

• 临床检验研究论著 •

利用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面分子 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率在反复自然流产中的应用*

石 瑛, 泰淑红, 荣守华, 孟祥颖, 胡玉芬, 邢金芳, 张 展, 贾莉婷[△]
(郑州大学第三附属医院检验科, 河南郑州 450052)

摘 要:目的 快速、准确检测反复自然流产(RSA)患者是否缺乏保护性封闭抗体, 监测免疫治疗效果, 以及探讨 RSA 的免疫学发生机制。方法 利用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面标志 CD3、CD4 和 CD8 分子的封闭效率。结果 反复自然流产患者 CD3、CD4 和 CD8 分子的封闭效率均低于健康对照组($P<0.01$); 利用丈夫单个核细胞进行免疫治疗后, CD3、CD4 和 CD8 分子的封闭效率转阳率与怀孕率呈正相关性。结论 利用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面 CD3、CD4 和 CD8 分子的封闭效率可以为 RSA 患者提供快速、准确的临床诊断依据, 实现对治疗效果的监测, 并有助于部分解释 RSA 的免疫学发病机制。

关键词:封闭抗体; 反复自然流产; T 细胞
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.012 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2014)06-0682-03

Application of blocking efficiency detection of T lymphocytes surface molecule CD3, CD4 and CD8 by flow cytometry in recurrent spontaneous abortion*

Shi Ying, Tai Shuhong, Rong Shouhua, Meng Xiangying, Hu Yufen, Xing Jinfang, Zhang Zhan, Jia Liting[△]
(Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract:Objective To rapidly and accurately detect whether lack the protective blocking antibodies in the recurrent spontaneous abortion (RSA) patients, to monitor the effect of immunotherapy and to study the immunological occurrence mechanism of RSA. **Methods** The blocking efficiency of surface markers CD3, CD4 and CD8 on T lymphocytes surface was detected by the flow cytometry. **Results** The blocking efficiency of CD3, CD4 and CD8 molecules in the RSA patients was lower than that in the control group ($P<0.01$); the positive conversion rate of the blocking efficiency of CD3, CD4 and CD8 after the immunotherapy by the husband's mononuclear cell was positively correlated with the pregnant rate. **Conclusion** Adopting the flow cytometry to detect the blocking antibody of CD3, CD4 and CD8 on T lymphocytes surface can provide the rapid and accurate clinical diagnosis basis, realize the monitoring of the therapeutical effect and conduce to partly explain the immunological pathogenesis mechanism of RSA.

Key words: blocking antibody; recurrent spontaneous abortion; T cells

封闭抗体主要是指孕妇针对胚胎主要组织相容性抗原(MHC)、滋养层细胞及淋巴细胞交叉反应抗原(TLX)产生的特异性 IgG 类抗体^[1-3]。正常状况下, 封闭抗体从妊娠初期开始产生, 至妊娠 3 个月达到最高, 以后逐渐下降, 分娩时又增高。封闭抗体缺乏是造成早期复发性自然流产(RSA)的重要因素之一^[4]。因此, 目前临床上对于 RSA 封闭抗体检测主要采用 ELISA 方法, 该方法是将 MHC 混合抗原包被于 96 孔板中, 检测受检者的血清中是否存在 MHC 的抗体。该方法的设计理念是从源头寻找 RSA 的致病因素, 但是由于 RSA 是多因素的集合体, 因此, 还有很多 RSA 患者不能单纯用是否缺乏封闭抗体来进行解释。本研究从免疫应答的结局上寻找 RSA 发生的原因, 即利用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面分子 CD3、CD4 和 CD8 的封闭效率, 通过该方法, 其目的是建立快速、准确、简便易行的手段, 有利于临床诊断和疗效观察, 同时可以进一步对 RSA 的免疫学发生机制进行解释。

1 资料与方法

1.1 一般资料 反复自然流产组(RSA 组)标本来源于郑州大学第三附属医院 2011 年 7 月至 2013 年 5 月门诊就诊患者, 共计 1 638 例, 年龄 20~46 岁, 平均(32±6.8)岁。其诊断标准为患者有 2 次或 2 次以上的自然流产病史, 同时排除夫妇双

方染色体异常、母体生殖道解剖结构异常、内分泌失调、生殖道感染和自身免疫病等; 健康对照组为正常妊娠来本院进行孕期保健者, 共计 100 例, 其妊娠均在 12 周以内, 年龄 24~36 岁, 平均(27±2.9)岁, 且既往无自然流产、死胎、死产史, 同时排除夫妇双方染色体异常、母体生殖道解剖结构异常、内分泌失调、生殖道感染和自身免疫病等, 本次妊娠期间无阴道流血和腹痛等先兆流产症状和体征, 超声检查证实胚胎发育正常者。

1.2 试剂 CD4 FITC/CD8 PE/CD3 Per CP 混合单克隆荧光抗体、红细胞裂解液购自美国 BD 公司; 淋巴细胞分离液(北京鼎国生物技术公司)。

1.3 方法 采集夫妇双方静脉血, 并用 EDTA-Na₂ 抗凝。采用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面标志 CD3/CD4/CD8 阳性细胞百分数。每对标本取 2 支流式细胞专用管, 第 1 管为对照管, 加入男方血浆和全血各 50 μL, 第 2 管为测定管, 加入女方血浆和男方全血各 50 μL; 然后再加入 10 μL FITC-CD3/PE-CD4/APC-CD8 混合单克隆荧光抗体; 震荡混匀, 室温避光 15 min; 加入 1×红细胞裂解液, 混均, 室温避光 10 min; 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 1 500 r/min, 5min; 最后加入 100 μL PBS, 等待上机。封闭效率(%) = 对照管 CD3/CD4/CD8 阳性细胞百分数 - 测定管 CD3/CD4/CD8 阳性细胞百分

* 基金项目: 河南省卫生厅科技创新人才项目(2009 年)。 作者简介: 石瑛, 女, 副主任技师, 主要从事生殖免疫学和免疫检验研究。
[△] 通讯作者, E-mail: jialt@163.com。

数;结果判定:CD3、CD4 和 CD8 封闭效率只要有一项出现负值,提示封闭抗体缺乏;三项封闭效率均为正值,提示正常。免疫治疗:分离获取 RSA 患者丈夫或无关健康第三者抗凝静脉血 30 mL,并提取单个核细胞,调整细胞浓度为 $(5\sim10)\times10^7/\text{mL}$,每次取 100 μL 分 3~5 点注入女方前臂皮下,3 次为一个疗程,每次间隔 2~3 周。治疗 1 个疗程后进行封闭抗体检测,若封闭抗体转阳鼓励患者 6 个月内自然妊娠,并在妊娠前 3 个月加强免疫治疗;若封闭抗体仍为阴性,则进入下一个疗程治疗。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件分析,组间比较采用两样本 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RSA 组与健康对照组封闭抗体缺乏率 1 638 例 RSA 患者中封闭抗体阴性(只要 CD3/CD4/CD8 封闭效率中有一项出现负值即规定为封闭抗体缺乏)1 459 例,阴性率为 76.86% (1 259/1 638),100 例健康对照组中封闭抗体阴性 8 例,阴性率为 8.00%。RSA 组封闭抗体阴性率明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 RAS 组与对照组封闭抗体阴性率比较			
组别	<i>n</i>	阴性例数(<i>n</i>)	阴性率(%)
RAS 组	1 638	1 259	76.86*
健康对照组	100	8	8.00

*: $P<0.01$,与健康对照组比较。

2.2 T 淋巴细胞表面分子 CD3、CD4 和 CD8 的封闭效率 RSA 组中,CD3 封闭效率为 $(-2.8\pm1.9)\%$,CD4 封闭效率为 $(-1.8\pm1.2)\%$,CD8 封闭效率为 $(-1.2\pm1.2)\%$;而健康对照组 CD3 封闭效率为 $(1.5\pm1.0)\%$,CD4 封闭效率为 $(0.6\pm0.6)\%$,CD8 封闭效率为 $(0.9\pm0.5)\%$ 。RSA 组和健康对照组中 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率之间比较差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 RSA 患者 T 淋巴细胞表面分子 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率阴性百分比 在 RSA 患者中,CD3 封闭效率阴性占 71.01%;CD4 封闭效率阴性占 64.10%;CD8 封闭效率阴性占 76.41%。RAS 患者中 CD8 封闭效率阴性比 CD4 封闭效率阴性所占比例更高,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

表 2 RAS 患者 T 淋巴细胞表面 CD3/CD4/CD8 封闭效率阴性比例[n(%)]		
项目	RSA 组	健康对照组
CD3	894(71.01)	100(5.00)
CD4	807(64.10)	100(6.00)
CD8	962(76.41)*	100(3.00)

*: $P<0.01$,与 CD4 封闭效率阴性比较。

2.4 免疫治疗后封闭抗体封闭效率转阳情况 993 例接受免疫治疗的 RSA 患者中,经过 1 个疗程免疫治疗后,封闭抗体转阳为 418 例,占 42.09%;2 个疗程治疗封闭抗体转阳为 359 例,占 36.15%;3 个及 3 个以上疗程后封闭抗体转阳 87 例,占 8.76%;其他为正在继续或放弃治疗,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.5 免疫治疗后 RAS 患者怀孕情况 接受免疫治疗抗封 CD3、CD4 和 CD8 均转阳后的 RAS 病例共 864 例,其中 657 例

已经证实怀孕,怀孕率为 76.04%。

3 讨 论

封闭抗体缺乏是造成 RSA 的重要因素之一。目前临床上对于 RSA 的诊断和治疗监测主要是通过 ELISA 方法检测母体中是否含有抗混合 HLA 抗体^[5-7]。但是,由于封闭抗体的复杂性,目前还不能做到对各种封闭抗体进行全面、快速、准确和定量检测。因此,本研究将从怀孕失败的免疫结局入手,利用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面分子 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率,以达到快速、准确和定量地检测 RAS 患者是否是由于缺乏封闭抗体而造成的反复自然流产,便于进行临床诊断、治疗和对疗效的观察,同时可以进一步揭示和补充 RSA 发病的免疫学机制。

在妊娠早期,胚胎周围通常浸润有一定数量的淋巴细胞,并且以 T 淋巴细胞为主^[8-10]。CD3、CD4 和 CD8 分子作为 T 淋巴细胞的分化抗原,主要参与信号的转导,而且也是 T 淋巴细胞亚群分类的分化抗原标志。CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞代表辅助性 T 淋巴细胞,而 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞代表细胞毒型/抑制型 T 淋巴细胞。这也是利用检测 T 淋巴细胞表面分子封闭效率预测是否为原因不明的免疫性 RSA 的重要基础。

本研究表明:健康对照组 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率分别为 $(1.5\pm1.0)\%$ 、 $(0.6\pm0.6)\%$ 、和 $(0.9\pm0.5)\%$;而 RAS 组 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率分别为 $(-2.8\pm1.9)\%$ 、 $(-1.8\pm1.2)\%$ 、 $(-1.2\pm1.2)\%$ 。两者比较差异有统计学意义($P<0.01$),因此,现暂定为若 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率只要有一项出现负值即代表缺乏封闭抗体;三项均为正值说明封闭抗体阳性,对胚胎植入以及生长、发育具有保护性。

通过分析 CD3、CD4 和 CD8 分子的封闭效率发现在 RSA 患者中 CD8 封闭效率阴性占 76.41%,高于 CD4 封闭效率阴性率(CD4 封闭效率阴性占 64.10%),暗示着 CD8 分子在 RSA 中发挥更为重要的作用。胎儿表达的父亲性主要组织相容性复合物(MHS)与肿瘤抗原一样,均属于内源性抗原,主要启动 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞的应答。在正常怀孕状况下,由于母体的免疫系统能够正好识别父亲性 MHC 分子并诱导机体产生保护性的封闭抗体,这些保护性抗体可以通过特异性与 T 淋巴细胞表面的 CD3 和 CD8 分子结合,干扰了 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞向细胞内传递第一信号系统,使细胞免疫得到一定程度的抑制,胎儿得以继续生长发育。通过进一步对临床免疫治疗后怀孕结果的观察也发现:CD8 封闭效率是否转阳对于能否正常怀孕和度过流产危险期是非常重要的。研究者对 20 例进行封闭抗体治疗期间怀孕妇女(CD3、CD4 和 CD8 封闭效率存在一项或者两项负值)进行临床观察与回访发现:CD8 封闭效率转阳而 CD4 封闭效率仍为阴性的妇女有 8 例怀孕,其中 1 例再发流产;而 CD4 封闭效率转阳但 CD8 为阴性的妇女仅有 3 例怀孕,其中 1 例再发流产。因此,通过封闭抗体治疗的结果,从另一个侧面说明 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率检测方法可以更直观为临床提供治疗依据、预测风险指标和再发 RSA 评估。

之所以 CD3、CD4 和 CD8 封闭效率可以作为 RSA 封闭抗体的检测,可能机制是:正常免疫状态下,机体本身就可以微量产生抗自身 T 淋巴细胞表面抗体,即抗 CD3、CD4 和 CD8 的抗体,以保持 T 淋巴细胞生理功能的平衡;而当父亲性 MHC 分子通过皮下注入女方体内,实际上是给予女方以抗原刺激,这些外源性抗原在树突状细胞的作用下,将外源性抗原进行处理,并提成给 B 淋巴细胞,不仅可以产生抗父(下转第 686 页)

于该病的发病率 0.143%,但都在允许的范围内,这是由于本研究针对的孕妇例数不大,研究基数较小,造成了统计概率上的影响。基于临床应用,联合 uE3 检测的三联筛查的效率上较二联筛查的还是存在优势。目前国内外一般是将唐氏综合征风险截断值定为 1/270^[6],建议在大样本研究基数的前提下,将风险截断值适当地进行调整,在各项统计学概率处于可接受范围的同时,提高检出率,也为可取方法。但需进行大样本研究,以制定更好的筛查方案和风险截断值。

由于游离雌三醇几乎全部来源于胎儿和胎盘,故可作为胎儿代谢变化的敏感指标,1988 年有研究者最先报道受唐氏儿影响的孕妇血清 uE3 明显降低,提出在孕中期测定 uE3 水平是一项有效的指标。由表 1 可见,第 6、7 例二联方法为低风险(1/480、1/340),但因 uE3 为 0.152 MoM、0.718 MoM,三联筛查转为高风险(1/260、1/260)。本研究的 43 例异常妊娠中,共有 12 例阳性,筛查阳性率为 26.1%;在确证为唐氏综合征的 7 例中,uE3 筛查阳性的占有 3 例,检出效率为 42.9%。可见,作为单项指标,uE3 在对唐氏综合征的辅助判断中有较好的提示意义。同时,在其他染色体易位、缺失、多态等遗传疾病中也有一定的提示作用。由于 uE3 是孕中期三联筛查中随孕周变化而变化最大的血清指标,故在检测过程中正确核对孕周是非常必要的。当然,在检测过程中,对血液标本的质量也要有严格要求,黄疸、脂血等标本对 uE3 的检测结果具有不同程度的影响。因此在规范操作、减少人为因素影响的前提下,uE3 单一指标对产前筛查有一定的提示意义^[7]。

高检出率、简便有效、成本低的唐氏综合征产前筛查方案是全世界产前诊断工作者共同追求的目标,以求减少漏诊的发生率,最大程度地检出唐氏患儿,并减少假阳性患者的比例,从而减少侵袭性产前诊断技术的应用。多指标联合检测,单一指标辅助诊断已经是现在产前筛查发展的流行趋势^[6-7]。目前国际多数学者提倡孕早中期联合筛查方案,期中酌情序贯筛查方案是目前最好的筛查方案,即对孕早期筛查结果为极高危风险

者,进行绒毛取材染色体核型分析;孕早期筛查结果为极低危风险者,在孕中期不进行进一步筛查;孕早期筛查结果介于两者之间,进行孕中期再次筛查,风险比高危者,进行羊水穿刺染色体核型分析,风险比低危者,不作进一步检查。此方案的检 出率高同时假阳性率低,医生和孕妇对此方案的满意度均较高。

参考文献

[1] Wright D, Bradbury I, Benn P, et al. Contingent screening for Down's syndrome is an efficient alternative to non-disclosure sequential screening[J]. Prenat Diagn, 2004, 24(10):762-766.
[2] Brambati B, Macintosh MC, Teisner B, et al. Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A(PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype[J]. Br J Obstet Gynecol, 1993, 100(4):324-326.
[3] Palacio M, Jauniaux E, Kingdom J, et al. Perinatal outcome in pregnancies with a positive serum screening for Down's syndrome due to elevated levels of free-beta-human chorionic gonadotropin [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 1999, 13(1):58-62.
[4] 林琳华,任景慧,袁红,等.妊娠相关血浆蛋白 A 对唐氏综合征胎儿的筛查价值[J]. 中国妇幼保健, 2005, 13(20):1623-1625.
[5] 宋婕萍,易松.孕中期母血清 AFP 检测产前筛查胎儿神经管缺陷的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(5):97-101.
[6] 任景慧,林琳华,李芳芳.孕妇血清甲胎蛋白、人绒毛膜促性腺激素 β 亚单位、妊娠相关血浆蛋白 A 联合筛查出生缺陷的研究[J]. 中华围产医学杂志, 2002, 9(5):192-195.
[7] 袁晖,王晨虹,张黎,等.孕妇血清 PAPP-A、AFP、F β -HCG、uE3 联合筛查法在产前诊断中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(4):46-47.

(收稿日期:2013-12-20)

(上接第 683 页)

源性 MHC 的特异性抗体,同时可以通过旁路活化途径使预存于机体中的具有产生抗 CD3、CD4 和 CD8 的 B 淋巴细胞克隆大量活化,进而产生相应的抗淋巴细胞表面 CD3、CD4 和 CD8 抗体,而这些抗体正是可以保护胚胎着床以及生长发育的保护性抗体。

CD3、CD4 和 CD8 封闭效率检测也可以为治疗效果进行评估。ELISA 方法对封闭抗体的检测通常是一种定性的方法,受到干扰的因素比较多,而 CD3、CD4 和 CD8 分子封闭效率检测是针对女方体内是否具有抗 CD3、CD4 和 CD8 的特异性抗体,因此干扰因素较少,不仅可以定性,而且可以定量,有利于对治疗效果及过程进行全程监测,更有利于临床对免疫治疗效果的评价。

参考文献

[1] Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, et al. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment[J]. Reprod Immunol, 2010, 85(2):25-32.
[2] Jaslow CR, Carney JL, Kutteh WH. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1):1234-1243.
[3] 苏琳,孙燕,欧珊,等.淋巴细胞主动免疫治疗复发性流产的疗效分析[J]. 吉林医学, 2012, 33(9):1822-1823.

[4] 林其德.现代生殖免疫学[M].北京:人民卫生出版社, 2006:157.
[5] Sipak-Szmigiel O, Ronin-Walknowska E, Cybulski C, et al. Antigens HLA G, sHLA G and sHLA-class I in reproductive failure [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2007, 45 Suppl 1:S137-141.
[6] Wilczyński JR, Radwan P, Tchórzewski H, et al. Immunotherapy of patients with recurrent spontaneous miscarriage and idiopathic infertility: does the immunization-dependent Th2 cytokine overbalance really matter? [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2012, 60(2):151-160.
[7] 曹文丽,叶玲玲,姜雯,等.复发性流产的免疫因素及抗免疫治疗效果的评价Ⅲ[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(8):1118-1119.
[8] Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion[J]. Arch Gynecol Obstet, 2004, 269(3):161-72.
[9] Matthiesen L, Kalkunte S, Sharma S. Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67(4):334-40.
[10] Perricone C, de Carolis C, Perricone R. Pregnancy and autoimmunity: a common problem [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012, 26(1):47-60.

(收稿日期:2013-12-08)