

探索肝炎的致病因子 Exploring the Agents Causing Hepatitis

缪晓辉

(第二军医大学长征医院, 博士、副教授
戚中田

(第二军医大学基础医学部, 博士、教授

上海 200003)

上海 200433)

有 10% 左右的急、慢性肝脏损害的病因迄今无法明确, 推测与病毒有关。近年来许多研究人员潜心于寻找新的肝炎致病因子, 至少获得两次不甚满意的结果, 这就是 HGV/ GB-C 和 TTV 的发现, 及其临床相关性的广泛研究。但有理由相信, 这层神秘的面纱不久将会被揭开。这不仅是因为有很多高水平研究者或研究机构致力于攻克这个医学难题, 更重要的是由于分子病毒学及其相关学科的迅猛发展, 研究手段的不断革新和高科技化, 以及病毒性肝炎和肝炎病毒研究经验的大量积累。肝炎病因学研究正以前所未有的速度向前推进。

肝炎病毒研究的历史里程碑

人类对病毒性肝炎的认识经过了非同寻常的艰难历程。“流行性黄疸”和“传染性黄疸”作为一种诊断名称从医学书籍上消失的时间并不长。真正认识到黄疸可能与感染因子有关还是在上世纪初, 也就是在发现了“可过滤的亚细胞成分”之后。直到第二次世界大战爆发前后的一段时间内, 许多士兵因为输血或血制品后染上了肝炎, 尤其是在 1942 年, 美国 28 585 名军人由于接种黄热病疫苗出现黄疸及其他肝炎的表现, 并有 62 人死亡, 病毒性肝炎的研究才得到高度重视, 并不断取得突破。有人把肝炎简单地分类为“传染性肝炎”和“血清性肝炎”, 前者似与瘟疫和恶劣的卫生条件有关, 后者可能与针刺和输血有关。也正是在这个时期, 医学界意识到这两种肝炎是分别由不同的传染性因子致病, 从而在认识上实现了一次大的飞跃。

“传染性肝炎”和“血清性肝炎”的称呼保留了 20 余年。在此期间, 许多研究者试图通过各种病毒培养技术和形态学研究方法来获得病毒感染的直接证据。最重要的成果有: 证实了狨猴对“传染性肝炎”(即甲型肝炎) 易感, 以及“传染性肝炎”的流行病学特征; 阐明了两类肝炎在免疫学特征, 以及在

传播方式、潜伏期、病毒血症的持续时间和清除病毒的时间等方面的差异。但是直到 1965 年 Blumberg 等发现澳大利亚抗原、1970 年 Dane 发现了成熟的乙型肝炎病毒颗粒、1973 年 Feinstone 第一次用免疫电镜从“传染性肝炎”人体实验者的急性期粪便中找到病毒颗粒, 两类肝炎才得以从病原学上明确地分类, “传染性肝炎”和“血清性肝炎”随之被“甲型病毒性肝炎”和“乙型病毒性肝炎”取代。

甲型肝炎系经肠道传播, 乙型肝炎经肠道外途径致病, 但是在临床上仍有大量典型的、具有传染特征的急性或慢性肝炎病例找不到甲型肝炎病毒和乙型肝炎病毒感染的证据, 也不能用这两型肝炎来解释病情, 提示其他致病因子感染。因此, 自 20 世纪 70 年代初至 80 年代末, 称这类肝炎为“非甲非乙型肝炎”, 根据传播途径的不同, 又分类为经肠道传播和肠道外传播两种“非甲非乙型肝炎”。1985 年有人推断大多数输血后肝炎的病原体可能是一种 RNA 病毒, 1989 年美国 Chiron 公司的研究人员终于成功地应用逆转录随机引物法, 从受染的黑猩猩血清克隆出一种新的病毒基因组, 丙型肝炎病毒被确认。差不多是在同期, 经肠道传播的戊型肝炎病毒被分离证实。而早在 1983 年, Rizzeto 将 δ 因子及其抗原、抗体和相关肝炎分别命名为丁型肝炎病毒抗原、抗体和丁型肝炎的建议就已被接受。至此, “非甲非乙型肝炎”的诊断名称结束了它的历史使命, 在肝炎病毒研究历程上留下又一个里程碑。

病毒性肝炎或肝炎病毒的命名排序已到第五个数字, 但还必须继续排列下去, 因为尚有为数不少的肝脏急慢性损害缺乏上述 5 型肝炎病毒感染的证据, 也不能用其他已知的病因来解释, “非甲-非戊型肝炎”的提法应运而生。10 年过去了, 研究人员迄今还无法确定第四个里程碑的距离, 更无法知道前方是否还有第五个或更多的里程碑。

HGV 和 TTV 的发现和可能的历史地位

发现和研究新型肝炎病毒一直是 20 世纪 90 年代以来的热门话题。微生物学 (尤其是病毒学)、传染病学、肝脏病学, 以及流行病学、诊断学和病理学等领域的研究者们从来就没有停止过对未知肝炎致病因子的探索。

1. HGV 和 TTV 的发现

在 1995 年, 美国 Abbott 实验室的研究人员采用代表性差异分析方法 (RDA), 以接种了非甲- 非戊型肝炎病人血清而发病的狨猴血清作被检子 (tester), 以接种前的狨猴血清作驱动子 (driver), 经过 3 轮 RDA 操作获得了 GBV-A 和 B 两个“肝炎病毒”相关全序列, 其后又在不同人群中扩增出 GBV-C 的全序列。几乎在同期, 美国 Genelabs 实验室采用构建 cDNA 文库免疫筛选及锚定 PCR 等技术, 从输血后肝炎病人血清中获得了 1 株新的病毒基因组全序列, 命名为庚型肝炎病毒(HGV)。后来证实, HGV 和 GBV-C 为同种病毒的不同分离株。当时曾引起医学界的轰动, 不少人为之兴奋不已, 以为一种新的肝炎致病因子, 或至少说与输血相关的肝炎致病因子已经被发现了。就是在这样一种氛围里, “庚型肝炎病毒” 堂而皇之地、非常频繁地出现在各种医学杂志乃至教科书里。5 年后的今天, 至少是临床医学界对所谓“庚型肝炎病毒” 的热情已经过去, 这并不是因为它的致病性得到肯定不再成为人们的兴奋点, 而是因为太多相反的研究结果令人失望。

就是在 HGV/ GBV-C 出现之后, 医学界的过热现象尚未恢复常态时, 即 1997 年, 日本研究者 Nishizawa 等再次应用 RDA 技术, 对 1 名不明原因的输血后肝炎病人 (该病人的名字缩写为 TT) 输血前后的双份血清进行分析, 肯定地发现了 1 段输血前不存在的基因序列, 并把这段序列与基因库中已知序列比较。因未找到相似或同源序列, 就认为这是在 TT 这位患者体内发现的新病毒, 命名为 TT 病毒, 简称 TTV。同年, Okamoto 等人测定了 TTV 全基因, 并从分子病毒学水平上给出了 TTV 的一些详细特征。这又一次的轰动效应席卷全球, 各国研究人员争先恐后地发表自己的研究结果和见解, 但以日本学者发表的论文数最多。我国学者不甘落后, 从基础到临床、从血清检测到病理分析、从正常人群到各种肝炎病人和有静脉输注史的各类人群, 其参与的研究人员和发表的论文数之多、研究范围之广、阶段性研究周期之短, 堪称为史无前例。3 年时间过去了, 研究 TTV 后所得到的结论与 HGV/ GBV-C 有着惊人的相似之处。在同样的兴奋之后, 迎来了同样的平静。

2. HGV 和 TTV 的临床意义和生物学意义

经典的微生物学在确定某种感染因子与疾病的相关性时遵循以下 3 个原则: 找到明确的病原体; 这种病原体能在适当的动物模型或其他人体内

构成感染; 感染后能复制相似的疾病。这就是著名的 Koch 定律。在研究致病病毒时, Koch 定律并没有因为分子病毒学的突飞猛进的发展, 以及各种病毒研究技术的广泛应用而显得过时, 相反, 任何违背这一定律所得到的结论均站不住脚。HGV 和 TTV 之所以迄今未能被认可为肝炎的致病因子, 主要原因就是在动物模型和感染人群中均没有足够和充分的证据, 来证明它们的感染与肝脏损害有关, 因此, HGV 和 TTV 感染的临床意义也就令人怀疑了。近几年来的研究结果, 绝大多数是不支持 HGV 和 TTV 有致病性的, 少数支持的研究报告也存在不少值得推敲的疑点, 比如样本数太小、血液生化指标与肝脏病理的相关性不明确、病毒感染肝细胞的判断依据的可靠性, 等等。

然而, 尽管目前还没有在任何组织或细胞内找到 HGV 和 TTV 颗粒, 更没有建立可靠的病毒培养模型, 我们也不应当对 HGV 和 TTV 的存在持怀疑态度, 否则我们就是从根本上否定了分子生物学理论和相关技术。

HGV 属于黄病毒科, 基因组为单股正链线性 RNA, 由 5'- 非编码区、结构区、非结构区和 3'- 非编码区组成, 基因组全长 9.4kb。整个基因组只有 1 个开放读框, 编码 1 个长约 2 900 个氨基酸的多蛋白前体, 该前体经宿主及病毒自身的酶加工后形成 HGV 的多个结构与功能蛋白。

TTV 是一种无包膜的 DNA 病毒, 可能归类于细小病毒科。基因组为单股、环状、负链, 全长 3.9kb, 含 2 个开放阅读框架。TTV 的变异率很高, 序列分析结果表明, 至少存在 16 个基因型, 各型之间的同源性小于 70%。非编码区是保守区, 编码区容易变异。由于 TTV 的高度变异, 同一个体感染几个变异株的现象非常普遍。最新的研究结果认为 TTV 可能是一种过客病毒, 在正常人群中的感染率很高, 而且有自然消失和再感染的现象; 与其他肝炎病毒重叠感染率也很高, 而且并不加重原病情, 也不引起其他组织损害; 动物中也有相当高的自然感染率。由此可见, TTV 可能并不对人类健康构成威胁。但是 TTV 和 HGV 作为独立的生命物质存在, 理所当然有其生物学意义。深入研究它们的起源、进化、生物学特性等问题, 是微生物学的重要课题。我国著名的病毒学家闻玉梅院士曾对为什么要研究 HGV 的提问作出过简洁而又精辟的回答: “因为它是一种业已存在的病毒”。

3. HGV 和 TTV 的发现和过程给我们的启示

HGV 和 TTV 的发现和过程给我们很多启示, 也有教训可以吸取, 这对进一步探索不明原因肝炎的致病因子不无借鉴意义。第一, 病原体的发现途径和研究手段已发生了巨大的变革。上个世纪

的四五十年代,免疫学理论和技术尚不成熟,分子生物学还处于萌芽状态,所以在发现乙型肝炎病毒的过程中走了很多弯路。至20世纪80年代末、90年代初,免疫学技术日趋成熟,分子生物学的新技术、新方法层出不穷,研究人员的思路普遍活跃,研究水平普遍提高,因此发现丙型肝炎病毒、HGV和TTV的周期大大缩短。第二,解决医学难题需要雄厚的实力。丙型肝炎病毒研究过程中对所需仪器设备和各种试剂,以及研究人员的素质,均有很高的要求。原美国Chiron公司具有雄厚的科研人力和财力,丙型肝炎病毒首先由他们发现与其研究条件有一定关系。同样,Abbott公司和Genelabs也是世界一流水平的实验室,具备首先克隆出GB病毒基因的条件。第三,报告结果必须有很强的说服力。TTV致病性的结论一开始就应该被质疑。仅凭1个病例得出某种结论是不科学甚至是不负责任的。不同国家,不同实验室,不同作者,报告的各种人群中TTV感染率相差如此悬殊,为什么迄今没有引起重视?TTV基因型很多,变异率很高,标本处理、引物的选择、检测技能等等都有可能影响检测阳性率,但为什么至今很少有人给予关注?1999年年底一则通过网页发布的关于SerrV的消息,至今没有下文,这是否是为了求得轰动而报告不成熟的结果,或出于其他目的,不得而知。许多缺乏说服力的研究结果给人类带来的不是贡献,而是灾难,当引以为戒。

病因未明的肝炎在诊断名称上的混乱和相应的修正意见

1. “病毒性肝炎,未分型”的提法值得商榷

我国于1995年在北京召开的第五次全国传染病和寄生虫病会议上,修订了病毒性肝炎的诊断标准。对甲、乙、丙、丁、戊五型肝炎病毒标志均为阴性的肝炎提出了“急性(慢性)病毒性肝炎(病原未定)”的诊断名称。该诊断名称已被沿用至今,有些医院将其演变为“病毒型肝炎,未分型”。笔者认为“急性(慢性)病毒性肝炎(病原未定)”的提法不恰当。理由有2点。第一,对病因未能明确的肝炎(或肝损害)所给定的诊断里,冠以“病毒性肝炎”的字样,岂不是说明已经明确病因了吗?以目前的临床和实验诊断水平而论,尚不能完全用排除法来排除病毒以外的肝损害因子的存在,即使能肯定肝损害系病原体所为,那么武断地定义为“病毒性”的依据又何在呢?第二,既然使用了“病毒性肝炎”,又在括号里补充“病原未定”,岂不是自相矛盾!

2. “非甲-非戊型肝炎”的提法欠妥

“非甲-非戊型肝炎”的提法要比“急性(慢性)病毒性肝炎(病原未定)”接近事实,但仍然欠妥。因为这个诊断名称虽然从字面上没有直接说明“病毒

性肝炎”,但它的基本框架仍然定位于病毒型肝炎,它隐含了“五种病毒型肝炎以外的某种病毒型肝炎”的意义。

3. “非甲-非庚型肝炎”的提法应当取消

迄今没有在任何国际会议上正式命名“非甲-非庚型肝炎”。只有少数作者在发表的论文中不自觉地使用这个名称,中、英文和其他国家文字的杂志上均可见到。“非甲-非庚型肝炎”除了和“非甲-非戊型肝炎”存在同样的弊病以外,最明显的错误是肯定了“庚型肝炎”的诊断。既然国际上还尚未确立HGV/GBV-C的致病性,那么贸然地使用“非甲-非庚型肝炎”就更欠考虑,应予取消。

4. “不明原因肝炎”是科学而符合事实的定义

如能留意,我们不难发现英文医学杂志上描述病因不明的肝炎时使用频率最高的是“hepatitis of unknown aetiology”。这种直截了当的描述是科学的和符合事实的,无论将其直译还是意译,中文的表达都是“不明原因肝炎”。如果我们不直译英文词汇,而是用中文描述,也还是以“不明原因肝炎”为妥。“不明原因发热”已经是众所周知的一个诊断名词,那么“不明原因肝炎”作为一种诊断名称应该同样可以被接受。巧合的是,过去的报告表明,在长期发热的病人中,最终仍将有10%左右不能明确发热的原因,这个百分比与当前诊断水平上最终确定的“不明原因肝炎”恰好相似。英文书刊也有“隐源性肝炎”(cryptogenic hepatitis)的提法,似也可作为1种诊断名称加以考虑。

确证不明原因肝炎致病因子的对策

1. 不明原因肝炎的病因可能是感染因子

已知的可引起肝脏损害的病因包括:肝炎病毒、某些非嗜肝病毒(如EB病毒、巨细胞病毒)、自身免疫、肝细胞脂肪变性、药物、细菌毒素、某些代谢性疾病,以及肝内占位性病变和胆道系统疾病等。从病因学角度可以把肝炎简单地分为感染性和非感染性两类。其中病毒性肝炎的发病比例最高,危害也最大。确诊病毒型肝炎的依据包括2个方面:肝脏受损的证据和肝炎病毒标志。确诊其他原因造成肝损害的首要依据,也必须有相应的致病因素,而且有明确的因果关系,如服用了能致肝脏中毒的药物后的肝功能异常。临床上对急性和慢性肝功能异常病人,在排除了各种可能的致肝损害原因之后才会诊断为“病毒性肝炎,未分型”。如前所述,虽然这一诊断名称不尽合理,但有些迹象表明,这部分不明原因肝炎的确可能与病毒感染有关。

值得探讨的现象有以下几个方面。第一,不明原因肝炎有急性和慢性之分。可见,如果系病毒感染,可能是一种病毒感染后的急、慢性表现,也有可

能不止 1 种疾病。第二,有黄疸型和非黄疸型之分。表明致病因子既可能干扰也可能不干扰胆红素代谢以及胆汁排泄。第三,有家庭集聚现象。我们最近发现了母子和父子同患原因不明肝炎的病例。如何解释家庭集聚现象呢?是遗传因素吗?是病毒的垂直传播吗?是病毒通过密切接触传播吗?这些问题有待研究证实。第四,绝大多数病人,尤其是原因不明的慢性肝功能异常者,常伴随球蛋白增高,提示慢性感染或免疫异常。第五,干扰素治疗有效。我们曾给 2 例高度怀疑与病毒感染有关(除了已知的 5 种嗜肝病毒)的慢性肝炎病人采用干扰素治疗,其中 1 例在治疗后 3 个月肝功能恢复正常,随访 1 年,肝功能的各项指标均保持在正常范围。由此似可间接提示病毒感染。

但是,现有的有限资源尚不足以肯定所有“未分型”肝炎的病因与病毒感染有关,故探索其他致病因子亦为必须。

2. 目前存在的问题及解决方法

学术界在过去的几年里把过多的精力集中在寻找新型肝炎病毒,放松甚至放弃了最基本的研究工作,比如,不明原因肝炎的流行病学研究,不明原因肝炎病例的回顾性研究和临床前瞻性观察,等等。这些最基本的研究工作有可能提供很有价值的诊断线索,因此,有必要加强流行病学调查、回顾性研究和随访观察,弄清不明原因肝炎的易感人群,不同人群的发病率,发病与年龄、性别、季节、基础疾病、病人接触、针刺、输液、地区等的关系;获取不明原因肝炎的发病规律、病程发展经过、治疗反应、转归和预后等等信息。此类工作难度不大,潜心去做,必有收获。

规范诊断标准是应当高度重视的另一个问题。前面阐述的关于不明原因肝炎诊断名称混乱的问题,应当尽早解决,以免误导医务人员和患者。但更重要的是要规范临床和实验室诊断过程,要在确实排除已知的肝损害因素之后方可定论。处理好这个问题需要注意 3 点。第一,保证实验诊断方法的

规范、科学和先进。实验诊断试剂、实验室条件和操作人员都应当标准化,最大限度地杜绝人为假阴性和假阳性的发生。第二,提高肝穿刺诊断率。肝组织学检查是确定肝炎的金标准,应该对所有病因不明的肝炎病例行肝脏活检。第三,综合评判,严格标准。比如确诊丙型肝炎病毒现症感染必须具备血清抗-HCV 阳性、HCV RNA 阳性以及肝功能异常 3 个条件,要排除抗-HCV 的假阳性结果;输血史可作为重要的协助诊断的资料。

基础和临床研究配合不得力是我国医学界普遍存在的问题。现实是:临床单位有病例资源和各种标本的资源,但绝大多数部门缺乏包括研究人员和仪器设备两方面的高水平的研究条件;而基础研究机构虽具备较充分的研究能力,却因为得不到临床的支持出现了另一种意义上的“无米下锅”。这个问题在研究原因不明肝炎方面显得尤为突出,因为血清标本是研究肝炎最重要的资源,舍此无从下手。1998 年 TTV 被发现不久,我们与本校的基础部微生物学教研室协作,相互利用对方优势,在很短的时间内获得了近全长的 TTV 基因组,并拼接成功;同时,对我们实验室血清库存放的标本作了 TTV 检测,不久即获得了 TTV 感染与肝功能损害无明显相关性的研究结果。这次合作真正产生了事半功倍的效果。我们认为这种有益的合作模式值得推广。

我国的肝炎发病率最高,绝对发病人数最多。如果按照比例关系推断,我国病因未明肝炎的发病人数也应当是世界之最。既然有如此众多的样本量,我们本应该有重大发现,但是从 HGV/GB-C 和 TTV 的研究情形分析,国内研究者的创新成果太少,而重复国外的研究结果却较多。有鉴于此,我们呼吁国家有关部门应当重视病因未明肝炎的研究,将其纳入国家重大研究计划的范围,拨专款给以大力度的支持;各研究机构则应当相互沟通、交流和合作;科学家们更应该扩大视野、放开思路、增强创新意识,避免盲目追随。

(责任编辑 王宏章)

科技动态

太阳能电站改变成天文望远镜

据英《新科学家》2000 年 6 月 10 日报道:在法国的比利牛斯山有一座在 80 年代就倒闭了的实验性太阳能发电站,它从来没有生产过有商业价值的电能。这座电站有大约 200 面可调整角度的反射镜,能把阳光聚焦在一座塔顶的热能收集器上用来发电。现在,法国研究院的科学家将这些反射镜重新装修,用其中的 40 面反射镜接收来自宇宙空间的伽玛射线而不再接收阳光。科学家们指出,它的原理很简单,即当伽玛射线击中大气上层中的原子时,能从原子中撞击出电子流,形成所谓电子瀑布;当电子瀑布雨点般降落到地球表面时,就会产生细小的称为

Cerenkov 射线的闪光。

40 面反射镜把这些闪光聚焦在塔顶的一个光检测器上,就能探测到来自宇宙空间各种天体辐射出来的伽玛射线。这就是太阳能电站改变成天文望远镜的简单原理。这台堪称废物利用的望远镜已于去年底正式运转,并首次接收到了来自巨蟹座星云的伽玛射线,观测到了中世纪爆炸的一颗星体的“残骸”和另一个“吞食”着周围大量气体、尘埃和星球的“超级黑洞”(Markarian 421)。

(刘先曙)