差异,与淋巴结转移情况吻合。但形态计量学图像分析法测定的 MVD 与 TNM 分期显著相关,而与性别、周围淋巴结转移无关。因此,根据实验结果,我们推论 EBVaGC 较少发生淋巴结转移与 BHRF1 的高表达可能抑制 EBVaGC 周围淋巴转移有关。

通过免疫组化与组织学观察对 EBVnGC(EB 病毒非相关性胃癌)与 EBVaGC 病理切片进行比较,结果表明 EBVnGC 组织中微血管形态不规整,分布不均,以癌肿边缘为主,而 EBVaGC 肿瘤微环境中,微血管和微淋巴管的增生较少,因而可能减少其淋巴转移的风险,该发现与临床 EBVaGC 较少发生淋巴结转移亦相符。

VEGF-C 是新近鉴定出的淋巴管生长因子,也是酪氨酸激酶受体(VEGFR-3/fit-4)的特异性配体,能通过选择性地诱导淋巴管生成促进淋巴结转移播散^[10]。

目前关于 VEGF-C 的研究在鼻咽癌等头颈部肿瘤中已较为深入,大量研究提示其表达与淋巴转移关系密切^[11],EBV 编码的 LMP1 蛋白可以通过直接或间接的方式上调 VEGF-C 的表达,从而对鼻咽癌的淋巴转移及发生发展起到促进作用^[12]。而本次实验以胃癌患者为研究对象,在 EBVaGC 标本中对比 19 例 VEGF-C 阳性标本和 11 例 VEGF-C 阴性标本的微血管和微淋巴管生成情况,结果发现,19 例 VEGF-C 阳性表达 EBVaGC 中, MVD 和 MLVD 均明显高于阴性组,其差异具有统计学意义,提示 VEGF-C 表达水平的上调可能与微血管和微淋巴管增生关系密切(表 3),可能参与 EBVaGC 的血管和淋巴管生成,其高表达间接促进肿瘤细胞沿新生的淋巴管迁徙和转移。

目前已知在鼻咽癌中 LMP1 存在高表达,它与 VEGF 的表达和鼻咽癌的侵袭性、血管生成密切相关。而在本研究中发现 EBVaGC 中存在 LMP1 低表达和 BHRF1 高表达,与鼻咽癌存在差异。而 EBVaGC 和 NPC 中侵袭性、血管生成和淋巴管生成的差异是否与 LMP1 和 BHRF1 的表达差异有关,LMP1 和 BHRF1 的表达在 EBVaGC 和

NPC 发生发展过程中的作用,甚至以及 EBVaGC 和 NPC 中的侵袭性、血管生成和淋巴管生成关系等分子机理等,仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(9): 1726-1733.

[2] Decaussin G, Sbih-Lammali F, de Turenne-Tessier M, et al. Expression of BARP1 gene encoded by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma biopsies [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5584-5588.

[3] Seto E, Yang L, Middeldorp J, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARP1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression [J]. *J Med Virol*, 2005, 76(1): 82-88.

[4] 陈莉, 朱远源. 肿瘤研究的新热点—EB 病毒 [J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 5(10): 750-754.

[5] Chen JN, He D, Tang F, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2012, 6(4): 262-271.

[6] van Beek J, zur Hausen A, Klein Kranenbarg E, et al. EBV-Positive gastric adenocarcinomas: a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(4): 664-670.

[7] 欧小波, 陈小毅. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 与肿瘤转移研究的进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 34(1): 72-74.

[8] 张霞, 刘霞, 荆永正, 等. EB 病毒相关胃癌及鼻咽癌组织病毒主要潜伏期基因启动子甲基化状态分析 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2010, 46(5): 399-406.

[9] Nicholls J, Kremmer E, Meseda CA, et al. Comparative analysis of the expression of the Epstein-Barr virus (EBV) anti-apoptotic gene BHRF1 in nasopharyngeal carcinoma and EBV-related lymphoid diseases [J]. *J Med Virol*, 2001, 65(1): 105-113.

[10] 石小燕, 胡国清, 袁响林, 等. VEGF-C 与鼻咽癌增殖和转移的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 8(5): 364-367.

[11] 赵国光, 向晓娟, 何友兼. 血管内皮生长因子 C, D 在鼻咽癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *癌症*, 2007, 6(1): 90-95.

[12] 易翔唐, 覃颖. EB 病毒潜伏膜蛋白-1 和环氧化酶-2 及血管内皮生长因子 C 在鼻咽癌中的表达及其关系 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, (3): 126-128.

(收稿日期 2013-03-15)