

不同基因型HBV对药物反应性和S基因突变位点研究

朱杰华¹ 黄嘉玲² 王江林² 何应中¹ 杜文胜¹ 黄健¹

【摘要】目的 分析HBV不同基因型对药物反应性及S基因变异情况。**方法** 收集遵义医学院附属医院于2016年3月至2017年7月就诊的186例HBV DNA阳性乙型肝炎患者的血清样本, 根据是否用药分为治疗组130例和对照组56例, 治疗组根据用药不同分为干扰素组、核苷(酸)类似物组、保肝药组和中成药组, 分别提取HBV DNA后扩增S基因并测序, 结合临床资料分析疗效与基因型相关性。**结果** 对照组共51例患者扩增出S基因[91.1% (51/56)], 其中B基因型30例, C基因型21例, 治疗组共有104例患者样本扩增出S基因[80.0% (104/130)], 其中B基因型62例, C基因型42例, 均以B、C基因型为主。两种基因型对核苷(酸)类似物的反应性(肝功能改变、HBV DNA拷贝数)与未治疗组差异有统计学意义($P < 0.01$)。B基因型HBV S基因经核苷(酸)类似物作用后, 第597位碱基鸟嘌呤G变为腺嘌呤A即183位苯丙氨酸(Phe/F)突变为缬氨酸(Val/V), 使翻译终止。保肝药和干扰素引起131位鸟嘌呤G突变为腺嘌呤A, 进而甘氨酸(Gly/G)变为谷氨酸(Glu/E), 且9和213位氨基酸突变率为100%。C基因型HBV则发生26位胞嘧啶C突变为胸腺嘧啶T, 即脯氨酸(P)变为亮氨酸(L)及53位点丝氨酸(Ser/S)突变为亮氨酸L。保肝药物作用主要引起68位点异亮氨酸(Ile/I)突变为苏氨酸(Thr/T)和49位点P变L。干扰素和中成药均可引起225位酪氨酸-异亮氨酸(YI)变为异亮氨酸-组氨酸(IH)和9位氨基酸P变L。**结论** 不同HBV基因型对药物反应不同, B、C基因型HBV对药物反应可产生相同突变位点。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 基因型; S基因; 药物治疗; 变异

Drug reactivity and mutations of S gene from different genotypes of hepatitis B virus Zhu Jiehua¹, Huang Jialing², Wang Jianglin², He Yingzhong¹, Du Wensheng¹, Huang Jiang¹. ¹Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; ²Department of Laboratory Medicine, Zunyi Medical College and Institute of Science and Technology, Zunyi 563099, China
Corresponding author: Zhu Jiehua, Email: 1464955357@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the different genotypes of HBV on drug reactivity and variation of S gene. **Methods** Total of 186 specimens of hepatitis B patients with HBV DNA positive were collected in Affiliated Hospital of Zunyi Medical University from March of 2016 to July of 2017. According to whether or not using drugs, 186 specimens were divided into experimental group with 130 cases and control group with 56 cases. And the experimental group was divided into interferon group, nucleoside analogue group, hepatoprotective drug group, and Chinese Traditional Medicine group. HBV DNA were extracted and amplified and S gene were sequenced. While the correlation between genotype and clinical treatment were analyzed by clinical data analysis. **Results** S gene were amplified in 91.1% (51/56) samples in untreated group and 80.0% (104/130) samples in experimental group, mainly with B and C genotypes. The reactivity of the two genotypes (the changes of ALT, AST and HBV DNA) were significantly different compared with untreated group ($P < 0.01$). After reacted with nucleos(t)ide analogues, guanine at the 597th alkaline of S gene in B genotype mutated to adenine, and Phenylalanine (Phe/F) at the 183rd amino acid mutated to valine

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.04.017

基金项目: 贵州省联合基金 (No. 黔科合LH字[2015]7478号)

作者单位: 563000 遵义市, 遵义医学院附属医院医学检验科¹; 563099 遵义市, 遵义医学院医学检验系医学检验2012级K-1班²

通信作者: 朱杰华, Email: 1464955357@qq.com

(Val/V), then translation was terminated. The hepatoprotective drugs and interferon mainly cause the 131st guanine changed to adenine, and Glycine (Gly/G) mutated to glutamic acid (Glu/E), the mutation rate of the 9th and 213rd amino acid were 100%. Among the C genotype, cytosine at the 26th site mutated to thymine, then Proline (Pro/P) mutated to Leucine (Leu/L) and serine (Ser/S) at the 53rd site mutated into Leu. In the hepatoprotective drugs group, Isoleucine mutated to Threonine at the 68th site and P changed into L at the 49th site. Interferon and Chinese Traditional Medicine caused a common mutation with 225 bit Tyrosine-Isoleucine (TI) changing into Isoleucine-Histidine (IH) for both genotype B and C HBV, and the 9th Proline mutated to Leucine. **Conclusions** Different genotypes of HBV showed different reactivity to drugs, genotypes B and C could show the same mutation sites in S gene.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genotype; S gene; Drug treatment; Mutation

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是严重威胁人类健康、可导致传染性疾病的病原体, 长期慢性感染可引起炎症、肝硬化和肝细胞癌, 已成为世界关注的公共卫生问题之一^[1-3]。疫苗接种虽然可以显著降低HBV感染率, 但对已经感染或者在围产期或学龄前感染者效果不甚理想^[4]。目前尚无有效治愈HBV感染的药物或方法, 抗病毒治疗和辅以免疫增强疗法为主要选择^[5-6], 其中核苷酸类似物抗病毒治疗是主要药物, 其作用靶点是HBV逆转录酶区, 但这类药物一般对机体无免疫调节作用, 停药后会出现病毒复制甚至反弹, 并可出现耐药突变株^[7-9]。感染不同基因型HBV患者对药物的反应性不同。HBV感染治疗需要长期用药, 故会导致耐药突变株出现^[10]。其突变包括HBV的不同基因区, 但P基因区和S基因区是常用的基因耐药突变分析靶点, 也是用药效果评估的常用靶点^[11]。S基因位于HBV基因组155~833核苷酸区, 编码由226个氨基酸残基组成的表面抗原 (HBsAg)^[12], 该抗原是诊断HBV感染的重要指标之一, 也是乙肝疫苗的主要组成部分。S基因的研究对HBV感染治疗评估和疫苗免疫效果分析有重要意义。本研究通过分析HBV不同基因型感染者经不同药物治疗后, S基因变异及生物学意义, 为HBV全基因组研究及患者治疗方案选择提供依据, 现报道如下。

资料与方法

一、一般资料

1. 研究对象: 2016年3月至2017年7月就诊于遵义医学院附属附属医院且实验室检测HBV DNA定量分析 (HBV DNA > 10³ IU/ml, PCR-荧光探针法) 为阳性病

例, 包括HBV携带者、慢性乙型肝炎、肝硬化以及肝细胞癌患者共130例纳入治疗组, 其中肝硬化患者5例, 肝癌术后抗病毒治疗1例, 短期用药治疗时间为6个月~12个月, 以单药为主, 其中核苷酸类似物治疗组35例 (包括替比夫定治疗者9例、恩替卡韦治疗者13例、拉米夫定治疗者8例、阿德福韦酯治疗者5例), 干扰素 (重组人干扰素 α -2b) 治疗组31例, 保肝药 (包括双环醇片、还原型谷胱甘肽、舒肝宁等) 治疗组37例, 中成药 (益肝灵、苦参素、当飞利肝宁胶囊) 治疗组27例, 治疗组中男性72例, 女性58例, 年龄为18~65岁, 平均年龄33岁; 临床诊断和处理符合《2017 EASL临床实践指南: 慢性乙型肝炎的管理》, 排除酒精性肝炎、药物性肝功能损伤、其他混合感染等引起的肝病, 亦无HIV、HCV、HDV等感染史, 无糖尿病、高血压等其他疾病。未治疗组设为对照组, 为随机收集的单纯HBV感染者, 共56例, 按诊断标准临床诊断为HBV携带者, 未进行任何用药处理, 男性39例, 女性17例, 年龄18~67岁。

2. 标本来自遵义医学院附属医院医学检验科临床分子检验室, PCR扩增试剂盒和DNA纯化试剂由课题组提供。

二、研究方法

1. 记录入组患者的用药前后肝功能指标 (ALT/AST)、HBV表面标志物、HBV DNA含量等指标检测结果。

2. 血样收集处理: 收集研究对象药物治疗6~12个月的外周静脉血5 ml, 分离血清1 ml, 用于DNA提取, 做好标记 (日期和实验室编号等), 冻存于-20℃备用。

3. 引物设计: 从GenBank中获取HBV基因序列, 各基因型及亚型的基因序列号如下: HBV A1

型: gi:399923514、HBV A2型: gi:399923524、HBV B型: gi:930588558、HBV C型: gi:973412648、HBV D型: gi:394556647、HBV D3型: gi:99923494、HBV D4型: gi:399923519、HBV E型: gi:399923529、HBV F2型: gi:399923439、HBV F4型: gi:399923449、HBV G型: gi:383082100、HBV H型: gi:530719456、HBV ADW: gi:221499、HBV ADR: gi:53913407, 对所选择的各基因型序列进行同源性分析, 确保所选择各基因型的序列可靠性。

使用Primer 5.0软件设计HBV S区引物, 结合应用软件Oligo 6.0进行PCR引物评价分析; 引物序列见表1, 由大连宝生物TaKaRa公司合成。

4. HBV DNA提取、扩增与回收: 采用大连宝生物公司购买的DNA提取和纯化试剂盒HBV DNA, 然后按试剂盒操作说明配制扩增反应体系, 总体积为50 μ l, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性2 min, 95 $^{\circ}$ C变性45 s, 56 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸6 min, 共40个循环, 每个样本首先选择表1中的第一对引物进行扩增, 若不能扩增出S基因, 排除各种原因后选择第二对引物配制体系, 依次类推。扩增结束后取5 μ l产物进行1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。将扩增出目的条带样本挑出, 应用碧云天PCR产物纯化试剂盒, 进行纯化回收, 严格按照试剂操作说明书进行。

5. S基因测序与结果分析: 纯化产物送上海生物工程有限公司测序, 结果用DNAMAN软件进行突变位点比对分析、Chromas进行测序可靠性分析、ORF Finder寻找开放读码框架, 并把测序结果翻译为对应的氨基酸再进行比对分析。

三、统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计分析, 经过不同药物治疗后, HBV DNA载量、AST和ALT水平为计量资料, 采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 呈非正态分布, 采用秩和检验, 组间比较采用独立样本 t 检验, 计

数资料采用非参数秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各基因型同源性分析

用DNAMAN软件对所选各基因型序列进行同源性分析, 结果保存为Outtree, 由Outtree图可知, 各基因型同源性均 $> 80\%$ (图1), 提示所选各基因型序列符合本实验要求。

二、PCR产物测序结果准确性分析

本实验设计引物时, 所研究位点离PCR序列两端 > 50 bp, 如图2所示, 目的序列测序结果峰图干扰较小, 单个峰清晰, 用Chromas软件将峰图转变为碱基序列后, 与GenBank中标准序列进行比对后显示无差异, 故本次实验标本的测序结果可靠。

三、不同基因型对药物反应性

将对照组和治疗组中扩增出的S基因序列与GenBank中S基因序列比对分析显示, 结果显示对照组中有30例B基因型, 21例C基因型, 治疗组中有62例为B基因型, 42例为C基因型。采用秩和检验对各组HBV DNA含量、AST、ALT分析显示, B

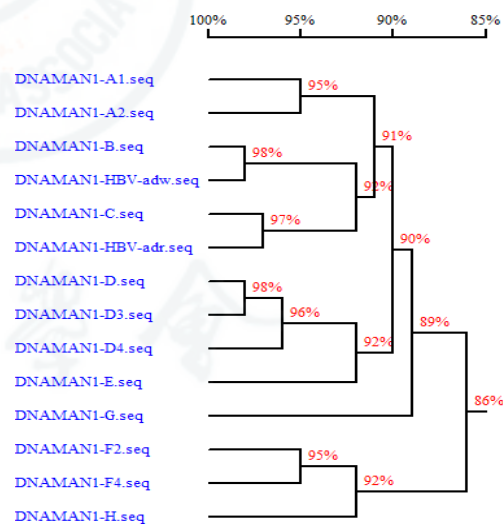


图1 各基因型的同源性

表1 HBV S 基因引物列表

基因型	引物	序列号 (5' → 3')	位点
ABCDE型	F	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	nt55~74
ABCDE型	R	AAATGTATACCCAAAGACAAAAG	nt800~832
FGH型	F	TTCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAG	nt53~76
FH型	R	AATTGGTAACAGCGGTATAAAGGG	nt784~807
G型	R	GAGAAACGGACTGAGGCCCACTCCC	nt641~665

基因型对核苷酸类似物反应性最好，较对照组显著下降，差异有统计学意义（ $P = 0.0016$ ）。保肝药物治疗组HBV DNA含量较对照组下降，但下降不如核苷酸类似物显著，肝功AST水平下降不明显，差异有统计学意义（ $P = 0.0072$ ）。其他药物治疗组，HBV DNA载量，AST、ALT水平与对照组差

异统计学意义。C基因型患者使用核苷酸类似物治疗组，HBV DNA载量较对照组下降，差异有统计学意义（ $t = 0.435$ 、 $P = 0.661$ ），详见表2~3。

四、HBV S基因突变位点

采用DNAMAN软件对B基因型S基因测序结果与GenBank中的S基因序列进行比对分析并用ORF

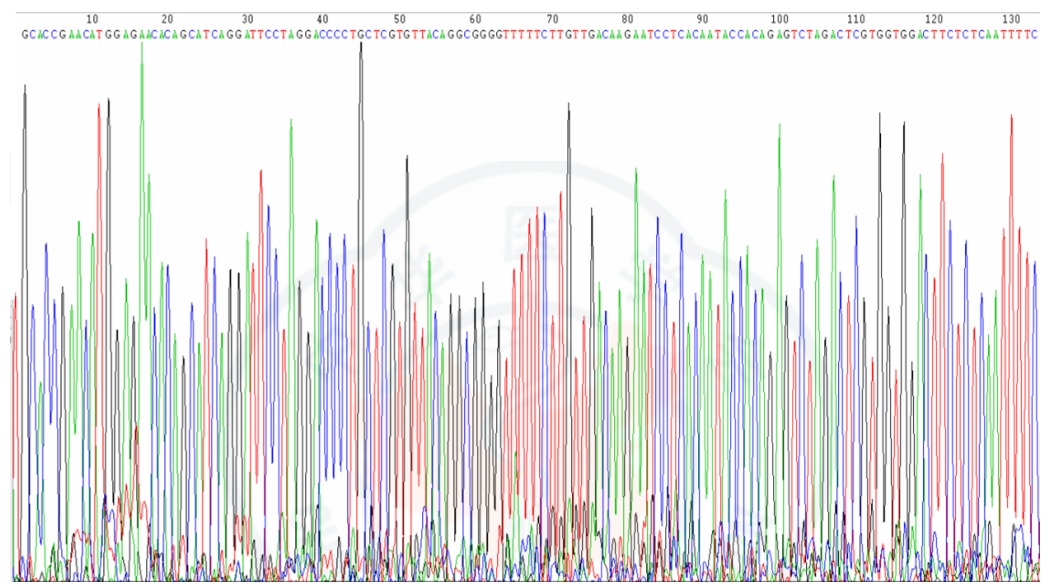


图2 S基因测序结果部分峰图

表 2 62 例 HBV B 基因型对不同药物的应答（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	例数	HBV DNA（ $\times 10^7$ IU/ml）	AST（U/L）	ALT（U/L）
对照组	30	6.92 ± 3.85	46.21 ± 29.84	42.75 ± 19.13
干扰素治疗组	11	4.19 ± 2.38	162.33 ± 18.47^b	95.10 ± 34.11
核苷酸类似物治疗组	14	2.45 ± 1.17^b	39.87 ± 17.18^a	40.50 ± 18.16
中成药治疗组	11	2.59 ± 0.96	84.83 ± 13.60	102.10 ± 52.13
保肝药治疗组	26	3.94 ± 1.14^b	86.34 ± 11.79^b	117.5 ± 12.83
t值		6.410	0.510	0.158
P值		0.003	2.394	2.112

注：与对照组相比，^a： $P < 0.05$ ，^b： $P < 0.01$

表 3 42 例 HBV C 基因型对不同药物的应答（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	例数	HBV DNA（ $\times 10^7$ IU/ml）	AST（U/L）	ALT（U/L）
对照组	21	6.72 ± 2.85	44.71 ± 23.84	44.72 ± 17.23
干扰素治疗组	11	3.85 ± 1.74	55.30 ± 33.40	104.10 ± 42.57
核苷酸类似物治疗组	10	4.27 ± 1.25	91.20 ± 33.65	159.41 ± 52.72
中成药治疗组	11	7.11 ± 1.57	83.05 ± 37.92	75.75 ± 35.51
保肝药治疗组	10	3.33 ± 1.17	193.31 ± 11.08	113.5 ± 10.80
t值		0.435	2.123	3.113
P值		0.661	0.048	0.511

Finder寻找开放读码框架,并把测序结果翻译为对应的氨基酸显示,治疗组中有1例为肝癌手术后抗病毒治疗,B基因型经不同药物呈现多位点突变,核苷酸类似物主要导致S基因183位苯丙氨酸F变为缬氨酸V及碱基597G变为A,使翻译终止。保肝药和干扰素,主要引起第131位碱基G变为A,氨基酸由甘氨酸G变为谷氨酸E。第9位氨基酸和213位氨基酸突变率达100%。相同方法对C基因型S基因测序结果与GenBank中的S基因序列进行比对分析显示,C基因

型经核苷酸类似物作用均发生26位碱基由C变为T,9位氨基酸由脯氨酸P变为亮氨酸L,另外引起53位点突变S变为L,保肝药物作用主要引起68位点突变I变为T和49位P变为L,详见表4~5。

对药物作用后HBV B、C基因型S基因共同突变位点分析发现B基因型和C基因型共同的氨基酸突变位点主要在中药组,为225位YI变为IH及干扰素组9位氨基酸P变为L;其他药物治疗组均出现不同程度、不同位点的共同突变,详见表6。

表4 药物作用后 HBV B 基因型 S 基因碱基及氨基(酸)突变位点[例(%)]

碱基突变位点	突变氨基酸	对照组 (30例)	保肝药组 (25例)	核苷(酸)类似 物组(14例)	中药组 (11例)	干扰素组 (11例)
26C-T	P9L	30 (100)	25 (100)	14 (100)	0 (0)	11 (100)
639A-G	I213M	30 (100)	25 (100)	14 (100)	0 (0)	11 (100)
41T-C	V14A	2 (7)	4 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
62T-C	L21S	3 (10)	5 (20)	0 (0)	0 (0)	5 (45)
131G-A	G44E	0 (0)	4 (17)	0 (0)	0 (0)	4 (36)
140T-A	V47E	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (27)
637插入T	IPLLPIFFCLWVYI 213YAAVTNLFLLSLGIH	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (36)
373C-T	T125M	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
584T-C	I195T	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (18)	0 (0)
547T-G	F183V	0 (0)	0 (0)	5 (35)	0 (0)	0 (0)
580G-T	V194F	0 (0)	0 (0)	3 (21)	0 (0)	0 (0)
26C-T	P9L	30 (100)	25 (100)	14 (100)	0 (0)	11 (100)

注:0表示无对应突变位点,表中保肝药组25为去掉1例肝癌手术后抗病毒治疗患者

表5 药物作用后 HBV C 基因型 S 基因碱基及氨基酸突变位点[例(%)]

突变位点	突变氨基酸	对照组 (21例)	保肝药组 (10例)	核苷(酸)类似 物组(10例)	中药组 (11例)	干扰素组 (11例)
26C-T	P9L	21 (100)	10 (100)	10 (100)	11 (100)	11 (100)
8A-G	N3S	6 (29)	0 (0)	4 (40)	0 (0)	0 (0)
203T-C	I68T	3 (14)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
71G-A	R24K	6 (29)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
158C-T	S53L	3 (14)	0 (0)	5 (50)	1 (10)	0 (0)
146C-T	P49L	0 (0)	4 (40)	0 (0)	0 (0)	1 (10)

注:0表示无对应突变位点

表6 药物作用后 HBV B 与 C 基因型相同突变位点[例(%)]

突变位点	突变氨基酸	对照组 (51例)	保肝药组 (36例)	核苷(酸)类似物组 (24例)	中药组 (22例)	干扰素组 (22例)
13A-G	T5A	3 (6.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (13.6)	0 (0.0)
673InsA	YI225IH	9 (18.4)	6 (17.0)	0 (0.0)	12 (54.5)	1 (4.5)
670G-T	0	4 (8.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (22.7)
599A-T	Y200F	2 (4.1)	2 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
26C-T	P9L	13 (26.5)	10 (27.8)	0 (0.0)	3 (27.3)	9 (40.9)

注:0表示无对应突变位点

讨 论

目前,抗病毒治疗虽可抑制肝细胞质中HBV基因组的复制,但不能彻底清除HBV DNA^[13],因其并不影响核内HBV闭合环状DNA(HBV closed circular DNA, cccDNA)的复制^[14-15],且目前尚无可靠反映肝内cccDNA水平的指标。许多学者认为cccDNA水平与HBsAg水平显著相关^[16],故寻找新方法或指标用于cccDNA水平检测或评估,但研究前提是全面明确HBV基因组特点。HBV基因组组成的变化与感染治疗密切相关,其基因组中S基因区主要编码病毒的S蛋白,其中最主要蛋白为HBsAg, HBsAg蛋白氨基酸排列顺序的差异和结构的差异均可直接影响病毒对药物的反应性^[17]。有研究显示乙型肝炎病毒的基因型与感染者对药物应答及病情转归有一定相关性,HBV A基因型感染者对于干扰素反应性高于D型, B型高于C型, A型和D型高于B和C型^[18]。而目前关于药物应答的评价指标与HBV感染的实验室检测指标相同或相似,但已不能满足临床需求。且随着实验技术的发展和精准医疗的要求,HBV感染研究逐渐进入基因组分析及个体化治疗阶段^[19]。尽管目前对HBV基因组研究取得一些成果,但对不同基因型在不同药物治疗后的基因突变研究尚少^[20]。为了解遵义地区HBV感染特点和不同HBV基因型感染者对药物反应的特点,本研究从基因型角度和突变位点分析不同基因型HBV感染者对药物反应性和与临床用药的相关性。

通过分析本研究收集的标本中S基因区分HBV基因型发现本地区感染主要以B、C基因型为主,与以往研究^[21]显示中国南方以HBV B基因型流行为主,北方则以HBV C基因型流行为主有差异,但与王丽丽等^[22]关于贵州地区基因型流行分析结果相似,造成该结果的原因可能与经济发展和人口流动有关。本研究采用与以往相同指标,即患者肝功能受损指标AST、ALT水平、HBV DNA含量变化,分析HBV B、C基因型感染者对不同药物反应性。因本研究中收集的样本主要来自慢性乙型肝炎患者,肝功能轻中度受损,治疗前各组患者AST、ALT水平较未治疗组显著升高,但各研究组相比较肝功能水平差异无统计学意义,基本在同一基线水平,故用药后直接进行AST、ALT水平、HBV DNA载量分析,结果显示核苷酸类似物、保

肝药物治疗患者HBV DNA显著降低,给予核苷酸类似物治疗后HBV DNA含量较对照组显著降低,肝功能也明显下降。而其他药物治疗组HBV DNA载量,AST、ALT水平变化并不明显,提示B、C基因型可能对核苷酸类似物药物反应效果较好,与以往研究结果一致^[23]。

为进一步分析不同药物对HBV S基因序列变化的影响,本研究分析药物作用后S基因突变位点,结果显示所有B和C型HBV感染者均有脯氨酸(P)变为亮氨酸(L)突变,甘氨酸(G)变为谷氨酸(E),苯丙氨酸(F)变为缬氨酸(V)等氨基酸突变均属于非极性、疏水性氨基酸,这可能与亮氨酸(L)较脯氨酸(P)更适合HBV在感染者体内生存与发展。甚至保肝药和干扰素引起的共同突变也显示出相似特点。另外研究显示, B、C基因型显示的突变位置与B基因型氨基酸突变主要发生在C-末端区域,而C基因型氨基酸突变主要发生在N-末端的结果一致^[24]。此外,本研究还发现干扰素和中药可引起B和C基因型发生共同突变,该突变是否在HBV感染治疗中有重要意义,有待进一步研究。

以往研究集中于核苷酸类似物作用后C基因区突变位点分析,本研究在分析C基因区序列变化的同时分析S区序列的改变,以便更全面了解药物作用后便于评估不同基因型对核苷酸类似物药物的反应。但因收集样本量的局限性,同时扩增S和C区的样本较少,故本研究将在后续研究中进一步扩大样本量并位点分析以进一步了解不同基因型对药物的反应特点。

综上,HBV B、C基因型经不同药物作用后,呈现出同一种药物不同位点碱基序列及对应氨基酸的改变,并存在少量共同碱基及氨基酸突变。

参 考 文 献

- [1] D Ganem, AM Prince. Hepatitis B virus infection natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med,2014,350(10):1118-1129.
- [2] 樊蓉,孙剑,侯金林. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗现状及展望[J]. 临床肝胆病杂志,2016,32(11):2029-2032.
- [3] Ghasemi F, Rostami S, Ghayour-Mobarhan M, et al. Current progress in the development of therapeutic vaccines for chronic hepatitis B virus infection[J]. Iran J Basic Med Sci,2016,19(7):692-704.
- [4] Chen DS. Hepatitis B vaccination: The key towards elimination and eradication of hepatitis B[J]. J Hepatol,2009,50(4):805-816.
- [5] Mobini M, Mortazavi M, Nadi S, et al. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy[J]. Iran J Basic Med Sci,2016,19(2):119-124.

- [6] Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection[J]. *Postgrad Med J*, 2013, 89 (1051):294-304.
- [7] Liang TJ, Block TM, Brian J, et al. Present and future therapies of hepatitis B: from discovery to cure[J]. *Hepatology*, 2015, 62(6):1893-1908.
- [8] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(14):1486-1500.
- [9] Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management[J]. *Hepatology*, 2007, 46(1):254-265.
- [10] Gu LJ, Han Y, Li YJ, et al. Emergence of lamivudine-resistant HBV during antiretroviral therapy including lamivudine for patients coinfecting with HIV and HBV in China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0134539.
- [11] Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: current drugs[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2014, 28(3):371-402.
- [12] 邱宁, 李蕊, 温春阳, 等. 慢性乙型肝炎患者在核苷(酸)类药物规范化治疗前耐药突变研究[J]. *中国病毒病杂志*, 2014, 4(1):11-14.
- [13] Chen L, Gan QR, Zhang DQ, et al. Increased intrahepatic quasispecies heterogeneity correlates with off-treatment sustained response to nucleos(t)ide analogues in e antigen-positive chronic hepatitis B patients[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(2):201-207.
- [14] Isorce N, Lucifora J, Zoulim F, et al. Immune-modulators to combat hepatitis B virus infection: from IFN- α to novel investigational immunotherapeutic strategies[J]. *Antiviral Res*, 2015, 122:69-81.
- [15] Gish R, Jia J, Locarnini S, et al. Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance[J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(4):341-353.
- [16] Cai WJ, Yin L, Wang SL, et al. Correlation between polymorphisms of the E-selectin gene, hepatitis B virus DNA copies, pre-S1 antigen and clinical outcomes during chronic hepatitis B[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2):2893-2898.
- [17] Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(39):8720-8734.
- [18] Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, et al. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(1):126-144.
- [19] Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, et al. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: Mass sequencing approach[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(41):6995-7023.
- [20] Wang YW, Shan XF, Liang Z, et al. Deep sequencing analysis of HBV genotype shift and correlation with antiviral efficiency during adefovir dipivoxil Therapy[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0131337.
- [21] 杨柳. 乙病毒基因型及基因变异特征分析的研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2015, 23(5):9-19.
- [22] 王丽丽, 杨兴林, 吴君, 等. 贵州地区269例慢性乙型肝炎患者病毒基因型与耐药分析[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(23):3874-3878.
- [23] Sun HY, Sheng WH, Tsai MS, et al. Hepatitis B virus coinfection in human immunodeficiency virus-infected patients: A review[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(40):14598-14614.
- [24] Zhang ZH, Zhang L, Dai Y, et al. Occult hepatitis B virus infection: influence of S protein variants[J]. *Virology*, 2016, 13(10):50-61.

(收稿日期: 2017-10-07)

(本文编辑: 孙荣华)

朱杰华, 黄嘉玲, 王江林, 等. 不同基因型HBV对药物反应性和S基因突变位点研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2018, 12(4):402-408.