

卵巢早衰外周血 B 细胞及 T 细胞亚群的研究

方 群¹ 梁贵尚¹ 谭路坚²

(附属第一医院妇产科¹ 内科²)

提 要 对25例继发性高促性腺素、低雌激素状态下的卵巢早衰(POF)患者,检测其外周血B淋巴细胞数及T细胞亚群,与18例正常育龄妇女作对照;并与12例原发性卵巢性闭经(原发闭经)患者进行对照。结果显示:POF组的B细胞数为19.16%,原发性闭经组为21.18%,均显著高于正常组的14.83%。提示B细胞的增多可能与患者体内自身免疫性抗体的增多有关。此外,雌激素缺乏可能与B细胞的增多也有关。原发闭经组 T_8 亚群为27.27%,显著高于POF组的23.08; T_4/T_8 在原发闭经组的比值为1.48,显著低于POF组的1.93及正常组的1.81。提示POF患者与原发性卵巢性闭经的患者虽同处于低雌激素状态,但其T细胞亚群分布有所不同。从而提示两组患者的细胞免疫状态可能不同。

关键词 卵巢早衰;淋巴细胞亚群;闭经

中图分类号 R711.75

现已认为,卵巢早衰(POF)并非一种罕见的妇科疾病。占继发性闭经的10%~15%。国内有资料统计占25%,国外曾有调查报道预计有0.9%的妇女,将在40岁前出现卵巢早衰^[1]。近年的研究认为自身免疫机制的改变是POF的重要病因之一。本研究检测了25例POF患者外周血B细胞数及T细胞亚群,试图为探讨该病的免疫状态提供参考数据。

材 料 与 方 法

研究对象

1. POF组 25例继发性高促性腺素、低雌激素的女性,年龄范围20~36岁,平均30.6岁。其中24例继发性闭经5个月以上(5个月~12年),1例为月经稀发及稀少。所有患者均无卵巢手术史,无放疗及化疗史。查血前无用甾体激素1个月以上。19人曾做外周血染色体核型分析,均为46,XX。1例合并有糖尿病,2例合并风湿关节炎。所有患者均作2次以上静脉血放免分析法测定血清的促卵泡素(FSH)及促黄体生成素(LH) ≥ 40 IU/L;血清雌二醇(E_2) < 50 pg/ml(天津利科公司提供药盒)。病历简况见表1。

2. 正常对照组(正常组) 身体健康、

月经正常的育龄期妇女18例,年龄19~35岁,平均24.5岁。于月经周期第3~7天抽血作B细胞及T细胞亚群分析。

3. 原发性卵巢性闭经对照组(原发闭经组) 12例。平均年龄24.4岁(18~35岁)。血清FSH及LH > 40 IU/L, $E_2 < 50$ pg/ml。其中10例行外周血染色体核型分析,6例为46,XX;3例为45,X;1例为45,X/46,X dic(X)。

实验方法 取外周血作单个核细胞(PBM)中B细胞及T细胞亚群测定。

1. 试剂 淋巴细胞分离液:上海试剂二厂。单克隆抗体(I抗): T_3 (CD_3)、 T_4 (CD_4)、 T_8 (CD_8)、 B^{152} (CD_{20})均由武汉生物制品研究所提供。ABC药盒(I抗、II抗):美国VECTASTAIN产品(Mouse IgG)。二氨基联苯二胺盐酸盐(DAB):上海试剂一厂。

2. 方法 按Sadhans法改良。研究对象于上午9时前抽取静脉血,经 1.31 mol/L枸橼酸抗凝。用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心(2000 rpm/20 min)。将分离出的PBM涂片晾干24h后,分别加I抗、II抗、III抗。DAB显色。每一步骤完毕后均用 6.7 mol/L

表1 POF 组 病 历 简 表

病例 编号	年 龄	闭经 时间	生育史 (孕-产)	药物试验*		内 分 泌 测 定			更年期 综合征	合并症
				P	E	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	E2 (pg/ml)		
1	29	12年		-	+	151	96	<10	-	
2	34	2年		+		>200	74	17	+	
3	32	9月	4-1	-	+	>200	>200	<10	-	
4	34	6月	1-1	-	+	>200	>200	28	+	
5	29	8年		-	+	157	>200	28	+	
6	36	7年	1-1	-	+	47	46	19	+	
7	30	2年		-	+	151	106	<10	+	糖尿病
8	30	5月		-	+	80	60	31	+	
9	36	5月	2-1	-	+	40	52	44	+	
10	21	2年		-	+	57	54	24	+	
11	36	9月	4-1	+		80	107	35	+	
12	32	5月		-	+	80	73	21	+	
13	27	7年		-	+	80	42	16	+	
14	30	1年	2-1	+		113	190	<10	+	
15	28	月经稀发**		+		176	174	12	+	
16	36	1年		+		161	127	13	+	
17	35	5月		+		80	141	23	+	
18	33	7年		-	+	152	173	47	-	
19	34	1.5年	3-1	-	+	149	103	24	+	
20	23	5年		-	+	>200	111	33	+	
21	25	6年		-	+	>200	80	21	+	
22	33	3年		-	+	42	40	<10	+	
23	28	10月	1-1	+		>200	121	41	-	
24	35	5月	1-0	-	+	198	51	34	+	风湿关节炎
25	20	1年		-	+	55	53	31	+	风湿关节炎

* P = 孕激素、E = 雌激素; **就诊后1年出现继发性闭经

PBS洗两次。实验结束前用 Myrein 苏木素复染细胞核。分别用80%、90%乙醇及无水乙醇逐级脱水。二甲苯透明。最后用中性树脂封化。光镜400倍下至少计数出200个淋巴细胞。结果判断：DAB阳性产物显示在细胞膜呈棕色反应。

统计学方法 均数 t 检验。

结 果

各组B细胞、T细胞亚群测定结果见表2。
测定结果显示：POF组B细胞数为

19.16%，较正常组14.83%明显增高 ($P < 0.01$)；原发闭经组21.18%，亦显著高于正常组 ($P < 0.05$)。T₃、T₄含量各组间无明显差别。而T₈的数值，原发闭经组为27.27%，明显高于POF组的23.08% ($P < 0.05$)；与正常组23.78%比较，无统计学差别。T₄/T₈比值，原发闭经组为1.48，显著低于正常组的1.81及POF组的1.93 (P 值分为 < 0.01 及 < 0.05)。而POF组T₄/T₈与正常组无明显差别。

表2 各组 B 细胞、T 细胞亚群 ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

	正常组 (n = 18)	POF组 (n = 25)	原发闭经组 (n = 12)
B细胞 (%)	14.83 ± 0.85	19.16 ± 1.06*	21.18 ± 2.50**
T3 (%)	61.83 ± 1.09	60.40 ± 1.02	63.55 ± 1.31
T4 (%)	42.89 ± 0.98	41.36 ± 1.42	39.18 ± 1.73
T8 (%)	23.78 ± 0.74	23.08 ± 0.99	27.27 ± 1.99***
T4/T8	1.81 ± 0.07	1.93 ± 0.14	1.48 ± 0.09*,***

* 与正常组比较, $P < 0.01$; ** 与正常组比较, $P < 0.05$; *** 与POF组比较, $P < 0.05$

讨 论

引起 POF 的原因颇多。除卵巢手术、化疗、放疗以及染色体异常等原因外,不少研究认为自身免疫状态的改变与部分患者的病因有关。POF 患者中的18%~70%可测到各种自身免疫性抗体^[2~6]。如抗卵巢抗体、抗甲状腺抗体、抗肾上腺皮质抗体、抗核抗体等。有27%~50%的患者可测到抗卵巢抗体^[6~9]。一些 POF 患者有自身免疫性卵巢炎,亦可同时合并或日后发生各种自身免疫性疾病如甲状腺疾病、阿的森病、糖尿病、红斑狼疮等^[2,3,9]。个别患者甚至患有多个内分泌腺疾病如 POF 合并阿的森病及甲状腺功能低下。据报道,这些患者可能自发恢复排卵。单用免疫抑制疗法或联用其它药物可使其恢复排卵乃至妊娠^[9,10]。因此,检测出该类患者,要积极治疗以取得妊娠的价值。

本研究测得 POF 患者 B 细胞高于正常。曾有报道存在自身免疫抗体的 POF 患者其 B 细胞数较无抗体者增高。因 B 细胞可转化为浆细胞分泌抗体,在体液免疫中起主要作用。B 细胞的增多及功能增强均可致自身免疫抗体的增加。一些学者将原发性卵巢性闭经也归入 POF, 这些患者亦可患自身免疫病。因而可解释原发性卵巢性闭经组 B 细胞明显高于正常组。然而,在本研究中,4 例染色体异常的原发性闭经患者中,3 例染色体核型为 45, X

者,其 B 细胞数高于正常(分别为29%、26%、19%); 1 例嵌合型者[45, X/46, X dic (X)], B 细胞数接近正常(14%)。染色体异常的患者其 B 细胞增高似不能单用自身免疫的变化加以解释,而与雌激素缺乏导致 B 细胞增高可能有关。雌激素含量与 B 细胞数的关系,有待进一步探讨。

T₄主要为辅助细胞(T_H)亚群; T₈主要为抑制细胞(T_S)亚群及杀伤细胞(T_K)亚群; T₃为各亚群 T 细胞的总和。T 细胞在机体细胞免疫中起主要作用。各亚群间的平衡失调,可导致免疫功能的改变。本研究未显示出 POF 患者 T₃、T₄、T₈以及 T₄/T₈与正常组明显不同。这一结果与 Rabinowe 等报道相同^[3,4]。而有学者发现患者 T₄、T₈增高, T₄/T₈降低,并认为这种变化与雌激素缺乏有关^[11]。本研究结果显示:虽同处于高促性腺素及低雌激素状态,原发性卵巢性闭经组 T₈显著高于 POF 组; T₄/T₈低于 POF 组。两组 T 细胞亚群的分布有所不同,提示它们的细胞免疫状态可能不同。目前尚未见有报道,故值得进一步探讨。

参 考 文 献

1. Coulam CB, et al. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986;67(4):604
2. Ho PC, et al. Immunologic studies in patients with premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1988;71(4):622

3. Rabinowe SL, et al. Premature menopause: Monoclonal antibody defined T lymphocyte abnormalities and antiovarian antibodies. *Fertil Steril* 1989;51(3):450
4. Miyake T, et al. Implications of circulating autoantibodies and peripheral blood lymphocyte subsets for the genesis of premature ovarian failure. *J Reprod Immunol* 1987;12(3):163
5. Damewood MD, et al. Circulating antiovarian antibodies in premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986;68(6):850
6. Coulam CB, Ryan RJ. Prevalance of circulating antibodies directed toward ovaries among women with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;9(1):23
7. Muechler EK, et al. Autoimmunity in premature ovarian failure. *Int J Fertil* 1991;36(2):99
8. Luborsky JL, et al. Ovarian antibodies detected by immobilized antigen immunoassay in patients with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70(1):69
9. Bennatyne P, et al. Autoimmune oophoritis: A clinicopathologic assessment of 12 cases. *Int J Gynecol Pathol* 1990;9(3):191
10. Tan SL, et al. Autoimmune premature ovarian failure with polyendocrinopathy and spontaneous recovery of ovarian follicular activity. *Fertil Steril* 1986;45(3):421
11. Ho PC, et al. Lymphocyte subsets in patients with Oestrogen deficiency. *J Reprod Immunol* 1991;20(1):85

(1992-07-06 收稿 1993-05-11 修回)

B LYMPHOCYTE AND T LYMPHOCYTE SUBSETS IN PATIENTS WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE

Fang Qun Liang Guishang Tang Lujiang

(Department of Gynecology & Obstetrics and Internal Medicine)

B lymphocyte and T lymphocyte subsets were investigated in 25 patients with premature ovarian failure (POF), which had secondary hypergonadotropin and hypoestrogen. The results were compared with both 18 normal women in childbearing age and 12 patients with primary ovarian amenorrhea. The B cell in POF group was 19.16%, significantly higher than 14.83% in normal group. In addition, the B cell was also higher in primary ovarian amenorrhea (21.18%) than in normal group (14.83%). The results showed that the increase of B cell might result in enhancement of autoantibodies. Besides, estrogen deficiency was probably related to the increase of B cell.

In the patients with primary ovarian amenorrhea, T_8 was 27.27%, significantly higher than 23.08% in POF; T_4/T_8 was 1.48, lower than 1.93 in POF and 1.81 in normal group. It suggested that the T lymphocyte subsets be different between the patients with POF and with primary ovarian amenorrhea, though existing estrogen deficiency in both groups.

Key words premature ovarian failure; lymphocyte subsets; amenorrhea