

实时荧光定量 PCR 检测肾移植患者术后 BK 病毒感染

陆明¹, 朱有华^{1*}, 王皓², 韩澍¹, 冀俊峰²

(1. 第二军医大学长征医院解放军器官移植研究所, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

[摘要] **目的:** 建立肾移植术后患者尿液和外周血 BK 病毒(BKV)感染负荷的实时荧光定量 PCR 检测方法, 并初步探讨其临床应用价值。 **方法:** 构建含有 BKV VP1 蛋白保守区核苷酸序列片段的质粒作为外参照品, 采用 TaqMan 荧光探针检测技术, 建立定量检测 BKV DNA 方法; 并对 112 例肾移植术后患者, 40 例正常体检者的尿液和外周血标本 BKV 含量进行检测。 **结果:** 本研究建立的 BKV 实时荧光定量 PCR 检测方法灵敏度、特异度及重复性较好, 定量 PCR 方法最低检测下限为 8×10^2 copy/ml, 测量批内差异为 0.54%~3.78%, 批间差异为 0.62%~4.58%。112 例肾移植术后患者尿液和外周血 BKV DNA 的检测阳性率分别为 27.7% 和 11.6%, BKV DNA 阳性者尿液和外周血 BKV 中位数水平分别为 8.2×10^4 copy/ml 和 2.4×10^3 copy/ml。40 例正常人 BKV 尿液和外周血阳性率为 2.5% 和 0%; 与正常体检者相比, 肾移植术后患者尿液及外周血 BKV DNA 阳性率及水平明显升高 ($P < 0.01$)。尿液 BKV 阳性率较外周血明显升高 ($P = 0.02$), 但尿液和外周血中 BKV 含量无明显相关性。 **结论:** 实时荧光定量 PCR 检测肾移植患者术后 BKV 感染方法简便、可靠、准确, 为进一步研究 BKV 感染与肾移植术后移植体丢失的关系奠定了基础。

[关键词] BK 病毒; 实时荧光定量 PCR; 肾移植**[中图分类号]** R 699.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0672-04

A real-time fluorescent quantitative PCR method for determination of BK virus in renal transplant recipients

LU Ming¹, ZHU You-hua^{1*}, WANG Hao², HAN Shu¹, JI Jun-feng² (1. Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a real-time fluorescent quantitative PCR method for determining the BK virus(BKV) level in renal transplant recipients, and to evaluate its clinical application. **Methods:** Plasmids containing part of BKV VP1 gene conservative region were constructed as external standards, and a TaqMan probe technique was used to establish a quantitative method for determination of BKV. Urine and peripheral blood(PB) samples from 112 renal transplant recipients were assayed for BK virus levels, and the results were compared with those of 40 healthy controls. **Results:** The real-time fluorescent quantitative PCR assay established in this study had good sensitivity, specificity, and reproducibility. The minimal detectable level was 8×10^2 copy/ml, intro-experiment variation was 0.54%-3.78%, and intra-experiment variation was 0.62%-4.58%. BKV was detected in 27.7% urine samples and 11.6% PB samples from patients. The median level of BKV in urine and PB were 8.2×10^4 copy/ml and 2.4×10^3 copy/ml, respectively. BKV positive rate of 40 healthy population in urine and PB samples were 2.5% and 0%, respectively. The positive rate and level of BKV in renal transplant recipients were both significantly higher than those in normal cohort (both $P < 0.01$). The positive rate of BKV in urine samples were significantly higher than that in PB samples ($P = 0.02$), but the BKV load in urine samples was not related to that in PB samples. **Conclusion:** The real-time fluorescent quantitative PCR assay in this study is simple, reliable, and precise, which lays a foundation for future study of the relationship between BKV infection and renal graft loss.

[KEY WORDS] BK virus; real-time fluorescent quantitative PCR; kidney transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6):672-675]

近年来, BK 病毒(BKV)再激活在肾移植术后患者中引起 BKV 性肾病(BK virus nephropathy, BKN)导致移植肾功能减退甚至移植体丢失的现象已逐渐被人们所关注^[1,2], 如何早期监测到 BKV 在体内的激活是防治 BKN 的关键因素之一。国外监测 BKV 感染和 BKN 的手段有脱落细胞学检查、PCR 检测、电镜检查、移植肾穿刺活检等^[3]; 但目前国内对于 BKV 的监测研究刚刚起步, 有关肾移植患者 BKV 定量检测的报道少见。本研究建立了针对 BKV 的实时荧光定量 PCR 方法, 对此方法进行评价, 并检测 112 例肾移植术后患

者外周血和尿液中 BKV DNA 的含量, 与正常人的 BKV 水平相比较。

1 材料和方法

1.1 研究对象 对 112 例因终末期肾病在第二军医大学长征医院解放军器官移植研究所接受同种异体肾移植的患者

[作者简介] 陆明, 博士生. E-mail: luming1975@sohu.com

* Corresponding author. E-mail: zhuyouhua@126.com

进行了研究。其中男82例,女30例,年龄25~60岁,平均年龄(45.2±7.2)岁;移植术后时间为3~72个月,平均(9.2±8.2)个月,均为尸体供肾者。40名正常健康志愿者均为2005年2月至2005年8月间本院门诊健康体检者,其中男30例,女10例,平均年龄(46.1±6.4)岁,均填写知情同意书并报伦理委员会批准。两组的年龄、性别构成均无显著性差异。

1.2 标本收集与处理 采集上述2组研究对象晨尿50 ml及外周血3 ml,尿液标本以2 000×g离心30 min,其沉淀用生理盐水洗涤后再次2 000×g离心10 min,二次沉淀溶解于200 μl纯水中,使用体液病毒DNA小量制备试剂盒(杭州维特洁生化有限公司)按厂家提供的说明抽提标本DNA,置-20℃保存待测。血液标本以EDTA抗凝,直接应用血液DNA中量制备试剂盒(杭州维特洁生化有限公司)按厂家提供的说明抽提标本DNA,置-20℃保存待测。

1.3 引物与探针 PCR引物(P1、P2)为BKV VP1基因区(GenBank V01108)特异引物,拟扩增该区片段长95 bp,P1(forward): 5'-AGT GGA TGG GCA GCC TAT GTA-3'(2 511-2 531 nt); P2(reverse): 5'-TCA TAT CTG GGT CCC CTG GA-3'(2 605-2 586 nt); TaqMan探针: 5'-AGG TAG AAG AGG TTA GGG TGT TTG ATG GCA CAG-3'(2 546-2 578 nt),5'端使用FAM标记,3'端使用TAMRA标记。以上引物和探针用Primer Express软件设计,并参考了Leung等^[4]的研究,经BLAST校对后证实为BKV特异性序列并为BKV各型所共有,由上海生工生物工程公司合成。

1.4 外参照标准品的克隆及质量评价 以化学合成的含有拟扩增区的单链核苷酸片段(104 bp,上海生工生物工程公司)为模板,P1、P2为引物,高保真PCR扩增系统扩增PCR产物,应用割胶回收试剂盒回收、纯化扩增的PCR产物,与pGEM-T载体经T₄DNA连接酶连接,转化DH5α菌株,在含X-gal、IPTG、氨苄青霉素的LB平板上筛选白色转化子菌落,培养细菌后提取质粒pGEM-BK,经Pst I酶切电泳和DNA测序证实含有95 bp目的DNA片段,配成不同浓度作为标准品使用,并根据扩增曲线评价构建质粒的质量。

1.5 实时荧光定量PCR检测BKV感染及其方法学评价

1.5.1 实时荧光定量PCR试剂配制 使用Ex TaqTMPCR试剂盒(大连宝生物公司),dATP、dCTP、dGTP、dUTP各200 μmol/L,Mg²⁺ 4 mmol/L,Taq DNA热启动聚合酶5 U/100 μl,P1、P2各400 nmol/L,TaqMan探针50 nmol/L,用试剂盒配备缓冲液配制。

1.5.2 实时荧光定量PCR检测肾移植患者术后BKV感染 在反应管中加入PCR反应液40 μl,加入10 μl待测样品提取液或系列浓度质粒标准品pGEM-BK,低速离心后,置于ABI PRISM 7000荧光定量PCR仪扩增。扩增条件为:50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,40个循环。连续测定荧光强度,利用Sequence Detection System软件(PE公司)分析检测结果。Ct值规定为PCR扩增仪默认设置,即1~15个循环计算出的荧光信号的标准偏差的10倍值对应的循环数。

1.5.3 标准曲线的绘制以及质量控制 调整基线以试剂空白和阴性管不出现阳性为准,一般基线在0.1~0.3之间,与基线的交点的循环次数(Ct)值为纵坐标,BKV DNA浓度的对数值为横坐标,制作标准曲线;同时对该方法的灵敏度、特异性和稳定性进行研究;为增加数据的可信度,每次实验均设置空白对照管,已知量靶序列的临界值对照管及阴性对照管。

1.5.4 肾移植患者术后BKV DNA含量的计算 利用待测标本的Ct值,结合标准曲线求出相应的BKV DNA含量。

1.6 统计学处理 采用SAS 9.1.3软件,率的比较采用χ²检验,计量资料用t检验和方差分析。

2 结果

2.1 实时荧光定量PCR方法学评价

2.1.1 标准品 pGEM-BK 质量评价 质粒浓度10⁴~10⁸ copy/ml,扩增曲线与图1中粗横线所示荧光信号变化阈值的交点处的横坐标为Ct值,扩增曲线呈s型,对数扩增期明显,Ct值间隔较均匀,表明所构建的质粒质量良好,符合标准品要求(图1)。

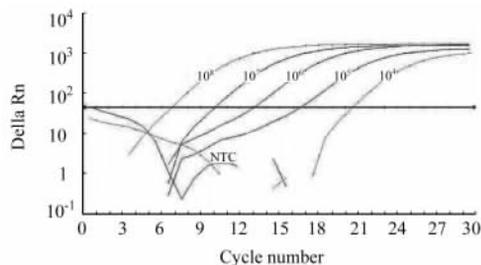


图1 系列浓度标准品 pGMT-BK 扩增曲线
Fig 1 Amplification plots of serial concentrations of pGMT-BK standards

Ct values are denoted by X-axis corresponding to junction of fluorescence signal threshold illustrated by the thick line and amplification curves. NTC: Negative control

2.1.2 荧光定量PCR扩增效果评价 每次检测均以10⁴~10⁸ copy/ml系列梯度浓度的标准品pGEM-BK构建标准曲线(图2),可见Ct值和浓度对数之间具有很好的相关性,所有测定标准曲线的相关系数R²≥0.977 4,标准曲线斜率在-3.23~-3.68之间,说明该试验PCR扩增效率良好,也证实实用Ct值进行定量的可信性。动态范围测定显示在10³~10¹⁰ copy/ml之间标准曲线具有良好的相关性。

2.1.3 灵敏度 将10²~10³ copy/ml的系列梯度浓度pGEM-BK同时测定10次,观察扩增曲线生成情况,以阳性扩增曲线生成率≥60%作为检测下限,结果当pGMT-BK(copy/ml)为1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100时,其阳性率分别为100、100、70、50、50、40、10、0、10、0,从而确定8×10² copy/ml为检测下限。

2.1.4 特异性 HBV-DNA(+),HCV-RNA(+),EBV-DNA(+),巨细胞病毒抗体IgM(+),TB DNA(+)者外周血标本用本法检测均为阴性结果。

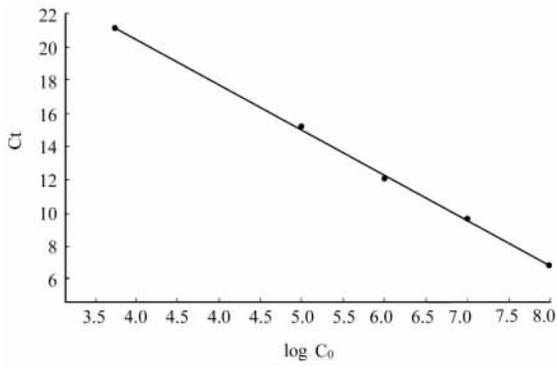


图2 pGMT-BK质粒起始浓度对数值-Ct值标准曲线

Fig 2 Standard curve of starting pGMT-BK amount against Ct

2.1.5 重复性 批内差异测定:选择3个浓度差别较大的BKV阳性患者尿液标本DNA抽提液A、B、C,每个浓度测定10管,共30管,在同一测定中完成,结果统计分析显示,测定浓度对数值的变异系数(CV值)分别为0.54%、1.62%和3.78%,以绝对浓度(copy/ml)表示的CV值分别为9.47%、17.6%、29.0%。批间差异测定:分别10次测定上述对数浓度值,得到的变异系数(CV值)分别为0.62%、1.34%和4.58%,以绝对浓度表示的CV值分别为11.9%、17.7%、32.9%。

2.2 BKV的定量结果 112名肾移植术后患者中,31名肾移植术后患者尿液中定量检测出BKV,阳性率为27.7%,BKV尿液负荷量为 $1.02 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^7$ copy/ml(中位数为 8.2×10^4 copy/ml);13名肾移植术后患者外周血中定量检测出BKV,阳性率为11.6%,BKV外周血负荷量为 $9.6 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^5$ copy/ml(中位数 2.4×10^3 copy/ml);其中12名患者尿液BKV亦为阳性,1名为阴性。尿液BKV阳性率显著高于外周血(χ^2 检验, $P=0.02$)。92.3%(12/13例)外周血BKV阳性者尿液病毒负荷量 $>5 \times 10^3$ copy/ml,68.4%(13/19例)外周血BKV阴性者尿液病毒负荷量 $<5 \times 10^3$ copy/ml。外周血病毒负荷量和尿液病毒负荷量之间统计学上无明显相关性(图3)。40名健康者中有1例尿液中检测到BKV,量为 0.96×10^3 copy/ml;外周血中均未检测出BKV。与正常人相比,肾移植术后组BKV DNA阳性率及水平明显升高($P<0.01$)。

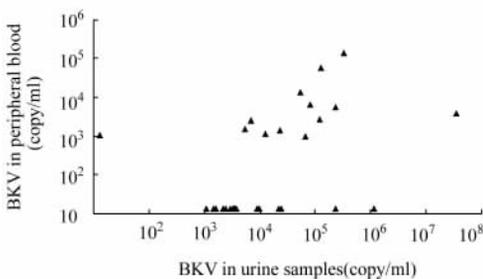


图3 32名BKV阳性者外周血病毒负荷量与尿液负荷量关系

Fig 3 Relationship between viremia and viruria of 32 BKV positive patients

3 讨论

BKV为多瘤病毒家族(polyomaviruses)亚型之一,是一种DNA小颗粒病毒。健康人群有BKV隐性感染史者较为普遍,一般无明显临床症状。肾移植术后患者处于免疫抑制状态时,潜伏于体内的BKV再度激活并大量复制,导致部分患者出现BKN,引起移植肾功能严重损害,甚至移植肾丢失^[2]。早期诊断、处理BK病毒感染可以使移植肾丢失的发生率明显降低^[2]。有国外研究^[5]认为,PCR定量检测外周血中BKV DNA含量对BKN诊断的阳性预测值可达75%,是预测BKN的独立危险因素。

实时荧光定量PCR检测方法建立的关键是外标准品的制备。外参照标准品通常由以下几种方式获得:(1)直接化学合成单链目的基因片段^[6],它的优点是纯度高、定量准确,但受化学合成工艺的限制,通常只能合成120 bp以下长度,120 bp以上者出现核苷酸错配的概率明显增高,而且化学合成的是单链寡核苷酸链,极易挥发造成PCR实验室污染出现假阳性,或者是经过一段时间保存后会出现明显降解。(2)利用设计的引物从可疑感染标本获得扩增片段并基因测序验证^[7],它的优点是方法简单,对于本实验而言,需要设计合适引物从大量标本DNA抽提物中扩增所需要的野生型靶基因片段,再将扩增的PCR产物进行测序确认,工作量较大,而且结果确认困难。(3)从纯化病毒株扩增片段,克隆入载体,制备质粒作为标准品^[8],此方法获得的标准品质粒特异性好,纯度较高,性质稳定,而且由于其相对分子质量一般较大,不易造成污染出现假阳性;同时,质粒后期的大量制备方便,价廉。但目前由于国内尚无纯化的BK病毒株保存,直接应用第三种方法获得外标准品有困难,因此我们将第一种和第三种方法结合起来,构建的质粒作为实验标准品具有稳定性、重复性好,扩增效率高等特点。获得较为满意的效果。

本研究所应用的TaqMan探针,对目标序列有很高的特异性,而且设计相对简单,定量准确,无须内参照,方法操作简单、安全、自动化程度高而且可预防污染,可以做到绝对定量^[6]。通过方法学评价可以看出,本法具有很好的重复性、特异性、较高的灵敏度(8×10^2 copy/ml)和较宽的线性范围($10^3 \sim 10^{10}$ copy/ml)。

112例肾移植术后患者和40例健康对照者的BKV DNA进行定量检测的结果发现,肾移植术后患者术后体液中BKV检出率明显高于健康对照者,尿液中BKV检出率明显高于外周血。有国外研究^[9]报道PCR检测外周血BKV的阳性率高于本方法,可能与其检测灵敏度较本方法高有关(可达100 copy/ml),此外,用不同的DNA抽提方法所导致的病毒DNA的得率差异也可能影响检测阳性率和定量。本研究中有92.3%(12/13例)外周血BKV阳性者的尿液BKV浓度大于外周血浓度,但尿液病毒负荷量和外周血病毒负荷量之间统计学上无明显相关性,而且还有1例患者外周血中检出了BKV而尿液中却未检出。国外亦有类似的报告,有研究者认为这是BKV在不同器官部位激活的结果,或是因其他种属的多瘤病毒如JC病毒或SV40病毒引起^[10]。

笔者认为,除了上述原因外,还可能是由于BKV在尿液中呈间歇性排出,加上尿流量生理性变动较大所致,具体机制还有待今后进一步进行BK病毒排泄动力学研究。因此,对于尿液中病毒含量偏低而外周血浓度相对较高者,应在短期内反复测定其尿液中BKV含量,以求获得尿液中病毒较为“准确”的含量。

因为肾移植患者尿液BKV的检出率高于外周血,可以考虑将尿液BKV DNA指标作为早期预警标志,但对于其预警BKN的阈值目前尚难确定,有待于今后的进一步研究。

总体上,本实验所建立的方法简便、准确、重复性好,有望应用于临床,作为BKV感染的无创监测手段。

[参考文献]

- [1] Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2002, 2: 25-30.
- [2] Nicleleit V, Hirsch HH, Zeiler M, et al. BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15: 324-332.
- [3] Bressollette BC, Coste BM, Hourmant M, et al. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5: 1926-1933.
- [4] Leung AY, Suen CK, Lie AK, et al. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation [J]. *Blood*, 2001, 98: 1971-1978.
- [5] Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347: 488-496.
- [6] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*, 1996, 6: 986-994.
- [7] Leung AY, Chan M, Tang SC, et al. Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viruria in renal allograft recipients [J]. *J Virol Methods*, 2002, 103: 51-56.
- [8] Parmjeet R, Abhay V, Ron S, et al. Monitoring for polyomavirus BK and JC in urine: comparison of quantitative polymerase chain reaction with urine cytology [J]. *Transplantation*, 2005, 79: 984-988.
- [9] Randhawa P, Ho A, Shapiro R, et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 1176-1180.
- [10] Si-Mohamed A, Goff JL, Desire N, et al. Detection and quantitation of BK virus DNA by real-time polymerase chain reaction in the LT-ag gene in adult renal transplant recipients [J]. *J Virol Methods*, 2006, 131: 21-27.

[收稿日期] 2005-11-30

[修回日期] 2006-05-10

[本文编辑] 贾泽军

Role of keratinocyte growth factor in the pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease

Mei C, Mao Z, Shen X, Wang W, Dai B, Tang B, Wu Y, Cao Y, Zhang S, Zhao H, Sun T (Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] Background: Previous studies have shown that the expression and distribution of keratinocyte growth factor (KGF), also known as FGF-7 (fibroblast growth factor-7) or HBGF-7 (heparin-binding growth factor-7), may be implicated in kidney cyst formation and expansion. However, there are no data on KGF expression in human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) tissue, and it is unknown whether it affects ADPKD cyst-lining epithelial cell proliferation. Methods: The expression and distribution of KGF and KGF receptor (KGFR) mRNA in ADPKD cystic and normal kidney tissues were examined using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridization. KGF and KGFR protein expression in the above tissues was analysed by immunohistochemistry and western blot. The effect of KGF on cyst-lining epithelial cell proliferation was assessed by MTT assay, and its effect on the cyst-lining epithelial cell cycle was analysed by flow cytometry. The effect of KGF on cyclin D1 and P21 (waf1) gene expression in cyst-lining epithelial cells was also determined. Results: KGF and KGFR mRNA expression in ADPKD cysts was higher than in normal kidney tissues. KGF and KGFR protein expression was also higher in ADPKD cysts and was localized to cyst-lining epithelial cells, tubular and interstitial cells. *In vitro* experiments revealed that KGF promoted cyst-lining epithelial cell proliferation, and decreased the ratio of G₀/G₁ phase but increased that of S phase. In response to KGF, the expression of the cyclin D1 gene in cyst-lining epithelial cells increased markedly while P21 (waf1) expression decreased. Conclusions: KGF and KGFR expression was upregulated in ADPKD kidney tissues. KGF stimulated the proliferation of cyst-lining epithelial cell *in vitro* by regulating the expression of cyclin D1 and P21 (waf1) genes. KGF may play a role in pathogenesis of ADPKD.

[*Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20: 2368-2375]