

巢式PCR检测卵泡液HBV X区、C区基因扩增反应体系与条件的优化研究

温嘉琦¹, 马偲航¹, 薛凯文¹, 颜晓玥¹, 孔馨怡¹, 李友筑², 张磊¹

(1. 厦门大学公共卫生学院, 福建厦门 361102; 2. 厦门大学附属第一医院生殖医学科, 福建厦门 361003)

摘要: **目的** 为提高巢式聚合酶链式反应(PCR)检测乙型肝炎病毒(HBV)X区基因与C区基因的灵敏度, 提高卵泡液HBV基因组的检测效率, 探索HBV X区与C区基因巢式PCR扩增反应的最佳体系与最适条件。**方法** 收集2024年9月~12月厦门大学附属第一医院8例乙肝表面抗原阳性、计划接受治疗的女性患者的卵泡液作为研究对象, 经PCR-荧光探针法检测, 得出样本HBV DNA滴度。利用软件Oligo 7进行引物设计, 分别从退火温度、模板量等进行优化。PCR扩增产物经1g/dl琼脂糖凝胶电泳以及测序分析后进行确认。**结果** 不论HBV X区基因或C区基因, 其最佳退火温度皆为53℃。X区基因巢式PCR反应检测中筛选出X3-X4引物组(XF3: ACTTATCGGGACTGACAACCTCG, XR3: GGTGAACAGACCAATTTATGCCT; XF4: TCCTCTCTCGGAAATACACCT, XR4: AGCCTCCTAGTACAAAGACCT)可获得最佳扩增效果, 8例样本检出率为87.5%; C区基因巢式PCR反应检测中筛选出C3-C4引物组(CF3: CCAGGGAATTAGTAGTCAGC, CR3: GTTTCCCACCTTATGAGTCCA; CF4: ATGTCAATGTTAATATGGGCCTA, CR4: TACTAACATTGAGATTCCCGAGA)可获得最佳扩增效果, 8例样本检出率为100%。DNA模板量3 μl与5 μl皆可有效扩增目的基因。**结论** 基于卵泡液建立了针对HBV X区与C区基因的最优巢式PCR体系, 显著提升低滴度HBV DNA及阴性样本的HBV目的基因检出效能, 为扩展乙肝病毒携带人员的相关基因组学研究提供检测方案。

关键词: 巢式聚合酶链式反应; 乙型肝炎病毒; X区基因; C区基因; 卵泡液

中图分类号: R373.21; R446.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)03-022-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.03.004

Optimization of the Nested PCR Amplification Reaction System and Conditions for Detection of HBV X Region and C Region Genes in Follicular Fluid

WEN Jiaqi¹, MA Sihang¹, XUE Kaiwen¹, YAN Xiaoyue¹, KONG Xinyi¹, LI Youzhu², ZHANG Lei¹ (1. School of Public Health, Xiamen University, Fujian Xiamen 361102, China; 2. Department of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Fujian Xiamen 361003, China)

Abstract: Objective To enhance the sensitivity of nested polymerase chain reaction (PCR) for detecting hepatitis B virus (HBV) X and C region genes, improve the detection efficiency of HBV genomic DNA in follicular fluid, and explore the optimal system and conditions for nested PCR amplification of HBV X and C region genes. **Methods** Follicular fluid samples were collected from eight hepatitis B surface antigen-positive pregnant patients scheduled for treatment at the First Affiliated Hospital of Xiamen University between September and December 2024. HBV DNA titers in the samples were determined using PCR-fluorescent probe methods. Primers were designed using the Oligo 7 software and optimization was performed based on factors such as annealing temperature and template concentration. The amplified products were confirmed via 1g/dl agarose gel electrophoresis and subsequent sequencing analysis. **Results** The optimal annealing temperature was 53℃ for both the HBV X region and C region genes. In the nested PCR assay for the X region gene, the X3-X4 primer set (XF3: ACTTATCGGGACTGACAACCTCG, XR3: GGTGAACAGACCAATTTATGCCT; XF4: TCCTCTCTCGGAAATACACCT, XR4: AGCCTCCTAGTACAAAGACCT) yielded the optimal amplification results, achieving a detection rate of 87.5% across 8 samples. In the nested PCR assay for the C region gene, the C3-C4 primer set (CF3: CCAGGGAATTAGTAGTCAGC, CR3: GTTTCCCACCTTATGAGTCCA; CF4: ATGTCAATGTTAATATGGGCCTA, CR4: TACTAACATTGAGATTCCCGAGA) yielded the optimal amplification results, achieving a detection rate of 100% for the 8 samples. Both 3 μl and 5 μl of DNA template volume were effective for amplifying the target gene. **Conclusions** A highly sensitive and specific nested PCR system for HBV X region and C region genes was established using follicular fluid, which significantly improved the detection efficiency of HBV target genes in low-titer HBV DNA and

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102140、81472988)。

作者简介: 温嘉琦(2002-), 女, 在读硕士, 主要从事流行病学研究, E-mail: 1374810249@qq.com。

通讯作者: 张磊(1972-), 女, 博士研究生, 硕士, 主要从事流行病学研究, E-mail: DrZhanglei@xmu.edu.cn。

negative samples, and provided a detection protocol for the relevant genomic studies in hepatitis B surface antigen carriers.

Keywords: nested polymerase chain reaction; hepatitis B virus; X gene; C gene; follicular fluid

2023年WHO报告全球乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性感染者约2.96亿,其中中国占23%^[1]。HBV相关免疫应答可致肝细胞损伤^[2],超50%的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者可归因于HBV感染^[3-4]。随着乙肝疫苗普及等一系列防控措施实施,一定程度有效地阻断了HBV水平传播,但乙肝疫苗无法完全阻断HBV垂直传播,且HBV宫内传播也成为HBV新发感染和慢性化的主要途径^[5]。2022年荟萃分析提示:我国孕妇的乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性携带率为6.64%,超过1/4的感染者具有较强传染性^[6]。目前疾病预防已扩展至生命全周期,为了更好地解读HBV在垂直传播中的机制,我们聚焦HBV对卵子的影响。卵泡液作为卵子发育的微环境,是研究HBV潜在经卵母细胞传播及影响早期生殖发育的关键样本,其携带的病毒基因组特征可能直接影响卵子质量与后续胚胎发育,并为探索病毒垂直传播的源头提供了独特视角。

HBV基因组包括S、C、P、X四个编码区,针对HBV S区基因的巢式聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增反应体系已积累了较为系统的研究基础^[7],而X区与C区基因的巢式PCR体系尚缺乏系统性数据。X区基因通过其整合的增强子II、核心启动子及microRNA结合区,介导突变体HBx蛋白^[8]的多通路协同致癌效应:包括泛素化降解p53^[9]、激活Ras-MAPK/Wnt信号轴诱导细胞异常增殖^[10],以及通过VEGF促血管生成增强肿瘤侵袭性^[11]。C区A1762T/G1764A双突变^[12-13]与前C区G1896A变异^[14]分别通过提升病毒复制效率及诱导HBsAg合成终止密码子(UAG),协同促进病毒免疫逃逸表型形成。以上突变特征可作为HCC早期筛查的生物标志物及治疗靶点。本研究基于现有研究缺口,以生殖人群的卵泡液为研究对象,针对巢式PCR反应体系的组分优化与热循环参数设置开展系统性研究,旨在提升低滴度HBV DNA的HBV X区和C区基因基因组扩增效率,为完善HBV垂直传播基因组学研究提供实验方法支持。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2024年9月~12月厦门大学附属第一医院就诊HBsAg阳性预行治疗女性患者8例作为研究对象,纳入条件:①乙肝病毒携带者确认:血清HBsAg阳性(化学发光法检测, Cut-off值 ≥ 0.05 IU/ml);②样本完整性要求:卵泡液获取于辅助生殖技术(ART)治疗周期。排除条件:HCV/HIV合并感染者;卵泡液样本肉眼观察呈血性或存在大量颗粒细

胞污染;年龄 ≥ 35 岁。本研究已获得厦门大学附属第一医院伦理委员会的批准(批号:SL-2024KY146),患者皆签署书面知情同意书。

1.2 试剂与仪器 乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)(61300103-0,圣湘生物科技股份有限公司);磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒(DP438-02)、DNA Marker III(MD103)、PowerPol 2X PCR Mix with Dye V2(KR-PCR-001)[天根生化科技(北京)有限公司];琼脂糖(A10065-100,科昊生物工程有限责任公司);50 \times TAE缓冲液(T1062,北京索莱宝科技有限公司);核酸凝胶染色剂[10204ES76,翌圣生物科技(上海)股份有限公司]。PCR扩增仪(960,杭州晶格科学仪器有限公司);化学发光成像系统(ChemiScope 6100,上海勤翔科学仪器有限公司);通用电泳仪电源[WIX-EP600,韦克斯科技(北京)有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 卵泡液采集:通过超声引导下,使用细针穿刺卵泡,抽取卵泡液。采集的卵泡液中可能包含卵子及其他细胞,医生将对这些细胞进行评估,确定卵子的质量。采集过程中需要严格控制针头的操作,确保准确无误。每个卵泡液的采集量约为4 ml,视卵泡大小而定;采集的卵泡液样本需立即送至实验室进行卵子评估,并置-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。

1.3.2 卵泡液HBV DNA滴度检测:使用乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒检测卵泡液HBV DNA滴度。将乙型肝炎病毒-PCR反应液及乙型肝炎病毒-酶混合液充分混匀成PCR-mix,瞬离后取40 μ l与10 μ l/人份已提取核酸溶液混合,震荡瞬离后上机。

1.3.3 乙型肝炎病毒核酸提取:使用磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒。取200 μ l卵泡液样本置于1.5ml离心管中,添加20 μ l蛋白酶K启动酶解反应,后续步骤严格遵循试剂说明书操作。通过磁珠吸附技术实现靶核酸分离纯化,最终获得80 μ l高纯度核酸洗脱液。产物保存于-80 $^{\circ}$ C超低温环境,避免多次冻融而造成核酸降解。

1.3.4 PCR扩增与电泳:采用PCR扩增仪对目标DNA进行两轮扩增。将所得PCR产物与已知大小的DNA Marker III加入各泳道中,180V恒压17min,利用1g/dl琼脂糖凝胶对PCR扩增产物进行电泳。DNA Marker III中7个条带分别为4 500、3 000、2 000、1 200、800、500、200bp。待电泳结束后将胶块置于化学发光成像系统中,通过与Marker比较,推测目标DNA分子量,记录实验结果。最后将PCR产物送至上海生工生物工程技术有限公司进行测

序,验证PCR扩增结果。

1.3.5 反应条件与体系设计:

1.3.5.1 退火温度:巢式PCR扩增体系中,退火温度通过热力学平衡控制引物-模板结合严格性:温度设置需接近引物解链温度(T_m 值)以确保特异性杂交。退火温度过高将阻碍引物-模板稳定配对;过低则显著增加非特异性结合风险,典型表现为引物二聚体形成及脱靶序列扩增,因此不同长度的引物组对应的最佳退火温度不同。本研究采用的巢式PCR反应条件为两轮扩增,每轮均运行31个循环。第一轮循环包括:95℃预热3 min;随后进行循环步骤:95℃变性30 s、53℃退火20 s、72℃延伸1 min 10 s;循环结束后72℃终延伸10 s。第二轮循环步骤与第一轮基本一致,仅在退火温度上设置为变量,本研究对比了51℃、52℃、53℃、54℃四个温度,以优化目的基

因的扩增效率。

1.3.5.2 X区与C区基因引物设计:见表1。根据巢式PCR扩增体系的引物设计原理^[15],利用Oligo 7分别设计X区基因巢式引物2组($X_1\sim X_2$ 与 $X_3\sim X_4$)、C区基因巢式引物2组($C_1\sim C_2$ 与 $C_3\sim C_4$)。在设计过程中优先以引物评分为核心指标,若评分相近则结合氢键数、吉布斯自由能等参数选择不良结构倾向更低的引物。当引物GC含量差异超过阈值(建议 $\Delta GC\% < 10\%$)时,应优先通过调整引物结合位点或调控序列长度(21 ± 2 bp)进行设计;在此过程中需同步验证3'端密码子完整性。所设计引物组基本涵盖所有X区基因与C区基因。 $X_5\sim X_6$ 引物组、 $C_5\sim C_5$ 引物组来源于文献[16-17],为X区基因与C区基因对照引物。所有引物均从厦门佰进生物科技有限公司订购。

表1 X区与C区基因引物

引物名称	引物序列(5'-3')		位置		产物长度	
	上游	下游	上游	下游		
X区基因引物	X_1	TTGCTTTCTCTGCGTTC	GTGAACAGACCAATTTATGCCT	1366-1385	1659-1637	272 bp
	X_2	CACCTCTCTTTACCGGTCTC	AGCCTCTACTACAAAGACCT	1401-1422	1636-1615	230 bp
	X_3	ACTTATCGGGACTGACAACCTCG	GGTGAACAGACCAATTTATGCCT	114	579	488 bp
	X_4	TCCTCTCTCGGAAATACACCT	AGCCTCTACTACAAAGACCT	140	556	437 bp
	X_5	CAAGTGTGCTGACGCAACC	ACAGCTGGAGGCTTGAACAG	-	-	464 bp
	X_6	TCCTTCCCATGGCTGCTCGGTGTGCTG	CATGAGATGATTAGGCAGAGGTGAAAAAG	-	-	464 bp
C区基因引物	C_1	CACCTCTGCCTAATCATCTCA	GCTGGGTCTTCCAAATTACTTCC	140	431	314 bp
	C_2	CTGTTCAAGCCTCCAAGCTG	TCATCAACTCACCCCAACACA	174	393	240 bp
	C_3	CCAGGGAATTAGTAGTCAGC	GTTTCCCACCTTATGAGTCCA	6	324	339 bp
	C_4	ATGTCAATGTAAATATGGGCCTA	TACTAACATTGAGATTCGCCGAGA	27	286	290 bp
	C_5	GGGTCACCATATTCTTGGGAA	GCAGCAAAGCCCAAAAGACC	2794-2814	-	-

1.3.5.3 模板量评估:由于样本不易采集,为提升样本最大使用效率,选择4个样本进行C区基因模板量的评估,其中2例HBV DNA滴度处于200~300 IU/ml,2例HBV DNA滴度<200 IU/ml。第一轮PCR中分别设置 $3\mu\text{l}$ 与 $5\mu\text{l}$ ^[18]两种初始样本模板量,除模板量外反应体系总体积为 $20\mu\text{l}$ (含 $12\mu\text{l}$ 预混液、 $0.8\mu\text{l}$ 正/反向引物及 $6.4\mu\text{l}$ ddH₂O),经31个循环扩增。取 $3\mu\text{l}$ 扩增产物作为第二轮PCR的模板,体系设置与第一轮一致。通过1g/dl琼脂糖凝胶电泳对比两种初始模板浓度下第二轮产物的条带亮度、特异性以及测序结果,明确初始模板量与终产物得率的关联性。

1.4 质量控制措施 本研究使用统一的试剂盒进行检测,检测方法和检测标准保持一致。第一次检测完成后,随机抽取10%的样本进行复检。复检过程与初次检测过程遵循相同的标准和规范。当复核相同率

达到100%时,结果被认为是可靠的。乙肝病毒DNA滴度检测和HBV基因提取的实验操作中,严格按照说明书进行操作;乙肝病毒DNA滴度检测、HBV基因提取和PCR检测时,均设立空白对照、阴性对照和阳性对照。

2 结果

2.1 PCR-荧光探针检测结果 结果显示:1例HBV DNA滴度大于 10^6 IU/ml,1例HBV DNA滴度大于 10^5 IU/ml,1例HBV DNA滴度大于 10^3 IU/ml,3例HBV DNA滴度处于200~300 IU/ml,2例HBV DNA滴度小于200 IU/ml。

2.2 退火温度优化结果 第二轮PCR中同一退火温度下不同引物PCR产物电泳结果,见图1,其中同温度组不同引物的理论条带总数为24;详细测序结果见表2与表3。

2.2.1 X区基因: PCR产物电泳结果显示, 在51℃和54℃退火温度下未扩增出任何条带, 而在52℃和53℃时均产生多个清晰条带且亮度较高。测序结果显示, 退火温度为51℃时测序成功率仅8.3%(2/24), 54℃时完全失败(0%); 52℃与53℃下测序成功率提升至45.8%(11/24)和50%(12/24), 表明该基因仅在52℃~53℃范围内可有效扩增。

2.2.2 C区基因: PCR产物电泳结果显示, 51℃时共产生4条低亮度条带, 54℃时共为10条低亮度条带; 52℃和53℃则分别扩增出15条和16条高亮度条带。测序结果显示, 退火温度为51℃与54℃时测序成功率仅41.7%(10/24)和16.7%(4/24), 而52℃与53℃时

显著提升至70.8%(17/24)和75%(18/24), 证明C区基因在52℃~53℃具有最优扩增效率与测序稳定性。

2.3 引物筛选结果 本研究对不同退火温度下X区与C区基因引物的扩增效能及测序成功率进行系统分析, 每组实验 $n=8$ 。

2.3.1 X区基因引物筛选结果: 53℃退火条件下, $X_1\sim X_2$ 引物组所得电泳条带5个, 部分条带亮度较低, 测序成功率为62.5%(5/8); $X_3\sim X_4$ 引物组可见条带7个, 多数条带亮度高, 测序成功率皆为87.5%(7/8); $X_5\sim X_6$ 引物组测序成功率为0%(0/8), 结果见图1与表2。

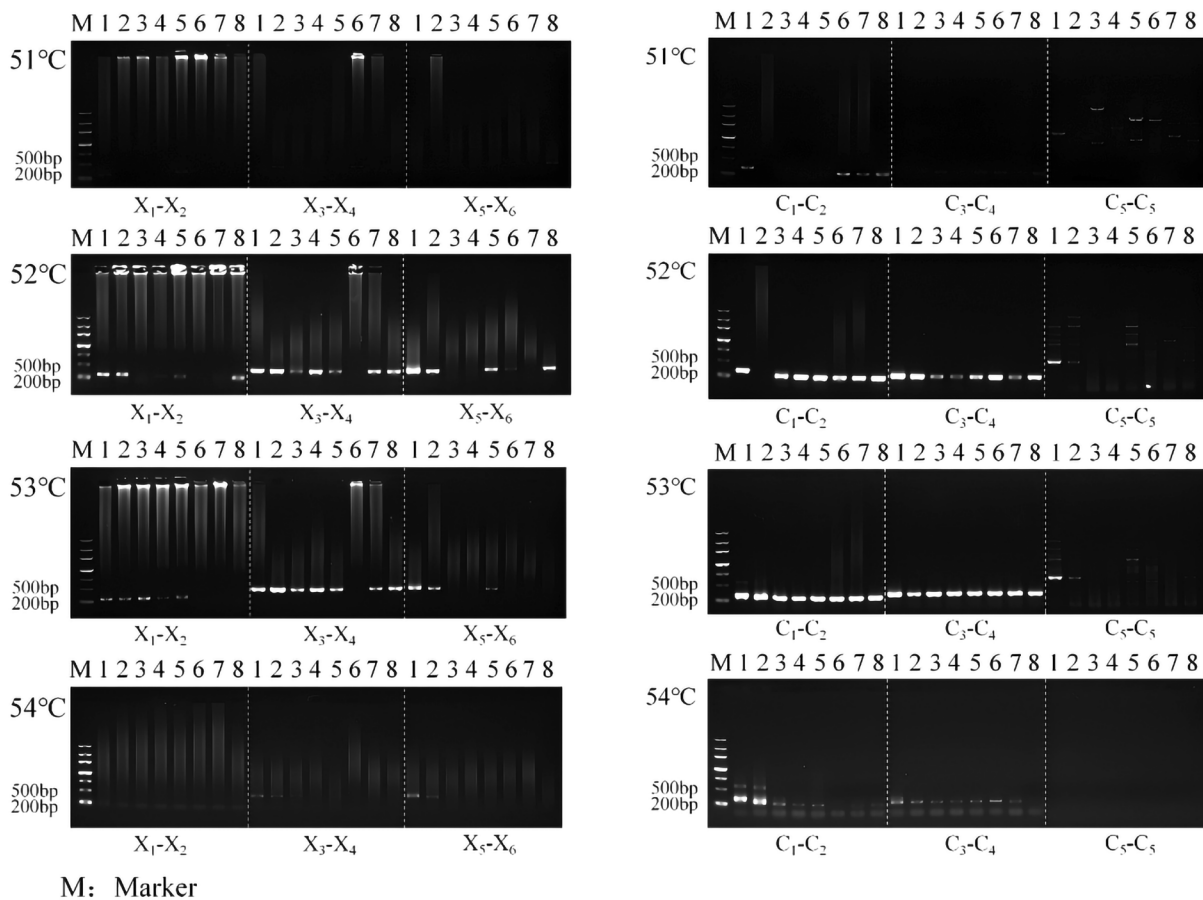


图1 X区和C区基因电泳结果图

2.3.2 C区基因引物筛选结果: 53℃退火条件下, $C_1\sim C_2$ 引物组均可见完整条带, 多数条带亮度高, 测序成功率为100%(8/8); $C_3\sim C_4$ 引物组均可见完整条带, 多数条带亮度高, 测序成功率皆为100%(8/8); $C_5\sim C_5$ 引物组测序成功率为25%(2/8), 结果见图1与表3。

2.4 模板量优化结果 选择DNA浓度为200~300 IU/ml的样本2例, 小于200 IU/ml的样本2例。利用C区最优引物组 $C_3\sim C_4$, 在53℃条件下, 对目的基因进行扩增。无论初始上样量为3 μ l或5 μ l, 所得可见条带数量与测序结果均一致, 仅5 μ l时条带亮度较高。

3 讨论

HBV基因组学可用于研究其传播和相关疾病, 无论是血液或卵泡液样本, 针对C区和X区基因的巢式PCR反应体系与实验条件尚缺乏系统性的研究数据, 特别是在引物设计、退火温度调控以及DNA模板量等关键环节仍存在研究空白。本研究选用8例临床样本进行重复实验, 基于巢式PCR方法, 通过优化巢式PCR体系和条件提高样本提取HBV基因序列效能, 进一步为HBV垂直传播机制研究提供依据。

表2 不同退火温度下X区基因测序结果

温度	引物	HBV DNA 滴度 (IU/ml)							
		1159845.121	461742.659	1389.312	297.851	215.377	201.558	171.396	138.42
51 °C	X ₁ -X ₂	-	-	-	-	+	-	-	-
	X ₃ -X ₄	-	-	-	-	-	+	-	-
	X ₅ -X ₆	-	-	-	-	-	-	-	-
52 °C	X ₁ -X ₂	+	+	-	-	+	-	-	+
	X ₃ -X ₄	+	+	+	+	+	-	+	+
	X ₅ -X ₆	-	-	-	-	-	-	-	-
53 °C	X ₁ -X ₂	+	+	+	+	+	-	-	-
	X ₃ -X ₄	+	+	+	+	+	-	+	+
	X ₅ -X ₆	-	-	-	-	-	-	-	-
54 °C	X ₁ -X ₂	-	-	-	-	-	-	-	-
	X ₃ -X ₄	-	-	-	-	-	-	-	-
	X ₅ -X ₆	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”表示测序成功；“-”表示测序失败。

表3 不同退火温度下C区基因测序结果

温度	引物	HBV DNA 滴度 (IU/ml)							
		1159845.121	461742.659	1389.312	297.851	215.377	201.558	171.396	138.42
51 °C	C ₁ -C ₂	+	-	-	-	-	+	+	+
	C ₃ -C ₄	-	-	+	+	+	+	+	+
	C ₅ -C ₅	-	-	-	-	-	-	-	-
52 °C	C ₁ -C ₂	+	-	+	+	+	+	+	+
	C ₃ -C ₄	+	+	+	+	+	+	+	+
	C ₅ -C ₅	+	+	-	-	-	-	-	-
53 °C	C ₁ -C ₂	+	+	+	+	+	+	+	+
	C ₃ -C ₄	+	+	+	+	+	+	+	+
	C ₅ -C ₅	+	+	-	-	-	-	-	-
54 °C	C ₁ -C ₂	+	+	-	-	-	-	-	-
	C ₃ -C ₄	+	+	-	-	-	-	-	-
	C ₅ -C ₅	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”表示测序成功；“-”表示测序失败。

基于Oligo 7设计的X₃-X₄与C₃-C₄引物组展现出显著优势。在53 °C退火温度下，X₃-X₄引物组的检出率达87.5%(7/8)，较X₁-X₂组(62.5%)提升40%；C₃-C₄组更实现100%检出率(8/8)，而对照引物组(X₅-X₆与C₅-C₆)效率不足25%。这表明引物结合位点设计直接影响扩增效率，尤其对低病毒载量样本(<200 IU/ml)的检测至关重要。

退火温度可通过热力学平衡调控引物-模板结合特异性。53 °C时X区与C区基因同步达到最优平衡：X区条带亮度高且测序成功率50%(较52 °C提升

4.2%)，C区成功率高达75%。温度降至51~52 °C时，非特异性结合导致引物二聚体增加(如C区51 °C条带亮度降低)；升至54 °C则因高温抑制使X区扩增失败。这印证了温度敏感性是巢式PCR的关键控制点。

基于巢式PCR扩增体系模板优化策略分析，模板体积的增加可提升DNA模板浓度，从而改善琼脂糖凝胶电泳条带完整性。实验数据显示，当模板体积增至5 μl时，测序结果与3 μl组相比未呈现显著性差异。鉴于生物样本获取涉及伦理审查限制且具有不可再生特性，为实施样本资源集约化利用原则，建

议将初始模板体积优化为 $3\mu\text{l}$,在保证扩增效率的同时实现样本的可持续性使用。

研究发现,当电泳条带亮度较低时,易出现测序成功率低于条带得出率的情况,提示电泳显示的部分条带(通常是亮度低、弥散或位置不典型的)并非真正的目标特异性扩增产物,可能是引物二聚体、非特异性扩增产物、基因组DNA污染等,或虽是目标产物但其浓度/纯度达不到测序要求。对于无条带却可得测序成功的情况,若PCR产物低于凝胶电泳的检测下限,则在胶上看不到条带,但高于测序反应(结合其更高的灵敏度和线性扩增能力)的检测下限,则可被成功测序。

综上所述,本研究设计了一套基于 $X_3\sim X_4/C_3\sim C_4$ 引物组的高效扩增体系(退火温度 53°C),形成了基于 $3\mu\text{l}$ 模板量的体系参数,在确保产物均一性与扩增特异性的同时,显著提升低病毒滴度样本的检测灵敏度。该体系为探索HBV经卵母细胞垂直传播的分子机制提供了可靠方法学支持,尤其适用于生殖医学中临界值样本的精准筛查。

参考文献:

- [1] WHO. Global hepatitis report 2024: action for access in low-and middle-income countries[EB/OL]. (2024-04-09). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672>.
- [2] 马莹,姜小建,赵佳.血清免疫球蛋白检测在慢性乙型肝炎和乙肝肝硬化中的临床意义[J].现代检验医学杂志,2018,33(5):123-125.
MA Y, JIANG X J, ZHAO J. Clinical significance of serum immunoglobulin detection in chronic hepatitis B and hepatitis B cirrhosis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5): 123-125.
- [3] 韩素雅.乙肝病毒感染者HBV基因突变与疾病进展的关系研究[D].北京:中国疾病预防控制中心,2024.
HAN S Y. Study on the relationship between HBV gene mutation and disease progression in hepatitis B virus infection[D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2024.
- [4] SHEN J Y, DAI J L, ZHANG Y, et al. Baseline HBV-DNA load plus AST/ALT ratio predicts prognosis of HBV-related hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a multicentre study[J]. Journal of Viral Hepatitis, 2021, 28(11): 1587-1596.
- [5] 李玲玲,毛玉萍,周莹.LAM联合HBIG在HBV母婴传播中的阻断效果及安全性[J].中外医学研究,2023,21(4):43-48.
LI L L, MAO Y P, ZHOU Y. Blocking effect and safety of LAM combined with HBIG in mother-to-child transmission of HBV[J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2023, 21(4): 43-48.
- [6] LIU D, LIU Y, NI J Q, et al. Hepatitis B infection among pregnant women in China: a systematic review and meta-analysis[J]. Frontiers in Public Health, 2022, 10: 879289.
- [7] 何成山,蒋秀娣,徐正,等.自建两轮PCR法对低载量HBV DNA S区基因的扩增及实验条件优化[J].第二军医大学学报,2021,42(10):1157-1163.
HE C S, JIANG X D, XU Z, et al. Amplification of low-load HBV DNA S-gene by self-built two-round PCR and optimization of experimental conditions[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2021,42(10):1157-1163.
- [8] SIVASUDHAN E, BLAKE N, LU Z L, et al. Hepatitis B viral protein HBx and the molecular mechanisms modulating the hallmarks of hepatocellular carcinoma: a comprehensive review[J]. Cells, 2022, 11(4): 741.
- [9] QIN L M, QIU M Q, TANG J M, et al. Genetic variants in p53 pathway genes affect survival of patients with HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Hepatocellular Carcinoma, 2024, 11: 1541-1555.
- [10] LIN Q L, QIU M Q, WEI X Y, et al. Genetic variants of SOS2, MAP2K1 and RASGRF2 in the RAS pathway genes predict survival of HBV-related hepatocellular carcinoma patients[J]. Archives of Toxicology, 2023, 97(6): 1599-1611.
- [11] 张天奇,龙喜带.HBx在乙肝相关肝细胞癌中的分子机制研究进展[J].右江医学,2019,47(3):161-165.
ZHANG T Q, LONG X D. Study progress on molecular mechanism of HBx in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Youjiang Medical Journal, 2019, 47(3): 161-165.
- [12] 郭敏卓,韩晶,刘凌.乙型肝炎病毒基因分型及相关应用的研究进展[J].中国口岸科学技术,2024,6(7):13-17.
GUO M Z, HAN J, LIU L. Research progress on hepatitis B virus genotyping and related applications[J]. China Port Science and Technology, 2024, 6(7): 13-17.
- [13] XIE Y, LIU S F, ZHAO Y, et al. X protein mutations in hepatitis B virus DNA predict postoperative survival in hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biology, 2014, 35(10): 10325-10331.
- [14] ZHAO B X, QIAO H X, ZHAO Y, et al. HBV precore G1896A mutation promotes growth of hepatocellular carcinoma cells by activating ERK/MAPK pathway[J]. Virologica Sinica, 2023, 38(5): 680-689.
- [15] GUO J W, STARR D, GUO H Z. Classification and review of free PCR primer design software[J]. Bioinformatics, 2021, 36(22/23): 5263-5268.
- [16] 李彦伟.PCR检测HBV前C/C基因启动子区变异与肝细胞癌的关系[J].肝脏,2020,25(3):300-301.
LI Y W. The relationship between PCR detection of HBV pre-C/C gene promoter region mutations and hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Hepatology, 2020, 25(3): 300-301.
- [17] 甘膺元.乙型肝炎病毒S区、X区基因突变与原发肝癌的相关性研究[D].南宁:广西医科大学,2017.
GAN Y Y. Study on the correlation between HBV S, X gene mutations and primary liver cancer[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2017.
- [18] JOSE-ABREGO A, ROMAN S, REBELLO PINHO J R, et al. Hepatitis B virus (HBV) genotype mixtures, viral load, and liver damage in HBV patients co-infected with human immunodeficiency virus[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 640889.

收稿日期:2025-06-03

修回日期:2025-07-19