

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00715

## 乙型肝炎病毒变异在母婴传播中的初步研究

谢震宇<sup>1</sup>, 傅益飞<sup>1</sup>, 张爱华<sup>1</sup>, 浦蕊<sup>2</sup>, 丁一波<sup>2</sup>, 孙乔<sup>1</sup>, 曹广文<sup>2\*</sup>

1. 上海市浦东新区疾病预防控制中心, 上海 200136

2. 第二军医大学热带医学与公共卫生学系流行病学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探索肝细胞癌(HCC)相关乙肝病毒(HBV)变异在母婴传播和婴儿慢性感染中的变化规律,为肝细胞癌的防控提供理论依据。**方法** 将413名HBV表面抗原(HBsAg)阳性产妇及其新生儿纳入本研究。应用定量PCR检测产妇外周血和新生儿脐带血HBV DNA,应用巢式PCR和克隆测序方法测定前S区和核心启动子区的HCC相关HBV变异。新生儿出生后均经标准HBV免疫,7个月后对104名婴儿HBV感染情况进行随访,对外周血HBV DNA阳性婴儿测定HCC相关HBV变异发生情况。**结果** 在413名新生儿中,41名(9.9%)HBV DNA水平 $\geq 10^3$  copies/mL。随访到的104名婴儿中,4名(占3.8%)HBV DNA $\geq 10^3$  copies/mL。与未发生HBV跨胎盘传播的产妇相比,发生HBV跨胎盘传播者外周血HBV核心启动子变异没有增加,但在C2基因亚型的前S区中,T2898G/C、C3000T、C3116T、T31C和T52C变异增加HBV跨胎盘传播的风险( $P < 0.05$ )。HBV基因组中前S区和核心启动子区的HCC相关变异的频率在产妇外周血和新生儿脐带血中无明显差别,但是在母婴传播的7个月龄HBV DNA阳性婴儿中,检测出极少数量。**结论** HBV C2基因亚型的前S区某些变异可能影响HBV跨胎盘传播,但是具有HCC相关HBV变异的准种没有造成婴儿慢性感染的优势,促进HBV致癌的变异体是在漫长的慢性感染过程中逐渐被选择出来的。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒;肝细胞癌;变异(遗传学);垂直疾病传播**[中图分类号]** R 512.62**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2015)07-0715-07

### Hepatitis B virus mutations during mother-to-children transmission: a preliminary study

XIE Zhen-yu<sup>1</sup>, FU Yi-fei<sup>1</sup>, ZHANG Ai-hua<sup>1</sup>, PU Rui<sup>2</sup>, DING Yi-bo<sup>2</sup>, SUN Qiao<sup>1</sup>, CAO Guang-wen<sup>2\*</sup>

1. Center for Disease Control and Prevention of Pudong New District, Shanghai 200136, China

2. Department of Epidemiology, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the mutations of hepatocellular carcinoma (HCC)-related hepatitis B virus (HBV) during mother-to-child transmission, so as to provide theoretic evidence for prophylaxis of HCC from the very beginning. **Methods** A total of 413 HBsAg-positive mothers and their newborns were enrolled in this study. Serum HBV DNA levels in maternal peripheral blood and cord blood of the newborns were measured using real-time quantitative PCR. Nested PCR together with cloning and sequencing methods were applied to examine the HCC-related HBV mutations in the preS and basal core promoter regions of HBV genome. All the newborns received standard HBV vaccination. Of the 413 newborns, 104 were successfully followed-up 7 months after birth, and the HBV mutations were examined if their circulating HBV DNA was detectable. **Results** Of the 413 newborns, 41 (9.9%) had HBV DNA level  $> 10^3$  copies/mL in their cord blood. Four (3.8%) of the 104 newborns who were successfully followed up had circulating HBV DNA level  $> 10^3$  copies/mL 7 months after birth. Compared to mothers without HBV trans-placental transmission, those with HBV trans-placental transmission had no increase in HBV mutations in the basal core promoter region. However, the viral mutations containing T2898G/C, C3000T, C3116T, T31C, and T52C in the preS region of HBV subgenotype C2 significantly increased the risk of HBV trans-placental transmission ( $P < 0.05$ ). The frequencies of the HCC-related mutations in the preS and basal core promoter regions of HBV genome were not significantly different between maternal peripheral blood and the cord blood of the newborns. Importantly, the HCC-related

**[收稿日期]** 2014-12-28 **[接受日期]** 2015-05-02**[基金项目]** 上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划(PWRq2011-31). Supported by Young Medical Talents Training Program of Pudong Health System of Shanghai (PWRq2011-31).**[作者简介]** 谢震宇, 硕士, 副主任医师. E-mail: zyxie@pdcde.sh.cn

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

mutations were rarely found in the HBV-positive infants at 7 months after birth. **Conclusion** The HBV mutations in the preS region of HBV subgenotype C2 may affect the trans-placental transmission of HBV. However, the quasispecies of HCC-related HBV mutants have no advantage in causing chronic HBV infection in infants. The HBV mutants which can promote HCC are selected during the long term chronic infection.

**[Key words]** hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; variation (genetics); vertical disease transmission

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(7): 715-721]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是我国主要公共卫生问题之一。我国大陆地区约有0.94亿感染者,以HBV基因型C和B为主,约占全世界乙肝感染者的1/3<sup>[1]</sup>。在HBV流行区,母婴传播和婴幼儿期感染是乙肝慢性化的重要原因。我国大陆地区慢性HBV感染者中男性约30%、女性约10%最终发展成肝细胞癌(hepatocellular carcinoma),而且母婴传播造成的慢性感染HCC发生率较高。HBV变异与疫苗免疫逃逸、HBV隐匿性感染,继而发生肝硬化和HCC等密切相关。我们前期研究<sup>[2-5]</sup>发现,HBV基因组前S区(preS)、核心启动子/增强子/前C区(preC)的相关变异与肝硬化和HCC显著相关。但是尚不清楚HCC等相关HBV变异能否通过母婴垂直传播给下一代。我们在上海市浦东新区HBV母婴传播发生率及其影响因素研究<sup>[6]</sup>的基础上,开展HBV变异在母婴垂直传播中的规律研究,为进一步制定相应的预防控制措施提供科学依据。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 2012年3月至2013年3月,从浦东新区城市地区与农村地区各选择2家分娩量最大的医疗机构(该4家医疗机构分娩量占全区62.5%),从4家医疗机构中招募445名入院分娩的乙肝表面抗原(HBsAg)阳性产妇及其新生儿作为研究对象,所有产妇均签署知情同意书。采集445对产妇外周静脉血与新生儿脐静脉血标本以检测HBV感染及基因情况。其中24对未采集到产妇外周静脉血与新生儿脐静脉血或血样本不足,8对经实验室复核检测产妇HBsAg阴性,故最终有效观察对象413对。对413名新生儿开展出生后7个月随访,并采集外周静脉血,其中309名因未获得知情同意、联系电话错误、离开上海等原因失访,共有效随访调查婴儿104名。新生儿脐静脉血HBV DNA和HBsAg同时阳性定义为新生儿宫内感染<sup>[7-9]</sup>。

1.2 乙肝五项与DNA定量检测 产妇外周静脉血、新生儿脐静脉血以及7个月龄婴儿外周静脉血,均采用酶联免疫吸附试验(ELISA)定性检测HBsAg、乙肝表面抗体(抗-HBs)、乙肝e抗原(HBeAg)、乙肝e抗体(抗-HBe)和乙肝核心抗体(抗-HBc)5项指标,采用实时定量PCR法检测血清中HBV DNA含量。

1.3 乙肝病毒基因型测定 采用我们建立的multiplex-PCR方法<sup>[7]</sup>。

1.4 乙肝病毒基因序列检测 采用巢式PCR法联合扩增产物克隆测序的方法对HBV基因组Enh II/BCP/preC区和preS区进行序列扩增与检测<sup>[8]</sup>。

### 1.5 实验检测材料

1.5.1 主要仪器 普通PCR仪(Master, Eppendorf)、梯度PCR(Veriti, ABI)、实时定量PCR仪(Roche LightCycler480, 罗氏)、凝胶成像系统(Molecular Imager Gel Doc™ XR system 170-8170, BioRad)、全波长多功能酶标仪(Synergy 2, Biotek)等。

1.5.2 主要试剂 乙肝五项ELISA检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司,血液基因组DNA提取试剂盒(非离心柱型)购自天根生化科技北京有限公司, AxyPrep PCR 清洁试剂盒购自 AX-YGEN 中国公司,乙肝病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购自上海复星医药股份有限公司。所有商品检测试剂均在有效期内使用,检测结果按照试剂盒说明书进行判断。rTaq 酶、10×Loading Buffer、pMD18-T 载体系统购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。普通PCR引物(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR产物测序由上海迈浦生物科技有限公司完成。

1.6 序列分析 运用MEGA5.0软件包对DNA序列进行比对和遗传进化分析。用Cluster W程序进行比对;用Phylogeny程序构建基因进化树,用Distance程序计算序列间的核苷酸和氨基酸的同源性距离。

1.7 统计学处理 采用EPI DATA 3.0软件建库,资料录入前经过严格核对,录入后进行资料核查。运用SPSS 16.0软件进行数据统计学分析,计数资

料各样本组间分布的比较采用 $\chi^2$ 检验。统计学检验均为双侧检验,检验水准( $\alpha$ )为0.05。

表1 HBV基因组 Enh II/BCP/PreC及PreS区扩增引物序列

Tab 1 The amplification primer sequences of the Enh II/BCP/PreC and PreS regions of HBV genome

Region	DNA sequence (from 5' to 3')	Position	Length (bp)
Enh II/BCP/PreC			
BCP-1S	TCGCATGGAGACCACCGTGA	1 604-1 623	873
BCP-1AS	CCCACCTTATGAGTCCAAGG	2 457-2 476	
BCP-2S	CATGGAGACCACCGTGAA	1 607-1 624	470
BCP-2AS	ATAGCTTGCCTGAGTGC	2 059-2 076	
PreS			
PreS-1S	AAAATTAATTATCCTGCTAGG	2 627-2 647	858
PreS-1AS	GAGAAGTCCACCACGAGTC	251-269	
PreS-2S	TTTACAACCTCTGTGGAAGGC	2 747-2 766	724
PreS-2AS	GAGTCTAGACTCTGTGGTATTGG	233-255	

HBV: Hepatitis B virus

## 2 结果

### 2.1 基本情况

2.1.1 产妇情况 413名产妇平均年龄为(27.2±4.8)岁,民族以汉族为主(402名,占97.3%),职业以待业为主(187名,45.3%),教育程度初中以下及大专以上各占43.3%、42.9%。413名产妇HBsAg均为阳性,HBcAg阳性133名(32.2%),抗-HBc阳性394名(95.4%),抗-HBe阳性224名(54.2%)。其中208名(50.4%)产妇HBV DNA水平 $\geq 10^3$  copies/mL,平均水平为 $5.25 \times 10^5$  copies/mL。

2.1.2 新生儿情况 在413名新生儿中,男女性别比为1.16:1;HBsAg阳性110名(26.6%),HBcAg阳性122名(29.5%),抗-HBc阳性387名(93.7%),抗-HBe阳性223名(54.0%);41名(9.9%)新生儿HBV DNA水平 $\geq 10^3$  copies/mL。

2.1.3 7个月龄婴儿情况 随访到的104名婴儿中,4名(占3.8%)HBsAg阳性且HBV DNA $\geq 10^3$  copies/mL;3名(2.9%)HBsAg和抗-HBs均阴性;97名(93.3%)HBsAg阴性、抗-HBs阳性;22名(21.2%)抗-HBc阳性。

### 2.2 基因检测结果

2.2.1 影响HBV宫内感染的突变分析 41例新生儿脐带血HBV DNA阳性(HBV DNA水平 $\geq 10^3$  copies/mL)的产妇外周血中,成功测序出37例。将

年龄和HBeAg匹配后,共成功测序出41例新生儿脐带血HBV DNA阴性(HBV DNA水平 $< 10^3$  copies/mL)产妇外周血中病毒基因序列。将这些序列比对后发现,BCP区中的变异在两组间的差异无统计学意义。但在C2基因亚型的preS区中,T2898G/C、C3000T、C3116T、T31C和T52C这些变异会增加HBV宫内感染的风险( $P < 0.05$ ),而G2859A则是保护因素( $P < 0.05$ ),具体数据见表2。

2.2.2 HBV基因进化分析及传播关系 在随访到的104例7个月龄婴儿中,共发现4例HBV阳性(外周血HBsAg阳性且HBV DNA $\geq 10^3$  copies/mL)。通过克隆测序,构建基因进化树,得出其中2例由宫内感染所致,2例由其他途径导致HBV母婴传播。将这2对发生母婴传播家庭的产妇外周血、新生儿脐带血、7个月龄婴儿外周血中HBV基因preS区克隆测序后,与B2亚型野生型序列(B2-wild type),C1亚型野生型序列(C1-wild type),C2亚型野生型序列(C2-wild type),以及从NCBI下载的野生型序列AF100309、AB074755、X04615一起进行分子进化分析。结果(图1)表明:在preS区,产妇外周血与新生儿脐带血中HBV的同源性为97.85%~100%,新生儿脐带血与7个月龄婴儿外周血中HBV的同源性为97.64%~100%,产妇外周血与7个月龄婴儿外周血中HBV的同源性为97.01%~100%。

表2 HBV 病毒基因组 preS 区变异与 HBV 宫内感染

Tab 2 HBV mutations in preS regions of HBV genome and HBV intrauterine infection

Subgenotype B2				Subgenotype C2			
Mutant site	Non-HBV	HBV	OR(95% CD)	Mutant site	Non-HBV	HBV	OR(95% CD)
	intrauterine infection (N=21)	intrauterine infection (N=17)			intrauterine infection (N=20)	intrauterine infection (N=20)	
nt. 2859				nt. 2859			
A				A	8	0	<1.00 <sup>a,b</sup>
C				C			
G	21	17	1	G	12	19	1
T				T			
				—	0	1	
nt. 2898				nt. 2898			
A				A			
C				C	0	2	>1.00 <sup>a,b</sup>
G				G	0	3	
T	21	17	1	T	20	15	1
nt. 3000				nt. 3000			
A				A	1	1	
C	21	17	1	C	19	13	1
G				G			
T				T	0	6	>1.00 <sup>a,b</sup>
nt. 3116				nt. 3116			
A				A		1	
C	21	17	1	C	17	9	1
G				G			
T				T	3	10	6.30(1.37-28.86) <sup>a,b</sup>
nt. 31				nt. 31			
A				A			
C				C	3	11	6.88(1.48-32.01) <sup>a,b</sup>
G				G			
T	21	17	1	T	15	8	1
				—	2	1	
nt. 52				nt. 52			
A				A			
C	19	17	1	C	3	10	5.56(1.20-25.71) <sup>a,b</sup>
G				G			
T	2	0		T	15	9	1
				—	2	1	

HBV: Hepatitis B virus. <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>: The Fisher's exact probability method is adopted

2.2.3 HCC 相关 HBV 突变在母婴传播中的传递 将新生儿脐带血 HBV DNA 阳性的 41 对产妇外周血、新生儿脐带血以及 4 名 7 个月龄婴儿 HBV 阳性外周血进行了克隆测序,检测位于 HBV BCP 区和 preS 区重要的肝细胞癌相关 HBV 变异<sup>[2-5]</sup>在母亲、新生儿脐带血和婴儿外周血的分布情况。结果在基因亚型 B2 中,与 HCC 密切相关的变异,如

C1653T、T1674C/G、A1762T/G1764A、G1799C、G1896A、C1T/A、preS1 起始密码子突变、preS2 起始密码子突变和 preS 缺失均存在于产妇外周血和新生儿脐带血中,但在 7 个月龄婴儿外周血中检测出极少数量。在基因亚型 C2 中,C1653T、T1674C/G、T1753V、A1762T/G1764A、G1896A、G2946A、C1T/A、preS1 起始密码子突变、起始密码子突变和

preS 缺失。这些与增强 HCC 的变异在产妇外周血和新生儿脐带血中的频率没有显著变化,但在 7 个月龄婴儿外周血中检测出极少数量。此外重要的

HCC 变异 T1753V 和 G1899A 均未发现于产妇外周血、新生儿脐带血以及 7 个月龄婴儿外周血中。

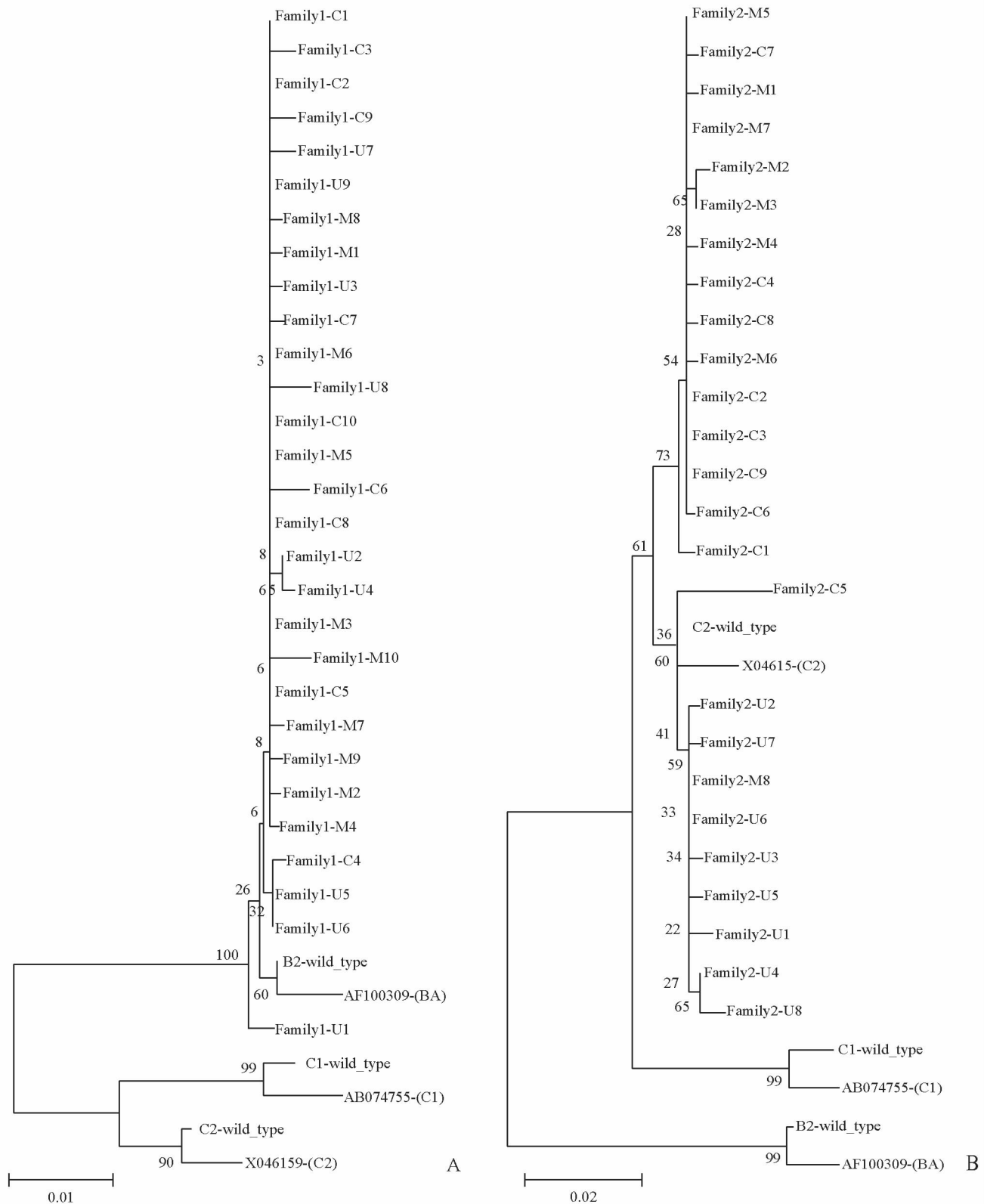


图 1 1号家庭(A)、2号家庭(B)基因进化树

Fig 1 Phylogenetic analysis of HBV from the No. 1 mother-child pairs (A) and No. 2 mother-child pairs (B)

M: Maternal peripheral blood; U: Umbilical cord blood; C: 7 months old baby peripheral blood



### 3 讨论

HBV 母婴传播是我国 HBV 慢性感染最主要的原因之一,常发生于免疫之前。本研究通过检测产妇外周血、新生儿脐带血、7 个月龄婴儿外周血中存在 HBV 的基因亚型以及基因进化树的构建,证实了 HBV 垂直传播的途径依据。我们发现 413 例 HBsAg 阳性孕妇产出的新生儿中,HBsAg 阳性 110 名(26.6%),HBeAg 阳性 122 名(29.5%),说明 HBeAg 比 HBsAg 更加容易透过胎盘屏障,而 41 名新生儿 HBV DNA 阳性,提示只有 9.9% 新生儿可能被 HBV 感染。经过出生后 HBV 疫苗免疫,到 7 个月龄时,只有 3.8% 新生儿形成了 HBV 慢性感染。疫苗免疫保护了 6.1% 或以上的新生儿免受 HBV 慢性化的困扰。出生后 7 个月婴幼儿感染除了母婴垂直传播外,还有可能母乳喂养以及家庭内的日常接触也会增加儿童感染 HBV 的风险。本研究通过基因进化树的构建分析,发现 2 对母婴传播基因型不一致,证明由其他途径导致 HBV 母婴传播。因此除宫内传播干预外,需要在婴儿获得 HBV 免疫力之前采取针对宫外感染、母乳喂养等综合干预措施。

病毒滴度和 HBV 基因型 B 容易造成母婴垂直传播和成年人之间的水平传播,但是 HBV 基因型 C 容易产生慢性化<sup>[10-11]</sup>。不同 HBV 基因型具有不同的 HCC 相关 HBV 变异谱。本研究中我们虽然未发现 HBV 基因组 Enh II /BCP/preC 区的病毒突变与 HBV 的宫内传播存在统计学关联,但首次发现在 HBV preS 区中的 T2898G/C、C3000T、C3116T、T31C 和 T52C 突变显著增加发生 HBV 跨胎盘传播的风险。这些突变中,C3116T、T31C 和 T52C 在 7 个月龄婴儿中也有较高的频率。C3116T 编码的氨基酸由 Ala 突变为 Val;而 T31C 和 T52C 并不引起氨基酸编码的改变。单一氨基酸的改变可改变 HBV 表面抗原表位,但并不能完全解释对 HBV 宫内传播的影响,需要进一步探索这些突变对母婴传播的作用机制。

本研究着重观察几个重要的 HCC 相关 HBV 变异在 HBV 母婴传播过程中的变化趋势,以确定这些变异发生时机。我们发现,重要的 HCC 相关 HBV 变异可突破胎盘屏障传递至脐带血中,但是这

种突变体和野生型准种相比不易于在新生儿体内造成感染。可能“野生型”较“突变型”的 HBV 具有感染婴儿肝脏的优势。这种现象解释了为什么嗜肝病毒进化上非常保守,但是 HBV 在感染人体内早期“野生型”具有感染优势,在感染人类宿主后重新开始新的病毒变异-选择-适应的进化过程,但是这种进化过程不易造成新的传播,以维持嗜肝病毒在进化上保守型。HCC 相关 HBV 变异的免疫选择是由 HBeAg 阳性阶段的 HBV 野生型开始,由感染宿主体内免疫系统长期逐渐选择的,有些癌症相关突变如 A1762T/G1764A 在儿童时期就出现了,有些则很晚发生<sup>[12]</sup>。这些数据对探索 HBV 致癌相关变异在生命早期的免疫选择规律具有重要意义。

综上所述,本研究探索了 HBV 基因亚型对应的主要 HCC 相关的 HBV 变异在母婴传播和婴儿造成感染等 HBV 慢性感染早期变异规律,为进一步认识 HBV 变异发生规律、制定相关干预措施以预防 HBV 慢性感染导致 HCC 提供了科学依据。但本研究对 7 个月龄婴儿随访时失访率较高,较难全面反映 HBV 感染情况,HBV 基因 BCP 区未发现与 HBV 的宫内传播存在统计学关联的变异,今后将进一步开展儿童期 HBV 感染与基因变异情况研究。

### [参考文献]

- [1] Yin J, Zhang H, He Y, Xie J, Liu S, Chang W, et al. Distribution and hepatocellular carcinoma-related viral properties of hepatitis B virus genotypes in Mainland China: a community-based study[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19: 777-786.
- [2] Zhang Q, Yin J, Zhang Y, Deng Y, Ji X, Du Y, et al. HLA-DP polymorphisms affect the outcomes of chronic hepatitis B virus infections, possibly through interacting with viral mutations[J]. *J Virol*, 2013, 87: 12176-12186.
- [3] Liu S, Xie J, Yin J, Zhang H, Zhang Q, Pu R, et al. A matched case-control study of hepatitis B virus mutations in the preS and core promoter regions associated independently with hepatocellular carcinoma[J]. *J Med Virol*, 2011, 83: 45-53.
- [4] Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, Han L, Lu W, 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, 106:81-92.
- [5] Yin J, Xie J, Zhang H, Shen Q, Han L, Lu W, et al. Significant association of different preS mutations with hepatitis B-related cirrhosis or hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2010, 45:1063-1071.
- [6] 谢震宇, 傅益飞, 浦蕊, 丁一波, 沈秋霞, 殷建华, 等. 上海市浦东新区乙型肝炎病毒母婴传播的发生率及其影响因素研究[J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35:631-636.
- Xie Z Y, Fu Y F, Pu R, Ding Y B, Shen Q X, Yin J H, et al. Incidence of mother to child transmission of hepatitis B virus and its influencing factors in Pudong New Area of Shanghai [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2014, 35:631-636.
- [7] Chen Y, Wang L, Xu Y, Liu X, Li S, Qian Q, et al. Role of maternal viremia and placental infection in hepatitis B virus intrauterine transmission[J]. *Microbes Infect*, 2013, 15:409-415.
- [8] Bai G Q, Li S H, Yue Y F, Shi L. The study on role of peripheral blood mononuclear cell in HBV intrauterine infection [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2011, 283:317-321.
- [9] Guo Y, Liu J, Meng L, Meina H, Du Y. Survey of HBsAg-positive pregnant women and their infants regarding measures to prevent maternal-infantile transmission[J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10: 26-30.
- [10] Chen J, Yin J, Tan X, Zhang H, Zhang H, Chen B, et al. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A-F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2[J]. *J Clin Virol*, 2007, 38:238-243.
- [11] Li Z, Xie Z, Ni H, Zhang Q, Lu W, Yin J, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis B virus: evolution of hepatocellular carcinoma-related viral mutations in the post-immunization era[J]. *J Clin Virol*, 2014, 61:47-54.
- [12] Zhang H W, Yin J H, Li Y T, Li C Z, Ren H, Gu C Y, et al. Risk factors for acute hepatitis B and its progression to chronic hepatitis in Shanghai, China[J]. *Gut*, 2008, 57:1713-1720.

[本文编辑] 尹 荼