

## Rta 蛋白:一个新的鼻咽癌临床诊断的分子靶标

李全<sup>1</sup>, 高飞<sup>1</sup>, 梁伟波<sup>2</sup>, 翟原<sup>4</sup>, 焦守恕<sup>1, 3</sup>

1 同昕生物技术(北京)有限公司, 北京; 2 中国华西医科大学, 成都; 3 首都医科大学, 北京; 4 California University - Los Angeles Medical School, California, USA

通讯作者: 李全, 同昕生物技术(北京)有限公司技术总监, albertlee2222@163.com

### 摘要

**【目的】**Rta 蛋白是 EB 病毒裂解立即早期基因 BRLF1 的编码产物, 是 EB 病毒由潜伏期转向裂解期的关键性调控因子, 它能引起一系列的裂解早期基因的相继表达, 最终引发 EB 病毒裂解感染。本研究的目的旨在通过临床酶联免疫法检测 Rta 蛋白抗体 IgG (transcription activator antigen) 在鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 未治疗前血清中的表达水平, 研究 Rta 蛋白在鼻咽癌诊断中的诊断价值。**【材料与方法】**收集 474 例病理学诊断确诊且未经治疗的鼻咽癌患者血清, 553 例正常人对照组血清, 用酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent, ELISA) 检测 Rta/IgG 抗体, 同时用试剂盒检测其他几种可能影响试剂盒检测结果的各种疾病样品。对结果进行分析, 计算灵敏度、特异性, 应用受试者工作特征 (ROC) 曲线对结果进行分析评价。**【结果】**结果显示在 474 份鼻咽癌病人血清中, 有 384 份表现为 Rta- IgG 阳性, 灵敏度为 81%。在 553 例正常人样品中, 有 509 份表现为 Rta- IgG 阴性, 特异度为 92%, 阳性预测值为: 89.7%, 阴性预测值为: 85.1%。ROC 分析最佳灵敏度与特异性选择点与预设判定值基本相符。**【讨论】**EB 病毒 Rta 蛋白抗体 IgG 检测试剂盒 (酶联免疫法) 在鼻咽癌诊断中有非常高的临床诊断价值。

## Rta: A NEW MOLECULAR MARKER FOR NPC DIAGNOSIS

Quan Li<sup>1</sup>, Fei Gao<sup>1</sup>, Weibo Liang<sup>2</sup>, Yuan Zhai<sup>4</sup>, Ray Jiao<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Tarcine BioMed Inc., Beijing, China; <sup>2</sup>Huaxi Medical University, Chengdu, China; <sup>3</sup>Capital Medical University, Beijing, China; <sup>4</sup>California University - Los Angeles Medical School, California, USA

## ABSTRACT

【Objectives】R trans-activator (Rta) is encoded by the BRLF1 which is an immediate-early genes in initiation of the Epstein-Barr virus (EBV) and the Rta is a significance regulatory factor which activate the EBV from the latent state to the lytic state. The purpose is to detect the expression level of the Rta-IgG in the untreated patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) in order to evaluate if the Rta is a molecular marker of NPC. 【Material & Methods】Rta-IgG express levels in serum were determined in 474 NPC patient before treatment by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), contemporary the 553 healthy check-up people were determined. The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was established to evaluate the value of the parameter in diagnosis of NPC. 【Results】Among the 474 patients with NPC, 384 showed positive results in Rta-IgG detecting and the sensitivity is 81%. While in 553 healthy controls 509 showed negative results in Rta-IgG detecting and the specificity is 92%. The same results were shown by the ROC analysis. 【Discussion】The result of this study showed that the titer of the Rta-IgG in NPC patients was significantly higher than that in the normal, which demonstrated that Rta could play an important role in NPC diagnosis.

鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种源于鼻咽部上皮组织的一种恶性度较高的肿瘤, NPC 的病因是多因素的, Epstein-Barr Virus (EBV) 早期感染和反复感染是主要因素之一。1969年 de-The 等<sup>[1]</sup>从鼻咽癌活检培养的类淋巴母细胞中分离出 EB 病毒, 随后人们又在鼻咽癌的癌细胞中观察到明确的 EBV 标志物 (EBV-DNA 和 EBV 核抗原)<sup>[5,6]</sup>。通过对肿瘤上皮细胞中的病毒基因组与抗原的检测证实了二者的密切相关性。鼻咽癌治疗的最佳方案是以放射治疗为主的综合治疗, 获得较好疗效的关键在于疾病的早期诊断, 能够大幅度提高鼻咽癌治疗的疗效。由于鼻咽位置深在, 临床常规体检不易发现其中的早期病变, 而 CT 等影像学诊断方法常难以鉴别早期鼻咽癌与其它鼻咽增生性病变, 因此血清学诊断方法已经成为鼻咽癌早期诊断的主要工具, 该类方法具有创伤小、成本低、检测速度快等优点。血清学诊断主要是检测病人体内的抗 EBV 抗体, 现在主要的检测指标为 EB 病毒壳抗原 (VCA) 血清抗体、早期抗原 (EA) 血清抗体、核抗原 1 (EBNA1) 血清抗体。其中

EBNA1 在 EB 病毒潜伏期和裂解期均有表达, 而 VCA 与 EA 虽然在 NPC 病人中检出率高, 但其特异性不好, 在健康人群中仍有较高的检出率, 即具有较高的假阳性率, 有学者对 12 万人的筛查结果显示, 8.15% 的 IgA/VCA (+) 人群 (高危人群) 中鼻咽癌的检出率虽然比 IgA/VCA (-) 的人群高 40 倍, 但是癌的阳性检出率也只有 1.21%, 因此鼻咽癌的血清学诊断方面一直存在着如何减少假阳性和提高疾病检出率的问题<sup>[4]</sup>。寻找及建立能提高鼻咽癌早期诊断率, 大规模筛查的检出率的新检测指标是本领域研究急需解决的问题之一。

BRLF1 基因位于 EB 病毒基因组 ORF50, 是 EB 病毒进入裂解复制状态早期表达的立即早期基因。BRLF1 基因长度为 1818bp, 编码产物为 605 个氨基酸的转录激活蛋白 Rta (又称 EB1)。Rta 蛋白可以激活多种病毒基因的启动子, 如 BMLF1, BaRF1, BALF5 等, 从而在 B 淋巴细胞以及上皮细胞中有效的激活 EB 病毒进入裂解复制状态。因此 BRLF1 基因表达的 Rta 蛋白是 EB 病毒进入裂解复制状态必需的激活元件。

胡怀忠等<sup>[5]</sup>用 RT-PCR 的方法对主要的 EBV 裂解基因在鼻咽部活检组织（包括肿瘤组织和正常组织）当中的表达情况进行研究，发现 BRLF1 的表达仅能在 NPC 样本中检测出，而正常组织中未能检出。接着，胡等经基因重组获得 Rta 蛋白，并且将其用于免疫沉淀方法检测了 53 例未经治疗的鼻咽癌病人和 53 例正常对照人血清中 Rta 蛋白 IgG 抗体，结果在 53 例鼻咽癌病人中，有 44 例检出 IgG-Rta (83%)，仅有 1 例正常人检出 IgG-Rta (1.9%)。这一结果表明了检测 EB 病毒 Rta 蛋白抗体作为鼻咽癌肿瘤标记物的巨大潜力。胡怀忠等<sup>[6]</sup>又进一步研究了 BRLF1 基因中抗原决定簇丰富且抗原性高、与人类蛋白质没有同源性的区域，即 BRLF1-185I 和 BRLF1-150I 两个片段，并用分子克隆的方法构建出融合的原核表达载体。获得 GST-R185I 和 GST-R150I 两种重组融合蛋白质，将两种融合蛋白混合作为抗原，间接 ELISA 的方法，分别检测了 51 例鼻咽癌病人和 47 例正常对照组血清样品中 Rta-IgG 和 Rta-IgA，结果在 51 例鼻咽癌病人血清中，有 42 例 (82.3%) 表现为 Rta-IgG 阳性。在 47 例正常人血清中，有 42 (89.4%) 例表现为 Rta-IgG 阴性。这一结果显示，诊断血清中 Rta-IgG 在鼻咽癌诊断中的重要应用价值。

综合以上研究，同昕生物技术（北京）有限公司的研究人员，筛选出 BRLF1 基因中抗原决定簇丰富且抗原性高、与人类蛋白质没有同源性的区域。即 BRLF1-185I 和 BRLF1-150I 两个片段，并用分子克隆的方法构建出融合的原核表达载体。通过大肠杆菌进行表达制备，使用亲和层析与 HPLC-分子筛两种纯化方法联合纯化，获得 GST-R185I 和 GST-R150I 两种重组融合蛋白质。将两种融合蛋白混合作为抗原，建立了人血清中 Rta-IgG 的 ELISA 检测方法。

2006 年曾毅院士的研究组<sup>[7]</sup>以 Rtac2/3 为抗原用于鼻咽癌病人检测，用表达和纯化的 BRLF1 基因 C 端 2/3 部分蛋白 (Rtac2/3) 建立间接 ELISA 方法，检测血清中的抗 Rta/IgG 抗体。结果显示 59 份 NPC 患者血清中 50 份阳性，灵敏度为 84.7%；而 59 份健康者对照血清中只有 7 份阳性，特异性为 88.1%，NPC 组的阳性率与健康对照组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。上述结果进一步验证了检测人血清中的抗 Rta-IgG 可以作为 NPC 诊断的重要标志物之一，用于 NPC 的筛检和诊断有很高的灵敏度或特异性。

本文应用同昕生物建立起的 EB 病毒 Rta 蛋白抗体 IgG 酶联免疫检测法，对 1027 例血样进行检测分析，深入研究 Rta 蛋白在鼻咽癌诊断中的诊断价值。

## 材料与方法

收集 474 例病理学诊断确诊且未经治疗的鼻咽癌患者血清，553 例正常人对照组血清，其中福建省肿瘤医院完成正常和病人组各 100 例；中山大学附属肿瘤医院完成正常 100 例和病人 99 例；广西医科大学附属肿瘤医院完成病人 274 例，正常人 353 例。使用同昕生物技术（北京）有限公司生产的“EB 病毒 Rta 蛋白抗体 IgG 检测试剂盒（酶联免疫法）”分别在各医院对其所收集的的血样进行检测，试验过程采用双盲法。检测时将血清用样品稀释液按 1:9 稀释后每孔加 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 温育 30min；充分清洗 5 遍后每孔加 100  $\mu$ l 辣根过氧化物酶标记的羊抗

人 IgG 抗体，37 $^{\circ}$ C 温育 15min；充分清洗 5 遍后加入 TMB 底物液 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 显色 10min；加入 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l 终止反应。酶标仪 450nm/630nm 波长读出每孔吸光度 (A) 值。根据试剂盒的判断值方法判定结果为阳性或是阴性。

分析试验结果计算灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值，同时计算特异性的 95% 可信区间，可信区间 =  $P \pm 1.96 * SE$ ， $SE^2 = P * (1 - P) / N$ ，P 为灵敏度或特异性，N 为样本数量。同时使用 SPSS 软件对数据进行 ROC 曲线分析。

## 结果

## 1. 各个医疗机构检测结果统计

表1列举出试剂盒在三家医疗结构的检测结果，三家医院的灵敏度分别为82%，77%和82.1%，特异性分别为95%，90%和

91.8%。从结果看，试剂盒在各个医疗机构检测结果基本相同，均表现出较好灵敏度和特异性。

表1 各医院检测结果统计

医疗机构名称	组别	n	Rta/IgG 阳性	Rta/IgG 阴性
中山大学 附属肿瘤医院	鼻咽癌组	99	81 (81.8%)	18 (18.2%)
	对照组	100	5 (5%)	95 (95%)
福建省 肿瘤医院	鼻咽癌组	100	77 (77%)	23 (23%)
	对照组	100	10 (10%)	90 (90%)
广西医科大学 附属肿瘤医院	鼻咽癌组	274	225 (82.1%)	49 (17.9%)
	对照组	353	29 (8.2%)	324 (91.8%)

## 2. 总数据分析

根据研究方案中的计算公式，对数据进行统计，计算总的灵敏度和特异性，计算阳

性预测值和阴性预测值。从数据看，试剂盒在检测鼻咽癌中灵敏度达到81%，特异性达到92%，试剂盒有非常好的临床诊断结果。

表2 总数据分析结果

内容	鼻咽癌病人组数目	正常对照组数目	总数
Rta—IgG 阳性	384	44	428
Rta—IgG 阴性	89	509	598
总数	473	553	1026
灵敏度(95%可信区间)	81%±3.5%		
特异性(95%可信区间)	92%±1.2%		
阳性预测值	89.7%		
阴性预测值	85.1%		

## 3. ROC 曲线分析

用SPSS V17.0对1026个数据进行ROC曲线分析，所得ROC分析结果如图1所示曲线下的面积为0.886，95%置信区间为0.863到0.909，说明试剂的诊断有意义。

用ROC分析获得的数据，计算各判定值

时的约登指数，以约登指数最大点为判定值最真实点。约登指数=灵敏度+特异性-1。计算结果见附件统计分析结果，由结果可知，在取判定值0.1033和0.1045时，约登指数最大为0.723。该判定值与试剂盒所设判定值基本符合

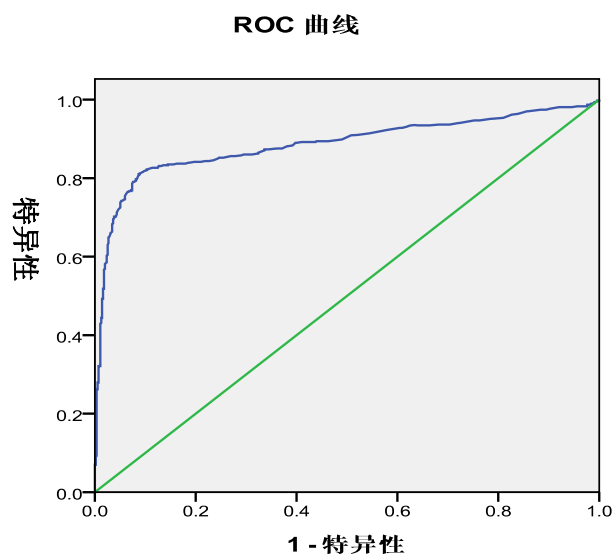


图1 Rta/IgG 抗体检测诊断鼻咽癌的 ROC 曲线

## 讨论

本文所使用的同昕生物研发的酶联免疫试剂盒是以重组 Rta 蛋白的 R185I 和 R150I 两个多肽片段为抗原的。BRLF1 基因谱上的这两个片段的抗原决定簇丰富且抗原性高。将这两个片段的重组融合蛋白混合作为抗原，做成 ELISA 试剂盒检测人血清中 Rta/IgG 抗体具有非常高的灵敏度和特异性。本文临床试验结果显示，鼻咽癌组的 Rta/IgG 抗体 A 值中位数明显高于健康对照组。Rta/IgG 抗体检测诊断鼻咽癌的准确性 (ROC 曲线下面积) 为 88.6%，敏感度为 81%，特异度为 92%，表明有良好的诊断价值。

自 2000 年胡怀忠等<sup>[5, 6]</sup>首创应用 EB 病毒 Rta 抗体血清学检测辅助诊断鼻咽癌的概念以来，此类研究在学术界受到广泛的重视。2005 年曾毅的研究组<sup>[7]</sup>发表文章，其结论认为检测人血清中 Rta-IgG 可以作为 NPC 诊断的重要标志物之一，并提出如果检测 Rta-IgG 与检测 Zebra IgG 抗体试验联合使用，用于 NPC 的筛查和诊断能够进一步提高灵敏度或特异性。近年来，在华西医科大学<sup>[8, 9]</sup>、广西医科大学<sup>[10]</sup>和广西梧州肿瘤防治

研究所<sup>[11]</sup>等许多单位都对 Rta 抗体血清学检测诊断鼻咽癌的功效进入了深入的研究，并与其他几个 EB 病毒的标志物如衣壳抗原 (VCA)、早期抗原 (EA)、核抗原 1 (NA1) 在鼻咽癌诊断上的应用进行了比较，结果分别显示 Rta 为更有效的鼻咽癌诊断标志物。华西医大<sup>[8]</sup>的试验进一步显示 NPC 病人血清中 Rta 抗体含量随治疗程度增加，具有下降趋势，有望成为 NPC 治疗及预后的监测指标。蔡永林<sup>[12]</sup>等通过一系列的临床试验，综合年龄、性别因素，应用多分类 logistic 回归模型对 Rta/IgG、EBNA1/IgA 及 VCA/IgA 三种 EB 病毒抗体联合检测对鼻咽癌、头颈部相似疾病及健康体检者的预测准确性进行评估，结果显示鼻咽癌的预测准确率非常高，头颈部相似疾病的预测准确率较好，健康体检者的预测准确率则相对较低。

因此，Rta 蛋白是一个新的鼻咽癌临床诊断的分子靶标，采用间接 ELISA 方法检测血清中 Rta/IgG 抗体可以作为鼻咽癌诊断的有力辅助手段。

## 参考文献

1. de-The G, Ablashi DV, Favre MC, Mourali N, Ellouz R. Presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma biopsies and their derived cultures. *Bibl Haematol*, 1975, 40:101.
2. Ragoczy T, Heston L, Miller G. The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J Virol*, 1998, 72:7978.
3. 刘克拉, 宋永生, 张昌卿等. 鼻咽癌组织中EB病毒LMP1的表达与癌细胞增殖和凋亡的关系。癌症, 1999, 18: 23
4. 闵华庆, 郭翔. 鼻咽癌研究回顾与展望, 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27:11
5. Feng P, Ren EC, Liu DX, Chan SH, and Hu HZ. Expression of EBV BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. *J General Virology*, 2000, 81:2417
6. Feng P, Chan SH, Soo MYR, Liu DX, Guan M, Ren EC, and Hu HZ. Antibody response to Epstein-Barr virus Rta protein in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 2001, 92:1872-1880.
7. 任军, 周玲, 曾毅等, 以Rtac2/3为抗原用于鼻咽癌病人检测的初步研究。中华微生物和免疫学杂志, 2006, 11: 1057
8. 梁伟波, EBV-BRLF1重组表达产物在鼻咽癌早期诊断中应用研究, 四川华西医科大学博士研究生学位论文, 2006
9. 徐永春, EB病毒Rta蛋白抗体IgG在鼻咽癌诊断中的应用, 四川华西医科大学硕士研究生学位论文, 2007
10. 朱文良, EB病毒Rta蛋白抗体IgG在鼻咽癌诊断中的应用, 广西医科大学硕士研究生学位论文, 2009
11. 郑裕明, 蔡永林等, EB病毒Rta/IgG抗体检测在鼻咽癌诊断上的价值, 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(4):285-287
12. 蔡永林、郑裕明等, 应用基于logistic回归模型的ROC曲线分析EB病毒抗体联合检测在鼻咽癌诊断中的价值, 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(5):384-387