

• 临床论著 •

免疫球蛋白联合绒毛膜促性腺激素 对原因不明复发性流产患者外周血 Th17/Treg 平衡的影响

沙静 刘福民 王文 刘小云 朱学文

【摘要】 目的 探讨免疫球蛋白联合绒毛膜促性腺激素对原因不明复发性流产患者外周血 Th17/Treg 平衡的影响。方法 选取有原因不明复发性流产病史且妊娠后行免疫球蛋白联合绒毛膜促性腺激素进行保胎治疗的孕妇 20 例, 作为治疗组, 于治疗前后分别留取孕妇外周血; 选取正常妊娠妇女 20 例作为对照组, 留取其外周血。采用 RT-PCR 和 ELISA 方法检测外周血中 IL-17、IL-6、IL-10 和 TGF- β 1 的表达水平。结果 (1) 治疗组治疗前外周血中 Th17 相关细胞因子 IL-17 和 IL-6 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$), Treg 相关细胞因子 IL-10 和 TGF- β 1 表达水平低于对照组 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。(2) 治疗组治疗后与治疗前相比, IL-17 和 IL-6 表达水平明显下降 ($P < 0.05$), IL-10 和 TGF- β 1 表达水平明显上升 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。(3) 治疗组治疗后与对照组相比, 外周血中 IL-17、IL-6、IL-10 和 TGF- β 1 四种细胞因子表达水平均无明显差异 ($P > 0.05$)。 (4) 治疗组中 IL-17 与 IL-6, IL-10 与 TGF- β 1 存在明显的正相关性。结论 复发性流产的发生与 Th17/Treg 平衡失调有关, 调节 Th17/Treg 平衡失调可能是免疫球蛋白联合绒毛膜促性腺激素治疗复发性流产的机制之一。

【关键词】 流产, 习惯性; 绒毛膜促性腺激素; 免疫球蛋白类; Th17; Treg

The effect of immunoglobulin combined with hCG on Th17/Treg balance in peripheral blood of unexplained recurrent spontaneous abortion patients Sha Jing*, Liu Fumin, Wang Wen, Liu Xiaoyun, Zhu Xuwen. *Graduate School, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

Corresponding author: Liu Fumin, Email: Liufumin820@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the administration of immunoglobulin combine hCG on Th17/Treg balance in unexplained recurrent spontaneous abortion(URSA). **Methods** Selected 20 cases of pregnant women as treatment group who had a history of unexplained recurrent spontaneous abortion and underwent the combine therapy of immunoglobulin plus hCG, whose peripheral blood samples were taken before and after treatment respectively; 20 cases of normal pregnant women were chosen as control group. Semi-quantitative RT-PCR and ELISA were applied to detect the concentrations of IL-17, IL-6, IL-10 and TGF- β 1 in the peripheral blood of both groups. **Results** (1) Expression levels of Th17 related cytokines IL-17 and IL-6 were significantly higher in peripheral blood of treatment group before treatment than control group ($P < 0.05$); Treg related cytokines IL-10 and TGF- β 1 levels were decreased compared with the control group ($P < 0.05$). (2) After treatment, IL-17 and IL-6 levels of treatment group were lower than before ($P < 0.05$); while IL-10 and TGF- β 1 levels were increased ($P < 0.05$). (3) Compared with the control group, the levels of IL-17, IL-6, IL-10 and TGF- β 1 of treatment group with aftertreatment were not significantly different, $P > 0.05$. (4) IL-17 and IL-6, IL-10 and TGF- β 1 of treatment group were positively correlated. **Conclusion** The happening of recurrent miscarriage may be associated with Th17/Treg

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.01.016

基金项目: 徐州市科技局社会发展立项项目 (XZZD1143)

作者单位: 221004 江苏省, 徐州医学院研究生院 2011 级 (沙静); 徐州医学院附属医院妇产科 (刘福民、王文), 中心实验室 (刘小云、朱学文)

通讯作者: 刘福民, Email: liufumin820@163.com

balance disorder, and correcting the disorder of Th17/Treg balance may be one of the mechanisms of immunoglobulin combined hCG to treat URSA.

【Key words】 Abortion, habitual; Chorionic gonadotropin; Immunoglobulins; Th17; Treg

复发性流产是指连续2次及2次以上的自然流产,每次流产多发生于同一妊娠月份。发生率为1%~2%,其病因涉及遗传、免疫、内分泌、感染及子宫畸形等因素,而原因不明复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)目前认为多与免疫因素有关。正常胚胎不被母体排斥有赖于母-胎界面的免疫耐受,一旦这种耐受平衡格局被打破,母体对胚胎产生免疫排斥,就会导致流产发生。辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)是近年新发现的两个不同于Th1和Th2的淋巴细胞亚群,有其独特的分化、发育调节机制,且与免疫性疾病和感染性疾病的发生发展关系密切。有研究表明,Th17/Treg失衡可能参与了URSA的发生^[1]。我们以往研究显示,联合使用小剂量人免疫球蛋白(immunoglobulin, IG)与人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin hormone, hCG)对有URSA病史的孕妇进行治疗,妊娠成功率为95.1%^[2],但目前这种免疫治疗的机制尚不清楚。本研究通过检测IG联合hCG治疗前后有URSA病史孕妇外周血中IL-17、IL-6、IL-10和TGF- β 1的表达变化,探讨免疫球蛋白联合hCG对URSA患者外周血中Th17/Treg平衡的影响。

资料与方法

1. 研究对象:2012年3月至2013年2月于我院门诊就诊的反复流产患者共53例,从中筛选出20例入组,为治疗组。入组标准为连续2次及2次以上的自然流产史,既往妊娠从未超过12周,并排除染色体、解剖、内分泌异常和生殖系统感染等常见病因,丈夫精液分析排除男方因素。选取孕12周内正常妊娠者20例为对照组,无难免流产、早产、死胎或死产等异常妊娠史。两组均排除内外科疾病。治疗组平均年龄(27.05 \pm 2.31)岁,对照组平均年龄(24.75 \pm 1.74)岁,两组年龄比较无统计学差异($P>0.05$)。所有入组者均签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会批准。

2. 治疗方法及采血时间:治疗组于停经后尽早进行尿妊娠试验,一旦确定妊娠立即给予IG和hCG治疗。具体方法为IG 0.3 g肌注,每3~4周重复注射一次,持续至妊娠14周;hCG 2 000 U肌

注,2 d一次,至孕12~13周之间行超声检查,如胚胎发育正常,13周后递减停药。正常妊娠对照组不给予任何治疗。治疗组确定妊娠后,在用药前和用药至孕12周分别留取孕妇外周血4 ml,对照组留取孕12周之内外周血4 ml,所有血标本1 ml为乙二胺四乙酸二钾(K₂EDTA)抗凝血,3 ml促凝血分离血清后-80℃保存待用。

3. 药物和主要试剂:IG(丽珠集团)、hCG(山东泰邦)、高纯总RNA快速提取试剂盒(上海捷瑞)、逆转录试剂盒(上海天根)、聚合酶链反应试剂盒为2 \times Taq Master Mix(南京诺唯赞)、DNA分子大小标记物为100 bp DNA ladder(上海天根)、引物由上海生工生物工程股份有限公司合成、酶联免疫吸附试剂盒(苏州卡尔文)。

4. 总RNA提取及cDNA合成:EDTA抗凝血使用高纯总RNA快速提取试剂盒(上海捷瑞)提取总RNA,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。用上海天根逆转录试剂盒进行逆转录反应,反应体系为20 μ l,全过程在冰上进行。

5. PCR反应:取cDNA 2 μ l,上下游引物各1 μ l,2 \times Mix 12.5 μ l,无核酶水8.5 μ l组成25 μ l反应体系。反应条件:94℃预变性5 min,每个循环中94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸60 s,共35个循环,循环结束后72℃延伸10 min。引物序列、产物大小及退火温度详见表1。取各样本目的基因PCR产物3 μ l、 β -actin产物2 μ l,经2%琼脂糖凝胶,90 V恒电压50 min,凝胶成像系统拍照。计算各目的基因产物和 β -actin的OD比值,以OD比值作为

表1 引物序列、产物片段大小及退火温度表

名称	序列(5'-3')	Tm(℃)	产物大小(bp)
IL-17	TGTCCACCATGTGGCCTAAGAG	60	119
	GTCCGAAATGAGGCTGTCTTTGA		
IL-6	CAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATG	58	313
	GATGAACTAATTAACCTGTGGGAG		
IL-10	CTTGCTGAGATGATCCAGTTTAC	58	298
	AAGAGAAATGAGCAAGAGATCTGAC		
TGF- β 1	GGGACTATCCACCTGCAAGA	55	239
	CCTCCTTGCGTAGTAGTCG		
β -actin	CGGGAAATCGTGCCTGACAT	62	481
	CGGACTCGTCATACTCTGCTTG		

mRNA 的相对定量表达水平。

6. 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测血清细胞因子含量: 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 测定血清样本中 IL-17、IL-6、IL-10 和 TGF-β1 的吸光度 (A) 值, 绘制标准曲线, 计算其浓度值。

7. 统计学处理: 采用 SPSS 16.0 统计软件, 治疗组组内比较采用配对样本 *t* 检验, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 相关性分析采用 Pearson 方法, 以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

结 果

1. 治疗组治疗前与对照组外周血 IL-17、IL-6、IL-10 和 TGF-β1 四种细胞因子的表达水平: 治疗组治疗前外周血中 Th17 相关细胞因子 IL-17 和 IL-6 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$), Treg 相关细胞因子 IL-10 和 TGF-β1 表达水平低于对照组 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。见图 1, 表 2, 3。

表 2 两组患者外周血中 4 种细胞因子的 RT-PCR 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-17	IL-6	IL-10	TGF-β1
治疗组 治疗前	20	0.50±0.10 ^a	0.84±0.16 ^a	0.31±0.17 ^a	0.41±0.10 ^a
治疗组 治疗后	20	0.21±0.07 ^{bc}	0.37±0.07 ^{bc}	0.65±0.14 ^{bc}	0.74±0.16 ^{bc}
对照组	20	0.23±0.08	0.41±0.11	0.71±0.12	0.71±0.09

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$; 与治疗前相比, ^c $P < 0.05$

表 3 两组患者外周血中 4 种细胞因子的 ELISA 结果 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-17	IL-6	IL-10	TGF-β1
治疗组 治疗前	20	57.17±19.31 ^a	122.66±38.32 ^a	48.93±25.15 ^a	162.05±57.67 ^a
治疗组 治疗后	20	28.84±13.61 ^{bc}	49.39±26.72 ^{bc}	109.64±49.65 ^{bc}	248.17±66.91 ^{bc}
对照组	20	33.06±15.87	56.57±32.12	92.92±55.58	229.09±65.38

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$; 与治疗前相比, ^c $P < 0.05$

2. 治疗组治疗前后外周血 IL-17、IL-6、IL-10 和 TGF-β1 四种细胞因子表达水平的变化: 治疗组 IG 联合 hCG 治疗后, IL-17 和 IL-6 表达水平明显下降 ($P < 0.05$), IL-10 和 TGF-β1 表达水平明显上升 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。见图 1, 表 2, 3。

3. 治疗组治疗后与对照组外周血 IL-17、IL-6、IL-10 和 TGF-β1 四种细胞因子的表达水平: 治疗组治疗后与对照组相比, 外周血中 IL-17、IL-6、IL-10 和 TGF-β1 四种细胞因子表达水平差异无统

计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1, 表 2, 3。

4. 相关性分析: 经 Pearson 相关性分析显示, 治疗组中 IL-17 与 IL-6, IL-10 与 TGF-β1 存在明显的正相关性, 见表 4。

表 4 IL-17 与 IL-6, IL-10 与 TGF-β1 的相关性分析

项目	IL-17 与 IL-6		IL-10 与 TGF-β1	
	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA
<i>r</i> 值	0.920	0.912	0.836	0.708
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

讨 论

Th17 细胞和 Treg 细胞是近年来新发现的两个不同于 Th1 和 Th2 的淋巴细胞亚群。Th17 细胞以高分泌 IL-17A (又称 IL-17) 为特征, 另外还分泌 IL-6、IL-17F、IL-21、IL-22 和 TNF-α 等炎症细胞因子, 具有强大的促炎效应, 在器官移植排斥反应的发生发展过程中发挥重要作用^[3]。正常生理妊娠类似于同种异体移植。Nakashima 等^[4]发现正常妊娠期间存在较低水平 Th17 细胞, 并且与正常未妊娠妇女相比, 外周血中 Th17 细胞的数量在妊娠各个阶段均无显著差异。也有研究显示, URSA 患者外周血及蜕膜组织中 Th17 细胞比例、IL-17 浓度均显著高于正常妊娠及非妊娠者, 且与其他炎症因子具有相关性^[1,5], 我们曾经研究了流产孕妇蜕膜组织中 IL-17 的表达, 发现 IL-17 的活化可增加 NF-κB 的表达, 进而减少孕激素受体表达并减弱其功能, 导致孕激素不能与足够的受体结合, 引起子宫蜕膜发育不良, 胚胎营养供应障碍, 导致流产^[6]。Treg 细胞是具有免疫调节功能的细胞群, 可抑制自身反应性 T 细胞的免疫反应、抑制传统 T 细胞的活化以及促进抑制性细胞因子的分泌等, 能够维持机体内环境的稳定并诱导移植物的免疫耐受^[7]。Treg 在体内诱导免疫耐受的机制尚不完全清楚, 目前认为 Treg 通过分泌 IL-10、TGF-β1 等免疫抑制因子来发挥免疫抑制作用^[8], 这些细胞因子具有抑制抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 以及拮抗效应性 T 细胞的功能。有研究显示, 在反复自然流产患者的外周血液和蜕膜组织中, Treg 细胞的数量明显下降, 且其免疫抑制活性较正常妊娠妇女显著降低^[9-10]。在小鼠自然流产模型中, 通过过继转移正常妊娠诱导的 CD4⁺CD25⁺ Treg 有利于妊娠的维持, 降低自然流产率^[11]。本研究中治疗组治疗前外周血中 Th17 相关细胞因子 IL-17 和 IL-6 表达水

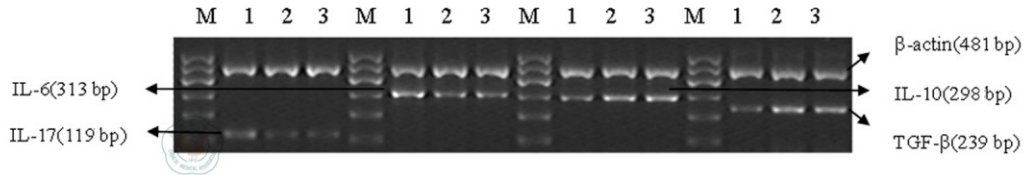


图1 两组患者外周血中4种细胞因子mRNA表达水平。M: marker 100~600 bp; 1: 治疗组治疗前; 2: 治疗组治疗后; 3: 对照组

平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而 Treg 相关细胞因子 IL-10 和 TGF- β 1 表达水平明显低于对照组 ($P < 0.05$), 提示在 URSA 的发生过程中存在着 Th17/Treg 失衡, 即具有促炎作用的 Th17 细胞因子占优势, 而诱导免疫耐受的 Treg 细胞不足, 使得机体趋向于免疫杀伤的状态, 导致流产的发生。

我们既往的动物实验研究证明, hCG 能够抑制母胎界面 TNF- α 和 INF- γ 的表达, 减少自然流产模型小鼠的胚胎吸收率^[12]。白虹等^[13]将人外周血单个核细胞(PBMC)与不同浓度的 hCG 共同培养发现, hCG 对 IL-6 和 TNF- α 表达均有抑制作用, 说明 hCG 具有抑制促炎因子产生的作用。高水平的 IL-6 可以通过 TGF- β 1 促进成熟 T 淋巴细胞向 Th17 细胞的分化, 导致自身免疫和炎症的发生^[14]。因此, hCG 可以通过抑制 IL-6 的表达, 抑制 Th17 细胞的分化, 增加 Treg 细胞的分化。Schumacher 等^[15]研究发现复发性流产患者蜕膜和胎盘中 hCG 和 Treg 表达量明显低于正常妊娠者, 且两者呈正相关, hCG 能上调 Treg 细胞表面的 LH/CG 受体, 并吸引 Treg 到母胎界面, 诱导免疫耐受的形成。IG 主要通过被动输入 IgG 抗体来达到治疗的目的。Maddur 等^[16]向培养的 T 细胞中加入 IG 后, 发现 Th17 细胞及其所分泌的细胞因子明显减少, 说明 IG 能抑制 Th17 细胞的分化和扩增, 并抑制 Th17 细胞产生细胞因子。另外, IG 还可以显著增加记忆性 T 细胞中 Treg 细胞的水平。本研究对治疗组治疗前后外周血中 Th17 及 Treg 所分泌的细胞因子进行检测后发现, 经 IG 联合 hCG 治疗后, IL-17 和 IL-6 表达水平较治疗前明显下降, 而 IL-10 和 TGF- β 1 表达水平明显上升, 与上述基础研究结果一致, 说明 IG 联合 hCG 可抑制 URSA 患者外周血中 Th17 细胞的分化, 增加 Treg 细胞的分化, 使 Th17/Treg 这一平衡向 Treg 为主的状态转化, 进而诱导母体对胚胎的免疫耐受, 促使妊娠向好的结局发展。也提示调节 Th17/Treg 平衡失调, 可能是 IG 联合 hCG 治疗复发性流产的机制之一。我们以往的临床和动物实验研究均显示 IG

联合 hCG 治疗流产的作用优于单一用药^[2,12], 而联合用药的协同机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Wang WJ, Hao CF, Yi L, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. J Reprod Immunol, 2010, 84(2): 164-170.
- [2] 王秀英, 刘福民, 杜玉霞, 等. 反复自然流产的免疫球蛋白和绒毛膜促性腺激素治疗[J]. 徐州医学院学报, 1997, 17(4): 368-370.
- [3] Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, et al. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection[J]. J Pathol, 2002, 197(3): 322-332.
- [4] Nakashima A, Ito M, Yoneda S, et al. Circulating and decidual Th17 cell levels in health pregnancy[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(2): 104-109.
- [5] Nakashima A, Ito M, Shima T, et al. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 64(1): 4-11.
- [6] 秦晓静, 刘福民, 刘小云. IL-17A、NF- κ B 与 PR 在不明原因早期自然流产蜕膜组织中的表达及意义[J]. 徐州医学院学报, 2013, 33(2): 132-135.
- [7] Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease[J]. Immunol Rev, 2005, 204: 195-207.
- [8] Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell subset[J]. Immunology, 2004, 112(1): 38-43.
- [9] Arruvito L, Sanz M, Banham AH, et al. Expansion of CD⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction[J]. J Immunol, 2007, 178(4): 2572-2578.
- [10] Liu YS, Wu L, Tong XH, et al. Study on the relationship between Th17 cells and explained recurrent spontaneous abortion[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 65(5): 503-511.
- [11] 印永祥, 韩晓枫, 赵益明, 等. 过继妊娠诱导的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞治疗不明原因复发性流产[J]. 中国血液流变学杂志, 2009, 19(3): 355-358.
- [12] 王宏, 刘福民, 刘小云, 等. hCG 联合免疫球蛋白对自然流产模型小鼠母胎界面 Th/Th2 型细胞因子及妊娠结局的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21: 53-55.
- [13] 白虹, 潘菊芬, 贾晓青, 等. 人绒毛膜促性腺激素(hCG)抑制人 PBMC 促炎细胞因子 mRNA 的表达[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(3): 193-203.
- [14] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(7): 1830-1835.
- [15] Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal

interface during early human pregnancy[J]. J Immunol, 2009, 182(9): 5488-5497.

immunoglobulin[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(3): 823-830.

(收稿日期: 2013-11-05)

(本文编辑: 戚红丹)

- [16] Maddur MS, Vani J, Hegde P, et al. Inhibition of differentiation, amplification, and function of human TH17 cells by intravenous

沙静, 刘福民, 王文, 等. 免疫球蛋白联合绒毛膜促性腺激素对原因不明复发性流产患者外周血 Th17/Treg 平衡的影响 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (1): 75-79.



中华医学会