

EB 病毒阳性肺癌组织中 LMP-1、p53、Bcl-2 及 MMP-9 表达

王梅梅¹,熊亚南¹,朱丽华¹,袁丽杰¹,张淑杰¹,章广玲¹,甄永占¹,刘志勇²

(1.河北联合大学基础医学院,河北 唐山 063000;2.河北联合大学附属医院,河北 唐山 063000)

摘要: [目的] 检测 EB 病毒(EBV)阳性肺癌组织中 EBV 潜伏感染膜蛋白-1(LMP-1)、p53、Bcl-2 及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达情况,分析它们与肺癌发生发展的关系。[方法] 采用原位杂交法检测 108 例肺癌组织和 22 例癌旁正常肺组织中 EBV 编码的小 RNA-1(EBV encoded small RNA-1, *EBER-1*)。免疫组织化学的方法检测 *EBER-1* 阳性和阴性肺癌组织中 LMP-1、p53、Bcl-2 及 MMP-9 的表达。[结果] 108 例肺癌组织中 *EBER-1* 阳性 36 例,阳性率 33.3%;22 例癌旁正常肺组织中 *EBER-1* 阳性 1 例,阳性率 4.5%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。*EBER-1* 阳性和阴性的肺癌组织中 LMP-1 阳性率分别为 11.1%和 4.2%,差异无统计学意义($P > 0.05$);在 *EBER-1* 阳性肺癌组织中 p53、Bcl-2 的平均面积(AA)和积分光密度(OD)均高于阴性组,差异有统计学意义。在 *EBER-1* 阳性肺癌组织中 MMP-9 AA 和 OD 均高于阴性组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。[结论] EBV 感染可能通过影响 LMP-1、Bcl-2、p53 和 MMP-9 在肺癌组织中的表达,进而在肺癌的发生、发展和转移中发挥作用。

关键词: 肺肿瘤;EB 病毒小 RNA(*EBER-1*);原位杂交;潜伏感染膜蛋白-1(LMP-1);p53;Bcl-2;基质金属蛋白酶-9(MMP-9)

中图分类号:R734.2

文献标识码:A

文章编号:1671-170X(2013)06-0431-04

Expressions of LMP-1, p53, Bcl-2 and MMP-9 in Tissues of Lung Cancer with Epstein-Barr Virus Infection

WANG Mei-mei, XIONG Ya-nan, ZHU Li-hua, et al.

(School of Basic Medical Sciences, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of Epstein-Barr virus (EBV) latent infection membrane protein 1(LMP-1), p53, Bcl-2, matrix metalloproteinases-9(MMP-9) in tissues of lung cancer with EBV infection, and to explore their relationship with carcinogenesis of lung cancer. [Methods] EBV encoded small RNA-1 (*EBER-1*) in 108 tissue samples of lung cancer and 22 cases of cancer adjacent tissues were detected by *in situ* hybridization. The expressions of LMP-1, p53, Bcl-2 and MMP-9 in EBV positive and negative cases were detected immunohistochemically. [Results] Positive expression of *EBER-1* was found in 36 of 108 cases with lung cancer (33.3%), and in 1 of 22 cases of cancer adjacent tissues(4.5%), with significant difference($P < 0.01$). Positive rate of LMP-1 in *EBER-1* positive lung cancer tissues and *EBER-1* negative tissues was 11.1% and 4.2% respectively, without significant difference. Average area (AA) and integral optical density(OD) of p53 and Bcl-2 in *EBER-1* positive cases were higher than those in negative tissues, with significant difference. AA and OD of MMP-9 in *EBER-1* positive tissues were higher than those in negative tissues, without significant difference($P > 0.05$). [Conclusion] EBV might play a role in carcinogenesis and metastasis of lung cancer by influencing the expressions of LMP-1, p53, Bcl-2 and MMP-9.

Subject words: lung neoplasms; EBV encoded small RNA-1(*EBER-1*); *in situ* hybridization; latent infection membrane protein 1(LMP-1); p53; Bcl-2; matrix metalloproteinases-9(MMP-9)

大多数学者认为,肺癌的发生是一个多因素、多阶段的发展过程^[1,2]。病因学研究是肿瘤防治的重要

环节,随着癌症基础理论研究的深入和现代分子生物学技术的进步,在各种致癌因素中,病毒致癌越来越受到关注。研究发现 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV) 个别编码蛋白可使淋巴细胞永生,在与 EBV 有关的恶性肿瘤发病中发挥主要作用^[2]。EBV 编码的小 RNA-1(EBV encoded small RNA-1, *EBER-1*)是

基金来源: 河北省自然科学基金资助项目(H2013209180);唐山市科技计划项目(121302136)。

通讯作者: 章广玲,副主任,教授,博士河北联合大学基础医学院病原生物学与免疫学系,河北省唐山市建设南路 57 号建设路校区(063000);E-mail:zhguangling@yahoo.com.cn。

收稿日期:2011-09-20;修回日期:2012-12-25

目前所知在潜伏感染 EBV 时基因转录最丰富的 RNA, 估计每个细胞约 1×10^7 拷贝^[3]。目前, 国内外检测 EBV 感染最敏感和高特异的方法是原位杂交法检测 *EBV-EBERs*^[4]。在 EBV 与肺癌的相关性研究中, 认为肺癌细胞内存在 *EBER-1* 者为 EBV 阳性肺癌^[5]。EBV 潜伏感染膜蛋白-1 (latent infection membrane protein 1, LMP-1) 通过上调数种细胞抗凋亡基因间接抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖^[6,7], *p53* 和 *Bcl-2* 是细胞和 DNA 受到损伤时肿瘤细胞逃避正常凋亡程序的两个关键基因^[8,9], 基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9) 与癌症的发展转移密切相关^[10]。我们用原位杂交和免疫组化的方法对 108 例石蜡包埋的肺癌组织中 *EBER-1*、LMP-1、*p53*、*Bcl-2* 及 MMP-9 表达进行检测, 探讨 EBV 阳性肺癌组织中 LMP-1、*p53*、*Bcl-2* 及 MMP-9 蛋白的表达及其意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集唐山市人民医院和开滦医院 2001 至 2006 年手术切除肺癌组织标本 108 例。对每一例标本经常规 HE 染色后, 进行组织病理学观察。同时取这些标本的相应癌旁正常组织 22 例作为对照。按 WHO “肺肿瘤组织学分型”(1981) 标准, 108 例肺癌分为鳞癌 39 例、腺癌 38 例、小细胞癌 29 例和大细胞癌 2 例。

1.2 试剂来源

EBER-1 原位杂交试剂盒购自天津灏洋生物制品有限责任公司; *p53* (Do7) 鼠抗人单克隆抗体、*Bcl-2* 鼠抗人单克隆抗体、二步法免疫组化检测试剂 (PV-9000) 购自美国 Zymed 公司; MMP-9 兔抗人多克隆抗体、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 多聚赖氨酸 (Poly-L-Lysine) 购自美国 Sigma 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 原位杂交 (*in situ hybridization*, ISH) 检测石蜡包埋组织标本中 *EBER-1* 表达

将肺癌患者石蜡包埋组织标本连续切片 3 张, 厚度为 $4 \mu\text{m}$, 预杂交后, 按照 *EBER-1* 原位杂交检测试剂盒说明书进行原位杂交检测。地高辛多点

标记的 *EBER-1* 寡核苷酸探针, 探针序列为 5'-TACAG CCACA CACGT CTCCT CCCTA GCAAA ACCTC T-3', 探针浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 。于细胞核内及核仁中见到浓染呈棕黄色分布细胞判断为阳性, 特异性对照没有任何显色, 为阴性结果, 经苏木精复染后阴性细胞核呈蓝色。在同一标定条件下, 对所有样本组织切片随机地在 200 倍显微镜下取 5 个视野, 录入 GD-6 多媒体彩色病理图像分析系统, 测定其平均面积 (average area, AA)、积分光密度 (integral optical density, IOD) 和平均光密度 (mean optical density, MOD)。

1.3.2 免疫组化 SABC 法检测 LMP-1 蛋白的定性表达

取 36 例 *EBER-1* 阳性标本和 72 例阴性标本, 切片 2 张, 切片厚度为 $4 \mu\text{m}$, 常规脱蜡。SABC 法进行检测。以已知阳性组织作为阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。细胞浆内可见到浓染呈棕黄色分布即判断为阳性细胞, 特异性对照没有任何显色, 为阴性结果, 经苏木精复染后阴性结果细胞核呈蓝色。

1.3.3 免疫组化法检测 *p53*、*Bcl-2* 和 MMP-9 蛋白的半定量表达

按 1.3.2 操作进行免疫组织化学检测。在同一标定条件下, 对所有样本组织切片随机地在 200 倍显微镜下取 5 个视野, 录入 GD-6 多媒体彩色病理图像分析系统, 测定 AA、IOD 和 MOD。

1.4 统计学处理

资料整理后, Excel 建立数据库, 用 SPSS11.5 统计分析软件进行分析, 用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组织标本的 *EBER-1* 原位杂交检测结果

108 例肺癌组织标本中 *EBER-1* 阳性 36 例, 阳性率 33.3%; 22 例癌旁正常肺组织中 *EBER-1* 阳性 1 例, 阳性率 4.5%。两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。图像分析表明, EBV 阳性肺癌中 *EBER-1* 的 AA、IOD、MOD 均高于 EBV 阴性肺癌组织 ($P < 0.01$) (Figure 1, 2, Table 1)。

2.2 EBER-1 阳性和阴性肺癌组织中 LMP-1 蛋白表达情况

为了研究 EBV 相关及不相关肺癌的分子学特征,用免疫组织化学的方法检测了 LMP-1 蛋白的表达(Figure 3,4)。结果显示,36 例 EBER-1 阳性标本中 7 例 LMP-1 蛋白表达,阳性率为 11.1%;72 例阴

性肺癌标本中 3 例 LMP-1 蛋白表达,阳性率为 4.2%。两组阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 EBER-1 阳性与阴性肺癌组织中 p53,Bcl-2 和 MMP-9 蛋白的表达情况

EBER-1 阳性组中 p53,Bcl-2 和 MMP-9 的 AA 和 IOD 均显著高于 EBER-1 阴性组(Table 2)。

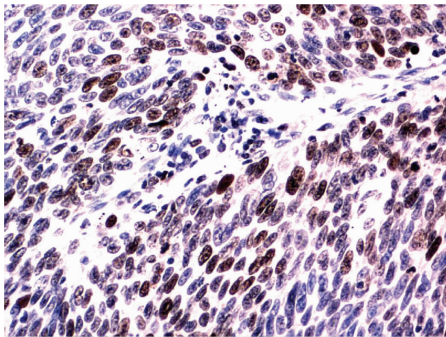


Figure 1 Positive expression of EBER-1 in squamous cell carcinoma of lung (ISH×200)

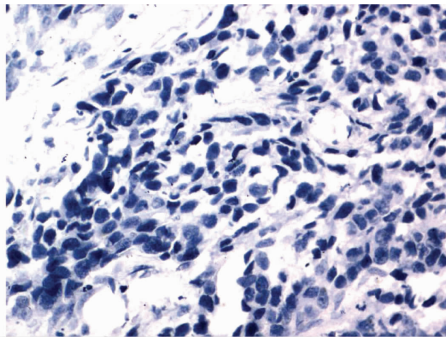


Figure 2 Negative expression of EBER-1 in squamous cell carcinoma of lung (ISH×200)

Table 1 Comparison of the expression of EBER-1 between lung cancer with EBV (+) and EBV (-)($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	AA	IOD	MOD
EBV (+)	36	26454.82±7007.78	8.01±2.11	0.000311±0.00008
EBV (-)	72	3460.00±2841.64	1.61±0.84	0.000128 ±0.00009
t		5.34	7.16	2.67
P		<0.01	<0.01	<0.01

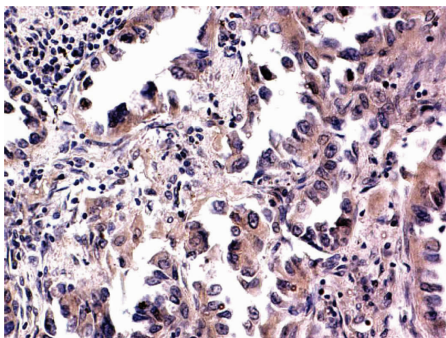


Figure 3 Positive expression of LMP-1 in adenocarcinoma of lung (IHC×200)

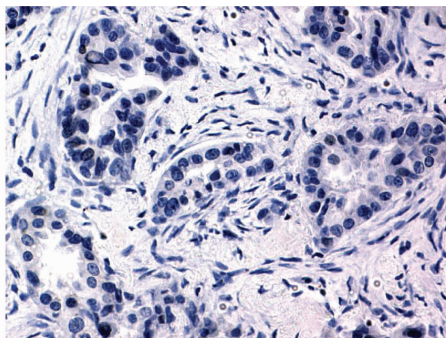


Figure 4 Negative expression of LMP-1 in adenocarcinoma of lung (IHC×200)

Table 2 Expressions of p53,Bcl-2 and MPP-9 in EBER-1 positive and negative patients

Groups	n	p53		Bcl-2		MMP-9	
		AA	IOD	AA	IOD	AA	IOD
EBER-1 (+)	36	57053.28±6783.18	13.85±1.55	58014.23±6918.45	11.00±1.48	21059.86±3426.04	3.65±0.77
EBER-1 (-)	72	38460.50±3503.62	10.89±0.70	38156.22±4096.79	8.03±0.78	16627.50±2283.99	3.17±0.37
t		3.26	2.24	3.10	2.46	0.75	1.19
P		<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05

3 讨论

近 20 年来,我国肺癌发病率迅速上升,到目前为止,肺癌的发病率和死亡率已居恶性肿瘤之首^[1]。努力探索肺癌有效诊治方法的同时,积极探讨肺癌发生的病因学研究摆在了极为重要的位置。自 1987 年 Begin 报道了首例肺淋巴上皮瘤样癌 (lymphoepithelioma-like carcinoma,LELC)与 EBV 的关系后,EBV 和肺癌的关系日益引起人们的关注。本组资料显示,肺癌组织中 EBER-1 阳性率为 33.3%,癌旁正常组织为 4.5% ($P<0.05$),提示 EBV 感染与肺癌的发生有关。

无论是在体内还是在体外,EBV 潜伏感染的特征是基因不表达,在感染的细胞内以质粒的形式携带着病毒

的基因组。EBV 的 LMP-1 通过上调数种细胞抗凋亡基因间接抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,是转基因动物的致癌基因,其机理可能是通过诱导 NF- κ B 通路^[12]。本研究中,EBER-1 阳性标本中 LMP-1 蛋白表达阳性率高于 EBER-1 阴性标本,但差异不具有统计学意义。

Bcl-2 是目前已知抑制细胞凋亡最重要的一种基因,Bcl-2 编码 Bcl-2 α 和 Bcl-2 β 蛋白,是抑制细胞程序化死亡的关键因子,Bcl-2 的高表达能使细胞凋亡减少,存活细胞数量增多有可能诱使肿瘤发生^[9]。本研究结果表明 EBV 阳性肺癌中 Bcl-2 表达明显高于 EBV 阴性肺癌,差异具有统计学意义,提示 EBV 可通过使 Bcl-2 高表达,影响细胞凋亡。作为肿瘤抑制基因,p53 是人类肿瘤中最常见的突变基因之一,约 85% 的 p53 突变是无义突变,导致 p53 蛋白稳定,这种稳定性使得我们可以用免疫组织化学的方法检测到它。本研究通过免疫组化检测肺癌组织中 p53 的表达状况,探讨 EBV 在肺癌中的作用,结果表明,EBV 相关肺癌中 p53 的 AA 和 IOD 均高于 EBV 非相关肺癌,统计分析表明,二者间差异有统计学意义,提示 EBV 感染可增加 p53 的突变,从而影响着肺癌发生发展的过程,与文献报道^[13]一致。

侵袭转移是恶性肿瘤最重要的特点,并且是导致恶性肿瘤患者死亡的主要原因。许多研究提示,肿瘤侵袭转移的能力与其产生或诱导产生 MMPs 的能力有关,MMPs 是一类跨膜或分泌性的肽链内切酶,可以降解细胞外基质,而且最近的研究表明^[10]在肿瘤早期就有数种 MMPs 表达增加。其中 MMP-2 和 MMP-9 与癌症的发展转移密切相关。本实验结果显示,EBV 阳性较 EBV 阴性肺癌 MMP-9 表达率增加,但差异不具有统计学意义,故 EBV 感染是否促进肺癌的转移尚不能确定,有待进一步研究。

本研究结果提示,EBV 感染过程中可能通过对癌基因以及抑癌基因的调控,影响肺癌的发生和发展。尽管如此,仍有待于进一步检测 EBV 对其他癌基因和抑癌基因及其表达状况的影响。

参考文献:

- [1] Kurzepa-Hasan E, Hasan K, Adamek R. Tobacco smoking among population in the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland between years: 1950 and 2003 [J]. Przegl Lek, 2008, 65(10): 740-741.
- [2] Li S, Du H, Wang Z, et al. Meta-analysis of the relationship between Epstein-Barr virus infection and clinicopathological features of patients with gastric carcinoma [J]. Sci China Life Sci, 2010, 53(4): 524-530.
- [3] Sheikh TI, Qadri I. Expression of EBV encoded viral RNA 1, 2 and anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) in FFPE lymphoma specimens: a preliminary study for diagnostic implication in Pakistan [J]. Diagn Pathol, 2011, 27(6): 70.
- [4] Nose K, Oki T, Banno E, et al. The efficacy of EBER in situ hybridization (ISH) stain in PTLD (malignant diffuse large B-cell lymphoma) about 4 years after ABO-incompatible kidney transplantation: a case report [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(4): 3593-62.
- [5] Takada K. Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis [J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(2): 162-165.
- [6] Bentz GL, Shackelford J, Pagano JS. Epstein-barr virus latent membrane protein 1 regulates the function of interferon regulatory factor 7 by inducing its sumoylation [J]. J Virol, 2012, 86(22): 12251-12261.
- [7] Huang JH, Ye SX, Li ZX, et al. Prediction of the B cell epitopes for the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus [J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(11): 979-981. [黄建华, 叶少雄, 李朝霞, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 的 B 细胞表位预测 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(11): 979-981.]
- [8] Yan SJ, Zhu YK. Research progress of the relationship of cancer suppressor genes p53 and lung cancer [J]. Medical Journal of National Defending Forces in North West China, 2010, 31(2): 126-127. [闫圣杰, 朱运奎. 抑癌基因 p53 与肺癌关系的研究进展 [J]. 西北国防医学杂志, 2010, 31(2): 126-127.]
- [9] Boonyaphiphat P, Pruegsanusak K, Thongsuksai P. The prognostic value of p53, Bcl-2 and Bax expression in laryngeal cancer [J]. J Med Assoc Thai, 2012, 95(10): 1317-1320.
- [10] Ketelhuth DF, Bäck M. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2011, 13(2): 162-169.
- [11] Zhang LP, Yao QF, Ning Y. Significance of p16, MGMT methylation for early diagnosis of lung cancer [J]. Chinese Journal of Public Health, 2008, 24 (1): 52-53. [张利平, 姚群峰, 宁勇. p16、MGMT 甲基化在肺癌早期诊断中意义 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24 (1): 52-53.]
- [12] Gou XM, Chen Y, Chen XY, et al. Effects of Epstein-Barr virus latent membrane protein1 (EBV-LMP1) on related factors of metastasis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1 [J]. Chinese Journal of Cancer, 2003, 22(5): 481-485. [苟新敏, 陈燕, 陈小毅, 等. EBV-LMP1 对鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞转移相关因素的影响 [J]. 癌症, 2003, 22(5): 481-485.]
- [13] Kameyama K, Huang CL, Liu D, et al. Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(13): 4926-4934.