

不明原因复发性流产病人外周血 NK 细胞的临床意义

刘佳杰¹, 吴祖常², 方小武¹, 韦剑洪¹, 陈伟辉¹

[摘要] **目的:**探讨不明原因复发性流产(URSA)病人难免流产和成功妊娠后外周血 NK 细胞的变化及临床意义。**方法:**选择 URSA 流产病人 44 例(URSA 流产组)、URSA 妊娠病人 34 例(URSA 妊娠组)作为观察组,并选择同期正常妊娠者 44 例(正常妊娠组)、健康非妊娠者 44 名(正常非妊娠组)作为对照组。使用流式细胞术检测外周血 NK 细胞的数量。**结果:**4 组研究对象流产 1 个月后检测 NK 细胞占淋巴细胞的比例为(21.18 ± 5.81)%、(16.12 ± 4.1)%、(15.16 ± 3.23)% 和(28.16 ± 3.38)%;URSA 流产组明显高于 URSA 妊娠组、正常妊娠组及正常非妊娠组($P < 0.01$),URSA 妊娠组、正常妊娠组及正常非妊娠组之间两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**URSA 的发生与 NK 细胞对胚胎的杀伤增强有关,外周血 NK 细胞表达水平可作为监测 URSA 病人的指标。

[关键词] 流产;妊娠;NK 细胞

[中图分类号] R 714.2 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.06.017

The clinical significance of peripheral blood natural killer cell in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion

LIU Jia-jie¹, WU Zu-chang², FANG Xiao-wu¹, WEI Jian-hong¹, CHEN Wei-hui¹

(1. Reproductive Medicine Center, Zhongshan Boai Hospital, Zhongshan Guangdong 528403;

2. The Clinical Medical Research Institute, The First People's Hospital of Foshan, Foshan Guangdong 528000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes of peripheral blood natural killer (NK) cell between inevitable abortion and successful pregnancy in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA), and its clinical significance. **Methods:** Forty-four URSA abortion patients and 34 URSA pregnant patients were divided into the URSA abortion group and URSA pregnancy group, respectively. Forty-four normal pregnancy women and 44 normal non-pregnancy women were divided into the normal pregnancy group and normal non-pregnancy group (control group), respectively. The number of peripheral blood NK cells in four groups was detected using flow cytometry. **Results:** The ratio of NK cell to lymphocyte in URSA abortion group, URSA pregnancy group, normal pregnancy group and normal non-pregnancy group was (21.18 ± 5.81)%, (16.12 ± 4.13)%, (15.16 ± 3.23)% and (14.91 ± 3.18)%, respectively. The ratio of NK cell to lymphocyte in URSA abortion group was higher than that in URSA pregnancy group, normal pregnancy group and normal non-pregnancy group ($P < 0.01$), the differences of which between URSA pregnancy group, normal pregnancy group and normal non-pregnancy group were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions:** The occurrence of URSA may be associated with the enhancement of NK cells to embryo killing. The number of NK cells in peripheral blood can be used as an index in monitoring URSA patients.

[Key words] abortion; pregnancy; natural killer cell

复发性自然流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指连续遭遇 2 次或 2 次以上在妊娠 20 周前的妊娠产物或胎儿 (体质量 < 500 g) 丢失^[1]。RSA 病因复杂, 主要包括内分泌异常、感染因素、子宫解剖异常、遗传因素、免疫紊乱等^[2]。研究^[3]表明, 不明原因复发性流产 (URSA) 中约有 80% 与免疫因素有关, 在各种免疫细胞及细胞因子中, 尤其认为 NK 细胞在免疫耐受中具有重要作用。

本文将 URSA 病人流产与成功妊娠后进行对比, 探讨 URSA 病人外周血 NK 细胞水平变化情况。

1 资料与方法

1.1 URSA 诊断标准 (1) 连续发生 2 次或 2 次以上的自然流产; (2) 夫妻双方染色体核型无异常; (3) 女方生殖道排除器质性病变; (4) 生殖内分泌激素测定无异常、无内分泌病史; (5) 排除生殖道感染; (6) 男方精液无异常; (7) 封闭抗体阴性; (8) 抗磷脂抗体、抗核抗体等自身免疫抗体阴性。

1.2 一般资料 选取 2012 - 2015 年就诊于我院符合 URSA 诊断标准的病人 78 例, 年龄 25 ~ 38 岁, 其

[收稿日期] 2016-08-17

[作者单位] 1. 广东省中山市博爱医院 生殖医学中心, 528403; 2 广东省佛山市第一人民医院 临床医学研究所, 528000

[作者简介] 刘佳杰(1982 -), 男, 主管技师。

中就诊时间为孕 8 ~ 10 周,经 B 超动态监测胚芽无生长、无胎心或胎心搏动消失的 44 例病人作为 URSA 流产组;就诊时确诊为早期妊娠,随访成功妊娠并分娩的 34 例病人作为 URSA 妊娠组。同期选取我院正常就诊第一胎足月分娩的妇女 44 名作为正常妊娠组,年龄 23 ~ 39 岁;选取我院健康体检的妇女 44 名作为正常非妊娠组,年龄 25 ~ 38 岁,有 1 次或 1 次以上足月妊娠史,且子女均健在,无自然流产史及死胎等异常孕育史。4 组受试者年龄均具有可比性($P > 0.05$)。本研究经医院道德委员会批准,所有研究对象、医护人员均知晓研究目的、内容及相关权利和义务,自愿参与本研究,并签署知情同意书。

1.3 仪器与试剂 流式细胞仪为美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪产品,溶血剂为相应配套试剂;NK 细胞检测采用美国 BD 公司 Simultest IMK-Lymphocyte 免疫荧光试剂盒。

1.4 标本采集 URSA 流产组于流产后 1 个月,URSA 妊娠组及正常妊娠组于妊娠 2 个月(8 ~ 10 周),以及正常非妊娠组分别抽取 EDTA-K₂ 抗凝血 2 mL 即时送检。

1.5 检测方法 取新鲜抗凝血 50 μ L,加入 CD3⁻perep/CD16⁺CD56⁻PE 荧光标记抗体 7 μ L,轻微混匀后室温避光保存 15 min,加入 500 μ L 溶血剂,3 h 内上机检测。检测前仪器用 FACSComp, CaliBRITE besds,调试好仪器,打开 MULTISSET 软件,上机检测。计算 CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 细胞群占淋巴细胞的比例,结果以阳性率(%)表示。

1.6 统计学方法 采用方差分析及 q 检验。

2 结果

4 组 NK 细胞比例差异均有统计学意义($P < 0.01$);URSA 流产组明显高于其他 3 组($P < 0.01$),URSA 妊娠组、正常妊娠组及正常非妊娠组之间两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 4 组外周血 NK 细胞比例比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	NK/%	<i>F</i>	<i>P</i>
URSA 流产组	44	21.18 ± 5.81	30.752	<0.01
URSA 妊娠组	34	16.12 ± 4.13 **		
正常妊娠组	44	15.16 ± 3.23 **		
正常非妊娠组	44	14.91 ± 3.18 **		

q 检验:与 URSA 流产组比较 ** $P < 0.01$

3 讨论

国内外研究^[4-5]表明,正常妊娠过程中机体免疫环境发生了适应性改变,主要表现在母胎免疫耐受反应增强,排斥免疫反应减弱,以利于胚胎在宫内正常发育。URSA 主要表现为妊娠免疫失衡,其中免疫职能细胞的改变是导致 URSA 的原因之一。尤其认为蜕膜 NK 细胞在母胎界面免疫耐受中具有重要的作用。但在目前的医疗水平下,尚无安全无创的方法在妊娠状态时检测蜕膜中 NK 细胞数量。NK 细胞称大颗粒淋巴细胞,属于淋巴细胞谱系的细胞。在正常人中,NK 细胞约占外周血淋巴细胞的 15%,NK 细胞以 CD56 表达强度不同分为:外周血以 CD56 低表达 NK 细胞(CD56^{low})为主,组织器官中以 CD56 高表达 NK 细胞(CD56^{high})为主,两个亚群的 NK 细胞在形态、功能、表型上均有不同。使用的检测方法不同,结果会有所差别,有的实验室单独使用 CD56 抗体标记,其结果会偏低,我们实验室使用的是 CD16⁺CD56⁺ 抗体标记,结果会比单独使用 CD56 抗体标记的高。最近研究^[6]表明,在 URSA 病人中,外周血的 NK 细胞可反映蜕膜中 NK 细胞的改变,并呈一定的相关性。这给我们研究 NK 细胞在 URSA 中的作用提供了极大的方便,通过检测外周血中的 NK 细胞数量即可反映蜕膜中的 NK 细胞的改变。

文献^[7]报道外周血 NK 细胞异常可能是 URSA 的重要原因之一。URSA 病人外周血 NK 细胞显著高于未孕状态,且非孕状态下亦高于正常妇女^[8]。GHAFOURIAN 等^[9]研究也发现 CD16⁺CD56⁺ NK 细胞在 URSA 病人中比正常怀孕中显著地增高。本研究检测到 URSA 病人难免流产时 NK 细胞高达(21.18 ± 5.81)%,明显高于 URSA 妊娠组、正常妊娠组及正常非妊娠组($P < 0.01$),提示 URSA 病人 NK 细胞比例增高可能是母体对胚胎的杀伤增强的表现。URSA 病人成功妊娠后,NK 细胞比例明显减低(16.12 ± 4.13)%,与文献^[10-11]报道的 URSA 病人通过免疫治疗成功怀孕后,外周血 NK 细胞比例明显减低一致。从本研究结果来看,虽然 URSA 妊娠组的 NK 细胞比例比 URSA 流产组低($P < 0.01$),但仍比正常妊娠组和正常非妊娠组高,而差异并无统计学意义($P > 0.05$),这也从另一方面反映了 NK 细胞在 URSA 中的重要作用。

机体的免疫反应包含了大量的免疫细胞、各种分子和细胞因子之间的相互作用,构成一个复杂的

网络系统,URSA 免疫状态的改变也包含了大量的免疫细胞及各种细胞因子在内,本研究侧重 NK 细胞,研究结果也显示 NK 细胞数量的改变与 URSA 的发生密切相关,因此 NK 细胞可作为检测 URSA 免疫状态的有效指标之一。

[参 考 文 献]

- [1] BEREK JS. Novak Gynecology [M]. 13th. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins,2002:643.
- [2] 吴美梅,孙丛萌,周运花,等. 复发性流产免疫治疗疗效观察[J]. 实用医学杂志,2013,29(20):3363.
- [3] NAKASHIMA A,SHIMA T,INADA K, *et al.* The balance of the immune system between T cells and NK cells in miscarriage[J]. Am J Reprod Immunol,2012,67(4):304.
- [4] 林其德. 原因不明复发性流产的基础与临床研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2003,38(8):481.
- [5] BEER AE,KWAK JY,RUIZ JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles[J]. Am J Reprod Immunol,1996,35(4):376.

- [6] PARK DW,LEE HJ,PARK CW, *et al.* Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages[J]. Am J Reprod Immunol,2010,63(2):173.
- [7] 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.
- [8] PERRICONE C, DE CAROLIS C, PERRICONE R. Pregnancy and auto-immunity: a common problem[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012,26(1):47.
- [9] GHAFOURIAN M,AYENEH BAND N,FARDI POUR A, *et al.* (2015). The role of CD16⁺, CD56⁺, NK (CD16⁺/CD56⁺) and B (CD20⁺) cells in the outcome of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion[J]. IJWHRS,2015,2015:61.
- [10] 丛林,刘长明,朱立新,等. 原因不明复发性流产病人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.
- [11] 孙巧霞,胡慧娟,王云,等. 淋巴细胞主动免疫治疗不明原因复发性流产疗效观察[J]. 山东医药,2014,54(4):64.

(本文编辑 刘畅)

(上接第 751 页)

输注(适用于除 T 细胞淋巴瘤之外的所有肿瘤)、脊髓腔注射(主要用于神经系统肿瘤)和体表实体瘤的局部注射。对于腹腔注射治疗腹水的相关研究少见报道。我们从局部药物浓度和安全性考虑,采用 CIK 细胞腹腔注射,使腹腔内 CIK 细胞浓度与瘤细胞比值达到甚至超过 30:1,起到了很好的控制腹水疗效,同时不良反应小,安全性高,减少了由腹水引发的低蛋白血、呼吸困难、食纳差等系列继发性症状,KPS 评分提高,病人生存时间和生存质量得以延长和提高。本研究结果显示,CIK 组病人总有效率为 76.0%,明显高于顺铂组病人的 40.0% ($P < 0.01$); CIK 组仅 1 例病人出现一过性体温升高外,无其他不良反应发生;CIK 组病人白细胞、白蛋白指标和食纳及 KPS 评分改善均明显优于顺铂组 ($P < 0.01$)。

综上,对中晚期肿瘤合并腹水病人,CIK 细胞腹腔注射治疗可有效控制腹水,改善由大量腹水引发的系列症状,不良反应小,是一种安全、有效的治疗模式,值得临床推广。

[参 考 文 献]

- [1] SUGARBAKER HP. Intraperitoneal chemotherapy for treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis and scarmatosis[J]. Dis Clin Rectum,1994,37(2):115.

- [2] AMMOURI L, PROMMER EE. palliative treatment of malignant ascites: profile of catumaxomab[J]. Biologics,2010,4:103.
- [3] THANENDRARAJAN S,NOWAK M, ABKEN H, *et al.* Combining cytokine-induced killer cells with vaccination in cancer immunotherapy: more than one plus one? [J]. Leuk Res,2011,35(9):1136.
- [4] SALIH HR, ANTROPIUS H, GIESEKE F, *et al.* Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia[J]. Blood,2003,102(4):1389.
- [5] PENDE D, RIVERA P, MARCENARO S, *et al.* Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity[J]. Cancer Res,2002,62(21):6178.
- [6] PIEVANI A, BORLERI G, PENDE D, *et al.* Dual-functional capability of CD3⁺ CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity[J]. Blood,2011,118(12):3301.
- [7] KIM HM, LIM, PARK SK, *et al.* Mtitumor activity of cytokine-induced killer ceVs against human lung cancer [J]. Int Immunopharmacol,2007,7(13):1802.
- [8] NIU Q, WANG W, LI Y, *et al.* Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with econd-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies[J]. Int Immunopharmacol,2011,11(4):449.

(本文编辑 卢玉清)