

乙肝病毒前 S 基因变异与乙肝肝硬化的相关性研究

谢佳新¹, 丁一波², 张丽¹, 王缚鲲³, 张海谱²

1. 陆军军医大学, 重庆 400038; 2. 海军军医大学, 上海 200433; 3. 白求恩国际和平医院, 河北 石家庄 050000

摘要: **目的** 探讨乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)前 S 基因(preS)变异与 HBV 感染后肝硬化发生的相关性。 **方法** 采用病例对照研究设计, 对 50 例慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者和 67 例乙肝肝硬化(liver cirrhosis, LC)患者的血清 HBV PreS 基因进行扩增和测序, 应用 MEGA7 软件进行序列比对, 使用 SPSS 16.0 统计软件对 PreS 基因热点变异与 LC 的相关性进行单因素和多因素分析。 **结果** 单因素分析结果表明, HBV 基因组 PreS 区 T3116m ($\chi^2 = 8.470$, $P = 0.004$)、A49m ($\chi^2 = 4.939$, $P = 0.026$)、T53m ($\chi^2 = 6.683$, $P = 0.010$)、A109m ($\chi^2 = 5.868$, $P = 0.015$) 及 PreS 缺失变异 ($\chi^2 = 12.154$, $P = 0.000$) 与 LC 发生显著相关。PreS 缺失变异在失代偿期 LC 患者中的频率(63.16%)显著高于代偿期 LC 患者(31.03%) ($P = 0.007$)。多因素分析结果表明, 年龄越大 ($OR = 1.07$, 95% $CI: 1.02 \sim 1.11$)、T3116m ($OR = 4.18$, 95% $CI: 1.39 \sim 12.61$)、PreS 缺失变异 ($OR = 7.20$, 95% $CI: 2.09 \sim 24.80$) 是 LC 的独立危险因素。 **结论** HBV PreS 缺失变异与 T3116m 是乙型肝炎患者进展至 LC 的危险变异, 还需要大样本人群进行验证。

关键词: 乙型肝炎病毒; 肝硬化; 突变; 基因型

中图分类号: R183.9 文献标志码: A 文章编号: 1006-3110(2020)05-0547-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.05.010

Correlation between preS gene mutation of hepatitis B virus and liver cirrhosis after hepatitis B virus infection

XIE Jia-xin¹, DING Yi-bo², ZHANG Li¹, WANG Fu-kun³, ZHANG Hai-pu²

1. The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. The Second Military Medical University, Shanghai 2000433, China;

3. Bethune Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Corresponding author: ZHANG Hai-pu, E-mail: haipuzhang@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the correlation of preS gene variation of hepatitis B virus (HBV) with the occurrence of liver cirrhosis (LC) after HBV infection. **Methods** A case-control study, including 50 patients with chronic hepatitis B (CHB) and 67 patients with LC after HBV infection, was designed. preS gene of serum HBV from all the subjects was amplified and sequenced. MEGA7 software was used to align the sequence. The correlation of mutations in HBV preS gene hot spots with LC was determined through univariate and multivariate analyses by using SPSS16.0 software. **Results** Univariate analysis indicated that HBV mutations in the preS region, including T3116m ($\chi^2 = 8.470$, $P = 0.004$), A49m ($\chi^2 = 4.939$, $P = 0.026$), T53m ($\chi^2 = 6.683$, $P = 0.010$), A109m ($\chi^2 = 5.868$, $P = 0.015$), and preS deletion ($\chi^2 = 12.154$, $P = 0.000$) were significantly associated with the risks of LC. The frequency of preS deletion was significantly higher in decompensatory LC patients than in compensatory LC patients (63.16% vs. 31.03%, $P = 0.007$). Multivariate analysis showed that advanced age ($OR = 1.07$, 95% $CI: 1.02 \sim 1.11$), T3116m ($OR = 4.18$, 95% $CI: 1.39 \sim 12.61$), and preS deletion ($OR = 7.20$, 95% $CI: 2.09 \sim 24.80$) were independent risk factors for LC. **Conclusions** HBV preS deletion and T3116m are the HBV mutations related to higher risk of progression from CHB to LC, which need to be validated in a larger sample size.

Key words: hepatitis B virus; liver cirrhosis; mutation; genotype

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是乙肝肝硬化(liver cirrhosis, LC)、肝功能衰竭和肝细胞癌最重

基金项目: 国家自然科学基金(81803294); 河北省自然科学基金(H2015509001)

作者简介: 谢佳新(1984-), 男, 湖南岳阳人, 博士, 副教授, 研究方向: 传染病与肿瘤分子流行病学。

通信作者: 张海谱, E-mail: haipuzhang@qq.com。

要的危险因素, 已成为我国严重公共卫生问题。数据显示, 15%~40%的乙肝病毒携带者将发展为慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)^[1], 约 90% 的 CHB 患者出现 HBeAg 血清学转换, 成为非活动性病毒携带者, 而其他 10% CHB 患者发生慢性活动性肝炎, LC 的年发生率为 2%~10%。其中, 代偿性 LC 进展为肝功

能失代偿期的年发生率为 3%~5%,失代偿性 LC 5 年生存率仅为 14%~35%^[2]。因此,探索 LC 相关危险因素,对乙肝患者实施积极干预措施具有重要公共卫生和社会价值。

CHB 患者疾病进展与病毒复制密切相关,HBV DNA 滴度(>2 000 IU/ml)、HBeAg 持续阳性,C 基因型以及某些 HBV 基因变异已被证实是 LC 的独立危险因素^[3-4]。HBV *PreS* 基因由 *PreS1* 和 *PreS2* 构成,分别编码 *PreS1* 和 *PreS2* 蛋白,前者含有肝细胞结合位点,对病毒颗粒的包装也至关重要。*PreS1* 和 *PreS2* 蛋白含有 T 细胞和/或 B 细胞的抗原表位,在 HBV 与机体免疫系统的相互作用中扮演重要角色^[5],*PreS* 基因变异可能与 HBV 隐匿性感染和进展性肝脏疾病相关^[6]。本研究采用病例对照研究设计,以 CHB(轻、中、重度)和乙肝 LC(代偿与失代偿期)患者为研究对象,探索 HBV *PreS* 基因变异与乙肝患者发生 LC 的相关性,为进一步研究乙肝 LC 的病毒因素提供线索。

1 对象与方法

1.1 研究对象 以白求恩国际和平医院确诊的 175 例 HBsAg 阳性住院和门诊肝病患者(67 例 CHB,108 例 LC)为研究对象,诊断标准符合《慢性乙型肝炎防治指南》(2015 年版),LC 病例均于本院进行肝脏活组织病理检查,且检查结果符合 LC 诊断标准;或重复超声检查均提示 LC 并辅以门静脉高压症临床指征(如腹水、血小板减少症、食管静脉曲张)。排除其他原因引起的肝炎、LC、肝癌等肝脏疾病(包括甲肝、丙肝、丁肝、戊肝、酒精性肝炎、自身免疫性肝炎、药物性肝炎、Wilson 病或 HIV、梅毒等其他病原体的感染)。采集外周血 5 ml,-40 ℃ 保存备用。通过查阅病历和现场询问等方法收集研究对象的人口学和临床资料。本研究符合《赫尔辛基宣言》(1975 年)并获得本单位伦理委员会批准,所有肝炎和肝硬化患者及其家属均知晓本研究,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA 提取 分离外周血血清,使用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,DP315),按照产品使用说明提取 HBV DNA,-40 ℃ 储存备用。

1.2.2 HBV 基因型鉴定 使用型特异性引物多重 PCR 法进行 HBV 基因型检测,所用引物序列,PCR 反应体系及反应条件参照文献报道^[7]。

1.2.3 HBV 变异检测 以待检 HBV DNA 为模板,采用巢式 PCR 法对 *PreS* 区进行扩增,PCR 反应体系

及反应条件参照文献报道^[8]。挑选特异性好且浓度较高的第二轮 PCR 扩增产物送上海生工生物技术有限公司进行双向测序,测序获得的基因序列使用 MEGA7 软件进行比对处理。

1.2.4 相关定义 以 CHB 患者中出现频率最高的核苷酸作为各位点“野生型”,其它核苷酸或缺失定义为“突变”,*PreS1* 或 *PreS2* 区三个或以上连续核苷酸缺失均定义为 *PreS* 缺失变异。将 CHB 或 LC 患者中变异频率高于 10%的变异纳入研究范围。

1.3 统计学处理 使用 Excel 2010 录入数据,应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。血清 HBV DNA 滴度经对数转化为正态分布资料,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异比较使用 *t* 检验。性别、吸烟、饮酒、HBV 基因型、HBeAg 阳性率、ALT 异常比例等计数资料比较使用 χ^2 检验。多因素分析使用 logistic 回归分析方法。所有统计检验均采用双侧检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 117 例样本经扩增、测序获得 *PreS* 基因序列,检测成功率为 66.86%,其中 CHB 患者检测成功率为 74.63%(50/67),乙肝 LC 患者检测成功率为 62.04%(67/108),两者之间差异无统计学意义(*P*>0.05)。乙肝 LC 患者中代偿期 29 例(43.28%),失代偿期 38 例(56.72%);CHB 患者中,重度 21 例(42.00%),中度 15 例(30.00%),轻度 14 例(28.00%)。LC 患者年龄显著高于 CHB 患者(*P*<0.001),CHB 患者血清 ALT 异常比例(*P*<0.001)、HBeAg 阳性比例(*P*<0.001)、HBV DNA 滴度(*P*<0.001)显著高于 LC 患者,其它指标在两组研究对象之间差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 研究对象人口学与病毒学特征

特征	CHB(<i>n</i> =50)	LC(<i>n</i> =67)	χ^2/t 值	<i>P</i> 值
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	39.52±14.84	52.49±11.22	-5.177	<0.001
男性(<i>n</i> ,%)	40(80.00)	49(73.13)	0.741	0.389
吸烟(<i>n</i> ,%)	13(26.00)	21(31.34)	0.397	0.529
饮酒(<i>n</i> ,%)	13(26.00)	20(29.85)	0.210	0.647
肝病家族史(<i>n</i> ,%)	16(32.00)	31(46.27)	2.425	0.119
HBV 基因型(<i>n</i> ,%)				
B	7(14.00)	8(11.94)		
C	41(82.00)	56(83.58)	0.333	0.564 ^a
B+C	0(0.00)	3(4.48)		
D	2(4.00)	0(0.00)		
ALT>45 U/L(<i>n</i> ,%)	45(90.00)	34(50.75)	20.118	<0.001
HBeAg 阳性(<i>n</i> ,%)	40(80.00)	26(38.81)	19.760	<0.001
HBV DNA(\log_{10} copies/ml, $\bar{x}\pm s$)	6.90±1.41	5.14±1.74	101.944	<0.001

注:ALT:谷丙转氨酶;HBeAg:乙肝病毒 e 抗原;a:HBV 基因型 B 与 C 的组间分布差异。

2. 2 *PreS* 基因变异与乙肝 LC 相关性的单因素分析

PreS 区 nt. 2889、nt. 2943、nt. 3000 等 14 个核苷酸位点突变,以及 *PreS* 缺失、*PreS2* 启动子变异频率在乙肝 LC 或 CHB 患者中变异频率高于 10%。*PreS* 缺失、T3116m、A49m、T53m、A109m 在乙肝 LC 中的变异频率高于 CHB,与乙肝 LC 的发生显著相关($P<0.05$),见表 2。

表 2 *PreS* 基因变异与 LC 相关性的单因素分析

突变	基因变异(<i>n</i> ,%)		AOR 值 (95%CI)	χ^2 值	<i>P</i> 值
	CHB	LC			
<i>PreS2</i> 启动子变异	8(16.00)	18(26.87)	1.93(0.76~4.88)	1.956	0.162
<i>PreS</i> 缺失	9(18.00)	33(49.25)	4.42(1.86~10.51)	12.154	<0.001
G2889m	17(34.00)	24(35.82)	1.08(0.50~2.34)	0.042	0.838
T2943m	9(18.00)	18(26.87)	1.67(0.68~4.12)	1.268	0.260
C3000m	11(22.00)	22(32.84)	1.73(0.75~4.02)	1.660	0.198
A3097m	10(20.00)	12(17.91)	0.87(0.34~2.22)	0.082	0.775
G3102m	16(32.00)	19(28.36)	0.84(0.38~1.87)	0.181	0.670
T3116m	17(34.00)	41(61.19)	3.06(1.43~8.57)	8.470	0.004
A3120m	7(14.00)	16(23.88)	1.93(0.73~5.12)	1.770	0.183
A7m	5(10.00)	15(22.39)	2.60(0.88~7.71)	3.101	0.078
A10m	7(14.00)	15(22.39)	1.77(0.66~4.74)	1.319	0.251
T31m	19(38.00)	29(43.28)	1.25(0.59~2.63)	0.330	0.565
A49m	8(16.00)	23(34.33)	2.74(1.11~6.81)	4.939	0.026
T52m	23(46.00)	41(61.19)	1.85(0.88~3.89)	2.668	0.102
T53m	9(18.00)	27(40.30)	3.08(1.29~7.35)	6.683	0.010
A109m	4(8.00)	17(25.37)	3.91(1.23~12.48)	5.868	0.015

注: m,野生核苷酸以外的其它三种核苷酸和缺失;AOR:经年龄、性别校正的比值比。

2. 3 *PreS* 基因变异与 LC 失代偿相关性

比较基因型、HBV DNA 滴度等 HBV 病毒学特征,以及单因素分析中 LC 相关 HBV 变异在代偿期与失代偿 LC 的分布特征,发现 *PreS* 缺失变异频率在失代偿 LC 患者中显著高于代偿期 LC 患者,*PreS* 缺失变异与失代偿 LC 具有显著相关性($P=0.007$),见表 3。

表 3 失代偿 LC 相关因素分析(*n*,%)

特征	代偿期 LC (<i>n</i> =29)	失代偿期 LC (<i>n</i> =38)	AOR 值 (95%CI)	χ^2 值	<i>P</i> 值
HBV 基因型					
B	5(17.24)	3(7.89)	2.45(0.50~11.91)	1.224	0.269
C	23(79.31)	33(86.84)			
ALT(>45 U/L)	15(51.72)	19(50.00)	1.05(0.39~2.85)	0.009	0.925
HBeAg 阳性	11(37.93)	15(39.47)	1.05(0.38~2.96)	0.009	0.923
HBV DNA(log ₁₀ copies/ml, $\bar{x}\pm s$)	5.11 \pm 1.78	5.16 \pm 1.73	1.05(0.77~1.42)	-0.126	0.900
<i>PreS</i> 缺失	9(31.03)	24(63.16)	4.42(1.50~13.00)	7.269	0.007
T3116m	20(68.97)	21(55.26)	0.48(0.16~1.40)	1.818	0.178
A49m	9(31.03)	14(36.84)	1.35(0.47~3.84)	0.315	0.575
T53m	10(34.48)	17(44.74)	1.91(0.67~5.44)	1.452	0.228
A109m	7(24.14)	10(26.32)	1.11(0.35~3.49)	0.030	0.862

注: ALT:谷丙转氨酶; HBeAg:乙肝病毒 e 抗原;AOR:经年龄、性别校正比值比。

2. 4 乙肝 LC 危险因素的多因素分析

将年龄、性别、HBV DNA 滴度、ALT、HBV 基因型及 *PreS* 缺失、T3116m、A49m、T53m、A109m 等可能与 LC 相关的因素纳入非条件 logistic 回归模型进行多因素分析,发现年龄越大、*PreS* 缺失变异、T3116m 是乙肝 LC 的独立危险因素($P<0.05$),见表 4。

表 4 乙肝 LC 危险因素的 logistic 回归分析

因素	β	SE	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值	OR(95%CI)
年龄(岁)	0.064	0.021	9.617	0.002	1.07(1.02~1.11)
HBV DNA	-0.617	0.196	9.976	0.002	0.54(0.37~0.79)
<i>PreS</i> 缺失	1.974	0.650	9.771	0.002	7.20(2.09~24.80)
T3116m	1.431	0.575	6.460	0.011	4.18(1.39~12.61)

3 讨论

研究表明,HBV 不直接杀伤肝细胞,其引起的免疫应答是肝细胞损伤及炎症发生的主要机制,炎症反复存在是 CHB 患者进展为 LC 的重要因素^[9],而 HBV *PreS* 蛋白在机体与 HBV 的免疫反应中扮演重要角色,*PreS* 区多个变异已被证实与 HBV 感染后肝病进展相关^[10-12]。本研究选择不同炎症程度 CHB 患者(轻、中、重度)为对照,以包括代偿期和失代偿期 LC 患者为病例,能控制不同炎症程度和临床进展期的病毒学特征差异对变异与 LC 相关性的影响。LC 患者的平均年龄显著高于 CHB 患者,而 HBeAg 阳性率显著低于 CHB 患者,同时 HBeAg 阳性感染者的平均年龄低于 HBeAg 阴性感染者,提示年龄是 CHB 患者发展为 LC 的重要决定因素。高血清 HBV 载量与 ALT 异常在其它研究中已经证实与 LC 发生相关^[13-14],表明持续 HBV 复制与肝细胞损伤促成了 LC 发生,被认为是其危险因素。但是,本研究中 LC 患者血清 HBV DNA 平均滴度与 ALT 异常比例均显著低于 CHB 患者($P=0.000$),CHB 患者 HBeAg 阳性率显著高于 LC 患者,一般认为 HBV 感染后 HBeAg 阳性期内,血清病毒载量较高,免疫选择较弱,病毒载量降低及 HBeAg 阴转与某些 HBV 突变发生显著关联。HBV 基因型 C 在同类研究中已证实是乙肝 LC 的危险因素^[15],但是本研究中两组研究对象中基因型分布差异无统计学意义($P>0.05$),可能与样本量较小有关。

HBV 基因变异在 HBeAg 阳性感染者中较低,且随着疾病进展逐渐累积^[16]。本研究以 CHB 患者血清 HBV *PreS* 基因各位点上频率最高核苷酸作为野生型,并以 CHB 患者作为对照分析 HBV 变异与乙肝 LC 的相关性。在参考其他同类研究^[14]的基础上,结合本次研究的测序结果,将变异频率>10%的位点作为“热点变异”纳入研究,有利于提高假设检验效能和筛选有

意义的变异位点。由于 HBV 变异频率随着年龄增大而升高,在男性中感染者变异更频繁,年龄与性别是主要的混杂因素^[17],因此在分析各 HBV 变异与乙肝 LC 的相关性时均对年龄与性别进行校正。单因素分析结果显示 *PreS* 缺失、T3116m、A49m、T53m、A109m 等变异显著增加 LC 的发生风险 ($P < 0.05$),其中 A49m、A109m 在同类研究中均未报道,相关性需要在更大样本量研究中进行验证。

CHB 患者在长期病程中,肝脏慢性反复炎症导致 LC 发生,约 15% LC 患者进入失代偿期,预后较差,5 年生存率不到 35%^[18]。在众多危险因素中,HBV 病毒浓度及相关基因变异可增加 CHB 患者进展至 LC、失代偿期和死亡风险。本研究比较了 HBV 病毒学特征和 *PreS* 基因变异在代偿期与失代偿 LC 患者间的差异,发现 *PreS* 缺失变异在失代偿 LC 中显著高于代偿期 LC ($P = 0.007$),提示代偿期 LC 患者体内 HBV *PreS* 基因发生缺失后更易进展为失代偿期。而 HBV 病毒载量在代偿与失代偿 LC 患者间未显示统计学差异,需要考虑 CHB 患者病程中接受抗病毒治疗。多因素分析结果显示,年龄、*PreS* 缺失变异、T3116m 是乙肝 LC 的独立危险因素 ($P < 0.05$),与其它研究结论一致^[10, 19-20]。随着年龄增加,肝组织炎症不断发展,疾病进展相关变异不断累积,因此年龄是 LC 的重要危险因素。*PreS* 区基因片段缺失导致编码蛋白结构和功能发生变化,对乙肝病毒感染后与机体免疫系统的相互作用产生影响。转录因子预测 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 结果显示,HBV *PreS* 基因 nt. 3116 由 T 突变为其它核苷酸后,相应区段失去了转录抑制因子 Ttk69 的结合位点,HBV 基因转录调控发生变化^[21]。因此,推测 HBV *PreS* 基因变异可能在 HBV 慢性感染过程中被选择出来并逐渐累加,又反过来促进了肝组织炎症发展与 LC 发生。*PreS* 基因变异导致的异常免疫反应,氧化性 DNA 损伤,以及病毒-宿主相互作用在乙肝 LC 发生中扮演重要角色。

综上所述,本研究发现 HBV *PreS* 基因变异在 CHB 感染不同阶段的分布差异,其中 *PreS* 缺失变异与乙肝 LC 发生及进展至失代偿期显著相关,为进一步研究乙肝 LC 相关变异提供线索。本研究亦存在诸多不足之处,如研究样本量偏小,相关结论需在更大样本量研究中进行重复。同时,HBV 基因型作为重要的病毒因素,具有不同变异谱,下一步应按感染 HBV 基因型确定不同疾病人群变异情况及其相关性。

参考文献

[1] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009[J]. Hepatol-

ogy, 2009, 50(3):661-662.

- [2] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 9(5):570-589.
- [3] Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, et al. Higher proportion of viral basal core promoter mutant increases the risk of liver cirrhosis in hepatitis B carriers[J]. Gut, 2015, 64(2):292-302.
- [4] Chen QY, Harrison TJ, Sabin CA, et al. The effect of HBV genotype C on the development of HCC differs between wild-type viruses and those with BCP double mutations (T(1762)A(1764))[J]. Hepat Mon, 2014, 14(2):e16214.
- [5] Li YW, Yang FC, Lu HQ, et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(6):1943-1952.
- [6] Kim H, Kim BJ. Association of *PreS/S* mutations with occult hepatitis B virus(HBV) infection in South Korea:transmission potential of distinct occult HBV variants[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(6):13595-13609.
- [7] 谢佳新,张海谱,高秋菊,等. 石家庄地区乙肝病毒基因型分布及其与疾病进展关联研究[J]. 现代预防医学, 2017, 44(7):1161-1165.
- [8] Xie J, Zhang Y, Zhang Q, et al. Interaction of signal transducer and activator of transcription 3 polymorphisms with hepatitis B virus mutations in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 57(6):2369-2377.
- [9] Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl):S84-101.
- [10] 蔡兰兰,祝玲玲. 乙肝 HBV DNA 荧光定量检测与乙肝五项及 *PreS1* 的相关性分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(10):1171-1173.
- [11] Li X, Qin Y, Liu Y, et al. *PreS* deletion profiles of hepatitis B virus (HBV) are associated with clinical presentations of chronic HBV infection[J]. J Clin Virol, 2016, 82:27-32.
- [12] Zhong YW, Di FL, Liu C, et al. Hepatitis B virus basal core promoter/precore mutants and association with liver cirrhosis in children with chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(4):379.e1-8.
- [13] Shantakumar S, Landis S, Lawton A, et al. Prevalence and incidence of liver enzyme elevations in a pooled oncology clinical trial cohort [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2016, 77:257-262.
- [14] Yin J, Xie J, Liu S, et al. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma[J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(1):81-92.
- [15] Tian Q, Jia J. Hepatitis B virus genotypes:epidemiological and clinical relevance in Asia[J]. Hepatol Int, 2016, 10(6):854-860.
- [16] Huang Y, Deng H, Shan X, et al. Lower mutation frequency of BCP/precore regions in e antigen-negative chronic HBV-infected children instead of adults patients[J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0120733.
- [17] Kao JH. Risk stratification of HBV infection in Asia-Pacific region [J]. Clin Mol Hepatol, 2014, 20(3):223-227.
- [18] Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors [J]. J Hepatol, 2008, 48(2):335-352.
- [19] Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, et al. Hepatitis B virus *PreS/S* gene variants:pathobiology and clinical implications[J]. J Hepatol, 2014, 61(2):408-417.
- [20] Cheong JY, Um SH, Seo YS, et al. A practical scoring system for predicting cirrhosis in patients with chronic viral hepatitis[J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(120):2592-2597.
- [21] Xie JX, Zhao J, Yin JH, et al. Association of novel mutations and haplotypes in the *PreS* region of hepatitis B virus with hepatocellular carcinoma[J]. Front Med China, 2010, 4(4):419-429.

收稿日期:2019-09-25