文章编号:1000-5404(2005)05-0429-03

论著

单纯疱疹病毒Ⅰ型在正常人眼睫状体潜伏的初步研究

陈 康,谢汉平 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究正常人睫状体是否有单纯疱疹病毒Ⅰ型潜伏。**方法** 采用健康志愿者捐献的新鲜眼球15个,1/3眼球组织进行免疫组化染色,排除HSV-1急性感染。取出剩余的睫状体,1/3睫状体组织进行离心,取上清液与Vero细胞共培养,另外2/3睫状体组织提取DNA作PCR和凝胶电泳检测HSV-1的DNA和LAT。**结果** 15个标本免疫组化染色皆阴性,Vero细胞与睫状体组织上清液共培养结果为阴性,未观察到细胞病理学改变,PCR检测的15个标本中4、5、7号标本的HSV-1 DNA阳性,HSV-1 LAT阴性,其他12个标本PCR检测HSV-1 DNA阴性,HSV-1 LAT阴性。**结论** 正常人睫状体存在HSV-1 DNA。

关键词: HSV-1;潜伏;睫状体
中图法分类号: R373.1; R733.3 **文献标识码:** A

Latency of herpes simplex virus 1 in the ciliary body of normal human eyes

CHEN Kang, XIE Han-ping (Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate whether there is latency of herpes simplex virus 1 (HSV-1) in the ciliary body of normal human eyes. **Methods** Parts (1/3) of the 15 fresh eyeballs from normal healthy donors were used for immunohistochemical staining to exclude from acute infection of HSV-1. After the residual ciliary bodies were taken out, 1/3 was centrifugated for co-culture with Vero cells, and DNA was extracted from the other 2/3 for PCR and gel electrophoresis for the detection of HSV-1 DNA and latency associated transcript (LAT). **Results** All the 15 samples were negative of immunohistochemical staining and the results of co-culture of Vero cells with the supernatant containing the ciliary body tissues were also negative. No pathological changes in the cells were observed. In the 15 samples, no. 4, 5, 7 samples were positive of HSV-1 DNA but negative of HSV-1 LAT, whereas the other 12 samples were negative of HSV-1 DNA and HSV-1 LAT. **Conclusion** HSV-1 DNA exists in the normal human cilicary body.

Key words: herpes simplex virus type 1; latency; ciliary body

眼部主要是单纯疱疹病毒Ⅰ型(herpes simplex virus, HSV-1)感染,病毒沿传入神经进入感觉神经节,主要潜伏在三叉神经节、颈交感神经节等部位。近来研究已经证实角膜是HSV-1的另一个眼部非神经组织的潜伏部位[1],三叉神经支配角膜、睫状体、虹膜,睫状体是否同角膜一样存在HSV-1潜伏,目前尚不明确。本研究采用细胞培养、免疫组化和PCR的方法,探讨正常人睫状体是否存在HSV-1的DNA和功能片段潜伏。

1 材料与方法

收集志愿捐献的眼球15个,捐献者属意外死亡,年龄25~35岁,其中男性13人,女性2人,均符合捐献角膜条件[2],患者无HSV急性感染病史,在死亡后6 h内摘除眼球。采用角膜移植术后剩余的新鲜供体眼球组织,将每个眼球的1/3作纵向剖开(前界为剩余角膜缘,后界为视网膜视神经,包含有角膜、虹膜、睫状体、巩膜、脉络膜、视网膜和玻璃体),将其浸泡于10%甲醛溶液,1周后行免疫组化染色。同时在显微镜下分离每个眼球剩余的睫状体组织,睫状体的1/3匀浆后离心取上清液与Vero细胞共培养,剩下的2/3提取DNA用PCR方法检测HSV-1的DNA和LAT。

1.1 主要实验试剂

山羊HSV-1一抗购自Santa公司,SABC试剂盒购自博士得公司,Vero(非洲绿猴肾细胞)细胞和HSV-1的F株(2X106PUF)购于第三军医大学微生物学教研室,HSV-1 DNA和HSV-1 LAT引物由博亚公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 本实验采用阴性标本作为纳入对象,所

作者简介:陈 康(1972-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事眼球单纯疱疹病毒方面的研究。电话:(023)65399046
通讯作者:谢汉平,电话:(023)65399046,E-mail: xiehanping@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-04-29;修回日期:2004-11-10

采用的标本排除了 HSV-1 急性感染。阳性对照采用单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)患者的角膜上皮,选择在急性感染期的树枝状角膜溃疡作角膜上皮刮片。甲醛浸泡的每个眼球组织作纵向石蜡切片 10 张(切片只包含角膜、虹膜、睫状体、脉络膜和视网膜),注明编号并与后面的实验标本一一对应,置 4 ℃冰箱保存。

取出石蜡切片,H_2O_2 灭活内源性酶,复合消化液消化,正常兔血清封闭,加山羊 HSV-1 一抗(浓度 1∶100),加二抗(生物素化兔抗山羊 IgG),DAB 染色,苏木精复染。阳性对照 HSK 患者角膜上皮刮片同法作免疫组化染色。

1.2.2 细胞培养 将睫状体组织上清液与 Vero 细胞共培养,然后将上清液盲传 3 代,观察有无细胞气球样改变、核浓缩、巨细胞形成、细胞破坏等细胞病理学改变(cell pathology effects, CPE)[3,4]。阳性对照为 HSV-1F 株感染的 Vero 细胞上清液,盲传 3 代,同时将只加 DMEM/F12 上清液的 Vero 细胞盲传 3 代作阴性对照。

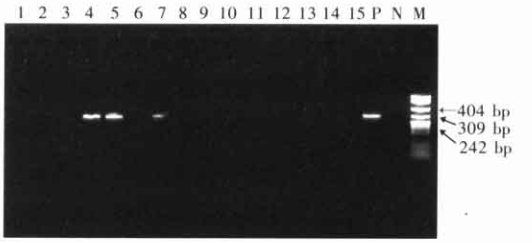
睫状体机械研磨匀浆,低温高速离心,取上清液倒入 Vero 细胞 24 孔培养板(刚传代 24 h 的 Vero 细胞),留两孔分别加入 HSV-1F 株、DMEM/F12 做阳性、阴性对照,37 ℃ CO_2 恒温箱孵育 1 h,吸去孔的上清液,加入 DMEM/F12 培养液,37 ℃ 5% CO_2 恒温箱孵育,同法共盲传 3 代。

1.2.3 PCR 和凝胶电泳 选用 HSV-1 的公共基因序列,HSV-1 DNA: 5′-ACCGTTACCACCGATAGC-3′,5′-CGTCGAAGGTTCTCGAAC-3′; HSV-1 LAT: 5′-ACACATGCCTTCTTGGAGTACG-3′, 5′-CAACAAAGACGCCGCGTTTC-3′。

阳性对照的 HSV-1DNA 用 HSV-1 的 F 株 DNA,阳性对照的 HSV-1 LAT 用 BALB/c 鼠 HSK 模型,在 30 d 后处死,取三叉神经节提取的 DNA[5]。PCR 的具体方法如下:①将冻存的睫状体 DNA 各取 5 μl 加入 200 μl EP 管;②每个 EP 管加入 buffer 2.5 μl, $MgCl_2$ 1.5 μl, dNTP 0.5 μl, *Taq* 酶 0.5 μl,引物 1.5 μl,三蒸水 13.5 μl ,每管共 25 μl。同时用 TE 液 5 μl 加入上述试剂做阴性对照;③PCR 反应条件 94 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,循环 35 次,72 ℃延伸 5 min (PCR System 2700, Singapore);④将 1.7% 琼脂糖凝胶加样,样品 10 μl 加入凝胶点样孔,留三孔分别加入阴性、阳性对照和 DNA marker;⑤1.7% 琼脂糖凝胶电泳 100 V,30 min,取出凝胶;⑥在凝胶成像系统(Biorad)紫外线灯下观察 EB 显影并记录、打印结果。

2 结果

15 个眼球组织纵切面的 150 张石蜡切片免疫组化结果皆阴性,阳性对照 HSK 患者角膜上皮细胞免疫组化染色阳性。15 个睫状体上清液与 Vero 细胞共培养结果为阴性,未观察到细胞病理学改变,阳性对照 HSV-1 F 株与 Vero 细胞上清液共培养后盲传第二代(4~6 d)出现阳性结果,观察到细胞气球样改变、核浓缩、巨细胞形成、细胞死亡。提取的 15 个睫状体 DNA 中,4、5、7 号标本用 PCR 方法检测到 HSV-1DNA 阳性(图 1),HSV-1 LAT 阴性,其他 12 个睫状体 DNA 用 PCR 方法检测结果为 HSV-1 DNA 阴性,HSV-1 LAT 阴性。HSV-1 的 F 株提取的 DNA 检测 HSV-1 DNA 阳性,三叉神经节提取的 DNA 检测 HSV-1 LAT 阳性。15 个正常人的睫状体免疫组化染色、细胞培养和 PCR 实验结果。



1 – 15: 15 samples; P: Positive (1 294 bp); N: Negetive; M: Marker

图 1 15 例正常人睫状体 PCR 结果

Fig 1 PCR results of the 15 normal human ciliary bodies

3 讨论

HSV 潜伏是 HSV 病毒长时间以无病毒体的形式存在于宿主体内,在刺激作用下激活和复制产生感染性的子代病毒体,本实验首次用 PCR 方法在正常人睫状体上发现 HSV-1 DNA 片段 3 例。PCR 方法具有高度敏感性,广泛用于 HSV-1 的检测[6],能检测出滴度很低的病毒,可以用来检测正常人含有低滴度病毒的组织标本。本实验选用 HSV-1 的公共基因序列片段作为引物合成的目标片段,以保证结果的可靠性。在我们的 PCR 实验中,15 个标本检测到 3 个 HSV-1 DNA,检出率是 20%,Detorakis 等[7]在正常人的翼状胬肉发现 HSV-1 DNA 检出率是 22%,谢立信等[8]研究兔 HSV-1 潜伏模型的 HSV-1 DNA 聚合酶检出率是 37.5%,与我们的结果基本相似。

细胞培养是检测病毒潜伏的金指标,Vero 细胞是 HSV-1 的易感细胞。本实验中,Vero 细胞与睫状体上清液共培养的结果为阴性,对照组是阳性,因此正常人睫状体 HSV-1 DNA 片段目前尚不能肯定是有功能的片段(即发现的 HSV-1 具有生物学活性),可能是无功能的病毒颗粒。

我们的实验结果表明在正常人睫状体存在 HSV-1 DNA,这一实验结果尚不能说明正常人睫状体是否存在 HSV-1 功能片段,需要扩大样本量对正常人睫状体是否有 HSV-1 LAT 片段和 HSV-1 可能潜伏的机制做进一步的研究。

参考文献:

[1] Kaye S B, Baker K, Bonshek R, *et al*. Human herpesviruses in the cornea [J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(6): 563 – 571.

[2] 张 锐, 廖世煌, 陈 斌. 眼库的医学标准控制及效果[J]. 四川

医学，1996，17(6)：375－377.
[3] 金　奇. 医学分子病毒学[M]. 北京：科学出版社，2001. 728.
[4] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京：科学出版社，1990. 818.
[5] Higaki S, Gebbardt B M, Lukiw W J, *et al*. Effect of immulosupression on gene expression in the HSV-1 latently infected mouse trigeminal ganglion [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43, 1862－1869.
[6] Kubat N J, Tran R K, McAnany P, *et al*. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression[J]. J Virol, 2004, 78(3)：1139－1149.
[7] Detorakis E T, Sourvinos G, Spandidos D A. Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium[J]. Cornea, 2001, 20(2)：164－167.
[8] 谢立信，李绍伟，董晓光，等. 单纯疱疹病毒 1 型功能性基因在角膜内潜伏感染的实验研究[J]. 中华眼科杂志，2000，36(1)：36－39.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2005)05-0431-01

个案与短篇

定向西藏的军校医学生实习阶段心理健康调查

Investigating the mental health condition of the student doctors assigned to Tibet in military medical colleges

景璐石，冯　军，韦晓亮　（四川省成都医学院人文社科部应用心理学教研室，成都 610083）

相对封闭而又严格管理的军校生活和艰苦紧张的学习任务使部分军校学员的心理压力明显增大。加之，青年学员正处于成人成材的重要时期，心理压力承受能力相对较弱，容易产生各种心理冲突和失衡。因此，军队学员的心理健康问题不容忽视，特别是定向西藏的军医学员，作为一个特殊的群体，其心理健康状况、生活应激能力以及心态，更是应引起大多数人关注。本研究旨在为军队医学院校学员的心理健康教育提供依据。

1　对象与方法

1.1　对象

本研究按自然数的随机排列法，从 289 人中抽取即将进入实习阶段的临床医学专业学员 126 名，实施调查测试，收回有效问卷 120 份。被试均为男性，年龄 18～24 岁，平均(21.15±1.88)岁。其中 60 名为西藏定向生(以下简称定向生)，60 名为非西藏定向生(以下简称非定向生)。

1.2　测量工具

①采用症状自评量表(SCL-90)[1]评定心理健康状况。②采用自编社会心态量表评定学员的心态状况。③采用学生生活应激问卷测量军校医学生在校期间所面临的挫折、冲突、压力、变化等应激源及其对这些应激源作出的生理、认知、情绪与行为反应。

1.3　测试与数据处理

3 份量表均有较好的信度与效度，将其装订成册，采取随机整群抽样法抽取被试，以班级为单位进行团体施测。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 统计软件，行 t 检验。

作者简介：景璐石(1972－)，女，山西省临汾市人，讲师，主要从事心理学方面的研究，发表论文 22 篇。电话：(028)86579150

收稿日期：2004-06-11；修回日期：2004-12-18

2　结果

2.1　军校医学生 SCL-90 各因子分与军队常模比较

被调查学员 SCL-90 各因子与军队常模[2]比较均无差异。

2.2　定向生与非定向生 SCL-90 测试结果比较

定向生与非定向生相比，定向生各项因子小于非定向生，其中躯体化、敌对性和偏执 3 项因子分明显低于非定向生，具有统计学意义，见表 1。

表 1　定向生与非定向生 SCL-90 测试结果比较($n=60$，$\bar{x}\pm s$)

项目	定向生	非定向生	t	P
躯体化	1.21±0.24	1.62±0.52	-3.92	<0.01
强迫	1.63±0.45	1.81±0.76	-1.12	>0.05
人际关系	1.63±0.64	1.78±0.71	-0.86	>0.05
抑郁	1.49±0.45	1.70±0.56	-1.60	>0.05
焦虑	1.45±0.55	1.61±0.55	-1.13	>0.05
敌对性	1.47±0.47	1.8±0.71	-2.12	<0.05
恐怖	1.21±0.34	1.4±0.40	-1.96	>0.05
偏执	1.53±0.46	1.9±0.74	-2.33	<0.05
精神病性	1.41±0.45	1.64±0.63	-1.63	>0.05

2.3　定向生、非定向生社会心态各因子分比较

表 2 显示：定向生与非定向生在对国家政治形势的看法、对国家经济文化社会生活的看法以及军校生活满意度 3 个因子分上的差别没有统计学意义，而在服役与自我发展态度因子分上非定向生要显著高于定向生。

表 2　定向生、非定向生社会心态各因子分比较($n=60$，$\bar{x}\pm s$)

项目	定向生	非定向生	t	P
对政治形势看法	1.87±0.42	2.01±0.28	-1.52	>0.05
对经济形势看法	2.26±0.33	2.38±0.26	-1.56	>0.05
自我发展要求	1.59±0.33	1.82±0.31	-2.78	<0.01
军校生活满意度	2.04±0.28	2.17±0.26	-1.87	>0.05

（下转 435 页）