

## 一种新的人类疱疹病毒: Kaposi's 肉瘤 相关疱疹病毒 (KSHV)

王世珍 刘淑红 耿运琪

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

R 373.11

## A New Human Herpesvirus: Kaposi's Sarcoma- Associated Herpesvirus (KSHV)

Wang Shizhen Liu Shuhong Geng Yunqi

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

**关键词** Kaposi's 肉瘤(KS), Kaposi's 肉瘤相关疱疹病毒(KSHV), 8型人类疱疹病毒(HHV-8), 获得性免疫缺陷综合征(AIDS) 艾滋病

**Key words** Kaposi's sarcoma (KS), Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), Human herpesvirus 8 (HHV-8), Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)

1994年 Y. Chang 等人从 AIDS 患者的 Kaposi's 肉瘤(KS)组织中分离到了两种独有的序列<sup>[1]</sup>, 并由 KS 建立了基因组文库, 对其中外源序列进行克隆和序列分析<sup>[2]</sup>, 初步确认一种新的人类疱疹病毒——KS 相关疱疹病毒。

### 1 KSHV 的发现

Kaposi's 肉瘤是 AIDS 患者中最为常见的肿瘤。在 AIDS 患者和其他免疫抑制人群中, KS 的发病率分别为美国正常人群发病率的 20 000 和 600 倍; AIDS 患者中同性恋或两性恋者发病率为血友病人的 20 倍<sup>[3]</sup>。这些流行病学特点暗示: AIDS 相关的 KS 可能是由一种感染性病原体引起的, 而且该病原体是性传播的。被怀疑的对象包括巨细胞病毒(CMV)、乙型肝炎病毒(HBV)、6型人类疱疹病毒(HHV-6)、人类免疫缺陷病毒(HIV)和 penatrans 支原体, 但是 PCR 检测发现, 它们都不同于推测的病原体。

使 KS 研究柳暗花明的是一种名为“代表性差异分析”(representational difference analysis, RDA)的方法, 即先 PCR 扩增短限制性片段, 作为同一个体病变组织和正常组织的基因组“代表”; 将病变组织的 DNA“代表”与引物序列连接, 再和过量未经连接的正常组织 DNA“代表”杂交; 这样, 在随后的 PCR 循环中仅病变组织独有的 DNA 片段两条链都含有引物序列, 能够被扩增。通过这种方法从 KS 组织中分离到了两段序列: KS330Bam 和 KS631Bam, 分别与  $\gamma$

疱疹病毒 *herpesvirus saimiri* (HVS)、Epstein-Barr virus (EBV) 的衣壳蛋白和被膜 (tegument) 蛋白基因同源, 标志着一种新的人类疱疹病毒。由于最初发现于 KS 组织, 许多研究者称之为 KS 相关疱疹病毒 (KSHV); 作为第 8 种鉴定的人类疱疹病毒, 它也被称为 8 型人类疱疹病毒 (HHV-8)。

## 2 KSHV 的流行病学特点

PCR 检测发现: 95% ~ 100% AIDS 相关 KS 患者的 KS 组织中存在 KSHV 序列, 而健康人组织中 KSHV 序列的阳性率 < 1%<sup>[4,5]</sup>。KS 患者未病变组织的 KSHV 序列阳性率约为 20%, 说明 KSHV 可传播至表型正常的组织, 并在这些组织中潜伏。在经典欧洲-地中海 KS、非洲地方性 KS 和接受移植者的 KS 中普遍发现了 KSHV 序列, 可见 KSHV 不仅仅是 AIDS 患者的一种机会感染的感染源, 而且很可能是所有形式 KS 的共同病原体。此外, AIDS 相关的 body cavity-based 淋巴瘤 (BCBL) 和 Multifocal Castleman's disease (MCD) 患者的病变组织中也存在 KSHV DNA。

52% KS 患者的外周血单核细胞 (PBMC) 中可检出 KSHV 序列, 健康者没有发现; 未患 KS 的 AIDS 患者如果 PBMC 中含有 KSHV 序列, 未来几年内出现 KS 的可能性极大<sup>[6]</sup>。在 AIDS 相关 KS 患者的睾丸中未检出 KSHV 序列, 但他们的前列腺和精液中都能检出 KSHV<sup>[7]</sup>, 说明前列腺可能是被感染宿主中 KSHV 潜伏或持续性感染的位点。KS 患者的痰和咽喉标本中很少检测到 KSHV, 粪便也全部为阴性, 但在 KS 患者的唾液中发现了以毒粒形式存在的 KSHV 序列<sup>[8]</sup>, 目前还不清楚这种感染性的唾液是否一种传播途径。

对 KSHV 的血清流行病学研究至今仍缺乏令人满意的方法。当前用于抗体检测的 KSHV 抗原全部来自 BCBL 建立的被 KSHV 潜伏感染的细胞系。用这种细胞系对不同来源的血清进行免疫荧光分析发现: 全部非洲地方性 KS 患者, 和 96% 的 AIDS 相关 KS 美国患者的血清中含 KSHV 抗体, 90% 美国同性恋男性 AIDS 患者血清为阳性, 而仅 23% 静脉用药 AIDS 患者和 21% 女性 AIDS 患者有 KSHV 抗体, 与普通成年人群并无差异<sup>[9]</sup>。血友病患者和其他接受血制品人群的血清阳性率也与普通人相似。这些结果显示: KSHV 首要的传播方式为性传播。2% ~ 8% 的儿童为血清学阳性, 暗示还存在非性传播途径<sup>[10]</sup>。免疫荧光显示 25% 美国正常成人都有抗 BCBL 细胞系的抗体, 而 PCR 检测发现, 正常人组织中极少出现 KSHV DNA, 这可能是该细胞系同时被另一种更为普遍的病毒感染造成的; 或者是一些人曾被 KSHV 侵入, 并产生了抗体, 但由于他们良好的免疫系统或其他某些原因, 造成病毒未能在机体中大量繁殖。

KSHV 病毒包括 100 多种蛋白成分, 抗体很容易与某些未知的抗原发生交叉反应。因而, 很多研究组都在寻找一种能产生灵敏、可靠结果的病毒抗原用于血清检测<sup>[11-14]</sup>, 已有的抗原包括被 KSHV 与 EBV 共同感染的 BC-1 细胞表达的 KSHV 裂解周期抗原 (lytic-cycle antigen) p40、小病毒衣壳抗原 (small viral capsid antigen, sVCA)、核抗原 p226 和 p234, 但它们的灵敏度还不够理想。对病毒其他抗原的研究还在进行之中。

## 3 KSHV 的分类地位

KSHV 基因组被克隆和序列分析后, 比较它与疱疹病毒科其他成员的关系发现: KSHV 是一种  $\gamma$ -2 疱疹病毒 (猴病毒属, *Rhadinovirus*), 在该属成员 *herpesvirus saimiri* (HVS)、2 型马疱疹病毒 (EHV2) 和 4 型牛疱疹病毒 (BHV4) 中, KSHV 与 HVS 关系最近<sup>[2]</sup>。KSHV 是猴病

毒属中第一个感染人类的成员。 $\gamma$ -1 疱疹病毒(淋巴潜伏病毒属, *Lymphocryptovirus*) EBV 是与 KSHV 最接近的人类病毒。

#### 4 KSHV 的病理学

KS 主要见于皮肤,组成上不均一,纺锤状(spindle)内皮细胞占主要部分。KSHV 以淋巴系统为初级复制场所,并与淋巴增殖失调密切相关,符合  $\gamma$  疱疹病毒嗜淋巴性的特点。AIDS 相关 KS 比经典 KS 和地方性 KS 更具危害性,可影响系统器官。免疫抑制有利于病毒的复制,从而触发 KS 多灶病状。培养的 KS 细胞可分泌多种细胞因子,如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、IL-6 和血小板衍生生长因子(PDGF),而且发现 bFGF、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和制癌蛋白(oncostatin)M 等生长因子和细胞因子对 KS 中纺锤细胞的增殖有重要作用。因此,人们推测细胞因子的局部失调很可能是 KS 形成的主要原因。

#### 5 KSHV 的基因组结构

KSHV 基因组为 165 kb 的双链线性 DNA<sup>[15]</sup>,与其它  $\gamma$  疱疹病毒基因组大小近似。在潜伏感染的 BCBL-1 细胞中,KSHV 以附加体(episome)的单体环状形式存在,当病毒从潜伏状态诱导进入裂解周期时,线性基因组形式大量积累。在被 EBV 共感染的非许可性或半许可性 B 细胞中 KSHV 基因组大小约 270 kb,可能是基因组的串联多聚化或倍增重排造成的。

KSHV 基因组中间为 140.5 kb 的低 GC DNA(L DNA),GC 含量 53.5%,含至少 81 个开放阅读框架(ORF);两边为 801 个核苷酸的高 GC DNA(H DNA)串联重复,GC 含量达 84.5%<sup>[16]</sup>。GC 含量的不均一性导致密度梯度离心时基因组断裂,这是猴病毒属的一个共同特点。KSHV L DNA 中的 ORF 与 HVS L DNA 基因共线性,并有 66 个 ORF 与 HVS 同源,因而用 HVS 基因组相应位置上的基因来初步命名 KSHV 的基因。猴病毒属有很多与细胞基因同源性很高的 ORF,可能是病毒在进化中从宿主细胞捕获的,常包括编码干扰免疫系统的蛋白(补体控制蛋白同源物、CD59)、参与核苷酸代谢的酶(胸苷合成酶、二氢叶酸还原酶)和细胞生长调节因子(细胞周期蛋白、IL-17、IL-8 受体等)的基因。此外,KSHV 还有几个其他猴病毒属没有的细胞同源基因:vIL-6<sup>[17,18]</sup>、三个 CC 趋化因子、干扰素应答因子和 N-CAM 家族穿膜蛋白 ox-2。这些基因产物都类似于细胞周期调控蛋白和信号蛋白,在病毒对宿主细胞的作用中有重要意义。KSHV 和 HVS 都有 D 型细胞周期蛋白(cyclin D)基因<sup>[19~22]</sup>和 bcl-2 的同源物,它们在阻止细胞凋亡或细胞周期停滞中起作用。

KSHV 还编码许多病毒结构蛋白和酶类,与 HVS 和 EBV 相比,有一些是保守的。其中 DNA 聚合酶参与病毒 DNA 复制,二氢叶酸还原酶与胸苷合成酶参与核苷酸合成。此外,还包括基因表达调节物、5 个保守的疱疹病毒衣壳蛋白、5 个糖蛋白和编码在同一 ORF 中的蛋白酶(Pr)和装配蛋白(AP)<sup>[22]</sup>。

EBV 的核抗原(EBNAs)和潜伏膜蛋白(LMPs)对病毒潜伏状态的维持及病毒引起的宿主细胞转化十分重要,它们能诱导 hIL-6、cyclin D、IL-8 受体、细胞 Bcl-2 和补体控制蛋白 CR-2 等细胞基因的表达。KSHV 虽然不编码与 EBNA 和 LMP 类似的蛋白,但它凭借病毒基因组本身携带的细胞同源基因,可以达到与 EBV 这两种蛋白相同的目的:克服宿主细胞对病毒感染产生的细胞周期停滞、细胞凋亡和细胞免疫激活这些应答现象。病毒用某种手段调节细胞生长是为了自己的繁殖,但当病毒没有进行裂解复制时,这些促进生长基因的表达便导致了细胞增殖的失调,从而产生肿瘤。

## 6 KSHV 的基因表达

在 KS 中, KSHV 的基因表达有很大局限性。杂交实验只发现了两种病毒 RNA: 大小分别为 1.1 kb 和 0.7 kb 的 T1.1 和 T0.7。这两个序列都含有 poly(A) 信号, 未经转录后拼接或 RNA 编辑, 而且在不同的 KSHV 分离物中完全保守。T1.1 的序列分析暗示它并非 mRNA<sup>[23]</sup>, 原位杂交发现, 它主要定位于细胞核, 伴随主要衣壳蛋白(MCP)RNA 出现于少数肿瘤细胞中, 这些细胞可能正在产生子代病毒, 因而 T1.1 是一种裂解周期基因产物。T0.7 有信使功能, 位于胞质, 其产物表现强烈的疏水性, 推测是一种小的膜蛋白, 称为 Kaposin。在肿瘤发生发展的各个阶段, 绝大多数的肿瘤细胞都含有这种病毒转录物, 它可能与细胞的转化有关<sup>[24, 25]</sup>。当然, 由于所用基因组文库不完整及杂交实验灵敏度的影响, 很可能还有其他基因的表达。

正常生长的 BCBL 细胞系中基因表达情况与 KS 十分相似。佛波酯 TPA 能够诱导细胞系中病毒的裂解复制, 表现为促进病毒 DNA 合成、更多的基因组区域转录和子代毒粒的产生及释放。可见, 在无 TPA 诱导时, 病毒基因的限制表达是潜伏感染的标志, 也说明 KS 中大多数被感染的细胞为潜伏感染, 仅在很少一部分细胞中有病毒的裂解复制。如果潜伏感染刺激靶细胞的无限增殖, 而且这种刺激并不是永久性的, 那么, 就需要一些产毒性感染的细胞释放子代病毒, 以对新的细胞进行潜伏感染, 肿瘤才得以生长。这种保持一定的潜伏和裂解感染比例的调控机制, 还有待人们去发现。

## 7 KSHV 与 HIV 的相互作用

KS 的发病与 AIDS 明显相关, 暗示 KSHV 与 HIV 之间存在相互作用。临床上 AIDS 相关性 KS 比非 AIDS 相关性 KS 严重; HIV tat 基因的转染能够促进体外培养的 KS 纺锤细胞生长; HIV 的感染还可能使被 KSHV 感染的淋巴细胞释放细胞因子和生长因子, 同时破坏免疫监视系统。这些结果说明 HIV 的感染至少通过免疫抑制和 tat 激活两方面加速 KS 肿瘤的形成。但是 KS 病灶中几乎检测不到 HIV, 推测 tat 的水平很低。此外, 有研究表明 KSHV 在体外激活 HIV 的基因表达, 但还不知道是否由某种 KSHV 编码的细胞因子介导。KSHV 和 HIV 在体内的相互作用尚需进一步研究。

## 8 KSHV 的动物模型

猴腹膜后腔纤维瘤病 (retroperitoneal fibromatosis, RF) 是一种血管纤维增殖肿瘤, 与人类的 KS 在形态学和组织学特点上十分相似。象 KS 在 AIDS 病人中流行一样, RF 与一种 D 型反转录病毒——2 型猴反转录病毒 (SRV-2) 感染引起的猴获得性免疫缺陷综合征 (SAIDS) 高度相关。从 *Macaca* 属中两种猴子 *Macaca nemestrina* 和 *Macaca mulatta* 的 RF 组织经 PCR 得到了不同于任何已知疱疹病毒的两种 DNA 序列。这两种新的疱疹病毒被暂时称为腹膜后腔纤维瘤病疱疹病毒 (RFHV), 分别表示为 RFHVMn 和 RFHVMm<sup>[26]</sup>。序列比较发现: 在所有疱疹病毒中, KSHV 与这两种 RF 病毒序列同源性最高, 关系最近。这两种新的疱疹病毒与 KSHV 一样属于  $\gamma$  疱疹病毒亚科, 并与 KSHV 一起构成了  $\gamma$  亚科中的一群, 这一群中的成员与人类 KS 和其他灵长类的 KS 样肿瘤相关。根据上述结果人们猜测: KSHV 是由非人灵长类传播至人类的, 由于在地理位置相距很远的人群中均能发现 KSHV, 该传播事件一定发生在很久以前。

RF 与 KS 的相似性及 RFHV 与 KSHV 的亲缘关系都说明 *Macaca* 猴子的 RF 可以作为

研究人类 KS 的动物模型。利用该模型,人们可增加对 KSHV 各方面特点的了解,并筛选治疗 KS 样肿瘤的药物。

## 9 小结

虽然科学工作者对这个新发现的病毒从不同的角度进行了研究,但由于缺乏适合 KSHV 生长的细胞培养系统,对该病毒毒粒结构、生活周期、与宿主细胞相互作用等方面的生物学特性至今还没有深入的了解。该病毒基因组的结构和功能、基因表达调控、与其他病毒的相互关系以及它的病理学特征和在临床上的意义,有待进一步研究。目前应该肯定的是:KSHV 与 Kaposi's 肉瘤相关,并且常与 HIV 伴生感染,对人类的健康有重要影响。对该病毒的分子生物学、临床医学、流行病学、病理学诸方面迅速开展研究,将有助于 KSHV 相关疾病的治疗,为人类健康作出贡献。

## 参 考 文 献

- 1 Chang Y, Cesarman E, Pessin M S *et al*. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 1994, 266:1865~1869
- 2 Moore P S, Gao S J, Dominguez G *et al*. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol*, 1996, 70(1):549~558
- 3 Neipel F, Albrecht J C, Fleckenstein B. Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *J Virol*, 1997, 71(6):4187~4192
- 4 Ambroziak J A, Blackbourn D J, Herndier B G *et al*. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science*, 1995, 268:582~583
- 5 Moore P S, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and those without HIV infection. *N Engl J Med*, 1995, 332(18):1181~1185
- 6 Whitby D, Howard M R, Tenant-Flowers M *et al*. Detection of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet*, 1995, 346:799~802
- 7 Corbellino M, Bestetti G, Tasaka T *et al*. Absence of HHV-8 in prostate and semen. *N Engl J Med*, 1996, 335(16):1237~1238
- 8 Vieira J, Huang M, Koelle D M *et al*. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol*, 1997, 71(9):7083~7087
- 9 Lennette E T, Blackbourn D J, Levy J A. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet*, 1996, 348:858~861
- 10 Gompels U A, Kasolo F C. HHV-8 serology and Kaposi's sarcoma. *Lancet*, 1996, 348:1587~1588
- 11 Lin S, Sun R, Heston L *et al*. Identification, expression, and immunogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded small viral capsid antigen. *J Virol*, 1997, 71(4):3069~3076
- 12 Miller G, Rigsby M O, Heston L *et al*. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 1996, 334(20):1292~1297
- 13 O'neill E, Douglas J L, Chien M *et al*. Open reading frame 26 of human herpesvirus 8 encodes a tetradecanoyl phorbol acetate- and butyrate-inducible 32-kilodalton protein expressed in a body cavity-based lymphoma cell line. *J Virol*, 1997, 71(6):4791~4797
- 14 Rickinson A B. Changing seroepidemiology of HHV-8. *Lancet*, 1996, 348:1110~1111
- 15 Renne R, Lagunoff M, Zhong W *et al*. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol*, 1996, 70(11):8151~8154
- 16 Russo J J, Bohenzky R A, Chien M *et al*. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc*

- Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:14862~14867
- 17 Moore P S, Boshoff C, Weiss R A *et al*. Molecular anatomy of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*, 1996, 274:1739~1744
  - 18 Neipel F, Albrecht J, Ensser A *et al*. Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J Virol*, 1997, 71(1):839~842
  - 19 Chang Y, Moore P S, Talbot S J *et al*. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature*, 1996, 382:410
  - 20 Goddard-Kent D, Talbot S J, Boshoff C *et al*. The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol*, 1997, 71(6):4193~4198
  - 21 Li M, Lee H, Yoon D *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol*, 1997, 71(3):1984~1991
  - 22 Unal A, Pray T R, Lagunoff M *et al*. The protease and the assembly protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J Virol*, 1997, 71(9):7030~7038
  - 23 Zhong W, Ganem D. Characterization of ribonucleoprotein complexes containing an abundant polyadenylated nuclear RNA encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J Virol*, 1997, 71(2):1207~1212
  - 24 Staskus K A, Zhong W, Gebhard K *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol*, 1997, 71(1):715~719
  - 25 Zhong W, Wang H, Herndier B *et al*. Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:6641~6646
  - 26 Rose T M, Strand K B, Schultz E R *et al*. Identification of two homologs of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in retroperitoneal fibromatosis of different macaque species. *J Virol*, 1997, 71(5):4138~4144