·专题报道——抗击乙肝，预防先行·

乙型肝炎病毒前 S/S 区氨基酸与表面抗原清除关联

王月梅[1,2]，袁筱婕[2]，张维璐[2]，吉兆华[2]，贺真[2]，付婷[2]，伍维康[2]，周灏澈[2]，李怡君[2]，徐琳莉[2]，张文华[3]，贾文玲[3]，梁春辉[3]，唐海涛[3]，王凤梅[3]，赵春梅[3]，邵中军[1,2]

1. 甘肃中医药大学公共卫生学院，兰州 730030；
2. 空军军医大学 军事预防医学系 军队防疫与流行病学教研室 特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室，西安 710032；
3. 甘肃省武威肿瘤医院肝胆中心，武威 733000
通信作者：邵中军，E-mail：13759981783@163.com

【摘　要】目的　分析甘肃省武威市乙型肝炎专病队列表面抗原清除（HBsAg）与乙型肝炎病毒（HBV）前 S/S 区氨基酸的关联。**方法**　于 2018 年 8 月—2022 年 12 月在甘肃省武威市肿瘤医院建立慢性乙型肝炎（CHB）感染者专病队列。随访至 2022 年 12 月 31 日并将 HBsAg 清除者作为病例组，HBsAg 持续阳性为对照组，采集基线调查时的血清样本进行 HBV 前 S/S 区二代测序（NGS），计算氨基酸突变率及复杂性。构建稀疏逻辑回归（SLR）模型，分析 HBsAg 清除与 HBV 前 S/S 区氨基酸的关联。**结果**　共纳入 171 例测序完整的 *C* 基因型患者，其中 HBsAg 清除组 23 例、持续阳性组 148 例。HBsAg 持续阳性组 S 区平均突变频率（*Z*=2.881）及复杂性（*Z*=3.255）均高于清除组（*P*<0.05）。共发现 121 个氨基酸位点的突变率在两组间差异有统计学意义（*P*<0.05），其中有效突变位点 20 个，且除 H132 位点以外均表现为 HBsAg 持续阳性组高于清除组（*P*<0.05）。建立 SLR 模型筛选出 HBV DNA、Sn_271、Sn_399、Sn_194、P_121 和 Sn_397 这 6 个与 HBsAg 显著相关的特征指标，HBV DNA 为最高贡献度指标。**结论**　HBV 前 S/S 区氨基酸位点的改变可能影响 HBsAg 的清除，SLR 模型的应用为 CHB 精准治疗提供了新的思路。

【关键词】乙型肝炎病毒（HBV）；表面抗原（HBsAg）清除；前 S/S 区；二代测序（NGS）；稀疏逻辑回归（SLR）

Association between pre-S/S amino acid variations of hepatitis B virus and hepatitis B surface antigen clearance

WANG Yuemei[1,2], YUAN Xiaojie[2], ZHANG Weilu[2], JI Zhaohua[2], HE Zhen[2], FU Ting[2], WU Weikang[2], ZHOU Haowei[2], LI Yijun[2], XU Linli[2], ZHANG Wenhua[3], JIA Wenling[3], LIANG Chunhui[3], TANG Haitao[3], WANG Fengmei[3], ZHAO Chunmei[3], SHAO Zhongjun[1,2] (*1. School of Public Health, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou* 730030, *China*; *2. Key Laboratory of Environmental Health Hazard Assessment and Protection in Shaanxi Province, Ministry of Education Key Laboratory of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment, Department of Military Epidemic Prevention and Epidemiology, School of Military Preventive Medicine, Air Force Medical University, Xi'an* 710032, *China*; *3. Hepatobiliary Centre, Wuwei Tumour Hospital, Wuwei* 733000, *China*)
Corresponding author: SHAO Zhongjun, E-mail: 13759981783@163.com

【Abstract】 Objective Analysis of the association between hepatitis B surface antigen (HBsAg) clearance and amino acid mutations in the pre-S/S region of the hepatitis B virus (HBV) in a cohort from Wuwei city, Gansu province. **Methods** A cohort of chronic hepatitis B (CHB) infected individuals was established at the Wuwei City Tumor Hospital in Gansu province during August 2018 and December 2022. Follow-up continued until December 31, 2022, with individuals who cleared HBsAg designated as the case group and those with persistent HBsAg positivity as the control group. Serum samples collected at baseline were subjected to next-generation sequencing (NGS) of the HBV pre-S/S region. Amino acid mutation rates and complexity were calculated. A sparse logistic regression (SLR) model was constructed to analyze the association between HBsAg clearance and amino acid mutations in the HBV pre-S/S region. **Results** A total of 171 patients with complete genotype C sequences were included, with 23 in the HBsAg clearance group and 148 in the persistent positive group. The average mutation frequency (Z = 2.881) and complexity (Z = 3.255) in the S region were significantly higher in the HBsAg persistent positive group than in the clearance group (P < 0.05). Mutations at 121 amino acid sites showed statistically significant differences between the two groups (P < 0.05), with 20 sites identified as effective mutation sites. Except for site H132, all other sites showed higher mutation

开放获取：CC BY-NC-ND 4.0　DOI：10.11847/zgggws1145738
基金项目：陕西省自然科学基础研究计划（2023-JC-QN-0987）
第一作者：王月梅（1998—），硕士在读，研究方向：传染病学、乙型肝炎病毒。
收稿日期：2024-08-19　修回日期：2024-12-04　录用日期：2025-04-23
利益冲突：不存在　伦理审查：已获取　出版授权：全体作者已与编辑部签署作者贡献声明及版权转让协议

rates in the HBsAg persistent positive group than in the clearance group ($P < 0.05$). An SLR model identified six characteristic indicators significantly associated with HBsAg clearance: HBV DNA, Sn_271, Sn_399, Sn_194, P_121, and Sn_397, with HBV DNA having the highest contribution. **Conclusions** Changes in amino acid sites in the HBV pre-S/S region may influence HBsAg clearance. The application of the SLR model provides new insights for precision treatment of CHB.

【Keywords】 hepatitis B virus (HBV); hepatitis B surface antigen (HBsAg) clearance; pre-S/S region; next-generation sequencing (NGS); sparse logistic regression (SLR)

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染仍是严重影响中国国民健康的重要公共卫生问题之一，是引起慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)、肝硬化(liver cirrhosis, LC)和肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要原因[1]。目前我国有2 000 万～3 000 万例 CHB 患者[2]。且一项研究发现在中国东部地区约有 87.5% 的肝癌与 HBV 感染有关[3]。乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)是 HBV 感染的重要血清学标志物，位于 HBV DNA 负链开放读码框架(open reading frame, ORF)的前 S/S 区，可转录大、中、小 3 种 HBsAg。目前 CHB 患者治疗的理想终点是血清 HBsAg 清除的功能性治愈，但是核苷(酸)类似物治疗的 HBsAg 转阴率仅约为 0.58%，加用干扰素可提高至 6.55%[4]，治愈率仍然不理想。既往研究表明，HBV 前 S/S 区变异可能导致病毒逃逸宿主免疫[5]，但与 HBsAg 清除的关系仍不十分清楚。本研究采用基于乙型肝炎专病队列的巢式病例对照研究设计，通过二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术对基线血清样本的 HBV 前 S/S 区进行测序，计算氨基酸突变频率及准种复杂性，建立稀疏逻辑回归模型(sparse logistic regression, SLR)分析 C 型 CHB 患者的 HBsAg 清除与前 S/S 区的关联，为精准治疗和功能性治愈提供数据支持。

1 对象与方法

1.1 对象 2018 年 8 月—2022 年 12 月，在甘肃省武威市肿瘤医院肝胆中心纳入慢性 HBV 感染者 3 882 例建立乙型肝炎专病队列。队列的纳入标准为：至少 6 个月 HBsAg 血清学检测阳性者；排除标准为：其他形式病毒性肝炎(如甲型肝炎和丙型肝炎等)、药物性肝损伤、遗传性肝病、自身免疫性疾病、内分泌代谢疾病、血液系统疾病及未完成检查者。纳入队列的患者每半年随访一次，随访形式为调查人员通过电话告知患者前往医院，随访内容包括：一般资料(姓名、身份证号、电话等)、肝功指标、乙肝 5 项和 HBV DNA 等。本研究基于武威乙肝专病队列采用巢式病例对照设计，以 2022 年 12 月 31 日前出现一次 HBsAg 清除且后续随访不复阳为病例组，以随访过程中 HBsAg 持续阳性为对照组。对其基线血清检测 NGS，共完成 239 例，其中 171 例 *C* 基因型完整前 S/S 区(HBsAg 清除 23 例、HBsAg 持续阳性 148 例)。

1.2 方法

1.2.1 调查方法和样本收集 问卷调查收集患者的基本信息和临床检查结果，采集基线调查时患者的外周血样本离心后置于−80 ℃ 冰箱中长期保存备检。本研究已获得甘肃省武威肿瘤医院医学伦理委员会的批准(伦理审查号：2024-伦理审查-10)，并且所有参与者均签署了知情同意书。

1.2.2 HBV DNA 提取和 PCR 扩增 采用病毒核酸提取试剂盒(中国西安天隆 Ex-DNA/RNA 病毒 4.0)提取基线血清样本的 HBV DNA。根据引物进行两轮 PCR 扩增(HBV1200F: 5'-GGGTCACCATATWCTTGGGAACAA-3', HBV1200R: 5'-TTTRTKAGGGTTTAAATGTATRCCCA-3')。两轮扩增完成后的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，阳性者采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒以及乙型肝炎病毒核酸定量测定试剂盒(PCR 荧光探针法)纯化和定量检测。

1.2.3 文库构建和二代测序 采用 QIAseq FX DNA 建库核心试剂盒、QIAseq Y 型 UDI 接头试剂盒 D 构建文库；Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit(invitrogen)检测文库浓度，通过电泳确定片段已成功切断。采用 Illumina 平台 Miseq 高通量测序进行二代测序。

1.2.4 原始数据处理 测序序列处理。(1)质量控制：通过质量控制得分 Q20 修剪序列，去除接头和低质量序列(Q20 表示碱基调用的准确度为 99%)等。(2)去嵌合体：通过序列比对等方式识别和去嵌合体。(3)组装：De novo 组装序列片段。(4)翻译：根据 NCBI 数据库将核苷酸序列翻译成氨基酸。

1.2.5 基因分型与序列比对 利用本地化的 NCBI Blast(basic local alignment search tool)工具包在 Unix 系统终端界面，以命令行的形式比对序列相似性，从 GenBank 数据库中下载 HBV A-H 基因型参考株序列比对绘制进化树并确定最终分型，参考序列如下：A(X51970、AF090842、X02763)，B(AB0738-46、AB602818、D00329)，C(AB014381、M12906、X-04615)，D(M32138、X65259、X85254)，E(AB032-

431、X75657)，F(AB036910、AF223965、X69798)，G(AB064310、AF160501)，H(AY090454、AY090457、AY090460)。

1.3 统计分析　使用 SAS 9.4 分析数据，采用 $\bar{x}\pm s$ 或 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示计量资料，组间比较采用 t 检验或 Mann-Whitney U 检验。采用 n(%)表示计数资料，组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法，以 P<0.05 为差异有统计学意义。采用香农熵(Shannon entropy, *Sn*)分析氨基酸复杂性，公式为：

$$Sn_i = -\sum_{i=1}^{20} P_i \log_2 P_i$$

其中 P_i 是氨基在位置 i 出现的频率。

1.4 稀疏逻辑回归模型　建立经典逻辑回归模型(logistic regression, LR)和 SLR 模型，比较两种模型性能指标，选择最优参数。采用 Python 3.11 软件中的 Scikit-learn 包实现模型的建立，纳入每个位点的突变频率(*P*)、*Sn*、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、白蛋白(albumin, ALB)、γ–谷氨酰转移酶(gamma-glutamyl transferase, GGT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)和 HBV DNA 共 9 个指标，并且使用准确率、ROC 曲线下面积(area under the curve of the receiver operating characteristic, AUC)、敏感性和特异性 4 个标准评估模型的性能。

2 结　果

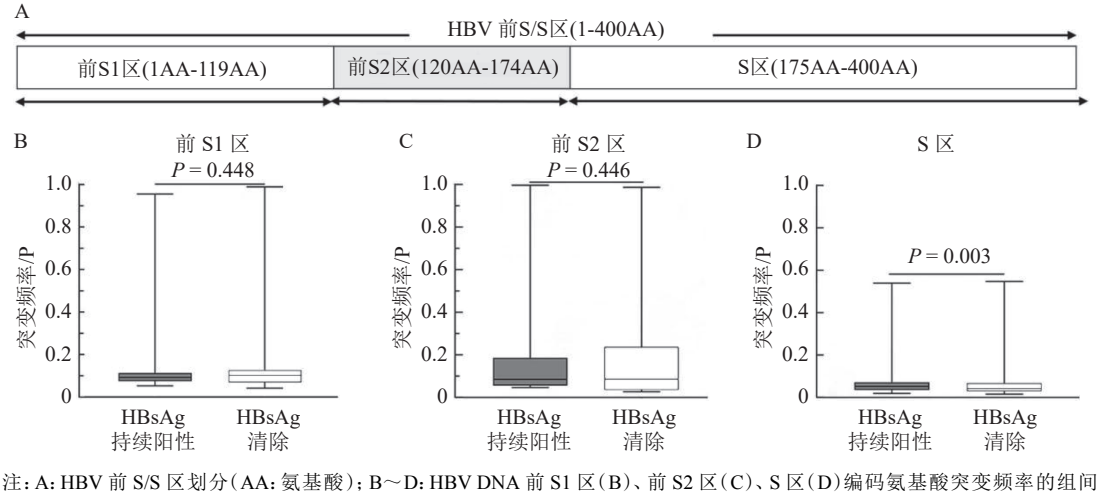
2.1 HBsAg 清除与持续阳性患者的基本特征(表 1)　共完成测序 239 例，其中 *C* 基因型 185 例(77.4%)。在这些确定为 *C* 基因型的患者中选取 HBV 前 S/S 区完整的样本，最终得到 171 例拥有完整的前 S/S 区，其中 HBsAg 清除 23 例、HBsAg 持续阳性 148 例。HBsAg 清除组年龄(Z=3.459)、男性患者(χ^2=4.084)和 HBV DNA 阴性(χ^2=41.939)患者构成均高于持续阳性组(均 P<0.05)。

表 1 HBsAg 清除与持续阳性患者的基本特征分析
Table 1 Analysis of basic characteristics of patients with HBsAg clearance and persistent positivity

项目	男性/%[a]	年龄/岁[b]	HBV DNA 阳性/%[a]	ALB/(mg/dL)[c]	ALT/(U/L)[c]	AST/(U/L)[c]	TBIL/(mg/dL)[c]	GGT/(U/L)[c]	AFP/(ng/mL)[c]
HBsAg清除(n=23)	17(73.9)	47.8±10.2	4(17.4)	48.6(46.7, 51.3)	43.4(30.2, 64.1)	29.1(24.0, 41.7)	17.00(14.0, 22.1)	33.0(23.0, 36.1)	2.1(1.6, 3.6)
HBsAg持续阳性(n=148)	76(51.4)	39.0±11.7	121(81.8)	48.2(45.2, 50.5)	42.1(27.5, 71.0)	32.5(23.7, 48.0)	16.1(13.2, 20.2)	23.5(15.8, 44.4)	2.7(1.7, 4.0)
Z/χ^2	4.084	3.459	41.939	1.089	1.089	0.487	0.801	1.340	1.216
P值	0.046	<0.001	<0.001	0.276	0.906	0.626	0.423	0.180	0.224

注：a 构成比；b $\bar{x}\pm s$；c $M(P_{25}, P_{75})$。

2.2 HBV 前 S/S 区氨基酸突变频率分析(图 1)　将前 S/S 区分为 S 区、前 S1 区、前 S2 区(图 1A)，比较 HBsAg 清除组与持续阳性组之间的平均突变频率。HBsAg 持续阳性组 S 区氨基酸平均突变频率高于清除组(Z=2.881，P<0.05)，前 S1 区(Z=0.765)与前 S2 区(Z=0.954)平均突变频率在 2 组间差异无统计学意义(P>0.05，图 1B-D)。

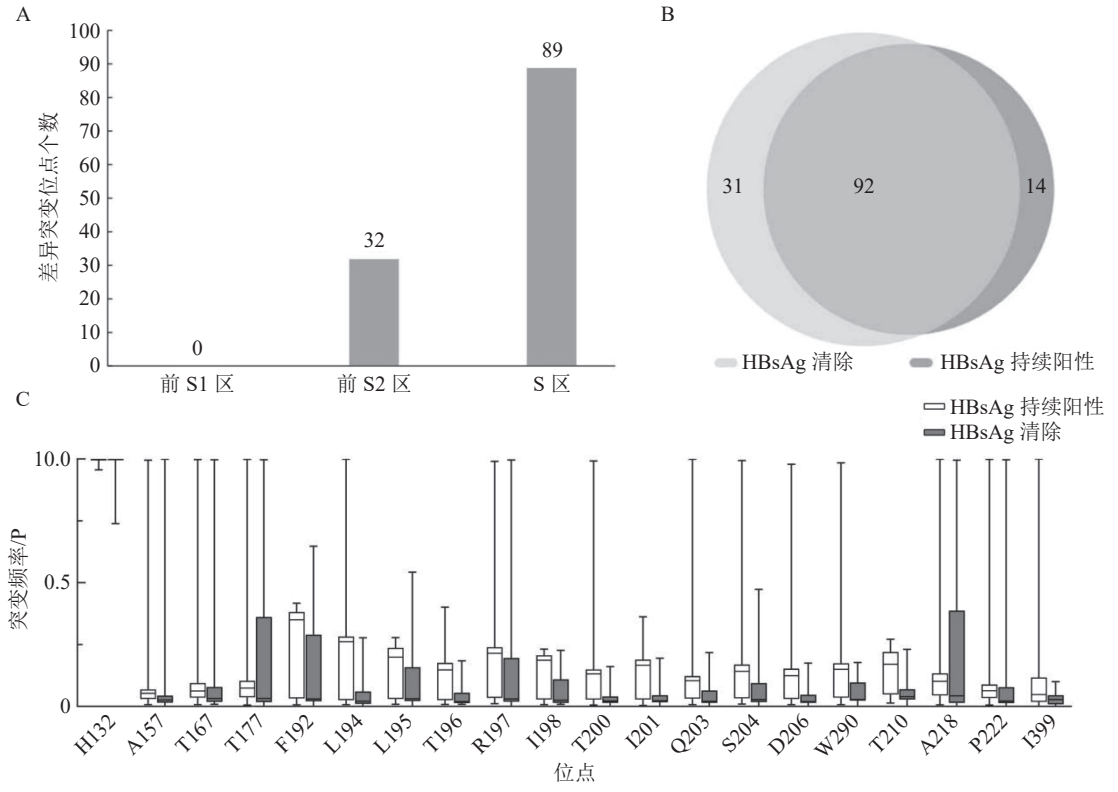


注：A：HBV 前 S/S 区划分(AA：氨基酸)；B～D：HBV DNA 前 S1 区(B)、前 S2 区(C)、S 区(D)编码氨基酸突变频率的组间比。

图 1 HBsAg 清除组与持续阳性组 HBV DNA 编码的氨基酸突变频率

Fig. 1 Frequency of amino acid mutation encoded by HBV DNA in HBsAg clearance group and persistent positive group

2.3 HBV 前 S/S 区氨基酸突变位点分析(图 2) HBV 前 S/S 区共发现 121 个氨基酸突变位点在两组间的差异有统计学意义(P<0.05)，其中有 89 个位点位于 S 区、32 个位于前 S2 区、前 S1 区中未发现有统计学差异的突变位点(图 2A)。其中仅在前 S 区发现 4 个氨基酸突变位点(H132、F352、L359、L365)的突变频率为 HBsAg 清除组高于持续阳性组，其余突变位点均为持续阳性组高于清除组。病毒前 S/S 区共有 137 个氨基酸位点的突变频率>0.10，占总氨基酸数的 34.3%。清除组有 31 个(22.6%)、持续阳性组有 14 个(10.2%)，两组共同的有效突变位点有 92 个(68.2%，图 2B)。比较两组间有效突变位点的突变率，有统计学差异的共 20 个(P<0.05)，且这些有效突变位点中除了 H132 位点外，均为 HBsAg 持续阳性组的突变频率均高于清除组(图 2C)。

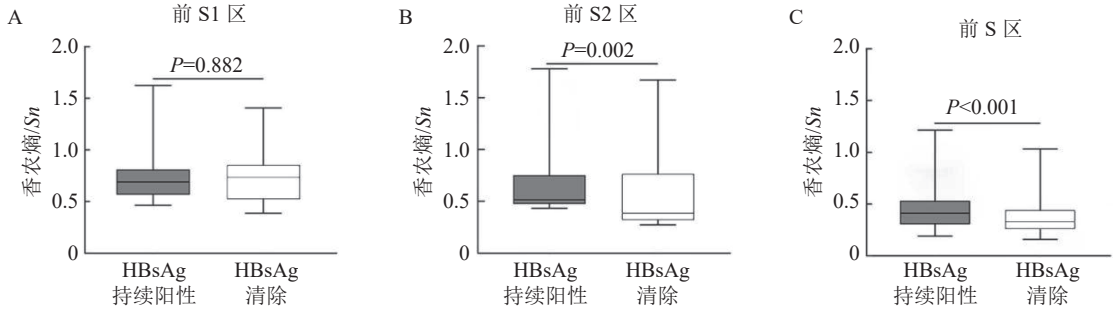


注：A：前 S/S 区差异突变位点分区统计柱状图；B：有效突变位点韦恩图；C：HBsAg 清除组与持续阳性组有统计学差异的有效突变位点。

图 2　HBsAg 清除与持续阳性组的氨基酸差异突变位点比较

Fig. 2　Comparison of amino acid differential mutation sites between HBsAg clearance and persistent positive group

2.4 病毒前 S/S 区氨基酸复杂性分析(图 3)　采用 Sn 比较 HBsAg 清除组与持续阳性组前 S/S 区的复杂性(图 3A-C)。HBsAg 持续阳性组的 S 区(Z=3.255)和前 S2 区(Z=5.425)复杂性均高于清除组(P<0.05)，前 S1 区复杂性差异无统计学意义(Z=0.140，P>0.05)

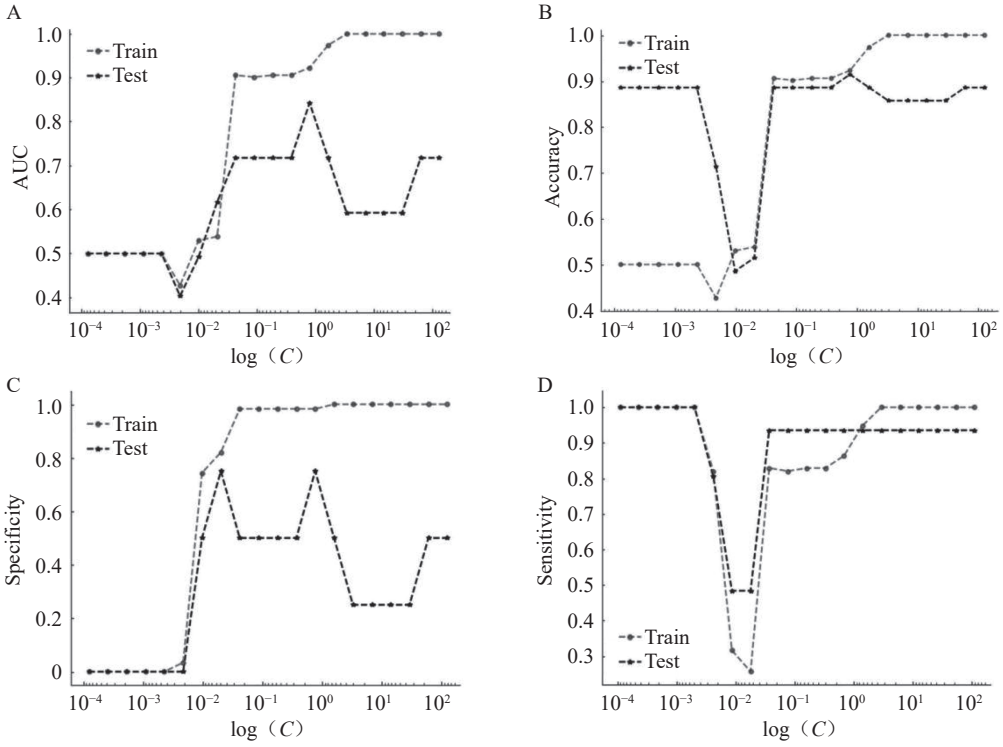


注：A～C：HBV DNA 前 S1 区(A)、前 S2 区(B)、S 区(C)编码氨基酸准种复杂性的组间比较。

图 3　HBsAg 清除组与持续阳性组 HBV DNA 编码的氨基酸复杂性

Fig. 3　Amino acid complexity encoded by HBVDNA in HBsAg clearance group and persistent positive group

2.5　LR 与 SLR 模型(图 4、表 2)　建立 LR 和 SLR 模型分析 HBV 前 S/S 区氨基酸与 HBsAg 清除之间的关联。将 171 例样本按照 3:7 随机分为训练集与测试集，纳入每个位点的突变频率(*P*)和香农熵(*Sn*)以及 ALT、AST、ALB、AFP、GGT、TBIL、HBV DNA 7 个指标。通过调整参数 *C* 对 SLR 模型拟合，当 *C*=0.616 即 log(*C*)=0.487 时，在测试集中模型的准确率、AUC、敏感性和特异性分别为 0.923、0.923、0.863 和 0.983(图 4A-D)，此时的模型拟合效果最好。且测试集中 SLR 模型的准确率、AUC 和特异性均高于 LR 模型，SLR 模型的整体拟合效果更好。



注：A：AUC；B：准确率；C：特异性；D：敏感性；Train 为训练集；Test 为测试集；log(*C*)为参数(*C*)的对数。

图 4　SLR 在测试集和训练集的性能指标图

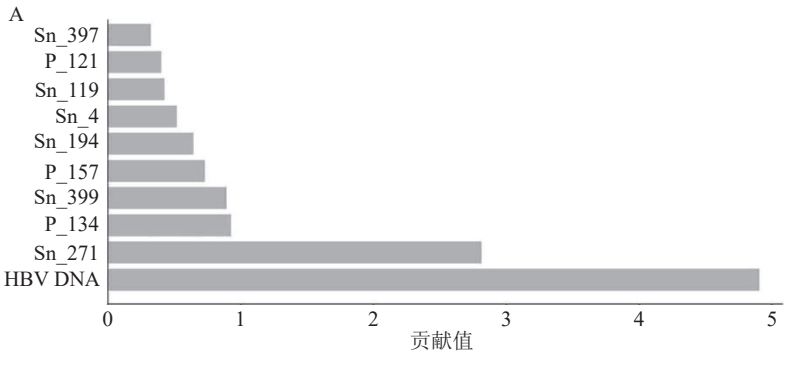
Fig. 4　SLR performance index graph in Test set and training set

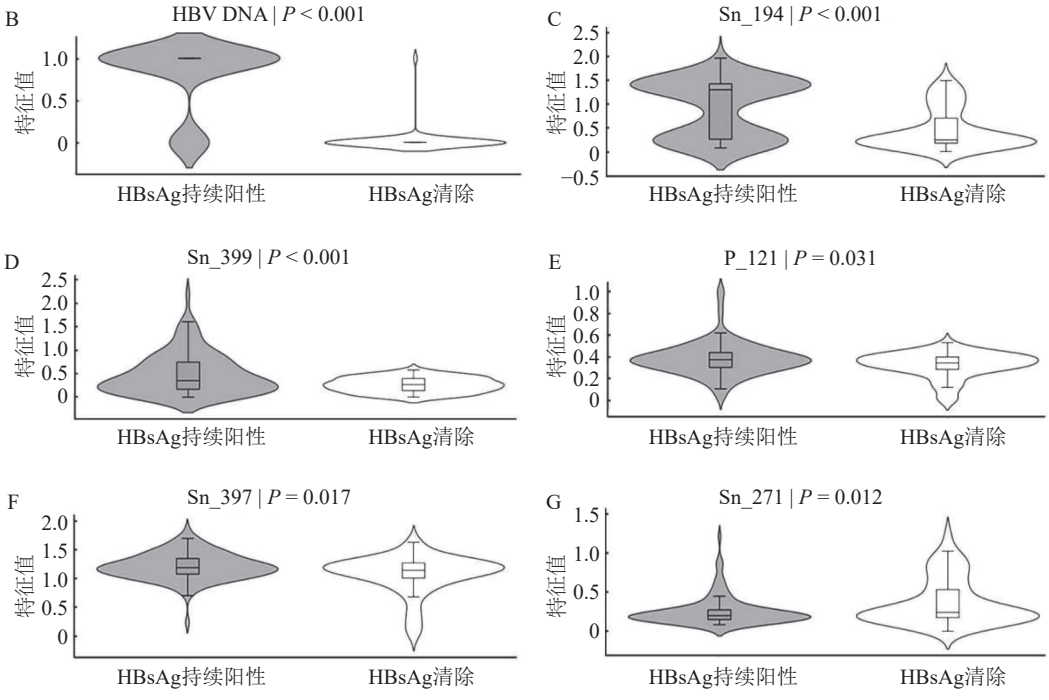
表 2　逻辑回归与稀疏逻辑回归的性能指标

Table 2　Performance indicators of logistic regression and sparse logistic regression

指标	稀疏逻辑回归		逻辑回归	
	训练集	测试集	训练集	测试集
准确率	0.923	0.914	1.000	0.886
AUC	0.923	0.843	1.000	0.609
敏感性	0.863	0.935	1.000	0.968
特异性	0.983	0.750	1.000	0.250

2.6　SLR 模型高贡献度指标(图 5)　采用 SLR 模型贡献度最高的前 10 个指标，其中 HBV DNA 的贡献度最高(图 5A)。对 10 个指标进行组间比较发现，HBV DNA、Sn_271、Sn_399、Sn_194、P_121 和 Sn_397 在 HBsAg 清除组与持续阳性组间的差异均具有统计学意义(*P*<0.05，图 5B-G)。





注：A：SLR 最相关 10 个特征贡献度柱状图；B–G：贡献特征提琴图

图 5　SLR 模型贡献指标

Fig. 5　SLR model contribution metrics

3 讨　论

本研究采用巢式病例对照研究设计比较了 HBsAg 清除组与持续阳性组 HBV 前 S/S 区氨基酸位点的突变频率和复杂性，结果表明，HBsAg 持续阳性组的基线血清 HBV DNAS 区氨基酸突变频率以及 S 区、前 S2 区复杂性均高于 HBsAg 清除组。共发现 121 个氨基酸突变位点在两组中存在差异，其中 20 个位点平均突变率>0.10，且仅有 H132 位点的突变频率为 HBsAg 清除组高于持续阳性组。通过 SLR 模型拟合发现 6 个在两组间具有差异的高贡献度指标，分别为 HBV DNA、Sn_271、Sn_399、Sn_194、P_121 和 Sn_397。

HBsAg 编码区位于 HBV 病毒前 S/S 区，其中由 S 区基因编码的 HBsAg 是 HBV 主要的抗原域，由 226 个氨基酸组成，也是最重要的免疫功能区域[6]。本研究发现 HBsAg 持续阳性组的 S 区平均突变频率和复杂性均高于清除组，意味着 S 区的突变和高复杂性可能是阻碍 HBsAg 清除的原因之一，这也为后续的治疗加大了难度。既往研究表明，S 区的突变可能诱导 HBsAg 的抗原性或病毒的适应性发生改变，甚至产生免疫逃逸，该区域的缺失突变、无义突变以及错义突变均可诱导 HBsAg 抗原性的改变，从而影响特异性抗体的产生[7–8]。

本研究共发现 121 个氨基酸突变位点在 HBsAg 清除组与持续阳性组中存在差异，其中 20 个为有效突变位点（突变频率大于 10%）。Thi Cam Huong N 等[9] 的研究同样观察到类似突变，且这些位点的突变可能影响 HCC 的发生发展。本研究还发现在这 20 个位点中只有 H132 是 HBsAg 清除组高于持续阳性组，Liu X 等[10] 研究同样有此发现，可能与疫苗接种、药物治疗以及隐匿性感染有关。本研究考虑到 NGS 数据（P、Sn）数据量及 α 错误概率，采用 SLR 模型并纳入 ALB、APF、AST、GGT、ALT、TBIL 和 HBV DNA 宏观变量，并与 LR 模型拟合效果比较。经过对 SLR 模型与 LR 模型的比较，观察到除敏感性以外，SLR 模型的 AUC、特异性、准确率 3 个性能指标均优于 LR 模型，整体拟合效果更好，与 Jia J A 等[11] 观察到的 SLR 模型优于 LR 模型结果一致。通过 SLR 模型获取了贡献度排名前十的指标，并发现 HBV DNA、Sn_271、Sn_399、Sn_194、P_121 和 Sn_397 在 HBsAg 清除组与持续阳性组间比较差异均有统计学意义，其中贡献度最高的是 HBV DNA，意味着 HBV DNA 是影响 HBsAg 清除的最关键指标，因为外周血 HBsAg 与 HBV DNA 载量呈正相关关系[12]。其余 5 个指标均为 NGS 数据结果，也说明 NGS 的数据结果与模型的结合能准确地获得两组之间差异的关键位点信息。此外，这 5 个位点（Sn_271、Sn_399、Sn_194、P_121 和 Sn_397）的突变也曾被研究者报道[9]。但由于本研究仅在武威乙型肝炎专病队列中开展且样本量少，所以该模型还有待进一步验证与完善。

本研究发现，HBV DNA 水平及 HBV 前 S/S 区氨基酸关键位点的改变可能影响 HBsAg 的清除，

并开发了 SLR 预测模型，为 CHB 治愈的预测及精准治疗方法的开发提供数据支持。

数据可用性声明　本研究的数据涉及个人敏感信息。在进行研究之前，研究团队已按照国际伦理准则和国家相关法律法规的要求，向甘肃省武威肿瘤医院医学伦理委员会提交了详细的研究方案并获批准。由于数据的敏感性以及保护参与者隐私的需要，无法公开提供原始数据。

致谢　本研究得到了空军军医大学以及甘肃省武威肿瘤医院肝胆中心的全力支持

参考文献

[1] 杨娜, 康文. 慢性乙型肝炎临床治愈研究进展 [J]. 传染病信息, 2023, 36(1): 73-79.

[2] 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 (2019 年版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2019, 13(6): 441-466.

[3] Yang F, Ma L, Yang Y, et al. Contribution of hepatitis B virus infection to the aggressiveness of primary liver cancer: a clinical epidemiological study in eastern China[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 370.

[4] Fonseca M A, Ling J Z J, Al-Siyabi O, et al. The efficacy of hepatitis B treatments in achieving HBsAg seroclearance: a systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Viral Hepatitis, 2020, 27(7): 650-662.

[5] Inoue J, Sato K, Ninomiya M, et al. Envelope proteins of hepatitis B virus: molecular biology and involvement in carcinogenesis[J]. Viruses, 2021, 13(6): 1124.

[6] Lamontagne R J, Bagga S, Bouchard M J. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis[J]. Hepatoma Research, 2016, 2: 163-186.

[7] de Almeida Ribeiro C R, Martinelli K G, da Motta de Mello V, et al. Association of Pre-S/S and polymerase mutations with acute and chronic hepatitis B virus infections in patients from Rio de Janeiro, Brazil[J]. Viruses, 2022, 14(7): 1375.

[8] Wu Y P, Zhu Z Q, Wu J Y, et al. Evolutionary analysis of Pre-S/S mutations in HBeAg-negative chronic hepatitis B with HBsAg < 100 IU/ml[J]. Frontiers in Public Health, 2021, 9: 633792.

[9] Thi Cam Huong N, Trung N Q, Luong B A, et al. Mutations in the HBV PreS/S gene related to hepatocellular carcinoma in Vietnamese chronic HBV-infected patients[J]. PLoS One, 2022, 17(4): e0266134.

[10] Liu X, Chen S X, Liu H, et al. Host immunity and HBV S gene mutation in HBsAg-negative HBV-infected patients[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1211980.

[11] Jia J A, Zhang S Q, Bai X, et al. Sparse logistic regression revealed the associations between HBV PreS quasispecies and hepatocellular carcinoma[J]. Virology Journal, 2022, 19(1): 114.

[12] Kwak M S, Chung G E, Yang J I, et al. Long-term outcomes of HBsAg/anti-HBs double-positive versus HBsAg single-positive patients with chronic hepatitis B[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 19417.