



季加孚,教授、主任医师、博士生导师、国务院特殊津贴专家。现任北京大学肿瘤医院、北京大学临床肿瘤学院院长,北京市肿瘤防治研究所所长,教育部恶性肿瘤发病机制及转化重点实验室主任,北京大学肿瘤研究中心主任。

兼任国际胃癌学会(International Gastric Cancer Association, IGCA)主席,中国抗癌协会副理事长,中国抗癌协会医院管理分会主任委员,中国医疗保健国际交流促进会副会长,中华医学会常务理事,中华医学会外科学分会常务委员兼秘书长,中国医师协会外科医师分会肿瘤外科医师委员会主任委员,约翰·霍普金斯大学医学院兼职教授,美国外科学院院士(Fellow of American College of Surgeons, FACS),英国皇家外科学院院士(Fellow of Royal Colleges of Surgeons, FRCS),亚洲外科学会(Asian Surgical Association, ASA)常务委员,中国人民政治协商会议第十三届全国委员会委员,中国民主同盟中央常务委员,中国民主同盟中央卫生与健康委员会主任。

康委员会主任。

从事医教研一线工作 36 年,在领导实现胃癌外科手术共识、创新围手术期治疗模式、率先建立胃癌样本库、探索个体化治疗分子机制等方面做出重要贡献。以第一或通信作者在 *Nature Communications*、*Annals of Oncology*、*Clinical Cancer Research* 等杂志发表 SCI 论文 127 篇,主编国内首个 SCI 收录的肿瘤学期刊。以第一完成人获国家科技进步二等奖 1 项、省部级一等奖 3 项,获吴阶平-保罗·杨森医学药学奖及英国文化教育协会职业成就奖,是国家卫生健康委员会突出贡献专家、北京学者。

单中心大样本 Epstein-Barr 病毒相关性胃癌亚型的临床病理及分子特征分析

杨 阳¹,刘毅强²,王晓红³,季 科¹,李忠武²,白 健⁴,杨爱蓉⁴,胡 颖³,韩海勃³,李子禹¹,步召德¹,吴晓江¹,张连海^{1Δ},季加孚^{1Δ}

(北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所,恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室,1. 胃肠肿瘤中心,2. 病理科,3. 生物样本库,北京 100142;4. 和瑞基因科技有限公司,北京 102206)

[摘 要] **目的:** Epstein-Barr 病毒相关性胃癌(Epstein-Barr virus associated gastric cancer, EBVaGC)与常见胃癌(非 Epstein-Barr 病毒相关性胃癌, Epstein-Barr virus non-associated gastric cancer, EBVnGC)不同,具有独特的临床病理特征,本研究采用单中心大样本探讨中国 EBVaGC 的临床病理及分子特征。 **方法:** 回顾分析 2003—2018 年北京大学肿瘤医院 EBVaGC 与 EBVnGC 两组患者的临床病理特征和预后。分析公共数据库胃癌数据集,筛选显著差异表达基因,并在本组病例中验证重要基因的表达及其与预后的相关性。 **结果:** 3 241 例胃癌患者纳入研究,EBVaGC 为 163 例,占总数的 5.0%。与 EBVnGC 相比,EBVaGC 男性常见,平均年龄低,多见于残胃癌,常为低分化腺癌、Lauren 混合型,较少出现淋巴结转移,EBVaGC 患者的 5 年生存率为 63.2%,优于 EBVnGC 的 59.6% ($P < 0.05$)。为挖掘 EBVaGC 的分子特征,对癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)胃癌数据集($n = 240$)进行分析,筛选到 7 404 个显著差异表达基因,涉及细胞增殖、凋亡、侵袭转移等功能,其中侵袭转移相关基因 *SALL4* 下调、免疫检查点相关基因 *PD-L1* 上调是 EBVaGC 重要的分子特征。大样本验证显示,*SALL4* 在 EBVaGC 中多为阴性(1/92, 1.1%, 低于 EBVnGC 的 303/1 727, 17.5%),*PD-L1* 在 EBVaGC 中多为阳性(81/110, 73.6%, 高于 EBVnGC 的 649/2 350, 27.6%),*SALL4* 阴性和 *PD-L1* 阳性患者的预后较好。 **结论:** EBVaGC 作为独特的胃癌亚型,较少出现转

移且预后良好,该亚型具有特征性分子背景,其中侵袭转移相关基因 *SALL4* 的下调以及免疫检查点相关基因 *PD-L1* 的上调是重要的分子特征。

[关键词] Epstein-Barr 病毒感染;胃肿瘤;临床病理特征;预后

[中图分类号] R735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2019)03-0451-08

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2019.03.012

Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus associated gastric cancer: a single center large sample case investigation

YANG Yang¹, LIU Yi-qiang², WANG Xiao-hong³, JI Ke¹, LI Zhong-wu², BAI Jian⁴, YANG Ai-rong⁴, HU Ying³, HAN Hai-bo³, LI Zi-yu¹, BU Zhao-de¹, WU Xiao-jiang¹, ZHANG Lian-hai^{1△}, JI Jia-fu^{1△}

(1. Department of Gastrointestinal Cancer Center, 2. Department of Pathology, 3. Department of Biobank, Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research, Ministry of Education; Laboratory of Genetics, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China; 4. Berry Oncology Corporation, Beijing 102206, China)

ABSTRACT Objective: Epstein-Barr virus associated gastric cancer (EBVaGC) is different from the traditional gastric cancer (Epstein-Barr virus non-associated gastric cancer, EBVnGC), and has unique clinicopathological features. This study investigated the largest single center cancer series so as to establish the clinicopathological and molecular characteristics of EBVaGC in China. **Methods:** A retrospective analysis was conducted on EBVaGC and EBVnGC patients diagnosed at Peking University Cancer Hospital from 2003 to 2018 by comparing their clinicopathological features and prognosis. The gastric cancer (GC) dataset of public database was analyzed to obtain differentially expressed genes. The expression of important genes and their association with prognosis of GC were verified in GC tissues from our hospital.

Results: In this study, 3 241 GC patients were included, and a total of 163 EBVaGC (5.0%) patients were identified. Compared with EBVnGC, EBVaGC was higher in male and younger patients, and positively associated with remnant GC, poorly differentiated adenocarcinoma, and mixed type GC. EBVaGC was inversely related to lymph node metastasis. The 5-year survival rate of EBVnGC and EBVaGC was 59.6% and 63.2% respectively ($P < 0.05$). In order to explore molecular features of EBVaGC, the Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset was analyzed ($n = 240$), and 7 404 significant differentially expressed genes were obtained, involving cell proliferation, apoptosis, invasion and metastasis. The down-regulated invasion/metastasis gene *SALL4* and the up-regulated immune checkpoint gene *PD-L1* were important molecular features of EBVaGC. Validation of these two genes in large GC series showed that the majority of the EBVaGC was *SALL4* negative (1/92, 1.1%, lower than EBVnGC, 303/1 727, 17.5%), and that *PD-L1* was mostly positive in EBVaGC (81/110, 73.6%, higher than EBVnGC, 649/2 350, 27.6%). GC patients with *SALL4* negative and *PD-L1* positive were often associated with better prognosis. **Conclusion:** EBVaGC is a unique subtype of GC with less metastasis and a good prognosis. It also has a distinct molecular background. The down-regulation of invasion/metastasis gene *SALL4* and up-regulation of immune checkpoint gene *PD-L1* are important molecular features.

KEY WORDS Epstein-Barr virus infections; Stomach neoplasms; Clinicopathological features; Prognosis

Epstein-Barr 病毒相关性胃癌 (Epstein-Barr virus associated gastric cancer, EBVaGC) 是经原位杂交技术证实胃癌细胞中 Epstein-Barr 病毒编码小 RNA (Epstein-Barr virus encoded small RNA, EBER) 表达的胃癌^[1]。随着胃癌分子分型的深入开展和免疫治疗的兴起,EBVaGC 越来越受到重视。据癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 研究报道,EBVaGC 是一种有独特分子特性的胃癌亚型,具有 *PD-L1/2* 过表达、*PIK3CA* 突变、*ARID1A* 突变、DNA 超甲基化等分子特征^[2]。另有研究表明,EBVaGC 具有独特的流行病学、临床和病理特征,但由于其发病率不高,大样本验证的研究少见^[3],不同研究的结论有所差异^[4-6]。本研究旨在大样本胃癌病例中检测 Epstein-Barr 病毒感染状态,明确 EBVaGC 在全部胃癌中的构成比、临床病理特征和预后,此外,运用生物信息学方法深度挖掘公共数据库

中 EBVaGC 的基因特征,了解差异基因的表达水平,并在本组病例中对重要基因进行验证和预后分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

回顾性收集 2003—2018 年于北京大学肿瘤医院胃肠外科行胃癌切除术的患者,全部患者经组织病理学检查确诊,剔除无法获得组织蜡块及临床病理信息不全的患者,共 3 241 例患者纳入本研究。患者的年龄、性别、肿瘤位置、分化程度、Lauren 分型、TNM 分期、病理类型、脉管神经浸润、淋巴结转移等信息从病历信息中获得,其中 TNM 分期参照国际抗癌联盟《胃癌 TNM 分期系统 (第 7 版)》。通过电话或门诊对患者进行随访,末次随访时间为 2018 年 4 月 18 日。研究样本来源于生物样本库及病理科,研究方案本身及涉及的组织标本采集和资料收

集均获得北京大学肿瘤医院医学伦理委员会批准。

1.2 原位杂交检测 EBER

原位杂交检测 EBER 表达是诊断 EBVaGC 的金标准,具体步骤为:(1)样本预处理:将 4 μm 厚石蜡包埋胃癌组织连续切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化;(2)酶处理:蛋白酶消化;(3)杂交:地高辛标记 EBER 探针杂交 (EBER 原位杂交试剂盒);(4)检测和显色:辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记抗地高辛抗体孵育,并进行二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色;(5)苏木素复染,常规脱水、透明和封片。以 $\geq 20\%$ 细胞核呈棕褐色着色为阳性,否则为阴性^[7]。选用已知 Epstein-Barr 病毒阳性和阴性的鼻咽癌组织作为阳性和阴性对照,应用未标记探针做杂交进行空白对照。所有组织切片染色均由北京大学肿瘤医院病理科两名专职病理人员独立阅片后综合判断结果。

1.3 EBVaGC 相关差异表达基因的筛选

下载 TCGA 数据库中胃癌数据集 (TCGA, Nature 2013, $n = 240$) HTseq-count 转录组数据,包含 EBVaGC 患者 23 例和 EBVnGC 患者 217 例。使用 edgeR 软件对两组样本进行基因差异表达分析,以 $|\text{Fold Change}| \geq 2$ 且 P 值 < 0.05 初步筛选显著差异表达的基因。对上述差异基因进行评价来获取关键基因,标准为:(1)相关文献报道的次数,(2)统计基因参与的功能及数量,(3)统计基因参与的通路及数量,(4)现有文献涉及的癌种数量。按高表达和低表达分组,分别提取关键基因的信息,包括:基因名称、 P 值、差异倍数和错误发现率 (false discovery rate, FDR)。

1.4 重要差异基因的验证

免疫组织化学染色检测重要基因 SALL4 和 PD-L1 的蛋白表达。将 4 μm 石蜡包埋胃癌组织连续切片,经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化后,按照抗体说明书进行抗原修复、抗体标记及 DAB 染色,PD-L1 稀释比 1 : 300, SALL4 稀释比 1 : 100。PD-L1 检测抗体试剂 (ab205921) 来自 Abcam 公司, SALL4 检测抗体试剂 (ZM-0393)、通用二步法检测试剂盒 (小鼠/兔增强聚合物法检测系统)、DAB 显色试剂盒、EDTA 抗原修复液、羊血清抗原封液和羊抗鼠 IgG-HRP 均来自北京中杉金桥生物技术有限公司。以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 代替一抗作为阴性对照,已知 PD-L1 和 SALL4 阳性的胃癌组织切片作为阳性对照。

染色切片由病理科专职人员独立判读,依据既往文献报道标准进行评分^[8-9]: PD-L1 定位于细胞

膜及细胞质, SALL4 定位于细胞核,染色结果根据阳性细胞比例和着色深浅计分,进行半定量分析。每张切片随机取 5 个 400 倍视野,每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比计分,总评分为染色强度和阳性细胞百分比评分的乘积。

PD-L1 染色强度评分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞百分比评分:0 为 0 分,1% ~ 30% 为 1 分,31% ~ 60% 为 2 分, > 60% 为 3 分;评分 ≥ 2 为 PD-L1 阳性表达。

SALL4 染色强度评分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞百分比评分:0 ~ 5% 为 0 分,6% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分;评分 > 0 为 SALL4 阳性表达。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。患者的计量资料 (如年龄) 用 Kolmogorov-Smirnov 检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 描述。组间计数资料采用 χ^2 检验。组间的计量资料如果符合正态分布,则采用独立样本 t 检验,否则采用 Mann-Whitney U 非参数检验。应用 Kaplan-Meier 法计算生存率并绘制生存曲线,组间比较采用 Log-rank 检验,采用 Cox 回归模型分析影响患者预后的风险因素,并计算风险比 (hazard ratio, HR)。双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EBVaGC 的临床病理特征

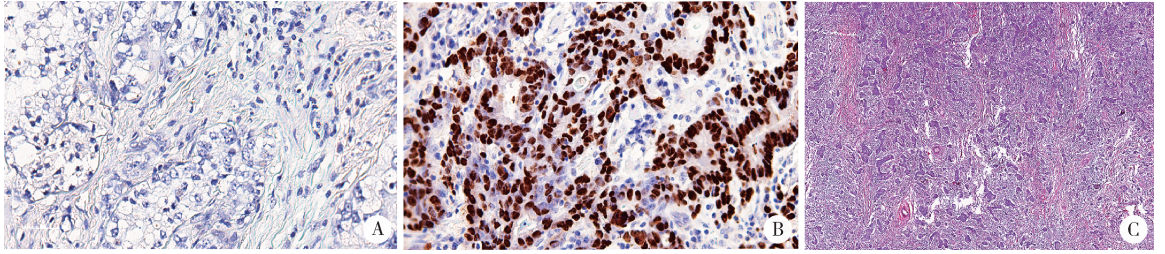
3 241 例胃癌组织标本中有 163 例 (5.0%) 胃癌细胞中检测到 EBER 阳性信号,确诊为 EBVaGC, Epstein-Barr 病毒阳性杂交信号位于细胞核 (图 1A、B)。

2.1.1 EBVaGC 组与 EBVnGC 组基线人口学资料及比较 EBVnGC 组与 EBVaGC 组的男女患者比分别为 2.6 : 1 和 6.0 : 1,两组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.783, P = 0.001$)。EBVaGC 组 163 例患者,平均年龄为 (55.9 \pm 10.8) 岁, EBVnGC 组 3 078 例患者,平均年龄为 (59.7 \pm 11.1) 岁,两组年龄差异有统计学意义 ($t = 4.190, P < 0.001$)。

2.1.2 EBVaGC 组与 EBVnGC 组临床病理特征及比较 残胃癌中 EBVaGC 患者 7 例 (7/51, 13.7%), 新发胃癌中 EBVaGC 患者 156 例 (156/3 190, 4.9%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.204, P = 0.004$)。与 EBVnGC 组相比, EBVaGC 组的 Lauren 分型多为混合型 ($\chi^2 = 16.547, P < 0.001$), 常见于低分化腺癌 ($\chi^2 = 10.783, P = 0.001$),

EBVaGC组织学分型多为伴有淋巴样间质的癌 (lymphoepithelioma-like carcinoma, LELC),本组的 21 例 LELC 患者中,EBER 均为阳性。低倍镜下其

形态呈典型的“花边样”变(图 1C)。EBVaGC 组和 EBVaGC 组的肿瘤位置和 TNM 分期等资料见表 1。



A, EBER negative (×200); B, EBER positive (×200); C, LELC exhibits “lace-like” pattern by HE staining (×40). EBER, Epstein-Barr virus encoded small RNA; LELC, lymphoepithelioma-like carcinoma.

图 1 原位杂交检测胃癌组织中的 EBER 表达

Figure 1 EBER expression in human primary gastric cancer by *in situ* hybridization

表 1 EBVaGC 的临床病理特征

Table 1 The clinicopathological features of EBVaGC

Variables	EBVaGC (n = 163)	EBVnGC (n = 3 078)	Statistics value	P value
Gender, n			$\chi^2 = 10.783$	0.001
Male	137	2 226		
Female	26	852		
Age/years, $\bar{x} \pm s$	55.9 ± 10.8	59.7 ± 11.1	$t = 16.959$	<0.001
WHO classification, n			$\chi^2 = 399.138$	<0.001
Adenocarcinoma	142	3 078		
LELC	21	0		
Lauren type, n			$\chi^2 = 16.547$	<0.001
Intestinal-type	50	1 431		
Diffuse-type	50	798		
Mixed-type	63	849		
Differentiation, n			$\chi^2 = 35.086$	<0.001
Poorly	112	1 403		
Moderately	51	1 581		
Well	0	94		
Location, n			$\chi^2 = 0.620$	0.431
Cardia	34	814		
Non-cardia	129	2 264		
TNM stage, n			$\chi^2 = 6.797$	0.079
I	44	615		
II	32	688		
III	71	1 546		
IV	16	229		
T, n			$\chi^2 = 4.679$	0.197
T1	31	499		
T2	25	416		
T3	62	1 437		
T4	45	726		
N, n			$\chi^2 = 4.772$	0.029
Positive	92	1 996		
Negative	71	1 082		
M, n			$\chi^2 = 1.251$	0.263
Positive	16	229		
Negative	147	2 849		
Vascular invasion, n			$\chi^2 = 7.775$	0.005
Positive	62	1 586		
Negative	91	1 460		
Remnant GC or not, n			$\chi^2 = 8.204$	0.004
Yes	7	44		
No	156	3 034		

EBVaGC, Epstein-Barr virus associated gastric cancer; EBVnGC, Epstein-Barr virus non-associated gastric cancer; WHO, World Health Organization; LELC, lymphoepithelioma-like carcinoma; GC, gastric cancer.

2.1.3 EBVaGC 组与 EBVnGC 组浸润转移及比较

EBVaGC 组淋巴结转移阳性率为 56.4% (92/163), EBVnGC 组为 64.8% (1 996/3 078), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.772, P = 0.029$)。EBVaGC 组与 EBVnGC 组脉管浸润阳性率分别为 44.2% (72/163) 和 52.6% (1 618/3 078), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.775, P = 0.005$)。

2.1.4 EBVaGC 组与 EBVnGC 组预后及比较

与 EBVnGC 组相比, EBVaGC 组患者的预后较好。EBVaGC 组 3 年和 5 年生存率分别为 82.2% 和 63.2%, EBVnGC 组分别为 69.6% 和 59.6%, 两组间差异有统计学意义 ($P = 0.038$), 尤其是在 III 期胃癌患者中, EBVaGC 和 EBVnGC 的 5 年生存率分别是 57.9% 和 49.0%, 差异有统计学意义 ($P = 0.044$, 图 2)。对胃癌患者进行预后单因素分析发现, EBER、TNM 分期、分化程度和淋巴结转移与胃癌预后相关 (P 均小于 0.05, 表 2)。将上述单因素纳入 Cox 回归进行多因素生存分析, 结果显示 EBER 是胃癌患者生存的预后因素 ($HR = 0.609, 95\% CI: 0.39 \sim 0.95, P = 0.029$), TNM 分期和淋巴结转移与胃癌预后相关 (表 3)。

表 2 影响胃癌术后生存时间的单因素分析

Table 2 Univariate Cox regression analysis of prognostic factors for gastric cancer patients

Variables	HR (95% CI)	P value
Age		
18 - 50	1	
50 - 90	1.156 (0.963 - 1.388)	0.121
Gender		
Male	0.970 (0.816 - 1.155)	0.735
Female	1	
EBER	0.040	
Negative	1	
Positive	0.627 (0.402 - 0.979)	
WHO classification		
Adenocarcinoma	1	
LELC	0.049 (0.000 - 52.491)	0.398
Differentiation		
Poor and moderate	1	
Well	0.209 (0.078 - 0.558)	0.002
Location		
Cardiac	1	
Non-cardiac	1.065 (0.666 - 1.703)	0.792
TNM stage		
I	1	
II	4.402 (2.246 - 8.628)	<0.001
III	15.600 (8.334 - 29.203)	<0.001
IV	18.541 (9.707 - 35.412)	<0.001
Lymphatic metastatic		
Negative	1	
Positive	3.979 (3.159 - 5.011)	<0.001

EBER, Epstein-Barr virus encoded small RNA. Other abbreviations as in Table 1.

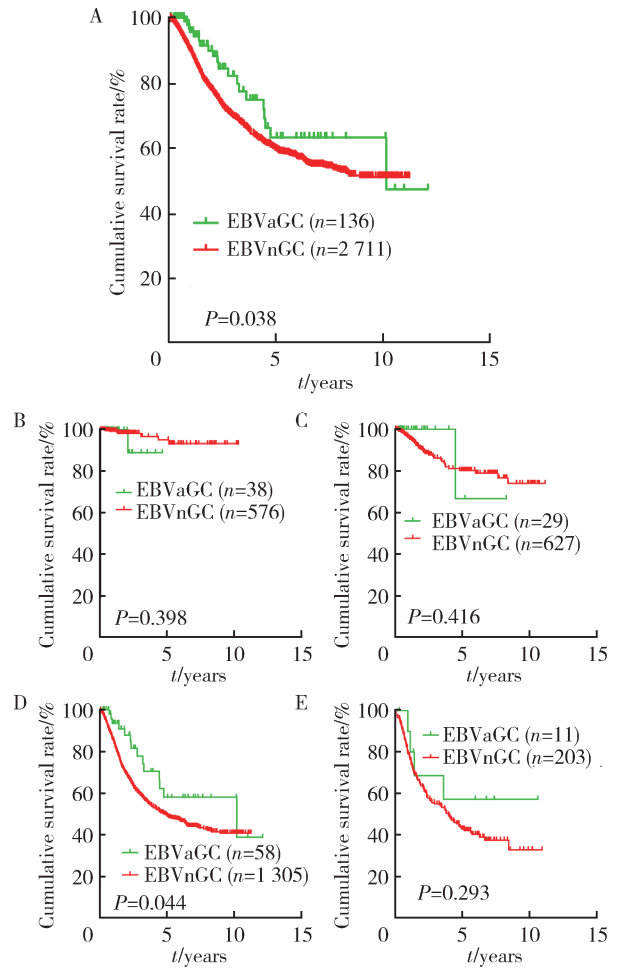


图 2 EBVaGC 和 EBVnGC 患者的生存曲线
Figure 2 Kaplan-Meier curves of EBVaGC and EBVnGC

2.2 TCGA 数据库中 EBVaGC 和 EBVnGC 的差异表达基因

为了进一步挖掘与 EBVaGC 临床病理特点相关的分子特征, 采用 edgeR 软件对 TCGA 数据库中 23 例 EBVaGC 和 217 例 EBVnGC 的转录组数据进行分析, 共获得 7 404 个差异表达基因, 其中高表达的基因 1 122 个, 低表达的基因 6 282 个 (图 3A)。根据文献报道、研究热点和基因的功能等进行筛选获得关键差异基因, 这些关键基因的生物学功能主要涉及细胞干性、细胞增殖、细胞凋亡、侵袭转移、细胞生存、耐药和免疫检查点等 (表 4)。在这些关键差异基因中, 免疫检测点相关基因——*PD-L1* 基因在 EBVaGC 样本中显著高表达 ($\lgFC = 2.53, P = 6.79 \times 10^{-22}$), 另一个近年来在胃癌中受到关注的侵袭转移相关基因——*SALL4* 基因在 EBVaGC 样本中显著低表达 ($\lgFC = -2.25, P = 4.41 \times 10^{-6}$), 具

体见表 4 和图 3B、C。

2.3 重要基因 *SALL4* 和 *PD-L1* 在 EBVaGC 的表达水平和验证

为进一步验证侵袭性相关基因 *SALL4* 和免疫检查点相关基因 *PD-L1* 在 EBVaGC 和 EBVnGC 中表达水平的差异,使用免疫组织化学检测 *SALL4* 和 *PD-L1* 蛋白在人胃癌组织中的表达,*SALL4* 在胃癌组织中的免疫反应位于细胞核,*PD-L1* 定位于细胞质和细胞膜,结果显示,*SALL4* 阳性率为 16.7% (304/1 819),*PD-L1* 阳性率为 29.7% (730/2 460)。*SALL4* 和 *PD-L1* 的表达在两组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。EBVaGC 组中 *SALL4* 的阳性率为 1.1% (1/92),EBVnGC 组中为 17.5% (303/1 727);EBVaGC 组中 *PD-L1* 的阳性率为 73.6% (81/110),EBVnGC 为 27.6% (649/2 350)。

为探讨 *SALL4* 和 *PD-L1* 对 EBVaGC 和 EBVnGC 患者预后的影响,将胃癌患者按基因表达水平进行分组后作生存分析。通过 Kaplan-Meier 分析得到,Epstein-Barr 病毒 (+) / *SALL4* (-) 组 ($P = 0.0347$) 和 Epstein-Barr 病毒 (+) / *PD-L1* (+) 组

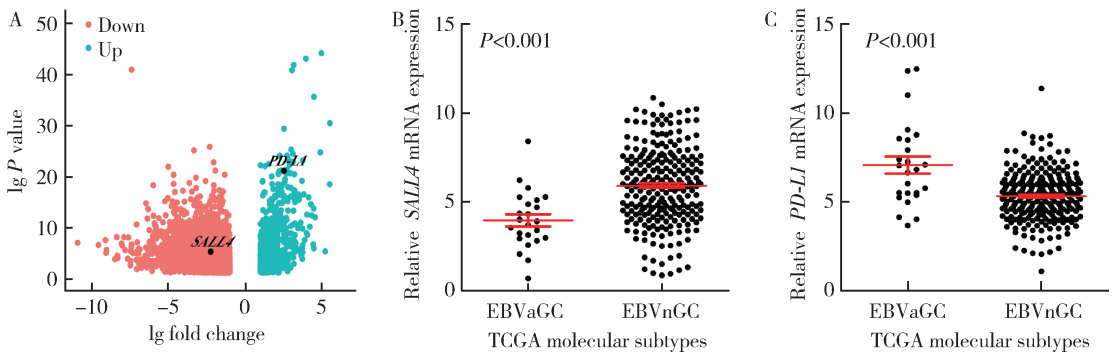
($P = 0.047$) 的预后较好 (图 4)。

表 3 影响胃癌术后生存时间的多因素分析

Table 3 Multivariate Cox regression analysis of prognostic factors for gastric cancer patients

Variables	HR (95% CI)	P value
EBER		
Negative	1	
Positive	0.609 (0.390 - 0.951)	0.029
TNM stage		
I	1	
II	2.904 (1.461 - 5.773)	0.002
III	8.761 (4.557 - 16.844)	<0.001
IV	10.816 (5.533 - 21.145)	<0.001
Differentiation		
Poor and moderate	1	
Well	0.432 (0.161 - 1.163)	0.100
Lymph node metastasis		
Negative	1	
Positive	2.028 (1.577 - 2.606)	<0.001

Abbreviations as in Table 2.



A, differentially expressed genes of EBVaGC (red: genes of up-regulation; green: genes of down-regulation); B, the expression of *SALL4* in EBVaGC and EBVnGC; C, the expression of *PD-L1* in EBVaGC and EBVnGC. TCGA, The Cancer Genome Atlas; other abbreviations as in Table 1.

图 3 TCGA 数据库中胃癌数据集差异表达基因及其表达水平

Figure 3 Differentially expressed genes and their expression levels in EBVaGC and EBVnGC from the TCGA gastric cancer dataset

3 讨论

2014 年 TCGA 将胃癌分为 Epstein-Barr 病毒感染型 (EBVaGC)、基因组稳定型、染色体不稳定型及微卫星不稳定型^[2],其中 EBVaGC 因具有独特的临床、病理和分子特征,预后良好并有望成为免疫治疗的适宜群体而受到关注。国外大样本荟萃分析报道,EBVaGC 占全部胃癌的比例为 9%^[4],国内小样本研究报道比例为 3.7% ~ 11%^[10-12]。本研究的大样本验证得到,EBVaGC 在胃癌中的构成比为 5.0%,与日本的一项研究结果类似(5.6%)^[13]。本

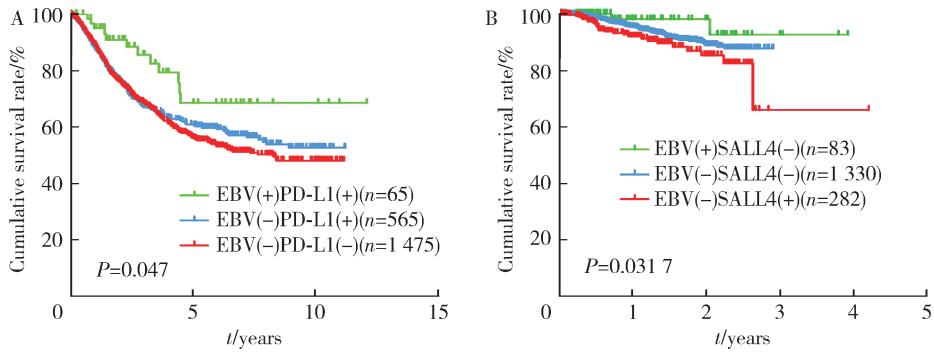
研究发现,残胃癌中 EBVaGC 为 13.7%,检出率高于普通胃癌,与既往文献报道基本一致^[14]。

EBVaGC 具有独特的临床和病理特征且预后较好。多数研究一致认为,EBVaGC 常见于男性和中低分化腺癌,而对于年龄、Lauren 分型、分期和淋巴结转移等与 EBVaGC 的相关性意见不一^[3-4,6]。本研究发现,EBVaGC 好发于较为年轻的患者,Lauren 分型以混合型多见,淋巴结转移及脉管浸润多为阴性。既往研究报道,在伴有淋巴样间质的癌 (LELC) 这种病理分型中,EBVaGC 检出率为 80%,镜下形态呈“花边样”结构且伴大量淋巴浸润,本研究中 LELC 的 Epstein-Barr 病毒检出率高达 100%。

表 4 EBVaGC 和 EBVnGC 关键差异基因信息
Table 4 The key differential genes of EBVaGC and EBVnGC

Expression level	Gene	Gene name	Chromosome	Reference sequence	Protein location	Function	P value	FDR	
Up-regulated	<i>TBK1</i>	Tektin 4	2q11.1	NM_001286559	Nucleus	Drug resistance	2.2625×10^{-36}	1.7233×10^{-32}	
	<i>ZNF683</i>	Zinc finger protein 683	1p36.11	NM_001114759	Nucleus	Prognosis	7.3329×10^{-25}	2.5311×10^{-21}	
	<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine ligand 10	4q21.1	NM_001565	Extracellular	Proliferation	3.0693×10^{-24}	9.6263×10^{-21}	
	<i>ATF5</i>	Activating transcription factor 5	19q13.33	NM_001193646	Cytoskeleton, nucleus	Immune, prognosis	3.2345×10^{-23}	8.2122×10^{-20}	
	<i>CXCL11</i>	C-X-C motif chemokine ligand 11	4q21.1	NM_001302123	Extracellular	Immune, prognosis	4.9724×10^{-23}	1.2050×10^{-19}	
	<i>ITGAE</i>	Integrin subunit alpha E	17p13.2	NM_002208	Plasma membrane	Prognosis	8.3876×10^{-23}	1.8634×10^{-19}	
	<i>XCRI</i>	X-C motif chemokine receptor 1	3p21.31	NM_001024644	Plasma membrane	Proliferation	3.9072×10^{-22}	8.0123×10^{-19}	
	<i>PD-L1</i>	Programmed cell death 1 ligand 1	9p24.1	NM_001267706	Plasma membrane, extracellular	Immune checkpoint	6.7897×10^{-22}	1.2483×10^{-18}	
	<i>CXCL9</i>	C-X-C motif chemokine ligand 9	4q21.1	NM_002416	Extracellular	Immune	2.1781×10^{-21}	3.6291×10^{-18}	
	<i>CX3CL1</i>	C-X3-C motif chemokine ligand 1	16q21	NM_001304392	Plasma membrane, extracellular	Immune, prognosis	2.8687×10^{-21}	4.6349×10^{-18}	
	<i>ERBB4</i>	Erb-B2 receptor tyrosine kinase 4	2q34	NM_001042599	Nucleus, extracellular	Proliferation	3.1460×10^{-21}	4.9334×10^{-18}	
	<i>JAK2</i>	Janus kinase 2	9p24.1	NM_001322194	Plasma membrane, nucleus	Proliferation	8.5274×10^{-21}	1.2288×10^{-17}	
	<i>DDR2</i>	Damage specific DNA binding protein 2	11p11.2	NM_000107	Nucleus	Cell stemness, apoptosis	6.6777×10^{-20}	8.4770×10^{-17}	
	Down-regulated	<i>CLDN3</i>	Claudin 3	7q11.23	NM_001306	Plasma membrane	Invasion and metastasis	1.1623×10^{-41}	1.2394×10^{-37}
		<i>HOXA10</i>	Homeobox A10	7p15.2	NM_018951	Plasma membrane	Proliferation, prognosis	1.0793×10^{-22}	2.3019×10^{-19}
		<i>MLYCD</i>	Malonyl-CoA decarboxylase	16q23.3	NM_012213	Mitochondrion	Proliferation	3.8168×10^{-21}	5.8142×10^{-18}
		<i>RCOR2</i>	REST corepressor 2	11q13.1	NM_173587	Nucleus	Cell stemness	1.4905×10^{-20}	2.0913×10^{-17}
		<i>TPD52L1</i>	Tumor protein D52 like 1	6q22.31	NM_001003395	Cytoplasm	Proliferation	7.9169×10^{-18}	6.3956×10^{-15}
		<i>NOL3</i>	Nucleolar protein 3	16q22.1	NM_001185057	Nucleus, mitochondrion	Prognosis	1.8561×10^{-17}	1.3556×10^{-14}
		<i>CDH17</i>	Cadherin 17	8q22.1	NM_001144663	Plasma membrane, nucleus	Prognosis	1.4290×10^{-13}	4.5082×10^{-11}
<i>HOXA9</i>		Homeobox A9	7p15.2	NM_152739	Nucleus	Proliferation	3.3198×10^{-13}	9.7322×10^{-11}	
<i>IRS2</i>		Insulin receptor substrate 2	13q34	NM_003749	Cytoplasm	Invasion and metastasis	7.7461×10^{-12}	1.7066×10^{-9}	
<i>NKD2</i>		Naked cuticle homolog 2	5p15.33	NM_001271082	Plasma membrane	Proliferation	8.2597×10^{-12}	1.7902×10^{-9}	
<i>SALL4</i>		Spalt like transcription factor 4	20q13.2	NM_001318031	Nucleus	Invasion and metastasis	4.4084×10^{-6}	0.0001	
<i>MT3</i>		Metallothionein 3	16q13	NM_005954	Cytoplasm	Invasion and metastasis	0.0003	0.0041	
<i>MUC21</i>		Mucin 21, cell surface associated	6p21.33	NM_001010909	Extracellular	Proliferation, prognosis	0.0011	0.0113	
<i>IRX6</i>		Iroquoishomeobox 6	16q12.2	NM_024335	Nucleus	Prognosis	0.0012	0.0120	

FDR, false discovery rate.



A, gastric cancer patients with PD-L1 positive with good outcomes; B, gastric cancer patients with SALL4 negative with good outcomes.

图 4 不同 SALL4 和 PD-L1 表达的 EBVaGC 和 EBVnGC 患者生存曲线

Figure 4 Kaplan-Meier survival curves for SALL4 and PD-L1 differentially expressed in EBVaGC and EBVnGC

EBVaGC 独特的临床病理特征意味着其有独特的分子背景。本研究通过对 TCGA 中的胃癌数据进行分析,找到 EBVaGC 的差异基因,涉及细胞增殖、凋亡、侵袭转移、细胞干性、耐药性等功能,其中, *SALL4* 是一种锌指蛋白转录因子,位于人类 20 号染色体 q13。既往研究报道 *SALL4* 在胃癌中呈高表达,与胃癌侵袭转移相关,提示不良预后^[15]。本研究发现 EBVaGC 中侵袭相关性基因 *SALL4* 在 EBVaGC 中呈低表达,另一重要差异基因 *PD-L1* 被公认为是 EBVaGC 的分子特征^[2,7]。据 TCGA 报道,15% 的 EBVaGC 呈 *PD-L1* 高表达^[2]。PD-L1 是程序性凋亡受体 1 (PD-1) 的配体,PD-1 和 PD-L1 在肿瘤进展中发挥着重要的作用。PD-1 是一种重要的 T 细胞免疫检查点,通过抑制外周 T 细胞的活化从而抑制自身免疫,因此,用药物阻断 PD-1/PD-L1 通路能增强 T 细胞功能,引起肿瘤细胞死亡,从而实现对肿瘤的持久控制。近来有研究报道,EBVaGC 对帕姆单抗治疗有效,客观缓解率达 100%^[16]。由于 PD-L1 在多种肿瘤组织中呈高表达,越来越多的研究显示,PD-L1 可作为肿瘤预后的标志物,但 PD-L1 的表达与胃癌患者的预后是否存在一定的相关性尚没有定论,本研究的大样本结果显示,PD-L1 阳性的 EBVaGC 患者有较好的预后。

综上所述,EBVaGC 具有独特的临床病理特点,较少出现侵袭转移、淋巴结转移,预后较好。结合公共数据库分析及大样本验证,发现 EBVaGC 独特的分子背景中,*SALL4* 低表达和 *PD-L1* 高表达是 EBVaGC 的重要分子特征之一,且 *SALL4* 低表达和 *PD-L1* 高表达有助于判断预后,这一点有待今后进一步研究证实。

参考文献

[1] 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.
- [2] Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202.
- [3] Baek DW, Kang BW, Hwang S, et al. Clinical significance of p53 protein expression, beta-catenin expression and HER2 expression for Epstein-Barr virus-associated gastric cancer [J]. *Chonnam Med J*, 2017, 53(2): 140-146.
- [4] Camargo MC, Kim WH, Chiaravalli AM, et al. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis [J]. *Gut*, 2014, 63(2): 236-243.
- [5] Camargo M, Murphy G, Koriyama C, et al. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis [J]. *Brit J Cancer*, 2011, 105(1): 38.
- [6] Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, et al. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(3): 824-833.
- [7] Dong M, Wang HY, Zhao XX, et al. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2016, 53: 25-34.
- [8] Myers RB, Kudlow JE, Grizzle WE. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and the epidermal growth factor receptor in adenocarcinoma of the prostate and benign prostatic hyperplasia [J]. *Mod Pathol*, 1993, 6(6): 733-737.
- [9] Yong KJ, Gao C, Lim JS, et al. Oncofetal gene *SALL4* in aggressive hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(24): 2266-2276.
- [10] Harn HJ, Chang JY, Wang MW, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan [J]. *Hum Pathol*, 1995, 26(3): 267-271.
- [11] Qiu K, Tomita Y, Hashimoto M, et al. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma in Suzhou, China and Osaka, Japan: Association with clinico-pathologic factors and HLA-subtype [J]. *Int J Cancer*, 1997, 71(2): 155-158.
- [12] Liu S, Zhao Z, Han L, et al. Epstein-Barr virus infection in gastric remnant carcinoma and recurrent gastric carcinoma in Qingdao of Northern China [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148342.
- [13] Sukawa Y, Yamamoto H, Noshio K, et al. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(45): 6577-6586.
- [14] Kaizaki Y, Hosokawa O, Sakurai S, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in the remnant stomach: de novo and metachronous gastric remnant carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2005, 40(6): 570-577.
- [15] Zhang L, Xu Z, Xu X, et al. *SALL4*, a novel marker for human gastric carcinogenesis and metastasis [J]. *Oncogene*, 2014, 33(48): 5491-5500.
- [16] Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer [J]. *Nat Med*, 2018, 24(9): 1449-1458.

(2019-03-18 收稿)
(本 文 编 辑 : 任 英 慧)