

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.002

不良结局家族聚集性乙型肝炎病毒感染者 HBV 基因型/亚型及前 C/C 启动子区变异特征分析

胡章勇, 杨 军, 陈 骥, 夏绍碧, 邓 兰, 王亚莉

(成都医学院第一附属医院感染科, 成都 610500)

【摘 要】目的: 分析不良结局家族聚集性乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染者 HBV 基因亚型和前 C/C 启动子(Core promoter, CP)区变异特征。方法: 选择 101 名不良结局家族聚集性 HBV 感染者为实验组, 92 名无明显家族聚集性的慢性 HBV 感染者作对照, 用巢氏 PCR 及直接测序法检测基因亚型及前 C/CP 区变异位点, 比较实验组和对照组的不同基因亚型构成比率及前 C/CP 区核苷酸变异频率, 分析实验组 HBV 基因亚型及热点变异与临床疾病谱的关系。结果: 在实验组和对照组中, Ba 均为优势基因亚型, 其次为 C2、C1 亚型, 仅在实验组检测出 1 例 Bj 亚型。C 基因型在实验组中构成比率显著高于对照组 ($P < 0.01$); 实验组 83.3% (5/6) 感染 C1 基因亚型的患者发生肝硬化和(或)肝癌(Liver cirrhosis/hepatocellular carcinoma, LC/HCC), 明显高于 Ba (29.9%, $P < 0.01$) 和 C2 亚型 (11.8%, $P < 0.01$); 各位点变异频率在 2 组中无明显差异 ($P > 0.05$); 实验组 17 个位点发生变异, 其中 A1752、A1775、G1899 位点变异在无症状 HBV 携带者(Asymptomatic carriers, ASC)、慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)、慢性重型乙型肝炎(Chronic severe hepatitis B, CSHB)及 LC/HCC 组间分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 随着病情加重, T1753、A1762、G1764、A1846、G1896 位点变异率在 ASC、CHB、CSHB 和 LC/HCC 组中呈逐渐增加的趋势。LC/HCC 组 A1762T/G1764A 双突变率及 A1762T/G1764A/1896A 三联变异率显著高于 ASC 组 ($P < 0.01$)。结论: 本地区, 不良结局家族聚集性 HBV 感染者 C 基因型患者构成比率增加, C1 基因亚型及前 C/CP 区多个位点变异可能与慢性 HBV 感染者不良结局相关。

【关键词】乙型肝炎病毒; 基因型/亚型; 变异; 家族聚集感染

【中国图书分类法分类号】R512.6+2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-06

Characteristics of HBV genotype/subgenotype and mutations in precore/core promoter region in patients suffering from family clustering HBV infection with unfavorable prognosis

HU Zhangyong, YANG Jun, CHEN Ji, XIA Shaobi, DENG Lan, WANG Yali

(Department of Infection, the First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College)

【Abstract】Objective: To study the characteristics of HBV genotype/subgenotype and mutations in precore/core promoter (CP) region in chronic HBV-infected patients suffering from HBV clustering infection families with unfavorable prognosis and to analyze its correlation with the outcome of HBV infection. Methods: A total of 101 family clustering chronic HBV infected patients with unfavorable prognosis were enrolled in this study, including 31 cases of asymptomatic carriers (ASC), 27 cases of chronic hepatitis B (CHB), 13 cases of chronic severe hepatitis B (CSHB), 30 cases of liver cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma (LC/HCC) and 92 CHB patients without family assemble features were taken as control group. HBV genotype/subgenotypes and mutations in precore/CP region of all samples were determined by nested-PCR combined with direct nucleotide sequence analysis. Results: Subgenotype Ba was predominant in both experimental group and control group, followed by C2 and C1, only 1 subgenotype Bj was detected in experimental group. The prevalence of genotype C was dramatically higher and Ba was significant lower in experimental group than in control group ($P < 0.001$). In addition, patients infected with subgenotype C1 had higher prevalence of (LC/HCC) than patients infected with subgenotype Ba or C2 (83.3% vs. 29.9%, 11.8%, $P < 0.001$). There was no significant difference in the frequency of mutations in pre-core/CP region between the two groups. In experimental group, substitution mutations were detected at 17 sites, the variation rate in A1752, A1775, G1899 was not statistically different among ASC, CHB, CSHB and LC/HCC groups, while the prevalence of mutations in T1753, A1762, G1764, A1846, G1896 showed a trend of gradual increase along with diseases progression. In LC/HCC group, the frequencies of A1762T/G1764A double mutants and A1762T/G1764A/G1896A triple mutants were 73.3% and 36.7% respectively,

作者介绍: 胡章勇 (1971-), 男, 副教授, 在读博士,

研究方向: 乙型肝炎基础与临床。

通信作者: 杨 军, 女, 副教授, Email: yangyi8166@163.com。

基金项目: 四川省卫生厅资助项目 (编号: 090113)。

obviously higher than those in ASC (22.6%, 9.7%, $P < 0.01$) and CHB group (29.6%, $P < 0.05$). Conclusions: The patients in experimental group show dramatically increased prevalence of genotype C infection. Subgenotype C1 and multiple-site muta-

tions in precore/CP region may be associated with the poor prognosis after HBV infection.

【Key words】hepatitis B virus; genotype/subgenotype; mutation; family clustering

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染后的转归由病毒、宿主基因及免疫因素决定,其中病毒因素又包括病毒载量、基因型/亚型、关键位点的变异等^[1,2]。本文通过分析不良结局家族聚集性慢性 HBV 感染者 HBV 基因亚型分布和前 C/C 启动子(Core promoter, CP)区的变异特征,以期从病毒因素角度探讨部分家族聚集性 HBV 感染者出现不良临床结局的成因。

1 材料与方法

1.1 研究对象

101 例病史资料完整的不良结局家族聚集性慢性 HBV 感染者为 2009 年 9 月-2010 年 7 月期间成都医学院第一附属医院感染科住院或门诊患者,其中慢性 HBV 携带者(Asymptomatic carriers, ASC)31 例,慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)27 例,慢性重型乙型肝炎(Chronic severe hepatitis B, CSHB)13 例,肝硬化和/或肝癌(Liver cirrhosis/hepatocellular carcinoma, LC/HCC)30 例。诊断标准:不良结局家族聚集性 HBV 感染标准:家族连续 3 代人中有乙肝病史,且至少 1 代人中 1 人以上有 LC 或 HCC,除外基因亚型和前 C/CP 区变异检测失败的病例。另选择同期就诊的所有病史资料完整且无明显家族聚集性 HBV 感染者 92 例作对照组,其中 ASC 25 例,CHB 25 例,CSHB 13 例,LC/HCC 29 例。所有病例诊断均符合 2005 年《乙型肝炎防治指南》,此前均未行核苷类似物、干扰素抗病毒治疗和免疫调节治疗,排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒感染及酒精、药物和自身免疫性肝病所导致的肝功能损害。

1.2 血清标志物检测

用 ELISA 方法检测乙肝两对半。

1.3 HBV DNA 定量

HBV DNA 定量检测在美国伯乐实时荧光扩增系统上进行,试剂盒由上海科华公司提供,检测参考限为 1×10^3 拷贝/ml。

1.4 HBV 基因分型

取待检血清 200 μ l,用 QIAGEN 公司的血清抽提试剂盒(QIAmp DNA Blood Mini Kit)提取 HBV DNA,按试剂盒操作说明进行,用 50 μ l Buffer AE 洗脱,离心所得 HBV DNA 直接用于 PCR 扩增模板。

HBV 基因分型用 S 基因区的序列。取 3 μ l 抽提的 DNA,先用 1 对外引物 PS1(5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3')和 PS2(5'-CGGGCAACGGGTAAAGGTTTC-3')各 50 pmol 进行第 1 轮 PCR 扩增,反应总体积为 30 μ l,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,后 94 $^{\circ}$ C 25 s、55 $^{\circ}$ C 25 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,共循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产物 4 μ l,用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳,第 1 轮阳性的 PCR 产物直接用引物 PS4(5'-GCGGGGTTTTTCTTGTGAC-3')进行测序,若为阴性则

行巢式 PCR 扩增,所用引物为 PS1 和 PS3(5'-ATACCCAAA-GACAAAAGAAAA-3'),反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,后 94 $^{\circ}$ C 25 s、55 $^{\circ}$ C 25 s、72 $^{\circ}$ C 40 s,共循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,反应总体积为 30 μ l。扩增阳性产物直接用引物 PS4 进行测序。

1.5 HBV 前 C/CP 区扩增

HBV 前 C/CP 区序列的扩增用于分析该区不同位点的变异情况。取 3 μ l 抽提的 DNA,先用 1 对外引物 PC1(5'-CA-TGGAGACCACCGTGAACGC-3')和 PC2(5'-TGATAAGATA-GGGGCATTG-3')各 50 pmol 进行第 1 轮 PCR 扩增,反应总体积为 30 μ l,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,后 94 $^{\circ}$ C 25 s、55 $^{\circ}$ C 25 s、72 $^{\circ}$ C 50 s,共循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取第 1 轮扩增产物 2 μ l,用引物 PC1 和 PC3(5'-GGAGTGC-GAATCCACACTCC-3')进行半巢式 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,后 94 $^{\circ}$ C 25 s、55 $^{\circ}$ C 25 s、72 $^{\circ}$ C 40 s,共循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,反应总体积为 30 μ l,PCR 阳性产物用引物 PC3 进行测序。

1.6 测序结果的比对分析

测序结果用 DNASTAR 处理,并与 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中的 A~H 8 种 HBV 基因型参考序列进行比较,进化树分析用 MEGA 4.0。

1.7 统计分析

用 SPSS 19.0 统计软件统计资料,率的比较用 χ^2 检验,计量资料的比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组和对照组一般资料比较

不良结局家族聚集性 HBV 感染者男性占 57.4%,平均年龄(38.8 ± 11.7)岁,平均病程(8.9 ± 5.6)年;对照组男性 63.0%,平均年龄(37.5 ± 9.9)岁,平均病程(9.2 ± 4.9)年。2 组患者比较,性别构成($Fisher \chi^2$ 检验值 0.634, $P = 0.426$)、平均年龄($t = 0.932$, $P = 0.353$)和病程($t = 0.404$, $P = 0.686$)差异均无统计学意义。

2.2 实验组与对照组 HBV 基因亚型构成比率的比较

实验组和对照组均以 Ba 为优势基因亚型,其次为 C2、C1 亚型,仅检测出 1 例 Bj 亚型。C 基因型在实验组中的比率显著高于对照组($P < 0.01$),而 Ba 基因亚型比率低于对照组($P < 0.01$),见表 1。

2.3 实验组 HBV 基因亚型在不同临床类型慢性 HBV 感染者中的分布

在 ASC、CHB、CSHB 与 LC/HCC 4 组间, Ba 与 C1 基因亚型($Fisher \chi^2$ 检验值 5.623, $P = 0.071$), Ba 与 C2 基因亚型间($Fisher \chi^2$ 检验值 2.849, $P = 0.424$)差异均无统计学意义。在 ASC、CHB、CSHB 3 组间, Ba 与 C1 基因亚型($Fisher \chi^2$ 检验值 1.834, $P = 0.564$), Ba 与 C2 基因亚型间($Fisher \chi^2$ 检验值 0.378, $P = 0.864$)差异均无统计学意义。但感染 C1 基因亚型

患者发生 LC/HCC 的比率高于 C2 和 Ba 亚型 ($P<0.001$), 见表 2。

表 1 实验组与对照组 HBV 基因型 / 亚型构成比率 (% , n)

Tab.1 Constituent ratio of HBV genotype/subgenotype between experimental group and control group (% , n)

基因型/亚型	实验组 ($n=101$)	对照组 ($n=92$)	χ^2 值	P 值
Ba	76.2 (77)	91.3 (84)	7.90	0.005
Bj	1.0 (1)	0.0 (0)	...	...
C1	5.9 (6)	1.1 (1)	3.25	0.07
C2	16.9 (17)	7.6 (7)	3.76	0.052
C	22.8 (23)	8.7 (8)	8.43	0.004

注: ..., 没有数据

表 2 实验组 HBV 基因亚型在不同临床类型慢性 HBV 感染者中的分布 (% , n)

Tab.2 Distribution of HBV subgenotypes in patients with different clinical types of chronic HBV infection in experimental group (% , n)

基因亚型	例数 (n)	ASC	CHB	CSHB	LC/HCC
Ba	77	24(31.2)	19(24.6)	11(14.3)	23(29.9)
C1	6	0(0.0)	1(16.7)	0(0.0)	5(83.3)
C2	17	7(41.1)	6(35.3)	2(11.8)	2(11.8)

注: Ba、C1 亚型比较, $\chi^2=7.11$, $P=0.008$; C2 亚型: $\chi^2=10.72$, $P=0.001$

2.4 实验组与对照组前 C/CP 区核苷酸替换率比较

共检测到 17 个变异位点, 除 1757 和 1837 位点仅在实验组检出 1 例发生变异而未进行统计学分析外, 其他位点变异率的差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 实验组与对照组前 C/CP 区核苷酸替换率比较

Tab.3 Comparison on incidences of nucleotide substitution in HBV precore/CP region between experimental group and control group

突变位点	主要变异形式	变异率 (% , n)		χ^2 值	P 值
		实验组 ($n=101$)	对照组 ($n=92$)		
1653	C-T	5.90 (6)	5.4 (5)	0.020	0.88
1673	C-T	4.00 (4)	4.3 (4)	0.018	0.89
1721	G-A	4.95 (5)	3.3 (3)	0.050	0.82
1752	A-G	51.50 (52)	57.7 (53)	0.730	0.39
1753	T-C	12.90 (13)	7.6 (7)	1.440	0.23
1757	G-T	1.00 (1)	0.0 (0)	...	...
1762	A-T	44.50 (45)	55.4 (51)	2.280	0.13
1764	G-A	42.60 (43)	52.1 (48)	1.780	0.18
1775	A-G	10.90 (11)	6.5 (6)	1.140	0.29
1799	C-G	4.00 (4)	4.3 (4)	0.018	0.89
1837	A-C	1.00 (1)	0.0 (0)	...	...
1846	A-T	22.80 (23)	32.6 (30)	2.340	0.13
1856	C-T	2.97 (3)	3.3 (3)	0.090	0.91
1858	T-C	4.90 (5)	4.3 (4)	0.020	0.84
1862	G-T	8.90 (9)	10.9 (10)	0.210	0.65
1896	G-A	37.60 (52)	42.4 (39)	0.460	0.50
1899	G-A	10.90 (11)	10.9 (10)	0.000	1.00

注: ..., 没有数据

2.5 实验组前 C/CP 区变异特征

统计分析总变异频率大于 10% 的 8 个位点在不同临床疾病中变异的发生情况, 其中 A1752、A1775 位点变异率在 ASC、CHB、CSHB 和 LC/HCC 组间的分布均无明显差异 ($P>0.05$)。随着病情的加重, T1753、A1762、G1764、A1846、G1896、G1899 位点变异频率呈逐渐增加的趋势, 但 1899 位点在各组中的差异无统计学意义, 见表 4。

表 4 实验组不同病情患者前 C/CP 区核苷酸变异发生率比较

Tab.4 Comparison on incidences of nucleotide substitution in HBV precore/CP region in different HBV infected patients in experimental group

碱基号	主要变异类型	不同临床疾病变异率 (% , n)			
		ASC ($n=31$)	CHB ($n=27$)	CSHB ($n=13$)	LC/HCC ($n=30$)
1752	A-G	51.6(16)	48.1(13)	53.8(7)	53.3(16)
1753	T-C	3.2(1) ^{a,c}	3.7(1) ^a	23.1(3)	26.7(8)
1762	A-T	22.6(7) ^{b,c}	37.0(10) ^b	61.5(8)	76.7(23)
1764	G-A	25.8(8) ^{b,c}	29.6(8) ^b	61.5(8)	73.3(22)
1775	A-G	6.5(2)	7.4(2)	15.4(2)	16.7(5)
1846	A-T	6.5(2) ^{b,c,d}	29.6(8)	15.4(2)	40.0(12)
1896	G-A	16.1(5) ^{a,c,d}	44.4(12)	53.8(7)	46.7(14)
1899	G-A	6.5(2)	7.4(2)	15.4(2)	20.0(6)

注: 与 LC/HCC 比较, a, $P<0.05$; b, $P<0.01$; 与 CSHB 比较, c, $P<0.05$; 与 CHB 比较, d, $P<0.05$

2.6 不同病情患者前 C/CP 区联合变异分析

联合变异的主要类型有: A1762T/G1764A 和 A1762T/G1764A/G1896A。A1762T/G1764A 双突变及 A1762T/G1764A/G1896A 三联变异在 LC/HCC 组的发生率较 ASC、CHB 组高。见表 5。

表 5 实验组不同病情患者联合变异发生率比较 (% , n)

Tab.5 Comparison on incidences of combined mutation in different HBV infected patients in experimental group (% , n)

疾病类型	例数 (n)	A1762T/G1764A	A1762T/G1764A/G1896A
ASC	31	22.6 (7) ▽	9.7 (3) ■
CHB	27	29.6 (8) ▲	14.8 (4)
CSHB	13	53.8 (7)	38.5 (5)
LC/HCC	30	73.3 (22)	36.7 (11)
变异率 (%)		41.6	22.8

注: 与 LC/HCC 比较, ▽, $\chi^2=15.74$, $P=0.000$; ▲, $\chi^2=10.88$, $P=0.001$; ■, $\chi^2=6.28$, $P=0.01$

3 讨论

国内外研究证实, HBV 感染呈现明显的家族聚集特性, 在聚集性 HBV 感染家系中病情轻重不同, 部分家系具有不良结局的特点, 即家族内多位 HBV 感染者发展为 LC、HCC。既往研究认为, 宿主基因的

单核苷酸多态性及差异表达与 HBV 感染的预后相关。宿主不但存在 HBV 易感基因,而且在感染 HBV 后,可改变宿主免疫基因表达,固有免疫功能的障碍可能是其慢性化的主要原因^[3-6]。

HBV 基因型/亚型是近年来的研究热点。目前,根据 HBV 全基因组核苷酸序列异质性 $\geq 8\%$ 或 S 区核苷酸序列异质性 $\geq 4\%$,将 HBV 分为 A~I 共 9 个基因型,然而,在 HBV 同一基因型毒株之间也存在着一定的差异,并依据全基因组核苷酸序列异质性 $> 4\%$ 并 $< 8\%$ 的原则进一步分为各个亚型。基因型/亚型的分布具有明显的地域特征,在我国,北方以 C 型为主,只发现 C1、C2 亚型,南方以 B 型为主,仅见 Ba 亚型。有关不同 HBV 基因亚型感染的临床意义,在 Ba 亚型中较为明确,不同 C 基因亚型感染的临床差异,目前尚不清楚^[7]。本研究表明,与对照组相比,实验组 Ba 基因亚型所占百分比明显下降,C 基因亚型比率显著增加,但因本地区 Ba 基因亚型占绝对优势,故在实验组仍以 Ba 基因亚型为主。不良结局家族聚集感染组病例中有 6 例为 C1 基因亚型,其中 5 例为 LC/HCC 患者,提示 C1 亚型发展至终末期肝病的可能性大,但因例数过少,需进一步扩大样本量以明确。

HBV 热点变异与其临床结局直接相关。在本研究中,检测出发生核苷酸替换的位点 17 处,C1653、C1673、G1721、G1757、C1799、A1837、C1856、T1858、G1862 位点的变异频率低,未进行分层统计。变异发生频率超过 10% 的 8 个位点中,T1753、A1762、G1764、A1846、G1896 位点变异频率在 ASC、CHB、CSHB 和 LC/HCC 组中呈逐渐增加的趋势,提示上述位点突变可能是肝脏疾病进展的危险因素,与既往报道一致^[8-11]。A1762T/G1764A、A1762T/G1764A/G1896A 联合变异发生率在 LC/HCC 组显著高于 ASC 和 CHB 组,可能与 HBV 感染后发展至终末期肝病相关^[12,13]。

不良结局家族聚集性 HBV 感染者与无明显家族聚集史的 HBV 感染者在前 C/CP 区的热点变异发生率并无明显差异,即使相同基因亚型和发生相同类型的变异,不同患者也表现出大相径庭的临床结局,从侧面印证了 HBV 感染的预后是由多因素交互作用的结果,病毒因素只是其中之一。

参 考 文 献

- [1] Frodsham A J. Host genetics and the outcome of hepatitis B virus infection[J]. *Transpl Immunol*, 2005, 14(3-4): 183-186.
- [2] Lin C L, Kao J H. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B[J]. *J Biomed Sci*, 2008, 15(2): 137-145.
- [3] Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene[J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(3): 721-724.
- [4] Hohler T, Kruger A, Gerken G, et al. A tumor necrosis factor- α (TNF α) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection[J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 111(3): 579-582.
- [5] 赵英仁, 何英利, 张树林, 等. 家族不良结局乙型肝炎外周血单个核细胞基因表达谱的建立[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(11): 811-814.
- [6] Zhao Y R, He Y L, Zhang S L, et al. Genomic analysis of a familial clustering of chronic hepatitis B patients[J]. *Chin J Hepatol*, 2005, 13(11): 811-814.
- [7] 何英利, 赵英仁, 张树林, 等. 家族聚集性慢性乙型病毒性肝炎患者 PBMC 免疫相关的基因表达谱[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(5): 620-622.
- [8] He Y L, Zhao Y R, Zhang S L, et al. Expression map of immune-related genes on PBMCs in familial clustering patients with chronic hepatitis B[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2006, 22(5): 620-622.
- [9] 李艳君, 王学忠. 乙型肝炎病毒基因型及亚型的研究现状[J]. *中国热带医学*, 2009, 9(5): 941-942.
- [10] Li Y J, Wang X Z. Advances on studies of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes[J]. *China Tropical Medicine*, 2009, 9(5): 941-942.
- [11] Sugauchi F, Orito E, Ichida T. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(4): 925-932.
- [12] Jammeh S, Tavner F, Waston R, et al. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt4): 901-909.
- [13] Sainokami S, Abe K, Sato A, et al. Initial load of hepatitis B virus (HBV), its changing profile, and precore/core promoter mutations correlate with the severity and outcome of acute HBV infection[J]. *J Gastroenterol*, 2007, 42(3): 241-249.
- [14] Dai M S, Lu J J, Chen Y C, et al. Reactivation of precore mutant hepatitis B virus in chemotherapy treated patients[J]. *Cancer*, 2001, 92(11): 2927-2932.
- [15] Tong M J, Blatt L M, Kao J H, et al. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers[J]. *Liver Int*, 2007, 27(10): 1356-1363.
- [16] Zhang D, Ma S, Zhang X, et al. Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2010, 10: 271.

(责任编辑: 冉明会)