

• 论著 •

< 临床研究 >

中国东北地区健康献血员中人类疱疹病毒 8 的检测

王官清*, 徐宏慧, 赵玉铭, 王雅坤, 陈洪锋

[摘要] 目的 了解中国东北地区健康献血员中人类疱疹病毒 8(HHV-8) DNA 和 IgG 抗体检出情况, 及不同性别、年龄段、种族和血型间的检出率差别。方法 用巢式 PCR 法检测外周血单核细胞(PBMCs)中 HHV-8 DNA, ELISA 法检测血清中抗 HHV-8 ORF65 和 ORF K8.1 寡核苷酸多肽的 IgG 抗体。结果 230 份献血员 PBMCs 中 HHV-8 DNA 检出率为 7.8%, 109 份血清中抗 HHV-8 IgG 抗体检出率为 7.3%。HHV-8 DNA 检出率有随献血员年龄增加而增高的趋势, 但男女、汉族和蒙族, 以及 A、B、AB、O 血型献血员间 HHV-8 DNA 或 IgG 抗体的检出率差异均无显著性。结论 中国东北地区健康献血员中 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体的检出并不罕见, 但 HHV-8 检出率没有性别、种族或血型差异。HHV-8 有经血液传播的可能。

[关键词] 献血员; 人类疱疹病毒 8

[中图分类号] R 752.1; R 457.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-7089(2002)02-0083-04

Detection of Human Herpesvirus 8 in Healthy Blood Donors in Northeast China

WANG Guan-qing, XU Hong-hui, ZHAO Yu-ming, et al

Department of Dermatology, First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: Objective To exam human herpesvirus 8(HHV-8) DNA and IgG antibodies in healthy blood donors in Northeast China, and to analyze any possible difference among those of different sex, age groups, ethnic groups and blood types. **Methods**

Nested PCR was used to detect HHV-8 DNA in periphery blood mononuclear cells(PBMCs), and ELISA was used to detect IgG antibodies against HHV-8 ORF65 and ORF K8.1 oligopeptides in sera. **Results** HHV-8 DNA was detected in 7.8 percent in 230 samples of PBMCs, IgG antibodies were found in 7.3 percent in 109 samples of sera. The positive detection rate of HHV-8 DNA in blood donors had a trend of increase with their increasing age. HHV-8 DNA or IgG antibodies had no significant difference between male and female, Han nationality and Mongolia nationality in China, neither among blood donors of different blood types. **Conclusion** Positive detection of HHV-8 DNA and IgG antibodies in healthy blood donors in Northeast China is not rare, but there is no significant difference among those of different sex, ethnic groups or blood types. HHV-8 may be transmitted by blood transfusion.

Key words: Blood donor; Human herpesvirus 8

人类疱疹病毒 8(human herpesvirus 8, HHV-8) 曾称卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV), 是 Chang 等从艾滋病相关性卡波西肉瘤(KS)组织中分离出的一种新病毒, 与 EB 病毒同属人类疱疹病毒 γ 亚科^[1]。后来的研究表明 HHV-8 除存在于艾滋病相关性 KS 外, 还存在于经典性、地方性和医源性 KS, 且位于其血管内皮细胞和梭形细胞, 很可能是 KS 的致病病毒^[2]。近来还发现在体腔性 B 细胞淋巴瘤和多环性 Castleman 病、免疫功能低下的器官移植接受者以及免疫功能正常的普通人群中也检出 HHV-8^[3]。但 HHV-8 检

出率在不同地区间普通人群中差异较大, 且似与该地区 KS 发病率高低一致^[4]。在中国, KS 为少见肿瘤, 但普通人群中 HHV-8 的检出情况少见报道。为此, 我们用巢式 PCR 法检测了中国东北地区 230 名健康献血员外周血单核细胞(PBMCs)中的 HHV-8 DNA, 用 ELISA 法检测了其中 109 名献血员血清中抗 HHV-8 ORF65 和 ORF K8.1 寡核苷酸多肽(oligopeptide)的 IgG 抗体, 报告如下。

1 资料和方法

1.1 临床资料 230 名献血员为东北地区自愿在我院献血者, 男 171 名, 女 59 名; 年龄 19~54 岁, 平均 34.6 岁, 其中 19~30 岁 66 名, 31~40 岁 96 名, 41~50 岁 58 名, 51 岁以上 10 名; 汉族 216 名, 蒙古族 14 名; A 血型 61 名, B 型 81 名, AB 型 56 名, O 型 32 名。

[作者单位] 1 中国医科大学第一临床医学院皮肤科, * 现在厦门大学医学院皮肤性病学教研室, 福建 厦门 361005

[作者简介] 王官清(1968-), 男, 四川省富顺县人。厦门大学医学院皮肤性病学副教授, 医学博士。主要从事人类疱疹病毒在某些皮肤病中的可能致病作用的研究。

所有献血员在近 1 月内均未系统使用过免疫抑制剂, 并否认同性恋行为, 均无乙型肝炎史。采取外周静脉血 230 份。109 份血清取自其中 109 名献血员, 男 70 名, 女 39 名; 年龄 20~ 50 岁, 平均 35.9 岁, 其中 20~ 30 岁 23 名, 31~ 40 岁 56 名, 41~ 50 岁 26 名, 51 岁以上 4 名; 汉族 103 名, 蒙古族 6 名; A 血型 28 名, B 型 43 名, AB 型 14 名, O 型 24 名。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 外周静脉血用红细胞裂解液处理后离心收集 PBM Cs, 以经典的酚-氯仿法抽提 DNA。

1.2.2 巢式 PCR 法检测 PBM Cs 中 HHV-8 DNA

1.2.2.1 引物 以 HHV-8 KS330Bam 片段为模板, 设计巢式 PCR 引物对(外引物对 KS1/KS2 和内引物对 NS1/NS2)。KS1 序列: 5'-AGC CGA AAG GAT TCC ACC AT-3', KS2 序列: 5'-TCC GTG TTG TCT ACG TCC AG-3', 产物为 233bp。NS1 序列: 5'-ACG GAT TTG ACC CCG TGT TG-3', NS2 序列: 5'-AAT GAC ACA TTG GTG GTA TA-3', 产物为 160bp^[5]。引物由大连宝生物工程公司合成。

1.2.2.2 PCR 反应条件 采用 25μl 反应体系, 其中含 10 × PCR 缓冲液 2.5μl, 25mmol/L MgCl₂ 1.5μl, dNTP(各 2.5mmol/L) 2.0μl, γ-Taq DNA 聚合酶 0.125μl (5U/μl, TaKaRa 产品), 0.1μg~ 0.25μg 模板 DNA, 引物(20μM) 各 1.0μl。T-Gradient PCR 仪为 Biometra 产品。以 KS1/KS2 做第 1 次 PCR 反应: 94℃ 预变性 2min, 94℃ 1min, 62℃ 1min, 72℃ 1min 循环 35 次后 72℃ 延伸 5min。取第 1 次 PCR 产物 2.5μl 做模板, 以 NS1/NS2 做第 2 次 PCR 反应, 条件与第 1 次相同。PCR 产物用 2.0% 琼脂糖(Promega 产品)凝胶电泳。

以 BG-1 细胞(HHV-8⁺ EBV⁺) DNA (美国疾病预防控制中心 Naoki Inoue 博士惠赠) 做阳性对照, 已知 HHV-8 阴性组织 DNA 做阴性对照, 灭菌双蒸水替代模板 DNA 做空白对照。所有提取的 DNA 用针对人 β 球蛋白基因的引物对 PC03/PC04 扩增(产物大小为 110bp) 以证实其为可扩增 DNA。

1.2.2.3 PCR 产物的限制性内切酶酶切鉴定 将 233bp 和 160bp 产物用 DNA 片段回收试剂盒(TaKaRa 产品)回收, 按试剂盒说明书操作。在 20μl 酶切反应体系中加入回收产物 5μl, 缓冲液 2μl, 双蒸水 13μl, PstI(Gibco 产品) 10U, 37℃ 反应 3h。酶切产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.3 ELISA 法检测血清抗 HHV-8 IgG 抗体 分别以 HHV-8 ORF65、ORF K8.1 寡核苷酸以及二者

混合液做包被抗原检测抗 HHV-8 IgG 抗体。参照 Spira 等^[6] 的方法并略做改进。HHV-8 ORF65、ORF K8.1 寡核苷酸由 Naoki Inoue 博士惠赠, 辣根过氧化物酶连接的羊抗人 IgG 为 Sigma 产品。以抗 HHV-8 IgG 抗体阳性血清(取自 HIV 阳性的 KS 患者, Naoki Inoue 博士惠赠) 作阳性对照, 已知 HHV-8 抗体阴性血清作阴性对照, BSA/PBS 代替待检血清作空白对照。以 ORF65、ORF K8.1 及二者混合液中任一种做抗原时的阳性结果为阳性。

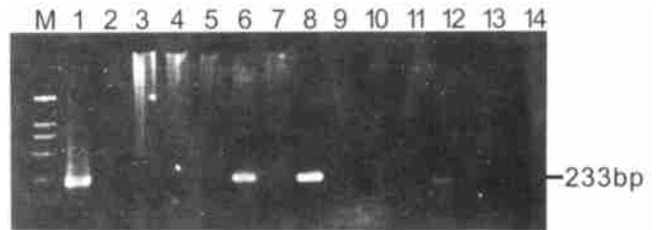
1.3 统计学分析 配对 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HHV-8 DNA 检测结果

2.1.1 对照 提取的 DNA 都可用 PC03/PC04 扩增出 110bp 片段。阳性对照扩增出 233bp 和 160bp 产物, 经 PstI 酶切分析, 233bp 产物被酶切成 138bp 和 95bp, 160bp 产物被酶切成 99bp 和 61bp。阴性和空白对照未扩增出 233bp 或 160bp 产物。

2.1.2 献血员检测结果 以 KS1/KS2 做第 1 次 PCR, 230 份健康献血员中 5 份扩增出 233bp 产物, 再以 NS1/NS2 做第 2 次 PCR 时, 有 18 份(7.8%) 扩增出 160bp 产物。产物经 PstI 酶切分析, 所有 233bp 片段被切成 138bp 和 95bp 两个片段, 160bp 产物被切成 99bp 和 61bp 片段, 证实为 HHV-8 产物(图 1~ 3)。



M 为 DNA 标记; 1 为阳性对照; 2 为阴性对照; 6、8、12 为阳性结果; 3~ 5、7、9~ 11、13~ 14 为阴性结果

图 1 部分献血员 PBM Cs 中 HHV-8 DNA 检测结果 (KS1/KS2 引物)

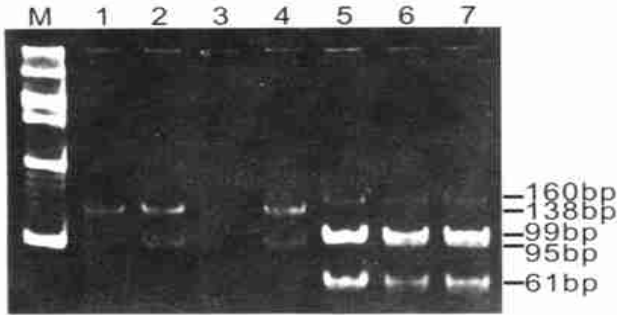


M、1、2 同图 1; 4、6、8、12 为阳性结果; 3、5、7、9~ 11、13、14 为阴性结果

图 2 部分献血员 PBM Cs 中 HHV-8 DNA 检出结果 (NS1/NS2) 引物

2.2 HHV-8 IgG 抗体检测结果 109 份献血员血清中共 8 份(7.3%) 检出 HHV-8 IgG 抗体。其中, 以

ORF65、ORF K8.1 寡核苷多肽和二者混合液做抗原时分别有 5 份 (4.6%)、3 份 (2.8%) 和 4 份 (3.7%) 检出 HHV-8 IgG 抗体。经 χ^2 检验, 应用 ORF65、ORF K8.1 和二者混合液做抗原时 HHV-8 IgG 抗体检出率差异无显著性 ($\chi^2 = 0.519, P > 0.05$)。HHV-8 IgG 抗体阳性者中 2 份合并 HHV-8 DNA 阳性。



M 为 DNA 标记; 3 为阴性对照; 1~ 2、4 为 233bp 产物酶切结果; 5~ 7 为 160bp 产物酶切结果

图 3 部分 233bp 和 160bp 产物 Pst I 酶切结果

2.3 不同性别、年龄段、民族和血型献血员中 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体检出率

2.3.1 男女献血员中 HHV-8 检出率 171 份男性和 59 份女性献血员 PBM Cs 中分别有 14 份 (8.2%) 和 4 份 (6.8%) 检出 HHV-8 DNA。70 份男性、39 份女性献血员血清中分别有 5 份 (7.1%) 和 3 份 (7.7%) 检出抗 HHV-8 IgG 抗体。经 χ^2 检验, 男女献血员的 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体检出率差异均无显著性 χ^2 分别 0.004、0.01, P 均 > 0.05 。

2.3.2 不同年龄段献血员 HHV-8 检出率 见表 1。

表 1 不同年龄段献血员 HHV-8 检测结果
阳性例数/总例数 (%)

年龄段	HHV-8 DNA*	HHV-8 IgG 抗体**
19~ 30 岁	3/66 (4.5)	1/23 (4.3)
31~ 40 岁	5/96 (5.2)	3/56 (5.4)
41~ 50 岁	8/58 (13.8)	4/26 (15.4)
51 岁~	2/10 (20.0)	0/4

4 个年龄段献血员比较, * $\chi^2 = 6.81, P > 0.05$; ** $\chi^2 = 3.42, P > 0.05$

从表 1 可以看出, 不同年龄段献血员 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体检出率差异均无显著性, 但 HHV-8 DNA 检出率有随献血员年龄增加而增高的趋势。

2.3.3 不同民族献血员中 HHV-8 检出率 216 份汉族和 14 份蒙古族献血员 PBM Cs 中分别有 17 份 (7.9%) 和 1 份 (7.1%) 检出 HHV-8 DNA, 103 份汉族和 6 份蒙古族献血员血清中分别有 7 份 (6.8%) 和 1 份 (16.7%) 检出抗 HHV-8 的 IgG 抗体。汉族和蒙古族献血员 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体检出率差异均无显著性 ($\chi^2 = 0.17, P > 0.05$; $\chi^2 = 0.01, P > 0.05$)。

2.3.4 不同血型献血员的 HHV-8 检出率 见表 2。

从表 2 看出, 4 种血型献血员的 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体检出率差异均无显著性。

表 2 不同血型献血员 HHV-8 检测结果
阳性例数/总例数 (%)

血型	HHV-8 DNA*	HHV-8 IgG 抗体**
A 型	6/61 (9.8)	2/28 (7.1)
B 型	6/81 (7.4)	3/43 (7.0)
AB 型	4/56 (7.1)	1/14 (7.1)
O 型	2/32 (6.3)	2/24 (8.3)

4 种血型献血员比较, * $\chi^2 = 0.51, P > 0.05$; ** $\chi^2 = 0.05, P > 0.05$ 。

3 讨论

在不同国家或地区, 除各种类型 KS 外, 在伴和不伴 HIV 感染的人群中都曾检出 HHV-8 的 DNA 或抗体, 提示 HHV-8 分布较广泛。但普通人群的 HHV-8 检出率存在地区差异, 欧美国家人群低于非洲国家人群, 亚洲地区中日本为 0.14%~ 0.20%, 沙特阿拉伯为 7%, 台湾地区与美国近似^[7~ 9]。我们用巢式 PCR 和 ELISA 首次检测出中国东北地区健康献血员中 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体检出率分别为 7.8% 和 7.3%, 提示该人群中 HHV-8 的检出并非罕见。该人群中 HHV-8 检出率与沙特阿拉伯接近, 但高于日本而低于台湾同年龄段人群, 原因有待进一步研究。

HHV-8 检出率的差异可能与以下因素有关: ① 地理分布, 尤其与当地 HIV 感染状况和 KS 发病率有关, 美国、英国献血员中 HHV-8 检出率不超过 1%, 与该地区 KS 发病率低相吻合^[6]。在中国, KS 极为少见, 但献血员中 HHV-8 检出率却并不低, 其原因待研究。④ 受检人群的年龄分布: 儿童和青少年中检出率低, 随年龄增长逐渐增高^[4, 9]。我们的检测结果提示, 随献血员年龄增长 HHV-8 DNA 检出率有增高趋势, 但没有性别、种族或血型差异。④ 社会经济状况: 一般而言, 发达国家较发展中国家检出率低。中国东北地区健康献血员中 HHV-8 检出率远低于其它一些发展中国家, 除地理分布因素外可能还与近年来我国经济发展使人民生活水平得以提高有关。1/4 HHV-8 检测方法: 目前常用 PCR、免疫荧光、ELISA 等方法。巢式 PCR 可检测一个拷贝的病毒 DNA, 以 ORF65 和 ORF K8.1 寡核苷多肽做抗原检测抗 HHV-8 IgG 抗体敏感而特异, 联合应用分子生物学、血清学等方法可提高检测的敏感性和特异性^[6]。我们用巢式 PCR 和 ELISA 同时检测献血员中 HHV-8 DNA 和 IgG 抗体, 结果可靠。但应用 ORF65、ORF K8.1 寡核苷多肽或二者混合抗原时抗 HHV-8 IgG 抗体检出率差异无显著性。

HHV-8 可在精液、前列腺液中检出,且男性同性恋者中的检出率显著高于其他人,提示其主要通过性接触传播。但唾液、鼻咽分泌物中以及儿童和青少年中曾检出 HHV-8,提示还存在非性接触传播途径。HHV-8 的可感染性已得到证实^[10]。我们在健康献血员中检出 HHV-8 尤其是其 DNA,提示 HHV-8 可能通过输血传播。针对这种可能,建议采取以下措施:
 ① 输血前常规筛查 HHV-8; ④像处理血液制品中人类 T 细胞淋巴瘤病毒一样,适当延长血液制品放置时间可使病毒失去活力。

[参 考 文 献]

[1] Chang Y, Cesarman E, Pessin M, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma [J]. Science, 1994, 266: 1865- 1869

[2] Huang Y, Li JJ, Kaplan MH, et al. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma [J]. Lancet, 1995, 345: 759- 761

[3] Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells [J]. Nat Med, 1997, 1: 1274- 1278

[4] Lennette ET, Blackborn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus

8 in the general population and patients with Kaposi's sarcoma [J]. Lancet, 1996, 348: 858- 861

[5] Dupin N, Franck N, Calvez V, et al. Lack of evidence of human herpesvirus 8 DNA sequences in HIV-negative patients with various lymphoproliferative disorder of the skin [J]. Br J Dermatol, 1997, 136: 827 - 830

[6] Spira TJ, Lam L, Dollard SC, et al. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2174- 2180

[7] Fujii T, Taguchi H, Katano H, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan [J]. J Med Virol, 1999, 57(2): 159- 162

[8] Qunibi W, Al Furayh O, Almeshari K, et al. Serologic association of human herpesvirus eight with posttransplant Kaposi's sarcoma in Saudi Arabia [J]. Transplantation, 1998, 65(4): 583- 585

[9] Huang LM, Huang SY, Chen M, et al. Geographical differences in human herpesvirus 8 seroepidemiology: a survey of 1, 201 individuals in Asia [J]. J Med Virol, 2000, 60(3): 290- 293

[10] Blackbom DJ, Ambraziak J, Lennette E, et al. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor [J]. Lancet, 1997, 349: 609- 611

[收稿日期] 2001-09-28 [修回日期] 2001-12-10

• 书评 •

新书《皮肤性病学》读后

刘荣卿

有幸读到由遵义医学院张信江教授领衔主编的医学成人高等学历教育专科教材《皮肤性病学》(1999年,人民军医出版社出版),读后有很大启发和收获。现将读后感简述如下。

1 教材编写指导思想明确 由于医学成人高等学历教育的特点在于受教育的对象系中等卫生学校毕业 2~3 年以上,有一定临床经验的医务工作者,他们的临床经验、自制能力、思维能力及自学能力均较强,是带着临床工作中没有弄懂的问题而进一步深造的。因此,编写本教材的指导思想是:除基础知识、基本理论等方面的内容与专科教材类似外,在基本技能、临床工作能力的提高方面则较专科教材为深。

2 内容选材编排恰当 该书 27 万字,分总论(6 章)及各论(19 章)共 25 章。总论中较详细地介绍了皮肤病、性病的基础理论及基本知识,并对皮肤病、性病的实验室检查作了较多的叙述。还介绍了皮肤保健、医

学美容的基础知识及简单的中医中药知识,以适应基层工作的需要。各论中介绍了 112 种常见皮肤病、11 种性传播疾病,并对其中卫生部要求重点监测的梅毒、艾滋病等 8 种性病进行重点描述。这些疾病选择恰当、内容新颖、重点突出、文字流畅、易于理解、简明适用。

3 图文并茂,理论结合实际 皮肤病学是以形象为主的学科,为此,作者选用了 134 幅彩色照片,这些照片真实典型,图象清晰,色彩鲜艳,对于看图识病有很大裨益,尤为可喜的是,作者选了 22 幅彩图介绍了皮肤病的基本损害图象,这对初学者来说,极为必要。

总之,本书不仅是适合于成人高等学历教育的教科书,也是皮肤科同道和广大卫生工作者的良师益友。本人向作者表示祝贺、敬意和谢意。

书中有个别错字,如第 39 页、第 1、2 行“无乙醇精”应为“无水乙醇”,第 16 页图 128“乳房外”应为“乳房”,希望再版时修正。

[作者单位] 第三军医大学西南医院皮肤科,重庆 400038