

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.10.021

排卵期生殖道局部细胞免疫与黄体功能不全患者不孕的关系研究

杨丽君 龙燕芬 詹望桃 石莹 易丹妮

(广州市妇女儿童医疗中心妇产科 广东 广州 510000)

摘要 目的:探讨排卵期生殖道局部细胞免疫与黄体功能不全(LPD)患者不孕之间的关系,旨在为临床防治不孕不育提供依据及参考。**方法:**选择2014年10月~2015年10月本院确诊的LPD患者50例为观察组,同期筛选同期50例健康体检者为对照组,排卵后第4d、6d、8d采用酶联免疫法检测两组排卵期血清孕酮(P)水平,采用放射免疫法(RIA)检测两组排卵期血清以及宫颈黏液中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达水平,对以上检测指标予以比较分析。**结果:**排卵后第4d、6d、8d观察组血清P明显低于对照组,比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。排卵期观察组血清TNF- α 及IL-1 β 水平与对照组比较,差异不具有统计学意义($P>0.05$),但观察组宫颈黏液中TNF- α 及IL-1 β 水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。排卵期观察组宫颈黏液中TNF- α 、IL-1 β 水平与血清P存在负相关关系($r=-0.879, -0.886, P<0.05$),且宫颈黏液中TNF- α 、IL-1 β 二者存在显著正相关关系($r=0.768, P<0.05$)。**结论:**排卵期生殖道局部细胞免疫激活,宫颈黏液中TNF- α 及IL-1 β 水平升高,对黄体发育产生影响,并导致LPD的发生。

关键词:排卵期;黄体功能不全;TNF- α ;IL-1 β ;局部细胞免疫

中图分类号:R711.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)10-1883-03

Study on the Relationship between the Local Cellular Immunity in Genital Tract and Infertility in Patients with Luteal Phase Defect

YANG Li-jun, LONG Yan-fen, ZHAN Wang-tao, SHI Ying, YI Dan-ni

(Department of Obstetrics and Gynecology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong, 510000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship between the local cellular immunity in genital tract and infertility in patients with luteal phase defect (LPD), in order to provide the reference for prevention and treatment infertility. **Methods:** A total of 50 patients confirmed diagnosis with LPD were selected as the observation group from October 2014 to October 2015, and enrolled 50 healthy people as the control group in the same period, used enzymelinked immunosorbent assay to detect the levels of serum progesterone (P) in the two groups 4 d, 6 d, 8 d after ovulation, and used radioimmunoassay (RIA) method to detect the levels of cervical mucus and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in two groups during ovulation, then above detection indexes were compared and analyzed. **Results:** Serum P levels in observation group were significantly lower than control group 4 d, 6 d, 8 d after ovulation respectively, the differences were statistically significant ($P<0.05$); The levels of serum TNF- α and IL-1 β between the two groups was no significant difference during ovulation ($P>0.05$), while the levels of cervical mucus TNF- α and IL-1 β in the observation group were significantly higher than control group during ovulation, the differences were statistically significant ($P<0.05$); The levels of cervical mucus TNF- α and IL-1 β negatively correlated with serum P in the observation group during ovulation($r=-0.879, -0.886, P<0.05$), moreover, the level of cervical mucus TNF- α positively correlated with cervical mucus IL-1 β ($r=0.768, P<0.05$). **Conclusion:** Local cellular immune activation in genital tract during ovulation, with the levels of cervical mucus TNF- α and IL-1 β increasing, which impact the corpus lutein and lead to the occurrence of LPD.

Key words: Ovulation; Luteal phase defect; TNF- α ; IL-1 β ; Local cellular immunity

Chinese Library Classification(CLC): R711.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)10-1883-03

前言

黄体功能不全(Luteal phase defect, LPD)属于一种临床综合征候,主要是患者机体卵巢黄体异常而导致孕酮分泌不足所致^[1,2]。LPD的发生是造成患者不孕的主要因素之一,给患者带来了较严重的心理负担,给家庭带来困扰^[3]。以往大量临床研究

认为造成LPD的因素相对较多,且着重点放在了卵泡期与黄体期的神经内分泌方面。但近年来,随着医学技术的发展,有大量学者专家认为在LPD的发生发展过程中,细胞免疫发挥了重要作用,且与不孕密切相关^[4,5]。我们从这个角度予以分析,对纳入本研究的LPD患者与健康者分别进行排卵期肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平检测,并分析两者与血清孕酮(Progesterone, P)水平的相关性,旨在探索生殖道局部细胞免疫与LPD患者不孕的关系,现报告如下。

作者简介:杨丽君(1963-),女,本科,主任医师,从事妇科方面的研究, E-mail: yanglijun123y@163.com

(收稿日期:2016-09-13 接受日期:2016-10-10)

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 10 月~2015 年 10 月本院确诊的 LPD 患者 50 例为观察组, 纳入标准: 诊断标准参照日本松本基础体温 (Basal body temperature, BBT) 分类方法^[6]; BBT 呈双相, 从低体温至高体温呈缓慢上升, 时间超过 3 d; 或高低体温之差小于 0.3℃; 或高温相体温波动大于 0.1℃。临床表现: 月经周期时间延长或缩短, 阴道可见少量流血, 经量多少不一, 有不孕或流产史。妇科检查, 未见异常; 输卵管造影显示通畅; 患者配偶均健康; 患者在 6 个月内未接受过同位素检查或者有关放射性治疗; 未使用过激素类药物治疗; 无吸烟等不良嗜好; 无结核病史。观察组患者年龄 22-38 岁, 平均年龄 (29.21± 3.20) 岁; 月经周期为 18-30 d, 平均月经周期 (22.21± 2.95) d; 不孕时间 2-10 年, 不孕平均时间为 (4.32± 2.11) 年; 不育类型: 原发性不育 38 例, 继发性不育 (反复性流产 ≥ 3 次) 12 例。另选择同期在我院行孕期检查现未孕健康妇女 50 例为对照组, 纳入标准: 黄体中期检查 3 次血清 P 水平之和 > 95.40 nmol/L, 妇科相关检查均正常。对照组年龄 23~37 岁, 平均年龄 (28.72± 4.08) 岁; 月经周期为 19-32 d, 平均月经周期为 (24.05± 2.26) d, 两组年龄、月经周期比较, 差异无统计学意义 (P>0.05), 具可比性。

1.2 指标检测方法

① 采用 B 超检测显示两组受检者卵泡由小到大排出, 于排

卵后第 4 d、6 d、8 d, 抽取其肘静脉血 3 mL, 于常温下 3000 r/min 离心处理 15 min, 随后取上清液存于 -70℃ 下备测。血清 P 水平采用酶联免疫法进行检测, Access Immunoassay System 试剂盒由美国 Beckman 公司提供; 采用放射免疫法 (radioimmunoassay, RIA) 检测两组排卵期血清 TNF-α 与 IL-1β 水平, 配套试剂盒由上海邦景实业有限公司提供。② 于受检者月经周期第 9 d 始, 每日或者隔日采用 Insler 宫颈黏液评分法^[7]对宫颈黏液予以评估, 患者排卵前后 1 d 内, Insler 评分 ≥ 7 分时, 选择宫颈内口处, 采用吸管吸取 0.30~0.51 mL 黏液, 置入 Apendoff 管中, 在 4℃ 条件下以 3000 r/min 离心 10 min, 随后取其上清液采用 RIA 法检测两组宫颈黏液中 TNF-α 与 IL-1β 水平, 试剂盒由上海邦景实业有限公司提供。

1.3 统计学方法

采用统计学软件 SPSS15.0 进行数据处理分析, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 组间两两比较予以 t 检验, 计数数据以百分率描述, 比较采用 X² 检验, 相关性分析予以直线相关分析法, 相关系数为 r, P<0.05 表示差异性具显著统计学意义。

2 结果

2.1 两组排卵期血清 P 水平比较

排卵后第 4 d、6 d、8 d 观察组血清 P 明显低于对照组, 比较差异均有统计学意义 (P<0.05), 见表 1。

表 1 两组排卵期血清 P 水平比较 (ng/mL)

Table 1 Comparison of serum progesterone levels in the two groups during ovulation (ng/mL)

Groups	n	4 d	6 d	8 d
Observation group	50	23.02± 8.33	35.75± 7.65	30.39± 6.91
Control group	50	50.18± 11.10	55.13± 9.01	55.14± 7.79
t	—	4.992	3.657	-10.883
P	—	0.002	0.000	0.001

2.2 两组排卵期血清及宫颈黏液中 TNF-α、IL-1β 水平比较

观察组血清 TNF-α 及 IL-1β 水平与对照组比较, 差异不具

有统计学意义 (P>0.05); 但观察组宫颈黏液中 TNF-α 及 IL-1β 水平显著高于对照组, 差异有统计学意义 (P<0.05), 见表 2。

表 2 两组排卵期血清及宫颈黏液中 TNF-α、IL-1β 水平比较 (μg/L)

Table 2 Comparison of serum and cervical mucus TNF-α, IL-1β levels in two groups during ovulation (μg/L)

Groups	n	TNF-α		IL-1β	
		Serum	Cervical mucus	Serum	Cervical mucus
Observation group	50	0.16± 0.05	1.55± 0.54	0.54± 0.17	2.46± 0.69
Control group	50	0.14± 0.06	1.24± 0.27	0.60± 0.18	1.88± 0.46
t		0.130	4.557	0.854	3.730
p		1.100	0.001	0.605	0.000

2.3 排卵期观察组宫颈黏液中 TNF-α、IL-1β 水平与血清 P 相关性分析

排卵期观察组宫颈黏液中 TNF-α、IL-1β 水平与血清 P 存在负相关关系 (r=-0.879, P=0.030; r=-0.886, P=0.010), 且宫颈黏液中 TNF-α、IL-1β 二者存在显著正相关关系 (r=0.768, P=0.

001)。

3 讨论

LPD 是一种黄体内分泌不足现象, 具体指在患者卵巢排卵后, 其黄体内分泌异常造成孕激素分泌失衡, 进一步导致患者

子宫内膜分泌转化出现障碍,干扰受精卵的着床,造成患者不孕不育或者流产^[8-10]。目前,LPD病因不详,尚无法确定其发生机制,但普遍认为卵巢黄体异常造成孕激素分泌不足是其主要病理基础。还有一些研究发现^[11,12],促卵泡成熟素(FSH)分泌不足、黄体生成素(LH)分泌不足;垂体分泌催乳素异常、卵泡刺激素与黄体生成素比值低、卵泡自身不成熟等因素均可引发LPD。LPD患者平时无明显不适症状反应,如果出现临床症状,则主要表现为患者月经发作频率增加、月经周期变短、出现不孕或流产,且流产多发于孕早期。

本次研究结果显示,观察组排卵期血清P值要明显低于对照组,与LPD的发病研究理论一致^[13]。随着医疗技术的发展,越来越多的研究发现,免疫系统尤其是生殖道局部免疫功能对生殖及不育有重要影响。阴道宫颈上皮巨噬细胞可与递抗原树突状及基底膜上的T细胞有联系,同时也与间质毛细血管直接接触,因此宫颈黏液与卵巢内分泌的变化有关,宫颈环境能够间接或者直接反映出生殖道局部情况^[14,15]。

血清TNF- α 及IL-1 β 均属于多效应的细胞因子,均可参与天然的免疫反应,是由巨噬细胞、单核细胞分泌及合成。本研究中排卵期两组宫颈黏液均可检测出TNF- α 及IL-1 β ,这是因为在排卵前,卵细胞中的TNF- α 及IL-1 β 表达水平平均会显著升高,并积极地参与到了排卵过程,高浓度TNF- α 会对颗粒细胞雌二醇的合成产生抑制,同时也会阻滞泡膜细胞雄烯二酮的合成,从而干扰卵泡的发育^[16,17]。表明黄体细胞功能及结构的完整与免疫细胞因子的调节有一定关联。而本研究还发现,LPD患者宫颈黏液中的TNF- α 及IL-1 β 水平要显著高于健康者,提示生殖道局部高浓度TNF- α 及IL-1 β 与LPD的发生有关。有实验发现^[18,19],IL-1 β 因子对精子穿卵过程产生影响,同时IL-1 β 因子会明显抑制子宫内膜间质细胞蜕膜化,从而干扰受孕。因此,排卵期LPD患者生殖道局部细胞免疫已经受到激活,局部分泌出大量TNF- α 、IL-1 β ,对精子穿卵、精子活力、精卵结合以及早期的胚胎着床均有不利影响;再者,生殖道局部细胞免疫激活产生经旁分泌效应,从而激活了盆腔局部免疫环境并障碍了黄体的发育,最终造成LPD发生^[20]。且相关性分析显示,排卵期观察组宫颈黏液中TNF- α 、IL-1 β 水平与血清P均存在负相关关系,进一步说明排卵期生殖道局部细胞免疫与LPD患者不孕有关,且TNF- α 、IL-1 β 二者在这一过程中发挥了协同作用。

综上分析,排卵期生殖道局部细胞免疫激活,TNF- α 及IL-1 β 水平升高,与LPD患者不孕有密切关系。

参考文献(References)

- [1] Nandedkar SS, Patidar E, Gada DB, et al. Histomorphological Patterns of Endometrium in Infertility [J]. J Obstet Gynaecol India, 2015, 65 (5): 328-334
- [2] Sadekova ON, Nikitina LA, Rashidov TN, et al. Luteal phase defect is associated with impaired VEGF mRNA expression in the secretory phase endometrium[J]. Reprod Biol, 2015, 15(1): 65-68
- [3] Shah D, Nagarajan N. Luteal insufficiency in first trimester[J]. Indian J Endocrinol Metab, 2013, 17(1): 44-49
- [4] Bonetti TC, Salomao R, Brunialti M, et al. Cytokine and hormonal profile in serum samples of patients undergoing controlled ovarian stimulation: interleukin-1beta predicts ongoing pregnancy [J]. Hum Reprod, 2010, 25(8): 2101-2106
- [5] Fu J, Yao R, Luo Y, et al. Anti-GAPDH antibodies: a biomarker of immune infertility[J]. Cell Tissue Res, 2016, 364(1): 199-207
- [6] Duffy DA, Manzi D, Benadiva C, et al. Impact of leuprolide acetate on luteal phase function in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination[J]. Fertil Steril, 2006, 85(2): 407-411
- [7] Artymuk NV, Kira EF, Kondratieva TA. Intravaginal gel prepared from Dead Sea peloid for treating luteal-phase defect [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2010, 108(1): 72-73
- [8] Gurbuz AS, Deveer R, Ozcimen N, et al. Absence of luteal phase defect and spontaneous pregnancy in IVF patients despite GnRH-agonist trigger and "freeze all policy" without luteal phase support: a report of four cases[J]. Gynecol Endocrinol, 2016, 32(1): 18-20
- [9] Muñoz E, Taboas E, Portela S, et al. Treatment of luteal phase defects in assisted reproduction[J]. Curr Drug Targets, 2013, 14(8): 832-842
- [10] Shivapathasundram G, Kwik M, Chapman M. Luteal phase defect: part of the infertility zeitgeist or relic from the past? [J]. Hum Fertil (Camb), 2011, 14(1): 60-63
- [11] Check JH, Wilson C, Choe JK. Mid-luteal phase injection of subcutaneous leuprolide acetate improves live delivered pregnancy and implantation rates in younger women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET)[J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2016, 43(2): 173-174
- [12] Aali BS, Ebrahimipour S, Medhdizadeh S. The effectiveness of luteal phase support with cyclogest in ovarian stimulated intra uterine insemination cycles: A randomized controlled trial [J]. Iran J Reprod Med, 2013, 11(4): 309-314
- [13] Brown HM, Fabre Nys C, Cognié J, et al. Short oestrous cycles in sheep during anoestrus involve defects in progesterone biosynthesis and luteal neovascularisation[J]. Reproduction, 2014, 147(3): 357-367
- [14] Brazdova A, Senechal H, Peltre G. Immune Aspects of Female Infertility[J]. Int J Fertil Steril, 2016, 10(1): 1-10
- [15] Barbosa MW, Silva LR, Navarro PA, et al. Dydrogesterone vs progesterone for luteal-phase support: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2016, 48(2): 161-170
- [16] Gonzalez-Navarrete F, Eisner V, Morales P, et al. Tumor necrosis factor-alpha activates nuclear factor-kappaB but does not regulate progesterone production in cultured human granulosa luteal cells[J]. Gynecol Endocrinol, 2007, 23(7): 377-384
- [17] Eid AA, Younan DN. Seminal Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its relationship to infertility in Egyptian patients with varicocele [J]. Andrologia, 2015, 47 (9): 1028-1033
- [18] Havrylyuk A, Chopyak V, Boyko Y, et al. Cytokines in the blood and semen of infertile patients [J]. Cent Eur J Immunol, 2015, 40(3): 337-344
- [19] Xia YH, Yao L, Zhang ZX. Correlation between IL-1 β , IL-1Ra gene polymorphism and occurrence of polycystic ovary syndrome infertility[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(3): 232-236
- [20] Kim NY, Cho HJ, Kim HY, et al. Thyroid autoimmunity and its association with cellular and humoral immunity in women with reproductive failures[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 65(1): 78-87