

·临床论著·

# HCV-1b型基因变异与干扰素/利巴韦林疗效的相关性研究

毛源 苗盛巍 王伟 邱洁 沈传来 沈玲 胡朝晖 谢维

**【摘要】** 目的 探讨HCV-1b型ISDR区、PKR-BD区、NS5A-V3功能区及E2-PePHD功能区的基因序列突变程度与干扰素/利巴韦林联合治疗慢性丙型肝炎疗效的相关性。方法 收集拟进行干扰素和利巴韦林联合治疗的慢性丙型肝炎患者的血清标本以及实验室数据和随后的临床治疗资料。提取血清标本RNA, RT-PCR鉴定HCV基因型。选取HCV-1b型阳性的标本, 利用RT-PCR分别扩增ISDR区、PKR-BD区、NS5A-V3功能区及E2-PePHD功能区的基因片段, 对PCR产物进行基因测序, 与标准株的基因序列比对, 确定各区的氨基酸突变位点和数量。回顾性分析各基因区氨基酸突变数量与干扰素/利巴韦林疗效的相关性。结果 169例慢性丙型肝炎患者中HCV-1b型患者124例, 占74.4%; 在干扰素/利巴韦林联合治疗满12个月并随访满6个月的HCV-1b型感染者中, 治疗前NS5A区的ISDR突变程度与持续病毒反应(SVR)的发生率之间呈显著相关性( $P < 0.05$ )。突变型(突变氨基酸数 $\geq 4$ )患者群的SVR发生率为85.7%, 中间型(突变氨基酸数为1~3)患者群的SVR发生率为55%, 而野生型患者群的SVR发生率最低, 仅为30%; 而PKR-BD区、NS5A-V3功能区以及E2-PePHD功能区的氨基酸突变数量与SVR发生率无显著相关性( $P > 0.05$ )。结论 HCV-1b型感染者治疗前NS5A区的ISDR突变程度对于干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效具有很大的预测价值。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒; 基因变异; 干扰素; 利巴韦林

**Correlation between HCV-1b gene mutations genotype and therapeutic effects of interferon/ribavirin in patients with chronic HCV-1b infection** MAO Yuan\*, MIAO Shen-wei, WANG Wei, QIU Jie, SHEN Chuan-lai, SHEN Ling, HU Zhao-hui, XIE Wei. \*Southeast University Medical School, Nanjing 210009, China  
Corresponding author: SHEN Chuan-lai, Email: scl\_xia@hotmail.com; SHEN Ling, Email: nanjingshl@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate whether mutations in ISDR, PKR-BD, NS5A-V3 and E2-PePHD regions of HCV-1b genotype influence the efficacy of interferon/ribavirin in patients with chronic HCV-1b infection. **Methods** The pretreatment serum samples from patients, who had chronic infection of HCV-1b and completed the course of interferon/ribavirin combination therapy as well as a 6-months follow-up, were collected, respectively. The pretreatment mutations in nucleic acid sequence of ISDR, PKR-BD, NS5A-V3 and E2-PePHD regions of HCV-1b were identified by RT-PCR products sequencing followed by comparison with the prototype sequence (HCV-J). Correlation with the clinical efficacy of interferon/ribavirin combination therapy was then analyzed, retrospectively. **Results** Total of 169 patients with chronic HCV infection were enrolled in the retrospective study. Among these patients, 124 (74.4%) were infected by HCV-1b genotype. The statistical analysis indicated a significant correlation between the mutations in ISDR and sustained virological response (SVR) to interferon/ribavirin treatment ( $P < 0.05$ ). The SVR rates of patients infected with wild-type, intermediate-type and mutant-type ISDR strains were 30%, 55% and 85.7%, respectively. However, there was no significant association among the mutations in PKR-BD, NS5A-V3 and E2-PePHD regions and SVR ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The pretreatment mutations in ISDR of NS5A gene have important predictive value for therapeutic effects of interferon/ribavirin to patients with HCV-1b infection.

**【Key words】** Hepatitis C virus; Gene mutation; Interferon; Ribavirin

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.03.011

基金项目: 江苏省科技厅科技计划项目(No. BS2007046)

作者单位: 210009 南京市, 东南大学医学院病原生物学与免疫学系(毛源、苗盛巍、王伟、沈传来); 东南大学生物科学与医学工程学院(毛源、谢维); 南京金城医学检验所有限公司(毛源、胡朝晖); 东南大学附属南京第二医院传染病科(邱洁、沈玲)

通讯作者: 沈传来, Email: scl\_xia@hotmail.com; 沈玲, Email: nanjingshl@163.com

丙型肝炎病毒 (hepatitis virus C, HCV) 感染是一个全球性的健康问题。世界范围内超过18 000万的患者曾感染HCV, 超过13 000万患者发展成慢性丙型肝炎患者, 其中较多患者发展成肝硬化和肝细胞癌<sup>[1]</sup>。HCV-1b型感染在日本、台湾、南欧和东欧是HCV感染的主要类型<sup>[2-4]</sup>; 在中国江苏地区HCV感染人群中1b型约占84%<sup>[5]</sup>。日本学者Emonoto等<sup>[6]</sup>于1996年发现HCV-1b型NS5A区中存有40个氨基酸长(NS5A 2209-2248)的干扰素敏感决定区(interferon sensitivity determining region, ISDR), 被认为是唯一能独立预测IFN疗效的指标。2004年Pascu等<sup>[7]</sup>对来自日本和欧洲的所有报道和病例进行综合分析, 证实治疗前HCV-1b型NS5A区ISDR的突变程度能预测IFN的疗效, 但预测能力存在明显的地区差异。这种地区差异可能由人种、治疗方案的差异以及野生型、中间型和突变型的地区分布频率差异等原因所致。中国大陆地域广阔, 人口密集, 但相关的报道和研究病例数仍然很少, 对ISDR区以外其他区域的研究则更少, 如PKR-BD区(RNA protein kinase binding domain)、NS5A-V3功能区(the non-structural 5A region-V3 domain)和E2-PePHD功能区(E2 protein-PKR/eIF2 $\alpha$  phosphorylation homology domain)等, 而在世界其他地区曾报道的基因变异与干扰素疗效存在相关性, 但结论不一<sup>[8]</sup>。为此, 本课题组收集江苏地区丙型肝炎患者的血清标本共169例, 对HCV-1b型的ISDR区、PKR-BD区、NS5A-V3功能区以及E2-PePHD功能区的基因序列进行分析, 回顾性研究其突变程度与干扰素联合利巴韦林治疗效果的关系, 探讨这些区域的基因变异程度在干扰素联合利巴韦林疗效预测中的价值。

## 资料与方法

### 一、研究对象

本课题组在2008年6月至2012年12月从江苏省内的南京市第二医院、解放军八一医院等单位收集到169例因丙型肝炎住院并行干扰素治疗患者的治疗前血清标本, 于-70℃保存。同时收集其治疗前后的临床和实验室资料, 并对12个月疗程结束后的患者进行6个月随访。

### 二、实验方法与试剂

1. HCV RNA提取与逆转录: 试剂: HCV RNA提取试剂盒, 购自Biomiga公司; M-MLV逆转录酶, 200 U/ $\mu$ l; 含20 mmol/L MgSO<sub>4</sub>的10 $\times$  Buffer; dNTP Mix, 10 mmol/L; RNA酶抑制剂, 40 U/ $\mu$ l; 以上试剂购自Fermentas公

司。Oligo (dT) 18合成于上海生物工程有限公司。

步骤: 采用HCV RNA提取试剂盒 (Biomiga公司) 从血清中提取HCV RNA。在Ep反应管中加入HCV RNA 5  $\mu$ l, DEPC处理水5  $\mu$ l, 10 pmol/L Oligo (dT) 18取2  $\mu$ l, RNA酶抑制剂0.5  $\mu$ l, 70℃反应10 min, 迅速置冰上5 min。在Ep管中加入以下20  $\mu$ l反应体系 (5 $\times$  Reaction buffer, 10 mmol/L dNTP, RNase抑制剂, M-MLV, DEPC处理水), 42℃温育90 min; 95℃ 10 min以灭活M-MLV; -20℃保存备用。

2. HCV-1b基因型鉴定: 试剂: Taq DNA聚合酶, 2.5 U/ $\mu$ l; 含20 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 10 $\times$  PCR Buffer; 10 mmol/L dNTP均购自Fermentas公司。

引物设计与合成: 根据HCV 5' -端非编码区 (5' -NCR) 的特异性序列自行设计而成, 并参照文献资料, 由上海Invitrogen公司合成, Y: C/T, R: G/A。外引物: HC1: 5' -GCCATGGCGTTAGTAYGAGT-3'; HC2: 5' -TTTCGCRACCCAACRCTACT-3'。内引物: HC3: 5' -AGTGTCTRRCAGCC-TCCAGG-3'; HC8: 5' -ACTACTCGGCTAGCAGTCTC-3'。

方法: 第一轮PCR取2.0  $\mu$ l cDNA模板于25  $\mu$ l反应体系 (10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, Taq DNA聚合酶 0.5  $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 17.5  $\mu$ l), 加入上游引物HC1 1.0  $\mu$ l, 下游引物HC2 1.0  $\mu$ l, 95℃预变性10 min, 然后95℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 循环30次, 72℃延伸10 min。然后取第一轮产物2.0  $\mu$ l于25  $\mu$ l反应体系 (同上), 加入上游引物HC3 1.0  $\mu$ l, 下游引物HC4 1.0  $\mu$ l, 95℃预变性10 min, 然后95℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 循环30次, 72℃延伸10 min。扩增产物取5  $\mu$ l行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 紫外线凝胶成像仪记录扩增条带。

3. ISDR区扩增: 第一轮PCR: 取2.0  $\mu$ l cDNA模板于25  $\mu$ l反应体系 (10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, Pfu DNA聚合酶 0.5  $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 17.5  $\mu$ l), 加入上游引物CV1 1.0  $\mu$ l, 下游引物CV2 1.0  $\mu$ l, 94℃预变性3 min, 然后94℃变性60 s, 41℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 循环32次, 72℃延伸10 min。第二轮PCR: 取第一轮产物4.0  $\mu$ l于50  $\mu$ l反应体系, 加入上游引物CV3 1.0  $\mu$ l, 下游引物CV4 1.0  $\mu$ l, 94℃预变性3 min, 然后94℃变性60 s, 41℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 循环32次, 72℃延伸10 min。取扩增产物5  $\mu$ l同上电泳。阳性结果的PCR产物送上海华大基因股份有限公司进行纯化和双向测序, 引物序列见表1。

4. PKR-BD区扩增: 第一轮PCR: 取2.0  $\mu$ l cDNA模板于25  $\mu$ l反应体系 (10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$

PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, Pfu DNA聚合酶 0.5  $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 17.5  $\mu$ l), 加入上游引物CV1 1.0  $\mu$ l, 下游引物CV2 1.0  $\mu$ l, 94  $^{\circ}$ C预变性3 min, 然后56  $^{\circ}$ C变性55 s, 38  $^{\circ}$ C退火50 s, 72  $^{\circ}$ C延伸55 s, 循环32次, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。

第二轮PCR: 取第一轮产物4.0  $\mu$ l于50  $\mu$ l反应体系, 加入上游引物CV5 1.0  $\mu$ l, 下游引物CV6 1.0  $\mu$ l, 94  $^{\circ}$ C预变性3 min, 然后56  $^{\circ}$ C变性55 s, 42  $^{\circ}$ C退火50 s, 72  $^{\circ}$ C延伸55 s, 循环32次, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。取扩增产物5  $\mu$ l同上电泳。阳性结果的PCR产物送上海华大基因股份有限公司进行纯化和双向测序。

5. NS5A-V3功能区扩增: 第一轮PCR: 取2.0  $\mu$ l cDNA模板于25  $\mu$ l反应体系 (10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, Pfu DNA聚合酶 0.5  $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 17.5  $\mu$ l), 加入上游引物V9 1.0  $\mu$ l, 下游引物V12 1.0  $\mu$ l, 95  $^{\circ}$ C预变性7 min, 然后95  $^{\circ}$ C变性50 s, 40  $^{\circ}$ C退火60 s, 72  $^{\circ}$ C延伸50 s, 循环30次, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。

第二轮PCR: 取第一轮产物4.0  $\mu$ l于50  $\mu$ l反应体系, 加入上游引物V10 1.0  $\mu$ l, 下游引物V11 1.0  $\mu$ l, 95  $^{\circ}$ C预变性7 min, 然后95  $^{\circ}$ C变性50 s, 42  $^{\circ}$ C退火60 s, 72  $^{\circ}$ C延伸50 s, 循环32次, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。取扩增产物5  $\mu$ l同上电泳。阳性结果的PCR产物送上海华大基因股份有限公司进行纯化和双向测序。

6. E2-PePHD功能区扩增: 第一轮PCR: 取2.0  $\mu$ l cDNA模板于25  $\mu$ l反应体系 (10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, Pfu DNA聚合酶 0.5  $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 17.5  $\mu$ l), 加入上游引物E2-1s 1.0  $\mu$ l, 下游引物E2-1as 1.0  $\mu$ l。94  $^{\circ}$ C预变性3 min, 然后56  $^{\circ}$ C变性45 s, 38  $^{\circ}$ C退火40 s, 72  $^{\circ}$ C延伸45 s, 循环30次, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。

第二轮PCR: 取第一轮产物4.0  $\mu$ l于50  $\mu$ l反应体系, 加入上游引物E2-2s 1.0  $\mu$ l, 下游引物E2-2as 1.0  $\mu$ l, 94  $^{\circ}$ C预变性3 min, 然后56  $^{\circ}$ C变性45 s, 48  $^{\circ}$ C退火40 s, 72  $^{\circ}$ C延伸45 s, 循环30次, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物同上电泳。阳性结果的PCR产物送上海华大基因股份有限公司进行纯化和双向测序。

7. 序列分析: 所有经测序获得的样本DNA序列用NCBI进行BLAST比对分析, 以HCV-1b原始株 (HCV-J, GenBank: 90208) 作为参考序列, 比对样本各区的DNA序列, 然后转换成氨基酸序列, 分析各片段的氨基酸突变情况。

### 三、统计学处理

采用GraphPad.Prism 5.0软件进行统计分析。计量资料采用Student's *t*检验, 计数资料采用 Chi-square 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、HCV-1b型的感染率

本研究入组的169例丙型肝炎患者中, HCV-1b型患者124例, 占丙型肝炎患者的74.4%。如图1所示, 1b型HCV的PCR特异性扩增条带为165 bp。

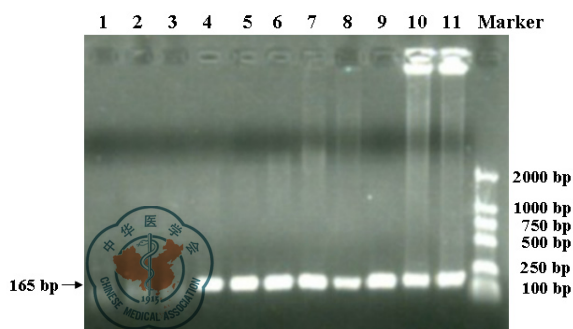
### 二、NS5A-ISDR区突变与干扰素/利巴韦林疗效的相关性

对124例HCV-1b阳性患者的HCV进行NS5A-ISDR区扩增和序列分析, 其中有47份标本实现了PCR扩增和测序成功、干扰素/利巴韦林联合治疗满1年疗程、有完整的24周随访资料。在这47例患者中, ISDR野生

表1 HCV-1b基因型ISDR、PKR-BD、V3及PePHD等基因片段扩增所用引物

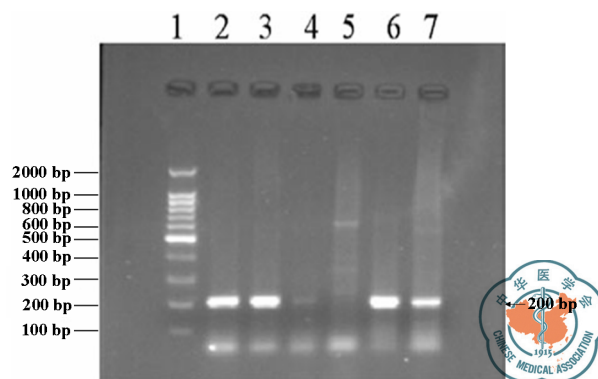
引物名称	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')	扩增区域	产物长度
CV1	TGGATGGAGTGC GGTTGCACAGGTA; nt 6703-6723	NS5A	CV1/CV2: 618 bp
CV2	TCTTTCTCCGTGGAGGTGGTATTGG; nt 7296-7320	NS5A	
CV3	AGGCTGGCCAGGGGGTCTCC; nt 6894-6913	NS5A-ISDR	CV3/CV4: 200 bp
CV4	GAGTCCAGGATTACCACCTT; nt 7075-7094	NS5A-ISDR	
CV5	CAGGTACGCTCCGGCGTGCA; nt 6722-6741	NS5A-PKR BD	CV5/CV6: 573 bp
CV6	GGGGCCTTGGTAGGTGGCAA; nt 7275-7294	NS5A-PKR BD	
V9	TGGTRCACGGGTGCCCGTTA; nt 7258-7277	NS5A	9/12: 529 bp
V12	CTCCTTGAGCACGTCGCCGGT; nt 7777-7796	NS5A	
V10	GAGCTYGCYACTAAGACCTT; nt 7365-7384	NS5A-V3	10/11: 416 bp
V11	CGGTARTGRTCCGTCAGGAC; nt 7761-7780	NS5A-V3	
E2-1s	CCYTGGWTSACACCYAGGTGCVTGGT; nt 2130-2155	E2	E2-1s/E2-1as: 365 bp
E2-1as	AGCAACAGGATATACTCCCA; nt 2475-2494	E2	
E2-2s	GACTACCCATAYAGGCTYTGGCA; nt 2157-2179	E2-PePHD	E2-2s/E2-2as: 274 bp
E2-2as	ATTGSACRTCCACGATGTT; nt 2412-2430	E2-PePHD	

注: Y: C/T, R: G/A



注：泳道1~11：11份来自不同病例的血清HCV cDNA标本，其中1~3号标本为HCV-1b阴性，其余标本为HCV-1b阳性

图1 PCR-SSP法鉴定HCV-1b基因型



注：泳道1为Marker，泳道2、3、6、7代表ISDR基因片段扩增成功的患者标本，泳道4、5代表ISDR基因片段扩增不成功的患者标本

图3 RT-PCR扩增NS5A区的ISDR基因片段

型(无氨基酸突变)患者20例, SVR发生率为30%; 中间型(有1~3个氨基酸突变)患者20例, SVR发生率为55%; 突变型(有≥4氨基酸突变)患者7例, SVR发生率为85.7%。47例标本的氨基酸突变情况及临床SVR如图2所示。代表性的ISDR区PCR扩增电泳结果见图3。对47例有效病例的回顾性分析, HCV-1b型感染者治疗前NS5A区的ISDR突变程度与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效呈显著相关性, 突变程度越高, 患者对干扰素/利巴韦林联合治疗的有效性则越高, 而野生型患者的有效率远低于目前约50%的总治疗有效率, 因此, ISDR区对疗效的预测价值不容忽视。

### 三、PKR-BD区和NS5A-V3区突变与干扰素/利巴韦林疗效的相关性

对124例HCV-1b阳性患者进行HCV PKR-BD区和NS5A-V3功能区扩增和测序分析, 其中有47份标本PKR-BD区扩增和测序成功, 并完成联合治疗疗程和半年随访。但回顾性分析发现HCV-1b型感染者治疗前PKR-BD区的突变程度与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效之间并无显著性相关性, 结果如图2和表2所示。另有49份标本V3区扩增和测序成功, 并完成12个月的干扰素/利

巴韦林联合治疗以及有完整的半年随访资料。同样, NS5A-V3功能区的突变程度与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效之间也无显著相关性。25例持续应答者与24例非持续应答者的平均氨基酸突变数分别为 $3.880 \pm 1.0131$ 和 $3.790 \pm 0.7787$ , 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 四、E2-PePHD功能区突变与干扰素/利巴韦林疗效的相关性

对124例HCV-1b阳性患者的HCV进行E2-PePHD功能区扩增和测序分析, 有64份病例达到上述标准。HCV-1b型感染者治疗前E2区的PePHD基因突变程度与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效之间无显著性相关。31例持续应答者与33例非持续应答者的平均氨基酸突变数分别为 $0.1935 \pm 0.4774$ 和 $0.1818 \pm 0.5839$ , 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 五、治疗前临床及实验室指标与干扰素/利巴韦林治疗疗效的相关性

对64例有效病例回顾性分析了13项治疗前临床及实验室指标与干扰素/利巴韦林疗效间的相关性。进行。患者治疗前的血清AST水平、白蛋白水平以

表2 干扰素/利巴韦林联合治疗中发生SVR与未发生SVR患者ISDR区及PKR-BD区氨基酸突变情况

	持续应答者	非持续应答者	统计量	P
患者例数(例)	23	24		
ISDR区氨基酸突变数(个, $\bar{x} \pm s$ )	$2.0000 \pm 1.7838$	$0.7083 \pm 1.1600$	$t = 2.9550$	0.0050
ISDR类型(氨基酸突变数)			$\chi^2 = 6.9530$	0.0309
野生型(0个), SVR: 30%	6	14		
中间型(1~3个), SVR: 55%	11	9		
突变型(≥4个), SVR: 85.7%	6	1		
PKR-BD区氨基酸突变数(个, $\bar{x} \pm s$ )	$3.6522 \pm 2.3279$	$2.5000 \pm 1.6680$	$t = 1.9570$	0.0566
PKR-BD类型(氨基酸突变数)			$\chi^2 = 2.6800$	0.2619
野生型(0个)	1	1		
中间型(1~3个)	10	16		
突变型(≥4个)	12	17		

HCV-J	2209	2248	2249	2274	SVR	
1	PSLKATCTTHHDS	PDADLIEANLLWRQ	EMGGNITRVESEN	KVVILDSFDPLRAE	EEDEREVSVPAEI	+
2	.....AR.....	.....	.....	.....G.....I.....	.....	-
3	.....	.....	.....	.....D.....A.....	.....	+
4	R.....T.....	.....P.....	.....	.....E.....	.....	+
5	.....	.....	.....	.....E.....A.....	.....	+
6	.....S.....R.....	.....V.....	.....K.....	.....R.....DA.....	.....	+
7	.....	.....	.....	.....D.....E.....	.....	-
8	LP.....	R.....Q.....	.....	.....Q.....GA.....A.....	.....	+
9	.....S.....	.....V.....	.....	.....E.....N.....	.....	-
10	.....P.....	.....	.....I.....	.....A.....	.....	+
11	.....V.....	.....	.....	.....E.....	.....	-
12	.....	.....	.....	.....E.....	.....	-
13	.....	.....	.....	.....E.....G.....	.....	-
14	.....R.....	.....	.....	.....E.....T.....	.....	-
15	.....N.....	.....	.....	.....D.....A.....	.....	-
16	.....	.....	.....	.....V.....	.....	-
17	.....	.....	.....	.....A.....Q.....E.....	.....	-
18	R.....	.....	.....	.....G.....	.....	-
19	.....	.....	.....	.....A.....QE.....R.....	.....	-
20	.....	.....	.....	.....R.....	.....	-
21	.....N.....S.....	PR.....	.....W.....	.....E.....	.....A.....	+
22	.....	.....R.....	.....	.....A.....T.....	.....	+
23	P.....K.....	.....RE.....	.....K.....	.....E.....	.....A.....	+
24	.....	.....	.....	.....S.....GD.....D.....	.....	-
25	.....	.....	.....	.....	.....	-
26	.....	.....	.....	.....A.....	.....	+
27	.....P.....	.....	.....	.....	.....	-
28	.....	.....	.....	.....I.....	.....	-
29	R.....	.....Q.....	.....	.....S.....H.....	.....	-
30	.....	.....	.....	.....D.....	.....D.....	+
31	P.....	.....	.....	.....A.....GT.....	.....	+
32	.....	.....	.....	.....E.....D.....A.....	.....	-
33	L.....SS.....R.....	.....E.....	.....	.....A.....S.....	.....	+
34	.....K.....R.....	.....	.....	.....	.....	+
35	RP.....	PR.....A.....	.....	.....	.....	+
36	.....R.....E.....	.....LD.....	.....	.....P.....M.....	.....	+
37	.....	.....	.....	.....A.....E.....	.....	+
38	.....	.....	.....	.....A.....	.....	-
39	.....	.....	.....K.....	.....	.....	+
40	P.....W.....	.....	.....	.....V.....T.....P.....	.....	-
41	.....N.....	.....	.....	.....	.....	+
42	.....I.....	.....	.....	.....D.....G.....I.....	.....	+
43	.....	.....	.....	.....	.....	-
44	.....A.....Q.....	.....	.....	.....A.....E.....	.....	-
45	.....	.....L.....	.....	.....	.....	-
46	.....E.....R.....A.....	.....	.....	.....AR.....A.....	.....	-
47	.....	.....	.....	.....D.....	.....	-

图2 NS5A区2209-2274片段的氨基酸突变及干扰素/利巴韦林联合疗效



及年龄等3项指标与干扰素/利巴韦林疗效间呈显著相关性，与治疗无反应者相比，呈SVR反应者的平均AST水平较低、白蛋白水平较高，而且年龄较低。其他指标如治疗前HCV RNA水平、干扰素剂量等与疗效则无显著相关性，见表3。

### 讨 论

本研究结果显示HCV-1b型HCV感染占江苏地区HCV感染的74.4%，和张永祥等2004年的调研结论84.4%存在一定差异<sup>[5]</sup>，但HCV-1b型仍占江苏地区HCV感染的绝大部分，和我国其他地域的HCV-1b型感染率比较接近，如河南（77 ± 12）%<sup>[9]</sup>和北京70%<sup>[10]</sup>等，证实HCV-1b型仍是我国当前大部分地区HCV感染的主要基因型别。

HCV本身具有精细而广泛的机制以逃逸宿主的固有及适应性免疫，即使在干扰素为基础的抗病毒治疗中仍然存在很强的干扰素抵抗效应<sup>[11]</sup>。当前慢性HCV感染的标准治疗方案是聚乙二醇化干扰

素（PegIFN）联合利巴韦林（ribavirin, RBV）治疗，对基因1、4、5型HCV感染者疗程为48周，2、3型感染者疗程为24周<sup>[12]</sup>。与以前的单纯干扰素治疗相比，PegIFN/RBV联合疗法使临床疗效明显提高，但总体SVR率仅约50%，而且干扰素治疗成本高、不良反应大且疗程长，因此，人们一直在探讨可以预测干扰素疗效的各种指标。

自从日本学者Emonoto等<sup>[6]</sup>1996年发现了HCV-1b型NS5A区中存在由40个氨基酸残基（NS5A 2209-2248）组成的干扰素敏感决定区（ISDR）以后，国内外围绕ISDR区的研究均有报道，结论也不尽相同。韩国Joon等<sup>[13]</sup>（50例）、香港Zhou等<sup>[14]</sup>（37例）以及法国Veillon等<sup>[15]</sup>均认为ISDR区与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效关系密切（10例）；而日本El-Shamy等<sup>[16]</sup>（45例）、突尼斯Bouzgarrou等<sup>[17]</sup>（21例）和我国周朝晖等<sup>[18]</sup>（32例）的研究均认为ISDR区不能单独用于预测干扰素疗效。本研究47例有效研究病例中，HCV-1b型感染者治疗前NS5A区的ISDR突变程度

与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效之间呈显著相关性,持续应答者和非持续应答者的氨基酸突变数分别为 $(2.0000 \pm 1.7838)$ 和 $(0.7083 \pm 1.1600)$ , ( $t = 2.955, P < 0.05$ ),不同突变程度患者的SVR发生率存在显著差异,野生型HCV-1b感染者SVR发生率为30%,有力地支持了ISDR的预测价值。

ISDR区加上其C-端的26个氨基酸残基(2209-2274)能和双链RNA依赖性蛋白激酶(protein kinase regulated by double-stranded RNA, PKR)结合,故这段区域称为PKR结合结构域(PKR-BD),此区域与PKR形成异源二聚体从而抑制PKR同源二聚体的产生有关<sup>[19]</sup>,使PKR丧失抑制病毒蛋白合成的能力,有利于病毒逃逸IFN的作用而维持病毒复制。虽然PKR-BD区包含了ISDR区且与干扰素的治疗相关,但本研究结果显示PKR-BD区的突变与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效并无显著相关性。但是Jenke等<sup>[20]</sup>和Bouzgarrou等<sup>[17]</sup>认为PKR-BD区的突变与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效存在关联性;与此同时,El-Shamy等<sup>[16]</sup>研究亦显示PKR-BD区的突变与干扰素/利

巴韦林联合治疗的疗效无关联性的。此外,NS5A-V3功能区以及E2区的PePHD基因段突变及预测价值也被人们所研究。Veillon等<sup>[15]</sup>研究认为NS5A-V3功能区与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效存在关联;而Bouzgarrou等<sup>[17]</sup>研究显示NS5A-V3功能区与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效不相关。韩国Joon等<sup>[13]</sup>研究认为E2区PePHD突变仅存在于治疗有效果的人群中;而Jenke等<sup>[20]</sup>研究显示E2区PePHD突变与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效无关联性。本研究结果更接近香港Zhou等<sup>[14]</sup>的结论,即ISDR区的突变是唯一能单独用于预测干扰素疗效的指标。

在13项治疗前的临床及实验室指标中,与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效之间存在相关性的是患者治疗前的AST水平、白蛋白水平以及年龄3项指标。治疗患者的年龄较年轻,SVR发生率越高,年龄越大且发生SVR的几率越低。这可能是因为年龄大的患者免疫反应性下降,肝内纤维化较年轻患者复杂,获得SVR的概率较低<sup>[21]</sup>。患者治疗前AST值越高则SVR发生率越低,治疗前白蛋白越低则SVR发生率越低,这

表3 干扰素/利巴韦林联合治疗中发生SVR与未发生SVR患者临床及实验室指标

	持续应答者	非持续应答者	统计量	P
患者数	31	33		
性别(男/女)	17/14	20/13	$\chi^2 = 1.411$	0.494
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	35.13 $\pm$ 11.40	44.57 $\pm$ 15.01	$t = 2.096$	0.043
ALT(U/L, $\bar{x} \pm s$ )	72.34 $\pm$ 59.31	89.22 $\pm$ 89.87	$t = 0.8703$	0.388
AST(U/L, $\bar{x} \pm s$ )	43.46 $\pm$ 25.88	65.36 $\pm$ 49.03	$t = 2.184$	0.033
GLT(U/L, $\bar{x} \pm s$ )	53.90 $\pm$ 44.28	68.04 $\pm$ 60.91	$t = 1.045$	0.300
血清白蛋白(g/L, $\bar{x} \pm s$ )	45.780 $\pm$ 3.291	43.930 $\pm$ 3.559	$t = 2.135$	0.037
总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ , $\bar{x} \pm s$ )	13.690 $\pm$ 4.479	18.080 $\pm$ 11.351	$t = 1.981$	0.052
白细胞( $10^9/\text{L}$ , $\bar{x} \pm s$ )	5.227 $\pm$ 2.029	5.408 $\pm$ 2.403	$t = 0.3190$	0.751
红细胞( $10^{12}/\text{L}$ , $\bar{x} \pm s$ )	4.423 $\pm$ 0.499	4.567 $\pm$ 0.642	$t = 0.9776$	0.332
血红蛋白(g/L, $\bar{x} \pm s$ )	132.83 $\pm$ 30.71	140.50 $\pm$ 17.48	$t = 1.247$	0.217
血小板( $10^9/\text{L}$ , $\bar{x} \pm s$ )	162.12 $\pm$ 72.94	133.130 $\pm$ 64.480	$t = 1.664$	0.101
HCV RNA( $10^7$ 拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$ )	3.124 $\pm$ 5.175	5.644 $\pm$ 11.100	$t = 1.152$	0.254
不同HCV RNA含量例数			$\chi^2 = 2.217$	0.330
< $10 \times 10^4$ 拷贝/ml	4	1		
$1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 拷贝/ml	11	14		
$> 1 \times 10^7$ 拷贝/ml	16	18		
IFN剂量				
PEG-IFN- $\alpha$ ( $\mu\text{g}/\text{周}$ , $\bar{x} \pm s$ )	167.70 $\pm$ 21.02	158.30 $\pm$ 35.88	$t = 0.7309$	0.474
IFN- $\alpha$ ( $10^4/2$ d, $\bar{x} \pm s$ )	435.70 $\pm$ 127.70	408.30 $\pm$ 116.50	$t = 0.5673$	0.576

与AST和白蛋白水平直接反映肝细胞的损害程度和肝细胞的功能状态有关。

本研究提示HCV-1b型感染者治疗前NS5A区的ISDR突变程度、年龄、AST和白蛋白水平与干扰素/利巴韦林联合治疗的疗效有着显著相关性,但是对于ISDR的效应机制以及AST和白蛋白的关联原因仍有待更深入的研究和阐明。

### 参 考 文 献

- Susser S, Welsch C, Wang Y, et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology*,2009,50(6):1709-1718.
- Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, et al. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med*,1995,122(3):161-168.
- McOmish F, Yap PL, Dow BC, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol*,1994,32(4):884-892.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Genotypes of hepatitis C virus in Taiwan and the progression of liver disease. *J Clin Gastroenterol*,1995,21(3):233-237.
- 张永祥, 孙南雄, 黄祖瑚, 等. 江苏地区丙型肝炎病毒基因分型研究. *江苏医药杂志*,2004,30(6):463-464.
- Enomoto N, Sakdama I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*,1996,334(2):77-81.
- Pascu M, Martus P, Hohne M, et al. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut*,2004,53(9):1345-1351.
- 杨锡琴, 冯晓燕, 张贺秋, 等. 丙型肝炎病毒对干扰素治疗的影响及预测. *军事医学科学院院刊*,2010,34(4):381-384.
- 何平, 陈春勇. 丙肝基因分型研究. *医药论坛杂志*,2010,31(2):10-11.
- 严艳, 李卓, 郭向华, 等. 北京地区慢性丙型肝炎患者血清HCV-RNA定量检测与基因分型的研究. *医学理论与实践杂志*,2007,20(7):756-757.
- 任姗, 陈新月. 丙型肝炎病毒干扰素抵抗机制研究进展. *首都医科大学学报*,2009,30(6):799-804.
- 金生. 基因1型HCV感染慢性丙型肝炎的抗病毒治疗(美国肝病研究学会2011年指南简介). *现代医药卫生杂志*,2012,28(2):256.
- Yoon J, Lee JI, Baik SK, et al. Predictive factors for interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterology*, 2007,13(46):6236-6242.
- Zhou XM, Chan PK, Tam JS. Mutations around interferon sensitivity-determining region: A pilot resistance report of hepatitis C virus 1b in a Hong Kong population. *World J Gastroenterology*,2011,17(48):5317-5323.
- Veillon P, Payan C, Le Guillou-Guillemette H, et al. Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy. *World J Gastroenterology*,2007,13(8):1195-1203.
- El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, et al. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology*,2008,48(1):38-47.
- Bouzzgarrou N, Hassen E, Mahfoudh W, et al. NS5AISDR-V3 Region Genetic Variability of Tunisian HCV-1b Strains: Correlation with the response to the combined interferon/ribavirin therapy. *J Med Virol*,2009,81(12):2021-2028.
- 周朝晖, 余为民, 钱雪梅, 等. 丙型肝炎病毒1b型NS5A基因变异与干扰素疗效关系研究. *中国临床医学*,2008,15(6):802-804.
- Munoz de Rueda P, Casado J, Paton R, et al. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J Virol*,2008,82(1):6644-6653.
- Jenke AC, Moser S, Orth V, et al. Mutation frequency of NS5A in patients vertically infected with HCV genotype 1 predicts sustained virological response to peginterferon alfa-2b and ribavirin combination therapy. *J Viral Hepat*,2009,16(12):853-859.
- Elefsiniotis IS, Pavlidis C, Ketikoglou I, et al. Patient's age modifies the impact of the proposed predictors of sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with PEG-interferon plus ribavirin. *Eur J Intern Med*,2008,19(4):266-270.

(收稿日期: 2013-01-13)

(本文编辑: 孙荣华)

毛源, 苗盛巍, 王伟, 等. HCV-1b型基因变异与干扰素/利巴韦林疗效的相关性研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(3): 370-376.