

· 论 著 ·

乙型肝炎病毒宫内传播机制的分子流行病学研究

徐德忠¹ 闫永平¹ 徐剑秋² 门可¹ 刘志华¹
张景霞¹ 王福生¹ 汪爱勤¹ 蒋美玲² 陈向红²

摘要 为了解乙型肝炎病毒 (HBV) 宫内传播的危险因素与机制, 笔者进行了病例对照研究与胎盘组织的免疫组化。收集陕西省妇幼保健院 242例 HBsAg 阳性的孕妇及其新生儿作为研究对象。结果显示, 母亲 HBeAg 阳性 (OR= 32.63) 和先兆早产史 (OR= 22.80) 是主要的危险因素。在 32例足月孕妇的免疫组化 HBsAg 阳性的胎盘组织中, HBsAg 阳性率在脱膜细胞层为 100%, 滋养层细胞为 59.38%, 绒毛间质细胞为 65.50%, 绒毛毛细血管内皮细胞为 39.38%, 表明 HBV 感染从母面到胎儿血管呈逐渐下降趋势 ($P < 0.01$) 而且绒毛毛细血管 HBsAg 阳性与婴儿宫内感染有关 (OR= 20.86, $P < 0.01$)。根据上述结果, 我们提出假设: HBV 宫内传播可能有两途径: 经先兆早产等引起的胎盘血管渗漏的“血源传播”和 HBV 经胎盘各层细胞“转移”至胎儿血循环的“细胞转移传播”。

关键词 HBV 宫内传播 分子流行病学

A Molecular Epidemiologic Study on the Mechanism of Intrauterine Transmission of Hepatitis B Virus Xu Dezhong*, Yan Yongping, Xu Jianqiu, et al.* Fourth Military Medical University, Xian 710032

Abstract A case-control study with examination of placentas using immunohistochemistry stain was reported in this paper. In the Maternal and Children Health Hospita of Shanxi Province, 242 consecutive HBsAg positive mothers and their babies were selected as subjects and 110 placentas of HBsAg positive mothers and 25 placentas of HBsAg negative mothers during the different period of pregnancy were collected for laboratory test. The results showed that maternal HBeAg positivity (OR= 32.63) and history of threatened premature labor (OR= 22.80) were important risk factors. Among full-term placentas with HBsAg positivity, HBsAg (biomarker of HBV infection) positive rates were 100% in decidual cell, 59.38% in trophoblastic cell, 65.50% in villous mesenchyme cell, and 39.38% in villous capillary endothelial cell (VCEC) with a decreasing trend (trend test, $\chi^2 = 30.5, P < 0.01$) from mothers to fetus whereas HBsAg positive in VCEC was significantly related to intrauterine infection (OR= 20.86, $P < 0.01$). Results suggested that there might be two transmission routes on the mechanism of HBV intrauterine transmission, homogenous by damage of placental vessels and cellular through placental cellular transfer of HBV.

Key words HBV Intrauterine transmission Molecular epidemiology

探讨 HBV 宫内传播的机理从而采取针

对性的预防措施是控制世界上乙肝流行的关键之一。但是, 国内外有关这方面的研究报告仅有数篇, 且结论相互矛盾^[1-3]。为此我们于 1992 年开始了病例对照研究与胎盘组织的免疫组化检测。

1 第四军医大学流行病学教研室 西安 710032

2 陕西省妇幼保健院

国家自然科学基金资助项目

材料与方 法

一 研究对象与标本收集: 1993年 3月 至 1995年 9月在陕西省妇幼保健院选择 HBsAg 阳性孕妇的连续性病例 283名及其所生婴儿,作为研究对象,采集孕妇血 出生 后 24h内的婴儿股静脉血标本。 婴儿采血后 进行乙肝疫苗全程免疫,注射乙肝高效价免 疫球蛋白;同时收集 HBsAg 阳性孕妇不同 孕期的胎盘 110例,阴性孕妇的胎盘 25例。

二、病例对照调查:按统一表格,由培 训的调查员进行。内容分六大类 51个项目。 凡 婴儿出生后 24小时内血清 HBsAg 阳性者判 定为宫内感染,作为病例组;阴性者为对照 组。

三、实验室检测:

1.血清 HBsAg 和 HBeAg:检测均用酶 联免疫吸附试验 (ELISA),检测盒购自上海 科华生物技术公司。结果用 DG-3022A ELISA 检测仪判定, $P/N \geq 2.1$ 为阳性。

2.胎盘 HBsAg 与 HBeAg 的免疫组织 化学方法检测:用 ABC免疫染色法检测,试 剂盒购自美国 Vecta公司。鼠单克隆抗-HBs 和兔单克隆抗-HBe购自美国 Zymed公司。

HBsAg 与 HBeAg 阳性的尸肝组织为阳性对 照;HBsAg 和 HBeAg 阴性的尸肝、HBsAg 阴性的孕妇胎盘组织为阴性对照。同时设正 常鼠或兔血清的替代对照和 PBS空白对照; 还进行了 HBsAg 吸收阻断试验以证明其特

异性

四、统计学方法:用第四军医大学统计学 教研室 SPLM 软件在 486微机上进行单因 素与多因素分析。

结 果

一 一般情况与 HBV 宫内感染率: 283 例孕妇血清,经实验室核查 HBsAg,有 41例 阴性 故仅 242例可供研究。 宫内感染率为 3.3% (8/242)。 HBsAg 与 HBeAg 双阳性的 孕妇有 88例,其宫内感染率为 9.1% (8/ 88)。

二、病例对照 研究结果:

1.均衡性检验:对病例组与对照组母亲 的年龄、职业和婴儿的体重、性别等进行均 衡性检验,差异均未见显著性。故这些因素与 宫内感染关系不大。

2.单因素分析:在孕妇 HBeAg 阳性 农村居住、既往 HBsAg 携带、人流史、1产以 上、剖腹产、孕期用药、先兆流产与早产、妊 高征等等诸多因素中,仅母亲 HBeAg 阳性与 先兆早产 OR 值高 (分别为 32.63 与 22.80) 且有统计学意义 ($P < 0.01$)。可见,这二者可 能是宫内感染的主要因素。

3.多因素分析:进行 logistic 回归分析 后,仍然是母亲 HBeAg 阳性与先兆早产史 这 2 个因素有意义 (OR 值分别为 7.06 与 13.08) (表 1)。

三、胎盘组织的免疫组化结果:

表 1 乙肝病毒宫内感染各危险因素的 logistic 多元分析

| 参数名 | OR 值 | 估计值 | 标准误 | U 值 | P 值 |
|-------------|-------|----------|--------|--------|--------|
| 常数项 | | - 4.8543 | 2.5119 | 1.9325 | 0.0533 |
| HBeAg 阳性 | 7.06 | 1.9548 | 0.9565 | 2.0436 | 0.0410 |
| 既往 HBsAg 携带 | 1.21 | 0.1882 | 0.1131 | 1.6644 | 0.0960 |
| 先兆流产 | 0.27 | - 1.3084 | 1.4894 | 0.8785 | 0.3797 |
| 先兆早产 | 13.08 | 2.5710 | 0.9652 | 2.6638 | 0.0077 |
| 妊高征 | 0.50 | - 0.6993 | 1.9568 | 0.3574 | 0.7208 |

1. HBsAg 和 HBeAg 的阳性检出状况: 25例 HBsAg 阴性孕妇各孕期的胎盘组织均 阴性。HBsAg 阳性组中,孕早期的 18例均阴 性;孕中期 6例中有 1例 HBsAg 和 HBeAg 免疫组化阳性 (16.67%), HBsAg 见于脱膜、

滋养层与 Hofbauer 细胞的胞浆中;足月的 86例中有 32例 (37.21%) 检测到 HBsAg,其 中 21例同时 HBeAg 阳性,后者分布在细胞 核内 (图略)。因此,HBV 在胎盘组织内的感 染有随孕期延长而增加的趋势。

2. 感染 HBV 的足月胎盘组织各层细胞中 HBsAg 与 HBcAg 检出频度: 在 32 例 HBV 感染的胎盘中, HBsAg 阳性率在母面蜕膜细胞最高 100% (32/32), 其次为胎儿的滋养层细胞与绒毛间质细胞, 分别为 59. 38% (19/32) 与 65. 50% (20/32), 绒毛中胎儿毛细血管内皮细胞最低 39. 38% (11/32) (趋势检验 $\chi^2 = 30. 5, P < 0. 01$)。HBcAg 也有类似趋势。这提示细胞的 HBV 感染频度由母面向胎儿逐渐降低。

3. 绒毛毛细血管内皮细胞 HBsAg 阳性与宫内感染的关系: 如上述, 在 86 例足月胎盘中, 11 例绒毛毛细血管内皮细胞 HBsAg 免疫组化呈阳性, 其中 4 例发生宫内感染; 而 75 例 HBsAg 阴性孕妇中, 仅 2 例发生宫内感染 (表 2) OR 为 20. 86 ($P < 0. 01$)。可见两者密切相关。

表 2 绒毛毛细血管内皮细胞 HBsAg 阳性与宫内感染的关系

| 绒毛毛细血管内皮细胞 HBsAg 阳性 | 新生儿宫内感染 | | 合计 |
|---------------------|---------|----|----|
| | + | - | |
| + | 4 | 7 | 11 |
| - | 2 | 73 | 75 |
| 合计 | 6 | 80 | 86 |

OR = 20. 86 (2. 56~ 207. 76), $\chi^2 = 16. 59, P < 0. 01$

讨 论

笔者利用 HBsAg 与 HBcAg 作为生物学标志 (Biological Markers), 同时在宏观与微观研究中均采取了一系列质量控制措施, 以保证研究的科学性。

病例对照研究的单因素与多因素均发现, 孕妇 HBeAg 阳性与先兆流产史和宫内感染密切相关 (表 1), 表示其确是宫内感染的主要危险因素。

有人曾在胎盘组织中发现 HBsAg 和 HBcAg^[4, 5]。本文免疫组化结果不仅发现, 16. 67% 孕中期和 37. 2% 足月产的胎盘组织 HBsAg 和 或 HBcAg 阳性; 而且显示, HBV 感染的胎盘组织各层细胞中感染的分

布频度 (阳性率) 由母面的蜕膜细胞至胎儿的绒毛毛细血管内皮细胞逐渐降低的趋势 (趋势检验, P 均 $< 0. 01$), 提示, HBV 感染似由蜕膜细胞至胎儿滋养层或绒毛间质细胞, 最后至绒毛毛细血管内皮细胞, 有一个“细胞转移”过程。很有意思的是, 把免疫组化与现场调查的结果综合分析 (表 2), 11 例绒毛毛细血管内皮细胞 HBsAg 阳性孕妇, 有 4 名婴儿宫内感染 (这 4 名婴儿的母亲均无先兆早产史), OR 值 20. 86, 然而, 还有 7 例绒毛毛细血管内皮细胞 HBsAg 阳性孕妇未出现宫内感染, 提示其可能是宫内感染的一个必备因素, 但还不是充分因素, 尚还存在其他影响因素, 尚需深入研究。

由以上结果, 我们初步考虑 HBV 宫内感染可能有 2 条途径: ① 血源性: 由于先兆早产等事件引起胎盘血管的破损, 使高浓度 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”, 最后使胎儿绒毛毛细血管内皮细胞受染引起胎儿宫内传播。然而, 要证实此假说, 还要作大量工作。

参 考 文 献

- 1 Lin H, Lee T, Chen D, et al. Transplacental leakage of HBeAg-positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus. *J Pediatr*, 1987, 111: 877.
- 2 Ohto H, Lin H, Kawana T, et al. Intrauterine transmission of hepatitis B virus is closely related to placental leakage. *J Med Virol*, 1987, 21: 1.
- 3 唐时幸, 于光烈, 程绍尧. HBV 宫内感染机制及影响因素的研究. *中华流行病学杂志*, 1991, 12: 325.
- 4 Lucifora G, Calabro S, Carroccio G, et al. Immunocytochemical HBsAg evidence in placentas of asymptomatic carrier mothers. *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 159: 839.
- 5 Lucifora G, Martines F, Calabro S, et al. HBcAg identification in the placental cytotypes of symptom free HBsAg carrier mothers: A study with the immunoperoxidase method. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, 163: 235.

(收稿: 1997-10-31 修回: 1997-12-12)