

基于 sPD-1 和 Th17/Treg 相关细胞因子探讨二至天癸方辨治 肾虚型反复种植失败的疗效和机制

王艺绚¹, 庞聪慧², 吴海萃², 于晓娜¹, 辛欣¹, 连方^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

[摘要] 目的:探讨补肾中药二至天癸方治疗肾虚型RIF的疗效和可能机制。方法:选择在山东中医药大学附属医院生殖与遗传中心行自然周期冻融胚胎移植(FET)的肾虚型反复种植失败(RIF)患者70例,随机分为观察组和对照组各35例,观察组患者于FET周期前2个月开始,每月经周期第3天起口服二至天癸方,并于移植当月月经周期第3天继续服用至移植日。对照组不服中药。另从本院生殖病案中筛选10例既往首次行自然周期FET即成功获得临床妊娠的患者作为正常组。从生殖中心标本库中提取3组患者胚胎移植日当天的外周血清,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清可溶性程序性死亡蛋白-1(sPD-1),可溶性程序性死亡蛋白-配体1(sPD-L1),转化生长因子- β (TGF- β),白细胞介素-17(IL-17),白细胞介素-10(IL-10)的水平,并进行比较;观察观察组和对照组治疗前后的肾虚证候积分变化及最终的生化妊娠率、临床妊娠率和胚胎着床率。结果:与正常组比较,对照组患者胚胎移植日血清sPD-1、IL-17水平明显升高($P<0.05$),IL-10和TGF- β 水平显著降低($P<0.01$),sPD-L1水平差异无统计学意义。肾虚型RIF患者血清sPD-1与IL-17呈正相关($r=0.347, P<0.05$),与IL-10($r=-0.521, P<0.01$)和TGF- β ($r=-0.457, P<0.01$)呈负相关。与对照组比较,中药治疗后,观察组中医证候积分明显改善($P<0.05$),临床妊娠率和胚胎着床率明显提高($P<0.05$),但两组生化妊娠率差异无统计学意义。结论:肾虚型RIF患者体内异常表达的sPD-1使辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)平衡被打破,不利于胚胎着床和妊娠维持。补肾中药二至天癸方能够明显改善肾虚型RIF患者的肾虚症状,降低外周血清sPD-1和IL-17的浓度,提高TGF- β 和IL-10的水平,调节外周Th17/Treg免疫平衡,提高着床率和临床妊娠率,具有较高的临床价值。

[关键词] 反复种植失败; 肾气虚证; 二至天癸方; 母胎免疫; 可溶性程序性死亡因子-1(sPD-1); 辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)免疫平衡

[中图分类号] R242;R2-031;R287;R271.14 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)07-0139-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231493

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230131.1524.010.html>

[网络出版日期] 2023-02-01 09:53:50

Clinical Efficacy and Mechanism of Erzhi Tiangui Prescription in Treatment of Patients with Repeated Implantation Failure of Kidney Deficiency Syndrome Based on sPD-1 and Th17/Treg Cytokines

WANG Yixuan¹, PANG Conghui², WU Haicui², YU Xiaona¹, XIN Xin¹, LIAN Fang^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical efficacy and possible mechanism of Erzhi Tiangui prescription on repeated implantation failure (RIF) of kidney deficiency syndrome. **Method:** Seventy patients with RIF of kidney deficiency syndrome who underwent natural cycle frozen-thawed embryo transfer (FET) in the Reproductive and Genetic Center of the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese

[收稿日期] 2022-09-27

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81974577,82274573)

[第一作者] 王艺绚, 硕士, 从事中医药在生殖领域的研究, E-mail: wyxyeah@163.com

[通信作者] * 连方, 博士, 主任医师, 从事中医辅助生殖技术研究, E-mail: lianfangbangong@163.com

Medicine were enrolled and randomly divided into a treatment group (35 cases) and a control group (35 cases). Patients in the treatment group took oral Erzhi Tiangui prescription from the third day of each menstrual cycle two months before the FET cycle and continued to take it until the day of transplantation from the third day of the menstrual cycle in the month of transplantation. Those in the control group did not accept traditional Chinese medicine (TCM). In addition, 10 patients who successfully achieved clinical pregnancy after the first natural cycle FET were screened from the reproductive medical record bank of this hospital and assigned to the normal group. Peripheral blood samples of patients in the three groups on the day of embryo transfer were collected from the specimen bank of the Reproductive and Genetic Center. Serum soluble programmed death molecule-1 (sPD-1), soluble programmed death molecule-ligand 1 (sPD-L1), transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin-17 (IL-17), and interleukin-10 (IL-10) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The changes in kidney deficiency syndrome scores, the final biochemical pregnancy rates, clinical pregnancy rates, and embryo implantation rates of the treatment group and the control group before and after treatment were observed. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased serum levels of sPD-1 and IL-17 ($r=0.347, P<0.05$), decreased levels of IL-10 and TGF- β ($P<0.01$), and non-significant change in sPD-L1 level. Serum sPD-1 was positively correlated with IL-17 ($P<0.05$) and negatively correlated with IL-10 ($r=-0.521, P<0.01$) and TGF- β ($r=-0.457, P<0.01$) in RIF patients with kidney deficiency syndrome. After TCM treatment, compared with the control group, the treatment group showed improved TCM syndrome score ($P<0.05$) and increased clinical pregnancy rate and embryo transfer rate ($P<0.05$), but there was no statistically significant difference in the biochemical pregnancy rate between the two groups. **Conclusion:** Abnormal expression of sPD-1 in patients with RIF of kidney deficiency syndrome breaks the balance of T helper 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg), which is not conducive to embryo implantation and pregnancy maintenance. Erzhi Tiangui prescription, a TCM for tonifying the kidney, can significantly improve the symptoms of kidney deficiency in patients with RIF of kidney deficiency syndrome, reduce the concentrations of sPD-1 and IL-17 in the peripheral serum, increase the levels of TGF- β and IL-10, regulate the peripheral Th17/Treg immune balance, and increase the implantation rate and clinical pregnancy rate, which has a high clinical value.

[Keywords] repeated implantation failure; kidney Qi deficiency syndrome; Erzhi Tiangui prescription; maternal-fetal immunity; soluble programmed death molecule-1 (sPD-1); Th17/Treg immune balance

反复种植失败(RIF)是指年龄40岁以下的不孕患者,在辅助生殖(ART)治疗中,连续3个及以上胚胎移植周期累计种植4枚及以上的优质胚胎而未获得妊娠^[1]。RIF的病因有很多,但目前仍有相当一部分患者发生不明原因胚胎反复种植失败,这些患者是生殖医生研究的一大难点。近来有研究发现辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)平衡能够对正常妊娠产生重要影响,然而在RIF患者体内却观察到了Th17/Treg免疫失衡现象^[2]。近年来免疫检查点分子在诱导移植耐受、肿瘤免疫逃避和预防自身免疫等领域取得了突破性进展。程序性死亡蛋白-1(PD-1)为免疫检查点分子的一种,与配体程序性死亡蛋白-配体1(PD-L1)相结合,对于Th17/Treg平衡具有调控作用,PD-1/PD-L1信号通路有望成为调控母胎免疫耐受的完美靶标^[3]。可溶性程序性死亡蛋白-1(sPD-1)为PD-1的可溶性

形式,既能够在血液循环中发挥类似于细胞因子的作用,也可以与配体PD-L1结合,调控机体的免疫状态。研究发现,在复发性流产(RSA)患者的血清中sPD-1的异常表达阻断了PD-1/PD-L1传递负性信号,打破了Th17/Treg平衡,因而导致了流产的发生^[4]。RIF被认为是RSA的一种早期特殊表现,二者之间存在相似的免疫机制,但是目前关于sPD-1在RIF中的相关研究甚少。

中医认为,肾为先天之本,五脏之根。肾藏精,主宰着人体的生长发育和生殖,还能够有效调节免疫功能,预防疾病的发生。中医药作为目前治疗RIF的主要手段之一,能够调整生殖免疫功能,调节子宫内膜的免疫活性细胞,提高母体免疫耐受能力,改善子宫内膜容受性^[5-6]。山东中医药大学连方教授对于反复种植失败的治疗颇有心得,指出肾虚精少,胞宫失养是子宫内膜容受性下降导致反复

种植失败的主要病机,肾虚是本病发生、发展的关键原因,补肾填精是最主要的治则。二至天癸方是连方教授在二至丸的基础上加减化裁而成的经验方,能够补肾益精,调和气血,对于治疗肾虚RIF具有良好的临床疗效。本研究笔者通过比较肾虚RIF患者种植窗口期sPD-1与Th17/Treg免疫平衡相关因子在外周血清中的表达水平,并进行相关性分析,初步探讨种植窗口期sPD-1和Th17/Treg免疫平衡与肾虚RIF疾病的关系,并以此为基础,阐释补肾中药二至天癸方治疗肾虚型RIF的疗效和可能机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象 本研究病例来源于2019年6月—2021年6月就诊于山东中医药大学附属医院生殖与遗传中心行自然周期冻融胚胎移植的患者。采取随机、对照、单盲实验方法,研究对象的临床妊娠率

为观测主要结局指标,根据本中心既往病例粗略估算,预计观察组的临床妊娠率为43%,对照组为13%, α 取0.05(双侧),把握度为80%,计算得到 $n=32$,考虑到1:1随机化分组,10%脱落率,最终得到样本量为70例。采用随机数字表法按1:1比例将患者分为观察组和对照组,每组各35例。同时为了避免选择性偏倚,研究采用将随机号装入不透光信封密闭作为随机分配方案隐匿的方法。对受试者干预措施实施盲法。此外,另从本院生殖病案库中筛选10例既往首次行自然周期胚胎移植即成功获得临床妊娠的患者作为正常组。

1.2 一般资料 本研究经山东中医药大学附属医院生殖医学伦理委员会审批同意(批号11-06-03号-KY),所有患者及家属自愿并签署知情同意书。收集患者的基线数据,统计得出各组患者的基线资料差异均无统计学意义,具有可比性。见表1。

表1 正常组、观察组和对照组一般资料的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data among normal group, treatment group and control group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄/岁	不孕年限/岁	身体质量指数/kg·m ²	既往移植周期数/个
正常组	10	31.90±2.23	3.60±1.65	23.39±3.91	-
观察组	32	33.09±3.29	3.43±1.80	22.25±2.33	4.83±1.15
对照组	33	32.82±2.97	3.29±1.43	21.88±2.81	4.89±1.13

1.3 诊断标准

1.3.1 RIF诊断标准 参照COUGHLAN等^[1]提出的共识制订诊断标准,即年龄<40岁的不孕患者,在辅助生殖治疗中,连续3个及以上新鲜/冻融胚胎移植周期,累计种植4枚及以上的优质胚胎而未获得妊娠。

1.3.2 肾虚辨证标准 参照2012年国家中医药管理局制定的《中药新药临床研究指导原则》^[7]和2021年中医妇科学(第十一版)^[8]所拟订,主证为婚久不孕,腰膝酸软,月经量少、质稀,舌质淡,苔薄白,脉细弱;次证为头晕耳鸣,性欲下降,神疲肢倦,夜尿频多,面色晦暗。符合主证兼有1~2项次证可确诊。

1.4 纳入标准 ①年龄<40岁;②符合本病西医诊断标准以及中医辨证标准;③有剩余胚胎,且拟行自然周期胚胎移植的患者;④具有正常的月经周期,不孕症病因主要为盆腔输卵管因素;⑤卵巢储备正常(卵泡刺激素<10 IU·L⁻¹);⑥夫妻双方染色体正常;⑦同意参与研究并签署知情同意书。

1.5 排除标准 ①在治疗期间用甾体类激素者;②宫腔镜或超声诊断为宫腔异常影响胚胎种植及妊娠者;③遗传因素所致不孕者;④有泌尿生殖系统急性感染、性病感染者;⑤双侧输卵管积水者;

⑥同时有严重的原发性躯体疾病和精神疾病所致的不能承受妊娠者。

1.6 剔除、脱落标准 ①入组后患者不配合治疗,中途中断治疗或主动要求退出者;②入组后因各种原因未移植者;③未说明原因的失访者。

1.7 样本收集 在进行该研究前严格建立标本库。对于拟在本院生殖中心行辅助生殖治疗的不孕症夫妇,在患者完全知情同意并自愿原则下,均于胚胎移植当天采集空腹肘静脉血3~5 mL,于干燥玻璃管中静置30 min后置于离心机,3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径13.5 cm)。取上清血清于1.5 mL EP管中,放于标本库-80℃低温冰箱内保存,以备用于后续酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测。

1.8 治疗方法

1.8.1 西药治疗 在本研究中,患者采用自然周期胚胎移植术。根据月经周期情况,一般于月经第8~10天开始用经阴道B超检查监测卵泡大小和内膜生长情况。期间结合血清黄体生成素(LH)的结果,综合判断卵泡发育情况及下次检查时间。当内膜厚度达到7 mm以上,卵泡直径超过18 mm,结合患者自身雌二醇(E₂)、LH水平,给予注射人体绒毛膜

促性腺激素(HCG,珠海丽珠药业公司,国药准字H44020673,2 000 U)4 000 U扳机,扳机后5 d行冻融胚胎移植。卵裂期胚胎在移植当天解冻,根据胚胎形状、破碎程度和细胞极性分为I级或II级胚胎^[9]。本中心正常冷冻的胚胎是第3天的卵裂期胚胎。每个周期移植胚胎的最大数量为2枚,所有患者均优先考虑I级胚胎的移植。移植术后按常规给予足量黄体支持。

1.8.2 中药治疗 观察组患者于FET周期前2个月开始,每月经周期第3天起口服二至天癸方,方剂组成为女贞子15 g、墨旱莲15 g、枸杞子15 g、菟丝子15 g、熟地黄12 g、当归12 g、白芍12 g、川芎9 g、制香附12 g、甘草6 g,所有饮片均来自山东省中医院中药房,经山东中医药大学李峰教授鉴定为正品,由本院中药房统一煎取400 mL,分早、晚2次餐后30 min后服用,每次200 mL,并于移植当月月经周期第3天继续服用至移植日。对照组不服中药。

1.9 观察指标

1.9.1 主要结局指标 临床妊娠率。胚胎移植28 d后行阴道B超,宫腔内见孕囊、胎芽及胎心者即为临床妊娠,临床妊娠率=临床妊娠例数/总例数×100%。

1.9.2 次要结局指标 ①治疗前后肾虚证候积分变化。治疗前后参照《中药新药临床研究指导原则》^[6]观察患者腰膝酸软,月经异常、舌脉等主证和头晕耳鸣,神疲肢倦,夜尿频多等次证并进行评分,主证分为0、2、4分,次证分为0、1、2分,总分最高26分;②移植日血清细胞因子含量。从标本库中提取存放的患者血清,采用ELISA检测血清中sPD-1、sPD-L1、转化生长因子-β(TGF-β)、白细胞介素-17(IL-17)、白细胞介素-10(IL-10)的水平,试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司,批号分别为210312、201023、210414、210259、210372。操作按照试剂盒说明书要求进行;③生化妊娠率和着床率。胚胎移植后2周血β-HCG>20 U·L⁻¹为生化妊娠,生化妊娠率=生化妊娠个数/总例数×100%。确立临床妊娠后,B超下所检查到的着床胚胎的个数与移植胚胎总数之比即为着床率,着床率=胚胎着床数/移植胚胎总数×100%。

1.10 安全性评价 观察两组患者治疗前后不良反应发生情况及肝肾功能等。

1.11 统计学方法 所有数据经过整理后使用SPSS 26.0统计软件进行分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示计量资料,若满足正态分布,采用 t 检验;若不满足正态分布,采用Mann-Whitney U 检验。计数资料以例(%)

表述,采用卡方检验;各因素之间相关性分析采用Pearson相关性检验; $P<0.05$ 者被认为结果具有统计学意义。应用GraphPad Prism 9.3.0软件进行作图。

2 结果

2.1 病例完成情况 观察组有1人途中擅自服用雌激素类药物,故剔除;有2人因个人原因取消移植,视为脱落病例。对照组有2人因个人原因中断治疗,视为脱落病例。最终共65例患者纳入分析,观察组32例,对照组33例。因受试者服药后仅在胚胎移植当天收集血清和肾虚证候积分,脱落患者未进行治疗后的症候评估和血清采集,故本研究采用了符合方案集(PP)数据集分析。

2.2 中医证候积分比较 治疗前,观察组与对照组的中医证候积分差异无统计学意义。治疗后,与本组治疗前比较,两组患者中医证候及分均明显降低($P<0.05$);与对照组治疗后比较,观察组患者中医证候及分明显降低($P<0.05$)。见表2。

表2 观察组和对照组中医证候积分的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison in integral of traditional Chinese medicine syndrome between treatment group and control group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	中医证候积分/分
观察组	32	治疗前	11.16±2.40
		治疗后	9.84±1.89 ^{1,2)}
对照组	33	治疗前	11.09±2.44
		治疗后	10.83±2.02

注:与本组治疗前比较¹⁾ $P<0.05$;与同期对照组比较²⁾ $P<0.05$

2.3 胚胎移植日血清细胞因子水平比较 与正常组比较,对照组患者胚胎移植日血清sPD-1、IL-17水平明显升高($P<0.05$),IL-10和TGF-β水平显著降低($P<0.01$),sPD-L1水平差异无统计学意义。将对照组患者血清sPD-1与IL-17、IL-10和TGF-β分别作相关性分析发现,肾虚型RIF患者血清sPD-1与IL-17呈正相关($r=0.347, P<0.05$),与IL-10和TGF-β呈负相关(分别为 $r=-0.521, r=-0.457, P<0.01$)。见图1。与对照组治疗后比较,中药治疗后,观察组患者sPD-1与IL-17水平明显下降($P<0.05$),IL-10和TGF-β水平明显升高($P<0.05$)。见表3。

2.4 生化妊娠率、临床妊娠率和着床率比较 中药干预后,观察组患者的临床妊娠率明显高于对照组($P<0.05$),两组率差(RD)=0.224 4,95%置信区间(95%CI,0.009 3~0.439 5)。观察组的胚胎着床率较对照组亦有明显提高($P<0.05$),然而两组患者的生化妊娠率差异无统计学意义。见表4。

表3 正常组、观察组和对照组胚胎移植日血清细胞因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison in serum cytokine levels on day of embryo transfer among normal group, treated group and control groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	sPD-1	sPD-L1	IL-17	IL-10	TGF- β
正常组	10	10.98 \pm 1.52	11.10 \pm 1.55	61.94 \pm 13.42	183.54 \pm 43.99	566.46 \pm 97.11
观察组	32	11.55 \pm 1.61 ³⁾	11.81 \pm 1.42	64.10 \pm 16.54 ³⁾	165.90 \pm 32.89 ³⁾	515.82 \pm 114.28 ³⁾
对照组	33	12.50 \pm 2.11 ¹⁾	11.62 \pm 1.89	75.15 \pm 17.20 ¹⁾	146.25 \pm 31.36 ²⁾	438.83 \pm 123.50 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与对照组比较³⁾ $P<0.05$

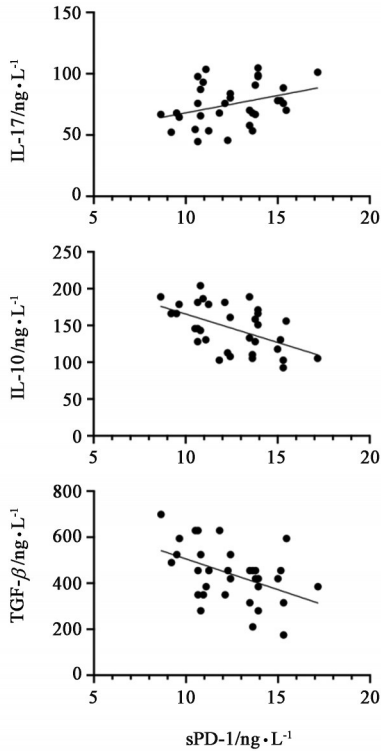


图1 对照组患者胚胎移植日血清sPD-1与IL-17、IL-10和TGF- β 的相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis of serum sPD-1 with IL-17, IL-10 and TGF- β in control group

表4 观察组和对照组生化妊娠率、临床妊娠率和着床率的比较

Table 4 Comparison in biochemical pregnancy rates, clinical pregnancy rates and implantation rates between treatment group and control group

组别	例数	生化妊娠率	临床妊娠率	着床率
观察组	32	50.00	40.63 ¹⁾	30.19 ¹⁾
对照组	33	33.33	18.18	14.04

注:与对照组比较¹⁾ $P<0.05$

2.5 不良反应及安全性评价 参与研究的所有患者均未见明显不良反应,具有良好的安全性。

3 讨论

体外受精-胚胎移植技术(IVF-ET)技术如今已成为治疗不孕症的主要方式之一,为无数的不孕症患者解决了生育难题。然而,当前IVF-ET的临床妊

娠率始终波动在40%~50%,RIF成为妊娠率难以突破的主要原因之一。中医认为,肾主生殖。《医学衷中参西录》指出:“男女生育,皆赖肾脏作强”,强调肾为先天之本,主宰人体的生长发育和生殖活动的重要作用。肾气充盛,精气满溢,天癸成熟泌至,胞宫得以濡养,从而具有容纳胚胎的能力。若肾虚精亏,天癸乏源,胞宫空虚,则难以载胎受孕。此外,肾主骨生髓,肾精能够充养骨髓,而在现代医学中骨髓被认为是免疫系统的中枢器官,因此,中医肾主骨生髓的功能亦与现代医学的免疫学紧密相关^[10]。若肾气虚衰,免疫功能缺陷,机体就更容易受到致病因子的影响而发生病变。肾虚型RIF患者机体免疫稳态失衡,免疫细胞增殖分化异常,免疫功能失衡。目前,临床上大多数RIF患者由于经常进行促排卵治疗,肾气亏虚,肾阴不足,常有腰膝酸软、月经量少,舌质偏红、苔少、脉细等肾虚症状表现,故此类型患者治疗当以补肾益阴为主。

二至天癸方是现代临床经验方,方中女贞子入肝肾经,有“强阴,健腰膝,明目”之功;菟丝子补益肝肾,强筋健骨,与女贞子共为君药,以奏阴阳双补之效;墨旱莲、枸杞子肝肾同补,养血益精;熟地黄填骨髓,益真阴,补肾精,充天癸;当归补血活血,调经止痛;白芍养血调经,敛阴止汗;川芎长于活血行气、祛风止痛,为治疗妇人血闭和不孕症的良药;香附疏肝解郁,理气宽中,乃“气病之总司,女科之主帅”;炙甘草偏于温补,调和诸药。全方共奏滋肾益阴,调气和血之功。既往研究表明,二至天癸方能够增加颗粒细胞E₂、孕激素(P)、抑制素B(INHB)的分泌,增加子宫动脉及子宫内膜血流灌注,提高子宫内膜成熟度,宏观调节母体的生殖内分泌环境,降低母胎界面的免疫排斥作用,提高RIF患者的妊娠率^[11-12]。此外,二至天癸方还能够通过增强Mfn2的表达,促进线粒体融合,介导磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号转导通路下调B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)关联死亡启动子重组蛋白(Bad)因子表达,抑制颗粒细胞凋亡等过程改善高龄肾气虚患者的助孕结局^[13-15]。

妊娠是一种同种异体移植现象,妊娠的成功取决于母胎界面微环境和免疫环境的平衡与协调。Th17细胞是近几年新发现的CD4⁺T细胞亚群,通过分泌IL-17、白细胞介素-22(IL-22)、肿瘤坏死因子- γ (TNF- γ)等细胞因子参与炎症反应和病理妊娠的过程^[16-17]。Treg细胞是CD4⁺T细胞的另一个重要亚群,具有免疫抑制和免疫应答低下两大主要功能。Treg细胞能够分泌IL-10、TGF- β 等免疫抑制性细胞因子来抑制免疫活动的过度兴奋,以避免自身性免疫疾病的发生^[18]。正常妊娠是一种“Treg趋向”现象,即母体免疫系统向Treg细胞及其相关细胞因子参与的免疫耐受和免疫抑制偏移,而不是向着Th17细胞及其相关细胞因子参与的免疫排斥和免疫炎症反应偏移^[19-20]。然而,在RIF患者体内却观察到了Th17/Treg免疫失衡现象^[2]。

对于免疫细胞而言,活化性和抑制性共刺激信号作用平衡在调节其功能活性中发挥重要作用。PD-1能够介导免疫抑制信号参与免疫耐受和肿瘤免疫逃逸等多种生理和病理过程^[21]。目前关于PD-1的研究大多集中在癌症领域。肿瘤细胞上过度表达的PD-L1与免疫细胞中的PD-1相结合能够增强Treg细胞的活性,抑制Th细胞增殖活化,削弱机体的免疫应答,这可能是肿瘤免疫逃逸的重要机制。正常妊娠时,胎盘中滋养细胞的快速增殖、分化以及免疫调节能力与肿瘤细胞的生长模式相类似,并且也受到了PD-1/PD-L1通路的精准调控。若调节发生异常,则会引起母胎免疫耐受能力下降,滋养细胞侵袭功能减弱,导致反复妊娠丢失、胎盘发育不良和妊娠并发症等疾病的发生^[22-23]。D'ADDIO等^[24]发现,向孕鼠腹腔注射PD-L1mAb阻滞PD-1/PD-L1信号通路传导,母胎界面Treg细胞减少,IL-17水平上升,因此认为PD-1/PD-L1信号通路能够调控Th17/Treg免疫平衡,有望成为临床诱导母胎免疫耐受的理想靶标。

PD-1在人体内具有膜性(mPD-1)和可溶性(sPD-1)2种形式,分别表达于细胞膜上和分泌于液体中。sPD-1是由PD-1Dex3型(3号外显子缺失)mRNA编码而成的不具有跨膜区和胞内区而有胞外区的游离蛋白,其能够与配体mPD-1竞争性结合,阻断PD-1/PD-L1信号通路,起到免疫增强的作用^[25-27]。XIAO等^[28]研究发现,使用sPD-1能够有效阻断肿瘤小鼠模型PD-1/PD-L1负性信号通路,促进T细胞的活化、增殖与细胞因子的分泌,加强淋巴细胞免疫应答,增强机体抗肿瘤的作用。REN等^[29]检

测了sPD-1在风湿性关节炎(RA)患者体内的表达水平,结果发现sPD-1在从RA患者PBMC分离的CD4⁺CD25⁺Tregs中上调,抑制了RA患者外周血中CD4⁺CD25⁺Tregs的水平,并可能参与CD4⁺CD25⁺Tregs介导的多种免疫过程。LIU等^[30]发现RA患者血清中升高的sPD-1浓度与Th1型细胞因子IFN- γ 和TNF- α 以及Th17型细胞因子IL-17均成正比,sPD-1对PD-1/PD-L1通路的阻断增强了促炎性细胞因子表达,Th1细胞和Th17细胞的生成。吴梦茹等^[4]检测了RSA患者血清中sPD-1的水平,发现在RSA患者血清中sPD-1的表达水平异常升高,且与TGF- β 和IL-10的水平呈负相关,推测可能是过度升高的sPD-1阻断了PD-1/PD-L1传递负性信号,减弱了Treg的免疫抑制功能,因而导致RSA的发生。RIF被认为是RSA的一种早期特殊表现,二者之间存在相似的免疫机制,但是目前关于sPD-1在RIF中的作用的报道甚少。

本研究发现,肾虚RIF患者外周血清sPD-1、IL-17的浓度升高,TGF- β 、IL-10的浓度下降,且sPD-1的浓度与IL-17呈正相关,与TGF- β 和IL-10呈负相关。肾虚型RIF患者体内异常表达的sPD-1阻断了PD-1/PD-L1信号通路,使Th17/Treg平衡被打破,不利于胚胎着床和妊娠维持。补肾中药二至天葵方能够明显改善肾虚型RIF患者的肾虚症状,降低外周血清sPD-1和IL-17的浓度,提高TGF- β 和IL-10的水平,调节外周Th17/Treg免疫平衡,进而增强患者免疫耐受,提高着床率和临床妊娠率,具有较高的临床价值。本研究先对RIF患者外周sPD-1和Th17/Treg相关细胞因子的表达进行实验研究,提出肾虚型RIF患者体内异常的sPD-1水平可能与Th17/Treg的免疫调节紊乱有关的新观点,发现了补肾中药二至天葵方改善肾虚RIF患者的妊娠结局可能机制。然而,母胎免疫是一个复杂的调控网络,PD-1/PD-L1对Th17/Treg的免疫平衡的具体影响机制尚不明确,因此使用动物模型,对PD-1/PD-L1通路进行活化和阻断,来深入研究其与Th17/Treg免疫平衡的关系可以作为生殖免疫学下一步的研究方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] COUGHLAN C, LEDGER W, WANG Q, et al. Recurrent implantation failure: Definition and management [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(1): 14-38.

- [2] 章志琴,龙生根,黄志辉,等. Treg/Th17 细胞平衡在反复种植失败患者外周血中的调节作用[J]. 江西医药,2019,54(5):447-449,460.
- [3] 张永红. PD-1/PD-L1 信号通路调控巨噬细胞分化和功能在早期妊娠中的作用及机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2019.
- [4] 吴梦茹,朱玥洁,赵静,等. 不明原因反复性流产患者血清中 sPD-1 和 sPD-L1 与相关细胞因子的水平变化[J]. 免疫学杂志,2015,31(7):603-607.
- [5] 张君探. 二至天葵颗粒对 IVF 准备周期子宫内膜 Galectin-3 和 T 淋巴细胞的干预[D]. 济南:山东中医药大学,2013.
- [6] 张良,张建伟,吴海萃. 养精种玉汤治疗反复移植失败肾阴虚证的疗效及对 LIF,VEGF,IL-1 β ,MCP-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(11):97-102.
- [7] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:386.
- [8] 冯晓玲,张婷婷. 中医妇科学(第十一版)[M]. 北京:中国中医药出版社,2021:62-66.
- [9] BRAIN D, KAY E. *In vitro* fertilization[M]. England: Cambridge University Press, 1997: 115.
- [10] 刘宏潇,冯兴华. 从遗传免疫学基础论肾藏象与强直性脊柱炎[J]. 辽宁中医杂志,2003,30(12):972-974.
- [11] 王瑞霞. 基于表观遗传学探讨补肾中药改善 IVF 治疗结局的机制研究[D]. 济南:山东中医药大学,2011.
- [12] 张建伟. 补肾中药对超促排卵小鼠着床期子宫内膜组织形态学的影响[J]. 中华中医药学刊,2009,27(11):2320-2322.
- [13] 连方,郭颖,刘丹琪,等. 二至天葵颗粒对高龄肾气阴两虚 IVF-ET 患者 Mfn2 表达的影响:随机对照研究[J]. 中国中西医结合杂志,2020,40(2):171-175.
- [14] 连方,相珊. 二至天葵方对 IVF-ET 患者颗粒细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2017,37(11):1315-1319.
- [15] 李然,郭颖. 基于网络药理学及分子对接探讨二至天葵方治疗女性不孕症的作用机制[J]. 中国药理学通报,2022,38(1):126-133.
- [16] LEE Y, AWASTHI A, YOSEF N, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells[J]. Nat Immunol, 2012, 13(10):991-999.
- [17] GUO Y, MACISAAC K D, CHEN Y, et al. Inhibition of ROR γ T skews TCR α gene rearrangement and limits T Cell repertoire diversity[J]. Cell Rep, 2016, 17(12):3206-3218.
- [18] WANG J, YANG J, YAN Y, et al. Effect of adoptive transfer of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ Treg induced by trichostatin A on the prevention of spontaneous abortion[J]. J Reprod Immunol, 2019, 131:30-35.
- [19] CHEN Z, LIN F, GAO Y, et al. FOXP3 and ROR γ T: transcriptional regulation of Treg and Th17 [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(5):536-542.
- [20] PECK A, MELLINS E D. Plasticity of T-cell phenotype and function: The T helper type 17 example [J]. Immunology, 2010, 129(2):147-153.
- [21] SHARPE A H, WHERRY E J, AHMED R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection [J]. Nat Immunol, 2007, 8(3):239-245.
- [22] HABICHT A, DADA S, JUREWICZ M, et al. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance[J]. J Immunol, 2007, 179(8):5211-5219.
- [23] 周晓君,丁锦丽,杨菁. 蜕膜组织 PD-1 和 PD-L1 的表达及其与复发性流产的相关性[J]. 华中科技大学学报:医学版,2019,48(3):258-262,310.
- [24] D'ADDIO F, RIELLA L V, MFARREJ B G, et al. The link between PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance[J]. J Immunol, 2011, 187(9):4530-4541.
- [25] NAN J, LIANG L, LI L, et al. Soluble programmed death-1 and soluble programmed death ligand 1 protein expression and immune status in patients with recurrent aphthous ulcer [J]. West China J Stomatol, 2017, 35(3):286-290.
- [26] SHIN S P, SEO H H, SHIN J H, et al. Adenovirus expressing both thymidine kinase and soluble PD1 enhances antitumor immunity by strengthening CD8 T-cell response[J]. Mol Ther, 2013, 21(3):688-695.
- [27] AMANCHA P K, HONG J J, ROGERS K, et al. *In vivo* blockade of the programmed cell death-1 pathway using soluble recombinant PD-1-Fc enhances CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell responses but has limited clinical benefit[J]. J Immunol, 2013, 191(12):6060-6070.
- [28] XIAO H, HUANG B, YUAN Y. Soluble CD160 enhances antitumor immunity against murine H22 hepatocarcinoma *in vivo* [J]. J Cancer Sci Ther, 2017, doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-2154.
- [29] REN C F, ZHAO Y X, HOU C F, et al. Expression of soluble programmed death-1 protein in peripheral blood regulatory T cells and its effects on rheumatoid arthritis progression[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(1):460-466.
- [30] LIU C, JIANG J, GAO L, et al. Soluble PD-1 aggravates progression of collagen-induced arthritis through Th1 and Th17 pathways [J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17:340.

[责任编辑 王鑫]