

# 体检发现谷丙转氨酶升高人群中检出 TT 病毒<sup>①</sup>

彭晓谋 高志良 陈雪娟 卢建溪 周元平 黄仰苏 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院传染科; 广州, 510630)

**摘要** 目的: 了解新型肝炎病毒—TT 病毒在中国的流行情况, 探讨其核酸变异性。方法: 收集 19 例健康体检发现谷丙转氨酶升高者的血清标本, 采用 PCR 方法检测 TT 病毒的 DNA。所得 PCR 产物再采用限制性片段长度多态性分析和 DNA 序列分析方法进行验证。最后将测序结果与 GenBank 中的一些分离株进行比较, 分析它们的同源性。结果: 19 例转氨酶升高者中, 2 例 PCR 检测呈阳性反应, 其产物经限制性片段长度多态性分析证实为特异性产物。DNA 序列分析显示, 2 个阳性产物间的核酸同源性为 98.7%, 与 Takahashi 等分离株和 Okamoto 等分离株相比, 同源性分别为 98.7% 和 89.2%。两个 TTV DNA 片段中均存在精氨酸取代丝氨酸变异。结论: 在中国广东人群中存在 TT 病毒感染, 其核酸序列与 Takahashi 等在日本得到的分离株高度同源。因而, 设计 PCR 引物时宜选择 Takahashi 等分离株为标准。精氨酸取代丝氨酸变异的意义需进一步研究。

**关键词** 肝炎, 病毒性, 人/病因学; 丙氨酸转氨酶/血液; TT 病毒

**中图分类号** R 512.6

## TT Virus Were Detected in Persons with Elevated Alanine Aminotransferase Found During Routine Medical Check Up

Peng Xiaomou Gao Zhiliang Chen Xuejuan Lu Jianxi Zhou Yuanping Huang Yangsu Yao Jilu

(Department of Viral Hepatitis Research, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510630)

**Abstract Objective:** To investigate the incidence of a new hepatitis virus (TT virus) infection in Guangdong, China, and analyze its nucleic acid variance. **Methods:** PCR was used in the detection of TTV DNA in 19 serum samples from elevated alanine aminotransferase persons in their routine medical check up. PCR products were confirmed by RFLP and DNA sequencing. Nucleotide sequence homology was analyzed by comparison with major isolates from GenBank. **Results:** TTV DNA was detected in 2 out of 19 cases by PCR. PCR products were verified to be specific. DNA sequencing showed that the homology rate of these 2 fragments was up to 98.7%. When compared with Takahashi's isolates and Okamoto's isolate, the homology rates were 98.7% and 89.2% respectively. A unique amino acid replacement of serine by arginine was found in both fragments. **Conclusions:** There were TTV infections in Chinese population. In China these viruses share high homology with Takahashi's strains which might be good standards for primer designation. The significance of the unique replacement of amino acid remained to be studied.

**Subject headings** hepatitis, viral, human/etiology; alanine aminotransferase/blood; TT virus

HCV 和戊型肝炎病毒(HEV)发现以来, 大部分未定型肝炎的病因逐渐明确。但仍约有 10% 肝炎患者病因不明<sup>[1,2]</sup>。近来又发现了庚型肝炎病毒(HGV), 但 HGV 的致病不强, 且仅在极少数原因不明肝炎中检出<sup>[3,4]</sup>。因而, 仍然存在许多肝炎病毒血清标志全部阴性的肝炎患者, 即所谓的非甲到庚型肝炎(Non A to G hepatitis, NA-G)。因此, 寻找新型

肝炎病毒是当前肝炎研究中的重要课题之一。近来日本学者采用差式文库的分子生物学方法从 1 例输血后 NA-G 肝炎患者血清中分离出 500 bp 的 DNA 片段。并根据患者的名称命名为 TT 病毒(TTV)<sup>[5]</sup>。这种病毒能引起谷丙转氨酶(ALT)的轻度升高。本研究收集健康体检发现 ALT 轻度升高者的血清标本, 采用聚合酶链反应(PCR)方法检测

① 广东省自然科学基金(970079)资助课题

TTV DNA, 探讨这种新型肝炎病毒在中国广东的流行情况和分析其核酸水平的变异性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病 例

660 名健康体检者为广东省玻璃厂职工。常规空腹采静脉血, 收集血清进行谷丙转氨酶(ALT)、HBsAg、HBeAg、抗-HBs、抗-HBe 和抗-HBe 检测。共检出 19 例 ALT 异常患者 ( $> 1 166.9$  nmol/S)。

### 1.2 方 法

1.2.1 PCR 检测 TTV DNA 血清中 TTV DNA 检测采用常规热变性法制备裂解上清, 以 5'-GCAGC AGCAT ATGGA TATGT-3' (TTV1, 正义) 和 5'-TGACT GTGCT AAAGC CTCTA-3' (TTV2, 反义) 为外引物进行第 1 次扩增, 产物为 270 bp。第 1 次产物再以 5'-CATAC ACATG AATGC CAGGC-3' (TTV 3, 正义) 和 5'-GTACT TCTTG CTGGT GAAAT-3' (TTV 4, 反义) 为内引物进行第 2 次扩增, 产物为 197 bp。 $\rho = 0.02$  琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.2.2 PCR 产物的限制性片段长度多态性分析 197 bp 的 PCR 产物中存在 1 个限制性内切酶 *Kpn* I 的位点。消化的片段分别为 169 bp 和 28 bp。50  $\mu$ L PCR 产物凝胶过滤去除剩余引物, 常规采用氯仿抽提和乙醇沉淀后, 沉淀溶于 9  $\mu$ L 双蒸水中, 加 1  $\mu$ L 10 $\times$  缓冲液, 2 U *Kpn* I, 于 37  $^{\circ}$ C 消化 1 h,  $\rho = 0.02$  琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.2.3 PCR 产物的 DNA 序列分析 TTV DNA 阳性的 142 和 667 号标本的产物, 经低熔点琼脂糖凝胶纯化后, 在达安基因诊断中心的全自动序列分析仪上进行 DNA 序列分析。

1.2.4 其他肝炎病毒血清标志检测 抗-HAV 采用中山生物工程公司试剂进行检测, 血清 HBV 标志和抗-HCV 采用美国 Abbott 试剂进行检测, 抗-HEV 和抗-HGV 采用新加坡 Genelabs 公司试剂进行检测。

## 2 结 果

### 2.1 血清中 TTV DNA

巢式 PCR 检测单项 ALT 升高标本中 TTV DNA 的结果和 RFLP 分析结果分别见图 1 和图 2。阳性产物的碱基数与设计相符。所有阳性 PCR 产物经限制性内切酶消化后所得 DNA 片段与期望大小一致。

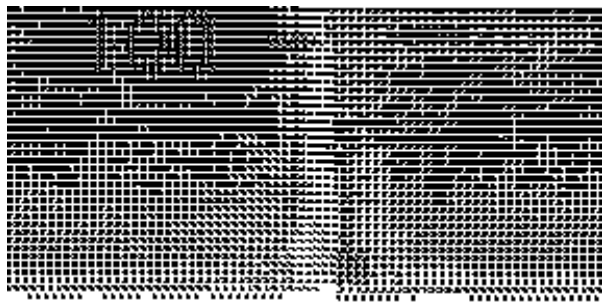


图 1 PCR 检测血清中 TTV DNA 的产物分析

Fig. 1 Product analysis of TTV DNA detection from serum by PCR

Lane 1 was 100 bp ladder from GIBCO BRL, USA, lane 2, 4, 5, were positive, lane 3 was negative

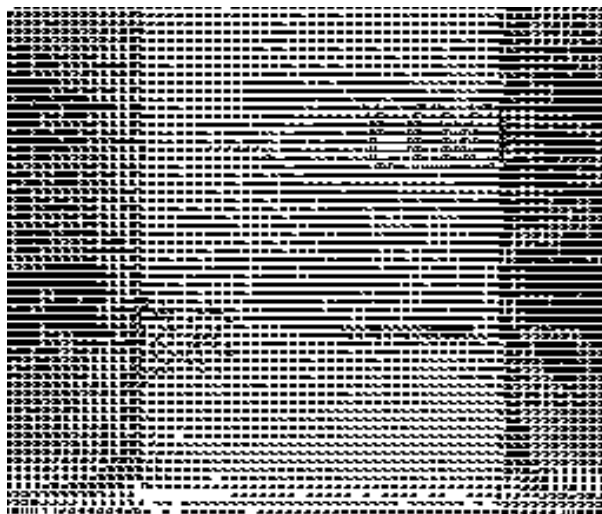


图 2 RFLP 分析 PCR 产物

Fig. 2 RFLP analysis of PCR products

Lane 1 was PCR product digested with *Kpn* I, lane 2 were undigested control, lane 3 was 100 bp ladder from GIBCO BRL

### 2.2 PCR 产物序列分析

142 和 667 号标本 DNA 序列分析结果和与 GenBank 中主要序列比较结果见图 3。DNA 序列同源性分析结果见表 1。

### 2.3 氨基酸序列的比较分析

相应氨基酸序列比较分析见图 4。

### 2.4 其他肝炎病毒感染的情况

19 例 ALT 升高者中, 根据病毒性肝炎防治方案(1995 年), 9 例诊断为乙型病毒性肝炎, 1 例为甲型肝炎和 1 例为丙型肝炎, 8 例原因不明。2 例 TTV DNA 阳性者均为 HBsAg 阳性。

TTV142	catacacatg	aatgccagge	TACTAATAAG	AAGTCCTTTT	ACAGACCCCC	50
TTV667			G			
AB008394				C	A	
AB011494						
AB011493						
TTV142	AGCTAATAGT	ACACACAGAC	CCCCTAAAG	GCTTTGTACC	CTATTCTTTA	100
TTV667						
AB008394	A	C	A	T	T	C
AB011494						
AB011493						
TTV142	AACTTTGGAA	ATGGTAAAAT	GCCAGGAGGT	AGTAGCAATG	TTCCATAAG	150
TTV667					T	
AB008394				T	G	T
AB011494				C		
AB011493				C		
TTV142	TATGAGAGCT	AAGTGGTACC	CCACTTTatt	tcaccagcaa	gaagtac	197
TTV667						
AB008394	A	A	T	A	A	
AB011494	A					
AB011493	A					

图 3 TTV DNA 142 和 667 片段与 GenBank 中主要分离株 DNA 序列的比较分析

Fig. 3 Comparison of DNA sequences of fragment 142 and 667 with major isolates from GenBank

TTV142	NIHMNARLLI	RSPFTDPQLI	VHTDPTKGFV	PYSLDFGNGK	40
TTV667					
AB008394			L		
AB011494					
AB011493					
TTV142	MPGGSSNVP1	SMRAKWYPTL	FHQQEV		66
TTV667					
AB008394		R			
AB011494		R			
AB011493		R			

图 4 TTV DNA 142 和 667 片段与 GenBank 中主要分离株氨基酸序列的比较分析

Fig. 4 Comparison of amino acid sequences of fragment 142 and 667 with major isolates from GenBank

表 1 142 和 667 片段与 GenBank 中主要分离株的核苷酸序列同源性分析

Table 1 Comparison of nucleotide sequence homology of fragment 142 and 667 with major isolates from GenBank (%)

	TTV 142	TTV667	A B008394	A B011494
TTV142				
TTV667	98.7			
A B008394	89.2	89.2		
A B011494	98.7	87.5	89.2	
A B011493	98.7	97.5	89.2	100

### 3 讨论

最近日本学者 Nishizawa 等采用差式文库方法从输血后 Non-A to G 肝炎患者的血清中分离出病毒克隆 N 22, 并证实其来源于 DNA 病毒的基因组, 因而根据病人的姓名命名为 TTV。根据 TTV DNA 序列设计引物进行 PCR 检查发现, 5 例输血后 Non-A to G 肝炎患者中, 3 例为阳性, 且 TTV DNA 水平与血清转氨酶的水平相关。平均于输血后 6~8 周开始检出, 持续约 5~8 周, 其中 1 例 6 周开始检出, 观察至 21 周时仍为阳性<sup>[9]</sup>。

本研究显示,在中国广东一工厂健康体检发现的19例ALT升高者中,有2例成功扩增出TTV DNA的片段。进一步分析显示从这2例扩增出来的DNA片段其序列高度同源,同源性达98.2%。目前GenBank中保存的TTV DNA序列中根据同源性不同主要有Takahashi等的AB 011494和AB 011493,以及Okamoto等的AB 008394两个主要类型,两者的同源性仅为89.2%。中国广东检出的TTV DNA片段与AB 011494和AB 011493高度同源,同源性为98.7%。而与AB 008394相比,同源性仅为89.2%。提示中国广东流行的TTV可能在基因型方法与Takahashi等的分离株相近。因而,在中国设计TTV的PCR引物时宜以Takahashi等分离株为标准。然而,仍存在2个碱基上的细微差别。其中,一个碱基变异导致密码子错义,出现精氨酸取代丝氨酸。这种差异的意义需进一步研究。

在健康体检人群中常可检出一些无症状ALT升高者,其中部分原因不明。本研究显示,HBV感染是健康体检人群中ALT升高的主要原因。2例

TTV DNA阳性的ALT升高者均重叠HBV现症感染。因而,TTV的致病性可能较弱或需要其他因素协同致病。

#### 参 考 文 献

- 1 Shiffman M L, Luktic V A, Sanyal A J, *et al.* Hepatic lidocaine metabolism and liver histology in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology*, 1994, 19(4): 933
- 2 Czaja A J, Carpenter H A, Santrach P J, *et al.* The nature and prognosis of severe cryptogenic chronic active hepatitis. *Gastroenterology*, 1993, 104(6): 1755
- 3 Karayiannis P, Brind A M, Pichering J, *et al.* Hepatitis G virus does not cause significant liver disease after liver transplantation. *J Viral Hepat*, 1998, 5(1): 35
- 4 Guilera M, Saiz J C, Lopez L F X, *et al.* Hepatitis G virus infection in chronic liver disease. *Gut*, 1998, 42(1): 107
- 5 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 Com*, 1997, 241(1): 92

(1998-06-19收稿 1998-09-15修回)

(上接第52页)

形成等形态学改变,DNA出现片段化,DNA电泳见到明显的梯样条带,流式细胞仪检查发现亚二倍细胞明显增加。结果显示维甲酸诱导了HL-60细胞出现凋亡,并存在时间效应关系和剂量效应关系。这提示,维甲酸诱导HL-60细胞凋亡可能是其治疗早幼粒细胞白血病的重要机制之一。

难治病例的白血病细胞存在多药耐药性(Multidrug Resistance, MDR),常使治疗失败。临床曾用环孢素A(CsA)联合化疗治疗耐药、复发的急性白血病,取得良好的疗效<sup>[4,5]</sup>,但其作用机制仍不很清楚。近年发现某些药物对维甲酸诱导白血病细胞凋亡有正性调节作用。Wallington等在体外研究发现,在1,25-双羟D3作用下,维甲酸诱导HL-60细胞凋亡活性明显较单用维甲酸强<sup>[6]</sup>。本研究在体外维甲酸诱导HL-60细胞凋亡培养中同时加入CsA 10 mg/L,维甲酸诱导HL-60细胞凋亡的活性明显增强,而且在环孢素A存在时,低浓度维甲酸也有明显诱导HL-60细胞凋亡的作用。提示环孢素A与维甲酸具有协同作用,对维甲酸诱导白血病细胞凋亡有上调作用,应用维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病时合用CsA,可能会取得更好疗效。

#### 参 考 文 献

- 1 孙关林,欧阳仁荣,陈赛娟,等.全反式维甲酸诱导分化治疗急性早幼粒细胞白血病5年研究总结. *中华肿瘤杂志*, 1993, 15(2): 125
- 2 Huang R W, Tsuda H, Takatsuki K. Interleukin-2 prevents programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Hematol*, 1993, 58(1): 83
- 3 Preisler H D, Gopaly V. Regrowth resistance in leukemia and lymphoma; the need for a new system to classify treatment failure and for new approaches to treatment. *Leuk Res*, 1994, 18(3): 149
- 4 赵春亭,卞寿庚,杨纯正,等.环孢素A逆转急性髓细胞白血病多药耐药一例. *中华血液学杂志*, 1995, 16(7): 347
- 5 李晓明,吴谨绪,张连生,等.环孢素A逆转难治性白血病多药耐药的临床研究. *中华血液学杂志*, 1997, 18(2): 73
- 6 Wallington L A, Bunce C M, Durham J, *et al.* Particular combinations of signals, by retinoic acid and 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D3, promote apoptosis of HL-60 cells. *Leukemia*, 1995, 9(7): 1185

(1998-06-23收稿 1998-10-21修回)