

乙 型 肝 炎

—基础 和 临床—

Hepatitis B

Basic Biology and Clinical Science

骆抗先 编著

Luo Kang-Xian

人 民 卫 生 出 版 社

People's Medical Publishing House

图书在版编目 (CIP) 数据

乙型肝炎——基础和临床/骆抗先编著. -北京: 人民卫生出版社, 1996

ISBN 7-117-02501-8

I. 乙… II. 骆… III. ①乙型肝炎-研究②③乙型肝炎-防治 IV. R512.62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (96) 第 16843 号

乙型肝炎

基础和临床

骆抗先 编著

人民卫生出版社出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

三河市宏达印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092 16开本 31- $\frac{1}{2}$ 印张 4插页 740千字

1997年3月第1版 1997年3月第1版第1次印刷
印数: 00 001--4 000

ISBN 7-117-02501-8/R·2502 定价: 70.00 元

自序

自 30 年前发现 HBsAg 以来,乙型肝炎在分子病毒学、组织病理学、免疫学、流行病学以及临床学等方面已进行较全面的研究,许多问题已较清楚,已有可能阐述一些较肯定的意见。对乙型肝炎研究所累积的丰富资料,足以编写一本独立的专著。

我国是乙型肝炎的高地方流行区,我们面临大量防治工作,存在一些国外不曾有过的问题,许多问题需要探讨。

将基础知识和临床经验汇集,不仅方便有关专业人士阅读,更重要的是有利于不同专业间的融会。临床医生要参考一些基础专业知识;基础工作者也要了解一些临床知识。医学科学的发展,越来越要求对一种疾病有更深入、也更广泛的认识。

乙型肝炎已在我国流行多年,当前临床大量的已是乙型肝炎相关的慢性肝病,而且即使在肝硬变或肝细胞癌,仍多存在活动性炎症。现实要求专科医生有更广泛的专业知识。本书阐述了自急性肝炎、慢性肝炎、肝硬变、肝细胞癌至肝衰竭整个感染发展过程中的基础和临床及其相关问题。

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

本书主要参考了近 5 年中的文献,在 3 年中多次改写后完成。我从事病毒性肝炎的临床工作和实验研究多年,对本书大部分内容有所涉猎。但一本阐述如此广泛的专著由一人完成,对个别章节深感力不从心。全书各章,甚至有些小节分别请有关专家审阅,个别章节还请有造诣的学者改写。大部分章节曾在一个主治医生专修班讲授和修改。

我所在科室的汪能平和梁炽森教授对本书给予了重要的意见;章廉教授分担了许多应由我完成的日常临床和行政工作;本书的草图由青年同事周福元医生电脑绘制;青年同事卢桥生、侯金林医生在国外期间搜集了许多新近出版的图书资料;侯金林医生还制作了病理和免疫病理的组织照相;全部引用的附图由博士生朱幼芙向国内外出版社征求引用附图的同意,她还做了大量秘书性工作;图照由陈家芳主管技师制作;初稿由何海棠技士印刷;特别是审阅的专家进行了精心的润色和细心的修改。对上述给予我的种种友情支持深表感激。

渴望阅读本书的同道惠予批评。希望能有机会再版。

骆抗先

广州南方医院 1996. 7

目 录

第一章	乙型肝炎的过去、现在和将来	(1)
第二章	病毒和病毒基因组	(7)
第三章	嗜肝 DNA 病毒	(20)
第四章	病毒蛋白	(28)
第五章	病毒变异	(39)
第六章	实验感染	(56)
第七章	组织病理	(71)
第八章	肝内病毒状态和免疫应答	(99)
第九章	肝组织免疫损伤	(115)
第十章	抗病毒免疫防护	(132)
第十一章	病毒变异、免疫应答与疾病发生	(143)
第十二章	流行率·流行环节	(158)
第十三章	流行特征·肝癌流行相关性·预防措施	(169)
第十四章	乙型肝炎疫苗和免疫球蛋白	(182)
第十五章	急性乙型肝炎	(195)
第十六章	慢性乙型肝炎	(207)
第十七章	小儿、老人和孕妇的乙型肝炎	(223)
第十八章	慢性无症状病毒感染	(232)
第十九章	HBsAg 阴性的 HBV 感染	(246)
第二十章	肝外感染·合并症·并存症	(260)
第二十一章	肝炎病毒的混合感染	(276)
第二十二章	丁型肝炎	(290)
第二十三章	血清病毒感染标志物	(306)
第二十四章	肝功能试验	(324)
第二十五章	干扰素抗病毒治疗	(340)
第二十六章	综合治疗	(355)
第二十七章	肝纤维化	(370)
第二十八章	肝硬变	(387)
第二十九章	门脉高压综合征	(402)
第三十章	肝癌发生的分子基础	(420)
第三十一章	肝细胞癌	(435)
第三十二章	肝衰竭：分型、病生理	(453)
第三十三章	肝衰竭：症状、诊断、预后	(466)
第三十四章	肝衰竭：治疗	(479)
索引		(492)

第一章 乙型肝炎的过去、现在和将来

一、历史的回顾.....	(1)
二、流行的现状.....	(2)
三、当前的认识.....	(3)
四、展望和建议.....	(4)

一、历史的回顾

黄疸型肝炎流行的历史久远，流行性黄疸可追溯到公元前，绝大多数无疑是甲型肝炎。

1908—1944 年期间，许多学者通过对“志愿者”的研究，确定肝炎最可能的病因是病毒。

1883 年德国的 1289 名造船工人，接种了由人淋巴结制备的牛痘疫苗，数周至数月后有 15% 出现了黄疸。这可能是第一次记录到乙型肝炎的流行性。在 20 世纪的上半期，各地都发现了输血、血制品或接种疫苗后发生的“长潜伏期”肝炎，可能是由于血液中含有或注射用具污染了乙型肝炎病毒 (HBV)。

根据流行病学的明显差别，40 年代将病毒性肝炎分为两型：传染性肝炎和血清性（或同种血清性）肝炎，1974 年将前者称为甲型肝炎，后者称为乙型肝炎。当时认为肠胃道外是乙型肝炎唯一的传播途径。

60 年代的一些研究，发现乙型肝炎亦可经人与人之间的密切接触而传播。

1965 年 Blumberg 等发现当时所谓的“澳大利亚抗原” (Blumberg BS, et al. JAMA 1965; 191: 541)，大量的血清流行病学调查发现其与乙型肝炎的关系 (Blumberg BS, et al. Ann Intern Med 1967; 66: 924)。1970 年 Dane 等在电镜下鉴定了 Dane 颗粒，即 HBV 颗粒 (Dane DS, et al. Lancet 1970; i: 695)。并从而阐明了毒粒的表面成分 HBsAg、核壳成分 HBcAg 和 HBeAg。检测 HBV 感染的方法学迅速建立，又进而推动流行病学调查的广泛开展。

1970 年曾以乙型肝炎病人血清，1:10 稀释后煮沸 1 min 灭活，含有大量耐热的 HBsAg，具有免疫原性和部分保护作用 (Krugman S, et al. JAMA 1971; 217: 41)，从而发展了以后的血源性亚单位 HB 疫苗。同一时期，还研制了含高浓度抗 HBs 的乙型肝炎免疫球蛋白 (HBIG)，并肯定其被动免疫的保护作用。

1973 年 Kaplan 发现 HBV 毒粒中含有 DNA 聚合酶 (DNAp, Kaplan PM, et al. J

Viol 1973; 12: 995)。1978—1980年期间,利用 DNAp 的活性,陆续发现几种动物的 DNA 肝炎病毒,从而建立了嗜肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae), HBV 是此科病毒的原型 (Marion PL, Robinson WS. Curr Top Microbiol Immunol 1983; 105: 99)。

分子病毒学的发展开始于 1974 年, Summers 等利用限制酶切技术,对 HBV 基因组作了详尽的限制酶图谱分析 (Summers J, et al. PNAS USA 1975; 72: 4597),也有人阐明了病毒的分子结构 (Robinson WS, Greenman RL. J Virol 1974; 14: 384), 1978 年以来利用 DNA 重组技术,对 HBV 的主要亚型已克隆成功。1982 年研究鸭肝炎病毒的复制机制,了解了嗜肝 DNA 病毒复制须经其独特的 RNA 中间体 (Summers JA, Mason WS. Cell 1982; 29: 403)。至此 HBV 的基因结构、编码蛋白、合成途径及其装配分泌等问题已基本阐明。

1985 年建立了聚合酶链反应 (PCR) 技术,迅速在乙型肝炎研究的许多方面广泛应用。更新了一些原有的概念,特别是促进了分子病毒学的更快发展。

现在可用 PCR 产物直接序列分析,由于方法学的简化,1989 年以后各地开展了许多 HBV 变异方面的研究,发现一些与病毒传播和疾病发展相关的变异位点。由于 PCR 和一些其它技术的应用,使乙型肝炎的免疫学、病理学、流行病学等方面的研究,也从而提高到分子水平。

1977 年 Rizzetto 小组在乙型肝炎病人的肝细胞核内,发现了一种新的病毒抗原 (delta 或 δ 抗原),并在血清中检出其相应的抗体 (Rizzetto M, et al. Gut 1977; 18: 997),5 年后这一新发现的病毒被命名为丁型肝炎病毒 (HDV),HDV 感染基本上是与 HBV 混合感染的形式发生。此后各地的研究陆续阐明丁型肝炎的存在及其流行、HDV 的特性及其与 HBV 的关系,以及混合感染的临床过程及其发展结局。

二、流行的现状

我国何时开始发生乙型肝炎流行,迄今尚无较确实的记载。

在 60 年代初期,我国曾发生全国性的饥荒,广大人群营养不良。此时无黄疸型肝炎流行,因缺乏特异性诊断方法,也难鉴别因饥饿合并的肝损害。发病慢、进展慢、恢复也慢,黄疸出现率低。这一流行状况延续迄今,其中的一些病例目前尚未痊愈,并已诊断为乙型肝炎或其相关的肝硬化。

乙型肝炎在我国流行可能已很久远,有据可查也有 30 余年。现状是慢性肝病逐渐累积;同时免疫人口也逐渐扩大。近年的大样本人群调查,HBsAg 检出率约 10%,包括抗 HBs 和抗 HBc 的 HBV 流行率 50%—60%。由一些数据估计,我国的慢性无症状 HBV 携带者 (AsC) 可能超过 1.2 亿人。现患乙型肝炎病人为 2 800 万人,现患率约为 2 770/10 万,年发病率约为 230/10 万。慢性乙型肝炎 (CHB) 的流行率为 0.1%—1%。累计现行的和既往的,我国已约有一半以上人口经受 HBV 感染。每年慢性 HBsAg 携带和清除均约 0.24%,我国当前慢性 HBV 感染的发生和消失,可能已保持相对平衡。

AsC 是我国 HBV 传播最重要的传染源。AsC 孕妇作为传染源的意义尤为重要。在我国,婴幼儿时期由 AsC 的母亲传播,是形成人群 AsC 和 HBV 贮存库的重要原因。母子间的传播不仅限于围生期,还延伸至整个学龄前期。婴幼儿 HBV 水平感染可来自母亲、家庭成员、幼儿园或社会,但多数仍由母亲传染。

日常生活接触传播主要发生在家庭内或公共场所。许多体液中含有 HBV，可通过密切接触传播。非注射的和潜在的肠胃道外传播的广泛性，可以解释为何绝大多数有 HBV 血清标志物者，并无注射或输血的历史。

据北京等大城市报道，由于在新生儿中广泛推行 HB 疫苗接种，儿童中 HBV 感染的发生率开始有较大幅度下降。

控制 HBV 感染的曙光已经展现，但流行的现状仍是严峻的。

三、当前的认识

HBV 属嗜肝 DNA 病毒。完全的病毒颗粒有脂蛋白外膜包裹核心，核心由核壳蛋白包裹环状的 DNA 分子。病毒基因组上已鉴定出至少有 4 个开放读架、2 个增强子和一些其它调节序列。开放读架重叠、并内含调节序列，因而 HBV 基因组是短小而高效的。

HBV 基因组可编码 7 种病毒蛋白：结构蛋白有装配毒粒的外膜抗原和核壳的 HBcAg；功能蛋白有对病毒和细胞具广泛转式激活活性的 X 蛋白，参与病毒复制的 P 基因产物 DNA 聚合酶、核酸酶 H 和末端蛋白，另一种功能蛋白是分泌型的核壳蛋白 HBeAg，可调节宿主的免疫应答。

HBV 具亲肝性，主要在肝细胞内复制；其有限的泛嗜性允许其在一些其它组织中低水平复制。

HBV 复制经 RNA 中间体反转录，有反转录活性的 DNA 聚合酶并无校正功能，HBV 是一种易于变异的病毒。

HBV 感染广泛的疾病谱是由其感染-免疫状态决定的。T 细胞应答可清除感染病毒，也导致感染细胞的损伤。这一免疫过程有众多的细胞因子参与调节。宿主的免疫状态既取决于本身的遗传素质，也与病毒的因素、尤其与病毒的异质性（变异）密切相关。病毒核壳抗原含免疫攻击的靶表位，相应的 C 基因区段即是变异的热点或聚集区。变异株免疫逃逸使感染持续，病变累积而加重。

近年来免疫学概念有重要进展。T 淋巴细胞并不能识别完整的病毒抗原，仅能与提呈在 HLA 分子沟中的、8—16 个氨基酸的短肽（表位）反应。从病毒感染至抗原提呈须经历一个复杂的过程，各个免疫细胞及其细胞因子有各自的、但相互协同的作用。T 细胞的细胞毒效应可经细胞坏死或细胞凋亡两种机制，在乙型肝炎的不同时期，两者不同程度的同时参与病变的形成。另外，近年还发现内毒素-单核巨噬细胞-细胞因子网络，与乙型肝炎的肝细胞损伤密切相关，肿瘤坏死因子 α 是网络中最重要的细胞因子。

我国育龄妇女有很高的 HBeAg 携带率，导致很高的母婴传播率，婴幼儿感染后有很高的慢性化率，从而形成 HBV 感染的高地方流行区。广泛的实践已经证明，婴幼儿 HB 疫苗接种是在我国控制 HBV 感染的最重要的措施。

HBV 通过母婴、血液、性行为和日常生活接触传播，复杂的传播机制使疫苗接种居于预防的首要地位。

慢性 HBV 感染的自然史经历免疫耐受的高复制期、病变活动的免疫清除期和复制病毒被清除后的持续稳定期。肝脏是一个表现“沉默”的器官，绝大多数 AsC 在“无症状”中完成了上述过程。有些病人病变活动发生慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌，病变继续进展也常是“无症状”的，这就成为当前慢性乙型肝炎流行的严峻的临床问题。

对血清标志物的认识仍在发展中, HBeAg (—) 未必表示病毒复制终止; HBsAg (—) 也未必能排除 HBV 感染。

HBeAg (—) 的活动性病变大多由 C 基因前 C 区变异毒株引起, 仍有持续的病毒复制。

我国人群中约有 3% HBsAg (—) 的慢性无症状 HBV 携带者, 对临床和流行病学带来一系列有待解决的问题: 经 HBsAg 筛检后的供血仍可引起输血后乙型肝炎; HB 疫苗接种后有较高的无应答率, 因相当多数的无应答者已是潜在的 HBV 感染者; 我国似有较多的非甲—非戊肝炎, 多数可能是漏检的 HBV 感染, HGV 感染的流行情况尚未阐明。

PCR 可以检出潜在的 HBV 血症, 已证明 HBeAg (—), 甚至 HBsAg (—) 时可能仍存在病毒复制。PCR 是分子病毒学研究的重要技术。

一些传统的肝功能试验仍较实用: 血清转氨酶 (ALT、AST) 反映病变的活动性, 白/球蛋白定量及其比率反映病变的慢性化, 凝血酶原时间延长则反映肝功能衰竭。目前开展的对纤维化的血清学试验, 其灵敏性和特异性都较低, 只可能有限的提示肝纤维化的动态发展。

国内肝穿刺开展很不普遍。只有肝活组织检查才能判定潜在的病变活动状态、才能适当评估肝纤维化、才能检出早期肝硬化, 进行组织病毒方面的检查才能最后除外 HBV 感染; 但病理检查并不能“一锤定音”, 甚至有时不能鉴别急性与慢性肝炎。只有临床资料结合组织学表现进行综合分析, 才能对慢性肝炎作出较正确的诊断。

影像学的进步已可检出 1cm 的癌变, 手术学也有很大的发展, 但当前确诊的 70% 以上的肝细胞癌, 已失去了手术切除的时机和可能。显然, 提高手术成功率有手术以外的、更为重要的问题。

在慢性肝炎, 感染-免疫状态决定病变的活动性, 活动或静止是可以相互移行的时相; 但也可以相当稳定, 对病变发展的预期须有经常的随访观察。

病毒复制通过免疫机制激发病变活动。在慢性肝病, 病毒常有变异, 病毒复制水平常较低, 病变活动常较潜隐, 因有复杂的宿主的病生理机制参与, 慢性肝病的进展常较难控制。

炎症-坏死继发纤维化, 也主要因炎症-坏死诱发细胞的基因突变。炎症是病毒复制启动的, 抗病毒药物应是治疗慢性 HBV 感染的主角。目前可用的只有 α 干扰素, 但其适应证也只是活动性的慢性肝炎, 仅对约半数病人可以控制其病毒复制。目前我国极大多数病人依靠综合治疗获得症状的好转, 任何药物只可能是综合措施中的成员, 尚未出现肯定有效的单一治疗。

四、展望和建议

全世界慢性 HBV 感染者中中国人占一半以上, 许多实际和理论的问题亟待解决。美国和一些欧洲国家虽然 HBV 感染低发, 却有许多高水平的研究成果, 我们还有一定的差距。一些较重大的理论问题很少由我国学者提出; 在浩瀚的国际文献中, 我国学者发表的有重要影响的论文很少, 如我国人群是 HBV 的最大贮存库, 但迄今发表的 61 株 HBV 全序列的基因库中, 属我国的仅 1 株, 限制了对我国病毒变异的研究; 我国的临床工作者尽管在治疗中做了大量工作, 惜未有重要的突破。出现这些情况的原因是很多的。有

些勤奋搞研究的缺乏支持；而有经济基础的却未必有兴趣搞真正的研究。“九五”以科教兴国，相信情况会有所改变。

在我国控制 HBV 感染、改变高地方流行区的现状，只能通过在小儿中普遍推行疫苗免疫计划。在日本、我国台湾和内地的一些城市先行一步，已充分显示这一措施的成功。对青少年（尤其是集体生活的青少年）、对各种高危人群，也应是免疫保护的对象。我国幅员辽阔、人口众多，实施计划免疫在经济和管理上都有一些暂时的困难。但随着改革开放的进程，在小儿中普遍实施 HB 疫苗接种，控制 HBV 感染流行，已不是很远的前景。

较大的问题是我国现有的一亿以上的慢性 HBV 感染者。

慢性无症状 HBV 携带者抗病毒治疗无效，在自然史的不同阶段应区别对待。对免疫耐受的病毒高复制者应长期观察、定期复查，管理远较治疗重要。定期复查才可能检出并控制“无症状”活动，从而防止病变的发展；定期复查才可能发现代偿性肝硬化和早期的肝细胞癌，从而获得及时处理。当今的技术发展足以检出最轻症的肝硬化和肝癌，但迄今临床就诊的大多数仍是晚期病例，提示先进的技术并不能代替先进的管理。在我国，亟须建立一套对 AsC 的检查和分类管理的医疗保健制度。要对他们开展相应的宣传教育，使他们能自觉接受医学观察、自我保健和合理用药。

HBV 不致细胞病变，但病变活动却是病毒复制诱发的。PCR 可检出极低水平的病毒复制，但不能肯定极低水平的病毒复制能否诱发病变活动。阳性 PCR 的临床流行病学意义还有待观察；且操作要求严格的条件，使其不宜广泛用作临床常规试验。分子杂交的灵敏性约为其千分之一，似更符合当前的一些概念。当前在临床上对于乙型肝炎的诊断，以多做一些分子杂交、少做一些 PCR 为宜。

肝活组织检查是正确判断病变的发展，是及时、合理处理的前提。应该认识到这首先是病人的需要，应大力提倡。不同医院肝穿刺数有很大不同，似说明医生的积极性是最主要的。大量事实表明，肝穿刺的安全性很高，只要按操作常规进行，顾虑是不必要的。主治的医生似应学会阅读组织切片，正如结核科医生须会阅读胸片。

目前在血清标志物检测结果中出现解释的“困惑”，在临床工作中较常遇到。主要是国内诊断试剂的质量仍亟待提高；另外，对各个标志物临床意义的认识有待进一步发展。

HBV 和 HCV 的传播途径近似，两者的混合感染较常见。目前 HCV 的输血后感染不少；潜在的肠胃道外传播较难估计；疫苗的研制尚须时日。在有效的预防措施出台前，HCV 感染与 HBV 的混合感染可能继续增加。目前的抗病毒治疗对 HBV 感染效果差，对 HCV 感染更差，对两者混合感染更不满意。HBV 和 HCV 感染分别都是肝癌的高危因素，两者混合感染致癌的协同作用难以除外。加强输血管理和防止其它肠胃道外传播，是当前较可能的着力点。

AIDS 在我国已是大雨将来风满楼，万一 HIV 感染流行，可能与 HBV 联合，将会出现许多新的问题。

HIV 主要通过血液或性接触传播，亦可母婴宫内或围生期传播。几乎所有对 HBV 感染高危的人群，对 HIV 感染亦具高危性。已在供血员中发现 HIV 携带者。两种病毒的混合感染多见于静脉药癖和性乱者；亦见于输血和输血制品的病人。

HIV 无症状携带者对 HB 疫苗的免疫应答严重受损害，抗体阳转率低、滴度低、持续时间短，对 HBV 感染的保护要困难得多。HIV 混合 HBV 感染，宿主对 HBV 的清除

要困难得多，用 α 干扰素治疗亦罕有 HBeAg 消失的完全应答。必须防止 AIDS 在我国蔓延，决不能让其与 HBV 感染联手。

由于全国广大医学工作者长期的努力，对晚期肝病的治疗积累了较多的经验，诊治水平有较大的提高。我国曾对肝衰竭的治疗有过较大的投入，曾总结过一些经验，推荐过某些药物，实际上并无突破。应回到预防为主的基本政策上来，重点似应放在对广大 AsC 群体的管理、对各个阶段病变发展的阻断措施。晚期肝病的病人应该有更好的治疗，但不宜推广价格高、疗效又尚未充分鉴定的药物，目前大部分晚期病人仍是“人财两空”，过高的耗费于国与民都未必有利。

无论中西新药的鉴定，似都应遵循“随机、双盲、对照和多中心”的原则。对肝炎和慢性肝病的综合治疗已积累了丰富的经验，但经客观评价、充分肯定疗效的药物还较少。新药的鉴定只能通过学术的和管理的途径，采取商业的手段难以获得正确的结论，反而影响治疗手段的科学发展。

对肝炎和慢性肝病的支持和对症治疗很重要，但其重要性也只能限制在字面定义上。与绝大多数感染性疾病一样，处于病毒复制期的乙型肝炎病人，也应着重清除病原体的治疗。主要由于经济承受力不足，我国迄今尚难广泛应用 α 干扰素。乙型肝炎经长期的流行，我国目前已积累近 3 千万慢性肝病病人，缺乏抗病毒治疗可能是重要原因之一。不论是否抗病毒治疗，都应重视支持和对症处理；但只要有条件、又是适应证，首先应考虑应用 α 干扰素。某些价格高昂、效果不肯定的药物以不推广为好，可能会削弱对 α 干扰素的经济承受力。

第三军医大学传染病教研室 顾长海
第一军医大学传染病教研室 汪能平审阅

第二章 病毒和病毒基因组

.....

一、病毒性状	(7)
(一) 形态和结构	(7)
(二) 抵抗力	(8)
二、病毒基因组	(9)
(一) 结构	(9)
(二) 基因组成	(9)
(三) 调节序列	(10)
三、基因组复制	(11)
(一) 复制周期	(12)
(二) 复制特点	(12)
四、基因组表达	(13)
(一) mRNA	(13)
(二) 病毒蛋白	(14)
(三) 表达的调节	(15)
五、细胞感染过程	(17)

.....

1965 年 Blumberg 等发现澳大利亚抗原 (Australian antigen), 现称为乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)。从此乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的基因组成、抗原结构、生物学特性及其生活周期的认识迅速发展, 很大程度得益于 1977 年病毒全基因组的克隆和测序。但因缺乏体外的增殖系统和易获得的动物模型, 借助于对嗜肝 DNA 病毒的研究以及对培养细胞中转染的实验研究, HBV 分子病毒学研究获得了进一步发展。分子病毒学的发展, 也促使乙型肝炎及其相关疾病的基础和临床研究有了相应的进步。

一、病毒性状

HBV 感染时可有大量病毒充斥在血液中 (图 2-1)。有些慢性感染血液中仅含病毒外膜; 含完整毒粒者外膜亦大量过剩。外膜颗粒有 22nm 的小球形和 40—100nm 长、22nm 宽的管形颗粒。血清中出现完整毒粒, 是肝内病毒活跃复制的标志。

(一) 形态和结构

完整毒粒 (图 2-2) 首先由 Dane 等描述 (Lancet 1970; i: 695), 亦称 Dane 颗粒。电



图 2-1 血清中的 Dane 颗粒和外膜颗粒毒粒有双层外膜 (▲)，含核心 (◐)

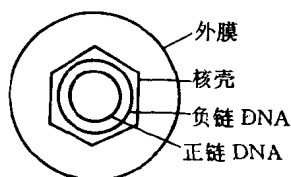


图 2-2 HBV 模式图

镜下呈双层外壳的圆形颗粒，直径约 42nm。外膜 (envelope) 厚约 7nm。用去污剂将外膜剥脱后暴露核心 (core)，核心颗粒为 20 面体的对称结构，直径约 27nm。其核壳 (capsid) 厚约 2nm。核心中含病毒 DNA 基因组、DNA 聚合酶、蛋白激酶活性和连接 DNA 的末端蛋白。

以梯度超速离心测得完整毒粒和外膜蛋白的浮力密度：在 CsCl 中分别为 1.39g/cm^3 和 1.20g/cm^3 ；在蔗糖分别为 1.35g/cm^3 和 1.16g/cm^3 。

每一毒粒的外膜含 300—400 个主蛋白分子、40—80 个中蛋白和大蛋白分子。核壳仅由一种主蛋白 (HBcAg) 组成，其所含蛋白激酶活性可使核壳蛋白磷酸化。

(二) 抵抗力

HBV 的抵抗力较强：对热、低温、干燥、紫外线和一般消毒浓度的化学消毒剂均能耐受。在 -20°C 稳定，活性可保存 20 年；在 37°C 7 天；在 56°C 尚可维持 6 小时。反复冻融 20—40 次、腐败、或以酸、硷处理，其抗原性很少改变。

HBV 在细胞外有很强的存活能力，因而有很强的传播活性或传染性。

过去的一些研究常将 HBsAg 作为考核消毒剂性能的指标，其实 HBV 的传染性与 HBsAg 的抗原性，在对外界的抵抗力方面并非一致。如 100°C 加热 10 分钟，可使 HBV 传染性消失，而仍保留表面抗原活性。

HBV 对 0.5% 过氧乙酸、3% 漂白粉液和 0.2% 新洁尔灭敏感。

用 ^{60}Co 的 γ 射线照射， $10-15 \times 10^6\text{r}$ 的剂量可使病毒完全变性。

二、病毒基因组

HBV 基因组结构精密，可以最小容量发挥高效功能。

(一) 结构

HBV 基因组有独特的结构，是一个仅约 3 200 碱基 (3.2kb) 的小环形 DNA。双链的长度不对称，全长的一链因与病毒 mRNA 互补，按惯例将其定为负极性；较短的一链则定为正极性。正链仅 5'端固定，其长度可为负链的 50%—100%，其 3'端位置不定，因而在病毒群体中有不同长度的正链与全长的负链匹配，仅有部分长度为双链 (图 2-3)。

两链的 5'端固定，5'端间 (核苷酸位置 nt1601-1826) 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)。DR1 和 DR2 在病毒复制中起重要作用。DR1 是前基因组 RNA 和负链 DNA 合成的起点；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 2-4)。

(二) 基因组组成

HBV 负链核苷酸序列至少有 4 个开放读架 (open reading frame, ORF)：C、P 和 S 基因 (相当于逆转录病毒的 gag、pol 和 env 基因) 分别编码核壳、聚合酶和外膜蛋白；另一 ORF 因开始鉴定时对其基因产

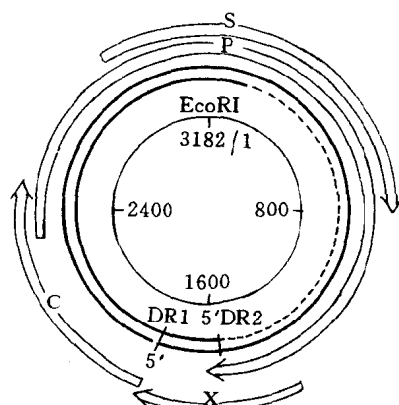


图 2-3 HBV 基因组
内圆表明核苷酸位置，弧形
箭头表明各基因位置

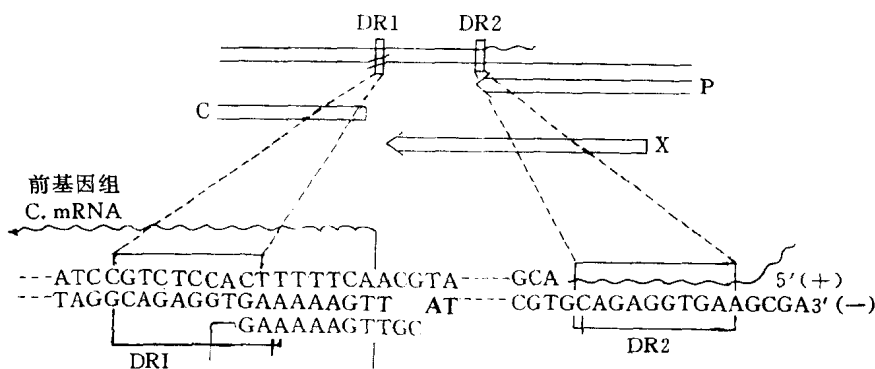
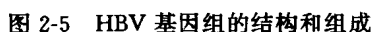


图 2-4 HBV 基因组的粘性末端

物的功能不明而称 X，现已了解 X 蛋白调节病毒基因的转录水平。正链序列上似无保守的 ORF (图 2-5)。

S-ORF 分为 S 基因、前 S2 区和前 S1 区，各有其起始密码 ATG。前 S2 区和 S 基因在所有 HBV 亚型，都是恒定的长度，分别为 165 和 678bp (nt3178-155-832)；而前 S1 区的 5'端在 ad 亚型较 ay 亚型多 33 (adr) 或 12bp (adw)，有 324—290bp，分别开始于 nt2854、2877 或 2888)。前 S 区的氨基酸改变 (15%) 可较 S 基因的 (7.5%) 多一倍，提示前 S 蛋白对病毒装配不及 S 蛋白更具关键性。前 S 区变异可能是逃避宿主免疫的一种方法。



P-ORF 在 nt2307-0-1621 是最长的读架, 其开始区段与 C-ORF 重叠, 中间与 S-ORF 重叠, 最后区段与 X-ORF 重叠。P 基因编码末端蛋白、反转录酶和 RNA 酶 H, 各该区段依次在 nt2307-2840、nt133-1128 和 nt1129-1621, 其间的 nt2841-132 为不编码的间隔区。

HBV 基因表达, 由控制转录的启动子和增强子所调节。

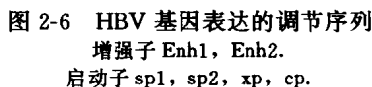
X 基因启动子 xp (nt1235-1374) 调节转录 0.8kb 的 mRNA, 编码 X 蛋白。

增强子 (enhancer element, Enh): 在病毒基因的转录调节中有重要作用。已知有两种 Enh: Enh1 (nt974—1247) 埋在 P 基因中, 末段内含 xp; Enh2 (nt1627—1774, 汪垣, 等. J Virol 1990; 64: 3977) 埋在 X 基因中, 末段内含 cp。Enh 埋藏在 ORF 中, 十分保守 (图 2-6)。

尽管 Enh 序列不长，却有几个功能区段组成，即几个 DNA-蛋白相互作用区，可分别与一些细胞因子结合。这些细胞因子是肝细胞专性的，这就规定了 HBV 的亲肝性；但亦有一些非肝特异的泛性的细胞因子。实际上，在 Enh1 区段只需约 50 个核苷酸的短小序列，即可保持其主要功能。

HBV 是已知真核细胞中最小的 DNA 病毒，但其结构紧密、功能齐全。这是由于：①在同一序列上有重叠的 ORF，整体基因组可读 1.5 次；②调节序列都埋在基因序列中未行另列；③一般病毒的基因含表达子 (exon) 和插入子 (intron)，由基因转录为 mRNA 须剪除插入部分，经多次拼接 (splicing) 才形成成熟的 mRNA，HBV DNA 全基因组不含插入子，全是表达序列，十分经济；④一个 ORF (如 C-ORF) 可转录

两种 RNA (前基因组 RNA 和 C-mRNA); ⑤一种 mRNA (如 2.1kb mRNA) 可编码两



种蛋白（外膜中、主蛋白）。

参 考 文 献

1. Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. Lancet 1993; 342: 1335.
综述 HBV 基因组结构、转录和转译、病毒复制、感染持续的机制、肝细胞损伤的机制、病毒相互作用和肝癌变。
2. Pugh JC, Bassendine MF. Molecular biology of hepadnavirus replication. Brit Med Bull 1990; 46: 329.
综述 HBV 的毒粒、基因组结构、基因组成、基因表达、启动子和增强子、病毒的结构蛋白、动物嗜肝 DNA 病毒、基因组复制和研究嗜肝 DNA 病毒感染及其复制的体外系统。
3. 王宇, 陶其敏. 顺向重复序列在乙型肝炎病毒 DNA 复制中的作用. 中华医学杂志 1990; 70: 604.
定向诱导寡核苷酸 DR1 和 DR2 点突变, 转染 HepG2 细胞, 证实 DR1、2 在 HBV 复制中的重要作用。

三、基因组复制

HBV DNA 复制周期, 开始于 cccDNA 转录全基因组 RNA; 反转录负链 DNA; 合成正链 DNA; 双链 DNA 又成熟为 cccDNA, 是一个连续的过程(图 2-7)(Summers J, Mason WS. Cell 1982; 29: 403)。

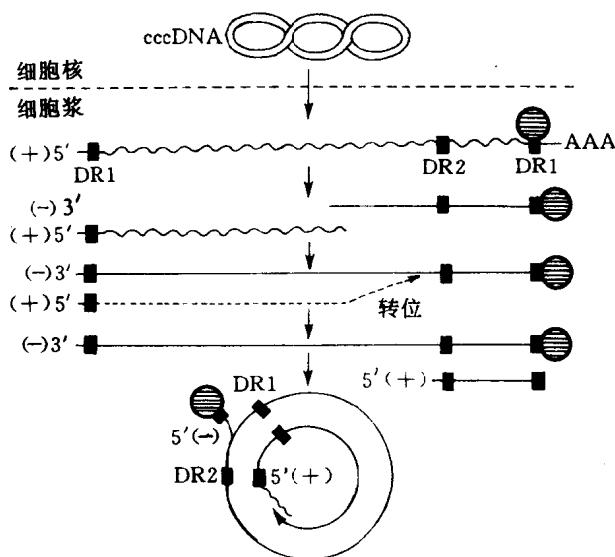


图 2-7 HBV 基因组复制

(一) 复制周期

1. 前基因组合成: HBV 脱去外膜进入细胞浆, 又脱去核壳, 形成松弛环状 DNA (relaxed circular, rcDNA)。HBV rcDNA 解脱负链 5' 端连接的末端蛋白、正链 5' 端的 RNA 残段; 以 DNA 聚合酶延长正链; 将各链的缺口封闭, 最后转换为共价闭环环状 DNA (covalently closed circular, cccDNA) 分子。细胞感染后 cccDNA 即可在胞核内检出, 是出现在感染细胞中的病毒核酸的第一种类型。cccDNA 是病毒前基因组 RNA 合成的模板。

转录(transcription)产生数种 HBV RNA (图 2-8), 只有 3.2 kb mRNA 含病毒 DNA 序列上的全部遗传信息, 且被包裹进病毒核心, 能够作为 DNA 基因组反转录(reverse

transcription) 的模板, 因而是病毒前基因组 (pregenome)。

2. 负链合成: 在 HBV DNA 粘性重叠区有两小段 11bp 的重复序列: DR1 和 DR2。前基因组 RNA 过长重复, 使其近 3' 端多一个 DR1。HBV 负链 DNA 合成始于 RNA 3' 端的 DR1 (图 2-7)。

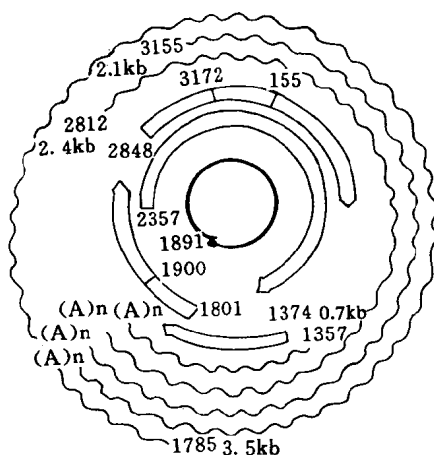


图 2-8 HBV DNA 的基因转录

由 P 基因编码产生的末端蛋白 (terminal protein), 共价连接于其 5' 端, 对负链 DNA 的合成起引物作用。

P 基因编码的 DNA 聚合酶 (DNA polymerase, DNAP) 是一种反转录酶 (reverse transcriptase), 前基因组 RNA 为模板、末端蛋白为引物、用 DNAP 合成负链 DNA。随着负链 DNA 的逐渐延伸, 同时模板 RNA 逐渐降解。起降解作用的是由 P 基因产生的 RNA 酶 H。

P 基因产生三种病毒蛋白 (第四章), 都作用于病毒基因组复制的反转录过程。

3. 正链合成: 前基因组 RNA 在合成负链 DNA 的同时降解, 最后残留其 5' 末端的 DR1 区段, 转位 (translocation) 连接到正链 DNA 5' 端。这一短小的残余 RNA 是合成正链 DNA 的引物。

HBV 正链 DNA 是以负链为模板, 以 DR1 区 RNA 为引物, 借助 DNAP, 由 DR2 开始, 与负链反方向, 随病毒颗粒的成熟而逐渐延长 (图 2-7)。

HBV 负链完全合成后开始合成正链, 正链逐渐延伸。正链在不同时点占负链的不同长度 (不对称性, asymmetry)。只有在 rcDNA 形成 cccDNA 时, 才能作为 RNA 转录的模板。

两链有不同起点, 因而只有环形结构, 正链才能以负链为模板完全复制。

(二) 复制特点

HBV DNA 的复制非常独特。

1. 细胞核内有稳定的 cccDNA 贮存: 由细胞外侵入的或细胞内新合成的 rcDNA 转换为 cccDNA, 这种转换 (conversion) 依赖宿主细胞酶而非病毒的聚合酶, 转换后转移至胞核中。HBV 复制是一种保守的机制, 在转录后模板仍然完整, 因而 cccDNA 十分稳定的贮存在细胞核中。长期使用抑制 DNA 复制的药物对 cccDNA 可无明显影响, 一旦停药, 可能继续作为模板而重新复制。

HBV cccDNA 的半寿期只有几天, 必须不断扩增以保持细胞内感染; 但又必须适当调节以防止其过量扩增, 过量的 cccDNA 分子可能损害感染细胞。病毒外膜蛋白可抑制 cccDNA 的扩增 (Summers J, et al. J Virol 1990; 64: 2819)。在感染早期仅有少量外膜蛋白, cccDNA 经细胞内转换途径扩增; 这一转录模板累积后, mRNA 表达、外膜蛋白也随之增加, 后者又负反馈调节 cccDNA 的扩增。慢性 HBV 感染正是通过这一机制, 才得以保持相当稳定的转录模板贮存。

2. 经复制中间体 RNA 反转录: 这是嗜肝 DNA 病毒复制机制的特征, 是病毒行为的生物学基础。DNA 链的合成是一个连续的过程, 负链完全合成后才开始进行正链合成。这

一过程与逆转录病毒的相似,但后者的中间体是整合的 DNA 分子。这与其它大多数病毒的复制明显不同,在其它病毒两个子链逐渐合成,同时两个母链逐渐消失,是一种半保守(semiconservative)机制;而在嗜肝 DNA 病毒,则通过中间体复制,子链合成时母本双链仍然完整,是一种保守机制。

参 考 文 献

1. Yoffe B, Noonan CA. Hepatitis B virus: New and evolving issues. Dig Dis Sci 1992; 37: 1. 综述感染的流行病学、原发性肝癌、HBV 的复制策略和分子生物学、HBV 变异株、建立 HBV 感染的体外细胞系统、肝外感染和治疗。对 HBV 复制过程有简要的叙述。
2. Koch J, Schlicht HJ. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication; Genome repair after infections entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. J Virol 1993; 67: 4867. 嗜肝 DNA 病毒含 rcDNA 基因组,进入宿主细胞即修补、转换为 cccDNA,后者是转录的模板。在正链延长的修补反应中抑制病毒聚合酶并不影响修补和转换,因而抑制病毒聚合酶的药物并不能防止复制模板的形成。
3. Civitico GM, Locarnini SA. The half-life of duck hepatitis B virus supercoiled DNA in congenitally infected primary hepatocyte cultures. Virology 1994; 203: 81-89. DHBV cccDNA 是 DHBV 复制的模板,在急性和先天性感染的肝细胞培养中至少可扩增 50 倍,但在鸭体感染中数量一般保持稳定。作者报道用 BrUdR 直接和间接标记 DHBV cccDNA,测定先天感染肝细胞中 DHBV cccDNA 的半寿期为 3-5 日,因而为保持慢性感染,必须持续扩增 DHBV cccDNA。

四、基因组表达

由含整合序列的肝癌细胞系和克隆 HBV DNA 的转染细胞系,已阐明基因组表达的主要过程。

(一) mRNA

至少有 5 种未拼接过的 mRNA,大小分别为: 3.5、3.4、2.4、2.1 和 0.8kb,有各自的起始密码 ATG: ①2.1kbS-mRNA 以 1:4 比率合成外膜中、主蛋白; ②2.4kbS-mRNA 虽含编码大、中、主蛋白的序列,主要用以合成外膜大蛋白; ③3.4kb 的 C-mRNA 含病毒编码的全部遗传信息,既作反转录模板的前基因组、又是病毒基因产物转译的 mRNA,独立编码合成 C 蛋白和 P 蛋白; ④3.5kb mRNA 产生 HBeAg 的前体,不产生 C 蛋白或 P 蛋白; ⑤X-mRNA 长 0.8kb,编码 X 蛋白。

HBVmRNA 均正极性、不拼接、有共同的 3' 末端序列,而其 5' 端即使同一 mRNA 亦起点不一(图 2-9)。真核细胞的基因启动子常含一 TATA 序列成分,对限定转录的确切起始点很重要(White RJ, Jackson SP. Genet 1992; 8: 284)。在 HBV 基因的上游有不同的 TATA 样成分,因而转录的 mRNA 是 5' 端不同的群体,HBV 可由单一基因合成多种 mRNA。如 cp 序列中有 3 个 AT 富集区(AT-rich region): 前 2 个 AT 富集区参与调节 3.5kb 前 C-mRNA 的转录,编码 HBeAg 的前体; 后 1 个 AT 富集区参与 3.4kb C/P-mRNA 的转录,编码前基因组、核壳蛋白和 P 蛋白。

各个 mRNA 合成不同量的病毒蛋白,有其特定的调控机制。每一蛋白转录起始处有一承启段(context),Kozak 提出哺乳动物细胞中最适合的承启段(图 2-10),与其对比,C-mRNA 中前 C 承启段最为符合,优于 C 区段和 P 序列,C 区段又优于 P 序列的承启