

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.013

复发性自然流产患者外周血中 Th17 及 Treg 细胞及其效应因子的变化

章雪莲 饶丽娟[△] 李名花 余丽辉 魏 馨

(长沙市中心医院 湖南 长沙 410004)

摘要 目的: 探讨复发性自然流产患者外周血中 Th17、Treg 细胞以及相关细胞因子的变化。**方法:** 选择复发性自然流产患者 25 例, 正常妊娠妇女 25 例以及正常非妊娠育龄妇女 25 例, 流式细胞术测定外周血中 Th17 和 Treg 细胞数量, ELISA 法测定血清 IL-10、TGF- β 及 IL-17 的浓度。**结果:** 复发性自然流产患者外周血中 Th17 细胞百分率显著高于正常妊娠以及正常非孕妇女 ($P<0.05$), Treg 细胞百分率显著低于正常非孕妇女 ($P<0.05$), 但与正常妊娠妇女相比无显著性差异 ($P>0.05$); 复发性自然流产患者外周血 IL-10 及 TGF- β 水平显著低于正常妊娠妇女以及正常非孕妇女 ($P<0.05$), 而 IL-17 水平显著高于正常妊娠妇女以及正常非孕妇女 ($P<0.05$)。**结论:** 外周血 Th17 细胞数和 IL-17 水平的升高以及抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- β 水平的下降可能是复发性自然流产发生的重要原因。

关键词: 复发性自然流产; Th17 细胞; 调节性 T 细胞

中图分类号: R714.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)11-2055-03

The Changes of Th17 and Treg Cells in the Recurrent Spontaneous Abortion Patients

ZHANG Xue-lian, RAO Li-juan[△], LI Ming-hua, YU Li-hui, WEI Xin

(Changsha Central hospital, Hunan Province, Changsha, Hunan, 410004, China)

ABSTRACT Objective: The changes of Th17 cells, Treg cells and related cytokines in peripheral blood of recurrent spontaneous abortion (RSA) patients was discussed. **Methods:** 25 recurrent spontaneous abortion patients, 25 normal pregnant women and 25 normal non-pregnant women at childbearing age were selected in this study. The numbers of Th17 and Treg cell in peripheral blood were measured by flow cytometry. The concentrations of serum IL-10, TGF- β , and IL-17 were determined by ELISA kits. **Results:** The percentage of Th17 cell in peripheral blood of RSA patients was significantly higher than that of normal pregnant and normal non-pregnant women ($P<0.05$), the percentage of Treg cell in peripheral blood of RSA patients was significantly lower than that in normal non-pregnant women ($P<0.05$), but there was no significant difference in comparison with normal pregnant women ($P>0.05$). The levels of serum IL-10 and TGF- β of RSA patients were significantly lower than that of normal pregnant women and normal non-pregnant women ($P<0.05$), while IL-17 level was significantly higher than that in normal pregnant and non-pregnant women ($P<0.05$). **Conclusion:** The number of Th17 cell, IL-17 level and serum level of inhibitory cytokines IL-10 and TGF-beta may play an important role in the development of recurrent spontaneous abortion.

Key words: Recurrent Spontaneous Abortion; Th17 Cell; Treg Cell

Chinese Library Classification: R714.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2055-03

前言

复发性自然流产 (Recurrent Spontaneous Abortion, RSA) 是一种常见的妊娠并发症, 在育龄妇女中的发病率约为 1%~3%^[1]。其病因复杂, 包括遗传、免疫、血型、感染、内分泌以及胚胎畸形等诸多因素^[2,3]。近年来的研究表明, 免疫因素, 特别是与免疫调节相关的细胞因子以及调节细胞在 RSA 的发病机制中起到重要的作用^[4-6]。Th17 细胞与 Treg 细胞都是近年来发现的与免疫调节密切相关的淋巴细胞, 普遍认为两者之间存在相互抑制的

效应, 并且这种平衡影响许多疾病的进展^[7,8]。为了进一步明确 RSA 患者体内 Th17 细胞与 Treg 细胞的变化情况, 探讨 Th17 及 Treg 与 RSA 发病的关系, 本研究检测并比较了 RSA 患者、正常妊娠妇女以及正常未孕育龄妇女体内的 Th17 细胞和 Treg 细胞的数目以及相关细胞因子水平, 旨在揭示 RSA 患者体内 Th17 细胞与 T 细胞的比例变化, 并初步探讨 Th17/Treg 比例失衡在 RSA 发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2010 年 4 月至 2011 年 4 月在我院就诊的复发性自然流产患者 25 例 (RSA 组), 孕周 7~14 周, 平均 10.3 周, 年龄 22~39 岁, 平均年龄 29.3 岁, 均有 3 次或 3 次以上自然流产病

作者简介: 章雪莲 (1968-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事病理产科研究, Tel: 0731-85667952, E-mail: 1276313652@qq.com

[△]通讯作者: 饶丽娟 (1962-), 女, 副主任医师, 主要从事病理产科的研究, Tel: 0731-85667952, E-mail: raolijuan@126.com

(收稿日期: 2013-10-05 接受日期: 2013-10-30)

史,而无活产、死产及死胎史,排除导致流产的常见病因(包括夫妻双方和胚胎染色体异常、子宫解剖结构异常、内分泌异常、生殖道感染以及血型不合、自身免疫性疾病等因素);25例正常早孕妊娠妇女(正常妊娠组),孕周 7~14 周,平均 9.7 周,年龄 21~35 岁,平均 25.5 岁,均为头胎;25 例来我院体检的正常非妊娠孕龄妇女(正常非孕组),年龄 20~35 岁,平均 27.5 岁,既往无孕史。正常妊娠组及正常非孕组均无遗传、解剖、内分泌方面的异常,并无生殖道感染和自身免疫疾病史。各组间年龄差异无显著性,具有可比性($P>0.05$)。

1.2 研究方法

1.2.1 主要仪器和试剂 IL-10、TGF- β 及 IL-17 ELISA 检测试剂盒购自 R&D 公司,氟波酯(phorbol myristate acetate)、离子霉素(ionomycin)以及莫能菌素(monensin)购自 Sigma 公司,小鼠抗人 CD4、CD25、IL-17A、Foxp3 荧光抗体以及同型对照抗体购自 eBioscience 公司,破膜剂(Fix&Perm)购自 Beckman 公司。酶标仪选用 BIO-RAD 公司 550 型,流式细胞仪选用 Beckman 公司 FACS Calibur and Cell Quest Pro 型。

1.2.2 标本采集与保存 RSA 组患者在流产发生 48 小时内采血,所有对象均于清晨采集空腹静脉血 5mL,其中 3mL 全血加入肝素钠抗凝管,应用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离 PBMC;另 2mL 全血不抗凝,在小试管中自然凝血后收集血清,-70℃ 保存待用。

1.2.3 指标测定 Th17 细胞检测:将采集到的 PBMC 用 PBS 洗涤 1 次后,加入氟波酯(50 ng/mL)、离子霉素(1 μ M)以及莫能菌素(500 ng/mL)后移入 24 孔板,在 37℃,5%CO₂ 条件下孵育 5 h。孵育完成后,PBS 洗涤 1 次,加入 FITC-CD4 单抗在

4℃ 下避光孵育 20 min,加入破膜剂继续孵育 20 min 后再加入 PE-IL-17A 单抗,4℃ 避光孵育 20 min,PBS 洗涤 1 次,重悬细胞,0.5%多聚甲醛固定后经流式细胞仪检测 CD4⁺IL-17A⁺ 细胞占 CD4⁺ 细胞的比例。

Treg 细胞检测:将采集到的 PBMC 用 PBS 洗涤 1 次后,调整细胞浓度至 2×10^6 Cells/mL,取 100 μ L 细胞悬液,加入 FITC-CD4 单抗、PerCP-CD25 单抗在 4℃ 下避光孵育 20 min,加入破膜剂继续孵育 20 min 后再加入 PE-Foxp3 单抗 4℃ 避光孵育 20 min,PBS 洗涤 1 次,重悬细胞,0.5%多聚甲醛固定后经流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 细胞占 CD4⁺ 细胞的比例。

细胞因子检测:按照相关 ELISA 试剂盒说明书进行操作,每份血清设复孔,酶标仪读取样本的 OD 值,通过标准曲线计算样本浓度。

1.3 统计学分析

所得数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 17.0 软件处理数据,组间均数比较用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,当 $P<0.05$ 时认为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血中 Th17 及 Treg 细胞百分率的比较

各组外周血中 Th17 及 Treg 细胞百分率的变化情况(表 1)。RSA 组外周血中 Th17 细胞比例显著高于正常妊娠组以及正常非孕组($P<0.05$),而正常妊娠组与正常非孕组之间没有显著性差异($P>0.05$);RSA 组与正常妊娠组外周血中 Treg 细胞比例均显著低于正常非孕组($P<0.05$),而 RSA 组与正常妊娠组之间没有显著性差异($P>0.05$)。

表 1 各组间外周血 Th17 及 Treg 细胞百分率的比较

Table 1 Comparison of the percentage of Th17 and Treg cells in Peripheral blood among three groups

Groups	cases(n)	Th17(%)	Treg(%)
RSA group	25	2.43 $\pm$ 0.22 ^{*#}	4.15 $\pm$ 0.28 [*]
Normal pregnant group	25	1.25 $\pm$ 0.13	4.67 $\pm$ 0.21 [*]
Normal non-pregnant group	25	1.48 $\pm$ 0.12	6.87 $\pm$ 0.33

注:与正常非孕组比较,* $P<0.05$;与正常妊娠组比较,# $P<0.05$

Note:Compared with normal non-pregnant group, * $P<0.05$; compared with normal pregnant group, # $P<0.05$

2.2 各组外周血血清 IL-10、TGF- β 及 IL-17 水平的比较

各组外周血血清中细胞因子 IL-10、TGF- β 及 IL-17 水平的比较(表 2)。RSA 组外周血 IL-10 水平显著低于正常妊娠组以及正常非孕组($P<0.05$),而正常妊娠组外周血 IL-10 水平显著高于正常非孕组($P<0.05$);RSA 组外周血 TGF- β 水平显著低

于正常妊娠组和正常非孕组($P<0.05$),正常妊娠组与正常非孕组之间没有显著性差异($P>0.05$);RSA 组外周血 IL-17 水平显著高于正常妊娠组和正常非孕组($P<0.05$),正常妊娠组与正常非孕组之间没有显著性差异($P>0.05$)。

表 2 各组外周血血清 IL-10、TGF- β 及 IL-17 的水平比较(ng/L)

Table 2 Comparison of serum levels of IL-10、TGF- β and IL-17 in Peripheral blood among three groups

Groups	cases(n)	IL-10	TGF- β	IL-17
RSA group	25	37.56 $\pm$ 12.35 ^{*#}	123.34 $\pm$ 20.13 ^{*#}	149.83 $\pm$ 31.64 ^{*#}
Normal pregnant group	25	154.44 $\pm$ 16.23 [*]	181.32 $\pm$ 33.75	63.01 $\pm$ 19.87
Normal non-pregnant group	25	92.63 $\pm$ 15.64	169.43 $\pm$ 24.65	71.23 $\pm$ 20.84

与正常非孕组比较,* $P<0.05$;与正常妊娠组比较,# $P<0.05$

Compared with normal non-pregnant group, * $P<0.05$; compared with normal pregnant group, # $P<0.05$

3 讨论

Th17 的概念在 2005 年首次提出,其生物学功能、分化过程和表达的细胞因子完全不同于 Th1 和 Th2 细胞,在宿主针对细菌感染的自体免疫疾病过程中发挥重要作用。而 Th17 细胞过度活化与多种自身免疫性疾病密切相关,如类风湿关节炎、结肠炎、多发性硬化症、牛皮癣等^[10]。Th17 细胞产生的最重要的效应因子是 IL-17,能有效地介导中性粒细胞动员的兴奋过程,从而有效地介导炎症反应。研究发现,过量的 Th17 细胞会引发严重的自体免疫疾病,比如多发性硬化症等。而免疫学异常也是导致 RSA 的重要原因。为了证实 Th17 细胞和 IL-17 在 RSA 发病中的作用,本研究对 RSA 患者体内的 Th17 细胞数量以及血清 IL-17 水平进行了检测,结果发现 RSA 患者组体内 Th17 细胞百分率以及 IL-17 水平均较正常妊娠妇女和正常非妊娠妇女升高,说明 Th17 的活化以及 IL-17 水平的升高可能在 RSA 的发生中起着一定的作用。

Treg 细胞可通过分泌抑制性细胞因子 IL-10、TGF- β 等对效应淋巴细胞的增殖、分泌等功能均显示抑制效应,是一类重要的负向免疫调节细胞。Treg 细胞数目的减少或功能的降低可导致许多疾病的发生,例如在多种自身免疫疾病模型中都已证实存在 Treg 细胞的减少^[11,12]。此外,Treg 细胞还与移植物耐受的形成密切相关^[13,14],而妊娠也是一种半同种异体移植,妊娠的成功取决于母胎之间双向免疫调节的平衡,而在这一平衡过程中 Treg 细胞必然有着至关重要的作用。本研究的结果显示,虽然 RSA 组与正常妊娠组外周血中 Treg 细胞数目无明显差异,但是其重要的效应细胞因子 IL-10、TGF- β 则均低于正常妊娠组,特别是正常妊娠组血清的 IL-10 水平显著高于正常非孕组,而 RSA 组的 IL-10 反而低于正常非孕组,说明 RSA 患者体内 Treg 细胞的功能受到抑制,相关细胞因子水平降低,这可能是导致母胎耐受被打破并进一步造成流产的重要原因。

Th17 细胞与 Treg 细胞之间的相互作用是目前的一个研究重点,在多种疾病模型中均提示 Th17 细胞与 Treg 细胞之间存在相互抑制^[14,15],而且这种相互作用对妊娠的维持也具有重要的意义^[16]。我们的研究结果也证实了这一点,RSA 患者体内 Th17 细胞增多,Treg 细胞比例虽然没有明显下降,但是其重要效应分子 IL-10、TGF- β 的水平显著下降,这些结果均提示我们当 Th17/Treg 平衡偏向于 Th17 细胞时将促进 RSA 的发生,对 Th17/Treg 平衡的检测可以作为评判 RSA 风险的指标,但 Th17/Treg 平衡与 RSA 发病的具体机制还有待深入研究。

参考文献(References)

- [1] Carrington B., G. Sacks, and L. Regan. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005,17 (6):591-7
- [2] 曹芳,虞斌,张晓青,等.反复自然流产夫妇染色体核型分析[J].现代生物医学进展,2010,10(24):p. 4707-4709
- [3] Cao Fang, Yu Bin, Zhang Xiao-qing, et al. Karyotype analysis on couples with recurrent spontaneous abortion [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(24):4707-4709
- [4] Nigro G, Mazzocco M, Mattia E, et al. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011,24(8):983-9
- [5] Choi, Y.K. and J. Kwak-Kim. Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review [J]. Am J Reprod Immunol, 2008. 60(2):91-110
- [6] Raghupathy, R. and J. Kalinka. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation[J]. Front Biosci, 2008,13:985-94
- [7] 田晶,王峰,薛金凤,等.2 型腺相关病毒载体介导正常人 β 珠蛋白基因在重型地贫流产胎儿造血细胞中的表达[J].现代生物医学进展,2010,10(11):2028-2033
- [8] Tian Jing, Wang Feng, Xue Jin-Feng, et al. Adeno-associated Virus Type 2-mediated Expression of the Normal Human β -globin Gene in Hematopoietic Cells of the Aborted β -thalassemia Major Fetus [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(11):2028-2033
- [9] Yang J, Yang X, Zou H, et al. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology (Oxford), 2011,50(8):1366-72
- [10] Lee SK, Kim JY, Lee M, et al. Th17 and Regulatory T cells in Women with Recurrent Pregnancy Loss[J]. Am J Reprod Immunol, 2012
- [11] Ruan Q. and CHEN Y.H.. Nuclear factor-kappaB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. Adv Exp Med Biol, 2012, 946: 207-21
- [12] Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM 2nd, et al. IL-17 Contributes to Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis [J]. The Journal of Immunology, 2010
- [13] Oh,S., A.L.Rankin, and A.J.Caton. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune arthritis [J]. Immunological Reviews, 2010,233 (1): 97-111
- [14] Lin J, Li M, Wang Z, et al. The role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation [J]. Journal of Lipid Research, 2010,51(5):1208-1217
- [15] Li X.C. and L.A. Turka. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection[J]. Nat Rev Nephrol, 2010,6(10):577-583
- [16] Hanidziar, D. and M. Koulmanda. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance [J]. Current Opinion in Organ Transplantation, 2010,15(4):411-415
- [17] Heo YJ, Joo YB, Oh HJ, et al. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4⁺ T cell population of rheumatoid arthritis patients [J]. Immunology Letters, 2010,127(2): 150-156
- [18] Saito S,Nakashima A,Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy [J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2010,63(6):601-610