

HBcAg 在乙型肝炎病毒携带者孕妇胎盘中的识别与意义

刘颖琳, 邝健全, 刘新质, 陈镛

(中山医科大学附属孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究胎儿感染乙型肝炎病毒(HBV)与胎盘感染之间的关系及其意义。【方法】用 PCR 及斑点杂交法检测母血、新生儿静脉血 HBV DNA(确定胎儿感染者), 用免疫组化方法(LSAB 法)检测 61 例 HBV 携带者母亲胎盘 HBcAg。【结果】① 胎儿 HBV 感染率为 22.92% (33/144); ② 61 例胎盘 HBcAg 阳性率为 68.85% (41/61), 胎儿感染组阳性率(82.14%)高于对照组(54.55%), $P < 0.025$; ③ 母血 HBeAg/HBV DNA 阳性者, 胎盘 HBcAg 阳性率(82.05%)高于母血 HBeAg/HBV DNA 阴性者(40.91%), $P < 0.005$; ④ 胎盘各种细胞成分中, 以与母血直接接触的蜕膜细胞、末梢绒毛合体细胞及 EVT(绒毛外滋养细胞) HBcAg 阳性率较高(36.07%~49.18%)。【结论】胎儿感染 HBV 与胎盘感染有关, 胎盘屏障对 HBV 有一定阻挡作用。

关键词: 肝炎核心抗原, 乙型; 肝炎病毒, 乙型; 疾病传播, 垂直; 胎盘/微生物学

中图分类号: R714.5; R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2000)01-0043-04

The Expression of HBcAg in HBV Carrier Mothers' Placentas and It's Significance

LIU Ying-lin, KUANG Jian-quan, LIU Xin-zhi, CHEN Mo-yie.

(Department of Obstetric and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Guangzhou, 510120, China)

Abstract:【Objective】To study the relationship between fetal infection and placental infection of HBV (Hepatitis B Virus).【Method】HBV DNA was detected in maternal and fetal peripheral blood by PCR and Southern-blot Hybridization. HBcAg was detected in 61 cases of HBV carrier mothers' placentas by immunocytochemistry (LSAB method).【Result】① Fetal infection rate of HBV is 22.92% (33/144). ② HBcAg positive incidence in carrier mothers' placentas was 68.85% (41/61). But the rate in fetal infection group (82.14%) was higher than that in control group (54.55%), $P < 0.025$. ③ The placental HBcAg positive rate in mothers with HBeAg/HBV DNA+ (82.05%) was higher than that in mothers with HBeAg-HBV DNA- (40.91%), $P < 0.005$. ④ The frequency of HBcAg positive syncytial cells which contact directly with mothers' blood was the highest among all other kinds of placental barrier cells.【Conclusion】The HBV was capable of infecting fetus by infecting the placental barrier. The placental barrier can considerably prevent the passage of HBV.

Key words: hepatitis B core antigens; hepatitis B virus; disease transmission, vertical; placenta/microbiology

对于乙型肝炎病毒(HBV)宫内感染的确切机制至今仍未阐明, 而乙型肝炎病毒疫苗接种免疫失败者, 往往是那些有胎儿期已通过胎盘感染了 HBV 的婴儿, 因此, 对 HBV 母胎传播的研究是一个重要的研究课题。本文试图通过检测乙型肝炎病毒携带者母亲胎盘中的 HBcAg, 说明胎盘感染 HBV 与

胎儿感染 HBV 之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

自 1995 年 1 月~1996 年 2 月到我院产科门诊

收稿日期: 1999-07-14

基金项目: 孙逸仙纪念医院科研基金资助课题

作者简介: 刘颖琳(1965-), 女, 广东台山入, 讲师, 临床博士

进行产前检查的孕妇 1 583 人次, 常规检查乙肝 3 对, 肝功 3 项 (AST、ALT 及 AST/ALT), 发现 HBsAg 阳性者 157 人, 阳性率为 9.92%, 其中以材料齐全的 149 名孕妇为研究对象; 平均年龄 28.04 岁, 孕龄 40 周。初产妇 138 例, 经产妇 11 例; 阴道分娩 107 例, 剖宫产 42 例, 平均产后出血量为 233.79 mL; 分娩新生儿共 152 例 (3 名孕妇分娩双胞胎) 均成活, 男性 71 例, 女性 81 例, 平均出生体重 3.21 kg, 身长 49.29 cm。出生 1 min Apgar 评分 < 4 分 2 例 (1.32%), 4~7 分 13 例 (8.55%), 8~10 分 137 例 (90.13%)。

同期分娩的孕妇中随机抽出 10 例 HBV 标志物阴性的产妇作为阴性对照。上述孕妇临产后均抽取静脉血检测 HBV DNA。新生儿出生后抽取脐血或 24 h 静脉血, 检测 HBV DNA (脐血结果阳性者须复查静脉血才能确诊为宫内感染)。

1.2 取材与分组

在证实为宫内感染的 33 例孕妇中, 有 28 例留取了胎盘标本, 作为胎儿感染组 (fetal infection group); 在新生儿脐血或静脉血 HBV DNA、HBV 标志物均阴性的携带者孕妇中, 随机选择 33 例作为对照组 (control group)。上述两组孕妇年龄 (maternal age)、孕周 (gestational duration), 以及胎膜早破 (PM-RM; premature rupture of membranes)、孕高症 (PIH-syndrom; pregnancy-induced hypertension syndrom)、早产 (preterm birth)、过期妊娠 (postdatism)、高龄初产 (elderly primiparity) 等妊娠合并症发生率等比较均无显著性差异 (表 1)。

表 1 胎儿感染组与对照组临床资料对比

Table 1 Comparison of the clinical data between fetal infection group and control group¹⁾ [n(%), $\bar{x} \pm s$]

Clinical data	Fetal infection group n = 28	Control group n = 33
Maternal age(y)	28.00 ± 3.42	29.50 ± 3.86
Gestational duration(wk)	39.71 ± 1.57	39.57 ± 1.57
PMRM	9(32.14)	6(18.18)
PIH syndrom	5(17.86)	4(12.12)
Preterm birth	2(7.14)	2(6.06)
Postdatism	1(3.57)	1(3.03)
Elderly primiparity	2(7.14)	3(9.09)

1) P > 0.10

上述两组孕妇 (共 61 例) 胎盘娩出后测量其大小、重量、脐长, 马上置于 10% 中性福尔马林液中固定, 于胎盘中央处取材, 包括胎盘各层, 常规石蜡包埋, 切片 (切片厚 5 μm), 作免疫组化检查。

1.3 方法

1.3.1 血清 HBV DNA 同一份标本分别用 PCR 及斑点杂交法检测, 药盒分别由中山医科大学附属中山三院传染科及上海医科大学源力试剂公司提供, PCR 扩增仪由美国 MJ 公司提供, 操作步骤按药盒说明书进行。

1.3.2 血清 HBV 抗原 用 ELISA 法检测, 药盒由深圳月亮湾工程有限公司提供, 操作步骤按药盒说明书进行。

1.3.3 胎盘组织 HBeAg 用免疫组化的方法——LSAB 法^[1] 检测。主要试剂: 一抗及 LSAB 药盒均由 Dako 公司提供, 一抗工作浓度为 1:200。每批实验均设阳性及阴性对照: 阳性对照标本为已证实 HBV 感染, 且 HBeAg 显色良好的同 1 例肝癌标本的连续切片; 阴性对照标本选在同期分娩、HBV 标志物阴性, 且母儿血 HBV DNA 均阴性的正常孕妇的胎盘组织。

阳性细胞的判断: 细胞结构清楚, 细胞浆内有明显的棕褐色颗粒显示, 阳性细胞与背景对比清晰, 背景结构清楚, 不显色。

2 结果

2.1 孕妇血 HBeAg 和/或 HBV DNA 阳性与胎儿感染 HBV 的关系

152 例新生儿中, 符合胎儿宫内感染 HBV 标准者 33 例, 另有 8 例新生儿出生时脐血 HBsAg 或 HBV DNA 虽呈阳性, 但未复查外周静脉血, 因而未能确定是否宫内感染者, 予以删除, 因此胎儿 HBV 宫内感染率为 22.92% (33/144)。从表 2 中可见, 母亲 HBeAg 或 HBV DNA 阳性者, 胎儿宫内感染率远高于 HBeAg 或 HBV DNA 阴性者, HBV DNA 阴性母亲无 1 例胎儿宫内感染 HBV。

2.2 HBV 胎儿感染与胎盘感染的关系

61 例 HBsAg 阳性携带者胎盘中, 发现 HBeAg 阳性细胞共 41 例, 阳性率为 68.85%。HBsAg 阳性细胞分散或簇状分布, 阳性颗粒弥漫分布于胞浆内, 未见明显的胞核着色。在该 41 例胎盘感染 HBV 的病例中, 23 例 (56.10%) 证实为胎儿感染。

胎儿感染组胎盘细胞 HBeAg 阳性率为 82.14%

(23/28), 高于对照组的 54.55% (18/33), 差异有显著性 ($P < 0.025$)。表 3 显示在胎盘各种细胞成分中比较两组 HBcAg 阳性率, 从表中可见, 仅有羊膜细胞的阳性率有差异, 胎儿感染组显著高于对照组, 其余细胞成分则无显著性差异。

2.3 孕妇血 HBeAg 和/或 HBV DNA 阳性与胎盘感染 HBV 的关系

在 61 例 HBsAg 阳性携带者孕妇中, 血 HBeAg 或 HBV DNA 阳性者 39 例, HBeAg 和 HBV DNA 均阴性 22 例。两组胎盘 HBcAg 阳性率及在各层细胞分布阳性率对比见表 4, 从表中可见孕妇血 HBeAg 或 HBV DNA 阳性者中, 82.05% 胎盘有 HBcAg 阳性细胞, 而两者均阴性者中仅 40.91% 胎盘有阳性细胞, 两组差异有显著性, 显示胎盘感染与母血中 HBV 感染程度有关。而胎盘蜕膜细胞及绒毛合体细胞 HBcAg 阳性率与母血 HBeAg 和 HBV DNA 有

关, 母血 HBeAg 或 HBV DNA 阳性者, 这两种细胞 HBcAg 阳性率远高于母血 HBeAg 及 HBV DNA 均阴性者。

表 2 胎儿感染 HBV 与母血 HBeAg 及 HBV DNA 的关系

Table 2 The relationship of fetal infection and HBeAg or HBV DNA Positive in mother's blood n (%)

HBVM/ HBV DNA in mothers' s blood	Total case number of fetus	Fetal infection	X^2	P
HBeAg+	46 ¹⁾	31 (67.39)	75.88	< 0.001
HBeAg-	98	2 (2.04)		
HBV DNA+	57 ¹⁾	33 (57.89)	65.34	< 0.001
HBV DNA-	87	0 (0)		

1) One case mother with HBeAg+/HBV DNA+ delivered twin

表 3 胎儿感染组与对照组胎盘组织细胞 HBcAg 总的阳性率及各种细胞成分阳性率的比较

Table 3 Comparison HBcAg Positive rate in placental tissue between the two groups and among various cellular type n (%)

Cellular type with HBcAg positive	Fetal infection group ($n = 28$)		Control group ($n = 33$)		P
	Decidual cell	14	(50.00)	16	
EVT	13	(46.43)	9	(27.27)	> 0.10
Syncytial cell	17	(60.71)	13	(39.39)	> 0.05
Basal membrane	6	(21.43)	6	(18.18)	> 0.10
Interstitial cell	3	(10.71)	7	(21.21)	> 0.10
Endothelia of villous vessel	10	(35.71)	6	(18.18)	> 0.10
Amnionic epithelia	9	(32.14)	2	(6.06)	< 0.10

表 4 孕妇血 HBeAg 或 HBV DNA 阳性与胎盘组织细胞 HBcAg 阳性的关系及其在各种细胞成分中的分析

Table 4 Analysis the relationship between mothers with HBeAg or HBV DNA positive rate and the rate of placentas with HBcAg positive in various cellular types¹⁾ n (%)

Type of HBcAg positive cell	HBeAg+ 或 HBV DNA+ ($n = 39$)		HBeAg- / HBV DNA- ($n = 22$)		P
	Total cell	32	(82.05)	9	
Decidual cell	24	(61.54)	6	(27.27)	< 0.01
EVT	17	(43.59)	5	(22.73)	> 0.05
Syncytial cell	24	(61.54)	6	(27.27)	< 0.01
Basal membrane	10	(25.64)	2	(9.09)	> 0.10
Interstitial cell	7	(17.95)	3	(13.64)	> 0.10
Endothelia of villous vessel	13	(33.33)	3	(13.64)	> 0.05
Amnionic epithelia	10	(25.64)	1	(4.55)	> 0.05

1) (+)positive, (-)negative

2.4 HBcAg 阳性细胞在胎盘组织各种细胞成分中的分布

从表 5 可见,在胎盘的各种细胞成分中,以蜕膜细胞(Decidual cell)、EVT (Extravillous trophoblast, 绒毛外滋养细胞)、末梢绒毛合体细胞(Syncytial cell)的 HBcAg 阳性细胞发现率较高(36.07%~49.18%),高于胎盘屏障的其他细胞成分:细胞基底膜(Basal membrane)、绒毛间质细胞(Interstitial cell)绒毛血管内皮细胞(Endothelia of villous vessel),亦高于羊膜上皮细胞(Amniotic epithelia)(16.39%~26.23%),差异有显著性($P < 0.01$)。

表 5 HBcAg 阳性细胞在胎盘组织细胞中的分布及阳性率的比较

Table 5 Distribution of HBcAg positive cells in placental tissue and comparing the positive rate case=61, n (%)

Type of HBcAg positive cell	n	(positive rate)	P
Decidual cell	30	(49.18)	> 0.10
EVT	22	(36.07)	> 0.10
Syncytial cell	30	(49.18)	< 0.01
Endothelium	16	(26.23)	> 0.10
Interstitial cell	10	(16.39)	> 0.10
Basal membrane	12	(19.67)	> 0.10
Amniotic epithelium	11	(18.03)	> 0.10

3 讨论

3.1 母血 HBeAg 或 HBV DNA 阳性是胎儿感染的高危因素

在本研究中发现,144 例 HBsAg 阳性携带者母亲所生新生儿中,胎儿感染率为 22.92%。在母亲为 HBeAg 或 HBV DNA 阳性新生儿中,胎儿感染率远高于母亲为 HBeAg 或 HBV DNA 阴性者,可见,母血 HBeAg 或 HBV DNA 阳性者,胎儿更容易感染 HBV。HBeAg 阴性者有 2.04% 发生胎儿感染,因此 HBeAg 阴性,但 HBV DNA 阳性母亲仍具有一定的感染力,对这些母亲新生儿仍需注意监测,但 HBV DNA 阴性者无 1 例发生胎儿感染,因而 HBV DNA 阴性的母亲,无论 HBeAg 阳性与否,均无发生宫内感染,与钟玲的研究结果一致^[4]。

3.2 胎盘感染与胎儿感染的关系

在 61 例胎盘中,发现 HBcAg 阳性细胞的机率为 68.85%,细胞类型包括胎盘屏障中的各层细胞,

与以往报道类似^[3,4],说明 HBV 不仅可感染胎盘,在其中复制,且有 HBcAg 的表达。

3.2.1 胎盘感染与母血的感染程度有关 在母亲为 HBeAg 或 HBV DNA 阳性者中,胎盘 HBcAg 阳性率远高于 HBeAg 及 HBV DNA 阴性者,差异有显著性($P < 0.005$),显示胎盘感染与母血 HBV 感染程度有关,而且母体成分的蜕膜细胞、与母血直接接触的末梢绒毛合体细胞感染率也与母血 HBV 感染程度有关,或者说,母亲血感染程度越高,越容易使胎盘感染。

3.2.2 胎儿感染与胎盘感染有关 本文结果显示,胎儿感染组胎盘组织细胞 HBcAg 阳性率(82.14%)远高于对照组(54.55%),差异显著,提示胎盘感染 HBV 与胎儿感染有关,母亲胎盘感染了 HBV,其胎儿更易获得感染,这与本人以往的研究结果相同^[5]。本研究还发现,在胎儿感染组中羊膜上皮细胞的 HBcAg 阳性率显著高于对照组,显示母亲胎盘羊膜上皮细胞受 HBV 感杂者,其胎儿更易受感染,羊膜上皮细胞受 HBV 感染也是胎儿宫内感染的另一重要有关因素。

3.3 胎盘屏障对胎儿有一定的保护作用。

本研究结果可见,41 例胎盘感染的病例中,只有 56.10% 发现胎儿感染,有 18 例携带者母亲胎盘 HBcAg 阳性,但其胎儿并没受 HBV 感染,说明胎盘受 HBV 感染后,并非必然会使胎儿感染,胎盘在一定程度上对胎儿有保护作用。此外,在胎盘屏障中,与母血直接接触的末梢绒毛合体细胞 HBcAg 阳性率最高(49.18%),而胎儿侧的胎盘屏障其他细胞成分(细胞基底膜、绒毛间质细胞、绒毛血管内皮细胞)的阳性率(16.39%~26.23%)则较低,其 HBcAg 阳性率在胎盘屏障中呈现从母体侧到胎儿逐渐减弱的趋势,提示 HBV 可能通过逐渐感染胎盘屏障而感染胎儿。

3.4 导致胎儿感染的其他可能因素

有关胎儿感染 HBV 的具体机理仍未有一致的认识,有人^[6]认为与胎盘渗漏有关,但也有学者^[7]反对,也有报道 HBV 垂直感染与遗传等有关^[8]。本文结果显示,胎儿感染组中胎盘细胞阴性率为 17.86%(5/28),因而未排除其他因素的存在。

参考文献:

[1] 梁英杰,凌启波.一种快速高敏感的免疫组织化学染色

与 ^{201}Tl 肺显像在原发性肺癌的诊断中均具有较高的阳性预测值,比较二者而言, ^{201}Tl 肺显像更具优越性,对于二者在肺癌淋巴结转移灶探测中的临床价值,有待更深入研究。

参考文献:

[1] Matsuno S, Tanabe M, Kawasaki Y, *et al*. Effectiveness of planar image and single photon emission computed tomography of thallium-201 compared with Gallium-67 in patients with primary lung cancer[J]. *Eur J Nucl Med*, 1992, 19(2): 86.

[2] Hassan I M, Salweil A, Constantinides C, *et al*. Uptake and kinetics of technetium-99m-Hexakis 2-methoxy isobutyl isonitrile in benign and malignant lesion in the lungs[J]. *Clin Nucl Med*, 1989, 14(5): 333.

[3] Desai S P, Yuille D L. Visualization of a recurrent carcinoid tumor and occult distant metastasis by technetium-99m-sestamibi[J]. *J Nucl Med*, 1993, 34(10): 1748.

[4] Nishiyama Y, Kawasaki Y, Yamamoto Y, *et al*. Technetium-99m-MIBI and thallium-201 scintigraphy of primary lung cancer[J]. *Nucl Med*, 1997, 38(8): 1358.

[5] Aktolun G, Bayhan H, Kir M. Clinical experience with Technetium-99m-MIBI imaging in patients with Malignant tu-

mors: preliminary results and comparison with thallium-201 [J]. *Clin Nucl Med*, 1992, 17(3): 171.

[6] Yüksel M, Cemik T F, Yedikaya N, *et al*. Is Tl-201 superior to Tc-99m-MIBI in the evaluation of primary lung cancer? [J]. *Eur J Nucl Med*, 1998, 25(8), 1024(abstr).

[7] Ito Y, Muranaka A, Harada T, *et al*. Experimental study on tumor affinity of thallium-201[J]. *Eur J Nucl Med*, 1978, 3(2): 81.

[8] Sehweil Am, Mckiliop J H, Milroy R, *et al*. Mechanism of thallium-201 uptake in tumors[J]. *Eur J Nucl Med*, 1989, 15(7): 376.

[9] Chiu M L, Kronauge J F, Piwnica-Worms D. Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of Hexakis(2-methoxy isobutyl isonitrile) technetium(1) in cultured mouse fibroblasts[J]. *J Nucl Med*, 1990, 31(10): 1646.

[10] Matsui R, Komori T, Namba R, *et al*. In vitro uptake and release of ^{201}Tl and $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ in cultured tumor cells and effect of anticancer drug[J]. *Radiat Med*, 1998, 16(2): 187.

[11] Piwnica W D, Chiu M L, Budding M, *et al*. Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organo-technetium complex[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(5): 977.

(编辑 关淡庄)

(上接第46页)

[1] 法——ISAB法[J]. *中华病理杂志*, 1993, 22(6): 369.

[2] 钟玲, 漆洪波, 胡丽娜, 等. 应用聚合酶链反应技术监测乙型肝炎病毒的子宫内传播[J]. *中华妇产科杂志*, 1995, 30(9): 553.

[3] 杨淑青, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 胎儿乙型肝炎病毒感染的研究——胎盘组织 HBV DNA、HBsAg 的检测及其意义[J]. *中山医科大学学报*, 1990, 11(2): 23.

[4] Giovanna I, Fabio M, Santina C, *et al*. HBsAg identification in the placental cytotypes of symptom-free HBsAg-carrier mothers: A study with the immunoperoxidase method[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, 163(1): 235.

[5] 刘颖琳, 邝健全, 刘新质, 等. 乙型肝炎病毒携带者母亲胎盘中 HBsAg 的表达及意义[J]. *中华围产医学杂志*, 1998, 1(2): 116.

[6] Ghendon Y. Perinatal transmission of Hepatitis B virus in high incidence countries [J]. *J Virol Method*, 1987, 17(1): 69.

[7] 唐时幸, 于光烈, 程绍尧. 乙肝病毒宫内感染机制及影响因素的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 1991, 12(6): 325.

[8] Ghendon Y. Perinatal transmission of hepatitis B virus in high incidence countries[J]. *J Virol Method* 1987, 17(1): 69.

(编辑 关淡庄)