

· 临床论著 ·

HBsAg阳性孕妇胎盘组织HBV感染相关因素分析

赵燕青¹ 顾梅蕾² 张媛媛² 翟艳立² 邱凤林³ 刘畅³ 胡燕³ 刘永明¹ 苏何玲¹ 钟彦伟^{1, 3}

【摘要】目的 研究HBsAg阳性孕妇乙型肝炎病毒血清标志物(HBVM)、HBV DNA含量与胎盘乙型肝炎病毒(HBV)感染的关系,进一步研究胎盘组织在HBV宫内感染中的作用。**方法** 以30例HBsAg阳性足月妊娠孕妇产前外周血及胎盘组织为研究对象。采用酶联免疫吸附试验检测孕妇外周血HBV血清标志物;实时荧光定量PCR方法检测孕妇外周血HBV DNA含量。免疫组织化学染色方法检测胎盘组织HBsAg和HBcAg表达情况。**结果** 30例HBsAg阳性孕妇中,HBcAg阳性18例,HBcAg阴性12例。HBV DNA $> 10^4$ IU/ml者17例,HBV DNA $10^2 \sim 10^4$ IU/ml者13例。21例胎盘组织HBsAg和HBcAg免疫组织化学染色阳性,胎盘HBV感染率为75% (21/30), HBsAg和HBcAg阳性率分别为55.67% (17/30) 和70% (21/30)。HBcAg阳性组中胎盘组织HBV感染率为88.89% (16/18), 高于HBcAg阴性组41.67% (5/12), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 血清中HBV DNA高含量组 ($> 10^4$ IU/ml) 胎盘组织HBV感染率为94.12% (16/17), 高于低含量组 ($10^2 \sim 10^4$ IU/ml) 患者的胎盘感染率38.46% (5/13), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 孕妇血清HBcAg阳性和高病毒载量是发生胎盘组织HBV感染的高危因素。胎盘组织是HBV宫内感染传播途径之一。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 胎盘; 感染

Analysis on the related factors of placental HBV infection in HBsAg positive pregnant women

Zhao Yanqing¹, Gu Meilei², Zhang Yuanyuan², Zhai Yanli², Di Fenglin³, Liu Chang³, Hu Yan³, Liu Yongming¹, Su Heling¹, Zhong Yanwei^{1, 3}. ¹Guilin Medical University, Guilin 541004, China; ²Department of Gynecology and Obstetrics, ³Institute of Infectious Diseases, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

【Abstract】Objective To study the relationship between placental HBV infection and the serum HBVM, HBV DNA levels in pregnant women with HBsAg positive, and to demonstrate the role of placenta in intrauterine infection of hepatitis B virus (HBV). **Methods** Total of 30 placental tissues and vein blood of HBsAg positive pregnant women were collected. HBVM and HBV DNA were detected by ELISA and RT-PCR, respectively. The expression of HBsAg and HBcAg in placental specimens were detected by immunohistochemistry. **Results** There were 18 cases with HBcAg positive and 12 cases with HBcAg negative. There were 17 cases with high viral levels group ($> 10^4$ IU/ml) and 13 cases with low viral levels group ($10^2 \sim 10^4$ IU/ml). HBsAg as well as HBcAg were detected in 21 cases among 30 placentas of HBsAg positive pregnant women, the incidences of placental HBV infection were 70% (21/30). The HBV infection rates of placental tissues in the serum of the pregnant women with HBcAg positive were 88.89% (16/18), significant higher than 41.67% (5/12) of HBcAg negative group ($P < 0.05$). The HBV infection rates of placental tissues were 94.12% (16/17) in 17 pregnant women with HBV DNA $> 10^4$ IU/ml significantly higher than 38.46% (5/13) in the serum of the pregnant women with low viral levels group ($P < 0.05$). **Conclusions** Serum HBcAg positive and high viral levels are risk factors of placental HBV infection. Placenta tissues play an important role in intrauterine infection of hepatitis B virus.

【Key words】 Hepatitis B virus; Placental; Infection

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个影响全人类健康的公共卫生问题, 全球

大约有20亿人曾感染HBV, 其中3.5亿多人成为慢性乙型肝炎病毒携带者, 乙型肝炎最终会发展为肝硬化和肝癌^[1]。母婴传播是HBV感染的主要途径, 中国作为乙型肝炎高流行区, 母婴传播占HBV感染的60%以上^[2]。母婴传播包括围生期感染、宫内感染和产后感染, 目前可以通过乙肝免疫球蛋白和

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.03.025

基金项目: 全军医学科技“十二五”科研面上项目(No. CWS11J161)

作者单位: 541004 桂林市, 桂林医学院¹; 100039 北京市, 解放军第302医院妇产中心²、传染病研究所³

通讯作者: 钟彦伟, Email: zhongyanwei@126.com

乙肝疫苗联合免疫使产时、产后感染得到有效的控制,而宫内感染目前尚缺乏明确的阻断途径,是造成免疫失败的主要原因,发生宫内感染的新生儿将成为终生携带者,其中20%~25%将会发展为肝硬化和肝癌,成为乙型肝炎持续存在的原因之一^[3]。已有文献记载胎盘组织在HBV宫内感染中占有重要地位,关于具体机制尚不清楚,本文通过对30例HBsAg阳性孕妇产前后外周血中乙型肝炎病毒血清标志物和HBV DNA含量的测定及其胎盘组织中HBsAg和HBcAg表达水平的测定,了解胎盘组织发生HBV感染的高危因素,进一步研究胎盘组织在HBV宫内感染中的作用,报道如下。

资料与方法

一、研究对象与血样本

以2013年9月至2014年3月在中国人民解放军第302医院妇产中心进行产检并分娩的30例HBsAg阳性的足月妊娠孕妇作为研究对象,年龄22~36岁,平均年龄(26.83 ± 3.91)岁,妊娠37~40周,无妊娠期并发症及其他肝炎,无心、肾等系统并发症,丈夫为非乙型肝炎。收集其孕晚期外周血,分离血清,存于-20℃待检。

二、胎盘组织的收集

胎盘娩出后30 min内,于脐带中央切取1.0 cm × 1.0 cm × 2.0 cm大小胎盘组织,包括从母体面到胎儿面各层组织,立即置于10%中性福尔马林中固定48~72 h,常规石蜡包埋,4.5 μm连续切片以备。

三、主要试剂

乙型肝炎病毒血清标志物试剂盒均由英科新创(厦门)有限公司生产;HBV DNA定量检测试剂盒由北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司生产;鼠单克隆抗-HBs、兔多克隆抗-HBc试剂和快捷型酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物均购自福州迈新生物技术公司。DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公

司。

四、HBVM和HBV DNA含量的检测

乙型肝炎病毒血清标志物(HBVM)包括HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb及HBcAb五项指标,其检测均采用酶联免疫吸附试验,操作步骤按说明书进行。按照血清中HBeAg是否为阳性,分为HBeAg阳性组和HBeAg阴性组。

HBV DNA定量检测采用实时荧光定量PCR法检测,HBV DNA > 10² IU/ml作为阳性判断标准,操作步骤按说明书进行。按照HBV DNA含量的高低分为高含量组(> 10⁴ IU/ml)与低含量组(10²~10⁴ IU/ml)。

五、胎盘组织HBsAg和HBcAg的检测

石蜡包埋的胎盘组织经常规脱蜡,免疫组织化学染色方法(间接酶标二步法)进行HBsAg和HBcAg的检测。HBsAg阳性且HBeAg阳性的肝组织样本作为阳性对照,HBVM均阴性的健康足月妊娠孕妇胎盘组织作为阴性对照,同时设PBS代替一抗作为空白对照。

六、胎盘组织HBV感染的指标

胎盘组织HBsAg或HBcAg为阳性者即诊断为胎盘组织发生乙型肝炎病毒感染。

七、统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,两组间率的比较采用四格表 χ^2 检验,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、HBVM和HBV DNA含量检测结果

HBeAg阳性组18例,HBeAg阴性组12例,其HBVM模式分别为HBsAg(+)、HBeAg(+)、HBcAg(+)和HBsAg(+)、HBeAb(+)和HBcAb(+)。HBV DNA高含量组(> 10⁴ IU/ml)共17例,低含量组(10²~10⁴ IU/ml)共13例。HBeAg阳性且HBV DNA > 10⁴ IU/ml共13例。

表1 HBeAg阳性组与HBeAg阴性组胎盘HBV感染情况的比较

组别	例数	胎盘HBV感染[例(%)]	
		阳性	阴性
HBeAg阳性组	18	16 (88.89)	2 (11.11)
HBeAg阴性组	12	5 (41.67)	7 (58.33)
合计	30	21 (70.00)	9 (30.00)

表2 HBV DNA高含量组与HBV DNA低含量组胎盘HBV感染情况的比较

组别	例数	胎盘HBV感染[例(%)]	
		阳性	阴性
HBV DNA高含量组	17	16 (94.12)	1 (5.88)
HBV DNA低含量组	13	5 (38.46)	8 (61.54)
合计	30	21 (70.00)	9 (30.00)

二、胎盘组织HBsAg和HBcAg的检测结果

30例HBsAg阳性孕妇的胎盘组织中, 21例胎盘组织发生HBV感染, 胎盘总感染率为70% (21/30)。其中HBsAg与HBcAg检出率分别为55.67% (17/30) 和70% (21/30)。胎盘各层细胞均可见HBsAg与HBcAg表达。HBsAg主要呈黄色不均一颗粒状或团块状位于胎盘组织各类细胞胞浆中。HBcAg呈黄色均匀颗粒状散在分布于各类细胞胞核内。阴性对照组及空白对照组无阳性信号检出。

三、孕妇血清中HBeAg状态和HBV DNA水平与胎盘HBV感染的关系

如表1所示, HBeAg阳性组18例, 其胎盘组织HBV感染率分别为88.89% (16/18), 高于HBeAg阴性组胎盘组织感染率41.67% (5/12), 采用Fisher确切概率法检测差异具有统计学意义 ($P=0.013$)。如表2所示, HBV DNA高含量组孕妇发生胎盘HBV感染率为94.12% (16/17), 高于HBV DNA低含量组38.46% (5/13), 差异有统计学意义 ($P=0.002$)。

讨 论

乙型肝炎病毒宫内感染是HBV传播的重要途径之一, 发生宫内感染后联合免疫很难再阻断, 因此阐明其发生机制具有很重要的临床意义。已有文献记载HBV发生宫内感染主要是通过胎盘引起的, HBV通过胎盘屏障的确切机制尚不清楚, 闫永平等^[4-7]通过ABC免疫组织化学方法在HBsAg阳性孕妇的胎盘组织各层细胞中检测到HBsAg、HBcAg表达, 且自母体面至胎儿面逐层减少, 说明乙型肝炎病毒可以通过感染胎盘组织各层细胞导致胎儿发生宫内感染, 提出经胎盘组织感染胎儿主要有两种途径: ①血源性: 由于先兆早产等引起胎盘微血管的破损, 使得含高水平HBV的母血直接进入胎儿循环造成感染。②细胞源性: HBV首先感染孕妇的蜕膜细胞, 然后经过“细胞转移”使胎儿绒毛膜血管内皮细胞受染而引起胎儿HBV宫内感染。Bai等^[8]和Zhang等^[9]研究也发现乙型肝炎病毒宫内感染主要是通过胎盘屏障传给胎儿, 胎盘组织各层细胞会发生HBV感染且逐层减少。与以往的ABC免疫组织化学染色法不同, 本试验采用间接酶标二步法对胎盘组织中HBsAg、HBcAg进行免疫组织化学检测, 该方法由于避免了生物素的使用, 从而可以避免由于生物素引起的非特异性背景显色, 使得

显色背景清晰。本研究发现胎盘组织各类细胞发生HBV感染, 因部分胎盘组织不能包含胎盘组所有层细胞, 总的胎盘HBV感染率为70% (21/30), HBsAg和HBcAg阳性率分别为55.67% (17/30) 和70% (21/30), HBsAg主要呈不均一颗粒状或团块状位于胎盘组织各类细胞胞浆中。HBcAg呈均匀颗粒状散在分布于各类细胞胞核内。HBV能够感染胎盘组织中各类细胞从而感染胎儿, 与上述结果报道一致, 但并不排除其他途径的可能性。

乙型肝炎病毒经胎盘组织发生宫内感染与孕妇血清中HBeAg阳性和HBV DNA载量呈正相关关系^[10-13], 关于HBeAg阳性孕妇引起胎盘感染的具体机制仍不清楚, Reifenberg等^[14]认为HBeAg不能通过胎盘。而也有报道认为因胎盘渗漏, 母血可以经过胎盘流入胎儿血, HBeAg能够通过胎盘^[11, 15], 从而使胎儿发生感染, 以上结果报道不同, 还需进一步的研究。本研究发现, HBeAg阳性组孕妇胎盘组织发生HBV感染率显著高于HBeAg阴性组, 差异具有统计学意义。HBV DNA作为乙型肝炎病毒复制的指标, 其高含量组发生胎盘HBV感染率高于低含量组, 差异具有统计学意义。本研究表明HBsAg阳性、HBeAg阳性和HBV DNA高载量是胎盘组织发生HBV感染的高危因素, 与以往结果一致。

自乙肝疫苗和乙肝免疫球蛋白接种以来, HBV感染已经得到良好的控制, 但是仍有5%~10%免疫失败^[2], 其主要原因为宫内感染。而孕妇血清HBeAg阳性和高病毒载量是组织宫内感染免疫预防失败的主要原因^[16], 胎盘组织在HBV宫内感染中占有重要的作用, 一旦胎盘组织被HBV感染, 就会逐层传染至胎儿, 引发宫内感染。因此, 对于HBsAg阳性的孕妇, 要尽量使其外周血中HBeAg转阴, HBV DNA量降至正常后再受孕。这对于减少HBV宫内感染, 具有极其重要的临床意义。

参 考 文 献

- 1 Treppe C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. Lancet, 2014, S0140-6736(14):60220-60228
- 2 Patton H, Tran TT. Management of hepatitis B during pregnancy[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(7):402-409.
- 3 Sun H, Tang X, Wang B, et al. A preliminary study on the molecular evolution of the two routes of intrauterine transmission of HBV[J]. Arch Virol, 2012, 157(1):155-164.
- 4 闫永平, 徐德忠, 王文亮, 等. HBsAg 阳性孕妇足月分娩胎盘HBV感染状态的免疫组织化学研究[J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(5):409-411.
- 5 徐德忠, 闫永平, 徐剑秋, 等. 乙型肝炎病毒宫内传播因素和机制的分子流行病学研究[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(1):24-27.
- 6 徐德忠, 闫永平, 王素萍, 等. 胎盘组织在乙型肝炎病毒宫内传播中的作用及其机制研究[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(3):176-

- 177.
- 7 Xu DZ, Yan YP, Zou S, et al. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus[J]. *Am J Obstet Gynecol*,2001,185(4):981-987.
- 8 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 J Gastroenterol*,2007,13(26):3625-3630.
- 9 Zhang SL, Yue YF, Bai GQ, et al. Mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus[J]. *World J Gastroenterol*,2004,10(3):437-438.
- 10 Xu DZ, Yan YP, Choi BC, et al. Risk factors and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study[J]. *J Med Virol*,2002,67(1):20-26.
- 11 Wang ZH, Zhang J, Hong Y, et al. Quantitative analysis of HBV DNA levels and HBeAg titer in hepatitis B surface antigen positive mothers and their babies: HBeAg passage through placenta and the rate of decay in babies[J]. *J Med Virol*,2003,71(3):360-366.
- 12 Chen Y, Wang L, Xu Y, et al. Role of maternal viremia and placental infection in hepatitis B virus intrauterine transmission[J]. *Microbes Infect*,2013,15(5):409-415.
- 13 Shao ZJ, Yan YP, Zhang L, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus: a Chinese experience[J]. *J Med Virol*,2011,83(5):791-795.
- 14 Reifenberg K, Deutschle T, Wild J, et al. The hepatitis B virus e antigen cannot pass the murine placenta efficiently and not induce CTL immune tolerance in H-2b mice in utero[J]. *Virology*,1998,243(1):45-53.
- 15 Wang JS, Zhu QR. Infection of the fetus with hepatitis B e antigen via the placenta[J]. *Lancet*,2000,355(9208):989.
- 16 Yin YZ, Wu LL, Zhang J, et al. Identification of risk factors associated with immunoprophylaxis failure to prevent the vertical transmission of hepatitis B virus[J]. *J Infect*,2013,66(5):447-452.

(收稿日期: 2014-09-22)

(本文编辑: 孙荣华)

赵燕青, 顾梅蕾, 张媛媛, 等. HBsAg阳性孕妇胎盘组织HBV感染相关因素分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(3): 393-396.

