

## 云南省部分 HIV 感染者唾液 EBV 检出率分析

史会萍<sup>1)</sup>, 李榕<sup>1)</sup>, 段开文<sup>1)</sup>, 夏志刚<sup>1)</sup>, 高辉<sup>2)</sup>, 李承文<sup>3)</sup>

(1) 昆明医科大学附属延安医院, 昆明市延安医院口腔科; 2) 检验科, 云南昆明 650051; 3) 昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院科研科, 云南昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 探讨 HIV 感染者唾液 EB 病毒存在情况及其与免疫抑制的关系. **方法** 采用横断面研究, 利用巢氏 PCR 方法对 245 例 HIV 感染者和 30 例健康对照者唾液 EBV DNA 的存在情况进行检测, 并分析检出率与 CD4 淋巴细胞计数的关系. **结果** HIV 感染者和健康对照人群唾液 EBV 检出率分别为 82.0% 与 30.0%, 二者有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); CD4 淋巴细胞计数小于 200、200~400 和大于 400 个  $\mu\text{L}$  的患者唾液 EBV 检出率分别为 93.0%、75.8% 和 45.7%, 3 组间检出率有显著差异 ( $P < 0.05$ ); 但是否使用高效抗逆转录病毒治疗对唾液 EBV 的检出率无明显影响. **结论** HIV 感染者唾液中 EB 病毒检出率高, 与免疫指标 CD4 淋巴细胞计数水平有关.

**[关键词]** EB 病毒; 唾液; 聚合酶链反应; 人类免疫缺陷病毒

**[中图分类号]** R781.5; R373.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 06 - 0144 - 04

## Detection of Epstein-Barr Virus in the saliva of human Immunodeficiency Virus Infected Patients from Yunnan Province, China

SHI Hui - ping<sup>1)</sup>, LI Rong<sup>1)</sup>, DUAN Kai - wen<sup>1)</sup>, XIA Zhi - gang<sup>1)</sup>, GAO Hui<sup>2)</sup>, LI Cheng - wen<sup>3)</sup>

(1) Dept. of Dentistry; 2) Dept. of Laboratory Medicine, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051; 3) Dept. of Research Management, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Tumor Hospital, Kunming Yunnan 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the presence of Epstein-Barr virus (EBV) -DNA in the saliva from human immunodeficiency virus (HIV) -infected individuals and healthy controls from Yunnan. **Methods** A cross-sectional study was performed in 245 HIV-infected subjects and 30 healthy controls. EBV DNA in saliva samples was examined by nested polymerase chain reaction (PCR). Chi-square test was performed to determine the prevalence rates among groups. **Results** The detection rate of EBV in HIV-infected group and non-HIV controls were 82.0% and 30.0%, respectively. EBV detection rate in HIV-infected subjects were significantly higher than non-HIV controls ( $P < 0.05$ ). The detection rate of EBV in patients with CD4 counts less than 200 cells/ $\mu\text{L}$ , 200-400 cells/ $\mu\text{L}$  and above 400 cells/ $\mu\text{L}$  were 93.0%, 75.8% and 45.7%, There was a significant difference among them ( $P < 0.05$ ). No significant difference was observed between the groups HIV-infected subjects who were on HAART and not on HAART ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The detection rate of oral EBV in HIV is significantly higher in HIV-infected subjects than non-HIV controls, and it is related to CD4 cell level.

**[Key words]** Saliva; Epstein-Barr virus; Polymerase chain reaction; Human immunodeficiency virus

EB 病毒 (epstein-barr virus, EBV) 是一种属 主要通过唾液传播, 该病毒可侵入口咽部黏膜, 被于疱疹病毒  $\gamma$  亚科的嗜淋巴细胞双链 DNA 病毒, 认为与非何杰金氏淋巴瘤、口腔毛状白斑 (oral

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30860315, 81160135); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2008ZC146M)

**[作者简介]** 史会萍 (1983~), 女, 山西河津市人, 在读硕士研究生, 主要从事牙周病和口腔黏膜病防治研究工作.

**[通讯作者]** 李承文. E-mail:liwen211@yahoo.com.cn

hairly leukoplakin, OHL) 和鼻咽癌等有关, 其中前二者与 HIV 感染的关系密切, 是 HIV 感染和免疫状态判断方面的指标之一<sup>[1,2]</sup>, 因此探明唾液中 EBV 的分布情况成为该领域关注的重点. 本研究旨在对 HIV 感染者唾液中的 EBV 病毒存在情况进行检测, 并分析 EBV 检出率与 OHL 存在与否和主要免疫指标 CD4 淋巴细胞计数水平的关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 研究人群

本研究预先获得医院伦理委员会同意, 对每位受试者进行知情告知, 受试者自愿参与. HIV 感染者为 2008 年 12 月至 2010 年 12 月间到昆明市第三人民医院感染一科就诊的 245 例 HIV 感染患者, 年龄大于 18 岁, 男女不限. HIV 血清阳性均经云南省地州市疾病预防控制中心确认; 30 例对照人群为昆明市延安医院体检中心进行例行体检的 HIV 阴性健康者, 年龄和性别与患者组基本匹配. 在口腔治疗椅自带的光源下进行口腔检查.

### 1.2 唾液标本收集

所有受试者的唾液收集均在上午于安静的房间内进行, 用无菌容器收集无刺激自然流出的唾液 5 mL, 迅速置于冰上, 分装为 1 mL/份, 液氮速冻后  $-70^{\circ}\text{C}$  保存. 同时还收集了 HIV 感染者唾液标本收集前后 1 个月内的 CD4 细胞计数值.

### 1.3 DNA 提取和质量评价

唾液 DNA 的提取使用美国 AXYGEN 公司的 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒 (Cat No.AP-MN-BL-GDNA-250 Lot No.KC30101002 - G), 参照说明书进行. 提取的 DNA 质量和 PCR 抑制剂的排除通过扩增看家基因  $\beta$ -actin 进行, 其引物序列为 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3' 和 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3' (上海生工生物工程技术有限公司合成); 扩增产物长度 443 bp. 扩增反应条件为  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $59^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 次循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min. 只有  $\beta$ -actin 扩增阳性的唾液标本方用于分析 EBV.

### 1.4 唾液 EBV DNA 的 PCR 检测

EBV DNA 的巢氏 PCR 扩增引物设计和扩增方法参照文献进行<sup>[3]</sup>, 外侧引物为 5'-AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA-3' 和 5'-TGT GCT GGT GCT GCT GGT GG-3', 内侧引物为 5'-AAC TTC AAC CCA CAC CAT CA-3' 和 5'-TTC TGG ACT

ATC TGG ATC AT-3'. 扩增后的 EBV 目的基因终产物为 116 bp 片段. 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 主要试剂购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 其外侧引物和内侧引物 PCR 反应的退火温度分别为  $56^{\circ}\text{C}$  和  $58^{\circ}\text{C}$ . EBV 阳性对照来自临床检验已确诊的阳性标本 (鼻咽癌患者的咽拭子). 每次反应都设立阳性和阴性对照. 阴性对照以双蒸水代替标本 DNA. 扩增后的 PCR 产物在含溴化乙锭 2% 的琼脂糖中进行电泳, 在凝胶电泳成像分析系统上观察 PCR 产物.

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 统计学软件对所获得的数据进行分析. 率的比较用  $\chi^2$  检验, 当理论数  $< 1$  时, 采用确切概率法计算  $P$  值, 检验水准:  $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

### 2.1 受试人群的一般信息

本组 245 例 HIV 感染者中男女之比为 1.99:1, 年龄在 20 ~ 68 岁之间. 男性和女性的平均年龄分别为  $(35.98 \pm 10.87)$  岁和  $(33.0 \pm 10.68)$  岁. 100 例患者报告使用了高效抗逆转录病毒治疗 (HAART). 与 HIV 感染相关的高危途径中以性 (包括异性和同性) 和静脉吸毒为主, 性途径共 97 例 (39.6%), 有 4 例男性有同性恋史; 静脉吸毒途径共 107 例 (43.7%). 30 例对照人群为男性 19 例, 女性 11 例, 年龄 25 ~ 65 岁, 平均  $(33.87 \pm 9.47)$  岁.

### 2.2 HIV 感染者唾液 EBV 检出情况

巢式 PCR 检测结果显示 HIV 感染者和对照组人群唾液中 EBV 检出率分别为 82.0% 与 30.0%, 经  $\chi^2$  检验与健康对照人群有统计学差异 ( $\chi^2 = 87.005, P < 0.01$ ). HIV 感染伴和不伴 OHL 患者唾液中 EBV 的检出率分别为 90.2% 和 79.2%, 二者无统计学差异 ( $\chi^2 = 1.623, P > 0.05$ ), 伴 OHL 患者唾液 EBV 检出率与健康对照人群差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ).

### 2.3 CD4 淋巴细胞计数与唾液 EBV 检出率的关系

本组 215 例患者收集到 CD4 淋巴细胞计数值, 将 CD4 计数分为小于  $200/\mu\text{L}$ 、 $201 \sim 400/\mu\text{L}$  和大于  $400/\mu\text{L}$  三个水平, 相应的唾液 EBV 检出率分别为 93.0%、75.8% 和 45.7%, 唾液 EBV 检出与细胞免疫抑制水平 (即 CD4 淋巴细胞计数) 有关 ( $P < 0.05$ ), 见图 1.

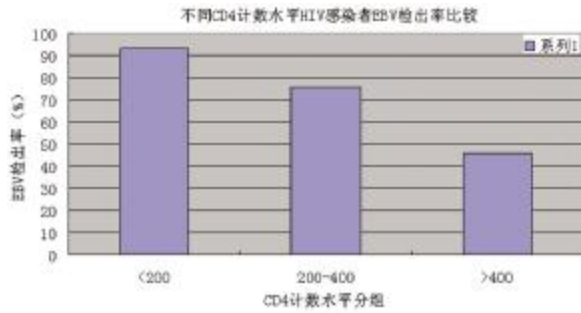


图 1 不同 CD4 计数水平 HIV 感染者 EB V 检出率比较  
Fig. 1 Different CD4 count level HIV infected people EB V detection rate compared

#### 2.4 HAART 对 HIV 感染者唾液 EBV 检出的影响

本组 HIV 感染者中 100 例使用 HAART, 145 例未使用 HAART. HAART 组 EBV DNA 的检出率为 77% (77 例), 非 HAART 组 EBV 的检出率 85.5% (124 例). 经过  $\chi^2$  检验, HIV 患者中 HAART 组与非 HAART 组唾液 EBV 病毒 DNA 的检出率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ).

### 3 讨论

在口腔颌面部 EBV 感染除与口腔毛状白斑有关, 还与牙周炎和口咽部癌等有关<sup>[4]</sup>. 对 HIV 感染者口腔 EBV 再激活的研究表明即使接受 HAART 治疗, 口腔 EBV 检出率仍较非 HIV 感染者高, 如 Miller 等<sup>[5]</sup>报道 HIV 感染者口腔 EBV 检出率高达 90%, 而健康人群仅为 48%. Carvalho 等<sup>[6]</sup>报道巴西 HIV 感染者中口腔 EBV 检出率为 48.8%, 对照组为 25.5%. 我国内地 HIV 感染者中口腔 EBV 再激活的研究此前尚无报道, 本研究结果显示为 82.0%, 健康对照为 30.0%. 之前一项来自河南的研究发现该地区 HIV 感染者组和健康对照组外周血单核细胞 (PBMCs) 中 EBV DNA 检出率分别是 35.6% 和 5.0%, 且与 CD4 计数水平有关<sup>[7]</sup>.

EBV 是 HIV/AIDS 重要的机会性病原体, HIV/AIDS 患者由于机体免疫功能受抑制, B 细胞内潜伏感染的 EBV 再活化, 导致 HIV/AIDS 患者一些特征性的机会性感染和恶性肿瘤的发生, 如口腔毛状白斑病、恶性淋巴瘤等. 应用 HAART 后, HIV 感染者 EBV 相关的恶性肿瘤的发生率明显降低, 口腔毛状白斑病的发病也有所减少. 有研究显示在 HAART 使用前, HIV-1 感染者比健康人群 PBMCs 中 EBV 基因组载量高, 另外 HIV-1 感染者增加了口咽部 EBV 的分泌量. 免疫抑制增加了一

些癌症的发生风险, 尤其是与病毒有关的恶性肿瘤, EBV 被认为在 HIV 感染者的原发性中枢神经系统非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤中起主要作用, 因为大多数此类肿瘤中可检出 EBV DNA 和病毒基因<sup>[4]</sup>. EBV 还是 HIV 感染过程中系统性非霍奇金淋巴瘤发生的联合因素. HAART 使用和抗机会性感染疾病的治疗明显提高了 HIV 感染者的生存率. Griffin 等<sup>[8]</sup>发现, 尽管 HAART 使用降低了 HIV 感染者唾液中 EBV 载量, 但其检出率无变化. 本研究结果也显示使用 HAART 和未用 HAART 的 HIV 感染者唾液 EBV 检出率无显著差异, 是否与 HAART 使用时间短有关尚待进一步研究.

外周血 CD4 细胞计数水平被认为是 HIV 感染后免疫抑制程度判断的重要指标, CD4 细胞数降低意味着机会性感染机率上升. 本研究发现随着 HIV 感染者 CD4 细胞计数降低, 唾液 EBV 检出率升高, 这和笔者过去报道的口腔毛状白斑发生率与 CD4 细胞数水平有关相一致<sup>[2]</sup>. Ling 等<sup>[9]</sup>研究表明接受 HAART 的 HIV 患者中血液和唾液 EBV DNA 载荷与 CD4 细胞计数不相关. 评价 PBMCs 中与 EBV DNA 载荷有关的 EBV 特异的 T 细胞反应而不是通过测量总的 CD4 细胞数, 可能更有助于认识 HIV 感染过程中 EBV 相关疾病的发生机制. Van Baarle 等<sup>[10]</sup>研究提示联合感染 HIV 和 EBV 的个体 HIV 特异的 CD27 T 细胞数量低, 相反 EBV 特异的 CD27/CD8 细胞数量增加. 这些研究提示病毒特异的 CD27 T 细胞在控制慢性感染方面起作用.

本研究仅分析了 HIV 感染者唾液 EBV 检出率及其与免疫抑制水平和 HAART 的关系, 未考虑口腔损害、全身情况等因素的影响. 对一些病原体来说, 量与疾病发生也有关系. 因此, 将在今后的研究中观察唾液 EBV 定量变化特点, 预期进一步认识该病毒与口腔疾病的关系.

#### [参考文献]

- [1] TUGIZOV S M, WEBSTER-CYRIAQUE J Y, SYRIANEN S, et al. Mechanisms of viral infections associated with HIV: Workshop 2B[J]. Adv Dent Res, 23(1): 130-136.
- [2] 翟维维, 陈雷, 白劲松, 等. 云南地区成年人免疫缺陷病毒感染患者口腔毛状白斑发病情况分析 [J]. 华西口腔医学杂志, 2011, 29(2): 149-152.
- [3] IMBRONITO A V, GRANDE S R, DE FREITAS N M, et al. Detection of EBV and HCMV in blood and oral samples: comparison of three sampling methods[J]. J Oral

(下转第 160 页)

由于手术原因患者的衣物大多有潮湿污染,应及时更换,避免患者热量随水份的蒸发而消失。护理、诊疗操作时尽量避免过多暴露患者身体。头部由于没有头发的保护散热较快,可戴一次性手术帽或让家属提前准备薄软帽为患者戴上保暖。足部穿上袜子,置50℃的热水袋于足底。在患者使用呼吸机期间,注意湿化温度为32℃,这样既保证了湿化又为患者加了温。当患者进食后,鼓励患者少食多餐,多进食高蛋白、高维生素、低脂易消化的食物,提供热量。

低体温是麻醉和外科围手术期常见的并发症之一,文献报道50%~70%的手术患者出现低体温<sup>[4]</sup>。应指派责任心强、经验丰富的护士进行看护。密切监测体温及时地报告严重的体温波动情

况,及时识别和治疗高危因素,防止发生体温异常。当低体温出现时,通过周详细致的护理措施是可以得到及时的纠正。

#### [参考文献]

- [1] SESSLER D I. Complications and treatment of mild hypothermia[J]. *Anesthesiology*, 2001, 95(2): 531-543.
  - [2] 安刚, 薛富善. 现代麻醉学技术[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999: 804.
  - [3] DANIELLS, MILD. perioperative hypothermia[J]. *New Engl J Med*, 1997, 24: 1730.
  - [4] 曾红, 耿启忠. 全身麻醉围手术期意外低体温2例[J]. *现代中西医结合杂志*, 2005, 14(22): 2998.
- (2012-02-14 收稿)

(上接第146页)

- Sci, 2008, 50(1): 25-31.
  - [4] SLOTS J. Oral viral infections of adults[J]. *Periodontology*, 2009, 49(1): 60-86.
  - [5] MILLER C S, BERGER J R, MOOTOOR Y, et al. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(7): 2409-2415.
  - [6] CARVALHO K S, SILVESTRE EDE A, MACIEL SDA S, et al. PCR detection of multiple human herpesvirus DNA in saliva from HIV-infected individuals in Teresina, State of Piaui, Brazil [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2010, 43(6): 620-623.
  - [7] 王传中, 陈媛媛, 何云. HIV感染者HAART后EBV变化的研究[J]. *医药论坛杂志*, 2008, 29(6): 4-7.
  - [8] GRIFFIN E, KRANTZ E, SELKE S, et al. Oral mucosal reactivation rates of herpesviruses among HIV-1 seropositive persons [J]. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80(3): 1153-1159.
  - [9] LING P D, VILCHEZ R A, KEITEL W A, et al. Epstein-barr virus DNA loads in adult human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy[J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 37(9): 1244-1249.
  - [10] SCHERRENBURG J, PIRIOU E R, NANLOHY N M, et al. Detailed analysis of Epstein-barr virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses during infectious mononucleosis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 153(2): 231-239.
- (2012-02-25 收稿)