

小肠疾病, 对其诊断与治疗产生不可估量的影响, 使胶囊内镜更好地为临床服务, 为患者造福。

#### 4 参考文献

1 张子其, 陈孝, 张建平, 张钰. 胶囊内镜对小肠疾病的诊断价值分

- 析. 中华消化内镜杂志 2003;20:227-229  
 2 吴云林, 张曙, 褚华, 孙波, 钟捷, 瞿祖康. M2A 胶囊内镜在消化病诊断中的应用研究. 中华消化内镜杂志 2003;20:230-233  
 3 李运红, 徐肇敏, 陈隆典, 韩树堂, 于成功. 胶囊内镜对胃肠道疾病的诊断意义. 中华消化内镜杂志 2003;20:234-236  
 4 朱森林, 陈旻湖, 胡品津. 胶囊内镜检查对小肠疾病的诊断价值. 中华消化内镜杂志 2003;20:240-242

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## HBV 感染的外周血单个核细胞在母婴传播中的载体作用

李淑红, 岳亚飞, 归巧娣, 石紫云, 杨秀莲, 白润芳, 葛文

李淑红, 岳亚飞, 归巧娣, 石紫云, 西安交通大学第一医院妇产科 陕西省西安市 710061  
 杨秀莲, 白润芳, 葛文, 陕西省人民医院妇产科 陕西省西安市 710061  
 项目负责人: 岳亚飞, 710061, 陕西省西安市健康路 1 号, 西安交通大学第一医院妇产科. zhangsl451206@vip.163.com  
 电话: 029-85324013  
 收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-07-11

### 摘要

**目的:** 探讨HBV感染的外周血单个核细胞(PBMC)在母婴传播中的载体作用。

**方法:** 选择血清HBV DNA(-)、PBMC HBV DNA(+ )孕妇分娩新生儿 25 例作为实验组, 乙肝标志物均为阴性孕妇分娩新生儿 10 例作为对照. 采用巢式PCR检测 2 组新生儿血清及PBMC HBV DNA; ELISA检测血清HBsAg; SP法检测PBMC中HBsAg.

**结果:** 实验组血清HBsAg均阴性, HBV DNA(+ )4 例; PBMC HBsAg(+ )6 例, HBV DNA(+ )6 例, 其中有 2 例血清和PBMC HBV DNA均为阳性, 4 例仅PBMC HBV DNA(+ ), 2 例仅血清HBV DNA(+ ). 对照组血清及PBMC HBV DNA和HBsAg均阴性.

**结论:** HBV感染的外周血单个核细胞可作为母婴传播的载体.

李淑红, 岳亚飞, 归巧娣, 石紫云, 杨秀莲, 白润芳, 葛文. HBV感染的外周血单个核细胞在母婴传播中的载体作用. 世界华人消化杂志 2004;12(9): 2229-2231

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2229.asp>

### 0 引言

母婴垂直传播是乙型肝炎病毒(HBV)传播的重要方式. 近年来, 随着乙肝疫苗和高效乙肝免疫球蛋白的应用, 使新生儿的感染率明显下降, 但仍有部分新生儿存在HBV感染<sup>[1]</sup>. 已有研究证实外周血单个核细胞是HBV的易感细胞, 也是HBV肝外寄生和复制的重要场所. HBV感染者的外周血单个核细胞中可检测到HBsAg,

HBeAg 和 HBV DNA 共价闭合环状 DNA (cccDNA) 的存在<sup>[2-6]</sup>甚至在血清HBsAg消失后产生了anti-HBs的患者的PBMC中HBV DNA, HBV RNA和共价闭合环状DNA (cccDNA)持续存在达数年之久<sup>[7-9]</sup>, 慢性乙肝患者PBMC内HBV DNA的阳性率为70-93%, 急性乙肝患者为50-80%左右<sup>[4]</sup>. 曾感染过乙肝现已恢复者PBMC内cccDNA的阳性率为50%, HBV RNA的阳性率为100%<sup>[9]</sup>. 因此, 这类细胞在抗HBV病毒感染过程中又可能成为病毒藏匿、复制的场所及进一步传播的媒介. 为探讨母亲HBV感染的PBMC在垂直传播中的作用, 我们用巢式PCR (nested-PCR, n-PCR) 法检测出血清HBV-DNA(-), PBMC HBV DNA(+ )母亲, 观察其分娩新生儿血清、PBMC内HBV-DNA和HBsAg的情况.

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-07/2004-03西安交通大学第一医院和省医院住院血清HBV DNA(-), PBMC HBV DNA(+ )孕妇及其分娩的新生儿 25 例, HBsAg(-)10 例, 其中anti-HBs(+), anti-HBe(+ )2 例; anti-HBs(+), anti-HBe(+ )1 例; anti-HBs(+), anti-HBe(+), anti-HBe(+ )6 例; anti-HBe(+ )1 例. HBsAg(+), anti-HBe(+), anti-HBe(+ )者 15 例. 年龄 24-36 (平均 28.5) 岁. 乙肝标志物均为阴性的同期在两医院分娩的孕妇及其新生儿 10 例为正常对照. 所有病例均无肝炎症状及体征, 无先兆流产、早产及妊高征. 各组间孕妇年龄、孕产次及分娩时胎龄无显著差异 ( $P > 0.05$ ).

#### 1.2 方法

**1.2.1 标本的采集和处理** 分娩时无菌采集产妇静脉血 5 mL, 新生儿接种HBV ac 和肌注HBIG前采集静脉血 5 mL, 2 mL 不抗凝留取血清, 3 mL 肝素抗凝分离PBMC, 于抽血后 2 h 内用比重 1.077 的淋巴细胞分离液常规分离PBMC. 用Hanks液洗涤 5 次, 保留最后一次上清 100  $\mu$ L, 以排除血清HBV DNA的污染. 吸取一

部分细胞 70% 丙酮固定, 甩片做免疫组化. 将 PBMC 浓度调整至  $6 \times 10^4$ ,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存统一检测.

1.2.2 HBV DNA 的检测 采用 n-PCR, 引物依 HBV 基因组相对保守的 S 区设计, 由中国科学院上海细胞生物学研究所合成. 引物序列为: 外引物 P<sub>1</sub> 5' - CATCTTCTTGTGGTTCTTCTG-3' (300-321), P<sub>2</sub> 5' - AGGGTTTAAATGTATACCC-3' (715-695), 内引物 P<sub>3</sub> 5' - TCTATGTTTCCCTCTTGTTC-3' (421-441), P<sub>4</sub> 5' - TACCACATCATCCATATAACTG-3' (626-605) 第 1 次扩增总反应体积 50  $\mu\text{L}$ , 无菌去离子水 26  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  buffer (含  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 20 mmol/L) 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 各 2  $\mu\text{L}$  (终浓度 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ), 待测模板 10  $\mu\text{L}$  振荡混匀后, 加入 Taq 酶 1  $\mu\text{L}$  (2 U), 最后加入石蜡油 50  $\mu\text{L}$  封顶  $94^\circ\text{C}$  预变性 180 s,  $94^\circ\text{C}$  变性 50 s,  $55^\circ\text{C}$  退火 50 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 60 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 300 s. 共 30 循环进行 PCR 扩增. 第 2 次扩增总反应体积 50  $\mu\text{L}$ , 无菌去离子水 34  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  Buffer (含  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 20 mmol/L) 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> 各 2  $\mu\text{L}$  (终浓度 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ), 第 1 次 PCR 扩增产物 2  $\mu\text{L}$  混匀后, 加入 Taq 酶 1  $\mu\text{L}$  (2 u), 最后加入石蜡油 50  $\mu\text{L}$  后进行 PCR 扩增. 反应条件同第 1 次 PCR 反应条件. 将扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 mg/L) 上电泳 (电压 5 V/cm) 后, 紫外灯下观察, 第 1 次扩增产物于分子大小为 416 bp 处有明确荧光带者判为阳性 (强阳性), 第 2 次扩增产物于分子大小为 206 bp 处有明确

荧光带者判为阳性 (弱阳性), 2 次扩增均阴性则判断为阴性, 每次试验均设阳性, 阴性及空白对照.

1.2.3 PBMC HBsAg 的检测 用 SP 法, 鼠抗人乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 单克隆抗体购自上海长岛公司, SP (二抗) 试剂盒购自购于福州迈新公司. 以乙型肝炎患者的肝组织标本为阳性对照. (1) 水化 20 min. (2) 0.5% TritonX-100 破膜 20 min. (3)  $\text{H}_2\text{O}_2$  封闭内源性过氧化物酶  $37^\circ\text{C}$  20 min; (4) 正常山羊血清封闭非特异性蛋白  $37^\circ\text{C}$  30 min; (5) 鼠抗人 HBsAb (1 : 100), 空白对照以 PBS 替代,  $4^\circ\text{C}$  过夜后  $37^\circ\text{C}$  复温 40 min; (6) 生物素化山羊抗小鼠 Ig G (二抗)  $37^\circ\text{C}$  30 min, (7) SP 复合物  $37^\circ\text{C}$  30 min, 以上各步之后以 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 洗 5 min  $\times$  3 次; (8) DAB 镜下控制显色, 苏木精复染 30 s, 脱水, 透明, 中性树胶封片显微镜下观察.

1.2.4 血清 HBsAg 的检测 采用 ELISA 法, 试剂盒购自厦门毕恩生物技术有限公司, 严格按说明书操作.

## 2 结果

2.1 血清 HBsAg 测定 实验组和对照组血清 HBsAg 均阴性.

2.2 PBMC HBsAg 测定 实验组 4 例 PBMC HBsAg 阳性 (表 1), HBsAg 棕黄色阳性信号出现在单核细胞和淋巴细胞的胞质 (图 1B), 细胞分布的频率以单核细胞为主, 其次是淋巴细胞. 对照组 PBMC 内无棕黄色颗粒 (图 1A).

2.3 血清及 PBMC HBV DNA 测定 实验组新生儿血清 HBV DNA (+) 4 例, PBMC HBV DNA (+) 6 例, 其中血

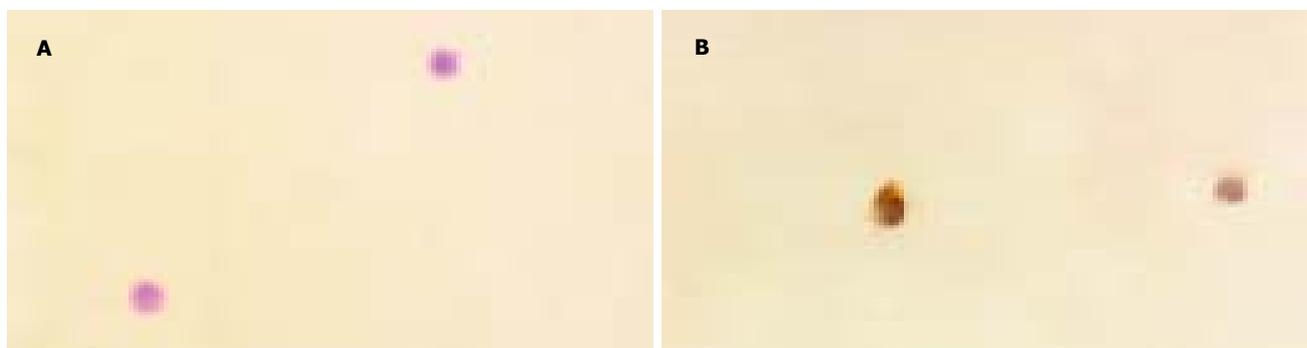


图 1 外周血单个核细胞中 HBsAg 表达 SP  $\times$  400. A: 正常对照组; B: 实验组.

表 1 新生儿宫内感染与母亲 HBV 感染状态的关系

No.	母亲血清 HBV 标志				母亲 HBV DNA		生儿 HBsAg		新生儿 HBV DNA	
	HBs Ag	anti-HBs	anti-HBe	anti-HBc	血清	PBMC	血清	PBMC	血清	PBMC
1	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
4	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
10	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
13	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
14	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
16	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
24	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+

清和PBMC HBV DNA 双阳性2例, 仅PBMC HBV DNA (+)4例, 仅血清HBV DNA(+)2例. (表1). 对照组血清和PBMC HBV DNA 均阴性.

### 3 讨论

PBMC不但可以从外周血摄取HBVDNA而且HBV可以在PBMC中复制. 本研究中, PBMC HBsAg的阳性率以单核细胞最高, 其次是淋巴细胞, 这与以往的研究结果一致. 宋闰宁 *et al*<sup>[10]</sup>体外用植物血凝素(PHA)刺激慢性乙肝病毒携带者PBMC, 在其培养的上清中用荧光定量PCR检测到HBV DNA. 本研究中, 仅PBMC HBV DNA(+)母亲所分娩新生儿中有4例血清HBV DNA(+). 表明PBMC可以作为HBV转录和翻译的场所, 产生并释放具有感染性的完整的病毒颗粒, 引起HBV感染. 本研究中, 2例新生儿血清和PBMC HBV DNA(+)PBMC HBsAg(+)而血清HBsAg(-), 2例PBMC HBV DNA(+)而PBMC HBsAg(-)可能是因为: (1)病毒复制水平相对较低. n-PCR法可检测出1-3copy/mL, 而ELISA方法检测出HBsAg, HBV-DNA必须大于/等于 $3 \times 10^{7-9}$ copy/mL. (2)病毒基因S区变异影响HBsAg表达或改变HBsAg立体构象而不能检出. 且绝大多数错义变异位于T, B淋巴细胞表位内或(和)其附近<sup>[11]</sup>, (3)HBV整合到宿主染色体中:HBV DNA的整合可导致病毒DNA序列重排, 进而影响HBsAg表达<sup>[12]</sup>. PBMC具有变形游走特性, 可在组织间隙内自由移动; 妊娠期和分娩期绒毛断裂也可使少量母体白细胞通过胎盘屏障. Lo *et al*<sup>[13]</sup>和Bauer *et al*<sup>[14]</sup>在脐血中检测到母亲PBMC. 本研究中, 实验组新生儿血清HBV DNA(+)4例, PBMC HBV DNA(+)6例, 我们同时在新生儿外周血单个核细胞中检测到HBsAg. 从而证明HBV感染的PBMC可作为一个载体引起HBV母婴传播. 我们推测仅新生儿PBMC HBV DNA(+)的机制可能在正常妊娠过程中通过完整的胎盘或分娩过程中母血经渗漏至胎儿血循环. 新生儿仅血清HBV DNA(+)的机制, 推测可能是PBMC中的HBV在胎盘处复制并感染胎盘进入新生儿血液循环. 孕期多次注射乙肝免疫球蛋白或联合乙肝疫苗可有效降低血清HBV感染率, 但对

PBMC中的HBV的感染无效<sup>[15]</sup>. 因此,要进一步降低HBV母婴传播率必须探索降低PBMC HBV感染率的方法.

### 4 参考文献

- 1 王建设, 朱启. 乙肝免疫球蛋白联合乙肝疫苗阻断乙型肝炎病毒母婴传播长期随访研究. 中国实用儿科杂志 2000;15:558-560
- 2 刘茂昌, 王贵强, 朴文花, 张乃临, 公维波, 王艳, 王勤环. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞共价闭环状DNA的检测. 中华肝脏病杂志 2004;12:249-250
- 3 Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002;9:243-57
- 4 杨晓静, 邹雄, 王立水. 荧光定量PCR检测血清和外周血单核细胞中HBV DNA含量及其意义. 中华肝脏病杂志 2003;11:214-215
- 5 王健, 孙琳. HBV垂直传播的细胞分子机制研究. 实用医学杂志 2001;17:827-828
- 6 Torii N, Hasegawa K, Joh R, Hayashi N. Configuration and replication competence of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis B patients and patients who have recovered from acute self-limited hepatitis. *Hepatol Res* 2003;25:234-243
- 7 Mei SD, Yatsuhashi H, Parquet MC, Hamada R, Fujino T, Matsumoto T, Inoue O, Koga M, Yano M. Detection of HBV RNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with and without HBsAg by reverse transcription polymerase chain reaction. *Hepatol Res* 2000;18:19-28
- 8 Chakravarty R, Neogi M, Roychowdhury S, Panda CK. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission. *Virus Res* 2002;90:133-141
- 9 Cabrerizo M, Bartolom inverted question marke J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen- negative cases. *Hepatology* 2000; 32:116-123
- 10 宋闰宁, 骆梅兰, 黄文琪. 乙肝病毒携带者外周血单个核细胞培养上清液HBV-DNA定量检测意义. 中国医师杂志 2003;5:484-485
- 11 许红梅, 彭明利, 凌宁, 卿玉玲, 任红. 母婴传播后母子体内乙型肝炎病毒前S/S基因变异研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:398-401
- 12 王贵强, 斯崇文. 应重视对隐匿性乙型肝炎的诊断. 中华内科杂志 2002;41:649-650
- 13 Lo YM, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000;46:1301-1309
- 14 Bauer M, Orescovic I, Schoell WM, Bianchi DW, Pertl B. Detection of maternal deoxyribonucleic acid in umbilical cord plasma by using fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeat sequences. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:117-120
- 15 岳亚飞, 李银姬, 张树林. 孕妇主动与被动联合免疫预防乙型肝炎病毒宫内感染的临床研究. 中华围产医学杂志 2000;3:3-5