

· 乙肝病毒宫内传播研究进展 ·

母源外周血和胎盘组织中Toll样受体9表达在HBV宫内传播中的作用

邵昱璋¹ 严敏² 胡妮² 王海荣² 付婷² 高洁² 张磊²

¹西安交通大学医学院 710061; ²空军军医大学军事预防医学系流行病学教研室 特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室, 西安 710032

通信作者:张磊, Email: drzhanglei@fmmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨Toll样受体9(TLR 9)经血液和胎盘途径在HBV宫内传播(BIT)中的作用。方法 对陕西省西北妇女儿童医院分娩的290例HBsAg阳性产妇为病例组和45例健康产妇为对照组进行流行病学调查, ELISA法检测产妇及子代外周血乙型肝炎(乙肝)五项和TLR 9水平, 实时荧光定量PCR检测HBV DNA水平; 免疫组织化学法检测TLR 9在胎盘组织中的表达。采用病例对照研究方法分析发生BIT的HBsAg阳性产妇TLR 9水平差异。结果 HBsAg阳性产妇所生新生儿发生HBV宫内显性感染(DBI)率、宫内隐匿性感染(OBI)率和BIT率分别为9.28%(27/291)、40.21%(117/291)和49.48%(144/291)。HBsAg阳性产妇及未传播组(NBIT)和OBI组的TLR 9水平均显著低于对照组($P < 0.001$), DBI组的TLR 9水平显著高于NBIT组和OBI组($P = 0.000$); OBI组中HBeAg阴性组的TLR 9水平显著低于HBeAg阳性组($P = 0.01$); HBV DNA载量分层中均随着BIT程度的加重, 产妇外周血TLR 9含量明显增加($P < 0.05$); 抗病毒治疗、注射免疫球蛋白和未接种乙肝疫苗组, 均随着BIT程度的加重, 产妇外周血TLR 9含量明显增加($P < 0.05$); DBI的胎盘组织中TLR 9表达显著高于OBI组和NBIT组($P < 0.05$)。结论 HBV一定程度下会抑制产妇体内分泌TLR 9, 但HBeAg能刺激母体TLR 9分泌, 随着BIT程度的加重, 其体内TLR 9水平呈增高的组内交叉分化现象, 因此, TLR 9不是一个能独立筛选分组的标记, 但可以做为HBsAg阳性产妇监测管理的参考指标。

【关键词】 乙型肝炎病毒; Toll样受体9; 宫内传播; 显性感染; 隐匿性感染

基金项目: 国家自然科学基金(81102140, 81472988, 81373058); 国家重点研发计划(2016YFC1303204); 陕西省重点研发计划(2018SF-166)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.009

Role of TLR 9 expression in maternal peripheral blood and placenta in intrauterine transmission of HBV

Shao Yuzhang¹, Yan Min², Hu Ni², Wang Hairong², Fu Ting², Gao Jie², Zhang Lei²

¹Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ²Department of Epidemiology, Key Laboratory of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment of Ministry of Education, School of Military Preventive Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Zhang Lei, Email: drzhanglei@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the role of TLR 9 in intrauterine transmission of hepatitis B virus (HBV) through blood pathway and placenta. **Methods** Epidemiological investigation was carried out in 290 HBsAg positive parturients and 45 normal parturients (control group) in Northwest Women and Children Hospital of Shaanxi Province. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect five serological makers of hepatitis B and TLR 9 levels in peripheral blood of pregnant women and newborns. HBV DNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Detection of TLR 9 expression in placenta by immunohistochemical method. A case-control study was conducted to analyze the difference of TLR 9 levels in placenta and peripheral blood of HBsAg-positive pregnant women with intrauterine transmission of HBV. **Results** The incidence of dominant HBV infection (DBI), occult HBV infection (OBI) and intrauterine transmission of HBV were 9.28% (27/291), 40.21% (117/291) and 49.48% (144/291) respectively. (1) The level of TLR 9 in peripheral blood of HBsAg-positive parturients, non-HBV intrauterine transmission (NBIT) group and OBI group

were significantly lower than that of control group ($P < 0.001$). The level of TLR 9 in DBI group was significantly higher than those in NBIT group and OBI group ($P = 0.000$). (2) The TLR 9 level in HBeAg-negative group was significantly lower than that in HBeAg-positive parturients in OBI group ($P = 0.01$). (3) With the increased severity of intrauterine transmission of HBV in each HBV DNA load group, the TLR 9 level in maternal peripheral blood increased significantly ($P < 0.05$). (4) With the increased severity of intrauterine transmission of HBV, the levels of TLR 9 increased significantly in antiviral therapy, immunoglobulin injection and non-hepatitis B vaccine groups ($P < 0.05$). (5) The expression of TLR 9 in placenta tissues with DBI group was significantly higher than that in OBI group and NBIT group ($P < 0.05$). **Conclusions** HBV can inhibit the secretion of TLR 9 in parturient to some extent, but HBeAg can stimulate the secretion of TLR 9. However, with the increased severity of intrauterine transmission of HBV, the level of TLR 9 in parturients is increased by intra-group cross-differentiation. Therefore, TLR 9 is not an independent marker for screening and grouping, but it can be used as a reference indicator for the monitoring and management of HBsAg-positive parturients.

【Key words】 HBV; TLR 9; Intrauterine transmission; Dominate infection; Occult infection

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81102140, 81472988, 81373058); Key Research and Development Program of China (2016YFC1303204); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2018SF-166)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.009

目前我国人群HBsAg阳性携带率高达6.1%^[1], HBV垂直传播是重要传播途径之一^[2-3]。Toll样受体家族(TLRs)是天然免疫系统的重要组成部分,其中Toll样受体9(TLR 9)在固有免疫和获得性免疫中具有重要作用,与乙型肝炎(乙肝)的发生、发展、治疗及预后密切相关^[2]。本研究以HBsAg阳性产妇外周血和胎盘的TLR 9表达为监测目标,根据其新生儿HBV传播状况为结局,探讨母体TLR 9水平对胎儿HBV宫内传播(BIT)的影响作用,为探索BIT的预警指标提供参考依据。

对象与方法

1. 研究对象:收集2015年1月至2017年6月经陕西省西北妇女儿童医院产前筛查HBsAg为阳性的产妇及其新生儿,产妇290例,新生儿291例。纳入标准:①HBsAg为阳性产妇;②所生新生儿在出生24 h内未接种乙型肝炎(乙肝)疫苗和卡介苗前采集静脉血者;③知情同意。

2. 研究方法:采用病例对照研究方法,根据HBsAg阳性产妇的新生儿HBV感染结果判定,分为病例组与对照组,比较病例组HBsAg阳性与对照组HBsAg阴性产妇TLR 9水平的差别。

(1)分组:采用两组均数比较的样本量估计方法,根据预实验数据求得相关参数:病例组(0.41 ± 0.39),对照组(4.14 ± 8.42),等比例分组,采用PASS 16.0软件计算病例组与对照组样本量各为43例。同期选择年龄匹配的45例健康产妇为对照组,纳入标准:HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe和抗-HBc(乙肝五项)及HBV DNA检测均为阴性结果。排除标准:①罹患其他感染性疾病;②未签署知情同意书。

(2)问卷调查:统一制定流行病学调查问卷,主要内容:产妇的一般情况、家族史、本次妊娠史、孕期干预史以及生产情况和新生儿情况等。

(3)标本采集:采集临产前的产妇及其新生儿(出生24 h内)未抗凝静脉血,新生儿需未接种乙肝疫苗和卡介苗前。分离血清,-20℃保存备用。采集产妇胎盘组织,10%福尔马林浸泡,蜡块包埋,切片备用。

(4)血清HBV标志物检测:产妇及新生儿乙肝五项均采用ELISA法检测,操作和结果判定按试剂盒说明书(北京万泰生物药业股份有限公司)进行。HBV DNA载量采用PCR-荧光探针法检测,操作和结果判定按照试剂盒说明书(湖南圣湘生物科技有限公司)进行。

(5)产妇外周血TLR 9检测:采用人TLR 9 ELISA试剂盒(北京方程生物有限公司)。检测均严格按照试剂盒说明书进行操作和判读结果。

(6)胎盘组织TLR 9检测:鼠抗人TLR 9单克隆抗体(美国Imgenex公司),鼠抗人HBsAg单克隆抗体(上海长岛生物技术有限公司),免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。设立阴性对照:5例健康产妇足月胎盘组织;空白对照:以磷酸盐缓冲生理盐水代替一抗。Olympus DP70数码显微镜在相同条件下采集图片,使用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统中macro下的pathology宏批量检测TLR 9的累计光密度(integrated optical density, IOD)。

(7)新生儿HBV感染结果判定:①BIT:HBV宫内显性感染(DBI)与HBV宫内隐匿性感染(OBI)的统称^[2],即HBsAg阳性产妇所生新生儿24 h静脉血中HBsAg阳性或HBV DNA载量 ≥ 200 拷贝/ml^[3];

②DBI: HBsAg 阳性产妇所生新生儿 24 h 静脉血中 HBsAg 阳性者; ③OBI: HBsAg 阳性产妇所生新生儿 24 h 静脉血中 HBsAg 阴性, 但 HBV DNA 载量 ≥ 200 拷贝/ml, 或者新生儿在全程接种乙肝免疫球蛋白(HBIG)和3针乙肝疫苗后外周静脉血中 HBsAg 阴性, 但 HBV DNA 载量 ≥ 200 拷贝/ml; ④HBV 宫内未传播(NBIT): 新生儿外周血检测 HBsAg 和 HBV DNA 均为阴性。

3. 质量控制: 调查员、实验员进行统一培训, 采用双人双录入核对, 随机抽取 10% 重复测量, 发放问卷 30 份, 通过 Kappa 系数法一致性检验分析, Kappa 值为 0.99, 表明本次调查的信度较好。实验均设阴阳性、空白对照, 并随机抽取 30% 进行复测, 通过 Kappa 系数法一致性检验分析, 乙肝五项 ELISA 检测结果 Kappa 值为 0.99; HBV DNA 载量检测结果 Kappa 值为 0.91, TLR 9 检测结果 Kappa 值为 0.79, 表明本次检测可信度较好。

4. 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。正态分布采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 偏态分布采用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 描述。两组比较方差齐者采用 t 检验, 方差不齐者采用 Mann-Whitney U 检验; 多组比较方差齐者采用方差分析, 方差不齐者采用非参 Kruskal-Wallis 检验。把握度 $(1 - \beta) = 0.08$, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 双侧检验。

结 果

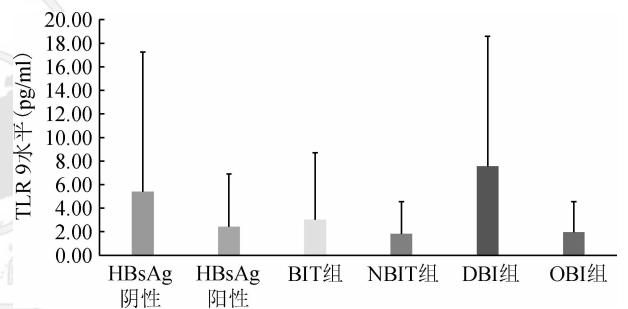
1. 社会人口学特征和 BIT 情况: 收集 2015 年 1 月至 2017 年 6 月经陕西省西北妇女儿童医院产前筛查的 290 例 HBsAg 为阳性产妇, 年龄 $[(29 \pm 3.5) 20 \sim 45]$ 岁, 45 例健康产妇产龄 $[20 \sim 45 (28 \pm 4.1)]$ 岁, 人口学特征见表 1。结果发现, 291 名新生儿中 HBsAg 为阳性者 27 例, HBsAg 阴性新生儿中 HBV DNA 载量 ≥ 200 拷贝/ml 者 117 例, 即该人群 DBI、OBI 和 BIT 率分别为 9.28% (27/291)、40.21% (117/291)、49.48% (144/291)。

表 1 研究对象产妇及其新生儿一般情况

| 特征 | 产妇 HBsAg 阳性组 | 产妇 HBsAg 阴性组 | t/χ^2 值 | P 值 |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------------|-------|
| 产妇 | 290 | 45 | | |
| 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$) | 29 \pm 3.5 | 28 \pm 4.1 | 1.26 ^a | 0.200 |
| 有孕产史 | 120(41.4) | 19(42.2) | 0.011 | 0.915 |
| 第 1 胎 | 170(58.6) | 26(57.8) | 0.011 | 0.915 |
| 新生儿 | 291 | 45 | | |
| 男婴 | 141(48.5) | 22(48.9) | 0.011 | 0.973 |
| 顺产 | 153(52.6) | 23(51.1) | 2.111 | 0.146 |
| 早产 | 6(2.1) | 2(4.4) | 0.199 ^b | 0.655 |

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%); ^a t 检验; ^b校正 χ^2

2. HBsAg 阳性产妇及其 BIT 分组与对照组外周血中 TLR 9 水平比较: HBsAg 阳性产妇外周血的 TLR 9 水平 $[290 \text{ 例}, (2.41 \pm 4.48) \text{ pg/ml}]$ 显著低于 HBsAg 阴性者 $[45 \text{ 例}, 1.83 (0.84 \sim 4.00) \text{ pg/ml}] (U = 4 457.00, P = 0.001)$, 其中 NBIT 组 $[146 \text{ 例}, 0.70 (0.14 \sim 1.60) \text{ pg/ml}]$ 和 OBI 组 $[117 \text{ 例}, 0.74 (0.14 \sim 1.60) \text{ pg/ml}]$ 均显著低于对照组 $(U = 1 825.00, P = 0.000; U = 1 672.00, P = 0.000)$; NBIT 组 TLR 9 水平显著低于 BIT 组 $[144 \text{ 例}, 1.21 (0.28 \sim 4.31) \text{ pg/ml}] (U = 8 779.00, P = 0.015)$; DBI 组的 TLR 9 水平 $[27 \text{ 例}, 5.06 (3.70 \sim 8.07) \text{ pg/ml}]$ 显著高于 NBIT 组 $[146 \text{ 例}, 0.70 (0.14 \sim 1.60) \text{ pg/ml}] (U = 537.00, P = 0.000)$ 和 OBI 组 $[117 \text{ 例}, 0.74 (0.14 \sim 1.60) \text{ pg/ml}] (U = 475.00, P = 0.000)$, 随着 BIT 程度的加重, HBsAg 阳性产妇外周血 TLR 9 含量呈增加趋势 $(\chi^2 = 37.75, P = 0.000)$ (图 1)。



注: DBI: 显性感染; OBI: 隐性感染; BIT: 宫内传播; NBIT: 宫内未传播

图 1 HBsAg 阳性产妇及各分组与对照组 Toll 样受体 9 (TLR 9) 水平

3. HBsAg 阳性产妇不同 HBV 感染状态下 TLR 9 水平状况: HBsAg 阳性产妇 HBV 感染状态包括 HBeAg 和 HBV DNA 载量: ①HBeAg: HBeAg 阴性组产妇的 TLR 9 水平显著低于 HBsAg 阴性对照组 $(U = 2 795.00, P = 0.000)$, HBeAg 阳性组 TLR 9 水平虽然低于 HBsAg 阴性对照组, 但差异无统计学意义 $(U = 69.50, P = 0.297)$; 每组按 BIT 程度分为: DBI、OBI 和 NBIT 组, 均随着 BIT 程度的加重, 产妇 TLR 9 含量呈增加趋势 $(P < 0.01)$; 无论 HBeAg 阴性和阳性组, DBI 组 TLR 9 水平均显著高于 OBI 组和 NBIT 组 $(P < 0.01)$ 。②HBV DNA 载量: 按 10^3 拷贝/ml、 10^6 拷贝/ml 为截点分 3 个层次, 每层均随 BIT 程度的加重, 其 TLR 9 含量呈增加趋势 $(P < 0.05)$, 每层中 DBI 组 TLR 9 水平均显著高于 OBI 组和 NBIT 组 $(P < 0.05)$ (表 2)。

4. HBsAg 阳性产妇孕期干预情况与 TLR 9 水平

的关系:DBI、OBI、NBIT 组在抗病毒治疗、接种乙肝疫苗和注射 HBIG 各因素干预与未干预间 TLR 9 水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。抗病毒治疗、注射 HBIG 和未接种乙肝疫苗组,均随着 BIT 程度的加重,产妇外周血 TLR 9 含量呈增加趋势($P<0.05$),除注射乙肝疫苗组外,其他组别均呈现 DBI 组的 TLR 9 水平显著高于 OBI 组和 NBIT 组($P<0.05$)(表 3)。

5. 胎盘组织 TLR 9 检测情况:免疫组化显示,生

理盐水缓冲液(PBS)对照组未见 TLR 9 棕黄色阳性信号,5 例 HBsAg 阴性胎盘组织和 15 例 HBsAg 阳性胎盘组织(包括 5 例 DBI 组、5 例 OBI 组和 5 例 NBIT 组)均能检测到 TLR 9 阳性信号,各组间方差分析呈现的差异有统计学意义($P<0.05$),其中 DBI 组胎盘 TLR 9 表达强度明显强于 HBsAg 阴性胎盘组织、OBI 组和 NBIT 组胎盘组织,其免疫组化累计光密度差异有统计学意义($P<0.05$)(表 4、图 2)。

表 2 HBsAg 阳性产妇不同 HBV 感染状态下的 TLR 9 水平对比[pg/ml, $M(P_{25} \sim P_{75})$]

| 指标 | DBI 组(n) | OBI 组(n) | NBIT 组(n) | 合计 | 3 组总体比较 | | DBI 组比 OBI 组 | | DBI 组比 NBIT 组 | | OBI 组比 NBIT 组 | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|------------|-------|--------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| | | | | | χ^2 值 | P 值 | t/U 值 | P 值 | t/U 值 | P 值 | t/U 值 | P 值 |
| HBsAg | | | | | | | | | | | | |
| 阴性 | 5.32(3.86 ~ 9.63) (13) | 0.65(0.17 ~ 1.48) (80) | 0.74(0.20 ~ 1.61) (112) | 2.27(0.18 ~ 4.61) (205) | 20.05 | 0.000 | 126.00 | 0.000 | 206.50 | 0.000 | 4 222.50 | 0.497 |
| 阳性 | 4.19(3.66 ~ 6.84) (14) | 2.29±2.83 (37) | 0.44(0.12 ~ 1.94) (34) | 0.74(0.21 ~ 2.13) (85) | 15.14 | 0.001 | 127.50 | 0.005 | 66.00 | 0.000 | 503.50 | 0.147 |
| U 值 | 69.50 | 1 156.50 | 1 701.00 | 7 610.00 | | | | | | | | |
| P 值 | 0.297 | 0.057 | 0.350 | 0.089 | | | | | | | | |
| HBV DNA (拷贝/ml) | | | | | | | | | | | | |
| <10 ³ | 5.32(4.06 ~ 9.26) (11) | 0.69(0.19 ~ 1.66) (72) | 0.74(0.25 ~ 1.43) (99) | 0.76(0.23 ~ 1.84) (182) | 15.97 | 0.000 | 112.00 | 0.000 | 154.50 | 0.000 | 3 462.00 | 0.749 |
| 10 ³ ~ | 8.26±4.45 (3) | 1.30(0.17 ~ 3.39) (19) | 0.31(0.06 ~ 1.41) (27) | 0.56(0.12 ~ 3.52) (49) | 7.13 | 0.028 | 4.02 | 0.001 | 3.26 | 0.003 | 0.44 | 0.666 |
| >10 ⁶ | 4.86±1.92 (13) | 1.78(0.08 ~ 4.22) (26) | 1.71(0.11 ~ 4.57) (20) | 3.36(0.37 ~ 4.77) (59) | 7.89 | 0.019 | 82.50 | 0.01 | 63.50 | 0.014 | 250.00 | 0.824 |
| χ^2 值 ^a | 2.27 | 1.10 | 3.19 | 5.90 | | | | | | | | |
| P 值 | 0.322 | 0.578 | 0.203 | 0.052 | | | | | | | | |

注: DBI: 显性感染; OBI: 隐匿性感染; NBIT: 宫内未传播; ^a采用 Kruskal-Wallis 检验对各状态分组中 DBI、OBI、NBIT 3 组比较,以及 DBI、OBI、NBIT 在不同 HBV DNA 载量中 3 组比较

表 3 HBsAg 阳性产妇不同干预因素下 TLR 9 水平的对比[pg/ml, $M(P_{25} \sim P_{75})$]

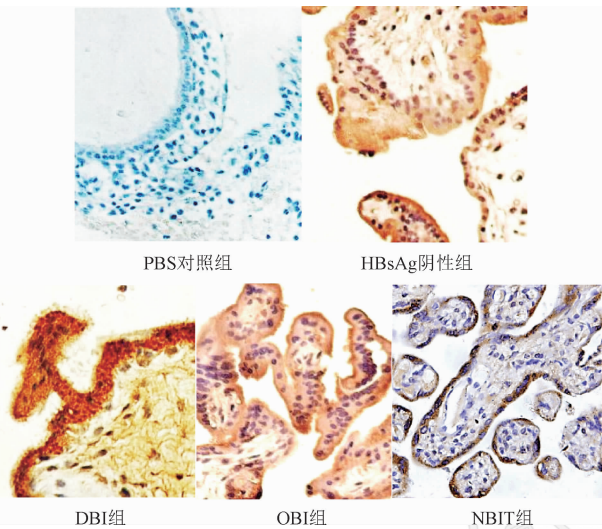
| 指标 | TLR 9 水平 | | | 合计 | 3 组总体比较 | | DBI 组比 OBI 组 | | DBI 组比 NBIT 组 | | OBI 组比 NBIT 组 | |
|---------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------|-------|--------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| | DBI 组(n) | OBI 组(n) | NBIT 组(n) | | χ^2 值 | P 值 | t/U 值 | P 值 | t/U 值 | P 值 | t/U 值 | P 值 |
| 抗病毒治疗 | | | | | | | | | | | | |
| 是 | 4.84±0.90 (4) | 0.73(0.13 ~ 1.96) (14) | 1.54±2.56 (20) | 0.74(0.40 ~ 3.28) (38) | 6.62 | 0.036 | 6.00 | 0.019 | 2.71 | 0.013 | 136.00 | 0.889 |
| 否 | 5.32(3.65 ~ 8.59) (23) | 0.74(0.18 ~ 3.42) (103) | 0.70(0.12 ~ 1.72) (126) | 0.88(0.17 ~ 3.65) (252) | 31.57 | 0.000 | 370.00 | 0.000 | 404.50 | 0.000 | 6 181.50 | 0.537 |
| U 值 | 44.00 | 680.00 | 1 183.50 | 4 736.50 | | | | | | | | |
| P 值 | 0.891 | 0.730 | 0.663 | 0.915 | | | | | | | | |
| 注射乙肝疫苗 | | | | | | | | | | | | |
| 是 | 0.40 (1) | 3.18±3.53 (7) | 1.74±2.41 (12) | 2.18±2.82 (20) | 0.91 | 0.633 | 2.00 | 0.513 | 2.00 | 0.284 | 41.50 | 0.966 |
| 否 | 7.65±11.33 (25) | 0.79(0.15 ~ 3.38) (104) | 1.87±2.84 (125) | 2.47±4.66 (254) | 36.88 | 0.000 | 348.00 | 0.000 | 407.50 | 0.000 | 6 216.00 | 0.824 |
| t/U 值 | 0.00 | 305.5 | -0.16 | 0.28 | | | | | | | | |
| P 值 | 0.096 | 0.477 | 0.877 | 0.778 | | | | | | | | |
| 注射免疫球蛋白 | | | | | | | | | | | | |
| 是 | 5.33±2.79 (13) | 2.33±2.51 (45) | 0.51(0.15 ~ 0.98) (45) | 0.74(0.19 ~ 3.65) (103) | 18.86 | 0.000 | 3.71 | 0.000 | 63.00 | 0.000 | 823.50 | 0.125 |
| 否 | 5.19(3.69 ~ 8.37) (14) | 0.69(0.20 ~ 1.66) (72) | 0.86(0.14 ~ 2.44) (100) | 0.89(0.22 ~ 3.48) (186) | 22.06 | 0.000 | 110.00 | 0.000 | 193.00 | 0.000 | 3 398.50 | 0.531 |
| U 值 | 80.50 | 1 497.00 | 1 795.50 | 9 307 | | | | | | | | |
| P 值 | 0.610 | 0.490 | 0.052 | 0.689 | | | | | | | | |

注: DBI: 显性感染; OBI: 隐匿性感染; NBIT: 宫内未传播

表 4 HBsAg 阳性产妇与对照组胎盘组织 TLR 9 检测情况

| 产妇胎盘分组 | 例数 | 累计光密度 | 对照组比 DBI 组、OBI 组和 NBIT 组 | | DBI 组比 OBI 组和 NBIT 组 | |
|----------|----|------------------------|--------------------------|------|----------------------|------|
| | | | t 值 | P 值 | t 值 | P 值 |
| HBsAg 阴性 | 5 | 159 337.29 ± 85 501.07 | - | - | - | - |
| HBsAg 阳性 | | | | | | |
| DBI | 5 | 278 686.57 ± 97 547.92 | -2.06 | 0.07 | - | - |
| OBI | 5 | 129 938.65 ± 73 325.85 | 0.58 | 0.58 | 2.73 | 0.03 |
| NBIT | 5 | 107 434.36 ± 67 291.14 | 1.07 | 0.32 | 3.23 | 0.01 |

注:对照组相比于 DBI、OBI、NBIT 4 个组间 $F=4.35, P=0.020$; DBI、OBI、NBIT 3 个组间 $F=6.69, P=0.011$; DBI:显性感染; OBI:隐匿性感染; NBIT:宫内未传播



注: DBI: 显性感染; OBI: 隐匿性感染; NBIT: 宫内未传播; PBS: 生理盐水缓冲液

图 2 胎盘组织中 TLR 9 的免疫组化结果 (×200)

讨论

既往研究发现约 >50% 的 HBV 感染新病例是母婴传播引起的^[3], 本研究发现该 HBsAg 阳性产妇发生 DBI 率、OBI 率、BIT 率分别为 9.28%、40.21% 和 49.48%, 其中 OBI 是 DBI 的 5.18 倍, 这部分人群可能是潜在乙肝疫苗无应答以及发生 HBV 母婴传播的高危人群, 因此, 对于 BIT 的预警监测研究不仅要包括 DBI 者, 还要包括 OBI 者, 才能实现全方位防控乙肝的目的。

表达于细胞器膜上的 TLR 9 在与细菌/病毒等 DNA 的非甲基化 CpG 为配体结合后有诱导凋亡的潜力^[4]。有研究认为慢性乙肝患者 TLR 9 的表达下调, 诱导病毒持续感染或机会性感染明显增加^[5]。本研究发现 HBsAg 阳性产妇外周血的 TLR 9 水平显著低于 HBsAg 阴性产妇, 其中 NBIT 组产妇和 OBI 组产妇均显著低于对照组, 既往研究提出 HBV 的病毒核心 dsDNA 主要被 TLR 9 所识别, HBV 感染能显著抑制 TLR 9 的表达^[6], 本研究结果与文献

一致。

在病毒保护实验中发现通过激活 TLR 9 加强肝细胞的免疫应答能力, 不但可以抑制 HBV 复制, 还可能加快 HBV 在机体内的清除速度^[7], 本研究发现 HBsAg 阳性产妇随着 BIT 程度的加重, 产妇外周血 TLR 9 含量呈增加趋势。不仅 HBsAg 阳性产妇中 DBI 组母体 TLR 9 均发生上调, 随着 BIT 程度的加重, 其 TLR 9 含量呈增加趋势, 而且按 HBV DNA 载量 10^3 拷贝/ml、 10^6 拷贝/ml 为截点分 3 个层次, 每层均随着 BIT 程度的加重, 其 TLR 9 含量呈明显增加趋势。有研究发现慢性重型乙型肝炎 (CSHB) 患者外周单核细胞 (PBMCs) 中 TLR 9 的 mRNA 表达比肝硬化患者明显增高, 虽然 CSHB 患者 PBMCs 作为 APC 通过 TLR 9 途径呈递 HBV 抗原并提供第二信号刺激的能力受损, 但通过 PBMCs 中 B 淋巴细胞代偿性上调 TLR 9 表达, 增强了第二信号刺激, 提示重症肝炎反而存在 TLR 9 上调表达的现象^[8], 本研究结果符合既往研究推论。BIT 中胎盘是一个重要途径, 在本免疫组化结果显示 DBI 的胎盘组织中 TLR 9 表达显著高于 OBI 组和 NBIT 组, 和母体外周血的 TLR 9 表达水平一致。进一步佐证了在 HBsAg 阳性孕妇体内 TLR 9 水平呈增高的组内交叉分化现象, 这为早期预测 DBI 提供了一个有效指标。

除注射乙肝疫苗组样本量太少外, 其他干预组与未干预组呈现 DBI 组的 TLR 9 水平显著高于 OBI 组和 NBIT 组, 并随着 BIT 程度的加重, 产妇外周血 TLR 9 含量有明显增加趋势。进一步分析发现孕期抗病毒治疗和注射 HBIG 的孕妇皆为 HBV DNA 高载量或者 HBeAg 阳性者, 其感染病情重于其他 HBsAg 阳性孕妇, 推测发生 BIT 的母体由于体内 HBV 的活跃性高于 NBIT 组, 可能存在刺激母体 B 淋巴细胞免疫应答, 代偿性上调 TLR 9 表达, 此研究结局符合既往研究结论^[8]。

综上所述, HBV 一定程度上会抑制产妇体内分泌 TLR 9, 但 HBeAg 能刺激母体 TLR 9 分泌, 随着

BIT 程度的加重,其体内 TLR 9 水平呈增高的组内交叉分化现象,因此,TLR 9 不是一个能独立筛选分组的标记,但可以做为 HBsAg 阳性产妇监测管理的参考指标。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Zhang WL, Ji ZH, Wang L, et al. A Meta-analysis of HBsAg-positive rate among general Chinese populations aged 1-59 years [J]. Infect Dis, 2015, 47(12): 878-888. DOI: 10.3109/23744235.2015.1064541.

[2] Shahrakvayeh A, Sanchooli J, Sanadgol N, et al. TLR 9: an important molecule in the fight against hepatitis B virus [J]. Postgrad Med J, 2014, 90 (1065) : 396-401. DOI: 10.1136/postgradmedj-2013-132309.

[3] 黄睿,曹引丽,高洁,等.西安市HBV宫内感染的发生情况及其影响因素研究[J]. 华南预防医学, 2017, 43(6): 507-511. DOI: 10.13217/j.scjpm.2017.0507.

Huang R, Cao YL, Gao J, et al. HBV intrauterine infection and its influencing factors in Xi'an [J]. South China J Prev Med, 2017, 43(6): 507-511. DOI: 10.13217/j.scjpm.2017.0507.

[4] Mahla RS, Reddy MC, Prasad DVR, et al. Sweeten PAMPs: Role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology [J]. Front Immunol, 2013, 4: 248. DOI: 10.3389/fimmu.

2013.00248.

[5] 贾妮娜,谢青,安宝燕,等.慢性乙型肝炎病毒感染者外周血浆样树突状细胞 Toll 样受体 9 的表达和分泌功能[J]. 中华传染病杂志, 2007, 25(12): 714-718. DOI: 10.3760/j.issn:1000-6680.2007.12.003.

Jia NN, Xie Q, An BY, et al. Toll like receptor 9 expression and functions of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Chin J Infect Dis, 2007, 25 (12) : 714-718. DOI: 10.3760/j.issn: 1000-6680.2007.12.003.

[6] Wagner H. The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9 [J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(4) : 396-400. DOI: 10.1016/j.coi.2008.06.013.

[7] Wu J, Lu MJ, Meng ZJ, et al. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice [J]. Hepatology, 2007, 46(6) : 1769-1778. DOI: 10.1002/hep.21897.

[8] 陈煜,时红波,张帆,等.慢性重型肝炎患者外周血单个核细胞中 TLR 2、TLR 3 和 TLR 9 的 mRNA 表达 [J]. 肝脏, 2010, 15(4) : 244-246, 315. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1704.2010.04.002.

Chen Y, Shi HB, Zhang F, et al. Expression of TLR 2, TLR 3, TLR 9 mRNA in PBMC of patients with chronic severe hepatitis [J]. Chin Hepatol, 2010, 15(4) : 244-246, 315. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1704.2010.04.002.

(收稿日期: 2019-02-01)

(本文编辑: 斗智)

中华预防医学会流行病学分会第八届委员会组成人员名单

(按姓氏笔画排序)

| | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 顾 问 | 刘天锡 | 汪 华 | 陆 林 | 姜庆五 | 贺 雄 | | | | |
| 名誉主任委员 | 李立明 | | | | | | | | |
| 主任委员 | 詹思延 | | | | | | | | |
| 副主任委员 | 叶冬青 | 冯子健 | 何 纳 | 何 耀 | 沈洪兵 | 胡永华 | | | |
| 常务委员 | 王 岚 | 王子军 | 王全意 | 王素萍 | 代 敏 | 吕 筠 | 朱凤才 | 江 宇 | |
| | 许国章 | 李立明 | 李亚斐 | 杨晓明 | 杨维中 | 吴 凡 | 吴先萍 | 汪 宁 | |
| | 张建中 | 陈 坤 | 赵根明 | 胡志斌 | 段广才 | 俞 敏 | 施小明 | 唐金陵 | |
| | 曹务春 | 谭红专 | | | | | | | |
| 委 员 | 丁淑军 | 么鸿雁 | 王 蓓 | 王建明 | 毛 琛 | 仇小强 | 方向华 | 田文静 | |
| | 白亚娜 | 吕 繁 | 庄贵华 | 刘 玮 | 刘运喜 | 刘雅文 | 刘殿武 | 许汴利 | |
| | 孙业桓 | 苏 虹 | 李 琦 | 李文庆 | 李石柱 | 李佳圆 | 杨西林 | 杨敬源 | |
| | 吴尊友 | 吴寰宇 | 邱洪斌 | 余宏杰 | 张 本 | 张 军 | 张卫东 | 张毓洪 | |
| | 陈可欣 | 陈维清 | 邵中军 | 欧剑鸣 | 周宝森 | 官旭华 | 孟 蕾 | 项永兵 | |
| | 赵亚双 | 胡东生 | 施 榕 | 姜 勇 | 姜 晶 | 袁 萍 | 贾存显 | 贾崇奇 | |
| | 高立冬 | 郭卫东 | 郭秀花 | 曹广文 | 梁 娴 | 寇长贵 | 彭 霞 | 韩秀敏 | |
| | 程锦泉 | 程慧健 | 曾小云 | 雷立健 | 蔡建芳 | 缪小平 | 潘 安 | 戴江红 | |
| | 魏文强 | | | | | | | | |
| 秘书长 | 王 岚 | | | | | | | | |
| 秘 书 | 余灿清 | 李银鸽 | | | | | | | |