

NK 细胞及淋巴细胞坏死率对 URSA 患者免疫治疗疗效的影响

李 琴¹ 丛 林¹ 袁 静¹ 方慧琴¹ 朱立新² 吴 瑾²

摘要 目的 探讨皮下注射淋巴细胞对不明原因性复发性流产(URSA)的临床疗效,回顾性分析免疫治疗前后 CD16⁺CD56⁺ NK 细胞与淋巴细胞坏死率(CDC)的变化与妊娠结局的关系。方法 应用荧光染色法和流式细胞术对行主动免疫治疗的 440 例 URSA 患者治疗前后淋巴细胞坏死率和 CD16⁺CD56⁺ NK 细胞比率进行测定,并随访妊娠结局。结果 353 例成功妊娠至孕 12 周之后,成功妊娠率 85.50%; 60 例在孕 12 周前再次流产,流产率为 14.50%;其它(17 例 1 年以上未孕,10 例失访)。妊娠成功组治疗后淋巴细胞坏死率显著上升,CD16⁺CD56⁺ NK 细胞明显下降($P < 0.01$);失败组治疗后淋巴细胞坏死率升高,而 CD16⁺CD56⁺ NK 细胞下降不明显($P > 0.05$)。结论 主动免疫治疗效果较好,CD16⁺CD56⁺ NK 细胞和淋巴细胞坏死率是 URSA 患者孕前免疫状态的两个独立指标,亦是评价免疫治疗疗效的两个重要参数。

关键词 不明原因复发性流产;主动免疫治疗;CD16⁺CD56⁺ NK 细胞;淋巴细胞坏死率

中图分类号 R 714.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1143-04

不明原因性复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)^[1]是指在排除双方染色体、解剖结构异常,感染因素,内分泌紊乱,免疫疾病,血栓性疾病及血栓前状态,男方精液异常,接触有毒物质等仍发生的流产,占 40% 左右^[2]。淋巴细胞主动免疫治疗作为 URSA 的一种治疗方法,安徽医科大学第一附属医院产前诊断中心治疗成功率在 85% 左右,与国外的报道^[3]接近。妊娠相当于同种异体移植,母胎界面免疫微环境中许多免疫因素参与调节作用,与妊娠结局相关。该研究回顾性分析本中心诊治的 440 例 URSA 患者资料旨在探讨 URSA 患者主动免疫治疗前后自然杀伤细胞(nature killer, NK)-CD16⁺CD56⁺与淋巴细胞坏死率(com-

plement dependent cytotoxicity, CDC)的变化情况与妊娠结局的关系,初步探讨 URSA 的免疫学机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 按照 URSA 诊断标准^[4],选取 2010 年 10 月~2013 年 10 月来安徽医科大学第一附属医院产前诊断中心诊治的 440 例 URSA 患者,治疗前告知免疫治疗风险,夫妻双方签署知情同意。

1.2 微量淋巴细胞毒实验(microlymphocytotoxicity test, MLCT) 采用淋巴细胞淋巴毒(荧光染色法)试剂盒(天津市秀鹏生物技术开发有限公司),分别于治疗前和治疗后 3 周测定。取患者配偶空腹静脉血 3 ml,肝素钠抗凝;抽取患者静脉血 5 ml,2 ml 加入促凝胶,另 3 ml 加入肝素钠抗凝。CDC 的测定按试剂盒说明书操作。结果判定:① CDC 阴性:镜下目测体积小、具有折光性和呈绿色荧光染色细胞 > 95%,并且小于阴性对照。② CDC 阳性:镜下目测体积大、无折光性和呈红色荧光染色的细胞 > 5%。以 CDC ≥ 10% 作为微量淋巴细胞毒实验阳性的界值。

1.3 NK 细胞的检测 取患者全血 50 μl,加入等体积的溶血剂,离心后去上清液,加入 PE-CD16⁺CD56⁺ 抗体(美国 Pharmingen 公司)20 μl,避光孵育 15 min 加入 100 μl PBS 悬液, Coulter Epics XL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)检测 CD16⁺CD56⁺ NK 细胞比率。

1.4 治疗方法与次数 供血者体健,无传染疾病。抽取患者配偶或健康第 3 者静脉血 15 ml,常规分离提取淋巴细胞,生理盐水洗涤 3 次,调淋巴细胞浓度到 $4.0 \sim 6.0 \times 10^7 / L$,剂量为 1.5 ~ 2 ml。在患者健康状态下,用 5 号针头于患者左右上臂三角肌下缘皮内注射,每侧 3 个点。一个疗程共 3 次,每次间隔 3 周,治疗过程中嘱避孕。疗程结束后 3 周复查淋巴毒实验,若 CDC 上升至 10% 以上,建议 3 个月内备孕,确认妊娠后立即孕酮黄体支持并来本中心进行 1 个治疗疗程巩固(至少 3 次)直至妊娠 12 周后 B 超检测胎盘形成良好作为免疫治疗有效的标准^[5]方可结束治疗。若仍为阴性则续加 1 ~ 2 个疗程直至 CDC 升至 10% 及以上方可在医师指导下备孕。

2015-04-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH172);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011Z215)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 产前诊断中心、² 中心实验室,合肥 230022

作者简介:李 琴,女,硕士研究生;

丛 林,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: cong-lin1957@163.com

1.5 统计学处理 数据录入 Excel 表格,采用 SPSS 16.0 软件进行分析。计量资料采用 *t* 检验,治疗前后计量资料之间的比较采用配对设计 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般情况 440 例患者年龄 21~45 岁(29.66 ± 5.31) 岁,流产 2~8(3.27 ± 1.54) 次,经过一个及以上疗程治疗后 353 例成功妊娠至 12 周之后;60 例失败,均于 5~12 周间胚停或自然流产,其中 3 例绒毛染色体为非整倍体(此 3 例均为高龄),余均正常;17 例未孕,治疗后在医师的指导下备孕 1 年以上未孕,10 例失访。成功妊娠率为 85.50% (353/413),流产率为 14.50% (60/413)。

2.2 免疫治疗前后 CD16⁺CD56⁺NK 细胞与 CDC 百分比的比较 440 例患者经过免疫治疗前后 CD16⁺CD56⁺NK 细胞明显降低(24.11 ± 7.09 vs 20.33 ± 7.3),差异有统计学意义(*t* = 4.805, *P* < 0.05); CDC 百分比明显升高(7.10 ± 3.66 vs 11.03 ± 8.11),差异有统计学意义(*t* = -5.061, *P* < 0.05)。

2.3 妊娠成功组与失败组 CD16⁺CD56⁺NK 细胞与 CDC 百分比比较 免疫治疗后再次妊娠成功组 NK 细胞明显降低(*P* < 0.01),CDC 百分比明显升高(*P* < 0.01);再次妊娠失败组治疗后 CD16⁺CD56⁺NK 细胞下降不明显(*P* > 0.05),CDC 较前升高(*P* < 0.05)。见表 1。

3 讨论

目前关于 URSA 的机制主要有:① 与封闭抗体不足(即 CDC 阴性)有关;② 与 NK 细胞过多有关;③ 与辅助 T 细胞(T helper cell, TH1/TH2)失衡有关。目前认为封闭抗体是保护胚胎的 IgG 抗体,可通过胎盘与胎儿胎盘滋养叶抗原结合防止胚胎父系抗原被母体免疫系统识别和杀伤,维持妊娠^[6]。TH1 分泌如白介素(interleukin, IL)-2、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-β 等促炎因子,主要

介导细胞免疫功能,直接或间接诱导淋巴因子激活 NK 细胞杀伤活性,介导对胎盘的损伤。TH2 分泌 IL-4、6、10 等抑炎因子,主要介导体液免疫、抗体产生和同种排斥反应耐受^[7]。主动免疫治疗可通过减少 TH1 和增加 TH2,调节 TH1/TH2 平衡防止流产^[8]。还可刺激封闭抗体的产生抑制 NK 细胞表面 IL-2 受体的表达和抑制 TH1 型细胞因子来弱化 NK 细胞活性^[9]。妊娠类似半同种抗原移植,母胎界面许多免疫因素(细胞体液免疫等)均参与免疫调节过程,推理 URSA 可能是多因素调节失衡的一种病理状态,免疫治疗则靶向调节母胎界面免疫耐受状态,从而维持妊娠。

国内外有文献^[3-5]表明主动免疫治疗疗效较满意,成功率在 80% 左右。免疫治疗可提高封闭抗体的数量和活性,保护胚胎免受 NK 细胞的攻击;同时平衡 TH1/TH2,利于妊娠^[10]。NK 细胞来源于骨髓干细胞,其表面具有特异性抗原标志 CD56CD16,外周血中主要以 CD56⁺CD16⁺NK 为主,占总淋巴细胞的 10%~20%^[11]。由于其高表达穿孔素和颗粒酶,具有较强的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用;还分泌如 TNF-α、IL-2 等促炎因子^[12]。有文献^[13]报道 URSA 患者早孕期外周血 NK 细胞显著高于未孕状态,且非孕状态下亦高于正常妇女。1981 年 Beer 和 Taylor 首次提出并将主动免疫治疗应用于 URSA 患者^[14]。近年来该治疗已相继在国内外开展,疗效较满意。本中心诊治的 440 例 URSA 患者中 353 例成功妊娠至 12 周(胎盘形成良好),有效率达 85.50%;60 例再次流产(3 例绒毛染色体非整倍体而早期停育,余均正常);考虑可能与治疗前后 CD16⁺CD56⁺NK 细胞下降不明显,杀胚作用并未明显改善;或可能与供者淋巴细胞活性较低有关;17 例 1 年及以上未孕,可能存在继发性不孕。大量的文献^[9]报道外周血 NK 异常可能是 URSA 的重要原因之一,本研究结论与之一致。有学者曾提出孕前 CD16⁺CD56⁺NK 细胞可作为复发性流产患者再次流产的风险预测指标之一^[7]。本研究显示治疗前

表 1 再次妊娠不同结局的 URSA 患者治疗前后 CD16⁺CD56⁺NK 细胞与 CDC 变化情况(% $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	项目	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
妊娠成功	353	CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK	24.98 ± 6.84	19.82 ± 6.15	4.377	0.000
		CDC	7.23 ± 3.99	12.84 ± 8.91	4.800	0.000
妊娠失败	60	CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK	21.02 ± 10.89	18.63 ± 10.64	2.103	0.059
		CDC	6.67 ± 2.19	8.67 ± 2.23	-2.211	0.049
未孕	17	CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK	23.90 ± 6.98	20.47 ± 7.15	3.377	0.000
		CDC	7.67 ± 4.54	11.83 ± 8.67	4.435	0.000

成功组 CD16⁺ CD56⁺ NK 较失败组低; 而治疗后失败组 CD16⁺ CD56⁺ NK 细胞下降不明显; 提示 CD16⁺ CD56⁺ NK 可能是反映孕前免疫状态的一个免疫参数, 也可能是治疗后评价疗效的指标之一。CDC 不是评价疗效的唯一参考指标; 综合 NK 细胞和 CDC 可能更准确评估患者的基础免疫状态和治疗疗效。后期随访表明免疫治疗患者子代出生体重、头围、生长及智力发育等与正常孕女子代无明显差异, 与杨清等^[15]结果一致。

淋巴细胞免疫治疗对 URSA 免疫调节机制尚未明确。此法对大部分人安全有效, 但仍有 15% ~ 20% 患者反复流产, 故多方面综合评估孕前免疫状态和疗效参数是需要的。NK 细胞和 CDC 可能是评价疗效的两个重要参数。母胎界面局部免疫与体液免疫(Th1/Th2、NK 细胞及其受体、CDC) 与 URSA 的免疫机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Saravelos S H, Li T C. Unexplained recurrent spontaneous miscarriage: how can we explain it[J]. *Hum Reprod* 2012 27(7): 1882-6.
- [2] Rajagopalan S, Bryceson Y T, Kuppusamy S P, et al. Activation of NK cells by all endocytosed receptor for soluble HLA-G[J]. *PLoS Biol*, 2006 4(1): e9.
- [3] Hosseini S, Zamani A H, Asgarian-Omran H, et al. Comparative analysis of NK cells in menstrual and peripheral blood of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion and fertile subjects[J]. *J Reprod Immunol* 2014 103: 9-17.
- [4] 林其德. 复发性流产免疫学诊断与治疗共识[J]. *生殖医学杂志* 2008 17(1): 4-5.
- [5] 丛林, 刘长明, 朱立新, 等. 原因不明复发性流产患者淋巴细胞主动免疫治疗前后细胞亚群的变化[J]. *中国实用妇科与产科杂志* 2012 28(5): 378-80.

- [6] Kling C, Steimann J, Flesch B, et al. Transfusion related risks of intrademat allogeneic lymphocyte immunotherapy, single case in a large cohort and review of the literature[J]. *Am J Reprod Immunol* 2006 56(3): 157-71.
- [7] Moraru M, Carbone J, Alecsardru D, et al. Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56⁺ cells[J]. *Am J Reprod Immunol* 2012 68(1): 75-84.
- [8] Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, et al. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment[J]. *J Reprod Immunol* 2010 85(1): 25-32.
- [9] Sacks G, Yang Y, Gowen E, et al. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure[J]. *Am J Reprod Immunol* 2012 67(5): 434-42.
- [10] Edstrom H S, Soderberg M P, Berg U B. Predictors of outcome in paediatric IgA nephropathy with regard to clinical and histopathological variable(Oxford classification) [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2012 27(2): 715-22.
- [11] Szpakowski A, Malinowski A, Glowacka E, et al. Influence of paternal lymphocytes immunization the selected subpopulations of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent spontaneous abortion of unknown etiology[J]. *Gineko Pol* 2003 74(4): 288-96.
- [12] Perricone C, de Carolis C, Perricone R. Pregnancy and autoimmunity: A common problem[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012 26(1): 47-60.
- [13] Karami N, Boroujerdnia M G, Nikbakht R, et al. Enhancement of peripheral blood CD56dim cell and NK cell cytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortion or *in vitro*-fertilization failure[J]. *Reprod Immunol* 2012 95(1-2): 87-92.
- [14] Moraru M, Carbone J, Alecsardru D, et al. Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56⁺ cells[J]. *Am J Reprod Immunol* 2012 68(1): 75-84.
- [15] 杨清, 游泽山. 主动免疫治疗不明原因反复自然流产的子代生长发育追踪[J]. *中国当代儿科杂志* 2011 13(11): 926-8.

Relationship between NK cells, complement dependent cytotoxicity and pregnancy outcomes in the patients of unexplained recurrent spontaneous abortion with lymphocyte immunotherapy

Li Qin, Cong Lin, Yuan Jing, et al

(Dept of Prenatal Diagnosis Center Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of lymphocyte immunotherapy on the patients with unexplained recurrent spontaneous abortion(URSA). The relationship between CD16⁺ CD56⁺ NK cells, complement dependent cytotoxicity(CDC) and pregnancy outcomes in URSA patients with lymphocyte immunotherapy was retrospectively analyzed. **Methods** Fluorescence staining and flow cytometry were used to detect complement dependent cytotoxicity and CD16⁺ CD56⁺ NK cell in 440 URSA patients. Meanwhile patients with successful pregnancy were followed up.

南通地区矮身材儿童不同病因的运动、学习状况调查研究

李 斌¹, 蔡 晋¹, 沈 毅²

摘要 目的 探究南通地区矮身材儿童常见病因及运动、学习状况,并讨论两者之间的关系。方法 回顾性分析 108 例矮身材儿童的相关资料,通过详尽病史采集、体格检查、实验室检查,诊断矮小以明确病因。采用病例对照研究,对 108 例矮身材儿童进行运动、学习状况的问卷调查。应用多因素 Logistic 回归分析、列联系数分析等统计学方法,分析研究南通地区矮身材儿童的运动和学习情况,及其与病因的相关性。对照组按年龄成组匹配的原则选出具有代表性的 108 名儿童。结果 在确诊的 108 例矮身材患儿中,生长激素缺乏症(GHD) 61 例,占 56.5%;非生长激素缺乏矮身材(NGHD) 47 例,占 43.5%。多因素 Logistic 回归分析显示,参加体育锻炼则为保护因素;好动不安且注意力不集中为危险因素,经常好动不安且注意力不集中所起作用更大($P < 0.001$, $OR = 7.483$, $95\% CI = 2.620 \sim 21.374$);常见病因与运动和学习情况之间无显著相关性($P > 0.05$)。结论 各种类型的运动(篮球、羽毛球、跑步、骑脚踏车)均为儿童矮身材的保护因素,好动不安且注意力不集中为儿童矮身材的危险因素;无论是否存在生长激素缺乏,矮身材儿童都应当尽量增加正确的运动,避免或减少上述危险因素的暴露。

关键词 矮身材; 运动; 学习状况; 儿童; 病因

中图分类号 R 725.8

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2015) 08 - 1146 - 04

矮身材是指与同地区同年龄同性别正常儿童相比较,身高低于正常身高的两个标准差以上,或者低于正常儿童生长曲线的第 3 百分位线^[1-2],在不同种族、不同生活环境下的发病情况均有不同报道。我国近十年有相关城市的调查报告显示,2004 年山东省淄博地区的儿童矮身材患病率为 0.64%^[3],2003 年上海市儿童各年龄组总体矮身材的患病率为 0.50% ~ 6.03%,平均患病率达到 3.77%^[4]。由于人类存在的社会性,儿童因矮身材会产生焦虑、忧郁等不良情绪,不利于在社会生活中处理人际关系,且特发性矮小儿童多动症发生率较高,在社会中导致儿童甚至成人的不良行为^[5]。该研究对南通地区矮身材儿童的病因进行调查分析,并对矮身材儿童的运动、学习状况进行研究,讨论矮身材的常见病因和运动、学习状况之间的相关性,有利于儿童避免生活中接触多种危害因素,配合相关治疗以改善身材矮小。

2015 - 03 - 24 接收

基金项目:江苏省卫生厅预防医学项目(编号:Y2013063)

作者单位:¹南通大学附属医院儿科,²南通大学公共卫生学院,南通 226001

作者简介:李 斌,男,主治医师;

蔡 晋,男,副主任医师,责任作者,E-mail: jsntcaijin@ qq.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 1 月 ~ 2013 年 12 月南通大学附属医院儿科门诊就诊的 108 例身材矮身

Results Among 440 cases, 353 patients were successfully conceived. 60 resulted in miscarriage again before 12 weeks. Successful pregnancy rate was 85.50%. After active immunotherapy, CD16⁺ CD56⁺ NK subtypes declined and complement dependent cytotoxicity percentage increased when compared with those before treatment. There was a significant difference ($P < 0.05$). In a retrospective view, the successful pregnancy group reflected a great drop in CD16⁺ CD56⁺ NK subtype and a notable increasement in CDC percentage ($P < 0.01$), while this situation was not so obvious in failure group. **Conclusion** Lymphocyte active immunotherapy shows a satisfactory efficacy on the treatment of unexplained recurrent spontaneous abortion. CD16⁺ CD56⁺ NK cells and complement dependent cytotoxicity are two separate indicators of immune status in pre-pregnancy URSA patients and turn into two important parameters to evaluate the efficacy of immunotherapy.

Key words unexplained recurrent spontaneous abortion; lymphocyte active immunotherapy; CD16⁺ CD56⁺ NK cells; complement dependent cytotoxicity