

HBsAg 阳性母亲 C 基因型 HBV DNA CpG 岛分布特点和宫内传播的关系

王婷¹ 王丹丹¹ 陈文鑫¹ 晋聪¹ 李雁笛¹ 袁琳琳¹ 丰淑英² 汪波² 冯永亮¹
王素萍¹

¹山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室/临床流行病学与循证医学中心,太原 030001;²太原市第三人民医院妇产科,太原 030001

通信作者:王素萍,Email:supingwang@sxmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨 HBsAg 阳性母亲 C 基因型 HBV DNA CpG 岛的类型、长度、CG 位点等的分布特点及其与 HBV 宫内传播的关系,为 HBV 宫内传播机制研究提供新视角。方法 连续收集 2011 年 6 月至 2013 年 7 月太原市第三人民医院妇产科住院分娩的 HBsAg 阳性母亲及其新生儿,通过面对面问卷调查及电子病历收集流行病学资料,采用电化学发光法和荧光定量 PCR 分别检测母亲及新生儿 HBV 血清学标志物及血清 HBV DNA。以新生儿出生 24 h 内乙型肝炎(乙肝)疫苗/乙肝免疫球蛋白注射前股静脉血 HBsAg 和/或 HBV DNA 阳性判定为 HBV 宫内传播。将 HBV 宫内传播者中 HBV DNA 载量 $\geq 10^6$ IU/ml(满足克隆测序要求)的 22 例母亲及其新生儿作为宫内传播组,从未发生宫内传播者中随机选取 HBV DNA 载量 $\geq 10^6$ IU/ml 的 22 例作为对照组,以 HBV DNA 测序分型结果为 C 基因型的 39 例母亲进行 HBV DNA CpG 岛分布预测等分析。结果 39 例 HBV C 基因型的母亲中,宫内传播组 19 例,对照组 20 例。39 例 C 基因型者 HBV DNA 均含有传统 CpG 岛 II、岛 III,而对照组中有传统 CpG 岛 I 以及新型 CpG 岛 IV、岛 V;HBV 宫内传播组和对照组母亲携带的 HBV DNA CpG 岛 II、岛 III 长度和 CpG 岛 II CG 位点个数分布不同,差异有统计学意义($P < 0.05$),HBV 宫内传播组中 CpG 岛 II 长度 ≥ 518 bp 且其 CG 位点个数 ≥ 40 个(11/19)的比例明显高于对照组(2/20),差异有统计学意义($P < 0.05$);位于 X 基因启动子区的 CpG 岛 II 长度和 CG 位点个数大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HBV 宫内传播组中大部分母亲(12/19)携带的 HBV DNA CpG 岛 II 完全覆盖了 X_p 区,明显多于对照组(5/20),且其 HBV DNA X_p 区 CG 位点个数大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 HBsAg 阳性母亲 C 基因型 HBV DNA CpG 岛分布与宫内传播有关,CpG 岛 II 长度长、CG 位点个数多可能会增加 HBV 宫内传播的发生风险。

【关键词】 乙型肝炎病毒; C 基因型; CpG 岛; 宫内传播

基金项目:国家自然科学基金(81872677,81573212)

Distributive characteristics of HBV DNA CpG islands in HBsAg positive mothers and its relationship with intrauterine transmission

Wang Ting¹, Wang Dandan¹, Chen Wenxin¹, Jin Cong¹, Li Yandi¹, Yi Linzhu¹, Feng Shuying², Wang Bo², Feng Yongliang¹, Wang Suping¹

¹Department of Epidemiology/Center of Clinical Epidemiology and Evidence-Based Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²Department of Obstetrics and Gynaecology, the Third People Hospital of Taiyuan City, Taiyuan 030001, China

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20211010-00779

收稿日期 2021-10-10 本文编辑 万玉立

引用格式:王婷,王丹丹,陈文鑫,等. HBsAg 阳性母亲 C 基因型 HBV DNA CpG 岛分布特点及与宫内传播的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43(5): 728-733. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20211010-00779.

Wang T, Wang DD, Chen WX, et al. Distributive characteristics of HBV DNA CpG islands in HBsAg positive mothers and its relationship with intrauterine transmission[J]. Chin J Epidemiol, 2022, 43(5): 728-733. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20211010-00779.



Corresponding author: Wang Suping, Email: supingwang@sxmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the type, length, and CG loci of HBV DNA CpG islands in HBsAg positive maternal C genotype and its relationship with intrauterine HBV transmission, so as to provide a new perspective for the study of intrauterine transmission of HBV. **Methods** From June 2011 to July 2013, HBsAg-positive mothers and their newborns who delivered in the obstetrics and gynecology department of the Third People's Hospital of Taiyuan were collected. Epidemiological data were collected through face-to-face questionnaires and electronic medical records. Serum HBV markers and serum HBV DNA were detected by electrochemiluminescence and quantitative fluorescence PCR, respectively. Intrauterine transmission of HBV was determined by positive HBsAg and/or HBV DNA in femoral venous blood before injection of HBV vaccine/Hepatitis B immunoglobulin within 24 h of birth. A total of 22 mothers and their newborns with HBV DNA load $\geq 10^6$ IU/ml in intrauterine transmission were selected as the intrauterine transmission group, and 22 mothers with HBV DNA load $\geq 10^6$ IU/ml without intrauterine transmission were chosen as the control group by random seed method. The distribution prediction of CpG islands of HBV DNA in 39 mothers with genotype C by HBV DNA sequencing was analyzed. **Results** Among 39 mothers with HBV C genotype, 19 were in the intrauterine transmission group, and 20 were in the control group. The HBV DNA of 39 patients with genotype C traditional CpG island II and III, while the control group had traditional CpG island I and novel CpG island IV and V. The length of CpG island II and III and the number of CG loci of CpG island II in the intrauterine transmission group differed from those in the control group ($P < 0.05$). The CpG island II length ≥ 518 bp and the number of CG loci ≥ 40 in the intrauterine transmission group (11/19) were significantly higher than those in the control group (2/20) ($P < 0.05$). The length of CpG island II and the number of CG loci in the X gene promoter region (Xp region) were higher than those in the control group ($P < 0.05$). In the HBV intrauterine transmission group, most of maternal (12/19) HBV DNA CpG island II completely covered the Xp region, which was significantly higher than that in the control group (5/20), and the number of HBV DNA Xp region CG loci was higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The distribution of maternal C genotype HBV DNA CpG islands is related to intrauterine transmission. The length of CpG island II and the number of CG sites may increase the risk of intrauterine transmission of HBV.

[Key words] Hepatitis B virus; Genotype C; CpG islands; Intrauterine transmission

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81872677, 81573212)

我国是 HBV 感染中流行区, 疾病负担较为严重^[1-2]。HBV 宫内传播是我国 HBV 感染的重要传播途径^[3-5], 且 HBV 宫内传播是目前人群中慢性乙型肝炎感染者积累的重要原因之一^[6], 研究 HBV 宫内传播的发生机制十分必要。HBV 具有高度的变异性, 根据其基因组间核酸序列差异性可将其分为多个基因型, 在我国以 C 基因型较为多见^[7-8]。HBV C 基因型有两个常见的传统 CpG 岛, 即 CpG 岛 II、CpG 岛 III。HBV DNA CpG 岛分布在 HBV 基因组的开放阅读框(S 基因、C 基因、P 基因以及 X 基因)及顺式作用元件(启动子、增强子等)上: CpG 岛 II 与增强子 I、X 基因启动子区(Xp 区)以及 X 基因区部分重叠, CpG 岛 III 在 P 基因区的起始位点附近^[9-10]。这些 HBV 基因组结构都与 HBV 在体内的复制密切相关, 而 HBsAg 阳性母亲体内 HBV 高复制水平又是宫内传播发生的重要危险因素^[11-12], 由此推测 CpG 岛在 HBV 基因组结构上的分布可能与 HBV 宫内传播有关, 其可能会通过影响 HBV DNA 碱基对的排列顺序而影响 HBV 在宿主体内的复制、转录

和表达, 从而进一步影响 HBV 宫内传播。本研究以 HBV C 基因型的 HBsAg 阳性母亲作为研究对象, 探讨母亲携带的 HBV DNA CpG 岛分布特点及与 HBV 宫内传播的关系, 从而为 HBV 宫内传播机制研究提出新视角, 为降低 HBV 宫内传播提供新思路。

对象与方法

1. 研究对象: 连续收集 2011 年 6 月至 2013 年 7 月山西省太原市第三人民医院妇产科的 HBsAg 阳性母亲及其新生儿 399 对。通过面对面问卷调查及电子病历收集母亲的一般人口学资料、本次妊娠情况和新生儿的分娩、出生情况等资料; 采集母亲分娩前 24 h 内肘静脉血及新生儿出生后 24 h 内乙肝疫苗/乙肝免疫球蛋白注射前股静脉血各 3 ml, 分装血清于 -80°C 冰箱保存备检。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。

2. HBV 宫内传播判定标准: 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^[13-14]。

3. 母亲及新生儿 HBV 血清学标志物及血清 HBV DNA 检测:采用电化学发光法(ECLIA,试剂购自德国罗氏诊断有限公司)检测 HBV 血清学标志物(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc),采用荧光定量 PCR(试剂购自中山大学达安基因股份有限公司)检测血清 HBV DNA 载量。

4. 母亲携带的 HBV DNA 的提取和扩增:使用德国 Qiagen 公司生产的 QIAamp DNA 提取试剂盒,严格按照使用说明书操作提取血清 HBV DNA。使用梯度 PCR 仪(德国 EPPENDORF 公司)进行 DNA 扩增,DNA 分单、双链进行扩增,扩增 HBV 单链(1 442 bp)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');扩增 HBV 双链(2 410 bp)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')。PCR 为 50 μ l 反应体系,包括 3 μ l HBV DNA 模板,10 μ l 5 \times TransStart[®]FastPfu Buffer,4 μ l dNTPs,1 μ l TransStart[®]FastPfu DNA 聚合酶,30 μ l 超纯水(ddH₂O)及上、下游引物各 1 μ l [引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成]。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 单链 80 s/双链 110 s,35 个循环;68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

5. 母亲携带的 HBV DNA 测序及基因型确定:将上述 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)股份有限公司进行测序。所得 HBV 序列经编辑(DNAStar 软件包)、拼接(SeqMan 软件)、位置调整(Mega 6.0 软件包)后采用邻接(Neighbor-joining)法构建系统进化树(Kimura 双参数,1 000 次验证)。通过与 NCBI 下载的标准序列比对进行基因分型,详见课题组前期研究^[13-14]。

6. 母亲携带的 HBV DNA CpG 岛分布预测:利用“MethPrimer”网站(<http://www.urogene.org/methprimer/>)对母亲携带的 HBV DNA CpG 岛的分布进行预测。进入网站后,点击“Go to MethPrimer (plus CpG Island Prediction)”界面,输入已经测序确定的母亲携带的 HBV DNA 序列,调整 CpG 岛预测所

需参数为默认参数(默认参数:片段长度 \geq 100 bp;GC 含量 \geq 50.0%;检测到的 CpG 岛与预期的 CpG 岛的比值 \geq 0.6),汇总 CpG 岛的类型、位置及长度等。

7. 统计学分析:用 EpiData 3.1 软件建库并进行数据录入,采用 SAS 9.4 软件进行数据分析。非正态分布的计量资料用 $M(Q_1, Q_3)$ 进行统计描述,计数资料用例数、构成比(%)进行统计描述;计量/计数资料组间比较用 Wilcoxon 秩和检验/ χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 母亲携带的 HBV 基因型:共收集 399 对 HBsAg 阳性母亲及其新生儿,其中 54 例新生儿发生 HBV 宫内传播。发生宫内传播者中,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 宫内传播者中,91 例母亲外周血 HBV DNA 载量满足克隆测序要求,以随机种子方法选择 22 例作为对照。

对 44 例 HBsAg 阳性母亲的 HBV DNA 进行扩增克隆测序,HBV 基因型分析结果显示:44 例样本中 39 例(88.64%, 39/44)为 C 基因型(均为 C2 亚型),余 2 例为 B 基因型,3 例为 B/C 基因混合型。选择 HBV C 基因型的 39 例 HBsAg 阳性母亲作为研究对象进一步进行 HBV DNA CpG 岛分布预测,其中宫内传播组 19 例,未发生宫内传播的对照组 20 例。

2. HBV C 基因型的 HBsAg 阳性母亲及新生儿的一般情况:39 例 HBsAg 阳性母亲年龄在 20~35 岁,均为汉族,分娩孕周为 37~41 周;新生儿出生体重和身长范围分别为 2.5~4.3 kg 和 45~52 cm。比较 HBV 宫内传播组与对照组母亲及新生儿的一般人口学特征和母亲携带的 HBV 复制情况,结果显示母亲的年龄、分娩孕周和血清 HBeAg、HBV DNA 以及新生儿的性别、出生身长和出生体重在两组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

3. C 基因型 HBV DNA CpG 岛分布与宫内传播的关系:HBV DNA CpG 岛分布预测结果显示,39 例 C 基因型中共检出 5 个 CpG 岛,包括传统 CpG 岛 I、II、III 以及新型 CpG 岛 IV 和 V,且均含 CpG 岛 II 和岛 III。HBV 宫内传播组仅含 CpG 岛 II 和岛 III;对照组均含 CpG 岛 II 和岛 III,且有 CpG 岛 I、岛 IV 和岛 V 各 1 例。另外,HBV 宫内传播组(1 例)和对照组(2 例)的岛 II 为“中断 CpG 岛 II”(中断 CpG 岛 II 是指 CpG 岛 II 被非甲基化区域分为两部分)。HBV

表 1 HBV 宫内传播组与对照组母亲及新生儿一般情况及母亲携带的 HBV 复制情况比较 $M(Q_1, Q_3)$

特 征	宫内传播组(n=19)	对照组(n=20)	Z/ χ^2 值	P 值
母亲				
年龄(岁)	25(23,26)	26(25,28)	-2.40	0.051
分娩孕周(周)	39(38,40)	38(38,40)	0.68	0.496
新生儿				
性别(例数,%)			0.03	0.537
男	10(52.63)	10(50.00)		
女	9(47.37)	10(50.00)		
出生体重(kg)	3.3(2.9,3.5)	3.2(3.0,3.5)	0.46	0.642
出生身长(cm)	50.0(50.0,51.0)	50.0(48.5,50.0)	1.03	0.303
母亲携带的 HBV 复制情况				
HBeAg(COI)	983.9(729.8,1 281.0)	1 015.0(919.1,1 258.0)	-0.58	0.565
HBV DNA($\times 10^6$ IU/ml)	93.0(30.1,180.6)	49.4(28.3,151.0)	0.32	0.747

宫内传播组的 HBV DNA CpG 岛有 2 种类型,而对
照组共有 5 种类型,15.00%(3/20)同时还含有 CpG
岛 I、岛 IV 或岛 V。见表 2。

表 2 HBV 宫内传播组与对照组母亲携带的 HBV DNA
CpG 岛位置分布

CpG 岛	宫内传播组(n=19)		对照组(n=20)	
	位置	例数	位置	例数
CpG 岛 I	-	-	nt76~192	1
CpG 岛 II	nt1 111~1 717	19	nt1 118~1 717	20
中断 CpG 岛 II	nt1 350~1 351	1	nt1 322~1 357	2
CpG 岛 III	nt2 280~2 457	19	nt2 260~2 466	20
CpG 岛 IV	-	-	nt255~389	1
CpG 岛 V	-	-	nt1 923~2 033	1

注:中断 CpG 岛 II 是指 CpG 岛 II 被非甲基化区域分为两部分

4. C 基因型 HBV DNA CpG 岛 II、岛 III 与 HBV
宫内传播的关系:HBV 宫内传播组和对照组母亲
的 HBV DNA 均含有 CpG 岛 II 和岛 III,进一步研究
HBV DNA CpG 岛 II、岛 III 与 HBV 宫内传播的关系。
比较两组母亲携带的 HBV DNA CpG 岛 II、岛
III 的长度及其 CpG 位点(CG 位点)个数,结果显示,
HBV 宫内传播组的 CpG 岛 II 长度及其 CG 位点个
数大于对照组($P<0.05$);CpG 岛 III 长度小于对照组
($P<0.05$),但 CpG 岛 III CG 位点个数在两组间的差
异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。将 CpG 岛长度
和 CG 位点个数以三分位数为界分析其分布差异,
结果显示,HBV 宫内传播组和对照组 CpG 岛 II 长
度及 CG 位点个数和岛 III 长度分布明显不同($P<$
 0.05),在 HBV 宫内传播组中有 11 例母亲的 HBV
DNA CpG 岛 II 长度 ≥ 518 bp,且 CG 位点个数 \geq
40 个,而 18 例对照组的 CpG 岛 II 长度 < 518 bp,且
CG 位点个数 < 40 个;在宫内传播组中有 10 例母亲

(10/19)的 HBV DNA CpG 岛 III 长度 < 149 bp,明显
多于对照组(2/20)。见表 4。

表 3 HBV DNA CpG 岛长度、CG 位点个数与 HBV
宫内传播的关系 [$M(Q_1, Q_3)$]

组别	HBV 宫内传播		Z 值	P 值
	是	否		
岛的长度(bp)				
岛 II	555(450,555)	450(420,496)	-2.82	0.005
岛 III	147(147,163)	164(154,177)	-2.81	0.005
CG 位点个数				
岛 II	41(37,41)	37(34,38)	-2.76	0.006
岛 III	11(11,12)	12(11,12)	-2.09	0.074

表 4 HBV DNA CpG 岛长度、CG 位点个数与 HBV
宫内传播的关系

组别	HBV 宫内传播		χ^2 值	P 值
	是(19例)	否(20例)		
岛的长度(bp)				
岛 II			10.12	0.006
<449	4	8		
449~	4	10		
518~	11	2		
岛 III			8.58	0.014
<149	10	2		
149~	5	8		
166~	4	10		
CG 位点个数				
岛 II			10.12	0.006
<37	4	8		
37~	4	10		
40~	11	2		

5. HBV DNA Xp 区和 P 基因区(P 区)的 CpG 岛
分布与 HBV 宫内传播的关系:测序及 CpG 岛预测
结果表明,39 例母亲的 HBV DNA CpG 岛 II 位置跨

越 nt1 111~1 717, 与部分 X_p 区 (nt1 170~1 359) 重叠, CpG 岛 III 位置跨越 nt2 260~2 466, 与部分 P 区 (nt2 307~3 125, nt1~1 620) 重叠。进一步分析 HBV X_p 区和 P 区的 CpG 岛分布与 HBV 宫内传播的关系, 结果显示, HBV 宫内传播组 HBV X_p 区 (有较多 RNA 聚合酶 II 结合位点的区域) CpG 岛长度大于对照组 ($P=0.013$)。在 HBV 宫内传播组的 19 例母亲中有 12 例母亲携带的 HBV DNA CpG 岛 II 完全覆盖了 X_p 区, 远多于对照组 (5/20)。见图 1。同时, HBV 宫内传播组 HBV DNA X_p 区 CG 位点个数高于对照组 ($P=0.041$), 提示 HBV X_p 区的 CpG 岛 II 与 HBV 宫内传播有关; 而 P 区 CpG 岛的长度及其 CG 位点个数在两组之间接近 ($P>0.05$)。见表 5。

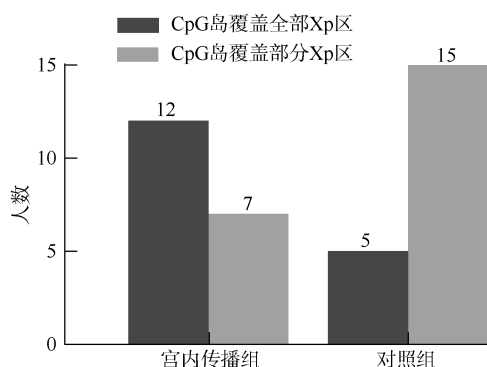


图1 HBV 宫内传播组和对照组母亲携带的 HBV DNA CpG 岛覆盖 X_p 区情况

表5 HBV DNA X_p 区 CpG 岛长度和 CG 位点个数与宫内传播的关系 [$M(Q_1, Q_3)$]

组别	宫内传播组 (n=19)	对照组 (n=20)	Z 值	P 值
X _p 区 CpG 岛长度(bp)	190(136, 190)	145(114, 174)	-2.49	0.013
X _p 区 CG 位点个数	12(11, 12)	10(8, 12)	-2.05	0.041
P 区 CpG 岛长度(bp)	139(139, 139)	139(139, 149)	-1.66	0.141
P 区 CG 位点个数	11(11, 11)	11(11, 11)	-0.58	0.563

讨 论

HBV 宫内传播无法完全得到有效控制是人群中 HBV 感染者积累的重要原因^[6], 了解 HBV 宫内传播发生的机制对于减轻由 HBV 引起的相关疾病负担具有重要意义。有研究表明 CpG 岛的分布与下游基因的表达有关^[15], 而 HBV DNA CpG 岛在 HBV 基因组结构上的分布有所不同^[8,9], 可能会通过影响母亲携带的 HBV 在体内的复制而导致宫内传播的发生, 相关研究未见报道。本研究发现, C 基因型 HBsAg 母亲携带的 HBV DNA CpG 岛的分布

与 HBV 宫内传播发生有关, 可能为 HBV 宫内传播机制研究提供新的思路。

HBV 是一种因缺乏聚合酶校正功能而具有高度变异性的病毒, 根据基因组序列异质性将其分为不同的基因型^[16], 在我国以 C 基因型较为多见^[7-8]。本研究同样显示大部分的 HBsAg 阳性母亲的 HBV 基因型为 C 基因型 (88.64%, 39/44), B 基因型及 B/C 基因混合型 (11.36%, 5/44) 较少。

CpG 岛是 HBV 基因组中富含 CG 双核苷酸的序列, 目前普遍认为 HBV DNA 中有 3 个传统类型的 CpG 岛: I、II 和 III, 以及 3 个新发现的 CpG 岛: IV、V 和 VI。本研究中 39 例 HBV C 基因型 HBsAg 阳性母亲携带的 HBV DNA 均含有 CpG 岛 II 和 III, 其他岛仅在个别研究对象中出现, 这与已有研究结果相似^[9, 15]。本研究中 HBV 宫内传播组的母亲携带的 HBV DNA 仅含有传统 CpG 岛 II 和 III, 对照组含有传统 CpG 岛 I 及新的 CpG 岛 IV 及 V。HBV 宫内传播组的 HBV DNA CpG 岛的类型较对照组少, 提示发生 HBV 宫内传播的 HBV DNA CpG 岛类型的分布可能比较保守。本研究还发现部分岛 II 出现“中断”现象, 其发生机制和临床意义目前尚不清楚, Hou 等^[15]在岛 II 的“中断”区域, 检测到了与 HBV 基因结构和功能异常有关的突变现象, 而本研究中仅发现 3 例, 待扩大样本量继续研究。本研究结果还显示对照组有新型 CpG 岛 IV 和 V, 新型岛 IV 的位置在岛 I 和 II 之间, 新型岛 V 位于岛 II 和 III 之间, 新型 CpG 岛可能是 DNA 甲基化的潜在区域^[17-18], 关于新型岛的生物学意义还有待进一步探讨。

本研究中 HBV 宫内传播组母亲携带的 HBV DNA CpG 岛 II 长度、CG 位点个数和 X_p 区的 CpG 岛 II 长度、CG 位点个数均明显高于对照组 ($P<0.05$), 提示 HBV DNA CpG 岛 II 长度和 CG 位点个数与 HBV 宫内传播有关。一方面, HBV DNA CpG 岛 II 与 HBV 的部分增强子 (Enh I)、X_p 区以及部分 X 基因区重叠。Enh I/X 基因启动子能与多种核内转录因子相结合, 增强启动子的转录水平从而上调前基因组 RNA (pgRNA) 的表达, 而 X 基因编码的 HBx 蛋白具有广泛的转录激活功能。Enh I/X 基因启动子及 X 基因的正确表达均有利于维持 HBV 在体内的高水平复制^[19-20]。另一方面, 有研究表明 CpG 岛的存在与基因调控区相关^[21], 也有研究显示, CpG 岛较长的启动子具有更多的 RNA 聚合酶 II 结合位点^[22-23]。在 HBV DNA 中, CpG 岛 II 覆盖部分 X_p 区

(nt1 170~1 359), 启动子区的 CpG 岛越长, 其 RNA 聚合酶 II 结合位点越多, 由于 HBV DNA 在复制过程中缺乏病毒聚合酶的校对功能, 大量的 RNA 聚合酶 II 的结合位点能够有效校对 HBV 聚合酶蛋白, 减少在复制的 DNA 链中出现随机的碱基错误合并, 避免 HBV 基因的结构和功能异常, 有助于 HBV 在体内的复制。在本研究中, HBV 宫内传播组母亲的 HBV DNA 载量也相对较高, 而母亲体内高病毒载量又是 HBV 宫内传播发生重要的危险因素, 支持了 CpG 岛 II 的长度及 CG 位点个数与 HBV 宫内传播的关系。

本次研究显示, 与 CpG 岛 II 相反, CpG 岛 III 短, 发生 HBV 宫内传播可能性高。HBV DNA CpG 岛 III 位于部分 P 区上, 但进一步分析 HBV DNA CpG 岛 III 长度及 CG 位点个数在 P 区的分布, 发现在两组之间并无差异, 出现这种差异的原因还有待进一步探讨。

本研究存在局限性。由于目前测序技术的高载量要求和测序结果的稳定问题, 本研究只选择了 HBV DNA 高载量的母亲及新生儿作为研究对象, 无法评估不同 HBV DNA 水平下 HBV DNA CpG 岛分布与 HBV 宫内传播的相关性, 因此研究结论需要增加研究样本量进一步深入阐释。

综上所述, HBsAg 阳性母亲 C 基因型 HBV DNA CpG 岛分布可能与 HBV 宫内传播有关, HBV DNA CpG 岛类型分布保守、CpG 岛 II 长度长和 CG 位点个数多可能会增加 HBV 宫内传播的发生风险。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 王婷、王丹丹: 实验操作、数据处理、论文撰写; 刘文鑫、晋聪、李雁笛、袁琳琳: 采集、整理数据; 丰淑英、汪波: 采集数据、支持性贡献; 冯永亮、王素萍: 研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017[EB/OL]. (2017-04-19). <https://www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017>.
- [2] Liu J, Liang WN, Jing WZ, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3): 230-238. DOI: 10.2471/blt.18.219469.
- [3] Xu YY, Liu HH, Wang Y, et al. The next step in controlling HBV in China[J]. BMJ, 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]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(8): 981-985. DOI:10.1016/s1473-3099(15)00158-9.
- [5] 张磊, 邵中军. HBV 宫内传播研究在乙型肝炎防控工作中发挥着重要的作用[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(9): 1055-1058. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.007.
- [6] Zhang L, Shao ZJ. Important role of study on intrauterine transmission of HBV in prevention and control of hepatitis B[J]. Chin J Epidemiol, 2019, 40(9):1055-1058. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.007.
- [7] 王贵强, 王福生, 庄辉, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. 肝脏, 2019, 24(12): 1335-1356. DOI: 10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2019.12.001.
- [8] Wang GQ, Wang FS, Zhuang H, et al. Guidelines for the Prevention and Treatment of Chronic Hepatitis B (2019 version)[J]. Chin Hepatol, 2019, 24(12): 1335-1356. DOI: 10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2019.12.001.
- [9] 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.
- [10] 伍宵, 魏少峰, 徐楠, 等. 中国慢性 HBV 感染者基因型分布及其临床意义 Meta 分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20(3): 271-275. DOI:10.3969/j.issn.1672-5069.2017.03.005.
- [11] Wu X, Wei SF, Xu N, et al. Meta-analysis on distribution of hepatitis B virus genotypes and related clinical outcomes in China[J]. J Pract Hepatol, 2017, 20(3): 271-275. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5069.2017.03.005.
- [12] Zhang YM, Li CX, Zhang YJ, et al. Comparative analysis of CpG islands among HBV genotypes[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e56711. DOI:10.1371/journal.pone.0056711.
- [13] Zhong CY, Hou ZW, Huang JH, et al. Mutations and CpG islands among hepatitis B virus genotypes in Europe[J]. BMC Bioinformatics, 2015, 16(1): 38. DOI: 10.1186/s12859-015-0481-8.
- [14] Shih YF, Liu CJ. Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus: challenges and perspectives[J]. Hepatol Int, 2017, 11(6):481-484. DOI:10.1007/s12072-017-9831-0.
- [15] Peng SX, Wan ZH, Liu TT, et al. Incidence and risk factors of intrauterine transmission among pregnant women with chronic hepatitis B virus infection[J]. J Clin Gastroenterol, 2019, 53(1): 51-57. DOI: 10.1097/mcg.0000000000001001.
- [16] 武佳欣, 杨志清, 张睿君, 等. HBsAg 阳性母亲携带的 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Zhao TJ, Yang ZQ, Li YD, et al. Relationship between C genotype HBV mutation and intrauterine transmission[J]. Chin J Epidemiol, 2021, 42(4):716-722. DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200915-01163.
- [20] Hou ZW, Huang JH, Zhong CY, et al. CpG islands of hepatitis B virus genome isolated from Chinese patients[J]. Gene, 2015, 561(2): 261-267. DOI: 10.1016/j.gene.2015.02.036.
- [21] Chen L, Shi Y, Yang WR, et al. Differences in CpG island distribution between subgenotypes of the Hepatitis B Virus genotype[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 6781-6794. DOI:10.12659/msm.910049.
- [22] 凌霄霞, 陈明泉, 施光峰. DNA 甲基化修饰在乙肝病毒持续感染相关肝病中的研究现状[J]. 肝脏, 2014, 19(5):362-364. DOI:10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2014.05.010.
- [23] Ling QX, Chen MQ, Shi GF. Research status of DNA methylation modification in hepatitis B virus persistent infection-associated liver disease[J]. Chin Hepatol, 2014, 19(5): 362-364. DOI: 10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2014.05.010.
- [24] Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Hepatitis B viral DNA is methylated in liver tissues[J]. J Viral Hepat, 2008, 15(2): 103-107. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00905.x.
- [25] Bock CT, Malek NP, Tillmann HL, et al. The enhancer I core region contributes to the replication level of hepatitis B virus in vivo and in vitro[J]. J Virol, 2000, 74(5):2193-2202. DOI:10.1128/jvi.74.5.2193-2202.2000.
- [26] 郑丹华, 王小众. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(10): 1158-1161. DOI: 10.13350/j.cjpb.181023.
- [27] Zheng DH, Wang XZ. Advances in the study of the hepatitis B virus X protein[J]. J Parasitol Biol, 2018, 13(10): 1158-1161. DOI:10.13350/j.cjpb.181023.
- [28] Kim TH, Barrera LO, Zheng M, et al. A high-resolution map of active promoters in the human genome[J]. Nature, 2005, 436(7052):876-880. DOI:10.1038/nature03877.
- [29] Elango N, Yi SV. Functional relevance of CpG island length for regulation of gene expression[J]. Genetics, 2011, 187(4):1077-1083. DOI:10.1534/genetics.110.126094.
- [30] Thompson AJ, Colledge D, Rodgers S, et al. Stimulation of the interleukin-1 receptor and Toll-like receptor 2 inhibits hepatitis B virus replication in hepatoma cell lines *in vitro*[J]. Antivir Ther, 2009, 14(6): 797-808. DOI: 10.3851/imp1294.