临床研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003622

高龄孕妇妊娠早期蜕膜及外周血免疫状态变化的研究

陈佞玄[1]，马晓辉[1]，李　莲[2]，杨再林[2]，易　萍[1]，徐　竞[1]

（1.重庆医科大学附属第三医院/捷尔医院，重庆　401120；2.重庆大学附属肿瘤医院血液肿瘤中心，重庆　400030）

【摘　要】目的：观察高龄妊娠女性早孕期母体免疫环境的变化。**方法：**收集2024年1月至4月于重庆医科大学附属第三医院行早期人工流产的女性外周血及蜕膜组织，分为高龄组和对照组，其中高龄组蜕膜标本16例、外周血12例，对照组蜕膜标本23例、外周血13例。通过流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群：$CD3^+$T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、$CD19^+$B细胞、自然杀伤（natural killer，NK）细胞以及蜕膜NK（decidual NK，dNK）细胞亚群：dNK1（$CD103^-CD18^-CD39^+$）、dNK2（$CD103^-CD18^+CD39^-$）、dNK3（$CD103^+CD18^+CD39^-$）。并采用化学发光免疫分析技术，检测外周血血清中的细胞因子。**结果：**相较于对照组，高龄组外周血中$CD3^+$T细胞、$CD19^+$B细胞、NK细胞数量和百分比无明显差异，但高龄组$CD4^+$T细胞占比[（40.25±6.40）%]较对照组[（35.29±3.95）%]增多（P=0.030），高龄组$CD8^+$T细胞占比[（21.83±6.20）%]较对照组[（26.69±4.76）%]减少（P=0.041）；2组的dNK占总淋巴细胞的百分比无明显差异，dNK1及dNK2细胞亚群在蜕膜NK细胞中占比无明显差异，但高龄组的dNK3亚群占比[（45.21±11.40）%]相较于对照组[（22.93±6.93）%]明显增多（P<0.001）。高龄组血清细胞因子白细胞介素4（Interleukin-4，IL-4）水平低于对照组（P=0.017），同时干扰素γ（Interferon-γ，IFN-γ）水平也低于对照组（P=0.011），肿瘤坏死因子α（Tumor necrosis factor-α TNF-α）水平高于对照组（P=0.014）。**结论：**高龄妊娠女性妊娠早期母体的免疫环境存在明显变化，dNK细胞亚群中dNK3细胞比例明显增高；外周血中存在$CD4^+$T细胞比例增多和$CD8^+$T细胞比例减少，IL-4和IFN-γ水平明显降低。

【关键词】高龄妊娠；母胎界面；免疫调节；淋巴细胞亚群；蜕膜NK细胞；细胞因子

【中图分类号】R714　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-12-22

Changes in immune status in decidua and peripheral blood during early pregnancy in women with advanced maternal age

Chen Ningxuan[1]，*Ma Xiaohui*[1]，*Li Lian*[2]，*Yang Zailin*[2]，*Yi Ping*[1]，*Xu Jing*[1]

（*1.The Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University（Jieer Hospital）；*

2.Department of Hematology-Oncology，Chongqing University Cancer Hospital）

【Abstract】*Objective*：To investigate the changes in maternal immune environment during early pregnancy in women with advanced maternal age. ***Methods*：**Peripheral blood and decidual tissue samples were collected from the women who underwent early induced abortion in The Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from January to April 2024，and the women were divided into advanced age group（16 decidual tissue samples and 12 peripheral blood samples）and control group（23 decidual tissue samples and 13 peripheral blood samples）. Flow cytometry was used to measure peripheral blood lymphocyte subsets（$CD3^+$T cells，$CD4^+$T cells，$CD8^+$T cells，$CD19^+$ B cells，and natural killer［NK］cells）and decidual NK（dNK）cell subsets including dNK1（$CD103^-CD18^-CD39^+$），dNK2（$CD103^-CD18^+CD39^-$），and dNK3（$CD103^+CD18^+CD39^-$）. Chemiluminescent immunoassay was used to measure serum cytokines in peripheral blood. ***Results*：**Compared with the control group，there was no significant difference in the number and percentage of $CD3^+$ T cells，$CD19^+$B cells，and NK cells in the peripheral blood of the senior group，but the percentage of $CD4^+$ T cells in the senior group［（40.25±6.40）%］was increased compared with that of the control group［（35.29±3.95）%］（P=0.030），and the percentage of $CD8^+$T cells in the advance age group［（21.83±6.20）%］was decreased（P=0.041）compared to the control group［（26.69±4.76）%］. There was no significant difference between the two groups in the percentage of dNK in total lympho-

作者介绍：陈佞玄，Email：8238554592@qq.com，研究方向：生殖免疫，妇科肿瘤的发病机制。

通信作者：徐　竞，Email：jingxu@hospital.cqmu.edu.cn。

基金项目：罗元恺滋肾育胎丸中青年科研基金资助项目（编号：20190812）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20241114.1824.024（2024-11-18）

cytes and the percentages of dNK1 and dNK2 subsets in decidual NK cells, but the advanced age group[(45.21±11.40)%] had a significantly higher percentage of dNK3 subset than the control group[(22.93 ± 6.93)%](*P*<0.001). Compared with the control group in terms of serum cytokines, the advanced age group had significantly lower levels of interleukin-4(IL-4)(*P*=0.017) and interferon-γ(IFN-γ)(*P*=0.011) and a significantly higher level of tumor necrosis factor-α(*P*=0.014). ***Conclusion***: There are significant changes in maternal immune environment during early pregnancy in women with advanced maternal age, with significant increases in the percentage of dNK3 cells in dNK cell subsets and the percentage of $CD4^+$T cells in peripheral blood and significant reductions in the percentage of $CD8^+$T cells and the levels of IL-4 and IFN-γ in the peripheral blood.

【Key words】advanced maternal age; maternal-fetal interface; immune regulation; lymphocyte subsets; decidual natural killer cells; cytokines

随着三孩政策的开放，高龄妊娠（≥35 岁）日益常见，但高龄女性妊娠失败率高[1-2]，以往的研究认为与卵巢储备功能下降导致雌孕激素水平下降、子宫内膜的容受性差（表现为子宫内膜分型较差、内膜血供不丰富、胚胎种植窗期孕酮水平低）等有关[3]。随着生殖免疫学的发展，母胎界面的免疫微环境作为受精卵着床、妊娠成功的一个重要影响因素备受关注。蜕膜作为一种构成复杂的局部免疫器官，在妊娠中发挥重要作用。研究表明，激素水平可以调节母胎界面的免疫应答，包括调节母胎界面自然杀伤（natural killer，NK）细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞等从而维持免疫耐受[4]。在这些免疫细胞中蜕膜 NK（decidual NK，dNK）细胞占据母胎界面总淋巴细胞的 70% 左右，是发挥主要免疫功能的细胞，调控母胎界面免疫状态，使胚胎免受母体免疫系统攻击，从而确保妊娠成功[5]。高龄女性的妊娠期雌孕激素水平较低，可能引起母体对免疫细胞的调节功能减弱，进而影响母胎界面的免疫微环境中的免疫细胞，尤其是 dNK 细胞，从而影响免疫耐受的维持，导致胚胎受到母体免疫攻击的风险增加。但目前高龄妊娠女性早孕期母胎界面 NK 细胞尤其蜕膜 NK 细胞亚群以及全身免疫环境的变化少报道。

因此，本研究重点关注高龄妊娠女性早孕期母胎界面蜕膜 NK 细胞亚群分布及其功能变化，同时分析外周血淋巴细胞亚群的变化及细胞因子水平，探索高龄孕妇母胎局部免疫微环境和全身免疫环境的特征，以分析高龄孕妇妊娠失败率高的可能原因，同时为后期寻找可能反映高龄妊娠失败率的临床标志物提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2024 年 1 月至 2024 年 4 月于重庆医科大学附属第三医院行早期人工流产的孕妇的蜕膜组织与外周血作为研究标本，蜕膜标本共收取 39 例，其中高龄组（年龄≥35 岁）16 例，平均年龄（38.4 ± 2.2）岁，对照组 23 例，平均年龄（24.7 ± 4.1）岁；外周血标本共收取 25 例，其中高龄组 12 例，对照组 13 例。2 组研究对象均满足以下条件：①本次妊娠均为自然受孕，且均因无生育要求，自愿要求行人工流产术；②孕周≤12 周；③本次妊娠期间无各类原因引起的异常子宫出血情况发生，无黄体酮等保胎药物使用；④术前 B 超检查提示胚胎发育正常，有胚囊、胚芽、心管搏动等。本研究经重庆医科大学附属第三医院伦理委员会审批（审批号：2021 年科伦审第（07）号），已征得所有研究对象同意。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 收集患者年龄、妊娠天数、术前孕囊大小、血常规白细胞（white blood cell，WBC）数目、红细胞（red blood cell，RBC）数目、血红蛋白（hemoglobin，HGB）、血小板数目（blood platelet，PLT）、淋巴细胞数目（lymphoblas，Lym）、淋巴细胞百分比（lymphoblas%，Lym%）及凝血功能相关指标如凝血酶原时间（prothrombin time，PT）、活化部分凝血活酶时间（activated partial thromboplastin time，APTT）、凝血酶时间（thrombin time，TT）、D-二聚体等数据。

1.2.2 仪器与材料 外周血淋巴细胞亚群检测采用 Wellgrow 公司的 EasyCell 流式细胞仪，试剂采用北京同生时代生物技术有限公司的六色淋巴细胞亚群分析试剂盒，包括 CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-Percp-Cy5.5/CD4-PC7/CD19-APC/CD8-APC-Cy7。蜕膜组织及外周血 NK 分群检测仪器采用 BD FACS canto plus，检测试剂组合为：CD103-FITC/CD56-PE/CD16-Pe-Cy7/CD19-Percp/CD18-APC/CD39-APC-Cy7/CD49a-BV421/CD45-V500/CD3-V605。其中 CD103-

FITC 为贝克曼库尔特流式细胞测定试剂，CD19-Percp 及 CD49a-BV421 购自美国 BD 公司，CD16-Pe-Cy7 购自河南凯普瑞生物技术有限公司，CD45-V500 及 CD56-PE 购自北京同生时代生物技术有限公司，余通道抗体购自美国 BioLegend 公司。血清细胞因子检测采用热景生物技术有限公司 C900 全自动化学发光免疫分析仪，试剂盒购自热景生物技术有限公司。

1.3 检测方法

1.3.1 外周血淋巴细胞亚群检测 采集乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）抗凝外周血 1 mL，混匀后取 50 μL 于流式管中，加入 20 μL 混合淋巴细胞亚群检测试剂，涡旋混匀后避光孵育 15 min，加入 450 μL 溶血素，涡旋混匀后避光孵育 10 min 后直接上机检测。

1.3.2 蜕膜组织 NK 细胞检测 收集患者蜕膜组织去除血凝块及绒毛组织后装于盛有生理盐水的标本袋中送至实验室，将适量蜕膜组织放入洗干净的研钵中，用干净的剪刀将组织尽可能剪碎，加入适量磷酸盐缓冲盐溶液（phosphate buffer saline，PBS）用钵杵轻轻研磨后，将研磨液收集于干净的管子中，37 ℃水浴箱孵育 5 min 后，1 800 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 PBS 重悬，37 ℃水浴箱再次孵育 5 min 后，1 800 r/min 离心 5 min，弃去上清液，重新加入 PBS 重悬后 1 800 r/min 离心 5 min，弃去上清液至 2 mL 左右，重悬混匀后使用纱网过滤，取滤液 100 μL 于干净的流式管中，将抗体逐一加入，涡旋混匀后避光孵育 15 min，向管中加入适量溶血素至液体透明，避光孵育 10 min，加入 PBS 洗涤，离心后弃去上清液至流式管中剩余液体约 450~500 μL 进行检测。

1.3.3 血清细胞因子检测 样本离心后上机检测白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、白细胞介素-2（interleukin-2，IL-2）、白细胞介素-2R（interleukin-2R，IL-2R）、IL-4（interleukin-4，IL-4）、白细胞介素-5（interleukin-5，IL-5）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、白细胞介素-8（interleukin-8，IL-8）、白细胞介素-10（interleukin-10，IL-10）、白细胞介素-17A（interleukin-17A，IL-17A）、干扰素 γ（interferon-γ，IFN-γ）、肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件及 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理、分析及作图，流式数据采用 kaluza 软件进行数据处理及分析。正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2 组间比较采用独立样本 t 检验。非正态分布的计量资料以中位数（四分位间距）[M_d（P_{25}，P_{75}）]表示，2 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 高龄组与对照组一般资料对比

收集的高龄组与对照组 2 组一般资料比较，除年龄外，差异无统计学意义（P>0.05），见表 1。

2.2 高龄孕妇血液学指标的变化

高龄组活化部分凝血活酶（APTT）时间较对照组短（P=0.038）；2 组其他指标（WBC、RBC、HGB、PLT、Lym、Lym%、PT、TT、D-Dimer）比较，差异无统计学意义（P>0.05），见表 2。

表 1 高龄组与对照组一般资料比较[M_d（P_{25}，P_{75}）]

组别	年龄（岁）	妊娠天数（d）	孕囊平均直径（mm）
高龄组（n=16）	38（37，41）	48.5（45，52）	17.67（14.92，19.83）
对照组（n=23）	24（21，27）	46（44，51）	16.00（13.84，20.34）
Z 值	5.270	0.788	0.944
P 值	0.001	0.431	0.345

表 2 高龄组与对照组血常规及凝血功能指标对比（$\bar{x} \pm s$）

组别	高龄组（n=16）	对照组（n=23）	t 值	P 值
WBC（×10^9/L）	6.66 ± 1.64	7.18 ± 1.85	0.900	0.374
RBC（×10^{12}/L）	4.20 ± 0.28	4.38 ± 0.35	1.660	0.105
HGB（g/L）	125.06 ± 13.75	131.96 ± 11.17	1.724	0.093
PLT（×10^9/L）	235.38 ± 55.99	259.74 ± 68.04	1.180	0.246
Lym（×10^9/L）	1.71 ± 0.39	1.82 ± 0.41	0.841	0.406
Lym（%）	26.19 ± 4.56	25.95 ± 4.69	0.163	0.872
PT（s）	12.43 ± 0.81	12.88 ± 0.88	1.596	0.120
APTT（s）	32.84 ± 2.58	35.24 ± 3.82	2.161	0.038
TT（s）	15.47 ± 0.80	15.75 ± 0.87	1.020	0.315
D-Dimer（μg/mL）	0.37 ± 0.12	0.38 ± 0.31	0.078	0.938

2.3 高龄孕妇早孕期外周血淋巴细胞亚群的变化

高龄组外周血中 $CD4^+$T 细胞数目高于对照组（P=0.030），$CD8^+$T 细胞数目低于对照组（P=0.041）；2 组其他指标（$CD3^+$总 T 淋巴细胞、$CD19^+$总 B 淋巴细胞及 NK 细胞等）对比差异无统计学意义（P>0.05），见表 3。

2.4 高龄孕妇早孕期蜕膜组织 NK 细胞及 NK 细胞亚群的变化

2018 年 Roser Vento-Tormo[6]等通过单细胞 RNA 测序确定了 dNK 细胞的 3 个主要亚群（dNK1、dNK2 和 dNK3），它们共同表达 CD49a，此外，dNK1 群特异的表达 CD39，dNK3 特异的表达 CD103，而 dNK2 和 dNK3 共同表达 CD18。本研究据此通过流式细胞术将蜕膜组织 NK 细胞分群，见图 1。比较高龄组和对照组蜕膜 NK 细胞之间的差异，发现 2 组蜕膜 NK 细胞总体数量和百分比无明显差异（P>0.05）。2 组蜕膜组织中 dNK1 及 dNK2 亚群含量也无明显差异（P>0.05）；高龄组蜕膜组织中 dNK3 亚群含量明显高于对照组（P<0.001），见图 2。

2.5 高龄孕妇早孕期外周血中细胞因子的变化

高龄组 IL-4（P=0.017）、IFN-γ（P=0.011）水平低于对照组，TNF-α 水平高于对照组（P=0.014）。而 IL-1β、IL-2、IL-2R、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17A 等因子水平在 2 组中差异无统计学意义，见表 4。

表 3 高龄组与对照组外周血淋巴细胞亚群对比（$\bar{x} \pm s$）

组别	高龄组（n=11）		对照组（n=13）		t 值	P 值
	绝对数（10^9/L）	百分数（%）	绝对数（10^9/L）	百分数（%）		
$CD3^+$细胞	1.194 ± 0.241	68.95 ± 5.49	1.280 ± 0.238	71.54 ± 5.67	1.130	0.270
$CD19^+$细胞	0.203 ± 0.101	11.17 ± 2.89	0.192 ± 0.076	10.72 ± 3.67	0.328	0.746
$CD4^+$细胞	0.694 ± 0.151	40.25 ± 6.40	0.630 ± 0.121	35.29 ± 3.95	2.325	0.030
$CD8^+$细胞	0.379 ± 0.134	21.83 ± 6.20	0.478 ± 0.128	26.69 ± 4.76	2.174	0.041
$CD4^+/CD8^+$	–	2.02 ± 0.86	–	1.37 ± 0.31	2.561	0.018
NK 细胞	0.318 ± 0.141	17.91 ± 5.22	0.301 ± 0.142	16.34 ± 4.93	0.755	0.458

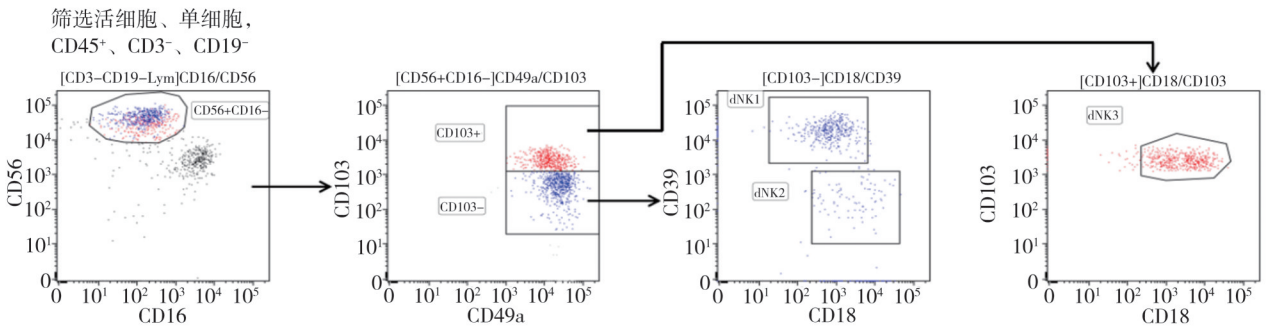
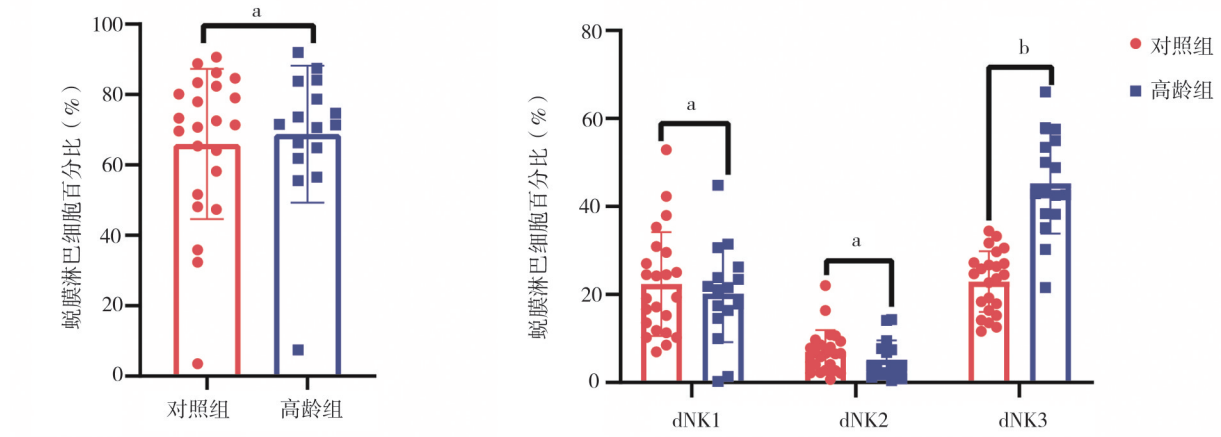


图 1 用于鉴定 dNK 亚群的门控策略



注：a，与对照组相比，P>0.05；b，与对照组相比，P<0.001

图 2 高龄组与对照组蜕膜 NK 细胞及其亚群比较

表4 高龄组与对照组外周血细胞因子含量对比[$M_d(P_{25},P_{75})$]

项目	高龄组（n=12）	对照组（n=11）	Z值	P值
IL-1β（pg/mL）	0.70（0.42，1.23）	0.41（0.35，0.65）	1.409	0.159
IL-2（pg/mL）	0.83（0.73，0.93）	0.79（0.71，0.90）	0.845	0.398
IL-2R（U/mL）	300（113，367）	259（200，274）	0.352	0.725
IL-4（pg/mL）	0.29（0.24，0.39）	1.20（0.44，3.74）	2.394	0.017
IL-5（pg/mL）	0.20（0.17，0.31）	0.19（0.17，0.24）	0.282	0.778
IL-6（pg/mL）	2.21（1.39，6.12）	3.63（1.48，25.84）	0.915	0.360
IL-8（pg/mL）	3.21（2.85，7.08）	3.45（2.97，6.34）	0.282	0.778
IL-10（pg/mL）	1.42（1.26，1.98）	1.31（1.17，1.49）	1.374	0.169
IL-17A（pg/mL）	0.73（0.44，1.37）	3.06（0.29，5.02）	1.127	0.260
IFN-γ（IU/mL）	0.31（0.13，0.44）	0.48（0.31，1.46）	2.538	0.011
TNF-α（pg/mL）	1.65（0.83，2.11）	0.75（0.70，0.84）	2.464	0.014

3 讨 论

随着孕妇年龄的增长，妊娠失败成为不容忽视的问题[7]。近年来，妊娠免疫学受到越来越多的关注。妊娠是一个独特的免疫过程，涉及胚胎植入、蜕膜化、胎盘形成和分娩等环节，这些过程与炎症和抗炎反应密切相关[8]。母胎界面是母体组织与胎儿成分直接接触的部位，是免疫应答的重要部位，正常妊娠期间，蜕膜内富含免疫细胞，包括巨噬细胞、NK细胞和调节性T细胞（regulatory T cells，Treg），其中NK细胞占70%[9]。研究表明，缺乏NK细胞会导致妊娠终止，其在早期妊娠维持中的重要性[10]。

有研究通过单细胞测序识别出dNK细胞的3个亚群（dNK1、dNK2、dNK3）；dNK1（$CD103^-CD18^-CD39^+$）在杀伤细胞免疫球蛋白样受体（killer cell immunoglobulin-lib receptor，KIR）和白细胞免疫球蛋白样受体B1（leukocyte immunoglobulin like receptors-B1，LILRB1）表达上较高，参与滋养层细胞的侵袭和免疫耐受；dNK2（$CD103^-CD18^+CD39^-$）和dNK3（$CD103^+CD18^+CD39^-$）则表达高水平的X-C基序趋化因子配体1（X-C motif chemokine ligand-1，XCL1），并且dNK3高度表达趋化因子配体5（C-C motif chemokine ligand，CCL5），显示其在母胎界面中的功能性相互作用[6,8,11,12]。本研究采用其分群方法检测妊娠女性的蜕膜NK亚群，并观察其与高龄的关系。结果发现，dNK1和dNK2在高龄妊娠组中与对照组中的表达差异无统计学意义，而dNK3的表达明显增加，提示其可能在母胎界面的免疫调节中发挥重要作用。dNK3的高水平XCL1可能促进免疫细胞的迁移，并参与胎盘发育和免疫平衡的调控。而CCL5的高表达则提示其在炎症调节和细胞间通讯中的关键角色；CCL5与其受体CCR1的相互作用可能调节绒毛外滋养层细胞的侵袭和血管生成，从而影响胎盘功能和母体-胎儿免疫适应性。dNK3在高龄妊娠女性早期妊娠中的明显增加，提示其在母胎界面免疫调节、血管重构和胚胎发育中的重要功能。基于高龄孕妇蜕膜dNK3亚群增高的检测结果，以及考虑到临床蜕膜组织检测的有创性，本研究希望能够在外周血中尝试可用于临床应用的检测指标，以期作为可能的生物标志物观察评估母胎界面免疫调节、血管重构及胚胎发育之间的关系。因此本研究尝试了外周血dNK3亚群检测，但未能检出，这可能由于外周血NK亚群具有与蜕膜NK不同的分子表达，这一结果也表明，蜕膜NK细胞在局部微环境中的特异性可能与外周血中的NK细胞特征存在明显差异。

在外周血淋巴细胞亚群的流式检测中，本研究发现高龄妊娠女性的外周血中$CD4^+$ T细胞含量明显高于正常年龄妊娠女性，而$CD8^+$ T细胞的含量则较低。该发现与1项关于复发性流产患者外周血淋巴细胞的研究结果相似[13]。根据表面标志物及功能的差异，T细胞中将$CD4^+$T细胞称作辅助型T细胞，$CD8^+$T细胞称作抑制型（细胞毒性）T细胞，相关研究已证实，在维持免疫耐受中，辅助型T细胞发挥至关重要的作用[14]。在母胎界面，妊娠早期蜕膜$CD4^+$T（decidual $CD4^+$T，dCD4$^+$T）细胞及$CD8^+$效应T细胞呈活跃状态，提供保护性免疫，诱导和维持母胎免疫耐受[15-19]。现有研究表明，正常妊娠外周血$CD4^+$T细胞及$CD8^+$T细胞均高于蜕膜组织，蜕膜

$CD4^+/CD8^+$的值小于外周血$CD4^+/CD8^+$的比值，结果对于母胎界面维持免疫耐受有益[18]。本研究的发现可能反映了高龄妊娠对免疫系统适应性造成的改变。$CD4^+$ T细胞数量的增加可能是为了满足妊娠期对免疫系统的需求，从而保护胎儿免受免疫攻击；而$CD8^+$ T细胞数量的减少则可能是为了避免过度免疫反应，以确保胎儿不受到负面影响；两者共同作用以维持母体与胎儿之间适当的免疫平衡，以确保妊娠成功。

本研究还发现，高龄妊娠中外周血细胞因子IL-4和IFN-γ的水平明显低于对照组，而TNF-α的水平则明显高于对照组。母胎免疫耐受的形成与辅助性T细胞1（T Helper 1 Cell，Th1）/辅助性T细胞2（T Helper 2 Cell，Th2）平衡有关，主要涉及Th1和Th2型细胞因子的分泌[17,20]。正常妊娠表现为Th2优势表达，Th1处于抑制状态，当Th1型细胞因子过度表达而缺乏抑制时，可能导致不良妊娠如流产、胎儿发育迟缓、死胎等[19]。根据文献报道，TNF-α作为Th1细胞因子，可以促进T细胞的免疫应答，释放引起炎症的细胞因子，表现为免疫杀伤，对着床、滋养细胞生长、胚胎发育和胎儿生存是有害的[21]。在本研究中高龄组TNF-α水平明显高于低龄组，提示高龄组患者外周血中Th-1处于优势表达，与妊娠失败相关；同样的IFN-γ作为Th1细胞因子，普遍认为起到免疫杀伤作用，但在本研究的实验结果中高龄组IFN-γ降低，有研究认为妊娠早期IFN-γ的增加有利于胚胎的贴壁和黏附[22]，因此早期妊娠中IFN-γ降低可能导致胚胎的贴壁和黏附成功率降低，这也可能作为高龄孕妇的妊娠成功率低的解释原因之一；IL-4作为Th2细胞因子，主要与B细胞增殖、成熟及抗体生成有关，主要功能是介导同种排斥反应的免疫耐受，抑制Th1反应，表现为免疫保护，防止对滋养细胞和胎儿的继发性损伤，使妊娠得以成功[23]，这与本研究的实验结果中高龄组IL-4水平降低一致，提示高龄孕妇的Th2免疫降低，妊娠失败率高。进行根据已有文献，TNF-α水平随着妊娠的进展而增加，IL-8在妊娠中期下降，IL-4水平无明显变化，而较低的妊娠中期IL-10浓度可能是先兆子痫的早期预测因子，促炎因子（如TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-8和IL-6）在子痫前期等病理妊娠过程中明显升高[20,22]。本研究的实验结果表明，在高龄妊娠女性中，免疫反应的调节可能更加复杂：尽管某些促炎因子（如TNF-α）处于较高水平，但其他促炎因子（如IFN-γ）却呈现下降趋势，这可能反映了高龄妊娠女性在免疫耐受与炎症反应之间的微妙平衡。

此外，本研究在对2组血液学指标的统计过程中发现，高龄妊娠女性凝血功能指标APTT尽管数值在正常范围，但较正常妊娠女性有缩短。既往研究表明，与未怀孕的女性相比，怀孕的女性患静脉血栓栓塞症（venous thromboembolism，VTE）的风险高出4～5倍，原因与血浆促凝血因子升高、抗凝活性降低、纤溶系统活性降低及血流动力学改变相关[1,24]。而在临床VTE风险评估量表中，年龄因素（≥35岁）作为一项独立因素存在。此外，一项关于凝血指标对于妊娠期易栓症患者的诊断价值的研究中表明，APTT缩短、PT缩短、TT延长、D-二聚体水平增加为妊娠期女性发生易栓症的独立危险因素[25]。那么，高龄妊娠女性妊娠早期外周血APTT较正常对照组短，也提醒我们对于这一特定人群在VTE风险的关注，同时提示血液高龄状态也与高龄孕妇妊娠失败率高相关，但仅APTT单一的实验指标检测具有其局限性，需要进一步研究证实高龄妊娠女性APTT缩短的潜在意义和机制。

综上，本研究发现，高龄妊娠女性早孕期母体的免疫环境存在明显变化，蜕膜NK细胞亚群中dNK3细胞明显增多；高龄妊娠女性外周血中存在$CD4^+$T细胞增多和$CD8^+$T细胞减少，IL-4和IFN-γ水平明显降低，以及TNF-α明显升高。提示高龄孕妇蜕膜局部免疫微环境和外周血免疫环境存在变化，外周血中检出的免疫细胞亚群和细胞因子的变化可能作为高龄女性的临床检验标志物，但其参与妊娠维持的重要性以及与妊娠结局的关系尚待进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] 王 玲，李燕滨，陈锦红，等. 高龄孕妇妊娠早期外周血自然杀伤细胞与先兆流产的相关性研究[J]. 发育医学电子杂志，2021，9（6）：443-448.

Wang L，Li YB，Chen JH，et al. Correlation between peripheral blood natural killer cells and preeclampsia in early pregnancy in elderly pregnant women[J]. Electronic Journal of Developmental Medicine，2021，9（6）：443-448.

[2] 程贤鹦，程 丽，王园园，等. 三孩高龄产妇妊娠特征、分娩方式及围生儿结局调查分析[J]. 中国优生与遗传杂志，2024，32（1）：

196-199.

Cheng XY, Cheng L, Wang YY, et al. Investigation and analysis of pregnancy characteristics, mode of delivery and perinatal outcome of three-child pregnant women[J]. Chinese Journal of Eugenics and Genetics, 2024, 32(1): 196-199.

[3] 王 丽，吕淑兰，毛文军，等. 高龄女性卵泡发育及子宫内膜容受性分析[J]. 中国妇产科临床杂志，2019，20(6)：502-505.

Wang L, Lü SL, Mao WJ, et al. Analysis of follicular development and endometrial tolerance in elderly women[J]. Chinese Clinical Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2019, 20(6): 502-505.

[4] 蒋国静，沈明洁，曾薇薇，等. 母胎界面的免疫-内分泌调控对早期妊娠影响的研究进展[J]. 中国医药导报，2017，14(21)：34-37，56.

Jiang GJ, Shen MJ, Zeng WW, et al. Research progress on the impact of immune-endocrine regulation at the mother-fetus interface on early pregnancy[J]. China Medical Journal, 2017, 14(21): 34-37, 56.

[5] 金 妮，芦 洁，王 明，等. 蜕膜自然杀伤细胞对孕早期母胎界面免疫微环境的影响[J]. 中国计划生育和妇产科，2021，13(7)：42-45.

Jin N, Lu J, Wang M, et al. Influence of meconium natural killer cells on the immune microenvironment at the maternal-fetal interface in early pregnancy[J]. China Family Planning and Obstetrics and Gynaecology, 2021, 13(7): 42-45.

[6] Vento-Tormo R, Efremova M, Botting R A, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans[J]. Nature, 2018, 563(7731): 347-353.

[7] Pinheiro RL, Areia A L, Mota PA, et al. Advanced maternal age: adverse outcomes of pregnancy, a meta-analysis[J]. Acta Med Port, 2019, 32(3): 219-226.

[8] Zhang X, Wei H. Role of decidual natural killer cells in human pregnancy and rlated pregnancy complications[J]. Front Immunol, 2021, 12: 728291.

[9] Espino A, El CH, Tabiasco J, et al. Innate immune response to viral infections at the maternal-fetal interface in human pregnancy[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 674645.

[10] Hussain T, Murtaza G, Kalhoro DH, et al. Understanding the immune system in fetal protection and maternal infections during pregnancy[J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 7567708.

[11] Xu X, Zhou Y, Wei H. Roles of HLA-G in the maternal-fetal immune microenvironment[J]. Front Immunol, 2020, 11: 592010.

[12] Papúchová H, Meissner TB, Li Q, et al. The dual role of HLA-C in tolerance and immunity at the maternal-fetal interface[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2730.

[13] 陈艺璇，唐相靖，崔金全. 外周血淋巴细胞亚群对早期复发性流产妊娠结局的预测价值[J]. 中国免疫学杂志，2019，35(22)：2765-2768，2773.

Chen YX, Tang XJ, Cui JQ. Predictive value of peripheral blood lymphocyte subsets for pregnancy outcome in early recurrent miscarriage[J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(22): 2765-2768, 2773.

[14] 余 甜，舒红英，杨小颀. 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.

Yu T, Shu HY, Yang XX. Progress of T-lymphocyte and subpopulation changes in patients with recurrent miscarriage[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 41(5): 661-667.

[15] Chen L, Li M, Sun F, et al. Eomesodermin regulate decidual CD4(+)T cell function during human early pregnancy[J]. J Reprod Immunol, 2021, 146: 103290.

[16] Fu B, Zhou Y, Ni X, et al. Natural killer cells promote fetal development through the secretion of growth-promoting factors[J]. Immunity, 2017, 47(6): 1100-1113.

[17] Hardardottir L, Bazzano MV, Glau L, et al. The new old $CD8^+$ T cells in the immune paradox of pregnancy[J]. Front Immunol, 2021, 12: 765730.

[18] Vacca P, Vitale C, Munari E, et al. Human innate lymphoid cells: their functional and cellular interactions in decidua[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1897.

[19] Lewis EL, Reichenberger ER, Anton L, et al. Regulatory T cell adoptive transfer alters uterine immune populations, increasing a novel MHC-Ⅱ(low) macrophage associated with healthy pregnancy[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1256453.

[20] Romanowska-Próchnicka K, Felis-Giemza A, Olesińska M, et al. The role of TNF-α and anti-TNF-α agents during preconception, pregnancy, and breastfeeding[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 1351-1402.

[21] 贾亦鸿，王丽丽，赵 敏. 肿瘤坏死因子-α、白介素-10及肿瘤坏死因子α诱导蛋白-2在母胎免疫调节中作用的研究[J]. 中国计划生育学杂志，2019，27(11)：1552-1554.

Jia YH, Wang LL, Zhao M. Study on the roles of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha-inducible protein-2 in maternal-fetal immunomodulation[J]. Chinese Journal of Family Planning, 2019, 27(11): 1552-1554.

[22] Madduru D, Dirsipam K, Goli M, et al. Association of reduced maternal sHLA-G5 isoform levels and elevated TNF-α/IL-4 cytokine ratio with recurrent pregnancy loss: a study on South Indian women[J]. Scand J Immunol, 2021, 94(4): e13095.

[23] Kaushal K, Ayushi, Sharma N, et al. Longitudinal changes in serum immune markers during normal pregnancy in a North-Indian population[J]. Am J Reprod Immunol, 2022, 87(5): e13531.

[24] Middeldorp S, Naue C, Köhler C. Thrombophilia, Thrombosis and thromboprophylaxis in pregnancy: for what and in whom?[J]. Hamostaseologie, 2022, 42(1): 54-64.

[25] 林蓉蓉，黄林凤，罗永慧，等. TEG、凝血指标和血小板相关参数对妊娠期易栓症患者的诊断价值[J]. 重庆医学，2022，51(21)：3654-3658，3664.

Lin RR, Huang LF, Luo YH, et al. Diagnostic value of TEG, coagulation indexes and platelet-related parameters in patients with thrombophilia during pregnancy[J]. Chongqing Medicine, 2022, 51(21): 3654-3658, 3664.

（责任编辑：周一青）