

人疱疹病毒6型感染与神经胶质瘤关系的初步研究

张春¹, 苌静², 顾斌¹, 郭丹丹², 张国锋¹, 周锋², 魏栋¹, 姚堃^{2*}, 胡卫星^{1*}⁽¹南京医科大学第一附属医院神经外科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学微生物与免疫学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究人疱疹病毒6型(human herpesvirus-6, HHV-6)感染与神经胶质瘤的关系。方法: 巢式PCR法检测40例神经胶质瘤样本和13例正常脑组织样本中HHV-6、人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)、HHV-7 DNA序列。免疫组化染色法检测神经胶质瘤样本和正常脑组织样本中HHV-6、HCMV、HHV-7抗原的表达。结果: 巢式PCR法检测结果显示, 神经胶质瘤组织HHV-6 DNA阳性率为42.5%, 正常脑组织HHV-6 DNA阳性率为7.7% ($P = 0.020$), 神经胶质瘤组织HCMV、HHV-7 DNA阳性率分别为20.0%和5.0%, 正常脑组织未检测到HCMV和HHV-7 DNA (P 值分别为0.087和0.566)。进一步用免疫组化染色法检测HHV-6早期抗原p41的表达, 神经胶质瘤组织阳性率为27.5%, 正常脑组织未见阳性表达 ($P = 0.030$)。同时检测HHV-6晚期抗原gp116/64/54的表达, 神经胶质瘤组织阳性率为32.5%, 正常脑组织未见阳性表达 ($P = 0.014$)。用HCMV pp65抗体进行免疫组化染色后发现其在神经胶质瘤中阳性率为12.5%, 正常脑组织未见阳性表达 ($P = 0.229$)。HHV-7 pp85抗原在神经胶质瘤样本和正常脑组织样本中均未检出阳性表达。结论: 根据PCR和免疫组化的检测结果, HHV-6感染在神经胶质瘤和正常脑组织中具有显著性差异, HHV-6感染在神经胶质瘤的病因和发展过程中起了一定作用。

[关键词] 人疱疹病毒6型; 神经胶质瘤; 巢式PCR; 免疫组化**[中图分类号]** R739.41**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2012)08-1052-05

Preliminary study on the relationship between human herpesvirus-6 infection and glioma

ZHANG Chun¹, CHI Jing², GU Bin¹, GUO Dan-dan², ZHANG Guo-feng¹, ZHOU Feng², WEI Dong¹, YAO Kun^{2*}, HU Wei-xing^{1*}⁽¹Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between human herpesvirus(HHV)-6 infection and glioma. **Methods:** HHV-6, human cytomegalovirus (HCMV) and HHV-7 DNA in glioma samples ($n = 40$) and control samples ($n = 13$) were detected by nested PCR. The expression of HHV-6, HCMV and HHV-7 was detected by immunohistochemistry (IHC). **Results:** HHV-6 DNA was positive in 17/40(42.5%) of glioma samples and 1/13(7.7%) of normal brain samples ($P = 0.020$), while the positive rates of HCMV and HHV-7 DNA were 20.0% and 5.0% in glioma, respectively. HCMV and HHV-7 DNA hadn't been found in normal brain samples ($P = 0.087$ and 0.566 respectively). HHV-6 late antigen p41 was expressed in 11/40 (27.5%) of tumors and 0 of the controls ($P = 0.030$), while HHV-6 early antigen gp116/64/54 was expressed in 13/40 (32.5%) of tumors and 0 of the controls ($P = 0.014$). HCMV pp65 antigen was expressed in 5/40 (12.5%) of glioma samples and 0/13 of the normal brain controls ($P = 0.229$). HHV-7 pp85 antigen hadn't been found in tumors and normal brain samples. **Conclusion:** Based on the results of nested PCR and immunohistochemistry, significant difference of HHV-6 infection between glioma and normal brain tissue was confirmed. HHV-6 infection may play a role on the pathogenesis and progression of glioma.

[Key words] human herpesvirus-6; glioma; nested PCR; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2011, 32(8): 1052-1056]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30972784); 江苏省医学重点人才工程(135工程)资助(RC2002075)

*通讯作者, E-mail: yaokun@njmu.edu.cn; hwx66@126.com

神经胶质瘤(glioma)是人类最常见的原发性恶性肿瘤, 其病因和发病机制目前尚不完全清楚。近年来有关病毒在神经胶质瘤发生发展中的作用引起了肿瘤学家、病毒学家和免疫学家的广泛关

注。国外已有文献报道在神经胶质瘤患者肿瘤组织中能检测到人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 的存在^[1]。Cobbs 等^[2]对 27 份神经胶质瘤标本石蜡切片进行了免疫组化检测,发现 HCMV 均为阳性,而正常脑组织均为阴性。Poltermann 等^[3]也提出神经胶质瘤与病毒相关,但不一定只是 HCMV,有可能还有其他病毒成员。神经胶质瘤与病毒感染之间的相关性得到广泛重视。

人疱疹病毒 6 型 (human herpesvirus-6, HHV-6) 于 1986 年由美国癌症中心的 Salahuddin 等^[4]首先从淋巴增生及艾滋病患者外周血单个核细胞中分离出,与 HCMV、HHV-7 (human herpesvirus-7, HHV-7) 同属于疱疹病毒 β 亚科。HHV-6 已被证实是婴幼儿急疹的病原,随着对 HHV-6 研究的深入发现其与一些中枢神经系统疾病有关^[5],如多发性硬化^[6]、癫痫^[7]、脑炎^[8]、胶质瘤^[9-10]等。本研究采用巢式 PCR 和免疫组化染色法,检测 40 例神经胶质瘤样本和 13 例正常脑组织对照样本中 HHV-6、HCMV、HHV-7 DNA 序列,并用免疫组化方法检测上述样本中 HHV-6、HCMV、HHV-7 抗原表达,以比较 HHV-6 感染与神经胶质瘤的相关性^[11]。

1 材料和方法

1.1 材料

神经胶质瘤样本和正常脑组织对照样本由南京医科大学第一附属医院神经外科提供,神经胶质瘤样本以术后病理报告作为确诊依据,正常脑组织为排除脑病的尸体解剖大脑组织,经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准认定,均取得患者家属的知情同意。

组织 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K (南京晟为诺生物科技有限公司),PCR 反应体系 (南京天为生物科技有限公司),DNA Marker (北京百泰克生物技术有限公司),琼脂糖 (上海基因科技有限公司),HHV-6 p41 抗体、gp116/64/54 抗体 (Advanced Biotechnologies 公司,美国),HCMV pp65、HHV-7 pp85 抗体 (Santa Cruz 公司,美国),即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒 (SA1021,武汉博士德生物工程有限公司),苏木素-伊红 (HE) 染液 (南京建成科技有限公司)。

根据 HHV-6 大衣壳蛋白基因 (LTP gene) 的 DNA 序列设计巢式 PCR 扩增 HHV-6 DNA 引物^[12],根据文献 UL99 基因设计 HCMV DNA 引物^[13],根据文献设计 HHV-7 DNA 引物^[14-15] (表 1)。引物均由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 组织 DNA 的提取

表 1 HHV-6、HCMV、HHV-7 引物序列

Table 1 Sequences of HHV-6, HCMV, HHV-7 primers

基因	引物序列 (5'→3')	产物大小
HHV-6	上游 P1: AGTCATCACGATCGGCGTGTATC	163 bp
	P2: TATCTAGCGCAATCGCTATGTCC	
	下游 P3: TCGACTCTCACCTACTGAACGAG	
	P4: TGA TAGAGAGCGACAAATTGGAGHCMV	
HCMV	上游 P1: GAGGATGACGATAACGAGGA	389 bp
	P2: TCAAACAGCACATTAGACACACGG	
	下游 P3: GACAGTAGTAGCGGCAGCCA	
	P4: GACTCGGAATCGTACGCGAHHV-7	
HHV-7	上游 P1: AGTTCAGCACTGCAATCG	264 bp
	P2: CACAAAAGCGTCGCTATCAA	
	下游 P3: CGCATAACCAACCCTACTG	
	P4: GACTCATTATGGGGATCGAC	

取 20~30 mg 组织于 1.5 ml Eppendorf 管,剪碎组织加入 200 μ l Buffer TL, 25 μ l 蛋白酶 K,漩涡震荡,55 $^{\circ}$ C 水浴 3 h, 13 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清放入另一 1.5 ml Eppendorf 管,加入 220 μ l Buffer BL,漩涡震荡,70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,加入 220 μ l 完全乙醇,漩涡震荡后将液体吸入 DNA mini 管,10 000 r/min 离心 1 min, 弃收集管内液体,加入 500 μ l

Buffer KB, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃收集管内液体,加入 500 μ l DNA Wash Buffer, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃收集管内液体重复 2 次, 13 000 r/min 离心 2 min。将 DNA mini 放入一个新的 1.5 ml Eppendorf 管,加入 100 μ l 预热的 Elution Buffer, 13 000 r/min 离心 1 min 重复 2 次,得到 DNA。

1.2.2 巢式 PCR 法检测 HHV-6、HCMV、HHV-7 DNA

巢式 PCR 反应体系均为 15 μl, 包括 7.5 μl PCR Mix, 5.5 μl ddH₂O, 1 μl 引物, 1 μl 样本 DNA。HHV-6 PCR 的反应参数为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min, 热循环 30 次, 末次延伸 72℃ 8 min。HCMV PCR 的反应参数为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 90 s, 热循环 30 次。末次延伸 72℃ 8 min。HHV-7 PCR 的反应参数为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 热循环 30 次。末次延伸 72℃ 8 min。产物用 1% 琼脂糖电泳分析, 凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

1.2.3 免疫组化染色

按照武汉博士德公司即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒使用说明书进行免疫组化染色, PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛, 4℃, 固定 30 min; 30% H₂O₂ 1 份+ 纯甲醇 50 份混合, 室温浸泡 30 min, 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗 3 次; 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体, 不洗; 滴加一抗(小鼠抗 HHV-6 IgG 单克隆抗体), 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 20℃~37℃ 20 min。PBS 洗 3 min×3 次; 滴加试剂 SABC, 20℃~

37℃, 20 min。PBS 洗 5 min×4 次; 使用 DAB 显色试剂盒(AR1022)。取 1 ml 蒸馏水, 加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片上。室温显色, 镜下控制反应时间, 一般在 5~30 min, 蒸馏水洗涤; 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜观察。

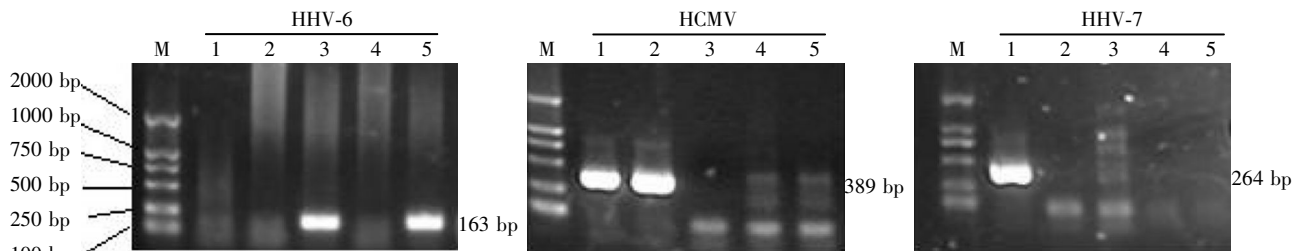
1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行 χ² 检验, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巢式 PCR 检测病毒 DNA

对神经胶质瘤组织和正常脑组织 DNA 进行巢式 PCR 检测(图 1): 神经胶质瘤组织 HHV-6 DNA 阳性率为 42.5%, HCMV DNA 阳性率为 20.0%, HHV-7 DNA 阳性率为 5.0%; 13 例正常脑组织 HHV-6 DNA 阳性率为 7.7%, HCMV 和 HHV-7 DNA 未检测到。神经胶质瘤组织 HHV-6 阳性率与正常脑组织对照组相比有显著差异(*P* = 0.020), 而 HCMV、HHV-7 阳性率与正常脑组织相比差别无统计学意义 (*P* 值分别为 0.087 和 0.566), 三者相比 HHV-6 DNA 在神经胶质瘤中的阳性率明显高于 HCMV 和 HHV-7 (表 2)。



M: DNA marker; 1~5: 神经胶质瘤样本。
图 1 巢式 PCR 电泳图
Figure 1 Electrophoresis of nested PCR

表 2 HHV-6、HCMV、HHV-7 巢式 PCR 检测结果
Table 2 HHV-6, HCMV, HHV-7 nested-PCR results [n(%)]

组别	n	HHV-6	HCMV	HHV-7
神经胶质瘤组	40	17(42.5)*	8(20.0)	2(5.0)
正常对照组	13	1(7.7)	0(0)	0(0)

与正常对照组比较, **P* < 0.05。

2.2 免疫组化染色法检测样本中 HHV-6、HCMV、HHV-7 抗原表达

用巢式 PCR 法检测神经胶质瘤样本中 HHV-6、HCMV、HHV-7 DNA 发现神经胶质瘤中 HHV-6 阳性率最高, 进一步用免疫组化染色法检测神经胶质瘤样本和正常脑组织样本中 HHV-6 早期抗原 p41 表达, 神经胶质瘤阳性率为 27.5%, 而正常脑

组织未见阳性表达(*P* = 0.030), 同时发现 HHV-6 晚期抗原 gp116/64/54 在神经胶质瘤中阳性率为 32.5%, 正常脑组织未见阳性表达 (*P* = 0.014)。HHV-6 早期、晚期抗原在神经胶质瘤与正常脑组织中的阳性率相比均具有统计学意义。同时用 HCMV pp65 抗体进行免疫组化染色发现在神经胶质瘤中的阳性率为 12.5%, 正常脑组织未见阳性表达, 神经胶质瘤与正常脑组织阳性率相比没有显著性差异(*P* = 0.229, 图 2)。HHV-7 pp85 抗原在神经胶质瘤和正常脑组织样本中均未被检测到。

3 讨论

本实验通过对神经胶质瘤和正常脑组织样本进

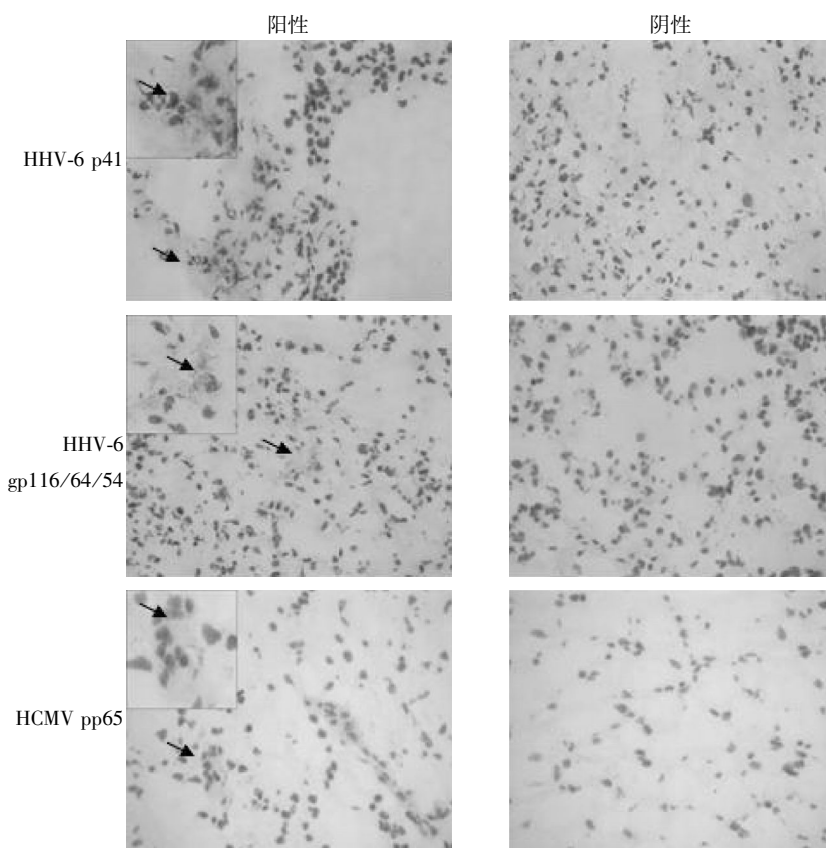


图 2 胶质瘤样本 HHV-6 及 HCMV 免疫组化结果($\times 400$)

Figure 2 HHV-6 and HCMV immunohistochemical results of glioma samples($\times 400$)

行巢式 PCR 检测,结果发现神经胶质瘤 HHV-6 阳性率显著高于正常脑组织,两者差别具有统计学意义 ($P < 0.05$),而神经胶质瘤 HCMV、HHV-7 DNA 阳性率虽然也高于正常脑组织,但差异没有统计学意义 ($P > 0.05$),并且在神经胶质瘤中 HHV-6 DNA 阳性率显著高于 HCMV 和 HHV-7。进一步用免疫组化染色法检测 HHV-6 早期抗原 p41 和晚期抗原 gp116/64/54 的表达情况,发现在神经胶质瘤中 HHV-6 早期和晚期抗原阳性率均高于正常脑组织,差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05)。用 HCMV pp65 抗体进行免疫组化染色发现神经胶质瘤与正常脑组织相比没有显著性差异 ($P = 0.229$),而 HHV-7 pp85 在神经胶质瘤和正常脑组织中均未被检测到。

国外已有文献报道 PCR 法检测 HHV-6 在成人脑肿瘤中的阳性率为 8%~36%^[16-18],本实验神经胶质瘤组织中 HHV-6 DNA 阳性率达 42.5%,与国外文献报道相符。通过比较疱疹病毒 β 亚科 PCR 和免疫组化结果发现 HHV-6 阳性率最高,而且与正常脑组织相比具有显著性差异。本实验分别从核酸和蛋白质水平上提示在疱疹病毒 β 亚科中 HHV-6 感染与神经胶质瘤关系最密切,可能是引起神经胶质瘤的

一个重要的病因或诱因。至今尚未见从神经胶质瘤中直接分离到任何病毒的报道,目前认为只有从肿瘤标本中分离到病毒才是病毒致肿瘤的直接证据之一,本实验室已经从 1 例神经胶质瘤囊液中成功分离到病毒,经初步鉴定为 HHV-6(另文报道),这更有力支持了神经胶质瘤和 HHV-6 感染之间的相关性。

本实验室对 HHV-6 感染所致的细胞免疫反应改变已进行了初步的研究^[19-20],下一步还将对 HHV-6 感染神经胶质细胞引起细胞分化、细胞周期、细胞凋亡和细胞转化等改变及其分子机制进行深入的研究,直至最终建立 HHV-6 感染致细胞转化和肿瘤的直接证据。本研究结果将有助于从病毒学角度进一步阐明神经胶质瘤发病的病因机制及深入探讨 HHV-6 感染引起的免疫抑制在肿瘤形成中的作用,为研究抗神经胶质瘤的综合治疗和发展新型预防、治疗疫苗提供新的思路 and 依据。

[参考文献]

- [1] Scheurer ME, Bondy ML, Aldape KD, et al. Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas[J]. Acta Neuropathol, 2008, 116(1): 79-86
- [2] Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, et al. Human cytome-

- galovirus infection and expression in human malignant glioma[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12): 3347-3350
- [3] Poltermann S, Schlehofer B, Steindorf K, et al. Lack of association of herpesviruses with brain tumors [J]. *J Neurovirol*, 2006, 12(2): 90-99
- [4] Salahuddin SZ, Ablash DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders[J]. *Science*, 1986, 234(4776): 596-601
- [5] Caserta MT. Human herpesvirus 6 infection of the central nervous system [J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2004, 6(4): 316-321
- [6] Yao K, Gagnon S, Akhyani N, et al. Reactivation of human herpesvirus-6 in natalizumab treated multiple sclerosis patients[J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e2028
- [7] Fotheringham J, Donati D, Akhyani N, et al. Association of human herpesvirus-6B with mesial temporal lobe epilepsy[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(5): e180
- [8] Fotheringham J, Akhyani N, Vortmeyer A, et al. Detection of active human herpesvirus-6 infection in the brain: correlation with polymerase chain reaction detection in cerebrospinal fluid[J]. *J Infect Dis*, 2007, 195(3): 450-454
- [9] Crawford R, Santi R, Thorarinsdottir K, et al. Detection of human herpesvirus-6 variants in pediatric brain tumors: Association of viral antigen in low grade gliomas [J]. *J Clin Virol*, 2009, 46(1): 37-42
- [10] Crawford R, Santi R, Cornelison R, et al. Detection of human herpesvirus-6 in adult central nervous system tumors: predominance of early and late viral antigens in glial tumors[J]. *J Neurooncol*, 2009, 95(1): 49-60
- [11] 刘军连, 徐志凯, 姚 堃, 等. 人疱疹病毒 6 型感染与淋巴瘤关系的初步研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(6): 565-566
- [12] 姜兰兰, 姚 堃, 尹全章, 等. 抗人类疱疹病毒 6 型南京分离株 E5 单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, 28(4): 416-419
- [13] Jean TW, Patrick S, John S. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers [J]. *J Virol*, 1994, 68(3): 1597-1604
- [14] Yalcin S, Karpuzoglu T, Suleymanlar G, et al. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey [J]. *Arch Virol*, 1994, 136(1-2): 183-190
- [15] 徐 建, 姚 堃, 窦 洁, 等. 人疱疹病毒 7 型 pp85 重组表达及抗体制备[J]. *微生物与感染*, 2007, 2(2): 88-110
- [16] Chan PK, Ng HK, Cheng AF. Detection of human herpesviruses 6 and 7 genomic sequences in brain tumours [J]. *J Clin Pathol*, 1999, 52(8): 620-623
- [17] Luppi M, Barozzi P, Marasca R, et al. Human herpesvirus-6: a survey of presence and distribution of genomic sequences in normal brain and neuroglial tumors [J]. *J Med Virol*, 1995, 47(1): 105-111
- [18] Cuomo L, Trivedi P, Cardillo MR, et al. Human herpesvirus-6 infection in neoplastic and normal brain tissue [J]. *J Med Virol*, 2001, 63(1): 45-51
- [19] 王 芳, 姚 堃, 冯东举, 等. 人疱疹病毒 6 型特异性 CD4+T 细胞的初步克隆 [J]. *微生物与感染*, 2008, 3(1): 17-20
- [20] 王 芳, 姚 堃, 周 锋, 等. 口腔鳞癌患者淋巴细胞对人疱疹病毒 6 型的增殖应答受损 [J]. *基础医学与临床*, 2008, 28(11): 1134-1137

[收稿日期] 2010-08-29