

URSA患者蜕膜调节性 T 细胞 Toll 受体表达变化的临床意义

梅珊珊¹, 屈艳霞², 张广兰¹, 何平¹

(1. 广州市妇女儿童医疗中心妇产科, 广东 广州 510623; 2. 广州市人口和计划生育技术服务指导所遗传优生科, 广东 广州 510410)

摘要:【目的】检测 URSA 患者蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 中 TLR2、TLR4、TLR9 的表达, 探讨 TLRs 参与 URSA 发生的免疫机制。【方法】选择从 2013 年 1 月至 2013 年 11 月就诊于广州市妇女儿童医疗中心妇产科的 URSA 患者, 其中 B 超确认胚胎已停育 30 例为研究对象, 同期选择 30 例要求人工流产的计划外妊娠的正常早孕妇女为对照组(Control)。收集 URSA 患者、对照组清宫手术后的新鲜蜕膜组织, 流式细胞仪检测两组蜕膜组织中 CD4⁺CD25^{high} Treg 比例以及 RT-PCR、Western-blot 方法比较蜕膜组织中 CD4⁺CD25^{high} Treg 中 TLR2、TLR4、TLR9 表达的差异。【结果】URSA 患者蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 TLR4、TLR9 的表达在 mRNA、蛋白水平均下调, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而 TLR2 表达两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。URSA 患者蜕膜中 CD4⁺CD25^{high} T 细胞低于正常早孕妇女蜕膜($P < 0.01$), TLR4、TLR9 的表达与 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞比例呈显著相关($P < 0.01$, $P < 0.05$)。【结论】URSA 患者蜕膜中的 CD4⁺CD25^{high} Treg 减少与 TLR4、TLR9 低表达相关, TLRs 异常表达可能参与 URSA 的发生。

关键词: Toll 受体; 调节性 T 细胞; 蜕膜; 复发性流产

中图分类号: R714 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2014)04-0559-06

Expression of Toll-like Receptors in Decidual Regulatory T cells from URSA Patients and Their Significance

MEI Shan-shan¹, QU Yan-xia², ZHANG Guang-lan¹, HE Ping¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510170, China; 2. Department of Genetics and Eugenics, Guangzhou Research Institute for Population and Family Planning, Guangzhou 510410, China)

Abstract:【Objective】To detect TLR2, TLR4, and TLR9 expression of decidual CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in URSA patients and explore the immune mechanism of TLRs involved in the pathogenesis of URSA.【Methods】We selected 30 URSA patients with early embryo growth arrest by ultrasonography from the Department of Obstetrics and Gynecology at the Women and Children's Medical Center between January 2013 and November 2013 to participate in the study. Meanwhile, 30 healthy pregnant women undergoing elective termination during the first trimester were conducted as control group. Decidual samples were obtained from URSA patients with spontaneous abortion and patients with induced abortion. The proportions of CD4⁺CD25^{high} Treg in deciduas were calculated by flow cytometry and RT-PCR and Western blotting were performed to detect TLR2, TLR4 and TLR9 expression of CD4⁺CD25^{high} Treg in deciduas.【Results】In deciduas, TLR4, and TLR9 expression of CD4⁺CD25^{high} Treg in URSA patients were down-regulated in mRNA and protein levels, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$), however, no statistically significance was found in TLR2 expression of CD4⁺CD25^{high} Treg between the two groups ($P > 0.05$). The percentage of CD4⁺CD25^{high} Treg in deciduas from URSA patients was significantly lower than that from normal pregnant women ($P < 0.01$), which were significantly positive correlations with TLR4 and TLR9 expression ($P < 0.01$, $P < 0.05$).【Conclusion】The reduction in decidual CD4⁺CD25^{high} Treg in URSA patients is correlated with lower TLR4 and TLR9 expressions. Abnormal expression of TLRs may involve in the pathogenesis of URSA.

Key words: toll-like receptor; regulatory T cells; decidua; recurrent spontaneous abortion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(4): 559-564]

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 广东省人口和计划生育委员会科研项目(20133095)

作者简介: 梅珊珊, 副主任医师, 主要研究方向: 复发性流产免疫机制, E-mail: meishanshan@126.com

反复自然流产病因复杂,其中仍有相当部分患者病因不清楚,临床上称之为原因不明复发性自然流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA),目前研究认为 URSA 主要与免疫异常有关^[1,2]。研究发现在机体免疫系统中发挥重要作用的一类模式识别受体如 Toll 受体(Toll-like receptors, TLR)在妊娠相关组织中表达。TLRs 不仅表达于免疫细胞,而且也表达于非免疫细胞如胎盘、蜕膜细胞、滋养细胞,不同妊娠时期他们的表达程度亦有不同,提示在母胎界面上 TLR 作为免疫细胞与胚胎组织相互联系的纽带对妊娠的成功维持有重要影响^[3-8]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(T regulatory cell, Treg)是参与免疫耐受一类重要的调节性 T 细胞,TLRs 在 CD4⁺CD25⁺ Treg 亦有选择性分布,并对其细胞增殖及抑制功能发挥重要调节作用^[9-10]。近来研究发现 TLR2、TLR4、TLR9 在流产中发挥一定的作用,但作用机制并不完全清楚^[11-13]。既往研究发现 URSA 患者蜕膜组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数目及叉状头转录因子 p3(forkhead box p3, FOXP3)表达下降,我们推测这种变化有可能与 TLR 的表达差异有关^[14]。本研究通过对 URSA 患者蜕膜组织 CD4⁺CD25^{high} Treg 中 TLR2、TLR4、TLR9 表达变化的分析,有助于进一步理解 URSA 的免疫学发病机制,为 URSA 临床免疫治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 研究对象及分组

选择从 2013 年 1 月至 2013 年 11 月就诊于广州市妇女儿童医疗中心妇产科的 URSA 患者 30 例,年龄 25 ~ 37(33.5 ± 2.8)岁,孕次 3 ~ 5 次,既往自然流产次数 2 ~ 4 次,月经周期规律(28.9 ± 4.0)d,此次 B 超确认胚胎已停育,孕周为 7 ~ 12(8.9 ± 1.5)周。URSA 的诊断标准参考既往文献^[14]。同期选取就诊于我院门诊要求人工流产的计划外妊娠的正常早孕患者 30 例为对照组,妊娠期间无先兆流产的症状和体征,超声确定胚胎发育正常,年龄 24 ~ 38(34.2 ± 3.2)岁,人工终止妊娠时孕周 7~11(8.7 ± 1.6)周,月经周期规律(29.1 ± 3.5)d,患者既往有妊娠史,无死产、死胎、自然流产病史,无家族遗传及自身免疫性疾病史,同时排除内分泌、生殖系统解剖异常及生殖系统感染。两组患者年

龄、月经周期、孕周无统计学差异($P > 0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准,所有研究对象都知情同意。

1.2 蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 分离及纯度测定

收集胚胎停育的 URSA 患者、及人工流产患者清宫术后的新鲜蜕膜组织,PBS 液反复漂洗过血后,将蜕膜组织剪切成 1 毫米的小片,通过 400 目尼龙网过滤器,获得单细胞悬液。Ficoll 密度梯度离心纯化淋巴细胞。收集细胞,一部分用于流式细胞仪分析 CD4⁺CD25^{high} Treg 比例,另一部分细胞通过抗 CD4、CD25 的单克隆抗体包被的微柱分离阳性选择 CD4⁺CD25^{high} Treg,按照细胞磁珠分离试剂盒说明书进行(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)。PBS 重悬分离的 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞,将细胞浓度调至 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$;取 100 μL 细胞悬液,分别加入 FITC-anti-CD4、APC-anti-CD25 各 5 μL (BD Pharmingen, USA),充分混匀,室温下避光温育 30 min;PBS 洗涤去除未结合的抗体后,再加 PBS 200 μL 重悬细胞,上流式细胞仪检测分离细胞的纯度。

1.3 蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 流式细胞仪分析

收集蜕膜分离的淋巴细胞约 1×10^6 个,分别加入 FITC-anti-CD4、APC-anti-CD25 各 5 μL (BD Pharmingen, USA),充分混匀,室温下避光温育 30 min;PBS 洗涤去除未结合的抗体后,再加 PBS 200 μL 重悬细胞,上流式细胞仪检测 CD4⁺CD25^{high} Treg 的比例(Becton Dickinson FACS Calibua, USA)。

1.4 荧光定量 RT-PCR 测量 TLR2、TLR4、TLR9 mRNA 表达

根据 Genbank 提供的人基因序列,用 Primer Premier5.0 软件设计引物,人 GAPDH 为内参基因,引物由上海博亚生物工程技术服务公司合成,引物序列见表 1。从纯化的 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞(1×10^6)中提取 RNA,采用 Trizol 试剂一步法,按照试剂盒说明书提取。按照转录试剂盒(FSK-100,上海 TOYOBO 公司)说明书进行逆转录操作。实时荧光定量反应总反应体系为 20 μL ,其中 SYBR Premix ExTaq 7 μL 、cDNA 1 μL 、ddH₂O 10 μL 及上下游引物各 1 μL ,在 Light Cycler PCR 仪中进行 Realtime-PCR 反应。PCR 反应参数:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、Tm 10 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,共 50 个循环。最后 65 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 进行融解曲线分析。根据软件分析,以

GAPDH的mRNA表达量为内参,得出待测基因的相对表达量。

表1 PCR引物序列及扩增片段长度

Table 1 Sequences of PCR primers and lengths of amplicons

Premiers	Sequence	Length/bp
TLR2	5-'TGTGAACCTCCAGGCTCTG-3'	256
	5-'GTCCATATTTCCCACTCTCAGG-3'	
TLR4	5-'ACAGAAGCTGGTGGCTGTG-3'	291
	5-'TCTTTAAATGCACCTGTTGG-3'	
TLR9	5-'GCAGTCAATGGCTCCAGTTC-3'	104
	5-'GCGGTAGCTCCGTGAATGACTG-3'	
GAPDH	5-'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	226
	5-'GAAGATGCTGATGGGATTC-3'	

1.5 Western-blot 检测 TLR2、TLR4、TLR9 蛋白的表达

从纯化的 CD4⁺CD25^{high} Treg (1 × 10⁶) 中提取的蛋白质,BCA 法测定蛋白含量。通过 10% SDS-PAGE 分离蛋白后,将蛋白转移到 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h, 洗涤后加入一抗: 兔抗 TLR2、TLR4、TLR9 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司) 及 β-actin 抗体, 4 °C 冰箱孵育过夜、漂洗后加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h、再次漂洗后,用化学发光法 (ECL) 显色,用 Quantity-One 图像分析软件对 TLR2、TLR4、TLR9、β-actin 条带的灰度比值进行相对定量分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件建立数据库,“One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test” 作数据正态性检

验;正态分布的定量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验; Pearson 线性相关分析 CD4⁺CD25^{high} Treg 比例与 TLRs 蛋白表达间的关系,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞的纯化

蜕膜组织制备成的单个核细胞,经磁珠分离纯化后获得 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞,采用流式细胞仪鉴定并分析其纯度。分离的 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞的纯度可达到 96.2% (图 1)。

2.2 蜕膜调节性 T 细胞 TLRs 表达

蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞中 TLR2、TLR4、TLR9 在基因、蛋白质水平都有表达。与正常对照组相比,URSA 患者蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞 TLR4、TLR9 受体明显下调,差异有统计学意义 (*P* < 0.01, 图 2, 表 2); TLR2 表达两者差异无统计学意义 (*P* > 0.05, 图 2, 表 2)。

2.3 蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞水平及与 TLRs 蛋白表达相关性

与正常对照组相比,URSA 患者蜕膜淋巴细胞中 CD4⁺CD25^{high} Treg 比例明显减低 (0.56 ± 0.23 Vs 1.38 ± 0.27 , *P* < 0.01, 图 3); CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺ 比值也明显降低 (15.8 ± 4.6 vs 6.4 ± 3.2 , *P* < 0.01)。TLR4 表达与 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞呈显著相关 ($r = 0.824$, *P* < 0.01), TLR9 表达与 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞亦呈显著相关 ($r = 0.721$, *P* < 0.05)。但 TLR2 表达与 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞无相关性 ($r = 0.085$, *P* > 0.05)。

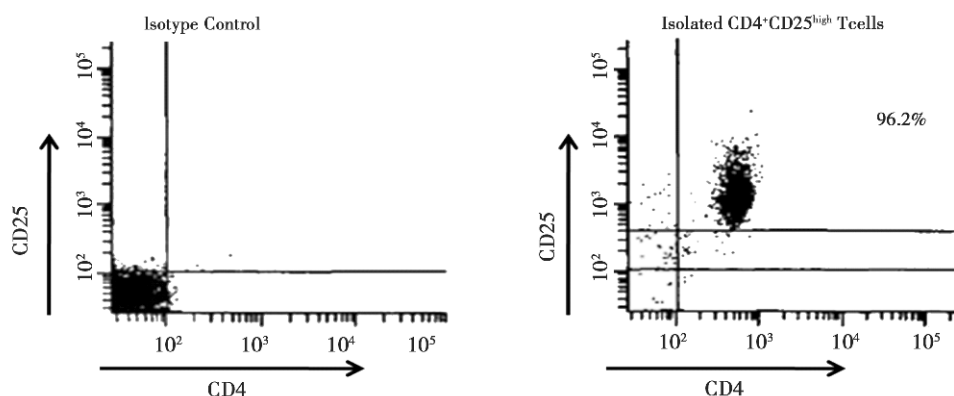


图1 磁珠分选后用流式细胞仪检测 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞纯度

Fig.1 Flow cytometry for the purity of decidual CD4⁺CD25^{high} Treg

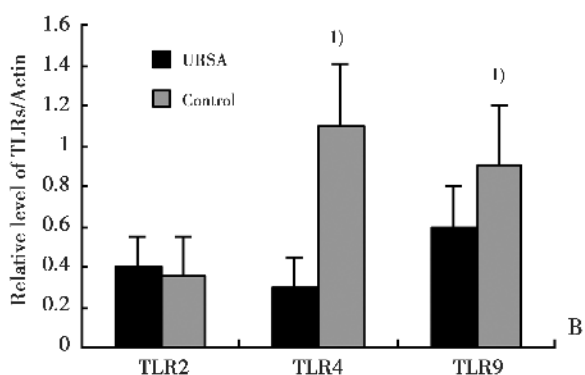
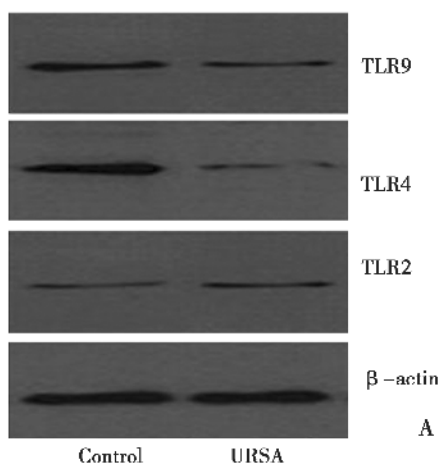


图 2 URSA 患者蜕膜 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞 TLR 蛋白表达

Fig.2 TLR proteins expressions in URSA patients

A: TLR protein expression in decidual CD4⁺CD25^{high} Treg was evaluated using western-blot analysis. B: Protein bands were analyzed using scanning densitometry. β -Actin was used for normalization of protein levels.

表 2 TLR2, TLR4, TLR9 mRNA 定量 PCR 检测

Table 2 TLR2, TLR4, and TLR9 mRNA were measured by real-time PCR ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	TLR2 mRNA	TLR4 mRNA	TLR9 mRNA
URSA	30	0.50 \pm 0.09	1.39 \pm 0.19 ¹⁾	1.26 \pm 0.23 ¹⁾
Control	30	0.47 \pm 0.06	1.92 \pm 0.25	1.68 \pm 0.27

The quantity of mRNA was normalized to that of GAPDH.

1) URSM vs. control, $P < 0.01$

3 讨论

3.1 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞与原因不明复发性流产

近代生殖免疫学研究表明妊娠成功需要母体

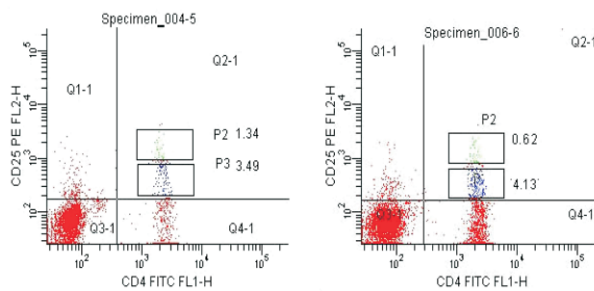


图 3 蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 流式细胞仪检测

Fig.3 Decidual CD4⁺CD25^{high} Treg flow cytometry

A: Normal control; BURSA Patient

免疫系统对胚胎抗原的免疫耐受。母-胎免疫耐受的建立和维持是由多种细胞和细胞因子相互参与和协同的结果。母胎免疫耐受机制的失调会导致母体对胚胎的排斥, 常常出现反复自然流产等其他妊娠并发症。调节性 T 细胞在机体免疫系统中发挥重要调节作用, 抑制效应细胞的增殖及免疫活性。目前已经发现了多种表型的调节性 T 细胞, 其中 CD4⁺CD25⁺ Treg 研究最多, 它是机体以“主动”方式获得和维持自身免疫耐受的一种重要方式。目前关于 CD4⁺CD25⁺ Treg 免疫效应的调节机制主要包括 FexP3、细胞因子、Toll 样受体、树突状细胞及共刺激分子的调节 [15]。近年研究表明 URSA 的发生与母胎免疫耐受紊乱有关, CD4⁺CD25^{high} Treg 数量降低和功能缺陷是 URSA 发病的重要原因 [9, 16]。本研究发现 URSA 患者蜕膜组织中 CD4⁺CD25^{high} Treg 数目下降, 表明 CD4⁺CD25^{high} Treg 有利于维持正常妊娠, 进一步证实 CD4⁺CD25^{high} Treg 的减少参与 URSA 发生的观点。

3.2 TLR 与不明原因复发性自然流产

Toll 样受体是一类进化保守的模式识别受体, 在天然免疫与获得性免疫之间的发挥重要的纽带作用。妊娠期母胎界面存在强烈的免疫反应, 母胎免疫耐受是妊娠成功所必需的。近年的研究发现, 母胎界面的羊膜细胞、滋养细胞表达某些 TLRs, 识别病原体从而参与先天性免疫反应, 对妊娠结局产生影响 [6, 17]。蜕膜是母胎界面重要组成部分, 除了营养作用外, 还是一种功能复杂的免疫器官, 它主要由蜕膜基质细胞、免疫细胞及侵蚀至蜕膜绒毛外的细胞滋养层细胞构成, 三者中任一种组分出现异常都可能导致妊娠失败或妊娠并发症的发生, 因此对蜕膜细胞功能研究是目前生殖免疫

学研究的热点。翟洪波等^[18]通过免疫组织化学的方法检测绒毛及蜕膜组织中 TLR2、TLR4 的表达情况,发现 URSA 患者蜕膜腺体上皮细胞、绒毛中的合体滋养细胞中 TLR4 的表达明显增强,而 TLR2 的表达无显著性变化,提示 TLR4 可能参与 URSA 的发病机制。杜久伟等^[19]检测 URSA 患者外周血单个核细胞(PBMC)中 TLR2、TLR4 的表达水平,并与 CD4⁺CD25⁺ Treg 数目相关性进行了分析,结果发现 URSA 患者外周血 TLR4 mRNA 及表达 TLR4 蛋白的 PBMC 比例明显高于正常妊娠对照组,但 TLR2 mRNA 及表达 TLR2 蛋白的 PBMC 比例两组无明显差异。研究表明 URSA 患者可能通过 TLR4 影响了 CD4⁺CD25⁺ Treg 的数量和功能,进而导致母胎免疫紊乱,引起自然流产的反复发生。本研究对蜕膜组织 CD4⁺CD25^{high} Treg 中 TLR2、TLR4、TLR9 受体表达进行分析,结果发现 URSA 患者 TLR2 受体表达未见明显变化,但 TLR4 表达水平下调,并且与 CD4⁺CD25^{high} Treg 比例下降成正相关。TLR4 研究结果似乎与前面研究不一致,主要是由于 TLRs 在蜕膜组织各细胞组份表达分布不同,导致针对不同细胞的研究可能存在差异有关。由于 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞比例仅占 PBMC 1%~2%,外周血 PBMC 中 TLR4 表达增高可能只是源于效应性 T 细胞及树突状细胞(Dendritic cells, DC)等其他单个核细胞的高表达,抑或是外周血与蜕膜组织间存在差异,具体情况仍需进一步研究证实。本研究还首次发现 URSA 患者蜕膜 CD4⁺CD25^{high} Treg 中 TLR9 表达水平下调,并且也与 CD4⁺CD25^{high} Treg 比例下降成正相关。我们认为 TLR4、TLR9 可能会协同调节 Treg 功能,从而参与 URSA 发病。

研究发现 TLR4 的配体脂多糖(LPS)可以诱导 Treg 上调多种激活受体的表达,从而增强了 Treg 增殖能力及免疫抑制活性^[20]。本研究发现 URSA 患者蜕膜 Treg 中 TLR4 表达水平下调,导致 CD4⁺CD25^{high} Treg 比例及免疫抑制功能下降,从而引起母胎界面免疫紊乱,导致 URSA 发生。潘荣明等^[21]发现在 TLR9 配体 CPG-ODN 刺激后,蜕膜组织 TLR9 表达显著升高,IL-6 分泌也显著增加,表明功能性表达于蜕膜的 TLR9 参与了母胎界面免疫微环境的调节。朱琴玲等^[22]研究发现 CPG 刺激可使 NOD 小鼠的胚胎吸收率显著增高,而 BALB/c 小鼠的胚胎吸收率没有发生明显改变,表明 NOD

小鼠对 CPG 刺激呈高度敏感,CPG 激活 TLR9 提高蜕膜巨噬细胞的相对数量、增强 TNF- α 表达,从而导致胚胎吸收率增高。本研究发现 URSA 患者蜕膜 Treg 中 TLR9 表达下调,CD4⁺CD25^{high} Treg 比例下降,我们推测可能与 TLR9 在蜕膜组织不同细胞分布不同有关,另外 TLR9 通过促进蜕膜巨噬细胞增殖及炎性因子释放对 Treg 细胞的分化发育及功能会产生影响,有研究发现在炎性环境中,巨噬细胞 IL-23、IL-6 表达增加,可促进 Treg/Th17 细胞平衡向 Th17 倾斜^[23]。近来研究发现 TLR9 的配体 CPG 可以促进 Treg 增殖,但是可以完全抑制 Treg 的免疫抑制功能^[24],URSA 患者蜕膜 Treg 中 TLR9 表达下调,CD4⁺CD25^{high} Treg 减少,但 Treg 的免疫调节功能究竟如何变化,仍需要进一步研究。

总之,母胎界面上 TLR 作为免疫细胞与胚胎组织相互联系的纽带并形成复杂的免疫调控网络,对其功能研究的不断深入,有助于进一步理解 URSA 的免疫学发病机制。本研究发现 URSA 患者蜕膜 Treg 细胞中 TLR4、TLR9 表达下调,提示 TLR 异常表达可能参与 URSA 的发病机制,从而为 URSA 免疫治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] Cramer DW, Wise LA. The epidemiology of recurrent pregnancy loss[J]. *Semin Reprod Med*, 2000, 18(4): 331-339.
- [2] 林其德. 原因不明复发性流产的基础与临床研究进展[J]. *中华妇产科杂志*, 2003, 38(8): 481-483.
Lin QD. Advances in basic and clinical research of unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Chin J Obstetr Gynecol*, 2003, 38(8): 481-483.
- [3] Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta[J]. *Immunology*, 2002, 107(1): 145-151.
- [4] Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, et al. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis [J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(1): 47-54.
- [5] Canavan TP, Simhan HN. Innate immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface[J]. *J Reprod Immunol*, 2007, 74(1-2): 46-52.
- [6] Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, et al. Divergent

- trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs[J]. *J Immunol*, 2004, 173(7): 4286-4296.
- [7] Krikun G, Lockwood CJ, Abrahams VM, et al. Expression of Toll-like receptors in the human decidua [J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22(8): 847-854.
- [8] Nitsche JF, Jiang SW, Brost BC. Toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression on maternal neutrophils during pregnancy [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 64(6): 427-434.
- [9] Mei S, Tan JP, Chen H, et al. Changes of CD4+CD25^{high} regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(6): 2244-2247.
- [10] Wild CA, Brandau S, Lindemann M, et al. Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 136(12): 1253-1259.
- [11] Thaxton JE, Romero R, Sharma S. TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes [J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 1144-1154.
- [12] Rindsjö E, Holmlund U, Sverremark-Ekström E, et al. Toll-like receptor-2 expression in normal and pathologic human placenta [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(3): 468-473.
- [13] Liu H, Redline RW, Han YM, et al. *Fusobacterium nucleatum* induces fetal death in mice via stimulation of TLR4-mediated placental inflammatory response [J]. *J Immunol*, 2007, 179(4): 2501-2508.
- [14] 梅珊珊, 谭剑平, 陈慧, 等. CD4+CD25^{high} T 细胞和 FOXP3 在不明原因复发性自然流产中的作用 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(4): 461-466.
Mei SS, Tang JP, Chen H, et al. Role of CD4+CD25^{high} T cells and FOXP3 in unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *J SUN Yat-sen Univ: Med Sci*, 2010, 31(4): 461-466.
- [15] Suttmüller R, Garritsen A, Adema GJ. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66 (Suppl3): iii91-95.
- [16] Sasaki Y, Sasaki M, Miyazaki S, et al. Decidual and peripheral blood CD4+CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases [J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(5): 347-353.
- [17] Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, et al. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells [J]. *J Immunol*, 2005, 175(12): 8096-8104.
- [18] 翟洪波, 徐键. TLR2 和 TLR4 在原因不明复发性流产绒毛和蜕膜中的表达及其意义 [J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(6): 80-83.
Zhai HB, Xu J. Expression of TLR2 and TLR4 on deciduas and villi in unexplained recurrent spontaneous abortion and its significance [J]. *J Med Res*, 2011, 40(6): 80-83.
- [19] 杜久伟, 朱瑞, 王飞, 等. 原因不明反复自然流产患者外周血 TLR2、TLR4 表达及 CD4+CD25⁺Treg 细胞的变化 [J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(5): 360-362.
Du JW, Zhu R, Wang F, et al. Expressions of TLR2 and TLR4 and the change of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood from the patients with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Chin J Clin Lab Sci*, 2013, 31(5): 360-362.
- [20] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(4): 403-411.
- [21] 潘荣明, 陈益民, 刘永林, 等. 黄芪多糖对孕早期蜕膜 Toll 样受体 9 (TLR9) 表达与功能的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(11): 2483-2485.
Pan RM, Chen YM, Liu YL, et al. Effect of expression and function of APS on Toll-like receptor 9 (TLR9) of early pregnancy decidua [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2012, 30(11): 2483-2485.
- [22] 朱琴玲, 李莉平, 秦晓黎, 等. 通过 TLR9 途径活化巨噬细胞导致小鼠流产的机制研究 [J]. *现代免疫学*, 2011, 31(6): 473-477.
Zhu QL, Li LP, Qin XL, et al. Mechanism of activation of macrophages by TLR9 pathway induced abortion in mice [J]. *J Modern Immunol*, 2011, 31(6): 473-477.
- [23] Zhuang Y, Shi Y, Liu XF, et al. *Helicobacter pylori*-infected macrophages induce Th17 cell differentiation [J]. *Immunobiology*, 2011, 216(1-2): 200-207.
- [24] Chiffolleau E, Heslan JM, Heslan M, et al. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4⁺ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4⁺CD25⁺ T cell [J]. *Int Immunol*, 2007, 19(2): 193-201.

(编辑 徐杰)