原因不明性复发性流产孕妇外周血 NKT 亚型及血清 IFN-γ、IL-4 表达变化*

陈旭菲，梁逸仙，林春明，蒲育栋，何淑贞
（东莞市第三人民医院 产科，广东 东莞 523326）

［摘 要］**目的**：观察原因不明性复发性流产（URSA）孕妇外周血中自然杀伤 T 细胞（NKT）、γ-干扰素（IFN-γ）及白细胞介素-4（IL-4）表达水平。**方法**：30 例 URSA 孕妇为观察组，选择同期同孕龄无流产史孕妇 30 例作为对照组；两组孕妇于相同孕周（6～14 周）抽取空腹静脉血，采用酶联免疫吸附法检测血清 NKT、IFN-γ 和 IL-4 水平，流式细胞仪分析外周抗凝血中 NKT 亚型 细胞 $CD56^+CD16^-$ 和 $CD56^+CD16^+$ 的百分比。**结果**：观察组孕妇 $CD56^+CD16^-$ 细胞百分比明显低于对照组，而细胞毒性较强的 $CD56^+CD16^+$ 细胞百分比明显高于对照组（$P<0.05$）；观察组孕妇血清 IFN-γ 水平和 Th1/Th2 比值高于对照组，IL-4 水平低于对照组（$P<0.05$）。**结论**：USRA 的发生可能与 $CD56^+CD16^+$ 亚型 NKT 细胞百分比和 Th1/Th2 比值升高有关。

［关键词］流产，习惯性；自然杀伤 T 细胞；γ-干扰素；白细胞介素-4
［中图分类号］R714.21 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2017）02-0223-03
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.02.024

Correlation Study between PB NKT Subtype and Serum IFN-γ, IL-4 Expression Change in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion

CHEN Xufei, LIANG Yixian, LIN Chunming, PU Yudong, HE Shuzhen
(*Department of Obstetrics, the Third People's Hospital of Dongguan City, Dongguan 523326, Guangdong, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To observe NKT, IFN-γ and IL-4 expression level in unexplained recurrent spontaneous abortion. **Methods**: 30 patients with unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) were selected as observation group, and 30 pregnant women with the same gestational age who without history of abortion as control group. After a night of fasting, the levels of NKT, IFN-γ and IL-4 in the two groups were detected by ELISA, and percentage of NKT subtype, cell $CD56^+CD16^-$ and $CD56^+CD16^+$ were analyzed by flow cytometry. **Results**: The $CD56^+CD16^-$ percentage of observation groups was obviously lower than control group, while $CD56^+CD16^+$ cells with stronger cytotoxicity showed higher percentage than control group ($P<0.05$); the IFN-γ level and Th1/Th2 percentage of observation group were significantly higher than that of the control group, and the level of IL-4 cytokine in observation group was lower than that in control group. **Conclusion**: The $CD56^+CD16^+$ NKT subtype cell percentage and increased Th1/Th2 percentage might involve with the USRA.

［**Key words**］abortion, habitual; natural killer T cells; interferon gamma; interleukin-4

复发性流产（recurrent spontaneous abortion，RSA）是指不间断地发生 2 次及以上的自然流产，在我国的发生率为 1%～5%[1]。RSA 的流产过程与一般流产类似，多在同一妊娠月发生[2-3]。原因不明性复发性流产（unexplained recurrent spontaneous abortion，URSA）是指复发性流产的原因不包括在染色体活性异常、甲状腺功能异常、黄体功能不足、子宫畸形及环境心理等已知原因外的复发性流

*［基金项目］东莞市医疗卫生科技计划一般项目（2016105101038）
网络出版时间：2017－02－17 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170217.1104.001.html

产,占复发性流产的 50% 以上[4]。目前对 URSA 的病因的研究主要集中于免疫耐受的细胞因子层面,而对于自然杀伤 T 细胞(NKT)、γ-干扰素(IFN-γ)及白细胞介素-4(IL-4)与 URSA 相关性研究未见报道[5-8]。$CD56^+CD16^-$、$CD56^+CD16^+$是 NK 细胞的两个亚型,$CD56^+CD16^-$在受到 IL-2 的刺激后可转化为细胞毒性较强的 $CD56^+CDl6^+$ NKT 细胞,发挥免疫防御功能[9]。Th1 型细胞因子有 IFN-γ,Th2 型细胞因子有 IL-4[10]。本文通过检测 URSA 患者外周血中 $CD56^+CD16^-$、$CD56^+CD16^-$百分比,血清 IFN-γ、IL-4 水平及 Th1/Th2 型细胞因子比值,研究 URSA 与 NKT、IFN-γ、IL-4 的相关性,报告如下。

1　材料与方法

1.1　临床资料

收集 2014 年 4 月 ~2015 年 5 月就诊的 URSA 孕妇 30 例作为观察组, 20 ~ 34 岁,平均(32.7 ± 5.7)岁;孕周 6 ~ 14 周,平均(8.7 ± 3.1)周。纳入标准为夫妻双方染色体正常、丈夫的精液检测指标正常,孕妇自身免疫系统检测阴性、既往有 2 次或以上自然流产病史。排除女性生殖道感染与畸形、雌激素水平异常、TORCH 检查感染、有内外科合并症或手术史患者。选择无流产史同孕龄的正常妊娠女性 30 例作为对照组, 20 ~ 34 岁,平均(31.7 ± 4.1)岁;孕周 6 ~ 14 周,平均(8.8 ± 3.2)周。纳入标准为既往生育且子女健康、无妇科疾病史、无流产史,无内外科合并症或手术史者。两组孕妇年龄、体重和体质指数(BMI)等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$);表 1。

表 1　两组孕妇年龄、体重和 BMI 比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1　General information of both groups

指标	观察组	对照组
年龄(岁)	32.7 ± 5.8	31.7 ± 4.1
体重(kg)	48.2 ± 8.6	45.9 ± 7.5
BMI(kg/m^2)	22.5 ± 2.7	23.2 ± 2.4

1.2　方法

两组孕妇于相同孕周抽取空腹静脉血 8 mL,其中 5 mL 不抗凝,常温静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 15 min 分离血清,采用酶联免疫吸附法检测血清 NKT、IFN-γ 和 IL-4 水平;剩余 3 mL 采用 EDTA 抗凝,采用流式细胞仪分析不同亚型的 NKT 细胞百分比($CD56^+CD16^-$和 $CD56^+CD16^+$细胞百分比):每份标本取细胞计数管 1 支,加入 CD3FITC-CD56/ CD16PE-CD45 PerCP-CD19 APC 20 μL 以及全血 50 μL,混匀后室温下避光 15 min,于每支测定管中加入溶血素 450 μL,混匀避光作用 10 min,采用流式细胞仪收获 10 000 个有核细胞,用 cellquest 软件进行分析;以 CD45 设门,将细胞分成粒、单、淋 3 群,分析 $CD56^+CD16^-$和 $CD56^+CD16^+$细胞百分比。

1.3　统计学分析

所有数据运用 SPSS 17.0 进行统计分析,计数资料用率(%)表示,两两比较采用 χ^2 检验;计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两两比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　NKT 细胞百分比

流式细胞检测结果显示观察组患者 $CD56^+CD16^-$细胞百分比明显低于对照组,而 $CD56^+CD16^+$细胞百分比明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。提示观察组孕妇外周血中细胞毒性较强的 NKT 细胞比例增加。

表 2　两组孕妇外周血 $CD56^+CD16^-$、$CD56^+CD16^+$细胞百分比($n=30,\bar{x}\pm s$)

Tab. 2　Peripheral blood $CD56^+CD16^-$, $CD56^+CD16^+$ cell percentage of both groups

指标	观察组	对照组
$CD56^+CD16^-$(%)	55.3 ± 4.9	70.6 ± 4.1(1)
$CD56^+CD16^+$(%)	21.3 ± 3.4	15.4 ± 2.0(1)

(1) 与观察组比较, $P<0.05$

2.2　IFN-γ 和 IL-4 水平及 Th1/Th2 比值

观察组孕妇血清 IFN-γ 水平和 Th1/Th2 比值高于对照组,IL-4 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3　两组孕妇血清 IFN-γ 和 IL-4 水平及 Th1/Th2 比值

Tab. 3　IFN-γ and IL-4 levels and Th1/Th2 percentage of both groups

指标	观察组	对照组
IFN-γ(ng/L)	198.1 ± 42.7	140.5 ± 31.6(1)
IL-4 (ng/L)	170.9 ± 40.2	251.0 ± 50.2(1)
Th1/Th2	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.2(1)

(1) 与观察组比较, $P<0.05$

3　讨论

URSA 是导致不孕的重要因素。随着越来越深入的基础研究,其中免疫因素已成为 URSA 发病的主要原因之一。根据 Th 细胞的功能作用将其分为 Th1 型和 Th2 型细胞。Th1 细胞能够分泌 IFN-γ 和 IL-2 等 Th1 细胞因子,该类型细胞因子可以促进细胞免疫活性,抑制滋养层细胞生长发育,介导滋养层细胞凋亡,抑制胎儿发育,激活易对胎盘造成毒性的细胞等,从而引起妊娠障碍。Th2 型细胞分泌 IL-4 和 IL-10 等 Th2 型细胞因子,该类型细胞因子可以促进 B 细胞增殖,参与体液免疫,同时与 Th1 型细胞因子互相产生拮抗作用,在胎儿生长发育阶段起到重要作用[11]。研究发现,妊娠早期机体通过激活大量外周血 NKT 细胞分泌 Th1 相关细胞因子 IFN-γ 等,维持免疫微环境的稳态,且能够迅速有效的清除外界入侵的抗人类巨细胞病毒等造成孕妇流产的有害微生物。妊娠中后期,为了延续对外来抗原的免疫耐受,NKT 细胞分泌 IL-4 等 Th2 细胞因子保持相对平衡。Th1 型细胞因子/Th2 型细胞因子的比例失调,影响胎儿发育,增加孕妇流产的概率[12]。

本研究结果显示 Th1 型细胞因子 IFN-γ 在 URSA 患者血清中的水平明显高于对照组中血清中 IFN-γ 的水平。与此相对应的是,Th2 型细胞因子 IL-4 在 URSA 患者血清中的水平显著低于对照组血清中 IL-4 的水平,从而引起 URSA 患者相对于正常对照组的 Th1/Th2 比值增高。此外, NKT 细胞表面标志为 CD56 分子。NKT 细胞的杀伤活性无组织相容性限制(major histocompatibility complex,MHC),通过其直接与靶细胞接触后释放穿孔素、颗粒酶等细胞因子,诱导靶细胞程序性死亡。NKT 细胞分 2 类,一类为 $CD56^+CD16^-$ 另一类为 $CD56^+CD16^+$。$CD56^+CDl6^-$ NKT 细胞有免疫抑制作用和免疫营养作用。可经 IL-2 刺激转化为 $CD56^+CDl6^+$ NKT 细胞,细胞毒性增强,发挥免疫防御功能[9]。$CD56^+$ 阳性的 NKT 细胞数量增加,表明 URSA 患者 NK 细胞活性增强,对胚胎有一定的杀伤作用,导致流产。本次研究结果同样预示了 URSA 患者 Th1 细胞因子的水平增加在该疾病发病过程中起到关键性的作用。

4　参考文献

[1] 肖世金, 赵爱民. 复发性流产病因学研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2014 (1):41 – 45.

[2] Dong F, Zhang Y, Xia F, et al. Genome-wide miRNA profiling of villus and decidua of recurrent spontaneous abortion patients[J]. Reproduction, 2014 (1):33 – 41.

[3] Sotnikova N, Voronin D, Antsiferova Y, et al. Interaction of decidual CD56 + NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation.[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2014 (3):198 – 208.

[4] Tae YC, Hye ML, Won KP, et al. Spontaneous abortion and recurrent miscarriage: A comparison of cytogenetic diagnosis in 250 cases[J]. Obstetrics & Gynecology Science, 2014 (6):518 – 525.

[5] 邱佩佩, 李小英. 原因不明复发性流产患者 Th1/Th2 型细胞因子的表达分析[J]. 中国妇幼保健, 2015 (9):1414 – 1416.

[6] 徐澄, 陆启滨. Th1/Th2 细胞因子失衡致复发性流产的机制及治疗[J]. 长春中医药大学学报, 2014 (5): 934 – 936.

[7] 安利峰, 胜利, 赵霏,等. 不孕症患者外周血中 Th1、Th2 细胞因子与自身抗体产生的相关性[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014 (5):527 – 529.

[8] Sag D, Krause P, Hedrick CC, et al. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset[J]. Journal of Clinical Investigation, 2014 (9): 3725 – 3740.

[9] 李慧敏, 李惠新. 主动免疫治疗对原因不明复发性流产患者外周血 $CD56^+CD16^+$ NK 细胞及 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞表达的影响[J]. 中国社区医师, 2010 (7): 132 – 133.

[10] Lu X, Liu Z, Zhang X, et al. Prothrombotic state of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion.[J]. International Journal of Gynaecology & Obstetrics the Official Organ of the International Federation of Gynaecology & Obstetrics, 2015 (2):2999 – 3006.

[11] 肖碧如, 薛向阳, 胡飞红,等. 微小 RNA155 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中的表达变化及其调控机制[J]. 中华妇产科杂志, 2014 (2):130 – 134.

[12] 杨慧霞. 妊娠期感染性疾病诊治策略[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2016(6):499 – 501.

(2016-11-25 收稿,2017-01-25 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵　毅