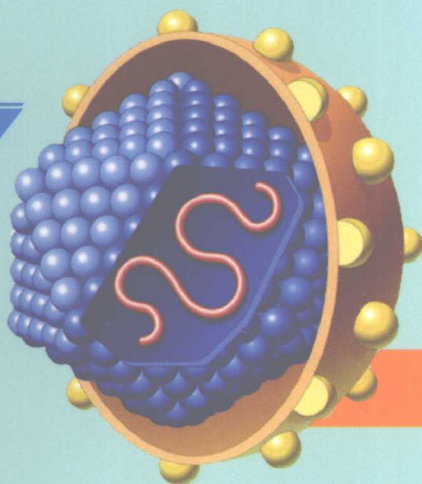


主 编 / 段学章 张 敏

丙型肝炎 防治新进展



BINGXING BINGDUXING
GANYAN FANGZHI
XIN JINZHAN



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

第2版 2014年12月第1次印刷

内科学 病毒性肝炎 防治新进展



本书是《病毒性肝炎防治指南》的
最新修订版，由中华医学会肝病学
分会、感染病学分会、免疫学分会
共同编写。



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

BINGXING BINGDUXING GANYAN
FANGZHI XINJINZHAN

丙型病毒性肝炎 防治新进展



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

丙型病毒性肝炎防治新进展/段学章,张敏主编. —北京:人民军医出版社,2010.2
ISBN 978-7-5091-3432-0

I. ①丙… II. ①段…②张… III. ①丙型肝炎-防治 IV. ①R512.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 005688 号

策划编辑:马莉 文字编辑:魏新 责任审读:吴然
出版人:齐学进

出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店
通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927301

网址:www.pmmp.com.cn

印、装:北京蓝迪彩色印务有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:9.75 字数:229千字

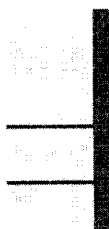
版、印次:2010年2月第1版第1次印刷

印数:0001~3000

定价:40.00元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换



— 内容提要

本书根据近几年丙型肝炎的最新研究进展,对丙型肝炎的基础研究、流行现状及预防特点、疫苗研究、临床诊断及鉴别、抗病毒治疗、免疫调节及综合治疗、肝硬化及肝衰竭处理以及中医治疗等方面均做了详尽的阐述。内容系统全面,反映了国内外有关方面的最新进展,适于感染科医师、全科医师、公共卫生医师等有关研究人员和研究生参考阅读。

序

目前,世界范围内确诊为丙型肝炎病毒(HCV)感染患者的人数达1.3亿~1.7亿,且每年有300万左右新增病例。根据生育高峰期的人口数目推断,患慢性丙型肝炎患者的基数将在2019年达到高峰,估计会超过2亿。目前,我国的HCV感染者至少3000万例。中国疾病预防控制中心(CDC)的资料表明:2008年丙型肝炎上报的病例数较2007年增加了16.79%,死亡患者比2007年增加了6.9%。预测2009年后HCV发病率将呈逐年增高趋势。

丙型肝炎病毒感染后,部分患者会发展成慢性持续进展性肝病,进而演变为肝硬化甚至肝细胞癌。由于目前尚缺乏有效疫苗进行预防,必须严格参照预防艾滋病的常识学会个人防护,慢性丙型肝炎患者也应得到专业的治疗,因此需要普及相关知识,做到全民重视HCV感染,共同树立“早发现、早诊断、早治疗”的理念,各科医务人员需要积极参与对高危人群的主动筛查,给予合理治疗、监测与管理。加快和提高人群对丙肝病毒防治的认知度是各科医护、管理和卫勤人员的共同职责,也是主编组织编写本书的最重要目的。

在丙型肝炎抗病毒治疗过程中,干扰素联合利巴韦林(RBV)的治疗方案已在国内外获得共识。延长疗程可明显增加应答率。一些前期临床试验的结果显示,蛋白酶抑制药(Boceprevir和Telaprevir)与聚乙二醇干扰素(PEG-IFN)/RBV有机配合,可明显提高持续应答率(SVR),还可明显缩短疗程,这给难治性丙型肝炎患者带来了希望。而特异性靶向抗HCV治疗药物的研究正方兴未艾。新药在不断涌现,这已成为抗HCV治疗研究的重要方向。

本书由解放军第302医院两位年轻博士、临床副主任医师担当主编,多位博士、硕士参与编写。通过精心策划,分工负责、去粗取精地采集近年来国内外专业会议中有关丙型肝炎防治的最新信息,结合自己的科研和临床实践编写本书。书稿写成后我们荣幸提前阅读,受益匪浅。我们认为:本书对感染病(含传染病院)专科、肝病科与消化内科、肾内科、血液科、妇产科、口腔科、内分泌科、免疫科、外科及移植科的专业医师特别有实用和参考价值。更可为基层各医院、门诊部、急诊部、疗养院、社区保健站的全科医师、防疫人员作为教材。本书提供的资料,给丙型肝炎患者及其家属带来了治疗新理念、新进展和新福音。我们相信随着低耐药率、高疗效、不良反应少的新型抗丙肝病毒药物的不断研发和个体化治疗方案的不断实践和深入,不久的将来,丙型肝炎的防治一定会有更新、更好的突破。

张玲霞 王永怡

2009年11月

前 言

丙型肝炎病毒于1989年被发现,20年以来,人们针对HCV的基础和临床研究均取得了很大的进展。2004年中华医学会公布了《丙型肝炎防治指南》,国外近年也有新的指南和共识问世,丙型肝炎的诊治方案不断更新,更为规范。因此,目前很有必要对丙型肝炎的动态研究情况和临床诊治的最新进展特点进行总结。

我们邀请我院的10位博士(包括3名博士后)、5位硕士共同编写了本书,内容为近3年国内外发表的研究论文或综述,具体内容涵盖了丙型肝炎病毒的基础研究、临床诊断、治疗及预防的系统概况和最新理念,同时结合我们自身的相关基础研究课题和临床实践经验。另外,也包括了近年的热点问题如丙型肝炎与母婴传播、丙型肝炎与非酒精性脂肪肝、丙型肝炎肝纤维化的非侵入性检查(Fibroscan)的研究进展及肝移植后丙型肝炎的复发等。本书可以为从事丙型肝炎基础研究和教学工作的人员提供参考,也为临床工作的专业医务人员和全科医生对丙型肝炎的诊治与防护提供帮助,还可为内外妇儿各科、疗养院、保健单位、社区医疗所的医护人员提供参考。对希望了解丙型肝炎的广大患者及其家属,也能起到熟悉疾病、普及知识的作用。

感谢张玲霞教授和王永怡教授对本书的策划与指导,他们的辛勤劳动使本书的结构更为合理,内容更为充实。

本书疏漏或不当之处,希望阅读本书的同道给予批评指正。

段学章 张 敏

2009年11月于北京解放军第302医院

目 录

第 1 章 丙型肝炎病毒学、免疫学特征及分型	1
一、丙型肝炎病毒的基因结构和功能	1
二、丙型肝炎病毒感染的免疫学特征及免疫逃逸	6
三、丙型肝炎病毒的分型和准种	11
第 2 章 我国丙型肝炎流行现状及防治目标	17
一、丙型肝炎的流行病学特点	17
二、国外丙型肝炎的流行状况	18
三、我国丙型肝炎的流行现状	19
四、丙型肝炎的防治目标	21
第 3 章 丙型肝炎的临床诊断及鉴别	24
一、急性丙型肝炎的临床诊断	24
二、慢性丙型肝炎的临床诊断	27
三、丙型肝炎的鉴别诊断	34
第 4 章 丙型肝炎的母婴传播	43
一、孕妇的感染率	43
二、母婴传播的发生率	43
三、母婴传播的诊断	44
四、母婴传播的途径	45
五、母婴传播的影响因素	46
第 5 章 丙型肝炎的病理学研究	50
一、基本病理学特征	50
二、肝组织损伤和丙型肝炎病毒含量与肝炎症和纤维化的关系	51

三、丙型肝炎病毒感染与肝脂肪变性	52
四、丙型肝炎合并其他疾病	53
五、丙型肝炎与干扰素治疗	54
六、HCV 感染与铁负荷的研究	55
第 6 章 丙型肝炎的发病机制研究	57
一、病毒直接的细胞毒性作用	57
二、丙型肝炎的免疫学机制	58
三、HCV 感染与细胞凋亡	62
第 7 章 丙型肝炎的抗病毒治疗	66
一、概述	66
二、急性丙型肝炎抗病毒治疗方案	67
三、慢性丙型肝炎抗病毒治疗方案	68
四、利巴韦林对干扰素抗病毒作用及病毒学应答的影响	69
五、抗病毒治疗应答的类型	70
六、影响抗病毒疗效的因素	71
七、无应答慢性丙肝治疗策略	73
八、抗病毒治疗药物使用的禁忌证及药物不良反应处理	74
九、个体化治疗和治疗的依从性	75
十、小儿和老年丙型肝炎的治疗	75
十一、丙型肝炎肝硬化的治疗	76
十二、有前景的新治疗药物	76
十三、结语	80
第 8 章 综合治疗和免疫调节治疗在丙肝防治中的作用	82
第 9 章 丙型肝炎合并其他病毒感染的治疗	85
一、合并 HIV 的治疗	85
二、合并 HBV 的治疗	87
三、合并 GBV-C/HGV 的治疗	88
四、合并 SEN 的治疗	88
第 10 章 丙型肝炎与非酒精性脂肪肝	90
第 11 章 丙型肝炎肝外表现的诊断和治疗	93
一、丙型肝炎的肝外表现	93
二、丙型肝炎肝外表现的治疗策略	94
三、丙型肝炎合并自身免疫性肝炎的诊断与治疗	96
四、丙型肝炎与酒精性肝病	97

第 12 章 丙型肝炎肝硬化及肝衰竭并发症处理原则	103
第 13 章 中医药治疗丙型肝炎的进展	111
第 14 章 肝移植后丙型肝炎的复发与治疗	118
第 15 章 丙型肝炎的预防策略聚焦	127
一、丙型肝炎的传播	127
二、丙型肝炎的预防	128
第 16 章 丙型肝炎的疫苗研究	132
附录 丙型肝炎防治指南	137

第 1 章

丙型肝炎病毒学、免疫学特征及分型

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)发现至今已 20 年,人们对它的病毒学和免疫学特征的研究不断深入和确切,对它的致病性等认识也逐步深化。可以说, HCV 致病性的深入研究、新型药物的开发及疫苗的研制均与其病毒学特征密切相关。因此认识 HCV 的基因结构、免疫学特征、变异与分型是 HCV 研究的基础。本章将分三部分介绍 HCV 的病毒学特征、它感染人体后引起的机体免疫学特征以及它的变异与分型。

一、丙型肝炎病毒的基因结构和功能

近年来,随着人们对 HCV 的分子生物学研究不断深入,对其基因组结构以及相关基因表达产物有了进一步的认识。上述研究为 HCV 的致病机制和抗病毒治疗靶位的选择提供了理论基础。现将 HCV 的基因组结构和功能分述如下。

1. HCV 的基因组结构 HCV 是单股正链的 RNA 病毒,属黄病毒科(Flaviviridae)。基因组全长约 9.6kb(图 1-1),包含 1 个大的开放阅读框(ORF)和两侧的 5' 及 3' 非编码区(non-translated region, UTR)。核糖体通过进入 HCV 5'UTR 端的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)将 HCV 基因组翻译成 1 个多聚蛋白前体。该蛋白前体在宿主和

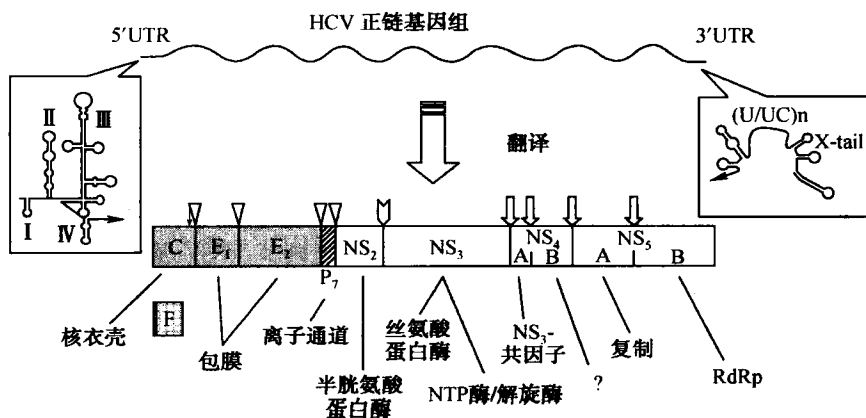


图 1-1 HCV 的基因组结构图

(摘自 Suzuki, et al. J Gastroenterology, 2007, 42: 411-423)

病毒蛋白酶的裂解作用下产生至少 10 个蛋白质,其排列顺序如下:核心蛋白(core,C)、包膜蛋白 1(envelope 1,E₁)、E₂、P₇,非结构蛋白 2(non-structural protein 2,NS₂),NS₃,NS_{4A},NS_{4B},NS_{5A},NS_{5B}。另外,存在 1 种阅读框替代蛋白(alternative reading frame protein,ARFP),又称 F(frame shift)蛋白,是由 HCV 的 C 蛋白重叠阅读框翻译获得。它们不但在 HCV 的生活史中发挥着重要的作用,而且也影响宿主细胞的信号传导、凋亡及物质代谢等一系列生化过程。

HCV 基因组的特点之一为它的变异率高,E₁ 和 E₂ 区是变异率最高的区域,而 5' 及 3' 非编码区则为最保守的区域。它的高变异率使之在人体内呈现准种(quasispecies)分布。

2. 非编码区

(1)5'UTR:5'UTR 包含 HCV 基因组 5'端的 341 个核苷酸。它是 HCV 基因组中最保守的区域。HCV 5'UTR 包括 4 个保守的结构域(structural domain),其中结构域 II~IV 构成 IRES,可直接与 40S 核糖体亚单位结合,启动 HCV 前体蛋白的翻译。IRES 以帽非依赖方式启动下游 HCV 编码区基因的翻译,且该活性并不依赖于 HCV 蛋白的作用,因而 HCV 的 IRES 成为抗病毒药物的理想靶位点。结构域 III 是核糖体附着位点最主要的组成部分。此外,5'UTR 还含有 HCV 复制所需的 5'顺式复制信号(5'cis-replication signal)。研究显示,5'端 125 核苷酸序列(结构域 II~III)构成 HCV 复制所必需的最小 5'顺式复制信号,但高效的 HCV 复制仍需要完整的 5'UTR。

(2)3'UTR:3'UTR 位于 HCV 3'末端,长度 200~235 个核苷酸,包括 1 个较短的可变区、1 段 80 个核苷酸的多聚 U(poly U)区域及 1 段高度保守的 X 尾(98 个碱基)。其中,可变区具有基因型的特异性,不同基因型之间具有核苷酸序列的差异。不同基因型的 HCV 多聚 U 长度不同。可变区可形成 2 个茎环结构(VSL₁ 和 VSL₂),而 X 尾含 3 个非常稳定的茎环结构(从 5'至 3'依次为 SL₁₋₃)。研究显示,完整的 3'UTR 才能发挥正常作用,不同型别甚至同型别不同株间 3'UTR 的互换都会导致 HCV RNA 无法复制,删除整个 poly U、X 尾或 X 尾中任何 1 个茎环均可彻底阻断 HCV RNA 复制。然而删除可变区仅影响复制效率,但并不彻底阻断 HCV 复制,这提示 3'末端 150 个核苷酸序列(包括多聚 U/UC 区和 3'X 尾)含有 HCV 复制所必需的 3'顺式复制元件,可能作为启动子来起始负链 RNA 的合成;其他 3'UTR 序列对 HCV 复制起辅助作用。近来的研究提示,3'UTR 特别是 X 尾可通过结合宿主细胞中的多聚嘧啶束结合蛋白(poly-pyrimidine tract-binding protein,PTB)、自身抗原 La(la auto-antigen)或一些核糖体蛋白,能增强 HCV RNA 的稳定性和翻译效率。

3. 结构蛋白区

(1)核心蛋白(core protein):C 基因位于 HCV 基因组 342~914 核苷酸位点,编码 191 个氨基酸,蛋白的大小为 23kDa,可进一步降解为 21kDa,为病毒核衣壳的重要组成部分。与糖蛋白作用组装出完整的 HCV 病毒颗粒。C 蛋白氨基端富含碱性氨基酸且高度保守,其羧基端具有高度的疏水性。C 蛋白通过与病毒 RNA 的结合来调节 HCV 基因组的翻译,其前 1~20 个氨基酸可以抑制 HCV IRES 的翻译。C 蛋白具有基因调控作用,体外的研究显示,C 蛋白可通过与宿主蛋白的相互作用调节基因的表达,对原癌基因 c-myc、IL-2、劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR、猿猴空泡病毒 SV₄₀ 早期启动子有激活作用,并且 C 蛋白可抑制肿瘤抑制基因 P₅₃ 启动子的活性,与 HCC 的发生相关。C 蛋白的另一个重要功能,就是参与 HCV 感染后的免疫调控。C 蛋白通过对 LAPC、PAK₂、API₅、BH₁、Tax₁BP₁、DAXX、TNFAIP₃/A₂₀ 等抗细胞凋亡因子的正调节来抑制细胞的凋亡,增加 HCV 感染细胞的存活率。而对 TNFSF₁₀、

CCL₂₀、骨桥蛋白(osteopontin)等的负调节作用抑制了炎症应答以及巨噬细胞吞噬作用,同时C蛋白对Cox-2也具有负调节作用。C蛋白对大量基因的调控作用抑制了机体的免疫应答,促进了细胞的持续感染。此外,C蛋白还参与了脂类的代谢,可促进细胞脂质小体的形成,诱导肝脏脂肪变性。

(2)包膜糖蛋白(envelope glycoprotein):包膜区基因包括E₁和E₂,分别位于基因组的第915~1490nt位点(E₁)和1491~2579nt位点(E₂),分别编码192个和363个氨基酸,E₁和E₂蛋白大小分别为33~35kDa和70~72kDa,包膜糖蛋白构成了病毒的外膜。E₁和E₂在内质网内,被大量的N₂糖基化修饰,并通过非共价键或二硫键形成异源二聚体。E₂蛋白羧基端含有疏水锚定区域,作为跨膜结构的一部分具有以下功能:①膜区锚定;②形成E₁、E₂二聚体;③内质网定位;④包含信号序列。

跨膜结构具有膜活化特性,可以改变细胞膜的通透性。E₁~E₂复合体在病毒颗粒的装备和释放中的作用还不清楚。在E₂的氨基端有2个高变区(HVR),分别是HVR₁和HVR₂。当HCV患者接受干扰素治疗时,E₂的突变增加;在慢性感染过程中,也观察到HVR₁序列在不断改变,针对HVR₁序列的特异抗体也相应地不断改变;E₂含有2个以上中和抗体表位,其中1个位于HVR₁。因此表明,E₂蛋白是免疫反应的主要目标。此外,E₂与病毒受体、tetraspanin、CD₈₁及低密度脂蛋白的受体可发生相互作用,可能在介导病毒附着、进入细胞的过程中起关键作用。因而研究包膜蛋白的抗原变异及宿主免疫应答规律,对HCV疫苗的研究和开发有重要意义。解放军302医院苏海滨等对HCV患者体内的HRV₁变异进行研究,发现6个保守的AA位点,串联后免疫小鼠后,诱导出HCV特异性的免疫反应。

(3)F蛋白:HCV C基因除编码C蛋白以外,同时还表达1个16~17kDa的蛋白P₁₆,早期的研究一直认为,这是1个截短的C蛋白。最近的研究证实,这一蛋白是翻译过程中C蛋白编码序列的核糖体阅读框发生-2或+1位漂移所致,并与C蛋白具有相同的N端序列,命名为ARFP或F蛋白。其氨基端10个氨基酸与C完全相同,长短取决于HCV基因型1a亚型编码162个氨基酸,而1b和2a分别编码144和126个氨基酸。F蛋白与内质网相连,并且极不稳定。目前,对它在HCV生活史和复制过程中的作用还知之甚少。仅在HCV感染者血清中可检测到针对F蛋白的特异性抗体,说明在HCV的自然感染过程中,有F蛋白的产生。抗F蛋白抗体的产生和HCV病毒载量、基因型别以及肝病的分期无关。通过对8份抗F阳性和5份抗F阴性的血清标本的序列分析,未发现任何抗F反应的特殊差异,说明这种抗F反应不受F蛋白的序列异质性的影响。F蛋白可能影响C蛋白的表达,而C蛋白又和免疫调节相关。F蛋白和C蛋白共有的前10个氨基酸序列可能包含RNA和蛋白以及蛋白与蛋白间相互作用区域。F蛋白极短的半衰期以及低表达水平可能与其作为调节蛋白的功能相关。F蛋白的过度表达可阻碍前折叠素2(prefoldin2,PFD₂)的正常功能,PFD₂是一种帮助蛋白质折叠的辅助蛋白,参与肌动蛋白和微管蛋白的折叠和组装。而细胞支架系统在HCV的感染过程以及细胞功能的调节中起重要作用。因而F蛋白可能会阻碍支架系统中微管蛋白的形成,从而抑制HCV的过度复制,有助于病毒的持续感染。

(4)P₇蛋白:P₇蛋白是从E₂蛋白上切割下来的一段含有63个氨基酸的多肽,介于结构蛋白和非结构蛋白之间,位于基因组2580~2768nt,有2个跨膜结构区。跨膜区通过 α 螺旋结构2次跨膜,将P₇定位于内质网膜上。由于HCV前体蛋白的加工是在宿主细胞的内膜系统上完成,因而膜定位作用对于非结构蛋白的加工和成熟尤为重要,可能是其加工成熟的前提条

件。最近报道显示, P_7 的 CBL (conserved basic loop) 是 3 个氨基酸组成的保守环结构, 具有离子通道活性, 这种活性可被抗病毒药物金刚烷胺抑制。Griffin 等的研究也证实, P_7 蛋白在 HepG₂ 细胞内可以形成六聚体, 构成离子通道, 说明 P_7 属于病毒细胞外膜孔道蛋白家族 (viro-porin family), 可能对于病毒的成熟和释放极为重要, 同时可以作为抗病毒治疗的潜在靶位。对与 HCV 同属的牛痘病毒 (BVDV) 的研究发现, P_7 对病毒的装配、传染性以及子代病毒的产生十分重要, 而对于 RNA 的复制并不是必需的。此外用细胞培养系统进行病毒扩增时, P_7 蛋白是不可缺少的。这些现象都说明, P_7 蛋白不影响 HCV 基因组的复制, 但参与了 HCV 感染细胞的过程。

4. 非结构蛋白区

(1) NS_2 : NS_2 基因位于 HCV 基因组 2 769~3 419nt 位点, 编码 217 个氨基酸。 NS_2 蛋白是 1 个强疏水性跨膜蛋白, 它的 C 末端转运至 ER 腔中, 而氨基端位于细胞腔。 NS_2 作为 1 个跨膜蛋白, 与 HCV 结构蛋白 E_1 、 E_2 和非结构蛋白如 NS_{5A} 、 NS_{5B} 都存在复杂的蛋白质之间的相互作用。 NS_2 与 NS_3 共同组成具有自我切割功能的 NS_{2-3} 蛋白酶复合体。 NS_{2-3} 蛋白酶可以将 NS_2 与 NS_3 从其连接处切开, 从而释放成熟的非结构蛋白。目前对于 NS_2 从 NS_2 - NS_3 复合体上切割下来后的功能还不清楚。有报道指出, HCV NS_2 蛋白通过抑制凋亡诱导因子 CIDE-B 介导释放的细胞色素 C 的活性, 阻碍 CIDE_{2B} 诱导的细胞凋亡途径, 参与 HCV 对宿主细胞的防御。

(2) NS_3 - NS_{4A} 复合物: NS_3 基因位于 HCV 基因组 3 420~5 312nt 位点, 编码 631 个氨基酸, 分子质量约 60kDa, 具有 NS_{2-3} 蛋白酶活性、丝氨酸蛋白酶活性、RNA 解旋酶活性和 NTP 酶活性。其氨基末端 1/3 序列是丝氨酸蛋白酶活性结构区, 其余部分是 NTP 酶和 RNA 解旋酶活性部分。丝氨酸蛋白酶催化 NS_3 / NS_{4A} 、 NS_{4A} / NS_{4B} 、 NS_{4B} / NS_{5A} 和 NS_{5A} / NS_{5B} 的裂解。 NS_{4A} 蛋白的基因位于基因组 5 313~5 474nt 位点, 由 54 个氨基酸组成。其作为 NS_3 丝氨酸蛋白酶的辅助因子, 与 NS_3 形成稳定的蛋白复合物, 对丝氨酸蛋白酶活性有重要的调节作用。 NS_3 的丝氨酸蛋白酶通过抑制 RIG-1a 和 TLR₃ 信号系统影响宿主细胞的防御反应, 为抗病毒药物提供了新的靶位。 NS_3 或 NS_{4A} 蛋白酶可完全抑制 K1271 或 MAVS 诱导的干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor-3, IRF-3) 和 IRF₂₇ 磷酸化, 阻碍 IRF 应答。 NS_3 氨基端可和抑癌基因 P_{53} 形成复合物, 阻碍其基因功能, 抑制放线菌素 D 诱导的细胞凋亡, 并可导致细胞的恶性转化。针对慢性丙型肝炎患者应用的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以有效地抑制病毒的复制。此外, NS_3 氨基端 120 个残基与 HCV 相关肿瘤的发生关系密切。最近报道, NS_3 L106A 和 F43A 位点突变可抑制丝氨酸蛋白酶活性, 并阻碍 NS_3 - P_{53} 复合物形成, 可能成为抑制 HCV 复制及致癌性的新靶位。 NS_3 的解旋酶或 NTP 酶活性对于 HCV 的 RNA 复制非常重要, 可以解旋双链 RNA, 消除 RNA 的二级结构, 使 RNA 从核酸结合蛋白中分离出来, 因此也成为抗病毒治疗的新靶点。

(3) NS_{4B} : NS_{4B} 位于基因组 5 475~6 257nt 位点, 编码 261 个氨基酸, 是一种高度疏水的蛋白, 至少 4 个跨膜区, 是膜相关定位蛋白。其主要作用包括抑制翻译, 调节 NS_{5B} RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) 的活性, 引起细胞转化, 诱导细胞非折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 等。 NS_{4B} 主要集中在内质网腔中, 可以诱导内质网膜的网状改变, 为病毒复制复合体的形成提供支架。Elazar 等报道, NS_{4B} 可调节膜相关物、复制复合体和 HCV RNA 的正确定位。同时 NS_{4B} 在 HCV 的致病, 特别是致肝细胞癌变

过程中起一定的作用, HCV NS_{4B} 通过 ATF₆ (activating transcription factor 6) 或 XBP₁ (X-box-binding protein) 途径引起内质网压力, 导致细胞发生非折叠蛋白反应, 使机体发生肿瘤的可能性大大增加。国内吕琪等采用 DNA 微点阵分析法, 通过 HCV NS_{4B} 稳定转染细胞对 HCV NS_{4B} 与信号传导相关基因表达之间的关系进行研究发现, 大部分原癌基因表达上调, 而大部分抑癌基因下调, 进一步证实 NS_{4B} 在致癌过程中的作用。

(4) NS_{5A}: NS_{5A} 蛋白位于基因组 6 258~7 601nt 位点, 编码 448 个氨基酸, 是高度磷酸化的非结构蛋白。目前发现, 它参与了 HCV 多种蛋白的成熟和 RNA 复制并调控宿主细胞多种基因表达, 刺激细胞增殖, 抑制细胞凋亡以及影响干扰素疗效。NS_{5A} 可以特异性的和膜结合蛋白 hVAP₂₃₃ 结合, 同时 hVAP₂₃₃ 还和 HCV 复制过程中的核心酶 RdRp 结合, 说明 NS_{5A} 可能是复制酶复合体的组成部分。NS_{5A} 高度磷酸化在控制 HCV RNA 复制过程中起着关键的作用。Lohmann 等对 26 个独立的复制子细胞克隆进行了序列分析, 发现多数保守性突变主要聚集于 NS_{5A} 丝氨酸(该蛋白高度磷酸化所需)富集的中心区域, 并且 NS_{5A} 适应性变异增强了 HCV 复制子的复制能力, S2197F、S2204I、S2202L 是 3 个独特的 NS_{5A} 变异位点, 其子代复制子转染 Huh27 细胞, 产生的集落形成效率明显高于亲代复制子, 说明 NS_{5A} 在 HCV 的复制中起着重要的作用。NS_{5A} 可激活多种转录因子如 NF- κ B、STAT-3、SRCAP、PCNA 的活性, 影响 P₅₃ 的功能, 抑制内源性和外源性 P₅₃ 对 P₂₁ 启动子的激活作用, 阻碍其介导的细胞凋亡作用。NS_{5A} 还可抑制双链 RNA 依赖蛋白激酶(ds RNA dependent protein kinase, PKR), 使细胞增殖失控, 最终导致细胞的恶性转化, 并能在裸鼠体内形成肿瘤。

NS_{5A} 可影响 IFN 的应答, 并是 α -IFN 干扰素治疗成功率低的原因之一。干扰素敏感决定区域(interferon sensitivity determining region, ISDR)的突变和 INF 治疗敏感性之间存在一定关系。NS_{5A} 还可诱导白细胞介素(IL)28 的表达, 使 HCV 对 IFN 的抗病毒作用产生抑制, 同时 ISDR 可以通过与依赖 RNA 的蛋白激酶(PKR)结合抑制细胞对 IFN 的应答。目前, 关于 NS_{5A} 对 IFN 应答反应的影响已成为研究的热点。但国内针对 HCV1b 型 ISDR 动态研究, 未发现 ISDR 与干扰素疗效的相关性。

(5) NS_{5B}: HCV 非结构蛋白 5B(NS_{5B})位于病毒基因组的 7 602~9 371 核苷酸位点, 编码 591 个氨基酸蛋白, 具有依赖于 RdRp 活性, RdRp 是 HCV RNA 复制的关键酶。NS_{5B} 是一个尾部锚定蛋白(tail-anchored protein)。其 C 端 21 个氨基酸区域疏水性较高, 其中含有 4 个亮氨酸组成的基序(motif), 在细胞中起到定位的作用, 将 NS_{5B} 蛋白锚定于近核周的内质网上, 同时与 NS_{5B} 的催化中心相互作用来调节 NS_{5B} 的聚合酶活性。NS_{5B} 的三级结构包括手指(finger)、手掌(palm)和拇指(thumb)3 种亚结构, 其中含有大量的活性位点, 为抗 HCV 药物研究的重要靶位。NS_{5B} 区具有 HLA 限制的杀伤性淋巴细胞识别位点, 可使 HCV 逃避宿主淋巴细胞的攻击。由于干扰素的治疗不可能完全脱离机体的免疫机制, 所以 T 淋巴细胞位点变化可影响干扰素的治疗效果。此外, NS_{5B} 蛋白参与细胞生长调节。You 等的一项研究显示, 在肝癌细胞株中 NS_{5B} 蛋白以不依赖 P₅₃ 表达的方式调节细胞增殖。并且 HCV NS_{5B} 蛋白通过反式激活方式激活 RPL₅、CDC₄₂、Securin、KRAS₂、脯氨酸 4-羟化酶、hVAP₂₃₃ 等细胞生长调节因子的表达水平, 参与细胞周期调节, 细胞恶性转化, 细胞信号转导等过程, 提示 NS_{5B} 蛋白在丙型肝炎向肝纤维化及肝细胞癌转归过程中发挥了一定的作用。NS_{5B} 还影响机体的免疫功能。它与 hVAP₃₃ 结合, 下调一些蛋白在细胞膜表面的表达, 如 MHC₂₁ 细胞膜表面表达的减少, 降低了宿主细胞的抗原呈递, 抑制了 CTL 对病毒的清除作用, 促进 HCV 的持续感染。

5. 展望 目前,利用各种模型系统对 HCV 及其多种病毒蛋白研究已经取得了巨大的进展,但是对其各种蛋白功能的了解仍需进一步深入。HCV 病毒颗粒的结构,复制的调控机制、完整的生活史以及致病机制等研究工作都需要不断地探索。对 HCV 分子生物学研究的不断深入将有助于设计出新型有效的抗 HCV 药物及针对 HCV 的治疗方法,并为疫苗的研究提供理论基础。

(段学章)

二、丙型肝炎病毒感染的免疫学特征及免疫逃逸

HCV 感染人体后易发生慢性化,不易为人体的免疫系统清除。急性感染 HCV 后 80% 左右的患者转为慢性,仅有少部分患者可自发清除病毒。目前对于 HCV 易于慢性化的机制仍不十分清楚,其中的原因可能如下: HCV 在人体内复制率高,约 10^{12} copies/d; 其 RNA 多聚酶缺乏校正功能,易导致 HCV 变异,使得免疫逃逸易于发生。此外, HCV 病毒复制复合体似乎形成一个坚硬的膜性结构,在体外该结构可耐受蛋白酶和核酸酶的作用,防止病毒 dsRNA 被机体的天然免疫系统识别。

在对慢性 HCV 感染患者、实验感染 HCV 黑猩猩模型以及可短暂表达 HCV 一个或多个 HCV 蛋白的转染细胞的研究中发现, HCV 可通过多种途径来逃逸机体的免疫监视,包括病毒的高变性、病毒基因编码产物对机体免疫应答的损害以及 HCV 在脏器的感染等。现分述如下。

1. HCV 感染后的免疫应答 宿主感染病毒后机体的免疫应答主要有先天性和获得性免疫应答。先天性免疫应答主要包括机体的物理屏障、免疫细胞,如 NK 细胞、巨噬细胞等,以及一些可溶性的成分,如补体、干扰素 (IFN) 等。获得性免疫主要包括体液免疫和细胞免疫。

(1) 先天性免疫应答: HCV 感染后,先天性免疫应答是第一道防线。但由于急性 HCV 感染多表现为无症状,因此目前关于人急性感染 HCV 后先天性免疫应答的状况比较缺乏。但在许多动物实验中发现,不论机体最终是否清除病毒, HCV 感染早期均可诱导较强的天然免疫应答,如 I 类 IFN 的分泌等,这说明在 HCV 感染早期, I 类 IFN 的分泌可能会限制病毒的过度复制,但并不能完全清除病毒。这可能与 HCV 本身的多种抗 IFN 机制有关。同样, NK 细胞功能在 HCV 感染后同样受到损害,这在 HCV 感染后易于慢性化的机制中起一定作用。

(2) 体液免疫应答: 中和性抗体可直接抑制病毒与宿主细胞的结合以阻止感染扩散,也可干扰病毒进入宿主细胞以及病毒基因组的转录,此外还可通过调理作用增强巨噬细胞对于病毒颗粒的吞噬,因此在抗病毒中起重要作用。

HCV 感染后诱导机体产生许多针对 HCV 结构蛋白和非结构蛋白的抗体,可在感染后 4~14 周检测到。但是对于这些抗体是否具有中和病毒的作用,目前仍有争论。虽然所有免疫功能正常的人感染 HCV 后均产生抗体,但绝大部分不能清除病毒,因此提示抗体在病毒清除中的作用不大。但在最近的研究中报道,在 HCV 感染早期诱导产生中和性抗体的患者,病毒逐渐被清除。在对 1 例 HCV 急性感染患者随访 6 个月当中发现,病毒载量与中和性抗体滴度呈负相关。但值得注意的是,也有患者即使在感染早期不能检测到中和性抗体,也可清除病毒。因此这些研究提示,虽然目前不能明确抗体在 HCV 感染中的作用,但感染早期强大的中和性抗体可能有助于控制病毒复制,并辅助细胞免疫清除病毒。

(3) 细胞免疫: 细胞免疫的效应细胞主要有 CD_4^+ 以及 CD_8^+ T 淋巴细胞。 CD_4^+ T 淋巴细胞

