

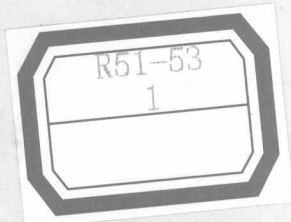
河南省医学会第二次感染病学术会议

论文汇编



河南省医学会

二〇〇二年八月·安阳



4140272744

目 录

· 专题讲座 ·

1. 病毒性肝炎预防和治疗有关进展..... 江河清(1)
2. 肝纤维化发生机理研究进展..... 武淑环(3)
3. 重视重型肝炎抗感染治疗的研究..... 申德林等(7)
4. 乙型肝炎病毒(HBV)S 基因'a'决定簇系列突变
克隆建立及其表达蛋白抗原性分析..... 余祖江等(8)
5. 树突状细胞疫苗及其在抗 HBV/HCV 免疫中的作用..... 王全楚等(12)
6. 氧化苦参碱对小鼠肝细胞凋亡相关基因
bcl-2、bax 表达的影响..... 江河清等(17)
7. 551 例肝脏活检病理检查与临床研究..... 王松贤(20)
8. HCV 酶切基因分型及其与干扰素治疗研究进展..... 许青田等(21)
9. 血源感染艾滋病 46 例临床表现..... 李继忠等(25)
10. 慢性重型肝炎并发多脏器功能失常综合征成因及防治探讨..... 刚光霞等(28)
11. 慢性乙型肝炎病理分级与临床关系的初步研究..... 尚建中等(29)
12. 1000 例病毒性肝炎患者甲胎蛋白检测分析..... 安敬军等(32)
13. 促肝细胞生长素联合胸腺肽、苦参碱治疗
慢性重症乙型肝炎的疗效观察..... 孙长宇(34)
14. 综合序贯疗法治疗乙型重症肝炎 689 例疗效分析..... 焦栓林等(36)
15. 肝炎肝硬化并自发性腹膜炎 32 例分析..... 丁汉元(39)

· 肝病的诊断与治疗 ·

16. 博尔泰力注射液治疗慢性乙型肝炎 30 例疗效观察..... 韩宝英等(41)
17. 丙型肝炎病毒 5' - 非编码区与 NS 5b 区酶切基因分型对比研究..... 许青田等(42)
18. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的 MYDD 变异与临床研究..... 焦栓林等(44)
19. 乙型肝炎患者血清 HBV DNA 与 HBV - M 关系的探讨..... 武艳霞等(46)
20. 一氧化氮与病毒性肝炎肝损伤关系探讨..... 肖景保等(48)
21. 膦甲酸钠抗乙肝病毒近期疗效观察..... 李 晖等(49)
22. 博尔泰力注射液治疗不同病理类型慢乙肝 58 例..... 李太平等(51)
23. 肝硬化患者血浆及腹水细胞因子水平研究..... 韩大正等(52)
24. 老年人肝硬化腹水并发低钠血症 30 例临床分析..... 冯亚珍(54)
25. 心得安、长效硝酸甘油联合大黄蛰虫丸治疗
肝硬化后门脉高压疗效的观察..... 李晓菲等(57)
26. HBc - IgM 阳性与重症肝炎进展关系的初步分析..... 余祖江等(58)

27. 血清标记物联合检测对肝纤维化组织学分期诊断价值研究	韩大正等(60)
28. 乙型肝炎后肝硬化合并上消化道出血 76 例治疗总结	孙长宇(63)
29. 拉米夫定治疗乙肝后肝硬化疗效的观察	张怀宏等(64)
30. 不同血型肝病患者免疫功能研究	程书权(65)
31. 原发性肝癌 32 例尸检分析	赵根成等(69)
32. 肝硬化患者血脂代谢变化的临床分析	朱丽君等(71)
33. 博尔泰力注射液联合拉米夫定治疗慢性乙型肝炎临床疗效观察	刘朝阳等(72)
34. 苦参素治疗肝硬化伴脾功能亢进 69 例疗效观察	焦桂林等(74)
35. 中西医结合治疗肝硬化 120 例临床观察	徐江海等(76)
36. 拉米夫定在顽固性低白蛋白血症肝硬化患者中的疗效观察	谷军生等(77)
37. 荧光定量 PCR 与普通定性 PCR 检测 乙型肝炎血清 HBV DNA 结果的比较	许青田等(79)
38. 慢性肝病肝纤维化程度与周围血细胞计数的关系	赵根成等(82)
39. 膦甲酸钠和 α -干扰素联合治疗慢性乙型肝炎疗效观察	张宪华等(83)
40. 重型肝炎的低磷血症	韩明光(85)
41. 116 例重型肝炎预后影响因素临床分析	许青田等(87)
42. 免疫组化检测非病毒性肝炎人群肝组织经输血传播病毒(TTV)	许德军等(92)
43. 18 例 HBsAg 阴性 HBeAg 阳性乙型肝炎临床分析	崔中锋等(94)
44. 用 HD-91-II 型肝病治疗仪治疗活动性肝硬化的疗效观察	卫锦秀等(95)
45. 62 例梗阻性黄疸误诊为病毒性肝炎临床分析	胡学基等(97)
46. 苦黄注射液治疗黄疸型病毒性肝炎疗效观察	武俊(98)
47. 苦参素联合拉米夫定治疗慢性乙肝疗效观察	何玉洁等(101)
48. α -2b 干扰素联合拉米夫定抗乙肝病毒疗效观察	李淑森等(102)
49. 抗结核药物引起肝损害 172 例临床分析	何建才等(104)
50. 苦参素在肝病抗病毒治疗中升白细胞作用临床观察	袁翠云等(106)
51. 不同方法治疗慢性乙型肝炎的疗效比较	原志远(108)
52. 胸腺肽联合甘利欣治疗慢性乙型肝炎	王健生等(109)
53. 乙型肝炎病毒不同血清学标志与 HBVDNA 含量的关系的研究	尚建中等(110)
54. 苦参碱联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎 48 例	陈海燕(113)
55. HBsAg 与抗-HBs 同时阳性乙型肝炎 56 例临床分析	许青田等(114)
56. 硫普罗宁治疗酒精性肝病的疗效观察	王坤铎(115)
57. 中西医结合治疗老年淤胆型戊型肝炎 36 例	王颜斌(116)
58. 安阳市铁西区征兵体检 HBsAg 检测分析	王素玲(117)
59. 芪蛇乙肝胶囊联合苦参素治疗慢性乙肝的疗效观察	付菊平(118)
60. 浅谈临床重用丹参治疗慢性肝炎	王长顺(120)
61. 慢性乙型肝炎病人心理治疗的临床研究	韩志启等(120)
62. 慢性重型肝炎的诊断及治疗	郭焦枝等(122)
63. HD-91-II 型肝病治疗仪治疗急慢性病毒性肝炎 60 例临床观察	徐丽娟等(123)
64. 经皮注射冰醋酸治疗原发性肝癌	申德林等(125)

65. 河南油田 2000 年度莱姆病治疗的临床评价.....	赵林端等(127)
---------------------------------	-----------

· 杂病 ·

66. 双歧杆菌口服液治疗婴幼儿腹泻 58 例疗效观察.....	魏素云等(130)
67. 霍乱 177 例临床分析	杨 莹等(131)
68. 安阳地区乙型脑炎病毒感染情况调查	王 瑜(133)
69. 双歧口服液佐治婴儿肝炎综合征 38 例疗效观察.....	宋朝阳(134)
70. 流行性出血热合并肝功能损伤 44 例分析.....	马玉宝(135)
71. 胶体金标记免疫层析法快速诊断霍乱临床研究	许青田等(136)
72. 麻疹 177 例临床分析	刘春礼等(138)
73. 胸腺肽联合干扰素治疗复发性尖锐湿疣疗效观察	韩志启等(140)
74. 白介素(IL-2)治疗复发性尖锐湿疣 47 例观察	许海生等(141)
75. 淋球菌(GC)反复感染危险因素分析	韩志启等(142)
76. 艾滋病 25 例临床分析.....	秦守杰等(143)
77. 肾综合征出血热急性肺水肿的早期观察与处理	徐艳云(144)
78. 细胞分析仪测定血小板计数结果分析	阎 艳(146)
79. 控制胃镜及附件交叉感染的措施及体会	吴 宁(146)
80. 病毒性肝炎并发溶血性贫血 5 例分析	韩志启等(149)
81. 水痘合并水痘肝炎一例报告	武艳霞等(151)
82. 典型水痘脑炎一例报告	武艳霞等(151)
83. 水痘并发急性再生障碍性贫血一例报告	武艳霞等(152)
84. 原发性血小板减少性紫癜应用激素合并水痘 1 报道	许青田等(153)
85. 白塞病误诊 2 例	杨红兵等(153)
86. 4 例医护人员感染 HIV 情况分析	何 云等(154)
87. 急性甲型肝炎并发脑膜炎 1 例	许青田等(155)
88. 腹腔巨大囊肿误诊为结核性腹膜炎 2 例分析	王灵菊等(156)
89. 分娩诱发急性粟粒性肺结核 5 例临床分析	杨 俊等(157)
90. 坏死增生性淋巴结病误诊为颈淋巴结结核 3 例	程书权等(158)
91. 一例气管切口处四种混合菌的分析	马玉娥(159)
92. 1 例高敏体质重型肝炎的护理	王焕枝等(160)
93. 慢性庚型肝炎伴脂肪变性 1 例报告	张宪华等(162)
94. 肝淤血继发于右心衰误诊 1 例	闫 冬(163)
95. 一例流行性脑脊髓膜炎严重瘀斑坏死的观察与护理体会	李秀芝等(163)
96. 破伤风感染方式临床探讨	许青田等(165)
97. 440 例艾滋病热线电话分析	顾丽芳等(167)

· 护理 ·

98. 社区护理势在必行——社区护理对慢肝患者遵医行为的干预	王璞洁等(168)
99. 老年肝病健康教育的实施与体会	王静玲等(170)

100. 肝硬化并发自发性细菌性腹膜炎的护理.....	赵运清等(172)
101. 慢性乙型病毒性肝炎患者健康教育实施体会	李艳云等(173)
102. 肝炎肝硬化患者出院指导	赵运清等(174)
103. 静脉输液中的微粒污染的护理对策	曹美丽等(176)
104. 重型病毒性肝炎并发症的观察及护理.....	段海叶等(177)
105. 急诊病人的心理状态及护理对策.....	秦艳峰等(180)
106. 成人麻疹患者增多的原因对策及护理.....	李玉玲等(181)
107. 肾综合征出血热的临床观察及护理.....	姚兰琴等(183)
108. 肝病合并糖尿病患者的健康指导	郑秀玲(185)
109. 慢性重症肝炎的护理体会.....	赵玉红(186)
110. 临终期肝癌病人实行临终关怀的体会	康巧玲(188)
111. 如何对肝炎病毒造成的污染进行消毒处理.....	路军芬等(190)
112. 艾滋病患者营养不良分析及护理.....	王焕枝等(191)
113. 病毒性肝炎病人的健康教育.....	邵玉芬等(192)
114. 传染科护士的职业危险因素及防护对策.....	刘占英(194)
115. 住院病人无效健康教育探因及对策.....	周秀英(196)
116. 26 例慢重肝病病人的护理体会	王玉玲(197)
117. 心理疏导在肝脏穿刺术中的应用.....	李艳芳等(198)
118. 肝病治疗仪治疗急慢性病毒性肝炎的临床观察及护理.....	张润莲等(200)
119. 重型肝炎出血抢救的护理体会.....	郝红梅等(202)
120. 乙型肝炎病人出院健康教育体会.....	魏巧霞等(203)
121. 乙型肝炎病毒 DNA 含量与血清标志物的对比分析	赵翠林等(204)
122. 与 HBeAg 血清学转换有关的协变因素	孙爱民等(206)
123. 流脑病历报告分析.....	张爱玲(208)
124. 胸腺肽 al(日达仙)治疗重症肝炎 6 例.....	吴 莹(209)
125. 重组生长激素治疗重型病毒性肝炎的临床观察.....	李伟红(210)
126. 胸腺肽辅助治疗糖尿病合并肺结核疗效观察.....	朱喜增(211)
127. 拉咪呋啉治疗乙肝后肝硬化失代偿期疗效观察.....	朱喜增等(213)
128. 拉米夫啉治疗慢性乙型肝炎临床观察.....	冯慧芬等(214)
129. 围产期母婴传播 HBV 的临床研究—附 41 例病例分析	张淑凤等(215)

1. 病毒性肝炎预防和治疗有关进展

郑州大学第一附属医院感染科 江河清

病毒性肝炎在预防和治疗的研究领域中已取得了长足的进展。现综述如下

一、病毒性肝炎的预防

免疫预防是人类最终控制肝炎病毒的主要途径甲肝疫苗和乙肝疫苗的研制成功及应用,显著改变了肝炎病毒流行的模式。丙型肝炎疫苗和戊型肝炎疫苗也进行了许多有益的尝试,但还有许多关键问题有待研究。Xu等总结了我国减毒甲肝疫苗接种策略和保护的效果,甲肝疫苗的保护率为97.5%,3年后下降到75%,3年内的保护效果没有明显的改变。该疫苗对暴露HAV感染后的机体和亚临床感染没有保护作用,婴儿从母体获得甲肝抗体可以持续18个月,因此小于18个月的婴儿不需要进行免疫,甲型肝炎流行率低,不仅与免疫预防接种有关,而且与人们的生活水平的提高密切相关。

全球大约有3.5亿人有慢性乙型肝炎病毒感染,其中约75%分布在亚太地区每年死于慢性肝脏疾病人数为200万,占疾病死因的第9位。母婴垂直传播和其他形式的接触传播是主要的传播形式。成人存在性传播和静脉注射途径的传播,某些地区不洁注射是HBV传播的主要途径。控制HBV感染流行的措施包括改变不洁注射行为,乙肝疫苗接种和对于暴露HBV人群的乙型肝炎免疫球蛋白联合乙肝疫苗的接种。在中国1992年开始进行新生儿的乙肝疫苗计划免疫接种,目前全国3剂乙肝疫苗接种的覆盖率平均为70.7%。在接受3剂乙肝疫苗接种的儿童中,有38.9%是在出生后24h内接种第一剂。在乙肝疫苗覆盖率90%以上的地区,HBsAg阳性率从乙肝疫苗接种前普通人群的10%下降到10岁以下儿童的1%以下。7-9岁儿童HBsAg阳性高峰消失,在乙肝疫苗接种儿童人群中乙型肝炎的发生率为1.6/10万,与1985-1987年乙肝疫苗接种前的乙型肝炎发生率相比下降91.3%。有力的证实了乙肝疫苗接种在控制HBV感染流行中的重要作用和效果。

HCV还可以在中枢神经系统中进行复制,这也可能是病毒持续存在的原因之一。对于单卵生和双卵生的个体进行HBV感染易感性的比较,阐明了HBV感染存在遗传易感性问题。人体染色体中存在着HBV的易感基因。以往的概念人为随着血清中HBsAg的清除,HBVDNA也同时阴转。但是,随着多聚酶链反应(PCR)技术的应用,证实一部分HBsAg消失的HBV感染者,血清或肝组织中仍然存在着HBVDNA。这种情况称为隐匿性或潜伏性HBV感染,即HBsAg阴性的HBV感染。有些研究结果表明这些隐匿性HBV感染属于前-S/S基因突变HBV感染。但大多数情况下是野生株HBV的感染。由于隐匿性HBV感染的存在,带来了一系列的问题,例如可能逃脱献血员的筛查,造成输血传播,造成肝移植后HBV再感染在免疫受损宿主引起急性肝衰竭。隐匿性HBV感染,尤其合并HCV感染依然具有发展为肝细胞癌的可能。另外隐匿性HBV感染在暴发性乙型肝炎,慢性乙型肝炎的进展以及治疗反应等方面都具有十分重要的作用。

戊型肝炎病毒(HEV)感染引起自限性肝脏疾病,可引起孕妇死亡率增加,这在其他肝

炎病毒感染中是少见的。戊型肝炎在发展中国家的流行率相对较高。目前还没有可靠的 HEV 培养系统来进行 HEV 疫苗的研究,因此 HEV 疫苗研究主要集中在大肠杆菌和昆虫细胞表达的重组蛋白方面。

二、病毒性肝炎的治疗的有关进展

1、病毒性肝炎的免疫治疗

诱导细胞免疫应答(CMI),即细胞毒 T 细胞(CTL)免疫应答的多肽疫苗是近年来抗 HBV 治疗性疫苗研究的重点之一。95% 的新生儿和 5% 的成年人在急性感染 HBV 以后,不能产生针对 HBV 的免疫应答,特别是针对 HBV 的 CMI,这是慢性 HBV 持续感染的重要免疫学基础。目前的重组蛋白疫苗因为应用铝作为免疫佐剂,主要诱导体液免疫应答,而细胞免疫和 Th1 型细胞因子的产生缺如,因此并不适宜作为以 CMI 缺陷为主要机制的慢性 HBV 感染的治疗。

由中国仓鼠卵母细胞(CHO 细胞)表达的包括前-S2 和 S 的重组疫苗,应用铝制剂作为免疫佐剂,这种新型的疫苗进行治疗临床研究时,病人血清中 HBVDNA 含量下降 30-59%,但没有引起免疫逃逸突变株的产生。这一治疗结果与前-S2 区所含有的 T、B 淋巴细胞位点有关。HBsAg-抗-HBs 免疫复合物可以通过 Fc 受体途径激活抗原递呈细胞,发挥治疗作用,这在动物模型和临床研究中都得到了初步证实。由于经典的铝制剂不能有效的诱导 CMI,因此近年来尝试了许多的新型免疫佐剂,以其探索新型的治疗型的疫苗。

T 细胞多肽疫苗,就是根据 T 细胞抗原表位合成的多肽,例如 HBcAg 的 18-27aa 多肽可以诱导 HBV 特异性 CTL 应答,可能具有一定的临床应用前景。从 20 世纪 90 年代发展起来的基因疫苗也是 HBV 感染免疫治疗的重要方向。

2、病毒性肝炎的基因治疗

从肝细胞感染肝炎病毒获得了肝炎病毒基因这一角度来讲,病毒性肝炎可以看作是异常基因表达的遗传性疾病,如果病毒性肝炎可以看作是一种获得性单基因遗传病,因此可以考虑应用基因治疗的技术进行治疗。病毒性肝炎基因治疗的策略包括:第一,阻断肝炎病毒基因的表达或功能。其中包括阻断病毒基因与转录因子蛋白之间的结合,即复制陷阱策略,反义 DNA 与 DNA/RNA 形成 DNA 三聚体或 DNA/RNA 异二聚体,切割肝炎病毒 RNA 分子核酶,反义 DNA 与 RNA 结合阻断基因的翻译,负显形突变体或干扰多肽的表达,以及由单链抗体介导的所谓的细胞内的免疫基因治疗策略等。第二,治疗性基因疫苗的研究。因为肝炎病毒抗原的表达载体的基因免疫策略不仅诱导体液免疫,而且还能诱导细胞免疫,因此是治疗性免疫途径的主要研究方向。

3、骨髓造血干细胞是肝细胞的来源

骨髓造血干细胞被认为是多潜能干细胞,能分化为多种细胞。Mitaka 认为从啮齿类动物和人类骨髓分离出来的细胞分化成卵圆形的是肝干细胞和肝细胞。净化的造血干细胞对于遗传性酪氨酸血症的小鼠有替代原代肝细胞的功能。Theise 等研究了来自男性骨髓供体的女性患者和 4 例来自女性供体的男性原位肝移植患者,经细胞角蛋白免疫组化和 x、Y 染色体原位杂交分析,认为肝细胞来源于肝外循环的肝细胞。Petersen 等也证实骨髓干细胞有形成上皮细胞的能力,其所在研究中心认为骨髓细胞除了可以导致两种组织细胞的产生(制造骨髓和肌肉的间叶细胞和组成血管内层的内皮细胞),还可以导致产生制造实体器官的上皮细胞,包括肝细胞。研究人员用鼠作实验,用骨髓细胞成功地为肝脏受损的鼠进行了修

补。这个发现为需要修补或更换肝脏的患者带来了新的希望。如果人类的临床实验成功,便可以培养骨髓细胞储存,然后用基因治疗方法为肝脏患者修补有缺陷的肝脏或用来防止滤过性毒菌的感染,移植这些细胞给患者并不造成排斥,又可以减少不必要的肝脏移植手术。Theise 等的新发现;人类骨髓原来是肝细胞的来源。当机体需要时,骨髓内的肝细胞可以被调动到肝脏,发挥着肝细胞的功能。这是科学家首次在人类身上证实这个过程。此发现对治疗肝脏疾病有很大帮助,例如可以利用肝细胞来重建肝组织,用来帮助肝脏移植患者,用来制造人工肝等。

4、肝干细胞为肝细胞移植和生物人工肝提供一种新的肝细胞来源

肝干细胞,又称肝卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC),在体内可分为肝细胞或胆管上皮细胞。目前 HOC 的分离技术及肝细胞移植技术已为肝病治疗带来了希望。

肝干细胞(hepatic stem cell, HSC)来源于前肠内胚层,在胚胎发育过程中,以肝细胞的形式存在,在成年哺乳动物中以小卵圆形细胞的形式存在于终末小胆管,又称 HOC 或肝前体细胞,起特点是胞体小,核大而胞质少,呈卵圆形并具有特殊的表面标志。这种细胞以往被认为是“小上皮细胞”,“胆管反应”,和“小胆管”。HOC 具有双向分化增殖潜力,可分化为肝细胞或胆管上皮细胞。在分化为成熟肝细胞前,HOC 先分化为嗜酸性小肝细胞即过渡肝细胞随着 HOC 分离和培养技术的成熟,HSC 工程将成为一个新兴的肝细胞研究领域,为肝病患者的治疗带来新的福音。

HSC 或起源与他们的肝细胞的移植将来可用于治疗急性肝衰竭,以改善其肝功能。移植部位的选择对移植肝细胞的植入和存活至关重要;有报道移植入腹腔,移植细胞在 3 天内坏死;而移植入动物脾脏或通过门静脉灌注及同时植入脾和肝内,可使移植的肝细胞长期存活,这为慢性肝病患者的治疗带来了希望。

HSC 的分离和培养为解决肝细胞移植的细胞来源提供了一个新的思路。

最近有报道骨髓造血肝细胞可转为肝细胞它将为肝细胞移植和生物人工肝提供一种新的肝细胞来源。

HSC 的研究是当前的热点,其涉及到:胚胎前体双潜能 HSC;成年肝细胞(也被认为是单潜能定向干细胞);卵圆细胞(一种非实质多潜能 HSC);造血干细胞(具有多向分化潜能的造血干细胞)。它将为肝细胞移植和生物人工肝提供一种新的肝细胞来源。通过体外基因修饰卵圆细胞,再移植给有基因缺陷的肝脏,使其转成正常功能的肝细胞,可用于治疗一系列肝脏代谢或病毒性疾病。用胚胎干细胞进行性操作,通过细胞移植进行治疗,是一种基于核移植技术的治疗性克隆策略,在科学上,伦理上和法律上都是可行的新思路。并有可能以此进一步获得肝脏等组织工程器官。

2. 肝纤维化发生机理研究进展

郑州大学第一附属医院感染科 (450052) 武淑环

肝纤维化的形成和发展是一个多因素相互促进、相互制约的过程,其实质是由于胶原和

细胞外基质的合成与降解失衡。肝星状细胞是细胞外基质的最主要来源,而各种细胞因子参与肝星状细胞的激活和控制,最后导致肝脏内纤维结缔组织增生而致肝纤维化,并可发展为肝硬化。目前对肝纤维化及其发展的研究已从细胞水平进入分子水平,越来越多学者认识到,肝纤维化是可逆的。早期诊断和防治对阻止肝纤维化发展具有重要意义。

一、非实质肝细胞在肝纤维化发生机制中的作用

肝脏由实质细胞(肝细胞)和非实质细胞或间质细胞组成,后者包括肝星状细胞(Stellate cells, SC)、枯否细胞(Kupffer cells, KC)、肝窦周围的窦内皮细胞(Sinusoidal endothelial cells, SEC)和 Pit 细胞。它们都从不同角度、不同程度与肝纤维化的形成有关。

(一)肝星状细胞,有多称名称,如贮脂细胞、Ito 细胞、窦周细胞等,位于肝内窦周间隙,即 Disse 腔隙,约占肝内细胞总数的 5%~15%,在正常肝脏中,肝星状细胞与肝细胞数量之比为 1:20,占肝体积 1.4%。其主要功能是储存和代谢维生素 A,合成与分泌少量的细胞外基质(ECM)及有一定的产生胶原酶的能力。在肝损伤时,肝星状细胞能合成除 V 型胶原外的几乎所有的 CM 成分。目前认为,肝细胞坏死的刺激能激活肝星状细胞并使之增殖。在急性肝损伤时,肝星状细胞增殖后表型发生改变,转为移行细胞,合成基质蛋白以利组织修复。然后,当解除时,细胞表型回复,且可能由于凋亡作用,细胞数量也恢复正常。在慢性肝损伤时,肝星状细胞持续增殖,细胞数量大增,显著的表型变化使之转变成肌纤维母细胞,后者为产生 ECM 的主要细胞,对肝纤维化的形成起主要作用。

(二)肝枯否细胞 是肝脏的巨噬细胞,是巨噬细胞中最大的群体,占总数的 80%~90%,占肝细胞数的 15%,位于内皮细胞的窦腔面或游离于窦周间隙内。肝枯否细胞是防御抗原经门静脉系统进入宿主的第一道防线。也是肝脏抵抗细菌、内毒素血症及病毒感染的主要屏障。肝枯否细胞参与肝纤维化,主要是通过释放一些细胞因子和炎性介质如 TGF β (转化生长因子 β)、IL-1(白细胞介素 I)、PAF(血小板活化因子)等炎性介质作用于肝星状细胞或其他细胞而发生“激活作用”。在肝纤维化机制中,对肝星状细胞的激活是肝纤维化形成的必要条件,而枯否细胞则是肝星状细胞活化的先决条件。目前认为,肝纤维形成的中心通路是肝细胞损伤或坏死的刺激而激活枯否细胞,后者活化后分泌细胞因子再激活肝星状细胞并产生 ECM 及 TGF β 刺激肝内皮细胞产生 ECM,进而激活肝星状细胞。

(三)肝窦内皮细胞 是肝窦壁的主要细胞,占肝脏非实质细胞总数的 44%。该细胞参与了肝脏至全身的血液动力学及代谢过程,作为一种选择性屏障,对于肝细胞功能的正常发挥不可缺少。由于内皮细胞的吞噬功能,它在糖蛋白、乳清蛋白、脂蛋白、白蛋白和透明质酸的转化分解代谢中起着重要作用。肝窦内皮细胞因缺血、缺氧及病毒感染或间质 ECM 沉积压迫时,可出现肿胀、坏死、使肝窦变窄、致肝细胞血流供应减少,从而诱发或加重肝细胞损伤。另外受损或肿胀的内皮细胞容易被淋巴细胞,血小板及枯否细胞粘附并释放各种细胞因子或炎性介质,如 PDGF、PAF、HGF、内皮等,IL-1、IL-6、IL-8 等,损伤邻近的肝窦内皮细胞,也可使此细胞上的小孔收缩,影响肝脏的血液循环,从而加重肝脏微循环障碍或激活肝星状细胞合成 ECM 等物质。

(四)Pit 细胞 是肝脏中具有自然杀伤活性的大颗粒淋巴细胞。用免疫电镜细胞化学技术证明分离的肝脏 Pit 细胞表面具有 NK 细胞的抗原 DXg 或 CDg 分子。由于 Pit 细胞缺乏吞噬活性和过氧化物活性,而不同于外周血中的单核细胞和淋巴细胞。Pit 细胞主要位于肝血窦周围,其功能①低密度 Pit 细胞能识别和杀伤肿瘤细胞、具有抗肿瘤或防止肿瘤细胞

转移能力。②抗病毒作用。③在小鼠作部分肝叶切除的早期,发现有 Pit 细胞的增多,推测它可能参与肝细胞损伤后的再修复调节过程。④Pit 细胞尚能影响巨噬细胞、内皮细胞、T 淋巴细胞和 B 细胞的增殖分裂,调节免疫反应。

二、细胞因子在肝纤维化中的作用

细胞因子(Cytokine)是指细胞分泌的能调节细胞功能的小分子多肽。在体内,细胞因子对于细胞间的相互作用,细胞的生长和分化有重要调节作用。随着分子生物学技术的不断进步,已证实有不少细胞因子与肝纤维化的形成有密切关系。参与肝纤维化机制的细胞因子有,转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-I(IL-I)。

(一)TGF- β_1 在肝纤维化中的作用可以概括为:①刺激蛋白多糖(PG)和纤维连接蛋白(FN)合成与排泄;②降低 ECM 蛋白酶的活化、胶原酶的活性和 PG 的降解;③提高 PDGFmRNA 和细胞粘附受体的表达;④使成纤维细胞和血内单核细胞发生趋化作用。

(二)PDGF 为 30KD 的二聚体蛋白,是一种重要的促分裂剂,能刺激多种细胞分裂和增殖,如成纤维细胞,平滑肌细胞、肝星状细胞、胚胎细胞等。只有活化的肝星状细胞才能表达 PDGF 受体,静止期无此受体。外源性 PDGF 可使培养的纤维母细胞增殖,合成大量 EM,这一作用可被 PDGF 受体阻断。在慢性肝病中,肝细胞变性、坏死/或肝组织的慢性炎症均可持续的释放 PDGF,刺激肝星状细胞活化和增殖,而活化的肝星状细胞又能分泌 PDGF 并过量表达相应受体,从而导致胶原等 ECM 过量产生和沉积,促进肝纤维化的发生和发展过程。巴证实静止期的肝星状细胞无 PDGF 的受体表达,只有活化的才表达 PDGF 受体,PDGF 可使肝星状细胞合成 DNA 增加 18 倍,也是肝星状细胞 DNA 合成及细胞增殖作用中最有效的一种有缘分裂源。

(三)TNF- α 主要有单核巨噬细胞产生,生物学作用包括抗肿瘤的细胞毒作用之外,还参与免疫调节及机体代谢。近年来发现 TNF- α 可以抑制纤维母细胞胶合成,并呈浓度和作用时间的依赖性,能对抗 TGF- β_1 引起的 I 型前胶原 mRNA 水平的升高,但不影响细胞增殖和非胶原的合成。TNF- α 在各种肝病时均有升高,特别是急性肝细胞变性、坏死、慢性肝病急性加重时更为明显。体外实验证实 TNF- α 可增加 TGF- β_1 刺激肝星状细胞合成 ECM 增加。

(四)IFN- γ 为分子量 21-24KD 的单体糖蛋白。对 I、III 型胶原的合成有影响,使培养的成纤维细胞胶原产量下降,其作用部分发生前胶原 mRNA。在培养激活的肝星状细胞中加 IFN- γ (1000u/ml)能明显抑制其细胞增殖和活化。实验证明,IFN- γ 分别降低 I 型胶原、IV 型胶原和 FNmRNA 水平,提示 IFN- γ 是一种有效的肝星状细胞活化抑制剂,并可能对肝纤维化损伤有帮助。

(五)IL-1 曾称为淋巴细胞激活因子,低浓度主要在局部起免疫调节作用,高浓度作用于全身,表现出与高浓度 TNF 相类似的生物活性。IL-I 其特殊的生物活性是促进纤维母细胞和肝星状细胞的增殖,胶原蛋白的合成增加,导致 ECM 产生增加。另外 IL-1 还能刺激 TNF- α 和 TGF- β_1 的合成。

三、细胞外基质与肝纤维化

ECM 主要包括胶原、非胶原糖蛋白及蛋白聚糖。其来源可归纳为:(1)肝细胞分泌 I、III、IV、V 型胶原,纤连蛋白,蛋白聚糖;(2)HSC 可分泌 I、III、IV 型胶原,层连蛋白,蛋白聚

糖;(3)血窦内皮细胞分泌Ⅳ型胶原、纤连蛋白;(4)门脉区成纤维细胞分泌Ⅰ型胶原;(5)枯否细胞可分泌胶原酶。正常情况下,肝细胞分泌的一半的胶原,并产生血浆纤连蛋白,但在肝纤维化时,一般认为主要是HSC被细胞因子激活转化为肌成纤维细胞,分泌Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原,细胞性纤连蛋白及层连蛋白。近年来研究表明,ECM包括更多的内容和成分。近年来研究表明,ECM包括更多的内容和成分,其组成影响HSC激活的程度及其对调节因子的应答性。持续增加胶原、纤维蛋白和蛋白聚糖使HSC保持持续的激活状态。

(一)胶原和胶原蛋白 胶原蛋白占人体蛋白总量的三分之一,在肝脏占蛋白总量的5% - 10%,当肝脏发生纤维化时,胶原蛋白可增加到50%左右,也就是说此时肝脏内的蛋白质有一半是胶原成份。正常每克脏组织中含胶原5.5mg,而肝硬化时可升高达30mg。肝组织中胶原主要有5种,分别是Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ型胶原,其中以Ⅰ、Ⅲ型为主,见下表:

胶原蛋白在正常肝和硬化肝中的分布

胶原蛋白	正常肝(%)	硬化肝(%)
Ⅰ	40 - 50	60 - 70
Ⅲ	40 - 50	20 - 30
Ⅳ	1	1 - 2
Ⅴ	2 - 5	5 - 10
Ⅵ	0.1	0.2

因此,为胶原蛋白的测定可不同程度地反映肝纤维化的情况。

(二)蛋白聚糖 蛋白聚糖具有一核心蛋白,其上连接多个糖胺多糖。现知有硫酸软骨素、硫酸皮肤素、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素及透明质酸等。

在肝纤维化过程中,胶原、非胶原糖蛋白、蛋白聚糖互相连接形成网状结构,它们来源于细胞,反过来又作用于细胞,将信息传递给细胞,影响核的基因表达从而影响基因表型。窦周的基质组成和细微结构的改变往往是星状细胞活化的主要因素。

(三)基质金属蛋白酶(MMP) 胶原的代谢既有合成、也有降解。肝纤维化时,某些基质蛋白过量合成,同时也有正常基质蛋白的降解。肝纤维化是其合成和降解失衡的结果。胶原降解需有胶原酶。MMP在细胞外间隙的基质转换中有关键性的作用,包括损害修复、炎症、纤维化和肿瘤生长等生理和病理过程。肝内的MMP主要有间质胶原酶(降解原纤维胶原)和Ⅳ型胶原酶/明胶酶(降解基底膜和明胶)。间质胶原酶的细胞来源为内皮细胞和HSC,肝脏炎症时肝细胞暴露于内毒素、释放细胞因子,刺激内皮细胞释放间质胶原酶;Ⅳ型胶原酶的细胞来源为HSC和枯否细胞,破坏正常ECM,如血窦的基底膜,而激活纤维化过程,这在肝纤维化的早期特别重要,而到后期则反而下降,因而,胶原酶活性下降,也许是导致纤维化后期胶原沉积的一个因素。

ECM:胶原、非胶原性糖蛋白、蛋白多糖特别是胶原在体内合成与降解,细胞因子的调节作用等方面研究进展,更新了人们对肝纤维化的认识,从而使诊断和研究方法出现了新局面,多种血清诊断标记如:PⅢP、LN、Ⅳ胶原,HA已用于临床,检测肝内胶原及胶原酶的DNA探针,可以检测出相应的mRNA增长状况,从而从分子水平了解胶原代谢及药物对其影响,相信随着科学技术日新月异的发展,人类攻克肝纤维化的工作,必将会产生新的突破。

3. 重视重型肝炎抗感染治疗的研究

解放军第一五三中心医院传染病研究中心

申德林 焦栓林 王全楚 朱晓红 张 燕

重型肝炎的发病机制是多种因素联合引起的,包括病毒因素、HBV 基因突变、免疫功能异常(细胞免疫、体液免疫、补体系统、自身免疫、免疫调节)、各种细胞因子的作用(肿瘤坏死因子、白细胞介素)、内毒素血症、肝脏微循环障碍、细胞凋亡等。越来越多的研究表明,继发性损伤和/或二次打击,即在原发性损伤(免疫病理和/或病毒本身引起)的基础上由内毒素介导的毒性细胞因子(炎症细胞因子、肿瘤坏死因子、一氧化氮)等经循环到达,直接诱发和加重肝功能衰竭。

重型肝炎病人多有营养不良、机体抵抗力下降,加上免疫功能紊乱,补体、免疫活性物质、调理素及中性粒细胞功能减弱可使重型肝炎病人处于感染高危状态。临床研究表明,各种急性、慢性肝炎、肝硬化和重型肝炎病人内毒素发生率有不同程度升高。重型肝炎时内毒素血症发生率高达 88-100%,以慢重肝内毒素发生率最高,其中伴有腹水者发生率更高。重型肝炎患者内毒素水平超过正常对照组的 5-8 倍,内毒素水平与肝损害程度之间存在着密切关系。

内毒素对重型肝炎具有如下作用,(1)内毒素可诱发与加重肝损伤进而发生肝功能衰竭;(2)内毒素可引起肝内胆汁淤积性黄疸,加速黄疸上升;(3)内毒素可引起凝血机能障碍,导致弥漫性血管内凝血,致使发生腔道出血;(4)内毒素可引起或加重肾功能障碍;(5)内毒素可诱发或加重肝性脑病;(6)内毒素可直接加重肝损害;(7)内毒素激活肝脏枯否细胞释放促炎递质;(8)内毒素可引起肝内微循环障碍,致使微血管内大量微血栓形成;(9)内毒素可促进或加重肝纤维化的形成;(10)内毒素可使免疫功能降低;(11)内毒素促进肝细胞发生脂质过氧化;(12)内毒素可促发肝癌细胞的发生。重型肝炎病人病程中一旦发生内毒素血症犹如另一道“鬼门关”,致使原有的病情重症化、复杂化,增加了治疗的难度,预后极差。

如何早期发现内毒素血症,近年来一些实验和临床研究给予我们许多新的启迪。(1)重肝病程中出现无其他原因可解释的腹泻和下坠;(2)脐周压痛或反跳痛和难治性腹水;(3)病程中黄疸骤然上升;(4)外周血中中性粒细胞、白细胞升高。如出现上述情况,应高度疑及内毒素血症的存在,积极采取相应措施,阻止病情的进一步发展。

如何把握重型肝炎内毒素血症的尺度,关乎整个治疗方案和预后。极早认识了重型肝炎和再伴感染内毒素血症是两个重要祸首,争取有效的抗感染、抗内毒素措施,增加机体免疫功能,加强营养支持疗法,结合“从整体出发,维护机体本身抗病能力”等综合措施,可望取得较高疗效,提高重型肝炎抢救成功率。我科于 1998 年-2001 年 3 年间收治重型肝炎 208 例,临床治愈 130 例,治愈率为 62.5%。

在重型肝炎伴发感染的治疗中,细菌的发源地是肠道,所以我们提出“治肝先治肠”的治疗措施,如采用通腑祛瘀重用大黄方剂,有清除肠道细菌,改善肠道菌群紊乱,防止肠黏膜屏障机能损伤;口服乳果糖有吸附肠道内毒素,降低肠道细菌数量作用,从而有效地防止肠道

细菌移位,减少内毒素血症发生率。在肝功能衰竭,免疫功能下降,门脉压力升高,胃肠道淤血及肠道屏障被破坏后,细菌和内毒素会移位到血管和腹腔里去。内毒素移位只需15分钟,3-6小时就可达到高峰,所以对重型肝炎病人适当给予抗生素很有必要。肝衰竭病人病情重笃,有时病情进展很快,在选用抗生素时,选用高效、低毒、广谱,力争一步到位,不按常规低档、中档、高档依次给药,这样有时往往会延误病情,失去治疗机会。临床常选用三代头孢类或三代喹诺酮类抗生素,2-3周为一疗程,临床经验表明,重型肝炎病人若能有效控制感染,临床恢复常较顺利,多数病人能够治愈;感染得不到有效控制,病情日渐加重,各种并发症相继发生,多数病人往往发生多脏器功能衰竭而死亡。

重型肝炎,尤其是慢重肝病人,肝脏处于饥饿状态,全身营养不良,机体免疫系统严重紊乱,对于这样的病人单用抗生素难以发挥应有效应,有时还会发生二重感染,应用大剂量胸腺肽,尤其是胸腺肽 α_1 (日达仙),能有效降低多种炎症介质水平,促进肝细胞再生,抑制病毒复制,抑制细胞凋亡作用,近年来,我们用日达仙治疗重型肝炎的体会:(1)与抗生素合用对抗感染有协同作用;(2)用日达仙组几乎没有霉菌感染发生;(3)重型肝炎抢救成功率明显提高;(4)没有任何不良反应。日达仙应用方法,1.6mg皮下注射,1/日,5天后改为1.6mg 1/隔日,二周为一疗程。

重型肝炎的临床治疗应是控制肝脏炎症,提高细胞免疫细胞,促进肝细胞再生,加强营养支持疗法,处理各种并发症的内科综合的系统工统,而预防和治疗感染则应贯穿于始终。所困惑的是,临床上往往是出现发热、血像高、培养出致病菌方才用抗生素,否则被视为滥用抗生素,加强内毒素血症的基础和临床研究,揭示其演变规律,建立一套行之有效的判断指标和防治方案,是今后工作的努力方向。

4. 乙型肝炎病毒(HBV)S基因‘a’决定簇 系列突变克隆建立及其表达蛋白抗原性分析

郑州大学第一附属医院感染科 (450052) 余祖江

华中科技大学同济医学院附属同济医院 (430030)

杨东亮 张俊 郝友华 王宝菊 郝连杰

我国是HBV感染的高流行区,经受着巨大的宿主免疫抵抗,病毒必须以变异等多种形式逃避宿主的免疫清除,其中最重要的是病毒外膜蛋白的变异。本文根据流行病学的调查结果,通过PCR定点突变技术(基因拼接重叠扩增PCR, gene SOEing PCR, gene splice of overlap extending PCR),对患者人群中HBV基因‘a’决定簇高突变频率点进行人工定点突变,得到真核细胞内表达克隆,即T126S, M133L, T144A。最后采用真核细胞表达系统,探讨HBV S基因‘a’决定簇突变对其表达蛋白(HBsAg)的抗原性和免疫原性的影响。

1. 材料和方法

1.1 质粒和细胞

pcDNA3 质粒购自 Invitrogen 公司, pCR3.1/SHBV 质粒(含野生株 HBVS 基因)。BHK-21(叙利亚仓鼠肾细胞)系本室保存。

1.2 主要仪器和设备

DNA/RNA 定量分析仪, Pharmacia Biotech 公司产; PTC-200PCR 扩增仪, 美国 MJ Research 公司产; 凝胶成像分析系统, 美国 UVP 公司。

1.3 主要试剂和工具酶

Pfu 聚合酶, EcoR I 内切酶, XhoI - I 内切酶购自武汉中科建公司。小牛碱性磷酸酶(CIAP), 123bp 分子量标准, 羊抗鼠免疫荧光抗体购自 Gibco BRL 公司。凝胶回收试剂盒, 德国 QIAGEN 公司。HBsAg 鼠单克隆抗体由北京生物公司提供。

2. 方法

2.1 HBV S 基因 126, 133, 144 位的定点突变

2.1.1 PCR3.1/SHBV 和 pcDNA₃ 酶切及 S 基因 5' 磷酸化

PCR3.1/SHBV 和 pcDNA₃ 同时被 EcoR I 37℃ 酶切 5 小时(其中 pcDNA₃ 酶切后线装载体作以后连接用), 前者酶切后混合产物, CIAP5' 去磷酸化, 与 pcDNA₃ EcoR I 酶切后线状载体连接。提供下一步 Gene SOEing PCR 反应所需的模板。

2.1.2 Gene SOEing PCR

2.1.2.1 引物(武汉金贝生物科技有限公司合成)

2.1.2.1.1 HBV S 基因上, 下游引物 ZL、ZR 和 pcDNA₃ 载体对应引物 SP6R:

ZL:(5' 位于 HBV 157, 5' - GCGCTGAACATGGAGAACATCAC - 3'), ZR:(5' 位于 HBV 860, 5' - CCATCTTTTTGTTTTGTTAQQG - 3'); 引物 SP6R, 位于 pcDNA₃ 载体上 SP6 启动子序列区: SP6R: 5' - AGCATTTAAGTGACACTATAQAATAQG - 3。

2.1.2.1.2 定点突变 HBV S 基因 126, 133, 144 位的互补突变引物:

126 位突变互补引物 126L: 5' - CTGCATGACTAQTGCTCAAGGAAC - 3' (439 - 415), 126R: 5' - TTCTTGAGCACTAGTCATGCAGGTCC - 3' (460 - 434); 133 位突变互补引物 133L: 5' - CCAGGAACCTCTCTGTATCCCTCC - 3' (455 - 431), 133R: 5' - AGGGATACAGAGAGGTTTCCTTGAGCA - 3' (476 - 450); 144 位突变互补引物 144L: 5' - AACCTTCGGCCGGAATTGC - 3' (492 - 472), 144R: 5' - GTGCAATTTCCGGCCGAAGGTTTG - 3' (513 - 489)

2.1.2.2 方法

按照 Horton 等方法进行, Pfu 酶保守扩增。简单的说, 第一次 PCR: ZL 与 126 扩增 126 位突变 S 基因的上半段; ZL 和 133R 扩增 133 位突变 S 基因的上半段; ZL 与 144R 扩增 144 位突变 S 基因的上半段。126L 与 SP6R 扩增 126 位突变的 S 基因的下半段; 133L 与 SP6R 扩增 133 位突变的 S 基因的下半段; 144L 与 SP6R 扩增 144 位突变的 S 基因的下半段。第二次 PCR 扩增利用引物 ZL 和 SP6R 进行。最后提取 T126S, M133L, D144A 突变的 S 基因全长的 PCR 扩增产物(含有 pcDNA₃ 载体的多克隆酶切位点)。

2.2 HBV S 基因定点突变产物的克隆与鉴定

2.2.1 HBV S 基因定点突变产物的克隆

XhoI 和 EcoR V 双向酶切 pcDNA₃, 提纯。同时用 XhoI 酶切 HBV S 基因定点突变产物, 提纯后与线状 pcDNA₃ 载体连接。连接产物按常规方法进行转化感受态细胞后, 涂板,

37℃ 培养,挑取单菌落,常规培养转化后的菌株。

2.2.2 突变克隆的筛选,鉴定

转化培养细菌 2ul, ZL 和 ZL 为引物,以 PCR3.1/SHBV 质粒作阳性对照,进行鉴定和筛选。PCR 阳性克隆,常规小提制备质粒,分别 EcoR I 和 XhoI 双酶切鉴定。

2.3 HBV S 基因突变克隆质粒测序及分析

小量提纯后质粒,送大连宝生物工程公司,采用双脱氧终止法进行全自动序列测定。测序的结果利用计算机软件进行分析。

2.4 不同位点突变的 S 基因克隆在真核细胞 BHK-21 表达

2.4.1 细胞培养

常规培养细胞,转染前一天将 BHK 细胞接种到 8 孔槽中,加入含 10% FCS 的 DMEM 培养基,在 37℃ 和 5% 的 CO₂ 培养至细胞的融合率为 50~80%。

2.4.2 转染

用 QIAGEN 小量提取质粒试剂盒提取质粒 SHBV、T126S、M133L 和 D144A,测定浓度后稀释到 1ug/ul。按 lipofectamine 试剂盒(Boehringer Mannheim Biochemicals Co. USA)说明转染细胞,ELISA 检测细胞培养上清。PBS 洗涤细胞 2 次后用 4℃ 的 50% 甲醇和 50% 丙酮混合液低温固定 15 分钟,间接免疫荧光检测。

2.5 SHBV、T12S、M133L 和 D144A 质粒表达产物的检测

2.5.1 ELISA 检测

用商品化 HBsAg 检测试剂盒检测上清存在的各种表达蛋白。按商品化试剂盒说明书要求夹心 ELISA 检测的蛋白。

2.5.2 间接免疫荧光

固定后的细胞加鼠抗 HBsAg 单抗(1:100 稀释),37℃ 1 小时孵育。PBS 洗涤后加羊抗鼠 IgG-FITC(1:100 稀释,含 0.1% 的伊文氏蓝)37℃,50 分钟。PBS 再洗涤后,甘油封片后在荧光显微镜下观察对照组。

3. 结果

3.1 Gene SOEing PCR(第一次和第二次 PCR 扩增)的结果

3.2 序列测定后可能翻译蛋白质与 S 蛋白氨基酸序列同源性分析结果

	0	10	20	30	40	50
	*	*	*	*	*	*
Wshbvaa						
MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTI PQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN						
T126Saa						
M133Lan						
D144Aaa						
	60	70	80	90	100	110

* * * * * *

Wshbvaa
 HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGP
 T126Saa
 M133Lan
 D144Aaa

120 130 140 150 160 170 180

* * * * * * *

Wshbvaa
 CRTCMTTAAGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVVQ
 T126SaaS.....
 M133LanL.....
 D144AaaA.....

Wshbvaa WFVG
 T126Saa G
 M133Lan G
 D144Aaa G

注: Wshbvaa 代表野生株 HBsAg 的氨基酸序列, T126Saa, M133Laa 和 D144Aaa 分别代表 126, 133 和 144 位点突变后 HBsAg 的氨基酸序列。黑体方框部分为‘a’决定簇氨基酸序列一级结构和同源性序列比较结果。

3.3 BHK-21 细胞免疫荧光检测

各突变质粒经脂质体包裹后, 转染 BHK 细胞 3 天后, 收获细胞, HBsAg 单克隆抗体免疫荧光检测各突变质粒表达产物, 细胞内或膜表面出现特异性荧光颗粒为阳性(10×40)。

4. 讨论

HBsAg‘a’决定簇是 HBsAg 诱导保护性抗体最主要的抗原决定簇, 其氨基酸表位上共有 28 个氨基酸, 含有构象依赖性 B 细胞表位和 T_H 细胞表位, 它们与 HBsAg 抗原性及抗 HBS 的产生密切相关。

HBsAg 是 HBV 感染的最重要标志, 抗-HBS 出现表示宿主已将病毒消除并具备中和外来 HBsAg 的能力。但目前研究显示, HBsAg 阴性或抗 HBS 阳性并不能排除 HBV 病毒血症。提取这些病毒核酸, 序列分析的结果显示 HBV S 基因往往出现变异。Carman 等发现在一意大利无症状携带者体内的 G145R 突变株可以稳定存在 5 年。Ogata 等从意大利患儿获得的 G145R 突变株血清感染黑猩猩, 证明该突变株可以在体内完整复制, 具有感染性和

致病性。最近 Coleman 等对乙型肝炎病毒 S 基因 'a' 决定簇在患者人群中高突变频率位点 G145R, M133A 突变质粒等分析表明, 不同的商业试剂盒对这些产生突变质粒所表达的 HBsAg 识别能力下降或根本不具备识别能力。在慢性感染患者人群中, S 基因突变十分常见, 突变位点多集中于 'a' 决定簇第一个环上面。另外在乙型肝炎疫苗主动预防失败和高效价 HBIG 预防器官移植患者再感染 HBV 的人群中, 'a' 决定簇也常常发生突变, 但突变的位点多集中于 a 决定簇第 2 个环上面。

在不同的患者人群中, HBV S 基因 'a' 决定簇上每一个氨基酸都可以发生点突变或和其他点突变一起产生复合突变, 不同的位点突变对 HBsAg 的抗原性都存在着或多或少的影响, 但关键在于必须明确哪些 HBV S 基因突变株可以改变 HBsAg 的体内抗原性和免疫原性(尤其是那些在流行病学调查上具有高突变频率的位点), 以及它们是如何突破人类的体液和细胞免疫防御体系的, 造成患者持续感染。解决上述问题关键在于对这些突变株所表达的蛋白在体内和体外的生物学活性进行细致的研究。因此对不同人群中高突变频率的点研究显得更具有意义。

本研究根据流行病学调查, 以 HBV S 基因野生株为基础, 利用 Gene SOEing PCR 技术, 获得系列 S 基因突变克隆。经过序列测定和氨基酸同源性分析表明: 与野生株 HBV S 基因克隆相比, 除目的位点突变外, 除目的位点氨基酸突变外, 其余位点氨基酸与野生株 HBsAg 的氨基酸同源性比较为 100%。以上结果表明我们对野生株 S 基因 'a' 决定簇高突变频率位点实行了定点突变, 获得了 3 株在不同患者人群中具有高突变频率的 S 基因 'a' 决定簇突变克隆。

基因工程乙型肝炎疫苗大多在酵母和昆虫等真核表达系统中生产, 但在酵母等系统表达的 HBsAg 不能分泌到细胞外, 且表达水平也不高, 因此具有一定的局限性。我们将 HBV S 基因不同位点突变的基因克隆入真核表达载体 pcDNA3 中, 转染 BHK 中表达, 转染细胞上清用 ELISA 检测(另文发表), 细胞用间接免疫荧光法进行检测。初步实验结果表明, HBV S 基因系列突变克隆能在真核细胞中表达, 正确折叠, 维持天然二级构象, 能够被 HBsAg 单克隆抗体识别, 具有良好的抗原性。因此本研究构建的 HBV S 基因 'a' 决定簇系列突变真核细胞表达克隆子可以用作开发新型乙型肝炎混合多价疫苗, 高效价 HBIG 及 HBsAg 检测试剂盒, 同时也为分析不同位点突变的 HBV S 基因克隆在体内表达 HBsAg 生物学活性, 特别对其抗原性和免疫原性的分析奠定基础。

5. 树突状细胞疫苗及其在抗 HBV/HCV 免疫中的作用

解放军第一五三中心医院传染科 王全楚 申德林

树突状细胞(Dendritic cell, DC)是目前发现的功能最强的专职抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC), 在免疫反应中起着举足轻重的作用, 因此备受重视。90 年代以来, 人们在体外诱导扩增 DC 成功之后, 克服了以往由于 DC 在组织中含量很少、难以获取的困难, 使 DC 研究取得了许多突破性的进展, 为人们探索新的疾病防治手段开辟了新的天地。以