

# CD 58 及雌酮对妊娠早期山羊 EML 分泌 L-2 及 L-4 的影响\*

沈文正<sup>1</sup>, 王爱华<sup>2</sup>, 李引乾<sup>2</sup>, 马勇江<sup>2</sup>, 郭欣怡<sup>1</sup>, 马安良<sup>1</sup>, 张振仓<sup>1</sup>

(1 杨凌职业技术学院 动物工程系, 陕西 杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 国家重点开放家畜生殖内分泌实验室, 陕西 杨陵 712100)

**[摘要]** 将妊娠 17 d 山羊子宫内腺淋巴细胞 (EML) 放入含不同剂量 PHA-P, CD 58 和雌酮的介质中进行体外培养, 并分别用生物学方法和双抗体夹心 ELISA 法测定培养上清液中 L-2 和 L-4 的水平。结果表明, CD 58 和雌酮处理组 EML 分泌的 L-2 水平低, 与细胞对照组差异不显著, 并显著低于 PHA-P 处理组。3 个浓度 CD 58 处理组 L-4 分泌水平高达 5.40~6.36 ng/mL, 高浓度雌酮处理组 L-4 分泌量也达到 4.77 ng/mL, 与细胞对照组差异均极显著, 而且 CD 58 能以剂量依赖方式促进 EML 对 L-4 的分泌。

**[关键词]** 子宫内腺淋巴细胞 (EML); L-2; L-4; CD 58; 雌酮; 生殖调控

**[中图分类号]** S827.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387 (2002) 06-0052-03

细胞因子与哺乳动物母-胎界面的免疫调节密切相关<sup>[1]</sup>。研究表明<sup>[1]</sup>, L-2 主要参与子宫局部免疫排斥反应, 不利于妊娠的维持。L-4 属于维持妊娠的主要细胞因子, 可调节胎盘生长, 刺激蜕膜单核细胞形成 L-1 受体拮抗剂 (L-Ra), 并在感染初期发挥抗早产作用<sup>[2]</sup>, 在体外可抑制 NK 样细胞的细胞毒性<sup>[3]</sup>, 促进子宫黏膜免疫耐受, 还能与 L-10 共同作用, 降低已活化巨噬细胞的活性<sup>[4]</sup>。新近研究发现, CD 58 不仅存在于红细胞膜及血清<sup>[5]</sup>, 而且能显著促进妊娠早期山羊子宫内腺淋巴细胞 (EML) 的活化<sup>[1]</sup>。然而, 关于 EML 活化后分泌 L-2 和 L-4 的活性及其影响因素尚未见报道, 对山羊妊娠早期 EML 体外分泌活动的研究, 不仅有助于阐明细胞因子与母-胎界面免疫抑制的关系, 而且能为 CD 58 及雌酮在羊生殖调控中的应用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 EML 培养上清液的制备

按文献 [1] 中的方法制备妊娠 17 d 山羊 EML 悬液 ( $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ), 并加入 96 孔培养板, 再将各孔分为试验组和对照组。试验组分别加入 PHA-P, CD 58 及雌酮作为 3 个处理, 每处理设 1~3 个水平组, 另设细胞对照组。试验组所加 PHA-P 质量浓度为 20 mg/mL (A 组), CD 58 分原液 (Et 花结抑制

率为 58.89%, C<sub>1</sub> 组) 及 2 倍和 4 倍稀释液 (C<sub>2</sub> 和 C<sub>3</sub> 组), 雌酮设原液 (40 pg/mL, D<sub>1</sub> 组)、20 pg/mL (D<sub>2</sub> 组) 和 10 pg/mL (D<sub>3</sub> 组)。以单纯 EML 为细胞对照组, 空白对照组只含完全培养液 (CM), 不含 EML。各组均设 3 个复孔, 每孔总量均为 200  $\mu\text{L}$ 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 66 h。取各孔上清液 25  $\mu\text{L}$  移于另一 96 孔培养板中, 分别用 CM 作 8 倍稀释, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 L-2 的测定

采用生物学方法进行。向一次解冻的各孔稀释上清液中分别加入活细胞浓度为  $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的 L-2 依赖细胞 (CTLL) 100  $\mu\text{L}$ , 向另一组 CTLL 孔中加入等体积倍比稀释的 L-2 标准品, 用于测定标准曲线。各孔于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 22~24 h, 给各孔加入 MTT 应用液 (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ 。继续孵育 4~6 h, 每孔加入 SDS-DMF 溶解缓冲液 50  $\mu\text{L}$ , 作用 6~8 h 后, 用 ELISA 读数仪于 570 nm 处以空白对照孔调零, 测定各组 OD 值, 计算刺激指数 (Stimulative index, SI), 绘制标准曲线, 确定各试验组 L-2 含量, 并进行统计分析。

### 1.3 L-4 测定

利用 ELISA 试剂盒 (美国 Sigma 公司生产), 按双抗体夹心法操作。加入抗 L-4 酶标抗体及显色剂

\* [收稿日期] 2001-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39770545)

[作者简介] 沈文正 (1963-), 男, 陕西岐山人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物生殖免疫学及传染病学研究。

后, 用 EL ISA 读数仪于 410 nm 处以空白对照孔调零, 测定各处理组和标准样品组 OD 值, 并以细胞对照组 OD 值为参照计算 SI 值, 绘制标准曲线, 确定各试验组 L-4 含量, 并进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 CD58 对山羊 EML 分泌 L-2 的影响

由表 1 可知, 只有 A 处理组分泌 L-2 的水平显著高于其他各组, C 处理各水平组及 D<sub>1</sub> 组 EML 分

泌 L-2 的水平与细胞对照组差异均不显著。

### 2.2 CD58 对山羊 EML 分泌 L-4 的影响

由表 2 可知, 除 D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> 两组外, 其他各处理组均能显著促进山羊 EML 分泌 L-4。A, C 及 D<sub>1</sub> 处理各水平组与细胞对照组差异极显著, 并且 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 和 C<sub>3</sub> 3 个水平 L-4 浓度之间差异极显著。显示, CD58 能显著促进 EML 分泌 L-4, 并且具有剂量依赖性。与之类似, 较高浓度雌酮处理组也能显著促进 EML 分泌 L-4。

表 1 CD58 对山羊 EML 分泌 L-2 的影响

Table 1 Effects of CD58 on the secretion of L-2 by goat EML

处理组 Treatment	$\bar{x}_i$ (SD) Average SI	$\bar{x}_i / (U \cdot \mu L^{-1})$ Average L-2 concentration	$\bar{x}_i - 0.0817$	$\bar{x}_i - 0.1693$	$\bar{x}_i - 0.2219$
A	1.056	0.6851	0.6034*	0.5158*	0.4653*
C <sub>1</sub>	1.030	0.2219	0.1402	0.0526	
C <sub>2</sub>	1.030	0.2219	0.1402	0.0526	
D <sub>1</sub>	1.022	0.1693	0.0876		
C <sub>3</sub>	1.008	0.0817			
细胞对照 Cell CK	1.000				

注:  $\bar{x}_i$  为平均数; \* 为差异显著 (LSD > LSD<sub>0.05</sub>), LSD<sub>0.05</sub> = 0.4518。

Note:  $\bar{x}_i$  for average value \* for significant difference (LSD > LSD<sub>0.05</sub>), LSD<sub>0.05</sub> = 0.4518

表 2 CD58 对山羊 EML 分泌 L-4 的影响

Table 2 Effects of CD58 on the secretion of L-4 by goat EML

处理组 Treatment	$\bar{x}_i$ (SD) Mean SI	$\bar{x}_i / (ng \cdot mL^{-1})$	$\bar{x}_i - 4.5628$	$\bar{x}_i - 4.6297$	$\bar{x}_i - 4.7661$	$\bar{x}_i - 5.4011$	$\bar{x}_i - 5.6251$	$\bar{x}_i - 6.3556$
A	1.81	7.0361	2.4733**	2.4064**	2.2700**	1.6350**	1.4110**	0.6805**
C <sub>1</sub>	1.62	6.3556	1.7982**	1.7259**	1.5865**	0.9545**	0.7305**	
C <sub>2</sub>	1.40	5.6251	1.0623**	0.9954**	0.8590**	0.2240**		
C <sub>3</sub>	1.32	5.4011	0.8383**	0.7714**	0.6350**			
D <sub>1</sub>	1.09	4.7661	0.2033**	0.1364*				
D <sub>2</sub>	1.04	4.6297	0.0669					
D <sub>3</sub>	1.01	4.5628						
细胞对照 Cell CK	1.00							

注:  $\bar{x}_i$  为平均数; \*\* 为差异极显著 (LSD > LSD<sub>0.01</sub>), LSD<sub>0.01</sub> = 0.1806; \* 为差异显著 (LSD > LSD<sub>0.05</sub>), LSD<sub>0.05</sub> = 0.1221。

Note:  $\bar{x}_i$  for average value \*\* for quite significant difference (LSD > LSD<sub>0.01</sub>), LSD<sub>0.01</sub> = 0.1806 \* for significant difference (LSD > LSD<sub>0.05</sub>), LSD<sub>0.05</sub> = 0.1221

## 3 讨论

### 3.1 L-2 与山羊早期妊娠维持

据研究, L-2 活性为 1.0~10.0 U/μL 的介质在体内外可以诱导产生淋巴因子活化的杀伤细胞 (LAK), 使之分泌 IFN-γ, TNF-α 等, 间接加强巨噬细胞的功能而延长感染弓形体小鼠的生存期<sup>[6]</sup>, 或增强淋巴结中淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[7]</sup>。流产模型雌鼠母胎界面存在 L-2 的 mRNA 表达, 产生 L-2, IFN-γ 及 TNF-α 等, 而正常鼠无此现象<sup>[1]</sup>。另外据研究, 不明原因不孕妇女宫颈粘液中 L-2 含量明显高于正常妇女, 并与 IFN-γ 水平呈

显著相关<sup>[8]</sup>。说明子宫局部高水平的 L-2 不利于妊娠维持。与之相反, 活性水平为 0.6 U/μL 的低剂量 L-2 可引起小鼠胸腺细胞由 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 向 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 再向 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T 细胞分化<sup>[9]</sup>, 而 γδT 细胞为 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 表型 T 细胞, 并且被认为在胸腺内分化<sup>[10]</sup>, 因而推测, 妊娠早期子宫局部低浓度的 L-2 经血液循环至胸腺, 使 γδT 细胞分化增多, 从而使移居于子宫特定部位的 γδT 细胞增多。同时, 适量的 L-2 能刺激滋养层细胞生长, 还能激活子宫局部原有 γδT 细胞, 维持子宫黏膜的免疫耐受<sup>[11]</sup>。本试验 CD58 处理各水平妊娠 17 d 山羊 EML 所产生 L-2 较少, 活性水平约

为  $0.17 \sim 0.22 \text{ U}/\mu\text{L}$ , 因而不能引起强烈的细胞排斥反应, 而是有利于刺激胎盘组织发育和参与母—胎界面的免疫耐受。这一时期, CD58 及雌酮对 EML 体外产生 L-2 没有显著促进作用。由于妊娠 17 d 时血浆雌酮浓度极低, 故推测雌酮在体内对 EML 分泌 L-2 的活动没有重要影响。新近研究证实, CD58 能极显著促进妊娠 17 d 山羊 EML 的活化, 本研究进一步证明活化后 EML 分泌 L-2 的水平并没有显著提高, 其机理有待进一步研究。

### 3.2 L-4 与山羊妊娠早期子宫黏膜免疫耐受

胎盘组织形成的 L-4 能抑制 L-2 通过 NK 细胞对滋养层的损伤, 抑制蜕膜、羊膜生成 PGE, 还能抑制单核细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 L-6。据研究, L-4

可以刺激胎盘生长, 防止 NK 细胞对滋养层细胞的损伤, 因而有利于胚胎附植。L-4 能促进 Th0 细胞向 Th2 型细胞转化, 使免疫应答偏向 (shifting) 细胞免疫抑制<sup>[11]</sup>。山羊妊娠 17 d 正处于胚胎附植的开始阶段, 本试验证实, 体外活化的该期 EML 分泌较高水平 L-4, 提示 L-4 是山羊早期胚胎附植重要的调节物质, 也是参与妊娠子宫局部免疫抑制的主要细胞因子。

各水平 CD58 能以剂量依赖方式极显著促进妊娠 17 d 山羊 EML 产生 L-4, 因而推测 CD58 能促进 Th2 型细胞活化, 这对子宫局部免疫抑制和胚胎附植具有重要的意义。

### [参考文献]

- [1] Shabnam Tangri, Raghupathy. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions [J]. *Biology of Reproduction*, 1993, 49: 850-856
- [2] 田仲萍. 细胞因子对妊娠的调节作用 [J]. 阎燕华审校. *国外医学—妇产科学分册*, 1996, 23 (1): 2-5
- [3] 马勇江, 靳亚平. 妊娠期子宫局部细胞因子网络 [J]. *西北农业学报*, 2000, 9 (6): 87-88
- [4] Interleukine 4 (L-4) [DB/OL]. [Http://www.Yahoo.com](http://www.Yahoo.com), 2001.
- [5] 马勇江, 靳亚平, 曹斌云, 等. 山羊血清可溶性 CD58 存在的研究 [J]. *西北农业学报*, 2001, 10 (2): 9-11
- [6] 方艳秋, 谭岩. L-2 在小鼠抗弓形体虫作用的研究 [J]. *中国人兽共患病*, 1998, 14 (4): 11-14
- [7] 王汝涛, 王树宽, 王彦宏, 等. rL-2 激活的人骨肉瘤 RL 和淋巴结中淋巴细胞的抗肿瘤活性 [J]. *细胞与分子免疫学*, 1999, 15 (3): 219-220
- [8] 张袭, 陈丽萍, 任芬若, 等. 不明原因不孕妇女宫颈黏液中抗精子抗体、L-2 和 IFN- $\gamma$  的测定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16 (4): 624
- [9] 高汉林, 谢蜀生, 郝洁, 等. 重组白介素 2 促进小鼠胸腺细胞发育及辐射损伤小鼠免疫功能的恢复 [J]. *中国免疫学杂志*, 1993, 9 (3): 136-138
- [10] 李国勤. 白细胞介素对雌性动物生殖的调节 [J]. *动物医学进展*, 1998, 19 (4): 23-25
- [11] 陈生林, 熊思东. 口服耐受机制的研究进展 [J]. 俞顺章审校. *上海免疫学杂志*, 2000, 20 (3): 187

## Effects of CD58 and estrone on the secretion of L-2 and L-4 by goat EML in early gestation

SHEN Wen-zheng<sup>1</sup>, WANG Ai-hua<sup>2</sup>, LI Yin-qian<sup>2</sup>, MA Yong-jiang<sup>2</sup>,  
GUO Xin-yi<sup>1</sup>, MA An-liang<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-cang<sup>1</sup>

(1 Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Endometrial lymphocytes (EMLs) of pregnant goat (17 d) were cultured in vitro respectively in media containing PHA-P, CD58 and estrone at different doses. Then L-2 and L-4 in medium supernatants were measured respectively with biological method and double-antibody ELISA. The results showed that EMLs treated with CD58 and estrone secreted L-2 at low level are insignificantly different from that of control cell group and significantly lower than that of EMLs treated with PHA-P. The EMLs treated with CD58 in three concentrations dose-dependently produced 5.40-6.36 ng/mL of L-4 and those with estrone at higher dose produced 4.77 ng/mL of L-4, all significantly higher than that of control cell group.

**Key words:** EML; L-2; L-4; CD58; estrone; reproductive control