

心肺移植患者巨细胞病毒耐更昔洛韦基因突变研究

周琳 钱景 蔡挺 TC Harder P Rautenberg

【摘要】 目的 建立并应用人巨细胞病毒(HCMV)行列探针检测(LiPA)技术,快速检测心肺移植患者 HCMV 耐更昔洛韦(GCV)基因突变。方法 以 HCMV-UL97 基因为靶序列,设计 13 条特异性寡核苷酸探针,用 Nested-PCR 扩增目的基因, LiPA 技术检测与耐药有关的碱基突变。并对 Nested-PCR 产物平行做直接序列测定,与 LiPA 结果比较。结果 16 例心肺移植患者, LiPA 技术检测发现 4 例患者存在 HCMV-UL97 基因突变,突变分别发生在编码子 520、595 及 603,与直接序列测定比较,两者完全吻合。结论 长期应用 GCV 预防及治疗 HCMV 感染可以诱导病毒耐药, LiPA 技术可作为检测 HCMV 基因突变的一种有效手段。

【关键词】 人巨细胞病毒; 器官移植; 更昔洛韦; 行列探针检测

Study on cytomegalovirus gene mutations conferring resistance to ganciclovir in heart and lung transplant patients ZHOU Lin, QIAN Jing, CAI Ting, et al. Department of Microbiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China

【Abstract】 Objective To establish a rapid and convenient assay to screen for emerging ganciclovir (GCV) resistant mutations in the UL97 gene of human cytomegalovirus (HCMV) from transplant recipients. **Methods** Thirteen specific oligonucleotide probes were designed according to the target sequence encoding HCMV-UL97 gene. A nested polymerase chain reaction (PCR) amplifying UL97 gene was employed. Line probes assay (LiPA) was configured to detect relevant non-synonymous mutations at codon 460, 520, 594, 595, 603 and 607. In parallel, nested-PCR amplicons were subsequently sequenced directly. **Results** Four of 16 heart and lung transplant recipients had been infected with HCMV resistant strains during GCV therapy. The mutant codons of UL97 gene were at codon 520, 595 and 603. All amplicons detected by LiPA were fully concordant with the nucleotide sequenced. **Conclusions** Long-term prophylaxis and treatment with GCV in heart and lung transplant recipients may develop HCMV resistant strains. HCMV-LiPA proves to be an alternative method for the resistance genotype analysis of HCMV.

【Key words】 Human cytomegalovirus; Organ transplant; Ganciclovir; Line probes assay

人巨细胞病毒(HCMV)感染是器官移植患者术后最常见的并发症之一,抗病毒药更昔洛韦(GCV)是被用于预防和治疗移植后 HCMV 感染的首选药^[1]。但是 HCMV 可通过其磷酸激酶基因(UL97)和/或 DNA 多聚酶基因(UL54)突变导致耐药。近年来在免疫缺陷患者中时有耐 HCMV 株被分离的报道^[2]。因此,移植患者术后监控 HCMV 感染,及时发现 UL97 及 UL54 基因突变,对保证移植成功尤为重要。我们以心肺移植患者为研究对象,术后检测 HCMV 感染,并在 HCMV

UL97 基因区自行设计寡核苷酸探针,建立了套式 PCR 加 LiPA 检测技术监测基因突变,取得了较好结果,现报告如下。

材料和方法

一、材料

(一)实验株及对照株来源 HCMV-Ad₁₆₉ 实验室株由德国基尔大学微生物病毒研究所提供。HCMV 耐 GCV 株分别由德国 Ulm 大学 Mertens 教授、意大利 Pavia 大学 Gerna 教授和美国 Chou S

植外科 1996 年至 1998 年接受心、肺或心肺联合移植的患者,从术后第 1 天起,静注 GCV 5 mg/kg,每日 2 次。从术后 30 d 开始,每隔 3 d 取患者血标本,进行 HCMV PP65 抗原及 HCMV DNA 检测。有 16 例患者确诊为活动性 HCMV 感染,从中收集阳性血标本 32 份。

二、方法

(一)标本 DNA 提取 200 μ l 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)-抗凝血,按照 Qiagen 公司提供的方法提取 DNA。

(二)HCMV UL97 PCR 1. 引物:根据基因库提供的 HCMV UL97 基因序列,用引物设计软件辅助设计内外 2 对引物,扩增产物长度分别为 929 bp 和 670 bp,见表 1。2. UL97 PCR 反应体系和反应条件:UL97 PCR 反应体系中含 4 \times dNTPs 各 200 μ mol/L, Mg^{++} 1.5 mmol/L, K^{+} 1.5 mmol/L, 外引物对各 0.5 pmol/ μ l, Taq 酶 1.5 U, DNA 模板 5 μ l,补水至 50 μ l。94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58.5 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环,最后延伸 5 min。Nested-PCR 反应体系为地高辛标记的 4 \times dNTPs (德国 Boehringer Mannheim 公司),采用内引物对各 0.5 pmol/ μ l,取第 1 轮 PCR 扩增产物 5 μ l 作为模板,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环,最后延伸 5 min。阳性对照为 HCMV-Ad₁₆₉ DNA,阴性对照为非 HCMV 感染的细胞 DNA 模板。经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,在紫外灯下观察结果。

(三)LiPA 技术 1. 特异性寡核苷酸探针设计:在 UL97 基因区,利用 MacMolly Tetra 软件,共设计 13 条特异性寡核苷酸探针,该 13 条探针可分别检测与 GCV 耐药有关的 6 个突变热点,即编码子 460、520、594、595、603 及 607,见表 2。2. 杂交膜制备:特异性寡核苷酸探针加尾,参照文献[3],稍加修改。20 μ l 反应体系中,分别加入探针 10

pmol/ μ l, 5 \times TdT buffer (CoCl₂ 1 mmol/L, 甲次磷酸钠 0.1 mol/L, DTT 0.1 mmol/L) 4 μ l, dTTP 3.2 mmol, TdT 酶(美国 Promega 公司) 48 U, 补水至 20 μ l。混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 加入 0.5 mol/L EDTA 2 μ l 终止反应。用 20 \times SSC (3 mol NaCl, 0.3 mol/L 枸橼酸三钠)溶液稀释成寡核苷酸探针最终浓度为 4 pmol/ μ l 及 6 \times SSC。3. 杂交:将固定有寡核苷酸探针的尼龙膜置于 2 ml 杂交液中 (ECL 杂交液,德国 Amersham 公司)。将变性的 10 μ l 地高辛标记的 Nested-PCR 产物,加入上述杂交液中。40 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱内,杂交 2 h。4. 洗膜:弃去杂交液,加入 2 ml 3 \times SSC, 0.1% SDS 溶液,室温下漂洗 5 min, 重复 1 次。再用 2 ml 1 \times SSC, 0.1% SDS 溶液, 50 $^{\circ}$ C 漂洗 30 min。5. 封闭:室温下,用 2 ml Buffer I (100 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl)洗膜 5 min, 用 2 ml Buffer II (含 1% Blocking Reagent 的 Buffer I) 浸泡 30 min, 再用 Buffer I 洗膜 1 min。6. 免疫反应:用 Buffer I 将抗地高辛 Fab (德国 Boehringer Mannheim 公司)稀释 5 000 倍,每条杂交膜 2 ml,室温下温育 30 min。用 2 ml Buffer I 洗膜 5 min, 重复 1 次。再用 2 ml Buffer III (100 mmol/L Tris-Cl, pH 9.5, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂) 平衡 5 min。7. 显色反应:将 1 ml 5-溴-4-氮-3-吡啶-磷酸/硝基蓝四氮唑 (BCIP/NBT) 加入杂交槽中,室温下暗处显色 30 min,肉眼观察棕蓝色杂交点。

(四)UL97 Nested-PCR 产物序列测定 按 PCR 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)提供的方法纯化。采用 ABI PRISM BigDye 测序盒(美国 PE 公司),于 DNA 自动测序仪(310 基因分析器)上自动测序。HCMV-Ad₁₆₉作为野生株对照。

结 果

一、HCMV-UL97 Nested-PCR 电泳分析结果 本实验中 16 例有活动性 HCMV 感染的移植

表 1 HCMV UL97 PCR 产物

UL97 引物	序列(5'-3')	基因位置	扩增产物长度
UL97-1 上游引物	5'-CAGACATGTTTCATCACGAC-3'	1247~1266 bp	929 bp
UL97-1 下游引物	5'-GAAAGGCAACAGAGAAGGTA-3'	2156~2175 bp	
UL97-2 下游引物	5'-GTGTCGTGTATGCCACTTTG-3'	1347~1366 bp	670 bp

患者 32 份系列血标本, Nested-PCR 扩增 UL97 基因, 1%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后, 均可见一长度为 670 bp 的 DNA 条带, 与设计产物大小相符。3 株 HCMV 耐药株, 经 PCR 扩增, 也可得到目的片段。

表 2 HCMV UL97 寡核苷酸探针

UL97 探针	序列(5'-3')	特异性
1	5'-GCACGTTTCATGGGTGTAA-3'	M460(ATG)
2	5'-GCACGTTACGGGTGTA-3'	M460V(GTG)
3	5'-CACGTTAATGGGTGT-3'	M460I(ATT)
4	5'-AGCAGGGTGGTAACATT-3'	H520(CAC, CAT)
5	5'-AGCAGGCTGGTAACATT-3'	H520Q(CAG)
6	5'-GAGCAGGTTGGTAACATT-3'	H520Q(CAA)
7	5'-CTCCAACGCGCGGCA-3'	A594(GCG)
8	5'-CCGTTCTTCTCCGACGCG-3'	S595L(TCG)
9	5'-TCGGAGCAGTGCGTGA-3'	G603(TGC)
10	5'-TCGGAACAGTGCGTGA-3'	C603(TGT)
11	5'-TCGGAACAGTGCGTGA-3'	C603W(TGG)
12	5'-TGAGCAGACAGGCGTC-3'	C607(TGT, TGC)
13	5'-TGAGCAGATAGGCGTC-3'	C607T(TAT)

二、HCMV-UL97 Nested-PCR 扩增产物 LiPA 检测结果

本实验中 32 份 HCMV-UL97 Nested-PCR 扩增产物经 LiPA 检测, 结果有 4 例患者的 9 份标本存在 UL97 基因突变。病例 1 共收集 5 份血标本, GCV 用药早期的 2 份血标本, 其 Nested-PCR 产物能与野生型寡核苷酸探针杂交, 表明该患者感染的 HCMV 为野生株, 用药晚期的 3 份血标本, UL97 基因突变产生了编码子 603 改变, 氨基酸由半胱氨酸变为色氨酸; 病例 2 共收集血标本 3 份, 其 Nested-PCR 产物能同时与寡核苷酸探针 4 和 5 杂交, 表明该患者既感染有 HCMV 野生株, 又感染有 HCMV 突变株, 突变为编码子 520, 氨基酸由组氨酸变为蛋氨酸。病例 3, 4 均各收集血标本 2 份, 病例 3 GCV 用药 135 d 时, UL97 基因尚为野生型, 但用药 273 d 时, UL97 基因中的编码子 595 发生突变, 氨基酸由亮氨酸变为丝氨酸; 而病例 4 的 2 份血标本, 均存在 UL97 基因编码子 595 突变。3 株 HCMV 耐药株, LiPA 检测结果显示 R_I 能与探针 2 杂交, 表明该耐药株有编码子 460 突变, 氨基酸中蛋氨酸变为色氨酸, R_{II} 与探针 8 杂交, 表明有

与探针 13 杂交, 表明有编码子 607 突变, 氨基酸由半胱氨酸变为酪氨酸, 见表 3。

三、UL97 Nested-PCR 扩增产物序列测定结果

32 份 UL97 Nested-PCR 扩增产物进行 LiPA 检测同时, 平行做直接序列测定。结果 3 份标本存在 1 558 位碱基有 A-G 的有义突变, 3 份标本存在 1 784 位碱基有 T-C 的有义突变, 3 份标本存在 1 809 位碱基有 C-G 的有义突变。上述突变的编码子分别为 520, 595 和 603, 经与 LiPA 检测结果相比, 两者完全相符。3 株耐药株, UL97 PCR 测序结果, R_I 有编码子 460 突变, 由 ATG 变为 GTG, R_{II} 有编码子 595 突变, 由 TTG 变为 TCG, R_{III} 有编码子 607 突变, 由 TGT 变为 TAT, 结果也与 LiPA 检测一致。

表 3 4 例患者病史资料及 HCMV UL97 基因突变情况

病例	移植器官	GCV 用药时间 (d)	碱基位置	碱基突变	氨基酸改变
1	肺	47	1 809	wt	C603
		57	1 809	wt	C603
		107	1 809	C-G	C603W
		120	1 809	C-G	C603W
		204	1 809	C-G	C603W
2	肺	114	1 558	A-G	H520Q
		148	1 558	A-G	H520Q
		159	1 558	A-G	H520Q
3	心	135	1 784	wt	L595
		273	1 784	T-C	L595S
4	肺	145	1 784	T-C	L595S
		159	1 784	T-C	L595S

讨 论

HCMV 是免疫抑制状态下的器官移植患者最常见和最严重的病原之一, 在感染早期进行特异性的抗病毒预防能有效地阻止致死性 HCMV 并发症的出现。抗病毒药 GCV 是目前被用于预防和治疗移植后 HCMV 感染的首选药, 其抗病毒有效率达 80% 以上。

GCV 本身无活性, 必须转化为三磷酸盐, 才能抑制病毒 DNA 合成。Littler 等^[4]报道 HCMV UL97 基因编码的蛋白激酶, 具有磷酸化功能, 能单磷酸化 GCV, 单磷酸化的 GCV 随后又被细胞白

磷酸 GCV。三磷酸 GCV 是 HCMV 的 DNA 多聚酶(UL54)的竞争抑制物,因结构类似而与脱氧鸟苷酸竞争掺入病毒基因组,并阻断 DNA 的延伸,干扰了病毒复制,达到治疗目的。HCMV 耐药最常见的途径是通过 HCMV UL97 基因突变。大约有 80%~90% 的耐 GCV 临床分离株中,UL97 基因区中存在一个或多个点突变,且这些突变常集中在编码子 460, 520, 594, 595, 603 及 607^[5]。HCMV 耐药的第二条较少发生的途径是 DNA 多聚酶基因(UL54)突变,大约有 10%~20% 的临床耐药株存在 UL54 基因突变^[6]。

HCMV 耐药可通过病毒分离和培养进行检测,如蚀斑减少试验(PRA)^[7]。细胞培养费时费力,近年来多采用分子生物学方法,如 PCR 结合序列测定或限制性内切酶长度多态(RFLP)分析等^[8]。这些方法中,直接测序是最准确但也是极昂贵的方法,RFLP 虽具有快速诊断价值,但复杂的酶切片段分析需要有实际经验,因而上述方法均不适合在临床实验室中广泛使用。

本实验中,我们成功地建立了 HCMV-LiPA 检测法。LiPA 方法的原理是反向杂交,即将一系列寡核苷酸探针固定在一杂交膜上,将地高辛标记的 PCR 产物与相应的探针结合,通过碱磷酸酶检测系统来观察杂交结果。我们一共设计了 13 条特异性寡核苷酸探针用以检测 HCMV UL97 基因中与 GCV 耐药有关的碱基突变,PCR 扩增产物能与所有野生型寡核苷酸探针杂交,而与所有突变型探针无杂交反应;若患者感染有突变的 HCMV,则 PCR 产物与相应编码子的突变型探针杂交阳性,而与该相应的野生型探针杂交阴性;若患者既有野生型又有突变型 HCMV 感染,则 PCR 产物与野生型探针和突变型探针均有杂交反应。本组 16 位心肺移植患者, LiPA 技术检测发现 4 位患者存在 HCMV-UL97 基因突变,突变发生率为 25%,突变分别发

生在编码子 520, 595 及 603,与直接序列测定比较,两者完全吻合。

本组实验结果表明,长期应用 GCV 预防及治疗 HCMV 感染可以诱导病毒耐药, HCMV-LiPA 技术可以作为检测 HCMV 耐药的又一有效手段,对及时发现病毒耐药,指导临床抗病毒药的更换,具有潜在实用价值。

参 考 文 献

- 1 Noble S, Faulds D. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drug*, 1998, 56; 115-146.
- 2 Chou S, Guentzel S, Michels KR, et al. Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates. *J Infect Dis*, 1995, 172; 239-242.
- 3 Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol*, 1993, 74; 1093-1102.
- 4 Littler E, Stuart AD, Chee MS. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature*, 1992, 358; 160-162.
- 5 Gilbert C, Handfield J, Toma E, et al. Emergence and prevalence of cytomegalovirus UL97 mutations associated with ganciclovir resistance in AIDS patients. *AIDS*, 1998, 12; 125-129.
- 6 Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, et al. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alteration in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis*, 1997, 176; 69-77.
- 7 Lurain NS, Spafford LE, Thompson KD. Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistance to ganciclovir. *J Virol*, 1994, 68; 4427-4431.
- 8 Chou S, Erice A, Jordan MC, et al. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis*, 1995, 171; 576-583.

(收稿日期: 2000-12-23)

(本文编辑 李欣)