

• 综 述 •

人类疱疹病毒 6、7、8 型实验室诊断方法的研究进展*

郑毅¹综述,赵友云^{1,2,3▲},王业富^{2△}审校

(1. 湖北中医药大学医学检验与技术系,湖北武汉 430065;2. 武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室,湖北武汉 430072;3. 湖北省中医院检验科,湖北武汉 430061)

关键词:疱疹病毒科感染; 实验室技术和方法; 诊断; 综述
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 05. 026 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)05-0573-04

疱疹病毒是一类在分子生物学和医学上有重要意义的病毒,它们是典型的双链 DNA 病毒,在自然界中分布广泛。其中人类疱疹病毒(HHV)6、7、8 型是近年来发现与幼儿急疹、移植性疾病和神经性疾病等相关的疱疹病毒。目前国内外对此 3 种病毒感染的致病机制、流行病学特征以及检测方法的研究比较活跃。疱疹病毒大约有 100 种之多,通过对各种传染性

疱疹病毒感染的临床界定和相关病毒的分离鉴定,已经证实了其中的 8 种与人类疾病相关。根据这 8 种病毒的结构、生物学性质及其致病特点等,分为 α、β、γ 3 类,见表 1。同时,又按 HSV-1、HSV-2、VZV、EBV、HCMV、HHV-6、HHV-7、HHV-8 的顺序,以 HHV-1 至 HHV-8 加以再命名。

表 1 疱疹病毒科的生物学分类

分类	种名	常用名	所致疾病
α 疱疹病毒	人类疱疹病毒 1 型(HHV-1)	单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)	龈口炎、口腔疱疹、角膜炎、疱疹性脑病、脑膜炎
	人类疱疹病毒 2 型(HHV-2)	单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)	新生儿疱疹、生殖器疱疹
β 疱疹病毒	人类疱疹病毒 5 型(HHV-5)	人巨细胞病毒(HCMV)	单核细胞增多症(传染性)、鼻咽癌、伯基特淋巴瘤
	人类疱疹病毒 6 型(HHV-6)	人疱疹病毒 6 型	幼儿急疹、玫瑰糠疹、鼻咽癌、口腔恶性肿瘤、脑脊髓炎
	人类疱疹病毒 7 型(HHV-7)	人疱疹病毒 7 型	玫瑰糠疹、玫瑰糠疹、脑炎
γ 疱疹病毒	人类疱疹病毒 4 型(HHV-4)	艾伯斯坦病毒(EBV)	先天性巨细胞包涵体病、单核细胞增多症、间质性肺炎
	人类疱疹病毒 8 型(HHV-8)	人疱疹病毒 8 型	卡波西肉瘤、获得性免疫缺陷综合症

HHV-6 是美国 Salahuddin 等于 1986 年首次从 6 名患有艾滋病(AIDS)及恶性淋巴瘤组织增生性疾病的患者的外周血单核细胞中分离出来^[1],于 1987 年定名为 HHV-6,HHV-6 被分为 HHV-6A 和 HHV-6B 2 个亚种^[2]。两个亚种在生物学、免疫学、分子生物学特征方面存在较大差异,HHV-6B 的致病性比 HHV-6A 强。HHV-7 是于 1990 年从外周血单个核细胞(PBMC)活化 CD4⁺ T 细胞中纯化分离出来。HHV-8 又名 Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus,KSHV),是 Chang 等于 1994 年用 PCR 方法从艾滋病患者合并卡波济肉瘤(KS)者的肉瘤组织中发现 KSHV DNA,后更名为 HHV-8^[3]。

HHV-6、7、8 主要与幼儿急疹、移植性疾病和神经性疾病等相关,准确的实验室诊断对治疗疾病有着重要意义。HHV-6、7、8 型的实验室诊断方法主要有培养法、血清免疫法和核酸检测法。

1 培养法

从患者标本中分离出病毒,无疑是最可靠的病原学诊断方法。但培养法操作复杂,技术要求高,费时费力、阳性率低,且分离培养成功与否影响因素较多,如采集的标本中是否含有活病毒;正确的取材、运输、保存和接种;细菌污染等。既往的 HHV-6、7 活动性感染病因学诊断方法主要为病毒分离,从活动性感染发热期的患者外周血单核细胞中进行病毒分离,需要 8~10 d,阳性率大于 90%,但进入出疹期后,阳性率变为

40%,退疹后几乎检测不到。

目前诊断 HHV-6 实验室培养检查方法主要为外周血单个核细胞(PBMC)病毒培养。该培养需要同脐带血单个核细胞一起培养,人 T 淋巴细胞系 JJhan 和 Molt 细胞经 PHA 刺激后对各种 HHV-6 分离物易感。在鉴定分离株一般用:(1)经过负染色后,电镜下可见分布于细胞核及胞浆内大小相近,形态为圆形的典型病毒颗粒。通过毒株培养的病毒检测能区分 HHV-6 的 A/B 变种,但其冗长的过程不适用于临床检测。(2)经过特异性的 PCR 扩增,可对病毒 DNA 进行鉴定。(3) HHV-6 的分离株用特异性的 PCR,通过限制性内切图谱分析,可以进一步区分 HHV-6A 和 HHV-6B。

HHV-7 的首次分离便是由学者从一个疲劳综合征患者体内的外周血单核细胞中分离出来。一般来说 HHV-7 的确诊也可采用病毒分离法,将外周血、脐带血淋巴细胞(HCBMC)或 T 淋巴细胞株刺激并加入临床标本后,9~14 d 出现细胞病变,病毒鉴定方法可用 PCR、分子杂交、限制性内切酶图谱分析等^[4]。鉴定分离株的方法一般用下列方法:(1)HHV-7 感染 CD4⁺ 细胞后,电镜下可见巨大多核合胞体细胞形成,坏死后释放大量成熟病毒颗粒。这是 HHV-7 体外有效感染的形态学标志。(2)HHV-7 的分离株用特异性的 PCR,通过限制性内切图谱分析,确定是否是 HHV-7 感染。(3)采用特异性的分子杂交技术,采用设计好的系列疱疹病毒探针如 HSV-1, HSV-2 等,与 HHV-7 DNA 无反应,HHV-7 特异性探针反应

* 基金项目:国家科技部重大专项资助(2009ZX10004-107)。 作者简介:郑毅,男,研究生在读,主要从事分子诊断研究。 △ 通讯作者, E-mail: wmlaizy@126. com。 ▲ 通讯作者, E-mail: zhaoyy206@163. com。

则为 HHV-7 感染。值得注意的是在体外培养时, HHV-7 在 SupT1 细胞株传代增殖最敏感, SupT1 是获得大量病毒用于分子遗传学、分子生物学、动物研究及免疫诊断研究的最佳细胞^[5]。从脑组织或脑脊液中分离培养 HHV-8, 其阳性率很低, 特别是在抗病毒感染治疗以后, 费时且敏感性差, 且采集样本时会增加患者痛苦。近十年来, 临床上已经不使用培养法进行 HHV-6、7、8 型的诊断, 取而代之是血清免疫学和核酸检查方法。

2 血清免疫法

HHV-6、7、8 型感染的血清学方法为病毒特异性抗原检测血清中的特异性抗体。一般来说从血清中检测疱疹病毒抗体, 可与其他病毒感染产生交叉反应, 使其诊断的敏感性和特异性大大地降低^[6]。由于许多高度保守蛋白的存在, 现阶段的血清学检测方法, 无法区分 HHV-6A 与 HHV-6B。但通过少数存在的变种特异性蛋白或多肽能区分 A/B 变种。一个阻碍血清学发展的重要因素是: 缺乏能在复发期出现在潜伏期消失的可靠抗体。

2.1 免疫荧光测定法 按照抗原抗体反应的结合步骤, 免疫荧光法可分为以下 3 种: (1) 直接免疫荧光法; (2) 间接免疫荧光法; (3) 补体法。一般来说间接免疫荧光法 (IFA) 的灵敏度要高于直接免疫荧光法, 故国内一般运用 IFA 检测疱疹病毒。其原理是用含有病毒的细胞, 体外培养并诱导出病毒的裂解状态, 使病毒在细胞膜表面表达多种病毒抗原, 与待测血清发生抗原抗体反应。同时将荧光素标记在相应的抗体上, 直接与相应抗原反应。用未知未标记的抗体 (待检标本) 加到已知抗原标本上, 在湿盒中保温, 使抗原抗体充分结合, 除去未结合的抗体后, 再加入荧光标记的抗球蛋白抗体或抗 IgG、IgM 抗体。如果发生了抗原抗体反应, 标记的抗球蛋白抗体就会和已结合抗原的抗体进一步结合, 从而可鉴定未知抗体。为了减少抗体的非特异性结合在 IFA 过程中, 可进行封闭, 能更有效地保证了检测的特异性^[7]。通常 IFA 的靶细胞: 一是表达潜伏期相关核抗原的潜伏期感染细胞, 二是经过化学诱导后表达裂解期抗原的细胞。免疫荧光法则取决于采用的是潜伏态 IFA 或裂解态 IFA。裂解态 IFA 法的假阳性高, 影响其准确性。目前中国报道的疱疹病毒流行病学研究以裂解态 IFA 法居多。

有关 HHV-6 在中国不同人群中感染的流行病学研究报道较少。既往有报道北京、广州、延边地区人群, IFA 法检测的抗体阳性率分别为 35.0%、69.3%、75.3%^[8-9]。针对 HHV-8 的 IFA 方法, 是以感染 HHV-8 的细胞 (如 BC-1、BCBL-1 等) 制备细胞涂片, 作为抗原检测血清中 HHV-8 抗体^[10]。

免疫荧光法的优点是方法简便、特异性高, 非特异性荧光染色少。缺点是敏感性偏低, 而且每检查一种抗原就需要制备一种荧光抗体。

2.2 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 特异性 IgG 和 IgM 检测是区分 HHV-6、HHV-7 和 HHV-8 潜伏感染和活性感染最为常用的指标, 其中 ELISA 检测血清抗体操作简便易行, 适于临床及一般实验室推广应用。抗疱疹病毒 IgG 主要用于流行病学研究, 由于约 5% 的成人体内 HHV-6 IgM 始终阳性, 故检验结果不能依靠 IgM 一项指标来诊断。

ELISA 方法的准确性与所选用的检测抗原以及该抗原的制备方法 (基因重组蛋白或人工合成多肽或病毒裂解产物) 有关。ELISA 方法的疱疹病毒血清学研究多选择特定抗原或完整病毒作为检测抗原, 若采用单一抗原建立 ELISA 法进行流行病学调查, 漏检率高, 因为病毒存在潜伏态、裂解态, 各表达

不同抗原, 不同抗原在感染人群中表达率、表达水平、抗原性各有差异。

孙迎娟等^[11]利用重组抗原和细胞工程抗原分别检测 HHV-7 IgM、IgG 时, 发现对于同一种免疫球蛋白, 重组抗原的特异性高于细胞工程抗原, 而敏感性则低于细胞工程抗原。

与细胞工程抗原相比, 原核表达重组抗原具有制备简易、成本较低、抗原稳定性好且易于标准化等优点, 如选择特异性高和免疫原性强的病毒蛋白作为目的蛋白, 则有望取代细胞工程抗原, 获得特异性和敏感性均较理想的抗体。单一免疫性多肽具有局限性, 选择具有特异性的几种免疫原性多肽可克服应用单一抗原的不足, 并提高诊断的敏感性和特异性。

研究表明糖蛋白 B (gB) 可以用于 HHV-7 感染的特异性 ELISA 检测。gB 在不同 HHV-7 株间高度保守, 与其他疱疹病毒糖蛋白类似, gB 能够诱导特异性免疫反应。然而在常规免疫印迹反应中, 不作为一种免疫显性蛋白出现^[12]。

2.3 免疫印迹法 (Western Blot, WB) 将蛋白质转移到膜上, 然后利用抗体进行检测。对已知表达蛋白, 可用相应抗体作为一抗进行检测, 对新基因的表达产物, 可通过融合部分的抗体检测。WB 方法具有良好的特异性, 可用于 ELISA 法初筛阳性后的确证试验。免疫印迹时存在许多技术困难, 并且作为大范围筛查工具也是不切实际, 但是在疱疹病毒诊断中, 它仍然是很有用的血清学方法。

Black 等应用上述三种免疫学方法检测 HHV-7 抗体, 对结果进行了比较, 发现 ELISA 法最为敏感 (94%), WB 法最特异 (94%)。HHV-7 感染血清学诊断存在的主要问题是特异性, 因为 HHV-7 与 HHV-6 有着广泛的同源基因, 同源率为 41%~75%, 因此某些针对一种病毒的单克隆抗体和多克隆抗体可能与另一种病毒存在交叉反应^[13-14]。

3 核酸检测法

考虑到大多数人 (>3 岁) 都有 HHV-6、-7 的感染, 那么能鉴别潜伏、激活感染的检测方法非常必要。PCR 技术在病毒的研究和临床诊断中虽已广泛应用, 但存在严重的缺陷, 如: 只能定性检测、灵敏度偏低易造成假阴性、扩增产物极易污染而产生假阳性等。HHV-6、7、8 型的特异性巢式 PCR、PCR-RFLP 及荧光定量 PCR, 已经在组织和体液的病毒检测方面发挥重要作用^[15]。

3.1 巢式 PCR 疱疹病毒是典型双链 DNA 病毒, 一般核酸检测法均通过检测病毒 DNA, 判定病毒在体内的含量, 但此法不能区分病毒是否处于潜伏、激活状态。Cuende 等^[16]研究发现健康人群中 HHV-6 病毒感染很广泛, 病毒 DNA 阳性率达 90%, 但都是处于潜伏感染状态, 并没有发生激活。

由于病毒侵染过程中产生的 mRNA 含量低且由于 RNA 的性质临床上难以提取, 普通的 RT-PCR 很难达到检测要求, 因此有学者运用巢式 RT-PCR 检测人群体内的 HHV-6 的感染状态, 结果表明健康人群体内感染的 HHV-6 病毒是处于潜伏状态, 这与理论相一致。巢式 PCR 法检测病毒的阳性率, 虽未能将潜伏性感染与活动性感染相区分, 但辅以逆转录 PCR 法, 即可检测出病毒活动性感染的情况。

巢式 PCR 取代免疫血清学方法, 其优势在于灵敏度的提高。当个体中 HHV-6 抗体滴度过低时, 血清学方法无法检出; 其次, 巢式 PCR 对病毒 DNA 的检测反应的是当前个体体内所携带的病毒情况。

3.2 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) PCR-RFLP 是采用 PCR 扩增待检测的目的 DNA 片段, 然

后目的 DNA 片段用限制性内切酶酶切,限制性内切酶识别并切割特异的序列,进而将酶切后的产物进行电泳,再由限制酶图谱(restriction map)分析此段序列的特异切位点,即由片段的多样性来比对不同来源基因序列的差异性。尚世强等建立了一种能同时检测 HCMV、EBV、HSV-1、HSV-2、VZV、HHV-6 的 PCR-RFLP 技术,用 BstUI 限制性内切酶消化扩增产物,并且能区分 6 种疱疹病毒的基因型^[17]。PCR 酶切技术虽然以其简单易行和同时检测多种疱疹病毒等特点被科研领域广泛应用,但亦免不了酶切及多次凝胶电泳的繁琐,和易污染的缺点,使其在临床常规使用时受到限制。现阶段国内尚不存在能同时检测所有人类疱疹病毒的 PCR-RFLP,考虑到此项技术需检测多个病毒,难度极大,需进一步研究。

3.3 基因芯片 基因芯片是分子杂交方法的扩展,与传统的核酸印迹方法(southern blotting 和 northern blotting 等)基本相似。它是将大量已知序列的核酸片段按设计好的排列方式固化于支持物表面,制备成芯片。待检测样品 PCR 扩增后加入荧光标记物进行标记,滴加于芯片上,使检测样品 PCR 产物与芯片充分杂交,洗脱后扫描,用图象显示杂交结果。基因芯片解决了传统核酸印迹杂交技术操作繁杂、自动化程度低、操作序列数量少、检测效率低等不足。

通常疱疹病毒基因芯片技术的靶基因是 DNA 多聚酶基因,因为它为各种人疱疹病毒所共有,在进化过程中具有保守性,且该区氨基酸序列具有一定的同源性,为 44.7%~95.0%^[18],被认为是设计引物的较理想基因区。Hudnall 等^[19]曾在此基因区设计简并引物,用于扩增 HHV-8 DNA,但需采用套式 PCR 来提高灵敏度。

虽然其敏感性略低于荧光定量 PCR,但它能在同一临床标本中同时检测出多种人疱疹病毒,既减少了样本的采集,降低了检测的成本,过程更为快捷直观,其优越性也是荧光定量 PCR 无法比拟的,在试验过程中必须设置阳性、阴性对照以克服 PCR 易污染的特点。

基因芯片技术已经取得了长足的发展,但仍然存在着许多难以解决的问题,例如技术成本昂贵、复杂、检测灵敏度较低、重复性差、分析范围较狭窄等问题。这些问题主要表现在样品的制备、探针合成与固定、分子的标记、数据的读取与分析等几个方面^[20]。

3.4 荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 通过序列特异性荧光探针以闭管模式在扩增的同时检测目标基因,从而可以增加特异性和降低交叉污染的可能性。另外,不需要进一步的下游分析,节约了凝胶电泳观察结果的时间。在实时荧光定量 PCR 中,PCR 产物累积的每个循环都被实时监控和分析,分析达到荧光阈值的循环数(Ct 值)就可以直接报告出 DNA 起始拷贝数。通过序列特异性引物和探针,实时荧光 PCR 能够有效地鉴别 HHV6、7、8^[21]。与常规的 PCR 方法相比,其优势在于:封闭的反应管分析,无需 PCR 扩增产物的后续处理和由此导致污染而产生的假阳性;对起始模板的精确定量;避免了强致癌物溴化乙锭(EB)对人体的危害和环境污染;节省了时间,提高了工作效率;更高的灵敏度和特异性。

影响荧光定量 PCR 检测 HHV6、7、8 效果的因素一般有以下几种:(1)组织标本的类型:最常检测到 DNA 的部位是唾液、血浆、尿液及外周血单个核细胞。(2)抑制 PCR 扩增的因素,如血液的抗凝方式等。(3)DNA 抽提技术:DNA 抽提的质量和效率是影响 PCR 结果的重要因素。(4)引物和探针的设计:在荧光定量 PCR 中选定保守的片段设计出合适的引物、探

针序列对实验的成败至关重要。HHV6、7、8 常用的 PCR 片段分别是聚合酶基因区 U38、U31、U10、结构磷酸蛋白 U11 基因和开放阅读框(ORF)26/72 HHV-8 DNA 水平无论在血清还是组织中均很低,故检测方法必须有很高的敏感性^[22]。荧光定量 PCR 正好解决了这一难题。

4 小 结

关于 HHV-6、7、8 的实验室诊断,现阶段基本认为:(1)由于病毒分离和抗体测定均存在不足,单个抗原检测的方法已被淘汰;由于大量的与 EBV 等病毒及其他微生物的交叉反应,裂解态抗原免疫荧光法(IFA)检测的准确性遭到普遍质疑,一般不建议用于病毒感染的初筛,而且目前有被淘汰的趋势。(2)核酸定量检测特别是荧光定量 PCR 技术近年来已得到长足发展,对疱疹病毒的检测拥有不可替代的地位。

参考文献

- [1] Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders[J]. Science, 1986, 234(4776): 596-601.
- [2] Schirmer EC, Wyatt LS, Yamanishi K, et al. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(13): 5922-5926.
- [3] Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of new herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma[J]. Science, 1994, 266(5192): 1865-1869.
- [4] 唐晓鹏, 童德军. 唾液中人类疱疹病毒 7 型的分离与培养[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(4): 226-228.
- [5] Ablashi DV, Handy M, Bernbaum J, et al. Propagation and characterization of human herpesvirus-7(HHV-7) isolates in a continuous T-lymphoblastoid cell line (SupT1) [J]. J Virol Methods, 1998, 73(2): 123-140.
- [6] Kosuge H. HHV-6, 7 and their related diseases[J]. J Dermatol Sci, 2000, 22(3): 205-212.
- [7] 刘军连, 徐志凯, 王红英, 等. 检测抗人疱疹病毒 6 型 IgG 的间接免疫荧光试验的建立及其应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(2): 181-182.
- [8] 王璐, 乌正赉. 人类 6 型疱疹病毒的血清流行病学研究进展[J]. 中华预防医学杂志, 1996, 5(3): 43-45.
- [9] 孙伟, 宋爱华, 萧俊. 广州人血清中第 6 型疱疹病毒抗体的检测[J]. 中华预防医学杂志, 1994, 28(5): 302.
- [10] Chohan BH, Taylor H, Obrigewitch R, et al. Human herpesvirus 8 seroconversion in Kenyan women by enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence assay[J]. J Clin Virol, 2004, 30(2): 137-144.
- [11] 孙迎娟, 王笑峰, 孙坚萍, 等. 酶联免疫吸附试验检测人疱疹病毒 7 型抗体的研究[J]. 检验医学, 2007, 22(1): 34-37.
- [12] Secchiero P, Berneman ZN, Sun D, et al. Identification of envelope glycoproteins H and B homologues of human herpesvirus 7[J]. Intervirology, 1997, 40(1): 22-32.
- [13] Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution[J]. Virology, 1995, 209(1): 29-51.
- [14] Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, et al. Characteristics and acquisition of human herpesvirus(HHV) 7 infections in relation to infection with HHV-6[J]. J Infect Dis, 2006, 193(8): 1063-1069.
- [15] Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in

high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4):1571-1574.

[16] Chuh AA, Chiu SS, Peiris JS. Human herpesvirus 6 and 7 DNA in peripheral blood leucocytes and plasma in patients with pityriasis rosea by polymerase chain reaction: a prospective case control study[J]. Acta Derm Venereol, 2001, 81(4):289-290.

[17] 尚世强, 董关萍, 余钟声, 等. 应用 PCR-RFLP 技术检测中枢神经系统感染患儿 6 种疱疹类病毒 DNA 的实验研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2004, 19(10):611-613.

[18] Teo IA, Griffin BE, Jones MD. Characterization of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6[J]. J Virol, 1991, 65(9):4670-4680.

[19] Hudnall SD, Chen T, Tyring SK. Species identification of all eight human herpesviruses with a single nested PCR assay[J]. J Virol Methods, 2004, 116(1):19-26.

[20] 郑之北, 俞锡林, 吴亦栋, 等. 多重 PCR——基因芯片技术检测多种人疱疹病毒[R]. 浙江: 浙江省医学病毒学、医学微生物与免疫学学术年会, 2007.

[21] Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis[J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92(7):928-932.

[22] 王慧, 惠艳, 刘涛, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应检测人类 8 型疱疹病毒载量方法的建立及其诊断应用[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(7):413-417.

(收稿日期:2012-08-20)

• 综 述 •

PEA3 亚家族在乳腺癌中的研究进展

薛成军¹, 陈治水¹, 袁 蓉¹综述, 陈 辉²审校

(1. 中国人民解放军第九十一中心医院检验科, 河南焦作 454003;
2. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

关键词: 乳腺肿瘤; 多瘤病毒增强子激活剂 3; 基因表达调控; 综述
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.027 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)05-0576-03

多瘤病毒增强子激活剂 3(Polyomavirus enhancer activator, PEA3)亚家族是 ETS(E26 transformation-specific)家族成员之一。ETS 最早是由美国 Frederick 国家癌症研究所分子肿瘤学实验室在鸟骨髓成红细胞增多症病毒 E26 的基因序列中发现的。随后, 拥有高度保守同源序列 28 个 EST 基因被发现。根据结构域中氨基酸序列的相似程度和亚群的特异性, ETS 基因家族编码的 28 种蛋白被分为 12 个亚家族。ETS 蛋白家族分子结构可分为 A、B、C 共 3 个区。A 区位于氨基末端, 在各个成员间缺乏同源性; B 区在各家族成员间仅有少量同源性; C 区位于羧基末端, 拥有一个高度保守的含 85 个氨基酸的 ETS 结合位点(ETS Binding Site, EBS), 可识别并结合富含嘌呤的 DNA 核心序列 5'-GGAA/T-3'^[1]。近十年来, 许多研究表明 PEA3 亚家族的转录因子的过表达可导致细胞的恶性转化, 增强肿瘤细胞的侵袭性和转移性; 已有动物实验证实 PEA3 亚家族与乳腺癌存在着联系。现就 PEA3 亚家族在乳腺癌中的研究进展作一综述。

1 PEA3 亚家族成员及其生理作用

PEA3 亚家族包括 3 个 ETS 转录因子。第一个被发现的是多瘤病毒增强子激活剂 3(PEA3), 也被称为腺病毒 E1A 增强子结合蛋白(E1AF), 可以被细胞中的病毒利用来完成它们自身的复制。现在, PEA3/E1AF 比较通用和合理的名字是 ETS 变体 4(ETS variant 4, ETV4)。后来, 另外两个与 ETV4 结构十分相似的 PEA3 亚家族成员, ETV1(ETS variant 5, ETV5)和 ETV5(ETS variant 5, ETV5)也相继被发现和鉴定。

ETS 转录因子家族在多种生理过程中发挥重要作用, 包括细胞的增殖分化、迁移凋亡、血管发生和器官形成等^[2]。通过对 PEA3 转录因子 mRNA 水平的分析, ETV1, ETV4 和 ETV5 在人类胚胎期和成年期的多种器官中都有不同程度的

表达^[3]。虽然 ETV1, ETV4 和 ETV5 经常存在重叠表达的情况, 但是它们在一些特定组织中的 mRNA 水平存在很大差异。由此可见, PEA3 亚家族成员可能存在不同的调节机制并执行不同的生理功能。有研究发现, PEA3 亚家族能促进上皮细胞出芽并进一步形成脉管样结构, 并通过一个复杂的通路与周围的组织间质产生相互作用^[4]。Chotteau-Lelievre 等^[5]研究了 ETV1, 4, 5 从小鼠胚胎 9.5 d 到出生时的表达规律, 认为它们在胚胎发育中, 尤其是在需经历上皮-基质相互诱导转化的一些器官的发育中扮演了重要角色。

2 PEA3 亚家族在乳腺癌中的过表达及其与 HER2/neu 关系

第一次发现 PEA3 亚家族与乳腺癌有关是通过转基因鼠乳腺癌的研究, 发现 ETV4 的过表达可产生致癌作用。有研究显示, ETV1 的下调可使植入裸鼠腹腔内的人类乳腺癌细胞增殖水平降低^[6]。在 Firlej 等^[7]的研究中, 对 ETV4 和 ETV5 表达的抑制可以减慢肿瘤的增殖和转移; 反之, 如果上调它们的表达, 也可能对乳腺组织产生致癌作用。这些研究表明 PEA3 亚家族在乳腺癌的形成和转移中可能起到关键的作用。

HER2/neu 属于表皮生长因子受体家族, 并在人类 20%~30% 的乳腺癌中存在过表达^[8]。已有研究证实 HER2/neu 与乳腺癌的发生、转移和药物抵抗相关联, 并且阻滞 HER2/neu 表达的药物曲妥珠单抗可以明显改善乳腺癌患者的预后。在 HER2/neu 转基因鼠的研究中, PEA3 亚家族的两个转录因子在 mRNA 水平上都有上调, 提示它们可能是 HER2/neu 蛋白的下游效应因子^[11]。有研究显示, 在乳腺癌的分级及预后分析中, ETV4 过表达与 HER2/neu 的过表达存在正向关联^[12]。但 Xia 等^[9-10]报道, ETV4 的表达与 HER2/neu 在乳腺癌中没有关联或成反向关联^[13]。这也许因为 ETV4 与 HER2/neu 的表达都有多个基因参与调控, 在乳腺癌发展的不同阶段, 参与