

文章编号 1006-8147(2020)01-0064-04

论著

妊娠梅毒患者外周血 T/B/NK 淋巴细胞亚群检测及分析

魏 然¹, 马 萍², 车雅敏¹

(1.天津医科大学总医院皮肤性病科,天津 300052;2.天津市第二人民医院皮肤性病科,天津 300192)

摘要 目的:检测妊娠梅毒患者外周血中淋巴细胞亚群及NK细胞的表达情况,探讨其在妊娠梅毒发病机制中的作用。方法:采用流式细胞仪对12例未经驱梅治疗的妊娠梅毒患者及16例血清固定的妊娠梅毒患者外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺、NK细胞进行检测,并与12例梅毒非妊娠女性、32例健康孕妇、25例健康非妊娠女性进行比较。结果:与其他4组相比,血清固定组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺细胞比例均显著降低($P<0.05$),CD8⁺细胞比例显著升高($P<0.05$);未治疗组CD4⁺细胞比例低于健康孕妇组($P<0.05$),CD8⁺细胞比例高于梅毒非孕妇组、健康孕妇组和健康非孕妇组($P<0.05$);未治疗组和血清固定组CD19⁺细胞比例均高于梅毒非孕妇组、健康孕妇组和健康非孕妇组($P<0.05$);血清固定组NK细胞比例高于未治疗组($P<0.05$);梅毒非孕妇组、健康孕妇组和正常非孕妇组各项淋巴细胞亚群水平无统计学差异($P>0.05$)。结论:妊娠梅毒患者存在细胞免疫抑制,体液免疫受到影响;血清固定组出现免疫失衡,NK细胞水平下降,引起机体对梅毒螺旋体的清除能力下降。

关键词 梅毒;妊娠;淋巴细胞;流式细胞仪

中图分类号 R759.1*54

文献标志码 A

The expression of lymphocyte subgroup in peripheral blood of pregnant syphilis patients and the analysis of immune function

WEI Ran¹, MA Ping², CHE Ya-min¹

(1.Department of Dermatology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2.Department of Dermatology, Tianjin Second People's Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract Objective: To determine the expression of peripheral lymphocyte subgroup and nk cells in peripheral blood of syphilis patients and to investigate its clinical significance. **Methods:** The levels of peripheral blood lymphocyte CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺, NK cell were detected with flow cytometry in 12 cases of untreated pregnant syphilitic patient, 16 cases of pregnant patients with syphilis sero-fixation, 12 cases of non-pregnant women with syphilis, 25 cases of normal controls and 32 cases of normal pregnant women was analyzed. **Results:** The level of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ in syphilis sero-fixation group was lower than that of the other four groups($P<0.05$), the level of CD8⁺ was higher significantly ($P<0.05$). The level of CD4⁺ was lower than normal pregnant women group ($P<0.05$), the level of CD8⁺ was higher than non-pregnant women with syphilis, normal pregnant women group and normal non-pregnant women group ($P<0.05$). The level of CD19⁺ in untreated group and sero-fixation group was higher than the non-pregnant women with syphilis, normal pregnant women group and normal non-pregnant women group ($P<0.05$). The level of NK cell in the sero-fixation group was higher than the untreated group ($P<0.05$). All indicators in the three control groups had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** The prominent suppression of cellular immunity and effects of humoral immune in pregnant syphilis patients is observed. There is an imbalance of cellular immunity and the lower level of NK cell in syphilis sero-fixation group, which cause the decline of ability of removing Treponema pallidum.

Key words syphilis; gestation; lymphocyte; flow cytometry

梅毒是由梅毒螺旋体引起的一种慢性传播疾病。近年来,伴随梅毒发病率的增加,妊娠梅毒已经成为重要的医学问题和公共卫生问题。妊娠梅毒以潜伏梅毒为主,多在妊娠期体检时发现,目前国内对于妊娠梅毒的免疫学研究较少,发病机制与细胞免疫功能的关系,至今尚不明确。为探讨

妊娠梅毒发病的免疫学相关机制,本研究应用流式细胞仪对12例未经驱梅治疗的妊娠梅毒及16例血清固定的妊娠梅毒进行外周血T淋巴细胞、NK细胞及B淋巴细胞检测,并与12例梅毒非妊娠女性、32例健康孕妇、25例健康非妊娠女性进行比较,以了解妊娠梅毒患者的免疫状态并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集天津市第二人民医院感染二

作者简介 魏然(1994-),女,硕士在读,研究方向:性传播疾病;通信作者:车雅敏,E-mail: lily_alan@sohu.com;马萍,E-mail: pincer0531@163.com。

科 2018 年 5 月–2018 年 10 月的妊娠合并梅毒患者共 28 例。妊娠梅毒的诊断标准与非妊娠人群相同,参考 2014 版中国性传播疾病临床诊疗及防治指南,同时测定甲苯胺红不加热血清试验(tolulized red unheated serum test, TRUST)和梅毒螺旋体颗粒凝集试验(treponemal pallidum particle agglutination, TPPA),两项均为阳性的孕妇即确诊为妊娠合并梅毒^[1]。其中未经驱梅治疗者 12 例,年龄 18~33 岁(25.2±4.0),全部为潜伏梅毒;经治疗后发生血清固定者 16 例,年龄 22~36 岁(25.4±3.6),其中既往为一期梅毒 1 例,潜伏梅毒 15 例。梅毒非孕妇组为 12 例梅毒血清学阳性的未妊娠女性,年龄 21~40 岁(28.3±6.30)。健康孕妇组为 32 例正常体检孕妇,年龄 21~35 岁(27.2±3.5)。正常对照组为 25 例健康体检女性,年龄 20~39 岁(27.4±3.9)。5 组年龄构成无统计学差异($F=1.516, P>0.05$)。梅毒血清固定诊断标准:早期梅毒治疗后,按规定时间随访如血清仍不转阴,或超过 2 年血清不转阴者称为血清固定^[2]。所有标本均排除自身免疫性疾病、过敏性疾病、合并感染 HIV 或其他性病、严重系统性疾病和应用免疫抑制剂史。

1.2 仪器与试剂 FACSCalibur™ 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);FACS Lysing 红细胞裂解液,

单克隆抗体:CD16⁺/CD56⁺PE、CD3⁺PerCP/CD4⁺FITC/CD8⁺PE 三色荧光抗体、CD19⁺FITC、CD45⁺PerCP(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.3 检测方法 取静脉血 2 mL 肝素抗凝,在新 EP 管加入全血 100 μ L、单克隆抗体试剂 20 μ L 混匀,室温避光孵育 20 min,加入 2 mL 红细胞裂解液混匀,放置 10 min。2 h 内上机检测。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17 统计学软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数比较采用 χ^2 分析,若存在统计学差异,则进一步采用 LSD 检验作组间两两比较;两组间均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与其他 4 组相比,血清固定组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺细胞比例均显著降低($P<0.05$),CD8⁺细胞比例显著升高($P<0.05$);未治疗组 CD4⁺细胞比例低于健康孕妇组($P<0.05$),CD8⁺细胞比例高于梅毒非孕妇组、健康孕妇组和健康非孕妇组($P<0.05$);未治疗组和血清固定组 CD19⁺细胞比例均高于梅毒非孕妇组、健康孕妇组和健康非孕妇组($P<0.05$);血清固定组 NK 细胞比例高于未治疗组($P<0.05$);梅毒非孕妇组、健康孕妇组和正常非孕妇组各项淋巴细胞亚群水平无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1 5 组人群外周血淋巴细胞亚群比较($\bar{x}\pm s, \%$)

Tab 1 Comparison of peripheral blood lymphocyte subgroups in 5 groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺	NK
血清固定妊娠梅毒组	71.02±8.21 ^{*§△}	36.85±4.72 ^{*§△}	36.52±5.70 ^{*§△}	1.17±0.30 ^{*§△}	12.90±3.20 ^{*△}	9.76±3.25 [§]
未治疗妊娠梅毒组	76.86±4.44	45.41±5.60 [*]	32.27±2.57 ^{*△}	1.58±0.41	13.27±3.29 ^{*△}	7.42±2.36
梅毒非孕妇组	74.76±6.38	46.18±5.10	25.81±4.31	1.54±0.22	10.55±2.97	/
健康非孕妇组	77.71±3.96	48.27±4.39	27.94±3.15	1.57±0.31	9.58±2.48	/
健康孕妇组	77.43±6.96	50.84±10.20	28.65±5.90	1.49±0.45	10.11±2.46	/
F	3.643	10.813	12.309	3.712	6.327	
P	0.008	0.000	0.000	0.008	0.000	0.04

与健康非孕妇组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与健康孕妇组比较, $^{*}P<0.05$;与梅毒非孕妇组比较, $^{\circ}P<0.05$;与未治疗妊娠梅毒组相比, $^{\S}P<0.05$

3 讨论

近年来,妊娠梅毒已成为一个值得关注的公共卫生问题,不同文献所报道的孕妇人群中患病率约为 3.7%~23.3%^[3]。以往研究认为,梅毒螺旋体在妊娠 16 周以前不易穿过滋养层细胞对胎儿造成感染,妊娠 16 周后,滋养层细胞逐渐萎缩退化,丧失屏障作用^[4]。但近年来的研究表明,在妊娠早期梅毒螺旋体即可感染胎儿,导致流产、早产、死胎等不良妊娠结局^[5]。一项关于妊娠梅毒患者发生不良妊娠结局的荟萃分析显示,未接受驱梅治疗的妊娠梅毒患者发生流产、死胎的概率上升 21%,新生儿死亡

率上升 9.3%,15%的新生儿发生先天梅毒^[6]。有多项研究报道指出目前妊娠梅毒患者以潜伏梅毒为主,这一趋势仍在逐年增加^[7-8]。

梅毒的病情发生发展与机体发挥免疫功能密切相关,固有免疫、细胞免疫及体液免疫协同作用保护机体减少再感染,同时造成梅毒临床症状的多样性。有研究表明,细胞免疫对梅毒的病程发展具有重要影响,梅毒患者存在细胞免疫功能抑制和失衡现象,细胞免疫功能低下不仅可增加 TP 再感染的机会,而且造成 TP 的隐匿性感染,增加神经梅毒的易感性,影响病情的发展和转归^[9-10]。CD4⁺和 CD8⁺

细胞亚群由 T 淋巴细胞分化而成。CD4⁺细胞能分泌多种细胞因子,介导迟发型超敏反应,对于清除梅毒螺旋体起到决定性作用;CD8⁺细胞对保护性免疫反应具有抑制作用。CD4⁺/CD8⁺是反映机体炎症反应和免疫情况的初步指标,在正常状况下人体 CD4⁺/CD8⁺水平相对稳定^[11]。凌昕等^[12]对梅毒血清固定患者及神经梅毒患者外周血检测发现,两组均表现为 CD4⁺细胞下降和 CD4⁺/CD8⁺比值下降。本研究中血清固定组外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平显著降低,CD8⁺水平高于其他 3 组,表明存在 T 淋巴细胞亚群平衡失常,造成免疫抑制,减弱机体对梅毒螺旋体的清除作用,这种免疫失衡也是疾病预后不良的重要标志之一^[13]。妊娠期母体免疫功能处于耐受状态,以避免对胎儿的排斥。因此,梅毒螺旋体感染状态下妊娠可能是加重免疫失衡的影响因素之一^[14]。有少数研究也发现较未经治疗的梅毒患者,发生血清固定的梅毒患者出现外周血 CD4⁺细胞、CD4⁺/CD8⁺比值显著减少,CD8⁺细胞显著增加,这种比例失衡现象可能是造成快速血浆反应试验(rapid plasma regain, RPR)持续阳性的原因之一^[15]。近年来有研究指出,CD8⁺细胞水平异常不仅可拮抗 CD4⁺介导的免疫反应,同时还抑制 TP 制动抗体的产生,引发梅毒螺旋体的复制和扩散^[16]。因此有研究者认为在梅毒常规治疗的基础上加用免疫调节剂可以明显改善治疗效果^[17]。已有多项研究证实梅毒血清固定患者中加用糖皮质激素治疗可以有效抑制炎症反应,调节免疫功能,具有更好的临床疗效且不良反应可控^[18-19]。此外,也有研究者采用双向免疫调节剂胸腺五肽通过调节外周血 T 淋巴细胞比例使免疫机能恢复至正常范围^[20]。

CD19⁺表达于所有 B 细胞表面,是 B 细胞的重要膜抗原,通过与 B 细胞抗原受体(B cell receptor, BCR)结合可溶性抗原,经内吞和加工后,以抗原肽(major histocompatibility complex, MHC)分子复合物形式提呈给 T 细胞,CD19⁺反映了机体的体液免疫功能^[21]。在凌昕等^[12]研究中,梅毒血清固定患者和神经梅毒患者 CD19⁺比例有所上升,但没有统计学差异。对各期梅毒患者的 CD19⁺细胞水平进行检测,结果往往与健康对照组无异,甚至在高滴度二期梅毒中出现显著下降,这种降低也可能与高滴度抗体形成的反馈抑制作用有关^[21-22]。与之不同的是,本研究中未经驱梅治疗及治疗后发生血清固定的妊娠梅毒患者外周血 CD19⁺水平平均高于梅毒非孕妇组、正常对照组与健康孕妇组,提示妊娠状态下梅毒螺旋体感染对患者的体液免疫产生影响。B 细胞在梅毒

免疫中有双向调节作用,并与 T 细胞介导的细胞免疫密切相关,但参与免疫失衡及免疫抑制的具体作用机制尚不明确^[23]。

NK 和巨噬细胞构成机体免疫监视的第一道防线,在清除 TP 方面发挥重要作用,同时也具有将固有免疫与获得性免疫相联系的作用^[24]。本研究中,相较于未治疗组,血清固定组 NK 细胞升高。虽然在正常孕妇及健康体检者中未检测 NK 细胞,但有以往研究表明,育龄期既往潜伏梅毒的血清固定女性患者外周血 NK 细胞水平显著低于健康人群,提示因其免疫防御功能受损导致梅毒螺旋体感染演化为慢性迁延性^[25]。颜霞等^[26]发现各期梅毒患者均存在 NK 细胞水平显著降低的现象。但在二期梅毒皮损中,大量的梅毒螺旋体会引发复杂的炎性细胞免疫应答,其中巨噬细胞发挥重要作用,活化的 NK 细胞可显著升高至正常人的 5 倍,通过分泌 IFN- γ 参与活化皮肤中的巨噬细胞^[27]。

综上所述,本研究虽然样本量较小且未对妊娠结局及胎传梅毒的发生率进行跟踪随访,但仍可说明妊娠梅毒患者存在免疫功能受损及免疫失衡现象,对梅毒免疫学机制的认识及免疫疗法的探索实践还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国疾病预防控制中心性病控制中心,中华医学会皮肤性病学会性病学组,中国医师协会皮肤科医师分会性病亚专业委员会.梅毒、淋病、生殖器疱疹、生殖道沙眼衣原体感染诊疗指南(2014)[J].中华皮肤科杂志,2014,47(5):365
- [2] 吴志华.现代皮肤性病学[M].广州:广东人民出版社,1999:350
- [3] 朴珉贞,郑占才,王家璧.妊娠梅毒的抗梅治疗及转归[J].中国性科学,2009,18(12):7
- [4] Albright C M, Emerson J B, Werner E F, et al. Third-trimester prenatal syphilis screening: A cost-effectiveness analysis[J]. Obstet Gynecol, 2015, 126(3):479
- [5] 樊尚荣.妊娠合并梅毒治疗方案的选择和评价[J].中国全科医学, 2006, 4:276
- [6] Gomez G B, Kamb M L, Newman L M, et al. Untreated maternal syphilis and adverse outcomes of pregnancy: a systematic review and meta-analysis[J]. Bull World Health Org, 2013, 91:217
- [7] 任旭琦,杨立刚,陈永锋,等.2005 至 2010 年广东省育龄妇女人群二期梅毒及隐性梅毒流行趋势[J].中国感染控制杂志, 2012, 11(3):174
- [8] 陈静辉.妊娠梅毒的防治与不良妊娠结局的关系探讨[J].实用预防医学, 2010, 17(9):1815
- [9] Qin J, Yang T, Wang H, et al. Potential predictors for serofast state after treatment among HIV-Negative persons with syphilis in china: a systematic review and meta-Analysis[J]. Iran J Public Health, 2015, 44(2):155
- [10] Pastuszcak M, Jakiela B, Jaworek A K, et al. Association of Interleukin-10 promoter polymorphisms with neurosyphilis[J]. Hum

- Immunol, 2015, 76(7): 469
- [11] 吴满平, 杨毅. 隐性梅毒患者外周血 T 淋巴细胞亚群对苋星青霉素 G 驱梅疗效的影响[J]. 中国性科学, 2018, 27(4):133
- [12] 凌昕, 刘润秋, 施辛, 等. 梅毒血清固定与神经梅毒患者淋巴细胞亚群的检测[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(5):418
- [13] 李维. 梅毒血清固定机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(3):82
- [14] Sundin M, Le B K, Ringdén O, et al. The role of HLA mismatch, splenectomy and recipient Epstein-Barr virus seronegativity as risk factors in post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Haematologica, 2006, 91(8): 1059
- [15] 梁泉服, 朱秀兰, 彭健华. 未治与血清固定梅毒患者外周血淋巴细胞亚群检测结果对比[J]. 吉林医学, 2016, 37(10):2422
- [16] Salazar J C, Hazlett K R, Radolf J D. The immune response to infection with treponema pallidum, the stealth pathogen[J]. Microbes Infect, 2002, 4(11): 1133
- [17] He W Q, Wang H L, Zhong D Q, et al. Treponemal antibody in CSF and cellular immunity in peripheral blood of syphilitic patients with persisting positive rapid plasma regain[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):5775
- [18] Saetlele M R, Loskutov A, Sigley M J, et al. Biopsy-proven case of childhood primary angitis of the central nervous system presenting with bilateral panuveitis. genous retinal detachment in patients with acute syphilitic panuveitis[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2016, 24(1):69
- [19] 邹爱玲, 石炯, 付曼妮, 等. 头孢曲松联合糖皮质激素治疗晚期梅毒血清固定的临床疗效研究[J]. 中国性科学, 2017, 26(10):75
- [20] 贺迎霞, 张庆田, 王冬梅, 等. 胸腺五肽联合苋星青霉素对早期梅毒血清固定患者外周血 T 淋巴细胞亚群及血清 TRUST 转阴率的影响[J]. 中国性科学, 2018, 27(11):115
- [21] 梁平, 徐小珂, 薛强东, 等. 早期潜伏梅毒和晚期梅毒外周血淋巴细胞亚群检测[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(4):307
- [22] 梁平, 陈宏, 何晓丹, 等. 流式细胞术检测二期梅毒患者外周血淋巴细胞亚群[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(2):163
- [23] 张君, 黄涛, 郑和平, 等. B 细胞与梅毒免疫的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(7):813
- [24] Figueiredo A S, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy[J]. Immunology, 2016, 148(1):13
- [25] 易江华, 翁智胜, 李晓辉, 等. 育龄期隐性梅毒血清固定患者的细胞免疫功能[J]. 广东医学, 2016, 37(22):51
- [26] 颜霞, 肖雪莲. 体液免疫和细胞免疫功能检测对梅毒患者的诊断意义[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(9):1222
- [27] 高第筱, 周平玉. 梅毒固有免疫研究进展[J]. 中华皮肤科杂志, 2015(5):362
- (2019-05-15 收稿)

(上接第 60 页)

- [26] Acanfora D, Gheorghiade M, Trojano L, et al. Relative lymphocyte count: A prognostic indicator of mortality in elderly patients with congestive heart failure[J]. Am Heart J, 2001, 142(1):167
- [27] 袁迎第, 孙军, 李鹏飞, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值及血小板与淋巴细胞比值对于川崎病 IVIG 敏感性的预测价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(4):410
- [28] 蔡金秀. 川崎病患者外周血血小板/淋巴细胞比值、中性粒细胞/淋巴细胞比值变化及临床意义[D]. 重庆医科大学儿科学(内科学), 2016
- [29] 仇慧仙, 施红英, 何跃娥, 等. 川崎病延迟治疗冠状动脉损害相关危险因素分析[J]. 温州医科大学学报, 2018, 48(2):96
- [30] 范江花, 段蔚, 罗海燕, 等. 血浆 N 端脑利钠肽前体和降钙素原对早期川崎病冠状动脉损害的预测价值[J]. 儿科药理学杂志, 2018, 24(9):1
- [31] 廖先华, 许玉霞, 王建军. 川崎病患者血钾和血钠水平的变化及意义[J]. 西部医学, 2010, 22(9):1652
- [32] 卢慧玲, 刘亚萍, 胡秀芬. N 端脑利钠肽前体在早期预测川崎病冠状动脉病变中的意义[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(4):300
- [33] Burns J C. Frequently asked questions regarding treatment of Kawasaki disease[J]. Glob Cardiol Sci Pract, 2017, 2017(3):e201730
- [34] 乔玉. 不同剂量阿司匹林在川崎病急性期治疗疗效的 Meta 分析[D]. 济南:山东大学, 2014
- [35] Marchesi A, De Jacobis I T, Rigante D, et al. Kawasaki disease: guidelines of Italian Society of Pediatrics, part II-treatment of resistant forms and cardiovascular complications, follow-up, lifestyle and prevention of cardiovascular risks[J]. Ital J Pediatr, 2018, 44(1):103
- [36] 盛丹丽. 糖皮质激素治疗 KD 冠脉损害的 Meta 分析及冠脉损伤危险因素分析[D]. 济南:山东大学, 2015
- [37] 赵冬梅, 尹千里, 季雪红, 等. 肾上腺糖皮质激素联合乌司他丁治疗儿童川崎病的非随机对照临床研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(8):780
- [38] 胡景伟, 周忠蜀, 杨凌, 等. 糖皮质激素联合静脉免疫球蛋白治疗川崎病有效性和安全性的荟萃分析[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(18):1259
- (2019-03-28 收稿)