

C 基因型 HBV 变异与宫内传播的关系

赵甜静¹ 杨志清¹ 李雁笛¹ 宸琳琳¹ 丰淑英² 汪波² 冯永亮¹ 王素萍¹

¹山西医科大学流行病学教研室,太原 030001;²太原市第三人民医院妇产科 030001

通信作者:王素萍, Email: spwang88@163.com

【摘要】 目的 分析携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组变异情况,探讨其与 HBV 宫内传播的关系。方法 选取 2011–2013 年在太原市第三人民医院产科住院的 399 对携带 HBV 的母亲及其新生儿,通过问卷调查和病历查阅获得母亲及其新生儿基本情况。采用荧光定量 PCR 和电化学发光法分别检测母亲及其新生儿血清 HBV DNA 及 HBV 血清学标志物。新生儿出生后 24 h 内且主/被动免疫前,股静脉血 HBsAg 和/或 HBV DNA 阳性者判定为 HBV 宫内传播。按克隆测序要求,母亲 HBV DNA 载量须 $\geq 10^6$ IU/ml,在 54 例发生 HBV 宫内传播者中,以满足克隆测序要求的 22 对母亲及其新生儿作为宫内传播组;以随机种子方法选择同等数量未发生宫内传播的母亲及其新生儿为对照组,经 PCR 扩增 HBV DNA、基因克隆、测序,对携带 C 基因型 HBV 的母亲进行病毒基因组变异分析。结果 44 例样本中 39 例 (88.63%, 39/44) 为 C 基因型,其余 2 例为 B 基因型,3 例为 B 与 C 混合型。将 42 例携带 C 基因型 HBV 的母亲的 406 条克隆株进行基因变异分析,其中宫内传播组 204 条,对照组 202 条。HBV 宫内传播组 PreS1、S、C、P 区碱基置换突变率均明显低于对照组 (χ^2 值介于 8.67~40.73 之间, $P < 0.05$); HBV 宫内传播组 PreC 和 X 区碱基缺失突变率低于对照组 (χ^2 值分别为 17.82 和 34.78, $P < 0.001$)。X 区 nt1644~1645 和 nt1649~1650 分别存在 31 bp 和 27 bp 的插入突变,且均发生于对照组。结论 携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组 PreS1、S、C、P 区碱基置换突变与 HBV 宫内传播有关;PreC 区的缺失突变、X 区的插入和缺失突变可能降低了宫内传播的发生风险。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 基因组; 变异; 宫内传播

基金项目: 国家自然科学基金 (81573212, 81872677); 传染病预防控制国家重点实验室自主研究课题 (2017SKLID306, 2018SKLID310)

Relationship between C genotype HBV mutation and intrauterine transmission

Zhao Tianjing¹, Yang Zhiqing¹, Li Yandi¹, Yi Linzhu¹, Feng Shuying², Wang Bo², Feng Yongliang¹, Wang Suping¹

¹Department of Epidemiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²Department of Obstetrics and Gynaecology, the Third People's Hospital of Taiyuan City, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: Wang Suping, Email: spwang88@163.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the virus genome mutation of mothers with C genotype HBV and explore its relationship with HBV intrauterine transmission. **Methods** A total of 399 mothers carrying HBV and their newborns hospitalized in the obstetrics department of the Third People's Hospital of Taiyuan from 2011 to 2013 were selected. Necessary information about mothers and children was obtained through a questionnaire survey and medical records. HBV DNA and HBV serological markers were detected by quantitative fluorescence PCR and electrochemiluminescence. Within 24 hours after birth and before active/passive immunization, those with positive HBsAg and/or HBV DNA in femoral venous blood were determined as HBV intrauterine transmission. According to the requirements of cloning and sequencing, mothers' HBV DNA load should be $\geq 10^6$ IU/ml. Among 54 cases of HBV intrauterine transmission, 22 pairs of mothers and their newborns meeting

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200915-01163

收稿日期 2020-09-15 本文编辑 万玉立

引用本文: 赵甜静, 杨志清, 李雁笛, 等. C 基因型 HBV 变异与宫内传播的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(4): 716–722. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200915-01163.



the requirements of cloning and sequencing were used as the intrauterine transmission group. The same number of mothers and their newborns without intrauterine transmission was selected as the random seed method's control group. After PCR amplification of HBV DNA, gene cloning, and sequencing, the gene mutation analysis of mothers with C genotype HBV was performed. **Results** Among the 44 samples, 39 (88.63%, 39/44) were genotype C, 2 were genotype B, and 3 were mixed genotype B, and C. A total of 406 clone beads from 42 mothers with C genotype HBV were analyzed for gene mutation, including 204 in the intrauterine transmission group and 202 in the control group. The base substitution mutation rate of PreS1, S, C, and P regions in the HBV intrauterine transmission group were significantly lower than those in the control group (χ^2 ranged from 8.67 to 40.73, $P < 0.05$). The mutation rate of base deletion in PreC and X regions in the HBV intrauterine transmission group was lower than that in the control group (χ^2 values were 17.82 and 34.78, $P < 0.001$). Two clones in the X region had 31 bp insertion mutations between nt1644 and nt1645, and two clones had 27 bp insertion mutations between nt1649 and nt1650, all of which took place in the control group. **Conclusions** The base substitution mutations in the PreS1, S, C, and P segments of the HBV genome in mothers with C genotype HBV were associated with the occurrence of intrauterine transmission of HBV. Deletion mutations in the PreC region, insertion and deletion mutations in the X region may reduce intrauterine transmission risk.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genome; Mutation; Intrauterine transmission

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81573212, 81872677); Open Project Supported by State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (2017SKLID306, 2018SKLID310)

HBV 感染是全球重大的公共卫生问题,我国有超过 9 000 万慢性乙型肝炎(乙肝)感染者,育龄期女性 HBsAg 阳性率约 6%^[1-2],母婴传播仍是我国众多 HBV 慢性感染者积累的主要原因,占新发 HBV 感染的 40%~50%^[3-4]。携带 HBV 母亲的新生儿出生后接受主/被动免疫,可有效阻断产时传播和产后传播,但对已发生的宫内传播无阻断作用,发生宫内传播的新生儿 90% 将转为慢性感染^[5]。近年来,研究显示 HBV 的基因型、基因组结构与宫内传播密切相关,我国主要流行 B 和 C 基因型 HBV 毒株,占 HBV 感染的 90% 以上,C 基因型在我国北方占主导地位,B 基因型在我国南方更常见^[6-7],与 B 基因型相比,C 基因型有更高的 HBV DNA 载量和基因突变率,C 基因型基因组变异与母婴传播的关系可能更为密切^[8-9]。HBV 基因组在长期的体液免疫或细胞免疫压力下,核酸碱基的点突变(置换、插入和缺失)逐年增加^[10],以往研究显示,PreS/S 突变率低的 HBV 株可能更容易引起新生儿宫内传播^[11];PreC 中的 G1896A 突变和核心启动子(BCP)的 A1762T/G1764A 突变是宫内传播的保护因素^[12-13];X 区的缺失突变可通过减少 HBsAg、HBeAg 和 HBeAg 的表达,影响宫内传播的发生^[14]。这些研究多侧重于 HBV 基因组单一区域突变对宫内传播的影响,而 HBV 全基因组突变与宫内传播的关系研究较少。因此,本研究从携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组变异入手,进一步探讨与宫内传

播可能有关的基因突变区,为 HBV 宫内传播机制的研究提供新思路。

对象与方法

1. 研究对象与标本收集:选取 2011-2013 年在太原市第三人民医院产科住院的 399 对携带 HBV 的母亲及其新生儿。本研究经山西医科大学伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。通过问卷调查和病历查阅获得母亲及其新生儿基本情况,收集母亲分娩前肘静脉血和新生儿出生后 24 h 内、主/被动免疫前股静脉血,及时分装血清并储存在 -80 °C 备检,股静脉血 HBsAg 和/或 HBV DNA 阳性者判定为 HBV 宫内传播^[15-17]。按克隆测序要求,母亲 HBV DNA 载量须 $\geq 10^6$ IU/ml,在 54 例发生 HBV 宫内传播者中,满足克隆测序要求的 22 对母亲及其新生儿作为宫内传播组;以随机种子方法选择同等数量未发生宫内传播的母亲及其新生儿为对照组,经 PCR 扩增 HBV DNA、基因克隆、测序,对 42 例携带 C 基因型 HBV 母亲的 406 条克隆株进行基因变异分析。

2. 血清中 HBsAg、HBeAg 标志物及 HBV DNA 检测:使用德国罗氏诊断有限公司生产的试剂盒,采用电化学发光法测定血清 HBsAg 和 HBeAg,HBsAg ≥ 1.00 COI (cut off index, 临界值指数)、HBeAg ≥ 1.00 COI 为阳性。使用中国湖南圣湘生物

科技有限公司生产的试剂盒,采用荧光定量 PCR 定量测定血清 HBV DNA,HBV DNA \geq 200 IU/ml 为阳性^[18-19]。所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

3. HBV DNA 的提取和纯化:使用德国 Qiagen 公司生产的 QIAamp DNA 提取试剂盒,提取血清 HBV DNA(按说明书操作)。

4. PCR 扩增及测序引物:由于 HBV DNA 全长 3.2 kb,为保证实验结果的稳定性,对 HBV DNA 分两个片段进行扩增后拼接为全长获得 HBV DNA 全基因组序列,片段 1 采用 HBV-DF/DR 引物(DF: 5'-GTC TGC GGC GTT TTA TC-3', DR: 5'-AAG TTG CAT GGT GCT GGT GA-3')进行扩增,产物大小为 1 442 bp,片段 2 采用 HBV-SF/SR 引物(SF: 5'-TCA CCT CTG CCT AAT CAT CTC ATG-3', SR: 5'-GCA AAG CCC AAA AGA CCC ACA AT-3')进行扩增,产物大小为 2 410 bp。PCR 反应体系为 50 μ l,主要包括血清病毒 DNA 3 μ l、Pfu DNA 聚合酶 1 μ l、5 \times TransStart[®] FastPfu 缓冲液 10 μ l、dNTP 4 μ l、ddH₂O 30 μ l、正反向引物各 1 μ l。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 80 s(单链)或 110 s(双链),35 个循环;68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成。

5. 克隆和测序:PCR 产物经凝胶电泳分离回收,将 HBV DNA 片段连接到 pEASY-Blunt Zero Cloning 载体,转入 Trans1-T1 噬菌体抗性化学感受态细胞(北京 TransGen 生物技术有限公司)进行培养,培养液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

6. 基因型确定及突变分析:所得 HBV 序列需经过整理(BioEdit 软件)、编辑(DNASTar 软件)、拼接(SeqMan 软件)、位置调整(Mega 6.0 软件),调整后的序列采用 Mega 6.0 软件与 HBV A~H 型标准序列进行对比,采用邻接(Neighbor-joining)法构建系统发育树(Kimura 双参数模型,1 000 次验证),通过与 NCBI 数据库下载的标准序列比对进行基因分型。HBV 各基因型标准序列编号:A: AF090842、X02763、X51970; B: D00329、AB073846、AB602818; C: AB014381、M12906、X04615; D: M32138、X65259、X85254; E: X75657、AB032431; F: AB036910、AF223965、X69798; G: AF405706、AB064310、AF160501; H: AY090454、AY090457、AY090460。从 NCBI 下载 HBV 野生型参考序列并校正(ClustalX2.1 程序、MegAlign 软件),与参考序

列相比,样本序列中核苷酸(位点)改变即为点突变。

7. 统计学分析:采用 SAS 9.4 软件进行统计学分析,计量资料用 $M(Q_R)$ 进行统计描述,计数资料用率描述,Wilcoxon 秩和检验和 χ^2 检验进行组间差异分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 新生儿 HBV 宫内传播率及母亲 HBV 基因型:共收集 399 对携带 HBV 的母亲及其新生儿,新生儿股静脉血 HBsAg 阳性 54 例,HBsAg 和 HBV DNA 同时阳性 6 例,HBV 宫内传播率为 13.53% (54/399)。

新生儿 HBV 宫内传播者中,22 例母亲外周血 HBV DNA 载量满足克隆测序要求(HBV DNA \geq 10⁶ IU/ml),未发生 HBV 宫内传播 345 例,母亲外周血中 HBV DNA \geq 10⁶ IU/ml 共 91 例,以随机种子方法选择同等数量 22 例,对 44 例携带 HBV 的母亲进行 HBV DNA 扩增克隆测序。

HBV 基因型分析结果显示:44 例样本中 39 例(88.63%,39/44)为 C 基因型,其余 2 例为 B 基因型,3 例为 B 与 C 混合型。选择携带 C 基因型 HBV 的 42 例母亲,宫内传播组和对照组各 21 例,共 406 条 C 基因型 HBV 基因组变异分析,其中宫内传播组 204 条,对照组 202 条。

2. C 基因型携带 HBV 的母亲及新生儿一般情况:宫内传播组携带 HBV 母亲年龄为 21.1~32.1 岁,孕周为 37.0~41.0 周,新生儿中有 9 名男孩,12 名女孩,新生儿身高为 47.0~52.0 cm,体重为 2.5~4.3 kg;对照组携带 HBV 母亲年龄为 20.1~35.8 岁,孕周为 38.0~41.0 周,新生儿中有 11 名男孩,10 名女孩,新生儿身高为 47.0~53.0 cm,体重为 2.8~4.0 kg。宫内传播组与对照组母亲及其新生儿一般人口学特征比较结果显示,母亲年龄及孕周,新生儿性别、出生身长及出生体重在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

3. 携带 C 基因型 HBV 的母亲及新生儿 HBV 复制与感染情况:42 例携带 HBV 的母亲均为 HBeAg 阳性,HBV 宫内传播组母亲 HBV DNA $>$ 10⁸ IU/ml 共 9 例、10⁷ IU/ml <HBV DNA \leq 10⁸ IU/ml 共 10 例、10⁶ IU/ml <HBV DNA \leq 10⁷ IU/ml 共 2 例;对照组母亲 HBV DNA $>$ 10⁸ IU/ml 共 6 例、10⁷ IU/ml <HBV DNA \leq 10⁸ IU/ml 共 13 例、10⁶ IU/ml <HBV DNA \leq 10⁷ IU/ml 共 2 例。

表 1 HBV 宫内传播组与对照组母亲及新生儿一般情况[M(Q_R)]

组别	例数	母亲年龄(岁)	母亲孕周(周)	新生儿性别(男/女)	新生儿身长(cm)	新生儿体重(kg)
传播组	21	24.4(2.6)	39.0(2.0)	9/12(42.9/57.1)	50.0(0.0)	3.3(0.6)
对照组	21	26.1(5.3)	38.0(2.0)	11/10(52.4/47.6)	50.0(1.0)	3.2(0.4)
Zχ ² 值		-1.96 ^a	0.66 ^a	0.38 ^b	0.97 ^a	0.10 ^a
P值		0.078	0.511	0.536	0.330	0.919

注:^a秩和检验,^bχ²检验

携带 HBV 的母亲血清 HBsAg、HBeAg 水平及 HBV DNA 载量在 HBV 宫内传播组与对照组间差异无统计学意义(P>0.05)。HBV 宫内传播组新生儿 HBV DNA>10⁸ IU/ml 1 例、10⁵ IU/ml<HBV DNA≤10⁸ IU/ml 1 例、10³ IU/ml <HBV DNA≤10⁵ IU/ml 4 例,余 15 例均为阴性;对照组 21 例新生儿 HBV DNA 均为阴性。新生儿 HBeAg 水平在 HBV 宫内传播组与对照组间差异无统计学意义(P>0.05),宫内传播组新生儿 HBsAg 水平高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 2。

4. 携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组碱基置换突变及与 HBV 宫内传播的关系:C 基因型 HBV 基因组 PreS1、S、C 及 P 区碱基置换突变与 HBV 宫内传播有关联。HBV DNA 基因组全长有 3 215 bp,HBV 宫内传播组共 305 bp 发生置换突变,突变率为 9.49%(305/3 215);对照组共 491 bp 发生置换突变,突变率为 15.27%(491/3 215),HBV 宫内传播组碱基置换突变率低于对照组,差异有统计学意义(χ²=49.60,P<0.001)。进一步比较两组间 HBV 基因组不同区碱基置换突变情况,HBV 宫内传播组 PreS1、S、C、P 区碱基置换突变率明显低于对照组(P<0.05)。说明碱基置换突变率较低者在 HBV 宫内传播中风险更大。见表 3。

5. 携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组碱基插入、缺失突变及与 HBV 宫内传播的关系:C 基因型 HBV 基因组 PreC、X 区碱基缺失突变率和 X 区碱基插入突变与 HBV 宫内传播有关联。PreS1 区缺失起始位点大多数位于 nt2848~2850 内,缺失长度

介于 12~21 bp 之间,其余还包括传播组起始于 nt3047 长度达 39 bp 及对照组起始于 nt3016 长度达 183 bp 的缺失突变;S 区仅有对照组长度为 3 bp 的缺失突变;PreC 区缺失起始位点位于 nt1815~1834 内,均为 1~4 bp 的小片段缺失;C 区传播组有长度达 168 bp 的缺失突变;P 区缺失起始位点位于 nt381~1019 内,有 1~5 bp 的小片段缺失,起始位点 nt2847~2850 有 12~21 bp 的缺失,其余还包括传播组起始于 nt3047 长度达 39 bp 及对照组起始于 nt3016 长度达 183 bp 的缺失突变;X 区是起始位点位于 nt1808~1834 内 1~4 bp 的小片段缺失突变和 nt1754~1768 内 8 bp、18 bp 或 20 bp 的缺失突变,其中 PreC 和 X 区宫内传播组碱基缺失突变率低于对照组,两组间差异有统计学意义(P<0.05)。提示 C 基因型 HBV 基因组除 PreS2 区外,其他各区均有碱基缺失突变发生,以 PreS1、PreC 和 X 区多见,C 和 P 区较少,PreS2 相对保守。见表 4。HBV 基因组 X 区 nt1644~1645 和 nt1649~1650 分别存在 31 bp 和 27 bp 的插入突变,且均发生于对照组。

6. 携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组 PreC、X 区缺失突变与母亲血清 HBeAg 水平及 HBV DNA 载量的关系:PreC 区发生缺失突变的母亲血清 HBeAg 水平低于未发生突变的母亲血清 HBeAg 水平(1 005.0 COI vs. 1 024.0 COI,P=0.647);X 区发生缺失突变的母亲血清 HBV DNA 载量低于未发生突变的母亲血清 HBV DNA 载量(5.4×10⁷ IU/ml vs. 6.6×10⁷ IU/ml,P=0.573),未发现两组间差异有统计学意义。

表 2 HBV 宫内传播组与对照组母亲及新生儿感染与复制情况[M(Q_R)]

组别	例数	母亲			新生儿	
		HBV DNA(×10 ⁶ IU/ml)	HBsAg(COI)	HBeAg(COI)	HBsAg(COI)	HBeAg(COI)
传播组	21	93.0(146.6)	698.3(376.2)	1 024.0(491.3)	3.3(4.9)	83.5(138.3)
对照组	21	53.9(107.4)	961.1(1 566.0)	1 017.0(341.6)	0.6(0.2)	82.5(84.8)
Z值		0.58	-1.79	-0.08	-5.53	-0.75
P值		0.563	0.074	0.940	<0.001	0.450

注:COI:临界值指数

表 3 HBV 宫内传播组与对照组 HBV 基因组各区碱基置换突变比较(例数,%)

基因区 (碱基数)	发生碱基 置换突变	未发生碱基 置换突变	χ^2 值	P 值
PreS1(357)			11.54	<0.001
传播组	24(6.72)	333(93.28)		
对照组	52(14.57)	305(85.43)		
PreS2(165)			0.76	0.383
传播组	16(9.70)	149(90.30)		
对照组	21(12.73)	144(87.27)		
S(681)			20.45	<0.001
传播组	51(7.49)	630(92.51)		
对照组	104(15.27)	577(84.73)		
PreC(84)			0.26	0.613
传播组	1(1.19)	83(98.81)		
对照组	3(3.57)	81(96.43)		
C(552)			8.67	0.003
传播组	43(7.79)	509(92.21)		
对照组	73(13.22)	479(86.78)		
P(2 532)			40.73	<0.001
传播组	245(9.68)	2 287(90.32)		
对照组	396(15.64)	2 136(84.36)		
X(465)			2.60	0.107
传播组	48(10.32)	417(89.68)		
对照组	64(13.76)	401(86.24)		

注:碱基置换突变率(%)=各基因区发生碱基置换突变位点数/各基因区碱基数

讨 论

HBV 可根据其全基因序列差异 $\geq 8\%$ 的标准将其划分为 A~J 10 种基因型,其分布存在一定的地理和种族差异,且不同基因型基因组长度不完全一致^[20]。例如, A 和 D 基因型 HBV 基因组分别为 3 221 和 3 182 nt,在欧洲、北美和中东地区常见。B 和 C 基因型 HBV 基因组长度相同,均为 3 215 nt,主要分布在亚洲地区。研究发现,我国主要流行的是 B 和 C 基因型 HBV 毒株,占 HBV 感染的 90% 以上, C 基因型在我国北方占主导地位, B 基因型在我国南方更常见^[6-7]。本研究中,携带 HBV 的母亲主要为 C 基因型,符合我国北方以 C 基因型为主的特征,与文献报道一致^[21]。

携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组 S、C、P 及 X 区碱基置换突变与 HBV 宫内传播有关。HBV DNA 基因组小、复制能力高,由其 mRNA 反转录而来,且反转录酶缺乏校正读码功能,因此,HBV 在复制或反转录过程中有很高的核苷酸错配率^[22]。在 HBV DNA 4 个开放阅读框(open reading frame)

表 4 HBV 宫内传播组与对照组 HBV 基因组各区碱基缺失突变比较(例数,%)

基因区	发生碱基 缺失突变	未发生碱基 缺失突变	χ^2 值	P 值
PreS1			3.71	0.054
传播组	10(4.90)	194(95.10)		
对照组	20(9.90)	182(90.10)		
S			-	0.498 ^a
传播组	0(0.00)	204(100.00)		
对照组	1(0.50)	201(99.50)		
PreC			17.82	<0.001
传播组	6(2.94)	198(97.06)		
对照组	30(14.85)	172(85.15)		
C			1.18	0.278
传播组	2(0.98)	202(99.02)		
对照组	6(2.97)	196(97.03)		
P			0.95	0.330
传播组	20(9.80)	184(90.20)		
对照组	26(12.87)	176(87.13)		
X			34.78	<0.001
传播组	8(3.92)	196(96.08)		
对照组	49(24.26)	153(75.74)		

注:^a采用 Fisher 确切概率法计算所得;传播组碱基缺失突变率(%)=发生碱基缺失突变克隆数/传播组总克隆数(204);对照组碱基缺失突变率(%)=发生碱基缺失突变克隆数/对照组总克隆数(202)

中, S 区与 HBV 免疫应答密切相关,可进一步分为前 S1(PreS1)、前 S2(PreS2)和 S 区,其中, S 编码的 HBsAg 有联合免疫的作用表位,前 S 与 HBV 黏附入胞作用密切相关,可以影响病毒复制,使宿主体内 HBV DNA 水平改变^[9]。本研究对照组中全 S 区多个位点的突变,可能通过影响 HBV 外膜蛋白的合成与分泌,进而影响病毒与细胞的结合及宿主体内的免疫应答,使其发生宫内传播的概率下降。前 C(PreC)/C 区突变主要影响病毒在宿主体内的复制能力^[23], PreC 中的 G1896A 突变和核心启动子(BCP)的 A1762T/G1764A 突变是宫内传播的保护因素^[12-13]。课题组前期研究显示 HBsAg 阳性母亲血清 HBeAg 与 HBV 宫内传播密切相关^[24], HBV C 基因型的 HBsAg 阳性母亲 HBV DNA BCP 区 A1762T/G1764A 双突变可能降低 HBV 宫内传播的风险^[25],本研究中对照组全 C 区碱基置换突变率高,可能阻止了 HBeAg 的表达,降低了宫内传播的危险性。目前, P 区是 HBV DNA 聚合酶的编码区,其位点突变可产生 HBV DNA 聚合酶变异株,影响 HBV DNA 正常复制,降低宫内传播的发生风险。X

区点突变与较低水平的 HBV cccDNA 和总 DNA 相关^[26]。对照组中 X 区多 bp 置换突变位点,可能通过降低 HBV 复制水平,影响宫内传播的发生。

PreC 区的缺失突变、X 区的插入和缺失突变可能降低了宫内传播的发生风险。PreC 区主要编码 HBeAg 蛋白,可能通过缺失突变减少 HBeAg 的表达,降低 HBV 感染力,发生 HBV 宫内传播的概率降低。X 区常见的缺失突变部位有 nt1763~1770、nt1770~1777、nt1753~1772 及 nt1750~1770, X 区的缺失突变可能会直接或间接抑制病毒的复制,在 HBV 基因 nt1763~1770 或 nt1753~1772 处缺失 8 bp 或 20 bp 可导致 HBsAg、HBcAg 和 HBeAg 的减少,这可能使突变病毒逃避免疫检测^[14];将 X 区缺陷型的 HBV 转染入细胞内后,HBV 的复制水平降低为野生型的 10%^[27]。由此提示,相对于 HBV 宫内传播组,对照组中较多的 X 区核苷酸片段缺失突变可能通过抑制病毒的复制水平,降低 HBV 感染力,进而相对不易发生 HBV 宫内传播。X 区发生插入突变也可能使 HBV 感染能力下降而使得 HBV 宫内传播的发生风险降低。可能由于样本量的限制,尚未发现 PreC 区缺失突变引起母亲 HBeAg 水平和 X 区缺失突变引起母亲 HBV DNA 载量的统计学改变,但发现母亲 PreC 区发生缺失突变时,HBeAg 的表达水平在一定程度上相较于未发生缺失突变时减少;母亲发生 X 区缺失突变时,HBV DNA 复制水平在一定程度上相较于未发生缺失突变时减少。

综上所述,携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒基因组碱基置换和缺失突变率较低者在 HBV 宫内传播发生中风险更大,PreS1、S、C 及 P 区碱基置换突变与 HBV 宫内传播有关;PreC 区的缺失突变、X 区的插入和缺失突变可能降低了宫内传播的发生风险。

本研究存在局限性。首先,由于技术限制,只选择了 HBV DNA 高载量的母亲血样,无法评估不同 HBV DNA 水平对宫内传播的影响;其次,仅研究了携带 C 基因型 HBV 的母亲病毒变异对 HBV 宫内传播的影响,今后应进一步扩大样本量,从基因分型的角度去分析 HBV 基因突变与 HBV 宫内传播的相关性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Polaris Observatory C. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study [J]. *The Lancet Gastroenterology Hepatology*, 2018, 3(6): 383-403. DOI: 10.1016/S2468-

1253(18)30056-6.

[2] Jing W, Liu J, Liu M. Eliminating mother-to-child transmission of HBV: progress and challenges in China [J]. *Front Med*, 2020, 14(1):21-29. DOI:10.1007/s11684-020-0744-2.

[3] Xu Y, Liu H, Wang Y, et al. The next step in controlling HBV in China [J]. *BMJ (Clinical research ed)*, 2013, 347:f4503. DOI:10.1136/bmj.f4503.

[4] Thio CL, Guo N, Xie C, et al. Global elimination of mother-to-child transmission of hepatitis B: revisiting the current strategy [J]. *The Lancet Infectious Dis*, 2015, 15(8): 981-985. DOI:10.1016/s1473-3099(15)00158-9.

[5] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2014, 60(6): 2099-2108. DOI: 10.1002/hep.27406.

[6] Li HM, Wang JQ, Wang R, et al. Hepatitis B virus genotypes and genome characteristics in China [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(21): 6684-6697. DOI: 10.3748/wjg.v21.i21.6684.

[7] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China [J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(6): 609-617. DOI:10.1111/j.1365-2893.2005.00657.x.

[8] Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26 Suppl 1:123-130. DOI:10.1111/j.1440-1746.2010.06541.x.

[9] Su HX, Zhang YH, Zhang ZG, et al. High conservation of hepatitis B virus surface genes during maternal vertical transmission despite active and passive vaccination [J]. *Intervirology*, 2011, 54(3):122-130. DOI:10.1159/000319437.

[10] Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 1):75-83. DOI:10.1099/0022-1317-81-1-75.

[11] Su HX, Xu DZ, Li D, et al. Heterogeneity analysis of the hepatitis B virus genome in intrauterine infection [J]. *J Med Virol*, 2005, 77(2):180-187. DOI:10.1002/jmv.20454.

[12] Papadakis MA, Elefsiniotis IS, Vlahos G, et al. Intrauterine-transplacental transmission of hepatitis B virus (HBV) from hepatitis B e antigen negative (precore mutant, G1896A) chronic HBV infected mothers to their infants. Preliminary results of a prospective study [J]. *J Clin Virol*, 2007, 38(2): 181-183. DOI:10.1016/j.jcv.2006.10.008.

[13] Sa-Nguanmoo P, Tangkijvanich P, Tharmaphornpilas P, et al. Molecular analysis of hepatitis B virus associated with vaccine failure in infants and mothers: a case-control study in Thailand [J]. *J Med Virol*, 2012, 84(8):1177-1185. DOI:10.1002/jmv.23260.

[14] Moriyama K. Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78 (Pt 6):1479-1486. DOI:10.1099/0022-1317-78-6-1479.

[15] Cheng H, Su H, Wang S, et al. Association between genomic heterogeneity of hepatitis B virus and intrauterine infection [J]. *Virology*, 2009, 387(1):168-175. DOI:10.1016/j.virol.2009.02.015.

[16] Zou H, Chen Y, Duan Z, et al. Virologic factors associated with failure to passive-active immunoprophylaxis in infants born to HBsAg-positive mothers [J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(2):e18-25. DOI:10.1111/j.1365-2893.2011.01492.x.

[17] Guo Z, Shi XH, Feng YL, et al. Risk factors of HBV intrauterine transmission among HBsAg-positive pregnant women [J]. *J Viral Hepat*, 2013, 20(5): 317-321. DOI: 10.1111/jvh.12032.

[18] Zeng DW, Liu YR, Dong J, et al. Serum HBsAg and HBeAg levels are associated with liver pathological stages in the immune clearance phase of hepatitis B virus chronic

infection [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5):3465-3472. DOI: 10.3892/mmr.2015.3207.

[19] Ko SC, Schillie SF, Walker T, et al. Hepatitis B vaccine response among infants born to hepatitis B surface antigen-positive women [J]. Vaccine, 2014, 32(18): 2127-2133. DOI:10.1016/j.vaccine.2014.01.099.

[20] Li H, She Q, Liu Y, et al. Clinical implication and viral mutation in basal core promoter/pre-core of hepatitis B virus C/D recombinant [J]. Hepatol Int, 2018, 12(5): 447-455. DOI:10.1007/s12072-018-9885-7.

[21] 许军, 王齐欣, 范春蕾, 等. 中国南北两城市乙型肝炎病毒基因型与血清型的构成差异 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(4): 327-329. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2003.04.006.

Xu J, Wang QX, Fan CL, et al. Comparison of hepatitis B virus serotype and genotype among HBsAg positive hepatitis B patients in a northern and a southern city of China [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2003, 17(4):327-329. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2003.04.006.

[22] Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B [J]. Gastroenterology, 2007, 132(4):1574-1585. DOI:10.1053/j.gastro.2007.02.039.

[23] Lee YI, Hur GM, Suh DJ, et al. Novel pre-C/C gene mutants of hepatitis B virus in chronic active hepatitis: naturally occurring escape mutants [J]. J Gen Virol, 1996, 77 (Pt 6): 1129-1138. DOI:10.1099/0022-1317-77-6-1129.

[24] Wang DD, Yi LZ, Wu LN, et al. Relationship between Maternal PBMC HBV cccDNA and HBV Serological Markers and its Effect on HBV Intrauterine Transmission [J]. Biomed Envir Sci: BES, 2019, 32(5):315-323. DOI: 10.3967/bes2019.043.

[25] 武佳欣, 杨志清, 张睿君, 等. HBsAg 阳性母亲 HBV 核心启动子突变与宫内传播的关系 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(6):902-907. DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200224-00163.

Wu JX, Yang ZQ, Zhang RJ, et al. Relationship between mutations of HBV basal core promoter region in HBsAg-positive mothers and intrauterine transmission[J], Chin J Epidemiol, 2020, 41(6):902-907. DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200224-00163.

[26] Jiao F, Long L, Ding S, et al. Complete genome sequencing and clinical analysis of intrahepatic hepatitis B virus cccDNA from HCC [J]. Microb Pathog, 2017, 109: 49-55. DOI:10.1016/j.micpath.2017.04.028.

[27] Yousif M, Mudawi H, Bakhiet S, et al. Molecular characterization of hepatitis B virus in liver disease patients and asymptomatic carriers of the virus in Sudan [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13:328. DOI:10.1186/1471-2334-13-328.

中华流行病学杂志第八届编辑委员会组成人员名单

(按姓氏汉语拼音排序)

顾 问 高 福 顾东风 贺 雄 姜庆五 陆 林 乔友林
 饶克勤 汪 华 徐建国

名誉总编辑 郑锡文

总编辑 李立明

副总编辑 邓 瑛 冯子健 何 纳 何 耀 卢金星 沈洪兵
 谭红专 吴尊友 杨维中 詹思延

编辑委员(含总编辑、副总编辑)

安志杰	白亚娜	毕振强	曹广文	曹卫华	曹务春	陈 坤	陈可欣
陈万青	陈维清	代 敏	戴江红	党少农	邓 瑛	丁淑军	段广才
段蕾蕾	方利文	方向华	冯子健	龚向东	何 纳	何 耀	何剑峰
胡东生	胡永华	胡志斌	贾崇奇	江 宇	阚 飙	阚海东	李 琦
李 群	李敬云	李立明	李秀央	李亚斐	李中杰	林 鹏	刘 静
刘 民	刘 玮	刘殿武	卢金星	栾荣生	罗会明	吕 繁	吕 筠
吕嘉春	马 军	马 伟	马家奇	马文军	毛 琛	孟 蕾	米 杰
缪小平	潘凯枫	潘晓红	彭晓霞	邱洪斌	任 涛	单广良	邵中军
邵祝军	沈洪兵	施小明	时景璞	宋志忠	苏 虹	孙业桓	谭红专
唐金陵	陶芳标	汪 宁	王 蓓	王 岚	王 丽	王 璐	王金桃
王丽敏	王全意	王素萍	王伟炳	王增武	王长军	王子军	魏文强
吴 凡	吴 静	吴 涛	吴先萍	吴尊友	武 鸣	项永兵	徐 彪
徐爱强	许汴利	许国章	闫永平	杨维中	么鸿雁	叶冬青	于普林
余宏杰	俞 敏	詹思延	张建中	张顺祥	张卫东	张作风	赵方辉
赵根明	赵文华	赵亚双	周脉耕	朱凤才	庄贵华		