

# PCR 检测白血病、再生障碍性贫血患者 3 种疱疹病毒

李娟 洪文德 罗绍凯 朱沃棠

(中山医科大学附属第一医院血液病研究室; 广州, 510080)

**摘要** 目的: 观察白血病、再生障碍性贫血患者治疗前后巨细胞病毒(CMV)、单纯疱疹病毒(HSV)、爱博斯坦巴尔病毒(EBV)的感染状况。方法: 用 PCR 法检测急性白血病患者骨髓单个核细胞内 CMV-DNA、HSV-DNA、EBV-DNA, 以及再生障碍性贫血患者血浆中 CMV-DNA 感染情况。结果: 急性白血病患者骨髓单个核细胞内 CMV-DNA 的检出率高于血浆的检出率; 初治白血病患者骨髓单个核细胞内及初治再生障碍性贫血患者的血浆 CMV-DNA 阳性率分别为 73% 和 54%, 明显高于正常人 ( $P < 0.05$ ); 经治疗半年后未能缓解的急性白血病患者骨髓单个核细胞内 3 种疱疹病毒 DNA 检出率高于完全缓解和部分缓解的急性白血病患者; 病情无改善或恶化的再生障碍性贫血患者血浆 CMV-DNA 检出率亦高于病情有好转的患者。结论: 初治白血病患者和初治再生障碍性贫血患者血浆 CMV-DNA 阳性率高于正常人, 治疗后 3 种疱疹病毒 DNA 的检出率在未缓解的白血病患者中较高, CMV-DNA 检出率在治疗效果差的再生障碍性贫血患者中较高。

**关键词** 聚合酶链反应; 白血病; 贫血, 再生障碍性; 疱疹病毒 2 型, 人; 疱疹病毒 4 型, 人; 巨细胞病毒

**中图分类号** R 455.2; 514.52

## THREE HERPES VIRUSES IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA AND APLASTIC ANEMIA

Li Juan Hong Wende Luo Shaokai Zhu Wotang

(Department of Hematology Laboratory, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

**Abstract** **Objects:** To observe the infection of CMV, HSV and EBV before and after treatment in patients with leukemia and aplastic anemia. **Methods:** We detected CMV-DNA, HSV-DNA, EBV-DNA in mononuclear cells of bone marrow from acute leukemic patients and CMV-DNA in plasma of aplastic anemic patients. **Results:** The positive rate of CMV-DNA with acute leukemic patients in mononuclear cells was higher than the that in plasma, and the positive rates of CMV-DNA in mononuclear cells of leukemic patients and in plasma of aplastic anemic patients at the beginning of therapy were 72.9% and 54.4%, respectively, which were higher than those of normal controls ( $P < 0.05$ ). The positive rates of the three herpes viruses DNA in mononuclear cells of acute leukemic patients in non-regression group after six months of treatment were all higher than the ones of complete and partial regression patients. The positive rate of CMV-DNA in plasma of the aplastic anemic patients without improvement or worsening condition was higher than the rate of those patients with improval. **Consluts:** The positive rate of CMV-DNA in untreated leukemic and aplastic anemic patients is higher than one of normal contol. The positive rates of three herpes viruses are high in nonremission patients after treatment. The positive rate of CMV-DNA is high in aplastic anemic patients who have poor treatment result.

**Subject headings** ploymerase chain reaction; leukemia; anemia, aplastic; herpesvirus 2, human; herpesvirus 4, human; cytomegalovirus

急性白血病和再生障碍性贫血的病因目前尚不明确; 已知白血病和再生障碍性贫血患者是疱疹

类病毒感染的高危人群<sup>[1]</sup>。本研究应用 PCR 法分别测定正常人、急性白血病和再生障碍性贫血患者

体内血浆和骨髓单个核细胞内巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)及爱博斯坦巴尔病毒(Epstein-Barr virus, EBV)3种疱疹病毒DNA,以及急性白血病患者治疗前后这3种疱疹病毒的检出率、再生障碍性贫血患者血浆CMV-DNA的检出率,了解这3种疱疹病毒在白血病和再生障碍性贫血中的感染状况,并探讨它们与疾病进程的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 检测对象

48例初治的急性白血病患者血浆和骨髓单个核细胞,22例初治的再生障碍性贫血患者的血浆;以及于治疗半年后重复抽取的其中40例白血病患者骨髓单个核细胞和18例再生障碍性贫血患者的血浆。所有急性白血病和再生障碍性贫血患者均符合1990年我国血液病诊断标准,并按常规方法治疗,但未用过特异性抗巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、爱博斯坦巴尔病毒的药物。正常人对照血浆取自20名健康献血员,正常骨髓单个核细胞取自我院胸外科非血液病、非恶性肿瘤患者手术切除的肋骨骨髓细胞。

### 1.2 检测方法

1.2.1 对照 以人胚肺二倍体细胞培养的CMV AD 169标准株DNA、纯化EBV-B 95-8病毒及单纯疱疹病毒DNA作阳性对照,高温消毒双蒸水作阴性对照。

1.2.2 引物 由上海细胞研究所合成和提供。CMV-DNA引物对为5'-GCAGAGCTCGTTAG-TGAACC-3'及5'-GGCAGGGGAATCCGCTTCC-3'; EBV-DNA引物对为5'-CCAGACAGCAGCCAAT-TGTC-3'及5'-GGTAGAAGACCCCTCTTAG-3'; HSV-DNA通用引物对为5'-CTGGTCAGCTTTC-GGTACGA-3'及5'-CAGGTCGTGCAGCTGGTT-GC-3'。

1.2.3 标本处理 骨髓单个核细胞:每例取骨髓5 mL,经淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,用高温消毒双蒸水洗3次,以除去血清病毒感染的影响,按Olive等<sup>[2]</sup>的方法破坏单个核细胞胞膜及核膜。血浆:每例取外周血2 mL,离心后取血浆检测。

1.2.4 病毒DNA提取 按常规方法提取病毒DNA。

1.2.5 反应体系 总体系50  $\mu$ L,含待测样本5  $\mu$ L, Taq聚合酶0.5  $\mu$ L, 1对引物各为1  $\mu$ L, dNTP 5  $\mu$ L, 10 $\times$  buffer 5  $\mu$ L, 循环,95  $^{\circ}$ C, 60 s $\rightarrow$ 55  $^{\circ}$ C, 60 s $\rightarrow$ 72  $^{\circ}$ C, 60 s,共35次,最后72  $^{\circ}$ C延长5 min。

1.2.6 产物检测 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,紫外线灯检测,每次检测均设已知阳性和阴性对照。

### 1.3 统计学处理

两个样本率的比较用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 治疗前急性白血病患者3种疱疹病毒检出情况

阳性结果CMV-DNA特异性扩增带在133 bp处,EBV-DNA扩增带129 bp,HSV-DNA扩增带342 bp,治疗前急性白血病患者骨髓单个核细胞内与血浆中3种疱疹病毒检出率的比较见表1。

表1 急性白血病患者骨髓单个核细胞内与血浆中3种疱疹病毒DNA检出率

Table 1 Positive rate of acute leukemia patients with three herpes viruses in bone marrow cells (MNC) and the plasma [n (%)]

Group	CMV-DNA	HSV-DNA	EBV-DNA	P	
MNC					
Normal control	20	3(15)	2(10)	4(20)	
Acute leukemia	48	35(73)	11(23)	10(21)	< 0.01
Plasma					
Normal control	20	3(15)	3(15)	5(25)	
Acute leukemia	48	29(60)	8(17)	10(21)	< 0.05

Positive rates of HSV-DNA, EBV-DNA in MNC of acute leukemia and plasma were compared with normal controls. Both of  $P > 0.05$

### 2.2 急性白血病治疗后3种疱疹病毒检出情况

48例急性白血病中,4例因死亡、4例出院后未再来我院复治而未能复查,其余40例中,经治疗半年后达完全缓解(CR)25例,部分缓解(PR)7例,未缓解(NR)8例;它们骨髓单个核细胞内3种疱疹病毒检出率见表2。

表2 急性白血病患者治疗后骨髓单个核细胞内3种疱疹病毒检出阳性数

Table 2 Positive rates of acute leukemia with three kinds of herpes virus in MNC after treatment  $n$  (%)

Group	CMV	HSV	EBV
CR+PR	32 15(47)	2(6)	3(9)
NR	8 8(100)	7(88)	6(76)
$P$	<0.001	<0.01	<0.01

CR: complete regression; PR: partial regression; NR: non-regression

### 2.3 再生障碍性贫血患者治疗前后血浆中 CMV-DNA 检出情况

22例患者治疗前血浆中CMV-DNA检出率为54%(12/22),与正常人血浆CMV-DNA检出率15%(3/20)相比,差别非常显著( $P < 0.001$ ),治疗半年后随访的18例患者中,15例外周血象及骨髓象有明显改善者,其血浆中CMV-DNA检出率为20%(3/15),与治疗前CMV-DNA检出率比较有显著性差异( $P < 0.01$ ),而3例病情无改善或恶化的患者,其血浆中CMV-DNA的检出率为100%(3/3),与上述18例有明显改善的检出率相比较,差别有显著性( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

疱疹病毒与白血病和再生障碍性贫血的关系日益受到重视。本研究应用PCR法检测急性白血病患者血浆与骨髓单个核细胞内CMV-DNA、HSV-DNA、EBV-DNA,并观察治疗半年后病情转归与3种疱疹病毒的感染状况,以探讨这3种疱疹病毒在白血病发生发展中的作用。结果显示48例急性白血病患者血浆及骨髓单个核细胞内CMV-DNA阳性率均高于正常人,但CMV与白血病的确切关系尚不能定论。而化疗后得到完全缓解或部分缓解的急性白血病患者与未缓解的病例这3种病毒检出率的比较,后者的检出率均高于前二者,这提示CMV、HSV、EBV的感染可能与白血病的发展有关,使病情恶化或成为难治性白血病;也可能与未缓解病例的免疫功能未能恢复而使之感染增高。

以往有用PCR法检测白血病患者血清、尿液、外周血白细胞的CMV、HSV、EBV感染状况的报

道<sup>[4]</sup>,但病毒既可存在于白血病患者血清,也可以进入细胞内,甚至与宿主细胞核整合,成为其潜伏的主要场所<sup>[5]</sup>、或致病点所在<sup>[6]</sup>。本研究急性白血病患者骨髓单个核细胞内CMV-DNA检出率为73%,明显高于其血浆的检出率(60%),因此,检测白血病患者骨髓单个核细胞内病毒的感染情况,可提高检出率,更能直接反映病毒与白血病的关系,临床意义更大。

再生障碍性贫血的病因尚不完全清楚,有文献<sup>[3]</sup>报道病毒与该病的发生发展有密切关系,本研究结果再生障碍性贫血患者血浆CMV-DNA检出率明显高于正常人血浆,治疗后病情无好转的再生障碍性贫血的患者CMV-DNA感染率明显高于病情有好转的患者,这提示CMV的感染可能与再生障碍性贫血的预后有一定的关系。

由于白血病和再生障碍性贫血患者机体的免疫力下降,对CMV等疱疹病毒的免疫应答功能降低,因此,对白血病和再生障碍性贫血患者用检测抗体反应法作CMV等的诊断依据是不适宜的,常造成假阴性结果,用PCR法检测病毒具有特异、敏感、快速、简便的优点。

### 参 考 文 献

- 1 Tokuuaga M, Imai S, Uemuea Y, *et al.* Epstein-Barr virus in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol*, 1993, 143(5): 1265
- 2 Olive D M, Simsek M, Muftis A L. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Cell Microbiol*, 1989, 27(3): 1238
- 3 张 正. 常见病毒感染若干问题. *中华医学检验杂志*, 1995, 18(3): 179
- 4 Beaulien A D, Paquin R, Gosselin J. Epstein-Barr virus modulates de novo protein synthesis in human neutrophils. *Blood*, 1995, 8(7): 2789
- 5 Yao Cheng, Wang Ying, Fu Qiang, *et al.* Study on cytomegaloviral infection in acute leukemia patients by polymerase chain reaction. *Chinese Med J*, 1993, 106(11): 848
- 6 Hart D N J, Baker B W, Inglis M J, *et al.* Epstein-Barr viral DNA in acute large granular lymphocyte (natural killer) leukemic cell. *Blood*, 1992, 79(8): 2116

(1997-09-24 收稿 1998-05-18 修回)