

人类早孕蜕膜对 B 淋巴细胞 IgG 分泌的影响

胡冬梅¹, 曹咏清², 陈竹钦³, 王妮² (¹南方医科大学珠江医院妇产科, 广东 广州 510282; ²中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ³第三军医大学大坪医院妇产科, 重庆 400042)

摘要:目的 观察细胞因子对蜕膜细胞介导 B 淋巴细胞分泌 IgG 的影响, 探讨蜕膜局部免疫微环境的免疫学特点。方法 将 γ -干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6) 和表皮生长因子 (EGF) 加入培养的蜕膜细胞中, 用蜕膜细胞的培养上清液刺激 B 淋巴细胞生长, 通过放射免疫法测定作用不同时间后 B 细胞分泌的 IgG 的值。结果 正常早孕蜕膜细胞的培养上清液可以刺激 B 淋巴细胞 IgG 的分泌; 经细胞因子作用后的蜕膜细胞培养上清液使 B 细胞分泌的 IgG 明显上升, 但这种作用与细胞因子的浓度、种类无明显相关性, 而与细胞因子作用的时间具有一定关联, 表现在第 12 小时实验组的 IgG 分泌显著上升 ($P < 0.05$), 到 24、48 h 时实验组有逐渐下降趋势。结论 在外源性细胞因子的作用下, 蜕膜局部体液免疫反应增强, 但这种增强可能是蜕膜局部免疫的自身调节作用, 以维护妊娠的正常进行。

关键词: 蜕膜; 细胞因子; B 淋巴细胞; 免疫球蛋白 G

中图分类号: R-33 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)07-1050-03

Effect of exogenous cytokine-stimulated decidual cells of early pregnancy on IgG secretion of B lymphocytes

HU Dong-mei¹, CAO Yong-qing², CHEN Zhu-qin³, WANG Ni²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; ²State Key Laboratory of Reproductive Biology, Beijing 100080, China; ³Department of Obstetrics and Gynecology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: **Objective** To study the effect of exogenous cytokine-stimulated decidual cells on IgG secretion of B lymphocytes and investigate the features of local immunological microenvironment of the decidua. **Methods** Exogenous cytokines interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), IL-6 and epidermal growth factor (EGF) were added separately in cultured decidual cells, and the supernatant of the culture medium was prepared for stimulating human peripheral blood lymphocytes. IgG secretion of the B cells was measured by radio-immunological method. **Result** The decidual cells of normal early pregnancy stimulated B lymphocyte IgG secretion, and the supernatant of exogenous cytokine-stimulated decidual cells had the same effect, which, however, was depended not on the concentration and category of the cytokines, but only on the time of treatment. **Conclusion** The exogenous cytokines can increase the humoral immunity in the decidual immunological microenvironment, but such effect might result from a self-regulatory mechanism of the local immunological microenvironment of the decidua, which can be fundamental for maintenance of normal pregnancy.

Key words: decidual cells; cytokines; B lymphocytes; immunoglobulin G

蜕膜免疫微环境是母体免疫系统与胎儿抗原接触最紧密部位, 是母胎免疫中极为关键的一环^[1], 在母胎间的免疫耐受方面发挥重要的作用。在以前的研究中, 我们发现外源性细胞因子破坏了蜕膜局部的免疫微环境, 导致细胞介导的免疫反应增强。那么, 外源性细胞因子对于蜕膜局部的体液免疫效应会产生什么影响呢? 对此我们进行了如下实验。

1 材料和方法

1.1 研究对象

早孕蜕膜取自北京市海淀区医院 26 例正常健康早孕行人工流产妇女, 孕期 6~8 周, 平均 7.4 周, 均无

生殖道感染及其他全身性疾病。人外周静脉血取自北京市中心血站的健康人静脉血。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 干粉培养基, IV 型胶原酶, 美国 GIBCO 公司产品; γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、表皮生长因子 (EGF) 为德国 Boehringer Mannheim 公司产品; 淋巴细胞分离液 (军事医学科学院药材供应站); 免疫球蛋白 B 放射试剂盒 (北京原子能研究所)。

1.3 方法

1.3.1 蜕膜细胞培养方法 将蜕膜组织洗涤、剪碎, 用 0.1% IV 型胶原酶置于 37 °C 水浴中将其振荡消化, 静置沉淀法获取单个分离的蜕膜细胞。将外源性细胞因子加入蜕膜细胞的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 12、24、48 h 后, 弃上清, 充

收稿日期: 2005-12-22

作者简介: 胡冬梅 (1971-), 女, 1998 年毕业于第三军医大学, 硕士, 主治医师, 电话: 020-61643360, E-mail: hudongmeino1@sina.com

分洗涤蜕膜细胞后,继续用 RPMI 1640 培养液培养 24 h,取其培养上清液,-20 °C 储存备用。

实验所选取的外源性细胞因子及其浓度如下,IFN- γ 浓度分别为:100、10、1 U/ml;IL-2, 浓度分别为:100、10、1 U/ml;IL-6 浓度分别为:10、1、0.1 ng/ml;EGF 浓度分别为:100、10、1 ng/ml。由此,实验分为 3 个时相、3 个浓度共 9 个组别。以未加细胞因子的作为对照组。

1.2.2 分离培养人外周血淋巴细胞方法 无菌采集正常献血员肘静脉肝素抗凝血,加在比重为 1.077±0.002 的淋巴细胞分离液液面之上,1000 r/min 离心 20 min,取交界面淋巴细胞,将淋巴细胞置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,准备下述试验。

1.2.3 放免法测定 B 细胞分泌的 IgG 的 cpm 值 取人外周血淋巴细胞,配成 1~10×10⁶/ml,加入 24 孔板,每孔 100 μ l,与 100 μ l 蜕膜细胞培养上清液共培养 24 小时后,1 000 r/min 离心 10 min,取其上清液,置-20 °C 冻存备用制成样品。按北京原子能研究院的放免药盒所附说明书测定其中 IgG 的含量,即按样品 100 μ l、¹²⁵I-IgG 100 μ l、IgG 抗体 200 μ l、二抗 200 μ l 的顺序,依次加样。加样完毕,摇匀,放 37 °C 温育 3 h,取出后,加聚乙二醇 100 μ l,摇匀后 35 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,计数仪测沉淀物中 IgG 的放射性 cpm 值。

1.4 统计学处理

本研究采用计算机 Slide 统计软件进行统计分析。cpm 的测定值以均值±标准差表示,组间差异采用方差分析、两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 蜕膜细胞培养上清液对人外周血 B 细胞 IgG 分泌的影响

在本实验中,12、24、48 h 采集的蜕膜细胞培养上清液组所测得的 cpm 值分别为 10089.33±153.83、9538.33±282.16、8999.00±595.96,而未加蜕膜细胞培养上清液的空白对照组的 cpm 值为 6193.67±346.86。与对照组相比,实验组 cpm 值有显著增加($P<0.05$),但实验组的三个时相,其 cpm 的值与作用的时间无明显差别。

2.2 细胞因子刺激的蜕膜细胞培养上清液对人外周血 B 细胞 IgG 分泌的影响

2.2.1 IFN- γ 组的 cpm 值(表 1) 在同一作用时间,IFN- γ 的浓度越高,其 cpm 值越低;在同一浓度组,IFN- γ 作用的时间越长,其 cpm 值越低。与其相应浓度的空白对照组相比,12 h 所有浓度组别的 cpm 值均明显增高,24 h 10 U/ml 的浓度组别也较空白对照组显著增高($P<0.05$)。所有浓度 48 h 实验组的 cpm 值与

对照组相比均无显著差异。

表 1 IFN- γ 各实验组中 IgG 的 cpm 值

Group	1 U/ml	10 U/ml	100 U/ml
12 h	10 037.69±131.65*	9 175.65±196.78*	8 482.15±276.54*
24 h	8 326.35±257.57	8 062.34±406.03*	6 964.67±224.82
48 h	6 890.64±444.56	5 991.67±308.09	5 182.21±219.56
Control	7 083.23±236.32	6 483.21±523.66	5 863.21±854.32

IFN- γ : interferon- γ ; * $P<0.05$ vs control group

2.2.2 IL-2 组的 cpm 值(表 2) 作用 12、24 h,实验组 IL-2 的浓度越高,其 cpm 值越高,在 10 U/ml、100U/ml 浓度组,IL-2 作用时间越长,其 cpm 值越低。12 h 所有浓度组的 cpm 值以及 10 U/ml、100U/ml 浓度的 24 h 的时相组与其相应的空白对照组相比,其 cpm 值都显著上升($P<0.05$)。所有浓度 48 h 实验组的 cpm 值与对照组相比均无显著差异。

表 2 IL-2 各实验组中 IgG 的 cpm 值

Group	1U/ml	10 U/ml	100 U/ml
12 h	17 631.65±521.66*	19 368.54±781.35*	19 986.88±458.69*
24 h	16 589.36±589.34	17 985.36±548.66*	18 368.96±588.66*
48 h	14 365.36±254.98	15 448.36±895.63	16 638.36±854.48
Control	15 967.53±475.15	16 177.33±395.15	16 459.97±745.15

* $P<0.05$ vs control group

2.2.3 IL-6 组的 cpm 值(表 3) 所有浓度为 0.1、1、10 ng/ml 的 12、24 h 时相组的 cpm 值与其对照组相比,均有显著上升,而 48 h 的仅有浓度为 1 ng/ml 的实验组的 cpm 值与对照组相比有显著升高。实验未显示 cpm 值与浓度之间有相关性。所有浓度 48 h 实验组的 cpm 值与对照组相比均无显著差异。

表 3 IL-6 各实验组中 IgG 的 cpm 值

Group	0.1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml
12 h	17 892.33±584.64*	18 563.65±596.35*	19 963.17±559.25*
24 h	16 348.24±589.15	19 363.24±489.47*	18 254.84±188.57*
48 h	14 595.57±489.24	17 663.89±821.35*	15 687.27±647.24
Control	15 587.03±3108.23	14 545.83±984.46	14 002.30±665.89

* $P<0.05$ vs control group

2.2.4 EGF 组的 cpm 值(表 4) 所有浓度 12 h 实验组 cpm 值与其相应对照组 cpm 值相比有显著提高,浓度为 100 ng/ml 的 24 h 实验组的 cpm 值与对照组相比有显著升高,所有浓度 48 h 实验组的 cpm 值与对照组相比均无显著差异。

3 讨论

在以往的研究中,我们发现:在正常妊娠状态下,

表 4 EGF 各实验组中 IgG 的 cpm 值
Tab.4 cpm value of IgG in EGF groups

Group	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml
12 h	17 986.33±563.38*	16 532.24±548.88*	19 875.24±558.88*
24 h	16 887.89±557.38	15 796.46±257.39	16 478.54±654.57*
48 h	15 697.87±489.97	14 789.57±894.7	15 877.68±788.57
Control	15 609.57±694.32	13 970.27±256.31	14 421.57±957.33

*P<0.05 vs control group

与胎儿抗原接触最直接的蜕膜局部的免疫功能受到抑制^[2],这对防止母体免疫系统对胎儿产生免疫排斥具有重要作用;外源性细胞因子可以破坏蜕膜局部的免疫状态,使其 T 细胞和 NK 细胞介导的细胞免疫反应增强,对妊娠产生危害作用^[3,4]。本实验培养的蜕膜细胞中细胞因子浓度的改变导致 B 淋巴细胞 IgG 分泌的增加,也就是体液免疫的增强。这种增强作用与细胞因子的种类及浓度无明显相关性,但与时间具有一定的相关性。各种数据显示:在 12 h 的实验组,这种增强作用最强,随着时间的推移,到 48 h 后,这种增强作用逐渐降低。

已知在正常妊娠状态下,抗胎儿的 MHC 抗体对自身无损害,因为胎盘能将其吸收并移去,但对细胞免疫反应的细胞毒作用,胎盘没有防御作用^[5]。由上可知,B 细胞介导的体液免疫反应的增强可能对妊娠的结局应该不会产生不良后果,那么,蜕膜局部体液免疫增强的意义何在呢?

在蜕膜局部,蜕膜中的各种细胞可产生多种细胞因子,这些细胞因子形成了蜕膜特殊的细胞因子网络(cytokine network) 这个网络是保持着动态的平衡系统状态,任何一种细胞因子质与量的改变都可能对这一平衡造成损害^[6]。损害的结果往往是细胞免疫的增强,Th1 细胞因子增多,导致了母体对胚胎形成免疫排斥,表现在临床上,就是流产、早产、妊娠高血压综合征的等严重妊娠并发症的发生^[7]。

体液免疫的增强,意味着 Th2 细胞因子的分泌也得到了增强。Ekerfelt^[8]在其研究中指出:蜕膜细胞因子的分泌具有直线相关性(co-linear),也就是当一种细胞因子的合成与分泌增加后,其它的细胞因子也同样表示出这一趋势。这说明蜕膜细胞因子网络具有一种自我修复的作用,当它的平衡状态被打破之后,Th1 细胞因子的分泌增强,随之网络本身可以通过自

身的调节作用,促进 Th2 细胞因子的分泌增多,以拮抗增多的 Th1 细胞因子,使蜕膜细胞因子网络在另一水平上恢复其平衡状态,以维持妊娠的顺利进行。

本研究提示:这种体液免疫反应的增强可能是细胞免疫反应的增强后不久就开始了,随着时间的推移,体液免疫反应逐渐减弱,使得蜕膜细胞因子网络的平衡状态可能重新回复到起点水平。这种蜕膜细胞因子网络的免疫调控机制与人体的体温调节机制有异曲同工之处。

参考文献:

[1] Audus KL, Soares MJ, Hunt JS. Characteristics of the fetal/maternal interface with potential usefulness in the development of future immunological and pharmacological strategies[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 301(2): 402-9.

[2] 胡冬梅, 陈竹钦, 颜建华. 正常早孕蜕膜非免疫细胞免疫活性的实验研究[J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(9): 353-5.

Hu DM, Chen ZQ, Yan JH, et al. Research on immunological activity of non-immunological cells of decidua in normal early pregnancy[J]. Chin J Obstet Gynecol, 1999, 34(9): 353-5.

[3] 胡冬梅, 曹咏清, 陈幼珍. 外源性细胞因子对早孕蜕膜 T 细胞免疫活性的研究[J]. 现代妇产科进展, 2002, 11(1): 39-41.

Hu DM, Cao YQ, Chen YZ. The immunological activity of T cells enhanced by decidua being stimulated by the exogenous cytokines in early pregnancy[J]. Prog Obstet Gynecol, 2002, 11(1): 39-41.

[4] 胡冬梅, 陈竹钦, 曹咏清, 等. 外源性细胞因子对早孕蜕膜调节自然杀伤细胞活性的作用[J]. 生殖医学杂志, 1999, 9(8): 155-9.

Hu DM, Chen ZQ, Cao YQ, et al. Modulation of exogenous cytokines on killing activity of natural killer in decidua cell of early pregnancy[J]. J Reprod Med, 1999, 9(8): 155-9.

[5] Dudley DJ, Chen CL, Mitchell MD, et al. Adaptive immune responses during murine pregnancy-induced regulation of lymphokine production by activated T lymphocytes [J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 168(4): 1155-63.

[6] 胡冬梅, 陈竹钦, 颜建华. 蜕膜的细胞因子网络平衡学说[J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(9): 574-5.

Hu DM, Chen ZQ, Yan JH. Hypothesis of decidual cytokine networks[J]. Chin J Obstet Gynecol, 1998, 33(9): 574-5.

[7] Olivares EG, Manoz R, Tejerizo G, et al. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortion induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells[J]. Biol Reprod, 2002, 67(4): 1211-7.

[8] Ekerfelt C, Lidström C, Matthiesen L, et al. Spontaneous secretion of interleukin-4, interleukin-10 and interferon-gamma by first trimester decidual mononuclear cell[J]. Am J Reprod Immunol, 2002, 47(3): 159-66.