

EB 病毒及其致癌机理的研究进展

朱大栩

(海宁市肿瘤研究所, 浙江)

Epstein-Barr (EB) 病毒是一种 DNA 肿瘤病毒, 其宿主谱极狭窄, 仅能感染人类及某些灵长类动物, 属疱疹病毒, 基因组为线性双链 DNA。

(一) EB 病毒发现的历史及感染的特点

1958 年首先在非洲发现有地方性流行的小儿多发的恶性肿瘤——Burkitt 淋巴瘤 (BL)。其后, Epstein^[1] 在 1964 年首次从这些 BL 的淋巴母细胞培养株 EB-1 中, 用电镜观察到一种新型的疱疹病毒, 后来命名为 Epstein-Barr 病毒 (EBV)。EBV 是一类特殊的人类疱疹病毒 (HHV), 属 4 型 (HHV-4), 它在全世界的人群中广泛地潜伏感染。其感染特点有: ①为“广泛”, 在人群中广泛传播, 感染率达 90% 以上; ②为“潜伏”, 一旦感染后, 病毒在体内终身潜伏, 并不断排出病毒。

EBV 的首次感染一般是在出生后半年, 即从母体中带来的抗体消失后开始的, 至三岁时约 70% 的婴幼儿已感染过 EBV^[2]。从进化观点来看, EBV 是极为成功的“复制者”, 它与人类宿主共存得如此之好, 以致这些病毒基因组可在人体内终身持续存在, 而病毒的变制及释放对宿主可以毫无或几乎没有损害。究竟 EBV 潜伏于何处又如何进行这样的复制? 开始时真令人迷惑不解。由于 EBV 首先是从 BL 中分离得到, 并在 B 淋巴细胞膜上发现了 EBV 的受体——2 型补体受体 (CR₂), 即补体 C_{3d} 的受体, 因此长期以来一直认为 EBV 是嗜 B 细胞的病毒。

直到最近利用 C_{3d} 的二种单抗在口咽上皮细胞发现有 EBV 受体的分布^[3], 并观察到口咽浅层分化较低的细胞不与单抗反应, 表明此受体在口咽上皮细胞上的表达与细胞的分化程度

有关。虽然 EBV 受体表达限于未成熟细胞, 然而与 EBV 增殖周期相关的早期抗原 (EA) 和壳抗原 (VCA) 的表达及病毒体的产生, 似乎限于成层组织的最上层细胞, 或刚脱落的鳞状上皮细胞。因此感染细胞已不再有有丝分裂活性, 而是成熟的终末分化细胞。在基底层进行有丝分裂的活性细胞中, 仅检测到唯一的核抗原 (EBNA-1), 而 EBNA-1 只维持 EBV 的 DNA 游离型, 故提示为潜伏感染, 限制其有关基因的表达与复制。潜伏 EBV 的活化和随后的病毒复制, 可能与感染的上皮细胞的分化与成熟密切相关。随着口咽部受体阳性的上皮细胞感染后的分化, 病毒逐渐成熟; 待产生有活性的病毒时, 上皮细胞也已终末分化而脱落。在上皮基底的干细胞群中 EBV 呈潜伏感染, 随上皮细胞的分化而使病毒活化, 并随着终末分化的上皮细胞脱落而释放有活性的病毒, 造成持续感染和终身释放病毒^[4]。EBV 一般可通过唾液传播, EBV 抗体阳性者都可从其唾液中分离到感染性 EBV。有些人感染后可不出现症状, 但可终身不断地释放病毒作为“带病毒者”。由于 90% 以上的人群 EBV 抗体均为阳性, 作为感染源, 在此环境中发育成长的婴幼儿有极高的感染率是可以理解的^[2]。在病毒与宿主间敏感的平衡中, 免疫功能是维持平衡的关键。抗体的产生仅限制了病毒颗粒的散播; 细胞免疫使宿主避免发病。如果被感染的上皮细胞出现了 EBV 的早期抗原 (EA)、壳抗原 (VCA)、膜抗原 (MA), 则膜上的这些抗原将引起机体的免疫反应, 通过抗原提呈细胞 (APC) 将抗原提呈给细胞毒 T 细胞, 杀灭带有这些抗原的靶细胞。但是存在于细胞核内的抗原 (EBNA) 则抗原提呈细胞无法识别, 故而不引起免疫反

应,避免了T细胞的杀伤,而对宿主也保证了无害,维持着微妙的平衡。

EBV 感染发病有一个特点,就是它具有显著的地域性。例如:EBV 感染在非洲的局部高疟区表现为儿童的 Burkitt 淋巴瘤,该病有二种临床表现:多发型或非洲型 (Africa) 100% 与 EBV 相关;散发型或非非洲型 (non-Africa) 仅 15% 与 EBV 相关。在欧洲或美洲的白色人种中,EBV 感染表现为青少年的传染性单核细胞增多症 (IM) 该病仅为一时性的虚弱,决不会恶性转化。在我国,特别是广东地区,则可能是鼻咽癌的病因之一。将鼻咽癌病人的白细胞 DNA 用限制性内切酶 Bam HI 酶切后,与 EBV-W 片段进行分子杂交时,52% (8/14) 出现杂交带;与 EBV-K 片段杂交时,100% (14/14) 均在相当于 6.1 kb 处出现了深浅不一的杂交带。而正常人白细胞 DNA 酶切后均未出现杂交带,提示在鼻咽癌病人外周血白细胞中存在着 EBV 的基因片段^[5]。

(二) EBV 基因组的结构及其表达的抗原

EBV 直径为 150 nm,中心髓核 45 nm,由 162 个病毒壳粒组成正 20 面体的衣壳,并在最外层裹有包膜。髓核中是病毒基因组,由双股 DNA 链(约 170 kb) 组成,其中有数个重复序列。EBV 的 B95-8 株,其 DNA 的全部核苷酸序列(172282 个 bp) 已全部测定^[6],其中的开放读码框架 (ORF) 为 84 个。潜伏 EBV 基因组从左面开始为 U1 区。(见图 1)

EBV 核抗原在 U1 区结合复制开始点 (oriP) 开始复制。从 U1 区开始:RNA 多聚酶 III 转录小 RNA (EBV encoded small RNA),然后是聚顺反子的 m-RNA,有 70 kb,编码 6 种 DNA 结合蛋白,称为 EB 核抗原 (EBNA) 1—6,这 6 种抗原均位于细胞核内。EBNA-1 是磷酸化的 DNA 结合蛋白,主要功能是维持非整合的 EBV DNA 游离体存在;还可以作为转录的逆向激活因子起作用^[7]。

EBV 基因组由 4 个直接重复序列 (IR₁₋₄),划分为 4 个结构域 U1, U2, U3, U4。IR₁ 中含有启动子序列: CCAAT, TATAAA, TATA; 其内还有一群对称的二联体 (5'TG-CA3') 与转位子相似; IR₁ 序列高度保守,可能作为调节蛋白的辨认点^[8]。IR₃ 位于 BamHI-K 片段内,长约 700 bp,与细胞 DNA 重复序列高度同源; IR₃ 可能作为增强子内部相互作用的位点,在转化细胞中调节病毒或细胞癌基因 (c-onc) 的表达。例如 Bjab 和 Ramos 细胞不表达原癌基因 fgr 的 mRNA,如被 EBV 转化后,则均能表达 fgr 的 mRNA;这是首次证明 DNA 肿瘤病毒可诱导细胞癌基因表达,EBV 感染可诱导 fgr 表达 mRNA 增加^[9]。

在体外 (in vitro) EBV 容易使 B 淋巴细胞发生转化。转化时除 B 细胞核内出现核抗原 (EBNA) 外,还在细胞表面出现膜抗原 (Lymphocyte detected membrane antigen, LYDMA)。该抗原一出现,转化细胞开始分裂,3—4 周后

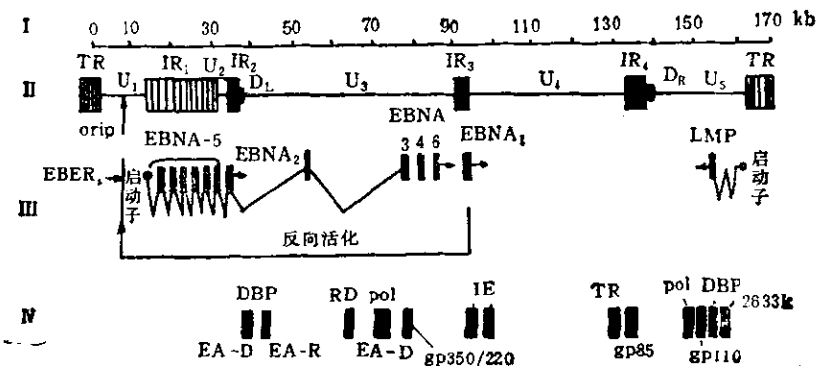


图 1 EBV 基因图谱

形成 EBV 基因组阳性的 B 淋巴母细胞株, 并形成克隆, 提示 EBV 是引起肿瘤的病毒。潜伏膜蛋白 (Latency membrane protein, LMP) 很可能就是上述的膜抗原 (LYDMA), 编码此蛋白的基因在 LT₃ (相当于 Bam HI-N 片段)。该蛋白具 6 个由 8 肽相连的跨膜区, 可能作为细胞毒 T 细胞的靶抗原, 可影响 G 蛋白活性, 激活 GTP 酶, 产生 ras 癌基因蛋白样效应, 诱导正常细胞向肿瘤表型转化^[40]。

在所有与 EBV 有关的恶性肿瘤和感染的淋巴细胞中都发现有 EBV 基因组的存在。EBNA 至少可编码 6 种蛋白, 它们对启动和维持上皮细胞及 B 细胞转化中起着重要作用。以前推测, 在 B 细胞和鼻咽癌细胞中 EBV 基因组的表达是类似的; 但实验表明, 在鼻咽癌细胞中仅能检测到 EBNA1 和 LMP, 说明 EBV 基因组的表达是以组织特异性方式进行的^[41]。

(三) EBV 的分子流行病学

EBV 在不同的地域和不同的人群中造成不同的疾病表现, 我们认为, 其原因很可能是由于 EBV 基因组中的 DNA 多态性, 有可能在不同的地域 EBV 有不同的亚型或突变株。我们可以通过限制性内切酶来分析其 DNA 多态性, 鉴别各个亚型和突变株, 进而开展分子流行病学的研究。

我国广州地区鼻咽癌高发区的 EBV 很可能是对鼻咽上皮细胞具有强烈亲嗜性和高度致癌活性的突变株。蒋金荃等从鼻咽癌病人白细胞 DNA 中检测到的 EBV-K 片段含编码 EBNA-1 基因; 与 W 片段杂交时, 发现在不同位置出现了杂交带^[4]; 提示其存在状态不同的可能性。用鼻咽癌活检组织中提取的 DNA 来转化细胞用 Bam HI 酶切时, 可发现其与 Ha-ras 癌基因杂交片段的长度呈多态性^[42]。由于 Ha-ras 的 3' 端是由一连串数量上可变的重复序列区域 (VTR) 组成, 而 Ha-ras 的转化活性、基因表达, 又与 VTR 结构有关; 因此其多态性可能在一定程度上反映转化活性的强弱, 即与 EBV 亚型相关。

EBV 感染的细胞中, 潜伏膜蛋白 (LMP)

基因可在 74% 的鼻咽癌样品中检测到, 但不能在 BL 中检测到, 说明这是 EBV 在鼻咽癌中表达的特点。尤其是中国人的鼻咽癌 80% 样品中可检测到潜伏膜蛋白, 而东非来源的样品中检出率仅 40%, 且显示一定程度的差异性, 出现 2—3 条异物特征^[41]。这可能是不同地域的亚型。用分子流行病学观点, EBV 不仅有地域特异性, 而且有组织特异性; 在鼻咽癌细胞中不表达核抗原 3、4、5、6, 而在 EBV 转化的 B 细胞中 EBNA 1—6 都表达, 二者形成明显对照。

EBV 早期抗原 (EA) 是由多基因编码多抗原成分的复合体, 主要包括弥散于胞浆和核中的弥散型 (EA-D), 可能与 EBV 的 DNA 多聚酶为同一物; 和限于核内的限制型 (EA-R), 它与核糖核酸降解酶有很大同源性^[43]。EA 作为有多种酶活性的蛋白在病毒复制、基因和抗原的加工修饰等方面均起重要作用。作为 EBV 外壳的壳抗原 (VCA), 其合成依赖于病毒 DNA 的复制完成, 故属晚期抗原 (LA)。EBV 诱导的膜抗原主要成分为 3 种高度糖基化的糖蛋白: gp 300/350, gp 200/250, gp 85/90。这 3 种特别是前 2 种糖蛋白能诱导产生抗体, 并介导抗体依赖性细胞毒 (ADCC) 效应, 因此可作为一种 EBV 亚单位疫苗的理想成分^[44]。

过去有人提出, EBV-DNA 是通过病毒颗粒感染, 或者是携带 EBV 基因组的细胞与宿主细胞融合, 从而导致 EBV-DNA 转输入宿主细胞的 DNA 中。近年发现, 基因片段传染细胞是发生基因转移和导致细胞转化的一种重要形式。应用限制性内切酶 Bam HI 可将 EBV 的 DNA 切片成 39 个片段, 其中内部同向重复序列的 W 片段可能是整合到宿主细胞 DNA 的连接部分; W 片段及其相邻接的 Y、H 片段是编码 EBNA-2 和 EBNA-5 的基因片段, 可能与细胞转化的启动和维持有关^[45]。

通常认为与 EBV 感染无关的宫颈上皮细胞最近也发现有部分 (5/28) 被 EBV 感染, 少数 (2/14) 标本中的上皮细胞内有 EBV 的 DNA^[46]。用 EBV-DNA 的 IR 序列作基因探

(下转第 106 页)

(上接第 113 页)

针,在支气管癌病人的脱落细胞中也发现了 EBV-DNA,而且从病人血中也检测到抗 EBV 抗体^[17],这一发现提示,下呼吸道也可能是 EBV 的贮存场所。最近,在艾滋病(AIDS)患者中发现舌上皮细胞内有 EBV 复制,在舌“毛髮”样白斑标本中显示出棘细胞中有 EBV 复制^[18]。EBV 的分子流行病学值得深入研究。

参 考 文 献

1. Epstein MA et al.: *Lancet* I: 702, 1964.
2. 水野文雄: 最新医学(日文) 44(1): 78, 1989。
3. Young LS et al.: *Lancet* I: 240, 1986.

4. Allday MJ & Crawford DH: *Lancet* (8590): 855, 1988.
5. 蒋金荃等: 癌症(1): 10-12, 1987。
6. Baer R et al.: *Nature* 310: 207, 1984.
7. Dilliner J et al.: *Int J Cancer* 37(2): 195, 1986.
8. Kieff E et al.: *J Inf Dis* 14b: 506, 1982.
9. Cheah MSC et al.: *Nature* 319:238, 1984.
10. Dolken G et al.: *Virology* 148(1): 58, 1986.
11. 胡利富等: 肿瘤, 8(6): 295, 1988。
12. 胡利富等: 癌症, 7(4): 251, 1988。
13. Goldschmidts W et al.: *Virology* 15 (1): 220, 1987.
14. 城野洋一郎: 最新医学(日文) 44(1): 106, 1989。
15. 陈剑经等: 癌症 8(1): 9-12, 1989。
16. Sixbey J W et al.: *Lancet* II: 1122, 1986.
17. Lung ML et al.: *Lancet* I: 889, 1985.
18. Epstein MA: *Nature* 321 (12): 653, 1986.