

蕈样肉芽肿皮损及外周血人类疱疹病毒 1、2、4、5 型 DNA 的检测

徐宏慧¹, 王官清², 何春涤¹, 王雅坤¹, 陈洪铨¹

[摘要] 目的 探讨蕈样肉芽肿与人类疱疹病毒 1 型(单纯疱疹病毒 1 型)、2 型(单纯疱疹病毒 2 型)、4 型(Epstein-barr 病毒)、5 型(人类巨细胞病毒)间有无相关性。方法 酚-氯仿法提取皮肤组织(蕈样肉芽肿 32 份、正常皮肤 29 份、慢性湿疹与慢性单纯性苔藓 24 份)及外周血白细胞(蕈样肉芽肿 15 份、健康献血员 40 份、慢性湿疹与慢性单纯性苔藓 11 份)中基因组 DNA。采用聚合酶链反应技术检测病毒 DNA, 扩增产物回收后以限制性内切酶 BamH iv、Sma iv 酶切鉴定。结果 蕈样肉芽肿皮损及外周血中, 各有 2 份检测到人类疱疹病毒 1 型 DNA; 蕈样肉芽肿皮损中有 5 份存在人类疱疹病毒 4 型 DNA; 健康献血员外周血以及正常皮肤、慢性湿疹与慢性单纯性苔藓患者皮损组织及外周血中未检测到此 4 种病毒 DNA。结论 蕈样肉芽肿与人类疱疹病毒 1、2、4、5 型间可能不具有相关性。

[关键词] 蕈样肉芽肿; 人类疱疹病毒; 聚合酶链反应

[中图分类号] R 739. 5; R373. 1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001- 7089(2004)02- 0077- 03

Detection of Human Herpesviruses 1, 2, 4 and 5 DNA in Lesional Skin and Peripheral Blood of Granuloma Fungoides

XU Hong-hui, WANG Guan-qing, HE Chun-di, et al

(Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shengyang 110001, China)

Abstract: Objective To evaluate the correlation between granuloma fungoides(also called as mycosis fungoides, MF) and human herpesvirus 1(Herpes simplex virus 1, HSV-1), 2(HSV-2), 4(Epstein-bar virus, EBV) and 5(human cytomegalovirus, HCMV). **Methods** Thirty-two lesional skins and fifteen peripheral blood samples of MF, as well as forty peripheral blood specimens from healthy blood donors and twenty-nine normal skin samples were studied. Twenty-four skin lesions and eleven peripheral blood samples of lichen simplex chronicus and chronic eczema were used as controls. Human genomic DNA isolation was carried out by using phenol-chloroform procedure. Polymerase chain reaction(PCR) was performed to detect specific DNA fragments of the four types of human herpesviruses. The amplified products were analysed by digestion with restriction endonuclease BamH iv and Sma iv. **Results** HSV-1 DNA sequences were found in two of thirty-two lesions(2/32) and two of fifteen peripheral blood samples(2/15) of MF respectively. EBV DNA were detected in five of thirty-two lesional skins(5/32) of MF, but not in the peripheral blood samples. No viral DNA was detected in skin samples and peripheral blood of the control subjects. **Conclusion** Our data suggested that there might be no correlation between MF and HSV-1, HSV-2, EBV and HCMV.

Key words: Granuloma fungoides(MF); Human herpesvirus; Polymerase chain reaction

蕈样肉芽肿曾称蕈样霉菌病(mycosis fungoides, MF), 是原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤的一种类型, 病因不清。Resnic 等^[1]在 1984 年报道 1 例 MF 患者病灶中虽未分离出单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus-1, HSV-1), 但阿昔洛韦治疗后, 溃疡及肿瘤相继消退, 提示 HSV-1 可能与 MF 有关。Epstein-Barr 病毒(EBV)与 Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌有关。有报道 EB 病毒可能与 MF 有关^[2], 但 MF 与此病毒的关系尚无定论。为了探讨 MF 与人类疱疹病毒之间是否存在相

关性, 本研究应用 PCR 方法检测 MF 患者皮损及外周血中是否有 HSV-1、HSV-2、EB 病毒及人类疱疹病毒 5 型(human cytomegalovirus, HCMV) DNA, 并以限制性内切酶 BamH iv、Sma iv 鉴定。

1 材料和方法

1.1 病例资料

1.1.1 病例组 32 份皮损和 15 份外周血标本均来自我院皮肤科门诊和病房经临床和病理确诊的 33 例 MF 患者, 病程 2 个月~ 30 年; 男 24 例, 女 9 例, 年龄 27~ 84 岁, 平均 55.09±14.68 岁。

1.1.2 正常对照组 正常皮肤来自 29 例行整形外科手术的健康人, 男 13 例, 女 16 例, 年龄 13~ 56 岁, 平均 43.86±19.61 岁; 正常外周血标本来自 40 例我院健康献血员, 男 23 例, 女 17 例, 年龄 20~ 48 岁, 平均

[基金项目] 辽宁省教育厅高等学校科学研究项目(攀登计划 20121030)

[作者单位] 1 中国医科大学第一临床学院皮肤科, 辽宁 沈阳 110001; 2 厦门大学医学院皮肤性病学科教研室, 福建 厦门 361005

[作者简介] 徐宏慧(1975-), 女, 辽宁鞍山市人, 医学硕士, 医师, 研究方向为某些皮肤病与疱疹病毒的关系。

30.50 ± 11.75 岁。

1.1.3 其它皮肤病对照组 24 份皮损和 11 份外周血来自 13 例慢性湿疹、11 例慢性单纯性苔藓患者,男 13 例,女 11 例,年龄 23~84 岁,平均 54.37 ± 15.02 岁。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用酚-氯仿法提取皮损组织及外周血白细胞中基因组 DNA, TE 缓冲溶液,以紫外分光光度计测定浓度和纯度后, -20℃ 保存。

1.2.2 PCR 采用人类 β-球蛋白(β-globin) 基因作内对照,以引物 PC 03/PC04^[3] 扩增,PC 03 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GG-3', PC 04 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CG-3', 产物长度 110 bp, 以检验 DNA 质量并排除 PCR 抑制因素,阳性标本入选本实验。采用 HSV-1 型、2 型、EB 病毒、HCMV 通用引物^[4], 上游引物 5'-CGA CTT TGC CAG CCT GTA CG-3', 下游引物 5'-AGT CCG TGT CCC CGT AGA TG-3', 4 种病毒扩增后产物长度分别为 518 bp、518 bp、524 bp 和 589 bp。所用引物均由 TaKaRa 公司合成。

PCR 反应采用 25 μl 反应体系,其中含基因组模板 DNA 1 μl(0.1 μg), 10 × PCR 缓冲液 2.5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μl, dNTPs 2.5 μl(各 2.5 mmol/L), rTaq DNA 聚合酶 0.13 μl(5 u/μl, TaKaRa 公司), 引物各 1 μl(20 μmol/L), 上述为 TaKaRa 产品。反应条件如下: 94℃ 2 min, 循环 1 次; 94℃ 1 min, 62℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 35 次; 72℃ 5 min。阳性对照采用 HSV-1 感染的细胞系(中国医科大学病原微生物学教研室赵玉坤教授惠赠)及 EB 病毒、HHV-8 共感染的 BG-1 细胞系中提取的 DNA(美国疾病预防控制中心 Ir-oue 博士惠赠); 空白对照为反应体系中不加 DNA 模板,代之以去离子蒸馏水。取反应产物 5 μl 进行 1.5% 琼脂糖凝胶(Promega 公司)电泳。

1.2.3 阳性片段回收及限制性内切酶酶切鉴定 阳性 PCR 产物用 DNA 片段回收试剂盒(TaKaRa 产品)回收。主要步骤如下: 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后切取阳性片段, NaI 溶液溶解, 硅胶树脂吸附, 洗涤后 TE 缓冲液溶解。回收后的产物用限制性内切酶 BamH I、Sma I(Gibco 公司)消化,在 20 μl 酶切反应体系中加入回收产物 5 μl, 缓冲液 2 μl, 去离子蒸馏 13 μl, Pst I 10 u。酶切反应产物再作 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.4 统计学分析 采用 SAS 软件计算确切概率 P。

2 结果

2.1 PCR 检测结果 见图 1。7 份 MF 皮损及 2 份外

周血标本中扩增出 520bp 左右的片段;慢性湿疹及慢性单纯性苔藓中无阳性片段; HSV-1、BG-1 细胞系 DNA 均扩增出 520 bp 左右的片段;空白对照阴性。



M 为 DNA marker; 1 为 HSV-1; 2 为 BG-1; 3 为空白对照; 4~8 为部分 MF 皮损; 9~13 为部分 MF 外周血

图 1 部分 MF 皮损及外周血中 HSV-1、EB 病毒 DNA PCR 检测结果

2.2 限制性内切酶酶切结果 见图 2。所有阳性产物回收后,限制性内切酶 BamH I、Sma I 消化,2 份 MF 皮损(2/32, 6.3%)及 2 份 MF 外周血(2/15)中扩增产物可被 Sma I 切成 476 bp 和 42 bp 两段,不被 BamH I 切断,证实为 HSV-1 DNA; 另外 5 份 MF 皮损(5/32, 15.6%)的扩增产物分别被 BamH I 和 Sma I 切成 247 bp、277 bp 和 100 bp、424 bp,证实为 EB 病毒 DNA。



M 为 DNA marker; 1、2 为 HSV-1(Sma I、BamH I); 5、6 为 BG-1(Sma I、BamH I); 3、4、7、8 为部分 MF 皮损(Sma I、BamH I)

图 2 部分 PCR 产物的 BamH I、Sma I 酶切结果

2.3 统计学分析结果 MF 皮损、外周血中 HSV-1 DNA 检出率与正常皮肤、献血员外周血相比, P 值分别为 0.493、0.707, 差异均无显著性;与其它皮肤病对照组的皮损、外周血相比, P 值分别为 0.501、0.492, 差异亦无显著性; MF 皮损中 EBV DNA 的检出率与正常皮肤、其它皮肤病对照组的皮损相比, P 值分别为 0.054、0.064, 差异也无显著性。

3 讨论

MF 的病因至今尚未完全阐明,有研究提出 MF 可能是慢性抗原刺激的结果,病毒被认为是可能的抗原之一^[5]。

Lee 等^[6]及 Duvic 等^[7]报道在 MF 皮损中已发现 HSV 特异性抗原和 DNA,认为 HSV-1 可能与 MF 皮

损的发生有关。但 Brice 等^[8]用 PCR 方法在 29 例 MF 患者皮损中未检测到 HSV、EB 病毒,不支持二者在 MF 发生中起作用。HSV 主要以上皮细胞和神经细胞为靶细胞,而不是淋巴细胞,但鉴于 MF 是一种亲表皮的淋巴瘤,因此有必要探讨 HSV 在 MF 发生和进展中的作用。我们采用 PCR 方法检测了 32 份 MF 皮损及 15 份外周血标本,各有 2 份检测到 HSV-1 DNA (皮损及外周血中无同时阳性者),而正常对照组及其它皮肤病对照组的皮肤标本及外周血中均未发现 HSV-1 DNA。统计学分析差异无显著性,表明 MF 与 HSV-1 之间不具有相关性。EB 病毒是第一个被认为与人类恶性肿瘤有关的病毒。EB 病毒具有嗜 B 淋巴细胞性,但近来有血清学资料^[9]提示 EB 病毒可能作为抗原,促成 T 细胞淋巴瘤/MF 发生,但尚有争议^[10]。目前认为 EB 病毒可能通过外膜蛋白 gp350/220 角质形成细胞表面表达的 CR2(CD21) 同系物受体^[11]而进入细胞,活化的角质形成细胞产生原位细胞因子(IV11a, IV16, TNF- α),引起 CD4⁺ T 淋巴细胞活化、增殖及真皮内浸润。我们用 PCR 方法在 15.6% (5/32) MF 皮损中检测到 EB 病毒 DNA,而正常皮肤及献血员外周血中均无 EBV DNA 检出,统计学分析显示差异无显著性,提示 MF 与 EB 病毒之间不具有相关性。

总之,虽然本组 MF 标本中检测到 HSV-1、EBV DNA 片段,但统计学分析差异无显著性,结果提示 MF 与 HSV-1 及 EB 病毒之间可能不具有相关性;所有 MF 标本中均未检出 HSV-2 和 HCMV DNA,提示 MF 与 HSV-2、HCMV 间可能无相关性。

[参 考 文 献]

[1] Resnic K, Kushner NS, Horwitz SN, *et al.* Remission of tumor stage

mycosis fungoides following intravenously administered acyclovir[J]. JAMA, 1984, 251(12): 1571-1573.

[2] Lee PYP, Charley M, Tharp M, *et al.* Possible role of Epstein-Barr virus in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary syndrome[J]. J Invest Dermatol, 1990, 95: 309-312.

[3] Saiki RK, Scharf F, Faloan F, *et al.* Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. Science, 1985, 230: 1350-1354.

[4] Rozenberg F, Lebon P. Amplification and characterization of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(11): 2412-2417.

[5] Pancake BA, Zucker FD, Coutavas EE, *et al.* The cutaneous T-cell lymphoma, mycosis fungoides is a human T-cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients[J]. J Clin Invest, 1995, 95: 547.

[6] Lee LA, Huff JC, Edmond BJ, *et al.* Identification of herpes simplex virus antigens and DNA in lesions of mycosis fungoides[J]. J Invest Dermatol, 1983, 80: 333.

[7] Duvic M, Magee K, Storthz KA. In situ hybridization for herpes simplex virus in mycosis fungoides and alopecia areata[J]. J Invest Dermatol, 1989, 92(3): 432.

[8] Brice SL, Jester JD, Friednash M, *et al.* Examination of cutaneous T-cell lymphoma for human herpesviruses by using the polymerase chain reaction[J]. J Cutan Pathol, 1993, 20: 304-307.

[9] Jumbo O, Mollat C, Guyen JMN, *et al.* Increased Epstein-Barr virus antibodies in epidemic cutaneous T-cell lymphoma: a study of 64 patients[J]. Br J Dermatol, 1997, 136: 212-216.

[10] Nagore E, Ledesma E, Collado C, *et al.* Detection of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 7 and 8 genomes in primary T- and B-cell lymphoma[J]. Br J Dermatol, 2000, 143: 320-323.

[11] Kieff E, Liebowitz D. Epstein-Barr virus and its replication[M]. In: Fundamental Virology, 2nd ed. New York: Raven Press, 1991. 897-928.

[收稿日期] 2003-04-16 [修回日期] 2003-10-08

• 启事 •

《中国医学文摘·皮肤科学》征订启事

《中国医学文摘·皮肤科学》是国家科委批准的卫生部医学情报管理委员会所辖的《中国医学文摘》系列刊物之一,属国家级医学情报检索期刊,收录国内外公开发行的 240 种学报和杂志中关于皮肤科学领域的文章。本刊覆盖面大、时差短、选材新、内容集中、信息全面,在内容上注重介绍我国皮肤科学领域中基础理论研究和对疾病防治的新成果、新经验及新方法,已成为皮肤科及其它临床科医药卫生人员,尤其是基层医务工作者全面了解国内皮肤科学动态和进展的必备参考资料。

本刊为双月刊,每册订价为 5 元,全年 30 元。全国各地邮局均办理征订,邮发代号:52-72,编辑部也可办理订购业务,并随时为读者提供邮购服务。地址:陕西省西安市兴乐里 2 号,《中国医学文摘·皮肤科学》编辑部收,邮编:710004,电话:(029)87217312, E-mail: pifucjdv@163.com。

• 告作者 •

医学文稿中统计学名词及符号书写

作者投稿时,统计学名词及符号请按国家标准 GB3358-82《统计学名词及符号》的有关规定:样本数用英小斜 n ; 样本的算术平均数用英小斜 \bar{x} , 标准差用英小斜 s , 标准误用英小斜 s_x , t 检验用英小斜 t , F 检验用英大斜 F , 卡方检验用希文 χ^2 , 相关系数用英小斜 r , 自由度用希文小写 ν , 概率用英大斜 P (P 值前应给出具体检验值如 t 、 χ^2 值等)。