维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1265-03

CTLA-4 抗体诱导原因不明复发性流产患者 Th1/Th2 转换的体外研究

刘西茹[1],李尚为[2],汪 燕[2],樊 伟[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心,重庆 400016; 2. 四川大学华西第二医院生殖中心,成都 610041)

【摘 要】目的:观察 CTLA-4 抗体在诱导原因不明复发性流产患者 Th1/Th2 转换中的作用。方法:用人绒毛膜癌细胞株 JEG-3 制备的滋养细胞抗原刺激 30 例复发性流产患者外周血单核细胞,实验组加 CTLA-4 抗体(10μg/ml 组和 1μg/ml 组),对照组加 IgG(10μg/ml 组和 1μg/ml 组)培养,分别取 24h、72h 上清液, ELISIA 法测其 IL-2、IFN-γ 和 IL-4 的水平。结果:①与同浓度对照组相比,实验组产生的 IL-4 均显著降低 ($P<0.01$), 而产生的 IFN-γ、IL-2 均明显升高 ($P<0.05$)。②与 CTLA-4 抗体 1μg/ml 组相比,CTLA-4 抗体 10μg/ml 组产生的 IL-4 稍低,而 IFN-γ 和 IL-2 稍高,但无统计学差异($P>0.05$)。结论:CTLA-4 抗体可以上调 Th1 型细胞因子, 下调 Th2 型细胞因子, 提示 CTLA-4 抗体体外阻断 CTLA-4 可诱导原因不明复发性流产的 Th1/Th2 失衡更向 Th1 极化,不利于妊娠。

【关键词】流产;复发性;Th1 细胞;Th2 细胞;CTLA-4

【中国图书分类法分类号】R714.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-02

In vitro study on Th1/Th2 shift modulated by anti-CTLA4 antibody in unexplained recurrent spontaneous abortion

LIU Xiru, et al

(*Reproductive Medical Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of anti-CTLA4 antibody on Th1/Th2 shift in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Methods*: The levels of IL-2, IFN-γ and IL-4 were assessed by ELISA in the supernatant of cultured maternal peripheral blood mononuclear cells(PBMC) from 30 patients of Unexplained RSA. Cytokine synthesis was induced by activation with antigens from a choriocarcinoma cell line of JEG-3, with anti-CTLA4 antibody or IgG. *Results*: We detected significantly greater levels of the Th1 cytokines IL-2、IFN-γ ($P<0.05$) and lower levels of the Th2 cytokines IL-4 ($P<0.01$) in anti-CTLA4 antibody groups, compared with control group of the same concentration. Between the trial groups of different concentration, there is no significance ($P>0.05$). *Conclusion*: Anti-CTLA4 antibody can up-regulate Th1-type cytokines and down-regulate Th2-type cytokines, which indicates that in URSA anti-CTLA4 antibody could swith T cell responses to Th1, and is harmful to URSA.

【Key words】 Abortion, Recurrent; Th1 cells; Th2 cells; Cytotoxic T lymphocyte associated antigen4

早期自然流产是指妊娠在 12 周前中止, 连续发生 2 次或 2 次以上称为复发性流产(Early recurrent spontaneous abortion, ERSA),影响了大约人口的 1%[1]。已知其可能与遗传、内分泌、感染、内生殖器解剖异常等因素有关;但仍有大约 50%为原因不明复发性流产(Unexplained RSA, URSA),推测可能与免疫因素有关。在正常妊娠母胎界面及外周血,Th1/Th2 间的平衡始终保持在最有利于维持妊娠的 Th2 型免疫偏移状态, Th1 型细胞因子过度表达可导致流产[2]。研究表明细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4)被封闭或缺乏将导致 $CD4^+$T 细胞向 Th2 亚群分化[3]。但亦有相反结论[4]。本实验用滋养细胞抗原来刺激 URSA 患者外周血单核细胞(PBMC),观察 CTLA-4 抗体组和 IgG 组 Th1/Th2 型细胞因子的表达情况, 探讨封闭 CTLA-4 在体外诱导 URSA 患者 Th1/Th2 细胞因子转换中的作用, 为 URSA 的治疗提供新的可能途径。

作者介绍: 刘西茹(1979-),女,住院医师,硕士,
主要研究方向:生殖内分泌。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取 2004 年 11 月～2005 年 4 月于四川大学华西第二医院妇产科门诊就诊的 URSA 患者 30 例，23～41 岁，中位年龄为 30.5 岁，均经过详细的询问病史及系统的检查。同时具备以下条件：①连续发生 3 次或 3 次以上早期自然流产，末次发生于 1 年以内；且为原发性。②夫妇双方染色体及流产胚胎染色体核型分析正常；③女方生殖道无畸形；④宫颈分泌物 PCR 检查排除生殖道感染；⑤生殖内分泌激素测定及诊断性刮宫排除内分泌因素；⑥抗磷脂抗体、抗子宫内膜抗体等自身免疫抗体阴性；⑦男方精液常规检查正常；⑧均未行免疫治疗。

1.2 主要试剂

JEG-3 细胞株(中国医学科学院基础医学研究所)；RPMI Medium 1640 powder(Gibco，美国)；胰酶(华西医大免疫教研室)；新生小牛血清(成都哈里生物公司)；淋巴细胞分离液(杭州四季青)；MTT 试剂(Sigma，美国)；Anti-CTLA4 monoclonal antibody (R&D Co.)；IgG (军事医学科学院)；IL-2、IFN-γ、IL-4 ELISA 试剂盒(深圳晶美公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 滋养细胞抗原的制备[5] 常规技术培养人绒毛膜癌细胞株 JEG-3，至细胞相连成片而基本长满瓶底时，用 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液，用无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 Hanks 液洗 2 次，台盼兰排除法测细胞活力 >90%后，调整细胞浓度为 2×10^7cells/ml，放入匀浆器中破坏细胞，400g 转速离心 10min，上清液即为富含 JEG-3 细胞膜的滋养细胞抗原，取上清液用 EP 管分装，置 -70℃保存备用。

1.3.2 滋养细胞抗原诱导 PBMC 产生细胞因子 无菌采集 URSA 患者肘静脉血 5ml，肝素抗凝，立即按常规方法用 Ficoll-Hypaque 分离 PBMC，Hanks 液洗 2 次，台盼兰排除法测细胞活力 >90%，调整细胞浓度为 1×10^6cells/ml，96 孔培养板的各孔中加入 PBMC150μl，实验组和对照组分别加不同浓度的 anti-CTLA4McAb 10μl 和 IgG10μl (终浓度为 1μg/ml 和 10μg/ml)，37℃ 5%CO_2 孵箱中孵育 2h 后，各孔加滋养细胞抗原 40μl，继续孵育 72h。各孔设 3 复孔。收集 24h 和 72h 上清液 (以分别检测 IL-2 和 IFN-γ、IL-4)，-20℃冻存，待测。

1.3.3 细胞因子的测定 采用双抗体夹心 ELISA 法，检测上清液中 IL-2、IL-4、IFN-γ 的水平。

1.4 统计学处理

用 SPSS11.0 统计软件进行数据处理，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，按配对 t 检验分析，$P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 在 anti-CTLA4McAb 作用下，滋养细胞抗原诱导各组 PBMC 产生细胞因子的水平

与同浓度的 IgG 组相比，anti-CTLA4McAb 组产生的 IL-4 均显著降低($P<0.01$)，而产生的 IFN-γ、IL-2 明显升高($P<0.05$)；与 anti-CTLA4McAb1 μg/ml 组相比，anti-CTLA4McAb10 μg/ml 组产生的 IL-4 稍低，而 IFN-γ、IL-2 稍高，但无统计学差异($P>0.05$)(见表 1)。

2.2 anti-CTLA4McAb 在诱导 URSA 患者 Th1/Th2 细胞因子转换中的作用

本研究应用 Th1 型细胞因子 IFN-γ 和 Th2 型细胞因子 IL-4 的比值作为反映 Th1/Th2 细胞免疫应答强度的指标。结果表明：anti-CTLA4McAb 组 IFN-γ/IL-4 比值 (分别为 5.89±2.55；5.29±2.09) 明显高于同浓度 IgG 组 (4.50±3.38；4.14±1.94)。anti-CTLA4McAb10μg/ml 组 IFN-γ/IL-4 比值 (5.89±2.55) 稍高于 anti-CTLA4McAb1μg/ml 组 (5.29±2.09)，但两组间无统计学差异。

3 讨 论

正常妊娠是一种成功的半同种异体移植现象，随着免疫学研究的进展，我们逐步认识到胚胎携带 1/2 有异于母体的组织抗原，然而不被母体免疫系统排斥的实质是依赖于母胎之间的免疫耐受关系。大量研究表明，孕期母体外周系统免疫环境同未孕时期相比发生适应性免疫改变，主要表现为母体对胚

表 1 滋养细胞抗原诱导各组 PBMC 产生细胞因子的水平($n=30$，$\bar{x}\pm s$)

组 别	IL-2(pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	IL-4(pg/ml)
anti-CTLA4McAb10μg/ml 组	169.25±40.91*▲	154.30±58.28*▲	27.39±6.13**▲
anti-CTLA4McAb1μg/ml 组	161.77±39.81*	142.83±48.20*	28.35±6.00*
IgG10μg/ml 组	155.19±47.35	127.72±54.94	34.41±14.52
IgG1μg/ml 组	152.08±35.36	122.12±40.22	33.37±12.08

注：与同浓度的对照组相比 *$P<0.05$；**$P<0.01$；不同浓度抗体组间比较 ▲$P>0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

胎半同种抗原抑制性反应增强、排斥性反应减弱，以有利于子宫内胎儿的发育。而 RSA 主要表现为正常妊娠免疫反应失衡，涉及到 Th1/Th2 的细胞因子平衡失调、特异性 HLA 表达增加、免疫职能细胞亚群的格局变化、保护性抗体或封闭抗体产生不足，而使胎儿遭受免疫打击而流产。在母胎界面，母体免疫职能细胞与胎儿滋养细胞及其他间质细胞，通过多种细胞表面分子的表达，构成复杂的细胞间信息网络，进行母胎的免疫对话，形成有利于维持正常妊娠的免疫微环境。一旦这种免疫耐受格局被打破，将导致 RSA 的发生。因此，URSA 的发生与母胎同种免疫关系异常有关，也称之为同种免疫型 RSA。

在成功妊娠时，胎盘单位内滋养细胞或者进入母体血液循环中的胎儿细胞可诱导母体内 T 淋巴细胞对于胎儿组织保持耐受状态，同时母体 T 淋巴细胞对胎儿细胞有所免疫反应，建立对胎儿生存有利的免疫耐受或者免疫营养微环境[6]。许多胎儿抗原组织能够被母胎界面内的 T 淋巴细胞所识别[6]。而 T 细胞的完全活化需要双信号。当 T 细胞识别抗原递呈细胞(Antigen-presenting cells，APC)表面的抗原肽—MHC 分子复合物启动第一信号后，若缺少协同刺激信号，则可诱导 T 细胞产生抗原特异性无反应。因此阻断协同刺激信号，是目前诱导抗原特异性免疫耐受和调控辅助性 T 细胞分化的重要手段。介导共刺激信号的分子有多种，其中表达于 APC 上的 CD80/CD86 分子与表达于 T 细胞上的受体 CD28/CTLA-4 间的相互作用，是最重要的共刺激信号。有研究表明：母胎交界面蜕膜组织中，CTLA-4/CD28 表达水平失衡可能造成妊娠期不明原因流产的易感性[7]。CTLA-4 基因对调节母胎之间的免疫耐受发挥着重要作用，其基因多态性可能是通过影响 Th1/Th2 免疫平衡从而影响妊娠的结局[8]。CTLA-4 属于免疫球蛋白超家族成员，表达于活化 T 细胞的表面。它与 CD28 在结构上约有 31%氨基酸序列同源性，同为 B7-1、B7-2 的受体，但其亲和力比 CD28 强 10～100 倍[9]。有研究表明共刺激信号在 Th 细胞亚群分化中起着重要的作用。B7 和 $CD4^+$T 细胞上的 CD28 相互作用促进体内外 Th2 细胞分化。而 CTLA-4 在活化期间抑制幼稚 $CD4^+$ 细胞向 Th2 亚群极化[3]，CTLA-4 被封闭或缺乏将导致 $CD4^+$T 细胞向 Th2 亚群分化[10,11]。但亦有研究发现，在体内用抗 CTLA-4 抗体阻止 CTLA-4/B7 的相互作用，会导致实验性过敏性脑脊髓炎—典型 Th1 介导的自身免疫性疾病的恶化[4]。这种相反的结论可能与体内外，尤其在体内，不同的环境等因素有关，因为 Th1/Th2 极化或平衡，是由各种各样的因素来决定的。

本研究结果显示 CTLA-4 抗体能使 URSA 患者 IL-2、IFN-γ 的产生明显增加，IL-4 的产生明显减少，即 Th1 型细胞因子产生增加，Th2 型细胞因子产生减少；IFN-γ/IL-4 比值升高，这说明体外用 CTLA-4 抗体封闭 CTLA-4 可使 URSA 患者外周血的 Th1/Th2 细胞因子向 Th1 型细胞因子偏移。这可能是由于体外 CTLA-4 抗体封闭了协同刺激分子受体 CTLA-4，其负调节功能下降，在 CD28/CD80、CD86 这一协同刺激通路的作用下，T 细胞继续活化，并分泌更多的 Th1 型细胞因子，使得 Th1/Th2 平衡更向 Th1 偏移，不利于妊娠的维持。而 CTLA-4 抗体 10μg/ml 组产生的 IL-2、IFN-γ 和 IL-4 水平与 CTLA-4 抗体 1μg/ml 组间无统计学差异，说明在 CTLA-4 抗体 1μg/ml 时已基本阻断了该共刺激通路，故加大 CTLA-4 抗体浓度，作用效果并无明显变化。

综上所述，CTLA-4 在 T 细胞的活化、Th 细胞亚群的分化和母胎间免疫耐受的诱导中起着重要的作用。封闭 CTLA-4 可使 URSA 患者外周血的 Th1/Th2 细胞因子向 Th1 型细胞因子偏移，因此不封闭 CTLA-4 或外源性给予与 CTLA-4 同样作用的物质，如 CTLA4Ig，可能逆转 USRA 患者的 Th 细胞因子偏移，使其向 Th2 型细胞因子偏移，有助于 URSA 的治疗。CTLA4Ig 是采用基因重组方法构建的一种可溶性嵌合蛋白，与 CTLA-4 作用相同，可封闭 APC 上的 CD80、CD86 分子阻断共刺激通路[12]。现已有报道利用 CTLA4Ig 进行动物实验，治疗自身免疫性疾病和控制移植排斥反应，取得一定效果。CTLA4Ig 可在体内外有效阻断免疫反应并且能介导获得性免疫耐受，因此可望成为替代环孢素 A 的新一代高效无毒免疫抑制剂，其在临床上的应用前景可能将十分广阔，具体尚待进一步研究。

(通讯作者：李尚为，联系方式：四川大学华西第二医院生殖中心，邮编：610041；Email：xixi0201@gmail.com)

参 考 文 献

[1] Regan L and Rai R. Epidemiology and the medical cause of miscarriage[J]. Bailliere's Clin. Obstet Gynaecol, 2000; 14: 839-854.

(下转第 1307 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

T_S-max,提示心衰患者存在着左心室内收缩不同步,这与 Yu 等[5]的结论相似。Yu 等[7]对 QRS 波均<120ms 的 CHF 患者进行研究,以 T_S-SD>32.6ms 作为划分心室收缩不同步的标准,其中 43%的患者具有心室收缩不同步。心室内同步性指数 TSI 和各室壁壁内的同步性指数 RSI 结果显示,心衰组 TSI 较对照组明显增大,TSI 越大,提示心室内收缩越不同步,心室内活动越不协调、不对称。CHF 组 RSI 较对照组亦明显增大,室壁 RSI 越大,提示同一室壁内的不同步越明显。

综上所述,QRS 时限并不能准确反应心室运动的不同步性,而 TVI 技术能对心室不同步运动进行无创和定量评价,从而为临床更准确选择适合 CRT 的 CHF 患者提供了更为可靠的依据。

参 考 文 献

[1] John G.F. Cleland, Jean-Claude Daubert, Erland Erdmann, et al.The Effect of Cardiac Resynchronization on Morbidity and Mortality in Heart Failure[J]. N Engl J Med,2005;352:1539-1549.

[2] Jerry C.,Deborah L. John P.,et al. Biventricular pacing in congestive heart failure:a boost toward finer living[J]. Current Opinion in Cardiology,2002;17:96-101.

[3] F. Rouleau,M. Merheb,S. Geffroy,et al. Echocardiographic assessment of the interventricular delay of activation and correlation to the QRS width in dilated cardiomyopathy[J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2001;24(10):1500-1506.

[4] G.A. Bleeker,M.J. Schalij,S.G. Molhoek,et al. Relationship between QRS duration and left ventricular dyssynchrony in patients with end-stage heart failure[J]. J Cardiovasc Electrophysiol,2004; 15: 544-549.

[5] Yu CM,Zhang Q,Fung WH,et al. A novel tool to assess systolic asynchrony and identify responders of cardiac resynchronization therapy by tissue synchronization imaging [J]. J Am Coll Cardiol, 2005;45:677-684.

[6] Jeroen J. Bax,Gerardo Ansalone,Ole A. Breithardt,et al. Echocardiographic evaluation of cardiac resynchronization therapy:ready for routine clinical use? A critical appraisal[J]. J Am Coll Cardiol, 2004;44(1):1-9.

[7] Yu CM,Lin H,Zhang Q. High prevalence of left ventricular systolic and diastolic asynchrony in patients with congestive heart failure and normal QRS duration[J]. Heart,2003;89:54-60

[8] Morris-Thurgood JA,Turner MS,Nightingale AK,et al. Pacing in heart failure:improved ventricular interaction in diastole rather than systolic re-synchronization[J]. Europace,2000;2:271-275.

(上接第 1267 页)

[2] 邱丽华,林其德,洪 燕,等. 原因不明习惯性流产患者主动免疫前后 T 辅助细胞 1、2 型细胞因子变化的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2001;36(7):408-410.

[3] Ubaldi V,Gatta L,Pace L,et al. CTLA-4 engagement inhibits Th2 but not Th1 cell polarization[J]. Clin Dev Immunol,2003;10(1): 13-17.

[4] Zhu Ji, Zou Liping,Zhu Shunwei,et al. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) blockade enhances incidence and severity of experimental autoimmuneneuritis in resistant mice[J]. J Neuro Immunol,2001;115(5):111-113.

[5] Hill JA,Polgar K,Harlow BL,et al. Evidence of embryo-and trophoblast-toxic cellular immune response (s) in women with recurrent spontaneous abortion[J]. Am J Obstet Gynecol,1992;166(4):1044-1052.

[6] Mellor AL,Munn DH. Immunology at the maternal-fetal interface:lessons for T cell tolerance and suppression[J]. Annu Rev Immunol, 2000;18:367-391.

[7] Wang X,Ma Z,Hong Y,et al. Expression of CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 at the maternal-fetal interface in women with unexplained pregnancy loss[J]. Int J Gynaecol Obstet,2006; 93(2):123-129.

[8] 汪希鹏,林其德,马政文,等. 原因不明复发性流产患者细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 基因第一外显子 49 位点 A/G 基因多态性研究[J]. 中华妇产科杂志,2006;41(3):155-158.

[9] Collins M, Carreno BM. The B7 family of ligands and its receptors:new patheways for costimulation and inhibition of immune responses[J]. Ann Rev Immunol,2002;20:29.

[10] Kato T,Nariuchi H. Polarization of naive $CD4^+$ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation[J]. J Immunol,2000;164(7): 3554-3562.

[11] Oosterwegel MA,Mandelbrot DA,Boyd SD,et al. The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation[J]. J Immunol,1999;163(5): 2634-2639.

[12] Judge TA,Tang A,LM Spain,et al. The in vivo mechanism of action of CTLA-4Ig[J]. J Immunol,1996;156(6):2294-2299.