

· 全科医学论著 ·

## 反复流产患者主动免疫治疗前后 T 淋巴细胞 封闭效率比较

马超, 韩维田, 冯文华

辽宁省计划生育科学研究院分子遗传实验室, 辽宁 沈阳 110031

**摘要:**目的 通过检测、分析反复流产(RSA)患者主动免疫治疗前后外周血中 T 淋巴细胞 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 封闭效率变化,评价主动免疫治疗的疗效,探讨 RSA 发生的免疫学机制。方法 选取 3 次或 3 次以上无明确原因的自然流产患者 82 例,使用流式细胞仪对这 82 例 RSA 患者主动免疫治疗前后外周血中 T 淋巴细胞 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 封闭效率进行检测,采用 Wilcoxon 符号秩检验分析主动免疫治疗前后封闭效率的差异,采用  $\chi^2$  检验来分析封闭效率转阳与否与妊娠结局的关系。结果 主动免疫治疗后 RSA 患者外周血中 T 淋巴细胞 CD3<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 的封闭效率明显升高,免疫治疗前 CD3 封闭效率为 0.31 (-0.51 ~ 1.09),免疫治疗后 CD3 封闭效率为 1.02 (0.09 ~ 2.33);免疫治疗前 CD8 封闭效率为 0.47 (-0.53 ~ 1.83),免疫治疗后 CD8 封闭效率为 1.39 (0.55 ~ 2.88),差异有统计学意义( $Z = -2.147, -2.622, P < 0.05$ ),而 CD4<sup>+</sup> 的封闭效率免疫治疗前为 -0.04 (-1.40 ~ 1.30),免疫治疗后为 0.52 (-1.10 ~ 1.35),有升高的趋势,但差异无统计学意义( $Z = -0.552, P > 0.05$ )。RSA 患者经过主动免疫治疗后转阳和未转阳的妊娠率分别是 42.9% 和 16.1%,转阳的患者妊娠率明显高于未转阳的患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 RSA 患者经过主动免疫治疗后,其外周血 T 淋巴细胞封闭效率提高,封闭抗体的阳性转变更有利于妊娠的建立和维持。

**关键词:**反复流产;主动免疫治疗;T 淋巴细胞封闭效率;流式细胞术

**中图分类号:** R394 R457.2 R714.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2017)04-0571-03

**DOI:** 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2017.04.008

**The changes of T lymphocytes blocking efficiency after active immunotherapy in recurrent spontaneous abortion patients** MA Chao, HAN Wei-tian, FENG Wen-hua. *Molecular Genetics Laboratory, Liaoning Province Research Institute of Family Planning, Shenyang, Liaoning 110031, China*

**Abstract: Objective** To detect the changes of T lymphocytes CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> blocking efficiency after initiate immunotherapy, monitor the effect of immunotherapy and explore the immunological occurrence mechanism of RSA. **Methods** A total of 82 patients with three times or more than 3 times unexplained recurrent spontaneous abortion patients were selected. Flow cytometry was used to measure T lymphocytes CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> blocking efficiency of these 82 patients, Wilcoxon rank sum test were used to analyze the difference between two groups, Chi-square test was used to analyze the relationship between positive changing of T lymphocytes blocking efficiency and the result of pregnancy. **Results** The level of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes blocking efficiency was significantly increased in peripheral blood of unexplained recurrent abortion patients after initiate immunotherapy ( $Z = -2.147, -2.622, P < 0.05$ ), CD3<sup>+</sup> T lymphocytes blocking efficiency before active immunotherapy were 0.31 (-0.51 to 1.09), CD3<sup>+</sup> T lymphocytes blocking efficiency after active immunotherapy were 1.02 (0.09 to 2.33); CD8<sup>+</sup> T lymphocytes blocking efficiency before active immunotherapy were 0.47 (-0.53 to 1.83), CD8<sup>+</sup> T lymphocytes blocking efficiency after active immunotherapy were 1.39 (0.55 ~ 2.88), while there is no significantly differences in CD4<sup>+</sup> although blocking efficiency were slightly unregulated ( $Z = -0.552, P > 0.05$ ), CD4<sup>+</sup> T lymphocytes blocking efficiency before active immunotherapy were -0.04 (-1.40 to 1.30), CD4<sup>+</sup> T lymphocytes blocking efficiency after active immunotherapy were 0.52 (-1.10 to 1.35). After active immunotherapy, the pregnancy rate of positive blocking efficiency is 42.9%. The pregnancy rate of negative blocking efficiency is 16.1%. The pregnancy rate was higher in the RSA patients with positive blocking efficiency than the patients with negative blocking efficiency ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** After active immunotherapy, T lymphocytes blocking efficiency of peripheral blood recurrent spontaneous abortion patients were unregulated, T lymphocytes blocking efficiency increasing after active immunotherapy in recurrent abortion patients may be helpful to maintain pregnancy.

**Key words:** Recurrent abortion; Active immunotherapy; T lymphocytes blocking efficiency; Flow cytometry

反复自然流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指发生于妊娠 12 周之前连续 3 次或 3 次以上

的自然流产,是一种常见的临床难以处理的不孕症<sup>[1]</sup>。其中有 40% ~ 80% 的患者在临床诊断上没有明确的原因,与患者自身的免疫因素有关,称为不明原因反复自然流产 (unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)<sup>[2]</sup>。研究发现,发生过 2 次自然流产情况的妇女再次妊娠的流产率为 24.4%,发生过 3 次或 3 次以

**基金项目:**辽宁省省直医院改革重点临床科室诊疗能力建设项  
目 (LNCCC-D49-2015)

**通信作者:**冯文华, E-mail: whfeng111@163.com

上自然流产情况的妇女再次妊娠的流产率提升到33.1%<sup>[3]</sup>。正常妊娠需要母体与胎儿之间建立免疫耐受的关系,如果母体在妊娠时不能有效的产生保护性封闭抗体,母体会对带有父亲抗原的胚胎产生排斥而引发流产<sup>[4-5]</sup>。缺乏保护性封闭抗体所引起的自然流产目前主要采用主动免疫治疗,即采用丈夫或健康第三方(丈夫有肝炎、梅毒或艾滋病感染可用他人淋巴细胞代替)的淋巴细胞对RSA患者进行主动免疫治疗,主动治疗效果目前仍有争议<sup>[6]</sup>。本研究通过对RSA患者主动免疫治疗前后外周血中T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率测定,来探讨主动免疫治疗对于RSA的疗效,同时对RSA疾病的免疫学机制进行研究探索。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 82例反复自然流产(RSA)患者来源于辽宁省计划生育科研院附属医院2014年3月—2016年3月门诊就诊患者,年龄25~41岁,平均年龄(32.1±6.7)岁。其诊断标准为患者发生3次或3次以上的自然流产且孕周小于12周,夫妻双方染色体和内分泌检查正常;无母儿血型不和,抗心磷脂抗体、抗核抗体检查为阴性;无生殖道感染、畸形;丈夫检查均无异常。

### 1.2 治疗方法

1.2.1 主动免疫治疗 首先检测丈夫或第三方个体艾滋病抗体、梅毒抗体和肝炎病毒均正常,无菌抽取患者丈夫或第三方个体肝素抗凝血10 ml,常规方法提取淋巴细胞,磷酸盐缓冲液洗涤细胞2次,然后用2 ml生理盐水稀释成淋巴细胞悬液,取0.8 ml分6~8个皮丘于女方前臂皮内注射,3次为1个疗程,每次间隔21 d。第4次主动免疫治疗后检测外周血T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率。

1.2.2 T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>封闭效率的检测 对照管中加入男方50 μl EDTA-Na<sub>2</sub>抗凝全血,测定管中加入男方EDTA-Na<sub>2</sub>抗凝全血和女方血清各50 μl,然后每只管中均加入FITC-CD3/PE-CD8/PerCP-CD45/APC-CD4混合单克隆荧光抗体10 μl(BD公司);涡旋振荡后,室温避光20 min;加入红细胞裂解液(BD公司)1 ml,涡旋振荡后,室温避光10 min;加入2 ml磷酸盐缓冲液洗涤细胞,低速离心后,加入500 μl磷酸盐缓冲液,混匀后上样检测。应用CellQuest Pro软件圈门淋巴细胞,得出CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>淋巴细胞百分率。封闭效率(%)=对照管(%) - 测定管(%),封闭效率小于0为阴性。T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率的检测对象为82例主动免疫治疗4次后的RSA患者。

1.3 治疗结果与结局 主动免疫治疗后的结果:①未

转阳:T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率主动治疗前某一项为负值,主动免疫治疗4次此项仍为负值;②转阳:T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率主动治疗前某一项为负值,主动免疫治疗4次此项变为正值。治疗后的妊娠结局:①未成功妊娠:主动免疫治疗前4周内,血液检查HCG为阴性,主动免疫治疗后血液检查HCG仍为阴性,或HCG阳性后再次发生流产;②成功妊娠:主动免疫治疗前4周内,血液检查HCG为阴性,主动免疫治疗后血液检查HCG为阳性且维持治疗3个月后仍正常妊娠。

1.4 统计学方法 采用SPSS 20.0统计学软件分析数据,对于不服从正态分布的数据,计量资料用中位数和四分位数间距[M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>)]描述,组间比较采用Wilcoxon符号秩检验、χ<sup>2</sup>检验,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 RSA患者主动免疫治疗前后T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率阳性率比较 RSA患者外周血治疗前CD3<sup>+</sup>封闭效率阳性率为60.9%,4次主动免疫治疗后阳性率为80.4%;CD4<sup>+</sup>治疗前阳性率为47.8%,治疗后阳性率为65.2%;CD8<sup>+</sup>治疗前阳性率为56.6%,治疗后阳性率为89.1%,均较治疗前有明显提高,见表1。

表1 82例RSA患者T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率阳性率比较(%)

项目	例数	免疫治疗前	免疫治疗后
CD3 <sup>+</sup> 封闭效率	82	60.9	80.4
CD4 <sup>+</sup> 封闭效率	82	47.8	65.2
CD8 <sup>+</sup> 封闭效率	82	56.6	89.1

2.2 RSA患者主动免疫治疗前后外周T淋巴细胞封闭效率值比较 主动免疫治疗前后的封闭率值经正态检验不服从正态分布,用秩和检验分析,主动免疫治疗进行4次后RSA患者外周血中CD3<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率明显提高(P<0.05),而CD4<sup>+</sup>的封闭效率无明显变化(P>0.05),见表2。

表2 82例RSA患者T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率值比较

项目	例数	主动免疫治疗前	主动免疫治疗后	Z值	P值
CD3 <sup>+</sup> 封闭效率	82	0.31(-0.51~1.09)	1.02(0.09~2.33)	-2.147	<0.05
CD4 <sup>+</sup> 封闭效率	82	-0.04(-1.40~1.30)	0.52(-1.10~1.35)	-0.552	>0.05
CD8 <sup>+</sup> 封闭效率	82	0.47(-0.53~1.83)	1.39(0.55~2.88)	-2.622	<0.05

2.3 主动免疫治疗后妊娠结局的比较 在检测T淋巴细胞CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>的封闭效率的82例患者中,我们对这些患者的妊娠结局进行回访和统计。失访11例(不能联系未能得到妊娠结局),不符合标准排除19例(4次主动免疫后,同时采用了其他辅助妊娠的治疗方式),排除失访和不符合标准的30例患者

后,剩余 52 例 RSA 患者治疗后妊娠 14 例,未转阳的 31 例中,成功妊娠的有 5 例,转阳的 21 例中,成功妊娠的有 9 例。转阳和未转阳的妊娠率分别是 42.9% 和 16.1%,转阳的患者妊娠率高于未转阳的患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

母体在妊娠期间存在复杂的免疫调节机制,妊娠的正常维持主要依赖母体相关免疫耐受和以封闭抗体为主的封闭效应<sup>[7-8]</sup>。一旦这种免疫平衡失调,将导致病理妊娠,甚至流产。近年来封闭抗体(blocking antibody, BA)的检测广泛应用于 RSA 患者的诊疗中。保护性的封闭抗体(BA)可以有效识别胚胎的父系抗原,封闭胚胎的父系抗原,产生封闭作用,保护胚胎的正常发育<sup>[9]</sup>。主动免疫治疗是利用外来抗原预先刺激母体,使母体免疫系统在再次妊娠时迅速与胚胎父系抗原结合,这样胚胎免受母体免疫系统攻击而正常生长<sup>[10]</sup>,活产率也得到明显提高<sup>[11]</sup>。

本研究发现 RSA 患者经过 4 次免疫治疗后,外周血 CD3<sup>+</sup> 封闭效率阳性率从 60.9% 提高到 80.4%; CD8<sup>+</sup> 封闭效率阳性率从 56.6% 提高到 89.1%; CD4<sup>+</sup> 封闭效率阳性率为 47.8% 提高到 65.2%, CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 封闭效率阳性率均有提高,但是经统计学分析,治疗后 CD3<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 封闭效率比治疗前提高,差异具有统计学意义,而 CD4<sup>+</sup> 封闭效率的提高差异无统计学意义。这与李晓荣等<sup>[9]</sup>报道的 RSA 患者主动免疫治疗后 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 封闭效率均提高,并都具有统计学意义的结果稍有不一致。本研究中 CD4<sup>+</sup> 封闭效率在经过 4 次主动治疗后,虽有提高的趋势,但是差异无统计学意义,这可能是由于选取的治疗次数为 4 次,而李晓荣的报道采用了多次主动免疫治疗乃至妊娠后继续免疫治疗的样本。以后可以深入研究随着主动免疫治疗次数增加 CD4<sup>+</sup> 的封闭效率能否进一步提高。本研究发现,随访的 52 例 RSA 患者,经过主动免疫治疗后妊娠 14 例,未转阳的 31 例中,成功妊娠的有 5 例,转阳的 21 例中,成功妊娠的有 9 例。转阳和未转阳的妊娠率分别是 42.9% 和 16.1%,封闭抗体转阳的患者妊娠率明显提高,这与孙莉等<sup>[12-13]</sup>报道的通过主动免疫治疗后封闭抗体阳性的提高,可以明显提高妊娠成功率一致。这些结果说明,主动免疫治疗可以提高 RSA 患者封闭抗体的阳性率,提高母体的免疫耐受性,利于正常妊娠的维持。石瑛等<sup>[14]</sup>对 RSA 患者外周血中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 分子的封闭效率分析发现,CD8<sup>+</sup> 封闭效率阴性率远高于 CD4<sup>+</sup> 封闭效率,提示 CD8<sup>+</sup> 分子在 RSA 疾病发生中意义更大。同时通过 RSA 患者的回访调查发现,CD8<sup>+</sup> 封闭效率的转阳能够提高 RSA 患者的怀孕成功率和妊娠成功

率<sup>[14]</sup>。Carbone J 等<sup>[15]</sup>研究发现,RSA 患者外周血中 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞与对照组相比较明显升高。本研究发现,RSA 患者主动免疫治疗 4 次后,CD8<sup>+</sup> 封闭效率明显提高,以后可以通过深入的研究比较单纯 CD8<sup>+</sup> 封闭效率转阳和单纯 CD4<sup>+</sup> 转阳患者妊娠成功率的差别,以探讨其中起关键作用的因素。

通过对 RSA 患者主动免疫治疗前后外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞封闭效率进行分析,可以对更好的了解妊娠过程中的免疫调节机制,为反复流产等妊娠相关疾病的治疗提供理论依据,减少患者的痛苦并提高怀孕的成功率。

### 参考文献

- [1] 李光梅, 洪志霞, 邓舒静. PAI-1 的水平与不明原因反复自然流产的关系[J]. 海南医学, 2016, 27(11): 1856-1857.
- [2] 张华坤, 刘庆芝, 谢建生, 等. 封闭抗体缺失与不同类型复发性自然流产关系分析[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(10): 787-789.
- [3] Chen JL, Yang JM, Huang YZ, et al. Clinical observation of lymphocyte active immunotherapy in 380 patients with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 40: 347-350.
- [4] 莫扬, 郝世勇, 朱宇芳, 等. 不同年龄反复自然流产患者封闭抗体检测结果分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(23): 1987-1990.
- [5] 陆启滨, 张恒. 安子合剂对复发性流产封闭抗体的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(5): 457-459.
- [6] 赵冬梅, 耿景旭, 谭丽, 等. 淋巴细胞免疫与非免疫治疗封闭抗体缺乏致胚胎停育效果观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(11): 1082-1084.
- [7] 洪琳凤, 尹保民. 不同方法治疗封闭抗体阴性复发性流产患者的疗效比较[J]. 中外医学研究, 2014, 12(8): 7-8.
- [8] 周晓莹, 赖有行, 刘紫菱. 不明原因复发性流产主动免疫联合中药治疗前后封闭抗体的变化及临床观察[J]. 中国医药导报, 2015, 12(8): 118-120.
- [9] 李晓荣, 魏丽娜, 王海燕, 等. 主动免疫治疗对 URSA 患者 CD 细胞封闭效率及妊娠结局的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(9): 2102-2104.
- [10] 王巍, 马海兰, 蓝雪琴, 等. 淋巴细胞免疫治疗不明原因反复流产 115 例妊娠结局分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(11): 1720-1724.
- [11] 高薇炜. 封闭抗体阴性反复流产患者采用主动免疫治疗的临床效果[J]. 中国计划生育学杂志, 2015, 11(23): 755-758.
- [12] 孙莉, 梁磊, 杨波. 主动联合被动免疫疗法治疗封闭抗体阴性孕妇复发性流产临床观察[J]. 山东医药, 2015, 55(43): 44-45.
- [13] 何金英, 孙文芳, 刘慧, 等. 279 例复发性流产封闭抗体检测及淋巴细胞主动免疫治疗疗效观察[J]. 内蒙古医学杂志, 2014, 46(11): 1289-1292.
- [14] 石瑛, 秦淑红, 荣守华, 等. 利于流式细胞术检测 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[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(6): 682-686.
- [15] Carbone J, Sarmiento E, Gallego A, et al. Peripheral blood T-and B-cell immunophenotypic abnormalities in selected women with unexplained recurrent miscarriage[J]. J Reprod Immunol, 2016, 113: 50-53.