P.O.Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2003 February;11(2):182-184
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

慢型丙型肝炎患者干扰素治疗前后HCV HVR1准种的动态变化

张 琳,赵桂珍,李 颖,石理兰

张琳,赵桂珍,李颖,石理兰,中国医科大学第二临床学院传染科
辽宁省沈阳市 110003
张琳,女,1967-06-12生,辽宁省沈阳市人,汉族.1990年大连医学院本科毕业,1997 年中国医科大学硕士研究生毕业,讲师.主要从事病毒性肝炎治疗方面的研究.
项目负责人:张琳,110003,辽宁省沈阳市,中国医科大学第二临床学院传染科.
收稿日期:2002-06-08 接受日期:2002-07-05

Dynamic changes of HVR1 quasispecies in chronic hepatitis C after IFN therapy

Lin Zhang,Gui-Zhen Zhao,Ying Li,Li-Lan Shi

Lin Zhang,Gui-Zhen Zhao,Ying Li, Li-Lan Shi,Department of Infectious Disease,The Second Clinical College,China MedicalUniversity, Shenyang110003,Liao Province,China
Correspondence to: Dr.Lin Zhang,Department of Infectious Disease, The Second Clinical College,China Medical University,36 Sanhao Street,Shenyang 110003,LiaoningProvince,China.
Received:2002-06-08 Accepted:2002-07-05

Abstract

AIM:To evaluate the correlation between the complexity of HCV HVR1 quasi-species and their response to IFN therapy in patients with chronic hepatitis C.

METHODS:Twenty patients with chronic hepatitis C received IFN therapy (3mu/day, three times/week for 24 weeks). Serum quasispecies complexity of HVR1 was analyzed by polymerase chain reaction mediated singl-strand conformation polymorphism (SSCP) before and 3 months,6 months post-therapy, respectively.

RESULTS:Of 20 patients,7 had low level of complexity (SSCP bands ≤ 3),13 had high level of complexity (SSCP bands >3). The rate of HCV RNA negative in low level complexity group was higher than that in high level complexity group.Patients with low level of complexity prior to therapy had good responsive to IFN;Serum HCV RNA in some patients did not convert to negative after IFN therapy,however, the number of SSCP bands decreased gradually.

CONCLUSION:HCV HVR1 quasi-species complexity is a predictive factor in response to IFN therapy, a statistically significant correlation between high level of complexity of HCV HVR1 quasi-species and lacking of response to IFN therapy in patients with chronic hepatitis C was found.

Zhang L, Zhao GZ, Li Y, Shi LL. Dynamic changes of HVR1 quasispecies in chronic hepatitis C after IFN therapy.Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):182-184

摘要

目的:探讨感染HCV1b型慢型丙型肝炎患者HCV HVR1区准种的复杂性与干扰素疗效的关系，以便对干扰素治疗疗效进行预测.

方法:应用 IFN 治疗的慢性丙型肝炎患者共 20 例,于治疗前、治疗后 3 mo、6 mo 留取血清，－70 ℃冻存待测.治疗方案为:干扰能 3 mu,3 次/wk，肌肉注射，共 24 wk.HCV HVR1准种的检测采用单链构象多态性聚合酶链反应法(SSCP 法).

结果:IFN 治疗前,35 %(7/20)的患者表现为 SSCP 低复杂性(SSCP 条带数≤3)，65 %(13/20)表现为高复杂性(SSCP 条带数>3).治疗 3 mo 后，4 例患者 HCV RNA 阴转，均发生在低复杂性组，其余大部分患者 SSCP 条带数减少 1-2 条带.治疗 6 mo 时，7 例患者 HCV RNA 阴转，仅 2 例发生在高复杂性组.治疗结束时 13 例(65 %)无应答患者中,8 例患者 SSCP 条带数均较治疗前减少，2 例无变化，1 例恢复到治疗前水平,2 例较治疗前升高.

结论:HCV HVR1区准种的复杂性可以对IFN治疗进行疗效预测，治疗前准种数少者可预测对IFN治疗有较好的应答.

张琳,赵桂珍,李颖,石理兰.慢性丙型肝炎患者干扰素治疗前后 HCV HVR1 准种的动态变化.世界华人消化杂志 2003;11(2):182-184
http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/182.htm

0 引言

HCV基因组具有高度的变异性,可以逃避机体的免疫反应,使HCV感染极易慢性化[1-4].尤其在 E2/NS1 区存在两个高变区(HVR1 和 HVR2),其中 HVR1 被认为机体免疫选择部位[5-8],可刺激机体产生免疫反应,而机体产生的免疫压力又促使其产生更多的变异,与HCV持续感染和慢性化密切相关，并给临床治疗带来困难.HCV 变异除产生不同的基因型和亚型外,另一重要的特征是在宿主体内以准种的形式存在[9,10].准种即同一株病毒，基因组序列极为相似的病毒群，但一些位点仍存在差异.由于 HVR1 的高变性，常用其来确定准种的数量[30].近年的研究发现,基因型HCV1b型患者 HVR1区准种的复杂性(准种数)与干扰素治疗疗效有密切关系，慢性丙型肝炎患者HVR1准种的复杂性程度越高，对IFN无应答的可能性越大[11-16].Sandres et al [17,18]则报道 HVR1 准种的复杂性与 IFN 疗效无关，不能用于疗效预测.我们对沈阳地区20例HCV1b型慢性丙型肝炎患者进行了IFN治

疗前后 HVR1 准种复杂性的动态观察,以探讨 HCV HVR1 准种的复杂性与干扰素疗效的关系,报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性丙型肝炎患者 20 例均感染 HCV1b 型、HCV RNA 阳性，男 15 例，女 5 例，年龄 23-45 岁.干扰素治疗方案:干扰能 3 mu,3 次 /wk，肌肉注射,疗程 6 mo.疗效判定：治疗结束时，ALT 正常、HCV RNA 阴转为有效.否则为无效.分别于治疗前、后 3 mo、6 mo 留取血清，-70 ℃冻存备用.

1.2 方法 HCV 基因分型采用 C 区型特异性引物 PCR 法(中国公共卫生 1997;13:199-200). HCV HVR1 准种检测采用 SSCP 法.引物序列根据中国人基因组序列设计(病毒学报 1993;9:114-126),由华美公司合成.外引物 1:5'-CTACTCCGGATCCCACAAGC-3'（核苷酸位置 1 009-1 028）；外引物 2：5'-GGGCTCGGAGTGAAGCAATA-3'(核苷酸位置 1 519-1 538).内因物 1：5'-ATTCCATG GTGGGGAACTGG-3'(核苷酸位置 1 085-1 104);内因物 2:5'-GCAATACACTGGACCACACA-3'(核苷酸位置1 504-1 523).HCV RNA 提取采用异硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿提取法.血清 50 μL, 分别加入异硫氰酸胍 200 μL,氯仿 / 异戊醇 50 μL，振荡混匀，离心，13 000 r/min,10 min,取水相 100 μL,加等量异丙醇，混匀，离心,13 000 r/min, 10 min,弃上清，控干残留液体,加 750 mL/L 乙醇 200 μL 洗涤，离心，13 000 r/min,5 min, 弃上清，真空抽干，65 ℃ 20 min 备用.

HVR1 基因片断 PCR 扩增:逆转录及第一轮 PCR 扩增.10×buffer 3 μL,dNTP3 μL,$MgCl_2$ 1.56 μL,Taq 2U,AMV 3U,Rnasin 20U,外引物$_1$ 20pmol(1 μL),外引物$_2$ 20pmol(1 μL),水 19 μL,总反应体积 30 μL.37 ℃ 30 min 逆转录之后进入 PCR 扩增，反应条件为 94 ℃ 300 s 预变性，94 ℃ 45 s、50 ℃ 45 s、72 ℃ 45 s,共 35 个循环,终延伸 300 s.第二轮 PCR 扩增.取第一轮扩增产物 5 μL,10 × buffer 3 μL,dNTP3 μL,$MgCl_2$1.56 μL,Taq 酶 2U,内引物$_1$ 20 pmol(1 μL),内引物$_2$ 20pmol(1 μL),水 15 μL, 总反应体积30 μL.反应条件与第一轮相同.取第二轮扩增产物5 μl 进行 2 % 琼脂糖凝胶电泳,片断大小在 280 bp 左右为阳性结果.

SSCP 检测:取 PCR 产物 10 μL,加变性上样液 10 μL,进行 96 ℃ 10 min 预变性，取出后立即放入冰浴中，之后进行80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳(300 V,5 h),胶取出后用 100 mL/L 乙醇加 5 g/L 冰乙酸进行固定 20 min,洗涤后用 2 g/L 硝酸银染色 20 min,之后用 15 g/L NaOH 加 4 g/L 甲醛显色，肉眼观察至显带为止，用 100 mL/L 冰乙酸进行终止.将结果存入电脑.

2 结果

2.1 IFN 治疗前后 HVR1 准种的动态变化 HCV RNA 阳性的 HCV1b 型慢性丙型肝炎患者 20 例中,7 例(35 %)表现为 SSCP 低复杂性，13 例（65 %）为高复杂性，IFN 治疗 3 mo 后，4 例（20 %）患者 HCV RNA 阴转，均发生在低复杂性组.其余大部分患者 SSCP 条带数减少 1-2 条带.治疗 6 mo 时,7 例（35 %）患者 HCV RNA 阴转，其中仅 2 例发生在高复杂性组.13 例无应答患者中，8 例 SSCP 条带数均有所减少，2 例无变化，1 例恢复到治疗前水平，2 例较治疗前增加(表 1).

表 1 IFN 治疗前后 HVR1 准种的动态变化

No	治疗前		3 mo		6 mo	
	SSCP 条带数	HCVRNA	SSCP 条带数	HCVRNA	SSCP 条带数	HCVRNA
1	2	+	0	-	0	-
2	4	+	2	+	1	+
3	3	+	1	+	0	-
4	5	+	5	+	5	+
5	4	+	2	+	1	+
6	6	+	5	+	3	+
7	2	+	0	-	0	-
8	3	+	3	+	3	+
9	4	+	3	+	4	+
10	5	+	3	+	2	+
11	4	+	1	+	0	-
12	6	+	3	+	3	+
13	2	+	0	-	0	-
14	4	+	4	+	5	+
15	1	+	0	-	0	-
16	4	+	2	+	0	-
17	4	+	2	+	2	+
18	3	+	1	+	1	+
19	4	+	4	+	5	+
20	5	+	4	+	3	+

2.2 HVR1准种复杂性与HCV RNA阴转率和疗效的关系 治疗结束时,7 例患者 HCV RNA 阴转,5 例(71.4 %)发生在低复杂性组，2 例(15.4 %)在高复杂性组，二者相比具有显著差异($P<0.05$).治疗结束时,20 例患者中 7 例(35 %)表现为完全应答,13 例(65 %)为无应答.有效组与无效组 HVR1 准种数的比较(2.43 ± 0.98 vs 4.46 ± 0.88, $P<0.01$)差异非常显著.

3 讨论

由于HCV基因组的高度变异性[19-22],使HCV感染后很难被机体的免疫反应所清除，80 % 以上的HCV感染者将转变成慢性肝炎，并逐步发展成肝硬化和肝癌[23-26].目前尚无有效的疫苗预防 HCV 感染,IFN 仍是唯一可以清除病毒、改善患者生化和组织学指标的药物.然而，慢性 HCV 感染者对 IFN 的完全应答率仅 10-30 %,且副作用大，治疗费用昂贵.因此，选择合适的病例进行治疗，并对疗效进行有效预测，具有重要临床意义.在

影响IFN疗效的众多因素中，1b型HCV感染是导致IFN疗效低下的重要因素之一[27-29].我国大部分HCV感染者为此种基因型.近年在研究1b型HCV抵抗IFN的机制时发现，HVR1准种的复杂性与IFN疗效有关，大多数研究表明，HCV HVR1准种复杂性越高，对IFN无应答的可能性越大.但Sandres et al则认为，HVR1准种的复杂性与IFN疗效无关，不能进行疗效预测.我们的研究结果发现，治疗前SSCP条带≤3组患者HCV RNA阴转率为71.4%,SSCP条带>3组患者为15.4%,二者相比具有显著差异.且治疗有效组SSCP条带数明显少于无效组.表明HVR1准种的复杂性确与IFN疗效有关，IFN治疗前HVR1准种数较少者可预测对IFN有较高的应答率.

一般认为，IFN治疗3 mo时，HCV RNA仍未阴转或ALT仍未降至正常，则该患者对IFN无应答的可能性较大.6 mo时仍为此种情况则为无效，应停药.在对该组患者的动态观察中发现,3 mo时有效率为25%，6 mo时为35%.部分患者虽然治疗结束时HCV RNA未阴转，但SSCP条带数较治疗前减少.由于该组患者均未延长治疗时间，未能观察到延长疗程是否可以提高IFN应答率.因此建议今后对治疗结束时无应答者，但SSCP条带数在治疗过程中逐渐减少者，可适当延长疗程.

在HCV准种的检测方法中，以SSCP法最简单易行，易于临床开展.在此技术中，对目的基因进行PCR扩增后，产物通过加热变性获得单链DNA，并通过电泳进行分析.分离的单链的泳动速度取决于其三维构象.因此众多异质性基因组成的混合体可被分离成不同的条带，而且条带数即可代表基因序列的复杂程度.尤其核苷酸片断<300 bp时，更适用于此种方法.

总之，对HVR1准种复杂性是否可以预测IFN疗效方面，尚有不同的观点存在，今后有必要进一步进行大样本研究和进行氨基酸序列测定以证实.

4 参考文献

1 Honda M,Kaneko S,Sakai A,Unoura M,Murakami S,Kobayashi K.Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease.*Hepatology* 1994;20:1144-1151
2 Sakai A,Kaneko S,Honda M,Matsushta E,Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis.*Hepatology* 1999;30:556-561
3 Koizumi K,Enomoto N,Kurosaki M,Murakami T,Izumi N, Marumo F,Sato C.Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment.*Hepatology* 1995;22:30-35
4 Gonzale RP ,Qian K,Jan Y,Davis GL,Ohno T,Mizokami M,Lau Z.Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C.*J Med Virol* 1996;49:242-247
5 Shirai M, Arichi T, Nishioka M, Nomura T, Ikeda K,Kawanishi K, Engelhard V, Feistone S, Berzofsky JA. CTL responses of HLA-A2.1-Transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of human carrying HLA-A2.1. *J Immunol* 1995;154:2733-2742
6 Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, Gioannis D, Strazzera A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by heperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Nalt Acad Sci USA* 1996;93:15394-15399
7 Shimizu YK,Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, Yoshikura H. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996;223:409-412
8 Allain JP, Zhai W, Shang D, Timmers E, Alexander G. Hypervariable region diversity of hepatitis C virus and humoral response:comparision between patients with or without cirrhosis.*J Med Virol* 1999;59:25-31
9 Maetell M, Esteban J, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J.Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes:quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-3229
10 Polyak SJ, Gerotto M. The molecular basis for responsiveness to anti-viral therapy in hepatitis C. *Form(Genova)* 2000;10:46-58
11 Grahovac B, Bingulac-Popovic J, Vucelic B, Hrstic I, Ostojic R, Drazic V, Balija M, Grgicevic D. Hypervariable region 1of hepatitis C virus genome and response to interferon therapy. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:905-910
12 Hino K, Yamaguchi Y, Fujiwara D, Katoh Y, Korenaga M, Okazaki M, Okuda M, Okita K. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C:a prospective study.*J Viral Hepat* 2000;7:36-42
13 Moribe T, Hayashi N, Kanazawa Y,Mita E, Fusamoto H, Negi M, Kaneshige T, Igimi H, Kamada T, Uchida K.Hepatitis C viral complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 1995;108:789-795
14 Guen BL, Squadrito G, Nalpas B,Berthelot P, Pol S, Brechot C. Hepatitis C virus genome complexity correlates with respons to interferon therapy :a study in French patients with chronic hepatitis C.*Hepatology* 1997;25:1250-1254
15 Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, Roudot-Thoraval F, Germanidis G, Bastie A, Darthuy F, Remire J, Soussy CJ, Dhumeaux D.Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus(HCV):influence on the characteristics of the infection and response to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C.*J Med Virol* 1998;54:256-264
16 Toyoda H, Kumada T, Nakano S, Takeda I, Sugiyama K, Osada T, Kiriyama S, Sone Y, Kinoshita M, Hadama T. Quasispecies nature of hepatitis C virus and response to alpha interferon: significance as a predictor of direct response to interferon . *J Hepatol* 1997;26:6-13
17 Polyak SJ , Faulkner G, Carithers RL,Corey L,Greth DR.Assessment of hepatitis C virus quasispecies heterogonity by gel shift analysis:correlation with response to interferon therapy.*J Infect Dis* 1997;175:1101-1107
18 Sandres K,Dubois M,Pasquier C.Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus(HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy.*J Virol* 2000;74:661-668
19 Brechot C. Hepatitis C virus molecular biology and genetic variability. *Dig Dis Sci* 1996;41:6s-12s.
20 Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C.*Hepatology* 1997;25:1527-1538
21 Simmonds P. Variability of hepatitis C .*Hepatology* 1995;21:570-583
22 Mullan B, Kenny-Walsh E, Collins JK, Shanahan F, Fanning LJ. Inferred hepatitis C virus quasispecies diversity is influenced by choice of DNA polymerase in reverse transcriptase-polymerase chain reactions. *Anal Biochem* 2001;289:137-146
23 Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis,diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):98-112
24 Ambrosch A, Konig W. Characteristics of the hepatitis C virus and viral predictors of therapeutic response. *Med Klin* 1999;94:626-632
25 Lunel F, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus. Virological diagnosis. *Pathol Biol* 1995;43:681-690
26 Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. *Princess Takamatsu Symp* 1995;25:75-91
27 Mita E, Hayashi N, Hagiwara H, Ueda K, KazanawaY, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T.Pridicting interferon therapy efficacy from hepatitis C virus genotype and RNA titer. *Dig Dis Sci* 1994;39:977-982
28 Trepo C. Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2000;7:250-257
29 Gitnick G. Hepatitis C:controversies,strategies and challenges. *Eur J Surg Suppl* 1998;582:65-70
30 Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K.Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in serum,peripheral blood mononuclear cells and liver. *Hepatology* 1999;29:217-222