

卵巢子宫内膜异位囊肿患者免疫调节细胞 Th17/Treg 失衡的临床研究

杨娟¹, 韦成厚², 祝彩霞¹, 耿慧珍¹, 邓松清¹, 牛刚¹

(1. 中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080; 2. 广东省计划生育科学技术研究所, 广东 广州 510600)

摘要:【目的】探讨卵巢子宫内膜异位囊肿患者体内是否存在 Th17/Treg 失衡的现象。【方法】采用病例对照研究方法, 实验组为腹腔镜术后病理确诊的卵巢子宫内膜异位囊肿患者(40例), 对照组为同期因单纯输卵管因素不孕行(宫)腹腔镜联合诊治术患者(40例)。分别收集两组患者的外周血、腹腔液、在位及异位内膜组织。流式细胞术检测外周血中 Th17 和 Treg 占 CD4⁺T 细胞比例; ELISA 分别检测两组患者血清及腹腔液中 Th17 分泌的 IL-17、IL-22 和 Treg 分泌的 IL-10、TGF- β 浓度; Q-PCR 检测在位及异位内膜组织中 Th17 特异转录因子 ROR- γ t mRNA 和 Treg 特异转录因子 FoxP3 mRNA 表达水平。【结果】①卵巢子宫内膜异位囊肿患者外周血中 Th17 占 CD4⁺T 细胞比例为(5.53 \pm 2.12)%, 较对照组的(2.16 \pm 0.78)% 明显升高; Treg 占 CD4⁺T 细胞比例为(4.22 \pm 1.04)% 较对照组的(6.14 \pm 1.52)% 明显降低, 外周循环中呈现 Th17/Treg 平衡失调现象。②与对照组比较, 卵巢子宫内膜异位囊肿患者外周血中 Th17 分泌 IL-17、IL-22 浓度明显升高, Treg 分泌 TGF- β 、IL-10 浓度明显降低; 与之相反, 卵巢子宫内膜异位囊肿患者腹腔液中 Th17 分泌 IL-17、IL-22 浓度较对照组降低, Treg 分泌 TGF- β 、IL-10 的浓度明显升高。③卵巢子宫内膜异位囊肿患者异位内膜 Treg 特异转录因子 FoxP3 mRNA 表达水平较两组在位内膜均明显升高, Th17 特异转录因子 ROR- γ t mRNA 表达水平较两组在位内膜均明显降低。【结论】卵巢子宫内膜异位囊肿患者体内存在免疫调节细胞 Th17/Treg 平衡失调现象, 在子宫内膜异位症发生发展的过程中出现了免疫调节的紊乱, 免疫因素与内异症的发病有相关性。

关键词: 子宫内膜异位症; 免疫调节紊乱; Th17; Treg

中图分类号: R71

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)01-0095-06

A Clinical Study on Imbalance of Th17/Treg in Patients with Ovarian Endometriosis

YANG Juan¹, WEI Cheng-hou², ZHU Cai-xia¹, GENG Hui-zhen¹, DENG Song-qing¹, NIU Gang¹

(1. Department of Obstetrics & Gynecology, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510000, China; 2. Guangdong Provincial Science and Technology Research Institute for Family Planning, Guangzhou 510600, China)

Corresponding to: Niu Gang, E-mail: niugdr@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the disturbance between Th17 and Treg cell balance in ovarian endometriosis patients. 【Methods】 Case-control study comparing 40 women with histo-pathologically confirmed ovarian endometriosis and with 40 control infertility women without visible endometriosis foci, pelvic inflammations who were subjected to laparoscopic surgery during the same period. Peripheral blood, peritoneal fluid, ovarian ectopic endometrial tissue and eutopic endometrial tissue of ovarian endometriosis patients and controls were collected during surgery. T lymphocytes subpopulations in peripheral blood were analyzed by flow cytometry using specific monoclonal antibodies recognizing CD4⁺, CD25⁺ and CD127⁻ markers and CD3⁺, CD8⁻ and IL-17A⁺ markers. Then, IL-17, IL-22, IL-10 and TGF- β concentration in the serum and peritoneal fluid was determined using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Also, Q-PCR was performed to verify Foxp3 mRNA and ROR- γ t mRNA expression differences in eutopic and ectopic endometrial tissue. 【Results】 1. The percentage of CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg cells was significantly decreased in the peripheral blood of

收稿日期: 2016-10-20

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031800297)

作者简介: 杨娟, 硕士, 住院医师, 研究方向: 子宫内膜异位症、妊娠期糖尿病, E-mail: yangjuan1208@126.com; 牛刚, 通信作者, 研究方向: 子宫内膜异位症、不孕症, E-mail: niugdr@163.com

women with ovarian endometriosis compared with control women. On the other hand, the proportion of CD3+CD8-IL-17A+ Th17 cells was significantly increased in the peripheral blood of women with endometriosis compared with control women. 2. Comparing with the controls, the concentration of IL-17 and IL-22 was significantly higher in the serum of women with ovarian endometriosis, and the levels of IL-10 and TGF- β were significantly lower in the serum of women with endometriosis. On the contrast, in the peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis, the concentration of IL-17 and IL-22 were lower, and the concentration of IL-10 and TGF- β were significantly higher than the controls. 3. Foxp3 mRNA expression level was significantly elevated in ectopic endometrial tissue of patients with ovarian endometriosis compared with eutopic endometrial tissue, while the ROR- γ t mRNA expression level of ectopic endometrial tissue was significantly decreased than eutopic endometrial tissue. 【Conclusion】 The present study verifies the imbalance of Th17/Treg in peripheral blood, peritoneal fluid and endometrial tissue in ovarian endometriosis patients, which implies the immune dysregulation and the disturbance of immunity homeostasis in the establishment and progression of endometriosis.

Key words: endometriosis; immunological dysregulation; Th17; Treg

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2017, 38(1):95-100]

子宫内膜异位症(endometriosis, EMT),简称内异症,是一种常见的妇科良性疾病,在育龄女性中发病率高达10%~15%^[1]。关于内异症发病机制的众多学说中,Sampson提出的经血逆流学说是最为经典的学说之一。经由输卵管进入盆腔的子宫内膜细胞,首先必须成功逃脱自身免疫系统的攻击幸存下来,进而黏附定植于盆腔腹膜处,形成最初的微小异位病灶,随之募集炎性细胞到病灶处造成一个炎性微环境,进一步促进内异症病情发展^[2]。Th17及Treg细胞是两种重要的CD4+效应T细胞,在免疫应答过程中均发挥重要作用。Th17特异性分泌IL-17、IL-22、IL-21等细胞因子,其特异转录因子为ROR- γ t,参与机体适应性免疫反应和炎症反应过程,在对抗胞外特定病原体方面具有重要作用。Treg主要分泌的细胞因子为IL-10、TGF- β ,其特异转录因子为FoxP3,在体内主要的生理功能是参与自身抗原耐受,维持机体免疫稳态,抑制自身免疫性疾病发生。正常机体内,促炎性的Th17与抗炎性的Treg细胞间保持一种动态平衡,而一旦这种平衡被打破将导致自身免疫性疾病及炎性疾病的发生。本研究分别从细胞、细胞因子及基因表达三个方面探索卵巢子宫内膜异位囊肿患者体内是否存在Th17/Treg平衡失调的现象。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

实验组:选取2015年01月至2015年06月于中山大学附属第一医院妇科行腹腔镜诊治术,术

中所见且术后病理证实为(单侧或双侧)卵巢型子宫内膜异位症患者共40例。年龄20~41岁,平均年龄31.94岁。实验组纳入标准:①育龄期女性,月经规律,月经周期27~35d;②术前3个月没有接受GnRH-a或雌孕激素治疗的患者;③合并子宫腺肌症、子宫肌瘤的患者不予纳入;④无自身免疫性疾病病史;⑤所有入组患者均知情同意。对照组选取同期在于中山大学附属第一医院妇科因输卵管阻塞不孕行(宫)腹腔镜诊治术,同时要求进行子宫内膜活检的患者40例,术中探查未发现内异症病灶。年龄22~43岁,平均年龄30.89岁。对照组纳入标准:①育龄期女性,月经规律,月经周期27~35d;②无痛经史及月经异常史;③妇科B超及妇科检查均不提示子宫肌瘤、子宫腺肌症及子宫内膜异位症;④无自身免疫性疾病病史;⑤所有入组患者均知情同意。所有入组患者的手术时间均选择在月经干净后3~7d内。

1.2 标本的获取及处理

分别获取同一患者的体液标本及组织标本,同时进行相应的处理。术前分别用肝素钠管、真空干燥管,各采集患者外周肘静脉血3mL,其中用肝素钠管采血后,即时行流式细胞仪检测。真空干燥管收集的血液离心后收集上层血清置于-80℃冰箱中保存待测细胞因子浓度。腹腔镜手术时,真空干燥管留取直肠子宫陷凹或膀胱子宫陷凹处腹腔液3~5mL置于-80℃冰箱中保存待测。

腹腔镜术中取实验组患者异位内膜组织(剔除的卵巢巧克力囊肿壁)共40例,同时诊刮获取同一患者在位内膜组织共40例。诊刮获取对照

组患者在位内膜组织共40例。取得的新鲜内膜组织立即置于液氮保存,随后转移至-80℃冰箱低温保存。

1.3 主要仪器设备及试剂

佛波醇乙酯(PMA)、离子霉素(Ionomycin, Iono)、布雷菲德菌素A(BFA)均购自MultiSciences公司。FITC标记的抗人CD3抗体、APC-CY7标记的抗人CD8、PE-CY7标记的抗人CD25抗、ALEXA647标记的抗人IL-17A抗体、ALEXA647标记的抗鼠抗体、PEMAB标记的抗人CD127抗体、PEMAB标记的抗鼠抗体、染色缓冲液、固定破膜液、固定破膜缓冲液均购自BD Pharmingen公司。人IL-17, IL-22, TGF- β , IL-10 ELISA试剂盒购自R & D systems。

1.4 Th17及Treg细胞的流式细胞学检测

肝素抗凝全血100 μ L加入CD3 FITC、CD8 APC-CY7、CD25 PE-CY7、CD127 PEMAB抗人抗体各10 μ L,室温避光孵育20 min后,溶解红细胞,然后固定、破膜50 min,加入IL-17 ALEXA647标记的抗体10 μ L,避光孵育50 min,洗涤细胞后PBS液重悬上机检测Th17、Treg细胞占CD3+CD8-细胞群即CD4细胞的比例。

1.5 ELISA检测

ELISA检测血清及腹腔液中IL-17, IL-22, TGF- β , IL-10细胞因子水平。各种细胞因子检测方法均按照试剂盒说明书进行。

1.6 qRT-PCR检测

qRT-PCR检测组织中特异转录因子ROR- γ t mRNA及Foxp3 mRNA表达水平。Trizol法提取内膜组织中RNA,核酸测定仪测 A_{260}/A_{280} ,要求在1.8~2.0之间,-80℃保存备用。按照PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒说明书进行RNA逆转录(每20 μ L逆转录体系中加入上述总RNA 800 ng)。逆转录完成后置于冰上,配置两种mix:mixA(11 μ L, SYBR+上下游引物),mixB(9 μ L, DEPC水+cDNA)。加好96孔板后封板模封板,3 000~5 000 r/min,离心机半径为8.6 cm,离心3~5 min,放入Roche Light Cycler 480II仪器中,反应条件为95℃30 s预变性,然后95℃5 s,60℃34 s共40个循环,反应结束,设定最佳阈值获取Ct值,根据仪器给出的标准曲线和斜率获得目的基因的相对表达指Foxp3 5'-TGTTACAGGAAGTCCCTTGCCATC-3',下游5'-CTGTGTGGACTTGGGA

GAGGAC-3'。ROR- γ t上游5'-GCAAGGAAGTATTTGGGCAC3',下游5'-CCCACADDDAAATCCCA TAA-3'。NAPDH(内参基因)上游5'-GAAGATG GTGATGGGATTTC-3',下游5'-GAAGGTGAAGG TCGGAGTC。

1.7 统计学方法

计数资料数据以均数 \pm 标准差表示。两组间均数比较,方差齐且符合正态分布,采用 t 检验。多组间均数比较,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以LSD(t)法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。应用SPSS17.0软件进行统计分析。

2 结果

2.1 Th17及Treg占CD4+T细胞比例

卵巢子宫内膜异位囊肿患者及对照组患者(各40例)外周血中Th17及Treg占CD4+T细胞比例。运用FlowJo7.6.1流式分析软件分析数据。采用 t 检验进行统计分析(表1)。

表1 外周血中Th17及Treg占CD4+T细胞比例

Table 1 The percentage of Th17 and Treg in peripheral blood CD4+T cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	<i>n</i>	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
EMT	40	5.53 \pm 2.12 ¹⁾	4.22 \pm 1.04 ²⁾	1.36 \pm 0.82 ³⁾
Control	40	2.16 \pm 0.78	6.14 \pm 1.52	0.35 \pm 0.12
<i>P</i> value		0.037	0.032	0.024

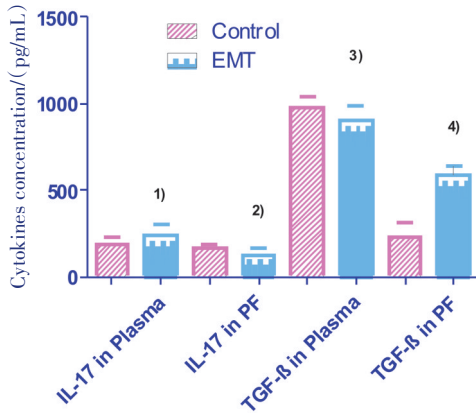
EMT: endometriosis. t test, 1) compared with control, $P < 0.05$; 2) compared with control, $P < 0.05$; 3) compared with control, $P < 0.05$

2.2 Th17分泌IL-17、IL-22及Treg分泌IL-10、TGF- β 的浓度检测

ELISA检测卵巢子宫内膜异位囊肿患者(40例)、对照组患者(40例)血清及腹腔液中Th17分泌IL-17、IL-22及Treg分泌IL-10、TGF- β 的浓度见图1、2。采用 t 检验进行统计分析。

2.3 内膜组织中特异转录因子表达水平

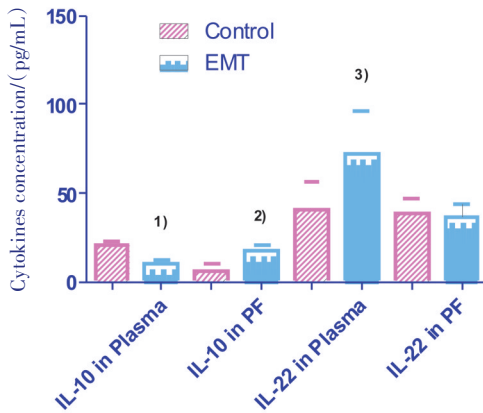
卵巢子宫内膜异位囊肿(简称巧囊)患者异位内膜、在位内膜及对照组在位内膜组织中Th17特异转录因子ROR- γ t mRNA表达分别为0.234 \pm 0.119、1.007 \pm 0.138、0.97 \pm 0.022,3组内膜组织间进行比较,异位内膜组织中ROR- γ t mRNA表达



EMT: endometriosis; $n = 40$. Comparing with the controls, the concentration of IL-17 was significantly higher in the plasma of women with endometriosis, and the level of TGF-β was significantly lower in the plasma of women with endometriosis. On the contrast, in the peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis, the concentration of IL-17 was lower, and the concentration of TGF-β was significantly higher. 1) $P = 0.043 < 0.05$ vs Control; 2) $P = 0.036 < 0.05$ vs Control; 3) $P = 0.032 < 0.05$ vs Control; 4) $P = 0.015 < 0.05$ vs Control.

图1 血清及腹腔液中IL-17和TGF-β浓度

Fig.1 Concentration of IL-17 and TGF-β in plasma and peritoneal fluid (PF)



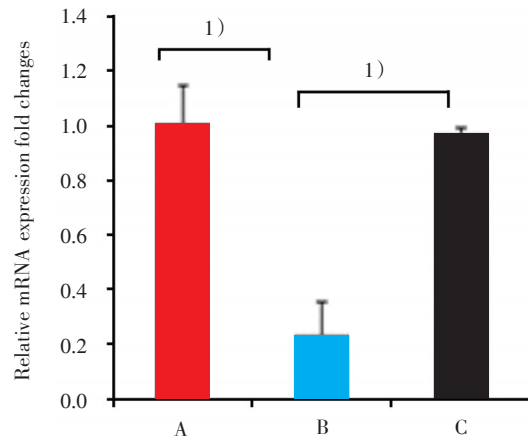
EMT: endometriosis; $n = 40$. Comparing with the controls, the concentration of IL-10 was significantly lower in the plasma of women with endometriosis, and the level of IL-22 was significantly higher in the plasma of women with endometriosis. On the contrast, in the peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis, the concentration of IL-10 was higher, and the concentration of IL-22 was lower, but not significantly. 1) $P = 0.041 < 0.05$ vs Control; 2) $P = 0.035 < 0.05$ vs Control; 3) $P = 0.028 < 0.05$ vs Control.

图2 血清及腹腔液中IL-22和IL-10浓度

Fig.2 Concentration of IL-22 and IL-10 in plasma and peritoneal fluid (PF)

水平明显降低,两组在位内膜组织ROR-γt mRNA表达无统计学差异(图3)。

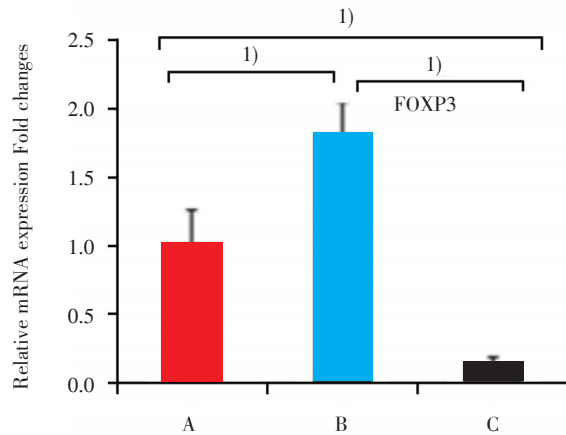
卵巢子宫内膜异位囊肿患者异位内膜、在位内膜及对照组在位内膜组织中Treg特异转录因子FOXP3 mRNA表达分别为 1.822 ± 0.226 、 1.019 ± 0.247 、 0.155 ± 0.040 , 3组内膜组织间进行比较,异位内膜FOXP3 mRNA表达水平较两组在位内膜明显升高,内异症患者在位内膜FOXP3 mRNA表达水平较对照组在位内膜明显升高(图3、4)。



A: eutopic endometrium, B: ectopic endometrium, C: control endometrium, 1) $P < 0.05$ A vs B, B vs C, $n = 40$

图3 内膜组织中Th17特异转录因子ROR-γt mRNA表达水平

Fig.3 The relative expression of ROR-γt mRNA in endometrium



A: eutopic endometrium, B: ectopic endometrium, C: control endometrium, 1) $P < 0.05$ A vs B, B vs C, A vs C, $n = 40$

图4 内膜组织中Treg特异转录因子FOXP3 mRNA表达水平

Fig.4 The relative expression of FOXP3 mRNA in endometrium

3 讨论

EMT是一种常见的妇科良性疾病,具有雌激素依赖、孕激素抵抗、慢性炎症性疾病的特点。在正常女性体内,随逆流经血逸入盆腔的内膜细胞会被盆腔内的免疫细胞识别并成功清除,而在内异症患者体内由于免疫清除机制的异常导致了内异症的易感性。Omwandho等人提出将EMT的发病分为6个阶段,即子宫内膜细胞脱落,内膜细胞异位存活,成功逃脱免疫监视,腹膜黏附,新生血管生成和周期性出血^[3]。据此,我们可以认为EMT是一种多因素参与、经历多步骤多阶段的复杂疾病。本研究首次证实了Th17/Treg平衡失调现象存在于卵巢子宫内膜异位囊肿患者体内,提示内异症患者体内存在免疫稳态失衡。

在关于内异症发病机制的众多学说中,自身免疫性疾病假说得到了越来越多的理论支持。多克隆B细胞活性的增强,T细胞和B细胞功能异常及数量增多,抗子宫内膜抗体的出现,所有这些证据都提示在EMT发生和进展的过程中出现了免疫系统的异常。CD4+T淋巴细胞在免疫反应的调控中发挥重要作用,而Th17及Treg是效应CD4+T细胞中重要的两类,大量的研究证实了Th17、Treg在自身免疫性疾病、炎性疾病及肿瘤发病中均发挥重要作用。

Th17细胞分泌细胞因子IL-17、IL-22,在机体对抗病原体和防御感染中发挥作用。IL-17是一种重要的致炎因子,其通过诱导粒细胞集落刺激因子和IL-8表达上调,介导中性粒细胞活化,进一步诱导炎症级联反应。体外实验证实,Th17通过CCL20/CCR6系统被募集到异位病灶处;促炎因子通过上调内膜间质细胞分泌的CCL20,募集更多的Th17,进一步促进内异症的发展^[4]。Gogacz等人的研究证实内异症患者腹腔液中的Th17能够促进异位内膜组织的增殖,进而促进内异症病情的发展^[5]。本研究证实,EMT患者外周血中Th17细胞比例增加,血清中Th17分泌细胞因子IL-17、IL-22浓度升高,而腹腔液中IL-17、IL-22浓度降低;同时EMT患者在位内膜及异位内膜ROR- γ t mRNA表达水平均较对照组在位内膜降低。内异症患者外周血中促炎性的Th17细胞占优势,提示内异症患者的外周循环呈现一种炎性疾病状态。同时,腹腔液中Th17细胞分泌细胞因

子浓度降低,可以推测盆腔局部Th17细胞功能低下,防御清除外界病原体能力降低,这一点为异位内膜细胞的存活创造了有利条件。

Treg细胞是一类能够调节其他多种免疫细胞功能的辅助性T细胞亚型,在体内发挥免疫抑制功能,在维持机体免疫内环境稳态方面起着尤为重要的作用^[6]。Treg发挥生理作用主要是通过分泌IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子,调节抗原提呈细胞的功能,参与穿孔素依赖的细胞毒作用3个途径实现。内异症患者外周血Treg细胞比例较对照组明显下降;另一方面,内异症患者腹腔液中Treg细胞比例却明显增高,循环中出现了Treg分布的紊乱^[7]。内异症患者腹腔液中Treg细胞比例升高,同时Treg分泌细胞因子IL-6、TGF- β 浓度明显升高。Podgac等^[8]通过病例对照研究发现子宫内膜异位症患者Treg分布紊乱,腹腔液中Treg细胞比例增加导致盆腔局部细胞免疫应答强度减弱,有助于EMT发生,而外周血中Treg比例下降则有助于自身免疫反应的发生发展。Treg细胞和NK细胞通过调节炎症反应,导致机体对异位内膜细胞的清除能力降低,在内异症最初发病及疾病进展中均发挥了相当重要的作用^[9]。本研究发现:EMT患者外周血中Treg细胞比例较对照组明显减少,血清中Treg分泌细胞因子IL-10、TGF- β 水平降低,而腹腔液中Treg分泌细胞因子IL-10、TGF- β 水平升高。同时EMT患者在位内膜及异位内膜Foxp3 mRNA表达水平均较对照组在位内膜升高。EMT患者盆腔局部Treg分泌细胞因子浓度升高,提示盆腔局部呈现Treg细胞功能优势状态,而Treg主要发挥免疫抑制作用,可以推测盆腔局部免疫抑制功能呈优势,造成了EMT发病的易感性。

子宫内膜异位症作为一种炎性综合征疾病,趋化因子介导的免疫细胞的募集及异位内膜细胞凋亡异常是EMT发病中发挥着重要作用的两个方面^[10]。子宫内膜异位症的发生与经血逆流、多种促炎细胞因子的分泌、细胞免疫功能受损、新生血管生成等众多环节紧密联系^[11]。内异症患者腹腔液中活化的巨噬细胞数量增多但功能异常,同时伴随着多种细胞因子/趋化因子表达的差异,包括巨噬细胞迁移抑制因子^[12],TNF- α ^[13]、IL-1 β 、IL-6、IL-8^[14]、单核细胞趋化蛋白-1等。TGF- β 是一种功能复杂多样的细胞因子,其在基因表达,细胞凋亡、增殖、运动、分化,免疫反应及肿瘤血管生

成等生理病理过程中均发挥一定作用^[15]。研究证实TGF- β 参与子宫内膜异位症发病的各个阶段,包括异位内膜细胞的存活、异位细胞在腹膜的黏附和侵袭、病灶新生血管形成、纤维化过程,有望成为诊断EMT敏感有效的生物学标志物。本研究再次证实了卵巢子宫内膜异位囊肿病人血清及腹腔液中TGF- β 的表达与对照组间存在明显的差异。

Treg维持机体免疫稳态,而Th17诱导组织炎症及自身免疫性疾病的发生,两者间的动态平衡对于机体免疫稳态的维持具有至关重要的作用。促炎性的Th17细胞与抗炎性的Treg细胞之间平衡状态的打破是导致多种炎症性疾病、自身免疫性疾病发病的一个重要因素。与正常孕妇相比,复发性流产患者Th17及Treg分泌细胞因子均存在显著差异,表明Th17和Treg细胞比例失调可能在不明原因复发性流产的发病中起一定作用^[16]。弥漫性及局灶性子官腺肌症病人外周循环及子宫局部存在Th17/Treg平衡紊乱现象,并且Th17/Treg比值与痛经程度和CA125水平呈正相关,提示Th17/Treg失衡在腺肌症的免疫发病机制中发挥重要作用,有可能成为腺肌症潜在的治疗靶点^[17]。本研究发现卵巢子宫内膜异位囊肿患者外周血、腹腔液及内膜组织中存在Th17/Treg平衡失调现象。EMT患者体内Th17、Treg分布紊乱,其相关细胞因子在血清和腹腔液中表达异常,提示卵巢子宫内膜异位囊肿患者体内存在免疫调控紊乱现象。

尽管本研究无法证实Th17/Treg失衡现象与EMT发病间的因果关系,但是可以肯定的是EMT患者体内确实存在Th17/Treg失衡现象,提示在内异症发生发展的过程中合并了免疫调控的异常,推测免疫调节的异常与内异症的发病有一定相关性。

参考文献

- [1] Giudice LC, Kao LC. Endometriosis [J]. *Lancet*, 2004, 364(9447):1789-1799.
- [2] Bianco B, Andre GM, Vilarino FL, et al. The possible role of genetic variants in autoimmune-related genes in the development of endometriosis [J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(3):306-315.
- [3] Omwandho CO, Konrad L, Halis G et al. Role of TGF- β s in normal human endometrium and endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(1): 101-109.
- [4] Hirata T, Osuga Y, Takamura M, et al. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 β -, TNF- α -, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(11):5468-5476.
- [5] Gogacz M, Winkler I, Bojarska-Junak A, et al. Increased percentage of Th17 cells in peritoneal fluid is associated with severity of endometriosis [J]. *J Reprod Immunol*, 2016, 117(4):39-44.
- [6] 陈祚珈,高雅懿,李志远,等. FOXP3~+调节性T细胞 [J]. *生命科学*, 2010, 7(6):515-528.
- [7] Olkowska-Truchanowicz J, Bocian K, Maksym RB, et al. CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(1):119-124.
- [8] Podgac S, Rizzo LV, Fernandes L, et al. CD4 + CD25 highFoxp3 + cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis [J]. *Au J Reprod Immunol*, 2012, 68(4):301-308.
- [9] Bellelis P, Barbeiro DF, Rizzo LV, et al. Transcriptional changes in the expression of chemokines related to natural killer and T-regulatory cells in patients with deep infiltrative endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(7):1987-1993.
- [10] Reis FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis [J]. *Hum Reprod Update*, 2013, 19(4):406-418.
- [11] Nezhat F, Datta MS, Hanson V, et al. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review [J]. *Fertil Steril*, 2008, 90(5):1559-1570.
- [12] Kats R, Collette T, Metz CN, et al. Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(1):69-76.
- [13] Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, et al. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery [J]. *Fertil Steril*, 1988, 50(4):573-579.
- [14] Milewski L, Dziunycz P, Barcz E, et al. Increased levels of human neutrophil peptides 1, 2, and 3 in peritoneal fluid of patients with endometriosis: association with neutrophils, T cells and IL-8 [J]. *J Reprod Immunol*, 2011, 91(1-2):64-70.
- [15] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression [J]. *Nat Genet*, 2001, 29(2):117-129.
- [16] 刘长明,丛林,方慧琴,等. Treg和Th17在原因不明性复发性流产发病中作用的探讨 [J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(12):944-947.
- [17] Gui T, Chen C, Zhang Z, et al. The disturbance of TH17-Treg cell balance in adenomyosis [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(2):506-514.

(编辑 徐杰)