

中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮穿越后免疫调节活性的比较

侯云华¹, 王慧娟², 杨晓帆², 季晓辉^{2*}

(¹无锡卫生高等职业技术学校护理学系, 江苏 无锡 214082; ²南京医科大学微生物与免疫学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮穿越分化后免疫调节活性的差异。方法: 分离新生儿脐静脉内皮细胞, 建立单层内皮细胞。分离中、晚期妊娠胎盘 CD14⁺ 单核-巨噬细胞, 与单层内皮细胞共培养诱导其分化。以 ELISA 法检测经内皮单层诱导分化前后单核-巨噬细胞培养上清中的 IL-12、IL-10 水平; 以流式细胞术检测经内皮穿越而分化的细胞诱导同种异型脐血淋巴细胞 CD69 分子和核因子 Foxp3 的表达。结果: ①晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞 IL-12 分泌水平显著高于 IL-10 分泌水平显著低于中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞, 培养上清中 IL-10/IL-12 比值在晚期和中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞中分别为 2.59 ± 0.71 和 71.4 ± 8.49 ; 经内皮单层穿越诱导分化后, 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞 IL-12 分泌水平均显著增高, IL-10 分泌水平则显著降低, 但晚期妊娠单核-巨噬细胞 IL-12 分泌水平提高倍数不及中期妊娠单核-巨噬细胞 [(2.00 ± 0.35) 倍 *vs* (8.91 ± 1.49) 倍], 而 IL-10 分泌水平下降比中期妊娠显著 [$(92.1 \pm 8.2)\%$ *vs* $(57.8 \pm 4.98)\%$], 导致 IL-10/IL-12 比值下降仅到 0.11 ± 0.04 , 而中期妊娠单核-巨噬细胞依然保持 IL-10/IL-12 比值 >1 (3.16 ± 0.96); ②两类细胞经内皮(逆)穿越后都能激活同种异型脐血 T 淋巴细胞表达 CD69, 其中晚期妊娠胎盘来源细胞的激活作用显著高于中期妊娠胎盘来源的细胞 [$(73.59 \pm 3.52)\%$ *vs* $(45.32 \pm 7.47)\%$]; ③在与同种异型脐血淋巴细胞共育的过程中, 与晚期妊娠胎盘来源的细胞相比, 中期妊娠胎盘来源的细胞则能诱导 T 细胞分化形成更多的 Foxp3⁺T 细胞。结论: 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮单层穿越系统的诱导培养, 可分化成具有不同免疫学特性的细胞。晚期妊娠胎盘来源的细胞经诱导分化后能刺激 T 细胞充分活化, 表达高水平 CD69, 而中期妊娠胎盘来源的细胞经分化后具有显著地诱导 Treg 的免疫调节活性。

[关键词] 妊娠; 胎盘; 单核-巨噬细胞; 分化; 免疫调节

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1469-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20141103

Changes of immunological activity of trans-endothelial trafficking monocyte-macrophages from the mid-term and late pregnancy placenta

Hou Yunhua¹, Wang Huijuan², Yang Xiaofan², Ji Xiaohui^{2*}

(¹Department of Nursing, Wuxi Advanced Vocational and Technical School of Health, Wuxi 214082; ²Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the differences of immunological activity of trans-endothelial trafficking monocyte-macrophage from mid-term placenta and late placenta. **Methods:** Umbilical vein endothelial cells were isolated and cultured for establishing endothelial cell monolayer. CD14⁺ monocyte-macrophage cells were separated from the mid-term placenta and late placenta and induced to differentiate by trafficking through the endothelial cell monolayer. We detected IL-12 and IL-10 levels of the culture supernatants with ELISA method before and after trafficking of monocyte-macrophages through endothelial cell monolayer. Flow cytometry was performed to detect the expressions of CD69 molecule and nuclear factor Foxp3 by allogeneic cord blood T lymphocyte co-cultured with differentiated monocyte-macrophages through transendothelial trafficking. **Results:** ① In the culture supernatant of monocyte-macrophages from late pregnancy placenta, IL-12 level was remarkably higher, while IL-10 level remarkably lower than those in the supernatant of the cells from mid-term pregnancy placenta, respectively. The ratio of IL-10/IL-12 was 2.59 ± 0.71 , remarkably lower than that in the supernatant of cells from mid-term placenta (71.4 ± 8.49). After trafficking through endothelial monolayer, IL-12 level increased, while IL-10 level decreased significantly in the supernatants of both cells from late

[基金项目] 江苏省生殖医学重点实验室对外开放课题(SZ200705)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: immune@njmu.edu.cn

placenta and mid-term placenta, and IL-10 level decreased more significantly in the supernatants of the cells from late pregnancy placenta than that from mid-term pregnancy placenta [(92.1 ± 8.2)% vs. (57.8 ± 4.98)%], so that IL-10/IL-12 ratio dropped down to less than 1 (0.11 ± 0.04) while the ratio remained more than 1 (3.16 ± 0.96) in the supernatants of the cells from mid-term placenta. ②After trafficking through endothelial monolayer, both cells from late placenta and mid-term pregnancy placenta activated allogenic cord blood T lymphocytes to express CD69, and CD69 expression level of T cells stimulated by the cells from late pregnancy placenta was significantly higher than that by the cells from mid-term placenta [(73.59 ± 3.52)% vs (45.32 ± 7.47)%]. ③After trafficking through endothelial monolayer, compared with the cells from late placenta, the cells from mid-term placenta induced allogenic cord blood T cells to differentiate into more Foxp3⁺ T cells. **Conclusion:** By trafficking through endothelial monolayer, monocyte-macrophages from mid-term and late pregnancy placenta differentiate into different cells with distinctively immunologic characteristics. After trafficking through endothelial monolayer, monocyte-macrophages from late pregnancy placenta differentiate into a kind of immunologically stimulatory cells which could fully stimulate T cells to activate and express high level of CD69, while monocyte-macrophages from mid-term pregnancy placenta differentiate into a kind of immunologically regulatory cells which are capable for inducing Treg.

[Key words] pregnancy; placenta; monocyte-macrophages; differentiation; immune regulation

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1469-1475]

胎盘组织中存在着许多免疫细胞,包括单核-巨噬细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)、T 细胞、NK 细胞等。在妊娠发生、发展的不同阶段,胎盘组织中的单核-巨噬细胞表现出不同的免疫学特性,可能与其在妊娠不同时期所扮演的不同功能角色相关。

本实验室先前已建立了单核-巨噬细胞经单层内皮(逆)穿越分化形成 DC 的模型^[1-2]。前期研究发现,足月胎盘组织中的单核-巨噬细胞可在体外单层内皮细胞(逆)穿越系统中被诱导分化,高表达 CD80/CD86 等共刺激分子和 HLA-DR,具有很强的刺激同种异型淋巴细胞增殖的能力,能诱导活化的 T 细胞分化形成更多的 IFN- γ 产生细胞,呈现了具有免疫激活功能的树突样细胞特征;而妊娠中期胎盘组织中的单核-巨噬细胞同样在内皮穿越系统中诱导培养,却并不高表达 CD80、CD86,不能获得刺激同种异型淋巴细胞增殖的能力,与其相互作用的 T 细胞被诱导分化形成更多的 IL-10 产生细胞^[3-5]。但这一结果有两个问题需要进一步解释:①妊娠中期胎盘组织中的单核-巨噬细胞在内皮穿越系统中培养,究竟有没有发生分化?因为中期妊娠胎盘组织中的单核-巨噬细胞本身也表达类似水平的 CD80、CD86,也不能明显刺激同种异型 T 细胞增殖^[6];②妊娠中期胎盘来源的单核-巨噬细胞在单层内皮(逆)穿越后究竟能不能引起同种异型 T 细胞的分化?因为它未能刺激同种异型 T 细胞增殖,是否对 T 细胞没有刺激作用?如果它对 T 细胞没有刺激作用,又如何诱导同种异型 T 细胞形成更多的 IL-10 产生细胞?因此,本研究试图通过比较中、晚期妊娠胎盘组织中单核-巨噬细胞经内皮(逆)穿越系统培养后

IL-10/IL-12 表达的变化、诱导同种异型 T 细胞活化表达 CD69 能力的变化以及诱导 T 细胞表达 Foxp3 能力的差异来提供进一步分析的线索,试图证明妊娠不同时期胎盘组织中的单核-巨噬细胞具有不同的免疫学分化潜能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 脐带、脐血和胎盘

本研究所用脐带、脐血、胎盘均取自江苏省妇幼保健卫生保健中心、淮安市妇幼保健医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要求。

1.1.2 试剂

荧光抗体:鼠抗人 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、CD69-PE、Foxp3-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(lipopolysaride, LPS)、佛波酯和离子霉素均购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 仪器

流式细胞仪(BD 公司, 美国), cliniBio128C 酶标仪(奥地利)。

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[1-2]。

1.2.2 胎盘单核-巨噬细胞的分离

按本室先前报道的方法分离中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞, 详细步骤见参考文献[4-5]。

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。分离细胞纯度达 93% 以上。

1.2.4 胎盘单核-巨噬细胞在内皮(逆)穿越体系中的诱导培养

按本室先前报道的方法^[3-5], 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 后收集逆向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)细胞表型检测

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

1.2.6 ELISA 法检测经内皮穿越体系中诱导培养的细胞所分泌的 IL-12、IL-10 水平

收集每孔逆向穿越后返回内皮单层上方的细胞, 调整细胞浓度至每孔 1×10^6 个, 加入 LPS 100 ng/ml, 在细胞培养板中 37°C、5%CO₂ 条件下继续培养 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), 具体步骤见参考文献[5], 收集 CD45⁺ CD3⁺ 细胞, 纯度达到 75% 以上。

1.2.8 流式细胞术检测细胞刺激同种异型脐血 T 淋巴细胞 CD69 的表达

将经内皮单层穿越诱导分化的细胞与同种异型

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 μ l, 在 37°C、5%CO₂ 环境下共育 6 h, 收集细胞, 加入 CD3-APC 抗体和 CD69-PE 抗体各 10 μ l, 室温避光孵育 30 min, PBS 液洗涤、离心、弃上清液, PBS 液悬浮细胞, 流式细胞仪检测并分析。

1.2.9 流式细胞术检测细胞刺激脐血 T 细胞胞内核因子 Foxp3 的表达

方案 1: 将上述分化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 200 μ l, 在 37°C、5 %CO₂ 环境下共育 72 h。在培养到第 68 h 时, 每孔再加入佛波酯 0.07 μ l(浓度为 3.5%)、离子霉素 0.2 μ l(浓度为 10%) 和 BFA 0.2 μ l(浓度为 10%), 继续培养 4 h, 收集细胞。标记流式抗体 CD3-APC, 避光孵育保存 30 min, D-hanks 液洗涤, 弃上清, 每管加入 F/P 破膜剂, 震荡, 4°C 避光保存 1 h, 然后缓冲液洗 2 次, 第 2 次弃上清后, 加入 1 μ l 大鼠血清封闭 15 min, 加入 Foxp3-PE 荧光抗体, 震荡, 4°C 避光保存 30 min, 最后缓冲液洗 2 次, 2% 多聚甲醛重悬, 流式检测 CD3⁺Foxp3⁺ 细胞。

方案 2: 无菌收集妊娠中期和晚期胎盘来源的经单层内皮穿越诱导分化的细胞, 与脐血淋巴细胞以 1:10 的比例混合, 以 5 ng/ml 的浓度加入 IL-2, 刺激脐血淋巴细胞培养 5 d(120 h), 收集细胞, 先标记流式抗体 CD3-APC, 再经破膜后标记 Foxp3-PE 荧光抗体, 操作步骤与方案 1 相同。流式细胞仪检测 CD3⁺Foxp3⁺ 细胞。

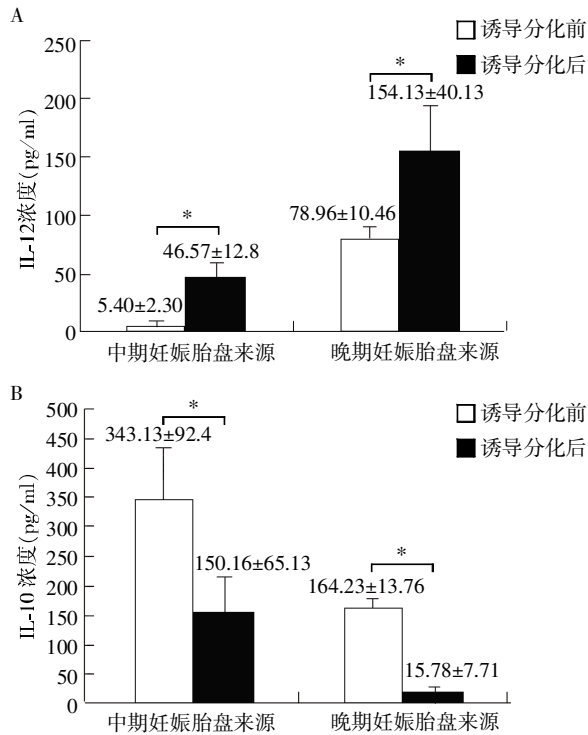
1.3 统计学方法

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* 检验的方法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮(逆)穿越系统诱导培养后 IL-12、IL-10 分泌水平的变化

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, 晚期妊娠胎盘来源的细胞经诱导分化后再与 LPS 共育, 其培养上清中 IL-12 含量较高、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、IL-10 含量较高, 二者间差异均有统计学意义(P 均 < 0.05 , 图 1)。



A: IL-12 浓度变化, 两组比较, * $P < 0.05$ ($n = 6$); B: IL-10 浓度变化, 两组比较, * $P < 0.05$ ($n = 6$).

图 1 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮(逆)穿越系统诱导培养后 IL-12、IL-10 分泌水平的变化

Figure 1 Comparison of levels of IL-12 (A) and IL-10 (B) secreted by DC-like cells induced from monocyte-macrophages derived from placental tissue in different gestational ages

胎盘单核-巨噬细胞分泌较低水平的 IL-12、较高水平的 IL-10。相比之下,中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞产生的 IL-12 水平显著低于、产生的 IL-10 水平则显著高于晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞,IL-10/IL-12 比值在中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞中高达 71.4 ± 8.49 ,而在晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞却仅为 2.59 ± 0.71 ($P < 0.001$)。经内皮(逆)穿越系统诱导培养后,两类细胞均发生了显著改变,表现为分泌 IL-12 水平均显著增高、分泌 IL-10 水平均显著下降,导致 IL-10/IL-12 比值也显著下降。然而,中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经诱导培养后,尽管 IL-12 分泌水平显著提高了 (8.91 ± 1.49) 倍,IL-10 分泌水平下降了 (57.8 ± 4.98)%,依然保持着 IL-10 绝对值水平显著高于 IL-12 绝对值水平的特点,使得 IL-10/IL-12 比值尽管显著下降,但仍 >1 (3.16 ± 0.96);而晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经诱导后 IL-10 分泌水平降低极其显著,下降了 (92.1 ± 8.2)%,IL-12

水平进一步增高[增高了 (2.00 ± 0.35) 倍],导致 IL-10 与 IL-12 水平形成倒置,即 $IL-10/IL-12 < 1$ (0.11 ± 0.04)。

2.2 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮穿越系统诱导培养后激活同种异型脐血 T 细胞表达 CD69 能力的变化

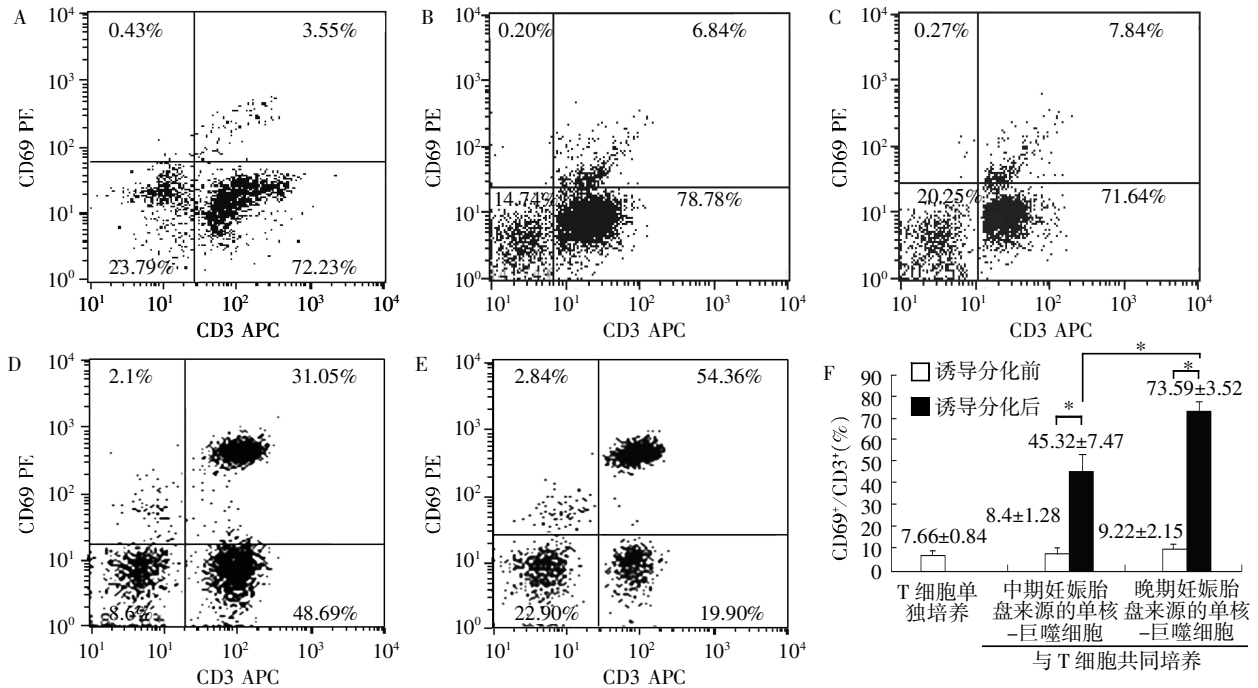
脐血淋巴细胞单独培养 6 h,CD69 的表达很低,其阳性表达率为 (4.74 ± 0.04)%。无论中或晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞均不能激活同种异型脐血 T 细胞,显著增高 CD69 的表达;但经内皮穿越系统诱导后则均获得了激活同种异型脐血 T 细胞表达 CD69 的能力,而晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞经内皮穿越后激活脐血 T 细胞表达 CD69 的能力显著高于经内皮穿越诱导后的中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞(图 2)。

2.3 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮穿越系统诱导培养后诱导同种异型脐血 T 细胞表达 Foxp3 能力的差异

以流式检测 CD3⁺T 细胞内的核因子 Foxp3 的结果显示,中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经诱导分化后,在不含 IL-2 的方案 1 培养体系中,刺激同种异型脐血淋巴细胞一定程度活化的同时,能诱导一定数量的 CD3⁺T 细胞表达 Foxp3,CD3⁺Foxp3⁺ 细胞比例达 (6.65 ± 0.02)%,而晚期妊娠胎盘来源的细胞分化后则没有此种能力,其与同种异型脐血淋巴细胞混合培养 48 h 后,其中 CD3⁺Foxp3⁺ 细胞的比例仅有 (2.53 ± 0.01)%,两者间差异有统计学意义 ($P < 0.05$);加入终浓度 5 ng/ml 的 IL-2 的方案 2 与脐血淋巴细胞进行 5 d 的混合培养,由中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞分化而来的细胞能诱导同种异型脐血 T 细胞表达高水平的 Foxp3,由晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞分化而来的细胞诱导同种异型脐血 T 细胞表达 Foxp3 的水平显著低于由中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞分化而来的细胞(图 3)。

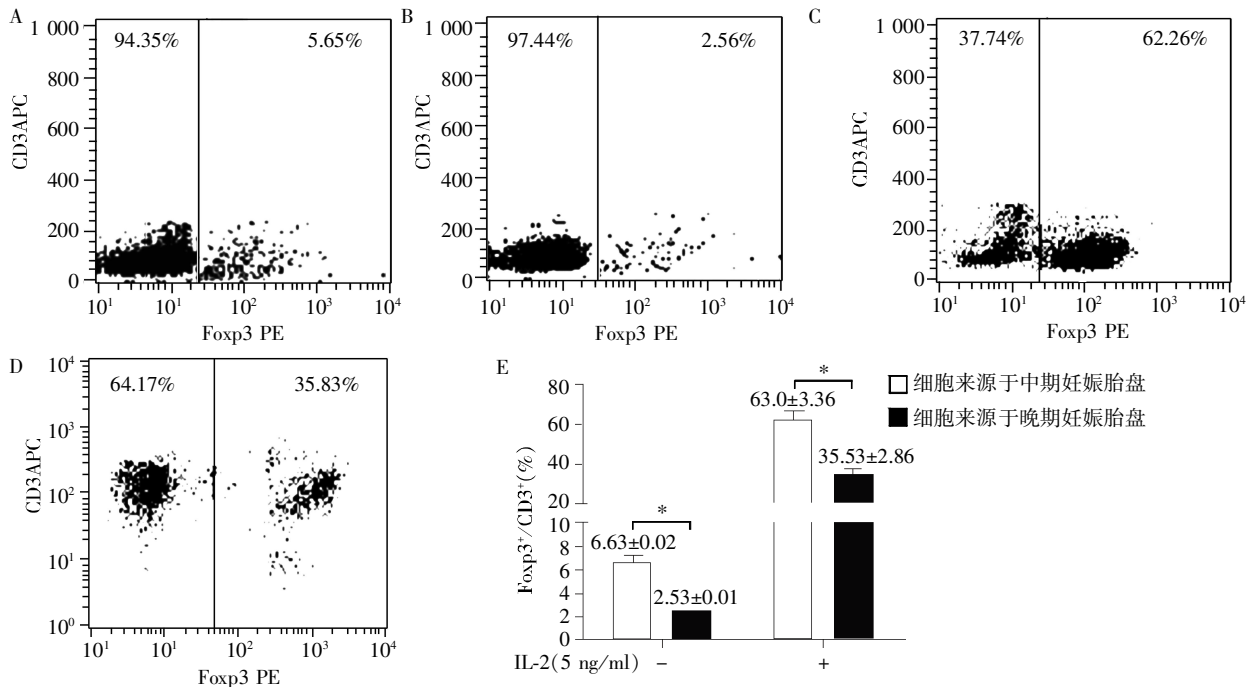
3 讨论

IL-10 是一种能抑制炎症反应、抑制单核-巨噬细胞和 T 细胞活化的抑制性细胞因子^[7],参与了免疫抑制和免疫耐受。研究表明,正常妊娠胎盘组织中的 IL-10 含量随着妊娠的发展而逐渐升高,而在分娩发动前足月胎盘组织中的 IL-10 显著下降^[8]。与正常妊娠比较,先兆子痫患者蜕膜组织 IL-10 含量下降^[9],多种负性调节 T 细胞如 Th3 等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^[10]。IL-12



A-E: 流式细胞术检测散点图(以其中 1 例为代表)。A: T 细胞单独培养; B: 脐血 T 细胞与中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞共培养; C: 脐血 T 细胞与晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞共培养; D: 脐血 T 细胞与中期妊娠胎盘来源细胞分化后的细胞共育; E: 脐血 T 细胞与晚期妊娠胎盘来源细胞分化后的细胞共育; F: 各组间均值的比较, 两组比较, * $P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 2 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮(逆)穿越系统诱导培养后激活同种异型脐血 T 细胞表达 CD69 能力的变化
Figure 2 Comparison of CD69 expression ability of umbilical cord blood T cell co-culture monocyte-macrophages derived from placental tissue in different gestational ages



A-D: 流式细胞术检测 CD3⁺Foxp3⁺细胞散点图(以其中 1 例为代表)。A: 中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞与同种异型脐血清淋巴细胞共育 3 d, 未加 IL-2(方案 1); B: 晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞与同种异型脐血淋巴细胞共育 3 d, 未加 IL-2(方案 1); C: 中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞与同种异型脐血淋巴细胞共育 5 d, 加 IL-2 5 ng/ml(方案 2); D: 晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞与同种异型脐血淋巴细胞共育 5 d, 加 IL-2 5 ng/ml(方案 2); E: 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮穿越系统诱导培养后诱导脐血 T 细胞表达 Foxp3 水平的两组比较, * $P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 3 中、晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮穿越系统诱导培养后诱导同种异型脐血 T 细胞表达 Foxp3 水平的比较
Figure 3 Comparison of Foxp3 expression level of umbilical cord blood T cell co-culture monocyte-macrophages derived from placental tissue in different gestational ages

则是一种能促进 T 细胞活化和向 Th1 细胞分化的激活性细胞因子,可诱导 Th1 亚群的形成,介导 Th1 型免疫反应,不利于妊娠。在妊娠过程中,妊娠早期和妊娠过程大部分时间中呈现 Th2 优势和 IL-10 优势,而在妊娠晚期和分娩发动时呈现 Th1 优势和 IL-12 优势,使妊娠得以正常进行^[11]。单核-巨噬细胞和由其分化而来的 DC 都能分泌 IL-10 和 IL-12,但不同亚群有不同的优势分泌谱。例如 M1 型巨噬细胞高表达 IL-1 低表达 IL-10,而 M2 型巨噬细胞则高表达 IL-10;成熟的 DC 表达高水平 IL-12,参与免疫应答的启动,而抑制性 DC 高表达 IL-10,诱导免疫耐受。而且 IL-10/IL-12 构成了一个动态平衡的调控系统,从正反两方向调控免疫反应。IL-10/IL-12 的比值增高反映抗炎、抑炎、免疫抑制作用的增强,而 IL-10/IL-12 比值降低反映免疫激活、促炎、诱炎作用的增强^[12]。因此本研究采用胎盘来源的单核-巨噬细胞在经历内皮穿越系统诱导培养前后 IL-10 和 IL-12 分泌水平的变化来反映细胞分化。本试验结果显示,晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分泌高水平的 IL-12、低水平的 IL-10,中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分泌低水平的 IL-12、高水平的 IL-10;IL-10/IL-12 比值在晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞中远低于中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞。提示中期妊娠胎盘内环境主要表现为抗炎、抑制免疫活化的特点;而晚期妊娠胎盘内环境则主要表现为促炎、诱发免疫活化的特点,这与王萍萍等^[13]的研究结果是一致的。将这些胎盘来源的单核-巨噬细胞与内皮细胞单层共育,通过正、逆向两次穿越后发生了生物学特性的变化,表现为 IL-12 分泌水平显著增高、IL-10 分泌水平显著降低的特点,提示两类细胞都具有向 DC 分化的趋势,但晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞穿越后 IL-10 分泌水平下降更为显著,呈现了向 DC 方向分化的特点,且晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞来源的 DC 样细胞分泌更高水平的 IL-12 和更低水平的 IL-10,导致 IL-10/IL-12 的比值降低到 1 以下,形成倒置;而中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞经过同样诱导培养后,尽管 IL-12 分泌水平有所提高、IL-10 分泌水平有所降低,但依然保持较高水平的 IL-10 和 IL-10/IL-12 比值、IL-10/IL-12 比值依然 > 1 的格局。这些数据提示,妊娠中、晚期胎盘来源的单核-巨噬细胞经过内皮穿越系统的诱导都发生了分化,所不同的是分化方向:晚期妊娠胎盘单核-巨噬细胞向具有免疫激活的 DC 样细胞分化,而中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞则向具有免疫抑制作

用的调节性细胞分化。

CD69 又称活化诱导分子,是淋巴细胞活化最早表达的膜表面分子^[14]。静止状态的 T 细胞不表达 CD69,只有当受刺激活化后可表达 CD69,且表达极快。本研究证实,无论中期或晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞,其本身并不能激活 T 细胞表达 CD69,但经过内皮穿越发生分化后则都能诱导 T 细胞活化、表达 CD69,其中中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化后刺激 T 细胞表达 CD69 在 45% 左右,而晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化后刺激 T 细胞表达 CD69 达 70% 以上、显示了很强的激活 T 细胞的能力。经内皮穿越后,中、晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞的功能分化可以通过对 T 细胞的不同作用体现出来,而且不同妊娠时期胎盘来源的单核-巨噬细胞经过内皮穿越发生分化后与 T 细胞相互作用,可进一步诱导 T 细胞向不同方向分化:晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化后能诱导活化 T 细胞分化形成更多的 IFN- γ ⁺ 细胞,并具有很强地刺激脐血淋巴细胞增殖的能力;而中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化后虽不能刺激脐血淋巴细胞发生明显增殖,却也能诱导 T 细胞分化形成更多的 IL-10 产生细胞^[5]。本试验进一步证实,中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化后诱导 T 细胞形成更多的 IL-10 产生细胞是建立在一定程度的 T 细胞活化(表达 CD69)基础上的。

调节性 T 细胞(Treg)是一大类具有免疫抑制功能的细胞,转录因子 Foxp3 是调节性 T 细胞发育和功能维持的重要调节基因。在早、中期妊娠,母体全身和蜕膜的 Treg 细胞比率显著高于妊娠晚期,通过细胞直接接触方式及分泌抑制性细胞因子(包括 IL-10 和 TGF- β)等抑制效应性 T 细胞的活性,可能在人类妊娠中扮演重要角色。在本试验中进一步发现,中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞经内皮(逆)穿越系统后刺激同种异型脐血淋巴细胞分化过程中,不仅能诱导更多的 IL-10 产生性 T 细胞,还能诱导 CD3⁺T 细胞表达更高水平的 Foxp3,IL-10 产生细胞与 Foxp3⁺ 产生细胞间存在平行关系,提示其可能诱导 Treg 细胞参与中期妊娠的免疫耐受。所以,中期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化后是能够诱导 T 细胞分化的,只不过是诱导 T 细胞向 Treg 方向分化,而晚期妊娠胎盘来源的单核-巨噬细胞分化后诱导 T 细胞向 Th1 方向分化。

从以上研究结果及其分析来看,妊娠不同时期

的胎盘单核-巨噬细胞参与了妊娠过程中对胎儿抗原的免疫耐受和妊娠晚期的免疫激活。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^[15]。但妊娠过程是相当复杂的过程,有关胎盘单核-巨噬细胞如何参与妊娠过程还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] 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
- [3] 陈赛英,张戎,张明顺,等. 足月胎盘单核-巨噬细胞体外诱导分化为树突状细胞[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2007,27(5):444-448
- [4] 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
- [5] 侯云华,何敏,季宁东,等. 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[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(9):1199-1206
- [6] 何敏,张晓洁,季晓辉. 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞免疫学特性的比较[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(8):1144-1150
- [7] 顾秋萍,自爱平. 白介素-10 与炎症性肠病[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(1):57-61
- [8] Hanna N, Hanna I, Hleb M, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts[J]. J Immunol, 2000, 164(11):5721-5728
- [9] Makris A, Xu B, Yu B, et al. Placental deficiency of interleukin-10(IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL-10 promoter polymorphism[J]. Placenta, 2006, 27(4-5):445-451
- [10] 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, 2003, 171(2):971-978
- [11] 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):2129-39
- [12] Ahmad E, Elgohary T, Ibrahim HJ. Naturally occurring regulatory T cells and interleukins 10 and 12 in the pathogenesis of idiopathic warm autoimmune hemolytic anemia[J]. Invest Allergol Clin Immunol, 2011, 21(4):297-304
- [13] 王萍萍,王增艳,代秀云,等. 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[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(10):1400-1404
- [14] Lindsey WB, Lowdell MW, Marti GE, et al. CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery [J]. Cytotherapy, 2007, 9(2):123-132
- [15] 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

[收稿日期] 2014-02-25