第6卷第1期 病学毒杂志 Vol.6 No.1
1991年3月 VIROLOGICA SINICA Mar.1991

鸭肝炎病毒感染和垂直传播的研究

李秋香 郑玉廷 李冬田 田金霞 张灏 王立军 任中原

（天津医学院微生物学教研室，天津 300070）

李伯绍 张胜付

（高邮县种鸭场，江苏 225601）

提 要

用 α-^{32}P-dATP-DHBV DNA 探针做斑点杂交试验、检测了不同鸭种血清中携带DHBV情况。其中北京鸭与樱桃谷鸭的杂交种鸭杂交阳性率为5.1%；而不同鸭龄不同饲养条件的高邮麻鸭血清阳性率 32.7—58.8%，经EM检测均在血清中找到病毒颗粒。将DHBV DNA不同的亲代配对所组成的四个组分群饲养，观察产卵后再孵化出的雏鸭DHBV DNA 阳性率。第一组（♀－♂－）为0%，第二组（♀＋♂＋）为100%，第三组（♀－♂＋）28%，第四组（♀＋♂－）100%。然而亲代雌雄鸭均为 DHBV DNA 阴性的雌鸭所产卵在孵化到第9天时，经尿囊腔注射 1×10^9 病毒颗粒 /ml10μl 的血清，孵出雏鸭时 DHBV DNA阳性率达83.3%。

关键词： 鸭肝炎病毒 垂直传播 自然感染

由于人乙型肝炎病毒（HBV）、鸭肝炎病毒（DHBV）、土拨鼠肝炎病毒（WHV）地松鼠肝炎病毒（GSHV）在形态结构、核酸组成、生物学特性及致病机理的相似性，国际病毒分类命名委员会（ICTV）将这一组病毒命名为“嗜肝DNA病毒”（Hepadnavirus）[1]。近年来发现后三种动物的肝炎病毒能自然感染相应动物，因而研究这三种动物肝炎病毒有助于间接认识人乙型肝炎病毒，但土拨鼠、地松鼠在实验室饲养、繁衍较困难，因而近年来DHBV以及所致疾病已被认为是研究人乙型肝炎和与乙型肝炎相关的肝硬化和肝癌的发生机理的理想实验模型[2-6]。本文拟通过不同鸭种 DHBV的感染率和 DHBV垂直传播率及途径等探讨DHBV 的传播机理。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 本实验所使用的鸭种为高邮麻鸭和北京鸭（♀）与樱桃谷鸭（♂）的杂交种鸭。其中高

本文于1989年12月26日收到，1990年8月7日修回。

邮麻鸭有从高邮市场购买、高邮种鸭场分群饲养以及高邮种鸭场提供的鸭卵在本室孵化后自养的几种情况；而北京鸭与樱桃谷鸭杂交种鸭系由天津市养鸭场所提供。

2. 鸭血清是以无菌技术自肱静脉或颈静脉放血后获得的全血，经离心分离血清，-70℃保存。鸭肝组织系杀鸭后取肝组织置10%福尔马林组织固定液中4℃保存。

3. 含pBR322及pBR322 DHBV DNA质粒的大肠杆菌均由美国Mason博士所提供。

4. α-^{32}P-dATP购于中国科学院原子能研究院。比活性1000—3000Ci/mmol，放化纯度98%，比浓度为1—1.75mCi/ml。

5. 感染用DHBV DNA阳性血清系随机取5只DHBV DNA阳性鸭，无菌切断颈静脉放血至死，分离血清后，经混合纤维素膜过滤除菌，将5份血清混合，测得病毒含量为1×10^9个病毒颗粒/ml，-70℃保存备用。电镜负染色用DHBV DNA阳性血清的制备方法同前，仅在分离血清后用 CsCl 密度梯度离心提取DHBV-70℃保存。

二、方法

1. DHBV DNA的提取：首先将美国Mason博士赠送的E.coli pBR322和E.coli pBR322-DHBV菌常规接种平板，挑取单个菌落转种L-肉汤增菌培养，然后加入溶菌酶裂解菌体，经苯酚抽提，用乙醇沉淀即获得DHBV DNA。将提取的CHBV DNA 做琼脂糖凝胶电泳，并以 pBR322 DNA 为对照，在紫外检测仪上测定其最终浓度。

2. DHBV DNA探针制备：按 Mason[2]1980年方法，用本室提取的DHBV DNA 片段，通过α-^{32}P-dATP缺口转移技术标记制备探针。在北京产 FT-613自动定标器（北京261厂生产）测试标记探针。探针的同位素参入率为24—38.7%，放射比活为$2.7—7.0\times10^7$cpm/μg DNA，敏感度为DHBV DNA 40 pgn/ml血清。

3. DHBV DNA斑点杂交法检测鸭血清：按郑玉廷等[6]方法，首先将从实验鸭获得的血清每份取50μl，经过加样抽滤板孔点于混合纤维素微孔滤膜上，经变性、预杂交后，用本室制备的α-^{32}P-dATP-DHBV DNA探针杂交。混合纤维素膜经反复用SSC缓冲液洗涤后，置-70℃低温冰箱行放射自显影。

4. 用DHBV DNA阳性血清感染鸭胚：将产卵的雄鸭43只与雄鸭5只按 DHBV DNA 阳性或阴性的情况分成四组（表1）分群隔离饲养。待雌鸭产卵8日后，经挑选将鸭卵入孵。其中第1 组的鸭胚孵化到9日时，用微量注射器注射DHBV DNA阳性血清15μl到鸭胚尿囊腔内，共注射鸭胚30只，或注射生理盐水作为对照，亦注射鸭胚 30 只。注射完毕用加热融化的固体石蜡封住小孔，并立即将鸭胚置39℃继续孵化至28天出壳，用双盲法检测雏鸭DHBV DNA的阳性率。

表1 亲代鸭分组情况

Table 1. Group of parental generation duck

Group 分组	♀ DHBV DNA 数量（只）	♀ Number	♂ DHBV DNA 数量（只）	♂ Number
I	−	20	−	2
II	+	8	+	1
III	−	9	+	1
IV	+	6	−	1

5、电镜下观察DHBV：将DHBV DNA阳性血清用CsCl密度梯度离心提取的DHBV经负染色放大85.000倍观察其形态。

结　果

一、不同鸭群血清中携带DHBV的情况：

用α-^{32}P-dATP-DHBV DNA探针做斑点杂交试验，检测了不同鸭群血清中携带DHBV的情况，结果见表2。在各鸭群DHBV DNA阳性的血清中做电镜检查，均见到病毒颗粒。

各不同鸭群包括天津种鸭场饲养的2—3日龄的北京鸭与樱桃谷鸭杂交种鸭和不同鸭

表2　不同鸭群自然感染DHBV的情况

Table 2. Natural infection of DHBV in several varieties of ducks

鸭种 Varieties	鸭令（日） Age(day)	来源 Source	数量（只） No.	DHBV阳性数(只) No.of DHBV(+)	阳性率(%) Rate(%)	EM
北京鸭(♀)×樱桃谷鸭(♂) PDXCVD	2—3	天津种鸭场 Duck Breeding Farm in Tianjin	98	5	5.1	+
高邮麻鸭 GaoYou duck	1—2	高邮种鸭场 Duck Breeding Farm in Gao You	104	53	51	+
高邮麻鸭 GaoYou duck	120	高邮种鸭场 Duck Breeding Farm in Gao You	53	20	37.9	+
高邮麻鸭 GaoYou duck	100	市场购买 Market	55	18	32.9	+
高邮麻鸭 GaoYou duck	50	实验室自养 Laborstory	17	10	58.8	+

PD: Pekiug Duck　　CVD: Cherry Valley Duck

龄不同饲养条件的高邮麻鸭血清中均检测到了DHBV DNA，电镜下查到了病毒颗粒。图版Ⅰ，1为北京鸭与樱桃谷鸭血清斑点杂交结果（阳性率为5.1%）。图版Ⅰ2为高邮麻鸭血清斑点杂交结果（阳性率在32.7—58.8%）。图版Ⅰ3为斑点杂交阳性的高邮麻鸭血清经CsCl离心后的负染色电镜观察结果。

二、DHBV垂直传播的研究

1、自然垂直传播：由DHBV DNA不同亲代配对所组成的四个组引起的垂直传播情况不同（表3）。

从表3可以说明无论是雌鸭还是雄鸭只要有一方DHBV DNA为阳性，就有自然垂直传播的可能性。

2、鸭胚人工感染：亲代雌雄鸭血清均为DHBV DNA阴性的雌鸭所生卵在孵化到

表3 亲代鸭乙型肝炎病毒感染情况与其垂直传播

Table 3. Vertical transmission of DHBV in several parental generation groups

组别 Group	亲代 DHBV DNA 情况 DHBV DNA of parental generation ♀	♂	雏鸭数(只) No. of duckling	雏鸭DHBV DNA(+)数(只) No. of DHBV DNA(+)	垂直传播率(%) Rate of infection
Ⅰ	−	−	30	0	0
Ⅱ	+	+	24	24	100
Ⅲ	−	+	36	10	28
Ⅳ	+	−	2	2	100

第9天时，经尿囊腔注射DHBV DNA阳性血清和未注射阳性血清而以生理盐水为对照的二者情况完全不同，注射了DHBV DNA阳性血清者到孵出雏鸭时DHBV DNA阳性率达83.3%，而注射生理盐水者到孵出雏鸭时DHBV DNA阳性率为0%（表4）。且注射DHBV DNA阳性血清者孵出雏鸭的血清于电镜下观察到病毒颗粒（图版Ⅰ4）。

表4 鸭胚尿囊腔注射DHBV DNA(+)血清后的DHBV感染率

Table 4. Rate of DHBV infection in duck embryos by allantoic inoculation of DHBV(+) serum

注射DHBV DNA(+)血清 inoculation of DHBV(+) serum	注射鸭胚数(只) No. of inoculated embryos	雏鸭DHBV DNA(+)数(只) No. of duckling DHBV DNA(+)	人工感染率(%) Rate of vertical transmission
+	30	25	83.3
−	30	0	0

讨 论

为研究DHBV的感染和传播情况，我们采用了DHBV DNA分子杂交、电镜观察等几种方法发现DHBV DNA阳性血清在电镜下均可见到病毒颗粒，DHBV的病毒颗粒呈圆形或椭圆形，直径约为40—55nm，有的为实心颗粒亦有空心颗粒，与Mason及周翊钟等[2,3,7]报道的DHBV形态相似。在抗原抗体系统尚未建立的情况下，DHBV DNA分子杂交的方法操作简便、灵敏度高、特异性强、可同时检测大量标本，因而作为检测DHBV的首选方法，如阳性则表示有感染。

日本学者[7]以及我国学者早已注意到我国鸭群中DHBV感染率有地区分布差异。我国瞿涤等[8]研究了7个不同鸭种DHBV感染率各不相同，其中高邮麻鸭和绍兴麻鸭的感染率最高，分别为50%和55%。我们的研究结果表明：天津种鸭场孵化的北京鸭(♀)与樱桃谷鸭(♂)杂交种雏鸭DHBV DNA阳性率为5.1%，而高邮麻鸭随鸭龄的不同DHBV DNA阳性率有差异，在32.7—58.8%之间，说明不同鸭群、鸭龄及饲养条件均可影响鸭的带毒率。

许多学者证实DHBV的主要传播途径为垂直传播[8-11]。我们将DHBV DNA不同的亲代配对组成四个组，分群隔离饲养，观察产卵后再孵出的雏鸭DHBV DNA的阳性率，

第一组（♀－♂－）为0%，第二组（♀＋♂＋）为100%，第三组（♀－♂＋）为28%，第四组（♀＋♂－）为100%，说明在传播中垂直传播是主要的，而在自然垂直传播中雌雄鸭均起作用，可能雌鸭起的作用更大，但因第四组鸭数太少，尚不能肯定。在人工感染的研究中，将亲代雌雄鸭DHBV DNA均阴性的雌鸭产的卵孵化到第9天，经尿囊腔注射1×10^9病毒颗粒/ml 10μl的血清或注射10μl生理盐水，孵出雏鸭时注射DHBV者DHBV DNA的阳性率达83.3%，而注射生理盐水者0%，与国内的报道相似[11]。

DHBV的实验性感染可以一日龄雏鸭[5]或正在发育中的鸭胚为材料[12]。Mason等曾把DHBV阳性血清接种到15日龄鸭胚的静脉内，孵出一日龄雏鸭血清DHBV DNA阳性率达75%，而本实验采用9日龄鸭胚尿囊腔接种，孵出2日龄雏鸭血清的DHBV DNA阳性率达83.3%，且操作简便，感染效果亦佳。由此可见，把DHBV接种至鸭胚的尿囊腔是快速有效的感染实验途径。

我们认为，以高邮麻鸭胚作为DHBV感染的实验模型是可行的，特别是在垂直传播的研究中更为有利。DHBV感染鸭后对研究嗜肝病毒，特别是HBV感染、致病机理、筛选抗病毒药物都是非常重要的，目前尚有许多问题需要进一步研究。

参考文献

〔1〕 Gust ID et al, 1986, *Intervirology*, 25(1): 14.

〔2〕 Mason WS et al, 1980, *J Virol*, 36(3): 829.

〔3〕 周翔钟等：1980，上海医学，3(11)：1，

〔4〕 O'connell AP et al, 1983, *Proc Narl Acad Sci USA*, 80(6): 1703.

〔5〕 Marion PL et al, 1984, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(3): 898.

〔6〕 郑玉廷等，α-^{32}p-DHBV DNA探针制备及其应用（未发表）.

〔7〕 Omata M et al, 1983 Gastroenterology, 85(2): 260

〔8〕 翟涤等，1987，上海医科大学博士研究生毕业论文，

〔9〕 Halpern MS et al, 1983, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(15): 4865.

〔10〕 钱耕孙等，1986，肿瘤，6(4)：163.

〔11〕 Tsiquaye KN et al, 1985, *Hepatology*, 5(4): 622.

〔12〕 Mason WS et al, 1983, *Virol*, 131(2): 375.

A Study on Natural Infection and Vertical Transmission of DHBV in Ducks

Li Qiu-xiang Zheng Yu-ting Li Dong-tian Tian Jin-xia
Zhang Hao Wang Li-Jun Ren Zhong-yuan
(Department of Microbiogy, Tianjin Medical College, Tianjin 300070)
Li Bo-shao Zhang Sheng-fu
(Duck-breeding farm, Gaoyou county, Jiang Su Province 225601)

DHBV in duck serum is assayed by α-^{32}P-DHBV DNA probe hybridization. It is found that the rate of DHBV viremia in hybrid from Beijing duck and Cherry valley duck was 5.1%, whereas in Gauyou local ducks was 32.7—58.8%. Positive sera are confirmed by EM. The virion of DHBV is characterized. Ducks are divided into four groups. The rate of DHBV viremia in the ducklings hatched from different groups is detected. Group 1 (F^-, M^-) is 0%, Group 2(F^+, M^+)100%, Group 3(F^-, M^+)28%, and Group 4 (F^+, M^-)100%. By allantoic route inoculation of DHBV 1×10^9 virion/ml for 10μl to 9-day old duck embryos from group 1, the rate of DHBV viremia in these hatched ducklings is 83.3%.

Key words: Duck hepatitis B virus Natural infection Vertical transmission