

山羊子宫内膜细胞与性腺激素对 uNK 细胞分泌活性的调节作用

廖庆红, 丁培阳, 赵丹丹, 王爱华, 齐雪峰*

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 为探讨山羊子宫内膜细胞和性腺激素对子宫自然杀伤(uNK)细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)和 γ -干扰素(IFN- γ)含量的影响。本研究以永生化的山羊子宫内膜基质细胞(ESC)和上皮细胞(EEC)为体外研究模型,通过ELISA法检测子宫内膜细胞和性腺激素(E_2 和 P_4)对uNK细胞分泌VEGF和IFN- γ 含量的影响。结果显示,在uNK细胞与EEC共培养时,雌激素 E_2 单独或与 P_4 共同作用可显著抑制uNK细胞中IFN- γ 和VEGF分泌水平($P < 0.05$),而 P_4 单独作用不显著;而当uNK细胞与ESC共培养时,孕酮 P_4 单独或与 E_2 共同作用可显著增强IFN- γ 在uNK细胞中的分泌水平($P < 0.05$),而 E_2 单独或与 P_4 共同作用可显著抑制VEGF分泌水平($P < 0.05$)。研究结果表明性腺激素对与EEC或ESC共培养的uNK细胞分泌水平具有不同程度的调节作用。

关键词: 山羊; 子宫内膜上皮细胞; 性腺激素; uNK细胞; 分泌活性

中图分类号: S827; Q813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)06-0866-05

Regulatory Role of Goat Endometrial Cells and Sex Gland Hormones in uNK Cells Secretion

LIAO Qing-hong, DING Pei-yang, ZHAO Dan-dan, WANG Ai-hua, QI Xue-feng*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To explore the effects of goat endometrial cells and sex hormones on secretion content of VEGF and IFN- γ in uNK cells. Using immortalized goat endometrial stromal cells (ESC) and epithelial cells (EEC) as an *in vitro* research model, the effects of the endometrial cells and sex hormones (E_2 , P_4) on secretion content of VEGF and IFN- γ in uNK cells was detected by ELISA assay. When uNK cells co-cultured with EEC, estrogen alone or together with P_4 significantly inhibited the secretion levels of IFN- γ and VEGF in uNK cells ($P < 0.05$), while the P_4 alone had no significant effect. When uNK cells co-cultured with ESC, P_4 alone or together with E_2 can significantly enhance the secretion of IFN- γ in uNK cells ($P < 0.05$), whereas E_2 alone or together with P_4 significantly inhibited the secretion level of VEGF ($P < 0.05$). These results indicated that the sex hormones play a role in regulating secretion of uNK cells co-cultured with EEC or ESC.

Key words: goat; endometrial epithelial cells; sex gland hormones; uNK cells; secretion activity

子宫内膜细胞主要包括基质细胞(Endometrium stromal cell, ESC)和上皮细胞(Endometrium

epithelial cell, EEC)。研究认为,子宫内膜细胞可通过多种途径参与局部免疫防御与免疫调节;如物

收稿日期: 2013-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(30901089); 国家博士点基金资助项目(20090204120011); 中央高校基本科研业务费专项重点项目(ZD2013008)

作者简介: 廖庆红(1989-), 女, 广西桂林人, 本科生, 主要从事家畜内分泌学与免疫学相关研究, E-mail: liaoqh729@163.com

* 通信作者: 齐雪峰, 副教授, 博士, E-mail: yxian2002@126.com

理屏障、表达 TLRs、分泌趋化因子和细胞因子及表达免疫黏附分子等^[1-3]。子宫 NK 细胞 (Uterine natural killer, uNK) 是一类功能特化的免疫细胞, 在发挥局部免疫调节作用的同时, 在平衡子宫局部免疫-内分泌中具有重要意义。目前对 uNK 细胞的研究取得了明显的进展, 如其表型功能、变化规律、局部免疫及产生的细胞因子, 而有关子宫内膜细胞在 uNK 细胞募集与活化中的作用, 以及性激素对该作用的影响等方面尚不清楚。性腺激素 E_2 和 P_4 是来自卵巢和子宫局部最主要的激素。大量的研究证明, E_2 和 P_4 对淋巴细胞的作用与剂量以及两者的比例相关。但有研究表明, P_4 对 uNK 细胞的影响似乎并不是通过其直接作用, 因为在子宫内膜 uNK 细胞尚未发现 P_4 受体^[4-5]。并且体外研究中两种激素发挥作用所需要的浓度远远高于体内的实际浓度和相应受体的结合度, 推测可能通过子宫内膜间接参与子宫局部的免疫调节。最近的研究也表明, 妊娠早期 uNK 等免疫相关细胞在子宫内膜呈时空分布变化, 在胚胎附植期主要聚集于子宫内膜基质细胞区域, 提示子宫内膜细胞在局部免疫细胞活化与功能发挥中的作用^[6-10]。

本研究旨在以分离纯化的山羊 uNK 细胞和 hTERT (Human telomerase reverse transcriptase) 转染获得的永生化山羊 ESC 和 EEC 为基础, 通过 ELISA 法检测子宫内膜细胞对 uNK 细胞分泌血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 含量的影响, 以探究山羊子宫内膜细胞及性腺激素对 uNK 细胞分泌活性的影响。对于全面了解子宫局部免疫和内分泌免疫调节机制, 而且对深入了解生殖道的抗感染免疫机制等均具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 细胞

hTERT 转染获得的永生化山羊 ESC 和 EEC 由西北农林科技大学动物医学院靳亚平教授馈赠。该细胞形态及免疫化学特性均与原代培养细胞相似^[11-12]。

1.2 主要试剂

DMEM/F-12 为 Gibco 产品; 胎牛血清为 Hyclone 产品; 胰蛋白酶为 Amresco 产品; E_2 和 P_4 均为 Sigma 公司产品, 分别用无水乙醇和氯仿配制, 过滤除菌, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 使用时用含血清的

DMEM/F-12 完全培养液稀释成设定浓度的工作液; DBA 凝集素、DNase I、N-乙酰-D-氨基半乳糖均购自 Sigma 公司; M280 磁珠和磁力架均购自 Invitrogen 公司; DBA 凝集素一抗及 HRP 标记链霉亲和素二抗为美国 US Biological 公司产品; 绵羊 IFN- γ ELISA 检测试剂盒、山羊 VEGF ELISA 检测试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司。

1.3 山羊 uNK 细胞的分离与鉴定

参照 M. C. Bizinotto 等^[6]的方法, 通过 DBA 标记链霉亲和素包裹磁珠法对山羊 uNK 细胞进行分离。主要程序: 无菌采集 2~3 月孕龄山羊子宫角, 分离子宫中膜淋巴细胞汇集区并剪成 1 mm^3 左右小块, 用 Hank's 溶液 (含 1% BSA、1 000 U 的 DNase type I) 反复冲洗, 离心后重悬于 Hank's 液, 加入 DBA 标记磁珠吸附溶液中 uNK 细胞, 然后用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ N-乙酰葡萄糖溶液洗脱磁珠并分离 uNK 细胞。通过台盼蓝染色法计算活细胞率。细胞纯度鉴定通过细胞离心法将分离的 uNK 细胞吸附于玻片, 丙酮预冷后与生物素化 DBA 凝集素一抗及 HRP 标记链霉亲和素二抗反应, 于显微镜下鉴定 uNK 细胞纯度。

1.4 ESC 和 EEC 的复苏与传代培养

分别将冻存的山羊 ESC 和 EEC 迅速解冻, $1\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心后, 用新配置的含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 完全培养液调整浓度至 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于细胞培养瓶, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中恒温培养 2~3 d (以下培养条件均与此同)。待细胞生长至约 80% 时, 吸弃旧培养液, 用灭菌 PBS 液洗涤 2~3 遍, 加入 0.25% 胰酶消化, 进行传代培养。根据细胞生长情况, 每 2~3 d 传代 1 次, 传代培养 3~4 次后进行下一步试验。

1.5 性腺激素作用下子宫内膜细胞体系对 uNK 分泌活性的调节作用

试验于 24 孔套皿培养板进行。主要过程: 将生长状态良好的 EEC 或 ESC 用胰酶消化后, 制成密度为 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 分别加入 24 孔细胞培养板, 每孔 500 μL , 置培养箱中培养。逐日观察细胞生长情况, 待各孔细胞生长形成单层时, 弃旧培养液; 并按照表 1 所述浓度将 E_2 或/和 P_4 分别加入 24 孔板各行, 每孔 250 μL , 激素添加剂量及比例参照文献^[1, 13-14]。激素空白对照组补加等量 DMEM/F-12 培养液。随后于各孔加入套皿, 皿内加入 5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 uNK 细胞悬液, 继续培养

至 56 h。每个处理做 5 个重复。收集套皿内细胞培养上清液,按照 ELISA 试剂盒说明进行 VEGF 和 IFN- γ 含量的测定与分析。

表 1 试验处理

组别 Treatment	1	2	3	4
雌二醇(E ₂)17 β -Estradiol	0	100	0	100
孕酮(P ₄)Progesterone	0	0	100	100

1.6 统计分析

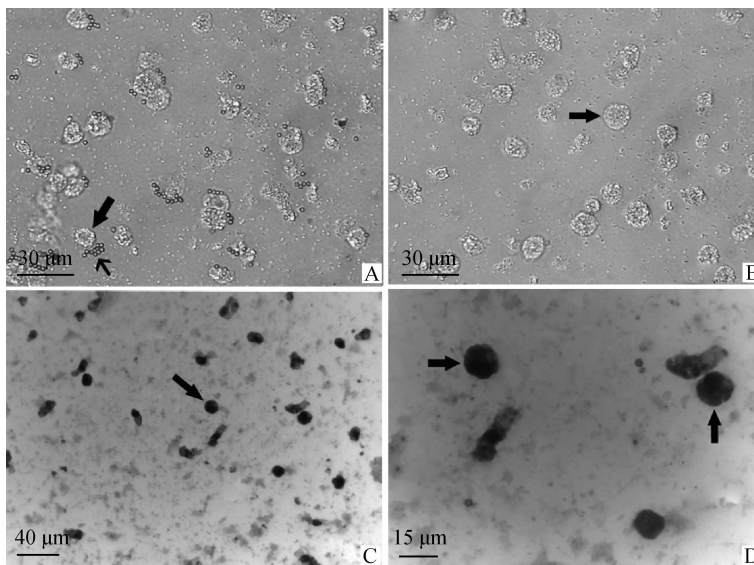
数据按 SPSS 进行方差分析,数据相关分析结果采用“平均数 \pm 标准差”表示, $P < 0.05$ 认为差异

性显著。

2 结果

2.1 山羊 uNK 细胞的分离与鉴定

通过 DBA 标记链霉亲和素包裹磁珠法对山羊 uNK 细胞进行分离纯化。由图 1A 可见与 M280 磁珠(细箭头所示)紧密结合的近似呈球形的 uNK 细胞(粗箭头所示);当经 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ N-乙酰葡萄糖溶液洗脱磁珠后,可见分离 uNK 细胞纯度较高,无其他杂质(图 1B),细胞浓度约 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,台盼蓝染色法计算活细胞率约为 90%;DBA 凝集素染色法计算活细胞率约为 90%;DBA 凝集素染色法显示分离的细胞呈棕色阳性染色,表明分离的山羊 uNK 细胞纯度较高(图 1C、D)。



A. 与 M280 磁珠(细箭头所示)紧密结合的近似呈球形的 uNK 细胞(粗箭头所示);B. 当经 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ N-乙酰葡萄糖溶液洗脱磁珠后,可见分离 uNK 细胞;C、D. 显示经 DBA 凝集素染色后分离的 uNK 细胞呈棕色阳性染色
A. Differential interference contrast (DIC) image of viable goat uNK cells attached to *Dolichos biflorus* (DBA) lectin-coated magnetic beads; B. Detached after addition of $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gal-NAC; C, D. Isolated uNK cells positive reactive with peroxidase labeling with HRP-conjugated DBA lectin (brown areas pointed out by arrows)

图 1 山羊 uNK 细胞分离纯化与鉴定

Fig. 1 Goat uNK cells isolation and purification

2.2 性腺激素及子宫内膜细胞对 uNK 细胞中 IFN- γ 分泌活性的影响

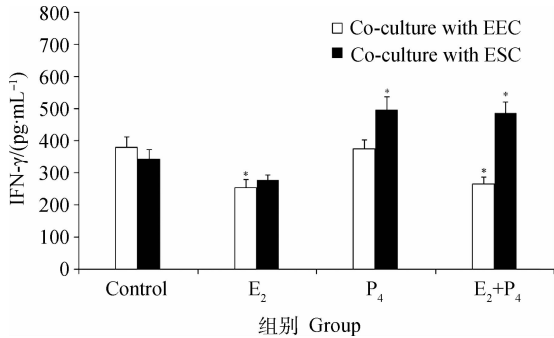
本研究通过套皿培养技术,检测性激素及体外培养的山羊子宫内膜细胞对 uNK 细胞分泌活性的影响。结果表明,性腺激素 E₂ 或/和 P₄ 在单独培养的 EEC 或 ESC 下对 uNK 细胞分泌 IFN- γ 水平有不同程度的调节作用。与未加激素对照组相比较:当 uNK 细胞与 EEC 共培养时,E₂ 单独或与 P₄ 共同作用对 uNK 细胞分泌 IFN- γ 活性具有显著的抑

制作用($P < 0.05$),P₄ 单独作用对 uNK 细胞分泌 IFN- γ 活性影响不显著。对于 uNK 细胞与 ESC 共培养 56 h 后,P₄ 单独或与 E₂ 共同作用对 uNK 细胞分泌 IFN- γ 水平具有显著的增强作用($P < 0.05$),E₂ 单独作用影响不显著(图 2)。

2.3 性腺激素及子宫内膜细胞对 uNK 细胞中 VEGF 分泌活性的影响

试验结果显示,性腺激素 E₂ 或/和 P₄ 在单独培养的 EEC 或 ESC 下对 uNK 细胞分泌 VEGF 水平

有不同程度的调节作用,主要呈抑制作用。如图 3 所示,当 uNK 细胞与 EEC 共培养后,与未加激素对照组相比较, E_2 单独或与 P_4 共同作用对 uNK 细胞分泌 VEGF 水平具有明显的抑制作用($P < 0.05$),而 P_4 单独作用对 uNK 细胞分泌 VEGF 活性影响不明显;当 uNK 细胞与 ESC 共培养后, E_2 和 P_4 单独或者共同作用对 uNK 细胞分泌 VEGF 水平均具有明显作用,其中 P_4 单独作用呈显著增强作用($P < 0.05$), E_2 单独或与 P_4 共同作用呈显著抑制作用($P < 0.05$)。



*. 差异显著, $P < 0.05$; $n = 5$ 。下同

*. Significantly different at $P < 0.05$ level, $n = 5$. The same as below

图 2 性腺激素及子宫内膜细胞对 uNK 细胞中 IFN- γ 分泌活性的影响

Fig. 2 Effect of sex hormones and endometrial cells on secretion activity of IFN- γ in uNK cells

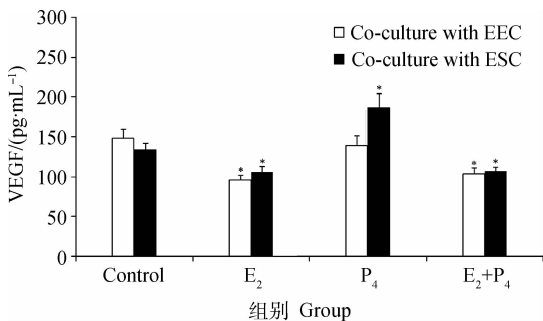


图 3 性腺激素及子宫内膜细胞对 uNK 细胞中 VEGF 分泌活性的影响

Fig. 3 Effect of sex hormones and endometrial cells on secretion activity of VEGF in uNK cells

3 讨论

进行体外研究的一个先决条件是收获高纯度并保持原有活性的单一细胞群。常见的 uNK 细胞分离方法有机械法和酶消化法,但因其局限性,效果皆不理想。研究表明:uNK 细胞膜及胞浆中含有可与双花扁豆素(DBA)结合的特异性 N-乙酰半乳糖胺

的糖结合物^[6]。本试验将 DBA 凝集素包裹链霉亲和素免疫磁珠,基于磁珠分选技术对妊娠山羊子宫内皮中 uNK 细胞进行分离纯化与鉴定,清除了胰酶消化后残留的各种杂质,成功地制备了高纯度的 uNK 细胞悬液。而怀孕中期哺乳动物体内 uNK 细胞含量最高,孕期过短或过长,动物体内的 uNK 细胞含量都会过低,无法满足试验需要^[8-9]。本研究采集 2~3 月孕龄山羊子宫组织,保证了高浓度 uNK 细胞的获得,为深入研究子宫内膜细胞以及性腺激素对高比例 uNK 细胞分泌活性所发挥的作用奠定重要的试验基础。

子宫内膜组织中存在大量的免疫细胞。其中 uNK 细胞是妊娠早期子宫内最主要的淋巴细胞,uNK 细胞水平变化与妊娠能否成功紧密联系。uNK 细胞常出现于血管周围,并且表达血管内皮生长因子(VEGF)^[15]。uNK 细胞通过促进适量 IFN- γ 的分泌,在植入部位发挥促进螺旋动脉改造的作用^[16]。本研究通过套皿培养技术,检测性激素及体外培养的山羊子宫内皮细胞对 uNK 细胞分泌活性的影响。本试验结果显示,性腺激素对与 EEC 或 ESC 共培养的 uNK 细胞分泌水平具有不同程度的调节作用。相关研究表明,性激素主要通过与其靶细胞上的受体特异性结合发挥其调节作用^[17]。但研究表明, E_2 和 P_4 对 uNK 细胞的影响似乎并不是通过其直接作用,因为在子宫内膜 uNK 细胞尚未发现激素受体^[4-5]。N. Ledee 等^[18]研究表明,妊娠早期子宫内膜中 IL-18 表达水平将直接影响 uNK 细胞中 IFN- γ 分泌水平。X. F. Qi 等研究表明, E_2 和/或 P_4 对 EEC 或 ESC 中 IL-18 分泌水平具有不同程度的调节作用^[19],结合性腺激素 E_2 和 P_4 对山羊子宫内皮细胞激素受体 ER 和 PR 表达水平的调节作用^[20]。本研究结果中性腺激素对与 EEC 或 ESC 共培养的 uNK 细胞 IFN- γ 分泌水平不同程度的调节作用提示性腺激素可能通过子宫内膜细胞上的激素受体调节子宫内膜细胞的增殖及 IL-18 分泌活性,间接参与对 uNK 细胞分泌活性的免疫调节作用。在与 EEC 或 ESC 共培养时, E_2 单独或与 P_4 共同作用均可显著抑制 uNK 细胞 VEGF 分泌水平,提示子宫内膜细胞介导性腺激素 E_2 对 uNK 细胞 VEGF 分泌抑制的重要作用。

4 结论

性腺激素对与 EEC 或 ESC 共培养的 uNK 细

胞分泌水平具有不同程度的调节作用。雌激素 E₂ 单独或与 P₄ 共同作用可显著抑制与 EEC 共培养 uNK 细胞中 IFN- γ 和 VEGF 分泌水平,提示子宫内膜上皮细胞在介导 E₂ 对 uNK 细胞分泌活性中的重要作用;在 uNK 细胞与 ESC 共培养时,孕酮 P₄ 单独或与 E₂ 共同作用可显著增强 IFN- γ 在 uNK 细胞中的分泌水平,而 E₂ 单独或与 P₄ 共同作用可显著抑制 VEGF 分泌水平,提示子宫内膜基质细胞在介导性腺激素对 uNK 细胞不同细胞因子分泌水平的调节作用。

参考文献:

- [1] ROBERTS R M, CHEN Y, EZASHI T, et al. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals [J]. *Semi Cell Dev Biol*, 2008, 19(2): 170-177.
- [2] LEANN B, KAZUYOSHI H, CHRISTOPH V. Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation [J]. *Reproduction*, 2008, 135(2): 181-195.
- [3] DIMITRIADIS E, WHITE C A, JONES R L, et al. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(6): 613-630.
- [4] SANTONI A, ZINGONI A, CERBONI C, et al. Natural killer (NK) cells from killers to regulators: Distinct features between peripheral blood and decidual NK cells [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2007, 58(3): 280-288.
- [5] OH M J, CRO B A. A map of relationships between uterine natural killer cells and progesterone receptor expressing cells during mouse pregnancy [J]. *Placenta*, 2008, 29(4): 317-323.
- [6] BIZINOTTO M C, TAMASHIRO W M, GABRIEL D L, et al. Uterine natural killer cells are immunogenic in syngeneic male mice [J]. *J Reprod Immunol*, 2008, 79(1): 18-25.
- [7] PFARRER C, RAZIWA S, WINTHER H, et al. Localizagtion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term [J]. *Placenta*, 2006, 27(8): 889-898.
- [8] MANASTER I, MANDELBOIM O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa [J]. *Placenta*, 2008, 29 (supplement A): S60-S66.
- [9] SAITO S, NAKASHIMA A, MYOJO-HIGUMA S, et al. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy [J]. *J Reprod Immunol*, 2008, 77(2): 14-22.
- [10] HERINGTON J L, BANY B M. Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and function in the mouse uterus during decidualization [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(4): 579-588.
- [11] 盛红霞, 吴庆侠, 靳亚平, 等. 山羊子宫内膜基质细胞永生化的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(6): 818-823.
- [12] 吴庆侠, 王爱华, 司永嘉, 等. 山羊子宫内膜上皮细胞转染 pCI-neo-hTERT 质粒后的永生化的研究 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30(2): 228-232.
- [13] WANG H B, LU S H, LIN Q X, et al. Reconstruction of endometrium in vitro via rabbit uterine endometrial cells expanded by sex steroid [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(7): 2385-2395.
- [14] 陈秀荔, 靳亚平, 张彦明. 分离培养兔子宫内膜细胞的鉴定及性激素对子宫内膜间质细胞形态的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1226-1231.
- [15] LASH G E, SCHIESS I B, KIRKLEY M, et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy [J]. *J Leu Biol*, 2006, 80(3): 572-580.
- [16] ASHKR A A, DISANTO J P, CROY B A. Interferon γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(2): 259-270.
- [17] TSUJI Y, TAMAOKI T H, HASEGAWA A, et al. Expression of interleukin-18 and its receptor in mouse ovary [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2001, 46: 349-357.
- [18] LEDEE N, CHAOUAT G, SERAZIN V, et al. Endometrial vascularity by three-dimensional power Doppler ultrasound and cytokines: a complementary approach to assess uterine receptivity [J]. *J Reprod Immunol*, 2008, 77(1): 57-62.
- [19] QI X F, NAN Z C, QU Y Y, et al. Stromal-epithelial interactions modulate the effect of ovarian steroids on goat uterine epithelial cell interleukin-18 release [J]. *Domest Anim Endocrin*, 2012, 42(4): 210-219.
- [20] 屈延延, 齐雪峰, 南志春, 等. 性腺激素对山羊子宫内膜上皮细胞激素受体表达的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(1): 135-139.