

淋巴细胞及血浆 EB 病毒 DNA 在 EBV 感染相关疾病中表达的研究*

喻 晶, 王 琳, 卢丽华, 吴夏枫, 刘晓翌, 张银汉 (北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518036)

摘要:目的 探讨外周血淋巴细胞和血浆中 EB 病毒 DNA(EBV DNA)在 EB 病毒感染相关疾病中表达的差异。方法 收集 112 例疑似 EB 病毒感染相关疾病患者的全血样本,其中鼻咽癌 14 例,传染性单核细胞增多症(传单)16 例,淋巴瘤 22 例,自身免疫性疾病 23 例,上呼吸道感染 26 例,肝功能异常 11 例,采用荧光定量 PCR 方法检测同一份样本淋巴细胞和血浆中 EBV DNA 的含量。结果 检测 112 例患者外周血淋巴细胞和血浆中的 EBV DNA,其总的阳性率分别为 83.0% (93/112), 27.7% (31/112), 差异具有统计学意义(卡方值 $\chi^2=60.02$, $P<0.01$); 14 例鼻咽癌患者外周血淋巴细胞和血浆 EBV DNA 的阳性率及其含量差异均无统计学意义($\chi^2=2.25$, $t=-1.04$, 均 $P>0.05$); 而传染性单核细胞增多症、淋巴瘤、自身免疫性疾病、上呼吸道感染和肝功能异常患者血浆 EBV DNA 阳性率及其含量均明显低于外周血淋巴细胞, 差异具有统计学意义($\chi^2=4.17\sim 15.06$, 均 $P<0.05$; $t=3.94\sim 10.45$, 均 $P<0.01$)。结论 荧光定量 PCR 检测非鼻咽癌患者的外周血淋巴细胞的 EBV DNA 可能优于检测血浆的 EBV DNA; 检测鼻咽癌患者外周血淋巴细胞和血浆 EBV DNA 无明显差异, 可根据临床情况, 选择合适的标本进行检测。

关键词: EB 病毒 DNA; 荧光定量 PCR; 血浆; 外周血淋巴细胞; EBV 感染相关疾病

中图分类号: R373.11; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)06-015-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.004

Expression of Epstein-Barr Virus DNA in Peripheral Blood Lymphocytes and Plasma in Patients with EBV-Associated Diseases

YU Jing, WANG Lin, LU Li-hua, WU Xia-feng, LIU Xiao-yi, ZHANG Yin-han (Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Hospital of Beijing University, Guangdong Shenzhen 518036, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of Epstein-Barr virus DNA (EBV DNA) in the peripheral blood lymphocytes and plasma of patients with EBV-associated diseases. **Methods** The whole blood samples were collected from 112 patients with suspected EB virus infection diseases, including 14 cases of nasopharyngeal carcinoma (NPC), 16 cases of infectious mononucleosis (IM), 22 cases of lymphoma, 23 cases of autoimmune disease, 26 cases of upper respiratory tract infection, and 11 cases of abnormal liver function. The levels of EBV DNA in lymphocytes and plasma of the same sample were detected by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). **Results** The EBV DNA positive rates in lymphocytes and plasma of all 112 patients were 83.0% (93/112) and 27.7% (31/112) respectively, with statistically significant difference ($\chi^2=60.02$, $P<0.01$). The positive rate and the load of EB virus DNA in lymphocytes and plasma of 14 patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) had no statistical difference ($\chi^2=2.25$, $t=-1.04$, all $P>0.05$). However, patients with lymphoma, infectious mononucleosis, upper respiratory tract infection, autoimmune disease or abnormal liver function, the positive rates and the concentration of EBV DNA in the plasma were dramatically lower than those in the peripheral blood lymphocytes, and the difference was statistically significant ($\chi^2=4.17\sim 15.06$, all $P<0.05$; $t=3.94\sim 10.45$, all $P<0.01$). **Conclusion** The detection of EB DNA in peripheral blood lymphocytes of non NPC patients by FQ-PCR might be better than that in plasma. There was no statistical difference between the detection of EBV DNA in lymphocytes and plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. Appropriate specimen type could be selected according to clinical consideration.

Keywords: EB virus DNA (EBV DNA); fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR); plasma; peripheral blood lymphocyte; EBV-associated diseases

EB 病毒(EBV)是一种嗜人类淋巴细胞的疱疹病毒,EBV 感染后,EBV 先在口腔上皮细胞内增殖,再感染附近的 B 淋巴细胞,受到感染的 B 淋巴细胞进入血液循环而造成全身性感染。EBV 感染比较常见,可以累及全身多个脏器,与多种疾病相关^[1,5],临床表现多种多样,病情轻重不一,给临

床诊断带来一定的困难,因此实验室诊断显得尤为重要。随着检验技术的进展,目前临床广泛采用荧光定量 PCR 技术检测 EBV 的核酸含量,但是选择不同的标本类型,可能对 EBV DNA 的检测结果产生影响^[2],本研究采用荧光 PCR 方法探讨外周血淋巴细胞和血浆中 EBV DNA 在 EBV 感染相关疾

* 作者简介:喻 晶(1967—),女,医学硕士,主任技师,主要从事临床分子生物学研究,E-mail:jing_yu2004@aliyun.com。

病包括鼻咽癌、传染性单核细胞增多症(传单)、淋巴瘤、自身免疫性疾病、上呼吸道感染和肝功能异常中表达的差异,为 EBV 相关疾病的诊断、监测、样本的选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 6 月~11 月北京大学深圳医院 112 例疑似 EBV 感染的门诊及住院患者的 EDTA 抗凝全血标本。112 例患者中,鼻咽癌 14 例,传染性单核细胞增多症 16 例,淋巴瘤 22 例,自身免疫性疾病 23 例,上呼吸道感染 26 例,肝功能异常 11 例。男性 66 例,女性 46 例,年龄 1~80 岁。

1.2 试剂和仪器 试剂采用 EB 病毒核酸扩增荧光定量检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司);仪器为 ABI7300 荧光定量扩增仪(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 外周血淋巴细胞中 EBV DNA 的提取:取 1 ml EDTA 抗凝全血加入等量的生理盐水稀释混匀,将稀释的全血沿管壁缓慢加到已装有 500 μ l 淋巴细胞分离液的干燥玻璃管中,2 000 r/min 离心 20 min;吸取淋巴细胞层,放入 1.5 ml 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min;弃上清,沉淀中加入 50 μ l DNA 提取液并充分混匀,100℃ 金属浴恒温处理 10 min,12 000 r/min 离心 5 min 备用。

1.3.2 血浆中 EBV DNA 的提取:将每份 EDTA 抗凝全血标本 3 000 r/min 离心 10 min,取 50 μ l

血浆放入 0.6 ml 的离心管中,加入 50 μ l DNA 提取液,充分混匀,100℃ 金属浴恒温处理 10 min,13 000 r/min 离心 10 min 备用。

1.3.3 荧光定量 PCR 扩增:在 PCR 管中加入 43 μ l PCR 反应液和 2 μ l 提取的 EBV DNA,用 EBV 阳性定量参考品制备标准曲线,同时设置阴阳对照,按照以下程序扩增:93℃ 2 min,93℃ 45 s,55℃ 60 s,10 个循环;93℃ 30 s,55℃ 45 s,30 个循环。阴性结果为无典型的 S 型扩增曲线或 C_t 值=30;阳性结果为呈典型的 S 型扩增曲线且含量>500 copies/ml。

1.4 统计学分析 外周血淋巴细胞和血浆 EB 病毒 DNA 含量的比较采用配对 t 检验;外周血淋巴细胞和血浆 EB 病毒 DNA 的阳性率比较采用配对卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞和血浆中 EBV DNA 阳性率在相关疾病中的比较 见表 1。检测 112 例患者外周血淋巴细胞和血浆中的 EBV DNA,其总的阳性率分别为 83.0%(93/112),27.7%(31/112),差异具有统计学意义($\chi^2=60.02, P<0.01$)。除鼻咽癌患者外,其他非鼻咽癌患者血浆中 EBV DNA 检出的阳性率明显低于淋巴细胞,差异具有统计学意义($\chi^2=4.17\sim 15.06, P<0.05$)。19 例外周血淋巴细胞 EBV DNA 检测阴性的标本,血浆检测结果均为阴性,两者阴性结果一致率 100%。31 例血浆检测阳性的标本,外周血淋巴细胞中均为阳性。

表 1 外周血淋巴细胞和血浆中 EBV DNA 的阳性率在 EBV 相关疾病中的比较[%(n)]

病种	n	阳性率		χ^2 值	P 值
		全血	血浆		
鼻咽癌	14	85.7(12)	57.1(8)	2.25	0.125
传染性单核细胞增多症	16	81.3(13)	31.3(5)	6.13	0.008
淋巴瘤	22	81.8(18)	18.2(4)	12.07	0.000 1
自身免疫性疾病	23	87.0(20)	13.0(3)	15.06	0.000 1
上呼吸道感染	26	84.6(22)	34.6(9)	11.08	0.000 1
肝功能异常	11	72.7(8)	18.2(2)	4.17	0.031

2.2 外周血淋巴细胞和血浆 EBV DNA 含量在相关疾病中的比较 见表 2。

表 2 外周血淋巴细胞和血浆中 EBV DNA 含量在 EBV 相关疾病中的比较

病种	n	淋巴细胞($\bar{x}\pm s$)		血浆($\bar{x}\pm s$)		t 值	P 值
		原始数值(copies/ml)	对数值	原始数值(copies/ml)	对数值		
鼻咽癌	14	$3.2\times 10^4\pm 5.4\times 10^4$	2.86 ± 2.79	$1.1\times 10^6\pm 2.8\times 10^6$	3.54 ± 1.62	-1.04	0.318
传染性单核细胞增多症	16	$9.4\times 10^5\pm 2.9\times 10^5$	4.01 ± 2.23	$5.6\times 10^4\pm 1.8\times 10^5$	1.46 ± 2.28	5.4	0.000 1
淋巴瘤	22	$6.9\times 10^4\pm 1.0\times 10^5$	3.83 ± 1.90	$6.9\times 10^2\pm 1.6\times 10^3$	0.64 ± 1.40	7.49	0.000 1
自身免疫性疾病	23	$4.2\times 10^4\pm 6.7\times 10^4$	3.60 ± 1.59	$6.3\times 10^1\pm 2.2\times 10^2$	0.33 ± 0.88	10.45	0.000 1
上呼吸道感染	26	$2.3\times 10^5\pm 6.6\times 10^5$	3.88 ± 1.88	$1.8\times 10^4\pm 6.5\times 10^4$	1.45 ± 2.07	7.21	0.000 1
肝功能异常	11	$4.2\times 10^4\pm 1.2\times 10^5$	2.94 ± 1.99	$1.3\times 10^4\pm 4.1\times 10^4$	0.75 ± 1.73	3.94	0.000 1

14例鼻咽癌患者外周血淋巴细胞和血浆中EBV DNA的含量差异无统计学意义($t=-1.04$, $P>0.05$);而淋巴瘤、传染性单核细胞增多症、上呼吸道感染、自身免疫性疾病和肝功能异常患者外周血淋巴细胞中EBV DNA的含量明显高于血浆,差异均具有统计学意义($\chi^2=3.94\sim 10.45$, 均 $P<0.01$)。8例血浆阳性的鼻咽癌患者中7例EBV DNA含量高于淋巴细胞(87.5%, 7/8), 23例血浆阳性的非鼻咽癌患者血浆中EBV DNA含量均低于外周血淋巴细胞(100%, 23/23)。

3 讨论 EBV是一种嗜人类淋巴细胞的疱疹病毒,与鼻咽癌、淋巴瘤和传染性单核细胞增多症等多种疾病的发生密切相关^[1,5]。EB病毒的感染在人体主要以潜伏感染的形式存在,大多数无明显的临床症状,但是在机体免疫功能下降和某些因素的触发下,潜伏的EBV可以被再激活,引起病毒复制和临床疾病。EBV感染可以累及全身多个脏器,临床表现多样,荧光定量PCR技术可以直接检测EBV的DNA含量,反映机体病毒复制的情况,为EBV的感染提供直接证据,但是选择不同的样本类型,可能会导致EBV DNA的检测结果产生较大的差异^[2],本研究采用荧光PCR方法探讨外周血淋巴细胞和血浆中EBV DNA在多种EB病毒感染相关疾病中表达的差异,为EBV相关疾病的诊断和样本的选择提供实验室的依据。

本研究检测了EBV感染相关疾病传染性单核细胞增多症、淋巴瘤、自身免疫性疾病、上呼吸道感染和肝功能异常患者外周血淋巴细胞和血浆中EBV DNA含量,结果显示传染性单核细胞增多症、淋巴瘤、上呼吸道感染、自身免疫性疾病和肝功能异常患者血浆中EBV DNA的阳性率及含量均明显低于外周血淋巴细胞($P<0.05$),提示检测淋巴细胞中的EBV DNA对上述EBV感染相关疾病的诊断更加敏感,可减少这些疾病的漏诊。其原因可能是:EBV感染后,先在口咽部和涎腺的上皮细胞内增殖,然后感染B淋巴细胞,以环状DNA的形式游离在胞浆中,整合在染色体内,如果在感染初期,病情尚未进展到细胞裂解并释放病毒入血时,此时血浆中EBV DNA的含量可能极低或是检测不到,导致血浆检测的阳性率较低。我们的研究发现在上述EBV感染相关疾病中,多数样本(18/23)在外周血淋巴细胞EBV DNA含量大于 10^5 copies/ml时才可以在血浆中检出,与文献^[3]的报道基本一致,可能当感染的淋巴细胞中EBV DNA大量复制,细胞裂解释放DNA入血时,此时可以在血浆中检测到EBV DNA。

EBV与鼻咽癌的发生、发展密切相关,本研究

发现鼻咽癌患者淋巴细胞和血浆中EBV DNA检测的阳性率及其含量差异均无统计学意义($P>0.05$)。14例鼻咽癌患者淋巴细胞和血浆中EBV DNA检测的阳性例数分别为12例和8例,分析淋巴细胞和血浆检测均为阳性的8例患者,发现其中7例阳性患者血浆中的EBV DNA含量高于淋巴细胞,与我们研究的其他5种EBV相关疾病的特点不一样(23例血浆阳性的非鼻咽癌患者血浆中EBV DNA含量均低于外周血淋巴细胞)。目前研究表明^[4]鼻咽癌患者血浆中EBV DNA以游离DNA片段而不是完整病毒颗粒的形式存在于细胞外,其来源于整合了EBV的鼻咽癌细胞,由肿瘤细胞将EBV DNA释放入血,是肿瘤源性的,血浆EBV DNA水平能反映体内肿瘤的负荷状况,与肿瘤的分期有明显的相关性,临床分期越晚,血浆中EBV DNA浓度水平越高,但在鼻咽癌的早期由于EBV DNA释放入血量少,血浆可能检测不到。放疗后肿瘤消退患者血浆EBV DNA可明显下降,如果治疗后血浆EBV DNA持续存在者,其临床进展的风险更高,预后更差。我们的研究结果中有4例鼻咽癌患者淋巴细胞中EBV DNA为阳性,血浆为阴性,其中3例为早期肿瘤患者,1例为鼻咽癌放疗后病人,说明检测淋巴细胞中EBV DNA可能对于早期鼻咽癌患者更敏感,但是对于疗效监测,可能检测血浆更好,由于样本例数少,需要增加样本量,并对患者进行治疗前后的动态检测,探讨选择不同样本对鼻咽癌患者的意义。

目前,临床上用于检测患者血液中EBV DNA的标本有外周血淋巴细胞、血浆和血清,其中哪一种为最理想的检测标本,尚未达成一致结论。本研究表明,对于EBV感染相关疾病传染性单核细胞增多症、淋巴瘤、自身免疫性疾病、上呼吸道感染和肝功能异常患者,检测淋巴细胞中的EBV DNA更加敏感;对于鼻咽癌患者,检测淋巴细胞和血浆中EBV DNA无明显差异,但是对于监测疗效,可能血浆优于淋巴细胞;对于早期发现,可能淋巴细胞优于血浆,需要扩大样本量进一步明确其临床意义。

参考文献:

- [1] Kanakry J, Ambinder R. The biology and clinical utility of EBV monitorin in blood[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2015, 391:475-499.
- [2] Ruf S, Behnke-Hall K, Gruhn B, et al. Comparison of six different specimen types for Epstein-Barr viral load quantification in peripheral blood of pediatric patients after heart transplantation or after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. J Clin Virol, 2012, 53(3):186-194.

- [3] 蔡桂君,王瑞莲,赵崇泉,等. 淋巴细胞与血浆 EB 病毒核酸定量结果的关系[J]. 广东医学,2014,35(17):2704-2706.
- Cai GJ, Wang RL, Zhao CQ, et al. The correlation of EB virus nucleic acid quantification in lymphocytes and plasma[J]. Guangdong Medical Journal, 2014, 35(17):2704-2706.
- [4] Yip TT, Ngan RK, Fong AH, et al. Application of circulating plasma/serum EBV DNA in the clinical man-

agement of nasopharyngeal carcinoma[J]. Oral Oncol, 2014, 50(6):527-538.

- [5] 李迪,李艳,彭锐. EB 病毒 DNA 载量与儿童肝肾损害的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(6):127-129.
- Li D, Li Y, Peng R. Correlation study between children hepatorenal damage and EBV-DNA load[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(6):127-129.

收稿日期:2017-03-31

修回日期:2017-07-16

(上接 14 页)鉴别,为 VE 的早期诊断和治疗提供依据,具有一定的临床推广应用价值。但该检测方法仍需进行大批量临床标本,特别是婴幼儿患者的标本进行检测,来提高检测体系准确性,优化检测体系,使其能够更适用于临床病毒性脑炎的检测。

参考文献:

- [1] Bautista C. Central nervous system infections[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2013, 25(3):11-12.
- [2] 高珺,王琼,林广裕,等. 病毒性脑炎患儿脑脊液人类鼻病毒检测的价值[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2):11-15.
- Gao J, Wang Q, Lin GY, et al. Value of human rhinovirus detected in cerebrospinal fluid of children with viral encephalitis[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(2):11-15.
- [3] Parisi SG, Basso M, Del Vecchio C, et al. Viral infections of the central nervous system in elderly patients: a retrospective study[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2016, 44(C):8-10.
- [4] 王云龙,李智涛,李玉林,等. 荧光定量 RT-PCR 检测临床标本中的肠道病毒 RNA[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6):1329-1331, 1346.
- Wang YL, Li ZT, Li YL, et al. Enterovirus RNA detection in clinical samples by real-time RT-PCR[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(6):1329-1331, 1346.
- [5] Hinson VK, Tyor WR. Update on viral encephalitis[J]. Curr Opin Neurol, 2001, 14(3):369-374.
- [6] 孙卫国,孙雯娜,侯江厚,等. 人巨细胞病毒 pp150-gp52 蛋白原核可溶性表达与 IgM 捕获 ELISA 方法建立和应用[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(5):1-4.
- Sun WG, Sun WN, Hou JH, et al. Soluble expression of HCMV pp 150-gp52 protein in prokaryotic system and establishment of IgM capture-ELISA[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(5):1-4.
- [7] 杨吉星,居丽雯,施强,等. 上海地区水痘带状疱疹病毒基因型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2):223-224.

Yang JX, Ju LW, Shi Q, et al. Research of genotype of varicella-zoster virus in Shanghai[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(2):223-224.

- [8] 曾昭森. 荧光 RT-PCR 同步检测肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型方法的建立及应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(16):1327-1328.
- Zeng ZS. Detection of a fluorescent RT-PCR method for detecting Enterovirus 71 and coxsackie A16[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2012, 11(16):1327-1328.
- [9] 郭建巍,高毓蕊,田占月,等. EB 病毒和人巨细胞病毒核酸检测的实验研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(1):105-107.
- Guo JW, Gao YR, Tian ZY, et al. Experiment research for detecting DNA of epstein-barr virus and human cytomegalovirus[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(1):105-107.
- [10] Ziyaeyan M, Alborzi A, Borhani Haghighi A, et al. Diagnosis and quantitative detection of HSV DNA in samples from patients with suspected herpes simplex encephalitis[J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2011, 15(3):211-214.
- [11] Cho HK, Lee NY, Lee H, et al. Enterovirus 71-associated hand, foot and mouth diseases with neurologic symptoms, a university hospital experience in Korea, 2009[J]. Korean Journal of Pediatrics, 2010, 53(5):639-643.
- [12] Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis[J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(12):1565-1577.
- [13] 陈勇,吴华平. 小儿病毒性脑炎的诊断与治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(24):1863-1865.
- Chen Y, Wu HP. Diagnosis and treatment of viral encephalitis in children[J]. J Appl Clin Pediatr, 2012, 27(24):1863-1865.

收稿日期:2017-08-03

修回日期:2017-09-25