

# 合并慢性子宫内膜炎的反复着床失败患者 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞水平的研究

黎 俏<sup>1,2</sup>, 余建华<sup>3</sup>, 薛永杰<sup>4</sup>, 陈海霞<sup>2</sup>, 赖放颖<sup>2</sup>,  
全 燕<sup>2</sup>, 何韶坚<sup>2</sup>, 翁光明<sup>2</sup>, 高天旸<sup>1,5</sup>

(1. 南方医科大学第二临床医学院, 广东 广州, 510515; 东莞康华医院, 2. 生殖医学科, 3. 血液中心实验室, 4. 病理科, 广东 东莞, 523080; 5. 广东省第二人民医院 生殖医学中心, 广东 广州, 510310)

**摘要:** 目的 观察合并慢性子宫内膜炎(CE)的反复着床失败(RIF)患者子宫自然杀伤(uNK)细胞的表达水平。方法 选取2018年10月—2023年2月就诊于生殖医学中心的82例RIF患者为RIF组;选择同期在本中心行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的有IVF助孕妊娠活产史且拟再次助孕的82例患者为对照组。2组均在黄体中期取2份子宫内膜组织,一份采用流式细胞仪检测子宫内膜CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK细胞水平,另一份采用免疫组化方法检测CD138。采集外周血3~4 mL,采用流式细胞仪检测CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>外周血自然杀伤(CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>PbNK)细胞水平及血常规。CE阳性患者口服抗生素治疗1个疗程。抗炎治疗结束后下个月经周期黄体期时再次取少量子宫内膜组织,采用免疫组化方法检测CD138。比较治疗前后2组临床妊娠率及胚胎着床率。结果 RIF组CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK细胞水平为(34.23±17.01)%,低于对照组的(45.41±20.90)%,差异有统计学意义( $P<0.05$ );RIF组黄体中期外周血中CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>PbNK细胞水平为(14.38±5.36)%,与对照组的(13.58±4.34)%比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );RIF组与对照组白细胞计数、淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。子宫内膜CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK细胞水平与外周血CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>PbNK细胞水平无相关性( $r=0.06$ )。RIF组合并CE与无合并CE、对照组合并CE与无合并CE的黄体中期内膜中CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK细胞、外周血中CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>PbNK细胞水平比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。在RIF组合并CE及对照组合并CE患者中,治疗后CE转阴者较CE仍为阳性者的临床妊娠率、着床率均升高,早期流产率降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK细胞低表达可能导致母胎界面免疫紊乱,从而增加RIF发生的风险;外周血CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>PbNK细胞与子宫内膜CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK细胞无相关性;抗生素治疗CE能明显改善RIF患者妊娠结局,CE的确诊和治疗应作为RIF评估的重要因素。

**关键词:** 反复着床失败;慢性子宫内膜炎;自然杀伤细胞;辅助生殖技术;生殖免疫

中图分类号: R 711.32; R 446.63 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2023)16-101-06 DOI: 10.7619/jcmp.20231704

## Study on level of CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> natural killer cell in patients with repeated implantation failure complicated with chronic endometritis

LI Qiao<sup>1,2</sup>, YU Jianhua<sup>3</sup>, XUE Yongjie<sup>4</sup>, CHEN Haixia<sup>2</sup>, LAI Fangying<sup>2</sup>,  
QUAN Yan<sup>2</sup>, HE Shaojian<sup>2</sup>, WENG Guangming<sup>2</sup>, GAO Tianyang<sup>1,5</sup>

(1. the Second School of Clinical Medicine of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515;  
2. Department of Reproductive Medicine, 3. Laboratory of Blood Center, 4. Department of Pathology,  
Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan, Guangdong, 523080; 5. Center for Reproductive Medicine,  
Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510310)

**Abstract:** **Objective** To observe the expression level of uterine natural killer (uNK) cell in patients with repeated implantation failure (RIF) complicated with chronic endometritis (CE). **Methods** A total of 82 RIF patients treated in the Reproductive Medicine Center from October 2018 to February 2023 were selected as RIF group; 82 cases with history of IVF-assisted pregnancy and willing of assisted pregnancy again in the same period who underwent *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the center were selected as control group. Two samples of endometrial tissues were taken from both

收稿日期: 2023-05-26 修回日期: 2023-07-24

基金项目: 广东省中医药局科研资助项目(20191013); 2023年广东省东莞市社会发展科技面上项目(20231800902612)

通信作者: 高天旸, E-mail: gaotianyang@yahoo.com

groups during the mid-luteal phase, one sample was used for detection of endometrial CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK cell level by flow cytometry, and another sample was used for detection of CD138 by immunohistochemistry. A sample of 3 to 4 mL peripheral blood was collected, and flow cytometry was used to detect the level of CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> peripheral blood natural killer (CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> PbNK) cell and blood routine. Patients with positive CE were asked to take a course of oral antibiotic therapy. In the luteal phase of the next menstrual cycle after the end of anti-inflammatory treatment, a small amount of endometrial tissues was taken again, and CD138 was detected by immunohistochemistry. Clinical pregnancy rate and embryo implantation rate before and after treatment were compared between the two groups. **Results** The level of CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK cell was (34.23 ± 17.01)% in the RIF group, which was significantly lower than (45.41 ± 20.90)% in the control group ( $P < 0.05$ ); the level of CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> PbNK cell in the peripheral blood of the mid-luteal phase in the RIF group was (14.38 ± 5.36)%, which showed no significant difference compared to (13.58 ± 4.34)% in the control group ( $P > 0.05$ ); there were no significant differences in white blood cell count, lymphocyte percentage, and neutrophil percentage between the RIF group and the control group ( $P > 0.05$ ). There was no correlation between the level of endometrial CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK cell and the level of CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> PbNK cell in peripheral blood ( $r = 0.06$ ). There were no significant differences in the levels of endometrial CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK cell and peripheral blood CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> PbNK cell in mid-luteal phase between cases with CE and without CE in the RIF group and the control group ( $P > 0.05$ ). In the patients complicating CE in the RIF group and the control group, the clinical pregnancy rate and implantation rate of cases with negative CE after treatment were significantly higher than those with positive CE after treatment, while the early abortion rate of cases with negative CE after treatment was significantly lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Low expression of CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK cell may lead to immune disorders at the maternal-fetal interface, thereby increasing the risk of RIF; there is no correlation between peripheral blood CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> PbNK cell and endometrial CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK cell; antibiotic treatment for CE can significantly improve the pregnancy outcome of RIF, and the diagnosis and treatment of CE should be considered as an important factor in the evaluation of RIF.

**Key words:** repeated implantation failure; chronic endometritis; natural killer cells; assisted reproductive technology; reproductive immunity

在体外受精-胚胎移植(IVF-ET)/卵胞浆内单精子注射(ICSI)周期中,胚胎着床率约 30%<sup>[1]</sup>。反复着床失败(RIF)的发生率可达 5%~10%<sup>[2]</sup>。近年来关于慢性子宫内膜炎(CE)或免疫因素密切影响 RIF 预后的相关研究越来越多<sup>[3]</sup>。CD138 检测的 CE 患病率在 RIF 患者中为 7.7%~44.0%<sup>[4]</sup>。CE 持续炎症将影响患者子宫内膜容受性,从而造成 RIF、复发性流产(RM)等不良妊娠结局<sup>[5-6]</sup>。有研究<sup>[7]</sup>推测 CE 引起 RIF 的机制之一是病原微生物的入侵可能影响宫腔定植微生物,使子宫自然杀伤(uNK)细胞激活及 T 细胞亚群分化异常等,影响子宫的免疫环境,使子宫内膜容受性下降,导致胚胎植入失败、胎盘形成不良。

人类子宫在生理状态下含有大量的免疫细胞,特别是自然杀伤(NK)细胞<sup>[8]</sup>。uNK 细胞与

外周血自然杀伤(PbNK)细胞在活性、表型、功能和形态方面完全不同<sup>[9-10]</sup>。相较于 PbNK 细胞,uNK 细胞是一种具有高度免疫调节性的 NK 细胞,可分泌细胞因子以促进血管新生和组织重构<sup>[11]</sup>。目前,大多数研究都采用 CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> uNK 分型来鉴定 uNK 细胞,较少提及 CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK 细胞的功能。本研究分析了东莞康华医院生殖中心 RIF 患者资料,探索 RIF 合并 CE 与 uNK 细胞的关系,评估合并 CE 的 RIF 患者外周血和子宫内膜的免疫状态,现将结果报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2018 年 10 月—2023 年 2 月就诊于生殖医学中心的年龄 < 40 岁的 82 例患者为 RIF 组,

均接受过 IVF-ET 移植 3 次及以上或移植高分卵裂期胚胎数 4~6 个或高分囊胚数 3 个及以上,但均未获得临床妊娠者<sup>[2]</sup>。另选择同期在本中心行 IVF-ET 助孕的年龄 <40 岁的有 IVF 助孕妊娠活产史且拟再次助孕的 82 例患者为对照组。

纳入标准:① 年龄 <40 岁者;② 因盆腔输卵管因素行 IVF 助孕治疗者;③ 月经周期正常且规律者(26~31 d);④ 夫妻双方染色体正常者;⑤ 生殖解剖结构正常者;⑥ 内分泌正常者;⑦ 无自身免疫性疾病者;⑧ 无高凝血倾向者;⑨ 无全身感染症状者;⑩ 男方精液检查正常者。

排除标准:① 体质量指数(BMI) <18 kg/m<sup>2</sup> 或 >28 kg/m<sup>2</sup> 者;② 染色体异常者;③ 生殖器官畸形者;④ 输卵管积液者,子宫内膜异位症或腺肌症者;⑤ 内分泌指标异常者(合并糖尿病或高血压或代谢性疾病);⑥ 系统性红斑狼疮者(LA 抗体阳性);⑦ 自身抗体阳性者(抗核抗体、甲状腺抗体、类风湿因子等);⑧ 卵巢储备功能减退者;⑨ 子宫内膜不典型增生者;⑩ 丈夫精液异常者。本研究开展前已获得东莞康华医院伦理委员会批准,所有患者均已告知实验内容并签署知情同意书。

## 1.2 实验方法

1.2.1 主要仪器:贝克曼库尔特 Navios 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2.2 标本采集:采用促黄体生成素(LH)测定试纸,于尿 LH 峰值出现后,在阴道 B 超监测排卵后第 7~9 天,采用子宫内膜取样器吸取 2 份少量子宫内膜组织,一份采用流式细胞仪检测子宫内膜 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK 细胞水平;另一份采用免疫组化方法检测 CD138。CD138 阳性作为诊断 CE 的依据。

1.2.3 外周血:所有受试者近 3 个月未服用任何甾体激素类药物,于月经来潮第 2~5 天空腹采集肘部静脉血液 3~4 mL,送检验科检测促卵泡激素(FSH)、LH、雌二醇(E<sub>2</sub>)、孕酮(P)等水平;超声监测排卵后第 7~9 天的黄体中期,采用 EDTA-K3 采血管采集空腹肘静脉血液 3~4 mL,并检测 PbNK 细胞、血常规。

1.2.4 子宫内膜组织:超声监测排卵后第 7~9 天,采用一次性内膜取样器取少量内膜,置于添加生理盐水的无菌容器中保存。

1.2.5 流式细胞术检测子宫内膜及外周血 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>NK 细胞表型的绝对计数方法:采

取流式细胞仪结合血细胞分析仪双平台绝对计数方法,首先通过流式细胞仪检测荧光抗体标记呈阳性细胞百分比,然后利用血细胞分析仪获得总细胞的绝对计数值,两者乘积得到所检测样本中荧光标记呈阳性细胞的绝对计数值。

1.2.6 免疫组化结果的判定及 CE 的诊断:CD138 在子宫内膜分泌期表达,主要表达于子宫内膜的腺上皮细胞、间质细胞和腔上皮细胞,呈深棕色染色,腺上皮细胞比间质细胞和腔上皮染色更强,见图 1。CE 的诊断标准参考文献<sup>[12]</sup>。免疫组化染色后 CD138 在浆细胞膜为强阳性,胞质为弱阳性。每高倍镜视野下,子宫内膜间质中见到 5 个或以上典型的浆细胞,则诊断为 CE;见到 5 个以下典型的浆细胞,诊断为非 CE。制片全过程均由有资质的技术人员按照操作规范完成,病理诊断由具有独立发放报告的诊断医生共同完成阅片以及复核,每张片子均需要 2 位及以上病理科副主任医师复核。

## 1.3 CE 的治疗及妊娠结局的追踪

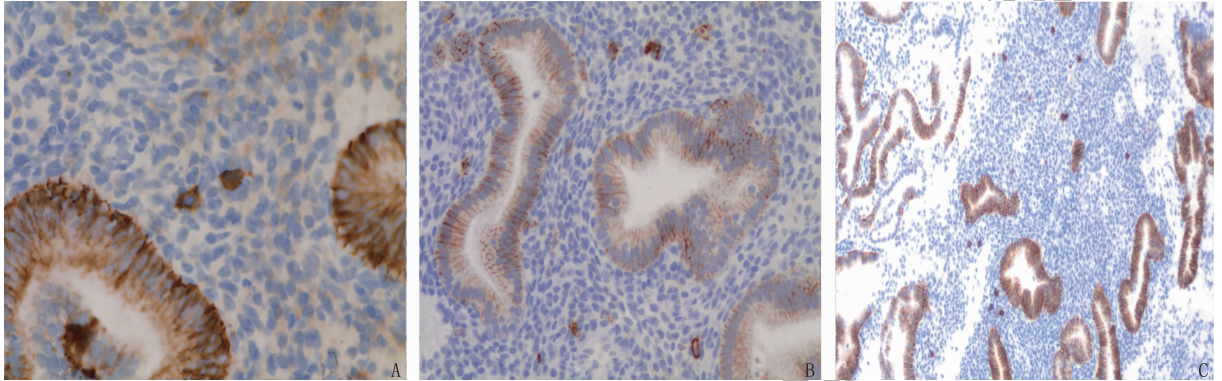
1.3.1 CE 的治疗及治疗后复查:① 对于确诊的 CE 患者,全身性使用抗生素是目前公认的治疗方法,口服抗生素为主要给药方式。本研究 CE 阳性患者采用口服盐酸多西环素片(100 mg, 2 次/d, 用药 14 d)联合甲硝唑片(400 mg, 2 次/d, 用药 14 d)治疗<sup>[13]</sup>。② 治疗结束后下次月经周期黄体期时,采用子宫内膜取样器吸少量子宫腔内膜组织,采用免疫组化进行 CE 病理诊断。

1.3.2 CE 患者的移植周期及内膜准备方法:CE 患者完成 1 个疗程抗炎治疗且再次复查后,于月经第 2~3 天 B 超及性激素[LH、E<sub>2</sub>、P、人绒毛膜促性腺激素(HCG)]结果达基础状态后,采用激素替代治疗(HRT)方案。口服戊酸雌二醇片(补佳乐,1 mg/片,拜耳医药制药)12 d(4~6 mg/d)后,超声监测内膜厚度和雌二醇、LH、P 水平,若内膜 ≥ 8 mm 时,给予黄体酮(黄体酮注射液,20 mg/支,浙江仙琚制药)60 mg/d 肌内注射及地屈孕酮片(达芙通,10 mg/片,荷兰苏威制药)40 mg/d 口服;于黄体支持转化内膜后行 D3 或 D5 胚胎移植,移植后继续给予黄体支持:黄体酮阴道缓释凝胶(雪诺酮,90 mg/支,默克雪诺兰制药)90 mg/d 阴道给药及地屈孕酮片(达芙通,10 mg/片,荷兰苏威制药)40 mg/d 口服。

1.3.3 妊娠标准与观察指标:胚胎移植后 10 d 检测血 HCG 水平,阳性者 2 周后超声检查见孕囊

确诊为临床妊娠。观察不同分组患者的临床妊娠结局。临床妊娠率 = 临床妊娠周期/总移植周期 × 100%；着床率 = 胚胎着床数/总移植胚胎

数 × 100%；早期流产率 = 孕 12 周内自然流产周期数/临床妊娠周期数 × 100%。



A: 放大 400 倍表现; B: 放大 200 倍表现; C: 放大 100 倍表现。深棕色染色为阳性反应。

图 1 显微镜下不同放大倍数免疫组化检测 CD138 的表达与定位 (SP 法)

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。定量数据描述为均值 ± 标准差, RIF 组和对照组的参数数据分析采用 t 检验。RIF 组合并 CE、RIF 组无合并 CE、对照组合并 CE、对照组无合并 CE 的黄体中期内 CD56+ CD16+ uNK、CD56+ CD16+ PbNK 细胞水平比例的分析采用卡方检验, 组间 CE 治疗后临床妊娠率、早期流产率的分析采用秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。采用 Pearson 相关系数确定 uNK 与 PbNK 的相关程度, 采用简单线性回归进行线性拟合。

CD56+ CD16+ PbNK 细胞水平为 (14.38 ± 5.36)% , 与对照组的 (13.58 ± 4.34)% 比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); RIF 组与对照组白细胞计数、淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 2。子宫内膜 CD56+ CD16+ uNK 细胞水平与外周血 CD56+ CD16+ PbNK 细胞水平无相关性 (r = 0.06), 见图 2。

表 2 2 组免疫细胞水平及外周血常规指标比较 (x ± s)

指标	RIF 组 (n = 82)	对照组 (n = 82)
CD56+ CD16+ uNK/%	34.23 ± 17.01*	45.41 ± 20.90
CD56+ CD16+ PbNK/%	14.38 ± 5.36	13.58 ± 4.34
白细胞计数/( × 10 <sup>9</sup> /L)	5.88 ± 1.45	5.98 ± 1.38
淋巴细胞百分比/%	20.80 ± 3.89	21.71 ± 2.93
中性粒细胞百分比/%	57.17 ± 9.51	58.43 ± 9.16

与对照组比较, \*P < 0.05。

## 2 结果

### 2.1 RIF 组与对照组的一般资料比较

2 组年龄、不孕年限、基础卵泡数、基础性激素水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05), 见表 1。

表 1 2 组患者一般资料比较 (x ± s)

一般资料	RIF 组 (n = 82)	对照组 (n = 82)
年龄/岁	33.31 ± 4.56	33.49 ± 4.78
不孕年限/年	5.12 ± 1.89	4.89 ± 1.13
基础卵泡/个	9.92 ± 1.65	9.38 ± 2.72
基础 FSH/(mIU/mL)	5.48 ± 1.68	5.81 ± 2.54
基础 LH/(mIU/mL)	4.56 ± 2.54	4.32 ± 1.67
基础 E <sub>2</sub> /(pg/L)	61.34 ± 28.12	62.80 ± 31.23
基础 P/(ng/mL)	0.32 ± 1.28	0.38 ± 2.01

FSH: 促卵泡激素; LH: 促黄体生成素; E<sub>2</sub>: 雌二醇; P: 孕酮。

### 2.2 2 组 NK 细胞水平的比较

RIF 组 CD56+ CD16+ uNK 细胞水平为 (34.23 ± 17.01)% , 低于对照组的 (45.41 ± 20.90)% , 差异有统计学意义 (P < 0.05); RIF 组黄体中期外周血中

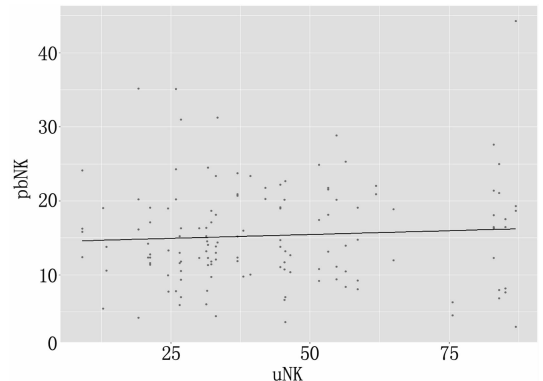


图 2 子宫内膜 uNK 细胞与外周血 PbNK 细胞水平的相关性分析 (相关系数 r = 0.06)

### 2.3 2 组合并 CE 时 CD56+ CD16+ uNK 细胞比较

RIF 组合并 CE 与无合并 CE、对照组合并 CE 与无合并 CE 的黄体中期内膜中 CD56+ CD16+ uNK 细胞、外周血中 CD56+ CD16+ PbNK 细胞水平比较, 差异均无统计学意义 (P > 0.05)。见表 3。

表 3 RIF 组及对照组内合并与无合并 CE 时免疫细胞水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	分类	n	CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> uNK/%	CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> PbNK/%
RIF 组(n=82)	合并 CE	42	32.12 ± 14.55	14.97 ± 3.12
	无合并 CE	40	36.40 ± 20.18	13.72 ± 5.28
对照组(n=82)	合并 CE	44	46.47 ± 22.93	13.83 ± 4.69
	无合并 CE	38	44.98 ± 20.11	13.29 ± 5.91

## 2.4 2 组 CE 治疗后妊娠结局比较

在 RIF 组合并 CE、对照组合并 CE 患者中,治疗后 CE 转阴与 CE 仍为阳性者的年龄、移植日内膜厚度、平均移植胚胎数比较,差异无统计学意

义( $P > 0.05$ ); 在 RIF 组合并 CE 及对照组合并 CE 患者中,治疗后 CE 转阴者较 CE 仍为阳性者的临床妊娠率、着床率均升高,早期流产率降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 2 组 CE 治疗后妊娠结局比较( $\bar{x} \pm s$ ) [n(%)]

妊娠结局	RIF 组合并 CE(n=42)		对照组合并 CE(n=44)	
	治疗后转阴(n=32)	治疗后仍为阳性(n=10)	治疗后转阴(n=39)	治疗后仍为阳性(n=5)
年龄/岁	32.80 ± 7.53	33.34 ± 5.51	33.12 ± 8.34	33.86 ± 9.16
移植日内膜厚度/cm	8.90 ± 1.33	8.77 ± 1.61	9.54 ± 1.39	9.59 ± 1.61
平均移植胚胎数/个	1.94	2.00	1.79	1.80
临床妊娠	11(34.38)*	2(20.00)	28(71.79)*	3(60.00)
着床	14(22.58)*	3(15.00)	37(52.86)*	4(44.44)
早期流产	2(18.18)*	1(50.00)	2(7.14)*	1(33.33)

着床: RIF 组合并 CE 患者中,治疗后转阴者总移植胚胎数为 62 个,治疗后仍为阳性者为 20 个; 对照组合并 CE 患者中,治疗后转阴者总移植胚胎数为 70 个,治疗后仍为阳性者为 9 个。与同组治疗后仍为阳性比较, \* $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

胚胎因素、子宫因素、母体免疫异常等原因均可导致胚胎着床失败。本研究结果显示,伴有 CE 时, RIF 组及对照组临床妊娠率、着床率均下降,在经 CE 治疗转阴后,临床妊娠率、着床率均显著升高,早期流产率显著降低( $P < 0.05$ )。CE 持续炎症的环境影响子宫内膜的容受性,相关机制可能与 CE 引起的内膜免疫异常、容受分子表达异常、蜕膜化异常和内膜蠕动异常等有关,也与 CE 患者存在病原菌感染或合并黏膜下肌瘤、息肉、子宫内膜异位症等有关<sup>[14]</sup>。因此,CE 对胚胎着床的影响极大,CE 的确诊和治疗应作为反复着床失败评估的重要因素。当 RIF 合并 CE 时,应合理治疗 CE,而不是单纯采用免疫疗法治疗免疫细胞紊乱。

研究<sup>[15]</sup>表明 uNK 细胞数量在植入前和妊娠孕早期急剧上升,可达到蜕膜淋巴细胞的 3/4,随着滋养细胞侵入结束及胚胎逐步形成, uNK 细胞慢慢发生凋亡,数目逐渐减少、消失。本研究结果发现, RIF 组黄体中期 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK 细胞水平显著低于对照组,提示 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK 细胞可能影响了 RIF 的过程。uNK 细胞保护妊娠的机制可能是在胚胎植入后, uNK 细胞通过表型转变和受体及细胞因子谱的改变、增强对微生物感

染的抵抗、子宫螺旋动脉的重构、加强免疫耐受等途径来促进成功妊娠<sup>[16]</sup>。在种植窗时期, uNK 和其他免疫细胞如树突状细胞、T-reg 细胞、巨噬细胞等通过分泌正常妊娠需要的细胞因子和血管形成因子,控制螺旋动脉原位细胞的迁移,使滋养细胞向内膜适度迁移<sup>[17-18]</sup>。若滋养细胞侵袭不足,则发生免疫功能失衡,这种免疫失衡会导致外周和子宫蜕膜的慢性炎症反应,进而导致妊娠丢失等相关病理状况<sup>[19-20]</sup>。

本研究结果还显示, RIF 组与对照组黄体中期外周血中 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>PbNK 细胞水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。PbNK 细胞是一种循环在外周血中的自然杀伤淋巴细胞,既往研究<sup>[21-22]</sup>多提示 RIF 患者 PbNK 细胞水平比正常生育史人群升高,其原因可能是血液检测的 PbNK 结果受患者外周血状态的变化影响<sup>[23]</sup>,从而产生偏倚。本研究检测 PbNK 时同时检测患者血常规状态,发现 RIF 组与对照组血常规中白细胞计数、淋巴细胞百分比及中性粒细胞百分比均无显著差异。此外,每个生殖机构对体内正常的 PbNK 细胞水平并无统一标准,因此 PbNK 细胞正常范围可能非常宽泛,在该范围内对个人的妊娠状态或许没有明显的影响<sup>[24]</sup>。

本研究发现,子宫内膜 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>uNK 细胞水平与外周血 CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>PbNK 细胞水平无

相关性( $r=0.06$ ),提示 uNK 细胞和 PbNK 细胞具有不同的表型和功能特征。uNK 在生殖过程中扮演有益角色,是实现胚胎植入、维持妊娠的基础保障。母体淋巴细胞里的 T 细胞和大量独特的 uNK 细胞可以识别子宫母胎界面的胎盘细胞,存在多种避免 T 细胞损伤胎儿的保护机制,从而猜测 uNK 细胞的激活可能是生理性的<sup>[25]</sup>。

局部内膜炎性细胞浸润和炎症介质渗出会改变子宫内微环境,影响子宫内腔容受性,不利于胚胎着床,最终可能导致 RIF<sup>[26]</sup>。在 RIF 患者中,不同表型的 uNK 细胞计数水平也提示不同的致病机制,而这些改变是内源性免疫功能障碍所固有的,还是由外源性因素(如微生物群和病原体的改变)引起的,目前仍有待阐明。有研究<sup>[27]</sup>显示在 CE 状态下,子宫内膜分泌的细胞因子等表达异常,表现为促炎因子分泌增多,抗炎因子分泌降低,影响子宫内膜细胞的增殖与凋亡,导致母-胎界面的免疫平衡被打破,同时对胚胎产生细胞毒作用,影响胚胎植入过程。另有研究<sup>[28]</sup>分析其机制为 CE 可能通过雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)的异常表达减弱子宫内膜基质细胞对孕激素的反应性,促进子宫内膜增殖潜能而抑制其分化潜能,影响蜕膜化的发生,对胚胎植入产生不利影响。研究发现,在 RM 患者中,与非 CE 组相比,CE 对 CD56<sup>+</sup> uNK 细胞的比例无显著影响<sup>[29]</sup>。本研究进一步分层分析发现,在 RIF 组、对照组中,合并 CE 者较无合并 CE 者的黄体中期内膜中 CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK 细胞、外周血中 CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> PbNK 细胞水平均无显著差异( $P>0.05$ ),与前述报道相符合。黄体时期孕酮升高,该时期 70% 的子宫内膜是 CD56<sup>+</sup> NK 细胞,当黄体期即将结束时,孕酮水平下降,uNK 细胞逐渐凋亡。因此,孕酮依赖的蜕膜细胞和 uNK 细胞的合作使基质向可接受植入的蜕膜基质转化<sup>[30]</sup>。本研究所有受试者均于 B 超监测排卵后第 7~9 天的黄体中期取子宫内膜活检标本,精确的同一时间段进行活检可以减少结果中的误差。

综上所述,CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK 细胞低表达可能导致母胎界面免疫紊乱,从而增加 RIF 发生的风险;外周血 CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> PbNK 细胞与子宫内膜 CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> uNK 细胞无相关性;抗生素治疗 CE 能明显改善 RIF 患者的妊娠结局,CE 的确诊和治疗应作为 RIF 评估的重要因素。

#### 参考文献

[1] LI Y Y, YU S Y, HUANG C Y, *et al.* Evaluation of periph-

- eral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure [J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(1): 187-196, e1.
- [2] 徐晨明. 胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术专家共识[J]. *中国产前诊断杂志: 电子版*, 2018, 10(2): 57-57.
- [3] 周怡, 李婷婷, 方丛. 影响胚胎着床的胚胎因素[J]. *实用妇产科杂志*, 2019, 35(2): 81-84.
- [4] 董鑫鑫, 王嵩明. 慢性子宫内膜炎影响女性生殖结局的相关机制探讨[J]. *生殖医学杂志*, 2020, 29(1): 130-134.
- [5] KITAZAWA J, KIMURA F, NAKAMURA A, *et al.* Alteration in endometrial helper T-cell subgroups in chronic endometritis[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2021, 85(3): e13372.
- [6] LI Y Y, XU S R, YU S Y, *et al.* Diagnosis of chronic endometritis: how many CD138<sup>+</sup> cells/HPF in endometrial stroma affect pregnancy outcome of infertile women[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2021, 85(5): e13369.
- [7] AGHAEPOUR N, GANIO E A, MCILWAIN D, *et al.* An immune clock of human pregnancy[J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(15): eaan2946.
- [8] 吴小华, 冯政利. 慢性子宫内膜炎的诊断及生育相关的发病机制研究进展[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2021, 41(1): 1-5.
- [9] 陈聪, 黄春宇, 李玉叶, 等. 反复种植失败患者与复发性流产患者分泌期子宫内膜自然杀伤细胞数量分析[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(10): 1016-1021.
- [10] AL-LAMEE H, HILL C J, TURNER F, *et al.* The role of endometrial stem/progenitor cells in recurrent reproductive failure[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(5): 775.
- [11] SOJKA D K, YANG L P, YOKOYAMA W M. Uterine natural killer cells: to protect and to nurture[J]. *Birth Defects Res*, 2018, 110(20): 1531-1538.
- [12] MCQUEEN D B, MANIAR K P, HUTCHINSON A, *et al.* Redefining chronic endometritis: the importance of endometrial stromal changes[J]. *Fertil Steril*, 2021, 116(3): 855-861.
- [13] 孟文静, 孟庆霞, 李红. 慢性子宫内膜炎在反复种植失败中的研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(4): 541-545.
- [14] STEVENS BRENTJENS L, HABETS D, DEN HARTOG J, *et al.* Endometrial factors in the implantation failure spectrum: protocol of a MULTidisciplinary observational cohort study in women with Repeated Implantation failure and recurrent Miscarriage (MURIM Study) [J]. *BMJ Open*, 2022, 12(6): e056714.
- [15] 蔡君英, 黄冬梅, 张波. 自然杀伤细胞在反复种植失败中的研究进展[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2018, 38(7): 594-596.
- [16] BUSNELLI A, SOMIGLIANA E, CIRILLO F, *et al.* Efficacy of therapies and interventions for repeated embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1747.
- [17] JABRANE-FERRAT N. Features of human decidual NK cells in healthy pregnancy and during viral infection[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1397.
- [18] VON WOON E, GREER O, SHAH N, *et al.* Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hum Reprod Update*, 2022, 28(4): 548-582.

(下转第 110 面)