Archive of SID

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۴۸- ۴۳

بررسی فراوانی اپشتین بار ویروس (EBV) دربلوک‌های نمونه بیوپسی سرطان مری دراستان‌های مازندران و گلستان در سال ۱۳۸۷

محمدرضا حق‌شناس[۱*]، علیرضا رفیعی[۲]، فروه ذبیحیان[۳] ، فرشاد نقشوار[۴]

۱) گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲) مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳) دانشجوی پزشکی ، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴) گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
نویسنده رابط: محمدرضا حق‌شناس، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی ساری، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، ساری
تلفن: ۲۲۶۲۵۸۶- ۰۱۵۱ haghshenas2001@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۳۰

چکیده:

زمینه و اهداف: سرطان مری یکی از سرطان‌های شایع در ناحیه مازندران و گلستان است، که در کمربند آسیایی سرطان مری واقع شده است. علت سرطان مری به‌درستی مشخص نمی‌باشد. عفونت با(Epstein Barr Virus (EBV عامل بسیاری از بدخیمی‌ها در انسان از جمله عامل لنفوم بورکیت و لنفوم هوچکین شناخته شده است. همچنین این ویروس می تواند با سرطان‌های معده و نازوفارنکس نیز ارتباط داشته باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی EBV در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به کارسینوم سنگفرشی مری (ESCC) =Esophageal squamous cell carcinoma در استان های مازندران و گلستان در سال ۱۳۸۷انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی-مقطعی بر روی نمونه‌های بیوپسی ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی مری انجام شد که بیماری آنها از لحاظ بالینی و پاتولوژی تایید شده بود. DNA از بلوک‌های پارافینی با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA جدا شد. سپس ژنوم ویروس EBV با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس EBV و به روش Polymerase Chain Reaction (PCR)تکثیر گردید. در نهایت محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ جدا و الکتروفورز گردید.

یافته ها: ۴۰ نمونه سرطان سلول سنگفرشی مری (ESCC) مورد مطالعه شامل ۲۲ نمونه (۵۵٪) مرد و ۱۸ نمونه (۴۵٪) زن بود. از ۴ نمونه (۱۰٪) ژنوم ویروس EBV جدا شد. موارد مثبت شامل ۳ نمونه (۱۳/۲٪) مرد و ۱ نمونه (۵/۵٪) زن بودند.

نتیجه گیری : بر اساس نتایج مثبت ویروس EBV در تعدادی از نمونه‌ها به نظر می‌رسد ویروس EBV ممکن است یکی از عوامل موثر در سرطان سلول سنگفرشی مری (ESCC) باشد.

کلید واژه ها: PCR ، ویروس اپشتین بار، سرطان سلول سنگفرشی مری ، مازندران، گلستان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

عفونت ناشی از Epstein Barr Virus (EBV) یکی از عوامل مهم مرتبط با سرطان‌ها از جمله لنفوم بورکیت، لنفوم هوچکین و غیر هوچکین، کارسینوم نازوفارنکس و بدخیمی سلول‌های دندریتیک و فولیکولار شناخته شده است(۲،۱). EBV همچنین با سرطان‌های حلق – مری و سرطان معده در ارتباط است (۴،۳). سرطان‌های بافت اپی تلیالی و لنفاوی مانند سرطان‌های نواحی شکم، ریه و رحم نیز با عفونت این ویروس ارتباط دارند (۵،۴). سرطان مری به عنوان نهمین بدخیمی شایع و ششمین عامل سرطان در جهان محسوب شده و جزء کشنده‌ترین انواع سرطان طبقه‌بندی می‌شود. اگر چه شیوع سرطان مری در نقاط مختلف جهان متفاوت است، اما شیوع آن در برخی مناطق بالاترین میزان محسوب می‌شود. این نواحی شامل کمربند آسیایی سرطان مری (شمال‌شرق‌ترکیه و نیز کشورهای قزاقزستان ، ترکمنستان، تاجیکستان ، عراق ، ایران تا شمال چین ، هنگ کنگ و ژاپن) و کشورهای جنوب غرب آفریقا ، فرانسه و قسمت‌هایی از آمریکا است (۷،۶). احتمال بروز سرطان مری در شمال چین, شمال آسیا و شمال ایران بیشتراز سایر مناطق جهان می‌باشد (۶). در سال‌های اخیر در مقالاتی به نقش EBV در بروز کارسینوم سنگفرشی مری (Esophageal squamous cell carcinoma= ESCC) اشاره شده‌است (۷) با این حال، هنوز ارتباط این دو نامشخص و موضوعی بحث برانگیز می‌باشد. استان‌های مازندران و گلستان بر روی کمربند جهانی سرطان مری قرار گرفته‌اند و در واقع یکی از مناطق پرخطر ابتلا به این سرطان محسوب می‌شوند. با توجه به اینکه تاکنون در ایران مطالعه خاصی در این ارتباط انجام نشده است، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ویروس EBV در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به ESCC انجام گردید.

مواد و روش‌ها:

این بررسی به روی نمونه‌های ۴۰ بیمار شامل۲۲ مرد (۵۵٪) و ۱۸ زن (۴۵٪) در محدوده سنی ۴۰ تا ۵۵ سال با میانگین سنی ۴/۴۵±۴۷/۶۵ سال و انجام شد. نمونه‌ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی(ره) ساری که از استان‌های مازندران و گلستان مراجعه کرده بودند جمع آوری شده بود. حجم نمونه باتوجه به مطالعات متعدد قبلی (۹،۸) و معنی دار بودن این جامعه و نیز باتوجه به شیوع تعداد افراد مبتلا تعیین شد. به طور تصادفی ۴۰ نمونه از نمونه‌های موجود در بانک بافت بیمارستان امام گرفته شد. صحت تشخیص ESCC علاوه بر یافته‌های بالینی با معیارهای پاتولوژی توسط پاتولوژیست تأیید شد. از بلوک‌های پارافینی ابتدا برش‌های ۵ تا ۷ میکرونی آماده گردید و تا انجام آزمایشات نهایی در فریزر ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. روش‌هایی که برای انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت به طور خلاصه شامل چهار مرحله زیر می‌باشد:

۱) زدودن و حذف پارافین (دپارافینیزاسیون) از نمونه‌های پاتولوژی سرطان مری، (۲)استخراج DNA سلول‌های سرطانی، (۳) ازدیاد DNA با استفاده از روش PCR، (۴)الکتروفورز بر روی ژل آگارز که توضیح مراحل انجام شده فوق به صورت زیر می‌باشد.

۱- دپارافینیزاسیون (زدودن و حذف پارافین از نمونه‌های پاتولوژی سرطان مری): برای شروع کار ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۰دقیقه در گزیلن (غلظت) قرار گرفت. مجدداً ۱۰دقیقه در گزیلن جدید قرار گرفت. بلافاصله بعد از خروج از گزیلن به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۱۰۰٪ و بعد به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۹۵٪ قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در آب قرار گرفت (۱۰).

۲- استخراج **DNA**: استخراج DNA با استفاده از کیت اختصاصی محصول شرکت KIAGEN ایران به نام Purification kit صورت زیر انجام گرفت. بافت موجود به وسیله TLB (tissue lysis buffer) و پروتئینازK لیز شد تا اسیدنوکلئیک موجود درآن آزاد گردد. سپس درحضور سایر محلول‌های نمکی اختصاصی، نوکلئیک اسید با ماتریکس سیلیکایی به طور اختصاصی باند می‌شد. اسید نوکلئیک با ماتریکس باند شده باقی می‌ماند و بااستفاده از مرحله شستشو و سانتریفوژ سایر بقایای سلولی از DNA موردنظر جدا شده و از ماتریکس سیلیکایی خارج می‌شد. در مرحله آخر بااستفاده از DNA , Elution Buffer از ماتریکس سیلیکایی جدا شده و تا زمان انجام تست PCR در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

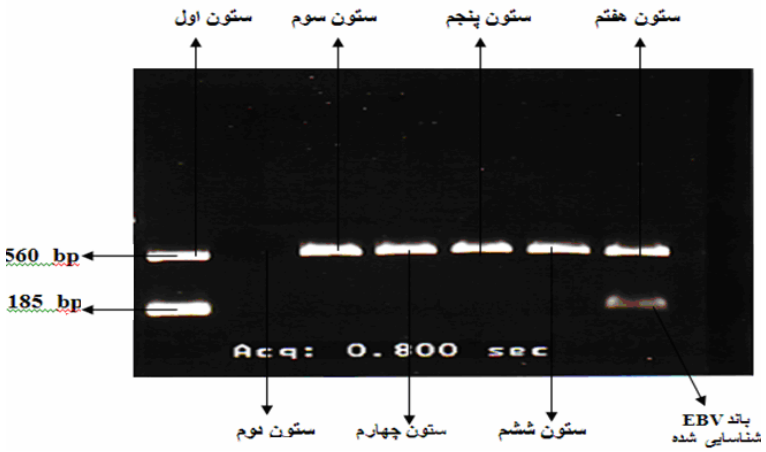
۳- مرحله انجام تست **PCR:** تست PCR با دستگاه شرکت DNA تکنولوژی روسیه مدل MTC 410 انجام‌شد (۱۱).پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص این ویروس به قرار زیر بود :

Forward primer:
5' – CACCTTAGACTCTGGAGGA – 3'
Reverse primer:
5' – TAAAGATACAGCAGCGCAG – 3'

۴- الکتروفورز بر روی ژل **(RUN)**: محصول PCR، روی ژل اگارز ۱ ٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. اگر ژن ویروس همراه DNA استخراج شده بود با load آن بر روی ژل الکتروفورز باند حاوی ژن ویروس ازدیاد شده، مشاهده می‌شد (۱۲). جهت الکتروفورز مقدار ۵ لاندا از DNA حاصل از PCR و ۵ لاندا از loading buffer با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت زمان ۴۰ دقیقه تحت الکتروفورز قرار می‌گرفت. سپس ژل را خارج کرده به دستگاه تصویر برداری (Gel Doc) منتقل می‌شد. پس از مشاهده باندهای تکثیر یافته، عکس ژل با استفاده از ترمال پرینتر ، چاپ می‌گردید .

یافته‌ها:

نتایج PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ ٪ در شکل ۱ نشان داده شده است. ۴ (۱۰٪) نمونه حاوی Band ناشی از EBV بودند که بیانگر شیوع آلودگی ۱۰٪ نمونه‌ها با این ویروس بود (جدول ۱). نمونه‌های EBV مثبت، شامل نمونه‌های ۳ (۷۵٪) مرد و ۱ (۲۵٪) زن بود، که نشانگر اختلاف قابل توجه بین فراوانی ابتلا به EBV در بین مردان و زنان بود. چون تعداد زنان EBV مثبت بسیار اندک بود عملا این اختلاف مورد بررسی واقع نشد. به‌عبارت دیگر بیوپسی ۳ مرد (۱۳/۶٪)و ۱ زن (۵/۵٪) مبتلا به سرطان مری آلوده به ویروس EBV بود.



شکل ۱: الکتروفورزمحصولات PCR بر روی ژل اکریل آمید ۱ ٪ و شناسایی ژنوم EBV درنمونه ستون هفتم . باند ۵۶۰ جفت بازی نشان دهنده کنترل داخلی جهت تایید صحت انجام واکنش PCR و باند ۱۸۵bp بخشی از ژنوم تکثیر یافته EBV است. ستون دوم نشان دهنده کنترل منفی (فاقد DNA) است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: نمونه‌های بافتی مورد بررسی به تفکیک سن و جنس بیماران

EBV	جنس		مجموع	میانگین سن + SD±
	مرد	زن		
موارد +EBV	۳ (٪۷۵)	۱ (٪۲۵)	۴ (٪۱۰)	۴۸،۵۰± ۴،۷۹
موارد -EBV	۱۹ (٪۵۲،۸)	۱۷ (٪۴۷،۲)	۳۶ (۹۰)	۴۷،۵۵ ± ۴،۴۸
جمع	۲۲ (٪۵۵)	۱۸ (٪۴۵)	۴۰ (٪۱۰۰)	۴۷،۶۵ ± ۴،۴۵

بحث:

نتایج آلودگی تعدادی از نمونه‌های بیوپسی سرطان مری را به EBV نشان می‌دهد.

سرطان مری به عنوان نهمین بدخیمی شایع و ششمین عامل سرطان در جهان محسوب می‌شود ونیز به عنوان یکی از کشنده‌ترین انواع سرطان‌ها طبقه‌بندی شده است (۱۳). در کشورهای غربی خطر سرطان مری به‌طور کلی پایین است. بررسی‌ها نشان داده‌است که مصرف فراوان الکل و تنباکو می‌تواند عامل بیش از ۹۰درصد موارد سرطان مری در این نواحی باشد.(۶). در صورتی که در ایران به‌خصوص در ناحیه شمالی (استان‌های مازندران و گلستان)، که روی کمربند سرطان مری هستند، مصرف این مواد پایین است. لذا، توجیه مناسبی جهت شیوع بالای سرطان مری در این نواحی نمی‌توان یافت (۱۴). بنابراین عوامل خطرزای دیگری را باید در رابطه با شیوع بالای سرطان مری سلول سنگفرشی در این نواحی تصور نمود.

عوامل ویروسی همانند EBV می‌تواند یکی از فاکتورهایی باشد که شیوع بالای این نوع سرطان را در این نواحی توجیه می‌نماید. مکانیسم ورود و اثر EBV به درستی شناخته شده نیست (۱۵) اما بررسی‌های مختلف نشان داده است که این ویروس می‌تواند سلول‌های اپی‌تلیال را آلوده کرده و سبب ترانسفورماسیون آنها به سمت بدخیمی شود (۱۸-۱۶). اخیرا نشان داده شده است که EBV با متوقف کردن بیان مولکول پیش آپوپتوزی Bax موجب مهار آپوپتوز در بیماران مبتلا به سرطان معده می‌شود (۱۹). در حالیکه تاثیری در افزایش بیان مولکول‌های ضد آپوپتوزی Bcl-2 و c-Myc ندارد (۲۰). همچنین ویروس EBV با القاء تولید سیتوکاین ضد التهابی IL-10 موجب رشد و تکثیر سلول‌های B در لنفوم بورکیت می‌گردد (۲۱). از طرفی در مطالعات قبلی نقش ویروس EBV در سرطان معده، بیماری هوچکین، لنفوم بورکیت و سرطان‌های نازوفارنژیال ثابت شده است (۲۲). بنابراین بررسی فراوانی و ارتباط بین آلودگی به EBV و سرطان مری با توجه به شیوع بالا در این نواحی لازم به نظر می‌رسد . شایان ذکر است که به رغم اینکه این نواحی روی کمربند آسیایی سرطان مری قرار دارند تا به حال مطالعه‌ای در این مورد در ایران انجام نشده است. اما نتایج مطالعات در سایر کشورها با توجه به شیوع بالای این سرطان موید شیوع بالاتری از EBV می باشد. به طور مثال در سوئد ۲۰ درصد (۱۵)، در فرانسه ۲۱/۴ درصد (۱۶) و در آلمان ۴۰ درصد نمونه‌ها (۲۳) آلودگی به EBV داشتند. این در حالی است که در کشورهای آسیایی مثل چین و ژاپن بین آلودگی به ویروس EBV و ESCC ارتباطی وجود ندارد(۲۴). در مطالعه حاضر میزان شیوع ویروس EBV در نمونه‌های بیوپسی سرطان مری ۱۰ درصد است. اختلاف موجود در نتایج بدست آمده در همراهی عفونت EBV با سرطان مری در نقاط مختلف دنیا، می‌تواند ناشی از تفاوت در مناطق جغرافیایی و عوامل محیطی و حتی عوامل ژنتیکی باشد(۱۴،۲۴-۱۶). پیشگیری و کاهش میزان بیماری‌های مختلف در جامعه و ارتقاء سطح سلامت عمومی، شناخت عوامل ایجاد کننده بیماری‌ها و درک اهمیت هر یک از آن‌ها به عنوان نخستین گام عملی مطرح می‌باشد . در مورد EBV و بیماری‌های متعددی که توسط این ویروس ایجاد می‌شود نیز این اصل کلی حاکم است. لذا، انجام مطالعات اپیدمیولوژی می‌تواند در برنامه ریزی‌ها و سیاست گذاری‌های سلامت جامعه مورد استفاده قرار گیرد، و توجه دوباره و بیش از پیش کادر بهداشتی درمانی را جلب نماید. باید در نظر داشت که گاهی تفسیر نتایج آزمایشگاهی سخت و پیچیده است. این امر باید توسط

www.SID.ir

Archive of SID

متخصصین آشنا با روند پاتوژنز ویروس EBV و آزمایشات مربوطه، که دسترسی به بیمار و بررسی‌های کلینیکی و پاراکلینیکی کامل او را لازم دارد، انجام گیرد (۲۲).

نتیجه‌گیری:

با توجه به آلودگی در ۱۰درصد از نمونه‌های بیوپسی سرطان مری در این مطالعه، می‌توان مطرح کرد که: احتمالا بین آلودگی به این عفونت ویروسی و سرطان مری می‌تواند نوعی ارتباط وجود داشته باشد، و ویروس EBV یکی از عوامل موثر در سرطان مری در این مناطق محسوب شود، و ممکن است این ویروس در پاتوژنز سرطان مری نقش داشته باشد. اما، با توجه به شیوع بالای این سرطان در این مناطق باید همچنان به دنبال دخالت سایر عوامل خطر مداخله‌گر در این سرطان نیز بود. برای اثبات این مدعا باید با انجام یک مطالعه گسترده‌تر، و به‌ویژه مطالعات مورد- شاهدی و یا کوهورت،این فرضیه را به‌صورت کاملا علمی اثبات نمود.

فهرست مراجع:

1. Sandlund JT, Gorban ZI, Berard CW, Sixbey J, Razzouk B, Talalayev A, *et al*. Large proportion of Epstein-Barr virus-associated small noncleaved cell lymphomas among children with non-Hodgkin's lymphoma at a single institution in Moscow, Russia. *Am J Clin Oncol* 1999; **22**(5):523-5.
2. Vasef MA, Ubaidat MA, Khalidi HS, Almasri NM, Al-Abbadi M, Annab HZ. Association between Epstein-Barr virus and classic Hodgkin lymphoma in Jordan: a comparative study with Epstein-Barr virus-associated Hodgkin lymphoma in North America. *South Med J* 2004; **97**(3):273-7.
3. Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, Myrmel H, Vedeler C, Grønning M, *etal.* Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; **64**(4):539-42.
4. Lindhout E, Lakeman A, Mevissen ML, de Groot C. Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med*. 1994; **179**(4):1173-84.
5. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymański M, Ziaja M, Gołabek W. Epstein-Barr virus antibodies in blood serum of patients with laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol*. 2002 ;**56**(1):45-8.
6. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalz J. *Harrison's Principles of Internal Medicin*; 17th Edition, New York: McGraw Hill Medical Publication Division, 2008;PP:479-713.
7. Chang CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res.* 2009;**143**(2):209-21.
8. Jenkins TD, Nakagawa H, Rustgi Ak. The association of Epstein Barr virus DNA with esophageal squamonus cell carcinoma. *Oncogene*. 1996 ,; **13** (8): 1809-1813.
9. Abdirad A, Ghaderi-Sohi S, Shuyama K, Koriyama C, Nadimi-Barforoosh H, Emami S, *et al.* Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: a report from Iran in the last four decades. *Diagn Pathol.* Published online 2007 Jul 15. doi: 10.1186/1746-1596-2-25.
10. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-combeded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev* 2003; **27**:397-404.
11. Ben-Ezra J, Johanson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-combeded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem* 1991; **39**:351-354.
12. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**(21):10325-9.
13. Faried A, Kimura H, Faried LS, Usman N, Miyazaki T, Kato H, *etal*. Expression of carbohydrate antigens in human esophageal squamous cell carcinoma: prognostic application and its diagnostic implications. *Ann Surg Oncol*. 2007; **14**(2):960-7.

۱۴. مدرس شهاب ، مدرس شهرزاد ، عفونت ویروس اپشتین بار (EBV) در کودکان و بالغین شهر تهران. *مجله علمی*

www.SID.ir

Archive of SID

نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، ۱۳۷۷ شماره ۳ ، صص ۱۷۹ تا ۱۸۳.

15. Wang J, Noffsinger A, Stemmermann G, Fenoglio – Oreiser C. Esophageal Squamous cell carcinomas arising in patients from a high – risk area of North china lack an association with Epstein – Barr virus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;**8**(12):1111-4 .
16. Hummei M, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Korbjiuhn PH. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: expression and cellular location of EBV gene products. *J Haematol* 1992; **82**:689-694.
17. Hummei M, Anagnostopulos I, korbjkuhn P. Epstein- Barr virus in B- cell non- Hodgkin's lymphomas : unexpected infection patterns and different infection incidence in low- and high-grade types. *J Pathol* 1995; **175**: 263-271.
18. Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci*. 2008; **99**(9):1726-33.
19. Ueda S, Maeda Y, Yamaguchi T, Hanamoto H, Hijikata Y, Tanaka M, *etal*. Influence of Epstein-Barr virus infection in adult T-cell leukemia. *Hematology*. 2008; **13**(3):154-162.
20. Lima MA, Ferreira MV, Barros MA, Pardini MI, Ferrasi AC, Mota RM, *l.* Relationship between EBV infection and expression of cellular proteins c-Myc, Bcl-2, and Bax in gastric carcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 2008; **17**(2):82-9.
21. Samanta M, Iwakiri D, Takada K Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene*. 2008; **27**(30):4150-60.
22. Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol*. 1992; **66**(5):2689-97.
23. Mizobuchi S, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Terada M. Absence of human papillomavirus 16 and – 18 DNA and Epstein – Barr Virus DNA in esophageal squamous cell carcinoma *Jpn J Clin Oncol*, 1997; **27** (1): 1-5
24. Ohfuji S, Osaki M, Tsujitani S, Ikeguchi M, Sairenji T, Ito H. Low frequency of apoptosis in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Int J Cancer*. 1996; **68**(6):710-5.

www.SID.ir