

• 临床研究 •

百色市献血人群中卡波氏肉瘤相关疱疹病毒 DNA 的套式 PCR 检测*

陈源红^{1,2}, 周正东³, 曾 怡², 唐华英², 韦红玉², 樊晓晖^{1△}

(1. 广西医科大学微生物学教研室, 南宁 530021; 2. 右江民族医学院微生物学与免疫学教研室, 广西百色 533000; 3 广西百色市中心血站 533000)

摘要:目的 了解百色市献血人群中卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)的流行状况。方法 收集百色市部分无偿献血者肘静脉抗凝血 474 份, 其中男 259 份, 女 215 份, 采用套式聚合酶链反应(n-PCR)方法对 474 例样本所提取的 DNA 进行 KSHV 特异性序列扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 出现 168 bp 条带为阳性结果。结果 474 名献血者中 9 例阳性, 阳性率 1.90%; 其中男性献血者中检出阳性者 5 例, 阳性率为 1.93%; 女性献血者中检出 4 例, 阳性率为 1.86%。男女两组间阳性率采用 χ^2 检验, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 百色市献血人群中存在 KSHV 的感染, 不同性别献血者感染率差异无显著性。

关键词: 献血人群; 卡波氏肉瘤相关疱疹病毒; 套式聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.19.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)19-2204-02

Detection of Kaposi's sarcoma associated hepersvirus DNA in baise blood-donor crowd by nested PCR*

Chen Yuanhong^{1,2}, Zhou Zhengdong³, Zeng Yi², Tang Huaying², Wei Hongyu², Fan Xiaohui^{1△}

(1. Department of Microbiology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Microbiology and Immunology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 3. Guangxi Baise Center Blood Stations, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Objective To understand the current epidemic situation of KSHV prevalence among blood donor crowd in Baise city. **Methods** There were 474 donors had been detected, including 259 male and 215 female. The KSHV DNA was detected by nested polymerase chain reaction(n-PCR). Then there was a 168 bp strip for positive results in the 1.5% agarose gel electrophoresis. **Results** The DNA of KSHV was found in 9 of 474(1.90%). The infection rate of male was 1.93%(5/259) and that of female was 1.86%(4/215). The chi-square test analysis showed that the differences were not significant($P>0.05$) between the two groups of male and female. **Conclusion** The DNA of KSHV in Base blood-donor crowd was found, there was no significant difference of infection rate in different gender of blood-donor.

Key words: blood-donor crowd; Kaposi's sarcoma associated hepersvirus; nested Polymerase chain reaction

卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma associated hepersvirus, KSHV)是 1994 年 Chang 等^[1]首先从获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关型 Kaposi's 肉瘤(KS)患者的肉瘤组织中发现, 又称人类 8 型疱疹病毒(human herpesvirus-8, HHV-8)。后续研究发现 KSHV 是 KS 发生的必须因素^[2], KS 是一种少见的软组织恶性多发性、出血性血管肉瘤, 艾滋病患者易患, 临床上分为四型, 经典型 KS、AIDS 相关型 KS、非洲型 KS 及免疫抑制型 KS^[3], 此外, KSHV 还与原发性弥漫性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL)、多中心浆细胞增多症(multicenter castleman's disease, MCD)等恶性肿瘤发生密切相关。目前, 广西百色市艾滋病有严重流行趋势, 为了评估 KSHV 的感染率及由此发生艾滋病相关的 KS 的可能风险, 本研究采用套式聚合酶链反应(nested polymerase chain reaction, n-PCR)调查百色市献血人群中 KSHV 的感染率。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2010 年 3 月至 2012 年 12 月收集百色市部分无偿献血者肘静脉抗凝血 474 份, 其中男 259 份, 女 215 份, 均置于-80℃冰箱保存。

1.2 试剂与仪器 PCR 引物(由上海捷倍思生物工程公司合成)序列, 第一轮外引物, 引物 1(P1): 5'-TCC GTG TTG

TCT ACG TCC AG-3', 引物 2(P2): 5'-AGC CGA AAG GAT TCC ACC AT-3'。第二轮 PCR 内引物序列, 引物 3(P3): 5'-AAT GAC ACA TTG GTG GTA TA-3', 引物 4(P4): 5'-ACG GAT TTG ACC CCG TGT TC-3'。DNA Maker(100 bp ladder plus DNA)、PCR Surpermix 购自 Fermentas 公司; 1-15PK 冷冻离心机为德国 Sigma 产品, Mycyclor PCR 仪和 Chemidoc XRS 型凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 产品。

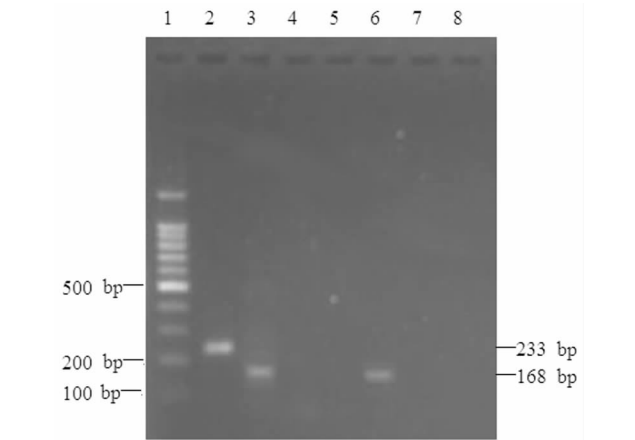
1.3 方法 (1)DNA 抽提: 采用北京天根公司提供的 Relax-Gene Blood DNA System 试剂盒, 严格按照试剂盒说明书操作, 抽提全血细胞 DNA。(2)采用了 n-PCR 技术检测 KSHV 的特异性片断 KS330(233 bp)。首先以第一轮 PCR 引物扩增 KS330 片段, 反应体系为 25 μ L, 包含: Surpermix 22.5 μ L, 40 pmol/ μ L P1、2 各 0.25 μ L, 模板 2 μ L。预变性 94℃ 5 min, 循环按: 94℃ 30 s, 55.4℃ 30 s, 72℃ 45 s 进行, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。第一轮扩增结束后, 取反应产物 1 μ L, 作为 n-PCR 的模板, n-PCR 反应体系包括: Surpermix 23.5 μ L, 40 pmol/ μ L P3、4 各 0.25 μ L, 模板 1 μ L。预变性 94℃ 5 min, 循环按 94℃ 30 s, 59.3℃ 30 s, 72℃ 45 s 进行, 共 35 个循环。72℃ 延伸 5 min。为排除假阳性和假阴性, 以 KSHV KS330 片段克隆质粒载体(KS330-T vector, 由南京医科大学卢春教

授馈赠)为阳性对照,以双蒸水作阴性对照。第一轮扩增阳性产物片段大小 230 bp,第二轮扩增阳性产物片段大小 168 bp。取 10 μ L 第二轮扩增产物,于 1.5% 琼脂糖凝胶中以 160 V 电压电泳 30 min,Chemidoc XRS 型凝胶成像系统做电泳结果分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计数资料采用率表示,组间阳性率采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

冻存血液经试剂盒抽提 DNA 后,n-PCR 检测用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,Chemidoc XRS 型凝胶成像系统电泳分析在 168 bp 处出现条带为阳性,部分电泳图(图 1)。474 份标本中有 9 份为阳性,阳性率为 1.90%。其中男性献血者中检出阳性者 5 例,阳性率为 1.93%,女性献血者中检出 4 例,阳性率为 1.86%。两组献血者 KSHV DNA 阳性检出率差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。



1:DNA Marker(100 bp DNA ladder plus); 2:第一轮阳性对照; 3:第二轮阳性对照;6:KSHV DNA 阳性标本;4、5、7、8:阴性标本。

图 1 n-PCR 检测血液标本中 KSHV DNA

性别	KSHV DNA	
	阳性数(n)	阴性数(n)
男	5	259
女	4	215
合计	9	474

3 讨 论

赵丽娟等^[8]用普通 PCR 检测百色市献血者中 KSHV DNA 阳性率为 1.33%,而本实验对相同地区的献血者采用 n-PCR 检测,阳性率为 1.90%,说明如果标本中 DNA 含量低时普通 PCR 容易漏检,有假阴性,而 n-PCR 灵敏度更高,提高了阳性检出率。

KSHV 分布具有明显地域特征,KSHV 血清阳性率在亚洲很低,日本献血者检测阳性率是 0.2%,美国 1%~3%,但意大利某些地区可达 28%(个别流行区甚至可达 50%以上),该区也是 KS 高发区,说明了 KS 发病率与该区 KSHV 感染率呈正相关^[9]。在中国新疆地区普通人群 KSHV IgG 抗体调查

显示,相同地区维吾尔族和哈萨克族 HHV-8 感染率高于汉族,与这两个民族 KS 高发病一致^[4]。因此 KSHV 的感染率与 KS 发病率呈正相关,有明显地域特征。

在中国不同地区的献血人群(普通人群)中 KSHV 感染率也各不相同,杜文慧等^[4]报道在新疆地区普通人群中维吾尔族 KSHV IgG 抗体阳性率为 30.4%,哈萨克族 12.5%。王官清等^[5]对中国东北地区健康献血员中 KSHV 检测,230 名献血员外周血单一核细胞中 KSHV DNA 阳性率为 7.8%。济南和浙江地区献血者 KSHV 抗体阳性率分别为 5.9% 和 16.1%^[6-7]。本组实验报道 KSHV DNA 的阳性率跟新疆地区、中国东北地区等其他地区的有差异,主要原因可能是:(1)百色市是以壮族为主的少数民族聚居区,不同地区不同民族人群对 KSHV 的敏感性存在差异。(2)不同地区对 KSHV 感染率采用的检测方法不一样。

因此对相同的标本最好采用多种方法进行检测。作者保存有本研究中涉及的血样的血清,课题组将采用酶联免疫吸附法(ELISA)进一步检测血清样本中的 KSHV IgG 抗体分布情况,正确评估 KSHV 的流行情况,以深入研究 KSHV 发病的相关机制。

参考文献:

[1] Chang Y, Cesarman E, Pessin M, et al. Dentification of hepersvirus like DNA sequences in AIDS-associated Kaposics sarcoma[J]. Science,1994,266(5192):1865-1869.

[2] Dilnur P,Katano H,Wang ZH,et al. Classic type of kapo-si'ssarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xin-jiang,China[J]. Pathol Int,2001,51(11):845-852.

[3] 马春雷,普雄明,吴卫东. 新疆 Kaposi 肉瘤患者感染的人类疱疹病毒 8 型 ORF75 基因多态性研究[J]. 实用皮肤病学杂志,2009,2(2):68-71.

[4] 杜文慧,孙荷. 新疆地区普通人群中人疱疹病毒 8 型 IgG 抗体的调查报告[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2000,14(1):45-47.

[5] 王官清,赵玉铭,陈洪铎. 中国东北地区健康献血员中人类疱疹病毒 8 的检测[J]. 中国皮肤性病学杂志,2002,17(2):15-18.

[6] 王炜琴,赵小英,张克奇. 浙江省献血者卡波氏肉瘤相关疱疹病毒感染的血清学研究[J]. 中国输血杂志,2001,14(1):46-47.

[7] 齐眉,赵蔚明,周亚滨,等. 济南地区献血者中人疱疹病毒 8 型(HHV-8)IgG 抗体的检测及相关危险因素分析[J]. 山东大学学报:医学版,2006,51(4):328-331.

[8] 赵丽娟,陈源红,周正东,等. 百色市献血者中人类疱疹病毒 8 型病毒 DNA 的 PCR 检测[J]. 右江民族医学院学报,2012,27(2):147-148.

[9] Subhash CV,Erle SR. Molecular biology and pathogenesis of Kaposisarcoma-associated herpesvirus[J]. FEMS Microbiol Lett,2003,222(2):155-163.