URSA 患者外周血免疫细胞特征及其意义的临床研究

陈 慧, 陈立斌, 宋小侠, 谭剑平, 孟丽丽, 王蕴慧, 张 睿, 刘颖琳, 张建平*
(中山大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨不明原因复发性流产(URSA)患者处于难免流产和流产后非孕状态等不同临床情况时外周血免疫细胞特征及其临床意义。【方法】回顾性分析 2008–2010 年于我院诊疗的自然流产患者 184 例,就诊时为早期妊娠难免流产的 URSA 患者 55 例(URSA 难免流产组),同期早期妊娠难免流产的偶发流产患者(sporadic abortion, SA) 23 例,作为对照(SA 难免流产组)。此外,就诊时为未孕状态,距最后一次流产 3 个月以上 URSA 患者 62 例(URSA 非孕组),同期未孕状态,距流产 3 个月以上 SA 患者 44 例作为对照(SA 非孕组)。记录患者一般情况,包括年龄、月经周期。使用流式细胞术检测外周血免疫细胞,包括 T 淋巴细胞亚群:T 细胞比例、Th 细胞比例、Ts 细胞比例、Th/Ts;其他免疫细胞:白细胞数量、淋巴细胞总数量(LYM 细胞)、B 细胞比例、自然杀伤细胞(NK 细胞)比例。【结果】难免流产状态:URSA 患者与 SA 患者 Th/Ts 均异常升高,前者为 2.77 ± 5.16,后者为 3.67 ± 6.12,URSA 患者与 SA 患者比较,前者 NK 细胞比例明显升高,为(15.57 ± 6.45)%,后者仅为(11.38 ± 3.66)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。非孕状态:URSA 患者与 SA 患者比较,URSA 患者 WBC 数量及 NK 细胞比例高于 SA 组,前者为$(6.27 \pm 1.09) \times 10^9$、(18.26 ± 7.88)%,后者为$(5.59 \pm 1.16) \times 10^9$、(11.0 ± 6.8)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】在发生早期妊娠难免流产时,URSA 患者与 SA 患者均存在一定的免疫紊乱,共同的表现是特异性免疫方面均有 Th/Ts 异常升高,不同的表现是,URSA 患者在非特异性免疫方面存在 NK 细胞比例增高。在非孕状态,SA 患者免疫紊乱得到调整回复正常,URSA 患者仍然存在一定的免疫紊乱,主要表现在非特异性免疫方面,以 WBC 数量和 NK 细胞比例增高为主。临床工作中应注意监测 URSA 患者的免疫状态。

关键词: 复发性流产; 妊娠; 免疫耐受; 免疫细胞; 难免流产
中图分类号: R714.21 **文献标志码**: A **文章编号**: 1672-3554(2010)04-0467-05

Clinical Research on Characteristics and Significance of Peripheral Blood Immune Cells in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion Patients

CHEN Hui, CHEN Li-bin, SONG Xiao-xia, TAN Jian-ping, MENG Li-li, WANG Yun-hui, ZHANG Rui, LIU Ying-lin, ZHANG Jian-ping*
(Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the clinical features of peripheral blood immune cells in unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) patients when the patients are in the state of inevitable abortion or non-pregnancy, and to provide clinical basis for URSA prevention and treatment.【Methods】A retrospective analysis of 184 cases of URSA and the spontaneous abortion (SA) patients was conducted, and all patients were divided into 4 groups. URSA inevitable abortion group including 55 cases inevitable abortion in early pregnancy, while 23 cases in SA inevitable abortion group. In addition, 62 cases in the URSA non-pregnant group, while 44 cases in the SA non-pregnant group, the visiting time of the URSA non-pregnant group and the SA non-pregnant group were more than 3 months from last abortion. Records of general situation of all the patients are made including age and menstrual cycle. The peripheral blood immunocytes were tested by using flow cytometry, including T cell ratio, Th cell ratio, Ts cell ratio, Th/Ts, the number of white blood cells (WBC), the number of total lymphocytes (LYM cells), B cell ratio, and

收稿日期: 2010-05-15
基金项目: 中山大学医科青年教师科研启动基金(2007016),广东高校优秀青年创新人才培育项目(粤财教[2008]342 号),教育部博士点新教师基金(20090171120075)
作者简介: 陈慧,医学博士,主治医师,研究方向围产医学和生殖免疫学; * 通信作者:张建平,博士生导师,教授,E-mail:zjp2570@126.com

natural killer cells (NK cells) ratio. 【Results】 Th/Ts is higher abnormally in inevitable abortion groups of URSA and SA. The former is 2.77 ± 5.16, and the later is 3.67 ± 6.12. NK cells ratio is obviously higher in the URSA inevitable abortion group which is (15.57 ± 6.45)% and that in the SA inevitable abortion group is (11.38 ± 3.66)%, and there is significant difference between the two groups ($P < 0.05$). The number of WBC is (6.27 ± 1.09) × 10^9 in the URSA non-pregnant group and (5.59 ± 1.16) × 10^9 in the SA non-pregnant group ($P < 0.05$). The ratio of NK cells is (18.26 ± 7.88)% in the URSA non-pregnant group and (11.00 ± 6.80)% in the SA non-pregnant group ($P < 0.05$). 【Conclusion】 When early pregnancy abortion is inevitable, patients of URSA and SA patients are in certain immunodeficiency. The common aspect is the abnormally Th/Ts increased in specific immunity, and the difference is that the proportion of NK cells of non-specific immunity is increasing in URSA but not in SA. In non-pregnant state, the SA patients with immunodeficiency may be adjusted back to normal when spontaneous abortion have happened more than 3 months before, but the immune disorder of URSA patients is still remained, mainly in the respect of non-specific immune for WBC number and percentage of NK cells increasing. During clinical work, we should pay attention to immune status of the URSA patients.

Key words: spontaneous abortion; pregnancy; immunological tolerance; immunocyte; inevitable abortion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(4):467-471]

妊娠时母体免疫系统对胚胎表现出免疫营养和免疫防护而非免疫攻击,一旦这种免疫耐受遭到破坏,可导致病理妊娠的发生[1]。在各种病理妊娠中,复发性自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是颇为重要的一个,RSA 指连续遭受 2 次或 2 次以上在妊娠 20 周前的妊娠产物或胎儿(体质量 < 500 g)丢失[2]。据统计,其发病率在 5%左右[3-4]。RSA 意味着不断发生的妊娠失败,在生理和心理方面对育龄妇女产生诸多不良影响,故 RSA 的诊疗成为生殖学研究热点。引起 RSA 发病的因素较多,除子宫畸形、内分泌因素和遗传因素及感染致胎儿畸形等,仍有 60% ~ 70% 患者病因不明,即原因不明复发性自然流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA),现认为大多数 URSA 与免疫异常有关。本研究旨在观察 URSA 患者在难免流产与非孕时的免疫状态,并与偶发流产患者(sporadic abortion, SA)进行比较,为 URSA 的防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 分 组

1.1.1 URSA 难免流产组 2008 年至 2010 年就诊于我院的 URSA 难免流产患者 55 例,本次早期妊娠流产时间为孕 6 ~ 10 周,符合以下条件:①连续发生 2 次及 2 次以上的早期自然流产;②夫妇双方染色体核型正常;③盆腔 B 超、宫腔镜排除生殖道器质性病变;④宫颈分泌物检查沙眼衣原体、解脉支原体排除生殖道感染;⑤生殖内分泌激素测定无异常,无内分泌疾病史;⑥抗磷脂抗体、抗核抗体等自身免疫抗体阴性;⑦男方精液常规检查正常;⑧就诊时为早期妊娠,有腹痛或阴道流血症状,经检查阴道彩超证实为胚胎停育、难免流产;⑨近 3 个月未使用免疫药物或免疫治疗。

1.1.2 SA 难免流产组 2008 年至 2010 年就诊于我院,既往无自然流产病史,就诊时难免流产患者 23 例,此次就诊时为早期妊娠孕 6 ~ 12 周,有腹痛或阴道流血症状,经检查阴道彩超证实胚胎停育、难免流产。既往无内分泌疾病、免疫疾病史。行盆腔 B 超、宫颈分泌物检查沙眼衣原体、解脉支原体、生殖内分泌激素、男方精液常规检查正常。

1.1.3 URSA 非孕组 2008 年至 2010 年就诊于我院的 URSA 患者 62 例,符合以下条件:①连续发生 2 次及 2 次以上的早期自然流产;②夫妇双方染色体核型正常;③盆腔 B 超、宫腔镜排除生殖道器质性病变;④宫颈分泌物检查沙眼衣原体、解脉支原体排除生殖道感染;⑤生殖内分泌激素测定无异常,无内分泌疾病史;⑥抗磷脂抗体、抗核抗体等自身免疫抗体阴性;⑦男方精液常规检查正常或治疗后恢复正常;⑧封闭抗体阴性;⑨就诊时为非妊娠期,距最后一次流产 3 个月以上。

1.1.4 SA 非孕组 2008 年至 2010 年就诊于我院的 SA 患者 44 例(既往自然流产 1 次者)[5-7]。进行生殖保健咨询,无内分泌疾病、免疫疾病史,就诊时为非妊娠期,距流产 3 个月以上。行盆腔 B 超、宫颈分泌物检查沙眼衣原体、解脉支原体、生殖内分泌激素、男方精液常规检查正常。

1.2 临床处理

难免流产患者均予以清宫。

1.3　标本采集

URSA 和 SA 难免流产患者,于清宫前抽取外周血 3 mL,URSA 和 SA 非孕患者，月经第 5 ~ 8 天抽取外周血 3 mL,均送流式细胞仪室检测。

1.4　检测指标

T 淋巴细胞亚群:T 细胞比例、Th 细胞比例、Ts 细胞比例、Th/Ts($CD4^+T/CD8^+T$)。其他免疫细胞:白细胞数量、淋巴细胞总数量(LYM 细胞)、B 细胞比例、自然杀伤细胞(natural killer cell，NK 细胞)比例。

1.5　检测方法

将各组静脉血 3 mL，常规肝素抗凝后使用 Ficoll-Hypaque 法密度离心分离外周血单个核细胞。将细胞悬液使用 CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-EDC/CD3-PC5、CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-EDC/CD3-PC5,通过孵育、透化等处理后,采用 BECKMAN COULTER　FC 500 流式细胞仪，使用 Cell Quest 软件分选和计算 T 细胞亚群,包括 T 细胞比例、Th 细胞比例、Ts 细胞比例、Th/Ts（$CD4^+T/CD8^+T$),以及白细胞数量、LYM 细胞数量、B 细胞比例、NK 细胞比例。

1.6　统计学方法

使用 SPSS 13.0 软件，计数资料以均数 ± 标准差表示,组间比较采用两独立样本 t 检验或秩和检验。组内比较采取配对资料 t 检验或秩和检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　一般情况

URSA 非孕组月经周期短于 SA 非孕组,$P < 0.05$(表 1、2)。

表 1　难免流产状态一般情况

Table 1　General situation records of inevitable abortion patients

Groups	n	Age (years)	Menstrual cycle (days)
URSA inevitable abortion	55	32.28 ± 5.00	31.44 ± 4.34
SA inevitable abortion	23	32.75 ± 4.58	29.33 ± 1.00
P		0.702	0.083

2.2　难免流产状态免疫细胞的比较

URSA 患者与 SA 患者 Th/Ts($CD4^+T/CD8^+T$)均异常升高，前者为 2.77 ± 5.16，后者为 3.67 ± 6.12(判断标准为 $CD4^+T/CD8^+T < 1.0$ 或 > 2.0)[6]。URSA 患者与 SA 患者比较，前者 NK 细胞比例明显升高,为(15.57 ± 6.45)%,差异有统计学意义,$P < 0.05$(表 3,图 1、2)。

表 2　流产后非孕状态一般情况

Table 2　General situation records of non-pregnant patients

Groups	n	Age (years)	Menstrual cycle (days)
URSA non-pregnant	62	29.43 ± 3.44	31.24 ± 4.92
SA non-pregnant	44	30.05 ± 5.04	34.50 ± 7.47[1)]
P		0.617	0.026

1) Compared with URSA non-pregnant group, $P < 0.05$

表 3　难免流产状态免疫细胞情况

Table 3　Peripheral blood immunocytes records of inevitable abortion patients

Index	URSA inevitable abortion group $n = 55$	SA inevitable abortion group $n = 23$	P
T cell			
T cell ratio (%)	70.89 ± 6.55	73.67 ± 5.75	0.243
Th cell ratio (%)	38.76 ± 5.24	43.18 ± 3.89	0.019[1)]
Ts cell ratio (%)	25.66 ± 6.14	23.78 ± 5.84	0.411
Th/Ts ($CD4^+T/CD8^+T$)	2.77 ± 5.16	3.67 ± 6.12	0.083
Other immunocytes			
WBC (10^9/L)	7.58 ± 2.30	6.77 ± 0.96	0.259
LYM (10^9/L)	2.07 ± 0.57	1.82 ± 0.39	0.182
B cell (%)	14.24 ± 4.00	13.90 ± 4.79	0.446
NK cell ratio (%)	15.57 ± 6.45	11.38 ± 3.66	0.029[1)]

Th, Ts, Th/Ts, the number of white blood cells (WBC), the number of total lymphocytes (LYM cells), B cell ratio, and natural killer cells (NK cells) ratio. 1) $P < 0.05$

2.3　流产后非孕状态免疫细胞的比较

URSA 患者与 SA 患者比较,T 淋巴细胞亚群的各项指标表现为,URSA 组 Th/Ts（$CD4^+T/CD8^+T$）高于偶发流产组，前者为 6.72 ± 2.49，后者为 2.16 ± 2.83,差异有统计学意义($P < 0.05$);其他免疫细胞指标表现为,URSA 患者 WBC 数量及 NK 细胞比例高于 SA 组,前者为(6.27 ± 1.09)%、(18.26 ± 7.88)%,后者为(5.59 ± 1.16)%、(11.00 ± 6.80)%,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 4,图 3、4)。

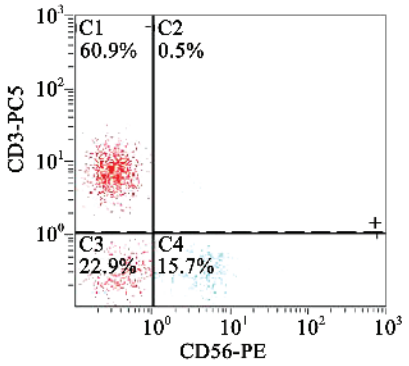


图 1 流式细胞术检测 URSA 难免流产患者免疫细胞

Fig.1 Flow cytometry of immune cells in URSA patients with inevitable abortion

NK cell 15.7%

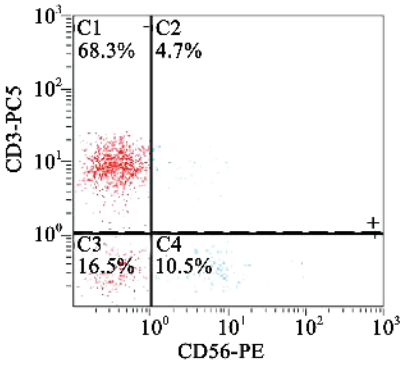


图 2 流式细胞术检测 SA 难免流产患者免疫细胞

Fig.2 Flow cytometry of immune cells in SA patients with inevitable abortion

NK cell 10.5%

表 4 流产后非孕状态免疫细胞情况

Table 4 Records of peripheral blood immunocytes of non-pregnant patients

Index	URSA non-pregnant group $n = 62$	SA non-pregnant group $n = 44$	P
T cell			
T cell ratio (%)	67.64 ± 8.83	69.40 ± 8.34	0.451
Th cell ratio (%)	35.32 ± 6.97	37.12 ± 5.34	0.301
Ts cell ratio (%)	25.47 ± 5.71	24.42 ± 9.57	0.297
Th/Ts ($CD4^+T/CD8^+T$)	1.45 ± 0.40	1.60 ± 0.46	0.202
Other immunocytes			
WBC ($10^9/L$)	6.27 ± 1.09	5.59 ± 1.16	0.026[1)]
LYM ($10^9/L$)	2.28 ± 0.63	2.02 ± 0.39	0.056
B cell ratio (%)	12.77 ± 4.16	13.69 ± 5.13	0.433
NK cell ratio (%)	18.26 ± 7.88	11.00 ± 6.80	0.010[1)]

1) $P < 0.05$

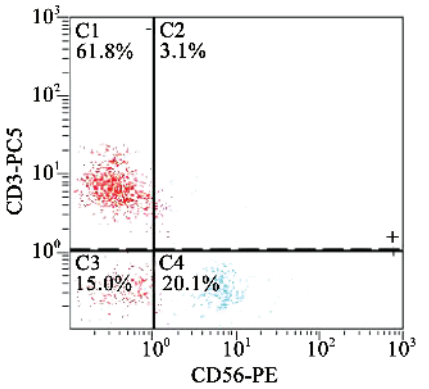


图 3 流式细胞术检测 URSA 非孕患者免疫细胞

Fig.3 Flow cytometry of immune cells in URSA patients

NK cell 20.1%.

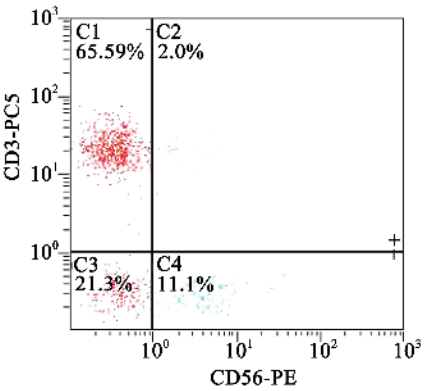


图 4 流式细胞术检测 SA 非孕患者免疫细胞

Fig.4 Flow cytometry of immune cells in SA patients

NK cell 11.1%

3 讨 论

近年,通过 β-HCG 检测等方法发现了部分生化妊娠、隐形流产,因此自然流产发生率约 50% ~ 60%。在自然流产患者中,与同一性伴侣只发生过一次自然流产称为偶发性流产(sporadic abortion, SA),发生率约 11% ~ 13%,其原因多为遗传因素如胚胎染色体或基因异常等。如不进行检查治疗,有 80%的患者能够再次妊娠并成功分娩,其原因在于再次妊娠重复发生遗传因素异常的可能性较小。

而复发性自然流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA)的发生率因其定义不同而不同,近 20 年, 伴随医学诊疗技术的发展以及对患者心理的研究, 认为 2 次自然流产即需要予以积极的处理,因 2 次自然流产后,胚胎丢失风险明显加大,且流产次数越多,复发率越高。故将 RSA 定义为 2 次及其以上自然流产者。据此,RSA 发生率为 3%

~ 5%。RSA 诊断治疗较为复杂,以往认为其病因为胚胎染色体异常（包括胚胎自身发育过程中出现的异常以及遗传自父母的异常),女方解剖异常、内分泌异常、感染,然而以上所有因素仅能解释 40%的自然流产,尚有 60%患者原因不明,即 URSA。经过近 20 年的发展，逐渐明确所谓 URSA 80%以上都与免疫因素相关,免疫紊乱是导致流产的重要原因[8]。

本研究自然流产患者一般资料显示,URSA 非孕组月经周期短于偶发流产非孕组，但仍在正常月经周期范围内,未达月经紊乱,该临床表现与本研究所设定的,URSA 患者入选条件中生殖内分泌激素测定无异常相符。

本研究检测患者静脉血免疫细胞,发现在难免流产状态,均存在 Th/Ts 异常升高[9]。目前已知,T 细胞按 CD 分子不同分为 $CD4^+$ 和 $CD8^+$,按功能可分为辅助性 T 细胞(Th)和抑制性 T 细胞(Ts)。本研究检测 $CD4^+$ Th 细胞和 $CD8^+$ Ts 细胞,前者介导细胞免疫，其数量增多或功能亢进可使母体细胞免疫增强,对胚胎发生较强的免疫排斥反应,导致妊娠不能继续。后者既可抑制由 B 淋巴细胞介导的体液免疫,也可抑制 $CD4^+$ 细胞介导的迟发性超敏反应等，从而保证胚胎半同种抗原不被排斥，二者相互制约，达到平衡。有报道,$CD4^+T/CD8^+T < 1.0$ 或 > 2.0,即可视为免疫调节功能异常,而 T 细胞异常变化对 URSA 女性影响重大[10-12]。在流产后非孕状态,URSA 组和 SA 患者 Th/Ts($CD4^+/CD8^+$)均在正常范围。据此推测,自然流产发生后,机体免疫系统进行了一定的自我调整与平衡。

此外,URSA 难免流产患者 NK 细胞比例高于 SA 难免流产组。NK 是固有免疫系统中一类既不需要抗原刺激,又不需抗体参与即能杀伤某些靶细胞的非 T 非 B 类淋巴细胞。以往部分学者认为,蜕膜中 NK 细胞较外周血 NK 细胞更有意义,近来研究表明外周血中的 NK 细胞状况反映了子宫蜕膜中 NK 细胞的情况,检测外周血是较为安全、无创的方法。国外研究已经证实，在欧美人群中 NK细胞异常与 RSA 相关[13-14]。目前,已知外周血 $CD56^+$ 细胞比例在正常人多为 10% ~ 12%，本研究检测到 URSA 患者难免流产时高达 15.57 ± 6.45%,在流产后非妊娠状态,URSA 患者 NK 细胞比例亦高于 SA 组,提示 URSA 患者 NK 细胞比例增高可能是母体对胚胎的杀伤增强的表现，可能导致 URSA 的发生，因此 NK 细胞可作为检测 URSA 免疫状态的有效指标之一。

参考文献：

[1] 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.

[2] Berek JS. Novak Gynecology [M]. 13th. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins. 2002: 643-670.

[3] Lee HH, Hong SH, Shin SJ, et al. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion [J]. Fertil Steril, 2010, 93(4): 1244-1247.

[4] 罗丽兰. 不孕与不育 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1998: 286.

[5] Fertl KI, Bergner A, Beyer R, et al. Levels and effects of different forms of anxiety during pregnancy after a prior miscarriage [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 142(1): 23-29.

[6] Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss [J]. Clin Obstet Gynecol, 2008, 51(1): 84-95.

[7] Glueck CJ, Gogenini S, Munjal J, et al. Factor V Leiden mutation: a treatable etiology for sporadic and recurrent pregnancy loss [J]. Fertil Steril, 2008, 89(2): 410-416.

[8] 张建平,林其德,李大金,等. 复发性流产的诊断与治疗 [J]. 现代妇产科进展,2006,15(7):481-492.

[9] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2006:153.

[10] Christiansen OB, Nielsen HS, Pedersen B. Active or passive immunization in unexplained recurrent miscarriage [J]. J Reprod Inununol, 2004, 62(1-2): 41-52.

[11] Souza SS, Ferriani RA, Santos CM, et al. Immunological evaluation of patients with recurrent abortion [J]. J Reprod Inununol, 2002, 56(1-2): 111-121.

[12] Dokouhaki P, Moghaddam R, Rezvany M, et al. Repertoire and clonality of T-cell receptor beta variable genes expressed in endometrium and blood T cells of patients with recurrent spontaneous abortion [J]. Am J Reprod Immunol, 2008, 60(2):160-171.

[13] 石永云,凌斌. 自然杀伤细胞与妊娠的研究进展 [J]. 国外妇产科学分册,2007,34(4):269-271.

[14] Yamada H, Morikawa M, Kato EH, et al. Pre-conceptional Natural Killer Cell Activity and Percentage as Predictors of Biochemical Pregnancy and Spontaneous Abortion with Normal Chromosome Karyotype [J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 50(2): 351-354.

（编辑　张恩健）