

◆文献综述◆

基于慢性乙型肝炎证候系统生物学基础的宫内感染研究进展及思路

陶承静, 刘寿荣, 荀运浩, 胡健女, 张素英, 白秀丽, 赵春, 左中宝

浙江中医药大学附属杭州市西溪医院, 浙江 杭州 310023

[摘要] 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染目前依然是一个严重的全球公共卫生问题, 阻断 HBV 的垂直传播仍然存在一定失败率, 可能与 HBV 宫内感染机制没有明确以及缺乏有效阻断措施相关。系统生物学、慢性乙型肝炎与中医证候的结合、发展与应用, 为 HBV 宫内感染机制的研究提供了手段和思路。从基因、蛋白、代谢等角度, 从不同组学层面探讨不同证候分类的宫内传播机制, 以期从慢性乙型肝炎中医证候联合生物系统学寻找解决当前困局的思路。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 宫内感染; 中医证候; 系统生物学

[中图分类号] R512.6*2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 09-0048-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.09.008

Research Progress and Idea of Intrauterine Infection Based on the Syndrome Systemic Biological Basis of Chronic Hepatitis B

TAO Chengjing, LIU Shourong, XUN Yunhao, HU Jiannv,
ZHANG Suying, BAI Xiuli, ZHAO Chun, ZUO Zhongbao

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) infection is still a serious global public health problem, and Blocking vertical transmission of HBV still has a certain failure rate, which may be related to the unclear mechanism of HBV intrauterine infection and the lack of effective blocking measures. The combination, development and application of system biology, chronic hepatitis B and traditional Chinese medicine (TCM) syndromes provide means and ideas for the study of HBV intrauterine infection mechanism. From the perspective of gene, protein and metabolism, the intrauterine transmission mechanism of different syndrome classification is discussed from different histological levels, with a view to finding a solution to the current dilemma from the combination of TCM syndrome and systems biology of chronic hepatitis B.

Keywords: Hepatitis B virus; Intrauterine infection; TCM syndrome; Systems biology

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染目前依然是一个严重的全球公共卫生问题。2016 年世界卫生大会提出到 2030 年消除病毒性肝炎的战略目标^[1], 2021 年世界卫生组织 (WHO) 发布报告概述了目前消除 HBV 取得

的进展: 2019 年全球约有 2.96 亿慢性乙型肝炎 (CHB) 感染者, 其中 6 500 万为育龄妇女^[2], 形势依然严峻。

1 HBV 的宫内感染

HBV 传播有经血液和性接触等水平传播, 及经

[收稿日期] 2022-11-29

[修回日期] 2023-02-19

[基金项目] 杭州市社会发展科研重点项目 (202204A02)

[作者简介] 陶承静 (1974-), 女, 副主任医师, E-mail: taochengjing74@163.com。

[通信作者] 刘寿荣 (1968-), 男, 教授, E-mail: lsr85463990@126.com。

胎盘、脐带、羊水、精子等母婴、父婴垂直传播。母婴传播是 HBV 感染的主要传播途径^[3]，包括经胎盘宫内传播、分娩时产道传播和产后哺乳传播 3 种途径。可能高危因素包括 HBV DNA 高载量、HBV 结构和突变、孕妇的乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)阳性、母体宫内环境、胎盘屏障和胎儿遗传易感性。目前国内外指南均要求乙肝表面抗原(HBsAg)阳性且 HBV DNA $\geq 10^5$ copies/mL 的孕妇在妊娠中晚期口服抗病毒药物，新生儿出生后接受主动(乙型肝炎疫苗)-被动免疫(乙型肝炎免疫球蛋白)，两者联合有效降低了 HBV 的垂直传播率^[4]，但仍然存在 1.2%~5% 的失败率^[5]，有研究认为这可能与无法明确 HBV 如何突破胎盘屏障感染胎儿的机制相关。目前存在几种学说：渗漏学说^[6]、细胞转移学说^[7]、外周血单个核细胞(PBMC)学说^[8]、HBV 病毒颗粒的胞吐作用学说^[9]。

2 系统生物学与证候系统生物学

系统生物学是一门研究基因、蛋白质和代谢物等的构成及其在遗传、环境等因素变化过程中相互关系的学科^[10]。从整体的高度，采用系统论的方法，从基因、蛋白质、细胞、组织、个体的分层角度研究其功能以及各组学间的相互关系，整合建立模拟生物系统的模型，预测其在各种环境因素干扰下的动态行为，分为基因、蛋白质等各种组学。

证候系统生物学是一种新兴交叉学科^[11]。从中医学整体观、治未病、辨证施治等基础理论出发，综合系统生物学的理论与技术，从基因、蛋白质、代谢物等不同层面对证候进行量化、标准化、客观化^[12]。CHB 证候系统生物学研究平台^[13]，是利用系统生物学理论与技术探索不同证型的特异性指标，将中医病证规范化、诊断指标定量化和疗效评定客观化。目前中医临床将 CHB 患者的主要中医证型候分为 5 型：湿热内结证、肝郁脾虚证、肝肾阴虚证、瘀血阻络证、脾肾阳虚证^[14]。已经发现不同中医证候分类存在不同的 HBV 基因型，与外周血淋巴细胞亚群(PBMC)之间也存在一定的相关性^[15]，其临床疗效及预后也不同。

系统生物学、CHB 与中医证候的结合、发展与应用，为 HBV 宫内感染机制的研究提供了手段和思路。笔者基于 CHB 证候系统生物学方法，从基因、蛋白、代谢等角度，从不同组学层面探讨不同证候分类的宫内传播机制：不同证候间母体个体基因和

蛋白表达谱的区别，与孕期 HBV 感染者的主要中医证型候的相关性，母婴传播阻断失败与 HBV 基因突变、基因多态性的关联，预测中医辨证与关键蛋白质和代谢网络的相关性，以期从 CHB 中医证候联合生物系统学寻找解决当前困局的思路。

3 系统生物学与 HBV 宫内感染

3.1 基因组学与 HBV 宫内感染

基因组学(Genomics)是从基因表征、定量、结构、相互关系中研究基因内在活动的规律，及其对机体影响包括测量基因表达、鉴定基因功能、研究生物信息，分析遗传密码^[16]。

基因表达差异性及序列多态性，在临床中表现为不同的个体差异、症状和体征，在中医证候中表现为不同的证候表型^[12]。HBV 感染后的自然病程及临床转归也受到病毒的基因型、病毒基因变异、病毒与宿主基因整合等影响^[17]。

2005 年 HBV 全基因组首次克隆成功，这个全新技术为 HBV 基因多样性与不同致病性和不同传播途径等关系的研究打开了窗口^[18]。大量证据表明 HBV 基因型与 HBV 的流行、传播模式和临床结果相关，可以作为确定地理分布与传播模式相关性的流行病学标志物，HBV 的基因型 B 型和 C 型在亚洲人群最容易出现，与宫内感染也具有较高的相关性^[19]，感染后也更倾向发展为慢性肝炎和肝硬化。但国内韩国荣团队认为虽然 HBV 的基因型与母婴传播有相关性，但是不能作为是否会发生免疫失败导致宫内感染的一项预测指标^[20]。近年也有研究认为基因 B 型孕妇使用抗病毒药物时，HBV DNA 下降更明显，母婴阻断效果更好^[21]。

HBV 具有高度优化的遗传组织，同时导致其灵活性也高，在逆转录步骤过程中由于缺乏基因突变自发错误校对，容易出现各种各样的基因型、亚型、突变、重组^[19]。这样的变异也使得 HBV 容易摆脱机体免疫监管而出现较高免疫逃逸、耐药性、复制率^[22]，从而导致宫内感染的易感性。另一项研究结果表明 HBV 基因变异的不同位点和量与中医证候具有相关性，基因 B 型主要是湿热中阻证与肝郁脾虚证患者，基因 C 型主要表现为脾肾阳虚证、肝肾阴虚证及瘀血阻络证患者，而肝郁脾虚证与 HBV 基因型及基因变异的位点有一定的相关性，更易发生 Per C 区变异。另一项临床检测认为，有报道称，HBV

宫内感染的发生和辅助性 T 细胞 1(Th1)/辅助 T 细胞 2(Th2)类细胞有关细胞因子之间免疫失衡有关^[23],特别是中医证型为脾肾阳虚型的患者,容易出现 IL-17/IL-10 失衡^[24],临床应用流式细胞仪检测调节性 T 细胞(Treg)/Th17 的表达,以及其相关细胞因子白细胞介素-10(IL-10)、IL-17 的水平,发现宫内感染的孕妇及新生儿这些表达均增强,且肝郁脾虚型最高,结合不同中医分型孕妇的 Treg/Th17 细胞因子能够制定预防措施来避免 HBV 宫内感染的发生^[24]。2019 年国内 IL-18 调控 Th1/Th2 网络平衡,监测 HBsAg 阳性孕妇体内 IL-18 水平,可以对是否发生宫内感染进行预判,还可以提前干预来提高母体的细胞免疫功能,有利于控制宫内传播^[25]。这说明鉴定 HBV 基因型的和监测 HBV 基因组某些区域的变异,作为对 HBV 感染患者评估是否发生宫内感染的一项预判指标,并实施个体化管理,具有一定的临床意义。2018 年最新的改良巢氏 PCR 法完成了对低浓度 HBsAg 的 CHB 全基因分析和低拷贝 HBV DNA 全基因扩增^[26],发现了 HBV 的 BCP 区、PreC 区和 C 基因区突变与肝脏损伤及肝病进程相关,不同中医证候类型有着不同的 HBV DNA 核苷酸突变率,其中湿热内蕴证候型的最高^[27]。研究基因多态性与中医证候分型的相关性,有助于了解不同证候表型的妊娠期 CHB 患者发生宫内感染的几率,以及对抗病毒药物治疗反应的个体差异。

3.2 蛋白质组学与 HBV 宫内感染 蛋白质组学(Proteomics)主要研究蛋白质组成成分及其动态变化特有规律,通过基因表达调控的机制来阐述疾病发病机理,通过比较和分析正常个体与病理个体之间的差异蛋白,寻找到疾病发生、发展过程中的特异性蛋白质分子,这为疾病的早期诊断可量化的客观指标和理论依据。

由于在疾病的不同阶段、不同情况下,蛋白质的分型和表达也不相同,随着空间和时间的不断动态变化,CHB 的中医证候蛋白质组学,就是寻找不同中医证候间的差异蛋白质,将中医证候诊断进行客观化、标准化,指导临床应用。

母婴垂直传播是 CHB 患者患病的主要病因,胎盘滋养层是母婴传播的天然屏障,然而 HBV 如何通过滋养层引起胎儿感染的机制不清楚。陈京龙团队采用液相 PCR 法检测出 HBV 感染孕妇胎盘组织中存

在 HBV 闭合环状 DNA(cccDNA)信号,证实了 HBV 可感染胎盘各层细胞并进行复制^[28]。有研究认为 HBV 病毒表面的 S 蛋白可以与胎盘 Hofbauer 细胞(绒毛间质内一种巨噬细胞)表面的 FcγR III(CD16)特异性结合,介导吞噬及摄入作用,引起胎儿宫内感染,阻断 FcγR III 受体表达可能会降低患者宫内感染风险^[29]。白晓霞及其团队^[30]研究认为 S100 蛋白的高表达可能与 HBV 的经胎盘宫内感染有关。一部分 HBV 劫持了自噬蛋白分泌途径,经由 S100A10/AnxA2 复合物和多泡体(MVB)介导的胞吐作用通过滋养层发生易位,如果敲除滋养层细胞中 AnxA2 或 S100A10 会导致滋养层 HBV 病毒数量的减少,这为了解并阻断 HBV 宫内感染和母婴传播提供了另一个潜在的靶点^[31]。

3.3 转录组学与 HBV 宫内感染 转录组学,在整体水平上研究细胞中基因转录的情况及转录调控规律的学科,是根据一些基因在一定条件下表达出的信息来推断出未知基因的功能和作用机制的一种学科,也称表达谱。由于外源性和内源性因素影响,转录组学具有特定的时空性^[32]。中医证候转录组学主要以转录组学方法检测中医证候患者样本,采取不同方法进行干预,并对比分析干预前后结果。

国内学者白桂琴^[33]应用抑制性消减杂交(SSH)技术从 HBV 感染胎盘组织中筛选出了参与细胞生长调节、基本代谢、氧化损伤、畸变等有关差异表达基因。白晓霞^[34]也发现 HBV 可以上调体内体外的胎盘滋养层内 HBD-3 和 A3G 的表达,这种上调的缺乏可能与 HBV 的宫内传递有关。2021 年白桂琴团队进一步研究发现,HBx 通过下调 Smc5/6 促进滋养层细胞中 HBV 复制,激活 EGFR 启动子,通过下调 PI3K/p-AKT 信号通路抑制滋养层细胞凋亡,从而增加 HBV 宫内感染的风险^[35]。2022 年北京佑安医院高虹采用逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)和免疫印迹法分别检测胎盘绒毛膜中自噬小体相关基因和蛋白的表达水平,发现 HBV 感染母体的胎盘中自噬小体水平增加,并随 HBV 载量的增加而显著上调。高水平的病毒血症可能是自噬小体活性和 MTCT 的原因^[36]。在高病毒载量或 HBeAg 阳性的孕妇中,自噬水平显著上调在 HBV MTCT 中起着重要的作用,在 HBV 宫内感染中起着重要的作用。

早在 2013 年,国内有学者研究发现 CHB 湿热蕴

结型患者和肝郁脾虚型患者具有不同基因分子表达模式。肝郁脾虚证患者、脾胃湿热证两证候间存在显著差异表达基因, miR-129-1-3p、miR-129-2-3p与中医证候肝胆湿热证具有一定的相关性, miR-1273g-3p与脾胃湿热证具有一定的相关性^[37]。

因此,采用转录组学方法对不同中医证候的宫内感染患者进行研究,为揭示HBV的宫内感染提供新的技术平台。

3.4 代谢组学与HBV宫内感染 代谢组学,是定性定量分析生物体细胞内在某一时刻的低分子量代谢物,并找寻其在生理病理变化中的规律,是系统生物学的重要组成部分。基本方法是采用高通量检测技术结合信息模式识别和专家系统整合等方法,反映了细胞所处的环境。主要有液相色谱-质谱联用(LC-MS)、气相色谱-质谱联用(GO-MS)技术和代谢轮廓分析(Metabolomic profiling)等。

随着代谢组学的快速发展,其在HBV感染中的应用也日趋广泛,有研究显示在正常人和HBV感染人群中存在柠檬酸、乌头酸等代谢物的差异,为乙型肝炎的发病机制以及乙肝治愈提供了新的视角^[38]。对于不同中医证候的CHB患者可筛选出特征性的小分子代谢物,来评估病情及指导治疗。研究认为CHB中医证型与生化学指标具有一定的相关性,在一定程度上可反应疾病进展程度及阐释疾病临床表现的中医机理^[39]。

HBV感染导致患者在妊娠期机体病理生理过程变化,引起代谢产物发生相应的改变,目前鲜少有研究,如果通过对某些代谢产物进行分析,并与正常人的代谢产物比较,寻找出宫内感染的生物标记物,可以提供一种较好的鉴别方法来判断宫内感染倾向、并进行母婴传播阻断。

4 存在的问题及小结

疾病产生是一个多变化的持续过程,从单一层面的数据变化来解释分析疾病的整个发生发展过程具有一定的局限性,而系统生物学和中医证候学都是从整体、系统、联系方面出发,采用多学科交叉来阐释基因-信息通路-证候间的具体联系。为了更好地研究HBV宫内感染的生物学机制,可以以转录组学为基点,利用系统生物学、中医证候学关联多个纬度的组学数据,对不同中医证候分类的慢性HBV感染孕妇,在差异基因变化规律、miRNA调控

的作用机制、蛋白质群、代谢标志物的比较和关联这几个方面开展深入研究,发现相关特征性基因表达和代谢物,选取与自己研究相关的方面进行整合分析,观察其在各个层面的不同变化,探究作用机制,从而找到最有效的研究方向。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021[R]. Geneva: World Health Organization, 2016.
- [2] World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021[R]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [3] 中华医学会感染病学分会. 中国乙型肝炎病毒母婴传播防治指南(2019年版)[J]. 中华传染病杂志, 2019, 37(7): 388–396.
- [4] NORAH A T, ANNA S F L, BRIAN J M, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance[J]. Hepatology, 2018, 67(4): 1560–1599.
- [5] 陈超, 王晨旭, 周冠伦, 等. 《2022年亚太肝病学会指南: 妊娠期HBV感染》摘译[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(5): 1023–1026.
- [6] HSIUNG L H, TZUYAO L, SHINN C D, et al. Transplacental leakage of HBeAg-positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus[J]. Journal of Pediatrics, 1987, 111(6 Pt 1): 877–881.
- [7] BAI H, ZHANG L, MA L, et al. Relationship of hepatitis B virus infection of placental barrier and hepatitis B virus intra-uterine transmission mechanism[J]. World Journal of Gastroenterology, 2007, 13(26): 3625–3630.
- [8] 冯永亮, 王素萍, 史晓红, 等. PBMC中HBV cccDNA与HBV宫内感染关系的研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 192–194.
- [9] PURNIMA B, DAVID A A. Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier[J]. Journal of Virology, 2007, 81(13): 7200–7207.
- [10] BERTOLASO M, RATTI E. Conceptual challenges in the theoretical foundations of systems biology[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1702: 1–13.
- [11] 吴小秋, 刘志龙. 中医证候的系统生物学研究[J]. 吉林中医药, 2013, 33(1): 12–15.
- [12] 卢冬雪, 刘峰, 严晶, 等. 基于系统生物学的中医证候研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 131–135.
- [13] 李瀚旻. 慢性乙型肝炎证候系统生物学的研究思路与方法[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(6): 1130–1134.
- [14] 中华中医药学会肝胆病分会. 病毒性肝炎中医辨证标准[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(10): 1839–1846.
- [15] 余钦, 凌昌全. 慢性乙型肝炎病毒感染的中医证候研究[J]. 中医肿瘤学杂志, 2020, 2(2): 89–93.

- [16] 成军. 功能基因组学与病毒性肝炎发病机制[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(12): 1939-1976.
- [17] 王慧, 贾继东. 慢性HBV感染自然史及治疗对转归的影响[J]. 首都医科大学学报, 2010, 31(5): 582-585.
- [18] 徐宝艳, 王宇明, 兰林, 等. 乙型肝炎病毒基因组全序列的扩增及高效克隆[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(9): 704-706.
- [19] LIN C L, KAO J H. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2017, 31(3): 249-255.
- [20] 王翠敏, 韩国荣, 王根菊. 乙型肝炎病毒S基因变异、基因型与宫内感染免疫失败的关系[J]. 中华传染病杂志, 2009, 27(2): 114-117.
- [21] 张宝芳, 程明亮, 陆爽, 等. 替诺福韦及替比夫定对贵州地区不同基因型HBeAg阳性乙肝孕妇HBVRNA的影响[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(43): 3503-3508.
- [22] SZMARAGD C, BALLOUX F. The population genomics of hepatitis B virus[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(22): 4747-4758.
- [23] 王建设, 朱启镛. 宫内感染HBV免疫失败儿童Th1和Th2型细胞因子mRNA转录研究[J]. 中华传染病杂志, 2003, 21(2): 105-109.
- [24] 袁杰, 崔玉, 戴蕾, 等. HBV宫内感染中医证型与Treg/TH17细胞因子平衡[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(23): 3597-3601.
- [25] 严敏, 邵昱璋, 王海荣, 等. HBsAg阳性产妇IL-18的表达在HBV宫内传播中的相关性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(9): 1071-1076.
- [26] 张孟, 李倩, 周华君, 等. 巢氏PCR扩增低拷贝HBV全基因组方法的建立及应用[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(3): 44-49.
- [27] 郭慧娟, 郭朋, 张引强, 等. 慢性乙型肝炎中医证型与HBV-DNA的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(20): 3011-3013.
- [28] 陈京龙, 刘霞, 谢尧, 等. HBV感染者胎盘组织HBV DNA检测[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2009, 1(1): 25-30.
- [29] 周娜. 胎盘 Hofbauer 细胞 FcγR III 介导 HBV 宫内感染[D]. 淮南: 安徽理工大学, 2015.
- [30] ZHAO P, WEN J, QIAN L, et al. Expression of S100 proteins is associated with HBV intrauterine transmission[J]. Arch Gynecol Obstet, 2020, 302(6): 1389-1399.
- [31] BAI X, RAN J, ZHAO X, et al. The S100A10-AnxA2 complex is associated with the exocytosis of hepatitis B virus in intrauterine infection[J]. Laboratory Investigation, 2022, 102(1): 57-68.
- [32] 吴芊, 邱文琪, 宋明, 等. 转录组学与中医证候研究现状分析[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 4094-4097.
- [33] 白桂芹, 岳亚飞, 张树林, 等. 乙型肝炎病毒感染胎盘组织差异表达基因的筛选与确定[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42(2): 76-78.
- [34] BAI X X, TIAN T, WANG P, et al. Potential Roles of Placental Human Beta-Defensin-3 and Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic Polypeptide 3G in Prevention of Intrauterine Transmission of Hepatitis B Virus[J]. Journal of Medical Virology, 2015, 87(3): 375-379.
- [35] LIN Y Y, LIU Y, XU D P, et al. HBxAg promotes HBV replication and EGFR activation in human placental trophoblasts[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2021, 22(21): 1-10.
- [36] GAO H, XU L, FAN Z, et al. The role of autophagy in the mother-to-child transmission of pregnant women with a high level of HBV DNA[J]. Frontiers In Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 850747.
- [37] 闫秀丽, 商嘉玮, 苏式兵, 等. 慢性乙型病毒性肝炎肝胆湿热证和肝郁脾虚证患者尿液中microRNAs的表达研究[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(7): 39-46.
- [38] 侯玉洁, 祝文君, 陈长功, 等. 基于气相色谱-质谱联用技术的乙型肝炎血清代谢标志物的探究[J]. 色谱, 2015, 33(4): 383-388.
- [39] 权冬梅. 慢性乙型肝炎代表证候代谢组学研究进展[J]. 中国现代医生, 2018, 56(33): 165-168.

(责任编辑: 吴凌, 李海霞)