

HBV基本核心启动子和前C区变异的深度测序分析

闫琳琳¹ 张恒辉² 马慧² 刘翟³ 李伟³ 陈红松² 邵启祥¹

【摘要】目的 利用Ion Torrent PGM深度测序技术,探讨乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)阳性慢性乙型肝炎(CHB)患者乙型肝炎病毒(HBV)基本核心启动子和前C区突变特征。**方法** 收集HBeAg阳性CHB患者血清样本25例,提取HBV DNA,采用巢式PCR方法扩增HBV基本核心启动子和前C区片段,构建深度测序文库,基于Ion Torrent PGM平台深度测序,生物信息学分析突变位点及其突变率;构建HBV基本核心启动子和前C区突变型和野生型参考质粒,作为深度测序质控品。**结果** 在25例HBeAg阳性CHB患者HBV基本核心启动子和前C区检出流行率达20%的突变位点10个:G1746A、A1752G/T、T1753C/G、A1762T、G1764A、C1817G/A、T1825C/A、A1846T、G1896A、G1899A;G1746A和T1825C/A的流行率分别达92%和100%。突变位点在HBV B基因型和C基因型感染者的分布情况显示,A1752G/T和G1896A主要流行于B基因型感染者(63.6% vs 0.0%, $\chi^2 = 12.374$, $P = 0.0007$; 72.7% vs 28.6%, $\chi^2 = 4.812$, $P = 0.0472$),A1762T和G1764A主要流行于C基因型感染者(27.3% vs 78.6%, $\chi^2 = 6.579$, $P = 0.0172$);C基因型感染者A1762T/G1764A突变率显著高于B基因型感染者,但差异无统计学意义(25.7% ± 28.4% vs 68.4% ± 42.7%, $t = 1.614$, $P = 0.1326$)。25例HBeAg阳性CHB患者中,32.0%患者仅有A1762T/G1764A突变,24.0%患者仅有G1896A突变,24.0%患者同时携带A1762T/G1764A和G1896A突变。**结论** 深度测序分析可用于定量检测HBV基本核心启动子和前C区突变,为HBV突变研究的临床应用提供了技术平台。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;基本核心启动子;前C区;深度测序

Deep sequencing analysis of hepatitis B virus mutations in the basal core promoter and precore regions

Yan Linlin¹, Zhang Henghui², Ma Hui², Liu Di³, Li Wei³, Chen Hongsong², Shao Qixiang¹. ¹Department of Immunology, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ²Beijing Key Laboratory of Hepatitis C and Immunotherapy for Liver Diseases, Peking University Hepatology Institute, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China; ³Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100078, China

Corresponding author: Shao Qixiang, Email: shao_qx@ujs.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the characteristics of mutations in the basal core promoter (BCP) and precore (PC) regions of hepatitis B virus (HBV) genome in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B (CHB) using Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) deep sequencing. **Methods** Serum samples from 25 HBeAg-positive patients with CHB were collected, which were used for HBV DNA extraction. Nested PCR was used to amplify the BCP and PC regions of HBV genome. The PCR product was subjected to deep sequencing libraries preparation and subsequently Ion Torrent PGM sequencing. The variants and mutant percentages were detected through bioinformatics analysis. HBV BCP/PC wild type and mutant type reference plasmids were constructed, which were used as quality control in deep sequencing. **Results** Ten single nucleotide polymorphisms (SNPs) that had variant types with prevalence of greater than

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.02.005

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81273202; No. 31400773); 国家重大科技专项(No. 2012ZX10002011-006); 江苏省临床医学科技专项(No. BL2013024)

作者单位: 212013 镇江市, 江苏大学医学院免疫学系¹; 100044 北京, 北京大学人民医院, 北京大学肝病研究所, 丙型肝炎及肝病免疫治疗北京市重点实验室²; 100078 北京, 中国科学院微生物研究所生物信息中心³

通讯作者: 邵启祥, Email: shao_qx@ujs.edu.cn

20% were observed in the BCP and PC regions among the 25 HBeAg-positive patients with CHB: G1746A, A1752G/T, T1753C/G, A1762T, G1764A, C1817G/A, T1825C/A, A1846T, G1896A and G1899A; the prevalence of G1746A and T1825C/A were 92% and 100%, respectively. The prevalence of these mutants was analyzed in patients with different HBV genotype infection. The A1752G/T and G1896A were mainly prevalent in genotype B infection HCV patients (63.6% vs 0.0%, $\chi^2 = 12.374$, $P = 0.0007$ and 72.7% vs 28.6%; $\chi^2 = 4.812$, $P = 0.0472$), A1762T and G1764A were mainly prevalent in genotype C HCV infection patients (27.3% vs 78.6%; $\chi^2 = 6.579$, $P = 0.0172$). Patients with genotype C HCV infection had higher A1762T/G1764A mutant percentages than those with genotype B HCV infection, but without statistical significance (25.7% ± 28.4% vs 68.4% ± 42.7%; $t = 1.614$, $P = 0.1326$). Among the 25 CHB patients with HBeAg-positive, 32.0% cases had BCP mutants only, 24.0% had PC mutant only, and 24.0% had both BCP and PC mutants. **Conclusions** Deep sequencing could be used for quantification of HBV BCP and PC mutants, providing a suitable technology platform for the clinical application of HBV mutant research.

【Key words】Hepatitis B virus; Basal core promoter; Precore; Deep sequencing

慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染过程中, 在宿主免疫压力和抗病毒治疗压力作用下, HBV突变发生率增加, 以基本核心启动子 (basal core promoter, BCP) 和前C (precore, PC) 区突变最为常见^[1-2]。系列研究报道BCP和PC突变与乙型肝炎病毒e抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg) 血清学转换, 肝硬化和肝细胞癌的发生风险相关^[3-9]。因此, 早期全面检出BCP和PC突变对于指导临床抗病毒治疗、预测疾病进展具有非常重要的意义。以往相关研究多数采用直接测序检测HBV突变, 仅能检出突变率达20%以上的突变, 限制了低频突变及其他潜在突变位点的全面检出。随着新一代测序技术的不断进展, 如Ion Torrent个人化操作基因组测序仪 (Personal Genome Machine, PGM), 使定量检测的敏感性显著增加。Ion Torrent PGM深度测序基于半导体技术, 具有低成本、大规模、高敏感的优势^[10-11]。因此, 本研究旨在利用Ion Torrent PGM深度测序平台, 深度分析25例HBeAg阳性慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者HBV BCP和PC区突变准种情况, 明确HBeAg阳性CHB患者HBV BCP和PC区突变准种构成特征, 报道如下。

资料与方法

一、研究对象

纳入北京大学人民医院收治的25例乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 阳性、HBeAg阳性CHB患者。本研究的实施完全符合赫尔辛基宣言伦理规范, 通过了北京大

学人民医院医学伦理委员会的批准, 并取得患者签署的知情同意书。患者的血清样本在使用前一直保存于-80℃冰箱。

二、主要实验试剂及仪器设备

QIAamp DNA Blood Mini Kit (德国QIAGEN公司); AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (美国Applied Biosystems公司); QIAquick® Gel Extraction Kit (德国QIAGEN公司); 乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒 (德国罗氏诊断有限公司); 乙型肝炎病毒表面抗原定量检测试剂盒 (美国雅培公司); PCR扩增仪 (德国Eppendorf公司); 雅培i2000全自动化学分析仪 (美国雅培公司)。

三、实验方法

1. 血清HBV DNA提取: 按照QIAamp DNA Blood Mini Kit说明从200 μl血清样本中提取HBV DNA。直接测序法分析HBV基因型。

2. 乙型肝炎病毒指标检测: 血清HBV DNA定量使用HBV核酸定量检测试剂盒; 血清HBsAg定量使用乙型肝炎病毒表面抗原定量检测试剂盒; 血清HBeAg定量采用自主研发的方法测定^[12]。

3. HBV BCP和PC区巢式PCR扩增: 使用AmpliTaq Gold® 360 Master Mix试剂盒扩增HBV BCP和PC区片段。第1轮PCR扩增引物为B935 (1 240~1 260, 5'-GAAGGTTTGTGGCTCCTCTG-3') 和MDC1 (2304~2324, 5'-TTGATAAGATAGGGGCATTG-3')^[13]; 扩增体系为20 μl, 含5 μl HBV DNA, 0.1 μl B935, 0.1 μl MDC1, 0.5 μl 360 GC enhancer, 10 μl 360 Master mix, 4.3 μl ddH₂O, 引物终浓度为0.5 μmol/L; 95℃预变性5 min, 40个循环 (95℃、30 s,

55℃、30 s, 72℃、90 s), 72℃、7 min。第2轮PCR扩增, 为实现一张测序芯片多样本同步测序, 在扩增引物CPRF1 (1 678~1 695, 5'-CAATGTCAACGACCGACC-3') 的5'-端通过接头序列分别连接序列差异的标签序列, 用于区分样本信息, 扩增引物CPRR1 (1 928~1 948, 5'-GAGTAACTCCACAGTAGCTCC-3') 的5'-端连接一致的测序识别序列; 扩增体系为50 μl, 含2.5 μl 第1轮产物, 上述第2轮引物各2.5 μl, 1.25 μl 360 GC enhancer, 25 μl 360 Master mix, 16.25 μl ddH₂O, 引物终浓度为1 μmol/L; 95℃预变性5 min, 40循环(95℃、30 s, 59℃、30 s, 72℃、90 s), 72℃、7 min。对于第2轮PCR产物电泳条带较弱的样本, 将第2轮PCR反应的模板量加倍。

4. HBV BCP/PC参考质粒构建: 根据前期部分样本直接测序情况, 选取8份样本构建克隆质粒, 测序并筛选携带BCP (A1762/G1764)/PC G1896和BCP (T1762/A1764)/PC A1896的质粒分别作为HBV BCP/PC野生型和突变型参考质粒(图1), 用作深度测序质控品。参考质粒构建及测序由北京三博远志生物技术有限公司完

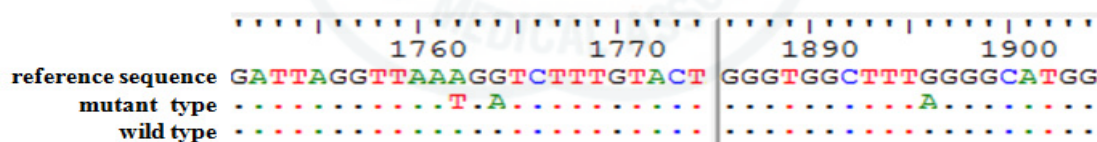
成。

5. 深度测序文库构建: 第2轮PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定(图2), 切胶回收目的条带, 按照QIAquick® Gel Extraction Kit说明书纯化产物。后续测序文库构建及Ion Torrent PGM深度测序由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

6. 生物信息学分析: 首先使用BWA (Burrows Wheeler Aligner, Version: 0.7.5a-r405) 序列比对软件将FASTQ测序文件与HBV B或C基因型基因组参考序列(参考序列源自NCBI数据库)进行比对, 生成sam文件; 然后使用Samtools (Version: 0.1.1944428cd) 软件对sam文件进行call snp处理, 获取突变位点及其突变率, 生成mpileup文件; 最后编写程序处理mpileup文件, 输出序列信息(图3)。

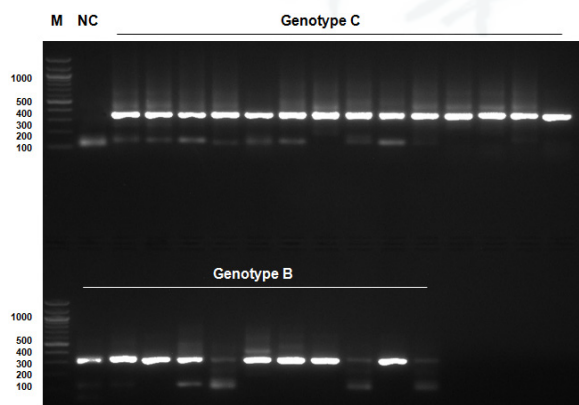
四、统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。患者的年龄、转氨酶水平、HBV变异位点的突变率为计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较采用 t 检验; 其余资料为计数资料, 采用 χ^2 检验或Fisher确切概率检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。



注: reference sequence: HBV基因组参考序列; mutant type: HBV BCP/PC突变型参考质粒(T1762/A1764)/A1896; wild type: HBV BCP/PC野生型参考质粒(A1762/G1764/G1896)

图1 HBV BCP (1762/1764) / PC 1896突变型和野生型参考质粒



注: M: DNA Ladder; NC: 阴性对照; Genotype C: C基因型样本; Genotype B: B基因型样本

图2 HBV BCP和PC区巢式PCR扩增产物电泳图

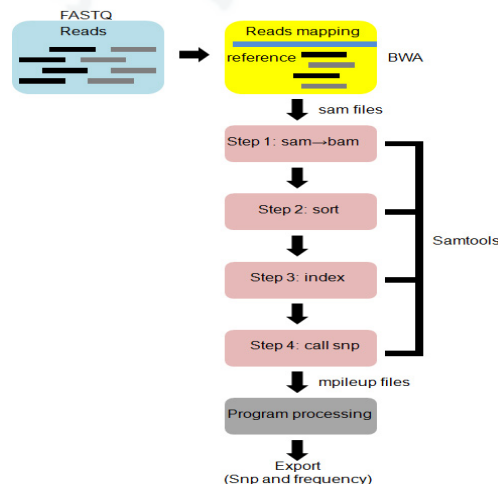


图3 生物信息学分析流程

结 果

一、研究队列特征

如表1所示, 本研究共纳入25例HBsAg阳性、HBeAg阳性CHB患者, 其中感染HBV C基因型的患者比例为56.0%, 感染HBV B基因型的比例为44.0%, 男性患者比例为80.0%。HBV DNA水平均 $> 1 \times 10^5$ 拷贝/ml, 丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)水平介于2~10倍正常值上限

表1 研究队列特征

特征	CHB (n = 25)
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	30.2 \pm 8.6
性别 [例 (%)]	
女	5 (20.0)
男	20 (80.0)
HBV基因型 [例 (%)]	
B型	11 (44.0)
C型	14 (56.0)
抗-HBe [例 (%)]	
阳性	0 (0.0)
阴性	25 (100.0)
血清HBV DNA水平 [例 (%)]	
$10^5 \sim 10^8$ 拷贝/ml	18 (72.0)
$\geq 10^8$ 拷贝/ml	7 (28.0)
血清HBsAg水平 [例 (%)]	
100~10 000 IU/ml	6 (24.0)
$\geq 10 000$ IU/ml	19 (76.0)
ALT ($\bar{x} \pm s$, U/L)	174.3 \pm 75.9
AST ($\bar{x} \pm s$, U/L)	86.9 \pm 62.6

注: CHB: 慢性乙型肝炎; 抗-HBe: 乙型肝炎病毒 e 抗原抗体; HBsAg: HBV 表面抗原; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天门冬氨酸氨基转移酶

(正常值上限为40 U/L)。

二、慢性乙型肝炎患者HBV BCP和PC区突变情况

本研究通过Ion Torrent PGM深度测序, 在25例HBeAg阳性CHB患者中, 检出流行率达20%的HBV BCP和PC区突变位点有: G1746A、A1752G/T、T1753C/G、A1762T、G1764A、C1817G/A、T1825C/A、A1846T、G1896A、G1899A (表2)。其中G1746A和T1825C/A的流行率达92%和100%, 平均突变率分别为 $(14.4 \pm 6.6) \%$ 和 $(27.6 \pm 11.5) \%$, 目前尚无研究报道。A1752G/T检出率为28%, 显著流行于HBV B基因型患者 $(63.6\% \text{ vs } 0\%, \chi^2 = 12.374, P = 0.0007)$, 并具有较高的突变率 $(85.4\% \pm 29.9\%)$ 。BCP A1762T/G1764A和PC G1896A在HBV B基因型和C基因型的分布情况显示, BCP A1762T/G1764A突变主要发生于C基因型患者 $(78.6\% \text{ vs } 27.3\%, \chi^2 = 6.579, P = 0.0172)$; PC G1896A突变主要发生于B基因型患者 $(72.7\% \text{ vs } 28.6\%, \chi^2 = 4.812, P = 0.0472)$ 。

三、慢性乙型肝炎患者BCP A1762T/G1764A和PC G1896A突变特征

研究报道BCP A1762T和G1764A双突变显著相关, 本研究25例患者深度测序结果也显示了A1762T和G1764A的显著相关性 $(R^2 = 0.999)$ (图4), 以下以A1762T代表BCP突变, G1896A突变代表PC突变。BCP/PC突变在25例患者的流行情况显示: C基因型的BCP突变率明显高于B基因型, 但差异无统计学意义 $(68.4\% \pm 42.7\% \text{ vs } 25.7\% \pm 28.4\%, t = 1.614, P = 0.1326)$; 32.0%患者仅有BCP突变, 24.0%患者仅有PC突变, 24.0%患者同时携带BCP和PC突变。

表2 慢性乙型肝炎患者 HBV BCP 和 PC 区突变情况

区域	突变位点	例 (%)	突变率 ($\bar{x} \pm s$, %)	C基因型 (n = 14)	B基因型 (n = 11)
BCP (1 742-1 849)	G1746A	23 (92.0)	14.4 \pm 6.6	13 (92.9)	10 (90.9)
	A1752G/T	7 (28.0)	85.4 \pm 29.9	0 (0.0)	7 (63.6)
	T1753C/G	6 (24.0)	8.9 \pm 7.6	5 (35.7)	1 (9.1)
	A1762T	14 (56.0)	59.3 \pm 43.1	11 (78.6)	3 (27.3)
	G1764A	14 (56.0)	47.4 \pm 43.3	11 (78.6)	3 (27.3)
PC (1 814-1 900)	C1817G/A	6 (24.0)	2.7 \pm 1.1	1 (7.1)	5 (45.5)
	T1825C/A	25 (100.0)	27.6 \pm 11.5	14 (100)	11 (100)
	A1846T	7 (28.0)	21.7 \pm 21.6	2 (14.3)	5 (45.5)
	G1896A	12 (48.0)	10.7 \pm 16.6	4 (28.6)	8 (72.7)
	G1899A	5 (20.0)	5.9 \pm 8.1	4 (28.6)	1 (9.1)

注: BCP: 基本核心启动子; PC: 前 C; A: 腺嘌呤; G: 鸟嘌呤; C: 胞嘧啶; T: 胸腺嘧啶

表3 慢性乙型肝炎患者 HBV BCP A1762T/G1764A 和 PC G1896A 突变特征

突变位点	例（%）	突变率（ $\bar{x} \pm s$ ，%）	P值
BCP A1762T			0.1326
B基因型	3（27.3）	25.7 ± 28.4	
C基因型	11（78.6）	68.4 ± 42.7	
PC G1896A			0.4995
B基因型	8（72.7）	13.2 ± 19.6	
C基因型	4（28.6）	5.9 ± 8.0	
BCP/PC组合			0.1869
W/W	5（20.0）	0/0	
W/M	6（24.0）	0/（14.9 ± 22.9）	
M/W	8（32.0）	（88.6 ± 27.5）/0	
M/M	6（24.0）	（20.2 ± 23.6）/（6.5 ± 5.8）	

注: BCP: 基本核心启动子; PC: 前 C; W: 野生型; M: 突变型

讨 论

慢性HBV感染在临床上可引发广泛的疾病谱, 从非活性携带状态到严重的肝脏并发症, 如肝硬化和肝细胞癌等^[14]。CHB患者的自然病程, 尤其对于婴幼儿期感染的患者, 可以分为免疫耐受期、免疫清除期、非活性携带状态^[15]。CHB患者由免疫耐受期进入免疫清除期后, 不同的突变被选择出来, 以BCP和PC区突变最为常见。研究报道除病毒基因型、HBV DNA水平外, HBV病毒突变也会影响CHB的进展^[16]。本研究通过Ion Torrent深度测序, 分析了25例HBeAg阳性CHB患者HBV BCP和PC区突变的准种特征。

本研究在HBV BCP和PC区检出10个变异热点: G1746A、A1752G/T、T1753C/G、A1762T、G1764A、C1817G/A、T1825C/A、A1846T、G1896A和G1899A。研究报道, BCP A1762T/G1764A增加肝硬化、肝癌发生风险^[4, 8-9, 17-18], PC G1896A降低肝癌的风险^[8]; BCP和PC突变促进自发或干扰素治疗诱发的HBeAg血清学转换, 并提出可以根据BCP和PC突变率预测发生自发HBeAg血清学转换的时间或干扰素治疗诱发HBeAg血清学转换的几率^[5-6, 19-21]。此外, T1753V和A1846T也与肝硬化和肝癌的发生风险相关^[22]。提示评估肝脏疾病进展时, 除BCP A1762T/G1764A和PC G1896A外, 其他突变位点也应予以考虑。因此, 基于一种高度敏感的深度测序技术, 早期全面检出突变位点, 对于预测抗病毒治疗疗效和肝脏疾病进展具有重要的临床意义。本研究发现G1746A和

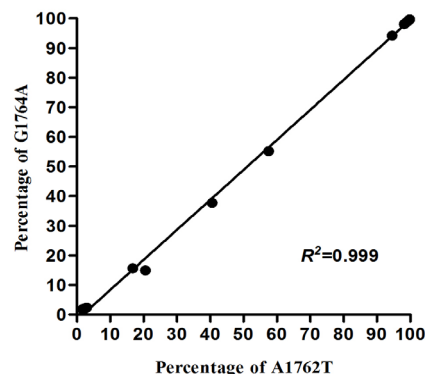


图4 HBV BCP A1762T和G1764A突变率相关性分析

T1825C/A流行率高达92%和100%, 平均突变率分别为(14.4 \pm 6.6) %和(27.6 \pm 11.5) %, 目前尚无研究报道。

本研究通过比较BCP和PC区突变在HBV B基因型和C基因型感染者中的流行情况发现, A1752G/T和G1896A主要发生于B基因型感染者, A1762T/G1764A主要发生于C基因型感染者。研究报道, 与B基因型感染者相比, C基因型感染者对于干扰素的应答率低于B基因型感染者^[23], 且更易进展为肝细胞癌^[24-25], 而BCP A1762T/G1764A增加肝癌发生风险^[8, 18], PC G1896A降低肝细胞癌的风险^[8]。因此, 推测C基因型增加肝癌发生风险可能与C基因型患者具有较高的BCP A1762T/G1764A流行相关, 增加肝细胞癌发生风险的因素究竟是C基因型还是BCP A1762T/G1764A有待进一步研究证实。

综上所述, 本研究基于Ion Torrent PGM深度测序, 通过对25例HBeAg阳性CHB患者HBV BCP和PC区突变的定量分析, 初步描述了HBeAg阳性CHB患者HBV BCP和PC区突变的准种特征, 为基于深度测序技术, 开展HBV变异与抗病毒治疗疗效和疾病进展相关性的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Chotiayaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 6(8):453-462.
- 2 Gunther S, Fischer L, Pult I, et al. Naturally occurring variants of hepatitis B virus[J]. Adv Virus Res, 1999, 52:25-137.
- 3 郑彩霞, 陈立, 潘晨. 乙型肝炎病毒准种的临床意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2011, 5(4):494-498.
- 4 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.
- 5 Yang HC, Chen CL, Shen YC, et al. Distinct evolution and predictive

- value of hepatitis B virus precore and basal core promoter mutations in interferon-induced hepatitis B e antigen seroconversion[J]. *Hepatology*,2013,57(3):934-943.
- 6 Nie H, Evans AA, London WT, et al. Quantitative dynamics of hepatitis B basal core promoter and precore mutants before and after HBeAg seroconversion[J]. *J Hepatol*,2012,56(4):795-802.
- 7 Chu CM, Lin CC, Chen YC, et al. Basal core promoter mutation is associated with progression to cirrhosis rather than hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection[J]. *Br J Cancer*,2012,107(12):2010-2015.
- 8 Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*,2008,100(16):1134-1143.
- 9 Chou YC, Yu MW, Wu CF, et al. Temporal relationship between hepatitis B virus enhancer II/basal core promoter sequence variation and risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*,2008,57(1):91-97.
- 10 Fujimoto M, Moyerbrailean GA, Noman S, et al. Application of ion torrent sequencing to the assessment of the effect of alkali ballast water treatment on microbial community diversity[J]. *PLoS One*,2014,9(9):e107534.
- 11 Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing[J]. *Nature*,2011,475(7356):348-352.
- 12 Ma H, Yang RF, Wei L. Quantitative serum HBsAg and HBeAg are strong predictors of sustained HBeAg seroconversion to pegylated interferon alfa-2b in HBeAg-positive patients[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2010,25(9):1498-1506.
- 13 Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, et al. The association of HBV core promoter double mutations (A1762T and G1764A) with viral load differs between HBeAg positive and anti-HBe positive individuals: a longitudinal analysis[J]. *J Hepatol*,2009,50(2):273-280.
- 14 Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. *N Engl J Med*,2008,359(14):1486-1500.
- 15 Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJ, et al. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies of hepatitis B virus DNA in serum[J]. *Hepatology*,1985,5(3):431-434.
- 16 Kao JH. Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B[J]. *Hepatol Int*,2007,1(4):415-430.
- 17 Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers[J]. *J Infect Dis*,2006,193(9):1258-1265.
- 18 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers[J]. *Gastroenterology*,2003,124(2):327-334.
- 19 Tseng TC, Yu ML, Liu CJ, et al. Effect of host and viral factors on hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients receiving pegylated interferon-alpha-2a therapy[J]. *Antivir Ther*,2011,16(5):629-637.
- 20 Erhardt A, Reineke U, Blondin D, et al. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B[J]. *Hepatology*,2000,31(3):716-725.
- 21 Lok AS, Akarca US, Greene S. Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance[J]. *Hepatology*,1995,21(1):19-24.
- 22 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.
- 23 Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy[J]. *J Hepatol*,2000,33(6):998-1002.
- 24 Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men[J]. *J Natl Cancer Inst*,2005,97(4):265-272.
- 25 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B[J]. *Gastroenterology*,2000,118(3):554-559.

(收稿日期: 2015-06-16)

(本文编辑: 孙荣华)

闫琳琳, 张恒辉, 马慧, 等. HBV基本核心启动子和前C区变异的深度测序分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(2):151-156.