

# 乙型肝炎病毒基因组前 - X 区的分子流行病学研究

董菁, 杨倩, 成军

董菁, 杨倩, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
董菁, 男, 1969-02-07 生, 河北省徐水县人, 汉族, 1993 和 1996 年第四军医大学毕业, 分别获得医学学士和硕士学位, 2001 年毕业于北京大学, 获得医学博士学位, 主治医师。主要从事乙型肝炎病毒分子生物学与病毒性肝炎治疗的研究。发表论文 25 篇, 参编专著 4 部, 获北京市科技进步奖和军队科技进步奖各 1 次。  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

## Molecular epidemiological features of pre-X region in hepatitis B virus genome

Jing Dong, Qian Yang, Jun Cheng

Jing Dong, Qian Yang, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing, 100039  
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

## Abstract

AIM: To identify pre-X region in hepatitis B virus (HBV) genome and to study the relationship between the genotype and the existence of pre-X region.

METHODS: HBV genomic DNA was extracted from the sera of patients with HBV infection. Multiple-primers polymerase chain reaction (PCR) method was used to identify the genotype of HBV strains. Pre-X region was amplified by PCR method, and TA cloning technique was used to clone the DNA fragment into pGEM Teasy vector. After sequencing of the target region, Vector 8.0 software was used to analysis the sequences.

RESULTS: Seventeen samples were collected in this study. One genotype A, 3 genotype B, 10 genotype C and 3 B/C genotype mixture were identified. After sequencing, 27 clones from 45 clones (60%) were found encoding the pre-X peptide. Eighteen from 27 clones (66.7%) pre-X coding sequences were found from C genotype. Three types of replacement mutation led to pre-mature coding of pre-X gene. The mutation in pre-X peptide had feature

of individually mutation.

CONCLUSION: Coding of the pre-X gene is popular in HBV genome.

Dong J, Yang Q, Cheng J. Molecular epidemiological features of pre-X region in hepatitis B virus genome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):794-800

## 摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒(HBV)基因组是否存在前-X编码基因, 并探讨前-X基因与HBV基因型之间的关系。

方法: 自慢性乙型肝炎患者血清中提取乙型肝炎病毒基因组, 首先应用多引物-多聚酶链反应(PCR)进行HBV基因型分型。之后将前-X区扩增, TA克隆到pGEM Teasy载体后进行单克隆测序, 利用Vector 8.0软件进行序列分析。

结果: 17例患者中, A型者1例, B型3例, B/C混合型者3例, C型10例。克隆测序的45个克隆中, 27个(60%)克隆编码前-X多肽, 其中18个(66.7%)克隆来自C基因型。有3种形式突变导致前-X区编码不能。前-X区多肽具有个体化突变现象。

结论: 前-X区编码在B、C基因型中均为普遍存在的现象, 其编码具有C型倾向性。

董菁, 杨倩, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):794-800

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/794.asp>

## 0 引言

Gelibert et al<sup>[1-2]</sup>于1979年第一次解读了乙型肝炎病毒(HBV)基因组, 全长在3200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒。之后学者<sup>[3-4]</sup>将HBV基因组划分出4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区。4个ORF中表达的氨基酸长度不同, S基因编码HBV囊膜蛋白, 包裹HBV病毒; C基因编码核心蛋白, 系HBV基因组的附着部位; P基因编码多聚酶, 在基因组复制过程中起重要作用; X基因编码产物的功能不明确, 研究发现具有反式激活作用<sup>[5-6]</sup>, 可激活宿主或病毒的基因表达。我国学者<sup>[7-8]</sup>于1984年报道了中国大陆HBV全序列, 近来我们利用长距离-精确多聚酶链反应(LA-PCR)方法<sup>[9]</sup>研究了乙型肝炎患者血清中存在的HBV病毒基因组, 确定了前-S基因<sup>[10]</sup>和前-X基因<sup>[11]</sup>的以及上述2个基因的启动子<sup>[12-13]</sup>, 并以文献流行病学

方法确定了前-X-S基因和前-X基因的普遍性<sup>[14]</sup>. 本文以分子流行病学实验方法证实了前-X区的存在状态.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 血清采集 血清来源: 17例患者, 诊断为病毒性肝炎, 乙型, 慢性, 符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会、中华医学会肝病学分会2000年联合制定的《病毒性肝炎防治方案》(试行)<sup>[15]</sup>, 临床初步检测HBV DNA阳性.

1.1.2 DNA提取 自静脉中采集5 mL全血, 分离血清, 200  $\mu$ L血清加入蛋白酶K及其缓冲液, 65  $^{\circ}$ C消化过夜, 饱和酚: 氯仿(1:1)抽提总DNA, 无水乙醇沉淀, 加入无DNA酶的RNA酶消化后, -20  $^{\circ}$ C保存备用.

### 1.2 方法

1.2.1 HBV基因型分析 参考Naito et al<sup>[16]</sup>设立的6种主要基因型分型方法, 建立HBV基因型的检测方法. 简言之, 应用巢式-多引物-多聚酶链反应, 外引物: 上游引物序列: 5' - AGC ATG GGA GGT TGG TCT TC-3', 下游引物序列: 5' - AAG GCA TCA AGG CAG GAT AGC-3', 目的片段长度约1 429 bp, 自前-S1区起始处至S区终止子下游226 bp. 内引物: 上游引物序列: 5' - GGC TCA AGT TCC GGA ACA GT-3', A基因型特异性下游引物: 5' - CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3', B基因型特异性下游引物: 5' - CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3', C基因型特异性下游引物: 5' - GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'.

外引物扩增PCR程序参数如下: 94  $^{\circ}$ C 1 min 预变性, 94  $^{\circ}$ C 1 min 30 s 变性, 59  $^{\circ}$ C 1 min 30 s 退火, 72  $^{\circ}$ C 2 min 延长, 共30个循环, 72  $^{\circ}$ C 延长10 min. 内引物扩增PCR程序参数如下: 94  $^{\circ}$ C 1 min 预变性, 94  $^{\circ}$ C 30 s 变性, 58  $^{\circ}$ C 30 s 退火, 72  $^{\circ}$ C 30 s 延长, 共35个循环. NT-PCR产物经过3%琼脂糖凝胶电泳后判断HBV基因型.

1.2.2 前-X区的克隆及序列分析 采用本研究组以往报告<sup>[17-19]</sup>的PCR-TA克隆-测序方法. PCR扩增前-X区基因: 前-X上游引物为P1: 5' - CCA AGT GTT TGC TGA CGC AAC C', 下游引物为P2: 5' - GGA TCC AGT TGG CAG CAC ACC-3', P1下游第31-33 nt处为前-X区起始密码子ATG, P2上游30-32 nt处为前S1区起始密码子ATG. 前-X区PCR参数如下: 94  $^{\circ}$ C 1 min 预变性, 94  $^{\circ}$ C 60 s 变性, 58  $^{\circ}$ C 60 s 退火, 72  $^{\circ}$ C 60 s 延长, 共35个循环, 72  $^{\circ}$ C再延长10 min.

克隆目的片段: 将PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与Promega公司所产的pGEM Teasy载体连接过夜. 将连接好的重组质粒转入细菌JM109, 氨苄青霉素(Amp)和X-gal 蓝白斑法筛选阳性菌落, 进一步提取质粒鉴定. DNA测序: 选择经鉴定pGEM Teasy内插入230 bp产物的菌落送检测

序, 由上海博亚公司完成. 测序引物为pGEM Teasy载体自有的T7、SP6测序引物.

1.2.3 序列分析 应用Vector 8.0版软件对进行了测序分析的HBV前-X基因序列进行碱基序列和氨基酸序列一致性分析. 该软件比较后提供两个数据: 阳性率和一致率, 阳性率是选定区域推定序列的核苷酸(氨基酸)序列数目与区域总长度之比, 推定序列是软件自动比较所有序列, 参考每个核苷酸(氨基酸)位点上每个克隆的编码方式, 由大多数克隆(多于70%)编码的核苷酸(氨基酸)组成的一致性序列, 阳性率用于展示区域内部的插入突变或/和缺失突变, 以及较少见的单一位点多种核苷酸(氨基酸)编码方式; 一致率是选定区域全部克隆均为一致的核苷酸(氨基酸)数目与最长的单一克隆核苷酸(氨基酸)序列数目之比, 表示该段区域核苷酸(氨基酸)序列一致性, 用于展示区域内部的替换突变或/和缺失突变.

## 2 结果

2.1 HBV基因型分型 获得的内引物PCR产物电泳结果见图1.

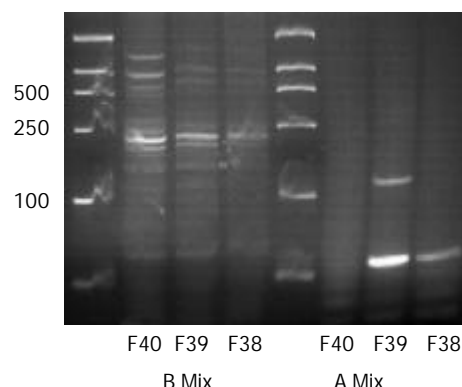


图1 HBV基因型分型电泳图. F40泳道为阴性; F39为B/C基因型混合存在; F38泳道为C基因型.

应用该基因型分型方法, 电泳时展示的HBV A基因型PCR产物长度为68 bp, B型为281 bp, C型为122 bp. 本研究的17例患者中, 基因型为A型者1例, 基因型为B型者3例, B/C混合型者3例, C型10例.

2.2 前-X基因核酸序列分析 前-X基因全长168 bp, 45株核苷酸序列比较见图2. 本研究扩增的靶区域全长231 nt, 包括前-X基因上游30 nt和下游X基因30 nt. 靶区域除去引物区全长187 bp, 比较结果提示阳性率为99.5%, 一致率为78.1%, 其中154 nt编码方式有A/G/C3种; 前-X基因编码框架自第31至第198 nt, 阳性率为99.4%, 一致率为76.8%; 在序列比较中, 我们发现来自同一患者体内的克隆之间的一致性大于95%, 符合准种表现.

图2显示了所有的45个克隆前-X区的核苷酸序列, 以及由这45个克隆推断出的一致性序列. 这45个克隆中, 有27个克隆编码前-X多肽, 占观察序列的60%.

导致前-X基因编码不能的原因在于 $A^{2608} \rightarrow C/T$ 替换突变或 $C/A^{2733} \rightarrow T$ 替换突变或上述位点的双突变<sup>[14]</sup>, 研究结果提示双替换突变是导致前-X区编码不能的主要原因, 占22.2%.

前-X基因的编码与否与基因型之间的关系见表1. 研究提示A型仅有1个克隆, 是由于双替换突变导致了编码失败; B型8个克隆中, 6个克隆是由于双替换突变导致了编码失败; C型26个克隆中, 5个克隆由于 $A^{2608} \rightarrow C/T$ 替换突变, 3个克隆由于 $C/A^{2733} \rightarrow T$ 替换突变导致了编码失败. C型测序的26个克隆中有18个克隆编码前-X区, 占69.2%; B型测序的8个克隆中仅有2个克隆编码前-X区, 占25%. 选择测序的45个克隆中有27个克隆编码前-X区, 其中B型2个, C型18个, B/C混合型7例.

值得注意的是患者F298, 共选择了4个克隆进行测序, 其中克隆F298-1发生 $A^{2608} \rightarrow C$ 替换突变, 导致前-X区编码不能, 其他3个克隆未发生替换突变.

表1 前-X区编码突变在HBV基因型中的分布

	$A^{2608} \rightarrow C/T$ 替换突变	$C/A^{2733} \rightarrow T$ 替换突变	双替换突变	编码前-X区
A型	0	0	1	0
B型	0	0	6	2
C型	5	3	0	18
B/C	0	0	3	7
比例%	11.1	6.7	22.2	60

31

80

F296-1C (31)ATGGGGCTTGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F296-4C (31)ATGGGGCTTGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F296-5C (31)ATGGGGCTTGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F298-1C (31)CTGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F298-2C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F298-3C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F298-5C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F299-1C (31)CTGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F299-2C (31)CTGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F300-1B/C (31)CTGGGGCTTGCTATAGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F300-2B/C (31)CTGGGGCTTGCTATAGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F300-4B/C (31)CTGGGGCTTGCTATAGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F325-2B (31)TTGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTC

F325-3B (31)TTGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTC

F325-4B (31)TTGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTC

F325-6B (31)TTGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCACATGCGTGGAACCTTTGTGTCTC

F326-1C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F326-2C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F326-4C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F326-6C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F327-1C (31)TTGGGGCTTGCTATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

F327-2C (31)TTGGGGCTTGCTATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y931-2B (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y931-3B (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y933-1B (31)TTGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTC

Y933-2B (31)TTGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTC

Y940-4C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y942-3C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y943-1A (31)TTGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTC

Y947-2C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y947-3C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y949-2C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y949-3C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCAACGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y949-4C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCAACGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y949-5C (31)ATGGGGCTTGCTATTGGCCATCAACGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y982-1B/C (31)ATGGGGCTTGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y982-3B/C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y982-4B/C (31)ATGGGGCTTGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y982-5B/C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y982-6B/C (31)ATGGGGCTTGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTAGCTC

Y983-2B/C (31)ATGGGGCTTGCCATCGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y983-3B/C (31)ATGGGGCTTGCCATCGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y985-2C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y985-3C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Y985-6C (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

Consensus (31)ATGGGGCTTGCCATAGGCCATCGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC

81

130

F296-1C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F296-4C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F296-5C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F298-1C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F298-2C (81)CTCAGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F298-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F298-5C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F299-1C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F299-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F300-1B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F300-2B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F300-4B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F325-2B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F325-3B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F325-4B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F325-6B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F326-1C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F326-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F326-4C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F326-6C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F327-1C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

F327-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

Y931-2B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

Y931-3B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

Y933-1B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTGTCTCGCAGC

Y933-2B (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTGTCTCGCAGC

Y940-4C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

Y942-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCAGCTTGTTTGTCTCGCAGC

Y943-1A (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y947-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y947-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y949-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y949-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y949-4C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y949-5C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y982-1B/C (81)CCCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y982-3B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y982-4B/C (81)CTCTGCCGATCCGTAAGTCTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y982-5B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y982-6B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y983-2B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y983-3B/C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y985-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y985-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Y985-6C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC  
Consensus (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCTGTTTTGCTCGCAGC

131

180

F296-1C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGAACTGACAACTCTGTTGTCTCTCTCG  
F296-4C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGAACTGACAACTCTGTTGTCTCTCTCG  
F296-5C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGAACTGACAACTCTGTTGTCTCTCTCG  
F298-1C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
F298-2C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTCGTCTCTCTCG  
F298-3C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTCGTCTCTCTCG  
F298-5C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
F299-1C (131)CGATCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
F299-2C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
F300-1B/C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACTGACAACTCTGTTGTCTCTCTCG  
F300-2B/C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACTGACAACTCTGTTGTCTCTCTCG  
F300-4B/C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACTGACAACTCTGTTGTCTCTCTCG  
F325-2B (131)AGGTCTGGGGCAAACCTCATCGGACTGACAATTCTGTCGTCTCTCCCG  
F325-3B (131)AGGTCTGGGGCAAACCTCATCGGACTGACAATTCTGTCGTCTCTCCCG  
F325-4B (131)AGGTCTGGGGCAAACCTCATCGGACTGACAATTCTGTCGTCTCTCCCG  
F325-6B (131)AGGTCTGGGGCAAACCTCATCGGACTGACAATTCTGTCGTCTCTCCCG  
F326-1C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCCGTTGTCTCTCTCG  
F326-2C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCCGTTGTCTCTCTCG  
F326-4C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCCGTTGTCTCTCTCG  
F326-6C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCCGTTGTCTCTCTCG  
F327-1C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTCTCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
F327-2C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTCTCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y931-2B (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y931-3B (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y933-1B (131)AGGTCTGGAGCGAAACCTCATCGGACTGACAATTCTGTCGTCTCTCCCG  
Y933-2B (131)AGGTCTGGAGCGAAACCTCATCGGACTGACAATTCTGTCGTCTCTCCCG  
Y940-4C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y942-3C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y943-1A (131)AGGTCTGGAGCAAACCTCATCGGACTGACAATTCTGTCGTCTCTCCCG  
Y947-2C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y947-3C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y949-2C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y949-3C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG

Y949-4C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y949-5C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y982-1B/C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y982-3B/C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCCGTTGTCTCTCTCG  
Y982-4B/C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y982-5B/C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCAGTTGTCTCTCTCG  
Y982-6B/C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y983-2B/C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTCATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y983-3B/C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTCATCGGAACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG  
Y985-2C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCAGTTGTCTCTCTCG  
Y985-3C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCAGTTGTCTCTCTCG  
Y985-6C (131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCAGTTGTCTCTCTCG  
Consensus (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCTGTTGTCTCTCTCG

181

198

F296-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F296-4C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F296-5C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F298-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F298-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F298-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F298-5C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F299-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F299-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F300-1B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F300-2B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F300-4B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F325-2B (181)CAAGTACACCTCATTTCC  
F325-3B (181)CAAGTACACCTCATTTCC  
F325-4B (181)CAAGTACACCTCATTTCC  
F325-6B (181)CAAGTACACCTCATTTCC  
F326-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F326-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F326-4C (181)GAAAGACACCTCCTTTCC  
F326-6C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F327-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
F327-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y931-2B (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y931-3B (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y933-1B (181)CAAGTATACATCATTTCC  
Y933-2B (181)CAAGTATACATCATTTCC  
Y940-4C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y942-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y943-1A (181)CAAGTATACATCATTTCC  
Y947-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y947-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y949-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y949-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y949-4C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y949-5C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y982-1B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y982-3B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
Y982-4B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC

Y982-5B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
 Y982-6B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
 Y983-2B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
 Y983-3B/C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
 Y985-2 C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
 Y985-3 C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
 Y985-6 C (181)GAAATACACCTCCTTTCC  
 Consensus (181)GAAATACACCTCCTTTCC

图2 前-X基因核酸序列比较. Consensus: 比较后推断的一致性序列.

2.3 前-X基因蛋白质序列分析 45株克隆中有27个克隆编码的前-X多肽, 其氨基酸序列比较见图3. 前-X多肽全长56 aa, 总一致率为73.2%. 经过比较, 按照一致率的差异分为3部分, 1-10 aa为高变区, 一致率为60.0%; 11-36 aa为高保守区, 一致率为88.5%, 其中19-36 aa是保守区中的保守区, 一致率为94.4%; 37-56 aa为另一高变区, 一致率为60.0%.

氨基酸序列中的部分替换突变具有来源个体化现象, 我们<sup>[20]</sup>曾命名其为HBV个体化突变.第26 aa, 来

自其他患者的病毒株均编码P, 而来自患者Y931的2个克隆编码S; 相应的, 第40 aa, 来自其他患者的病毒株均编码Y, 而来自患者Y983的2个克隆编码H.

氨基酸的变异还表现为一些位点的变异具有相对的普遍意义, 比如第5 aa的Y(10)/H(17)(括号中为编码该氨基酸残基的克隆数, 下同), 第6 aa的W(12)/R(15), 第37 aa的G(11)/S(16), 第38 aa的E(15)/K(12), 第42 aa的N(14)/H(13).

### 3 讨论

本研究组<sup>[21-29]</sup>在近期的研究中着重阐述了HBV准种现象, 在此基础上, 我们发现以往界定的HBV前-S1基因之前存在一个ORF, 将其命名为前-前-S基因<sup>[10]</sup>. 同时发现X基因之前存在一融合表达的ORF, 命名为前-X区<sup>[11]</sup>, 为了证实前-X基因的实际存在以及氨基酸序列特点, 我们采取横断面研究方式对慢性乙型肝炎患者体内感染的HBV基因组进行了研究.

本研究选择了17例HBV DNA阳性的患者, 按照Naito et al<sup>[13]</sup>建立的快速分型鉴定方案进行了HBV基因型分型研究, 试图探讨HBV基因型别与前-X区编码

		1	56
f298-2	(1)	MGLGYWSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCRPLSEIHLFS	
f298-3	(1)	MGLGYWSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCRPLSEIHLFS	
f298-5	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
f326-1	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLRCPLSEIHLLS	
f326-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLRCPLSEIHLLS	
f326-4	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLRCPLSERHLLS	
f326-6	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLRCPLSEIHLLS	
y931-2	(1)	MGLGYWSPHAWNLCGSSADPYCGTSSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y931-3	(1)	MGLGYWSPHAWNLCGSSADPYCGTSSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y940-4	(1)	MGLGYWSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y942-3	(1)	MGLGYWSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y947-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y947-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y949-2	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRHRQLCCPLSEIHLLS	
y949-3	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRHRQLCCPLSEIHLLS	
y949-4	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRHRQLCCPLSEIHLLS	
y949-5	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRHRQLCCPLSEIHLLS	
y982-1	(1)	MGLGHWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y982-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLRCPLSEIHLLS	
y982-4	(1)	MGLGHWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y982-5	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLSCPLSEIHLLS	
y982-6	(1)	MGLGHWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	
y983-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETHRNRQLCCPLSEIHLLS	
y983-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETHRNRQLCCPLSEIHLLS	
y985-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLSCPLSEIHLLS	
y985-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLSCPLSEIHLLS	
y985-6	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGKTYRHRQLSCPLSEIHLLS	
Consensus	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPWVGWETYRNRQLCCPLSEIHLLS	

图3 前-X多肽氨基酸序列比较. Consensus: 比较后推断的一致性序列.

之间的关系. 经过分型研究, 本研究抽取的 17 例患者中, 基因型为 A 型者 1 例, 基因型为 B 型者 3 例, B/C 混合型者 3 例, C 型 10 例. 自 17 例患者的克隆库中随机选择了共 45 个克隆进行核酸序列测定, 其中 27 个克隆编码前-X 区, 18 个克隆不编码前-X 基因. 编码前-X 基因的克隆中以 C 基因型为最多, 有 18 个克隆, 来自 7 例患者; 其中 B 型 2 个克隆, 来自 1 例患者; B/C 混合型 7 个克隆, 来自 2 例患者. 10 例患者体内的 HBV 病毒基因组编码前-X 基因, 占采样总数的 58.8% (10/17), 提示多数患者体内的 HBV 基因组编码前-X 基因. 进行 HBV 基因型分型的研究试图阐明前-X 基因的存在与 HBV 基因型之间的关系, 结果发现 C 型测序的 26 个克隆中有 18 个 (69.2%) 克隆编码前-X 区, B 型测序的 8 个克隆中仅有 2 个 (25%) 克隆编码前-X 区, 提示前-X 基因的编码具有一定的 HBV C 基因型倾向性, 但并不具有基因型特异性.

我们<sup>[14]</sup>之前的研究发现前-X 基因编码不能主要由于 3 种突变所导致, 即  $A^{2608} \rightarrow C/T$  替换突变、 $C/A^{2733} \rightarrow T$  替换突变以及上述 2 个位点的双替换突变. 第一种变异导致前-X 区起始密码子 ATG 突变为 C/TTG, 病毒 X 蛋白自动以下一个 ATG 为起始密码子; 第二种变异导致前-X 区 ATG 与原 X 区之间 ATG 之间第 44 位氨基酸编码子发生终止突变, C/AGA 突变为 TGA, 导致前-X 基因表达被提前终止; 双替换突变是指上述的 2 种突变同时发生. 表 1 初步揭示了 HBV 基因型与前-X 基因编码不能之间的关系. 结果发现 A 基因型 1 个克隆、B 基因型 6 个克隆和 B/C 混合型 3 个克隆发生了双替换突变, 而 C 基因型前-X 区编码不能的 8 个克隆均表现为单位点替换突变, 其中  $A^{2608} \rightarrow C/T$  突变 5 个,  $C/A^{2733} \rightarrow T$  突变 3 个, 本组研究结果初步提示 C 基因型 HBV 基因组与其他基因型导致前-X 编码不能的机制是不同的, 相对而言, C 基因型的变异是初步的, 而 A、B 基因型的变异是进一步的. 值得注意的是患者 F298, 在选择性的 4 个测序克隆中, 其中 1 个克隆发生  $A^{2608} \rightarrow C$  替换突变而导致前-X 区编码不能, 其他 3 个克隆未发生替换突变, 这提示前-X 区变异是渐变的, 并不是一成不变的.

针对前-X 多肽氨基酸序列进行的分析发现前-X 多肽存在 2 个高度变异区和一个高度保守区. 前-X 多肽全长 56 aa, 氨基酸序列总一致率为 73.2%. 高度变异区存在于肽段的两端, 分别为 1-10 aa, 一致率为 60.0%; 37-56 aa 为另一高变区, 一致率为 60.0%. 上述 2 个区域的一致率较前-X 多肽的总一致率低 13.2%. 前-X 多肽的中央部分为高保守区, 11-36 aa 段一致率为 88.5%, 19-36 aa 的一致率高达 94.4%. 这些发现对以后前-X 多肽的检测有重要意义. 前-X 多肽之中的变异以替换突变为主, 而之中部分位点的变异展示出 HBV 个体化突变特征<sup>[20]</sup>. 如第 26 aa, 来自其他患者的病毒株均编码 P, 而来自患者 Y931 的 2 个克隆编码 S; 第 40 aa, 来自其他患者的病毒株均编码 Y, 而来自患者 Y983 的 2 个克

隆编码 H, 这些变异提示 HBV 基因组的变异就象人类的指纹, 这在 HBV 生活史中具有什么样的意义, 还需要进一步研究.

前-X 区多肽氨基酸的变异还表现为一些位点的变异具有相对的普遍意义, 比如第 5 aa 的 Y(10)/H(17) (括号中为编码该氨基酸残基的克隆数, 下同), 第 6 aa 的 W(12)/R(15), 第 37 aa 的 G(11)/S(16), 第 38 aa 的 E(15)/K(12), 第 42 aa 的 N(14)/H(13). 这些位点的变化可能具有进一步分型的意义, 需要进一步研究.

总之, 本研究应用分子流行病学研究方法, 自 17 例患者的血清中提取了 HBV DNA 基因组, 之后应用 HBV 基因型分型技术和 PCR-TA 克隆-测序技术展示了前-X 基因的存在, 这些样本来自普通 HBV 感染者, 而不是来自原发性肝癌患者<sup>[30-31]</sup>, 提示前-X 基因的存在是一种普遍现象. 结合本研究组针对前-X 基因的研究<sup>[11, 13-14]</sup>, 我们认为应当加强对前-X 区的研究, 将 Loncarevic et al<sup>[32]</sup>最初的研究提高到蛋白水平. 本研究还提示前-X 基因存在 HBV C 基因型倾向性, 但不存在基因型的特异性.

#### 4 参考文献

- 1 Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 2 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 3 Kann M, Gerlich. Chapter 7: structure and molecular virology. viral hepatitis (Eds. Zuckerman AJ.), 2nd edition, Harcourt Publishers Limited, 1998:77-106
- 4 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版, 北京: 人民军医出版社, 1997:179-182
- 5 Kumar U, Jayasuryan N, Kumar R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein transactivation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5647-5652
- 6 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 7 吴祥甫, 周翊钟, 冯宗铭, 李载平, 夏绍源. 人乙型肝炎病毒-HBV adr 血清型基因组的克隆和限制酶切图谱. *中国科学 B 辑* 1983;2:162-167
- 8 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 克隆的 adr 血清型乙型肝炎病毒(pADR-1)的核苷酸顺序. *中国科学 B 辑* 1986;5:55-65
- 9 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. *解放军医学杂志* 2002;27:116-118
- 10 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X 区编码基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003;11:1091-1096
- 11 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X 编码基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003;11:1097-1101
- 12 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-S-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:761-762
- 13 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因启动子活性的鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:763-765
- 14 董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:42-46
- 15 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防

- 治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 16 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:362-364
- 17 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 18 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 19 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 20 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 21 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 22 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 23 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原 / 抗体同时阳性患者体内 S 基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 24 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 25 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 26 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 27 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-221
- 28 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 29 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 30 Takahashi K, Kishimoto S, Ohori K, Yoshizawa H, Akahane Y, Okamoto H, Mishiho S. A unique set of mutations in the "preX" region of hepatitis B virus DNA frequently found in patients but not in asymptomatic carriers: implication for a novel variant. *Int Hepatol Commun* 1995;3:131-138
- 31 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiho S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 32 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940

## World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.