

## 论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0880-06

### HCV 核心蛋白氨基酸替换与干扰素应答的关系

朱季香<sup>1</sup>,何长龙<sup>1</sup>,郭艳<sup>1</sup>,程玲<sup>2</sup>,毛青<sup>1</sup> (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所,感染病研究重庆市重点实验室<sup>1</sup>;646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院感染科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 研究慢性丙型肝炎病毒核心蛋白氨基酸替换与干扰素疗效的关系。方法 纳入 HCV RNA 阳性的慢性丙型肝炎患者 108 例,依据干扰素治疗结局分为持续病毒学应答组(76 例)、非持续病毒学应答组(32 例)。逆转录巢式 PCR(RT-nested-PCR)扩增核心蛋白区,分析其氨基酸替换模式及其与干扰素疗效的关系。结果 高频替换(频率 > 10%)发生于 Core 蛋白第 70、75、91、106、110、147、187 位氨基酸残基,各位点之间存在广泛的连锁替换;两组间 Core 蛋白第 70 位的 Q/non-Q 替换( $P=0.004$ )、91 位的 M/non-M 替换( $P=0.039$ )、110 位的 T/non-T 替换( $P=0.025$ )具有显著差异;70Q、91M、110T 替换更倾向于发生不应答治疗结局,OR 值及 95% CI 分别为 0.288 (0.120 ~ 0.693)、0.413 (0.177 ~ 0.966)、0.346 (0.133 ~ 0.896);同时携有上述 2 个以上的“抵抗型”替换者,治疗 4 周时 HCV RNA 水平下降更缓慢( $P=0.001$ )。结论 HCV Core 区第 70、91、110 三个位点可作为 Core 区预测干扰素疗效的优选氨基酸位点。

**[关键词]** 核心蛋白;丙型肝炎病毒;氨基酸变异;病毒学应答

**[中图分类号]** R373.21; R394.6; R977

**[文献标志码]** A

### Relationship between amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein with antiviral response to pegylated interferon

Zhu Jixiang<sup>1</sup>, He Changlong<sup>1</sup>, Guo Yan<sup>1</sup>, Cheng Ling<sup>2</sup>, Mao Qing<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Infectious Diseases, Chongqing Key Laboratory of Infectious Disease Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; <sup>2</sup>Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between amino acid substitutions in hepatitis C virus core region with the virological response (VR) to pegylated interferon. **Methods** The substitution pattern of amino acid in core region and whether it is associated with VR to pegylated interferon were analyzed retrospectively in a subset of HCV RNA-positive, chronically infected patients who were inpatients or outpatients of our department from December 2008 to October 2012. A total of 108 patients were enrolled and divided into 2 groups based on their final VR to pegylated interferon, sustained VR (SVR) group ( $n=76$ ), and non-SVR group ( $n=32$ ). Serum viral RNA was extracted and full-length core gene was amplified through nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Hypermutated sites (with mutation frequency exceeding 10%) occurred at positions 70, 75, 91, 106, 110, 147 and 187 amino acids of the core protein. The proportion of Glutamine (Q) and non-Q at position 70, methionine (M) and non-M at position 91, threonine (T) and non-T at position 110 of the core protein were significantly different between SVR and non-SVR group ( $P=0.004$ , 0.039 and 0.025, respectively). Q at position 70, M at position 91 and T at position 110 were correlated with non-SVR with  $OR=0.288$ , 0.413, 0.346 and 95%  $CI=0.120-0.693$ , 0.177-0.966, 0.133-0.896, respectively. Patients carried 2 or more undesirable substitutions mentioned above simultaneously tended to attain slower viral decrease after 4 weeks' treatment ( $P=0.001$ ). **Conclusion** Amino acid substitutions at positions 70, 91 and 110 of HCV core protein should be used as predictors of VR to pegylated interferon.

**[Key words]** core protein; hepatitis C virus; amino acid substitutions; virological response

Supported by the Major Project of National "Eleventh Five-year Plan" for Science and Technology of China (2012ZX10001003-003-003; 2011ZX09302-005).  
Corresponding author: Mao Qing, Tel: 86-23-68754141, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

**[基金项目]** “十一五”国家科技重大专项 (2012ZX10001003-003-003, 2011ZX09302-005)

**[通信作者]** 毛青, 电话: (023)68754141, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130313.0841.001.html> (2013-03-13)

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染已呈全球流行的发展态势。聚乙二醇干扰素(pegylated interferon, PEG-IFN)联合利巴韦林(ribavirin, RBV)是治疗丙型肝炎的标准方案。不同基因型HCV对联联合治疗的应答反应差别显著,单纯考虑宿主因素(如IL-28B SNP)不能完全解释疗效差异,且初治无应答的患者再治疗时有17%~24%可获得持续病毒学应答(sustained virological response, SVR),初治有应答但停药后复发的患者再治疗时44%~62%不能产生有效应答<sup>[1-3]</sup>,其机制仍不清楚。说明病毒自身可影响干扰素疗效,并提示可从病毒遗传进化差异的角度寻找干扰素治疗失败的原因。核心蛋白(core protein)是病毒核衣壳的重要组成部分,与宿主蛋白间存在大量的交互作用,参与调控基因转录表达,影响机体免疫,一直是HCV致病机制和防治的研究热点之一。基础研究表明Core蛋白可与信号传导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)级联通路相互作用,减少干扰素刺激基因(interferon stimulate gene, ISG)转录<sup>[4-5]</sup>,提示核心蛋白在抵抗干扰素疗效的过程中发挥作用。临床研究也报道了Core蛋白第70、91等位点的氨基酸变异在SVR与non-SVR组间存在差异<sup>[6-7]</sup>,尤其在1b型患者,认为70Q/91M变异是产生干扰素无应答反应的独立预测因子<sup>[8]</sup>。而Fusao等<sup>[9]</sup>在Core蛋白第70、91位点分别制造R-Q、L-M的点突变体转染4种肝细胞系后,发现2',5'-OAS启动子活性、mRNA及蛋白表达均增加,但这些ISG的表达水平在各个突变组之间几乎没有差别;Kumthip等<sup>[10]</sup>的研究也认为,至少在1、3型丙肝患者中,不存在与治疗失败相关的Core蛋白氨基酸变异。因此,Core蛋白氨基酸变异与干扰素疗效有无关联仍存在争议。在我国,HCV常见感染型别有1b、2a、3a/3b、6a,分别占据约51.9%、29.4%、8.9%、4.8%的疾病比例<sup>[11]</sup>。本研究回顾性分析4种常见HCV基因型Core蛋白功能区氨基酸替换类型,判断其与干扰素治疗敏感性有无关联。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象与分组

2008年12月至2012年10月在西南医院感染科门诊或住院的慢性丙型肝炎患者108例(病例资料见表1),经HCV CE1区基因序列分析分型;所有患者血清抗HCV阳性(二代ELISA法),治疗前HCV RNA  $>1.0 \times 10^5$  U/mL(荧光定量PCR法),排除甲、乙、丁、戊型病毒性肝炎、人免疫缺陷病毒感染,自身免疫性肝病、恶性肿瘤、精神疾病等。治疗:采用PEG-IFN(92例PEG-IFN  $\alpha$ -2a,16例PEG-IFN  $\alpha$ -2b)联合RBV标准疗法,药物剂量据体质量及不良反应调整。疗程及随访:1b、6a型患者疗

程48周,2、3型患者疗程24周,停药后均完成24周随访。病毒学疗效判定:参照我国2004年丙型肝炎防治指南:①持续病毒学应答(SVR):疗程结束随访6个月时,血清HCV RNA定量小于最低检测限(500 U/mL);②非持续病毒学应答(non-SVR):包括无应答和停药后复发患者。按结局分组:①SVR组,76例;②non-SVR组,32例,其中复发7例。

### 1.2 病毒RNA提取和RT-PCR扩增

取血清140  $\mu$ L, QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)提取病毒RNA。按文献<sup>[10]</sup>合成引物:外侧上游CEF 5'-CTTGTGG-TACTGCCTGATAGG;外侧下游EAP 5'-CGTAGGGGACCAGT-TCATCATCAT;内侧上游CIF 5'-GCCTGATAGGTTGCTT-GCGAGTG;内侧下游IAP 5'-GTTCATCATCATATCCCATGC-CAT。第1轮PCR采用逆转录和热循环一步法进行,25  $\mu$ L反应体系,50  $^{\circ}$ C 60 min 逆转录,94  $^{\circ}$ C 预变性2 min,94  $^{\circ}$ C 30 s;58  $^{\circ}$ C 30 s;72  $^{\circ}$ C 70 s,30个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸15 min。取产物2  $\mu$ L进行第2轮PCR:94  $^{\circ}$ C 30 s;58  $^{\circ}$ C 30 s;72  $^{\circ}$ C 70 s,30个循环后72  $^{\circ}$ C 延伸7 min。目的片段长度约1 000 bp。

### 1.3 核苷酸测序和序列分析

扩增产物采用内侧引物对双向测序,应用DNA Star Laser-gene 7.1-SeqMan程序拼接双向测序结果,引入参考序列定位Core区,译为氨基酸序列并导出。参考序列来自HCV DataBase(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/view.cgi?db=3>),分别为AB049088(1b)、AF139594(1b)、AF356827(1b)、D90208(1b)、AB047639(2a)、AB047641(2a)、AF169004(2a)、D00944(2a)、AF046866(3a)、D17763(3a)、D28917(3a)、D49374(3b)、DQ480524(6a)、Y12083(6a)。序列比对采用MEGA5.0(ClustalW法),.fasta格式导出,用Alignment Format Converter(<http://biotechvana.uv.es/servers/afc/main.php>)转换为MSF格式,应用美国Mount Sinai School of Medicine开发程序MutationMaster([http://cagt.bu.edu/page/MutationMaster\\_about](http://cagt.bu.edu/page/MutationMaster_about))进行氨基酸替换位点及模式分析<sup>[12]</sup>。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件,基线情况及两组间氨基酸变异数目比较采用Mann-Whitney U检验或t检验,氨基酸替换类型的组间差异比较采用Pearson  $\chi^2$ 检验、Fisher's精确检验,位点之间氨基酸替换是否存在一致性采用Spearman相关分析。

## 2 结果

### 2.1 治疗前(基线)情况和治疗应答

108例患者中男性67例(62.04%),女性41例(37.96%),年龄40[12~74(40.87 $\pm$ 12.07)]岁。1b型74例(68.52%),2a型5例(4.63%),3a/3b型18例(16.67%),6a型11例(10.18%)。经检验两组基线时的性别构成、病毒感染水平、肝功能无差异( $P > 0.05$ ),年龄、白细胞数目存在统计学差异( $P$ 值分别为0.017、0.035),见表1。

### 2.2 治疗前Core氨基酸高频替换位点筛选及替换模式相关性分析

采用MutationMaster对108例患者治疗前的HCV Core蛋白氨基酸替换位点及模式分析,发现与优势序列相比,第70、

75、91、106、110、147、187位的氨基酸替换在4种基因型间均存在,且常见替换的发生频率>10%(表2)。对上述7个位点替换的相关分析显示,位点70与位点75、106的氨基酸替换模式呈负性连锁( $P$ 值分别为0.007、0.015),即位点70为Q(non-

Q)时,75为non-T(T),106为non-S(S);而位点75与位点91、106、147、187替换,位点91与位点106、110、147、187替换,位点106与位点110、147、187替换,位点110与位点147、187替换,位点147与位点187替换呈正性连锁( $P < 0.05$ ),见表3。

表1 108例患者基线参数及治疗结局

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	性别 (男/女)	ALT (IU/L)	Alb (g/L)	WBC ( $\times 10^9/mm^3$ )	RBC ( $\times 10^{12}/mm^3$ )	HGB (g/L)	PLT ( $\times 10^9/mm^3$ )	HCV RNA (Log <sub>10</sub> U/mL)
SVR组	76	39.08 ± 11.82	41/28	36(17~113)	45.43 ± 7.14	5.39 ± 2.07	4.40 ± 0.81	135.65 ± 22.42	143.16 ± 70.27	6.87 ± 0.99
non-SVR组	32	45.13 ± 11.76	26/13	56.5(30~89)	45.21 ± 4.52	4.49 ± 1.81	4.11 ± 0.82	131.73 ± 21.75	129.84 ± 62.43	6.53 ± 1.07
<i>P</i>		0.017 <sup>a</sup>	0.456 <sup>b</sup>	0.351 <sup>c</sup>	0.876 <sup>a</sup>	0.035 <sup>a</sup>	0.090 <sup>a</sup>	0.404 <sup>a</sup>	0.355 <sup>a</sup>	0.119 <sup>a</sup>

a: *t* 检验; b: Pearson  $\chi^2$  检验; c: Mann-Whitney U 检验; 偏态分布数据以中位数及四分位数间距表示 [Me(Q<sub>25</sub> ~ Q<sub>75</sub>)]

表2 MutantMaster 分析108条Core序列获得18个氨基酸高频替换位点的相应替换模式及评分

位点	共有序列			替换模式1				替换模式2				替换模式3				替换模式4			
	aa	比例	频数	aa	比例	频数	评分												
4	N	0.75	81	L	0.20	22	-4	I	0.03	3	-4	T	0.01	1	0	Q	0.01	1	0
10	K	0.90	97	Q	0.09	10	1	I	0.01	1	-3								
20	Q	0.91	98	M	0.09	10	0												
36	L	0.86	93	V	0.14	15	0												
70	R	0.60	65	Q	0.31	33	1	H	0.03	3	0	P	0.06	7	-2				
71	P	0.83	90	S	0.10	11	-1	R	0.05	5	-2	T	0.01	1	-2	Q	0.01	1	-2
75	S	0.18	19	T	0.44	48	1	A	0.26	28	1	H	0.09	10	-1	V	0.03	3	-2
91	M	0.47	51	L	0.26	28	2	C	0.24	26	-2	W	0.02	2	-2	I	0.01	1	1
106	S	0.81	87	H	0.10	11	-1	N	0.06	7	0	T	0.03	3	1				
110	T	0.62	67	N	0.23	25	0	S	0.15	16	1								
139	L	0.85	92	V	0.15	16	0												
144	L	0.84	91	V	0.16	17	0												
147	A	0.61	66	V	0.39	42	-1												
149	R	0.89	96	A	0.10	11	-2	K	0.01	1	2								
157	V	0.75	81	A	0.25	27	-1												
162	V	0.81	88	I	0.19	20	3												
182	L	0.88	95	F	0.12	13	0												
187	T	0.16	17	I	0.63	68	-1	H	0.07	8	-2	C	0.06	7	-2	V	0.06	6	0

表3 7个常见位点氨基酸替换模式的相关分析

位点	75	91	106	110	147	187
70						
<i>r</i> 值	-0.258 <sup>b</sup>	0.138	-0.233 <sup>a</sup>	0.022	-0.131	0.051
<i>P</i> 值	0.007	0.156	0.015	0.822	0.178	0.601
75						
<i>r</i> 值	--	0.255 <sup>b</sup>	0.242 <sup>a</sup>	0.148	0.432 <sup>b</sup>	0.286 <sup>b</sup>
<i>P</i> 值	--	0.008	0.011	0.127	0.000	0.003
91						
<i>r</i> 值	--	--	0.277 <sup>b</sup>	0.320 <sup>b</sup>	0.450 <sup>b</sup>	0.533 <sup>b</sup>
<i>P</i> 值	--	--	0.004	0.001	0.000	0.000
106						
<i>r</i> 值	--	--	--	0.339 <sup>b</sup>	0.376 <sup>b</sup>	0.301 <sup>b</sup>
<i>P</i> 值	--	--	--	0.000	0.000	0.002
110						
<i>r</i> 值	--	--	--	--	0.354 <sup>b</sup>	0.388 <sup>b</sup>
<i>P</i> 值	--	--	--	--	0.000	0.000
147						
<i>r</i> 值	--	--	--	--	--	0.489 <sup>b</sup>
<i>P</i> 值	--	--	--	--	--	0.000

a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$

### 2.3 Core 氨基酸替换在两组间的分布差异

对上述18个高频替换位点进行组间分布的差异比较,分析与治疗结局的相关性。发现70位的R/H--Q替换、91位的L/C--M替换、110位的S/N--T替换在2组间存在差

异, $P$ 值分别为0.004、0.039、0.025,类似的差异也存在于1b型患者中(表4)。70Q、91M、110T替换倾向于发生non-SVR,OR值及95%CI分别为0.288(0.120~0.693)、0.413(0.177~0.966)、0.346(0.133~0.896),我们将此类倾向于发生non-SVR的替换定义为“抵抗型”替换,将倾向于发生SVR的替换定义为“敏感型”替换。

### 2.4 Core 氨基酸替换与基线病毒RNA水平的关系

分析上述3个位点氨基酸替换与治疗前HCV RNA水平的差异,发现Core表现为110T的60例1b型患者病毒RNA水平(中位值6.93)显著高于110N/S的14例患者(中位值6.19)( $P = 0.032$ )(图1C),而表现为70Q与70R/H、91M与91L/C的患者治疗基线时的病毒RNA水平无差异( $P$ 值分别为0.153、0.322)(图1A、B)。3个位点中同时表现为 $\geq 2$ 种“抵抗型”替换的46例患者RNA水平(Me = 6.93, IQR: 6.29~7.49)与 $\leq 1$ 个位点“抵抗型”替换的62例患者(Me = 6.93, IQR: 6.02~7.50)无显著差异( $P = 0.528$ )(图1D)。

### 2.5 治疗早期Core氨基酸替换与病毒RNA水平变化

治疗早期(12周内)的病毒动力学分析发现,Core蛋白3个位点中表现为2个以上“抵抗型”替换的患者,第4、8、12周的平均RNA水平均高于仅有单个位点“抵抗型”替换及无替换的患者,第4周时差异更为显著( $P$ 值分别为0.010、1.85E-4),见图2。

表4 Core第70、91、110位氨基酸替换在SVR与non-SVR组间的差异

基因型	位点 <sup>a</sup>	替换类型	SVR (n=76)	non-SVR (n=32)	Pearson $\chi^2$ 值	P值	OR值(95%CI)	r值	P值
纳入队列(4种基因型)	70	Q/non-Q	17/59	16/16	8.103	0.004	0.288(0.120-0.693)	-0.274	0.004
	91	M/non-M	31/45	20/12	4.259	0.039	0.413(0.177-0.966)	-0.199	0.039
	110	T/non-T	42/34	25/7	4.997	0.025	0.346(0.133-0.896)	-0.215	0.025
HCV-1b	70	Q/non-Q	10/42	13/9	11.467	0.001	0.165(0.055-0.492)	-0.394	0.001
	91	M/non-M	29/23	19/3	6.349	0.016	0.199(0.052-0.757)	-0.293	0.011
	110	T/non-T	38/14	22/0	7.305	0.007	0.731(0.620-0.862)	-0.314	0.006

a: 仅列出 P < 0.05 的 3 个位点

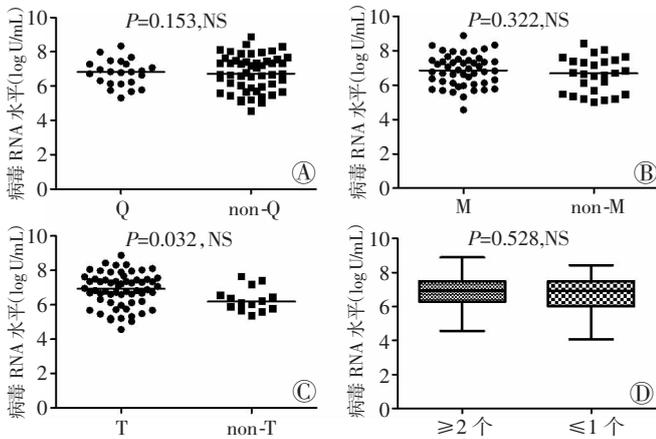


图1 Core蛋白氨基酸替换与治疗基线RNA水平的关系

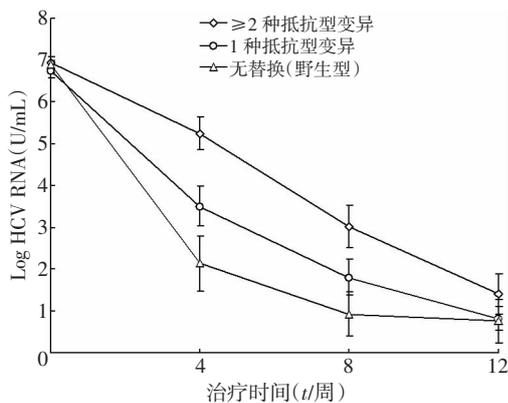


图2 Core蛋白3个位点抵抗型变异的数目与治疗早期HCV RNA下降程度

### 2.6 3个优选预测位点氨基酸替换与Core蛋白功能结构域氨基酸替换数目的关系

结果表明,在70Q的33名患者与70R/H的75名患者之间,Domain I, Domain II及Core蛋白总氨基酸替换数目无明显差异( $P > 0.05$ ) (图3A~C);而Domain I, Domain II及Core蛋白总氨基酸替换数目在91M的51例患者与91L/C的57例患者之间均存在显著差异( $P$ 值分别为0.0014, 0.0012, 0.0003) (图3D~F);在110T的67例患者与110N/S的41例患者之间也存在显著差异( $P$ 值分别为0.002, 0.0006, 0.0001) (图3G~I)。

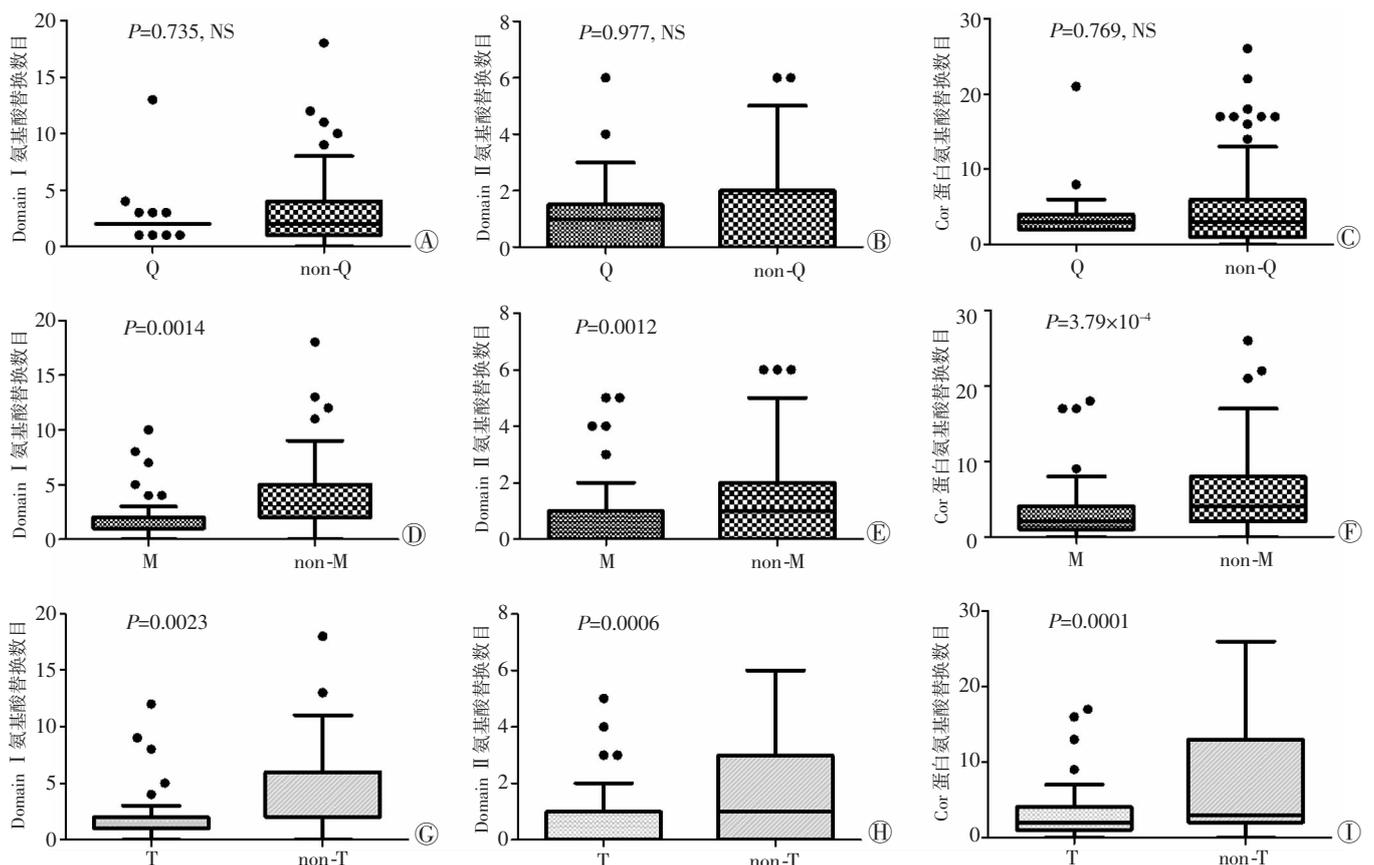
### 3 讨论

核心蛋白与干扰素抵抗的关系是HCV致病机制研究的热点之一。已报道的同类研究数据主要来自于

HCV-1b型的日本患者,尚缺乏其他地区和其他基因型的相关研究,且多数仅分析了单一时间点(通常为治疗起点)的Core蛋白氨基酸序列,不能反映在机体免疫和/或药物压力下病毒的适应性演变。本研究针对我国4种常见基因型HCV Core蛋白的氨基酸替换模式,从基线水平预测及纵向观察RNA变化2个维度探索Core蛋白氨基酸变异与治疗结局的关联。

研究发现Core 70Q、91M、110T替换在一定程度上与干扰素治疗失败相关(表3),这与Akuta等<sup>[6,13-15]</sup>的研究结果较一致。对治疗早期(12周内)的病毒动力学分析结果提示,3个位点中表现为2个以上“抵抗型”替换的患者较之于仅有1个“抵抗型”替换及无“抵抗型”替换的患者血清病毒RNA下降速率更平缓(图2),这与Alestig等<sup>[16]</sup>的研究结果一致,在一定程度上佐证了70Q、91M、110T替换与干扰素治疗失败相关。

70Q、91M、110T替换对治疗应答的潜在影响机制尚未阐明,而相对于单个位点的替换,氨基酸的协同变异对蛋白结构、功能或临床表型的影响可能更为显著。目前尚缺乏关于HCV Core区各个高频替换位点之间的相关性研究,因此本研究分析了7个高频替换位点氨基酸替换之间的相关性。结果显示,7个高频替换位点之间存在广泛的氨基酸替换模式相关性(表2),这与Alestig等<sup>[16]</sup>的观点相反,他们认为70Q、91M变异只是HCV-1b型毒株无特定规律而又频繁发生的事件。我们的前期研究发现HCV-1b型Core蛋白功能结构域II的氨基酸替换率在SVR与non-SVR组间存在差异( $P = 0.020$ ),替换数目为0(与参考序列一致)者,更倾向于发生non-SVR( $r = -0.273, P = 0.019$ ),因此又考量了Core蛋白整体水平、功能结构域Domain I及Domain II水平的残基替换总数与70、91、110三个位点替换之间的关系,发现上述区域各自的替换数目与第91、110位残基替换存在显著关联(图3)。Domain I是富含碱性氨基酸的亲水区,结构不稳定,可与IFN介导的Jak-STAT pathway、PKR pathway, Insulin pathway、TGF  $\beta$  pathway (IJT Network<sup>[17]</sup>)中的分子结合,且存在大量酰胺化、磷酸化修饰位点,是Core蛋白发挥IFN抵抗机制的重要区域。已有报道该区段内



A~C: 功能结构域 I、II 及 Core 蛋白氨基酸替换总数分别在 70Q 与 70R/H 两组间的差异; D~F: 功能结构域 I、II 及 Core 蛋白氨基酸替换总数分别在 91M 与 91L/C 两组间的差异; G~I: 功能结构域 I、II 及 Core 蛋白氨基酸替换总数分别在 110T 与 110N/S 两组间的差异

图3 70、91、110 三个优选位点氨基酸替换与 Core 功能结构域氨基酸替换数目的关系

70、91 位氨基酸替换与 IFN 应答、胰岛素抵抗、脂肪肝、原发性肝癌的发生有关<sup>[18]</sup>。Domain II 是 Core 蛋白疏水氨基酸富集区域, 包含 2 个  $\alpha$  螺旋(H I 和 H II) 及中间的疏水环(H L), 主要与“脂筏”(组装生产感染性病毒颗粒的唯一亚细胞结构)及质膜相关成分结合。Boulant 等<sup>[19]</sup>证实了任何存在于 H I、H II 或 H L 的疏水氨基酸替换成亲水氨基酸均可影响 Core 蛋白与脂滴融合, 使之不能组装成具有感染性的病毒颗粒。Domain II 也可经 PPAR、PI3K-Akt2 通路影响宿主细胞脂质代谢, 引起组织器官脂肪变性。Piodi 等<sup>[20]</sup>发现 L144V、V162I、Y164F 替换更易造成脂质积聚, 尤其是 Y-F 替换, 由于消除了酪氨酸羟基极性而增强了 Core 蛋白与脂滴的结合强度及相互作用稳定性, 使患者更易发生脂肪肝变性。而肥胖、脂肪变又与胰岛素抵抗相互协同, 均不利于患者产生理想的干扰素应答。综上所述, HCV Core 蛋白位点之间存在广泛的替换模式相关性, 且替换类型与其功能结构域的替换数目紧密关联。因此我们推测 70Q、91M、110T 替换可能与本研究未发现的一些低频替换位点发生协同效应, 从而与

治疗反应产生间接关联, 但不排除这些残基替换对治疗反应的直接影响, 因为 70Q、91M、110T 替换同样可能直接影响蛋白的分子构象和功能。由于 Core 蛋白尚无完整晶体的三维结构解析, 以基于计算机辅助的同源建模来解释这些位点变异致干扰素疗效差异的分子机制仍欠缺精细度与准确性, 构建上述位点的不同突变体开展功能实验是阐明其影响干扰素应答潜在机制的可行途径。本研究中 Domain I、Domain II、Core 的替换数目与第 70 位残基替换无明显关联, 推测可能由于 70 位氨基酸替换与一些位点的替换呈负相关关系(表 2), 当功能域区段中其他位点协同表现为“优势关联”表型, 则 70 位氨基酸相应表现为“弱势关联”表型或完全“无作为”, 因而出现无统计意义的结果。此外, 由于样本量的影响, 7 个高频氨基酸替换位点中并未发现其他位点氨基酸替换与治疗结局相关, Core 蛋白功能域中与治疗应答或许相关的其他低频替换位点可能被掩盖和遗漏。

本研究未结合 IL-28B 基因的 SNP 分型等与干扰素疗效有关的宿主因素进行分析, 因为考虑到中国的

慢性 HCV 感染者中 87.8% 表现为应答敏感的 CC 型 (SNP rs12979860), 12.1% 的患者为应答抵抗的 CT 或 TT 基因型, rs8099917 的分布率基本类似<sup>[11]</sup>; 且已有研究表明 IL-28B、ITPA SNP 分型与 Core 蛋白氨基酸变异无关<sup>[16]</sup>。此外, 组间样本量不平衡可能影响统计结果, 基于大宗临床治疗结果, 中国的慢性 HCV 感染者经标准治疗后 SVR 率高达 77%<sup>[21]</sup>, 因此本研究的 SVR 与 non-SVR 组间样本量分布是基本符合实际发生率的。

本研究仅在蛋白质一级结构层面发现某些位点氨基酸变异可作为推断干扰素疗效的预测因子。Kurbanov 等<sup>[22]</sup>的研究认为, Core 区核苷酸同义突变可导致 RNA 二级结构改变, 倾向于产生移码突变的各种截短型 F 蛋白 (ARFP) 准种, 刺激机体产生高滴度抗-F 蛋白抗体, 从而发挥与治疗结局相关的表型效应。进一步分析两组间 Core 区核苷酸的同义替换率是否存在差异, 可从另一角度阐释 Core 蛋白变异与干扰素疗效的关系。

#### 参考文献:

[1] Husa P, Oltman M, Ivanovski L, *et al.* Efficacy and safety of peginterferon  $\alpha$ -2a(40 kD) plus ribavirin among patients with chronic hepatitis C and earlier treatment failure to interferon and ribavirin: an open-label study in central and Eastern Europe[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 23(5): 375-381.

[2] Sherman M, Yoshida E M, Deschenes M, *et al.* Peginterferon alfa-2a (40 kD) plus ribavirin in chronic hepatitis C patients who failed previous interferon therapy[J]. *Gut*, 2006, 55(11): 1631-1638.

[3] Sagir A, Heintges T, Akyazi Z, *et al.* Relapse to prior therapy is the most important factor for the retreatment response in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. *Liver Int*, 2007, 27(7): 954-959.

[4] Heim M H, Moradpour D, Blum H E. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway[J]. *J Virol*, 1999, 73(10): 8469-8475.

[5] Lin W, Kim S S, Yeung E, *et al.* Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain[J]. *J Virol*, 2006, 80(18): 9226-9235.

[6] Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, *et al.* Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C Virus genotype 2a high viral load and virological response to interferon-ribavirin combination therapy[J]. *Intervirology*, 2009, 52(6): 301-309.

[7] Mori N, Imamura M, Kawakami Y, *et al.* Randomized trial of high-dose interferon-alpha-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C: Correlation between amino acid substitutions in the core/NS5A region and virological response to interferon therapy[J]. *J Med Virol*, 2009, 81(4): 640-649.

[8] El-Shamy A, Shoji I, Saito T, *et al.* Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegy-

lated-interferon/ribavirin combination therapy[J]. *Microbiol Immunol*, 2011, 55(6): 418-426.

[9] Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, *et al.* Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- $\alpha$  *in vitro* [J]. *Liver Int*, 2010, 30(9): 1324-1331.

[10] Kumthip K, Pantip C, Chusri P, *et al.* Correlation between mutations in the core and NS5A genes of hepatitis C virus genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and the response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy[J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(4): e117-e125.

[11] 医脉通. [AASLD 2011] 中国丙肝现状及流行病学[EB/OL]. (2011-11-16) [2013-03-04]. [http://news.medlive.cn/all/info-progress/show-33734\\_35.html](http://news.medlive.cn/all/info-progress/show-33734_35.html).

[12] Walewski J L, Gutierrez J A, Branch-Elliman W, *et al.* Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions[J]. *RNA*, 2002, 8(5): 557-571.

[13] Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, *et al.* Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(4): 575-582.

[14] Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, *et al.* Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin[J]. *Hepatology*, 2010, 52(2): 421-429.

[15] Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, *et al.* Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy[J]. *Intervirology*, 2012, 55(3): 231-241.

[16] Alestig E, Arnholm B, Eilard A, *et al.* Core mutations, IL28B polymorphisms and response to peginterferon/ribavirin treatment in Swedish patients with hepatitis C virus genotype 1 infection[J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 124.

[17] de-Chasseay B, Navratil V, Tafforeau L, *et al.* Hepatitis C virus infection protein network[J]. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 230.

[18] Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A. Sequence variability of HCV Core region; important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production[J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(3): 543-556.

[19] Boulant S, Montserret R, Hope R G, *et al.* Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(31): 22236-22247.

[20] Piodi A, Chouteau P, Lerat H, *et al.* Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis[J]. *Hepatology*, 2008, 48(1): 16-27.

[21] 中国日报网. 国内最大规模丙肝调查研究成果公布[EB/OL]. (2011-12-02) [2013-03-04]. [http://www.chinadaily.com.cn/hqsj/hqlw/2011-12-02/content\\_4558478.html](http://www.chinadaily.com.cn/hqsj/hqlw/2011-12-02/content_4558478.html).

[22] Kurbanov F, Tanaka Y, Matsuura K, *et al.* Positive selection of core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin[J]. *J Infect Dis*, 2011, 201(11): 1663-1671.

(收稿:2013-01-29;修回:2013-03-04)

(编辑 王红)