

乙型肝炎病毒基因分型的临床意义

杨艳杰, 成军, 陈东风, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏

杨艳杰, 成军, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
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: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

虽然近年来对乙型肝炎病毒(HBV)基因组变异已进行了较为系统的研究, 但仍有许多问题尚未解决. 目前研究的热点集中在HBV基因型的特点及临床意义和HBV聚合酶基因变异与核苷类似物耐药性的研究. 根据聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)基因型分型法, 目前已将前-S基因分为A, B, C, D, E, F, G, H八种基因型. 现就HBV基因型分型方法, 基因型与肝炎疾病的关系、预后以及与干扰素、拉米夫定等抗病毒疗效相关性的研究作一综述.

杨艳杰, 成军, 陈东风, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏. 乙型肝炎病毒基因分型的临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1670-1673

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1670.asp>

0 引言

我国是乙型肝炎发病大国, 全球有3.5亿乙型肝炎病毒(HBV)携带者, 我国占三分之一, 每年发病率在6000万人次以上. 相关研究表明, HBV基因有着多种类型, 不同的基因型之间存在着致病性上的差异, 同时病毒基因变异可引起抗药性等不同的后果. 据了解, 目前国内外传统的临床诊断方法无法检测病毒的基因型, 以致于难以全面快速地反映HBV在患者体内的感染状况, 在临床上会表现为漏诊、盲目用药和延误治疗. 同时, 目前一些实验室采用的基因检测方法由于周期长、手段复杂、费用高, 无法做到临床推广. HBV基因型概念提出10a来, 国内外学者从流行病学、分子生物学、临床医学等方面对HBV基因型进行了大量的研究.

1 HBV基因型及分型的方法

HBsAg是HBV包膜的主要蛋白, 根据其抗原性的不同, 将其分为9个主要的血清型(HBsAg的亚型), 即adw2, adw4, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adr_q+, adr_q-和ayr. Okamoto et al^[1]通过对HBV全基因序列比较后发现, 血清亚型的区分并不能真正反应HBV基因组的差异. 认为HBV核苷酸序列差异8%可定为不同

的基因型. 将18株不同血清型的病毒株分为4种基因型: A型(adw), B型(adw), C型(adw, adr, ayr), D型(ayw). 其中adw血清型核酸序列变异程度最大. 1992年Norder et al依据S基因序列的异质性发现了两种的基因型: E型和F型, 补充并完善了HBV基因分型, 将HBV分为6种. 经研究发现HBV基因型与血清型间的关系为A型(adw1, ayw2)、B型(adw1, ayw2)、C型(adr, ayr, adw2)、D型(ayw2, ayw3)、E型(ayw4)、F型(adw4). 不同的血清型可属同一基因型, 而同一血清型可分布于不同的基因型. 因此, 血清型并不能反映基因组的差异. 随后的研究证明, 基因分型的方法较为正确^[2-3].

目前认为, HBV基因型比HBV基因组的概念更具有广泛的应用性, 他可以更好的理解不同HBV株之间的关系. 由于基因型概念的提出是建立在测序的基础上, 因而测序已成为主要鉴定基因型的方法. 目前用于HBV基因型分型的方法有多种, 如全基因序列测定, S基因序列测定, 克隆抗体酶联免疫吸附法(ELISA)基因型分型法, 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)基因型分型法等. 由Lindh et al^[4]最初建立的S基因PCR-RFLP基因分型方法首次可区分A-F等6种不同的基因型. 由于前-S是HBV基因变异最大的区域, 而每一种基因型的变异是有限的, 提示前-S区最适于基因分型^[5]. 随后Lindh et al^[6], 又建立了前-S基因PCR-RFLP基因分型法. 经过比较, 用S基因PCR-RFLP基因分型法不能够分型的样本而使用前-S基因PCR-RFLP基因分型法可以明确分型, 表明随后建立的前-S基因PCR-RFLP基因分型法是一种简明和完善的基因分型方法. Mizokami et al^[7]建立的S基因PCR-RFLP基因分型法, 用分子进化的方法将68例HBV已知基因型的全基因序列及S基因序列排列后, 发现了每一种基因型独特的酶切位点, 用HphI, NciI, AluI, EarI和NlaIV等5种限制性内切酶, 酶切可区分A, B, C, D, E和F基因型. 酶切图谱简明直观. 目前根据HBV全基因核苷酸序列异源性8%或者S基因区核苷酸序列异源性4%, 将不同病毒株分为不同的基因型, 迄今为止, HBV可以分为8个基因型, 即A, B, C, D, E, F, G和H型.

2 HBV基因型的地域分布与致病性

随着HBV基因型分型方法的日趋完善, 将有助于发现新的HBV基因型及开展流行病学调查, 了解HBV各基因型毒力的强弱和致病性的关系, 同时也可用基因

型与疗效相关性的研究. 当前, 按 HBV 基因组核苷酸序列将 HBV 分为 A-F6 型, 其中 A 型主要见于北欧, B 型和 C 型见于东亚和远东, D 型见于世界各地, 但以地中海区域、近东、中东和南亚多见, E 型主要见于撒哈拉沙漠以南的西部地区, F 型主要见于美洲人, G 型发现于法国和美国^[8], 目前认为, 不同地区的优势基因型反映了 HBV 自然感染史发生的变异特点, 是病毒变异后进化的后果. 除地理分布上的差异外, 不同基因型在发病机制上有什么差异仍不得而知. 人类感染 HBV 基因的类别可能与疾病的感染谱及疾病的进展有一定的相关性.

我国 A, B, C, D 等 4 个基因型都存在, 北方城市以基因 C 型流行为主, 由北方至南方, 基因 B 型感染率逐渐增高, 深圳基因 B 型和 C 型感染率比例相当, 少数民族地区基因 D 型有较高的感染率, 西藏则以 D 型为主. 我国南方地区采用微板核酸分子杂交 ELISA 技术, 对 152 例不同临床表现的肝炎患者血清中的 HBV DNA 进行了基因分型. 研究表明: 19 例急性重型肝炎的 HBV 基因型分别为 B 型 3 例, C 型 8 例, D 型 8 例; 14 例急性轻型肝炎的 HBV 基因型的分别为 B 型 6 例, C 型 8 例; 20 例轻型慢性肝炎的 HBV 基因型分别为 B 型 9 例, C 型 11 例; 48 例中度慢性肝炎的 HBV 基因型分别为 A 型 2 例, B 型 14 例, C 型 18 例, D 型 7 例, E 型 2 例, F 型 1 例; 51 例重度慢性肝炎的 HBV 基因型分别为 B 型 11 例, C 型 12 例, D 型 14 例, E 型 1 例, F 型 1 例. 可见 152 例不同临床表现的肝炎患者血清中的 HBV DNA 基因型大多数集中在 B, C 和 D 型这 3 种基因型, 其所占比例分别为 B 型 28.3%(43/152), C 型 37.5%(57/152), D 型 18.4%(28/152), 其中 C 型为最多. 说明我国乙型肝炎患者的 HBV 基因型主要是 B、C 和 D 这 3 型, 并以 C 型最多. 重度肝炎 D 型较为多见. 急性重度肝炎和慢性重度肝炎 D 基因型分别为 42.1% 和 27.5%, 明显高于轻型肝炎, 提示 D 基因型与疾病的严重程度有关.

Mayerat et al^[9]在研究以 A, D 型为优势基因型的西欧国家 HBV 基因型与疾病的关系时发现, 35 例慢性乙型肝炎组中 28 例为 A 型, 仅 4 例为 D 型; 30 例急性自限性肝炎组中 24 例为 D 型, 仅 3 例为 A 型. 尚无法解释 A 型与慢性活动性肝炎, D 型与自限性肝炎相关性的机制, 可能是基因型在病毒与宿主关系上起一定的作用. 提示感染 HBV 后的病情与病毒基因型有一定的相关性. Mbayed et al^[10]报道, 在北美地区, HBV 基因型以 A, F, D 型为主; 基因型与肝癌重度肝炎的关系在某些地区有相关性.

3 HBV 基因型与肝脏疾病预后

人类感染 HBV 基因型的型别可能与感染途径有一定的相关性. 东方国家以母婴传播为主, 而西方国家则以性传播及静脉注射毒品传播为主. Michielsen et al^[11]认为, 母婴传播的危险性取决于 HBV 复制水平. HBsAg 和 HBeAg 均阳性的母亲有 80-90% 的母婴传播危险性, 约有 85% 的婴儿日后成为慢性 HBV 携带者; HBsAg 阳性和

HBeAg 阴性的母亲仅有 2-15% 的母婴传播危险性, 且后代很少成为慢性 HBV 携带者. 这可能与东亚地区以 B, C 型为优势基因型, 其 HBV 呈高复制水平有关.

不同基因组可能有不同的致病性. 在台湾的 1 个调查中检测了 100 例无症状 HBV 携带者和 170 例组织学证实为慢性乙型肝炎的肝细胞癌患者, 结果表明, 台湾除 E 型外, 其他所有基因组都有, B 和 C 型占优势. HBV (HBV) 感染的结局与所感染的病毒基因型有关, C 型 HBV 感染者肝脏受损较严重, 而 B 型感染者中年以前容易发展成肝细胞肝癌. 这份台湾的研究表明, C 型 HBV 在肝硬化患者中的比例要比年龄相当的无症状携带者高得多, 而且 C 型 HBV 感染者发展至晚期肝病者显著多于 B 型感染者. 另外, 还观察到 C 型在年长人群中的感染率比较低, 而 B 型在各年龄组的患病率相对恒定. 这些都提示, C 型在迁延性 HBV 感染的免疫清除阶段滞留较长时间, 并且导致较重的肝脏炎症损害; 而 B 型则可能从免疫反应阶段迅速转入休眠相, 这时血清中几乎测不到 HBV DNA. 另一个值得注意的发现是, B 型病毒感染和 <50 岁患者较早发生肝癌显著相关, 而 C 型病毒感染则和 >50 岁患者肝癌的发病显著相关. 总之, 大多数已知的 HBV 基因型都存在于台湾, 并且以 B 型和 C 型为主, C 型可造成较严重的肝病, 而 B 型可能与年轻台湾人肝细胞肝癌的发生有关. 这些发现表明, 不同 HBV 基因型可能具有不同的致病性. Mayerat et al^[12]在研究以 A, D 型为优势基因型的西欧国家 HBV 基因型与疾病谱的关系时发现, 35 例慢性活动性肝炎组中 28 例为 A 型, 仅 4 例为 D 型; 30 例急性自限性肝炎组中 24 例为 D 型, 仅 3 例为 A 型. 尚无法解释 A 型与慢性活动性肝炎、DB 与急性自限性肝炎相关性的机制, 可能基因型在病毒与宿主关系上起一定作用. A 型与 D 型相比, A 型可能抗原性较弱, 免疫清除能力弱. 此假说尚需进一步研究. Lindh et al^[13]研究了东亚 HBV 感染者中, HBV CP 变异与基因型的关系及其对 HBV 复制和肝损害的相关性. 发现 CP 变异多发生于 C 型, 可引起更严重的肝脏炎症和纤维化, 与 HBV 载量、HBeAg 状态无关, 而前 -C 变异常与较轻的炎症、HBeAg 阴性和较低水平的 HBV 复制相关. 他们认为, CP 变异是进展性肝损害的一个标志. 临床资料显示, HBsAg 的清除可能与 HBV 基因型有关. 与 B 基因型相比, C 基因型有更高的 HBeAg 阳性率, 分别为 16% 与 53%, 即使按性别、年龄、肝脏疾病进行配对, 同样有显著差异. 甚至认为 B 基因型的自发性 HBeAg 清除要比 (基因型) 早 10 a, 并且在 HBeAg 清除后, 肝脏生物化学指标持续正常. 这一差别可能是导致基因 B 型感染与基因 C 型感染后临床结局不同的原因之一.

据西班牙学者报道, 感染 A, D, F 基因型 HBV 的慢性乙型肝炎患者的长期预后不同. 巴塞罗那大学消化病研究所的 Sanchez-Tapias et al^[14]长期随访 258 例感染不同基因型 HBV 的西班牙慢性乙型肝炎患者, 观察

并比较其临床与病毒学后果,以探讨慢性乙型肝炎的预后是否与HBV基因型有关.结果发现,A,D,F基因型的发病率分别为52%,35%和7%.A基因型感染患者的持续生化缓解与HBV DNA清除率高于D基因型(log-rank: 14.2; $P=0.002$)和F基因型(log-rank: 4.2; $P=0.03$).A基因型患者的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)清除率高于D基因型(log-rank: 4.6; $P=0.03$).Cox回归分析显示,持续缓解和HBsAg清除与A基因型感染相关.乙型肝炎e抗体(抗-HBe)的血清转化与HBV基因型无关,但随访产生抗HBe的患者(log-rank: 4.5; $P=0.03$)或基线时呈抗-HBe阳性的患者(log-rank: 6.66; $P=0.009$)发现,A基因型患者在血清转化后的持续缓解率高于D基因型.F基因型患者的肝病相关性死亡多于A基因型($P=0.02$)和D基因型($P=0.002$).根据上述发现,Sánchez-Tapias et al认为,感染A,D,F基因型HBV的慢性乙型肝炎患者的长期预后是不同的.

为了探讨HBV基因型对肝脏疾病进展的影响,日本千叶大学的Sumi et al调查了585例慢性乙型肝炎感染患者,包括258例经组织学证实的慢性肝病(CLD)患者和74例肝细胞癌(HCC)患者.其中,B基因型的晚期纤维化(F3或F4期)和HCC患者的平均年龄显著大于C基因型患者(P 分别为0.018和0.024).结果发现,B基因型CLD患者的活检乙型肝炎e抗原(HBeAg)阴性率和累积HBe血清转化率显著高于C基因型患者(P 分别为 <0.01 和0.022).多变量分析发现,B基因型、前-核心突变、ALT水平高和重度组织学活性是HBe血清转化的独立相关因素.所有经活检证实CLD的患者中,B基因型晚期纤维化患者的比例显著低于C基因型(分别为4/30例和74/224例; $P=0.034$),而且,年轻患者(<45 岁)的差异更为明显(分别为1/25例和47/180例; $P=0.020$),但老年患者(>45 岁)未见显著差异.另外,在CLD和HCC患者中,各基因型的比例相同(B和C基因型分别占11.2%和87.0%、10.8%和89.2%).Sumi et al认为,虽然B基因型患者出现HBe血清转化较早、肝脏纤维化进展较慢、发生HCC较晚,但B和C基因型慢性肝病患者进展为晚期纤维化、发生HCC的终生危险性没有差异.

4 乙型肝炎病毒基因分型与抗病毒的疗效

乙型病毒性肝炎是一类严重危害人类身体健康的感染性疾病,全球有3.5亿人感染乙型肝炎(HBV其中近10%的患者可因持续HBV感染而导致肝硬化或肝细胞癌^[15].虽然HBV的致病机制十分复杂,但HBV在体内持续存在是引起多种免疫紊乱的始动因子,只有有效地阻断HBV在体内的复制,直至根除HBV,才能最终控制肝脏进行性炎症反应,从而消除各种严重的并发症.但是到目前为止,临床上仍然缺乏理想的抗HBV药物;尽管干扰素被认为是目前最有价值的抗HBV制剂,但其总显效率也不超过40%^[16],并且对“母婴垂直传播”引起的HBV感染显效率更低甚至无效.因此,寻

找更有效的抗HBV药物就显得十分必要.虽然近年来科学家对HBV基因组变异已进行了较为系统的研究,但仍有许多问题尚未解决.目前研究的热点集中在HBV基因型的特点及临床意义和HBV聚合酶基因变异与核苷类似物耐药性的研究.

随着长效干扰素的临床应用和不同抗病毒联合治疗方案的推出和优化,HBV分子病毒学的特点与抗病毒治疗的关系可能越来越引起临床医师的关注.对148例接受干扰素治疗的e抗原阳性的慢性乙型肝炎患者进行分析.结果显示,与非A基因型患者相比,A基因型患者对标准干扰素治疗应答较好($P=0.014$).多因素回归分析显示,与基线HBV DNA和ALT水平相比,基因型A可作为更好的治疗应答预测指标($P=0.001$;相对危险(RR)为6.19,95%CI为1.94-19.8).相反,不同的基因型对长疗程干扰素治疗应答率没有差别.对基线和治疗结束时HBV序列研究发现,只有A基因型在治疗结束时CP变异率增高($P<0.001$).此外,与B,C或D基因型相比,C基因的氨基酸突变率在A基因型中发生率最低.HBV基因型A对标准干扰素治疗应答率较其他基因型高,这与不同基因型的分子病毒学特点有关.感染不同基因型的HBV患者,接受干扰素治疗的合理疗程也应不同.

不同的基因型与某些变异相关,比如前-C区1896变异是基因型依赖的,在B,C,D和E型的G1896与T1858配对的干攀结构不稳定,1896的G-A变异使干攀结构趋于稳定,故前-C终码变异率较高.而A和F型的1858位核苷酸为C,能与1896位核苷酸G形成稳定的结构,较少发生变异.所以,前-C区1896变异的流行率与基因型相关,这就造成HBeAg阴性HBV感染流行率与地区优势基因型相关的现象.这一观点已被广泛证实.不同基因型HBV感染后的临床病情轻重、对治疗的反应可能是不同的.国内外均有研究发现,在中重度慢性肝炎、肝硬化、肝癌人群中,基因C型的检出率高于基因B型的检出率.基因A型和基因B型患者接受干扰素、拉米夫定治疗后,HBeAg血清转换率较高;而基因D/E型和基因C型的HBeAg血清转换率较低.而且,基因B型感染者发生肝癌后,对栓塞治疗的反应优于基因C型,栓塞治疗后预后好,无再发;而对照组中的C基因型患者发生肝癌后,在栓塞治疗后仍继续发展,最终死于肝衰竭.因HBV感染导致终末期肝病接受肝移植患者中,基因C型和基因B型移植后感染再发率较高.

拉米夫定(Lamivudine)是新一代核苷类抗病毒药.开始用于治疗艾滋病.1995年后逐渐发现其对HBV DNA的抑制作用,并在全球多中心先后进行了拉米夫定治疗乙型肝炎的I期和II期临床试验,是迄今为止唯一经历长期慢性乙型肝炎治疗试验的核苷类药物.所有临床研究均证实,拉米夫定有较强的抑制HBV的作用,而且不良反应较轻微,发生率也不高,患者的耐受性较好,他的出现给乙型肝炎治疗带来了新的希望^[17].在美国, α -干扰素(IFN α)和拉米夫定是目前惟一批准的治

疗慢性乙型肝炎的药物^[18]。干扰素除具有直接抑制病毒复制作用外, 还对患者的免疫应答机制的调节及激活发挥作用。 α -干扰素抗病毒作用的重要机制在于启动激活机体的免疫功能。但在实际应用中, 除干扰素的毒副作用外, 他还有可能诱导机体产生 α -干扰素抗体和HBV前-C期基因突变, 不能够长期使用, 其有效率仅在30-40%^[19]。新的逆转录酶抑制剂-核苷类的发现为乙型肝炎患者的治疗带来希望。拉米夫定在临床实验中显示出持续抑制病毒复制的抗病毒作用。拉米夫定作为一种双脱氧胞嘧啶核苷类似物, 他可与DNA聚合酶结合后, 抑制多聚酶活性, 同时与dCTP掺入DNA链, 造成HBV DNA链合成终止, 抑制HBV的复制^[20]。用药后相当数量的患者可在较短的时间内使HBeAg抗原阴转和HBV DNA降为 $<1 \times 10^6$ copy/L。但是, 长期服用易耐药或停药后易出现反跳。目前认为, 其主要原因是位于多聚酶结构区域的酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)是该酶的活性区域, 编码多聚酶的P基因的个别核苷酸变异可以使之发生改变^[21]。在中国地区进行的拉米夫定临床实验结果显示YMDD变异株的出现可引起病毒对拉米夫定的耐药。另外, 多聚酶其他部位的变异可能导致拉米夫定与病毒结合力降低, 因而治疗反应差, 需要进一步证实^[22]。

已有的研究表明, 拉米夫定耐药性的产生与HBV P基因突变有关, 耐药株中多见P基因变异且相对集中于YMDD基序。YMDD变异分为两种, 一种是HBV P基因第550位氨基酸由M突变为V, 另一种是HBV P基因第550位氨基酸由M突变为, 此两种变异分别由HBV第739位碱基A突变为G和741位G突变为T所引起。Tassopoulos et al^[23]发现, 治疗基线时血清HBV DNA滴度的中位数较高者发生变异的可能性增高, 前-C区变异株产生耐药性的机会高于野毒株。Allen et al报道在20例发生治疗耐药的患者中, YVDD/L528M变异株为18例, 而YIDD变异株仅为2例。提示YVDD变异株较YIDD常见, 而Pessoa et al认为YIDD变异株发生率高于YVDD发生率。

以上资料提示, 对于拉米夫定治疗无效或反跳的患者, 不一定仅仅由于YMDD变异而产生耐药。HBV多聚酶区其他部位的变异以及基因型不同可影响其拉米夫定的治疗效果。随着人们对基因型不断深入的研究, 将对临床合理使用拉米夫定提供有益的启示。

总之, 今后还需进行更多的临床研究和实验, 以确定是否需要将基因型列为临床监测指标, 指导乙型肝炎临床治疗和预后判断。

5 参考文献

- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayum M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;69:2575-2583
- Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993;74:1627-1632
- Sastrosoewignjo RI, Sandjaja B, Okamoto H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Indonesia. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:491-498
- Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997;175:1285-1293
- Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992;73:1201-1208
- Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of pre-Samplicon. *J Virol Methods* 1998;72:163-174
- Cao K, Mizokami M, Orito E, Ding X, Ge XM, Huang GY, Ueda R. TT virus infection among IVDUs in south western China. *Scand J Infect Dis* 1999;31:21-25
- Karthigesu VD, Allison LM, Fortuin M, Mendy M, Whittle HC, Howard CR. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. *J Gen Virol* 1994;75:443-448
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999;6:299-304
- Mbayet VA, Lopez JL, Telenta PF, Palacios G, Badia I, Ferro A, Galoppo C, Campos R. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *J Clin Microbiol* 1998;36:3362-3365
- De Groote K, Van Damme P, Deprettere A, Michielsens P. Prevention of vertical transmission of hepatitis B virus infection. Is there a standard policy in Flanders (Belgium)? *Acta Gastroenterol Belg* 1997;60:255-258
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999;6:299-304
- Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2000;7:258-267
- Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856
- Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 姚桢. 分子乙型肝炎病毒相关病学. 第1版, 北京: 中国医药科技出版社, 1998:138
- Hollinger FB. Factors contributing to the evolution and outcome of cirrhosis in hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1999;3:741-755
- Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD, Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol* 1997;26:1393-1395
- 孙正伟, 张源潮. HBV基因型与拉米夫定疗效相关性的研究. 国外医学·病毒学分册 2002;3:96-98
- Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condeay LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997;349:20-22
- Rodriguez-Novoa S, Gomez-Tato A, Aguilera-Guirao A, Castroagudin J, Gonzalez-Quintela A, Garcia-Riestra C, Regueiro BJ. Hepatitis B virus genotyping based on cluster analysis of the region involved in lamivudine resistance. *J Virol Methods* 2004;115:9-17
- Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condeay L, Gray DF. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis Be antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine precore mutant study group. *Hepatology* 1999;29:889-896