

习惯性流产的病毒病因探讨

习惯性流产(habitual abortion, HA)是孕期妇女的一种常见疾病,发生率约占妊娠总数的1%~2%,其病因尚不明了。目前认为遗传、解剖、感染、营养不良、免疫及情感因素均与其发生有关。Axelesson等在研究柯萨奇B组病毒(Coxsackie B Virus, CBV)与流产的关系中发现,习惯性流产妇女血液中存在该病毒的特异性IgM抗体,并高于对照组人工流产妇女[1]。为进一步证明CBV与习惯性流产关系,我们从病毒抗体、病毒核酸检测及胎盘组织中直接分离病毒等不同侧面研究了CBV与习惯性流产的关系,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

86例自然流产妇女选自武汉大学人民医院、武汉大学中南医院,年龄20~35岁,妊娠时间为6~14周,无任何其他病史,同时以40例人工流产妇女作对照,妊娠时间为6~12周内。

1.2 标本收集

所有研究对象均取静脉抗凝血3 ml,常规分离血浆与淋巴细胞,用于抗体与核酸检测,取胎盘组织用于核酸检测和分离病毒。

1.3 主要试剂

Ficollite Lympholl 为美国Atlanta生物公司产品,HRP抗人IgM μ 链结合物为Sigma公司产品,AMV逆转录酶为Promega公司产品。

1.4 病毒核酸检测

病毒核酸提取参考文献[2],引物序列参考文献[3],选自CBV基因组5'端非编码区(5' NC)由上海细胞生物所合成,定位于CBV3基因组180至479位核苷酸处,引物序列为P1 5'-CCCCGGAGGAGTATCA ATA-3', P2 5'-GCAGTTAGGATTAGUGCAT-3',扩增片段为300 bp,反转录和PCR反应步骤在1.5 ml的离心管中加入DEPC水、10 \times 缓冲液(RT)、引物2和RNA模板,93 $^{\circ}$ C 3 min,冰浴2 min,再加入10 \times Buffer、RNasin、AMV逆转录酶,43 $^{\circ}$ C水浴90 min后进行PCR扩增。反应系统包括10 \times dNTP、引物1、引物2、PCR缓冲液、Taq DNA聚合酶、无菌纯水。反应参数为94 $^{\circ}$ C 1 min、53 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1.5 min,循环35次,最后72 $^{\circ}$ C延伸8 min。产物用2%琼脂糖凝胶电泳,参照DNA相对分子质量,在300 bp处出现特异性扩增核酸带为阳性。

1.5 CBV抗体检测

采用改良间接ELISA法即包被纯化的CBV1-6型混合抗原于聚乙烯板内,4 $^{\circ}$ C过夜,洗涤后,加入稀释的待检血浆,37 $^{\circ}$ C反应1 h后,洗涤,加入羊抗人IgM μ 链HRP结合物,37 $^{\circ}$ C反应45 min,洗涤后加入底物TMB显色,用酶标仪450 nm测其D(λ)值,以阳性标本与阴性标本的比值(P/N) \geq 2.1为阳性,否则为阴性。

1.6 病毒分离与鉴定

取患者胎盘组织1 g,研细,加入含800 μ /ml的青链霉素的PBS 1 ml 4 $^{\circ}$ C过夜,取上清接种细胞(24孔培养板)0.2 ml/孔,每份标本接种两孔,37 $^{\circ}$ C吸附1 h,加入含2%胎牛血清的MEM培养基,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养,每日观察病变,如出现CBV特征性病变为病毒分离阳性,如无病变7 d后盲传1次,连续3代,仍无病变,为病毒分离阴性。病毒分离阳性标本再用RT-PCR和血清学方法鉴定结果。

1.7 统计学处理

采用 χ^2 检验进行各类指标的统计显著性检测,以检验其判别是否具有统计学意义。

2 结果

2.1 习惯性流产妇女血浆中柯萨奇B组病毒IgM抗体检测

对86例习惯性流产妇女和40例人工流产妇女血浆柯萨奇B组病毒IgM抗体的检测结果见表1。从表1可知，习惯性流产妇女IgM抗体阳性率及抗体水平高于人工流产组， χ^2 值为35.88， $P < 0.01$ ，差异有显著意义。

表1 习惯性流产妇女血浆柯萨奇B组病毒IgM抗体检出情况

Tab.1 Detection of Coxsackie B virus IgM antibody in the two groups

Group	Case	IgM antibody			χ^2	P
		Positive case	Positivity rate (%)	1/antibody titer		
Habitual abortion	86	75	87.2	598.1	35.88	<0.01
Induced Abortion	40	14	35.0	129.5		

2.2 习惯性流产妇女淋巴细胞和胎盘组织中病毒核酸检测

86例习惯性流产患者和40例人工流产妇女淋巴细胞和胎盘组织中CBV RNA检测结果见表2、图1、2。从表2可知，习惯性流产妇女淋巴细胞和胎盘组织病毒RNA检出率均高于人工流产组。两组比较 χ^2 值分别为14.51和19.20，且 $P < 0.01$ ，差异均有显著性。

表2 习惯性流产妇女淋巴细胞及胎盘组织中柯萨奇B组核酸检测

Tab.2 Coxsackie B virus RNA detection in the two groups

Group	Case	Lymphocytes			χ^2	P	Placenta tissue			χ^2	P
		Positive case	Positivity rate (%)				Positive case	Positivity rate (%)			
Habitual abortion	86	46	53.5	14.51	<0.017	51	59.3	19.20	<0.01		
Induced abortion	40	7	17.5			7	17.5				

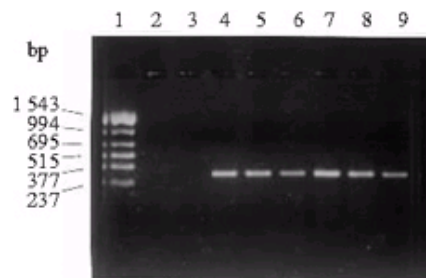


图1 淋巴细胞中柯萨奇B组病毒RNA

Fig.1 Coxsackie B virus RNA in blood lymphocyte

Lane 1: DNA molecular weight marker; Lane 2: Negative template control; Lane 3: RT-PCR negative control; Lanes 4-9: Blood lymphocytes

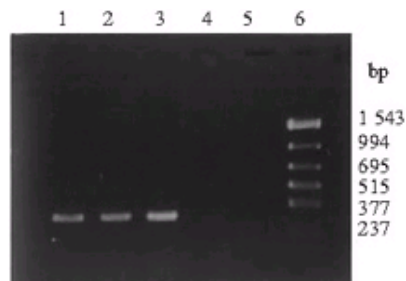


图2 胎盘组织中柯萨奇B组病毒RNA

Fig.2 Coxsackie B virus RNA in placenta tissue

Lanes 1-3: Placenta tissue; Lane 4: Negative template control; Lane 5: RT-PCR negative control; Lane 6: DNA molecular weight marker

2.3 习惯性流产妇女胎盘组织中病毒分离

对62例习惯性流产妇女胎盘和29例人工流产妇女胎盘组织进行了病毒分离，其病毒检出率分别为41.9%和6.9%， χ^2 值为11.39， $P < 0.01$ 。从图3、4可以看出，所分离的病毒大小约30 nm、无包膜，病毒感染细胞核变性、胞浆空泡化。病毒分离阳性标本再经RT-PCR检查确认也为阳性。此外，取所分离的病毒与患者血浆再进行ELISA反应，亦为阳性。

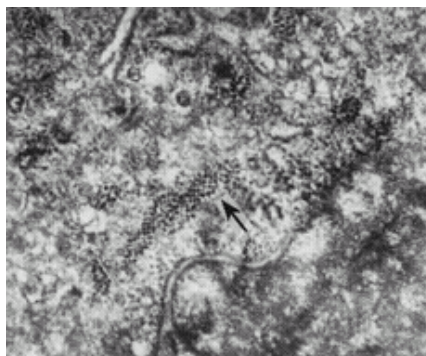


图3 胎盘组织中病毒分离(箭头所示为病毒颗粒)

Fig.3 Viral separation (the arrow indicates the viral particles) from the placenta tissue (Original magnification: $\times 200$)

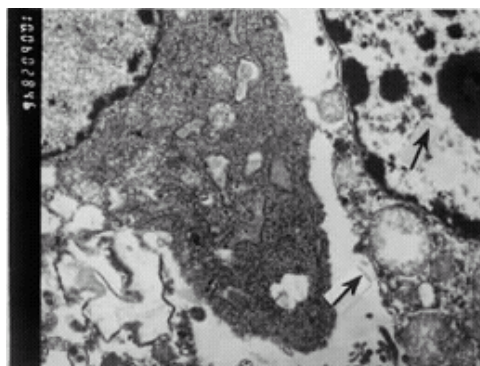


图4 病毒感染细胞超微结构(箭头所示为核变性,胞浆空泡化)

Fig.4 Ultrastructure of the virus-infected cells presenting cell nuclear degeneration and vacuolization in the cytoplasm (arrows) (Original magnification: $\times 200$)

3 讨论

柯萨奇B组病毒(CBV)属小RNA病毒科肠道病毒成员，它所引起的心肌炎、扩张性心肌病是青少年的重要死因之一[4]。1993年，Axelesson等通过比较自然流产与人工流产妇女血清中CBV抗体水平，提出了CBV与流产发生有关的观点，但抗体检测仅仅是一个反映感染的间接指标，不能替代直接的病原学检查。为此，我们从不同的角度研究了柯萨奇B组病毒与习惯性流产的关系。IgM抗体是反映病毒感染的早期特异性指标，一旦阳性，即可确认。通过实验我们发现习惯性流产妇女CBVIgM抗体阳性率和抗体水平均高于人工流产妇女(表1)，这说明CBV感染与自然流产的发生有关，可能是习惯性流产发生因素之一，也证实了Axelesson等的报道。

要证明某一疾病在病原病因关系，首先必须从患者体内分离出病原体。Karia等指出CBV进入血液后，首先在淋巴细胞内增殖，然后到达实质器官[5]。我们通过PCR技术的研究进一步发现自然流产妇女血淋巴细胞及胎盘组织中均有CBV核酸存在，并可分离出病毒(结果2、3)，这两种直接的病原学证据再一次证实了CBV与自然流产的因果关系，目前

国内外尚未见此报道。

我们的对比研究发现人工流产妇女血浆也有IgM抗体产生，并且在淋巴细胞和胎盘组织亦可检出CBV核酸，分离出病毒，这是因为正常成人亦有很高的CBV感染率[6]，如果发生在孕期，则可引起胚胎损害，导致流产。

参考文献:

[1]Axelsson C, Bondestan K, Frisk G, et al. Coxsackie B virus infection in women with misearriage[J]. J Med Virol, 1993, 39: 282-5.

[2]宋婕萍, 刘建军, 杨占秋, 等. RT-PCR检测柯萨奇B组病毒方法的建立[J]. 湖北医科大学学报, 1998, 19(4): 291-3.

[3]Severine GM, Mestroni L, Falaschi A, et al. Nested polymerase chain reaction for high sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31: 1345.

[4]Marino TA. Viral infection and pathogenesis of dilated cardiomyopathy[J]. Circulation Res, 1994, 74(2): 182-8.

[5]Karin K, Sibylle S, Martina S, et al. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis virus dissemination and immune cell targets[J]. J Virol, 1996, 70(12): 8888-95.

[6]赵利淦, 张美英. 柯萨奇B1、B3、B4病毒在人群中感染及形态发生学研究[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 1993, 13(1): 6-8.

Zhao LG, Zhang MY. Study on seroepidemiology and morphogenesis of Coxsackievirus B1, B3 and B4[J]. Chin J Microbiol Immunol, 1993, 13(1): 6-8.

[回结果列表](#)