

TT 病毒与肝炎关系的临床流行病学研究

张军 罗文新 杨海杰 康俊杰 陈国良 苏智军 庄立琳 夏宁邵

【摘要】目的 对闽南地区各种肝炎患者、健康体检者、义务献血员和肝癌患者共 480 例从临床流行病学角度探讨 TT 病毒 (TTV) 的致病性及其与各种肝炎的关系。方法 采用巢式 PCR 检测血清 TTV DNA、ELISA 检测血清抗 HAV IgM、HBsAg、抗 HBc IgM、抗 HCV IgG、抗 HEV IgG, 用 EPI INFO 6.0 软件进行统计分析。结果 480 名研究对象中 TTV DNA 的总检出率为 23.96%。各种肝炎患者的 TTV 总阳性率为 23.94%, 肝癌患者的 TTV 阳性率为 20.69%, 而健康者的 TTV 阳性率为 24.84%, 义务献血员的阳性率为 30.00%, 均未见明显差别。从临床类型看, 急性肝炎、慢性肝炎和重症肝炎的 TTV 阳性率都在 25% 左右; 从病原类型看, 非甲~戊型肝炎的 TTV 阳性率为 26.19%, 并未见与相应健康者的 25.23% 阳性率的差别; 除 HCV 由于感染率太低而无法分析外, HAV、HBV、HEV 阳性肝炎患者间 TTV 的阳性率分别为 20.00%、23.14%、21.79%, 未见 TTV 与这些已知肝炎病毒的明显相关。对一个时期内的全部 135 例住院肝炎患者及 153 名健康者进行肝炎病原分析, HAV、HBV、HEV 在肝炎患者中的阳性率都要明显高于健康人 ($P=0.0142$), 而 TTV 在肝炎患者中的阳性率与健康人没有明显差别 ($P=0.6021$); 对病毒的单独致病性进行分析, HAV、HBV、HEV 在非重叠感染的肝炎患者中的阳性率都要明显高于健康人 ($P=0.0037$), 而 TTV 在非甲~戊型肝炎患者中的阳性率仍不高于健康人 ($P=0.5256$)。结论 闽南地区的临床流行病学研究未见 TTV 感染与肝炎的明显相关性。

【关键词】 TT 病毒; 流行病学; 肝炎; 致病性

A clinical epidemiology study of the association between TT virus and hepatitis ZHANG Jun, LUO Wenxin, YANG Haijie, et al. The State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, P. R. China

Corresponding autor: XIA Ningshao, E-mail: nsxia @jingxian. xmu. edu. cn

【Abstract】 Objective TT virus (TTV) is a novel DNA virus discovered in Japan from a post-transfusion non-A to G hepatitis patient, but the pathogenic role of TTV in hepatitis is still far from clear yet, nor is the relation of TTV with other well-known hepatitis virus. This study was focused on these problems in terms of clinical epidemiology. **Methods** The study objects comprised 259 cases with all kinds of hepatitis, 163 healthy people and 58 hepatocellular carcinoma cases in Minnan area. Nested PCR was used to detect TTV DNA in sera, while enzyme linked immunosorbent assay was used to detect anti-HAV IgM, HBsAg, anti-HBc IgM, anti-HCV IgG, and anti-HEV IgG in sera. **Results** The total detection rate of TTV DNA in these 480 objects was 23.96%. The TTV positive rate was 23.94% in all hepatitis, 20.69% in hepatocellular carcinoma cases, 24.84% in healthy checkups and 30.00% in blood donors. In view of clinical catalog, no difference of TTV positive rate was found in acute hepatitis, chronic hepatitis and fulminant hepatic failure, and they all showed a TTV positive rate around 25%. In view of pathogenic agents, we also could not find any significant difference of TTV prevalence in non-A to G hepatitis (26.19%), hepatitis A (20.00%), hepatitis B (23.14%), hepatitis E (21.79%), and healthy people who had no infection markers of hepatitis virus A to E (25.23%). The hepatitis C was very few in this area, so it was not calculated in this study. To discount the case selection bias, we invested all hospitalized hepatitis cases during a short period, which comprised 135 hepatitis cases. While the positive rate of HAV, HBV and HEV were all significantly higher than that of healthy controls, the positive rate of TTV was not higher in hepatitis patients. **Conclusion** These results suggest strongly that the TTV is unlikely to be the pathogen that causes non-A to E hepatitis.

【Subject words】 TT virus; Epidemiology; Hepatitis

作者单位:厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室(张军、罗文新、杨海杰、夏宁邵);厦门市中医院(康俊杰、陈国良);泉州市第一医院(苏智军);漳州 175 医院(庄立琳)

通信作者:夏宁邵, 361005 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室(E-mail: nsxia @jingxian. xmu. edu. cn)

肝炎是对人类健康危害严重的传染病之一,目前已发现并确认的肝炎病毒已有甲、乙、丙、丁、戊 5 种肝炎病毒,但仍有近 5%~10% 的肝炎患者找不到任何已知肝炎病毒的感染标志。这些患者中包括一些急慢性肝炎患者、重症肝炎患者、输血后肝炎患

者^[1],因而国内外学者基本上都认为必然还存在某种尚未人所知的肝炎相关病毒,并有众多研究小组致力于此,这些努力导致了庚型肝炎病毒(HGV)的发现^[2]。进一步的研究发现,HGV 仍不能解释许多非甲~戊型急、慢性肝炎、重症肝炎或输血后肝炎的发生^[3],因而多数学者都认为 HGV 并非是人们所寻找的那种新型肝炎病毒。1997 年底,日本 Mayumi 小组^[4]使用代表性差异分析法(RDA)从一个输血后非甲~庚型肝炎患者血清中克隆到一段与目前已知的任何 DNA 序列都没有明显同源性的未知 DNA 序列,并进一步证明该序列为一种单链 DNA 病毒的基因组成分^[5]。根据该患者的姓名,他们将这一新发现的病毒命名为 TT 病毒(TTV)。他们根据该序列合成引物进行巢式 PCR,从 5 例输血后非甲~庚型肝炎患者血清中检测到了 3 例阳性,且发现病人血清转氨酶(ALT)的水平与 TTV DNA 含量有正相关的趋势。同时发现,在原因不明重症肝炎和原因不明慢性肝炎中 TTV 的检出率分别为 47% 和 46%,而在献血员中的检出率为 12%。因此认为,TTV 与部分原因不明输血后肝炎以及急、慢性肝炎密切相关^[4,5]。我们在 1998 年 3 月根据 GenBank 上收录的 TTV 序列设计了两对特异性引物,建立了检测血清中 TTV 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,经测序证实与 TTV 原型株的同源性为 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^[6]。随后又在同一地区的肝炎患者、义务献血员中先后获得了其它 5 株 TTV 序列,与 TTV 原型株的同源性在 82%~99% 之间(另文报道)。为探讨 TTV 与肝炎及肝癌的关系,并了解 TTV 在肝炎及肝癌患者中的感染情况,我们在福建闽南地区(厦门市、泉州市和漳州市)进行了本项研究。

材料与方法

研究对象:分别来自厦门市中医院、泉州市第一医院、漳州 175 医院、厦门 174 医院和厦门大学抗癌中心,包括 1998 年 5 月底~6 月初厦门市中医院全部住院肝炎患者 98 例,1998 年 3~4 月间泉州市第一医院全部住院肝炎患者 37 例,1997 年 1 月~1998 年 3 月漳州 175 医院重症肝炎患者 44 例及非甲非乙型肝炎患者 80 例,1996 年厦门 174 医院和厦门大学抗癌中心来自厦门地区的肝癌患者 58 例,厦门市中医院健康体检者 153 例,厦门市义务献血

员 10 例,共 480 人。每人抽血 5ml,分离血清-20 保存,肝炎的诊断符合 1995 年(北京)第 5 次全国传染病寄生虫病会议修订的病毒性肝炎诊断标准。

甲~戊型肝炎病毒血清标志物的检测:抗 HAV IgM 微量 ELISA 试剂盒、HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb、抗 HBc IgM、抗 HCV IgG、抗 HEV IgG ELISA 试剂盒均由厦门新创科技有限公司提供,具体操作按试剂盒说明书进行。

TTV DNA 的提取及巢式 PCR 的检测: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,具体操作按试剂盒说明书进行。引物的序列及位置(TTV 原型株 TA278,GenBank 收录号 AB008394)见表 1。

表 1 引物的名称、位置和序列

Table 1. The name, sequence and site of the primers

Name	Sites	Sequence (5'-3')
TTV F1	5-22	TGC TAC GTC ACT AAC CAC
TTV R1	733-713	CTC CTC TGC GGC GTC TCC TTA
TTV F2	95-111	GTG CAC TTC CGA ATG GC
TTV R2	283-265	GTA ATG CCT GCC AAT AAA C

结 果

1. TTV DNA 的检出率:在全部 480 人份血清共检出 TTV DNA 阳性 115 例,总检出率为 23.96%,厦门、泉州和漳州 3 个地区肝炎患者中 TTV DNA 的检出率均相似。

2. 不同人群中 TTV DNA 的检出率:除了丙型肝炎患者例数太少不宜分析外,在非甲~戊型,甲~戊型肝炎患者中,健康体检者中,TTV 的阳性率都在 20%~30% 之间,各人群间均未见到 TTV 阳性率的明显差别。各种临床类型肝炎患者、肝癌患者、健康体检者及义务献血员中 TTV DNA 的检出率也都基本一致(表 2)。从病原学角度、临床角度均未见到 TTV 与肝炎的明显相关性,也未见 TTV 与肝癌的明显关系。

3. TTV 及 HAV、HBV、HEV 与肝炎关系的平行分析:由于漳州的 124 例肝炎病例是经过特别选择的,以非甲~戊型肝炎和重症肝炎为主,而厦门和泉州的 135 例肝炎病例以及 153 例健康体检者都是来自一个较短时期内的接近完整的横断面,代表性较好,因此我们在厦门和泉州的病例基础上对 TTV 和几种已知肝炎病毒(HAV、HBV、HEV,由于闽南地区 HCV 的感染率太低,按现有样本量无法进行深入分析)与肝炎的关系进行了平行分析。结果表明,HAV、HBV、HEV 在肝炎患者中的阳性率都明

显高于健康人,显示出这些病毒与肝炎密切相关,与公认的结果一致,因而从一个侧面反映了本研究对象的对象选择基本可以反映出人群中肝炎病毒与临床肝炎的关系。与这些明确的肝炎病毒相比,在研究人群中,肝炎患者中 TTV 的阳性率与健康人基本相同,未能见到 TTV 与肝炎的明显相关性(表 3)。为排除不同肝炎病毒的重叠感染对结果造成的干扰,我们同时对各病毒单独感染的情况进行了分析,同样见到了 HAV、HBV、HEV 与肝炎明显相关,未见 TTV 与肝炎明显相关(表 4)。

表 2 不同人群中 TTV DNA 的检出率

Table 2. Detection rate of TTV DNA in different populations

Population	Number	Positive for TTV	Positive rate (%)
Hepatitis	259	62	23.94
Acute hepatitis	81	18	22.22
Chronic hepatitis	134	29	21.64
Fulminant hepatitis failure	44	15	34.09
Hepatocellular carcinoma	58	12	20.69
Healthy checkups	153	38	24.84
Non-remunerated blood donors	10	3	30.00
Total	480	115	23.96

表 3 HAV、HBV、HEV 及 TTV 与肝炎的相关性分析

Table 3. The association analysis of hepatitis with HAV, HBV, HEV and TTV

Virus	Positive number in hepatitis cases (positive rate %) (n = 135)	Positive number in healthy checkups (positive rate %) (n = 153)	2	P value	Odds ratio value
HAV	8 (5.93)	1 (0.65)	-	0.0142	9.57
HBV	91 (67.41)	34 (22.22)	59.61	0.0000	7.24
HCV	2 (1.48)	1 (0.65)	(Cannot be calculated due to too few samples)		
HEV	50 (37.04)	22 (14.38)	19.64	0.0000	3.50
TTV	30 (22.22)	38 (24.84)	0.27	0.6021	-

表 4 HAV、HBV、HEV 及 TTV 与非重叠感染肝炎的相关性分析

Table 4. The association analysis of non-superinfected hepatitis with HAV, HBV, HEV and TTV

HAV	Number	Positive number for HAV	Positive rate for HAV (%)	2	P value	odds ratio value
Non-B, C, E hepatitis	18	3	16.67	-	0.0037	30.40
Healthy checkups	153	1	0.65			
HBV		Positive number for HBV	Positive rate for HBV (%)			
Non-A, C, E hepatitis	80	65	81.25	74.90	0	15.17
Healthy checkups	153	34	22.22			
HEV		Positive number for HEV	Positive rate for HEV (%)			
Non-A, B, C hepatitis	37	22	59.46	34.03	0	8.73
Healthy checkups	153	22	14.38			
TTV		Positive number for TTV	Positive rate for TTV (%)			
Non-A to E hepatitis	15	2	13.33	-	0.5256	-
Healthy checkups	153	38	24.84			

讨 论

我们的研究结果表明,在闽南地区 480 名研究对象中 TTV DNA 的总检出率为 23.96%,彼此相邻的厦门、泉州、漳州三地的阳性率基本相同。TTV 的阳性率无论是在各种肝炎患者、肝癌患者、健康体检者还是义务献血员中的阳性率都在 20%~30%之间,未见任何较明显的差别。在各类肝炎患者中,从临床类型看,急性、慢性肝炎患者中的 TTV 阳性率

都在 25%左右,未见明显的差别,而重症肝炎患者的 TTV 阳性率(34.09%)略偏高,可能主要与目前我国在重症肝炎的治疗中经常给予输血有关,若只计算采血时无输血史的重症肝炎患者,其 TTV 的检出率即为 26.4%(9/34)。从病原类型看,非甲~戊型肝炎与甲肝、乙肝、戊肝及健康体检者的 TTV 阳性率都在 25%左右,依然未见任何较明显的差别。对厦门、泉州两医院基本同一时期的全部 135 例住院肝炎患者及 153 名健康体检者进行肝炎病原分析,

HAV、HBV、HEV 在肝炎患者中的阳性率都明显高于健康人 ($P < 0.05$), 而 TTV 在肝炎患者中的阳性率与健康人没有明显差别 ($P = 0.6021$); 在非重叠感染肝炎中对病毒的单独致病性进行分析, HAV、HBV、HEV 均反映出了与肝炎的明显相关性 ($P < 0.01$), OR (odds ratio) 值分别为 30.40、15.17 和 8.73。而 TTV 在非甲~戊型肝炎患者中的阳性率也并不高于健康人 ($P = 0.5256$)。这些结果提示: TTV 与肝炎的联系至少在闽南地区要远弱于其它已知肝炎病毒, 从临床流行病学角度还看不到有任何迹象表明 TTV 与临床肝炎间存在明显联系。

最近,《Lancet》杂志报道了英国两个研究小组的研究结果并进行了编辑述评^[7-9], 其中 Naoumov 等^[7]在 72 例慢性肝炎患者中检出了 18 例 TTV 阳性 (25%), 与正常人群没有明显差别, 而且在多种肝脏疾病中 TTV DNA 的阳性率也是相似的。另外, 在绝大多数 TTV 阳性肝炎病例中都没有明显的肝损伤的生化或组织学证据, 因而认为 TTV 可能与肝炎没有明显关系。我们的结果与 Naoumov 等的结果是一致的。Naoumov 等同时还发现两种不同基因型的 TTV 在无症状的献血员、血透病人及各种肝炎中都存在, 还没有证据表明 TTV 的型别与致病有关。

Simmonds 等^[8]在义务献血员及商品化的凝血因子、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明显相关, 提示 TTV 可经输血或血制品而传播, 而现有的血制品制备程序只能部分消除 TTV DNA。Charlton 等^[10]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 (RR) 为 4.5。我们对漳州和泉州的 161 例肝炎病例进行了输血史调查, 结果在有输血史的 13 例患者中 TTV 的阳性率高达 69.23% (9/13), 明显高于无输血史的 22.97% (34/148, $P < 0.001$), 相对危险度为 3.01 (1.89~4.81), 与这些结果也是相符的。

迄今的一些研究结果尽管并不完全一致, 但都无一例外地发现 TTV 在正常人群及献血员中有较高的阳性率, 已有较多的证据表明 TTV 可经输血传播。另外, Mayumi 小组^[11]还在 TTV 阳性肝癌患者的粪便中检出了 TTV DNA, 提示 TTV 还可经胃肠道传播。由于 TTV 的感染率高, 传播途径多样, 即便 TTV 与人类疾病仅有微弱的联系, 也是值得重视的。

志谢: 厦门新创科技有限公司陈滨晖等为本研究进行了肝炎病毒标志物的复查, 厦门泰伦生物工程有限公司栾国彦等协助进行 TTV DNA 的 PCR 复查, 厦门大学抗癌中心和中国人民解放军 174 医院肿瘤科提供肝癌患者血清标本, 特此致谢。

编者评注: 1997 年发现 TTV 时认为与肝炎有病原关系, 在随后进行广泛调研后, 对其与肝炎的关系出现分歧意见, 不少学者已持否定观点, 但在国内仍有部分学者认为与肝炎密切相关。厦门大学一批青年科技工作者通过对闽南地区 TTV 的临床流行病学调研, 提出 TTV 与肝炎无相关性。本文经有关同行审阅认为结果可信。现发表此文, 希望进一步引起有关科研人员的关注, 并将研究重点放在 TTV 的病原学方面, 以期能对 TTV 的作用统一认识。

参 考 文 献

- Alter HJ, Bradley DW. Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (non-ABC). *Semin Liver Dis*, 1995, 15:110-120.
- Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*, 1996, 271:505-508.
- Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis G virus-A true hepatitis virus or an accidental tourist? *N Engl J Med*, 1997, 336:786-787.
- 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.
- 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. *Hepatol Res*, 1998, 10:1-16.
- 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. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 1998, 37:315-317.
- Naoumov N, Petrova E, Thomas M, et al. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet*, 1998, 352:195-197.
- Simmonds P, Davidson F, Lycett C, et al. Detection of a novel DNA virus (TT virus) in blood donors and blood products. *Lancet*, 1998, 352:191-195.
- Cossart Y. TTV a common virus, but pathogenic? *Lancet*, 1998, 352:190.
- Charlton M, Adjei P, Poteracha J, et al. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*, 1998, 28:839-842.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, et al. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol*, 1998, 56:128-132.

(收稿日期:1998-11-23)