

妊娠期携带乙型肝炎病毒的母儿细胞免疫状况的研究

谭剑平, 张建平, 陈立斌, 曹媛媛, 刘颖琳, 王蕴慧

(中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨孕妇无症状携带乙型肝炎病毒(HBV)对母儿细胞免疫功能的影响。【方法】采用直接免疫荧光标记法流式细胞仪检测30例慢性HBV感染孕妇外周血及其新生儿脐血的T淋巴细胞亚群和自然杀伤(NK)细胞,并与30例健康孕妇外周血及其新生儿脐血对照。【结果】研究组孕妇与对照组孕妇外周血T淋巴细胞亚群、NK细胞、白细胞分类比较无统计学差异($P > 0.05$);研究组新生儿脐血与对照组新生儿脐血T淋巴细胞亚群、NK细胞、白细胞分类比较也无统计学差异($P > 0.05$)。孕妇外周血与其新生儿脐血对应的各T淋巴细胞亚群、NK细胞、白细胞分类无相关性($P > 0.05$)。【结论】孕妇慢性携带HBV对母儿细胞免疫功能无明显影响。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; T淋巴细胞; 杀伤细胞, 天然; 免疫, 细胞; 妊娠

中图分类号: R714.7; R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2003)02-0147-04

Study on the Maternal and Fetal Cellular Immune Status in HBsAg - positive Pregnant Women

TAN Jian-ping, ZHANG Jian-ping, CHEN Li-bin, CAO Yuan-yuan, LIU Ying-lin, WANG Yun-hui

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To study the maternal and fetal cellular immune function in pregnant women with positive hepatitis B surface antigen. 【Methods】 T-lymphocyte subsets and natural killer (NK) cells were labeled by direct immunofluorescence and detected by flow cytometry, in peripheral blood (PB) of 30 pregnant women with chronic hepatitis B virus (HBV) infection and in cord blood (CB) of their 30 newborn infants. The results were compared with that of 30 healthy pregnant women and their neonates. 【Results】 There were no significant differences in T-lymphocyte subsets, NK cells and white cell subsets in PB between the study group and the control group ($P > 0.05$). The same results were found in fetal cord blood ($P > 0.05$). Fetal T-lymphocyte subsets, NK cells and white cell subsets were not related to those of their mothers ($P > 0.05$). 【Conclusion】 Chronic HBV infection seems to have no influence on maternal and fetal cellular immune function.

Key words: hepatitis B virus; T-lymphocyte; killer cells, natural; immunity, cellular; pregnancy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 147 ~ 150]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)主要侵犯肝脏,但也可直接感染外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、淋巴结、脾及骨髓等免疫活性组织细胞并表达病毒抗原,使受感染的免疫活性组织细胞被特异性细胞毒性T细胞(CTL)识别并杀伤,造成T、B淋巴细胞功能紊乱,从而使机体免疫功能紊乱,导致HBV长期携带者免疫功能低下及HBV感染慢性化^[1,2]。妊娠

期母体免疫功能特别是细胞免疫功能受到一定抑制,在这特定的免疫抑制时期,HBV感染对孕妇及胎儿细胞免疫功能的影响尚未清楚。本研究采用直接免疫荧光标记法流式细胞仪检测HBV无症状携带者(Asc)孕妇外周血及其新生儿脐血的T淋巴细胞亚群和NK细胞,探讨孕妇慢性感染HBV对其本身细胞免疫功能的影响,并初步探讨孕妇为HBV携带者对新生儿细胞免疫功能的影响。

收稿日期:2002-07-30

基金项目:广东省科委重点攻关基金资助项目(ZKB047019)

作者简介:谭剑平(1970-),女,广东云浮人,硕士研究生,主治医师;曹媛媛:现在广州医学院第一附属医院妇产科。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究对象来自初产检时在我院产检门诊行血清 HBV 标志物检测并于 2000 年 8 月至 2001 年 5 月住院待产足月妊娠孕妇共 60 例,其中符合 1995 年北京第五次全国传染病寄生虫病学术会议讨论修订的慢性 HBsAg 携带者诊断标准^[3]的 30 例孕妇为研究组,平均年龄 (29.8 ± 3.0) 岁,平均妊娠周数 (39.1 ± 1.5) 周;同期住院且 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、HBcAg、抗-HBc 全阴性的另外 30 例健康孕妇为对照组,平均年龄 (28.7 ± 2.5) 岁,平均妊娠周数 (39.3 ± 1.4) 周,两组年龄、妊娠周数没有统计学差异 ($P > 0.05$)。两组孕妇均分别与其新生儿作配对研究。所有孕妇均无妊娠并发症和合并症,无合并其他肝炎病毒和其他病毒感染,孕期无使用激素史,抗心磷脂抗体 (ACA) 均阴性。

1.2 主要试剂

所有单克隆抗体均为美国 Phar Mingen 公司产品,包括异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记和藻红蛋白 (PE) 荧光标记的抗体:抗 CD3-PE、抗 CD4-FITC、抗 CD8-FITC、抗 CD16CD56-PE、抗 CD3-FITC、抗 CD45-FITC、抗 CD14-PE,均为小鼠抗人 IgG 型抗体;兔抗鼠 IgG1-FITC、IgG2 α -PE。检测血清乙肝 3 对的药盒购自中山生物工程公司。

1.3 主要仪器

采用美国 Becton-Dickinson 公司 FACSCalibur 流式细胞仪。

1.4 实验方法

1.4.1 外周血、脐血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞的检测 孕妇外周静脉血的采集:孕妇入院当天或次日(无先兆临产或临产迹象)抽取外周静脉血 2 mL。新生儿脐血的采集:新生儿娩出而胎盘未娩出时常规消毒胎盘侧脐带,行脐静脉穿刺,抽取脐血 2 mL。标本均置于 EDTA-2Na(乙二胺四乙酸二钠)抗凝管中,6 h 内送检,行直接免疫荧光标记。抗凝外周血或脐血 50 μ L,加入上述各相应荧光抗体 10 μ L,摇匀,避光 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 10 min。加氯化铵裂解液 2 mL,避光室温放置 10 min,待红细胞完全溶解后,1 000 r/min($r=11$ cm)离心 10 min,弃去上清液,PBS 洗 2 次,加多聚甲醛固定液 450 μ L 固定,待上机检测。以流式细胞仪的配套软件(Cell Quest)获取样本中 1×10^4 个细胞中淋巴细胞的相应标记

阳性表达率。每个样本都用 FITC 和 PE 标记同型 IgG 作为相应的阴性对照。CD45-FITC/CD14-PE 作辅助设门。

1.4.2 HBV 血清学标志物检测 孕妇 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、HBcAg 和抗-HBc 用酶联免疫吸附法(ELISA)测定。

1.5 统计学分析

计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。孕妇外周血间、新生儿脐血间计量资料比较用 t 检验。孕妇、新生儿间比较用配对设计资料均数的 t 检验及线性相关分析。分类计数资料用 χ^2 检验。所有统计学分析过程应用 SPSS10.0 统计学软件。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

30 例 HBsAg 阳性孕妇分娩的新生儿孕龄平均 (39.2 ± 1.3) 周,出生体质量平均 (3.30 ± 0.45) kg,其中剖宫产 19 例,阴道分娩 11 例;男 16 例,女 14 例。30 例对照组孕妇分娩的新生儿孕龄平均 (39.4 ± 1.0) 周,出生体质量平均 (3.29 ± 0.30) kg,其中剖宫产 18 例,阴道分娩 12 例;男 15 例,女 15 例。两组新生儿孕龄、出生体质量、分娩方式、性别比较无统计学差异 ($P > 0.05$),表明研究组与对照组间资料具有可比性。

2.2 慢性 HBsAg 携带者 (Asc) 孕妇与健康孕妇细胞免疫状况比较

30 例研究组和 30 例对照组孕妇外周血 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞、白细胞分类百分数的均数比较结果见表 1。从表 1 可以看出两组外周血 CD3 $^+$ T 淋巴细胞百分数、CD3 $^+$ CD4 $^+$ (Th) 细胞百分数、CD3 $^+$ CD8 $^+$ (Ts) 细胞百分数、CD4/CD8(Th/Ts) 的比值、NK 细胞 (CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^+$) 百分数、淋巴细胞百分数、单核细胞百分数、中性粒细胞百分数比较均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.3 Asc 孕妇与健康孕妇分娩的新生儿细胞免疫状况比较

30 例 Asc 组与 30 例对照组新生儿脐血 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞、白细胞分类的检测见表 2。从表 2 可以看出两组脐血 CD3 $^+$ 细胞、CD4 $^+$ 细胞、CD8 $^+$ 细胞、CD4/CD8 比值、NK 细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞百分数比较均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 1 Asc 孕妇与健康孕妇外周血 T 淋巴细胞、白细胞亚群的比较

Phenotype	Asc (n = 30)	Control (n = 30)	P
CD3 ⁺ TLC	74.81 ± 9.20	72.05 ± 9.82	0.266
CD3 ⁺ CD4 ⁺	31.75 ± 10.61	26.02 ± 12.87	0.065
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24.29 ± 6.39	21.36 ± 6.68	0.087
CD4/CD8	1.35 ± 0.49	1.28 ± 0.73	0.650
NK cell	11.65 ± 6.60	13.25 ± 8.08	0.405
Lymphocyte	21.81 ± 6.81	20.09 ± 7.94	0.372
Monocyte	4.48 ± 1.28	4.69 ± 1.57	0.557
Granulocyte	71.57 ± 7.04	72.40 ± 8.99	0.693

TLC: T lymphocyte; NK cell: natural killer cell

表 2 Asc 孕妇与健康孕妇的新生儿脐血 T 淋巴细胞、白细胞亚群的比较

Phenotype	Asc (n = 30)	Control (n = 30)	P
CD3 ⁺ TLC	61.44 ± 14.62	61.88 ± 10.31	0.893
CD3 ⁺ CD4 ⁺	38.04 ± 11.05	35.31 ± 11.92	0.360
CD3 ⁺ CD8 ⁺	13.74 ± 7.38	13.70 ± 5.25	0.978
CD4/CD8	3.56 ± 2.37	3.09 ± 2.16	0.423
NK cell	16.03 ± 8.04	16.44 ± 8.55	0.846
Lymphocyte	35.30 ± 18.00	37.38 ± 9.23	0.574
Monocyte	6.65 ± 2.65	6.19 ± 2.25	0.469
Granulocyte	52.96 ± 19.27	50.09 ± 10.61	0.830

TLC: T lymphocyte; NK cell: natural killer cell

2.4 孕妇与其新生儿细胞免疫状况的比较

对 30 对 Asc 孕妇外周血及其新生儿脐血、30 对健康孕妇外周血及其新生儿脐血的 T 淋巴细胞各亚群、NK 细胞、白细胞分类分别行线性相关分析,结果两组母儿间 CD3⁺细胞、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞、CD4/CD8 比值、NK 细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞均未发现存在线性相关关系 ($P > 0.05$, 见表 3)。HBV 携带者孕妇分娩的新生儿脐血的 CD3⁺细胞、CD8⁺细胞、中性粒细胞分别低于其孕母外周血的 CD3⁺细胞 ($P = 0.001$)、CD8⁺细胞 ($P = 0.000$)、中性粒细胞 ($P = 0.000$); 而 CD4/CD8 比值、淋巴细胞百分数、单核细胞百分数则分别高于其孕母外周血的 CD4/CD8 比值 ($P = 0.000$)、淋巴细胞百分数 ($P = 0.001$)、单核细胞百分数 ($P = 0.000$), 和健康孕妇与其新生儿比较的结果相似。

3 讨论

3.1 孕妇慢性携带 HBV 对其细胞免疫功能状况的影响

表 3 孕妇与其新生儿细胞免疫状况的相关性分析

Table 3 Correlation of maternal and fetal T - lymphocyte and white cell subpopulations

Phenotype	Asc		Control	
	r	p	r	p
CD3 ⁺ TLC	-0.300	0.107	0.339	0.067
CD3 ⁺ CD4 ⁺	-0.326	0.079	0.307	0.099
CD3 ⁺ CD8 ⁺	-0.004	0.983	0.002	0.990
CD4/CD8	-0.296	0.113	-0.057	0.764
NK cell	-0.312	0.094	0.149	0.432
Lymphocyte	0.007	0.972	0.069	0.717
Monocyte	0.109	0.568	0.193	0.307
Granulocyte	0.007	0.970	-0.035	0.85

TLC: T lymphocyte; NK cell: natural killer cell

HBV 为非杀伤性病毒, 本身对感染细胞无直接致病作用, 但它可刺激宿主的免疫系统攻击受感染的细胞, 间接引起组织、细胞的损伤。T 淋巴细胞是介导细胞免疫的主要淋巴细胞, 检测外周血 T 淋巴细胞亚群可间接了解机体的细胞免疫功能状况。国内外不少学者对乙型肝炎病毒感染时机体的免疫功能进行研究, 多数认为慢性乙型肝炎

炎患者外周血中 CD4⁺细胞减少、CD4/CD8 比值下降、CD8⁺细胞增多,与病毒复制、病情的严重程度相关;无症状携带者(Asc) T 细胞亚群则与正常对照无显著差异^[2,4,5]。妊娠期合并 HBV 感染对孕妇外周血淋巴细胞亚群影响的报道少见。Kotmire S 等^[6]检测 25 例 HBsAg 阳性孕妇外周血的 T 淋巴细胞亚群,发现 HBsAg 阳性者 CD3⁺细胞、CD4⁺细胞下降;CD8⁺细胞升高,认为 HBsAg 阳性孕妇免疫功能低下。本研究结果未发现慢性 HBsAg 携带者孕妇外周血 T 淋巴细胞各个亚群、NK 细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞百分数与对照组比较有统计学差异,与 Kotmire S 等的报道不同,但与多数报道的普通 Asc 和正常对照比较的结果相一致。提示虽然妊娠期母体处于细胞免疫抑制状态,但肝功能正常时,孕妇可与普通 Asc 一样,慢性 HBV 感染可不影响其外周血的 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞及其他白细胞分类,孕妇细胞免疫功能可不受到损害;另一方面也说明孕妇对 HBV 感染继续处于免疫耐受状态中。

3.2 孕妇为慢性 HBsAg 携带者对新生儿细胞免疫功能的影响

Poblete A 等^[7]报道孕妇近期感染可使母儿白细胞计数、T 淋巴细胞亚群改变,也有学者报道先兆子痫影响新生儿淋巴细胞免疫表型^[8],提示母体患病可能对胎儿免疫功能造成影响。孕妇慢性感染 HBV 是否影响胎儿的免疫功能,尚未见有关方面的报道。本研究尚未发现 HBsAg 阳性或阴性孕妇其外周血 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞与各自新生儿脐血中相应的亚群存在相关关系,提示母儿间细胞免疫功能状态相互独立,母体本身细胞免疫功能状况对胎儿细胞免疫功能状况无明显影响。本研究也未发现 HBsAg 阳性孕妇分娩的新生儿脐血的 CD3⁺细胞、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞、CD4/CD8 比值、NK 细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞与对照组有统计学差异,提示孕妇慢性感染 HBV 可能未对胎儿细胞免疫功能造成的损害,其分娩的新生儿可同样具有正常的细胞免疫功能。母儿间免疫细胞的比较显示母儿间的细胞免疫功能状态不同,HBV 携带者孕妇分娩的新生儿脐血的 CD3⁺细胞、CD8⁺细胞、中性粒细胞分别低于其孕母外周血的 CD3⁺细胞、CD8⁺细胞、中性粒细胞,而 CD4/CD8 比值、淋巴细胞百分

数、单核细胞百分数则分别高于其孕母外周血的 CD4/CD8 比值、淋巴细胞百分数、单核细胞百分数,与陈旭芳^[9]报道的脐血与成人外周血的比较结果相似,显示新生儿脐血与孕妇外周血淋巴细胞的免疫表型不同,且新生儿的 T 淋巴细胞表型未完全成熟,非特异性免疫功能也未完全成熟。以往的研究证实孕妇 HBV 感染可通过垂直传播使胎儿或新生儿受到 HBV 感染^[10],在免疫功能未成熟的情况下,若胎儿或新生儿感染 HBV(如宫内感染),新生儿的细胞免疫功能是否受损尚未清楚。本研究中收集的 HBsAg 阳性孕妇分娩的新生儿例数尚较少,且只检出 1 例新生儿为宫内感染 HBV 者,故孕妇 HBV 感染间接对胎儿免疫功能的影响尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张友才,贺降福. HBV 感染慢性化机制研究进展[J]. 国外医学. 消化系疾病分册,2001,21(1):37.
- [2] 贾战生. 乙型肝炎病毒长期携带机理的研究进展[J]. 国外医学病毒学分册,1995,2(1):16.
- [3] 中华医学会传染病寄生虫病学分会修订. 病毒性肝炎防治方案(试行)[J]. 中华传染病杂志,1995,13(4):241.
- [4] Choong M L, Ton S H, Cheong S K. The cellular immune status of HBsAg-positive carriers in Malaysia[J]. Asian Pac J Allergy Immunol,1996,14(1):19.
- [5] 贾战生,张银霞,于兰,等. 无症状 HBV 携带者 IL-2 及其受体的研究[J]. 中华传染病杂志,1995,13(1):43.
- [6] Kotmire S, Gupta I, Ganguly N K, et al. Study of T-lymphocyte subpopulation in HBsAg-positive pregnant women[J]. Acta Virol,1993,37(6):459.
- [7] Poblete A, Roberts A, Trespidi L, et al. Fetal and maternal white cells and B-and T-lymphocyte subpopulations in pregnant women with recent infection[J]. Fetal Diagn Ther, 2001,16(6):378.
- [8] Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzela B, Rolinski J, et al. Pre-eclampsia affects the immunophenotype of neonates[J]. Immunol Lett,2001,77(2):67.
- [9] 陈旭芳,贾廷珍. 脐血淋巴细胞免疫学特性研究[J]. 免疫学杂志,1998,14(2):138.
- [10] 刘琳琳,邝健全,刘新质,等. HBcAg 在乙型肝炎病毒携带者孕妇胎盘中的识别与意义[J]. 中山医科大学学报,2000,21(1):43.

(编辑 张思健)