

## 417 例初诊鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 检测结果分析<sup>①</sup>

陈慧, 李付贵<sup>②</sup>

(广东省中山市人民医院肿瘤研究所, 广东 中山 528403 E-mail: 1842270832@qq.com)

**摘要:** **目的** 回顾性分析 417 例初诊鼻咽癌患者的血浆 EB 病毒(EBV)-DNA 检测结果, 评估血浆 EBV-DNA 水平对鼻咽癌的辅助诊断价值以及与 TNM 分期的关系。 **方法** 以 2013 年 8 月—2015 年 8 月间在中山市人民医院肿瘤科住院的初诊鼻咽癌患者 417 例为研究对象, 同时选取 95 例鼻咽炎症及健康人群 211 例为对照, 抽取外周血分离血浆, 提取 EBV-DNA, 采用定量 PCR 方法测定 EBV-DNA 水平。分析初诊鼻咽癌的 EBV-DNA 阳性检出率及其与 TNM 分期的关系。 **结果** 初诊鼻咽癌患者 EBV-DNA 总阳性检出率为 82.97%。临床早期(I 期+II 期)EBV-DNA 阳性检出率只有 61.00%, 临床中晚期(III 期+IV 期)可达到 89.91%。I 期+II 期 EBV-DNA 含量低于 III 期+IV 期( $P < 0.01$ )。T1 期、T2 期与 T3 期、T4 期比较, EBV-DNA 含量差异也具有统计学意义( $P < 0.01$ )。N0 期、N1 期和 N2 期之间 EBV-DNA 中位值并无明显差异, 而前三者中位值则显著低于 N3 期中位值( $P < 0.05$ )。M0 期和 M1 期的 EBV-DNA 中位值之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。 **结论** 血浆 EBV-DNA 水平与鼻咽癌临床分期密切相关, 可作为鼻咽癌诊断和临床分期的分子指标。

**关键词:** 鼻咽癌; EBV-DNA; TNM 分期

**中图分类号:** R739.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-5817(2017)02-0094-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.02.003

### Analysis of plasma EBV-DNA in 417 patients with newly diagnosed nasopharyngeal carcinoma

Chen Hui, Li Fugui

(Cancer Research Institute, Guangdong Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528403, Guangdong, China E-mail: 1842270832@qq.com)

**Abstract:** **Objective** To retrospectively analyze plasma EBV-DNA in 417 patients with newly diagnosed nasopharyngeal carcinoma (NPC) and to evaluate the value of plasma EBV-DNA for supplementary diagnosis of nasopharyngeal carcinoma and the relationship between EBV-DNA and TNM staging. **Methods** A total of 417 newly diagnosed NPC patients hospitalized at Zhongshan People's Hospital from August 2013 to August 2015 were enrolled in this study. At the same time, 95 cases of nasopharyngeal inflammation and 211 healthy individuals were selected as controls. Peripheral blood was drawn for isolating plasma, and EBV-DNA was extracted. The level of EBV-DNA was determined by quantitative PCR. An analysis of detection rate of positive-EBV-DNA in newly diagnosed nasopharyngeal carcinoma and its relationship with TNM staging was done.

**Results** The total detection rate of positive-EBV-DNA in patients with newly diagnosed nasopharyngeal carcinoma was 82.97%. The detection rate of positive-EBV-DNA of clinical early stage (stage I + stage II) nasopharyngeal carcinoma was only 61.00%, while the detection rate of positive-EBV-DNA of clinical moderate late stage (stage III + stage IV) nasopharyngeal carcinoma reached to 89.91%. The content of EBV-DNA at stages I and II was significantly lower than that at stages III and IV ( $P < 0.01$ ). Compared the content of EBV-DNA at stages T1 and T2 with that at stages T3 and T4, there were statistically significant differences ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in EBV-DNA median value among stages N0, N1 and N2, while the median value of the first three stages were significantly lower than that of stage N3 ( $P < 0.05$ ). Comparison of the EBV-DNA median value between stage M0 and stage M1 showed that there was also statistical difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Plasma EBV-DNA level is closely related to clinical staging of nasopharyngeal carcinoma and can be used as a molecular marker for diagnosis and clinical staging of nasopharyngeal carcinoma.

**Key words:** nasopharyngeal neoplasms; EBV-DNA; TNM staging

① 基金项目: 广东省医学科研基金(A2016613)

② 通信作者, E-mail: leef2002@126.com

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是高发于中国南方及东南亚部分地区的常见恶性肿瘤,其中流经广西、广东的西江流域是全球鼻咽癌高发区(发病率为10~30/100,000人年)<sup>[1]</sup>。中山地区地处西江流域下游,发病率居广东前列<sup>[2]</sup>。鼻咽癌主要影响20~65岁青壮年,是严重威胁华南高发区居民生命健康的重大公共卫生问题<sup>[3]</sup>。循环游离DNA在各类疾病、尤其是恶性肿瘤的研究中逐渐受到重视<sup>[4]</sup>。对鼻咽癌而言,上世纪末研究人员在血液循环中检测到游离的EB病毒(EBV)-DNA片段,为鼻咽癌分子诊断提供了新的、有重要价值的工具,直到今日仍是临床研究的热点。我们运用荧光定量PCR方法检测中山地区417例初诊鼻咽癌患者的血浆游离EBV-DNA水平,结合临床特征进行分析,以期揭示本地区初诊鼻咽癌患者血浆EBV-DNA特点,并评价此方法的临床应用价值,为鼻咽癌的临床诊治及预后提供重要参考依据。

## 1 资料和方法

1.1 研究对象 研究对象为2013年8月—2015年8月广东省中山市人民医院收治的417例初诊鼻咽癌患者,经病理学检查证实均为非角化性鼻咽癌(排除极少数的角化性癌),TNM分期依据鼻咽癌2008分期标准<sup>[5]</sup>,纳入NPC组。另设对照组1为鼻咽炎症患者95例,其中鼻咽黏膜慢性炎症41例、慢性鼻窦炎20例、鼻咽炎性息肉16例、慢性鼻炎11例、慢性咽炎4例、鼻中隔偏曲3例;对照组2为中山某镇区参加鼻咽癌筛查的健康人群211名。收集研究对象抗凝血(2 ml/例),分离血浆后置于-80℃保存。

1.2 仪器与试剂 血浆DNA抽提试剂(煮沸法,广州达安基因公司);定量PCR试剂、阳性定量参考品、阴性质控品(广州达安基因公司委托生产);EBV强阳性质控品、EBV临界阳性质控品(广州市邦德盛生物科技有限公司);EBV-DNA引物为香港大学微生物系馈赠;美国ABI 7500型实时荧光定量PCR系统[Life Tech(applied biosystems)];超净工作台(苏州安泰);高速低温离心机,恒温金属浴(珠海黑马);医用冰箱(德国西门子)。

1.3 检测指标 提取研究对象血浆标本获得血浆游离DNA,实验步骤严格按照广州达安基因EBV-DNA核酸定量试剂盒的操作规程,检测结果以Ct值 $\leq 40$ ,且有明显S型扩增曲线者判定为阳性。

## 1.4 实验方法

1.4.1 血浆游离DNA提取和纯化 保存于-80℃的血浆样本实验前平衡至常温;取已消毒的1.5 ml EP离心管,各管分别加入30  $\mu$ l样本血浆、阳性定量参考品、阴性质控品、EBV强阳性质控品、EBV临界阳性质控品;各管再加入70  $\mu$ l DNA提取液,用振荡

器剧烈混匀15 s,瞬时离心数秒;将EP管置于100℃恒温金属浴10 min,再以12 000 r/m离心5 min;取上清10  $\mu$ l点样,盖上试管盖,8000 r/m离心数秒后上机。

1.4.2 引物及探针的设计与合成 本实验引物和探针序列由香港大学微生物系提供<sup>[6]</sup>,委托广州达安基因公司合成并优化。上游引物序列:W-120F(5'-GGTCGCCAGTCCTACCA-3');下游引物序列:W-205R(5'-GCTTACCACCTCTCTTCTTGCT-3');探针序列:5'-(FAM) CCAAGAACCCAGACGAGTC-CGTAGAAGG (TAMRA)-3'。

1.4.3 反应循环参数的设置 反应条件为50℃ 2 min,再95℃ 10 min,95℃ 15 s,最后60℃ 1 min,共50个循环。反应结束后,用计算机将样本和标准曲线对比,计算出待测样本中的EBV-DNA拷贝数。

1.4.4 定量标准曲线的建立 用稀释成不同浓度的阳性质控品在ABI-7500型扩增仪上进行扩增反应。PCR反应过程中,每个循环实时检测一次产物量,反应结束时,得出PCR扩增的动力学曲线及荧光定量标准曲线<sup>[7]</sup>。

1.4.5 血浆EBV-DNA含量的计算 血浆EBV-DNA拷贝数 $C=Q \times (VDNA/VP\text{CR}) \times (1/V\text{ext})$ ,其中C为待测血浆中EBV-DNA的浓度(copies/ml),Q代表PCR扩增后计算机检测的原始DNA拷贝数,VDNA代表抽提得到的DNA稀释液体积,VP\text{CR}为用于PCR扩增的DNA体积,Vext代表抽提DNA所用的血浆体积<sup>[8]</sup>。检测极限为100 copies/ml,大于该值为阳性。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行分析,计数资料用中位值M(P25,P75)表示,计数资料用百分数表示,对变量进行正态性检验(D检验),非正态分布资料使用秩和检验(Mann-Whitney U检验);检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 初诊鼻咽癌患者一般临床资料特点 初诊鼻咽癌患者417例,其中男性305例,女性112例,年龄范围17~83岁,平均48.3岁;对照组1(鼻咽炎症患者)95例,其中男性70例,女性25例,年龄范围22~76岁,平均47.8岁;对照组2(参与鼻咽癌筛查的健康人群)211例,其中男152例,女59例,年龄范围25~71岁,平均46.6岁。本地区初诊鼻咽癌患者就诊年龄虽不呈正态分布( $P < 0.05$ ),但从图1中可观察到,高峰年龄位于40~60岁,其中最高值集中于45~50岁,且男性明显多于女性,表明鼻咽癌对本地区中壮年劳动力的威胁程度更高(见表1)。从病理类型来看,中山地区绝大多数鼻咽癌患者为未分化型非角化性癌,

因此本研究对象未包含占比极少的角化性癌患者。从临床分期来看, I 和 II 期初诊患者仅占全部人数的 23.98%, 绝大多数患者就诊时候已经处于临床 III 或 IV 期(T、N 分期也多处于中后期), 甚至已经发生远处转移, 这些都是预后不佳的提示(见表 1)。

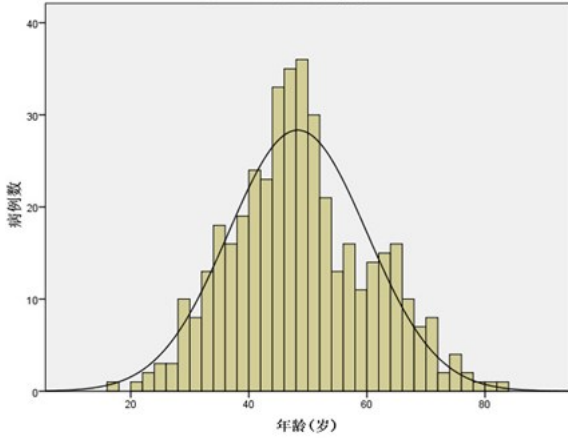


图 1 初诊鼻咽癌患者年龄分布特点

2.2 血浆 EBV-DNA 的诊断价值 从表 2 中可以观察到, 417 例初诊鼻咽癌患者的血浆 EBV-DNA 总的阳性检出率为 82.97%(346/417)。对于临床早期(I 期+II 期), 其阳性检出率仅为 61.00%; 而对于临床中晚期(III 期+IV 期)患者, 其阳性检出率接近 89.91%。具体从四个不同临床分期的结果来看, 随着

表 1 鼻咽癌患者及对照组的临床资料特征

特征参数	鼻咽癌患者	非鼻咽癌对照	
		鼻咽炎症患者	健康对照者
数量	417	95	211
年龄均值(最小,最大)/岁	48.3(17,83)	47.8(22,76)	46.6(25,71)
性别			
男性	305	70	152
女性	112	25	59
EBV-DNA 含量			
<100copies/ml	71	94	209
>100copies/ml	346	1	2
临床分期			
I / II / III / IV	18/82/225/92		
T 分期			
T1/T2/T3/T4	85/104/158/70		
N 分期			
N0/N1/N2/N3	43/157/199/18		
M 分期			
M0/M1	402/15		

临床分期增加, 血浆 EBV-DNA 的阳性检出率逐渐提高。而同样的趋势也可以在 T、N、M 分期中观察到。此外 EBV-DNA 的特异度可达 99.02%, 这意味着只有 1% 左右的受检者有误诊可能。而阳性预测值可达 99.14%; 阴性预测值则较低, 只有 80.75%, 提示其阴性结果可能会导致较高的漏诊率。

表 2 初诊鼻咽癌患者 EBV-DNA 阳性检出率

诊断准确性	鼻咽癌占比(%) (数量/总数)	95% CI	对照占比(%) (数量/总数)	95% CI
灵敏度				
I 期	38.89(7/18)	16.37~61.41		
II 期	65.85(54/82)	55.59~76.11		
III 期	88.00(198/225)	83.75~92.25		
IV 期	94.57(87/92)	89.94~99.20		
I 期+II 期	61.00(61/100)	51.44~70.56		
III 期+IV 期	89.91(285/317)	86.59~93.23		
I 期+II 期+III 期+IV 期	82.97(346/417)	79.36~86.58		
特异度			99.02(303/306)	97.92~100.00
阳性预测值 PPV	99.14(346/349)	98.17~100.00		
阴性预测值 NPV	80.75(303/374)	77.05~84.99		
T1 期	61.18(52/85)	50.82~71.54		
T2 期	85.58(89/104)	78.83~92.33		
T3 期	88.61(140/158)	83.66~93.56		
T4 期	92.86(65/70)	86.83~98.89		
N0 期	60.47(26/43)	45.86~75.08		
N1 期	77.56(121/156)	71.01~84.11		
N2 期	90.50(181/200)	86.44~94.56		
N3 期	100.00(18/18)	—		
M0 期	82.34(331/402)	78.61~86.07		
M1 期	100.00(15/15)	—		

2.3 各临床分期 EBV-DNA 结果比较 将临床早期(I 期+II 期)和晚期(III 期+IV 期)患者的 EBV-DNA 含量比较,其中位值分别为 101(0,1542) copies/ml 和 5789(733,53950) copies/ml,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。将 T1 期和 T2 期与 T3 期和 T4 期比较,其中位值分别为 742(0,6370) copies/ml 和 7945(953,58850) copies/ml,差异也具有统计学意义( $P < 0.01$ )。而对于 N 分期而言,N0 期、N1 期和 N2 期之间 EBV-DNA 含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而三者中位值 2240(101,22900) copies/ml 与 N3 中位值 28250(3187,259500) copies/ml 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。对于 M 分期而言,M0 期和 M1 的中位值分别为 2375(101,22900) copies/ml 和 27800(2880,151000) copies/ml,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

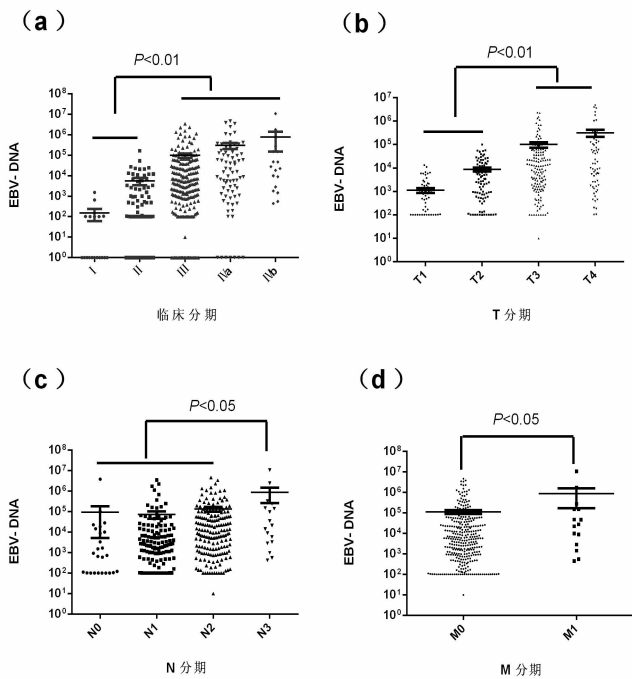


图 2 不同临床分期和 TNM 分期患者的 EBV-DNA 比较

### 3 讨论

目前鼻咽癌的发生机制并不明确,以早发现、早诊断以及早治疗为主的肿瘤二级预防策略仍是提高鼻咽癌患者生存率、改善生存质量的最有效途径。从本研究结果来看,中山地区初诊鼻咽癌患者大多数就诊时已处于临床 III 或 IV 期,错过了最佳治疗期,这对于其预后是不良因素,因此鼻咽癌的早期筛查和早期诊治工作将成为本地区未来鼻咽癌防治的重点工作。此外,本地区初诊患者的年龄分布接近正态分布,多数患者为 40~60 岁的男性,尤其以 45~50 岁为最多,反映出鼻咽癌对中壮年劳动力人群构成极大威胁,这与很多其他种类恶性肿瘤随年龄增加而发病率增加不同。另一方面,这也提示本地区中壮年人群应重视和加强健

康体检,尽早发现和早期治疗疾病,以获得较好的治疗效果和预后。

早在 20 世纪 40 年代,研究发现某些疾病状态下,机体血液循环中的游离 DNA 水平明显高于健康人。此后不断有学者在不同的肿瘤、炎症等疾病中证实循环 DNA 与疾病的关系<sup>[9]</sup>。20 世纪末 Mutirangura 等<sup>[10]</sup>首先采用巢式 PCR 在鼻咽癌患者血清中扩增出 EBV-DNA 条带。随后香港学者 Lo YM 等<sup>[11]</sup>采用荧光定量 PCR 扩增到 EBV-DNA 片段,从此开始了 EBV-DNA 在科研和临床中的广泛应用。目前,已有研究探讨 EBV-DNA 在鼻咽癌诊断中的价值。国内曹素梅等<sup>[12]</sup>报道 EBV-DNA 检测在初诊鼻咽癌患者中的阳性率为 84.0%,健康对照组为 9.30%。邓蕾<sup>[13]</sup>检测鼻咽癌患者白细胞及鼻咽分泌物中 EBV-DNA 含量,认为鼻咽分泌物检测更有意义。Chan KC 等<sup>[7]</sup>用 FQ-PCR 检测鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 的敏感度和特异度分别为 96% 和 93%。

在本回顾性研究中,我们检测了中山地区 417 例初诊鼻咽癌患者 EBV-DNA 水平,其总体阳性检出率为 82.97%。这个结果与国内有些报道一致,而有些研究阳性检出率甚至高达 95% 以上。造成差异的原因主要有:首先是提取循环游离 DNA 的方法不同。很多研究采用离心柱提法,将血浆 DNA 富集,因而能增加阳性检出率,但其 DNA 抽提成本高,制约了其在临床上的应用,尤其是在基层医院的开展。其次是采用的血浆量不同。如果加大血浆量,可提高 EBV-DNA 得率,增加检出概率。最后不同的荧光定量 PCR 引物和探针检测效能也会导致检测的差异。本研究样本均来自临床检测样本,所使用的 DNA 抽提方法为 DNA 提取液(主要成分:Tris-HCl、TritonX-100、NP-40 及 Chelex-100 等)与血浆混合,然后 100 °C 煮沸,主要是考虑到检测成本与检测效能的平衡。关于血浆用量,我们仅采用 30  $\mu$ l,下一步可考虑加大血浆量以提高 DNA 阳性检出率。由于临床病例血浆采集难度大,因此在较少的血浆量以及较低的成本的情况下,能得到相对准确、高效的检测结果,这是本方法的优势之一。另一方面,虽然灵敏度不是很高,但本方法的特异度很高,非鼻咽癌的阳性检出率不到 2%,这意味着绝大多数受检者不会受到误诊。而若能够结合检测成本低的 EBV 血清学抗体检测,则有可能进一步提高阳性检出率,这也是我们下一步的研究方向。

进一步的分析发现,不同临床分期下 EBV-DNA 阳性率有差别,随着临床分期增加,EBV-DNA 的阳性率也会增加,并且在 T、N、M 分期中也发现了相同的趋势,提示 EBV-DNA 的检出与 T、N 及 M 分期均密切相关。通过回顾性研究,我们发现 EBV-DNA 的临床应用,确实为鼻咽癌的辅助诊断提供了非常好的工具。但是另一方面,目前早期(临床 I + II 期)鼻咽癌

的灵敏度只有 60% 左右,对于这部分患者,EBV-DNA 的检测很难在其病情监测及预后评估中产生积极影响,因此必须进一步研究提高临床诊断效能的方法,尤其是早期鼻咽癌的诊断,从而更好地服务于临床。

#### 参考文献:

- [1] Cao SM, Simons MJ, Qian CN. The prevalence and prevention of nasopharyngeal carcinoma in China[J]. *Chin J Cancer*, 2011,30(2):114-119.
- [2] Wei KR, Yu YL, Yang YY, et al. Epidemiological trends of nasopharyngeal carcinoma in China[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010,11(1):29-32.
- [3] Ji MF, Yu YL, Cheng WM, et al. Detection of Stage I nasopharyngeal carcinoma by serologic screening and clinical examination[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(2): 120-123.
- [4] Karampini E, McCaughan F. Circulating DNA in solid organ cancers-analysis and clinical application[J]. *QJM*, 2016,109(4):223-227.
- [5] 中国鼻咽癌临床分期工作委员会. 鼻咽癌'92 分期修订工作报告[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2009,18(1):1-12.
- [6] 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.
- [7] Chan KC, Lo YM. Clinical applications of plasma Epstein-Barr virus DNA analysis and protocols for the quantitative analysis of the size of circulating Epstein-Barr virus DNA[J]. *Methods Mol Biol*, 2006,336:111-121.
- [8] 俞霞, 季明芳, 程伟民, 等. 鼻咽癌高危人群血浆 EBV-DNA 定量分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014,21(17):1309-1312.
- [9] Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer[J]. *Clin Chem*, 2015,61(1):112-123.
- [10] Mutirangura A, Pornthanakasem W, Theamboonlers A, et al. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 1998,4(3):665-669.
- [11] 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*, 1999,59(21):5452-5455.
- [12] 曹素梅, 高劲松, 刘晓东, 等. 荧光定量 PCR 法检测血浆 EB 病毒 DNA 在鼻咽癌诊断上的价值[J]. *癌症*, 2002,21(3):328-329.
- [13] 邓蕾. 静脉血和鼻咽分泌物 EB 病毒 DNA 检测结果的比较研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2015,37(5):715-716.

收稿日期:2017-03-19;修回日期:2017-04-11

## 《右江民族医学院学报》采编系统启用通告

为适应信息化时代期刊发展的需要,缩短审稿流程,加快稿件处理速度,方便作者投稿和专家审稿,本刊自 2015 年 10 月 1 日起至 2015 年 10 月 31 日期间试运行期刊采编系统,2015 年 11 月 1 日起正式投入使用。

登录本刊网站 <http://yjzxyx.cnjournals.com/> 即可进入采编系统平台进行投稿或审稿。该采编系统平台由作者在线投稿、专家在线审稿、主编在线办公和编辑在线办公四部分组成。作者进行在线投稿并可查询稿件的处理进度,审稿专家从专家登录口进入审稿中心可进行稿件审阅。试运行期间作者可使用原学报投稿邮箱 [yyxb1979@126.com](mailto:yyxb1979@126.com),自 2015 年 11 月 1 日起正式启用期刊采编系统后,学报投稿邮箱停止使用投稿功能。敬请广大读者、投稿作者、审稿专家使用本系统,并向编辑部反馈意见,以不断对系统进行改进。如您在操作上遇到任何问题,请与编辑部联系:0776-2843414。感谢您对本刊的关注与支持! 欢迎踊跃投稿!



扫一扫

《右江民族医学院学报》编辑部