

干扰素作用下乙型肝炎病毒的变异机制

王卫峰, 周晓东

王卫峰, 浙江医院消化内科 浙江省杭州市 310013
周晓东, 中山大学附属第二医院医学研究中心 广东省广州市 510120
王卫峰, 男, 1977-03-18 生, 河南省卫辉市人, 汉族, 2000 年中山大学
硕士, 住院医师. 主要从事病毒性肝炎的研究.
国家科技部 973 计划项目, No. G1999054105
通讯作者: 周晓东, 510120, 广东省广州市沿江西路 107 号, 中山大学附属第
二医院医学研究中心. xdzhou@public.guangzhou.gd.cn
电话: 020-81215583
收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-26

Mutation of hepatitis B virus with treatment of interferon

Wei-Feng Wang, Xiao-Dong Zhou

Wei-Feng Wang, Department of Gastroenterology, Zhejiang Hospital,
Hangzhou 310013, Zhejiang Province, China
Xiao-Dong Zhou, Medical Research Center, the Second Affiliated
Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510120, Guangdong
Province, China
Supported by the Major State Basic Research/Development Program of
China (973 Program), No. G1999054105
Correspondence to: Dr. Xiao-Dong Zhou, Medical Research Center,
the Second Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou
510120, Guangdong Province, China. xdzhou@public.guangzhou.gd.cn
Received: 2004-12-17 Accepted: 2005-01-26

Abstract

AIM: To investigate the mutation of hepatitis B virus (HBV) with the treated with interferon (IFN)- α 2b.

METHODS: Different doses of IFN- α 2b were added to the HepG2.2.15 cell culture. The α -fetoprotein (AFP) in the supernatant was assayed by Western blot. HBV DNA was isolated from the culture medium. HBV C gene amplified by PCR was cloned by T-A cloning into pGEM-T easy vector. The recombinant was sequenced with T7/SP6 primer, and analyzed by DNA software.

RESULTS: AFP in the culture medium was detected, which was not reduced after IFN- α treatment. There were two subtypes of preC/C gene in the control group. The homogeneity was 93%, with 10 amino acids different, 6 of which were of identical characteristics. The same subtypes were found in the experiment group. The proportion of the dominant strain gene was altered in the high dose IFN group. There were 4 insertion/deletion mutations in the high dose IFN experiment group, which resulted in reading frame shift. The mean homogeneity was more than 97%.

CONCLUSION: HBV pre-C/C gene insertion/deletion mu-

tants exist in HepG2.2.15 cells treated with high dose IFN- α . Compared with the dominant strain, the mean homogeneity of the mutant strain was more than 97%.

Key Words: IFN- α 2b; Hepatitis B virus; Mutation

Wang WF, Zhou XD. Mutation of hepatitis B virus with treatment of interferon. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(6):724-728

摘要

目的: 体外研究干扰素- α 2b(IFN- α 2b)作用下乙肝病毒(HBV)突变机制。

方法: 以不同浓度 IFN- α 2b 反复作用于 HBV 分泌型 HepG2.2.15 细胞, Western blot 方法检测培养细胞上清中 AFP, 提取培养细胞上清中 HBV 基因组 DNA, 以聚合酶联反应扩增 HBV C 基因, 克隆入 pGEM-T easy 载体, 鉴定后行测序分析。

结果: Western blot 方法检测各组培养细胞上清中 AFP, 实验组 AFP 未见明显减少; 序列分析表明, 对照组前 C/C 基因克隆有两种类型, 同源性 93%, 有 10 个氨基酸的差别, 其中 6 个氨基酸相比, 氨基酸的性质相同; 实验组同样具有这两种克隆, 其中优势株所占比例分别为 12/15、14/14 和 9/15, 高剂量组与对照组相比优势株所占比例差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组高剂量 IFN 组出现了四个插入/缺失突变克隆, 造成前 C/C 基因移码突变, 其中 C31-2 插入突变发生在前 C 区, 另外 3 个突变均发生在 C 区, 与优势株相比平均同源性 97% 以上。

结论: 在 rhIFN- α 高剂量条件选择下, 能检测到 HepG2.2.15 HBV 前 C/C 基因插入或缺失突变株, 突变株与优势株相比基因序列同源性平均在 97% 以上。

关键词: 干扰素 - α 2b; 乙肝病毒; 突变

王卫峰, 周晓东. 干扰素作用下乙型肝炎病毒的变异机制. 世界华人消化杂志 2005;13(6):724-728
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/724.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)变异是导致 HBV 持续性感染的一个重要原因. 在 IFN- α 临床治疗过程中, HBV 突变株被检测到的概率增加^[1-10], 但突变株产生的机制目前存在着不同意见^[11]. 通过体外研究 IFN 作用下 HBV 突

变现象将有助于揭示 IFN α 直接分子作用在 HBV 突变株产生过程中的权重, 为探讨 IFN 致 HBV C 基因变异的多重机制提供科学的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2. 2. 15 细胞由广州中医药大学病毒室惠赠; HepG2 细胞系、JM109 菌种为林百欣医学研究中心保存; DMEM 培养基、胎牛血清、G418、谷氨酰胺、蛋白质预染 Marker 购自美国 Invitrogen 公司; IFN α 2b, 兔抗人 AFP, Pfu 聚合酶购自品美实验有限公司; DL2000 (DNA ladder), 1kb DNA ladder 购自广州威佳公司; SDS-PAGE 试剂、蛋白酶 K、TaqDNA 聚合酶购自上海生物工程有限公司; QIAquick gel extraction kit 购自基因公司; pGEM[®]-T easy vector 购自美国 Promega 公司; E. Z. N. A plasmid miniprep kit 购自美国 Omega 公司; Not I 内切酶购自 MBI 公司。

1.2 方法 将 HepG2. 2. 15 细胞悬液调整为 $4 \times 10^8/L$, 分组接种于六孔板, 每孔 2 mL, 培养 3 d, 细胞生长状态良好, 该培养细胞株用于实验研究。IFN 作用浓度为 100, 500, 1 000 kU/L 共 3 个剂量组, 对照组不加 IFN, HepG2 细胞作为空白对照, 每组 3 个复孔。实验组每日换液, 培养液含不同浓度 IFN, 连续培养 20 d, 最后 1 次换液(用无血清 DMEM 培养液)后细胞继续培养 48 h, 留取的上清立即于 $-20^{\circ}C$ 保存待测。采用台盼蓝排斥试验检测细胞活力。培养上清中 AFP 的检测采用 Western blot 方法, 对实验结果进行图像分析。细胞上清中 HBV DNA 的提取通过蛋白酶 K 消化, 酚、氯仿纯化, 从培养细胞收获的上清中提取病毒基因组 DNA, 溶于 TE 溶液中, $-20^{\circ}C$ 保存待测。根据 Genbank 中 HBV ayw 亚型全基因序列, 选择保守区域设计出特异性引物: P1 5' -GGGAGGAGATTAG GTTAA -3'; P2 5' -GTACAGTAGAAGAATAAAGC -3'。取上清 HBV DNA 提取物 5 μ L, Pfu 聚合酶 2.5U 及适量引物、dNTP、三蒸水、PCR 缓冲液组成 50 μ L 反应体系, 在如下条件下反应: $94^{\circ}C$ 5 min, 然后 $94^{\circ}C$ 1 min, $55^{\circ}C$ 1 min, $72^{\circ}C$ 1 min, 共 25 个循环, 最后 $72^{\circ}C$ 延伸 7 min。取纯化后的 PCR 产物 7 μ L、10 \times 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 1 μ L、dATP 1 μ L、Taq 酶 1 μ L、 $70^{\circ}C$ 反应 30 min。取适量反应产物与 pGEM-T easy 载体连接, 然后氯化钙法转入受体菌 JM109 中。经蓝白斑筛选获得可能插入目的 DNA 的白色菌落, 提取质粒并进行酶切 (Not I 内切酶) 和 PCR 鉴定 (条件同上)。将鉴定阳性者送上海申有公司测序。测序结果用 DNA 软件分析。

2 结果

用 Western blot 方法检测 AFP, 在 70 ku 位置上的

蛋白能特异性地被 AFP 抗体识别 (图 1, 2); 对免疫杂交后条带作图像分析, 对照组 AFP% 作为 100%, 各实验组 AFP% 分别为: 低剂量组 114%, 中剂量组 94%, 高剂量组 118%。方差分析 $P = 0.870$, 即各组之间差异不显著。

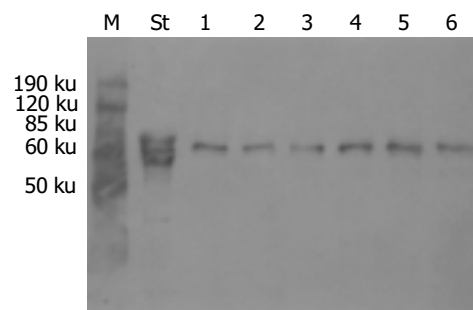


图1 对照组、低剂量组 Western blot 结果。M: 蛋白预染 marker; St: AFP 标准; 1-3: 对照; 4-6: 低剂量。

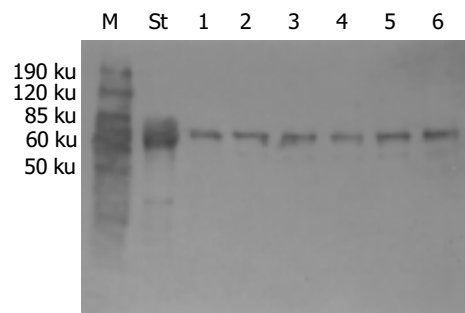


图2 中、高剂量组 Western blot 结果。M: 蛋白预染 marker; St: AFP 标准; 1-3: 中剂量; 4-6: 高剂量。

2.1 PCR 扩增 HBV DNA 通过上述方法从培养细胞收获的上清中提取病毒基因组 DNA, 溶于 TE 溶液中, 经 UV-2201 型紫外分光光度计测定其 $A_{260} = 0.022$, $A_{280} = 0.012$, 浓度为 1.1 g/L, $A_{260}/A_{280} = 1.83$, 表明 DNA 纯度较高。以提取物为模板, 按上述方法扩增 HBV C 基因, PCR 产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见大小约 770 bp 的片段, 多次实验此结果均稳定出现 (图 3)。

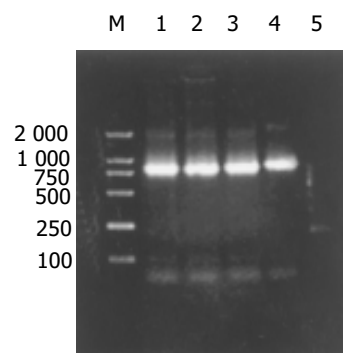


图3 C 基因 PCR 结果。M: DL2000 分子量标准 (bp); 1: 对照; 2: 低剂量; 3: 中剂量; 4: 高剂量; 5: 空白对照。

2.2 HBV C 基因 DNA 克隆 将 HBV C 基因与 pGEM-T easy 载体连接后转化至受体菌 JM109; 经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 用 OBI 质粒提取 kit 提取质粒; 由于插入片断两端含有 *Not* I 酶切位点, 作 *Not* I 单酶切可以释放出插入基因(图 4), PCR 鉴定可以扩增出 770 bp 大小片断, 均与预期相符, 可以初步确定 pHBV 是 pGEM-T easy 与 HBV C 基因连接的重组体。

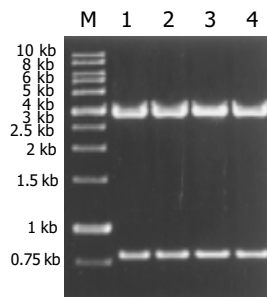


图4 重组质粒酶切. M: 1kb 分子量标准; 1: 对照; 2: 低剂量; 3: 中剂量; 4: 高剂量。

2.3 HepG2.2.15 细胞 HBV C 基因序列分析 C区克隆基因大小为 770 bp, 前C区编码 29 个氨基酸, C区编码 183 个氨基酸, 包含有完整的编码序列. 对照组前 C/C 基因克隆有两种类型, 优势株所占比例 14/15, 同源性 93%, 两种类型基因有 10 个氨基酸的差别, 其中 6 个氨基酸对比氨基酸的性质相同(表 1); 实验组同样具有这两种克隆, 其中优势株所占比例分别为 12/15、14/14 和 9/15; 用统计学方法比较实验组和对照组中优势株所占比例, Fisher 精确概率检验法(Fisher's exact test), 低剂量组 $P = 0.33$; 中剂量组 $P = 1.00$; 高剂量组 $P = 0.04$. 高剂量组与对照组相比优势株所占比例差异有统计学意义; 实验组高剂量 IFN 组出现了 4 个插入/缺失突变克隆, 造成前 C/C 基因移框突变, 其中 C31-2 插入突变发生在前 C 区, 另外 3 个突变均发生在 C 区, 与优势株相比平均同源性 97% 以上(表 2)。

表1 优势株与次优势株氨基酸序列比较

位置密码子	氨基酸野生株	氨基酸突变株
41	T	S
56	V	I
95	T	N
103 ¹	V	S
112	D	E
120 ¹	T	V
126	F	I
145	I	L
197 ¹	F	S
210 ¹	P	S

¹氨基酸性质发生变化。

表2 四种移框突变分析

克隆号	位置核苷酸(nt)	类型突变	突变后果
C31-2	nt 13	插入	密码子 25ATC→TAA, e 抗原不能表达
C32-4	nt 108	缺失	密码子 60CTA→TAG, c 蛋白提前终止
C32-5	nt 283	缺失	密码子 95ATG→TGA, c 蛋白提前终止
C31-4	nt 598	插入	密码子 199 后的氨基酸序列改变

3 讨论

C 基因测序结果显示, 在对照组和实验组均存在着不同的 HBV 毒株, 这表明 HepG2. 2. 15 细胞内 HBV 具有异质性. 目前研究结果表明, 在慢性 HBV 感染者体内可发现 3 种类型的基因异质性^[12]. 第一类, 不同的 HBV 基因型(A-F)在人群中稳定传播; 第二类, HBV 感染者体内的 DNA 序列发生自发性突变, 主要是在 HBV DNA 复制过程中, 由于 HBV DNA 逆转录酶的不精确性而造成的, 如多种类型的变异体形成; 第三类, 是由于在某些外来干预因素的作用下进行选择, 使得某些类型的突变体存活下来, 改变了病毒的基因表型, 最常见的变化是增加了病毒复制的活性, 或对于抗病毒药物产生了耐药性. 后两类 HBV 异质性孕育出了准种的概念, 准种是用于表现遗传物质异质性的概念, 其定义是物种的基因组 DNA 或 RNA 的碱基序列在统计学上高度一致, 但个体之间又存有差异的一组群体. 产生的原因是由于 RNA 多聚酶或逆转录酶不具有校对功能, 从而产生一群存在不同位点变异的基因组 DNA 或 RNA. 在宿主免疫压力的作用下, 或在药物的干预下, 准种群经过筛选, 遗留下优势种群耐受宿主内环境, 并继续变异. 1993 年有学者^[13-14]指出 HBV 在患者体内变异程度达到了准种的定义标准, 近年来一些研究支持 HBV 准种假说. 更有学者^[15-29]研究了经拉米夫定治疗前后的准种漂变现象。

了解 HBV 基因异质性与准种特点, 对于研究 HBV 基因变异是非常重要的, 首先, 他使我们认识到机体内 HBV 变异是受两方面共同作用的结果, 其内因是 HBV 逆转录酶存在校读偏差, 外因是存在免疫压力和药物的干扰, 在内因和外因的共同作用下 HBV 不断的发生变异, 因此 HBV 变异是绝对的, 而突变的程度和速度是相对的. 其次, 了解 HBV 基因异质性与准种特点, 有助于全面理解 HBV 基因突变的特点和规律. 如果从准种这一角度来看 HBV 的基因变异, 因为很难控制所得到的 HBV 基因片段总是来源于同一病毒株, 因此关于 HBV 基因突变的生物学意义及临床意义应持谨慎态度. 准种最大的特点是从患者体内整个病毒群体水平上去认识病毒的生物学特征及临床意义, 不再注重某种单个的所谓野生型或变异株的意义. 尽管目前已在不同病变和不同感染状态的感染者发现了许

多变异株, 但对其生物学意义大多还是推测性的, 可以肯定因果关系的证据极为有限. 因此, 认为评估 HBV 准种群体的异质性程度可能比鉴定单个特殊的病毒变异株更重要, 这种异质性赋予了 HBV 群体更强的生存适应能力.

在高剂量 IFN 组发现有 4 个克隆发生了插入或缺失变异 (4/15), 插入或缺失的碱基数不是 3 的倍数, 引起移框突变, 造成 HBcAg 和 / 或 HBeAg 的不完整表达或不表达. 而在对照组及其他实验组没有见到这种类型的突变株, 显示这种突变和高剂量 IFN 高度相关. 另外, 根据准种理论, 研究 HBV 变异不仅要分析单个突变株的意义, 更要从病毒群体水平去认识病毒的生物学特征及临床意义. 因此我们分析了高剂量组内优势株的比例在 IFN 作用下的变化, 结果表明, 与对照组相比, 优势株的比例发生了变化, 这种变化具有统计学意义, 即可以认为, 受高剂量 IFN 干扰的影响, 优势株在群体中的比例发生了变化.

Radecke *et al*^[1] 在研究高剂量 IFN 治疗对前 C/C 基因影响时, 发现 HBcAg 有稳定的氨基酸替代. 表明高剂量 IFN 对 HBcAg 免疫显性表位有选择作用. 但这种选择作用是靠 IFN 的免疫调节机制还是其直接抗病毒机制, 作者没有加以阐述. 在本实验中, 高剂量 IFN 组发现核心基因有 4 个克隆出现插入或缺失突变, 与 Radecke *et al* 的研究结果一致. 虽然这些突变位置较为分散, 突变部位没有规律, 但他们共同的结果是造成 HBcAg 部分表达或不表达. 由于 HBcAg 是 HBV 的重要结构蛋白, 具有多种功能, 他的不完整表达必然会影响病毒颗粒的包装过程, 如果出现在体内, 还可以逃避宿主免疫系统的攻击, 降低机体的清除作用. 由于体外实验中缺乏机体内的免疫环境, IFN 对 HBV 的作用只表现为直接分子作用机制, 因此推测这种突变的机制是 IFN 的直接抗病毒效应.

在这种效应下, 这些突变株的产生我们分析有两种可能性. 第一, 这种变异株在 IFN 作用前已经出现, 是原有准种的一种, 由于野生株对 IFN 比较敏感, 在 IFN 作用下逐渐减少, 使得这种对 IFN 不敏感的变异株比例相对增加, 能够被检测出来. 在其他病毒研究中发现, 一些病毒如麻疹病毒、单纯疱疹病毒和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒在治疗前就存在一些耐受 IFN 的毒株, 这些毒株对 IFN 的耐受作用使得病毒感染持续存在^[30-32], 这种现象支持了上述观点. 第二, 变异株是在 IFN 作用开始后出现的, 即由原来的野生株突变而来, 是一种新出现的突变株, 这种观点抛弃准种理论, 认为该突变株的出现是一种真正意义上的突变现象, 而不是选择的结果. 突变的发生和病毒的复制率以及聚合酶的错配率有关, 有研究表明, 杂

交实验检测阳性者, 病毒复制水平 10^{11} 个颗粒 / 日, HBV 聚合酶的错配率在 10^{-3} – 10^{-5} 之间, 即病毒复制一个循环出现单个碱基错配的可能性为 10^{-3} – 10^{-5} , 如果每日产生 10^{11} 个 HBV 颗粒, 那么 1 d 中就可以产生 10^6 – 10^9 个单碱基突变株.

Sells *et al* 人在对 2. 2. 15 细胞研究中发现, 细胞培养上清中可以检测到 HBsAg、HBeAg 以及完整的 Dane 颗粒, 胞质中可以检测到 HBV 各种复制中间体, 特别重要的是, 在胞核中发现了共价闭合环状 HBV DNA 游离体, 即 cccDNA. 由于自然感染状态下 cccDNA 是细胞核内 HBV 复制的模板, 因此, 在 2. 2. 15 细胞核中检测到 cccDNA 表明这种人工构建细胞系中存在着 HBV 自身复制的过程, 这为体外研究 HBV 在各种状态下生物学特性及其变化提供了可能.

2. 2. 15 细胞生长状态对 HBV 复制很重要, 生长期细胞内游离型 HBV 颗粒较少, 静止期细胞内 HBV 复制活跃, 是生长期细胞内病毒量的 10–100 倍. HBV 复制中间体在细胞融合后一段时间快速积累增加几百倍, 这一时期是 HBV 核心颗粒积累的过程, 对 IFN 作用较为敏感.

本实验中以不同剂量 IFN 反复作用于 2. 2. 15 细胞, 达到一定时间后, 收获细胞上清, 通过免疫印迹的方法检测上清中 AFP 的含量, 并将实验组与对照组中的 AFP 比较, 结果显示各实验组中 AFP 与对照组相比未见减少, 表明 IFN 在实验组剂量下主要发挥抗病毒作用, 对 2. 2. 15 细胞增生及蛋白合成没有抑制作用.

蛋白酶 K 消化 – 饱和酚: 氯仿 (1:1) 抽提法提取细胞上清中的 HBV DNA, PCR 法扩增靶片段, 采用 TA 克隆的方法将单个实验组内可以获得的克隆尽可能地存储在载体中. 利用 pGEM-Teasy 载体固有的 *NotI* 酶切分析, 发现插入片段与 PCR 扩增的靶片段长度相当; 随机选择菌落测序, 用 clustalx 软件对测序结果进行分析. Pfu 酶的错配率为 2.6×10^{-6} , 而我们扩增的靶片段长度仅 770 bp, 因此 Pfu 酶引起的碱基错配不会影响到实验的真实性.

4 参考文献

- 1 Radecke K, Protzer U, Trippler M, Meyer Zum Buschenfelde KH, Gerken G. Selection of hepatitis B virus variants with aminoacid substitutions inside the core antigen during interferon-alpha therapy. *J Med Virol* 2000;62:479-486
- 2 Zampino R, Marrone A, Cirillo G, del Giudice EM, Utili R, Karayiannis P, Liang TJ, Ruggiero G. Sequential analysis of hepatitis B virus core promoter and precore regions in cancer survivor patients with chronic hepatitis B before, during and after interferon treatment. *J Viral Hepat* 2002;9:183-188
- 3 Cabrerizo M, Bartolome J, Otero M, Ruiz-Moreno M, Carreno V. Sequence variation of hepatitis B virus precore-core open reading frame isolated from serum and liver of children with chronic hepatitis B before and after interferon treatment. *J Med Virol* 1999;58:208-214

- 4 Karasawa T, Aizawa Y, Zeniya M, Kuramoto A, Shirasawa T, Toda G. Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: spontaneous seroconversion and interferon-induced seroconversion. *J Med Virol* 1995;45:373-380
- 5 Laskus T, Rakela J, Persing DH. Nucleotide sequence analysis of precore and proximal core regions in patients with chronic hepatitis B treated with interferon. *Dig Dis Sci* 1995;40:1-7
- 6 Lampertico P, Manzin A, Rumi MG, Paolucci S, Del Ninno E, Clementi M, Colombo M. Hepatitis B virus precore mutants in HBeAg carriers with chronic hepatitis treated with interferon. *J Viral Hepat* 1995;2:251-256
- 7 Seo Y, Yoon S, Hamano K, Nakaji M, Yano Y, Katayama M, Ninomiya T, Hayashi Y, Kasuga M. Response to interferon-alpha in chronic hepatitis B with and without precore mutant strain detected by mutation site-specific assay. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:460-464
- 8 Chen RY, Bowden S, Desmond PV, Dean J, Locarnini SA. Effects of interferon alpha therapy on the catalytic domains of the polymerase gene and basal core promoter, precore and core regions of hepatitis B virus. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:630-637
- 9 Gunther S, Paulij W, Meisel H, Will H. Analysis of hepatitis B virus populations in an interferon-alpha-treated patient reveals predominant mutations in the C-gene and changing e-antigenicity. *Virology* 1998;244:146-160
- 10 Fattovich G, McIntyre G, Thursz M, Colman K, Giuliano G, Alberti A, Thomas HC, Carman WF. Hepatitis B virus precore/core variation and interferon therapy. *Hepatology* 1995;22:1355-1362
- 11 Rehmann B, Pasquinelli C, Mosier SM, Chisari FV. Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. *J Clin Invest* 1995;96:1527-1534
- 12 成军. 病毒性肝炎研究的新进展 - 第三届国际肝炎及肝病学术研讨会系列报道. 国外医学·流行病学传染病学分册 2001;28:273-278
- 13 Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993;35:40-50
- 14 Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-353
- 15 Mutimer D, Pillay D, Dragon E, Tang H, Ahmed M, O'Donnell K, Shaw J, Burroughs N, Rand D, Cane P, Martin B, Buchan S, Boxall E, Barmat S, Gutekunst K, McMaster P, Elias E. High pre-treatment serum hepatitis B virus titre predicts failure of lamivudine prophylaxis and graft re-infection after liver transplantation. *J Hepatol* 1999;30:715-721
- 16 Li ZG, Chen LY, Huang J, Qiao P, Qiu JM, Wang SQ. Quantification of the relative levels of wild-type and lamivudine-resistant mutant virus in serum of HBV-infected patients using microarray. *J Viral Hepat* 2005;12:168-175
- 17 Natsuizaka M, Hige S, Ono Y, Ogawa K, Nakanishi M, Chuma M, Yoshida S, Asaka M. Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region. *J Viral Hepat* 2005;12:154-159
- 18 Pas SD, Noppornpanth S, van der Eijk AA, de Man RA, Niesters HG. Quantification of the newly detected lamivudine resistant YSD variants of Hepatitis B virus using molecular beacons. *J Clin Virol* 2005;32:166-172
- 19 Lin CL, Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Liaw YF. High frequency of functional anti-YMDD and -mutant cytotoxic T lymphocytes after in vitro expansion correlates with successful response to lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Gut* 2005;54:152-161
- 20 Thabut D, Thibault V, Bernard-Chabert B, Mouquet C, Di Martino V, Le Calvez S, Opolon P, Benhamou Y, Bitker MO, Poynard T. Long-term therapy with lamivudine in renal transplant recipients with chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1367-1373
- 21 Nogales MC, Serrano MC, Suarez E, Corpas R, Perez L, Claro R, Jarana R, Romero-Gomez M, Martin-Mazuelos E. Determination of hepatitis B virus genotype and detection of lamivudine-resistance mutations. *Gastroenterol Hepatol* 2004;27:515-520
- 22 李兵, 周伯平, 彭劲甫, 陈立炎, 李丽雄, 王召钦, 王敏, 刘赛云, 蒋小玲. 基因芯片高通量检测乙型肝炎病毒拉米夫定耐药株及其突变热点的分析. 中华肝病杂志 2004;12:673-676
- 23 Torre F, Mattioli F, Campo N, Delfino A, Basso M, Pelli N, Martelli A, Picciotto A. Serum lamivudine levels in the presence of a lamivudine-resistant HBV mutant. *Dig Liver Dis* 2004;36:677-681
- 24 Lindstrom A, Odeberg J, Albert J. Pyrosequencing for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* 2004;42:4788-4795
- 25 Yuen MF, Yuan HJ, Sablon E, Wong DK, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Long-term follow-up study of Chinese patients with YMDD mutations: significance of hepatitis B virus genotypes and characteristics of biochemical flares. *J Clin Microbiol* 2004;42:3932-3936
- 26 Santos EA, Sucupira MV, Arabe J, Gomes SA. Hepatitis B virus variants in an HIV-HBV co-infected patient at different periods of antiretroviral treatment with and without lamivudine. *BMC Infect Dis* 2004;4:29
- 27 Tanaka Y, Yeo AE, Orito E, Ito K, Hirashima N, Ide T, Sata M, Mizokami M. Prognostic indicators of breakthrough hepatitis during lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol* 2004;39:769-775
- 28 Punia P, Cane P, Teo CG, Saunders N. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol* 2004;40:986-992
- 29 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT. No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. *Antivir Ther* 2004;9:257-262
- 30 Carrigan DR, Knox KK. Identification of interferon-resistant subpopulations in several strains of measles virus: positive selection by growth of the virus in brain tissue. *J Virol* 1990;64:1606-1615
- 31 Su YH, Oakes JE, Lausch RN. Ocular avirulence of a herpes simplex virus type 1 strain is associated with heightened sensitivity to alpha/beta interferon. *J Virol* 1990;64:2187-2192
- 32 Moskopidis D, Battegay M, Bruendler MA, Laine E, Gresser I, Zinkernagel RM. Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J Virol* 1994;68:1951-1955