DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.037

文章编号:1000-5404(2000)01-0091-03

临床研究

血清 TTV-DNA 检测及 TTV 肝炎临床特点初探

张 瑞[1],张绪清[1],顾长海[1],黄燕萍[1],王海涛[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军传染病专科中心,重庆 400038;[2]军事医学科学院,北京 100850)

提 要 目的:了解输血传播病毒(TTV)在非甲~庚型肝炎中的感染状况,探讨其在肝炎发病中的作用和地位。方法:采用套式 PCR 法检测血标本中的 TTV-DNA。结果:检测了 30 例非甲~庚型肝炎病人,其中血清 TTV-DNA 阳性者 11 例,阳性率 36.7%。结论:TTV 感染与 ALT 异常有极为密切的关系,可能是导致非甲~庚型肝炎重要病原。

关键词 输血传播病毒;多聚酶链反应;肝炎;病毒性

中图法分类号 R394;R512.6 文献标识码 A

Detection of TTV-DNA and serum clinical characteristics of TTV hepatitis

ZHANG Rui, ZHANG Xu-qing, GU Chang-hai, HUANG Yang-ping, WANG Hai-tao (Infectious Diseases Research Center of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chong qing 400038)

Abstract Objective: To investigate the transfusion transmitted virus (TTV) infection in the patients with non-A-G hepatitis. Mehtods: TTV-DNA in serum was detected by nest PCR. Results: The serum TTV-DNA was positive in 11 of 30 (36.7%) patients with non-A-G hepatitis. Conclusion: TTV infection was closely correlated with elevated aminotransferase and TTV may be one of the major causes of non-A-G hepatitis in China.

Key words TTV; polymerase chain reaction; hepatitis; virous

1997 年底,日本学者报道了一种与肝功能异常有关的 DNA 病毒,并将之命名为输血传播病毒(Transfusion transmitted virus, TTV)。初步研究表明,这种病毒可能是一种新的输血后非甲~庚型肝炎的致病病原[1]。1999 年 4 月已有报道在我国人群中也存在 TTV 感染[2]。为了解 TTV 感染在非甲~庚型肝炎发病中的作用与地位,我们对近期收集的部分非甲~庚型肝炎血清进行了 TTV-DNA/PCR 检测,现将研究报告如下。

1 材料与方法

1.1 血清采集

采集 1996 年 4 月至 1998 年 7 月部分非甲~庚型肝炎病人(西南医院住院病人)血清标本 30 例。

1.2 检测指标及检测方法

1.2.1 排除甲型~庚型肝炎病毒感染的方法 用 ELISA 法和 RT-PCR 检测排除甲型~庚型肝炎病毒感染所用的 ELISA 试剂均购自美国 Abbott 公司。PCR 试剂为军事医学科学院五所提供。

1.2.2 套式 PCR 检测血清 TTV-DNA 的方法 ①DNA 提取:采用 STG 试剂提取血清病毒 DNA(试剂购自美国 Biotronics Tech. Corp 公司)。取 50 μl STG 缓冲液混匀,100 ℃变性 5 min,13 000×g 离心 10 min,挑除变性蛋白,加 90 μl 异丙醇沉淀,室温离心,沉淀物干燥后用无菌水 10 μl 溶解备用。②套式 PCR 检测 TTV-DNA:P1/P2 为外引物,序列分别为 P1:5′-CCAGGAGCA-TATACAGAC-3′;P2:5′-TGTACTTCTTGCTGGTGAAAT-3′;P3/P4 为内引物,序列分别为 P3:5′-ACAGACAGAGGAGAAGGCAAC-3′;P4:5′-AACAGGCACATTACTACTACC-3′。第 1 轮 PCR 反应条件:取模板 4 μl、10× PCR buffer 3 μl、dNTPs 0.8 μmol/L、P1/P2 0.1 μmol/L,30 μl 反应体积,94℃预变性 180 s,94 ℃ 40 s,55 ℃ 40 s,72 ℃,45 s,扩增 35 个循环;取第 1 次 PCR 产物 2 μl 作模板,10×

作者简介:张 瑞(1963.4),女,浙江省渠州市人,博士,主治医师,主要从事乙型肝炎病毒变异与免疫发病机制的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)68754293

收稿日期:1998-12-20;修回日期:1999-09-16

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

PCR bufer 3 μl 反应体积进行第 2 次扩增，循环条件为：94 ℃ 40 s，55 ℃ 40 s，72 ℃ 40 s，扩增 30 个循环。取 2 次 PCR 产物 10 μl，用 2%的琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，紫外灯下观察结果。每次 PCR 均设阳性及阴性对照。

2 结果

2.1 TTV-DNA 的检测

采用以上方法用套式 PCR 扩增的产物，用 2%的琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，紫外灯下见在 380 bp 外可见目的带，见图 1。

2.2 受检测非甲～庚肝炎中的阳性率

对此 30 例非甲～庚型肝炎的血清标本，用 PCR 检测 TTV-DNA 其中 1 例阳性，阳性率为 36.7%。

2.3 TTV 肝炎患者中的临床情况

从本 11 例 TTV 阳性的病人来看，其中 4 例为急性黄疸型肝炎，1 例为急性无黄疸型肝炎，3 例为慢性肝炎，2 例为瘀胆型肝炎，1 例为慢性重型肝炎。其临床及实验室情况见表 1。

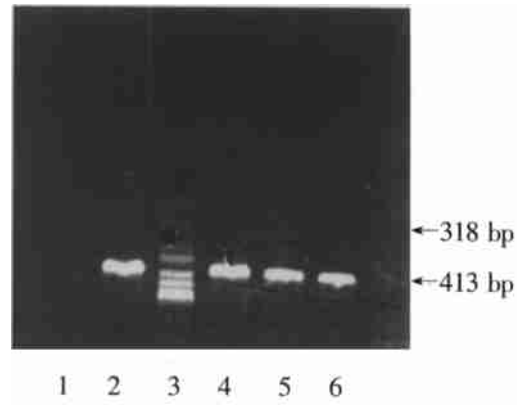


图 1 二轮 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 2nd round PCR products showed in electrophoresis agarose gels

Negative control；2：Positive control；5：HBV-DNA marker (PEG-TZF)；3、4、6: Positive serum

表 1 TTV 阳性肝炎临床及实验室情况

Fig 1 Clinical characteristic and liver function test in patient with TTV positive hepatits

	Age	Sex	Precursory Symton	History of transfusion	ALT (IU/L)	TB (μmol/L)	A/G	PT
Range	22～66	8/3	3	0	115～438	19～687	0.95～1.48	13～26
Mean	54.9	-	27.3%*	0	270.6	242.8	1.22	14.6

*：Percentage；TB：Total bilirubin；PT：Prothrombin time；A/G：ratio of albumin and globulin；ALT：alanine transaminase

从上表可见，我们所测的 11 例 TTV 阳性病人中，平均年龄为 54.9 岁，3 例起病时有明确的“上感”样症状，无 1 例有明确的输血史。其肝功能检查 ALT 平均为 270.6 IU/L，TB 平均为 242.8 μmol/L，A/G 比值平均 1.22，PT 平均为 14.6 s。

3 讨论

现有的研究表明，70%的非甲～庚型肝炎病例原因不明[3～5]。1997 年底日本学者发现了一种单链 DNA 病毒，研究表明与血清转氨酶异常有密切关系，今年初我国已证实国人中也存在 TTV[2]。

TTV 主要有二个读码框架（ORF），分别编码 770 和 220 个氨基酸，其基因组长约 3.7 kb。TTV 与已知动物单链 DNA 病毒相似的有圆环副链 DNA 病毒（圆环病毒科，如鸡贫血病毒）和绒状细小病毒科（如人细小病毒 B19，腺联病毒 AAV）。从已知的资料来看，TTV 更象细小病毒[6]。多数报道认为 TTV 与输血后肝炎相关，TTV-DNA 在暴发性肝炎中的检出率明显高于无症状献血员，有一系列的证据支持 TTV 具有诱发肝炎的能力[7]。在日本的急性和慢性非甲～庚型肝炎患者中 TTV-DNA 阳性率为 50%。在输血后非甲～庚型肝炎病人中阳性率更高，在献血员中 TTV-DNA 检出率约为 12%。我国的研究表明在非甲～庚型肝炎 TTV-DNA 阳性率为 30%～60%。我们报道为 36.6%，在此范围中。这些都提示 TTV 感染极有可能是导致非甲～庚型肝炎的重要病原。

通过分析我们这 11 例 TTV-DNA 阳性的肝炎患者，可初步归纳以下几点：①病型多。11 例阳性患者中 4 例为普通型急性黄疸型肝炎，1 例为急性无黄疸型肝炎，3 例为慢性肝炎，2 例为瘀胆型肝炎，1 例为慢性重型肝炎。②发病年龄似乎偏大。从年龄上看其波动范围 22～66 岁，平均 54.9 岁。③重度黄疸多。此类病人 TB 波动范围 19～687 μmol/L，平均 242.8 μmol/L。④PT 基本正常。除 1 例 PT26″/13″外其余均在正常范围，平均 14.6 s。⑤无明确的输血史，TTV 可以经过血源性途径感染传播，而我们检查的 11 例 TTV 阳性病人中均无明确的输血史，这提示 TTV 感染存在接触传播或消化道传播等途径。

参考文献

[1] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, *et al*. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttrans-

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

fusion hepatitis of unknown etiology[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 241(1):92—97.

[2] 周育森, 何忠平, 董京芳. 中国人 TTV 部分基因克隆及序列测定[J]. 军事医学科学院院刊, 1998, 22(2): 81—83.

[3] Leary T P, Muerhoff S A, Simons J N, *et al*. Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis[J]. J Med Virol, 1996, 48(1): 60—67.

[4] Linnen J, Jr Wages J, Zhang-Keck Z Y, *et al*. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent[J]. Science, 1996, 271(5248): 505—508.

[5] 周育森, 陈　薇, 王海涛, 等. 中国庚型肝炎病毒(HGV)全基因结构特点及 HGV 感染的地理分布[J]. 微生物学通报, 1997, 24(5): 27—31.

[6] Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, *et al*. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with post-transfusion hepatitis of unknown etiology[J]. Hepatology Research, 1998, 10(10): 1—16.

[7] Glavits R, Ratz F, Palya V, *et al*. Pathological and immunological study of goose embryos and goslings inoculated with an attenuated strain of Derzsy's disease virus[J]. Acta Vet Hung, 1991, 39(1～2): 39—47.

（编辑　冷怀明）

文章编号: 1000-5404(2000)01-0093-01

科研简报

缺氧条件下运动可促进骨骼肌毛细血管新生——缺氧条件下的体力活动有利于机体对高原的习服

Exercise at high altitude improve proliferation of skeletal muscle in rats: Doing exercise promote acclimation to high altitude

高钰琪[1], 黄庆愿[1], 史景泉[2], 刘福玉[1], 曹利飞[1], 孙秉庸[1]
(第三军医大学: [1] 高原军事医学系高原医学研究室, 病理生理学教研室; [2] 基础医学部病理学教研室; 重庆 400038)

高原低氧可对机体产生一系列影响。初入高原者劳动能力明显降低, 但机制不明。如何提高进驻高原部队的劳动能力, 以提高战斗力, 是高原军事医学研究的重要课题。维持骨骼肌正常的结构和功能对提高高原劳动能力具有重要作用。机体对高原低氧的反应是整体的综合反应。毛细血管增加, 可缩短氧从毛细血管向细胞弥散的距离, 是机体在组织水平上对低氧习服适应的重要机制。但在缺氧时, 骨骼肌毛细血管是否增多尚无定论。关于毛细血管增多的机制也未完全阐明。在缺氧条件下复合运动对骨骼肌结构和毛细血管密度的影响罕见报道。本实验用组化法和放射性微球法观察了单纯缺氧和缺氧复合运动大鼠骨骼肌肌纤维大小、毛细血管密度、骨骼肌的血流量及血管内皮细胞生长因子 (Vsacular endothelial growth factor, VEGF) 和 VEGF 受体 KDR 的变化, 以探讨缺氧时骨骼肌结构的变化规律和毛细血管的增多状况, 并研究其机制。

基金项目: 国家自然科学基金资助重点项目(39730190)

作者简介: 高钰琪(1962-5), 男, 内蒙古察右中旗人, 教授, 主要从事缺氧病理生理的研究, 发表论文 20 篇。电话: (023) 68752336

收稿日期: 1999-11-16; 修回日期: 2000-01-05

1　动物模型

48 只健康 Wistar 大鼠, 体重(187±20)g, 雌雄不拘。分为 3 组: ①常压对照组, ②单纯缺氧组, ③缺氧复合运动组。其中②、③两组每天置减压舱内, 先在模拟海拔 4 000 m 高原稳定 30 min 后, 缺氧运动组大鼠开始游泳运动(在模拟海拔 4 000 m 高原)。游泳池大小为 100 cm×80 cm×70 cm, 水深 50 cm, 水温 33～35 ℃。游泳每天 1 次, 每次 1 h, 每周训练 6 d, 共 5 周。每次游泳结束后, 动物在减压舱内继续减压至 5 000 m, 每天在 5 000 m 模拟高原停留 22 h。单纯缺氧组大鼠不进行运动训练, 其余条件与缺氧运动组大鼠一致。常压对照组置舱外饲养。

以^{99m}Tc 标记生物微球法测定骨骼肌血流量。用酶组化法进行腓肠肌外侧头红色部分肌球蛋白 ATP 酶 (Myosin-ATPase) 染色。采用细胞图像分析仪交互式半自动分析测量单位面积内毛细血管密度 (Capillary dencity, CD), 单位面积内毛细血管数与肌纤维数的比值 (Capillary/fiber, C/F)。在 pH 为 4.2 预孵片上, 测量Ⅰ型纤维的平均横断面积, 在 pH10.4 预孵片上, 测量Ⅱ型纤维的平均横断面积。用 Santa Cruz 公司兔抗人 VEGF(A-20) 和 KDR 多抗进行免疫组化染色。

(下转 96 页)

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