

CD81 和 LDLR 在不同妊娠时期绒毛组织中的定位与表达

聂青和

(第四军医大学唐都医院, 陕西 西安 710038)

[摘要] **目的** 检测 CD81、低密度脂蛋白受体(LDLR)在人胎盘绒毛组织滋养层细胞中 mRNA 表达水平,了解一些可能参与丙型肝炎病毒(HCV)入胞的宿主因子表达。**方法** 通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CD81、LDLR 在人胎盘绒毛组织滋养层细胞中 mRNA 表达水平,并采用免疫荧光方法检测 CD81、LDLR 在不同孕早期胎盘绒毛组织的表达。**结果** 发现不同孕早期胎盘绒毛组织的 CD81、LDLR 表达量随孕早期呈递增趋势。采用免疫荧光方法证实了 CD81、LDLR 在不同孕早期胎盘绒毛组织的表达。**结论** 胎盘绒毛组织滋养层细胞中可以定位并表达 HCV 入胞的宿主相关因子 CD81、LDLR。为进一步研究 CLEC4M 传播 HCV 的分子机制奠定了实验基础。

[关键词] 滋养层细胞, 人体; 肝炎病毒, 丙型; CD81; 低密度脂蛋白受体; 绒毛组织; 母婴传播

[中图分类号] R512.6⁺3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)04-0241-07

Localization and expression of CD81 and LDLR in placental villi during different stages of pregnancy

NIE Qing-he (*Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China*)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of CD81 and low density lipoprotein receptor (LDLR) mRNA in cultured human trophoblast cells from different placental villi, and to explore HCV entry mechanisms. **Methods** CD81 and LDLR mRNA expression in trophoblast cells from human placental villi was detected by RT-PCR, and expression of CD81 and LDLR was also detected during different pregnancy stages by immunofluorescence method. **Results** CD 81 and LDLR were found in different placental villi and their expression has shown an increasing trend during different stages of gestation by immunofluorescence. **Conclusion** The localization and expressions of HCV entry-related receptor CD 81 and LDLR are found in cultured human trophoblast cells, which lay the foundation for further exploring the molecular mechanism of HCV infection transmission by CLEC4M.

[Key words] human trophoblastic cells; hepatitis C virus; CD81; low density lipoprotein receptor; villi; mother-to-child transmission

[Chin Infect Control, 2012, 11(4): 241-246, 265]

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是 1989 年由美国学者 Choo 等首次从受感染的黑猩猩血液标本中分离。HCV 感染呈全球性流行, 根据世界卫生组织的统计, HCV 在人群中的感染率约为 3%, 全球约有 1.8 亿人感染 HCV, 每年新发丙型肝炎病例约 3 万~4 万例^[1]。我国进行的全国 HCV 血清流行病学调查显示, 我国一般人群抗 HCV 阳性率为 3.2%, 约有 4 000 万人感染

HCV^[2]。HCV 母婴传播发生率大约为 10%, 目前尚无有效的方法阻断 HCV 的母婴传播, 因此 HCV 的母婴传播将可能成为未来 HCV 感染的主要途径之一。早期人们通过一些替代模型鉴定出一些可能参与 HCV 入胞的宿主因子, 如 GAG、低密度脂蛋白受体 (LDLR)、CD81 分子 (CD81)、SR-B1 等, 并在一定程度上分析了 HCV 包膜糖蛋白在入胞过程中的作用^[3-4]。近年来, HCV 体外培养系统的建立

[收稿日期] 2012-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81170390, 30771891)

[作者简介] 聂青和 (1961-), 男 (汉族), 江西省进贤县人, 教授、主任医师, 博士生导师, 主要从事传染病学研究。

[通讯作者] 聂青和 E-mail: nieqinghe@hotmail.com

为其相关研究提供了强有力的工具,一些参与 HCV 感染过程的宿主分子及其与 HCV 蛋白之间相互作用的研究成果接踵而来,但事实上 HCV 的入胞过程可能比目前体外实验所了解的情况要复杂得多,如有些同时表达了 CD81、SR-B1 和 Claudin-1 的人源性肝细胞仍不支持 HCV 的入侵^[5],表明可能还有一种或多种介导 HCV 入胞的因子未被发现。此外,已知的受体及入胞相关分子的具体作用机制也有待进一步研究。HCV 基因组在肝脏细胞、造血肝细胞包括树突状细胞和 B 细胞中的复制,在体内和体外实验均已被证实,然而,病毒靶向与这些部位的复制,特别是肝脏的分子机制并不清楚^[6];也不清楚 HCV 母婴传播的具体机制和传播时机。本研究通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CD81、LDLR 在胎盘绒毛组织滋养层细胞中 mRNA 表达水平,并采用免疫荧光方法证实 CD81、LDLR 在不同孕期胎盘绒毛组织的表达,为探讨 HCV 母婴传播的可能机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基、胰蛋白酶、PBS、FBS,购自 Gibco 公司;Trizol 试剂,购自 Invitrogen 公司;RevertAid™第 1 链 cDNA 合成试剂盒,购自 Fermentas 公司;DNA marker DL 2000,购自 Takara 公司;兔抗人 LDLR 抗体(ab52818)购自 Abcom 公司,鼠抗人 TAPA1(CD81, ab35026)抗体购自 Abcom 公司,FITC 标记羊抗鼠 IgG 二抗、FITC 标

记羊抗兔 IgG 二抗为北京博奥森生物技术公司产品。

1.2 液体配制 参考既往实验^[7]。

1.3 标本制作 胎盘绒毛组织切片参考既往实验^[8]。

1.4 PCR 引物的设计与合成 参照 CD81 核苷酸序列(Genbank 注册号为 NM_004356),LDLR 核苷酸序列(Genbank 注册号为 NM_000527)设计如下引物(表 1)。引物由北京博迈德科技公司合成。

1.5 总 RNA 提取 (1)将新鲜分离、纯化的滋养层细胞培养于高糖 DMEM 培养基(10%FBS),适当调整细胞密度接种 25 cm² 培养瓶。37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养。每 2~3 天换液一次,细胞达到融合时,用 0.25%胰酶 + 0.02% EDTA 在 37℃ 消化 5 min,按 1:3 传代。PBS 洗细胞 1 次,将细胞移入 1.5 mL EP 管中。加入 Trizol 1 mL,室温作用 5 min。(2)加入 200 μL 三氯甲烷,剧烈振荡 15 s,室温作用 2~3 min。4℃,12 000 r/min 离心 15 min。将上层水相吸出,移至新的 DEPC 处理的 EP 管中。(3)加入等量异丙醇混匀,室温静置 10 min。4℃,12 000 r/min 离心 10 min。弃上清,75%乙醇洗涤沉淀。4℃,8 000 r/min 离心 5 min。弃上清,室温干燥 10 min。(4)30 μL DEPC 水溶解沉淀,紫外分光光度计测定浓度后,冻存于 -80℃ 待用。(5)组织 RNA 提取:分别取早孕绒毛及孕中、晚期胎盘组织约 100 mg,加入 2 mL Trizol,匀浆器充分匀浆;按以上操作步骤提取总 RNA。

表 1 PCR 引物的设计

Table 1 PCR primers

	Size(bp)	Sequence
CD81	729	Sense primer: 5'- ATAGATCCATGGGAGTGGAGGGCTGCAC-3'
		Antisense primer: 5'- TGGTCTAGATCAGTACACGGAGCTGTTCCGG-3'
LDLR	468	Sense primer: 5'-GAAGACTCATGCAGCAGGAACG-3'
		Antisense primer: 5'-CTCATCGGAGCCGTCAACACAG-3'
GAPDH	235	Sense primer: 5'-GGGGACCCAAAAGGGTCATCATCT-3'
		Antisense primer: 5'-GAGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'

1.6 RevertAid 反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链

(1)总 RNA 11 μL、随机引物 1 μL 在冰上混匀,离心 3~5 s,70℃ 孵育 5 min。(2)移至冰上,依次加入反应 Buffer 4 μL、RiboLock 核糖核酸酶抑制剂 1 μL、10 mmol/L dNTP 混合物 2 μL,轻轻混匀,25℃ 孵育 5 min。(3)加入 RevertAid 反转录酶 1 μL,反应总体积为 20 μL。(4)25℃、10 min,

42℃、60 min 合成 cDNA,70℃、10 min 终止反应,冰浴冷却,-20℃ 保存。

1.7 PCR 扩增

1.7.1 CD81 基因 以 cDNA 为模板扩增 CD81 基因,PCR 反应体系:ddH₂O 30 μL、5× Buffer 10 μL、dNTP 4 μL、上游引物及下游引物各 1 μL、cDNA 3 μL、Taq DNA 聚合酶 1 μL(合计 50 μL)。PCR

扩增条件:95℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,64℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃ 10 min 使反应完全,4℃冷却。

1.7.2 LDLR 基因 以 cDNA 为模板扩增 LDLR 基因,PCR 反应体系如下:ddH₂O 30 μL、5× Buffer 10 μL、dNTP 4 μL、上游引物及下游引物各 1 μL、cDNA 3 μL、Taq DNA 聚合酶 1 μL(合计 50 μL)。PCR 扩增条件:95℃预变性 3 min;94℃变性 60 s,55℃退火 60 s,72℃延伸 60 s,共 30 个循环;72℃ 10 min 使反应完全,4℃冷却。

1.7.3 PCR 产物电泳鉴定 取 PCR 扩增产物 10 μL,加缓冲液(6× loading buffer)2 μL 混匀,加样于凝胶孔中,电泳 30 min,凝胶扫描成像系统记录电泳结果。用 Quantity One 软件对 RT-PCR 产物的电泳条带进行分析,结果用各样本受体与各自 GAPDH 电泳条带的吸光度面积之比值表示。

1.8 间接免疫荧光染色 (1)4%多聚甲醛灌注固定,取材切片,贴片;(2)切片室温静置 1 h;(3)切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水;(4)灭活内源性过氧化物酶;(5)抗原修复;(6)1%BSA 封闭液 37℃温育 30 min,倾去,勿洗;(7)滴加稀释后一抗,4℃过夜;(8)滴加荧光 FITC 标记二抗,37℃温育 30 min;(9)缓冲甘油封片,荧光显微镜观察并照相,阳性结果为黄绿色荧光;(10)阴性对照实验用 PBS 代替一抗。

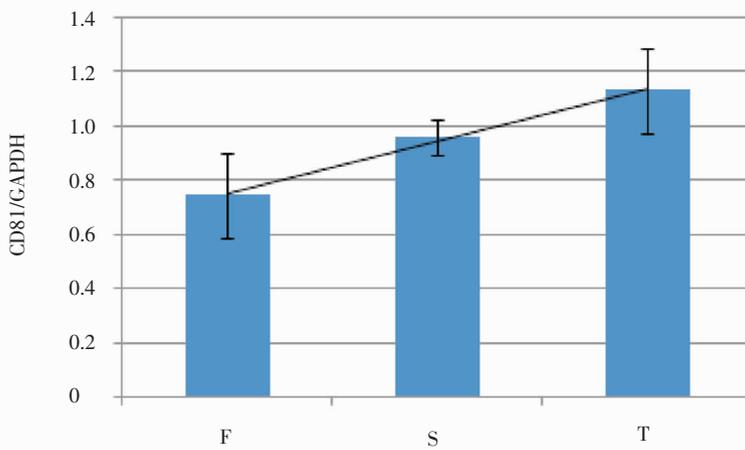
1.9 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用

SPSS 16.0 统计软件,以完全随机设计方差分析和 LSD 法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 早、中、晚孕期胎盘及早孕滋养细胞表达 CD81 和 LDLR mRNA 半定量 RT-PCR 结果显示,早、中、晚孕期胎盘组织均表达 CD81 和 LDLR。5 个绒毛组织 CD81 mRNA 相对表达量,早孕期分别为 0.975、0.805、0.561、0.663、0.708;中孕期分别为 1.017、1.013、0.936、0.856、0.971;晚孕期分别为 1.003、1.357、1.172、0.969、1.132。不同孕期样本 CD81 的表达量不完全一致($F = 10.535, P = 0.002$),同孕期样本表达量基本一致(见图 1; $F =$ 早孕期, $S =$ 中孕期, $T =$ 晚孕期; $P_{FS} = 0.024, P_{ST} = 0.01, P_{FT} = 0.068$)。

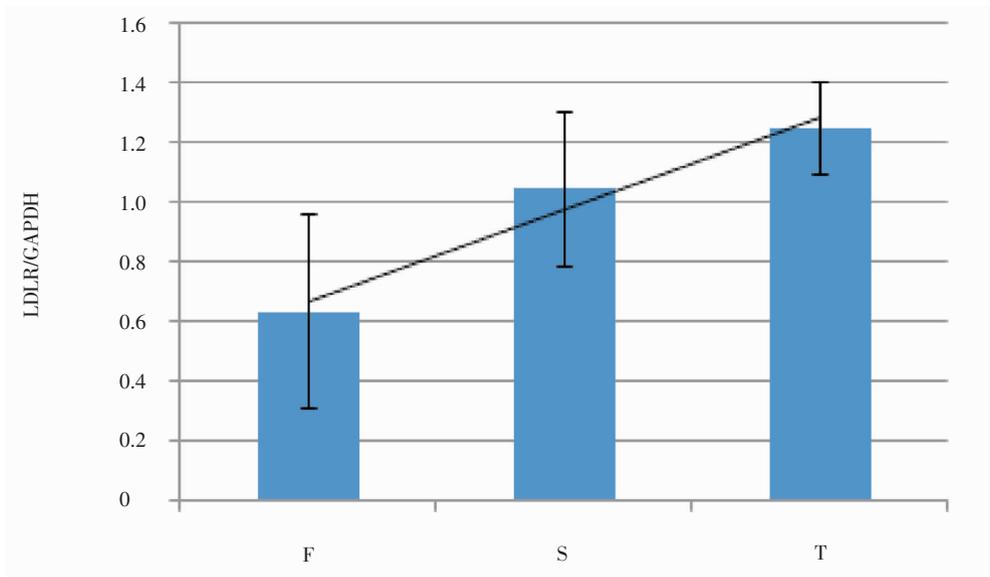
5 个绒毛组织 LDLR mRNA 的相对表达量,早孕期分别为 0.241、0.396、1.013、0.635、0.898;中孕期分别为 1.207、1.117、0.686、0.907、1.342;晚孕期分别为 1.376、1.353、1.293、1.252、0.984。不同孕期样本 LDLR 的表达量不完全一致($F = 7.467, P = 0.008$),同孕期样本 LDLR 的表达量存在较明显的个体差异性(见图 2; $F =$ 早孕期, $S =$ 中孕期, $T =$ 晚孕期; $P_{FS} = 0.025, P_{ST} = 0.003, P_{FT} = 0.242$)。



F: Placental villi of the first trimester of pregnancy; S: Placental villi of the second trimester of pregnancy; T: Placental villi of the third trimester of pregnancy

图 1 不同孕期胎盘 CD81 mRNA 的表达

Figure 1 Expression of CD81 mRNA in placental tissue of different pregnant stages



F: Placental villi of the first trimester of pregnancy; S: Placental villi of the second trimester of pregnancy; T: Placental villi of the third trimester of pregnancy

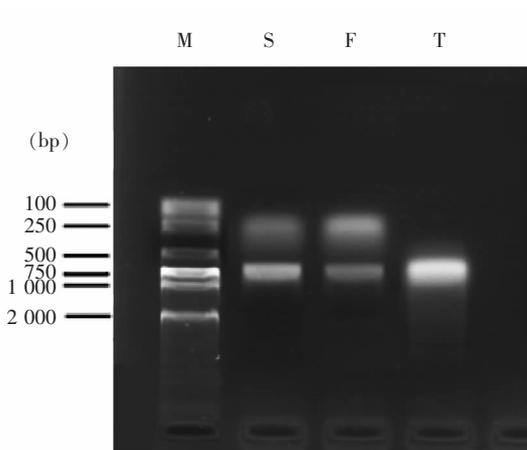
图 2 不同孕期胎盘 LDLR mRNA 的表达

Figure 2 Expression of LDLR mRNA in placental tissue of different pregnant stages

不同孕期胎盘 CD81 及 LDLR 的表达见图 3~4。

新鲜分离、Percoll 纯化的早孕期滋养细胞表达 CD81 mRNA 和 LDLR mRNA。3 次实验中,LD-

LR mRNA 的相对表达量分别为 0.776、0.497、0.294;CD81 mRNA 的相对表达量分别为 0.827、0.879、1.006。见图 5。



M:Marker DL 2000;F: Placental villi of the first trimester of pregnancy; S: Placental villi of the second trimester of pregnancy; T: Placental villi of the third trimester of pregnancy

图 3 不同孕期胎盘组织 CD81 表达

Figure 3 Expression of CD81 in placental tissue of different pregnant stages

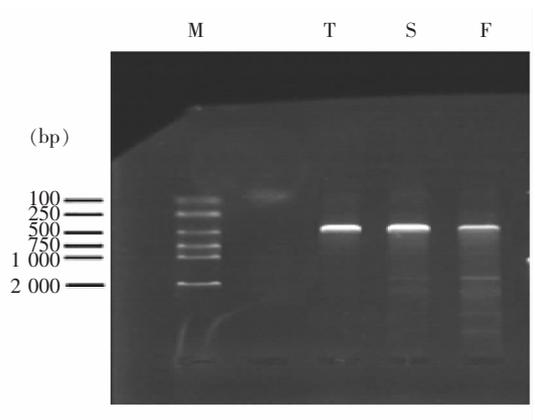
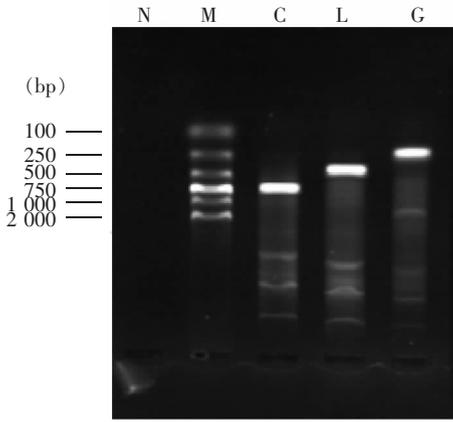


图 4 不同孕期胎盘组织 LDLR 表达

Figure 4 Expression of LDLR in placental tissue of different pregnant stages



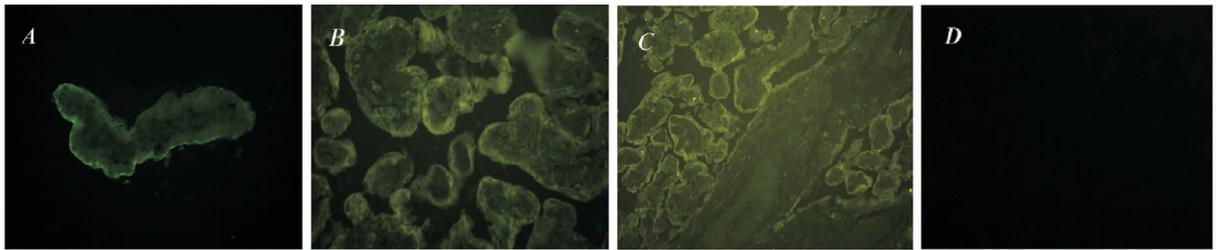
M: Marker DL 2000; C: CD81; L: LDLR; G: GAPDH; N: Negative control

图 5 早孕滋养层细胞 CD81、LDLR 表达

Figure 5 Expression of CD81 and LDLR in early pregnancy trophoblast cells

2.2 CD81 在胎盘绒毛组织的表达与定位 免疫荧光染色检测的阳性信号为显色后的绿色荧光颗粒。妊娠第一、二、三期绒毛外层细胞滋养层细胞及合体滋养层细胞的 CD81 染色阳性, 阴性对照标本中未见阳性信号。见图 6。

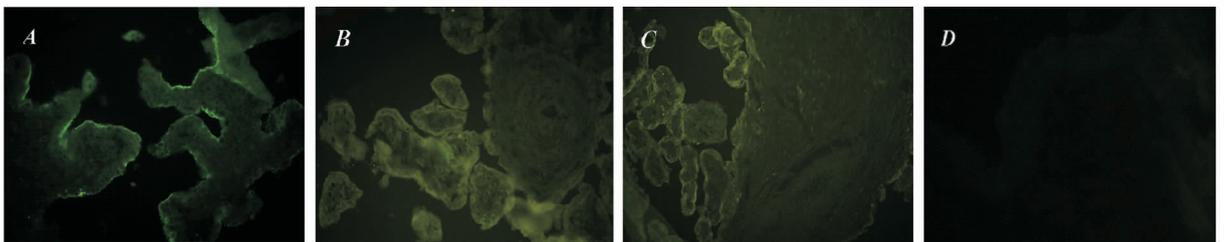
2.3 LDLR 在胎盘绒毛组织的表达与定位 免疫荧光染色检测的阳性信号为显色后的绿色荧光颗粒。妊娠第一、二、三期绒毛外层细胞滋养层细胞及合体滋养层细胞的 LDLR 染色阳性, 阴性对照标本中未见阳性信号。见图 7。



A, B, C: The first, second and third trimester of pregnancy respectively; D: Negative control

图 6 CD81 在胎盘绒毛组织的表达与定位

Figure 6 Expression and localization of CD81 in placental villous tissue



A, B, C: The first, second and third trimester of pregnancy respectively; D: Negative control

图 7 LDLR 在胎盘绒毛组织的表达与定位

Figure 7 Expression and localization of LDLR in placental villous tissue

3 讨论

HCV 的母婴传播途径还不十分明确, 可能发生在宫内、产时和产后。宫内垂直传播是主要途径, 也是研究的热点, 其传播可发生于早、中、晚各孕期^[9]。目前有关病毒经子宫传播的途径与机制, 大

致有下述 3 种假说: (1) 病毒或者病毒感染的母体 PBMC 直接通过破裂的滋养层, 使胎盘 Hofbauer 细胞、基质细胞及毛细血管内皮细胞暴露于病毒颗粒^[10]; 母体白细胞可由于持续地低梯度渗漏、迁移并通过破裂的滋养层。(2) 病毒颗粒与母体抗体形成复合物, 之后与胎盘上的受体 FcγR (receptor for the Fc part of IgG) 或 FcRn (neonatal Fc receptor)

结合并进而感染胎盘细胞^[11]。(3)病毒直接侵入合体滋养细胞,即滋养细胞能够被直接感染或者病毒完整地横穿滋养层,并从基底膜侧释放^[12-13]。

为阐释 HCV 宫内垂直传播的分子机制,本实验首先以 RT-PCR 的方法检测了早、中、晚孕期胎盘组织 CD81、LDLR mRNA 的表达情况,结果不同孕期胎盘组织均表达 CD81 和 LDLR mRNA;由于胎盘组织含多种细胞,难以确定究竟是何种细胞在表达,故又进一步检测了新鲜分离、纯化的早孕滋养细胞 CD81、LDLR 的转录水平,结果显示滋养细胞存在其转录。半定量 RT-PCR 结果显示,早、中、晚孕期胎盘组织均表达 CD81 和 LDLR。不同孕期 CD81、LDLR 的表达强度不完全一致,同孕期不同样本间 CD81 的表达强度基本一致,而同孕期不同样本间 LDLR 的表达则存在较明显的个体差异性,这种差异可能是由于样本数量太小的原因造成。尽管如此,图 1 与图 2 整个孕期的 CD81 和 LDLR 表达趋势显示,呈递增趋势。

除明确 CD81、LDLR 在胎盘的表达外,本研究采用间接免疫荧光染色再次证明 CD81、LDLR 在滋养层的表达。并且发现早孕期荧光相对分布较局限,仅分布在外层的滋养层细胞,而中、晚孕期的荧光相对分布较为弥散,可能随着自身的发育,胎盘中的其他细胞如基质细胞、Hofbauer 细胞都转录了 CD81、LDLR mRNA。宫内传播多发生于晚孕期,尤其是临近分娩时。我们的研究表明,怀孕后期垂直传播概率的增加原因,除了晚孕期滋养层没有早孕期致密,致使子宫收缩使滋养层易出现断裂而发生感染的解剖学机制外,还有 HCV 受体增加的分子学机制。

目前有关病毒宫内传播的机制很不明了,基于本研究的发现,并结合目前已有的关于其他病毒(如 HIV-1)母婴传播的研究成果,可提出以下观点:(1)游离的 HCV 一般不能直接感染滋养层细胞;游离的病毒需通过滋养层裂隙发生复制并进而感染毛细血管内的胎儿细胞^[14]。(2)早孕期滋养层致密,此期较少发生 HCV 宫内传播;晚孕期子宫收缩使滋养层易出现断裂,同时胎盘绒毛组织的 HCV 入胞相关受体 CD81、LDLR 表达的量也随着孕期呈递增趋势,故宫内传播多发生于晚孕期,尤其是临近分娩时。(3)HCV 入胞相关受体在胎盘除滋养层细胞外的其他细胞(Hofbauer 细胞、毛细血管内皮细胞和/或基质细胞)也可能有表达;HCV 母婴传播 10%的传播率提示滋养层细胞作为胎盘屏障的主要

细胞可能只是机体防御 HCV 垂直传播的第一道防线,而在基质中游离的 Hofbauer 细胞可能对控制 HCV 感染胎儿细胞起关键作用。(4)研究证实,胎盘绒毛组织的 HCV 入胞相关受体 CD81、LDLR 表达的量随着孕期呈递增趋势,因此胎儿对母体血中 HCV 的易感性也随之增加;可通过外源性给予 CD81、LDLR 的衍生物或配体拮抗 HCV 与受体结合,因此在晚孕期通过阻断 HCV 感染而控制母婴传播在理论上是可行的^[9,15]。上述实验结果为进一步完成国家自然科学基金资助项目 CLEC4M 传播 HCV 的分子机制及其诱导病毒逃逸免疫应答研究奠定了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Kwo P Y, Vinayek R. The therapeutic approaches for hepatitis C virus: protease inhibitors and polymerase inhibitors[J]. Gut Liver, 2011, 5(4): 406 - 417.
- [2] 聂青和. 加强病毒性肝炎的基础与临床研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2007, 16(1): 95 - 99.
- [3] Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions[J]. J Gen Virol, 2006, 87: 1075 - 1084.
- [4] Bergmann J F, De Knecht R J, Janssen H L. What is on the horizon for treatment of chronic hepatitis C? [J]. Minerva Med, 2008, 99(6): 569 - 582.
- [5] Evans M J, von Hahn T, Tscherne D M, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry [J]. Nature, 2007, 446(7137): 801 - 805.
- [6] Soriano V, Peters M G, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(2): 313 - 320.
- [7] 程勇前, 聂青和, 周永兴, 等. 人胎盘滋养层细胞的分离培养及 IgGFcγRⅢ在滋养层细胞的表达[J]. 医学研究生学报, 2002, 15(2): 105 - 111.
- [8] 程勇前, 聂青和, 周永兴, 等. 人滋养层细胞分离培养及 HCV 体外感染试验[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(17): 1544 - 1547.
- [9] 聂青和. 丙型肝炎病毒母婴感染研究及其预防现状(述评)[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(11): 1257 - 1262.
- [10] Papadogiannakis N. Traffic of leukocytes through the maternal-fetal placental interface and its possible consequences[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1997, 222(2): 141 - 157.
- [11] Simpson R M, Hubbard B S, Zhao T M, et al. Experimental perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by passage of infected T cells[J]. J Infect Dis, 1997, 175(6): 1337 - 1343.

Kp。这提示可能有些患者入院时存在 MDROs 定植,通过在 ICU 内治疗及抵抗力下降后转变为感染菌;另一方面,也可能与抗菌药物的大量使用有关,导致非耐药菌转变为 MDROs。因此,在进行 MDROs 感染防控中,除了要关注隔离措施外,还需合理使用抗菌药物和增强患者免疫力等。

本研究提示我们,在 ICU 内开展 MDROs 的监测,对有效控制 MDROs 医院感染至关重要,尤其是预防和控制 MDROs 医院感染的暴发^[3]。另外,还可帮助我们了解该部门以哪种 MDRO 感染为主,如本研究 SICU 内主要为 MDR-Ab 感染,提示我们应更深入研究该细菌耐药机制及其感染危险因素,针对不同 MDROs 感染采取相应控制措施,以取得更好效果。

[参 考 文 献]

- [1] Suchada S, Klaita S S, Nuanchan P, *et al.* Multidrug-resistant hospital-associated infections in a pediatric intensive care unit; a cross-sectional survey in a Thai university hospital[J]. *Int J Infect Dis*, 2009, 13(4):506-512.
- [2] 陈红岩,唐玉分,孙嫣. 重症监护病房耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的预防与控制[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(21):2987-2988.
- [3] Enoch D A, Summers C, Brown N M, *et al.* Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK[J]. *J Hosp Infect*, 2008, 70(2):109-118.
- [4] 徐峰倩. 综合干预措施对控制医院常见多药耐药菌流行的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(21):3279-3280.
- [5] Bearm G M, Marra A R, Seller C N, *et al.* A controlled trial of universal gloving versus contact precautions for preventing the transmission of multidrug-resistant organisms [J]. *Am J Infect Control*, 2007, 35(10):650-655.
- [6] Mahamat A, MacKenzie F M, Brooker K, *et al.* Impact of infection control interventions and antibiotic use on hospital MRSA: a multivariate interrupted time-series analysis [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 30(2): 169-176.
- [7] Clock S A, Cohen B, Behta M, *et al.* Contact precautions for multidrug-resistant organisms: Current recommendations and actual practice [J]. *Am J Infect Control*, 2010, 38(2):105-111.
- [8] Aboelela S W, Saiman L, Stone P, *et al.* Effectiveness of barrier precautions and surveillance cultures to control transmission of multidrug-resistant organisms: A systematic review of the literature [J]. *Am J Infect Control*, 2006, 34(8):484-494.
- [9] Cepeda J A, Whitehouse T, Cooper B, *et al.* Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study[J]. *Lancet*, 2005, 365(9 456): 295-304.
- [10] Evidence-based healthcare management. Single rooms, isolation wards, and nursing cohorts help to control MRSA colonisation and infection in hospitals [J]. *Evidence-Based Healthcare and Public Health*, 2005, 9(2): 117-118.
- [12] Moussa M, Roques P, Fievet N, *et al.* Placental cytokine and chemokine production in HIV-1-infected women; trophoblast cells show a different pattern compared to cells from HIV-negative women[J]. *Clin Exp Immunol*, 2001, 125(3): 455-464.
- [13] Phuapradit W, Panburana P, Jaovisidha A, *et al.* Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1 in mid-trimester gestation[J]. *AIDS*, 1999, 13(14): 1927-1931.
- [14] Kilani R T, Chang L J, Garcia-Lloret M I, *et al.* Placental trophoblasts resist infection by multiple human immunodeficiency virus (HIV) type 1 variants even with cytomegalovirus coinfection but support HIV replication after provirus transfection[J]. *J Virol*, 1997, 71(9): 6359-6372.
- [15] Riley J K. Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance[J]. *Immunol Invest*, 2008, 37(5): 395-426.

(上接第 246 页)