

•成果综述•

病毒性肝炎临床诊治的基础与应用研究^①

姚集鲁 高志良 彭晓谋 周元平 李刚
崇田 邓子德 何有成 柯伟民 陆玮伦

(中山医科大学肝炎研究室、附属第三医院传染科; 广州, 510630)

摘要 病毒性肝炎是我国最重要的传染病之一, 可导致严重慢性肝病, 并且与肝细胞癌密切相关。近 5 年来, 我们改进肝炎病毒核酸诊断技术, 建立热变性 HCV RNA 直接扩增技术、RT-PCR 夹心斑点杂交技术、HBV 前 C 区点突变检测技术, 以及克隆 HCV、HGV 基因序列。此外, 对广东甲型肝炎流行病学调查与输血传播 HCV、HGV 及 TTV 人群感染的情况、慢性 HBV 感染者病情反复发作的因素、HCV 与肝癌关系、干扰素、Lamivudine 的临床治疗观察、基因治疗的应用基础研究, 以及中西医结合治疗病毒性肝炎等作了一系列研究。这些技术的改进与研究成果, 迅速应用到临床防治工作中, 对当前病毒性肝炎诊治工作起到积极的推动作用。

主题词 肝炎, 病毒性, 人/诊断; 拉米夫定/治疗应用; 干扰素类/治疗应用; 肝炎, 病毒性, 人/治疗; 基因疗法

中图分类号 R 512.6

Basis and Applied Study of Clinical Diagnosis and Treatment on Viral Hepatitis

Yao Jilu Gao Zhiliang Peng Xiaomao Zhou Yanping Li Gang
Chong Yutian Deng Zhide He Youcheng Ke Weiming Lu Weilun

(Hepatitis Institute, Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Abstract Viral hepatitis is one of the most important infectious diseases in China. It is the most common cause of chronic hepatitis and is closely related to hepatocellular carcinoma. In the past 5 years, we have improved the molecular biology techniques for the diagnosis of this group of diseases, including the establishment of direct-amplified heat-denatured detection of HCV RNA, detection of pre-core region mutant of HBV with RT-PCR, dot hybridization and the sequence cloning of HCV and HGV. A series of epidemiologic studies including the investigation of epidemiology of HAV in Guangdong, as well as risk factors study on transmission of HCV, HGV and acute exacerbation in chronic hepatitis B patients was carried out. Preliminary basic study on gene therapy and a series of studies on combination of Chinese traditional medicine with western medicine are also in progress. All these achievements have been rapidly applied to clinical practice and played important roles in the advance of diagnosis and treatment in viral hepatitis.

Subject headings hepatitis, viral/diagnosis; lamivudine/therapeutic use; interferons/therapeutic use; hepatitis, viral/therapy; gene therapy

目前我国病毒性肝炎感染情况仍然很严重。 甲型肝炎总流行率为 80.9%, 乙型肝炎表面抗原

携带率为 9.75% 估计实际人数超过 1.2 亿, 乙型肝炎病毒(HBV)感染总流行率为 57.63%。丙型肝炎标准化流行率为 3.2%, 戊型肝炎为 17.2%。目前又发现一些新的肝炎病毒, 如庚型肝炎病毒(HGV)、TT 病毒(TTV)等。感染肝炎病毒后所致慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌是造成众多病人病情不愈、加重及死亡的主要原因。因而, 病毒性肝炎的防治研究成为我国疾病控制的重大问题。本室过去 5 年来, 在不断追踪国内外最新研究技术与方法的基础上, 创建敏感的诊断技术, 积极开展抗病毒治疗, 免疫病理研究等, 对病毒性肝炎有关的临床热点问题进行了一系列研究观察, 现分述如下。

1 诊断技术

1.1 改进分子检测技术

1.1.1 热变性 HCV RNA 模板直接扩增法技术

彻底提纯样本或充分除去样本中的抑制因子是巢式逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HCV RNA 成功的关键。同时, 在处理过程中, 如何抑制 RNase 活性和避免污染也是至关重要的。我科采用直接裂解制备样本进行 PCR 扩增, 加 $\rho=0.5\%$ 硫基乙醇进行热裂解来制备样本, 先用 300 mg/L 的蛋白酶 K 于 55 °C 将血浆消化 30 min 再进行热变性, 离心后, 取上清液进行 RT-PCR 扩增^[1~3]。

本方法与目前常用的酸胍酚一步法比较, 其敏感性与特异性一样, 检出率相符, 本法检测仅需 4 h, 而酸胍酚法约需 36 h, 明显缩短了时间。该法操作简便, 不易出现污染, 由于操作简化, 有利推广。

1.1.2 RT-PCR 夹心斑点杂交技术

建立相应的重组体。载体选用 P t 7 t 3, 将质粒 pUN 中的 HCV 5' 端非编码区 300 bp 的 cDNA 片段亚克隆到选用载体中。经转化、增殖, M13K07 超感染, 可从培养上清中制备纯化重组的单链 DNA, 作为一级探针(不标记)。因避免了双链探针的自身复杂性问题, 这种单链 DNA 探针杂交效率要高很多。

标记通用二级核酸探针。Pt 7 t 3 空载体经转化、增殖后, 按需要量制血双链 DNA, 线性化后按随机引物法标记 Dig, 即为二级标记探针。这种探针灵敏度高, 操作简便, 无放射性污染, -20 °C 可有效保存 1 年以上。

RT-PCR 夹心斑点杂交法放大检测血清标本中 HCV RNA, 先用 RT-PCR 对待检标本进行单轮扩增, 产物经 99 °C 15 min, 冰浴骤冷, 点样于硝酸纤维素膜(NCM), 烘膜固定后即可用夹心斑点杂交法放大鉴定。由于充分利用了单链一级探针杂交的高效性和通用二级探针的信号高倍放大作用, 省去了第 2 轮 PCR 扩增, 减少多次 PCR 操作及高扩增造成的假阳性率偏高问题, 降低实验费用, 探针杂交结果也比电泳后观察条带更肯定、更特异^[4~7]。

1.1.3 改变引物 3' 端检测 HBV 前 C 区点突变

乙型肝炎病毒感染后可发生变异。变异后逃避免疫攻击, 引起病毒复制持续, 造成病情迁延不愈。我们采用引物 3' 限定扩增的方法研究 HBV 前 C 区点突变, 发现 HBV 这种变异在慢性肝炎中可达 70.1%, 肝硬化中 70.6%, 肝细胞癌 7.5%, 较急性肝炎 25.0% 及 HBV 携带者 19.2% 明显高 ($P < 0.01$)^[8,9]。

1.1.4 肝脏纤维化指标检测

肝炎病毒感染所致肝纤维化是慢性肝炎、肝硬化发生、发展的重要因素。开展对一系列肝纤维化指标的检测如: 血清透明质酸酶、前胶原等, 有利于判断慢性肝病的发展, 为抗纤维化治疗提供疗效考核的指标。在 10 余种肝纤维化血清指标中, 我们观察结果表明, 以透明质酸酶(HA)的临床意义较大。对 164 例病毒性肝炎患者测定 HA, 发现血清 HA 水平随肝纤维化发展而升高, 在肝硬化组最高。结合其病理结果分析, HA 与肝内炎症、坏死及纤维化程度呈正相关^[10,11]。

1.2 分子克隆与测序工作

1.2.1 HCV 首先对 HCV 广东株 5' NCR, E1, E2/NS1 区进行分子克隆和序列测定, 经同源性比较, 证实为 1b 基因型; 在国内首次报道采用酶切法以 E1, E2/NS1 区作为分型区段; 在国内率先报道肝细胞癌中 HCV 的序列, 并与非肝癌的慢性丙型肝炎 HCV 序列比较, 发现同源性; 对 HCV 包膜蛋白进行体外融合表达, 对 HCV 特异性受体的研究中可能有重要作用; HCV 5' NCR cDNA 进行体外转录, 体外合成 HCV RNA, 作为逆转录和 PCR 的阳性对照模板, 对消除 PCR 过程中的假阳性有重要作用^[12~15]。

1.2.2 HGV 首先报道 HGV 广东株的分子克隆和序列测定,对多个不同株(包括云南、广东、香港)的 5' NCR 进行同源性分析。对华南地区 1991 份不同人群的血清标本进行 HGV 流行病学调查,发现接受骨髓移植、血液透析、静脉吸毒者、乙型、丙型、非甲~戊型肝炎病人及肝细胞癌患者是 HGV 的高感染人群;不同 HGV 株存在一定的地区性差异,同一地区不同人群的 HGV 株变异不明显;感染 HGV 后短时期内(3 个月)无变异;序列中存在高度保守区及较大变异区^[16~18]。

2 流行病学

2.1 广州地区正常人群甲型肝炎血清流行病学调查

继 80 年代初期之后,我科再次在 90 年代初期在较大样本的人群中,用 ELISA 法检测了 1 014 名正常人不同年龄组血清抗 HAV-IgG 的水平,1~10 岁组的抗体阳性率仅为 30%左右,11 岁后的抗体阳性率随年龄增长而上升(>50%),21~30 岁组达到高峰(77.2%)。各年龄组的抗体滴度亦有较大的差异^[19]。随后通过粤港两地的调查比较表明,广州的抗 HAV 阳性年龄分布曲线与香港 70 年代的情况相似。

2.2 输血与丙型肝炎关系的前瞻性研究

我们采用前瞻性研究方法,对 52 例输血前无丙型肝炎病毒(HCV)感染的受血者及 30 例无输血的对照组随访检测 ALT、抗-HCV、HCV RNA 等项目并进行临床观察。结果显示:①52 例受血中有 9 例符合输血后丙型肝炎的诊断,发生率为 17.3%,对照组 30 例无 1 例感染 HCV,两组比较有统计学差异($P < 0.05$),且趋势检验 $\chi^2 = 16.67$, $P < 0.05$;②9 例输血后丙型肝炎患者中的 8 例经 1 年随访,均转为慢性丙型肝炎;③导致 9 例输血后丙型肝炎的献血员血清标本(共 45 份),经第 2 代 ELISA 方法(1995 年)复检抗-HCV,仅有 1 份为抗-HCV 可疑阳性,余 44 份阴性;而采用逆转录 PCR(RT-PCR)法检测上述标本的 HCV RNA,则有 12 份 HCV RNA 阳性,33 份阴性。结论:在 90 年代初、中期用于筛选献血员的方法(第 2 代 ELISA 法检测抗-HCV)尚不够灵敏,不足以筛去有可能导致

HCV 传播的供血,也可能与部分 HCV 感染者,缺乏或呈低效价的抗-HCV,但其 HCV RNA 阳性,仍然具有传染性,导致当时输血传播丙型肝炎相当常见,而且输血量越多,感染 HCV 的机会越大,丙型肝炎慢性化率高。因此避免不必要的输血以预防输血后丙型肝炎的发生仍然是应强调的原则^[20~23]。

2.3 HGV 感染调查

HGV 是近年来新发现的全球分布的一种可能与肝炎有关的病毒。我们在广东地区开展了一系列的临床血清流行病学研究,探讨其发病情况,致病性等。对 351 例住院肝炎病人检测发现,32 例(9.11%)HGV RNA 阳性,34 例(9.68%)抗 HGV 阳性。HGV 多数重叠其它肝炎病毒感染,重叠感染率 7.8%(39/497),有输血史的病人 HGV RNA 阳性率(16.0%)高于无输血史的患者(6.4%)($P < 0.01$)。在 84 例静脉毒瘾者中 15 例检出 HGV RNA,阳性率 17.9%,且 HGV RNA 阳性病例中 11 例合并丙型肝炎病毒感染。反映 HGV 主要经输血途径传播。在部分没有甲~戊型肝炎证据的病人中的 HGV 感染,表现了肝功能异常,极个别有重症肝炎表现,是否 HGV 单独致病有待进一步研究^[24~29]。

2.4 TT 病毒感染调查

我们对 340 名 ALT 正常和 19 名 ALT 异常健康体检者的血清,90 份献血员,60 例血透患者和 156 例肝病患者的血标本,采用 PCR 检测 TTV DNA,其检出率分别为 1.8%、10.5%、2.2%、8.3%和 4.5%,其中 ALT 升高体检人群和血透患者的 TTV DNA 检出率显著高于 ALT 正常健康体检人群, P 值分别为 < 0.05 和 < 0.01 。

由广东分离的 TTV 病毒,经 PCR 产物测序,其同源性与 Takahashi 等分离株和 Okamoto 等分离株相比分别为 98.2%和 89.2%。在肝炎病人中 TTV 病毒与其它肝炎病毒重叠感染,无法确定其单独致病性。

3 发病机理

3.1 慢性乙型肝炎急性发作与血清 HBV DNA 含量关系

采用荧光标记(amplisensor)定量方法测定 11 例患者中有 9 例(82%)血清 HBV DNA 含量的高峰值是在最大肝损害之前出现,或与谷丙转氨酶(ALT)同时达到高峰。另 2 例的高峰值则出现在恢复期。测定 2 例数次发作的慢性乙型肝炎患者的系列血清中 HBV DNA,也显示了上述特点。另 1 例肝炎肝硬化多次急性发作中,显示持续高水平的病毒血症。对 44 例自发性发作的慢性乙型肝炎患者进行肝组织活检,比较其血清中 HBV DNA 含量,结果显示血清 HBV DNA 含量与肝脏炎症程度(G1~G4)及纤维化程度(S1~S4)之间无明显相关性($P < 0.05$),与血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及总胆红素(T-Bili)之间也无相关性。这种情况可能是 HBV 的复制活跃先于肝损害加重,并可能是启动机体免疫应答的因素,但 HBV DNA 绝对值与肝细胞损伤的程度没有关系^[30]。

3.2 HBV 感染者重叠 HEV 感染致病情明显加重

乙型肝炎病毒感染在人群中感染率高,重叠其它肝炎病毒感染可导致病情明显加重,尤以 HEV 明显。对 384 例慢性乙型肝炎感染检查重叠感染情况,其中 16.6%重叠 HEV 感染,重症肝炎中更为明显(22.73%)^[31~33]。

3.3 重症肝病患者体内 TNF- α 和 IL-6 水平的研究

为进一步探讨某些细胞因子在重症肝炎发病机理中的作用及其意义,我们用双抗体夹心 ELISA 法测定了 30 例重症肝炎患者血清肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素 6(IL-6)水平的变化。研究结果提示血清 TNF- α 和 IL-6 水平与肝细胞坏死程度密切相关。重肝患者血清 TNF- α 和 IL-6 的显著升高亦与肝炎病毒的重叠感染和内毒素血症有密切关系。

为了在细胞因子水平上阐明严重感染与慢性肝病重症化之间的关系,探讨肝炎肝硬化失代偿期患者体内 TNF- α 和 IL-6 水平与感染的关系及其对诊断和预后的判断价值,我们检测了肝炎肝硬化患者血清和腹水 TNF- α 和 IL-6 水平。我们的研究表明,肝硬化患者血清和腹水 TNF- α 和 IL-6 的检测对判断感染的存在和预后有一定的临床实用价值。提出在腹水培养阴性的情况下,腹水 IL-6 $\geq 1\ 200\ \text{ng/L}$ 可作为诊断原发性细菌性腹膜炎

(SBP)的一项指标,具有灵敏性较高,特异性较强,快速简便的优点^[34,35]。

3.4 HCV 与 HCC 关系的研究

针对我国肝癌高发及丙型肝炎流行的状况,对丙型肝炎病毒(HCV)在肝癌发生中的病因作用及与其它因素的协同作用,从人群、细胞和分子等宏观到微观不同水平上率先进行了系列研究与报道。

3.4.1 在人群水平上 通过病例对照研究 Logistic 回归分析(3 个样本,抽样于华南地区、广州市和顺德),在我国 HBV 高流行背景下,发现 HCV 仍为独立的致肝癌因素(OR=8.0-15.8);与 HBV 有协同致肝癌作用;不同肝病组的病毒血清学、临床和病理比较分析均揭示 HCV、HBV 重叠感染是我国肝癌的突出现象。临床上随访 66 例重叠感染病例,41 个月后发现肝硬化发生率(32.25%)显著高于单独 HBV 或 HCV 组,并在重叠感染组中出现 2 例原发性肝癌提示肝硬化是重要的中间环节。

3.4.2 在组织细胞水平上 采用地高辛标记逆转录原位 PCR 技术,分析 HCV RNA 在肝癌组织中的定位和分布,发现肝癌和癌周肝组织中 HCV RNA 主要呈胞浆型分布,在癌细胞中核型、核膜型分布明显增高,免疫组化分析也证实肝癌组织中 HCV 抗原的存在和分布特点,表明 HCV 基因组与宿主基因组可能存在相互作用,并与 HCV 的致癌机理有关;采用高效液相色谱定量检测肝癌组织中的黄曲霉毒素,同时用改进的巢式 PCR 技术检测肝癌组织中的 HCV RNA 和 HBV DNA,这 3 种因子的检出率分别为 69.2%、12.7%和 90.5%。发现 HCV 与 HBV 或者黄曲霉毒素双阳性或三阳性时存在着明显的协同致癌作用。协同致癌作用的理论观点可较合理地解释我国东南沿海肝癌高发的现象。由于我国 HBV 感染基数高,黄曲霉毒素污染实际存在而易忽视,协同致癌作用的观点为采取综合措施降低华南特别是广东省肝癌高发提供了重要理论依据。

3.4.3 在分子水平上 利用特异性引物的限制作用,在国内首次在肝癌组织中鉴定并报道(1993 年上海国际肝病会议)存在 HCV 复制中间体,提供了 HCV 与肝癌相关的深入证据;用克隆测序的方法从肝癌患者血清中获得 780 bp 的 HCV cDNA 片段,序列分析表明,与我国 HCC 相关的 HCV 为 II

型病毒,并在特殊氨基酸位置存在较大变异,这在国内亦为首次报道;采用 PCR/SSCP、PCR/RFLP 技术结合 DNA 序列分析,首先报道了广东地区肝细胞癌患者中宿主基因 $p53$ 基因的突变情况,突变率为 36%,突变部位 95.8% 在密码子 249,突变方式为第 3 个碱基的 G→T 转换。采用新方法直接观察到 $p53$ 基因的杂合性丢失情况,杂合性丢失率为 68.4%。进一步分析发现,HBV、HCV 感染与 $p53$ 基因改变密切相关,揭示 HBV DNA 的存在,以及 HBV、HCV 感染引起的肝硬化过程是 HBV、HCV 感染与 $p53$ 基因改变的重要因素。黄曲霉素摄入和 HBV、HCV 感染是 $p53$ 基因密码子 249 突变的主要原因,其中,HBV、HCV 感染的意义相对重要,因为,病毒感染不仅能引起突变还可引起基因发生杂合性丢失^[36~52]。

以上系列研究的结果和发现,为我国特别是华南地区肝癌的一级预防和二级预防提供了重要实验和理论依据,提出切实地采取综合处理措施,阻断协同致肝癌作用,对降低肝癌率的发病具有重要意义。

3.5 病毒性肝炎与脂肪肝的发生

在 69 例非酒精性脂肪肝患者中分别检出 HBsAg 阳性 25 例 (36.23%)、抗 HCV 阳性 8 例 (11.59%), 合计 HBV 与 HCV 现症感染率为 47.82%; 对照组 138 名健康体检者中 HBsAg 阳性 17 例 (12.32%), 抗 HCV 阳性 2 例 (1.45%), 合计 HBV 与 HCV 现症感染率为 13.77% (两组比较 P 值分别 <0.01 、 0.01 和 0.001)。调查显示在非酒精性脂肪肝患者中普遍存在慢性 HBV、HCV 感染。结果提示持续存在慢性 HBV、HCV 现症感染与脂肪肝有密切关系,可能是非酒精性脂肪肝的重要原因之一^[53~55]。

4 治疗

4.1 抗病毒治疗

4.1.1 α -干扰素治疗乙型与丙型肝炎的临床疗效近 5 年时间,我们使用各种干扰素 (INF) 治疗乙型与丙型肝炎近 500 余例,获得了丰富的临床经验。我们应用 α -干扰素 (INF- α) 治疗急、慢性丙型肝炎患者,以同期收治而未用 INF- α 治疗的病例作随机

对照,观察 INF- α 治疗丙型肝炎的临床疗效和远期疗效 (停药后随访 6~12 个月)。结果表明,急性丙型肝炎患者应用 INF- α 治疗 3~6 个月后,ALT 复常率为 80%,对照组为 20%,停药后半年内复发率为 37.5%,疗效显著优于对照组。慢性丙型肝炎患者应用 INF- α 治疗 6 个月后,ALT 复常率为 40%,停药后复发率高。INF- α 治疗组血清 HCV RNA 的阴转与 ALT 的复常有密切相关,而大多数患者治疗前后血清抗-HCV 的效价无显著差异 ($P > 0.05$),故不认为血清抗-HCV 是临床上考核 IFN 抗病毒疗效的灵敏指标。INF 治疗乙型肝炎可使部分 (25%~40%) HBeAg 转阴,虽然 INF 治疗乙型肝炎的疗效不尽人意,但国际上依然将其作为乙型肝炎抗病毒治疗的首选药物。经过大量临床观察,我们应用 INF 治疗丙型肝炎用隔天 3MU, 12 个月疗程,治疗乙型肝炎用隔天 5MU, 不少于 6 个月的疗程^[56~58]。

我们比较了 4 种常用的干扰素制剂,在 98 例病毒性肝炎病人,治疗前后,治疗期间干扰素抗体的产生情况,结果显示:总的阳性率为 34.7%;该抗体的产生与病人的性别、年龄、治疗前 ALT 水平、肝炎病毒感染类型、以及肝炎的临床类型均无显著相关。低剂量干扰素较易产生中和抗体。使用不同干扰素制剂产生中和抗体有差异,其中以 r-INF- α 2 α 最高,INF- α N1 最低。但抗体的出现对干扰素的疗效影响不大^[59]。

4.1.2 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎病毒感染

HBV 不断复制,病毒不能清除是造成慢性乙型肝炎反复发作,迁延不愈的主要原因,近 10 多年来慢性乙型肝炎的抗病毒治疗一直是国内外临床研究的热点,虽然 α -干扰素及一些免疫调节剂对抑制 HBV 的复制有一定的效果,但疗效远不尽人意。

拉米夫定 (2, -3-双脱氧核苷 3-硫胞嘧啶) 是一种毒性低、在人体内吸收快、生物利用度大的新的胞嘧啶核苷类似物。我科被卫生部指定为该药在全国多中心进行临床试验单位之一。从 1996 年 12 月开始对 88 例慢性 HBV 感染者进行了严格按照美国 FDA 要求和卫生部新药临床研究指导原则的临床试验:88 例随机分入拉米夫定治疗组 (66 例) 和安慰剂对照组 (22 例),在头 12 周,按双盲法每人每天口服拉米夫定 100 mg (1 片),或安慰

剂1片,第13周起所有病人都继续服拉米夫定 $100\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$,至52周末结束。结果在头12周末结束时,HBV DNA 阴转率拉米夫定组为92%,安慰剂组均仅为9%,两组比较 $P < 0.001$ 。在52周治疗结束时,拉米夫定组及安慰剂组的最终HBV DNA 阴转率分别为69%与77%,但若扣除中途脱落者,两组的HBV DNA 阴转率实际分别为87.5%(42/48)与85%(17/20),两组的ALT复常率亦相似(65%对70%),统计学均无显著差异($P > 0.05$),血清HBeAg阴转,抗-HBe阳转率治疗前后无明显差异。

两组病人在治疗1年中,对拉米夫定的耐受性均良好,两组不良反应发生频率均相似,并无严重不良反应或肝、肾功能损害、骨髓抑制等发生。结论认为拉米夫定能迅速有效抑制HBV的复制,并可改善肝功能,口服 $100\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$,1年的治疗安全、有效。

4.2 基因治疗的应用基础研究

4.2.1 硫代修饰三螺旋形成寡脱氧核苷酸及反义寡脱氧核苷酸抗HBV作用研究 ①以HBV核心启动子1734~1754 nt(含SP1位点)、前C RNA、前基因组RNA^{5'}端帽区及翻译起始区为靶点,设计、合成了21 mer 硫代修饰三螺旋形成寡脱氧核苷酸(TF 021)、反义寡脱氧核苷酸(ODNas 21)及无关序列对照寡脱氧核苷酸(ODNcon)。②在HBV模型细胞—HepG 2 22.1.5细胞研究了TF 021、ODNas 21对HBV复制及抗原合成的抑制作用。③研究了TF 021、ODNas 21对HepG 2 22.1.5细胞的毒性作用。结果:①TF 021,ODNas 21能有效抑制HBV复制及HBsAg, HBeAg合成。②该抑制与作用时间有关,并呈剂量依赖性。③TF 021与ODNas 21联合给药抑制作用增强。④硫代寡核苷酸对22.1.5细胞无毒性作用^[60]。

4.2.2 逆转录病毒介导反义HBV前C/C基因转移的抗HBV作用研究 ①用BamH I酶切HBV(ayw)质粒pHBV获得了1504 bp的HBV前C/C基因片段,将其正、反向插入逆转录病毒载体pDOR,构建了正、反义前C/C重组体。②将重组体转染逆转录病毒包装细胞PA317,用G 418筛选获得了抗性细胞及正、反义重组逆转录病毒。③采用PCR及RT-PCR检测了逆转录病毒载体介导反

义前C/C基因转移及产生HBV反义RNA的水平。④在22.1.5细胞研究了逆转录病毒介导的反义HBV前C/C基因转移的抗HBV作用及对22.1.5细胞的毒性作用。结果:①逆转录病毒载体能有效转移反义前C/C基因并能转录、产生HBV反义RNA。②在22.1.5细胞,逆转录病毒介导的反义HBV前C/C基因转移、表达能有效抑制HBV复制及HBsAg、HBeAg合成,该抑制具有特异性。③增加重组逆转录病毒感染次数能在一定程度提高抗HBV作用。④重组逆转录病毒感染对22.1.5细胞无明显毒性作用^[61]。

4.3 慢性肝炎肝硬化的中西医结合治疗

于1986年开始从事这方面的研究。自此以后10年来,本科先后开发肝酶灵注射液、和肝胶囊、宁肝丹胶囊、复肝酶胶囊、强肝胶囊等多种制剂,在本科肝病患者中应用,并逐渐形成医疗特色,创造了良好而稳定的社会与经济效益。

4.3.1 肝酶灵注射液对慢性病毒性肝炎尤其是乙型肝炎进行了较大规模和较长时间的临床应用 通过66例慢性乙型肝炎患者的对照观察表明,经过疗程为3个月的肝酶灵肌肉注射治疗,原先ALT呈2倍以上升高的患者获得77.27%的复常率,并且53.03%的患者出现HBeAg阴转,两项指标均明显优于对照组。结果表明肝酶灵注射液对慢性乙型肝炎不但具有保护肝细胞作用,同时还观察到一定的抑制HBV复制的作用。肝酶灵注射液价格较为低廉,是一种适合我国国情的制剂^[62,63]。

4.3.2 改良小柴胡汤制剂——和肝胶囊 我们曾应用和肝胶囊对81例肝病患者的治疗,观察其对血清肝纤维化标志物的影响。结果显示和肝胶囊治疗可使血清透明质酸(HA)和Ⅲ型前胶原肽(PHIP)由治疗前的 $(245.89 \pm 148.49)\ \mu\text{g/L}$ 和 $(261.89 \pm 134.42)\ \mu\text{g/L}$ 分别降至 $(125.43 \pm 85.46)\ \mu\text{g/L}$ 和 $(144.04 \pm 83.99)\ \mu\text{g/L}$ ($P = 0.000$),下降幅度分别为 $(120.45 \pm 89.71)\ \mu\text{g/L}$ 和 $(117.85 \pm 73.64)\ \mu\text{g/L}$,均优于对照组;治疗组的HA和PIIIP复常率分别为34.38%(22/64)和50.68%(37/73)。提示改良小柴胡汤制剂对肝纤维化过程具有一定的抑制作用^[64]。

4.4 抗肝炎药物的临床验证

近年来,作为卫生部抗肝炎与寄生虫药物临床

试验基地以及广东省新药(抗感染)临床试验研究中心,我们接受国内外数10种与治疗肝炎有关的药物如: α -胸腺素(日达仙)、前列腺素、肝细胞生长因子等进行临床验证。为肝炎的上市治疗药物进行评估,从而为临床正确使用提供了依据。

在病毒性肝炎诊治方面,我们做了大量的工作,取得了较大的成绩,为广东省病毒性肝炎防治作出了积极的贡献。由于病毒性肝炎防治工作难度大,仍然有许多问题尚未解决。因而,将在我们已有的研究工作基础上,对一些病毒性肝炎热点与焦点问题,特别是发病机理、定量检测、新的治疗方法的研究与应用等方面进一步深入研究。

参 考 文 献

- 高志良,姚集鲁·热变性法处理 HCV RNA 模板直接扩增·中山医科大学学报,1994,15(3):223
- 高志良,姚集鲁·传染病实验诊断的高新技术应用·临床内科学杂志,1993,10(4):2
- 高志良,姚集鲁·HBV DNA 与 HCV RNA 同步扩增技术的建立与应用·中山医科大学学报,1996,17(2):145
- 周元平,姚集鲁,彭文伟,等·夹心斑点放大杂交技术的建立和初步应用·中山医科大学学报,1997,18(1):77
- 周元平,姚集鲁,彭文伟,等·用原位 PCR 研究石蜡包埋肝组织中微量 HCV RNA·中山医科大学学报,1997,18(2):100
- Zhou Y P, Yao J L, Peng W W, *et al* · Quantitative estimation of HCV RNA using sandwich dot hybridization technique after reverse transcription polymerase chain reaction· *Gastroenterology and Hepatology*, 1997, 12 (Suppl):S104
- Peng W W, Zhou Y P, Zhang L F, *et al* · Studies on the pathogenetic role of hepatitis C virus (HCV) in hepatocellular carcinoma (HCC)· *Gastroenterology and Hepatology*, 1997, 12(Suppl):S93
- 高志良,姚集鲁,郭万里,等·改变引物 3'端检测 HBV 前 C 区点突变·中华肝病杂志,1997,5(3):176
- 朱建芸,崇雨田,谢冬英,等·HBV 前 C 区划 896 位点变异与 HBV 感染者肝功能损害程度的关系·中国现代医学杂志,1998,8(7):4
- 谢仕斌,陈幼明,谢冬英,等·血清透明质酸测定对肝纤维化诊断的临床意义·中山医科大学学报,1998,19(3):211
- 赖菁,崇雨田·血清 HA、HPCIII、IV-C 对肝纤维化评估的意义·临床荟萃,1993,13(12):534
- 李刚,姚集鲁,彭文伟,等·HCV 广东株部分基因的序列测定·中山医科大学学报,1994,15(3):237
- 李刚,彭文伟,姚集鲁,等·肝癌病人血清 HCV E2/NS1 区 cDNA 的克隆和序列分析·病毒学报,1995,11(1):27
- 李刚,姚集鲁,彭文伟,等·HCV 5'NCR cDNA 的体外转录·中国病毒学,1996,4(11):332
- 李刚,姚集鲁,彭文伟·HCV 广东株包膜蛋白基因的序列测定·病毒学报,1997,13(1):24
- 李刚,姚集鲁,陈青,等·一种新型肝炎病毒——庚型肝炎病毒的 cDNA 克隆·中山医科大学学报,1996,17(3):237
- 李刚,姚集鲁,陈青,等·庚型肝炎病毒的 5'NCR 基因的扩增、鉴定、克隆及测序·中华微生物和免疫学杂志,1997,17(1):11
- 李刚,姚集鲁,陈青,等·GBV-C/HGV 5'NCR cDNA 的序列分析·中国病毒学,1997,12(3):224
- 何有成,姚集鲁,郑锡澄,等·广州地区 1014 名正常人甲型肝炎血清流行病学调查·中山医科大学学报,1990,11(1):100
- 邓子德,彭文伟,姚集鲁,等·输血及血液制品与慢性 HBV 感染患者发生 HCV 重叠感染的关系·中山医科大学学报,1995,16(4):47
- 邓子德,彭文伟,姚集鲁,等·慢性 HBV 与 HCV 重叠感染的发病调查及原因分析·中华流行病学杂志,1996,2A:32
- 邓子德,姚集鲁,彭文伟,等·丙型肝炎病毒感染在各类慢性乙型肝炎患者中的血清流行病学分析·新医学,1996,27(3):128
- 崇雨田,彭文伟,姚集鲁·输血与丙型肝炎关系的前瞻性研究·中山医科大学学报,1997,18(2):92
- 崇雨田,姚春澜,黄仰苏,等·HGV 在献血员、血液透析病人及粤港两地青少年体检人群中的感染状况·中华流行病学杂志,1999,19(2-A)(已审校,待发表)
- 崇雨田,林潮双,陈青,等·庚型肝炎病毒合并/重叠其他肝炎病毒感染状况调查·中山医科大学学报,1998,19(2):144
- 崇雨田,凌小强,姚集鲁,等·广州地区散发性慢性非甲乙丙丁戊型肝炎中庚型肝炎病毒感染状况·中山医科大学学报,1996,17(4):283
- 陈雪娟,李刚,陈文思,等·RT-PCR 法检测 HGV RNA 和 ELISA 法检测抗-HGV 意义探讨·实用内科杂志,1998,3(1):5
- 李刚,陈青,姚集鲁,等·静脉毒瘾者 84 例 HGV 感染状况·中华传染病杂志,1998,16(1):26
- 柯伟民,李学俊,林潮双,等·庚型肝炎病毒感染的临床流行情况和致病力的探讨·胃肠病学和肝脏学杂志,1998,7(2):116
- 黄仰苏,江元森,姚集鲁,等·定量聚合酶链反应检测血

- 清中 HCV RNA. 广东医学, 1998, 19(8): 580
- 31 何有成, 张晓红, 雷瑞祥, 等. 散发性戊型肝炎 142 例临床分析. 新医学, 1997, 28(增刊): 29
- 32 谢冬英, 梁远航, 邓子德. 慢性乙型肝炎患者重叠感染 HEV 及 HCV 的流行病学调查及其临床意义. 中华流行病学杂志, 1998, 19(1-A): 8
- 33 何有成, 张晓红, 雷瑞祥, 等. 散发性戊型肝炎 142 例临床分析. 新医学, 1997, 28(增刊): 29
- 34 何有成, 谢俊强, 黄仰苏, 等. 重症病毒性肝炎患者血清 TNF- α 和 IL-6 水平变化及其意义. 上海免疫学杂志, 1998, 18(3): 168
- 35 何有成, 谢俊强, 黄仰苏, 等. 肝炎肝硬化患者 TNF- α 和 IL-6 水平的变化及临床意义. 中国免疫学杂志, 1998, 14(增刊): 107
- 36 周元平, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 肝细胞癌与 HCV、HBV 感染关系的病例对照研究. 中山医科大学学报, 1994, 15(1): 45
- 37 周元平, 彭文伟, 姚集鲁, 等. HCC 组织中 HCV RNA 正链和负链的检测分析. 中山医科大学学报, 1994, 15(3): 239
- 38 周元平, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 肝细胞癌和其它慢性肝病 HCV、HBV 感染的比较分析. 中山医科大学学报, 1995, 16(2): 11
- 39 范小玲, 周元平, 彭文伟, 等. 肝细胞癌患者乙、丙和丁型肝炎病毒感染状况. 中华传染病杂志, 1995, 13(3): 129
- 40 范小玲, 周元平, 彭文伟, 等. 广州地区肝细胞癌与 HCV、HBV 感染关系的病例对照研究. 癌症, 1995, 14(5): 328
- 41 周元平, 何光耀, 彭文伟, 等. 高效液相色谱法检测人肝组织中黄曲霉毒素. 色谱, 1995, 13(6): 453
- 42 Peng W W, Zhou Y P, Zhang L F, *et al*. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma (HCC). Studies at population, cellular and molecular levels. in: Update on hepatobiliary diseases, 1996: 68
- 43 周元平, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 人肝癌组织中黄曲霉毒素定量分析的方法学研究. 癌症, 1996, 15(4): 315
- 44 周元平, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 人肝癌组织中黄曲霉毒素和肝炎病毒基因检测分析. 中山医科大学学报, 1996, 17(1): 21
- 45 周元平, 彭文伟, 姚集鲁. 三种危险因素协同致肝癌作用. 中华预防医学杂志, 1996, 30(5): 289
- 46 王志瑾, 周元平, 程兵, 等. 广东省顺德市原发性肝癌危险因素流行病学研究. 中华流行病学杂志, 1996, 17(3): 111
- 47 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁. HCC 癌组织的癌旁组织中 HCV RNA 检测及半定量分析. 中山医科大学学报, 1996, 17(4): 251
- 48 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁. 肝细胞癌患者中丙型、乙型肝炎病毒感染与 p53 基因变化的关系. 中华肝脏病学杂志, 1997, 5(2): 124
- 49 彭晓谋, 彭文伟, 周元平. 肝细胞癌患者中 p53 基因的突变研究. 中山医科大学学报, 1997, 18(4): 245
- 50 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁. p53 基因密码子 249 突变致肝细胞癌的机理研究. 胃肠病学和肝病杂志, 1997, 6(3): 206
- 51 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁. 肝细胞癌患者 p53 基因杂合性丢失的研究. 癌症, 1998, 17(2): 81
- 52 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 肝细胞癌患者中 p53 基因变化的相关因素分析. 临床肝胆病杂志, 1998, 14(4): 25
- 53 邓子德, 庚慧鸣, 何达秋. 丙型肝炎病毒感染与脂肪肝的关系. 新医学, 1996, 27(9): 471
- 54 邓子德, 庚慧鸣, 何达秋. 非酒精性脂肪肝患者中的乙型肝炎病毒感染. 广东医学, 1996, 17(11): 721
- 55 邓子德, 庚慧鸣, 何达秋. 脂肪肝患者中的 HBV/HCV 感染及其临床意义. 中华肝脏病杂志, 1996, 4(3): 14
- 56 何有成, 陆玮伦, 姚集鲁, 等. α 干扰素治疗丙型肝炎疗效观察. 中华传染病杂志, 1994, 12(4): 237
- 57 何有成, 陆玮伦, 姚集鲁, 等. 干扰素治疗慢性丙型肝炎诱发 I 型糖尿病酮症 1 例. 中华传染病杂志, 1994, 12(3): 188
- 58 何有成, 姚集鲁. α 干扰素治疗慢性丙型肝炎的远期疗效. 国外医学内科学分册, 1997, 24(12): 522
- 59 徐启桓, 彭文伟, 陆玮伦. 干扰素治疗后病毒性肝炎病人干扰素中和抗体的检测及意义. 中山医科大学学报, 1997, 18(4): 288
- 60 杨林, 张定风, 王玉芝, 等. 抗基因及反义寡核苷酸抑制 N-ras 表达及对肝癌细胞增殖的影响. 中华肝脏病杂志, 1996, 4(4): 203
- 61 杨林, 张定风, 任红, 等. 反义乙肝病毒 S 基因真核载体构建及体外抗乙肝病毒作用. 中华肝脏病杂志, 1997, 5(4): 213
- 62 何树初, 邓子德, 邓练贤, 等. 肝酶灵治疗慢性乙型肝炎. 广东医学, 1988, 9(4): 19
- 63 张永明, 黄亚菲, 邓子德. 肝酶灵注射液的研制与临床应用. 华西药理学杂志, 1997, 12(4): 26
- 64 邓子德, 肖杰生, 俞洪林. 改良小柴胡汤对慢性肝病患者纤维化标志物的作用. 中国中西医结合脾胃杂志, 1996, 4(4): 206

(1998 - 11 - 25 收稿 1998 - 12 - 05 修回)