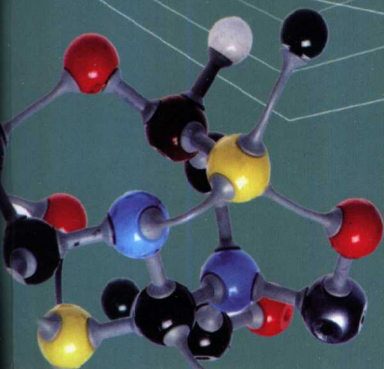


慢性病毒性肝炎

的临床分子生物学研究与基因治疗

主编 胡世平 陈少辉



军事医学科学出版社

慢性病毒性肝炎的临床分子 生物化学研究与基因治疗

主 编 胡世平 陈少辉

副主编 杨书兰 孙升云 郑学宝

编 委 李际强 杨钦河 张学海

王 超 张书贞 魏合伟

军事医学科学出版社
·北 京·

内 容 提 要

本书主要介绍慢性病毒性肝炎的分子生物学最新研究进展,分子生物学技术在慢性病毒性肝炎研究中的应用,慢性病毒性肝炎的基因治疗及目前基因疫苗的研究开发与临床应用情况。同时,本书也简要介绍了慢性病毒性肝炎及其并发症的诊断、病理和临床治疗。

本书适于从事慢性病毒性肝炎基础研究、疫苗研发、预防等工作的专业技术人员及肝病科临床医师阅读参考。

* * *

图书在版编目(CIP)数据

慢性病毒性肝炎的临床分子生物学研究与基因治疗/胡世平,陈少辉主编. - 北京:军事医学科学出版社,2002.11

ISBN 7-80121-268-1

I.慢… II.①胡… ②陈 III.①分子生物学-应用-病毒性肝炎:慢性病-研究 ②病毒性肝炎:慢性病-基因治疗 IV.R512.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 078086 号

* *

军事医学科学出版社出版

(北京市太平路 27 号 邮政编码:100850)

新华书店总店北京发行所发行

潮河印刷厂印刷 春园装订厂装订

*

开本:787mm×1092mm 1/32 印张:13 字数:290 千字

2003 年 3 月第 1 版 2003 年 3 月第 1 次印刷

印数:1-3000 册 定价:18.00 元

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

目前,慢性肝炎在全世界尤其是在第三世界国家的发病率相当高,治疗慢性肝炎为许多国家带来沉重的社会负担。据美国第三次全国健康和营养普查(NHANES III)与疾病控制和预防中心(CDC)2000年统计,美国每年在慢性病毒性肝炎方面耗资4百万美元以上,而每年的慢性肝炎患者死亡人数近2万。我国是慢性肝炎的高发国家之一,虽然我国目前还没有相应的统计数字,但相信会远远高于这个水平。因此,加强对慢性病毒性肝炎的研究刻不容缓。

分子生物学的迅猛发展,技术的日新月异,使人们看到了战胜疑难病症的光明前景。分子生物学方法在慢性病毒性疾病研究中起着越来越重要的作用,尤其是基因技术在慢性肝炎治疗和基础研究中的应用,为深入研究慢性肝炎的发病机理提供了新的研究方法,为慢性肝炎的治疗提供了新的思路 and 方向,亦可能成为人类征服慢性肝炎的有力武器。为此,我们组织肝病临床和分子生物学技术研究方面的专家编写了本书。本书主要介绍慢性病毒性肝炎的研究进展,分子生物学技术在慢性肝病研究中的应用及基因治疗和基因疫苗的研究

进展,希望能够抛砖引玉,为广大的临床医师和基础研究工作
者提供参考。

在本书即将付梓之时,谨向提供帮助和支持的专家和学者致以深深的感谢,并向付出了辛勤劳动的诸位编委和编审人员致以衷心的感谢。另外,分子生物学和基因技术内容丰富,涉及面较广,尽管我们力求做到严谨认真,但不当和疏漏之处在所难免,恳请大家批评指正。

编 者

2002 年 6 月

目 录

第一章 慢性病毒性肝炎新概念	(1)
第一节 慢性病毒性肝炎概述	(1)
一、慢性病毒性肝炎的研究概况	(1)
二、慢性病毒性肝炎的定义	(3)
三、常见的慢性病毒性肝炎	(4)
第二节 慢性病毒性肝炎的临床分型与病理分类	(9)
一、慢性肝炎临床分型与病理分类的历史沿革	(9)
二、慢性肝炎的病理组织学计分、分级和分期	(11)
三、慢性病毒性肝炎的临床分型	(15)
四、慢性病毒性肝炎的基本病理改变	(17)
第三节 病毒性肝炎的发生与慢性化机理	(20)
一、乙型病毒性肝炎	(20)
二、丙型病毒性肝炎	(28)
三、丁型病毒性肝炎	(34)
第四节 肝纤维化发生机理研究	(37)
一、肝纤维化概述	(37)
二、肝窦的组织学基础	(38)
三、细胞外基质的组成及其代谢和生物学功能	(39)
四、肝纤维化的形成机理	(45)
参考文献	(51)
第二章 慢性肝炎病毒的分子生物学研究	(55)
第一节 乙型肝炎病毒的分子生物学研究	(55)
一、HBV 的形态与结构	(56)

二、HBV 的基因组结构与功能	(57)
三、HBV DNA 的复制	(61)
四、HBV 基因的转录与调控	(62)
五、HBV 的结构蛋白与受体	(65)
六、HBV 基因变异和基因分型	(72)
七、HBV 的持续感染与其致癌机理的分子生物学 研究	(80)
八、分子生物学研究在乙型肝炎诊断与防治中的 应用	(83)
第二节 丙型肝炎病毒的分子生物学研究	(89)
一、HCV 的基因组结构与功能	(90)
二、HCV 基因编码的蛋白结构与功能	(92)
三、HCV RNA 的复制	(98)
四、HCV 的基因变异及基因分型	(99)
五、HCV 的受体	(104)
六、丙型肝炎慢性化及致肝细胞癌的分子生物学 机理	(105)
七、分子生物学研究在丙型肝炎诊断与防治中的 应用	(110)
参考文献	(113)
第三章 慢性病毒性肝炎的治疗	(122)
第一节 概 述	(122)
第二节 抗 HBV 的药物治疗	(123)
一、干扰素	(123)
二、核苷类似物	(126)
三、导向疗法	(136)
四、中医药疗法	(137)

五、小结	(137)
第三节 丙型病毒性肝炎的药物治疗	(139)
第四章 基因疗法	(142)
第一节 概 述	(142)
一、基因治疗的类型	(143)
二、基因治疗主要实现途径	(144)
三、基因治疗所需解决的关键技术	(145)
第二节 对基因转移系统的研究	(145)
一、病毒介导的基因转移系统	(145)
二、非病毒载体	(157)
第三节 慢性乙型肝炎的基因治疗	(163)
一、基因封闭策略	(164)
二、基因免疫调节策略	(187)
第四节 丙型肝炎的基因疗法概况	(208)
参考文献	(212)
第五章 肝炎并发症的治疗	(218)
第一节 肝性脑病	(218)
一、发病机理	(218)
二、临床表现症状与体征	(221)
三、实验室检查	(222)
四、诊 断	(223)
五、治 疗	(223)
第二节 肝 癌	(225)
一、发病机理	(226)
二、病理学变化及分型	(227)
三、临床表现	(229)
四、实验室检查	(230)

五、诊 断	(231)
六、治 疗	(232)
第三节 肝硬化	(239)
一、发病机理	(239)
二、病理学改变	(240)
三、病理生理	(240)
四、临床表现	(244)
五、实验室检查	(245)
六、诊断与鉴别诊断	(246)
七、治 疗	(247)
第四节 脂肪肝	(250)
一、发病机理	(250)
二、临床表现	(251)
三、实验室检查	(251)
四、诊 断	(251)
五、治 疗	(252)
第五节 肝内胆汁淤积与高胆红素血症	(252)
一、发病机理	(252)
二、临床表现	(253)
三、诊 断	(254)
四、治 疗	(254)
第六节 糖代谢障碍	(255)
一、糖尿病	(255)
二、低血糖症	(258)
第七节 消化性溃疡	(260)
一、发病机理	(260)
二、病理学变化	(261)

三、临床表现	(261)
四、实验室检查	(261)
五、诊 断	(262)
六、治 疗	(262)
第八节 腹 泻	(262)
一、发病机理	(262)
二、临床表现	(263)
三、实验室检查	(263)
四、诊 断	(264)
五、治 疗	(264)
第九节 神经系统疾病	(264)
一、发病机理	(264)
二、临床表现	(265)
三、实验室检查	(266)
四、诊 断	(266)
五、治 疗	(267)
第十节 血液系统并发症	(267)
一、贫 血	(267)
二、再生障碍性贫血	(269)
三、脾功能亢进	(271)
四、凝血功能障碍	(273)
五、弥漫性血管内凝血	(276)
参考文献	(280)
第六章 分子生物学技术在慢性肝炎诊断上的应用	(285)
第一节 概 述	(285)
第二节 分子生物学技术基础	(286)

一、核酸分子杂交技术	(286)
二、聚合酶链反应	(293)
第三节 基因诊断的基本理论	(303)
一、基因诊断的定义及特点	(303)
二、基因的结构与基因突变	(304)
第四节 基因探针技术	(307)
一、何谓基因探针	(307)
二、基因探针分类	(308)
三、基因 DNA 探针片段的制备	(308)
四、基因探针的标记	(309)
第五节 基因诊断技术	(311)
一、用 PCR 诊断病毒血症的有关问题	(311)
二、病毒核酸定量测定	(313)
三、原位杂交试验	(317)
四、肝炎病毒序列多样性分析技术	(321)
五、基因诊断技术的临床应用评述	(325)
六、各种诊断方法的应用	(326)
第六节 乙型肝炎分子生物学诊断的应用	(328)
一、概 述	(328)
二、应用 PCR 检测乙型肝炎	(329)
三、PCR 检测 HBV 携带者的 HBV DNA	(331)
四、PCR 检测肝组织和外周血单个核细胞(PBMC)中的 HBV DNA	(332)
五、PCR 分析 HBV 基因的异质性	(334)
第七节 丙型肝炎的分子生物学诊断技术在 HCV 肝病中的应用	(335)
一、HCV RNA 的定性检测	(335)

二、肝细胞肝癌中 HCV 感染的 RNA 正链和负链 病毒的检测	(340)
三、用 5' - 非翻译区探针直接狭线杂交检测血清中 HCV RNA	(343)
第八节 肝炎病毒变异及其检测方法	(347)
一、HBV 变异性及其检测方法	(347)
二、HCV 异质性及其检测方法	(356)
参考文献	(357)
第七章 慢性肝炎基因工程疫苗的研究	(359)
第一节 乙型肝炎的基因工程疫苗研究及应用进展	(359)
一、乙型肝炎疫苗的研究和发展简况	(359)
二、乙型肝炎疫苗在我国的应用情况	(361)
第二节 乙型肝炎疫苗的临床应用	(364)
一、疫苗免疫方案 and 对象	(364)
二、免疫效果	(369)
三、决定免疫应答的因素	(373)
四、免疫策略	(375)
五、发展中的疫苗	(377)
第三节 乙型肝炎疫苗免疫失败的原因及对策	(381)
一、病毒原因	(381)
二、疫苗原因	(382)
三、接种因素原因	(382)
四、机体因素原因	(382)
五、对免疫无应答者的对策	(383)
第四节 丙型肝炎的基因工程疫苗研究及应用	(384)
一、丙型肝炎病毒的基因结构	(385)

二、机体免疫应答	(385)
三、丙型肝炎疫苗研究及应用进展	(389)
第五节 核酸疫苗的作用机理	(394)
参考文献	(397)

第一章 慢性病毒性肝炎新概念

第一节 慢性病毒性肝炎概述

一、慢性病毒性肝炎的研究概况

人类对肝炎的研究历史大约可分为四个阶段：

第一个阶段(史前期~19世纪末)

这个阶段人类只是对黄疸简单记录和对流行事件进行描述。在西方医学中最早是希腊人希波克拉底(Hippocrates)描述记载黄疸,早在8世纪就有黄疸感染流行事件的记载。1883年Lurman报道了码头工人种痘后血清肝炎的暴发流行。

第二个阶段属于研究的初期(20世纪初叶至中叶)

标志是1908年McDonald最先提出传染性的黄疸是由病毒引起的假设,从此人类开始了对病毒性肝炎的研究历程。直到1947年,才由Mac Callum提出了肝炎的分类。他认为病毒性肝炎应该分为两类,甲型病毒性肝炎是可传染的,而乙型病毒性肝炎只是血清肝炎(serum hepatitis)。

第三个阶段是肝炎研究的发展期(1965~1985年)

以1965年Blumberg在澳大利亚土著人身上发现了澳大利亚抗原(乙型肝炎表面抗原,简称“澳抗”, hepatitis B surface

antigen, HBsAg)为标志,从此人类对肝炎的研究飞快地开展起来。在这一阶段人类发现了更多类型的肝炎病毒。例如,1970年 Dane 发现了乙型肝炎病毒的完整颗粒;1972年, Mag-nius 发现了乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg);1973年, Feinstone 和 Purcell 鉴别出了甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV);1977年, Rizzetto 发现了丁型肝炎病毒抗原; Balayan 1983年发现了戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV),等等。并研制出了一些肝炎疫苗,1970年, Krugman 等研制出血源性亚单位乙型肝炎(hepatitis B, HB)疫苗和一些有效的治疗药物。1976年, Greenberg 等首次将 α 干扰素成功用于慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的治疗。

第四个阶段为肝炎研究的高速发展期(1985年至今)

主要以 1985 年聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术在肝炎研究上的应用为标志,从此各种分子生物学技术在肝炎研究的各个方面都得到了更为广泛的应用,使各方面的研究进入到分子水平,促进了分子病毒学的更快发展。在这一阶段更多的肝炎病毒被发现,更多的有效新药不断涌现,成为研究史上的鼎盛时期。

1988年, Chiron 公司的 Choo、Kuo、Houghton 等克隆并鉴别出丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)。1993年, 拉米夫定(lamivudine)开始用于慢性病毒性肝炎治疗的临床试验,1999年在我国批准上市。1995年, Genelabs 技术公司宣布发现庚型肝炎病毒(hepatitis G virus, HGV);1997年, Nishizawa 等应用 PCR 差别分析法发现输血传播型病毒(transfusion-transmitted virus, TTV)。目前对肝炎病毒已比较清楚,人类已发现的肝炎病毒有甲型、乙型、丙型、丁型、戊型和庚型病毒,以及输血传播性病毒和微小病毒 B19 等,这些病毒的传播途径有两种:

粪-口传播和经血液或血制品传播。各型肝炎病毒的特点见表 1-1。

表 1-1 各型肝炎病毒特点

肝炎及其 病毒分型	核酸型	颗粒大小 (nm)	传播方式	发现时间 (年)
甲型肝炎 HAV	肠病毒 (Enterovirus) RNA 型	27	肠道	1973
乙型肝炎 HBV	嗜肝 DNA 病毒 (Hepadnavirus) DNA 型	42	血液,母婴 垂直传播	1970
丙型肝炎 HCV	黄病毒 (Flavivirus) RNA 型	50 ~ 60	血液	1989
丁型肝炎 HDV	类病毒相关 (Viroid - related) RNA 型	36	血液	1986
戊型肝炎 HEV	杯状病毒 (Calicivirus) RNA 型	27 ~ 34	肠道	1990
庚型肝炎 HGV	RNA 型	—	血液	1995
输血传播型 肝炎	DNA 型 TTV	—	血液或肠 道传播	1997

引自: Seeff. 编著者略有改动

二、慢性病毒性肝炎的定义

慢性病毒性肝炎是指由肝炎病毒引起的病程持续在半年以上的肝脏慢性炎症,或原有肝炎病毒携带史,本次又因同一

病原再次出现肝炎症状、体征及肝功能异常者均可诊断为本病。在肝炎病毒中,只有乙型、丙型和丁型肝炎病毒能够引起成人或儿童的慢性肝炎,其中乙型肝炎病毒感染是最普遍最重要的一种。临床上,慢性病毒性肝炎症状轻微,甚至无任何症状,常常被忽视,而当发现时,肝炎往往已经到了肝硬化阶段。甚至到了肝硬化阶段,仍然有一些患者还是没有很显著的症状,所以反复进行实验室检查对确诊慢性肝炎来说是很必要的。临床上,慢性病毒性肝炎最常见的症状是间歇性不适或乏力,纳差、恶心、腹痛,肌肉或关节痛,严重者有明显并持续的黄疸、腹胀、便溏等,甚至伴有肝病面容、肝掌、蜘蛛痣、肝脏肿大、脾脏肿大等临床体征。少数患者可发展为肝硬化,极少数病例可呈重型肝炎的临床过程。血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸氨基转氨酶(AST)通常可以显示肝炎的不同严重程度,不过有时发生了肝炎其值却仍在正常值范围之内。所以正常值并不意味着没有发生肝炎或者肝炎是静止的,而且其值升高的程度也并不与慢性肝炎的组织学活性成正比。当发生慢性肝炎时,血清胆红素、白蛋白等通常也是在正常范围之内或者仅有轻度的升高,当然严重患者必须除外。

三、常见的慢性病毒性肝炎

根据引起慢性病毒性肝炎的病因可分为慢性乙型肝炎(CHB)、慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)以及慢性丁型肝炎(chronic hepatitis D, CHD)。各种慢肝炎的比例随着病毒感染频率、种族背景、高危人口的分布而有较大的差异。

(一)慢性乙型病毒性肝炎

慢性乙型肝炎(CHB)是一种常见病、多发病。HBV感染呈全球性分布,可能半数以上人口曾受感染,每年发生5千万