

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.09.015

❖ 临床研究 ❖

IL-15 与 NK 细胞在不明原因复发性流产中的临床意义

谷秀霞, 林宁, 戴凌, 李晓红, 赵琳

(南京医科大学附属苏州科技城医院妇产科, 江苏 苏州 215000)

【摘要】目的: 探讨外周血白细胞介素 (IL)-15 与自然杀伤 (NK) 细胞亚群水平的表达和不明原因复发性流产 (URSA) 的关系, 及其诊断 URSA 的价值。**方法:** 以 57 例 URSA 患者为观察组, 同期入院体检无不良孕产史的 57 例健康早孕者为对照组; 酶联免疫法检测两组血清孕酮、绒毛膜促性腺激素 β (HCG- β)、IL-15、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及趋化因子配体 5 (CCL5) 水平, 流式细胞仪检测两组 NK 细胞水平; 分析 IL-15 与 NK 细胞亚群的相关性及诊断 URSA 效能。**结果:** 观察组血清孕酮及 HCG- β 水平低于对照组 ($P < 0.05$), 观察组 IL-15 水平高于对照组 ($P < 0.05$)。观察组 NK 细胞 CD56⁺CD16⁺ 型高于对照组 ($P < 0.05$), NK 细胞 CD56⁺CD16⁻ 与 CD56⁻CD16⁺ 型观察组低于对照组 ($P < 0.05$)。外周血 IL-15 水平和 NK 细胞 CD56⁺CD16⁺ 型呈正相关性 ($r = 0.560, P < 0.05$); 外周血 IL-15 水平和 NK 细胞 CD56⁺CD16⁻、CD56⁻CD16⁺ 型呈负相关性 ($r = -0.641, -0.571, P < 0.05$)。外周血 IL-15 与 NK 细胞的三种亚型水平对 URSA 的发生均有诊断学价值 ($AUC = 0.680 \sim 0.927, P < 0.05$); IL-15 与 NK 细胞的三种亚型联合诊断的 AUC 可达到 0.942 ($P < 0.05$)。**结论:** 外周血 IL-15 与 NK 细胞指标联合检测可增强 URSA 诊断的敏感度及特异性, 临床监测外周血 IL-15 与 NK 细胞亚群可作为 URSA 诊断依据。

【关键词】 白细胞介素 15; 自然杀伤细胞; 不明原因复发性流产

【中图分类号】 R714.21 **【文献标志码】** A

Clinical significance of IL-15 and NK cells in unexplained recurrent abortion

GU Xiu-xia, LIN Ning, DAI Ling, LI Xiao-hong, ZHAO Lin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Suzhou Science and Technology Town Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215000, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective: To analyze the relationship between the expression of peripheral blood interleukin (IL)-15 and natural killer (NK) cell subsets and unexplained recurrent abortion (URSA), and the value of its combined diagnosis of URSA. **Methods:** The clinical data of 57 patients with URSA were collected as the observation group, 57 healthy early pregnancies with no adverse pregnancy history were set as the control group. Serum progesterone and chorionic gonadotropin β (HCG- β), IL-15, tumor necrosis factor- α (TNF- α), the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chemokine ligand 5 (CCL5) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, the levels of NK cells in the two groups were detected by flow cytometry. The correlation between peripheral blood IL-15 and NK cell subsets and the diagnostic efficacy of URSA were analyzed. **Results:** Serum progesterone and HCG- β in the observation group were higher than those in the control group, the level of IL-15 in the observation group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The CD56⁺CD16⁺ types of NK cells in the observation group were higher than those in the control group, and the CD56⁺CD16⁻ and CD56⁻CD16⁺ types of NK cells in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). The levels of IL-15 in peripheral blood was positively correlation with the CD56⁺CD16⁺ type of NK cells ($r = 0.560, P < 0.05$), and the levels of IL-15 in peripheral blood was negatively correlation with the CD56⁺CD16⁻ and CD56⁻CD16⁺ types of NK cells ($r = -0.641, P < 0.05$). The levels of il-15 and NK cell subtypes in peripheral blood were of diagnostic value for URSA ($AUC = 0.680 \sim 0.927, P < 0.05$). The AUC of the combined diagnosis of four indicators was 0.942 ($P < 0.05$). **Conclusion:** The combined detection of peripheral blood IL-15 and NK cell indexes can significantly enhance the sensitivity and specificity of diagnosis. Clinical monitoring of peripheral blood IL-15 and NK cell subsets can be used as the basis for the diagnosis of URSA.

【Key words】 Interleukin 15; Natural killer cells; Unexplained recurrent abortion

基金项目: 江苏省苏州市高新区医疗卫生科技计划项目 (2019Z014)

作者简介: 谷秀霞 (1976 -), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: guxiuxia19@163.com

通讯作者: 赵琳, 博士。E-mail: 2024328082@qq.com

复发性自然流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 在临床指妇女妊娠期出现连续两次或超过两次的自然流产现象, 是育龄期女性较易见病症之一, 而导致 RSA 产生原因与父母染色体存在异常、内分泌严重失调、子宫内膜感染及子宫的结构存在异常等有关, 且这些原因在 RSA 中占 40% ~ 50%; 而其余 50% ~ 60% 的 RSA 原因还未明确。在患者再次妊娠期间出现自然流产风险较大时临床统称不明原因复发性流产 (unexplained recurrent abortion, URSA), 严重影响女性生殖健康^[1-2]。绒毛膜促性腺激素 β (human chorionic gonadotropin- β , HCG- β) 与孕酮是临床评估产妇是否存在先兆流产风险的常规指标, 其中 HCG- β 为胎盘滋养层的细胞分泌而得糖蛋白类激素, 有效保持产妇黄体, 并减少产妇淋巴细胞相关功能对胎儿造成排斥反应, 是女性妊娠期特异性标志^[3]; 孕酮为妊娠早期机体必需的孕激素, 具有显著生物活性, 其能减少妊娠期产妇产子官遭受外界刺激敏感度, 继而降低子宫收缩现象^[4]。但近年来研究^[5]发现, HCG- β 与孕酮水平易遭到诸多因素影响, 使得鉴别诊断价值欠佳。因此, 临床学者对寻找更具诊断价值的指标十分关注。自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞为人体防御体系的首层屏障, NK 细胞具备机体监视功能, 通过分泌大量细胞因子及细胞毒性免疫等途径产生免疫调节^[6]。白细胞介素-15 (Interleukin-15, IL-15) 被认为是维持 NK 细胞在机体中存活、增殖及分化所必需的细胞因子^[7-8]。对于外周血 IL-15 与 NK 细胞的相关性临床研究尚少。本研究拟观察 URSA 患者的外周血 IL-15 与 NK 细胞亚群水平的改变, 并分析其检测临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2019 年 12 月就诊于南京医科大学附属苏州科技城医院妇产科计划生育门诊及妇科门诊的 URSA 患者 57 例为研究对象 (观察组); 并选取同期入院体检, 且无不良孕产史的健康早孕者 57 例为对照组。两组一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。对照组纳入标准: (1) 既往有生育出足月且健康的胎儿; (2) 早孕等临床反应均正常。观察组纳入标准: (1) 通过排除性诊断筛查^[9], 排除如子宫解剖结构因素、患者血栓前状态、遗传因素、内分泌因素、感染因素、免疫因素及其他不良因素等病因, 无法确定上述病因的复发性流产患者, 且已完善妇科相关检查; (2) 既往出现超过两次自然流产症状; (3) 夫妻双方未出现染色

体异常; (4) 患者及其家属均知情同意。排除标准: (1) 自身存在免疫性相关病症; (2) 伴发心肝肾等重大疾病; (3) 遗传性病症; (4) 合并其他严重病症; (5) 临床相关资料不齐等。本研究已获得南京医科大学附属苏州科技城医院医学伦理委员会批准, 所有患者对研究内容知情同意。

1.2 方法

全部的受试者在检查的前 1 d 天饮食保持少盐、少脂肪, 维持睡眠充分且均禁烟酒; 于此日的清晨空腹采集 8 mL 的静脉血, 在 2 000 rpm 下离心 15 min, 并放置 -80°C 待测。

ELISA 检测血清 IL-15、孕酮、HCG- β 、TNF- α 、VEGF 和 CCL5 水平: 酶联免疫分析仪 (型号: AMR-100/100T; 厂家: 杭州奥盛) 检测血清 IL-15 (型号: YY-Es-11497; 厂家: 德国 IBL)、孕酮、HCG- β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及趋化因子配体 5 (CCL5) (均购自武汉赛培生物) 水平。实验步骤严格按照操作说明书进行操作。

流式细胞仪检测外周血单个核细胞 (PBMC) NK 细胞亚群: (1) FICOLL 密度的梯度分离法对外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 进行提取, 选用无热源的人淋巴细胞分离液 (含葡聚糖、蒸馏水及泛影葡胺成分, 厂家: 美德太平洋生物) 制作出 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL 细胞悬液; (2) 超净台在进行实验前 30 min 实施紫外消毒, 低温待检分离液放置到室温温度后再行实验, 室温需控制低于 24°C , 全部标本需于 3 d 里完成检测; (3) 流式细胞仪 (型号: EPICS-XL; 厂家: 美国 Beckman Coulter 公司) 对 PBMC 悬液里 NK 细胞亚群 ($\text{CD}56^+ \text{CD}16^+$ 、 $\text{CD}56^+ \text{CD}16^-$ 、 $\text{CD}56^- \text{CD}16^+$) (试剂盒货号: BNCC339975; 厂家: 北京北方伟业计量技术研究院) 检测。流式细胞仪实验步骤: 取一定量细胞 (约 1×10^6 个/mL), 直接加入连接有荧光素的抗体进行免疫标记反应, 孵育 20 ~ 60 min 后, 用 PBS (pH7.2 ~ 7.4) 洗 1 ~ 2 次, 加入缓冲液重悬, 上机检测。(4) BD FACSAnto 软件进行自动化质量控制, 选择 BD FACSDiva 软件获得 10 000 个细胞, 前向角散射光 (forward scatter, FSC) 对细胞碎片的干扰进行排除, 用 FSC/SSC 图以圈出所检淋巴细胞, 通过散点图对细胞亚群比例加以分析, 最后再用 BD FACSDiva 软件进行计算。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计学软件对相关数据进行分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较应用 t 检验; 采用 Pearson 简单相关分析外周血 IL-15 水平和 NK 细胞各个亚型水平的相关性, 选择受试者工作特征

(ROC)曲线分析外周血 IL-15 与各型 NK 细胞对 URSA 的诊断效能,并进一步采用 Hanley&McNeil 法比较不同指标 ROC 曲线之间的差异性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组观察组与对照组年龄、体重指数(BMI)、体重、孕囊大小、孕周、染色体异常占比、黄体功能不全占比、内分泌异常占比、吸烟及酗酒比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),观察组子宫异常占比、高凝状态占比高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组一般资料比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

组别	观察组($n=57$)	对照组($n=57$)	χ^2/t 值	P 值
年龄(岁)	34.96±1.83	34.82±1.96	0.390	0.350
BMI(kg/m ²)	22.95±2.11	22.48±2.32	1.130	0.130
体重(kg)	50.34±5.21	51.21±4.38	0.970	0.170
孕囊(cm)	2.51±0.43	2.46±0.38	0.660	0.260
孕周(周)	11.19±2.33	11.24±2.11	0.120	0.450
染色体异常	4(7.02)	1(1.75)	1.883	0.170
子宫异常	5(8.77)	0	5.229	0.022
高凝状态	8(14.04)	0	8.604	0.003
黄体功能不全	7(12.28)	2(3.51)	3.016	0.082
内分泌异常				
甲状腺功能亢进	3(5.26)	2(3.51)	0.209	0.647
甲状腺功能减退	4(7.02)	1(1.75)	1.883	0.170
糖尿病	3(5.26)	1(1.75)	1.036	0.309
吸烟	2(3.51)	0(0.00)	2.036	0.154

2.2 两组血清孕酮、HCG-β 及 IL-15 水平比较

观察组血清孕酮及 HCG-β 水平低于对照组, IL-15 水平高于对照组($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组孕酮、HCG-β 及 IL-15 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孕酮(nmol/L)	HCG-β(U/mL)	IL-15(ng/L)
观察组($n=57$)	72.21±2.52	56.48±2.41	8.10±2.02
对照组($n=57$)	78.84±2.90	65.20±3.21	5.83±1.23
t 值	13.029	16.401	7.247
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 两组 NK 细胞水平比较

观察组 CD56⁺CD16⁺型 NK 细胞水平高于对照组, CD56⁺CD16⁻与 CD56⁻CD16⁺型 NK 细胞低于对照组($P < 0.05$)。见表3。

表3 两组 NK 细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD56 ⁺ CD16 ⁺	CD56 ⁺ CD16 ⁻	CD56 ⁻ CD16 ⁺
观察组($n=57$)	3.13±0.60	4.90±1.24	2.71±0.57
参照组($n=57$)	2.77±0.46	6.00±1.56	4.40±1.07
t 值	3.595	4.167	10.524
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 外周血 IL-15 与 NK 细胞各个亚群水平的相关分析

外周血 IL-15 水平和 CD56⁺CD16⁺型 NK 细胞水平呈正相关性($r = 0.560, P < 0.05$); 和 CD56⁺CD16⁻、CD56⁻CD16⁺型 NK 细胞水平呈负相关性($r = -0.641, -0.571, P < 0.05$)。见图1。

2.5 外周血 IL-15 与 NK 细胞诊断 URSA 效能

外周血 IL-15 与 NK 细胞的三种亚型比例对 URSA 的发生均有诊断学价值(AUC = 0.680 ~ 0.927, $P < 0.05$); 4个指标联合诊断的 AUC 可达到 0.942, 高于任意一项指标的单独诊断效能($Z = 6.524, 16.325, 11.700, 6.052, P < 0.05$)。见表4。

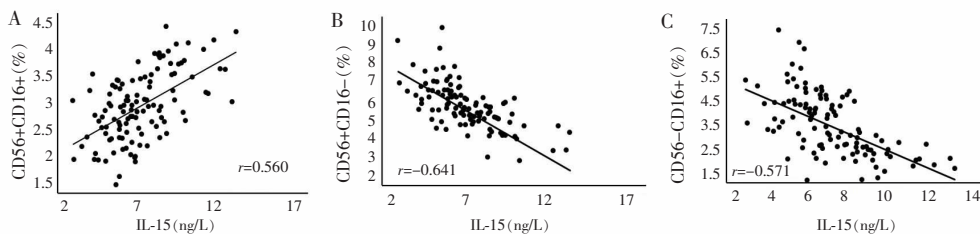


图1 外周血 IL-15 水平和 NK 细胞各个亚型比例的相关性

A. IL-15 水平与 CD56⁺CD16⁺型 NK 细胞比例; B. IL-15 水平与 CD56⁺CD16⁻型 NK 细胞比例; C. IL-15 水平与 CD56⁻CD16⁺型 NK 细胞比例。

表4 外周血相关指标诊断 URSA 效能

指标	Cut-off 值	AUC	95% CI	Youden 值	敏感度(%)	特异性(%)	P 值
IL-15	7.165	0.836*	0.761~0.911	0.561	68.40	87.70	<0.001
CD56 ⁺ CD16 ⁺	3.145	0.680*	0.579~0.780	0.351	52.60	82.50	0.001
CD56 ⁺ CD16 ⁻	5.775	0.774*	0.686~0.862	0.474	80.70	66.70	<0.001
CD56 ⁻ CD16 ⁺	3.725	0.842*	0.754~0.929	0.659	88.20	77.70	<0.001
联合检测	0.491	0.942	0.898~0.986	0.842	94.70	89.50	<0.001

* $P < 0.05$, Hanley&McNeil 检验结果, 与联合检测组比较。

2.6 血清 TNF-α、VEGF 与 CCL5 水平比较

观察组血清 TNF-α、VEGF、CCL5 水平高于对照组($P < 0.05$)。见表5。

表5 两组 TNF-α、VEGF 与 CCL5 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α(ng/L)	VEGF(pg/mL)	CCL5(pg/mL)
观察组($n=57$)	682.45±117.28*	283.85±113.25*	116.38±15.50*
对照组($n=57$)	443.65±83.52	226.43±74.16	79.83±23.24
t 值	12.522	3.202	9.878
P 值	<0.001	0.002	<0.001

3 讨论

RSA 患者在妊娠 12 周前,便能产生腹痛与阴道流血等症状,通过超声等检查可见患者胚胎发育低于正常孕周,其妊娠囊有所变形,未见胚芽,伴随妊娠囊的位置朝下移动,呈现无原始心血管的搏动等影像学相关表现。诸多患者可能仅表现月经量异常增多或推迟。胎儿在母体中能被识别成同种异体的移植物,因其具有约 50% 父系相关遗传物质,在母体中当作移植受体,可发挥出非我以及自我识别免疫系统功能^[10-11]。考虑到 URSA 病因较复杂,其出现和机体免疫相关指标存在紧密关系,故而通过分析免疫相关因素在 URSA 病发期间的作用对确定患者发病机制并进行尽早预防至关重要。基于此笔者对 URSA 患者的外周血 IL-15 与 NK 细胞亚群水平的改变进行观察,发现伴随外周血 IL-15 水平提升,NK 细胞的毒活性随之增多,继而引发患者流产症状。

有研究^[12]发现,在正常女性不同的月经周期检测子宫内膜皆存在 IL-15 表达,而子宫内膜里 IL-15 含量 RSA 患者更高,且 IL-15 变化和临床常规检查具备相似检测结果。本研究中 URSA 患者孕酮与 HCG- β 水平低于正常产妇,而 IL-15 水平高于正常产妇,提示通过孕酮与 HCG- β 水平异常与否可确定患者是否存在流产风险,而 IL-15 在母胎界面出现异常表达和自然流产存在相关性。分析原因可能是在正常妊娠时 IL-15 适量表达能有效维系妊娠期间免疫系统的平衡性,但 IL-15 呈现过量表达可能对胎儿与滋养层细胞造成细胞毒相关效应,使机体免疫受损,对患者胚胎顺利着床与后续发育产生影响,从而导致流产症状。NK 细胞来源至今尚未完全确定,常认为其直接由骨髓所衍生,且其在淋巴结与骨髓里的表达远少于外周血,是机体中固有的一类免疫系统细胞,其活化无需通过抗原的刺激,能直接产生细胞毒相关效应,可在人体中发挥抗肿瘤、病原菌的杀灭等重大功效^[13]。妊娠早期 NK 细胞会分泌诸多细胞因子,并参与子宫内胎盘的小血管重塑,继而对女性正常妊娠加以保护。NK 细胞 CD56⁺ CD16⁻ 型可保护并在胚胎的发育期间提供营养;适量的 CD56⁻ CD16⁺ 型可抵御女性妊娠期间出现微生物的感染,而过量则能对其胎儿造成排斥反应;CD56⁺ CD16⁺ 型能激活细胞的毒效应,产生非特异性的靶细胞杀伤能力;当这三类亚型失衡时,杀灭妊娠相关有害物质的同时,对胚胎产生排除伤害,导致妊娠失败^[14]。本研究中观察组 CD56⁺ CD16⁺ 型 NK

细胞水平高于对照组,观察组 CD56⁺ CD16⁻ 与 CD56⁻ CD16⁺ 型 NK 细胞水平低于对照组。说明 CD56⁺ CD16⁺ 型数量异常增加,CD56⁺ CD16⁻ 与 CD56⁻ CD16⁺ 型异常减少,继而导致 URSA。正常妊娠期间,杀伤性的抑制受体水平提高,能阻挡杀伤信号的传递,使 NK 细胞的杀伤功能关闭,继而有效维持妊娠;当 NK 细胞的毒性增加时,会致使妊娠失败的不良结局出现。

T 淋巴细胞为机体免疫耐受中关键性介质,依照其表面不同分化簇,可分成抑制性的 T 细胞与辅助性 Th 细胞,而 Th 细胞又因所介导功能不同分 Th1 与 Th2 细胞亚群,IL-15 归属于 Th1 型的细胞因子,IL-15 为 NK 细胞的特异性促成熟因子,临床可见 NK 细胞上存在 IL-15 受体表达^[15]。有研究^[16]证实,肿瘤的发生期间 NK 细胞活化主要由 IL-15 反式信号所转导的细胞影响,其触发 NK 细胞约 8 h 至外周血,进而到达机体肿瘤组织的相应部位,再由其余活化信号产生协同作用来构成效应细胞。本研究显示,URSA 患者外周血 IL-15 水平和 NK 细胞 CD56⁺ CD16⁺ 型呈正相关性,和 CD56⁺ CD16⁻、CD56⁻ CD16⁺ 型负相关性;外周血 IL-15 与 NK 细胞联合检测诊断 URSA 效能最优。提示 IL-15 水平随着 NK 细胞 CD56⁺ CD16⁺ 型水平的上升而增加,IL-15 与 NK 细胞联合检测有助临床 URSA 疾病诊断和鉴别。可能是因 IL-15 表达增加致使 NK 细胞中能激活细胞毒活性的 CD56⁺ CD16⁺ 型增多,引发机体免疫过量激活,导致免疫耐受异常,进而致使患者流产等不良妊娠结局。肿瘤发展期间 NK 细胞能通过内识别法对机体细胞活化进行直接识别,通过 IL-15 等直接接触因子或 TNF- α 等能溶性因子传递信号到机体 NK 细胞,使其发挥炎症因子分泌以及杀伤功效^[17]。

女性孕早期血清 IL-15 水平能对 NK 细胞的增值产生促进,继而使 NK 细胞生成包含 TNF- α 在内的一系列相关炎症因子,在妊娠早期 TNF- α 能促进产妇能量代谢、降解细胞的外基质以及维系黄体功能,通过调节机体滋养层细胞来影响血清孕酮、HCG- β 等激素水平^[18-19]。而妊娠期 NK 细胞可产生 VEGF 等生成血管的前因子,能对血管的重塑构成诱导,形成产妇胎盘区域的血管,继而为产妇与胎儿供给血液^[20]。同时,NK 细胞能分泌 CCL5 等趋化因子,而此类趋化因子能利用自分泌以及旁分泌有效调控机体免疫活性以及滋养层细胞功能,进而产生妊娠的免疫耐受,使妊娠成功^[21]。本研究显示,观察组血清 TNF- α 、VEGF、CCL5 水平高于对照组。提示 TNF- α 参与机体滋养层细胞浸入及分化

等功能的调节,流产症状产生可能和 TNF- α 、VEGF 与 CCL5 水平增加相关。临床可通过辅助诊断 NK 细胞下游介质 TNF- α 、VEGF、CCL5 水平变化为早期诊断 URSA 提供参考。分析原因 TNF- α 的高表达令母胎界面的免疫失衡,进而介导机体排斥胚胎细胞相关免疫反应,并对子宫的平滑肌相关组织产生兴奋,引发子宫收缩,进而使胎盘的滋养层处血管遭受损伤,产生炎症血栓,继而对胚胎的植入以及发育形成阻碍;而 VEGF 水平异常会影响胎盘的绒毛血管正常生长,导致产妇产前;CCL5 能募集许多活化 Th1 型淋巴细胞到蜕膜,而这些活化 Th1 型细胞会再分泌 CCL5,形成级联增大的作用,继而产生免疫效应,其水平上调导致母胎界面 Th1 型水平的紊乱,导致产妇出现自然流产。

综上,外周血 IL-15 与 CD56⁺CD16⁺型 NK 细胞水平呈正相关,检测外周血 IL-15 水平高表达及 NK 细胞亚群明显失衡可作 URSA 有效诊断指标。但本研究由于病例数较少,具有局限性,仍需更多样本检测加以证实。

参考文献

- [1] Ticeoni C, Pietropolli A, D'Ippolito S, *et al.* Time-to-pregnancy in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a controlled study[J]. *Reproductive Sciences*, 2020, 27(5): 1121–1128.
- [2] Ghasemi M, Rezaei M, Yazdi A, *et al.* The effects of DICER1 and DROSHA polymorphisms on susceptibility to recurrent spontaneous abortion[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2020, 34(3): e23079.
- [3] Herzberger EH, Knaneh S, Amir H, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone agonist versus recombinant human chorionic gonadotropin triggering in fertility preservation cycles[J]. *Reproductive Sciences*, 2021, 28(12): 3390–3396.
- [4] Zhang RX, Li GH, Du MY, *et al.* Effect of ezrin on regulating trophoblast cell invasion via PKC signaling pathway in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Reproductive Biology*, 2022, 22(2): 100634.
- [5] 姜芳芳,洪婷,石少权,等.不明原因复发性流产患者主动免疫治疗期间免疫功能变化与病原学感染的相关性分析[J].*中国妇幼保健*, 2020, 35(18): 3452–3455.
- [6] 郭益萍,何卫芬,孙岳琴.外周血 NK 细胞、IFN- γ 、IL-4 水平诊断不孕患者生殖道感染临床价值[J].*中华医院感染学杂志*, 2021, 31(9): 1423–1426.
- [7] 刘倩,侯悦,金大中,等.外周血 NK 及 NKG2C + NK 细胞比例变化与复发性流产的关系[J].*中国医科大学学报*, 2020, 49(12): 1066–1069.
- [8] 盛立霞,王佳萍,赖艳丽,等.达沙替尼对 NK 细胞的体外扩增、细胞亚群、受体表达及细胞毒功能的调节作用[J].*中国实验血液学杂志*, 2020, 28(5): 1762–1768.
- [9] 国家妇幼健康研究会生殖免疫学专业委员会专家共识编写组.复发性流产合并血栓前状态诊治中国专家共识[J].*中华生殖与避孕杂志*, 2021, 41(10): 861–875.
- [10] Samira H, Fazel S, Soheila AP, *et al.* Diminished frequency of menstrual and peripheral blood NKT-like cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion and infertile women[J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(1): 97–108.
- [11] 肖润颖,肖建华,王比男,等.基于转录组学的不明原因复发性流产关键基因及机制分析[J].*中南医学科学杂志*, 2021, 49(2): 162–168.
- [12] 李莉,王海燕,李蓉,等.不明原因复发性流产患者血清细胞因子的变化[J].*中国计划生育学杂志*, 2020, 28(12): 2084–2087.
- [13] 王锡携.系统性红斑狼疮患者外周血 CD3⁺CD16⁺+CD56⁺+NK 细胞水平变化的临床意义[J].*中南医学科学杂志*, 2020, (3): 288–291, 296.
- [14] 陈月婵.原因不明复发性流产患者外周血 NK 细胞亚群及细胞因子水平的研究[J].*检验医学与临床*, 2020, 17(14): 2033–2035.
- [15] Asensio JP, Villalobos ES, Miquel J, *et al.* FRI356-interleukin-15 restores the reactivity of the peripheral memory-like pool in the exhausted hepatitis B virus-specific CD8⁺ T cell population during persistent HBeAg(-) infection[J]. *Journal of Hepatology*, 2020, 73(suppl 1): S84–S85.
- [16] Peng YZ, Yin S, Wang M. Significance of the ratio interferon-gamma/interleukin-4 in early diagnosis and immune mechanism of unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 2021, 154(1): 39–43.
- [17] Zhang J, Liu XQ, Gao YL. Abnormal H3K27 histone methylation of RAS1 gene leads to unexplained recurrent spontaneous abortion by regulating Ras-MAPK pathway in trophoblast cells[J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(6): 5109–5119.
- [18] Sarno M, Carneiro C, Cavalcante M, *et al.* Evaluation of paternal lymphocyte immunotherapy and potential biomarker mixed lymphocyte reaction-blocking factor in an Argentinian cohort of women with unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained infertility[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2021, 86(4): e13456.
- [19] Manoel S, Carolina C, Marcelo C, *et al.* Evaluation of paternal lymphocyte immunotherapy and potential biomarker mixed lymphocyte reaction-blocking factor in an Argentinian cohort of women with unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained infertility[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2021, 86(4): e13456.
- [20] Liang Q, Tong L, Xiang L, *et al.* Correlations of the expression of gamma delta T cells and their co-stimulatory molecules TIGIT, PD-1, ICOS and BTLA with PR and PIBF in the peripheral blood and decidua tissues of women with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2021, 203(1): 55–65.
- [21] 谭诗,余华,李秋红,等.母体血清 IL-10 和 RANTES 预测早产发生的研究[J].*中国妇幼保健*, 2019, 34(14): 3179–3181.

(收稿日期:2022-04-12)

修回日期:2022-05-09