

## HBV感染者胎盘组织HBV ccc DNA检测

陈京龙<sup>1</sup>, 刘霞<sup>2</sup>, 谢尧<sup>3</sup>, 兰孟东<sup>4</sup> (1.首都医科大学北京地坛医院 肿瘤内科, 北京 100015; 2.山东大学齐鲁儿童医院 内一科, 济南 250013; 3.首都医科大学北京地坛医院 内4科, 北京 100015; 4.首都医科大学北京地坛医院 病理科, 北京 100015)

**摘要:** 目的 建立HBV ccc DNA在胎盘组织中定性及定位检测方法, 了解慢性HBV感染者胎盘组织中HBV ccc DNA的存在状况, 进一步探讨其意义及乙型肝炎病毒母婴传播机制。方法 选取首都医科大学北京地坛医院慢性乙型肝炎病毒感染者孕晚期胎盘组织40例, 阴性对照肝组织标本3例, 阴性对照为健康足月妊娠产妇胎盘标本, 共5例。所有胎盘标本均分两份, 分别于-80℃冷冻和福尔马林室温浸泡保存。冷冻标本采用质粒抽提法提取胎盘组织中HBV ccc DNA, 液相PCR定性检测; 福尔马林处理标本作石蜡切片, 用于原位PCR定位检测。结果 40例标本中, 液相PCR检测出HBV ccc DNA阳性者8例, 其相应的血清HBV DNA均>10<sup>5</sup>拷贝/ml。取该8例及另2例乙型肝炎患者孕晚期胎盘石蜡切片经HBV ccc DNA原位扩增, 7例检测出HBV ccc DNA阳性, 胎盘绒毛毛细血管内皮细胞、绒毛合体滋养层细胞、PBMC等多种细胞均存在HBV ccc DNA阳性信号。结论 研究表明, 胎盘组织HBV感染与孕妇血液中HBV DNA含量显著相关。胎盘组织的HBV ccc DNA原位PCR检测显示, HBV可感染胎盘各层细胞。羊膜上皮细胞中也发现HBV ccc DNA阳性信号。胎盘组织感染的HBV及其在这些细胞中的复制是否直接与HBV宫内感染相关尚需进一步研究。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; 共价闭合环状DNA; 母婴传播; 原位聚合酶链反应

### Detection of HBV ccc DNA in placental tissue of HBV carrier

CHEN Jing-long<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>2</sup>, XIE Yao<sup>3</sup>, LAN Meng-dong<sup>4</sup> (1.Internal Department of Oncology of Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.The First Internal Department of QiLu Children Hospital, Medical College of Shandong University, Jinan 250013, China; 3.The Fourth Department of Internal Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 4.Department of Pathology of Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To construct the methods of HBV ccc DNA qualification and localization in placental tissue and study the HBV ccc DNA status in placenta of HBV carrier, furtherly to approach the significance of detection and the mechanism of intrauterine transmission. **Methods** Forty cases of HBV carrier placental tissue of late trimester of pregnancy in Beijing Ditan Hospital, twenty cases with serum HBV DNA > 10<sup>5</sup> copies/ml, and the other 20 cases with serum HBV DNA < 10<sup>5</sup> copies/ml. Three positive hepatic tissue and 5 placenta of pregnancy at term were enrolled as positive control and negative control, respectively. All samples were divided into two groups, stored in -80℃ and soaked in formaldehyde at room temperature, respectively. HBV ccc DNA was extracted from frozen tissue through plasmid extraction and stored for PCR detection; paraffin section was carried out for isPCR. **Results** Liquid phase PCR indicated that 8 cases of 40 placental samples were HBV ccc DNA positive, whose serum HBV DNA > 10<sup>5</sup> copies/ml. We qualitatively considered that hepatitis B virus reproduced in the placenta tissue. Placenta paraffin section in situ amplification was carried out for 10 cases, 7 cases were positive with royal blue signal and located in the cell nucleus of placental villus syncytial trophoblasts, capillary endothelium, pile interstitial substance, PBMC interior blood capillary and amnion cell epithelialis. By comparing HE dyeing with alkali phosphatase dyeing, we confirm that HBV ccc DNA is present in parts of vascular endothelial cell, PBMC and so on. **Conclusions** HBV ccc DNA was detected in capillary endothelium of chorion, capillary endothelium and PBMC. Liquid

基金资助项目: 首都医学发展基金项目 (编号: 2002-2016)

通讯作者: 谢尧 Email: chejl6412@yahoo.com.cn

phase PCR indicate that 8 cases of 20 placental samples with serum HBV DNA  $> 10^5$  copies/ml which were HBV ccc DNA positive, intrauterine transmission is related to high HBV DNA content. Seven cases of ten were positive with royal blue signal in placenta paraffin section in situ amplification, which indicated that placenta is probably one of the most important pathway of intrauterine transmission and HBV ccc DNA can be transmitted via PBMC in placenta and transmitted between cells. HBV ccc DNA were also detected in amniotic epithelium which indicates that HBV intrauterine transmission may be through amnion. This study constructed one qualification and localization method to detect HBV ccc DNA in placenta, in order to guide clinical treatment and prevent HBV infection and provide an important method in molecular biology and histomorphology for blocking intrauterine transmission to infant.

**Key words:** Hepatitis B virus; Chronic hepatitis B; DNA, covalently closed circular; Intrauterine transmission to infant; In situ polymerase chain reaction ( ISPCR)

乙型肝炎病毒(HBV)是以嗜肝性为主的泛嗜性DNA病毒,其价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, ccc DNA)是HBV基因组复制和转录的模板,也是HBV持续感染的关键。研究表明,HBV ccc DNA长期存在于肝细胞及PBMC细胞核中,成为病毒难以完全清除及日后临床复发的关键。在我国,母婴传播是慢性乙型肝炎的重要传播途径<sup>[1-3]</sup>,胎盘屏障能阻止母体内的多数细菌、病毒通过。有研究显示在胎盘组织细胞可检测到HBV抗原和核酸,认为是通过细胞的胞饮作用使HBV进入细胞,但尚无研究报道HBV能否在胎盘组织细胞内复制,本研究对胎盘组织细胞进行了HBV ccc DNA检测。

## 1 材料和方法

**1.1 标本组织来源** 慢性乙型肝炎患者胎盘组织标本取自于2006年1月至4月首都医科大学北京地坛医院妇产科足月妊娠病例,其中血清HBV DNA  $> 10^5$ 拷贝/ml者20例,HBV DNA  $< 10^5$ 拷贝/ml 20例,共40例标本。阴性对照3例,为首都医科大学北京地坛医院病理科提供的慢性HBV感染者石蜡包埋肝组织,均来自2004~2005年间肝硬化或重症乙型肝炎患者尸解标本。阴性对照为健康足月妊娠产妇胎盘标本,共5例。同时设立反应体系无引物、无地高辛标记dNTP、无Taq DNA聚合酶共5例为背景对照组。所有胎盘标本均分两份,分别为一80℃冷冻和福尔马林室温浸泡保存。

**1.2 试剂** 柱子法提取质粒试剂盒和Triton X-100均为美国Sigma公司产品;Proteinase K、Tris购自

华美生物有限公司;多聚甲醛购自北京市旭东化工厂;PCR试剂盒购自晶美生物工程公司;免疫组织化学检测试剂盒购自中杉金桥生物技术有限公司。其余常规试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** 液相及原位PCR仪:东胜创新MJR PCR系列产品,为ALD1244和AL085122;Ultrospec 4300 pro紫外分光光度计,波长扫描软件Swift II 美国法马西亚公司;台式高速离心机:eppendorf 5417C;微量恒温仪:北京方通达科技有限公司,型号TDW-1。

## 1.4 胎盘组织HBV cccDNA提取

**1.4.1 组织预处理** 称量冰冻胎盘组织250mg,液氮下研磨,放置1.5 ml EP管中,室温融化,11 000 转/min室温离心1分钟,弃上清。

**1.4.2 重悬及溶解细胞** 加200  $\mu$ l含有适量RNase A溶液的重悬液混悬或用枪头吹打,使组织细胞块完全重悬;再加200  $\mu$ l溶解液溶解重悬细胞,即刻轻柔颠倒混匀6~8次,直到混合物变得清亮且黏稠,溶解反应不要超过5分钟;加350  $\mu$ l中和液沉淀细胞碎片,轻柔颠倒EP管4~6次,11 000转/min离心10分钟,沉淀细胞碎片,弃沉淀,留取上清。

**1.4.3 核酸小量提取结合柱的预处理** 将核酸小量提取结合柱(带有一个蓝色的o行环)插入准备好的微型离心管中,加入500  $\mu$ l柱子预备液至每一个小量提取柱,11 000转/min离心1分钟,弃流出液。把第2步留取的上清,即细胞溶解产物加入到准备好的柱子中,11 000转/min离心1分钟,弃流出液。

1.4.4 核酸的纯化 向柱子中加入750  $\mu$ l稀释的含适量乙醇的漂洗液, 11 000转/min离心30秒~1分钟, 弃流出液; 再次以最大速度离心1~2分钟, 弃流出液; 转移柱子到一个新EP管中, 向柱子加100  $\mu$ l洗脱液, 11 000转/min离心1分钟。HBV ccc DNA在洗脱液中, 可当时使用或保存在-20℃备用。

### 1.5 胎盘组织HBV ccc DNA液相PCR扩增

1.5.1 HBV ccc DNA引物设计 从PubMed检索我常见HBV基B型和C型序列18个, 从Clustal W在线找出保守序列区。将上游引物(P1)位于DR2区上游(< 1523 bp), 而下游引物(P2)则位于DR1区的下游(> 1856 bp), 为保证该引物位于保守区并跨两个缺口。即P1: 5'-GGCGCACTTACCTCT-3' (nt1480~1497) 18 bp; P2: 5'-TAAGCTTGGTGGCAAGAA-3' (nt 1856~1874) 18 bp。该引物由上海生物工程有限公司合成。

1.5.2 PCR反应条件 每份样品为50  $\mu$ l反应体系: 10  $\times$  PCR反应液5  $\mu$ l; 2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu$ l; 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l; 10  $\mu$ mol/L P1/P2 各2  $\mu$ l; Taq DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ l) 0.8  $\mu$ l; ccc DNA提取液 5  $\mu$ l; 去离子水 28.2  $\mu$ l。

循环参数: 94℃ 预变性 7分钟; 94℃ 变性 1分钟; 55℃ 退火 60秒; 72℃ 延伸 90秒; 扩增35个循环; 72℃ 总延伸 10分钟。

1.5.3 扩增产物的鉴定 取PCR产物10  $\mu$ l加至1%琼脂糖凝胶孔中, 电泳(100 V, 20分钟), 置紫外凝胶成像分析仪下观察, 通过与标准分子量DNA Marker比较作出判断。

### 1.6 胎盘组织HBV ccc DNA原位PCR反应

1.6.1 切片处理 切片常规脱蜡至水; 二甲苯10分钟(2次), 100%酒精5分钟(2次), 95%酒精~75%酒精各3分钟。增加细胞膜通透性: 0.2 mol/L HCl室温下处理10分钟, 1  $\times$  PBS洗3次; 1% Triton X-100室温下处理10分钟; 1  $\times$  PBS洗3次; 50  $\mu$ g/ml蛋白酶K 37℃消化10分钟, 1  $\times$  PBS洗3次。梯度酒精脱水(75%酒精~100%酒精各3分钟), 室温干燥。

1.6.2 原位PCR扩增 引物设计及序列见液相PCR反应, 将dNTP做地高辛标记, 由上海生物工程有限公司合成。切片组织上滴加特异性PCR扩增反应液30  $\mu$ l, 覆以盖玻片, 石蜡油封边; PCR反应条件及反应液成分见液相PCR反应。

1.6.3 原位扩增信号检测 用1  $\times$  PBS浸泡并去掉盖玻片, 二甲苯浸泡10分钟 $\times$ 2, 100%酒精浸泡两次, 去除石蜡油。4%多聚甲醛固定10分钟, 梯度酒精脱水。原位扩增信号检测: pH 7.2的1  $\times$  PBS冲洗3分钟。滴加50 mg/ml山羊血清封闭非特异结合位点, 室温孵育10分钟; 滴加碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体, 37℃孵育2小时; 1  $\times$  PBS冲洗, 3分钟 $\times$ 3次; 滴加NBT/BCIP 0.5~2小时, 室温普通光镜下观察显色结果。

## 2 结果

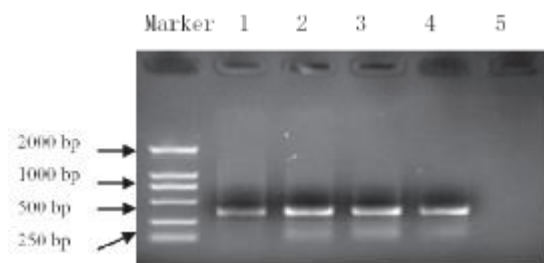
2.1 胎盘HBV ccc DNA液相PCR鉴定结果 HBV ccc DNA PCR阳性标本扩增结果为394 bp的片段, 1%琼脂糖电泳结果见图1。40例胎盘标本中PCR检测出HBV ccc DNA阳性者8例, 血清HBV DNA均> 10<sup>5</sup> 拷贝/ml, 见表1。

2.2 胎盘组织HBV ccc DNA原位PCR检测结果(图2) HBV ccc DNA原位扩增后, 碱性磷酸酶免疫组织

表1 血清HBV DNA与胎盘组织HBV ccc DNA检测结果(例)

检测指标	HBV DNA < 10 <sup>5</sup> 拷贝/ml	HBV DNA > 10 <sup>5</sup> 拷贝/ml
HBV ccc DNA (+)	0	8
HBV ccc DNA (-)	20	12

注: 两组比较  $\chi^2 = 10.00$ ,  $P = 0.002$



■ 1 胎盘HBV ccc DNA 液相PCR 产物鉴定结果(部分)

注: 1~3为胎盘组织(394 bp); 4为肝组织阳性对照; 5为阴性对照

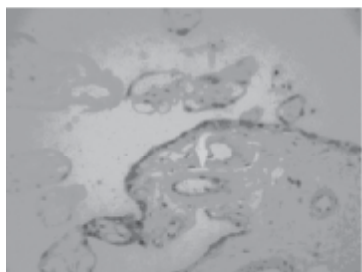
化学染色, 阳性信号位于胎盘绒毛合体滋养层细胞、毛细血管内皮细胞、中轴组织、毛细血管内PBMC、羊膜上皮细胞的细胞核中, 所有标本均为孕晚期胎盘, 合体滋养层清晰可见, 细胞滋养层已退化, 未见基蜕膜组织, 结果见图2。

### 3 讨论

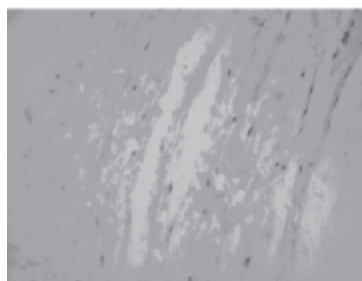
乙型肝炎病毒全长约为3.12 kb, 基因组

为双链松弛环状DNA (relaxed circular DNA, rcDNA), ccc DNA是HBV基因组复制中间体mRNA和前基因组RNA的合成模板, 也是HBV持续感染的关键<sup>[4-10]</sup>。目前, 国内外许多学者采用选择性PCR技术对HBV ccc DNA进行检测, 其原理大都基于rcDNA和ccc DNA具有高度同源性<sup>[11-14]</sup>, 但结构上, rcDNA的正链和负链上均有缺口, 而ccc DNA则为完整的双链结构, 具有利用rcDNA和ccc DNA结构上的这种差异设计引物, 使其跨两个缺口, 才能保证用PCR技术检测出的是ccc DNA。研究首先找出我国HBV常见的两个基因型—B型和C型的常见序列共18个, 从中找出上下游引物所在区域的保守序列区, 以便排除序列差异造成的PCR扩增失败。

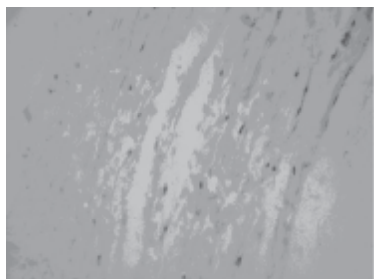
笔者依此原则设计引物, 利用荧光定量聚合酶链反应法检测PBMC中HBV ccc DNA水平, 其敏感度可达 $6 \times 10^3$ 拷贝/ml<sup>[15]</sup>。由于ccc DNA与质粒均为闭合环状结构, 实验通过质粒提取试剂盒提



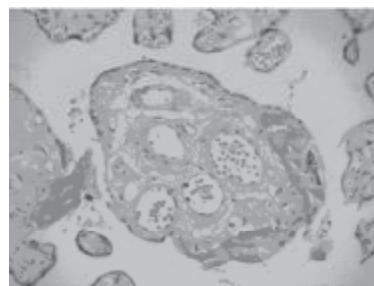
A. 阳性结果: 慢性乙型肝炎患者胎盘组织标本HBV ccc DNA原位扩增信号免疫组化染色(SP法, 400×)。在胎盘绒毛毛细血管内皮细胞、中轴组织中, 可见HBV ccc DNA阳性信号。



B. 阳性结果: 慢性乙型肝炎患者胎盘组织标本HBV ccc DNA原位扩增信号免疫组化染色(SP法, 400×)。可见HBV ccc DNA阳性信号散在于羊膜上皮细胞中。

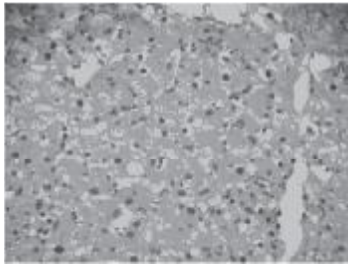


C1. 阳性结果: 慢性乙型肝炎患者胎盘组织标本HBV ccc DNA原位扩增信号免疫组化染色(SP法, 400×)。可见HBV ccc DNA阳性信号在胎盘绒毛毛细血管内皮细胞、PBMC分布。



C2. HE染色结果: 慢性乙型肝炎患者胎盘组织标本HE染色(HE染色, 400×)。绒毛组织结构清晰, 与C1为连续切片。





D. 阳性对照:慢性乙型肝炎肝组织标本HBV ccc DNA原位扩增信号免疫组织化学染色(SP法,400×)。可见HBV ccc DNA阳性信号主要在肝细胞核分布。



E. 阴性对照:健康人胎盘组织标本HBV ccc DNA原位扩增信号免疫组织化学染色(SP法,400×)。未见HBV ccc DNA阳性信号。

■ 2 胎盘组织中HBV cccDNA原位PCR检测结果

HBV ccc DNA<sup>[17-19]</sup>,达到了纯化目的。

实验首先采用冰冻胎盘组织标本提取HBV ccc DNA,进行液相PCR,40例标本中PCR检测出HBV ccc DNA阳性者有8例,其相应的血清HBV DNA > 10<sup>5</sup>拷贝/ml。选10例血清HBV DNA > 10<sup>5</sup>拷贝/ml的胎盘组织标本,其中包括上述液相PCR HBV ccc DNA阳性的8例胎盘组织标本,另外2例为血清HBV DNA > 10<sup>5</sup>拷贝/ml的胎盘标本,进行原位PCR,结果发现HBV ccc DNA阳性者7例,分析如下:①孕晚期胎盘的合体滋养层细胞、毛细血管内皮细胞、中轴组织、毛细血管内PBMC、羊膜上皮细胞的细胞核,均可见阳性信号,提示胎盘组织多种细胞中均有HBV ccc DNA感染,符合细胞间传播的宫内感染机制。有报道认为从胎盘母血至胎儿面的HBV感染率有逐渐下降的趋势<sup>[20]</sup>。本研究未出现从母体面到子体面阳性信号逐渐减少的明显表现;②绒毛毛细血管内皮细胞

中出现HBV ccc DNA阳性信号,是经胎盘感染胎儿的直接证据,与闫永平等<sup>[21]</sup>的病例对照研究相符;③绒毛间隙中可见少量ccc DNA阳性信号,考虑为HBV病毒本身造成胎盘损害或通透性增加血液渗漏入胎盘所致;④胎盘绒毛毛细血管内PBMC的ccc DNA阳性信号证实了经PBMC感染可能是胎盘母婴传播的重要途径;⑤羊膜上皮细胞核出现紫蓝色ccc DNA阳性信号,提示其可能为细胞之间进行病毒传播所致,羊膜HBV感染能将病毒直接分泌入羊水,进而感染胎儿。

既往诊断HBV宫内感染在孕早期主要是血清学指标<sup>[22]</sup>,多为脐带血检测乙型肝炎病毒标志物,乔云波等<sup>[23]</sup>研究认为胎盘组织HBV DNA含量可直接反映胎盘组织中病毒携带量。目前有较好的阻断母婴HBV传播的方法<sup>[23-29]</sup>,但仍然有10%~15%的母婴传播发生率,而HBV ccc DNA是乙型肝炎病毒感染及复制的根源<sup>[30]</sup>,故胎盘组织中ccc DNA研究具有重要的理论及临床价值。对母婴传播阻断提供重要的分子生物学和组织形态学研究手段<sup>[31]</sup>。

总之,HBV可感染胎盘各层细胞。胎盘组织感染HBV及复制与宫内感染的关系需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Xiao XM, Li AZ, Chen X, et al. Prevention of vertical hepatitis B transmission by hepatitis B immunoglobulin in the third trimester of pregnancy[J]. Int J Gynaecol Obstet,2007,96:167-170.
- [2] Song YM, Sung J, Yang S, et al. Factors associated with immunoprophylaxis failure against vertical transmission of hepatitis B virus[J]. Eur J Pediatr, 2007,166:813-818.
- [3] Xu Q, Xiao L, Lu XB, et al. A randomized controlled clinical trial: interruption of intrauterine transmission of hepatitis B virus infection with HBIG[J]. World J Gastroenterol,2006,12: 3434-3437.
- [4] Addison WR, Walters KA, Wong WW, et al. Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication[J]. J Virol,2002,76:6356-6363.
- [5] Singh M, Dicaire A, Wakil AE, et al. Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR[J]. J Virol Methods,2004,118:159-167.

- [6] Caruntu FA, Molagic V. CccDNA persistence during natural evolution of chronic VHB infection[J]. Rom J Gastroenterol, 2005, 14: 37.
- [7] Takehara T, Suzuki T, Ohkawa K, et al. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication[J]. J Hepatol, 2006, 44: 267-274.
- [8] Sung JJ, Wong ML, Bowden S, et al. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy[J]. Gastroenterology, 2005, 128: 1890-1897.
- [9] Yao YQ, Zhang DF, Luo Y, et al. An in vitro model of hepatitis B virus gene replication and expression in primary rat hepatocytes transfected with circular viral DNA[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2002, 10: 275-278.
- [10] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locamini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy[J]. Gastroenterology, 2004, 126: 1750-1758.
- [11] Bowden S, Jackson K, Littlejohn M, et al. Quantification of HBV covalently closed circular DNA from liver tissue by real-time PCR[J]. Methods Mol Med, 2004, 95: 41-50.
- [12] Liu MC, Yu M, Zhang NL, et al. Dynamic analysis of hepatitis B virus DNA and its antigens in 2.2.15 cells[J]. J Viral Hepat, 2004, 11: 124-129.
- [13] Zhang YY, Zhang BH, Theele D, et al. Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver[J]. Proc Natl Acad Sci US A, 2003, 100: 12372-12377.
- [14] Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, et al. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction[J]. J Virol Methods, 2003, 112: 45-52.
- [15] 魏红山, 董庆明, 庄辉, 等. 乙型肝炎病毒美价闭合环状DNA荧光定量聚合酶链反应法的建立及应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14: 56-58.
- [16] 曹真军, 魏秀桂, 晏伟, 等. HBV感染者血清中HBVcccDNA、HBsAg及HBVDNA的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2005, 21: 202-203.
- [17] 赵克开, 缪晓辉, 徐文胜. Hep G2.2.15细胞内乙型肝炎病毒cccDNA的定量检测[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23: 6-9.
- [18] Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, et al. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions[J]. J Virol, 1988, 62: 2836-2844.
- [19] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84: 1005-1009.
- [20] 于华鹏, 刘筱娟. 乙型肝炎母婴传播的途径及预防[J]. 国外医学社会医学分册, 2001, 18: 117-121.
- [21] 闫永平, 徐德惠, 王文亮, 等. 乙型肝炎表面抗原阳性孕妇不同孕期血清乙型肝炎病毒感染状态[J]. 中华医学杂志, 1998, 78: 76-77.
- [22] Lucifora G, Martines F, Calabro S, 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: 235-239.
- [23] 乔云波, 于爱莲, 邹威中, 等. 胎盘HBV感染病理形态学研究[J]. 济宁医学院学报, 2005, 28: 28-29.
- [24] Li XM, Yang YB, Hou HY, et al. Interruption of HBV intrauterine transmission: a clinical study[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1501-1503.
- [25] Zhu Q, Lu Q, Gu X, et al. A preliminary study on interruption of HBV transmission in uterus[J]. Chin Med J (Engl), 1997, 110: 145-147.
- [26] Yue Y, Yang X, Zhang S. Prevention of intrauterine infection by hepatitis B virus with hepatitis B immune globulin: efficacy and mechanism[J]. Chin Med J (Engl), 1999, 112: 37-39.
- [27] Grosheide PM, del Canho R, Voogd M, et al. Anti-HBs levels in infants of hepatitis B carrier mothers after delayed active immunization with recombinant vaccine concomitant with DTP-polio vaccine: is there need for a second dose of HBIG? Dutch Study Group on Prevention of Neonatal Hepatitis B[J]. Vaccine, 1994, 12: 1059-1063.
- [28] Wong VC, Ip HM, Reesink HW, et al. Prevention of the HBsAg carrier state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBsAg and HBeAg by administration of hepatitis-B vaccine and hepatitis-B immunoglobulin. Double-blind randomised placebo-controlled study[J]. Lancet, 1984, 1: 921-926.
- [29] Lo KJ, Tsai YT, Lee SD, et al. Combined passive and active immunization for interruption of perinatal transmission of hepatitis B virus in Taiwan[J]. Hepatogastroenterology, 1985, 32: 65-68.
- [30] Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 82-85.
- [31] Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1997, 177: 57-65.

收稿日期: 2008-05-14