

# 淋巴细胞免疫治疗技术在生殖医学中的应用进展<sup>①</sup>

王巍,马海兰,蓝雪琴<sup>②</sup>

(广西桂平市人民医院生殖医学中心,广西 桂平 537200 E-mail:64wangwei@163.com)

**摘要:** 随着免疫遗传学及基础遗传学的发展,有越来越多研究发现,不明原因反复自然流产(unexplained recurrent spontaneous abortion,URSA)病因与母胎免疫调节紊乱有关。近年研究也进一步证实:URSA 患者夫妻间人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)相容性增强,致使妊娠妇女对胎儿父系同种抗原呈低识别或低反应,导致无法产生足够的可以使胎儿免受免疫打击而流产的保护性抗体即封闭抗体。而淋巴细胞免疫治疗可提高 URSA 患者免疫反应性,使其产生足够数量封闭抗体,避免胎儿父系抗原被母体免疫系统识别、杀伤和排斥,使妊娠获得成功。

**关键词:** 流产,自然;淋巴细胞;免疫疗法;封闭抗体

**中图分类号:** R714.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)06-0923-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.06.057

随着生殖免疫学研究进展,越来越多研究结果表明不明原因反复自然流产(unexplained recurrent spontaneous abortion,URSA)与母胎免疫调节紊乱有关。19 世纪 50 年代,Billingham 等<sup>[1]</sup>首先认为,胎儿作为一种半同种异体移植体,具备有不被母体免疫排斥的能力,但当母-胎界面的免疫耐受机制发生异常或障碍时,胎儿则会受到母体体液免疫应答的攻击受到排斥而流产。鉴于此理论,人们在如何对 URSA 进行有效治疗的问题上,开始致力于生殖黏膜免疫的研究,认为母体的体液免疫应答是影响妊娠延续及成功的重要因素。郑妍等<sup>[2]</sup>研究结果表明:URSA 患者夫妇间 HLA 相容性增加,导致母体对胎儿免疫识别异常,不能产生保护性抗体——封闭抗体(blocking antibodies,BA)即抗丈夫白细胞抗体(anti paternal leukocyte antibody,APLA),致使妊娠妇女在妊娠时对胎儿中来自父系的同种异体抗原表现出免疫低反应或免疫低识别,以致无法产生足够的 BA 来保护胎儿不被母体免疫排斥而最终流产。基于上述理论,国内外学者均认为:BA 缺乏是导致 URSA 发生的重要原因,淋巴细胞免疫治疗技术可通过对同种异体抗原(淋巴细胞的免疫应答,刺激患者产生足够的 BA 以及调节一系列免疫因子,抑制母-胎间细胞免疫排斥反应,使胎儿避免免疫排斥而使妊娠获得成功。

## 1 淋巴细胞免疫治疗技术与 URSA

反复自然流产(recurrent spontaneous abortion,RSA)是指与同一性伴侣连续发生自然流产 2 次或 2 次以上者,发生率为 1%~5%。通常把 RSA 患者经过病因筛查,包括:患者生殖器官解剖学、夫妇双方染色体检查、内分泌指标以及感染性病因排查等未发现异常者定义为 URSA 或称为原发性复发性流产,其发生率可高达 50%~60%<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4]</sup>表明:BA 缺乏是导致 URSA 发生的重要原因。妊娠是成功的半同种移植过程,妊娠妇女由于自身免疫系统产生一系列的适应性变化,对宫内胚胎移植体表现出免疫耐受而不发生排斥反应。母体血清中,存在着一种或几种能够抑制免疫识别和免疫反应的封闭因子即 BA。BA 可通过与母体反应性淋巴细胞结合,或通过与抗原结合,达到阻断细胞免疫反应的目的而使妊娠得以继续。如果 URSA 患者体内缺乏抗配偶的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 抗原的 BA,则会使母体对胎儿的免疫损伤作用高于对胎儿的免疫保护作用,

导致胎儿最终因遭受母体的免疫打击而被排斥致流产。

1981 年,英国的 Taylor 等<sup>[5]</sup>基于当时对 URSA 患者发病机制的研究,认为 URSA 患者体内缺乏 BA,因此首次大胆采用父方或无关第三方外周血淋巴细胞,对 4 名 BA 即 APLA 阴性的 URSA 患者进行淋巴细胞免疫治疗,治疗后有 3 人获得妊娠并成功分娩。Taylor 采用淋巴细胞免疫治疗,人为地强化了妊娠的免疫学维持机制,抑制母-胎间的免疫排斥反应,使妊娠获得成功。1993 年,国内林其德等<sup>[6]</sup>教授首次报道开展淋巴细胞免疫治疗技术,并获得了 87% 的治疗成功率。国内文献<sup>[7]</sup>也报道,URSA 患者经淋巴细胞免疫治疗后获活产率达 75%。由此证明淋巴细胞免疫治疗可提高 URSA 患者的免疫反应性,使其获得 BA,防止胎儿中的父系抗原被母体免疫系统识别和杀伤。从此,应用淋巴细胞免疫治疗技术治疗 URSA 的方法在全世界范围内开始被广泛使用,目前为止在全球已应用 20 多年。

## 2 淋巴细胞免疫治疗技术的原理

淋巴细胞免疫治疗技术是根据 Faulk 等提出的滋养细胞淋巴细胞交叉反应抗原(TLX)免疫保护学说,该学说认为,胎儿逃脱母体体液免疫排斥的作用机制主要与滋养细胞层膜抗原有关,妊娠的发生和延续必须依赖与母体对 TLX 的识别和免疫应答。妊娠的成功是母-胎免疫耐受的过程,妊娠免疫耐受机制主要表现为滋养细胞膜抗原——人类白细胞抗原(HLA)表达上调,CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤(NK)细胞亚群占优势,Th1/Th2 型细胞因子免疫反应平衡失调,Th2 型细胞因子水平升高。这些滋养细胞抗原,均可使母-胎界面保护性抗体-BA 表达水平上升及共刺激(CD18/CD86)占优势,可抑制母体免疫细胞对滋养层细胞的细胞毒作用,使滋养层细胞免遭免疫打击。妊娠妇女在妊娠过程中一旦某些环节发生异常或障碍,无法产生足够数量 BA 时,宫内胎儿将遭受免疫攻击而流产。韩岚等<sup>[8]</sup>研究发现:淋巴细胞免疫治疗能诱发妊娠免疫耐受,上调辅助性 T 淋巴细胞 Th2 型细胞因子 IL-4 水平,下调 Th1 型细胞因子,提高血中 CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平,发挥免疫抑制功效,诱导母体产生足够数量 BA,从而保护胎儿免受母体的排斥而使妊娠成功。华月琴等<sup>[9]</sup>研究也发现:URSA 患者血清 Th1 型细胞因子占优势,通过淋巴细胞免疫治疗可下调 Th1 型细胞因子,上调 Th2 型细胞因子,改变 Th1/Th2 型细胞因子

① 基金项目:广西贵港市科学研究与技术开发计划项目课题(1408020)

② 通讯作者,E-mail:xqlan66@sina.com

之间的平衡,增强 Th2 型细胞因子的免疫应答,由此通过同种异体抗原(外周血淋巴细胞)的免疫应答,促使患者产生 BA,抑制母一胎间的细胞免疫而使妊娠获得再次成功。杜焕清等<sup>[10]</sup>研究也证实:BA 可通过与母体反应性淋巴细胞结合,或直接与相应的抗原结合而阻断免疫反应,应用 URSA 患者丈夫或无关第三者外周血淋巴细胞对其进行皮内或皮下注射,可以刺激患者产生相应的 BA 并使体内 BA 水平提高,同时改变免疫细胞亚群构成比,促使 Th1 型细胞因子向 Th2 型细胞因子转化,从而达到保护胚胎免受母体体液免疫排斥而造成的流产,而且可以使再次妊娠成功率达到 70%~90%。

### 3 淋巴细胞免疫治疗技术的主要流程

3.1 URSA 患者妇科筛查 排除先天性发育异常和妇科器质性病变,检测夫妻双方染色体核型分析正常,性激素、甲状腺功能、空腹血糖及黄体功能正常,抗核抗体、重复性流产抗体系列(抗心磷脂抗体、抗子宫内抗体、抗卵巢抗体、抗精子抗体、抗透明带抗体、抗 HCG 抗体)阴性、优生四项(TORCH)阴性,封闭抗体阴性,排除其他病因,确定为 URSA 患者,拟进行淋巴细胞免疫治疗。治疗前夫妇双方均需签署知情同意书。

3.2 免疫原供者的选择 患者丈夫或无关第三个体经血液检测排除乙肝、丙肝、TORCH 感染,快速血浆反应(RPR)、HIV 检测阴性者,均可做为淋巴细胞提供对象。首选健康丈夫外周血淋巴细胞作为免疫原供者,若丈夫不宜作为免疫原供者,则选择健康的第三方淋巴细胞作为免疫原供者。有研究<sup>[11]</sup>表明:来源于丈夫或来源于无关第三个体的淋巴细胞以及第三个体淋巴细胞来源于男性或女性之间的疗效差异无统计学意义。

3.3 外周血淋巴细胞提取 抽取供者空腹肘静脉血 30~40 ml 用肝素抗凝,充分混匀后在无菌条件下,按 1:1 比例将抗凝血小心加到入外周血淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)之液面上,以 400 g 离心(半径 15 cm 水平转子)20 min,此时离心管中由上至下细胞分为四层:第一层为血浆层,第二层为环状乳白色淋巴细胞层,第三层为透明分离液层,第四层为红细胞层。用无菌巴氏吸管收集第二层细胞放入含注射用生理盐水 4~5 ml 离心管中,充分混匀后 400 g 离心 10 min,将沉淀如此反复洗涤 2 次,之后将沉淀用 0.8~1.0 ml 注射用生理盐水稀释定容,即得所需淋巴细胞悬液。

3.4 注射方法 以双侧前臂皮内注射为主。将收集到的淋巴细胞悬液约 0.8~1.0 ml,活细胞数为(60~100)×10<sup>6</sup>个/ml,于患者双侧前臂皮内注射 5~6 点位,首次注射后须观察 30 min。每隔 2 周重复 1 次,3 次为 1 个疗程,治疗时间避开月经期。疗程结束后 2 周复查封闭抗体,阳性者鼓励其在 3 个月内妊娠,如获妊娠则再次行 2~3 次免疫治疗直至孕 3 个月以上。对治疗 5 次后封闭抗体阴性者,可以继续治疗 2~3 次后再复查。

3.5 注意事项 ①技术操作过程中所使用的实验材料均应为无毒、无尘、无菌的一次性使用耗材;严格执行无菌操作,避免感染发生。②积极预防和及时处理过敏反应,结合孕早期的黄体支持治疗(HCG 和非合成黄体酮),注意对患者进行孕早期的精神心理调适。③告知患者此项技术的过程及技术风险:如存在目前医学无法预测的血源性传染病风险。④告知患者若超过 6 个月需要进行重复治疗者,则其免疫原供者需重新抽取血液检测,排除甲肝、乙肝、丙肝、RPR、HIV 均阴性者方可重新供血。

### 4 淋巴细胞免疫治疗技术的临床疗效

4.1 对 URSA 患者的疗效 据国内文献<sup>[12~13]</sup>报道,URSA 患者通过应用淋巴细胞免疫治疗技术治疗后再次妊娠成功率可

达 70%~90%。URSA 患者体内缺乏 BA,应用其丈夫或无关第三者的淋巴细胞对其进行治疗,可有效刺激母体产生足够数量 BA 及提高 BA 功能活性,通过调节母体的细胞及体液免疫功能,使母体对胎儿发生免疫耐受而呈封闭状态,从而提高了妊娠成功率。

4.2 对体外受精——胚胎移植中反复自然流产患者的疗效 在体外受精——胚胎移植过程中,胚胎对于母体来说属于半同种异体移植,其优质胚胎能否在宫内生长发育,除胚胎本身质量和子宫内腔容受性外,还与发生在母一胎界面滋养细胞与蜕膜免疫细胞之间的免疫失衡有关。张燕等<sup>[14]</sup>研究发现,对行体外受精——胚胎移植后反复自然流产患者,查其 BA,若呈阴性者,对其进行淋巴细胞免疫治疗,治疗后的妊娠成功率达到 60%。

4.3 影响因素 影响治疗成功率的关键因素包括:①治疗开始时间及间隔时间、次数、疗程等,应以患者 BA 能及时转阳为目标;②注射淋巴细胞密度:(60~120)×10<sup>6</sup>个/ml,一定量的淋巴细胞密度是保障患者 BA 及时转阳并获得满意疗效的保证;③孕妇的年龄和反复流产次数是影响治疗效果的因素之一;④注射部位皮肤反应轻重可作为判断免疫治疗效果的有效观察指标之一,第一次注射后 24~48 h 皮肤局部出现直径为 3~10 mm 的红润硬结,且几次注射后皮肤反应逐渐减轻者表明治疗效果良好。

### 5 淋巴细胞免疫治疗技术的安全性回顾

到目前为止,淋巴细胞主动免疫治疗技术在全球应用已有 20 余年,其主要的副作用为目前医学无法预测的血源性传染病(如肝炎、HIV 等)、输血反应、过敏反应、移植抗宿主反应等<sup>[15]</sup>。关于治疗后对母体免疫功能及传染病方面的影响,到目前为止未见有易感染和恶性肿瘤的报道<sup>[16]</sup>。关于对子代的影响,林其德等<sup>[17]</sup>经过 10 多年的观察,未见主动免疫对母体及子代产生明显不良反应,主动免疫的后代在出生体重、体格生长发育和智力,包括个人—社会、语言、精细动作—适应性、大运动 4 个能区方面与同龄儿童比较差异无统计学意义。由此表明:淋巴细胞免疫治疗技术是治疗 URSA 的一种安全有效、简便经济、可行的方法。

### 6 淋巴细胞免疫治疗技术的展望

据统计不同地区不同阶层不同年龄 URSA 发生率约为 15%~40%,其中发生于妊娠 12 周前者约占 62%。因 URSA 的发生难以预测,实际发生率可能更高,由于妊娠的反复丢失给患者本人及其家庭带来了许多生理和心理问题,因此 URSA 已成为危害女性生殖健康的重要原因。URSA 的发病原因复杂,涉及遗传学、免疫学、解剖学、内分泌学及感染等诸多因素,在现代技术诊断中,40%~80%患者流产原因不明,临床治疗效果差,是目前生殖医学上一个急需解决的问题。自 1981 年 Taylor 等创立应用淋巴细胞免疫治疗技术治疗 URSA 以来,该方法已被世界多中心采用。近年来,国内许多中心也开始探讨用健康丈夫或健康无关第三方外周血淋巴细胞对 URSA 患者进行免疫治疗,取得良好临床治疗效果。该技术的临床应用可明显改善患者机体的免疫状态,有效提高患者免疫反应性、降低流产率、提高再次妊娠成功率,而且疗效肯定、方法简便,可减轻患者流产的痛苦、减少治疗经济费用、对患者本身及其出生子代无影响。因此,淋巴细胞免疫治疗技术是当前治疗 URSA 及体外受精——胚胎移植中胚胎停育患者的有效方法。

### 参考文献:

[1] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired

- tolerance of foreign cells[J]. Nature, 1953, 172(4379): 603-606.
- [2] 郑妍,何庭宇,何茜冬,等. 人类白细胞抗原基因多肽性与不明原因反复流产免疫治疗妊娠结局的初步探讨[J]. 生殖与避孕, 2010, 30(3): 174-176.
- [3] 王晓艳,景军宁,王文弟,等. 淋巴细胞免疫治疗不明原因复发性流产妊娠结局分析[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2013, 39(1): 30-32.
- [4] 郭玉琪,李晓倩,张俊清,等. 复发性流产患者免疫治疗前后 T 淋巴细胞表达率与治疗效果的临床观察[J]. 中国计划生育学杂志, 2014, 22(1): 41-43.
- [5] Taylor C, Faulk WP. Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusions[J]. Lancet, 1981, 2(8237): 68-70.
- [6] 林其德,赵爱民,周涵春,等. 原发性习惯性流产的主动免疫治疗[J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31(6): 351-356.
- [7] 王文娟,邱丽华,林其德,等. 连续 2 次原因不明自然流产主动免疫治疗必要性的探讨[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(2): 122-124.
- [8] 韩岚,武美丽,柳萧芬,等. 主动免疫治疗对反复自然流产患者外周血 Th1 型/Th2 模式表达影响[J]. 中国妇幼保健, 2010, 17(25): 2423-2424.
- [9] 华月琴,陈瑞华,吴志南,等. 主动免疫治疗原因不明习惯性流产后外周血免疫球蛋白及 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(19): 2697-2698.
- [10] 杜焕清,左振伟,桓秀杰,等. 主动免疫治疗原因不明习惯性流产后细胞免疫功能的变化[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2009, 12(1): 80-81.
- [11] 林其德,金妍. 如何规范习惯性流产的病因筛查及治疗[J]. 实用妇产科杂志, 2005, 21(2): 66-68.
- [12] 张趁利,卢涛,庞桂芝,等. 淋巴细胞免疫治疗原因不明习惯性流产的临床疗效[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(13): 2127-2128.
- [13] 赵静,巩晓芸,胡泊,等. 淋巴细胞主动免疫治疗不明原因复发性流产 91 例临床研究[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(1): 77-80.
- [14] 张燕,陶淑贞,丁卫,等. 主动免疫治疗对体外受精-胚胎移植的反复性自然流产患者的临床应用价值[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(12): 1807-1810.
- [15] 李倩. 辅助生殖技术中免疫治疗的作用与安全性[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(8): 631-634.
- [16] 张晨光,朱琳琳,庞桂芝,等. 淋巴细胞免疫治疗习惯性流产的临床疗效分析[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(8): 739-741.
- [17] 林其德,邱丽华. 免疫型复发性流产的发病机制及诊断和治疗[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2009, 29(11): 1275-1278.

收稿日期: 2014-06-17; 修回日期: 2014-07-14

(上接第 922 页)

- [4] Warrington S, Bailey K, Boyce M, et al. Effects of rabeprazole, 20mg, or esomeprazole, 20mg, on 24h intragastric pH and serum gastrin in healthy subjects [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16: 1301-1307.
- [5] Groeneweg M, Moerland W, Queto JC, et al. Screening of subclinical hepatic encephalopathy [J]. J Hepatol, 2000, 32(5): 748-753.
- [6] 李素文,许建明,胡凯风,等. 轻微肝性脑病患者情况调查及相关危险因素分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(2): 176-179.
- [7] 中华医学会消化病学分会, 中华医学会肝病学分会. 中国肝性脑病诊治共识意见(2013 年, 重庆)[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(9): 641-651.
- [8] 李让钱,江宇泳,王宪波. 急性肝衰竭时肝性脑病发病机制的研究进展[J]. 天津医药, 2012, 40(1): 87-89.
- [9] 汤剑平,沈雪梅,胡川. 精氨酸联合门冬氨酸治疗肝性脑病疗效分析[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2012, 29(1): 75-76.
- [10] 王旷靖,宋汉明. L-鸟氨酸-L-门冬氨酸治疗肝硬化肝性脑病的 Meta 分析[J]. Chinese General Practice, 2012, 15(10C): 3451-3454.
- [11] 阮耀. 肝功能不全患者的临床用药 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(15): 136-137.

收稿日期: 2014-11-07