

# 包膜糖蛋白 B 基因分型与造血干细胞移植后 CMV 感染患者病毒载量和抗病毒疗程的关系

吴小津 汪颖 朱子玲 徐杨 何广胜 韩悦  
唐晓文 傅琤琤 仇惠英 孙爱宁 吴德沛

**【摘要】目的** 探讨 CMV 包膜糖蛋白 B (CMVgB) 基因分型对造血干细胞移植后 CMV 感染患者病毒载量和抗病毒疗程的影响。**方法** 选择接受造血干细胞移植且 CMV-DNA 阳性的 115 例 CMV 感染患者, 采用荧光定量 PCR 检测病毒载量, 限制性片段长度多态性 PCR (PCR-RFLP) 法鉴定 CMVgB 基因分型, 分析不同 CMVgB 基因型感染患者病毒载量和抗病毒疗程的差异。**结果** ①115 例患者 CMVgB 基因型分布: gB1 型 42 例 (36.52%), gB2 型 3 例 (2.61%), gB3 型 43 例 (37.39%), gB4 型 2 例 (1.74%), 混合分型 20 例 (17.39%), 5 例 (4.35%) 因缺乏 RsaI 酶切位点命名为 gB5。②CMVgB1、gB3 和混合型感染患者 CMV-DNA 拷贝数的中位值分别为  $2.7 \times 10^3$  ( $1.81 \times 10^3 \sim 6.03 \times 10^4$ )、 $4.0 \times 10^3$  ( $1.32 \times 10^3 \sim 6.39 \times 10^4$ ) 和  $1.2 \times 10^4$  ( $2.28 \times 10^3 \sim 6.50 \times 10^5$ )。CMVgB1 型和 gB3 型 CMV-DNA 拷贝数比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。单一 CMVgB 基因型感染 (gB1 型或 gB3 型) 与混合型感染比较, CMV-DNA 拷贝数差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。③单一 CMVgB 感染患者 CMV-DNA 转阴中位时间为 14 (7~34)d, 混合型感染患者 CMV-DNA 转阴中位时间为 17 (11~42)d, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** CMVgB 基因分型对 CMV 感染患者病毒载量和治疗疗程有影响。

**【关键词】** 造血干细胞移植; 巨细胞病毒; 基因型; 病毒载量

**The correlation of cytomegalovirus gB genotype with viral DNA load and treatment time in patients with CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation** WU Xiao-jin, WANG Ying, ZHU Zi-ling, XU Yang, HE Guang-sheng, HAN Yue, TANG Xiao-wen, FU Zheng-zheng, QIU Hui-ying, SUN Ai-ning, WU De-pei. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: WU De-pei, Email: wudepei@sudzu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To explore the effect of CMV gB genotypes on viral load and treatment time in patients with CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Methods** Viral load was detected by real-time (RT) quantitative polymerase chain reaction (PCR) (Q-PCR), CMV gB genotypes by PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) (PCR-RFLP) in 115 patients with CMV infection (CMV-DNA positive) after HSCT during July 2004 and May 2010. **Results** ①The distribution of CMV gB genotypes in HSCT recipients were as following: gB1, 42/115 (36.52%); gB2, 3/115 (2.61%); gB3, 43/115 (37.39%); gB4, 2/115 (1.74%). 20 patients (17.39%) had a combination of 2 different CMV genotypes and 5 patients (4.35%) had a CMV variant that lacked an RsaI digestion site, herein named gB5. ②The median viral load were  $2.7 \times 10^3$  ( $1.81 \times 10^3 \sim 6.03 \times 10^4$ ) in gB1,  $4.0 \times 10^3$  ( $1.32 \times 10^3 \sim 6.39 \times 10^4$ ) in gB3 and  $1.2 \times 10^4$  ( $2.28 \times 10^3 \sim 6.50 \times 10^5$ ) in mixed gB. There was no statistical difference in viral load between gB1 and gB3 ( $P > 0.05$ ). There was significantly statistical difference in viral load between single-gB (gB1 or gB3) and mixed-gB ( $P < 0.05$ ). ③The median treatment time was 17 days in mixed-gB and 14 days in single-gB. There was significantly statistical difference between two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** gB genotype may have an impact on CMV DNA load and treatment time in HSCT recipients with CMV infection.

**【Key words】** Hematopoietic stem cell transplantation; Cytomegalovirus; Genotype; Viral load

CMV 是造血干细胞移植 (HSCT) 后重要的机会

性感染源。CMV 感染后在体内复制和对治疗的敏

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.02.005

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81100390); 江苏省自

然科学基金 (BK2011265); 江苏省临床医学中心 (ZX201102)

作者单位: 215006 苏州大学附属第一医院血液科

通信作者: 吴德沛, Email: wudepei@suda.edu.cn

感性与病毒本身的异质性密切相关<sup>[1]</sup>。目前研究最多的是 CMV 包膜糖蛋白 B (CMVgB) 的多态性。

CMVgB 由 UL55 基因编码, 是病毒颗粒的主要包膜

糖蛋白,在感染细胞及传染性病毒粒子表面大量表达,诱导宿主细胞及体液免疫,在病毒颗粒进入宿主细胞、病毒与细胞融合及细胞间的传播中起着关键作用<sup>[2,4]</sup>。目前根据 CMVgB 基因酶切位点的不同将 CMVgB 分为 4 型<sup>[5-6]</sup>,不同基因型 CMVgB 可能对患者 CMV 病毒载量和治疗的影响存在差异<sup>[6-7]</sup>。我们对 115 例 HSCT 后 CMV 感染患者进行了 CMVgB 基因分型鉴定并研究其与 CMV 病毒载量及疗程的关系。

## 病例和方法

1. 病例:2004 年 7 月至 2010 年 5 月在我院接受 HSCT 的 CMV 感染患者 115 例,其中男 68 例、女 47 例,中位年龄 29(13~62)岁。79 例行 HLA 全相合亲缘间 HSCT,31 例行非亲缘间 HSCT,5 例行自体造血干细胞移植(auto-HSCT)。疾病类型:急性髓系白血病(AML)24 例,急性淋巴细胞白血病(ALL)28 例,慢性髓性白血病(CML)29 例,重型再生障碍性贫血(SAA)5 例,淋巴瘤(HL)5 例,多发性骨髓瘤(MM)8 例,骨髓增生异常综合征(MDS)16 例。AML 及部分低危组 ALL 患者以改良的 BUCY 方案进行预处理;淋系和合并中枢神经系统白血病的 AML 患者采用以 TBI + CY 为主的预处理方案。移植抗宿主病(GVHD)的预防:甲氨蝶呤(MTX) HSCT 后第 1 天(+1 d)15 mg/m<sup>2</sup>,+3、+6、+11 d 均为 10 mg/m<sup>2</sup>;环孢素(CsA)3 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,根据血液药物浓度调整 CsA 用量,其中 HLA 全相合的亲缘移植从 HSCT 前 1 天(-1 d)、无关供体移植从 -10 d 开始应用,无关供体移植同时加用抗胸腺细胞球蛋白(ATG)2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,-5~-2 d;霉酚酸酯(MMF)30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,-7~+30 d。

2. 标本收集:移植 2 周后开始每周收集供体外周血 4~6 ml 用于 CMVpp65 抗原检测和 CMV-DNA 抽提。

3. 荧光定量 PCR 检测病毒载量:CMV-PP65 荧光定量试剂盒购自深圳匹基公司。设置白管和 5 个标准品对照(浓度分别为 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup> 拷贝数/μl)。每个样本设主、副孔各 1 个,条件完全一致。另设 2 个对照孔(以等体积去离子水替代 DNA 和引物)。扩增条件:37℃ 5 min,94℃ 1 min,95℃ 5 s,60℃ 30 s,42 个循环。荧光信号收集设在 60℃,反应体系设为 40 μl。根据标准品建立标准曲线,由软件自动计算出待测样本中病毒 DNA 的含量。

4. 采用 CMV Brite 间接荧光免疫组化抗原血症试剂盒(荷兰 IQ 公司产品)进行 CMV 抗原检测。CMV 抗原阳性和阴性对照玻片由试剂盒提供。

5. 半巢式 PCR 定性检测 CMV-DNA:正向引物 5'-TGGCAAGGCATCAAGCAAAAA-3';外巢反向引物 5'-CATATCACGCAGCACCTTGA-3',内巢反向引物 P3:5'-ATCACCCATGAAACGCGCGGC-3'。扩增片段长度分别为 409 和 321 bp。反应体系:基因组 DNA 5 μl 作为第 1 轮反应模板,取 10 × 缓冲液 5 μl,10 μmol/L 引物各 1 μl,10 mmol/L dNTPs 1 μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μl,Taq DNA 聚合酶 1.5 U,最后用注射用水补足至 50 μl。反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 60 s,共扩增 20 个循环,72℃ 再延伸 7 min。第 2 轮取 2 μl 第 1 轮反应产物为模板,反应体系与第 1 轮基本相同,反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 60 s,59℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 60 s,扩增 35 个循环,72℃ 再延伸 7 min。取 PCR 产物 10 μl,在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳(100 V、25 min),在 VILBER LOURMAT 紫外线凝胶成像仪观察并拍照,321 bp 处出现扩增条带为阳性结果。

6. 限制性片段长度多态性 PCR(PCR-RFLP)法鉴定 CMVgB 基因分型:回收 DNA 行 Rsa I / Hinf I 双酶切,酶切体系:10 × 缓冲液 + BSA 2 μl,Rsa I / Hinf I 1 μl,H<sub>2</sub>O 7 μl,DNA 10 μl 于 37℃ 水浴 3 h,产物在 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。按丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺 = 49:1 的比例配制成 30% 丙烯酰胺,待胶完全聚合好后,拔出梳子,5 × TBE 冲洗加样孔,1 × TBE 为缓冲液。取 6 μl 酶切后产物,加入 2 μl 6 × 上样缓冲液,电泳(85 V、120 min)。电泳结束后,将胶从玻璃板取下,浸泡在含 EB 的 1 × TAE 缓冲液中染色,10 min 后取出,拍照。

7. CMV 感染干预性治疗方案:所有移植患者在 -10 d 开始用更昔洛韦(GCV)5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 预防,直到 -2 d,移植后 2 周,造血重建后开始每周 1 次 CMV-DNA 或 CMV-PP65 检测,一旦发现其中任何一项阳性就开始使用 GCV 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,以上指标转为阴性后剂量减半继续治疗 1 周后停药。如果 CMV 抗原或 DNA 持续阳性,则改用膦甲酸钠(FCN)180 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 治疗。

8. 统计学处理:应用 SAS 8.0 统计学软件进行分析。非正态分布的计量数据以中位数表示,进行 Mann-Whitney U 检验,两组间率的比较采用卡方检验,P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. CMVgB 基因分型鉴定: gB1 型基因存在 2 个 Hinf I 的酶切位点和 1 个 Rsa I 的酶切位点, gB2 存在 1 个 Hinf I 的酶切位点和 1 个 Rsa I 的酶切位点, gB3 不存在 Hinf I 酶切位点而存在 2 个 Rsa I 酶切位点, gB4 型存在 1 个 Hinf I 酶切位点和 2 个 Rsa I 酶切位点(图 1)。我们还发现 1 种存在 2 个 Hinf I 酶切位点、不存在 Rsa I 酶切位点的新型 gB 基因, 暂命名为 gB5 型。115 例患者 CMVgB 基因型分布如下: gB1、gB2、gB3、gB4、gB1 和 gB3 混合分型、gB5 型分别为 36.52% (42 例)、2.61% (3 例)、37.39% (43 例)、1.74% (2 例)、17.39% (20 例) 和 4.35% (5 例)。gB5 基因与基因库编号为 AC146906.1 的基因存在 99% 的相似性。

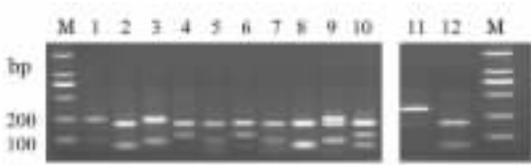


图 1 CMVgB 基因分型电泳图

M: Marker; 1~8 为 gB1~gB4 型分别用 Hinf I 和 Rsa I 酶切; 9~10 为混合分型酶切; 11~12 为 gB5 型酶切

2. CMVgB 基因分型与 CMV 病毒载量: CMVgB1、gB3 和混合型感染患者 CMV-DNA 拷贝数中位数分别为  $2.7 \times 10^3$  ( $1.81 \times 10^3 \sim 6.03 \times 10^4$ )、 $4.0 \times 10^3$  ( $1.32 \times 10^3 \sim 6.39 \times 10^4$ ) 和  $1.2 \times 10^4$  ( $2.28 \times 10^3 \sim 6.50 \times 10^5$ )。CMVgB1 型和 gB3 型拷贝数比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.7297$ ), 单一 CMVgB 基因型感染与混合感染比较, CMV-DNA 拷贝数差异有统计学意义 ( $P = 0.0242$ ) (图 2)。

3. CMVgB 基因分型与抗 CMV 治疗后转阴时间: 患者经抗病毒治疗后, CMVgB1 型 CMV-DNA 转阴中位时间为 11 (7~17)d, gB3 型为 14 (7~34)d, 单一 CMVgB 感染者 CMV-DNA 转阴中位时间为 14 (7~34)d, 混合型感染者为 17 (11~42)d, gB3 型 CMV 感染患者抗病毒疗程长于 gB1 型感染患者, 但差异无统计学意义, 单一 CMVgB 基因型感染与混合感染比较, CMV-DNA 转阴时间差异有统计学意义 ( $P = 0.0045$ ) (图 3)。

## 讨 论

在我国成年人人群中 CMV 潜伏感染率接近 100%, 正常人群大多呈隐性感染<sup>[9-11]</sup>。在机体免疫

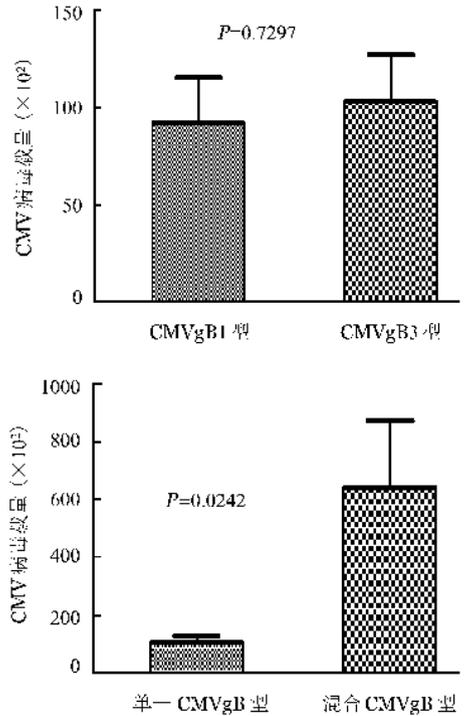


图 2 不同 CMVgB 基因型感染患者的病毒载量比较

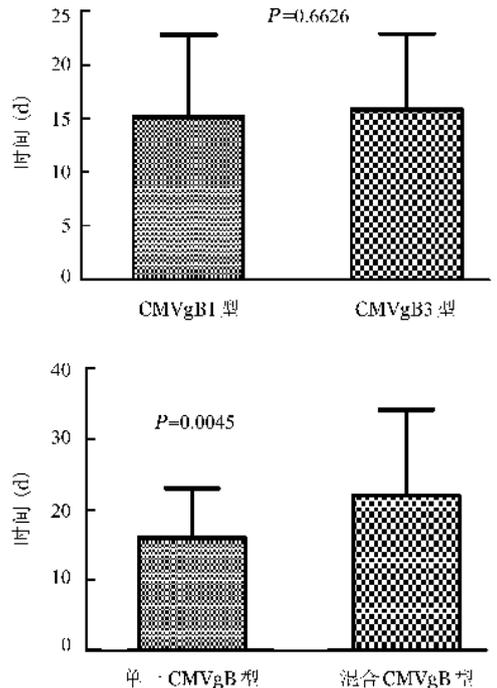


图 3 不同 CMVgB 基因型感染患者抗病毒治疗后 CMV-DNA 转阴时间比较

功能低下时易出现 CMV 激活, 因此 CMV 是 HSCT 后最常见的机会性感染源之一<sup>[12-13]</sup>。病毒本身基因的异质性导致病毒致病力的差异, 对 CMV 基因进行分型是研究 HSCT 后 CMV 感染的重要内容。

我们在研究中发现,在我国的人群中不仅存在目前已知的 4 个 gB 基因型,还存在另 1 个基因,我们暂时命名为 gB5。并通过克隆测序和酶切的方法进行鉴定,该基因与在艾滋病患者中分离出来的一种新型 CMV 病毒株<sup>[14]</sup>(基因库编号为 AC146906.1)基因存在 99% 的相似性。在我们的研究之前,并无在我国 HSCT 后的患者存在这种新型的 CMV 病毒的相关报道。

我们的研究结果显示,我国 HSCT 患者中 gB2 和 gB4 型 CMV 感染者非常少见,而以 gB1 和 gB3 型 CMV 感染为主,有别于国外以 gB1 和 gB2 型为主<sup>[5-6]</sup>,实体器官移植中有报道以 gB1 和 gB2 型为主<sup>[15-16]</sup>,同时在实体器官移植中发现存在 CMV 亚型混合感染的患者<sup>[17-18]</sup>,在 HSCT 后也存在 gB 基因型混合感染的患者,我们在研究中主要是 gB1 和 gB3 型混合感染为主。对不同亚型的 CMV 感染患者最高的病毒载量进行比较,发现混合感染的患者 CMV 病毒载量高于单一 gB 基因 CMV 感染者。虽然 gB3 型的 CMV 病毒载量的中位数比 gB1 型高,但差异无统计学意义。由于其他基因型的 CMV 感染患者例数过少,我们没有进行统计比较。我们在研究中同时证实病毒载量的差异与抗病毒疗程有关,混合基因型较单一基因型 CMV 感染患者需要更长疗程的抗病毒治疗,与国外的报道基本一致<sup>[19-20]</sup>。

综上所述,我们从 CMV 基因角度分析了 CMVgB 基因型与 CMV 的病毒载量及抗病毒治疗疗程的关系。我们认为,在监测 HSCT 后 CMVpp65 和 CMV-DNA 的同时,对 CMVgB 基因进行分型有利于指导治疗的疗程,预测 CMV 疾病。

### 参考文献

[1] Woo PC, Lo CY, Lo SK, et al. Distinct genotypic distributions of cytomegalovirus (CMV) envelope glycoprotein in bone marrow and renal transplant recipients with CMV disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997, 4:515-518.

[2] Boeckh M. Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 2011:305-309.

[3] Isaacson MK, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol*, 2009, 83: 3891-3903.

[4] Boehme KW, Singh J, Perry ST, et al. Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol*, 2004, 78: 1202-1211.

[5] Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, et al. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after

marrow transplantation. *Blood*, 1997, 90: 2097-2102.

[6] Fries BC, Chou S, Boeckh M, et al. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis*, 1994, 169:769-774.

[7] Puchhammer-Stöckl E, Görzer I, Zoufaly A, et al. Emergence of multiple cytomegalovirus strains in blood and lung of lung transplant recipients. *Transplantation*, 2006, 81:187-194.

[8] Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definition of cytomegalovirus infection and diseases in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2002, 34:1094-1097.

[9] Peggs KS, Mackinnon S. Cytomegalovirus: the role of CMV post-haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36:695-701.

[10] Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*, 2003, 98:269-297.

[11] Roberts ET, Haan MN, Dowd JB, et al. Cytomegalovirus antibody levels, inflammation, and mortality among elderly Latinos over 9 years of follow-up. *Am J Epidemiol*, 2010, 172: 363-371.

[12] Tuthill M, Chen F, Paston S, et al. The prevention and treatment of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58:1481-1488.

[13] Leruez-Ville M, Ouachée M, Delarue R, et al. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:2040-2046.

[14] Murphy E, Yu D, Grimwood J, et al. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100:14976-14981.

[15] Sarcinella L, Mazzulli T, Willey B, et al. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype does not correlate with outcomes in liver transplant patients. *J Clin Virol*, 2002, 24:99-105.

[16] Bongarts A, Von Laer D, Vogelberg C, et al. Glycoprotein B genotype of human cytomegalovirus: distribution in HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis*, 1996, 28: 447-449.

[17] Vogelberg C, Meyer-König U, Hufert FT, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant recipients. *J Med Virol*, 1996, 50:31-34.

[18] Rosen HR, Corless CL, Rabkin J, et al. Association of cytomegalovirus genotype with graft rejection after liver transplantation. *Transplantation*, 1998, 66:1627-1631.

[19] Tarragó D, Quereda C, Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:2872-2877.

[20] Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, et al. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 2004, 39:155-161.

(收稿日期:2012-06-22)

(本文编辑:董文革)