

表 1 不同感染者血清中 TT 病毒部分核苷酸序列及与日本株同源性的比较 (%)

	N22	Case2	Case4	Case5	TX1	TX2	TX3	TX4	TX5	TX6
Case2	100									
Case4	98.98	98.98								
Case5	90.31	90.31	90.31							
TX1	95.41	95.41	95.41	88.26						
TX2	98.47	98.47	98.47	90.82	94.90					
TX3	97.45	97.45	97.45	90.82	94.90	97.96				
TX4	97.96	97.96	97.45	89.80	93.37	96.43	95.41			
TX5	96.43	96.43	96.43	88.26	93.37	95.92	94.90	94.39		
TX6	97.96	97.96	97.96	90.31	94.39	97.45	96.94	97.45	96.43	
TX7	96.94	96.94	96.94	89.80	93.37	97.45	96.94	94.90	97.45	96.94

注:N22,Case2,Case4 与 Case5 均为日本株, TX1, TX5, TX6, TX7 均来自非甲-戊, 非庚型肝炎患者, TX2 来自献血员, TX3 与 TX4 分别为慢性乙型肝炎与慢性丙型肝炎

研究表明^[1,3], TT 病毒为单股 DNA 病毒, 在日本慢性非甲-戊, 非庚型肝炎, 非甲-戊, 非庚型暴发性肝炎, 献血员, 血液透析者及静脉药瘾者中均有不同程度的感染率。本组结果证实, 在我国慢性非甲-戊, 非庚型肝炎患者中存在 TT 病毒感染。在所选择的 32 例患者中, 感染率为 34%。提示, TT 病毒可能是甲、乙、丙、丁、戊及庚型肝炎病毒以外另一个与人类肝炎相关的病毒。同时还发现, 以聚合酶链反应检测 TT 病毒核酸, 其感染率占慢性非甲-戊, 非庚型肝炎患者的 30% 以上, 仍有相当一部分患者病原学不明。因对 TT 病毒感染研究尚少, 所以有必要采用更多敏感试剂联合检测, 以明确在该部分患者中是否有漏检者, 最终明确 TT 病毒感染状况及临床意义。

关于 TT 病毒研究报道观察了 3 例患者均有明确的输血史, 且输血量较大。为此, 认为 TT 病毒经输血传播引起肝炎^[1]。本研究所发现的 11 例 TT 病毒核酸检测阳性者中, 仅有 1 例具有明确输血史, 提示输血可能仅仅是 TT 病毒传播

的途径之一, 至少不是唯一途径。TT 病毒感染的发生还可经其它传播途径而构成。

本组资料显示, 从本地区不同感染者血清中所分离的 TT 病毒在开放读码框架 1 的部分区域, 变异于 88% ~ 98% 间, 表明 TT 病毒可能与其它致人类肝炎病毒一样, 其基因变异可能具有地理分布特征。

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. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241: 92-97.
- 2 魏来, 王宇, 陈红松, 等. 丙型肝炎病毒 PCR 直接序列分析方法的建立及应用. *中华肝脏病杂志*, 1996, 4: 103-105.
- 3 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. *Hepatology Res*, 1998, 10: 1-16.

(收稿:1998-06-26 修回:1998-12-28)

(本文编辑:李群)

TT 病毒在非甲 ~ 庚型和重型肝炎中感染的研究

庄立琳 黄其炯 夏宁邵 张军 沈春奇 饶日春

我们根据日本报道的 TT 病毒(TTV) DNA 序列^[1], 设计合成两对特异性聚合酶链反应(PCR)引物, 用巢式 PCR(nested-PCR) 对非甲 ~ 庚型和重型肝炎患者感染 TTV 情况进行研究。对其中 1 份 TTV-DNA 阳性的 PCR 产物进行纯化、克隆、测序, 与日本报道的 TTV-DNA 序列进行同源性比较。并对感染 TT 病毒的重型肝炎病人临床特点进行分析。

一、对象和方法

1. 病人血清:127 份血清标本均采自 1997 年 1 月至 1998 年 3 月住我院的肝炎病人。按 1995 年第五次全国传染病寄生虫病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准诊断, 急性肝炎

30 例, 慢性肝炎 58 例, 重型肝炎 39 例。88 例急、慢性肝炎均为非甲 ~ 庚型(以下称非甲 ~ 庚型肝炎)。39 例重型肝炎中非甲 ~ 庚型 5 例, 甲型 3 例, 乙型 16 例, 戊型 5 例, 甲型 + 乙型、乙型 + 丙型 + 戊型和乙型 + 丁型 + 庚型各 2 例, 乙型 + 丙型、乙型 + 丁型、丙型 + 戊型和戊型 + 庚型各 1 例。

2. 肝炎病毒标志物检测:病人血清均进行 6 种肝炎病毒标志物检测, 其中甲型肝炎病毒抗体(抗 HAV-IgM)、乙型肝炎病毒抗体(抗 HBV-IgM)和丁型肝炎病毒抗体(抗 HDV-IgG)用 ELISA 法检测, HBV-DNA、HCV-RNA、HEV-RNA 和 HGV-RNA 用 PCR 法检测。

3. 设计合成 TTV-DNA 巢式 PCR 引物:外引物对:TIVF1:5'-TGCTACGTC ACTAACCA-3 (nt5-22), TIVR1:5'-CTCCTCTCGCGCGTCCTTA-3 (nt733-713), 扩增片段长度为 729 bp。内侧引物对:TIVF2:5'-GTGCACTTCCGAATGGC-3 (nt95-111),

作者单位:363000 福建省漳州市, 中国人民解放军第一七五医院(庄立琳、黄其炯、饶日春); 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室(夏宁邵、张军、沈春奇)

TIVR2:5 - GTAATGCCTGCCAATAAAC-3 (nt283-265), 扩增片段长度为 189 bp。

4. 巢式 PCR 检测 TIV-DNA:除将第一次 PCR 产物 1 μl 进行第二次 PCR 反应外,其它操作参照文献[2]。

5. PCR 产物纯化、克隆、测序:将其中 1 份扩增片段(TS1)用 Wizard^(d) PCR Preps DNA 纯化系统(Promega 公司)纯化,克隆入 pGEM-TEasy 载体,转化大肠杆菌 DH5 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,REG8000 第二次沉淀提取。提取的双链模板,采用双脱氧链终止法,用 T7 启动子引物(5'-TAATAGGACTCACTATAAGGG-3)在 ABIPRISMTM 377 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。每份标本测 3 个克隆,纠正偏差后获得一段 199 bp 的序列。所获序列输入计算机,用 DNASIS 软件(Hitachi Software Engineering Co. 1992)与 TIV 作同源性比较。

二、结果

1. 88 例非甲~庚型肝炎病人 TIV-DNA 阳性 16 例(18%),男 12 例,女 4 例,年龄 4~67 岁,平均(41 ±17)岁。其中急性肝炎 5 例(31.3%),慢性肝炎 11 例(68.7%)。

2. 39 例重型肝炎病人中 TIV-DNA 阳性 16 例(41%),男 14 例,女 2 例;年龄 25~83 岁,平均(50 ±16)岁;急性重型肝炎 4 例(25%),亚急性重型肝炎 3 例(19%),慢性重型肝炎 9 例(56%);病原分型,非甲~庚型 3 例(19%),甲型 2 例(13%),乙型 5 例(31%),戊型、甲型+乙型、丙型+戊型、戊型+庚型、乙型+丙型+戊型和乙型+丁型+庚型各 1 例(6%)。

3. TS1 序列与 TIV 相应片段的同源性为 87%,见图 1。

TIV	GTGCACTTCGGAATGGCTGAGTTTCCACGCCCGTCCGACGGGTGAAGCCACGGAGGGA	154
TS1	-----AG-G-----AG	
TIV	GATCTCCGGTCCCGAGGGCGGGTGCAGGAGTGTACACACCGAAGTCAAGGGGCA	214
TS1	CTC-CGA-----G-----C-----	
TIV	ATTCCGGCTCGGACTGGCCGGGCTATGGGCAAGCTCTCAA#####AAAAGCAT	264
TS1	-----T-GGGTATTCATT-T-AA-	
TIV	GTTTATTGGCAGGCATTAC	283
TS1		

注: # 插入 - 相同序列
注: # 插入 - 相同序列

图 1 TIV 与 TS1 的 DNA 序列比较

三、讨论

1997 年日本学者 Nishizawa 等^[1]从一个输血后非甲~庚型肝炎病人血清中克隆到一段未知 DNA 序列,经进一步研究表明该序列为单链 DNA,与一般病毒相似,命名为 TIV。迄今基因库中检索到的 TIV 序列仅有 1 条,为该研究小组发表的部分 DNA 序列(收录号:AB008394),长 3 739 bp,有两个开放读码框架(ORF),分别编码 172 个氨基酸(CRF2)和 774 个氨基酸(ORF1)^[3]。将该序列及编码氨基酸与已知核酸、氨基酸比较,均未见任何较大同源性。

TS1 与 TIV 相应片段的同源性为 87%,127 例肝炎患者 TIV-DNA 阳性 32 例,证实了我国肝炎病人中存在 TIV-DNA 感染。日本学者 Nishizawa 等报告的 TIV-DNA 阳性的肝炎病人均为输血后肝炎,我们检测 TIV-DNA 阳性的 32 例肝炎病人中仅 7 例有输血史(22%),而 25 例(78%)无输血史,说明除输血途径外,其它途径也可以感染 TIV。重型肝炎病人 TIV 阳性率为 41%,非甲~庚型肝炎病人为 18%,重型肝炎病人感染率明显高于非甲~庚型肝炎病人(P<0.01)。在肝炎病人中 TIV 感染者年龄普遍偏大,除 1 例 4 岁患儿外,其他病人均在 21 岁以上,其中大于 30 岁有 27 人,占 84%,老年人(≥60 岁)有 9 人,占 28%。平均年龄重型肝炎病人为 50 岁,非甲~庚型肝炎病人为 43 岁,重型肝炎病人年龄明显大于非甲~庚型肝炎病人(P<0.05)。重型肝炎病人中单一 TIV 感染的 3 例,说明 TIV 感染可能造成重型肝炎。3 例单一 TIV 感染的重型肝炎患者临床症状相对较轻,3 例均为治愈或好转,治愈好转率为 100%。而 TIV 合并其它肝炎病毒感染 13 例重肝患者,5 例治愈或好转,治愈好转率为 36%。治愈好转率单一 TIV 感染重肝病人显著高于 TIV 合并其它肝炎病毒感染的重肝病人(P<0.05)。

参 考 文 献

- 1 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K. et al. A novel DNA virus(TIV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusi on hepatitis of unknown etiology. Biochem Biophys Res Commun,1997,241:92-97.
- 2 戴利成,施柏年,钱志尧,等.套式聚合酶链反应检测伤寒杆菌 DNA 及其临床应用.中华传染病杂志,1995;2:77-79.
- 3 Okamoto H, Nishizawa T, Kato N. et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA Virus (TIV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Hepatol Res,1998,10:1-16.

(收稿:1998-06-23 修回:1998-12-16)

(本文编辑:吕珊)

全国胰腺癌早期诊断及综合治疗新进展学术研讨会征文通知

中华医学杂志编辑委员会拟定于 1999 年 10 月上旬在上海举办全国胰腺癌早期诊断及综合治疗新进展学术研讨会,届时将请有关专家作专题报告。

1. 征文内容:基础理论研究,包括癌基因和抑癌基因的研究,基因治疗和

临床应用前景;诊断技术进展;治疗进展;胰腺癌流行病学调查;其他新技术、新方法介绍。

2. 征文要求:(1)请寄全文及 600 字摘要各一份。(2)请注明作者姓名、单位、邮政编码并加盖公章或附单位介绍

信。(3)稿件请于 1999 年 7 月 10 日以前寄(100710)北京东四西大街 42 号中华医学杂志编辑部陈新石收。信封上注明“胰腺癌会议”字样。

中华医学杂志编辑委员会