

# EB 病毒 BRLF1 基因及 EB 病毒 Rta/IgG 抗体在鼻咽癌中表达的临床意义

赵新星 张龙城 全超坤 韦干观 桂源 杨志\*

**【摘要】** 目的 探讨 EB 病毒 BRLF1 基因(EBV-BRLF1)表达量及血清 EB 病毒 Rta/IgG(EBV-Rta/IgG)抗体浓度在鼻咽癌(NPC)早期诊断、临床分期中的意义。方法 运用实时荧光定量聚合酶链反应法测量 89 例 NPC 组织的 EBV-BRLF1 基因表达量,采用 EBV-Rta/IgG 定量抗体试剂盒检测 228 例血清的 Rta/IgG 抗体浓度,分析它们与 NPC 早期诊断、临床分期的相关性。228 例血清包括 NPC 组 89 例、鼻咽部慢性黏膜炎病例(高危组)19 例和同期健康人群 120 例。结果 89 例 NPC 组血清的 EBV-Rta/IgG 抗体浓度为(111.81 ± 76.77) U/mL,灵敏度为 75.3% (67/89),特异度为 94.2% (131/139),诊断符合率为 86.8% (198/228);19 例高危组血清的 EBV-Rta/IgG 抗体浓度为(15.14 ± 33.04) U/mL,120 例健康体检组血清的 EBV-Rta/IgG 抗体浓度为(6.63 ± 11.26) U/mL;各组间比较浓度差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。EBV-BRLF1 基因在 NPC 肿瘤组织中的表达率为 63.51% (47/74),中位表达量为 8.53。NPC 组中 EBV-BRLF1 基因表达量与 N 分期、M 分期及临床分期无关( $P > 0.05$ ),与 T 分期差异有关( $P = 0.061$ ),接近临界范围。血清 EBV-Rta/IgG 抗体浓度与 N 分期、M 分期及临床分期无关( $P > 0.05$ )。在 T 分期组间比较中发现,T3 期呈一定上升趋势,T2 与 T3 组间差异具有统计学意义( $P = 0.048$ )。结论 EBV-BRLF1 基因在 NPC 组织中高度表达;EBV-Rta/IgG 定量抗体试剂盒检测可以作为早期筛查 NPC 的临床指标之一;EBV-BRLF1 基因表达量及血清 EBV-Rta/IgG 抗体浓度与 NPC 的 N 分期、M 分期及临床分期无关,与 T 分期局部组织浸润呈一定相关性。(中国眼耳鼻喉科杂志,2016,16;243-247)

**【关键词】** 鼻咽癌;EB 病毒 BRLF1 基因;EB 病毒 Rta/IgG 抗体;临床意义

## Clinical significance of EBV-BRLF1 gene and EBV-Rta/IgG antibody expression in nasopharyngeal carcinoma

ZHAO Xin-xing, ZHANG Long-cheng, QUAN Chao-kun, WEI Gan-guan, GUI Yuan, YANG Zhi\*. Department of Otolaryngology, People's Liberation Army 303 Hospital, Nanning 530021, China

Corresponding author: ZHAO Long-cheng, Email: zhlc\_303@163.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the significance of Epstein-Barr virus BRLF1 (EBV-BRLF1) gene expression and serum EBV-Rta/IgG antibody concentration on early diagnosis and clinical staging of nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-Q-PCR) was used to measure the EBV-BRLF1 gene expression of 89 NPC tissues, and quantitative EBV-Rta/IgG antibody kit was used to detect the serum Rta/IgG antibody concentration of 228 clinical samples. The correlation between the NPC early diagnosis and clinical stages was analyzed. The serum samples included 89 NPC, 19 cases with chronic nasopharyngeal mucosal inflammation and 120 healthy people. **Results** The mean value of EBV-Rta/IgG concentration in 89 NPC patients was (111.81 ± 76.77) U/mL, with a sensitivity of 75.3% (67/89) and specificity of 94.2% (131/139) and diagnosis coincidence rate of 86.8% (198/228); The mean value of EBV-Rta/IgG concentration in 19 high risk group and 120 healthy volunteers were (15.14 ± 33.04) U/mL and (6.63 ± 11.26) U/mL; There were significant difference between NPC and other groups ( $P < 0.05$ ). EBV-BRLF1 gene expression rate in NPC tumor tissue was 63.51% (47/74), with median amount was 8.53. No significant difference in EBV-BRLF1 gene expression level was found in the NPC patients in different N, M or clinical stages ( $P > 0.05$ ) while the difference in T stage ( $P = 0.061$ ) was near to the critical range. No significant difference in EBV-Rta/IgG antibody concentration was found in the NPC patients in different N, M or clinical stages ( $P > 0.05$ ). But in comparison among T stages, it was found that T3 rise by a certain trend and the difference between T3 and T2 groups was statistically significant ( $P = 0.048$ ). **Conclusions** EBV-BRLF1 was highly expressed in NPC tumor tissues; Quantitative EBV-Rta/IgG antibody kits can be used as a clinical indicator of early screening for NPC; The expression of EBV-BRLF1 gene and concentration of serum EBV-Rta/IgG antibody were not associated with N, M or clinical stages, but had a certain correlation with the T staging concerning local tissue invasion. (Chin J Ophthalmol and

作者单位:中国人民解放军第三〇三医院耳鼻咽喉头颈外科 南宁 530021; \* 中国农业大学生命科学研究中心 北京 100193

通讯作者:张龙城 (Email:zhlc\_303@163.com)

DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2016.04.004

Otorhinolaryngol, 2016, 16: 243-247)

**【Key words】** Nasopharyngeal carcinoma; Epstein-Barr virus BRLF1 gene; Epstein-Barr virus Rta/IgG antibody;  
Clinical significance

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种源于鼻咽部上皮组织恶性程度较高的肿瘤。其最终诊断依赖于活检组织病理,但对于一些早期及不典型的病例不一定能取到癌组织。因此,快速、方便、准确的血清学检测是早期有效发现 NPC 的一种方法。EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)与 NPC 的发生、发展密切相关,EBV 立即早期基因 BRLF1(EBV-BRLF1)的表达对病毒基因组具有反式激活作用,能够引发裂解感染期基因“瀑布式表达”,诱导鼻咽部细胞发生癌变<sup>[1]</sup>。通过对 EBV 抗体谱的进一步探索,国内多数研究<sup>[2-5]</sup>表明,通过检测血清中 EBV 特异性抗体 Rta/IgG(EBV-Rta/IgG)可以为 NPC 早期筛查提供依据,有助于辅助 NPC 的早期诊断。本研究采用实时荧光定量多聚酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-Q-PCR)法检测 NPC 患者鼻咽部肿瘤组织中 BRLF1 基因的表达量及酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno-sorbent assay, ELISA)定量检测血清中 EBV-Rta/IgG 抗体的浓度,以探讨其与 NPC 临床参数间的关系及意义。

## 1 材料与方法

1.1 材料 收集 2013 年 8 月~2014 年 12 月在我科就诊疑似 NPC 患者的血清及鼻咽部组织样本共 108 例。其中经病理确诊为非角化性未分化癌(NPC 组)89 例,男性 68 例、女性 21 例;年龄 15~77 岁,中位年龄 48 岁。所有病例均按“鼻咽癌 2008 分期”<sup>[6]</sup>进行分期,其中 I~II 期 4 例、III 期 50 例、IV 期 35 例。经病理确诊为鼻咽部慢性黏膜炎病例(高危组)19 例,男性 13 例、女性 6 例;年龄 15~62 岁,中位年龄 36 岁。同期健康人群体检血清样本(健康体检组)120 例,男性 80 例、女性 40 例;年龄 25~67 岁,中位年龄 42 岁。3 组年龄、性别比例差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。所有样本均得到医院医学伦理审查委员会批准,并在患者知情同意后获得。血清样本要求清亮、无沉淀,每份 $\geq 1$  mL,在 $-20$  °C 条件下冻存。用于检测 EBV-BRLF1 基因 mRNA 的组织厚度 $\leq 0.5$  cm,保存于 RNAstore 溶液中, $-80$  °C 条件下冻存。

1.2 主要试剂及仪器 Rta/IgG 定量抗体检测试剂盒由同昕生物技术(北京)有限公司提供,TIAN GEN 牌 RNAstore、EBV-BRLF1 及内参基因 EF1a 引物由华大

合成提供,总 RNA 提取液为 QIAGEN 公司的 RNeasy Mini 试剂盒。酶标仪(双波长 450 nm/630 nm),Gene Amp PCR System9700 扩增仪(ABI 公司,美国),Nano Drop 2000 超微量分光光度计,电泳槽,PCR Light Cycler 480 扩增仪(Roche 公司)。

1.3 实验方法 RT-Q-PCR:取冻存组织,经溶解、研磨、分离、沉淀等处理后,使用 Dnase I 去除基因组 DNA,参考 RNeasy Mini 试剂盒说明书提取总 RNA。根据 NanoDrop 吸光度值提取约 1  $\mu$ g 总 RNA 进行反转录反应。反应条件:70 °C 变性,冰浴 3 min,37 °C 1 h,70 °C 15 min。反转录所得 cDNA 稀释 4 倍进行 RT-Q-PCR 检测。目的基因及内参基因在不同的反应管中进行扩增,每个测定基因做 3 次重复,反应体系均为 20  $\mu$ L,反应条件:95 °C 变性 20 min,94 °C 20 s,60 °C 1 min,35 个循环;PCR Light Cycler 480 扩增仪记录各样本达到荧光阈值的循环数(threshold cycle, Ct 值)。假设 2 个样本的内参 Ct 值一样,那么某个样本的目的基因含量越高,其 Ct 值就越小,目的基因与内参 Ct 值的差值越小。结果采用 RT-Q-PCR 中的相对定量法,即目的基因表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[7]</sup>计算。 $\Delta Ct$  值 = ( $Ct_{BRLF1RNA} - Ct_{EF1aRNA}$ ),这个值代表目的基因的相对含量, $\Delta Ct_{Max}$  为目的基因表达量最低,或内参基因表达量相对最高; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{Max}$ ,该值越小,目的基因表达越高;当 Ct 值为 35 时,可以认为该基因片段没有表达。该法是 RT-Q-PCR 实验中分析基因相对表达量的一种简便方法。

定量检测 Rta/IgG 抗体浓度采用 ELISA,按产品说明书操作规程进行操作。将酶标仪设定在双波长 450 nm/630 nm,测量各孔吸光度值,用校准品的含量及其对应的吸光度值进行  $\log(X) - \log(Y)$  直线回归方程拟合,将待测样品的吸光度值代入拟合曲线拟合方程,计算出相对应的浓度值。本实验试剂盒校准品曲线的相关系数( $r$ )为 0.996 5,以 30 U/mL 为临界值对检测结果进行判定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,变量进行正态性检验。血清 Rta/IgG 抗体浓度值在 TNM 分期、临床分期组间关系分析采用  $t$  检验和  $\chi^2$  检验;BRLF1 基因表达量在不同分期间关系分析采用 Kruskal-Wallis 检验,2 组之间比较采用 Mann-Whitney 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BRLF1 基因在 NPC 组和高危组中的表达情况

NPC 组中位数值明显高于高危组,差异具有统计学意

义( $Z = -4.221, P < 0.05$ );其中 NPC 组 BRLF1 基因的表达率为 63.51% (47/74);高危组 Ct 值为 35 的有 15 例,占 93.75% (表 1)。

表 1 NPC 组和高危组中 BRLF1 基因 RT-Q-PCR 表达情况

组别	例数 <sup>a</sup> (n)	ΔΔCT 值(相对循环差值)		EBV-BRLF1 基因表达量	
		中位数	Q1 ~ Qu	中位数	Q1 ~ Qu
高危组	16	-1.10	-1.50 ~ -0.59	2.14	1.51 ~ 2.84
NPC 组	74	-3.10	-4.45 ~ -2.01	8.53	4.03 ~ 21.86

注:<sup>a</sup>示由于各种原因导致部分组织样本没能提取出理想总 RNA,以至于 RT-Q-PCR 未能进行

2.2 血清 Rta/IgG 抗体在不同组间的结果比较 从表 2 可以看出,NPC 组 Rta/IgG 平均浓度明显高于高危组、健康体检组,组间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。89 例 NPC 血清的 Rta/IgG 抗体表达阳性 67 例,灵敏度为 75.3% (67/89),特异度为 94.2% (131/139),诊断符合率为 86.8% (198/228)。

表 2 血清 Rta/IgG 抗体在不同组间的结果

组别	例数(n)	血清 Rta/IgG 抗体		
		浓度(U/mL)	阴性(n)	阳性(m)
NPC 组	89	111.81 ± 76.77 <sup>a</sup>	67	22
高危组	19	15.14 ± 33.04	2	17
健康体检组	120	6.63 ± 11.26	6	114

注:<sup>a</sup>示与高危组、健康体检组比较,t 值分别为 -8.692, -12.823, P 值均 < 0.05

2.3 NPC 患者 BRLF1 基因表达量及血清 Rta/IgG 抗体浓度与 TNM 分期、临床分期的关系 各组数据经正态性检验,BRLF1 基因表达量呈偏态分布。NPC 患者血清 Rta/IgG 抗体浓度、BRLF1 基因表达量与 TNM 分期、临床分期的关系见表 3。

血清 Rta/IgG 抗体浓度在各 N 分期、M 分期、临床分期中的比较,差异均无统计学意义( $\chi^2 = 0.241, 0.002, 0.981, P = 0.745, 0.968, 0.379$ );T 分期整体差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.289, P = 0.283$ ),但在 T2 与 T3 组间比较中,差异具有统计学意义( $P = 0.048$ )。BRLF1 基因表达量在各 N 分期、M 分期、临床分期中的比较,差异均无统计学意义( $\chi^2 = 2.184, 0.068, 4.748, P = 0.336, 0.795, 0.093$ );在 T 分期的关系比较中( $\chi^2 = 6.998, P = 0.061$ ),P 值接近临界范围,提示基因表达量与 T 分期可能具有潜在的意义。

表 3 NPC 患者 BRLF1 基因表达量、血清 Rta/IgG 抗体浓度与 TNM 分期、临床分期的关系

分期	血清 Rta/IgG 抗体浓度		BRLF1 基因表达量			$\chi^2$ 值	P 值
	例数(n)	$\bar{x} \pm s$	例数(n)	中位数	Q1 ~ Qu		
T 分期						6.998	0.061
T1	18	116.77 ± 76.63	14	14.03	6.81 ~ 218.62		
T2	28	92.28 ± 72.25	24	10.06	5.28 ~ 20.18		
T3	24	133.46 ± 77.44	20	9.16	2.04 ~ 19.47		
T4	19	108.55 ± 80.75	16	4.63	2.95 ~ 7.03		
N 分期						2.184	0.336
N0-1	7	95.03 ± 88.62	5	19.84	7.24 ~ 120.82		
N2	64	111.64 ± 77.03	53	7.36	3.32 ~ 16.76		
N3	18	118.95 ± 74.68	16	9.80	3.31 ~ 99.74		
M 分期						0.068	0.795
M0	85	111.74 ± 76.75	71	8.94	3.61 ~ 21.86		
M1	4	113.33 ± 89.03	3	6.32			
临床分期						4.748	0.093
I、II 期	4	61.74 ± 90.23	4	29.47	7.20 ~ 155.42		
III 期	50	117.13 ± 75.23	39	11.31	5.24 ~ 21.86		
IV 期	35	109.94 ± 77.67	31	5.98	3.01 ~ 11.47		

## 3 讨论

EBV 是一种普遍存在于人体的疱疹病毒,感染后

常形成终身潜伏期感染,进入裂解期后与 NPC 的发生、发展密切相关。有研究<sup>[8-9]</sup>发现,BRLF1 是 EBV 的立即早期基因,参与整个裂解感染的启动过程,作为一

种反式激活因子调节 EBV 早、晚期裂解期基因组的复制和表达,其表达产物 Rta 蛋白与 EBV 从潜伏期向裂解期的转换密切相关。Rta 蛋白可以在 B 淋巴细胞、上皮细胞中激活多种病毒基因的启动子,如 BMLF1, BARF1, BALF5 等<sup>[10]</sup>,能够有效激活 EBV 进入裂解复制状态,对宿主肿瘤细胞的生长增殖具有调控作用,对其发生、发展起到一定的影响。因此研究 BRLF1 基因及其产物 Rta 能为 NPC 的筛查和治疗提供线索。目前尚鲜见关于 NPC 组织 BRLF1 基因的表达量及血清 EBV-Rta/IgG 抗体的浓度与 NPC 2008 临床分期的报道。

传统的 PCR 技术不能准确定量,在操作过程中易受污染而使假阳性率偏高;RT-Q-PCR 技术拥有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点,已成为分子生物学研究的重要工具<sup>[11-12]</sup>。本研究应用 RT-Q-PCR 方法检测 74 例 NPC 组及 16 例高危组鼻咽部组织 BRLF1 基因的表达情况,发现 NPC 组 Ct < 35 的有 47 例, BRLF1 基因表达率为 63.51% (47/74);高危组 Ct = 35 的 15 例,另有 1 例为 34.25;NPC 组织中 BRLF1 基因中位表达量为 8.53,而高危组为 2.14,两者差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),说明 BRLF1 基因在 NPC 组织中高度表达,且在 NPC 发生中起着重要作用。这与 Feng 等<sup>[13]</sup>运用 PT-PCR 对鼻咽部活检组织 (NPC 组和非 NPC 组)中的 EBV 早期裂解基因表达情况研究相一致。他们认为,在 NPC 组和非 NPC 组中 BZLF1、BALF2、BCLF1 均能检出,但只有 BRLF1 在 NPC 组织中检测出,而正常组织中未能检出。采用 ELISA 检测血清 Rta/IgG 抗体和其他 EBV 抗体水平,分析比较各组血清抗体的灵敏度和特异度。国内不少研究<sup>[2-5]</sup>认为检测血清 Rta/IgG 抗体是一项简单、可靠的方法,可用来早期筛选 NPC 患者。本次实验采用定量 Rta/IgG 抗体检测试剂盒,通过测量各孔的吸光度值,根据校准品拟合的直线回归方程,计算出相对应的浓度。从表 2 对 228 例患者血清中 EBV-Rta/IgG 抗体的浓度可得知, NPC 组的浓度明显高于对照组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。唐国全等<sup>[14]</sup>以检测血清样本的相对吸光度值作为标准来判断 Rta/IgG 抗体的诊断价值,其灵敏度为 89.3% (134/150),特异度为 88.7% (133/150)。本次实验采用定量试剂盒检测血清中 Rta/IgG 抗体浓度的灵敏度为 75.3%,特异度为 94.2%,诊断符合率为 86.8%,结果与上述报告基本相近。具体不同可能与检测试剂盒、检测方法、阳性判断标准及样本

量的差异等有关。本研究通过评价 Rta/IgG 抗体定量试剂盒在 NPC 诊断中的作用,结果表明其在 NPC 的早期筛查、诊断中具有较高的敏感度、准确度,有一定的临床参考价值。

在分析血清 Rta/IgG 抗体水平与不同 TNM 分期及临床分期的相关性研究中,蔡永林等<sup>[15]</sup>通过测量 NPC 患者血清 Rta/IgG 抗体相对吸光度值,认为 EBV-Rta/IgG 表达与 NPC 92'分期无关,其研究用样本数量有限,且未能测得具体浓度值,能否对 NPC 临床分期进行相关指导,可靠性尚不能确认。本文的表 3 具体分析 NPC 病例中 BRLF1 基因表达量及 Rta/IgG 抗体的浓度与 NPC 分期是否存在一定的关系,通过对比各组间的关系,发现在 N 分期、M 分期、临床分期中差异均无统计学意义。在 T 分期的相关性比较中,发现 BRLF1 基因表达量  $P$  值接近临界范围 ( $P = 0.061$ ), Rta/IgG 抗体的浓度值在 T2 与 T3 组间比较, T3 浓度较 T2 高,组间差异具有统计学意义 ( $P = 0.048$ ),提示上述检测值与 NPC 的周围浸润情况 T 分期可能呈一定的相关性。我们发现,随着临床分期增加,EBV-BRLF1 基因表达量的四分位距有下降趋势,可能是 BRLF1 作为一种 EBV 的立即早期基因,参与病毒基因组的早期表达,其反式激活作用,引发病毒裂解感染期基因“瀑布式表达”,诱导鼻咽部细胞发生癌变。Rta 蛋白为溶解期抗原,在 EBV 由潜伏期向裂解期转换的过程中发挥关键作用。当肿瘤经过 T2 期发展阶段后,EBV-BRLF1 表达及 Rta 抗原相对增多,浸润范围扩大,颈部淋巴结转移同步发生,可以刺激机体的免疫系统产生更多的抗体,使得 Rta/IgG 抗体值有一定程度的上升。随着病情进一步发展到 T4 阶段,EBV-BRLF1 表达量相对恒定及其抑制体内 IRF3、IRF7 转录和抑制干扰素- $\beta$  诱导,逃避宿主天然免疫应答<sup>[16]</sup>,机体处于免疫极低状态,免疫细胞间的原动态平衡被打破,新平衡建立,使得 Rta/IgG 抗体浓度值相对稳定。这可能是导致 NPC 患者血清 Rta/IgG 抗体浓度在不同 T 分期中呈现相应改变的原因,具体的机制值得进一步深入研究。

综上所述,定量检测血清 Rta/IgG 抗体浓度在 NPC 早期筛查、诊断中具有较高的临床价值。NPC 组织 EBV-BRLF1 基因表达量及血清 Rta/IgG 抗体浓度,在不同 N 分期、M 分期、临床分期中大致相同;在 T3 期呈一定的上升趋势,提示 EBV-BRLF1 基因及其产物在 NPC 的局部组织浸润中起到特定的作用,为进一步探索 NPC 发生、发展、转移提供参考价值。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] El-Guindy A, Ghiassi-Nejad M, et al. Essential role of Rta in lytic DNA replication of Epstein-Barr virus[J]. *J Virol*, 2013, 87(1): 208-223.
- [ 2 ] Feng P, Chan SH, Soo MY, et al. Antibody response to Epstein-Barr virus Rta protein in patients with nasopharyngeal carcinoma: a new serologic parameter for diagnosis[J]. *Cancer*, 2001, 92(7): 1872-1879.
- [ 3 ] 郑裕明, 蔡永林, 成积儒, 等. 鼻咽癌 EB 病毒 Rta/IgG 抗体检测的诊断价值[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2009, 23(4): 285-287.
- [ 4 ] 罗耀凌, 陈浩, 彭颂国, 等. 联合检测 EB 病毒不同抗体及 EB 病毒 DNA 在鼻咽癌血清学诊断中的价值[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(44): 3516-3519.
- [ 5 ] 覃桂芳, 李友琼, 卢秋维, 等. EB 病毒 Rta-IgG 定量检测试剂盒分析性能评估及其在鼻咽癌血清诊断学中的应用[J]. *中国临床新医学*, 2013, 6(10): 942-944.
- [ 6 ] 潘建基. 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): 2-6.
- [ 7 ] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [ 8 ] Wille CK, Nawandar DM, Panfil AR, et al. Viral genome methylation differentially affects the ability of BZLF1 versus BRLF1 to activate Epstein-Barr virus lytic gene expression and viral replication[J]. *J Virol*, 2013, 87(2): 935-950.
- [ 9 ] 任军. BRLF1-EBV 的一种立即早期基因的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2005, 14(6): 372-375.
- [ 10 ] Zalani S, Holley-Guthrie E, Kenney S. Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(17): 9194-9199.
- [ 11 ] 徐楠楠, 胡桂学. 实时荧光定量 PCR 技术的研究进展及应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2011(21): 24-27.
- [ 12 ] 陈旭, 齐风坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(8): 148-155.
- [ 13 ] Feng P, Ren EC, Liu D, et al. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 10): 2417-2423.
- [ 14 ] 唐国全, 沙慧芳, 唐玉竺. 血清 EB 病毒 Rta-IgG 抗体检测对鼻咽癌的诊断价值[J]. *广西医学*, 2014, 36(8): 1083-1085.
- [ 15 ] 蔡永林, 郑裕明, 成积儒, 等. EB 病毒 Rta/IgG, EBNA1/IgA, VCA/IgA 及 EA/IgA 抗体与鼻咽癌分期的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(3): 509-511.
- [ 16 ] Bentz GL, Liu R, Hahn AM, et al. Epstein-Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon-beta[J]. *Virology*, 2010, 402(1): 121-128.
- (收稿日期 2015-08-25)  
(本文编辑 杨美琴)
- 
- (上接第 242 页)
- [ 6 ] 宋春琼, 焦烽, 庄洪兴, 等. 多孔高密度聚乙烯应用于扩张法耳廓再造术的临床研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(1): 40-43.
- [ 7 ] Brunelli A, Bottini DJ, Cervelli V, et al. Reconstruction of partially amputated external ear with costal cartilage graft: case report [J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2004, 24(3): 150-156.
- [ 8 ] Staudenmaier R, Aigner J, Kastenbauer E. Microtia: technique for external ear reconstruction with autologous rib cartilage [J]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 2001, 33(3): 162-170.
- [ 9 ] Siegert R, Weerda H, Magritz R. Basic techniques in autogenous microtia repair[J]. *Facial Plast Surg*, 2009, 25(3): 149-157.
- [ 10 ] Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 105(3): 980-990.
- [ 11 ] Kamisan N, Naveen SV, Ahmad RE, et al. Chondrocyte density, proteoglycan content and gene expressions from native cartilage are species specific and not dependent on cartilage thickness: a comparative analysis between rat, rabbit and goat [J]. *BMC Vet Res*, 2013, 9(1): 62.
- [ 12 ] Herz B, Albrecht A, Englbrecht M, et al. Osteitis and synovitis, but not bone erosion, is associated with proteoglycan loss and microstructure damage in the cartilage of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 1101-1106.
- [ 13 ] 陆晓娜, 王欢, 王盛, 等. 提高自体软骨移植物活性的研究进展简[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2013, 9(6): 349.
- [ 14 ] Grimaud E, Heymann D, Rédini F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(3): 241-257.
- [ 15 ] McDuffee LA, Esparza GB, Nino-Fong R, et al. Evaluation of an in vivo heterotopic model of osteogenic differentiation of equine bone marrow and muscle mesenchymal stem cells in fibrin glue scaffold [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(2): 327-335.
- [ 16 ] Wu X, Ren J, Yao G, et al. Biocompatibility, biodegradation, and neovascularization of human single-unit platelet-rich fibrin glue: an in vivo analysis [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(3): 408-411.
- [ 17 ] Le Nihouannen D, Guehennec LL, Rouillon T, et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(13): 2716-2722.
- [ 18 ] Nagamine K, Okamoto K, Kaji H, et al. Bonding of synthetic hydrogels with fibrin as the glue to engineer hydrogel-based biodevices [J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118(1): 94-97.
- [ 19 ] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials [J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1014-1017.
- (收稿日期 2015-06-08)  
(本文编辑 杨美琴)