

妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源树突样细胞刺激脐血 T 淋巴细胞的特性比较

侯云华^{1,2}, 何敏¹, 季宁东², 张晓洁¹, 季晓辉^{1*}

(¹南京医科大学微生物及免疫学系, 江苏 南京 210029; ²淮阴卫生高等职业技术学校检验药理学系, 江苏 淮安 223002)

[摘要] **目的:**观察妊娠不同阶段胎盘来源的树突样细胞(DC样细胞)刺激脐血淋巴细胞增殖活化特点的差异,进一步研究胎盘免疫细胞在妊娠耐受及分娩发动中的作用。**方法:**机械分离妊娠中、晚期胎盘中的单个核细胞,用磁珠分离法获取 CD14⁺细胞,以内皮(逆)穿越系统诱导其分化为 DC 样细胞,并用流式细胞仪分析细胞表型,ELISA 法检测细胞培养上清中白细胞介素(IL)-12、IL-10 水平,CCK-8 法检测其激发脐血淋巴细胞增殖能力,流式细胞术检测其所刺激的脐血 T 淋巴细胞内细胞因子。**结果:**足月妊娠胎盘来源的经诱导的细胞高表达与免疫激活有关的细胞表面标志物 CD80、CD86;培养上清中检出较高水平的 IL-12,极低水平的 IL-10,具有较强的刺激脐血淋巴细胞增殖的能力;能刺激脐血 T 淋巴细胞分化形成较多的 IFN- γ 产生细胞,而分化形成的 IL-10 产生细胞则较少。但相比之下,中期妊娠胎盘来源的经诱导的细胞则低表达 CD80、CD86($P < 0.05$),培养上清中检出较高水平的 IL-10($P < 0.05$),但检测出的 IL-12 浓度极低($P < 0.05$),刺激脐血淋巴细胞的能力较弱($P < 0.05$);刺激脐血 T 淋巴细胞分化形成较多的 IL-10 产生细胞($P < 0.05$),而分化形成的 IFN- γ 产生细胞较少($P < 0.05$)。**结论:**妊娠不同时期胎盘来源的单核-巨噬细胞分化形成的 DC 样细胞免疫学特性不同,高表达 CD80、CD86、IL-12 的 DC 样细胞细胞在妊娠免疫耐受中止及分娩发动中发挥着一定的作用,而低表达 CD80、CD86,高表达 IL-10 的细胞可能参与了妊娠过程中的免疫耐受。

[关键词] 妊娠; 胎盘; 单核-巨噬细胞; 树突状细胞; 免疫; 脐血淋巴细胞

[中图分类号]

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)09-1199-08

Comparisons of immunological characteristics of placental monocyte-macrophage-derived dendritic-like cells in stimulating cord blood T lymphocytes in different periods of pregnancy

HOU Yun-hua^{1,2}, HE Min¹, JI Ning-dong², ZHANG Xiao-jie¹, JI Xiao-hui^{1*}

(¹Department of Microbiology & Immunology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Clinical Laboratory & Pharmacy, Huaiyin Advanced Vocational & Technical School Of Health, Huaian 223002, China)

[Abstract] **Objective:**To observe the differences of characteristics in activation and proliferation of cord blood lymphocytes stimulated by placenta-derived dendritic-like cells in different stages and further study the role of placental immune cells in pregnancy tolerance and labor onset. **Methods:** Mononuclear cells were separated mechanically from the mid-term placenta and late placenta. CD14⁺ cells were obtained by MACS and induced to differentiate into dendritic-like cells through the transebdothelial trafficking system. Flow cytometry was performed to analyze dendritic-like cell phenotype and ELISA assay was performed to detect the levels of IL-12, IL-10 in culture supernatant. CCK-8 assay was used to detect the ability of stimulating the proliferation of cord blood lymphocytes and flow cytometry was used to detect intracellular cytokine produced by stimulated cord blood T lymphocytes. **Results:** CD14⁺ monocyte-macrophage obtained from decidual tissue were inoculated into the endothelial monolayer, after two-way-induced culture, cells derived from full-term placenta had an appearance of dendritic morphology changes and highly expressed cell surface markers related to immune activation of dendritic cells, such as CD80, CD86; simultaneously, higher level of IL-12 and very low level of IL-10 were detected in the culture supernatant, and cells had strong ability of stimulating the cord blood lymphocytes proliferation. They could stimulate cord blood lymphocytes to differentiate into the cells that most of them producing IFN- γ and less of them producing IL-10. However, the induced cells derived from mid-term placenta, expressed low-level CD80 and CD86($P < 0.05$), in the culture supernatant, higher level of IL-10 ($P < 0.05$) and very low level of IL-12 ($P < 0.05$) were detected. Cells had weaker

[基金项目] 江苏省生殖医学重点实验室对外开放课题(SZ200705)

*通讯作者, E-mail: immune@njmu.edu.cn

ability in stimulating cord blood lymphocytes ($P < 0.05$), and stimulated cord blood lymphocytes to differentiate to form more cells producing IL-10 ($P < 0.05$) and less cells producing IFN- γ ($P < 0.05$). **Conclusion:** Dendritic-like cells differentiated from placenta-derived monocyte-macrophages in different periods of pregnancy have different immunological characteristics, dendritic-like cells highly expressed CD80, CD86 and high-level IL-12 play a certain role in the termination of immune tolerance in pregnancy and labor onset, dendritic-like cells expressed low-level CD80, CD86, and high-level IL-10 may be involved in immune tolerance during pregnancy.

[**Key words**] pregnancy; placenta; monocyte-macrophages; dendritic-like cells; immunity; cord blood lymphocytes

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1199-1206]

树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内最重要的抗原提呈细胞,处于免疫应答的中心环节。成熟的 DC 不但具有激发免疫应答的能力,某些特定类型的 DC 还可以下调免疫应答或诱导免疫耐受的产生。胎儿对于母体而言是半异己的异体“移植物”,因此理论上,母体应该对胎儿发生免疫排斥反应,但这种情况通常不会发生。近年来的研究表明,在母胎接触面存在着 DC,并且可能参与了正常妊娠时母体对胎儿抗原的免疫耐受以及分娩的发动^[1]。本研究参照本实验室先前建立的单核-巨噬细胞内皮(逆)穿越分化形成树突样细胞(DC 样细胞)的方法^[2],建立三维的脐静脉内皮细胞单层培养体系,将妊娠不同时期胎盘来源的单核-巨噬细胞种于其中,依据其本身所具有的穿越本性,经正反 2 次穿越内皮单层,分化为树突样细胞,再以脐血淋巴细胞为靶细胞,比较妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源的树突样细胞的免疫学特性,探讨树突状细胞在免疫耐受及分娩发动中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 脐带、脐血和胎盘

本实验所用脐带、脐血、胎盘均取自江苏省妇幼保健中心、淮安市妇幼保健院及解放军第八二医院。脐带、脐血、足月妊娠胎盘取自健康、足月(孕 37~40 周)、自然分娩的产妇。中期妊娠胎盘取自孕 16~26 周、无妊娠并发症以及妊娠合并症、自愿要求终止妊娠、采用米非司酮和米索前列醇联合药物引产的健康妇女(平均孕周 21 周+6 天)。所有脐带、脐血、胎盘的取用均遵循知情同意的要求。

1.1.2 试剂

荧光抗体:鼠抗人 CD80-PE、CD86-PE、CD14-FITC、CD45-PE-Cy5 单克隆荧光抗体及其同型对照为美国 eBioscience 公司产品,鼠抗人 CD3-FITC、CD8-PE-Cy5、IFN- γ -PE、IL-10-PE 单克隆荧光抗体

及其同型对照购自美国 Caltag 公司,人 IL-10 ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司,人 IL-12 检测试剂盒购自美国 Biolegend 公司。CD14 磁珠购自德国美天旎公司。

胞内细胞因子检测相关试剂:破膜剂和固定剂 Fix&Perm 购自美国 Caltag 公司,蛋白转运抑制剂(brefeldin, BFA)为美国 eBioscience 公司产品。

脂多糖(LPS)、佛波酯(PMA)和离子霉素(ionomycin)均购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞的原代培养及内皮细胞模型的构建

按本室已建立的方法建成内皮细胞模型,详细步骤见参考文献[3-5]。

1.2.2 胎盘单核-巨噬细胞的分离

无菌操作剥离妊娠不同时期胎盘;多点采集母体面的胎盘组织, D-Hanks 液洗涤至无明显的血凝块;将洗后的组织放置于金属小筛网中,用眼科剪剪切成直径 1 mm 左右的组织块, RPMI1640 淋洗,用一次性注射器橡皮头研磨、挤压,纱布过滤,离心浓缩后溶于 RPMI1640 培养液中,制备成混合细胞悬液。将细胞悬液以 1:2 体积比缓慢加于人淋巴细胞分离液(密度 1.077)上, 2 000 r/min 离心 20 min 后,收集界面层细胞,混悬于 RPMI1640 中 2 000 r/min 离心 10 min,洗涤 2 遍后计数。

1.2.3 CD14⁺免疫磁珠分选单核-巨噬细胞

采用包被 CD14⁺单抗的免疫磁珠,以阳性分离法通过磁柱磁场从上述胎盘组织白细胞混悬液中分离获得 CD14⁺单核-巨噬细胞。具体操作按说明书进行。

1.2.4 胎盘单核-巨噬细胞内皮(逆)穿越诱导培养树突样细胞

将分离获得的胎盘单核-巨噬细胞接种于已制备好的 24 孔板内皮单层上,吸附 2 h 后用 D-Hanks 液冲洗掉未黏附的细胞^[6], 48 h 后收集逆穿越返

回内皮单层上方的已分化细胞。

1.2.5 流式细胞术(FCM)检测细胞表型

收集每孔穿越后的细胞,标记 CD14-FITC、CD45-PE-Cy5、CD80-PE 或 CD86-PE 荧光抗体,上流式细胞仪(美国 BD 公司)检测,并用 WinMDI 统计软件分析数据。

1.2.6 ELISA 法检测树突样细胞分泌的 IL-12、IL-10 水平

收集每孔穿越后的细胞,调整细胞浓度至每孔 10^6 个,加入 LPS 100 ng/ml, 37°C 、5% CO_2 条件下孵育 48 h;无菌收集细胞培养上清,以 ELISA 法检测上清中 IL-12、IL-10 含量。

1.2.7 脐血 T 淋巴细胞的分离

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离健康、足月、自然分娩新生儿的新鲜脐血中的单个核细胞(PBMCs),加入 24 孔板中, 37°C 、5% CO_2 条件下孵育 2 h。收集未贴壁细胞。以其中部分细胞标记 CD3-FITC、CD45-PE-Cy5 单抗,以流式细胞术分析细胞纯度。

1.2.8 CCK-8 法检测 DCs 刺激脐血淋巴细胞的增殖能力

取 96 孔 U 型细胞培养板,每孔加入上述分离的脐血淋巴细胞 2×10^5 个,再分别加入不同浓度的已诱导分化的 DC 样细胞 (2×10^4 、 1×10^4 、 4×10^3 、 2×10^3 个),终体积 200 μl 。每个样品组设 3 个复孔,并设淋巴细胞(2×10^5 个/孔)为阴性对照,培养基作空白对照。 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中孵育 96 h,96 h 后在各孔加入 CCK-8 试剂 20 μl , 37°C 、5% CO_2 条件继续孵育 2 h。取出培养板放入酶标仪,测定各孔的光密度(optical density, OD)值,计算刺激指数(stimulating index, SI)。 $\text{SI} = (\text{实验孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}) / (\text{阴性对照孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值})$ 。

1.2.9 DC 样细胞刺激脐血淋巴细胞反应中淋巴细胞胞内细胞因子的检测

将 DC 样细胞与脐血淋巴细胞在 96 孔培养板中以 1:10 的比例混合,每孔终体积为 200 μl ,在 37°C 、5% CO_2 环境下共育 72 h。在培养到第 68 h 时,每孔再加入 PMA 0.07 μl (浓度为 3.5%)、Ionomycin 0.2 μl (浓度为 10%)和 BFA 0.2 μl (浓度为 10%),继续培养 4 h,收集细胞。首先进行细胞表面分子染色,加入 CD3-FITC 和 CD8-PE-Cy5 抗体,室温避光孵育 20 min,加固定剂 50 μl ,室温避光孵育 20 min, PBS 洗涤,再加破膜剂 50 μl ,室温避光孵育 20 min,之后加入 IFN- γ -PE 或 IL-10-PE 或其同型对照抗体,孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次,重悬细胞,以流式细胞仪检测并分析。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。两组之间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立内皮细胞单层

培养之后的内皮细胞单层在光学显微镜下呈现典型的铺路石样排列,细胞呈多角形,细胞核为圆形或椭圆形,与本实验室先前报道的内皮细胞单层的细胞形态学特点相符,提示内皮单层构建成功。

2.2 免疫磁珠分离所得的胎盘 CD14⁺单核-巨噬细胞纯度

以 CD14 作为单核-巨噬细胞的标记,FCM 检测 CD14⁺的细胞占 CD45⁺胎盘白细胞总数的比例为 84.53%~98.60%,平均(93.63 ± 2.58)%($n = 14$,图1)。

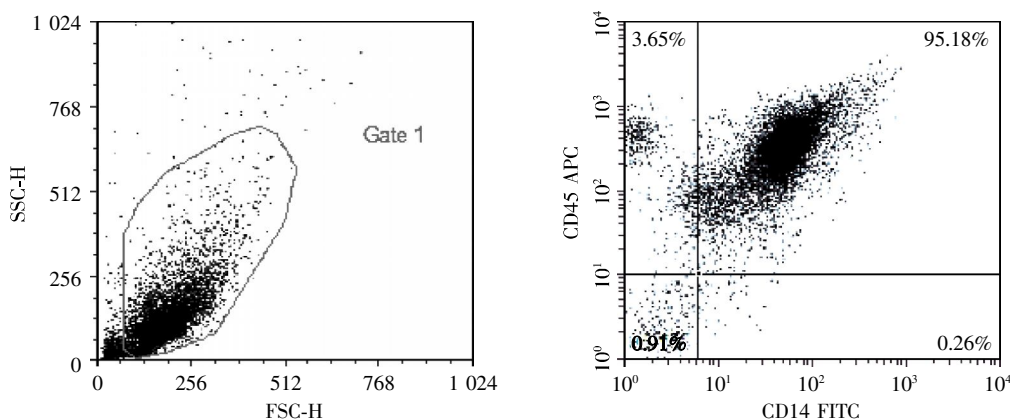


图 1 经磁珠分选后的 CD14⁺ 细胞的纯度(选自 14 例中的 1 例)

Figure 1 Purity of CD14⁺ purified by MACS

2.3 妊娠不同时期胎盘单核巨噬细胞来源的树突样细胞表型

妊娠晚期和妊娠中期胎盘来源的 CD14⁺单核-巨噬细胞与脐静脉内皮细胞单层共培养 48 h, 收集正、逆向 2 次穿越内皮单层后返回内皮单层上方的

细胞, 用流式细胞术分析共刺激分子的表达, 以显示其分化状态。结果显示, 晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞已分化形成高表达 CD80、CD86 的细胞, 而中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞经穿越内皮单层后表达低水平的 CD80、CD86(图 2)。

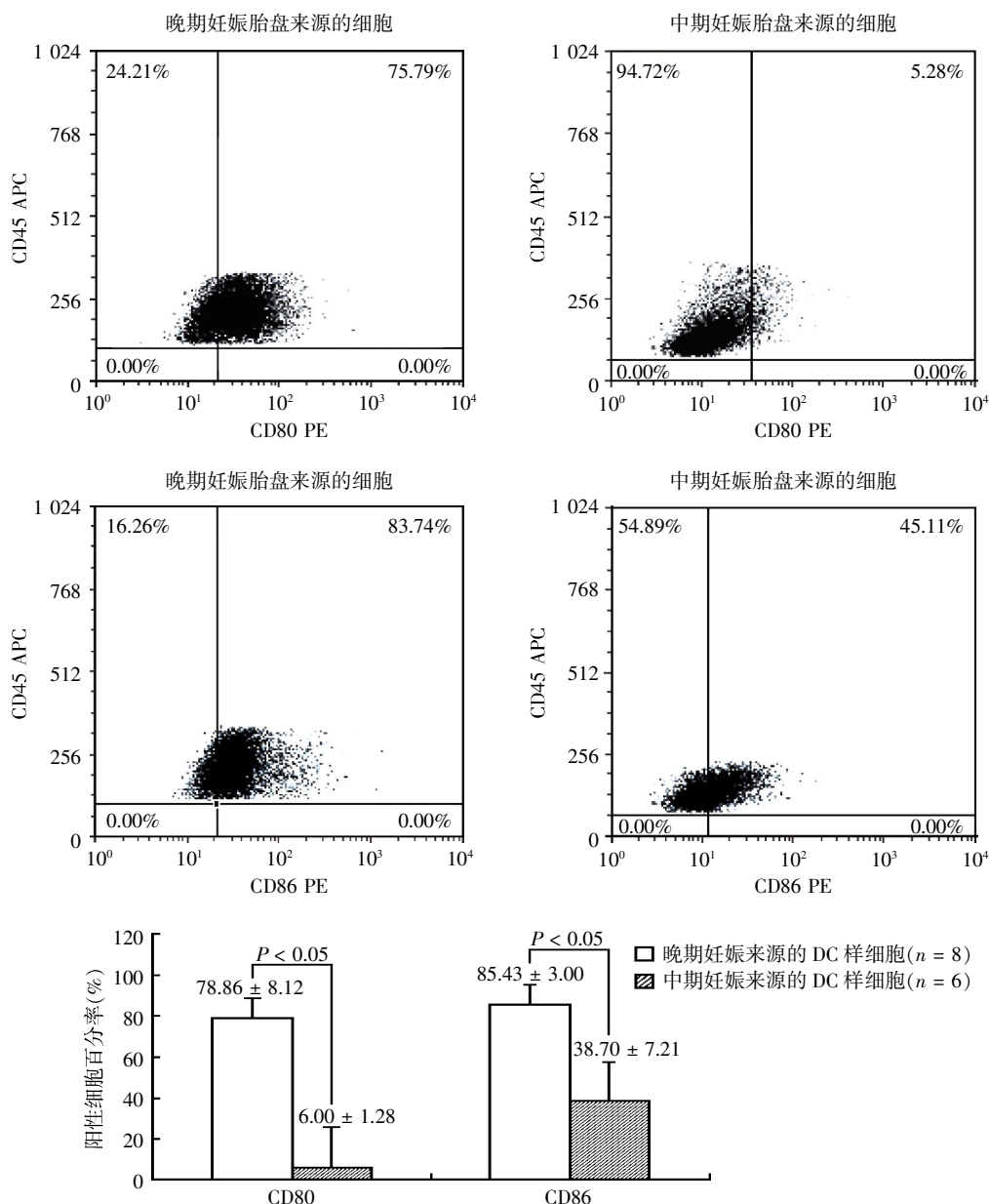


图 2 晚期和中期妊娠胎盘来源单核-巨噬细胞经内皮单层穿越后 CD80 和 CD86 表达的比较

Figure 2 Comparison of CD80 and CD86 expression on monocyte-macrophages through the transeendothelial trafficking system of different gestational ages placenta

2.4 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源的 DC 样细胞分泌细胞因子能力的比较

收集内皮细胞模型经正、逆向穿越后已返回内皮细胞单层上方的细胞, 离心洗涤, 然后加 LPS 刺激培养 48 h, 收集细胞培养上清, ELISA 法测 IL-12、IL-10 水平。结果显示, 足月妊娠胎盘来源

的细胞经内皮(逆)穿越分化后再与 LPS 共育, 其培养上清中 IL-12 含量较高而 IL-10 含量较少; 中期妊娠胎盘来源的细胞经诱导分化后与 LPS 共育, 其培养上清中 IL-12 含量较低而 IL-10 含量较高, 二者间差异均有统计学意义(P 均 < 0.05 , 图 3)。

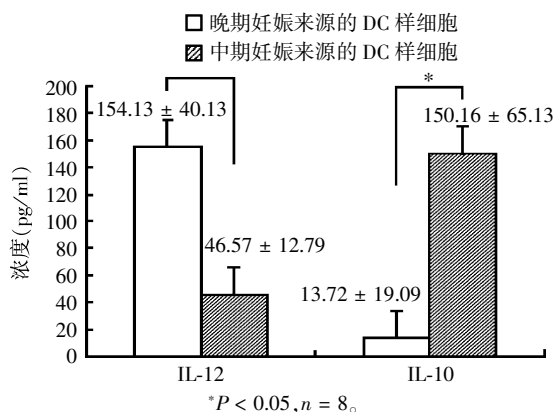


图 3 中晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞来源的 DC 样细胞分泌细胞因子的比较

Figure 3 Comparison of cytokines secreted by dendritic-like cells induced from monocyte-macrophages derived from placental tissue in different gestational ages

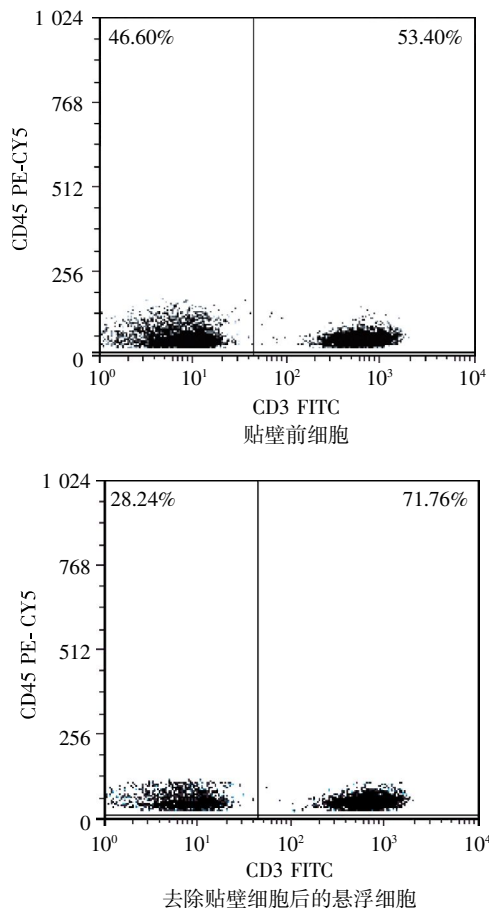


图 4 流式细胞术分析富集后脐血 T 淋巴细胞的纯度

Figure 4 Purity of cord blood lymphocytes enriched by FCS

2.5 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源的 DC 样刺激脐血淋巴细胞增殖的能力

2.5.1 脐血 T 淋巴细胞的纯度

以密度梯度离心法分离来自足月健康新生儿脐

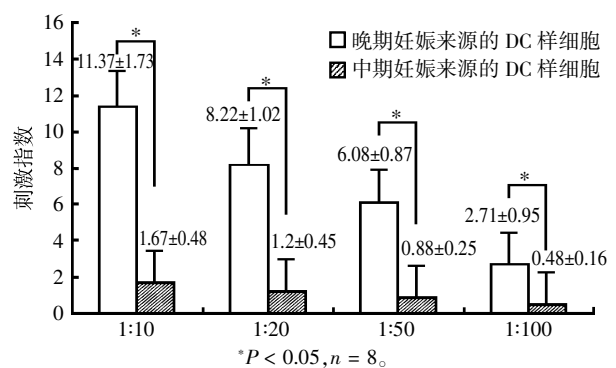


图 5 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞源性 DC 样细胞刺激脐血异体淋巴细胞的增殖能力的比较

Figure 5 Comparison of the characteristic of cord blood T-cell-stimulation between dendritic-like cells induced from monocyte-macrophages derived from placental tissue in different gestational ages

血的单个核细胞(PBMC)。将所收集的细胞加入 24 孔培养板中,分别于贴壁 2 h 前后,以 CD45 作为白细胞标记、CD3 作为 T 淋巴细胞标记,FCM 分析纯度。结果显示,贴壁前 CD3⁺细胞比例为 53.40%~58.60%,平均为 56.40%(n = 3)。去除贴壁细胞后 CD3⁺细胞比例为 68.25%~78.30%,平均为 70.70%(n = 3,图 4)。

2.5.2 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源的 DC 样细胞刺激脐血淋巴细胞增殖的能力

收集胎盘来源的单核-巨噬细胞经内皮(逆)穿越系统诱导培养 48 h 后重现于内皮上方的 DCs,与脐血淋巴细胞共育,经 CCK-8 法实验证实,来源于晚期妊娠胎盘者具有很强的刺激脐血淋巴细胞增殖的能力,但来源于中期妊娠胎盘者刺激脐血淋巴细胞增殖的能力要弱得多(图 5)。

以上实验通过 CD80、CD86 表型分析,细胞因子 IL-12/IL-10 分泌水平分析和刺激脐血同种异体淋巴细胞增殖能力检测,证实晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞经内皮(逆)穿越,已经分化成了具有免疫激活能力的 DC 样细胞;而中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞经同样的诱导过程,未分化形成具有免疫激活作用的 DC 样细胞。

2.6 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源的树突样细胞刺激脐血 T 淋巴细胞分化的特点

将穿越后形成的分化细胞与脐血淋巴细胞按照 1:10 的比例混合,FCM 检测其诱导 T 淋巴细胞活化、分化后胞内因子的表达特点,结果显示,与中期妊娠相比,晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞来源的 DCs 诱导脐血 T 淋巴细胞,尤其是 CD3⁺(CD8⁻)亚群分化

形成了较多的 IFN- γ 产生细胞, 而中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞来源的 DC 样细胞则诱导 T 淋巴细胞

无论是 CD3⁺CD8⁻亚群还是 CD3⁺CD8⁺亚群都分化形成了较多的 IL-10 产生细胞(图 6)。

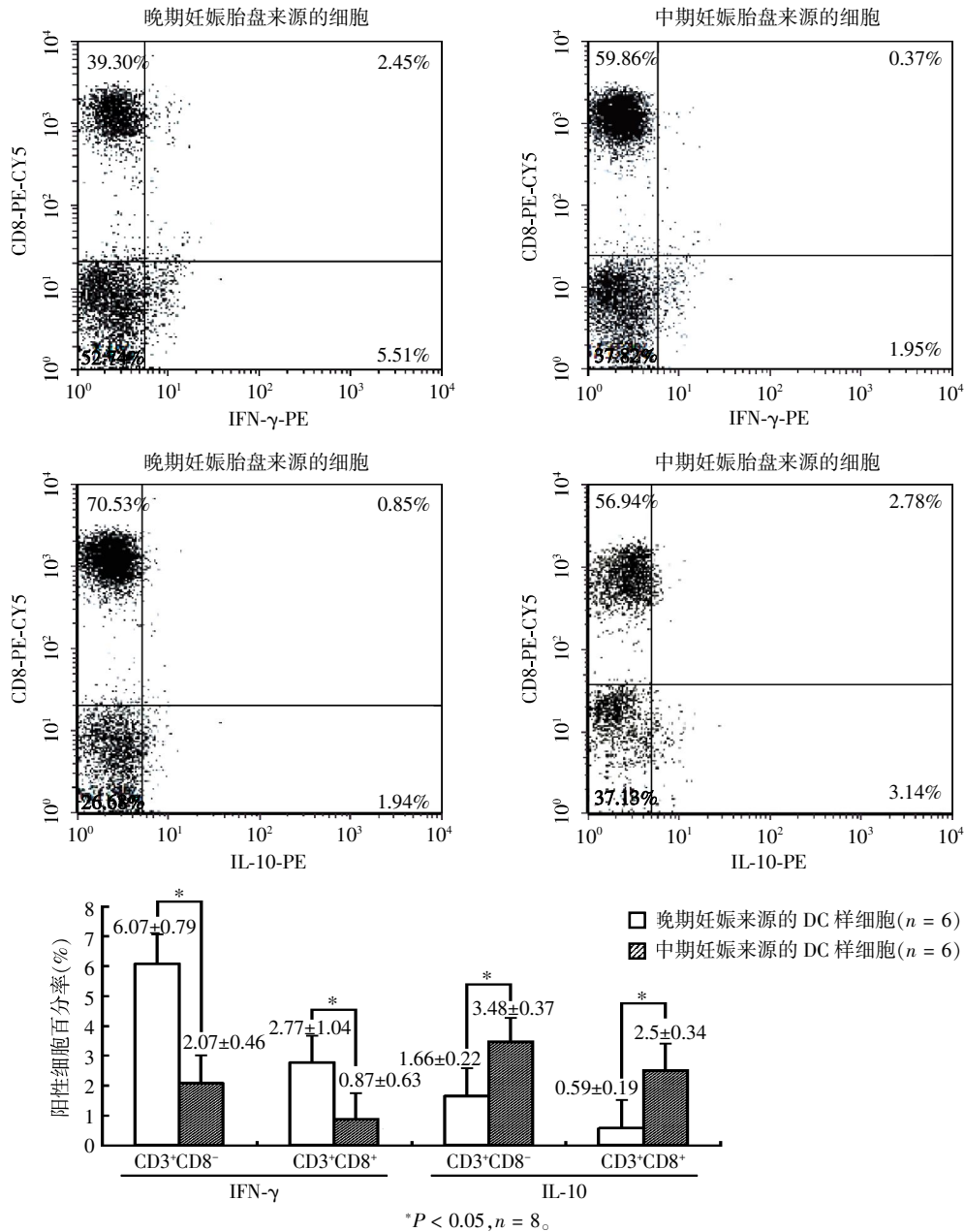


图 6 晚期和中期妊娠胎盘来源的 CD14⁺细胞经内皮(逆)穿越后分化形成的细胞刺激脐血同种异体淋巴细胞活化过程中 CD3⁺T 细胞胞内细胞因子表达的比较

Figure 6 Comparison of the cytokine expression of cord blood CD3⁺T-cell-stimulation of the cells induced from CD14⁺ through the transendothelial trafficking system derived from placental tissue in different gestational ages

3 讨论

树突状细胞是机体功能最强的专职抗原提呈细胞,能高效地摄取、加工处理和提呈抗原,处于启动、调控并维持免疫应答的中心环节。树突状细胞并不是均一的细胞群体,具有典型的异质性,如有不同的亚型、表现不同的功能特点。成熟的 DCs 主要发挥

免疫激活作用,而某些不成熟的 DCs 则可以诱导免疫耐受,即是说它不但具有激发免疫应答的能力,还可以下调免疫应答或诱导免疫耐受的产生。已有许多重要研究提示 DCs 在妊娠耐受以及分娩发动中起重要作用^[7]。然而,在妊娠发展过程中,DCs 伴随着母体内多种因素的影响形成不同的功能变化,在妊娠中期和妊娠晚期所发挥的功能是相当复杂的。

本实验先建立了单核-巨噬细胞经内皮单层(逆)穿越分化形成树突样细胞的模型,取妊娠晚期胎盘组织的单核-巨噬细胞经过正、逆向 2 次穿越后,于内皮细胞上方收集重返细胞,发现该群细胞高表达共刺激分子 CD80、CD86 和 Th1 型分化诱导因子 IL-12,能强有力地刺激同种异体脐血淋巴细胞活化增殖,表现出具有免疫激活作用的 DC 样细胞特点。而妊娠中期的单核-巨噬细胞经过穿越后,重返内皮细胞上方的细胞表达低水平的 CD80、CD86 和 IL-12,却相对高表达 IL-10,刺激同种异体淋巴细胞活化增殖的能力也很弱,表现出完全不同的免疫学特性。

免疫应答的产生需要双信号刺激。DCs 细胞刺激 T 细胞活化的过程中,T 细胞抗原受体(TCR)识别 DCs 提供的抗原肽:MHC 分子复合物为第一信号,另外还需要协同刺激信号分子与 T 细胞结合形成第二信号。第二信号的存在与否及其强度决定了与其相互作用的 T 细胞的反应状态^[8]。本研究中,晚期妊娠胎盘来源的 DC 样细胞高表达 CD80、CD86,提供了协同刺激信号,具有较强的刺激脐血淋巴细胞增殖的能力,而中期妊娠胎盘来源的 DC 样细胞表达的 CD80、CD86 水平和刺激脐血淋巴细胞增殖的能力则低得多,这与本实验室先前报道的刺激成人外周血淋巴细胞的结果相一致^[9]。但与成人外周血淋巴细胞相比,刺激脐血淋巴细胞增殖的刺激指数在效靶比 1:10 时仍在 12 以下,而对成人外周血淋巴细胞的刺激指数则可达到 18 左右^[9]。究其原因,可能与脐血淋巴细胞大多数呈幼稚型或处于抑制状态,成熟 T 淋巴细胞数量不足有关^[10]。而低表达共刺激分子如 CD80、CD86 的 DCs 与诱导免疫耐受有关。

随着妊娠期的进展,蜕膜组织的 DCs 的数量以及分布发生着动态的变化,预示在妊娠的不同阶段,不同成熟状态的 DCs 可能发挥着不同的功能,进而调节着免疫反应向 Th1 或 Th2 极化^[11]。树突状细胞介导的免疫反应的类型特点,不但与其表面的共刺激分子 CD80、CD86 有关,其合成分泌的细胞因子也较大程度影响着免疫反应的进行^[12]。妊娠过程中,母体内 Th1、Th2 型细胞因子的改变和新的动态平衡的建立,有利于受精卵的着床和胎儿的发育,使妊娠得以正常进行^[13-14]。Th1 型细胞因子抑制绒毛膜促性腺激素(HCG)的分泌和蜕膜蛋白的合成,诱导滋养层细胞凋亡,直接或间接损害胎盘组织及胎儿。IL-12 是细胞免疫应答中的一种重要的调节剂,为

重要的 Th1 型细胞因子^[15],在调节 Th1/Th2 平衡中起重要作用,可诱导 Th1 亚群的形成,避免 Th2 优势活化,介导 Th1 型免疫反应,不利于妊娠。IL-10 是一种对免疫应答进行负性调控的细胞因子^[16],多种负性调节 T 细胞如 Th3、Tr1 及某些 CD8⁺T 细胞均可通过表达释放 IL-10 而对效应性 T 细胞发挥免疫抑制作用^[17-18]。在本实验中,妊娠晚期胎盘来源的 CD14⁺细胞所诱导形成的树突样细胞经 LPS 刺激后,分泌较多的 IL-12,促进 Th1 型分化,不利于妊娠;而妊娠中期胎盘来源的 CD14⁺细胞所诱导形成的细胞经刺激后分泌较少的 IL-12,不利于 Th1 型分化,且分泌较高水平的 IL-10,可能具有诱导免疫抑制或免疫耐受的作用而有利于妊娠的维持。

本实验中还对妊娠不同时期胎盘来源的单核-巨噬细胞经内皮单层(逆)穿越诱导分化后,刺激同种异体脐血淋巴细胞活化过程中,T 细胞胞内 IFN- γ 和 IL-10 两种代表性功能性细胞因子的表达进行了分析。将脐血白细胞经过贴壁黏附过程,去除具有贴壁黏附、向巨噬细胞分化能力的单核细胞,使 T 细胞进一步富集,达到 70%左右,用于淋巴细胞活化增殖试验。妊娠晚期胎盘来源的单核-巨噬细胞经内皮单层(逆)穿越诱导分化后,不仅刺激同种异体脐血淋巴细胞活化增殖,而且其中所形成的 IFN- γ ⁺T 细胞,不论是 CD3⁺CD8⁺亚群或是在 CD3⁺CD4⁺亚群,都显著高于与中期妊娠胎盘来源的细胞共育的结果;而中期妊娠胎盘来源的细胞则能诱导出更多的产生 IL-10 的 T 细胞。这些结果显示,妊娠不同时期胎盘来源的单核-巨噬细胞经内皮单层(逆)穿越分化后形成的细胞群能诱导 T 细胞向不同方向分化,晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化形成的 DC 样细胞能诱导 Th1 方向的分化;而中期妊娠胎盘来源的细胞则可能诱导具有抑制作用的 T 细胞亚群的分化。本实验室在先前的实验中曾用成人外周血淋巴细胞揭示了这一现象。由于成人外周血 T 细胞中含有许多抗原特异性淋巴细胞,是一个经过环境抗原刺激、诱导分化的成熟 T 细胞库。本实验中以新生儿脐血淋巴细胞再次得出了相同的结果,进一步证实了上述结论。由于新生儿脐血淋巴细胞相对较原始,受环境抗原的影响甚少,因此这一结果更具可靠性。

从这些研究结果来看,妊娠不同时期单核-巨噬细胞来源的树突样细胞分别参与了妊娠中期对胎儿抗原的免疫耐受和妊娠晚期的免疫激活。但妊娠过程是相当复杂的过程,有关树突样细胞如何参与

妊娠的过程还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(4): 1438-1446
- [2] Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, et al. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking [J]. *Science*, 1998, 282(5): 480-483
- [3] 张明顺, 张江全, 王慧娟, 等. 内皮细胞穿越模型中系统性红斑狼疮患者树突状细胞分化及功能状态的初步研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10(1): 118-122
- [4] 张江全, 季晓辉, 张明顺, 等. 人类系统性红斑狼疮血清对内皮(逆)穿越模型中树突状细胞表型成熟的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2005, 25(5): 337-340
- [5] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52(11): 2745-2756
- [6] Hakkert BC, Rentenaar JM, Van Aken WG, et al. A three-dimensional model system to study the interactions between human leukocytes and endothelial cells [J]. *Eur J Immunol*, 1990, 20(12): 2775-2781
- [7] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, 392(6673): 245-252
- [8] Abe R. Regulation of immune response by T cell co-signaling[J]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2005, 28(1): 21-32
- [9] 张晓洁, 季晓辉, 何敏, 等. 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源的树突样细胞刺激T细胞作用的比较[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29(9): 1208-1214
- [10] 王梦玖. 临床生殖免疫学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 279-281
- [11] Kammerer U, Kurse A, Barrientos G, et al. Role of dendritic cells in the regulation of maternal immune responses to the fetus during mammalian gestation[J]. *Immunol Invest*, 2008, 37(5): 499-533
- [12] Whelan M, Harnett MM, Houston KM, et al. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6453-6460
- [13] 张静, 王红霞, 周建慧, 等. 自然流产患者蜕膜组织TH1/TH2型细胞的变化[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(4): 574-575
- [14] 秦明春, 王若光. 妊娠免疫耐受机制的研究[J]. *实用预防医学*, 2007, 14(2): 587-589
- [15] Doucet C, Brouty Boye D, Pottin Clemenceau C, et al. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(10): 2129-2139
- [16] Rivera DL, Ollister SM, Liu X, et al. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise[J]. *FASEB J*, 1998, 12(2): 189-197
- [17] Asseman C, Read S, Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice control by CD4+ regulatory T cells and IL-10 [J]. *J Immunol*, 171(2): 971-978
- [18] Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, et al. Tr1 cells: from discovery to their clinical application [J]. *Semin Immunol*, 2006, 18(2): 120-127

[收稿日期] 2012-04-28