

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00037

高血压患者人巨细胞病毒感染率及其血浆中和抗体水平分析

曹元应^{1△}, 甘霖^{2△}, 赵俊², 张俊玲², 陈敬贤², 房功思¹, 江丹³, 王明丽^{2*}

1. 安徽医学高等专科学校, 合肥 230601
2. 安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032
3. 安徽省第二人民医院检验科, 合肥 230061

[摘要] **目的** 了解自然状态下, 高血压患者群体人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)的感染率及血浆特异性 HCMV 中和抗体水平, 初步探讨 HCMV 感染与高血压的关系。**方法** 于 2013 年 1 月至 4 月在安徽省第二人民医院募集 51 名诊断为高血压患者的血标本, 同时募集性别和年龄类似的 50 名体检正常者的血标本作为对照。采用间接免疫荧光染色快速微量中和试验检测血浆标本中 HCMV 特异性中和抗体, 采用常规间接酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血浆 HCMV 特异性 IgG 和 IgM, 采用巢式 PCR 法检测 HCMV UL93 DNA。**结果** 高血压患者组 HCMV UL93 DNA、HCMV IgG 和 IgM 的阳性率分别为 72.55%、70.59% 和 3.92%, 正常对照组分别为 56.00%、50.00% 和 2.00%, 高血压患者组中 HCMV DNA 和 HCMV IgG 的阳性率高于正常对照组($P < 0.05$), 而 HCMV IgM 的阳性率在两组间的差异无统计学意义。高血压患者组血浆 HCMV 中和抗体的平均几何滴度为 38.56 ± 20.42 , 正常对照组为 60.12 ± 25.38 , 两组差异有统计学意义($P = 0.0326$)。**结论** 高血压患者 HCMV 的感染率高于正常对照, 但特异性中和抗体水平明显降低。提示高血压患者的 HCMV 体液免疫状态低下, 表明高血压与 HCMV 感染存在相关性。

[关键词] 高血压; 巨细胞病毒感染; 病毒抗体; 相关性

[中图分类号] R 544.1; R 512.93 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)01-0037-06

Prevalence of human cytomegalovirus infection and analysis of its plasma neutralizing antibody level in hypertension patients

CAO Yuan-ying^{1△}, GAN Lin^{2△}, ZHAO Jun², ZHANG Jun-ling², CHEN Jing-xian², FANG Gong-si¹, JIANG Dan³, WANG Ming-li^{2*}

1. Anhui Medical College, Hefei 230601, Anhui, China
2. Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China
3. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei 230061, Anhui, China

[Abstract] **Objective** To determine the prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) infection and plasma level of its neutralizing antibody in hypertension patients, so as to discuss the association between HCMV infection and hypertension. **Methods** A total of 51 anti-coagulated blood samples were collected from hypertension patients and the 50 control samples were obtained from age- and sex-matched healthy controls in the Second People's Hospital of Anhui Province from Jan. 2013 to Apr. 2013. Neutralizing antibody level was analyzed by rapid fluorescence micro-neutralization; plasma anti-HCMV IgG and anti-HCMV IgM were determined by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), and HCMV UL93 DNA was detected by nested PCR. **Results** The positive rates of HCMV UL93 DNA and anti-HCMV IgG in hypertension patients were significantly higher than those in healthy controls (72.55% vs 56.00% for UL93 DNA and 70.59% vs 50.00% for IgG, $P < 0.05$). The positive rates of anti-HCMV IgM were not significantly different between the two groups (3.92% vs 2.00%, $P > 0.05$). The geometric mean titer of HCMV neutralizing antibody was 38.56 ± 20.42 in hypertension patients, which was significantly lower than that in healthy controls (60.12 ± 25.38 , $P = 0.0326$).

[收稿日期] 2013-08-01 **[接受日期]** 2013-11-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30872253), 安徽省科技厅科技攻关项目(8010302179), 安徽省教育厅自然科学重点课题(KJ2009A041Z). Supported by National Natural Science Foundation of China (30872253), the Key Project of the Science and Technology Department of Anhui Province (8010302179), and Key Subject for Natural Science Research of the Education Department of Anhui Province (KJ2009A041Z).

[作者简介] 曹元应, 硕士, 副教授. E-mail: 125293660@qq.com; 甘霖, 硕士, 实验师. E-mail: hefei10zhong@160.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0551-65123422, E-mail: 1952987441@qq.com

Conclusion HCMV positive rate is higher in hypertension patients than in healthy controls; however, the specific neutralizing antibody level of HCMV is greatly lower than that in healthy controls, suggesting that the humoral immune status is declined in hypertension patients and there is a correlation between HCMV infection and hypertension.

[Key words] hypertension; cytomegalovirus infections; viral antibodies; correlation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(1): 37-42]

高血压是人类健康的主要威胁之一,美国心脏学会(AHA)预计2025年全球高血压患者总数将达15亿。虽然高血压被确定为心血管疾病的重要危险因素已近50年,但95%以上的高血压为病因不明的原发性高血压,因此难以进行有效的早期预防和治疗。2011年,我国研究人员报道了人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染与原发性高血压有相关性。研究人员通过临床病例对照研究,发现HCMV编码的hcmv-miR-UL112在高血压组较健康对照组上调3倍,并且在独立样本研究中也得到证实^[1]。来自欧洲的研究人员又以更大的样本量发现了类似的结果,证明HCMV感染与收缩压和舒张压都独立相关^[2]。HCMV在全球范围成人血清抗体阳性率为60%~90%,与所有的疱疹病毒一样,一旦感染,HCMV会在宿主体内(唾液腺、白细胞等)建立持续终生的潜伏感染,而潜伏感染常会间断性地被激活而发生活动性感染^[3]。HCMV感染会显著提高任何原因引起的心血管疾病死亡率,如心肌梗死、脑卒中和冠状动脉再狭窄等^[4-6]。

目前,HCMV感染与高血压发病的相关性尚不完全清楚。HCMV感染机体后可刺激机体产生中和抗体,但在感染中所起的保护作用尚未确定。本研究通过检测并比较高血压患者和正常对照人群血浆HCMV中和抗体水平、HCMV DNA血症、HCMV IgG和IgM阳性率,探讨高血压患者HCMV感染情况及特异性中和抗体水平,进一步揭示高血压与HCMV感染的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象 于2013年1月至4月在安徽省第二人民医院募集51名年龄不超过60岁的高血压患者,诊断标准参照2010年中国高血压防治指南^[7];同时募集性别和年龄类似的体检正常者50名。记录两组对象的性别、年龄、体质量、是否存在其他心血管疾病(如冠心病、高心病、高血脂等)以及是否有抽烟和饮酒习惯等。

1.2 标本收集 采集5 mL外周血并用EDTA抗凝,离心收集血浆, -20℃保存,用于HCMV IgG、IgM及中和抗体检测;同时采用蛋白酶K、酚/氯仿/异戊醇(购自国药集团)法提取总DNA, -20℃保存备用。

1.3 HCMV UL93 DNA的检测 采用巢式PCR扩增HCMV UL93 DNA片段来检测HCMV DNA。先使用外侧引物扩增35个循环(上游引物: 5'-GGC AGC TAT CGT GAC TGG GA-3';下游引物: 5'-GAT CCG ACC CAT TGT CTA AA-3';扩增产物长度为522 bp),再取2 μL扩增产物用内侧引物扩增35个循环(上游引物: 5'-TTA GCG CGT GAC CTG TTA CG-3';下游引物: 5'-TCT AAA TTG TTA CGC AGT CCG-3',扩增产物长度为249 bp),引物参照HCMV AD169株基因序列(GenBank; FJ527563)并利用Primer Premier 5.0软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。取5 μL PCR产物进行2.5%琼脂糖凝胶电泳,用从培养物中提取的HCMV AD169株病毒(安徽医科大学微生物学教研室保存)DNA作为阳性对照,出现特征性条带判断为阳性,阳性结果送生工生物工程(上海)股份有限公司进行DNA测序。

1.4 HCMV IgG和IgM的检测 血浆HCMV IgG和IgM采用ELISA试剂盒(Biocheck, USA)进行检测,按说明书操作。

1.5 HCMV特异性中和抗体的检测 对经ELISA试剂盒初筛为HCMV IgG阳性标本进一步检测HCMV特异性中和抗体。采用以HCMV IE1单克隆抗体显色作为结果判断标记物的间接免疫荧光染色快速微量中和实验进行中和抗体的检测,具体步骤为:第1天,在96孔细胞培养板中每孔加入 2.5×10^4 个人胚肺成纤维细胞(HEL,安徽医科大学微生物学教研室保存),培养过夜;第2天,将10倍稀释血浆标本置56℃水浴作用30 min,以消除非特异性抑制因素,将该血浆作为原液,再按1:2、1:4、1:8、1:16、1:32和1:64进行二倍递增系列稀

释,每个稀释度总体积为 200 μL ;将该系列稀释的血浆与等量 100 TCID₅₀ HCMV AD169 株病毒液振荡混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 1 h;弃去 96 孔板中培养液,每孔加入上述病毒和血浆的混合液 200 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中培养过夜;第 3 天,弃去孔中培养液,用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 50 μL 无水乙醇,室温固定 20 min 后,弃去无水乙醇,立即用 PBS 水化 15 min;再用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 20 μL 稀释好的 HCMV IE1 单克隆抗体(Abcam),室温孵育 2 h;用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 20 μL 稀释好的山羊抗小鼠 IgG-Alex488 (Abcam),室温孵育 1 h;用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入用 PBS 配制的 70%甘油 20 μL ,于倒置荧光显微镜下观察,感染 HCMV 细胞的细胞核可观察到苹果绿色荧光。将每个有苹果绿色荧光的细胞核作为一个阳性信号。通过 Image J 软件扫描记录不同稀释度血浆作用后每孔阳性信号的个数,将数据输入 GraphPad.

Prism. v5.0 软件,通过四参数拟合曲线计算血浆样品的 50%中和滴度(NT₅₀)。

1.6 统计学处理 HCMV 几何平均滴度采用 GraphPad. Prism. v5.0 软件进行分析,其余指标的统计学分析采用 SPSS 13.0 软件完成。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两独立样本的 t 检验比较两组间的差异;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验比较两组间的差异。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般性资料比较 由表 1 可见,两组性别、年龄、体质量及抽烟和饮酒情况差异均无统计学意义;高血压患者组有 11 例伴有其他心血管疾病,其中冠心病 2 例,高血脂 9 例,正常对照组有 3 例伴有高血脂。其他心血管疾病的伴发率在两组间差异有统计学意义($P<0.001$)。

表 1 高血压患者和正常对照人群一般性资料比较

Tab 1 Clinical profile of hypertension patients and healthy controls

Characteristic	Hypertension patients (N=51)	Healthy controls (N=50)	P value
Age (year), $\bar{x}\pm s$	40.81 \pm 15.00	38.08 \pm 14.63	0.888
Gender (male/female) n/n	28/23	27/23	0.961
Body weight m/kg, $\bar{x}\pm s$	60.3 \pm 18.2	62.7 \pm 15.5	0.626
Smoking n(%)	12(23.53)	14(28.00)	0.091
Drinking n(%)	20(39.22)	22(44.00)	0.096
Complicated with other cardiovascular diseases n(%)	11(21.57)	3(6.00)	<0.001

2.2 HCMV UL93 DNA、HCMV IgG 和 IgM 检测结果 UL93 DNA PCR 扩增结果见图 1,两组 HCMV UL93 DNA、HCMV IgG 和 IgM 阳性率如表 2 所示。由表 2 可见,高血压患者组 HCMV UL93 DNA 和 HCMV IgG 的阳性率高于正常对照组,两组间差异有统计学意义($P<0.05$);两组间 HCMV IgM 阳性率差异无统计学意义。提示高血压与 HCMV 既往感染存在联系。

2.3 HCMV 特异性中和抗体检测结果 采用快速微量中和实验对两组 HCMV IgG 抗体阳性的血浆标本(高血压患者组 36 例,正常对照组 25 例)中和抗体滴度进行检测,结果发现:血浆中含有 HCMV IE1 特异性中和抗体者,则在荧光显微镜下观察到的苹果绿色阳性荧光信号明显减少(图 2)。

HCMV 特异性中和抗体的检测结果发现,高血

压患者组 NT₅₀ 的几何平均数低于正常对照组(38.56 \pm 20.42 vs 60.12 \pm 25.38),差异有统计学意义($P=0.0326$,图 3)。提示高血压患者对 HCMV 特异性体液免疫功能降低。

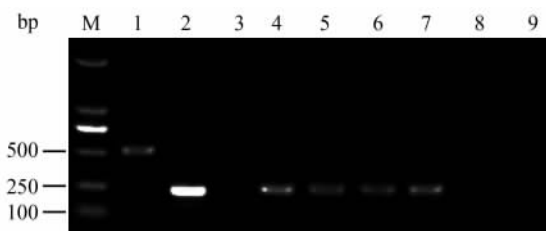


图 1 部分血清标本 HCMV UL93 DNA PCR 扩增结果

Fig 1 Human cytomegalovirus (HCMV) UL93

DNA PCR results for hypertension serum samples

M; DNA marker DL 2000; 1; Positive control amplification by outside primers; 2; Positive control amplification by inner primers; 3; Without template control; 4-9; Serum samples

表2 高血压患者和正常对照人群 HCMV DNA、血浆 HCMV IgG 和 IgM 检测阳性率比较

Tab 2 Comparison of HCMV DNA, plasma HCMV IgG and IgM between hypertension patients and healthy controls

Index	Hypertension patients (N=51)	Healthy controls (N=50)	P value
HCMV DNA ⁺ n(%)	37(72.55)	28(56.00)	0.027
HCMV IgG ⁺ n(%)	36(70.59)	25(50.00)	0.019
HCMV IgM ⁺ n(%)	2(3.92)	1(2.00)	0.540

HCMV: Human cytomegalovirus

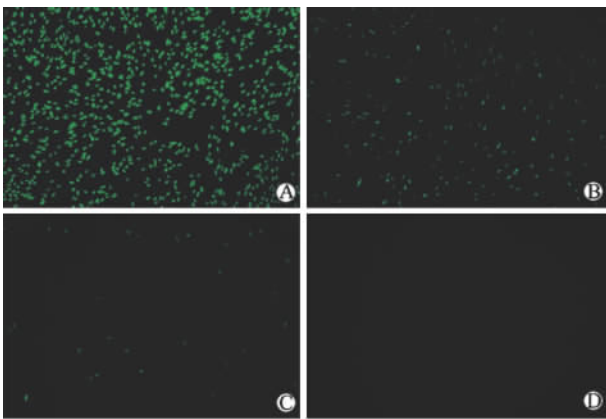


图2 间接免疫荧光染色 HCMV 快速微量中和实验结果

Fig 2 Results of immunostaining

human cytomegalovirus (HCMV) neutralization assay

A: Virus control; B,C: HCMV seropositive serum samples; D: Positive serum control. Original magnification: $\times 100$

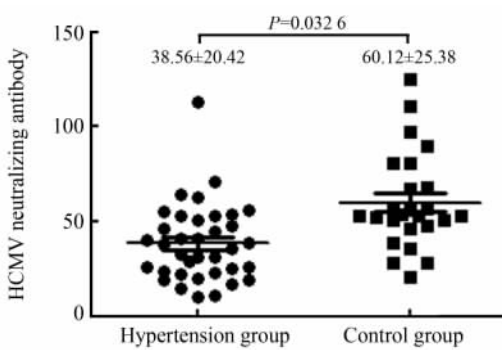


图3 高血压患者和正常对照人群血浆 HCMV 中和抗体 NT₅₀ 几何平均数比较

Fig 3 Comparison of geometric mean titers

of human cytomegalovirus (HCMV) neutralizing antibody between hypertension patients and healthy controls

3 讨论

HCMV 为条件致病性微生物,在宿主体内它可以在上皮细胞、成纤维细胞、白细胞和精子细胞中增殖,而且还可以在唾液腺、乳腺、肾脏和白细胞中形

成潜伏感染,在免疫功能低下的人群可反复再激活感染,导致各器官多种疾病。近年来心血管疾病的发病与 HCMV 感染之间的联系备受关注,HCMV 临床分离株可感染血管内皮细胞,并引起 CXC 趋化因子释放,募集中性粒细胞,引起炎症反应^[8]。研究发现,HCMV 感染与动脉粥样硬化也有关系,在 HCMV 血清抗体阳性个体中存在血管内皮功能障碍,并加快动脉粥样硬化进程^[9]。在心脏移植患者中使用抗病毒药物更昔洛韦可以减少移植相关动脉粥样硬化的发生率^[10]。动物实验也显示该病毒感染可以直接引起小鼠动脉血压升高,而且引起小鼠血浆炎性因子 IL-6、TNF- α 和 MCP-1 的含量升高,血浆和动脉血管组织中血管紧张素 II (Ang II) 的含量也显著上升,而 Ang II 可直接作用于血管,引起血管收缩,提示该病毒感染可能与高血压存在联系^[11]。

在本研究中,我们通过巢式 PCR、ELISA 和间接免疫荧光染色快速微量中和实验,分析了高血压患者和正常人群 HCMV 的感染情况以及对 HCMV 的体液免疫状况。通过巢式 PCR 检测 HCMV UL93 DNA 一直被认为是检测 HCMV 最敏感的方法^[12],但往往出现假阳性而降低其特异性,因此本研究对其 PCR 产物进行了测序分析以减少假阳性结果。血浆中检出 HCMV IgM 说明发生了新近感染,具有高度的特异性和敏感性;血浆中检出 HCMV IgG 说明发生既往感染;而血浆 HCMV 中和抗体滴度则可反映机体抗 HCMV 的体液免疫功能。已有研究证明,体液免疫在预防先天性 HCMV 感染方面起着重要作用,如 HCMV 抗体阳性的孕妇可以为胎儿提供保护,大大减少胎儿先天性 HCMV 感染的概率^[13];对器官移植患者使用纯化的 HCMV IgG 生物制剂,可以有效预防降低 HCMV 感染造成的危害^[14];设计用以诱发机体体液免疫的 HCMV gB 疫苗对血清抗体阴性的妇女有 50% 的保护作用^[15],因此体液免疫在预防 HCMV 感染和发病时均有着重要作用。血清中和抗体滴度是评价体液免疫水平的主要指标,空斑形成抑制实验是检测血浆标本抗病毒中和活性最传统的方法,它通过直接观察病毒致细胞病变效应(CPE)来判断标本中和抗体的抗病毒活性,但其操作繁琐,耗时久,而且对 HCMV 产生的 CPE 需要有经验的操作者才能准确

判断。在本研究中,我们采用了一种以 IE1 单克隆抗体作为结果判断标记物的间接免疫荧光染色为基础的微量中和实验方法,用于快速检测人血浆中 HCMV 中和抗体的效价。这种基于 HCMV IE1 单克隆抗体、在 96 孔细胞培养板上进行的微量中和实验大大缩短了实验时间。由于 IE1 在 HCMV 感染细胞后 2 h 就开始表达,8 h 后就可以通过间接免疫荧光实验检测到^[16];IE1 在成熟的病毒颗粒中不存在,而是病毒感染细胞后重新合成的,因此不会因为病毒颗粒本身携带而造成假阳性结果。

本研究中,高血压患者组 HCMV UL 93 DNA、HCMV IgG 和 IgM 的阳性率分别为 72.55%、70.59%和 3.92%,正常对照组分别为 56.00%、50.00%和 2.00%。高血压患者组 HCMV DNA 和 HCMV IgG 的阳性率高于正常对照组($P < 0.05$),而两组间 HCMV IgM 的阳性率差异无统计学意义,表明高血压的发生与 HCMV 的既往感染存在联系。比较两组血浆 HCMV 中和抗体几何平均滴度发现,高血压患者组低于正常对照组($P = 0.0326$),显示高血压患者对 HCMV 体液免疫降低。在正常人群中 HCMV DNA 和血浆 IgG 的阳性率为 50%~60%,这与总人口中 HCMV 的感染率在 70%左右的结论基本一致,在高血压患者中已有研究显示 HCMV 编码的 hcmv-miR-UL112 出现了 3 倍以上的增加^[2]。美国全国健康和营养调查报告显示,在妇女中 HCMV 血清阳性率与高血压相关,而且随着接触 HCMV 机会增加(及年龄的增加)相关性明显升高^[17]。本研究结果显示,我国高血压患者中 HCMV 的感染率和中和抗体水平与正常人群相比也存在很大差异,进一步支持了 HCMV 感染与高血压具有相关性的结论。此外,国外的一些研究也发现在某些炎症性疾病和肿瘤中 HCMV 的感染率显著高于正常水平,在炎症肠病(IBD)患者中 HCMV 的感染率大于 70%^[18-19],神经胶质瘤患者瘤体组织中 HCMV DNA 的阳性率为 60%~70%^[20]。由于 HCMV 感染人体后不能被清除而是潜伏在机体内,一旦免疫力下降就会再次激活引起感染,反复感染导致炎症反应和增生进而诱发多种疾病。高血压患者表现为动脉内膜中层厚度增加、血管内皮舒张功能减退,这些现象在小鼠巨细胞病毒(mouse cytomegalovirus, MCMV)感染的小鼠动

脉血管中均可以观察到^[11]。因此,HCMV 感染后可能通过影响机体血管中 miRNA 的表达、炎症信号的激活导致动脉内膜中层厚度增加、血管内皮舒张功能减退等,直接参与高血压的发生。

本研究中高血压患者组和正常对照组血浆 HCMV IgM 的阳性率分别为 3.92%和 2.00%,这与近期印度一项报道有较大差异,该报道显示在正常人群中 HCMV IgM 的阳性率为 9.52%^[21],但本研究结果与我国另一项关于 HCMV 感染与 IBD 相关性研究中 HCMV IgM 阳性率以及北美人群中 HCMV IgM 阳性率较为一致^[17,19],这可能与不同国家人民的生活水平、地理位置和气候因素有关。另外,部分疱疹病毒的流行病学特征与气温有明显的关系,如水痘-带状疱疹病毒在温带地区初次感染多发生在 10 岁以前,而在热带地区多发生在 15 岁或更年长一些人群^[22],可能 HCMV 也存在类似的流行病学特征。

由于本研究标本量有限,下一步我们将继续扩大标本量,并进一步从活检标本中寻找 HCMV 感染与高血压相关的证据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Li S, Zhu J, Zhang W, Chen Y, Zhang K, Popescu L M, et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection[J]. *Circulation*, 2011, 124: 175-184.
- [2] Haarala A, Kähönen M, Lehtimäki T, Aittoniemi J, Jylhävä J, Hutri-Kähönen N, et al. Relation of high cytomegalovirus antibody titres to blood pressure and brachial artery flow-mediated dilation in young men; the Cardiovascular Risk in Young Finns Study[J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 167: 309-316.
- [3] Maher M M, Nassar M I. Acute cytomegalovirus infection is a risk factor in refractory and complicated inflammatory bowel disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54: 2456-2462.
- [4] Smieja M, Gnarpe J, Lonn E, Gnarpe H, Olsson G, Yi Q, et al. Multiple infections and subsequent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study[J]. *Circulation*, 2003, 107: 251-

- 257.
- [5] Kytö V, Vuorinen T, Saukko P, Lautenschlager I, Lignitz E, Saraste A, et al. Cytomegalovirus infection of the heart is common in patients with fatal myocarditis[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40: 683-688.
- [6] Ziemann M, Sedemund-Adib B, Reiland P, Schmucker P, Hennig H. Increased mortality in long-term intensive care patients with active cytomegalovirus infection[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36: 3145-3150.
- [7] 刘力生. 中国高血压防治指南 2010[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 19: 701-743.
- [8] Grundy J E, Lawson K M, MacCormac L P, Fletcher J M, Yong K L. Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration[J]. *J Infect Dis*, 1998, 177: 1465-1474.
- [9] Grahame-Clarke C, Chan N N, Andrew D, Ridgway G L, Betteridge D J, Emery V, et al. Human cytomegalovirus seropositivity is associated with impaired vascular function[J]. *Circulation*, 2003, 108: 678-683.
- [10] Valantine H A, Gao S Z, Menon S G, Renlund D G, Hunt S A, Oyer P, et al. Impact of prophylactic immediate posttransplant ganciclovir on development of transplant atherosclerosis; a post hoc analysis of a randomized, placebo-controlled study [J]. *Circulation*, 1999, 100: 61-66.
- [11] Cheng J, Ke Q, Jin Z, Wang H, Kocher O, Morgan J P, et al. Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000427.
- [12] Roback J D, Hillyer C D, Drew W L, Laycock M E, Luka J, Mocarski E S, et al. Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV DNA in blood donors[J]. *Transfusion*, 2001, 41: 1249-1257.
- [13] Yeager A S, Grumet F C, Haffleigh E B, Arvin A M, Bradley J S, Prober C G. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants [J]. *J Pediatr*, 1981, 98: 281-287.
- [14] Bonaros N, Mayer B, Schachner T, Laufer G, Kocher A. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a meta-analysis [J]. *Clin Transplant*, 2008, 22: 89-97.
- [15] Vilalta A, Shlapobersky M, Wei Q, Planchon R, Rolland A, Sullivan S. Analysis of biomarkers after intramuscular injection of Vaxfectin-formulated hCMV gB plasmid DNA [J]. *Vaccine*, 2009, 27: 7409-7417.
- [16] Hagemeyer C, Walker S M, Sissons P J, Sinclair J H. The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(Pt 9): 2385-2393.
- [17] Li C, Samaranyake N R, Ong K L, Wong H K, Cheung B M. Is human cytomegalovirus infection associated with hypertension? The United States National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002 [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e39760.
- [18] Dimitroulia E, Spanakis N, Konstantinidou A E, Legakis N J, Tsakris A. Frequent detection of cytomegalovirus in the intestine of patients with inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2006, 12: 879-884.
- [19] Yi F, Zhao J, Luckheeram R V, Lei Y, Wang C, Huang S, et al. The prevalence and risk factors of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease in Wuhan, Central China [J]. *Virol J*, 2013, 10: 43.
- [20] Mitchell D A, Xie W, Schmittling R, Learn C, Friedman A, McLendon R E, et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2008, 10: 10-18.
- [21] Kishore J, Ghoshal U, Ghoshal U C, Krishnani N, Kumar S, Singh M, et al. Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome [J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53 (Pt 11): 1155-1160.
- [22] Lolekha S, Tanthiphabha W, Sornchai P, Kosuwan P, Sutra S, Warachit B, et al. Effect of climatic factors and population density on varicella zoster virus epidemiology within a tropical country [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 64(3-4): 131-136.