

EB 病毒在不同类型淋巴瘤中的表达及检测方法的比较

卢 璐 孙文文 袁凤菊 杨开颜

摘 要 **目的** 探讨 EB 病毒(EBV)在不同类型淋巴瘤中的表达差异及对用于检测 EBV 表达的 3 种实验方法(免疫组织化学、原位杂交、PCR)进行比较分析。**方法** 收集明确诊断淋巴瘤石蜡组织 57 例,包括结外 NK/T 细胞淋巴瘤(NK/TCL)鼻型 12 例、血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤(AITCL)13 例、霍奇金淋巴瘤(HL)12 例、弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)20 例,应用免疫组织化学(IHC)、原位杂交(ISH)、聚合酶链反应技术(PCR)分别检测淋巴瘤中 EBV 蛋白(LMP-1)、EBV 潜伏相关 RNA(EBER1)、EBV(DNA)的表达情况。**结果** 57 例淋巴瘤组织中 EBV 蛋白(LMP-1)、EBER1、EBV DNA 总阳性表达率分别为 17.5% (10/57)、47.4% (27/57)、50.9% (29/57)。其中 NK/TCL 鼻型为 8.3% (1/12)、83.3% (10/12)、91.7% (11/12);AITCL 为 30.8% (4/13)、53.8% (7/13)、61.5% (8/13);HL 为 33.3% (4/12)、41.7% (5/12)、41.7% (5/12);DLBCL 为 5.00% (1/20)、25.0% (5/20)、25.0% (5/20)。PCR 及原位杂交检测方法比免疫组化更敏感($P < 0.05$)。**结论** EBV 感染在不同类型的淋巴瘤中表达存在差异,3 种检测方法之间的阳性表达率也不同且 ISH 和 PCR 检测方法优于 IHC。

关键词 EB 病毒 淋巴瘤 免疫组织化学 原位杂交 聚合酶链反应技术

[中图分类号] R373.1

[文献标识码] A

Expression of EBV in Lymphomas of Different Types and Comparison of Different Detection Methods. Lu Lu, Sun Wenwen, Yuan Fengju, Yang Kaiyan. The Pathology Department of First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of EBV in different types of lymphomas and comparative three different detection methods (IHC, ISH, PCR). **Methods** We collected 57 lymphomas including extranodal NK/T cell nasal type lymphoma 12 cases, angioimmunoblastic T cell lymphoma 13 cases, Hodgkin's lymphoma 12 cases and diffuse large B-cell lymphoma 20 cases. The expression of EBV protein LMP-1, EBER1 mRNA and EBV DNA in 57 lymphomas were analyzed by immunohistochemistry (IHC), in situ hybridization (ISH) and Polymerase chain reaction (PCR). **Results** The positive results of EBV LMP-1 protein expression, EBER1 mRNA expression and EBV DNA expression were 17.5% (10/57), 47.4% (27/57), 50.9% (29/57) respectively in 57 cases of lymphoma, including 8.3% (1/12), 83.3% (10/12), 91.7% (11/12) in extranodal NK/T cell nasal type lymphoma, 30.8% (4/13), 53.8% (7/13), 61.5% (8/13) in AITCL, 33.3% (4/12), 41.7% (5/12), 41.7% (5/12) in HL, 5.00% (1/20), 25.0% (5/20), 25.0% (5/20) in DLBCL. The expression rate of EBV by PCR and ISH was higher than IHC. **Conclusion** There was a close association between EBV infection and lymphomas, with variation among different types of lymphomas. The expression rate of EBV by IHC, ISH, PCR was variation. The expression rate of EBV by PCR and ISH was higher than IHC.

Key words EBV; Lymphoma; IHC; ISH; PCR

EB 病毒是一种嗜人类淋巴细胞的 DNA 病毒,属于人类疱疹病毒 4 型(γ -herpesvirus)在全世界的感染率大于 90%,大多数人终身 EBV 潜伏感染而无任何症状,少数情况下如机体免疫功能明显下降时,免疫系统与病毒之间的平衡被打破,则可引起严重的相关性疾病,特别是良性或恶性的淋巴增殖性疾病。国内外已有大量的文献报道,EBV 阳性检出率在不同地区,不同类型的淋巴瘤之间存在差异^[1,2]。本实验应用免疫组织化学、原位杂交及 PCR 方法对恶性淋

巴瘤中 EBV 感染进行检测,旨在探讨不同类型的淋巴瘤中 EBV 的感染情况和 3 种检测方法的差异性。

材料与方法

1. 标本:所有标本均为 2009 年 1 月~2011 年 12 月温州医科大学附属第一医院确诊为淋巴瘤的石蜡包埋组织 57 例,其中男性 34 例,女性 23 例,发病年龄 25~90 岁,中位发病年龄 56.5 岁。所有标本的切片均经 2 位以上病理专家重新阅读,并按照 WHO 2008 年淋巴瘤新分类诊断标准进行组织形态学分型。结外 NK/T 细胞淋巴瘤鼻型 12 例,血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤(angioimmunoblastic T-cell lymphoma, AITCL)13 例,霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma, HL)12 例,弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)20 例。

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院病理科

通讯作者:杨开颜,主任医师,电子信箱:1220235004@qq.com

2. 主要试剂: EBV LMP-1 单克隆抗体工作液、免疫组织化学两步法染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Rembrant 原位杂交试剂盒为 PanPath 公司产品, EBER 1 管核苷酸探针为地高辛标记, EBV 及 β -actin 引物合成并订购于上海生工生物工程有限公司。

3. 免疫组化检测 EBV Lmp-1: 采用免疫组织化学两步法, 具体操作按照试剂盒说明书进行。蜡块按常规切片厚 $4\mu\text{m}$, 脱蜡, 抗原高压修复后用一抗 4°C 冰箱孵育过夜, 再用二抗 37°C 孵育 30min, DAB 显色, 并用苏木素复染。PBS 液代替一抗作为阴性对照。Lmp-1 阳性定位于细胞质, 呈棕黄色颗粒。结果按阳性细胞所占比例分别记录, 无明显阳性细胞为阴性(-), 阳性细胞数 1%~25% 为弱阳性(+), 阳性细胞数 26%~50% 为中等阳性(++), 阳性细胞数 51%~75% 为强阳性(+++), 阳性细胞数 $\geq 75\%$ 为极强阳性(++++)。

4. 原位杂交检测 EBER1 mRNA 表达: 原位杂交具体步骤简述如下: ①石蜡切片脱蜡, 无水乙醇 5min, 自然干燥; ②胃蛋白酶 37°C 湿盒消化 30min, 梯度乙醇脱水 (70%、95%、100%), 自然干燥; ③杂交, 滴加探针并加盖玻片, 放置湿盒中 55°C 恒温箱孵育 60min, 37°C 湿盒孵育过夜。结果判定标准同免疫组化。

5. PCR 方法检测 EBV DNA 的表达: 首先是模板 DNA 的提取, 切 $10\mu\text{m}$ 厚石蜡切片 5~10 张, 脱蜡清洗干燥后, 用蛋白酶消化过夜, 然后进行 PCR 扩增: β -actin 引物上游为 5'-CCACACTGTGCCATCTACG-3', 下游为 5'-AGGATCTTCATGAGGTAGTCACTCAG-3', 目的片段长度为 99bp。EBV 引物上游为 5'-CCAGACAGCAGCCAATTGTC-3', 下游为 5'-GGTAGAAGACCCCTCTTAC-3', 目的片段长度为 123bp。PCR 反应体系为在 0.2ml 去酶 EP 管中依次加入 $2\times\text{PCR MIX}$ $10\mu\text{l}$ 、上游引物 $1\mu\text{l}$ ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)、下游引物 $1\mu\text{l}$ ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)、DNA $1\mu\text{l}$ 、 ddH_2O $7\mu\text{l}$ 。总反应体积为 $20\mu\text{l}$ 。PCR 反应体系参数: 根据预试验及参考文献, 确定退火温度 (T_m 值) 及循环数: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 58°C 退火 30s, 72°C 延伸 45s, 循环 40 次; 72°C 终末延伸 10min。最后是琼脂糖凝胶电泳, 取 $10\mu\text{l}$ PCR 扩增产物点样在 2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 溴化乙锭 ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 染色, 用条带凝胶图像分析系统观察、照相。

6. 统计学方法: 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 对不同类型淋巴瘤 EBV 表达差异、不同检测方式的比较及两两之间比较均采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫组化检测结果: 57 例淋巴瘤中总阳性表达率为 17.5% (10/57), 13 例 AITCL 中 4 例 (30.8%) 表达阳性, 其中 2 例为“+”2 例为“++”, 12 例 NK/TCL 中 1 例 (8.3%) 表达阳性为“++”, 12 例 HL 中 4 例 (33.3%) 表达阳性, 3 例为“++”, 1 例为“+”, 20 例 DLBC 中 1 例 (5.0%) 阳性为“++”。4 种类型淋巴瘤的 EBV LMP-1 的表达情况见图 1。

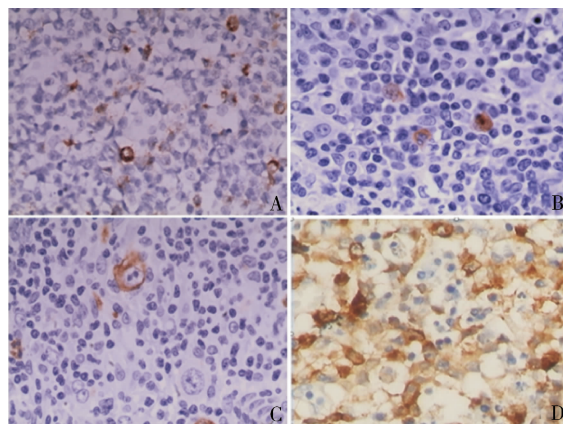


图 1 EBV LMP-1 在不同类型淋巴瘤中阳性表达 (IHC, $\times 400$)

A. 结外 NK/T 细胞淋巴瘤, 鼻型; B. 血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤; C. 霍奇金淋巴瘤; D. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤

2. 原位杂交结果: 本实验 57 例淋巴瘤总阳性表达率为 47.4% (27/57), 12 例 NK/TCL 中有 10 例 (83.3%) 表达阳性, 其中 1 例为“++++”, 6 例为“+++”, 3 例为“++”。13 例 AITCL 中有 6 例 (46.2%) 表达阳性, 6 例均为“+”。12 例 HL 中有 5 例 (41.7%) 表达阳性, 5 例均为“+”。20 例 DLBCL 中, 5 例表达阳性 (25.0%), 4 例为“+”, 1 例为“++++”, 此 1 例为器官移植后弥漫大 B 细胞淋巴瘤。4 种类型淋巴瘤的 EBER1 表达情况见图 2。

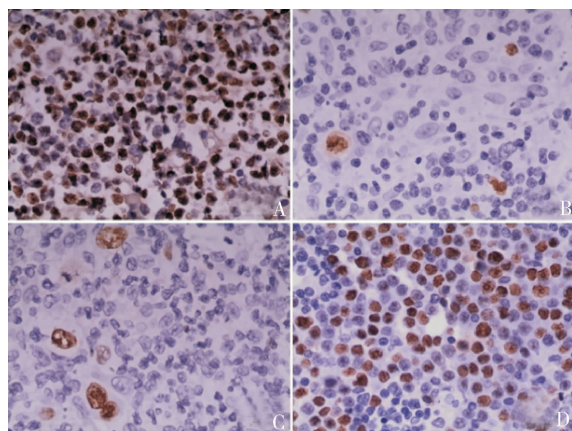


图 2 EBER1 mRNA 在不同类型淋巴瘤中阳性表达 (ISH, $\times 400$)

A. 结外 NK/T 细胞淋巴瘤, 鼻型; B. 血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤; C. 霍奇金淋巴瘤; D. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤

3. PCR 检测结果: 57 例淋巴瘤中 EBV 总阳性表达率为 50.9% (29/57), 12 例 NK/TCL 中 11 例 (91.7%) 表达阳性, 13 例 AITCL 中 8 例 (61.5%) 表达阳性, 12 例 HL 中 6 例 (50.0%) 表达阳性, 20 例

DLBCL 中 5 例表达阳性 (25.0%), 表达强弱有所不同。PCR 检测 EBV 感染淋巴瘤的表达情况见图 3。

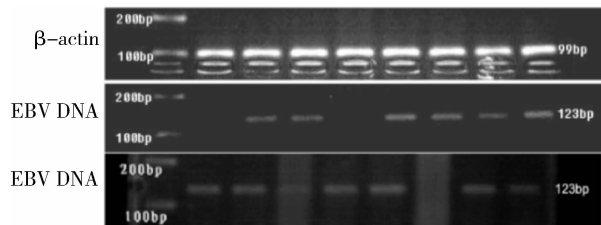


图 3 EBV DNA 在不同淋巴瘤中的表达

4. 不同类型淋巴瘤与 EBV 感染的关系及 3 种检测方法的比较: EBV 在 T 细胞淋巴瘤中的表达高于 B 细胞淋巴瘤与霍奇金淋巴瘤 ($P < 0.05$), NK/TCL 中的表达高于霍奇金淋巴瘤和弥漫大 B 细胞淋巴瘤 ($P < 0.05$), AITCL 中高于弥漫大 B 细胞淋巴瘤, 而结外 NK/TCL 与 AITCL、AITCL 与 HL、HL 与 DLBCL 之间表达差异均没有统计学意义 ($P > 0.05$)。在 3 种 EBV 检测方法中, PCR 及 ISH 优于 IHC ($P < 0.05$), 而 PCR 与 ISH 之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

Epstein-Barr 病毒 (EBV) 是 Epstein 和 Barr 于 1964 年在 Burkitt 淋巴瘤标本的体外传代细胞中发现, 具有嗜淋巴细胞和上皮细胞的特性。在细胞外成熟的病毒颗粒为球形, 直径为 150 ~ 180nm, EBV 病毒基因是线性双链 DNA, 基因组长平均为 172kb。EBV 以潜伏感染最为常见, 人群普遍易感。EBV 可长期潜伏在被感染的 B 细胞内, 形成持续的潜伏感染。其中仅极少数可发展为 EBV 相关的上皮细胞恶性肿瘤和淋巴瘤。本课题通过应用 3 种方法检测不同类型淋巴瘤中 EBV 感染情况来探讨 EBV 与不同类型淋巴瘤的感染情况及 3 种检测方法结果的差异性。

大量研究证明 EBV 与霍奇金淋巴瘤及部分 T、B 细胞来源的非霍奇金淋巴瘤均有一定的关系。EBV 感染与 HL 的关系较为密切, 但各国所报道的 HL 中 EBV 的检出率有很大的差异, 日本为 65%, 墨西哥为 67%。秘鲁为 94%, 肯尼亚为 92%。意大利为 41%, 美国为 50% 左右^[3]。本实验 HL 中 EBV DNA 的阳性表达率为 50.0%, 在我国报道的 48% ~ 57% 范围内^[4]。很多年来一直认为 EBV 感染仅与 B 细胞淋巴瘤的发病有关, 但越来越多的研究表明, 在非霍奇金淋巴瘤中, EBV 阳性的 T 细胞淋巴瘤远较 EBV 阳性的 B 细胞淋巴瘤多, 尤其是 NK/TCL 和 AITCL^[5]。其中 AITCL 中 EBV 检出率为 75%, 有学者报道 EBV 在

鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤中 DNA 检出率为 69.66%, 但 EBV 在 B 细胞淋巴瘤中的检出率仅为 5% ~ 8% 左右^[6-8]。本研究对 4 种淋巴瘤做了初步研究和阐述, 通过 PCR 数据分析显示 EBV 在 NK/TCL 和 AITCL 中表达偏高, 而在 HL 和 DLBCL 中表达偏低, 而 AITCL 与 HL 阳性率虽有差异, 但没有统计学意义, 结果表明 EB 病毒感染在不同类型的淋巴瘤中的存在着一定的差异性, 对临床是否把抗 EBV 治疗作为治疗某种类型淋巴瘤的必要手段有一定的参考价值。笔者将收集更多的标本对不同类型淋巴瘤与 EBV 的关系作进一步的研究。

研究表明, EBV 阳性的 NK/TCL 淋巴瘤患者生存率明显低于阴性患者, 故对 EBV 感染的检测至关重要^[9, 10]。EBV 的检测方式主要有免疫组化、原位杂交及聚合酶链反应, 而 3 种检测方法原理不同, 故检测结果存在一定的差异性。免疫组化检测方法中 LMP-1 为胞质及胞膜着色, 只能说明被感染细胞中 EBV 的蛋白表达情况, 检测不出病毒的定位和转录数量。但该方法具有操作简单、方便、价格便宜等优点。原位杂交检测 EBER 被认为检测肿瘤细胞中 EBV 的金标准, 其敏感度高, 特异性强, EBER1 染色为胞核着色, 结果清晰, 容易辨认, 反映的是 DNA 转录情况, 但实验周期较长 (36 ~ 40h), 过程较为繁琐^[11]。PCR 从 DNA 水平检测, 其敏感度比免疫组化和原位杂交高, 对样本要求低, 但 PCR 检测成本高且其特异性略差, 结果易受各种不确定因素影响, 易出现假阳性或假阴性, 有时需要多次重复才能得出可靠结果。3 种方法各有优缺点, PCR 与原位杂交方法敏感度比免疫组化高, 这与国外研究结论一致, 但免疫组化操作方便, 因此临床工作中可把免疫组化作为 EBV 的初筛方法^[12]。本实验 IHC、ISH、PCR 3 种方法阳性表达率分别为 17.5%、47.4%、50.9%, 数据分析显示 PCR 和 ISH 比 IHC 更为敏感, 而 PCR 与原位杂交之间没有统计学差异。EBV 阳性是淋巴瘤的独立不良预后因素, 故 EBV 的检测对于淋巴瘤的诊断、治疗、及预后具有重要的指导意义。检测方法不同可能是导致各报道中恶性淋巴瘤 EBV 检出率相差悬殊的原因之一。故建议在临床病理诊断工作中尽量将 3 种方法结合, 相互补充, 以提高其检出率。

EBV 在全世界感染率非常高, 尤其是在欠发达的国家, EBV 活动性感染以及 EBV 感染相关的淋巴瘤发病率更高, 因此加强 EBV 感染的检测和 EBV 阳性淋巴瘤的治疗是十分重要的。尽管关于 EBV 与淋

巴瘤之间关系的研究已经取得突破性进展,如抗 EBV 疫苗,但仍然存在很多问题。EBV 感染所致淋巴瘤的内在机制尚不明确,仍有待进一步研究。

参考文献

- 1 Trimeche M, Bonnet C, Korbi S, *et al.* Association between Epstein - Barr virus and Hodgkin's lymphoma in Belgium: a pathological and virological study[J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(7):1323 - 1331
- 2 Cho EY, Kim KH, Kim WS, *et al.* The spectrum of Epstein - Barr virus - associated lymphoproliferative disease in Korea; incidence of disease entities by age groups[J]. *J Korean Med Sci*, 2008, 23(2):185 - 192
- 3 Thompson MP, Kurzrock R. Epstein - Barr virus and cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3):803 - 821
- 4 周小鸽. 霍奇金淋巴瘤与 EB 病毒相关性研究进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2003, 2(1):22 - 27
- 5 Cohen JL, Kimura H, Nakamura S, *et al.* Epstein - Barr virus - associated lymphoproliferative disease in non - immunocompromised hosts; a status report and summary of an international meeting, 8 - 9 September 2008[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(9):1472 - 1482
- 6 Huh J, Cho K, Heo D S, *et al.* Detection of Epstein - Barr virus in Korean peripheral T - cell lymphoma[J]. *Am J Hematol*, 1999, 60

- (3):205 - 214
- 7 李开智, 浣孝强. 89 例鼻 NK/T 细胞淋巴瘤与 EB 病毒关系的研究[J]. *天津医药*, 2008, 36(5):343 - 345
- 8 De Roos AJ, Martinez - Maza O, Jerome KR, *et al.* Investigation of Epstein - Barr Virus as a potential cause of B - Cell non - Hodgkin lymphoma in a prospective cohort[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013
- 9 Lee J, Suh C, Huh J, *et al.* Effect of positive bone marrow EBV in situ hybridization in staging and survival of localized extranodal natural killer/T - cell lymphoma, nasal - type[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(11):3250 - 3254
- 10 彭金昀, 唐运莲, 何洁. 不同部位和类型恶性淋巴瘤与 EBV 感染相关性研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(20):1145 - 1149
- 11 Khan G. Screening for Epstein - Barr virus in Hodgkin's lymphoma[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 511:311 - 322
- 12 Ashraf MJ, Makarempour A, Monabati A, *et al.* Comparison between presence of Epstein Barr virus in nodal and extra nodal diffuse large B cell lymphoma of head and neck, an Iranian experience[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2012, 14(12):764 - 770

(收稿日期:2013 - 09 - 07)

(修回日期:2013 - 10 - 17)

患者在 ICU 期间血流感染的发生率及对患者结局的影响

吴长江 黎宁君 朱团结

摘要 **目的** 调查患者在 ICU 期间血流感染的发生率并评估其对患者结局的影响。**方法** 对所有进入 ICU 并且在 ICU 期间送检血培养的患者进行回顾性分析,记录的数据包括患者人口统计数据、可能的感染源、既往抗生素使用情况和 ICU 内的处理过程。使用急性生理学与慢性健康状况评分系统 II 对患者病情的严重程度进行评估。**结果** 在被调查的 567 名患者中,42% 的患者使用过抗生素,64% 的患者因急症直接进入 ICU,10.76% 的患者来自病房,19.05% 的患者来自其他类 ICU,19.05% 的患者转自其他医院。血培养阳性患者占 10.6%,其病死率显著高于血培养阴性患者(45% vs 13.6%, $P=0.000$)。通过 Logistic 回归分析发现,只有抗生素的使用与血流感染患者高病死率具有统计学意义上的相关性($P=0.002$)。**结论** 在疑似感染的 ICU 患者中只有少数患者血培养是阳性的,然而这些血培养阳性患者的预后是很差的,特别是正在使用抗生素而血培养为阳性的患者。

关键词 血流感染 多脏器功能障碍 血流感染的危险因素

[中图分类号] R515

[文献标识码] A

Incidence of Bloodstream Infection in the Intensive Care Unit and Its Impact on the Prognosis of Patients. Wu Changjiang, Li Ningjun, Zhu Tuanjie. *Intensive Care Unit, Suzhou Kowloon Hospital Shanghai Jiaotong University Medical School, Jiangsu 215000, China*

Abstract Objective To investigate the incidence of bloodstream infection for patients suspected to have infection at the time of ICU admission and to assess its impact on the outcome. **Methods** Retrospective cohort study from all the admissions in ICU, in whom blood cultures sent at the time of admission were analyzed. Data regarding patient demographics, probable source of infection, previous

作者单位:215000 上海交通大学医学院苏州九龙医院重症医学科

通讯作者:吴长江,电子邮箱:icuwj@sina.cn