

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.23.014

CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞在妊娠期高血压疾病中的异常表达分析*

何花,李诗雨,高鹰,杨林,任为[△]

(湖北省妇幼保健院产科,武汉 430070)

[摘要] **目的** 探讨 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞及其分泌的细胞因子白细胞介素-10(IL-10) 在妊娠期高血压疾病中的表达及意义。**方法** 选取该院 2020 年 9 月至 2021 年 5 月收治的 15 例妊娠期高血压患者(妊娠期高血压组)、11 例子痫前期患者(子痫前期组),另选取同期 12 例正常妊娠孕妇(对照组)。应用流式细胞术分别检测 3 组孕妇终止妊娠前外周血 CD19⁺ B 淋巴细胞、CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞及 IL-10 的表达。**结果** 3 组血清 CD19⁺ B 淋巴细胞百分比比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。3 组血清 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞百分比两两比较,对照组>妊娠期高血压组>子痫前期组,且对照组与妊娠期高血压组、子痫前期组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。3 组血清 IL-10 表达水平两两比较,对照组>妊娠期高血压组>子痫前期组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞及其分泌的 IL-10 在妊娠期高血压疾病孕妇中异常表达,可能与妊娠期高血压疾病的发生、发展相关。

[关键词] 妊娠期高血压疾病;妊娠高血压;子痫;调节性 B 淋巴细胞;白细胞介素-10;流式细胞术

[中图法分类号] R714.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2023)23-3598-05

Abnormal expression of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B lymphocytes in hypertensive disorder complicating pregnancy*

HE Hua, LI Shiyu, GAO Ying, YANG Lin, Ren wei[△]

(Department of Obstetrics, Maternal and Child Health Hospital of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430070, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} regulatory B lymphocytes and secreted cytokine interleukin-10 (IL-10) in hypertensive disorder complicating pregnancy. **Methods** A total of 15 patients with gestational hypertension (the gestational hypertension group) and 11 patients with preeclampsia (the preeclampsia group) admitted to this hospital from September 2020 to May 2021 were selected, and 12 normal pregnant women (the control group) were selected during the same period. Flow cytometry was used to detect the expression of CD19⁺ B lymphocytes, CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} regulatory B lymphocytes, and IL-10 in peripheral blood of three groups of pregnant women before termination of pregnancy. **Results** There was no statistically significant difference in the percentage of serum CD19⁺ B lymphocytes among the three groups ($P>0.05$). The results of pairwise comparison showed that the percentage of serum CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} regulatory B lymphocytes in the control group was higher than that in the gestational hypertension group, and it was higher than that in the preeclampsia group. And the differences between the control group and the gestational hypertension group and the preeclampsia group were statistically significant ($P<0.05$). The results of pairwise comparison showed that the serum level of IL-10 in the control group was higher than that in the gestational hypertension group, and it was higher than that in the preeclampsia group. And the difference between any two groups was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} regulatory B lymphocytes and secreted IL-10 are abnormally expressed in women with hypertensive disorder complicating pregnancy, which may be related to the occurrence and development of gestational hypertension.

[Key words] hypertensive disorder complicating pregnancy; gestational hypertension; preeclampsia; regulatory B lymphocyte; interleukin-6; flow cytometry

* 基金项目:湖北省卫生健康委员会联合基金项目(WJ2019H298)。 作者简介:何花(1991—),住院医师,硕士,主要从事妊娠期高血压疾病研究。

[△] 通信作者, E-mail:331609779@qq.com。

妊娠期高血压疾病是妊娠与血压升高并存的一组疾病,发生率为 5%~12%^[1]。其中,子痫前期是妊娠妇女 20 周以后出现高血压和蛋白尿的妊娠特有全身综合征,占妊娠妇女的 5%~7%,严重影响母婴健康,是导致孕产妇死亡、早产和围生儿死亡的重要原因^[2]。尽管对于妊娠期高血压疾病发病机制、病因、预测及治疗手段的研究很多,但其具体发病机制至今尚未完全阐明。越来越多的研究表明,B 淋巴细胞主导的体液免疫同样在子痫前期的致病机制中起着重要作用^[3]。而近年来,学者们在 B 淋巴细胞群中发现了一类具有免疫反应负向调节作用的 B 淋巴细胞亚群,将其称为调节性 B 淋巴细胞,作为负性调节细胞,其功能主要依赖于分泌的大量抑制性细胞因子,在抑制炎症免疫反应、维持/诱导调节性 T 淋巴细胞功能及阻止自身免疫反应等方面均具有调节作用^[4]。本研究为了提供更多 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞参与妊娠期高血压疾病的证据,拟通过检测孕妇血清 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞及其分泌的相关细胞因子白细胞介素-10(IL-10)的表达来了解其在妊娠期高血压疾病发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2020 年 9 月至 2021 年 5 月于本院就诊的孕妇信息。妊娠期高血压疾病孕妇的纳入标准:(1)孕前检查、定期产检及分娩均在本院;(2)有完整的孕期血压数据,符合《妊娠期高血压疾病诊治指南(2020)》^[5] 诊断标准;(3)终止妊娠前经孕妇同意采集并留存有外周血。排除标准:(1)孕前存在高血压、糖尿病、自身免疫性疾病等内外科合并症病史;(2)存在高血压家族史;(3)分娩前有其他产科并发症及合并症;(4)无完整的孕前检查、定期产检及分娩时的血压数据。最终纳入符合标准的孕妇 26 例,并将其分为妊娠期高血压组(15 例)、子痫前期组(11 例)。另选取同期正常妊娠孕妇 12 例作为对照组,整个孕期血压均正常,分娩前无其他产科并发症及合并症,孕前无高血压、糖尿病、自身免疫性疾病等内外科合并症病史。本研究得到了本院伦理委员会的批准([2022] IEC118 号)。

1.2 方法

1.2.1 取血样

在终止妊娠前,采用乙二胺四乙酸(EDTA)真空管采集 3 组孕妇血液,并在 1 h 内进行处理。

1.2.2 流式细胞术检测 B 淋巴细胞

取 100 μ L 抗凝血置于流式管底部;加入流式抗体 CD19、CD24、CD38(每个抗体每管加 5 μ L),涡旋混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min;加入 2 mL 溶血素,涡旋,置于室温避光 15 min;每隔 5 分钟观察 1 次,若变

成透明的红色则立刻进行下一步。每管加入 2 mL Stain 上样缓冲液,1 100 r/min 离心 5 min,弃上清液;再加入 2 mL Stain 上样缓冲液后涡旋,1 100 r/min 离心 5 min,弃去上清液;加入 400 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞,上流式细胞仪检测并分析数据。

1.2.3 流式细胞术检测细胞因子

(1)制备细胞因子标准品:将 1 瓶冻干的细胞因子标准品小球转移至 15 mL 锥形离心管中,标记为最高浓度标准品(5 000 pg/mL);用 2 mL Assay Diluent 稀释标准品,室温平衡至少 15 min;用枪头轻柔混匀标准品;取 9 支 12 \times 75 mm 流式管,分别标记梯度稀释倍数 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256;每管加入 500 μ L Assay Diluent;从最高浓度标准品开始逐个加入 500 μ L 倍比稀释液,梯度稀释标准品(从最高浓度标准品管取 500 μ L 溶液至 1:2 管,吹打混匀,随后从 1:2 管取 500 μ L 溶液至 1:4 管,吹打混匀,以此类推,直至 1:256 管),最后取 1 支 12 \times 75 mm 流式上样管加入 500 μ L Assay Diluent 作为阴性质控管(0 pg/mL)。(2)混合细胞因子捕获微球:确定样品数,混合前每种捕获微球需 Vertex 充分涡旋 5~15 s,按照每个样品 7 μ L 吸取适量的捕获微球,充分涡旋混匀。(3)样品孵育:充分涡旋重悬混合微球,每个实验管加入 50 μ L 混合微球,再加入 50 μ L 藻红蛋白(PE)标记的细胞因子检测抗体,室温避光孵育 3 h。(4)上机检测:每管加入 1 mL 洗液清洗样品,1 100 r/min 离心 5 min,小心吸去或轻柔倒掉上清液,每管加入 300 μ L 洗液重悬细胞,仪器调校完毕后尽快上机检测。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism6 软件进行统计分析,非正态分布计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,多组间比较采用 Kruskal Wallis 检验,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验;检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组一般资料比较

3 组年龄、孕次、产次及 BMI 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

2.2 3 组 CD19⁺B 淋巴细胞的表达

3 组血清 CD19⁺B 淋巴细胞百分比:对照组>子痫前期组>妊娠期高血压组,但 3 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

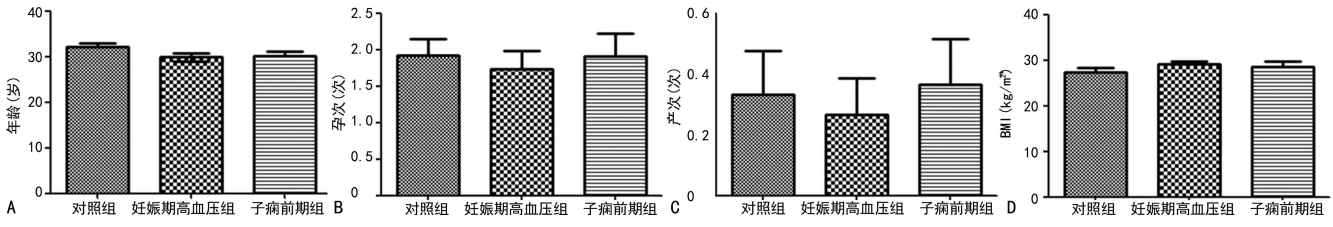
2.3 3 组 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞的表达

3 组血清 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞百分比比较,差异有统计学意义($P<0.05$);两两比

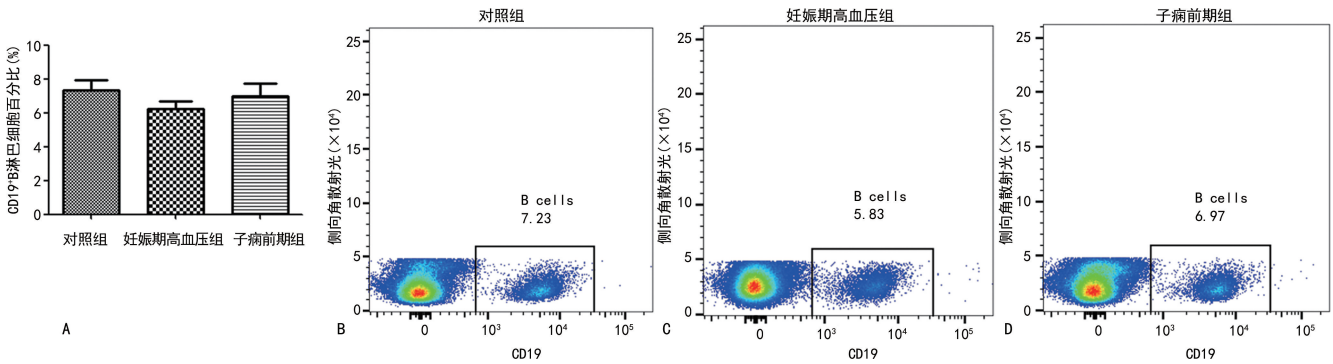
较显示:对照组>妊娠期高血压组>子痫前期组,且对照组与妊娠期高血压组、子痫前期组有明显差异($P<0.05$),妊娠期高血压组与子痫前期组无明显差异($P>0.05$),见图 3。

2.4 3 组血清 IL-10 的表达

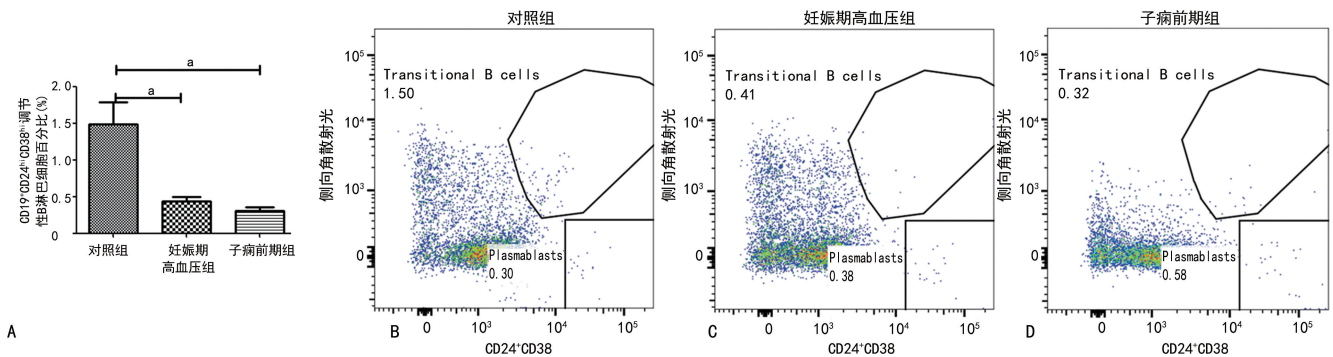
3 组血清 IL-10 表达水平:妊娠组>妊娠期高血压组>子痫前期组,且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



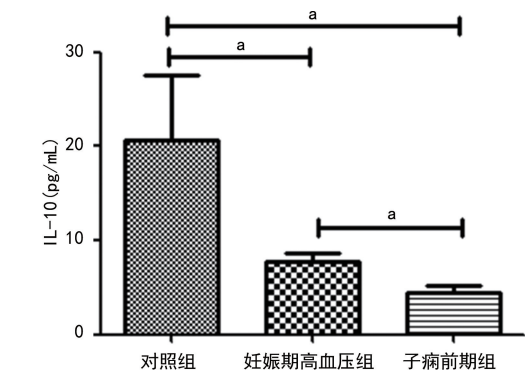
A: 3 组年龄比较; B: 3 组孕次比较; C: 3 组产次比较; D: 3 组 BMI 比较。
图 1 3 组一般资料比较



A: 3 组 CD19⁺ B 淋巴细胞百分比比较; B~C: 流式细胞术分析 CD19⁺ B 淋巴细胞在对照组、妊娠期高血压组及子痫前期组中的表达。
图 2 3 组 CD19⁺ B 淋巴细胞的表达



A: 3 组 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞百分比比较; B~D: 流式细胞术分析 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞在对照组、妊娠期高血压组及子痫前期组中的表达; a: $P<0.05$ 。
图 3 3 组 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞的表达



a: $P<0.05$ 。
图 4 3 组血清 IL-10 表达水平比较

3 讨论

妊娠期高血压疾病是妊娠期特有的一组疾病,其中子痫前期以妊娠 20 周后出现高血压、蛋白尿和水肿为特征。子痫前期经治疗母胎状况没有改善或病情持续进展时,终止妊娠是最有效的治疗措施,因此在确定发生原因方面取得的研究进展有限^[6]。目前,子痫前期的病理生理机制尚未明确,胎儿-母亲耐受性障碍和免疫稳态的改变被广泛认为是其发生的主要机制。已有大量证据表明,免疫细胞在子痫前期的发生、发展中发挥作用^[7-8]。正常妊娠期间,植入后不久母胎界面出现强化的免疫浸润,以自然杀伤细胞为主

(占蜕膜淋巴细胞总数的 70%)，其次是巨噬细胞(占 20%)、T 淋巴细胞(占 10%~20%)和罕见的树突状细胞和 B 淋巴细胞^[9]。其中 B 淋巴细胞是免疫反应的谨慎协调者，这对维持胎儿-母体的耐受性至关重要。调节性 B 淋巴细胞是一种具有免疫调节功能的 B 淋巴细胞亚型，对人体健康和疾病有多种影响，其通过各种细胞因子(如 IL-10、IL-35)及细胞表面标志物的表达发挥免疫耐受和调节作用^[10]。

研究发现，CD19⁺B 淋巴细胞水平在正常妊娠或子痫前期患者中没有变化^[11]，这与本研究结果相似。在本研究中妊娠期高血压组孕妇血清 CD19⁺B 淋巴细胞也处于相对稳定状态。此外，本研究中妊娠期高血压组及子痫前期组孕妇 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞百分比明显低于对照组。BLAIR 等^[12]研究表明，人外周血中可分泌 IL-10 的 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞百分比最高。ROLLE 等^[13]发现调节性 B 淋巴细胞在正常妊娠的前 3 个月增强，可能通过产生抗炎因子 IL-10 抑制炎症反应，有助于妊娠耐受环境的建立。在本研究中，相较于对照组，妊娠期高血压组及子痫前期组孕妇外周血血清 IL-10 水平降低。

已有研究表明，调节性 B 淋巴细胞可能通过调节辅助性 T 淋巴细胞(Th)亚群 Th1/Th2 和 Th17/调节性 T 淋巴细胞(Treg)细胞平衡，在子痫前期的发生中发挥作用^[14]。调节性 B 淋巴细胞可诱导初代 T 淋巴细胞分化为 Th1 和 Th17。它们还可以通过调节树突状细胞分泌细胞因子来影响 Th1 和 Th17 的分化。此外，调节性 B 淋巴细胞还能分泌抑制性细胞因子，如 IL-10、IL-35 和抑制性抗体^[15]。其中，IL-10 被证明在子痫前期中失调，且其表达水平在疾病活动期降低^[15]。这表明子痫前期的全身炎症反应和内皮功能障碍可能与 IL-10 缺乏相关，并最终导致免疫调节、促炎环境和血管生成受损。临床上，靶向 IL-10 的治疗方法可能为子痫前期提供新的选择。

在各种子痫前期动物模型中也类似地证明了 IL-10 途径的失调^[16-19]。此外，在子痫前期动物模型中使用重组 IL-10 可改善子痫前期症状，并且没有其后代发生不良反应的报道^[20-21]。这为 IL-10 用于子痫前期治疗的可能性提供了依据。重组 IL-10 安全且耐受性良好，虽然在人体中的使用可能因半衰期短而受到限制，但对于 IL-10 水平较低的子痫前期患者，IL-10 药物递送系统的研究可能具有重要意义。

综上所述，孕妇外周血 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} 调节性 B 淋巴细胞及其分泌的 IL-10 改变可能与妊娠期高血压的发生有关，利用围产期免疫调节特性来调节 B 淋巴细胞的激活和功能，可能会成为一种新的治疗

方案。

参考文献

- [1] IVES C W, SINKEY R, RAJAPREYAR I, et al. Preeclampsia: pathophysiology and clinical presentations. JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(14): 1690-1702.
- [2] RANA S, LEMOINE E, GRANGER J P, et al. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives[J]. Circ Res, 2019, 124(7): 1094-1112.
- [3] XIA Y, KELLEMS R E. Is preeclampsia an autoimmune disease? [J]. Clin Immunol, 2009, 133(1): 1-12.
- [4] MAURI C, BOSMA A. Immune regulatory function of B cells[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 221-241.
- [5] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组. 妊娠期高血压疾病诊治指南(2020)[J]. 中华妇产科杂志, 2020, 55(4): 227-238.
- [6] LARESGOITI-SERVITJE E, GÓMEZ-LÓPEZ N, OLSON D M. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia[J]. Hum Reprod Update, 2010, 16(5): 510-524.
- [7] MAGATTI M, MASSERDOTTI A, CARGNONI A, et al. The role of B cells in PE pathophysiology: a potential target for perinatal cell-based therapy? [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3405.
- [8] VITALE G, MION F, PUCILLO C. Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity[J]. Mol Immunol, 2010, 48(1/3): 1-8.
- [9] MUZZIO D O, SOLDATI R, EHRHARDT J, et al. B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice[J]. Biol Reprod, 2014, 91(5): 115.
- [10] DASGUPTA S, DASGUPTA S, BANDYOPADHYAY M. Regulatory B cells in infection, inflammation, and autoimmunity[J]. Cell Immunol, 2020, 352: 104076.
- [11] ZENG B, KWAK-KIM J, LIU Y, et al. Treg cells are negatively correlated with increased memory B cells in pre-eclampsia while maintaining suppressive function on autologous B-cell proliferation[J]. Am J Reprod Immunol, 2013,

70(6):454-463.

- [12] BLAIR P A, NOREÑA L Y, FLORES-BORJA F, et al. CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients[J]. *Immunity*, 2010, 29, 32(1):129-140.
- [13] ROLLE L, MEMARZADEH TEHRAN M, MORELL-GARCÍA A, et al. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 70(6):448-453.
- [14] LU H Q, HU R. The role of immunity in the pathogenesis and development of pre-eclampsia[J]. *Scand J Immunol*, 2019, 90(5):e12756.
- [15] CARTER N A, ROSSER E C, MAURI C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(1):R32.
- [16] NATH M C, CUBRO H, MCCORMICK D J, et al. Preeclamptic women have decreased circulating IL-10 (interleukin-10) values at the time of preeclampsia diagnosis: systematic review and meta-analysis[J]. *Hypertension*, 2020, 76(6):1817-1827.
- [17] HEYWARD C Y, SONES J L, LOB H E, et al.

The decidua of preeclamptic-like BPH/5 mice exhibits an exaggerated inflammatory response during early pregnancy[J]. *J Reprod Immunol*, 2017, 120:27-33.

- [18] DONG X, SHI D. Simvastatin alleviates pathology in a rat model of preeclampsia involving ERK/MAPK pathway[J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(7):1053-1061.
- [19] KEMSE N G, KALE A A, JOSHI S R. Supplementation of maternal omega-3 fatty acids to pregnancy induced hypertension Wistar rats improves IL-10 and VEGF levels[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2016, 104:25-32.
- [20] HARMON A, COMELIUS D, AMARAL L, et al. IL-10 supplementation increases Tregs and decreases hypertension in the RUPP rat model of preeclampsia[J]. *Hypertens Pregnancy*, 2015, 34(3):291-306.
- [21] CHATTERJEE P, CHIASSON V L, SEERANGAN G, et al. Cotreatment with interleukin 4 and interleukin 10 modulates immune cells and prevents hypertension in pregnant mice[J]. *Am J Hypertens*, 2015, 28(1):135-142.

(收稿日期:2023-05-30 修回日期:2023-09-11)

(编辑:冯甜)

(上接第 3597 页)

tectomy population: a review [J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51(8):1281-1290.

- [17] 中华医学会泌尿外科学分会, 中国膀胱癌联盟. 根治性膀胱切除尿流改道术中国膀胱癌联盟共识[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2021, 42(7):481-484.
- [18] SMITH Z L, JOHNSON S C, GOLAN S, et al. Fistulous complications following radical cystectomy for bladder cancer: analysis of a large modern cohort[J]. *J Urol*, 2018, 199(3):663-668.

- [19] YAMASHITA R, NAKAMURA M, NOTSU A, et al. The occurrence of high-grade complications after radical cystectomy worsens oncological outcomes in patients with bladder cancer[J]. *Int Urol Nephrol*, 2020, 52(3):475-480.

- [20] 沈剑楠, 朱舒苏, 毛立军, 等. 膀胱癌根治术后尿道复发的危险因素探讨[J]. *中国临床医生杂志*, 2020, 48(9):1070-1072.

(收稿日期:2023-06-28 修回日期:2023-09-29)

(编辑:姚雪)