

· 论 著 ·

## HBV 在宫内传播途径的分子进化特点研究\*

曾毅<sup>1</sup>, 李利<sup>1</sup>, 郭鑫武<sup>2</sup>, 邓国宏<sup>2</sup>, 李俊男<sup>1</sup>, 王琳<sup>1△</sup>

(第三军医大学西南医院: 1. 妇产科; 2. 传染病研究所, 重庆 400038)

**摘要:**目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)的宫内传播的分子进化特点。方法 选择有乙型肝炎母子无症状携带者两对母子的血清样本分离 HBV 准种病毒株, 进行 PCR-克隆-测序后, 构建遗传进化树及拓扑结构比较, 计算每对母子准种群内及种群间的进化距离。结果 2 个进化树包括 2 种类型, 第 1 种类型, 大部分母亲株聚集为一枝, 但新生儿株与小部分母亲株聚集在另一枝, 母亲株为新生儿株的起源。第 2 种类型, 母亲株与新生儿株未形成总的单源群, 也没形成各自的单源群, 有 1 株新生儿的病毒株为大部分母子序列的起源。结论 两组病例的传播途径分别符合“胎盘泄漏”和“细胞途径”特点。

**关键词:**乙型肝炎病毒; 宫内传播; 准种; 系统进化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.15.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)15-1467-04

## A study on molecular evolution characters of intrauterine transmission route of HBV\*

Zeng Yi<sup>1</sup>, Li Li<sup>1</sup>, Guo Xinwu<sup>2</sup>, Deng Guohong<sup>2</sup>, Li Junnan<sup>1</sup>, Wang Lin<sup>1△</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing 400038, China;

2. Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To study the characters of the molecular evolution of the intrauterine transmission route of HBV. **Methods**

The quasispecies isolated from two pairs of HBsAg-positive mothers and their neonates, who were infected with HBV by intrauterine transmission, were selected as study subjects. After PCR-cloning-sequencing, the phylogenetic trees of the HBV strains of each pair of mother and neonate were constructed, the topological structures were compared, and the distance between and within the quasispecies was calculated. **Results** The two phylogenetic trees included two types. In the first type, most of the maternal sequences clustered into one clade, the neonatal sequences and some of maternal sequences clustered into another clade. One of maternal strains was the ancestor of the neonatal strains. In the second type, the sequences of the mothers and neonates could form neither a monophyletic cluster nor separate monophyletic clusters. One of the neonatal strains was the ancestor of most strains of mother and neonate. **Conclusion** The characters of the molecular evolution of the two cases were separately accorded with those of ‘placental leakage’ and ‘cellular route’.

**Key words:** hepatitis B virus; intrauterine transmission; quasispecies; phylogenesis

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个全球性的健康问题<sup>[1]</sup>。HBV 表面抗原(HBV surface antigen, HBsAg)阳性母亲的新生儿出生后立即接种乙型肝炎疫苗(Hepatitis B vaccine, HBVacc)或联合应用乙型肝炎免疫球蛋白(hepatitis B immunoglobulin, HBIG)可有效阻断分娩过程感染和产后感染,但对已发生的宫内感染无阻断作用<sup>[2]</sup>,通过这种途径感染的新生儿几乎终身携带病毒,是造成免疫失败的主要原因<sup>[3-5]</sup>,20%~25%发展为肝硬化及肝癌,宫内感染的女性新生儿很有可能将来通过妊娠将病毒再传递给她们的下一代。HBV 宫内传播的途径主要有胎盘途径、外周血单核细胞(peripheral blood monocytes, PBMCs)途径及经生殖细胞的传播。其中胎盘的渗漏和胎盘细胞的感染是主要的途径<sup>[6]</sup>。HBeAg 可以经过局部的胎盘渗漏通过胎盘<sup>[7]</sup>,随着胎盘屏障的破坏,造成母亲血液进入胎儿的血液循环中,或者通过“细胞途径”促进感染经胎盘的传播<sup>[8]</sup>。母亲 HBeAg 血清型阳性及高病毒载量为胎盘 HBV 感染明确的正相关因素<sup>[8]</sup>。本研究对 HBV 宫内传播的两对母子血清样本中的 HBV 病毒株序列建立进化关系类型,进行遗传进化分析,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 1 月至 2011 年 1 月第三军医大

学西南医院产科就诊的两对乙型肝炎母子无症状携带者。母亲均为重庆地区汉族人,年龄分别为 24(M1, 新生儿为 N1)和 25(M2, 新生儿为 N2)岁,孕前及孕期确诊为 HBV 感染(HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性),伴 HBV 病毒高载量(滴度均大于  $1 \times 10^6 \log_{10}$  copies/mL),肝炎病毒 A、C、D、E 抗体阴性,生命体征及肝功能指标基本正常,均临床诊断为无症状的 HBsAg 携带者,实验前均未接受乙型肝炎疫苗接种及抗病毒治疗。产后立即收集母亲的静脉血样及新生儿的股静脉血样,父母及其子女的血清样本-70℃超低温冰箱保存。两对乙型肝炎母子无症状携带者的临床资料见表 1。入选标准:新生儿在出生 24 h 内、免疫接种前检测示 HBsAg 及 HBV-DNA 双阳性,母亲是 HBsAg 携带者,父亲非 HBsAg 携带者,新生儿常规乙型肝炎疫苗预防接种及注射乙型肝炎免疫球蛋白后,产后 1 个月新生儿的血液样本中,HBsAg 及 HBV-DNA 双阳性<sup>[8]</sup>。

1.2 试剂 引物参照文献设计(上海生工生物工程公司合成),柱式液体样品总核酸抽提试剂盒(W7291)(上海华舜生物技术有限公司,中国),LA Taq DNA 聚合酶(Takara 公司,日本),长片段 TA 克隆试剂盒(TOPO-XL-PCR Cloning kit)(Invitrogen 公司,美国),E. Z. N. A™质粒 DNA 小抽试剂盒(美国 Omega 公司),EcoR I 限制性内切酶(美国 Promega 公司)。

表 1 两对乙型肝炎母子无症状携带者的临床资料

编号	分娩时年龄(岁)	出生时间	性别	病毒载量(log <sub>10</sub> copies/mL)	ALT(IU/mL)	Apgar 评分	基因型	病毒株编号
M1	24	—	女	3.33E+7	23	—	C	M1-01~M1-09
N1		2008-6-3	女	4.49E+7	34	10	C	N1-01~N1-06
M2	25	—	女	3.05E+7	40	—	B	M2-01~M2-25
N2		2008-5-30	男	7.28E+7	29	10	B	N2-01~N2-05

—:表示无数据。

### 1.3 方法

**1.3.1 血清 DNA 提取** 采用上海华舜生物技术有限公司的柱式液体样品总核酸抽提试剂盒(W7291)提取。

**1.3.2 母子 HBV 基因组全长序列的扩增、克隆、酶切鉴定和测序** 对高病毒载量血清( $>10^7$  log<sub>10</sub> copies/mL)参考文献[9]HBV 全序列基因组扩增所采用的引物及扩增方法。HBV 基因组全长 PCR 引物为 P1:5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3';P2:5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G-3'。PCR 参数为预变性 94 °C 5 min,94 °C 25 s,55 °C 30 s,72 °C 3 min 30 s(共 35 个循环),延伸 72 °C 10 min。胶回收纯化目的基因,采用 Invitrogen 公司提供的 TA Cloning® Kit-One-Step PCR Cloning 试剂盒中的 pCR®-2.1T 载体快速连接 5 min,重组载体转入感受态 TOP10,致死基因 ccdB 及卡那霉素筛选阳性菌落。提取重组质粒,EcoR I 酶切鉴定,每个患者选 33 个酶切鉴定正确重组质粒的菌液,送华大生物工程公司测序,测序引物 M13。

**1.3 基因序列比对方法** 各样本的 HBV 基因组全长序列为 3.2 kb,采用 CLUSTAL X1.83 进行序列比对<sup>[10]</sup>,用 MEGA 5.05 软件计算遗传距离<sup>[11]</sup>,选择最佳替代模型,PAUP4.0 b 10 和 Treeview 进行系统进化分析。用 MEGA5.05 软件建立 3 种数据库,第 1 种包括一个数据包,内有两对母子所有的 45 个序列,命名为 MN;第 2 种包含 2 个数据包,每个数据包内为一对母子的序列,命名为 M1N1、M2N2;第 3 种包含 4 个数据包,每个数据包内为单一的某一母亲或孩子的序列,命名为 M1、N1、M2 和 N2。M1 和 M2 的序列为 C1 型基因型,M2 和 N2 的序列为 B2 基因型,选择标准序列 B2 型(AF100309)和 C1 型(X04615)分别作为外周序列进行比对。

采用 MEGA5.05 软件计算母子之间的遗传距离,根据贝叶斯标准计算的结果选择 Kimura 2-parameter 替代模型分析转换和易位。MN 数据包的系统进化树用邻接法通过 1 000 次自展法重复计算建立。对第 2 种和第 3 种数据包运用最大似然法(maximum likelihood method,ML)和最大简约法(maximum parsimony method,MP)进行系统进化分析。PAUP4.0 b 10 建构 ML 和 MP 系统进化树。根据以上标准做进化树构建和分析的参数设置,构建进化树并进一步分析。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS11.5 软件进行统计学数据处理,计数资料比较采用 *t* 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

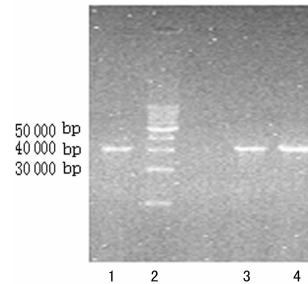
**2.1 母子 HBV L-PCR 扩增及重组质粒酶切鉴定** 血清 DNA 模板扩增出约 3 200 bp 的 DNA 片段,重组质粒经 EcoR I 酶切,可产生 3 200 bp 及 3 500 bp 两个片段,均与预期目的基因大小相符合。见图 1、2。

**2.2 HBV 病毒株的遗传进化** 两对母子的遗传距离及遗传多态性见表 3~4。

### 2.3 系统进化结果

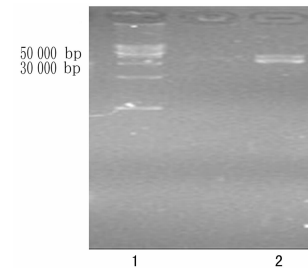
**2.3.1 对于所有 45 个病毒株** 基于从 2 对母子中选择的

3.2 kb 的 HBV 病毒株基因组,MEGA5.05 软件邻接法构建的进化树(图 3)。在这个拓扑结构中,M1N1 和 M2N2 之间没有重叠,分别聚集在一侧。M1 和 N1 聚集后混杂分布,未形成单源群,也没形成各自的单源群;M2 和 N2 非单一起源,虽然 M2 的大部分优势株聚为一枝,但少部分 M2 与 N2 聚集形成另一枝。



1、4、5:HBV 病毒分离株;2:Marker;3:阴性对照。

图 1 HBV 基因组全长序列 PCR 产物凝胶电泳图



1:DNA Marker;2:酶切片段(3 200 bp 的目的片段及 3 500 bp 的载体片段)。

图 2 HBV L-PCR 扩增及重组质粒酶切鉴定电泳图

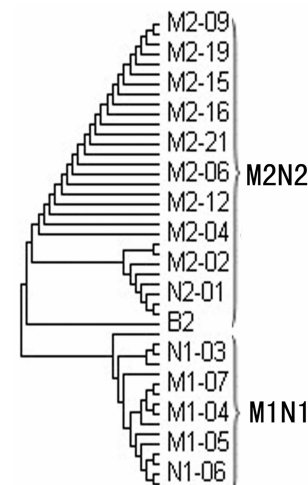


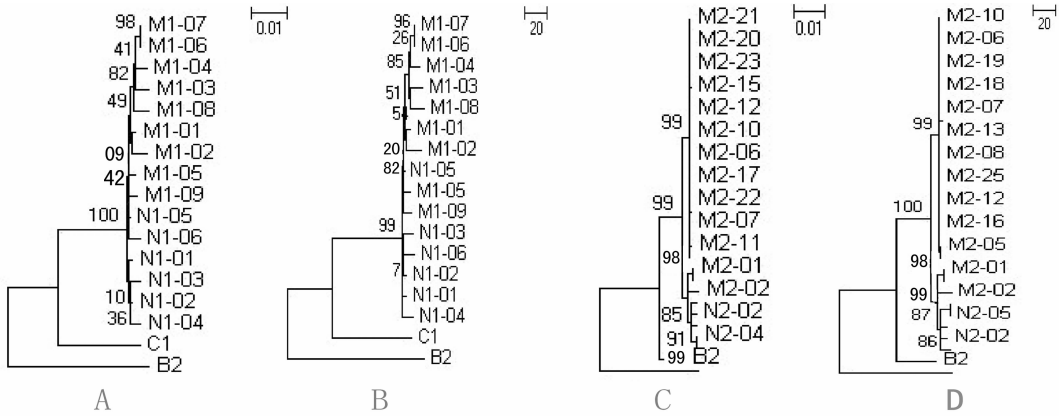
图 2 HBV 3.2 kb 全长序列邻接法进化树

**2.3.2 每对母子的 HBV 病毒株** 图 3A、3B 为 M1N1 的 ML、MP 的进化树。M1 和 N1 聚集后混杂分布,未形成总的单源群,也没形成各自的单源群,均没有明显的优势株,有一株

新生儿的病毒株 N1-01 为除 3 条新生儿株(N1-02, N1-03, N1-04)外其余母子序列的起源。

图 3C、3D 为 M2N2 的 ML、MP 的进化树。大量 M2 的优势株聚集在一枝上,但 N2 却与小部分 M2(M2-01, M2-02, M2-

03)聚集在另一枝,两枝为姐妹群,N2 可形成单源群,并有一个共同的起源 M2-01 和 M2-03(2 株的序列相同,视为同一病毒株)。



A: M1N1-ML; B: M1N1-MP; C: M2N2-ML; D: M2N2-MP.

图 3 M1N1、M2N2 的进化树图

表 3 M 和 N 的遗传距离和遗传多态性

编号	遗传距离	遗传多态性
M1	0.005*	0.005
M2	0.001△	0.002
N1	0.003	0.003
N2	0.003	0.003

\*:  $P < 0.05$ , 与 N1 比较; △:  $P < 0.05$ , 与 N2 比较。

表 4 每对母子的遗传距离和多样性

编号	遗传距离	遗传多态性
M1/N1	0.005	0.004
M2/N2	0.005	0.002
M1N1	0.005*	0.005
M2N2	0.002	0.002

\*:  $P < 0.05$ , 与 M2N2 比较。

### 3 讨论

HBV 宫内传播的途径主要有胎盘途径、PBMCs 途径及生殖细胞的传播。其中胎盘的渗漏或胎盘细胞的感染是主要的途径<sup>[6]</sup>。通常认为胎盘渗漏是含有高浓度 HBV 的母血直接进入胎儿血液循环中。这个过程中,母亲的病毒株不经受选择压力,新生儿的病毒与母亲的一致。通过宫内传播的细胞途径的新生儿感染是绒毛毛细血管内皮细胞感染的结果。在通过胎盘屏障的过程中,母亲的优势病毒株被过滤,只有那些更适应新环境的病毒株得以继续繁殖。在通过每层绒毛毛细血管巨大选择压力的作用下,许多母亲的病毒株为了适应新环境而发生突变,特别是感染发生在孕早期的病例,母子病毒株之间的遗传距离相应增大,N 由 M 进化而来。若感染发生在妊娠晚期,M 和 N 病毒之间的进化距离则相对缩短。

有研究根据 8 对发生 HBV 宫内感染的母子的 HBV 病毒株序列进行进化树分析,推测出 4 种可能的情况:第 1 种,母子的序列聚集为一枝,归因为局部胎盘渗漏;第 2 种,母亲和胎儿的病毒株分别聚集为 2 个独立的姐妹进化枝,母子病毒株之间的遗传距离相对较大,可用细胞途径加以解释;第 3 种,从拓扑结构看,母亲的病毒株是新生儿病毒株的起源,这种情况与传播的细胞途径相一致;第 4 种,母亲病毒株与一些新生儿的病

毒株聚集为一枝,其余的新生儿病毒株聚集为另一单源群,可用联合传播途径加以解释<sup>[12]</sup>。

在本研究中,M2N2 的进化模式符合第 3 种细胞途径进化模式,大量 M2 的优势株聚集在一枝上,但 N2 却与小部分 M2 (M2-01, M2-02, M2-03)聚集在另一枝,2 枝为姐妹群,N2 可形成单源群,并有一个共同的起源母亲病毒株 M2-01 和 M2-03(2 株的序列相同,视为同一病毒株)。在细胞途径中,胎盘屏障阻碍了大部分病毒株的通过,只有那些在层层选择压力下发生突变的病毒株适应了新环境后得以突破,从而感染胎儿,因此,大部分 M2 优势株聚集在一条进化枝上,为没能突破的株系,而少部分发生变异的病毒株通过细胞途径感染胎儿,并成为新生儿病毒株的起源,故 N2 为一单源群,N2 的上游为少量的 M2 病毒株。

但在 M1N1 的序列进化树中,却发现了与上述 4 种模式不同的情况,M1 和 N1 聚集后混杂分布,未形成总的单源群,也没形成各自的单源群,均没有明显的优势株,有一株新生儿的病毒株 N1-01 为除 3 条新生儿株(N1-02, N1-03, N1-04)外其余母子序列的起源。M1N1 各序列间的遗传距离明显大于 M2N2。可能原因是:在孕早期发生胎盘渗漏导致胎儿感染,但胎盘渗漏并不是一个持续的过程,可能通过修复得以终止,HBV 病毒分别在胎儿和母亲两个相对独立的环境中演进。感染初期胎儿和母亲的 HBV 病毒株之间来源相同,序列无明显差异,为同一个基础。随着时间的推移,由于胎盘屏障的过滤和阻断功能,胎儿环境相对稳定,病毒株所经受的选择压力较小。而母亲在孕期可能面临来自内外环境的各种压力,病毒株变异速率加快,遗传距离的计算中,M1 也明显比 M2 及 N1 要大,形成更多、遗传距离更远的变异株。

有研究报道,发生先兆流产和(或)早产,大部分宫内传播是因为母血中 HBeAg 的胎盘渗漏<sup>[7,13]</sup>。有研究显示,HBV 感染胎盘毛细血管内皮细胞是宫内传播的一个主要危险因素。HBV 经胎盘传播途径可能是胎盘的细胞与细胞之间的传递<sup>[14-15]</sup>。本研究结果显示,2 组中 M1N1 通过胎盘渗漏传播的可能性大,M2N2 则更有可能通过细胞途径传播。因为纳入研究的病例数目及每对母子准种数目的局限,系统进化树不能完全说明病毒株的进化过程,但从这些树中可以看出部分组间差

异,并推测出可能的传播模式,并据此采取相应的预防措施及干预手段减少宫内传播的风险。

#### 参考文献:

- [1] Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection[J]. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2(7): 395-403.
- [2] 陈天艳, 刘敏, 陈云茹, 等. HBV 宫内传播的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(19): 2138-2143.
- [3] Liu SL, Dong Y, Zhang L, et al. Influence of HBV gene heterogeneity on the failure of immunization with HBV vaccines in eastern China[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(3): 437-443.
- [4] Shi Z, Li X, Yang Y, et al. Lamivudine in late pregnancy to interrupt in utero transmission of hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis[J]. *Obstet Gynecol*, 2010, 116(1): 147-159.
- [5] Wang S, Han JQ, Hu DR. The advancement of intrauterine-transplacental transmission of hepatitis B virus[J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 18(8): 770-772.
- [6] Xu DZ, Yan YP, Zou S, et al. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 185(4): 981-987.
- [7] Lin HH, Lee TY, Chen DS, et al. Transplacental leakage of HBeAg-positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus[J]. *J Pediatr*, 1987, 111(6 Pt 1): 877-881.
- [8] Xu DZ, Yan YP, Choi BC, et al. Risk factor and mechanism of intrauterine transmission of hepatitis B virus: a

- case-control study[J]. *J Med Virol*, 2002, 67(1): 20-26.
- [9] Gunther S, Li BC, Miska S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients[J]. *J Virol*, 1995, 69(6): 5437-5444.
- [10] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [12] HSun X, Tang B, Wang J, et al. A preliminary study on the molecular evolution of the two routes of intrauterine transmission of HBV[J]. *Arch Virol*, 2012, 157(1): 155-164.
- [13] Lin HH. Perinatal transmission of hepatitis viruses: the possible mechanisms[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2004, 43(1): 1-4.
- [14] Xu DZ, Yan YP, Zou S, et al. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 185(4): 981-987.
- [15] Yue YF, Jiang H, Shi L, et al. Study on the mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus[J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2004, 39(4): 224-226.

(收稿日期:2012-02-02 修回日期:2012-03-05)

(上接第 1466 页)

具有很强的免疫刺激活性,能激活多种免疫细胞,产生大量炎症介质,加重组织损伤和参与高代谢反应<sup>[6]</sup>。实验结果显示,给予 rhITF 能有效维护肠黏膜屏障,阻止内毒素入血,减轻了对免疫细胞的刺激,避免了炎症反应的级联放大效应,实验结果说明,使用外源性 rhITF 后能降低肠源性高代谢,使机体代谢率保持在一个较为合理的水平,防止代谢率过高加重机体损伤。

肠源性高代谢是本课题组经过多年研究提出的一个新概念,其定义为:在各种病理状态下,由于肠道本身受损以及肠腔内细菌、毒素移位造成的机体高代谢反应,它是炎症介质、神经递质、激素等多种因素共同作用的结果<sup>[2]</sup>。肠道损害是引发肠源性高代谢的结构基础,维护肠黏膜屏障功能是降低肠源性高代谢的主要途径。尽管肠源性高代谢的理论已提出,但防治措施还不完善。生长因子,尤其是肠道特异分泌的 ITF 在保护肠黏膜屏障中的作用值得重视,前期体外研究已经证实,ITF 能减轻烧伤血清对肠上皮细胞的损伤,在维护肠黏膜屏障中起重要作用<sup>[7]</sup>。本实验结果提示,使用外源性 ITF 能通过减轻烧伤后肠道损伤,维护肠黏膜屏障功能,减少肠腔细菌和毒素移位,减轻炎症介质对免疫系统的刺激,以间接方式降低全身高代谢反应。但 ITF 是否能直接作用于免疫细胞,调控免疫细胞活性,减轻烧伤后免疫应激,下调机体炎症反应,直接干预机体代谢反应,目前尚不甚清楚,值得深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 45(9): 799-809.
- [2] 汪仕良, 邓诗琳. 烧伤代谢营养学[M]. 石家庄:河北科技出版社, 2009.
- [3] Kjellef S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities[J]. *Cell and Mol Life Sci*, 2009, 66(7): 1350-1369.
- [4] Sun Y, Wu W, Zhang Y, et al. ITF produced in escherichia coli promotes the healing of rat burn-induced acute gastric mucosal lesions[J]. *J Trauma*, 2008, 65(1): 163-169.
- [5] Todd WC, Carrie Y, Peterson L, et al. Role of p38 mapk in burn-induced intestinal barrier breakdown[J]. *J Surgical Res*, 2009, 156(1): 64-69.
- [6] Mashkoo AC, Shadab NR, Michael JK, et al. Impaired intestinal immunity and barrier function: a cause for enhanced bacterial translocation in alcohol intoxication and burn injury[J]. *Alcohol*, 2004, 33(3): 199-208.
- [7] 吴修文, 王焕, 万千雪, 等. 肠三叶因子和黏蛋白对烧伤血清所致肠上皮细胞免疫功能变化的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2011, 27(5): 341-346.

(收稿日期:2012-01-02 修回日期:2012-03-02)