

第4版 FOURTH EDITION

乙型肝炎 基础和临床

HEPATITIS

B

BASIC BIOLOGY AND
CLINICAL SCIENCE

骆抗先 陈金军 李平 编著



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

乙型肝炎 基础和临床

第 4 版

Hepatitis B
Basic Biology and Clinical Science
Fourth Edition

骆抗先 陈金军 李 平 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/骆抗先等编著. —4 版.
—北京: 人民卫生出版社, 2012. 3
ISBN 978-7-117-15200-6

I. ①乙… II. ①骆… III. ①乙型肝炎-防治
IV. ①R512.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 244899 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

ISBN 978-7-117-15200-6



乙 型 肝 炎
基础和临床
第 4 版

编 著: 骆抗先 陈金军 李平
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)
地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号
邮 编: 100021
E-mail: pmph@pmph.com
购书热线: 010-67605754 010-65264830
010-59787586 010-59787592
印 刷: 北京人卫印刷厂
经 销: 新华书店
开 本: 787×1092 1/16 印张: 48
字 数: 1168 千字
版 次: 1997 年 3 月第 1 版 2012 年 3 月第 4 版第 7 次印刷
标准书号: ISBN 978-7-117-15200-6/R·15201
定 价: 176.00 元
打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com
(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)



这是几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,与国内某些
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。

希望本书对提高乙型肝炎的临床研究水平
能有所裨益。



第4版骆序

我国是乙型肝炎的地方流行区,已实施疫苗计划免疫十余年,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,每年仍有数十万例肝病死亡。在相当长的时期内我们仍将面临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、也更广泛的认识。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超过半个世纪,早年缺乏抗病毒药物,当前临床所遇到的病例许多已是乙型肝炎相关的慢性进展性肝病,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。

本书从1993年开始写作,第1版于1997年3月、第2版于2001年5月、第3版于2006年10月出版。近二十年来朝朝暮暮写作不息。阅读文献获得的新知识或工作中的新体会,随时编写入书。我已耄耋之年,将逐渐淡出,此版起由中青年学者参与。此版骆抗先编写组织学、血清学和临床学共36章,负责全书插图绘制或修改。陈金军编写免疫学和流行病学6章。李平编写病毒学和辅助治疗5章。

此书是为临床医生写的。第4版书大量删减基础理论,病毒学由7章缩为4章,免疫学由6章也缩为4章,流行病学由3章缩为2章。大量扩充临床部分,抗病毒药物由2章增加至4章,各类HBV感染和疾病由21章增加至26章。文字力图精简易懂,改写54.6%。图340多幅,其中新增120幅,旧图均经修饰。更换全部参考文献,作为正文的补充。

本书对一些日常诊疗事项,有相当详尽的讨论。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,请不要看做是“指导性意见”,希望得到同道们的批评。

本书写成得到科室同事们的支持,部分章节曾经他们的修改和批评,尤其是张琪医生在产假中修改了多章;何海棠做了许多秘书性工作,深表感谢。

本书有大批热情的读者,感谢你们对此书的厚爱。渴望阅读本书的同道惠予批评,俾能在下一版改进。

此书完稿正逢我八十生日,也算是对自己的一份纪念。

骆抗先

2011.08 广州 南方医院 时年八十

常用缩写词

(只包括书内应用较普遍的缩写字,不再在书文中注明)

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 HBsAg carrier)慢性无症状 HBsAg 携带者

α FP(alpha fetoprotein)甲胎蛋白

Bil(bilirubin)胆红素,Tbil(total bilirubin)总胆红素,Dbil(direct bilirubin)结合胆红素,Ibil(indirect bilirubin)非结合胆红素

bp(base pair)碱基对

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

DC(dendritic cell)树突状细胞

γ GT(gamma glutamyl transpeptidase)谷氨酰转肽酶

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

HBcAg(hepatitis B core antigen)乙型肝炎病毒核心抗原

HBcAg(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

IFN α (interferon alpha,gamma) α 干扰素

IL(interleukin)白介素

M ϕ (macrophage)巨噬细胞

NAs(nucleos(t)ide)核苷类药

NK(natural killer)自然杀伤细胞

PBMC(peripheral mononuclear cell)外周血单个核细胞

Th(T helper cell)辅助性 T 细胞

TNF α (tumor necrosis factor)肿瘤坏死因子 α

ULN(upper limited of normal)(血清转氨酶)正常上限

目 录

第一章	HBV 概述·病毒基因·病毒颗粒	1
第二章	病毒复制·病毒消长	16
第三章	病毒蛋白	31
第四章	病毒变异	48
第五章	固有免疫·适应性免疫	65
第六章	免疫抑制病毒·免疫损伤肝组织	84
第七章	肝细胞死亡:凋亡·坏死	99
第八章	病毒抗原免疫应答·免疫耐受	116
第九章	肝脏·肝细胞及其再生	131
第十章	肝组织学:急性和慢性肝炎	146
第十一章	肝组织学:肝硬化·肝癌	166
第十二章	流行病学:流行率·流行环节	184
第十三章	流行病学:预防·防疫措施	202
第十四章	血清病毒·病毒标志物	217
第十五章	血清生化学:肝酶试验	231
第十六章	血清生化学:胆红素·肝功能试验	248
第十七章	基础处理·辅助治疗	264
第十八章	核苷(酸)类药:临床应用	278
第十九章	核苷(酸)类药:耐药变异	298
第二十章	干扰素:机制·效应·个体化	320
第二十一章	聚乙二醇化干扰素:药理·效应·不良反应	334
第二十二章	急性乙型肝炎	352
第二十三章	慢性无症状病毒携带	367
第二十四章	隐匿性乙型肝炎病毒感染	384

第二十五章 慢性乙型肝炎:自然史·临床学	401
第二十六章 慢性乙型肝炎:HBsAg 阴性亚型	418
第二十七章 免疫虚损病例的复活性肝炎	436
第二十八章 淤胆型乙型肝炎	452
第二十九章 孕妇乙型肝炎	469
第三十章 小儿乙型肝炎	482
第三十一章 老人乙型肝炎	498
第三十二章 肝外感染·肝外并发症	509
第三十三章 混合感染:HBV 与 HAV、HEV、HCV	523
第三十四章 混合感染:HBV 与 HDV、HIV	537
第三十五章 肝纤维化的发生和干预	554
第三十六章 活动性肝硬化:自然史	571
第三十七章 活动性肝硬化:失代偿期的临床学	585
第三十八章 活动性肝硬化:代谢并发症	598
第三十九章 门静脉高压:胃食管静脉出血	609
第四十章 门静脉高压:脏器并发症	625
第四十一章 门静脉高压:腹水	637
第四十二章 细菌感染·自发性细菌性腹膜炎	653
第四十三章 门静脉高压:循环动力学失常·肝肾综合征	671
第四十四章 肝衰竭:代谢性脑病	683
第四十五章 肝衰竭:肝移植的内科问题	700
第四十六章 肝细胞癌:慢性 HBV 感染与 HCC 发生	715
第四十七章 肝细胞癌:临床学	731
索引	750

第一章

HBV 概述 · 病毒基因 · 病毒颗粒

一、HBV 概述

- (一) 起源与进化
- (二) 病毒分类

二、HBV 基因组

- (一) 基因结构 · 组成
- (二) 病毒 DNA 调节元件
- (三) 病毒 RNA 调节元件

三、共价闭合环状 DNA

- (一) cccDNA 的增长
- (二) cccDNA 的削减
- (三) 不同自然史中的感染数量

四、病毒颗粒

- * HBV 引起最严重的病毒性肝炎

要点

1. 从 1965 年 Blumberg 等发现 HBsAg, 经历许多学者的研究, 才逐渐了解 HBV 的基因结构。HBV 属嗜肝 DNA 病毒科, 可能来源于灵长类动物。
2. HBV 基因组是 3.2kb、环形的、部分双链 DNA, 有 S、C、P 和 X 4 个读框区; 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。
3. HBV 感染宿主后将形成 cccDNA, 其具有较长的半减期, 且不被核苷类药物抑制, 故 cccDNA 在肝细胞内可长期稳定存在。
4. HBV 感染者血清中存在三种形式的病毒颗粒: 大球形颗粒、小球形颗粒和管形颗粒。大球形颗粒又称完整毒粒、Dane 颗粒。另两种颗粒由 HBsAg 组成, 为空心包膜, 不具有传染性。

HBV 只是 3.2kb 的很小基因组, 却给人类带来沉重的打击。想更好了解 HBV 的致病机制, 以提高预防效率和改进临床治疗, 应从学习病毒开始。

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染呈世界流行, 全球有 20 亿人曾感染过 HBV,

其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染,每年约有 100 万人死于 HBV 相关的肝衰竭或原发性肝癌 (PLC)(Shepard CW, et al. Epidemiol Rev, 2006, 28:112)。近年随着疫苗接种的推广,HBV 感染率已明显下降,但我国仍有超过 7% 的人口有慢性 HBV 感染,因此仍是一个严重的公共卫生问题,HBV 的防治工作依然形势严峻,防治工作还任重而道远。

一、HBV 概述

(一) 起源与进化

HBV 发现

有关 HBV 的记载最早可追溯到 1883 年,1289 名德国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% 的工人出现了黄疸。这可能是第一次记录到乙型肝炎的流行性,随后也有多次肝炎流行的记载。直到 20 世纪上半叶,研究者根据流行病学的差别将肝炎分为两型:传染性肝炎和血清性(或同种血清性)肝炎,并最终确定肝炎病因是病毒。

我国在 20 世纪 50 年代末至 60 年代初期间开始有血清性肝炎流行,后来才证实为乙型肝炎。

1965 年 Blumberg 等在来自澳大利亚的患者中发现了 HBV 相关的病毒成分,当时命名为“澳大利亚抗原”(Blumberg BS, et al. JAMA, 1965, 191:541)。1970 年 Dane 等利用电镜鉴定了 Dane 颗粒(Dane DS, et al. Lancet, 1970:695)。这种直径约 42nm 的经过精确包装的颗粒即是 HBV 颗粒,而毒粒表面是 AuAg 颗粒,后改名为 HBsAg。随后的研究进一步阐明了毒粒的核壳成分 HBeAg 及其可溶性的 HBeAg。1973 年 Kaplan 发现 HBV 毒粒中含有 DNA 多聚酶(DNAp)(Kaplan PM, et al. J Virol, 1973, 12:995)。1974 年,Summers 等利用限制性酶切技术,对 HBV 基因组作了详尽的限制酶图谱分析(Summers J, et al. PNAS, 1975, 72:4597),并阐明病毒的分子结构(Robinson WS, et al. J Virol, 1974, 14:384)。1982 年以来通过研究鸭肝炎病毒的复制机制,发现嗜肝 DNA 病毒复制需经其独特的 RNA 中间体(Summers JA, et al. 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。

HBV 起源

关于 HBV 起源的各种假说都是基于核苷和氨基酸的替代变化,目前主流观点认为:人类 HBV 来源于猩猩、长臂猿、黑猩猩等灵长类动物,并随着这些宿主共同演化了 1000 万 ~ 3500 万年。这个假说的理由是这些灵长动物主要分布在南美洲、中非和东南亚,与人类 HBV 高流行区是一致的;另外这三个地区的 HBV 基因型也相对集中(分别是 F、E、B/C),而在北美、欧洲等地区 HBV 基因型则是混杂存在的,可能与后期的 HBV 流行扩散有关(MacDonald DM, et al. J Virol, 2000, 74:4253)。灵长动物的病毒在进化树中的分布位于人类不同基因型的 HBV 中。

还有一种新大陆起源的假说,这种观点认为:HBV 由是美洲的 F 基因型起源,在过去的 400 年间,由于欧洲人进入美洲,在殖民过程中和当地人接触,将其传播至全世界(Bollik PL, et al. Hepatology, 1997, 26:765)。这个假说的缺陷是不能解释 HBV 在灵长类动物的广泛分布。

HBV 突变进化

HBV 进化发生在病毒不断复制和突变的过程中。由于 HBV 的复制过程需要反转录步骤,因此其发生核酸置换的概率比其他 DNA 病毒明显要高,但是 HBV 突变率又受一些因素影响:①HBV 基因组各开放读框区相互重叠,制约了突变的发生。虽然重叠区的某些突变能够提高 HBV 的复制效率,但是却可能产生没有活性的 HBV 毒粒。②HBV 基因组中的某些保守序列(启动子、增强子等各种作用元件)在复制过程中制约了突变的发生。③HBV 的复制过程在核内,只涉及一个拷贝的 RNA 前基因组,因而限制了染色体同源重组的可能。虽然受这些因素的制约和影响,但不同 HBV 基因型的核苷酸仍有近 12% 的差异。

嗜肝 DNA 病毒都有反转录的过程,其突变率大约在 $10^{-4} \sim 10^{-5}/(\text{位点} \cdot \text{年})$ 范围,处于 DNA 病毒和 RNA 病毒突变率之间。一项持续 22 年的研究发现:HBV 核苷酸替代率为 $2.1 \times 10^{-5}/(\text{位点} \cdot \text{年})$ 。据此推算,HBV 不同基因型可能来源于同一祖先,且这一病毒出现距今已有 3000 年(Orito E, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:7059)

(二) 病毒分类

人类肝炎病毒

人类肝炎病毒(human hepatitis viruses)是一组引起以肝脏损伤为主要表现的全身感染性病毒,现已证明至少有甲、乙、丙、丁、戊五种肝炎病毒(HAV、HBV、HCV、HDV 和 HEV)。HAV 和 HEV 主要通过消化道传播,引起急性感染;HBV、HCV、HDV 通过血液、体液等方式传播,急性感染后可移行为慢性过程。在器官移植患者中,也发现存在极少数慢性戊肝感染(Nassim K. N Eng J Med, 2008, 358:811)。

除 HBV 外,其他的病毒均为单链基因结构。HDV 是一种缺陷病毒,只有包被 HBsAg 以后,才具有传染活性,因此 HDV 只是一种亚病毒。常见的肝炎病毒基本特征见表 1-1。

表 1-1 肝炎病毒基本特征

肝炎病毒	发现时间	分类种属	病毒大小 (nm)	基因结构	碱基数	传播途径	潜伏期 (周)	慢性率
• HAV	1973 年	微小病毒属 肝病毒科	27 ~ 32	单股线状 RNA	7478	粪-口	2 ~ 4	无
• HBV	1965 年	嗜肝 DNA 病毒属	42	双股环状 DNA	3200	血液、体液	4 ~ 24	和感染年龄有关
• HCV	1989 年	黄病毒属	30 ~ 60	单股正链 RNA	9400	血液、体液	2 ~ 24	70% ~ 85%
• HDV	1977 年	Delta 病毒属	35 ~ 37	单股环状闭合负链 RNA	1679	血液、体液	4 ~ 20	和感染 HBV 的状态有关
• HEV	1983 年	肝病毒属 肝病毒科	27 ~ 34	单股正链 RNA	7600	粪-口	2 ~ 9	罕见

嗜肝 DNA 病毒科

自 1973 年发现 HBV 毒粒中含有 DNAP 以后,陆续从不同动物中发现多种含内源性 DNAP 活性的肝炎病毒。1991 年国际病毒分类委员会(ICTV)将这些类似 HBV 的病毒划为

嗜肝 DNA 病毒科 (*Hepadnaviridae*), 细分为哺乳动物的正嗜肝 DNA 病毒 (ortho hepadnavirus) 与水禽类嗜肝 DNA 病毒 (avian hepadnavirus), 人 HBV 是嗜肝 DNA 病毒的原型 (prototype), 见表 1-2。

表 1-2 嗜肝 DNA 病毒科的主要成员

哺乳动物的正嗜肝 DNA 病毒	水禽类嗜肝 DNA 病毒
• 灵长类乙型肝炎病毒 (人和猩猩 HBV) • 毛猴乙型肝炎病毒 (WMHBV) • 美洲旱獭肝炎病毒 (WHV) • 地松鼠肝炎病毒 (GSHV)	• 鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) • 雪鹅乙型肝炎病毒 (SCHBV) • 鹭乙型肝炎病毒 (HHBV) • Ross 鹅乙型肝炎病毒 (RGHBV)

嗜肝 DNA 病毒除了都含有 DNAP 外, 还有一些共同特点: ①病毒结构相似, 直径 40 ~ 45nm 的球形, 表面有包膜。②基因组大小相近, 正嗜肝 DNA 病毒为 3.2 ~ 3.3kb, 而水禽类嗜肝 DNA 病毒为 3.0kb, 都具有 P、S、C 和 X 4 个开放读框。③复制方式相同, 在复制过程中需要先形成 RNA 中间, 再进行反转录复制。④相对嗜肝性, 嗜肝 DNA 病毒在肝细胞内可大量复制, 但在肝外组织复制活性较低。⑤种属特异性, 嗜肝 DNA 病毒有严格的宿主特异性, 不能传染与其关系不密切的种属动物。⑥易形成慢性化, 嗜肝 DNA 病毒感染宿主后大多呈持续感染状态。

嗜肝 DNA 病毒科两个亚族之间也存在一些不同, 见表 1-3。

表 1-3 正类和水禽类嗜肝 DNA 病毒生物学特性的差异

	正嗜肝 DNA 病毒	水禽类嗜肝 DNA 病毒
• 病毒基因组		
结构	X 基因比 C 基因略短	X 基因短缺, C 基因明显较长
X-开放读框	有	没有
• 外膜蛋白		
结构	有 3 种	无前 S2、无管形颗粒
糖基化	有	没有
• 核壳蛋白	<200 残基	262 残基
• DNA 整合	有	很少
• 组织嗜性	较严格	较泛嗜
• 先天感染	较少	常见
• 与癌相关性	WHV 最常见	非重要高危因素

嗜肝 DNA 病毒还与反转录病毒有相似点 (如基因组组成、反转录复制方式), 推测两者有较密切的亲缘关系, 可能由同一先祖病毒进化而来。嗜肝 DNA 病毒在进化过程中, 似保留了先祖病毒对基因组反转录复制和毒粒产生的必要序列, 包括包装信号序列、核壳蛋白的核酸结合区、基因表达的调节序列以及反转录酶和核酸酶 H 基因区; 但 HBV DNA 正在逐渐

失去特异的整合功能。

参考文献

1. 庄辉. 乙型肝炎流行病学研究进展. 中国医学前沿杂志(电子版), 2009, 1: 18-24. 乙型肝炎病毒感染是一个严重的公共卫生问题。据世界卫生组织报道, 全球肝癌患者中, 75% 以上是由 HBV 所致。我国现有的慢性 HBV 感染者约 9300 万人, 其中慢性乙型肝炎患者约 2000 万例, 每年因 HBV 导致的肝硬化和肝癌死亡 30 余万例。
2. Jazayeri SM, Alavian SM, Carman WF, et al. Hepatitis B virus: origin and evolution. J Viral Hepat, 2010, 17: 229-235. HBV 起源和突变进化相关内容根据此文编写。

二、HBV 基因组

(一) 基因结构·组成

基因结构

HBV 是已知真核细胞中最小的 DNA 包膜病毒, 大小仅约 3200 碱基对 (base pair, bp), 目前发现的 HBV 大小为 3182 ~ 3221bp。我国流行的 B 和 C 基因型大小均为 3215bp。

双链: HBV 基因组有独特的结构, 是一个环形部分双链 DNA。双链的长度不同, 全长的一链因与病毒 mRNA 互补, 按惯例将其定为负链, 较短的一链则定为正链。负链的 3' 端有 5~8 个碱基与其 5' 端重复, 称为末端冗余 (terminal redundancy) 或过剩段 (r), 使这一小段成为三链结构。正链 5' 端固定, 3' 端位置不定, 其长度可为负链的 50% ~ 100%, 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 1-1)。

黏性末端: 正负链的 5' 端相对固定, 分别位于核苷酸 (nt) 1601 和 nt1826。2 个 5' 端之间的 224bp 为黏性末端 (cohesive terminus), 其两侧各有一个 11bp (5' TTCACCTCTGC3') 的直接重复序列 (direct repeat, DR), 称为 DR1 和 DR2 (图 1-2)。DR1 位于负链 DNA 的 3' 端和 5' 端交汇处, DR2 位于正链 DNA 5' 端。DR1 和 DR2 的相对同源性, 使 HBV DNA 分子在复制过程中形成长黏性末端, 进而形成环状。DR 还在病毒的整合中起重要作用。

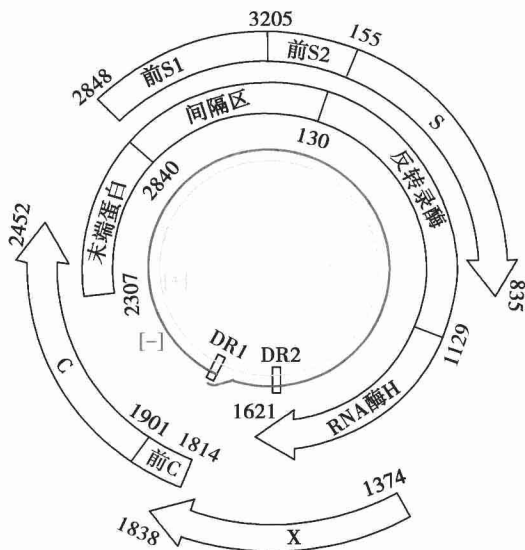


图 1-1 HBV 基因组的结构和组成

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

形成长黏性末端, 进而形成环状。DR 还在病毒的整合中起重要作用。

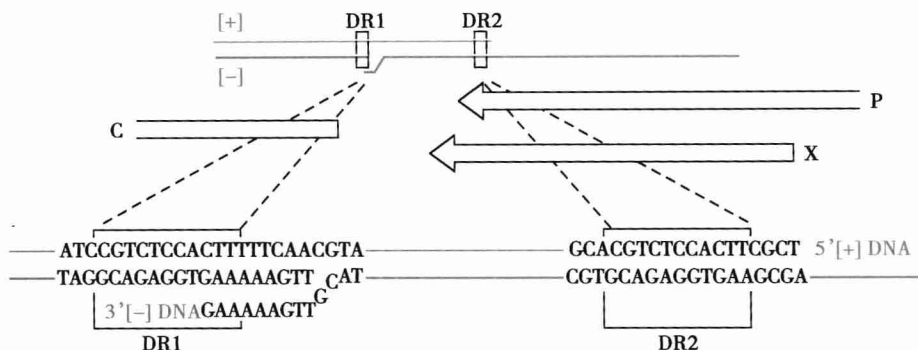


图 1-2 HBV 基因组的黏性末端

上部表明 DR 与开放读框 P、C、X 的位置关系；下部表明正链和负链 DNA 5' 端开始的位置，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

基因组组成

HBV 负链 DNA 序列至少有 4 个开放读框 (open reading frame, ORF), 即 Pre-S/S、Pre-C/C、Pol、X, 分别编码表面蛋白 (HBsAg)、e 蛋白 (HBeAg) 和核心蛋白 (HBcAg)、HBV P 蛋白、X 蛋白 (HBx)。正链序列上似无保守的 ORF (见图 1-1)。

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

S-ORF: 分为前 S1 区、前 S2 区和 S 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 (nt3205-155-835); 而前 S1 区的 5' 端则因基因型而异, B 和 C 型均始于 nt2848。前 S 区的氨基酸变异 (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: 分为前 C 区和 C 基因区, 各有起始密码 ATG。前 C 区 87bp (nt1814-1900), 而 C 基因区 552bp (nt1901-2452), 这一区段最保守, 是免疫攻击的靶表位所在。

P-ORF: 最长的读框区 (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 1-4)。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 nt2841-0-129 为不编码的间隔区 (spacer)。

表 1-4 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%

X-ORF:位于 nt1374-1838,C 基因型短缩 27bp。产物 HBx 17kD,是有多种功能的调节因子,包括转式激活增强子和启动子的转录功能。

(二) 病毒 DNA 调节元件

在病毒基因组上,不仅有编码蛋白的结构基因,还含有调节元件(regulatory element)分布在 HBV 基因组中。其中 DNA 调节元件主要包括 4 个启动子、2 个增强子、糖皮质激素应答元件、负性调节元件(NRE)、CCAAT 元件等(图 1-3)。

在调节元件的共同作用下,基因组 DNA 转录出相应的 mRNA,转译相应的病毒蛋白。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。

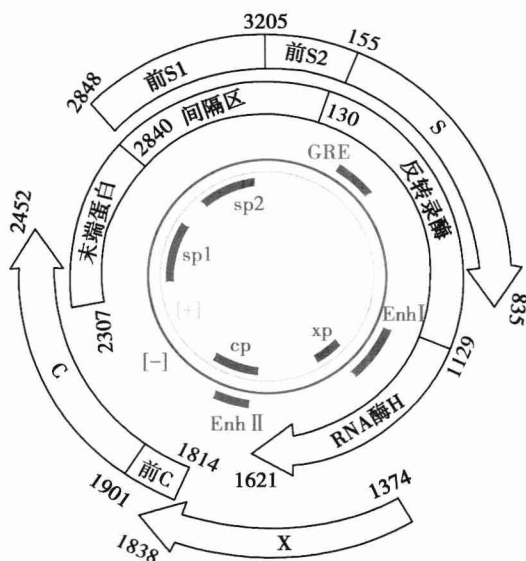


图 1-3 HBV 基因表达的 DNA 调节元件

Enh I、Enh II: 2 个增强子; sp1、sp2、xp、cp: 4 个启动子; GRE: 糖皮质激素应答元件

启动子

启动子(promotor)是能与 RNA 聚合酶结合并激活转录开始的一段序列。HBV 有 4 个启动子: pg/pc 启动子、X 基因启动子、S1 基因启动子和 S2 基因启动子,分别与 RNA 聚合酶结合后启动不同序列的转录。

pg/pc 启动子:也可简称 cp,位于 nt1643-1849,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(~ nt1838)、C 基因前 C 区的 5'

末端(nt1814 ~)重叠,增强子 II (nt1685-1773)和 DR1 (nt1826-1836)也位于 cp 区域内。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 1-4)。

Bcp 大小约 100bp,不具有保守 TATA 盒结构,但在相应位置有 2 个重叠的类似 TATA 盒样 DNA 区域,这对于 mRNA 精确转录的起始很重要。CURS 中含 2 个重复序列(nt1668-1684),是肝细胞核内因子的结合部位。通过位置与方向依赖性方式 CURS 正性调节 BCP,使 BCP 活性提高 200 ~ 2000 倍。

cp 指导两种 3.5kb mRNA,前基因组 RNA(pgRNA)和前 C 基因 mRNA(pc mRNA)的正确启动,pc mRNA 位于 pgRNA 上游 15 ~ 35bp。pc mRNA 转译产生 HBeAg 前体,经信号肽酶和高尔基复合体中的蛋白酶加工形成成熟的 HBeAg 分泌到细胞外;而 pgRNA 转译产生 HBeAg 和 P 蛋白,同时也是 HBV DNA 复制的模编码板。

S 基因启动子(sp):S 基因有两个串联的启动子, sp1 (nt2219-2780)和 sp2 (nt2809-3152)。

sp1 调节 2.4kb 的 mRNA 的转录,编码表面抗原大蛋白(LHB)。是目前发现的 HBV 启

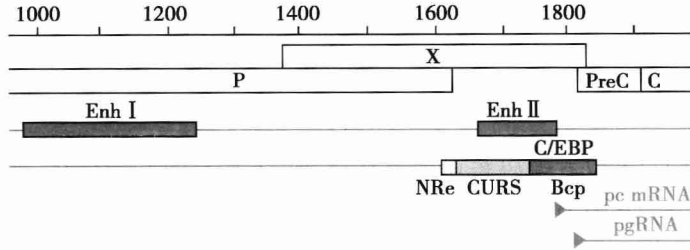


图 1-4 C 启动子结构示意图

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 基因启动子位置。Cp 作用于 pc mRNA 和 pgRNA 的启动。NRe、CURS、Bcp 和 C/EBP 位置如图所示,其中 C/EBP 是一种调节转录的细胞因子结合部位

动子中唯一具有 TATA 盒结构的顺式作用元件。TATA 盒位于 sp1 上游约 20bp, -25 ~ -32bp, 准确控制转录的开始。再上游 60bp 是 13bp 长的肝细胞核因子 HNF1 的结合序列,肝细胞特异因子与之结合能显著提高转录水平。

sp2 调节 2.1kb 的 mRNA 转录,编码表面抗原中蛋白(MHB)和主蛋白(SHB),有不同的 5' 端,在 4 个启动子中其活性最高。其上游 -25 ~ -32nt,是启动子特异活性区域,可与胞核提取物特异结合。

X 基因启动子:位于 nt1235-1374,无 TATA 盒,是最短的 HBV 启动子。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)。xp 调控的转录物 HBx 是建立 HBV 复制所必需的。在 X 基因编码区上游 130bp 发现有一 GC 富集的 21bp 序列,细胞因子可结合在此 DNA 短序上,故也是个微小启动子(minimal promoter),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。

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。

增强子

增强子(enhancer element, Enh)是一段可以增强启动子效率的 DNA 序列,其作用和位置、方向、距启动子距离无关。在 HBV 序列中有 2 个增强子,Enh I 和 Enh II。

Enh I:大约位于 nt970-1240,可分为三个区段,前、后区段为调节元件,起辅助功能,中心区段在 nt1080-1165,增强启动子的转录活性。目前认为 Enh I 上至少有 5 个不同的区域结合转录因子,分别为:2C,GB,EP,E 和 NF1。Enh I 作用不受方向和位置限制,即可调节 xp 和 cp,又调节 sp1 和 sp2,但效率不同,对 cp 比对 xp 的增强作用高 60 倍。Enh I 对启动子的作用不是直接的,而是通过与 Enh II 的协同作用。新近研究还提示 Enh I 与控制细胞周期和凋亡的细胞因子有关。

Enh I 如此广泛的作用主要因其中心区段含多个细胞转录因子结合部位,包括肝细胞特异性的胞核因子(NF)1,非肝细胞特异性的细胞因子亮氨酸拉链家族(leucine zipper family)成员(包括 Sp1、C/EBP、AP1)和信号转导和转录激活因子(Signal transducers and activators of transcription, STAT)家族成员。

Enh II:大约位于 nt1627-1774,与 cp 重叠。Enh II 可分为 A、B 两个功能区,A 部分是正

调节元件,主要参与 Enh II 的肝细胞专一性;而 B 部分是 Enh II 的活性单位,需与 A 部分协同才具活性。B 部分又可分为 B1(nt1627-1705)、B2(nt1706-1736)和 B3(nt1737-1774)三个亚区,B1、B2 是主要功能区,B2 同时是转录因子的主要结合位点。Enh II 主要调节 cp 和 sp2 的转录。

在 HBV 生命周期的不同阶段,2 个增强子分别调节一组启动子,可能 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)。

其他调节元件

糖皮质激素应答元件(glucocorticoid responsive element, GRE):位于 nt349-366, Enh I 上游约 1kb 处,其核心有两个靠近的“TGTTCT”序列。糖皮质激素经 GRE 刺激 Enh I,至少能够增强病毒复制 5 倍,但是其不是一个独立的增强子。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,可以以此解释。

负性调节元件(negative regulatory element, NRE):位于 CP 上游,是一种顺式作用元件,可负调节 pg/pc 活性。

CCAAT 元件:位置与 S 启动子重叠,其负向调节 Pre-S1 的转录,却能够增强 S mRNA 的转录。不同的表面蛋白表达对病毒颗粒产生有重要意义,故推测 CCAAT 元件在病毒形成过程中起作用。

正性和负性转录效应元件:正性和负性转录效应因子(positive and negative effectors of transcription, pet & net)调节环形 DNA 模板转录的终止,尤其是对 3.5kb mRNA 合成非常重要。pet 是编码序列 5' 转录区的 1 个小元件,顺式,方向依赖性,可能调节 3.5kb mRNA 延长,当 3.5kb mRNA 转录首次通过环形病毒 DNA 的终止区时,pet 调节转录继续进行。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。

环磷酸腺苷反应元件(cyclic adenosine monophosphate response element, CRE):位于 Enh I 的 E 元件区域中,具有高度保守性,对 HBV 基因表达和病毒复制有重要影响(Kim B-K, et al. Hepatology, 2008, 48:361)。

(三) 病毒 RNA 调节元件

除了 DNA 调节元件,HBV 还有调节 RNA 的元件,在病毒的转录过程中对 RNA 进行加工修饰,主要元件有:聚腺苷酸化信号、转录后调节元件(PRE)和包装信号 ϵ 。基因组上的这些元件进一步揭示 HBV 是一种结构简单、但高效能的病毒(图 1-5)。

聚腺苷酸化信号(polyadenylation signal):

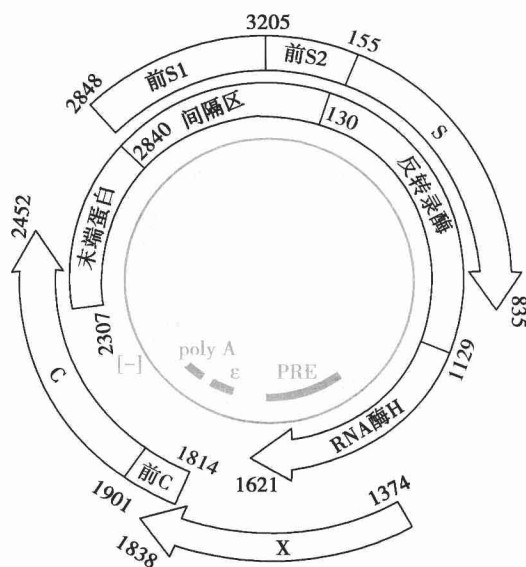


图 1-5 HBV 基因表达的 RNA 调节元件
Poly A, 聚腺苷酸化信号; ϵ , 包装信号;
PRE, 转录后调节元件