

局部晚期鼻咽癌血浆 EBV-DNA 水平与肿瘤负荷及预后的关系

陈 猛, 郭文杰, 宗 丹, 尹 丽, 王德军, 吴 婧, 郭 昌, 何 侠

(南京医科大学附属江苏省肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

摘要: [目的] 探讨局部晚期鼻咽癌患者治疗前血浆 EBV-DNA 水平与肿瘤负荷及预后的关系。[方法] 165 例初治局部晚期鼻咽癌患者, 均采用适形调强放射治疗 (IMRT)。收集患者治疗前 EBV-DNA 拷贝数水平及肿瘤靶区体积, 并对患者生存结果进行随访总结。[结果] 治疗前血浆 EBV-DNA 中位拷贝数 3790 copies/ml, 鼻咽原发灶 (GTVnx)、淋巴结病灶 (GTVnd) 及总 GTV 体积中位值分别为 72.46、23.26、106.25 cm³; EBV-DNA 水平与 GTVnd 及总 GTV 体积显著相关 ($P < 0.01$)。治疗前血浆 EBV-DNA 表达阴性及阳性患者 2 年总生存率分别为 100.0% 和 98.4% ($P > 0.05$), 无病生存率 94.4% 和 80.8% ($P < 0.05$)。[结论] 局部晚期鼻咽癌患者治疗前血浆 EBV-DNA 水平与鼻咽癌患者颈部淋巴结转移负荷有关, 治疗前血浆 EBV-DNA 表达阴性的患者无病生存率优于阳性患者。

关键词: 鼻咽肿瘤; EB 病毒; 调强放疗; 肿瘤负荷; 预后

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)03-0190-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.03.B006

The Relation of Plasma EBV-DNA Level with Tumor Burden and Prognosis in Patients with Locally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma

CHEN Meng, GUO Wen-jie, ZONG Dan, et al.

(Affiliated Cancer Hospital of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: [Purpose] To investigate relation of pretreatment plasma concentration of Epstein-Barr virus (EBV) DNA with tumor burden and prognosis of patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma (NPC). [Methods] One hundred and sixty-five patients with locally advanced NPC were treated with IMRT. Blood samples were collected and EBV-DNA was detected by real-time quantitative PCR. The tumor target region was delineated on CT images with IMRT planning system based on MRI images, and the tumor volume was calculated by computer software system summation method. Patients were followed up and survival was analyzed. [Results] The median plasma EBV-DNA before treatment was 3790 copies/ml. The median GTVnx, GTVnd and gross GTV were 72.46, 23.26, and 106.25 cm³ respectively. The relationship between plasma EBV-DNA and GTVnd or gross GTV was positively correlated ($P < 0.01$). The overall survival rate was 100.0% and 98.4% ($P > 0.05$), and the disease-free survival rate was 94.4% and 80.8% ($P < 0.05$) respectively in plasma EBV-DNA negative and positive patients. [Conclusion] Plasma EBV-DNA before treatment is an effective predictive factor that reflects the tumor burden of lymph node. The prognosis of patients with plasma EBV-DNA negative expression is better than that of patients with positive expression.

Subject words: nasopharyngeal neoplasms; Epstein-Barr virus (EBV); intensity modulated radiation therapy (IMRT); tumor burden; prognosis

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种具有明显民族聚集现象和地域差异的恶性肿瘤, 是

我国南方及东南亚地区最常见的恶性肿瘤之一^[1], 其发病主要与遗传及环境因素有关^[2]。鼻咽癌的治疗手段是以放射治疗为主的综合治疗, 尽管鼻咽癌的临床疗效较过去有很大的进步, 但对于局部晚期鼻咽癌患者, 其局部复发或远处转移仍是困扰临床

通讯作者: 何侠, 主任, 主任医师, 教授, 博士生导师, 博士; 南京医科大学附属江苏省肿瘤医院放疗科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: hexia200302@tom.com

收稿日期: 2014-11-20; **修回日期:** 2014-12-27

的一大难题。目前证实鼻咽癌的发生发展与 EB 病毒 (EBV) 感染密切相关, 血浆 EBV-DNA 已被认为是诊断及评估鼻咽癌患者预后的有效指标^[3]。另外, 有研究提出原发肿瘤体积是预测鼻咽癌患者预后的一个重要指标, 肿瘤体积越大, 其预后相对较差^[4]。Ⅲ期和Ⅳ期的患者治疗效果欠佳, 治疗失败的主要原因是局部复发或远处转移^[5]。研究影响鼻咽癌患者生存的预后因素从而指导治疗显得尤为重要。本研究通过回顾 165 例接受 IMRT 联合同步化疗治疗的局部晚期鼻咽癌患者, 分析治疗前血浆 EBV-DNA 拷贝数与肿瘤体积是否存在相关性及其对评估患者预后的预测作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2011 年 9 月至 2012 年 7 月期间在江苏省肿瘤医院接受放射治疗的初诊鼻咽癌患者共 165 例, 所有患者治疗前评估项目包括详细的体格检查, 电子鼻咽镜检查; 鼻咽及全颈部的 MRI 平扫和增强扫描; 胸部及腹部的 CT 平扫和增强扫描; 全身骨显像; 完整的血常规、生化, EBV-DNA 拷贝数, 甲状腺功能及肿瘤标志物检查。明确为: ①经病理证实为鼻咽低分化鳞癌患者; ②局部晚期患者 (按照 UICC) 2008 年分期标准); ③均接受调强放疗 (IMRT) 联合同步放化疗治疗; ④具有完整的临床资料。患者的一般资料见表 1 (Table 1)。

1.2 治疗方案

1.2.1 放疗

所有患者均接受 IMRT 根治性放疗, 依据患者治疗前的 MRI 作为基本影像学参照, 根据 ICRU50 号及 62 号报告定义, 增强 CT 上逐层勾画治疗靶区, GTV_{nx} (影像学及临床检查可见的原发肿瘤部位及侵犯范围) 给予剂量 70~76Gy, 单次剂量 2.10~2.25Gy; GTV_{nd} (颈部转移淋巴结) 给予剂量 64~70Gy, 单次剂量 2.00~2.25Gy; CIV1 (高危预防区) 给

予剂量 60~64Gy, 单次剂量 1.80~2.05Gy, CTV2 (低危预防区) 给予剂量 50~56Gy, 单次剂量 1.70~1.80Gy。危及器官限定剂量根据 RTOG0615 规定作计划评估要求。

1.2.2 化疗

患者均采用 TP 方案化疗, 于放疗第 1d 起同时进行, 紫杉醇 135 mg/m² d₁, 奈达铂 80 mg/m² d₁₋₃, 每 4 周 1 次, 放疗期间共行 2 个周期化疗。

1.3 测量方法

1.3.1 肿瘤体积

所有患者靶区勾画完成后, Varain 公司治疗计划系统 (TPS) 自动生成原发肿瘤 (GTV_{nx}) 及淋巴结 (GTV_{nd}) 体积, 随之计算生成总 GTV 体积。

1.3.2 EBV-DNA 拷贝数检测

治疗前抽取患者静脉血 3ml 注入含 EDTA 的玻璃管, 颠倒混匀 5~10 次, 加入淋巴细胞分离液离心后分离血浆, 用 EB 病毒核酸扩增 (PCR) 荧光定量检测试剂盒提取血浆总 DNA, 检测的目的基因源自 EB 病毒基因的 BamHI-W 片段, 所有患者数据均用 Applied Systems 公司 7300 System SDS software 软件统计分析实验结果, 我院将 EBV-DNA 表达量 <100copies/ml 定义为阴性。

Table 1 Patients' characteristics (n=165)

Characteristics	Pretreatment EBV-DNA			Median tumor volume (cm ³)		
	Negative	Positive	Median load (copies/ml)	GTV _{nx}	GTV _{nd}	GTV _{total}
Age (years old)						
<50	18	77	7210	73.6	29.7	106.3
≥50	20	50	13850	69.3	24.6	108.6
Gender						
Male	30	92	9665	75.1	25.8	115.4
Female	8	35	8620	68.1	26.2	102.8
UICC stage						
Ⅲ	24	65	7590	64.8	24.5	87.9
Ⅳ _a	14	62	14900	101.7	30.0	139.5
T stage						
T ₁	7	8	3945	47.0	24.7	62.3
T ₂	7	18	6265	51.0	29.3	83.5
T ₃	16	55	12000	67.9	27.4	104.7
T ₄	8	46	12650	113.7	20.2	142.3
N stage						
N ₀₋₁	5	21	5520	76.3	14.5	92.3
N ₂	26	84	8855	71.8	25.3	103.6
N ₃	7	22	47700	65.0	58.8	138.0

1.4 随访

治疗结束后第1年每2个月随访1次,第2年每3个月随访1次。随访内容包括病史询问、详细的体格检查;测定血浆EBV-DNA拷贝数;电子鼻咽镜;鼻咽及颈部MRI检查;每半年随访1次胸部及腹部CT;临床可疑骨转移者予以全身骨显像检查。随访形式主要是预约随访及电话随访。

随访的终点计算:从治疗结束开始计算至最后1次随访的日期。评价的指标有:总生存率(overall survival, OS);无病生存率(disease-free survival, DFS);无远处转移生存率(distance metastasis free survival, DMFS)。

1.5 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件(SPSS公司,美国)进行数据录入及统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,计数资料采用 χ^2 检验。使用双变量相关性分析治疗前血浆EBV-DNA水平与肿瘤负荷之间的相关性。采用卡方检验分析治疗前血浆EBV-DNA阴性与阳性患者总生存率与无病生存率之间的差异。Kaplan-Meier法计算和绘制生存曲线,生存率的计算采用Log-rank检验,多因素分析采用Cox回归模型。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前EBV-DNA拷贝数与预后的相关性

中位随访29个月,165例患者中共28例发生远处转移,2例患者死亡,无局部复发。总生存率为98.8%,无病生存率为83.1%。38例治疗前血浆游离EBV-DNA水平为阴性的患者中,2例发生远处转

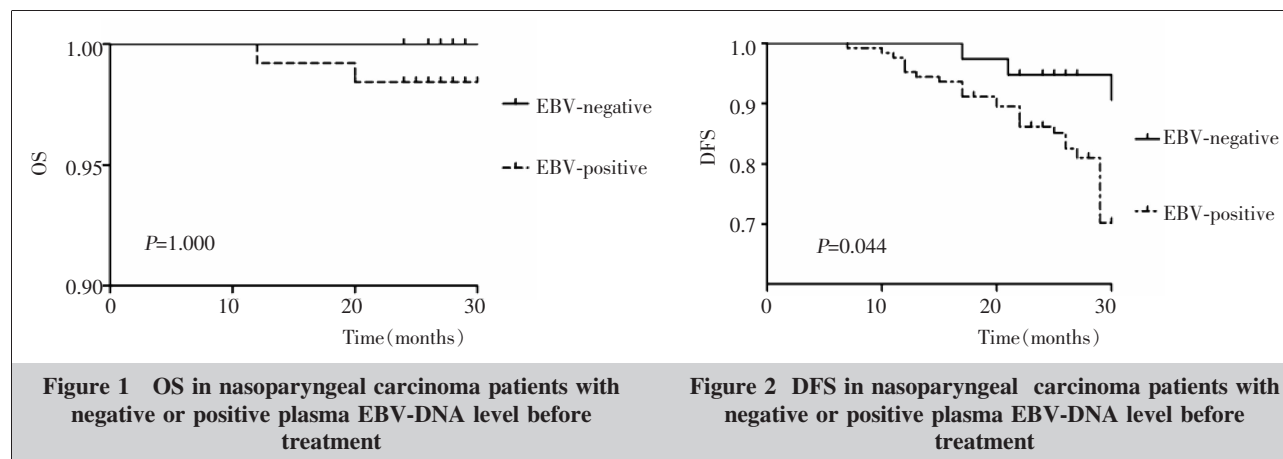
移,无死亡病例,2年总生存率和无转移生存率分别为100.0%和94.7%。另127例治疗前血浆EBV-DNA水平为阳性的患者26例发生远处转移,2例死亡,2年总生存率和无转移生存率分别为98.4%和79.5%,其2年总生存率和治疗前EBV-DNA阴性者相比差异无统计学意义($P=1.000$),2年无病生存率低于治疗前EBV-DNA阴性的患者($P=0.044$)(Figure 1, 2)。

2.2 治疗前EBV-DNA拷贝数与肿瘤负荷的相关性

165例患者治疗前血浆EBV-DNA中位拷贝数为3790copies/ml,原发肿瘤体积、颈部转移淋巴结体积及总体积中位值分别为72.46、23.26、106.25 cm^3 。治疗前血浆EBV-DNA拷贝数水平与肿瘤靶区体积(GTV_{nx}、GTV_{nd}、总GTV)经双变量相关分析显示,治疗前血浆EBV-DNA水平与颈部转移淋巴结的体积和总体积均有显著相关性(Spearman系数 $r=0.246$ 、 0.213 , $P<0.001$),但与原发肿瘤体积并无显著相关性($r=0.051$, $P>0.05$)。

3 讨论

鼻咽癌是头颈部高发恶性肿瘤,临床分期是影响鼻咽癌预后的主要因素,局部复发或远处转移是鼻咽癌患者治疗失败的主要原因^[6]。血浆EBV-DNA作为鼻咽癌的一个肿瘤标志物已被广泛研究且其可靠性已得到验证^[7-9]。Lo等^[10,11]研究发现,96%鼻咽癌患者血浆中能够检测到EBV-DNA的表达,并提出临床分期与EBV-DNA拷贝数呈正相关,提示可在分子水平对鼻咽癌临床分期进行补充。本组中的127例治疗前血浆EBV-DNA拷贝数表达阳性的局



部晚期患者中,Ⅲ期患者血浆 EBV-DNA 拷贝数的中位水平数 7400copies/ml,Ⅳa 期为 14 900copies/ml,与既往报道相符。

既往文献报道鼻咽癌肿瘤体积可以作为预测预后的一个良好指标^[4,12],肿瘤体积是反映肿瘤负荷最直接、最客观的指标,肿瘤体积越大提示预后不良,其总生存率越低。Lo 等^[13]认为血浆中 EBV-DNA 表达水平与患者体内肿瘤细胞的负荷相关,可能来源于坏死的肿瘤细胞。本研究中我们将肿瘤负荷用原发肿瘤体积及颈部淋巴结体积来表示,165 例局部晚期鼻咽癌患者治疗前原发肿瘤体积、淋巴结体积及总体积中位值分别为 72.46、23.26、106.25cm³,通过双变量分析,结果发现治疗前血浆 EBV-DNA 拷贝数与颈部转移淋巴结的体积和总体积均有显著相关性($P<0.001$),但与原发肿瘤体积并无显著相关性($P>0.05$)。结果表明局部晚期鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 拷贝数的主要影响因素为颈部转移淋巴结情况。

本研究中 165 例患者随访 2 年共 28 例患者发生远处转移,2 例患者死亡,其中治疗前 DNA 拷贝数阳性的 127 例患者 26 例远处转移,2 例死亡。我们认为肿瘤的复发和转移可能与治疗前血浆 EBV-DNA 水平高低有关。Chan 等研究表明治疗前血浆 EBV-DNA 水平可以用于评价鼻咽癌患者的无进展生存率和总生存率,并指出治疗前小于 4000copies/ml 和治疗后小于 500copies/ml 的患者可以获得较好的生存率^[14,15]。本研究中 127 例患者治疗前血浆 EBV-DNA 水平表达为阳性,其中位拷贝数为 9090copies/ml,大于 4000copies/ml,随访结果显示预后不良,与报道一致。

Lo 等^[8]检测了 10 例放疗后复发的鼻咽癌患者,发现其血浆 EBV-DNA 中位拷贝数为 32 350copies/ml,而 15 例缓解期的患者却为 0copies/ml。Leung 等^[16]对 19 例鼻咽癌患者进行了 45 个月的随访,发现发生远处转移患者的血浆 EBV-DNA 中位拷贝数远高于未发生转移者的患者。本组患者中有 38 例患者治疗前血浆 EBV-DNA 水平为阴性,末次随访时无死亡患者,且仅有 2 例患者发生远处转移,2 年总生存率和无病生存率分别为 100.0%和 94.4%。而另 127 例治疗前血浆 EBV-DNA 水平为阳性的患者有 26 例发生远处转移,2 例死亡,2 年总生存率和无病生存率分别为 98.4%和 80.8%,其中 2 年无病生存率

低于治疗前血浆 EBV-DNA 水平为阴性者 ($P=0.044$),与既往研究结果相符,进一步提示治疗前血浆 EBV-DNA 水平可能是鼻咽癌患者的预测因素。

综上所述,局部晚期鼻咽癌患者治疗前血浆 EBV-DNA 拷贝数与颈部转移淋巴结体积有显著正相关性,说明治疗前血浆 EBV-DNA 水平可能主要取决于颈部转移淋巴结负荷。治疗前血浆 EBV-DNA 水平能够预测局部晚期鼻咽癌患者的预后,治疗前血浆 EBV-DNA 水平阴性的患者可能预后较好。

参考文献:

- [1] Lee AW, Ng WT, Chan YH, et al. The battle against nasopharyngeal cancer [J]. *Radiother Oncol*, 2012, 104 (3): 272-278.
- [2] Zhang W, Dou H, Lam C, et al. Concurrent chemoradiotherapy with or without adjuvant chemotherapy in intermediate and locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34 (3): 1729-1736.
- [3] Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdikul S, et al. Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(3): 1046-1051.
- [4] Chen CB, Pan JJ, Chen LS, et al. Significance of primary tumor volume on prognosis in nasopharyngeal carcinoma treated by intensity-modulated radiotherapy [J]. *Chinese Journal of Radiation Oncology*, 2012, 21(3): 205-208. [陈传本, 潘建基, 陈荔莎, 等. 调强放疗条件下鼻咽癌原发肿瘤体积对预后的影响 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2012, 21 (3): 205-208.]
- [5] Song LB, Zeng MS, Liao WT, et al. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (12): 6225-6232.
- [6] Sun Y, Tang LL, Chen L, et al. Promising treatment outcomes of intensity-modulated radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma patients with N0 disease according to the seventh edition of the AJCC staging system [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 68.
- [7] Lin JC, Wang WY, Chen KY, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(24): 2461-2470.
- [8] Lo YM, Chan LY, Chan AT, et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (12): 3225-3232.

- noma[J].Cancer res, 1999, 59(21):5452-5455.
- [9] Zuo Y, Liao S, Xu Z, et al. A new version of targeted mini-circle producer system for EBV-positive human nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncol Rep, 2014, 32(6): 2564-2570.
- [10] Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Plasma cell-free Epstein-Barr virus DNA quantitation in patients with nasopharyngeal carcinoma: correlation with clinical staging [J]. Ann NY Acad Sci, 2000, 906: 99-101.
- [11] Lo YM. Prognostic implication of pretreatment plasma/serum concentration of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2001, 55(7): 362-365.
- [12] Chen C, Fei Z, Pan J, et al. Significance of primary tumor volume and T-stage on prognosis in nasopharyngeal carcinoma treated with intensity-modulated radiation therapy[J]. Jpn J Clin Oncol, 2011, 41(4): 537-542.
- [13] Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 2000, 60(9): 2351-2355.
- [14] Wang YL, Si YF, He N, et al. Dynamic observation of EB virus DNA load before and after the treatment in patients with nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2014, 28(11): 801-804. [王勇利, 司勇锋, 何宁, 等. 鼻咽癌治疗前后 EB 病毒 DNA 载量的动态观察及临床意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(11): 801-804.]
- [15] Chan AT, Lo YM, Zee B, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(21): 1614-1619.
- [16] Leung SF, Chan AT, Zee B, et al. Pretherapy quantitative measurement of circulating Epstein-Barr virus DNA is predictive of posttherapy distant failure in patients with early-stage nasopharyngeal carcinoma of undifferentiated type[J]. Cancer, 2003, 98(2): 288-291.

《胸部肿瘤放射治疗策略》出版启事

由毛伟敏教授和许亚萍教授组织浙江省肿瘤医院/浙江省胸部肿瘤研究指导中心的中青年骨干编写的《胸部肿瘤放射治疗策略》，是一本系统介绍胸部恶性肿瘤诊断以及放射治疗规范和进展的学术专著。

全书内容主要针对临床一线的放射治疗工作者，以循证医学为基础，并结合目前国内外的临床指南，重点介绍了肺癌、食管癌、乳腺癌等常见胸部恶性肿瘤近年来的放射治疗新技术、新进展，放射治疗与化疗、靶向治疗、内分泌治疗、手术治疗等手段的联合应用，并对肿瘤的疗效评价、放射治疗并发症的处理作了较为详细的阐述。大量引用了近年来国内外的最新资料，并参考了美国国立综合癌症网络(NCCN)发布的 2013 指南中的诊治规范。

体现综合治疗的原则是该书的另一特点。在胸部恶性肿瘤中有较多争议的部分，如局部晚期非小细胞肺癌的多学科综合治疗，由多个科室的专家联合执笔，以两个章节的篇幅详细阐述；在以手术为基础的食管癌多学科综合治疗部分，全面地讨论了手术与术前新辅助放化疗联合以及术后辅助放化疗联合的意义。

该书由中国抗癌协会副理事长、山东省肿瘤医院院长、中国工程院院士于金明教授作序，由美国 Georgia Regents University 的 Feng-Ming (Spring) Kong 教授和浙江省肿瘤医院陈明教授担任主审，由军事医学科学出版社出版发行。