

闽南地区 TT 病毒的变异及经输血传播的初步证据

张军¹, 杨海杰¹, 罗文新¹, 苏智军², 庄立琳³, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 福建 厦门 361005; 2. 泉州市第一医院, 福建 泉州 362000; 3. 中国人民解放军漳州 175 医院, 福建 漳州 363000)

关键词: TT 病毒; 肝炎; 输血传播; 变异

中国分类号: R373.2⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(1999)-04-0360-04

TT 病毒(TT virus, TTV)是新近发现的被认为与输血后肝炎及其它急、慢性肝炎有关的一种新型单链 DNA 病毒^[1,2]。1997 年底,日本 Mayumi 研究小组用代表性差异显示分析法(RDA),首先从一例非甲-庚型输血后肝炎患者血清中克隆到 TTV 的部分序列^[1],随后又用半巢式 PCR 获得了 78 株 TTV ORF1 的 1 段 356bp 的序列进行进化分析,将这 78 株序列分为 2 个组 4 个亚组^[2]。我们曾根据所报道的 TTV 序列,在 TTV ORF2 设计了两对特异性引物,建立了检测血清中 TTV 样 DNA 的巢式 PCR 方法,从福建省泉州市 1 例非甲-庚型肝炎患者血清中扩增出了一条 199bp 的特异片段(TS1),经测序证实,与 TTV 的同源性为 87%,从而证实了 TTV 样序列在我国非甲-庚型肝炎病人血清中的存在^[3]。为了解 TTV 在我国的变异情况,并进一步探讨输血与 TTV 传播的关系,我们在福建闽南地区对部分 TTV 阳性肝炎患者及义务献血员血清中的 TTV DNA 序列进行了测定,并对患者输血史与 TTV 间的关系进行了初步分析。

161 例肝炎病例分别来自中国人民解放军 175 医院(漳州)传染科的住院肝炎患者(124 例)和福建泉州市第一医院住院肝炎患者(37 例)。7 份义务献血员血清来自泉州市第一医院。巢式 PCR 采用本室与厦门泰伦生物工程有限公司联合研制的 TTV-DNA 巢式 PCR 检测试剂盒,按产品说明书进行。引物为根据 TTV ORF2 序列设计的 2 对特异性 PCR 引物,外侧引物对 TTVF1: 5'-TGCTACGTCACTAACCAC-3'(nt5~22), TTVR1: 5'-CTCCTCTGCG-GCGTCTCCTTA-3'(nt733~713), 预计扩增片段长度为 729bp; 内侧引物对 TTVF2: 5'-GT-GCACTTCCGAATGGC-3'(nt95~111), TTVR2: 5'-GTAATGCCTGCCAATAAAC-3'(nt283~265), 预计扩增片段长度为 189bp。

将 PCR 扩增产物经 PAGE 胶回收纯化,在 PAGE 胶上显示为一条清晰窄带,作为 PCR 产物直接测序的模板;或将 PCR 扩增片段用 WizardR PCR Preps DNA 纯化系统(Promega 公司)回收纯化,克隆入 GEM-T Easy 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 株。采用双链模板测序。双链模板提取采用碱裂解, RNaseA 消化,氯仿 2 次抽提,异丙醇第一次沉淀,PEG-8000 第二次沉淀提取。提取的双链模板,1/5 量经 0.75% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见超螺旋 DNA 占 80% 以

收稿日期: 1998-10-22; 修回日期: 1998-12-26

* 责任作者: 夏宁邵

上。采用双脱氧链终止法,用 T7 启动子引物(5'- TAATACGACTCACTATAGGG- 3')在 ABI PRISMTM377 型 DNA 测序仪上进行 Dye Terminator 反应,测序所用成套试剂为美国 ABI 公司产品。

将所获序列输入计算机,用 CLUSTAL X (Julie Thompson and Francois Jeanmougin, CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program, version 1.5b 1997) 和 DNASIS 软件 (Hitachi Software Engineering Co. 1992) 进行同源性比较。

从 161 例肝炎患者中共检出 43 例 TTV-DNA 阳性。我们对其中两例非甲- 庚型肝炎患者的阳性 PCR 产物进行了克隆测序(TS1、NR2), 结果与该区域仅有的两株序列(TA278 和 TTVCHN1, 分别来自日本和中国, Genbank 号分别为 AB008394 和 AF079173) 比较, 同源性约为 92% (表 1, 图 1)。

表 1 闽南地区 TTV 与 TTV 日本株及中国株部分序列的同源性比较

Table 1 Comparison of nucleotide homology of TT viruses in Minnan area with TTV Japanese strain and TTV Chinese strain

	TA278	TTVCHN1	S396	S397	TS1	NR2	TT6392	TT6393
TA278	-	99.3	98.6	95.0	92.3	92.1	86.5	83.7
TTVCHN1		-	99.3	95.7	92.3	92.1	86.5	83.7
S396			-	95.0	91.5	91.4	85.8	83.0
S397				-	93.0	90.7	85.8	84.4
TS1					-	89.3	87.2	87.2
NR2						-	85.7	82.9
TT6392							-	92.1

注: TA278: TTV 日本株, Genbank 收录号 AB008394; TTVCHN1: TTV 中国株, Genbank 收录号 AF079173; S396、S397: 来自闽南地区义务献血员, Genbank 收录号 AF109897(S396)、AF109808(S397); TS1、NR2、TT6392、TT6393: 来自闽南地区非甲- 庚型肝炎患者, 其中 TT6392、TT6393 来自同一病人, Genbank 收录号 AF109810(TS1)、AF109806(NR2)、AF109811(TT6392)、AF109812(TT6393)。

Note: TA278: TTV Japanese strain, Genbank accession number: AB008394; TTVCHN1: TTV Chinese strain, Genbank accession number: AF079173; S396, S397: Derived from volunteer blood donors in Minnan area, Genbank accession number: AF109897(S396), AF109808(S397); TS1, NR2, TT6392, TT6393: Derived from non-A to G hepatitis cases, TT6392 and TT6393 were derived from the same serum, Genbank accession number: AF109810(TS1), AF109806(NR2), AF109811(TT6392), AF109812(TT6393).

另外, 有一例非甲- 庚型亚急性重症肝炎患者(患者 A), 病期第 14 天时所采第一次血清为 TTV DNA 阴性, 但 1 月时转为阳性。在第一次采血前已给该患者先后输过 10 次血, 在第一、二次采血间又输过 10 次血。我们查到了患者 A 的 TTV 由阴转阳期间 10 次所输血的 10 名献血员中的 7 名(均为闽南地区的义务献血员), 并采血检测 TTV-DNA, 结果 3 例阳性。对其中 2 份血清(S396、S397)及患者 A 的第二次血清(S18)巢式 PCR 产物直接进行测序, 结果 S396、S397 的测序结果十分清晰, 但 S18 的测序结果较混乱, 许多位置同时出现数种较强测序峰, 提示 S18 血清中很可能同时存在多种 TTV 模板, 可能分别来自不同的献血员。对 S18 的 PCR 产物进行了克隆, 挑选了其中两个克隆(TT6392、TT6393)进行了测序, 结果与现有序列间的同源性为 82%~87%, 这两个克隆间的同源性为 92.1% (表 1, 图 1), 提示该患者体内可能确实同时存在多株 TTV, 分别来源于不同的献血员。我们尚未能从该患者的几株 TTV 序列中发现与该患者献血员的两株序列完全相同的序列, 可能与我们正好没能挑到相应的克

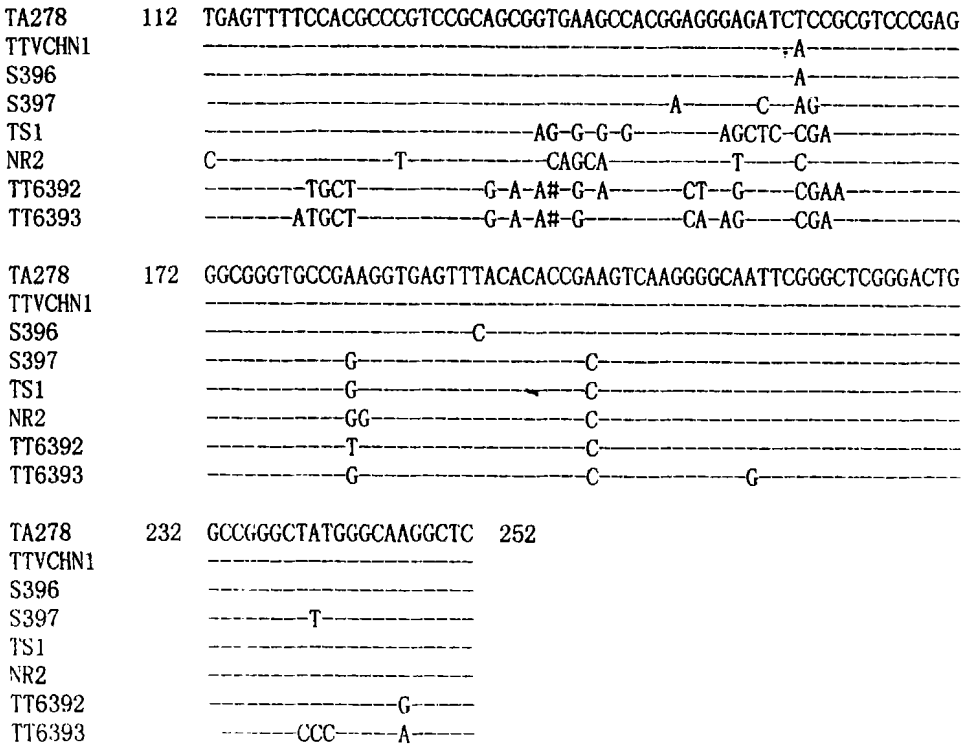


图 1 闽南地区 TTV 与 TTV 日本株及中国株部分序列的同源性比较

Figure 1 Comparison of homology of partial nucleotide sequence of TT viruses in Minnan area with TTV Japanese strain and TTV Chinese strain

: 缺失 Deletion.

隆有关,也可能因为该患者体内多种 TTV 中有部分已获得了较明显的生长优势,从而使其他 TTV 毒株难以持续存在或是难以检出,目前我们还无法确切地阐明其原因。

对来自同一地区的这些序列及与来自日本、北京的两株序列的同源性分析表明,地理距离相对遥远的不同地区的 TTV 之间的同源性可高达 98% 以上,而同一地区也可同时有同源性较低的不同毒株存在。最近英国两个研究小组通过对 TTV ORF1 区域部分片段进行的同源性研究也有类似的结果^[4,5]。目前在日本、中国、英国、北美都已有检出 TTV 的报道^[1-6],而且在各地区都发现毒株间既可有较大的变异,又可与其他地区的毒株间有很高的同源性存在,从而提示 TTV 很可能是一种分布广泛的、在各地早已存在的病毒。

最近,Simmonds 等^[5]在义务献血员中,商品化的凝血因子(II、III)中都检出了 TTV DNA,而且发现血友病人的 TTV DNA 阳性率明显高于其他人群,而且其阳性率与输血制品的量有明显相关。提示 TTV 可经输血或血制品而传播,而且现有的血制品制备程序只能部分消除 TTV DNA。Charlton 等^[6]的研究同样发现了 TTV 经血液传播的初步流行病学证据,他们的数据显示,输血对 TTV 传播的相对危险度为 4.5。我们对漳州和泉州 161 例肝炎病例进行了输血史调查,结果共有 13 例患者过去有过输血史,他们的 TTV 的阳性率高达 69.23% (9/13),明显高于无输血史的 22.97% (34/148, P < 0.001),相对危险度(RR)为 3.01 (1.89~

4.81)。这一结果以及上述患者 A 的研究结果都提示, 输血是 TTV 传播的一种重要危险因素。

参 考 文 献

- 1 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus(TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241: 92- 97.
- 2 Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus(TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology[J]. *Hepato Res* 1998, 10: 1- 16.
- 3 张军, 杨海杰, 苏智军, 等. 从中国非甲- 庚型肝炎病人中克隆到 TT 病毒样 DNA 序列[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1998, 37: 315- 317.
- 4 Naoumov N, Petrova E, Thomas M, et al. Presence of a newly described human DNA virus(TTV) in patients with liver disease[J]. *Lancet*, 1998, 352: 195- 97.
- 5 Simmonds P, Davidson F, Lycett C, et al. Detection of a novel DNA virus(TT virus)in blood donors and blood products [J]. *Lancet*, 1998, 352: 191- 95.
- 6 Charlton M, Adjei P, Poteracha J, et al. TT- virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis[J]. *Hepatology*, 1998, 28: 839- 42.

VARIATION OF TT VIRUSES IN MINNAN AREA AND EVIDENCE FOR TRANSFUSION TRANSMISSION

ZHANG Jun¹, YANG Hai- jie¹, LUO Wen- xin¹, SU Zhi- jun²,
ZHUANG Li- lin³, XIA Ning- shao¹

(1. *The State Labfor Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Fujian, Shamen 361005, China;*
2. *Quanzhou First Hospital, Fujian, Quanzhou 362000, China;* 3. *175th Hospital
of People's Liberation Army, Fujian, Zhangzhou 363000, China*)

Abstract: TT virus(TTV)DNA was tested by nested- PCR from sera of hepatitis patients and volunteer blood donors in Minnan area. The amplified segment was a 189 base pair region in TTV ORF2. A total of six sequences were obtained from three non- A to G hepatitis patients and two from volunteer blood donors. The sequences were found to be with 82.9% to 99.3% homology to TTV Japanese strain and Chinese strain. The divergence of sequence in these six segments varied from 0.7% to 17.1%, which indicated that the TTV had been existing for a long time in this area. In the serum of a non- A to G hepatitis patient who was negative for TTV DNA in the 14th day of disease course turned to be positive in the 30th day, two TTV sequences were obtained which showed 92.1% nucleotide homology. It indicated that different TTV strains can co-exist in the same person. This patient's blood had been transfused ten times between the collection of his TTV negative sample and his positive serum sample. Seven of the blood donors were traced and sampled for sera, of which three were positive for TTV. For all 161 patients tested, the history of exposure to blood products was associated with an increased risk of TTV infection(relative risk, 3.0; 95% confidence intervals, 1.89- 4.81).

Key words: TT virus; Hepatitis; Transfusion transmission; Variation