

· 临床论著 ·

疱疹病毒感染与特发性肺纤维化关系的分子生物学证据

李海静 汤一苇

【摘要】 目的 探讨疱疹病毒感染和特发性肺纤维化(IPF)的关系。**方法** 采用体外基因扩增技术检测 33 例 IPF 患者(25 例散发性和 8 例家族性)与 25 例对照组患者的肺组织人疱疹病毒及 JC、BK 病毒核酸,并经免疫组织化学、电镜检查及试验性治疗进一步确认。**结果** IPF 患者肺组织中巨细胞病毒、Epstein-Barr 病毒以及人疱疹病毒 8 型的检出率显著高于对照肺组织,IPF 患者肺组织检查到 EBV 和 HHV-8 病毒特异性抗原、直径近似于疱疹病毒的病毒样颗粒。IPF 患者肺功能试验性治疗后获得改善。**结论** 疱疹病毒感染是 IPF 发生发展过程中重要的触发因子。

【关键词】 特发性肺纤维化;人疱疹病毒;多聚酶链反应

A molecular correlation of herpesvirus infections and idiopathic pulmonary fibrosis LI Hai-jing, TANG Yi-wei. Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee 37232, USA

Corresponding author: TANG Yi-wei, Email: yiwei.tang@vanderbilt.edu

【Abstract】 Objective To test the correlation of herpesvirus infections and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Methods** We tested lung specimens from 33 IPF patients (8 familial and 25 sporadic) and 25 diseased controls for the presence of eight herpesviruses including herpes simplex virus-1, herpes simplex virus-2, varicella-zoster virus, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpesvirus (HHV)-6, HHV-7 and HHV-8 as well as polyoma BK and JC viruses using PCR along with immunohistochemistry, electronic microscopy and therapy only for experiment. **Results** CMV, EBV, and HHV-8 were found more frequently in IPF than in the controls. Two or more herpesviruses were detected in 19 of 33 (57%) IPF patients, and in 2 of 25 (8%) controls. EBV and HHV-8 antigens/particles were shown primarily in airway epithelial cells by immunohistochemistry and electronic microscopy. Pulmonary function of IPF patients have ameliorated after treatment with the anti-virus drug valacyclovir. **Conclusions** Herpesvirus could be a kind of trigger factor that causes IPF in a genetically susceptible host.

作者单位:37232 纳什维尔,美国田纳西州纳什维尔市范德堡大学医学中心

通讯作者:汤一苇 Email:yiwei.tang@vanderbilt.edu

【Key words】 Idiopathic pulmonary fibrosis; Human herpesviruses; Polymerase chain reaction

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是以弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱最终导致肺间质纤维化为特征的进行性阻塞性肺病。该病主要发生于 50 ~ 70 岁男性,估计发病率为 0.004% 左右。除了肺移植外临床尚无特异性治疗方法,一旦确诊患者通常只有 5 年左右的生存期,IPF 多为散发,但文献报道有 2% ~ 5% 的家族发病倾向^[1,2]。该病发病原因不明,但绝大多数病例的临床表现、病理生理、组织学改变以及预后颇为相近,故推测可能有一共同病因导致该病发生。有关专家曾经提出该病发生的基本假设,即某些触发因素在易感人群中引发肺部的炎症反应,从而不断刺激机体自身引起进行性肺间质纤维化^[2]。既往众多研究文献报道老龄、职业性粉尘接触、吸雪茄烟、放射线接触、结缔组织疾病、抗焦虑药物的应用等均可能是该病发生的触发因素^[3]。此外,既往已有不少研究发现一些微生物感染,包括巨细胞病毒(cytomegalavirus, CMV), EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)以及腺病毒均可能与 IPF 发展有关。Yonemaru 等^[4]研究发现 IPF 患者血清中 CMV 及 EBV 特异性抗体水平明显高于其它人群,另一临床研究则从 IPF 患者肺组织中检出较高频率的 EBV 核酸或抗原^[5],本研究拟进一步探讨疱疹病毒感染和特发性肺纤维化相关性。

资料和方法

一、资料

1. 研究对象:选择 1995 ~ 2000 年间美国田纳西州纳什维尔市范德堡大学医学中心收治的 58 例住院患者。病例组为 33 例 IPF 病例,其中 8 例为家族性,25 例为散发性。这些病例均经临床及病理学检查确诊。对照组为 25 例非炎症肺部疾病患者。

2. 标本来源:收集所有病例组和对照组肺组织,冰冻或福尔马林固定,应用 QIAamp DNA Mini Kit(美国加州 Qiagen 公司产品)萃取所有被固定标本 DNA,并进行看家基因检测^[6],以确证其质量。

二、方法

1. PCR 检查:应用多聚酶链反应-酶免疫分析技术(polymerase chain reaction-enzyme immunoassay, PCR-EIA)对萃取 DNA 作 8 种人疱疹病毒检测,它们包括单纯疱疹病毒 I 型(herpes simplex virus-1, HSV-1)、单纯疱疹病毒 2 型(herpes simplex virus-2, HSV-2)、巨细胞病毒(cytomegalavirus, CMV)、水痘带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)、EB 病毒(Epstein-Barr, EBV)、人疱疹病毒 6 型(human herpesvirus-6, HHV-6)、人疱疹病毒 7 型(human herpesvirus 7, HHV-7)与人疱疹病毒 8 型(human herpesvirus 8, HHV-8),实验所用方法、试剂参见此前文献^[7,8]。考虑到人多瘤病毒 JC、BK 病毒与一些肾脏纤维化疾病有关,我们也对 JC、BK 病毒进行了检测,实验所用所有方法、试剂均与此前相关报道相同^[9]。

2. 免疫组织化学和电镜检查:选取 1 例散发性 IPF 病史 5 年患者的肺标本,采用免疫组织化学法和电镜检查肺疱疹病毒抗原和病毒颗粒,具体方法和所采用试剂均与此前文献相同^[8]。

3. 试验性治疗:对患有早期家族性 IPF 的 1 例 46 岁男性病人进行了试验性治疗研究。该病人在诊断及随后的 2 年随访都无相应的临床症状及体征,但该病人的肺功能持续下降(图 2),为制止该患者肺功能的急剧下降,给予其 6 个月的伐昔洛韦治疗。同时,采用荧光定量 PCR 检查治疗前后患者痰标本疱疹病毒载量。

三、统计学方法

全部数据采用软件 EpiInfo 处理,组间比较采用卡方检验。当 $P \leq 0.01$ 时判定差异具有统计学意义。

结 果

一、特发性肺纤维化患者肺组织中病毒检出情况

在 33 份特发性肺纤维化肺组织中,有 32 份检出任一疱疹病毒 DNA,检出率为 97%。与其相比,25 份对照肺组织中只有 9 份检出这些病毒,检出率为 36%。经统计学检验,IPF 与对照肺组织任一疱疹病毒、两个或多个疱疹病毒以及 CMV、EBV 或 HHV-8 单个病毒检出率之间均存在显著性差别,HHV-7 在两种组织中的检出率差异无显著性。

二、IPF 患者肺免疫组织化学和电镜检查结果

免疫组织化学法检查发现:IPF 患者肺组织出现 EBV 和 HHV-8 特异性抗原。其中 HHV-8 病毒特异性抗原主要存在于血管内皮细胞胞浆中,而 EBV 病毒抗原则主要存在于呼吸道细小支气管的上皮细胞中。电镜检查发现:该患者肺间质部分出现大小与疱疹病毒近似的病毒颗粒(图 1)。

三、IPF 患者实验性治疗研究结果

该患者的肺组织中采用 PCR 法检出 EBV 和 HHV-7,其中 EBV 和 HHV-7 治疗前痰标本中的病毒载量分别为 750 ~ 10 500 和 450 ~ 2500(拷贝/ml),治疗后患者痰标本中的 EBV 消失而 HHV-7 仍然存在(表 3)相应,以用力肺活量为指标的患者肺功能的急剧下降治疗后获得了明显改善(图 2)。

表 1 IPF 组以及对照组肺组织疱疹和人多瘤病毒检出情况比较[例(%)]

	任一疱疹病毒	多个疱疹病毒	CMV	EBV	HHV-6	HHV-7	HHV-8	HSV-1	HSV-2	VZV	JC	BK
IPF 组	32(97)	19(57)	8(24)	21(64)	0(0)	13(40)	15(45)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
对照组	9(36)	2(8)	0(0)	3(12)	0(0)	6(24)	2(8)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
P 值	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.01$	-	$P > 0.05$	$P < 0.01$	-	-	-	-	-

表 2 散发性和家族性 IPF 肺组织中疱疹病毒的检出情况比较[例(%)]

	任一疱疹病毒	多个疱疹病毒	CMV	EBV	HHV-7	HHV-8
散发性 IPF	24(96)	6(64)	3(12)	15(60)	11(44)	14(56)
家族性 IPF	8(100)	3(38)	5(63)	6(75)	2(25)	1(13)
P 值	$P > 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05$

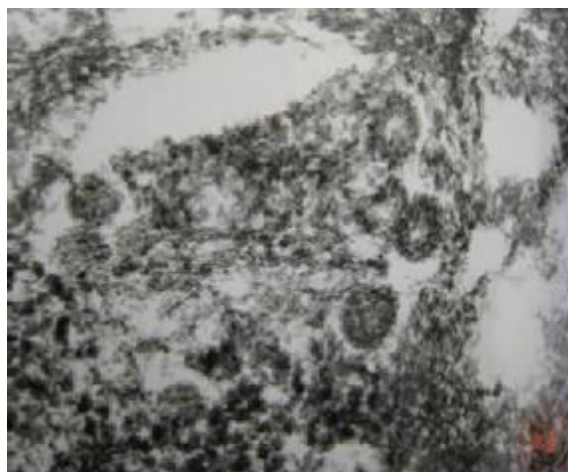


图 1 电镜下 IPF 患者肺组织间质中直径近似于疱疹病毒的病毒样颗粒

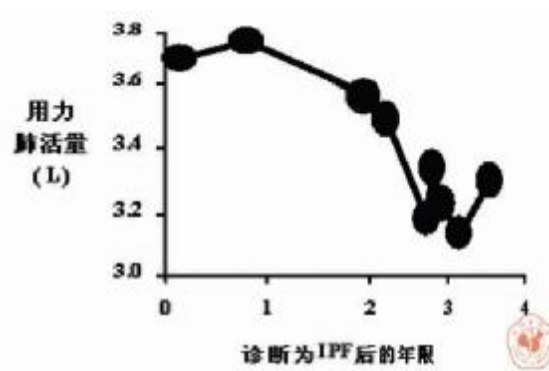


图 2 IPF 患者接受抗病毒治疗前后肺功能测定

表 3 IPF 患者痰标本中的 EBV 和 HHV-7 病毒载量

	治疗前	治疗后			
		1	3	6	9
EBV	750 ~ 10 500	<200	<200	<200	<200
HHV-7	450 ~ 2500	560 ~ 2250	340 ~ 3500	未测	1250 ~ 2750

讨 论

本研究首先通过 PCR-EIA 检测疱疹病毒及与肾纤维化相关的人多瘤 JC、BK 病毒,结果发现 CMV、EBV、HHV-8 病毒在 IPF 肺组织中检出率明显高于对照组,但两组患者肺组织均未检测到与肾纤维化有关的 JC、BK 病毒。由此初步推测,CMV、EBV、HHV-8 是 IPF 发生发展的重要触发因子,这些疱疹病毒引发的纤维化与肾纤维化的发生机制是不同的。此外,本研究发现散发性 IPF 患者肺组织单个 CMV、EBV、HHV-8 及多种疱疹病毒肺检出率均显著高于家族性,这提示散发性 IPF 的发生发展可能需要多种疱疹病毒的感染,而家族性 IPF 则可能由于其基因存在某些缺陷而对 IPF 易感,少量疱疹病毒感染即可触发 IPF 发生发展。但家族性 IPF 患者究竟是由那些遗传基因缺陷引起的?这种遗传基因缺陷导致疱疹病毒易感的具体机理是?这都是我们今后需要继续探讨的问题。

另外,本研究进一步选择 1 例散发和 1 例家族性 IPF 患者的肺标本分别进行形态学和治疗性研究。形态学研究发现:IPF 患者肺标本存在 EBV、HHV-8 特异

性抗原、直径近似于疱疹病毒的病毒样颗粒。治疗性研究发现:给予抗疱疹病毒药物伐昔洛韦 6 个月后,IPF 患者的肺功能明显改善,痰标本 EBV 病毒载量在治疗后有明显减少。这些研究进一步提示疱疹病毒感染和 IPF 的发生发展密切相关。

但疱疹病毒感染和 IPF 的发生发展究竟谁先谁后尚不清楚,所以另一种可能则是 IPF 发生导致机体抵抗力下降从而提高了肺组织继发疱疹病毒的机会,这有待后续的研究进一步阐明。

总之,本研究通过一系列研究初步发现疱疹病毒 CMV、EBV、HHV-8 和 IPF 的发生发展密切相关,抗疱疹病毒药物治疗 IPF 患者可以明显缓解症状,这一研究有助于阐明 IPF 的发病机制、有助于研究治疗 IPF 更有效的药物。

致谢 感谢美国范德堡大学 Joyce Johnson、Philip Browning、Roberto Cruz-Gervis、James Loyd 博士、美国杜克大学 Angela Davis 博士、美国国立卫生研究院 Barney Graham 博士、美国爱默生大学 Arlene Stecenko、Kenneth Brigham 博士以及美国迈阿密大学 Gary Procop 博士对该项研究工作的大力支持。另外,孟淑芳女士帮助中文输入工作,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Hunninghake GW, Kalica AR. Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151:915-918.
- 2 Ryu JH, Colby TV, Hartman TE. Idiopathic pulmonary fibrosis: current concepts. *Mayo Clin Proc*, 1998, 73:1085-1101.
- 3 Brown KK, Raghu G. Medical treatment for pulmonary fibrosis: current trends, concepts, and prospects. *Clin Chest Med*, 2004, 25:759-772.
- 4 Yonemaru M, Kasuga I, Kusumoto H, et al. Elevation of antibodies to cytomegalovirus and other herpes viruses in pulmonary fibrosis. *Eur Resp J*, 1997, 10:2040-2045.
- 5 Stewart JP, Egan JJ, Ross AJ, et al. The detection of Epstein-Barr virus DNA in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med*, 1999, 159:1336-1341.
- 6 Li H, Dummer JS, Estes WR, et al. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:187-191.
- 7 Tang YW, Rys PN, Rutledge BJ, et al. Comparative evaluation of colorimetric microtiter plate systems for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:2714-2717.
- 8 Tang YW, Johnson JE, Browning PJ, et al. Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:2633-2640.
- 9 Procop GW, Kohn DJ, Johnson JE, et al. BK and JC polyomaviruses are not associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Microbiol*, 2005, 43:1385-1386.

(收稿日期:2007-07-15)

(本文编辑:杨涤)