

杨令国 等 编著

丙型肝炎研究进展

BINGXINGGANYAN

YANJIUJINZHAN

2.6

南海出版公司

95
R512.6
17
2

丙型肝炎研究进展

杨令国 史鸣树 孙振华 编著



南海出版公司

1994年·海口



C

198815



丙型肝炎研究进展

编著	杨令国等
责任编辑	石 竣
装帧设计	刘 萍
出版发行	南海出版公司
经销	各地新华书店
印刷	曲阜市新华印务公司
开本	787×1092 毫米 32 开
印张	4.5 印张
字数	100 千字
版次	1994 年 6 月第 1 版
印次	1994 年 6 月第 1 次印刷
印数	1—2000 册
书号	ISBN 7-5442-0360-3/R·5
定价	5.80 元

(版权所有·盗印必究)

内 容 简 介

本书系《常见病综合防治丛书》的一个分册。病毒性肝炎是危害人们身体健康的常见疾病之一,具有很强的危害性,是我国重点“攻关”疾病之一。本书根据病毒性肝炎的类型、发病概况,对病毒性肝炎的诊断、中西医治疗方法和常见并发症的治疗做了详尽论述,并介绍了一些单方和验方。另外,本书还用了相当的篇幅介绍了病毒性肝炎的预防和家庭护理要点。

本书集专家多年临床经验,内容丰富,对广大病患者认识肝炎、防治肝炎具有一定指导意义。

《常见病综合防治丛书》

编 委 会

主 任 王为珍 贺迎昌
副主任 张尚忠 刘梅仕 吕敏和
甄娟兰 李国华 赵书荣
崔连群

编 委 (以姓氏笔画为序)

于桂兰	马秀华	王建伟	王建河
叶 芳	田萌子	刘 梅	刘梦华
张先河	迟兆富	李仁桃	苗 华
周连群	卓晶明	贺向群	徐巨林
高春义	董建文	傅淑花	

总 主 编

贺迎昌

前 言

病毒性肝炎是一类严重危害人类健康的传染病,根据其病原不同分为甲、乙、丙、丁、戊五型。其中丙型及戊型肝炎,由于长期未能确定其病原,曾一直被称作非甲非乙型肝炎,直到1989年choo及Reyes等分别应用分子克隆技术获得丙型肝炎及戊型肝炎的基因克隆,才取得突破性进展。目前已知,虽然丙型肝炎及戊型肝炎的病原均属于RNA病毒,但两者的传播途径及临床经过却截然不同。丙型肝炎类似于乙型肝炎,主要经肠道外传播,慢性化率高,易发展为肝硬化及肝细胞癌,其危害性不亚于乙型肝炎;而戊型肝炎则类似于甲型肝炎,经粪一口传播,呈一过性感染,无慢性倾向,其危害性相对要小。因此,近年的研究焦点主要集中在丙型肝炎上。在丙型肝炎病毒基因克隆研究成功后的短短几年内,无论是病毒分子生物学、实验诊断方面,还是流行病学、临床治疗方面,可以说是日新月异,尤其是最近一二年,某些方面研究更是突飞猛进。我们收集与整理了近年国内外有关丙型肝炎研究的文献资料,编写成这本小册子,以期对广大同行了解丙型肝炎提供帮助。

全书共分9章,对近年国内外有关丙型肝炎病毒及其分子生物学、丙型肝炎流行病学、丙型肝炎病毒感染自然史以及丙型肝炎实验室诊断、药物治疗等方面的研究进展,作了

较全面的介绍，文中引用资料以最近一二年的文献为主，并注意介绍了国内的最新研究成果。由于作者才疏学浅，占有资料也有限，难免存在许多不足甚至错误之处，恳请广大同道指正。

杨令国

1993年8月30日

目 录

第一章 丙型肝炎病毒.....	1
第一节 丙型肝炎病毒的发现及命名.....	1
第二节 丙型肝炎病毒及其分子生物学.....	3
一、HCV 的生物学特性.....	3
二、HCV 的种属特性.....	4
三、HCV 的基因组结构与表达.....	5
第三节 丙型肝炎病毒分型.....	8
一、HCV 基因型.....	8
二、HCV 血清型.....	13
三、HCV 变异规律.....	13
四、HCV 分型意义.....	14
第二章 丙型肝炎流行病学.....	20
第一节 发病情况.....	20
一、自然人群中的 HCV 感染.....	20
二、供血员中的 HCV 感染.....	22
三、HCV 感染高危人群.....	24
第二节 传播途径.....	30
一、经血液传播.....	30
二、性传播.....	32
三、家庭内接触传播.....	33
四、母婴传播.....	34
五、医源性传播.....	36

六 其他传播途径	36
第三章 丙型肝炎的实验诊断	42
第一节 特异性抗体检测	42
一、ELISA 法及 RIA 法	42
二、重组免疫印迹试验 (RIBA)	46
三、特异性 IgM 抗体检测	48
四、GOR 抗原表位及其抗体检测	53
第二节 HCVRNA 检测	55
一、PCR 法	55
二、免疫组化法	62
第三节 实验诊断的临床应用	62
一、筛选供血员	62
二、流行病学研究	63
三、HCV 血清型探讨	64
四、研究 HCV 的体内分布和存在状态	65
五、帮助认识慢性肝病病因	66
六、评价药物疗效	67
第四章 HCV 感染自然史	71
第一节 病毒血症	71
一、病毒血症出现的时间	71
二、病毒血症持续时间与 HCV 感染类型	71
三、病毒血症与肝内 HCV 复制	72
四、慢性感染	73
第二节 肝脏酶学改变	74
第三节 宿主的抗体应答和免疫状况	75
一、血清抗体阳转时间和持续时间	75
二、抗 HCV 检测的意义和局限性	76
三、宿主的免疫状况	77
第四节 转归	78

第五章 丙型肝炎的病理学特征	81
第一节 一般病理学特征	81
一、肝脏的一般病理改变	81
二、胆管病变	81
三、肝细胞脂肪沉着	82
四、肝细胞再生	82
五、淋巴细胞滤泡样聚集现象	82
第二节 免疫病理学	84
第六章 丙型肝炎的临床表现	87
一、潜伏期	87
二、临床经过	87
三、抗体反应类型	91
四、肝外表现	92
五、小儿丙型肝炎临床特点	93
第七章 HCV 感染与肝细胞癌	96
第一节 流行病学调查	96
第二节 临床随访研究	98
第三节 抗 HCV 及 HCVRNA 检测	99
第四节 HBV 与 HCV 的相互作用	101
第五节 HCV 诱发 HCC 的机理探讨	103
第八章 HCV 感染与自身免疫	105
第一节 自身免疫性肝炎与抗 HCV	105
一、简介	105
二、自身免疫性肝炎中的抗 HCV 及其意义	106
第二节 HCV 感染与自身抗体	108
一、ANA 与 SMA	108
二、抗 LKM 及其意义	108
三、抗 GOR	109

第三节 HCV 感染时自身抗体检测意义	110
第九章 丙型肝炎的治疗	113
第一节 干扰素疗法	113
一、作用原理	113
二、临床应用	115
三、干扰素的治疗剂量与疗程	121
四、影响干扰素疗效的因素	122
五、副作用	125
第二节 病毒唑在治疗丙型肝炎中的应用	126
一、病毒唑的抗病毒作用	126
二、病毒唑的临床应用	126
第三节 联合疗法	127

第一章 丙型肝炎病毒

第一节 丙型肝炎病毒的发现及命名

1974年美国的 Goldfield 用放射免疫法检测输血后肝炎时发现多数病例无乙型肝炎病毒 (HBV) 标志, 后来又发现这类病人抗 HAV (甲型肝炎抗体) 也阴性, 因而称其为输血后非甲非乙型肝炎 (PT-NANBH)。此后, 日本和欧洲的一些国家也先后报告了输血后和散发性非甲非乙型肝炎病例。由于本病主要经血液或血制品传播, 故又称肠道外传播的非甲非乙型肝炎 (NET-NANBH)。1980年 Khuroo 报告了另一型非甲非乙型肝炎, 主要经粪-口传播, 常引起暴发流行, 因此称之为肠道传播的非甲非乙型肝炎 (ET-NANBH)。但在此后的十几年时间里, 对 NANBH 病原的研究未取得突破性进展。

1982年起, 美国学者发现用常规免疫学及分子生物学方法均不能获得引起该病的病毒颗粒、核酸以及特异性的抗原。推断可能是患者体内病毒及其抗原浓度太低的缘故。

鉴于上述, 1989年美国 Chiron 公司的 Choo 等人, 用具有高度传染性的实验黑猩猩的血清作为病毒来源, 超速离心沉淀后提取核酸, 用逆转录酶合成 cDNA, 再将 cDNA 重组

于 λ gt Ⅰ 噬菌体，建立了一个 cDNA 基因库，通过细菌表达其抗原，然后用一名慢性 NANBH 患者血清筛查 cDNA 所表达的抗原。在筛查约一百万个克隆后，终于发现了一个被噬菌体感染的细菌克隆。将该克隆中含 155 碱基对 (bp) 的片断切下，命名为 5—1—1，作为探针与人 DNA 和黑猩猩 DNA 进行杂交，结果均为阴性，证实 cDNA 不是来自宿主的 DNA，而可能与不能检测的病毒序列有关。由于不能检测到同源性 DNA，推测病毒为 RNA。为了证实这一点，用 cDNA 克隆分别与从受染及未受染黑猩猩肝脏提取的 RNA 杂交，结果与受染黑猩猩肝提取的 RNA 发生杂交，与正常黑猩猩肝组织的 RNA 不发生杂交。同时，又用 cDNA 克隆分别与受染黑猩猩血浆总核酸、经 RNA 酶 (RNase) 预处理的总核酸及 DNA 酶 (DNase) 预处理的总核酸进行杂交，结果未处理的总核酸及经 DNase 处理的总核酸杂交阳性，证实了与 cDNA 互补的 NANBH 病毒 (NANBHV) 是 RNA 病毒。接着又根据 cDNA 用基因组步移法得到了该病毒的全长基因，并对其核苷酸序列及基因组结构进行了分析。Choo 首先将该病毒称为丙型肝炎病毒 (HCV)，1989 年 12 月在罗马举行的第一次丙型肝炎国际会议上正式应用了这一名称。

与此同时，将 5—1—1 克隆从大肠杆菌表达系转移到了酵母表达系，制出了大量的重组抗原 (C—100)，从而建立了丙型肝炎抗体 (抗 (HCV) 的检测系统。

HCV 克隆基因工程提取及抗原重组过程如图 1—1 所示。

由感染 HNANBV 的黑猩猩血浆浓缩病毒颗粒
↓
提取核酸

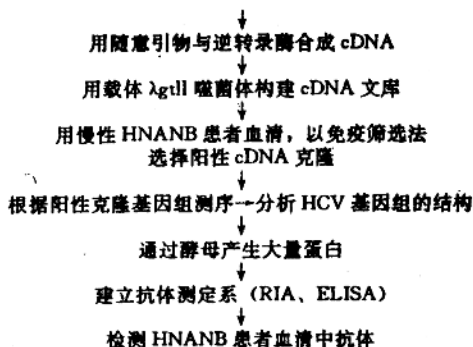


图 1—1 HCV 的克隆化过程

第二节 丙型肝炎病毒及其分子生物学

一、HCV 的生物学特性

从进化角度分析，HCV 是一类重组 RNA 病毒。其 N'—端氨基酸来自小核糖核酸病毒科，而 C'—端氨基酸源于披膜病毒甲科。

HCV 在感染者血中浓度极低，为 $10^5 \sim 10^6 \text{CID}_{50}/\text{L}$ (CID_{50} 为 50% 黑猩猩感染量)，常规情况下不能用免疫电镜观察到病毒颗粒。如将血清超速离心后再浓缩 1000 倍以上，作负染色，进行电镜检查，可检出极少量的病毒颗粒。用聚合酶链反应 (PCR) 法能检出 HCV RNA。

HCV 在形态上类似于黄病毒，表面有包膜和 22 个棘突。在血中的 HCV 直径为 36~62nm，在肝细胞中为 36~40nm。将 HCV 颗粒给健康黑猩猩接种，接种 2~10 周于肝细胞内可检出 HCV。HCV 在肝细胞内复制，可引起平滑膜增生，形

成管状结构。HCV 在蔗糖中的浮密度为 $1.09 \sim 1.11 \text{ kg/L}$ ，沉降系数为 140S 。HCV 对有机溶剂比较敏感，提示含有脂类衣膜； $1:1000$ 福尔马林于 37°C 处理 96 小时；加热 100°C 5 分钟或 60°C 10 小时，可使其失去传染性。已发现 HCV 有多个变异株，不同国家报道的 HCV 核苷酸序列差异很大，HCV 与其他各型肝炎病毒的比较见表 1—1。

表 1—1 各型肝炎病毒比较

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
病毒属	细小病毒	嗜肝病毒	黄病毒	缺损病毒	
基因组	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA
长度(kb)	7.8	3.2	10.5	1.7	8.2
大小(nm)	27	42	30~60	40	32
传播方式	粪—口	肠道外 性传播 围产期	肠道外 性传播 围产期	肠道外 性传播?	粪—口
慢性经过	0%	新生儿 70~90% 儿童 60% 成人 10%	散发 30~50% 输血 50~70%	混合感染 2% 重叠感染 70~90%	0%

二、HCV 的种属特性

许多证据表明，HCV 是人类黄病毒（如黄热病毒、登革热病毒和日本乙型脑炎病毒）和动物瘟病毒（如牛病毒性腹泻病毒和猪霍乱病毒）的一个远亲。在种系发生上 HCV 与瘟病毒关系更近，现已将瘟病毒归入黄病毒家族。目前倾向于 HCV 是黄病毒家庭的成员，其依据是：①将 HCV 编码的多肽序列与蛋白资料库用计算机进行比较，显示 HCV 多肽的一个小区域与黄病毒、植物 POTyvirus 和动物瘟病毒所编码

的能与三磷酸核苷相结合的螺旋酶有很大的序列同源性，其中与后者的同源性更大。②黄病毒、瘟病毒及植物病毒所编码的丝氨酸蛋白酶和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶与 HCV 所编码多肽的某些区域，在氨基酸序列上存在一定的相似性。③ HCV、黄病毒和瘟病毒中多肽序列相似的一些区域呈共线性，说明这三种病毒有相似的基因结构。④尽管这三种病毒在初级序列上一致性很少，但它们所编码多肽的基本结构及疏水性相似。这些病毒多肽的氨基端都含有一个基本的核包膜蛋白区，紧接着是糖蛋白区。⑤ HCV 基因组 5'—末端区与瘟病毒对应区的核苷酸序列同源性较高 (45~49%)。⑥在原始的多肽序列水平上，HCV 与瘟病毒也存在较大的同源性。

三、HCV 基因组结构与表达

(一) HCV 基因组结构

HCV 基因组为单股正链 RNA，呈线状，全长约 10kb，由 9400~9416 个核苷酸组成。基因组由一个占全长 95% 的编码区（也称开放读码框架，ORF）和 5'—末端及 3'—末端非编码区组成。

1. ORF 区

HCVRNA 基因组的 ORF 由 9033 个核苷酸组成，其 5' 端为结构基因区，3' 端为非结构基因区。结构基因区包括 C（核心蛋白）基因区、M（基质蛋白）基因区和 E（外膜蛋白）基因区；非结构基因区分为 NS₁~NS₅ 基因区（图 1—2）。

2. 5'—末端和 3'—末端非编码区

5'—末端区由 324~341 个核苷酸组成，位于 ORF 区上

游, 含有 3~4 个小 ORF, 该区核苷酸序列高度保守。此外, 该区尚有一个由 22 个核苷酸组成的分叉。3'-末端区由 27~55 个核苷酸组成, 位于 ORF 区下游。3'-末端区的核苷酸, 在不同变异株其数目不同, HCV 原始株由 27 个核苷酸组成, 其下游有 poly (A) 尾, poly (A) 之前有终止密码子, 但随后分离的病毒株无 poly (A) 尾, 而是由 54 或 55 个核苷酸组成的较长的 3'-末端非编码区。

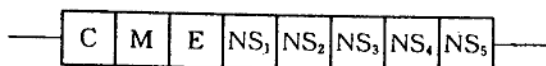


图 1-2 HCVRNA 基因组示意图

C: 核心蛋白基因 M: 基质蛋白基因

E: 外膜蛋白基因 NS₁~NS₅: 非结构蛋白基因

(二) HCV 基因表达及功能

1. ORF 区表达产物及其功能

ORF 区可编码一个由 3010 或 3011 个氨基酸残基组成的聚合蛋白前体, 该聚合蛋白前体于翻译过程中被裂解成 3 个结构蛋白 (C 蛋白、M 蛋白和 E 蛋白) 和 5 个非结构蛋白 (NS₁~NS₅)。结构蛋白参与病毒颗粒的装配, 非结构蛋白如 RNA 聚合酶 (复制酶) 参与 HCVRNA 基因组的复制。核心蛋白 (C 蛋白) 的氨基酸序列为残基 1~191 (191 个残基), 外膜蛋白 (E 蛋白) 的氨基酸序列为残基 192~383 (192 个残基)。核心蛋白中精氨酸、赖氨酸含量较高 (23.5%), 氨基酸序列稳定性较好, 不能附加糖链。外膜蛋白有 5 个潜在糖基化位点, 氨基酸序列变异性较大, 其 C'-末端可与宿主膜相互作用。NS₁ 蛋白由 340 个氨基酸组成, 分子量 37700u