论著

文章编号:1000-5404(2005)04-0282-05

广州2002年登革病毒流行株的分离鉴定及进化分析

张俊磊[1],寒 锐[1],万颖杰[1],彭 涛[1],安 静[1],张复春[2],唐小平[2] ([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;[2]广州市第八人民医院,广州 510060)

提 要:目的 从2002年广州采集的可疑登革病人血清中分离登革病毒,明确流行株的血清型及基因型,并鉴定该分离株的毒力。**方法** 采集疑似登革热患者血清20份,应用C6/36细胞体外培养的方法进行病毒分离,并合成登革病毒通用引物,进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)后,将PCR扩增产物克隆到T载体进行序列测定和比对。确定血清型后,进一步扩增在病毒进化上有代表意义的病毒血清型特异性E/NS1连接区基因片段,测序后用邻位相连(N-J)法构建登革病毒进化树,分析此次登革病毒流行株的来源。通过乳鼠脑内接种及空斑实验,测定分离株的毒力。**结果** 上述20份血清标本中,5份标本出现明显的细胞病变,主要表现为细胞融合,形成大小不一的空泡和网状结构。RT-PCR扩增、序列测定证实为登革病毒Ⅰ型。E/NS1连接区基因序列片段分析表明,2002年广州分离株(DEN-1/GZ2002)的核苷酸序列与基因型Ⅳ型的DEN-1/T14株(澳大利亚,1981)同源性最高,达98%。N-J法构建进化树显示:11株DEN-1病毒分成3个基因群,分别与Rico-Hesse 1990分型中的Ⅰ,Ⅳ和Ⅴ型以及Ana P. Goncalvez 2002年分型中的亚洲型,南太平洋型和美洲/非洲型相符,本室分离的DEN-1/GZ2002株属于Ⅳ型或者称南太平洋型。DEN-1/GZ2002株脑内接种乳鼠11 d左右导致乳鼠弓背,后肢麻痹、瘫痪,直至死亡。感染Vero细胞8 d后可见小而不透明的空斑,病毒滴度可达10^6 pfu/ml,TCID50为4.37 log pfu/0.2 ml。**结论** 2002年广州登革热流行为登革病毒Ⅰ型感染所致,病毒基因型为Ⅳ型,本实验虽然未明确毒力相关基因,动物实验及细胞感染实验证实该分离株的毒力较弱。

关键词:登革病毒;GZ2002株;进化分析;毒力

中图法分类号:R372;R373.33 **文献标识码**:A

Identification and phylogenetic analysis of virulence of dengue-1 virus isolated from strains prevalent in Guangzhou in 2002

ZHANG Jun-lei[1], JIAN Rui[1], WAN Ying-jie[1], Peng Tao[1], AN Jing[1], ZHANG Fu-chun[2], TANG Xiao-ping[2] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2] the Eighth People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou, 510060, China)

Abstract: Objective To isolate and identify the virus from the serum samples of patients with suspected classical dengue fever in Guangzhou province in 2002. **Methods** The serum was inoculated into the Aedes albopictus cell line, C6/36, for isolation of the virus. We amplified 539 nucleotide sequences in the NS1 region of the isolated virus genome using general purpose primers of 4 serotypes of DEN viruses, sequenced the primer-extension production and blasted in the Genbank to identify the isolated strain. And we also sequenced the Envelope-Nonstructural protein 1 (E/NS1) regions of these isolates to compare with the published sequences of dengue 1 serotype (DEN-1) viruses isolated worldwide. The isolated virus was intracerebrally inoculated to suckling mice for the detection of its virulence. TCID50 of the isolated virus was measured using Reed-Muench method. **Results** Five of the 20 serum samples had cytopathologic effects on C6/36 cells. According to the sequences of 539 bp fragment from the NS1 region (positions 2492 to 3030), the isolated virus belonged to DEN-1. A 595-bp fragment from the E/NS1 region (positions 2107 to 2701) was also sequenced. Phylogenetic analysis of the NS1 (480 bp) and E/NS1 (240 bp) regions of the gene nucleotide sequences was performed using neighbor-joining methods: 11 stains of DEN-1 virus divided into three genotypes: Ⅰ, Ⅳ, and Ⅴ respectively as defined by Rico-Hesse or Asia, South Pacific and Americas/Africa.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300303);第三军医大学军事医学创新预研基金(XJYY200304)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300303), Military Medicine Research Foundation of Third Military Medical University (XJYY200304)

作者简介:张俊磊(1978-),女,山东省德州市人,博士研究生,助教,主要从事登革病毒致病机制方面的研究。电话:(023)68752774

通讯作者:安 静,电话:(023)68752774,E-mail: anjing60@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-09-07;**修回日期**:2005-01-25

The isolated DEN-1/GZ 2002 stain by us belonged to Ⅳ or south Pacific genotypes. Suckling mice died at 10 – 11 d after intracerebrally inoculation with the isolated virus. TCID50 of the virus was 4.37 log PFU/0.2 ml. Small plagues were seen on Vero cells at 8 d after infection. **Conclusion** The outbreak of dengue fever in Guangzhou in 2002 was caused by DEN-1. The results suggest that DEN-1/GZ 2002 stain belonges to genotype Ⅳ and this virus showes biological maker of low virulence.

Key words: dengue virus; DEN-1/GZ2002; phylogenetic analysis; virulence

登革病毒(dengue virus, DEN)是黄病毒属的单股正链RNA病毒,根据E蛋白的抗原性不同,分为DEN-1,DEN-2,DEN-3和DEN-4 4个血清型。DEN病毒以埃及伊蚊和白纹伊蚊为传播媒介,引起登革热(classical dengue fever, DF)和登革出血热/登革休克综合症(dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, DHF/DSS)。每年全世界热带与亚热带地区有1亿人感染DEN病毒,其中以与我国接壤的东南亚地区流行最为严重(WHO,1998)。近年来,我国南方频发DF的流行,时有DHF/DSS的病例报告。可见,DEN病毒感染已是一个严重的公共卫生问题。

DHF/DSS表现为高热,出血,休克,病死率较高,但其发生机制不明,多数学者认为DHF/DSS的发生受病毒本身的生物特性[1]和宿主(病人)的免疫因素两方面的影响。近年来,随着人口流动的增加,城市化的发展,DEN病毒型别的地域性分布被破坏,DF的流行区域扩大,DHF/DSS病例亦有增多趋势。有学者认为在一个地区不同血清型或同一血清型中不同基因型的DEN病毒流行可能是DHF/DSS发生的重要原因之一[2],因此了解流行区DEN病毒毒株的生物学特性及其传播规律,对于阐明DHF/DSS的发病机制,预防DEN感染可能具有重要意义。目前利用DEN病毒的基因序列特征可以鉴定同一血清型中的DEN病毒基因型的差异,并根据这些差异分析流行毒株的来源[2,3]。Rico-Hesse等[4]发现病毒E/NS1连接区240 bp基因片段相对保守,其随机突变有一定的规律性,能够反映病毒的长期进化趋势,因此利用E/NS1片段分别比较了40株DEN-1病毒和40株DEN-2病毒,分析了同一血清型中不同基因型的病毒之间的进化关系。Goncalvez等[5]利用整个E蛋白基因片段的分析比较,阐述了36株DEN-1病毒的进化关系。这些研究结果表明:根据小片段的基因序列分析所构建的进化树,与整个基因组比较,除在末端分支处有些较小的分歧外,所得结果基本一致[6]。由于小片段基因序列分析简便易行,因而得到广泛的应用。

本研究对2002年广州市传染病医院收集20份可疑DEN病人血清标本进行了病毒的分离与鉴定,在确定为DEN-1病毒后,进一步扩增在病毒进化上有代表意义的DEN-1特异的E/NS1连接区基因片段,测序后构建DEN病毒进化树,与国际参考株和国内分离株的基因序列进行了同源性比较,分析了此次DEN病毒流行株的可能来源,同时测定了该分离株的毒力。

1　材料与方法

1.1　标本来源

2002年9月于广州市传染病医院采集可疑DEN病人血清20份(年龄23~57岁、性别12男,8女)。采血时间为发热后16 h至11 d不等,采血后当天分离血清,冷藏带回,-80 ℃保存。

1.2　病毒分离

1白纹伊蚊C6/36细胞株用含10%小牛血清(成都哈里),2 mmol/L谷氨酰胺,10 mmol/L Hepes RPMI1640培养液(Hyclone)于无菌24孔板中培养至长成单层细胞。可疑病人血清稀释10倍后接种至C6/36单层细胞,每孔0.3 ml,28 ℃孵育1 h后去除病人血清,加入含2%小牛血清的RPMI1640培养液继续培养[7]。出现细胞病变(CPE)后收集培养上清,抽提病毒RNA,进行RT-PCR。如接种后第7天未出现明显CPE,将细胞吹散后盲传,盲传6代后不出现CPE者视为阴性。

1.3　菌株、质粒和主要试剂

大肠杆菌JM109菌种为本室保存;pMD18-T载体及逆转录试剂盒购自TaKaRa公司;PCR试剂为Promega公司产品。Ⅱ型DEN-2病毒(Tr 1751株)分离自DF病人,由日本感染病研究所大谷.明博士惠赠。

1.4　引物的设计及扩增序列的位置

合成DEN病毒的通用引物[8],上游引物:5′-GTGCACACATGGACAGAACA-3′,下游引物:5′-CTTTCTATCCAATAACCCAT-3′,扩增基因序列位于整个基因组2 492~3 030位,编码NS1蛋白的部分序列,长度为539 bp。

1.5　病毒RNA的制备,逆转录和PCR扩增

取用血清标本感染的C6/36细胞培养上清,用聚乙二醇(PEG)8000进行浓缩,ISOGEN(Nippon Gene, Toyama,日本)抽提病毒的RNA。病毒RNA逆转录及PCR扩增均按试剂盒说明书操作,通用引物PCR扩增参数为:95 ℃预变性5 min,94 ℃ 60 s、53 ℃ 60 s、72 ℃ 90 s,30个循环后,72 ℃延伸10 min。PCR产物在1%琼脂糖上电泳分析。

1.6　NS1基因部分序列的克隆、鉴定和测序

用Silver beads DNA纯化回收试剂盒(上海Sangon)将RT-PCR扩增产物回收纯化后与pMD18-T载体连接。连接物转化JM109宿主菌;涂布含氨苄西林(Amp)、IPTG和X-gal的琼脂平板;37 ℃孵育16 h后挑选白色菌落。采用华舜质粒小量提取试剂盒提取质粒,用限制性内切酶*Hind*Ⅲ酶切后,电泳鉴定重

组子。将含有重组质粒的菌液保存于含有 15% 无菌甘油的 LB 培养液中，送至上海申友公司完成序列测定，将所测序列输入 GenBank 进行 Blast 检索。

1.7 DEN-1 病毒特异性 E/NS1 连接区基因的扩增、克隆及测序

根据 Blast 结果，以 GenBank 上与所分离的病毒 NS1 片段同源性最高的 DEN-1 病毒 AY145123 株为模板设计 DEN-1 特异性引物，上游引物：GTT CAA GAA GGG AAG CAG TA，下游引物：ACT GAC ATC TCC TAC GAC CA。扩增基因序列位于整个基因组 2107 ~ 2701 位，是编码 E/NS1 连接区的序列，长度为 595 bp。病毒 RNA 的制备、逆转录和 PCR 扩增以及与 pMD18-T 载体连接同上述操作。

1.8 基因序列同源性分析及进化树的构建

分离株的 E/NS1 连接区基因测序后，应用 ClustalX 1.8，PHYLIP 和 Tree View 等软件，与 Genbank 中的 DEN-1 病毒国际参考株（表 1）的相应的基因序列进行了同源性比较，以 DEN-2 病毒 Tr1751 株作为 outgroup，根据邻位相连法（neighbor-joining method，NJ）构建系统发生树[9]。先用 ClustalX 1.8 软件将分离株的序列与 Genbank 中相应序列进行排序，依次利用 PHYLIP 软件包中的 SEQBOOT，DNADIST，NEIGHBOR 和 CONSENSE 等软件分析构建出一致的引导进化树（strict consensus bootstrap tree）。最后用 Tree View 软件画出系统进化树[10]。

表 1 进化树分析中用到的 DEN 病毒基因序列（GenBank）

Tab 1 Dengue viral sequences from GenBank used in the phylogenetic analysis

Virus	Strain	Origin	Year isolated	Accession number
DEN-1	FGA/89	French Guiana	1989	AF226687
DEN-1	BR/90	Brazil	1990	AF226685
DEN-1	S275/90	Singapore	1990	M87512
DEN-1	Abidjan	Ivory Coast	1999	AF298807
DEN-1	WestPac/74	Nauru	1974	U88535
DEN-1	A88	Indonesia	1988	AB074761
DEN-1	GD05/99	Guangdong, CN	1999	AY376738
DEN-1	GD23/95	Guangdong, CN	1995	AY373427
DEN-1	GZ/80	Guangzhou, CN	1980	AF350498
DEN-1	Mochizuki	Japan	1943	AB074706
DEN-1	Djibouti	Djibouti	1998	AF298808
DEN-2	TR1751*	Trinidad	1954	M32969

* The full-length gene segment sequence of this viral strain is unavailable in GenBank and the NS1 region in the phylogenetic analysis is sequenced ourselves. (behind the table)

1.9 病毒毒力分析

1.9.1 乳鼠脑内接种 取第 5 代病毒液，脑内接种 2 d 龄乳鼠，0.02 ml/只（约为 10^4 pfu/只）。感染后每日观察动物的发病率与死亡率。

1.9.2 病毒滴度的检测 采用空斑实验，具体方法是：种植 Vero 细胞于 24 孔培养板。次日取第五代病毒液，用含有 2% 小牛血清的 RPMI1640 培养液将病毒从 10^{-1} ~ 10^{-8} 进行 10 倍递增稀释，取 0.2 ml 接种于单层生长的 Vero 细胞，37 ℃吸附 1 h 后，洗去病毒液，加入含 1% 甲基纤维素，2% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 1 ml/孔。待出现 CPE 不再发展时，结晶紫染色，计数空斑，计算病毒滴度。

1.9.3 半数细胞感染剂量（$TCID_{50}$）的计算（Reed-Muench 法）

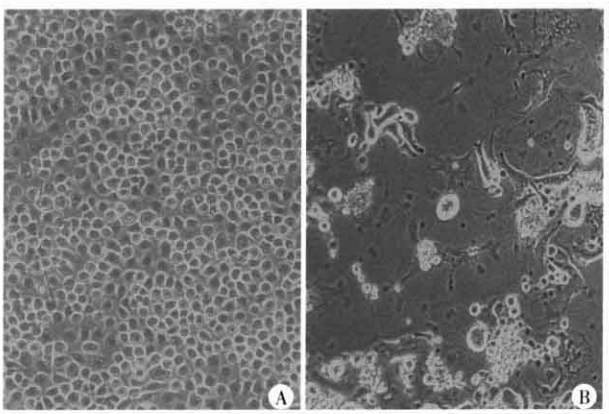
Vero 细胞培养和病毒感染步骤同 1.9.2。$TCID_{50}$ 按下列公式计算：

$$TCID_{50} = \text{CPE} > 50\% \text{的病毒稀释度} + \frac{> 50\% \text{的百分数} - 50}{> 50\% \text{的百分数} - < 50\% \text{的百分数}} \times \lg 10$$

2 结果

2.1 病毒分离

在 20 份患者的血清标本中，有 5 份在感染 C6/36 后，出现明显细胞病变（CPE），主要表现为细胞堆积融合，并出现空泡、网状结构（图 1）。CPE 一般在接种后 5 d 出现，此后随着时间的延长，数量不等的细胞死亡，从培养瓶底脱落。



A: C6/36 cells without DEN-1 infection; B: Cell-cell fusion and syncytia on C6/36 cells was seen at 6 d after infected with DEN-1/GZ2002

图 1 血清标本接种 C6/36 后，出现的细胞病变 （光镜 × 100）

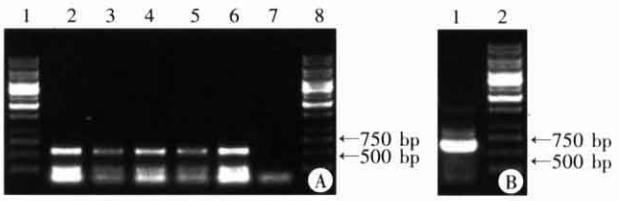
Fig 1 The serum specimens caused CPE on C6/36 cells (LM × 100)

2.2 NS1 基因部分序列的克隆、鉴定和测序

从 C6/36 细胞感染上清中抽提病毒的 RNA，应用通用引物进行 RT-PCR 扩增，5 份病毒分离阳性标本的感染上清均扩增出分布在 500 ~ 750 bp 之间的特异条带，与预计的长度为 539 bp 的目的片段相符（图 2）。分别将 5 份病毒阳性标本 NS1 部分基因序列的 RT-PCR 扩增产物克隆至 pMD18-T 载体。鉴定后进行序列测定，结果表明：5 份阳性标本 NS1 片段仅有个别碱基不同，可能是测序过程中的误差，故认为这 5 份病毒标本是同一株病毒。将序列输入 GenBank 进行 Blast 检索，结果与 DEN-1 病毒减毒株 rDEN1delta30 株同源性最高，为 95%。认为该毒株为 DEN-1，称为 DEN-1/GZ2002 株。

2.3 DEN-1 特异性 E/NS1 连接区基因部分序列的克隆、鉴定和测序

取分离的 DEN-1/GZ2002 中的一个毒株（A1630 株）的 RNA 作为模板，用 DEN-1 特异的引物扩增出分布在 500 ~ 750 bp 之间的特异条带，与预计的长度为 595 bp 目的片段相符（图 2）。序列测定证实片段长度为 593 bp，与 rDEN-1delta30（AY145123）株相应序列相差的 2 bp 可能由于缺失突变引起。



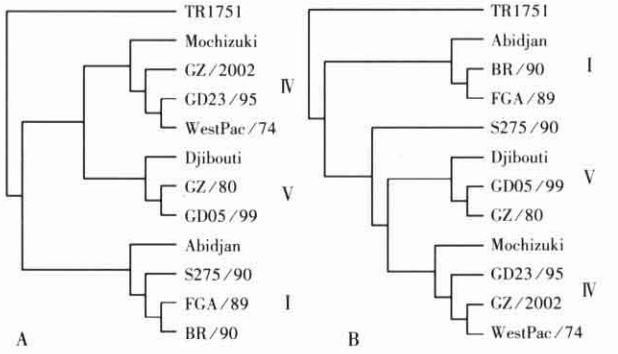
A: NS1 fragment, 2 - 6: After amplification with the universal primer, a band of 539 bp for the NS1 fragment was seen, PCR amplified DNA products from different samples respectively; 7: Blank control; 1, 8: 1 kb DNA ladder marker (GeneRulerTM); B: E-NS1 fragment, 1: After amplification with a primer for 593 bp fragment of E/NS1 region, an expected band about 593 bp was seen; 2: 1 kb DNA ladder marker (GeneRulerTM)

图2　C6/36细胞感染上清中抽提RNA的RT-PCR扩增电泳结果

Fig 2　Agarose gel analysis of the cDNA products from RT-PCR of RNA samples isolated from the supernatant of the infected C6/36 cells

2.4　构建系统发生树与基因序列同源性分析

为了明确本次流行株与其他流行株进化上的关系，选择E/NS1连接区的240 bp(2282～2521)的片段与国际标准株和其他国内分离株进行比对。结果发现本次流行的A1630株与分离自澳大利亚的TI4株同源性最高，达98%，(Score = 444 bits (224), Expect = e-122)。后者是基因型为Ⅳ型的DEN-1病毒，故认为本实验分离的DEN-1/GZ2002株，基因型为Ⅳ型。分别根据E/NS1(240 bp)序列和NS1(480 bp)序列构建系统发生树(图3)，两个进化树结果基本一致，均分为Ⅰ、Ⅳ、Ⅴ 3个基因型，本实验所分离的DEN-1/GZ2002株与我国的GD23/95株(1995年广东流行株)亲缘关系较近，同属于基因型Ⅳ型或者称南太平洋型。



A: Using 240 bp from DEN-1 E/NS, region position 2309 to 2548; B: Using 480 bp from DEN-1 NS1 region position 2516 to 2995.

The resulting unrooted trees were out grouped to the sequence of DEN-2 (TR1751)

图3　DEN-1/GZ2002株的进化树分析

Fig 3　Phylogenetic relationship of DEN-1/GZ2002 with previously characterized DEN-1 viruses

2.5　病毒毒力的测定

用DEN-1/GZ2002株接种2 d龄乳鼠，接种后10 d开始发病，主要表现为拒奶，双下肢肌肉萎缩、麻痹、抽搐、大多在11 d死亡；分离株对单层生长的Vero细胞可以产生噬斑，但所形成的空斑较小，且不十分透明。利用Vero细胞所测得的分离株的$TCID_{50}$为4.37 log pfu/0.2 ml。在C6/36细胞中增殖的最高病毒滴度10^6 pfu/ml。

3　讨论

广东省2002年夏秋季陆续发现疑似DF患者，其主要临床表现为发热、头痛、肌痛、关节痛及皮疹伴淋巴结肿大。根据流行病学资料和血清学检测，初步诊断是DEN病毒感染。收集疑似DF患者发病早期的血清，通过体外培养的C6/36细胞分离病毒，所出现的细胞病变与文献报道的黄病毒属感染的细胞病变一致。收集感染上清，用DEN通用引物进行RT-PCR，扩增NS1部分序列，通过序列测定进一步证实为DEN-1病毒感染。

DEN病毒基因组约含11 000个碱基，编码3种结构蛋白和7种非结构(nonstructure, NS)蛋白，其顺序依次为：5′-C-PreM-E-NS_1-NS_{2a}-NS_{2b}-NS_3-NS_{4a}-NS_{4b}-NS_5-3′。其中，NS1蛋白不受宿主免疫选择的影响，基因序列相对比较保守，故本实验利用通用引物扩增NS1的部分序列确定病毒的血清型，并进行基因分型：利用480 bp的PCR产物测序后，可以构建系统进化树，确定该分离株与4个血清型中其它分离株的亲缘关系。E/NS1连接区在进化上有代表意义，Rico-Hesse[4]通过对登革Ⅰ型病毒特异性E/NS1连接区240 bp长的基因片段进行分析，认为DEN-1病毒可分成5个基因型：Ⅰ为美洲，非洲和东南亚分离株；Ⅱ为自斯里兰卡分离的DEN-1；Ⅲ分离自日本；Ⅳ为来自南亚，南太平洋，澳大利亚，墨西哥的分离株；Ⅴ为台湾和泰国的分离株。Goncalvez等[5]用完整的E蛋白编码基因对36株DEN-1病毒进行了进一步的分析，构建了系统进化树。根据进化树分支有效度统计分析，仍然将世界各地分离的DEN-1分为5个基因型：森林栖息/马来群岛型，美洲/非洲型，南太平洋型，亚洲型和泰国型，其中亚洲型，南太平洋型和美洲/非洲型分别与1990年Rico-Hesse分型的Ⅰ，Ⅳ和Ⅴ型相对应。本实验中分别根据E/NS1(240 bp)序列和NS1(480 bp)序列构建的系统进化树将11株DEN-1病毒分成3个基因型，与Rico-Hesse 1990分型中的Ⅰ，Ⅳ和Ⅴ型以及Ana P. Goncalvez 2002年分型中的亚洲型，南太平洋型和美洲/非洲型相符。本室分离的DEN-1/GZ2002株属于Ⅳ型或者称南太平洋型。

两个进化树唯一的不同之处是S275/90株的位置不同，这一结果支持S275/90株是个重组株的假说[11]。到目前为止，尚未分离到一株符合重组标准的病毒株，说明在DEN病毒这种非分节段病毒中，基因重组事件并不常见[12]。两个进化树的结果基本一致，提示可以

用480 bp的NS1片段的系统进化树代替E/NS1(240 bp)构建的进化树来分析不同病毒株之间的亲缘关系。

DF是一种古老的疾病,从零散记载来看,我国早有DF流行,我国最早记载的DF流行是1873年于厦门。此后我国有多次DF流行,但均在沿海省市,可能是国际往来渔船及其人员将此病带进国内。1978年后又有多次流行,故需要比较分析本次登革热流行是以前流行株的再次流行还是另外的病毒株的传入。但由于我国登革病毒流行株的资料特别是病毒基因组方面的资料较少,给确定本实验所分离的病毒株的来源带来了困难。根据本实验构建的进化树,我室分离的DEN-1/GZ2002株与1995年广东流行株(我国的GD23/95株)同属一个基因型,故2002年广州流行的DEN-1病毒可能是1995年流行株的再次流行。而1999年广东流行株GD05/99株属于基因型Ⅴ型,说明1999年与2002年DEN-1型病毒的流行株来源不同。

由于DEN病毒感染至今没有理想的动物模型[13,14],确定病毒的毒力非常困难,但据流行病学资料此次流行以轻症患者居多;动物实验乳鼠脑内接种后发病较晚,感染Vero细胞所形成的空斑较小且不透明,与减毒株空斑特点相似。TCID50为4.37 log pfu/0.2 ml,以及NS1片段及E/NS1连接区片段比对,该分离株与减毒株rDEN1delta30同源性最高等,提示本次流行株毒力可能较低。

参考文献:

[1] Leitmeyer K C, Vaughn D W, Watts D M, *et al*. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis[J]. J Virol, 1999, 73(6): 4738 - 4747.

[2] Aviles G, Rowe J, Meissner J, *et al*. Phylogenetic relationships of dengue-1 viruses from Argentina and Paraguay[J]. Arch Virol, 2002, 147(11): 2075 - 2087.

[3] Chu M C, O'Rourke E J, Trent D W. Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains[J]. J Gen Virol, 1989, 70(pt7): 1701 - 1712.

[4] Rico Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature[J]. Virology, 1990, 174(2): 479 - 493.

[5] Goncalvez A P, Escalante A A, Pujol F H, *et al*. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1[J]. Virology, 2002, 303(1): 110 - 119.

[6] Chungue E, Cassar O, Drouet M T, *et al*. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses[J]. J Gen Virol, 1995, 76(pt7): 1877 - 1884.

[7] Yamada K, Takasaki T, Nawa M, *et al*. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection[J]. J Clin Virol, 2002, 24(3): 203 - 209.

[8] 秦鄂德, 杨佩英, 徐品芳, 等. 登革病毒基因组逆转录及其cDNA扩增的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(5): 324 - 326.

[9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406 - 425.

[10] Page R D. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers[J]. Comput App Biosci, 1996, 12(4): 357 - 358.

[11] Tolou H J, Couissinier Paris P, Durand J P, *et al*. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences[J]. J Gen Virol, 2001, 82(pt6): 1283 - 1290.

[12] Rico Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses[M]. Adv Virus Res, 2003, 59: 315 - 341.

[13] 安 静, 周德山, 张俊磊. 经脑感染后登革病毒在小鼠脊髓分布特点的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 401 - 403.

[14] An J, Kimura Kuroda J, Hirabayashi Y, *et al*. Development of a novel mouse model for dengue virus infection[J]. Virology, 1999, 263(1): 70 - 77.

(编辑 刘洪娥)

(上接281页)

以完全区分,有学者报道的病例中[1],囊肿误诊为成釉细胞瘤占10.3%~11.9%,成釉细胞瘤误诊为颌骨囊肿占35.2%,表明术前明确诊断的困难性。因此在本文报告的病例中,尽管我们术前诊断为成釉细胞瘤,术中仍进行冰冻活检,明确颌骨囊肿的诊断,从而采用正确的手术方式。

除根尖周囊肿之外,几乎所有的颌骨囊肿和成釉细胞瘤均须手术治疗[3,4]。由于成釉细胞瘤具有沿骨小梁间浸润性生长的局部侵袭性生物学特性,临床常称为"临界瘤",单纯手术刮除复发率很高,需采用局部截骨并修复的方法进行手术治疗,才能取得良好的治疗效果。而颌骨囊肿采用单纯摘除的手术方法即可获得良好的治疗效果,即使是巨大颌骨囊肿,也不应采用截骨的方法进行手术治疗。对于范围广泛、术后可能发生病理骨折的病例,可在颌骨囊肿摘除后,采用下颌骨重建钛板贴附于下颌骨外侧面,跨越囊肿摘除后的薄弱区,两端固定于正常骨质上,起到支架和固定作用。本病例虽然囊肿范围几乎涉及整个左侧升枝,但不在咬合受力区,内侧骨壁较厚,故仅作囊肿摘除。

关键词:下颌骨;囊肿;手术

中图法分类号:R782.05 文献标识码:B

参考文献:

[1] 赵镇敬, 王 磊. 下颌骨牙源性囊肿159例临床X线分析[J]. 中国现代临床医学杂志, 2004, 2(4): 440.

[2] Kazunori Y, Yoshinori H, Kazuyuki A, *et al*. Morphological analysis of odontogenic cysts with computed tomography[J]. Oral Surg Oral Medi Oral Patho, 1997, 83(6): 712 - 718.

[3] 彭利伟, 赵怡芳, 张文峰, 等. 669例牙源性颌骨囊肿临床分析[J]. 临床口腔医学杂志, 2004, 20(5): 297 - 299.

[4] Philipsen H P, Reichart P A, Ogawa I, *et al*. The inflammatory paradental cyst: a critical review of 342 cases from a literature survey, including 17 new cases from author's files[J]. J Oral Patho & Medi, 2004, 33(3): 147 - 155.

(编辑 王 红)