

成 军 杨守纯 主编

现代肝炎病毒分子生物学

XIANDAI GANYAN BINGDU
FENZISHENGWUXUE



人民卫生出版社

现代肝炎病毒分子生物学

XIANDAI GANYAN BINGDU FENZI SHENGWUXUE

成 军 杨守纯 主 编

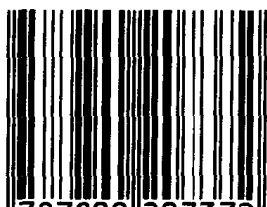
编 者

成 军	李立新	邹正升	于岩岩
范 涛	席宏丽	孙新婷	于 敏
韩凤连	杨守纯	张昌恒	洪士雯
杨永平	魏振满	梁 勇	

以下人员参加部分章节编写

施 红 雷周云 刘 琳 金 磊

ISBN 7-80020-737-4



9 787800 207372 >

人民军医出版社

(京)新登字 128 号

图书在版编目(CIP)数据

现代肝炎病毒分子生物学/成军,杨守纯主编. —北京:人民军医出版社,1997. 8
ISBN 7-80020-737-4

I. 现… I. 成… III. 肝炎病毒-分子生物学 IV. R373. 2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 00836 号

人民军医出版社出版

(北京市复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码:100842 电话:68222916)

人民军医出版社激光照排中心排版

北京京海印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/16 • 印张:23.5 • 字数:562 千字

1997 年 8 月第 1 版 1997 年 8 月(北京)第 1 次印刷

印数:1~3000 定价:58.00 元

ISBN 7-80020-737-4/R • 668

〔科技新书目:420—101④〕

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

内 容 提 要

本书为论述肝炎病毒的基因结构和功能、表达和调控以及基因治疗的一部分子生物学方面的专著。详细介绍了甲、乙、丙、丁、戊和庚型肝炎病毒基因的一级结构,基因的结构与功能之间的相互关系,表达与调控之间的相互关系,基因突变和调控,肝炎病毒蛋白质的基因工程表达,转基因动物,肝炎病毒核酸复制与表达及其与肝炎和肝细胞癌间的相互关系。抗肝炎病毒的基因治疗技术也是本书的重要内容。本书对从事肝炎病毒研究的科技人员以及从事病毒性肝炎的临床医师均有重要的参考价值。

责任编辑 姚 磊
罗子铭

前 言

病毒性肝炎是危害我国人民健康的主要传染病,提高其诊断和治疗水平,最终达到治愈病毒性肝炎,是传染病专科科技人员一项迫切而艰巨的任务。

从1990年世界上第一例腺苷脱氨酶缺乏症的基因治疗临床研究开始,基因治疗遗传性疾病和肿瘤等相继开展。通过近几年的发展,基因治疗已形成一个完整的理论体系。而病毒性肝炎即为病毒核酸成分的存在,及其表达的蛋白质和其引发的免疫病理反应。所以,基因治疗病毒性肝炎最有希望的突破点,是直接阻断、封闭、破坏肝炎病毒的核酸成分,破坏病毒蛋白的表达,改变其引发的免疫病理反应,以增强病毒性肝炎患者机体的免疫力,促进机体将病毒排除体外或将病毒杀灭。

目前的研究表明,基因治疗的反式效应和反义技术是破坏、阻断或封闭肝炎病毒核酸成分的复制和表达的有效手段。但探索上述技术必须对肝炎病毒的核酸成分的结构与功能、表达与调控有较深入的研究和了解。从抗肝炎病毒核酸成分的基因治疗角度,来探索病毒性肝炎的新疗法,同时对6种病毒性肝炎的分子生物学进行全面系统的论述,其目的是为传染病专业基础研究与从事临床工作的同行提供一本较新的参考书。

从我们所查阅的有关病毒性肝炎的专著,当前还没有一本详细而系统介绍6种肝炎病毒分子生物学研究进展的专著。特别是从分子生物学高技术、基因方面阐述抗肝炎病毒更为少见。

本书在编写过程中,得到北京医科大学斯崇文教授、田庚善教授和其他同志大力支持。在此表示感谢。

由于此书内容较新,涉及本专业的面较宽,加之我们编者知识浅薄,水平有限,肯定有不妥或错误之处,恳请各界同行批评指正。

中国人民解放军传染病研究所

1996年9月

目 录

第一章 肝炎病毒的分子生物学概论	(1)
第一节 分子生物学的理论和技术是肝炎病毒研究的重要手段	(1)
一、丙肝病毒和戊肝病毒的发现从基因水平上取得突破	(1)
二、分子生物学技术是肝炎病毒病原学检测的重要手段	(2)
三、HBV DNA 转染细胞系的建立为 HBV 的研究提供了体外繁殖体系	(3)
第二节 分子生物学技术是病毒性肝炎发病机制的研究手段	(4)
一、分子杂交技术原位检测肝炎病毒的核酸成分	(4)
二、HBV DNA 原位表达与 HBcAg 表达方式及其与病理改变的关系	(4)
三、转基因动物是研究 HBV 等肝炎病毒致病机制的合适的模型	(4)
第三节 肝炎病毒的分子生物学研究可丰富分子生物学的理论	(5)
一、HBV DNA 复制是研究逆转录过程的一个很好的模型	(5)
二、HBV DNA 复制过程是研究转录物剪切加工机制的模型	(5)
三、HBV DNA 的研究也是基因表达调控的一个重要手段	(6)
第四节 用分子生物学技术探索抗肝炎病毒治疗的新途径	(6)
一、分泌抗病毒物质的抗肝炎病毒基因治疗	(7)
二、利用肝炎病毒的反式调节机制探讨抗肝炎病毒治疗的新方法	(7)
三、反义技术抗肝炎病毒治疗方法	(8)
第五节 肝炎病毒分子生物学内容	(9)
一、肝炎病毒的基因结构和功能	(9)
二、肝炎病毒基因表达和调控	(9)
三、抗肝炎病毒新方法的探讨	(9)
第二章 甲型肝炎病毒的分子生物学	(11)
第一节 HAV 基因结构	(11)
一、5'非翻译区	(14)
二、编码区	(15)
三、3'非翻译区	(15)
第二节 HAV 基因组编码产物	(15)
一、P1 区	(16)
二、P2 区	(16)
三、P3 区	(16)
第三节 HAV 的复制	(17)
一、HAV 体外增殖	(17)
二、HAV 在体内的生活周期	(17)
第四节 HAV 变异及分型	(18)
一、HAV 基因组核酸变异	(18)
二、HAV 氨基酸序列变异	(18)

三、HAV 分型	(19)
第五节 HAV 抗原结构	(19)
第六节 HAV 减毒与细胞培养适应化的分子基础	(20)
一、HAV 野毒株与减毒株核苷酸比较	(20)
二、2B 和 2C 区基因突变	(21)
三、5'-NTR 对 HAV 体外生长的影响	(22)
第七节 HAV 疫苗的研究进展	(22)
一、HAV 灭活疫苗	(22)
二、HAV 减毒活疫苗	(23)
三、基因工程疫苗	(23)
第三章 乙肝病毒基因的结构与功能	(25)
第一节 HBV 基因组	(25)
一、顺向重复序列	(25)
二、S 基因区	(29)
三、C 基因区	(30)
四、P 基因区	(31)
五、X 基因区	(31)
第二节 HBV 的复制	(31)
一、HBV 进入肝细胞	(31)
二、HBV 细胞内移行	(32)
三、超螺旋双链 HBV DNA 的形成	(32)
四、HBV DNA 前基因组的合成与装配	(32)
五、HBV DNA 双链的形成	(33)
六、HBV 颗粒的装配与释放	(33)
第三节 HBV DNA 的转录	(34)
第四节 HBV 结构蛋白	(37)
一、包膜蛋白	(37)
二、核心区蛋白	(39)
三、HBV DNA 多聚酶蛋白	(41)
四、HBV 的 X 蛋白	(42)
第四章 丙肝病毒的分子生物学	(44)
第一节 HCV 基因的克隆化	(44)
一、HCV 是一种 RNA 病毒	(44)
二、5-1-1 片段的克隆	(45)
三、HCV 基因组克隆化的意义	(46)
第二节 丙肝病毒的基因结构	(47)
一、丙肝病毒基因的一级结构	(47)
二、中国河北株与美、日株一级结构的比较	(47)
三、中国丙型肝炎病毒河北流行株和上海流行株核苷酸序列的比较	(55)
四、中国丙型肝炎病毒基因组克隆的方法	(57)
第三节 HCV 基因组变异及分型	(58)
一、HCV 基因组分型的基础	(59)

二、HCV 基因组分型的方法	(59)
三、HCV 基因组分型的意义	(62)
第四节 丙肝病毒蛋白的翻译	(63)
一、HCV 蛋白编码的基因结构	(64)
二、核糖体与 HCV 5'-NTR 结合的方式	(65)
三、HCV 病毒蛋白的裂解产物	(66)
四、HCV 病毒多蛋白的裂解酶 NS3	(67)
第五节 丙肝病毒感染的分子诊断	(68)
一、HCV 基因组扩增技术	(68)
二、重组 HCV 抗原	(69)
三、人工合成 HCV 抗原	(69)
四、第一代抗-HCV 检测方法	(70)
五、第二代抗-HCV 检测方法	(71)
六、抗-HCV IgM 的检测	(72)
七、HCV 核酸和蛋白的原位表达	(73)
第五章 丁型肝炎病毒的分子生物学	(77)
第一节 HDV 的结构特性	(77)
第二节 HDV 的基因组和抗基因组	(78)
一、HDV 基因组的一级结构的发现	(78)
二、HDV 抗基因组 RNA	(88)
第三节 HDV 的复制	(90)
一、研究 HDV 基因组复制的实验系统	(91)
二、HDV RNA 复制的代谢需要	(92)
三、亚基因组 mRNA	(92)
四、翻译	(92)
五、嗜肝 DNA 病毒在 HDV 基因组复制中的作用	(92)
六、HDAg 在 HDV 复制中的作用	(93)
七、自身裂解	(95)
八、自连	(98)
九、HDV(复制)对 HBV 的影响	(98)
第四节 HDV 的蛋白质	(99)
一、HDAg 的一般特性	(99)
二、两种蛋白的结构区及意义	(99)
三、HDAg' 的发现及特性	(102)
四、28kDa 的发现	(103)
第五节 HDV 的分子生物学内容在诊断、治疗及预防等中的应用	(103)
一、诊断上的应用	(103)
二、治疗上的应用	(104)
三、预防上的应用	(105)
四、其它的应用	(105)
第六章 戊型肝炎病毒的分子生物学	(110)
第一节 HEV 基因片段的克隆化	(110)

一、原始材料	(110)
二、HEV cDNA 克隆化实验流程	(111)
三、HEV cDNA 克隆的结果	(111)
四、HEV cDNA ET1.1 成功的意义	(112)
第二节 HEV 基因组的结构	(113)
一、HEV 核苷酸的一级结构	(113)
二、HEV cDNA 全序列克隆策略	(116)
三、不同株的一级序列比较	(117)
四、戊肝病毒基因组与其它肝炎病毒基因组的比较	(120)
五、HEV RNA 的二级结构	(121)
第三节 HEV 基因组表达研究	(122)
一、HEV RNA 开放读框分析	(122)
二、翻译方式	(123)
三、HEV 抗原的表位	(124)
第四节 HEV 基因重组表达与突变	(124)
一、HEV 蛋白在克隆载体中的表达	(124)
二、HEV 病毒蛋白融合基因的表达	(125)
三、HEV 基因组的变异与突变	(126)
第五节 HEV 的生活周期与体外培养	(127)
一、HEV 的生活周期	(127)
二、HEV 的细胞培养	(128)
第六节 HEV 的分子免疫学	(129)
一、HEV 病毒抗原	(129)
二、HEV 病毒蛋白的抗原决定簇	(129)
三、HEV 抗原在肝脏中的表达	(130)
四、HEV 表达人 B 细胞抗原表位	(131)
第七章 庚型肝炎病毒和 GB 病毒的分子生物学	(134)
一、概况	(134)
二、GBVs 和 HGV 的基因构成及相应特性	(134)
三、GBVs 和 HGV 的结构蛋白	(137)
第八章 乙肝病毒 DNA 转染细胞系的建立和应用	(141)
第一节 HBV DNA 转染细胞系的建立	(141)
一、HBV DNA 目的基因	(141)
二、靶细胞的选择	(143)
三、基因转移方法	(146)
第二节 HBV DNA 转染细胞系复制和表达的特点	(146)
一、HBV DNA 转染细胞系中 HBV DNA 的存在状态	(147)
二、HBV DNA 转染细胞系中 HBV DNA 复制特点	(148)
三、HBV DNA 转染细胞中的转录产物	(149)
四、HBV 蛋白的表达	(151)
五、转染细胞中 HBV DNA 表达调控	(153)
六、HBV 颗粒的装配	(155)

第三节 乙肝病毒基因组转染细胞系的应用	(156)
一、HBV 结构基因的表达	(156)
二、HBV DNA 调控研究	(158)
三、HBV DNA 突变研究	(160)
四、HBV 致病机制研究	(160)
五、HBV 感染与肝细胞癌的关系	(161)
六、HBV DNA 的转染在 HDV 研究中的应用	(162)
第四节 转染细胞系在抗 HBV 药物研究中的应用	(163)
一、病毒基因组复制	(163)
二、病毒的转录	(164)
三、蛋白的表达	(165)
四、药物结构和抗 HBV 活性关系	(166)
第九章 乙肝病毒的基因突变研究	(169)
第一节 人工突变研究方法	(169)
一、直接的缺失与插入突变	(169)
二、系列缺失突变体构建	(169)
三、人工合成方法	(170)
四、PCR 扩增法	(171)
五、寡核苷酸定点诱变	(171)
六、盒式突变	(173)
第二节 直接重复序列的突变	(174)
一、突变体的构建	(174)
二、DR 区突变的意义	(175)
第三节 S ORF 基因突变	(176)
一、前 S ₁ 区突变	(176)
二、前 S ₂ 基因突变	(179)
三、S 基因突变	(180)
第四节 C ORF 区基因突变	(182)
一、前 C 区突变	(182)
二、C 区突变	(183)
第五节 P ORF 和 X ORF 的突变	(183)
一、P ORF 的突变	(183)
二、X ORF 的突变	(184)
第十章 乙肝病毒复制和表达的调控	(186)
第一节 基因调控的研究方法	(186)
一、S ₁ 核酸酶作用	(186)
二、引物延伸实验	(187)
三、基因突变法	(188)
四、体外转录系统	(188)
五、报道基因技术	(189)
六、异种启动子表达实验	(190)
七、尾随序列的置换与突变	(190)

第二节 HBV 基因调节的结构基础	(190)
一、增强子序列	(190)
二、HBV 基因的启动子	(191)
第三节 HBV DNA 复制的调节	(196)
一、HBV DNA P 突变与 HBV DNA 复制	(196)
二、前基因组 RNA 转位与 HBV DNA 复制	(196)
三、HDV 基因共转染对 HBV 复制的影响	(197)
四、影响 HBV DNA 复制的细胞因子	(197)
第四节 HBV DNA 转录物的剪切与调节	(198)
一、HBV DNA 转录物的种类和功能	(198)
二、HBV DNA 转录物剪切现象的发现	(199)
三、HBV DNA 转录物剪切机制	(199)
四、HBV DNA 转录物的剪切特点	(200)
第十一章 乙肝病毒与细胞因子	(203)
第一节 影响 HBV DNA 表达调控的细胞因子	(203)
一、HBV 感染的免疫应答	(203)
二、细胞因子的应答	(205)
三、转录调节因子的应答	(208)
第二节 干扰素与乙肝病毒	(208)
一、HBV 感染导致 IFN 系统的改变	(209)
二、干扰素对 HBV 复制与表达的影响	(209)
三、HBV DNA 的复制和表达对 IFN 的影响	(211)
第三节 白细胞介素-2 与乙肝病毒	(214)
一、IL-2 抗病毒作用的发现	(214)
二、IL-2 的抗乙肝病毒作用	(214)
三、IL-2 抗 HBV 作用的机制	(216)
四、IL-2 转基因表达抗病毒基因治疗的优势	(217)
第十二章 肝炎病毒与肝细胞癌	(219)
第一节 肝炎病毒致肝细胞癌的证据	(219)
一、病因学	(219)
二、流行病学	(220)
三、动物模型和转基因动物	(222)
四、转染细胞的模型	(222)
五、肝炎病毒与癌基因的激活	(223)
第二节 HBV DNA 整合与 HCC	(223)
一、HBV DNA 在肝细胞基因中的整合	(224)
二、HBV DNA 整合与 HCC 间的相互关系	(226)
三、HBV DNA 整合区的细胞基因重排	(226)
四、乙型肝炎病毒致原发性肝癌模式	(229)
第三节 HBV DNA X 基因与 HCC	(230)
一、X 基因 ORF 的结构和作用	(230)
二、X 抗原对癌基因的激活	(230)

三、X 基因研究的意义	(231)
第四节 癌基因与 HCC	(231)
一、抗癌基因 P ₅₃ 与肝细胞癌	(232)
二、癌基因与肝细胞癌	(234)
第五节 HCV 和 HCC	(236)
一、原发性肝癌的抗-HCV 检测	(237)
第十三章 乙肝病毒蛋白质的基因工程表达	(239)
第一节 HBV 蛋白基因工程表达的条件	(239)
一、表达细胞宿主	(239)
二、表达载体	(241)
三、HBV DNA 基因片段	(241)
第二节 原核细胞表达系统	(242)
第三节 酵母菌表达系统	(242)
一、常用的酵母克隆载体	(242)
二、启动子的选择	(243)
第四节 哺乳动物细胞表达系统	(243)
一、表达的策略	(244)
二、小蛋白的表达	(244)
三、中蛋白的表达	(245)
四、大蛋白的表达	(245)
第五节 非包膜蛋白的基因工程表达	(246)
一、核心基因的表达	(247)
二、多聚酶的表达及 HBxAg 的表达	(247)
第十四章 乙肝病毒转基因小鼠	(250)
第一节 转基因动物的发展	(250)
一、早期的转基因动物	(251)
二、转基因动物中基因的表达	(251)
三、外源基因的表达对转基因动物的影响	(252)
第二节 转基因动物的建立方法	(252)
一、外源基因的准备	(253)
二、生殖细胞的准备	(253)
三、外源基因导入受精卵的方法	(253)
四、受体动物的准备及转导受精卵的植入	(254)
五、转基因动物的鉴定	(254)
第三节 转基因动物的应用	(255)
一、肿瘤研究	(255)
二、免疫学研究	(256)
三、动物品种的改良	(257)
四、基因表达的调节和控制	(257)
五、生物工厂	(258)
第四节 乙肝病毒转基因小鼠	(258)

一、乙肝病毒概况	(259)
二、乙肝病毒转基因小鼠的建立	(260)
三、病毒基因表达的调控	(260)
四、病毒基因组的复制	(263)
五、病毒蛋白的合成	(263)
六、转基因动物中的 HBV 致病性	(264)
七、重排序列的不稳定性	(264)
第十五章 肝炎病毒基因组的 PCR 扩增	(267)
第一节 PCR 技术的原理	(267)
一、PCR 技术的理论根据	(267)
二、PCR 技术的基本过程	(268)
三、PCR 技术的影响因素	(268)
四、PCR 技术的类型	(270)
第二节 几种新型的 PCR 技术	(271)
一、定量 PCR 技术	(271)
二、原位 PCR 技术	(271)
三、SISPA PCR 技术	(273)
第三节 HCV RNA 定量 PCR 技术	(274)
一、标本的倍比稀释法	(274)
二、竞争性逆转录 PCR 技术	(275)
三、放射性核素掺入法	(276)
四、HCV RNA 定量检测的应用	(277)
第四节 PCR 技术在乙肝病毒研究中的应用	(278)
一、检测微量 HBV DNA	(278)
二、抗病毒疗效的评价	(278)
三、用于 HBsAg 亚型的研究	(279)
四、血液及血制品安全性的研究	(279)
五、鉴定 HBsAg 阴性的 HBV 感染者	(280)
第十六章 抗肝炎病毒的基因治疗	(283)
第一节 基因治疗概述	(283)
一、基因治疗的策略	(283)
二、基因治疗的条件	(284)
三、基因治疗的操作步骤	(285)
四、影响基因治疗的因素	(286)
五、病毒性肝炎基因治疗的整体构想	(287)
第二节 细胞内免疫抗病毒基因治疗	(288)
一、细胞因子转基因表达	(288)
二、抗病毒蛋白的转基因表达	(290)
三、病毒特异性抗体转基因表达	(291)
四、反式调节机制抗病毒基因治疗	(291)
五、反义技术抗病毒基因治疗	(294)
第三节 细胞自杀机制的抗病毒基因治疗	(295)

一、细胞自杀机制设计思路	(295)
二、病毒主导性酶药物预施疗法	(296)
三、白喉毒素的转基因表达	(297)
四、细胞程序化死亡机制	(298)
五、细胞自杀机制设计的应用	(298)
第十七章 抗肝炎病毒的反义技术	(301)
第一节 反义技术的概念	(301)
一、反义技术的定义	(301)
二、原核细胞中的反义分子	(302)
三、真核细胞中的反义分子	(302)
第二节 反义分子的种类和来源	(304)
一、反义分子的种类	(304)
二、反义分子的来源	(308)
第三节 反义技术的原理和应用	(309)
一、反义技术的原理	(309)
二、反义技术的应用	(311)
第四节 反义技术抗肝炎病毒的作用靶位	(313)
一、甲肝病毒基因组位点	(313)
二、乙肝病毒基因组位点	(313)
三、丙肝病毒基因组位点	(314)
四、丁肝病毒基因组位点	(314)
五、戊型肝炎病毒基因组位点	(314)
第十八章 抗肝炎病毒的寡核苷酸	(317)
第一节 寡聚核苷酸的种类	(318)
一、n-ODN	(318)
二、修饰的 ODN	(318)
三、ODN 与其它反应基团的结合	(319)
第二节 反义寡核苷酸的作用机制	(319)
一、反义寡核苷酸的作用靶分子	(319)
二、反义寡核苷酸的作用类型	(321)
第三节 反义寡核苷酸的药代动力学	(323)
一、一般原理	(323)
二、定量分析方法	(324)
三、体外资料	(324)
四、体内资料	(325)
五、药物毒性	(326)
第四节 寡核苷酸的合成	(326)
一、反义寡核苷酸人工合成的发展	(326)
二、核苷酸合成的策略	(327)
三、核酸小片段的化学合成	(327)
四、核酸小片段的酶促合成法	(330)
第十九章 抗肝炎病毒的核酶技术	(332)

第一节 核酶概述.....	(332)
一、核酶的发现	(332)
二、核酶的基本结构	(333)
三、核酶裂解反应条件	(337)
四、核酶催化的酶学性质	(338)
五、核酶 RNA 的来源	(339)
第二节 核酶的分子设计	(340)
一、靶链的选择	(340)
二、裂解位点	(341)
三、侧翼序列	(342)
四、活性中心化学修饰	(343)
五、载体序列	(343)
六、启动子序列	(344)
七、顺式和反式核酶	(345)
八、二级结构	(345)
第三节 抗肝炎病毒的应用	(345)
一、抗 HAV RNA 核酶技术	(346)
二、抗 HBV 核酶技术	(346)
三、抗 HDV 核酶技术	(347)
索引	(349)

第一章 肝炎病毒的分子生物学概论

1989年,在日本东京召开的庆祝东京医科大学成立100周年的活动中,召开了一次有关血液传播疾病和非甲非乙型(NANBH)病毒性肝炎的国际学术研讨会。在这次大会上,美国疾病控制中心(center for disease control, CDC)的 Bradley 及其同事首次报道了他们从 NANBH 肝炎病毒感染的黑猩猩的血液及肝脏中克隆了的 NANBH 相关的病毒基因片段,即著名的 5-1-1 片段。这一片段被认为是丙型肝炎的病原的基因片段,故将其命名为丙型肝炎病毒(hepatitis c virus, HCV)。1990年,也是这一研究小组,也从病毒的基因克隆化角度入手,成功地克隆了肠道传播的非甲非乙型肝炎(enterical transmitted, Non-A, Non-B hepatitis, ET-NANBH)的病毒的基因片段。1996年 Linnen 等先后从慢性肝炎及输血后肝炎患者血液中克隆分离获得 HGV 的全序列。至此, NANBH 的病原学研究取得了突破性的进展,同时,也使得到确定的肝炎病毒的种类达6种,分别称为甲、乙、丙、丁、戊和庚型肝炎病毒,引起的病毒性肝炎,分别称为甲型肝炎(hepatitis A)、乙型肝炎(hepatitis B)、丙型肝炎(hepatitis C)、丁型肝炎(hepatitis D)、戊型肝炎(hepatitis E)和庚型肝炎(hepatitis G)。

第一节 分子生物学的理论和技术是 肝炎病毒研究的重要手段

一、丙肝病毒和戊肝病毒的发现从基因水平上取得突破

乙型肝炎病毒(HBV)的研究,是从其血清学研究发端的,即从其抗原抗体系统的研究着手的。免疫学技术的发展和运用,促进了对 HBV 的发现和认识。电子显微镜(electric microscope, EM)技术的应用,发现了 HBV 的病毒颗粒,即 Dane 颗粒,使人们加深了对 HBV 的认识。甲型肝炎病毒(HAV)和丁型肝炎病毒(HDV)的发现和认识,也得益于免疫学技术和电镜技术的应用。因此,在 NANBH 的病原学的研究中,人们也试图应用传统的免疫技术和电镜技术获得病毒的证据,但屡遭失败。人们不得不转向其它的研究技术。

80年代中期,随着基因克隆化技术的发展,人们也想到了先研究 NANBH 病毒的基因结构入手的途径。美国 CDC 的几个研究小组也曾进行联合研究,直到1989年,以 NANBH 患者的血感染的黑猩猩取得的血标本为材料,提取所有的核酸成分,逆转录后构建 cDNA 文库。因为当时并不清楚 NANBH 的病毒是 DNA 病毒还是 RNA 病毒。从 10^6 个菌落中筛选到了一个 HCV 相关的基因片段,即 5-1-1 片段。以此 HCV 基因片段为探针,又克隆了一个较大的 HCV 基因片段,构建了 HCV 抗原的表达载体,在大肠杆菌、酵母及哺乳动物细胞中都得到了 HCV 抗原的表达。现在知道,这一片段表达的抗原是 HCV 非结构基因的抗原。以此重组的抗原成分免疫动物,得到了特异性的抗血清,并组装了第一代的抗-HCV 的试剂盒。随之, HCV 的研

究取得了突破性的进展,并证明是血液传播的非甲非乙型病毒性肝炎的主要病原。

从 HCV 的研究来看,HCV 的研究之所以取得突破,打破了多年来一直徘徊不前的局面,主要得益于正确研究方法的选择,主要得益于将基因的克隆化、基因重组与基因表达等先进的分子生物学技术的正确应用。现在回过头来看,由于 HCV 病毒抗原在患者和实验感染的动物模型,如黑猩猩中的浓度很低,以现有的免疫学技术是不能检出的。因此,如果不转向新的研究技术,仍然在传统的免疫学技术上研究,是很难取得成功的。只有先从病毒基因的克隆化方向入手,获得病毒的基因片段,构建病毒蛋白的表达载体,以重组抗原检测抗-HCV,才获得了成功。不仅如此,近几年来有关 HCV 的研究,也大多集中在 HCV 病毒基因的结构与功能、表达与调控等分子生物学领域中。

与 HCV 的发现与研究的历程类似,HEV 与 HGV 的研究也是首先从病毒基因的克隆化入手取得突破。1990 年有关 HEV 的基因序列得到确定,1996 年 HGV 的基因序列也得到确定,使 ET-NANBH 的病原学研究取得了突破性进展。

从 HCV、HEV、HGV 及其与 NANBH 病原学研究的历程来看,分子生物学理论和技术的应用发挥了重要作用。可以说,没有将分子生物学研究技术引入到 NANBH 病原学的研究,就没有 HCV、HEV 和 HGV 的发现,人们对 NANBH 的研究难以取得突破性的进展。

二、分子生物学技术是肝炎病毒病原学检测的重要手段

一直到目前为止,HCV RNA 的逆转录多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)仍然是 HCV 病原成分的唯一检测方法。特别是两对引物的套式或巢式(nest)PCR 技术,是 HCV RNA 有效的检测手段。最近根据 PCR 的原理,设计了 HCV DNA 定量分析方法,是研究 HCV 血液及生物制品 HCV 污染的检测,以及丙型肝炎抗 HCV 治疗疗效评价的有力手段。因为 HCV 各种结构和非结构区抗原成分的检测至今还没有敏感而可靠的手段,所以,只能依靠 HCV RNA 的 RT-PCR 检测。而 PCR 技术,也是分子生物学领域中的一种重要的检测手段。

不仅对丙肝病毒的检测如此,对乙肝病毒的检测亦如此,因为 PCR 技术是一种高度敏感的核酸检测技术。对于乙型肝炎,目前尚缺乏非常可靠的治疗方法。重组的干扰素(γ IFN α_{2b})是目前抗 HBV 较为有效的一种制剂,但也有相当比例的乙肝病人,在 IFN α 治疗一段时间以后,随着血清及肝脏中 HBV DNA 的逐渐减少,其病程也进入恢复期。但在停药一段时间以后,病程再次进入活动期,同时血液及肝组织中的 HBV DNA 重新出现。对乙肝患者 IFN α 治疗有效,停药后即有部分患者重新复发的机理一直不十分清楚。1985 年 PCR 技术出现,并迅速应用到 HBV DNA 的检测研究中,IFN α 治疗乙型肝炎后复发的原因也就找到了。原来,慢性乙型肝炎患者在 IFN α 治疗有效以后,一部分患者中 HBV DNA 逐渐减少直至消失。也有部分患者 HBV DNA 逐渐减少,至一般的分子杂交检测至阴性水平,但仍然残留极微量的 HBV DNA,IFN α 停用后,这一小部分的 HBV DNA 可再次进行复制和表达,使血清及肝组织中的 HBV DNA 重现,而且慢性乙型肝炎患者的病程也再次进入活动期。因此,这部分复发病人,在 IFN α 治疗后,HBV DNA 的复制和表达减少,只是常规的分子杂交技术难以检出罢了。以 HBV DNA 的 PCR 技术进行检测和研究,血清中 HBV DNA 以 PCR 检测为阴性的 IFN α 治疗患者中,绝大部分都取得了治愈的治疗结果;而那些复发的乙型肝炎患者中,IFN α 治疗后血中的 HBV DNA 仍能以 PCR 技术检测到,但以各种分子杂交技术检测,结果都是阴性。因此,