

乙型肝炎 基础和临床

(第3版)

**Hepatitis B
Basic Biology and Clinical Science**

Third Edition

Luo Kangxian

骆抗先 编著

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

乙型肝炎基础和临床/骆抗先编著. —3 版. —北京:
人民卫生出版社, 2006. 10

ISBN 7-117-07602-X

I. 乙... II. 骆... III. 乙型肝炎—诊疗
IV. R512.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 043343 号

ISBN 7-117-07602-X



9 787117 076029 >

乙型肝炎基础和临床
(第 3 版)

编 著: 骆抗先
出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-67616688)
地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
邮 编: 100078
网 址: <http://www.pmph.com>
E-mail: pmph@pmph.com
购书热线: 010-67605754 010-65264830
印 刷: 北京人卫印刷厂(铭成)
经 销: 新华书店
开 本: 889×1194 1/16 印张: 45.25
字 数: 1434 千字
版 次: 1997 年 3 月第 1 版 2006 年 10 月第 3 版第 5 次印刷
标准书号: ISBN 7-117-07602-X/R·7603
定 价: 175.00 元
版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394
(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)



这是一位临床医生结合自己的临床经验和学习体会编写的书。

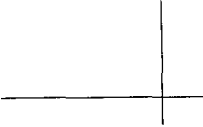
按自己的认识选择和把握内容，与某些传统的概念不尽一致。

对一些日常诊疗事项，结合基础知识，有较详尽的讨论，也有一些其他书刊尚未充分阐述过的内容。

此书的主旨是与临床同道们交流临床经验和对相关基础知识的认识，使我们的诊断思维更活跃、治疗措施更合理。

基于临床讨论基础问题，试图加强基础研究与临床实际的密切联系。

希望本书对提高乙型肝炎的临床研究水平能有所裨益。



第3版自序

我国是乙型肝炎的地方高流行区,正在实施疫苗计划免疫,小儿感染将逐渐控制,但仍会有不少新的感染;成年人中众多的慢性感染仍是沉重的社会负荷。乙型肝炎有发生肝硬化、肝衰竭和肝癌的高危性,每年有数十万例肝病患者死亡。在相当长的时期内我们仍将担负乙型肝炎的大量防治工作,许多问题需要探讨。

医学科学的发展,越来越要求对一种疾病有更深入、更广泛的认识。将基础知识和临床经验汇集,可方便专业人士阅读。临床医生参考一些基础专业知识,使诊断思维更活跃、治疗措施更合理。

乙型肝炎在我国流行可能已近半个世纪,当前临床所遇到的病例许多已是乙型肝炎相关的慢性肝病,而且肝硬化和肝细胞癌仍多存在病毒复制和活动性炎症,因而要求专科医生有更广泛的专业知识。乙型肝炎病毒感染的疾病谱包括急性肝炎、慢性无症状携带、慢性肝炎、肝硬化以至肝细胞癌,本书详细论述了整个感染发展过程中的基础和临床问题。

乙型肝炎病毒感染及其引起的一系列疾病,涉及多数临床学科,渗入各科临床医生的日常工作。

我从1993年开始《乙型肝炎:基础和临床》的写作,第一版于1997年3月、第二版于2001年5月出版,第3版于2006年初交稿。十余年来几乎无一日停止,朝朝暮暮,写作不息。阅读文献、参加会议获得的新知识或工作中的新体会,随时编写,经反复推敲而成书。本书汇集编著者的经验和学习心得,经历十余年的写作,第三版才渐趋成熟。

第三版改写字数占64.3%,新增126幅图。主要改进有:①内容有较大更新,并着力于阐明一些新观念;②增加新内容3章,并按内容的系统性,对章节反复进行了调整,避免重复;③更换全部参考文献,作为正文的补充;④添加了每章的要点和小结,小结包含编著者对该内容的评述。

本书的读者大多是已较熟悉本领域知识的医生和科学工作者,因而本书的编排主要按内容的内在联系,与教科书的程式有很大差别。

我从事临床工作50余年,实验研究也有很多年,迄今仍在做专业的具体工作,有一些自己的积累。本书对临床内容,尤其是一些日常诊疗事项,有相当详尽的讨论。此书对内容的选择和把握,反映编著者的观点,也有与当前业内不尽一致的提法,有较多探索性的论述;个人写作又难免偏颇。因而,有些诊断和治疗方面的内容主要提供对临床问题的思考,请不要看作是“指导性意见”,希望得到同道们的批评。

虽对本书的基础部分着力改写,因受专业水平的限制,理解的深度不够,难以写得深入浅出,未能对临床同道们的批评有较大改进,深感不安和无奈。

本书的编写得到我科青年同事们的支持。刘定立(博士生)、毛乾国细致修改大部分内容,姜荣龙补充了一些新文献,彭劼、周福元、陈永鹏、孙剑、文维群、朱冰和余治健(博士生)分别修改了部分章节。刘志华对基础部分的定稿提出了不少重要意见,尤其对流行病学内容纠正了一些概念性的错误,也参与了大量秘书性工作,为此书出版出力很多。影像科马著彬、许乙凯、吴凤林和流行病教研室聂军教授审改了相应章节。

姚光弼教授审阅了全书的要点和小结,提出了十分重要的修改意见,对他的友情支持深表谢意。

本书插图是3次版本逐步改进的结果。第一版由周福元、第二版由朱幼芙、第三版由梁蔚芳

(博士生)制作,每位都用了数个月的业余时间。何海棠参与一些图稿修改,并做了许多秘书性工作。

本书有大批热情的读者,感谢你们对此书的厚爱,因此我不敢懈怠。此书完稿正值我从医 50 周年,也算是对自己的一份纪念。生命不息,学习不尽,工作不止。渴望阅读本书的同道惠予批评,俾能在下一版改进。

骆抗先

2006. 5. 18

于广州 南方医院

常用缩写词

序列位置: AA (amino acid) 氨基酸, nt (nucleotide) 核苷酸, rt (reverse transcriptase) 反转录酶
Alb (albumin) 白蛋白
A/G (albumin/globulin ratio) 白/球蛋白比例
ALT (alanine transaminase) 丙氨酸转氨酶, AST (aspartate transaminase) 天冬氨酸转氨酶
APC (antigen presenting cell) 抗原提呈细胞
AsC (chronic asymptomatic HBV carrier) 慢性无症状 HBV 携带者
 α FP (alpha fetoprotein) 甲胎蛋白
Bil (bilirubin) 胆红素, Tbil (total bilirubin) 胆红素, Dbil (direct bilirubin) 直接胆红素, Ibil (indirect bilirubin) 间接胆红素
bp (base pair) 碱基对
CD (cluster of differentiation) 白细胞分化群
cp/ml (copies/ml) 1ml 血清中的病毒拷贝数
CTL (cytotoxic T cell) 细胞毒性 T 细胞
 γ GT (gamma glutamyl transpeptidase) 谷氨酰转肽酶
HAV (hepatitis A virus) 甲型肝炎病毒
HBV (hepatitis B virus) 乙型肝炎病毒
HCV (hepatitis C virus) 丙型肝炎病毒
HDV (hepatitis D virus) 丁型肝炎病毒
HEV (hepatitis E virus) 戊型肝炎病毒
HBcAg (hepatitis B core antigen) 乙型肝炎病毒核心抗原
HBeAg (hepatitis B e antigen) 乙型肝炎病毒 e 抗原
HBsAg (hepatitis B surface antigen) 乙型肝炎病毒表面抗原
HBIG (hepatitis B immunoglobulin) 乙型肝炎免疫球蛋白
HCC (hepatic cellular cancer) 肝细胞癌
HLA (histocompatibility leukocyte antigen) 组织相容性白细胞抗原
IFN α , γ (interferon alpha, gamma) 干扰素 α , γ
MHC (major histocompatibility complex) 主要组织相容性复合物
M ϕ (macrophage) 巨噬细胞
NK (natural killer) 自然杀伤细胞
NO (nitric oxide) 一氧化氮
PBMC (peripheral mononuclear cell) 外周血单个核细胞
PCR (polymerase chain reaction) 聚合酶链反应
TcR (T cell antigen receptor) T 细胞受体
TNF α (tumor necrosis factor) 肿瘤坏死因子 α
ULN (upper limited of normal) 正常上限

目 录

第三版自序

第一章 病毒基因组·复制过程·病毒颗粒·····	1
第二章 病毒复制：模板·动态·致病性·····	19
第三章 病毒谱系·····	33
第四章 病毒蛋白·····	47
第五章 病毒变异：概论·P基因·S基因·····	63
第六章 病毒变异：C基因及其启动子·····	78
第七章 实验传染模型·····	93
第八章 自然性免疫·适应性免疫·····	107
第九章 免疫清除病毒和免疫损伤肝组织·····	123
第十章 肝细胞死亡：凋亡·坏死·····	136
第十一章 外膜抗原免疫应答·免疫耐受·····	151
第十二章 肝内病毒状态和免疫应答·····	165
第十三章 病毒感染、宿主因素与疾病发展·····	181
第十四章 肝脏·肝细胞及其再生·····	195
第十五章 肝组织学：基本病变·急性和慢性肝炎·····	210
第十六章 肝组织学：肝硬化和肝癌·超微组织学·····	227
第十七章 流行病学：流行率·流行环节·····	245
第十八章 流行病学：流行特征·预防·肝癌流行·····	260
第十九章 乙型肝炎疫苗·免疫球蛋白·····	272
第二十章 血清病毒·病毒标志物·····	287
第二十一章 肝血清生化学：胆红素·肝酶试验·····	299
第二十二章 肝血清生化学：肝功能试验·····	316

第二十三章 肝影像学	333
第二十四章 基础处理·辅助治疗·免疫调节剂	347
第二十五章 α 干扰素	359
第二十六章 核苷(酸)类似物	375
第二十七章 自然史	395
第二十八章 急性乙型肝炎	408
第二十九章 慢性无症状病毒携带	422
第三十章 慢性乙型肝炎: 临床表现·诊断	437
第三十一章 慢性乙型肝炎: 鉴别·处理·随访	449
第三十二章 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎	461
第三十三章 隐匿性乙型肝炎病毒感染	474
第三十四章 淤胆型乙型肝炎	489
第三十五章 孕妇、小儿和老人的乙型肝炎	501
第三十六章 免疫虚损病例中的 HBV 感染	517
第三十七章 肝外感染·肝外合并症	527
第三十八章 混合感染	539
第三十九章 丁型肝炎	554
第四十章 肝纤维化	570
第四十一章 活动性肝硬化	584
第四十二章 门静脉高压: 胃食管静脉出血	601
第四十三章 门静脉高压: 腹水	615
第四十四章 肝细胞癌: HBV 感染的分子基础	630
第四十五章 肝细胞癌: 临床学	644
第四十六章 肝衰竭: 概论·感染·出血	659
第四十七章 肝衰竭: 多脏器衰竭	674
第四十八章 肝衰竭: 支持治疗·肝移植的内科问题	689
索引	704

第一章

病毒基因组·复制过程·病毒颗粒

一、病毒基因组

二、病毒复制：转录

(一) 转录过程

(二) 转录的调节元件

(三) 细胞转录因子

三、病毒复制：反转录

四、细胞内传染

(一) 传染过程

(二) 病毒整合

五、病毒颗粒的产生

(一) 核心颗粒的装配

(二) 病毒颗粒的包装·分泌

* HBV 怎能使人类病亡如此惨重?

要点

1. HBV 基因组是 3.2kb、小环形的部分双链 DNA，有 S、C、P 和 X4 个重叠的读框，调节元件也重叠在编码基因中，HBV 是组织紧密而高效的小 DNA 病毒。

2. HBV DNA 复制周期始于 cccDNA 转录为 pgRNA。转录需由细胞转录因子结合于病毒的元件，是经高度调节的过程。

3. 反转录始于 P 蛋白识别 pgRNA 5' 端的 ϵ 干-袢结构而包裹进核心颗粒。末端蛋白引导-4 寡核苷酸转位为引物从而合成负链 DNA，RNA 酶 H 降解去 pgRNA；再以负链为模板、残余 RNA 做引物，合成正链 DNA。双链 DNA 的合成均由反转录酶介导；整个过程均由 P 蛋白的成分蛋白介导。

4. HBV 毒粒侵入细胞后，脱去外膜和核壳转换为 cccDNA，cccDNA 是病毒转录的模板；转录物 pgRNA 又是反转录的模板。病毒传染细胞的早期即可发生与细胞 DNA 的整合，整合部位是随机的，含整合病毒的肝细胞不表达靶抗原，可长期不被清除。

5. 核壳包裹 P 蛋白和 RNA/DNA，从而装配成核心颗粒；再包装外膜蛋白而成为完整的病毒颗粒；成熟的毒粒向细胞外分泌。核心和毒粒的装配分别需要各自成分间的相互作用，还需有细胞因子的调节。

* 慢性 HBV 感染为何难以被根除?

一、病毒基因组

HBV 是很小的包膜病毒。HBV DNA 和 HBV 特异 P 蛋白由核壳包裹成为核心颗粒，再由含 HBsAg 的脂蛋白外膜包裹成为完整的病毒颗粒。病毒基因组是 3.2kb 的部分双链 DNA。

结构

HBV 基因组结构精密，仅约 3200 碱基对 (bp)，我国的流行基因型 B 和 C 均为 3215bp，以最小容量发挥高效功能。

我国的 HBV 参照序列：我们曾从 9 例慢性无症状 HBV 携带者一次扩增出 9 株 C 基因型 HBV，分析序列同源性拟定参照序列 (consensus sequence) (图 1-1)。

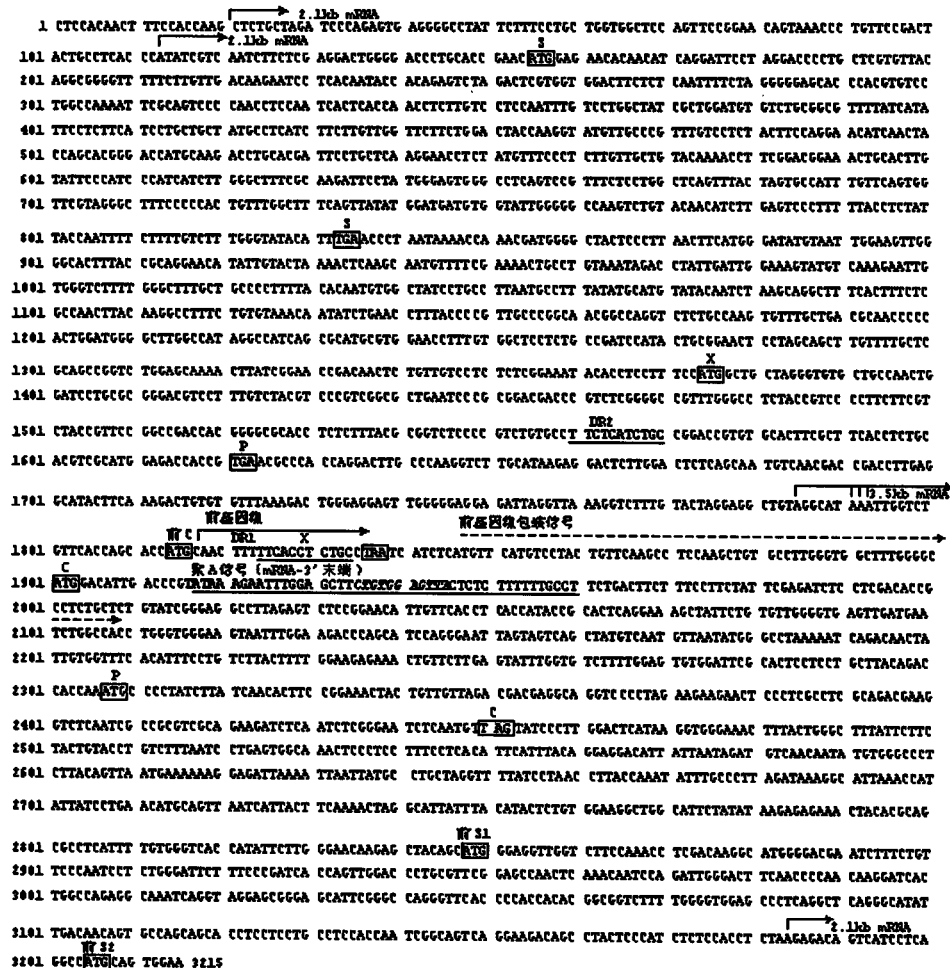


图 1-1 由我国分离的 HBV/C 基因型流行株的参照全序列

核苷酸正链。左侧数字表示行初的核苷酸位置。开放读框和转录 RNA 的起止已注明，框内为各开放读框的起始或终止密码子。(郭亚兵，等，中华微生物学和免疫学杂志 1999; 19:197)

双链：HBV 基因组有独特的结构，是一个小环形双链 DNA。双链的长度不同，全长的一链因与病毒 mRNA 互补，将其定为负极性；较短的一链定为正极性。正链仅 5' 端固定，其长度可为负链的 50%~100%，其 3' 端位置不定，故在病毒群体中有不同长度的正链与全长的负链匹配，仅部分长度为双链 (图 1-2)。

粘性末端：两链的 5' 端固定，2 个 5' 端间 [核苷酸 (nt) 1601-1826] 的 224bp 为粘性末端 (cohesive terminus)，其两侧各有顺向、11bp (5' TTCACCTCTGC) 的直接重复序列 (direct repeat, DR)。DR 在病毒复制和整合中起重要作用。负链 DNA 的 5' 端始于 DR1 内；3' 端有 5~8 个碱基与其 5' 端重复，是在 DR1 内的末端冗余 (terminal redundancy)，使这一小段成为三链。正链 DNA 5' 端起于 DR2；3' 端与 DNAP 结合使其合成不断延长。DR1 也是前基因组 RNA 的起点。DR1 和 DR2 的相对同源性，使 HBV DNA 分子在复制过程中形成长粘性末端、进而形成环状 (图 1-3)。

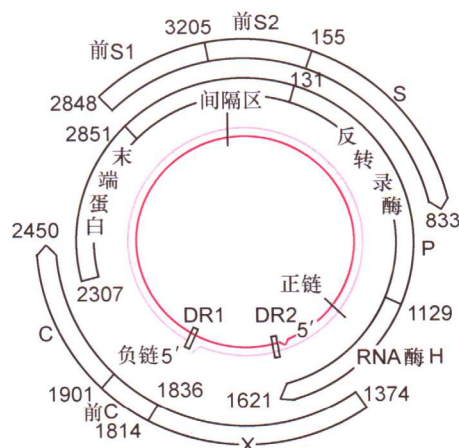


图 1-2 HBV 基因组的结构和组成

中心双圆表示 DNA 正负链 5' 端和 DR 位置。空心箭头表示各开放读框，数字是其起止点核苷酸的位置。

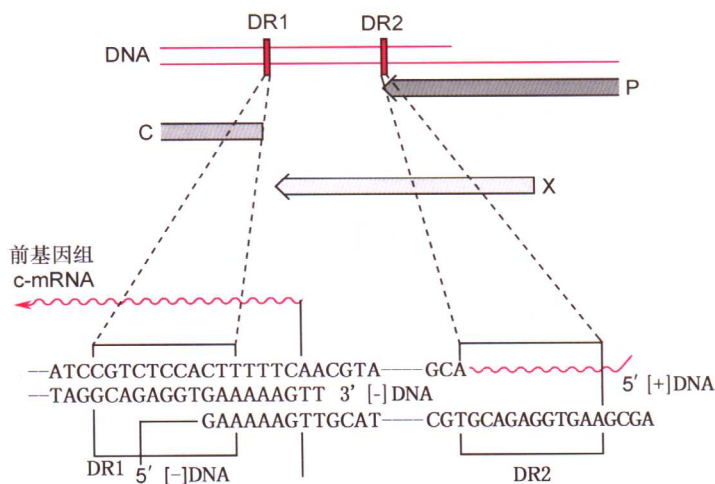


图 1-3 HBV 基因组的粘性末端

上部表明 DR 与开放读框 P、C、X 的位置关系；下部表明 pgRNA、正链和负链 DNA 的开始端的位置，DR1 含负链 DNA 5' 端及其 3' 端有末端冗余的三链区，正链从此经过；DR2 含正链 5' 端的 RNA 帽，负链也从此经过。

基因组成

HBV 负链核苷酸序列至少有 4 个开放读框 (open reading frame, ORF)：C、P 和 S 基因分别编码核壳、P 蛋白和外膜蛋白；另一 ORF 因开始鉴定时对其基因产物的功能不明而称 X，现已了解 X 蛋白 (HBx) 调节病毒基因的转录水平。正链序列上似无保守的 ORF (图 1-2)。

不同基因型的序列长度和各 ORF 的起止略有差异，我国流行 B 和 C 基因型。本书结构基因的位点均按 C 基因型描述。

S-ORF：分为 S 区、前 S2 区和前 S1 区，各有其起始密码 ATG。前 S2 区和 S 区在所有 HBV 基因型都是恒定的长度，分别为 165bp 和 681bp (nt3205-nt155-nt835)；而前 S1 区的 5' 端则因基因型而异，B 和 C 型均始于 nt2848。前 S 区的氨基酸改变 (15%) 可较 S 基因的 (7.5%) 多 1 倍，提示 S 蛋白比前 S 蛋白对病毒装配更为重要。

C-ORF：分为 C 区 (nt1901-2452) 和前 C 区 (nt1814-1900)，各有起始密码 ATG。这一区段最保

守，是免疫攻击的靶表位所在。

X-ORF: 在 nt1374-1838, C 基因型有 27bp 的短缩。其基因产物 HBx 是一种多功能的调节因子, 包括转式激活增强子和启动子的转录功能。

P-ORF: 最长的读框 (nt2307-0-1623), 开始区段与 C-ORF 部分重叠, 中间与 S-ORF 完全重叠, 最后区段与 X-ORF 部分重叠 (表 1-1)。P 基因编码末端蛋白 (terminal protein, TP)、反转录酶 (reverse transcriptase, RT) 和 RNA 酶 H (RNase H), 各区段依次在 nt2307-2840、nt130-1161 和 nt1129-1621, 其间的 nt2841-129 为不编码的间隔区。

表 1-1 HBV 基因组的读框重叠

ORF	C	P	S	X
C	–	23	0	4
P	6	–	47	10
S	0	100	–	0
X	5	39	0	–

横列 ORF 与纵行 ORF 重叠, 重叠 bp 占纵行 ORF/bp 数的%。0 表示无重叠, P 与 S 重叠的 bp 数占 S 的 100%, 占 P 的 47%。

参考文献

1. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--Natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004; 350; 11: 121-33. (Virologic features 一节) 嗜肝 DNA 病毒主要选择肝细胞传染, 少量病毒发现于某些组织, 与肝外疾病无关。HBV 毒粒是双层膜壳颗粒, 脂蛋白外膜内有核壳, 含病毒基因组 rcDNA 和反转录酶。基因组只有 4 个 ORF: 前 S-S 区编码 3 种外膜抗原; 前 C-C 区编码 HBeAg 和 HBcAg; P 区编码多功能的反转录酶, 涉及 DNA 合成核苷 RNA 包装; X 区编码 HBx 蛋白, 调节宿主细胞的信号转导, 能影响宿主和病毒的基因表达。
2. Liang TJ. The molecular virology of hepatitis B virus; new insights into an old virus. *AASLD*, Dallas; 2000: p78-82. HBV 是 DNA 病毒, 用病毒编码的反转录酶、通过 RNA 中间体复制。含 S、C、P 和 X 4 种基因, S 和 P 能编码多种蛋白。有很高的复制效率, 血清水平可 $>10^9$ cp/ml。DHBV 以羧基肽酶作为细胞受体; HBV 的受体尚未阐明。

二、病毒复制：转录

病毒进入细胞脱去病毒蛋白, HBV DNA 在细胞浆中成为松弛环状 DNA (relaxed circular, rcDNA); 延长正链, 将各链缺口闭合成为共价闭合环状 (covalently closed circular), cccDNA 是紧密的超螺旋分子。细胞感染后的 24h, cccDNA 已可在胞核内检出。

HBV DNA 复制周期开始于 cccDNA 转录前基因组 RNA；由前基因组 RNA 反转录为负链 DNA；再合成正链 DNA；双链 rcDNA 又成熟为 cccDNA（图 1-4）。

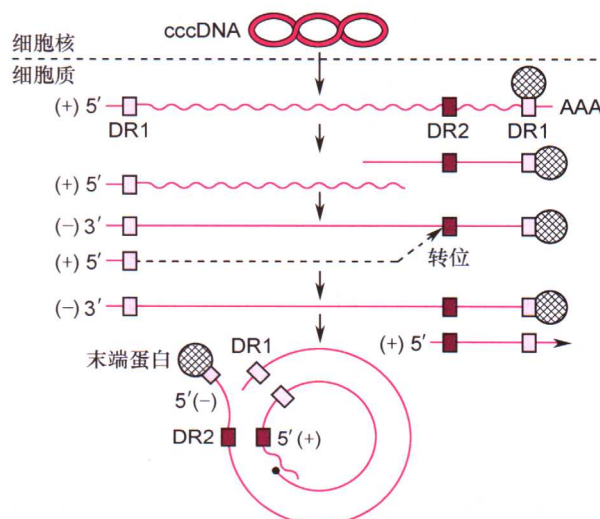


图 1-4 HBV 基因组复制

胞核内的 HBV cccDNA 作为模板转录 pgRNA，移至细胞质中；反转录负链 DNA；再据其合成互补的正链 DNA，双链环化。

(一) 转录过程

病毒转录：以 cccDNA 为模板，利用细胞的 RNA 转录酶进行转录（transcription），产生 4 种 HBV mRNA：3.5kb 的 RNA 和 3 种亚基因组 mRNA。3.5kb 的 RNA 进行病毒复制；亚基因组的 mRNA 合成病毒蛋白（参见第四章）。

4 种 RNA 均经修饰：3' 端聚腺苷酰化（polyadenylation）和 5' 端加“帽”。单一的聚腺苷酰化信号在相同位点的 3' 端结束转录；5' 端起点不同，取决于各自启动子开始转录的位点。

pgRNA：在细胞浆中 3.5kb 的 RNA 和病毒 P 蛋白一起被核壳蛋白包裹，组成病毒核心。3.5kb 的 RNA 含病毒 DNA 序列上的全部遗传信息，可作为复制的中间体。进入病毒核心的 HBV RNA 是病毒 DNA 基因组反转录（reverse transcription）的模板，因而称为病毒前基因组（pregenome, pgRNA）。

3.5kb 的 RNA 又是合成 C 蛋白和 P 蛋白 [DNA 聚合酶 (DNAP)] 的 mRNA。

干-袢结构：pgRNA 的 5' 端和 3' 端各有一个部分逆向的重复序列形成稳定的干-袢结构 (ϵ)，但只有 5' 端的 ϵ 干-袢结构序列 (nt. 1847-1907) 是 pgRNA 的包装信号，而且是负链 DNA 反转录开始的部位，这 2 种功能都需病毒的 DNAP 与 ϵ 相互作用，DNAP 和 ϵ 都改变构型，共价联结，形成有引导活性的核糖核蛋白，包装进核心颗粒。

pgRNA 有一冗余末端， ϵ 和 DR1 都出现 2 次，但只有 5' ϵ 是功能性的包装信号。

ϵ 含一中间膨出序列 CUGUUC 高度保守，在复制中可作为负链 DNA 合成的引物，复制出一寡核苷酸引物，才能开始反转录负链 DNA（图 1-5）。

(二) 转录的调节元件

由双链 DNA 转录为 RNA 是一个需要高度调节的过程，由一些细胞转录因子与其病毒基因组的相应转录调节基序，其间精细的平衡和复杂的相互作用来进行。

病毒基因组不仅是有编码蛋白的结构基因，还含有调节元件（regulatory element）分散在整个 HBV 基因组中。调节元件包括 4 种启动子、2 种增强子、正性/负性转录效应元件、糖皮质激素应答元件等（图 1-6）。

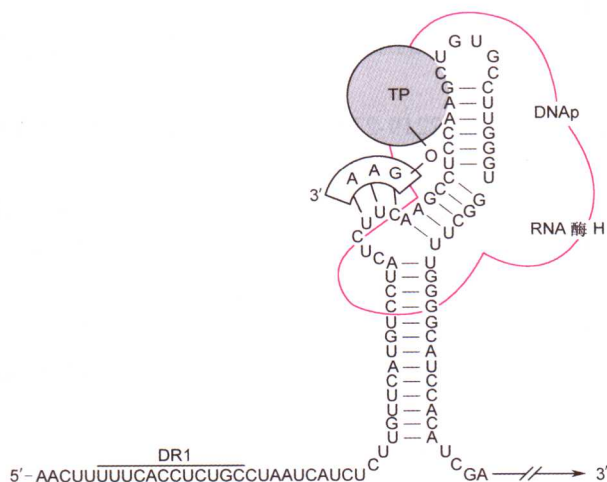


图 1-5 P 蛋白与 ϵ 结合的模式

pgRNA 的 5' 端序列二级结构与 P 蛋白的三维模型。 ϵ 膨出的暴露部分作为 DNA 短小寡核苷酸的模板，寡核苷酸与蛋白共价联结 (Nassal M, Schaller H. J. Viral Hepat, 1996; 3: 221)。

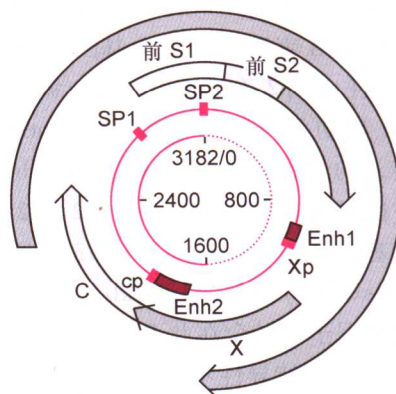


图 1-6 HBV 基因表达的调节序列

增强子 Enh1、Enh2，启动子 sp1、sp2，xp、cp，GRE 糖皮质激素应答元件。

HBV RNA 是在各自的启动子控制下由 2 个增强子和正性/负性转录元件调节；细胞转录因子可结合在调节元件的 DNA 基序，分别调节（加强或抑制）不同基因的表达；而不同基因又可受同一调节元件

的控制。这些调节元件在基因组中以顺式排列的相对位置，提示可以协同的方式调节 HBV 基因组和亚基因组同一方向的转录。

启动子

ORF 分别有各自的启动子 (promotor)，转录启动需要启动基因序列，位于 RNA 合成起始位点附近的 DNA 序列中。细胞 RNA 反转录酶 II 和转录因子结合于启动子序列，启动 RNA 合成。HBV 的启动子除 sp1 外，均无规范的 TATA 盒。转录因子结合 RNA 反转录酶 II 即在启动子下游的约 30bp 处开始转录。

pg/pc 启动子：也可简称 cp (nt1643-1849)，大体在转录开始处上游约 200bp 内，结构和功能都十分复杂。cp 与 X 基因的 3' 末端 (~nt1837)、C 基因前 C 区的 5' 末端 (nt1838 ~) 重叠；增强子 II (nt1685-1773) 和 DR1 (nt1826-1836) 全在 cp 区段内。

cp 由上游调节序列 (core upstream regulatory sequence, CURS, nt1643-1742) 和基本 cp (basal cp, Bcp, nt1742-1849) 2 部分构成 (图 1-7)。

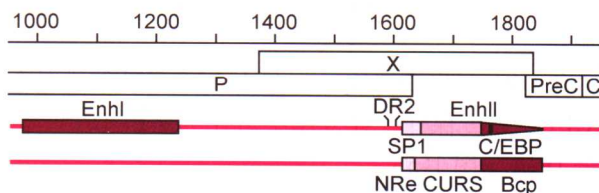


图 1-7 C 启动子及其下游的结构

上方数字示核苷酸位置；矩形框示 ORF；下方示调节序列增强子 II 和 C 基因启动子 (包括 NRe、CURS 和 Bcp) 位置。cp 的下游是 pgRNA、前 C 和 C 基因 mRNA 的起点。NRe 负性调节元件，CURS 核心上游调节序列，Bcp C 基因基本启动子，C/EBP 一种调节转录的细胞因子的结合部位。

Bcp 约 100bp，含 2 个重叠的 TATA 样盒，分别指导 pgRNA 和 pc mRNA 转录的正确启动。pgRNA 和 pc mRNA 都由 cp 启动，在基因组的同一区段转录，但经不同的转录调节。

CURS 中含 2 个重复序列 (nt1668-1684)，是肝细胞核内因子的结合部位。在 cp 上游还有 1 个顺式的负性调节元件 (NRe)，负调节 cp 活性。

S 基因启动子 (sp)：S 基因有两个串联的启动子，sp1 (nt2219-2780) 调节 2.4kb 的 mRNA 转录，编码大蛋白；sp2 (nt2809-3152) 调节 2.1kb 的 mRNA，编码中、主蛋白 (s2/sp)。

sp1 启动 2.4kb 的 mRNA 始于 nt2812，其上游 20bp 是 sp1 的 TATA 样序列 (-25 ~ -32bp)，准确控制转录的开始。在上游 60bp 有 13bp 长的肝细胞核因子 HNF1 的结合序列，只有肝特异因子与之结合，才能显著提高转录水平。sp2 (s2/sp) 启动 2.1kb 的 mRNA，有不同的 5' 端。

X 基因启动子：在 nt1235-1374 段，无 TATA 盒。调节 x-mRNA 转录，有 2 个不同的 5' 端，短的 0.7kb (sxRNA) 和长的 3.9kb (lxRNA)。还发现在 X 基因编码区上游 130bp 有一 GC 富集的 21bp 序列，细胞因子可结合在此 DNA 短序上，故也是微小启动子。

xp 的组织特异性不如 cp 和 sp 的严格，可在肝细胞以外的组织中起转录的调节作用。

xp 上调的转录物 HBx 即是对建立 HBV 复制所必需，近年的研究证明 HBx 靶向线粒体，使钙流出，故 HBx 是作用于 Ca^{+} 依赖的信号转导途径。这一作用由 X 基因微小启动子 (X gene minimal promoter) 介导。这一微小 xp 同时激活 X 基因和线粒体基因使 HBx 靶向线粒体更有效。

增强子

增强子 (enhancer element, Enh) 是在病毒基因的转录调节中有显著作用的 DNA 序列，提高启动子的转录水平，特点：① Enh 是较长、有重复的序列，十分保守；② 由几个功能区段组成，即几个

DNA-蛋白相互作用区,可分别与一些细胞转录因子结合;③顺式作用,与距离和位置不甚相关;④仅在特定的组织或细胞中才有功能。

Enh I:埋在P基因中(nt970-1240)。前部为调节元件(modulatory element),中心区段在nt1080-1165,后部与xp重叠。前后区段仅有辅助功能,联合增强中心区段的活性约10倍。中心区段在S和X-ORF之间,约120bp,以定向和位置非依赖方式强调节xp和cp,也调节sp。

Enh I还与控制细胞周期和凋亡的细胞因子有关。

Enh I如此广泛的作用因其中心区段含多个肝特异和非特异的细胞转录因子结合部位。

Enh II:埋在X基因(nt1685-1773)中,紧接Bcp上游而与CURS重叠。

Bcp以定向和位置依赖方式激活Enh II而增强转录;Enh II则以定向和位置非依赖方式调节cp和前sp2(s2/sp)的转录,优先顺式激活sp1。

Enh II长148bp,分为IIA和IIB两个功能区,单一区无增强活性,二者协作才能发挥功能。肝细胞核内有多种因子可结合在Enh II的2个功能区上。

可能在HBV生命周期的不同阶段,2个Enh各自调节一组发挥功能的转录物,Enh I在转录的早期活跃;而Enh II在后期被激活(Doitsh G, et al. Mol Cell Biol, 2004; 24: 1799)。

其他转录元件

糖皮质激素应答元件:此元件(glucocorticoid responsive element, GRE)在nt349-366, EnhI上游约1kb处。糖皮质激素经GRE刺激EnhI,从而增强病毒复制。GRE也应答其他类固醇激素,HBV转基因小鼠经地塞米松处理,雄性对病毒外膜蛋白的表达水平高于雌性。HBV感染后男性病人较多慢性化,也可以此解释。

正性和负性转录效应元件:此类因子(positive and negative effectors of transcription, pet & net)对环形DNA模板转录的调节,尤其对pgRNA和C/P-mRNA转录的调节很重要。转录首次必须通过聚(A)信号,以合成全长、末端过剩的RNA,这就需要pet和net的调节(Summers J. J Virol, 1997; 71: 7917)。

pet是编码序列5'转录区的一个小元件,顺式,方向依赖性,可能调节初生pgRNA延长。在鸭乙型肝炎病毒(DHBV)模板,转录延长需要pet,推测在pgRNA转录首次通过环形病毒DNA的终止区时,pet不使转录终止。net调节pgRNA形成3'末端,是涉及转录终止的序列,pet抑制net,net缺失时产生异常长度的RNA。

(三) 细胞转录因子

病毒RNA、包括pgRNA的转录水平受4个启动子和2个增强子的控制,在这些控制区有与细胞转录因子结合的DNA基序,特别是EnhI与细胞转录因子相互作用,调节病毒RNA转录最重要。

肝细胞中与病毒调节元件相互作用的有转式激活活性的多种细胞因子,既有肝内富集的肝细胞专性的转录因子,主要是胞核因子(NF)1;也有非肝特异的泛性的细胞因子,后者包括Sp1、C/EBP、AP1等属亮氨酸拉链家族(leucine zipper family)以及信号转导和转录激活因子(Signal transducers and activators of transcription, STAT)家族的成员。这些因子结合在EnhI的特定部位,转式激活EnhI增强转录的活性(图1-8)。EnhI序列上的这些特定的保守部位与其细胞因子间相互作用,才可能有效激活基因的启动子。

胞核受体因子:胞核受体(nuclear receptor, NRs)是主要的肝内富集的转录因子,含众多细胞转录因子的超家族,众多因子的DNA结合区段有高度同源性,能直接控制靶基因的活性。

NRs按序列特异性与各自的胞核受体应答元件(nuclear receptor responding elements, NRREs)结合,调节邻近的启动子。NRREs散布在基因组的EnhI和EnhII/前C区段中。

NRs包括HNF4 α 和RXR α 等。

肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)4 α 在肝脏发育中是肝细胞分化所必需;HNF4 α 激

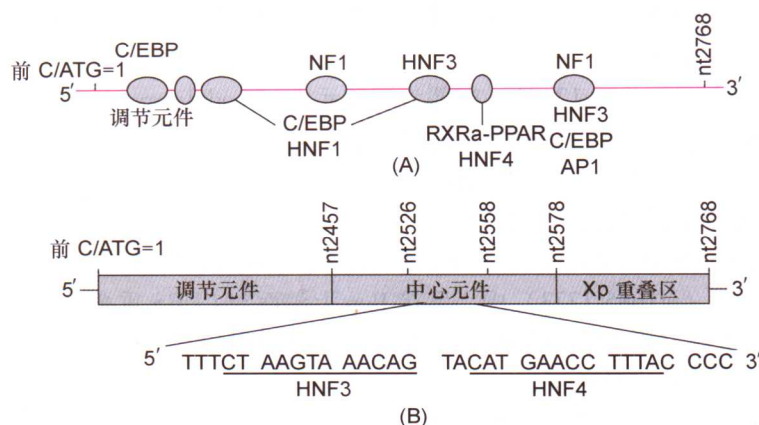


图 1-8 增强子 I 与细胞转录因子结合的基序

(A) 增强子 I 中的 DNA 结合部位，肝特异转录因子 HNF3、HNF4 和泛嗜性转录因子 C/EBP、RXRα-PPAR 等；(B) 增强子 I 的功能区段。(Bock CT, J Virol, 2000; 74: 2193)

活 pgRNA 的启动子。

视黄酸 (retinoic acid, RA) 与其受体 (RAR) 结合，将其转化为有转录活性的因子。视黄酸 X 受体 (retinoid X-receptor, RXR) α 是一种超种系的 RAR，在细胞核中与 RA 有更强的亲和性和更高的反应浓度，是基因表达的高效激活剂。HBV/EnhI 的短小序列中，存在 RA 应答元件 (responsive element, RARE)，RXRα 与 RA 结合刺激 RARE，增强 EnhI 的功能。

上述 NRs 因子结合 NRREs，控制 cp 的活性，协同参与 pgRNA 的转录和病毒复制。EnhII/前 C 的 NRRE 对病毒 pgRNA 和 DNA 合成很重要；EnhI 的 NRRE 有较广泛的作用：因有可与 HNF3、HNF4 和 RXRα-PPARα 异双聚体结合的基序，能调节 pgRNA 和 C-RNA 的转录，对 HBV 转录活性有最强的影响；也可对其他结合因子有补偿效应。

因而，HBV NRREs 在病毒生命周期中起重要作用；NRs 足以支持 HBV 复制。

肝内富集的特异性转录因子增强病毒在肝细胞内复制，从而限定了 HBV 的组织嗜性。

STAT：介导从胞膜到胞核的信号途径，也是潜能的转录因子。在与细胞因子 (IL-6 和上皮生长因子等) 应答中被激活，进入胞核内与相应的病毒 EnhI 的 DNA 序列结合，从而激活基因表达。

转录因子 Sp1：较普遍存在于各种细胞，结合于 GC 富集的元素上，在 sp、cp 和 EnhII 上都有结合部位。在 cp 上游结合的 Sp1 负调节 S 基因和 X 基因的转录，下游的无此效应；在 EnhII 结合的 Sp1 正调节所有基因 (Li J, et al. J Virol, 2001; 75: 8400-6)。

参考文献

1. Moolla N, Kew M, Arbuthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. J Viral Hepat, 2002; 9: 322-7. HBV 序列转录受 pg/pc、S1、S2 和 X 启动子的控制，除 S1 外，所有 HBV 的启动子无规范的 TATA 盒基序，需形成转录起始复合体，是一些独特的转录起始元件。增强子和负性调节元件增加 HBV RNA 的合成。HBV 转录调节元件是嗜肝的或肝富集的转式因子。
2. Tokusumi Y, Zhou S, Takada S. Nuclear respiratory factor 1 plays an essential role in transcriptional initiation from the hepatitis B virus X gene promoter. J Virol, 2004; 78: 10856-64. X 基因的微小启动子结合活性类似核呼吸因子 (nuclear respiratory factor, NRF1)，能激活多数核编码的线粒体基因。NRF1 特异性结合在 21bp 的 xp，上调 X 基因转录。
3. Doitsh G, Shaul Y. Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression. Mol Cell Biol, 2004; 24: 1799-808. HBV 转录需 2 个增强子，EnhI 位于 xp 上游，可由多个因子激活；EnhII 位于 pc/cp 的上游，主要由胞核受体 (NR) 激活。HBV 转录物可分早、晚 2 组，EnhI 结合蛋白在早期向晚期转换中可能有作用，EnhI 调节广泛和即时的 HBV 基因表达。