

吲哚胺 2,3-双加氧酶及 IL-12/IL-10 细胞因子平衡与妊娠免疫耐受

王萍萍¹, 王增艳², 代秀云¹, 王增芳¹, 王培英¹

(¹潍坊市妇幼保健院妇产科, 山东 潍坊 261000; ²诸城市人民医院麻醉科, 山东 诸城 262200)

[摘要] 目的: 观察妊娠不同时期胎盘来源的单核-巨噬细胞吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)的表达及细胞因子白细胞介素(IL)-10、IL-12 的分泌情况, 探讨其在妊娠免疫耐受中的可能作用。方法: 机械分离中期妊娠(21周 \pm 3天, 19例)及足月妊娠(39周 \pm 5天, 25例)胎盘中的单核-巨噬细胞, ELISA法检测其分泌 IL-10、IL-12 的水平; RT-PCR及 Western blot 法分别检测 IDO mRNA 及蛋白水平的表达; 以 CCK-8 法检测其激发同种异体 T 细胞增殖能力的不同。结果: 足月妊娠较中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞产生更多的 IL-12, 但 IL-10 及 IDO 的表达较之明显减低; 并且, 足月妊娠较中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力更强。结论: 中期及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞参与维持妊娠免疫耐受及分娩发动可能与其调节 IL-12/IL-10 细胞因子平衡及影响 IDO 的表达有关, 但 IL-12/IL-10 细胞因子平衡与单核-巨噬细胞 IDO 表达的关系还有待进一步研究。

[关键词] 妊娠; 胎盘; 单核-巨噬细胞; 免疫耐受; 吲哚胺 2,3-双加氧酶

[中图分类号] R714

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1400-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20131014

Association of indoleamine 2,3-dioxygenase and IL-12/IL-10 balance with pregnant tolerance

Wang Pingping¹, Wang Zengyan², Dai Xiuyun¹, Wang Zengfang¹, Wang Peiying¹

(¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Weifang Hospital of Maternal and Child Health, Weifang 261000;

²Department of Anesthesia, People's Hospital of Zhucheng, Zhucheng 262200, China)

[Abstract] **Objective:** To estimate the possible effect of placental monocyte-macrophages on the pregnant immunological tolerance by observing the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and the secretion of IL-10 and IL-12 in cells from different gestational phases. **Methods:** Monocyte-macrophages cells were separated mechanically from normal term (39 weeks \pm 5 days, 25 cases) and midtrimester (21 weeks \pm 3 days, 19 cases) placental tissues. The cytokines including IL-12 and IL-10 were assayed by ELISA, while the expression of IDO was measured by RT-PCR and Western blot, respectively. The monocyte-macrophages cells derived from placental tissue in different gestational phases were co-cultured with allogeneic T cells in order to detect their abilities in stimulating the proliferation of allogeneic T cells detected by CCK-8. **Results:** Monocyte-macrophages cells from normal term placental tissues secreted high level of IL-12, but expressed low levels of IL-10 and IDO. Besides, monocyte-macrophages cells from normal term placental tissues were more powerful in promoting the proliferation of allogeneic T cells than the cells from midtrimester term placental tissues. **Conclusion:** Monocyte-macrophages cells from normal term and midtrimester placental tissues may play roles in the maintenance of pregnant immunological tolerance and delivery possibly by placental tissue in different gestational phases possess different biological characters, which possibly by regulating the IL-12/IL-10 balance and IDO expression. However, the association of IL-12/IL-10 balance with the expression of IDO needs further elucidation.

[Key words] pregnancy; placenta; monocyte-macrophages; immunological tolerance; indoleamine 2,3-dioxygenase

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1400-1404]

妊娠是一个复杂而协调的过程, 母体对胎儿的免疫耐受是决定妊娠成功与否的关键。胚胎作为一种半同种异体抗原组织进入母体, 却未受到排斥而

存活, 这种神奇的母胎耐受作用引起广大学者的关注。随着分子生物学技术的飞速发展, 妊娠免疫耐受机制的研究也不断深入, 但至今尚无定论。研究发

现,吡啶胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)作为一种可催化色氨酸分子分解代谢的酶,能够通过耗竭色氨酸直接抑制 T 淋巴细胞,也可通过影响抗原提呈细胞和调节性 T 细胞的功能而发挥免疫抑制功能^[1-2]。IDO 广泛表达于母-胎界面,可能参与母体对胎儿免疫耐受的调节。因此推测,妊娠不同时期胎盘来源的单核-巨噬细胞具有不同的生物学功能,可能通过调节 IDO 的表达参与母胎免疫耐受维持及分娩的发动。本文通过观察中期妊娠及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞 IL-12、IL-10 细胞因子的分泌及 IDO 表达的差异,进一步探讨妊娠免疫耐受维持的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

足月妊娠(孕 37~40 周)胎盘取自山东省潍坊市妇幼保健院足月、自然分娩的产妇,无妊娠并发症及合并症,平均孕周为 39 周 ± 5 天,共 25 例。中期妊娠(孕 16~26 周)的胎盘取自潍坊市妇幼保健院无妊娠并发症及合并症,自愿终止妊娠,行米非司酮和米索前列醇联合药物引产的健康妇女,平均孕周为 21 周 ± 3 天,共 19 例。

RPMI1640、胎牛血清(fetal calf serum,FCS,GIBCO BRL 公司,美国);人淋巴细胞分离液(天津 TBD 生物技术发展中心);佛波酯(PMA,Sigma 公司,美国);总 RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国);IL-10、IL-12 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(R&D Systems,美国);细胞裂解液 RIPA(上海碧云天生物技术有限公司);BCA 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司);小鼠抗人 IDO 抗体(SC-376413,Cell Signalling 公司,美国);HRP 标记的 GAPDH 单克隆抗体(南京康成生物科技有限公司);ECL 发光试剂盒(Millipore 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 胎盘单核-巨噬细胞的分离

新鲜无菌中期妊娠及足月分娩的胎盘,多点采集母体面的胎盘组织,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗涤数次至无明显的血凝块,置于筛网上,剪切成直径约 1 mm 的组织块,PBS 淋洗后进行研磨,纱布过滤,滤液收集至 50 ml 离心管中,2 000 r/min 离心 15 min,收集细胞。采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法获取单个核细胞,用于后

续试验。

1.2.2 同种异体 T 淋巴细胞的富集

采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离健康成人献血者外周血中的单个核细胞,用含 10%FCS 的 RPMI1640 培养基重悬,37℃孵育 6 h,收集未贴壁细胞,培养基洗涤、离心获取淋巴细胞。

1.2.3 CCK-8 法检测不同时期胎盘来源单核-巨噬细胞刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力

将分离的单核-巨噬细胞分别按照 2×10^4 、 1×10^4 、 4×10^3 、 2×10^3 个/孔种于 96 孔细胞培养板,加入健康成人外周血淋巴细胞 2×10^5 个/孔,再加入 PMA(10 ng/ml),37℃孵育 96 h,然后加入 CCK-8 试剂 20 μ l,继续孵育 2 h 测定光密度(optical density, OD),计算刺激指数(stimulating index, SI): $SI = (\text{实验孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}) / (\text{阴性对照孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值})$ 。

1.2.4 IDO 蛋白免疫印迹检测(Western blot)

获取细胞全蛋白,100℃煮沸 5 min 使蛋白充分变性。BCA 蛋白含量检测试剂盒进行蛋白定量后,加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后进行电泳。湿转法转膜后,用含 5%脱脂奶粉的 TBST(20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.1% Tween-20)室温封闭 PVDF 膜 2 h;先后浸于用 TBST 稀释的小鼠抗人 IDO(1:200)的抗体及 TBST 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG(1:5 000)中,室温孵育 1.5~2.0 h;ECL 发光试剂盒进行化学发光检测。

1.2.5 总 RNA 抽提及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

总 RNA 的提取完全按照 TRIzol 试剂说明书进行。按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录获得 cDNA,逆转录体系共 25 μ l。然后以 cDNA 为模板进行 PCR,扩增 IDO 与 β -actin 的基因编码片段。IDO 引物:上游 5'-CGAGGGGATGATGATATTCG-3',下游 5'-GGTGTCTGGATCCACGAAGT-3',产物大小为 396 bp; β -actin 引物:上游 5'-CTCCATCTGGCCTC-GCTGT-3',下游 5'-GCTGTACCTTCACCGTTCC-3',产物大小为 264 bp。IDO 与 β -actin 的退火温度均为 59℃。扩增条件均为:94℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环,72℃末次延伸 10 min。PCR 体系共 12.5 μ l。

1.2.6 ELISA 实验测定 IL-12、IL-10 水平

按照 IL-12、IL-10 ELISA 试剂盒的说明书进行操作,用酶标仪于 450 nm 波长处(630 nm 作为参考波长)检测吸光度。根据标准曲线计算 IL-12、IL-10

浓度。

1.3 统计学方法

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS11.3 软件进行统计学分析。两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *q* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 中期妊娠及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分泌细胞因子 IL-12/IL-10 的差异

足月妊娠较中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞经 PMA 活化后能够分泌高水平的 IL-12 ($P < 0.001$); 而中期妊娠较足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分泌较多 IL-10 ($P < 0.001$, 图 1)。

2.2 中期妊娠及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞 IDO 的表达差异

足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞 IDO mRNA 表达水平较中期妊娠低(图 2)。足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞 IDO 表达很少, 而中期妊娠胎盘来源的单核巨噬细胞则能够高表达 IDO。IDO 蛋白水平的表达变化与其 mRNA 变化相一致(图 3)。

2.3 中期妊娠及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力

与中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞相比, 足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞具有很强的刺激 T 淋巴细胞增殖的能力, 表现为效应细胞:靶细胞 (effect cell:target cell) 比例即使降至 1:100, 足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞仍具有较强的刺激淋巴细胞增殖的能力 ($P < 0.001$, 图 4)。中期妊娠胎盘

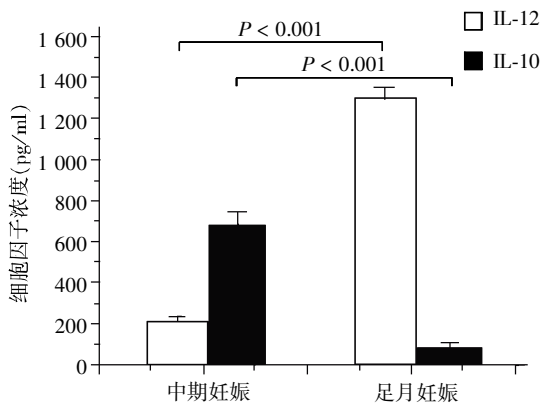
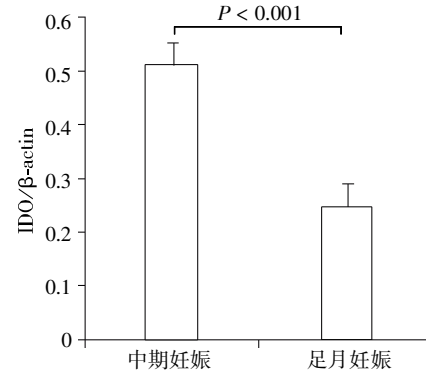
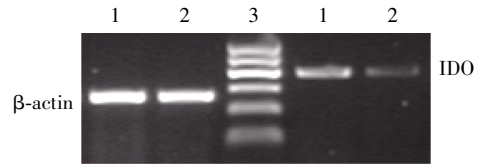


图 1 中期及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分泌 IL-12、IL-10 的差异

Figure 1 Secretion of IL-12 and IL-10 from monocyte-macrophages cells in pregnant stages of normal term and midtrimester



1: 中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞; 2: 足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞; 3: Marker 条带, 分别为 600、500、400、300、200、100 bp。

图 2 中期妊娠及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞 IDO mRNA 表达的差异

Figure 2 Different expression of IDO mRNA in monocyte-macrophages cells from normal term and midtrimester placental tissues

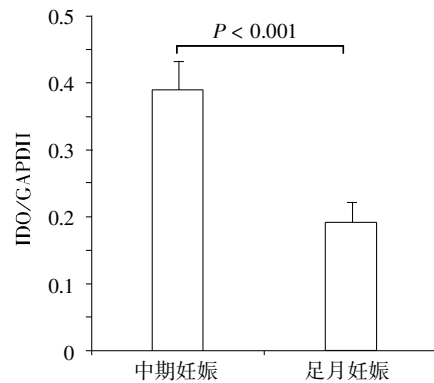
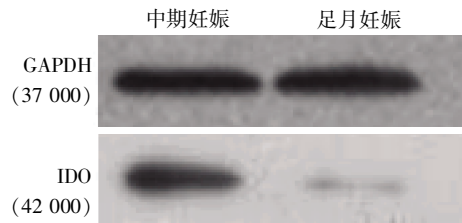


图 3 中期妊娠及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞 IDO 蛋白表达的差异

Figure 3 Different expression of IDO in monocyte-macrophages cells from normal term and midtrimester placental tissues

来源的单核-巨噬细胞也能够刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖,但是刺激能力明显低于足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞。

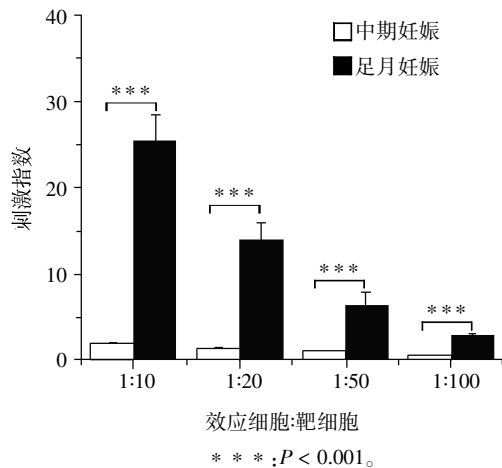


图 4 CCK-8 法检测中期妊娠及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞刺激同种异体 T 淋巴细胞的增殖能力

Figure 4 Efficiency of monocyte-macrophages cells from normal term and midtrimester placental tissues on the proliferative capacity of allogeneic T lymphocyte

3 讨论

母-胎界面免疫耐受的维持是妊娠成功的基础。在早、中期妊娠时,母-胎界面局部免疫微环境有利于妊娠的建立、维持以及胎儿的生长发育,至妊娠晚期,母胎界面的免疫微环境发生变化,为分娩发动做准备^[3]。母-胎界面免疫微环境紊乱会导致免疫耐受失衡,导致先兆子痫、妊娠期高血压综合征等病理妊娠的发生^[4]。

IDO 是一种含亚铁血红素的单体蛋白,是肝脏以外唯一可催化色氨酸分子分解代谢的酶,广泛表达于单核-巨噬细胞、树突状细胞、T 淋巴细胞等免疫细胞^[5]。大量研究提示,IDO 具有免疫抑制作用,譬如抑制 T 淋巴细胞反应、促进调节性 T 细胞的分化及抑制肿瘤进展等^[6-7]。Munn 等^[8]报道,单核-巨噬细胞表达的 IDO 能够通过降解色氨酸而抑制 T 淋巴细胞的增殖。IDO⁺的抗原递呈细胞在体内外均能诱导初始 T 细胞(naive T cell)分化成 Treg 细胞, Treg 细胞的存在可能是母胎免疫耐受时维持 Th1/Th2 细胞亚群平衡的关键所在^[9]。IDO⁺的树突状细胞可能通过激活 T 细胞表面的蛋白激酶进而抑制 T 细胞的增殖和活性或通过诱导 Treg 细胞的形成发挥免疫调节作用^[10]。

IDO 与多种临床多发病、常见病相关。有学者提

出,IDO 能够通过降解色氨酸控制或者下调过敏症患者变应原特异的 T 淋巴细胞反应^[11-12]。Toldi 等^[13]发现,先兆子痫患者表达 IDO 的 T 淋巴细胞数量明显低于健康妊娠者,提示 IDO 的表达可能与先兆子痫的发生有关,进而参与妊娠特异的免疫耐受调节。有研究报道,正常足月妊娠胎盘与妊娠期高血压患者的胎盘细胞相比,其 IDO 的表达水平更高^[14]。早孕、晚孕期胎盘合体滋养细胞和内皮细胞中均可见较多的 IDO 表达,此外,早孕和足月蜕膜中也可见具有典型侵袭性绒毛外滋养细胞特征的细胞高表达 IDO^[15]。但是,目前有关单核-巨噬细胞 IDO 的表达变化与妊娠免疫耐受关联的报道很少,缺乏有力的证据。单核-巨噬细胞作为胎盘组织中主要的免疫细胞之一,本文推测,妊娠不同时期胎盘来源的单核-巨噬细胞可能具有不同的生物学功能,其 IDO 的表达变化可能在母胎免疫耐受维持及分娩的发动过程中扮演重要角色。本组研究发现,足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞较中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞表达 IDO 水平低,但刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力较强,这一差异可能与 IL-12/IL-10 细胞因子平衡的调节有关。也就是说,高水平表达 IDO 的单核-巨噬细胞能够通过抑制淋巴细胞的过度增殖,从而抑制妊娠中期免疫微环境的过度激活,以维持妊娠耐受;而足月妊娠时,胎盘来源的单核-巨噬细胞低表达 IDO,对淋巴细胞增殖的抑制作用减弱,从而打破了妊娠免疫耐受,机体处于免疫激活状态,有利于胎儿的成功分娩。

IDO 参与免疫耐受的分子信号机制复杂。研究提示, γ -干扰素(IFN- γ)能够通过调节信号转导和活化转录子 1(STAT1) 及干扰素调节因子 1(IRF1) 进一步诱导细胞表达 IDO^[16]。本文仅仅初步探讨了中期及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞 IDO 表达的差异及与 IL-12/IL-10 细胞因子平衡调节的关系,对于它们如何在妊娠免疫耐受的维持及分娩发动过程中相互作用,有待于深入研究。

在不同的内环境影响下,CD4⁺T 细胞可分化为 Th1 型、Th2 型细胞亚群,发挥不同的免疫调节作用^[17]。Th1 型细胞对妊娠过程具有免疫损伤作用, Th2 型细胞则对妊娠具有保护作用,两个细胞亚群相互影响及制约,决定机体细胞免疫与体液免疫的平衡,其复杂变化的细胞因子网络影响生殖过程的各个环节。胚胎植入时,胎盘局部微环境的细胞因子以 IL-4、IL-10 等 Th2 型为主,利于维持母体对胎儿的免疫耐受;在妊娠晚期分娩发动时,局部微环境

发生微妙变化,细胞因子以 IL-12、IFN- γ 等 Th1 型细胞因子为主^[18]。本文研究发现,足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞高分泌 IL-12,低分泌 IL-10,在一定程度上刺激了淋巴细胞的增殖,参与免疫激活;而中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞高分泌 IL-10,低分泌 IL-12,通过抑制淋巴细胞的增殖参与维持免疫耐受,同时提示妊娠不同时期细胞因子网络的平衡是妊娠耐受的重要机制。但是,IL-12/IL-10 细胞因子平衡如何调节单核-巨噬细胞 IDO 的表达尚不清楚。

综上所述,中期及足月妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞参与维持妊娠免疫耐受及分娩发动可能与 IL-12/IL-10 细胞因子平衡及 IDO 的表达变化有关。IDO 可能通过抑制 T 淋巴细胞增殖,在妊娠免疫耐受中发挥重要而复杂的作用,是妊娠免疫耐受的重要机制之一。但是,IL-12/IL-10 细胞因子平衡与 IDO 表达的关系及 IDO 参与妊娠免疫耐受的分子信号机制有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Catani L, Sollazzo D, Trabonelli S, et al. Decreased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in dendritic cells contributes to impaired regulatory T cell development in immune thrombocytopenia [J]. *Ann Hematol*, 2013, 92(1): 67-78
- [2] Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(8): 1932-1937
- [3] D'Addio F, Riella LV, Mfarrej BG, et al. The link between the PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance [J]. *J Immunol*, 2011, 187(9): 4530-4541
- [4] Birkeland SA, Kristofferson K. Pre-eclampsia--a state of mother-fetus immune imbalance [J]. *Lancet*, 1979, 2(8145): 720-723
- [5] Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(10): 762-774
- [6] Noh KT, Chae SH, Chun SH, et al. Resveratrol suppresses tumor progression via the regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(2): 348-353
- [7] Cesario A, Rocca B, Rutella S. The interplay between indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and cyclooxygenase (COX)-2 in chronic inflammation and cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(15): 2263-2271
- [8] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism [J]. *Science*, 1998, 281(5380): 1191-1193
- [9] Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes [J]. *Blood*, 2003, 102(12): 4107-4114
- [10] Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response [J]. *Immunol Cell Biol*, 2003, 81(4): 247-265
- [11] von Bubnoff D, Hanau D, Wenzel J, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing antigen-presenting cells and peripheral T-cell tolerance: another piece to the atopic puzzle [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(5): 854-860
- [12] Honkanen T, Luukkainen A, Lehtonen M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and antrochoanal polyps [J]. *Rhinology*, 2011, 49(3): 356-363
- [13] Toldi G, Vasarhelyi B, Biro E, et al. B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase expression in peripheral blood of healthy pregnant and pre-eclamptic women [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 69(3): 264-271
- [14] Santoso DI, Rogers P, Wallace EM, et al. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae [J]. *Placenta*, 2002, 23(5): 373-379
- [15] Hönig A, Rieger L, Kapp M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance [J]. *J Reprod Immunol*, 2004, 61(2): 79-86
- [16] Shirey KA, Jung JY, Maeder GS, et al. Upregulation of IFN receptor expression by proinflammatory cytokines influences IDO activity in epithelial cells [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2006, 26(1): 5-62
- [17] Emerudh J, Berg G, Mjösberg J. Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2011, 66(Suppl 1): 31-43
- [18] Nelson DM, Smith SD, Furesz TC, et al. Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284(2): C310-315

[收稿日期] 2013-05-25