

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目： 不完全型胚胎着床障碍模型小鼠滤泡辅助性 T 细胞占比及功能相关细胞因子表达水平分析

作者： 王鹏，巩晓芸，张曼丽，张于念，腊晓琳

网络首发日期： 2025-10-11

引用格式： 王鹏，巩晓芸，张曼丽，张于念，腊晓琳. 不完全型胚胎着床障碍模型小鼠滤泡辅助性 T 细胞占比及功能相关细胞因子表达水平分析[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251011.1507.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

不完全型胚胎着床障碍模型小鼠滤泡辅助性 T 细胞占比及功能相关细胞因子表达水平分析¹

王 鹏¹, 巩晓芸¹, 张曼丽¹, 张于念¹, 腊晓琳^{1,2,3,4}

(¹新疆医科大学第一附属医院生殖医学中心, 乌鲁木齐 830054; ²新疆医科大学生殖疾病与出生缺陷临床医学研究中心, 乌鲁木齐 830054; ³新疆生殖免疫临床医学研究中心, 乌鲁木齐 830054; ⁴省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室, 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的 检测不完全型胚胎着床障碍 (EID) 模型小鼠脾脏滤泡辅助性 T (Tfh) 细胞比例及其功能相关的细胞因子表达水平, 探讨 Tfh 在 EID 导致的不孕症中的免疫学机制。**方法** 将 16 只雌性昆明小鼠随机均分为 2 组, 于妊娠第 4 天利用米非司酮混悬液灌胃的方式建立不完全型 EID 小鼠模型, Control 组给予等量生理盐水; 于妊娠第 8 天处死小鼠, 采用流式细胞术检测不完全型 EID 组和 Control 组小鼠脾脏淋巴细胞内 Tfh 细胞水平, qRT-PCR 检测两组小鼠脾脏淋巴细胞中 B 细胞淋巴瘤分子 6 (Bcl-6) 和趋化因子受体 5 (CXCR5) mRNA 水平, Western blot 检测两组小鼠脾脏淋巴细胞中 Bcl-6 和 CXCR5 蛋白表达水平, ELISA 法检测血清白细胞介素 4 (IL-4)、IL-6 和 IL-21 水平, 免疫组织化学法 (IHC) 检测两组小鼠子宫内膜组织孕激素受体 (PR)、Bcl-6 和 CXCR5 蛋白的水平。**结果** 不完全型 EID 小鼠胚胎着床点数降低, 子宫内膜 PR 受体表达降低。流式检测结果显示, 不完全型 EID 小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺CXCR5⁺Tfh 细胞比例显著高于 Control 组 ($P<0.05$)。与 Control 组相比, 不完全型 EID 组小鼠脾脏淋巴细胞 Bcl-6 和 CXCR5 mRNA 水平和蛋白水平均升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 不完全型 EID 组小鼠血清 IL-4、IL-6 和 IL-21 水平均增高, 子宫内膜中 Bcl-6 和 CXCR5 蛋白显著升高 ($P<0.05$)。**结论** Tfh 细胞及其相关细胞因子 Bcl-6 和 CXCR5 的增加与不完全型 EID 的发生有关, 可能参与女性免疫性不孕的发生。

关键词 滤泡辅助性 T 细胞; 胚胎着床障碍; 趋化因子受体 5 蛋白; B 细胞淋巴瘤分子 6 蛋白; 细胞因子; 子宫内膜容受性

中图分类号 R 711.6

文献标志码 A

Analysis of follicular helper T cell percentage and expression levels of

2025-09-14 接收

基金项目: 河南省免疫与靶向药物重点实验室开放课题 (编号: HNKLTID2024001); 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题 (编号: SKL-HIDCA-2024-GX2); 自治区卫生健康科技计划创新科研项目 (编号: 2025001CXKYXM650030870)

作者简介: 王 鹏, 男, 主管技师;

腊晓琳, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: 909232905@qq.com

functionally related cytokines in a mouse model of incomplete embryo implantation disorders

Wang Peng¹, Gong Xiaoyun¹, Zhang Manli¹, Zhang Yunian¹, La Xiaolin^{1,2,3,4}

(¹Center for Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; ²Xinjiang Medical University Clinical Medical Research Centre of Reproductive Diseases and Birth Defects, Urumqi 830054; ³Xinjiang Clinical Research Centre for Reproductive Immunology, Urumqi, 830054; ⁴State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention, and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Urumqi, 830054)

Abstract Objective To detect the proportion of splenic follicular helper T (Tfh) cells and their functionally related cytokine expression levels in the incomplete embryo implantation disorder (EID) model mice, and to explore the immunological mechanism of Tfh in infertility caused by embryo implantation disorder. **Methods** Sixteen female Kunming mice were randomly divided into two groups, with eight mice in each group. On day 4 of pregnancy, an incomplete EID mouse model was established by oral gavage of mifepristone suspension, while an equal volume of saline was administered to the control group. On day 8 of pregnancy, the mice were euthanized. Flow cytometry was used to detect the levels of Tfh cells in the spleen lymphocytes of both incomplete EID mice and normal control mice. qRT-PCR was performed to measure the mRNA levels of B-cell lymphoma 6 (Bcl-6) and chemokine receptor 5 (CXCR5) in the spleen lymphocytes of both groups. Western blotting was employed to assess the protein expression levels of Bcl-6 and CXCR5 in the spleen lymphocytes of both groups. Serum levels of interleukin-4 (IL-4), IL-6, and IL-21 were measured by ELISA. Immunohistochemistry (IHC) was used to observe the expression levels of progesterone receptor (PR), Bcl-6, and CXCR5 proteins in the uterine endometrial tissue of mice in both groups. **Results** Incomplete-type EID mice had a reduced number of embryo implantation points and reduced endometrial PR receptor expression. Flow assay results showed that the proportion of CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells in splenic lymphocytes of incomplete-type EID mice was significantly higher than that of normal controls ($P<0.05$). Compared with the normal control group, Bcl-6 and CXCR5 mRNA levels and protein levels were elevated in splenic lymphocytes of incomplete EID mice, with statistically significant differences ($P<0.05$); serum IL-4, IL-6, and IL-21 levels were elevated in incomplete EID mice, and Bcl-6 and CXCR5 proteins in the endometrium were significantly elevated ($P<0.05$). **Conclusion** The

increase of Tfh cells and their associated cytokines Bcl-6 and CXCR5 is associated with the development of incomplete EID, and may be involved in the development of female immune infertility.

Key words follicular helper T cells; embryo implantation disorder; C-X-C Chemokine Receptor Type 5 protein; B-cell lymphoma 6 protein; cytokines; endometrial receptivity

Fund programs: Open Project of Henan Key Laboratory of Immunology and Targeted Drugs (No. HNKLTID2024001); Open Project of State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia (No. SKL-HIDCA-2024- GX2); Innovative Research Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region Health and Wellness, Science and Technology Program (No. 2025001CXKYXM650030870)

Corresponding author La Xiaolin, E-mail: 909232905@qq.com

胚胎着床是哺乳动物繁殖过程中至关重要的环节,需要母体子宫内膜与胚胎之间的高度协调与相互作用。在临床实践中,胚胎着床障碍(embryo implantation dysfunction, EID)是导致女性不孕的重要因素之一,其发病机制复杂,涉及多种生理与病理过程。近年来,母体免疫系统在胚胎着床过程中的作用日益受到关注,尤其滤泡辅助性 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh)及其相关因子的变化被认为与 EID 密切相关^[1]。Tfh 细胞是辅助性 T 细胞(CD4⁺T 细胞)的重要亚群,通过高表达趋化因子受体 5(chemokine receptor type 5, CXCR5)和 B 细胞淋巴瘤分子 6(B cell lymphoma 6, Bcl-6)等分子定位于滤泡区,调控 B 细胞活化及抗体生成,参与体液免疫应答。已有研究^[2]表明,Tfh 细胞功能异常或其标志分子表达失调可能诱发妊娠相关免疫病理反应,影响胚胎着床。然而其在 EID 中的具体机制尚不明确。该研究通过建立不完全型 EID 小鼠模型,系统探讨 Tfh 细胞及其关键因子在胚胎着床过程中的作用,以进一步揭示 EID 的免疫学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 16 只 7 周龄雌性昆明小鼠,体质量 30 ~ 35 g,均为发育成熟且未曾怀孕或分娩的个体;8 只 7 周龄雄性昆明小鼠,体质量 35 ~ 40 g,均为发育成熟且未曾交配的个体。所有小鼠均来自并饲养于新疆医科大学实验动物中心。饲养环境为 12 h 昼夜交替光照,20 ~ 24 °C,相对湿度保持在 40% ~ 60%,小鼠自由进食。此项研究已通过新疆医科大学实验动物伦理委员会的审查批准(批号:IACUC-20211224-47)。

1.1.2 试剂与仪器 米非司酮片（武汉九珑人福药业有限责任公司），白细胞介素-4（interleukin-4, IL-4）、IL-6 和 IL-21 ELISA 试剂盒（上海江莱生物科技有限公司），RIPA 裂解液、PMSF、BCA 蛋白定量试剂盒（北京索莱宝科技有限公司），一步法 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒（北京博泰斯生物技术有限公司），0.45 μm PVDF 膜（上海碧云天生物技术有限公司），ECL 化学发光底物试剂盒（北京兰杰柯科技有限公司），反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒（宝生物工程（大连）有限公司），APC-CyTM7 标记抗小鼠 CD3 抗体、FITC 标记抗小鼠 CD4 抗体、PE 标记抗小鼠 CXCR5 抗体（美国 BD 有限公司），兔抗 Bcl-6 多克隆抗体、兔抗孕激素受体（progesterone receptor, PR）多克隆抗体（武汉三鹰生物技术有限公司），兔抗 CXCR5 多克隆抗体（北京博奥森生物技术有限公司）。qPCR 引物由上海吉凯基因有限公司合成，引物序列见表 1。

倒置显微镜（日本尼康株式会社），酶标仪（上海伯乐生命医学产品有限公司），电泳仪（上海伯乐生命医学产品有限公司），流式细胞仪（美国 BD 有限公司），荧光定量 PCR 仪（爱普拜斯应用生物系统贸易（上海）有限公司），Westen Blot 成像扫描仪（北京深蓝云生物科技有限公司），2.5/10/100/1 000 μL 移液器（德国艾本德股份公司）。

表 1 Bcl-6、CXCR5 和 GADPH 基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences for Bcl-6, CXCR5 and GADPH genes

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
Bcl-6	TGGCTCCAAGTTTCCTATGTG	GAGGAGTTGGCTTGCATTCC
CXCR5	GAAAACGAAGCGGAAACTAGAG	AGGAAGATGACAATGTGGTAGG
GADPH	TCCATTTCCTGTTCTCCC	GATTTTCACCTGGCACTGCA

1.2 方法

1.2.1 不完全型 EID 小鼠模型的建立 雌雄小鼠适应性分笼喂养 1 周后，以 2:1 的比例将处于动情期的雌、雄鼠进行合笼处理，次日早晨根据雌鼠阴道是否有阴栓判断其是否受孕，若发现阴栓则记为雌鼠妊娠第 1 天。将 16 只妊娠雌鼠随机分为 2 组，分别为 Control 组和 EID 组，每组 8 只小鼠。于小鼠妊娠第 4 天早上进行造模，EID 小鼠给予 0.16 mL/只米非司酮混悬液灌胃制备不完全型 EID 模型，Control 组小鼠灌胃等量生理盐水，喂养至妊娠第 8 天处死。

1.2.2 ELISA 法检测血清 IL-4、IL-6 和 IL-21 水平 雌鼠眼球取血后收集外周血血清，按照说明书将标本进行包被、洗涤、孵育等过程后，于 450 nm 处测各孔光密度值（optical density, OD），并绘制标准曲线，计算 IL-4、IL-6 和 IL-21 含量。

1.2.3 小鼠脾脏淋巴细胞 Tfh 细胞比例的检测 在无菌条件下以仰卧位固定小鼠，暴露腹腔

后取出脾脏并将其浸泡在预冷的 PBS 溶液中。将脾脏置于洁净的细胞筛上，用注射器尾端碾压小鼠脾脏。用 PBS 冲洗细胞筛并将组织细胞收集到 50 mL 离心管中，2 000 r/min 离心 5 min 后加入 4 mL 红细胞裂解液，重悬混匀并静置 5 min 后以 2 000 r/min 离心 5 min 并弃上清液。PBS 重悬并通过滤网过滤至新的离心管中，以 2 000 r/min 离心 5 min 弃上清液。PBS 重悬，并调整浓度至少为 1×10^6 个/mL。取 100 μ L 细胞液加入抗体：2 μ L CD3-APC-CyTM7、CD4-FITC、CXCR5-PE，室温避光孵育 15 min。加入 400 μ L 无菌 PBS 进行洗涤，1 500 r/min 离心 5 min，弃去上清液。再次加入 300 μ L 无菌 PBS 重悬细胞，混匀并过滤细胞悬液。调整流式细胞仪的荧光补偿后进行检测。

1.2.4 小鼠脾脏淋巴细胞 Bcl-6 mRNA 和 CXCR5 mRNA 表达水平的检测 根据 TRIzol 试剂盒的操作说明提取脾脏淋巴细胞总 RNA，使用 DNase 酶处理去除基因组 DNA，然后进行反转录反应合成 cDNA。Bcl-6、CXCR5 以及内参基因 GAPDH 的基因序列可以通过基因库（Gene Bank）查找。定量 PCR 反应体系采用 SYBR Green 荧光染料进行检测，并确保反应过程中避光操作，每个样本进行 3 次技术重复。使用荧光定量 PCR 仪进行实时 PCR 检测，分析转录因子及细胞因子基因的转录水平。根据试剂盒说明书进行 PCR 扩增，qPCR 反应条件为：初始变性 95 $^{\circ}$ C，持续 30 s；接下来进行 40 个循环，每个循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s 和 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 34 s。通过记录每个孔的循环阈值（cycle threshold value, Ct），并使用相对定量法计算基因的表达量。

1.2.5 Western blot 检测小鼠脾脏淋巴细胞中 Bcl-6 和 CXCR5 蛋白的表达 从小鼠脾脏中提取的淋巴细胞并置于 EP 管中，每管加入 1 mL RIPA 裂解液和 10 μ L 苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF），样品冰上静置 30 min，以确保充分裂解。将裂解后的样品放入低温高速离心机中，12 000 r/min 离心 15 min，收集中间层液体，并转移到 1.5 mL 的 EP 管中。使用 BCA 法测定蛋白质浓度。接下来，取适量的组织蛋白，置于 100 $^{\circ}$ C 的金属加热器中加热 10 min，使蛋白质完全变性。加热后，冷却至室温并将其储存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。配制 10% 的分离胶。加样完毕后，先 80 V 电泳 30 min，后用 100 V 继续电泳 80 ~ 90 min。电泳结束后，设置电流为 0.25 A，电转 90 min。电转完成后，将 PVDF 膜浸泡在 5% 的脱脂奶粉溶液中，在室温下封闭 60 min。封闭结束后，加入 Bcl-6 和 CXCR5 抗体稀释液（1:3 000），内参蛋白甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 1:5 000）并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。次日将 PVDF 膜放入 TBST 溶液中，洗涤 5 次，每次 10 min。然后加入辣根过氧化物酶二抗稀释液（1:5 000），在室温下孵育 60 min，使用 TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。最后，将显色液 A 和 B 按 1:1 的比例混合，取 200 ~ 250 μ L

均匀涂抹于膜上，曝光并拍照记录。

1.2.6 免疫组化观察小鼠子宫内膜 PR、Bcl-6 和 CXCR5 的表达 将子宫内膜白片置于 60 °C 的烤箱中加热 4 ~ 6 h，再在 37 °C 孵箱中孵育过夜。使用二甲苯脱蜡 2 次，每次 10 min，通过乙醇梯度复水，每次 3 min。用去离子水振荡洗涤 2 次，每次 5 min。进行抗原修复后，样本在室温下冷却。用 3% H₂O₂ 在室温下避光浸泡 10 min，使用 PBS 缓冲液清洗样品 3 次，每次 5 min。加入封闭血清并在室温下孵育 15 min，滴加 PR、Bcl-6 和 CXCR5 抗体稀释液（1:200），并在 4 °C 条件下过夜孵育。孵育结束后，复温 15 min，用 PBS 清洗样品 3 次，每次 5 min。加入辣根过氧化物酶稀释液（1:200），在室温下孵育 30 min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。再次滴加二抗，在常温下继续孵育 20 min，最后使用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。使用 DAB 显色剂染色，苏木精复染。之后进行乙醇梯度脱水，用二甲苯进行透明化处理 2 次，每次 10 min。使用中性树胶封片，观察并拍摄显微镜下的图像。通过 Image J 软件分析，计算阳性区域的累积 OD 值及其对应的面积，并用平均光密度值（average optical density, AOD）作为阳性表达的定量指标，反映 PR 的表达情况。AOD = 累积 OD 值/阳性区域面积。

1.3 统计学处理 统计分析和制图分别使用了 SPSS 26.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件。采用 Shapiro-Wilk 检验对数据进行正态性检验。对于呈正态分布的数据，组间差异使用 *t* 检验进行比较；对于非正态分布的数据，则采用非参数秩和检验进行组间差异比较。所有报告的 *P* 值均为双侧检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不完全型 EID 小鼠模型的建立 通过评估模型小鼠的胚胎着床点数及子宫内膜 PR 受体的表达判断是否造模成功。结果显示，EID 组小鼠的胚胎着床点数为 0.13（0，1）个，Control 组小鼠的胚胎着床点数为 14.75（13，17）个（*P* < 0.001，图 1）。子宫内膜免疫组化结果提示，PR 在 Control 组中的表达连续、完整，EID 组中 PR 表达部分缺失，进一步蛋白半定量分析显示，EID 组小鼠子宫内膜组织中 PR 蛋白的表达水平显著低于 Control 组（*P* = 0.003，图 2）。

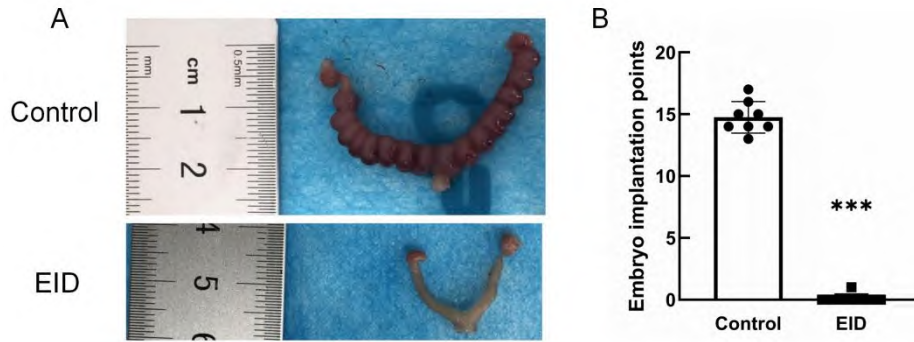


图 1 两组小鼠胚胎着床点数的比较

Fig. 1 Comparison of the number of embryo implantation points in two groups of mice

A: Morphological observation of the uterus in two groups of mice; B: Bar graph of the number of points of embryo implantation in two groups of mice; *** $P < 0.001$ vs Control group.

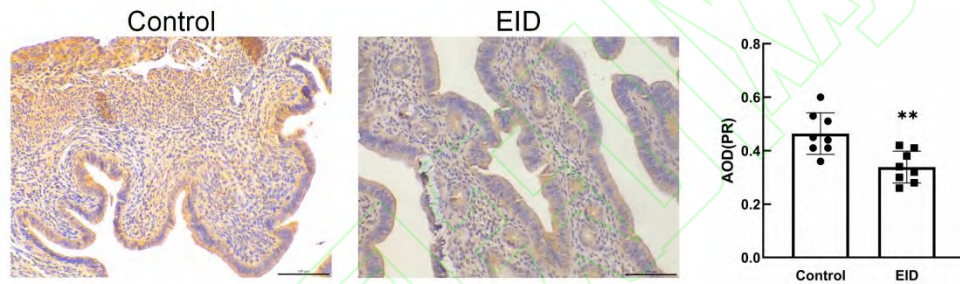


图 2 Control 组与 EID 组小鼠子宫内膜孕激素受体表达量的比较 免疫组化 $\times 400$

Fig. 2 Comparison of endometrial progesterone receptor expression in Control and EID groups of mice, detected by immunohistochemistry $\times 400$

** $P < 0.01$ vs Control group.

2.2 EID 模型对小鼠脾脏淋巴细胞中 $CD4^+CXCR5^+$ Tfh 细胞表达水平的影响 将脾脏淋巴细胞分离后，进行多重免疫荧光标记，以 $CD4^+CXCR5^+$ 作为 Tfh 的标志进行分析。结果显示，与 Control 组相比，EID 组小鼠脾脏 $CD4^+CXCR5^+$ Tfh 细胞比例显著增多 ($P < 0.001$ ，图 3)。提示 EID 组雌鼠可能通过促进 Tfh 细胞的扩增或激活，调控机体免疫反应的发生。

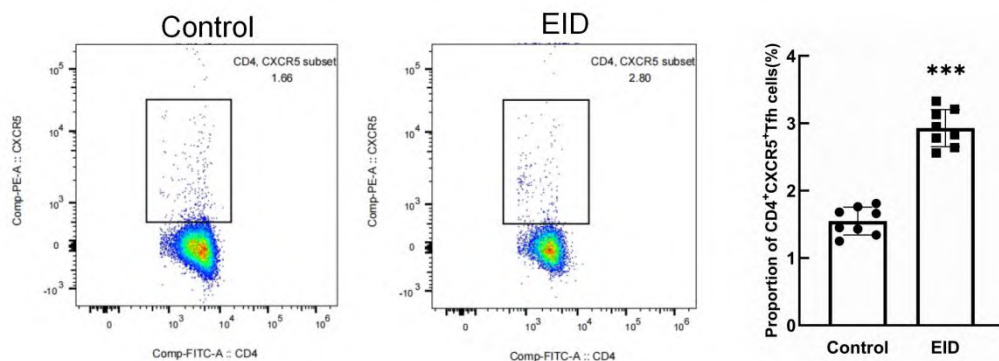


图 3 Control 组和 EID 组小鼠脾脏 CD4⁺CXCR5⁺Tfh 细胞比例分析

Fig. 3 Analysis of the proportion of CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells in the spleen of mice in Control and EID groups

*** $P<0.001$ vs Control group.

2.3 EID 模型对小鼠脾脏淋巴细胞中 Bcl-6 和 CXCR5 mRNA 表达水平的影响 Bcl-6 是 Tfh 细胞的转录因子，而 CXCR5 是 Tfh 细胞的标志性受体之一。为了进一步确认和细化 Tfh 细胞的激活及功能状态，本研究检测了小鼠脾脏淋巴细胞中 Bcl-6 和 CXCR5 mRNA 和蛋白的表达水平。qRT-PCR 结果提示：EID 组小鼠淋巴细胞 Bcl-6 和 CXCR5 mRNA 含量升高（均 $P<0.001$ ）。Western blot 结果提示，与 Control 组相比，EID 组小鼠 Bcl-6 和 CXCR5 蛋白的表达水平也显著增加（均 $P<0.001$ ），见图 4。

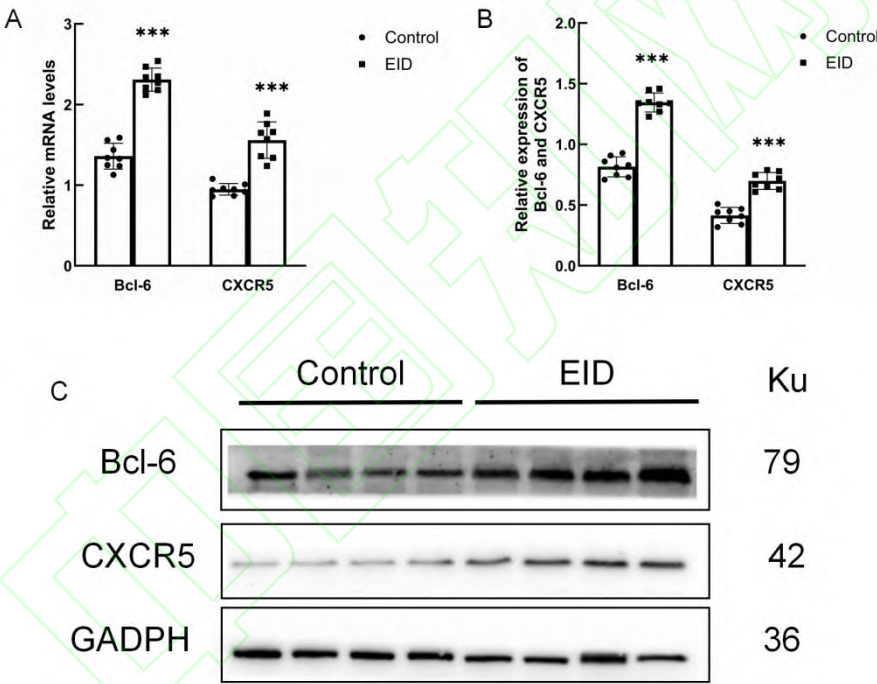


图 4 两组小鼠脾脏淋巴细胞中 Bcl-6 和 CXCR5 mRNA 和蛋白的表达水平

Fig. 4 The expression levels of Bcl-6 and CXCR5 mRNA and protein in splenic lymphocytes of mice in two groups

A: The expression levels of Bcl-6 and CXCR5 mRNA in splenic lymphocytes of mice in both groups; B, C: The expression levels of Bcl-6 and CXCR5 protein in splenic lymphocytes of mice in both groups; *** $P<0.001$ vs Control group.

2.4 EID 模型对小鼠血清中 IL-4、IL-6 和 IL-21 表达水平的影响 血清 ELISA 结果提示：与 Control 组相比，EID 组小鼠血清中 IL-4 ($P=0.002$)、IL-6 ($P=0.004$) 和 IL-21 ($P<0.001$)

的含量均升高，见图 5。结合流式细胞术的检测结果显示，EID 模型小鼠 Tfh 细胞活性增强，体液免疫应答可能被激活。

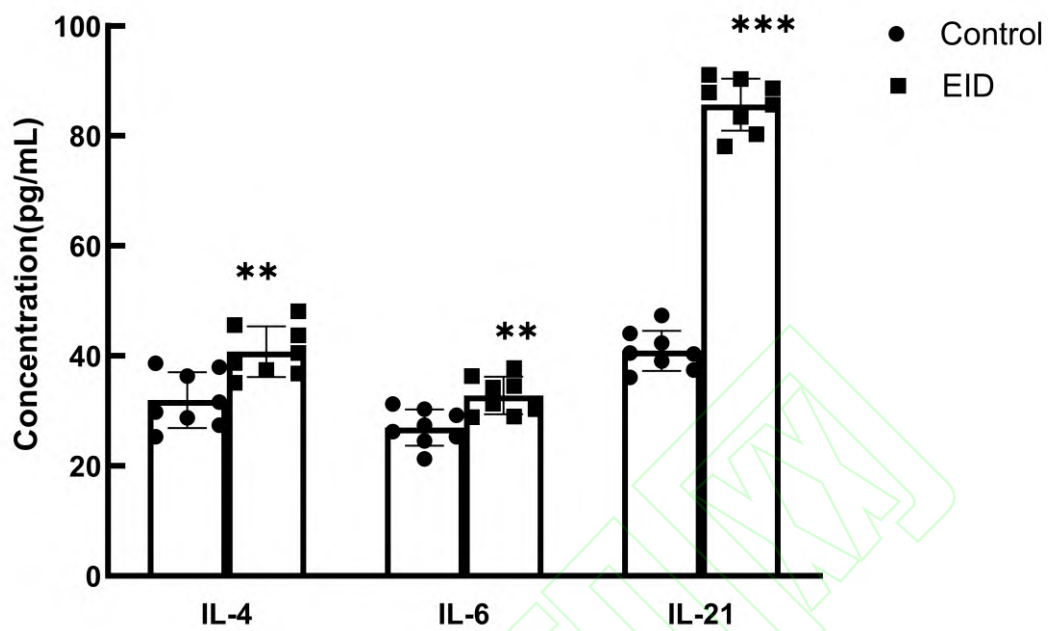


图 5 小鼠血清中 IL-4、IL-6、IL-21 的表达水平

Fig. 5 The expression levels of IL-4, IL-6 and IL-21 in mouse sera

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

2.5 EID 模型对小鼠子宫内膜 Bcl-6 和 CXCR5 蛋白表达水平的影响 本研究采用免疫组化法检测了子宫内膜组织中 Bcl-6 和 CXCR5 的表达水平，检测结果提示，阳性信号同时存在于子宫内膜基质细胞和腺上皮细胞中，Bcl-6 阳性信号定位于间质细胞的细胞核或腺上皮细胞的胞核，CXCR5 阳性信号定位于间质细胞和线体细胞的胞膜或胞质中。与 Control 组相比，EID 组小鼠子宫内膜组织中 Bcl-6 和 CXCR5 的表达显著增多（均 $P < 0.001$ ，图 6）。

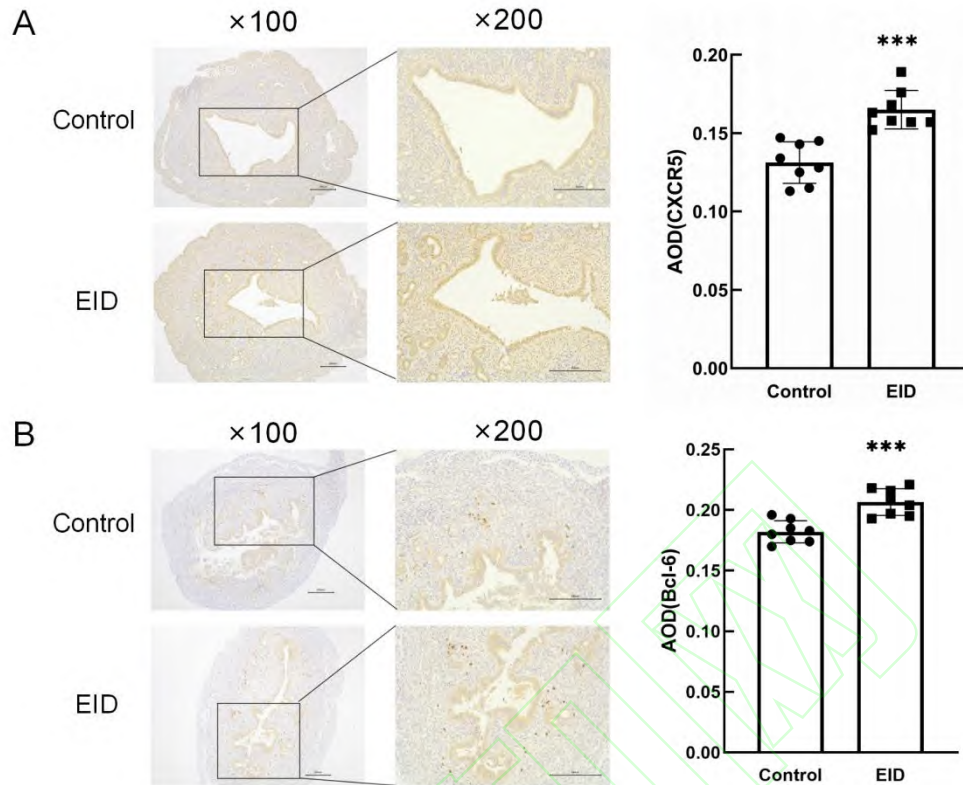


图 6 小鼠子宫内膜组织中 Bcl-6 (A) 和 CXCR5 (B) 的表达水平

Fig. 6 The expression levels of Bcl-6 (A) and CXCR5 (B) in mouse endometrial tissues

*** $P < 0.001$ vs Control group.

3 讨论

成功的胚胎植入依赖于母体子宫内膜与胚胎之间的成功“对话”。在这一过程中，蜕膜中的免疫细胞和基质细胞发挥了关键作用，参与了母胎相互作用的初期阶段。Tfh 细胞是 $CD4^+$ T 细胞的一种特殊亚群，在调控体液免疫中具有核心地位，主要通过促进 B 细胞增殖、分化及抗体生成来发挥作用^[3]。研究^[4]表明，妊娠期妇女的外周血和蜕膜组织中， $CD4^+CXCR5^+$ Tfh 细胞的比例会增加，且在孕晚期，外周血中 $PD-1^+$ Tfh 细胞的比例显著高于孕早期。此外， $PD-1^+/CXCR3^+$ Tfh 细胞的比例与外周血中的雌激素水平呈正相关^[5]。适度水平的 Tfh 细胞有助于维持妊娠期免疫平衡，但异常增多则可能与病理性妊娠相关^[6]。例如，子痫前期和复发性流产（recurrent spontaneous abortion, RSA）患者外周血中 Tfh 细胞比例显著上升，免疫性不孕患者中也存在类似现象^[7]，且体外受精成功率与 Tfh 细胞水平呈负相关，提示其异常活跃可能影响胚胎着床^[8-9]。因此，妊娠期间 Tfh 细胞的积累需要适时且适度，过多或过少的 Tfh 细胞积累都可能导致 EID 或流产。本研究中，EID 组胚胎着床点数显著降低，同时伴有子宫内膜 PR 受体表达异常。进一步免疫学分析显示，EID 组小鼠脾脏中 $CD4^+CXCR5^+$

Tfh 细胞比例明显上升，提示 Tfh 细胞的异常活化参与母胎免疫耐受的失衡，进而影响胚胎的着床和妊娠。

在细胞因子层面，EID 组小鼠血清中 IL-4、IL-6 及 IL-21 水平显著升高。IL-21 作为 Tfh 细胞的关键效应因子，不仅促进 B 细胞应答，还可通过抑制 Treg 细胞分化、破坏 Th17/Treg 平衡，从而影响母胎免疫耐受^[10]。已有临床报道，RSA 患者外周血及蜕膜中 IL-21 及相关炎症因子水平升高^[11]，提示这类细胞因子可能不利于胚胎的种植和妊娠维持。

Tfh 细胞的分化和功能依赖于转录因子 Bcl-6 和趋化因子受体 CXCR5 的调控^[12]。Bcl-6 作为 Tfh 细胞的关键转录因子，不仅促进其分化，还正向调控 CXCR5 的表达，后者介导 Tfh 细胞向 B 细胞区迁移，从而参与免疫应答的精细调节^[13-14]。多项临床研究^[15-16]指出，Bcl-6 在子宫内膜中的过度表达与不孕症患者不良妊娠结局显著相关，提示其可能通过影响子宫内膜容受性而损害胚胎植入能力。此外，Bcl-6 还被认定为子宫内膜异位症的潜在诊断标志物，进一步支持其在子宫内膜功能紊乱中的重要作用^[13]。本研究显示，在不完全型 EID 模型小鼠的脾脏淋巴细胞中，Bcl-6 和 CXCR5 在转录和蛋白水平均显著上调，表明 Tfh 细胞处于高度活化和分化状态。更重要的是，在子宫内膜组织中同样检测到 Bcl-6 与 CXCR5 表达的明显升高，且主要分布于基质细胞与腺上皮细胞。这一结果提示，Tfh 细胞及相关分子可能直接参与子宫内膜局部免疫微环境的调节。基于上述发现，课题组提出 EID 的发生可能与子宫内膜中免疫微环境紊乱与腺体功能异常之间存在“双向调控”机制：Bcl-6 所驱动的免疫异常及炎症因子分泌可能抑制腺体正常功能，而腺体功能失调又可能进一步加剧免疫细胞的异常募集与活化，形成正反馈循环，最终导致胚胎着床失败。该机制为理解 EID 的复杂病理生理过程提供了新视角，也表明 Tfh 细胞—Bcl-6/CXCR5 轴在母胎界面免疫调节中具有潜在重要作用。

此外，本研究所有流式、qPCR 和 Western blot 数据均来源于脾脏组织，未能直接证实子宫局部 Tfh 细胞的存在及分布，因此无法完全阐明其在子宫内膜微环境中的具体作用机制。未来需开展子宫组织的免疫细胞表型分析和空间定位研究，以更精确揭示 Tfh 细胞在母胎界面中的功能路径。

综上所述，本研究提示 Tfh 细胞的过度活化及 Bcl-6、CXCR5 的信号上调可能与 EID 密切相关。这些异常通过促进炎症因子分泌、破坏免疫细胞平衡及直接干扰子宫内膜腺体功能，最终影响胚胎植入。调控 Tfh 细胞活性或下游信号分子可能为免疫相关着床失败提供新的治疗策略。

参考文献

- [1] Wang J, Han T, Zhu X. Role of maternal-fetal immune tolerance in the establishment and maintenance of pregnancy[J]. Chin Med J, 2024, 137(12): 1399-406. doi:10.1097/CM9.0000000000003114.
- [2] Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, et al. T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/tfh cells[J]. Front Immunol, 2020, 11: 2025. doi:10.3389/fimmu.2020.02025.
- [3] Kim Y J, Choi J, Choi Y S. Transcriptional regulation of Tfh dynamics and the formation of immunological synapses[J]. Exp Mol Med, 2024, 56(6): 1365-72. doi:10.1038/s12276-024-01254-7.
- [4] Monteiro C, Kasahara T M, Castro J R, et al. Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells[J]. J Reprod Immunol, 2017, 121: 1-10. doi:10.1016/j.jri.2017.04.007.
- [5] Hu C, Liu H, Pang B, et al. Supraphysiological estradiol promotes human T follicular helper cell differentiation and favours humoral immunity during *in vitro* fertilization[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(14): 6524-34. doi:10.1111/jcmm.16651.
- [6] Monteiro C, Kasahara T, Sacramento P M, et al. Human pregnancy levels of estrogen and progesterone contribute to humoral immunity by activating T(FH)/B cell axis[J]. Eur J Immunol, 2021, 51(1): 167-79. doi:10.1002/eji.202048658.
- [7] Tola E N. The association between *in vitro* fertilization outcome and the inflammatory markers of complete blood count among nonobese unexplained infertile couples[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2018, 57(2): 289-94. doi:10.1016/j.tjog.2018.02.019.
- [8] Tsuda S, Zhang X, Hamana H, et al. Clonally expanded decidual effector regulatory T cells increase in late gestation of normal pregnancy, but not in preeclampsia, in humans[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1934. doi:10.3389/fimmu.2018.01934.
- [9] 侯悦, 刘倩, 金大中, 等. LMWH 对复发性流产患者外周血滤泡辅助性 T 细胞亚群影响的研究[J]. 现代免疫学, 2022, 42(2): 139-44.
- [9] Hou Y, Liu Q, Jin D Z, et al. The effect of LMWH on circulating follicular helper T cells in patients with recurrent spontaneous abortion[J]. Curr Immunol, 2022, 42(2): 139-44.

[10] 方紫璇, 余楠. 不明原因复发性流产中 Th17/Treg 免疫平衡机制研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(21): 2657-63. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2021.21.017.

[10] Fang Z X, Yu N. Research progress of Th17/Treg immune balance mechanism in unexplained recurrent abortion[J]. Chin J Immunol, 2021, 37(21): 2657-63. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2021.21.017.

[11] Wang W J, Hao C F, Yi-Lin, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. J Reprod Immunol, 2010, 84(2): 164-70. doi:10.1016/j.jri.2009.12.003.

[12] Wei X, Niu X. T follicular helper cells in autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2023, 134: 102976. doi:10.1016/j.jaut.2022.102976.

[13] Ekemen S, Comunoglu C, Kayhan C K, et al. Endometrial staining of CD56 (uterine natural killer), BCL-6, and CD138 (plasma cells) improve diagnosis and clinical pregnancy outcomes in unexplained infertility and recurrent IVF failures: standardization of diagnosis with digital pathology[J]. Diagnostics, 2023, 13(9): 1557. doi:10.3390/diagnostics13091557.

[14] 黄自坤, 张露, 李雪, 等. 类风湿关节炎患者外周血 TFH 细胞 TIGIT 和 PD1 表达及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(5): 838-44. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.022.

[14] Huang Z K, Zhang L, Li X, et al. Expression of TIGIT and PD1 on TFH from RA patients and clinical significance[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(5): 838-44. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.022.

[15] Almquist L D, Likes C E, Stone B, et al. Endometrial BCL6 testing for the prediction of *in vitro* fertilization outcomes: a cohort study[J]. Fertil Steril, 2017, 108(6): 1063-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.09.017.

[16] Huang D, Chan M, Solomon M, et al. B-cell lymphoma 6 expression significantly differs by the uterine preparation method used for frozen embryo transfer[J]. Fertil Steril, 2023, 120(2): 305-11. doi:10.1016/j.fertnstert.2023.04.021.