

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.03.015

❖ 临床研究 ❖

妊娠高血压综合征产妇胎盘组织中免疫细胞表达水平及其与不良妊娠结局的相关性

钟辉¹, 晋兴林², 蒋玉芬², 化金金¹, 龙璐雯¹, 马静¹, 倪萍¹, 钟文娜¹

(淮北市妇幼保健院, 1. 病理科; 2. 产科, 安徽 淮北 235000)

【摘要】目的: 探讨妊娠高血压综合征产妇胎盘组织中免疫细胞表达及其与不良妊娠结局的关系。**方法:** 选取 100 例妊娠高血压孕妇为研究组, 同期 100 例正常妊娠分娩的孕妇为对照组。对比两组胎盘组织中免疫细胞 (CD3、CD4、CD8 标记 T 细胞、CD56 标记 NK 细胞、CD68 标记巨噬细胞) 表达情况。多因素分析免疫细胞表达与分娩结局的关系, 采用受试者工作 (ROC) 曲线分析免疫细胞表达对不良分娩结局的预测价值。**结果:** 两组受试者胎盘底蜕膜免疫细胞 CD4 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 研究组的 CD3、CD8、CD56、CD68 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$)。100 例妊娠高血压孕妇中不良分娩结局 21 例 (21.00%)。两组受试者胎盘底蜕膜免疫细胞 CD4 表达阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 不良组的 CD3、CD8、CD56 和 CD68 阳性率高于对照组 ($P < 0.05$)。多因素分析结果显示, CD3、CD8、CD56 和 CD68 均是妊娠结局的独立危险因素 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, CD3、CD8、CD56 和 CD68 预测不良妊娠结局的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.727、0.734、0.753 和 0.684。**结论:** 妊娠高血压综合征产妇胎盘组织中免疫细胞表达水平异常, 其中 CD3、CD8、CD56、CD68 标记的免疫细胞均高表达, 可增加不良妊娠结局风险。

【关键词】 妊娠高血压; 胎盘组织; 免疫细胞; 妊娠结局; 不良妊娠

【中图分类号】 R714.24; R473.6 **【文献标志码】** A

Expression of immune cells in placenta of pregnant women with pregnancy induced hypertension and its relationship with adverse pregnancy outcome

ZHONG Hui¹, JIN Xing-lin², JIANG Yu-fen², HUA Jin-jin¹, LONG Lu-wen¹, MA Jing¹, NI Ping¹, ZHONG Wen-na¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Obstetric, Huaibei Maternal and Child Health Hospital, Huaibei 235000, Anhui, China)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of immune cells in placental tissue of pregnant women with pregnancy-induced hypertension syndrome and its relationship with adverse pregnancy outcomes. **Methods:** 100 pregnant women with pregnancy-induced hypertension were selected (study group), and 100 pregnant women who gave birth in normal pregnancy during the same period (control group) were selected. The expression of immune cells (CD3, CD4, CD8 labeled T cells, CD56 labeled NK cells, CD68 labeled macrophages) in placental tissues of the two groups were compared. The relationship between immune cell expression and delivery outcome was analyzed by multivariate analysis, and the predictive value of immune cell expression to adverse delivery outcome was analyzed by receiver operating curve (ROC). **Results:** There was no significant difference in CD4 level of immune cells of decidua placenta between the two groups ($P > 0.05$), and the expression levels of CD3, CD8, CD56 and CD68 in the study group were higher than those in the control group. Among 100 pregnant women with pregnancy-induced hypertension, 21 cases (21.00%) had adverse delivery outcomes. There was no significant difference in the positive rate of CD4 expression in immune cells of decidua placenta between the two groups, but the positive rates of CD3, CD8, CD56 and CD68 in the study group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). Multivariate analysis showed that CD3, CD8, CD56 and CD68 were independent risk factors for pregnancy outcome ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the areas under the curve of CD3, CD8, CD56 and CD68 to predict adverse pregnancy outcomes were 0.727, 0.734, 0.753 and 0.684, respectively. **Conclusion:** The expression level of immune cells in placental tissues of pregnant women with pregnancy-induced hypertension syndrome was significantly abnormal, among which CD3, CD8, CD56, CD68 labeled immune cells were highly expressed, which could increase the risk of adverse pregnancy outcome.

【Key words】 Pregnancy induced hypertension; Placenta tissue; Immune cells; Pregnancy outcome; Adverse pregnancy

妊娠高血压综合征是因妊娠而引起的孕期特有并发症,我国发病率为 2.5% ~ 9.5%,妊娠高血压综合征是造成孕产妇和围产儿不良预后的主要原因之一^[1],其病因至今尚未阐明,目前研究^[2-3]一般认为,免疫因素、遗传因素、血管内皮细胞激活和损伤、胎盘或滋养细胞缺血、氧化应激、营养缺乏等是重要致病因素。近年来,有研究^[4-5]表明,母-胎界面免疫细胞是免疫耐受的基础,免疫细胞对母-胎界面发挥了重要的免疫调节作用,促进胎盘的生长发育,母-胎界面的免疫细胞功能改变直接影响胎盘生长,因此妊娠高血压综合征产妇胎盘组织中免疫细胞表达情况可能与不良妊娠结局密切相关,但尚无确切论据。因此,本研究拟探讨妊娠高血压综合征妇女胎盘免疫细胞对妊娠结局的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 7 月至 2022 年 8 月在淮北市妇幼保健院接受产前检查且分娩的妊娠高血压孕妇 100 例(研究组),选取同期正常妊娠分娩的孕妇 100 例(对照组)。本研究获得医院医学伦理委员会批准,且孕妇均知情同意。纳入标准:(1)妊娠期高血压的诊断标准参考《妊娠期高血压疾病诊治指南(2015)》^[6]中的标准,妊娠期首次出现血压 $\geq 140/90$ mmHg,产后 12 周可恢复;(2)自然受孕、单胎;(3)孕前身体健康,孕期均定期于淮北市妇幼保健院检查,子宫及相关附件均正常;(4)均在淮北市妇幼保健院产科完成分娩。排除标准:(1)妊娠期有接触有毒、有害化学物质史;(2)合并妊娠期糖尿病、妊娠期胆汁淤积综合征、自身免疫性疾病等;(3)伴有染色体异常先天性缺陷,生殖系统畸形、感染;(4)心、肝、肾等重要脏器功能障碍。研究组中,年龄(29.8 ± 5.6)岁;分娩孕周(37.82 ± 2.23)周;经产妇 61 例。对照组中,年龄(27.93 ± 4.16)岁;分娩孕周(37.5 ± 2.1)周;经产妇 48 例。两组研究对象的年龄、体质量指数(BMI)、分娩孕周、血检孕周、孕次、分娩方式指标比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般资料比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

资料	对照组($n=100$)	研究组($n=100$)	t 值	P 值
年龄(岁)	27.93 \pm 4.16	29.8 \pm 5.6	1.465	0.145
BMI(kg/m ²)	24.58 \pm 2.61	24.89 \pm 2.45	0.866	0.388
分娩孕周(周)	37.53 \pm 2.15	37.82 \pm 2.23	0.936	0.350
血检孕周(周)	30.28 \pm 0.57	30.39 \pm 0.45	1.515	0.132
孕次(次)	1.68 \pm 0.45	1.79 \pm 0.47	1.691	0.093
分娩方式			2.189	0.139
剖宫产	80(80.00)	71(71.00)		
顺产	20(20.00)	29(29.00)		

1.2 方法

两组均行胎盘组织免疫细胞 [CD3、CD4、CD8 标记 T 淋巴细胞(T-lymphocyte, T 细胞)、CD56 标记自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细胞)、CD68 标记巨噬细胞] 表达检查。

胎盘病理学检查:胎盘娩出后置于 10% 中性甲醛溶液中固定 12 ~ 24 h,选择无明显出血、钙化的胎盘组织进行免疫组化切片,脱蜡,蛋白酶消化,滴加内源性过氧化物酶抑制剂 100 μ L 封闭切片内源酶,加入 10% 小牛血清,降低切片背景,清洗缓冲液冲洗两次,滴加一抗孵育 32 min,清洗液冲洗 3 次,滴加二抗 100 μ L 温育 8 min,清洗缓冲液冲洗 2 次,滴加二氨基联苯胺(DAB)显色,温育 8 min,清洗液冲洗 1 次,滴加铜离子显色增强剂,温育 4 min,清洗液冲洗 1 次,滴加苏木素衬染 12 min,清洗液冲洗两次,滴加返蓝液温育 4 min,清洗液冲洗两次,染色运行结束,收片,洗洁精清洗切片,流水冲洗至无洗洁精残留,梯度酒精脱水,二甲苯透明后封片。显微镜下判断免疫组化结果,先用 40 \times 光镜扫视整个切片,寻找淋巴细胞浸润的高密度区域后,在 100 \times 视野下记录 5 个视野计数被染成棕色的淋巴细胞。CD3、CD4、CD8 标记 T 细胞、CD56 标记 NK 细胞、CD68 标记巨噬细胞阳性为细胞质或细胞膜染色呈棕黄色,在显微镜下观察蜕膜浸润的淋巴细胞的阳性数量。

1.3 检查评定

阳性细胞数量占有所有淋巴细胞的 25% 以内为(-),26% ~ 50% 为(+),51% ~ 75% 为(++), > 75% 为(+++),其中阳性细胞数量占有所有淋巴细胞 51% 以上判为表达阳性。

1.4 观察指标

(1)观察两组受试者基线资料,包括年龄、BMI、分娩孕周、血检孕周、孕次、分娩方式;(2)观察两组受试者胎盘底蜕膜免疫细胞 CD3、CD4、CD8、CD56、CD68 表达水平;(3)分析不良妊娠结局与胎盘底蜕膜免疫细胞 CD3、CD4、CD8、CD56、CD68 的关系;(4)分析多因素免疫细胞表达与分娩结局的关系;(5)胎盘组织中免疫细胞对于不良妊娠结局的预测价值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用独立样本 t 检验;计数资料以[$n(\%)$]表示,组间比较用独立样本 χ^2 检验,等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验;免疫细胞表达与不良分娩结局的影响因素采用 Logistic 回归分析,免疫细胞表达对不良分娩结局的预测价值采用

受试者工作曲线(ROC)分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组产妇胎盘底蜕膜免疫细胞指标比较

两组产妇的胎盘底蜕膜免疫细胞 CD3、CD8、CD56、CD68 指标比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。研究组与对照组的胎盘底蜕膜免疫细胞 CD4 指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 两组产妇胎盘底蜕膜免疫细胞指标比较 [n(%)]

指标	对照组(n=100)	研究组(n=100)	Z _c 值	P 值
CD3			49.126	<0.001
-	5 (5.00)	9 (9.00)		
+	76 (76.00)	31 (31.00)		
++	18 (18.00)	32 (32.00)		
+++	1 (1.00)	28 (28.00)		
CD4			0.043	0.836
-	87 (87.00)	86 (86.00)		
+	13 (13.00)	14 (14.00)		
++	0	0		
+++	0	0		
CD8			55.196	<0.001
-	16 (16.00)	12 (12.00)		
+	72 (72.00)	27 (27.00)		
++	8 (8.00)	26 (26.00)		
+++	4 (4.00)	35 (35.00)		
CD56			28.977	<0.001
-	18 (18.00)	37 (37.00)		
+	67 (67.00)	29 (29.00)		
++	5 (5.00)	11 (11.00)		
+++	10 (10.00)	23 (23.00)		
CD68			10.959	0.012
-	1 (1.00)	1 (1.00)		
+	28 (28.00)	43 (43.00)		
++	37 (37.00)	16 (16.00)		
+++	36 (36.00)	40 (40.00)		

2.2 两组产妇免疫细胞表达阳性率比较

100 例妊娠高血压孕妇,其中不良分娩结局 21 例(21.00%),产后出血 9 例、新生儿窒息 5 例、胎儿窘迫 5 例、羊水过少 2 例。良好组与不良组受试者胎盘底蜕膜免疫细胞 CD4 表达阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。良好组与不良组受试者 CD3、CD8、CD56、CD68 表达阳性率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 两组产妇免疫细胞表达阳性率比较 [n(%)]

组别	CD3	CD4	CD8	CD56	CD68
良好组(n=79)	43 (54.43)	0	43 (54.43)	21 (26.58)	40 (50.63)
不良组(n=21)	17 (80.95)	0	18 (85.71)	13 (61.90)	16 (76.19)
t 值	4.862	-	6.825	9.224	4.398
P 值	0.027	-	0.009	0.002	0.036

2.3 影响不良妊娠结局的多因素分析

以预后情况(赋值:不良=1,良好=0)为因变量,以 CD3、CD8、CD56、CD68 作为自变量(赋值:阳性=1,阴性=0),进行 Logistic 回归分析。多因素分析结果显示,CD3、CD8、CD56、CD68 均是妊娠结局的影响因素,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 影响不良妊娠结局的多因素分析

因素	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
CD3	0.658	0.218	9.110	0.003	1.931	1.260~2.960
CD8	0.587	0.181	10.518	0.001	1.799	1.261~2.564
CD56	0.552	0.244	5.118	0.024	1.737	1.077~2.802
CD68	0.507	0.235	4.655	0.031	1.660	1.047~2.632

2.4 胎盘组织中免疫细胞对于不良妊娠结局的预测价值

ROC 曲线分析显示,CD3、CD8、CD56、CD68 预测不良妊娠结局的曲线下面积(AUC)分别为 0.727、0.734、0.753、0.684。见表 5。

表 5 胎盘组织中免疫细胞对于不良妊娠结局的预测价值

指标	SE 值	AUC 值	95% CI	敏感度(%)	特异度(%)	约登指数
CD3	0.020	0.727	0.659~0.786	80.95	45.57	0.265
CD8	0.025	0.734	0.667~0.802	85.71	45.57	0.313
CD56	0.127	0.753	0.678~0.813	61.90	73.42	0.353
CD68	0.018	0.684	0.618~0.752	76.19	49.37	0.256

3 讨论

妊娠期高血压是严重危害母婴健康的产科并发症,多在妊娠 20 周至产后 12 周发病,以全身小血管痉挛、重要脏器血流灌注减少为病理特征,临床表现为高血压、水肿、蛋白尿等,严重者可出现胎盘早剥、弥漫性血管内凝血、抽搐、昏迷、心和肾功能衰竭等危重症候,甚至引起母婴死亡^[7-8]。妊娠期高血压是引起孕产妇及胎儿围产期死亡的主要原因之一,因此在进行产检时准确识别和及时干预具有重要临床意义^[9-10]。

母-胎界面的免疫细胞在滋养细胞侵入、胎盘形成、子宫血管重铸等生理过程中发挥重要作用,如母-胎界面的巨噬细胞通过分泌抗炎因子而发挥免疫抑制作用,以及调控滋养细胞的侵袭能力^[11-12]。胎盘组织中免疫细胞亚群(T 淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞等)在母-胎界面的表型转化与胎盘局部微环境密切相关,其的异常活化或者表达参与妊娠高血压综合征的发生发展过程。本研究发现,研究组、对照组孕妇胎盘组织中的 CD3 标记 T 细胞、CD8 标记 T 细胞、CD56 标记 NK 细胞、CD68 标记巨噬细胞表达水平差异有统计学意义,表明妊娠高血压综合征患者的胎盘组织中免疫细胞(T 淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞等)处于失衡状态,其中 CD3、CD8、CD56、

CD68 与妊娠高血压综合征密切相关。正常妊娠的母体处于免疫抑制状态,而妊娠高血压综合征时母胎间的免疫平衡失调,防护作用减弱,排斥反应增强,故而抗原呈递 CD3 标记的 T 淋巴细胞亚群占优势^[13]。同时,滋养细胞为胎儿细胞,遗传物质一半来自父系,释放的相关细胞成分作为抗原激活母体免疫系统,诱导特异性 CD8⁺T 细胞的生成,且在抗原的趋化作用下诱导 CD8⁺T 细胞于滋养细胞周边聚集,故而 CD8⁺T 细胞数量明显增加。NK 细胞在无抗体存在下即能杀伤被感染的靶细胞,其中 CD56 标记 NK 细胞可通过与 MHC-I 类分子特异性结合而维持正常的妊娠状态,但其表达水平异常增加时,可趋化巨噬细胞,介导胎盘局部炎症反应,并引起滋养细胞凋亡和损伤胎盘功能,故而妊娠高血压综合征患者 CD56 标记 NK 细胞处于高表达状态,且既往研究^[14]已证实滋养细胞凋亡失调可导致子宫内生长迟缓、妊娠丢失、子痫前期等妊娠期合并症。在胎盘形成和发育过程中,胎盘组织中的滋养细胞的凋亡、增殖失衡,会募集大量的巨噬细胞,诱导炎症反应以及清除凋亡细胞。吴震溟等^[15]研究发现,CD68 标记巨噬细胞表达量与胎盘滋养细胞中的凋亡程度呈正相关性,在滋养细胞侵入子宫蜕膜层时,CD68 标记巨噬细胞活性变化,杀伤入侵的滋养细胞,从而参与子痫前期的发生、发展过程,故而本研究发现研究组的 CD68 巨噬细胞表达水平高于对照组。

在不同妊娠时期,母胎界面免疫微环境处于动态平衡中,妊娠早、中期,胚胎局部的免疫微环境有利于胎儿的生长发育,直至妊娠晚期免疫微环境逐渐转变并为分娩作内源性准备^[16]。免疫微环境的失衡会导致胎盘生长发育异常,滋养细胞凋亡,胎盘功能受损,从而影响胎儿的正常发育,进而导致一系列妊娠疾病、并发症或不良妊娠结局,如妊娠高血压综合征、反复自发性流产以及胎儿窘迫、窒息,甚至死胎^[17],故而本研究中发现不良妊娠结局的 CD3、CD8、CD56、CD68 免疫细胞均处于高表达状态,进一步表明妊娠高血压综合征产妇胎盘组织中免疫细胞表达与不良妊娠结局密切相关。同时,采用行 Logistic 回归分析显示,CD3、CD8、CD56、CD68 均是妊娠结局的影响因素,表明免疫微环境中免疫细胞异常可增加不良妊娠结局风险。但本研究存在局限性,仅初步分析免疫微环境中免疫细胞异常与妊娠高血压综合征以及妊娠结局密切相关,而对于调控的具体机制仍需通过分子、细胞水平的研究进一步探讨。

综上,妊娠高血压综合征产妇胎盘组织中免疫细胞表达水平明显异常,其中 CD3、CD8、CD56、

CD68 标记的免疫细胞均高表达,可能会增加不良妊娠结局风险。

参考文献

- [1] 魏文文,王欣,谭贵琴,等. 妊娠高血压综合征易感基因研究进展[J]. 现代妇产科进展,2020,29(6):469-472.
- [2] Reddy S,Jim B. Hypertension and pregnancy:Management and future risks[J]. Advances in Chronic Kidney Disease,2019,26(2):137-145.
- [3] Garovic VD,Dechend R,Easterling T, et al. Hypertension in pregnancy: Diagnosis, blood pressure goals, and pharmacotherapy: A scientific statement from the american heart association[J]. Hypertension,2022,79(2):e21-e41.
- [4] 杨佳颜,胡丽娜. 母-胎界面 GAS6 低表达诱导蜕膜巨噬细胞分化异常致自然流产的机制研究[J]. 实用妇产科杂志,2021,37(11):858-864.
- [5] 李芸芸,林懿空,李大金,等. NK 细胞在早孕期母-胎界面的功能[J]. 现代免疫学,2019,39(2):145-149.
- [6] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组. 妊娠期高血压疾病诊治指南(2015)[J]. 中华妇产科杂志,2015,50(10):721-728.
- [7] Greene MF,Williams WW. Treating hypertension in pregnancy[J]. New England Journal of Medicine,2022,386(19):1846-1847.
- [8] Thapa T,Sharma S,Sigdel D, et al. Pregnancy induced hypertension among pregnant women delivering in a tertiary care hospital: A descriptive cross-sectional study[J]. JNMA Journal of Nepal Medical Association,2021,59(244):1209-1214.
- [9] Nobles CJ,Mendola P,Mumford SL, et al. Preconception blood pressure and its change into early pregnancy:Early risk factors for preeclampsia and gestational hypertension[J]. Hypertension,2020,76(3):922-929.
- [10] 杨小芳,王萍,蔡春晓,等. 妊娠期高血压患者心功能、子宫动脉血流指标的变化及其意义[J]. 医学综述,2022,28(5):1009-1013.
- [11] 李雨珊,邵昱,梁彬. 妊娠期高血压患者动脉血流动力学参数与胎儿心脏发育功能指标[J]. 中国计划生育学杂志,2022,30(5):1133-1136.
- [12] 徐春芳,李彦虹,李大金,等. 蜕膜巨噬细胞在母-胎界面的作用研究[J]. 现代免疫学,2019,39(6):514-517.
- [13] 黄茜茜,刘璐,王莉,等. 母-胎界面 T 细胞功能研究进展[J]. 生理学报,2020,72(1):11-19.
- [14] 尹红亚,刘会雪,童重新,等. 未足月胎膜早破孕妇外周血 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞、NK 细胞 CD56 水平及与绒毛膜羊膜炎的关系[J]. 中国性科学,2020,29(7):96-99.
- [15] 吴震溟,林建华,张羽,等. 胎盘巨噬细胞数量和滋养细胞凋亡与重度子(痫)前期的相关性[J]. 上海医学,2014,37(9):793-797.
- [16] Jena MK,Nayak N,Chen K, et al. Role of macrophages in pregnancy and related complications[J]. Archivum Immunologiae ET Therapiae Experimentalis,2019,67(5):295-309.
- [17] 许梦梵,叶红,刘程程,等. 免疫细胞紊乱与复发性流产发病的关系及在疾病诊治中的应用研究进展[J]. 山东医药,2021,61(8):89-92.

(收稿日期:2022-11-09

修回日期:2022-12-19)