

• 临床检验研究论著 •

原因不明复发性流产患者蜕膜 NK 细胞亚群特征研究

杜冀晖, 许欣宜

(广东医学院附属南山医院中心实验室, 广东深圳 518052)

摘要:目的 通过分析原因不明复发性自然流产(URSA)患者流产蜕膜组织中 NK 细胞亚群表型特征,探讨蜕膜 NK 细胞在 URSA 发病中的作用。方法 选取 URSA 患者 26 例为 URSA 组,20 例同期正常妊娠行人工流产者作为正常早孕组,采用流式细胞术分析蜕膜组织 NK 细胞亚群表型、比例及其抑制性受体 CD94/NKG2A 表达情况。结果 蜕膜中 CD3⁺CD56⁺ NK 细胞约占淋巴细胞的 70%,是妊娠子宫蜕膜中淋巴细胞的主要类型,URSA 组蜕膜 NK 细胞比例与正常早孕组无明显差异;正常早孕组蜕膜 NK 细胞主要为 CD56^{bright}CD16⁻亚群,约占 80%;而 URSA 组 CD56^{bright}CD16⁻亚群比例为(72.2±15.2)%,明显低于正常早孕组,而 CD56^{dim}CD16⁺亚群比例(15.3±6.7)%,明显高于正常早孕组,均有统计学差异($P<0.05$)。URSA 组蜕膜 CD56^{bright}CD16⁻细胞亚群 CD94/NKG2A 表达显著低于正常早孕对照组($P<0.01$)。结论 URSA 的发生可能与其蜕膜 NK 细胞 CD56^{bright}CD16⁻和 CD56^{dim}CD16⁺亚群比例失衡有关,而且蜕膜 CD56^{bright}CD16⁻细胞亚群抑制性受体 CD94/NKG2A 表达明显降低,可能引起 NK 细胞异常激活,参与 URSA 妊娠母胎免疫耐受的破坏。

关键词:流产,习惯性; 杀伤细胞,天然; 蜕膜; 免疫,细胞; 免疫抑制法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)23-2865-02

Expression patterns of NK cell subset in the decidua from unexplained recurrent spontaneous abortion

Du Jihui, Xu Xinyi

(Central Laboratory, Nanshan Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518052, China)

Abstract:Objective To investigate the expression patterns of natural killer(NK) cells subset in the decidua from pregnant women with unexplained recurrent spontaneous abortion(URSA) and to explore the role of decidua NK cells in URSA. **Methods** The decidua were obtained from 26 cases of pregnant women with URSA and 20 healthy pregnant women induced abortion with informed consent(control group). The expression of immunophenotypic characteristics CD3,CD56,CD16 and the inhibitory receptor CD94/NKG2A on decidual NK cells were determined by flow cytometry. **Results** About 70% of the lymphocytes in decidua were CD3⁺CD56⁺ NK cells. No significant differences in NK cell percentages were found between URSA and normal pregnancy control. The CD56^{bright}CD16⁻ NK cells represented at least 80% of decidual NK cells in normal pregnancy and were therefore the major subset. The proportion of CD56^{bright}CD16⁻ subsets in the URSA group(72.2±15.2)%, was significantly lower than the normal pregnancy group, while the proportion of CD56^{dim}CD16⁺ subsets(15.3±6.7)%, was significantly higher than the control($P<0.05$). The expression of CD94/NKG2A on decidual CD56^{bright}CD16⁻ subsets in the URSA group was significantly decreased as compared with those in the normal pregnancy control($P<0.05$). **Conclusion** The decidual CD56^{bright}CD16⁻ and CD56^{dim}CD16⁺ subsets imbalance might correlate with occurrence of URSA. Depressed expression of the inhibitory receptor CD94/NKG2A on the decidual CD56^{bright}CD16⁻ subsets could cause abnormal activation of NK cells, and might play an important role in the maternal-fetal immune tolerance destruction in URSA.

Key words:abortion,habitual; killer cells,natural; decidua;immunity,cellular; immunosuppression

复发性自然流产(RSA)是连续发生两次或两次以上的自然流产,病因复杂,约有 50% RSA 原因不明,多与免疫因素有关,称为不明原因复发性自然流产(URSA)^[1]。近年来研究认为蜕膜自然杀伤(NK)细胞是最丰富的蜕膜淋巴细胞,在母胎界面的免疫调控中起重要作用^[2-3]。本研究通过流式细胞术分析 URSA 患者流产蜕膜组织中 NK 细胞亚群表型特征及其抑制性受体 CD94/NKG2A 表达的情况,旨在探讨蜕膜 NK 细胞在 URSA 免疫学发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)URSA 组:选择 2011 年 6 月至 2012 年 6 月在本院妇产科就诊的 URSA 患者 26 例,自然流产 2~5 次,平均 3.1 次,均为早期流产(孕周小于 12 周),年龄(27±4.3)岁,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。(2)正常早孕组:选择同期正常妊娠行人工流产者 20 例,年龄(26±4.8)岁,B 超显示胎儿发育正常,既往无不良妊娠史,自愿要求终止妊娠,平均孕周为(8.0±2.1)周。两组对象年龄、

平均孕周等比较无统计学差异。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂 鼠抗人 CD16-FITC、CD56-PC5、CD3-ECD、CD94/NKG2A-PE 单克隆荧光抗体及 mouse IgG2a、IgG1 相应荧光标记同型对照抗体(美国,Beckman Coulter),淋巴细胞分离液 Ficoll(上海化学试剂厂),RPMI-1640 细胞培养液及胎牛血清(美国,Hyclone)。

1.2.2 标本采集及蜕膜单个核细胞分离 常规人工流产后,取新鲜蜕膜组织约 6~8 g,磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗后置于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液内,剪碎后在 200 目不锈钢网上轻搓、过滤,收集细胞悬液,以 Ficoll 分离单个核细胞,2 000 r/min×15 min 离心后取中间层单个核细胞,行台盼蓝染色确定细胞存活率大于 90%,PBS 洗涤后调整细胞数为 1×10⁶ 个/毫升备用。

1.2.3 流式细胞仪检测 NK 细胞亚群表型及 CD94/NKG2A 表达 采用四色标记方法,取两管蜕膜单个核细胞悬液各 100 μL,一管加入 CD16-FITC/CD56-PC5/CD3-ECD/CD94/NKG2A-PE

单克隆荧光抗体 15 μ L,另一管加入 IgG2a/IgG1 相应荧光标记抗体 15 μ L 作为同型对照,充分混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 缓冲液洗涤 1 次,0.5 mL 1%多聚甲醛固定,用流式细胞仪(美国,Beckman Coulter-EP-ICS XL 型)检测。

1.3 统计学处理 使用统计软件 SPSS 11.0 进行数据分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学分析采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为组间差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 蜕膜 NK 细胞亚群表型特征 两组蜕膜淋巴细胞中 CD3⁻CD56⁺ 细胞约占 70%,这部分细胞即为 NK 细胞,URSA 组与正常早孕组比较,NK 细胞总量无统计学差异($P>0.05$);蜕膜中 NK 细胞主要表达特征为 CD56^{bright}CD16⁻,与正常早孕组比较,URSA 组蜕膜中 CD56^{bright}CD16⁻ 细胞亚群比例明显低于正常早孕组,而 CD56^{dim}CD16⁺ 亚群比例明显增高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 蜕膜 N K 细胞亚群表型特征比较($\bar{x}\pm s, \%$)				
组别	<i>n</i>	CD3 ⁻ CD56 ⁺	CD56 ^{bright} CD16 ⁻	CD56 ^{dim} CD16 ⁺
正常早孕组	20	67.6 \pm 12.6	81.8 \pm 10.1	10.8 \pm 7.6
URSA 组	26	65.4 \pm 15.3	72.2 \pm 15.2*	15.3 \pm 6.7*

* :与正常早孕组比较, $P<0.05$ 。

2.2 蜕膜 NK 细胞亚群抑制性受体 CD94/NKG2A 表达分析

两组蜕膜组织 NK 细胞亚群抑制性受体表达存在差异,URSA 组蜕膜 CD56^{bright}CD16⁻ 细胞亚群 CD94/NKG2A 表达比例 [(56.5 \pm 13.8)%]明显低于正常早孕组 [(82.9 \pm 16.5)%] ($P<0.01$),而两组蜕膜 CD56^{dim}CD16⁺ 细胞亚群 CD94/NKG2A 表达无统计学差异($P<0.05$)。

3 讨 论

CD56 为 NK 细胞的表面抗原标志,在外周血中,根据 CD56 表达密度不同,将 NK 细胞分为 CD56^{bright} (约占 5%) 和 CD56^{dim} (约占 95%) 两群^[4]。这两个细胞亚群具有不同的生物学功能:CD56^{dim} 细胞高表达 CD16 (Fc γ R III 受体),主要发挥自然杀伤和抗体依赖的细胞介导的细胞毒效应 (ADCC) 作用,而 CD56^{bright} 细胞不表达或弱表达 CD16,活化后可产生多种细胞因子,具有免疫调节功能^[4]。

越来越多的研究证实,胚胎作为半同种移植体不被母体免疫系统排斥,子宫内膜局部免疫因素起着重要的调节作用。蜕膜免疫细胞中 NK 细胞含量最丰富,占 70%~80%^[2-3]。蜕膜 NK 细胞受滋养细胞的人类白细胞抗原 (HLA) 及局部多种细胞因子的调节,处于免疫抑制状态并参与母胎耐受的形成^[5]。若蜕膜 NK 细胞亚群及活性改变,将可能造成病理性妊娠 URSA 的发生^[2]。

本研究结果显示,正常早孕组蜕膜 NK 细胞主要为 CD56^{bright}CD16⁻ 亚群,约占 80%;URSA 组 CD56^{bright}CD16 亚群比例为 (72.2 \pm 15.2)%,明显低于正常早孕组,而 CD56^{dim}CD16⁺ 亚群比例 (15.3 \pm 6.7)%,明显高于正常早孕组, $P<0.05$,与多数文献报道一致^[6-7]。已有研究证实,CD16 是 NK 细胞毒效应的标志,其表达增高可增强 NK 细胞的杀伤活性^[5]。因此,CD56^{dim}CD16⁺ 细胞亚群比例增高可能对同种异体抗原(胚胎)的杀伤作用增强,不利于胚胎发育及妊娠的维持。另一方面,CD56^{bright}CD16⁻ 细胞亚群,在妊娠早期通过与胎盘绒毛外滋养细胞密切接触发挥重要的免疫调节作用^[8]。

CD56^{bright}CD16⁻ 亚群比例减少,可能对母-胎界面间免疫耐受的调节作用减弱,不利于妊娠过程中对胚胎的免疫保护作用。由此推测,蜕膜组织 NK 细胞 CD56^{bright}CD16⁻ 和 CD56^{dim}CD16⁺ 亚群比例失衡可能是 URSA 的发病原因之一。

NK 细胞能够表达多种激活性和抑制性受体,调节其活化及杀伤功能。正常情况下,抑制性信号占主导地位,可避免正常自身细胞被 NK 细胞杀伤^[9]。蜕膜 NK 细胞表面抑制性受体以 C 型凝集素样受体 CD94/NKG2 为代表,几乎所有的蜕膜 NK 细胞均表达 CD94/NKG2A^[10],NKG2A 能特异性结合表达在胎儿滋养层细胞表面的 HLA-E,传递抑制信号,抑制 NK 细胞的杀伤活性^[11]。本研究结果显示,URSA 组蜕膜 CD56^{bright}CD16⁻ 细胞亚群 CD94/NKG2A 表达显著低于正常早孕组 ($P<0.01$),提示蜕膜 NK 细胞表面抑制性受体表达降低,可能影响抑制性信号的正常传递,造成 NK 细胞杀伤潜能被激活,对滋养层细胞发挥杀伤作用。

本研究对 URSA 患者蜕膜组织中 NK 细胞亚群特征进行了分析,结果显示 URSA 组蜕膜 NK 细胞 CD56^{bright}CD16⁻ 和 CD56^{dim}CD16⁺ 亚群比例失衡,而且其 CD56^{bright}CD16⁻ 细胞亚群抑制性受体 CD94/NKG2A 表达明显降低,可能是 URSA 母胎免疫耐受紊乱的原因之一,其确切作用机制仍有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Pandey MK,Rani R,Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion[J]. Arch Gynecol Obstet,2005,272(2):95-108.

[2] Riley JK,Yokoyama WM. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface[J]. Am J Reprod Immunol,2008,59(5):371-387.

[3] Kwak-Kim J,Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction[J]. Am J Reprod Immunol,2008,59(5):388-400.

[4] Cooper MA,Fehniger TA,Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets[J]. Trends Immunol,2001,22(4):633-640.

[5] Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy[J]. Nat Rev Immunol,2002,2(5):656-663.

[6] Yamamoto T,Takahashi Y,Kase N,et al. Decidual natural killer cells in recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content[J]. Am J Reprod Immunol,1999,41(5):337-342.

[7] 金平,靳荣,秦晓黎,等. 原因不明复发性流产与 CD56CD16NK 细胞的相关性研究[J]. 中国妇幼保健,2009,24(24):3418-3421.

[8] Hanna J,Goldman-Wohl D,Hamani Y,et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface[J]. Nat Med,2006,12(9):1065-1074.

[9] Moretta L,Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors[J]. EMBO J,2004,23(2):255-259.

[10] Masilamani M,Nguyen C,Kabat J,et al. CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse[J]. J Immunol,2006,177(6):3590-3596.

[11] King A,Allan DS,Bowen M,et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94 /NKG2 receptors on decidual NK cells[J]. Eur J Immunol,2000,30(6):1623-1631.

(收稿日期:2012-07-23)