

胚胎反复种植失败与淋巴细胞主动免疫的应用

赵芳, 吕玉珍, 王娟, 蒋毅, 田可可(河南省焦作市妇幼保健院生殖中心, 河南省焦作市 454000)

文章亮点:

应用淋巴细胞主动免疫治疗, 可以改善患者的体液免疫和细胞免疫功能, 提高封闭抗体水平, 而且该技术简单易行、安全有效。对于体外受精-胚胎移植中反复种植失败患者, 如其封闭抗体检查阴性, 可建议行淋巴细胞主动免疫治疗, 待封闭抗体转阳后再行胚胎移植。

关键词:

组织构建; 移植; 体外受精-胚胎移植; 反复种植失败; 封闭抗体; 主动免疫治疗; 临床妊娠率; 胚胎种植率; 流产率; 淋巴细胞; 免疫系统; 母胎耐受

主题词:

移植; 抗体; 妊娠; 淋巴细胞; 免疫系统

摘要

背景: 目前文献大多报道主动免疫治疗对复发性流产取得较好效果, 而关于主动免疫治疗对反复种植失败的效果有待于进一步研究证实。

目的: 探讨封闭抗体检测和淋巴细胞主动免疫治疗在体外受精-胚胎移植反复种植失败患者中的应用。

方法: 对 52 例封闭抗体检查为阴性的反复种植失败患者, 行淋巴细胞主动免疫治疗, 设为观察组, 74 个周期, 封闭抗体转阳后行胚胎移植。另选对照组 65 例, 92 个周期, 直接行胚胎移植。

结果与结论: 反复种植失败患者行淋巴细胞主动免疫治疗后封闭抗体转阳率 92%。观察组的临床妊娠率和胚胎种植率明显高于对照组($P < 0.05$)。两组的流产率差异无显著性意义($P > 0.05$)。结果表明, 淋巴细胞主动免疫治疗有助于提高反复种植失败患者再次助孕的妊娠率。

赵芳, 吕玉珍, 王娟, 蒋毅, 田可可. 胚胎反复种植失败与淋巴细胞主动免疫的应用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(51):8281-8285.

赵芳, 女, 1982 年生, 河南省焦作市人, 汉族, 2009 年郑州大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事生殖医学研究。

通讯作者: 吕玉珍, 主任医师, 河南省焦作市妇幼保健院生殖中心, 河南省焦作市 454000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.51.015
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)51-08281-05
稿件接受: 2014-12-01

Effect of active immunotherapy with lymphocytes on repeated implantation failure

Zhao Fang, Lv Yu-zhen, Wang Juan, Jiang Yi, Tian Ke-ke (Maternal and Child Health Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454000, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: There are many reports addressing the good effect of active immunotherapy on repeated miscarriage, but the effect of active immunotherapy on repeated implantation failure needs to be confirmed by further studies.

OBJECTIVE: To study the effect of active immunotherapy with lymphocytes on repeated implantation failure in *in vitro* fertilization-embryo transfer.

METHODS: Active immunotherapy with lymphocytes was done in 52 repeated implantation failure patients lacking blocking antibodies. Repeated implantation failure patients were divided into two groups: study group (74 cycles): active immunotherapy was done and blocking antibodies turned positive before embryo transfer; control group (92 cycles): active immunotherapy was not done before embryo transfer. The pregnancy outcome was compared between two groups.

RESULTS AND CONCLUSION: After the active immunotherapy with lymphocytes, the positive rate of blocking antibodies was 92% in repeated implantation failure patients. The pregnancy rate and implantation rate of study group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the miscarriage rate between two groups ($P > 0.05$). So the active immunotherapy with lymphocytes in repeated implantation failure patients may be helpful to improve the rate of pregnancy in following embryo transfer.

Subject headings: transplantation; antibodies; pregnancy; lymphocytes; immune system

Zhao F, Lv YZ, Wang J, Jiang Y, Tian KK. Effect of active immunotherapy with lymphocytes on repeated implantation failure. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(51):8281-8285.

Zhao Fang, Master, Attending physician, Maternal and Child Health Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454000, Henan Province, China

Corresponding author: Lv Yu-zhen, Chief physician, Maternal and Child Health Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454000, Henan Province, China

Accepted: 2014-12-01

0 引言 Introduction

近年来,人类辅助生殖技术发展迅速,体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfe, IVF-ET)的临床妊娠率和胚胎种植率不断提高,但反复种植失败(repeated implantation failure, RIF)是生殖医学领域尚未解决的难题,也是限制体外受精发展的瓶颈。反复种植失败是移植了至少3次优质胚胎,或者多次移植的胚胎数量 ≥ 10 个仍未获妊娠^[1]。

反复种植失败已成为困扰临床医生和不孕患者的一个难题^[2]。胚胎着床过程较复杂且受诸多因素的精细调节,在胚胎植入前的任何一个环节异常均有可能导致着床障碍,尽管反复种植失败的具体病因及相关机制尚未明了,但已有研究证实反复种植失败的相关危险因素与子宫内膜容受性降低、胚胎质量、胚胎移植技巧缺陷、精神心理因素和不明原因等多因素相关^[3],其中优质的胚胎和良好的子宫环境是胚胎种植成功的关键^[4]。但在体外受精-胚胎移植中,经常会发现许多患者有优质的胚胎,子宫内膜形态正常,但是经多次移植胚胎无法成功妊娠。反复种植失败患者在排除了染色体异常、解剖结构异常、内分泌失调、生殖道感染、自身免疫疾病等病因,多次移植优质胚胎仍未妊娠,被认为可能与免疫平衡遭到破坏致使免疫耐受下降有关。

体外受精-胚胎移植治疗周期中,为了募集更多卵泡而使用外源性促性腺激素,产生高水平的雌二醇,患者处于性激素高生理水平状态,免疫微环境也发生相应变化。DeLoia等^[5]发现,内膜和外周血淋巴细胞总数量,特别是自然杀伤细胞,在超生理水平的雌二醇影响后数量会增加。

随着生殖免疫学的发展,越来越多的研究发现反复种植失败与母胎免疫调节紊乱有关。胚胎携带父系抗原种植于母体,相当于半同种异体移植,胚胎中来自父亲的基因抗原对孕妇而言属于外来异物,因此受到母体的排斥^[6]。母体的免疫系统与胚胎源性抗原形成免疫平衡状态是胚胎得以存活的前提条件,一旦这种免疫平衡状态被破坏,导致母胎免疫失衡,将可能造成反复胚胎种植失败或流产的发生,免疫学调控在胚胎种植过程中发挥重要的角色^[7]。在正常妊娠中,人类白细胞抗原相互排斥,这样胚胎所携带的父源性人类白细胞抗原能刺激母体免疫系统,并产生一类称为封闭抗体的IgG型抗体,该抗体既可与母体淋巴细胞表面抗原结合,又可与滋养细胞本身结合,从而阻断母体胎儿之间的免疫识别和免疫反应^[8]。

应用淋巴细胞对封闭抗体缺乏的反复种植失败患者进行免疫治疗,主要是利用丈夫(或第3人)淋巴细胞注射给妻子后,刺激妻子免疫系统,使其产生具有免疫保护作用的封闭抗体,当妻子再次妊娠时,这些封闭抗体就能识别胚胎上来自丈夫的抗原,并与之结合,继而产生封闭作用,防止胚胎或胎儿父系抗原被母体免疫系统识别和杀伤,产生免疫保护,使胚胎得到保护并生长发育^[9]。

文章以此探讨体外受精-胚胎移植中淋巴细胞主动免疫治疗在反复种植失败患者中的应用及疗效。

1 对象和方法 Subjects and methods

设计: 回顾性临床对照研究。

时间及地点: 2012年1月至2013年12月在河南省焦作市妇幼保健院生殖中心完成。

对象: 行新鲜周期体外受精-胚胎移植助孕的反复种植失败患者117例。

纳入标准: ①行新鲜周期体外受精-胚胎移植助孕的反复种植失败患者,患者年龄21-43岁,平均(31.75 \pm 3.28)岁。②宫腔镜检查正常。③患者签署知情同意书。

排除标准: 排除染色体、解剖、内分泌异常及生殖道感染、输卵管积水、自身免疫性疾病和卵巢反应不良等异常情况。

封闭抗体检测及淋巴细胞主动免疫治疗所需的试剂:

试剂	来源
淋巴细胞分离液	国药集团化学试剂有限公司
封闭抗体试剂盒	美国One Lambda公司

方法:

分组及干预: 将117例患者分为2组,观察组(74个周期,52例)行淋巴细胞主动免疫治疗,封闭抗体转阳后行胚胎移植;对照组(92个周期,65例患者)不行淋巴细胞主动免疫治疗,直接行胚胎移植。

封闭抗体检测方法: 封闭抗体采用酶联免疫法检测^[10],操作按试剂盒(美国One Lambda公司)说明书进行。向试剂盒的96孔板中加入阴性、阳性对照液,取20 μ L待测血清,加入20 μ L 抗体稀释液,混匀后加入96孔板中,37 $^{\circ}$ C孵育45 min,弃去各孔中液体,用洗涤液洗涤各孔2次,扣干。向各孔中加入已稀释酶标抗体10 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30 min,弃去各孔液体,洗涤液洗涤3次,扣干。各取向A, B液500 μ L,混匀,加入各孔10 μ L,避光孵育10 min(37 $^{\circ}$ C),加入50 μ L 终止液,放入酶标仪中检测。观察结果蓝色为阳性,无色为阴性。

淋巴细胞主动免疫治疗: 治疗前常规检查夫妻传染性疾病,若丈夫有传染性疾病,则采用与女方无血缘关系的健康第3方供血。按照李大金等^[11]的方法,抽取丈夫(或第3方)外周血30 mL肝素抗凝,在无菌条件下常规分离提取淋巴细胞,用生理盐水洗涤3次后,调至淋巴细胞浓度为 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$,给妻子左上臂皮内多点注射。每间隔3周免疫1次,3次为1个疗程。末次免疫后一两周复查封闭抗体各项指标。

体外受精-胚胎移植助孕: 观察组患者免疫治疗一两个疗程,封闭抗体转阳后行新鲜周期胚胎移植。对照组患者不行淋巴细胞主动免疫治疗,直接行胚胎移植。两组患者按本中心常规进行长方案体外受精-胚胎移植。移植后行

表1 两组患者基线资料的比较

项目	观察组(n=52)	对照组(n=65)
周期数(n)	74	92
平均年龄(岁)	31.67±3.36	31.99±3.17
不孕年限(年)	4.48±2.55	4.18±2.63
既往移植次数(次)	3.73±0.37	3.42±0.40
平均移植胚胎数(枚)	2.30±0.43	2.39±0.38
移植日平均内膜厚度(mm)	10.25±2.16	10.57±2.34
基础卵泡刺激素水平(U/L)	7.58±2.35	7.64±2.46
窦卵泡数(n)	8.11±2.49	7.78±2.63
体质量指数(kg/m ²)	21.53±1.55	22.16±1.43

表注: 两组患者的平均年龄、不孕年限、既往移植次数、平均移植胚胎数、移植日平均子宫内膜厚度、基础卵泡生成素水平、窦卵泡数和体质量指数比较差异无显著性意义。

黄体支持, 两组患者采用相同的黄体支持方案。移植后30 d的B超检测见孕囊为临床妊娠。观察组患者妊娠后继续行免疫治疗至妊娠12周。

主要观察指标: 反复种植失败患者淋巴细胞主动免疫治疗后封闭抗体转阳率, 封闭抗体转阳率=封闭抗体转阳患者数/淋巴细胞主动免疫治疗患者数。比较两组患者的临床妊娠率、胚胎种植率及流产率, 临床妊娠率=临床妊娠周期数/移植周期数, 胚胎种植率=孕囊数/移植胚胎数, 流产率=流产周期数/临床妊娠周期数。

统计学分析: 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用率表示, 采用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析, 数据符合正态分布, 组间数据差异比较采用独立样本 t 检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 受试者数量分析 纳入 117 例患者, 均进入结果分析, 无中途退出者。

2.2 受试者基线分析 两组患者的平均年龄、不孕年限、既往移植次数、平均移植胚胎数、移植日平均子宫内膜厚度、基础卵泡生成素(FSH)水平、窦卵泡数和体质量指数比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 体外受精-胚胎移植反复种植失败患者封闭抗体转阳率 52例封闭抗体阴性的反复种植失败患者, 经淋巴细胞主动免疫治疗后, 封闭抗体阳性48例, 转阳率92.31%。

2.4 两组患者妊娠结局的比较 观察组的临床妊娠率和胚胎种植率高于对照组($P < 0.05$), 两组患者的流产率比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表2。

3 讨论 Discussion

辅助生殖技术为不孕不育夫妇解决了生育问题, 近年来随着个性化促排卵方案的合理应用和胚胎培养技术的进步, 体外受精-胚胎移植的临床妊娠率和累积妊娠率逐步提高, 但胚胎的种植率仍较低, 为20%–30%^[12]。引起反复种植失败的原因是很多, 包括胚胎质量、子宫内膜的容受性

表2 两组患者妊娠结局的比较

项目	观察组	对照组
临床妊娠率	30/74(41)	24/92(26)
胚胎种植率	39/170(23)	33/220(15)
流产率	4/30(13)	4/24(17)

表注: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

和免疫因素等。近年来, 许多证据表明免疫因素在反复种植失败中发挥重要作用。

目前国内外大量文献报道主动免疫治疗对复发性流产取得较好效果, 而关于主动免疫治疗反复种植失败报道甚少。淋巴细胞主动免疫治疗用于不明原因复发性流产患者的主要机制是淋巴细胞免疫可提高患者的免疫反应性, 使其获得封闭抗体, 提高患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的数量^[13-15], 并可诱导患者体内Th1/Th2平衡Th2偏离, 防止胚胎或胎儿父系抗原被母体免疫系统识别和杀伤, 产生免疫保护, 从而帮助维持正常妊娠^[16-19]。有学者认为, 反复种植失败与复发性流产的病因可能存在相当部分的重叠^[20], 反复种植失败与复发性流产可能是同一病理机制的不同时期的表现, 即胚胎种植障碍, 反复种植失败为胚胎种植失败, 而复发性流产为妊娠继续失败, 均由多因素所致^[21]。Kling等^[22]将在复发性流产患者中证明行之有效的免疫治疗引入反复种植失败患者的治疗中, 同样取得了令人振奋的结果。

文章将淋巴细胞主动免疫治疗应用于体外受精-胚胎移植中不明原因的反复种植失败患者, 取得了较好的妊娠结局。应用淋巴细胞对封闭抗体缺乏的反复种植失败患者进行免疫治疗, 主要是提取丈夫(或第3人)淋巴细胞注射给妻子后, 刺激妻子免疫系统, 使其产生具有免疫保护作用的封闭抗体, 当妻子再次妊娠时, 这些封闭抗体就能识别胚胎上来自丈夫的抗原并结合, 防止胚胎或胎儿父系抗原被母体免疫系统识别和杀伤, 有利于妊娠。

文章中52例封闭抗体阴性的反复种植失败患者, 经淋巴细胞主动免疫治疗一两个疗程后, 封闭抗体阳性48例, 转阳率92%, 显著提高了其封闭抗体水平。有研究报道主动免疫治疗后约90%产生封闭抗体, 较治疗前显著提高, 可诱导CD8⁺细胞增殖, 淋巴细胞免疫治疗能够提高Th2型细胞因子及下调Th1型细胞因子, 促使Th1/Th2的平衡而进一步诱导免疫耐受^[23-26]。

林其德等^[27]研究发现淋巴细胞来源于丈夫与来源于无关的第3个体以及第3个体淋巴细胞来源于男性或女性之间的疗效比较差异无显著性意义, 从而扩大了供血者的范围。因此, 文章中大多数患者免疫治疗淋巴细胞来源于丈夫, 对丈夫有传染性疾病者采用与女方无血缘关系的健康第3方供血。

文章结果表明, 观察组反复种植失败患者经淋巴细胞

主动免疫治疗, 封闭抗体转阳后再次行新鲜周期胚胎移植, 其临床妊娠率和胚胎种植率均高于对照组。观察组和对照组两组患者的一般情况如平均年龄、不孕年限、既往移植次数、平均移植胚胎数、移植日平均子宫内膜厚度、基础促卵泡生成素水平、窦卵泡数和体质量指数等比较差异无显著性意义, 具有可比性。两组患者体外受精助孕前均行宫腔镜检查为正常, 并排除了胚胎质量和子宫内膜因素导致的胚胎种植失败。免疫治疗后, 可有效刺激母体产生封闭抗体, 调节母体的体液和细胞免疫功能, 母体免疫耐受形成, 胚胎易于存活, 妊娠成功率提高。

娄华等^[28]报道采用淋巴细胞主动免疫治疗反复种植失败可调节异常的细胞免疫功能, 但并未明确能否提高反复种植失败的临床妊娠率。文章中对于辅助生殖中的反复种植失败患者, 淋巴细胞主动免疫治疗后仍可获得41%的妊娠率, 有较好的临床应用价值。淋巴细胞主动免疫治疗不仅增加患者体内的封闭抗体水平, 改善患者免疫状态, 以利于胚胎继续发育, 还同时降低自然杀伤细胞毒性, 降低母体对胚胎的攻击能力, 产生免疫保护, 提高妊娠成功率^[29]。

文章中两组患者的流产率比较差异无显著性意义, 提示淋巴细胞主动免疫治疗并未降低反复种植失败患者的流产率。有文献报道主动免疫治疗可降低复发性流产患者的流产率^[30-31], 根据患者体内封闭抗体的变化来判断淋巴细胞免疫治疗的效果和对指导习惯性流产患者妊娠及对再次妊娠的结局有良好的预示价值^[32]。

文章中可能是由于两组患者均为反复种植失败患者, 既往无反复流产史, 其流产率并不高, 与本中心其他体外受精患者的流产率相近。由于本文研究对象较少, 关于主动免疫治疗后封闭抗体转阳率和封闭抗体对反复种植失败患者再次助孕的疗效, 尚有待于今后进一步的研究和大样本量的数据。

目前, 关于国内外主动免疫治疗对反复种植失败治疗的确切效果仍缺乏大量的前瞻随机对照研究的循证医学证据, 仍有待日后进一步研究和探索。Coulam等^[33]研究认为免疫治疗只在那些显示有异常免疫风险的生育失败的妇女中起作用, 目的是提高其活产婴儿的出生。但也有专家认为淋巴细胞注射缺乏坚实的循证医学基础, 反对进行该项治疗^[34]。

文章未发现对母体的不良发应如母体的过敏反应及传染病的发生, 但是其提高反复种植失败患者体外受精临床妊娠率和胚胎种植率的作用机制尚待进一步研究。反复种植失败可能存在母胎免疫平衡的失调, 而主动免疫治疗可能诱发细胞免疫参与的免疫耐受, 使封闭抗体增强, 诱导母胎界面微环境耐受, 为摸索提高胚胎的着床的方法以及阐明反复种植失败的发病机制提供了理论依据^[35-40]。

总之, 应用淋巴细胞主动免疫治疗, 可以改善患者的体液免疫和细胞免疫功能, 提高封闭抗体水平, 而且该技术简单易行、安全有效。对于体外受精-胚胎移植中反复种

植失败患者, 如其封闭抗体检查阴性, 可建议行淋巴细胞主动免疫治疗, 待封闭抗体转阳后再行胚胎移植。

作者贡献: 第一作者构思并设计本文, 统计分析数据, 实施为第四、五作者, 评估为第三作者, 通讯作者审核并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 试验通过伦理委员会审批, 并全程接受伦理委员会监督。

学术术语: 淋巴细胞主动免疫治疗-是利用丈夫(或第3人)淋巴细胞注射给妻子后, 刺激妻子免疫系统, 使其产生具有免疫保护作用的封闭抗体, 当妻子再次妊娠时, 这些封闭抗体就能识别胚胎上来自丈夫的抗原, 并与之结合, 继而产生封闭作用, 防止胚胎或胎儿父系抗原被母免疫系统识别和杀伤, 使胚胎得到保护并生长发育。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Harton G, Braude P, Lashwood A, et al. ESHER PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/ preimplantation genetic screening. Hum Reprod. 2011;26(1):14-24.
- [2] Potdar N, Gelbaya T, Nardo LG. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online. 2012;25(6):561-571.
- [3] 全松,陈雷宁,高瑞花,等.胚胎反复种植失败的处理研究进展[J].广东医学,2010,31(19):2475-2477.
- [4] Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. Fertil Steril. 2012;97(5):1039-1043
- [5] DeLoia JA, Stewart-Akers AM, Brekosky J, et al. Effects of exogenous estrogen on uterine leukocyte recruitment. Fertil Steril. 2002;77(3):548-554.
- [6] Beydoun H, Saftlas AF. Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions. Tissue Antigens. 2005;65(2):123-135.
- [7] Makrigiannakis A, Petsas G, Toth B, et al. Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. Reprod Immunol. 2011;90:96-104.
- [8] 郑妍,何庭宇,何茜冬,等.人类白细胞抗原基因多态性与不明原因反复流产免疫治疗妊娠结局的初步探讨[J].生殖与避孕,2010,30(3):174-176.
- [9] 张建平,林其德,李大金.复发性流产的诊断及治疗[J].现代妇产科进展,2006,15(7):481-492.
- [10] 方伟祺,蔡振华,谢晓英.封闭抗体检测与反复自然流产患者主动免疫治疗的相关性分析[J].中国微生态学杂志,2014,26(9):1059-1061.
- [11] 李大金,余江,朱影,等.母-胎免疫识别低下型反复自然流产配偶淋巴细胞免疫疗法的改进[J].上海免疫学杂志,2003,23(6):393-395.
- [12] Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, et al. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005. Results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod. 2009;24(6):1267-1287.

- [13] 邱丽华,林其德. 调节性T淋巴细胞与原因不明复发性流产的相关性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(12): 816-818.
- [14] Yang H, Qiu L, Chen G, et al. Proportional change of CD4+ CD25 + regulatory T cells after lymphocyte therapy in un-explained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*. 2009;92(1):301-305.
- [15] 沈伶,卢焕霞,胡瑞霞,等. 两种免疫治疗方法治疗封闭抗体阴性复发性流产患者的疗效观察[J]. 新医学, 2011, 42(6): 402-405.
- [16] 彭婀娜,姚若进. 不明原因复发性流产主动免疫治疗前后封闭抗体的变化及其意义[J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26: 773-775.
- [17] 赖有行,李正梅,詹新林,等. 主动免疫联合中药治疗封闭抗体不足性反复自然流产的临床观察[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(21): 3486-3488.
- [18] 杨章莉,周春慧,李新蓉,等. 淋巴细胞主动免疫联合地屈孕酮治疗封闭抗体阴性所致复发性流产的临床观察[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(2): 128-130.
- [19] 伍金华,黄胜起,谢志威,等. 原因不明复发性流产主动免疫治疗前后CD3⁺PD-1⁺T细胞表达水平研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2014, 28(8): 747-749.
- [20] Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM, et al. Future direction of failed implantation and recurrent miscarriage research. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(1):71-83.
- [21] Stern C, Chamley L. Antiphospholipid antibodies and coagulation defects in women with implantation failure after IVF and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13(1):29-37.
- [22] Kling C, Schmutzler A, Wilke G, et al. Two-year outcome after recurrent implantation failure: prognostic factors and additional interventions. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;8(2): 135-142.
- [23] 彭桂元,伍招娣,黄向红,等. 主动免疫治疗不明原因反复自然流产疗效的循证医学评价[J]. 中国医学工程杂志, 2006, 14(5): 489-493.
- [24] Szpakowski A, Malinowski A, Glowacka E, et al. The influence of paternal lymphocyte immunization on the balance of Th1/ Th2 type reactivity in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Ginekol Pol*. 2000;71(6):586-592.
- [25] 李大金,李超荆. 原发性反复自然流产的白细胞免疫治疗[J]. 生殖与避孕, 1995, 15(6): 457-458.
- [26] 陶淑贞. 淋巴细胞免疫治疗反复自然流产140例分析[J]. 江苏卫生保健, 2008, 10(5): 42-43.
- [27] 林其德,邱丽华. 免疫型复发性流产的发病机制及诊断和治疗[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(11): 1275-1278.
- [28] 娄华,王兴玲,王雪梅,等. 反复胚胎植入失败患者主动免疫治疗前后封闭抗体的检测及其意义[J]. 现代免疫学, 2013, 33(1): 52-55.
- [29] Clark DA, Gorczynski RM, Blajchman MA. Transfusion-related immunomodulation due to peripheral blood dendritic cells expressing the CD200 tolerance signaling molecule and alloantigen. *Transfusion*. 2008;48(5): 814-821.
- [30] 邹琳,彭彩玲,许丽华,等. 321例复发性流产患者采用丈夫或无关个体淋巴细胞免疫治疗的临床分析[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(24): 3951-3952.
- [31] 余宏,胡艳秋,吕芳,等. 复发性自然流产患者淋巴细胞主动免疫治疗的临床分析[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2014, 10(5): 98-101.
- [32] 黄华英,孙鸿燕,廖运梅. 淋巴细胞主动免疫治疗对反复自然流产的疗效分析及其护理策略[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2012, 8(3): 255-257.
- [33] Coulam CB, Acacio B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(4):296-304.
- [34] Clark DA. Shall we properly re-examine the status of allogeneic therapy for recurrent early pregnancy failure. *Am J Reprod Immunol*. 2004;51(1):7-15.
- [35] Fan X, Wang Z, Ji P, et al. rgpA DNA vaccine induces antibody response and prevents alveolar bone loss in experimental peri-implantitis. *J Periodontol*. 2013;84(6): 850-856.
- [36] Liu Y, Wang Q, Kleinschmidt-DeMasters BK, et al. TGF-beta2 inhibition augments the effect of tumor vaccine and improves the survival of animals with pre-established brain tumors. *J Neurooncol*. 2007;81(2):149-162.
- [37] Friese MA, Platten M, Lutz SZ, et al. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res*. 2003;63(24):8996-9006.
- [38] Rao J, Seshagiri PB, Shetty G, et al. Active immunization against riboflavin carrier protein results in peri-implantation embryonic loss leading to pregnancy termination in rats: use of alternate adjuvants. *Indian J Exp Biol*. 2000;38(9):863-872.
- [39] Steck T. Immunotherapy for prevention of abortion and for improving implantation in extracorporeal fertilization. *Zentralbl Gynakol*. 2001;123(6):357-360.
- [40] Baines MG, Duclos AJ, de Fougères AR, et al. Immunological prevention of spontaneous early embryo resorption is mediated by non-specific immunosimulation. *Am J Reprod Immunol*. 1996;35(1):34-42.