

EB 病毒与乳腺癌的相关性研究进展

何健荣¹, 宋尔卫², 任泽舫¹

Research advancement on relationship between Epstein-Barr virus and breast cancer

Jian-Rong He,¹ Er-Wei Song² and Ze-Fang Ren¹

[Abstract] The etiology of breast cancer is still unclear. The well-known risk factors, including reproductive and other factors affecting circulating sex hormones, and genetic susceptibility, explain only about 50% of all breast cancer incidence. More and more studies have shown interest in the possibility that breast cancer may be caused by viral infection. Epstein-Barr virus (EBV) is one of the candidate viruses, but the association of EBV with breast cancer remains controversial. Here we reviewed the studies on EBV biology and the association of EBV with breast cancer, including EBV detection in breast cancer tissues, serological tests, cytologic experiments and clinical analyses, and described the limitations of current studies and future directions.

Key words: Epstein-Barr virus, breast neoplasm, association

【摘要】乳腺癌的病因尚未明确,已知的危险因素包括生殖因素、影响体内性激素水平因素和遗传易感因素,但这些因素也只能解释约 50% 乳腺癌病例。近年来有研究试图从病毒感染的角度探讨乳腺癌的病因,EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 正是研究热点之一。但 EBV 与乳腺癌的关系仍存在着很大的争议。本文就 EBV 生物学特点、EBV 与乳腺癌的相关性研究 (包括癌组织中的 EBV 检测、血清学研究、细胞学实验和临床特点分析) 作一综述,并提出目前存在的问题和今后研究的方向。

关键词: EB 病毒; 乳腺肿瘤; 相关性

中图分类号: R730.55; R735.3 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2009)08-0827-04

1. 中山大学公共卫生学院
医学统计与流行病学系,
广东 广州 510080

2. 中山大学附属第二医院
乳腺肿瘤中心,
广东 广州 510120

1. School of Public Health,
Sun Yat-sen University,
Guangzhou, Guangdong, 510080,
P.R. China

2. Breast Tumor Center,
The Second Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University,
Guangzhou, Guangdong, 510120,
P.R. China

通讯作者: 任泽舫

Correspondence to: Ze-Fang Ren

Tel.: 86.20.87332577

Fax: 86.20.87332577

Email: renzef@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-10

修回日期: 2009-07-01

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤, 每年大约有新发病例 115 万, 死亡病例 41 万^[1]。大量研究对乳腺癌的病因进行了探讨, 发现生殖因素、影响体内性激素水平因素以及遗传易感因素与乳腺癌发生发展密切相关, 但这些因素只能解释约 50% 的乳腺癌病例^[2], 这促使人们从其它方面探索乳腺癌病因。大量研究证实, 病毒感染与某些特定肿瘤的发生发展密切相关, 如 HPV 与宫颈癌、HBV 与肝癌、EB 病毒 (EBV) 与 Burkitt 淋巴瘤等^[3], 这使科学家们联想到了乳腺癌与病毒的关系。

早在 19 世纪 30 年代, Bittner 观察到小鼠乳汁中存在一种物质, 可以通过母乳喂养导致子代小鼠乳腺癌发病风险增加^[4], 在随后的研究中, 这种物质

被确认为小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV)。后来也有研究在人类乳腺癌组织中找到 MMTV 样颗粒, 但迄今还没有充分证据表明 MMTV 样颗粒参与乳腺癌的形成。1994 年, Horiuchi 等^[5]在 3 例乳腺癌组织的 2 例中检出 EBV。但在随后的研究中, EBV 的检出率存在着很大差异, EBV 与乳腺癌的关系显得错综复杂。本文就 EBV 的生物学特点、EBV 与乳腺癌的相关性研究作一综述。

1 EBV 生物学特点及相关肿瘤

EBV 属于 γ 疱疹病毒亚科, 是 Epstein 和 Barr 于 1964 年研究非洲儿童恶性淋巴瘤时发现的一种亲人类 B 淋巴细胞的 DNA 疱疹病毒, 其基因组全长约 184 kb, 编码约 100 种蛋白^[6]。

EBV 感染 B 细胞后,极少数受感染细胞中的病毒基因能充分表达,合成约 80 种蛋白,包括早期抗原(EA)、病毒衣壳抗原(VCA)和膜抗原(MA),并进行 DNA 复制,最后组装成完整病毒颗粒而释放,实现增殖感染;而绝大部分受感染细胞中的病毒处于潜伏感染状态,不进行复制,这种状态下的 EBV 仅表达 6 种核抗原(EBNA1、EBNA2、EBNA3a、EBNA3b、EBNA3c 和 LP)、3 种潜伏膜蛋白(LMP1、LMP2a、LMP2b)和 2 种小 RNA(EBER1 和 EBER2),这有利于病毒逃避宿主免疫监视而实现终生潜伏感染^[7,8]。根据表达抗原的不同,潜伏感染可分为 4 种类型:0 型潜伏感染,表达产物主要有 LMP2 和 2 种 EBER; I 型潜伏感染,表达产物主要有 EBNA1 和 2 种 EBER; II 型潜伏感染,表达产物主要有 EBNA1、3 种 LMP 和 2 种 EBER; III 型潜伏感染,可表达所有的潜伏抗原,即 6 种 EBNA、3 种 LMP 和 2 种 EBER^[7,9]。在一定条件下,EBV 可以从潜伏状态转为增殖状态,使被感染的细胞裂解并释放病毒颗粒,从而实现传播^[7]。

EBV 主要经唾液传播,感染部位为口咽部上皮组织^[9]。据统计,全球 90% 以上的成人存在着 EBV 感染,但原发感染的发生年龄存在很大差异,在发展中国家发生较早,如乌干达 80% 以上的 1 岁儿童血清呈 EBV 阳性;而在美国农村,1 岁儿童的血清学阳性率只有 45% 左右^[6]。造成这种差异的原因可能是各国的社会卫生条件不同,导致 EBV 暴露率不一样。原发感染一般发生在幼年,无临床症状,表现为隐性感染;如果感染推迟至青少年或成年,可能会导致感染性单核细胞增多症^[6]。原发感染后,EBV 可以长期存在于 B 细胞中,呈潜伏感染状态。尽管潜伏感染患者一般不会出现临床症状,但大量研究证实 EBV 在相关肿瘤的发展过程中起到重要作用^[6],国际癌症研究中心于 1997 年将 EBV 定为 I 类致癌物。这些 EBV 相关肿瘤(EBV-associated tumour)包括:免疫抑制相关肿瘤(如器官移植后淋巴增殖症、艾滋病相关淋巴瘤等)、B 细胞淋巴瘤(如 Hodgkin's 淋巴瘤、Burkitt 淋巴瘤等)、T 细胞和 NK

细胞淋巴瘤、上皮源性癌(鼻咽癌、胃癌和淋巴上皮癌)^[9]。不同肿瘤的 EBV 检出率存在很大差异(如 90% 以上的地方性 Burkitt 淋巴瘤能检出 EBV,而胃癌检出率小于 25%),提示 EBV 在不同的肿瘤中有着不同的致癌或促癌机制^[2,9]。

2 EBV 与乳腺癌相关性研究

2.1 癌组织中的 EBV 检测

自从 1994 年 Horiuchi 等^[5]采用 PCR 检测乳腺癌组织 EBV 后,很多研究也采用 PCR 进行 EBV 检测,但是不同研究间的 EBV 检出率存在很大差异。如 Labrecque 等^[10]和张丽萍等^[11]在 20%~30% 的乳腺癌标本中扩增出 EBV 重复序列 *Bam*HIW,而 Gaffey 等^[12]在 35 例乳腺癌标本未扩增出 EBNA1 基因。Glaser 等^[2]认为这与 PCR 检测的目的基因有关,EBER 和 *Bam*HIW 阳性率最高,LMP-1 和 EBNA3b 次之,EBNA1 最低。

PCR 检测虽然灵敏度高,但无法判断病毒 DNA 是来自肿瘤细胞还是浸润淋巴细胞,而原位杂交和免疫组化技术能做到阳性定位,解决病毒 DNA 来源的问题。由于 EBER 在各型潜伏感染中均有表达,EBER 原位杂交被认为是检测 EBV 潜伏感染的金标准方法^[13]。各种 EBV 相关肿瘤普遍大量表达 EBER^[13],但对于乳腺癌,大多数的 EBER 原位杂交结果为阴性,只有少数研究检测到阳性信号,而且这些阳性信号只来自于一小部分肿瘤细胞^[10,14-17]。免疫组化实验以潜伏蛋白 EBNA1、LMP 和 ENBA2 为靶抗原检测癌组织中的 EBV,同样只在部分肿瘤中得到阳性结果,并发现阳性信号来源于部分乳腺癌细胞而非浸润淋巴细胞^[18-21]。另外,还有研究采用激光显微切割技术先将乳腺肿瘤细胞和浸润淋巴细胞分离,再对肿瘤细胞作 PCR 检测,从而判断病毒 DNA 是否存在于肿瘤细胞,也只有少量研究发现部分肿瘤细胞 EBV 阳性^[14,22]。上述的检测结果表明,EBV 存在于部分乳腺癌细胞中而不是淋巴细胞。

除了以上的定性检测外,有研究采用实时定量 PCR 检测癌组织中的病毒负荷量。Murray 等^[23]对 92 例乳腺癌标

本作实时定量 PCR 检测,其中 19 例标本出现阳性结果,但是病毒负荷量很低(0.1~7.1 EBV 拷贝/1000 细胞),而鼻咽癌阳性对照的病毒负荷量大于 2000 EBV 拷贝/1000 细胞。Arbach 等^[24]在 44 例(46%)乳腺癌组织中扩增出 EBV 基因组,病毒负荷量同样很低,最小值为 0.02 EBV 拷贝/1000 细胞,最大值为 883 EBV/1000 细胞,只有 3 例大于 20 EBV 拷贝/1000 细胞;经显微切割后的标本中只有部分肿瘤细胞仍显示阳性结果,病毒负荷量为 15~6333 拷贝/1000 细胞,Arbach 等^[24]认为乳腺癌中可能存在着 EBV 增殖感染。

EBV 只存在于部分肿瘤细胞中,而且病毒负荷量很低,这使 EBV 与乳腺癌的相关性受到质疑。但有研究认为,EBV 感染可能存在后滞效应,即在乳腺癌发生过程中有重要作用,而在肿瘤发展阶段则逐渐消失^[10];也可能在细胞恶变后才发生感染,增强肿瘤的恶性程度^[10,16];EBV 基因组可能因整合到宿主细胞染色体而发生改变^[25]。这些尚未明确的感染机制均可能导致了只有部分肿瘤组织检测出 EBV。

2.2 血清学研究

无论是 EBV 增殖感染期表达的抗原(如 EA、VCA 和 MA),还是潜伏感染期表达的抗原(如 EBNA、LMP),均能引起机体免疫学反应,产生特异抗体^[26]。过去几十年常采用免疫荧光或免疫酶标法检测血清中 EBV 抗体,但近年来逐渐被酶联免疫吸附实验(ELISA)所替代^[27]。由于 EBV 在一般人群中的感染率很高,健康携带者血清中 VCA-IgG、MA 中和抗体和 EBNA1 抗体持续阳性^[26],所以要判断 EBV 相关疾病和健康携带的 EBV 血清学差异,不能只依靠血清中是否存在 EBV 抗体,而应根据不同 EBV 感染状态的特异抗体及其水平进行判断。例如鼻咽癌属于 II 型潜伏感染,可高度表达 EBNA1 和 3 种 LMP 抗原,而且常有癌细胞裂解,可持续表达 Zta、EA、VCA 和 MA 等多种溶解相抗原,因此,鼻咽癌的血清学特点表现为多种 EBV 抗体水平升高^[28]。近年来,临床上越来越多采用 ELISA 检测 EBNA1-IgA、EBNA1-IgG 和 Zta-IgG 进行鼻咽癌筛查^[29]。有研究发现,近

60%的鼻咽癌患者和 0.9%健康个体中的 EBNA1-IgA、EBNA1-IgG 和 Zta-IgG 处于高水平,三种抗体同时处于高水平的人群患鼻咽癌的风险极高($OR=138$)^[30]。其它 EBV 相关肿瘤(如 Hodgkin's 淋巴瘤和 地方性 Burkitt 淋巴瘤)的血清学变化常表现为临床诊断数月或数年前 VCA 和 EA 抗体滴度已明显升高^[6]。

目前对乳腺癌患者进行 EBV 血清学检测的研究甚少。Richardson 等^[31]对 208 例乳腺癌病例和 169 例对照进行 VCA-IgG 检测,两组阳性率差异无统计学意义。Angeloni 等^[32]检测 71 例乳腺癌患者血清中 EBV 复制相关蛋白 BFRF1 的抗体,结果全为阴性,但在 31 例(78%)鼻咽癌、7 例(47%)Burkitt 淋巴瘤患者中出现阳性反应。EBV 在乳腺癌中的感染状态尚未明确,目前还未筛选出合适的病毒蛋白作为血清学试验的检测依据,因此,尽管现有的少量研究没有找到乳腺癌患者与健康个体 EBV 血清学差异,但尚不能认为 EBV 与乳腺癌没有联系。

2.3 细胞学实验

Speck 等^[33]发现乳腺上皮细胞能通过 EBV 转化的淋巴母细胞样细胞直接接触而感染 EBV;Xue 等^[34]观察到 EBV 基因 p31 可以刺激正常乳腺上皮细胞生长;Lin 等^[35]建立 EBV 感染的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 BT474,并发现 EBV 能增强乳腺癌细胞的生长。以上研究表明 EBV 能侵袭乳腺上皮组织,促进乳腺生长,可能具有一定的致癌能力。

2.4 EBV 感染与乳腺癌临床特点

少量研究发现 EBV 感染与乳腺癌临床特点存在关联。例如恶性程度越高肿瘤的 EBV 阳性率越高,雌激素受体阳性肿瘤的 EBV 阳性率比雌激素受体阴性高^[18];伴有淋巴结转移的肿瘤 EBV 阳性率比无淋巴结转移高^[36]。但也有研究认为 EBV 阳性率与肿瘤组织学分级、雌激素受体表达、累及淋巴结无关^[19]。Fina 等^[15]认为鼻咽癌高发区的 EBV 阳性乳腺癌标本的病毒负荷量比低发区高,Arbach 等^[24]发现 EBV 感染能增强乳腺癌化疗耐药性。

3 存在问题和今后研究方向

由于 EBV 只在部分肿瘤组织中被

检测出来,而且不同研究的检出率差异明显,加上癌组织中的病毒负荷量极低,使 EBV 与乳腺癌的关系显得扑朔迷离。不同研究的检出率差异很大,主要是由以下几点原因造成:首先,癌组织中的 EBV 检测缺少统一的实验规范。如不同研究对标本的处理不同(福尔马林固定或直接使用新鲜癌组织),选用的 PCR 靶基因、引物、循环条件不同,原位杂交和免疫组化的靶基因或靶抗原不同。其次,EBV 在乳腺癌细胞中的感染状态尚不明确,所表达的抗原可能与 EBV 相关肿瘤不一样,目前还未找到合适的检测指标对乳腺癌中的 EBV 进行检测。再次,大部分研究设计缺乏流行病学考虑,绝大多数病例选自临床机构,而不是基于人群抽样,很多研究的样本量过小,因此人群代表性有所欠缺,而不同人群的 EBV 阳性率可能存在差异^[2]。

要弄清 EBV 与乳腺癌的关系,在今后的研究工作中应首先建立一套高灵敏度和特异度的 EBV 检测方案,解决乳腺癌组织中是否存在 EBV 的问题。除了 EBER 原位杂交,其它靶序列或抗原(如 LMP 和 ENBA)检测能否作为新的检测标准还有待证明。细胞学试验和动物实验可被用于寻求更多的 EBV 致癌证据。另外还应开展流行病学研究,探索不同乳腺癌人群的 EBV 感染率差异及血清学表现,为 EBV 与乳腺癌的相关性提供佐证。乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤,如果 EBV 被证实为乳腺癌的致癌因子或促癌因子,即使只导致一小部分乳腺癌,都对乳腺癌的预防、早期诊断和治疗有重大意义。

[参 考 文 献]

- [1] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol*, 2006,24(14):2137-2150.
- [2] Glaser SL, Hsu JL, Gulley ML. Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis [J]. *Cancer Epidemiol*

Biomarkers Prev, 2004,13(5):688-697.

- [3] Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L, et al. Viral infections as a cause of cancer (review) [J]. *Int J Oncol*, 2007,30(6):1521-1528.
- [4] Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice [J]. *Science*, 1936,84(2172):162.
- [5] Horiuchi K, Mishima K, Ohsawa M, et al. Carcinoma of stomach and breast with lymphoid stroma: localisation of Epstein-Barr virus [J]. *J Clin Pathol*, 1994,47(6):538-540.
- [6] Hsu JL, Glaser SL. Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000,34(1):27-53.
- [7] Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases [J]. *Annu Rev Pathol*, 2006,1:375-404.
- [8] Khanna R, Burrows SR, Moss DJ. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases [J]. *Microbiol Rev*, 1995,59(3):387-405.
- [9] Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10(3):803-821.
- [10] Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, et al. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study [J]. *Cancer Res*, 1995,55(1):39-45.
- [11] 张丽萍,许良中. 应用聚合酶链反应技术检测乳腺肿瘤中 EB 病毒整合 [J]. *中国癌症杂志*, 1997,7(2):79-81.
- [12] Gaffey MJ, Frierson HF Jr, Mills SE, et al. Medullary carcinoma of the breast. Identification of lymphocyte subpopulations and their significance [J]. *Mod Pathol*, 1993,6(6):721-728.
- [13] Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases [J]. *J Mol Diagn*, 2001,3(1):1-10.
- [14] McCall SA, Lichy JH, Bijwaard KE, et al. Epstein-Barr virus detection in ductal carcinoma of the breast [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001,93(2):148-150.

- [15] Fina F, Romain S, Ouafik L, et al. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas [J]. *Br J Cancer*, 2001,84(6):783-790.
- [16] Chu PG, Chang KL, Chen YY, et al. No significant association of Epstein-Barr virus infection with invasive breast carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(2):571-578.
- [17] 李淑英,李 冀,胡金华,等. 乳腺癌患者癌组织中 EB 病毒感染基因产物的研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2008,23(1):87-88.
- [18] Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1999,91(16):1376-1381.
- [19] Preciado MV, Chabay PA, De Matteo EN, et al. Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Argentina [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2005,129(3):377-381.
- [20] 杨文涛,许良中. 102 例乳腺癌中的 EB 病毒感染 [J]. *上海医科大学学报*, 1998,25(3):175-178.
- [21] Trabelsi A, Rammeh S, Stita W, et al. Detection of Epstein-Barr virus in breast cancers with lymphoid stroma [J]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2008,66(1):59-62.
- [22] Thorne LB, Ryan JL, Elmore SH, et al. Real-time PCR measures Epstein-Barr virus DNA in archival breast adenocarcinomas [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2005,14(1):29-33.
- [23] Murray PG, Lissauer D, Junying J, et al. Reactivity with A monoclonal antibody to Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 defines a subset of aggressive breast cancers in the absence of the EBV genome [J]. *Cancer Res*, 2003,63(9):2338-2343.
- [24] Arbach H, Viglasky V, Lefeuf F, et al. Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol) [J]. *J Virol*, 2006,80(2):845-853.
- [25] Griffin BE. Epstein-Barr virus (EBV) and human disease: facts, opinions and problems [J]. *Mutat Res*, 2000, 462(2-3):395-405.
- [26] Rickinson AB, Kieff ED. Epstein-Barr virus [M]. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2655-2700.
- [27] 胡维维,宗永生,李凤萍,等. 六种抗 EB 病毒抗体检测在鼻咽癌血清学诊断中的比较 [J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(14):795-798.
- [28] Zhang JX, Chen HL, Zong YS, et al. Epstein-Barr virus expression within keratinizing nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Med Virol*, 1998,55(3):227-233.
- [29] 吴文翰,陈国雄,吴子柏,等. 早期发现和筛选鼻咽癌的 EB 病毒血清学检测 [J]. *癌症*, 2006,25(2):250-256.
- [30] Cheng WM, Chan KH, Chen HL, et al. Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV antibody spectrum [J]. *Int J Cancer*, 2002,97(4):489-492.
- [31] Richardson AK, Cox B, McCredie MR, et al. Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and risk of breast cancer before age 40 years: a case-control study [J]. *Br J Cancer*, 2004,90(11):2149-2152.
- [32] Angeloni A, Farina A, Gentile G, et al. Epstein-Barr virus and breast cancer: search for antibodies to the novel BFRF1 protein in sera of breast cancer patients [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001,93(7):560-561.
- [33] Speck P, Longnecker R. Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000,92(22):1849-1851.
- [34] Xue SA, Lampert IA, Haldane JS, et al. Epstein-Barr virus gene expression in human breast cancer: protagonist or passenger? [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(1):113-119.
- [35] Lin JH, Tsai CH, Chu JS, et al. Dysregulation of HER2/HER3 signaling axis in Epstein-Barr virus-infected breast carcinoma cells [J]. *J Virol*, 2007,81(11):5705-5713.
- [36] Fawzy S, Sallam M, Awad NM. Detection of Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Egyptian women [J]. *Clin Biochem*, 2008,41(7-8):486-492.

[编辑及校对:张 菊]