

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.016.html>

甘肃省敦煌地区普通人群卡波肉瘤 相关疱疹病毒感染的血清学分析

方 圆, 许常青, 周 畅, 陈 伟, 王林定

摘要 目的 研究卡波肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)在甘肃敦煌地区普通人群中的血清阳性率,并分析KSHV感染的危险因素。方法 随机收集1000例敦煌地区普通人群血清,以KSHV 3个基因片段 $orf65$ 、 $orf73$ 、 $orf k8.1$ 编码蛋白为抗原,间接ELISA检测样本中KSHV抗体,SPSS软件分析危险因素。结果 1000份血清中,KSHV抗体总阳性率为19%,男性阳性率(22.9%)高于女性(16.6%)($P=0.016$);KSHV感染与梅毒螺旋体($P=0.004$)和丙肝病毒($P=0.027$)感染间有相关性,而与年龄、乙肝五项无关。多因素Logistic回归分析显示梅毒螺旋体感染的OR(95% CI)为10.142(1.920~53.577)。结论 甘肃敦煌地区普通人群中KSHV的感染率较高,且与性别有关;梅毒螺旋体感染是该地区KSHV感染最重要的独立危险因素。

关键词 卡波肉瘤相关疱疹病毒;血清阳性率;危险因素;甘肃;敦煌

中图分类号 R 373.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0697-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.016

卡波肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)为近年来发现的一种新的疱疹病毒,又称人类疱疹病毒8型(human herpesvirus type 8, HHV-8),属于 γ 疱疹病毒亚科,是卡波肉瘤(Kaposi's sarcoma, KS)的相关病原体,另外与

两种淋巴增殖性疾病原发性渗出性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL)和多心性牧牛人病(multi-centric cattleman's disease, MCD)密切相关^[1]。大量文献^[2-4]显示,KSHV感染率存在明显的地域差异,其中在赤道附近的非洲地区KSHV的血清阳性率显著高于世界其他地区。但有关KSHV感染在中国境内的研究较少,目前仅对新疆地区的调查较为深入。结果显示新疆维吾尔族人群中经典型KS的发病率明显高于其他地区 and 民族^[5],且新疆汉族人群的感染率也高于我国中部地区^[6]。该课题组选择了临近新疆的甘肃敦煌地区进行调查,敦煌地区地理环境和人文环境与新疆地区十分相似,且目前未有文献对新疆周边地区的KSHV感染进行研究。该调查意在比较新疆周边地区与新疆地区以及我国中部地区KSHV感染率的差异,为以后研究我国其他地区 and 民族的KSHV流行病学提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2015年9~12月甘肃省敦煌市各医院普通人群1000份血清样品。研究计划经安徽医科大学伦理委员会审批并已获得研究对象的知情同意。KSHV阳性对照血清和阴性对照血清检测参见文献^[7]。

1.2 主要试剂 $k8.1$ 基因编码的裂解期蛋白、 $orf73$ 基因编码的潜伏期相关核抗原LANA、 $orf65$ 基因编码的衣壳蛋白参见文献^[8-9];辣根过氧化物酶标记山羊抗人IgG抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);TMB单组份显色液(北京索莱宝生物科技有限公司);即用型山羊血清(武汉博士德生物工程有限公司)。

2017-01-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271837);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012A161);安徽医科大学博士科研经费资助项目(编号:XJ200914)

作者单位:安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

作者简介:方 圆,女,硕士研究生;

王林定,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wanglinding@ahmu.edu.cn

tion, and joint group had significant difference with other group. ④ There was no significant difference on K-RAS, ERK1, ERK2 mRNA expression in every groups by RT-PCR. **Conclusion** ① Raltitrexed exerts anti-proliferation and apoptosis-promoting effects on colon cancer cell HT-29 in a concentration dependent manner. ② Raltitrexed combined with ERK inhibitor has synergistic effect on HT-29 cells. ③ ERK inhibitor does not affect cell proliferation and apoptosis at gene expression levels.

Key words colon cancer; Raltitrexed; PD98059; RAS-MEK-ERK1/2 pathway; HT-29 cells

1.3 方法

1.3.1 ELISA 法检测 KSHV 血清 采用 ELISA 法检测 KSHV 抗原 ORF65、ORFK8.1 及 ORF73 的抗体。具体步骤如下:用封闭液(含 5% 脱脂牛奶和 1% 山羊血清的 PBST 溶液)按 1 : 100 比例将待测血清样品以及阳性对照与阴性对照血清进行稀释备用。包被液(0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液)将 3 个纯化的重组蛋白稀释到 5 ng/μl,分别加入到 96 孔酶标板中,每孔 50 μl,4 °C 过夜;次日,用 PBST(含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液)洗板 3 次,每次 10 min(下同);洗板结束后,每孔加封闭液 250 μl,37 °C 封闭 1 h;洗板并加入稀释备用的血清样品,每孔 50 μl,每样设 2 个复孔,37 °C 孵育 1 h 后每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 二抗(用封闭液按 1 : 5 000 稀释)50 μl,37 °C 孵育 1 h;洗板 3 次后每孔加入 50 μl TMB 单组份显色液,37 °C 避光显色 15 min,之后加入 50 μl 3 mol/L 的 HCL 溶液终止反应,并与 450 nm 处检测吸光度(optical density,OD)值,对照和检测样品都设 3 次重复。

1.3.2 结果判定 以 KSHV 阴性对照血清 OD 值的平均值加上 5 倍标准差(standard deviation,STD)作为临界值(Cut-off 值)。待测样品 OD 值高于 Cut-off 值则判定为阳性。3 次检测中任意一个相应抗体阳性则判定为该样品 KSHV 血清阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行 KSHV 血清学结果的 χ^2 检验,对 KSHV 抗体存在的不同独立危险因素进行单因素和多因素的 Logistic 回归分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况描述分析 在检测的 1 000 例普通人群血样中,男 380 例(占 38%);女 620 例(占 62%)。年龄 1 ~ 88(44.040 ± 12.538)岁。甘肃敦煌地区普通人群 KSHV 血清抗体阳性率见表 1。总血清阳性率为 19% (19/1 000),其中男性占 22.9%,女性占 16.6%。按照年龄将人群分为 9 组,10 岁作为一个年龄统计组。对年龄组和性别分别进行 χ^2 检验,结果表明各年龄组间阳性率差异无统计学意义,不同性别间阳性率差异有统计学意义($P = 0.016, P < 0.05$)。

2.2 单因素分析 将性别、年龄、乙肝五项、丙肝以及梅毒等指标引入方程,单因素 Logistic 回归分析结果见表 2。可见 KSHV 感染与性别、丙型肝炎病毒和梅毒螺旋体感染有关($P < 0.05$),而与年龄、乙肝

五项差异无统计学意义。

2.3 多因素分析 将单因素分析中 $P < 0.05$ 的项目进行多因素条件 Logistic 回归分析。结果显示:性别指标的偏回归系数 $B = 0.518, OR = 1.678, 95% CI = 1.193 \sim 2.360$,且 $P = 0.003$,说明该地区 KSHV 感染与性别之间具有显著相关性,由表 1 可知,男性感染率高于女性。梅毒螺旋体感染的 OR 值为 10.142,95% CI 为 1.920 ~ 53.577,表明梅毒是 KSHV 感染最重要的独立危险因素。见表 3。

表 1 甘肃敦煌地区普通人群 KSHV 血清抗体阳性率

Table with 5 columns: 项目, 样品例数 (n), 阳性例数 (n), 阳性率 (%), P 值. Rows include gender (男/女), age (年龄), and age groups (1~10, 11~20, etc.).

表 2 KSHV 感染的单因素 Logistic 回归分析

Table with 5 columns: 项目, B 值, Wald 值, P 值, OR(95% CI). Rows include gender, age, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Anti-HCV, and Anti-TP.

表 3 KSHV 感染的多因素 Logistic 回归分析

Table with 5 columns: 项目, B 值, Wald 值, P 值, OR(95% CI). Rows include gender, Anti-HCV, and Anti-TP.

3 讨论

KSHV 是一种 DNA 病毒,又称 HHV-8,首次发现于 1994 年,由美国哥伦比亚教授 Cesarman et al[10]从艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)患者的 KS 组织中分离得到,使用的是代表性差异分析法并建立了 KS 基因组文库[11]。HHV-8

是一切类型 KS、PEL 和 MCD 的共同病因,并且与多发性骨髓瘤、淋巴增殖性疾病、血管性肿瘤等疾病的发生发展密切相关。

前期研究^[5,7]显示,就全球范围而言,KSHV 并没有普遍流行。其中在北美和欧洲北部 KS 发病率较低,普通人群血清中 KSHV 的阳性率在 0~5%,而南部地中海地区高达 30%,在 KS 流行的非洲地区,KSHV 阳性率甚至超过 50%。亚洲地区,关于 KSHV 的感染报道较少,少量文献^[9]显示,日本地区阳性率为 0.14%~0.20%,沙特阿拉伯为 7%,台湾地区与美国接近,而中国新疆地区为 19.3%~46.6%。由此可见,在不同国家和地区,KSHV 的感染率存在很大差异^[8,12]。

本研究主要调查 KSHV 在甘肃敦煌地区普通人群感染情况,结果显示总抗体阳性率为 19%,其整体 KSHV 抗体阳性率接近于中国西北的新疆地区(19.3%~46.6%)^[6],与中部地区(7.3%~16.1%)^[5,13]相比,KSHV 抗体阳性率明显偏高,原因可能与该地区特殊的地理位置有关。敦煌与新疆地理环境十分相似,都位于中国西北,含有维吾尔族和哈萨克族在内的多个少数民族,是古丝绸之路的重要组成部分。先前已有研究^[5]表明新疆地区有较高的 KSHV 感染率,而维吾尔族和哈萨克族是感染率最高的民族^[6]。敦煌地区同样含有这两个少数民族,而本研究的 1 000 份血清样本是随机抽取的,其中可能含有这两个少数民族的血清。另一方面,随着各民族之间交流日益频繁,虽然汉族相较于其他少数民族感染率低,但仍随着当地少数民族感染率的增高而增高,这也间接反映了 KSHV 感染和地理区域间存在相关性。

对该地区 KSHV 感染的危险因素分析显示,其感染率与年龄和乙肝五项无关,提示这些因素均不影响 KSHV 的感染。然而在分析梅毒螺旋体感染与 KSHV 抗体阳性率之间的关系显示,两者存在显著相关性,这就表明 KSHV 可能与梅毒螺旋体具有相似的传播渠道^[12,14-15]。同样本研究对性别分析显示男性的感染率明显高于女性,这与先前报道^[5-6,13]的新疆及湖北地区的研究结果并不相符,原因可能是样本收集时性别分配不均等从而影响统计学分析的准确性。因此本课题组接下来会在已有的研究基础上扩大样本收集量并保证样本性别上的均等性,继续研究 KSHV 感染与性别之间的关系,并将民族作为一个独立危险因素进行分析,同时研究

该地区 KSHV 的亚型,为进一步开展我国其他地域和种族的 KSHV 流行病学调查提供参考依据。

参考文献

- [1] Bergonzini V, Salata C, Calistri A, et al. View and review on viral oncology research [J]. *Infect Agent Cancer* 2010, 5(1): 1-11.
- [2] Zhang T, Shao X, Chen Y, et al. Human herpesvirus 8 seroprevalence, China [J]. *Emerg Infect Dis* 2012, 18(1): 150-2.
- [3] Mesri E A, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus [J]. *Nat Rev Cancer* 2011, 10(10): 707-19.
- [4] Zhang T, Liu Y, Zhang Y, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 and hepatitis C virus among drug users in Shanghai, China [J]. *Viruses* 2014, 6(6): 2519-30.
- [5] Ouyang X, Zeng Y, Fu B, et al. Genotypic analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from patients with Kaposi's sarcoma in Xinjiang, China [J]. *Viruses* 2014, 6(12): 4800-10.
- [6] Fu B, Sun F, Li B, et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and risk factors in Xinjiang, China [J]. *J Med Virol* 2009, 81(8): 1422-31.
- [7] 张莹, 曾宪聪, 汪小五, 等. 安徽蚌埠地区卡波肉瘤相关疱疹病毒的血清阳性率研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(5): 493-5.
- [8] Fu B S, Li B L, Ouyang X X, et al. Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF K8.1 and its preliminary diagnostic application [J]. *Virol Sin* 2009, 24(3): 202-8.
- [9] Baillargeon J, Deng J H, Hettler E, et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among blood donors from Texas [J]. *Annals Epidemiol* 2001, 11(7): 512-8.
- [10] Cesarman E, Chang Y, Moore P S, et al. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related bodycavity-based lymphomas [J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(18): 1186-91.
- [11] Fu B, Li B, Wang L, et al. Immunogenicity analysis of prokaryotic expression products of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus orf65 [J]. *Virol Sin* 2008, 23(3): 196-202.
- [12] Wang H, Liu J, Dilimulati, et al. Seroprevalence and risk factors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among the general Uygur population from south and north region of Xinjiang, China [J]. *Virol J* 2011, 8: 539.
- [13] 方勤, 刘娟, 白志强, 等. 湖北地区普通人群卡波肉瘤相关疱疹病毒的血清学分析 [J]. *中国病毒学* 2006, 21(2): 97-101.
- [14] Xie Y, Ruan B, Chen Y, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Chinese patients with chronic hepatitis B [J]. *Med Virol* 2011, 83(5): 879-83.
- [15] Wakeham K, Webb E L, Sebina I, et al. Risk factors for seropositivity to Kaposi's sarcoma associated herpesvirus among children in Uganda [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013, 63(2): 228-33.

基于蛋白质组学的胸腔积液蛋白标志物筛选与验证

李志斌 束军 孟静

摘要 目的 用蛋白质组学技术对比分析良、恶性胸腔积液标本,寻找蛋白标志物为其鉴别诊断提供帮助和新线索。方法 采用双向电泳分离、搜寻蛋白,基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定蛋白,ELISA验证蛋白在良恶性胸腔积液样本中具体含量。结果 恶性组胶图对比良性组共显示明显差异蛋白点(上调或下调 ≥ 2 倍)43个,上调9个,下调34个;对其中7个显著差异点(上调或下调 ≥ 3 倍)质谱鉴定明确了具体类型;挑选显著差异点中免疫球蛋白 λ (Ig λ)、结合珠蛋白(Hp)进行ELISA验证,结果表明Ig λ 在良、恶性胸腔积液中含量差异无统计学意义,Hp含量组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步评估显示诊断标准为胸腔积液中Hp $< 389.02 \mu\text{g/L}$ 时,诊断恶性胸腔积液灵敏度为75.00%,特异度为52.38%。结论 蛋白质组学技术的应用对胸腔积液蛋白标志物搜寻具有较大帮助,本研究搜寻到的标志物Hp对于良、恶性胸腔积液鉴别诊断具有一定

价值,值得进一步研究。

关键词 免疫球蛋白 λ ; 结合珠蛋白; 蛋白质组学; 胸腔积液; 诊断

中图分类号 Q 51; R 561.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0700-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.017

胸腔积液是肺、胸膜疾病或其他多种全身疾病的常见临床表现之一。根据病因的不同,胸腔积液可分为恶性胸腔积液和良性胸腔积液。恶性胸腔积液最常见病因为肺癌,尤以肺腺癌多见,良性胸腔积液最常见病因为肺结核和肺部感染^[1]。不同病因导致的胸腔积液在治疗方案和预后上具有显著不同,因此病因的鉴别诊断对胸腔积液的诊治具有重要临床意义。但是,目前临床上对于两者的鉴别诊断有一定困难,一旦出现漏诊和误诊后果严重。蛋白质组学(proteomics)是一门大规模、高通量、系统化研究某一类型细胞、组织或体液中所有蛋白质组成及其功能的新兴学科^[2]。目前,蛋白质组学已在研究生物体及其器官的蛋白质组成、发现蛋白质相互作用网络及关系、探索疾病的发病机制与治疗途

2017-01-11 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);

安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011A173)

作者单位:安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230032

作者简介:李志斌,男,硕士研究生;

束军,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: J. Shu

@126.com

Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Dunhuang, Gansu province

Fang Yuan, Xu Changqing, Zhou Chang, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To estimate the seroprevalence and risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infection in the general population in Dunhuang, Gansu province. **Methods** We examined 1 000 sera specimens using an ELISA-based assay that measured antibodies to one KSHV latent antigen (ORF73) and two KSHV lytic proteins (ORF65 and ORF K8.1). **Results** Of the 1000 subjects, the seroprevalence of KSHV in the general population was 19% and slightly higher in the male than that in the female (22.9% vs 16.6%, $P = 0.016$). Statistical analysis showed that seroprevalence of KSHV had significant associations with syphilis ($P = 0.004$) and hepatitis C virus infection ($P = 0.027$), but it had no differences with the age, hepatitis B virus infection. **Conclusion** These results indicate that the infection rates of KSHV in Dunhuang, Gansu province are higher than that in other areas in China. The infection of KSHV is significantly associated with the gender. Syphilis infection is the most important independent risk factor for KSHV infection in this area.

Key words Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; seroprevalence; risk factor; Dunhuang; Gansu