

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.014

文章编号: 1005-8982(2017)24-0066-04

复发性流产患者血清维生素 D 水平与自身免疫抗体、淋巴细胞亚群的关系研究

贾新转¹, 郭丽娜¹, 李玉琢², 王叶¹, 魏兰²

(1. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011; 2. 河北省胸科医院, 河北 石家庄 050041)

摘要:目的 探讨复发性流产(RSA)患者血清维生素 D 水平与自身免疫抗体、淋巴细胞亚群的关系。**方法** 回顾性分析 RSA 患者 125 例,根据血清 25 羟维生素 D[25(OH)D]水平,分为 25(OH)D 正常水平组 50 例、25(OH)D 低水平组 75 例,分析两组自身免疫抗体阳性率及淋巴细胞亚群水平。**结果** 25(OH)D 低水平组抗心磷脂抗体(ACA)、抗核抗体(ANA)的阳性率及甲状腺过氧化物酶(TPO)抗体阳性率均高于 25(OH)D 正常水平组,差异有统计学意义($P < 0.05$);25(OH)D 低水平组外周血 CD3⁺CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺ 及 CD56⁺ 百分率均高于 25(OH)D 正常水平组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RSA 患者中维生素 D 缺乏的比例较高,维生素 D 缺乏的 RSA 患者 ACA、ANA 及 TPO 抗体阳性率较高,RSA 维生素 D 水平与 CD4⁺T 细胞、B 细胞及 NK 细胞免疫平衡有关。

关键词: 复发性流产;维生素 D;T 淋巴细胞;B 淋巴细胞;NK 细胞

中图分类号: R71

文献标识码: A

Study on relationship between serum vitamin D level and autoantibodies or lymphocyte subsets in patients with RSA

Xin-zhuan Jia¹, Li-na Guo¹, Yu-zhuo Li², Ye Wang¹, Lan Wei²

(1. Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China;

2. Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050041, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between serum vitamin D level and autoantibodies or lymphocyte subsets in patients with recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods** A total of 125 patients with RSA were included in a retrospective analysis. According to the serum levels of 25-hydroxy vitamin D [25-(OH)-D], the patients were divided into [25-(OH)-D] normal group including 50 cases and [25-(OH)-D] low level group including 75 cases. The positive rate of autoantibodies and the level of lymphocyte subsets in the two groups were analyzed. **Results** Compared with the [25-(OH)-D] normal group, the positive rates of anticardiolipin antibody (ACA), antinuclear antibody (ANA) and thyroid peroxidase (TPO) antibody were higher in the [25-(OH)-D] low level group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the percentages of (CD3⁺/CD4⁺) T, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ B cells and CD56⁺ natural killer (NK) cells were higher in the [25-(OH)-D] low level group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The rate of vitamin D deficiency is higher in women with RSA. The positive rates of ACA, ANA and TPO are higher in RSA women with vitamin D deficiency. The vitamin D level in women with RSA is related to CD4⁺T cells, B lymphocytes and the balance of NK cells.

Keywords: recurrent spontaneous abortion; vitamin D; T lymphocyte; B lymphocyte; NK cell

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续 ≥ 3 次的自然流产,在孕龄女性中的

收稿日期:2017-03-16

[通信作者] 魏兰, E-mail: 1134979643@qq.com

发病率为 1%~3%^[1],目前证实免疫失衡与 RSA 有关。近年来研究发现维生素 D 作为胚胎种植中免疫调节因子,在生殖中发挥重要作用^[2],维生素 D 充足与体外受精(in vitro fertilization, IVF)妊娠率提高相关^[3]。但关于维生素 D 在 RSA 中作用的研究较少。本研究旨在探讨 RSA 患者血清维生素 D 水平与自身免疫抗体、淋巴细胞亚群的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2016 年 6 月-2016 年 9 月在本院生殖中心就诊的 RSA 患者 125 例作为研究对象,年龄 25~32 岁。入组标准:①夫妻双方染色体核型均正常;②盆腔彩超除外生殖道器质性病变;③宫颈分泌物检查除外生殖道感染;④生殖内分泌激素检查无异常,且无内分泌疾病史;⑤无血栓形成倾向或高凝状态;⑥月经周期规律,最近 3 个月内未应用内分泌或免疫调节剂及维生素 D;⑦男方精液常规检查无异常。根据血清 25(OH)D 水平将研究对象分为维生素 D 正常水平组(25(OH)D \geq 30 ng/ml)、维生素 D 低水平组(25(OH)D<30 ng/ml)。两组研究对象既往流产次数[25(OH)D 低水平组既往流产 3 次 49 例(65.33%),既往流产 \geq 4 次 26 例(34.67%),25(OH)D 正常水平组既往流产 3 次 29 例(58.00%),既往流产 \geq 4 次 21 例(42.00%)($\chi^2=0.69, P=0.41$)]差异无统计学意义($P>0.05$)。两组研究对象年龄、体重指数(body mass index, BMI)、月经周期及末次自然流产后后的时间间隔差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

1.2 研究方法

研究对象均于月经周期第 3 天,抽取晨空腹静脉血 3 ml(检测标本均为外周血)。

1.2.1 血清 25(OH)D 水平测定 应用 JC028 酶标仪(瑞士澳斯邦公司)酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 25(OH)D 水平,按照 25(OH)D 试剂盒(英国 IDS 公司)说明进行操作。

1.2.2 自身免疫抗体检测 应用 ELISA 测定抗心

磷脂抗体(anti cardiolipin antibody, ACA)、ACA-IgG 及 ACA-IgM。采用间接免疫荧光法测定抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)和免疫印迹法测定 ANA 谱(抗-dsDNA 抗体、抗-ssDNA 抗体、抗-组蛋白抗体及抗 Scl70 抗体);应用化学发光免疫分析法测定甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)。TPOAb 试剂盒购自美国 Beckman 公司,其余试剂盒购自德国欧蒙公司,所用仪器分别为 JC028 酶标仪, Eurolinescan 自动判别软件(德国欧蒙公司), EUROBlotMaster 分析仪荧光显微镜(德国欧蒙公司), DXI800 型全自动化学发光免疫分析仪(美国 Beckman 公司)。

1.2.3 淋巴细胞亚群检测 采用流式细胞术测定淋巴细胞亚群 [CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD8⁺、CD19⁺、CD56⁺]。所用试剂盒购自美国 eBioscience 公司, FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验或秩和检验,计数资料以率(%)表示,用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSA 女性 25(OH)D 水平分组情况

125 例 RSA 患者中,50 例(40.00%)为 25(OH)D 正常水平(≥ 30 ng/ml),75 例(60.00%)是 25(OH)D 低水平(<30 ng/ml)。

2.2 两组自身免疫抗体阳性率的比较

25(OH)D 低水平组 ACA、ANA 的阳性率及 TPOAb 阳性率均高于 25(OH)D 正常水平组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组 ACA-IgG、ACA-IgM、抗-dsDNA、抗-ssDNA、抗-组蛋白及抗 Scl70 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3 两组淋巴细胞亚群的比较

25(OH)D 低水平组外周血 CD3⁺CD4⁺、CD4⁺

表 1 两组基本情况的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄/岁	BMI/(kg/m ²)	月经周期/d	末次自然流产后后的时间间隔/月
25(OH)D 低水平组	75	27.75 \pm 1.71	21.42 \pm 1.72	27.52 \pm 2.12	4.13 \pm 0.82
25(OH)D 正常水平组	50	27.46 \pm 1.97	21.16 \pm 1.75	26.68 \pm 2.30	4.12 \pm 0.79
t 值		0.861	0.819	0.789	0.091
P 值		0.391	0.414	0.481	0.928

CD8⁺、CD19⁺ 及 CD56⁺ 百分率均高于 25(OH)D 正常水平组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组 CD3⁺ 及 CD3⁺CD8⁺ 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 两组自身免疫抗体阳性率的比较 %

组别	例数	ACA	ACA-IgG	ACA-IgM	ANA	抗-dsDNA	抗-ssDNA	抗-组蛋白	抗 Sc170	TPOAb
25(OH)D 低水平组	75	53.30	17.33	21.33	48.00	25.33	17.33	12.00	9.33	60.00
25(OH)D 正常水平组	50	30.00	8.00	10.00	22.00	16.00	12.00	6.00	4.00	22.00
χ^2 值		6.630	2.220	2.760	8.640	1.540	0.660	0.650	0.600	17.52
P 值		0.010	0.140	0.100	0.030	0.210	0.420	0.420	0.440	0.00

表 3 两组淋巴细胞亚群的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD3 ⁺ T/%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ T/%	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T/%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺ /%	CD56 ⁺ /%
25(OH)D 低水平组	75	74.48 ± 3.02	42.12 ± 3.79	25.52 ± 2.34	1.65 ± 0.04	10.65 ± 1.60	13.23 ± 3.07
25(OH)D 正常水平组	50	74.86 ± 2.83	36.30 ± 3.47	25.16 ± 1.87	1.44 ± 0.05	6.55 ± 0.48	10.44 ± 1.48
t/u 值		0.706	8.687	1645.000	15.000	273.000	777.000
P 值		0.481	0.000	0.243	0.000	0.000	0.000

3 讨论

近年来研究发现,维生素 D 参与钙磷代谢、机体免疫及生殖等生理过程^[4],维生素 D 是生殖成功过程中的一个关键因素^[5]。大量流行病学调查发现维生素 D 缺乏在世界范围内普遍存在^[6]。最近研究中显示,妊娠期女性同样普遍存在维生素 D 缺乏^[7]。本研究发现在 RSA 患者中维生素 D 缺乏的比例较高。

本研究同时发现,RSA 患者中 25(OH)D 低水平组 ACA、ANA 及 TPO 抗体的阳性率高于 25(OH)D 正常水平组,而两组 IgG、IgM、抗-dsDNA、抗-ssDNA、抗-组蛋白及抗 Sc170 抗体阳性率均无差异。本研究组前期研究提示 TPOAb 阳性与维生素 D 低水平密切相关,维生素 D 低水平、TPOAb 阳性相互作用增加自然流产风险^[8],另有学者报道,维生素 D 水平与 TPOAb 定量负相关^[9]。ROUSSEV 等^[10]报道抗磷脂抗体综合征的患者维生素 D 缺乏普遍性增加,维生素 D 缺乏与 ACA、ANA 及 TPOAb 增加相关。本研究结果与之相似,推测维生素 D 水平可影响 RSA 自身免疫抗体。有学者对维生素 D 水平如何影响自身抗体进行研究,证实维生素 D 缺乏与经 B 细胞活化的自身抗体增加相关^[11],维生素 D 通过抑制活化的 B 细胞增殖、诱导其凋亡,在自身抗体产生中起调节作用。在本研究中 RSA 患者 25(OH)D 低水平组外周血 CD19⁺ 百分比高于 25(OH)D 正常水平组,推测维生素 D 通过调节 B 淋巴细胞增殖及功能影响自身免疫抗体,进而影响妊娠过程,其具体机

制仍需进一步探讨。

在本研究中同时对 RSA 女性维生素 D 水平与 T 淋巴细胞、NK 细胞的关系进行分析,结果显示,维生素 D 低水平组 CD4⁺ 较维生素 D 正常水平组增多,CD4⁺/CD8⁺ 增高,但 T 细胞总数、CD8⁺ 均无差异。T 淋巴细胞是机体内主要的免疫细胞,主要包括 CD4⁺、CD8⁺。CD4⁺ 介导细胞免疫,其数量增多可使母体对胚胎发生较强的免疫排斥,引起流产。CD8⁺ 可抑制 CD4⁺ 介导的免疫排斥,正常情况下两者达到平衡状态。反复流产患者外周血 CD4⁺ 增多,而 CD8⁺ 无变化^[12]。体外试验证实维生素 D 可调控活化 T 细胞,促进其分化及免疫耐受^[13],维生素 D 可抑制 Th1 细胞增殖并限制其产生细胞因子(如 IFN- γ 、IL-2 及 TNF- α),诱导 Th2 细胞因子(如 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 及 IL-13)^[14]。而维生素 D 在 RSA 患者体内如何调控 T 淋巴细胞有待于进一步研究。

NK 细胞数量、功能异常是引起 RSA 的重要因素^[15],外周血 NK 细胞高水平能够预测下次妊娠仍有可能发生自然流产^[16]。有研究报道,维生素 D 与 NK 细胞毒性呈负相关,体外实验进一步发现缺乏维生素 D 可抑制穿孔素分泌,进而影响对靶细胞的杀伤^[7]。本研究结果显示,25(OH)D 低水平组外周血 CD56⁺ 百分比高于 25(OH)D 正常组,推测维生素 D 同时参与 NK 细胞数量和细胞毒性的调控。

综上所述,RSA 患者中维生素 D 缺乏的比例较高,维生素 D 缺乏可影响 RSA 患者的免疫状态。维

生素 D 低水平的 RSA 患者有 ACA、ANA 及 TPOAb 阳性的倾向,而 ACA、ANA 及 TPOAb 阳性与生殖失败相关。RSA 患者维生素 D 水平与 CD4⁺、B 细胞及 NK 细胞免疫平衡有关。对于维生素 D 缺乏的 RSA 患者添加维生素 D 治疗是否可改善生殖状况有待于进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] ALIJOTASREIG J, GARRIDOGIMENEZ C. Current concepts and new trends in the diagnosis and management of recurrent miscarriage[J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2013, 68(6): 445-466.
- [2] LERCHBAUM E, OBERMAYER-PIETSCH B. Vitamin D and fertility: a systematic review[J]. *Eur J Endocrinol*, 2012, 166(5): 765-778.
- [3] RUDICK B, INGLES S, CHUNG K, et al. Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(11): 3321-3327.
- [4] BLOMBERG J M. Vitamin D and male reproduction[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(3): 175-186.
- [5] 贾新转,魏兰,王咏梅. PCOS 患者卵泡液维生素 D 水平与 IVF 周期结局相关性分析[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(10): 1904-1906.
- [6] HOLICK M F, BINKLEY N C, BISCHOFF-FERRARI H A, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(7): 1911-1930.
- [7] OTA K, DAMBAEVA S, HAN A R, et al. Vitamin D deficiency may be a risk factor for recurrent pregnancy losses by increasing cellular immunity and autoimmunity[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(2): 208-219.
- [8] 贾新转,张娜,郭丽娜,等. 复发性流产孕妇血清 TPOAb、25OHD 与临床结局的关系[J]. *广西医学*, 2016, 38(9): 1232-1234.
- [9] AGMON-LEVIN N, BLANK M, ZANDMAN-GODDARD G, et al. Vitamin D: an instrumental factor in the anti-phospholipid syndrome by inhibition of tissue factor expression[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(1): 145-150.
- [10] ROUSSEV R G, KAIDER B D, PRICE D E, et al. Laboratory evaluation of women experiencing reproductive failure[J]. *Am J Reprod Immunol*, 1996, 35: 415-420.
- [11] RITTERHOUSE L L, CROWE S R, NIEWOLD T B, et al. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(9): 1569-1574.
- [12] DARMOCHWAL-KOLARZ D, LESZCZYNSKA-GORZELAK B, ROLINSKI J, et al. The immunophenotype of patients with recurrent pregnancy loss[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002, 103(1): 53-57.
- [13] LOVATO A, MARIONI G, MANZATO E, et al. Elderly patients at higher risk of laryngeal carcinoma recurrence could be identified by a panel of two biomarkers (nm23-H1 and CDI05) and pN+status[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2015, 272(11): 3417-3424.
- [14] ADAMS J S, HEWISON M. Unexpected actions of vitamin D: New perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity[J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4(2): 80-90.
- [15] SACKS G, YANG Y, GOWEN E, et al. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 67(5): 434-442.
- [16] MICHOU V I, KANAVAROS P, ATHANASSIOU V, et al. Fraction of the peripheral blood concentration of CD56⁺CD16⁻CD3⁻ cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility[J]. *Fertil and Steril*, 2003, 80(2): 691-697.

(唐勇 编辑)