

卵巢早衰和外周血 T 淋巴细胞亚群及补体的关系^①

王文军 邝健全

(中山医科大学孙逸仙纪念医院妇产科; 广州, 510120)

摘要 目的: 为明确卵巢早衰者外周血 T 淋巴细胞亚群及补体的特点。方法: 运用免疫酶组化技术——碱性磷酸酶—抗碱性磷酸酶(APAAP)法, 检测卵巢早衰(POF)患者($n=30$)、自然绝经后妇女($n=20$)及健康育龄妇女($n=30$)的外周血 T 淋巴细胞亚群, 同时检测其补体水平。结果: ①健康育龄妇女、卵巢早衰者及自然绝经者在外周血成熟 T 淋巴细胞总体水平是一致的。②POF 患者及自然绝经后妇女的 CD_8^+ 、 CD_{16}^+ T 淋巴细胞数明显升高 ($P < 0.05$), CD_4^+/CD_8^+ 明显降低 ($P < 0.05$), 卵巢早衰者出现的闭经、衰老与体内存在的免疫异常, 不仅与细胞的相对数量有关, 还与其调节功能有关, 即淋巴细胞亚群失衡有关。③自然绝经者 C_3 、 C_4 明显高于健康育龄妇女 ($P < 0.05$), 卵巢早衰者 C_4 显著高于健康育龄妇女 ($P < 0.05$)。结论: 卵巢早衰病因之一可能是自身免疫性卵巢炎。卵巢早衰者与自然绝经者体内细胞免疫、补体水平相似, 卵巢早衰者的免疫调节、免疫应答均处于衰老状态。

关键词 卵巢功能早衰/免疫学; T 淋巴细胞; 补体

中图分类号 R 711.75

THE RELATIONSHIP BETWEEN PREMATURE OVARIAN FAILURE AND PERIPHERAL T LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND COMPLEMENT LEVEL

Wang Wenjun Kuang Jianquan

(Department of Obstetric and Gynaecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Abstract Objective: Our purpose was to understand the characteristics of peripheral T lymphocytes subpopulations and complements of POF women. **Methods:** Peripheral T lymphocytes subpopulations ($CD_3^+ CD_4^+ CD_8^+ CD_{16}^+$) of POF ($n=30$), postmenopausal women ($n=20$) and health women ($n=31$) were tested by APAAP method. Complements (C_3 , C_4 , CH_{50}) were measured at the same time. **Results:** ① The total level of peripheral matured T lymphocytes showed no difference in three groups. ② CD_8^+ percentage and CD_{16}^+ percentage of POF and postmenopausal cases were higher than that of healthy cases ($P < 0.05$). Rates of CD_4^+/CD_8^+ of former were much lower than that of latter ($P < 0.05$). Phenomena of amenorrhoea, aging, and abnormal of immunity of POF were associated with the amount of lymphocytes and the regular function. ③ Not only C_3 level and C_4 level of postmenopausal cases but also C_4 level of POF were much higher than that of healthy women ($P < 0.05$). **Conclusions:** One of the cause of POF might be autoimmune oophoritis. The cellular immunity and complement level of POF were similar to that of postmenopausal women. The immunoregulation and immunoreponse of POF were in aging situation.

Subject headings ovarian failure, premature/immunology; T-lymphocyte; complement

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指 40 岁前 (包括 40 岁) 出现闭经和性器官萎缩, 并伴有卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH) 升高, 而雌激素 (E_2) 降低之综合征。至 80 年代中期, 发现人

类 POF 患者有细胞免疫的改变, 在 POF 患者的卵巢中有淋巴细胞浸润。检测外周血 T 淋巴细胞亚群可大致反映体内淋巴细胞亚群的状况。因此, 研究 POF 病人及健康育龄妇女的外周血 T 淋巴细胞

亚群的变化特点及其与补体间的相互变化,有助于探讨 POF 者与自身免疫因素间的关系并指导临床治疗。

本研究运用免疫酶组化技术——碱性磷酸酶—抗碱性磷酸酶(APAAP)法,对 POF 患者、自然绝经后妇女及健康育龄妇女的外周血 T 淋巴细胞亚群进行检测,同时检测其补体水平的变化。

1 资料及方法

1.1 检测对象与分组

1组(健康育龄妇女组):选自生育年龄的健康体检者、输卵管结扎术后要求复通的健康妇女。以往无慢性疾病,近半年未有急性疾病,月经正常。2组(卵巢早衰组):选自本院妇科门诊的卵巢早衰病人,病程9个月~10年,所有病例继发闭经半年以上;无高催乳素血症, $PRL < 25 \text{ ng/L}$ 。3组(自然绝经妇女组):选自本院妇科门诊体检健康妇女和子宫脱垂住院的患者。符合下列要求:自然绝经1~20年;未发现有卵巢癌、糖尿病、高血压等急慢性妇科、内、外科疾病史。见表1。以上3组妇女睾酮在正常水平,在日常生活及工作中均无长期接触放射线及化学毒物史。

表1 3组病例的血清 FSH, E₂ 水平

Table 1 Serum levels of FSH and E₂ in three groups

group	n	age(yr)	mean age(yr)	FSH(IU/L)	E ₂ (ng/L)
1	31	23~39	28.2	2.06~7.64	53.28~238.4
2	30	24~40	33.1	40.5~125.7	<50
3	20	52~72	61.9	42.82~108.3	<48.2

1.2 临床和实验室指标

年龄、工种(有无接触放射线或化学毒物)、月经情况(初潮、周期、持续时间、经量)、生育情况、避孕方式、腹腔镜、宫腔镜检查结果。

3组均检测 T 淋巴细胞亚群:CD₃、CD₄、CD₈、CD₁₆。1组31例、2组30例、3组20例均接受补体水平检测:CH₅₀(补体总溶血活性)、C₃(补体3)、C₄(补体4)。

1.3 检测试剂和标本制备

1.3.1 检测试剂 ①T 淋巴细胞亚群的检测:APAAP 试剂盒由北京四环医学局技术开发部——生物制剂发展中心提供②内分泌项目的检测:检测 FSH、E₂、睾酮的酶标法,由瑞士 SERONO 公司提供试剂盒③补体 CH₅₀、C₃、C₄ 的检测由北京科兴医用试剂开发中心提供试剂盒。

1.3.2 标本制备 肘关节部位取静脉血 2~2.5 mL,每毫升加 25 U 肝素抗凝。加入 5 mL 淋巴细胞分离液,分离外周血单个核细胞。取 10~20 μL 的细胞悬液,涂布于载玻片上。染色步骤按试剂盒要求。判断标准:细胞膜上或细胞浆内有红色标记物着染的细胞为阳性,计算阳性细胞数在 500 个淋

巴细胞中所占的百分比。

1.4 统计学方法

用均数(\bar{x})、标准差(s)、方差分析、t 检验、直线相关分析等方法进行;两两比较方法是 Student Newman keual 法。

2 结果

2.1 临床症状及体征

卵巢早衰组初潮年龄、经量、持续时间及周期在发病前与健康育龄妇女组无显著性差异。卵巢早衰组和自然绝经组在检查中可见:外阴皮肤弹性差,阴道粘膜菲薄、干燥,分泌物少,子宫较正常小,甚至萎缩,宫内膜菲薄,色苍白。在手术中见卵巢萎缩,无排卵迹象。

2.2 T 淋巴细胞亚群

健康育龄妇女、POF 者、自然绝经者外周血 T 淋巴细胞亚群的比较见表 2。

2.3 补体 C₃、C₄、CH₅₀水平

健康育龄妇女、POF 者、自然绝经者外周血补体 CH₅₀、C₃、C₄ 的比较,见表 3。

表2 健康育龄妇女、POF者、自然绝经者外周血T淋巴细胞亚群的比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Subpopulations of peripheral T lymphocytes in three group ($\bar{x} \pm s$)

group	n	CD ₃ ⁺ %	CD ₄ ⁺ %	CD ₈ ⁺ %	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺	CD ₁₆ ⁺ %
1	31	57.3±9.2 ¹⁾	40.5±11.9 ²⁾	22.0±5.8 ³⁾	1.98±0.89 ³⁾	26.1±9.5 ³⁾
2	30	59.4±9.8 ¹⁾	40.7±15.3 ²⁾	33.1±13.5 ⁴⁾	1.29±0.44 ⁴⁾	34.6±10.9 ⁴⁾
3	20	57.4±12.7 ¹⁾	37.0±12.8 ²⁾	29.5±12.0 ⁵⁾	1.61±1.56 ⁶⁾	30.0±8.0 ⁶⁾

note: group 1= health women, group 2= POF women, group 3= postmenopausal women. + = positive lymphocyte. 1), 2) compared each other in three group it was nonsignificant difference ($P > 0.05$). 3) while compared group 1 with group 2, $P < 0.05$. 4) while compared group 2 with group 3, $P > 0.05$. 5) while compared group 1 with group 3, $P < 0.05$. 6) while compared group 1 with group 3, $P > 0.05$

表3 健康育龄妇女、POF者、自然绝经者外周血补体CH₅₀、C₃、C₄的比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 complement levels of peripheral CH₅₀、C₃、C₄ in three groups ($\bar{x} \pm s$)

group	n	CH ₅₀ (ku/L)	C ₃ (mg/L)	C ₄ (mg/L)
1	31	72±18.9 ¹⁾	726±167.7 ²⁾	381±109.5 ¹⁾
2	30	94±20.4 ³⁾	856±245.1 ³⁾	492±174 ³⁾
3	20	94±21.7 ⁴⁾	948±295.4 ⁴⁾	472±207.1 ⁴⁾

note: 1) group 1 was lower than group 2, $P < 0.05$. 2) while compared group 1 with group 2, $P > 0.05$. 3) while compared group 2 with group 3, $P > 0.05$. 4) group 3 was higher than group 1, $P < 0.05$

2.4 T淋巴细胞亚群与补体的相互关系

健康育龄妇女、POF者与自然绝经者在年龄与CD₈⁺细胞、CD₄⁺/CD₈⁺、CD₁₆⁺细胞、C₃、C₄、CH₅₀方面无直线相关关系($P > 0.05$)。

2.5 3组病例的卵巢病理结果

健康育龄妇女组: 15例肉眼观察正常大小, 约有4cm×3cm×2cm。镜下可见卵泡, 未见淋巴细胞、浆细胞浸润。卵巢早衰组: 4例经手术探查, 大体观察卵巢明显萎缩, 包膜厚, 表面黄白色, 未见卵泡, 无排卵迹象。3例镜下皮质纤维组织增生, 未见典型卵泡。1例切片中可见黄素化泡膜细胞增生, 白体形成或白体钙化, 2例见少量淋巴细胞浸润。自然绝经组: 10例未见卵泡, 未见淋巴细胞浸润。

3 讨论

1968年Irvine^[1]等首先总结了POF在免疫学方面与非特异性Addison病之间的关系, 发现血循环中有抗卵巢抗体, 认为POF是抗卵巢抗体对卵巢的作用, 使卵泡不发育, 致血液循环中的雌激素水平降低, 出现了卵巢早衰及相应的衰老现象。

至1982年, Shimon等报道动物实验中有关自身免疫性卵巢炎的细胞免疫情况^[5]。80年代中期, Fridman等发现人类POF患者有细胞免疫的改

变^[2], 在POF患者的卵巢中有淋巴细胞浸润, 提示: POF者有不同程度的卵巢炎表现。但是, 到目前为止, 对POF者细胞免疫介导的机制的研究还没有一个一致的结论^[3, 4]。

本文显示, 健康育龄妇女、卵巢早衰者及自然绝经者在外周血CD₃⁺细胞亚群(总体成熟T淋巴细胞)总体水平是一致的, 说明POF妇女、自然绝经妇女出现衰老等, 与T淋巴细胞总数的关系不大。

本文显示, CD₄⁺细胞亚群在3组妇女无显著性差异。同时, POF组CD₈⁺细胞明显高于健康育龄妇女, 自然绝经组CD₈⁺细胞稍高于正常人, 而3组妇女年龄与CD₈⁺细胞的变化无直线相关关系。出现卵巢功能衰退闭经者, 不仅有50~60岁妇女(自然绝经), 还有20~40岁妇女(POF)。说明: 闭经的原因, 并不单纯由年龄增长引起, 尤其在病理性闭经如卵巢早衰, 可能有细胞免疫的变化, 发生自身免疫性卵巢炎。而CD₈⁺淋巴细胞亚群的升高在POF组尤其突出。这说明, CD₈⁺淋巴细胞亚群的升高, 可能是卵巢功能衰退闭经时自身免疫性卵巢炎在外周血的反映。文献报道: ①在自身免疫病中, 常出现CD₄⁺细胞调节功能上升, CD₈⁺细胞调节功能下降。当CD₈⁺细胞作为一个整体, 虽然其数量升高, 当其抑制功能不能充分表达、甚至完全丧失时, CD₄⁺细胞功能相对增强, 最终将造成机体自身

免疫反应亢进^[9]。②随着年龄的增长,受胸腺控制的T细胞功能及其产生的细胞因子水平下降,受骨髓调控的B细胞功能及其分泌的免疫因子、各类免疫球蛋白分子亦下降,个体免疫功能下降,与机体衰老呈平行关系^[6,7]。这在本文的CD₈⁺细胞亚群升高可反应出来。与此同时,本文POF组、自然绝经组CD₄⁺/CD₈⁺比值下降,这与童坦君、潘国强等的意见相符,童坦君等认为在自身免疫方面,衰老的免疫系统对自体成分的反应性将异常增高,老年人自身免疫功能大大增加,对突变抗原监视功能下降,而对自身抗原产生高反应性,除攻击外来病原体外,还会攻击自身组织,引起机体、组织衰老或死亡。沈其昀等^[7]认为:健康老年人的外周血CD₄⁺与CD₈⁺细胞均处于失衡状态,CD₄⁺/CD₈⁺显著低于青年人。

本研究中,虽然POF组、自然绝经组的外周血CD₈⁺明显高于健康育龄妇女,但在卵巢组织活检中,淋巴细胞数却不多。说明在外周血中有CD₈⁺细胞数升高,并非同时有卵巢组织的淋巴细胞浸润,有认为CD₈⁺数量与体内免疫进程有关,发生POF的时间越长,如10年者,以及自然绝经时间长的病人,卵巢组织活检已无始基卵泡,免疫组化染色见浸润的淋巴细胞数量亦少。而另一些POF者,被发现在闭锁的卵泡周围可见淋巴细胞,推测这部分病人的卵巢组织正在发生损害。但是,要在卵巢组织中找到CD₈⁺细胞的结合位点,还有待进一步探讨。

本实验在具体数值上部分与方氏结果不同^[8],这可能与病例情况及所用实验方法有关。本文在病例选择及分组方面,采用正常人、POF者、自然绝经者分组法,从而排除了非卵巢早衰的闭经者体内免疫因素的影响。采用APAAP法,不受内源酶的影响,染色背景清晰,灵敏度高,标记前后标本可保存相当长时间。

在CD₁₆⁺亚群淋巴细胞中,主要起作用的是自然杀伤细胞(NK)。Herberman认为^[10],NK细胞是一种不需抗原致敏的非特异性的自然杀伤细胞,年轻妇女的NK细胞数高于老年人。本文显示,POF者外周CD₁₆细胞比健康育龄妇女显著升高。CD₁₆细胞数升高是免疫功能亢进的一种表现,有可能引起自身免疫性卵巢炎,成为卵巢早衰的一个病因,但仍有待深入研究。

本研究可见:自然绝经组的C₃、C₄水平明显高

于健康育龄妇女组,卵巢早衰组C₃略高于健康育龄妇女组,CD₄显著高于健康育龄妇女组。在总补体溶血活性(CH₅₀)方面,卵巢早衰者及自然绝经者都明显高于健康育龄妇女。提示卵巢早衰可能是外周血CH₅₀增高引起卵巢局部的自身免疫性卵巢炎,造成卵巢的损伤。这是因为补体系统活化后可裂解多种细胞,其中肥大细胞和血小板等可释放生物活性物质,增加血管通透性,以及白细胞趋化作用,参与炎症的介导作用,引起机体损伤。

本研究提示卵巢早衰者体内免疫调节、免疫反应等均处于衰老状态,而自身免疫性则增强,建议对月经稀少或闭经早期的病人应检查其免疫状况,及早发现POF的趋向。

参 考 文 献

- 1 Lrvine W J, Chan M W, Scarth L, *et al*. Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease. *Lancet*, 1968, 2: 883
- 2 Friedman C I, Neff J, and Kim M H. Immunologic parameters in premature follicular depletion; T and B lymphocytes, T cell subpopulations, cutaneous reactivity, and serum immunoglobulin concentrations. *Diagnostic Immunology*, 1984, 2: 48
- 3 Rabinowe S L, George K L, Ravnikar V A, *et al*. Premature menopause monoclonal antibody defined T lymphocyte abnormalities and antiovarian antibodies. *Fertil and Steril*, 1989, 51: 450
- 4 Moncayo R, Moncayo H E. Autoimmunity and the ovary. *Immunology Today*, 1992, 13: 255
- 5 Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune ophoritis in mice. *J Exp Med* 1982, 156: 1577
- 6 童坦君, 张宗玉. 医学老年学. 衰老与长寿. 北京: 北京人民卫生出版社, 1995. 47, 194~196
- 7 沈其昀, 沈吕南, 黄铭新, 等. 锌对老年人外周血T淋巴细胞的调节作用. *中华老年医学杂志*, 1987, 6(4): 226
- 8 方 群, 梁贵尚, 谭路坚. 卵巢早衰外周血B细胞及T细胞亚群的研究. *中山医科大学学报*, 1993, 14(3): 213
- 9 张冬青, 赵丹凤, 周光炎, 等. 人体T细胞CD₈⁺VV+亚群在活动性SLE患者中显示反抑制活动. *中国免疫学杂志*, 1993, 9(3): 173
- 10 Herberman R B. Nature killer cell mediated immunity. *Adv Cancer Res* 1978, 27: 305

(1997-01-31 收稿 1997-11-14 修回)