

戚中田 杜平 主编

上海科学技术出版社

丙型肝炎病毒与丙型肝炎

92
R512.6
3
3

丙型肝炎病毒与丙型肝炎

主 编

戚中田 杜 平

编 者

(按出现先后为序)

杜 平 潘 旦 戚中田

官培龙 曾 敏 孟宗达

厉永建 江 咏

XH12.63



3 0073 9327 9

上海科学技术出版社

馆藏
藏書

B

丙型肝炎病毒与丙型肝炎

臧中田 杜 平 主编

上海科学技术出版社出版、发行

(上海南京路430号)

上海竟成印刷厂印刷

开本 787×960 1/32 印张 6.5 字数 122,000

1992年2月第1版 1992年2月第1次印刷

印数 1-3,000

ISBN 7-5323-2684-5/R·807

定价: 3.75 元

内 容 提 要

1989年,国际上正式将人类病毒性肝炎分为甲型、乙型、丙型、丁型和戊型五大类,其病原体分别命名为HAV、HBV、HCV、HDV和HEV。过去的非甲非乙型肝炎现分成丙型肝炎和戊型肝炎。丙型肝炎主要经血传播,极易转成慢性,与原发性肝癌和肝硬化的关系十分密切,还可与乙型肝炎混合感染,严重危害人类健康和生命。本书介绍了丙型肝炎病毒的基因克隆、生物学特性及丙型肝炎的实验室诊断、临床特点、治疗方法和流行病学特征,可供各科临床医师及从事病毒学、分子生物学和基础医学工作的科研、教学人员参考。

代 序

非甲非乙型肝炎病毒感染诊断手段在过去几年里有了重要的发展。虽然早在 1974 年,引起非甲非乙型肝炎的病原体已经受到重视,但直到 10 多年以后,这些病原体之一——丙型肝炎病毒 (HCV) 的基因片段才得以克隆。HCV 基因的克隆是病毒学与分子生物学姻缘的结晶。HCV 碱基序列的研究报告提示, HCV 存在亚型。尽管有学者进行了 HCV 基因组全序列的测定,但那些序列可能是不同亚型 HCV 基因组片段的组合体,因为从免疫学方法筛选的多个较短的 HCV 基因组序列可以延伸出整个 HCV 序列。因此,欲研究 HCV 的性质,就必须建立诸如细胞培养那样的 HCV 增殖系统。

一般而言,日本株和美国株 HCV 基因组序列在核苷酸和氨基酸水平上的同源性分别约为 75% 和 85%,表明 HCV 家族的基因结构存在地区性差异,这在长沙和上海地区的初步研究中亦得到证实。我们以 HCV 病人血清为材料构建 λ gt11 随机引物 cDNA 库,运用免疫筛选法得到大小为 50~500 个碱基的 HCV 基因片段克隆 100 余个,但无一 ENV 区克隆。这一结果表明,必须进一步研究此区序列以发展丙型肝炎疫苗。利用 HCV 基因组片段的表达产物作

为抗原检测 HCV 抗体进行 HCV 感染的诊断，已经证明是行之有效的。此外，利用 HCV 基因组片段作为探针进行基因诊断的方法也已建立。

可以预料，由工作在这个令人振奋的研究领域内的中国同行撰写的这本专著，定能在不久的将来结出丰硕的成果。

医学博士、科学博士、日本鹿儿岛大学

医学部第二内科教研室主任、教授、

中国上海第二军医大学客座教授

Terukatsu Arima, M.D.

February 5, 1991

目 录

第一章 丙型肝炎病毒与丙型肝炎研究概况	(1)
第一节 肝炎病毒的概貌	(1)
第二节 丙型肝炎病毒的研究历程	(2)
一、非甲非乙型肝炎的提出	(3)
二、病毒因子的初步证实	(3)
三、HCV 的提出与证实	(4)
第三节 研究丙型肝炎及其病原的重要性	(6)
第四节 急待研究解决的问题	(8)
一、建立特异性检测试剂与方法	(8)
二、进一步探查病原学方面的基本问题	(9)
三、调查我国的传播与感染状况	(9)
四、积极开展干扰素临床试治	(10)
第二章 丙型肝炎病毒基因的克隆与鉴定	(11)
第一节 HCV 基因组克隆和鉴定前的非甲非乙型肝炎研究	(11)
第二节 HCV 原型基因组的克隆	(13)
一、丙型肝炎病原体的分离	(13)
二、丙型肝炎病原体基因组 cDNA 文库的构建	(14)
三、阳性克隆的免疫筛选	(15)
四、用基因行走法测定 HCV 基因的全部	

cDNA 序列	(15)
第三节 HCV 原型基因组 cDNA 的鉴定	(20)
一、阳性基因组 cDNA 的病毒来源	(20)
二、阳性克隆 cDNA 序列的特征	(22)
三、阳性克隆编码多肽与丙型肝炎的 特异相关性	(22)
四、最新的研究结果	(23)
第四节 HCV 有马株 cDNA 的成功克隆	(24)
一、共同的克隆策略	(24)
二、不同点	(24)
三、N ₁₄ 抗体与丙型肝炎的相关性	(25)
 第三章 丙型肝炎病毒的生物学特性	(28)
第一节 HCV 的形态结构与理化特征	(28)
第二节 HCV 的基因组特征及其进化分类	(30)
第三节 HCV 的变异	(34)
第四节 HCV 的复制	(40)
第五节 HCV 的免疫性	(45)
 第四章 丙型肝炎病毒感染的实验室诊断	(54)
第一节 HCV 感染的血清学诊断	(54)
一、HCV 抗体的 EIA 检测方法	(55)
二、HCV 抗体检测试剂盒的使用方法	(58)
三、EIA 结果的判定	(59)
四、HCV 抗体的 RIA 测定法	(64)
第二节 HCV 感染的基因诊断	(64)
一、HCV 及其基因特征	(64)

二、HCV 基因诊断概述	(66)
三、套式 PCR 及其应用	(68)
四、HCV-PCR 实验方法	(72)
第五章 丙型肝炎的病理及临床诊断	(80)
第一节 发病机制	(80)
一、丙型肝炎的免疫反应	(80)
二、丙型肝炎免疫肝损伤的机制	(83)
第二节 病理变化	(86)
一、一般病理变化	(86)
二、病理变化的相对特征	(86)
三、组织学分类	(87)
四、超微结构变化	(91)
第三节 临床表现	(97)
一、急性丙型肝炎	(97)
二、慢性丙型肝炎	(102)
三、重症肝炎	(104)
四、丙型肝炎的血清酶学变化	(104)
第四节 丙型肝炎的临床诊断	(107)
一、流行病学资料	(108)
二、临床症状	(109)
三、体征	(110)
四、实验室检查	(115)
五、其他辅助检查	(124)
六、丙型肝炎的鉴别诊断	(131)
第五节 预后	(132)

第六章 丙型肝炎的治疗	(137)
第一节 一般基础治疗	(137)
一、适当的休息	(137)
二、合理的饮食	(140)
第二节 一般药物治疗	(141)
一、急性丙型肝炎的治疗	(142)
二、慢性迁延性丙型肝炎的治疗	(145)
三、慢性活动性丙型肝炎的治疗	(145)
四、重型丙型肝炎的治疗	(153)
第三节 丙型肝炎的干扰素治疗	(155)
一、急性丙型肝炎的干扰素治疗	(156)
二、慢性丙型肝炎的干扰素治疗	(157)
三、干扰素对丙型肝炎的治疗机制	(160)
第七章 丙型肝炎的流行特征和预防	(162)
第一节 丙型肝炎的流行特征	(162)
一、丙型肝炎的分布状态	(162)
二、丙型肝炎的传播途径	(163)
三、丙型肝炎的临床类型与传播	(165)
四、丙型肝炎的慢性化及肝硬化与癌变	(166)
五、抗-HCV 与感染性的关系	(169)
第二节 丙型肝炎的一般预防	(171)
一、管理传染源	(171)
二、切断传播途径	(173)
三、易感人群的保护	(173)
第八章 中国丙型肝炎的研究概况	(175)

第一节 非甲非乙型肝炎的初步调查	(175)
第二节 非甲非乙型肝炎暴发流行的研究	(175)
第三节 我国丙型肝炎流行病学和临床学 的初步研究	(177)
一、丙型肝炎在我国的首次证实	(177)
二、HCV 感染在固安县的普遍性	(179)
三、固安县输血后丙型肝炎的发生率	(179)
四、抗-HCV 出现及持续时间	(181)
五、抗-HCV 与传染性的关系	(181)
六、我国丙型肝炎的某些临床特点	(185)
七、我国其他地方 HCV 感染状况初步调查	(187)
八、对丙型肝炎预防措施的研究	(188)
第四节 我国丙型肝炎的病原学研究	(189)
一、常规方法研究简况	(189)
二、分子生物学方法研究	(190)

第一章 丙型肝炎病毒与丙型肝炎研究概况

现今已知的肝炎病毒有两大群：一群是人类肝炎病毒，一群是动物肝炎病毒(如鸭肝炎病毒和鼠肝炎病毒等)。对人类肝炎病毒的研究迄今已有半个世纪，但研究进展较快的还只是近 20 年，特别是近 5 年来的事。本章拟简要介绍人类肝炎病毒的型别、丙型肝炎(简称丙肝)病毒的研究历程、重要性及其急待研究的课题。

第一节 肝炎病毒的概貌

以侵犯人类肝脏为靶器官的真正的人类肝炎病毒目前已知有 5 种，现将其要点归纳于表 1-1。

此外，还有一些偶可引起肝炎的病毒，如巨细胞病毒(CMV)、EB 病毒(EBV)、黄热病毒、立夫特山谷热病毒、风疹病毒、单纯疱疹病毒、副流感病毒、某些型别的腺病毒和肠道病毒等。但是，上述这些病毒并不是真正的肝炎病毒，而只是偶尔经过肝脏引起肝炎的过客病毒(Passenger Viruses)。

表 1-1 人类肝炎病毒及其特点

型 别	病 原	大 小	核 酸	病 型
甲型肝炎	甲型肝炎病毒 (HAV) 属小 RNA 病毒科	27nm	RNA 7500 碱基	急性肝炎
乙型肝炎	乙型肝炎病毒 (HBV) 属嗜肝病毒科	42nm	DNA 3200 碱基对	急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、肝癌、重症肝炎
丙型肝炎	丙型肝炎病毒 (HCV) 属披盖病毒科 或黄病毒科(?)	36~62nm	RNA 10 000 碱基	急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、肝癌、重症肝炎
丁型肝炎	丁型肝炎病毒 (HDV)	36nm	RNA 1700 碱基	急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、肝癌、重症肝炎
戊型肝炎	戊型肝炎病毒 (HEV) 属杯状病毒*科	32nm	RNA 8500 碱基	急性肝炎

注：* 杯状病毒(Calicivirus)

△ 丁型肝炎病毒过去称 delta(δ)肝炎病毒

第二节 丙型肝炎病毒的研究历程

丙肝的研究大致经过下列 3 个阶段，回顾这一历程，对我们病毒学研究者不无启示。

一、非甲非乙型肝炎的提出

Goldfield 在 1968~1974 年间用放射免疫检测法(RIA)检测 HBcAg 和抗-HBc 时发现,许多输血后肝炎病例并未检出乙型肝炎(简称乙肝)标志。遂与 Decker 合作研究,证明许多输血后肝炎既不是乙肝,也不是甲型肝炎(简称甲肝)。于是,在 1974 年明确提出了非甲非乙型肝炎(NANBH)。其后,美国、日本和欧洲的一些学者也作了类似的报告。尤其是经筛选 HBsAg 阳性血源后出现的输血后肝炎,有 90% 肯定是 NANBH。

进一步研究发现, NANBH 又分肠道传播和肠道外传播两类, 1987 年 11 月, WHO 病毒肝炎技术咨询小组建议, 将其分为两类, 一类称肠道传播的非甲非乙型肝炎(Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis), 简称 HNANB(E)或 ET-NANBH; 另一类称肠道外传播的非甲非乙型肝炎(Parenterally Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis), 简称 HNANB(P)或 PT-NANBH。现已研究证明 ET-NANBH 的病原为 HEV, 而 PT-NANBH 的病原为 HCV。

二、病毒因子的初步证实

早期的研究发现, PT-NANBH 主要发生在受血者和注射血制品的病人。用黑猩猩实验证明, 以 PT-NANBH 阳性献血员的血液、急性输血后 NANBH 病人的血液、慢性 NANBH 病人的血液、抗血友病因子、Ⅷ因子复合物和纤维蛋白原等制品注入黑猩猩, 均可使其发生肝炎。其主要表现是血清转氨酶(ALT)升高和肝脏组织的病理学改变。进一步又

发现，引起这种肝炎的现象能在黑猩猩中不断传代，从而证明血液及血制品中存在有致 PT-NANBH 的感染性因子。用过滤法证实，这种因子属于病毒。

根据临床观察及黑猩猩的实验结果，发现 PT-NANBH 的潜伏期分长(8~12 周)和短(2~4 周)两类，可多次发病，转氨酶异常表现不一，交叉攻击试验不能保护，肝细胞的超微结构变化不同等，提示引起 PT-NANBH 的病毒可能不止一种。

自 1975 年以来，对感染 NANBH 的人或黑猩猩的肝脏或血液进行电镜观察，发现病毒样颗粒的报道已有十余篇，但各家报道的结果很不一致且没有一家得到公认。

三、HCV 的提出与证实

上述事实只证明 PT-NANBH 是由一种病毒因子所致，但无从确定该因子属何种病毒。后来才发现，这种病毒在感染的人和黑猩猩肝组织和血液中的含量极少，用一般的常规血清学方法无法鉴定其特性。美国和日本学者率先采用分子生物学技术进行研究，历经两年多的努力，终于取得重大突破。

1989 年 5 月，美国 Chiron 公司宣称，用分子克隆法获得了能表达特异性 PT-NANBH 病毒蛋白抗原的 cDNA 克隆，Choo 等人正式报道了详细方法。著者们用接受人 VIII 因子而发生 NANBH 的黑猩猩血浆作为材料，首先用超速离心法获得小病毒颗粒，随后提取核酸，并经 CH_3HgOH 变性，用逆转录酶的随机引物合成 cDNA，将其插入到 $\lambda\text{gt}11$ 中，然后用 ALT 升高 6 个月以上的 NANBH 病人血清(10^{-2} 稀

释)筛选。

结果从大约百万个克隆中分离到一个能表达 NANBH 病毒特异性蛋白的 cDNA 克隆。该 cDNA 含 155bp, 经鉴定来源于外源性病毒的 RNA 分子, 此 RNA 约由 10 000 个核苷酸组成, 单链正股有一连续的开读框架(ORF)。最后将此 cDNA 克隆到酵母菌中, 在有 λ 过氧化歧化酶(SOD)存在的条件下, 能大量表达病毒特异性多肽。此抗原只与 NANBH 病人血清或实验感染的黑猩猩恢复期血清发生反应, 而与正常人血清、实验感染 NANBH 的黑猩猩的急性期血清以及实验感染 HAV 或 HBV 的黑猩猩血清均不发生反应。由此证明, 这的确是 NANBH 病毒的特异性抗原, 并将此病毒命名为 HCV, 其抗体称为抗-HCV。

在同一时期, 日本学者 Arima 等用类似的方法以 100L 取自 ALT 异常、HBV DNA 阴性献血员的血浆为原材料, 提取病毒 RNA, 在 λ gt11 中构建了 cDNA 克隆, 用急、慢性 NANBH 病人血清进行筛选。其结果, 从 100 万个克隆中选出 56 个有反应性的克隆。经用三组参比血清(Arima、Alter 及 Kanai)鉴定, 发现有 12 个克隆对日本及美国的丙肝都有反应, 16 个克隆只对日本的丙肝有反应。阳性克隆对日本丙肝的反应性存有差异, 这表明日本的丙肝可能有不同的亚型。著者选出其中 5 个克隆对一般人群的抗体存在率进行了测定, 其阳性率分别为 15.1%、8.7%、2.0%、1.7% 和 0.3%, 表明这些抗原的抗体有所不同。对 28 个克隆的核苷酸序列进行了分析。

其大小介于 63~280 bp 之间, 与多种人和动物来源的细胞 DNA 无同源性, 与已知人类病毒的核酸序列也不同。日本 Maeno 等用类似 Arima 的方法也得到了 3 个 cDNA 克隆, 其中 1 个仅与携带 NANBH 病毒的黑猩猩血清发生反应, 而不与正常黑猩猩血清发生反应。

分子生物学技术终于攻克了一个长期困扰学者们研究 NANBH 的难题——病原学的证实。回顾这段研究历程, 我们可以从中得到一个重要的启迪: 由于 HCV 在感染者肝脏和血液中存在的数量极少, 特异性病毒抗原量微乎其微, 这一特点就不能机械沿用对检测其他病毒有效的常规血清学方法来进行研究, 而必须针对其特点, 另辟蹊径闯出一条新路以求突破。类似这种情况, 在今后研究其他病毒性疾病的病原时也许还会碰到, 证实 HCV 的研究思路值得借鉴。

第三节 研究丙型肝炎及其

病原的重要性

从一定程度上而言, 丙肝对人类健康与生命的威胁绝不亚于乙肝, 其理由有:

(1) 可能广布于全球: 据美国、日本、意大利和英国的最新调查资料, 丙肝可能呈世界性分布, 我国最近的调查资料也支持这一推测。近年来, 对 PT-NANBH 病人的抗-HCV 检测, 其检出率分别为: 美国 54~89%、日本 35~76%、意大利 84%、