

IVIG 治疗对复发性流产患者外周血 NK 细胞的影响

李维茹¹, 谭剑平², 陈 慧², 刘玉昆², 王振花², 王蕴慧², 张 睿², 刘颖琳², 张建平^{2*}
(1. 佛山市第一人民医院妇产科, 广东 佛山 528000; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨静脉滴注免疫球蛋白(IVIG)治疗对复发性流产患者(RSA)外周血 NK 细胞的影响。【方法】研究组包括 31 例 RSA 患者,均进行静脉滴注免疫球蛋白(IVIG)治疗,于治疗前后采用流式细胞术检测患者外周血 NK 细胞毒性及 NK 细胞在所有淋巴细胞中的比例;26 例未接受 IVIG 的 RSA 患者为对照组,首次检测检测 NK 细胞毒性及 NK 细胞比例后,于第 10 天复查上述项目。【结果】治疗前研究组 NK 细胞毒性为(19.7 ± 8.7)%,NK 细胞比例为(21.4 ± 8.2)%,治疗后实验组 NK 细胞毒性为(13.1 ± 3.7)%,NK 细胞比例为(19.3 ± 7.5)%;对照组第一次检测,NK 细胞毒性为(20.1 ± 7.0)%,NK 细胞比例为(21.0 ± 8.1)%,间隔 10 d 复测,NK 细胞毒性为(19.8 ± 7.2)%,NK 细胞比例为(21.2 ± 7.7)%。研究组患者 IVIG 治疗前后外周血 NK 细胞毒性及比例显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而对照组前后两次外周血 NK 细胞毒性及比例无显著差异($P > 0.05$);研究组患者 IVIG 前后外周血 NK 细胞毒性改变与 IVIG 前后 NK 细胞比例改变没有明显的相关性($P > 0.05$)。【结论】IVIG 治疗对 NK 细胞毒性及比例产生降调节作用。

关键词: 复发性流产; 静脉滴注免疫球蛋白; NK 细胞毒性; NK 细胞比例

中图分类号: R714.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0472-04

Influence of Intravenous Immunoglobulin on Peripheral Blood Natural Killer Cells in Women with Recurrent Spontaneous Abortion

LI Wei-ru¹, TAN Jian-ping², CHEN Hui², LIU Yu-kun², WANG Zhen-hua²,
WANG Yun-hui², ZHANG Rui², LIU Ying-lin², ZHANG Jian-ping^{2*}

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China;
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of SUN Yat-sen University,
Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To discuss the influence of intravenous immunoglobulin (IVIG) on peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion. 【Methods】There are 31 patients with a history of RSA (recurrent spontaneous abortion) received the IVIG. Maternal peripheral blood samples were taken from these patients and the NK cell cytotoxicity and percentage were detected before and after the treatment by flow cytometric analysis. Twenty control subjects were not receive the treatment. 【Results】Before the treatment, the NK cell cytotoxicity in experimental group was (19.7 ± 8.7)% and that was (20.1 ± 7.0)% in control group. After the treatment, the NK cell cytotoxicity in experimental group was (13.1 ± 3.7)% and that was (19.8 ± 7.2)% in the control group. Before the treatment, the NK cell percentage in experimental group was (21.4 ± 8.2)% and that was (21.0 ± 8.1)% in control group. After the treatment, the NK cell percentage in experimental group was (19.3 ± 7.5)% and that was (21.2 ± 7.7)% in the control group. In experimental group, the NK cell cytotoxicity and percentage were significantly reduced ($P < 0.05$) and that in control had not significant difference ($P > 0.05$). In experimental group, the change of NK cell cytotoxicity and the change of NK cell percentage after treatment were no significant relation ($P > 0.05$). 【Conclusion】IVIG can down regulate the NK cell cytotoxicity and percentage.

Key words: recurrent spontaneous abortion; intravenous immunoglobulin; NK cell cytotoxicity; NK cell percentage

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4):472-475]

收稿日期: 2010-05-15

基金项目: 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: 李维茹, 医学硕士, 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

静脉滴注免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG) 用于复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 的治疗已在国内外相继展开, 并获得了良好的临床效果^[1], 但其机制尚不清楚。积极探索 IVIG 的作用机制对 IVIG 的临床应用具有指导意义。自然杀伤细胞 (NK cell, natural killer cell) 在母胎界面的免疫防御及免疫调节过程中发挥重要作用^[2]。外周血 NK 细胞毒性及比例的升高与 RSA 患者的不良妊娠结局有关^[3]。本研究通过检测 IVIG 治疗前后外周血 NK 细胞毒性及 NK 细胞比例来观察 IVIG 对 NK 细胞的影响, 初步探讨 IVIG 治疗的免疫学机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2008 年 9 月至 2009 年 9 月中山二院 RSA 患者 57 例作为研究对象, 所选患者均曾有 ≥ 2 次自然流产史 ($< 孕 20$ 周)。免疫学检查无异常: 封闭抗体阳性, 抗心磷脂抗体、抗核抗体、抗精子抗体、抗 HCG 抗体、抗子宫内膜抗体、抗卵巢抗体等阴性。查夫妇染色体排除遗传因素, 行 B 超及宫腔镜检查排除解剖因素, 甲功、血糖检测排除内分泌因素, 行 TORCH、白带常规及宫颈分泌物支原体衣原体检测排除感染因素, 通过详细询问病史及内科就诊排除内科疾病因素。研究组 31 例, 对照组 26 例均停经 30 ~ 40 d, 血 HCG 阳性即入院安胎治疗, 每日予 HCG 和黄体酮肌注, 对照组知情同意后并给予静脉滴注免疫球蛋白 25 g, 连用 3 d, 治疗前均检测外周血 NK 细胞毒性及 NK 细胞比例, 治疗后 7 ~ 10 d 予以复查。对照组 26 例, 暂未接受 IVIG 治疗, 前后间隔 10 d, 两次检测其 NK 细胞毒性及 NK 细胞比例。

1.2 实验材料

K562 细胞株, 为 NK 细胞敏感的靶细胞, 购自上海中国科学院细胞库; CD3/CD16⁺CD56 单克隆抗体 (Becton Dickinson 公司), PI 碘化丙啶和 PKH2 试剂盒 (Sigma 公司), RPMI1640 培养基 (GIBCO 公司), 胎牛血清 (四季青公司)。

1.3 细胞培养

K562 细胞在含 100 mL/L 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5%CO₂ 的条件下培养。

待细胞数目增多至约 80%, 将细胞移至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min ($r = 15$ cm) 离心 3 min, 弃上清液, 加入新的培养液, 重悬细胞, 再将细胞悬液按所要求的浓度分装入新的培养瓶中培养。

1.4 NK 细胞毒性检测

1.4.1 原理 选用 K562 细胞株作为 NK 细胞的靶细胞, 将两者共同培养, 双标记总的 K562 细胞以及死亡的 K562 细胞, K562 细胞株与 NK 细胞共同培养 2 h 后, 流式细胞术检测总的 K562 细胞及死亡的 K562 细胞数目, 计算 K562 细胞的死亡率, 判断 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤作用, 从而反映 NK 细胞毒性。

1.4.2 方法 ①取处于对数生长期的 K562 细胞 2 mL 用不含血清的培养液洗涤 2 次, 用 0.5 mL PKH 稀释液重悬。另取 PKH 稀释液 0.5 mL, 加入 2.5 μ L PKH-2 染色剂混匀, 将此 PKH 溶液加入重悬后的 K562 细胞中, 室温下反应 2 min, 取 1 mL 胎牛血清终止反应。然后再用含有 100 mL/L 胎牛血清的培养液洗涤 3 遍。洗涤后用含血清的培养液重悬细胞, 将细胞浓度调整为 1×10^5 /mL 备用。②抽取患者肘静脉血 10 mL, 用密度梯度离心法分离淋巴细胞, 加 PBS 洗涤 3 次, 弃上清, 加入含 100 mL/L 胎牛血清的培养液重悬, 通过细胞记数将细胞浓度调整到 5×10^6 /mL 备用。③流式细胞术检测: 将分离并处理好的淋巴细胞及 K562 细胞分别以 50:1 和 25:1 的比例混合培养 2 h。2 h 后, 在混合培养管中加入碘化丙啶 (PI) 对死亡的细胞进行染色, 然后上机检测。

1.5 NK 细胞比例检测

采用双标记直接免疫荧光流式细胞技术检测。抗凝血中加双荧光标记抗体 FITC-CD3 和 PE-CD56 CD16, 经流式细胞仪分析, 记数 CD3⁺/CD56⁺CD16⁺ 细胞在所有淋巴细胞中的比例, 即 NK 细胞比例。

1.6 统计学方法

IVIG 前后 NK 细胞毒性及 NK 细胞比例的改变采用配对 *t* 检验; 治疗前后 NK 毒性改变与比例改变之间的相关性分析采用 Pearson 相关系数进行相关性检验; 各种检验均以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

治疗组患者年龄平均 30.4 岁, 入院时孕 36.2

d,既往自然流产 2.7 次。对照组年龄平均 30.7 岁,入院时孕周 35.9 d,既往自然流产 2.6 次。两组比较无统计学差异。

2.2 NK 细胞毒性及比例的改变

IVIG 治疗后, 研究组外周血 NK 细胞毒性、

NK 细胞比例较治疗前明显降低 ($50:1, P < 0.05$; $25:1, P < 0.05$)。对照组间隔 10 天后, 外周血 NK 细胞毒性、NK 细胞比例较 10 天前无显著性差异 ($50:1, P > 0.05$; $25:1, P > 0.05$; 表 1、2)。

表 1 IVIG 治疗前后 NK 毒性改变

Table 1 Change of NK cell cytotoxicity between two time-point test

($\bar{x} \pm sd, \%$)

Groups	Percentage of E:T ¹⁾	The first time test	The second time test	P
Experimental group (n = 31)	50:1	21.4 ± 10.6	13.5 ± 5.3	0.013
	25:1	19.7 ± 8.7	13.1 ± 3.7	0.007
Control group (n = 26)	50:1	21.1 ± 6.9	20.7 ± 6.8	0.091
	25:1	20.1 ± 7.0	19.8 ± 7.2	0.219

1) E:T: the blending ratio of leukomonocyte and K562 cell

表 2 IVIG 治疗前后 CD3/CD16⁺CD56 细胞百分比改变

Table 2 Change of CD3/CD16⁺CD56 cell percentage between two time-point test

($\bar{x} \pm sd, \%$)

Groups	The first time test	The second time test	P
Experimental group (n = 31)	21.4 ± 8.2	19.3 ± 7.5	0.004
Control group (n = 26)	21.0 ± 8.1	21.2 ± 7.7	0.490

2.3 IVIG 治疗后 NK 细胞毒性改变与 CD3⁻CD56⁺CD16⁺细胞比例改变的相关性

研究组 IVIG 治疗前后 NK 细胞毒性差值和 CD3/CD16⁺CD56 细胞比例差值两组数据均服从正态分布, 所以采用 Pearson 相关系数进行相关性分析。分析结果见表 3。

研究组 IVIG 前后外周血 NK 细胞毒性改变与 IVIG 前后 CD3⁻CD56⁺CD16⁺细胞比例改变没有明显的相关性 ($P > 0.05$)。

表 3 治疗前后 NK 细胞毒性差值与 CD3/CD16⁺CD56 细胞比例差值相关性

Table 3 The correlation test between the change of NK cell cytotoxicity and the change of CD3/CD16⁺CD56 cell percentage after treatment

Groups	Percentage of E:T ¹⁾	Pearson Correlation coefficient	P
Control group	50:1	0.145	0.285
	25:1	-0.104	0.445
Experimental group	50:1	0.212	0.252
	25:1	0.193	0.299

1) E:T: the blending ratio of leukomonocyte and K562 cell

3 讨 论

3.1 IVIG 治疗对外周血 NK 细胞的影响

尽管 IVIG 治疗的确切机制还没有被完全阐明, 但是对淋巴细胞反应和细胞因子产物的平衡调节应该是 IVIG 治疗免疫机制的核心^[4]。本研究发现 IVIG 治疗后外周血 NK 细胞毒性及比例明显降低。由此可推测, IVIG 对 RSA 患者外周血中 NK 细胞有降调节作用。NK 细胞的表面抗原 CD16 为低亲和性 IgG Fc 受体 (FcR III)^[5], RSA 患者体内异常升高的自身抗体与靶细胞表面相应表位特异性结合后, 可通过其 Fc 段与 NK 细胞表面 FcR III 的结合, 而使 NK 细胞对靶细胞产生定向非特异性杀伤作用, 即抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC 效应)。结合本研究结果推测, IVIG 治疗成功可能是: 大量的免疫球蛋白进入机体, 球蛋白的 Fc 段与 NK 细胞的表面抗原 CD16 结合, 部分阻断了病理状态下自身抗体的 Fc 段与 NK 细胞结合, 从而抑制了 NK 细胞的 ADCC 效应, 达到降低 NK 细胞毒性的效果。此外, 有学者曾报道, IVIG 治疗有利于促使免疫系统 Th1 细胞向 Th2 细

胞转化^[6,8-9]。在正常妊娠过程中, Th2 细胞反应活性高于 Th1 细胞活性^[7]。而 RSA 患者体内, Th1/Th2 细胞比例失调, Th1 细胞占主导地位^[7]。Th1 相关的细胞因子, 如 IL-2、INF- γ 、TNF- α 、 β 在复发性流产患者体内是明显升高的^[8]。Th1 相关因子可以诱导 NK 细胞增值活化, Th1 细胞占主导地位, 其分泌的细胞因子也相应的升高, 这样可部分解释 RSA 患者 NK 细胞毒性及比例都有所上升的现象^[9]。因此, IVIG 对 NK 细胞的抑制作用可能也与 Th1 细胞向 TH2 细胞的转化, 使可诱导 NK 细胞增值活化的 Th1 细胞相关因子减少有关。

3.2 免疫治疗过程中 NK 细胞毒性与比例的关系

如前所述, IVIG 治疗对 NK 细胞毒性及比例均有降调节作用, 本研究针对免疫治疗前后这两项检测的改变进行相关性的统计学分析, 结果显示: IVIG 治疗后, NK 细胞毒性下降与 NK 细胞比例减少没有明显的相关性, 提示: 免疫治疗对 RSA 患者外周血 NK 细胞毒性的抑制及比例的抑制是独立的, 相互间没有太大的影响。对于这一结果, 我们认为可能是由于 NK 细胞各亚群细胞所占的比例不同造成的。NK 细胞存在两类亚群, CD56⁺CD16⁻ 细胞亚群, 和 CD56⁺CD16⁺ 细胞亚群, CD16 可以触发 NK 细胞的 ADCC 效应, 所以该类亚群对同种异体抗原具有杀伤作用。Lachapelle 等也发现 CD16⁺ NK 细胞较 CD16⁻ NK 细胞持续显示较强的细胞毒性^[10]。总的 NK 细胞中, CD56⁺CD16⁺ 细胞所占比例升高时, NK 细胞的毒性就会相应的升高, 相反亦然。因此, 即使 NK 细胞总数不变, 若两种 NK 细胞亚群比例不同, 其 NK 细胞毒性也是不同的。由此提示我们可以在以后的研究中进一步对 NK 细胞进行分型检测, 这样可能会更准确的反应 NK 细胞的活性状态。

3.3 细胞毒性及比例检测的临床意义探讨

NK 细胞在妊娠的免疫防御及免疫调节过程中发挥着重要作用。在 RSA 患者体内, NK 细胞毒性及比例异常升高, 而且与妊娠结局有着明显的相关性。本实验研究结果显示, IVIG 治疗对 NK 细胞产生了一定的抑制作用, 支持 IVIG 治疗 RSA 有效的观点。关于 IVIG 的治疗剂量、治疗持续时间以及是否需再次治疗及治疗间隔时间目前尚处于摸索阶段, 国内外尚没有一个统一的标准。而且, RSA 患者体内的免疫状态存在着较大的个体差异性, 所以免疫治疗的间隔时间、持续时间, 以

及剂量等应个体化调整。因此, 经 IVIG 治疗后 NK 细胞毒性及比例降低, 这提示我们可以考虑通过监测 NK 细胞毒性及比例的变化, 结合其他免疫学指标来动态观察患者体内的免疫状态, 指导临床免疫治疗方案的具体应用。本研究还发现免疫治疗后, NK 细胞毒性改变与比例的改变两者没有相关性, 由此提示: 临床上两项指标的检测不能相互取代, 应全面考虑两方面的改变。

参考文献:

- [1] Sapir T, Carp H, Shoenfeld Y. Intravenous immunoglobulin (IVIG) as treatment for recurrent pregnancy loss (RPL) [J]. *Harefuah*, 2005, 144(6): 415-420.
- [2] Sanguanserm S, Pongcharoen S. Pregnancy immunology: decidual immune cells [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2008, 26(2-3): 171-181.
- [3] Wang Q, Li TC, Wu YP, et al. Reappraisal of peripheral NK cells in women with recurrent miscarriage [J]. *Reprod Biomed Online*, 2008, 17(6): 814-819.
- [4] Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, et al. Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells [J]. *Blood*, 2007, 110(9): 3253-3262.
- [5] 陈慰峰. 医学免疫学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 84.
- [6] Rezaei A, Dabbagh A. T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion [J]. *Med Sci Monit*, 2002, 8(8): CR607-610.
- [7] Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, et al. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245(3): 933-938.
- [8] Calleja-Agius J, Brincat MP. Recurrent miscarriages: What is the role of cytokines? [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2008, 24(12): 663-668.
- [9] De Carolis C, Perricone C, Perricone R. NK Cells, Autoantibodies, and Immunologic Infertility: A Complex Interplay [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2009 Nov 12. [Epub ahead of print]
- [10] Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, et al. Flow-cytometric characterization of hematopoietic cells in non-pregnant human endometrium [J]. *Am J Reprod Immunol*, 1996, 35(1): 5-13.

(编辑 张恩健)