

# 乙型肝炎病毒-代谢相关脂肪性肝病共病患者脂质代谢紊乱与口腔微生物组及代谢产物变化相关

张晶晶<sup>1</sup>, 冯松<sup>2</sup>, 张达利<sup>1</sup>, 薛剑<sup>3</sup>, 周超<sup>1</sup>, 刘鹏程<sup>1</sup>, 付双楠<sup>1</sup>, 宫嫚<sup>1</sup>, 冯卉<sup>2</sup>, 张宁<sup>1</sup>

中国人民解放军总医院<sup>1</sup>肝病医学部,<sup>2</sup>肿瘤医学部超声诊断科,<sup>3</sup>心血管病医学部,北京 100039

**摘要:**目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)感染对代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)患者口腔微生态及代谢物的影响,并分析其潜在机制。方法 纳入2023年11月~2024年1月本院就诊的单纯MAFLD患者(48例)和合并慢性乙型肝炎患者[MAFLD+慢性乙型肝炎病毒性肝炎(CHB)组,47例],采集空腹舌苔样本,结合16S rDNA高通量测序与非靶向代谢组学技术,对比菌群结构及代谢物差异,通过相关性分析和功能注释探讨其与临床指标的关联及生物学通路。结果 合并CHB组空腹血糖、总胆固醇(TC)、谷氨酰转氨酶(GGT)及脂肪肝程度均低于单纯MAFLD组( $P<0.05$ )。菌群分析显示,MAFLD+CHB组 *Patiscibacteria*(门水平)、*Hydrogenophaga* 和 *Absconditabacteriales*(属水平)丰度升高,*Megasphaera* 丰度降低( $P<0.05$ ),且差异菌群与TC、GGT、低密度脂蛋白等指标相关( $r=-0.68-0.75$ ,  $P<0.05$ )。代谢组学显示,合并CHB组469种代谢物上调(如脂质类、氨基酸类),2306种下调(如有机含氧化合物、苯丙素类),KEGG富集分析显示亚油酸代谢、甘油磷脂代谢通路异常激活( $P<0.01$ )。菌群-代谢物相关性分析显示,*Patiscibacteria*与脂质代谢物正相关,*Megasphaera*与脂肪酸代谢物负相关( $P<0.05$ ),共同影响糖脂代谢及氧化应激通路。结论 与单纯MAFLD患者相比,合并慢性HBV感染的MAFLD患者部分脂代谢指标及肝脏脂肪变程度较低,同时伴有口腔菌群结构及代谢谱的改变,具体机制尚待进一步研究。

**关键词:**乙型肝炎病毒;代谢相关脂肪性肝病;口腔微生态;代谢组学;脂代谢紊乱;口腔-肝脏轴

## Altered oral microbiome and metabolites are associated with improved lipid metabolism in HBV-infected patients with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease

ZHANG Jingjing<sup>1</sup>, FENG Song<sup>2</sup>, ZHANG Dali<sup>1</sup>, XUE Jian<sup>3</sup>, ZHOU Chao<sup>1</sup>, LIU Pengcheng<sup>1</sup>, FU Shuangnan<sup>1</sup>, GONG Man<sup>1</sup>, FENG Hui<sup>2</sup>, ZHANG Ning<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Senior Department of Hepatology, <sup>2</sup>Department of Ultrasound, Senior Department of Oncology, <sup>3</sup>Senior Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

**Abstract: Objective** To investigate the impact of hepatitis B virus (HBV) infection on oral microbiota and metabolites in patients with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) and the underlying mechanisms. **Methods** This prospective study was conducted in 47 MAFLD patients complicated with chronic hepatitis B (CHB) and 48 MAFLD patients without CHB enrolled from November, 2023 to January, 2024. Fasting tongue coating samples were collected from the patients for analyzing microbial community structures and metabolites using high-throughput 16S rDNA sequencing and non-targeted metabolomics techniques, and their associations with clinical indicators and biological pathways were explored using correlation analysis and functional annotation. **Results** The levels of fasting blood glucose, total cholesterol (TC), gamma-glutamyl transferase (GGT), and severity of fatty liver were all significantly lower in MAFLD+CHB group than in MAFLD group. Microbiota analysis showed that the abundances of *Patiscibacteria* (at the phylum level), *Hydrogenophaga*, and *Absconditabacteriales* (at the genus level) were significantly increased, while the abundance of *Megasphaera* was decreased in MAFLD+CHB group. The differential microbiota were significantly correlated with TC, GGT and low-density lipoprotein ( $r=-0.68-0.75$ ). Metabolomics analysis revealed that 469 metabolites (including lipids and amino acids) were upregulated and 2306 (including organic oxygen-containing compounds and phenylpropanoids) were downregulated in MAFLD+CHB group, for which KEGG enrichment analysis suggested abnormal activation of the linoleic acid metabolism and glycerophospholipid metabolism pathways. Correlation analysis between microbiota and metabolites indicated that *Patiscibacteria* and *Megasphaera*, which were positively correlated with lipid metabolites and negatively with fatty acid metabolites, respectively, jointly affected glycolipid metabolism and oxidative stress pathways. **Conclusion** Compared to patients with MAFLD alone, MAFLD patients with concurrent chronic HBV infection showed lower levels in some lipid metabolism indicators and the degree of hepatic steatosis, accompanied by alterations in oral microbiota structure and metabolic profiles. The precise mechanisms involved require further investigation to be fully elucidated.

**Keywords:** hepatitis B virus; metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; oral microbiota; metabolomics; lipid metabolism disorders; oral-liver axis

收稿日期:2024-12-15

基金项目:北京市自然科学基金—海淀原始创新联合基金(L222134)

作者简介:张晶晶,主治医师,E-mail: zt2230224@126.com;冯松,主治医师,E-mail: flying-1984@163.com;张晶晶、冯松共同为第一作者

通信作者:张宁,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,E-mail: zhangning198191@sina.com;冯卉,博士,副主任医师,E-mail: fenghui810@126.com

随着现代生活方式与饮食习惯的变迁,肥胖、2型糖尿病(T2DM)及代谢综合征的发病率持续攀升,代谢相关性脂肪性肝病(MAFLD)也跃升为全球最为普遍的慢性肝病之一<sup>[1]</sup>。MAFLD相关的肝硬化、肝癌等晚期肝病以及肝外肿瘤的发病率亦显著增长<sup>[2,3]</sup>。从其命名由非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)向MAFLD乃至代谢

功能障碍相关的脂肪变性肝病(MASLD)的演变中,不难发现对代谢紊乱逐渐重视,且诊断标准更为包容与非排他性<sup>[4,5]</sup>。乙型肝炎病毒(HBV)感染仍是全球公共卫生领域的一大挑战,尽管全球范围内已大力推广HBV疫苗接种与抗病毒疗法,但HBV感染仍呈地方性流行态势<sup>[6,7]</sup>。鉴于NAFLD与慢性乙型病毒性肝炎(CHB)与纤维化进展、肝硬化及肝细胞癌的发展密切相关,这两种疾病的共患现象引起了广泛关注。然而,NAFLD与HBV感染之间的确切相互作用至今仍未阐释清楚<sup>[8]</sup>。

目前关于脂肪肝和乙型肝炎相互影响的研究结论不一,有研究显示在未接受治疗的HBeAg阴性CHB患者中,合并MASLD与更高的HBsAg血清清除率和血清转换率相关,这提示代谢功能障碍可能对CHB的功能性治愈具有正面叠加效应<sup>[9]</sup>。另一项包含57385例CHB和慢性丙型肝炎患者的全国性队列研究发现,脂肪肝与肝细胞癌(HCC)发生率和死亡率显著相关。伴随轻度脂肪肝的患者HCC风险增加50%,而重度脂肪肝患者的风险则增加至88%<sup>[10]</sup>。既往感染HBV的NAFLD患者纤维化程度显著加剧,提示这两种病因的叠加可能有促进纤维化进展的作用<sup>[11]</sup>。HBV感染者的肝脏微生物组与非感染者存在显著差异,HBV感染者的肝脏微生物组多样性较低,且某些有益菌的丰度显著下降,这可能促进了脂肪肝的发生和进展<sup>[12]</sup>。

肠道-肝脏轴的双向调控机制在维持胃肠道健康与疾病状态中扮演着关键角色,通过环境与宿主介体发挥重要作用。营养物质、微生物抗原、代谢物及胆汁酸等因子可调节肠道与肝脏的代谢及免疫反应,而这些反应又反过来影响微生物群落的结构与功能。在NAFLD患者中,肠道微生物生态失衡与疾病的进展密切相关<sup>[13]</sup>。与健康个体相比,NAFLD患者肠道中*Proteobacteria*、*Escherichia*及*Dorea*的相对丰度显著增加,而*Ruminococcaceae*、*Anaerospacter*、*Coprococcus*、*Eubacterium*、*Faecalibacterium*及*Prevotella*的丰度则显著降低<sup>[14]</sup>。值得注意的是,HBV感染会进一步影响NAFLD患者的肠道菌群分布,有研究表明合并HBV感染的NAFLD和糖尿病患者肠道中*Faecalibacterium*物种的丰度降低,而*Megasphaera*的丰度增加<sup>[15]</sup>。菌群的变化可诱发代谢物质及免疫状态的改变,从而影响疾病进程,尽管其具体机制尚待深入探索。

口腔微生物群的失调与慢性肝病的发生和发展也密切相关,口腔内的病原菌可以通过血液循环进入肝脏,导致肝脏的炎症反应,进而加重肝脏疾病的进展<sup>[16]</sup>,口腔健康较差的患者更容易发展为非酒精性脂肪肝病(NAFLD)和肝纤维化<sup>[17]</sup>。然而,HBV感染对MAFLD患者口腔微生态的影响尚未阐明。本研究通过多组学联合分析,揭示HBV感染对MAFLD患者口腔微生态

及代谢物的调控作用,为探索肝病跨器官交互机制提供新视角。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

前瞻性收集2023年11月~2024年1月于解放军总医院诊断为MAFLD的患者,同时存在HBsAg阳性,HBVDNA<400 IU/mL归为合并HBV感染组(MAFLD+CHB)。该研究获得解放军总医院伦理委员会批准(伦理批号:KY-2033-2-4-1),所有患者签署知情同意书。

### 1.2 诊断标准及纳入、排除标准

MAFLD诊断标准参考2020年欧洲肝病学会发布的国际标准<sup>[18]</sup>,该标准与2020年亚太肝病研究学会标准一致且更加细化<sup>[19]</sup>,具体诊断标准:影像学或肝脏病理的基础上发现脂肪病变大于5%,并至少符合以下条件中的一项:体质量指数(BMI)≥23 kg/m<sup>2</sup>;患有2型糖尿病;体质量正常或偏瘦者,至少存在两种代谢风险异常:腰围男性≥90 cm,女性≥80 cm;血压≥130/85 mmHg或正接受高血压治疗;血浆甘油三酯(TG)≥1.70 mmol/L或正接受降脂药治疗;血浆高密度脂蛋白胆固醇,男性<1.0 mmol/L,女性<1.3 mmol/L,或正接受降低胆固醇药物治疗;糖尿病前期,即空腹血糖5.6~6.9 mmol/L,或餐后2 h血糖时7.8~11.0 mmol/L,或糖化血红蛋白HbA1c 5.7%~6.4%;胰岛素抵抗评分的稳态模型评估≥2.5;血浆高敏C反应蛋白水平>2 mg/L。

纳入标准:年龄18~75岁;HBV感染超过6个月,病情稳定(ALT/AST<3倍正常值上限);近2周末口服中药/中成药以及抗生素;签署知情同意书同意加入本研究的患者。排除标准:合并肝硬化、恶性肿瘤以及妊娠期或哺乳期女性。本研究通过超声影像诊断脂肪肝及其程度,由两名高年资超声专业医生同时判断得出结果。

### 1.3 临床信息收集

基线信息:身高、体质量、腰围、合并疾病等;化验指标:血常规、肝功、肾功、血糖、血脂、甲状腺功能、心肌酶、CRP、糖化血红蛋白、嗜肝病毒标记物等。影像学信息:腹部B超,肝脏弹性监测。

### 1.4 舌苔标本采集

收集晨起空腹的舌苔样本,使用舌苔拭子将舌头从根部刮到尖端5次,将拭子放入装有1 mL磷酸缓冲盐水(PBS)的无RNase Eppendorf管中,搅拌拭子,重复2次确保舌苔充分采集。将试管在5000×g下离心5 min。上清液和沉淀物分别保存在无菌试管中,并在-80℃下储存。

### 1.5 16s rDNA测序

通过CTAB法提取样本总DNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测质量后,使用由上海百趣生物

医学科技有限公司合成的特异性引物 341F (5'-CC TACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACH VGGGTATCTAATCC-3') 靶向扩增 16S rRNA 基因 V3-V4 区(反应体系含 Phusion Hot Start Mix, 循环条件为 98 °C 预变性 30 s, 32 个循环的 98 °C 10 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s, 终延伸 72 °C 10 min); 扩增产物经 AMPure XT 磁珠纯化、Qubit 定量及凝胶电泳验证后, 使用 Agilent 2100 生物分析仪和 Illumina 文库定量试剂盒评估文库质量(浓度 $\geq 2$  nmol/L), 合格文库经变性后上机进行 2 $\times$ 250 bp 双端测序(NovaSeq 6000 SP 试剂盒)。生物信息分析包括: Cutadapt 去除接头、FLASH 拼接序列、fqtrim 过滤低质量读段(窗口平均质量 $< 20$ , 长度 $\geq 100$  bp)、Vsearch 去嵌合体, DADA2 去噪生成 ASV, 基于 SILVA 数据库(v138)进行物种注释, 并通过 PICRUSt2 预测功能通路。实验全程设置超纯水阴性对照, 数据经严格质控(如嵌合体过滤、单例 ASV 剔除), 确保结果可靠性。V3-V4 区选择基于其高分类分辨率及对口腔菌群的覆盖度, 双端测序策略提高了序列拼接准确性。

#### 1.6 非靶向代谢组学检测

采用基于 LC-MS/MS 系统结合四极杆-静电场轨道阱 Orbitrap 质谱仪(Thermo Fisher Scientific)的技术对人舌苔拭子样本进行代谢组学检测。样本处理时, 先离心取 100  $\mu$ L 上清液旋干, 用含同位素标记内标的提取液(甲醇:乙腈:水 = 2:1:1 (V/V))复溶, 经涡旋混匀、超声、静置、离心后取上清上机检测, 并将所有样品等量上清混合成质量控制(QC)样品一同检测。上机检测使用 Vanquish 超高效液相色谱仪, 通过特定色谱柱对目标化合物进行色谱分离, Orbitrap Exploris 120 质谱仪在控制软件下进行一级、二级质谱数据采集。

#### 1.7 统计学分析

计量资料用均数 $\pm$ 标准差(正态分布)或中位数(四分位间距)(非正态分布)表示, 组间比较采用 *t* 检验或非参数检验; 计数资料用百分比表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。舌苔微生物分析包括数据拆分、拼接和过滤、DADA2 去噪、多样性分析、物种注释、差异分析和高级分析等, 方法参考文献[20]。舌苔代谢组学分析包括对原始数据进行偏离值过滤、缺失值过滤、缺失值填补和数据标准化处理, 接着运用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等多元变量统计分析, 结合 *t* 检验等筛选差异代谢物, 再对差异代谢物进行层次聚类分析、Box-plot 分析、相关性分析等多种可视化分析, 并利用 KEGG 数据库进行功能注释和富集分析, 以探究其参与的生物学通路。差异性比较、小提琴图、PCoA 分析、LeFse 分析、热图、相关性分析等, 使用 R-3.4.4 软件。PICRUSt2 软件用于基于标记基因序列来预测功能丰度。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料比较

本研究共纳入 95 例符合 MAFLD 诊断标准的患者, 其中单纯 MAFLD 组 48 例, MAFLD+CHB 组 47 例。两组在年龄、性别、BMI、腰围以及合并疾病的差异无统计学意义, 且多数血液学指标差异亦无统计学意义。与单纯 MAFLD 组相比, MAFLD+CHB 组在空腹血糖水平、谷氨酰转氨酶(GGT)、总胆固醇水平以及甘油三酯与葡萄糖比值方面均较低( $P < 0.05$ ), 经超声诊断的脂肪肝程度也较轻。通过计算天冬氨酸氨基转移酶与血小板比值指数(APRI)及纤维化-4 指数(FIB-4), 结果显示两组在纤维化程度上的差异并无统计学意义(表 1)。

MAFLD+CHB 组 8 例患者 HBVDNA 弱阳性 ( $< 400$  IU/mL), 其余均阴性, 有 4 例未抗病毒治疗, 其余 4 例接受一线口服抗病毒药治疗; HBVDNA 阴性的 39 例患者接受一线抗病毒药治疗。

### 2.2 两组患者舌苔差异菌群分析

2.2.1 序列聚类分析 对两组患者的舌苔标本进行 16S rDNA V3-V4 区基因片段的扩增, 扩增产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示片段大小 550~650 bp。随后对原始序列进行过滤, 并在相似度为 100% 的水平上对过滤后的序列进行聚类分析, 共获得 6058 个扩增子序列变体, 以及 4 332 061 个高质量序列。

2.2.2 多样性分析 相较于单纯 MAFLD 患者, 合并 HBVDNA 感染的患者舌苔菌群多样性呈现出下降的趋势, 然而该差异无统计学意义(图 1A~C)。PCoA 结果显示, 两组在 Beta 多样性层面存在差异性(图 1D)。

2.2.3 物种丰度注释 基于物种相对丰度表, 选取在各分类水平上相对丰度排名前 30 的群落组成数据, 依据分类单元的丰度分布特征或样本间的相似程度进行聚类分析。根据聚类结果, 对分类单元和样本分别进行排序, 通过热图形式呈现。在门水平上, 表达丰度较高的优势菌主要包括 *Proteobacteria*、*Bacteroidota*、*Firmicutes*、*Patescibacteria*、*Fusobacteriota*、*Actinobacteriota* 以及 *Dependentiae* 等(图 1E)。在属水平上, *Prevotella\_7*、*Veillonella*、*Neisseria*、*Streptococcus* 及 *Fusobacterium* 等呈现出较高的表达丰度(图 1F)。

2.2.4 差异性分析 在门水平上, 两组间存在显著差异的菌群包括候选门 *Patescibacteria*、梭杆菌门和 *Dependentiae*(图 2A)。在属水平上, 差异最显著的 5 种菌群依次为隐匿杆菌目 *Absconditabacteriales*、*Megasphaera*、*Hydrogenophaga*、双歧杆菌属和埃希-志贺氏菌属(图 2B)。进一步采用结合秩和检验与线性判别分析的 LeFse 分析结果显示, 与单纯 MAFLD 组相比, 合并 HBV 感染组中 *Patescibacteria*、*Absconditabacteriales* 和 *Hydrogenophaga* 的丰度升高, 而 *Megasphaera* 的丰度则降低。

表1 患者基线指标及人口学特征

Tab.1 Baseline demographic and clinical characteristics of the enrolled patients

Indicator	MAFLD (n=48)	MAFLD+CHB (n=47)	Total (n=95)	P
Degree of steatosis				
Mild	15 (31.3%)	31 (66.0%)	46 (48.4%)	0.0179
Medium	26 (54.2%)	14 (29.8%)	40 (42.1%)	
Severe	7 (14.6%)	2 (4.3%)	9 (9.5%)	
Age (years, Mean±SD)	46.8±11.2	46.6±8.03	46.7±9.70	0.976
Gender (Male)	33 (68.8%)	35 (74.5%)	68 (71.6%)	0.826
BMI (Mean±SD)	26.7±5.02	27.5±2.98	27.1±4.14	0.326
Waist (cm)	93.4±10.3	97.2±9.98	95.3±10.3	0.305
Hypertension	12 (25.0%)	9 (19.1%)	21 (22.1%)	0.79
T2DM	10 (20.8%)	3 (6.4%)	13 (13.7%)	0.123
CHD	3 (6.3%)	2 (4.3%)	5 (5.3%)	0.910
ALT (U/L)	51.6±39.8	38.7±22.0	45.2±32.7	0.586
AST (U/L)	40.7±38.2	30.3±12.7	35.6±28.9	0.221
ALP (U/L)	90.2±26.0	78.7±20.8	84.5±24.2	0.0975
GGT (U/L)	64.8±52.9	35.2±16.9	50.1±42.0	0.00116
Glucose (mmol/L)	6.77±1.91	5.79±1.45	6.28±1.76	<0.001
TG (mmol/L)	2.80±2.84	1.89±0.835	2.35±2.14	0.215
TC (mmol/L)	5.07±0.989	4.62±0.703	4.85±0.885	0.046
HDL (mmol/L)	1.18±0.246	1.12±0.235	1.15±0.242	0.541
LDL (mmol/L)	3.40±0.772	3.24±0.603	3.32±0.695	0.568
Apo-A1 (g/L)	1.23±0.206	1.18±0.191	1.21±0.199	0.419
Apo-B (g/L)	0.935±0.237	0.867±0.149	0.901±0.201	0.274
Lp-a (mg/L)	113±177	149±222	131±200	0.458
APRI	0.579±1.06	0.411±0.297	0.496±0.783	0.609
FIB-4	1.37±1.47	1.37±0.972	1.37±1.24	0.862

BMI: Body mass index; T2DM: Type 2 diabetes Mellitus; CHD: Coronary heart disease; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; TG: Total triglycerides; TC: Total cholesterol; GGT: Gamma glutamyl transferase; ALP: Alkaline phosphatase; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; Apo-A1: Apolipoprotein A1; Apo-B: Apolipoprotein B; Lp-a: Lipoprotein; APRI: Aspartate-to-platelet ratio index; FIB-4: Fibrosis-4 index. MAFLD: Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; CHB: Chronic hepatitis B.

2.2.5 差异菌群的相关性分析 相关性分析显示, *Patescibacteria* 与谷氨酰转移酶、总胆固醇、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶负相关 ( $P<0.05$ , 图 3A); *Absconditabacteriales* 与碱性磷酸酶、谷氨酰转移酶、总胆固醇负相关, *Hydrogenophaga* 与血红蛋白正相关, 与总胆红素正相关, *Megasphaera* 与载脂蛋白 B、低密度脂蛋白、总胆固醇正相关 ( $P<0.05$ , 图 3B)。 *Hydrogenophaga* 与 *Megasphaera* 负相关, *Megasphaera* 与 *Absconditabacteriales* 负相关 ( $P<0.05$ , 图 3C)。

2.2.6 功能注释 基于 16S rDNA 基因测序数据, 对差异检验  $P<0.05$  的前 30 个功能进行 STAMP 分析, 与具体的 KEGG 功能通路进行映射, 显示两组差异菌主要参与了多种氨基酸及物质的降解, 包括缬氨酸、亮氨酸、异亮

氨酸等人体必需的支链氨基酸、柠檬烯、萜品烯、香叶醇、氨基苯甲酸、赖氨酸的降解以及丁酸和脂肪酸的代谢, 合并 HBV 感染组上述功能路径中相关菌群丰度含量更高(图 4)。

### 2.3 两组患者舌苔差异代谢物分析

对符合以下标准的样本进行非靶向代谢组学的分析(MAFLD 组、MAFLD+CHB 组各 37 例): 代谢物提取浓度  $\geq 10$  ng/ $\mu$ L; QC 样本的峰面积相对标准偏差 (RSD)  $<30\%$ ; 色谱峰保留时间漂移  $<0.1$  min。差异代谢物的筛选基于多重校正 (FDR  $<0.05$ ) 和 VIP  $>1.0$  的严格标准, 最大程度降低了样本量差异对结果的影响。

2.3.1 两组患者舌苔非靶向代谢组学的变化 OPLS-DA 显示两组样本在代谢物层面的存在差异(图 5A), 火

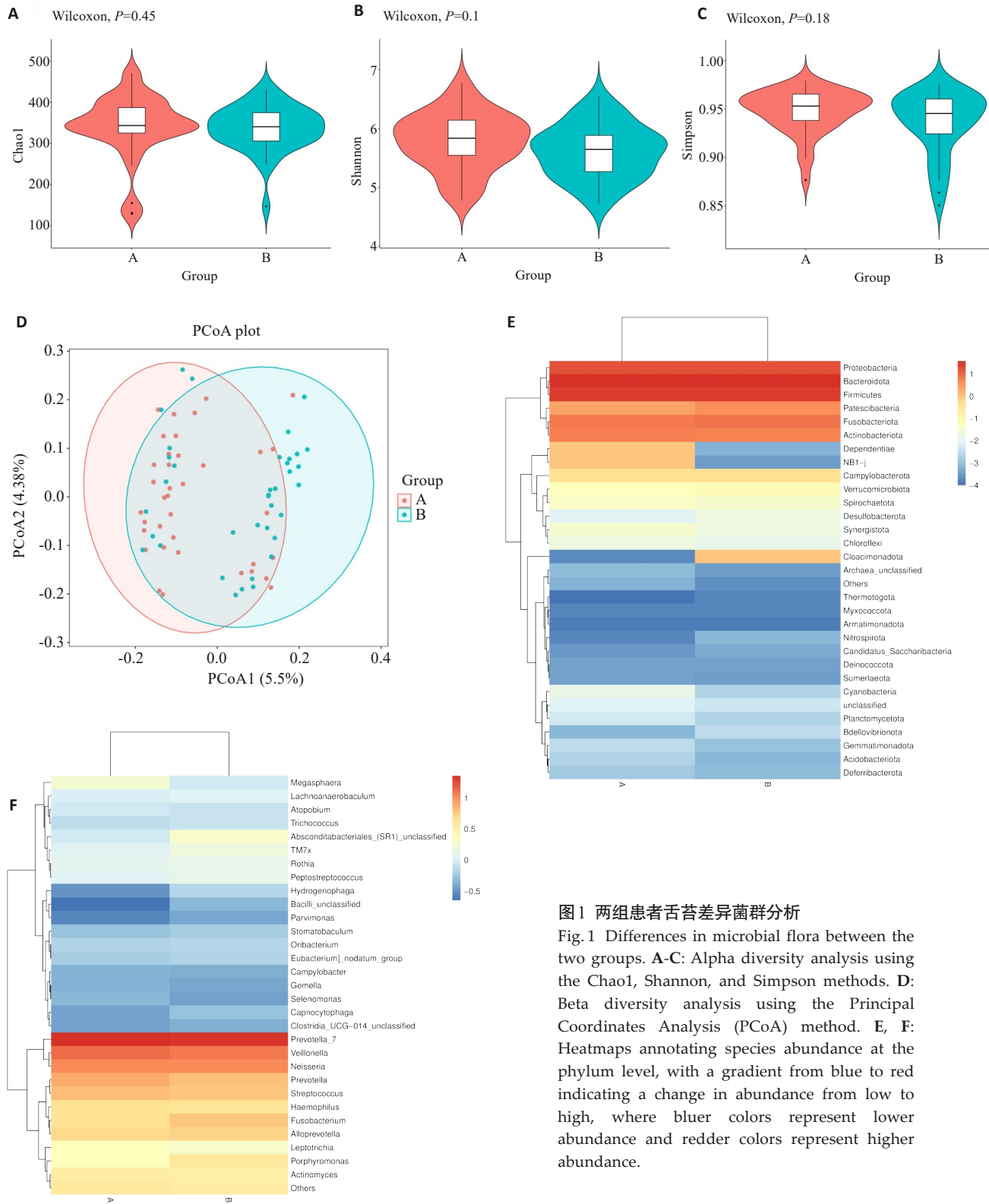


图1 两组患者舌苔差异菌群分析

Fig. 1 Differences in microbial flora between the two groups. A-C: Alpha diversity analysis using the Chao1, Shannon, and Simpson methods. D: Beta diversity analysis using the Principal Coordinates Analysis (PCoA) method. E, F: Heatmaps annotating species abundance at the phylum level, with a gradient from blue to red indicating a change in abundance from low to high, where bluer colors represent lower abundance and redder colors represent higher abundance.

山图显示与单纯MAFLD组相比,合并CHB组舌苔中检测到上调的代谢物有469种,下调的代谢物达2306种(图5B),进一步筛选出变量重要性投影(VIP)和log<sub>2</sub> Fold Change(|FC|>1)等指标上表现突出且排名前10的上调和下调代谢物(图5C),合并CHB组多种代谢物上调,其中包括脂质及类脂质分子、氨基酸和肽类、生物碱类及有机氧、有机杂环等,下调代谢物主要脂质及

类脂质分子及有机氧、有机杂环等,这些分子与代谢、炎症、免疫及肿瘤形成有关。菌群和代谢物的相关性分析提示上调代谢物基本与 *Patescibacteria*、*Absconditabacteriales*、*Hydrogenophaga* 正相关,与 *Megasphaera* 负相关,反之亦然(图6)。

2.3.2 舌苔非靶向代谢组学通路富集情况分析 KEGG 通路富集差异丰度得分结果显示(图5D),合并HBV感

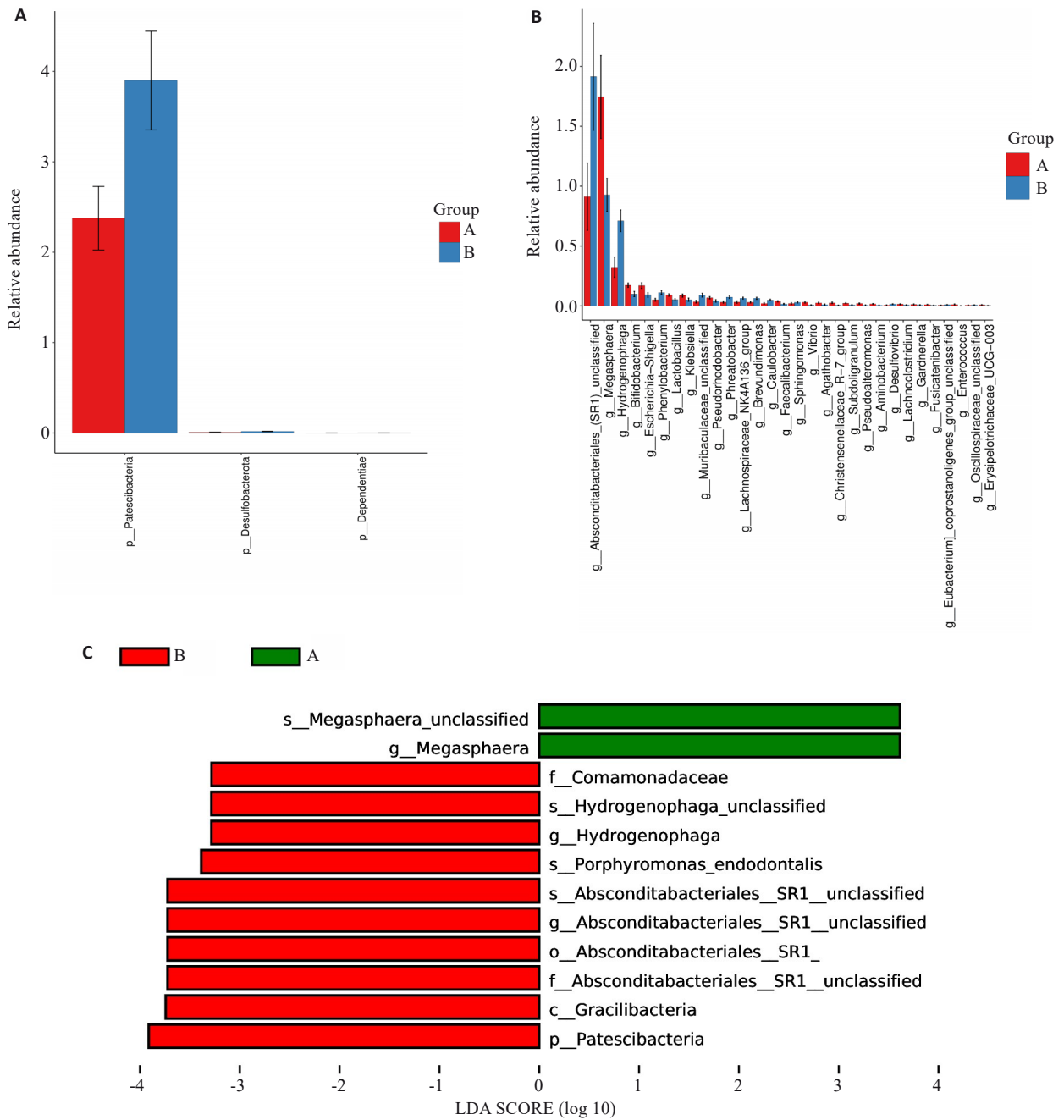


图2 差异性分析

Fig.2 Analysis of variances. A: Differences at the phylum level. B: Differences at the genus level. C: LEfSe analysis at all levels. Group A: MAFLD; Group B: MAFLD+CHB.

染组显著富集且总体上调的通路包括:核苷酸代谢、嘧啶代谢及前列腺癌通路,显著富集且下调的通路有半胱氨酸和蛋氨酸代谢、果糖和甘露糖代谢。

### 3 讨论

本研究探讨单纯 MAFLD 与合并低病毒载量或病毒阴性的 HBV 感染的 MAFLD 患者在口腔菌群和代谢物方面的差异,通过多组学联合分析,揭示了 MAFLD-CHB 组的空腹血糖、总胆固醇、GGT、甘油三酯/葡萄糖指数及脂肪肝程度显著降低,这一发现与以往研究一致<sup>[9]</sup>,但本研究进一步从口腔微生态视角揭示了潜在的

跨器官调控机制。HBV 对代谢相关性脂肪肝的脂类代谢的正向调节作用与另一研究结论也相似<sup>[21]</sup>,该研究指出 HBV 感染会增加肝纤维化的总体风险,但不论是与健康对照组比较还是与合并 MAFLD 组比较,HBV 感染组的代谢指标如总胆固醇、甘油三酯、血糖等水平均偏低,遗憾的是该研究未收集 HBV 病毒载量及抗 HBV 治疗的相关数据。

分析口腔微生态发现,合并 CHB 组中 *Patescibacteria*、*Absconditabacteriales* 以及 *Hydrogenophaga* 的丰度显著升高,而 *Megasphaera* 的丰度则显著下降。相关性分析进一步揭示了这些菌群与生化指标之间的

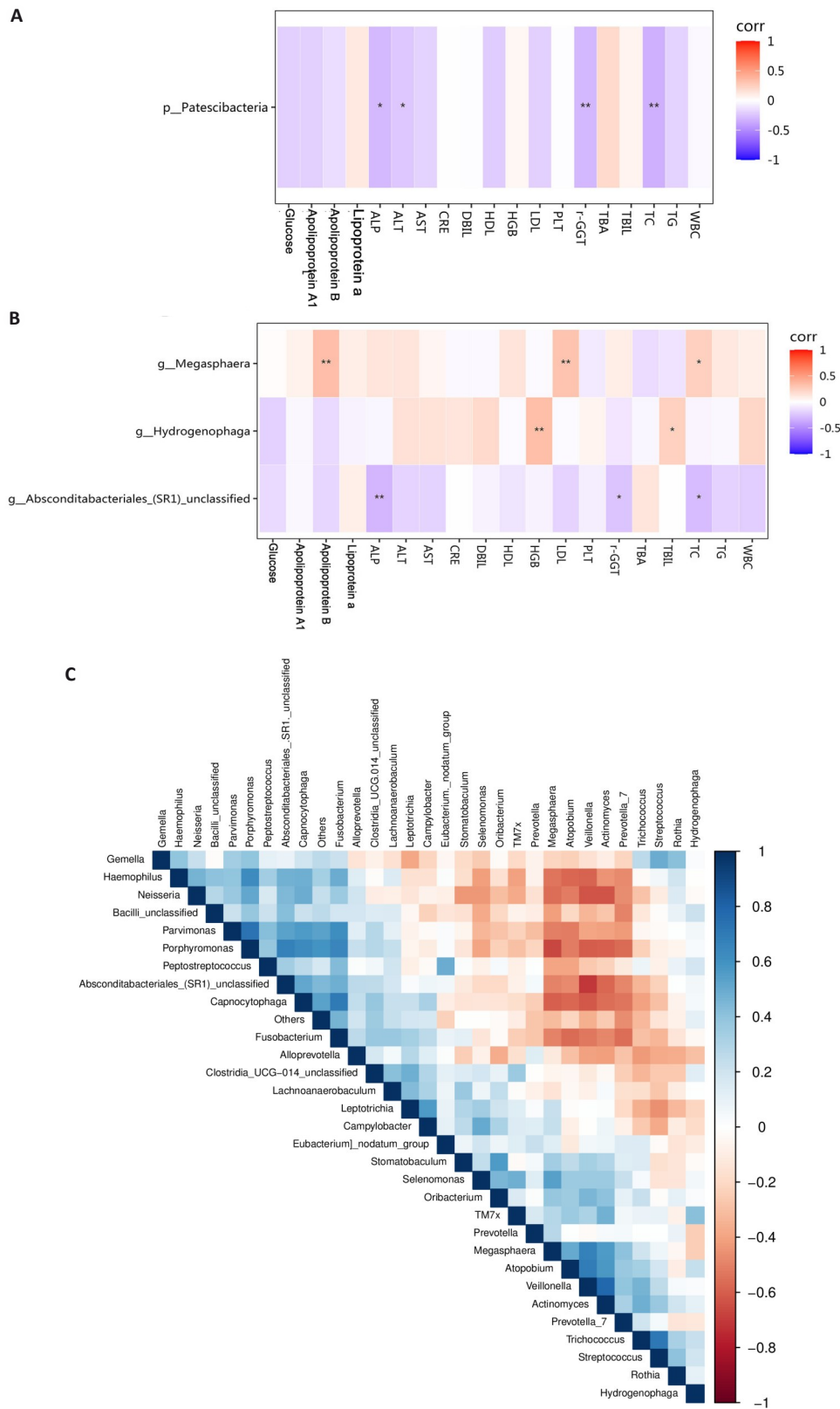


图3 差异菌群的相关性分析

Fig. 3 Correlation analysis of different bacterial groups. **A**: Correlation analysis between phylum-level bacteria and blood indicators. **B**: Correlation analysis between genus-level bacteria and biochemical indicators. **C**: Correlation analysis among differentially abundant genus-level bacteria. Group A: MAFLD; Group B: MAFLD+CHB. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

关联; *Patescibacteria* 与谷氨酰转移酶、总胆固醇呈负相关关系; *Absconditabacteriales* 同样与谷氨酰转移酶、总胆固醇呈负相关; 而 *Megasphaera* 则与载脂蛋白 B、

低密度脂蛋白、总胆固醇呈正相关。 *Patescibacteria* 作为一种新发现的细菌门, *Patescibacteria* 在小鼠的溃疡性结肠炎组中丰度下降, 中药及柳氮磺吡啶组丰度上升,

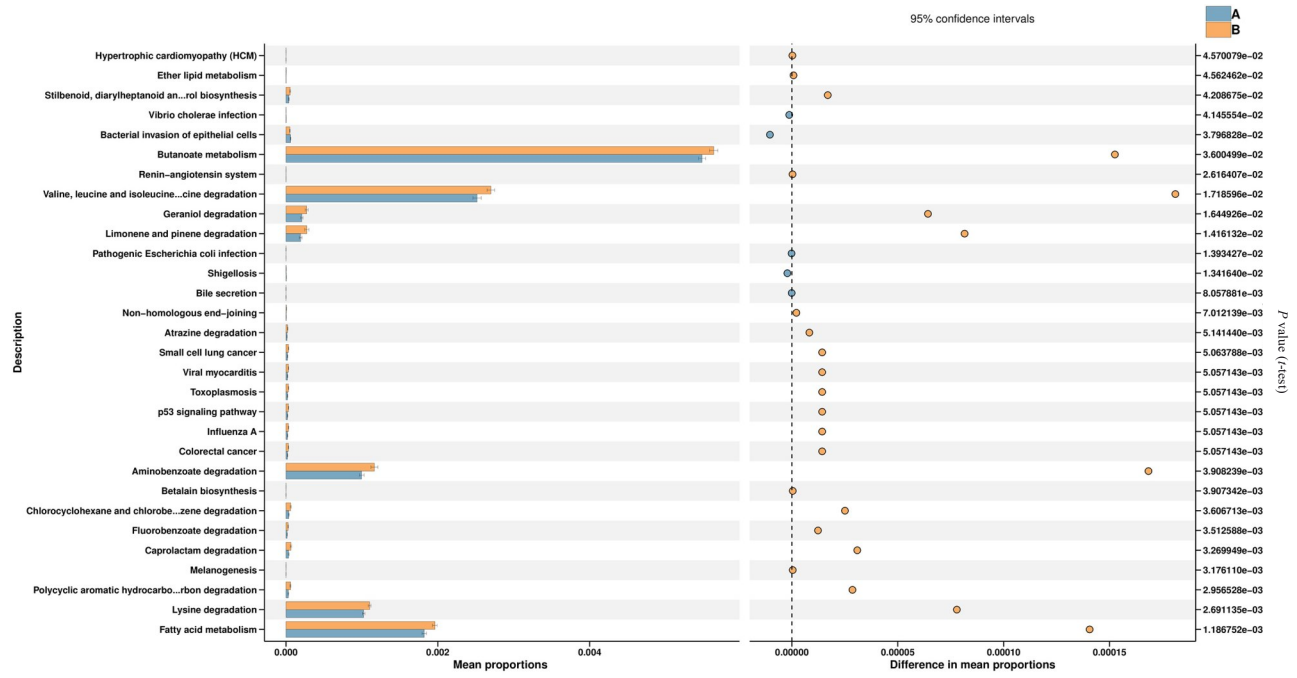


图4 两组差异菌的KO功能注释

Fig.4 KO functional annotation of differentially abundant bacteria between the two groups. Group A: MAFLD; Group B: MAFLD+CHB.

且其表达与IL-18、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6等验证因子密切相关<sup>[22]</sup>。针对*Abconditabacteriales*与人体健康的专门报道较少,研究提示健康人唾液中的*Abconditabacteriales*可被新型氟喹诺酮类药物拉舒氟沙星短暂下调,提示其可能是抗生素作用的靶点<sup>[23]</sup>。*Hydrogenophaga*一类重要的嗜水性细菌,广泛存在于多种环境中,研究提示室内空气微生物的*Hydrogenophaga*丰度升高与肺部疾病有关<sup>[24]</sup>。有研究报道*Megasphaera*与免疫性及代谢性疾病的相关,银屑病患者粪便该菌丰度升高,且与全身炎症以及肝功异常有关,该菌可能是银屑病关节炎患者肠道菌群与附着点炎和(或)指(趾)炎之间的一个关联因素<sup>[25]</sup>。*Megasphaera*是伴有胃肠道自主神经病变的2型糖尿病患者的特征菌属,可能参与细菌对上皮细胞的侵袭以及致病性大肠杆菌感染<sup>[26]</sup>。

代谢组学揭示合并CHB组脂质类及氨基酸类代谢物显著上调,而*Patescibacteria*与这些代谢物的正相关提示其可能通过降解复杂脂质生成游离脂肪酸,从而改善脂代谢紊乱。值得注意的是,*Hydrogenophaga*与芳香族氨基酸的正相关可能通过调节宿主BCAAs循环,增强胰岛素敏感性,这与MAFLD+CHB组空腹血糖水平降低一致。相反,*Megasphaera*的丰度降低与脂肪酸代谢物负相关,可能减少丁酸等促炎代谢物的产生,抑制炎症通路激活,进而缓解肝脏炎症。上述发现支持“口腔菌群-代谢物-肝脏”轴的存在,为HBV感染改善MAFLD提供了跨器官调控证据。基于上述多组学联

合分析结果,合并低病毒载量或经治HBV感染的MAFLD患者,其口腔菌群结构(如*Patescibacteria*、*Hydrogenophaga*等丰度升高,*Megasphaera*降低)及代谢物谱(脂质、氨基酸类代谢物上调)发生显著改变,且这些变化与血糖、血脂、肝脏酶学等代谢指标的较低水平及较轻的肝脏脂肪变性程度相关。这提示,慢性HBV感染或其相关的管理方式可能与MAFLD患者口腔微生态及代谢物功能的调节有关,进而影响其代谢表型,为“口腔-肝脏轴”在病毒-代谢共病中的潜在作用提供了初步证据。然而,该关联是否具有因果性及其临床意义仍需进一步研究验证。

基于KEGG通路富集差异分析,HBV感染组显著富集且总体上调的通路包括:核苷酸代谢、嘧啶代谢及前列腺癌通路,显著富集且下调的通路有半胱氨酸和蛋氨酸代谢、果糖和甘露糖代谢。HBV作为一种病毒,其在宿主细胞内的复制需要大量的核苷酸原料。因此,上调的核苷酸代谢和嘧啶代谢通路可能是为了满足HBV复制对核苷酸的需求。对于脂肪肝而言,肝脏细胞在脂肪堆积的情况下,可能也需要通过调整核苷酸代谢来维持细胞的基本功能和修复受损的DNA。在乙肝合并脂肪肝的情况下,半胱氨酸和蛋氨酸代谢下调,可能影响到肝脏内的甲基化平衡,进而影响基因表达调控和细胞膜的稳定性。此外,半胱氨酸是谷胱甘肽的重要组成成分,谷胱甘肽是肝脏内重要的抗氧化物质,该通路下调可能削弱肝脏的抗氧化能力,使肝脏更容易受到氧化应

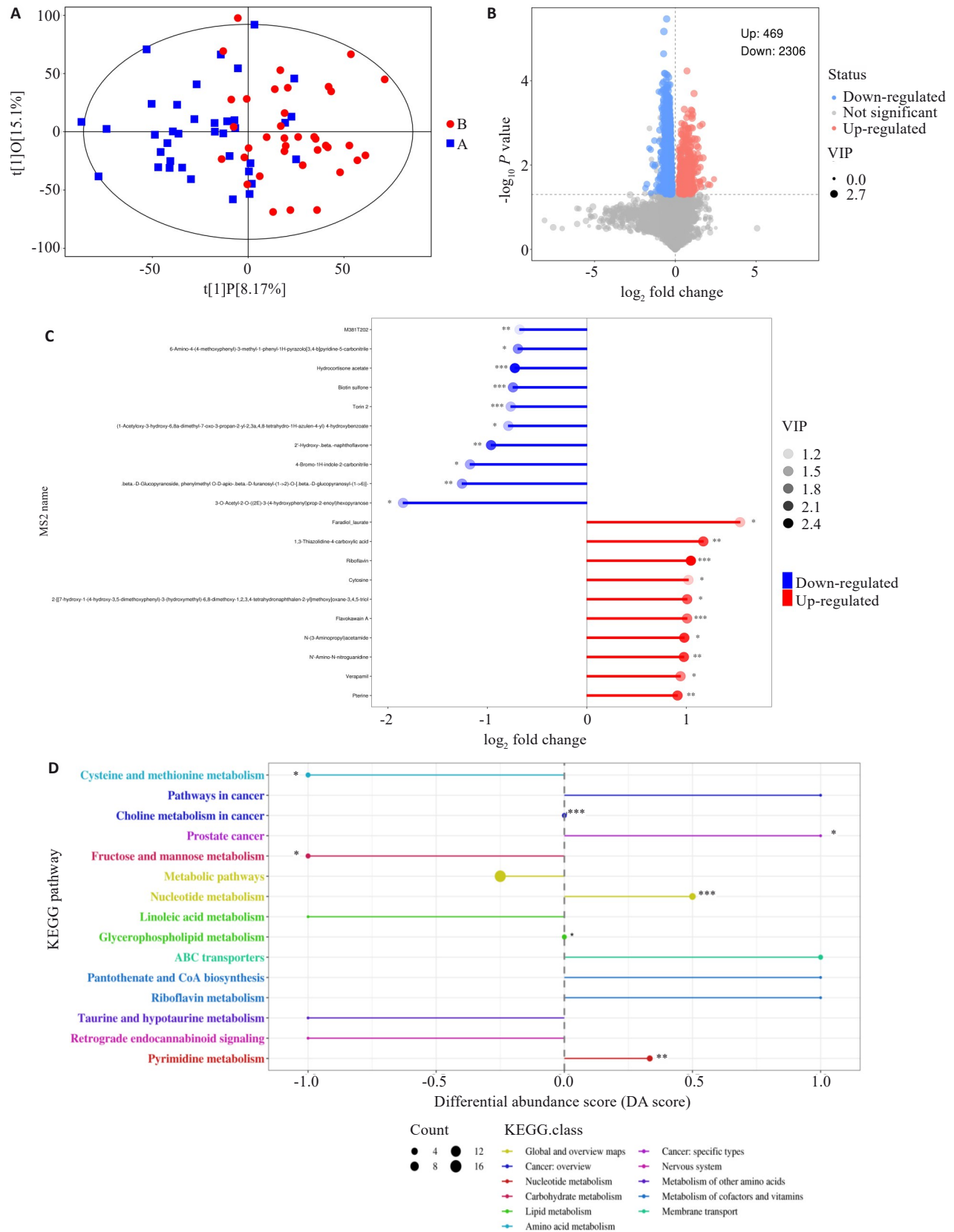


图5 两组差异代谢物分布情况及通路富集分析

Fig.5 Distribution and pathway enrichment analysis of differential metabolites between the two groups. **A:** Scatter plot showing the differences between the sample groups (OPLS-DA model). **B:** Volcano plot showing the overall distribution of metabolite differences between the two groups. **C:** The top 10 metabolites with the highest upregulation and downregulation fold after logarithmic transformation among the differential metabolites. **D:** Differential abundance scores of KEGG enrichment for differential metabolites between the two groups. DA Score of 1 indicates an upregulation trend in the expression of all annotated differential metabolites within that pathway, while -1 indicates a downregulation trend. The larger the dot, the greater the number of differential metabolites in that pathway. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

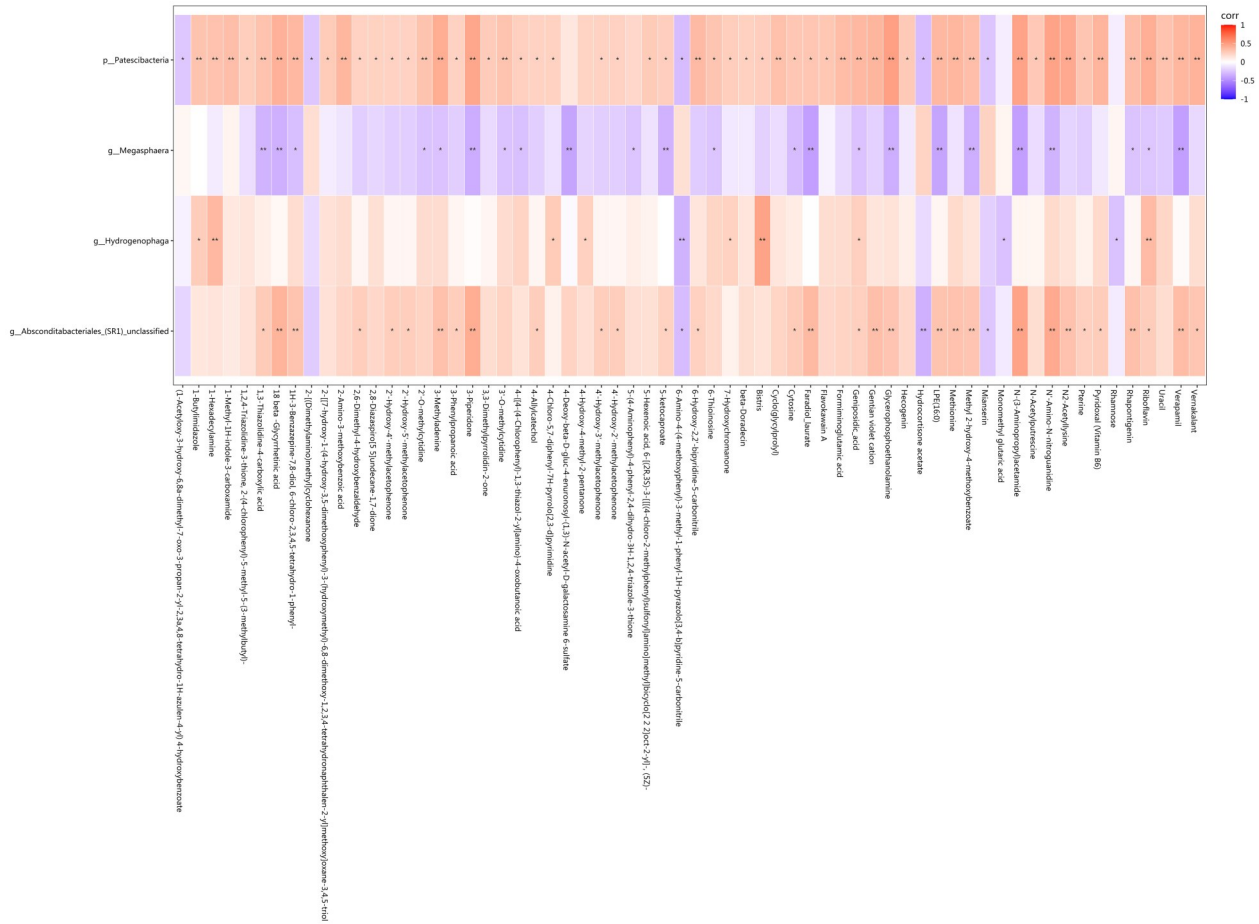


图6 差异菌和差异代谢物中相关性存在统计学差异的相关分析

Fig. 6 Correlation analysis showing statistical differences in the correlation between the differential bacteria and metabolites. Red represents positive correlation, blue represents negative correlation, and darker colors indicate stronger correlation. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

激损伤,这在乙肝和脂肪肝疾病进展中都可能起到重要作用。果糖和甘露糖是糖类代谢的一部分。在正常生理状态下,肝脏能够有效代谢果糖和甘露糖,为机体提供能量。然而,在合并HBV感染的脂肪肝患者中,这一代谢通路下调。一方面,HBV感染可能干扰了肝脏细胞对糖类代谢的调控机制,另一方面,脂肪肝状态下肝脏内脂肪堆积可能影响了糖代谢相关酶的活性或表达。这种下调可能导致肝脏对果糖和甘露糖的利用效率降低,影响能量供应,同时也可能影响相关糖蛋白和糖脂的合成,进而影响肝脏细胞的正常功能和信号传导<sup>[27-29]</sup>。而前列腺癌通路的显著富集可能与乙肝和脂肪肝引发的慢性炎症微环境以及细胞增殖调控紊乱有关,但这一通路两种疾病的确切联系还需要更多研究去揭示。

综上所述,本研究提示MAFLD患者合并稳定期的HBV感染时机体代谢状态与内环境存在差异,这种差异从口腔部位已经有所表现,在临床诊疗中应对这两类患者分别提供精细化管理,积极抗病毒治疗和系统的MAFLD治疗均是必要的。针对本研究的局限性和未

来可开展的研究分析如下:本研究仅纳入MAFLD患者(单纯组与合并CHB组),未设置健康对照组,因此对结果的诠释仅能体现HBV感染对MAFLD存在的可能影响,无法区分MAFLD本身的口腔菌群特征。后续研究需进一步完善健康对照组、单纯CHB组的检测,绘制比较健康人群、单纯MAFLD、单纯CHB以及MAFLD+CHB 4组间更加完整的菌群和代谢图谱。本研究合并HBV组中92%患者接受口服抗病毒治疗(如恩替卡韦、替诺福韦),已有研究提示抗病毒治疗可能对肠道微生态产生影响<sup>[30]</sup>,也有研究表明核苷类似物可能影响宿主细胞代谢通路,进而影响口腔上皮细胞能量代谢,同时调节全身免疫状态(如Th17/Treg平衡),间接改变口腔微环境<sup>[31]</sup>。本研究纳入的未接受抗病毒治疗的CHB患者比例较低(8%),导致难以通过亚组分析完全剥离药物效应与HBV感染本身的影响。这一局限性可能影响结果的解释,尤其是口腔菌群差异的归因(药物 vs 病毒),后续可开展抗病毒治疗前后的菌群及代谢分析,进一步细化单纯HBV感染及抗病毒治疗的影响;本文横

断面研究通过排除了近2周内使用抗生素及中药等可能对口腔微生态影响的因素,但影响患者的微生态的因素较多,例如饮食结构、生活习惯等,本研究入组时同时采集了患者的特殊生活习惯及特殊饮食嗜好,除个别偏食辣味及晚睡外,未发现有特殊异常的患者,吸烟及少量饮酒情况在两组占比较少,且两组对比无差异。因此,可以认为本研究结果主要与慢性HBV感染及其相关的治疗有关。后续将开展可控的动物实验以及扩大样本量的多时点的临床研究对本结果进行验证和深入分析。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

### 参考文献:

- [1] Younossi ZM, Wong G, Anstee QM, et al. The global burden of liver disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(8): 1978-91.
- [2] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) [J]. *J Hepatol*, 2024, 81(3): 492-542.
- [3] Thomas JA, Kendall BJ, El-Serag HB, et al. Hepatocellular and extrahepatic cancer risk in people with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2024, 9(2): 159-69.
- [4] De A, Bhagat N, Mehta M, et al. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) definition is better than MAFLD criteria for lean patients with NAFLD[J]. *J Hepatol*, 2024, 80(2): e61-2.
- [5] Yang A, Zhu X, Zhang L, et al. Transitioning from NAFLD to MAFLD and MASLD: consistent prevalence and risk factors in a Chinese cohort[J]. *J Hepatol*, 2024, 80(4): e154-5.
- [6] Danpanichkul P, Duangsonk K, Chen VL, et al. Global burden of HBV-related liver disease: primary liver cancer due to chronic HBV infection increased in over one-third of countries globally from 2000 to 2021 [J]. *Hepatology*, 2025, 29: 130945-58.
- [7] Wong RJ, Gish RG, Cheung R, et al. Low prevalence of vaccination or documented immunity to hepatitis a and hepatitis B viruses among individuals with chronic liver disease[J]. *Am J Med*, 2021, 134(7): 882-92.
- [8] Tourkochristou E, Assimakopoulos SF, Thomopoulos K, et al. NAFLD and HBV interplay-related mechanisms underlying liver disease progression[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 965548.
- [9] Huang SC, Su TH, Tseng TC, et al. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease facilitates hepatitis B surface antigen seroclearance and seroconversion[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2024, 22(3): 581-90. e6.
- [10] Kim MN, Han K, Yoo J, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma and mortality in chronic viral hepatitis with concurrent fatty liver[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2022, 55(1): 97-107.
- [11] Vassilopoulos S, Kalligeros M, Vassilopoulos A, et al. Impact of prior HBV, HAV, and HEV infection on non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Viral Hepat*, 2023, 30(8): 685-93.
- [12] Joo EJ, Cheong HS, Kwon MJ, et al. Relationship between gut microbiome diversity and hepatitis B viral load in patients with chronic hepatitis B [J]. *Gut Pathog*, 2021, 13(1): 65.
- [13] Tilg H, Adolph TE, Trauner M. Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(11): 1700-18.
- [14] Lang S, Schnabl B. Microbiota and fatty liver disease—the known, the unknown, and the future [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(2): 233-44.
- [15] Han W, Huang C, Ji Y, et al. Alterations in the gut microbiota and hepatitis-B-virus infection in southern Chinese patients with coexisting non-alcoholic fatty liver disease and type-2 diabetes mellitus [J]. *Front Med: Lausanne*, 2021, 8: 805029.
- [16] Lei Y, Li S, He M, et al. Oral pathogenic bacteria and the oral-gut-liver axis: a new understanding of chronic liver diseases [J]. *Diagnostics: Basel*, 2023, 13(21): 3324.
- [17] Chen TP, Yu HC, Lin WY, et al. The role of microbiome in the pathogenesis of oral-gut-liver axis between periodontitis and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Dent Sci*, 2023, 18(3): 972-5.
- [18] Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 202-9.
- [19] Eslam M, Fan JG, Yu ML, et al. The Asian Pacific association for the study of the liver clinical practice guidelines for the diagnosis and management of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease [J]. *Hepatol Int*, 2025, 19(2): 261-301.
- [20] Liu G, Li T, Zhu X, et al. An independent evaluation in a CRC patient cohort of microbiome 16S rRNA sequence analysis methods: OTU clustering, DADA2, and Deblur [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1178744.
- [21] Cheng YM, Hsieh TH, Wang CC, et al. Impact of HBV infection on clinical outcomes in patients with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease [J]. *JHEP Rep*, 2023, 5(9): 100836.
- [22] Gu H, Tian Y, Xia J, et al. Li-Hong Tang alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis by regulating NRF2/HO-1 signaling pathway and gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1413666.
- [23] Mukuda K, Inoue R, Takata M, et al. Temporal effects of lasefloxacin on human gut and salivary microbiota: Analysis using next-generation sequencing method [J]. *J Infect Chemother*, 2025, 31(1): 102483.
- [24] Zhao YT, Liu S, Wang WZ, et al. Associations of indoor airborne microbiome with lung function: evidence from a randomized, double-blind, crossover study of microbial intervention [J]. *Environ Sci: Processes Impacts*, 2024, 26(11): 2020-35.
- [25] Yunusbayev B, Bogdanova A, Nadyrchenko N, et al. Gut dysbiosis narrative in psoriasis: matched-pair approach identifies only subtle shifts correlated with elevated fecal calprotectin [J]. *Microbiol Spectr*, 2025, 13(1): e0138224.
- [26] Du Y, Neng Q, Li Y, et al. Gastrointestinal autonomic neuropathy exacerbates gut microbiota dysbiosis in adult patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 804733.
- [27] Badmus OO, Hillhouse SA, Anderson CD, et al. Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD):

- functional analysis of lipid metabolism pathways[J]. Clin Sci: Lond, 2022, 136(18): 1347-66.
- [28] Paulusma CC, Lamers WH, Broer S, et al. Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 201: 115074.
- [29] Li H, Xu QY, Xie Y, et al. Effects of chronic HBV infection on lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease: a lipidomic analysis [J]. Ann Hepatol, 2021, 24: 100316.
- [30] Shen Y, Wu SD, Chen Y, et al. Alterations in gut microbiome and metabolomics in chronic hepatitis B infection-associated liver disease and their impact on peripheral immune response[J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2155018.
- [31] Li XX, Wu S, Du Y, et al. Entecavir therapy reverses gut microbiota dysbiosis induced by hepatitis B virus infection in a mouse model [J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 56(1): 106000.
- [32] Albuquerque-Souza E, Sahingur SE. Periodontitis, chronic liver diseases, and the emerging oral-gut-liver axis[J]. Periodontol 2000, 2022, 89(1): 125-41.

(编辑:林 萍)