

## 宫颈病变卡波济肉瘤相关疱疹病毒感染状况分析\*

姚水洪<sup>①</sup> 陈敏<sup>①</sup> 查国芬<sup>②</sup> 邱惠萍<sup>①</sup> 陆小青<sup>③</sup>

**摘要 目的:**了解宫颈病变卡波济肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)感染状况,探讨KSHV感染与宫颈病变的关系。**方法:**选择组织学确诊为宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌(SCC)的病例440例作为研究组,同区域、同期就诊或体检并排除有宫颈病变的女性380例为对照组,分别采集血液和宫颈脱落细胞标本,提取DNA,巢式PCR检测KSHV ORF26,核酸电泳观察结果。**结果:**研究组血液样品KSHV检出率12.9%(53/412),对照组检出率6.5%(23/354),两组差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),但宫颈脱落细胞样品中未能检出KSHV;对研究组作分层分析,KSHV检出率随年龄增加、宫颈病变程度加重而升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**宫颈病变女性KSHV检出率高于正常女性,感染率随宫颈病变程度加重而升高,应加强监测。

**关键词** 卡波济肉瘤相关疱疹病毒 宫颈病变 宫颈癌 宫颈上皮内瘤变 巢式PCR 感染率

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.17.006

## Analysis of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Infection Status in Females with Cervical Lesions

Shuihong YAO<sup>1</sup>, Min CHEN<sup>1</sup>, Guofen ZHA<sup>2</sup>, Huiping QIU<sup>1</sup>, Xiaoqing LU<sup>3</sup>

Correspondence to: Shuihong YAO; E-mail: qzxyysh@126.com

<sup>1</sup>Medical School, Quzhou College of Technology, Quzhou 324000, China

<sup>2</sup>Department of Function Examination, People's Hospital of Kecheng District, Quzhou 324000, China

<sup>3</sup>Department of Pathology, Quzhou Maternity and Child Health Hospital, Quzhou 324000, China

This work was supported by grants from the Project for Cultivation of High-Skill Talents and Technological Innovation Activities in Zhejiang Province (No. 2011R30050); the Scientific Research Fund of the Zhejiang Provincial Education Department (No. Y200803858); and the Scientific Research Fund of Quzhou City (No. 20091104)

**Abstract Objective:** To aimed to analyze the infection status of female patients with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) and its relationship with the occurrence of cervical lesions. **Methods:** For the study group, 440 histological cases with confirmed cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical squamous cell cancer (SCC) were randomly selected. Simultaneously, 380 cases without cervical lesions in the same region were physically examined as the control group. Blood and cervical cell samples were collected for DNA extraction, and the KSHV ORF26 was detected using nested PCR and gel electrophoresis. **Results:** The KSHV detection rate of blood samples in the study group was 12.9% (53/412), whereas that in the control group was 6.5% (23/354). The difference between the two groups was statistically significant ( $P < 0.01$ ), but KSHV could not be detected in the cervical cell samples. Stratified analysis was applied for the study group, and the detection rate of KSHV was found to significantly increase with the aggravation of cervical lesions and with increasing age ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The KSHV detection rate in females with cervical lesions is higher than in normal females. Thus, KSHV can potentially strengthen the monitoring of cervical lesions.

**Keywords** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV); Cervical lesions; Cervical cancer; Cervical intraepithelial neoplasia; Nested PCR; Infection rate

流行病学研究已证实人乳头状瘤病毒(HPV)感染是宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌的主要病因。近年发现通过性接触传播的某些疱疹病毒,如单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-2)、人巨细胞病毒(HCMV)等都与宫颈癌发病有一定关系<sup>[1-2]</sup>。卡波济肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)又称人类疱疹

病毒8型(human herpesvirus-8, HHV-8),是1994年在艾滋病患者的卡波济肉瘤组织中首次被鉴定出的疱疹病毒,与卡波济肉瘤、原发性渗出性淋巴瘤、多发性骨髓瘤等肿瘤的形成密切相关,主要通过性接触、唾液、血液及器官移植等途径传播<sup>[3]</sup>。体外实验证实,KSHV能感染人宫颈癌标准细胞株HeLa细胞等<sup>[4]</sup>。为了解本地区宫颈病变患者KSHV感染状况,

作者单位:①衢州职业技术学院医学院(浙江省衢州市324000);②衢州市柯城区人民医院功能科;③衢州市妇幼保健院病理科

\*本文课题受浙江省科技厅高技能人才培养和技术创新活动项目(编号:2011R30050)、浙江省教育厅科研项目(编号:Y200803858)和衢州市科技计划项目(编号:20091104)资助

通信作者:姚水洪 qzxyysh@126.com

探讨KSHV感染与宫颈癌及癌前病变的相互关系,本文对宫颈病变女性进行了KSHV感染的检测和分析。现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

选择2008年9月至2011年8月在本地区一所综合性医院、一所妇幼保健院就诊,经TCT细胞学和阴道镜下活检组织学确诊为宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌(SCC)的病例440例作为研究组。年龄20~66(38.4±12.7)岁;随机选择同区域、同期参加健康体检,排除有宫颈病变的女性380例为对照组,年龄21~60(38.9±12.9)岁。两组年龄分布差异无统计学意义( $t=1.07, P>0.05$ )。

### 1.2 方法

1.2.1 标本采集 1)血液标本:采集研究对象EDTA抗凝全血3 mL,3 000 rpm离心10 min后,血细胞采用本实验室配置的红细胞裂解液处理后,按照血细胞基因组抽提试剂盒(杭州博日科技公司产品)说明书,提取外周血单个核细胞(PBMC)总DNA。2)宫颈脱落细胞采集:按照文献[5]方法,使用宫颈取样刷收集调查对象宫颈及宫颈管的脱落细胞,浸泡于盛有PBS的试管中,PBS洗涤后,提取细胞DNA。以上DNA标本-20℃冷冻保存待检。

1.2.2 引物合成 参照文献[6]和GenBank中KSHV DNA序列,设计合成扩增KSHV保守序列ORF26基因片段233 bp大小的特异性外引物ORF26-1/2,目的片段138 bp大小的内引物ORF26-3/4。序列及对应位点如下:ORF26-1:5'-AGCCGAAAGGATTCCACCAT-3'(47287~47306);ORF26-2:5'-TCCGTGTTGTCTACGTCCAG-3'(47519~47500);ORF26-3:5'-TATTCTGCAGCAGCTGTTGG-3'(47373~47392);ORF26-4:5'-TCTACGTCCAGACGATATGTGC-3'(47510~47489),以上引物由上海博彩公司合成。同时合成扩增1对内参基因 $\beta$ -globin的引物,产物大小268 bp。

1.2.3 巢式PCR检测KSHV DNA 分别以PBMC总DNA和宫颈脱落细胞DNA为PCR模板,首先取0.5  $\mu$ L样品作为模板,扩增 $\beta$ -globin,电泳鉴定有条带者继

续巢式PCR扩增KSHV的特异性保守基因ORF26。每次扩增均以KSHV阳性、EBV阴性的标准细胞株BCBL-1细胞DNA为阳性对照,宫颈脱落细胞同时扩增DNA中HPV L1基因作为平行对照,以灭菌双蒸水为空白对照。PCR扩增产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳,GDS-8000凝胶成像仪观察拍照。

1.2.4 KSHVORF26基因测序 PCR产物由大连宝生物公司进行纯化和测序。测序结果与GenBank中KSHV DNA序列进行同源性对比。

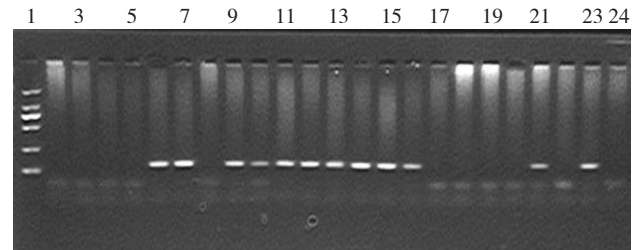
### 1.3 统计学方法

采用SPSS 15.0软件进行数据分析,率的比较采用 $\chi^2$ 检验, $P>0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCR产物电泳结果

820例血液和宫颈样品扩增 $\beta$ -globin,766例(其中研究组412例、对照组354例)均在大约268 bp位置上有较亮的条带。条带较弱或无条带者,可能DNA含量少或含PCR抑制物而弃去。取有效的样品DNA为模板,扩增KSHV ORF26目的基因片段,第二轮PCR产物电泳后,在约138 bp位置处有条带者为阳性(图1),提示KSHV感染。



1: DNA标志; 23:阳性对照; 24:空白对照

图1 样品KSHV ORF26琼脂糖电泳结果(138 bp)

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of HHV-8 ORF26 PCR products with the DNA Marker (lane 1) as well as the positive (lane 23) and negative (lane 24) controls

### 2.2 PCR产物测序结果

取其中5例PCR产物进行测序(图2)。Blast比对结果提示,5例样品序列和GenBank中已经登记的KSHV (Accession: NC009333)基因序列100%同源(图3)。

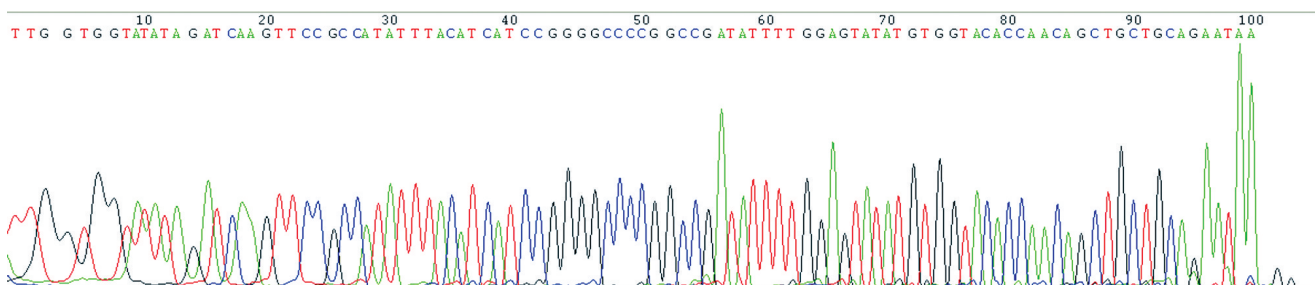


图2 KSHV ORF26阳性样品测序图

Figure 2 DNA sequences of HHV-8 ORF26-positive samples

```

Query 1 TATTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATATACTCCAAAATATCGGCCGGGGCCCCGGA 60
      |||
Sbjct 181 TATTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATATACTCCAAAATATCGGCCGGGGCCCCGGA 240

Query 61 TGATGTAAATATGGCGGAACTTGATCTATATAACCACCAATGTGTCATTTATGGGGCGCAC 120
      |||
Sbjct 241 TGATGTAAATATGGCGGAACTTGATCTATATAACCACCAATGTGTCATTTATGGGGCGCAC 300

Query 121 ATATCGTCTGGACGTAGA 138
      |||
Sbjct 301 ATATCGTCTGGACGTAGA 318
    
```

图3 KSHV ORF26序列与GenBank比对结果

Figure 3 Comparison of HHV-8 ORF26 sequences with other GenBank sequences

### 2.3 KSHV 感染率

412例研究组和354例对照组扩增KSHV ORF26基因,其中血液样品阳性率分别为12.9%和6.5%,两组差异有统计学意义( $P=0.003$ ,  $OR=2.12$ ,  $95\% CI=1.26 \sim 3.54$ ,表1);两组的宫颈细胞样品中,均未扩出KSHV ORF26基因。研究组和对照组作同步检测的HPV L1基因检出率分别为61.2%(252/412)和22.0%(78/354)。

表1 两组血液标本PCR扩增KSHV基因阳性率

Table 1 Positive rate of HHV-8 detection in blood samples of the two groups

组别	例数	KSHV 阳性例数	阳性率(%)	$\chi^2$	$P$
研究组	412	53	12.9	8.64	0.003
对照组	354	23	6.5		

### 2.4 KSHV 感染相关因素

血液样品研究组按年龄、病变程度和HPV感染情况分层分析,≥41岁年龄段与≤30岁年龄段比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );按病变程度分层分析,CIN-2、CIN-3、SCC与无病变组(对照组)比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ );HPV阳性组KSHV检出率高于HPV阴性组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ,表2)。

### 3 讨论

宫颈病变是妇科最常见疾病,其中宫颈上皮内瘤变(CIN)是一组与浸润性宫颈癌密切相关的癌前病变。通常从发现病变到发展成浸润癌约10年时间,且宫颈癌发病逐渐呈年轻化趋势<sup>[7]</sup>。因此,高度重视癌前病变及早期宫颈癌的筛查,是预防和控制宫颈癌的重要手段。研究表明,病毒感染在CIN发生以及进展为宫颈癌的过程中扮演了重要角色。已经证实,人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈病变发生的重要条件,是宫颈癌发生的首要 and 始动因素<sup>[8]</sup>。近年多个研究发现,通过性接触传播的人类疱疹病毒,如HSV-2、HCMV、EBV等,与宫颈癌发病有一定关系,

如Yang等<sup>[1]</sup>用PCR方法从27例宫颈癌病理组织标本中检测到疱疹病毒包括EBV、CMV、HSV-1、HSV-2基因片段。

表2 按年龄、病变情况和HPV感染情况分层分析

Table 2 Analysis of HHV-8 infection stratified with age, lesions and HPV infection

因素	例数	KSHV 阳性例数	阳性率(%)	$\chi^2$	$P$
年龄(岁)					
≤30*	89	5	5.6		
31~40	96	10	10.4	1.43	0.230
41~50	129	21	16.3	5.70	0.017
≥51	98	17	17.3	6.18	0.012
病变程度					
对照*	354	23	6.5		
CIN-1	125	9	7.2	0.07	0.780
CIN-2	141	19	13.5	6.32	0.010
CIN-3	101	16	15.8	8.76	0.003
SCC	45	9	20.0	9.87	0.002
HPV 感染					
阴性*	160	16	10.0		
阳性	252	37	14.7	1.91	0.160

\*为组内对照

KSHV是 $\gamma_2$ 型致瘤疱疹病毒,亲嗜B淋巴细胞,对内皮细胞、上皮细胞等也具有易感性<sup>[4]</sup>。与其他疱疹病毒相似,感染后可以建立潜伏感染和裂解性复制两种不同的生命周期,并伴随宿主终生。初次感染后,病毒基因组以共价环状形式(附加体)持续存在于细胞核中,不仅有利于病毒逃避宿主的免疫清除,而且在诱发癌变中具有极为重要的作用<sup>[9]</sup>。当机体受到各种不利应激源刺激,潜伏的KSHV被激活而进入裂解期复制,产生大量病毒粒子进一步感染内皮细胞、B淋巴细胞。目前用于KSHV感染检测的方法主要有ELISA、免疫荧光等血清免疫学和基因水平的PCR检测等方法。由于KSHV感染的特殊性,KSHV在不同的人群或者疾病的不同时期其抗原的表达可

能存在较大差异,同时因检测指标不同,各研究者报道的结果有着很大的差异,目前仍缺乏国际统一的评价KSHV感染的金标准。为提高检测的可靠性,本文选择敏感性高、特异性强的核酸检测技术,并以外周血单个核细胞(PBMC)基因组作为PCR的模板,通过巢式PCR检测编码KSHV次要衣壳蛋白的ORF26保守序列,核酸电泳结果表明,阳性标本条带清晰,与KSHV阳性标准细胞系BCBL-1细胞阳性对照一致,经公司测序,与GenBank中KSHV基因序列100%同源。

KSHV DNA常在患者唾液和精液中被检测到<sup>[3]</sup>,因而接吻、未保护的异性性行为增加了传播KSHV的机会。有学者用巢式PCR方法,在异常的宫颈脱落细胞中检测到KSHV<sup>[10]</sup>。本研究宫颈病变组女性血液中KSHV ORF26的检出率(12.9%)要高于对照组女性(6.5%),差异有统计学意义( $P<0.01$ ),提示KSHV感染是宫颈病变的危险因素。研究组按年龄、病变程度和HPV感染情况分层分析提示,KSHV感染率随年龄增长而升高,随病变程度加重也呈升高趋势。然而,本文宫颈病变组和对照组共766例有效的宫颈脱落细胞样品,在确保整个PCR方法可靠、排除假阴性及PCR抑制物干扰等因素后,未能检出KSHV DNA片段。Enbom等<sup>[11]</sup>分别采用巢式PCR和Real-time PCR调查当地妇女的KSHV感染率,检测宫颈脱落细胞KSHV的ORF26基因片段均为阴性。Lampinen等<sup>[12]</sup>用巢式PCR方法扩增了来自津巴布韦妇女不同来源细胞标本的KSHV ORF26基因片段,在卡波济肉瘤患者的宫颈细胞阳性率32%(19/57),但在非卡波济肉瘤组的宫颈细胞标本中也未能检测到KSHV。本研究结果及相关文献<sup>[11-12]</sup>提示,尽管体外实验表明KSHV能感染人宫颈癌标准细胞株HeLa细胞,但在女性体内的宫颈阴道上皮细胞中未检出KSHV,是否女性生殖道黏膜免疫功能能够抵御KSHV侵入<sup>[13]</sup>,值得关注 and 追踪观察。对于KSHV与女性宫颈病变的关系还有待今后深入探索。

#### 参考文献

- 1 Yang YY, Koh LW, Tsai JH, et al. Correlation of viral factors with cervical cancer in Taiwan[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2004, 37(5): 282-287.
- 2 Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, et al. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis[J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(2): 337-342.
- 3 Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, et al. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(19): 1369-1377.
- 4 Chandran B. Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells[J]. *J Virol*, 2010, 84(5): 2188-2199.

- 5 邱惠萍,姚水洪,徐卫东.女性人乳头状瘤病毒感染与宫颈病变关系研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(1): 65-68.
- 6 Zhu X, Zhou F, Qin D, et al. Human immunodeficiency virus type 1 induces lytic cycle replication of Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus: role of Ras/c-Raf/MEK1/2, PI3K/AKT, and NF-kappaB signaling pathways[J]. *J Mol Biol*, 2011, 410(5): 1035-1051.
- 7 郭科军,葛莉莉,薛 晖.年轻妇女宫颈癌的发病趋势及临床病理特点[J]. *中国肿瘤临床*, 2007(5): 269-270.
- 8 许 雪,张 杰,武景波,等.宫颈上皮内瘤变与人类乳头瘤病毒不同亚型感染的关系[J]. *肿瘤*, 2011, 31(4): 364-368.
- 9 Zhang X, Dawson CW, He Z, et al. Immune evasion strategies of the human gamma-herpesviruses: implications for viral tumorigenesis[J]. *J Med Virol*, 2012, 84(2): 272-281.
- 10 Chan PK, Li WH, Chan MY, et al. Detection of human herpesvirus 8 in cervical cells of Chinese women with abnormal papanicolaou smears[J]. *Clin Infect Dis*, 1999, 29(6): 1584-1585.
- 11 Enbom M, Strand A, Falk KI, et al. Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction[J]. *Sex Transm Dis*, 2001, 28(5): 300-306.
- 12 Lampinen TM, Kulasingam S, Min J, et al. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in oral and genital secretions of Zimbabwean women[J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(5): 1785-1790.
- 13 陈瑞萍,徐建平,黎 清.人乳头瘤病毒感染与宫颈癌局部免疫功能[J]. *实用医学杂志*, 2011(12): 2282-2284.

(2012-05-24收稿)

(2012-08-20修回)

(本文编辑:郑莉)