

秦绍明 黄耀焯 主编

丙型肝炎

BINGXING GANYAN

人民军医出版社

丙 型 肝 炎

BINGXING GANYAN

主编 秦绍明 黄耀煊

编者 秦绍明 黄耀煊

邬光惠 彭晓君

杨文俊 刘元业

人民军医出版社

1992·北京

内 容 提 要

自从1989年美国科学家克隆出丙型肝炎病原后，人们对丙型肝炎的认识迅速提高，研究工作已从实验室走向临床。为了使医务工作者全面了解这方面知识，本书系统地介绍了丙型肝炎的病原学、分子生物学、流行病学、血清学的理论知识以及丙型肝炎的诊断，治疗及预防等临床知识，并在每章之后概述了研究近况。因此，本书对从事这方面研究的科研人员及广大医务工作者均有裨益。

责任编辑 李超林 张晓宇

丙 型 肝 炎

秦绍明 黄耀煌 主编

人民军医出版社出版

(北京复兴路22号甲3号)

(邮政编码: 100842)

北京孙中印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行

开本: 787×1092mm/32·印张: 6.625字数: 143千字

1992年12月第1版 1992年12月(北京)第1次印刷

印数: 1~6,000 定价: 3.90元

ISBN 7-80020-346-8/R·132

〔科技新书目: 279—248⑤〕

前 言

早在10多年前就有人发现，除了甲型肝炎和乙型肝炎之外，还有非甲非乙型肝炎。现已知，病毒性肝炎包括甲、乙、丙、丁、戊等5型。所谓非甲非乙型肝炎，实际上包括丙型肝炎和戊型肝炎。戊型肝炎通过粪-口途径传播，其临床表现与甲型肝炎相似，只引起一过性感染，无慢性化病例。丙型肝炎通过输血等肠道外途径传播，其临床过程与乙型肝炎相似，但更易慢性化，除引起一过性感染外，还可导致慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌。

人们对非甲非乙型肝炎—丙型肝炎的认识，经历了一段艰难的路程。10多年来，一直未能直接观察到或分离出导致非甲非乙型肝炎的病毒，也未能象乙型肝炎那样建立相关抗原抗体系统的血清学检测方法。直到1989年，对非甲非乙型肝炎病原的研究才有了突破性进展。美国Chiron公司和疾病控制中心（CDC）的科学家们独辟蹊径，采用先研究核酸后研究蛋白质（抗原）的分子生物学方法，经过6年通力合作，终于在1989年克隆出了慢性非甲非乙型肝炎的病原。这种病原已被命名为丙型肝炎病毒（HCV），由其引起的肝炎称为丙型肝炎。

近两年来，有关丙型肝炎的研究报告如雨后春笋般出现在医学杂志上。这些文献资料使人们对非甲非乙型肝炎的认识豁然开朗。“山重水复疑无路，柳暗花明又一村”，这一古句恰好能够表达非甲非乙型肝炎—丙型肝炎的研究现状。

本书比较全面而系统地介绍了丙型肝炎的病原学、分子生物学、流行病学、血清学、临床诊断、治疗和预防的基本知识和研究进展。由于编写人员水平所限，书稿虽几经修改，仍会有不当之处，恳望同道专家及广大读者指正。

秦绍明

1991年10月于北京

目 录

前言

- 第一章 丙型肝炎病毒(HCV) 是病毒性非甲非
乙型肝炎的主要致病因子…………… (1)
- 第二章 HCV的结构与序 列…………… (17)
- 第三章 HCV基因组的克隆与表 达……………(31)
- 第四章 应用重组HCV抗原检测抗HCV抗体
…………… (49)
- 第五章 聚合酶链反应 (PCR) 在丙型肝炎病毒
检测中的应用…………… (65)
- 第六章 丙型肝炎血清学诊断的临床应用…………… (82)
- 第七章 丙型肝炎的流行病学…………… (104)
- 第八章 丙型肝炎的临床表现…………… (128)
- 第九章 HCV和HBV重迭感 染…………… (138)
- 第十章 丙型肝炎和肝细胞癌…………… (149)
- 第十一章 自身免疫性肝炎检出抗-HCV的意义
…………… (165)
- 第十二章 丙型肝炎的干扰素治疗…………… (174)

第一章 丙型肝炎病毒(HCV) 是病毒性非甲非乙肝炎 的主要致病因子

在1989年之前,丙型肝炎称为非甲非乙型肝炎(NANBH),这是因为在1975年甲型肝炎病毒(HAV)和乙型肝炎病毒(HBV)的诊断方法建立起来以后,发现有一种输血后肝炎不是由HAV、HBV或其他嗜肝病毒如巨细胞病毒、EB病毒所引起。因其性质未定,故暂叫NANB。这种因输血引起的肝炎称为PT-NANBH,以别于经口、胃肠道传染的ET-NANBH。PT-NANBH的病原先是根据临床推测为病毒(Prince 1974, Feinstone 1975),随后在70年代后期,由于黑猩猩的实验感染成功得到了证实(Alter 1978, Shimizu 1979)。黑猩猩是这种NANBH病毒的易感动物,因此研究者以黑猩猩进行实验感染。从动物实验得到的结果结合临床的观察,发现NANBH病毒感染者有50%转变为慢性,其中20%可导致肝硬变。所以,NANBH病毒是一严重损害肝脏的致病因子。自从70年代中期首次报道NANBH以来,研究者做了大量研究工作,积极探索该病的病原,但进展甚缓,而且在一些问题上存在不少争议。科学家们在进行形态学、组织化学和DNA原位杂交等方面研究的同时,随着分子生物学的进展,DNA重组技术被应用于NANBH致病因子的研究。1982年开始,美国的Chiron公司、疾病控制中心(CDC)

和国家卫生研究院 (NIH) 等单位合作研究, 经过多年努力, 终于在1989年Choo等^[1]和Kuo等^[2]成功地从受感染的黑猩猩血液标本中克隆了NANBH病毒基因, 并命名之为丙型肝炎病毒 (HCV)。这使丙型肝炎的研究进入了一个新的起点, 打开了新的局面。在这之后短短的两年多时间内研究取得了很快进展, 人们对HCV有了许多新的认识。

一、NANBH致病因子研究中争论的问题

在1989年发现HCV之前近10年的时间, 科学家们虽然对于NANBH做了大量研究工作, 但是对它的病因学、诊断学和治疗学的研究仍然处于困境, 主要在致病因子的性质、疾病的临床意义、抗体的检测和预防的方法等方面存在争论^[8]。

(一) NANBH的致病因子是否反转录病毒的问题

在1984年国际肝炎会议后, 有Seto和Prince 两个研究小组提出NANBH致病因子可能是一与人免疫缺陷病毒(HIV)有关连的反转录病毒 (retrovirus) ^[4, 5]。Seto 等报道他们检测了18例NANBH病人血清, 18例都有反转录酶 (RT) 活性。但在对照血清标本中只有个别的测到。在采用蔗糖梯度离心分离时RT区带位于1.14g/ml, 取此区带所含物接种黑猩猩实验证明可引起明显NANB感染。后来Seto和Gerety (1985)^[6]又报道, 在1例NANBH病人血清中发现有一种分子量约为77,000dal的糖蛋白抗原, 抗该抗原的抗体可与40% NANBH病人血清产生反应, 而甲肝和乙肝病人的血清只有3.4%。此外, 该抗体亦可与前面所述NANBH病人血清的1.14g/ml蔗糖部份起反应。在他们之后, 意大利的Alberti等人还发现输血引起的23个NANBH病例中有16个在其血清中

测有RT活性，而且该活性分布在1.15g/ml区带并结合于70~90nm反转录病毒样的颗粒上，明显区别于细胞的和HBV的DNA聚合酶。

尽管在文献上有以上这些令人感兴趣的记载，但是与此相反，Khan和Hollinger (1986) [7]报道，他们在来自11个家系因输血得NANBH的病人血清或从11个具有NANBH临床症状的血透析病人血清中均未查到有RT活性；同时他们在感染了含有NANBH致病因子的FVIII浓缩物的3个黑猩猩中亦未发现有RT活性。此外，他们还检测了多批FVIII、FIX和γ球蛋白的制品，未测到RT活性或-反转录病毒样的颗粒。这些生物制品都是被认为与NANBH传染有关连的，他们还将这些生物制品接种到合适的细胞系中，观察它们之中是否有能引起RT活性，结果是阴性。Khan和Hollinger共测260份NANBH病毒感染病人的血清标本或与NANBH病毒感染有关连的某些组份，在这些标本中也没有发现有RT活性。此外，Alter称还有几个研究小组都证明，在一些非常明确为家系的NANBH病人血清中未测到RT活性。那么，1984年Prince等报告的，在接种了H-株NANBH病毒的肝细胞人工培养物中观察到的反转录病毒样的颗粒又是如何解释的呢？据报道，证明是肝细胞人工培养系统中的一些病毒污染物，而不是NANBH致病因子本身。再者，他们所观察到的管状物体大小亦与反转录病毒的大小不符。现比较趋于一致的看法：NANBH病毒不是反转录病毒。

(二) NANBH致病因子是不是HBV变异体的问题

NANBH是否为乙肝的“非典型”表现或HBV血清学阴性的变异体，是研究NANBH致病因子的科学家感兴趣的问题。文献上倾向于NANBH病毒与HBV有关系的3个方面报

道：1. HBV的HBsAg、HBeAg和HBcAg在NANBH病人血清中测到。2. 抗HBs单克隆抗体被发现能与一些诊断为NANBH的病人肝组织和血清起反应，而这些肝组织和血清用一般的抗HBs多克隆抗体检测时HBsAg呈阴性。3. 一些急性和慢性肝炎病人的血清和肝组织用一般检测方法测HBV标志物呈阴性，但在这些标本中检出有HBV DNA^[8]。

Wands等(1986)^[9]报道，有1份血清用抗-HBs多克隆抗体测HBsAg呈阴性，但用抗-HBs单克隆抗体测呈阳性。而且HBV DNA也呈阳性。用该血清接种黑猩猩，经过一个长时间后两个对HBV易感和两个对HBV免疫的黑猩猩均可与抗-HBs单克隆抗体反应，但不能与多克隆抗体产生反应，同时也显示HBV DNA的阳性反应。在一些动物体内血清转氨酶上升。因为上述现象在HBV易感和HBV免疫的黑猩猩都出现，因此推测NANBH致病因子的抗原性与HBV不同，但它们共有一些抗原决定簇，这些决定簇能与抗HBs单克隆抗体反应。但是，在这里有一问题，如果确存在有所谓HBV变异体，在以往诊断为NANBH的病例中占有多大比例呢？这个问题有两层意思：1. 怎能找到HBV变异体的血清学或遗传学证据。2. 如果存在有这方面的证据，那是不是说明这个变异体就是负责现所观察到的NANBH呢？对于这个问题曾经存在相当分歧的意见，现难于估计在已诊断为NANBH的病例中有多大比率可归类于与HBV变异体有关。但一般研究者认为如果有的话数目也是很小的，因为乙型肝炎和NANBH无论是在临床上、免疫学上和生物学上都是两种不同的疾病。

二、NANBH的形态学、免疫组织化学和原位杂交的研究

从70年代中期NANBH提出以后,曾有许多实验方法被用来试图发展一种敏感的过筛NANBH的试验。但这些方法到80年代中期均未能为科学界所接受,主要是没有分离到致病因子,而这对于建立敏感的NANBH诊断方法是至为重要的。因此,NANBH在很长时间内都是用排除法诊断。Alter等(1978)将人NANBH致病因子感染黑猩猩成功且为其他实验室所证实,这使NANBH的研究获得很大进展。它的成功的重大意义在于:1.证明可以传染的物质是致病因子。2.为NANBH进一步研究提供血清和肝组织标本。在继续研究分离致病因子的同时,Schaff^[10]等研究者利用NANB感染的肝组织从形态学、免疫组织化学和原位杂交方面对DN-NBH进行研究。

(一) 组织学和电子显微镜学观察

NANBH感染的黑猩猩肝活检标本用电子显微镜观察急性肝炎的形态变化,接种后4~14星期在NANBH感染的黑猩猩肝细胞中观察到具有特征的超微结构改变,被认为是黑猩猩NANBH感染的证据。

(二) 免疫组织化学分析

免疫组织化学分析首先要有合适的抗体。研究者从一例PT-NANBH病人血清中获得用以接种黑猩猩的接种物I。然后再从后者分离提纯得到一种 $M_r = 7,700$ 的糖蛋白(GP77),并将它注入猕猴制备具有免疫活性的抗体(抗GP77)^[6]。Schall等用NANBH感染3个黑猩猩,接种12~16星期后取肝组织与抗GP77反应,肝细胞产生扩散的染色(棕)。如先在体外用GP77抗原中和抗GP77,则可明显地减弱肝组织标本

的组织化学染色。如用没有接种NANBH的黑猩猩肝活检标本，或用HBV感染的黑猩猩肝活检标本作同样处理，则均不产生反应。

从14个临床和组织学上均诊断为NANBH的病人获得的肝活检标本中，有11个与抗-GP77的免疫组化反应呈阳性。肝细胞中约有30%~50%补缀地在细胞浆染色。GP77抗原在细胞浆定位于细胞膜下或围绕细胞核周围，较少成团状存在。渗入肝门的淋巴细胞、胆管、上皮细胞和血管等不染色。现将黑猩猩和病人肝活检标本免疫组化分析的结果分别列于表1.1和表1.2。

表1.1 接种NANBH和HBV的黑猩猩肝细胞内GP77的定位

黑猩猩 NO	感 染	免疫组织化学反应						
		接种前 (2周)	接种后(周)					
			4	8	10	12	16	20
1284	NANBH	-	-	-	-	+	+-	-
1290	NANBH	-	-	-	-	+	+-	-
1292	NANBH	-	-	-	-	+-	+-	-
1135	HBV	-	-	-	-	-	-	-
1170	HBV	-	-	-	-	-	-	-

+-：轻度反应

(三) 原位杂交

原位杂交试验在3个NANBH感染的黑猩猩上进行^[10]。动物在接种前和接种后6~8周取其肝活检标本与NANBH病毒DNA探针作原位杂交。所用探针有3种：(1) 780bpNA-

表1.2 人肝活检标本GP77的检测

诊 断	GP77
NANBH (急性和慢性)	11/14
急性乙型肝炎	0/2
药物引起肝炎	1/3
脂肪肝	1/3
慢性肝炎	0/3
肝 癌	0/2

NBH病毒DNA探针。(2)载体质粒pBR322DNA。(3)HBV基因组与载体pBR322的重组质粒。肝活检标本冰冻切片放在经多聚L-赖氨酸予处理的载玻片上,用1%聚甲醛固定后放在70%乙醇4℃。杂交前载玻片先用2×SSC处理,放50%甲醛50℃平衡,然后用³⁵S标记的上述3种探针进行杂交。杂交在37℃下进行48小时,用Mung bean核酸酶消化未杂交的DNA探针。经2×SSC充分洗涤后,载玻片涂上一层Kodak NTB-2乳剂,放4℃4天,然后作放射自显影。观察结果:3只黑猩猩中,2只在肝酶活性上升前1~2周即可检测到核酸,另一只猩猩则在7周之后。很重要的是发现克隆载体pBR322不与探针产生杂交,而且3种探针中没有一种能和未接种NANBH接种物的动物肝活检标本产生杂交。³⁵S标记HBV DNA探针只能和HBV接种的黑猩猩的肝标本产生杂交,这进一步证明HBV基因组序列和NANBH感染的黑猩猩的序列之间无同源性。

上述结果表明免疫组织化学分析和DNA原位杂交可用于

NANBH病人或NANBH感染黑猩猩的肝组织检测。

三、NANBH致病因子的物化性质

1983年有两个研究小组报道,存在于细胞质中的管状体NANBH致病因子对氯仿的敏感性质,说明在它的结构中存在有必需的脂肪层(Feinstone等1983,Bradley等1985)^[11]。接着Bradley等(1985)^[12]指出该管状体致病因子的大小,其直径小于80nm。随后He及其同事(1987)对该致病因子进行过滤试验。过滤的每一步骤均有内对照,以便估计能通过滤膜或被阻留的病毒大小。NANBH致病因子和已知大小的对照病毒通过100、80、50和30nm的滤膜,将滤过物接种到黑猩猩和(或)组织培养物,后用标准方法测定感染性。NANBH致病因子能通过100、80和50nm滤膜,但完全为30nm滤膜所阻留。通过与能滤过或被阻留的已知大小的病毒比较,估计NANBH致病因子的大小介于半径30和60nm之间。

NANBH致病因子是这样的小而且外膜包有脂类,只有极少数病毒符合这样条件。研究者考虑有两组,一组是黄病毒类,有人研究NANBH致病因子与黄病毒之间的同源性。另一组是小而外包有脂层的趋肝病毒。NANBH病毒与HBV之间的联系曾被研究,已见前述。更引起大家兴趣的问题是有无可能NANBH病毒是丁型肝炎病毒似的致病因子。对此问题研究者用光学显微镜观察,发现NANBH和丁型肝炎具有非常相似的肝组织病理学效应,电镜下看到它们均可导致相同的细胞质的管状结构和细胞核改变。两者均可有HBV共传染,有很大部份病例发展为慢性化,在早期急性期显示有很高的传染性,而在慢性期则传染性较低。此外,它们的

表面与内部抗原的免疫反应性均很低。虽然它们之间有以上所述这些相似性，但是Bradley和Chiron公司的一些合作研究者未能发现管状体NANBH致病因子和丁型肝炎病毒之间在核酸上有何同源性。所以，科学家们认为NANBH致病因子是新的一种病毒致病因子，而要揭开这个谜必须分离到该致病因子并对其基因进行克隆、表达和序列分析。

四、NANBH主要致病因子——HCV

(一) 寻找研究的突破口

有关NANBH致病因子的有限知识大部份都是来自黑猩猩感染的研究。这些研究表明，通常存在于大多数感染病人中的NANBH致病因子滴度很低，只有 $10^2 \sim 10^3$ CID/ml，CID (Chimp infection dose) 为黑猩猩感染剂量，它可使实验感染的黑猩猩肝细胞内出现明显的膜性管状体。该致病因子是对有机溶剂敏感的^[11]小的被膜病毒。鉴于从该致病因子提得的核酸，与最近鉴定的另一种肝炎病毒HDV基因组之间不发生交叉反应，因此提出一种假想，即该因子可能与黄病毒有关，或是黄病毒科的一个成员。黄病毒类似HDV是一小的被膜病毒，也可在感染细胞内引起膜性管状体的产生^[12]。

早期研究以为，NANBH致病因子与经血传播的HDV一样，在急性期血清中存在有大量抗原和病毒，到了恢复期则有相应的抗体出现。因此，开始时都用常规的免疫学方法对不同时期的NANBH患者的血清进行大量的分析，但未能发现特异的抗原抗体反应。因此他们停了下来，分析失败的原因。他们想到前面所说的NANBH致病因子类似黄病毒，而后者有一特点，即在被其感染的动物组织中病毒含量很低。

因此，他们用黑猩猩做血清病毒感染浓度滴定，即用系列稀释的PT-NANBH急性期病人血清分别接种黑猩猩。结果发现如上所述大多数人NANBH急性期每毫升竟仅含 $10^2 \sim 10^3$ CID，而HBV的感染浓度为 $10^8 \sim 10^{13}$ CID/ml。这使人们认识到长期未能测出NANBH抗原抗体反应的主要原因，是由于NANBH病毒抗原的浓度大大低于常规免疫学检测的浓度最低要求。Houghton等认为NANBH病毒不能被检出，不是由于不存在此种肝炎，因动物实验已证明NANBH血清确可引起发病。也不是由于人体对于NANBH病毒免疫反应甚弱，因动物实验亦已证明黑猩猩有明显的免疫反应。NANBH病毒长期未能检出是由于病毒抗原浓度太低，远低于HAV或HBV在血中的浓度，现有血清学分析方法不能检出。

为了要在这个问题上取得突破，科学家们决定采用DNA重组新技术对致病因子进行研究，以期获得基因组克隆，便于对致病因子的核酸和抗原蛋白作进一步深入研究。

（二）NANBH致病因子HCV基因组克隆的获得

1982年美国3个研究小组开始联合研究^[1]，以感染的黑猩猩肝脏为材料对致病因子基因组进行分子克隆，试图寻找与NANB基因组有关连的核酸。在基因工程或DNA重组技术中，克隆这个术语是指含有单一DNA重组体的无性系或指将DNA重组体引进受体细胞中建立无性系的过程。所谓重组体是目的基因与载体构建而成的，载体可用质粒、入噬菌体或病毒。Choo等^[1]先是从许多感染的黑猩猩肝脏中提取RNA入手，以入噬菌体 λ gt11为载体。经多年工作得 2×10^6 λ gt11克隆，后用许多不同的感染血清对其进行筛选，以放射标志羊抗体作为第二抗体来检测结合的抗体。虽然获得了阳性的克隆，但后来作进一步的分子水平分析和血清学鉴定，均证

明这些克隆中没有一个是从小NANBH致病因子基因组衍生来的。因此,他们放弃了肝脏改用血浆为材料,即从抽选出来的一些慢性感染的黑猩猩上采集大量血浆合并在一起,然后在其他动物身上进行感染性滴度测定,获得一批滴度 10^6 CID/ml的混合血浆,该滴度与过去测定急性期病人血浆的结果相近。血浆经稀释和充分超速离心后,取沉淀物从中提取总核酸。因致病因子及其基因组的性质尚不清楚,将提取所得核酸用化学变性剂使其变为单链,所得RNA和DNA单链都用随机引物进行反转录,该引物能引导任一种单链核酸的转录,然后将获得的互补DNA(cDNA)克隆到噬菌体载体 λ gt11。后者可使克隆的cDNA得到高效表达,合成它所编码的多肽。该载体的设计使可能利用目的多肽的特异抗体筛选cDNA基因库的方法,达到分离克隆的目的。研究者以已诊断为慢性NANBH的病人血清作为特异抗体进行筛选,从cDNA基因库约为 10^6 克隆中筛到5个阳性克隆,其中一个命名为5-1-1,其编码的一种抗原能结合NANB感染病人的循环抗体。5-1-1是现在主要用以检测抗-HCV的抗原C100-3的主要决定簇。它的核苷酸序列见图1·1(Hosodaket al, 1992)。以5-1-1克隆为杂交探针,从相同的cDNA库中衍生得到一更大的重叠克隆叫克隆81。

3732

HCV-US	ATCATACCTG	ACAGGGAAGT	CCTCTACCGA
HCV-J	G—T—T—C—	—————	—————AG
*1	—————T—C—	—————	—————AG
*2	—TG—T—G—	—T—G—	T—A—
*3	G—TG—T—C—	—————	—————T—AG
*4	G—T—TT—C—	—————	T—G—
*5	G—T—T—C—	—————	—————AG