DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.026

文章编号:1000-5404(1999)10-0760-03

子宫内膜异位症不孕患者腹腔液IL-2活性及外周血T细胞亚群变化

胡 珊* 史常旭 (第三军医大学附属西南医院妇产科)重庆,400038

提 要 **目的**:探讨子宫内膜异位症导致不孕的免疫机制。**方法**:选择临床轻度子宫内膜异位症不孕患者,以多囊卵巢综合征及不明原因不孕的患者为对照。采取CTLL细胞株法检测腹腔液IL-2生物活性,以流式细胞分选技术检测外周血T淋巴细胞亚群的变化。**结果**:与对照组比较,轻度子宫内膜异位症不孕患者腹腔液IL-2活性显著增高,外周血CD_4^+T细胞数目增加,而CD_8^+T细胞变化不明显。**结论**:轻度子宫内膜异位症不孕患者腹腔免疫细胞处于高度活化状态、全身存在免疫异常。提示高水平IL-2与子宫内膜异位症导致不孕有关。

关键词 子宫内膜异位症;不孕症;白细胞介素-2;T淋巴细胞亚群

中图法分类号 R711.71 **文献标识码**:A

子宫内膜异位症(Endometriosis,EM)为生育期妇女最常见的疾病之一。不孕病人中25%~50%患有此病。但EM导致不孕的机制一直不十分清楚。近年的研究提出免疫机制可能参与EM不孕的病理生理过程。细胞因子作为细胞间相互作用的重要信使分子,引起广泛关注,认为细胞因子的异常很可能是造成不孕的直接原因。本实验以轻度EM不孕患者为研究对象,应用CTLL细胞株法检测了EM组及对照组腹腔液IL-2生物活性,应用流式细胞仪检测外周血T淋巴细胞亚群的改变。旨在了解EM不孕患者的免疫状态,探讨其在EM不孕中的意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

淋巴细胞分离液(上海试剂二厂,比重1.077±0.002)、RPMI1640培养液(Gibco公司)、IL-2依赖性CTLL细胞株(ATCC公司)、抗CD4-FITC及抗CD8-FITC单抗(北京邦定公司)

1.2 观察对象

于非行经期施行腹腔镜检查术。排除全身性疾患(包括感染),术前3个月内未使用过任何激素及免疫制剂。

EM组:25例,年龄24~34岁,平均26.5岁,均为因不孕经腹腔镜检查诊断为轻度EM的患者,其中单纯性EM 22例,合并慢性输卵管炎3例。

对照组:15例,年龄24~32岁,平均27.1岁。均为因不孕行腹腔镜检查的患者,12例诊断为多囊卵巢综合征,其中合并慢性输卵管炎4例;正常盆腔3例。

EM诊断依据:腹腔镜下依照Acosta[1]分类标准,轻度EM表现为:子宫直肠窝、膀胱反折腹膜、子宫骶韧带或盆腔腹膜有分散的泡状、息肉样及片状,呈红色、暗红色或紫色等新、老的异位内膜灶,卵巢及输卵管周围无粘连,无巧克力囊肿。

多囊卵巢综合征诊断依据:腹腔镜下见双侧卵巢增大或正常大小,包膜增厚呈珍珠色,表面光滑,卵巢包膜下可见多个滤泡,无排卵痕迹,部分患者卵巢表面可见血管。

慢性输卵管炎诊断依据:腹腔镜下示输卵管迂曲,轻度或中度肿大,伞端可部分或完全闭锁,与周围组织粘连,或输卵管积水,或输卵管粗细不均。输卵管美蓝生理盐水通液检查提示输卵管通而不畅或不通。本研究中慢性输卵管炎患者腹腔镜下盆腔形态、解剖正常,仅输卵管通液检查示一侧输卵管不通或通而不畅,另一侧通畅者。

1.3 实验方法

1.3.1 样本采集

1.3.1.1 收集腹腔液 常规局麻下行电视腹腔镜检查术。顺序观察盆腔,经操作孔插入导管,抽吸子宫直肠窝腹腔液5 ml,立即置预冷含肝素的离心试管内。4 ℃离心,3 000 r/min×5 min。将离心的上清分装,冻存于-20 ℃待测。

1.3.1.2 收集外周血及分离外周血淋巴细胞 腹腔镜检查手术当日取患者肘静脉血5 ml,肝素抗凝,室温(18~28 ℃)保存(<12 h)。常规方法分离外周血淋巴细胞。以无菌注射器抽取5ml淋巴细胞分离液,连接9号腰穿针,插入装有充分混匀血液的离心试管底部,渐渐注入分离液,立即置水平离心机,2 000 r/min×20 min。吸取血浆和分离液之间呈乳白色的淋巴细胞,至D-Hank's溶液内,离心洗涤2次,1 000 r/min×10 min,弃上清,管底淋巴细胞重悬于冻存剂中,-196 ℃液氮保存。

1.3.2 腹腔液IL-2活性的测定[2] 取生长良好的CTLL-2细胞,用RPMI1640洗涤2次,悬浮于含10%灭活小牛血清的完全RPMI1640培养液中,调整细胞浓度为1×10^5/ml。在96孔培养板中,每孔加入细胞悬液100 μl,再分别加入1∶2稀释的待测腹腔液上清及倍比稀释的标准品100 μl/孔,平行3孔。设10% FCS RPMI1640 100 μl+CTLL-2细胞悬液100 μl(1×

* 胡 珊,女,34岁,主治医师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10^5/ml)为阴性对照。培养物置 37 ℃ 5% CO_2 中培养 24 h，每孔加入 ^{3}H-TdR 1 μCi/ml，继续培养 6 h。收集细胞于玻璃纤维滤纸上，晾干后用计数仪检测细胞的 ^{3}H-TdR 掺入值(即 cpm 值)。

1.3.3　T 淋巴细胞亚群的检测　采用流式细胞技术，快速复温冻存的淋巴细胞(每一样本 2 份)，离心 2 000 r/min×5 min，弃上清。再以冷 PBS 离心洗涤 3 次。将细胞用含 5%FCS、0.01 mol/L PBS 配成 1×10^6/ml 悬液，按 1∶4、1∶2 分别加入抗 CD4-FITC、抗 CD8-FITC 单抗，4 ℃ 避光反应 30 min。离心后再以 PBS 洗涤 3 次，同时设置 PBS 为阴性对照。移入测试管中，流式细胞仪检测阳性细胞百分率。

1.4　统计学方法

采用 SPLM 软件，计算各指标的平均数与标准差，并作方差分析及相关性分析。方差不齐者，经变量代换后方差齐性，作方差分析。

2　结果

2.1　腹腔液 IL-2 活性

EM 组腹腔液 IL-2 活性显著高于对照组($P<0.05$)，见表 1。

表 1　EM 组及对照组腹腔液 IL-2 活性(min^{-1}，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The IL-2 activity in peritoneal fluid (min^{-1}，$\bar{x}\pm s$)

Groups	n	IL-2 activity
Endometriosis	25	262±147.0*
Control	15	146±78.9

*：$P<0.01$ *vs* control

2.2　外周血 T 淋巴细胞亚群分析

EM 患者 CD_4^+T 淋巴细胞百分率高于对照组，且具有统计学意义($P<0.05$)，见表 2。而 CD_8^+T 淋细胞百分率在 EM 组及对照组间未见明显差异。腹腔液 IL-2 活性显著增高的 EM 患者，其 CD_4^+T 淋巴细胞亦呈较高水平，相关分析表明两指标呈显著正相关($r=0.595$，$P<0.02$)。

表 2　EM 组及对照组外周血 T 淋巴细胞亚群百分率(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Percentage of T lymphocyte subpopulation in peripheral blood(%，$\bar{x}\pm s$)

Groups	n	CD_4^+	CD_8^+
Endometriosis	25	32.9±9.5*	25.3±5.4
Control	15	25.5±7.5	24.8±6.4

*：$P<0.05$ *vs* control

3　讨论

轻度 EM 为疾病早期，随着 EM 进展，出现腹腔免疫炎症、粘连及解剖结构的异常，不仅涉及免疫损伤，而且涉及机械性损伤，引起不孕。本实验选择轻度 EM 不孕患者为对象，其年龄在 24～34 岁，除不孕外，不伴其他系统疾患，也未见局部盆腔解剖结构异常及炎症体征，最大限度地避免了 EM 继发多因素对探讨不孕关系的影响。

IL-2 由活化 T 细胞产生，同时又是 T 细胞增殖的必要条件。对机体 IL-2 水平的检测，是评估机体免疫活化状态的一个敏感指标[3]。本实验采用敏感而可靠的生物活性法检测 IL-2 活性，显示轻度 EM 不孕患者腹腔液 IL-2 活性显著高于对照组，支持 Hill 的观点[4]。已知 T 细胞产生 IL-2，需要巨噬细胞(Mφ)分泌的 IL-1 及抗原两因素的共同作用。以往本科的研究已表明，轻度 EM 不孕妇女腹腔液 Mφ 存在质和量的变化，为高度活化的 Mφ。结合本实验，提示轻度 EM 不孕患者的腹腔局部 T、Mφ 等免疫细胞处于高度活化状态，能够分泌高水平的 IL-1、IL-2 等细胞因子。大量实验表明处于活化的免疫细胞如 Mφ 可吞噬精子和产生前列腺素从而干扰生理活动。体外实验表明重组 IL-1 抑制精子穿过人卵细胞透明带[5]，IL-2 可降低精子对仓鼠卵的穿透力[6]，从而导致不孕。本实验 FACS 分析表明，轻度 EM 不孕患者外周血 CD_4^+T 细胞(T_H)数目增加，相关分析表明它与腹腔液 IL-2 活性水平显著正相关，提示外周血 CD_4^+T 细胞数目增加代表活化 T_H 增加。文献[7]表明 IL-2 及活化 TH 促进 B 细胞产生抗自身抗体，影响胚胎种植等，从而介导 EM 不孕。综上所述，EM 不孕患者在疾病的早期即存在全身及腹腔局部免疫细胞活化和功能异常、细胞因子异常分泌等，它们可能通过多种途径在 EM 不孕中发挥重要作用。对 EM 导致不孕免疫机制的探讨将为治疗 EM 不孕开拓新的途径。

参考文献

1　Acosta A A, Buttrum V C, Franklin R R, *et al*. A proposed classification of pelvic endometriosis. Obstet Gynecol, 1973,42(1):19

2　Gillis S, Ferm M M, Smith K A, *et al*. T cell growth factor: Parameters of production and quantitative microassay for activity. J Immunol,1978,120(6):2027

3　Hill J A. Immunology and endometriosis. Fertil Steril, 1992,58(3):262

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4 Hill J A, Anderson B J. Lymphocyte activity in the presence of peritoneal fluid from fertile women and infertile women with and without endometriosis. Am J Obstet Gynecol, 1989, 16(4): 861

5 Sueldo C E, Kelly E, Swanson J A, *et al*. Effect of interleukin-1 on gamete interaction and mouse embryo development. J Reprod Med, 1990, 35(9): 868

6 Hill J A, Cohen J, Anderson D J. The effects of lymphokines and monolines of human sperm fertilizing ability in the zonafree hasmter egg penetration test. Am J Obstet Gynecol, 1989, 160(8): 1154

7 Bruce A L, Arthur J C, Stephen J C, *et al*. Intergins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. Fertil Steril, 1995, 63(3): 535

(收稿: 1999-04-05; 修回: 1999-08-11)

(编辑 刘 鹏)

The changes of interleukin-2 activity in peritoneal fluid and T lymphocyte subpopulation in peripheral blood of patients with endometriosis-induced infertility

Hu Shan, Shi Changxu (Department of Obsterics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the immune mechanism of endometriosis-induced infertility. **Methods**: The infertile women with mild endometriosis were chosen and those with polycystic ovarian syndrome and unidentified causes as controls. The activities of IL-2 in peritoneal fluid were determined with CTLL cell line method, and the changes of T lymphocyte subpopulation in peripheral blood was also determined with flow cytometry technique. **Results**: IL-2 activity was obviously increased in the infertile women with mild endometriosis compared with the controls. CD_4^+ T cell number in peripheral blood was increased while CD_8^+ T cell number had no evident changes. **Conclusion**: The peritoneal immune cells were in the state of hyper activated activation and there was dysimmunity in the infertile women with mild endometriosis. It suggest that IL-2 may play a role in endometriosis-induced infertility.

Key words endometriosis; infertility; interleukin-2; T lymphocyte subpopulation

文章编号: 1000-5404(1999)10-0762-02

对70%冷乙醇固定单细胞悬液保存时间的观察

Observation on preservation period of fixing single cell suspension in cold 70% ethanol

陈兆珍* (第三军医大学基础医学部中心实验室) 重庆, 400038

在用流式细胞仪对细胞进行周期分析时，为了防止细胞的自溶和破坏，通常要对样品进行固定。而使用最多也是最方便的固定液便是70%冷乙醇。但人们一般认为用此固定液固定的样品保存时间不宜过长，一般为1～2周[1]。我们对70%冷乙醇固定的样品进行了为期5个月的观察测定，固定5个月后和固定2 d的样品相比较，*CV*值及周期分布都无明显的变化，说明70%冷乙醇固定的样品至少可以保存5个月以上。

1 方法

将制备好的单细胞(BCaD-37人乳腺癌细胞)悬液的沉淀加0.05 ml PBS充分吹散。将此细胞悬液用吸管迅速加到事先准备好的70%冷乙醇中，放进4℃冰箱，保存备用。乙醇的体积视细胞的多少而定，一般5～10 ml为宜。

每次实验取固定样品若干，用PBS洗去固定液，加RNA酶37℃冰浴消化30 min，加碘化丙啶(PI)染色30 min后上机测定。流式细胞仪为美国BD公司生产的FACStar^{Plus}。从固定后第2天开始，分别在2 d、1、2、3、4、5个月共测6次。

(下转767页)

* 陈兆珍，男，42岁，实验师

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net