DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.06.045
第24卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 6
732 2002年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)06-0732-03

TTV部分传播途径的初步研究及西安地区TTV部分片段测序分析

傅恩清[1],陈立珍[2],白雪帆[3],潘 蕾[3],李光玉[3],周永兴[3],扬为松[3] (第四军医大学唐都医院:[1]呼吸内科;[3]感染病科;西安 710038;[2]安徽省全椒县妇幼保健站,全椒 239500)

提 要:目的 研究输血传播肝炎病毒(TTV)有否直接垂直传播途径及尿液传播的可能性,初步了解西安地区TTV结构部分特点。方法 参照文献[1]在TTV DNA ORF1区设计一套套式PCR引物,建立TTV DNA套式PCR检测方法,对16例血清检测TTV DNA阳性的患者尿液做了TTV DNA检测,对52例正常顺产孕妇血清及其婴儿脐带血同时检测TTV DNA;并且对西安地区1例原因不明而TTV阳性肝炎患者的TTV套式PCR扩增终产物纯化直接测序。结果 16例血清检测TTV DNA阳性的患者尿液TTV DNA检测未发现1例阳性;在52例顺产妇外周血中,9例TTV DNA阳性TTV基因检测阳性率为17.3%(9/52);而新生儿脐带血TTV基因检测阳性率为7.7%(4/52);其中,母子同时TTV DNA阳性2例,单纯母亲血TTV DNA阳性7例;单纯婴儿脐带血TTV DNA阳性2例。直接测序法测序,测得的143bp序列用DNAsis分析软件中国1株(BDH1)序列比较,二者同源性为65.0%,差异率为35.0%(>30%)。结论 TTV可能不能通过尿液传播,但能经胎盘直接垂直传播,西安地区TTV流行毒株可能存在新的TTV基因型。

关键词:输血传播肝炎病毒;套式PCR;尿液传播;垂直传播;测序
中图法分类号:R18;R373.21;R394.3 文献标识码:A

Preliminary study on partial transmitted routes of TTV and sequence analysis of part of TTV genome in Xi'an region

FU En-qing, CHEN Li-zhen, BAI Xue-fan, PAN Lei, LI Guang-yu, ZHOU Yong-xing, YANG Wei-song (Department of Respiratory Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether transfusion transmitted virus (TTV) transmites through maternal-infant way and through unrine and study the molecular speciality of TTV DNA in Xi'an region. **Methods** A nested polymerase chain reaction (PCR) assay with 2 pairs of primers complemented to OFR1 of TTV genome was established to detect TTV DNA in urine samples from 16 hepatitis patients whose sera were TTV DNA positive and in the serum samples from 52 normal pregnant women and their children's umbilical cords. A target fragment in the agarose was cut down and the amplified product was purified and sequenced directly, then the data were analyzed with DNAsis program with computer. **Results** The 16 urine samples were all TTV DNA negative. TTV DNA was detected in 9 pregnant women's sera and in their 4 children's umbilical cord blood. Two pregnant women and their children were TTV DNA positive together. Two children were TTV DNA positive while their mothers were TTV DNA negative. Seven pregnant women were TTV DNA positive while their children were TTV DNA negative. The partial TTV DNA fragment of 143 bp was detected. Compared with complete sequence of BDH1 with DNAsis program, it was found that homology between BDH1 and partial sequence of TTV in Xi'an was 65%. **Conclusion** TTV may transmit through placental barrier directly and may not transmit through urine. Sequencing results suggest that the new genotype of TTV may exist in Xi'an region.

Key words: transfusion transmitted virus; nested-PCR; transmission routes; sequence

国内外对输血传播肝炎病毒(Transfusion transmitted virus, TTV)传播途径的研究很多,但是,TTV的传播途径仍然不十分明确,本研究通过血清与尿液对比研究及正常孕妇与其胎儿脐带血对比研究探讨TTV尿液与母胎垂直传播的可能性。

1 材料与方法

1.1 病例与临床资料

安徽省全椒地区1998年12月至2000年5月全椒县妇幼保健站就诊的正常妊娠并正常分娩的产妇共52例,平均年龄为(25.5±1.9)岁,分别取外周血及其所产新生儿脐带血备检。新生儿性别为男27例,女25例。产前采产妇血,产后立即抽取脐带血保留,量约2 ml置于玻璃试管中,离心(20× g, 10 min)分离血清,-20 ℃保存待检。取血清或血浆20 μl,置于Eppendorf管中,加入20 μl(等体积)的裂解液,置沸水中加热10 min,高速离心(80× g, 10 min),取上清备用。

1.2 尿液处理

对16例血清TTV阳性患者,男10例,女6例,急性乙型肝炎4例,慢性乙型肝炎7例,丙型肝炎3例,非甲-戊型肝炎2例,年龄(35.2±3.2)岁,立即留取尿样2 ml,取100 μl高速(80× g, 10 min)离心,取上清20 μl加等体积裂解液20 μl,煮沸10 min,再高速(80× g, 10 min)离心,留上清待检。

1.3 PCR扩增法

参照文献[1]报道的引物序列设计TTV DNA检测的引物,由西安美联公司合成,见表1。Taq DNA聚合酶,2.5 mmol/L

作者简介:傅恩清(1965-),男,安徽省全椒县人,硕士,主治医师,主要从事TTV研究及呼吸病诊治方面的研究,发表论文10余篇。电话:(029)3377725

收稿日期:2001-06-05;修回日期:2001-11-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

dNTPs, DNA 分子量标准为华美公司生产, QIAEX Ⅱ PCR 产物纯化试剂盒为德国 QIAGEN 公司生产, 琼脂糖由上海东海制药厂生产, PCR 扩增仪为美国 PE 公司生产的 PE 2400 型 PCR 扩增仪, DNA 全自动测序仪有美国 ABI 公司生产。第 1 次取标本离心上清 2 μl 做 DNA 模板, 第 2 轮以第 1 轮产物 2 μl 做模板, 2 次 PCR 反应体积均为 15 μl, 含 2.5 mmol·L^{-1} dNTPs 1 μl, 2.5 μmol·L^{-1}浓度引物各 1 μl(第 1 轮为两外引物, 第 2 轮为两内引物), *Taq* 酶 1.5 U, 10×*Taq* 酶 buffer 1.5 μl。以 PE-2400 型 PCR 仪自动循环, 均按下列参数循环: 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共 35 个循环。开始循环前 94 ℃预变性 5 min, 最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 终产物经 15 g·L^{-1}琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外线检测仪观察结果。当观察到 197 bp 的扩增 DNA 条带时判为 TTV DNA 检出阳性, 见图 1。每次检测均设阳性与阴性对照。对 1 例非甲-戊型肝炎患者血清检测扩增的 TTV DNA 的靶片段进行了碱基序列的直接测定, 从低熔点凝胶中切下阳性条带, 用 QIAEX 纯化试剂盒按说明步骤进行纯化, 送我校中心实验室以自带引物直接测序法测序, 内引物预计靶基因全长为 197 bp, 见表 1。

表 1　TTV DNA 套式 PCR 扩增引物序列

Tab 1　Sequences of primers of nested-PCR for TTV DNA

Name	Squence and position of primers	Polarity	Role
TTV01	5′-GCAGCAGCATATGGATATGT-3′ nt2 008—2 027	positive	5′-end external primer
TTV02	5′-TGACTGTGCTAAAGCCTCTA-3′ nt2 258—2 277	negative	3′-end external primer
TTV03	5′-CATACACATGAATGCCAGGC-3′ nt2 061—2 080	positive	5′-end inner primer
TTV04	5′-GTACTTCTTGCTGGTGAAAT-3′ nt2 237—2 256	negative	3′-end inner primer

引物合成后以无离子水稀释至 2.5 mmol/L 的应用浓度。

2　结果

16 例血清检测 TTV DNA 阳性的患者尿液做了 TTV DNA 检测, 未发现 1 例阳性。52 例正常顺产孕妇及其婴儿脐带血的 TTV DNA 检测显示, 52 例正常产妇 TTV 阳性 9 例, 阳性率为 17.3%; 而 52 例新生儿脐带血 4 例 TTV 阳性, 其中 2 例母亲与胎儿均 TTV 阳性, 2 例单纯胎儿 TTV 阳性。

对 1 例非甲-戊型肝炎患者血清检测扩增的 TTV DNA 的靶片段进行了碱基序列的直接测定, 测得 143bp 长片段, 测序结果与王海涛在 GenBank 注册 BDH1 序列比较结果, 见图 1、2。两者同源性为 65.0%, 差异率为 35.0%(> 30%), 位置与预计相符, 见图 1、2。

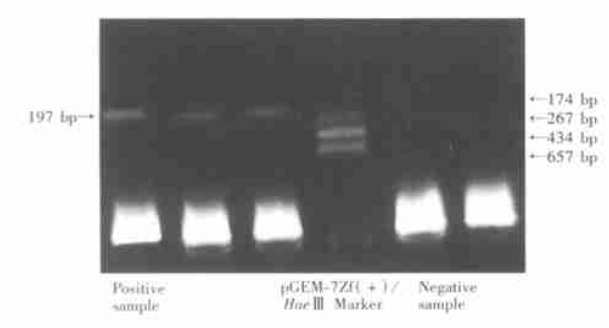


图 1　TTV-DNA 检测电泳图

Fig 1　Electrophoresis of amplified products with nested-PCR

```
DNASIS          65.0% identity in 143 bp overlap
                2 110     2 120     2 130     2 140     2 150     2 160
DBN1.SEQ        CACAACTACTGTAGACACAGA-CCCCACAAAAGGCTTTGTTCCTTACTCTTTAAACTTT
                : :: ::   . : ::: : :::. :::   ::  :   ::: ::::::   : ::   :: ::
TTVFNQ01.SEQ    ATTATCTTCTTCANTATACATATCCNCACCCAAAG  -TTGTCCTTA-CCTTTCAGTTT
                          10        20        30        40        50
                2 170     2 180     2 190     2 200     2 210     2 220
DBN1.SEQ        GGAAATG-
                GTAAAATGCCAGGAGGTAGTAATGTGCCTATTAGAATGAGAGGTAAATGG
                ::  : ::: X:::::  V:::   :::::::::: ::::::: ::::::::
TTVFNQ01.SEQ    GGAAGGTAAATCCC-AGATATATGT -CCTATTAG -ATGAGA-CTAAATGG
                          60        70        80        90        100
                2 230     2 240     2 250
DBN1.SEQ        TATCCAACATTATTTCACCAGCAAGAAGT
                ::  : ::::::: :  ::  :: :
TTVFNQ01.SEQ    TA-CCACATTATTCCCACAAGAATACAA
                          110       120
```

图 2　扩增的 TTV DNA 序列(143bp)与 BDH1 株相应序列的同源性比较

Fig 2　Comparison on homology of the sequence (143 bp) of TTV DNA in Xi' an region and the counterpart sequence of BDH1 with DNAsis

3　讨论

TTV 发现于输血后肝炎, Okamoto 等[2] 研究认为 TTV 具有输血传播的特点, 大量流行病学调查也显示 TTV 在有血液制品密切接触人群如静脉吸毒人群、有偿献血员、血液透析人群等的感染率较高; Pisani 等[3] 对来自不同国家血浆与血液制品中 TTV 的流行状况进行研究发现, 10 份免疫球蛋白、21 份白蛋白样品中 TTV DNA 均为阴性, Ⅷ因子中 80%(4/5)TTV 阳性, 肌肉注射用免疫球蛋白 40%(4/10)TTV 阳性, 采集的血浆中 70%TTV 阳性, 提示血液制品可能作为 TTV 的传播媒介。Utsunoniya 等[4] 研究发现血液透析患者 TTV DNA 阳性率 51.3%(59/115), 健康献血员为 16.5%(15/91), 无输血史与有输血史者 TTV DNA 阳性率分别为 51.6%及 51.2%, 两者无统计学差异, 提示 TTV 有输血以外的传播途径。Matusumoto 等[5] 通过对一组患者输血前后 TTV 感染状况的对比研究证实, TTV 可经输血传播。骆抗先[6] 研究发现, TTV 可经消化道传播。Saback 等[7] 对一组甲型肝炎的研究提示, TTV 可经粪口传播; Ross 等[8] 从 8 例血清 TTV 阳性患者的粪便中检出 4 例 TTV 阳性, 但滴度极低; 同时呕吐液中 5 例阳性, 尿中无 1 例阳性, 说明 TTV 可经消化道传播, 但可能不能经尿液传播。我们对 16 例血清 TTV DNA 阳性患者, 尿液检测 TTV DNA 均为阴性, 同样支持 TTV 不能通过尿液传播的研究结果。Inaba 等[9] 对日本 36 例 TTV 阳性健康孕妇及其顺产婴儿研究发现, 婴儿 TTV 阳性率随母乳喂养时间延长而增加, 说明其有母婴垂直传播可能, 但是, 并未说明 TTV 直接经胎盘传播。我们对 52 例顺产孕妇与婴儿脐带血对比 TTV DNA 检测, 52 例正常产妇 TTV 阳性 9 例, 阳性率为 17.3%, 提示安徽地区正常妇女中存在 TTV 感染, 其阳性率与西安地区有偿献血员 TTV 感染阳性率相当[10,11], 张瑞[12] 的研究也得出 TTV 存在其他传播途径的可能性; 而 52 例新生儿脐带血 4 例 TTV 阳性, 其

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

中,2 例母亲与胎儿均 TTV 阳性,2 例单纯胎儿 TTV 阳性。由于母亲血与胎儿血仅通过胎盘屏障实现物质互换,因此提示 TTV 可通过胎盘直接实现母婴垂直传播,即 TTV 可通过胎盘屏障;然而,两例单纯母亲血 TTV DNA 阳性,其婴儿血 TTV DNA 阴性,提示,并非所有的 TTV 感染母亲均会实现 TTV 的垂直传播,胎盘屏障对 TTV 可能同样会有屏障作用;2 例单纯婴儿血 TTV DNA 阳性,存在两种可能:其一,母亲在实现了 TTV 垂直传播后自身清除了 TTV 而转为阴性,TTV 的自身免疫清除作用,文献[13] 有报道;另一方面提示 TTV 可能通过其它途径实现其垂直传播,如产道传播。

对 1 例扩增的 TTV DNA 的靶片段进行了碱基序列的直接测定,由于该测序法两端部分序列不能完全测出,实际测得完整片段长度为 143 bp,两端有个别碱基未能测出,用 DNAsis 分析软件与 GEN BANK 注册申报的 BDH1 毒株序列比较,同源性为 65.0%,差异率 35.0%(> 30%),推测西安 TTV 毒株全基因组序列可能与国内其它地区的流行株有较大的差异,可能存在新的 TTV 基因型;Okamoto 等[14] 对报道的众多 TTV DNA 序列进行同源性比较,发现基因变异性极高,达 52%,以变异率大于 30%为度,将 TTV 至少分为 16 个基因型。我国学者[15] 及 Ball 等[16] 研究也同样发现 TTV 极高的基因变异性。因此,西安地区存在新的基因型是完全可能的。测序片段位置也与预设计引物时位置相符,提示我们检测 TTV 方法的确实可靠性。

参考文献:

[1] Nishizawa T, Okamoto H, Keinishi K, *et al*. . A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transminase levels in posttranfusion hepatitis of unknown etiology[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 241(1): 92—97.

[2] Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M. A Novel Unenveloped DNA Virus (TT Virus) Associated with Acute and Chronic Non-A to G Hepatitis[J]. Intervirology, 1999, 42(2—3): 196—204.

[3] Pisani G, Cristiano K, Wirz M, *et al*. Prevalence of TT virus in plasma pools and blood products[J]. Br J Haematol, 1999, 106(2): 431—435.

[4] Utsunomiya S, Yoshioka K, Takagi K, *et al*. The prevalence of TTV infection and the route of TTV transmission in hemodialysis patients-compared with HCV infection [J]. Nippon Rinsho, 1999, 57(6): 1 417—1 420.

[5] Matsumoto A, Yeo A E, Shih J W, *et al*. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease[J]. Hepatology, 1999, 30(1): 283—288.

[6] 骆抗先, 章 廉, 王姗姗, 等. 一种新型肠传染性病毒性肝炎的临床流行病学及病毒学的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(3): 161—163.

[7] Saback F L, Gomes S A, de Paula V S, *et al*. Age-specific prevalence and transmission of TT virus[J]. J Med Virol, 1999, 59(3): 318—322.

[8] Ross R S, Viazov S, Runde V, *et al*. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood[J]. J Clin Virol, 1999, 13(3): 181—184.

[9] Inaba N, Oshima K, Okajima Y, *et al*. TTV materno-infantile infection-a study on the TTV frequency in Japanese pregnant women and the natural history of TTV mother-to-infant infection[J]. Nippon Rinsho, 1999, 57(6): 1 406—1 409.

[10] 傅恩清, 白雪帆, 潘 蕾, 等. 西安地区不同人群 TTV 感染状况调查分析[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(11): 967—969.

[11] 傅恩清, 白雪帆, 潘 蕾, 等. 西安地区病毒性肝炎患者 TTV DNA 的检测及临床意义[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(7): 824—826.

[12] 张 瑞, 张绪清, 顾长海, 等. 血清 TTV-DNA 检测及 TTV 肝炎临床特点初探[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 91—93.

[13] Poovorawan Y, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, *et al*. TT virus infection in intravenous drug users[J]. Asian Pac K Allergy Immunol, 1999, 17(2): 101—106.

[14] Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, *et al*. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions[J]. Virology, 1999, 259(2): 428—436.

[15] 姬新颖, 傅恩清, 周育森, 等. 中国部分地区人群血清 TTV 部分序列变异的研究[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(7): 830—834.

[16] Ball J K, Curran R, Berridge S, *et al*. TT virus sequence heterogeneity *in vivo*: evidence for co-infection with multiple genetic types[J]. J Gen Virol, 1999, 80(7): 1 759—1 768.

(编辑 谢义霞)

(上接 731 页)

至超选择性远侧回肠动脉造影[4] 可显示持久存在的肠卵黄管动脉(Vitellointestional artery),提示 Meckel's 憩室的存在。③小肠钡剂灌注造影和结肠镜检查回肠末段,对发现 Meckel's 憩室有一定的帮助[3,6]。④近年来有报道经腹腔镜下行 Meckel's 憩室的诊断与治疗。

2.2 治疗

对于术前已经确诊为 Meckel's 憩室炎的病人,应行手术治疗。但绝大多数 Meckel's 憩室炎病人,术前诊为"急性阑尾炎",术中探查才发现为 Meckel's 憩室炎,同样需行手术切除。有其它并发症的 Meckel's 憩室或 Meckel's 憩室肿瘤也应当手术治疗。

发现 Meckel's 憩室可行憩室切除或行含憩室的肠段切除、吻合术[1],究竟如何选择,原则上视憩室基底的大小、病变程度邻近肠管的病变而定。我们认为,对于憩室基底小于肠腔直径、病变轻者可采用单纯憩室切除术;如憩室基底等于及在于肠腔直径、基底部穿孔、病变累及肠壁或疑有憩室肿瘤者则行含憩室的肠切除、肠对端吻合术。

关键词:Meckel's 憩室炎;阑尾炎;误诊
中图法分类号:R656.7 文献标识码:B

参考文献:

[1] Bryan M, Clary H, Kim Lerly. Meckel's Diverticulum[A]. In: D C Textbook of Surgery[M]. 15 thed Singapore: Harcourt Aisa. 1999, 946—950.

[2] 张翠媛, 叶 敏. 小儿梅克尔憩室 16 例诊治体会[J]. 广东医学, 2000, 21(6): 476—477.

[3] 刘 伟, 董小燕. 美克耳憩室的影像诊断[J]. 国外医学: 临床放射学分册, 1998, 21(1): 17—20.

[4] Mitchell A W M, Spencer J, Allison D J, *et al*. Meckel's Diverticulum: Angiographic Findings in 16 patients[J]. AJR, 1998, 170(5): 3 129—3 133.

[5] 李衍军. 结肠镜检查回肠末段 645 例分析[J]. 中国内镜杂志, 1999, 5(2): 35.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net