

· 论 著 ·

巢式聚合酶链反应检测人疱疹病毒在人群中的感染情况*

李明月¹, 沈曦月¹, 周 帅¹, 罗 笛², 巢嘉婧², 冯 纯¹, 姚 堃², 冯东举², 周 锋², 李凌云^{1△}
(南京医科大学: 1. 发育遗传学系; 2. 微生物与免疫学系, 江苏南京 210029)

摘 要:目的 调查人群中人疱疹病毒(HHV), 包括人巨细胞病毒(HCMV)、EB 病毒(EBV)、HHV-6 和 HHV-7 的感染情况。**方法** 收集 55 例南京市无偿献血者的外周血标本, 提取全血 DNA, 巢氏 PCR 扩增 HCMV、EBV、HHV-6 和 HHV-7 特异性序列, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。**结果** 55 例献血者中 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 的阳性感染率分别为 50.9%、5.5%、49.1% 和 21.8%, 并且存在多种病毒混合感染。**结论** HHV 筛查对临床相关疾病的诊治具有十分重要的意义, 应引起医务工作者的重视。

关键词: 人疱疹病毒; 感染; 巢式聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2777-03

Identification of human herpes virus in blood donors by nested-polymerase chain reaction*

Li Mingyue¹, Shen Xiyue¹, Zhou Shuai¹, Luo Di², Chao Jiajing², Feng Chun¹,
Yao Kun², Feng Dongju², Zhou Feng², Li Lingyun^{1△}

(1. Department of Developmental Genetics; 2. Department of Microbiology and Immunology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of four kinds of human herpes viruses (HHV) in the blood of blood donors, including human cytomegalovirus (HCMV), epstein-barr virus (EBV), HHV-6, HHV-7. **Methods** DNA was prepared in whole blood samples collected from 55 blood donors. The presence of DNA of EBV, HCMV, HHV-6, HHV-7 were examined by specific nested-polymerase chain reaction. **Results** Prevalence of EBV, HCMV, HHV-6 and HHV-7 in whole blood were 50.9%, 5.5%, 49.1% and 21.8% respectively. Multi-infections were observed in some objects. **Conclusion** The examination of HHV infection is useful in diagnosis and treatment of HHV related disease.

Key words: human herpes virus; infection; nested-polymerase chain reaction

人疱疹病毒(HHV)是一类中等大小的双链 DNA 病毒, 根据其保守结构蛋白的遗传特性可分为 α 、 β 、 γ 三个亚科。HHV 初次感染后持续存在于宿主体内, 形成潜伏感染, 当受到各种非特异性刺激、抵抗力减弱、免疫功能下降时, 易发生病毒的再激活, 从而导致多种疾病。HHV-6 和 HHV-7 是婴幼儿急疹的病因^[1]。此外, HHV-6 与淋巴系统增生性疾病、慢性疲劳综合征、多发性硬化症、急性脑炎、自身免疫病和免疫缺陷病、器官移植后感染等多种疾病有关^[2]。人巨细胞病毒(HCMV)感染可导致胎儿宫内感染, 造成流产、死胎、新生儿早产及畸胎等一系列不良后果^[3]。EB 病毒(EBV)也与人类多种疾病相关, 如传染性单核细胞增多症、鼻咽癌和霍奇金病等^[4]。本文利用巢式 PCR 法对健康人群中 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 的感染情况进行了初步调查。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 7 月 55 例献血者均采集外周血标本, 其中男 37 例, 女 23 例, 年龄 20~86 岁。

1.2 仪器与试剂 血液 DNA 提取试剂盒, DNA 标记物购自北京天根生物技术有限公司, PCR 反应试剂 2×Taq 混合标记物试剂购自北京百泰克生物技术有限公司。设计合成 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 巢式 PCR 扩增引物, 内引物大小分别为 330、389、163、264 bp。引物序列见表 1。引物均由上

海赛百盛基因技术有限公司合成, 使用时用去离子水溶解至 10 pmol/ μ L 浓度。

1.3 方法

1.3.1 血液 DNA 的提取 300 μ L 含抗凝剂的血液中加入 750 μ L 细胞裂解液, 颠倒混匀 5 次, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清; 加入 150 μ L Proteinase K-SDS 缓冲液, 涡旋混匀。65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 其间颠倒混匀数次; 加入 150 μ L 异丙醇, 颠倒混匀至出现丝状或簇状沉淀(基因组 DNA); 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 150 μ L 70% 乙醇, 涡旋振荡 5 s, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清。将离心管倒置在干净的吸水纸上停留至少 5 min(确保沉淀在管中), 空气干燥 DNA 直至所有的液体挥发干净后加入 100 μ L TE 溶解 DNA。

1.3.2 巢式 PCR 检测 4 种病毒 DNA 巢式 PCR 外引物、内引物反应体系均为 15 μ L, 包括 7.5 μ L 2×Taq 混合标记物试剂, 4.5 μ L dd H₂O, 上、下游引物各 0.5 μ L, 2 μ L 模板 DNA。EBV 外、内引物 PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 热循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min; HCMV 外、内引物 PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 热循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。HHV-6 外、内引物 PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 热循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273235, 81201520); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201410312060X)。作者简介: 李明月, 女, 本科在读, 主要从事病毒与肿瘤分子生物学研究。△ 通讯作者, E-mail: llyun2000@sina.com。

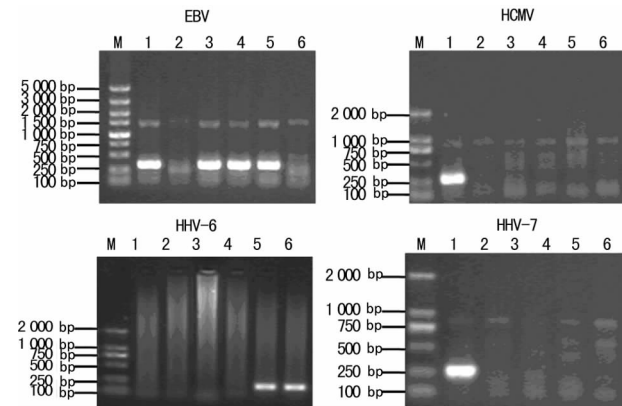
延伸 8 min。HHV-7 外、内引物 PCR 反应参数为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,热循环 30 次,72 ℃ 延伸 8 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 进行数据处理及统计学分析。

表 1 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 引物序列		
引物	DNA 序列(5'~3')	
EBV	外引物	P1:GCA GTA ACA GGT AAT CTC TGG
		P2:ACC AGA AAT AGC TGC AGG ACC
	内引物	P3:GAT TTG GAC CCG AAA TCT GA
		P4:CCT CCC TAG AAC TGA CAA TTG G
HCMV	外引物	P1:GAG GAT GAC GAT AAC GAG GA
		P2:TCA AAC AGC ACA TTA GAC ACA CGG
	内引物	P3:GAC AGT AGT AGC GGC AGC CA
		P4:GAC TCG CGA ATC GTA CGC GA
HHV-6	外引物	P1:AGT CAT CAC GAT CGG CGT GTA TC
		P2:TAT CTA GCG CAA TCG CTA TGT CG
	内引物	P3:TCG ACT CTC ACC CTA CTG AAC GAG
		P4:TGA CTA GAG AGC GAC AAA TTG GAG
HHV-7	外引物	P1:AGT TCC AGC ACT GCA ATC G
		P2:CAC AAA AGC GTC GCT ATC AA
	内引物	P3:CGC ATA CAC CAA CCC TAC TG
		P4:GAC TCA TTA TGG GGA TCG AC

2 结 果

2.1 健康献血者外周血 DNA 巢式 PCR 结果 对提取的全血 DNA 进行 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 特异性引物巢式 PCR 扩增,1% 琼脂糖 DNA 电泳检测,见图 1。



M:DNA 标记物。

图 1 1~6 号献血者外周血 DNA 巢式 PCR 结果

2.2 4 种病毒的感染情况 55 例献血者血液 DNA 标本中 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 的阳性感染率分别为 50.9% (28/55)、5.5% (3/55)、49.1% (27/55) 和 21.8% (12/55)。EBV 与 HHV-6, HHV-6 与 HHV-7, EBV 与 HHV-7, HHV-6、HCMV 与 EBV, HCMV、EBV 与 HHV-7, HHV-6、EBV 与 HHV-7 混合感染率分别为 25.5% (14/55)、7.2% (4/55)、

3.6% (2/55)、1.8% (1/55)、3.6% (2/55)、1.8% (1/55)。

3 讨 论

本研究通过巢式 PCR 检测南京地区部分健康人群 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 的感染情况,结果表明在 55 例献血者中,EBV 和 HHV-6 检出率均较高,分别为 50.9% 和 49.1%,HHV-7 和 HCMV 的检出率略低,分别为 21.8% 和 5.5%。另外,在 55 例献血者外周血中,存在多例个体有混合感染,其中有 4 例同时检出 3 种 HHV DNA 片段,表明 3 种 HHV 能共同潜伏于宿主中。在混合感染中 HHV-6 与 EBV 混合感染所占比例最高,可以推测共同感染时多种病毒之间存在相互作用,已有研究显示 HHV-6、HHV-7、EBV、HCMV 病毒的再活化存在协同作用[5-6]。

HHV 感染在人群中较普遍,原发感染常发生在婴儿期,以后长期潜伏于宿主体内,不引起临床症状,但当人体免疫功能低下时,体内潜伏的病毒可被激活。临床上造血干细胞移植和肾移植等多数脏器移植后常可引起 EBV、HCMV、HHV-6 和 HHV-7 的再激活。激活的病毒感染患者的 T、B 淋巴细胞,进一步加重机体免疫功能的损伤,从而导致病毒性肺炎、间质性肺炎等各种并发症,最终导致器官移植的失败[7]。因此器官移植手术前对供体和接受者进行 HHV 感染的筛查,采取适当的抗病毒预防和治疗对于器官移植的成败具有至关重要的作用。

近年来 HHV 在肿瘤发生、发展中的作用引起了肿瘤学家、病毒学家和免疫学家的广泛关注。大量研究发现 EBV 感染与低分化鼻咽癌密切相关[8-9],鼻咽癌是南方地区,特别是广东和广西地区高发的恶性肿瘤。HHV-6 也是一种肿瘤相关病毒,其 PDR7 基因具有转化能力,发现其与人类多种肿瘤如淋巴瘤、白血病、神经胶质瘤等有关[10]。有报道在人脑胶质瘤组织标本中检测出 HHV-6、HCMV 的核酸和蛋白,其阳性率明显高于正常脑组织[11-13]。因此对于 HHV 相关肿瘤的病毒学监测,以及合理的抗病毒治疗也应引起医疗工作者的重视。

参考文献

[1] Caselli E, Di Luca D. Molecular biology and clinical associations of roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7[J]. New Microbiol, 2007, 30(3): 173-187.

[2] Lautenschlager I, Razonable RR. Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review [J]. Transpl Int, 2012, 25(5): 493-502.

[3] Alenda R, Alvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, et al. Identification of the major HHV-6 antigen recognized by cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis[J]. Eur J Neuro Neur, 2014, 21(8): 1096-1101.

[4] Mercorelli B, Lembo D, Palu G, et al. Early inhibitors of human cytomegalovirus: state-of-art and therapeutic perspectives [J]. Pharmacol Ther, 2011, 131(3): 309-329.

[5] Grywalska E, Rolinski J. Epstein-Barr Virus-Associated lymphomas[J]. Semin Oncol, 2015, 42(2): 291-303.

[6] Seishima M, Yamanaka S, Fujisawa T, et al. Reactivation of human herpesvirus (HHV) family members other than HHV-6 in drug-induced hypersensitivity syndrome[J]. Br J Dermatol, 2006, 155(2): 344-349.

的环境中,有利于室内尘螨寄生繁殖,夏季使用空调,门窗紧闭,空气不流通,患者长时间逗留在空调房中,接触和吸入尘螨的机会增多。对于螨虫过敏患者要保持室内通风干燥,经常清洁除尘,勤洗、勤晒衣被、床单,夏季开空调时可用特制的滤过膜,保持室内空气新鲜。对于因尘螨过敏而导致的疾病,目前可采用脱敏疗法,可以减轻症状和疾病的发作。食入性过敏原中常见的有海鲜类、奶制品及谷类。可能由于本地区是南方近海地区,海鲜丰富,食用较多,因此也就出现较高的阳性率。统计发现牛奶过敏主要集中在婴幼儿,可能由于婴幼儿是食用牛奶的主要人群,同时由于婴幼儿消化系统尚未发育完全,故对致敏性抗原的屏障保护功能尚不健全,一些通透性高、大分子物质容易经过肠道黏膜组织进入患儿体内,进而引起变态反应发生。谷类过敏在本地区也比较常见,这在其他相关文献中鲜有报道,具体原因有待研究。过敏性疾病的过敏原种类繁多,常因环境、地理位置、生活习惯不同而有所差异,故对其诊断及防治应考虑地区差异性。本研究分析了中山地区常见过敏原阳性率分布情况,可提示临床更有针对性地发现引起患者过敏的过敏原。ImmunoCAP250 可以提供 600 种过敏原检测,并可根据地区特点定制相关的过敏原试剂。随着过敏性疾病患者的增加,目前已经根据国内人群的过敏原谱研制出相关的过敏原检测产品,具有较强的临床应用价值^[6]。

过敏原过敏程度阳性分级研究显示尘螨类反应级数为 1~2 级(轻度过敏)的阳性率与反应级数 3~6 级(中重度过敏)的阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);其他各类过敏原组合反应级数为 1~2 级(轻度过敏)的阳性率明显高于反应级数 3~6 级(中重度过敏)的阳性率($P<0.05$)。值得注意的是,同一患者有 2 种或 2 种以上混合过敏原阳性率高达 82.0%。且尘螨类和动物表皮类常混合致敏。说明大多数患儿被多种过敏原致敏,这与国内相关报道一致^[7]。这表明在高敏状态下可同时多种过敏原产生过敏,且提示单一变应原脱敏治疗效果不佳。不同性别患者过敏原阳性检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。这表明过敏性体制无性别倾向。过敏原特异性 IgE 阳性率随着年龄增加而降低。主要原因可能是 1~<20 岁患者处于身体发育期,自身免疫系统不完善,易受外界因素的侵扰。随着年龄增长,免疫系统功能日趋成熟,对

过敏原的免疫应答反应也逐渐增强。由于脱敏的关系,过敏原阳性率随年龄增长而降低。因此,在发现过敏后如何进行饮食干预和环境控制显得非常重要。本研究说明过敏性特异性 IgE 产生与年龄、机体免疫状态有一定的关系,关系如何有待进一步研究。

综上所述,应用 ImmunoCAP250 系统,使用吸入性与食入性等组合联合检测过敏原,对过敏性疾病患者一次可以进行 600 多种过敏性物质特异性 IgE 的检测,本研究提示可进一步选择本地区阳性率较高的过敏原组合中具体单一过敏原进行特异性 IgE 检测,可更好地为临床过敏性疾病的诊断和治疗提供依据,并可提示患者在日常生活中避免接触导致自身过敏的致病因素。

参考文献

[1] Kim JS, Ouyang F, Pongracic JA, et al. Dissociation between the prevalence of atopy and allergic disease in rural China among children and adults[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(5): 929-935.

[2] Johansson SG. ImmunoCAP specific IgE test; an objective tool for research and routine allergy diagnosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(3): 273-279.

[3] Fall BI, Niessner R. Detection of known allergen-specific IgE antibodies by immunological methods[J]. Methods Mol Biol, 2009, 509(2): 107-122.

[4] Robinson M, Smart J. Allergy testing and referral in children[J]. Aust Fam Physician, 2008, 37(4): 210-213.

[5] 闭雄杰,覃正学,兰玉清. 118 例过敏性疾病过敏原检测分析[J]. 检验医学, 2011, 26(8): 555-557.

[6] 丁红梅,王学谦,赵俊芳,等. 食物过敏原特异性 IgE 检测方法的建立及临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(11): 1221-1223.

[7] 刘素琴,董松英,李爱兰. 反复发作性过敏性紫癜患儿血清过敏原特异性 IgE 检测[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2005, 19(5): 286-287.

(收稿日期:2015-05-28)

(上接第 2778 页)

[7] Gotoh M, Yoshizawa S, Katagiri S, et al. Human herpesvirus 6 reactivation on the 30th day after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation can predict grade 2-4 acute graft-versus-host disease[J]. Trans Infec Dis, 2014, 16(3): 440-449.

[8] Weseslindtner L, Kerschner H, Steinacher D, et al. Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8+ T cell responses in lung transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2012, 12(8): 2172-2180.

[9] Sanz J, Andreu R. Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder after allogeneic stem cell transplantation[J]. Curr Opin Oncol, 2014, 26(6): 677-683.

[10] Lan YY, Hsiao JR, Chang KC, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2a promotes invasion of nasopharyngeal carci-

noma cells through ERK/Fra-1-Mediated induction of matrix metalloproteinase 9[J]. J Virol, 2012, 86(12): 6656-6667.

[11] Wang L, Tian WD, Xu X, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) protein induction of epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cancer, 2014, 120(3): 363-372.

[12] Lacroix A, Collot-Teixeira S, Mardivirin L, et al. Involvement of human herpesvirus-6 variant B in classic Hodgkin's lymphoma via Dr7 oncoprotein[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(19): 4711-4721.

[13] Chi J, Gu B, Zhang C, et al. Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma[J]. J Infect Dis, 2012, 206(9): 1394-1398.

(收稿日期:2015-06-18)