

HBV感染者精液HBV-DNA载量对子代垂直传播的影响

张荣莲 王梅颖 陈起燕 任坤海 修晓燕 邱丽茵 黄艳红

【摘要】 目的 探讨HBV感染者精液HBV-DNA载量对子代垂直传播的影响。方法 选择福建省妇幼保健院2009年8月至2011年11月初次产前检查孕妇(母)血清HBsAg阴性、丈夫(父)血清HBsAg阳性的138个家庭及其新生儿为研究对象。知情同意下收集孕妇血液、其夫血液和精液及分娩时新生儿脐带血,检测HBV血清学标志物(HBVM)、HBV-DNA。以脐带血HBV-DNA载量 $\geq 5 \times 10^2$ copies/ml为病例组,脐带血HBV-DNA载量 $< 5 \times 10^2$ copies/ml为对照组。结果 (1)新生儿脐带血HBV-DNA阳性率为34.8%(48/138)、HBsAg阳性率为28.3%(39/138),HBeAg阳性率为15.2%(21/138)。(2)父血清HBV-DNA阳性率为76.8%(106/138)、HBeAg阳性率为42.8%(59/138);精液HBV-DNA阳性率为21.0%(29/138)。(3)单因素分析显示,父血清HBV-DNA阳性、父血清HBeAg阳性、精液HBV-DNA阳性、父对乙型肝炎(乙肝)传播途径及预防方法、乙肝一级家族史为HBV垂直传播的危险因素($P < 0.05$)。(4)多因素分析显示,父血清HBV-DNA阳性、父HBeAg阳性、精液HBV-DNA阳性为HBV父婴垂直传播的危险因素,OR值(95%CI)分别为5.7(1.1~29.1)、4.2(1.7~10.0)、6.7(2.4~18.9)。(5)父血清HBV-DNA载量与精液HBV-DNA载量存在剂量反应关系。(6)ROC曲线分析表明,父血清HBV-DNA载量为 10^5 copies/ml、精液HBV-DNA载量为 10^3 copies/ml其预测的敏感度和特异度较高,是预测发生HBV垂直传播的分界点。结论 父血清HBV-DNA阳性、父HBeAg阳性、精液HBV-DNA阳性是HBV父婴垂直传播的危险因素;父血清HBV-DNA载量 $> 10^5$ copies/ml、精液HBV-DNA载量 $> 10^3$ copies/ml时,增加父婴HBV垂直传播的阳性率。

【关键词】 乙型肝炎病毒;垂直传播;病毒载量;精液;血液

Study on the relationship between semen HBV-DNA load and offspring-paternal-vertical-transmission of HBV Zhang Ronglian¹, Wang Meiyang², Chen Qiyang¹, Ren Kunhai¹, Xiu Xiaoyan¹, Qiu Liyin¹, Huang Yanhong¹. 1 Fujian Provincial Maternity and Child Health Hospital, Fuzhou 350001, China; 2 Quanzhou Women's and Children's Hospital

Corresponding author: Chen Qiyang, Email: 534086942@qq.com

This work was supported by grants from the Fujian Provincial Natural Science Foundation (No. 2011J01124) and the Fujian Provincial Medical Innovation of China (No. 2011-CXB-17).

【Abstract】 Objective To explore the relationship between HBV-DNA load and the offspring vertical transmission of HBV. **Methods** 138 families who had taken the examination between August 2009 and November 2011 but the HBsAg of the housewife was negative, were chosen as research objects. Blood from the couples and sperms from the husbands during pregnancy were followed and collected for detection on related indicators. Cord blood was sampled after delivery for HBVM and HBV-DNA quantification. Those with HBV-DNA load $\geq 5 \times 10^2$ copies/ml were chosen as cases while those $< 5 \times 10^2$ copies/ml were formed as controls, respectively. **Results** 1) The positive rates of HBV-DNA was 34.8% (48/138) in the neonatal cord blood while the positive rates of cord blood HBsAg and HBeAg were 28.3% (39/138) and 15.2% (21/138) respectively. 2) The positive rate of semen HBV-DNA was 21.0% (29/138) while the positive rates of paternal serum HBV-DNA and HBeAg were 76.8% (106/138) and 42.8% (59/138). 3) Among the positive ones on paternal serum HBV-DNA, paternal serum HBeAg, semen HBV-DNA, items as measures taken for HBV vertical

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.02.003

基金项目:福建省自然科学基金项目(2011J01124);福建省医学创新课题(2011-CXB-17)

作者单位:350001 福州,福建省妇幼保健院教学医院(张荣莲、陈起燕、任坤海、修晓燕、邱丽茵、黄艳红);泉州市妇幼保健院(王梅颖)

通信作者:陈起燕, Email: 534086942@qq.com

transmission and prevention on the fathers and the first class family histories on HBV appeared to be the risk factors for HBV paternal transmission ($P < 0.05$). 4) Data from Multivariate analysis showed that positivities on paternal serum HBV-DNA, paternal serum HBeAg and semen HBV-DNA were risk factors for HBV paternal transmission ($OR = 5.7, 95\% CI: 1.1-29.1; OR = 4.2, 95\% CI: 1.7-10.0; OR = 6.7, 95\% CI: 2.4-18.9$). 5) Dose-response relationships were seen between levels of paternal serum HBV-DNA load and cord blood HBV-DNA load, between levels of paternal serum HBV-DNA load and semen HBV-DNA load, between levels of semen HBV-DNA load and cord blood HBV-DNA load. 6) Results from the analysis on ROC curve showed that paternal serum HBV-DNA load level (10^5 copies/ml) and semen HBV-DNA load level (10^3 copies/ml) were better demarcation points to forecast the occurrence of paternal transmission of HBV, because of the better sensitivity and specificity they had. **Conclusion** Items as positives on paternal serum HBV-DNA, paternal serum HBeAg and semen HBV-DNA were risk factors for HBV paternal transmission. When paternal serum HBV-DNA load $> 10^5$ copies/ml and semen HBV-DNA load $> 10^3$ copies/ml appeared, the positive rate of HBV paternal transmission would increase.

【Key words】 Hepatitis B virus; Vertical transmission; Virus load; Semen; Blood

HBV 垂直传播可分母婴和父婴垂直传播^[1]。有研究认为, HBV 通过精细胞传播的父婴传播, 是真正意义上的垂直传播。迄今为止, 国内外学者对 HBV 父婴垂直传播的研究已开展 30 余年, 但有些问题尚未清晰。为此本研究分析 138 名孕妇配偶的精液 HBV-DNA 载量与新生儿脐带血 HBV-DNA 载量(阳性率), 探讨 HBV 父婴传播的感染情况。

对象与方法

1. 研究对象: 选择 2009 年 8 月至 2011 年 11 月在福建省妇幼保健院行产前初诊检查, 询问病史其配偶系 HBsAg 阳性, 而孕妇为 HBsAg 阴性的孕妇, 其中经夫妇双方知情同意参与 HBV 血清学标志物(HBVM)和 HBV-DNA 载量检测确定为 HBV 感染者, 以及配偶同意取精液进行 HBV-DNA 载量检测, 并决定住本院分娩的家庭及其新生儿为研究对象。新生儿脐带血 HBV-DNA 载量 $\geq 5 \times 10^2$ copies/ml 为病例组, $< 5 \times 10^2$ copies/ml 为对照组。为排除孕期配偶间密切接触传播, 孕妇于分娩时再次抽血检测 HBVM 和 HBV-DNA, 符合入选条件入组研究的家庭共 138 个。

2. 研究方法: 配偶双方采血复查 HBVM, 并检测血清 HBV-DNA 载量, 追踪随访孕妇至分娩, 收集新生儿脐带血检测 HBVM、HBV-DNA 载量。HBVM 检测采用 ELISA, 试剂盒由中山生物工程有限公司提供; 父血清、精液 HBV-DNA 检测采用载量荧光定量 PCR 法(FQ-PCR), 试剂盒由德国 ROCHE 公司提供, 具体操作及结果判断均由检验科专业人员严格按试剂盒说明书。

3. 统计学分析: 统计分析采用 SPSS 11.5 软件, 计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法; 计量资料采用 t 检验或非参数检验; 多因素及因素间的交互作

用采用 logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 新生儿脐带血 HBV-DNA 阳性率: 在 138 个家庭中父血清 HBsAg 均阳性, 其中 HBV-DNA 阳性率为 76.8% (106/138)、HBeAg 阳性率为 42.8% (59/138), 精液 HBV-DNA 阳性率为 21.0% (29/138); 其新生儿脐带血 HBV-DNA 阳性率为 34.8% (48/138)、HBsAg 阳性率为 28.3% (39/138), HBeAg 阳性率为 15.2% (21/138)。

2. HBV 父婴垂直传播危险因素分析:

(1) 单因素分析: 共筛选出父血清 HBV-DNA 阳性、父血清 HBeAg 阳性、精液 HBV-DNA 阳性、父对乙型肝炎(乙肝)传播途径及预防方法不知晓、乙肝一级家族史 5 个变量为 HBV 垂直传播的危险因素 ($P < 0.05$, 表 1)。而父母双方年龄、职业、文化程度、HBV 携带时间、肝功能是否正常、是否系统治疗、HBV 通过精子垂直传播的知晓程度、孕妇(母)对乙肝传播途径及预防方法、婚前检测 HBV 情况、是否定期体检、新生儿结局等为 HBV 父婴垂直传播的非危险因素(均 $P > 0.05$)。

表 1 HBV 父婴垂直传播的单因素分析

因 素	例数	χ^2 值	P 值	OR 值
父血清 HBV-DNA 阳性	106	14.951	< 0.05	11.50
父血清 HBeAg 阳性	59	27.359	< 0.05	7.40
精液 HBV-DNA 阳性	29	27.313	< 0.05	10.03
父对乙肝传播途径及预防方法不知晓	48	7.728	< 0.05	2.669
有乙肝一级家庭史	48	6.500	< 0.05	1.877

(2) 多因素分析: 采用前进法筛选单因素分析筛选出有统计学意义的变量, 最终保留在模型内的变量有父血清 HBV-DNA 阳性、父 HBeAg 阳性、精液 HBV-DNA 阳性, OR 值及其 95% CI 分别为 5.744

(1.135 ~ 29.076)、4.167(1.739 ~ 9.985)、6.679(2.362 ~ 18.881), 为 HBV 父婴垂直传播的危险因素(表 2)。

表 2 HBV 父婴垂直传播危险因素的多因素分析

因素	β	s_e	Wald χ^2 值	P 值	Exp(β)(95%CI)
父血清 HBV-DNA 阳性	1.748	0.827	4.464	0.035	5.744(1.135 ~ 29.076)
父 HBeAg 阳性	1.427	0.446	10.250	0.001	4.167(1.739 ~ 9.985)
精液 HBV-DNA 阳性	1.899	0.530	12.825	0.000	6.679(2.362 ~ 18.881)

3. 父血清、精液 HBV-DNA 载量与新生儿脐带血 HBV-DNA 载量的关系: 将新生儿脐带血 HBV-DNA 载量分为 $<2 \times 10^3$ 、 $2 \sim 4 \times 10^3$ 、 $>4 \times 10^3$ copies/ml 3 组。结果显示, 父血清、精液 HBV-DNA 载量均与新生儿脐带血 HBV-DNA 载量之间存在剂量反应关系, 提示随父血清、精液 HBV-DNA 载量的升高, 新生儿脐带血 HBV-DNA 载量也逐渐升高。两组新生儿脐带血 HBV-DNA 阳性率及 HBeAg 阳性率比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

4. 父血清 HBV-DNA 载量与精液 HBV-DNA 载量的关系: 将精液 HBV-DNA 载量分为 $0 \sim 8 \times 10^3$ 、 $8 \times 10^3 \sim 4 \times 10^4$ 、 $>4 \times 10^4$ copies/ml 3 组。结果显示, 父血清 HBV-DNA 载量与精液 HBV-DNA 载量之间存在剂量反应关系, 提示随父血清 HBV-DNA 载量的升高, 精液 HBV-DNA 载量也逐渐升高。

5. 父血清、精液 HBV-DNA 载量与 HBV 父婴垂直传播的关系: 为进一步分析父血清、精液 HBV-DNA 载量对 HBV 父婴垂直传播的影响, 预测 HBV 父婴垂直传播发生风险的最佳分界点, 作 ROC 曲线分析。本研究根据父血清、精液 HBV-DNA 载量对数水平分为 8 个切点, 分别计算各等级切点的敏感度(Se)、特异度(Sp)和曲线下面积(AUC)。结果显示, 父血清 HBV-DNA 切点在 10^5 copies/ml 时 $Se = 0.771$, $Sp = 0.700$ (假阳性 = $1 - Sp$), $AUC = 0.763$, 此切点 Se 和 Sp 较高且 AUC 值最大; 精液 HBV-DNA 切点在 10^3 copies/ml 时 $Se = 0.458$, $Sp = 0.922$ (假阳性 = $1 - Sp$), $AUC = 0.531$, 此切点 Se 和 Sp 较高且 AUC 值最大(图 1)。认为父血清 HBV-DNA 切点在 10^5 copies/ml, 精液 HBV-DNA 切点在 10^3 copies/ml 是最佳分界点, 较适宜作 HBV 父婴垂直传播发生的预测指标。再以父血清 HBV-DNA 载量 10^5 copies/ml 为界面, 即 $<10^5$ copies/ml 和 $\geq 10^5$ copies/ml 分别计算 HBV 父婴垂直传播的阳性率, 阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$); 以精液 HBV-DNA 载量 10^3 copies/ml 为界面, 即 $<10^3$ copies/ml 和 $\geq 10^3$ copies/ml 分别计算 HBV 父婴垂直传播的阳性率, 其差异有统计学意

义($P < 0.01$), 见表 3。

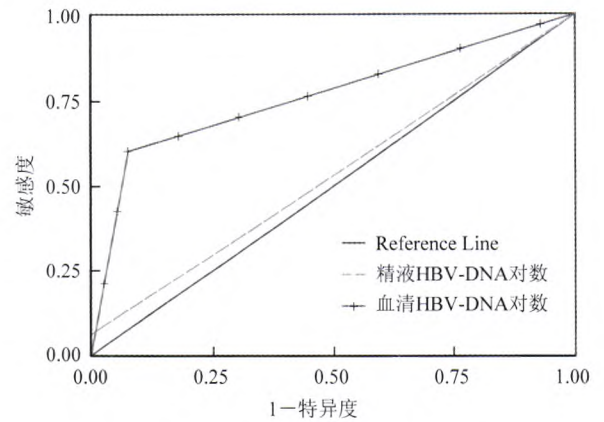


图 1 父血清、精液 HBV-DNA 载量切点与 HBV 父婴垂直传播水平的 ROC 曲线分析

表 3 父血清、精液 HBV-DNA 载量(copies/ml)界面与 HBV 父婴垂直传播水平的关系

分组	父血清 HBV-DNA 载量		精液 HBV-DNA 载量		合计
	$<10^5$	$\geq 10^5$	$<10^3$	$\geq 10^3$	
病例组	11	37	27	21	48
对照组	63	27	84	6	90
$\chi^2(P)$ 值	27.905(<0.01)		27.355(<0.01)		

讨 论

1. HBV 父婴垂直传播的危险因素: 以往报道 HBV 父婴垂直传播的危险因素较为肯定的是血清 HBV-DNA 高载量和 HBeAg 阳性, 其他因素如乙肝一级家族史、避孕方式、性行为等也有报道^[2-5]。如刘智昱等^[3]应用巢式病例对照探讨围生期 HBV 传播的影响因素, 表明乙肝一级家族史是独立危险因素。Shan 等^[6]研究证实患者家系内血缘关系最近的一级亲属 HBsAg 阳性率显著高于血缘关系较远的二、三级亲属及无血缘关系的姻亲家庭成员。本研究中单因素及 logistic 多因素回归分析发现, 父血清 HBV-DNA 阳性、HBeAg 阳性及精液 HBV-DNA 阳性为 HBV 父婴传播的危险因素。提示孕前使父血清 HBV-DNA、HBeAg、精液 HBV-DNA 均转阴性(至少 HBV-DNA 载量下降至正常)可以减少 HBV 父婴传播的危险。

2. 精液 HBV-DNA 阳性: 高慧婕等^[7]采用荧光原位杂交技术, 证实 HBV-DNA 存在于 HBV 感染者各级生精细胞中, 尤其大部分存在于初级精母细胞内, 同时在睾丸和附睾组织的毛细血管中也可观察到 HBV-DNA, 显示感染生精细胞的 HBV 可能随血液循环至生殖系统。而存在于男性生殖系统的 HBV-DNA 可进一步与生殖细胞染色体整合, 若全长

HBV-DNA 整合入精子,则可通过自然受精方式进入卵细胞,在胚胎发育过程中复制和表达,胎儿体内某些组织必然会形成 HBV 病毒颗粒,使宫内感染的胎儿一出生即为携带者。张荣莲等^[8]研究证实部分 HBV 感染者的精液中 HBV 呈复制状态,其精液具有传染性,可作为传播 HBV 的媒介物。

本研究中 138 例精液 HBV-DNA 载量与收集孕周无相关性($P>0.05$),可能与精液中的病毒携带呈间歇性相关,该结论为精子可间歇携带 HBV 提供参考依据。结果中出现部分父血清 HBV-DNA 阳性、精液 HBV-DNA 阴性者,也可能与精液中病毒携带呈间歇性有关,或因血清 HBV-DNA 阳性,但病毒量或毒力尚不足使精液 HBV-DNA 呈阳性。分析父血清、精液 HBV-DNA 载量与脐带血 HBV-DNA 载量间的相关性,结果表明父血清 HBV-DNA 载量、精液 HBV-DNA 及脐带血 HBV-DNA 三者中两两比较呈正相关,且父血清 HBV-DNA 载量 > 精液 HBV-DNA 载量 > 脐带血 HBV-DNA 载量。

3. 新生儿 HBV-DNA 阳性率高于 HBsAg 阳性率的原因:①由于胚胎时期免疫功能尚不完善,无法表现出 HBVM,形成所谓的“潜隐性状态”^[9];②宫内感染的延迟表现^[10];③HBV 复制水平低,加之 ELISA 测定的敏感性低,使低量的 HBsAg 漏检^[11];④HBV 基因组突变影响 HBsAg 的表达,或者改变 HBsAg 立体构象而难以检出^[12];⑤HBV 已整合到宿主染色体内^[13]。

4. 父血清、精液 HBV-DNA 载量与新生儿脐带血 HBV-DNA 载量间存在剂量反应关系:分析发现父血清 HBV-DNA 载量、精液 HBV-DNA 载量升高,新生儿脐带血 HBV-DNA 载量也逐渐升高;父血清 HBV-DNA 载量与精液 HBV-DNA 载量间存在剂量反应关系,提示随着父血清 HBV-DNA 载量的升高,精液 HBV-DNA 载量也逐渐升高。

为进一步分析父血清 HBV-DNA 载量和精液 HBV-DNA 载量对 HBV 父婴垂直传播的影响,预测 HBV 父婴垂直传播发生风险的最佳分界点,本研究根据父血清 HBV-DNA 载量、精液 HBV-DNA 载量对数水平分为 8 个切点作 ROC 曲线分析,结果表明父血清 HBV-DNA 切点在 10^5 copies/ml、精液 HBV-DNA 切点在 10^3 copies/ml 是最佳分界点,较适宜作 HBV 父婴垂直传播发生的预测指标。再以上述最佳分界点为界面,分别计算两组 HBV 父婴垂直传播的阳性率,其阳性率差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。提示阻断 HBV 父婴传播的关键是对父血清

HBV-DNA 载量、精液 HBV-DNA 载量高于此切点值者,于孕前进行系统化正规的抗病毒治疗,降低父血清 HBV-DNA 载量、精液 HBV-DNA 载量切点值,以减少 HBV 父婴传播的危险性。

参 考 文 献

- [1] Zhang QJ, Xie QD, Huang TH, et al. A new approach of vertical transmission of hepatitis B virus research [J]. J Carcinogene Teratogene Mutagene, 2003, 15(2): 121-123. (in Chinese) 张清健, 谢庆东, 黄天华, 等. 乙型肝炎病毒垂直传播新途径的研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2003, 15(2): 121-123.
- [2] Li WL, Peng P, Zhang YL, et al. Clinical research of vertical transmission of hepatitis B virus between fathers and babies [J]. J Pract Med, 2005, 21(3): 277-278. (in Chinese) 李文玲, 彭萍, 张艳玲, 等. 乙型肝炎病毒父婴垂直传播的临床研究 [J]. 实用医学杂志, 2005, 21(3): 277-278.
- [3] Liu ZY, Li XY, Yan XM, et al. Nested case-control study on the influence factors of perinatal stage transmission of hepatitis B virus [J]. Bull Cent South Univ: Med Sci, 2007, 32(3): 451-454. (in Chinese) 刘智显, 李夏雨, 颜雪梅, 等. 应用巢式病例对照探讨 HBV 围生期传播的影响因素 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2007, 32(3): 451-454.
- [4] Kkidd-Ljunggren K, Holmberg A, Blackberg J, et al. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers [J]. J Hosp Infect, 2006, 64(4): 352-357.
- [5] Shao ZJ, Xu DZ, Xu JQ, et al. A retrospective study on the association of sexual behavior during pregnancy with intrauterine infection of hepatitis B virus [J]. Chin J Epidemiol, 2005, 26(4): 232-235. (in Chinese) 邵中军, 徐德忠, 徐剑秋, 等. 孕期性行为与乙型肝炎病毒宫内感染关系的病例对照研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(4): 232-235.
- [6] Shan J, Wang L, Li Z, et al. Relationship between polymorphisms of vitamin D receptor gene and family aggregation of HBsAg carriers [J]. CAMS, 2006, 28(2): 148-153.
- [7] Gao HJ, Liu C, Li Q, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in testis and epididymis in patients with hepatitis B [J]. J Bengbu Med Coll, 2008, 33(2): 150-152. (in Chinese) 高慧婕, 刘超, 李倩, 等. 乙型肝炎患者睾丸和附睾组织 HBV-DNA 检测 [J]. 蚌埠医学院学报, 2008, 33(2): 150-152.
- [8] Zhang RL, Chen QY, Xie JX, et al. Study on the risk factors of vertical transmission of HBV from HBsAg-positive father to infant [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2009, 44(11): 805-808. (in Chinese) 张荣莲, 陈起燕, 谢静娴, 等. 乙型肝炎病毒父婴垂直传播的危险因素分析 [J]. 中华妇产科杂志, 2009, 44(11): 805-808.
- [9] Guettouche T, Hnatyszyn J. Chronic hepatitis B and viral genotype: the clinical significance of determining HBV genotypes [J]. Antiviral Therapy, 2005, 10: 593-604.
- [10] Chaouat G. Should we re-examine the status of lymphocyte alloimmunization therapy for recurrent spontaneous abortion? [J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 50(6): 433-438.
- [11] He JQ, Yuan SH, Xian GJ, et al. Study of hepatitis B virus vertical transmission from father to infant [J]. J Pract Obstet Gynecol, 2005, 21(5): 301-302. (in Chinese) 何进球, 袁松华, 洗革坚, 等. 乙型肝炎病毒父婴垂直传播的临床研究 [J]. 实用妇产科杂志, 2005, 21(5): 301-302.
- [12] Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, et al. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via the germ line [J]. J Med Virol, 1985, 16(1): 61-66.
- [13] Zhao LS, Liu XS, Zhang ZX, et al. Study on HBV vertical transmission via infected spermatozoa [J]. Chin J Infect Dis, 1998, 16(3): 154-157. (in Chinese) 赵连三, 刘晓松, 张智翔, 等. 乙型肝炎病毒经精子传播的可能性研究 [J]. 中华传染病学杂志, 1998, 16(3): 154-157.

(收稿日期: 2013-08-19)

(本文编辑: 张林东)