

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 14. 023

外周血淋巴细胞亚群及血清雌二醇、孕酮在自然流产中的应用价值

荣成智, 兰 访[△], 李明艺, 唐文庭
广西壮族自治区妇幼保健院检验科, 广西南宁 530002

摘 要:目的 探讨外周血淋巴细胞亚群及血清雌二醇(E₂)、孕酮(PROG)水平与自然流产的关系。
方法 选取 2017 年 1 月至 2022 年 5 月该院 444 例自然流产患者按流产诊断标准分为常规性自然流产组(180 例)和复发性流产组(264 例),将 165 例先兆流产患者作为先兆流产组,另选取同期 87 例健康早期妊娠者作为健康早期妊娠组,140 例健康非孕者作为健康非孕组。采用流式细胞技术分析所有研究对象的 T 细胞亚群、B 细胞亚群和 NK 细胞亚群;采用电化学发光技术检测所有研究对象血清 E₂ 和 PROG 水平。比较各组淋巴细胞亚群、E₂ 和 PROG 水平,并分析其与自然流产的关系。**结果** 复发性流产组 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞均低于健康非孕组,差异均有统计学意义(P<0.05);常规性自然流产组、复发性流产组、先兆流产组 B 细胞均低于健康非孕组,差异均有统计学意义(P<0.05);复发性流产组 NK 细胞均高于常规自然流产组、先兆流产组、健康早期妊娠组和健康非孕组,差异均有统计学意义(P<0.05)。先兆流产组与健康早期妊娠组淋巴细胞亚群比较,差异均无统计学意义(P>0.05)。先兆流产组 E₂、PROG 水平均低于健康早期妊娠组,差异均有统计学意义(P<0.05);常规性自然流产组、复发性流产组 PROG 水平均高于健康非孕组,差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论** 自然流产患者免疫功能异常与激素紊乱有关联,早期妊娠妇女体内 NK 细胞增高伴 E₂ 和 PROG 水平降低可能是发生流产的指征。

关键词:淋巴细胞亚群; 雌二醇; 孕酮; 自然流产; 先兆流产
中图法分类号:R714.21 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2023)14-2088-04

Application of peripheral blood lymphocyte subsets,serum estradiol and progesterone in spontaneous abortion

RONG Chengzhi, LAN Fang[△], LI Mingyi, TANG Wenting
Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Guangxi
Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530002, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between peripheral blood lymphocyte subsets, serum estradiol (E₂), progesterone (PROG) levels and spontaneous abortion. **Methods** A total of 444 patients with spontaneous abortion in the hospital from January 2017 to May 2022 were selected and divided into the routine spontaneous abortion group (180 cases) and the recurrent spontaneous abortion group (264 cases) according to the diagnostic criteria of abortion, and 165 patients with threatened abortion were selected as the threatened abortion group. In addition, 87 healthy early pregnant women were selected as the healthy early pregnancy group, and 140 healthy non-pregnant women were selected as the healthy non-pregnant group. Flow cytometry was used to analyze T cell subsets, B cell subsets and NK cell subsets of all subjects. The serum E₂ and PROG levels of all subjects were detected by electrochemical spectrophotometry. The levels of lymphocyte subsets, E₂ and PROG in each group were compared, and their relationship with spontaneous abortion was analyzed. **Results** CD3⁺T cells and CD4⁺T cells in the recurrent spontaneous abortion group were lower than those in the healthy non-pregnant group, and the differences were statistically significant (P<0.05). B cells in the normal spontaneous abortion group, recurrent abortion group and threatened abortion group were lower than those in the healthy non-pregnant group, and the differences were statistically significant (P<0.05). NK cells in the recurrent spontaneous abortion group were higher than those in the routine spontaneous abortion group, threatened abortion group, healthy early pregnancy group and healthy non-pregnant group, and the differences were statistically significant (P<0.05). There was no significant difference in lymphocyte subsets

作者简介:荣成智,男,主管技师,主要从事流式细胞学方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:452564063@qq.com。
网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=50.1167.R.20230613.0956.004&uniplatform=NZKPT\(2023-06-14\)](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=50.1167.R.20230613.0956.004&uniplatform=NZKPT(2023-06-14))

between the threatened abortion group and the healthy early pregnancy group ($P>0.05$). The levels of E_2 and PROG in threatened abortion group were lower than those in healthy early pregnancy group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of PROG in routine spontaneous abortion group and recurrent spontaneous abortion group were higher than those in healthy non-pregnant group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The abnormal immune function in patients with spontaneous abortion is associated with hormone disorder. The increase of NK cells and the decrease of E_2 and PROG levels in early pregnancy women may be an indication of miscarriage.

Key words: lymphocyte subsets; estradiol; progesterone; spontaneous abortion; threatened abortion

妊娠是一种复杂的生理过程,受母体遗传因素、子宫环境、细胞因子、激素水平及外界环境等多方面的影响^[1]。当孕妇体内的平衡环境被打乱时,会导致不良妊娠结局发生。自然流产和先兆流产都是妇产科最常见的并发症,也是危害女性生殖健康的主要原因。临床上自然流产和先兆流产的人群发生率约为15%^[2],大部分发生在妊娠早期。国内通常将3次或3次以上在妊娠28周之前的胎儿丢失称为复发性流产,其发生率为1%~5%^[3]。流产的发生一般都经过先兆流产这个阶段,但是二者之间又存在差异。先兆流产的结局可以继续妊娠,也可以终止妊娠。母体免疫系统一直是自然流产发生的研究重点,而外周血淋巴细胞亚群是观察细胞免疫和体液免疫功能的重要指标,体内淋巴细胞亚群数量、表型或受体的变化,会导致母胎屏障出现异常,进而影响妊娠结局。体内激素水平异常也是造成自然流产及先兆流产的常见因素,而母体内激素的变化同时受母体本身及胎盘的共同影响^[2]。本研究分析自然流产患者和先兆流产患者体内淋巴细胞亚群及血清雌二醇(E_2)、孕酮(PROG)水平,探讨三者与流产的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年1月至2022年5月本院诊断为自然流产的444例患者按《自然流产诊治中国专家共识(2020年版)》^[4]分为常规性自然流产组(180例)和复发性流产组(264例),将165例先兆流产患者作为先兆流产组。自然流产患者纳入标准:(1)患者无诱因流产,复发性流产患者无诱因流产 ≥ 3 次;(2)男方精液和女方生殖系统检查基本正常;(3)夫妻双方染色体无异常;(4)排除自身免疫性疾病;(5)未发现内分泌疾病或其他重大疾病等。先兆流产患者纳入标准:(1)存在临床先兆流产指征及既往无复发性流产史;(2)夫妻双方染色体无异常;(3)无自身免疫性疾病;(4)女方生殖系统检查基本正常;(5)项目检查前未使用激素类药物。另选取同期87例健康早期妊娠者作为健康早期妊娠组,140例健康非孕者作为健康非孕组。健康早期妊娠组和健康非孕组人群既往无复发性流产史,并且排除自身免疫性疾病

和内分泌疾病或其他重大疾病等。所有研究对象年龄18~45岁,常规性自然流产组平均年龄(32.07 ± 4.69)岁,复发性流产组平均年龄(32.50 ± 5.10)岁,先兆流产组平均年龄(32.22 ± 5.12)岁,健康早期妊娠组平均年龄(30.49 ± 3.81)岁,健康非孕组平均年龄(33.03 ± 4.45)岁。所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。本研究经本院伦理委员会审核通过。

1.2 检测仪器及方法 采用贝克曼公司FC500型流式细胞分析仪对外周血淋巴细胞亚群水平进行检测,试剂为B/NK细胞:CD45-FITC、CD56-RD1、CD19-ECD、CD3-PC5、CD16-PE,T细胞:CD45-FITC、CD4-RD1、CD8-ECD、CD3-PC5,流式细胞分析用溶血剂,专用微球质控(Flow-Check Fluorospheres),检测用细胞质控IMMUNO-TROL cell。检测项目:T淋巴细胞CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞;B淋巴细胞亚群(B细胞);NK淋巴细胞亚群(NK细胞)。 E_2 、PROG检测仪器为罗氏Cobas e601电化学发光法全自动免疫分析仪。所有项目均采用原厂试剂及配套耗材并严格执行室内质控及室间质评,操作过程严格按照操作说明书进行,确保结果的正确性及可比性。

1.3 统计学处理 采用SPSS22.0统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用SNK- q 检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血T细胞、B细胞及NK细胞检测结果比较 复发性流产组CD3⁺T细胞均低于健康早期妊娠组和健康非孕组,差异均有统计学意义($P<0.05$);复发性流产组CD4⁺T细胞低于健康非孕组,差异有统计学意义($P<0.05$)。复发性流产组与健康早期妊娠组B细胞比较,差异有统计学意义($P<0.05$);健康非孕组B细胞均高于常规性自然流产组、复发性流产组、先兆流产组和健康早期妊娠组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。常规性自然流产组、先

兆流产组、健康早期妊娠组与复发性流产组 NK 细胞比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);常规性自然流产组、复发性流产组、先兆流产组及健康早期妊娠组 NK 细胞均高于健康非孕组,差异均有统计学意义

($P<0.05$),且复发性流产组最高;先兆流产组与健康早期妊娠组 NK 细胞比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组外周血 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ T 细胞 (%)	CD4 ⁺ T 细胞 (%)	CD8 ⁺ T 细胞 (%)	CD4 ⁺ T 细胞/ CD8 ⁺ T 细胞	B 细胞 (%)	NK 细胞 (%)
常规性自然流产组	180	71.96±7.11	37.74±6.40	28.96±6.16	1.45±1.03	12.06±3.78	15.93±6.92
复发性流产组	264	70.87±7.53	36.84±6.57	27.73±6.57	1.42±0.47	11.65±3.83	17.35±7.19
先兆流产组	165	72.22±7.06	37.59±5.97	28.06±5.55	1.41±0.44	12.47±4.11	15.14±6.65
健康早期妊娠组	87	72.75±6.75	37.95±6.71	28.57±7.15	1.43±0.49	12.74±4.32	14.19±5.58
健康非孕组	140	72.89±5.98	39.01±6.00	27.70±6.20	1.51±0.57	13.51±4.16	13.17±4.43
<i>P</i>		0.039	0.033	0.386	0.809	<0.001	<0.001

2.2 各组 E₂、PROG 水平比较 常规性自然流产组、复发性流产组与健康非孕组 E₂ 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);先兆流产组 E₂ 水平低于健康早期妊娠组,差异有统计学意义($P<0.05$)。常规性自然流产组、复发性流产组 PROG 水平均高于健康非孕组,差异均有统计学意义($P<0.05$);先兆流产组 PROG 水平低于健康早期妊娠组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组 E₂、PROG 水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	<i>n</i>	E ₂ (pmol/L)	PROG (nmol/L)
常规性自然流产组	180	224.55(138.45,594.95)	1.51(0.77,3.39)
复发性流产组	264	275.60(156.80,508.28)	1.08(0.66,3.49)
先兆流产组	165	1 390.00(800.40,2 559.00)	82.09(58.50,124.85)
健康早期妊娠组	87	3 769.00(2 821.00,4 900.00)	94.58(80.96,108.60)
健康非孕组	140	282.40(186.18,379.78)	0.84(0.48,3.41)
<i>P</i>		<0.001	<0.001

3 讨 论

MAGNUS 等^[5]研究表明,年龄和既往流产次数是发生自然流产的主要影响因素,女性发生流产风险最低的年龄是 20~29 岁,随着年龄升高,特别是 45 岁以后发生流产的风险可达 50% 以上;流产次数的增加也会使再次发生流产的风险增高,有 3 次及以上流产经历的女性,其流产再发风险率可达 40% 以上。本研究所有研究对象年龄为 18~45 岁,常规性自然流产组平均年龄(32.07±4.69)岁,复发性流产组平均年龄(32.50±5.10)岁,先兆流产组平均年龄(32.22±5.12)岁,健康早期妊娠组平均年龄(30.49±3.81)岁,健康早期妊娠组年龄小于其他 3 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。虽然分析人群受到一些入选条件的限制,但是对于本研究而言,存

在流产风险的人群年龄相对偏高。

各组 CD3⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、B 细胞、NK 细胞比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。CD4⁺ T 细胞主要对产生特殊抗原反应的靶细胞进行杀灭,发挥细胞免疫功能。CD8⁺ T 细胞在免疫反应中主要起中间过程的作用,辅助或“调控”其他淋巴细胞发挥各自的免疫功能。CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞比例平衡是维持机体正常生理功能和免疫应答的基础,其比例失衡可能会导致机体免疫功能失常,产生针对自身组织的自身抗体及促进炎症因子引起生殖系统损伤,最终导致不孕。复发性流产组 CD3⁺ T 细胞低于其他各组,与国内相关研究结果一致^[6-7]。在国内研究 T 细胞亚群与流产关系的研究中,普遍认为 T 细胞失衡表现主要与 Th1/Th2 的失衡及它们所分泌的白细胞介素(IL)-2、干扰素-γ(IFN-γ)、IL-4、IL-5、IL-6 等细胞因子有关^[8];CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞下降与流产及复发性流产等存在密切关系^[9]。先兆流产作为流产的前期阶段,其所表现出来的特征是介于流产与健康早孕之间的状态。免疫内分泌失调是先兆流产的主要原因,而细胞因子则是将免疫和内分泌因素联系起来的纽带。先兆流产组 CD3⁺ T、CD4⁺ T 及 CD8⁺ T 细胞与健康早期妊娠组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),推测 T 细胞的这些表型标记可能无法反映妊娠期免疫状态。临床上先兆流产的发病机制是多方面、多因素的,除了常见的免疫内分泌失衡外,染色体异常、生殖系统病变等,亦需纳入综合分析^[10]。常规性自然流产组、复发性流产组、先兆流产组 B 细胞均低于健康非孕组,差异均有统计学意义($P<0.05$),复发性流产组 B 细胞最少,提示流产发生机制及流产次数与体液免疫失衡存在关联性。

外周血 NK 细胞主要分为 CD56⁻ CD16⁺ (约占

95%)和 CD56⁺CD16⁻(约占 5%)2 个亚群。目前有研究表明,CD56⁻CD16⁺NK 细胞是 NK 细胞毒性作用及抗体依赖性细胞毒作用的效应细胞,CD56⁺CD16⁻是免疫调节因子的来源,促进子宫蜕膜血管的生成,对胎盘的植入及其微环境的保持起决定性作用。当 CD56⁻CD16⁺NK 细胞异常增多时,胎儿将受到 NK 细胞的攻击,引起流产^[1]。本研究结果显示,常规性自然流产组、复发性流产组、先兆流产组及健康早期妊娠组 NK 细胞均高于健康非孕组,其中复发性流产组最高,其次是常规性自然流产组,由此也可推测,NK 细胞与流产次数存在关联性。李医^[11]、杨攀玉等^[12]的研究结论与本研究相似,外周血 NK 细胞数量及活性明显增高的患者极有可能造成自然流产,但本研究先兆流产组与健康早期妊娠组 NK 细胞比较,差异无统计学意义($P>0.05$),NK 细胞在早期诊断先兆流产的意义不大,但其与复发性流产比较可知,NK 持续增高可能会导致流产发生。

内分泌疾病与自然流产的发生密切相关,多囊卵巢综合征、黄体功能不全、高泌乳素血症等均会造成孕妇体内内分泌异常,从而造成流产^[4]。常规性自然流产组、复发性流产组与健康非孕组 E₂ 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),先兆流产组 E₂ 和 PROG 水平均低于健康早期妊娠组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。人体 PROG 是由卵巢黄体及滋养层细胞分泌合成的,可通过加强子宫平滑肌细胞膜的通透性,促进平滑肌松弛,从而促进胚胎发育;妊娠时高水平 PROG 对子宫有镇痛保胎效果,当体内出现 PROG 分泌异常时,则会引起流产。E₂ 是由胎盘、卵巢及黄体分泌的激素,可以反映孕妇卵泡质量和卵巢黄体功能。在既往研究中,先兆流产患者 E₂ 和 PROG 水平均低于同孕周健康早孕者,可作为先兆流产早期诊断和预后观察的良好指标^[13]。王雪梅^[14]对复发性流产患者再次妊娠时研究发现,复发性流产患者再次妊娠早期就出现 E₂、PROG 水平异常,结合本研究结果,流产患者激素异常主要体现在再次妊娠期间,而基础激素水平在各组人群中并无较大差异。

常规性自然流产、复发性流产及先兆流产患者外周血淋巴细胞亚群并未体现出规律性变化趋势,但是大多数流产患者存在免疫失衡现象,特别是与健康早期妊娠者比较,先兆流产患者和自然流产患者 NK 细胞变化表现为持续增高趋势,因此认为 NK 细胞或许能作为流产患者临床诊断及治疗效果评价的一项辅助性指标。同时部分流产患者亦存在体内激素异常的表现,因此,定期关注外周血淋巴细胞亚群和激素

水平变化,特别是有流产史或先兆流产的患者,不仅有助于了解机体免疫功能状态,而且在其临床诊断、妊娠结局和治疗中也有重要意义。

参考文献

[1] 李燕滨,王玲,吴湔婷,等. NK 细胞在免疫异常自然流产中的研究进展[J]. 中国当代医药,2020,27(19):17-21.

[2] 曾琼连,姚美玉,吴效科. 先兆流产的防治[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(4):121-123.

[3] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 复发性流产诊治的专家共识[J]. 中华妇产科杂志,2016,51(1):3-9.

[4] 自然流产诊治中国专家共识编写组. 自然流产诊治中国专家共识(2020 年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2020,36(11):1082-1090.

[5] MAGNUS M C, WILCOX A J, MORKEN N H, et al. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study[J]. BMJ, 2019,364:1869.

[6] 王群,高志芬,杨朝国. 不孕症患者外周血 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞及 NK 细胞特征分析[J]. 医学检验与临床,2018,29(3):29-32.

[7] 李想,李满元,王宏亮,等. 复发性流产患者 NKT 细胞、DNT 细胞、T 细胞亚群的变化探讨[J]. 中国现代药物应用,2022,16(11):70-73.

[8] 余甜,舒红英,杨小顾. 复发性流产患者 T 淋巴细胞及其亚群变化研究进展[J]. 天津中医药大学学报,2022,41(5):661-667.

[9] 王莲莲,曹霞,施展. 复发性自然流产妇女外周血调节性 T 细胞和辅助性 T 细胞水平的表达[J]. 中国妇幼保健,2011,26(7):1068-1070.

[10] 方志红,刘华. T 淋巴细胞亚群、NK 细胞及 Th1/Th2 细胞因子与先兆流产发病的关系[J]. 江苏医药,2014,40(9):1070-1072.

[11] 李医. 不明原因复发性自然流产患者 NK 细胞的数量及活性研究[J]. 中国妇幼保健,2015,30(33):5827-5828.

[12] 杨攀玉,曲婷,曾莉,等. 外周血 TBNK 淋巴细胞亚群和血清 Th1/Th2 细胞因子与不明原因复发性流产的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(6):729-736.

[13] XU L, WEI Q, WU Q, et al. Higher β -human chorionic gonadotropin and estrogen levels during the first 6 weeks of pregnancy are associated with threatened abortion[J]. Bioscience Trends,2019,13(3):245-252.

[14] 王雪梅. 复发性流产者孕早期监测雌激素、孕酮、 β -人绒毛膜促性腺激素预测流产再发生的临床价值[J]. 中国计划生育学杂志,2022,30(6):1318-1322.

(收稿日期:2022-12-26 修回日期:2023-03-17)