

$\times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cpm/ μ g DNA。每次试验均设HBV DNA阳性血清、阴性血清和PBR322质粒DNA对照。证明探针的特异性较好, 敏感度至少为1pg HBV DNA。

3. 斑点杂交 (Dot-blot hybridization): 按Lieberman方法^[4]改进。硝酸纤维素滤膜 (Nitrocellulose filter, NC膜) 经煮沸后吹干, 漂浮在 $2 \times$ ssc液面上, 将 $10 \sim 20 \mu$ l血清或组织DNA提取液直接点在NC膜上。杂交液含50%甲酰胺 (formamide), 杂交温度为 42°C , 探针浓度为 10^6 cpm/ml。

4. 转膜杂交 (Southern-blot hybridization): 组织DNA提取液 10μ l经EcoRI和BamHI酶切, 同未经酶切的组织DNA经0.8%琼脂糖凝胶电泳, 经EcoRI酶切的 λ DNA在相同条件下电泳作为DNA碱基数的标志。然后将凝胶垂直放置, 150伏电泳30分钟, 将凝胶上的DNA转至NC膜上。以后的处理同斑点杂交, 探针浓度为 17^7 cpm/ml。

三、HBV宫内感染的判定依据 凡胎心血HBsAg、抗-HBcIgM、HBVDNA或肝组织HBsAg、HBcAg、HBVDNA任一指标阳性, 即判为宫内感染。

结 果

一、胎心血检测结果: 实验组35份胎心血经检测4例HBsAg阳性(11.4%)、5例抗-HBcIgM阳性(14.3%), 其中2例HBsAg和抗-HBcIgM均阳性。17例抗-HBc阳性(48.6%), 3例抗-HBe阳性(8.6%)。胎心血HBV DNA均阴性。宫内感染的检出率为20.0% (7/35)。对照组10例胎心血除1例抗-HBc和抗-HBe均阳性外(该例母血抗-HBc和抗-HBe均阳性), HBV感染标志均阴性。

二、胎肝组织免疫组化检测结果: 实验组17例肝组织经免疫组化ABC法检测, 1例HBcAg阳性(5.9%), 该例孕妇HBeAg和HBV DNA均阳性。光镜下见HBcAg阳性细胞孤立存在, 胞浆着色, 颜色较浅。同HB患者尸检

的阳性片有显著差异, 后者HBcAg阳性肝细胞成堆分布, 多为胞核着色, 颜色很深。说明感染HBV的胎肝细胞较少, 病毒抗原在胎肝中的表达较低。17例胎儿和对照组8例胎儿肝组织HBsAg均阴性, 后者HBcAg亦阴性。

三、胎肝组织分子杂交检测结果:

实验组27例胎儿12例肝组织HBV DNA阳性(44.4%), 其中5例HBsAg、HBcAg或抗-HBcIgM阳性(18.5%, 5/27), 说明宫内感染HBV的胎儿并不都表达HBV抗原或产生抗病毒抗体。2例HBsAg阳性孕妇所生双胞胎以及对照组8例胎儿肝组织HBV DNA均阴性。本文发现胎肝组织HBV DNA斑点杂交信号较弱, 且全部标本经转膜杂交检测, HBV DNA均阴性, 可能是胎肝组织HBV基因的拷贝数较少。

讨 论

本文从HBsAg阳性孕妇引产胎儿胎心血中查出HBsAg和抗-HBcIgM, 从胎肝组织查出HBcAg和HBV DNA, 证实了HBV宫内感染的存在。本文采用血清学、免疫组织化学和核酸分子杂交检测, HBV宫内感染的检出率分别为20.0% (7/35)、5.9% (1/17)和44.4% (12/27), 表明宫内感染是HBV感染的重要方式。但以往认为HBV感染的垂直传播主要发生在分娩过程中因母血混入胎儿血或接触阴道分泌物以及吸入羊水等, 而宫内感染发生的比例较低^[5], 感染率在5~15%^[6]。近年来对HBsAg阳性孕妇引产胎儿的直接研究^[7~9]以及对DHBV感染方式的研究^[10]提示, 在HB地方性流行区, HBV宫内感染是导致人群中形成众多HBsAg慢性携带者的重要原因, 对此应引起重视。

有关HBV宫内感染率仍没有一致的结果^[6], 文献报道的结果相差很大, 除了与研究对象如孕妇和胎儿的各种情况有关外, 也与检测方法不同有关。本文发现经血清学和免疫组化检测, HBV宫内感染率均低于肝组织HBV

DNA阳性率，同以往研究的结果相似〔7,8,10,12〕，可能与胎儿组织细胞不成熟，病毒的复制和病毒抗原的表达低下有关〔13,14〕。本文发现实验组12例胎肝组织HBV DNA阳性（44.4%，12/27），但仅5例HBsAg、HBcAg或抗-HBcIgM阳性（18.5%，5/27）。且HBsAg和抗-HBcIgM滴度较低；胎肝组织HBcAg阳性细胞较少，着色浅；肝组织HBV DNA杂交阳性信号弱。上述结果表明，部分胎儿在宫内感染HBV后处于一种“潜隐状态”，仅仅表现为胎肝HBV DNA阳性，而用常规的血清学方法检测不到HBV感染的标志，因而宫内感染不被发现。推测胎儿出生后，随着组织细胞发育成熟，潜隐的HBV开始大量复制和表达，在外周血中即可检测到感染指标。这部分感染过去被认为是分娩过程中感染，实际上可能是宫内感染的“延迟表现”，对此有待深入研究。本文研究表明肝组织HBV DNA是反映宫内感染最直接、可靠的指标。

Study on the HBV Intrauterine Infection and its Rate Tang Shixin, et al., Dept. of Epidemiology, The First Military Medical College

In thirty-five fetuses induced from HBsAg-positive pregnant women, the fetuses were examined for HBV markers. Another 10 fetuses were used as control and none of the fetuses was infected by HBV in utero. Among 35 fetal serum samples, HBsAg and anti-HBcIgM were detected in 4 and 5 fetuses (in 7 fetuses) respectively. One out of 17 fetal liver sections was HBcAg positive by ABC stain. Twelve out of 27 fetal livers were HBV-DNA positive. Thus, the rate of intrauterine infection of HBV was 20.0% (7/35), 5.9% (1/17) and 44.4% (12/27) respectively by serological test, immunohistochemical test and molecular hybridization using P-labeled HBV DNA as a probe. The results showed that HBV intrauterine infection was an important mode of HBV transmission.

Key words HBV Vertical transmission Induced abortion Intrauterine infection

（本研究得到珠江医院、南方医院和157医院妇产科的大力协助，特此致谢）

参 考 文 献

1. Shafritz D A, et al. Integration of hepatitis B virus DNA into genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 1981; 305 : 1067.
2. Rigby P W, et al. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 1977; 113 : 237.
3. Feinberg A P, et al. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochemistry 1983; 132 : 6.
4. Lieberman H M, et al. Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test; comparison to HBeAg/anti-HBe states in HBsAg carriers. Hepatology 1983; 3 : 285.
5. Beasley R P. 乙型肝炎病毒感染的母婴垂直传播. 国外医学流病分册 1984; 11 : 258.
6. Ghendon Y. Perinatal transmission of hepatitis B virus in high incidence countries. J Virol Methods 1987; 17 : 69.
7. 易健如, 等. 乙型肝炎病毒子宫内传播的研究. 中国公共卫生 1986; 5 : 16.
8. 易健如, 等. 从乙型肝炎表面抗原阳性母亲流产的胎儿查出乙型肝炎病毒标志. 病毒学报 1985; 1 : 100.
9. 贾希瑜, 等. 乙型肝炎病毒宫内感染的研究. 病毒学报 1985; 1 : 183.
10. Le L, et al. Transplacental transmission of hepatitis B virus Lancet 1986; 11 : 872.
11. O'Connell A P, et al. Naturally occurring infection of Pekin Duck embryos by duck hepatitis B virus. PNAS 1983; 80 : 1703.
12. 刘崇柏, 等. 乙型肝炎病毒胎内感染及围产期传播的研究. 病毒学报 1985; 1 : 35.
13. Alexander G J M, et al. Does maternal antibody to core antigen prevent recognition of transplacental transmission of hepatitis-B-virus infection? Lancet 1986; II : 29.
14. London W T, et al. Transplacental transmission of hepatitis B virus. Lancet 1986; II : 1037.

（1989年11月2日收稿，1990年3月28日修回）