

CD4⁺CD25^{high} T细胞和FOXP3在不明原因 复发性自然流产中的作用

梅珊珊¹, 谭剑平², 陈慧², 刘颖琳², 刘玉昆², 祝丽琼², 张建平^{2*}

(1. 广州市妇女儿童医疗中心妇产科, 广东 广州 510170; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】检测不明原因复发性自然流产(URSA)患者外周血及蜕膜的CD4⁺CD25^{high} T细胞和FOXP3的表达,探讨CD4⁺CD25^{high} T细胞和FOXP3在母胎免疫耐受中的作用。【方法】选择从2005年9月至2006年6月就诊的154例URSA患者根据就诊时的妊娠状态分成未孕组129例,早期流产组25例;正常早孕要求人工终止妊娠的妇女组50例及正常未孕女性组42例为对照组。收集所有研究对象的外周血及由于计划外妊娠要求行人工流产者和已确认胚胎停育的URSA患者行清宫术后的新鲜蜕膜组织,采用流式细胞仪分析外周血及蜕膜组织CD4⁺CD25⁺调节性T细胞及其亚群的比例及FOXP3表达。【结果】①外周血及蜕膜中CD4⁺CD25^{high} T细胞的比例:正常早孕妇女外周血CD4⁺CD25^{high} T细胞高于正常未孕妇女及URSA流产组,差异有统计学意义($P < 0.01$),URSA未孕患者外周血CD4⁺CD25^{high} T细胞也显著低于正常未孕女性及URSA流产患者($P < 0.01$);URSA流产患者蜕膜CD4⁺CD25^{high} T细胞低于正常早孕妇女蜕膜(0.62 ± 0.27 vs. 1.41 ± 0.31 , $P < 0.01$)。②外周血及蜕膜中FOXP3表达比例:正常早孕妇女外周血CD4⁺CD25^{high} T细胞中FOXP3的表达比例为(95.6 ± 3.6),高于正常未孕妇女(92.1 ± 3.4)及URSA流产患者,差异有统计学意义($P < 0.01$; $P < 0.05$);URSA未孕组患者外周血中FOXP3的表达与正常未孕妇女及URSA流产组之间相比无统计学差异($P > 0.05$);URSA流产患者蜕膜CD4⁺CD25^{high} T细胞中FOXP3的表达比例低于正常早孕妇女蜕膜,差异有统计学意义(94.3 ± 3.1 vs. 97.1 ± 2.2 , $P < 0.01$)。【结论】CD4⁺CD25^{high} T细胞在维持正常妊娠中发挥重要作用,URSA的发生与CD4⁺CD25^{high} T细胞的减少有关,URSA患者CD4⁺CD25^{high} T细胞比例下降与FOXP3表达的降低有关。

关键词: 复发性流产; 妊娠; 调节性T细胞; FOXP3; 蜕膜

中图分类号: R714 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0461-06

Role of CD4⁺CD25^{high} Regulatory T cells and FOXP3 in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion

MEI Shan-shan¹, TAN Jian-ping², CHEN Hui², LIU Ying-lin², LIU Yu-kun²,
ZHU Li-qiong², ZHANG Jian-ping^{2*}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510170, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To detect the proportions of CD4⁺CD25^{high} cells and FOXP3 expression in peripheral blood and decidua of URSA patients and explore the function of CD4⁺CD25^{high} cells and FOXP3 expression to maternofetal immunological tolerance. 【Methods】 A total of 154 URSA patients from The Department of Obstetrics and Gynecology at The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from September 2005 to June 2006 were recruited to participate in the study. A total of 129 of the URSA patients were in non-pregnant status, and 25 patients were in the condition of early miscarriage confirmed by ultrasonography. Meanwhile, we selected 50 healthy pregnant women who were undergoing elective terminations were all conducted during the first trimester and 42 volunteers who were all normal reproductive women in non-pregnant condition as control groups. Heparinized venous blood was obtained immediately from all study objects and decidual samples were obtained from patients with

收稿日期: 2010-3-07

基金项目: 广东省自然科学基金(2003830505)

作者简介: 梅珊珊, 硕士, 主治医师, 研究方向为复发性流产机制的研究, E-mail: meishanshan@126.com; * 通信作者: 张建平, 教授, 博士生导师, Email: zjp2570@126.com

induced abortion, and URSA patients with spontaneous abortion. The proportions of CD4⁺CD25^{high} cells and FOXP3 expression in peripheral blood and decidua were calculated by flow cytometry. 【Results】 ① In peripheral blood, the proportion of CD4⁺CD25^{high} T cells in normal early pregnant women was significantly higher than that in non-pregnant healthy women and URSA patients with early miscarriage ($P < 0.01$), and the proportion of CD4⁺CD25^{high} T cells in URSA patients with non-pregnancy were significantly lower than that in URSA patients with early miscarriage and non-pregnant healthy women ($P < 0.01$). But in decidua, the proportion of CD4⁺CD25^{high} T cells in URSA patients with early miscarriage were lower than that in pregnant healthy women (0.62 ± 0.27 vs. 1.41 ± 0.31 , $P < 0.01$). ② In peripheral blood, the proportion of FOXP3 expression of CD4⁺CD25^{high} cells in early pregnant women was significantly higher than that in normal non-pregnant women and URSA patients ($P < 0.01$; $P < 0.05$). But the proportion of FOXP3 expression of CD4⁺CD25^{high} cells in URSA patients with non-pregnancy had no statistical significance compared with non-pregnant healthy women and URSA patients with early miscarriage ($P > 0.05$). In decidua, the proportion of FOXP3 expression in CD4⁺CD25^{high} T cells in URSA patients with early miscarriage were significantly lower than that in pregnant healthy women (94.3 ± 3.1 vs. 97.1 ± 2.2 , $P < 0.01$). 【Conclusion】 CD4⁺CD25^{high} T cells play an important role in maintaining normal pregnancy and its decrease may involve in the pathogenesis of URSA. The decrease of the proportions CD4⁺CD25^{high} T cells in URSA patients is related with the lower FOXP3 expression.

Key words: recurrent spontaneous abortion; pregnancy; regulatory T cells; FOXP3; decidua

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4):461-466]

复发性自然流产病因复杂, 其中至少 35% ~ 44% 的患者未发现明确的致流产因素, 称为不明原因复发性自然流产 (unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)^[1]。目前研究认为 URSA 是同种免疫性疾病, 是由于母体对胚胎之父系抗原识别异常而产生的免疫低反应性, 导致母体封闭抗体和/或保护性抗体缺乏和其他的细胞免疫及体液免疫异常, 使得胚胎遭受异常免疫系统的攻击而造成的流产^[2]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)及 Foxp3(forkhead box p3) 是目前免疫学研究的热点之一^[3-6]。Foxp3(forkhead box p3) 是 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的一个特征性标志, 是其发育和功能维持的一个重要调控基因^[5]。研究表明人体中 CD4⁺CD25^{high} T 细胞才真正具有强大的免疫调节功能^[7]。有文献报道 URSA 患者与正常早孕者相比, 其外周血及蜕膜组织 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞及 FOXP3 基因表达是下调的^[8-9], 但 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞亚群中 FOXP3 的表达比例以及 URSA 患者的妊娠状态对其影响未见报道。本研究检测不同妊娠状态下 URSA 患者中 CD4⁺CD25^{high} T 细胞以及 FOXP3 的表达, 进一步探讨 CD4⁺CD25^{high} T 细胞和 FOXP3 在 URSA 中的作用。

1 材料与方 法

1.1 研究对象及分组

选择从 2005 年 9 月至 2006 年 6 月就诊于我

院的 URSA 患者 154 例, 其中 129 例就诊时为非妊娠状态, 年龄 25 ~ 38 岁, 孕次 3 ~ 5 次, 曾有自然流产次数 2 ~ 4 次。25 例就诊时为妊娠早期流产, B 超提示胚胎停育, 流产时平均孕周 8.5 ($S = 0.7$) 周。年龄 26 ~ 35 岁, 孕次 3 ~ 5 次, 曾有自然流产次数 2 ~ 4 次。URSA 的诊断依据符合以下条件^[3]: ①有 2 次或 2 次以上自然流产史; ②夫妇双方染色体 G 带染色体核型分析正常, 无家族遗传病史; ③经常规妇科盆腔检查、B 超检查和/或子宫输卵管造影及宫腔镜等检查排除明显的生殖道畸形和形态学异常; ④阴道白带常规和宫颈分泌物支原体、衣原体检查排除常见的生殖道感染; ⑤生殖内分泌激素 (PRL、FSH、LH、E₂、P、T) 及甲状腺激素 (T₃、T₄、TSH) 正常; ⑥月经周期正常, B 超监测排卵正常; ⑦抗心磷脂抗体、抗核抗体、抗子宫内 膜抗体和抗 HCG 抗体等自身免疫抗体阴性; ⑧抗丈夫淋巴细胞毒性试验阴性 (封闭抗体阴性); ⑨纳入研究前 3 个月未经任何免疫治疗和接种, 也未使用过调节免疫功能药物; ⑩男方精液分析正常。同期选取的就诊于我院门诊要求行人工流产的正常早孕妇女 50 例, 妊娠期间无阴道流血、腹痛等先兆流产症状和体征, B 超证实胚胎发育正常, 年龄 27 ~ 36 岁, 终止妊娠时平均孕周 8.1 ($S = 1.2$) 周; 及我院工作的女职工自愿者 42 例, 均为正常育龄非妊娠期妇女, 既往均有妊娠史 (至少有一次活产), 年龄 26 ~ 37 岁, 作为对照组。两对照组既往均无自然流产、死胎、死产史, 否认自身免疫性疾病史和家族遗传病史, 同时排除

生殖系统感染、生殖系统解剖、和内分泌方面的异常;纳入研究前3个月均未经任何免疫治疗和接种。

1.2 实验试剂

小鼠抗 CD4 FITC 单抗、抗 CD25PE 单抗购自 BD PharMingen; APC-大鼠 IgG2a 同型对照抗体、APC-抗人 FOXP3 抗体及操作试剂盒购买于美国 eBioscience 公司。流式细胞仪 Becton Dickinson FACS Calibua, USA。

1.3 外周血流式细胞检测

实验各组应用无菌技术空腹采集静脉血 3 mL, 肝素抗凝, Ficoll-Hypaque 法密度离心分离外周血单个核细胞(PMBC), 制成细胞悬液。分成两个试管, 两管均加 CD4-FITC, CD25-PE 抗体各 5 μ L, 室温、避光孵育 20 min; 加入 0.5 mL 破膜缓冲液; 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min; 2 mL PBS 洗涤 1 次, 1 000 r/min ($r = 15$ cm) 离心 5 min, 弃上清, 悬浮细胞; 1 mL 破膜缓冲液洗一次; 1 μ L 正常大鼠血清、50 μ L 破膜缓冲液 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min; 一管加 10 μ L APC 大鼠 IgG2a 同型对照抗体, 另一管加 10 μ L APC-抗人 Foxp3 抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min; 1 mL 破膜缓冲液洗一次; 450 μ L PBS 悬浮细胞, 上机检测。记录 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞亚群及 FOXP3 表达比例。

1.4 蜕膜流式细胞检测

收集由于计划外妊娠要求行人工流产者和已确认胚胎停育的 URSA 流产组患者行清宫术后的新鲜蜕膜组织, 制备蜕膜 T 细胞悬液, 将细胞悬液顺序用 CD4-FITC 抗体、CD25-PE 抗体、APC-抗人 FOXP3 抗体标记, 通过孵育、透化等处理后, 然后按上述方法行流式细胞仪检测。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 12.0 软件包, 计数资料计算均数和标准差, 多组均数比较采用方差分析, 组间差异采用 S-N-K 检验; 若方差不齐, 则组间比较采用曼-惠特尼 U 检验 (Mann-Whitney U test)。检验水准 α 为 0.05, 双侧检验。

2 结果

2.1 研究对象的一般情况

四组研究对象的年龄、月经周期组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 1)。

表 1 研究对象一般情况

Table 1 Demographic data of the study objects

Group	$(\bar{x} \pm s)$	
	Ages (years)	Menstrual cycle (days)
Normal non-pregnancy ($n = 42$)	33.5 \pm 2.7	29.2 \pm 2.9
Normal early pregnancy ($n = 50$)	34.2 \pm 3.4	29.5 \pm 2.8
URSA with early miscarriage ($n = 25$)	33.8 \pm 2.6	29.7 \pm 3.3
URSA with non-pregnancy ($n = 129$)	33.7 \pm 2.8	29.6 \pm 3.4

2.2 外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 的表达

正常早孕妇女与正常未孕妇女相比, 外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞、CD4⁺CD25^{low} T 细胞、CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺ 均显著高于正常未孕妇女 ($P < 0.01$); URSA 流产组患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞、CD4⁺CD25^{low} T 细胞、CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺ 均显著高于 URSA 未孕患者 ($P < 0.01$); URSA 流产组患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞及 CD4⁺CD25^{high}/CD4⁺ 均显著低于正常早孕妇女 ($P < 0.01$), URSA 流产组患者外周血 CD4⁺CD25^{low} T 细胞与正常早孕妇女相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); URSA 未孕组患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞的表达显著低于正常未孕妇女 ($P < 0.01$), URSA 未孕组患者外周血 CD4⁺CD25^{low} T 细胞的表达与正常未孕妇女相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 2)。

2.3 蜕膜 CD4⁺CD25⁺Treg 的表达

蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T 细胞及 CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺ URSA 流产患者显著低于正常早孕妇女 ($P < 0.01$), 但蜕膜 CD4⁺CD25^{low} T 细胞二者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 正常早孕妇女蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺ 显著高于其外周血 ($P < 0.01$); URSA 流产组患者的蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺ 与外周血相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 2)。

2.4 外周血 FOXP3 的表达

正常早孕妇女外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3 的表达比例为 (95.6 \pm 3.6), 高于正常未孕妇女 (92.1 \pm 3.4) ($P < 0.01$); 外周血 CD4⁺CD25^{low} T 细胞及 CD4⁺CD25⁻ T 细胞中 FOXP3 表达比例二组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); URSA 流产组患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞、CD4⁺CD25^{low} T 细胞以及 CD4⁺CD25⁻ T 细胞中 FOXP3 表达与 URSA 未孕患者相比均差异无统计学意义 ($P >$

表 2 外周血和蜕膜中 CD4⁺CD25⁺Treg 的表达比例Table 2 Proportion of CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{low} cells in peripheral blood and decidua lymphocytes(%; $\bar{x} \pm s$)

	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	CD4 ⁺ CD25 ^{low}	CD4 ⁺ CD25 ^{high}
	lymphocytes	lymphocytes	CD4 ⁺
Normal non-pregnancy (<i>n</i> = 42)			
PBL	1.12 ± 0.29 ¹⁾	6.45 ± 1.47	3.38 ± 0.81 ¹⁾
Normal early pregnancy (<i>n</i> = 50)			
PBL	2.94 ± 1.23 ¹⁾²⁾	10.51 ± 1.48 ¹⁾²⁾	7.93 ± 2.19 ¹⁾²⁾
Deciduas	1.41 ± 0.31	3.72 ± 1.31	16.92 ± 5.27 ³⁾
URSA with early miscarriage (<i>n</i> = 25)			
PBL	1.87 ± 0.39 ¹⁾²⁾³⁾	9.94 ± 2.28 ¹⁾²⁾	5.57 ± 2.05 ¹⁾²⁾³⁾
Decidua	0.62 ± 0.27 ⁴⁾	4.03 ± 1.29	6.34 ± 2.37 ⁴⁾
URSA with non-pregnancy (<i>n</i> = 129)			
PBL	0.63 ± 0.21	6.50 ± 1.43	2.41 ± 0.74

1) $P < 0.01$ vs. URSA with non-pregnancy PBL; 2) $P < 0.01$ vs. normal non-pregnancy PBL; 3) $P < 0.01$ vs normal early pregnancy PBL; 4) $P < 0.01$ vs. normal early pregnancy decidua

0.05); URSA 流产患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3 的表达比例低于正常早孕妇女 ($P < 0.05$); 但 CD4⁺CD25^{low} T 细胞以及 CD4⁺CD25⁻ T 细胞中 FOXP3 的表达差异无统计学意义 ($P >$

0.05); URSA 未孕组患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞、CD4⁺CD25^{low} T 细胞、CD4⁺CD25⁻ T 细胞中 FOXP3 的表达频率与正常未孕妇女外周血相比均差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 3)。

表 3 外周血和蜕膜中 FOXP3 表达比例

Table 3 Proportion of FOXP3 expression in peripheral blood and decidua (%)

($\bar{x} \pm s$)

	FOXP3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	FOXP3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{low}	FOXP3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	CD4 ⁺ CD25 ^{low}	CD4 ⁺ CD25 ⁻
Normal non-pregnancy (<i>n</i> = 42)			
PBL	92.1 ± 3.4 ¹⁾	39.4 ± 2.5	1.5 ± 0.7
Normal early pregnancy (<i>n</i> = 50)			
PBL	95.6 ± 3.6	40.1 ± 2.6	1.7 ± 0.8
Deciduas	97.1 ± 2.2 ²⁾	39.2 ± 2.7	1.8 ± 1.3
URSA with early miscarriage (<i>n</i> = 25)			
PBL	93.5 ± 3.8 ²⁾	39.7 ± 2.1	1.6 ± 1.3
Deciduas	94.3 ± 3.1 ³⁾	38.9 ± 2.2	1.7 ± 1.1
URSA with non-pregnancy (<i>n</i> = 129)			
PBL	91.7 ± 2.3 ¹⁾	39.2 ± 2.9	1.6 ± 1.2

1) $P < 0.01$ vs. normal early pregnancy PBL; 2) $P < 0.05$ vs. normal early pregnancy PBL; 3) $P < 0.01$ vs. normal early pregnancy decidua

2.5 蜕膜 FOXP3 的表达

蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3 的表达比例 URSA 流产患者明显低于正常早孕妇女, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 但 CD4⁺CD25^{low} T 细胞以及 CD4⁺CD25⁻ T 细胞中 FOXP3 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 3)。

2.6 URSA 流产患者、正常早孕妇女蜕膜与外周血 FOXP3 的比较

正常早孕妇女蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3 的表达高于其外周血 ($P < 0.05$); URSA 流产组患者蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3 的表达与外周血中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),

但低于正常早孕妇女蜕膜中的表达($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 调节性 T 细胞与不明原因复发性自然流产

近年来大型的前瞻性流行病学调查均显示^[10],多种不同性质的免疫学异常参与 URSA 的发病过程,基本上可以归结为母胎之间的免疫耐受平衡被破坏,导致胚胎半同种异体移植的失败。由于近 1/2 的复发性流产病例的原因不明,疗效不理想,为临床上难治性不育的重要原因。

调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的“主动”抑制机制作为引发外周免疫耐受的主要部分越来越受到重视。随着研究的深入,发现其中一个重要亚群 CD4⁺CD25⁺Treg,它经过 TCR 介导信号刺激和活化能够抑制 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的 IL-2 基因转录和表达,进而抑制 T 细胞的增殖和活化;而且一旦它被激活后,抑制作用即为非抗原特异性,在免疫耐受的维持中发挥重要作用^[11]。正常妊娠与 CD4⁺CD25⁺Treg 数量增多密切相关,CD4⁺CD25⁺Treg 在维持正常妊娠和导致病理妊娠中起重要作用;URSA 患者中有相当一部分与母胎免疫耐受紊乱有关,在免疫耐受中起关键作用的 CD4⁺CD25⁺Treg 表达和功能异常是 URSA 发病的主要原因^[12]。近来研究揭示人类 CD4⁺CD25⁺Treg 中真正发挥免疫调节功能的仅仅是 CD4⁺CD25^{high} T 细胞亚群^[7]。因此,我们采用免疫荧光三重标记的流式细胞分析技术,分别对 URSA 患者、正常早孕妇女及正常未孕妇女的外周血和蜕膜中的 CD4⁺CD25⁺Treg 的两个亚群——CD4⁺CD25^{high} T 细胞和 CD4⁺CD25^{low} T 细胞在的表达进行了相关研究,以便更准确地评价人 CD4⁺CD25⁺Treg 在母胎免疫耐受中的免疫调节作用。

本研究发现,URSA 流产组患者和正常早孕妇女的外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞和 CD4⁺CD25^{low} T 细胞的表达均显著高于正常未孕妇女,这提示妊娠时,胚胎这一半同种异体抗原可诱导母体淋巴细胞活化和 Treg 增殖,导致 CD4⁺CD25⁺Treg 的两个细胞亚群均升高。但是 URSA 流产组患者的外周血和蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T 细胞表达频率均显著低于正常早孕妇女,而 CD4⁺CD25^{low} T 细胞与正常早孕妇女相比无显著性差异。这表明一定数量的 CD4⁺CD25^{high} T 细胞在维持正常妊娠中发挥着重

要的作用,在人类妊娠早期显著升高,并在母体外周血和蜕膜局部,同时发挥着免疫调节功能,诱导母体对胚胎产生免疫耐受,从而使妊娠获得成功;而妊娠时 CD4⁺CD25^{low} T 细胞表达的增加,可能只是正常活化的 T 细胞,并不发挥免疫调节作用,因此在正常早孕妇女和 URSA 患者中其表达并无显著差异。同时我们研究也显示 URSA 未孕组患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞的表达显著低于正常未孕组,这表明 CD4⁺CD25^{high} T 细胞对维持机体的自稳状态具有重要意义,URSA 患者在未孕时已存在 CD4⁺CD25^{high} T 细胞异常表达的免疫功能紊乱,对于 URSA 患者应在孕前及时给予相关检查及免疫治疗。

妊娠时母胎界面是母体和胚胎之间的免疫识别和免疫反应的基础,而蜕膜的局部免疫调节对母胎免疫耐受的产生和维持起着十分重要的作用。在本研究中,正常早孕妇女蜕膜的 CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺显著高于外周血,URSA 患者蜕膜的 CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺与外周血相比无显著升高,并显著低于正常早孕妇女。提示 CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺在蜕膜局部的变化比外周血中更加灵敏,其原因可能是 CD4⁺CD25^{high} T 细胞在胚胎抗原的刺激下,优先募集在母胎界面-蜕膜局部,一旦蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T/CD4⁺数量减少,可能导致母体不能正常对胚胎发挥免疫抑制和免疫营养的作用,从而使胚胎遭到免疫攻击而被母体排斥,导致流产的发生。

3.2 FOXP3 与不明原因复发性自然流产

已有研究发现转录因子 Foxp3 在 CD4⁺CD25⁺Treg 组成性表达是该细胞发挥功能的前提,是 CD4⁺CD25⁺Treg 发育和功能维持的一个重要调节基因^[5]。本研究发现 FOXP3 在 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中高表达,在 CD4⁺CD25^{low} T 细胞中表达较低,在 CD4⁺CD25⁻ T 细胞中几乎不表达。Khattari 等^[13]人发现特异性抗体清除小鼠体内的 FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,或将外周血特异性去除 FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞后再回输小鼠体内均引起小鼠严重的自身免疫反应。这表明 FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞对维持机体的自稳状态具有重要意义,机体正常状态下存在的自身反应性 T 细胞之所以对自身抗原不反应,一个很重要的方面就是 FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的存在抑制了自身反应性 T 细胞的活化。

由此我们设想, CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3⁺ 的表达是否与母胎免疫耐受有关? 我们的研究发现, 正常早孕妇女外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3 的表达显著高于正常未孕妇女, URSA 流产组患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中 FOXP3 的表达显著低于正常早孕妇女, 但与正常未孕妇女相比无显著性差异; 这表明正常妊娠时 FOXP3 在 CD4⁺CD25^{high} T 细胞中的表达增加。Aluvihare 等^[14] 研究发现 BALB/c × BALB/c 和 BALB/c × C57BL/6 孕鼠子宫组织 Foxp3mRNA 的表达为同龄未孕鼠的 1 000 倍, 且同种异体和同基因型的孕鼠的 Foxp3mRNA 表达无显著差异, 表明 Foxp3 表达的变化是妊娠所致, 而不是由同种抗原的刺激引起。由此我们推测 FOXP3 可能在人类妊娠早期即参与了对 CD4⁺CD25^{high} T 细胞的调节。正常妊娠时胚胎这一半同种异体抗原除诱导母体淋巴细胞活化和 Treg 细胞的增殖外, 还可能诱导母体转录因子 FOXP3 表达增高, 从而使 CD4⁺CD25^{high} T 细胞的表达进一步增加, 并发挥正常的免疫调节功能。流产时, 母体 FOXP3 的表达则下降到正常非孕状态。我们推测, URSA 患者外周血 CD4⁺CD25^{high} T 细胞表达的下降, 与母体外周血 FOXP3 表达的降低密切相关。研究进一步显示, 正常早孕妇女蜕膜 CD4⁺CD25^{high} T 细胞 FOXP3 的表达显著高于外周血, URSA 流产组患者 CD4⁺CD25^{high} T 细胞 FOXP3 在蜕膜与外周血中的表达无显著性差异, 且低于正常早孕妇女。提示蜕膜局部 FOXP3 的变化较外周血更为灵敏, FOXP3 的表达增加, 使 CD4⁺CD25^{high} T 细胞在蜕膜局部表达增多, FOXP3 在调控母胎界面局部免疫耐受方面可能发挥着举足轻重的作用。

参考文献:

- [1] Johnson PM, Ramsden GH. Recurrent miscarriage. In: Johnson PM, ed. Immunological disease in pregnancy [M]. London: Bailliere Tindall, 1988: 607-624.
- [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.
- [3] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunological self-tolerance maintained by activated T cells expression IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [4] 谭国珍, 罗益金, 曾凡钦. 初发系统性红斑狼疮患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞和 TGF- β 1 含量 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2009, 30(5): 636-638.
- [5] Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? [J]. Immunity, 2003, 19(2): 165-168.
- [6] 史艳侠, 韩文杰, 彭柔君, 等. 使用 FLAG 标签肽及慢病毒载体共同筛选小鼠 foxp3 基因 RNA 干扰的有效靶点 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(6): 641-644.
- [7] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood [J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1245-1253.
- [8] Yang H, Qiu L, Chen G, et al. Proportional change of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients [J]. Fertil Steril, 2008, 89(3): 656-661.
- [9] Jin LP, Chen QY, Zhang T, et al. The CD4⁺CD25⁺ bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage [J]. Clin Immunol, 2009, 133(3): 402-410.
- [10] Morikawa M, Yamada H, Kato EH, et al. Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003, 109(1): 21-26.
- [11] Nolte-'t Hoen EN, Wagenaar-Hilbers JP, Boot EP, et al. Identification of a CD4⁺CD25⁺ T cell subset committed in vivo to suppress antigen-specific T cell responses without additional stimulation [J]. Eur J Immunol, 2004, 34(11): 3016-3027.
- [12] 邱丽华, 林其德. 原因不明复发性流产与 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞关系的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(12): 816-818.
- [13] Khattry R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺T regulatory cells [J]. J Nature Immunol, 2003, 4(4): 337-342.
- [14] Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Tolerance, suppression and the fetal allograft [J]. J Mol Med, 2005, 83(2): 88-96.

(编辑 张恩健)