

· 临床研究 ·

长链脂肪乳对反复种植失败患者外周血 Treg 细胞比例失衡的调节作用

邢俊,周建军,王玢,周梦园,王俊霞*

南京大学医学院附属鼓楼医院生殖医学中心,江苏 南京 210008

[摘要] 目的:探讨长链脂肪乳对反复种植失败(repeated implantation failure, RIF)患者外周血调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)比例失衡的调节作用。方法:选择2016年5—12月在南京鼓楼医院生殖中心行辅助助孕RIF患者75例,静脉长链脂肪乳治疗后分别用流式细胞技术检测外周血Treg细胞亚群比例。结果:75例RIF患者经静脉脂肪乳治疗后,外周血中Treg细胞亚群比例为(2.46±1.23)%,较治疗前的(2.30±0.83)%虽有所上升,但差异无统计学意义。进一步分析治疗前外周血Treg细胞比例异常降低的35例RIF患者,结果显示,静脉脂肪乳治疗后,该组RIF患者外周血中Treg细胞亚群比例为(2.18±0.64)%,较治疗前的(1.63±0.29)%显著上升,差异有统计学意义($P < 0.001$)。结论:长链脂肪乳对于RIF患者外周血Treg细胞比例失衡具有调节作用,可能在诱导免疫耐受,促进胚胎植入,降低流产率中发挥作用。

[关键词] 反复种植失败;脂肪乳;Treg

[中图分类号] R711.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)08-1198-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20200821

胚胎着床是一个母胎相互识别、相互融合的复杂过程。一方面胚胎滋养细胞表达胚胎抗原并分泌细胞因子,以逃避母体免疫系统的攻击;另一方面母体蜕膜特征性的免疫细胞富集,形成母胎界面独特的免疫微环境,有利于胚胎着床。自然杀伤(natural killer, NK)细胞、调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)都是其中重要的免疫细胞。围着床期母胎免疫调节的任一环节失常都可能造成种植失败。

反复种植失败(repeated implantation failure, RIF)已经成为阻碍妊娠率进一步提高的瓶颈问题,日益受到生殖医学界的广泛关注。RIF是指年龄<40岁的不孕患者,接受≥3个新鲜胚胎移植周期或者冻融胚胎移植周期,且累计移植≥4枚优质胚胎而未能临床妊娠^[1]。其中,免疫因素是造成不明原因反复种植失败的一个重要原因。

临床上采用静脉滴注免疫球蛋白来治疗免疫

相关的复发性自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)及RIF,疗效尚可^[2]。但是由于免疫球蛋白是血源性制品,仍然有可能存在血源传染疾病的风险,而且免疫球蛋白药价昂贵,所以临床使用的范围很小。脂肪乳是以大豆为基础组成的水包油型注射液,可以调节身体免疫系统,并且使用安全、价格低廉,具有一定的应用前景。国内外多篇文献报道,脂肪乳替代免疫球蛋白对RIF及RSA患者进行治疗,可以显著降低患者静脉外周血NK细胞比例及毒性、抑制促炎细胞因子的产生,提高临床妊娠率^[3-4]。

在胚胎植入和妊娠期间,Treg被认为可以抑制NK细胞介导的免疫反应。外周血及子宫蜕膜的Treg受损会导致NK细胞数量与毒性升高^[5]。那么,脂肪乳治疗是否可以改善RIF患者外周血Treg水平呢?本研究拟对RIF患者行静脉脂肪乳治疗,观察其对外周血Treg细胞比例的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

选择2016年5—12月在本中心行辅助助孕的RIF患者75例,年龄(33.56±4.25)岁,基础卵泡刺

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81200127);江苏省社会发展科技计划项目(BL2014003);南京市卫生青年人才培养工程;Merck Serono China Research Fund for Fertility Experts

*通信作者(Corresponding author),E-mail:docjx@vip.163.com

激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 为 (7.81 ± 2.79) U/L, 既往移植失败周期数为 (4.28 ± 1.59) 个, 既往移植胚胎数为 (6.63 ± 2.17) 枚。纳入标准: ①年龄 < 40 岁; ②本中心接受 ≥ 3 个新鲜胚胎移植周期或者冻融胚胎移植周期, 且累计移植 ≥ 4 枚优质胚胎而未能临床妊娠者; ③夫妻双方染色体正常。排除标准: ①子宫畸形、子宫腺肌病、宫腔形态异常; ②自身免疫性抗体: 抗核抗体、抗甲状腺抗体、抗心磷脂抗体、抗 $\beta 2$ -糖蛋白 1 抗体异常; ③内分泌科及代谢性疾病: 高血压、糖尿病、心脏病、甲状腺功能异常等; ④移植日子宫内膜厚度 < 7 mm。本研究经本院伦理委员会审核批准, 所有患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案及观察指标

给予 RIF 患者静脉滴注体积分数 20% 脂肪乳 250 mL, 每周 1 次, 共 3 周。治疗前后分别用流式细胞技术检测外周血 Treg 细胞亚群比例。本研究前期对正常育龄期女性外周血中 Treg 细胞比例进行了检测分析, 确定本中心外周血中 Treg 比例正常范围为 $2.00\% \sim 5.28\%$ ^[6]。以此为标准将 RIF 患者分为 Treg 比例正常组与 Treg 比例异常组。

1.2.2 流式细胞学分析

收集清晨空腹静脉血 3 mL (EDTA 抗凝)。拟对 Treg 胞内标志物进行染色, 首先用 anti-CD4-FITC 单克隆抗体和 anti-CD25-APC 单克隆抗体 (Affymetrix 公司, 美国) 对外周血细胞进行染色, 然后用 anti-Foxp3 单克隆抗体 (eBioscience 公司, 美国) 固定、渗透和染色。最后使用 FACSCanto 流式细胞仪 (BD Biosciences 公司, 美国) 进行检测。将 $CD4^+$ T 细胞设门, 以 Foxp3 为纵坐标, CD25 为横坐标圈出 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg 细胞群。检测 $CD4^+$ T 细胞亚群中 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ 细胞的百分比, 从而间接反映 Treg 亚群的细胞数目。

1.3 统计学方法

所有数据均用 GraphPad Prism 5 软件进行分析。计量指标经正态性检验后采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用配对样本 t 检验分析 RIF 患者治疗前后 Treg 细胞比例改变。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RIF 患者脂肪乳治疗前后外周血 Treg 亚群比例变化

75 例 RIF 患者经静脉脂肪乳治疗后, 外周血中

Treg 亚群比例为 $(2.46 \pm 1.23)\%$, 较治疗前的 $(2.30 \pm 0.83)\%$ 虽有上升, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。

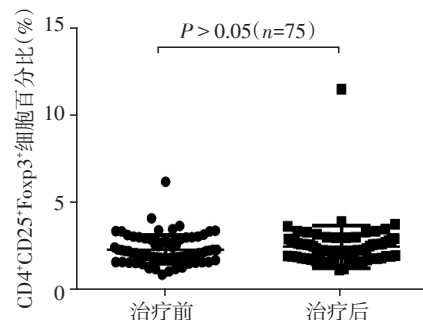


图1 所有RIF患者脂肪乳治疗前、后外周血Treg比例

2.2 Treg 比例正常组与异常组患者脂肪乳治疗前后外周血 Treg 细胞亚群比例变化

治疗前外周血 Treg 亚群比例正常的 RIF 患者 40 例, 进一步观察这 40 例患者脂肪乳治疗后外周血 Treg 亚群比例变化。结果显示, 静脉脂肪乳治疗后, 该组 RIF 患者外周血中 Treg 亚群比例为 $(2.70 \pm 1.54)\%$, 较治疗前的 $(2.85 \pm 0.74)\%$ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2A)。该 40 例患者后续行冻融胚胎移植, 生化妊娠 1 例, 临床妊娠 17 例, 临床妊娠率 42.5%。其中, 早期自然流产 3 例, 自然流产率 17.6%; 活产 14 例, 活产率 35%。

治疗前外周血 Treg 亚群比例异常组 RIF 患者 35 例, 进一步观察这 35 例患者脂肪乳治疗后外周血 Treg 亚群比例变化。结果显示, 静脉脂肪乳治疗后, 该组 RIF 患者外周血中 Treg 亚群比例为 $(2.18 \pm 0.64)\%$, 较治疗前的 $(1.63 \pm 0.29)\%$ 显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 2B)。该 35 例患者后续行冻融胚胎移植, 生化妊娠 1 例, 临床妊娠 18 例, 临床妊娠率 51.4%。其中, 异位妊娠 1 例, 异位妊娠率 5.6%; 早期自然流产 2 例, 自然流产率 11.1%; 活产 15 例, 活产率 42.9%。临床妊娠率、自然流产率、活产率均与外周血 Treg 细胞亚群比例正常的 RIF 患者无显著性差异。

3 讨论

良好的胚胎种植与妊娠维持有赖于良好的子宫内膜容受性。胚胎之所以能够植入子宫内膜, 主要是母-胎接触面能够出现一种暂时性、高强度的免疫耐受状态。Schumacher 等^[7]研究显示, 母体“短时期”内出现的这种对胚胎显著免疫耐受、避免自身免疫疾病发生的能力, 是以 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg

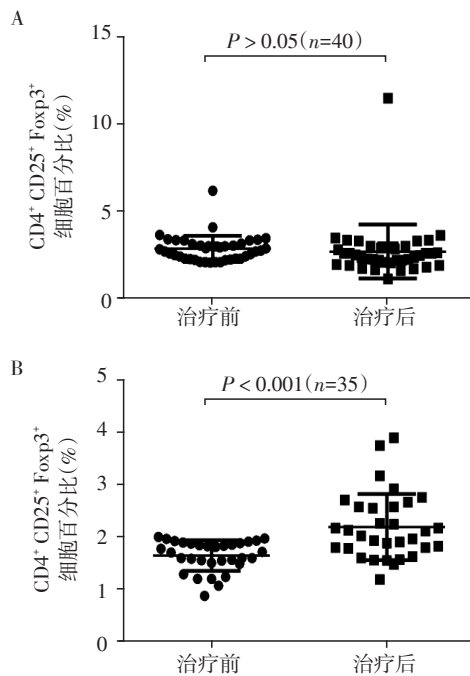


图2 Treg亚群比例正常组(A)与异常组(B)RIF患者脂肪乳治疗前后外周血Treg比例

出现在子宫内膜后获得的,说明Treg在妊娠耐受的建立和维持中发挥重要作用。

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg是一类具有免疫应答负调节功能的CD4⁺T淋巴细胞亚群,是机体维持外周T细胞内环境稳定和调节免疫耐受状态的重要因素^[8-9],在妊娠母胎界面免疫调节中发挥重要作用。Zhou等^[10]研究显示,体外受精患者外周血Treg水平与妊娠结局呈正相关性。Ghaebi等^[11]研究显示,RIF患者外周血Treg比例显著低于正常生育女性。本课题组前期研究发现,宫腔灌注人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)能提高RIF患者种植窗期外周血Treg比例,诱导免疫耐受,促进胚胎植入,降低流产率^[12]。在胚胎植入和怀孕期间,Treg已经被证实能抑制NK细胞介导的免疫反应,外周血及子宫蜕膜的Treg细胞受损会导致NK细胞数量与毒性升高^[5]。可能的机制包括Treg可以抑制NK细胞的稳态增殖、细胞毒性和白细胞介素(interleukin, IL)-12介导的 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)的产生。

脂肪乳是以大豆为基础组成的水包油型注射液,能调节身体免疫系统。目前研究认为,脂肪乳的潜在作用机制可能是调节NK细胞数量、功能和促进滋养层侵入性生长^[13],逆转过度激活的免疫反应,促进免疫耐受与免疫平衡^[14]。Roussev等^[15]对275例外周血NK细胞升高的RSA患者的血样品分

别使用免疫球蛋白、脂肪乳以及人类白细胞抗原G(human leukocyte antigen-G, HLA-G)进行分析处理,结果提示,3种处理方法均可在体外抑制NK细胞毒性。Roussev等^[3]对50例外周血NK细胞异常升高的患者静脉滴注脂肪乳并监测NK细胞水平,结果提示治疗后所有患者NK细胞均降至正常水平,并且该抑制作用可持续4~9周。Coulam等^[16]报道,对外周血NK细胞升高的RSA患者分别给予脂肪乳或免疫球蛋白治疗,结果提示2种药物均可降低患者流产率,疗效并无统计学差异。Singh等^[17]对105例RIF患者的随机对照试验显示,静脉脂肪乳治疗的患者胚胎种植率及活产率显著提高。黄琳等^[18]对283例由于NK细胞升高所导致的RSA的孕妇,用脂肪乳替代免疫球蛋白进行治疗,张力鹏等^[19]对94例此类患者用脂肪乳联合环孢素A替代免疫球蛋白进行治疗,均显著降低患者静脉外周血NK细胞比例,提高临床妊娠率,疗效显著。

脂肪乳治疗可以促进免疫耐受与免疫平衡,这一作用有可能通过调节NK细胞数量及功能改善子宫内膜免疫微环境及其他机制来实现。同时,免疫调节细胞Tregs已经被证实能抑制NK细胞介导的免疫反应。那么,脂肪乳治疗是否可以改善RIF患者外周血Treg水平呢?目前,国内外尚无脂肪乳治疗对RIF患者外周血Treg水平调节的相关研究。本研究结果显示,脂肪乳治疗可以上调外周血低下的Treg比例,改善免疫调节,诱导免疫耐受,可能在促进胚胎植入、提高临床妊娠率中发挥作用。但即便如此,对RIF患者使用脂肪乳治疗也应当谨慎和指征明确。本研究结果显示,脂肪乳仅能上调外周血低Treg患者的外周血Treg比例,但对所有RIF患者的外周血Treg水平无明显改善。这或许可以解释有研究认为的脂肪乳不能提高RIF患者的活产率^[20],可能与其未进行分组研究相关。未进行分组,对所有RIF患者一律使用外周血脂肪乳治疗,是不合适的。外周血的脂肪乳治疗或许是对一类患者有效,而非全部。

考虑到脂肪乳治疗需要多次静脉输液,部分患者接受度欠佳,在完成本部分治疗研究后,近3年我中心亦在探索针对RIF患者免疫失衡的其他药物及治疗途径。但不可否认,脂肪乳治疗是一种可靠、安全、经济的治疗方法,对外周血低Treg患者的免疫调节效果显著。在后期工作中,我们将进一步扩大脂肪乳治疗样本量并探索其他治疗方法,以寻找患者接受度更好、效果更佳的免疫调节方案。

[参考文献]

- [1] COUGHLAN C, LEDGER W, WANG Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(1): 14-38
- [2] URMAN B, YAKIN K, BALABAN B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 11(3): 371-381
- [3] ROUSSEV R G, ACACIO B, NG S C, et al. Duration of intralipid's suppressive effect on NK cell's functional activity [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 60(3): 258-263
- [4] 岑振考, 杨华丽. 脂肪乳与丙种球蛋白对因自然杀伤细胞活性升高所致复发性流产患者妊娠结局的影响 [J]. *实用临床医学*, 2018, 19(2): 53-55, 68
- [5] SHARMA S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss [J]. *Int J Dev Biol*, 2014, 58(2-4): 219-229
- [6] LIU M, ZHEN X, SONG H, et al. Low-dose lymphocyte immunotherapy rebalances the peripheral blood Th1/Th2/Treg paradigm in patients with unexplained recurrent miscarriage [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15(1): 95
- [7] SCHUMACHER A, COSTA S D, ZENCLUSSEN A C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 196
- [8] 陈菲菲, 毛山, 史莹, 等. 花姜酮对小鼠 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞分化功能的影响及机制 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2): 205-209
- [9] 王星, 吴倩, 王悦舒, 等. 体外高效扩增人外周血调节性 T 细胞技术的建立 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(8): 1034-1038
- [10] ZHOU J, WANG Z, ZHAO X, et al. An increase of Treg cells in the peripheral blood is associated with a better in vitro fertilization treatment outcome [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 68(2): 100-106
- [11] GHAEBI M, ABDOLMOHAMMADI-VAHID S, AHMADI M, et al. T cell subsets in peripheral blood of women with recurrent implantation failure [J]. *J Reprod Immunol*, 2019, 131: 21-29
- [12] 邢俊, 周建军, 王俊霞, 等. 宫腔灌注 hCG 对反复种植失败及复发性流产患者外周血 Treg 的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(12): 1443-1445
- [13] MENG L, LIN J, CHEN L, et al. Effectiveness and potential mechanisms of intralipid in treating unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2016, 294(1): 29-39
- [14] LÉDÉE N, VASSEUR C, PETITBARAT M, et al. Intralipid[®] may represent a new hope for patients with reproductive failures and simultaneously an over-immune endometrial activation [J]. *J Reprod Immunol*, 2018, 130: 18-22
- [15] ROUSSEV R G, NG S C, COULAM C B. Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2007, 57(4): 262-269
- [16] COULAM C B, ACACIO B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 67(4): 296-304
- [17] SINGH N, DAVIS A A, KUMAR S, et al. The effect of administration of intravenous intralipid on pregnancy outcomes in women with implantation failure after IVF/ICSI with non-donor oocytes: a randomised controlled trial [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2019, 240: 45-51
- [18] 黄琳, 胡素云, 黄丽娟, 等. 脂肪乳替代免疫球蛋白在自然杀伤细胞升高导致复发性流产孕妇中的疗效观察 [J]. *生殖与避孕*, 2014, 34(5): 406-409
- [19] 张力鹏, 赵骏达, 马俊旗. 环孢素 A 联合脂肪乳治疗复发性流产的疗效评价 [J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(12): 1562-1565
- [20] MARTINI A E, JASULAITIS S, FOGG L F, et al. evaluating the utility of intralipid infusion to improve live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure [J]. *J Hum Reprod Sci*, 2018, 11(3): 261-268

[收稿日期] 2019-10-09