

人脑肿瘤猴病毒 40 的感染状况及来源研究

步星耀 章翔 张旭 易声禹

【摘要】 目的 探讨人脑肿瘤猴病毒 40(SV40)的感染状况及来源。方法 采用聚合酶链反应(PCR)和斑点杂交方法,检测人脑肿瘤组织 516 份,健康人外周血 80 份,精液 50 份,人胚胎组织 100 份,正常人脑组织 30 份以及 SHG44 和 BT325 两株人脑胶质瘤细胞系中 SV40 的 DNA 序列。结果 人脑肿瘤组织 SV40 DNA 阳性率为 36.4%(188/516);健康人外周血 16.3%(13/80);精液 22.0%(11/50);人胚胎组织 8.0%(8/100);正常人脑组织 6.7%(2/30)。SHG44 及 BT325 两株细胞中也分别检测出 SV40 的 DNA 序列。人脑肿瘤组织、健康人外周血及精液与健康人脑组织及人胚胎组织阳性率相比,差异有显著性($P < 0.05$)。结论 ①人脑肿瘤有较高的 SV40 感染率;②SV40 与人脑肿瘤的发生有密切关系;③SV40 可能通过水平和垂直两种途径在人群中传播。

【关键词】 脑肿瘤;猴病毒 40;聚合酶链反应;斑点杂交

A study of simian virus 40 infection and its origin in human brain tumors BU Xingyao*, ZHANG Xiang ZHANG Xu, et al. *Department of Neurosurgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

【Abstract】 Objective To study the status of simian virus 40 (SV40) infection and its origin in human brain tumors. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) and Dot blot hybridization were used to detect SV40 DNA sequences in 516 human brain tumor tissues, 80 peripheral blood cells and 50 sperm fluids from healthy individuals, 100 human embryo tissues from artificial abortion, 30 normal brain tissues and two human glioma cell lines: SHG44 and BT325. **Results** SV40 DNA sequences were found in 36.4% of human brain tumors (188/516), 16.3% of healthy peripheral blood cells (13/80), 22.0% of healthy semen (11/50), 8.0% of human embryo tissues (8/100) and 6.7% of normal brain tissues (2/30). SV40 DNA sequences were also detected in SHG44 and BT325 cell lines. The positive rates of SV40 DNA in human brain tumors, peripheral blood cells and semen from healthy donors were significantly higher than those in human normal brain and embryo tissues ($P < 0.05$). **Conclusions** ①SV40 has a higher infection rate in human brain tumors, ②SV40 is closely related to the etiopathogenesis of human brain tumors, ③the ways of SV40 spread may due to both horizontal and diaplacental infections in human population.

【Key words】 Brain tumors; Simian virus 40; Polymerase chain reaction; Dot blot hybridization

猴病毒 40(simian virus 40, SV40)是乳多空病毒科多瘤病毒属双链 DNA 肿瘤病毒,可诱发多种动物多个部位或器官产生肿瘤,体外可使动物和人正常细胞发生恶性转化,对脑组织有嗜性,并在人脑的多种肿瘤组织检测到其相关核苷酸序列^[1,2]。我们采用聚合酶链反应(PCR)和斑点杂交(dot blot)技术,检测了 516 份人脑肿瘤组织,健康人外周血 80 份,精液 50 份,人胚胎组织 100 份及 30 份正常人脑组织中的 SV40 DNA 序列,旨在探讨 SV40

的感染状况及来源,并进一步揭示 SV40 感染与脑肿瘤的关系。

材料与方法

一、组织标本

选取经病理组织学检查确诊的 516 份脑肿瘤标本(347 份为石蜡包埋组织,169 份为手术切除的新鲜组织,取材后立即置-70℃保存)。其中胶质瘤 256 份,脑膜瘤 103 份,脑垂体腺瘤 83 份,颅内神经鞘瘤 42 份,先天性肿瘤 32 份。另取健康献血员外周血 80 份,健康人精液 50 份,人工流产胚胎组织 100 份以及无神经系统肿瘤的正常脑组织标本 30 份作为对照。SHG44 和 BT325 细胞株分别由苏州

基金项目:中国博士后科学基金(编号中博基-23)

作者单位:450003 郑州,河南省人民医院神经外科(步星耀);第四军医大学西京医院全军神经疾病研究所(章翔、易声禹);第四军医大学全军神经科学研究所(张旭)

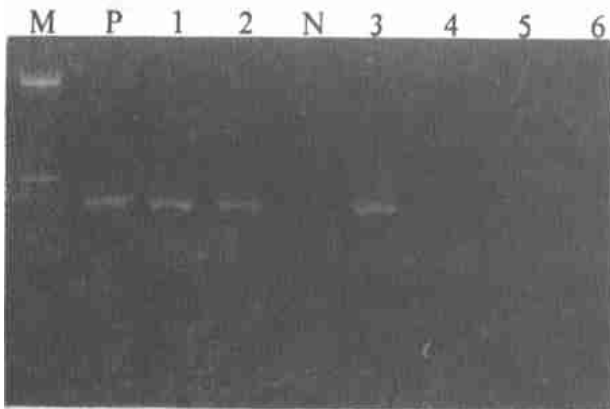
医学院和北京神经外科研究所提供。

二、组织 DNA 制备

石蜡组织分块取 5~10 μm 厚薄片 5 片, 经二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 10%SDS 及蛋白酶 K 消化, 煮沸 10 min 后, 取上清液用于 PCR。新鲜组织置于玻璃匀浆器中研碎, SDS、蛋白酶 K 及 1%NP40 裂解, 饱和酚、氯仿提抽, 无水乙醇沉淀, 三蒸水溶解备用。细胞及外周血 DNA 的提取按经典分子生物学方法提取。

三、PCR 扩增 SV40 早期区域基因序列

引物参照 Bergsagel 等^[3]文献报道设计, 由 Gibco 公司合成, 核苷酸序列为: 5' - CTTTGAGGCTTCTGGATGCAACT - 3'; 5' - GCATGACTAAAAAAGTTAGCAATTCTG - 3'。在总体积 50 μl 的反应体系中, 含样品液 10 μl, dNTP 各 0.2 mmol/L, 一对引物各 50 pmol/L, Taq DNA 聚合酶 3 U。PCR 扩增 60 次, 94℃ 1 min, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s。循环结束后, 置 72℃ 5 min。另以 SV40 DNA 克隆片段为阳性对照, 阴性对照以灭菌三蒸水代替 DNA, 同时进行扩增。取 10 μl 扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳(图 1)。



M: PCR 标记; P: 阳性对照 N: 阴性对照; 1~3 为阳性脑瘤标本; 4~6 为阴性脑瘤标本

图1 PCR 产物 2%琼脂糖电泳

四、PCR 扩增产物斑点杂交

SV40 DNA 特异寡核苷酸探针 (5' - ATGTTGAGAGTCAGCAGTAGCC - 3') 由 Gibco 公司合成, 采用地高辛 (digoxigenin, DIG) 末端标记。将 PCR 扩增产物加入斑点杂交点样器, 点于硝酸纤维素膜上, 真空泵抽干, 80℃烘烤 1 h, 42℃预杂交 2 h, 加入新鲜变性探针杂交 24 h, 室温下充分洗膜, 抗 DIG 碱性磷酸酶复合物 (1:5 000) 37℃ 1 h, 洗涤

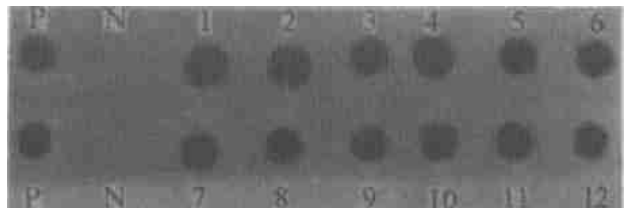
后用 NBT 和 BCIP 液在暗室中显色(图 2)。

五、统计学处理方法

采用 χ^2 检验。

结 果

人脑肿瘤组织 516 份中 188 份检测出 SV40 的 DNA 序列, 阳性率 36.4%。PCR 扩增产物的斑点杂交检测结果见表 1。经统计学处理显示, 人脑肿瘤组织标本中各种病理类型 SV40 DNA 序列检测阳性率差异无显著性 ($\chi^2 = 5.163, P > 0.05$); 其它正常组织标本检测结果见表 2。健康人外周血及健康人精液之间阳性率差异不显著 ($\chi^2 = 0.676, P > 0.05$), 两者阳性率可合并; 人胚胎组织与正常脑组织的阳性率之间差异也无显著性 ($\chi^2 = 0.058, P > 0.05$), 两者阳性率也可合并。 χ^2 检验脑肿瘤阳性率与合并后各组织类型阳性率之间的差异均显著 ($P < 0.05$), 结果见表 3。SHG44、BT325 两株细胞系中也分别检测出 SV40 的 DNA 序列。



P: 阳性对照; N: 空白对照; 1~10 为脑瘤组织扩增产物阳性

图2 PCR 产物斑点杂交

表1 516 份脑肿瘤组织标本 SV40 DNA 序列检测结果

脑肿瘤组织标本	份数	阳性份数	阳性率(%)
胶质瘤	256	104	40.6
脑膜瘤	103	37	35.9
脑垂体腺瘤	83	26	31.3
颅内神经鞘瘤	42	11	26.2
先天性肿瘤	32	10	31.3
合 计	516	188	36.4

表2 260 份其它标本 SV40 DNA 序列检测结果

标 本	份数	阳性份数	阳性率(%)
健康人外周血	80	13	16.3
健康人精液	50	11	22.0
人胚胎组织	100	8	8.0
正常人脑组织	30	2	6.7
合 计	260	36	13.8

表3 各种组织标本 SV40 DNA 序列检验结果

标 本	份数	阳性份数	阳性率(%)
脑肿瘤	516	188	36.4
健康人外周血及精液	130	24	18.5
人胚胎组织及正常人脑组织	130	10	7.7
合 计	776	222	28.6

讨 论

DNA 肿瘤病毒 SV40 具有将包括人类在内的不同组织类型正常细胞, 转化成具有肿瘤表型细胞的能力。新生仓鼠等多种动物脑内接种 SV40 病毒能产生与病毒用量成正比的致瘤作用, 将 SV40 大 T 序列与编码人类糖蛋白 α 亚单位的基因 5' 端 1.8 kb 区连接作插入基因, 超过半数的转基因子代鼠都发生了垂体肿瘤^[4]; Martini 等^[5] 采用 PCR 结合 southern 印迹分子杂交发现在肿瘤组织中存在 SV40 基因结构, RT-PCR 及免疫组化证实 SV40 大 T 抗原 (Tag) 在转录和翻译水平均有表达; Lednicky 等^[6] 通过 SV40 基因组再感染猴肾细胞, 从人脑瘤组织中拯救出有感染活性的 SV40。本研究采用 PCR 结合 dot blot 杂交方法检测的 516 份脑肿瘤标本中, SV40 DNA 阳性率达 36.4%; 30 份健康人脑组织, 阳性率 6.7%, 其它正常组织也均明显低于脑肿瘤 ($P < 0.05$), 结果表明人脑肿瘤有较高的 SV40 感染率, 并可能涉及其发生的病因。

目前对以猴为宿主的 SV40 病毒引起人类感染的机制和途径尚未阐明。实验证实, 接种了受到 SV40 污染的脊髓灰质炎病毒疫苗的儿童, 其粪便排毒约 5 周; 接受 SV40 感染的志愿受试者, 其体内有病毒复制, 并可产生低水平的抗体反应, 表明人体可以获得 SV40 感染^[1]。由于 SV40 潜伏存在于用以制备脊髓灰质炎病毒疫苗的猴肾细胞中, 已被大量的不知不觉地注入人体, 使得数以千万计的人意外感染 SV40^[7]。另一项血清学调查显示, 没有暴露于 SV40 污染的脊髓灰质炎病毒疫苗的人群, 部分病人体内仍可检测到低水平的 SV40 Tag 抗体^[8]。这些结果均提示 SV40 感染在人群中普遍存在的可能。本研究发现 16% 的健康人外周血, 22% 的健康人精液存在 SV40 感染, 虽较 Martini 等^[5] 报道的 23% 和 45% 低, 但支持人群 SV40 感染的普遍性, 提示 SV40 可通过输注血制品和性接触途径传播。

近年来研究显示, SV40 对脑组织有亲嗜性, 可在人脑细胞内繁殖, 完成溶解周期。Martini 等^[5] 研究发现, 外周血 SV40 阳性者, 其杂交信号较瘤组

织明显减弱, 认为外周血低浓度的 SV40 可经血脑屏障到达正常脑组织。但他们在正常脑组织中却没有检测出 SV40 的 DNA 序列。而在本研究中, 却从 30 份正常人脑组织标本中检测到了 2 份 SV40 阳性, 进一步支持 SV40 可能通过血脑屏障进入脑组织。Heinonen 等 1973 年调查了从 1958 ~ 1966 年的 50 897 名妊娠妇女, 有 18 342 人在妊娠期间接受了 SV40 污染的脊髓灰质炎病毒疫苗免疫, 其中 14 例免疫妊娠妇女的儿童发生了颅内肿瘤, 未免疫的 32 555 例妊娠妇女的子女中, 仅有 10 例患颅内肿瘤; Farwell 等^[9] 统计 40 例儿童脑肿瘤中, 37% 其母有妊娠期 SV40 污染的脊髓灰质炎病毒疫苗免疫史。Bergsagel 等^[3] 在 28 孕周胎儿检测到 SV40 的 DNA, 推测 SV40 可经胎盘途径感染胎儿。本研究中 8% 的胚胎组织和 22% 精液有 SV40 DNA 的存在, 提示脑肿瘤组织中 SV40 可能部分为先天获得, 即来源于生殖细胞或经胎盘途径感染。

参 考 文 献

- 1 Geisler E. SV40 and human brain tumors. *Prog Med Virol* 1990, 37:211-222.
- 2 Martini F, De Mattei M, Iaccheri L, et al. Human brain tumors and simian virus 40. *J Natl. Cancer Inst*, 1995, 87:1331-1332.
- 3 Bergsagel DJ, Finegold MJ, Butel JS, et al. DNA sequences similar to those of simian virus SV40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *New Engl J Med*, 1992, 326:988-993.
- 4 Windle JJ, Weiner RL, Mellon PL, et al. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1990, 4:597-602.
- 5 Martini F, Iaccheri L, Lazzarini L, et al. SV40 early region and large T antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals. *Cancer Res*, 1996, 56:4820-4825.
- 6 Lednicky JA, Gercea R, Bergsagel DJ, et al. Natural Simian Virus 40 strains are present in human choroid plexus and pependymoma tumors. *Virology*, 1995, 212:710-717.
- 7 Shah K, Nathanson N. Human exposure to SV40: review and comments. *Am J Epidemiol* 1976, 103:1-12.
- 8 Strickler HD, Rosenberg PS, Devesa SS, et al. Contamination of poliovirus vaccines with simian virus 40 (1955-1963) and subsequent cancer rates. *JAMA*, 1998, 279:292-295.
- 9 罗世祺, 董京飞. 儿童颅内肿瘤概述. 见: 罗世祺, 主编. 儿童颅内肿瘤. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 1-14.

(收稿日期: 1999-07-13)