

CD 58 对山羊子宫内 膜 $\gamma\delta$ T 细胞活化及其分泌 TGF- β s 的作用^{*}

王爱华¹, 靳亚平¹, 沈文正²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2 杨凌职业技术学院 动物工程系, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 用 MTT 法测定了 CD 58 对山羊妊娠不同时期子宫内 膜 $\gamma\delta$ T 细胞的活化作用, 同时应用 ELISA 法, 分别测定了山羊妊娠第 30 天的子宫局部 $\gamma\delta$ T 细胞在体外活化后分泌 TGF- β s 的特性。结果表明, CD 58 可以剂量依赖的方式刺激 $\gamma\delta$ T 细胞活化, 在试验剂量范围内, 1.25 mg/L CD 58 刺激作用最强。同时, 各刺激因素的作用在妊娠的不同时期也存在差异, 在相同剂量 CD 58 的刺激下, $\gamma\delta$ T 细胞的活化程度自妊娠第 20 天起至妊娠 3 个月, 依次升高, 4 个月又呈下降趋势。PHA-P 和 CD 58 均可刺激子宫内 膜 $\gamma\delta$ T 细胞分泌 TGF- β 和 TGF- β , 其分泌量与细胞的活化程度一致。与目前已研究的小鼠等动物不同, TGF- β 的分泌量显著高于 TGF- β 。

[关键词] 山羊; $\gamma\delta$ T; TGF- β s; 妊娠

[中图分类号] S827.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)06-0059-03

妊娠期间子宫内 膜 $\gamma\delta$ T 细胞数量增多, 其活化和分泌活性对妊娠的免疫耐受具有重要作用^[1], 因而其活化机制受到国内外研究者的广泛关注。CD 58 表达于多种体细胞, 尤其是红细胞, 且以游离的形式存在于血液中^[2], 能够以非 MHC 限制的方式非特异地刺激淋巴细胞的活化^[3]。妊娠期母胎间血液的接触最为密切, 而 CD 58 是否参与 $\gamma\delta$ T 细胞的活化, 则未见报道。本研究以山羊 CD 58 为材料, 对山羊妊娠期 $\gamma\delta$ T 细胞的刺激作用进行了探索, 并测定了 CD 58 对 $\gamma\delta$ T 分泌 TGF- β s 的影响, 对揭示红细胞免疫在子宫局部免疫调控中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

山羊 购自陕西省杨陵区养殖户, 均为 2 年或当年青年母羊, 临床检查健康, 经 2 个发情周期观察正常后, 任其自然发情并本交配种, 记录配种日期, 于妊娠第 20, 30, 90 和 120 天, 剖腹取出子宫, 用于 $\gamma\delta$ T 细胞制备。

CD 58 自健康山羊红细胞提取^[4], 经效价检测后真空冷冻干燥, -30℃ 保存。本试验所用 CD 58 的 Et 花环抑制率 70%。临用前用 RPM I

1640 培养液 (Hyclone) 稀释为使用浓度。

TGF- β 检测试剂盒 TGF- β 检测试剂盒为美国 Sigma 公司产品, 包括 TGF- β 样品缓冲液, TGF- β 及 TGF- β 标准品原液, TGF- β 多克隆抗体 (pAb)、TGF- β HRP 酶结合物、酶底物、显色剂等。

1.2 方 法

1.2.1 $\gamma\delta$ T 细胞悬液制备 按文献 [5] 的方法, 首先制备子宫内 膜淋巴细胞 (EML), 再用 1.02~1.03 g/L Percoll 分离液离心分离, 收集管底细胞, 经无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 平衡盐溶液 (CMF) 洗涤后, 以完全 RPM I 1640 培养液 (CM) 调活细胞浓度至 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。根据 $\gamma\delta$ T 细胞不表达 CD 4 抗原, 极少表达 CD 8 抗原的特性, 采用免疫磁珠法 (MACS)^[1] 去除 EML 中 $\text{CD}4^+$ T 及 $\text{CD}8^+$ T 细胞, 该法制备的细胞悬液中 $\text{CD}4^+$ T 及 $\text{CD}8^+$ T 细胞比例分别 < 5%, 所得的细胞悬液即富含 $\gamma\delta$ T 细胞的细胞悬液, 用 RPM I 1640 培养液洗涤 3 次后, CM 调浓度至 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。

1.2.2 细胞活化试验 取上述制备的细胞悬液, 按每孔 100 μL 加于 96 孔细胞培养板中, 再分别加入 PHA-P 或 CD 58, 设 PHA-P+ CD 58 和 CD 58 2 个试验组及 PHA-P, 细胞和 CM 3 个对照组。含 PHA-P 各组中 PHA-P 的终质量浓度均为 0.5 mg/

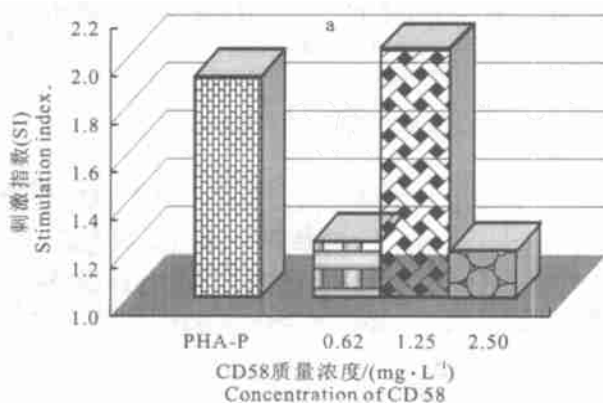
* [收稿日期] 2002-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39970544)

[作者简介] 王爱华 (1966-), 女, 陕西合阳人, 讲师, 主要从事动物微生物学与免疫学的教学与科研工作。

L, 各组分别依相应的 CD 58 作 4 个质量浓度梯度, 所有各孔均设 3 个重复, 不足 200 μL 的各孔中加入 CM, 使所有孔总体积均为 200 μL 。于 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO_2 饱和湿度条件下培养 66 h, 轻轻取出, 各孔吸出 100 μL (用于 TGF- β 的测定), 加入 MTT 应用液 50 μL , 继续孵育至 72 h, 取出, 每孔加入十二烷基硫酸钠-N, N-二甲基甲酰胺 (SDS-DMF) 溶解缓冲液 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜, 取出后, 用 DG5030 酶标仪 (华东电子集团) 在 570 nm 以阴性对照组调零, 测定各孔 OD 值, 并按下式计算各组刺激指数 (SI):

$$\text{SI} = \text{试验孔 OD 值} / \text{细胞对照孔 OD 值}$$



1. 2. 3 TGF- β 的测定 取上述 1. 2. 2 中收获的细胞培养上清液, 依照试剂盒说明书, 按双抗体夹心法进行 ELISA 试验, 测定上清液中的 TGF- β 和 TGF- β 。

2 结果与分析

2.1 CD 58 刺激 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞活化的作用

图 1, 2 显示, CD 58 和 PHA-P 均可刺激子宫内 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的活化。CD 58 对 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的活化程度随 CD 58 剂量的变化而表现出差异, 在试验剂量范围内, 1. 25 mg/L CD 58 刺激作用最强。同时, 各刺激因素的作用在妊娠的不同时期也存在差异。

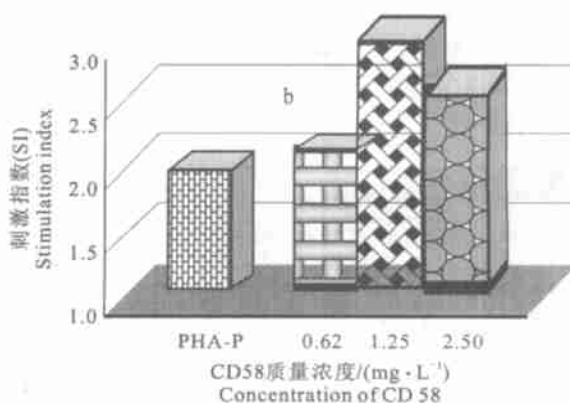


图 1 CD 58 对子宫 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的活化作用

Fig. 1 The activation of CD 58 on uterus $\gamma\delta\text{T}$ cells

a. 20 d; b. 30 d

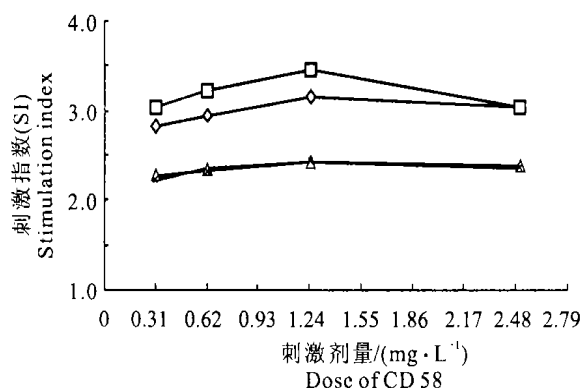


图 2 CD 58 对妊娠 3~4 个月子宫 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞活化作用的比较

Fig. 2 Comparison of the activation of CD 58 on uterus $\gamma\delta\text{T}$ cells

A. PHA-P+ CD 58 90 d; B. CD 58 90 d
C. PHA-P+ CD 58 120 d; D. CD 58 120 d

分析表明, PHA-P+ CD 58 及 CD 58 的刺激剂量对细胞的活化均有极显著的影响 ($P < 0.01$)。妊

娠第 20 天, PHA-P 与 1. 25 mg/L CD 58 的刺激强度相似 ($P > 0.05$, 图 1), 而妊娠第 30 天, 1. 25 mg/L CD 58 的作用则显著高于 PHA-P ($P < 0.05$), 且 CD 58 刺激的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的活化程度显著大于妊娠第 20 天 ($P < 0.05$, 图 2)。妊娠 90 d, CD 58 的单独刺激作用显著高于 CD 58+ PHA-P 的联合刺激 ($P < 0.05$), 而对于妊娠 4 个月山羊, 二者之间则无显著差异 ($P > 0.05$)。妊娠 3 个月的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞活化程度均显著高于 4 个月和妊娠第 30 天 ($P < 0.01$, 图 1, 2)。

2.2 CD 58 刺激 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞产生 TGF- β 的作用

对 CD 58 刺激妊娠第 30 天山羊子宫 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞分泌的 TGF- β 和 TGF- β 进行了测定, 结果见表 1。由表 1 可见, PHA-P 和 CD 58 均可刺激子宫内 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞分泌 TGF- β 和 TGF- β , 其分泌量的大小与细胞的活化程度一致。同时, TGF- β 的分泌量显

著高于 TGF- β 。

表 1 CD58 刺激 $\gamma\delta$ T 细胞分泌 TGF- β 的作用

Table 1 The effects of CD58 on secretion of TGF- β from $\gamma\delta$ T cells

	TGF- β				TGF- β			
	$\bar{X}_{i(SD)}$		$\bar{X}_i/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$		$\bar{X}_{i(SD)}$		$\bar{X}_i/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	
CD58	1	31	78	675 1	2	12	4	299 8
PHA+P+ CD58	1	05	1	436 9	1	20	0	774 3
PHA+P	1	03	0	832 2	1	06	0	595 6

3 讨 论

子宫黏膜局部 $\gamma\delta$ T 细胞的活化条件及因素与妊娠免疫耐受关系密切^[1,6]。对人子宫内膜 $\gamma\delta$ T 细胞研究表明^[1], 妊娠期 $\gamma\delta$ T 细胞数量为非妊娠期的 100 倍, 揭示妊娠期子宫内膜内淋巴细胞类型与表型的变化。妊娠期子宫局部 $\gamma\delta$ T 细胞的活化与增殖的刺激信号, 一直是人们关注和研究的焦点之一。目前发现磷酸化基团、热休克蛋白 (HSP60, 70) 及革兰氏阴性细菌胞壁脂多糖 (LPS) 在体内外能明显活化黏膜表面的 $\gamma\delta$ T 细胞^[7]。滋养层细胞也能够活化子宫局部的 $\gamma\delta$ T 细胞, 但对 $\gamma\delta$ T 细胞识别的分子仍不清楚, 对其活化后的功能, 意见尚不统一。本研究结果显示, CD58 可引起 $\gamma\delta$ T 细胞的活化, 其作用具有剂量依赖性, 提示 CD58 是 $\gamma\delta$ T 细胞活化的信号之一, 参与妊娠子宫 $\gamma\delta$ T 细胞的活性调节。

进一步研究显示, 分离自妊娠不同时期的子宫内膜内 $\gamma\delta$ T 细胞对 CD58 刺激的反应程度存在显著差异, CD58 对妊娠 3 个月山羊子宫 $\gamma\delta$ T 细胞的活化作用依次显著高于妊娠 30 和 20 d 的山羊。而且, 对于妊娠 3 个月山羊, PHA-P 与 CD58 共刺激下的

活化作用弱于 CD58 单独作用, 妊娠 4 个月以后这种趋势不明显。提示 CD58 对妊娠不同时期子宫 $\gamma\delta$ T 细胞的活化作用受多种因素的影响。

目前认为, $\gamma\delta$ T 细胞是生殖道 TGF- β 的主要来源, 而 TGF- β 反过来又调节 T 细胞的功能。TGF- β 具有抑制 T 细胞活化及分化, 降低机体免疫水平的作用。0.5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β 能显著抑制小鼠外周 T 细胞的体外增殖^[7]。对牛子宫内膜细胞体外分泌活动的研究表明, 单独用 TGF- β 可使子宫内膜细胞产生 PGE₂、PGF₂ 的比例显著升高, 而用 TGF- β 处理可下调子宫基质细胞 L-2 mRNA 的表达, 认为 TGF- β 在子宫内膜局部的作用是提高 PGE₂ 的净生成, 减少 L-2 的分泌量^[7], 因而有利于子宫局部免疫耐受。本试验证明, 山羊子宫内膜 $\gamma\delta$ T 细胞经 CD58 和 PHA-P 刺激活化后, 可分泌 TGF- β , 与目前在小鼠、牛等的研究结果相似, 但本试验中, 山羊子宫内膜 $\gamma\delta$ T 细胞所产生 TGF- β 的量显著高于 TGF- β , 这与小鼠等不同, 表明 $\gamma\delta$ T 细胞活化后的分泌特性与动物种属有关。

妊娠期子宫局部 $\gamma\delta$ T 细胞的活化及其功能的发挥是一个极其复杂的动态变化过程, 受多种因素的相互影响与约束。有研究认为^[8], 人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞可产生 GM-CSF, TNF, IFN- γ , IL-4, IL-6 和 IL-8 等细胞因子, 这些细胞因子的比例, 与妊娠成败密切相关。山羊子宫 $\gamma\delta$ T 细胞的分泌谱组成如何尚不清楚, 本试验为其进一步研究提供了可靠的试验依据与方法。

[参考文献]

[1] Kent D, Heyborne, Robin L, et al Characterization of $\gamma\delta$ T lymphocytes at the maternal-fetal interface [J]. The Journal of Immunogy, 1992, 149 (9): 2872- 2878

[2] 马勇江, 靳亚平, 曹斌云, 等 山羊血清中CD58 存在的研究 [J]. 西北农业学报, 2001, 10 (2): 9- 12

[3] 靳亚平, 王爱华, 王建辰, 等 CD58 对山羊 PBL 的活化作用 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22 (1): 50- 52

[4] 靳亚平, 王爱华, 武 浩, 等 小鼠和山羊子宫内膜淋巴细胞的制备 [J]. 动物医学进展, 2000, 21 (3): 43- 45

[5] 靳亚平, 王建辰, 王爱华, 等 山羊红细胞膜CD58 的制备与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2000, 21 (2): 54- 56

[6] Hansen P J. Interactions between the immune system and the ruminant conceptus [J]. J Rprod Fertil, 1995, 49 (Suppl): 69- 82

[7] Eric A sselin, Vincent Emond, Raymond, et al Transforming growth factor beta-1 and beta-2 regulation of prostaglandin synthesis in cultured bovine endometrial cells and cytokine expression in lymphocytes [J]. Theirogenology, 1999, 1: 219

[8] 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

(下转第 65 页)

Correlation analysis between 305-day yield and characters of milk proportionality in dairy cattle

L IU Xiao-lin, ZHANG Hui-lin, XU Tie-shan, ZHANG Li

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Data for this study were collected from 35 dairy cattle in Dairy Cattle Trial Farm of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry. Milk days in initial stage (X_1), milk days of peak period (X_2), milk days in later period (X_3), maximum daily yield (X_4), minimum daily yield (X_5), difference between max and min (X_6) and 305-day yield (Y) were measured. The correlation coefficients were calculated. The former four characters of milk proportionality were omitted because of no significance of every correlation coefficient between each of them and 305-day yield. The later two were used as independent variables, and 305-day yield was used as a dependent variable for path analysis. Path coefficient (p_i), determination coefficients (d_i) and correlation index (R^2) were calculated. The results showed that 2 correlation coefficients between characters of milk proportionality and the 305-day yield were with very significant difference ($P < 0.01$). X_5 gave predominant direct effects ($p_5 = 1.2083$) and determination on 305-day yield, it is the key effective factor. X_6 gave a large direct effect ($p_6 = -0.4191$) and middle indirect effect through X_5 on 305-day yield, and this two characters are the good factors of milk proportionality. It is clear that the path coefficient analysis could reveal the exact relationship between the independent variables and the dependent variable.

Key words: dairy cattle; milk proportionality; milk yield; correlation analysis

(上接第61页)

The effects of CD58 on activation of $\gamma\delta T$ from endometrial lymphocytes and its secretion of TGF- β s

WANG Ai-hua¹, JIN Ya-ping¹, SHEN Wen-zheng²

(¹ College of Animal Science and Technology Medicine, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shaanxi, Yangling 712100, China;

² Yangling Vocational and Technical College, Shaanxi, Yangling 712100, China)

Abstract: The research of the effects of CD58 on the activation and its secretion of $\gamma\delta T$ in endometrial lymphocytes, which play a major role in immunological endurance during gestation, has significance on revealing the effects of CD58 on the local immunological regulation during gestation. In the present study, the effects of CD58 on activation of the $\gamma\delta T$ cells prepared by magnetic cell sorting (MACs) from goat endometrial lymphocytes during the certain time of gestation were determined with the method of MTT. Further, the secreting activities of TGF- β s of the proliferated $\gamma\delta T$ cells obtained from the goat 30 d after gestation were investigated. The results indicate that CD58 was able to activate the $\gamma\delta T$ cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), in which the dose of 1.25 mg/L of CD58 had the most significant effect within the doses used in the tests ($P < 0.01$). The effect enhanced with the development of gestation from the 20th day to 3 months during pregnancy, and downtrend appeared after 4 months. Both PHA-P and CD58 are able to stimulate the $\gamma\delta T$ cells to secrete TGF- β and TGF- β , the amount of which is consistent with the activity of the $\gamma\delta T$ cells. While inconsistent with the result on mouse, the amount of TGF- β is higher than TGF- β .

Key words: goat; $\gamma\delta T$; TGF- β ; pregnancy