

· 重视 HBV 宫内传播 ·

母胎细胞转运与乙型肝炎病毒
宫内感染关系的研究

魏俊妮 王素萍 双杰玉

【摘要】 目的 探讨母胎细胞转运与乙型肝炎病毒(HBV)宫内感染的关系。方法 用 STR-PCR、As-PCR 及 hemi-nPCR 技术扩增 HBsAg 阳性孕妇及其新生儿外周血中胎儿 DNA 及母亲 DNA, 通过检测 TH01、GSTM1、ACE 等位基因确定母-胎细胞转运与胎-母细胞转运。采用巢式病例对照研究方法分析母-胎细胞转运与 HBV 宫内感染的关系。结果 以 GSTM1、ACE 基因多态性判定母亲源性或胎儿源性等位基因, 42 对信息病例中有 26 例新生儿发生了母-胎细胞转运(61.90%, 26/42); 40 对信息病例中有 32 例发生了胎-母细胞转运(80.00%, 32/40); 10 对母胎发生了双向转运。统计分析显示母-胎细胞转运与 HBV 宫内感染有关联, 胎-母细胞转运与 HBV 宫内感染无关联, 母-胎细胞转运与胎-母细胞转运无关。母-胎细胞转运、孕妇 PBMC HBV DNA 阳性是 HBV 宫内感染的危险因素, 二者未显示交互作用; 母-胎细胞转运、孕妇 PBMC HBV DNA 阳性与新生儿 PBMC HBV 感染有关, 两因素间亦未显示交互作用。结论 母胎之间存在细胞转运, 母-胎细胞转运是 HBV 宫内感染的危险因素, 这可能是对 HBV 宫内感染途径的补充。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 宫内感染; 细胞转运; 危险因素

Study on the relationship between fetomaternal cellular traffic and hepatitis B virus intrauterine infection

WEI Jun-ni*, WANG Su-ping, SHUANG Jie-yu. *Department of Epidemiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: WANG Su-ping, Email: spwang88@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the relationship between fetomaternal cellular traffic and hepatitis B virus(HBV) intrauterine infection. **Methods** Maternal DNA and fetal DNA were amplified by short tandem repeat (STR)-polymerase chain reaction(PCR), allele-specific PCR(As-PCR) and heminested PCR (hemi-nPCR). Cell transfer from mother-to-fetus or fetus-to-mother was determined by detecting the existence of TH01, GSTM1 and ACE. The relationship between cell transfer from mother-to-fetus and HBV intrauterine infection was analyzed by nested case-control study. **Results** 26 of the 42 informative mother-baby pairs indicated mother-to-fetus cell traffic, 32 of the 40 informative mother-baby pairs indicated fetus-to-mother cell traffic and two-way cell traffic occurred in 10 mother-baby pairs. Statistical analysis demonstrated that the mother-to-fetus instead of fetus-to-mother cell traffic presented the association with HBV intrauterine infection. There was no significant correlation between mother-to-fetus cell traffic or the fetus-to-mother cell traffic. Both mother-to-fetus cell traffic and PBMC HBV DNA positivity appeared in pregnant women were risk factors of HBV intrauterine infection but the two did not manifest the interaction. The positive risk factors of positivity PBMC HBV DNA in newborns would included mother-to-fetus cell traffic and PBMC HBV DNA in pregnant women, also did not display the interaction. **Conclusion** The cell traffic from HBsAg positive mother to fetus had more contribution to HBV intrauterine infection, which was possibly one of the HBV routes of intrauterine infecting.

【Key words】 Hepatitis B virus; Intrauterine infection; Cell traffic; Risk factors

乙型肝炎病毒(HBV)宫内感染是形成众多的 HBsAg 慢性携带者的重要原因之一, 也是导致乙型

肝炎(乙肝)疫苗免疫失败的主要因素, 目前认为 HBV 宫内传播是通过先兆早产等因素使母血渗入胎血和胎盘细胞间传递 HBV 两条途径实现的, 但近年先兆早产及先兆流产暴露率很低, 多项巢式病例对照研究未显示出此类因素与 HBV 宫内感染的关联, 而研究中新生儿外周血单个核细胞

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070669)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学流行病学教研室(魏俊妮、王素萍); 太原市传染病医院(双杰玉)

通讯作者: 王素萍, Email: spwang88@163.com

(peripheral blood mononuclear cells, PBMC) HBV 感染与复制状况及其与母亲 PBMC HBV 感染关系的揭示却引起了研究者的关注^[1], 提出了 HBsAg 阳性孕妇细胞通过胎盘屏障进入胎儿血循环, 即发生母-胎细胞转运的可能性及其与宫内感染关系研究的必要性, 成为 HBV 宫内感染机制研究的一个很有意义线索。

对象与方法

1. 研究对象: 以 2001 年 12 月至 2003 年 10 月由太原市传染病院妇产科进行产前检查, 并将分娩的 HBsAg 阳性孕妇及其新生儿各 123 例作为研究对象。

2. HBV 宫内感染诊断标准: 出生后 24 h 内新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 及 PBMC HBV DNA 任一项阳性者即为 HBV 宫内感染。

3. 实验室检测方法:

(1) 标本的采集与制备: 采集孕妇肘静脉血及其出生 24 h 内未接受主被动免疫前的新生儿股静脉血各 3~4 ml, 分抗凝血与非抗凝血, 分离血清, 抗凝血 (2% EDTA) 分离并充分洗涤 PBMC 及有核细胞, -20℃ 保存备检。

(2) 人类基因组 DNA 的提取: 采用经典的蛋白酶 K-酚氯仿提取法。

(3) 外周血 HBsAg、HBV DNA 及 PBMC HBV DNA 的检测及序列测定: ELISA 法检测血清 HBsAg, 试剂盒为上海科华实业总公司生产, 批号 20030629。巢式 PCR 技术扩增血清 HBV DNA^[2]。选择性 PCR 技术检测 PBMC HBV DNA^[1]。HBV DNA 序列测定由上海生工生物工程公司完成, 采用 PCR 产物直接测序法。

(4) TH01、GSTM1 及 ACE 基因多态性与母-胎细胞转运判定方法:

① 筛选母儿信息病例对: 短串联重复序列 PCR (short tandem repeat PCR, STR-PCR) 方法筛选母儿酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH01) 基因均为杂合子者作为信息病例对; 等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, As-PCR) 方法筛选母亲为谷胱甘肽-S 转移酶 (glutathione S transferase M1, GSTM1) 基因表达型和/或为血管紧张素转换酶 (angiotension-converting enzyme, ACE) 基因杂合子型 (ID), 且其新生儿为 GSTM1 基因缺失型 [GSTM1(-/-)] 和/或为 ACE 基因纯合子型 (纯合

插入 II 型或纯合缺失 DD 型) 者作为信息病例对。所用引物序列参照文献 [3, 4]。

② 母-胎细胞转运的判定: 若于 TH01 基因为杂合子的新生儿检出除父、母源性的基因外, 还有一个等位基因和母亲相同者即判定发生母-胎细胞转运; 若于 GSTM1 基因缺失型新生儿检出 GSTM1 基因 (扩增片段长度为 252 bp)、ACE 基因纯合缺失型 (DD) 新生儿检出母亲插入型基因 (I) (第一轮扩增片段长度为 425 bp, 第二轮扩增片段长度为 356 bp) 或 ACE 基因纯合插入型 (II) 新生儿检出母亲缺失型基因 (D) (第一轮扩增片段长度为 226 bp, 第二轮扩增片段长度为 190 bp), 即判定发生母-胎细胞转运。

③ 胎-母细胞转运的判定: 同上述母-胎细胞转运检测方法, 从母亲外周血中检出胎儿 DNA。

3. 统计学处理: 资料输入 Visual Fox Pro 6.0 数据库, 采用 SPSS 10.0、Epi Info 2000 软件统计分析。巢式病例对照研究进行 HBV 宫内感染危险因素分析, 非条件 logistic 回归模型进行危险因素的多因素分析, 对危险因素间的交互作用采用 Mantel-Haenszel 法分层分析判定。

结 果

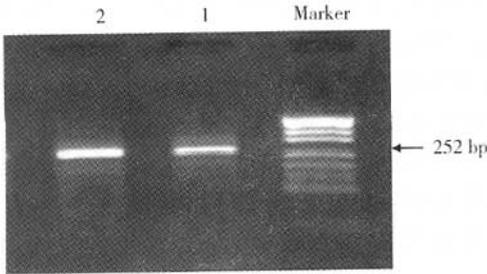
1. HBV 宫内感染率: 所收集 123 例 HBsAg 阳性孕妇的新生儿中, 外周血 HBsAg 阳性 8 例, HBV DNA 阳性 24 例, 阳性率分别为 6.50% (8/123) 及 19.51% (24/123)。新生儿外周血 PBMC HBV DNA 阳性 32 例, 阳性率为 26.02% (32/123)。上述任一项指标阳性合计 HBV 宫内感染率为 40.65% (50/123), 若仅以外周血 HBsAg 阳性 and/或外周血 HBV DNA 阳性合计 HBV 宫内感染率为 23.58% (29/123)。上述阳性标本 PCR 产物经序列测定证实为 HBV DNA, 测序结果与 GenBank 中已知 HBV 序列进行比较, 同源性达 99.3%~100%。

2. 母-胎细胞转运与 HBV 宫内感染:

(1) HBsAg 阳性孕妇及其新生儿 TH01 基因多态性与母-胎细胞转运: 未检出母婴均为 TH01 基因杂合子, 且基因型相同外新生儿另有一个和父亲相同等位基因者。

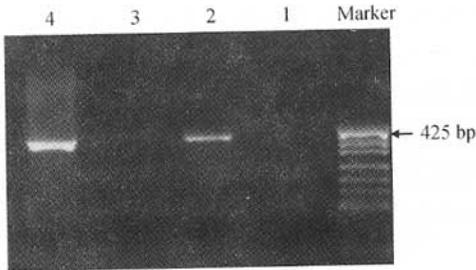
(2) HBsAg 阳性孕妇及其新生儿 GSTM1 及 ACE 基因多态性与母-胎细胞转运: 以 GSTM1、ACE 基因多态性判定母亲源性等位基因时, 在外周血细胞中检出 29 对母亲 GSTM1 (+/+, +/-) 基

因型且其新生儿 GSTM1(-/-)基因型的信息病例对,22 对母亲 ACE(ID)基因型且其新生儿 ACE(II/DD)基因型的信息病例对。上述方法共筛选出 42 对信息病例对,其中 26 例新生儿细胞标本中检出母亲 DNA,占 61.90% (26/42),结果见图 1、2。



Marker: pUC19DNA/MspI; 1,2: 新生儿血细胞中检出母亲 DNA

图1 新生儿外周血中检测母亲 GSTM1 基因



Marker: pUC19DNA/MspI; 1,3: 新生儿外周血未检出母亲 DNA; 2,4: 新生儿外周血检出母亲 DNA

图2 新生儿外周血中检测母亲 ACE 基因

(3)母-胎细胞转运与新生儿 HBV 宫内感染的关系:分别以新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA、新生儿外周血 PBMC HBV DNA 阳性判定 HBV 宫内感染,分析与母-胎细胞转运的关系,结果显示母-胎细胞转运与新生儿外周血 PBMC HBV DNA 阳性有关联,而与新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 阳性无关联;以新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 及 PBMC

HBV DNA 任一项阳性判定 HBV 宫内感染,结果显示母-胎细胞转运与新生儿 HBV 宫内感染有关联(表 1)。

3. 胎-母细胞转运与 HBV 宫内感染:以 GSTM1、ACE 基因多态性判定胎儿源性等位基因时,从母亲外周血细胞标本中检出 40 对母子信息病例对,其中 32 例母亲细胞标本中有胎儿 DNA,占 80.00% (32/40);胎-母细胞转运与新生儿外周血 PBMC HBV DNA 阳性无关联 ($\chi^2 = 0.04, P = 0.85$),与新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 阳性无关联(校正 $\chi^2 = 0.27, P = 0.61$),与新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 及 PBMC HBV DNA 任一项阳性无关联(校正 $\chi^2 = 0.42, P = 0.52$)。

4. 母-胎细胞转运和胎-母细胞转运关系:将 GSTM1、ACE 基因既作为母亲源性等位基因,又作为胎儿源性等位基因进行母子细胞双向转运的分析,经 Fisher's 精确概率分析,新生儿外周血中母亲 DNA 与母亲外周血中胎儿 DNA 之间无关联,即母-胎细胞转运与胎-母细胞转运无关联(表 2)。

5. HBV 宫内感染危险因素的巢式病例对照研究:分别以新生儿出生后 24 h 内外周血 HBsAg、HBV DNA 或 PBMC HBV DNA 阳性以及上述指标任一项阳性判断 HBV 宫内感染,确定病例组和对照组,进行病例对照研究,病例组和对照组新生儿母亲年龄、文化程度、职业构成差异无显著性,进而分析孕妇既往肝炎史、先兆流产及先兆早产史、孕妇外周血 HBeAg 阳性、孕妇 PBMC HBV DNA 阳性、孕妇血清 HBV DNA 阳性、孕期注射乙肝高效价免疫球蛋白、母-胎细胞转运、胎-母细胞转运等因素的暴露比例在两组的差异,探讨 HBV 宫内感染的危险因素,结果如下。

(1)42 对信息病例中 9 例新生儿外周血 HBsAg

表1 母-胎细胞转运与新生儿 HBV 宫内感染的关系

宫内感染	母-胎细胞转运		合计	χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
	转运例数 (n = 26)	未转运例数 (n = 16)				
以新生儿外周血 PBMC HBV DNA 阳性判定宫内感染						
发生例数	18	3	21	10.10	0.000	9.75(2.10~40.90)
未发生例数	8	13	21			
以新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 任一项阳性判定宫内感染						
发生例数	6	3	9	0.11	0.740	1.30(0.28~6.14)
未发生例数	20	13	33			
以新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 及 PBMC HBV DNA 任一项阳性判定宫内感染						
发生例数	20	5	25	8.58	0.003	7.33(1.82~29.63)
未发生例数	6	11	17			

表2 母-胎细胞双向转运的比较

母-胎细胞转运	胎-母细胞转运		合计
	转运例数	未转运例数	
转运例数	4	1	5
未转运例数	3	2	5
合计	7	3	10

注: Fisher's 精确概率 = 1.00, OR = 2.67(0.16~45.14)

和/或 HBV DNA 阳性, 以此 9 例新生儿作为病例组, 余 33 例阴性的新生儿作为对照组进行新生儿外周血 HBV 感染危险因素的研究, 结果显示上述研究因素的暴露比例在两组差异无统计学意义。

(2) 将 21 例新生儿 PBMC HBV DNA 阳性者作为病例组, 余 21 例 PBMC HBV DNA 阴性的新生儿作为对照组, 进行新生儿 PBMC HBV 感染危险因素的研究。单因素及多因素分析均显示孕妇 PBMC HBV DNA 阳性、母-胎细胞转运为新生儿 PBMC HBV 感染的危险因素, 结果见表 3。以母-胎细胞转运分层, 根据 Mantel-Haenszel 法判断各层 OR 值之间的一致性, 各组 OR 值一致, 说明母-胎细胞转运和孕妇 PBMC HBV DNA 两因素间无交互作用的可能(一致性检验 $\chi^2 = 1.47, P > 0.05$)。

(3) 以 25 例外周血 HBsAg、HBV DNA 及 PBMC HBV DNA 任一项阳性新生儿作为病例组, 余 17 例为对照组进行 HBV 宫内感染危险因素的研究。单因素及多因素分析结果显示母-胎细胞转运、孕妇 PBMC HBV DNA 阳性为 HBV 宫内感染的危险因素, 结果见表 3。以母-胎细胞转运分层, 根据 Mantel-Haenszel 法判断各层 OR 值之间的一致性, 各组 OR 值一致, 说明母-胎细胞转运和孕妇 PBMC HBV DNA 两因素间无交互作用的可能(一致性检验 $\chi^2 = 2.42, P > 0.05$)。

讨 论

对 HBV 宫内感染诊断指标的综合判定及宫内感染率的正确估计, 有助于全面认识 HBV 宫内感

染问题。HBV 宫内感染用何种指标测量为宜, 尚未形成完全统一的标准^[5,6], 多数学者用新生儿外周血 HBsAg 和 HBV DNA 作为诊断指标, 作者既往的研究发现有些 HBsAg 阳性孕妇新生儿仅表现为外周血 PBMC HBV 感染, 即血清 HBV 标志物与 PBMC HBV 感染标志物检出结果不尽相同, 因此, 增加 PBMC HBV 感染指标的检测可能更全面地反映新生儿出生时 HBV 感染情况, 当然, 需要进一步随访, 探讨新生儿 PBMC HBV 感染与复制的意义, 了解新生儿 HBV 感染及复制程度与 HBV 持续存在以及干预效果的关系。另外, 既往的研究显示 HBsAg 阳性孕妇新生儿 HBV 感染状态确实存在动态变化^[2], 出生时 HBV 感染的新生儿中的一部分将持续感染变成 HBV 慢性携带者, 另一部分则将处于动态变化的过程, 这部分感染 HBV 的新生儿有两种结局, 一种经过一段时间阴转后又呈现持续感染状态, 另一种可能不再出现 HBV 感染标志, 出生时的感染呈一过性或暂时性, 这种结局受何种因素的影响, 是否与感染病毒量, 感染时间以及新生儿个体易感性等有关, 抑或是注射乙肝高效价免疫球蛋白后病毒血症的暂时改变, 还是完全归因于产程中 HBV 一过性感染? 尚需进行更深入的研究证实。

国外学者 Lo 等^[4]建立了母-胎细胞转运的检测方法, 之后有学者将母-胎细胞共存的微嵌合状态与自身免疫疾病关系进行了研究^[7,8], Lo 曾提出母-胎细胞转运可能与病原体的母婴垂直传播有关, 如 HIV, 但未见相关研究资料, 那么, HBV 宫内感染是否与母-胎细胞转运有关, 这是很值得探讨的与 HBV 宫内传播机制有关的重要问题。

本次研究结果显示母-胎细胞转运是 HBV 宫内感染的危险因素(OR 值为 7.33), 是新生儿 PBMC HBV 感染的危险因素(OR 值为 9.75)。多因素分析显示母-胎细胞转运、孕妇 PBMC HBV DNA 阳性

表3 新生儿 HBV 宫内感染及 PBMC HBV 感染危险因素的多因素分析

因 素	β	s_x	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)	EF(%)
以新生儿外周血 PBMC HBV DNA 阳性判定宫内感染						
孕妇 PBMC HBV DNA 阳性	3.05	1.14	7.13	0.01	21.00(2.25~196.35)	95.24
母-胎细胞转运	3.05	1.14	7.13	0.01	21.00(2.25~196.35)	95.24
常数项	-3.05	1.12	7.34	0.11		
以新生儿外周血 HBsAg、HBV DNA 及 PBMC HBV DNA 任一项阳性判定宫内感染						
孕妇 PBMC HBV DNA 阳性	2.17	1.00	4.70	0.03	8.78(1.23~62.69)	88.61
母-胎细胞转运	2.13	0.91	5.50	0.02	8.40(1.42~49.74)	88.10
常数项	-1.55	0.27	3.54	0.06		

是 HBV 宫内感染的危险因素,且两因素间未显示交互作用;母-胎细胞转运、孕妇 PBMC HBV DNA 阳性是新生儿 PBMC HBV 感染的危险因素,OR 值为 21.00,关联强度大。而母-胎细胞转运与新生儿外周血 HBsAg、HBV 阳性无关,胎-母细胞转运与 HBV 宫内感染无关联,母-胎细胞转运和胎-母细胞转运无相关性。结果表明孕妇 PBMC HBV 感染与孕期母-胎细胞转运均可引起 PBMC HBV 感染,提示 HBV 可能通过细胞(PBMC)的介导进入胎儿血液循环导致感染。因此,在排除先兆早产、先兆流产等传统的血源性传播 HBV 的情况下,母-胎细胞转运可能是 HBV 宫内感染的一个原因。推测母血细胞如果进入胎儿血液循环后,可经代谢至淋巴器官,淋巴器官是 HBV 的肝外储存场所,如果淋巴器官受染,那么在此增殖的新生儿 PBMC 也可发生 HBV 感染,PBMC 感染 HBV 后,可表现为“潜隐性”感染,即单独 PBMC 阳性,血清 HBV DNA 阴性,这有可能解释本次研究在血清 HBV DNA 阴性的新生儿中 PBMC HBV DNA 阳性。母-胎细胞转运与 HBV 宫内感染关系的研究可能为既往提出的 HBV 宫内感染机制的假说提供重要补充,同时为其他病毒宫内感染的传播机制的研究奠定了基础。另外,母-胎细胞转运与新生儿外周血 HBsAg、HBV 阳性未显示统计学关联,可能的原因是母-胎细胞转运仅与新生

儿外周血 PBMC HBV 感染有关,也可能本次研究样本量小,未能显示出两者的关联。所以,要确立母-胎细胞转运在 HBV 宫内感染中的作用,还需要进行大量的工作,特别是适宜样本量的随访研究。

参 考 文 献

- 1 史晓红,王素萍,李淑珍,等. HBsAg 阳性孕妇新生儿 HBV 感染状况的研究. 山西医科大学学报,2004,35:18-19.
- 2 王素萍,徐德忠,闫永平,等. 用巢式 PCR 进行 HBV 宫内感染状况的研究. 卫生研究,2000,29:23-26.
- 3 Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*,1992,12:241-253.
- 4 Lo YMD, Lo ESF, Watson N, et al. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*,1996,88:4390-4395.
- 5 岳亚飞,姜惠,石磊,等. 乙型肝炎病毒宫内感染机理的研究. 中华妇产科杂志,2004,39:224-226.
- 6 刘一萍,门可,徐德忠,等. 乙型肝炎病毒宫内感染的随访研究. 第四军医大学学报,2004,25:734-736.
- 7 Bianchi DW. Fetomaternal cell traffic, pregnancy-associated progenitor cells, and autoimmune disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*,2004,18:959-975.
- 8 Khosrotehrani K, Mery L, Aractingi S, et al. Absence of fetal cell microchimerism in cutaneous lesions of lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*,2005,64:159-160.

(收稿日期:2004-12-05)
(本文编辑:张林东)

HBsAg 阳性孕妇的婴儿经宫内阻断治疗后乙型肝炎病毒标志物模式及意义

韩国荣 余敏敏 唐讯 方之勤 杨龙涛 岳欣 吴凯华

母婴传播是乙型肝炎病毒(HBV)感染的主要途径之一,我国成人慢性 HBV 感染约 50% 来自母婴传播,经母婴联合免疫阻断后,仍有 5%~10% 的婴儿免疫失败,免疫成功的婴儿其乙型肝炎病毒标志物(HBVM)可有多种模式,不同的 HBVM 往往具有特殊的临床意义,对行母婴阻断后婴儿 HBVM 的研究有助于加深 HBV 母婴传播的生物学特点和感染发病机制的认识,提高母婴传播的诊断和防治水平。

1. 对象与方法:研究对象为 2000 年 4 月至 2003 年 4 月

HBsAg 阳性、肝功能正常的孕妇及其新生儿各 221 例。孕妇自孕 28 周起肌肉注射人乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)200 IU(四川蜀阳药业生产),每 2 周(双阳性孕妇)或 4 周(单阳性孕妇)一次,直至分娩。新生儿于出生、15 天各注射 HBIG 200 IU,然后于 1、2、7 月龄各接种 HBV_{ac} 20 μg。孕妇于 28 周前(免疫注射前)采肘静脉血,新生儿于出生即刻(HBIG 注射前)、1、7、12 月采股静脉血检测 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc。孕妇和婴儿血清检测采用美国 Abbott 单克隆酶联免疫试剂检测。HBsAg>1S/CO、HBeAg>0.28 PEIU/ml、抗-HBs>10 mIU/ml 为阳性,抗-HBs>100 mIU/ml 具有保护性。HBsAg<10S/CO 为低滴