

• 短篇论著 •

CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞、T 淋巴细胞亚群 在 URSA 患者外周血表达的意义*

陈建安, 陈丽莉, 丁茜, 周静, 何永明, 吴伯艳, 朱学海
(中山大学附属东华医院检验科, 广东东莞 523110)

摘要:目的 探讨 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞、T 淋巴细胞亚群在不明原因反复自然流产患者(URSA)外周血表达的意义。方法 选择 53 例 URSA 患者和 22 例体检健康妇女(健康对照组)的外周血,通过流式细胞术检测 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞、T 淋巴细胞亚群的表达情况。结果 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞在 URSA 患者外周血的表达率为(8.35±11.48)%,明显高于健康对照组(1.12±0.52)%,差异有统计学意义($t=2.924, P<0.01$);Th/Tc 比值为 1.50±0.61,较健康对照组(1.23±0.22)偏高,差异有统计学意义($t=2.045, P<0.05$);CD3⁺ T 细胞、CD3⁺CD4⁺ Th 细胞、CD3⁺CD8⁺ Tc 细胞在 URSA 患者外周血表达率与健康对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞与 Th/Tc 比值的相关系数为 0.004 8,其无正相关关系($P>0.05$)。结论 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞、Th/Tc 比值在 URSA 患者外周血表达水平的增高对反复自然流产的发生有一定的关系,通过检测 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞和 Th/Tc 比值对评估 URSA 患者的免疫功能状态和临床对患者免疫功能的有效干预有重要的意义。

关键词:不明原因反复自然流产; NKT 细胞; T 淋巴细胞; Th1/Th2

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.02.027

中图法分类号:R714.2

文章编号:1673-4130(2020)02-0236-03

文献标识码:B

不明原因反复自然流产(URSA)指除解剖因素、遗传疾病、内分泌疾病及感染等因素致胎儿非正常发展,连续 2 次或多次怀孕时,在同一妊娠周期发生自然流产的现象,仍有 60%~70%反复性流产患者由不明病因所致,对女性的生殖和心理健康有严重的伤害。目前的研究多认为,与母胎界面免疫调节失调导致 URSA 患者的免疫耐受失衡有关^[1],正常妊娠时,Th1/Th2 平衡起着非常重要的作用,而 Th1/Th2 失衡时对流产的发生也有重要作用^[2]。Th1/Th2 平衡可影响细胞免疫与体液免疫的平衡,免疫调节细胞亦可影响 Th1/Th2 平衡。NKT 细胞是一种免疫调节性淋巴细胞,而淋巴细胞亚群分析能很好地反映细胞和体液免疫功能,本研究旨在研究 URSA 患者外周血 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞和 T 淋巴细胞亚群的表达情况,为了解 URSA 患者的细胞免疫功能状态提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 11 月至 2018 年 10 月来中山大学附属东华医院妇科门诊或生殖中心就诊的 URSA 患者 53 例为研究对象,年龄 21~43 岁,具有 3 次或 3 次以上自然流产史,排除解剖因素、遗传疾病、内分泌疾病及感染等因素的女性患者。健康对照组 22 例为体检健康妇女,年龄 18~36 岁。分别抽

取 URSA 患者和健康对照组妇女静脉全血 2 mL,置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管内,混匀后送检,常温保存,48 h 内上机检测。

1.2 仪器与试剂 仪器为美国 Beckman-coulter 公司生产的 FC500MCL 流式细胞仪,试剂为广东国药有限公司提供的 Beckman-coulter 公司生产的 CD45⁻异硫氰酸荧光素(FITC)/CD8⁻藻红蛋白(PE)/CD4⁻藻红蛋白-德克萨斯红(ECD)/CD3⁻藻红蛋白-花青素(PC5);CD45⁻FITC/CD56⁺16-PE/CD19-ECD/CD3⁻PC5 等荧光抗体试剂,磷酸盐缓冲溶液(PBS),红细胞裂解液。

1.3 检测方法 分别加入 CD45⁻FITC/CD8⁻PE/CD4⁻ECD/CD3⁻PC5,CD45⁻FITC/CD56-PE/CD19-ECD/CD3⁻PC5 试剂各 5 μL 至 2 管流式专用管内底端,同时分别加入 50 μL 抗凝全血避光反应 20 min,加入红细胞裂解液 500 μL,避光 20 min 后加入 PBS 上机检测,用 CD45/SS 设门圈定淋巴细胞群。在十字门图中分别分析 CD3⁺区域细胞百分比,即为 CD3⁺ T 细胞;CD3⁺且 CD4⁺区域细胞的百分比,即为 CD3⁺CD4⁺ Th 细胞表达率;在 CD3⁺而 CD8⁺性区域的百分比,即为 CD3⁺CD8⁺ Tc 细胞表达率;在 CD3⁻而 CD19⁺性区域的百分比,即为 B 细胞表达率;在 CD3⁻而 CD56⁺CD16⁺性区域的百分比,即为

* 基金项目:东莞市社会科技发展项目(201750715046010)。

本文引用格式:陈建安,陈丽莉,丁茜,等. CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞、T 淋巴细胞亚群在 URSA 患者外周血表达的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(2): 236-238.

NK 细胞表达率;在 $CD3^{+}$ 而 $CD16^{+}56^{+}$ 性区域的百分比,即为 NKT 细胞表达率。

1.4 统计学处理 应用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用线性回归方法分析 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞与 Th/Tc、B 细胞的关系,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ NK 细胞、 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞在 URSA 患者外周血的表达情况

$CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞在 URSA 患者组外周血表达率明显高于健康对照组($t=2.924, P<0.01$),而 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ NK 细胞和 B 淋巴细胞在 URSA 患者外周血表达与健康对照组比较,差异无统计学意义($t=0.773、-0.162$,均 $P>0.05$)。见表 1。

表 1 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ NK 细胞、 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞在 URSA 患者和健康对照组外周血的表达率比较($\%,\bar{x}\pm s$)

组别	n	NK 细胞	NKT 细胞	B 细胞
URSA 患者组	53	13.37±7.38	8.35±11.48	11.73±3.69
健康对照组	22	14.62±2.67	1.12±0.52	11.60±1.36
t		0.773	2.942	-0.162
P		0.442	0.004	0.872

2.2 T 淋巴细胞亚群在 URSA 患者外周血的表达情况 $CD3^{+}$ T 细胞、 $CD3^{+}CD4^{+}$ Th 细胞、 $CD3^{+}CD8^{+}$ Tc 细胞在 URSA 患者外周血表达率与健康对照组比较,差异无统计学意义($t=0.591、0.007、0.354$,均 $P>0.05$),Th/Tc 比值在 URSA 患者较健康对照组偏高,差异有统计学意义($t=2.045, P<0.05$)。见表 2。

表 2 $CD3^{+}$ T 细胞、 $CD3^{+}CD4^{+}$ Th 细胞、 $CD3^{+}CD8^{+}$ Tc 细胞等在 URSA 患者和健康对照组外周血的表达率比较($\%,\bar{x}\pm s$)

组别	n	$CD3^{+}$ T 细胞	$CD3^{+}CD4^{+}$ Th 细胞	$CD3^{+}CD8^{+}$ Tc 细胞	Th/Tc
URSA 患者组	53	72.70±7.03	38.06±7.79	27.63±6.92	1.50±0.61
健康对照组	22	73.61±2.42	38.05±3.36	27.08±3.29	1.23±0.22
t		0.591	0.007	0.354	2.045
P		0.556	0.994	0.724	0.044

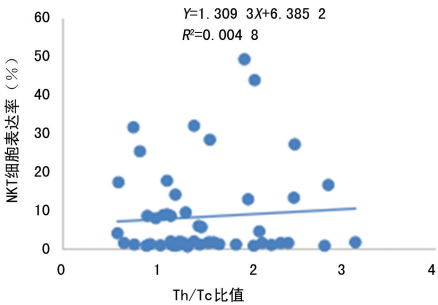


图 1 NKT 细胞与 Th/Tc 的直线回归关系散点图

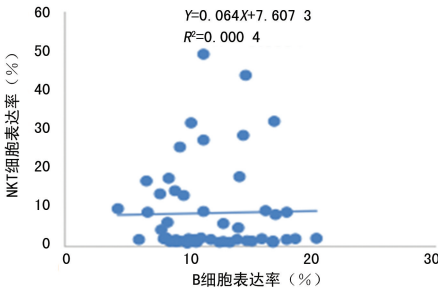


图 2 NKT 细胞与 B 细胞直线回归关系散点图

2.3 URSA 患者 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞与 Th/Tc、B 细胞的关系 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞与 Th/Tc 比值的相关系数为 0.004 8, $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞与 B 细胞相关系数为 0.000 4,均无正相关关系($P>0.05$)。见图 1、2。

3 讨 论

$CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞是一种新鉴定的免疫调节性细胞,是一种特殊类型的 T 淋巴细胞,其细胞表面不仅有 T 细胞受体,也有 NK 细胞的受体^[3];NKT 细胞的表面标志物表达为 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$,其生物学作用主要包括免疫调节和细胞毒作用。有研究认为 NKT 细胞被激活后分泌大量的细胞因子,包括白细胞介素(IL)-4、IL-10、IL-13,及干扰素等,通过影响 Th1/Th2 平衡,从而发挥免疫调节的作用^[4]。

有研究认为 NKT 细胞与母胎界面有非常密切的关系,DANG 等^[5]研究显示孕鼠的子宫中在围着床期检测到大量的 NKT 细胞,并且推测 NKT 细胞可能分泌 IL-4,诱导 Th2 型微环境偏移,从而在围着床期发挥重要的作用;且 NKT 细胞在诱导流产过程中可能有重要的作用。ITO 等^[6]研究显示,Val4 NKT/VB7 细胞与生殖免疫有一定的相关性,提出 a-Galcer 以 Val4 NKT 细胞依赖方式引起小鼠流产。袁静等^[7]研究显示,少量的 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 样细胞对维持妊娠有一定的作用,其可分泌大量的细胞因子,参与机体的免疫反应,其数量的增多与妊娠结局呈负相关,当外周血中 $CD3^{+}CD56^{+}CD16^{+}$ NKT 细胞表达率增高时,发生流产的概率随之升高^[8]。本

研究显示,CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞在 URSA 患者外周血表达率明显高于健康对照组,与袁静等^[7]、蒋楠等^[9]的报道相类似,提示外周血 NKT 细胞的增多对反复自然流产有一定的作用,可能影响 Th1/Th2 平衡,其偏移向 Th1 型时,增强细胞免疫功能,在母胎界面的免疫排斥反应亦增强,抑制免疫耐受而导致流产的发生;但与陈卫光等^[10]、LIN 等^[11]的报道的不同,其 NKT 细胞较健康对照组偏低。已有报道证实,当 Th1 型细胞因子分泌时,活化蜕膜上的 NK 细胞^[12],NK 细胞是一种具有细胞毒性的杀伤细胞,可激活下游一系列细胞和因子的级联反应,放大免疫杀伤作用,因子的平衡对妊娠是否成功起重要作用^[13]。

T 淋巴细胞亚群主要包括辅助性 T 淋巴细胞(Th 细胞,表型表现为 CD3⁺CD4⁺)、杀伤性 T 淋巴细胞(Tc 细胞,表型表现为 CD3⁺CD8⁺ Tc),其是重要的免疫功能状态的检测指标,当 Th/Tc 升高时,提示细胞免疫功能亢进,下降提示细胞免疫功能下降。本研究显示 CD3⁺T 细胞、CD3⁺CD4⁺ Th 细胞、CD3⁺CD8⁺ Tc 细胞在 URSA 患者外周血表达率与健康对照组比较,差异均无统计学意义,与司斯^[14]的报道有所不同,而 Th/Tc 比值在 URSA 患者偏高,提示其细胞免疫功能亢进,可能与反复自然流产的发生有一定关系^[15]。本研究显示 URSA 患者外周血 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞表达率与 Th/Tc 比值、B 细胞表达率均无正相关关系,提示造成 URSA 患者细胞免疫功能增强而引起流产,CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞与 Th/Tc 表达的增高无必然关系,其可能均是一种反映 URSA 患者细胞免疫功能状态的独立指标因素,因此,同时检测此两项指标更能提示 URSA 患者细胞免疫功能状态。

综上所述,CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞、Th/Tc 比值在 URSA 患者外周血表达水平与反复自然流产的发生有一定的关系,通过检测 CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT 细胞和 Th/Tc 比值对评估 USRA 患者的免疫功能状态和临床对患者免疫功能的有效干预有重要意义。

参考文献

[1] KWAK-KIM J, PARK J C, AHN H K, et al. Immunological modes of pregnancy loss[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(6): 611-623.

[2] 蒋国静, 邱丽华, 林其德. 原因不明复发性流产患者调节性 T 淋巴细胞对树突状细胞的调控作用[J]. 中华妇产科

杂志, 2009, 44(4): 257-259.

[3] KMNENBERG M, GAPIN L. The unconventional lifestyle of NKT cells[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 81(2): 557-568.

[4] TSUDA H, SAKAI M, MICHIMATA T, et al. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes[J]. Am J Reprod Immunol, 2001, 45(5): 295-302.

[5] DANG Y, HEYBORNE K D. Cutting edge: regulation of uterine NKT cells by a fetal class I molecule other than CD1[J]. J Immunol, 2001, 166(6): 3641-3644.

[6] ITO K, KARASAWA M, KAWANO T, et al. Involvement of decidual Valpha4 NKT cells in abortion[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(2): 740-744.

[7] 袁静, 李坚. NKT 样细胞及 Th1 型、Th2 型细胞因子表达变化与 URSA 的相关性[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(4): 120-123.

[8] 龚英, 李子涛, 付笑迎, 等. 人外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 与 Vα24+iNKT、Vβ11+iNKT 细胞的关系及 NKT 亚群和细胞因子分泌的研究[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(2): 137-141.

[9] 蒋楠, 邹一梅, 张金凤. 自然杀伤 T 细胞在不明原因习惯性流产患者外周血中的表达[J]. 中国计划生育与妇产科, 2017, 9(2): 26-28.

[10] 陈卫光, 李秀娟, 牛映红, 等. 原因不明习惯性流产患者外周血 CD3⁺CD16⁺CD56⁺自然杀伤 T 细胞的表达及意义[J]. 中华实用诊断与治疗, 2015, 29(7): 657-659.

[11] LIN X H, LIN D J, LIU J, et al. Declined natural killer cells emerging in women with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Clin Lab, 2016, 62(11): 2241-2247.

[12] SMYTH M J, CROWE N Y, PELLICCI D G, et al. Sequential production of interferon-gamma by NK1. 1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide [J]. Blood, 2002, 99(4): 1259-1266.

[13] 陈静, 杨润雨, 陈璐, 等. 自然杀伤细胞与不明原因复发性流产关系的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2018, 41(3): 322-326.

[14] 司斯. 不明原因反复自然流产患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞特征分析[J]. 临床军医杂志, 2016, 44(6): 634-636.

[15] 王振荣, 田喜凤, 李宜学. 反复自然流产患者外周血 T 淋巴细胞亚群比率的变化与作用[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(13): 102-104.