

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.16.002

不明原因反复自然流产妇女蜕膜中树突状细胞亚群的变化*

张艳霞^{1,2}, 高天阳^{3△}, 李梅清^{1,2}, 周长华³, 陈哲⁴, 全燕³, 赵雪峰², 李锐²

(1. 南华大学附属第二医院妇产科, 湖南衡阳 421001; 2. 南华星辉生殖健康专科医院生殖中心, 湖南衡阳 421001; 3. 广东省第二人民医院生殖中心, 广东广州 518037; 4. 南华大学附属第二医院呼吸内科, 湖南衡阳 421001)

[摘要] **目的** 本研究通过检测正常早孕及不明原因反复自然流产(URSA)患者子宫蜕膜中髓样树突状细胞(MDC)及浆细胞样树突状细胞(PDC)的水平, 探讨树突状细胞(DC)亚群在 URSA 中的作用。**方法** 选取 URSA 患者($n=22$)作为 URSA 组, 正常早孕妇女($n=20$)作为对照组, 采用流式细胞技术检测其蜕膜中 MDC 及 PDC 亚群的水平, 比较其数量和比值的变化。**结果** URSA 组与对照组比较, 蜕膜中 DC、MDC、MDC/PDC 值的水平均显著增高($P<0.05$)。**结论** URSA 患者蜕膜中 DC、MDC 的水平及 MDC/PDC 值明显增加, 可能是 URSA 发病的免疫因素之一。

[关键词] 树突细胞; 流产, 自然; 蜕膜; 流式细胞术

[中图分类号] R741.21

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)16-2164-03

The changes of the subsets of dendritic cells in patients with unexplained early spontaneous abortion*

Zhang Yanxia^{1,2}, Gao Tianyang^{3△}, Li Meiqing^{1,2}, Zhou Changhua³, Chen Zhe⁴, Quan Yan³, Zhao Xuefeng², Li Rui²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Reproductive Center of Nanhua Xinghui Reproductive Health Hospital, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. Reproductive Center, the Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 518037, China; 4. Department of Respiratory, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the changes of the subsets of dendritic cells(DC) in normal pregnant women and patients with unexplained early spontaneous abortion. **Methods** Twenty normal pregnant women and 21 unexplained early spontaneous abortion patients were included in this study. The DC were stained with monoclonal antibodies and estimated by the flow cytometric method. Comparison of the numbers and subsets of DC in the decidua were performed between the two groups. **Results** The level of DC and MDC, MDC/PDC ratio in the decidua of spontaneous abortion patients were higher than the normal pregnant women ($P<0.05$). **Conclusion** The percentage of DC and myeloid DC and the MDC/PDC ratio in the unexplained early spontaneous abortion patients is significantly higher than that in the normal pregnant women. It may contribute to the spontaneous abortion.

[Key words] dendritic cell; abortion, spontaneous; decidua; flow cytometry

反复自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续两次及以上的自然流产, 发生率约占总妊娠数的 5%。RSA 的发病原因复杂, 包括解剖、内分泌、染色体异常、感染、环境理化因素的影响等。其中 15%~50% 的 RSA 找不到原因, 称为不明原因反复自然流产(URSA), 近代生殖免疫的研究提示多数系同种免疫异常所致, 即类似于同种移植排斥反应。研究证实, 1 型辅助 T 淋巴细胞与 2 型辅助 T 淋巴细胞的比值(Th1/Th2)平衡向 Th1 偏移, NK 细胞、调节性 T 细胞功能异常, 树突状细胞功能异常等均可能导致母胎免疫平衡破坏, 导致流产^[1]。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知的功能最强的抗原提呈细胞(APC), 是机体免疫反应始动者^[2], 参与了调节性 T 细胞的诱导分化^[3]、NK 细胞的激活及 Th1/Th2 之间平衡的调节^[4], 因此 DC 对妊娠的维持具有重要意义。人的 DC 可分为髓样 DC(myeloid dendritic cell, MDC)亚群和浆细胞样 DC(plasmacytoid dendritic cell, PDC)亚群。MDC 经激活能产生大量 IL-12, 使 Th0 分化为 Th1 细胞^[5-6], 而 PDC 有利于

Th0 分化为 Th2 细胞^[5,7-8]。Th1 型细胞因子具有胚胎毒性作用, 而 Th2 型细胞因子对正常妊娠的维持起重要作用。妊娠时期的免疫调节作用不仅发生于母体全身免疫系统, 而且也发生在妊娠子宫局部, 这种局部免疫因素的调节作用更直接地影响着母胎之间的相互作用。也有观点认为胎儿从未与母体组织直接接触, 因此母胎免疫调控机制可能仅发生于胎盘的母胎界面处^[9]。DC 主要分布于皮肤和黏膜等表面组织, 在黏膜表面抗原的免疫应答的启动和调节过程中起了举足轻重的作用。蜕膜是一种特殊的黏膜组织, 蜕膜 DC 被认为在维持母胎免疫调控中发挥着关键作用^[4,10]。

因此, 本研究拟通过检测 URSA 患者与正常计划外妊娠人流妇女蜕膜组织中 DC 亚群的变化, 探讨 DC 亚群在 URSA 中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 一般资料 URSA 组: 研究对象为 2012 年 5 月至 2013 年 5 月于广东省第二人民医院妇科、生殖医学科门诊就诊的妊

* 基金项目: 广东省社会发展领域科技计划基金项目(20120318080)。 作者简介: 张艳霞(1977-), 主治医师, 硕士, 主要从事妇产科研究。 △ 通讯作者, Tel:13710541363; E-mail: gaotianyang@yahoo.com。

娠 12 周内、B 超提示胚胎停止发育的 URSA 患者 22 例, 年龄 19~37 岁, 平均(28.3±5.2)岁, 孕次 2~5 次。所有患者均在流产前或后进行病因筛查, 入选者需符合以下条件: (1) 女方无生殖道畸形; (2) 优生 4 项(TORCH)检查为阴性; (3) 月经周期正常; (4) 性激素、甲状腺功能、空腹血糖、胰岛素等内分泌检查均正常; (5) 抗心磷脂抗体、抗核抗体(ANA)等自身免疫抗体阴性; (6) 衣原体、支原体等检查排除生殖道感染; (7) 无血型不合或抗体效价小于 1:128; (8) 男方精液常规检查正常; (9) 夫妇双方染色体检查正常, 排除家族遗传病史。对照组选取同期年龄及孕次、孕周相匹配的因计划外妊娠要求人工流产的正常妊娠妇女 20 例, 年龄 21~37 岁, 平均(28.0±5.5)岁, 孕次 2~4 次。须符合以下条件: (1) 无自然流产、死产、死胎等异常孕育史; (2) 无解剖结构、内分泌等方面的异常; (3) 无感染、自身免疫性疾病史, 本次妊娠期间无阴道流血、腹痛等先兆流产症状和体征; (4) B 超检查显示胚胎发育正常。

1.1.2 主要试剂与仪器 LIN1-FITC、FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。PerCP-Cy5.5 抗人 HLA-DR、PE 抗人 CD123、APC 抗人 CD11c、PerCP-Cy5.5 鼠 IgG2b Isotype Control、PE 鼠 IgG1、APC 鼠 IgG1 均购自美国 eBioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 无菌方法采集人工流产负压吸引蜕膜组织, 将收取的蜕膜组织立即置于冰块预冷的 RPMI1640 培养液中, 迅速运回实验室。标本采集经广东省第二人民医院伦理委员会批准及患者本人知情同意。

1.2.2 蜕膜单个核细胞的分离 新鲜蜕膜组织用无菌 PBS 漂洗 2~3 次, 剪碎成约 1 mm³ 左右的组织块, 置于 120 目滤网上, 用 20 mL 橡皮针栓研磨。收集通过滤网的细胞悬液, 再过 200 目滤网。收集通过 200 目滤网的细胞悬液, 800 r/min 离心 10 min。弃上清, 用 PBS 重悬细胞后, 将细胞悬液以 1:1 体积平铺于淋巴细胞分离液上, 4℃ 2 000 r/min 离心 25 min。吸出中间的淋巴细胞层, 加入 1×PBS 缓冲液, 800 r/min 离心 10 min。弃上清, 再加入 PBS 重悬细胞, 800 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入少量 PBS 重悬细胞, 进行细胞计数、调整细胞浓度为 1×10⁶/L, 待用。

1.2.3 DC 亚群的测定 (1) 单克隆抗体标记: 取 Falcon 离心管, 取 100 μL 上述待用的单个核细胞, 加入抗人 LIN1-FITC 抗体 20 μL, PerCP-Cy5.5 抗人 HLA-DR 抗体 10 μL, APC 抗人 CD11c 抗体 5 μL, PE 抗人 CD123 抗体 5 μL, 振荡混匀后室温避光孵育 25 min。同时设置同型对照管。(2) 加入 PBS 漂洗 2 次, 300×g 离心 5 min, 弃上清。(3) 轻轻混匀, 加入 300 μL PBS。(4) 2~8℃ 避光保存, 24 h 内上机分析。

1.2.4 流式细胞仪分析 全部数据经 FACS Calibur 流式细胞仪和 CELLquest 软件获取, 获取 5×10⁴ 个细胞。使用 FSC/SSC 点图, 画 R1, 排除碎片和死细胞。找到淋巴细胞系列抗原 LIN1 弱阳性和阴性群体, 使用抗 HLA-DR/LIN1 点图(G1=R1), 画 R2, 圈定 LIN1 弱阳性和阴性及抗 HLA-DR 阳性细胞群, 该群细胞界定为 DC。使用 CD11c/CD123 点图(G2=R2) 区分 CD123⁺ 及 CD11c⁺ 细胞群分别为 PDC 及 MDC。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行方差齐性检验后, 采用独立样本 *t* 检验对数据进行统计学分析, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

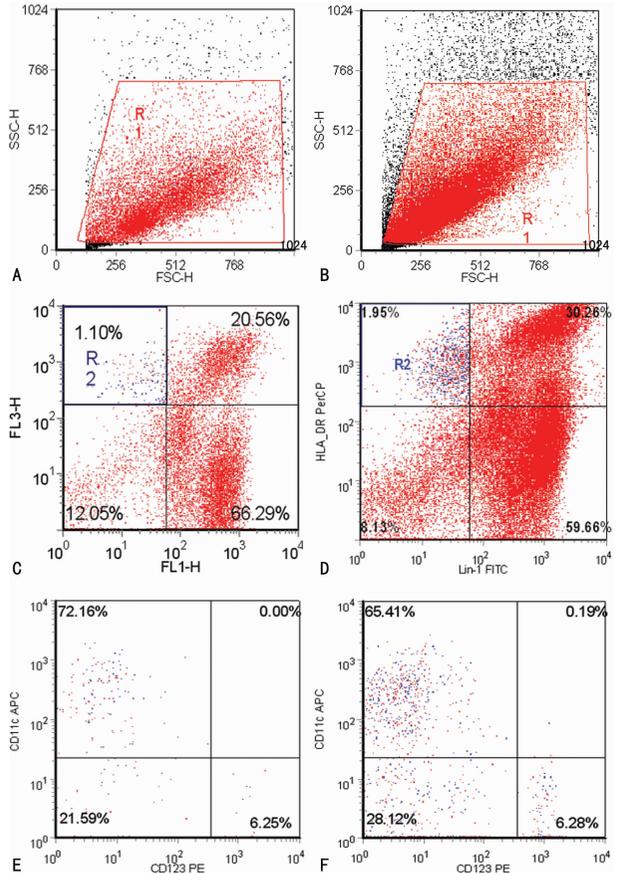
2 结 果

URSA 组蜕膜中 DC、MDC、PDC、MDC/PDC 的水平与对

照组比较均显著增高(*P*<0.05), 见表 1、图 1。

表 1 两组蜕膜树突状细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s, n=20, \%$)

项目	对照组	URSA 组	<i>t</i>	<i>P</i>
DC/MNC	1.01±0.10	2.05±0.15	26.90	0.000
MDC/MNC	0.67±0.07	1.43±0.12	24.70	0.000
PDC/MNC	0.06±0.02	0.11±0.02	10.05	0.000
MDC/PDC	11.04±2.81	12.87±1.70	2.58	0.014



A: 对照组蜕膜中单个核细胞; B: URSA 组蜕膜中单个核细胞; C: 对照组 DC 的百分率; D: URSA 组 DC 的百分率; E: 对照组 MDC 和 PDC 的百分率; F: URSA 组 MDC 和 PDC 的百分率。

图 1 两组患者蜕膜 DC 亚群流式细胞分析图

3 讨 论

DC 是目前已知的功能最强的 APC, 也是体内惟一能直接激活初始 T 细胞的 APC。不仅可以通过诱导 T 细胞无能及克隆清除、分泌细胞因子及诱导调节性 T 细胞的扩增等方式来诱导免疫耐受^[11-12], 在某些理化因素、内环境改变及致炎因子的影响下, 亦可以激活效应 T 细胞, 产生免疫应答^[13]。DC 产生免疫耐受还是免疫应答主要取决于其亚群分化、成熟度及其分泌的细胞因子的模式等。DC 依据来源不同可分为 MDC 和 PDC。DC 亚群的不同, 其功能亦存在差异。MDC 表达髓系抗原 CD11c, 与单核巨噬细胞有共同的前体细胞, 可分泌 IL-12, 使 Th0 细胞向 Th1 细胞分化, 介导 Th1 型免疫应答, 对胚胎具有细胞毒性; PDC 来源于淋巴样干细胞, 缺乏髓系标志物, 但可表达 CD123, 可分泌 IL-4、IL-10, 使 Th0 细胞向 Th2 细胞分化, 介导 Th2 型免疫应答, 有利于妊娠的维持^[14]。同时 PDC 由于具有诱导 Th 细胞凋亡的能力而被认为具有免疫耐受功能^[15]。

母体蜕膜组织和胎盘滋养层组织共同构成的母-胎界面是

妊娠免疫耐受的基础。蜕膜是母体与胎儿成分密切接触的部位,妊娠早期蜕膜含有大量白细胞,包括蜕膜 NK 细胞、DC、单核巨噬细胞和 T 细胞等,这些白细胞之间互相作用形成一个复杂的网络。Abraham 等^[15]于 2000 年发现了人类蜕膜 DC 的存在,并首次对其超微结构等进行了详细的描述。另外一些学者^[4,10,16]也证实,人类早期妊娠的蜕膜中存在 DC。Blois 等^[17]研究发现,在小鼠的整个妊娠过程中子宫蜕膜中均有 DC 存在,进而推测 DC 可能在母胎界面的免疫调节中发挥重要作用。大量文献表明,蜕膜 DC 亚群可能在正常妊娠维持母胎免疫调控中发挥着关键作用^[4,10]。

目前已有共识,Th1/Th2 型细胞因子的平衡对妊娠的维持起重要作用。而初始 Th 细胞(Th0)激活并向 Th2 或 Th1 分化需要 APC 的参与。DC 广泛分布于皮肤、消化道、呼吸道黏膜等机体防御第一线,其功能独特之处在于全身所有 APC 中惟有 DC 才能激活初始型 T 细胞,是识别内外抗原,调节免疫功能,维持机体稳定的关键因素。在母胎界面,母体保护胎儿的免疫耐受与防御病原体的免疫反应之间的平衡对正常妊娠的维持起关键作用。目前 DC 可调节免疫耐受及激发免疫应答的双重功效也被认可,Kammerer 等^[18]对早孕子宫蜕膜中具有 DC 形态特征的细胞进行研究,发现早孕蜕膜中存在 CD83⁺细胞,而 CD83⁺被认为是 DC 成熟的标志。与外周血一样,蜕膜 CD83⁺细胞富集后能够进行混合淋巴细胞反应,说明其也有免疫活性,提示在某些致炎因素的影响下,DC 也可以产生免疫应答,进而使胚胎被排斥,导致流产。虽然目前关于树突状细胞与妊娠免疫耐受的研究较多,但大部分都限于正常妊娠,对于流产与 DC 相关的研究目前报道较少。

本研究发现 URSA 组与对照组比较,自然流产患者其 DC、MDC 均较对照组显著性增高,MDC/PDC 比值明显增加,而蜕膜中的 MDC 增加尤为明显,因此推测在 URSA 患者中由于 MDC、MDC/PDC 的增加,以 MDC 亚群占优势,使 IL-12 等 Th1 型细胞因子分泌增加,IL-10 等 Th2 型细胞因子分泌减少,导致 Th1/Th2 型细胞因子的平衡向 Th1 型细胞因子偏移,使胚胎遭到免疫攻击,导致流产。因此,MDC 和 PDC 含量的差异可能导致母体免疫反应是倾向于免疫排斥还是免疫耐受。DC 亚群的这一变化可能与自然流产有相关性。

母胎免疫耐受的维持不是由一个或几个独立机制所调控,免疫调节是一种精细、复杂的现象,是由多细胞、多种机制共同参与、互相制约、稳定协调的动态平衡过程。积极探索 DC 在妊娠中的作用机制,对解决器官移植排斥反应及免疫性病理妊娠的治疗等具有重要意义。

参考文献

[1] 林其德. 原因不明复发性流产的基础与临床研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2003,38(8):481-483.

[2] Sioud M, Mobergslin A, Sæbøe-Larssen S, et al. Immunosuppressive factor blockade in dendritic cells via siRNAs results in objective clinical responses[J]. *Methods Mol Biol*,2015(1218):269-76.

[3] Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity[J]. *Immunol Invest*,2012,41(6/7):738-764.

[4] Leno-Durán E, Muñoz-Fernández R, Olivares EG, et al. Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation[J]. *Cell Mol Immunol*,2014,11(5):449-

455.

- [5] Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation[J]. *Science*,1999,283(545):1183-1186.
- [6] Pulendran B, Smith JL, Caspary G, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo Proc[J]. *Natl Acad Sci*,1999,96(3):1036-1041.
- [7] Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, et al. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells[J]. *Blood*,2000,95(8):2484-2490.
- [8] Whelan M, Harnett M, Houston KM, et al. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells[J]. *Immunol*,2000,164(12):6453-6460.
- [9] Negishi Y, Wakabayashi A, Shimizu M, et al. Disruption of maternal immune balance maintained by innate DC subsets results in spontaneous pregnancy loss in mice[J]. *Immunobiology*,2012,217(10):951-961.
- [10] Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua[J]. *Biol reprod*,2003,69(4):1438-1446.
- [11] Qian ZD, Huang LL, Zhu XM, et al. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance an immunohistochemical study of CD83-and CD1a-positive dendritic cells in the decidua of women with recurrent spontaneous abortion[J]. *Eur J Med Res*,2015,20(1):2.
- [12] Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity[J]. *Immunol*,2011,106(3):259-262.
- [13] Olson MR, Seah SG, Cullen J, et al. Helping themselves: optimal virus-specific CD4 T cell responses require help via CD4 T cell licensing of dendritic cells[J]. *J Immunol*,2014,193(11):5420-5433.
- [14] Saito S, Tsukaguchi N, Hasegawa T, et al. Distribution of Th1, Th2 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells[J]. *Reprod Immunol*,1999,42(4):240-245.
- [15] Abraham S, Indrasingh I, Vettivel S, et al. Gross morphology and ultrastructure of dendritic cells in the normal human deciduas[J]. *Clin Anat*,2000,13(3):177-180.
- [16] Ban YL, Kong BH, Qu X, et al. BDCA-1(+), BDCA-2(+), and BDCA-3(+) dendritic cells in early human pregnancy decidua[J]. *Clin Exp Immunol*,2008,151(3):399-406.
- [17] Blois SM, Soto CD, Tometten M, et al. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy[J]. *Biol Reprod*,2004,70(4):1018-1023.
- [18] Kammerer U, Schoppet M, Mclellan AD, et al. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells[J]. *Am J Pathol*,2000,157(1):159-169.