

# rs16833431 位点多态性与淋巴细胞主动免疫治疗 URSA 后妊娠结局的相关性探讨

贺凌云 万志勇

**【摘要】 目的** 探讨信号转导与转录激活因子 4(STAT4)基因 rs16833431 位点基因多态性与淋巴细胞主动免疫治疗原因不明复发性自然流产(URSA)后妊娠结局的相关性。**方法** 采用配偶或者第三方亲属的外周淋巴细胞行主动免疫治疗 326 例 URSA 患者(URSA 组),并追踪完成主动免疫治疗后的妊娠结局,根据妊娠结局分为主动免疫治疗成功组(URSA 亚组 1)、主动免疫治疗失败组(URSA 亚组 2);采用 PCR-RFLP 法检测 326 例 URSA 患者和 152 名正常女性(对照组)STAT4 基因 rs16833431 位点的基因型分布。**结果** 326 例 URSA 患者中,成功妊娠 215 例,再次出现自然流产 111 例。Logistic 回归显示,URSA 亚组 1 和对照组间 rs16833431 基因位点及等位基因分布比较差异无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ );与对照组比较,URSA 亚组 2 的 rs16833431 位点 T/C ( $OR = 0.425$ , 95%  $CI$  0.181 ~ 0.997)、C/C ( $OR = 0.308$ , 95%  $CI$  0.130 ~ 0.729)基因型及 C 等位基因( $OR = 0.620$ , 95%  $CI$  0.430 ~ 0.894)频率较高,T/T 基因型频率较低( $P$  均  $<0.05$ );与 URSA 亚组 1 比较,URSA 亚组 2 的 rs16833431 位点 C/C 基因型( $OR = 0.387$ , 95%  $CI$  0.182 ~ 0.825)及 C 等位基因( $OR = 0.674$ , 95%  $CI$  0.481 ~ 0.946)频率较高,T/T 基因型频率较低( $P$  均  $<0.05$ )。**结论** rs16833431 位点基因多态性可能是导致主动免疫治疗 URSA 妊娠失败的遗传学因素。

**【关键词】** 复发性自然流产;信号转导与转录激活因子 4;基因多态性;主动免疫

**Association between rs16833431 polymorphism and pregnancy outcome after lymphocyte active immunotherapy for unexplained recurrent spontaneous abortion** He Lingyun, Wan Zhiyong. Department of Gynaecology, Hengyang County People's Hospital of Hunan Province, Hengyang 421200, China  
Corresponding author, He Lingyun, E-mail: 651257529@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the association between the rs16833431 polymorphism of the signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) gene and the pregnancy outcome after lymphocyte active immunotherapy for unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA). **Methods** A total of 326 URSA patients received lymphocyte active immunotherapy with the peripheral lymphocytes from a spouse or third party, and the pregnancy outcome after the lymphocyte active immunotherapy was monitored. According the pregnancy outcome, all patients were divided into the success (URSA subgroup 1) and failure groups (URSA subgroup 2). PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed to detect the genotype distribution of rs16833431 polymorphism of STAT4 gene in 326 URSA patients and 152 healthy female (control group). **Results** Among 326 patients with URSA, 215 were successfully pregnant and 111 had spontaneous abortion. Logistic regression analysis demonstrated that the distribution in 3 genotypes (C/C, C/T, T/T) and 2 alleles (C and T) of rs16833431 did not significantly differ between the URSA subgroup 1 and control group (all  $P > 0.05$ ). Compared with the control group, the frequencies of T/C genotype ( $OR = 0.425$ , 95%  $CI = 0.181-0.997$ ), C/C genotype ( $OR = 0.308$ , 95%  $CI = 0.130-0.729$ ) and C allele ( $OR = 0.620$ , 95%  $CI = 0.430-0.894$ ) of rs16833331 were significantly higher, whereas that of T/T genotype was considerably lower in the URSA subgroup 2 (all  $P < 0.05$ ). Compared with the URSA subgroup 1, the frequencies of C/C genotype ( $OR = 0.387$ , 95%  $CI = 0.182-0.825$ ) and C allele ( $OR = 0.674$ , 95%  $CI = 0.481-0.946$ ) of

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2018.08.006

基金项目:清远市社会发展领域自筹经费科技计划项目(20151500)

作者单位:421200 衡阳,湖南衡阳县人民医院妇科[贺凌云(原工作单位为广东英德市人民医院)];510700 广州,中山大学附属第一医院东院区妇产科(万志勇)

通讯作者,贺凌云,E-mail: 651257529@qq.com

rs16833431 were significantly higher, whereas that of T/T allele was dramatically lower in the URSA subgroup 2 (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The polymorphism of rs16833431 may be the genetic factor leading to the failure of lymphocyte active immunotherapy for URSA.

**【Key words】** Recurrent spontaneous abortion; Signal transducer and activator of transcription 4; Polymorphism; Active immunity

复发性自然流产(RSA)是指和同一性伴侣连续发生 $\geq 2$ 次的自然流产,其发病机制复杂,排除目前检测条件能够确诊的病因外,还有约半数患者的病因未能明确诊断,称之为原因不明 RSA(URSA)。研究显示,URSA 发病与异常免疫耐受相关<sup>[1]</sup>。临床中通过主动免疫治疗改善母胎免疫耐受的情况,使大约 2/3 的 URSA 患者获得正常妊娠,但仍有 1/3 URSA 患者出现再次自然流产<sup>[2]</sup>。主动免疫治疗后再次流产 URSA 患者的治疗成为 URSA 研究的热点。目前研究发现,信号转导与转录激活因子 4(STAT4)通过 Janus 激酶(JAK)/STAT 信号通路,改变辅助性 T 细胞 1(Th1)/Th2 细胞平衡状态,促进 Th17 细胞的活化等机制,破坏体内免疫耐受<sup>[3]</sup>。有研究表明,在 URSA 蜕膜组织中 STAT4 的部分位点基因多态性与 URSA 发病风险相关<sup>[4]</sup>。由此可见,STAT4 与 URSA 关系密切,而位于 STAT4 基因启动子区 rs16833431 位点的基因多态性与主动免疫治疗后再次自然流产 URSA 的相关性研究,笔者尚未见报道。为此,本研究拟从免疫及遗传学角度探讨 URSA 经主动免疫治疗后再次自然流产的可能病因,为全面治疗 URSA 提供参考依据。

## 对象与方法

### 一、研究对象

选择 2015 年 8 月至 2017 年 8 月在英德市人民医院行主动免疫治疗的 326 例 URSA 患者(URSA 组),年龄 23~38 岁、中位年龄 28 岁,自然流产史 $\geq 2$ 次,孕周 $\leq 10$ 周,夫妻双方染色体正常,女方生殖道无畸形,无合并生殖道感染,妇科内分泌检查结果无异常,抗磷脂抗体、抗核抗体等常见自身抗体均阴性。另选择同期在英德市人民医院进行健康体检的 152 名妇女,年龄 25~39 岁、中位年龄 30 岁,均有至少 1 次正常孕产史,既往无自然流产、死胎以及其他不良孕产史;无合并 SLE、甲状腺功能亢进等免疫性疾病及内分泌代谢性疾病史。本研究经英德市人民医院医学伦理委员会批准,所有受检者均已签署知情同意书。

## 二、方 法

### 1. 主动免疫治疗

根据参考文献[2]制定主动免疫治疗程序:抽取配偶或者第三方家属(排除患病毒性肝炎、梅毒及艾滋病者)的外周静脉血,分离淋巴细胞,无菌生理盐水配制浓度为 $(2 \sim 4) \times 10^{10}/L$ 淋巴细胞悬液备用;于 URSA 患者前臂内侧行皮内注射,每点约注射 0.15 ml,共注射 6 点。间隔 2~3 周重复 1 次,4 次为一疗程,之后指导怀孕,待成功妊娠后重复上述免疫治疗 3 次,至妊娠 12 周。追踪完成主动免疫治疗疗程后的妊娠结局,根据妊娠结局分为主动免疫治疗成功组(URSA 亚组 1)、主动免疫治疗失败组(URSA 亚组 2)。

### 2. 基因组 DNA 的提取与 rs16833431 位点基因型检测

采用 PCR-RFLP 法检测 326 例 URSA 患者和 152 名正常女性(对照组)STAT4 基因 rs16833431 位点的基因型分布:抽取受检者约 3 ml 外周静脉血,按照 AXYGEN 基因组 DNA 试剂盒操作说明书提取基因组 DNA。采用 PCR-RFLP 法检测 rs16833431 位点基因型,利用 Primer premier 5.0 设计 rs-16833431 位点扩增引物序列:正向 5'-TTAGCCTGCCTCCCTCTTC-3',反向 5'-GCGCCTACCTAACC-AGGAAAT-3'。总反应体系 30  $\mu$ l:模板 DNA 4  $\mu$ l、正反向引物各 2  $\mu$ l(5 pmol)、Takara Ex Taq 混合物 15  $\mu$ l、补水至 30  $\mu$ l。反应条件:先 95℃ 预变性 5 min 1 次,然后 94℃ 变性 30 s、60℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 1 min,35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。取 10  $\mu$ l PCR 产物加入 1  $\mu$ l 内切酶和 2  $\mu$ l 缓冲液,加水配成 25  $\mu$ l 的酶切体系,与限制性内切酶 MspI(Fermentas 公司)37℃ 孵育 10 h。取酶切产物 10  $\mu$ l 行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 20 min,EB 染色,拍照辨别基因型。

### 三、统计学处理

计数基因型、等位基因频率,利用 Excel 软件检验位点基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg(H-W)平衡定律,利用 SPSS 13.0 软件行 $\chi^2$ 检验、非条件 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学

意义。

结    果

一、326例URSA患者主动免疫治疗后的妊娠结局

经主动免疫治疗后，326例URSA患者中成功妊娠215例(66%，URSA亚组1)，再次出现自然流产111例(34%，URSA亚组2)。URSA亚组1患者年龄23~35岁、中位年龄28岁；URSA亚组2患者年龄22~37岁、中位年龄29岁。

二、rs16833431位点基因型检测结果

rs16833431位点PCR扩增目的产物片段长度170bp(图1)，完全没有被内切酶MspI内切的是T/T基因型，只有部分被酶切为170bp、123bp及47bp片段的是T/C，彻底被酶切为123bp及47bp片段是C/C，47bp条带弥散到胶外不能显示。

三、rs16833431位点的H-W平衡检验

经检验，URSA组及对照组的rs16833431位点的基因型分布符合H-W平衡( $P$ 均 $>0.05$ )，具有人群代表意义。

表1	URSA亚组1和对照组rs16833431位点基因型和等位基因的分布比较			例(%)
rs16833431位点	URSA亚组1(215例)	对照组(152例)	$P$ 值	$OR(95\%CI)$
基因型			0.854	
T/T	100(47)	74(49)	-	参照
T/C	98(46)	68(45)	0.591	0.795(0.344~1.836)
C/C	17(8)	10(7)	0.700	0.848(0.366~1.964)
等位基因				
T	298(69)	216(71)	0.610	0.920(0.667~1.269)
C	132(31)	88(29)	-	参照

五、URSA亚组2和对照组的rs16833431位点基因多态性分析

Logistic回归显示，与对照组比较，URSA组

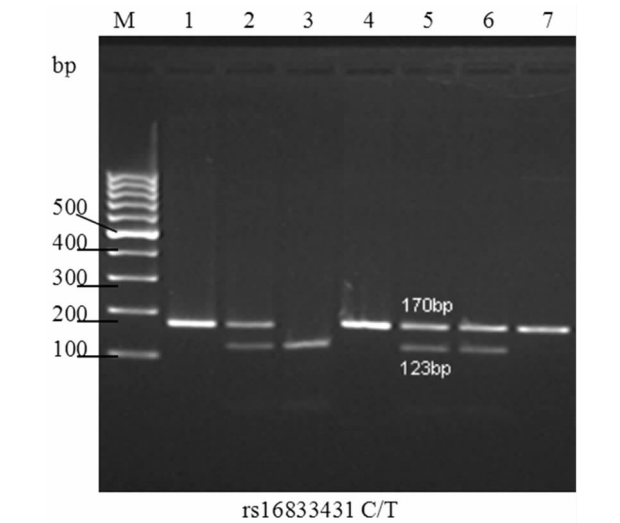


图1 rs16833431位点PCR产物电泳结果  
泳道1、4：T/T基因型；泳道2、5、6：T/C基因型；泳道3：C/C基因型；M为100bp的DNA梯度标尺

四、URSA亚组1和对照组的rs16833431位点基因多态性分析

Logistic回归显示，URSA亚组1和对照组间rs16833431基因位点及等位基因分布比较差异无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ )，见表1。

表2	URSA亚组2和对照组rs16833431位点基因型和等位基因的分布比较			例(%)
rs16833431位点	URSA亚组2(111例)	对照组(152例)	$P$ 值	$OR(95\%CI)$
基因型			0.026	
T/T	41(37)	74(49)	-	参照
T/C	52(47)	68(45)	0.049	0.425(0.181~0.997)
C/C	18(16)	10(7)	0.007	0.308(0.130~0.729)
等位基因				
T	134(61)	216(71)	-	参照
C	88(40)	88(29)	0.011	0.620(0.430~0.894)

六、URSA 亚组 1 和 URSA 亚组 2 的 rs16833431 位点基因多态性分析

Logistic 回归显示，与 URSA 亚组 1 比较，UR-表 3

rs16833431 位点	URSA 亚组 1 (215 例)	URSA 亚组 2 (111 例)
基因型		
T/T	100 (47)	41 (37)
T/C	98 (46)	52 (47)
C/C	17 (8)	18 (16)
等位基因		
T	298 (69)	134 (61)
C	132 (31)	88 (40)

SA 亚组 2 rs16833431 位点 C/C 基因型及 C 等位基因频率较高，T/T 基因型频率较低 ( $P$  均  $< 0.05$ )，见表 3。

rs16833431 位点	URSA 亚组 1 (215 例)	URSA 亚组 2 (111 例)	$P$ 值	OR (95% CI)
基因型			0.048	
T/T	100 (47)	41 (37)	-	参照
T/C	98 (46)	52 (47)	0.068	0.501 (0.238 ~ 1.054)
C/C	17 (8)	18 (16)	0.014	0.387 (0.182 ~ 0.825)
等位基因				
T	298 (69)	134 (61)	-	参照
C	132 (31)	88 (40)	0.022	0.674 (0.481 ~ 0.946)

讨 论

正常妊娠是一种成功的半同种异体移植状态，母体免疫系统对胚胎的父方抗原耐受，在持续的妊娠中发挥了关键作用。而母-胎免疫适应的异常，就可能导致如 RSA、子痫前期等不良妊娠结局出现<sup>[1]</sup>。研究发现，在母-胎免疫耐受机制中，Th 的数量及功能非常重要，在不同的外来抗原刺激下初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞第一步分化 Th0 细胞，在复杂细胞因子的不同诱导下再分化为 Th1、Th2、Th17 及调节性 T 细胞 (Treg)，行使各自的生物学功能，Th1、Th2、Th17 及 Treg 恰好平衡及制约状态，保障正常妊娠的继续<sup>[5]</sup>。于是出现了新的 Th1/Th2/Th17/Treg 联合细胞模式解释 URSA 发病的免疫机制：在 URSA 中，Th1/Th2 细胞平衡向 Th1 方向分化移动，呈现一种 Th1 升高极化的免疫不适宜现象<sup>[6]</sup>。另一方面，Th17 在 URSA 患者外周血和蜕膜组织中数量增加及功能增强，由其分泌的促炎因子 IL-17 亦增加，而且 URSA 患者蜕膜中 Treg 的比例降低且免疫抑制功能下降，这些免疫细胞及其细胞因子组成一个错综复杂免疫调节网络来维持母胎界面的免疫适应<sup>[3,7-8]</sup>。一旦这种精微的适应状态被破坏，可能就会导致母胎免疫耐受失衡而发生复发性流产。

基于上述的 Th1/Th2/Th17/Treg 细胞模式在 URSA 发病中的免疫机制，临床使用淋巴细胞主动免疫治疗 URSA，并取得了一定的疗效<sup>[9]</sup>。本研究中显示有效率达到 66%，与王欣等<sup>[2]</sup>研究观察的妊娠成功率基本相似。研究显示，淋巴细胞主动免疫治疗 URSA，恢复患者体内正常妊娠时的免疫平衡状态，降低 Th1/Th2 比值，使患者处于特殊

“Th2 现象”的利于妊娠的状况之下，同时降低了 Th1 细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-2 等参与排斥反应的促炎因子水平，增加了 Th2 细胞分泌的 IL-10 和 IL-13 等抑炎、保护因子；且使 Th17 细胞增殖分化减少，细胞 Th17 比例减少，Th17/Treg 比值降低<sup>[10-11]</sup>。通过淋巴细胞主动免疫治疗，URSA 患者 Th1/Th2/Th17/Treg 细胞平衡状态恢复，利于正常妊娠的维持。但是仍有大约 1/3 的 URSA 患者经过淋巴细胞主动免疫治疗后再次出现自然流产，可能还有未发现的机制在主动免疫治疗失败的 URSA 患者中起着主导作用，所以研究主动免疫治疗失败的 URSA 患者成为提高 URSA 患者妊娠成功率的重点。

研究显示，STAT4 通过 JAK-STAT 信号通路，促进 Th0 向 Th1 优势分化增殖，在 Th1/Th2 平衡中，使 Th1 处于极化状态<sup>[12]</sup>。而且，STAT4 能够导致 Th17 细胞的活化，引起 Th17 细胞数量及活性增强，并能够抑制 Treg 细胞的免疫应答反应，使 Th17/Treg 比例的平衡向免疫性失调性疾病的方向偏移<sup>[13-14]</sup>。研究发现，STAT4 在 URSA 中蜕膜组织高表达，且 STAT4 的部分内含子位点的基因多态性增加 URSA 发病风险<sup>[4]</sup>。由此推测，在 URSA 中过表达 STAT4 通过上述机制引起 Th1/Th2/Th17/Treg 细胞平衡偏移，从而引起自然流产的发生。

本研究通过对位于 STAT4 基因启动子区的 rs16833431 T/C 位点多态性的研究发现，URSA 亚组 2 患者的 rs16833431 位点的 T/C、C/C 基因型及 C 等位基因频率高于对照组，提示携带 C 等位基因和 C/C 基因型患者发生自然流产的风险增加；与 URSA 亚组 1 相比，URSA 亚组 2 的 rs16833431 位点 C/C 基因型及 C 等位基因频率也升高，可能是

因为携带过高频率的 C 等位基因,引起 STAT4 的高表达,且成为主导,导致淋巴细胞主动免疫治疗在恢复 URSA 患者的 Th1/Th2/Th17/Treg 细胞平衡作用中的效能受到限制,所以主动免疫治疗对 URSA 亚组 2 患者失效。rs16833431 T/C 位点多态性在 URSA 亚组 1 和对照组中的频率分布比较差异无统计学意义,提示排除了 STAT4 基因 rs16833431 T/C 位点多态性对 STAT4 表达的影响后,淋巴细胞主动免疫治疗 URSA 可恢复 Th1/Th2/Th17/Treg 平衡,避免了再次自然流产,成功妊娠,这从另一个方面再次证明了上述推测的合理性。

综上所述,STAT4 基因 rs16833431 位点多态性与主动免疫治疗失败的 URSA 有关,下一步计划通过 STAT4 基因表达的检测实验,进一步确证基因表达与基因型的关系,通过基因沉默技术消除 rs16833431 位点多态性对 URSA 亚组 2 影响,使淋巴细胞主动免疫治疗对 URSA 亚组 2 患者变得有效,以期主动免疫治疗失败的 URSA 患者得到适当的治疗。

#### 参 考 文 献

- [1] Wilczyński JR. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia-the same basic mechanism? *Hum Immunol*, 2006, 67 (7): 492-511.
- [2] 王欣,李培旭. 封闭抗体阴性的反复自然流产患者采用配偶淋巴细胞主动免疫治疗效果观察. *生殖医学杂志*, 2016, 25 (11): 998-1001.
- [3] Liu YS, Wu L, Tong XH, Wu LM, He GP, Zhou GX, Luo LH, Luan HB. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*, 2011, 65 (5): 503-511.
- [4] 李银广,李婕,刘俊,赖嘉杰,何善阳,游泽山. STAT4 基因 rs10181656 位点的多态性与不明原因复发性自然流产的相关性. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2017, 38 (4): 551-555.
- [5] Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J. FOXP3 + regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol Reprod*, 2010, 82

(4): 698-705.

- [6] Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*, 2009, 16 (2): 206-215.
- [7] Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, Kapur R, Levy DE, Kansas GS, Kaplan MH. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol*, 2007, 178 (8): 4901-4907.
- [8] Mei S, Tan J, Chen H, Chen Y, Zhang J. Changes of CD4<sup>+</sup> CD25 high regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*, 2010, 94 (6): 2244-2247.
- [9] Li J, Xu D, Li HL. Evaluation of failed immunotherapy among patients with negative APLA recurrent spontaneous abortion by serum anticardiolipin antibodies and mononuclear cell of Tim-1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21 (5): 908-912.
- [10] Cavalcante MB, Sarno M, Araujo Júnior E, Da Silva Costa F, Barini R. Lymphocyte immunotherapy in the treatment of recurrent miscarriage: systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 295 (2): 511-518.
- [11] Hosseini S, Shokri F, Ansari Pour S, Jeddi-Tehrani M, Nikoo S, Yousefi M, Zarnani AH. A shift in the balance of Th17 and Treg cells in menstrual blood of women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol*, 2016, 116: 13-22.
- [12] Varikuti S, Oghumu S, Natarajan G, Kimble J, Sperling RH, Moretti E, Kaplan MH, Satoskar AR. STAT4 is required for the generation of Th1 and Th2, but not Th17 immune responses during monophosphoryl lipid A adjuvant activity. *Int Immunol*, 2016, 28 (11): 565-570.
- [13] Lee PW, Smith AJ, Yang Y, Selhorst AJ, Liu Y, Racke MK, Lovett-Racke AE. IL-23R-activated STAT3/STAT4 is essential for Th1/Th17-mediated CNS autoimmunity. *JCI Insight*, 2017, 2 (17). pii: 91663.
- [14] Xu J, Yang Y, Qiu G, Lal G, Yin N, Wu Z, Bromberg JS, Ding Y. Stat4 is critical for the balance between Th17 cells and regulatory T cells in colitis. *J Immunol*, 2011, 186 (11): 6597-6606.

(收稿日期: 2018-03-27)

(本文编辑: 林燕薇)