

中文摘要

子宫内膜自然杀伤细胞与女性不明原因不孕症的相关性研究

目的:

作为妊娠早期蜕膜中最丰富的白细胞,子宫内膜自然杀伤细胞(uterine Natural Killer cells, uNK cells)主导着蜕膜免疫格局,它们的数量及功能改变可能会影响生殖成功。本研究旨在通过研究 uNK 细胞与不孕症之间的关系,从而为女性不孕症的诊治提供新的见解与方法。

方法:

随机选取并收集 2022 年 10 月-2023 年 1 月在吉林大学第二医院行宫腔镜手术的不孕症女性部分子宫内膜组织,并同期随机收集健康已婚已育女性的适量子宫内膜组织,使用流式细胞技术检测其子宫内膜中 CD56⁺CD3⁻NK 细胞及 CD16⁺CD69⁺NK 细胞的百分比,获得的数据使用统计学软件 SPSS 26.0 分析,应用 ROC 曲线分析确定灵敏度和特异度, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结果:

1. 不孕组患者的年龄为 32.87 ± 4.02 岁,月经周期为 27.11 ± 2.63 天,经期持续时间为 4.87 ± 1.30 天,样本采集时间为月经周期的第 20.79 ± 2.26 天, BMI 为 $20.65 \pm 0.70 \text{ kg/m}^2$ 。对照组的年龄为 32.08 ± 3.37 岁,月经周期为 26.92 ± 3.29 天,经期持续时间为 5.67 ± 1.61 天,样本采集时间为月经周期的第 19.92 ± 2.71 天, BMI 为 $20.32 \pm 0.53 \text{ kg/m}^2$ 。以上一般资料两组之间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. 不孕组子宫内膜中 CD56⁺CD3⁻NK 细胞的百分比为 20.42(13.63,41.58),对照组子宫内膜中 CD56⁺CD3⁻NK 细胞的百分比为 8.20 (5.83,9.15),不孕组子宫内膜中 CD16⁺CD69⁺NK 细胞的百分比为 45.30 (22.20,72.83),对照组子宫内膜中 CD16⁺CD69⁺NK 细胞的百分比为 10.75 (3.58,17.28),不孕组子宫内膜中 CD56⁺CD3⁻NK 细胞的百分比、CD16⁺CD69⁺NK 细胞的百分比均显著高于对照组 ($P < 0.001$)。

3. CD56⁺CD3⁻NK%诊断 UI 时的 AUC 为 0.880 (95%CI: 0.760~0.963),灵敏度为 84.20%,特异度为 91.70% ($P < 0.001$); CD16⁺CD69⁺NK%诊断 UI 时的 AUC 为 0.862 (95%CI: 0.785~0.976),敏感度为 78.90%,特异度为 100.00% ($P < 0.001$),两者均有一定的预测价值。

结论:

1. 子宫内膜中 CD56⁺CD3⁻NK 细胞和 CD16⁺CD69⁺NK 细胞百分比的增加与不孕症具有相关性，它们可以作为女性不明原因不孕症的免疫风险标志物。

2. CD16⁺CD69⁺NK 细胞百分比的上调预示着某些不明原因不孕症患者局部免疫的激活，可以作为一个治疗靶点。

关键词：

自然杀伤细胞，子宫内膜，不孕症，细胞毒性，治疗

Abstract

Research on the correlation between uNK cells and Female unexplained Infertility

Objective:

Uterine natural killer cells (uNK cells), as the most abundant white blood cells in the decidua of early pregnancy, which dominate the decidual immune pattern, their number and functional changes may affect reproductive success. To study the relationship between uNK cells and infertility, so as to provide new insights and methods for the diagnosis and treatment of female infertility.

Methods:

Some endometrial tissues were randomly selected and collected from women with infertility who underwent hysteroscopic surgery at the Second Hospital of Jilin University from October 2022 to January 2023, and an appropriate amount of endometrial tissues were randomly collected from healthy married and fertile women during the same period, the percentage of CD56⁺CD3⁻NK cells and CD16⁺CD69⁺NK cells in their endometrium was detected by FACS. The data obtained were analyzed by statistical software SPSS26.0, ROC analyses were performed to determine the sensitivity and specificity, $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results:

1. In the infertile group, the age, menstrual cycle, menstrual duration, sample collection time and BMI were 32.87 ± 4.02 years, 27.11 ± 2.63 days, 4.87 ± 1.30 days, 20.79 ± 2.26 days and 20.65 ± 0.70 kg/m² respectively. In the healthy control group, the age, menstrual cycle, menstrual duration, sample collection time and BMI were 32.08 ± 3.37 years, 26.92 , 5.67 ± 1.61 days, 19.92 ± 2.71 days and 20.32 ± 0.53 days, respectively. There was no significant difference in the above general data between the two groups ($P > 0.05$);

2. The percentage of CD56⁺CD3⁻NK cells in the endometrium was 20.42

(13.63,41.58) in the infertility group and 8.20 (5.83,9.15) in the control group, the percentage of CD16⁺CD69⁺NK cells in the endometrium was 45.30 (22.20, 72.83) in the infertile group and 10.75 (3.58,17.28) in the healthy control group, the percentage of CD56⁺CD3⁻NK cells and CD16⁺CD69⁺NK cells in the endometrium of the infertile group were significantly higher than those of the healthy control group ($P < 0.001$).

3. The AUC of CD56⁺CD3⁻NK% is 0.880 (95% CI: 0.760~0.963), the sensitivity is 84.20%, and the specificity is 91.70% ($P < 0.001$); The AUC of CD16⁺CD69⁺NK% was 0.862 (95% CI: 0.785~0.976), the sensitivity was 78.90%, and the specificity was 100.00% ($P < 0.001$), Both have certainly predictive value.

Conclusions:

1.The increase of the percentage of CD56⁺CD3⁻NK cells and CD16⁺CD69⁺NK cells in the endometrium is related to infertility,and they may serve as immune risk markers for unexplained infertility in women.

2.The upregulation of CD16⁺CD69⁺NK cells' percentage suggests the activation of local immunity in some patients with unexplained infertility and could be a therapeutic target.

Keywords:

Natural killer cells ,Endometrium,Infertility, Cytotoxicity,Therapy

目 录

第 1 章 绪 论	1
1.1 研究背景	1
1.2 综述	3
1.2.1 介绍 uNK 细胞	3
1.2.2 uNK 细胞在妊娠中的作用	4
1.2.3 uNK 细胞与妊娠疾病的关系	7
第 2 章 材料与方法	11
2.1 一般资料	11
2.1.1 研究对象	11
2.1.2 纳入及排除标准	11
2.2 研究方法	11
2.3 主要试剂	11
2.4 主要耗材及仪器	12
2.5 实验方法	12
2.5.1 单细胞悬液的制备	12
2.5.2 NK 细胞 CD56、CD16、CD69 的表达检测	13
2.6 统计学分析	13
第 3 章 结 果	15
3.1 患者的一般临床特征	15
3.2 两组之间子宫内膜中 NK 细胞的比较	15
3.3 子宫内膜中 CD56 ⁺ CD3 ⁻ NK%、CD16 ⁺ CD69 ⁺ NK%对 UI 的诊断价值 ...	16

第 4 章 讨 论	18
4.1 实验结果分析	18
4.2 uNK 细胞可能导致 UI 的机制	19
4.3 免疫治疗和中药治疗	20
第 5 章 结 论	23
参考文献	24
作者简介及在学期间所取得的的科研成果	34
研究生期间发表论文情况	34
致 谢	35

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
NK cells	Natural Killer cells	自然杀伤细胞
UI	unexplained infertility	不明原因不孕症
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
IL-11	Interleukin-11	白介素-11
IFN- γ	Interferon- γ	干扰素- γ
Tim-3	T cell immunoglobulin and mucin domain-3	T细胞免疫球蛋白及黏蛋白 结构域分子 3
TGF- β	Transforming Growth Factor- β	转化生长因子- β
NCRs	natural cytotoxicity receptors	天然细胞毒性受体
KIRs	killer cell immunoglobulin-like receptors	杀伤免疫球蛋白样受体
ILT	immunoglobulin-like transcript	免疫球蛋白样转录物
MHC	major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
HLA	Human Leukocyte Antigen	白细胞抗原
PE	Preeclampsia	子痫前期
FGR	fetal growth restriction	胎儿生长受限
RSA	recurrent spontaneous abortion	复发性流产
RIF	repeat implantation failure	反复植入失败
ART	assisted reproductived techniques	辅助生殖技术

第1章 绪论

1.1 研究背景

不孕症是由各种复杂问题导致的生育障碍，但有多达 10%-30% 的病例^[1]即使在有周期、未避孕性生活至少 1 年的情况下，经过常规筛查不孕因素仍未能明确病因，这种情况被称为不明原因不孕症（unexplained infertility, UI）^[2]，其中，免疫机制的紊乱被认为可能参与了 UI 的发病机制，研究发现，作为母胎界面最丰富的白细胞的 NK 细胞在生殖失败中发挥着不可或缺的作用。

NK 细胞属于先天免疫系统的一部分，可以在事先接触病原体或刺激的情况下通过 NK 受体识别结合在靶细胞表面的特异性抗原 IgG 启动细胞溶解活性^[3]，它们与 T 细胞相似，但不表达 TCR-CD3 复合物^[4]。子宫内膜中的 NK 细胞可分为 2 个不同的群体：约 10% 是 CD56⁺CD16⁺，这与外周血相似又不完全相同，外周血 NK 细胞（peripheral Natural Killer cells, pNK cells）的表型主要是 CD56⁺CD16⁺，而 90% 的亚群为 CD56⁺CD16⁻表型^[5]，CD16 密度的差异导致这两种亚群功能的截然相反，因为 CD16 被证明能触发抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（Antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC）^[6]，CD16⁻NK 细胞可表达血管内皮生长因子-C（Vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C）的 RNA 信使和蛋白质^[7]，因此，CD16 表达的正常缺失被认为是一种促生育介质，正常情况下，子宫内膜中 CD56⁺CD16⁻NK 细胞亚群被认为在妊娠中发挥着优势作用。

对 NK 细胞与 UI 关系的研究，之前多集中在外周血中，研究普遍认为 CD16⁺pNK 细胞亚群的增加与胚胎植入率的降低、流产率的增高相关^[8]，然而存在的这些细胞数量并不能说明细胞的激活状态，这时 CD69 进入了人们的视线，CD69 是 NK 细胞最早、最强劲的激活标志之一，能够诱导细胞毒性和刺激细胞因子的产生^[9]，更有体外模型显示 CD69⁺NK 细胞亚群能够溶解滋养层细胞^[10]。研究发现外周血中 CD56⁺CD16⁺CD69⁺NK 细胞的增加与不良妊娠结局相关^[11]，于是有人猜测可以通过检测外周血中 NK 细胞的改变来反映局部子宫内膜免疫状态，许多生殖中心也将其计数作为一种诊断手段，但有的研究却发现外周血和子宫内膜之间这些细胞并没有相关性^[12]，并且它们的分布易受到外部动力学的影响，尤其是在外周血中^[13]，因此，如果能够

直接研究不孕症女性子宫内膜中 NK 细胞亚群的变化,可能会更有助于我们了解某些 UI 患者不孕的病因,从而帮助临床医师提供更加有效的治疗方法。

迄今为止,现有 uNK 细胞的相关研究始终没有一个标准化的方法,流式细胞检测技术近年来发展高速,它能够快速定量地展开细胞表面抗原分析、细胞分类及亚群分析,具有稳定性佳、重复性好,且精密度高的优势,能够更敏感地反映患者免疫功能的变化^[14]。

因此,本文通过病例对照研究的方法,使用流式细胞术检测处于分泌中期的实验组与对照组子宫内膜中 CD56⁺CD3⁻NK 细胞及 CD16⁺CD69⁺NK 细胞的百分比,探讨 uNK 细胞与女性不孕症的相关性。

1.2 综述

1.2.1 介绍 uNK 细胞

妊娠时,母体并未对作为半同种异体移植物的胚胎产生排斥作用是因为子宫通过母胎界面对其产生了适应性^[15]。母胎界面主要是由来自母体的蜕膜基质细胞(decidual stromal cells,DSCs)和蜕膜免疫细胞(decidual immune cell,DIC)及胚胎来源的绒毛外滋养层细胞(extravillous trophoblasts, EVT)组成,是两种异基因实体交流的共同基础^[16],其中 DIC 中位于中心的免疫细胞是 uNK 细胞^[15],CD56⁺CD16⁻亚群占多数,目前普遍认为它是一系列血管生成因子的有效分泌体,对生殖有利。除此之外,在人类子宫内膜中还发现了一种独特的 NK 细胞亚群,只存在于重复妊娠中,被定义为妊娠训练的蜕膜 NK 细胞(pregnancy trained decidual NK cells,PTdNKs),该亚群具有独特的转录组和表观遗传特征,在受到刺激时会产生更多的 IFN- γ 和 VEGF,从而更好地支持胎盘血管发育,这可能是初产妇较经产妇更易发生胎盘发育不良疾病的原因^[17]。

uNK 细胞从进入分泌期开始增殖,这与胚胎着床是同步的,它在黄体晚期达到最大值^[18],如果此时发生怀孕,在富含激素的粘膜微环境的影响下^[19],它将在着床部位扩张,在胚胎着床后分化为蜕膜 NK 细胞(decidual Natural Killer cells, dNK cells)^[20]。特别是在妊娠前三个月,数量达到高峰,约占总淋巴细胞的 70%,浸润并聚集在腺体和螺旋动脉的周围^[21],妊娠中期数量开始减少,在足月时只有少量存在^[22],这些预示着 uNK 细胞在胚胎植入及动脉重塑的妊娠关键时期起着不可或缺的作用。

1.2.1.1 uNK 细胞的来源

目前,uNK 细胞的来源尚不明确,但有学者提出了以下两种可能性:1) uNK 细胞可能来自 pNK 细胞的招募^[23],在趋化因子受体(CXCL12、CXCR3、CXCR4)^[24]、转化生长因子- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β)^[25]、IL-11 及 IL-15^[26]的共同作用下,CD56⁺CD16⁻pNK 细胞或 CD56⁻CD16⁺pNK 细胞转化为 uNK 细胞。2) Lynch 等^[27]证实了人子宫内膜中存在造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs),uNK 细胞可以在子宫内膜基质细胞分泌的 TGF- β 、IL-15^[25]的作用下于原位从局部造血祖细胞^[28](蜕膜基质中存在着 CD34⁺前体)或由来源于循环的造血祖细胞^[29]分化而来;另一个支持 uNK 细胞起源于局部干细胞的发现是趋化因子受体表达谱,

uNK 细胞表达高水平的 CXCR3 和中间水平的 CXCR4，然而，它们并不是在所有 uNK 细胞上都表达，这表明某些 uNK 细胞并不是通过趋化因子从外周血迁移而来，而是来自局部祖细胞^[30]。尽管 uNK 细胞的来源尚未明了，但无论其来源于子宫内膜中造血祖细胞的增殖还是 pNK 细胞的招募再分化，母胎界面内的微环境决定了这些 uNK 细胞具有和 pNK 细胞不同的独特的表型和功能特征，即较高的产生可溶性细胞因子的能力和较低的细胞毒性功能，这两者都是成功妊娠所必需的。

1.2.1.2 uNK 细胞的受体

NK 细胞作为针对病毒感染和恶性肿瘤的第一道防线是通过几种激活受体介导的，包括 NKG2D 和三种天然细胞毒性受体（natural cytotoxicity receptors, NCRs）：NKP30、NKP44 和 NKP46，这些受体在 pNK 细胞上高表达，而对于 uNK 细胞，活化受体 NKP46、NKG2D 及 NKP44、NKP30 的缺乏或低表达是典型的^[31]，它们主要表达杀伤免疫球蛋白样受体（killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs）、免疫球蛋白样转录物（immunoglobulin-like transcript, ILT）和 C 型凝集素受体，这些受体可与 EVT 表达的四种主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC）结合，包括一个经典 I 类分子（Human Leukocyte Antigen-C, HLA-C）和三个非经典分子（HLA-E、HLA-F 和 HLA-G），这种结合使胚胎逃脱 NK 细胞的杀伤力，实现怀孕所需的免疫稳态^[32]，同时它们之间的相互作用是决定早期胎盘形成成功的关键因素^[33]。然而，在生殖失败的女性中，伴随着 NK 细胞数量和功能的改变，某些受体的表达受损。因此，uNK 细胞功能受体的异常调节可能有助于理解 UI 女性的 NK 细胞功能障碍的潜在病理。

1.2.2 uNK 细胞在妊娠中的作用

uNK 细胞在卵巢激素、各种细胞因子、趋化因子等的影响下，于妊娠时发生分化、招募并聚集，并通过受体与 EVT 的配体相结合发挥着独特的功能，对这些功能的详细研究，将有助于我们更好地了解它们导致妊娠相关疾病发生的机制。

1.2.1.1 促进胎儿免疫耐受

首先，uNK 细胞可以通过和母胎界面其他免疫细胞相互作用来达到该目的。成功妊娠被认为是 Th1-Th2 协同现象，随着妊娠的开始，在 uNK 细胞的协助下，局部子宫内膜免疫系统转变为由具有免疫营养作用的 Th2 细胞

主导^[18]。除了 Th1/Th2 细胞外，Th17/Tregs 之间向 Tregs 的偏向同样会促进母体对胎儿的耐受及成功怀孕。一方面，dNK 细胞增加局部 Tregs 的丰度，导致 IL-10、TGF- β 、细胞毒 T 淋巴细胞抗原 4（Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4，CTLA-4）上调，促进子宫内保护微环境的形成^[18]，另一方面，通过分泌大量 IL-17 发挥促炎反应的 Th-17 细胞也可由 dNK 细胞分泌的 IFN- γ 抑制进而促进免疫耐受^[34]。巨噬细胞作为母胎界面数量仅次于 NK 细胞的淋巴细胞^[35]，与 dNK 细胞之间交互作用分泌 IFN- γ ，促使 CD14⁺巨噬细胞产生吲哚胺 2,3 二氧化酶（indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO），诱导 Tregs 的产生，形成免疫耐受，M2 型巨噬细胞还可分泌 TGF- β ，显著降低 NK 细胞的杀伤作用^[36]。在树突状细胞方面，研究发现不成熟的树突状细胞可通过表达低水平的 MHC-I 类分子（如 HLA-G）和 NK 细胞的 KIR2DL4、ILT2 相互作用，阻抑 NK 细胞溶解活性，保护胎儿免受母体的攻击^[37]，此外，它也可在 dNK 细胞分泌的 IFN- γ 的作用下，表达 IDO，进而促进 Tregs 的产生^[38]。

其次，其余一些免疫调控因子也在这一过程发挥着重要作用。Tim-3 由 Li 等^[39]首次于 dNK 细胞上检测到，与 Tim-3⁺细胞相比，Tim-3⁺dNK 细胞能够表达更多的 Th2 型细胞因子，细胞毒性较低。同时，它还通过和滋养层细胞分泌的半乳糖凝集素-9（Galectin-9, Gal-9）相互作用，诱导 pNK 细胞向 dNK 细胞表型转化^[33]。Huang 等^[40]在健康孕妇的蜕膜组织中发现 microRNA-30e 的表达上调，该物质可通过增加 KIR2DL1 的表达和降低 NKG2A 的表达来抑制 dNK 细胞的细胞毒作用，参与母胎界面免疫耐受。另一方面，dNK 细胞上的 CD94/NKG2A 与 EVT 表达的 HLA-E 相互作用，从而限制 NK 细胞毒性^[41]。同样，HLA-G 显示出与受体 ILT2 和 ILT4 结合的高亲和力，这种结合之间的相互作用被认为可以抵消 KIR2DL4 的激活信号^[42]，使 NK 细胞的活化减少，抑制 NK 细胞溶解活性，保护胎儿免受母体免疫系统的攻击^[18, 37]。

1.2.2.2 调控滋养细胞侵袭和螺旋动脉重塑

dNK 细胞数量的大量涌入与滋养层侵袭期的一致性及其与 EVT 于妊娠早期在母体动脉附近的定位均表明这些细胞和滋养层的侵袭及血管重塑、胎

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/745143014212011123>