

淋巴细胞主动免疫治疗对反复胚胎种植失败患者的临床效果及 T 淋巴细胞因子水平变化的影响^{*}

陈 慧^{1,2}, 刘仲伟¹, 孟昱时^{1△}, 李东娅¹, 马 兰¹, 杨晓玲¹

(1. 昆明医科大学第二附属医院生殖医学科, 昆明 650101; 2. 湖南省郴州市第一人民医院生殖中心 423000)

[摘要] **目的** 探讨淋巴细胞主动免疫治疗(LIT)对反复胚胎种植失败(RIF)患者临床效果及 T 淋巴细胞因子水平变化的影响。**方法** 选取 2014—2016 年在昆明医科大学第二附属医院生殖医学科接受体外受精与胚胎移植(IVF-ET)助孕的不明原因 RIF 患者 214 例为研究对象, 根据是否接受 LIT 分为 LIT 组(97 例)及对照组(117 例), 比较两组患者胚胎种植率、临床妊娠率及流产率。2016 年 5—12 月接受 LIT 患者 21 例, 测定治疗前后 T 淋巴细胞相关因子水平。**结果** LIT 组患者胚胎种植率、临床妊娠率明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 流产率明显低于对照组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。21 例 RIF 患者 LIT 治疗后 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-17(IL-17)水平、IL-17/转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)比值较治疗前下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), IL-10 及 TGF- β_1 水平较治疗前增高, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** LIT 可以改善 RIF 患者再次 IVF-ET 的结局, 其对 Th1 型细胞因子下调作用明显, 对 Th2 型细胞因子调节作用不明显。

[关键词] Th1 细胞; Th2 细胞; Th17 细胞; T 淋巴细胞, 调节性; 胚胎植入; 免疫疗法, 主动

[中图法分类号] R711.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)06-0957-03

Study on clinical efficacy of lymphocyte active immunotherapy in patients with repeated embryo implantation failure and level change of T-lymphocytes cytokines^{*}

CHEN Hui^{1,2}, LIU Zhongwei¹, MENG Yushi^{1△}, LI Dongya¹, MA Lan¹, YANG Xiaoling¹

(1. Department of Reproductive Medicine, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China; 2. Reproduction Center, Chenzhou Municipal First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the clinical efficacy of lymphocyte active immunotherapy(LIT) in the patients with repeated embryo implantation failure(RIF) and the change of T lymphocyte cytokine levels. **Methods** Two hundreds and fourteen unknown RIF cases receiving in vitro fertilization and embryo transfer(IVF-ET) in this hospital during 2014—2016 served as the study subjects and were divided into LIT group(97 cases)and control group(117 cases) according to whether receiving LIT. The embryo implantation rate, clinical pregnancy rate and early abortion rate were compared between the two groups. Twenty-one cases received LIT from May to December 2016. The T lymphocyte related cytokine level was detected before and after the therapy. **Results** The embryo implantation rate and clinical pregnancy rate in the LIT group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), while the abortion rate was lower than that in the control group, but the difference between them had no statistical significance ($P > 0.05$). The IL-17 and IFN- γ levels and IFN- γ /IL-10 ratio after treatment in 21 cases of RIF were decreased compared with before treatment($P < 0.05$), while the IL-10 and TGF- β_1 levels were increased compared with before treatment, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** LIT can improve the outcomes of RIF patients with IVF-ET once again, has obvious down-regulative effect on Th1 type cytokines and its regulative effect on Th2 type cytokines is unobvious.

[Key words] Th1 cells; Th2 cells; Th17 cells; T-lymphocytes, regulatory; embryo implantation; immunotherapy, active

^{*} 基金项目:昆明医科大学“十三五”校级学科建设重点项目(J1301819);2016 年云南省科技厅昆明医科大学应用基础研究联合专项面上资金项目[2017FE467(-181)];2016 年昆明医科大学研究生创新基金项目(2016S34)。 作者简介:陈慧(1992—),医师,硕士,主要从事辅助生殖技术及生殖免疫研究。△ 通信作者, E-mail: mengyushi0102@163.com。

20 世纪 80 年代起,基于胚胎作为有异于母体组织抗原的同种免疫理论,学者提出了淋巴细胞主动免疫治疗(lymphocyte immunotherapy, LIT)方法,并应用于复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)患者^[1]。基于反复胚胎种植失败(repeated implantation failure, RIF)与 RSA 患者可能存在类似的免疫失衡机制,学者推测不明原因的 RIF 可能是发生在种植 10 d 内的免疫排斥以致早期流产而着床失败。尝试性将 LIT 应用于 RIF 患者以调节免疫失衡,但其有效性及免疫调节机制在国内外仍存在争议。本文探讨 LIT 对 RIF 患者的临床效果及 T 淋巴细胞因子水平变化的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014—2016 年在昆明医科大学第二附属医院生殖医学科接受体外受精与胚胎移植(IVF-ET)助孕的不明原因 RIF 患者 214 例为研究对象,按是否接受 LIT 分为 LIT 组及对照组。入组标准^[2]:胚胎移植大于或等于 3 次优质胚胎,或累计移植优质胚胎数大于或等于 10 枚仍未获临床妊娠;排除双方染色体异常,输卵管积水,内分泌紊乱,血栓前状态,子宫内膜异常,多囊卵巢综合征及子宫内膜异位症等可能影响胚胎着床的不利因素^[3]。本研究经伦理委员会批准,患者及家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 LIT 方案 按照李大金等^[4]的操作方法,无菌抽取丈夫或健康第三者空腹静脉血 30 mL,适量肝素抗凝,在无菌条件下常规分离提取淋巴细胞,用生理盐水洗涤 3 次,调节淋巴细胞浓度达到 $(20\sim30)\times 10^6/\text{mL}$;对患者前臂外侧行皮内注射,注射后 30 min 观察是否出现红肿、水泡等局部反应。每 2~3 周注射 1 次,4 次为 1 个疗程。

1.2.2 胚胎移植及黄体支持 若有冻存胚胎,在行 LIT 1 个疗程后行冻融胚胎移植。若无移植冻存胚胎,在 LIT 期间再次进入 IVF-ET 周期行超促排卵,在行 LIT 1 个疗程后行新鲜胚胎移植。胚胎移植后采用黄体酮针剂/黄体酮阴道凝胶(雪诺酮每支 90 mg,德国默克公司)、地屈孕酮片(每片 10 mg,荷兰苏威公司)或人绒毛膜促性腺激素(HCG) 2 000 U 进行黄体支持,持续用药至妊娠 8~10 周。胚胎移植术后 14 d 检测尿或者血 HCG 阳性确定为生化妊娠。胚胎移植术后 28~35 d B 超检查见孕囊、胚芽及原始心管搏动为临床妊娠。孕 12 周前发生的自然流产为早期流产。

1.2.3 标本收集 2016 年 5—12 月接受 LIT 患者 21 例,测定治疗前后 T 淋巴细胞相关因子水平。患者在 LIT 治疗前及治疗 1 个疗程后 2 周留取样本,于 8:00—10:00 空腹抽取肘静脉血 5 mL,静置 15 min,

4 ℃条件下 3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清,置于一 80 ℃冰箱,待测。采用 ELISA 检测血清样本中白细胞介素(IL)-10、IL-17、 γ -干扰素(IFN- γ)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)细胞因子水平,并计算 IFN- γ /IL-10 和 IL-17/TGF- β_1 比值。按照试剂盒说明书步骤操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两个独立样本 *t* 检验及配对 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况 接受 LIT 患者 97 例(LIT 组),未行 LIT 患者 117 例(对照组),两组患者一般情况比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。另 21 例检测血清细胞因子水平的 RIF 患者平均年龄 (33.00 ± 4.01) 岁,平均 BMI $(22.46\pm 2.86)\text{kg}/\text{m}^2$,平均不孕时间 (5.57 ± 3.48) 年,平均胚胎移植失败 (3.54 ± 1.50) 次。

表 1 两组患者一般情况比较			
项目	LIT 组(<i>n</i> =97)	对照组(<i>n</i> =117)	<i>P</i>
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	33.98 $\pm$ 4.09	33.40 $\pm$ 3.61	0.274
不孕年限($\bar{x}\pm s$,年)	5.60 $\pm$ 3.40	5.96 $\pm$ 3.50	0.446
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	22.51 $\pm$ 2.96	22.47 $\pm$ 3.10	0.933
胚胎移植失败次数($\bar{x}\pm s$,次)	4.31 $\pm$ 1.64	3.97 $\pm$ 1.21	0.097
移植日内膜厚度($\bar{x}\pm s$,mm)	9.70 $\pm$ 1.40	9.92 $\pm$ 2.07	0.353
胚胎移植数($\bar{x}\pm s$,个)	2.46 $\pm$ 0.60	2.57 $\pm$ 0.67	0.217
女因不孕[<i>n</i> (%)]	82(84.5)	91(77.8)	0.227
新鲜胚胎移植[<i>n</i> (%)]	46(47.4)	60(51.3)	0.584

2.2 临床效果 LIT 组患者胚胎种植率、临床妊娠率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),流产率明显低于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 两组患者临床效果比较[<i>n</i> / <i>n</i> (%)]			
项目	LIT 组(<i>n</i> =97)	对照组(<i>n</i> =117)	<i>P</i>
胚胎种植率	58/239(24.3)	47/301(15.6)	0.016
临床妊娠率	43/97(44.3)	36/117(30.8)	0.047
流产率	5/43(10.4)	8/36(22.2)	0.222

2.3 治疗前后血清细胞因子水平 21 例 RIF 患者 LIT 治疗后 IFN- γ 、IL-17 水平、IL-17/TGF- β_1 比值较治疗前下降($P<0.05$);IL-10 及 TGF- β_1 水平较治疗前增高,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 治疗前后各细胞因子变化($\bar{x}\pm s$)				
项目	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>
IFN- γ (pg/mL)	22.23 $\pm$ 4.94	20.01 $\pm$ 4.68	2.163	0.043
IL-10(pg/mL)	403.38 $\pm$ 78.47	427.71 $\pm$ 78.87	-0.950	0.353

续表 3 治疗前后各细胞因子变化($\bar{x}\pm s$)				
项目	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>
IL-17(pg/mL)	399.85±77.74	360.40±85.47	2.622	0.016
TGF-β ₁ (pg/mL)	239.18±45.50	264.50±87.23	-1.842	0.080
IFN-γ/IL-10	0.06±0.01	0.05±0.02	1.652	0.114
IL-17/TGF-β ₁	1.70±0.31	1.45±0.44	2.835	0.010

3 讨 论

目前 IVF-ET 治疗过程中,排除导致胚胎种植失败的诸多可能因素外,如胚胎因素、宫腔因素、易栓症等,仍有部分患者找不到原因,对于这部分患者治疗手段有限,是当今研究的热点和难点。

免疫因素是影响胚胎着床的主要因素之一,正常妊娠过程中只有母体的免疫耐受达到平衡状态才能保护携带半异体抗原的胚胎免受母体的排斥,否则将导致胚胎着床失败或流产。

免疫失衡具体的发病机制仍不明确,研究发现 T 淋巴细胞免疫应答在胚胎反复种植失败中发挥了重要的作用^[5-8]。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN-γ 和肿瘤坏死因子 β(TNF-β),介导迟发型变态反应(DTH)和巨噬细胞活化等细胞免疫应答、炎症反应和急性排斥反应过程;Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10,介导体液免疫应答,被认为是免疫调节性因子。有研究认为 Th1 细胞因子可干扰滋养细胞的侵蚀,并抑制子宫内膜蜕膜化,还可引起 NK 细胞的活化、浸润,诱发妊娠早期滋养细胞凋亡,导致胚胎死亡^[9]。Th2 细胞因子作为免疫调节性因子,可以下调 Th1 的反应,从而诱导母体对胎儿产生免疫耐受。因此,Th1/Th2 平衡在胚胎植入过程中起到了非常重要的作用。Th17 细胞特征性分泌 IL-17,而不产生 IFN-γ 和 IL-4,参与移植排斥等的发生、发展。Treg 细胞具有免疫无能和免疫抑制两大功能特征,可分泌 IL-9、IL-10 及 TGF-β 等多种抑制性细胞因子。Treg 细胞可抑制反应性 CD4⁺ T 淋巴细胞和细胞毒性 CD8⁺ T 淋巴细胞的活化、增殖与效应功能,能抑制半同种抗原引起的母体对胚胎的免疫排斥反应,在胚胎种植期及妊娠早期维持妊娠免疫耐受起重要作用^[10]。

近几年,少数学者将 LIT 应用于 RIF 患者的治疗中。有研究^[11-13]认为经 LIT 治疗 RIF 患者,可以从中获得短期的明显益处。有研究认为 LIT 能提高 RIF 患者的活产率,但仅仅针对有异常免疫风险的 RIF 患者^[14]。另有研究认为 LIT 治疗 RIF 的适应证有限^[15],并对临床效果持反对态度,认为 LIT 可改善多次生化妊娠患者的再次生化妊娠现象,但不能改善 RIF 患者的妊娠结局。

本研究结果显示,LIT 组患者的胚胎种植率、临

床妊娠率均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),流产率低于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),提示 LIT 可改善 RIF 患者再次 IVF-ET 的胚胎种植率和临床妊娠率;两组流产率虽无明显变化,但 LIT 组的流产率呈现下降趋势。

LIT 治疗后 IFN-γ、IL-17 水平及 IL-17/TGF-β₁ 比值较治疗前下降($P<0.05$);IL-10 及 TGF-β₁ 水平较治疗前增高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。说明 Th17 优势地位下降,Th17/Treg 平衡向 Treg 转化,这与文献^[16-17]对 LIT 的免疫调节机制的研究结论相一致,进一步说明 LIT 通过下调 Th1 因子和上调 Treg 因子的表达,调节母胎免疫耐受从而利于胚胎植入。

综上所述,LIT 可以改善 RIF 患者再次 IVF-ET 的结局;LIT 对 Th1 细胞因子下调作用更加明显,而对于 Th2 细胞因子的调节作用不明显。本研究样本量有限,还有待于扩大样本量做进一步研究。

参考文献

[1]

YANG K M,NTRIVALAS E,CHO H J,et al. ORIGINAL ARTICLE:women with multiple implantation failures and recurrent pregnancy losses have increased peripheral blood T cell activation[J]. Am J Reprod Immunol,2010,63(5):370-378.

[2]

COUGHLAN C,LEDGER W,WANG Q,et al. Recurrent implantation failure: definition and management[J]. Reprod Biomed Online,2014,28(1):14-38.

[3]

THORNHILL A R,DEDIE-SMULDERS C E,GERAEDTS J P,et al. ESHRE PGD consortium 'best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)' [J]. Hum Reprod, 2005,20(1):35-48.

[4]

李大金,余江,朱影,等. 母-胎免疫识别低下型反复自然流产配偶淋巴细胞免疫疗法的改进[J]. 上海免疫学杂志,2003,23(6):393-395.

[5]

梁佩燕,李观贵,连若纯,等. 促/抑炎因子平衡在反复胚胎种植失败中的作用[J]. 生殖医学杂志,2013,22(4): 237-241.

[6]

WANG W J,LIU F J,QU H M,et al. Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage. [J]. J Reprod Immunol,2013,99(2):39-45.

[7]

LEDEE N,PETITBARAT M,CHEVRIER L,et al. The uterine immune profile may help women with repeated unexplained embryo implantation failure after in vitro fertilization [J]. Am J Reprod Immunol,2016,75(3):388-401.

[8]

艾海权,腊晓琳,巩晓芸,等. Th17 及 Treg 相关因子在反复种植失败患者种植窗口期子宫内膜中(下转第 964 页)

- scopic lumbar discectomy for L₅-S₁ disc herniation; transforaminal versus interlaminar approach[J]. *Pain Physician*, 2013, 16(6):547-556.
- [4] 行勇刚, 田伟, 何达, 等. 经皮椎间孔镜治疗腰椎神经根孔狭窄的短期疗效观察[J]. *中国微创外科杂志*, 2016, 16(5):445-448, 454.
 - [5] HOOGLAND T, SCHUBERT M, MIKLITZ B, et al. Transforaminal posterolateral endoscopic discectomy with or without the combination of a low-dose chymopain: a prospective randomized study in 280 consecutive cases[J]. *Spine*, 2006, 31(24):e890-897.
 - [6] 冯皓宇, 何李明, 马迅. 经皮内镜下腰椎间盘髓核切除术的应用进展[J]. *中国微创外科杂志*, 2015, 15(3):272-275.
 - [7] 格日勒, 郭昭庆. 经皮椎间孔镜技术治疗腰椎间盘突出症的应用进展[J]. *中国微创外科杂志*, 2018, 18(3):267-270, 273.
 - [8] 张之栋, 杜怡斌, 储建军. 经皮椎间孔镜腰椎间盘摘除术与微创经椎间孔腰椎融合术治疗腰椎间盘突出症的前瞻性随机对照研究[J]. *中国微创外科杂志*, 2015, 15(7):583-587.
 - [9] 金丹杰, 徐南伟, 赵国辉, 等. 经皮椎间孔镜与椎板开窗椎间盘切除术治疗腰椎间盘突出症的前瞻性随机对照研究[J]. *中国微创外科杂志*, 2017, 17(6):491-494.
 - [10] 李广松, 乔荣慧, 刘伟, 等. 经椎间孔脊柱内窥镜技术治疗腰椎间盘突出症合并神经根管狭窄[J]. *中国微创外科杂志*, 2015, 15(6):522-526.
 - [11] 李振宙, 吴闻文, 侯树勋, 等. 经皮侧后路腰椎间孔成形手术器械的设计及临床应用[J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(10):1026-1032.
 - [12] 吕国华, 王冰, 刘伟东, 等. 完全内镜技术治疗腰椎间盘突出症的学习曲线[J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(10):1104-1109.
 - [13] 张西峰, 温冰涛, 王岩, 等. 经皮内窥镜治疗腰椎间盘突出症的并发症及其处理[J]. *中华外科杂志*, 2011, 49(12):1091-1095.
 - [14] 徐恒, 简伟, 谷福顺, 等. 经皮椎间孔镜 TESSYS 技术治疗腰椎间盘突出症伴或不伴腰椎神经根管狭窄的疗效观察[J]. *中国微创外科杂志*, 2018, 18(1):39-42.
 - [15] AHN Y, KIM C H, LEE J H, et al. Radiation exposure to the surgeon during percutaneous endoscopic lumbar discectomy: a prospective study[J]. *Spine*, 2013, 38(7):617-625.
 - [16] MARISCALCO M W, YAMASHITA T, STEINMETZ M P, et al. Radiation exposure to the surgeon during open lumbar microdiscectomy and minimally invasive microdiscectomy: a prospective, controlled trial [J]. *Spine*, 2011, 36(3):255-260.
 - [17] 李振宙, 吴闻文, 侯树勋, 等. 经皮侧后路腰椎间孔成形手术器械的设计及临床应用 [J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(10):1026-1032.

(收稿日期:2018-10-10 修回日期:2018-12-02)

(上接第 959 页)

- 的表达[J]. *生殖医学杂志*, 2016, 25(11):1013-1017.
- [9] 邢福祺, 陈士岭. 肿瘤坏死因子和干扰素诱导人绒毛膜滋养细胞凋亡的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 1999, 34(8):476-478.
 - [10] SHIMA T, SASAKI Y, ITOH M, et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice [J]. *J Reprod Immunol*, 2010, 85(2):121-129.
 - [11] KHESHTCHIN N, GHARAGOZLOO M, ANDALIB A, et al. The expression of Th1- and Th2-related chemokine receptors in women with recurrent miscarriage; the impact of lymphocyte immunotherapy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 64(2):104-112.
 - [12] 陈丹, 刘仲伟, 陈慧, 等. 反复胚胎种植失败免疫治疗疗效及淋巴细胞免疫表型变化的研究[J]. *实用妇产科杂志*, 2017, 33(12):910-914.
 - [13] 何培, 李正伟, 许益娟, 等. 主动免疫疗法对体外受精-胚胎移植反复着床失败影响的研究[J]. *重庆医学*, 2017, 46(5):673-676.
 - [14] SCHOOLCRAFT W B, SURREY E S, MINJAREZ D A, et al. Management of poor responders; can outcomes be improved with a novel gonadotropin-releasing hormone antagonist/letrozole protocol? [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(1):151-156.
 - [15] CARP H A, TODER V, MASHIACH S, et al. Effect of paternal leukocyte immunization on implantation after biochemical pregnancies and repeated failure of embryo transfer[J]. *Am J Reprod Immunol*, 1994, 31(2/3):112.
 - [16] 娄华, 王兴玲, 王雪梅, 等. 主动免疫治疗对反复胚胎植入失败患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞表达的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2012, 21(5):440-442.
 - [17] YIN B, CAI J. Increased circulating Th1/Th2 ratios but not other lymphocyte subsets during controlled ovarian stimulation are linked to subsequent implantation failure after transfer of in vitro fertilized embryos[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2015, 73(1):12-21.

(收稿日期:2018-10-21 修回日期:2018-12-23)