

人巨细胞病毒感染与非特异性下腰痛的相关性研究*

李 红¹ 吴建贤¹ 洪永锋¹ 王 斌¹ 胡 勇² 蔡亦红² 胡雪影² 王明丽²

摘要 目的:探讨人巨细胞病毒(HCMV)感染与非特异性下腰痛(NLBP)的关系,HCMV 活动性感染与 NLBP 临床症状和内皮素(ET)的相关性。**方法:**PCR、HE 染色检测尿沉渣 HCMV-DNA 和包涵体;ELISA、放免法测定血浆 HCMV 抗体和内皮素水平。**结果:**①NLBP 患者病毒包涵体、HCMV 抗体阳性率明显高于正常对照组($P<0.05$)。②NLBP 患者 HCMV-IgM 抗体阳性组与阴性组,在疼痛加重病程、疼痛程度和内皮素水平方面差异均有显著性意义, t 值分别为 $-4.74(P<0.01)$ 、 $3.67(P<0.01)$ 、 $4.32(P<0.01)$ 。**结论:**NLBP 患者腰痛症状可能与 HCMV 活动性感染相关。成年人 HCMV 活动性感染后导致的 NLBP 患者,尿沉渣涂片经 HE 染色后光镜下见不典型 HCMV 包涵体。

关键词 非特异性下腰痛;人巨细胞病毒;内皮素

中图分类号:R493,R681 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-01-0037-04

A clinical study on human cytomegalovirus infection and nonspecific low back pain/LI Hong, WU Jianxian, HONG Yongfeng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(1): 37—40

Abstract Objective: To explore the relationship of human cytomegalovirus (HCMV) and nonspecific low back pain (NLBP), the correlation of HCMV active infection with clinical symptoms of NLBP and endothelin (ET). **Method:** Blood and urine samples were collected from 50 patients with NLBP and 36 controls. HCMV-DNA was detected by PCR; inclusion bodies were detected by HE dyeing; HCMV-IgM and IgG were measured by ELISA and ET were examined by radioimmunoassay. VAS and OSW questionnaire evaluation were used to assess clinical symptoms. **Result:** ① NLBP patients had higher positive rates in HCMV antibody and inclusion bodies ($P<0.05$). ② In NLBP group, pain duration, pain severity and endothelin level were statistically different in HCMV-IgM antibody positive and negative cases. The differences of t value were $-4.74(P<0.01)$, $3.67(P<0.01)$, $4.32(P<0.01)$ respectively. **Conclusion:** Pain symptoms in NLBP may be related to the active infection of HCMV. After active infection of HCMV, in adult NLBP patients, there were nontypical HCMV inclusion bodies in HE dyeing uropus smears under light microscope.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, 230022

Key words nonspecific low back pain; human cytomegalovirus; endothelin

下腰痛是一种非常普遍的公共健康问题,因而受到广泛关注。然而,由于 85% 的下腰痛病因不明^[1],从而限制了临床的有效治疗。关于非特异性下腰痛(nonspecific low back pain, NLBP)的病原学有许多假说,病毒感染理论就是其中最具挑战性的一种。Omura 报道单纯疱疹病毒-I 感染是慢性顽固性疼痛的主要原因。风湿性多肌痛与巨细胞动脉炎见于同一患者,提示两者关系密切^[2]。

近 20 年研究发现,人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)的潜伏感染与激活在神经系统、心血管系统、泌尿系统等发病中具有一定意义。文献报道 NLBP 患者的腰痛症状可能与 HCMV 潜伏再激活有关^[3]。本研究进一步探讨 HCMV 感染与 NLBP 的关系, HCMV 活动性感染与 NLBP 的临床症状的相关性,为 NLBP 病因、早期诊断提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 对象

收集 2004 年 12 月—2005 年 9 月本院康复运动医学科门诊患者,选取符合 NLBP 诊断标准^[4](美国和英国政府于 1993—1994 年间相继颁布的 LBP 诊治指南)患者 53 例,排除退出 3 例,其余 50 例均按要求完成治疗为 NLBP 组。男 18 例,女 32 例;年龄 18—67 岁,平均年龄 37.78 ± 11.38 岁。健康对照组 36 例,男 25 例,女 11 例,年龄 20—60 岁,平均年龄 39.78 ± 12.14 岁。两组在性别、年龄方面无显著性差

* 基金项目:安徽省教育厅科学基金(2004KJ230zc);安徽省卫生厅科学基金(06B117);安徽省科技厅重点项目(06023058)

1 安徽医科大学第一附属医院康复医学科,合肥,230022

2 安徽医科大学基础医学院微生物教研室

3 通讯作者:吴建贤(安徽医科大学第一附属医院康复医学科,230022)

作者简介:李红,女,硕士

收稿日期:2006-02-20

异。

1.1.1 NLBP 组纳入标准: 确诊为 NLBP 的成年患者。自愿接受, 且具有完成实验行为的能力。

1.1.2 NLBP 组排除标准: 年龄 < 18 岁、孕妇(因不便干预)、患脊柱肿瘤、骨折与结核、特异性感染、风湿、类风湿、血清阴性脊柱关节病、系统性红斑狼疮、峡部裂(即腰椎椎板的疲劳性骨折)者除外。

1.1.3 NLBP 组退出原因: 发生意外(疾病或新损伤)、中断治疗、外地不能完成治疗、其他个人原因等。

1.1.4 对照组纳入标准: 与 NLBP 组年龄、性别相匹配, 选择健康人 36 例(志愿者)。

1.1.5 对照组排除标准: 在过去 4 个月内曾有腰痛者。

1.1.6 NLBP 组和对照组常规检查: ①腰椎正侧位片; ②RF、ESR、ASO、HLA-B27; ③怀疑腰椎间盘突出者应做腰椎 CT, 必要时做腰椎 MRI。

1.1.7 实验前按照赫尔辛基(Helsinki)宣言 II 的规定, 征得所有研究对象的同意, 告知实验的目的、过程及注意事项。同时得到安徽医科大学技术伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 HCMV-DNA 和 HE 染色: 采集患者治疗前后及对照组清晨空腹中段尿 10ml, 取 8ml 经 2000r/min, 20min 离心, 吸管轻吸弃上清, 余 3ml 分装于 1.5ml EP 管中, 再次 10⁴r/min, 2min 离心, 其中一管标记后放 -20℃ 冰箱保存备集中测 HCMV-DNA。另一管再次弃上清, 余 0.5ml 用吸管或枪头吹打均匀, 载玻片上涂片 3 张, 干燥后进行 HE 染色。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法检测 HCMV-DNA。具体操作方法见参考文献^[5]。

HE 染色流程: 苏木素染 2—3min, 自来水冲洗, 显微镜下观察色度适中, 70%、75%、80% 酒精各浸约 1min, 伊红染色 2—3min, 显微镜下观察色度适中, 95%、100%、50% 二甲苯/无水酒精、100% 二甲苯各浸约 1min, 三张涂片中去最好一张封片(斜、慢注意不要产生气泡, 影响观察细胞), 最后在光学显微镜下观察找 HCMV 包涵体。

1.2.2 HCMV 抗体和内皮素检测: 入选患者治疗前后及正常对照组于清晨空腹安静状态下抽取肘静脉血 5ml(分 2 个试管), 2ml 试管中加入 EDTA 20μl, 抑肽酶 30μl, 低温离心, 分离血浆置 -40℃ 冰箱内保存备集中检测内皮素。3ml 试管经 2000r/min, 20min 离心, 取血浆装于 1.5ml EP 管中 -20℃ 冰箱内保存备

测 HCMV 抗体。

HCMV 抗体检测时取备用血浆, 室温下复融样本, 用间接酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清中 HCMV 抗体 IgM、IgG。测定方法参照王明丽等^[6]文献稍加修改。血清 1:100 稀释测定 HCMV-IgG、IgM, 在酶标仪上 450nm 处测吸光度 A 值, P/N ≥ 2.1 为阳性。

内皮素的检测采用放射免疫法, 北京北方生物研究所的内皮素试剂盒, 具体操作由专人严格按照说明书进行。

1.2.3 疼痛评估方法: 本研究采用 OSW 问卷调查量表 (Oswestry low back pain disability index, OSW)^[7], 对所有患者进行治疗前、后腰痛程度和日常生活活动能力评估, 更能准确反映患者临床的实际情况。

OSW 包括 10 个部分, 第 1 部分与腰部疼痛有关, 其余部分与各种的日常生活活动行为有关, 每一部分有 6 个程度递进的提问, 积分指数从 0—5, 合计最大积分指数为 50, 积分指数越高表示日常/社会生活活动功能受限越大。

1.3 统计学分析

定量数据, 包括各种功能评价量表评分用平均数 ± 标准差, 对 PCR 结果、抗体、病毒包涵体等计数资料进行 χ^2 检验, 抗体、病毒包涵体等计数资料组间用配对 χ^2 检验 (McNemar Test); 对患者年龄、性别、ET 值组间进行 t 检验; 对 NLBP 组中抗体阴阳组间腰痛加重病程、OSW 得分、ET 值组间进行两独立样本 t 检验。分析软件为 SPSS10.0。

2 结果

2.1 HE 染色及鉴定结果

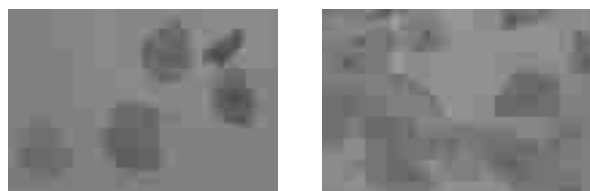
NLBP 组和对照组尿沉渣 HE 染色后的涂片在普通光学显微镜下观察, NLBP 组患者尿道脱落上皮部分细胞中发现细胞核肿大, 核颜色变浅, 并可以看到规则的空晕(见图 1A)。而在正常对照组中见到的细胞核呈紫色, 细胞浆呈红色, 细胞核周围看不到规则的圆晕(见图 1B)。把 HE 染色后光镜下发现异常细胞患者的尿沉渣用 PCR 方法, 用 HCMV 特异性引物扩增后, 766bp 可见特异性条带(见图 2)。

2.2 两组病毒包涵体、HCMV IgM 抗体结果

NLBP 组 50 例与正常对照组 36 例经 HE 染色检测尿沉渣病毒包涵体; 经过 ELISA 测定血浆 HCMV IgM 抗体的结果见表 1—2。

2.3 NLBP 组 HCMV-IgM 与临床指标结果

50 例 NLBP 患者中 HCMV-IgM 抗体阳性组疼



A NLBP 组 B 对照组见正常细胞

图 1 光镜下两组尿沉渣 HE 染色片 (×400)

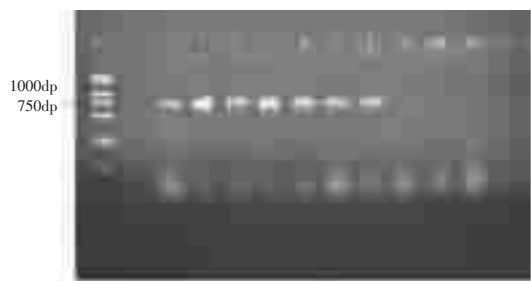


图 2 病毒包涵体阳性者尿沉渣 HCMV UL83 PCR 产物检测结果

泳道 M: 250bp 梯度分子量 Marker; 泳道 1: UL83 PCR 阴性对照; 泳道 2: UL83 PCR 阳性对照; 泳道 3-8: 病毒包涵体阳性 UL83 PCR

痛加重病程、OSW 得分、ET 均值分别为 1.36 ± 0.50 、 36.36 ± 1.75 、 56.07 ± 6.08 ; IgM 抗体阴性组疼痛加重病程、OSW 得分、ET 均值分别为 3.00 ± 1.01 、 28.28 ± 7.19 、 44.93 ± 7.90 。NLBP 组中 IgM 抗体阴、阳性组间疼痛加重病程、OSW 得分、ET 均值经两独立样本 T 检验比较, 结果分别为 $t = -4.74$ ($P < 0.01$)、 $t = 3.67$ ($P < 0.01$)、 $t = 4.32$ ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 NLBP 组与健康对照组病毒包涵体及血清 HCMV IgM 抗体结果比较

	NLBP 组走罐前 (50 例)		NLBP 组走罐后 (50 例)		健康对照组 (36 例)	
	例	%	例	%	例	%
病毒包涵体						
+	6	12	0	0	0	0
-	44	88 ^①	35	100	36	100
HCMV IgM						
+	11	22	8	23	0	0
-	39	78	27	77	36	100

表 2 NLBP 组中 IgM 抗体阴、阳性组疼痛加重病程、OSW 得分、ET 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	疼痛加重病程(天)	OSW 得分	ET 值
IgM(+)	11	1.36 ± 0.50	36.36 ± 1.75	56.07 ± 6.08
IgM(-)	39	3.00 ± 1.01 ^①	6.37 ± 1.80 ^②	44.93 ± 7.90 ^③

① $t = -4.74$, $P < 0.01$, ② $t = 3.67$, $P < 0.01$, ③ $t = 4.32$, $P < 0.01$

3 讨论

巨细胞病毒属 β -疱疹病毒亚科, 是双股线性 DNA 病毒。具有种属特异性和潜伏再激活特性^[8]。人巨细胞病毒在人群中感染非常普遍, 发达国家、发展中国家的成人感染率分别为 60%、90%。人巨细胞病毒感染机体后, 在机体免疫功能正常时, 病毒大多可

以成功逃脱免疫系统的追缴, 在人体内长期存活处于潜伏感染状态, 而且一旦感染, 终身带毒; 当机体免疫功能降低时, 潜伏于机体内的病毒再激活可导致多组织器官如神经系统、血管系统、肌肉筋膜等的感染, 产生疼痛或痛觉过敏等相应的临床症状, 即活动性感染^[9]。

近几年, 文献报道单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒感染, 可能是引起腰腿痛更为普遍的重要原因。国内有人统计了 1000 例腰腿痛患者, 认为与单纯疱疹病毒感染有关的约占 1/3。这一观点已经得到国内外学者及分子生物学方面近二十年来研究成果的有力支持。文献报道 NLBP 患者腰痛症状可能与 HCMV 感染再激活有关^[9], 本研究亦进一步证实, HCMV 感染及再激活与腰痛的发生关系密切, 如表 1 所示 NLBP 组尿包涵体、HCMV IgM 阳性率均高于对照组 ($P < 0.05$ 或 < 0.01), HE 染色光镜下找到巨细胞病毒包涵体并经 PCR 鉴定、HCMV-IgM 阳性可以判断为巨细胞病毒活动性感染^[10]。

本研究在对 50 例 NLBP 患者的尿标本进行 HE 染色检测后, 有 6 例标本涂片后镜下观察到不典型的巨细胞病毒包涵体(图 1A)。6 例病毒包涵体阳性标本, 同时用聚合酶链反应方法(PCR)检测 HCMV-DNA 中的 UL83 特异性片段, 图 2 所示在 3—8 泳道 766bp 可见与泳道 2 相同的阳性条带, 证明这 6 例尿标本中包涵体为人巨细胞病毒包涵体。本研究中发现的 HCMV 包涵体形态, 与先天性 HCMV 感染形成的典型包涵体形态不同。许多文献报道先天性及围产期感染的婴幼儿中发现典型 HCMV 包涵体^[11]。主要由于婴幼儿免疫系统尚在形成与发展中, 病毒在其体内繁殖快速, 这时期尿中排 HCMV 的浓度高; 而本研究入选对象均为成年人, 成年人大多对 HCMV 已有免疫, 但 HCMV 抗体对 HCMV 的抑制作用不强, 不足以阻止潜伏感染 HCMV 的激活, 但机体的免疫能起到限制病毒在局部快速复制的作用。

HCMV 感染再激活引起腰痛的可能机制: ①直接刺激神经。单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒是一种亲神经病毒, 可长期甚至终身潜伏于机体各种神经节中, 包括脊神经节、颅神经节以及自主神经节细胞内。脊神经节是腰痛病的调节器, 潜伏其中的单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒在患者劳累、月经、情绪紧张或受凉、发烧等抵抗力下降情况下被激活, 引起损害, 影响神经细胞基因表达, 呈不同程度的兴奋状态, 造成功能障碍, 成为腰腿痛的病理基础。这种激活主要归结于宿主清除病毒的免疫反应的失败, 而不是改变病毒的转录过程。在机体的免疫功能恢复

正常后,被激活的巨细胞病毒可以得到适当的抑制,再次转为潜伏感染的状态,由此导致腰痛的反复发作。②血管系统也是 HCMV 主要的潜伏部位。病毒进入内皮细胞,导致腰部血管内皮细胞损伤,内皮素的合成与释放增加,局部内皮素的升高可以引起动脉痉挛,该部位的血管收缩,进而引起血管平滑肌细胞增生,血管狭窄,产生缺血性炎症样改变,引起腰痛和功能障碍等^[12]。③筋膜感染,肌肉痉挛。HCMV 可以感染腰部筋膜、肌肉组织,使细胞产生人巨细胞病毒病变效应,导致细胞溶解,引起局部炎症,产生腰痛^[13]。

IgM 为 HCMV 感染早期产生的抗体,与病毒的活动性感染有关,而 IgG 为 HCMV 感染晚期产生的抗体,与病毒的既往感染有关。表 2 所示 IgM 与病程、腰痛程度、内皮素具有显著相关性,且有显著性意义,说明 NLBP 患者发病病程时间越短,腰痛程度越重,IgM 滴度水平越高,可能与腰痛发病时间越短,病毒复制量越多,引起内皮损伤也越重有关。IgM 与内皮素具有显著相关性 ($P<0.01$),IgG 与内皮素度相关($P<0.05$),说明 HCMV 潜伏激活感染或活动感染可损伤血管内皮功能,引起内皮素高浓度表达,内皮素通过与胞膜上特异受体结合,激活细胞膜上特异受体——二磷酸肌醇酯系统,引起细胞内肌浆网向细胞浆释放钙及激活细胞膜钙通道引起细胞外钙离子内流,导致细胞内钙增高,从而导致血管收缩,出现腰痛。

本研究不足之处:样本量需在今后研究中进一步扩大;由于人体肾脏是间歇性排 HCMV,故应多次取尿标本进行 HE 染色、血清抗体检测等多种途径提高阳性检出率;本研究通过尿液检测到部分 NLBP 患者有 HCMV 感染,但无法说明是腰部何种组织感染了 HCMV,下一步课题组将建立 HCMV 感

染引起的 NLBP 动物模型,并结合人体组织学检测、临床症状和体征以反映 HCMV 对腰部各种组织的亲嗜性。

参考文献

- [1] 周士枋.骨关节和肌肉疾病的康复—学习第三届 ISPRM 会议内容之二[J].中国康复医学杂志,2005,20(8):608—609.
- [2] 中华医学会风湿病学分会.风湿性多肌痛诊治指南(草案)[J].中华风湿病学杂志,2004,8(8):506—507.
- [3] 王斌,吴建贤,洪永锋,等.非特异性下腰痛患者血清中人巨细胞病毒 pp65 抗体检测与腰背痛的相关性[J].中国临床康复,2005,9(14):80—82.
- [4] 王斌.非特异性下腰痛的临床与康复[J].中国康复医学杂志,2004,19(2):150—153.
- [5] 类延化.聚合酶链反应在检测脑性瘫痪患儿人巨细胞病毒感染中的应用[J].实用儿科临床杂志,2005,20(2):157—159.
- [6] 王明丽.人巨细胞病毒先天性中枢神经系统感染小鼠模型的建立[J].动物学报,2000,46(2):167—174.
- [7] 吴建贤,王斌.运动疗法早期介入对非特异性下肢痛康复的作用[J].安徽医科大学学报,2000,35(4):300—301.
- [8] Schleiss M.Progress in cytomegalovirus vaccine development[J].Herpes,2005,12(3):66—75.
- [9] Rigamonti A,Usai S,Ciusani E,et al.A typical transverse myelitis due to cytomegalovirus in an immunocompetent patient[J].Neurol Sci,2005,26(5):351—354.
- [10] 李红,吴建贤.人巨细胞感染状态与免疫[J].中国康复理论与实践,2005,11(8):636—637.
- [11] 陈俊青,刘霆.巨细胞病毒感染检测方法的现况和进展[J].中国输血杂志,2005,18(5):428—431.
- [12] Bouwman JJ,Visseren FL,Bosch MC,et al. Procoagulant and inflammatory response of virus-infected monocytes [J].Eur J Clin Invest.2002,32(10):759—766.
- [13] Tallman MS, McGuffin RW, Higano CS,et al.Bone marrow transplantation in a patient with myelodysplasia associated with diffuse eosinophilic fasciitis [J]. Am J Hematol, 1987,24(1):93—99.