

• 临床检验研究论著 •

自然流产患者封闭抗体检测及免疫治疗临床研究

赵学峰¹, 金书林², 蔡 甜¹, 罗丽贞¹, 区云枝¹

(1. 南方医科大学附属南海医院检验科, 广东佛山 528200; 2. 佛山科技学院, 广东佛山 528000)

摘要:目的 检测自然流产患者体内封闭抗体(BA)水平, 观察应用淋巴细胞疗法后的受孕率与成功分娩率, 为临床治疗自然流产积累数据。方法 用 ELISA 法检测 486 例复发性自然流产患者治疗前 BA 水平, 选择 BA 阴性者用分离的配偶淋巴细胞进行皮内注射免疫治疗, 治疗结束后复查 BA, 并随访妊娠结局。结果 486 例患者治疗前 BA 阳性率为 12.1%(59/486), 其中 132 例 BA 阴性者经淋巴细胞免疫治疗 3 次治疗后共转阳 103 例, 治疗 1、2、3、4 次后的合计转阳率分别为 7.5%、39.4%、74.2% 和 77.8%。经过免疫治疗后, BA 转阳患者的受孕成功率和成功分娩率分别为 100.0% 和 79.6%, 4 次治疗后 BA 维持阴性患者的受孕率和成功分娩率分别为 75.8%、50.0%, 差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 淋巴细胞免疫治疗能使 BA 显著转阳, 且能提高患者的妊娠成功率、成功分娩率, 分娩后的母婴之间并未见明显不适或其他副作用。

关键词:流产; 自然; 抗体; 封闭; 淋巴细胞免疫治疗

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)02-0156-02

Clinical research of blocking antibodies test and lymphocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion patients

Zhao Xuefeng¹, Jin Shulin², Cai Tian¹, Luo Lizhen¹, Ou Yunzhi¹

(1. Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Nanhai, Foshan, Guangdong 528200, China;

2. Foshan Science and Technology College, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To test the levels of blocking antibodies(BA), and observe the curative effect of lymphocyte immunotherapy to the patients, in order to accumulate the clinical data for recurrent spontaneous abortion(RSA) patients. **Methods** The ELISA kit was employed to evaluate the BA, and 132 of 486 subjects with negative reaction were enrolled for immunotherapy. The BA would be detected again after treatment and re-gestation. **Results** The positive rate of BA in 486 RSA was 12.1% before treatment. Among the 132 BA negative reactors there were 103 changing positive. The positive rates of BA after the 1 st, 2 rd, 3 rd and 4 th treatment were 7.5%, 39.4%, 74.2% and 77.8%, respectively. Compared to 75.8% of re-gestation rate and 50.0% of giving-birth rate in negative reaction group, 100.0% and 79.6% were observed in the transfer-positive group respectively with significant statistic difference($P<0.01$). **Conclusion** The lymphocyte immunotherapy could promote the success rates of re-gestation and giving-birth in RSA without any side-effect or obvious discomfort after lymphocyte immunotherapy.

Key words: abortion, spontaneous; antibodies, blocking; lymphocyte immunotherapy

自然流产是妊娠常见的并发症, 占妊娠总数的 15% 左右^[1], 其中 2 次或 2 次以上自然流产即复发性流产(RSA), 其发病率约为 5%。RSA 病因比较复杂, 排除遗传、解剖、内分泌、感染等因素后, 仍有 40%~80% 的病例发病原因不明, 称为不明原因性流产(UHA)^[2]。目前认为免疫因素尤为重要。在免疫因素 UHA 中约有 30% 与自身抗体产生有关, 称为自身免疫性 RSA; 另外约有 70% 可能与患者对胎儿父系抗原低反应性有关, 主要是由于患者对胚胎同种异体抗原无法产生足够的 BA 有关, 称为同种免疫性 RSA。封闭抗体(BA)是人类白细胞抗原(HLA)、滋养层及淋巴细胞交叉反应抗原等刺激母体免疫系统, 所产生的一类 IgG 型抗体^[3]。目前临床上多采用配偶或无关个体的淋巴细胞进行免疫治疗, 诱导母体产生同种免疫反应, 从而出现 BA 及微淋巴细胞毒抗体, 使母体免疫系统不易对胎儿产生免疫攻击, 使妊娠继续, 且治疗后, 患者体内 BA 的出现与成功受孕之间有良好的相关性。此方法的疗效, 近年来多数报道认为有效^[4], 有效率为 70%~90%, 且未见主动免疫治疗对母体及后代产生明显的副反应。本研究采用配偶(或第三方)淋巴细胞皮下注射法对 RSA 患者进行免疫治疗, 并观察治疗前后 BA 水平的变化与妊娠结果的关系, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 3 月至 2011 年 12 月到佛山市南海人民医院门诊就诊的有过 1 次以上流产史的患者, 对所有研究对象进行妇产科检查、B 超或宫腔镜检查、染色体核型分析、TORCH 检查、性激素与甲状腺功能等内分泌检查, 以及不孕相关的免疫学检验, 包括抗心磷脂抗体、抗精子抗体、抗子宫内膜抗体及封闭抗体。

1.2 方法

1.2.1 健康宣教 采用宣传单、现场咨询等多种形式向就诊患者宣传 RSA 的病因与治疗对策, 说明“主动免疫”的意义、注意事项及方法等, 指导患者配合治疗。建立 RSA 治疗专项病历, 记录治疗时间、辅助检查结果, 定期电话随访, 增强心理安慰与疏导。

1.2.2 免疫治疗 用丈夫(首选)或第三方男性(首先要排除乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒及艾滋病等血源性传染性疾病)静脉血作为淋巴细胞免疫原供体, 以淋巴细胞分离液分离供体淋巴细胞, 选择自然流产患者前臂行 8 点皮下免疫注射。具体方法如下: 无菌条件下取 20 mL 淋巴细胞分离液(由上海华精生物高科技公司提供), 置于离心管, 加入 20 mL 丈夫或第三方肝素抗凝静脉血于分离液层上。3 000 r/min 离心 30 min, 小心

吸出淋巴细胞液层,20 倍生理盐水洗涤 3 次,配成 $(20\sim 40)\times 10^6/\text{mL}$ 的淋巴细胞生理盐水悬浮液,细胞悬液量约 2 mL,并分装于 2 支注射器中,然后给患者前臂内侧行多点(6~8 个点)皮内注射。从准备怀孕前 3 个月开始治疗,每 3~4 周治疗 1 次,3 次为 1 个疗程,治疗过程中避孕,3 个疗程后复查 BA,阴性者继续治疗,阳性者则鼓励患者在 3 个月内妊娠,如获妊娠,则于孕 5 周开始再进行 1 次治疗,如未获妊娠重新进行 1 次免疫治疗。

1.2.3 BA 检测 免疫治疗前后抽取患者外周血 2 mL,分离血清,用 ELISA 试剂盒(由北京索奥生物技术有限公司提供)检测治疗前、后抗体的水平。结果记录为:阴性、弱阳性、阳性。

1.3 统计学处理 在每次免疫治疗 1 个月后检测 BA,登记检测阴性;根据治疗后是否受孕及最终是否成功分娩来计算成功受孕率和成功分娩率。所有数据采用 SPSS19.0 统计学软件处理,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 判断是否具有统计学意义。

2 结 果

2.1 自然流产人群的 BA 阳性率调查 以发生 1 次及以上自然流产史的门诊患者为调查对象,以 ELISA 法检测 BA,以阴性作为结果报告。在研究期间,共有 486 例自然流产史的患者检测了 BA,其中 BA 阴性率为 87.8%(427/486)。由于地址信息、联系方式、治疗中断等多种原因,最终只有 132 例研究对象获得了全程数据,年龄 20~41 岁,平均 28.39 岁。

2.2 免疫治疗后 BA 水平变化 132 例 BA 阴性患者进行免疫治疗后,有 10 例患者经 1 次治疗后 BA 转阳,阳性率为 7.5%(10/132);有 42 例经 2 次治疗之后 BA 转阳,转阳性率为 31.8%(42/132),前 2 次治疗后合计转阳性率为 39.4%;经 3 次治疗后有 46 例 BA 转为阳性,阳性率为 34.8%(46/132),3 次治疗后合计转阳性率为 74.2%,4 次治疗合计转阳性率为 77.8%。

2.3 免疫治疗后妊娠结局 在接受免疫治疗的 132 例患者中,经 4 次治疗后 BA 转阳 103 例,另 29 例经 4 次治疗后 BA 仍为阴性。经 3 次治疗后,无论 BA 是否转阳,均鼓励患者在 3 个月内进行妊娠,共有 132 例受孕。132 例患者于孕 5 周后再进行 1~2 次免疫治疗,103 例 BA 转阳患者中,有 82 例成功妊娠,9 例再次发生流产,成功分娩率为 79.6%(82/103)。而另经免疫治疗后 BA 仍为阴性的患者 29 例中,22 例受孕(75.8%,22/29),其中成功分娩 11 例(50.0%,11/22)。免疫治疗后 BA 转为阳性者获得妊娠成功率明显高于 BA 仍为阴性者的妊娠成功率,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

现代生殖免疫学认为,妊娠是一种半同种异体移植,正常的妊娠中,母体中存在一种抗丈夫淋巴细胞的特异性 IgG 抗体,即 BA。研究发现,RSA 的发生与母体缺乏 BA 或者水平低下有关,BA 的缺乏或产生不足,使得母体免疫系统对胎儿或胚胎产生强烈的排斥反应,或通过释放炎症介质间接损害胎儿或胎盘,导致孕妇在怀孕早期出现 RSA,怀孕晚期则可出现其他并发症如妊娠高血压疾病、胎儿宫内生长受限,甚至出现胎死宫内,最终导致流产^[5-6]。1981 年有研究者对 4 例 AP-LA 阴性习惯性流产病人进行 HLA 免疫治疗后 3 例分娩了婴儿,引起围产医学界的极大兴趣^[3,7]。近年来,对 BA 缺乏的 RSA 患者应用配偶的淋巴细胞进行免疫治疗,已有较多的文献报道。

本研究对入选病例严格筛选,排除其他致病因素,最终选择了 132 例进行淋巴细胞治疗。治疗后有 70.4% 的患者成功分娩。本研究中 BA 的转阳性率与文献报道基本符合,成功分娩率稍稍偏高^[8],造成成功率差异的原因考虑如下:(1)病例数太少导致统计缺乏可信度(国内相关文献病例数多数少于 100 例);(2)对患者进行治疗的时间及流程没有进行严格要求,导致妊娠成功率下降;(3)治疗过程中,出现除 BA 阴性以外的其他导致不孕或者流产的原因(如母方感染妇科疾病、外力因素导致的意外流产等)而未进行系统排除^[9]。在 132 例接受治疗的 RSA 患者中,有 29 例 BA 经 4 次治疗后仍为阴性,主要考虑为以下原因:(1)淋巴细胞提供者与患者之间的 HLA 相容程度过高,无法刺激患者产生 BA;(2)本次对 BA 进行的是定性检测,无法观察治疗过程中 BA 水平的微量变化;(3)患者本身免疫耐受低下;(4)部分淋巴细胞提供者的淋巴细胞活性较低,在对患者进行注射之前已经失去大部分活性。

于淋巴细胞免疫治疗过程中至患者成功分娩后 1 个月对患者进行定期回访,并对新生儿进行为期 1 个月的观察,没有发现母婴产生相应的副反应。在操作过程中,严格按照无菌操作的要求,尽可能地减少污染,尽可能地洗涤干净,去除红细胞及其他血液成分,最大限度地避免对患者造成不必要的免疫反应而引起身体不适^[10]。

对于 BA 阴性的患者,在妊娠前、妊娠中应用配偶(或第三方)淋巴细胞主动免疫治疗,可以改变 RSA 患者的 BA 水平,有效地提高 BA 的阳性率及再次妊娠的成功率。淋巴细胞主动免疫治疗 RSA 安全有效,治疗过程中及治疗后对母体及胎儿均无副作用产生,对指导 RSA 患者妊娠及对再次妊娠的结局有良好的参考价值。

参考文献

- [1] 吴芸.习惯性自然流产病因学及其治疗进展[J].实用医药杂志,2003,20(12):949-951.
- [2] 彭婀娜,姚若进.不明原因复发性流产主动免疫治疗前后封闭抗体的变化及其意义[J].实用妇产科杂志,2010,26(10):773-774.
- [3] 梁宝珠,谭忠伟,黎彩鹏,等.淋巴细胞主动免疫治疗复发性流产的临床研究[J].中国妇幼保健,2007,22(5):3561-3562.
- [4] 林其德,汪希鹏.原因不明复发性流产的病因、病理生理机制现治疗研究进展[J].中国实用妇科与产科杂志,2007,23(1):5-7.
- [5] 李带莉.30 例原因不明性反复自然流产患者免疫治疗的临床分析[J].国际医药卫生导报,2005,11(24):38-40.
- [6] Pandey MK, Agrawal S. Induction of MLR-Bf and protection of fetal loss: a current double blind randomized trial of paternal lymphocyte immunization for women with recurrent spontaneous abortion[J]. Int Immuno Pharmacol, 2004, 4(2): 289-298.
- [7] 吴菁,黄艳仪,黄华梅,等.不明原因复发性流产的主动免疫治疗[J].赣南医学院学报,2007,27(3):392-393.
- [8] Szpakowski A, Malinowski A, Glowacka E, et al. The influence of paternal lymphocyte immunization on the balance of Th1/Th2 type reactivity in women with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Ginekol Pol, 2000, 71(6): 586-592.
- [9] 温泰芳,李晓红,杨乙,等.淋巴细胞注射治疗习惯性流产的分析[J].海南医学院学报,2008,14(4):1007-1237.
- [10] 张瑞群.淋巴细胞免疫治疗自然流产 49 例分析[J].中国实用医药,2010,5(15):97-98.