

丙型肝炎基础与临床

主 编 郝 飞 余宙耀

主要编写人员（按姓氏笔画为序）

王小红	王宇明	王永刚	方 锋	邓 涛
李灼亮	刘树人	余宙耀	严福明	张宜俊
郝 飞	赵英仁	赵利斌	姚 鹏	聂青和
彭齐荣	魏 来			

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

丙型肝炎基础与临床/郝飞 余宙耀主编. —北京: 人民卫生出版社, 1998

ISBN 7-117-03019-4

I. 丙… II. ①郝… ②余… III. 丙型肝炎 IV. R512.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 16417 号

丙型肝炎基础与临床

郝 飞 余宙耀 主编

人民卫生出版社出版发行

(100078 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼)

中国科学院印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16 开本 21 $\frac{1}{2}$ 印张 8 插页 498 千字

1998 年 9 月第 1 版 1998 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

印数: 00 001—4 000

ISBN 7-117-03019-4/R·3020 定价: 43.00 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

序

自 1989 年国际会议正式确定丙型肝炎病毒 (HCV) 以来, 世界各地曾掀起过研究丙型肝炎的高潮。近几年来, 我国一些学者对此病也做了大量的研究工作, 并取得了明显的成就。但是从目前国内外研究进展来看, 仍然有一些新的问题尚待探讨, 例如丙型肝炎病毒变异和免疫发病机制, 临床抗病毒药物治疗作用和疗效的评价, 逆转和防止肝纤维化、肝硬化乃至演变为肝癌的措施等等, 可能都是当前迫切要研究的课题。

这本书是由郝飞和余宙耀同志为主编, 启用 10 多位从事丙型肝炎研究, 并获得成就的年轻博士、硕士, 不辞辛苦、共同编写而完成的。由于作者们收集文献资料“多”, 而且大多是近几年的报道, 因此, 内容“新”。在写作程序方面, “条理清楚”、“重点突出”, “文字简练”, 我认为这是国内第一本有关丙型肝炎的高水平专著。我通读之后, 收获很大。

我认为, 该领域各方面的研究者阅读之后, 可以从中获得“选题立项”的依据; 从事实际工作者阅读之后, 也将会受到启发与赞助; 对于大专院校的学生, 也可提供参考。

基于以上, 我认为, 这本专著问世之后, 我国在丙型肝炎防治方面将会取得新的进展和更大的成就。为此, 我愿为此书作序, 并愿推荐。



1998 年元月 15 日

前 言

自 20 年前提出非甲非乙型肝炎概念，特别是 1989 年明确丙型肝炎病毒以来，有关丙型肝炎的分子病毒学、流行病学、发病机制、临床特征以及防治等各个方面均取得较大的进展，许多问题已经清楚，有些观点需要更新和完善，而且丙型肝炎在病毒性肝炎研究工作中占有重要地位，有必要系统全面地编写一本专著。为此，我与余宙耀同志合作，并邀请国内 20 多位从事丙型肝炎研究的青年学者编写了这本书。

近年来，丙型肝炎无论在基础理论，还是临床医学或预防医学方面均取得重要进展。本书在写作过程中，采取光盘检索，将众多的研究内容加以综合，并结合作者研究工作，对丙型肝炎各个方面均有较详细的论述，力求保证本书的内容能够确切地反映丙型肝炎的研究现状，并在内容安排上侧重于临床实际问题的解决。总之，编写上力求系统性、实用性和先进性，望能对丙型肝炎的基础和临床研究产生积极的影响。

本书由两个相互联系的体系组成，一是集中反映近年来在丙型肝炎基础研究中取得的显著进展，侧重于丙型肝炎病毒学、分子生物学和发病机制等，包括病毒的生物学特性、基因组结构和功能、病毒变异和免疫发病机制等及其相关内容；另一方面则以基础研究指导临床应用，内容包括丙型肝炎的传播途径、临床表现、实验室检查和防治及其相关内容。此外，对丙型肝炎与自身免疫、丙型肝炎与酒精性肝病、丙型肝炎与肝移植、丙型肝炎肝外表现、小儿丙型肝炎以及新肝炎病毒与丙型肝炎关系均作了较详细的介绍。

承蒙我国传染病学界著名专家崔振宇教授热情指导并为本书作序，在此深表谢意。编写过程中得到了第三军医大学李梦东教授和顾长海教授的指导和帮助，并提出了许多重要意见；部分草图由青年同事丁健技师绘制完成；同济医科大学赵西平主治医师、郝连杰教授和北京中日友好医院刘霞主治医师、王泰龄教授提供部分病理照片。对以上同志给予的支持深表感激。本书还得到空军广州医院肝病研究所和第三军医大学西南医院等单位支持，使本书得以顺利出版。此外，我还要特别感谢我的家人，没有他们的支持和理解，是很难完成本书的主编工作。

由于参编人员较多，写作风格和学术造诣各异，疏漏或不当之处在所难免，祈望阅读本书的同道给予批评斧正，并望再版时改正。

郝 飞

一九九八年元月于重庆

目 录

第一章 绪论	1
第一节 丙型肝炎研究的重要历程.....	2
第二节 丙型肝炎病毒基因组的发现及其意义.....	6
第三节 丙型肝炎的研究现状及存在问题.....	8
第四节 丙型肝炎研究的展望	14
第五节 我国丙型肝炎的研究现状	17
第二章 丙型肝炎病毒的生物学特性	21
第一节 丙型肝炎病毒的基本特征	21
第二节 丙型肝炎病毒的体外细胞培养	28
第三节 丙型肝炎病毒感染的动物模型	31
第四节 丙型肝炎病毒进化亲缘关系	37
第三章 丙型肝炎病毒的分子生物学	39
第一节 丙型肝炎病毒基因组基本结构	40
第二节 丙型肝炎病毒基因组的翻译和产物加工	42
第三节 丙型肝炎病毒各区段基因组结构和功能	43
第四节 丙型肝炎病毒包膜糖蛋白的研究进展	49
第五节 丙型肝炎病毒类似株的临床意义	58
第六节 丙型肝炎病毒的基因变异和分型	61
第七节 我国病毒基因及基因分型研究	66
第四章 丙型肝炎的流行病学	77
第一节 传播途径	78
第二节 流行特征	88
第三节 院内感染	93
第五章 丙型肝炎的发病机制	98
第一节 病毒的直接致病作用	98
第二节 病毒感染后的体液免疫.....	101
第三节 病毒感染后的细胞免疫.....	104
第四节 丙型肝炎病毒感染与细胞凋亡.....	109
第五节 丙型肝炎与铁代谢.....	112
第六章 丙型肝炎的病理学	116
第一节 急性丙型肝炎的病理改变.....	116
第二节 慢性丙型肝炎的病理改变.....	118
第三节 丙型肝炎和肝纤维化.....	123
第四节 超微病理学研究.....	127

第七章 丙型肝炎的免疫病理	131
第一节 丙型肝炎病毒及抗原在肝组织内的表达及与肝损伤的关系.....	131
第二节 肝组织中浸润的免疫细胞.....	134
第三节 肝组织 HLA 抗原表达的原位研究	137
第四节 粘附分子和抗原提呈与肝细胞损伤的关系.....	138
第八章 丙型肝炎的临床表现	142
第一节 急性丙型肝炎.....	143
第二节 慢性丙型肝炎.....	145
第三节 肝硬化.....	149
第四节 重型肝炎.....	152
第五节 丙型肝炎病毒与 HIV 联合感染	155
第六节 丙型肝炎病毒与 HBV 合并感染	155
第七节 丙型肝炎病毒与庚型肝炎病毒、GBV-C 合并感染	156
第九章 丙型肝炎与原发性肝癌	159
第一节 临床流行病学.....	159
第二节 分子流行病学.....	162
第三节 丙型肝炎病毒感染相关的肝癌发生的主要危险因素.....	164
第四节 丙型肝炎病毒致肝癌的自然经过.....	166
第十章 丙型肝炎与自身免疫性肝炎	169
第一节 自身免疫性肝炎的诊断.....	170
第二节 自身免疫性肝炎的分型.....	172
第三节 丙型肝炎相关的自身免疫.....	174
第四节 丙型肝炎病毒感染与自身免疫性肝炎相关性的根据.....	175
第五节 丙型肝炎病毒感染发生自身免疫现象的机制.....	176
第六节 丙型肝炎与自身免疫性肝炎的特征及鉴别.....	177
第七节 治疗的策略.....	180
第十一章 酒精性肝病与丙型肝炎	184
第一节 酒精性肝病的诊断与分类.....	184
第二节 慢性丙型肝炎与酒精性肝病的相关.....	186
第三节 丙型肝炎病毒与嗜酒的相互影响.....	188
第四节 慢性丙型肝炎与酒精性肝病的特征.....	190
第五节 慢性丙型肝炎与酒精性肝病的治疗.....	192
第十二章 丙型肝炎肝外表现	194
第一节 丙型肝炎病毒肝外组织感染的基础研究.....	194
第二节 体液中丙型肝炎病毒的检测.....	197
第三节 丙型肝炎肝外表现.....	198
第十三章 丙型肝炎和肝移植	204
第一节 肝移植前的丙型肝炎病毒感染.....	204
第二节 肝移植后的丙型肝炎病毒感染.....	205

第三节	肝移植中丙型肝炎病毒的获得性感染	206
第四节	丙型肝炎病毒感染的诊断	206
第五节	肝移植后丙型肝炎病毒感染的转归	207
第六节	肝移植后丙型肝炎病毒感染的治疗	209
第十四章	小儿丙型肝炎	211
第一节	发病情况	211
第二节	传播途径	213
第三节	临床特点	216
第四节	治疗与预防	220
第十五章	丙型肝炎病毒感染无关的非甲非乙型肝炎	223
第一节	既往研究对新型肝炎病毒的推测	224
第二节	己型肝炎病毒	225
第三节	庚型肝炎病毒	225
第四节	GB 病毒	234
第五节	特殊类型的肝炎	237
第六节	研究新型肝炎病毒的技术思路	238
第十六章	丙型肝炎实验室检查	241
第一节	重组抗原检测特异性抗体	242
第二节	合成肽检测特异性抗体	245
第三节	IgM 型抗 HCV 的检测	248
第四节	丙型肝炎病毒抗原的检测	249
第五节	HCV RNA 检测	251
第六节	丙型肝炎病毒基因分型的检测	262
第七节	丙型肝炎病毒感染其他相关指标检测	264
第八节	丙型肝炎病毒感染实验诊断的评价	265
第九节	丙型肝炎病毒感染实验诊断程序	266
第十七章	丙型肝炎抗病毒治疗	269
第一节	干扰素抗病毒治疗一般情况	270
第二节	复发与无反应的慢性丙型肝炎干扰素再治疗	284
第三节	干扰素治疗慢性丙型肝炎的特殊副作用	286
第四节	熊脱氧胆酸治疗丙型肝炎	291
第五节	反义核酸技术及其抗丙型肝炎病毒的研究	292
第十八章	丙型肝炎的预防	307
第一节	管理传染源	307
第二节	切断传播途径	310
第三节	保护易感人群	314
第十九章	丙型肝炎疫苗研究的希望与挑战	318
第一节	丙型肝炎病毒的基因结构	318
第二节	机体免疫应答	319

第三节	丙型肝炎疫苗研究的现状及困难.....	322
第四节	核酸疫苗的发展简史及特点.....	323
第五节	核酸疫苗的作用机制.....	324
第六节	丙型肝炎核酸疫苗研究现状.....	326
第七节	展望.....	328
索引		331

第一章 绪 论

第一节 丙型肝炎研究的重要历程.....	2
一、非甲非乙型肝炎概念的提出.....	2
二、非甲非乙型肝炎的病原学研究.....	3
第二节 丙型肝炎病毒基因组的发现及其意义.....	6
一、丙型肝炎病毒基因组的发现.....	6
二、非甲非乙型肝炎基因组发现的意义.....	7
第三节 丙型肝炎的研究现状及存在问题.....	8
一、病毒的生物学特性和基因结构.....	8
二、流行病学特征.....	9
三、丙型肝炎的发病机制及病理.....	11
四、临床研究.....	12
第四节 丙型肝炎研究的展望.....	14
一、病毒的生物学特性尚需进一步阐明.....	14
二、传播途径的研究.....	15
三、发病机制的研究.....	15
四、临床研究中的一些问题.....	16
五、治疗与预防.....	17
第五节 我国丙型肝炎的研究现状.....	17
一、广泛开展了基因序列分析和基因型调查.....	18
二、建立了丙型肝炎实验室检测方法.....	18
三、丙型肝炎流行病学的调查和防治对策的探讨.....	18

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是输血后肝炎的主要病因, 感染后易呈慢性化, 并与肝硬化和原发性肝癌的发生关系密切, 故对人类健康危害很大。在提出本病疑为一独立的疾病以后, 经过了 10 多年的时间才基本明确其病原。1989 年美国 Chiron 公司 Choo 等率先采用分子生物学技术成功地将 HCV cDNA 克隆成功, 使丙型肝炎的研究取得突破性进展。近 10 年来, 丙型肝炎的研究十分活跃, 尤其在发病机制、诊断技术和治疗上进展较为迅速, 并产生了许多新的认识, 为建立有效的预防措施创造了一定的条件。

第一节 丙型肝炎研究的重要历程

一、非甲非乙型肝炎概念的提出

病毒性肝炎是一古老的疾病，人们对这一疾病尤其是病原学的认识经过漫长的历史阶段（表 1-1）。从病毒性肝炎疾病的记载到目前明确存在 5 种类型肝炎已经历了 1 个多世纪，而且仍然存在许多问题亟待解决。同样，对丙型肝炎的认识也经历了较长的一段时间。在 1965~1974 年间，先后明确了甲型肝炎病毒（hepatitis A virus, HAV）和乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）的性质，并相应地建立了 HAV 和 HBV 感染的血清学诊断方法，为病毒性肝炎的临床诊断和筛选供血员提供了可靠的检测手段。但临床工作者和研究人员很快发现一种与输血有关的特殊致肝损害因子，这种因子既不是 HAV，也不是 HBV。1974 年纽约血液净化中心的 Prince 教授及其同事，对 204 例接受心血管手术的病人进行长期随访，发现 6 个月后有 51 例（25%）病人发生输血后肝炎，其中仅 12 例与 HBV 感染有关。进一步分析比较，发生肝炎与未发生肝炎的病人中其巨细胞病毒（cytomegalovirus, CMV）感染的血清学标志物检出率十分接近，这样就排除了 CMV 感染的可能。同时发现，发生输血后肝炎的潜伏期较长，几乎与乙型肝炎相等，故显然也不是 HAV 感染所致。鉴于上述事实，他们提出了输血后肝炎还存在着另一种肝炎病毒感染。

关于可能存在新的一种致输血后肝炎的病毒观点提出后，很快吸引了众多临床工作者和研究者的关注，有关不明原因的输血后肝炎的研究报道迅速增加。Feinstone 等也报告了 22 例输血后肝炎病人，经临床资料分析和多种血清学标志物检测也未发现有 HAV 和 HBV 感染的证据。以后有许多学者报道了类似的情况，这样输血后肝炎的病原学存在着与 HBV 和 HAV 感染无关的新的肝炎致病因子这一事实被众多的独立研究得到证实。

表 1-1 病毒性肝炎的认识和研究历程

重要记载	时 间
可传播的黄疸	18 世纪以前
肠道外传播的黄疸	1885 年
提出甲型和乙型两种肝炎的存在	1940 年
甲型和乙型肝炎流行特征的区别	1950~1970 年
发现乙型肝炎表面抗原	1965 年
发现乙型肝炎完整病毒	1970 年
甲型肝炎病毒的分离成功	1973 年
丁型肝炎病毒的发现	1977 年
丙型和戊型肝炎病毒基因组发现	1989 年

事实上，在 70 年代以前，乙型肝炎一直被认为是输血后肝炎最常见的病因。以后相继建立了较灵敏的方法检测 HBV 感染的多种标志物，并用于供血员的筛选，输血后肝炎的发生率并没有得到满意的控制。进一步对输血后肝炎患者进行肝炎病毒血清学检

查,发现既缺乏 HAV 感染依据,也无 HBV 感染的依据,而且排除了其他病毒如 CMV、EB 病毒等感染所致,这样就不得不谨慎地提出非甲非乙型肝炎(non-A, non-B hepatitis, NANB 肝炎)的命名,并于 1975 年在英国 Lancet 杂志上首次使用这个名词。应该承认,之所以提出 NANB 肝炎这一名词也是因为当时不能明确其病原性质,也无特异性的检测手段,只能依靠排除 HAV、HBV 和其他损害肝脏的病毒感染后才能作出对这种肝炎的临床诊断。NANB 肝炎概念的提出,标志着这一种肝炎的研究历程的正式开始。

流行病学观察发现, NANB 肝炎存在两种情况:一种类似于甲型肝炎,主要经粪-口途径传播,可在较大的人群中爆发流行;另一种情况类似于乙型肝炎,主要经输血或生活密切接触传播,以散发为主。因此,根据传播途径不同,将 NANB 肝炎分为肠道外传播的 NANB 肝炎(parenterally transmitted NANB hepatitis, NANB (P) 肝炎)和经肠道传播的 NANB (enterally transmitted NANB hepatitis, NANB (E) 肝炎),后者现命名为戊型肝炎(hepatitis E)。

二、非甲非乙型肝炎的病原学研究

NANB 肝炎概念提出以后,有关其病原是一种或一种以上新的病原体,抑或是已知肝炎病毒的变异体是研究中一个争论的问题。临床工作者和研究者们虽然做了大量的工作,但其病原学研究包括血清学方法的建立在一个相当长的时间内处在困境中,这后来证实与致病因子感染状态有关。

研究证实,输入血液制品可多次发生肝炎,而且将输血后肝炎患者的血液实验感染黑猩猩后,同样可引起类似人类肝炎的病理变化,提示存在致 NANB 肝炎的感染因子。作为 NANB 肝炎传染源的供血员中,93%并无受血史,许多显性发病的 NANB 肝炎患者也无输血或接触血液或血清的明确传播途径,均说明输血并非是本病唯一传播途径。有迹象表明,密切接触、共用剃刀或牙刷、纹身或注射、性接触等也可以感染本病,显示了传播方式的复杂化。在同一家庭中有本病的聚集现象,也支持本病是由可传播的因子所致。

有研究发现,输全血后发生短潜伏期和长潜伏期 NANB 肝炎,表明存在两种或两种以上的致病因子。早期实验也发现,黑猩猩在感染来自 NANB 肝炎患者的血液后,可引起肝细胞浆呈管形样结构改变,并认为这种改变是 NANB 肝炎感染所特有的病变,因而将 NANB 肝炎的感染因子称为微管形成因子(tubule forming agent, TFA)。如黑猩猩被输入凝血因子,则不引起这种特殊的肝细胞超微结构改变。Bradley 等进一步研究发现,当不用氯仿处理接种物后,黑猩猩肝细胞内可出现这种病变;如用氯仿处理接种物再接种则并无这种特殊的变化。TFA 的发生被认为是与感染因子共存的某种因素造成的一种特殊改变,而不是致病因子本身的特性,更不是其本身的结构。人类输血后 NANB 肝炎未见到肝细胞有类似的病理改变,也支持上述观点,并说明输血与输入凝血因子可能是同一致病因子的见解似更能使人信服。

早期 NANB 肝炎病原研究中另一个争论的问题是输血后 NANB 肝炎与乙型肝炎的关系。不少研究者认为,经血传播的 NANB 肝炎感染因子与 HBV 有交叉免疫反应,或认为前者是后者的变异体。提出这样观点有以下几方面依据:①NANB 肝炎(P)在临

床发病和转归以及流行病学方面与乙型肝炎极其相似；②在 NANB 肝炎肝细胞内发现类似 HBV 的颗粒；③肝内和血清中检测的 NANB 肝炎相关抗原与 HBcAg 和 HBeAg 有交叉免疫反应；④一些急性或慢性 NANB 肝炎患者及实验性感染黑猩猩的血清和肝组织中也出现 HBV DNA 阳性杂交信号；⑤用高度敏感的方法可在一些 NANB 肝炎患者的体内检出 HBsAg；⑥用抗 HBc 作为筛选供血员的指标，可以使输血后 NANB 肝炎发生率下降 43%。在确诊 HBV 感染患者中，确有少部分患者存在血清 HBsAg 阴性甚至各种 HBV 感染标志物均阴性，但肝组织中可检测出 HBV 抗原或 DNA。因此认为，用常规排除法诊断为 NANB 肝炎的病例中，至少有半数 HBV 感染所致。

进一步分析发现，NANB 肝炎在临床特征、生化改变和血清学标志上与乙型肝炎有差别。经血传播的 NANB 肝炎一般病情较轻，70%~80% 无黄疸，血清谷丙转氨酶 (ALT) 水平多有长期波动，更易进展成慢性，发生肝功能衰竭者少于 1%。用 HBV 感染血清接种黑猩猩会恒定地出现 HBsAg、抗 HBe 及抗 HBc 等血清学标志，而用 NANB 肝炎感染性血清则均不会检出 HBV 血清学标志。比较发现，NANB 肝炎感染因子与 HBV 感染黑猩猩的接种剂量有差别，NANB 肝炎感染性血清接种量应为每毫升 10~1000 黑猩猩感染剂量 (chimpanzee infectious dose, CID) 以上，如经 1:10 或 1:100 稀释后则失去感染性，这显著低于 HBV 的感染性。上述研究表明，NANB 肝炎感染因子与 HBV 并非同一种，在 NANB 肝炎患者体内检出 HBV 感染标志物可能是两种病原同时或重叠感染所致，也可能属假阳性。

1984 年国际病毒性肝炎会议以后，曾研究发现 NANB 肝炎致病因子可能是一种逆转录病毒 (retrovirus)。Seto 等报道他们在检测了 18 例急性和慢性 NANB 肝炎患者血清，全部病例均有逆转录酶活性，而对照血清标本中只有少数可以检测到。采用蔗糖梯度离心后其逆转录酶位于 1.14g/ml 区带，取此区带所含物接种黑猩猩，证明能引起明显的 NANB 肝炎。后来 Seto 等在 1 例 NANB 肝炎患者血清中发现有一种分子量约 77kD 的糖蛋白抗原，且该抗原能与 40% 的 NANB 肝炎患者血清产生反应，而甲型肝炎和乙型肝炎患者的血清阳性反应率只有 3.4%。进一步研究发现，NANB 肝炎患者血清中逆转录酶活性很低，必须将大量感染性血清经浓缩后才能测出。Prince 等报告用 NANB 肝炎患者的血清接种于原代正常人及黑猩猩肝细胞，并改进培养方法后成功地分离到一种具有壳膜蛋白的病毒颗粒，其直径为 85~90nm，核心为 40~45nm，将此种感染细胞匀浆后再接种给黑猩猩可引起肝炎，并认为这种颗粒是一种逆转录病毒，可能与 NANB 肝炎致病因子有关。

NANB 肝炎的致病因子是一种逆转录病毒的研究令人感兴趣，但也有相反的报道。Khan 等对来自 11 个家系因输血感染 NANB 肝炎的患者血清均未查到逆转录酶活性，对 11 例血液透析合并 NANB 肝炎的患者血清中亦未查到逆转录酶活性。同时他们还检测了多批凝血因子和丙种球蛋白等血液制品，也未测到逆转录酶活性，更没有发现逆转录样病毒颗粒。将这些凝血因子浓缩物感染黑猩猩，尽管造成黑猩猩发病，但同样检测逆转录酶活性呈阴性。后来证实，Prince 等接种 NANB 肝炎血清的肝细胞培养物中所观察到的逆转录病毒样颗粒不是 NANB 肝炎致病因子，而是灵长类细胞培养中被污染的一种逆转录酶病毒，这种病毒称为 simian foamy virus。后来多数研究工作形成较一致的看法，即 NANB 肝炎病原不是逆转录病毒。

用 NANB 肝炎患者的血清感染动物获得成功, 对 NANB 肝炎病原研究起了重要的作用。Alter 等 (1978 年) 首次将 NANB 肝炎患者血清感染黑猩猩, 并造成黑猩猩肝脏发生类似人类 NANB 肝炎的病理改变, 且这一结果被其他学者所证实。这一研究的重要意义在于: ①证明 NANB 肝炎病原是可传播的致病因子; ②建立了可靠的动物模型, 为研究 NANB 肝炎的病原、发病机制、病理和临床转归奠定了基础。

Schaff 等研究者利用黑猩猩 NANB 肝炎模型从感染的组织学、免疫组织化学分析和原位杂交等方面对 NANB 肝炎进行研究。研究发现, 在接种感染性血清后 4~14 周, 电镜下可以观察到肝细胞有特征性超微结构改变; 免疫组化显示疑似病毒相关抗原定位于细胞膜下以及细胞核周围, 呈散在分布, 而淋巴细胞、胆管、血管等其他组织未见阳性染色; 用一长 780bp 的 NANB 肝炎患者血清中获得的 DNA 探针对 3 个感染 NANB 肝炎黑猩猩肝组织进行原位杂交, 结果两只在血清 ALT 升高前 1~2 周即可阳性, 另一只在接种 7 周后也检测阳性, 而用 HBV DNA 探针检测为阴性。

在研究提示 NANB 肝炎是由病毒所致后, 许多学者对其理化特性进行了探讨。血清经氯仿处理后可以有效地防止实验感染的黑猩猩肝组织内形成特征性病变, 这一事实提示 NANB 肝炎病毒结构中存在重要的脂质结构。对感染性血清进行过滤试验, 过滤的每一步骤均设有平行对照, 以便估计能通过滤膜或被阻留的病毒大小。将感染性血清和已知大小的对照病毒通过 100、80、50 和 30nm 的滤膜, 然后将滤过物接种到黑猩猩和组织培养物中, 并用标准的方法测定感染性。结果证实, NANB 肝炎病毒能通过 100、80 和 50nm 滤膜, 但完全被 30nm 滤膜所阻留。通过与能滤过或被阻留的已知大小的病毒比较, 估计 NANB 肝炎致病因子的大小介于 30~60nm 之间。

由于符合这样一种既有脂质外膜而直径又在 30~60nm 之间条件的病毒为数较少, 研究者多考虑以下两种, 即黄病毒属和嗜肝病毒属。嗜肝病毒属中 HAV 和 HBV 已经排除, 而有无可能是类似丁型肝炎病毒 (HDV) 样的结构引起学者们的兴趣。对此研究发现, NANB 肝炎和丁型肝炎具有非常相似的肝组织病理学效应, 均可在细胞质中形成相同的管状结构。另一方面, 两者与 HBV 感染有密切相关性, 且均可呈慢性感染。但无论从临床研究, 还是血清学调查, 均否定两者有明确的相关性。

在提出了 NANB 肝炎是一种病毒感染性疾病后, 许多学者试图建立特异性的血清学检测手段。早期研究认为, 一般病毒感染在急性期血中存在大量的病毒抗原和病毒颗粒, 进入恢复期后应出现相应的抗体。因此, 在研究的开始阶段均采用常规的免疫学方法对 NANB 肝炎患者不同时期的血清做了大量分析, 但均未能稳定发现病毒的抗原或抗体。后来研究推测, NANB 肝炎病毒类似黄病毒, 而黄病毒属感染存在一重要特点, 即在被感染的动物体内病毒含量较低。用系列稀释的输血后 NANB 肝炎患者急性期血清分别接种黑猩猩, 也证实 NANB 肝炎病毒的感染性远低于 HBV 感染。因此, 长期未能检测出 NANB 肝炎病毒相关抗原或抗体的原因, 不是感染者缺乏免疫反应, 而是由于病毒抗原浓度太低, 现有的常规免疫分析方法敏感性不能达到所检测的浓度。为了使这一问题取得突破, 研究者们开始考虑采用分子克隆技术, 以期首先获得病毒的基因组, 再经重组和表达获得抗原, 继而建立病毒的免疫学检测方法。事实证明, 这一学术思路对 NANB 肝炎病原研究起了极其重要的作用。

NANB 肝炎研究的重要历程见表 1-2。

表 1-2 NANB 肝炎研究的重要历程

时间	研究内容	报告者
1974 年	发现输血后肝炎并非由 HAV 和 HBV 所致	Prince 等
1975 年	提出 NANB 肝炎的概念	Editorial
1978 年	黑猩猩感染成功	Alter 等
1984 年	提出感染黑猩猩肝组织中 TFA 及其性质	Bradly 等
1985 年	经过滤试验提出致病因子的大小	Bradly 等
1985 年	试验性黑猩猩肝细胞中可疑病毒抗原检测	Krawczynski 等
1985 年	经单个核细胞传播 NANB 肝炎的证实	Helling 等
1989 年	发现部分病毒基因序列	Choo 等
1989 年	建立第一代病毒特异性抗体检测方法	Kuto 等
1990 年	建立 RT-PCR 检测病毒核酸	Weiner 等

第二节 丙型肝炎病毒基因组的发现及其意义

一、丙型肝炎病毒基因组的发现

鉴于常规的免疫学方法不能检出病毒的抗原和抗体,采用传统的病毒分离技术也不能发现病毒,故在 80 年代初期就开始了以黑猩猩肝和血为材料对致病因子进行分子克隆,试图寻找与 NANB 肝炎病毒相关的基因组。Choo 等先是从许多实验感染的黑猩猩肝脏中提取 RNA 入手,以噬菌体为载体并获得 2×10^6 个克隆并用许多感染性血清进行筛选。经筛选虽然获得了阳性克隆,但经基因序列分析和血清学鉴定,均证明这些克隆中没有一个是与 NANB 肝炎基因组有关。

因此,他们放弃了肝脏改用血浆为材料,即采集一些慢性感染的黑猩猩血浆并混合在一起,这些混合血浆经测定其滴度为 10^6 CID/ml,这一滴度与急性期患者血浆滴度相近。将总体积为 1L 的血浆经稀释和超速离心后,取沉渣从中提取总的核酸。因病毒的核酸类型不明,故首先将所得的核酸先进行变性,使其呈单链,然后将所获得的核酸在随机引物存在下逆转录,使全部核酸变成 DNA 或 cDNA,并克隆到噬菌体载体 γ gt11。在噬菌体载体 γ gt11 中可使克隆的 cDNA 得到高效表达,合成它所编码的多肽。

由于所采集的核酸是血浆中总的核酸成分,且将 RNA 逆转录成 cDNA 也是在随机引物作用下,故获得的 10^6 个克隆也是非特异性的,必须进行筛选。将表达的多肽置于硝酸纤维滤膜上,然后用临床上慢性 NANB 肝炎患者的血清作为特异性抗血清进行筛选,从 cDNA 基因库中共筛选出 5 个阳性克隆,其中有一个克隆编码的抗原能稳定地结合慢性 NANB 肝炎患者血清中的抗体,并命名为 5-1-1。对 5-1-1 克隆基因进行序列分析,获得了第一段有关 NANB 肝炎病毒基因(图 1-1)。

与此同时,日本岡山大学医学院 Arima 等用相同的方法成功地分离出 NANB 肝炎病毒基因。他们从 1047 例 ALT 升高和 HBV DNA 阴性的供血员中收集血清 100L,从

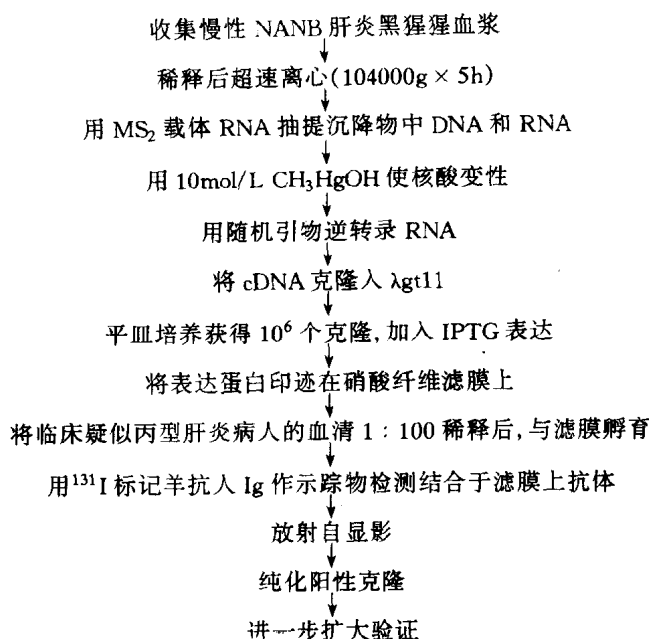


图 1-1 NANB 肝炎病毒基因发现的实验过程
注: IPTG (isopropyl thiogalactoside) 为异丙基-β-D-硫代半乳糖苷

中提取 RNA 并建立 cDNA 库, 用急慢性 NANB 肝炎患者的血清作抗体对 cDNA 库表达的产物进行筛选, 共筛选出 29 个阳性克隆, 其中部分序列与 Choo 等报道的序列有较高的同源性。首次从不同国家研究证实了 5-1-1 基因序列是 HCV 病毒基因序列(图 1-2)。

HCV-US	ATCATACCTG	ACAGGGAAGT	CCTCTACCGA	GAGTTCGATG
HCV-J	G-T-T-C-		AG	
	AGATGGAAGA	GTGCTCTAG	CACTTACCGT	ACATCCAGCA
		TGTCG	C-C-T-	
	AGGGATGATG	CTCGCCGAGC	AGTTCAAGCA	CAAGGCCCTC
	A-CA-	A	A	G-
	GGCCTC			
	AT-G			

图 1-2 NANB 肝炎病毒基因克隆 5-1-1 核苷酸序列及不同株间的比较
注: HCV-US 为 Choo 克隆株, 又称美国株; HCV-J 为日本株

二、非甲非乙型肝炎基因组发现的意义

1. 明确将 NANB 肝炎 (P) 定义为丙型肝炎。成功地获得 NANB 肝炎病毒基因组后, 长期围绕人们的 NANB 肝炎病原问题就迎刃而解了。由于几乎同时成功地分离出 NANB 肝炎 (E) 的病原, 这样使 70 年代提出的 NANB 肝炎概念得以废除。1989 年 9 月东京国际 NANB 肝炎及血液传播性疾病会议上, 明确将 NANB 肝炎 (P) 命名为丙型肝炎, 其病原相应定名为 HCV, 将 NANB 肝炎 (E) 命名为戊型肝炎, 其病原也相应地定名为戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV)。这一命名, 使整个病毒性肝炎的名称简明而又合理。但是, HCV 能否成为全部 NANB 肝炎 (P) 唯一病原问题, 这是

一个值得深入研究的问题。

2. 建立了丙型肝炎特异性诊断方法。HCV 基因克隆的成功并获得 HCV 抗原多肽, 使建立丙型肝炎血清学方法成为可能。将 5-1-1 克隆基因与另外三个重叠克隆基因相互连结并形成 C100 基因片段。为了促进 C100 基因高效表达, 将 C100 基因和人超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 基因相融合, 并在重组的酵母菌中表达出一个融合多肽, 称为 C100-3 抗原, 这是建立第一代酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 所采用的抗原。在此基础上, 又相继加用其他区段的抗原建立第二代 ELISA 和重组免疫印迹试验 (recombinant immunoblot assay, RIBA) 检测抗 HCV, 使丙型肝炎血清学诊断日趋完善, 为临床病毒性肝炎的病原诊断提供了有效的手段。

HCV 病毒核酸序列的明确, 为开展丙型肝炎基因诊断创造了条件。由于 HCV 感染时病毒血症水平较低, 常规的分子杂交技术其敏感性尚难以达到, 必须依赖基因扩增技术。针对已知的病毒序列设计引物, 经逆转录后使 HCV RNA 转变成 HCV cDNA, 进行第一次基因扩增。然后取第一次基因扩增产物, 再进行第二次基因扩增, 这样经过两次基因扩增过程, 使低水平的病毒基因片段呈百万倍的增加后, 再用电泳法或分子杂交技术对扩增的片段进行鉴定。这一过程称为逆转录-聚合酶链反应 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)。

3. 为发现或研究其他未知病毒或病原体提供了新的技术路线。在此之前, 在研究新的病原体时, 常常先分离到完整的病原体, 或从感染者体内获得病原体相关抗原, 再对病原体的结构、核酸类型及序列进行鉴定。如 HAV 的病原研究是先从感染的人或动物的粪便中成功地分离到完整的病毒, 然后再进行分离培养并获得相关的抗原, 在此基础上建立了特异性血清学反应。乙型肝炎的病原研究是首先在感染的人体血清中检测到相关抗原, 然后采取超速离心法分离到完整的病毒颗粒, 再建立相应的抗原抗体检测系统。丙型肝炎的研究是采用先进的分子生物学技术首先从感染的动物或人血清中分离到病毒的基因片段, 然后依靠基因重组技术获得抗原, 再建立抗体检测系统。这一技术路线是一种创新的学术思想, 尤其是病毒感染水平较低, 常规方法难以获得完整病毒或病毒抗原更有其实际价值 (图 1-3)。

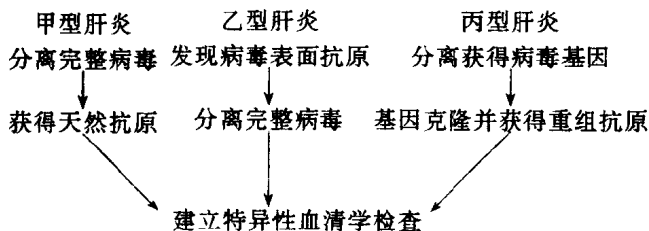


图 1-3 甲型、乙型和丙型肝炎病原研究的技术路线比较

第三节 丙型肝炎的研究现状及存在问题

一、病毒的生物学特性和基因结构

黑猩猩的实验感染模型建立, 为研究 HCV 的生物学特性提供了有利的条件。研究

发现, HCV 直径约 30~60nm, 有脂类外膜, 最低沉降系数为 140s, 在蔗糖中密度为 1.09~1.11g/ml, 经 1:1000 福尔马林 37℃ 96 小时处理, 加热 100℃ 5 分钟, 10%~20% 氯仿或 60℃ 10 小时均可使其灭活。长期研究始终未能明确发现病毒的完整形态, 这与丙型肝炎患者和实验动物病毒血症水平较低密切相关。尽管有少数学者将感染性血清超速离心浓缩后, 在免疫电镜下观察到病毒颗粒, 但尚缺乏足够的证据证明所观察到的病毒颗粒就是 HCV。因此, 寻找 HCV 颗粒, 研究其形态和结构特征, 为进一步探讨病毒的生物学特性和指导防治有重要的意义。

HCV 的基因结构研究已较为深入。HCV 为单股、正链的 RNA 病毒, 其基因全长约 9.4kb 核苷酸 (nt), 由 5' 末端、3' 末端和位于两个末端之间的单一开放读码框架 (open reading frame, ORF) 三个部分组成。5' 末端具有高度的保守性, 在病毒的复制和保持病毒的性状方面起重要作用。3' 末端含有 27~55nt, 其长度取决于不同来源的分离株, 在病毒的复制过程中可能也起一定的调节作用。单一的 ORF 长约 9030nt, 编码 3010 个氨基酸 (amino acid, aa), 称病毒多蛋白前体 (precursor polyprotein)。这一大的病毒蛋白前体, 经宿主基因和病毒基因编码的蛋白酶等一系列酶切修饰, 形成不同大小和功能不一的病毒蛋白。这些病毒蛋白目前主要分为两大类: ①结构蛋白, 位于 5' 末端, 包括核心蛋白 (C)、包膜蛋白 (E1、E2/NS1), 是参与组成病毒颗粒的蛋白质; ②非结构蛋白, 包括 NS2~NS5, 是参与病毒复制和具有其他功能的蛋白质, 又称功能蛋白。HCV 基因存在显著的变异, 这一变异导致 HCV 不同的分离株间核苷酸序列和氨基酸序列存在不同程度的差别, 以此将 HCV 分为若干个亚型。

HCV 的核苷酸序列及编码的多肽与目前已知的其他病毒序列同源性极小, 提示是一种新的病毒。从 HCV 结构、部分区段的同源性以及多肽的亲水性等分析表明, 与黄病毒属 (如黄热病病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒等) 和动物瘟病毒属 (如牛腹泻病毒、猪霍乱病毒等) 存在某种亲缘关系, 这样可借黄病毒属和动物瘟病毒属的病毒特性, 促进 HCV 感染特别是病毒的生物学特性和疫苗的研究。

HCV 基因结构的研究较为深入, 但病毒的复制过程尚不十分清楚, 基因的变异规律以及与临床关系尚了解较少, 各基因区段的功能尚需进一步认识, 基因分型标准有待统一, HCV 与其他病毒的进化亲缘关系尚需进一步确认, 新的肝炎病毒如庚型肝炎病毒 (hepatitis G virus, HGV) 和 GB 因子与 HCV 之间是否存在一定的关联等也是研究中需要澄清的问题。

二、流行病学特征

丙型肝炎呈世界分布, 但以发展中国家发生率较高。在明确病原以前, 就已经对丙型肝炎流行病学特征进行了广泛深入的研究, 证明了传播途径的复杂性, 并提示与乙型肝炎极其类似。HCV 主要经输血传播, 输血后丙型肝炎发生率主要取决于供血员中 HCV 感染率的高低。不同的国家和地区其供血员中抗 HCV 检出率不一, 美国和日本的供血员为 1.2%~1.4%, 意大利为 0.9%, 法国为 0.7%, 德国为 0.4%, 英国为 0.3%~0.7%。我国供血员中抗 HCV 检出率不同地区有较大的差别, 多在 1.57%~17.4% 之间, 也有报道可高达 50% 以上。一般认为, 职业供血员比业余供血员感染率高, 单采浆供血员比献全血感染率高, 血清抗 HBc 阳性和 ALT 升高的供血员比抗 HBc 阴性和