

• 论 著 •

外周血 Th17 及 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞失衡与不明原因反复自然流产的相关性研究

高 勇¹, 宋 月², 安万新¹, 于卫建¹, 肖 南¹, 潘凌子¹, 王 霓¹

(1. 辽宁省大连市血液中心血液免疫实验室 116001; 2. 辽宁省大连市疾病预防控制中心理化所 116001)

摘要:目的 观察不明原因反复自然流产(URSA)孕妇外周血 Th17 与 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性 T 细胞比例的变化,探讨 Th17/T 细胞比例失衡在 URSA 孕妇发病机制中的作用。方法 选择 36 例 URSA 孕妇为实验组,健康早孕妇女 40 例为对照组,应用流式细胞仪检测 Th17 与 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞的比例,应用 ELISA 法检测 IL-6、TGF-β 和 IL-17 的水平。结果 URSA 孕妇外周血中,CD3⁺CD8⁻IL-17⁺T 细胞占 CD3⁺T 淋巴细胞的百分比高于对照组, $P < 0.05$; CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比明显低于对照组, $P < 0.05$ 。相关细胞因子测定结果显示,IL-6、IL-17 水平在 URSA 孕妇血清中均明显升高,TGF-β 水平在 2 组间比较,差异无统计学意义。结论 外周血 Th17 与 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性 T 细胞的比例及相关细胞因子数量的异常可能下调母胎免疫耐受功能,参与 URSA 的发生。

关键词:流产,自然; T 淋巴细胞,调节性; 细胞因子类; 免疫耐受

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1036-03

Investigation of the relationship between the imbalance of Th17 cells/CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and unexplained recurrent spontaneous abortion

Gao Yong¹, Song Yue², An Wanxin¹, Yu Weijian¹, Xiao Nan¹, Pan Lingzi¹, Wang Ni¹

(1. Blood Immunology Laboratory, Dalian Blood Services, Liaoning 116001, China; 2. Physics and Chemistry Institute, Dalian Center for Disease Control and Prevention, Liaoning 116001, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of Th17/CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells(Treg) ratio within peripheral blood in pregnant women with unexplained recurrent spontaneous abortion and to explore the role of Th17/Treg imbalance in URSA. **Methods** Flow cytometry was used to detect the Th17 and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T cells in 36 cases of pregnant women with URSA and 40 healthy pregnant women(control group). The concentrations of serum IL-6, TGF-β and IL-17 of all subjects were tested by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The proportion of CD3⁺CD8⁻IL-17⁺ cells in total CD3⁺T cells of URSA patients was higher than that of control group($P < 0.05$) and the proportion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T cells in total CD4⁺ cells was lower in URSA patients, compared with control group($P < 0.05$). Among the detected cytokines, concentrations of serum IL-6 and IL-17 were higher in URSA patients as compared with control group($P < 0.05$), except TGF-β($P > 0.05$). **Conclusion** This study suggests the abnormality of Th17/CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ratio could down-regulate the immune function of maternal-fetal tolerance and mediate unexplained recurrent spontaneous abortion possibly through the variances of IL-6 and TGF-β.

Key words: abortion, spontaneous; T-lymphocytes, regulatory; cytokines; immune tolerance

近年来,研究者发现了 1 种能分泌 IL-17 的 Th 细胞亚群,将其命名为 Th17,其被认为与免疫性疾病密切相关^[1]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是一类特异性表达转录因子 FoxP3,具有免疫负性调节功能的 CD4⁺T 细胞,可通过细胞间接触抑制及分泌抑制性细胞因子等途径发挥抗炎和维持自身免疫耐受的作用。研究表明,CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞所介导的免疫抑制在移植耐受及母胎耐受中起关键作用^[2]。随着对这两群细胞的深入研究,Th17/T 细胞间的平衡受到越来越广泛的关注,但其平衡状态与不明原因反复自然流产(URSA)的关系尚不清楚。本研究旨在分析 URSA 孕妇外周血中 Th17 细胞与 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞的比例变化,以初步阐明 Th17/T 细胞比例的失衡在 URSA 发病机制中的作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 实验组:随机入选 2010 年 6~10 月在本市妇产院生殖门诊、产科门诊及住院患者 36 例,自然流产 2~5 次,平均 3.6 次,孕期(11±5)周,平均年龄(31±8)岁,病程(7.3±3.9)年。经相关检查排除染色体异常、生殖道畸形、内

分泌异常、病毒感染、自身抗体、Rh 或 ABO 血型不合等因素引起的流产。对照组:选择 40 例健康早孕妇女,孕期(10±5)周,平均年龄(29±9)岁,无不良妊娠史。2 组孕期及年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 仪器及试剂 仪器:FACS Calibur 流式细胞分析仪购自 BD 公司;DK-600A 电热恒温水箱购自上海一恒科学仪器有限公司;BIO-RAD model 550 型酶标仪购自伯乐公司。试剂:CD3-PerCP、CD8-FITC、Mouse IgG₁-PE、IL-17-PE、human treg kit、FIX and PERM kit、细胞因子 ELISA kit 均购自 eBioscience 公司;氟波酯(PMA 与 PBS 配制成 25 ng/mL 工作浓度)、离子霉素(Ionomycin, PBS 配制成 1 μg/mL 工作浓度)和 BFA(Brefeldin, PBS 配制成 10 μg/mL 工作浓度)均购自 Sigma 公司;淋巴细胞分离液购自天津源生生物制品科技有限公司。

1.3 标本采集 所有孕妇均于早晨 8~9 时空腹抽取全血 4 mL,其中 2 mL 放入肝素钠抗凝管内,另 2 mL 置于普通不抗凝试管。

1.4 流式细胞术检测 T 细胞亚群

1.4.1 Th17 标志 取肝素钠抗凝血 100 μ L, RPMI 1640(1:1) 稀释, 加入 PMA 5 μ L、Ionomycin 4 μ L、BFA 4 μ L; 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h; 标本分 A 管(同型对照管)、B(检测管)两管, 每管分别加入 5 μ L CD3 和 5 μ L CD8, 避光孵育 15 min; 加 100 μ L ReagentA, 避光 15 min; 加 3 mL PBS, 250 g 离心 5 min; 弃上清液; 每管分别加 100 μ L ReagentB, A 管加入 5 μ L 的鼠 IgG₁, B 管加入 5 μ L IL-17; 避光 15 min, 加 3 mL PBS, 250 g 离心 5 min, 弃上清液, 0.5 mL PBS 重悬。

1.4.2 Treg 标志 1 mL 血以 1:1 PBS 稀释; 1 000 g 离心 30 min, 取淋巴细胞层; 加 PBS 2 mL, 700 g 离心 10 min, 去上清液; 取 A(同型对照管)、B(检测管)两管, 每管加 100 μ L 标本, 分别加入 10 μ L CD4/CD25 混合抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光 30 min; 400 g 离心 5 min, 去上清液; 震荡后加入 1 mL 的固定/破膜工作液, 4 $^{\circ}$ C 避光 60 min; 加 PBS 离心, 弃上清液; 加入 2 μ L 鼠血清, 4 $^{\circ}$ C 避光 15 min; 在 A 管中加入鼠 IgG_{2a} 抗体 5 μ L, B 管中加入 FoxP3 抗体 5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 避光 45 min; 0.5 mL PBS 重悬细胞。

1.4.3 Th17 与 Treg 检测 流式检测使用 FACS Calibur 流式细胞分析仪, 采用 BD Cell Quest 软件分析数据, 结果以 CD3⁺CD8⁻IL-17⁺T 细胞占 CD3⁺T 细胞的比例、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺细胞占 CD4⁺T 细胞的比例进行统计。

1.5 ELISA 检测细胞因子 使用 IL-6、TGF- β 和 IL-17 ELISA kit, 按照说明书进行操作, 读取血清样本的吸光度值(A), 通过标准曲线计算样本浓度值。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件, 对正态分布计量资料采用 *t* 检验; 对非正态分布计量资料采用秩和检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验组与对照组 Th17/T 细胞表达水平的比较, 见表 1。

表 1 实验组与对照组 Th17/T 细胞表达水平的比较(%)

组别	<i>n</i>	Th17	T 细胞
实验组	36	1.06 \pm 0.31*	3.14 \pm 0.61*
对照组	40	0.62 \pm 0.26*	5.29 \pm 1.31*

*: *P* < 0.05, 与对照组比较。

2.2 实验组与对照组 IL-6、TGF- β 和 IL-17 细胞因子水平的比较 见表 2。

表 2 实验组与对照组血清中 IL-6、TGF- β 和 IL-17 水平的比较(ng/L)

组别	<i>n</i>	IL-6	TGF- β	IL-17
实验组	36	11.7 \pm 3.5*	27.0 \pm 7.0	48.0 \pm 12.0*
对照组	40	5.6 \pm 1.9	31.0 \pm 6.0	35.0 \pm 9.0

*: *P* < 0.05, 与对照组比较。

3 讨 论

反复自然流产(RSA)是指连续遭受 2 次或 2 次以上在妊娠 20 周前的妊娠产物或胎儿(体质量小于 500 g)丢失。RSA 病因复杂, 除染色体、解剖、自身免疫等因素外, 至少仍有 35%~44% 的 RSA 患者未发现明确的致流产因素, 称为 UR-

SA。

研究提示, 那些常规检查仍然无法诠释发病原因的 RSA 中至少有 80% 归因于免疫性因素。T 辅助细胞(Th)的功能性分化对 URSA 的作用是近年来免疫学研究的热点之一。Th17 细胞是新近发现的 1 种与自身免疫性疾病、肿瘤、炎症反应和移植排斥等关系密切的辅助细胞, 可通过分泌相关细胞因子参与免疫性疾病的发生、发展。Th17 细胞产生的细胞因子有 IL-17(又称 IL-17A)、IL-17F、IL-22、肿瘤坏死因子等, 其中 IL-17 是 Th17 细胞最重要的效应因子, 其受体在体内广泛表达, 具有较广泛的生物学功能。IL-17 在感染或损伤早期能有效介导促炎性反应, 在自身免疫性疾病如虹膜炎、类风湿关节炎、结肠炎以及牛皮癣等病理过程中发挥作用^[3]。

本实验结果显示, URSA 孕妇外周血 Th17 细胞(CD3⁺CD8⁻IL-17⁺T 细胞)增多, URSA 患者血清中 IL-17 水平亦升高。由于 Th17 细胞是分泌 IL-17 的主要细胞群, 两者变化趋势上的一致性共同反映 Th17 细胞可能对 URSA 的发病有一定作用。

本实验也发现, URSA 患者外周血中 Th17 细胞增高幅度低于多种自身免疫性疾病患者, 其原因可能为 URSA 发病机制较复杂, 为多因素联合作用, 如 T、B 等细胞及其亚群均参与其中, 突出表现为 B 淋巴细胞异常激活, 产生多种特征性自身抗体^[4-5]; 同时, T 淋巴细胞也可以出现异常反应, 如功能亢进、受累器官出现免疫复合物沉积及各类白细胞浸润等。

某一细胞亚群的改变往往由诱导其发育的细胞因子的改变引起, Th17 细胞也是如此^[6]。IL-6 和转化生长因子 β (TGF- β) 是 Th17 细胞分化的关键因子。两者共存时, 能诱导 Th17 细胞大量形成, 而 IL-17 能进一步促进 IL-6 的产生; 但缺乏 IL-6 时, TGF- β 并不能单独诱导 Th17 细胞的分化。由此可见, TGF- β 和 IL-6 共存是启动 Th17 细胞分化的必要因素。随着研究的深入, 发现 TGF- β 的水平在决定 T 细胞向 Th17 或 T 细胞分化过程中也起到决定作用。在低水平时, TGF- β 协同 IL-6 上调 Th17 的分化, 而 TGF- β 在水平较高时可诱导 FoxP3 的表达, 促进 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞对 Th17 的抑制^[7]。

本实验结果显示, URSA 患者血清 IL-6 水平明显升高, 而 TGF- β 水平未见明显变化, 与健康妊娠者比较, 差异无统计学意义。参照以上研究分析, URSA 患者体内这两种细胞因子的变化趋势, 为 Th17 细胞的分化提供了重要的环境。

CD4⁺CD25⁺T 细胞存在于外周血和脾脏中, 主要功能是介导免疫耐受。Brusko 等^[8]发现, CD4⁺CD25⁺T 细胞能抑制反应性 T 细胞的增殖和细胞因子分泌。虽然 CD4⁺CD25⁺T 细胞在维持健康妊娠中发挥作用的机制还不清楚, 但研究证实, 在妊娠的各个时期, 母体外周血以及胎儿的脐带血中都有 CD4⁺CD25⁺T 细胞的存在, 且 CD4⁺CD25⁺T 细胞在妊娠早期孕妇外周血中开始升高, 至妊娠中期达最高峰, 而产后 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例下降, 这与胎儿作为同种异体移植体被排出是一致的, 表明 CD4⁺CD25⁺T 细胞在妊娠期间是动态变化的^[9-10]。邱丽华和林其德^[11]首次在国内报道, URSA 妇女外周血 CD4⁺CD25⁺T 调节细胞明显低于同期健康孕妇。Yang 等^[12]发现, URSA 孕妇经过主动免疫治疗后, 妊娠成功者的体内 CD4⁺CD25⁺T 调节细胞明显较治疗前增多。这些研究提示, CD4⁺CD25⁺T 细胞在妊娠早期母胎耐受过程中发挥重要作用。

转录因子 FoxP3 是 CD4⁺CD25⁺T 细胞发育和功能维持的重要调节基因,特异性表达于 CD4⁺CD25⁺T 细胞,不因细胞活化方式而变化,是当今最为特殊的 CD4⁺CD25⁺T 细胞标志物^[13]。鉴于 FoxP3 在 CD4⁺CD25⁺T 细胞的发育和功能上是必需的,检测 URSA 孕妇 CD4⁺CD25⁺T 细胞中 FoxP3 的表达,对于进一步探讨 CD4⁺CD25⁺T 细胞在 URSA 中的作用具有更重要的意义,而目前少见此方面的报道。

本实验临床检测显示,URSA 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞比例低于同期健康妊娠者。CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞水平下降可能导致母胎耐受,不能有效维持而发生病理妊娠,提示 T 细胞在妊娠期介导和维持母胎免疫耐受至关重要。

综上所述,Th17 细胞和 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞的关系是复杂的,Th17、T 细胞和细胞因子形成 1 个网络,在维持健康妊娠过程中发挥重要作用。Th17 数量增加而 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞数量减少可能下调母亲对胎儿的免疫抑制功能,导致母胎免疫耐受形成障碍,从而导致 URSA 的发生。故对 Th17/T 细胞平衡调控的深入研究,将为该病的临床治疗提供新的、重要的理论依据。

参考文献

[1] Feng NH, Wu HF, Wu J, et al. Immunology mechanism of CD4⁺CD25⁺T regulatory cells acting on effect or T cells[J]. Journal of Nanjing Medical University, 2004, 18(4): 178-182.

[2] Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Tolerance, suppression and the fetal allograft[J]. Mol Med, 2005, 83(2): 88-96.

[3] Korn T, Mitsdoerffer M, Kuchroo VK. Immunological basis for the development of tissue inflammation and organ-specific autoimmunity in animal models of multiple sclerosis[J]. Results Probl Cell Differ, 2009, 23: 43-74.

[4] Young DA, Hegen M, Ma HL, et al. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(4): 1152-1163.

[5] Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, et al. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin[J]. Br J Dermatol, 2009, 160(2): 319-324.

[6] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-β-induced FoxP3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing RORγt function[J]. Nature, 2008, 453(7192): 236-241.

[7] Tang Q, Bluestone JA. The FoxP3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation[J]. Nat Immunol, 2008, 9(3): 239-244.

[8] Brusko TM, Hulme MA, Myhr CB, et al. Assessing the in vitro suppressive capacity of regulatory T cells[J]. Immunol Invest, 2007, 36(5-6): 607-628.

[9] Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(2): 373-378.

[10] 陈书恩, 杨小猛, 桑佩霞, 等. 外周血雌二醇水平和 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与反复自然流产相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1043-1045.

[11] 邱丽华, 林其德. 调节性 T 淋巴细胞与原因不明复发性流产的相关性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(12): 816-818.

[12] Yang H, Qiu LH, Chen GJ, et al. Proportional change of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. Fertil Steril, 2008, 89(3): 656-661.

[13] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. Cell, 2008, 133(5): 775-787.

(收稿日期: 2011-02-03)

(上接第 1035 页)

体质控物的即刻测定稳定性结果, 见表 1。

3 讨论

制备的液体质控血清使用的是标本每次测试完后剩余的新鲜血清,一方面可以废物利用,节省费用;另一方面,由于使用人血清具有与正常血清同样的清晰度、黏稠度和色泽,性状与水平符合临床要求,因此可以更好地控制日常标本检测的质量。以复合保护剂作稳定剂制备的过敏原检测的液体质控血清,具有与健康人血清相近的性状,制备中又减少了因冻干和重建等因素的影响与干扰。表 1 结果表明,光化学灭活病毒技术制备的过敏原检测的液体质控血清的即刻测定结果稳定、变异较小,能满足临床检验质控要求。

丙二醇有较强的高渗抑菌和抗氧化作用,再加上复合保护剂其他成分的保护,使制备的过敏原检测的液体质控血清稳定性很好,在 4~8℃ 及 -20℃ 的条件下至少可达 85 周,远多于普通液体质控血清的稳定时间(50 周)。

人液体质控血清的生物安全一直是液体质控血清制备中 1 个不易解决的重要问题。亚甲基蓝/光动力灭活病毒是近几年才发展起来的新技术,欧洲的一些国家从 1992 年开始在临床应用亚甲基蓝/光化学法处理冷冻新鲜血浆,亚甲基蓝/光化学法产生的单线态氧对病毒核酸、膜蛋白、膜脂都会造成损伤,光激活产生的自由基(比如羟自由基)可导致 DNA 单链断裂,

病毒已完全失去穿透、复制及再感染能力;同时,光化学法对血浆中的各种成分及抗体活性影响较小^[5-6]。作者将此技术引入过敏原检测的液体质控血清的制备,以保证液体质控血清的生物安全,表 1 结果表明,光化学法对制备的过敏原检测的液体质控血清的稳定性确实没有显著影响。

参考文献

[1] 李婷, 王国江, 张海清, 等. 神经性皮炎患者 61 例吸入性和斑贴过敏原检测结果分析[J]. 中国医学文摘: 皮肤科学, 2009, 26(5): 276-278.

[2] 李润祥, 朱慧兰. 特异性变应原体外检测的研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(10): 890-892.

[3] 段勇, 王玉明, 赵滢, 等. 临床化学检验的液性质控血清的制备研究[J]. 昆明医学院学报, 2003, 24(2): 24-27.

[4] 刘静, 刘军. 亚甲基蓝光化学法灭活血浆病毒的研究进展[J]. 临床输血与检验, 2009, 11(2): 189-192.

[5] 程玉根, 柏则蓉, 贾红志, 等. 亚甲基蓝光化学法灭活血浆病毒对血浆成分的影响[J]. 临床血液学杂志, 2007, 4(4): 169-170.

[6] 吕丽萍, 张艳宇, 马平, 等. 亚甲基蓝/光化学法对血浆中 IgG 的影响[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(1): 8-10.

(收稿日期: 2011-01-10)