

北京地区乙肝病毒S基因序列多态性及其分布

王继荣, 周莉, 赵洪斌, 季芬, 丁惠国, 曾长青

■背景资料

S基因编码HBV表面抗原,也是病毒基因组中突变率最高的区域,其变异对于乙型肝炎的准确诊断和抗病毒疗效有重要影响。对于HBV这种高突变率的病毒进行深入全面的序列分析有赖于多种生物信息学方法的建立和应用。本文着重S基因的多态性分析,旨在阐明病毒S基因的突变特点、分布特征及其与临床表型的关系。

王继荣, 赵洪斌, 季芬, 中国科学院北京基因组研究所 北京市 101300; 中国科学院研究生院 北京市 100049
曾长青, 中国科学院北京基因组研究所 北京市 101300
周莉, 丁惠国, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科 北京市 100069
王继荣, 2005年内蒙古大学生命科学学院毕业, 2005至今中国科学院研究生院硕士研究生, 主要从事乙型肝炎病毒基因组突变及其临床关系研究。
中国科学院知识创新工程重大项目, No. KSCX2-SW-207
北京市教育委员会基金项目, No. KM20070025024
通讯作者: 曾长青, 101300, 北京市北京顺义空港工业区B区6号楼, 中国科学院北京基因组研究所。czeng@genomics.org.cn
电话: 010-80481146 传真: 010-80498676
收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2007-08-12

Sequence polymorphism in the surface gene of hepatitis B virus and its distribution in the Beijing area

Ji-Rong Wang, Li Zhou, Hong-Bin Zhao, Fen Ji, Hui-Guo Ding, Chang-Qing Zeng

Ji-Rong Wang, Hong-Bin Zhao, Fen Ji, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China; Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China
Chang-Qing Zeng, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China
Li Zhou, Hui-Guo Ding, Department of Digestive Diseases, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Supported by: the Knowledge Innovation Program (KIP), Important Project of the Chinese Academy of Sciences, No. KSCX2-SW-207 and the Foundation of Beijing Municipal Education Commission, No. KM20070025024
Correspondence to: Chang-Qing Zeng, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing Airport Industrial Zone B-6, Shunyi, Beijing 101300, China. czeng@genomics.org.cn
Received: 2007-07-12 Revised: 2007-08-12

Abstract

AIM: To investigate the sequence polymorphism of the surface (S) gene of hepatitis B virus (HBV), to study the distribution of viral genotypes/serum subtypes circulating in the Beijing area, and to search for possible correlations between viral genotypes/serum subtypes and clinical conditions.

METHODS: HBV DNA samples from 69 patients from the Beijing area were isolated and purified.

The viral S gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then directly sequenced. Genotypes and serum subtypes were determined by sequence alignment and comparison with the standards with MEGA3.1. Nucleotide polymorphisms and amino acid changes of the S gene were analyzed using DnaSP software.

RESULTS: In the 69 patients, HBV from 14 samples was identified as genotype B (20.3%), and that of the remaining 55 as genotype C (79.7%). Adrq⁺ and adw2 of HBV were the predominant subtypes (75.4% and 20.3%, respectively). Further, 1 sample was determined as adrq⁻ and 2 were detected as a previously unreported subtype. Mutation type showed significant differences in hydrophilic and hydrophobic regions of the S gene ($P < 0.05$, $P < 0.001$, respectively, in genotypes C and B). Compared to genotype B, higher sequence polymorphism was observed in genotype C. Nucleotide variation (π value) was not equally distributed in the S gene, and π in the "a" determinant was lower than that in other regions. Clinical symptoms were significantly associated with genotypes B and C, but not with serum subtypes ($P < 0.05$ and $P = 0.381$, respectively).

CONCLUSION: There is higher sequence variation of the surface gene in genotype C compared with genotype B. Mutations in the S gene are not randomly distributed. The two hydrophilic regions appear more conserved, while mutation frequency in the hydrophobic region is higher.

Key Words: Hepatitis B Virus; S Gene; Polymorphism; Genotype; Serum subtype; Polymerase chain reaction

Wang JR, Zhou L, Zhao HB, Ji F, Ding HG, Zeng CQ. Sequence polymorphism in the surface gene of hepatitis B virus and its distribution in the Beijing area. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(23): 2496-2502

摘要

目的: 探讨HBV的S基因序列多态性、基因型/血清型在北京地区的分布特征以及基因型/血

清型与临床症状的可能相关性。

方法: 对69例样品进行S区聚合酶链反应扩增测序, 通过标准序列使用MEGA3.1和DnaSP软件分析核苷酸差异度, 比较基因型、血清亚型的核酸及蛋白质差异。

结果: 在69例北京地区样品中检测出C基因型55例(79.7%), B基因型14例(20.3%); adr^q⁺和adw2分别为52和14例, 2例血清亚型未见报道。S基因核苷酸差异度分布不均匀, 在C型中较高。非同义突变类型多分布在疏水区中, 亲水区多为同义突变。临床症状在B、C基因型中有显著性差异。

结论: S基因的序列差异在C型中高于B型; DNA序列突变在S基因中呈非随机分布, 疏水区突变率高而两个亲水区比较保守。

关键词: 乙型肝炎病毒; S基因; 多态性; 基因型; 血清型; 聚合酶链反应

王继荣, 周莉, 赵洪斌, 季芬, 丁惠国, 曾长青. 北京地区乙肝病毒S基因序列多态性及其分布. 世界华人消化杂志 2007;15(23):2496-2502

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2496.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是已知的突变率最高的DNA病毒, 了解HBV的多态性对乙型肝炎的诊断和治疗以及基础研究具有十分重要的意义, 对其变异及其与临床关系的研究一直是国内外关注的热点。病毒的高突变率和核苷酸多态性形成HBV的不同基因型, 以全基因序列差异≥8%或S基因序列差异≥4%划分, 共有A-H的8个基因型^[1-4], 各在不同的地理区域性呈优势分布。HBV基因型与乙型肝炎病毒复制及致病性、宿主免疫应答和临床表现、治疗与预后等都有一定的相关性^[5-6]。此外, HBV分类还包括血清型分析。外膜主蛋白上的一些残基(如aa139-147, aa122和aa160)决定HBV的血清亚型, 目前有ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4, ayr, adr^q⁺和adr^q⁻共9种类型^[7], 在不同的临床表型中有不同分布。

编码HBV表面蛋白的S基因(surface)位于HBV基因组的核苷酸(nt)第155-833, 编码226个氨基酸残基的外膜主蛋白即乙肝表面抗原蛋白HBsAg。这一蛋白不但是引起机体产生保护性抗体的主要成分和乙肝疫苗的主要成份, 也是

诊断HBV感染的主要依据之一。S基因是HBV基因组中突变率最高的区域, 病毒这一区域在体内产生的变异对于乙型肝炎的准确诊断和抗病毒的疗效产生严重影响, 因而从DNA水平研究其突变的性质、特点、规律和功能具有重要意义和迫切性。我们采用PCR产物直接测序方法, 对HBV的S基因的678 bp片段进行大样品量测序和多态性分析, 同时应用生物信息学方法分析北京地区HBV的基因型/血清型分布及其与临床表型的关系。我们发现对于S基因来说, C型基因型的序列差异高于B型, 并且基因疏水区突变率明显高于亲水区。

1 材料和方法

1.1 材料 北京佑安医院住院患者69例, 患者均为HBsAg阳性, 男50例, 女19例; 年龄7-77岁; 临床诊断无症状携带者4例; 慢性肝炎37例; 慢性重型肝炎4例; 代偿期肝硬化2例; 失代偿期肝硬化18例; 肝癌4例。诊断均符合2005年中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学分会联合制定的《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准^[8]。所有血清置-20℃保存。

1.2 方法

1.2.1 病毒DNA的提取及扩增, 纯化 采用QIAamp UltraSens™ Virus kit(Qiagen公司)提取病毒DNA。对病毒S基因进行PCR扩增, 引物: 5'-CTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCC-3' (nt67-90), 5'-AGTTGGCGAGAAAGTGAAAGCCTG-3' (nt1084-1107), 扩增条件95℃ 150 s, 94℃ 1 min, 60℃ 90 s, 72℃ 3 min共35循环, 72℃ 10 min。PCR扩增产物经含有EB的15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定产物, 并加入GIAquick纯化柱进行纯化。纯化产物用于测序反应。

1.2.2 S基因测序及序列拼接和生物信息学分析 使用ABI 3730进行测序及DNASTar软件包的SeqMan进行拼接处理。生物信息学分析: (1)首先从DNA数据库中(GenBank)获取已知基因型(A-H)的HBV病毒参考株的核苷酸序列; (2)将获取的病毒序列以Bioedit软件建立数据库, 以便进行单机序列比对; (3)将我们测序得到的序列和上述数据库中的序列用Bioedit软件包中的Local Blast程序进行比对; (4)将相应的片段用Clustal W程序联配, 同时肉眼观察并予以校正; (5)使用MEGA3.1程序的Kimura双参数法, 应用NJ(Neighbor-Joining)法建立系统进化树(bootstrap 1000次)及分析基因型; (6)用DnaSP软件分

■研发前沿

HBV研究主要在于分析病毒的突变规律、与药物耐受和免疫逃逸的相关性、及其与临床治疗的指导评估和病程转归的关系, 以期产生进行精确临床诊断和指导个体化治疗的基础数据。在方法学上, 基因组学研究的各种先进思路和算法的引入和应用正在为HBV突变分析提供重要的技术和手段。

■相关报道

田拥军 *et al* 报道定点突变S基因氨基酸并构建载体转染肝细胞, 发现主要亲水区II中的4个氨基酸(P120T, C121S, K122I和T123N)对维持HBsAg的空间构象和抗原性具有重要作用; CHAO-WEI HSU *et al* 发现在核苷类似物药物治疗患者血清HBsAg消失是由于S基因点突变造成。

■创新盘点

本文用直接测序的方法精密鉴定了HBV的基因型,采用多种生物信息学方法从S基因的整体核苷酸差异度水平深入分析了病毒S基因特点,并将病毒的基因型和突变特点与临床表型进行了关联分析,对于乙型肝炎的分子病理学的诊断提供了基础数据,并有助于我国特有HBV序列数据库的建立。

表 1 不同地区基因型和血清型的分布

地区	基因型	基因型百分比	血清亚型	血清亚型百分比
北京(本研究)	B	20.3	adw2	17.4
			new	2.9
	C	79.7	adrq ⁺	75.4
			adw2	2.9
中国(4个省) ^[9]	B	29.3	adrq ⁻	1.4
			adw2 ^p	29.3
	C	67.9	adr ^p	67.9
			adw2 ^p	2.9
哈尔滨 ^[10]	B	12.2	adw2 ^p	12.2
	C	87.8	adr ^p	87.8
廉江 ^[10]	B	26.1	adw2 ^p	26.1
	C	73.2	adr ^p	73.2

^p 优势血清型。

析核苷酸差异及蛋白质差异。

1.2.3 聚合酶链反应-限制性酶长度多态性(PCR-RFLP)分析 应用ABI7000 Real-time PCR检测仪进行基因型分析,并与S基因直接测序结果对比,HBV基因分型试剂盒购自杭州博赛基因诊断技术有限公司。采用Magnius和Norder的方法^[7]进行血清亚型分析。核苷酸差异度为群体中针对基因组中特定区域的任意两个随机选取的单体型间每个位点的平均核苷酸差异数,用 π 表示^[11-12]。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行Fisher精确检验及 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HBV基因型与血清型在北京地区的分布 将测定的全部69例乙肝患者的病毒S基因序列与NCBI中的8种已知基因型的参考序列进行比较,确定样品DNA的基因型并进行系统进化分析(图1),共有C基因型55例(79.7%),B基因型14例(20.3%),未发现其他基因型。且北京地区基因型分布处于中国大陆两个南北城市黑龙江哈尔滨市和广东廉江市中间(表1)。这一结果符合我国北方多流行C型,在南方多流行B型的特点。

采用Magnius和Norder的方法进行血清亚型分析,测得adrq⁺ 52例(75.4%),adw2 14例(20.3%),血清亚型adrq⁻ 1例(1.4%)。用同样方法确定血清亚型w1-w4的S基因的编码蛋白质第127个氨基酸分别是脯氨酸(Pro, w1和w2)、苏氨酸(Thr, w3)或亮氨酸(Leu, w4),但第6和55两个样本中

表 2 3种类型突变在S基因不同区域中的分布(n)

基因型	第一亲水区		第二亲水区		疏水区	
	B型	C型	B型	C型	B型	C型
错义突变	6	32	2	21	44	128
无义突变	0	2	0	2	0	3
同义突变	6	65	88	41	30	366
总数	12	99	90	64	74	497

此位点是丝氨酸(Ser),因而不能由此确定其血清亚型,表明可能是对亚型w的补充或是一种新的血清亚型,在此用new来标示。52例adrq⁺血清亚型样本全部为C基因型,与adr血清亚型只存在C型中完全符合;14例adw2血清亚型样本中有12例B基因型,2例C基因型;adrq⁺和adw2血清亚型分别与C, B基因型的相关性显著($P < 0.05$, Fisher精确检验)。

2.2 S基因的序列差异 对乙肝病毒S基因的核苷酸差异度进行分析(图2),发现S基因核苷酸序列中 π 值分布在B, C基因型中很不均匀。除nt60-120, nt340-390和nt580-680区序列外,大部分区域C型 π 值高于B型,即S基因C型序列差异高于B型。对于单个基因型来说, B型中第一亲水区和第二亲水区后半部分内的 π 值低于其他区域; C型中第一亲水区前半部分和第二亲水区后半部分内 π 值低于其他区。核苷酸差异度 $\pi = \sum_{i,j} A_i B_j P_{ij}$, 其 A_i 和 B_j 分别为DNA序列的第 i 种和第 j 种类型的频率,而 P_{ij} 是序列的第 i 种和第 j 种类型间不同核苷酸的比值。

2.3 S基因疏水区突变率明显高于亲水区 将所有样品C和B基因型的S基因序列与NCBI数据库中的参考序列M12906(C/adrq⁺)和D00329 (B/adw2)分别进行比较,发现B型中非同义突变(错义和无义突变)在S基因第一亲水区、第二亲水区和疏水区中的总数分别是6, 2和44个, C型中分别是34, 23和131个(表2)。B基因型中突变类型在第一亲水区和疏水区中无显著性差异($P = 0.538$, χ^2 检验),但第二亲水区和疏水区中有显著性差异($P < 0.001$, Fisher精确检验),在第二亲水区中的同义突变多于疏水区中的同义突变,而突变类型在两个亲水区和疏水区中有显著性差异($P < 0.001$, χ^2 检验)。在C基因型突变类型第一亲水区和疏水区、第二亲水区和疏水区中的差别分布无显著性意义($P = 0.105$ 和 $P = 0.106$, χ^2 检验),而两个亲水区和疏水区中有显著性差异($P < 0.035$, χ^2 检验)。因此S基因大部分突变分布在

图 1 HBV基因分型.



■应用要点

HBV的S基因突变具有非随机性, 其疏水区突变率明显高于亲水区. 同时C型基因型的S基因序列差异高于B型, 这一结果对于乙型肝炎诊断, 治疗及其研发乙肝疫苗具有应用价值.

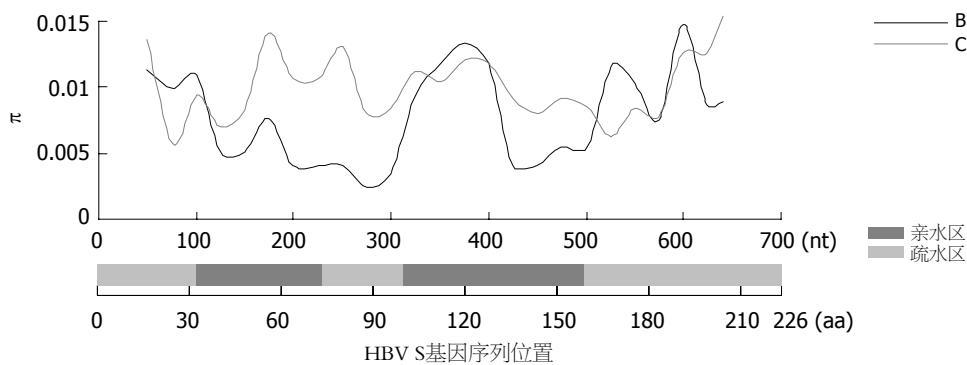


图 2 HBV S基因核苷酸差异度的比较分析. Nt: 核苷酸位置; aa: 氨基酸位置.

疏水区中, 亲水区很少发生突变, 且亲水区突变 大部分为同义突变. 同义突变、无义突变和错

■名词解释

核苷酸差异度: 群体中针对基因组中特定区域的任意2个随机选取的单体型间每个位点的平均核苷酸差异数称为核苷酸差异度, 用 π 表示。

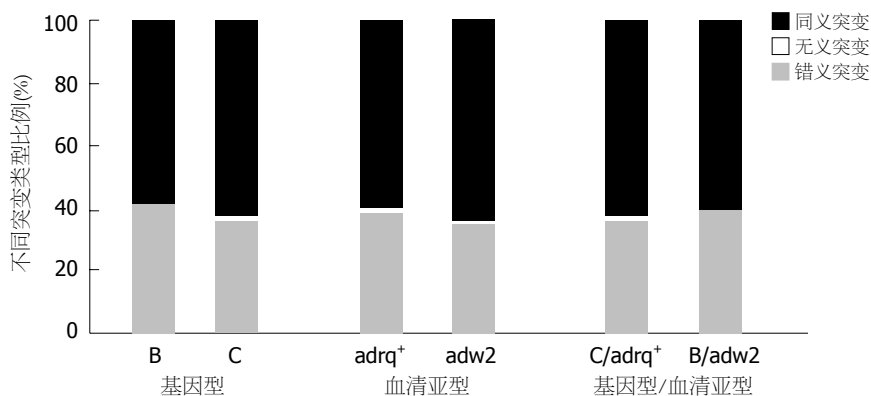


图3 HBV基因型/血清亚型中不同突变类型的比例。

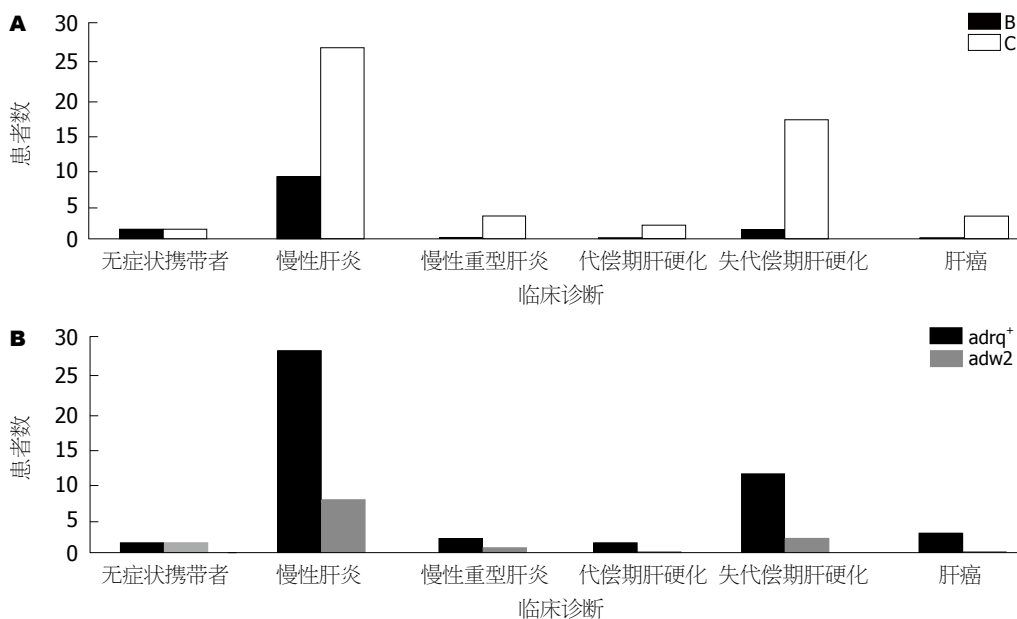


图4 不同诊断患者的基因型和血清亚型的分布。A: 基因型; B: 血清亚型。

义突变在不同基因型和血清亚型中分布(图3)所示, 无义突变只在C基因型中发现而未在B基因型见到。无义突变在基因型B和C型中分布无显著性差异($P = 0.337$, Fisher精确检验)。同义突变和非同义突变在B, C基因型, adr^q⁺, adw2血清亚型和C/adr^q⁺, B/adw2型中的分布的差别无显著性意义($P = 0.554, 0.234, 0.782; \chi^2$ 检验)。

2.4 HBV基因型、血清型与临床关系 B基因型中分别有2例无症状携带者、10例慢性肝炎、2例失代偿期肝硬化; C基因型分别中有2例无症状携带者、27例慢性肝炎、4例慢性重型肝炎、2例代偿期肝硬化、16例失代偿期肝硬化和4例肝癌(图4A)。按照肝病的进展, 将肝脏病变和临床症状较重的病例包括慢性重型肝炎、代偿期肝硬化, 失代偿期肝硬化和肝癌患者归为1组, 其余归为另1组。对比2组患者基因型发现症状较重的肝病在C基因型患者中出现频率

高($P < 0.05$, Fisher精确检验)。adr^q⁺血清亚型在无症状携带者、慢性肝炎、慢性重型肝炎、代偿期肝硬化、失代偿期肝硬化、肝癌中分别占50.0%, 75.7%, 75.0%, 100%, 72.2%和100%, 而adw2血清亚型分别为50.0%, 21.6%, 25.0%, 0%, 16.7%和0%(图4B), 1例adr^q血清亚型为失代偿期肝硬化患者, 2例new血清亚型为慢性肝炎和失代偿期肝硬化患者。adr^q⁺和adw2血清亚型在症状较轻患者和症状较重患者中分布的差别无显著性意义($P = 0.381$, Fisher精确检验)。

3 讨论

HBV基因型具有呈地理区域性分布的特点^[13-15], 我国以C, B基因型为主, 在北方流行多为C型, 南方多流行B型, 呈B型由北向南逐渐增多, 而C型逐渐减少的趋势^[9]。我们采用S基因序列测序直接分型, 确定北京地区HBV以C基因型约占80%,

其余为B基因型. 表1综合了本实验和文献报道结果, 显示北京地区HBV基因型分布处于两个南北城市中间(黑龙江哈尔滨市和广东廉江市), 与文献报道相符^[9-10,16-17]. 我们的研究中患者临床症状在B, C基因型中有显著性差异($P<0.05$), 和B型相比C型与症状较重的肝炎相关, 结果与国内外文献[17-18]报道一致, 其机制有待进一步研究.

已有结果表明, 中国北方地区HBV血清型以adr为主, 南方则以adw2为主^[19], 本研究中发现北京地区adrq⁺和adw2各占75.4%和20.3%. 我们还在2例样品中发现了一种无法用Magnius和Norder的方法确定的血清亚型, 由S基因nt379CCT突变为TCT而使S蛋白第127的Pro变为Ser造成. 这2例为B基因型的慢性肝炎和失代偿期肝硬化患者. 这一亚型是新的血清亚型或对其他亚型的补充及其与患者临床症状的关系有待进一步研究. HBV的血清型除了流行病学意义外, 在乙肝患者不同诊断中的分布不一样, 如慢性肝病以adr亚型比率最高^[20]. 本研究中血清亚型在不同临床患者中的分布与他人结果基本一致, 且与临床症状无相关性.

乙肝病毒S基因编码病毒外膜主要表面蛋白, 在HBV感染与传播中起重要作用. S蛋白有2个亲水区, 分别为aa32-76和aa100-160, 是HBV主要的表面抗原表位. 许多研究表明S基因多态性与HBV抗原决定簇、免疫原性和免疫逃避等有关^[21-23]. 本研究中发现S基因有很多核苷酸突变位点, 但其分布在S基因中并非随机. B和C基因型中的亲水区特别是第二亲水区后半部分内的 π 值均低于其他区域, 而这一部分为编码a决定簇. 同时, 不但疏水区中的突变率明显高于亲水区, 且亲水区中的突变多为同义突变, 这些均提示病毒S基因的功能区域相对保守. S基因 π 值分布不均匀, 即本研究表明北京地区C型S基因的多态性高于B型, 而有研究表明B型HBV多态性高于C型^[24], 这可能是样本抽样数量不同造成的结果.

我们的结果显示B基因型在第二亲水区中的同义突变较多, 很可能是由于我们样品中的14个B型序列nt354, nt428和nt432 3个位点的核苷酸全部不同于参考序列D00329而造成. 而参考序列D00329是NCBI报道的日本患者血清HBV的序列, 鉴于日本B型HBV以Bj亚型为主, 而中国地区B型HBV主要流行Ba亚型^[24], 因此这3个位点可能反映中国地区Ba亚型HBV的变异

相关位点.

HBV基因分型的方法有全基因序列测定^[25], S基因序列测定、聚合酶链反应-限制性酶长度多态性分析(PCR-RFLP)^[26]、基因型特异性引物PCR^[27]等很多种方法. 近年来, 基因型分型多采用对S区进行分析, 主要为PCR-RFLP及基因型特异性引物PCR方法. 本研究比较了直接S基因测序后与参考株比较的基因分型方法和PCR-RFLP基因分型方法, 并着重比较了RFLP中常用的限制性内切酶Bsr I 和Sty I 的特异性酶切位点. B基因型病毒株在S基因nt174处有Bsr I 的酶切位点. 识别序列为C▼CAGT可被分解成为126和459 bp 2个片段, 依此可准确鉴定B型; C基因型病毒株在S基因nt301位有Sty I 的酶切位点, 识别序列为C▼CAAGG, 应分解为332和253 bp 2个片段. 我们的结果发现基因型为B的14株病毒S基因有Bsr I 并且无Sty I 酶切位点, 55例C型无Bsr I 酶切位点; 而基因型为C的55例患者中48株病毒有Sty I 位点, 其余7株(12.7%)此处有突变而破坏了内切酶识别, 从而使PCR-RFLP基因分型实验失败或分型不准确. 这些表明由于HBV的高突变率, 仅依赖个别位点进行基因分型并不可靠, PCR-RFLP基因分型方法存在一定局限性.

致谢: 感谢庄辉院士和王福生博士的讨论指导, 感谢李志杰对于课题立项的帮助.

4 参考文献

- 1 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- 2 Norder H, Courouge AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- 3 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- 4 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- 5 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
- 6 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*

同行评价

本文研究了北京地区HBV核苷酸多态性和突变, 并与国内其他地区的研究进行比较, 对结果进行了针对性的讨论. 所采用的技术先进, 内容新颖, 科学性较强, 讨论较充分全面, 有较重要的参考价值.

- 2000; 118: 554-559
- 7 Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34
- 8 中华医学会肝病学会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 9 范金水, 庄辉, 李远贵, 朱晓洁, 徐德忠, 马为民, 王跃民, 陈雅洁, 娄国强, 马廷贤. 我国8城市HBsAg阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. 中华微生物学和免疫学杂志 1998; 18: 88-91
- 10 Xu J, Wang QX, Fan CL, Jiang D, Li RB, Cong X, Fei R, Chen HS, Wei L, Wang Y. Comparison of hepatitis B virus serotype and genotype among HBsAg positive hepatitis B patients in a northern and a southern city of China. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2003; 17: 327-329
- 11 Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003; 19: 2496-2497
- 12 Nei M, Miller JC. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 1990; 125: 873-879
- 13 Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002; 76: 6131-6137
- 14 Jazayeri MS, Basuni AA, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. Hepatitis B virus genotypes, core gene variability and ethnicity in the Pacific region. *J Hepatol* 2004; 41: 139-146
- 15 Yuen MF, Sablon E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Doutrelaigne J, Yuan HJ, Wong DK, Sum SM, Lai CL. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. *J Hepatol* 2004; 41: 119-125
- 16 Xia G, Nainan OV, Jia Z. Characterization and distribution of hepatitis B virus genotypes and subtypes in 4 provinces of China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2001; 22: 348-351
- 17 Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; 44: 43-47
- 18 Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Orito E, Mizokami M, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A, Miyagi Y. Preponderance of hepatitis B virus genotype B contributes to a better prognosis of chronic HBV infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol* 2002; 67: 484-489
- 19 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 41-55
- 20 赵艳芳, 闫永平, 张磊, 王安辉, 苏海霞, 门可, 张景霞, 徐德忠. Adr亚型乙型肝炎病毒转染细胞模型的构建. 中国公共卫生 2006; 22: 1066-1068
- 21 He JW, Lu Q, Zhu QR, Duan SC, Wen YM. Mutations in the 'a' determinant of hepatitis B surface antigen among Chinese infants receiving active postexposure hepatitis B immunization. *Vaccine* 1998; 16: 170-173
- 22 Mele A, Tancredi F, Romano L, Giuseppone A, Colucci M, Sangiuolo A, Lecce R, Adamo B, Tosti ME, Taliani G, Zanetti AR. Effectiveness of hepatitis B vaccination in babies born to hepatitis B surface antigen-positive mothers in Italy. *J Infect Dis* 2001; 184: 905-908
- 23 Chen WN, Oon CJ. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutants in Singapore adults and vaccinated children with high anti-hepatitis B virus antibody levels but negative for HBsAg. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2793-2794
- 24 Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289-309
- 25 游晶, 庄林, 陈红英, 杨海秋, 唐宝璋, 黄梦玲. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 921-928
- 26 Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL. A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3132-3136
- 27 Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292

编辑 程剑侠 电编 张敏