维普资讯 http://www.cqvip.com

1-6

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar. 1993

丙型肝炎病毒分子生物学研究进展

唐红 林勇

(华西医科大学附属第一医院病毒性肝炎研究室，成都 610041)

R373.21

Advances of Research on Molecular Biology of Hepatitis C Virus

Tang Hong Lin Yong

(*Department of Viral Hepatitis, The First Affiliated Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu* 610041)

关键词：丙型肝炎病毒 分子生物学 基本结构 特性

Key words: Hepatitis C Virus Molecular Biology

丙型肝炎病毒（HCV）是经血源传播的一类肝炎病毒。1989年美国Chiron公司Choo等率先将HCV cDNA克隆成功[1]，使HCV成为第一个利用分子生物学技术而发现的病毒。近两年来，HCV研究的进展十分迅速，已成为病毒性肝炎研究领域中的一个热点。本文就HCV分子生物学的研究进展作一综述。

1. HCV的结构与特性

（1）HCV病毒的特性：

HCV是一种与黄病毒属中的黄病毒和瘟病毒极为相似的RNA病毒，目前将其暂归类为黄病毒样（Flavivirus-like）病毒。因大多数病人血浆中的HCV滴度不高，一般仅为10^3—10^5黑猩猩感染剂量/毫升，所以关于HCV的认识主要来自黑猩猩的传代实验，现已从感染的黑猩猩血浆中分离出病毒。HCV为含脂质外壳的球形病毒，具有囊膜和刺突结构，直径30～60nm，对氯仿敏感[2]。但目前对HCV病毒颗粒的完整结构和各组成成份间的相互关系尚不清楚；且已发现对氯仿耐受，并对C_{100}不反应的非甲非乙肝炎病毒，故是否存在另外的引起输血性肝炎的病毒也有待进一步查明。

（2）HCV RNA的结构与功能：

1. 基本结构与功能：

尽管目前许多细节尚待进一步研究和确证，但对HCV RNA的基本结构和主要功能已有了初步认识。

本文于1992年6月5日收到，9月12日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

HCV 基因组为一单股正链 RNA，长约 9.5kb，G+C 含量59%。HCV RNA 有一个很大的开放阅读框架（ORF），约由9033个核苷酸构成，可编码合成含 3011 个氨基酸的多聚蛋白质前体；该 ORF 两侧各有一个非编码区（NC 区），5′-NC 和 3′-NC 区的长度分别为 341 和 27～55 个核苷酸，有的分离株在基因组的 3′ 末端含 poly(A)$^+$ 尾（其3′-NC 区较短，为 27nt）[1,4]，而有的则无 poly(A)$^+$尾（其3′-NC 区常较长，分别为 42、51 和 55nt）[5,8,35]，因此，对 HCV RNA 3′ 末端的确切结构尚有待进一步研究澄清；编码病毒结构蛋白的基因位于 HCV RNA 的 5′ 端，包括 C 和E_1、E_2/NS_1 区，分别编码核心蛋白和外壳蛋白，而病毒非结构蛋白的编码基因则位于 3′ 端，包括NS_2、NS_3、NS_4 和 NS_5 区，分别编码相应的蛋白成分[3]。目前报道的 HCV RNA 全基因克隆的核苷酸数目为9401～9416[5,8,9,35]，因难以得到5′和3′-NC 区的完整克隆，故目前所公布的顺序是否代表 HCV 基因组的全部序列尚不清楚[2]。根据现有资料，HCV 的基因组结构可初步归纳如图[3,35]。

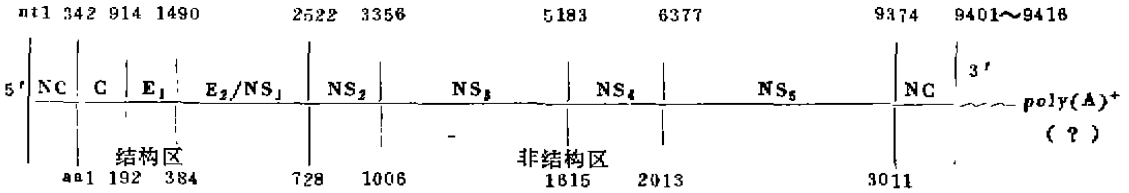

图. HCV 基因组图谱

Fig. Map of HCV genome

有资料提示：HCV 基因组的5′和3′-NC 区不被翻译，但含有调节因子，在 HCV 复制中起重要作用[3,24]。5′-NC 区含有一个末端发夹结构、一个短的直接重复顺序和 3～4 个小 ORF，这些 ORF 的功能尚不清楚，由于去除这些区域可使 HCV RNA 的体外表达效率提高，故推测其可能为负向调节因子[4,5]。

2. 变异与亚型：

不同来源的 HCV 毒株的基因结构有较大的差异。美国学者自黑猩猩中克隆的 HCV 与日本学者从病人中克隆的序列有很大差异，不同国家报道的 HCV 序列差异也较大，甚至从同一国家不同地区和不同病人中分离的 HCV，其核苷酸和氨基酸序列亦有较大变异，各株间的同源性约70～90%。通常将美国最先克隆的 HCV 称为原型(Prototype，PT)，来自 5 位日本病人的HCV株同美国株比较，核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 76～77% 和 79～83%，而 5 株间的同源性分别为89～99%和93～99%[6]。其它国家报道的 HCV 序列，有的与美国株相似，有的则比日本株同源性更高，故有学者认为HCV 至少存在两种亚型，其分布可能与地理因素有关[14,21,28]。有报道 HCV 各株间在核苷酸水平上变异较大，而在氨基酸水平上则相对保守[7]。由于来自同一地区不同病人的 HCV 株有时也存在较大变异，故宿主和病毒间的相互作用（特别是宿主的免疫选择作用）可能也与 HCV 的变异有关[31]。不同亚型（血清型或基因型）间是否存在致病性的差异尚待进一步研究。

HCV 基因组不同区域的变异程度是不同的。5′-NC 区最为保守，各株间同源性≥95%，常作为 PCR 引物的核苷酸序列而用于 HCV RNA 检测[21,27]；该区中还有两个不

维普资讯 http://www.cqvip.com

变区，若根据其设计引物进行PCR，对HCV的检测更加有效[32]；Lee等发现台湾地区5株HCV 5′-NC区的219位均缺失，其生物学意义有待探讨[18]。3′-NC区的变异相对较大，同源性约60～90%[5,27]。结构蛋白编码区中，核心蛋白编码区（C）相对保守，而外壳蛋白编码区（E_1、E_2/NS_1）变异较大[24,28]；E_1区可分成两组，同组内高度保守，而两组间同源性仅50～60%[5]；E_2/NS_1区变异最大，其氨基末端有两个高变区（HV_1、HV_2），两者编码蛋白有相同的亲水区和二级结构，可能在免疫反应中起重要作用[17,21]。各非结构蛋白编码区的确切变异程度尚不完全清楚，有研究表明其变异程度小于E_1和E_2/NS_1区，特别是NS_3和NS_4区相对保守，变异程度可能与C区相似[21,25]。

（3）HCV蛋白的结构与功能：

HCV cDNA的克隆成功，使HCV基因的体外表达成为可能。利用原核、真核表达质粒和重组杆状昆虫病毒，已在细菌、哺乳动物细胞和昆虫细胞中表达了多种HCV蛋白成分。通过基因克隆和体外表达，目前对HCV部分蛋白成分的结构和功能已有了初步了解。

与黄病毒和瘟病毒相似，HCV RNA先编码合成一多聚蛋白质前体，然后通过病毒和宿主细胞蛋白酶的共同作用，将其切割为结构蛋白（C、E_1、E_2/NS_1）和非结构蛋白（NS2～NS5）。C/E_1和E_1/E_2-NS_1蛋白的交界点已经确定，分别为191/192和383/384，由宿主细胞的蛋白酶（一种与微粒体膜成分相关的信号肽酶）进行切割[5,25,27]。而非结构蛋白的切割则与病毒的NS_3蛋白有关[3,20]。

C蛋白可以与HCV RNA相互作用，从而构成病毒核衣壳体，该核心蛋白为19～22 kd的糖基化蛋白（p19～22），其主要抗原决定簇位于氨基末端和C/E_1交界区[25,26,27]。有学者发现：核心蛋白羧基端的两个疏水区与其分布特性有关，完整的p22存在于转染细胞的胞浆和细胞表面，而缺失该两区的核心蛋白则集中在核内形成特异性包涵体[28]。

E_1蛋白是构成病毒外壳的主要成分，目前还不能完全确定E_2/NS_1蛋白属结构还是非结构蛋白，但多数研究提示其为病毒的外壳蛋白；两种外壳蛋白均为糖基化，分子量分别为33～35kd和70～72kd(gp33～35，gp70～72)，它在蛋白前体中的排列顺序为NH_2—p22—gp35—gp70—COOH[25,27]。gp70的氨基末端为高变区，是机体免疫选择的作用部位，可能在刺激免疫反应中起重要主用，而机体免疫压力又在HCV外壳蛋白变异中起一定作用，这可能与HCV持续感染和慢性化有关，在研制疫苗时，除注意HCV的一般变异外，还应考虑这种免疫选择作用的影响[26,27,31]。有研究提示：在急性期抗-gp35抗体具有中和活性，而在长期慢性肝炎病人体内则可能无此作用，NS1蛋白（gp70的一部分）具有抗原性，在病人血清中可产生抗-NS1蛋白的特异性抗体，但该抗体与HCV清除和疾病恢复无关[31]。

NS_2和NS_4蛋白的功能还不清楚，但在HCV感染时，宿主细胞产生的特异性抗体与NS_4蛋白有关，推测它具有刺激机体产生抗-C_{500}抗体的作用，对丙型肝炎血清学诊断的建立有重要意义[5]。NS_3蛋白具蛋白酶和螺旋酶活性，有可能将多聚蛋白的部分非结构蛋白切割成多肽，而这些多肽是病毒复制和包装所需的[3,25]。NS5蛋白的功能尚不很清楚，可能具复制酶（RNA依赖的RNA多聚酶），功能而与病毒的复制有关[5]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表. HCV 蛋白的结构与功能

Table. The Structures and functions of HCV proteins

蛋白组成	大小		可能功能
	预计长度[5,8]	实际大小[27]	
结构蛋白			
C	192AA	p22	核壳体蛋白
E_1	192AA	gp35	外壳蛋白
E_2-NS_1	344AA	gp70	外壳蛋白?
非结构蛋白			
NS_2	278AA		?
NS_3	609AA		蛋白酶/螺旋酶
NS_4	398AA		?
NS_5	998AA		复制酶

2. HCV的体外培养和动物模型

对 HCV 体外培养的研究刚刚开始。Robert 等报道：用急慢性 HCV 感染的黑猩猩肝细胞进行原代培养，结果有 HCV 复制，培养上清中有 HCV RNA 和病毒颗粒存在，且可用其试验感染黑猩猩；用 HCV 体外感染培养的正常黑猩猩肝细胞也获成功，感染后15天可在培养上清中检出 HCV RNA，并可维持21 天以上[34]。但上述体系均为短期培养，有必要研究长期传代的 HCV 体外培养系统，以便为 HCV 分子生物学研究和药物筛选提供有用的工具。

HCV 黑猩猩动物模型的建立，不仅为 HCV 的研究提供了大量材料来源，而且有利于 HCV 体外培养和体内感染过程的研究。在 HCV 接种后 2天，肝内就可检出 HCV RNA，并与血清 ALT 升高的时间一致；此后 1～2 天，HCV RNA 在血清中出现，而抗-HCV 在接种后 3～8 月才产生；这对 HCV 感染的临床观察有一定参考意义[33]。

3. HCV 感染的检测及其意义

目前 HCV 感染的诊断主要是检测血清抗-HCV 和 HCV RNA，也有报道检测肝内 HCV RNA 和 HCV 抗原。

（1）抗-HCV 的检测和意义　利用体外表达的各种 HCV 重组蛋白（如C_{22}、C_{33}、S_2、C_{100}、NS_1、NS_5 等）已建立了多种抗-HCV 检测方法，并用于 HCV 感染的临床诊断和实验研究[5,12]。目前最常使用的是 Ortho 公司生产的检测抗-HCV ELISA 试剂盒，第一代产品是用体外表达的 NS_4 蛋白（C_{100}-3）和人超氧化物歧化酶（SOD）构成的融合蛋白作为包被抗原，检测抗-C_{100} 抗体；第二代方法的包被抗原不仅包括 C_{100}，而且含有NS_3（C_{33c}）和核壳体（C_{22}）蛋白，其灵敏度和特异性均优于第一代产品，且抗-HCV 的检出较早，对 HCV 感染的早期诊断似有一定意义，有认为抗-C_{22} 有可能成为反映病毒血症的一个指标，但这还需进一步实验加以证实[3,9,12]。抗-HCV 检测方法还有重组免疫印迹法（RIBA）及酶免疫法（EIA），国内目前已有抗-HCV检测试剂盒出售。但

维普资讯 http://www.cqvip.com

上述各种方法相互间的重复性还不太高，其方法学本身尚有待完善。

抗-HCV多在感染后2～6月（有的甚至更晚）才出现，其出现时间因不同个体和不同检测方法而异，甚至有的急性病例恢复后不产生可检测水平的抗体，故抗-HCV阴性不能排除HCV感染[3,18,21]。而抗-HCV阳性病人仅部分可检出HCV RNA，故持续抗-HCV阳性并不表示体内有HCV病毒存在[3,12]。另外，抗-C_{100}抗体不具保护性，不能预防再次感染[3]。

（2）HCV RNA的检测和意义　由于HCV感染者血中病毒含量极低，用一般的分子杂交技术难于检出HCV RNA，故目前HCV RNA的检测均采用逆转录PCR（RT-PCR或cDNA-PCR）技术[13,15]。即便如此，有时结果也不理想。最近应用"套式"PCR（Nested PCR）检测HCV RNA，其敏感性和特异性更为提高[11,12,16]。利用这些技术，常在一些抗-HCV阴性的病人血清中检出HCV RNA，能较抗-HCV早数周至数月检出，并常早于临床症状出现和血清ALT升高，是HCV感染早期诊断的主要指标；还能鉴别抗-HCV阳性血中是否含有HCV，对传染性的判定也有重要意义[3,12,16]。

在血清HCV RNA阴性病人的肝穿组织中，有学者用PCR检出HCV RNA，这可能是一种比血清测定更能反映病毒持续感染的指标[22,23]。还有学者利用^{35}S-HCV RNA和地高辛标记的寡核苷酸探针，以原位杂交方法检测肝内HCV RNA，从细胞水平对HCV感染进行了研究[18,23]。

（3）HCV抗原的检测　目前虽有检测肝内HCV抗原的报道[11]，但还不是诊断HCV感染的常用方法，血清HCV抗原的检测方法尚有待建立。

参考文献

〔1〕 Choo, Q. L. et al., 1989, Science, 244: 359—362.

〔2〕 Bradley, D. W. et al., 1990, Prog. Med. Virol. 37: 101—135.

〔3〕 Gowans, E. et al., 1991, Virus Information Exchange Newsletter, 8: 106—110.

〔4〕 Han, J. H. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 1711—1715.

〔5〕 Choo, Q. L. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 2451—2455.

〔6〕 Kato, N. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 9524—9528.

〔7〕 Kubo, Y. et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17: 10367—10372.

〔8〕 Takamizawa, A. et al., 1991, J Virol. 65: 1105—1113.

〔9〕 Chiba, J. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 4641—4645.

〔10〕 Nakamoto, Y. et al., 1992, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, University of California, San Diego, p183.

〔11〕 Artini, M. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p176.

〔12〕 Artini, M. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p177.

〔13〕 Abate, M. L. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p178.

〔14〕 Bartolome, J. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p179.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[15] Porchon, C. et al., 1991. Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p180.

[16] Lemas, E. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meetiog, Institut Pasteur, Paris, p182.

[17] Honda, M. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p184.

[18] Wulec, Y. H. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p185.

[19] Geiger, C. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p186.

[20] McGarvpy, M. J. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p188.

[21] Kremsdorf, D. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p189.

[22] Vitvitski, L. et al., 1991, Moleculer Biology of Hepatitis B Virus Meeing, Institut Pasteur, Paris, p192.

[23] Diamantis I. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasttur, Paris, p193.

[24] Kumar, U. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p194.

[25] Quiroga, J. A. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p195.

[26] Choo, Q. L. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p210.

[27] Shimotohno, K. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p211.

[28] Li, J. S. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p212.

[29] Kim, D. W. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p213.

[30] Saito, I. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p214.

[31] Cariani, E. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p215.

[32] Bukh, J. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p216.

[33] Negro, F. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p218.

[34] Robert, E. L. et al., 1991, Molecular Biology of Hepatitis B Virus Meeting, Institut Pasteur, Paris, p221.

[35] Inchauspe, G. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 10292—10296.