

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

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 R711.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)01-0038-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.01.007

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(C-X-C chemokine receptor type 5 protein, 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,体重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,体重35~40 g,均为发育成熟且未曾交配的个体。所有小鼠均来自

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:HNK LITD2024001);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:2025001CXKYXM6 50030870)

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

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 ℃,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),Western 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)。

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,按照说明书对本进行包被、洗涤、孵育后,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,并调整浓度为至少1×10⁶个/mL。取100 μL细胞液加入抗体:2 μL CD3-APC-CyTM7、CD4-FITC、CXCR5-PE,室温避光孵育15 min。加入400 μL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 μL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 ℃,持续30 s;接下来进行40个循环,每个循环包括95 ℃变性5 s和60 ℃退火/延伸34 s。通过记录每

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	TGGCTCCAAGTTTCCTATGTC	GAGGAGTTGGCTTGCATTCC
CXCR5	GAAAACGAAGCGGAACTAGAC	AGGAAGATGACAATGTGCTAGC
GADPH	TCCATTCCCCTGTTCTCCC	GATTTTCACCTGGCACTGCA

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, GADPH)(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 $^{\circ}$ C的烤箱中加热4~6 h,再在37 $^{\circ}$ 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% H_2O_2 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 $^{\circ}$ 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ImageJ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。 $\text{AOD} = \text{累积OD值} / \text{阳性区域面积}$ 。

1.3 统计学处理 统计分析和制图分别使用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蛋白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)。

2.2 EID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,将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。

2.3 EID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。

2.4 EID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($P =$

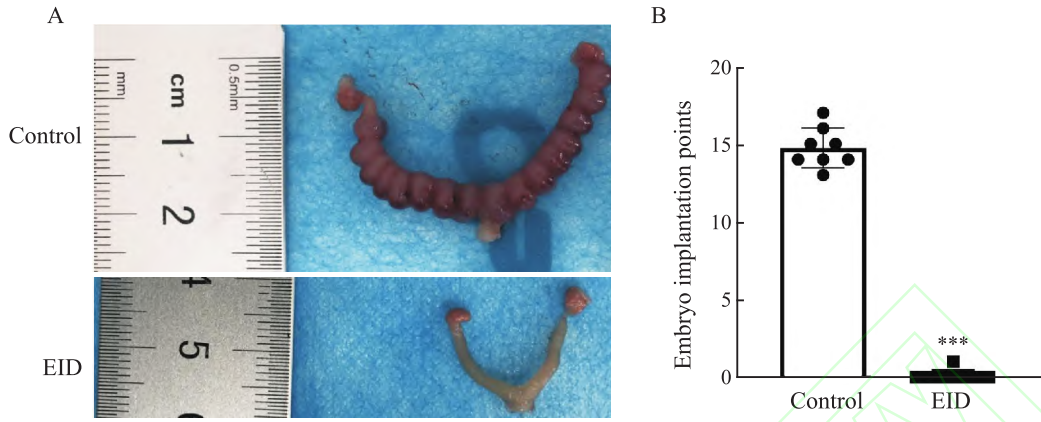


图1 两组小鼠胚胎着床点数的比较

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.

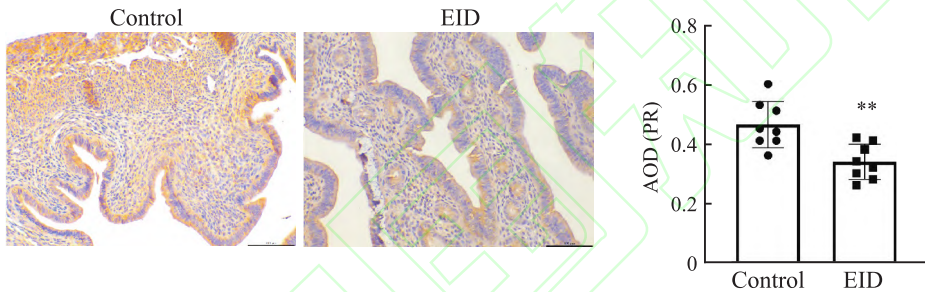


图2 Control组与EID组小鼠子宫内膜孕激素受体表达量的比较 免疫组化×400

Fig. 2 Comparison of endometrial progesterone receptor expression in Control and EID groups of mice Immunohistochemistry ×400

** $P < 0.01$ vs Control group.

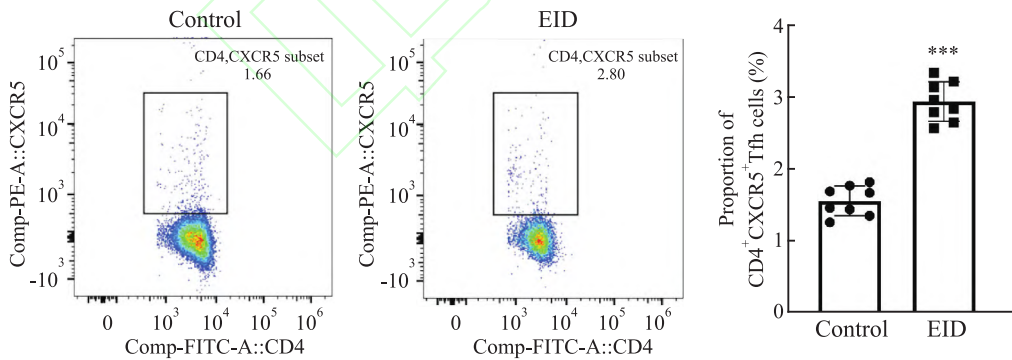


图3 Control组和EID组小鼠脾脏CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞比例分析

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.

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。

2.5 EID对小鼠子宫内膜Bcl-6和CXCR5蛋白表达水平的影响 免疫组化法检测子宫内膜组织中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粒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)。

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

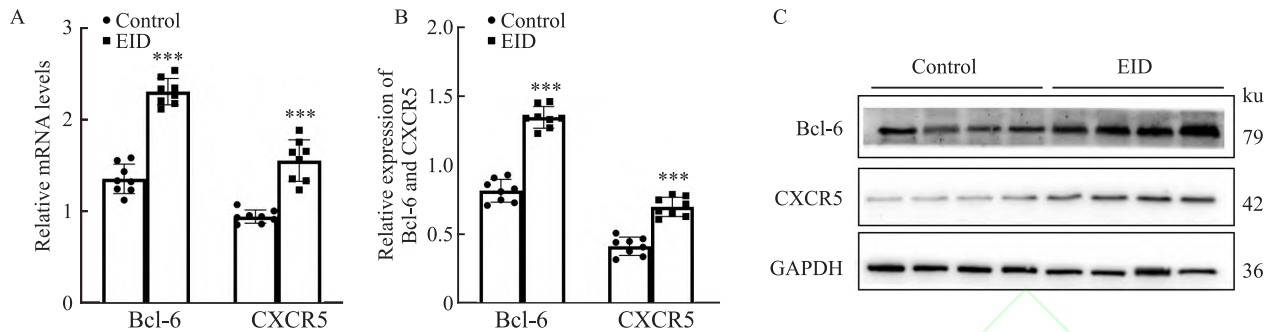


图4 两组小鼠脾脏淋巴细胞中Bcl-6和CXCR5 mRNA和蛋白的表达水平

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.

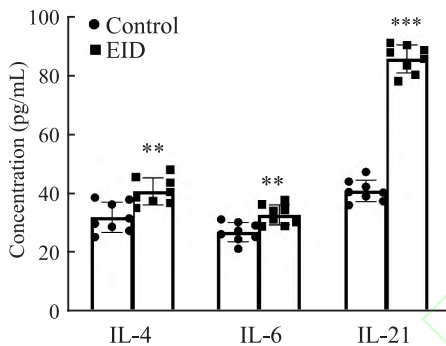


图5 小鼠血清中IL-4、IL-6、IL-21的表达水平

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.

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,同时伴有子宫内膜蛋白表达异常。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]。已有临床研究^[11]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,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 and 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,本研究提出在EID小鼠子宫内膜中,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,而腺体功能失调又进一步加剧免疫细胞的异常募集与活化,这种相

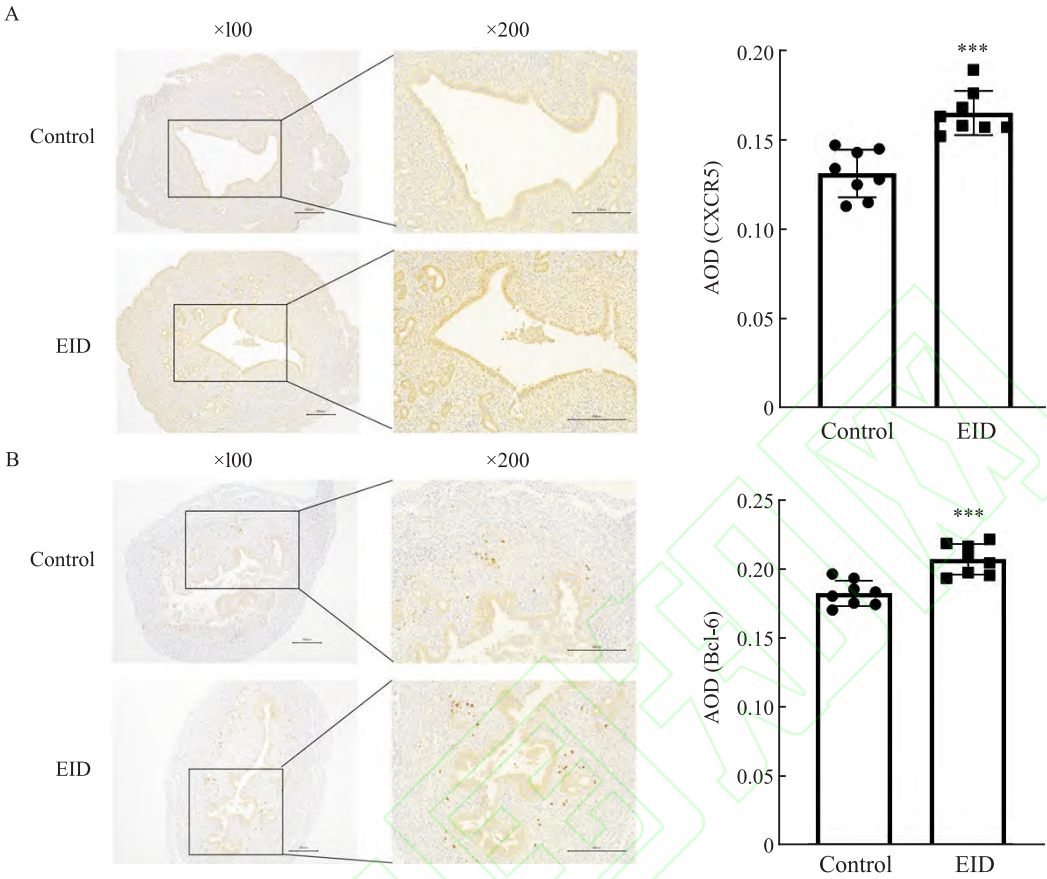


图6 小鼠子宫内膜组织中 Bcl-6(A)和 CXCR5(B)的表达水平

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

***P<0.001 vs Control group.

互作用形成正反馈循环,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、qRT-PCR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。

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.

Analysis of follicular helper T cell percentage and expression levels of 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}

(¹ Center for Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; ² Xinjiang Medical University Clinical Medical Research Centre of Reproductive Diseases and Birth Defects, Urumqi 830054; ³ Xinjiang Clinical Research Centre for Reproductive Immunology, Urumqi 830054; ⁴ State 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 C-X-C chemokine receptor type 5 protein (CXCR5) in the spleen lymphocytes of both groups. Western blot 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 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).

辛伐他汀通过抑制铁死亡减轻肾脏缺血再灌注损伤

付志辉¹, 刘忠忠², 叶启发², 肖琦¹, 邓琴¹, 肖建生¹, 符碧琪³

(南昌大学第一附属医院¹器官移植科、³免疫科, 南昌 330006;

²武汉大学中南医院肝胆疾病研究院, 武汉 430000)

摘要 目的 探讨辛伐他汀预处理对小鼠肾脏缺血再灌注损伤(IRI)的作用及机制。**方法** 将15只6~8周龄雄性C57BL/6小鼠均分为3组:假手术(Sham)组、肾脏IRI(IR)组、辛伐他汀预处理+肾脏IRI(SIM)组。对肾脏组织行苏木精-伊红(HE)染色,检测血清肌酐(Scr)、乳酸脱氢酶(LDH)以评估肾脏损伤情况;检测超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量和活性氧(ROS)水平以评估氧化应激水平;检测肾脏组织二价铁离子(Fe^{2+})及三价铁离子(Fe^{3+})含量;采用透射电镜观察线粒体形态学变化;检测肾脏组织Krüppel样因子2(KLF2)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)蛋白的相对表达量。**结果** 与IR组相比,SIM组肾小管损伤明显减轻,血清中Scr和LDH的含量降低($P<0.001$);抗氧化应激物质SOD和GSH的表达增加,氧化应激物质MDA和ROS的表达减少($P<0.01$);辛伐他汀预处理降低组织中的 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 的含量($P<0.01$),减轻线粒体损伤;促进KLF2的表达($P<0.01$),上调铁死亡相关保护蛋白GPX4和SLC7A11的表达,下调铁死亡相关损伤蛋白ACSL4的表达($P<0.05$)。**结论** 辛伐他汀预处理可能通过促进KLF2的表达抑制肾脏铁死亡,进而减轻肾脏IRI。

关键词 辛伐他汀;肾脏;缺血再灌注损伤;Krüppel样因子2;铁死亡;线粒体损伤

中图分类号 R 699.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)01-0045-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.01.008

终末期肾病严重危害患者生命健康,而肾脏移植是最有效的治疗手段之一。与脑死亡供体(donation after brain death, DBD)相比,心脏死亡供体(donation after cardiac death, DCD)器官存在更长的热缺血时间,致缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, IRI)更加严重,是影响移植物长期存活的关键因素之一^[1]。研究^[2]表明铁死亡主要依赖铁过载和活性氧(reactive oxygen species, ROS)聚积,肾小管上皮细胞富含线粒体和细胞内铁,活性氧和铁离子在该区域功能极其活跃,对缺血缺氧表现出高度敏感性,因此肾小管上皮细胞可能以铁死亡方式参与肾损伤。研究^[3]显示,使用铁死亡抑制剂 Ferro-

nation after cardiac death, DCD)器官存在更长的热缺血时间,致缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, IRI)更加严重,是影响移植物长期存活的关键因素之一^[1]。研究^[2]表明铁死亡主要依赖铁过载和活性氧(reactive oxygen species, ROS)聚积,肾小管上皮细胞富含线粒体和细胞内铁,活性氧和铁离子在该区域功能极其活跃,对缺血缺氧表现出高度敏感性,因此肾小管上皮细胞可能以铁死亡方式参与肾损伤。研究^[3]显示,使用铁死亡抑制剂 Ferro-

2025-10-17 接收

基金项目:江西省自然科学基金项目(编号:20212BAB206027、20232BAB206056)

作者简介:付志辉,男,硕士研究生;

符碧琪,女,副主任医师,通信作者, E-mail: fubiqi@ncu.edu.com

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