

文章编号 1006-8147(2014)06-0502-04

综述

# 免疫因素在胚胎着床中的作用及临床应用现状

闫惠惠<sup>1</sup>, 韩莹<sup>1</sup>, 综述, 张云山<sup>2</sup> 审校

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市中心妇产科医院生殖医学中心, 天津 300199)

关键词 免疫因素; 胚胎; 着床

中图分类号 R321

文献标志码 A

人类的繁殖以效率低下为特点。据统计, 30%的妊娠丢失发生在胚胎着床之前, 30%发生在胚胎着床后下一个月经周期错失之前, 10%为临床流产。现今体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术虽能够解决多种原因导致的不孕不育, 胚胎着床失败仍是限制其成功率的主要原因。胚胎着床包括定位(apposition)、黏附(adhesion)和穿透(penetration), 是胚胎与母体组织之间发生一系列复杂反应的过程。这一过程有两个目的: (1)在胎盘形成之前, 为胚胎提供生长发育所需的营养物质。(2)保护胚胎半同种异体移植免受母体免疫系统的攻击<sup>[1]</sup>。好的胚胎质量及子宫内膜容受性是胚胎成功着床的关键。随着生殖免疫学的发展, 免疫因素在胚胎着床过程中的作用受到越来越多关注。本文就与着床密切相关的免疫细胞、胚胎滋养层细胞表面分子进行阐述, 并介绍生殖免疫学在生殖医学临床中的一些应用现状。

## 1 胚胎着床过程中的免疫细胞

子宫内膜在卵巢分泌甾体激素的影响下发生周期性、特征性改变。排卵后孕激素升高使处于增生期的子宫内膜向分泌期转变, 这一过程即子宫内膜蜕膜化, 伴随子宫内膜间质细胞(stromal fibroblasts)转化为蜕膜细胞(decidual cells)、局部免疫细胞募集及螺旋动脉重塑等<sup>[2]</sup>。子宫内膜蜕膜化是妊娠过程中不可缺少的一步。蜕膜化的结果是子宫内膜在一个短暂的时间内, 即“着床窗口期”(window of implantation, WOI)能够接受胚胎植入。

子宫内膜蜕膜化时, 母体外周血免疫细胞被募集到内膜局部, 增殖分化成为蜕膜免疫细胞(decidual immune cells)。蜕膜免疫细胞不仅建立母胎免疫耐受(maternal immune tolerance), 还参与蜕膜化过程中蜕膜的发育和重塑<sup>[3]</sup>。蜕膜免疫细胞包括蜕膜NK细胞(uterine natural killer cell, uNK cell)、树突状细胞(dendritic cell, DCs)、巨噬细胞、T细胞和B

细胞。

1.1 uNK细胞 在蜕膜化过程中, uNK细胞占蜕膜免疫细胞的比例迅速上升到65%~70%<sup>[4]</sup>。uNK细胞在表型及生物学性能上不同于外周血NK细胞, 外周血NK细胞的表型以CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>为主, 相反uNK细胞的表型以CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>为主。uNK细胞的生理功能是通过重塑螺旋动脉, 增加母胎界面的血流量, 促进内膜间质细胞分化为蜕膜细胞, 并调控胚胎滋养层细胞侵入蜕膜组织、子宫肌层及子宫螺旋动脉<sup>[5-7]</sup>。uNK细胞可生成血管生长因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胎盘生长素(placenta growth factor, PLGF)、血管生成素-2(angiopoietin-2)等。此外uNK细胞还可分泌粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、干扰素 $\gamma$ (interferon, IFN- $\gamma$ )、转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor, TGF- $\beta$ 1)等细胞因子。uNK细胞的这些特性促进子宫内膜蜕膜化, 有利于胚胎植入。动物实验显示<sup>[8]</sup>, 老鼠体内uNK细胞的减少会引起子宫出现严重的异常情况, 子宫腺体数目减少、正常结构的子宫螺旋动脉闭塞等。在人类, 蜕膜细胞产生一些趋化因子如巨噬细胞源趋化因子(macrophage-derived chemokine)、单核细胞趋化蛋白3(monocyte chemotactic protein-3)和巨噬细胞抑制蛋白1 $\beta$ (macrophage inhibitory protein 1 $\beta$ ), 可能是趋化NK细胞渗入蜕膜组织的物质<sup>[9]</sup>。

1.2 巨噬细胞 蜕膜处巨噬细胞约占淋巴细胞总数的20%~25%, 是数量第二多的淋巴细胞<sup>[10]</sup>。巨噬细胞具有显著的表型可塑性, 可参与妊娠过程中多种生理反应, 如抵抗外来病原体、清除凋亡细胞及形成新生血管<sup>[11]</sup>。巨噬细胞通过其表面的toll样受体(toll-like receptors)和C型凝集素受体(C-type lectin receptors)识别病原微生物, 在蜕膜处发挥免疫防御功能。胎盘形成过程中, 巨噬细胞在螺旋动

作者简介 闫惠惠(1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 妇产科; 通信作者: 张云山, E-mail: tjzys@hotmail.com。

脉处聚集,通过清除凋亡的细胞及产生 VEGF、基质金属蛋白酶(metalloproteinases, MMPs)促进血管重塑,增加胎盘与子宫间血流交换<sup>[12]</sup>。

**1.3 树突状细胞** DCs 占蜕膜免疫细胞的 10% 左右,其表型主要为 CD11c<sup>+</sup>DC,与外周组织 DCs 相同。胚胎着床后,DCs 即在胚胎着床处的蜕膜大量积聚。Plaks<sup>[13]</sup>认为 DCs 通过分泌两种关键因子,可溶性血管内皮生长因子受体 1 (soluble FMS-like tyrosine kinase1, sFlt-1) 和 TGF- $\beta$ 1 直接调节蜕膜血管生成,促进新生血管成熟。在动物实验中,老鼠子宫内中 DCs 数量减少将严重影响胚胎植入过程,导致胚胎植入失败。此外,DCs 通过分泌 IL-15 促进 NK 细胞前体细胞的募集和成熟,协同 NK 细胞促进血管生成和重塑<sup>[14]</sup>。

**1.4 T 细胞** 子宫内中膜中的 T 细胞主要分布于功能层,包含丰富的 T 细胞亚群。CD4<sup>+</sup>T 细胞激活后按分泌细胞因子谱分为 Th1 型和 Th2 型两个功能亚群。Th1 型细胞介导细胞免疫,主要分泌 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$  等细胞因子。Th2 型细胞介导体液免疫,主要分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等因子。大量研究表明 Th1 型细胞介导的免疫应答是不利于妊娠的,而 Th2 型细胞介导的免疫应答可以改善这种状态,正常妊娠是一种 Th2 偏移现象<sup>[15-16]</sup>。Th1/Th2 平衡是维持正常妊娠的重要机制,但这一学说并不能解释所有妊娠成功现象。因此,Th1/Th2 平衡只能是妊娠成功或失败的一个标志,而不是原因。妊娠建立及维持有着更多更复杂的机制。

新近研究发现 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞还存在另外两种细胞亚群:调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg) 和 Th17 细胞。Treg 细胞是一类具有免疫抑制功能的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞,以表达转录抑制基因叉状头(forkhead box p3, Foxp3)为特征<sup>[17]</sup>。Treg 细胞通过分泌 IL-10、IL-35、TGF- $\beta$ 1 等细胞因子发挥免疫调节作用,保护胚胎免受母体免疫系统伤害<sup>[18-19]</sup>。一项实验对比复发性流产(recurrent pregnancy loss, RPL)妇女与行人工流产妇女的外周血及蜕膜组织中 Treg 细胞数量,发现 RPL 组中 Treg 细胞的数量均低于另一组<sup>[20]</sup>。这表明 Treg 细胞在母胎免疫耐受中发挥重要作用。Th17 细胞的主要效应因子是 IL-17。IL-17 是致炎性细胞因子,可生成多种细胞因子及趋化因子,如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、G-CSF、NO、前列腺素(prostaglandin, PG)和急性时相反应蛋白(acute phase reactive proteins, APRP),同时诱导基质金属蛋白酶的合成<sup>[21]</sup>。不明原因 RPL 妇女外周血及蜕膜组织中 Th17 细胞占淋巴细胞的比例要高于正常早

孕期的妇女<sup>[22]</sup>,提示过多的 Th17 细胞可能在不明原因 RPL 的发病中起重要作用。

这 4 类细胞之间即相互联系又相互影响,母胎界面处 Th1/Th2/Treg/Th17 平衡在胚胎着床中的作用受到学者广泛关注<sup>[23]</sup>。

**1.5 B 细胞** 蜕膜组织中 B 细胞的数量很少,目前关于 B 细胞如何参与胚胎着床过程的研究较少,研究热点集中于 B 细胞分泌的自身抗体如抗心磷脂抗体与病理妊娠的联系<sup>[24]</sup>,包括胎儿生长受限、早产及严重的子痫前期<sup>[25]</sup>。

## 2 胚胎滋养层细胞表面分子 HLA-G 与胚胎着床

在正常妊娠过程中,胚胎滋养层细胞是在母胎界面上惟一与母体直接接触的细胞,它们不表达经典的人类白细胞抗原 I (human leukocyte antigen, HLA-I)、HLA-II,而特异性地表达非经典 I 类分子 HLA-E、HLA-F、HLA-G。1990 年, Kovats 等首次在滋养层细胞上发现 HLA-G,由此展开了对 HLA-G 分布及功能的研究。HLA-G 以两种形式存在,即胞质可溶型 HLA-G (solution HLA-G, sHLA-G) 和膜结合型 HLA-G (membrane HLA-G, mHLA-G)。HLA-G 存在 7 种亚型,其中 HLA-G5 与胚胎着床的关系备受关注。

在胚胎着床过程中,HLA-G 可与 uNK 细胞、巨噬细胞、细胞毒性 T 细胞的受体,例如:白细胞免疫球蛋白样受体亚群 B1 (leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B1, LILRB1) 和杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4, KIR2DL4) 结合进而保护滋养层细胞免受这些细胞的攻击<sup>[26]</sup>。

滋养层细胞分解和重塑子宫内膜细胞外基质是胚胎着床过程中关键的一步。滋养层细胞的这种侵袭性受一些蛋白酶如基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、MMP9 和尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂(uPA)的调节。在植入的初始阶段 MMP2 起主要作用,妊娠 5~9 周时, MMP9 合成增加,继续促进滋养层细胞的侵入。uPA 也参与滋养层细胞的侵入行为,并能促进螺旋动脉的重塑。HLA-G5 通过与特异性受体 LILRB1 和 KIR2DL4 结合,增加 MMP 和 uPA 的表达水平及酶活性,刺激滋养层细胞的侵入。这一结合过程受细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERKs)的调节<sup>[27]</sup>。细胞外调节蛋白激酶是蛋白分解酶家族丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)中的一员。HLA-G5 通过磷酸化 ERKs 激活 ERK 路径,调控滋养层细胞的侵袭性。而添加 ERK 抑制物 U0126 和

PD98059 后,滋养层细胞这一侵袭行为即停止。此外,HLA-G 刺激蜕膜免疫细胞分泌细胞因子 IL-10、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ,在胎盘重塑中发挥作用<sup>[28]</sup>。

### 3 生殖免疫学在体外受精(IVF)中的应用

IVF-Worldwide.com 上一项网络调查结果显示<sup>[29]</sup>,在不孕症治疗过程中,69%的临床医生建议既往有 RPL 史的患者进行免疫学相关检查,与之相比,86%的医生建议行血栓形成倾向检查,79%的医生建议行双方染色体检查。对既往 2 次 IVF 治疗失败者,30%的医生考虑行免疫学相关检查,而既往 3 次失败者,只有 21%的医生这样做,这与临床医生对 IVF 治疗失败风险高的患者持放弃治疗的态度有关。临床医生对反复植入失败(repeated implantation failures, RIF)患者与 RPL 患者常用的免疫学检查相似,其中最常用的 4 种是抗心磷脂抗体、狼疮抗凝抗体、甲状腺过氧化物酶抗体、抗核抗体,而对 NK 细胞、HLA、Th1/Th2 的检查很少。该调查发现虽然生殖免疫学在人类生殖中的重要意义得到绝大多数医生(93%)认同,但由于生殖免疫学发展迅速,临床医生又缺乏专业指导和培训,现今对 RIF、RPL 和 IVF 治疗失败者的临床管理方法还未达成一致。

对免疫因素导致 RIF 者,常用的治疗有淋巴细胞免疫治疗、静脉应用免疫球蛋白、低分子量肝素和阿司匹林及糖皮质激素的应用。2012 年, Krigstein 等<sup>[30]</sup>首次报道根据外周血 NK 细胞及 uNK 细胞的数量决定使用泼尼松龙治疗 RIF 患者,并获得两次成功妊娠的病例。该女性患者 30 岁,不孕 5 年,因丈夫(33 岁)不明原因严重少弱精行 ICSI 治疗,平素月经规律,宫腹腔镜检查均无异常。前 3 次 ICSI 周期共 8 次移植,3 次流产 5 次未孕。深入检查发现该女性体内抗心磷脂抗体升高,第 4 次 ICSI 周期时,在治疗过程中使用低分子量肝素和阿司匹林,移植 2 次均未孕。第 5 次 ICSI 周期时,再次行宫腹腔镜检查仍无异常,通过对黄体中期的子宫内膜活检及外周血检验,该患者 uNK 细胞的比例 28%,外周血中 NK 细胞的比例是 19.1%,这两项值均高于生育力正常的女性。除低分子量肝素和阿司匹林,从治疗第 1 天开始加服泼尼松龙 20 mg/d,直至孕 12 周,低分子量肝素和阿司匹林继续用至孕 34 周,该女性成功妊娠并足月分娩一健康男婴。两年后,又以相似的治疗方法冻胚移植分娩一健康男婴。这是临床治疗 RIF 患者新的思路,但因缺乏对照研究,还不能下结论该患者成功妊娠原因是因为加用了泼尼松龙。

Neelam 等<sup>[31]</sup>做了一项 Meta 分析结果表明,RIF

的女性在 IVF/ICSI 治疗中使用低分子量肝素,与对照组(使用安慰剂或空白对照)相比,活产率(live birth rates)明显提高( $RR=1.79, 95\%CI=1.10\sim2.90, P=0.02$ ),植入率(implantation rates)没有明显变化( $RR=1.73, 95\%CI=0.98\sim3.03, P=0.06$ ),流产率(miscarriage rates)明显下降( $RR=0.22, 95\%CI=0.06\sim0.78, P=0.02$ )。

免疫治疗在辅助生殖技术中的应用是临床医生普遍关注的热点问题。当前的免疫治疗有效性和安全性仍需大样本前瞻性随机对照研究来证实。目前我们已经了解胚胎着床过程、建立维持母胎免疫耐受的机制及免疫异常对妊娠结局的影响等,但是如何将这些知识应用于临床,提高 IVF 治疗的成功率是目前生殖医学领域工作者面临的最大挑战。

### 参考文献:

- [1] Yoshinaga K. Two concepts on the immunological aspect of blastocyst implantation[J]. J Reprod Dev, 2012, 58(2): 196
- [2] Koot Y, Teklenburg G, Salker M S, et al. Molecular aspects of implantation failure[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(12): 1943
- [3] Zhang S, Lin H Y, Kong S B, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(5): 939
- [4] Lash G E, Robson S C, Bulmer J N. Functional role of uterine natural killer(uNK)cells in human early pregnancy decidua[Z]. 2010
- [5] Jy L, Lee M, Lee S K. Role of endometrial immune cells in implantation[J]. Clin Exp Reprod Med, 2011, 38(3): 119
- [6] Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(8): 584
- [7] Charalambous F, Elia A, Georgiades P. Decidual spiral artery remodeling during early post-implantation period in mice: Investigation of associations with decidual uNK cells and invasive trophoblast[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(2): 847
- [8] Ashkar A A, Di Santo J P, Croy B A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy [J]. J Exp Med, 2000, 192(2): 259
- [9] Jones R L, Hannan N J, Kaitu'u T J, et al. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(12): 6155
- [10] Kovats S, Main E K, Librach C, et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts[J]. Science, 1990, 248(4952): 220
- [11] Stout R D, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments[J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(3): 509
- [12] Nagamatsu T, Schust D J. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(6): 460
- [13] Plaks V, Birnberg T, Berkutski T, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice[J]. J Clin Invest, 2008, 118(12): 3954

- [14] Blois S M, Klapp B F, Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells[J]. J Reprod Immunol, 2011, 88(2): 86
- [15] Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, et al. Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm[J]. Immunol Lett, 2004, 92(3): 207
- [16] van Nieuwenhoven A L, Heineman M J, Faas M M. The immunology of successful pregnancy[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(4): 347
- [17] Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(6): 601
- [18] Viganò P, Gaffuri B, Somigliana E, et al. Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon- $\gamma$ [J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(10): 971
- [19] Collison L W, Workman C J, Kuo T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function[J]. Nature, 2007, 450(7169): 566
- [20] Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, et al. Decidual and peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases[J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(5): 347
- [21] Nakashima A, Ito M, Shima T, et al. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 64(1): 4
- [22] Wang W J, Hao C F, Yi Y L, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. J Reprod Immunol, 2010, 84(2): 164
- [23] Lee S K, Kim J Y, Lee M, et al. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67(4): 311
- [24] Zenclussen A C. Adaptive immune responses during pregnancy[J]. Am J Reprod Immunol, 2013, 69(4, SI): 291
- [25] Lockshin M D. Anticoagulation in management of antiphospholipid antibody syndrome in pregnancy[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(2): 367
- [26] Hunt J S, Langat D L. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(4): 462
- [27] Guo Y, Lee C L, So K H, et al. Soluble human leukocyte antigen-g5 activates extracellular signal-regulated protein kinase signaling and stimulates trophoblast invasion[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76023
- [28] Van der Meer A, Lukassen H G, van C B, et al. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(2): 123
- [29] Kwak-Kim J, Han A R, Gilman-Sachs A, et al. Current trends of reproductive immunology practices in in vitro fertilization (IVF) – A First World survey using IVF-Worldwide. com[J]. Am J Reprod Immunol, 2013, 69(1): 12
- [30] Krigstein M, Sacks G. Prednisolone for repeated implantation failure associated with high natural killer cell levels[J]. J Obstet Gynaecol, 2012, 32(6): 518
- [31] Potdar N, Gelbaya T A, Konje J C, et al. Adjunct low-molecular-weight heparin to improve live birth rate after recurrent implantation failure: a systematic review and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update, 2013, 19(6): 674

(2014-04-23 收稿)

.....

(上接第 501 页)

- [25] Medrek C, Ponten F, Jirstrom K A. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 12
- [26] Gottfried E, Kunz-Schughart L A, Weber A, et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types[J]. Scand J Immunol, 2008, 67(5): 453
- [27] Mahmoud S, Lee A, Paish E C, et al. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2012, 65(2): 159
- [28] Condeelis J, Pollard J W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis[J]. Cell, 2006, 124(2): 263
- [29] Sinha P, Clements V K, Bunt S K, et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response[J]. J Immunol, 2007, 179(2): 977
- [30] Grugan K D, McCabe F L, Kinder M, et al. Tumor-associated macrophages promote invasion while retaining Fc-Dependent anti-tumor function[J]. J Immunol, 2012, 189(11): 5457
- [31] Huang Y H, Yuan J P, Righi E, et al. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(43): 17561

(2014-06-26 收稿)