

·论著·

母婴输血传播病毒感染及垂直传播的 分子流行病学研究

周晓光¹, 肖昕², 朱宁湖³, 熊爱华², 陈新², 肖小敏², 周伯平⁴, 徐六妹⁴

(1. 广州医学院附二院新生儿科, 广东 广州 510260; 2. 暨南大学附一院围产医学中心, 广东 广州 510632;
3. 广东省妇幼保健院产科, 广东 广州 510010; 4. 深圳市肝病研究所, 广东 深圳 518020)

[摘要] 目的 探讨孕产妇输血传播病毒(TTV)感染情况及其母婴传播途径。方法 采用巢式聚合酶链反应(nPCR)技术对广州市490例孕产妇静脉血及其新生儿脐血标本进行TTV DNA扩增,并对8例孕产妇静脉血及新生儿脐血TTV DNA均阳性的PCR产物进行克隆和测序。结果 87例孕产妇静脉血及12例新生儿脐血检测出TTV DNA,孕产妇TTV DNA阳性率为17.8%,母婴垂直传播率为13.8%。TTV广州分离株核苷酸序列与日本株的同源性为85.3%~98.2%。结论 孕产妇TTV感染率较高,TTV可经胎盘传递给胎儿而引起感染。

[中国当代儿科杂志,2003,5(3):219-222]

[关键词] 肝炎病毒;疾病传播;垂直;聚合酶链反应

[中图分类号] R512.6;R457 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)03-0219-04

Molecular Epidemiology Study on Mother-to-Infant Transmission of Transfusion Transmitted Virus

Xiao-Guang ZHOU, Xin XIAO, Ning-Hu ZHU, Ai-Hua XIONG, Xin CHEN, Xiao-Min XIAO, et al. Department of Neonatology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China (Email: gzzhouxg@163.net)

Abstract: **Objective** To study the incidence of transfusion transmitted virus (TTV) infection in pregnant women and the route of TTV infection. **Methods** TTV DNA was detected by nested polymerase chain reaction (nPCR) technique in serum of 490 pregnant women and in umbilical blood of their infants in Guangzhou City. PCR products from the 8 women and their infants with positive TTV DNA were cloned and sequenced. **Results** The positive TTV DNA occurred in 87 mothers (17.8%) and 12 babies born to them, with 13.8% of incidence of mother-to-infant transmission. The homology of nucleotide sequence of TTV isolates from Guangzhou of China and from Japan was 85.3% - 98.2%. **Conclusions** There is a high incidence of TTV infection in pregnant women. TTV can be transmitted via placenta (vertical transmission).

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(3): 219-222]

Key words: Hepatitis virus; Disease transmission, vertical; Polymerase chain reaction

1997年Nishizawa等^[1]从1例输血后肝炎病人血清中分离到一种新的肝炎相关病毒基因,由于与输血有关,故暂命名为输血传播病毒(transfusion transmitted virus, TTV)。初步研究表明TTV为一种单股DNA病毒,主要经血传播。1998年周伯平等^[2]研究证实TTV感染在我国存在。随后,我们即开展了TTV母婴感染及垂直传播的研究,并作

了初步报道^[3]。为进一步探讨TTV母婴垂直传播,我们采用巢式聚合酶链反应(nPCR)对广州市490例孕产妇静脉血及其新生儿脐血标本进行了TTV DNA检测,并对其中8例母婴配对血清标本TTV DNA均阳性的血清PCR产物进行分子克隆与测序,现将结果报道如下。

[收稿日期] 2002-09-12; [修回日期] 2003-01-17

[作者简介] 周晓光(1961-),男,硕士,副主任医师。主攻方向:围产新生儿学。

[通讯作者] 周晓光,广州市昌岗东路250号广州医学院附二院新生儿科,邮编:510260。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择 1999 年 8 月 ~ 2000 年 10 月在广州市两家三级甲等医院产科住院分娩的 490 例孕产妇及其新生儿为研究对象。所有孕产妇妊娠期间均健康,无输血、吸毒史,无肝病及其他慢性病史。在妊娠中期常规检测肝功能和乙肝两对半,其肝功能未发现异常,但有 74 例孕产妇 HBsAg 阳性,系乙肝病毒 (HBV) 健康携带者。

1.2 方法

1.2.1 血标本的收集 采用经高压灭菌处理的一次性带盖试管,于临产 12 h 内采孕妇静脉血 5 ml; 新生儿娩出后立即留取脐血 5 ml, 严格避免母血污染。标本不抗凝,分离出的血清置 -70℃ 保存,直至同一批检测。

1.2.2 引物设计 根据 Okamoto 等^[4]报道的 TTV 基因序列,用 Goldkey 软件,在 TTV ORF1 保守区设计两对套式引物,委托上海 Sangon 生物工程公司合成。引物序列: T₁ 5'-ACAG ACA GAG GAA G-GCAAG-3', T₂ 5'-GGA TACCTA TTA GCTCTCA T-3'; T₃ 5'-AACATGTTG TGG A TAGACT- GG-3', T₄ 5'-CCTGGCATTTTACCA TTTCCA-3'。其中 T₁ 与 T₂ 为外引物, T₃ 与 T₄ 为内引物,扩增产物长度为 272 bp。

1.2.3 TTV DNA 的检测 采用蛋白酶 K 法提取血清中的 TTV DNA (模板),应用套式 PCR (nested PCR) 两次扩增血清 TTV DNA。第 1 次 PCR 体系中含引物 T₁ 20 pmol/L, T₂ 2 mmol/L, dNTPs 3 μl, Taq 酶 2 U, 10 × 缓冲碱 3 μl, 加入 TTV DNA 模板后反应总体积为 30 μl。用石蜡油封顶后置 PCR 扩增仪 (美国 MJ Research INS 公司产品) 进行第 1 次扩增,循环条件和次数为: 94℃ 变性 40 s、56℃ 退火 35 s 和 72℃ 延伸 42 s, 共 30 个循环。第 2 次 PCR 体系中含引物 T₃ 20 pmol/L, T₄ 2 mmol/L, dNTPs 3 μl, Taq 酶 2 U, 10 × 缓冲碱 3 μl, 第 1 次 TTV DNA 扩增产物 2 μl, 反应总体积为 30 μl。循环条件和次数为: 94℃ 变性 40 s、56℃ 退火 35 s 和 72℃ 延伸 42 s (最后一次循环 72℃ 延伸 7 min), 共 30 个循环。第 2 次 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳、溴乙啶染色,紫外灯下观察结果,出现 272 bp 扩增带者为阳性。所有血清标本均按上述方法重复测试两次。

1.2.4 PCR 产物的分子克隆与测序 取第 2 次 PCR 产物,用低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收,然

后用 Klenow 酶补平,再用 T₄ DNA 连接酶将其与经 Sma I 酶切后的载体 pUC18 连接,转化大肠杆菌 DH5α 菌,挑白斑筛选阳性克隆。用碱裂解/PEG 沉淀法提取质粒,采用通用引物,经荧光自动测序仪 (Applied Biosystems, 373A) 进行双向测序。

2 结果

2.1 PCR 产物的电泳结果

分别对第 1 次与第 2 次 PCR 产物进行电泳,阳性标本的第 2 次扩增产物可见 272 bp 的 DNA 带,与预期大小一致 (图 1), 但第 1 次 PCR 扩增产物则未见 DNA 带。提示阳性血清标本中 TTV DNA 含量较少,经一次 PCR 扩增不足以检出。

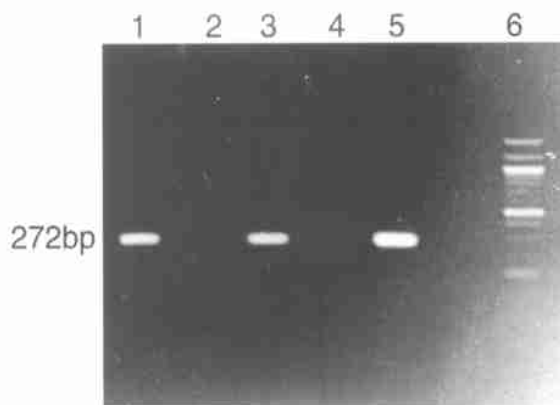


图 1 TTV DNA 的 PCR 产物电泳图

1, 3, 5: 阳性标本 (272 bp); 2, 4: 阴性标本; 6: DNA 分子量标准 (100 bp DNA ladder)

Figure 1 Electrophoresis of nested PCR products of TTV DNA

1, 3, 5: Positive samples (272 bp); 2, 4: Negative samples. 6: PCR Marker (100 bp DNA ladder)

2.2 孕产妇静脉血及新生儿脐血 TTV DNA 检测结果

在 490 例孕产妇静脉血标本中, 87 例检测出 TTV DNA, TTV DNA 阳性率为 17.8% (87/490); 在 490 例新生儿脐血标本中, 12 例检测出 TTV DNA, 脐血 TTV DNA 阳性率为 2.4% (12/490); 脐血 TTV DNA 阳性的 12 例新生儿, 其母亲静脉血 TTV DNA 亦全部阳性, 母婴垂直传播率为 13.8% (12/87)。

2.3 PCR 产物的克隆及序列测定结果

对 8 例孕产妇静脉血及新生儿脐血 TTV DNA 均阳性的血清 PCR 产物克隆的测序结果表明, 其核

苷酸序列与 Okamoto 等^[4]报道的 TTV N22 克隆的 同源性为 85.3 % ~ 98.2 %,见图 2。

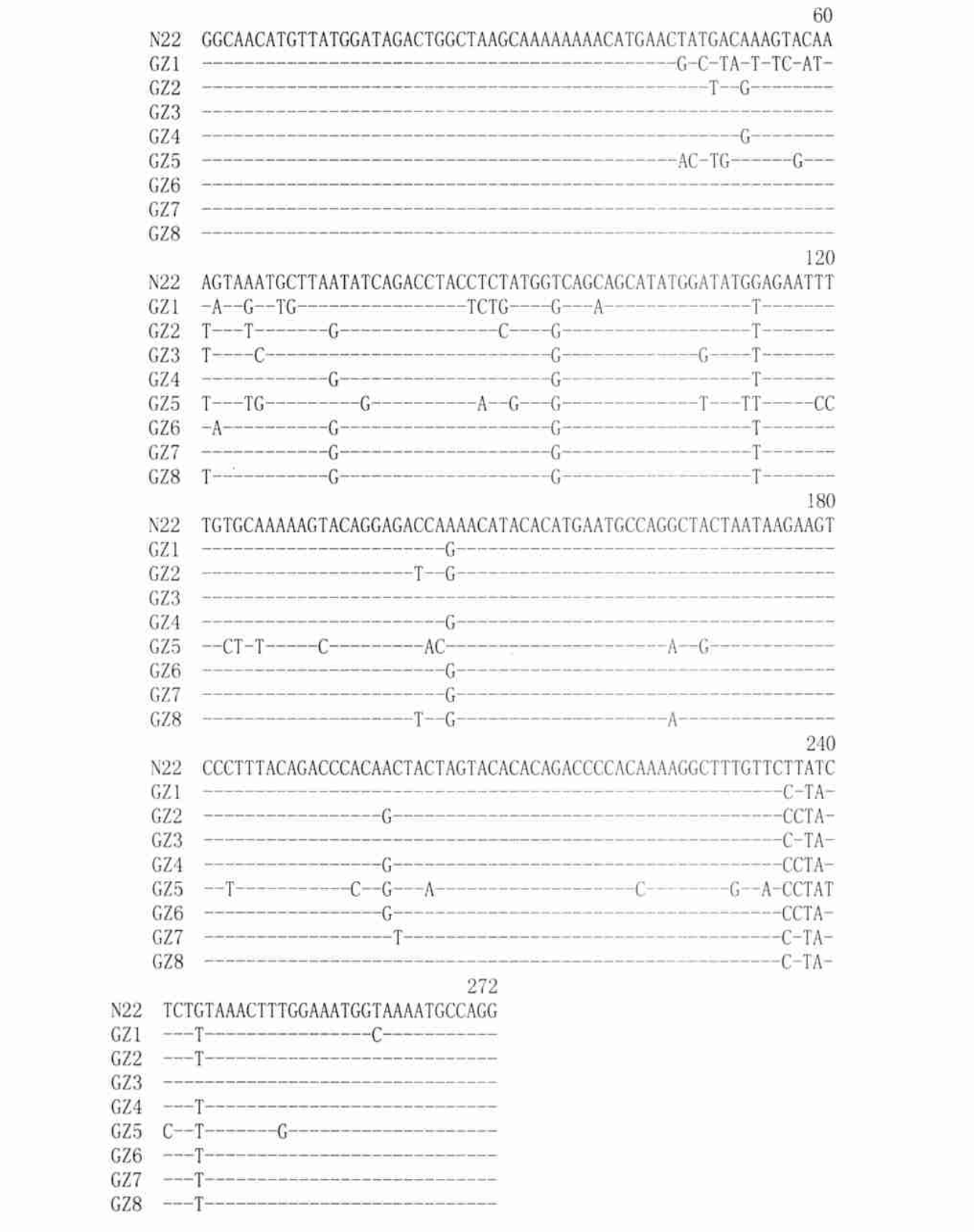


图 2 TTV 广州分离株 ORF₁ 部分基因测序结果

N22: TTV 日本分离株; GZ1 ~ 8: TTV 广州分离株

Figure 2 The nucleotide sequence of ORF₁ region of TTV isolates from Guangzhou of China
N22: Japanese TTV isolate reported by Okamoto. GZ1 - 8: Guangzhou TTV isolates

3 讨论

自从日本学者 Nishizawa 等于 1997 年首先报道 TTV 以来,国内外对 TTV 感染的研究不断增加。研究表明,TTV 与已知的动物单股 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),线状细小病毒科(如人细小病毒 HPV B19,腺联病毒 AAV)。TTV 是一个无包膜的单股 DNA 病毒,可能属于细小病毒科。目前已测定的 TTV 基因序列长约 3.7 kb,含有 ORF₁ 与 ORF₂ 两个开放读码框,分别编码 770 与 202 个氨基酸。我们对 8 例孕产妇静脉血及新生儿脐血 TTV DNA 均阳性的血清 PCR 产物进行分子克隆与测序,结果表明其核苷酸序列与 Okamoto 等^[4]报道的 TTV N22 克隆的同源性为 85.3%~98.2%,表明该 PCR 产物属 TTV 的特异性序列。

TTV 在各种人群中分布极为广泛,在肝炎患者、静脉注射毒品者、血液透析、器官移植和血友病患者等高危人群中 TTV 感染率很高^[1,5,6],在健康人群中也有 TTV 感染存在,如英国的一般人群的感染率为 10%,日本为 12%左右,中国华南地区为 7.8%^[3,4]。孕妇作为一般人群的一部分,理论上也应有不低的 TTV 感染率。Gerner 等^[7]报道孕产妇 TTV 感染率为 41.3%;Saback 等^[8]报道孕妇 TTV 感染率为 35%。陈慧等^[9]检测 60 例健康孕产妇,TTV 感染率为 28.3%(17/60)。我们对 490 例孕产妇静脉血 TTV DNA 进行检测,TTV DNA 阳性 87 例,TTV DNA 阳性率为 17.8%,低于上述报道结果。

关于 TTV 母婴垂直传播的途径,目前存在不同的看法。Gerner 等^[7]检测了 138 例孕产妇静脉血 TTV DNA,其中 51 例阳性,同时脐血 TTV DNA 阳性者 19 例,母婴垂直传播率为 33.3%,提示 TTV 可经胎盘传播。Saback 等^[8]在 105 例临产孕产妇静脉血中检测出 TTV DNA 37 例,脐血检测出 TTV DNA 7 例,母婴垂直传播率 18.9%,也认为经胎盘传播是 TTV 母婴传播的主要途径。而陈慧等^[9]对 60 例健康孕产妇进行 TTV 检测,其中 11 例

TTV 阳性,胎儿脐血 TTV 均为阴性,故认为 TTV 不能通过胎盘屏障,母婴间不存在垂直传播。得出这个结论可能与其样本量小有关。本文对 490 例孕产妇静脉血和脐血标本进行检测,静脉血 TTV DNA 阳性 87 例,其中 12 例静脉血和脐血 TTV DNA 均阳性,母婴垂直传播率为 13.8%,结果说明 TTV 可以通过胎盘屏障而进入胎儿血液,属血源性母婴垂直传播。但 TTV 是否存在细胞源性母婴垂直传播,即 TTV 先感染胎盘的组织细胞,再经过“细胞转移”至胎儿血液,最后引起胎儿感染,尚不清楚。我们正在应用免疫组化和原位杂交技术对胎盘组织 TTV 感染情况进行分子病理学研究,以探讨 TTV 母婴垂直传播的机制。

【参 考 文 献】

- [1] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241(1): 92 - 97.
- [2] 周伯平,马为民,王火生,等. 深圳地区不同人群 TTV 感染情况的调查 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1998, 12(3): 241 - 244.
- [3] 肖昕,周晓光,陈新,等. 孕妇的输血传播病毒感染及母婴垂直传播 [J]. *中华围产医学杂志*, 2000, 3(3): 156 - 158.
- [4] 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]. *Hepatol Res*, 1998, 10(1): 1 - 16.
- [5] 宋建新,田德英,雷洪波,等. 非甲-庚型肝炎患者中 TTV 感染的研究 [J]. *临床内科杂志*, 1999, 16(4): 197 - 199.
- [6] 郑煜煌,郑宣鹤,杨旭,等. 新肝炎病毒 TTV 在各类高危人群中分子流行病学研究 [J]. *湖南医科大学学报*, 2000, 25(4): 337 - 340.
- [7] Gerner P, Oettinger R, Gerner W, et al. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2000, 19(11): 1074 - 1077.
- [8] Saback FL, Gomes SA, de Paula VS, et al. Age-specific prevalence and transmission of TT virus [J]. *J Med Virol*, 1999, 59(3): 318 - 322.
- [9] 陈慧,王玉兰,裴发光,等. 输血传播病毒母婴感染的前瞻性研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2000, 35(5): 277 - 278.

(本文编辑:吉耕中)