

山羊 ESC 培养上清液对 PBMC 和 PBL 转化及分泌活性的影响

吴庆侠, 杨普光, 王爱华, 郭挺伟, 董海龙, 靳亚平

(西北农林科技大学 动物医学院, 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**探索山羊子宫内膜基质细胞(ESC)培养上清,对山羊外周血单核细胞(PBMC)和外周血淋巴细胞(PBL)的转化与分泌活性的影响。**【方法】**分离山羊 PBMC 和 PBL,制备原代 ESC(ESC₀)及永生化传至 30 代的 ESC(ESC₃₀)培养上清,将不同培养上清与 PHA 组合刺激 PBMC 与 PBL 转化,应用 MTT 法检测 ESC₀ 及 ESC₃₀ 培养上清对 PBMC 和 PBL 转化的作用,ELISA 检测 PBMC 和 PBL 分泌 IL-2、IL-4 的相对含量。**【结果】**ESC₀ 及 ESC₃₀ 上清可刺激 PBMC/PBL 转化并分泌 IL-2 和 IL-4,抑制 PHA-P 诱导的 PBMC/PBL 增殖及 IL-2 的分泌,但对 PHA-P 引起的 PBMC/PBL 分泌 IL-4 有促进或协同作用。**【结论】**ESC 能通过旁分泌作用影响 PBMC 和 PBL 的转化与分泌活性,优势活化 Th2 型淋巴细胞,在子宫局部免疫调节中发挥重要作用。

[关键词] 山羊;原代子宫内膜基质细胞;传至 30 代的子宫内膜基质细胞;外周血单核细胞;外周血淋巴细胞;IL-2;IL-4

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)09-0013-05

Effects of supernatant of goat endometrial stromal cells (ESC) on activation and secretion activity of PBMC and PBL

WU Qing-xia, YANG Pu-guang, WANG Ai-hua, GUO Ting-wei,
DONG Hai-long, JIN Ya-ping

(Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agriculture
Ministry of China, College of Veterinary Medicine Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to explore the effects of endometrial stroma cells (ESC) on proliferation and secretion activity of PBMC and PBL in goat via the way of paracrine. **【Method】** Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and peripheral blood leucocyte (PBL) were isolated, the supernatant of primary ESC (ESC₀) and the 30th immortalized ESC (ESC₃₀) were prepared. The effects of supernatant on proliferation of PBMC and PBL were detected by MTT respectively, and the effects on the secretion of IL-2 and IL-4 were determined by ELISA. **【Result】** The supernatant from both the ESC₀ and the ESC₃₀ could stimulate the proliferation of PBMC and PBL and induce the secretion of IL-2 and IL-4, inhibit the proliferation and IL-2 secretion of PBMC/PBL induced by PHA-P, but enhance IL-4 secretion induced by PHA-P. **【Conclusion】** The results revealed that ESC affects the activation and secretion of PBMC and PBL, predominantly the Th2 lymphocytes, in a paracrine way, thus plays an important role in local uterine immune regulation.

* [收稿日期] 2008-12-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39770545);西北农林科技大学青年骨干教师支持计划项目(01140305)

[作者简介] 吴庆侠(1973—),女,陕西城固人,在读博士,主要从事家畜生殖内分泌与生殖免疫研究。

[通信作者] 靳亚平(1966—),男,陕西宝鸡人,教授,博士生导师,主要从事兽医产科学家畜生殖内分泌研究。

E-mail: yapingjin@163.com

Key words: goat; ESC; ESC30, PBMC; PBL; IL-2; IL-4

子宫组织变化与胚胎发育和局部内分泌-免疫调节的同步对胚胎的成功附植有重要意义^[1]。局部内分泌-免疫平衡的失调是早期胚胎丢失和胚胎移植成功率低的主要原因之一,深入研究子宫局部免疫的调节,对揭示胚胎附植的调控机制、提高胚胎移植成功率具有重要意义。在妊娠期,子宫局部“经典”的免疫细胞显著减少,参与非特异性免疫的细胞显著增多并聚集在子宫内膜的基质区,Th1/Th2 比例倒置^[1],目前对于该变化的机制仍然不十分明了。来自母体的生殖激素和胚胎均参与了该调节过程,来自母体和胎儿的 CD58 也参与了 Th1/Th2 比例变化的调节^[2],由此可见子宫局部免疫调节的复杂性。有研究认为,生殖激素等对局部淋巴细胞的调节可能是间接的,因为子宫白细胞本身并不表达雌孕激素受体^[3]。有关子宫局部免疫细胞分布的研究表明,妊娠期子宫局部巨噬细胞、淋巴细胞的种类和数量在子宫内膜存在明显的区域性^[4],提示子宫上皮细胞和基质细胞本身也在局部免疫调节中发挥着作用。研究证明,上皮细胞可通过其抗原提呈功能或分泌可溶性分子调节子宫局部免疫^[5-6]。子宫内膜基质细胞与上皮细胞在多种功能上存在相互调节,据此笔者推测,基质细胞可能通过旁分泌等方式参与子宫局部免疫的调节。为了验证上述推测,本试验检测了山羊原代子宫内膜基质细胞(ESC₀)和永生化第 30 代 ESC(ESC₃₀)上清对外周血单核细胞(PBMC)及外周血淋巴细胞(PBL)的转化及分泌活性的影响,以揭示子宫内膜基质细胞旁分泌功能对 PBMC 及 PBL 的作用机制,为子宫局部免疫调节的进一步研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 3 只 8 月龄奶山羊购自陕西杨凌,临床检查健康。

1.1.2 主要试剂 DMEM-F12、RPMI1640、胶原酶Ⅱ为 Gibco 公司产品,胰蛋白酶为上海生工公司产品,二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)、植物血凝素(PHA-P)为 Sigma 公司产品,ELISA 试剂盒购自北京晶美生物工程有限公司,胎牛血清(FCS)购自杭州四季青公司。

1.1.3 主要仪器和设备 96 孔细胞培养板为 Costar 公司产品,离心机为 Sigma 公司产品,超净

工作台为苏净集团安泰公司产品,组织培养倒置显微镜为 Nikon 公司产品,体积分数 5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱为上海福玛试验设备有限公司产品,超低温冰箱为 New brunswick 公司产品。

1.2 山羊 ESC 悬液的制备及其生长活性的检测

参照文献[7]分离制备山羊 ESC₀ 悬液,台盼兰拒染法检测细胞活性并计数,调整活细胞密度为 1×10^6 /mL。取冻存的 ESC₃₀ 细胞株扩增,并调整活细胞密度为 1×10^6 /mL。将山羊 ESC₀ 及 ESC₃₀ 分别接种于 96 孔培养板上,每孔 200 μ L,在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。每 24 h 进行 1 次 MTT 试验,连续检测 8 次。

MTT 检测方法:在待检孔内每孔加 20 μ L MTT 应用液继续培养 6 h,之后移去孔内培养液,加 150 μ L SDS-DMF,37 $^{\circ}$ C 过夜,在 492 nm 处以培养液对照孔调零,测定各孔光吸收值,记录数据,每次检测 3 孔,结果取平均值,并绘制生长曲线。

1.3 山羊 ESC 培养上清液的采集

自 ESC 培养 24 h 后开始收集上清液,以后每隔 24 h 收集 1 次,连续收集 8 次,-80 $^{\circ}$ C 保存备用,临用前解冻并使用 0.22 μ m 的滤膜过滤。

1.4 山羊 PBMC 与 PBL 的分离

无菌采集山羊颈静脉血液,肝素抗凝,常规等密度梯度离心法分离外周血单个核细胞。台盼兰拒染法检测细胞活力并计数,取部分悬液用含体积分数 10% FCS 的 RPMI1640 调细胞密度为 2×10^6 /mL。另一部分 PBMC 悬液加入培养瓶于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 2 h,轻轻吸取上部悬液,1 000 r/min 离心 8 min,收集管底细胞,用含 10% FCS 的 RPMI1640 调细胞密度为 2×10^6 /mL,即得 PBL 细胞悬液。

1.5 山羊 ESC 培养上清液对 PBMC 与 PBL 转化的影响

取 96 孔板,每孔加 PBMC 或 PBL 悬液 100 μ L,试验设 A~F 6 组,A 组每孔加 ESC₀ 上清 50 μ L;B 组每孔加 ESC₃₀ 上清 50 μ L;C 组每孔加 ESC₀ 上清+PHA-P 各 50 μ L;D 组每孔加 ESC₃₀ 上清+PHA-P 各 50 μ L;E 组为阳性对照组,每孔加 50 μ L 的 PHA-P(200 μ g/mL)应用液;F 组为阴性对照组,每孔加 100 μ L 完全培养液。各组不足 200 μ L 的孔用完全培养液补足,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 66 h。先从培养孔内每孔吸取 100 μ L

上清液,离心后分别装于 EP 管内,−80 ℃ 保存用于细胞因子(IL-2 和 IL-4)检测,再进行 MTT 试验,测量各孔 OD₄₉₂ 值,计算刺激指数(SI): $SI = \text{试验孔 OD}_{492} / \text{阴性对照孔 OD}_{492}$ 。每组设 3 次重复。

1.6 山羊 ESC 培养上清液对 PBMC 和 PBL 分泌活性的影响

取 1.5 中制备的各组上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测 IL-2 和 IL-4 的相对含量。

1.7 数据的统计与分析

试验结果以“ $\bar{X} \pm SD$ ”表示,数据用 SPSS 13.0 统计软件处理。对 PBMC/PBL 的转化与分泌活性试验结果进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 山羊 ESC 生长活性的检测

图 1 表明,在相同的培养条件下,ESC₃₀ 较 ESC₀ 生长旺盛。两者均在培养 1~2 d 稳定生长,之后生长迅速,第 4 天时达到平台期,ESC₀ 于培养第 5 天活力开始下降,而 ESC₃₀ 持续至第 6 天生长活力才开始下降。

2.2 山羊 ESC 培养上清液对 PBMC 转化的影响

图 2 显示,山羊 ESC 培养上清对 PBMC 转化影响的强度与培养时间相关,ESC₀ (A 组)和 ESC₃₀ (B 组)的作用一致,均为培养 4~5 d 的上清液对 PBMC 的刺激作用最强,两者对 PBMC 转化的刺激指数 SI 分别为 1.237 ± 0.016 和 1.248 ± 0.017 ,与阴

性对照 F 组($SI = 1$)相比,差异不显著($P > 0.05$),但显著低于阳性对照 E 组($SI = 2.1, P < 0.01$)。ESC₀ 与 ESC₃₀ 培养上清液对 PBMC 转化的影响差异不显著。

不同培养时间的原代 ESC₀ 上清+PHA-P(C 组)及 ESC₃₀ 上清+PHA-P(D 组)对 PBMC 的转化作用均低于 PHA-P 阳性对照(E 组),第 3~7 天的培养上清显著抑制 PHA-P 诱导的 PBMC 转化($P < 0.05$)。

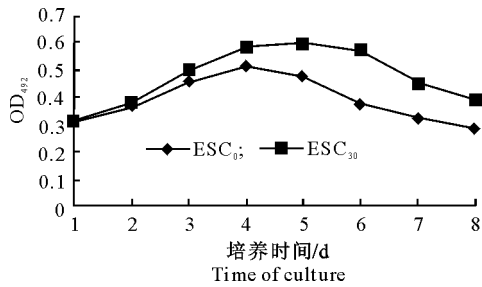


图 1 山羊 ESC 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of goat ESC

2.3 山羊 ESC 培养上清液对 PBL 转化的影响

ESC 培养上清液对 PBL 转化的影响结果见图 3。由图 3 可知,ESC₀ (A 组)和 ESC₃₀ (B 组)培养上清液对 PBL 的影响与对 PBMC 的影响一致。培养 3~6 d 的 ESC₀ 和 ESC₃₀ 培养上清液可刺激 PBL 转化($P < 0.05$),但其作用低于阳性对照组($SI = 1.92$)。与对 PBMC 的作用类似,2 种细胞的培养上清均抑制 PHA-P 刺激的 PBL 转化($P < 0.05$)。

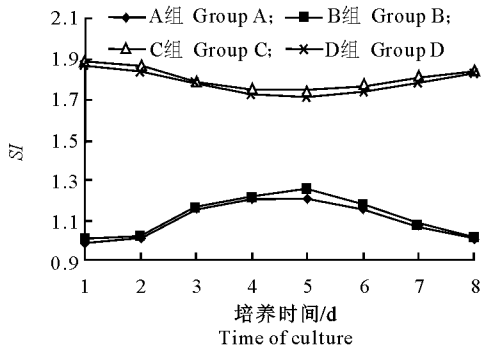


图 2 山羊 ESC₀ 与 ESC₃₀ 上清液对 PBMC 转化的影响

Fig. 2 Effects of the supernatant of the ESC₀ and ESC₃₀ on activation of PBMC

2.4 山羊 ESC 培养上清液对 PBMC 分泌活性的影响

由图 4 和图 5 可知,不同培养时间的 ESC₀ 及 ESC₃₀ 上清液均可刺激 PBMC 分泌一定量的 IL-2

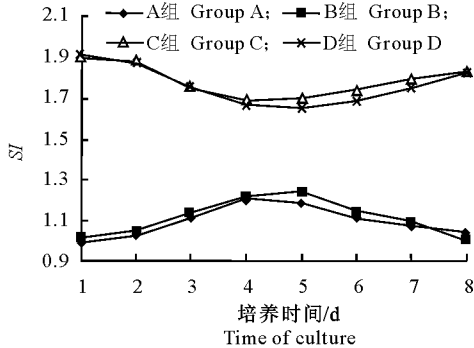


图 3 山羊 ESC₀ 与 ESC₃₀ 上清液对 PBL 转化的影响

Fig. 3 Effects of the supernatant of the ESC₀ and ESC₃₀ on activation of PBL

及 IL-4,培养 3~6 d 的 ESC₀ 及 ESC₃₀ 上清液刺激 PBMC 分泌 IL-2 及 IL-4 的量均显著高于培养 1 d 时($P < 0.05$),培养 5 d 的 ESC₀ 和 ESC₃₀ 上清液刺激 PBMC 分泌 IL-2 及 IL-4 的水平达峰值。

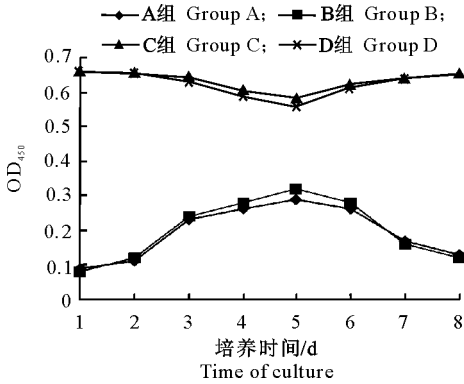


图 4 ESC₀ 及 ESC₃₀上清液对 PBMC 表达 IL-2 的影响
Fig. 4 IL-2 expression of PBMC stimulated by the supernatant of the ESC₀ and ESC₃₀

不同培养时间的 ESC₀ 及 ESC₃₀ 培养上清液 + PHA-P(分别为 C 组和 D 组)刺激 PBMC 产生的 IL-2 水平平均比 PHA-P 对照低 (PHA-P 刺激产生 IL-2 的 OD₄₅₀ = 0.74), 表明 ESC₀ 及 ESC₃₀ 上清液均能抑制由 PHA-P 诱导的 PBMC 对 IL-2 的分泌。

ESC₀ 及 ESC₃₀ 培养上清液 + PHA-P(分别为 C 组和 D 组)刺激 PBMC 分泌 IL-4 的水平均高于 PHA-P 对照 (OD₄₅₀ = 0.56), 表明 ESC 培养上清液能促进或协同由 PHA-P 引起的 PBMC 对 IL-4 的分泌。

2.5 山羊 ESC 培养上清液对 PBL 分泌活性的影响
ESC₀ 及 ESC₃₀ 上清对 PBL 分泌 IL-2 和 IL-4

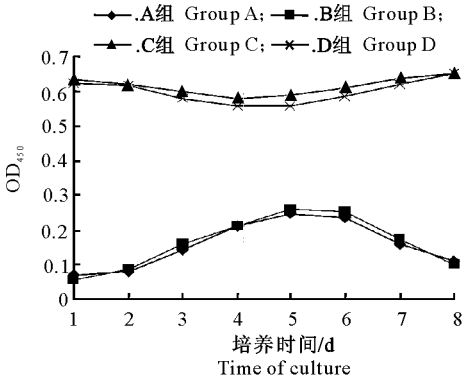


图 6 ESC₀ 及 ESC₃₀上清液对 PBL 表达 IL-2 的影响
Fig. 6 IL-2 expression of PBL stimulated by the supernatant of the ESC₀ and ESC₃₀

3 讨 论

随着神经-内分泌-免疫网络研究的深入,人们对子宫局部调节的认识进一步加深,免疫因素在动物妊娠中的作用受到越来越多的重视。妊娠期子宫局部的免疫平衡涉及多种调节机制。随着黏膜免疫研究的不断深入,使更多的学者将注意力集中到子

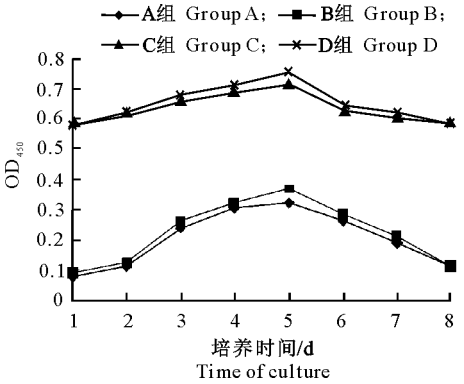


图 5 ESC₀ 及 ESC₃₀上清液对 PBMC 表达 IL-4 的影响
Fig. 5 IL-4 expression of PBMC stimulated by the supernatant of the ESC₀ and ESC₃₀

的影响与其对 PBMC 的刺激作用类似 (图 6、图 7)。培养 3~6 d 的 ESC₀ (A 组) 及 ESC₃₀ (B 组) 上清液刺激 PBL 分泌 IL-2 及 IL-4 的量均显著高于培养 1 d 时 ($P < 0.05$); 培养 5 d 的 ESC₀ 和 ESC₃₀ 上清液诱导 PBL 分泌 IL-2 及 IL-4 的水平达到峰值。

在不同培养时间的 ESC₀ 及 ESC₃₀ 上清液 + PHA-P(分别为 C 组和 D 组)的组合作用下, PBL 产生的 IL-2 水平平均低于 PHA-P 阳性对照 (OD₄₅₀ = 0.66), 表明 ESC₀ 及 ESC₃₀ 上清液均能抑制由 PHA-P 引起的 PBL 对 IL-2 的分泌, 而对 PHA-P 诱导的 IL-4 的分泌有促进作用。

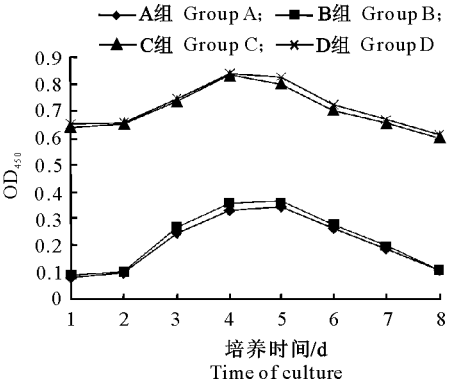


图 7 ESC₀ 及 ESC₃₀上清液对 PBL 表达 IL-4 的影响
Fig. 7 IL-4 expression of PBL stimulated by the supernatant of the ESC₀ and ESC₃₀

宫内膜上皮细胞的研究上。Fahey 等^[3]证明,在破伤风毒素(TT)存在的情况下,人子宫内皮细胞与 PBMC 接触共培养可使淋巴细胞的增生显著高于淋巴细胞单独培养,并且上皮细胞 CD1d 和 CD40 的表达增加,表明子宫内皮细胞在子宫局部感染时具有抗原提呈作用。Lok 等^[8]将子宫内皮细胞与 PBMC 共培养,发现共培养 PBMC 在培养 4

d 后比单独培养的 PBMC 细胞活率提高 72.5%。上述研究表明,子宫内膜细胞既具有免疫提呈作用,又能刺激淋巴细胞的活力。而 Rao 等^[9]将子宫内膜细胞混悬液及子宫内膜上皮细胞分别与 PBMC 共培养,发现二者均可抑制由 ConA 和抗原引起的淋巴细胞增殖,显示子宫内膜细胞可以抑制淋巴细胞对抗原的反应性,Rao 认为发挥这种抑制作用的主要是子宫内膜上皮细胞。本试验证明,山羊 ESC₀ 及 ESC₃₀ 培养上清均能刺激 PBMC/PBL 转化,与 Lok 等^[8]的研究结果类似;同时,ESC 上清可抑制由 PHA-P 引起的 PBMC/PBL 转化作用,与 Rao 等^[9]的研究结果一致。证明子宫内膜基质细胞同样存在上述两种作用,且上述作用可能是通过旁分泌途径而非直接作用,由于上述作用在 PBMC 和 PBL 之间无显著差异,提示这种作用无需巨噬细胞参与。

CD4⁺ T 细胞根据其分泌细胞因子的不同可分为 Th1 和 Th2 细胞,Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子,主要介导细胞免疫、炎症反应、迟发型超敏反应及急性移植排斥反应;而 Th2 细胞分泌 IL-4、IL-10、TGF- β 等细胞因子,主要介导体液免疫,参与同种移植免疫耐受^[10-12]。大量研究表明,在正常妊娠期,子宫局部 Th1/Th2 比例发生倒置,而多种原因导致的流产均伴有 Th1 型细胞因子的升高^[13-14]。Nan 等^[15]通过大鼠和小鼠种间胚胎移植模型证明,Th1 和 Th2 型细胞因子比例的偏移是异种妊娠障碍的主要原因。本试验发现,ESC 上清单独作用既可刺激 IL-2 分泌,又能刺激 IL-4 的分泌,但抑制由 PHA-P 诱导的 IL-2 的分泌,促进由 PHA-P 诱导的 IL-4 的分泌,这与 CD58 对淋巴细胞的作用类似^[2],提示 ESC 对淋巴细胞的作用是非特异的,可能主要刺激 PBMC/PBL 中 Th2 型细胞的活化和分泌功能,而抑制由抗原诱导的 Th1 型淋巴细胞的转化。这表明山羊 ESC 在子宫局部内分泌-免疫调节中具有极为重要的作用,而这种特性可能对于胚胎附植有重大意义。有关 ESC 对 Th1 和 Th2 型细胞的作用,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Chernyshov V P, Tumanova L E, Sudoma I A, et al. Th1 and Th2 in human IVF pregnancy with allogenic [J]. Am J Reprod Immunol, 2008, 59(4): 352-358.
- [2] 靳亚平,王爱华,王建辰,等. CD58 对山羊外周血淋巴细胞(PBL)的活化作用 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(1): 50-52.
- [3] Jin Y P, Wang A H, Wang J C, et al. The *in vitro* activation of CD58 on PBL in goat [J]. Chin J Vet Sci, 2002, 22(1): 50-52. (in Chinese)
- [4] Fahey J V, Wallace P K, Johnson K, et al. Antigen presentation by human uterine epithelial cells to autologous T cells [J]. AM J Reprod Immunol, 2006, 55 (1): 1-11.
- [5] Gills V, Peter M J, Paul G. Clinical immunity [M]. 2nd ed. UK: Harcourt Publishers Ltd, 2001.
- [6] Fahey J V, Schaefer T M, Channon J Y, et al. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract [J]. Human Reproduction, 2005, 20: 1439-1446.
- [7] Julia T A, David G K, Markku S, et al. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth *in vitro*: a new co-culture model [J]. Human Reproduction, 2001, 16: 5836-5845.
- [8] 吴庆侠,丰艳妮,楚元奎,等. 山羊子宫内膜基质细胞的分离培养及鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 11-14.
- [9] Wu Q X, Feng Y N, Chu Y K, et al. Isolation, culture and identification of goat endometrium stromal cells [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(4): 11-14. (in Chinese)
- [10] Lok S H, Lai L T, Yiu W C, et al. Establishment of a mouse primary co-culture of endometrial epithelial cells and peripheral blood leukocytes: Effect on epithelial barrier function and leukocyte survival [J]. Cell Biology International, 2006, 30: 977-982.
- [11] Rao H P, John V F, Shirley L H, et al. Regulation by human uterine cells of PBMC proliferation: influence of the phase of the menstrual cycle and menopause [J]. Journal of Reproductive Immunology, 1998, 40: 25-45.
- [12] Takahiro N, Hiroshi F, Michiyuki M, et al. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion *in vitro*: HCG enhances the effects of PBMC [J]. Human reproduction, 2002, 17(1): 207-212.
- [13] Shawn R, Mathias L, Monica R F, et al. Murine neonatal CD4⁺ cells are poised for rapid Th2 effector-like function [J]. The Journal of Immunology, 2007, 178: 2667-2678.
- [14] Indira G, Mohamed H S. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance [J]. The Journal of Immunology, 2007, 178: 3345-3351.
- [15] Varuna R A, Alexander G B. The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance [J]. Immunological Reviews, 2006, 212: 330-343.
- [16] Gérard C, Sylvie D, Nathalie L. Cytokines: Important for implantation? [J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24: 491-505.
- [17] Nan C L, Lei Z L, Zhao Z J, et al. Increased Th1/Th2 (IFN- γ /IL-4) cytokine mRNA ratio of rat embryos in the pregnant mouse uterus [J]. Journal of Reproduction and Development, 2007, 53: 219-228.