

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 19. 003

血液肿瘤患者血浆 EB 病毒和巨细胞病毒定量检测的临床价值*

王海滨,张冬青,司英丽,赵 娇

(中国人民解放军总医院第一附属医院检验科,北京 100048)

摘要:目的 采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)测定血液肿瘤患者血浆中 EB 病毒(EBV)和巨细胞病毒(CMV) DNA 水平,探讨血浆 EBV DNA 和 CMV DNA 定量测定的临床意义。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 280 例血液肿瘤患者血液中 EBV DNA 和 CMV DNA 载量。结果 280 例血液患者中 EBV DNA 检测阳性率为 17.1%,CMV 检测阳性率为 18.9%,动态监测病毒 DNA 拷贝数为 $10^2 \sim 10^7$ copy/mL。接受外周造血干细胞移植的患者 126 例,其中 EBV 检测阳性率为 28.6%,CMV 检测阳性率为 40.5%。血液肿瘤患者进行抗病毒治疗后,均在 7~14 d 后转阴。结论 实时荧光定量 PCR 动态检测血液肿瘤患者 EBV DNA 和 CMV DNA 水平对于 EBV 和 CMV 感染患者的疗效判断具有重要临床意义。

关键词:EB 病毒; 巨细胞病毒; 血液肿瘤

中图法分类号:R373.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2852-04

Clinical value of quantitative detection of plasma EB virus and cytomegalovirus in patients with hematological malignancies*

WANG Haibin, ZHANG Dongqing, SI Yingli, ZHAO Jiao

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract: Objective To adopt real time fluorescent quantitative PCR assay to detect plasma EB virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) DNA levels in the patients with hematological malignancies and to investigate their clinical significance. **Methods** The real time fluorescent quantitative PCR assay was adopted to detect plasma EBV and CMV DNA loads in 280 patients with hematological malignancies. **Results** Among 280 cases of hematological malignancies, the EBV detection positive rate was 17.1% and the CMV detection positive rate was 18.9%. The viral DNA copy number by dynamic monitoring ranged $10^2 - 10^7$ copy/mL. Among 126 patients receiving peripheral hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), the EBV detection positive rate was 28.6% and the CMV detection positive rate was 40.5%. After antiviral therapy in the hematological patients, the negative-conversion was obtained after 7-14 d. **Conclusion** Adopting the real time fluorescent quantitative PCR assay for detecting EBV and CMV DNA level has an important clinical significance for judging the curative effect in the patients with EBV and CMV infection.

Key words: EB virus; cytomegalovirus; hematological malignancies

EB 病毒(EBV)是对人类有致癌潜能的一种 γ 疱疹病毒,主要侵袭人 B 淋巴细胞。免疫学、流行病学及分子生物学等方面研究表明,EBV 感染与鼻咽癌、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、伯基特淋巴瘤等多种肿瘤的发生、发展密切相关^[1]。巨细胞病毒(CMV)感染可累及消化道、中枢神经系统和肺等多种器官,在血液肿瘤移植患者中,CMV 的感染率高达 32%~45%,病死率可达 75%~90%^[2-3]。因此,准确、快速诊断 EBV 和 CMV 感染的方法在早期诊断和治疗中起到

日益重要的作用。本研究应用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)对血液肿瘤患者血浆中 EBV DNA 和 CMV DNA 的水平变化进行观察,以探讨病毒水平的动态变化与患者病毒感染的预防、诊断与治疗的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1 月至 2017 年 6 月本院诊治的 280 例血液肿瘤患者。患者年龄 3~85 岁,中位年龄 41 岁,其中男 161 例、中位年龄 40 岁(3~78 岁),女 119 例、中位年龄 46 岁(3~85 岁)。临床诊断为 NHL 81 例(28.9%),HL 27 例(9.7%),急性

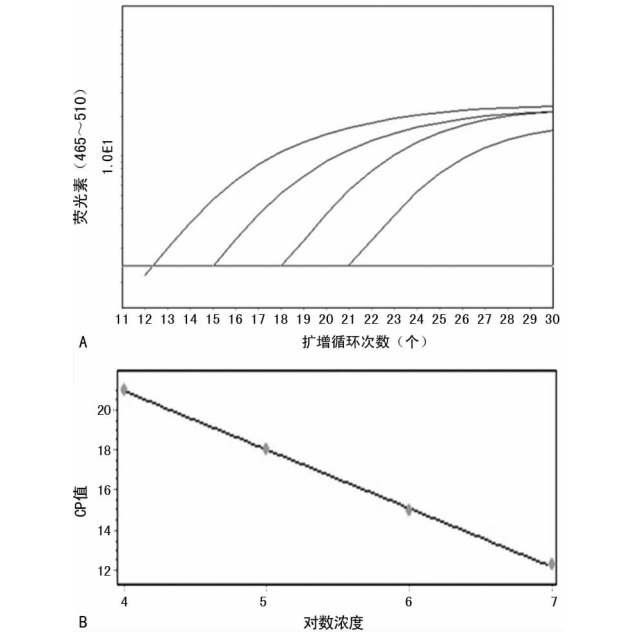
* 基金项目:国家重大科学仪器设备开发专项基金资助项目(2013YQ1904670703);解放军总医院临床科研扶持基金资助项目(三〇四专项;2015FC-TSYS-3047)。

作者简介:王海滨,女,副主任技师,主要从事临床生物化学及分子生物学研究。

淋巴细胞白血病(ALL)32 例(11.4%),急性髓细胞白血病(AML)48 例(17.1%),再生障碍性贫血(AA)43 例(15.4%),多发性骨髓瘤(MM)23 例(8.2%),MDS 26 例(9.3%)。所有患者经骨髓细胞形态学、细胞遗传学和免疫学确诊,符合《血液病诊断疗效与标准》^[4]。其中进行外周造血干细胞移植的患者 126 例,患者中位年龄 33 岁(3~77 岁),其中男 81 例、中位年龄 32 岁(5~77 岁),女 45 例、中位年龄 33 岁(3~71 岁);临床诊断为 NHL 15 例(11.9%),ALL 20 例(15.9%),AML 31 例(24.6%),AA 38 例(30.1%),MM 4 例(3.2%),MDS 18 例(14.3%)。

1.2 标本处理 抽取患者静脉血 2 mL,应用乙二胺四乙酸二钾抗凝,血液标本 3 500 r/min 离心 5 min 后取血浆,置于 4 ℃ 保存,24 h 内检测完毕。

1.3 实时荧光定量 PCR 取 100 μ L 血浆加入等量的 DNA 浓缩液充分混匀,12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液,沉淀中加入 50 μ L DNA 提取液充分混匀,100 ℃ 恒温处理 10 min,12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液备用。EBV 和 CMV 核酸定量检测试剂盒(PCR 荧光法)均购自中山大学达安基因股份有限公司。应用实时荧光定量 PCR 技术检测血浆中病毒 DNA 拷贝数,PCR 反应体系严格按照产品说明书进行。应用 Roche 公司 Light Cycler® 480 实时荧光定量 PCR 仪进行检测,PCR 反应条件为 93 ℃,2 min;93 ℃,45 s,55 ℃,60 s,循环 10 次;93 ℃,30 s,55 ℃,45 s,循环 30 次,采集点选择在 55 ℃,45 s,反应体系为 45 μ L。每次 PCR 反应均设置 4 个标准品(拷贝数数量级为 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 ,用于制作标准曲线,以 EBV 为例,图 1),根据试剂盒说明书病毒 DNA 拷贝数 >500 copy/mL 定义为阳性结果。



注:A 为 4 个标准品病毒 DNA 的 PCR 扩增曲线;B 为病毒 DNA 的 PCR 扩增标准曲线

图 1 EBV 病毒 DNA 的 PCR 标准扩增曲线

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血液肿瘤患者血浆 EBV 和 CMV 检测阳性率分布 280 例血液肿瘤患者中 EBV 检测阳性的患者 48 例,阳性率为 17.1%,CMV 检测阳性的患者 53 例,阳性率为 18.9%,动态监测病毒 DNA 拷贝数为 $10^2 \sim 10^7$ copy/mL,EBV 和 CMV 检测同时阳性者 25 例,阳性率为 8.9%。其中 AA 患者中 EBV 和 CMV 检测阳性率分别为 27.9%和 37.2%,见表 1。

表 1 血液肿瘤患者的 EBV、CMV 感染情况[n(%)]

疾病类型	n	EBV	CMV
NHL	81	14(17.3)	6(7.4)
HL	27	3(11.1)	1(3.7)
ALL	32	7(21.9)	10(31.2)
AML	48	8(16.7)	15(31.2)
AA	43	12(27.9)	16(37.2)
MM	23	0(0.0)	1(4.3)
MDS	26	4(15.4)	4(15.4)
合计	280	48(17.1)	53(18.9)

2.2 血液肿瘤患者中接受移植者的病毒感染情况 血液病患者中接受骨髓或外周造血干细胞移植的患者 126 例,其中 EBV 检测阳性的患者 36 例,阳性率为 28.6%,EBV 感染拷贝数为 $0 \sim 5 \times 10^2$ copy/mL,EBV 感染拷贝数最高为 1.81×10^6 copy/mL;CMV 检测阳性的患者 51 例,阳性率为 40.5%,CMV 感染拷贝数为 $0 \sim 5 \times 10^2$ copy/mL,CMV 感染拷贝数最高为 6.30×10^4 copy/mL。EBV 和 CMV 检测同时阳性者 25 例,阳性率为 19.8%。

2.3 接受移植者的临床特征及病毒感染情况 126 例接受移植患者中共有 36 例(28.6%)发生 EBV 血症,其中男性患者 EBV 感染率稍高于女性患者(30.9% vs. 24.4%, $P>0.05$),ALL 患者感染率稍高于其他疾病患者($P>0.05$),异体移植发生 EBV 血症的感染率为 33.3%,自体移植患者并无 EBV 感染。所有患者中共有 51 例(40.5%)发生 CMV 血症,其中男性患者 CMV 感染率稍高于女性患者(44.4% vs. 33.3%, $P>0.05$),ALL 患者感染率稍高于其他疾病患者($P>0.05$),异体移植发生 CMV 血症的感染率为 47.2%,自体移植患者并无 CMV 感染。血液肿瘤患者接受移植者中 13 例患者 EBV 的 PCR 检测连续呈阳性,36 例患者 CMV 的 PCR 检测连续呈阳性,给予更昔洛韦、阿昔洛韦、膦甲酸钠等抗病毒治疗,病毒感染进展为病毒性肺炎、脑炎、肠炎等疾病时,进行联合抗病毒治疗,同时增加免疫球蛋白以提高患者机体免疫力,患者均在抗病毒治疗 7~14 d 后转阴。其中

有 1 例进行异基因造血干细胞移植后 56 d 出现 EBV 拷贝数升高,有 1 例进行异基因造血干细胞移植后 85 d 后出现 EBV 拷贝数升高,同时出现了移植后淋巴细胞增殖性疾病(PTLD),发生率为 1.59%(2/126)。126 例血液肿瘤患者中共 5 例发生死亡,2 例患者为多重感染导致败血症及呼吸衰竭,2 例患者为重度移植抗宿主病,1 例患者出现移植后原发疾病复发。随访患者,本研究还发生的 2 例移植后 PTLD,发生率为 1.59%。见表 2。

表 2 126 例造血干细胞移植患者的临床特征及病毒感染情况[n(%)]

临床特征	n	EBV(n=36)	CMV(n=51)
性别			
男	81	25(30.9)	36(44.4)
女	45	11(24.4)	15(33.3)
原发疾病			
AA	38	13(34.2)	17(44.7)
AML	31	8(25.8)	15(48.4)
ALL	20	9(45.0)	11(55.0)
MDS	18	2(11.1)	4(22.2)
NHL	15	4(26.7)	4(26.7)
MM	4	0(0.0)	0(0.0)
移植类型			
自体移植	18	0(0.0)	0(0.0)
异体移植	108	36(33.3)	51(47.2)
并发疾病			
肺部感染	59	20(33.9)	23(39.0)
移植抗宿主病	30	11(36.7)	15(50.0)
肝功能不全	38	15(39.5)	18(47.4)
疾病转归			
死亡	5	3(60.0)	3(60.0)

注:死亡者中有 1 例既有 EBV 感染又有 CMV 感染

3 讨 论

血液恶性肿瘤的发病率在世界范围内逐年递增,严重危害人类健康,随着临床诊疗水平的提高,造血干细胞移植目前逐渐成为治疗血液疾病的有效手段,使血液肿瘤患者造血系统和免疫系统重建,但是移植后的并发症是影响移植成败的关键因素。由于免疫重建缓慢及免疫抑制剂的应用等原因,使血液肿瘤患者容易发生经输血及供者干细胞病毒感染,以及体内潜伏的病毒复燃^[5-6],其中 EBV 和 CMV 感染是威胁患者临床疗效和生存的重要并发症之一。EBV 和 CMV 的传统血清学检测虽然简便快速,但是敏感性较差,无法提供患者现症感染的临床资料,应用实时荧光定量 PCR 技术检测血浆 EBV DNA 和 CMV DNA,比常规 PCR 技术灵敏度更高,能够更为精确地反映患者 EBV 和 CMV 感染的状态^[7]。

据报道 EBV 人群易感性高,成人 EBV 血清学阳性率超过 95%^[8],而成人血清 CMV 阳性率几乎为 100%,即大部分人都存在既往感染。移植后与 EBV 感染相关的 PTLD 是少见但是致命的并发症^[9],单倍体移植患者移植后发生 PTLD 的危险性较高。本研究分析发现,移植后 EBV 的感染率为 28.6%,男性患者 EBV 感染率稍高于女性患者,AA 感染率高于其他疾病患者,其中 PTLD 的发生率为 1.59%,较文献^[10]报道低。CMV 感染可以累及肝、肺、消化道等,CMV 相关间质性肺炎早期诊断和治疗,可显著降低其病死率。本研究发现,移植后 CMV 的感染率为 40.5%,男性患者 CMV 感染率稍高于女性患者,在 CMV 感染的患者中出现 3 例间质性肺炎,AA 感染率高于其他疾病患者。动态监测患者病毒 DNA 拷贝数为 10²~10⁷ copy/mL,在所有患者中,EBV 和 CMV 检测同时阳性者为 25 例,阳性率为 19.8%。对 PTLD 高风险人群应警惕 EBV 感染的发生,在应用免疫抑制剂加量前应密切监测 EBV DNA 载量,建议定期复查 EBV 病毒载量,以及密切观察相关的临床表现。本研究发生的 2 例 PTLD,由于临床早期识别,并进行及时干预,减少免疫抑制剂用量,应用抗病毒药物,患者预后良好。

综上所述,通过实时荧光定量 PCR 检测血液肿瘤患者血浆 EBV DNA 和 CMV DNA 水平有助于 EBV 和 CMV 感染的早期诊断和疗效判断,其检测灵敏度高,稳定性强。造血干细胞移植后患者移植前后病毒的预防及感染后的抗病毒治疗是非常必要而且有效的,使病毒载量降低并最终转阴,从而可以降低病死率。因此,血浆 EBV DNA 和 CMV DNA 检测具有重要的临床意义。

参考文献

[1] MUTIRANGURA A I,PORNTHANAKASERM W,THEAM-BOONLERS A,et al. DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma Epstein-barr virus[J]. Clin Cancer Res,2013,4 (3):665-669.

[2] INAGAKI J,NOGUCHI M,KURAUCHI K,et al. Effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric acute leukemia [J]. Biol Blood Marrow Transplant,2016,22(2):300-306.

[3] ROWE R G,GUO D,LEE M,et al. Cytomegalovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplantation:risk factors for primary infection and cases of recurrent and late infection at a single center[J]. Biol Blood Marrow Transplant,2016,22(7):1275-1283.

[4] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:232-235.

[5] 叶晓佩,徐维,杨岩,等. 成人骨髓移植中 EB 病毒、CMV 及 BK 病毒感染情况分析[J]. 大连医科大学学报,2017,39(1):34-40.

少、生理功能下降。这种下降首先反映在精子形态上^[12],而精子形态又与精卵结合、顶体反应、精子穿卵等功能息息相关,同时精子形态正常与否在一定程度上也反映了精子染色质浓缩程度和 DNA 片段化水平,从而对胚胎发育及辅助受孕起到一定的预测作用^[13]。另外,随着年龄的增长,男性精液内氧自由基明显增多,当氧自由基过多超过了机体抗氧化能力或抗氧化能力遭到破坏时,可直接氧化 DNA 碱基或通过脂质过氧化产物(MDA)与 DNA 共价键结合,造成 DNA 链损伤或断裂,这种伤害表现可能体现在精子功能与形态上^[14]。CHEN 等^[6]研究认为,随着年龄的增长,精子形态正常率下降趋势明显,尾部缺陷显著增加;而该研究者的另一个交叉研究中则未发现年龄增加对精子形态产生明显的影响,并认为可能是因为研究群体比较年轻的原因^[5]。一篇包含 20 篇相关文献,研究对象年龄为 30~50 岁的 Meta 分析认为,年龄的增加影响男性精子形态正常的比例^[15]。本研究结果发现,>30~40 岁年龄组精子形态正常率最高、头部畸形率最低,与 30 岁以下组和 40 岁以上组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);而 TZI 在 40 岁以上组最高。可能是精子形态参数在>30~40 岁年龄段到达最佳,此后随着年龄的增加,呈下降趋势。

综上所述,季节和年龄因素均可能影响温州地区男性精子的形态正常率,在男性生育力评估和不育的诊断中应考虑这两方面的因素。

参考文献

- [1] 王瑞雪,刘睿智.精子形态与精子功能关系研究进展[J].中华男科学杂志,2007,13(4):348-351.
- [2] 世界卫生组织.人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册[M].4版.北京:人民卫生出版社,2001:51.
- [3] 马兰,刘洋,谭颖,等.精子因素对体外受精-胚胎移植术中受精率的影响[J].实用医学杂志,2016,32(8):1271-1274.
- [4] CENTOLA G M, EBERLY S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration[J]. Fertil Steril, 1999, 72(5):803-808.
- [5] CHEN Z, BAILEY L G, SCHIFF I, et al. Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: The Massachusetts General Hospital experience[J]. J Exp Clin Assist Reprod, 2004, 1(1):2-10.
- [6] CHEN Z, TOTH T, BAILEY L G, et al. Seasonal variation and Age-Related changes in Human Semen parameters[J]. J Androl, 2003, 24(2):226-231.
- [7] ZHANG X Z, LIU J H, SHENG H Q, et al. Seasonal variation in semen quality in China[J]. Andrology, 2013, 1(4):639-643.
- [8] CARLSEN E, PETERSEN J H, ANDERSSON A M, et al. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality[J]. Fertil Steril, 2004, 77(2):358-366.
- [9] 张欣宗,姚康寿.季节因素对精子形态的影响[J].中国优生与遗传杂志,2008,16(7):93-94.
- [10] 谢伟,张海英.中国生育男性精液质量现状和研究进展[J].医学综述,2014,20(14):2562-2564.
- [11] 张树成,贺斌,王弘毅.有关环境与男性精液质量变化的几个问题:我国男性精液质量下降的最新数据[J].中国计划生育学杂志,2003,89(3):189-191.
- [12] 李俊,杨雪梅,赵婷婷,等.精子形态与核蛋白组型转换及 DNA 完整性的相关性[J].实用医学杂志,2015,31(7):1144-1146.
- [13] MURATORI M, MARCHIARFI S, TAMBURRINO L, et al. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters[J]. Hum Reprod, 2008, 23(5):1035-1043.
- [14] 也照燕,吴海峰,张娜,等.不同年龄对精子凋亡率及 DNA 完整性影响的研究[J].中华男科学杂志,2012,18(11):1004-1008.
- [15] KIDD S A, ESKENAZI B, WYROBEK A J. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature[J]. Fertil Steril, 2001, 74(2):237-248.

(收稿日期:2018-01-24 修回日期:2018-04-08)

(上接第 2854 页)

- [6] RUGGERI A, ROTH-GUEPIN G, BATTIPAGLIA G, et al. Incidence and risk factors for hemorrhagic cystitis in unmanipulated haploidentical transplant recipients [J]. Transpl Infect Dis, 2015, 17(6):822-830.
- [7] GREEN M, MICHAELS M G. Epstein-Barr virus infection and post-transplant lymphoproliferative disorder[J]. Am J Transplant, 2013, 13(3):41-54.
- [8] CHAN T S, HWANG Y Y, GILL H, et al. Post-transplant lymphoproliferative diseases in Asian solid organ transplant recipients: late onset and favorable response to treatment[J]. Clin Transplant, 2012, 26(5):679-683.
- [9] SAN-JUAN R, MANUEL O, HIRSCH H H, et al. Current preventive strategies and management of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease in solid organ transplantation in Europe. Results of the ESGICH questionnaire-based cross-sectional survey [J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(6):21.
- [10] XU L P, ZHANG C L, MO X D, et al. Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplant lymphoproliferative disorder after unmanipulated human leukocyte antigen haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors, treatment, and clinical outcomes [J]. Bio Blood Marrow Transplant, 2015, 21(12):2185-2191.

(收稿日期:2018-02-04 修回日期:2018-05-17)