

重度子痫前期患者外周血 NK 细胞功能的研究 *

朱吉红¹ 张玉蓉¹ 肖文辉¹ 李有秋² 彭耀金² 谭海平³

(1 湖南邵阳县妇幼保健院 湖南 邵阳 422100 2 湖南师范大学医学院 湖南 长沙 410013 ;

3 湖南省妇幼保健院 湖南 长沙 410008)

摘要 目的 探讨重度子痫前期患者外周血中 NK 细胞数量、杀伤功能以及相关细胞因子的变化。方法 选择重度子痫前期患者 25 例(研究组)以及正常妊娠妇女 25 例(对照组),流式细胞术测定外周血中 NK 细胞数量,细胞毒实验测定 NK 细胞的杀伤活性,ELISA 法测定血清 IFN- γ 及 IL-2 的浓度。结果 研究组患者外周血中 NK 细胞的数量以及杀伤活性显著高于对照组;研究组外周血中 IFN- γ 、IL-2 的浓度也显著高于对照组。结论 重度子痫前期患者外周血 NK 细胞数量增多,杀伤活性增强,血清中 NK 细胞相关细胞因子也增加。这些改变可能参与重度子痫前期的发病机制。

关键词 子痫前期;NK 细胞;细胞毒活性

中图分类号 R714.245 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)26-5126-04

Research on Peripheral Blood NK Cell Function in Severe Pre-Eclamptic Patients*

ZHU Ji-hong¹, ZHANG Yu-rong¹, XIAO Wen-hui¹, LI You-qiu², PENG Yao-jin², TAN Hai-ping³

(1 Maternal and Child Care Service Centre of Shaoyang County, Hunan, 422100, China;

2 School of Medicine, Hunan normal University, Changsha 410008, China;

3 Maternal and Child Care Service Centre of Hunan province, Changsha, Hunan, 410013, China)

ABSTRACT Objective: To explore the changes of numbers and cytotoxic activity of NK cell and related cytokines in peripheral blood of severe pre-eclamptic patients. **Methods:** 25 severe pre-eclamptic patients (study group) and 25 normal pregnant women (control group) were included in this study. The rates of NK cell in peripheral blood were measured by flow cytometry. The cytotoxic activity of NK cell was detected by cytotoxicity assay. The concentrations of serum IFN- γ and IL-2 were determined by ELISA. **Results:** The rate and cytotoxic activity of peripheral blood NK cell of study group was significantly higher than that of control group. The serum IFN- γ and IL-2 levels of study group were also significantly higher than that of control group. **Conclusion:** The peripheral blood NK cell number, cytotoxic activity and related cytokines all increased in severe pre-eclamptic patients. These changes may play an important role in the cause of severe pre-eclampsia.

Key words: Pre-eclampsia; NK cell; Cytotoxic activity

Chinese Library Classification(CLC): R714.245 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)26-5126-04

前言

子痫前期(pre-eclampsia)是发生于妊娠期的独特疾病,以高血压、蛋白尿为主要症状,是妊娠高血压疾病中最常见的类型。子痫前期的发病率为 7%~12%,其中重度子痫前期是导致孕产妇和围生儿致病甚至死亡的首要原因之一^[1,2]。虽然针对该疾病的临床研究在不断增加,但目前对子痫前期的发病机制尚无完整的认识^[3,4]。大量研究证实,自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)在妊娠过程中发挥着极其重要的作用,不仅参与胚胎的植入、分化及正常生长过程,特别是母胎耐受以及机体免疫平衡状态的维持,同时也与多种妊娠疾病密切相关^[5-7]。妊娠时的子宫淋巴细胞中约有 70%~90%表达 NK 细胞的特异性表面标志^[8]。子宫内的 NK 细胞直接参与母胎耐受的形成与维持,

而外周血 NK 细胞数目和功能的异常也很可能参与反复流产、子痫前期等疾病的发生^[9-11]。为了明确重度子痫前期对外周 NK 细胞的影响及其在发病机制中的作用,本研究探讨了重度子痫前期患者体内 NK 细胞的数量、杀伤功能以及相关细胞因子 IFN- γ 及 IL-2 浓度的变化情况。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2010 年 1 月至 2011 年 12 月在我院住院分娩的重度子痫前期患者 25 例作为研究组,诊断标准参照第七版《妇产科学》^[12],年龄 25~34 岁,平均年龄 28.4 $\pm$ 2.3 岁;孕周:35 $\pm$ 3~39 $\pm$ 4 周,平均 37.3 $\pm$ 1.34 周。选择同期在本院住院分娩的正常妊娠妇女 25 例作为对照组,年龄 23~33 岁,平均年龄

* 基金项目 湖南省教育厅基金项目资助(09C632)

作者简介 朱吉红(1975-),女,主治医师,主要从事妇产科临床工作,电话:15073990998, E-mail:602181399@qq.com

(收稿日期:2012-04-10 接受日期:2012-05-06)

28.1±1.8岁,孕周35+4~39+3周,平均36.8±1.04周。两组间年龄及孕周比较差异无统计学意义($P>0.05$),所有妊娠均为单胎,未临产,既往无慢性高血压及心脏病史。

1.2 研究方法

1.2.1 仪器与试剂 人红白血病细胞系 K562 购自中国典型物种保存中心(武汉),DMEM 细胞培养基购自 GBICO 公司,新生小牛血清购自四季青公司,淋巴细胞分离液由中国医学科学院提供,小鼠抗人 CD16(PE-CY5)、CD56(FITC)、CD3(PE)荧光抗体以及同型对照抗体购自 eBioscience 公司,Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒购自 PROMEGA 公司,人 IFN- γ 及 IL-2 ELISA 检测试剂盒购自 R&D 公司,酶标仪选用 BIO-RAD 公司 550 型,流式细胞仪选用 Beckman 公司 FACS Calibur and Cell Quest Pro 型。

1.2.2 标本采集 所有测试对象均在未采取任何治疗措施前清晨空腹采集肘正中静脉血 5mL,其中 3mL 全血用肝素钠抗凝,淋巴细胞分离液常规分离 PBMC, PBS 洗涤 2 次后, DMEM 细胞培养基调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 4h 内行流式细胞检测以及杀伤活性检测;另 2mL 全血不抗凝,在小试管中自然凝血后,离心收集血清, -70°C 保存待用。

1.2.3 指标测定 ①NK 细胞数量检测:取 100 μL 调整细胞浓度后的 PBMC 悬液,加入 PE-CY5-CD16、FITC-CD56、以及 PE-CD3 单抗, 4°C 下避光孵育 30min, PBS 洗涤 1 次,重悬细胞, 0.5% 多聚甲醛固定后经流式细胞仪检测 CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^+$ 细胞比例,同时设立同型抗体对照。②NK 细胞杀伤活性检测:

按 Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒(LDH 释放法)说明进行,取对数生长期的 K562 细胞, PBS 洗涤后,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,取 100 μL 细胞悬液加入 24 孔板中作为靶细胞,将采集到的 PBMC 作为效应细胞,按照 10:1、5:1、2.5:1、1.25:1 的效靶比加入 24 孔板中后, 37°C 5% CO_2 条件下孵育 4h,孵育结束前 45 min 加入细胞裂解剂,离心后每孔取 50 μL 加入 96 孔酶标板(每个浓度均设 3 个复孔),再加入重悬混合液 50 μL ,室温避光 30 min,加终止液 50 μL , 490 nm 处酶标仪读取各孔的光密度值。③血清 IFN- γ 及 IL-2 浓度检测:按照相关 ELISA 试剂盒说明书进行操作,每份血清设复孔, 490 nm 处读取样本的光密度值,通过标准品曲线计算样本浓度。

1.3 统计学分析

所得数据用 SPSS 17.0 软件处理,计数资料采用卡方检验,计量资料采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,当 $P<0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 NK 细胞数量的比较

流式细胞仪检测两组患者的 PBMC,以 CD16 阳性细胞设门,计数 CD3 阴性、CD56 阳性细胞的比例。结果显示,重度子痫前期患者外周血中 CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^+$ NK 细胞的比例为 $19.43 \pm 5.22\%$,显著高于对照组的 $10.48 \pm 3.12\%$,差异具有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。

表 1 两组外周血 NK 细胞数量比较
Table 1 The NK cells in peripheral blood of the two groups

组别 Group	例数 Cases	NK(CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^+$)
研究组 Study group	25	$19.43 \pm 5.22\%^*$
对照组 Control group	25	$10.48 \pm 3.12\%$

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P<0.05$.

2.2 两组外周血 NK 细胞杀伤活性的比较

应用 LDH 释放法检测两组妊娠妇女外周血 NK 细胞的杀伤活性后发现,不同效靶比(1.25:1、2.5:1、5:1 和 10:1)下的检

测结果均显示,重度子痫前期患者外周血 NK 细胞的杀伤活性均高于正常妊娠对照组(图 1),且两组之间的差异具有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

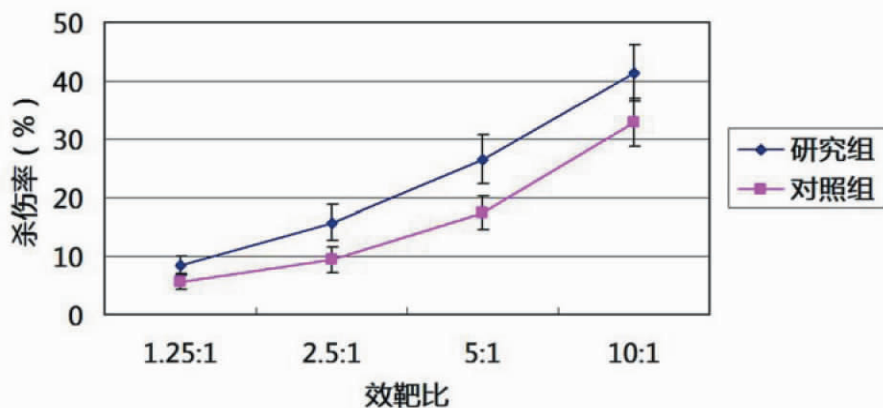


图 1 两组外周血 NK 细胞杀伤效率比较

Fig.1 The cytotoxic activity of NK cells in peripheral blood of the two groups

表 2 两组外周血 NK 细胞杀伤效率比较(%)
Table 2 The cytotoxic activity of NK cells in peripheral blood of the two groups(%)

组别 Group	例数 Cases	效靶比			
		1.25:1	2.5:1	5:1	10:1
研究组 Study group	25	8.43± 1.68*	15.78± 3.02*	26.55± 4.21*	41.37± 4.83*
对照组 Control group	25	5.73± 1.34	9.43± 2.22	17.42± 2.81	32.82± 4.11

注 :与对照组比较 ,*P<0.05。

Note :Compared with normal group, *P<0.05.

2.3 外周血血清 IFN- γ 以及 IL-2 的浓度对比

ELISA 法检测两组妊娠妇女外周血血清 IFN- γ 以及 IL-2 的浓度 结果显示 重度子痫前期患者血清中 IFN- γ 的浓度为 128.56± 32.14 pg/mL ,显著高于正常妊娠对照组(95.04± 18.13

pg/mL) ,重度子痫前期患者血清中 IL-2 的浓度为 51.68± 19.37 pg/mL ,亦显著高于正常妊娠对照组(35.17± 11.45 pg/mL)。差异均具有统计学意义(P<0.05)(表 3)。

表 3 两组血清 IL-2 浓度比较
Table 3 The serum IL-2 concentration of the two groups

组别 Group	例数 Cases	IFN- γ (pg/mL)	IL-2(pg/mL)
研究组 Study group	25	128.56± 32.14*	51.68± 19.37*
对照组 Control group	25	95.04± 18.13	35.17± 11.45

注 :与对照组比较 ,*P<0.05。

Compared with normal group, *P<0.05.

3 讨论

子痫前期的发病与炎症、血管内皮功能障碍、母胎间免疫耐受被打破等因素密切相关^[13-15]。NK 细胞是机体重要的免疫细胞 ,可以经细胞毒作用或分泌相关细胞因子 ,在机体抗感染、免疫调节等方面发挥重要作用。正常妊娠时 ,NK 细胞与胚胎及胎儿的作用处于一种平衡状态 ,这种平衡一旦被打破 ,可引起子宫局部的 NK 细胞活性增强 ,从而进一步导致母胎免疫排斥以及病理妊娠的发生。外周血中的 NK 细胞与子宫内的 NK 细胞具有相似的调节机制 ,因此外周 NK 细胞数目与功能的变化可间接体现母胎界面局部的免疫状况^[16]。我们的研究显示 ,重度子痫前期患者外周血 NK 细胞数量以及细胞毒活性均明显高于正常妊娠妇女 ,此结果与国内外的研究报道相一致^[17-20]。说明在子痫前期时 ,母体内的 NK 细胞数量增多 ,活性升高。NK 细胞可以通过介导免疫损伤性炎症 ,引起全身血管内皮炎症及功能障碍并导致子痫前期的各种临床表现。

IFN- γ 是 NK 细胞活性的最强激活剂 ,IL-2 也是 NK 细胞的重要刺激因子 ,它们可诱导增强 NK 细胞的杀伤活性 ,并促进与杀伤活性相关的蛋白质(如穿孔素、颗粒酶等)编码基因的转录 ,是诱导 NK 细胞活化的重要信号分子。本研究的结果同时显示 :在重度子痫前期患者血清中 ,IFN- γ 和 IL-2 的水平均显著高于正常妊娠妇女 ,这与 NK 细胞活性增强的结果是一致的。升高的 IFN- γ 和 IL-2 能促使 NK 细胞活化 ,而活化的 NK 细胞可进一步产生 IFN- γ 和 IL-2 ,并加重 NK 细胞介导的病理效应。

本研究的结果显示 ,在发生重度子痫前期的个体内 ,外周血中的 NK 细胞数量、杀伤活性以及相关细胞因子均上调 ,说

明 NK 细胞的活化是子痫前期发病机制的重要部分 ,但 NK 细胞在该过程中的具体效应及其调节机制有待进一步的深入研究。

参考文献(References)

- [1] Khan KS, Wojdyla D, Say L, et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review [J]. Lancet, 2006, 367(9516):1066-1074
- [2] Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, et al. Pre-eclampsia [J]. Lancet, 2010, 376(9741):631-644
- [3] Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia [J]. Placenta, 2002, 23(5): 359-372
- [4] Verdonk K, Visser W, Steegers EA, et al. New insights into the pathogenesis of pre-eclampsia: the role of angiogenesis-inhibiting factors [J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2011, 155:A2946
- [5] Male V, Trundle A, Gardner L, et al. Natural killer cells in human pregnancy [J]. Methods Mol Biol, 2010, 612:447-463
- [6] Vacca P, Moretta L, Moretta A, et al. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy [J]. Trends Immunol, 2011, 32(11):517-523
- [7] Tang AW, Alfirevic Z, Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review [J]. Hum Reprod, 2011, 26(8):1971-1980
- [8] Park DW, Lee HJ, Park CW, et al. Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages [J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(2):173-180
- [9] Poon LC, Kametas NA, Maiz N, et al. First-trimester prediction of hypertensive disorders in pregnancy [J]. Hypertension, 2009, 53(5):812-818
- [10] Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia [J]. Am J

- Reprod Immunol, 2010, 63(6):534-543
- [11] Fukui A, Yokota M, Funamizu A, et al. Changes of NK cells in preeclampsia [J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67(4): 278-286
- [12] 乐杰. 妇产科学 [M]. 第七版. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 996(1): 05
- Le Jie. Obstetrics and Gynaecology seventh edition [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2004, 996 (1): 05
- [13] 葛志平, 孙丽洲. 葡萄糖调节蛋白 78 在子痫前期中的表达及其意义 [J]. 现代生物医学进展, 2011, (24): 4917-4919
- Ge Zhi-ping, Sun Li-zhou. Glucose-regulated protein 78 expression in pre-eclampsia and its significance [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, (24): 4917-4919
- [14] 钱卫, 周倩, 刘憬兰, 等. 早发型与晚发型重度子痫前期的临床表现及母婴结局的对比分析 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(13): 2461-2463
- Qian Wei, Zhou Qian, Liu Jin-lan, et al. Early onset and late onset severe pre-eclampsia the clinical presentation and comparative analysis of maternal and neonatal outcomes [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(13): 2461-2463
- [15] Tong Yan, Hu Xiu-rong, Zhou Jian-tao. Neutrophil cell extracellular trap net and pre-eclampsia [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, (21): 4179-4180
- [16] Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, et al. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance [J]. Semin Immunopathol, 2007, 29(2):115-122
- [17] Sargent I, Borzychowski A, Redman C. NK cells and pre-eclampsia [J]. Journal of reproductive immunology, 2007, 76(1-2): 40-44
- [18] Zhang zhan, Jia Li-ting, Hou Lei, et al. The role of NK cells in severe preeclampsia [J]. China journal of pathological physiology, 2005, 25 (12): 2457-2461
- [19] Zhang Zhan, Jia Li-ting, Yang Ru-jing, et al. Preeclampsia patients peripheral blood, umbilical cord blood and the membrane NK cells related research [J]. China journal of immunology, 2006, 30(05):477-479
- [20] Hao Sha, Li Peng-fei, Li Ruo-tian, et al. Preeclampsia mice animal model of NK cells and the change of cell factors [J]. China journal of immunology, 2009, 27(08):708-712
-
- (上接第 5139 页)
- [9] Kim WD, Lee YH. A fatal case of severe hemolytic disease of new-born associated with anti-Jkb [J]. J Korean Med Sci, 2006, 21(1):151-154
- [10] Novaretti MC. Hemolytic disease of the new-born due to anti-U [J]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo, 2003, 58(6):320-328
- [11] Yaseen H, Khalaf M, Rashid N, et al. Does prophylactic photo-therapy prevent hyperbilirubinemia in neonates with ABO incompatibility and positive Coombs test [J]. Journal of Perinatology, 2005, 25(9): 590-597
- [12] Mohamed H, Turner JN, Caggana M. Biochip for separating fetal cells from maternal circulation [J]. J Chromatogr A, 2007, 1162(2): 187-192
- [13] 张晨光, 吴子钊, 王亚荣, 等. ABO 新生儿溶血病与 O 型孕妇血清中 IgG 及其亚类含量的相关分析 [J]. 中国输血杂志, 2007, 20(2):15-17
- Zhang Chen-guang, Wu Zi-zhao, Wang Ya-rong, et al. The relationship between the IgG anti-body titers, the concentration of IgG subclasses of group O pregnant women and ABO hemolytic disease of new-born [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2007, 20(2):15-17
- [14] 肖瑞卿, 赵树铭, 林武存, 等. 献血者 O 型血清抗-A、抗-B 完全抗体与不完全抗体效价的调查分析 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25 (10):916-917
- Xiao Rui-qin, Zhao Shu-ming, Lin Wu-cun, et al. Investigation and analysis of anti-A/B complete and incomplete antibody titers in blood group O serum [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2003, 25(10):916-917
- [15] 张伟东, 付涌水, 罗广平. O 型血孕妇血清中抗 A 和抗 B 抗体效价的分析 [J]. 中华妇产科杂志, 2001, 36(4):306-307
- Zhang Wei-dong, Fu Yong-shui, Luo Guang-ping. The clinical analysis of serum anti-A and anti-B antibody titer in O blood type of maternal [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2001, 36(4): 306-307
- [16] Wu KH, Chu SL, Chang JG, et al. Haemolytic disease of the new-born due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan [J]. Transfus Med, 2003, 13(5):311-314
- [17] Narang A, Jain N. Haemolytic disease of newborn [J]. Indian J Pediatr, 2001, 68(2):167-172
- [18] Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, et al. Enrichment of NRBC in maternal blood: a more feasible method for noninvasive prenatal diagnosis [J]. Prenat Diagn, 2006, 26(6):545-547