

妊娠期肝内胆汁淤积症患者外周血中维生素 D 受体
与 Th1/Th2 型细胞因子的变化

喻莲香 黄小霞[△]

(广州市花都区妇幼保健院 广东 广州 510800)

摘要 目的：研究妊娠期肝内胆汁淤积症患者外周血中维生素 D 受体的表达与 Th1/Th2 型细胞因子干扰素- γ / 白细胞介素-4 (IFN- γ /IL-4) 的变化关系,探讨 ICP 发病机制。方法：选取 ICP 患者 31 例 (ICP 组),孕周相匹配的正常孕妇 31 例 (正常对照组)。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA 法),检测两组孕妇血清中 Th1 型细胞因子(IFN- γ)和 Th2 型细胞因子(IL-4)的水平;采用实时荧光定量逆转录-多聚酶链反应 (qRT-PCR),检测两组孕妇外周血单个核细胞维生素 D 受体 (VDR) mRNA 的表达水平,采用 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为内参,根据相对定量公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析 VDR mRNA 的表达水平。结果：(1) ICP 组外周血清中 IFN- γ 的浓度[(230.93 $\pm$ 36.04)pg/ml]明显高于正常对照组[(138.37 $\pm$ 25.08)pg/ml],差异有统计学意义($P<0.01$)。ICP 组血清中 IL-4 浓度[(9.99 $\pm$ 3.19)pg/ml]和正常对照组[(8.58 $\pm$ 2.43)pg/ml]比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。ICP 组 IFN- γ /IL-4 比值(24.56 $\pm$ 6.91)高于正常对照组(17.13 $\pm$ 4.84),差异有统计学意义($P<0.05$)。(2) ICP 组外周血单个核细胞维生素 D 受体 mRNA 的表达明显低于正常对照组($P<0.01$),正常对照组 VDR 的表达定义为 1.0,ICP 组的表达量为 0.4。(3) ICP 组外周血中 VDR 的表达水平与 IFN- γ 浓度呈明显负相关($r=-0.833, P<0.01$),与 IL-4 浓度无明显相关($r=-0.109, P>0.05$),与 IFN- γ /IL-4 比值呈负相关,但相关性不强($r=-0.356, P=0.049<0.05$)。结论：ICP 患者外周血 Th1/Th2 型细胞因子平衡由 Th2 向 Th1 偏移,可能与 ICP 孕妇外周血单个核细胞 VDR 的表达减少有关。

关键词 维生素 D 受体 胆汁淤积 肝内 妊娠并发症 T 淋巴细胞亚群

中图分类号 R714.25 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 08-1533-04

The Diversification of Vitamin D Receptor and Th1/Th2 Cytokines in
Peripheral Blood of Patient with Intraheptic Cholestasis of Pregnancy

YU Lian-xiang¹, HUANG Xiao-xia[△]

(Department of Gynecology and Obstetrics, Huadu Women and Children's Hospital and Health institute, Guangzhou 510800, China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship between the expression of the vitamin D receptor (VDR) and Th1/Th2 cytokines (IFN- γ /IL-4) profile in the peripheral blood of patients with intraheptic cholestasis of pregnancy (ICP),so as to investigate the pathogen of ICP. **Methods:** There were 31 pregnant women with intraheptic cholestasis of pregnancy and 31 normal pregnant women in the study. The T helper cell type-1 (Th1) cytokine [interferon-gamma (IFN- γ)] and T helper cell type-2 (Th2) cytokine [interleukin-4 (IL-4)] in the serum of patients with ICP (ICP group)and normal pregnant women (normal group,NP) were measured by enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA);The vitamin D receptor (VDR) expression in the peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) was examined by real time fluorescent quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time qRT-PCR) in the two groups. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogease (GAPDH) was used as an endogenous reference. VDR expression level were used by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method in the two group. **Results:** (1)The concentrations of IFN- γ in ICP group [(230.93 $\pm$ 36.04)pg/ml] was significantly higher than those in normal group [(138.37 $\pm$ 25.08)pg/ml]($P<0.01$). But there were no significant differences in the concentrations of IL-4 between ICP group [(9.99 $\pm$ 3.19)pg/ml] and normal group [(8.58 $\pm$ 2.43)pg/ml] ($P>0.05$).The IFN- γ /IL-4 ratio in ICP group(24.56 $\pm$ 6.91) was higher than those in normal group(17.13 $\pm$ 4.84) ($P<0.05$). (2)VDR expression in the peripheral blood mononuclear cells was found to be significantly lower(0.4) in all patients with ICP than that in normal pregnancy (1.0), $P<0.01$.(3)In ICP group the correlation between the expression of VDR and the levels of IFN- γ was significantly negative ($r=-0.833, P<0.01$); the correlation between the expression of VDR and the levels of IL-4 was not significant($r=-0.109, P>0.05$); the correlation between the expression of VDR and IFN- γ /IL-4 ratio was negative, but the relation was not significant ($r=-0.356, P=0.049<0.05$). **Conclusions:** The cytokine profile shift from Th2-type to Th1-type in the peripheral blood, which may relate to the reduced expression of VDR in the peripheral blood mononuclear cells of the patients with ICP.

Key words: Vitamin D receptor; Cholestasis; Intraheptic; Pregnancy complication; T-lymphocyte subsets

Chinese Library Classification(CLC): R714.25 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2012) 08-1533-04

[△]通讯作者 黄小霞,电话 13450256420

E-mail: 37029308@qq.com

(收稿日期 2011-09-10 接受日期 2011-10-10)

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠期特有的肝脏疾病,是以妊娠后期皮肤瘙痒为主要症状,伴胆酸、肝酶等生化异常^[1],主要危及围生儿,引起早产、宫内窘迫、新生儿窒息、围生儿病死率高。ICP的这些妊娠结局,已引起产科临床的关注^[2]。2004年1月至2008年12月五年间在我院住院分娩的孕妇中,ICP患者占7.54%,ICP胎儿窘迫的发生率为32.2%,而死胎、死产率为3.03%,占所有死胎、死产的7.34%。但其病因及发病机制不明。国内外大量研究表明,ICP的发生与免疫功能的改变有关^[3]。正常妊娠母体免疫系统是一种“Th2现象”,Th1向Th2偏移,Th2的免疫占优势,避免Th1型细胞因子参与的细胞免疫,使胎儿免受母体排斥^[4]。然而,有研究表明ICP患者体内Th1/Th2型细胞因子平衡已由Th2向Th1方向偏移,细胞免疫功能增强,导致胚胎组织易被母体排斥^[5]。近年来研究表明,维生素D的活性物质1,25-(OH)₂D₃作为一种免疫调节激素,与维生素D受体(VDR)结合后发挥生物作用^[6],主要作用的靶细胞是Th1细胞,其作用为直接抑制Th1细胞分泌IFN- γ ^[7],而抑制Th2细胞分泌IL-4的作用较弱^[8],可使Th细胞由Th1细胞向Th2细胞偏移^[9],符合正常妊娠母体“Th2现象”。

有文献报道外周血中1,25-(OH)₂D₃的浓度在ICP孕妇与孕周相匹配的正常孕妇两者间比较,未见明显改变^[10],但1,25-(OH)₂D₃的生物学效应是通过VDR介导而实现,那么ICP孕妇与正常孕妇在VDR的表达方面是否存在差异,未见相关文献报道。Th1型细胞因子有IFN- γ 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-2等,Th2型细胞因子有IL-4、IL-5、IL-10等^[5,11]。故本研究检测ICP患者外周血清中Th1/Th2型细胞因子(IFN- γ /IL-4)的浓度,同时研究其外周血单个核细胞维生素D受体的表达,初步探讨维生素D受体的表达变化与妊娠期肝内胆汁淤积症的关系,进一步阐明ICP的发病机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象和分组

选择妊娠期肝内胆汁淤积症患者(ICP组)31例,均为2008年8月-2009年1月广州市花都区妇幼保健院产科住院病人,ICP诊断标准参照文献^[12]。选择同期门诊或住院的正常晚期孕妇(正常对照组)31例,正常对照组孕周与ICP组相匹配,且无妊娠并发症及合并症。两组产妇的临床资料如表1所示。研究对象均为初产妇,均系单胎妊娠,月经周期规律且正常,孕周确切,在孕早期经B超证实了孕周,采血前无产兆,无感染史、无血制品及免疫抑制剂或免疫增强剂使用史。研究对象均无ICP家族遗传史,且均于孕20周后常规口服“迪巧”(碳酸钙/维生素D₃片)补钙。

1.2 方法

1.2.1 用ELISA法测外周血清中IFN- γ 和IL-4含量 所有患者入院用药前,抽取各组妇女空腹静脉血2ml,收集血清,-20℃冰箱冻存待测。采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测IFN- γ 、IL-4的浓度,IFN- γ 、IL-4的ELISA法试剂盒购自美国R&D公司。其中IFN- γ 的批内差异与批间差异分别为3.1%和7.4%,IL-4的分别为2.9%和5.1%。

1.2.2 用实时荧光定量RT-PCR测外周血VDR的表达 (1)分

离出外周血单个核细胞:用肝素钠抗凝管抽取肘静脉血5ml,用葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法(淋巴细胞分离液)常规将5ml的外周血中单个核细胞分离出来,加入0.4ml Trizol,于-70℃冰箱冻存待测。

(2) 引物设计与合成:应用Oligo 6.0软件进行设计,由TaKaRa公司合成。VDR(238bp):5'-TGA AGC GGA AGG A-GG AGG AG-3',5'-GAG CAG GAG GAG GAG GAG TC-3'。以3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参(138bp) 5'-GCA CC-G TCA AGG CTG AGA AC-3',5'-TGG TGA AGA CGC CAG T-GG A-3'。

(3) 细胞总RNA提取:采用Trizol(TaKaRa公司)提取细胞总RNA,操作按说明进行。提取后的RNA测A260-A280吸光值,要求A260/A280比值为1.8-2.0,并计算出RNA含量。

(4) cDNA的合成:采用20 μ l反应体积,包括寡聚核苷酸引物1 μ l,2 μ g总RNA,4 μ l $\times$ 逆转录缓冲液,AMV逆转录酶2.2 μ l,RNA酶抑制剂0.6 μ l,dNTPs 1 μ l,加去离子水至20 μ l。42℃ 40min,95℃ 10min灭活逆转录酶,冰浴5min。

(5) 实时荧光定量RT-PCR:采用TakaRa公司的SYBR®Premix Ex Taq™荧光定量PCR试剂盒。反应体系为50 μ l $\times$ DNA样品4 μ l,SYBR®Premix Ex Taq™(2 $\times$) 25 μ l,上、下游引物各1 μ l,ROX Reference Dye (50 $\times$) 1 μ l,灭菌蒸馏水18 μ l。反应条件为95℃ 10s,95℃ 5s,65℃ 31s共40个循环。95℃ 1min后制作熔解曲线,确定扩增产物的特异性。反应在ABI 7300(美国ABI公司)扩增仪上进行。

(6) 扩增效率一致性检测 取一cDNA样品模板行2倍梯度稀释,VDR和GAPDH分别进行荧光定量PCR反应,根据每个稀释度VDR和GAPDH值来计算 Δ CT值(VDR和GAPDH基因的CT值之差)。以稀释倍数的 $-\log_2$ 值为横坐标,以 Δ CT值为纵坐标作图比较两基因的扩增效率。经回归方程分析直线斜率为0.0345(斜率 <0.1),表明VDR和GAPDH基因具有相同的扩增效率,可用 $\Delta\Delta$ CT法计算VDR的相对表达量^[13]。

(7) VDR相对定量的计算 研究组VDR mRNA的含量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示,正常对照组VDR的表达水平定义为1。其中 Δ CT= Δ CT(研究组)- Δ CT(对照组), Δ CT=CT(VDR)-CT(GAPDH)。

(8) 结果判断 每样本至少重复测三次,每个样本的CT值取平均值。熔解曲线分析发现VDR基因和GAPDH基因的PCR产物均呈较为锐利的单一峰,无引物二聚体及其他杂峰,说明扩增产物特异性好。

1.3 统计学处理

所有数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用SPSS 16.0软件统计分析,方差齐性时采用配对样本t检验,方差不齐时采用Wilcoxon符号秩和检验。相关分析采用Pearson检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

ICP组孕妇外周血胆酸、谷丙转氨酶、谷草转氨酶均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组孕妇的年龄和孕周均无明显差异($P>0.05$)(见表1)。

表 1 ICP 组与正常对照组的临床资料比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of clinical data in the ICP group and NP group

Comparison of clinical data	ICP group (n=31)	NP group (n=31)	P
Years	27.12±4.28	28.74±2.27	P>0.05
Gestational age	35.25±2.07	35.43±1.84	P>0.05
Bile acid(mmol/L)	32.14±23.31	3.62±1.26	P<0.05
Alanine aminotransferase(U/L)	50.12±21.08	30.45±9.91	P<0.05
Aspartate aminotransferase (U/L)	46.11±18.21	27.38±7.41	P<0.05

2.2 两组孕妇外周血清中 IFN-γ 与 IL-4 的浓度比较

ICP 组外周血清中 IFN-γ 的浓度 [(230.93±36.04)pg/ml]明显高于正常对照组 [(138.37±25.08)pg/ml]，差异有统计学意义 (P<0.01)；ICP 组血清中 IL-4 浓度[(9.99±3.19)pg/ml]和正常对照

组[(8.58±2.43)pg/ml]比较，差异无统计学意义(P=0.067)；ICP 组 IFN-γ/IL-4 比值 (24.56±6.91)高于正常对照组 (17.13±4.84)，差异有统计学意义 (P<0.05)。见图 1。

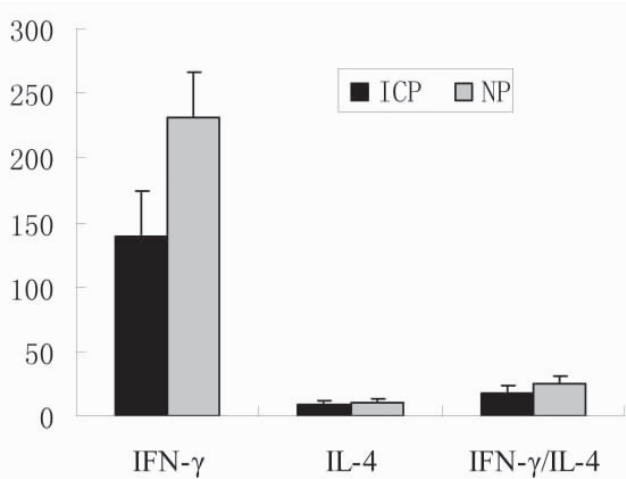


图 1 两组孕妇外周血清中 IFN-γ、IL-4 浓度和 IFN-γ/IL-4 比值的比较。(ICP 代表 ICP 组,NP 代表正常对照组)。

Fig.1 Comparison of date of IFN-γ, IL-4, IFN-γ/IL-4 in the serum of the ICP group and NP group. (ICP is the ICP group NP is NP group)

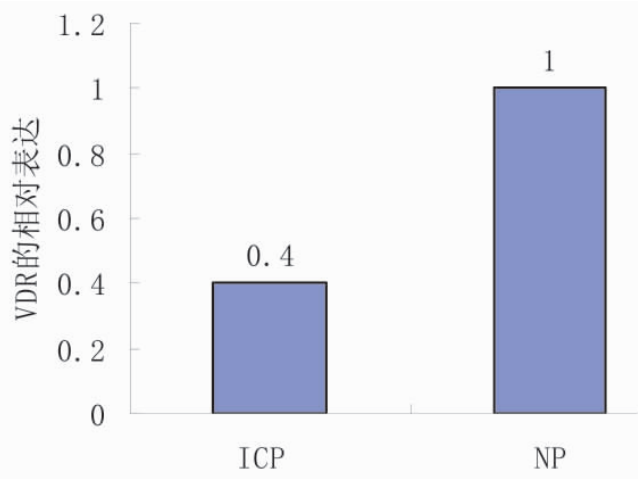


图 2 实时荧光定量 RT-PCR 检测外周血 VDR mRNA 的表达结果 NP 代表正常对照组。ICP 组中 VDR 的表达明显低于正常对照组(P<0.01)
Fig.2 The vitamin D receptor (VDR) expression in the PBMCs of the two groups. VDR expression was found to be significantly lower in all patients with ICP than that in normal pregnancy P<0.01

表 2 两组孕妇外周血单个核细胞 VDR 的表达比较
Table2 Comparison of VDR expression in the PBMCs in two groups

Group	Number	ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
ICP	31	5.11±0.69	1.60±0.24	0.40±0.14▲
NP	31	3.52±0.85	0	1

Note : ▲P<0.01 ICP group compared with NP group.

2.3 两组孕妇外周血单个核细胞 VDR 的表达

所有样本均检出有 VDR 与 GAPDH mRNA 的表达，用ΔΔCT 法计算 VDR 的相对表达量,见表 2 与图 2。

2.4 ICP 组外周血中 VDR 的表达水平与 IFN-γ、IL-4 浓度和 Th1/Th2 (IFN-γ/IL-4) 比值的相关性

ICP 组外周血中 VDR 的表达水平与 IFN-γ 浓度呈明显负相关 (r=-0.833,P<0.01)，与 IL-4 浓度无明显相关 (r=-0.109，P=0.558)，与 IFN-γ/IL-4 比值呈负相关，但相关性不强(r=-0.356，P=0.049<0.05)。

3 讨论

正常人体内的维生素 D 主要通过皮肤中的 7-脱氢胆固醇经紫外线照射后生成内源性维生素 D3 而获得,在体内经过一定的代谢后转变为具有生物活性的物质：1,25 二羟维生素 D3 [1,25-(OH)₂D₃]而发挥作用。1,25-(OH)₂D₃ 的生物学效应是由 1,25-(OH)₂D₃ 受体(VDR)介导^[14]。研究表明 VDR 除对钙、磷代谢有调节作用外,还具有多种重要的生物作用,如免疫调节、促进细胞的增殖与分化、影响中枢神经功能等^[15]。1,25-(OH)₂D₃ 对

白细胞介素(IL)系统、干扰素(INF)、粒-巨噬细胞集落刺激因子(CM-CSF)、T 细胞生长因子的活性及其他细胞因子的生长均有抑制作用^[16]。1,25-(OH)₂D₃ 作为一种免疫调节激素,主要作用的靶细胞是 Th1 细胞,其作用为减少 Th1 细胞的增生,抑制 Th1 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2^[7,17]。对 Th2 类细胞的作用较小,对 IL-4 的生成影响较弱^[8]。

妊娠是一个复杂的生理过程,正常妊娠的维持有赖于母体对胎儿组织产生免疫耐受,这是母体免疫系统自身调节的结果。而 T 辅助淋巴细胞亚型(Th1, Th2 细胞)及其分泌的细胞因子在这一过程中起重要调控作用^[18]。近年来,大量研究表明,正常妊娠是一种“Th2 现象”,即妊娠期母体趋向于 Th2 型细胞因子参与的体液免疫,而避免 Th1 型细胞因子参与的细胞免疫^[4]。妊娠期间母体免疫系统从 Th1 向 Th2 方向转换,使胎儿免受母体排斥。Th1 和 Th2 型细胞因子的平衡失调与多种妊娠并发症的发生有关^[19]。本研究检测 ICP 患者和正常妊娠孕妇外周血清中 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和 Th2 型细胞因子 IL-4 的水平,结果提示,在 ICP 患者体内也存在 Th1/Th2 型细胞因子的分泌失衡。ICP 患者外周血清中 IFN- γ 水平明显高于正常对照组,IL-4 水平不变,使 IFN- γ /IL-4 比值升高,说明了 ICP 患者体内 Th1/Th2 型细胞因子平衡已由 Th2 向 Th1 方向偏移。

维生素 D 作为一种免疫调节激素,有文献报道外周血中 1,25-(OH)₂D₃ 的浓度在 ICP 孕妇与孕周相匹配的正常孕妇两者间比较,未见明显差异^[10],但 1,25-(OH)₂D₃ 的生物学效应是通过 VDR 介导而实现,ICP 患者体内也存在免疫失衡,ICP 孕妇与正常孕妇在 VDR 的表达方面是否存在差异?目前尚未见相关报道。本研究发现 ICP 孕妇外周血单个核细胞 VDR 的表达明显低于正常对照组,还发现在 ICP 组中 VDR 的表达水平越低,外周血清 IFN- γ 浓度就越高,且与 IFN- γ 浓度呈明显负相关,与 IFN- γ /IL-4 比值也呈负相关。这可能是由于介导 1,25-(OH)₂D₃ 发挥生物学效应的 VDR 表达降低,削弱了其靶器官 Th1 细胞分泌 IFN- γ 的作用,使 ICP 患者体内 Th1/Th2 型细胞因子平衡由 Th2 向 Th1 方向偏移,破坏了正常妊娠母体“Th2 现象”。本试验还发现在 ICP 组中 VDR 的表达水平与 IL-4 浓度无明显相关,说明 ICP 患者体内由 Th2 向 Th1 方向偏移现象,并非 IL-4 降低所致,而为 IFN- γ 升高所致。

IFN- γ 是最主要的 Th1 型细胞因子,大量研究证明,IFN- γ 不仅是免疫排斥反应的始动因素,而且在免疫应答、移植免疫排斥反应中也发挥重要作用^[5,11]。IFN- γ 通过直接或间接激活自然杀伤细胞及诱导淋巴细胞因子活化的杀伤细胞的形成,介导迟发型超敏反应^[19];另外,IFN- γ 还可抑制由生殖道局部产生的粒-单细胞集落刺激因子的产生,该因子具有促进胚胎发育的作用,IFN- γ 抑制该因子的作用增强,可直接损害滋养层组织^[20],这些都可造成胎盘胎儿损害。因此 ICP 导致的不良妊娠结局发生可能与 IFN- γ 的过度表达有关。

综上所述,ICP 患者外周血 Th1/Th2 型细胞因子平衡由 Th2 向 Th1 偏移,可能与 ICP 孕妇外周血单个核细胞 VDR 的表达减少有关。

参考文献(References)

[1] Thomas P, Ulrich B. Intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2007, 2(26):1-6

[2] Lammert F, Marschall HU, Glantz A, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management [J]. J Hepatol, 2000, 33(6):1012-1021

[3] Pusch T, Beuers U. Intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. Orphanet J Rare Dis, 2007, 29(2):26

[4] Vargas-Villavicencio JA, Morales-Montor J. Pregnancy, acquired immunity and parasitic diseases: main mechanisms associated to resistance or susceptibility[J]. Rev Invest Clin, 2007, 59(4):298-305

[5] 彭冰, 刘淑芸. 辅助性 T 淋巴细胞亚型与妊娠期肝内胆汁淤积症发病的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(9):516-518

[6] Margherita TC, Yan Z, Monica F, et al. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 80(6):1717-1720

[7] Penna G, Amuchastegui S, Laverny G, et al. Vitamin D receptor agonists in the treatment of autoimmune diseases: selective targeting of myeloid but not plasmacytoid dendritic cells [J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(Suppl 2):69-73

[8] Baroni E, Biffi M, Benigni F, et al. VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2007, 81(1):250-262

[9] Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury[J]. BMC Immunol, 2007, 30(8):5

[10] Kuoppala T, Tuimala R, Parviainen N, et al. Vitamin D and mineral metabolism in intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1986, 23(1-2):45-51

[11] Liu W, Dan H, Wang Z, et al. IFN- γ and IL-4 in saliva of patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population[J]. Inflammation, 2009, 32(3):176-181

[12] Zeyi Cao. Chinese Obstetrics and Gynecology [M]. 2nd edition, Beijing: People's Health Publishing House, 2004, 468-475

[13] Kenneth JL, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method[J]. METHO-DS, 2001, 12(62):402-408

[14] Bednarski R, Donderski R, Manitus J. Role of vitamin D₃ in arterial blood pressure control[J]. Pol Merkuri Lekarski, 2007, 23(136):307-310

[15] Birlea SA, Costin GE, Norris DA. Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Action of Vitamin D Analogs Targeting Vitiligo Depigmentation[J]. Current Drug Targets, 2008, 9(4):345-359

[16] 王静. 1,25-二羟维生素 D₃ 的免疫抑制作用[J]. 国外医学内科学分册, 2005, 32(3):130-134

[17] Femke B, Evelyne VE, Lut O, et al. Vitamin D₃ and the immune system: maintaining the balance in health and disease[J]. Nutrition Research Reviews, 2007, 20(1):106-118

[18] Marzi M, Vigano A, Trabatto D, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic pregnancy[J]. Clin Exp Immunol, 1996, 106(1):127-133

[19] Satio S, Sakai M, Sasaki Y, et al. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1/Th2 cell ratio during normal pregnancy and preeclampsia[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 117(3):550-555

[20] Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Miyazaki S, et al. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy[J]. Am J Reproductive Immunology, 2005, 54(1):21-29