

· 论 著 ·

孕晚期用 HBIG 对 HBV 携带孕妇胎盘 Toll 样受体的影响*

张满云[#], 吴彩林, 肖小敏[△]

(暨南大学附属第一医院妇产科, 广州 510630)

摘要:目的 探讨孕晚期应用乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)干预对乙型肝炎病毒(HBV)携带孕妇胎盘组织 TLR3、TLR4、TLR7 表达的影响。方法 收集 2010 年 6~12 月在该院产检并分娩的 HBsAg(+)孕妇 53 例, 正常孕妇 10 例。血清 HBV-Ms 和胎盘 TLR3、TLR4、TLR7 平均光密度分别采用 ELISA 和 Envision 免疫组织化学法检测。结果 孕妇血清 HBsAg(+)组, 胎盘 TLR3、TLR7 的表达水平均较对照组高; 胎盘 HBsAg(-)组与胎盘 HBsAg(+)组间, TLR3、TLR7 表达水平比较差异无统计学意义; 孕晚期使用 HBIG 者, 胎盘中 TLR3、TLR7 的表达与未应用 HBIG 者比较差异无统计学意义。结论 尚不能认为孕期应用 HBIG 可改变胎盘的 TLR3、TLR7 的表达。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; Toll 样受体; 免疫球蛋白类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2057-03

The influence upon placental Toll like receptors of HBsAg carriers with the usage of HBIG during the late pregnancy*

Zhang Manyun[#], Wu Cailin, Xiao Xiaomin[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

Abstract: Objective To explore the influence on placental Toll-like receptor 3(TLR3), TLR4, TLR7 in the hepatitis B surface antigen(HBsAg) positive women with the usage of Hepatitis B Immune Globulin(HBIG) during the late pregnancy. **Methods** 53 HBsAg positive and 10 normal pregnant women recruited in this study were regularly performed perinatal care in our hospital from June to Dec. 2010. Serum hepatitis B virus markers(HBV-Ms), average optical density of placental TLR3, TLR4 and TLR7 were respectively detected by ELISA and Envision immunohistochemistry. **Results** The expressions of placental TLR3 and TLR7 in HBsAg positive gravidas were stronger than those of normal ones. The expressions of placental TLR3 and TLR7 were not statistically different between placental HBsAg positive and negative gravidas. Neither were the HBIG users or not during the late pregnancy. **Conclusion** Placental TLR3 and TLR7, perhaps, join in the immunoregulation of anti-HBV transmission. The maternal HBsAg positive can stimulate the expression of placental TLR3, 7. The influence on placental TLR3 and TLR7 of HBsAg carriers with the usage of HBIG during late pregnancy is yet to be researched into.

Key words: hepatitis B virus; toll-like receptors; immunoglobulins

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)宫内感染是乙肝传播的重要途径。HBV 感染胎盘后诱导天然免疫应答, 由模式识别受体识别病原体相关分子模式, 并通过不同的信号传导途径诱导分泌干扰素等细胞因子, 达到抗病毒的作用。Toll 样受体(toll like receptors, TLRs)是主要的模式识别受体, 在天然免疫防御病原体中起着重要作用。有学者^[1]对正常孕妇和乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性孕妇胎盘组织中 HBsAg 和 TLR3、TLR9 的表达进行研究, 认为胎盘组织中 TLR3、TLR9 的表达与感染有关, TLR3、TLR9 可能是 HBV 感染保护性因素。近年来, 对慢性 HBV 感染孕妇, 有报道孕晚期应用乙型肝炎免疫球蛋白(hepatitis B immune globulin, HBIG)以降低宫内感染率, 但其阻断效果和机理尚存在争议^[2-3]。有学者^[4]通过对国内外有关孕晚期使用 HBIG 阻断母婴宫内传播的随机对照临床试验结果进行 Meta 分析, 显示孕晚期应用 HBIG 可以显著降低 HBV 的母婴宫内传播。然而, 孕晚期应用 HBIG 对胎盘 TLR 是否存在影响, 尚未见文献报道。本研究对 TLR3、TLR4、TLR7 在慢性 HBV 感染孕

妇及正常孕妇胎盘中的表达水平进行检测, 探讨孕晚期应用 HBIG 干预, 对慢性 HBV 感染孕妇胎盘组织 TLR3、TLR4、TLR7 表达的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 6~12 月, 在暨南大学附属第一医院正规产检并分娩的 HBsAg(+)的孕妇 53 例作为研究组。夫妻双方 HBsAg 均为(-)的 10 例正常孕妇作为对照组。两组均无其他并发症。两组孕妇在年龄、孕龄、分娩方式等方面比较差异均无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。两组孕妇均于孕 28 周前, 新生儿于分娩 12 h 内主、被动免疫前抽取静脉血检测乙肝标记物(hepatitis B virus markers, HBV-Ms)及乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(hepatitis B virus-deoxyribose nucleic acid, HBV-DNA)。研究组中有 7 例签署知情同意后于孕 28、32、36 周各注射 HBIG 200 U(规格 200 U/瓶, 同路生物公司), 且 7 例孕妇 HBV-DNA $>10^5$ copy/mL, 余不予注射; 产时无菌条件下取胎盘组织, 切成 1.5 cm×1.5 cm×0.5 cm 大小, 浸入 4% 甲醛溶液中固定后用常规石蜡包埋, 切成 5 μm 连

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(C30973214); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20070559006)。作者简介: 张满云(1980~), 主治医师, 主要从事围产医学的研究。△ 通讯作者, Tel: 13312800349; E-mail: xiaoxiaomin55@163.com。# 现工作单位: 湖南省长沙市妇幼保健院产科, 410007。

续切片,烘干备用。

1.2 研究方法 血清 HBV-Ms 检测采用 ELISA 法。试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司。胎盘组织中 HBsAg 和 TLR3、TLR4、TLR7 平均光密度的表达采用 Envision 免疫组织化学染色法检测,经 DAB 显色后,其阳性结果显示为棕黄色颗粒。鼠抗人 TLR3、TLR7 购于 Abcam 公司;鼠抗人 TLR4 购自 Bioworld 公司;鼠抗人 HBsAg 购自中杉金桥公司;免疫组织化学二抗购自 DAKO 公司。操作方法按试剂盒说明。采用 Leica 光学显微镜及摄像装置(德国徕卡仪器)在相同条件下采集图片,阳性每组中,各切片随机选 5 个视野,高倍镜下使用 Image Pro-Plus6.0 软件分析图像,以平均光密度值(mean density)作为 TLR3、TLR4、TLR7 的相对表达量。

1.3 统计学处理 用 SPSS16.0 统计软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用方差分析及多个独立样本 Kruskal-Wallis *H* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 孕妇外周血乙肝 HBeAg 抗原状态与胎盘组织 TLR3、TLR7 及 TLR4 的表达 根据孕妇 e 抗原的状态将研究组分成 HBeAg(+)组、HBeAg(-)组与对照组。其中,HBeAg(+)组、HBeAg(-)组及对照组分别有 1 例、3 例、2 例未检测到 TLR3,HBeAg(-)组中有 1 例未检测到 TLR7。TLR4 平均光密度 3 组间比较差异均无统计学意义。孕妇 HBeAg(+)组及 HBeAg(-)的胎盘组织中 TLR3、TLR7 的表达水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);胎盘组织

TLR3、TLR7 的表达水平在孕妇 HBeAg(+)及 HBeAg(-)组间比较差异无统计学意义($P = 0.991, P = 0.883$),见表 1。

2.2 孕妇胎盘 HBsAg 状态与胎盘组织 TLR3、TLR7 及 TLR4 的表达 根据胎盘组织 HBsAg 状态将研究组分为胎盘 HBsAg(+)组、胎盘 HBsAg(-)组并与对照组比较。胎盘 HBsAg(-)组 4 例未检测到 TLR3,1 例未检测到 TLR7。对照组有 2 例未检测到 TLR3。胎盘 HBsAg(-)组的 TLR3、TLR7 表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P = 0.001, P = 0.000$);胎盘 HBsAg(+)组的 TLR3、TLR7 表达水平低于胎盘 HBsAg(-)者,但差异无统计学意义($P = 0.281, P = 0.381$),结果见表 2。

2.3 孕妇孕晚期使用 HBIG 对胎盘组织 TLR3、TLR7 及 TLR4 表达的影响 根据孕妇孕晚期是否使用 HBIG 将研究组分为 HBIG 组、非 HBIG 组与对照组比较。非 HBIG 组中有 4 例、对照组中有 2 例未检测到 TLR3。非 HBIG 组中有 1 例未检测到 TLR7。TLR4 平均光密度 3 组间比较差异无统计学意义($P = 0.621$)。无论孕妇孕晚期是否使用 HBIG,其胎盘组织中 TLR3、TLR7 的表达水平均显著高于对照组,差异有统计学意义;孕晚期使用 HBIG 与未使用 HBIG 胎盘组织 TLR3、TLR7 的表达水平比较差异无统计学意义($P = 0.791, P = 1$),见表 3。

2.4 新生儿外周血 HBV-Ms 及 HBV-DNA 概况 研究组 53 例孕妇及正常对照组所生新生儿无 1 例 HBsAg 阳性。新生儿 HBV-DNA 均小于 500 copy/mL。

表 1 孕妇 HBeAg 状态对胎盘组织 TLR3、TLR7 及 TLR4 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$,单位:平均光密度)

组别	<i>n</i>	TLR3	TLR7	TLR4	
研究组	孕妇 HBeAg(+)	20	408.46 ± 249.18 ^{a*}	673.95 ± 514.57 [*]	281.52 ± 192.72
	孕妇 HBeAg(-)	33	389.13 ± 257.22 ^{b*}	593.45 ± 241.83 ^{d*}	365.51 ± 277.08
对照组	10	148.55 ± 65.30 ^c	263.91 ± 121.05	374.33 ± 161.29	
<i>F</i>		3.954	4.947	0.826	
<i>P</i>		0.025	0.010	0.443	

*: $P < 0.05$,与对照组比较;^a: $n = 19$;^b: $n = 30$;^c: $n = 8$;^d: $n = 32$ (剔除 TLR 检测阴性者)。

表 2 HBsAg(+)胎盘组织 TLR3、TLR7 及 TLR4 表达水平比较($\bar{x} \pm s$,单位:平均光密度)

组别	<i>n</i>	TLR3	TLR7	TLR4	
研究组	胎盘 HBsAg(+)	3	335.09 ± 248.79	612.81 ± 318.72	206.37 ± 59.02
	胎盘 HBsAg(-)	50	405.26 ± 313.54 ^{a*}	983.21 ± 365.42 ^{b*}	342.00 ± 255.21
对照组	10	148.55 ± 65.30 ^c	263.91 ± 121.05	374.33 ± 161.29	
χ^2		11.947	14.278	2.570	
<i>P</i>		0.003	0.001	0.227	

*: $P < 0.05$,与对照组比较;^a: $n = 46$;^b: $n = 49$;^c: $n = 8$ (剔除 TLR 检测阴性者)。

表 3 孕晚期使用 HBIG 对胎盘组织 TLR3、TLR7 及 TLR4 表达水平比较($\bar{x} \pm s$,单位:平均光密度)

组别	<i>n</i>	TLR3	TLR7	TLR4	
研究组	注射 HBIG 组	7	401.04 ± 259.82 [*]	721.08 ± 595.26 [*]	263.22 ± 187.57
	未注射 HBIG 组	46	400.48 ± 195.00 ^{a*}	609.38 ± 327.59 ^{b*}	345.62 ± 258.59
对照组	10	148.55 ± 65.30 ^c	263.91 ± 121.05	374.32 ± 161.29	
χ^2/F		11.486	13.645	0.480	
<i>P</i>		0.003	0.001	0.621	

*: $P < 0.05$,与对照组比较;^a: $n = 42$;^b: $n = 45$;^c: $n = 8$ (剔除 TLR 检测阴性者)。

3 讨 论

3.1 孕妇及胎盘 HBV 感染状态与胎盘 TLRs 的关系 TLRs 作为一种模式识别受体,不仅广泛分布于各类免疫细胞,还可表达于胎盘各层细胞中。Abrahams 等^[5-6]提出 TLRs 在介导母胎之间天然免疫中起重要作用。这表明不仅免疫细胞对入侵的病原体启动免疫应答,胎盘滋养细胞也可参与免疫反应,对防止入侵病原体的垂直传播起保护作用。有研究证实 HBsAg 阳性孕妇的胎盘组织中在基因水平 TLR3-mRNA 的表达水平较正常孕妇胎盘组织的表达水平高^[7]。有学者^[8]研究结果显示,TLR3 介导的天然免疫能一定程度抑制人胎盘 Bewo 细胞中的 HBV 复制。段乃荣等^[9]研究表明慢性乙型肝炎外周血单个核细胞中 TLR7-mRNA 的表达明显低于正常对照组,且与 HBV-DNA 的滴量呈负相关。提示胎盘 TLR3、TLR7 高表达可能是孕妇 HBV 感染的保护因素。本研究胎盘 HBsAg(-)组的 TLR3、TLR7 表达高于对照组,虽胎盘 HBsAg(+)组的 TLR3、TLR7 表达低于胎盘 HBsAg(-)者,差异无统计学意义,但不排除因胎盘 HBsAg 阳性例数太少所致,有待进一步扩大样本量进行后续研究。

Xiao 等^[10]研究结果显示,孕妇 HBV 感染状态直接影响 HBV 母儿垂直传播率,HBeAg 阳性者垂直传播风险高于 HBeAg 阴性者。故本研究以 e 抗原状态分组,结果显示无论 HBeAg 阳性或阴性,TLR3、TLR7 的表达均较正常对照组高。但在 HBeAg 阳性与阴性组内,HBeAg 状态对胎盘组织 TLRs 的影响差异无统计学意义。提示孕妇表面抗原阳性可刺激胎盘 TLR3、TLR7 表达。而胎盘 TLR 降低者,易滋养细胞 HBsAg 阳性。资捷等^[11-12]研究显示,HBeAg 阳性孕妇胎盘 TLR3、TLR4 的平均光密度值明显低于正常组和 HBeAg 阴性组。

3.2 孕晚期使用 HBIG 对胎盘 TLRs 表达的影响 HBIG 是一种 IgG 型抗体,胎盘滋养细胞表达 Fc 受体,自孕 20 周起能将母体内的 IgG 型的抗体通过胎盘转运给胎儿。体外实验证实 HBIG 可在某种程度上使 HBsAg 水平显著降低,有效地阻断胎盘滋养细胞 HBV 的感染,使其丧失侵入细胞的能力^[13]。作者前期研究 HBeAg 阳性孕妇孕期接种 HBIG 以调节新生儿细胞免疫功能,有效清除病毒,打破免疫耐受,可以有效降低乙型肝炎病毒母婴垂直传播。但有学者^[14]对 HBsAg 阳性孕妇免疫接种阻断 HBV 宫内感染疗效的 Meta 分析认为,HBsAg 和 HBeAg 均阳性孕妇孕期应用 HBIG 阻断宫内感染的疗效尚不清楚。有关孕期应用 HBIG 对胎盘 TLRs 的影响,目前国内外尚未见报道。本研究发现 HBsAg(+)孕妇使用 HBIG 后,TLR3、TLR7 的表达与未使用 HBIG 者组间比较差异无统计学意义。因此,尚不能认为孕期应用 HBIG 可改变胎盘的 TLR3、TLR7 的表达。但不排除与研究组同意孕晚期注射 HBIG 者太少有关,有待扩大样本量进一步研究。

3.3 孕晚期使用 HBIG 与新生儿外周血 HBV-Ms 的关系 新生儿血液中 HBV-Ms 情况,可通过脐血和外周血来反映。但因脐血混有 HBsAg(+)母亲的血,用脐血中来反映新生儿乙型肝炎感染情况有可能增加伪阳性。故本研究直接抽取新生儿股静脉血检测。妊娠中期后,胎盘滋养细胞具有主动将母体 IgG 型抗体传输给胎儿的功能,孕期注射 HBIG,HBsAb 可通过胎盘到达胎儿体内,使胎儿在宫内获取被动免疫,从而降低宫内感染率^[15]。本研究中,注射 HBIG 7 例孕妇 HBV-DNA 均大于 10^5 copy/mL,无 1 例新生儿 HBsAb 阳性,且 HBV-

DNA 小于 500copy/mL。可能与注射 HBIG,胎儿在宫内获取被动免疫,清除乙型肝炎病毒能力增强有关,但因同意孕晚期注射 HBIG 者太少,有待扩大样本量进一步研究。

参考文献:

- [1] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection natural history and clinical consequences[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(11):1118-1129.
- [2] 陈敏, 朱坤仪, 宋华, 等. 乙肝病毒携带孕妇被动免疫阻断母婴传播的研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2003, 11(1): 65-67.
- [3] 朱科华, 马佩球, 张为民, 等. HBV 阳性孕妇接种乙肝免疫球蛋白后免疫学反应的研究[J]. *广州医药*, 2004, 35(1):1-2.
- [4] 范祎, 肖小敏. 产前应用乙型肝炎免疫球蛋白对于阻断乙肝母婴宫内传播作用的 Meta 分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2007, 15(1):62-64.
- [5] Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast[J]. *Placenta*, 2005, 26(7):540-547.
- [6] Abrahams VM, Schaefer TM, Fahey JV, et al. Expression and secretion of antiviral factors by trophoblast cells following stimulation by the TLR-3 agonist, Poly(I:C)[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(9):2432-2439.
- [7] 车晓文, 王素萍, 李淑珍, 等. 实时荧光定量 PCR 检测 HBV 阳性孕妇胎盘组织 TLR3 的表达[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(9):1686-1687.
- [8] 资捷, 王前, 郑磊, 等. Toll 样受体 3 介导抑制 Bewo 细胞中乙型肝炎病毒复制[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2011, 19(1):16-18.
- [9] 段乃荣, 陈红, 王岐洁. 慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞 TLR7 mRNA 表达与血清 IL-12, HBV-DNA 载量的相关性[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(15):1422-1424.
- [10] Xiao XM, Li AZ, Chen X, et al. Prevention of vertical hepatitis B transmission by using hepatitis B immunoglobulin during the third trimester of pregnancy[J]. *Int J Obstet Gynecol*, 2007, 96(3):167-170.
- [11] 资捷, 王前, 郑磊, 等. HBeAg 对慢性乙型肝炎孕妇胎盘组织 TLR4 表达的作用研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2010, 18(1):41-43.
- [12] 资捷, 王前, 郑磊, 等. HBeAg 阳性慢性乙型肝炎孕妇胎盘组织 Toll 样受体 3 的表达及意义[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2010, 26(4):280-283.
- [13] 王安辉, 门可, 闫永平, 等. 乙型肝炎免疫球蛋白阻断胎盘滋养细胞感染乙型肝炎病毒的实验研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2006, 41(3):165-168.
- [14] 李苗, 景涛, 杨克虎, 等. HBsAg 阳性孕妇免疫接种阻断 HBV 宫内感染疗效的 Meta 分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(2):90-95.
- [15] 倪明军, 钟婉秀, 蔡江慧. 乙型肝炎免疫球蛋白阻断乙型肝炎病毒母婴传播的临床研究[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(19):2664-2665.