

# 定量检测 HCMV pp67 mRNA 快速诊断人巨细胞病毒活动性感染

钟 峰,赵 俊,张业婷,姚 瑶,王明丽

**摘要** 目的 建立实时荧光定量逆转录 PCR (Real time RT-qPCR) 方法,检测外周血中人巨细胞病毒 (HCMV) pp67 mRNA 的拷贝数,用于临床快速诊断 HCMV 活动性感染。方法

采用 RT-qPCR 测定 86 份癌症患者外周血标本中的 HCMV pp67 mRNA 拷贝数,并与 HCMV pp65 抗原血症检测及 HCMV 分离培养的实验结果进行比较。结果 86 例癌症患者中,HCMV 病毒分离检测阳性率 3.49% (3 例);实时荧光定量 RT-PCR 检测阳性率 17.44% (15 例),灵敏度为 100%,特异性为 85.54%;HCMV pp65 抗原血症检测阳性率为 10.47% (9 例),灵敏度为 66.7%,特异度为 92.8%。两者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。通过受试者工作特征 (ROC) 曲线分析,RT-qPCR 检测每  $2 \times 10^5$  个外周血白细胞中 HCMV 拷贝数的截断点值为 201.5;此病毒拷贝数可作为诊断 HCMV 活动性感染的参考阈值。结论 应用 RT-qPCR 检测 HCMV 活动性感染,灵敏度高、特异性好;并能够为抗病毒治疗供重要的参考依据。

**关键词** 人巨细胞病毒;pp67 mRNA;实时荧光定量 RT-PCR;活动性感染

**中图分类号** R 373.9

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0324-05

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 属疱疹病毒  $\beta$  亚科,为双链 DNA 病毒。在人群中感染普遍,我国人群感染率高达 90% 以上<sup>[1]</sup>。HCMV 在原发性感染后会潜伏于人体组织内并形成终身感染<sup>[2]</sup>。通常对免疫正常人无危害,但对免疫功能低下人群可造成致死性损伤<sup>[3-4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>显示,在肿瘤组织中检测到 HCMV 核酸及抗原,表明 HCMV 感染可能与肿瘤发生发展相关。HCMV pp67 是由 UL65 基因编码的一种病毒结构性皮层蛋白,是 HCMV 复制晚期表达的基因产物。因此,pp67 mRNA

的检出能够表明病毒呈活动性感染状态<sup>[6]</sup>。临床研究<sup>[7]</sup>表明,目前对 HCMV 早期活动性感染的诊断,远不能达到临床需求,存在盲目用药或药物毒性反应发生等不良反应。为了更好地预防和控制 HCMV 活动性感染,该研究以 HCMV pp67 mRNA 为靶基因,定量检测 HCMV 基因拷贝数,目的是建立一个更适用于临床需求的科学检测方法,为临床快速诊断与抗病毒治疗用药提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株与病毒株** 人胚成纤维细胞株由安徽医科大学微生物教研室自行制备,PCR 鉴定排除疱疹病毒污染。HCMV AD169 毒株由复旦大学医学院微生物教研室提供,本实验室保存。

**1.2 病例资料** 收集 2015 年 1 月 5 日~2 月 13 日安徽医科大学第一附属医院老年科癌症患者外周血标本 86 份,使用 EDTA-K2 抗凝管收集患者静脉血 3 ml,分别用于实时荧光定量 PCR 及 pp65 抗原血症检测和病毒分离。

**1.3 实验试剂与仪器** DMEM 培养基、小牛血清 (美国 Gibco 公司);mRNAiso Blood 抽提试剂盒、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒、pMD18-T Vector (日本 Takara 公司);HCMV Brite Turbo Kit (荷兰 IQ 公司);DNA 凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒 (杭州爱思进生物技术有限公司);SYBR Green I Master、荧光定量 PCR Lightcycler® 480 仪 (瑞士 Roche 公司)。

**1.4 PCR 引物** 以 GenBank 中选择病毒复制所必需的在各株间具有高度保守性的 HCMV 晚期基因 (pp67 基因) 序列进行引物设计,由上海 Invitrogen 公司合成。pp67 上游引物为 5'-AAAAGAGAC-CGCGTCTCTGG-3',下游引物为 5'-TAGAGCCT-GAGATGATGATG-3',扩增产物为 202 bp。以 HCMV Town 株的 UL144 基因为模板合成 PCR 引物,UL144 上游引物为:5'-TCGTATTACAAAAGCG-GAGAGGAT-3',下游引物为 5'-ACTCAGACACGCT-TCCGTAA-3',扩增产物为 736 bp。

2015-12-25 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:30872253);安徽省教育厅自然科学基金重大项目 (编号:KJ2012ZD08)

作者单位:安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

作者简介:钟 峰,男,硕士研究生;

王明丽,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:1952987441@qq.com

**1.5 病毒分离** 将第5~7代的HF细胞制成 $1 \times 10^5$ 个/ml细胞悬液接种于细胞瓶,置5% CO<sub>2</sub> 37℃温箱培养。抗凝血标本处理:将抗凝管采集的患者静脉血3 ml静置1 h后,于4℃ 2 000 r/min离心10 min,取离心后得到的白细胞0.2 ml接种至已长成单层的HF细胞,37℃孵育1 h,更换维持液,置5% CO<sub>2</sub> 孵育箱37℃培养。接种标本的细胞每周传代1次,每天通过倒置显微镜观察细胞有无CPE。

**1.6 HCMV pp65 抗原血症** 应用荷兰IQ公司生产的HCMV Brite Turbo Kit(L14041)检测血标本中白细胞HCMV pp65抗原。试剂盒检测步骤:使用裂解液去除红细胞,1 000 r/min离心10 min收集白细胞;调整细胞数为 $2 \times 10^5$ /ml,制备涂片;固定破膜;加入一抗,孵育60 min;加入二抗,孵育30 min;封片,荧光显微镜下读片,判读结果。

### 1.7 荧光定量RT-PCR方法建立

**1.7.1 标准品的构建** 采用mRNAiso Blood抽提试剂盒,从感染HCMV AD169株的细胞内提取总RNA,RT-PCR扩增并制备pp67基因的目的片段,扩增产物经过回收纯化后与pMD18-T载体连接成重组质粒,转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,挑取阳性克隆,用AxyPrep小提质粒试剂盒提质粒,用PCR对重组质粒进行鉴定。根据重组质粒的光密度(optical density, OD)值换算出重组质粒的拷贝数,梯度稀释后作为标准品。

**1.7.2 荧光定量RT-PCR反应条件** 实时荧光定量PCR反应条件(循环参数):95℃ 5 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s 72℃ 20 s(40循环)40℃ 10 s。20  $\mu$ l总体积最适反应体系为:引物0.5  $\mu$ mol/l,SYBER Green I Master 10  $\mu$ l、H<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l、DNA模板2.0  $\mu$ l。

**1.7.3 灵敏度及稳定性试验** 以制备的标准品为模板,进行10倍系列梯度稀释,取8个稀释度的mRNA按反应条件和体系进行荧光定量RT-PCR,以不同模板浓度的扩增曲线所在的Ct值确定此方法的灵敏度。并以批内每个稀释度的2个复孔进行平行试验。

**1.7.4 特异性试验** 分别对与HCMV同种属的其它疱疹病毒如HSV1、HSV2和VZV进行RNA抽提并作为模板,并设立正常细胞对照及空白对照,在相同的反应体系和扩增参数条件下进行实时荧光定量RT-PCR。鉴定该方法的特异性。

**1.7.5 标准曲线的制备** 将标准品从 $4.08 \times 10^7$ 拷贝数/ $\mu$ l依次10倍系列稀释,共计7个浓度梯

度。每个稀释度进行2次重复,以平均Ct值为横坐标,模板浓度的对数为纵坐标自动生成标准曲线。

**1.8 结果判定** 病毒分离结果着重在镜下观察接种标本后的HF细胞单层上在4周内有无出现HCMV特征性CPE;对CPE阳性者,取样进行PCR,检测HCMV UL144基因。阳性的PCR产物经测序比对后,方可确认为病毒分离阳性;HCMV pp65抗原血症检测阳性结果的认定为,在荧光显微镜下观察到HCMV pp65阳性细胞的细胞核呈均匀的苹果绿荧光,以 $2 \times 10^5$ 个多形核白细胞中pp65抗原阳性细胞 $\geq 1$ 个为阳性;全血HCMV实时荧光定量PCR检测结果以全血HCMV mRNA拷贝数 $\geq$ 最低检测限为阳性。

**1.9 统计学处理** 采用SPSS 17.0软件进行统计分析,计数资料进行 $\chi^2$ 检测。ROC曲线及最佳截断点评估荧光定量RT-PCR诊断的价值,以曲线下面积表示。

## 2 结果

### 2.1 病毒分离CPE观察及分离株鉴定

**2.1.1 细胞CPE观察** 镜下观察在86份接种了临床标本的细胞单层上,发现病毒分离阳性的细胞明显变圆、肿胀、折光性增强、形态及排列不规则、细胞内颗粒增多,呈典型的巨细胞病毒特征性CPE现象。见图1。

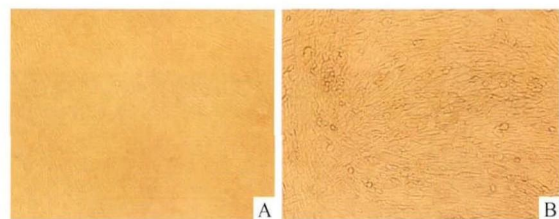


图1 临床标本在HF细胞上分离培养CPE结果观察  $\times 100$   
A:病毒分离阴性;B病毒分离阳性

**2.1.2 分离株鉴定** 本次实验成功分离出3例HCMV临床病毒株。PCR检测阳性产物由通用生物系统(安徽)有限公司对分离的病毒株进行UL144基因鉴定,测序结果经过BLAST比对显示,被测基因片段序列与GenBank报道Town株序列匹配达98%,确认为HCMV临床病毒分离株。见图2。

**2.2 HCMV pp65 抗原血症检测** 86份样本中,检测HCMV pp65抗原血症阳性患者9例(阳性率10.47%),荧光显微镜下观察HCMV pp65阳性细胞

核呈现出均匀绿色荧光(图 3B),阳性细胞数  $\geq 1/2 \times 10^5$  外周血白细胞判为阳性,阳性标准品对照由试剂盒提供(图 3A)。红色荧光为伊文斯兰衬染细胞激发出的红光。

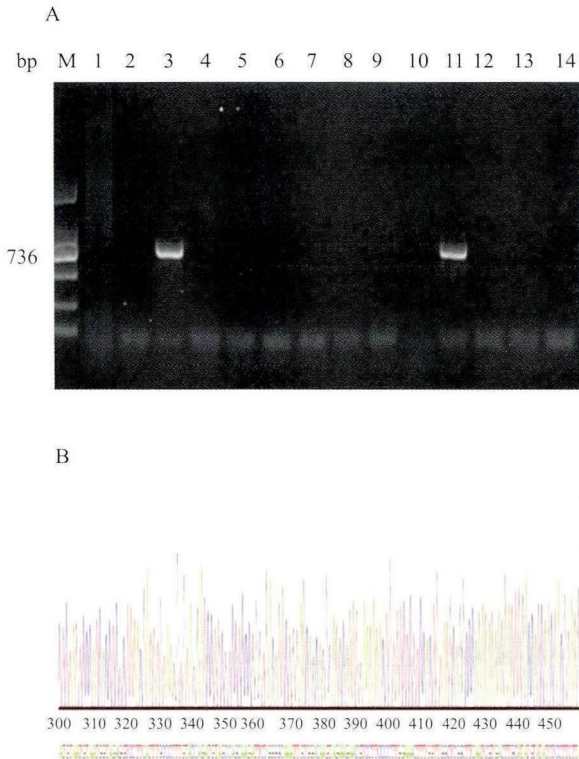


图 2 HCMV 临床分离株鉴定

A: HCMV 病毒分离 PCR 产物电泳图; B: PCR 产物测序图; M: DNA Marker; 1~14: 检测样本(3、11 样本为 PCR 检测阳性)

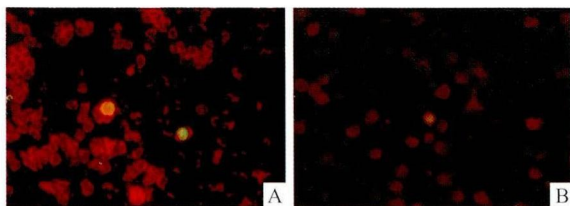


图 3 荧光显微镜观察 HCMV pp65 抗原血症阳性细胞  $\times 400$   
A: 阳性标准品 ; B: 检测阳性样本

**2.3 HCMV pp67 mRNA 荧光定量 RT-PCR 方法的建立** 本次实验成功建立了 HCMV pp67 mRNA 荧光定量 RT-PCR 方法,构建了 HCMV 的阳性标准品,制作了标准曲线,扩增效率达到 1.786,反应灵敏度达到  $4.08 \times 10$  copies/ $\mu$ l,对于已构建的阳性样本为特异性扩增,而阴性对照物无特异性扩增,组内与组间重复性良好。

**2.3.1 灵敏度及稳定性试验** 实时荧光定量 RT-PCR 检测 HCMV pp67 mRNA 扩增曲线,呈典型的 S

形上升曲线,模板在每两个相邻的稀释度之间的 Ct 值相差约 3 个单位,实验检测模板最低含量限度为 40.8 拷贝数/ $\mu$ l。每个稀释度重复的平行对照 Ct 值基本一致,表明实验体系的稳定性良好,见图 4。

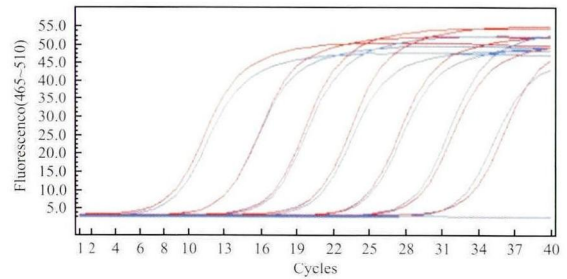


图 4 荧光定量 RT-PCR 灵敏度与稳定性试验扩增曲线

**2.3.2 特异性试验** 检测所构建方法的特异性,对 HCMV、HSV1、HSV2、VZV、正常细胞对照的 DNA 模板进行荧光定量 RT-PCR,非靶目的 DNA 对照组无荧光曲线的增长,只有 HCMV 病毒对照组出现阳性扩增曲线,此结果显示该方法有良好的特异性见图 5。

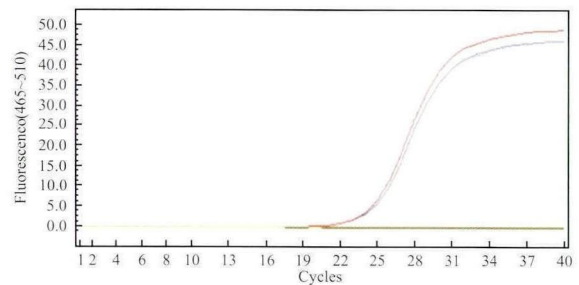


图 5 荧光定量 RT-PCR 检测特异性

**2.3.3 标准曲线的制备** 分别用 10 倍系列稀释的标准品作为模板,以模板拷贝数的对数作为横坐标。以平均 Ct 值为纵坐标,生成出一条直线型的标准曲线:方程为  $Y = -3.97 \log(X) + 42.65$ ,斜率为 -3.970,扩增效率为 1.786,见图 6。

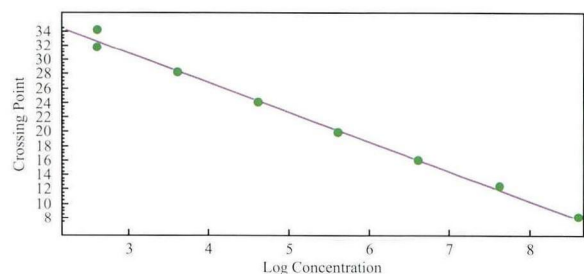


图 6 荧光定量 RT-PCR 灵敏度实验标准曲线

**2.4 HCMV pp67 mRNA 荧光定量 PCR 与 pp65**

**抗原血症检测结果比较** 对 86 份患者全血进行检测, HCMV pp67 mRNA 荧光定量 PCR 阳性为 15 例, 阳性率 17.44%。HCMV pp65 抗原血症检测阳性 9 例, 阳性率 10.47%。这两种方法所得结果符合率为 90.70%。两种检测方法结果之间进行统计学处理, 应用校正  $\chi^2$  检验公式, 即 HCMV pp67 mRNA 荧光定量 PCR 检测阳性率与 pp65 抗原血症检测阳性率相比, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 30.308, P < 0.01$ )。

**2.5 HCMV pp67 mRNA 荧光定量 RT-PCR 检测结果与病毒分离的比较** 病毒分离阳性样本(3 例)中 RT-qPCR 检测全为阳性, RT-qPCR 检测阴性样本(71 例)中病毒分离未见阳性。RT-qPCR 检测方法灵敏度为 100%, 特异性为 85.54%, 阳性预测值(PPV)0.20, 阴性预测值(NPV)1.00, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 9.372, P < 0.05$ )。

**2.6 HCMV 荧光定量 RT-PCR 最佳诊断阈值的确定** 以灵敏度为纵坐标, 误诊率(1-特异度)为横坐标, 在 SPSS17.0 软件上作 ROC 曲线并计算曲线下面积。HCMV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的 ROC 曲线下面积为 0.823, 准确性较好。以 Youden 指数接近 1 时对应的数值为 cutoff 值, 得到 cutoff 值为 201.5 拷贝数/ $2 \times 10^5$  PBLs, 提示此方法检测的 cutoff 值可作为临床诊断 HCMV 活动性感染的指标。见图 7。

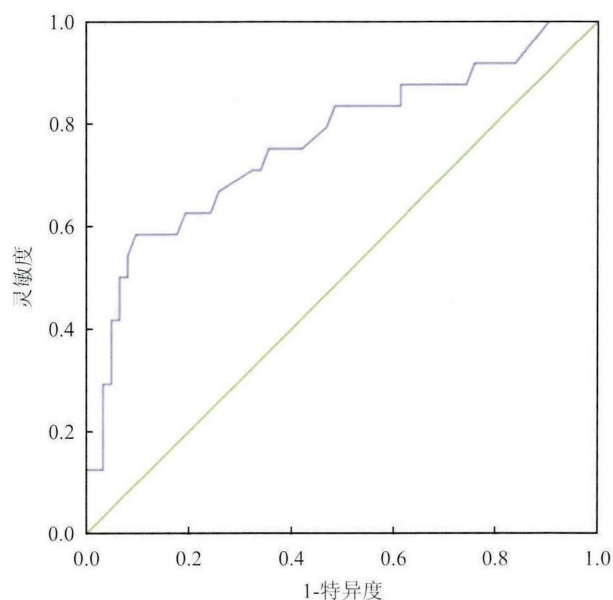


图7 HCMV RT-qPCR 诊断 HCMV 活动性感染的 ROC 曲线

### 3 讨论

HCMV 基因复制具有时序性, 分为立即早期

(IE)、早期(E)和晚期(L)基因, 活动性感染的重要标志就是晚期基因的出现。目前 pp65 抗原血症检测被广泛认为是 HCMV 活动性感染的“金标准”<sup>[8]</sup>。但是这种方法也存在一些缺点: 实验工作量多, 耗时长, 观察结果需要专业熟练的技术人员, 技术不能够标准化, 精确的临床确诊参考阈值仍然没有确定。HCMV pp67 mRNA 是病毒复制晚期表达的基因, 文献<sup>[9]</sup>报道 pp67 mRNA 检测与 IE 基因比较, 前者能够更好地反映 HCMV 在体内活动性感染。

本研究对 86 份癌症患者外周血白细胞样本进行检测。以荧光定量 RT-PCR 和 HCMV pp65 抗原血症检测结果相比较, 二者符合率为 90.70%。通过 ROC 曲线分析, 荧光定量 RT-PCR 检测的 cutoff 值为 201.5 拷贝数/ $2 \times 10^5$  PBLs, 对应灵敏度为 73.33%, 特异度为 72.26%。但是由于标本数量过少及检测方法有待进一步优化, 实验数据有待进一步提高。

恶性肿瘤现已成为我国人口死亡的主要原因之一, 现主要治疗手段有手术、化疗和放疗, 而在杀死癌细胞的同时也会杀死大量正常细胞, 导致肿瘤患者免疫功能大大降低, 并由此诱导 HCMV 再激活而导致活动性感染。与此同时, HCMV 活动性感染对肿瘤细胞周期的影响、参与肿瘤细胞的凋亡及调节肿瘤细胞的免疫逃逸, 对肿瘤的发展起到重要的作用, 并能够增加肿瘤的恶性程度<sup>[10-11]</sup>, 目前研究<sup>[12-14]</sup>表明, HCMV 感染与肿瘤细胞数量及恶性程度有关。将抑制 HCMV 复制及调节病毒基因编码的 mRNA 表达作为肿瘤治疗的一个新靶目标, 能够拓展肿瘤治疗的一个新领域, 为临床治疗肿瘤提供新的思路, 同时也能预防并减少因 HCMV 活动性感染造成器官损伤, 包括肺炎、肠炎、视网膜炎等终末器官综合征。

### 参考文献

- [1] Michaelis M, Baumgarten P, Mittelbronn M, et al. Oncomodulation by human cytomegalovirus; novel clinical findings open new roads [J]. Med Microbiol Immunol, 2011, 200(1): 1-5.
- [2] Yun J H, Lee S O, Jo K W, et al. Infections after lung transplantation: time of occurrence, sites, and microbiologic etiologies [J]. Korean J Intern Med, 2015, 30(4): 506-14.
- [3] Compels U A, Larke N, Sanz-Ramos M, et al. Human cytomegalovirus infant infection adversely affects growth and development in maternally HIV-exposed and unexposed infants in Zambia [J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(3): 434-42.
- [4] Johnsen J I, Baryawno N, Sderberg-Nauclér C. Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? [J]. Oncotarget, 2011, 2

- (12):1329-38.
- [5] Kuo C P, Wu C L, Ho H T, et al. Detection of cytomegalovirus re-activation in cancer patients receiving chemotherapy[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(3):221-7.
- [6] Saracino A, Colucci R, Latorraca A, et al. The effects of preemptive therapy using a very low threshold of pp65 Antigenemia to prevent cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients; a single-center experience[J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(1):182-4.
- [7] Ahmed A. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection[J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2011, 11(5):475-503.
- [8] Seehofer D H, Meisel N, Rayes A, et al. Prospective evaluation of the clinical utility of different methods for the detection of human cytomegalovirus disease after liver transplantation[J]. *Transplant*, 2004, 4(8):1331-7.
- [9] Degré M, Kristiansen K I, Rollag H, et al. Detection of human cytomegalovirus(HCMV) pp67-mRNA and pp65 antigenemia in relation to development of clinical HCMV disease in renal transplant recipients[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(5):254-60.
- [10] Soroceanu L, Cobbs C S. Is HCMV a tumor promoter? [J]. *Virus Res*, 2011, 157(2):193-203.
- [11] Hoeber G, Vogel J U, Lukashenko P, et al. Impact of persistent cytomegalovirus infection on human neuroblastoma cell gene expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(2):395-401.
- [12] McCormick A L, Skaletskaya A, Barry P A, et al. Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis(vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis(vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses[J]. *Virology*, 2003, 316(2):221-33.
- [13] Martin M, Doerr H W, Cinatl J. The Story of Human Cytomegalovirus and Cancer: Increasing Evidence and Open Questions [J]. *Neoplasia*, 2009, 11(1):1-9.
- [14] Cobbs C S, Soroceanu L, Denham S, et al. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3):724-30.

## The quantitative detection of human cytomegalovirus pp67 mRNA in rapid diagnosis of active human cytomegalovirus infection

Zhong Feng, Zhao Jun, Zhang Yeting, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract** *Objective* To explore the detection of HCMV pp67 mRNA in peripheral blood by RT-PCR for the diagnosis of HCMV active infection. *Methods* The peripheral blood samples of 86 postoperative cancer patients were measured by the real-time quantitative PCR(RT-PCR). The results were compared with pp65 antigenemia test and HCMV virus isolation. *Results* In the 86 cancer patients, 15 patients were positive in pp67 mRNA RT-PCR, 9 patients were positive in pp65 antigenemia test, 3 patients were positive in virus isolation. The sensitivity of HCMV pp67 mRNA RT-PCR was 100%, and the specificity was 87.9%, the sensitivity of HCMV pp65 antigenemia was 66.7% and the specificity was 92.8%, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The result of ROC curve analysis showed the cutoff value of real-time RT-qPCR is 201.5copies/ $2 \times 10^5$  Peripheral blood leucocyte cells, these hint this virus content can be used as a reference threshold of HCMV active infection. *Conclusion* The sensitivity and specificity of the RT-qPCR are good, which can provide fast and accurate diagnosis of HCMV active infection, and lay the basis for clinical antiviral treatment.

**Key words** human cytomegalovirus; pp67 mRNA; Real time RT-PCR; active infection