调查研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0724-03

重庆麻鸭乙型肝炎病毒感染率流行病学调查研究

刘英果,姚云清

(重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016)

【摘 要】目的:调查研究重庆地区成年麻鸭鸭乙型肝炎病毒(Duck hepatitis B virus, DHBV)感染率及其季节差异性,为优化DHBV研究模型奠定基础。方法:2009年春季与夏季随机采集重庆麻鸭血清560份,采用随机引物法地高辛素标记DHBV DNA探针,斑点杂交检测麻鸭血清DHBV DNA感染率。结果:重庆地区麻鸭春季DHBV感染率为1.82%,夏季DHBV感染率为5.26%,后者显著高于前者($P<0.05$)。结论:重庆地区成年麻鸭DHBV感染率夏季高于春季,但均低于国内其他地区鸭DHBV感染率。

【关键词】鸭乙肝病毒;流行病学;斑点杂交

【中国图书分类法分类号】R512.6+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-30

Epidemiological study on infection rate of duck hepatitis B virus in Chongqing

LIU Ying-guo, et al

(*Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the infection rate of Chongqing duck hepatitis B virus (DHBV) in Chongqing and its seasonal difference in adult ducks, in order to optimize DHBV research model. *Methods*: 560 serum specimens of Chongqing ducks were collected randomly from a duck farm in Spring and Summer of 2009. Duck hepatitis B virus DNA was detected by dot blotting, with DNA probe labelled with digoxigenin. *Results*: The infection rate of duck hepatitis B virus was 1.82% in Spring and 5.26% in Summer, with the lattre being significantly higher than the former ($P<0.05$). *Conclusion*: The infection rate of duck hepatitis B virus in Chongqing area is higher in Summer than that in Spring, but both are lower than that in other areas of China.

【Key words】Duck Hepatitis B Virus; Epidemiology; Dot blotting

乙型病毒性肝炎是一种呈全球分布,严重危害人民身体健康的常见传染病,全球每年约5千万新近感染乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus,HBV)病例[1]。世界卫生组织最新统计表明,大约有3.74亿人(占世界总人口的6.4%)为HBV慢性感染者。每年由HBV引发肝脏相关疾病导致死亡的人数达到一百万[2]。乙型病毒性肝炎的致病病毒为HBV,HBV为一嗜肝DNA病毒,由于受HBV宿主范围(主要是人和黑猩猩)的限制及缺乏HBV体外培养系统,人们对乙型病毒性肝炎的研究受到阻碍。因此,人们开始寻找类似于HBV的其它动物肝炎病毒用于研究。早在1980年Summers[3]曾自33份中国广东鸭血清中发现11份有类似人HBV的病毒。Mason等[4]自美国饲养的19世纪传入美国的北京鸭血清中发现有内源性DNA多聚酶活性的DNA病毒,大量病毒DNA存在于肝脏,其生物学特性与HBV相似,命名为鸭乙型肝炎病毒(Duck hepatitis B virus, DHBV)。DHBV在形态、结构、复制、组织亲和性等生物学特性等方面与HBV十分相似[5],且其自然宿主鸭的分布广泛经济便宜、容易饲养,所以感染DHBV鸭的动物模型,近十几年来已越来越多地被用于探讨HBV发病机理及筛选抗肝炎病毒药物的研究。

本研究旨在调查研究重庆地区成年DHBV感染率及其季节差异性,为优化DHBV研究模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Pyrobest DNA聚合酶、dNTP、DNA Fragment Purification Kit、核酸分子量标准均购自大连宝生物(TAKARA)公司;随机引物法高效地高辛标记和检测试剂盒购自Roche公司;柱离心式质粒抽提试剂盒购自上海生工公司。

1.1.2 菌种、质粒、血清 大肠杆菌DH5α菌株和重组质粒pGEM-DHBV$_{1.3}$由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室保存。重庆地区某一麻鸭养殖场,经胫静脉采集成年麻鸭(2~3月龄)血清560份。

1.1.3 引物 根据已知重组质粒(pGEM-DHBV$_{1.3}$)的序列,设计了位于S区内的两条引物,可以扩增出长约1 800 bp的

作者介绍:刘英果(1983-),女,住院医师,硕士,研究方向:感染性疾病发病机制与治疗。

通讯作者:姚云清,男,教授,主任医师;E-mail: cqyaoyunqing@126.com。

基金项目:重庆市自然科学基金项目(编号:NO.20021889);重庆市医学科技基金项目(编号:NO.07-2-062)。

S 区 DNA 片段,用于标记 DHBV DNA 探针,检测血清中是否有 DHBV DNA。所用引物均有 invitrogen 公司合成,配制为 20 μM 溶液,-20℃保存。其序列为:

上游引物:5'-GATTGCTTTGGTGGCATTAC-3';

下游引物:5'-CAATCTGGTAACCGAGGAAT-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 扩增反应 转化重组质粒(pGEM-DHBV$_{1.3}$)于宿主菌(*E.coli* DH5α)后,提取质粒约 7 kb,并进行琼脂糖凝胶电泳;再以纯化的重组质粒为模板和已合成的引物,在 Pyrobest DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 扩增反应;扩增出长约 1 800 bp 的目的基因进行琼脂糖凝胶电泳,用以标记 DHBV DNA 探针,再以 PCR 产物纯化试剂盒纯化目的基因并进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 标记探针 按照高效地高辛标记和检测试剂盒说明书,采用随机引物法进行 DHBV DNA 探针标记并检测标记效率。

1.2.3 探针标记敏感性和特异性检测 将提取的质粒 DNA 与纯化的 PCR 产物稀释成 10、10^2、10^3、10^4 倍,按照高效地高辛标记和检测试剂盒说明书进行,用于检测标记探针的敏感性。收集 HBV DNA 定量在 10^5~10^8 之间的 HBV 患者的血清 10 份,按照高效地高辛标记和检测试剂盒说明书进行,用于检测标记探针的特异性。

1.2.4 斑点杂交法(Dot-blotting)检测鸭血清 分别用去离子水和 15×SSC 溶液浸泡硝酸纤维素膜各 30 min,晾干后将上述所有血清以 40 μl/ 只,真空抽滤点于硝酸纤维素膜上。同时将阴性与阳性对照血清点样。硝酸纤维素膜置于 0.5 mol/L NaOH 10 min 变性后,依次置 3 mol/L NaCl 0.5 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)和 0.6 mol/L NaCl 1 mol/L。Tris-HCl(pH 7.5)溶液 15 min 中和,室温晾干,于 80℃ 固定 2 h。将待检的硝酸纤维膜经 42℃水浴预杂交 2 h 后,加入杂交液和探针,42℃水浴过夜。杂交膜先后经 2×SSC/0.1%SDS(室温)洗涤 2×5 min 和 0.1×SSC/0.1%SDS 洗涤(68℃)洗涤 2×15 min。按试剂盒说明书进行封闭、孵育、洗涤、平衡、显色,显色 16 h 后,TE 终止反应,室温晾干,读取结果。肉眼判断出现蓝紫色斑点即为阳性。

2 结 果

2.1 重组质粒的提取

提取的重组质粒(pGEM-DHBV$_{1.3}$)约 7 kb 大小位于 λ-*Hind* Ⅲ *digest 6 557 bp* 与 *9 416 bp* 条带之间与预期结果相符。

2.2 目的基因 PCR 扩增

用位于 S 区内的两条引物,预计可扩增出长约 1 800 bp 的 S 区 DNA 片段即目的基因,目的基因经纯化后,位于 DL 2 000 分子量标准 1 000 bp 与 2 000 bp 之间(见图 1),与预期结果相符。

2.3 探针标记效率的检测

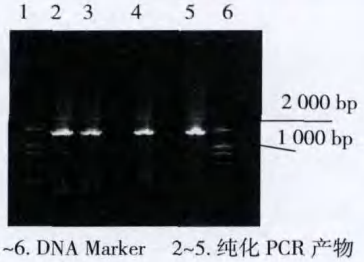
按试剂盒说明书进行探针标记效率的检测,达到了预期的标记效率。如图 2 所示。

2.4 标记探针的敏感性及特异性检测

将提取的重组质粒与 PCR 产物倍比稀释,当质粒 DNA 的浓度为 0.1 pg/μl 时呈阳性反应;当 PCR 产物的浓度为 0.1 pg/μl 时呈阳性反应。将标记好的 DHBV DNA 探针与含 HBV DNA 的血清杂交反应后不显色,说明探针检测具有特异性。如图 3、图 4 所示。

2.5 斑点杂交法检测麻鸭血清

运用斑点杂交法检测重庆地区春季、夏季采集成年麻鸭血清,比较春季与夏季 DHBV 感染阳性率的差异。采用 *SPSS17.0* 软件,将春季与夏季 *DHBV* 感染的阳性率进行两样本率的 U 检验(见表 1)。



1~6. DNA Marker 2~5. 纯化 PCR 产物

图 1 纯化 PCR 产物凝胶泳成像



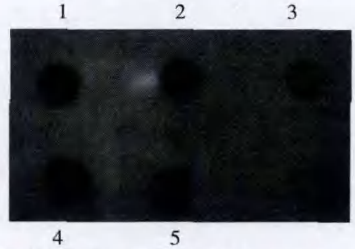
1~5 分别代表重组质粒 DNA 浓度为 1 ng/μl、100 pg/μl、10、1、0.1 pg/μl

图 3 重组质粒 DNA 与标记的探针杂交检测



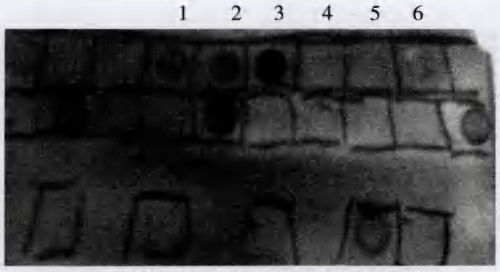
1~7 分别代表标记 DNA 的浓度为 1 ng/μl、10 pg/μl、3、1、0.3、0.1、0.03 pg/μl

图 2 探针标记效率检测



1~5 分别代表 PCR 产物浓度为 1 ng/μl、100 pg/μl、10、1、0.1 pg/μl

图 4 PCR 产物与标记的探针杂交检测



1~3. 阳性血清对照；4~6. 阴性血清对照

图 5 斑点杂交检测麻鸭血清

2.6 检测麻鸭血清斑点杂交图像

检测重庆地区成年麻鸭血清采用斑点杂交法。肉眼观察出现蓝紫色斑点者即为阳性。此张硝酸纤维素膜共点样血清 40 孔，其中阴性对照血清 3 孔、阳性对照血清 3 孔。（见图 5）

3 讨 论

鸭乙型肝炎动物模型是研究 HBV 基因突变、细胞表面病毒受体、病毒清除机制以及筛选新的抗病毒药物的合适的动物模型，它为我们提供了一个体内研究抗 HBV 药物活性和毒性反应的合适体系。Mason 等[4]建立了可用于体内研究慢性 DHBV 感染病毒清除机制的模型。研究显示在免疫耐受的宿主体内，应用核苷类似物 2'脱氧鸟苷进行超过 12 个月的长期治疗，可以显著降低病毒复制的水平，并减少被感染肝细胞的数量。Luscombe 等[7]使用核苷类似物更昔洛韦（Ganciclovir）证明在 DHBV 感染的雏鸭体内，延长 DNA 多聚酶抑制物的治疗时间，可抑制病毒 DNA 的合成，但不影响肝内病毒 cccDNA 和 RNA 的含量。他们同时还观察到治疗后病毒前 s 蛋白在肝细胞内大量蓄积，从而推测病毒蛋白的蓄积可对细胞产生毒性而导致肝病的发生，提示该治疗方案临床应用时应慎重。鸭乙型肝炎动物模型也可用于新的抗病毒策略的评估。雏鸭感染 DHBV 可维持长期病毒血症而无明显的自然转阴现象，该模型建立方便稳定，是目前筛选和评价抗 HBV 药物的重要动物模型。可作为抗病毒药物临床前评价的工具，研究药物的药效、药物动力学以及毒理学，也可用作评价免疫治疗的疗效。自然感染 DHBV 的鸭腹腔内注射喷昔洛韦（Penciclovir）12 ~ 24 周，可明显抑制病毒 DNA 和蛋白的合成[8]，其口服形式泛昔洛韦（Famciclovir）也可明显抑制自然感染 DHBV 的雏鸭体内的病毒复制。另外，鸭乙型肝炎动物模型在基因治疗研究领域和血液制品消毒学领域也有广泛的应用。

本研究调查了重庆地区成年 DHBV 感染率及其季节差异性，目的是为更好的筛选动物，为建立更优化的 DHBV 动物模型奠定基础。调查结果显示重庆地区麻鸭春季 DHBV 感染率为 1.82%，夏季 DHBV 感染率为 5.26%。而 1982 年日本学者报道我国不同地区成年鸭血清 DHBV 阳性率，上海市

表 1 Dot-blot 检测重庆地区春季、夏季采集成年麻鸭血清结果

季节	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
春季	5	275	1.82
夏季	14	266	5.26

注：$P<0.05$。春季与夏季 DHBV 感染阳性率的差异有显著统计学意义

场鸭 9/40(22.5%)，崇明县 23/50(46%)，广西扶绥、隆县 3/30(10%)。本研究调查的重庆地区 2009 年春季与夏季成年麻鸭血清的感染率显示成年麻鸭 DHBV 感染率夏季显著高于春季，但均低于国内其他地区鸭 DHBV 感染率。推测可能是由于 DHBV 的自然感染率不仅与地区分布、鸭品种有关，还可能与长期生存的环境、不同的季节、不同的气候等自然条件密切相关。总之，DHBV 模型是一种非常有价值的研究 HBV 的模式系统，进一步探讨 DHBV 的流行病学特点，可以促进 DHBV 模型的优化、提高其在乙型病毒性肝炎基础研究中的应用价值。

（衷心感谢重庆医科大学病毒性肝炎研究所唐霓博士对本研究的支持和帮助！）

参 考 文 献

[1] Merican I, Guan R, Amarapuka D, et al. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countryies [J]. Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(12): 1356-1361.

[2] Huang M A, Lok A S. Natural history of hepatitis B and outcomes after liver transplantation [J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(3): 521-536.

[3] Summers J, Smolec J M, Snyder R. A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitits and hepatoma inwoodchucks[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(9): 4533-4537.

[4] Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus[J]. J Viral, 1980, 36(3): 829-836.

[5] Michael N, Immanuel L, Ida W, et al. A structural model for duck hepatitis B virus core protein derived by extensive mutagenesis[J]. Journal of virology, 2007, 81(23): 13218-13229.

[6] Mason W, Cullen J, Saputelli J, et al. Characterization of the antiviral effects of carbodeoxyguanosine in ducks chronically infected with duck hepatitis B virus [J]. Hepatology, 1994, 19(2): 398-411.

[7] Luscombe C, Pedersen J, Uren E, et al. Long term ganciclovir chemotherapy for congenital duck hepatitis B virus infection in vivo: effect on intrahepatic-viral DNA, RNA, and protein expression [J]. Hepatology, 1996, 24(4): 766-773.

[8] Offensperger W, Offensperger S, Kepplerhafkemeyer A, et al. Antiviral activities of pencicloviand famciclovir on duck hepatitis B virus in vitro and in vivo[J]. Antivir Ther, 1996, 1(3): 141-146.

（责任编辑：关蕴良）