

广西壮族自治区肝癌高发区HBV基因型、BCP/前C区突变与肝癌相关性的研究

郑丹 邓伟 黄天壬 李曦亮 李召发

【摘要】 目的 研究广西壮族自治区(广西)扶绥县肝癌高发区HBV基因型、基本核心启动子(BCP)/前C区突变与肝癌的关系。方法 采用病例对照方法收集53例肝癌患者和70例HBV健康携带者的血清,提取HBV DNA,用巢式PCR扩增HBV S区、BCP/前C区,扩增产物纯化后测序,分析基因型、基因突变与肝癌发生的关系。结果 BCP区A1762T/G1764A及前C区T1858C在病例组中的突变率高于对照组,分别为94.3% vs. 75.7% ($P=0.006$)和50.9% vs. 31.4% ($P=0.029$); A1775G在对照组中的突变率高于病例组28.6% vs. 13.2% ($P=0.041$)。多因素logistic回归分析显示,HBV A1762T/G1764A和T1858C突变是肝癌发生的危险因素,OR值分别为5.459 (95%CI: 1.397~21.332, $P=0.015$)和3.881 (95%CI: 1.462~10.305, $P=0.006$); A1775G突变是肝癌发生的保护因素,OR=0.192 (95%CI: 0.059~0.622, $P=0.006$)。结论 HBV C基因型是广西肝癌高发区的主要流行株,HBV BCP区A1762T/G1764A、A1775G、前C区T1858C突变与HBV相关肝癌的发生有密切关系。

【关键词】 肝癌; 乙型肝炎病毒; 基因型; 突变

Relationship between hepatitis B virus genotype, BCP/Pre-C region mutations and risk of hepatocellular carcinoma in Guangxi Zhuang Autonomous Region Zheng Dan¹, Deng Wei², Huang Tianren², Li Xiliang¹, Li Zhaofa¹. 1 Guangxi Medical University, 2 Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: Huang Tianren, Email: tianrenhuang@sina.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30960333 and No. 81260319) and Scientific and Technology of University, Guangxi Zhuang Autonomous Region (No. 2013ZD016).

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between hepatitis B virus (HBV) genotype, the mutation in basic core promoter (BCP) region/pre-core (Pre-C) region and the incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) in Fusui county of Guangxi Zhuang Autonomous Region (Guangxi), a area with high incidence of HCC. **Methods** In this case-control study, 53 HCC patients and 70 asymptomatic HBV carriers were enrolled. Blood samples were collected from them for serum separation and HBV DNA extraction. The DNA sequences of the S region and BCP/Pre-C region of HBV was determined by direct sequencing following nested-PCR amplification. The relationship between the genotype, gene mutation of HBV and the incidence of HCC was analyzed. **Results** The mutation rates of the A1762T/G1764A in the BCP region and the T1858C in the Pre-C region of HBV were significantly higher in HCC group than in control group (94.3% vs. 75.7%, $P=0.006$; 50.9% vs. 31.4%, $P=0.029$). The mutation rate of A1775G was significantly higher in control group (28.6%) than in HCC group (13.2%) ($P=0.041$). Multiple logistic regression analysis indicated that A1762T/G1764A and T1858C mutations are the risk factors for the development of HCC ($OR=5.459$, 95% CI: 1.397-21.332, $P=0.015$; $OR=3.881$, 95% CI: 1.462-10.305, $P=0.006$). A1775G is the protective factor in the development of HCC ($OR=0.192$, 95% CI: 0.059-0.622, $P=0.006$). **Conclusion** The present investigation showed that BCP A1762T/G1764A, A1775G and Pre-C T1858C mutations are correlated with the incidence of HCC in Fusui county of Guangxi.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Hepatitis B virus; Genotype; Mutation

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.07.013

基金项目: 国家自然科学基金(30960333, 81260319); 广西壮族自治区高校科技项目(2013ZD016)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学(郑丹、李曦亮、李召发), 附属肿瘤医院(邓伟、黄天壬)

通信作者: 黄天壬, Email: tianrenhuang@sina.com

广西壮族自治区(广西)扶绥县是我国原发性肝癌(肝癌)高发区,肝癌死亡率达 55.62/10 万,是全国平均水平的 2 倍^[1]。HBV 感染、黄曲霉毒素 B1 摄入和饮用水源污染是当地肝癌发病的三大危险因素。通过实施防霉去毒、改水,黄曲霉毒素和饮用池塘水这两个致癌因素已得到较好控制,该地区肝癌有下降趋势,但肝癌发病率和死亡率仍然处在较高水平^[2],提示 HBV 感染因素可能是当地目前肝癌高发的关键性因素。为此本研究采用病例对照研究设计,检测分析扶绥县肝癌患者和肝癌高危人群 HBV 基因型和 BCP/前 C 区突变,为肝癌高发区 HBV 相关肝癌的病因学研究提供依据。

对象与方法

1. 研究对象:均来自本课题组于 2003 年起在广西扶绥县肝癌高发现场建立的高危人群队列,共 123 例,队列成员均为当地常住居民。其中肝癌病例组 53 例,对照组 70 例。肝癌病例的诊断符合 2001 年中国抗癌协会肝癌专业委员会修订的《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》,对照组为 HBV 携带者。2008—2014 年收集研究对象血清标本,分离后置-80℃冰箱保存备用。

2. 血清 HBV DNA 复制水平的检测:采用 PCR-荧光探针法(乙型肝炎病毒核酸定量测定试剂盒,湖南圣湘生物科技有限公司)检测 HBV DNA 水平,检测步骤参考试剂说明书,将 50 μl 血清样本与 5 μl 核酸释放剂充分混匀后作为 PCR 反应的模板,加入 40 μl PCR-mix, 2 000 r/min 离心 30 s 后行 PCR 扩增。检测下限值为 500 copies/ml。

3. HBV DNA 的提取和 BCP/前 C 区扩增:取研究对象血清 200 μl 提取 HBV DNA(天根 PD315 试剂盒),溶解于 30 μl ddH₂O 中。采用巢式 PCR 扩增 HBV BCP/前 C 区和 S 基因。BCP/前 C 区基因第一轮扩增引物为 Fgp1 和 Rgp2,第二轮扩增引物为 Fgp3 和 Rgp4(表 1)。BCP/前 C PCR 第一轮反应条件为 95℃ 2 min; 95℃ 35 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。第一轮 PCR 扩增结束后,取 1 μl 产物为模板,进行第二轮 PCR 扩增,反应条件为 95℃ 2 min; 95℃ 35 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。得到 279 bp 大小的产物。HBV S 区第一轮扩增引物为 Fgp5 和 Rgp6,第二轮扩增引物为 Fgp7 和 Rgp8(表 1)。S 区 PCR 第一轮反应条件为 95℃ 2 min; 95℃ 35 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。第二轮反应条件为

95℃ 2 min; 95℃ 35 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。所有 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,送北京六合华大基因科技股份有限公司(广州)进行 PCR 产物纯化,并经 ABI3730xl 基因分析仪进行双向测序。

表 1 HBV S 区、BCP/前 C 区巢式 PCR 扩增引物

引物	序列(5' ~ 3')	nt 起止位点
BCP/前 C 区:		
第一轮 Fgp1	ACTCTTGACTYTCAGCAATG(Y=C or T)	1 662 ~ 1 682
Rgp2	GTCAGAAGGCAAAAAAGAGAG	1 946 ~ 1 966
第二轮 Fgp3	TCTCAGCAATGTCAACGACCG	1 672 ~ 1 692
Rgp4	AGAGAGTAACTCCACAGAWGCTC(W=A or T)	1 929 ~ 1 951
S 区:		
第一轮 Fgp5	GGGTCACCATATTCTTGGG	2 814 ~ 2 832
Rgp6	GACCCACAATTCTTTGACAT	987 ~ 1 006
第二轮 Fgp7	GCGGGGTTTTCTTGTGTA	203 ~ 221
Rgp8	GGGACTCAAGATGTTGTACAG	788 ~ 769

4. HBV 基因型的确定和突变点分析:应用 Chromas 软件读取测序峰图。根据 S 区序列,采用 NCBI 的在线病毒基因分型工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Projects/genotyping/formpage.cgi>) 确定 HBV 基因型。HBV 基因 BCP/前 C 区序列应用 DNAMAN 进行核苷酸变异分析。

5. 统计学分析:采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。样本率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;正态分布计量资料均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较采用 *t* 检验,偏态分布采用非参数秩和检验;所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多因素分析采用非条件 logistic 回归分析,变量筛选用逐步后退法,纳入标准为 $P < 0.05$,剔除标准为 $P > 0.1$ 。

结 果

1. 基本特征:病例组和对照组的性别、年龄、ALT 分布的差异无统计学意义;病例组中有 19 例(35.8%) HBV DNA $\geq 10^5$, 低于对照组(38 例, 54.3%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

2. HBV 基因型分布:123 例研究对象均为 B 和 C 两种基因型。其中 B 型占 25.2%(31/123, 病例组 12 例、对照组 19 例), C 型占 74.8%(92/123), 提示广西扶绥肝癌高发区 HBV 基因型以 C 型为主。病例组和对照组中均以 C 基因型为主, 分别为 77.4%(41/53) 和 72.9%(51/70)。B 和 C 基因型的分布在两组间的差异无统计学意义($\chi^2 = 0.324, P = 0.569$), 提示基因型与肝癌的发生可能并无关联($OR = 1.273, 95\% CI:$

表 2 两组研究对象基本特征

特征	病例组(n=53)	对照组(n=70)	χ^2 值	P 值
性别			2.217	0.137
男	40(75.5)	44(62.9)		
女	13(24.5)	26(37.1)		
年龄(岁)			2.774	0.096
<50	20(37.7)	37(52.9)		
≥50	33(62.3)	33(47.1)		
HBV DNA			4.123	0.042
<10 ⁵	34(64.2)	32(45.7)		
≥10 ⁵	19(35.8)	38(54.3)		
ALT(IU/L)			0.489	0.484
<40	51(96.2)	64(91.4)		
≥40	2(3.8)	6(8.6)		

注:括号内数据为构成比(%)

0.554 ~ 2.923)。

3. HBV BCP/前 C 区突变情况:以病例组 HBV DNA 为模板,巢式扩增 BCP/前 C 区,经 1%琼脂糖凝胶电泳,可见约 300 bp 的目的条带(图 1)。

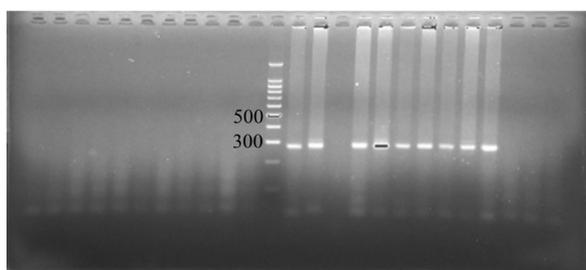


图 1 BCP/前 C 区扩增电泳结果

HBV 基因点突变频率较高位点有 BCP 区 A1762T/G1764A、T1753C、A1775G、C1799G、T1802C/T1803G/C1804T、前 C 区 C1827A、A1846T、T1858C、G1896A、G1899A。其中 A1762T/G1764A、T1858C 突变在病例组中的突变率高于对照组, A1775G 突变在病例组中的突变率低于对照组,差异有统计学意义,提示这 3 个位点的突变与肝癌发生相关(表 3)。前 C 区的 C1827A 在病例组和对照组中突变率均很高(98.1% vs. 94.3%),但差异无统计学意义。

4. HBV 基因型和复制中各突变位点与肝癌发生的关系:在 B 基因型中 A1762T/G1764A 在病例组中的突变率高于对照组,提示 B 基因型 A1762T/G1764A 突变更易发生在肝癌患者中;C 基因型中 T1858C 在病例组的突变率高于对照组,提示 C 基因型 T1858C 突变更易发生在肝癌患者

中。无论是 HBV DNA ≥ 10⁵ 组还是 HBV DNA < 10⁵ 组中,病例与对照间突变率的差异均无统计学意义(表 4)。

5. A1762T/G1764A 及其他因素与肝癌关系的多因素分析:利用非条件 logistic 回归二分类方法探讨与肝癌发生的相关因素。纳入因素包括性别、年龄、基因型以及 A1762T/G1764A 和 T1858C、A1775G 变异,其变量赋值见表 5。多因素 logistic 回归分析结果见表 6,显示 A1762T/G1764A 和 T1858C、A1775G 突变均与肝癌的发生有相关性。A1762T/G1764A 和 T1858C 具有增加肝癌风险的趋势(OR=5.459, 95%CI: 1.397 ~ 21.332, P=0.015; OR=3.881, 95%CI: 1.462 ~ 10.305, P=0.006)。A1775G 有降低肝癌风险的趋势(OR=0.192, 95%CI: 0.059 ~ 0.622, P=0.006)。HBV 基因型和 HBV DNA 与肝癌的发生无相关性。

讨 论

目前已鉴定发现 HBV 有 10 种基因型(A ~ J)和多种基因亚型,中国人以 B、C 型感染为主^[3]。本研究发现广西扶绥县肝癌高危人群感染的 HBV 基因型包括 B 型和 C 型,这两种基因型在肝癌病例组与对照组中分布的差异无统计学意义,提示基因型与当地肝癌的发生可能无直接关系,与广西肝癌高发家系和对照家系基因型的对比研究结果一致^[4]。Yang 等^[5]认为 C 基因型相对 B 基因型更易增加肝癌的风险,可能与研究对象不同有关。Yang 等^[5]的研究中 HBV B 基因型为主要流行株(64.2%),而本研究则以 C 基因型为主要流行株。HBV DNA 是 HBV 复制的指标,本研究显示对照组 HBV DNA 复制水平高于病例组,这是因为在 HBV 慢性感染发展为肝细胞癌的过程中,HBV 基因整合到肝细胞基因组中造成病毒复制能力下降,外周血中 HBV DNA

表 3 HBV BCP/前 C 区主要突变位点的单因素分析

位 点	病例组 (n=53)	对照组 (n=70)	χ^2 值	P 值	OR 值(95%CI)
ntT1753C	18(34.0)	20(28.6)	0.411	0.522	1.286(0.596 ~ 2.775)
ntA1762T/G1764A	50(94.3)	53(75.7)	7.685	0.006	5.346(1.346 ~ 19.358)
ntA1775G	7(13.2)	20(28.6)	4.156	0.041	0.380(0.147 ~ 0.983)
ntC1799G	6(11.3)	10(14.3)	0.234	0.628	0.766(0.260 ~ 2.259)
ntT1802C/T1803G/C1804T	11(20.8)	19(27.1)	0.667	0.414	0.703(0.301 ~ 1.641)
ntC1827A	52(98.1)	67(95.7)	0.053	0.818	2.238(0.235 ~ 23.038)
ntA1846T	14(26.4)	17(24.3)	0.073	0.788	1.119(0.493 ~ 2.539)
ntT1858C	27(50.9)	22(31.4)	4.793	0.029	2.266(1.083-4.739)
ntG1896A	20(37.7)	35(50.0)	1.835	0.176	0.606(0.293 ~ 1.253)
ntG1899A	10(18.9)	10(14.3)	0.465	0.495	1.359(0.534 ~ 3.644)

表 4 HBV 基因型和复制水平中各突变位点与肝癌发生的关系

位点	基因型 (%)				复制水平 (%)			
	B		C		<10 ⁵		≥10 ⁵	
	病例组	对照组	病例组	对照组	病例组	对照组	病例组	对照组
A1762T/G1764A	11(91.7) 1(8.3)	9(47.4) ^a 10(52.6)	39(95.1) 2(4.9)	44(86.3) 7(13.7)	34(100.0) 0(0.0)	28(87.5) 4(12.5)	16(84.2) 3(15.8)	25(65.8) 13(34.2)
A1775G	1(8.3) 11(91.7)	4(21.1) 15(78.9)	6(14.6) 35(85.4)	16(31.4) 35(68.6)	5(14.7) 29(85.3)	9(28.1) 23(71.9)	2(10.5) 17(89.5)	11(28.9) 27(71.1)
T1858C	2(16.7) 10(83.3)	5(26.3) 14(73.7)	25(61.0) 16(39.0)	17(33.3) 34(66.7) ^a	20(58.8) 14(41.2)	13(40.6) 19(59.4)	7(36.8) 12(63.2)	9(23.7) 29(76.3)

注:与对照组比较,^a P<0.05

表 5 变量及其赋值

变 量	赋 值
性别	男=1,女=2
年龄(岁)	<50=1, ≥50=2
基因型	B型=1,C型=2
HBV DNA	<10 ⁵ =1, ≥10 ⁵ =2
A1762T/G1764A	未突变=0,突变=1
A1775G	未突变=0,突变=1
T1858C	未突变=0,突变=1

表 6 A1762T/G1764A 和 T1858C 与肝癌关系的多因素回归分析

变 量	β	OR 值(95%CI)	P 值
性别	1.018	2.767(1.101 ~ 6.954)	0.030
年龄(岁)			
≥50	0.880	2.412(1.022 ~ 5.694)	0.045
基因型			
C	-0.124	0.884(0.377 ~ 2.730)	0.821
HBV DNA			
≥10 ⁵	-0.139	0.870(0.363 ~ 2.028)	0.754
突变点			
A1762T/G1764A	1.697	5.459(1.397 ~ 21.332)	0.015
A1775G	-1.651	0.192(0.059 ~ 0.622)	0.006
T1858C	1.356	3.881(1.462 ~ 10.305)	0.006

拷贝数减少^[6]。

大量研究的结果提示 A1762T/G1764A 与肝癌的发生密切相关。2003 年我国台湾学者 Kao 等^[7]对 250 例慢性 HBV (基因 B 或 C 型) 患者 A1762T/G1764A 双联突变率进行分析,结果提示随着疾病严重程度增加,A1762T/G1764A 双联突变率也相应增加;而且该双突变阳性率在肝癌患者中显著增高,是 HBV 携带者发生肝癌的病毒学预测因素。2008 年在江苏省启东市的一项研究对比了 58 例肝癌患者及与之匹配的 71 例慢性乙型肝炎患者发现,肝癌组 BCP A1762T/G1764A 双突变明显较对照组高,多因素 logistic 回归分析得出,BCP A1762T/G1764A 变异与肝癌发生相关^[8]。Fang 等^[9]在广西隆安地区的研究认为 A1762T/G1764A 双突变可以作为筛选男性 HBsAg 携带者肝癌最高危人群的生物标记。

本研究结果显示 BCP 区 A1762T/G1764A 双突变在病例组中的突变率高于对照组,差异有统计学意义,A1762T/G1764A 双突变与肝癌发生的关系密切,是肝癌发生的危险因素,与上述研究结果一致。但 A1762T/G1764A 双突变具体致癌机制尚未明确。有观点认为,BCP 双突变可以上调 pgRNA 的转录,促进 pgRNA 衣壳化,增加 HBcAg 产量,从而增强 HBV 复制力。BCP 区 A1762T/G1764A 双突变引起编码蛋白质 130 位亮氨酸(Leu)变为蛋氨酸(Met),131 位从缬氨酸(Val)变为亮氨酸(Leu),使位于 BCP 上的内核受体结合位点转为肝细胞核因子-1(HNF-1)的结合位点,由于转录因子结合的改变,使得前 C 区 mRNA 的转录降低,最终导致 HBeAg 水平下降,pgRNA 转录及 HBcAg 合成增强^[10]。由于上调核心蛋白的表达和下调前 C 蛋白的表达,从而加强衣壳化,导致病毒复制增加,导致 HBV 长期持续感染。此外,双突变正好位于 p53 结合区域,可能影响了 p53 的抑癌作用、DNA 修复及调节细胞周期等功能。本研究病例组 A1762T/G1764A 突变率高达 94.3%,实属少见,这与广西扶绥县持续的肝癌高发是否相关,有待进一步与低发区进行比较研究。本研究显示,B 基因型中 A1762T/G1764A 在病例组中的突变率高于对照组,与 Yang 等^[5]的研究不一致,原因可能与本文 B 基因型样本量较少有关。

稳定的茎环结构是病毒复制的基础,前 C 区是 ε 循环二级结构的一部分,其二级结构中,nt1896 与 nt1858 的匹配程度决定了茎环结构的稳定性。HBV 基因型 B、D、E 及部分 C 型中,nt1858 为 T,通常认为 nt1896 的 G 突变为 A 可以使结构更加稳定,有利于病毒的复制和流行,因而 PC 变异常见于 B、C、D、E 型。本研究与肝癌相关的位点是 T1858C,而不是 G1896A,与 Sakamoto 等^[11]的研究结果一致。由此推测,与 nt1896 的 G 突变为 A 的目的-一样,nt1858 T 突变为 C,也会使干拌结构趋向稳定,病毒的复制力增强,患肝癌的风险增加。来自香港地区的一项相

关研究报道了在前C区nt1856~nt1858位点上3个碱基为TCC代表一种特定的HBV结构,与C基因型其他结构相比,TCC的模式会引起更为严重的肝脏疾病^[12]。

本研究发现一个与肝癌相关的新突变位点A1775G。相对于肝癌患者,A1775G突变更多见于慢性HBV感染者。提示较低的A1775G突变率可能为肝癌的保护性因素。对于C基因型或HBV DNA $\geq 10^5$ copies/ml患者,对照组中A1775G突变率明显高于病例组。但关于A1775G突变的报道较少,一项在儿童中开展的研究表明A1775G突变与HBeAg血清学转化相关,HBeAg血清学转化儿童中A1775G突变率较高^[13]。另外两项研究中发现较高频率的A1775G突变,但是其在各疾病组中无统计学意义^[14-15]。该位点突变对于肝癌的发病作用还需要进一步佐证。

为了综合分析肝癌的相关性因素,本研究将病例组和对照组所有相关因素包括年龄、性别、HBV DNA复制水平、HBeAg状态、基因型和病毒变异(A1762T/G1764A、T1858C、A1775G)进行logistic回归分析,结果显示年龄>50岁、男性、A1762T/G1764A、T1858C、A1775G变异均与肝癌的发生有密切关系。本研究结果支持Yuen等^[16]的观点,认为BCP变异是肝癌的高危因素,基因型C与肝癌发生的密切关系是由于C基因型较易发生BCP变异所致。来自台湾地区的报道也表明只要有BCP变异,B、C基因型均有较高发生肝癌的危险性^[17]。

总之,在广西扶绥县肝癌高发区HBV基因型突变既有共同点,也有自身特点,相对其他地区人群A1762T/G1764A存在比较高的突变率实属少见,值得进一步探索。

参 考 文 献

[1] Huang FS, Wei ZL. The analysis of cancer mortality in Fusui from 2006-2008 [J]. J Youjiang Med Coll Nation, 2012, 34(2): 174-175. (in Chinese)
黄福生, 韦忠亮. 扶绥县2006-2008年肝癌死亡率分析[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(2): 174-175.

[2] Deng W, Long L, Li JL, et al. Mortality of major cancers in Guangxi, China: sex, age and geographical differences from 1971 to 2005 [J]. Asia Pac J Cancer Prev, 2014, 15(4): 1567-1574.

[3] Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18): 5427-5434.

[4] He P. A study on correlation among the HBV-DNA level, HBV genotype (subtype) and familial clustering of hepatocellular carcinoma in the high incidence area of Guangxi [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2010. (in Chinese)

何平. 广西肝癌高发区人群HBV复制水平、基因型及亚型与肝癌家族聚集性关系的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2010.

[5] 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, 2014, 100(16): 1134-1143.

[6] Chong MH, Chen JY, Feng PT, et al. HBV integration in relate HCC [J]. Hepatology, 1991, 13(2): 316.

[7] 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.

[8] Guo X, Jin Y, Qian GS, et al. Sequential accumulation of the mutations in core promoter of hepatitis B virus is associated with the development of hepatocellular carcinoma in Qidong, China [J]. J Hepatol, 2008, 49(5): 718-725.

[9] Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, et al. HBV A1762T, G1764A mutations are a valuable biomarker for identifying a subset of male HBsAg carriers at extremely high risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study [J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103(9): 2254-2262.

[10] Tong S, Kim KH, Chante C, et al. Hepatitis B virus e antigen variants [J]. Int J Med Sci, 2005, 2(1): 2-7.

[11] Sakamoto T, Tanaka Y, Orito E, et al. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines [J]. J Gen Virol, 2006, 87(7): 1873-1882.

[12] Chan HL, Tse CH, Ng EY, et al. Phylogenetic, virological, and clinical characteristics of genotype C hepatitis B virus with TCC at codon 15 of the precore region [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 681-687.

[13] Ni YH, Chang MH, Hsu HY, et al. Longitudinal study on mutation profiles of core promoter and precore regions of the hepatitis B virus genome in children [J]. Pediatr Res, 2004, 56(3): 396-399.

[14] Shi RF, Wu JZ, Wan PQ, et al. Relationship between hotspot mutations in basic core promoter of hepatitis B virus and familial clustering of hepatocellular carcinoma in Guangxi [J]. J Pract Med, 2014, 30(23): 3762-3765. (in Chinese)
石仁芳, 吴继周, 万裴琦, 等. 乙型肝炎病毒基本核心启动子区热点突变与广西肝癌家族聚集性的相关性[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(23): 3762-3765.

[15] Hu ZY, Yang J, Chen J, et al. Characteristics of HBV genotype/subgenotype and mutations in precore/core promoter region in patients suffering from family clustering HBV infection with unfavorable prognosis [J]. J Chongqing Med Univ, 2012, 37(11): 936-939. (in Chinese)
胡章勇, 杨军, 陈骥, 等. 不良结局家族聚集性乙型肝炎病毒感染患者HBV基因型/亚型及前C/C启动子区变异特征分析[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(11): 936-939.

[16] Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, et al. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2003, 37(3): 562-567.

[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.

(收稿日期: 2014-12-09)

(本文编辑: 张林东)