·基础研究·

用 PCR 法检测唾液腺组织中 HHV-6 DNA

赵继志　沐桂藩　沈晓东　范宏宇　程效东

摘要　采用多聚酶链反应(PCR)的方法,首次对 18 例国人唾液腺组织标本中人类疱疹病毒 6 型(HHV-6)特异 DNA 序列进行了检测。结果腮腺组织 8 例阳性(8/9),颌下腺组织 5 例阳性(5/7),舌下腺组织 1 例阳性(1/2)。提示唾液腺可能是 HHV-6 的主要潜伏部位之一,唾液可能是该病毒的传播媒介。

关键词　人类疱疹病毒 6 型　唾液腺　多聚酶链反应

人类疱疹病毒 6 型(HHV-6)是 1986 年美国学者 Salahuddin 等[1] 从淋巴组织增生性疾病患者的外周血淋巴细胞中分离出的一种新型人类疱疹病毒。已有研究提示该病毒可能通过唾液传播,而唾液腺可能是其潜伏感染的部位。为验证这一假说,我们采用多聚酶链反应(PCR)的方法,首次对国人唾液腺组织中 HHV-6 特异 DNA 序列进行了检测。

1　材料和方法

1.1　主要仪器和试剂

美国产 PTC-100™型 PCR 自动扩增仪。引物 1:5′-GATCCGACGCCTACAAACAG-3′,引物 2:5′-CG-GTGTCACACAGCATGAACTCTG-3′,由中科院微生物所合成。Taq DNA 聚合酶购于中国科学院遗传所。含有 HHV-6 特异皮质层蛋白基因片段(约 830 bp)的质粒 pHC5 作为阳性模板,由法国巴黎巴斯德研究所 Helene Collandre 教授惠赠。

1.2　组织病理材料

采用北京协和医院口腔颌面外科成人患者手术切除标本 18 例,包括腮腺组织 9 例(良性肿瘤 6 例,恶性肿瘤 3 例),颌下腺组织 7 例(结石、炎症 5 例,良性肿瘤 2 例)及舌下腺组织 2 例(正常组织及良性肿瘤各 1 例)。全部标本均经病理学确诊。

1.3　组织 DNA 的提取

用冰冻切片机切取融冻组织 5～10 片(每片厚 10 μm)置于 1.5 ml Eppendorf 管中,加 TE(pH7.4) 200 μl,混匀后入 75 ℃水浴 20 min。取出后加蛋白酶 K 溶液 8 μl(10 mg/ml),在 55 ℃恒温水浴中消化 2 h。取出后加等体积饱和酚,振荡,以 12000 rpm 离心 5 min,取上层水相,加等体积氯仿后混匀,再以 12000 rpm 离心 5 min。取上层水相,加 1/10 体积 3 mol/L NaAc,混匀,再加 2 倍体积无水乙醇,在 -20 ℃冰箱放置 2 h。以 12000 rpm 离心 20 min,沉淀 DNA。弃上清液,加 2～4 倍 70 %冷乙醇漂洗,在 37 ℃温箱放置 15 min 以上,挥发乙醇。每管加 TE(pH7.6～8.0) 50 μl,反复吸打,溶解沉淀的 DNA。

1.4　多聚酶链反应

于 0.5 ml Eppendorf 管中依次加入终浓度为 50 μm dNTPs,两个引物各 50 pmol,1 ×反应扩增缓冲液,0.01～0.1 ng 质粒或 5 μg 组织 DNA,补充灭菌双蒸水,使反应终体积达到 50 μl。于 PCR 仪上 96 ℃变性 5 min,加 1.5 U Taq DNA 聚合酶,混匀后加石蜡油封闭反应体系。再上 PCR 仪,94 ℃变性 50 s,55 ℃退火 50 s,70 ℃延伸 1.5 min,循环往复 30 次,最后一次延伸 8 min。扩增后作 1 %琼脂糖凝胶电泳,观察在 830 bp 处出现的 DNA 扩增带。

2　结　　果

以 Lamda DNA Hind Ⅲ作为标准参照物,以 pHC5 作为阳性对照。作 1 %琼脂糖凝胶电泳,在 830 bp 处出现扩增带者为阳性。结果 9 例腮腺标本中 8 例阳性(88.9 %),7 例颌下腺标本中 5 例阳性(71.4 %),2 例

作者单位:100730　中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院口腔科(赵继志,沈晓东),基础医学研究所(沐桂藩,范宏宇,程效东)

舌下腺标本中 1 例阳性(50 %) ,总阳性率为 77.8 %。其中 3 例腮腺恶性肿瘤中 1 例阳性。见附表及附图。

附表　唾液腺组织中 HHV-6 DNA 检测结果

检测组织	例数	阳性数	阳性率(%)
腮　腺	9	8	88.9
颌下腺	7	5	71.4
舌下腺	2	1	50.0
合　计	18	14	77.8

3　讨　　论

自从 1986 年首次分离出 HHV-6 以来 ,人们一直试图找到其感染的传播途径和病毒活化或潜伏感染的部位。由于唾液中 HHV-6 的分离率较高 ,使得唾液和唾液腺成为人们注意的焦点[2]。Fox[3] 及 Krueger[4] 两个研究小组分别采用免疫组化染色和核酸分子杂交技术在唾液腺组织中检测到 HHV-6 抗原及其特异 DNA。但是 , Green 等[5] 却未能在石蜡或冰冻切片中重复上述结果 ,并且对他们所采用的实验技术提出了质疑。本研究采用 PCR 方法在成人唾液腺组织冰冻标本中检测出 HHV-6 特异 DNA 片段 ,且阳性率很高(77.8 %) ,从而证实唾液腺中该病毒的存在。由此提示唾液腺可能是 HHV-6 的主要潜伏部位之一 ,唾液可能是该病毒的传播媒介。除唾液腺外 ,支气管腺、外周血淋巴细胞、肾脏、淋巴结等处都曾被检测出 HHV-6。因此 ,对于该病毒确切的潜伏部位尚不完全清楚 ,不能排除多器官多部位潜伏感染的可能。

用 PCR 法检测病毒基因组 DNA 的最大优点是其具有高度敏感性 ,它能在大量宿主核酸存在的条件下特异地扩增出病毒 DNA 序列 ,而引物对病原体的高度专一性是特异 PCR 扩增的关键。本研究采用的一对引物是由 Collandre[6] 根据编码 HHV-6 皮质层蛋白基因的序列设计的 ,已被证明具有 HHV-6 的特异性。

HHV-6 与疾病的关系是人们极为关注的另一焦点。近十年来的研究表明 ,与 HHV-6 感染相关的疾病多达十几种(包括婴幼儿急疹、艾滋病、肝炎、淋巴瘤等) 。但目前只有婴幼儿猝发疹(exanthema subitum) 被确认与 HHV-6 感染直接相关。值得注意的是 ,有人报告在伴有 Sjögren's 综合征的淋巴瘤组织中检测到 HHV-6 特异 DNA 序列[7]。Sjögren's 综合征的病理特征之一是唾液腺和泪腺淋巴细胞弥漫性浸润 ,而这与该病患者腺体发生淋巴瘤的危险性高于正常人相关。这是否提示 HHV-6 在腮腺内的表达对某些淋巴瘤具有病因学作用 ? 最近 , Yadav 等[8] (1994) 报告 ,在口腔癌组织中 HHV-6 DNA 及其抗原有较高检出率 ,这又是否提示 HHV-6 同人类单纯疱疹病毒和乳头状瘤病毒一样 ,与口腔癌的发病相关 ? HHV-6 与口腔粘膜癌前病变、唾液腺等病的关系又如何 ? 值得深入研究。

(本文图见中心插页 9)

4　参考文献

1　Salahuddin SZ, Ablashi D, Markham P, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science, 1986;234:596

2　赵继志综述. 新型人类疱疹病毒与唾液及唾液腺. 国外医学口腔医学分册, 1995;22(2):82

3　Fox JD, Briggs M, Ward P, et al. Human herpes virus 6 in salivary glands. Lancet, 1990;336:590

4　Krueger GRF, Wasserman K, DeClerck LS, et al. Latent herpes virus-6 in salivary and bronchial glands. Lancet, 1990;336:1255

5　Green M, Sviland L, Taylor CE, et al. Human herpes virus 6 and endogenous biotin in salivary glands. J Clin Pathol, 1992;45:788

6　Collandre H, Aubin JT, Agut H, et al. Detection of HHV-6 by the polymerase chain reaction. J Virol Methol, 1991;31(2～3):171

7　Jarrett R, Gledhill S, Qureshi F, et al. Identification of human herpesvirus 6 specific DNA sequences in two patients with non-Hodgkins lymphoma. Leukemia, 1988;2:496

8　Yadav M, Chandrashekran A, Vasudevan DM, et al. Frequent detection of human herpesvirus 6 in oral carcinoma. J Natl Cancer Inst, 1994;86(23):1792

(1996 - 03 - 06 收稿)

Detection of Human Herpesvirus 6 (HHV-6) DNA by the Polymerase Chain Reaction (PCR) in Salivary Glands

Zhao Jizhi , Shen Xiaodong

Department of Stomatology , Peking Union Medical College Hospital

Mu Guifan , Fan Hongyu , Cheng Xiaodong

Institute of Basic Medical Science , Chinese Academy of Medical Sciences

Abstract

To assess the presence of HHV-6-specific DNA in human salivary glands , eighteen specimens of salivary gland tissue were investigated using the polymerase chain reaction. Eight of nine parotid glands , five of seven submandibular glands and one of two sublingual glands showed positive. The findings suggest that salivary gland tissue is one of the potential sites for HHV-6 persistence following primary infection and saliva is a vehicle for transmission of the virus.

Key words : human herpesvirus 6 salivary gland polymerase chain reaction

---

上颌骨尤文氏肉瘤一例报道

石 冰 余少秋

发生于上颌骨尤文氏肉瘤较为罕见 ,作者近期收治一例 ,特报道如下。

患儿:王某 ,女 ,8 岁。20 余天前偶然发现右面部包块 ,胡豆大小 ,无痛 ,包块进行性长大。外院穿刺活检诊断为“横纹肌肉瘤 ”,转送我院。

检查:右面眶下区 5 cm ×4 cm 大小质软包块 ,边界欠清 ,基底固定 ,无压痛。表面皮肤无异常 ,张闭眼及张口度正常 ,无鼻塞。口内右上颌口腔前庭粘膜处可清楚扪及该包块 ,动度差 ,与颌骨粘连。腭部及颈部无异常 ,无牙松动及叩痛等。上颌骨华氏位、侧位及胸部 X 线片未见异常。穿刺活检示小圆细胞恶性肿瘤。活检 ,经免疫组化染色诊断为骨外尤文氏肉瘤。

治疗:行右面部肿瘤切除术 ,右上颌骨次全切除术。术中发现肿瘤累及上颌骨前壁并粘连 ,骨质破坏 ,上颌窦粘膜正常。手术切除肿瘤及上颌骨前壁和颧突 ,刮除上颌窦粘膜。术后辅以化疗和放疗。

术后病检 ,诊断为尤文氏肉瘤。

讨论 尤文氏肉瘤极少见 ,多发生于 3～20 岁。来源于骨髓内血管内皮细胞 ,多发生于四肢长管状骨 ,而颌骨及椎骨极少见。常表现为局部疼痛及肿块 ,恶性程度高 ,发展迅速。早期发生骨脑肺等转移。X 线片特征为溶骨性病灶 ,伴骨膜反应性增生 ,呈葱皮状表现。诊断较困难。本例临床表现及 X 线片检查极不典型 ,经特殊染色病检才诊断为尤文氏肉瘤。尤文氏肉瘤可采用放疗和化疗及手术治疗 ,但单一治疗效果不理想。

参考文献

1 李 振主编. 恶性肿瘤的化疗与免疫治疗. 北京:人民卫生出版社 ,1990

2 汤钊猷主编. 现代肿瘤学. 上海:上海医科大学出版社 ,1993

3 李树玲主编. 头颈肿瘤学. 天津:天津科学技术出版社 ,1993

(1996 - 03 - 27 收稿)

作者单位:610041 华西医科大学附属口腔医院