



复发性流产和不孕不育患者免疫细胞表面标志物检测的临床价值

严海燕¹ 谢文锋¹ 周晖² 刘晓强¹ 何建¹

作者单位: 510120 广州市, 中山大学孙逸仙纪念医院检验科¹, 妇产科²

【摘要】 目的 了解细胞表面标志物作为诊疗指标在复发性流产 (repetitive spontaneous abortion, RSA) 及不孕不育患者中的临床意义。方法 用 BECKMAN 流式细胞仪检测 RSA、RSA 治疗后、不明原因不孕不育患者及先兆流产患者外周血 CD3、CD19、CD56、Th 及 Ts 细胞标志物, 用 SYSMEX XE2100 血细胞分析仪检测其 WBC 及淋巴细胞 (lymphocyte, LYM)。结果 WBC、LYM、CD56 及 Th 在四组中差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中先兆流产患者组 WBC 水平显著高于 RSA 组、RSA 治疗后组及不明原因不孕不育组, 且差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); RSA 治疗后组的 LYM 水平显著高于先兆流产组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 先兆流产组的 CD56 水平低于 RSA 组、RSA 治疗后组及不明原因不孕不育组, 且差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); RSA 治疗后组的 Th 水平低于不明原因不孕不育组及先兆流产组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 监测 WBC、LYM、CD56 及 Th 指标可辅助对 RSA、不孕不育患者及先兆流产患者的鉴别诊断及 RSA 患者 LYM 皮下注射的疗效判断。

【关键词】 复发性流产; 流式细胞术; 细胞表面标志; 流产, 先兆; 不育, 女性

The value of surface marker of the immunocyte detecting in women with pregnancy disease

YAN Hai-yan¹, XIE Wen-feng¹, ZHOU Hui², et al. ¹Clinical Laboratory Department, ²Department of Gynecology and Obstetrics, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China

【Abstract】 Objective To study the clinical value of the immunocyte surface markers in the women with pregnancy disease. **Methods** CD3, CD19, CD56, Th and Ts indexes were detected by BECKMAN flow cytometer and WBC and lymphocyte were detected by SYSMEX XE2100 blood cell analyzer in repetitive spontaneous abortion (RSA) patients and after being treated, at the same time, some unknown reason infertility patients and threatened abortion patients were involved in too. **Results** The difference of WBC, LYM, CD56 and Th among the four groups all had statistical significance ($P < 0.05$). The level of WBC in threatened abortion group was higher than in RSA group, after being treated RSA group and unknown reason infertility group, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The level of LYM in RSA after being treated group was higher than in threatened abortion group, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The level of CD56 in threatened abortion group were obviously lower than in the other three groups, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The RSA level in after being treated group were significantly lower than in unknown reason infertility group and threatened abortion group, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** It is helpful to make differential diagnosis among the RSA, threatened abortion and infertility patients by detecting WBC, LYM, CD56, Th, and judgment about the lymphocyte treatment effect.

【Key words】 Recurrent spontaneous abortion; Flow cytometry; Cell surface marker; Abortion, Threatened; Infertility, Female

复发性流产 (repetitive spontaneous abortion, RSA) 是指连续发生 3 次或 3 次以上的自然流产, 发生率为 0.4%~1.0%, 如按连续发生两次计算则为 5%^[1]。RSA 发生的原因有解剖、内分泌、遗传、感染等, 其中有 40%~80% 的患者原因不明, 考虑与免疫因素有关。此乃原发性 RSA 发病原因及治疗依据^[2]。临床

多采用与母体滋养叶淋巴细胞 (lymphocyte, LYM) 交叉抗原不一致的 LYM (如丈夫或第 3 者 LYM) 给流产妇女行皮下注射。采用流式细胞仪与免疫荧光技术相结合的方法对不明原因复发性流产患者治疗前后的外周静脉血中免疫细胞表面标志物进行检测分析, 探讨免疫细胞与不明原因复发性流产的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 研究对象 选择 2008 年 6 月至 2009 年 9 月在我院因生育问题而就诊的门诊患者及住院女性患者共 371 例, 年龄最小 21 岁, 最大 44 岁, 平均为 (31.78 ± 4.7) 岁。其中 RSA 组共 212 例, 年龄 (31.7 ± 4.4) 岁; RSA 治疗后组 46 例, 年龄 (32.7 ± 2.1) 岁; 不明原因的不孕不育组共 83 例, 年龄 (31.8 ± 4.7) 岁; 先兆流产组共 30 例, 年龄 (33.3 ± 2.7) 岁。

1.1.2 RSA 患者的筛选标准 ①无诱因流产 ≥ 3 次; ②夫妇双方染色体正常, 无严重全身性疾病; ③内分泌和解剖学检查基本正常; ④男方精液和女方妇科检查正常; ⑤排除自身免疫性疾病等。

1.1.3 不明原因不孕不育患者纳入标准 无 RSA 病史及明显临床病因而导致不育患者。

1.1.4 先兆流产患者纳入标准 无既往流产史而又有先兆流产的临床指征的患者。

1.1.5 治疗方法 丈夫 LYM 皮下免疫法: 采静脉血 20 ml, 无菌分离 LYM, 用生理盐水洗两次, 调浓度至 $2.5 \times 10^7/\text{ml} \sim 3.5 \times 10^7/\text{ml}$, 于妻子前臂内侧皮内注射 6~9 点, 每点用量 0.2 ml。

1.2 仪器与方法

1.2.1 标本来源 抽取患者空腹全血 2~3 ml, 采用 EDTA-K₂ 抗凝(按 1:9 比例)。

1.2.2 用日本 Sysmex XE2100 全自动五分类血液分析仪及其配套试剂, 按照标准操作程序检测 WBC 及 LYM; 用美国 Beckman Coulter Cytomics FC 500 流式细胞分析仪及其配套试剂, 按照标准操作程序检测 CD3、CD19、CD56、Th 及 Ts 细胞标志物。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分

析, 对差异有统计学意义的项目再做两组样本间的 q 检验。

2 结果

2.1 各组 WBC、LYM、CD3、CD19、CD56、Th 及 Ts 的检测结果的比较 各组除 CD19、Ts 外, 其余指标的检测结果差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.05)。后经组间两两比较, RSA 组、RSA 治疗后组、不明原因的不孕不育组与先兆流产组比较, WBC、CD56 检测结果差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.05)。RSA 治疗后组与不明原因的不孕不育组和先兆流产组比较, Th 检测结果差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.05)。LYM 检测结果仅有 RSA 治疗后组与先兆流产组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

RSA 患者经主动免疫治疗后, 会引起体内免疫系统的反应, 细胞表面标志物可以很好地体现这一反应。因此, RSA 患者体内细胞表面标志物能够间接地对 RSA 进行诊断并能够客观地判断免疫疗法的效果, 使对 RSA 的治疗更有科学性和针对性^[1]。常规人工技术检测的 LYM 群仅占总数的很小一部分, 最多 200 个, 速度极慢, 误差大。而流式细胞仪 1 次检测 5000 个细胞, 且速度极快, 误差小、客观性强, 其标本制备及检测都在同一管中完成, 减少了常规方法可能引起的污染环节。本文自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 细胞表型是根据当前细胞表型在研究中应用的普遍性和对临床的指导意义确定的, 目前临床上将 CD3⁻、CD56⁺、CD16⁻ 淋巴样细胞认定为 NK 细胞, 故本文检测 NK 细胞利用两种在 NK 细胞表面表达 80% 以上的 CD56、CD16 联合标记。CD56 抗原存在于 T 细胞上, 但成熟 NK 细胞不表达 CD3, 用双色标记除去 T 细胞中表达部分, CD16 抗

表 1 各组 WBC、LYM、CD3、CD19、CD56、Th 及 Ts 的检测结果及单因素方差分析的结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	WBC($\times 10^9/\text{L}$)	LYM($\times 10^9/\text{L}$)	CD3(%)	CD19(%)	CD56(%)	Th(%)	Ts(%)
1 组	212	6.8 \pm 1.82	2.14 \pm 0.61	68.5 \pm 7.43	12.9 \pm 4.33	17.4 \pm 7.37	36.6 \pm 6.37	24.2 \pm 5.68
2 组	46	6.6 \pm 1.63	2.41 \pm 0.69	66.3 \pm 7.63	11.6 \pm 3.73	20.0 \pm 7.57	33.9 \pm 6.05	25.1 \pm 4.53
3 组	83	6.3 \pm 1.40	2.12 \pm 0.50	67.2 \pm 10.9	14.2 \pm 14.2	17.3 \pm 7.92	37.7 \pm 6.45	23.5 \pm 6.24
4 组	30	7.9 \pm 1.80	1.90 \pm 0.56	71.7 \pm 5.88	14.8 \pm 3.94	11.9 \pm 5.19	39.6 \pm 5.54	26.0 \pm 5.44
F 值		5.56	4.42	2.58	1.70	6.33	5.78	1.57
P 值		0.001	0.005	0.053	0.166	0.000	0.001	0.195

注: 1 组-RSA; 2 组-RSA 治疗后; 3 组-不明原因的不孕不育; 4 组-先兆流产。a. WBC 的两两比较: 1 组-4 组 ($P=0.005$), 2 组-4 组 ($P=0.026$), 3 组-4 组 ($P=0.000$)。b. LYM 的两两比较: 2 组-4 组 ($P=0.004$)。c. CD56 的两两比较: 1 组-4 组 ($P=0.002$), 2 组-4 组 ($P=0.000$), 3 组-4 组 ($P=0.014$)。d. Th 的两两比较: 2 组-3 组 ($P=0.005$), 2 组-4 组 ($P=0.002$)。

原也存在于中性粒细胞和嗜碱性粒细胞上,但在流式细胞仪检测时通过前向散射角和侧向散射角对细胞大小颗粒度的检测已先区分出 LYM。进一步通过抗体标记,检测出 CD56⁺、CD16⁺ 细胞,结果准确,具有重要的临床指导意义。

CD56⁺ NK 细胞减少,可能减少了细胞因子的表达,故不能提供胎儿适当生长环境而导致流产^[4]。实验过程中测得 RSA 组及不明原因不孕不育组外周静脉血 CD56 细胞分别是 17.4%±7.37% 及 17.3%±7.92%,RSA 治疗后组 CD56⁺ NK 细胞升高为 20.0%±7.57%,差异具有统计学意义(P<0.05),说明流产患者经丈夫 LYM 免疫治疗后可以提高 CD56⁺ NK 细胞数量。而先兆流产组 CD56⁺ NK 细胞 11.9%±5.19%,与其他三组相比明显减少(P<0.05),LYM 1.9×10⁹/L±0.56×10⁹/L,与 RSA 治疗后组 2.41×10⁹/L±0.69×10⁹/L 相比显著降低,差异具有统计学意义(P<0.05),提示 LYM 降低尤其是 NK 细胞降低可能促进了流产的产生。尽管 RSA 的主动免疫治疗疗效和治疗机制目前还不肯定,但丈夫 LYM 免疫治疗不失为一种较好的治疗不明原因 RSA 的方法^[5,6]。RSA 治疗后组 Th 细胞比例 33.9%±6.05%与不明原因不孕不育组 37.7%±6.45%及先兆流产组 39.6%±5.54%相比显著降低,差异具有统计学意义(P<0.05),说明免疫系统的作用在发病中起到了重要作用,也说明

丈夫 LYM 皮下注射对激发妻子的免疫系统有着非常重要的作用。使用第三者 LYM 的免疫治疗在实际应用中有很多不便,因为第三者 LYM 相对于丈夫 LYM 更不容易获得,女方对于第三者 LYM 也不易接受。所以丈夫 LYM 免疫治疗也许是临床上效果最好的主动免疫治疗方法。

4 参考文献

- 1 Xia XY, Yang B, Xiong T, et al. Evaluation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of recurrent spontaneous abortion patients. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2008, 14: 1106-1108.
- 2 姜中影,孙明艳,曲维,等.习惯性流产的免疫疗法与 PRA 检测的意义. *中国优生与遗传杂志*, 2007, 15: 72-80.
- 3 Kwak-Kim J, Lee SK, Gilman-Sachs A. Elevated Th1/Th2 cell ratios in a pregnant woman with a history of RSA, secondary Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis complicated with one fetal demise of twin pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 2007, 58: 325-329.
- 4 李彩霞,王晓慧,雷军强. NK 细胞与不明原因早期自然流产的临床研究. *实用妇产科杂志*, 2009, 25: 433-434.
- 5 Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 59: 388-400.
- 6 Liu SY, Zhao SY, Ji JJ, et al. The measurement of proportion and function of regulatory T cells in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2007, 42: 176-179.

(收稿日期:2010-10-26)

(本文编辑:李霖)



中国医师协会检验医师分会网站信息

中国医师协会检验医师分会于 2004 年底创建了中国医师协会检验医师分会网站,2005 年改版,属于非营利性网站。网站创建宗旨是:加强检验与临床之间的合作,为检验医师与临床医师提供一个交流的平台,推动检验医师国际间的交流,促进国内行业的发展,服务于广大医务工作者和患者。网站开设栏目全面,包括:关于协会(协会介绍、协会动态),专题报道(主要报道与检验医学与临床医学相关的专题会议),法律法规(介绍与临床医学、检验医学相关的政策、医疗纠纷案例点评、聚焦医改),会议信息(发布临床医学与检验医学的会议信息,突出信息时效性),临检交流(实验室指标的临床应用、检验与临床、交流平台、前沿技术),专家介绍(检验专家、临床专家),继教园地(医师培训、专家讲座、在职教育、培训通知、考试专栏),医学刊物(介绍《实用检验医师杂志》,实现网上约稿、收稿、专家审稿等),国际交流(国际会议介绍、信息交流、学术交流等,以促进国内同行业发展),厂商介绍(背景、产品、新技术等),人才交流(注册登记、招聘信息、人才推荐等),友情链接(医院、商家、网站)等。本网站内容丰富,浏览量较大。至今,网站已在互联网上推出近 7 年了,欢迎广大医务工作者、患者以及网站支持者浏览网站。

本网站的中文实名为:中国医师协会检验医师分会网站 英文域名为:www.cmdal.org;www.cmdal.com