

[文章编号] 1000-4718(2007)01-0030-05

妊娠期 uNK 细胞与 pNK 细胞的生物学特性研究

赵丽丽¹, 曲迅^{1△}, 梁璐¹, 杨美香¹, 董白桦², 吕晓梅², 孔北华²(山东大学齐鲁医院¹ 临床基础研究所,² 妇产科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 研究妊娠期子宫 NK 细胞(uNK 细胞)与外周血 NK 细胞(pNK 细胞)的生物学特性, 比较两者在生理学功能上的差异。方法: 用免疫磁珠(MACS)技术分离并纯化 pNK 细胞与 uNK 细胞, 流式细胞仪检测其纯度, MTT 法检测两者的杀伤功能与增殖活性, RT-PCR 技术检测 uNK 细胞与 pNK 细胞趋化、侵袭、促血管形成等生物学活性。结果: 通过 MACS 技术可得到纯度较高的 NK 细胞, pNK 细胞对 K562 的杀伤活性高于 uNK 细胞, 但其增殖活性较 uNK 细胞低。uNK 细胞与 pNK 细胞均能分泌一些血源性生长因子, 并能表达某些趋化因子受体, 其中 PIGF 及 Ang II mRNA 仅在 uNK cells 检测到。结论: uNK 细胞的功能与 pNK 细胞相比具有某些独特性, 这可能是由于妊娠子宫独特的微环境所致。

[关键词] 子宫; 杀伤细胞, 天然; 基因表达; 妊娠

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Biological characteristics of uNK and pNK cells in pregnancy

ZHAO Li-li¹, QU Xun¹, LIANG Lu¹, YANG Mei-xiang¹, DONG Bai-hua², LÜ Xiao-me², KONG Bei-hua²(¹Basic Medical Science Institute, ²Department of Gynecology & Obstetrics, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China. E-mail: quxun@sdu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the biological characteristics of uterine natural killer cells (uNK cells) and peripheral natural killer cells (pNK cells) in early gestation and their difference on physiological functions. **METHODS:** MTT assay was used to detect cytotoxicity and proliferation of the uNK and pNK cells. RT-PCR technique was applied to examine the altered gene expression of the chemotaxis, angiopoiesis and other biological activity in uNK and pNK cells. **RESULTS:** Compared with pNK group, uNK cells showed a higher cytotoxicity against K562 and a lower proliferation activity. The expression of some chemokine receptor genes and angiogenic growth factor genes in uNK cells and pNK cells were detected, such as CCR1, CCR5, CCR7, CXCR2, CXCR4 and CX3CR1 expressed by uNK cell and high contents of CXCR4 and CX3CR1 mRNA were found. The ligand genes of the chemokine receptor were expressed by decidual tissue or trophoblast tissue in early pregnancy. PIGF and Ang II mRNA were only found in uNK cells. **CONCLUSION:** Compared with pNK cells, uNK cells have peculiarities of the behaviour that might contribute to uterine unique microenvironment during pregnancy.

[KEY WORDS] Uterus; Killer cells, natural; Gene expression; Pregnancy

妊娠子宫最主要的淋巴细胞是 NK 细胞源性的大颗粒淋巴细胞, 它主要分布于母体与胚胎接触的蜕膜, 其数量在子宫内膜的分泌晚期上升, 在妊娠的第 3 个月达到高峰(占淋巴细胞总量的 70% - 80%), 妊娠 20 周后蜕膜中 uNK 细胞显著减少, 至孕末期完全消失。当胚胎植入和蜕膜形成时, uNK 细胞的数量显著上升, 它们聚集在胎盘部位的蜕膜处与侵入的滋养层细胞密切接触并分泌多种细胞因子调节胚胎生长发育。uNK 细胞功能的独特性引起了人们的广泛关注, Koopman 等^[1] 运用基因芯片技术

分别对 uNK 细胞和外周血 NK 细胞的 1 万多个基因进行分析后发现, 有 278 个差异表达的基因, 在这些差异表达基因中有 188 个基因是 uNK 细胞所特有的, 包括一些编码膜表面蛋白(如 CD9)和免疫调节分子(如 PP14, progesterone-associated protein 14)的基因, 据此推测, 与同期 pNK 细胞相比, uNK 细胞在生物学特性和生理功能等方面可能存在着较大差异, 相关报道不多。本研究主要观察妊娠期 uNK 细胞与 pNK 细胞在增殖与杀伤活性的变化及妊娠早期子宫微环境中趋化、促血管形成等基

[收稿日期] 2005-04-12 [修回日期] 2005-09-29

△通讯作者 Tel: 0531-2169251; E-mail: quxun@sdu.edu.cn

因表达的变化,探讨妊娠过程中 uNK 细胞的生物学活性。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 人早孕期蜕膜组织及外周血样品 从齐鲁医院计划生育门诊收集 5 例 8 - 10 孕周正常妊娠妇女行人工流产术获得的蜕膜组织,磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗 2 - 3 次,除去血凝块及蜕膜组织中的绒毛组织,同时抽取外周血样品。所有实验均重复 3 次以上。

1.2 试剂 RPMI - 1640 (Hyclone 产品,含 15% 小

牛血清,青、链霉素终浓度为 1×10^5 U/L),淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技公司产品),CELEction™ Pan Mouse IgG Kit(Dynal Biotech 产品),anti - human CD56 单抗(Biolegend 产品),人重组 IL - 2(长春长生基因药业股份有限公司产品);荧光抗体:CD3 - TC(购自 eBioscience 公司),羊抗鼠 - FITC(购自 R&D 公司),半定量 RT - PCR 试剂盒由本室制备。

1.3 引物 本实验所需引物均由美国哥伦比亚大学微生物系(Department of Microbiology, Columbia University, New York City, NY 10032)Dr. Wenli ZHAO 馈赠,引物序列如表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

	Forward	Reverse
CCR1	5' - CGAAAGCCTACGAGAGTGAA - 3'	5' - CGGACAGCTTTGGATTTCTCT - 3'
CCR5	5' - TGTCCCCTTCTGGGCTCACTAT - 3'	5' - TGGACGACAGCCAGCTACCTA - 3'
CCR6	5' - TCGCCATTGTACAGGGGACTA - 3'	5' - CGCTGCCTTGGGTGTTGTAT - 3'
CCR7	5' - ACATGGGAGACAACACCACA - 3'	5' - TCGCGATGATGACAAGGTAA - 3'
CXCR2	5' - TGGCAATAATACAGCAAAC - 3'	5' - GAGCAGGAAGATGAGGACGAC - 3'
CXCR4	5' - TTCTGCCCACCATGTAGTC - 3'	5' - TCGATGCTGATCCCAATGTA - 3'
CX3CR1	5' - AAGAAGCCCAAGAGTGT - 3'	5' - GAAGAAGCGGCTACTGAA - 3'
VEGF - A	5' - CTTGCCCTTGCTGCTTACC - 3'	5' - CACACAGGATGGCTTGAAG - 3'
VEGF - B	5' - CCTTGACTGTGAGCTCATG - 3'	5' - TGTCTGGCTTCACAGCACTG - 3'
VEGF - C	5' - TGCCGATGCATGTCTAAACT - 3'	5' - TGAACAGGTCTCTTCATCCAGC - 3'
VEGF - D	5' - GTATGGACTCTCGCTCAGCAT - 3'	5' - AGGCTCTCTTCATTGCAACAG - 3'
VEGF - E	5' - AGGGAGCACAGGAGGATAG - 3'	5' - AAGCAAACAACCTGAGATTAAGGA - 3'
PIGF	5' - ATTTCTTTGTGCAGATTCTGTAAGG - 3'	5' - CTAGAAGGTACAATCTCTCAGGGG - 3'
bFGF	5' - AGCGACCCTCACATCAAGC - 3'	5' - AAAAGAAACACTCATCCGTAACACA - 3'
Ang I	5' - CAGGAGGATGCTGGTTTG - 3'	5' - GCCCTTTGAAGTAGTGCC - 3'
Ang II	5' - ATCTCTTCTGTAGAATTAGGG - 3'	5' - AAATAGTGACTGCCACGGTG - 3'
Homo box b3	5' - GAAAGGGCGAACCAGGATT - 3'	5' - TGGCAGGCAGATGGAACAA - 3'
COX - 2	5' - ATCATTCACCAGGCAAATTGC - 3'	5' - GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG - 3'
NOS3	5' - GTCTGCATGGACCTGGATAC - 3'	5' - GGACACCACCTCATACTCATC - 3'
iNOs	5' - CATGGATAAGTACAGGCTGAG - 3'	5' - AGGTCACATTGGAGGTGTAG - 3'
HIF - 1 α	5' - GAATGCTCAGAGAAAGCG - 3'	5' - AGATTTGCATCCTTTTACACG - 3'
TGF β_1	5' - GTGGAAAACCCACAACGAAAT - 3'	5' - CTCCTTCCGGAAGTCAATGT - 3'
TGF β_2	5' - TCCAATTTGGTAAAAGCAGA - 3'	5' - TGTACCCTTTGGGTTCTGT - 3'
TGF β_3	5' - ACTGACACCCTTGGACTT - 3'	5' - TTTAGGGCAGACAGCCAGTT - 3'

2 方法

2.1 uNK 细胞与 pNK 细胞的分离、纯化

① 蜕膜单个核细胞制备 将所得蜕膜组织用 PBS 漂洗,将其剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 左右的组织块,置 120 目铜网上研磨后滤过 200 目铜网,PBS 洗涤细胞,按 1:1 体积比平铺于 Ficoll 淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 30 min,取出淋巴细胞层,PBS 洗涤

2 次,加入适量 RPMI - 1640,轻轻悬起细胞块,吸入培养瓶,37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO₂ 培养箱贴壁 30 min,将悬浮细胞移入一新离心管中,4 $^{\circ}$ C 放置 10 min。

② 外周血单个核细胞的制备 取上述妊娠妇女外周抗凝血 3 mL,加等体积 PBS 稀释,按 1:1 比例加于淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 25 min,取淋巴细胞层,用 PBS 洗涤 2 次,余下同 1.1。

③ NK 细胞的纯化 按说明书要求首先将 Mircobeads 与 anti - human CD56 抗体共同孵育,再将标有 CD56 的 Mircobeads 分别加入 1.1 和 1.2 的 NK 细胞悬液中,孵育 15 min,最后加入释放液,收集细胞上清。

④NK 细胞的纯度测定 取纯化好的 uNK 细胞与 pNK 细胞加入 2 μ L 羊抗鼠 - FITC,4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min,PBS 洗两遍,加入 CD3 - TC 10 μ L,4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min,PBS 洗 1 次,设阴性对照管,上机检测后用 WinMDI2.8 软件分析结果。

2.2 MTT 检测 NK 细胞的杀伤及增殖特性

① NK 细胞的杀伤特性 MTT 法检测 uNK 细胞与 pNK 细胞对 K562 的杀伤^[2],效靶比分别为 5:1, 2.5:1,1.25:1,0.625:1,每组复孔 3 个,实验重复 3 次以上。

② NK 细胞的增殖特性^[3] MTT 法检测 uNK 细胞与 pNK 细胞在 4 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的增殖情况,每一时段所用培养基为加有 1×10^5 U/L IL - 2 的 RPMI - 1640,按时更换培养基。

2.3 RT - PCR 技术检测 NK 细胞 mRNA 的表达的差异

①异硫氰酸胍法提取 NK 细胞总 RNA。②cDNA 的合成:总反应体积 20 μ L。5 \times RT buffer 4 μ L,DTT (0.1 mol/L) 2 μ L,4 \times dNTP Mix 1 μ L,Oligo T 1 μ L,M - MLV 1 μ L,细胞总 RNA 2 μ L,去 RNase 水 9 μ L。37 $^{\circ}$ C 反应 60 min,95 $^{\circ}$ C 反应 10 min 灭活

M - MLV。③PCR 扩增:扩增体系:20 μ L 反应体系,10 \times PCR buffer 2 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 1.6 μ L,Taq DNA 聚合酶(1 U/ μ L) 0.4 μ L,4 \times dNTP Mix: 0.4 μ L,上游引物 P1 1 μ L,下游引物 P2 1 μ L,RT 反应产物 0.8 μ L,去 RNase 水 12.8 μ L。PCR 条件: ① 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min。② 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s。③ 58 $^{\circ}$ C 复性 30 s。④ 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s。b - d 循环 35。⑤ 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 85 V,电泳 30 min。采用捷达凝胶成像系统采集并处理电泳结果。

结 果

1 uNK 细胞与 pNK 细胞的纯度

图 1 显示,经 CD56 免疫磁珠处理后所获取的 uNK 细胞 (CD56^{bright} CD3⁻) 与 pNK 细胞 (CD56^{dim} CD3⁻),NK 细胞的纯度 >95%。

2 uNK 细胞与 pNK 细胞的杀伤及增殖活性

2.1 uNK 细胞与 pNK 细胞的杀伤活性 MTT 法检测 uNK 细胞与 pNK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性,发现在效靶比为 5:1、2.5:1、1.25:1、0.625:1 的条件下,uNK 细胞的杀伤活性分别是 9.2% \pm 1.7%、6.6% \pm 2.2%、4.4% \pm 1.4%、1.3% \pm 0.8%; pNK 细胞的杀伤活性分别是 48.2% \pm 5.3%、40.7% \pm 3.7%、26.9% \pm 4.8%、20.8% \pm 5.5%。不同效靶比下两者杀伤活性比较,均 $P < 0.05$ (图 2)。

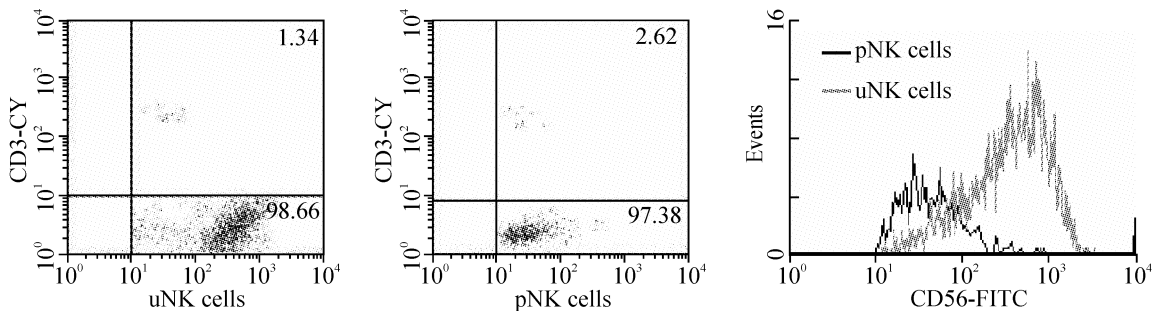


Fig 1 FACS analysis of uNK cells and pNK cells purity.

图 1 流式细胞仪分析 uNK 细胞与 pNK 细胞的纯度

2.2 uNK 细胞与 pNK 细胞的增殖活性 MTT 法检测 uNK 细胞与 pNK 细胞在 4 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的增殖情况,如图 3 所示,发现 uNK 细胞的增殖活性略高于 pNK 细胞。

3 RT - PCR 技术检测 uNK 细胞与 pNK 细胞 mRNA 的表达状况

3.1 uNK 细胞与 pNK 细胞的趋化特性 uNK 细胞与 pNK 细胞均可表达趋化因子受体 CCR1、CCR5、CCR7、CXCR2、CXCR4 和 CX3CR1,且表达强度相近 (图 4),其中 CXCR4 和 CX3CR1 mRNA 的表达水平

较高。

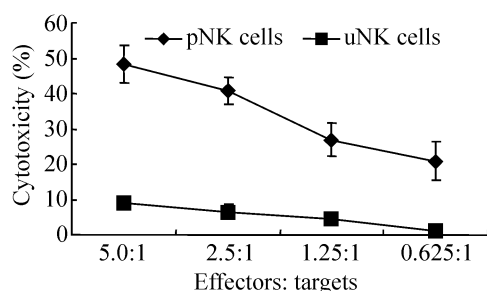


Fig 2 Cytotoxicity of uNK cells and pNK cells.

图 2 uNK 细胞与 pNK 细胞的杀伤活性

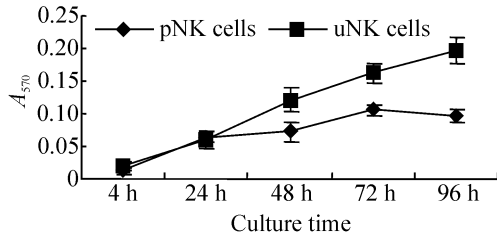


Fig 3 Proliferation activity of uNK cells and pNK cells.

图3 uNK细胞与pNK细胞的增殖活性

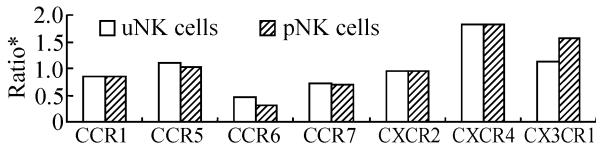


Fig 4 Chemokine receptor mRNA expression in uNK cells and pNK cells. Ratio* = various chemokine receptors band intensities/ β -actin band intensities.

图4 uNK细胞与pNK细胞表达的趋化因子受体

3.2 uNK细胞与pNK细胞分泌的血源性生长因子

uNK细胞与pNK细胞均检测到 VEGF - A、VEGF - B、VEGF - C 和 VEGF - E mRNA 的表达, uNK 细胞还表达 PIGF 和 Ang II mRNA(表2)。

表2 uNK细胞与pNK细胞分泌的血源性生长因子

Tab 2 Angiogenic growth factors mRNA expression in uNK cells and pNK cells

	uNK cells	pNK cells
VEGF - A	++	++
VEGF - B	++	++
VEGF - C	++	+
VEGF - D	-	-
VEGF - E	++	+
PIGF	++	-
bFGF	-	-
Ang I	-	-
Ang II	+	-

Densitometrical analysis was performed to compare the intensities of the β -actin band with that of the various chemokine receptors. ++: indicates higher band intensity compared with β -actin band; +: lower band intensity compared with β -actin band; and -: no visible band.

3.3 uNK细胞与pNK细胞表达的其它血管形成相关因子

uNK细胞与pNK细胞可表达其它与造血有关的因子如 homeo box b3、COX - 2、HIF - 1 α 、TGF β ₁ 和 TGF β ₃,此外,uNK细胞还表达 iNOS(表3)。

讨 论

尽管人们很早就开始关注妊娠期 uNK 细胞与 pNK 细胞生物学特性的研究,但目前的资料通常是

表3 uNK细胞与pNK细胞表达的其它与血管形成相关的因子

Tab 3 Other factors related to angiogenesis mRNA expression in uNK cells and pNK cells

	uNK cells	pNK cells
Homeo box b3	+	+
COX - 2	+	+
NOS3	-	-
iNOS	+	-
HIF - 1 α	++	+
TGF β ₁	+	+
TGF β ₂	-	-
TGF β ₃	+	+

Densitometrical analysis was performed to compare the intensities of the β -actin band with that of the various chemokine receptors. ++: indicates higher band intensity compared with β -actin band; +: lower band intensity compared with β -actin band; and -: no visible band.

选用妊娠期 uNK 细胞与正常健康妇女的 pNK 细胞进行对照分析,这种结果受个体间差异影响较大,本研究选用妊娠期早孕妇女 uNK 细胞与自身的 pNK 细胞进行分析研究,能更为直观地反映出 uNK 细胞与自身的 pNK 细胞生物学特性的异同。

本研究分析了早期妊娠妇女 uNK 细胞与 pNK 细胞的增殖活性及对 K562 细胞的杀伤活性,发现与 pNK 细胞比较,uNK 细胞的增殖活性升高而杀伤活性降低。推测可能与妊娠早期 uNK 细胞的数量迅速升高及妊娠期子宫微环境中 NK 细胞表面独特的受体库变化有关^[4]。对 uNK 细胞、pNK 细胞及蜕膜与滋养层组织趋化因子受体 CCR1、CCR5、CCR7、CXCR2、CXCR4、CX3CR1 及相应配体 mRNA 水平检测结果表明(图4),在妊娠早期子宫微环境中大量趋化因子及其受体的表达对 NK 细胞的迁移和在蜕膜中的选择性聚集与分化密切相关^[5]。在我们的研究中还发现,pNK 细胞高表达 CXCR4,同时滋养层组织检测到其配体 CXCL12 的高表达(另文列出),此结果与文献报道一致,因此认为,CXCR4 在 pNK 细胞向子宫定向迁移的过程中可能起至关重要的作用^[6,7]。

妊娠时,母体与胚胎通过母胎界面的血管进行营养物质和代谢产物的交换,因此母胎界面的血管在妊娠早期能否正常建立关系到蜕膜和胚胎的正常发育。有资料显示,uNK 细胞可能参与调控母胎界面的血管发育^[8]。在我们的研究中发现, uNK 细胞表达大量血源性生长因子如 VEGF - A、VEGF - B、VEGF - C、VEGF - E、PIGF 和 Ang II,这些因子与局

部血管阻力降低,血流量增大,子宫动脉内皮细胞数量迅速增加,促进胎盘血管生长并维持其稳定有关,同时发现蜕膜组织表达此类血源性因子的受体(另文列出),它们的相互作用可能是维持母胎界面血管重建的重要因素^[8]。我们在该实验中还发现 uNK 细胞还表达一些与血管形成相关的因子如 homeobox b3、HIF-1 α 及 TGF β_1 和 TGF β_3 等,表明 uNK 细胞在胚胎发育过程中的血管形成及胚胎植入过程中起重要的调节作用^[9,10]。

本研究表明,妊娠期 uNK 细胞与 pNK 细胞的表型、增殖和杀伤活性有较大不同,其某些细胞因子及其受体的表达的不同与妊娠早期 uNK 细胞在蜕膜中的募集和生理学功能有关。妊娠期外周血 CD56^{bright} NK 细胞比例增加,CD56^{bright} NK 细胞在生理功能上与 uNK 细胞有较大相似性,它能产生多种生物活性因子,参与正常妊娠的维持,但与 pNK 细胞相比,uNK 细胞有更强的促血管形成能力,因此被认为在母胎界面的血管重建中发挥重要功能。本研究通过对妊娠早期 uNK 细胞及自身 pNK 细胞的研究,初步阐明 uNK 细胞在蜕膜中的大量聚集的原因及其生物学行为,为下一步继续深入研究 uNK 细胞在正常妊娠中功能及其作用机制奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential[J]. *J Exp Med*, 2003, 198(8): 1201-1212.
- [2] 顾忠民,马忠森,安继红,等. 改良 MTT 比色法检测 NK 细胞活性[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2003, 29(6): 119-120.
- [3] 何金生,李瑞珠,宗庭益. MTT 还原法检测 NK 细胞活性的方法学研究[J]. *中国免疫学杂志*, 1996, 72(12): 356-358.
- [4] 赵丽丽,曲 迅,孔北华,等. 妊娠期 uNK、pNK 细胞 NKG2A 与 NKG2D 的表达及其生物学意义的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(7): 518-520.
- [5] Red-Horse K, Drake PM, Fisher SJ. Human pregnancy: the role of chemokine networks at the fetal-maternal interface[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2004, 6(4): 1-14.
- [6] Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16⁻ human natural killer cells[J]. *Blood*, 2003, 102(5): 1569-1577.
- [7] Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect[J]. *Blood*, 2002, 100(5): 1935-1947.
- [8] Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(4): 1823-1834.
- [9] Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis[J]. *J Cell Biol*, 2000, 148(2): 343-351.
- [10] Karmakar S, Das C. Regulation of trophoblast invasion by IL-1 beta and TGF-beta[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2002, 48(4): 210-219.