

文章编号:1004-0374(2011)01-0070-07

## 丙型肝炎病毒准种及其临床意义研究进展

何立华<sup>1</sup>, 李 峥<sup>2</sup>, 夏雪山<sup>1\*</sup>

(1 昆明理工大学生命科学与技术学院, 分子病毒学实验室, 昆明 650224; 2 昆明医学院附属昆华医院, 昆明 650032)

**摘要:** 丙型肝炎病毒(HCV)易发生变异, 在宿主体内主要以准种形式存在。HCV 准种能够参与病毒逃避宿主的免疫监控及抗病毒治疗的耐药性, 导致病毒在宿主体内持续存在, 形成慢性感染。该文就 HCV 准种的产生、研究方法、基因组各区段内准种的研究及其临床意义作一综述。

**关键词:** HCV; 准种; 变异

**中图分类号:** R512.63 **文献标识码:** A

### Research progress on hepatitis C virus quasispecies and its clinical significance

HE Li-Hua<sup>1</sup>, LI Zheng<sup>2</sup>, XIA Xue-Shan<sup>1\*</sup>

(1 Laboratory of Molecular Biology, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China; 2 Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

**Abstract:** Hepatitis C virus (HCV), with highly genetic variation, was characterized by the existence of a wide quasispecies distribution within a single infected individual. It was proved HCV quasispecies play an important role in the virus escaping from the host immunosurveillance and the resistance to antiviral therapy, which lead to the chronic virus infection and persistent pathogenicity. Here, we summarized the generation of HCV quasispecies, the research of quasispecies' characters within each gene of HCV genome, and its clinical significance.

**Key words:** HCV; quasispecies; variability

丙型肝炎病毒(HCV)为单股正链RNA病毒, 属黄病毒科, 基因组全长约9.6 kb。HCV 基因易发生变异, 其基因组序列呈高度异质性。根据核酸序列变异程度, HCV 表现为基因型、亚型、准种三个水平的变异。HCV 基因型之间核酸序列约有20%~30% 的差异, 亚型之间序列差异约为10%~20%, 序列差异度小于5% 的毒株称为准种<sup>[1]</sup>。准种是由一种母序列和来自该序列的大量相关突变体所组成的病毒群体。HCV 在宿主体内主要以准种形式出现, 准种在病毒逃避宿主免疫监视、病毒持续感染及抗病毒治疗耐受中具有重要作用<sup>[2]</sup>。在早期HCV 感染中, 准种的变化情况与疾病转归密切相关<sup>[3-5]</sup>。HCV 准种的序列差异分布在基因组各区段内, 如5'UTR、Core、E2、NS2、NS3、NS5A 等, 序

列变异导致病毒产生免疫逃逸和耐药性。因此, HCV 准种在自然病程及抗病毒治疗过程中变化情况备受关注。

#### 1 准种的产生

“准种”最早用于描述地球生命演化, Domingo 在分析QB 群噬菌体克隆的RNA 时发现“准种株”的确存在, 并将此概念引入病毒研究领域, 准种存在

收稿日期: 2010-07-26; 修回日期: 2010-08-30  
基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2009CB522502); 国家自然科学基金项目(C150703); 云南省自然科学基金面上项目(2009CD194)

\* 通讯作者: E-mail: oliverxia2000@yahoo.com.cn

仅限于RNA病毒。HCV病毒复制效率很高,每天新产生病毒颗粒高达 $10^{12}$ 个<sup>[6]</sup>,同时其基因复制需要的关键酶——RNA依赖的RNA聚合酶缺乏校对功能,使病毒复制时核酸极易发生错配,每个复制周期中约 $10^3\sim 10^5$ 个核苷酸中就有1个碱基发生突变<sup>[7]</sup>,从而导致HCV准种的产生。HCV在宿主体内主要以准种形式存在,但准种并非一成不变,而是在免疫监控、药物治疗等环境选择压力下,优势准种一直发生变化。另外,病毒自身遗传漂变(genetic drift)及病毒的重叠感染,也可使准种组成发生变化。

## 2 HCV 准种的研究方法

HCV准种分析有很多方法,每个研究方法都有各自的优劣。目前最常用的方法就是多克隆核酸测序法和单链构象多态性分析法。

### 2.1 多克隆核酸测序分析

多克隆核酸测序法是分析准种多样性最常用的方法,其主要过程为提取病毒基因组,对目的基因进行PCR扩增,将PCR扩增产物连接到质粒载体,转化宿主细菌,挑选多个阳性克隆进行核酸序列测定。HCV准种的研究需要挑取多少个克隆,尚无统一说法。Gretch等<sup>[8]</sup>经对HCV突变频率和熵值分析,认为每个样本应挑选20~100个克隆。挑取20个克隆进行测序,就可获取样本中95%的突变体序列。然而,McCaughan等<sup>[9]</sup>认为,对HCV高变区进行分析,需要对99个克隆进行测序才可以确定95%的突变体。克隆的数目不够,突变数量较小的变异株就可能检测不到,进而忽略了有用的信息。因此,多克隆核酸序列测定分析最重要的还是要确定应选取多少个克隆进行测序,才能足以反映样本相应基因区段的准种情况。

在获得多个克隆的核酸序列后,需要使用相关软件进行生物信息学分析。目前最常用的HCV准种分析软件有MEGA、DNASTar、PHYLIP等。核酸变异可导致同义替换(synonymous substitutions)和非同义替换(nonsynonymous substitutions)两种结果,同义替换的核酸序列改变但编码的氨基酸序列不改变,非同义替换在改变核苷酸序列的同时编码的氨基酸序列也发生改变。每个位点非同义替换与同义替换的比率(dN/dS)是群体正向选择或负向选择的主要指标。dN/dS比值大于1,表示群体被“正向”选择,正向选择导致优势准种发生变化并可相对稳定存在。dN/dS比值小于1,表示群体为“负向”

选择,表明变异主要为同义替换,非同义替换不具有生存优势而容易被取代<sup>[10]</sup>。

### 2.2 单链构象多态性分析(single-strand conformation polymorphism, SSCP)

SSCP是一种基于DNA构象差别来检测点突变的方法。相同长度的单链DNA,如果碱基序列不同,所形成的构象就不同,这样就形成了单链构象多态性。SSCP技术使突变检测方法更加简便、快捷,其基本过程为:PCR扩增目的基因;变性PCR扩增产物,然后快速复性,使之成为具有一定空间结构的单链DNA分子;将单链DNA进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,由于突变所造成的不同构象DNA链所受的阻力不同,迁移速度不一;最后通过硝酸银、溴化乙锭染色,根据条带数目,确定准种复杂性。Vera-Otarola等<sup>[11]</sup>的研究将电泳条带进行同位素标记、Southern杂交或染色观察,单个核酸的变化也能检测出来,电泳条带的数目可很好的反映样本中HCV准种数目。

SSCP技术是评价准种复杂性的一种比较方便的方法,通过观察电泳条带可推测准种复杂程度,但准种突变的具体位点不能确定,还需要通过对电泳条带进行片段回收,并通过序列测定,才能最终确定突变位点。因此,目前常将SSCP和核酸序列测定法结合,既能初步判断HCV准种的数目,又能确定核酸的突变位点。

### 2.3 异源双链凝胶泳动分析(heteroduplex gel shift assays)

异源双链凝胶泳动分析类似于SSCP,可分为异源双链追踪检测法<sup>[12]</sup>(heteroduplex tracking assay, HTA)和克隆频率分析法(clonal frequency analysis, CFA)两种类型。用异源双链凝胶泳动分析方法检测HCV准种,首先需要提取病毒RNA作为模板进行PCR扩增,然后用放射性标记的探针进行杂交。在HTA分析中,标记的探针与PCR扩增产物杂交,形成异源双链产物,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙锭染色。由于突变型和野生型DNA链间错配或未配对碱基所产生的泡状结构或突起,其在凝胶的迁移速度不一,产生不同的电泳条带,条带数目反映了准种复杂程度。在CFA检测中,PCR产物需要克隆到质粒中,阳性克隆质粒与探针杂交产生异源双链产物,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,最后再根据电泳条带分析准种情况。通过测量异源双链核酸分子的迁移比率(heteroduplex mobility ratio, HMR)可

以计算准种遗传距离,并得出种群遗传多样性的平均值。异源双链凝胶泳动分析通过对聚丙烯酰胺凝胶中异源双链片段分布多少来估计基因变异率,即准种的复杂性,并根据各异源双链带与同源双链带之间的距离和各异源双链带之间的距离来判定准种内各病毒株之间的异质性。因此,异源双链凝胶泳动分析被认为是检测准种复杂性及异质性最简便的方法。

#### 2.4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱是近年来发展起来的一种新型的生物质谱方法。MALDI的工作原理是用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量传递给生物分子,而电离过程中将质子转移到生物分子或从生物分子得到质子,而使生物分子电离的过程。TOF的原理是离子在电场作用下加速飞过飞行管道,离子的质荷比(M/Z)与其飞行时间成正比,根据不同离子到达检测器的飞行时间不同,达到检测离子的目的。

利用此方法分析HCV准种时,首先要提取基因组RNA进行RT-PCR扩增[RT-PCR扩增的上游引物包含一个启动子序列和标记(Flag)序列,下游引物加入终止密码子序列],然后以PCR产物为模板,进行体外的转录和翻译。合成的带标记的多肽首先经MALDI解离为离子信号,最后经TOF分析确定其氨基酸序列。这种分析方法相对于多克隆片段测序来说,比较便宜和快速<sup>[13-15]</sup>。与其他准种分析的快速方法,如SSCP和异源双链泳动相比,MALDI-TOF法能够准确测得目的片段中氨基酸的组成,从这些信息中还可以推导出有关的同义突变。

### 3 HCV基因组各区段准种研究现状

几乎HCV基因组的每个区段都存在准种序列差异,各基因区段的相关位点的变异为病毒在宿主选择压力下的持续感染提供了可能,目前对HCV准种的研究主要集中于以下区域。

#### 3.1 5'非编码区(5'UTR)

5'UTR区由319~341个核苷酸组成,是HCV最保守的区段。5'UTR区的内部核糖体进入位点(IRES),与病毒RNA翻译和病毒复制速度直接相关。Soler等<sup>[5]</sup>利用克隆核酸测序法,对6个经 $\alpha$ -IFN治疗的HCV患者的5'UTR区进行了准种分析,发现

在干扰素治疗前后5'UTR区的准种没有显著差异。但是,在混合型(2a/1b,3a/1b)感染患者中,干扰素治疗后其中的一个准种株消失,并且发现IRES序列的准种分布在抗HCV的干扰素治疗中起作用。Vera-Otarola等<sup>[16]</sup>对45位未经治疗的慢性丙型肝炎患者的血浆及外周血淋巴细胞中HCV基因组的5'UTR区进行准种分析,发现在这两种组织中HCV 5'UTR区都以准种形式存在,而且有56.7%的患者的HCV准种株在这两种组分中发生了隔离,即在血浆及外周血淋巴细胞中HCV 5'UTR区准种不同。

#### 3.2 Core区

丙型肝炎病毒Core区基因编码的核心蛋白除维持病毒外形,还有一定的免疫调节功能,是细胞免疫的主要识别位点,在HCV致病过程中起着重要作用。Ray等<sup>[17]</sup>研究发现,Core蛋白可能是HCV的致癌因素之一,对Core区的准种研究有助于了解HCV的发病机理。Hayashi等<sup>[18]</sup>对HCV慢性感染者Core区的准种变化进行研究,发现肝功能正常者Core区变异率较低且多为同义突变,肝功能异常者突变率高,因而认为Core区变异与肝功能的异常有关。Christie等<sup>[19]</sup>对6例慢性HCV感染者进行研究,其中包括3例免疫缺陷者和3例免疫正常感染者,分别在两个时间点对HCV Core区进行测序,发现随着病程的进展,Core区的准种多样性增加了,基因的突变率也高于预期。

#### 3.3 E2区

E2区准种的研究主要集中在高变1区(high variation region 1, HVR1),高变1区是编码囊膜蛋白氨基端的27个氨基酸,其中第27个氨基酸的变异性最大。该蛋白区段是机体对HCV的细胞免疫和体液免疫应答主要靶位点,对HVR1区的准种研究有助于了解HCV病毒免疫逃逸的分子机制。Alfonso等<sup>[20]</sup>对12例干扰素治疗无应答的慢性丙肝感染者的高变1区进行了测序,发现患者治疗前后HVR1区存在不同的准种,其中3个患者在治疗前病毒准种复杂性随着选择压力变化而变化,一旦环境趋于稳定,准种的组成也相对稳定。E2中高变1区的准种演变是由不同的病毒突变株被选择的结果,而非源于自然突变连续积累。López-Labrador等<sup>[21]</sup>通过多克隆测序对340例HIV/HCV共感染者HVR1区准种的变化情况进行了研究,发现HCV准种的复杂性和多样性降低了,dN/dS的比率下降了。穆锦江和祁勇<sup>[22]</sup>利用异源双链泳动技术研究在

干扰素治疗压力下,慢性丙型肝炎患者体内HVR1区的准种多样性及动态变化,发现患者无论对干扰素应答情况如何,其体内HCV准种的数量没有明显变化,但治疗无效者体内HCV准种的异质性发生了明显改变;治疗前,占支配地位的准种株群在不同感染者体内的比例并不相同,随着抗病毒治疗的进行,不断有新的异质性程度更高的准种株出现,打破原有的平衡,从而认为慢性HCV患者对干扰素治疗有无应答取决于变异株的异质性程度,而不是变异株数量。

### 3.4 NS2区

其他基因区段HCV准种变化的特点逐渐被了解,但由于NS2蛋白是一个强疏水性蛋白,对它的功能了解还不多,对HCV NS2区准种情况很少关注<sup>[23]</sup>。冷彦等<sup>[24]</sup>利用逆转录-巢式PCR从1份慢性HCV感染者的阳性血清及1份丙型肝炎患者的血清中获得NS2区DNA片段,克隆到T载体,随机挑取5个阳性克隆进行序列测定。结果显示,这两个患者NS2区在核苷酸水平和氨基酸水平上的变异互不相同,慢性丙型肝炎患者氨基酸变异主要集中在N端。从选择的两例感染者的NS2区序列看,不同临床类型的HCV患者体内的HCV准种在NS2区存在差异,这种差异可能与病毒存在于机体的状态相关,即NS2区的准种的变化与患者的病情有关,慢性丙型肝炎感染者准种差异比急性感染者大。

### 3.5 NS3区

NS3区准种的研究主要集中在N端的丝氨酸蛋白酶区域,此区域变异对其发挥蛋白酶作用有一定的影响。Winters等<sup>[25]</sup>分别对感染1a、1b、2a和3a型HCV的HIV/HCV共同感染者的HCV丝氨酸蛋白酶区域进行了克隆变异分析,发现基因型内核酸和氨基酸变异水平不同,但这种不同在基因型间无明显差异,而1a型患者中的核酸变异明显高于其他基因型,丝氨酸蛋白酶区域的准种变化还可能影响以蛋白酶为靶点药物的治疗效果。NS3区存在多个CTL免疫表位,此区变异导致准种多样性可使病毒逃逸细胞免疫监控,使病毒建立持续感染。NS3区的某些抗原表位还可以促进IL-2、IL-10的分泌,Wang和Eckels<sup>[26]</sup>对HCV患者的NS3 358~375(诱生IL-2)区域和NS3 505~521(诱生IL-10)区域变异进行研究,发现这两个表位都有明显序列变异,且出现不同的准种形式,对这两个区域的功能进一步研究,发现NS3 358~375和NS3 505~521变异株不能

刺激T细胞增殖,可能使病毒获得了免疫逃逸能力。

### 3.6 NS5A区

NS5A蛋白C末端(2220~2248 aa)的一段序列称为干扰素敏感性决定区(ISDR),它与干扰素治疗反应性相关,此区准种变化可能对病毒的持续感染和抗病毒治疗有影响。为了确定聚乙二醇干扰素(PEG-IFN $\alpha$ )和利巴韦林联合治疗前NS5A区的准种变化是否与治疗效果有关,Jardim等<sup>[27]</sup>对11名感染HCV1型的患者治疗前的NS5A区全长的163个克隆进行了测序,发现丙型肝炎病毒在治疗前NS5A区的平均突变量与治疗结果没有显著相关性。对NS5A区进一步分析,发现任何氨基酸位点的突变都与治疗应答无关,且突变集中在ISDR下游,主要在V3区。患者样本中准种遗传距离值小的核苷酸和氨基酸突变数目也少,但在治疗结束时出现复杂的基因异质形式。这些结果表明,对大量样本的NS5A区进行分子病毒学分析可能有助于抗HCV治疗耐药性机制的研究。

### 3.7 3'非编码区(3'UTR)

3'UTR区对HCV复制起着关键性作用<sup>[28,29]</sup>,而此区准种的研究很少报道。秦兆习等<sup>[30]</sup>为探讨丙型肝炎病毒3'UTR区的准种特性,对6例1b型HCV感染者,采用RT-PCR法扩增出约400 bp的3'UTR区基因片段,每例选取12~15个克隆进行测序,发现各克隆中序列变异位点主要分布于高变区、Poly(U/C)区,认为在丙型肝炎病毒3'UTR区存在复杂的准种特性,可能影响病毒的复制效率。

## 4 HCV准种特性的临床意义

### 4.1 准种与病毒持续感染

由于HCV高度变异,使抗原表位发生变化,导致病毒逃避宿主免疫系统的监控,从而建立慢性感染<sup>[31-33]</sup>。由输血引起的丙型肝炎患者急性感染期的准种情况直接决定病毒能否建立感染,而慢性感染过程的发展却与准种进化有关<sup>[14]</sup>。感染窗口期样本的准种复杂程度越低,HCV病毒越容易被自身免疫清除<sup>[14]</sup>。HCV感染由急性到慢性的过程中,HVR1区准种复杂程度提高了<sup>[13]</sup>。肝脏移植后HVR1区准种复杂性和多样性比肝脏移植前明显降低,表明移植器官生长所需要的免疫抑制可能降低了突变的产生<sup>[34,35]</sup>。严重免疫缺陷的HCV/HIV共感染患者中,HCV准种复杂性明显低于免疫健全的HCV单独感染者,免疫缺陷也能够降低准种多样性<sup>[36]</sup>。

在HCV慢性感染过程中,感染时间、年龄,HIV和HBV等病原体共感染,以及酗酒等很多种因素,都可能影响肝脏疾病的进程<sup>[37]</sup>。HCV准种多样性及复杂性与肝脏损伤、肝硬化和肝细胞癌的过程有较大相关性<sup>[38-41]</sup>。Rothman等<sup>[42]</sup>发现,HVR1区的准种复杂性与ALT水平有关,而ALT水平是肝脏损伤功能代偿的重要指标。而Farci等<sup>[13]</sup>通过研究丙型肝炎儿童,发现在急性感染期HVR1区的准种复杂性与ALT水平没有显著相关性,反而ALT水平与准种的复杂程度降低有关。尽管如此,HCV准种复杂性已被认为是预测病毒是否建立持续感染、病毒致病程度及病程进展的重要指标。

#### 4.2 准种与药物治疗应答

丙型肝炎病毒准种变化对药物治疗反应性都有很大影响。目前,丙型肝炎的最佳治疗方法是聚乙二醇IFN $\alpha$ —利巴韦林联合疗法,但只有42%~52%的1型HCV感染的患者以及76%~84%的2型和3型HCV感染的患者对治疗有持续性应答<sup>[43-45]</sup>。随着长效干扰素的使用,该疗法的治疗有效性得到一定的提高,但仍有接近50%的患者对治疗不敏感或无反应<sup>[46]</sup>。药物提供的选择压力可促使病毒发生准种变化,准种复杂性与干扰素治疗有效性密切相关。Salmeron等<sup>[47]</sup>研究表明,治疗前的准种复杂程度低的患者对治疗的持续病毒学应答率较高,但准种构成没有变化的患者也会治疗失败<sup>[48]</sup>。HCV准种的存在能够降低IFN的治疗效果<sup>[49]</sup>,HCV的HVR1区准种复杂程度高的慢性患者治疗容易失败<sup>[49-53]</sup>,而NS5A区基因的干扰素治疗敏感决定区(ISDR)的准种变化直接导致干扰素治疗不反应<sup>[54-56]</sup>。

#### 5 结语

HCV整个基因组内都存在变异,因而能够逃避宿主的免疫监控和清除,HCV慢性感染就是HCV准种产生的速度大于宿主免疫清除的能力的过程。HCV感染后,中和抗体针对HCV囊膜蛋白发挥作用,而HCV Core区、包膜区、NS3区、NS4区、NS5区都存在CTL抗原表位,能够被细胞免疫应答识别,但由于这些抗原表位突变产生复杂的准种,使得病毒逃逸免疫监控,在体内持续存在。同时,药物选择压力导致准种组成发生变化,而准种的存在状况又直接影响药物治疗反应性。因此,需要更深入的研究HCV准种产生机制及其与免疫监控及药物疗效的关系,以治疗、预防丙型肝炎感染。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bukh J, Miller RH, Purcell RH, et al. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis*, 1995, 15(1): 41-63
- [2] Poyak SJ, McArdle S, Liu SL, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitive-determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol*, 1998, 72(5): 4288-96
- [3] Curran R, Jameson CL, Craggs JK, et al. Evolutionary trends of the first hypervariable region of the hepatitis C virus E2 protein in individuals with differing liver disease severity. *J Gen Virol*, 2002, 83(1): 11-23
- [4] Duffy M, Salemi M, Sheehy N, et al. Comparative rates of nucleotide sequence variation in the hypervariable region of E1/E2 and the NS5b region of hepatitis C virus in patients with a spectrum of liver disease resulting from a common source of infection. *Virology*, 2002, 301(2): 354-64
- [5] Soler M, Pellerin M, Malnou CE, et al. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5'-noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-therapy. *Virology*, 2002, 298(1): 160-73
- [6] Nitkiewicz J. Chronic hepatitis C infection-mechanisms of virus "immune escape". *Przegl Epidemiol*, 2004, 58(3): 423-33
- [7] Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 23(96): 13910-3
- [8] Gretch DR, Polyak SJ. The quasispecies nature of hepatitis C virus: research methods and biological implications[C]. *Proceedings of the Hepatitis C virus GEMHEP Conference*, John Libbey Eurotext, Paris, France, 1997: 57-69
- [9] McCaughan GW, Laskus T, Vargas HE. Hepatitis C virus quasispecies: misunderstood and mistreated? *Liver Transpl*, 2003, 9(10): 1048-52
- [10] Rocha EP, Smith JM, Hurst LD, et al. Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes. *J Biol*, 2006, 239(2): 226-35
- [11] Vera-Otarola J, Barría MI, León U, et al. Is single-strand conformation polymorphism analysis of the full 5' untranslated region an adequate approach to study Hepatitis C virus quasispecies distribution? *J Virol*, 2009, 9(83): 9018-21
- [12] Garcí a F Jr, Garcí a F, Bernal MC, et al. Genomic variability of hepatitis G virus/GBV-C at the NS3 region: clinical implication. *Microbios*, 2000, 102(401): 17-25
- [13] Farci P, Quinti I, Farci S, et al. Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(22): 8475-80
- [14] Farci P, Strazzera R, Alter HJ, et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 3081-6
- [15] Yea C, Bukh J, Ayers M, et al. Monitoring of hepatitis C virus quasispecies in chronic infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrom-

- etry mutation detection. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(3): 1053-7
- [16] Vera-Otarola J, Barría MI, León U, et al. Hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cells of treatment naive chronically infected patients. *J Viral Hepat*, 2009, 16(9): 633-43
- [17] Ray BR, Meyer K, Ray R, et al. Suppression of apoptotic cell death by Hepatitis C virus core protein. *Virology*, 1996, 226(2): 176-82
- [18] Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, et al. Hepatitis C viral quasispecies and liver damage in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 1997, 25(3): 697-701
- [19] Christie JM, Chapel H, Chapman RW, et al. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. *Hepatology*, 1999, 30(4): 1037-44
- [20] Alfonso V, Flichman DM, Sookoian S, et al. Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt1): 39-46
- [21] López-Labrador FX, Dove L, Hui CK, et al. Trends for genetic variation of hepatitis C virus quasispecies in human immunodeficiency virus-1 coinfecting patients. *Virus Res*, 2007, 30(12): 285-91
- [22] 穆锦江, 祁勇. 慢性丙型肝炎患者 HCV 准种变异研究. *哈尔滨医科大学学报*, 2008, 42(1): 75-7
- [23] Zhang ZX, Chen M, Sönnnerborg A, et al. Antigenic structure of the complete nonstructural (NS) 2 and 5 proteins of hepatitis C virus (HCV) anti-HCV NS2 and NS5 antibody reactivities in relation to HCV serotype, presence of HCV RNA and acute HCV infection. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994, 1(3): 290-4
- [24] 冷彦, 陈秀珠, 杜勇, 等. 丙型肝炎病毒准种在 NS2 区的变异状况初探. *中国病毒学*, 2001, 16(3): 215-9
- [25] Winters MA, Welles SL, Holodniy M. Hepatitis C virus protease gene diversity in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. *J Virol*, 2006, 80(8): 4196-9
- [26] Wang H, Eckels DD. Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. *J Immunol*, 1999, 169(2): 4177-83
- [27] Jardim AC, Yamasaki LH, de Queiróz AT, et al. Quasispecies of hepatitis C virus genotype 1 and treatment outcome with Peginterferon and Ribavirin. *Infect Genet Evol*, 2009, 9(4): 689-98
- [28] 秦兆习, 丛旭, 蒋栋, 等. 中国大陆 1b 型丙型肝炎病毒 3' 非编码区序列变异研究. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(6): 469-70
- [29] Friebe P, Boudet J, Simorre JP, et al. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol*, 2005, 79(1): 380-92
- [30] 秦兆习, 张光彩, 魏来, 等. 丙型肝炎病毒 3' 非编码区准种研究. *中国临床医生*, 2005, 7(12): 1598-600
- [31] Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 1999, 10(4): 439-49
- [32] Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, et al. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 2001, 15(6): 883-95
- [33] Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, et al. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med*, 2004, 200(12): 1593-604
- [34] Farci P, Strazzera R, Alter HJ, et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 3081-6
- [35] Schvoerer E, Soulier E, Royer C, et al. Early evolution of hepatitis C virus (HCV) quasispecies after liver transplant for HCV-related disease. *J Infect Dis*, 2007, 196(4): 528-36
- [36] Canobio S, Guilbert CM, Troesch M, et al. Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasispecies evolution in children vertically co-infected with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9): 4365-9
- [37] Domingo E, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res*, 2007, 127(2): 131-50
- [38] Arenas JJ, Gallegos-Orozco JF, Laskus T, et al. Hepatitis C virus quasispecies dynamics predict progression of fibrosis after liver transplantation. *J Infect Dis*, 2004, 189(11): 2037-46
- [39] Canobio S, Guilbert CM, Troesch M, et al. Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasispecies evolution in children vertically coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9): 436-69
- [40] Qin H, Shire NJ, Keenan ED, et al. HCV quasispecies evolution: association with progression to end-stage liver disease in hemophiliacs infected with HCV or HCV/HIV. *Blood*, 2005, 105(2): 533-41
- [41] Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, et al. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? *J Viral Hepat*, 2007, 14(2): 96-106
- [42] Rothman AL, Morishima C, Bonkovsky HL, et al. Associations among clinical, immunological, and viral quasispecies measurements in advanced chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2005, 41(3): 617-25
- [43] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2002, 347(13): 975-82
- [44] Pawlotsky JM. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis*, 2003, 16(6): 587-92
- [45] Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon- $\alpha$ 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*, 2004, 140(5): 346-55
- [46] Wedemeyer H, Wiegand J, Cornberg M, et al. Polyethylene glycol-interferon: current status in hepatitis C virus therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(Sup3): 344-50
- [47] Salmeron J, Casado J, Rueda PM, et al. Quasispecies as

- predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype1, treated with peginterferon-ribavirin. *J Clin Virol*, 2008, 41(4): 264-9
- [48] Quesnel-Vallieres M, Lemay M, Lapointe N, et al. HCV quasispecies evolution during treatment with interferon alfa-2b and ribavirin in two children coinfectd with HCV and HIV-1. *J Clin Virol*, 2008, 43(2): 236-40
- [49] Pellerin M, Lopez-Aguirre Y, Penin F, et al. Hepatitis C virus quasispecies variability modulates nonstructural protein 5A transcriptional activation, pointing to cellular compartmentalization of virus-host interactions. *J Virol*, 2004, 78(9): 4617-27
- [50] Abbate I, Lo Iacono O, Di Stefano R, et al. HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *J Hepatol*, 2004, 40(5): 831-6
- [51] Chambers TJ, Fan X, Droll DA, et al. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*, 2005, 79(5): 3071-83
- [52] Kumar D, Malik A, Asim M, et al. Response of combination therapy on viral load and disease severity in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(4): 1107-13
- [53] Moreau I, Levis J, Crosbie O, et al. Correlation between pre-treatment quasispecies complexity and treatment outcome in chronic HCV genotype 3a. *Virol J*, 2008, 5: 78
- [54] Nousbaum J, Polyak SJ, Ray SC, et al. Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J Virol*, 2000, 74(19): 9028-38
- [55] Puig-Basagoiti F, Fornis X, Furciã I, et al. Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and nonresponder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gen Virol*, 2005, 86 (Pt4): 1067-75
- [56] Veillon P, Payan C, 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 Gastroenterol*, 2007, 13(8): 1195-203