

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )12-1064-04

## 人胎盘绒毛提取物体外对 T 细胞应答的抑制效应

肇静娴<sup>1</sup>, 曾耀英<sup>1</sup>, 江 逊<sup>1</sup>, 季煜华<sup>1</sup>, 刘 毅<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室, 广东 广州 510630, <sup>2</sup>中国医学科学院中国协和医科大学皮肤病研究所, 江苏 南京 210042 )

## Inhibitory effects of human placental villous extracts on T cell response *in vitro*

ZHAO Jing-Xian<sup>1</sup>, ZENG Yao-Ying<sup>1</sup>, JIANG Xun<sup>1</sup>, JI Yu-Hua<sup>1</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Ministry of Education for Tissue Transplantation & Immunology, Jinan University, Guangzhou 510630, China,

<sup>2</sup>Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China

**【Abstract】** AIM : To have a progressive knowledge of the inhibitory capacity of placental villi on T cell response and its changes in the 3 trimesters of pregnancy. **METHODS** : Tissue extracts were prepared from early ( 10 weeks ), middle ( 20 weeks ) and late ( 37 weeks ) placental villi, and their impacts on T cell activation were evaluated by detecting CD69 and CD25 expressions, impacts on proliferation were analyzed by method of WST-1, and impacts on Th1/Th2 cytokine repertoire were measured by cytometric bead array ( CBA ). Content of indoleamine 2,3-dioxygenase ( IDO ) in the tissue extracts was detected by Western blotting. **RESULTS** : All tissue extracts from the 3 trimesters showed inhibitory effects on activation, proliferation and cytokine secretion of human peripheral T cells stimulated by PHA, and also on activation of mouse T cell activation stimulated by ConA (  $P < 0.01$  ). In general, the 20 week extracts had the strongest immunosuppressive effects. The content of IDO was much more in 20 week extracts than in 37 week extracts, and there was only trace amount of IDO in 10 week extracts. **CONCLUSION** : Villous extracts from the 3 trimesters of pregnancy had different degrees of inhibitory effects on T cell response, and their inhibitions to different T cell behaviors were not consistent, indicating their different expression patterns ( quality and quantity ) of inhibitory factors.

收稿日期 2005-12-30; 接受日期 2006-03-22

基金项目 国家自然科学基金重点项目( 30230350 ); 国家自然科学基金面上项目( 30500466 ); 广东省自然科学基金博士启动项目( 05300419 )

通讯作者: 曾耀英. Tel : ( 020 ) 85226219 Email : tzengyy@jnu.edu.cn  
作者简介 肇静娴. 博士, 助理研究员. Tel : ( 020 ) 85225180 Email : zhaojingxian@126.com

**【Keywords】** placental villus ; trophoblast ; immunosuppression ; T lymphocytes ; tryptophan oxygenase

**【摘要】**目的: 了解胎盘绒毛对 T 细胞应答的抑制能力及其在妊娠周期不同阶段的变化. 方法: 制备孕 10、20 和 37 wk 的绒毛提取物, 通过检测 CD69 和 CD25 分子的表达, 评价其对 T 细胞活化的影响, WST-1 法分析其对 T 细胞增殖的影响, 流式微球阵列( CBA )法分析其对 Th1/Th2 细胞因子谱的影响, 并以 Western 印迹法分析提取物中吲哚胺-2,3-双加氧酶( IDO )的含量. 结果: 孕早、中、晚期的胎盘绒毛提取物均能显著抑制植物血凝素( PHA )诱导的人 T 细胞活化、增殖、细胞因子分泌以及 ConA 诱导的小鼠 T 细胞活化(  $P < 0.01$  ). 但三个时期的提取物对上述不同 T 细胞行为的抑制强度不同, 以 20 wk 提取物的抑制作用最强. 提取物中 IDO 蛋白的含量 20 wk 最高, 37 wk 次之, 10 wk 最低. 结论: 妊娠不同时期的绒毛滋养细胞均能够抑制 T 细胞应答, 但抑制强度不一致, 且对 T 细胞不同行为的抑制存在分离现象, 提示妊娠不同时期的绒毛滋养细胞表达抑制因子的模式不同.

**【关键词】** 胎盘绒毛; 滋养层; 免疫抑制; T 淋巴细胞; 色氨酸加氧酶

**【中图分类号】** R392.1 **【文献标识码】** A

## 0 引言

在胎盘局部, 受精卵来源的绒毛滋养细胞和绒毛外滋养细胞作为胎儿细胞的代表, 处于母胎界面的最前沿, 因此已成为研究母胎耐受机制中胎儿因素的最重要靶点. 虽然已知绒毛滋养细胞表达 HLA-G, FasL, 吲哚胺-2,3-双加氧酶( indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO ), 以及分泌高浓度的雌、孕激素都可能参与了降低母体免疫系统对胎儿抗原的应答<sup>[1-4]</sup>, 但以往研究多是对上述单个因素的作用进行分析, 而对胎盘绒毛所具有的整体免疫抑制能力, 及其在妊娠不同阶段有何变化等问题的研究报道较少. 本研究拟从胎盘绒毛提取物的角度, 对妊娠早、中、晚期胎盘绒毛的细胞免疫抑制能力进行评价, 并希望通过此研究思路为发现新的免疫耐受相关机制奠定基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 K2EDTA 抗凝静脉血取自 8 例健康志愿

者,男性,年龄 18~35 岁;SPF 级 Balb/cJ 近交系小鼠,雄性,8~10 wk,购自南方医科大学实验动物中心;碘化丙啶(propidium Iodide, PI)、刀豆蛋白 A (ConA)、植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)均购自美国 Sigma 公司;Nycoprep™ 淋巴细胞分离液购自挪威 Nycomed Pharma AS 公司;WST-1 购自德国 Boehringer Mannheim 公司;人 Th1/Th2 细胞因子流式微球检测(cytometric bead array, CBA)试剂盒以及抗人和抗小鼠 CD3-FITC, CD69-PE, CD25-PE mAb 均购自美国 BD Pharmingen 公司;兔抗 IDO 抗体购自美国 CHEMICON 公司;小鼠抗  $\beta$ -actin 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG, HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 均购自美国 Santa Cruz 公司;RPIM 1640 培养基、胎牛血清购自美国 GIBCO BRL 公司;BIO-RAD 3550 酶标仪, Amersham MiniVE 垂直板电泳仪, FAC-SCalibur 型流式细胞仪。

## 1.2 方法

1.2.1 胎盘绒毛提取物的制备 绒毛组织取自人工流产(孕 10 wk)、孕中期水囊引产(孕 20 wk)和行择期剖宫产(孕 37 wk)的妇女。剪取末梢细小绒毛组织,大量冷 PBS 多次冲洗,再将其剪碎,经超声破碎制成匀浆,以上操作均在冰浴中进行。4℃, 15 000 g, 离心 15 min 吸取上清,经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,分装, -20℃ 保存。检测蛋白浓度约为 0.2 g/L。

1.2.2 T 细胞活化和增殖诱导及实验分组 分离健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)或从小鼠淋巴结制备淋巴细胞,以含 100 mL/L FBS 的 RPMI 1640 完全培养液悬浮,细胞密度为  $1.5 \times 10^9$ /L, 96 孔板培养,每孔定容 200  $\mu$ L。设置不加刺激剂的空白对照组(control)和不加刺激剂但加入不同体积百分比(5%, 10%, 15%)绒毛提取物(孕 10, 20 或 37 wk)的实验组,以及加刺激剂的(PHA/ConA)对照组和加刺激剂同时加入不同体积百分比绒毛提取物的实验组,每组设 4 个复孔。刺激人 T 细胞活化和增殖用 PHA 10 mg/L, 刺激小鼠 T 细胞活化和增殖用 ConA 5 mg/L。

1.2.3 流式细胞术分析 T 细胞活化 人 PBMC 或小鼠淋巴细胞按方法 1.2.2 进行分组培养, 6 h 后收集细胞,常规方法标记抗人或抗小鼠的 CD3-FITC, CD69-PE 抗体,培养 24 h 后按相同方法标记 CD3-FITC, CD25-PE 抗体,流式细胞术分析 CD69 和 CD25 阳性 T 细胞百分率。

1.2.4 WST-1 法检测 T 细胞增殖 健康人 PBMC 按方法 1.2.2 进行分组培养,每孔定容 100  $\mu$ L, 各组设

量 5 个复孔。培养 48 h 后每孔加入 10  $\mu$ L WST-1 轻轻振荡, 37℃ 继续孵育 2 h, 用酶标仪进行检测。检测波长为 450 nm, 参考波长为 600 nm。

1.2.5 PI 染色检测细胞活力 收集培养的 PBMC, PBS 离心洗涤 1 次, 380  $\mu$ L PBS 重悬, 加入 50 mg/L 的 PI 染液 20  $\mu$ L 混匀, 5 min 后即用流式细胞仪进行检测。PI 染色阳性细胞为死细胞。

1.2.6 流式微球法检测培养上清中的细胞因子 健康人 PBMC 按方法 1.2.2 进行分组培养, 6 h 和 24 h 分别收集培养上清, 使用人 Th1/Th2 CBA 试剂盒, 按文献[5], 检测 IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  6 种细胞因子的浓度, 检测范围为 20~5000 pg/mL。

1.2.7 Western 印迹法检测绒毛提取物中的 IDO 蛋白 将绒毛提取物 10 倍浓缩, 100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白, 每道上样量 20  $\mu$ g, 以  $\beta$ -actin  $M_r$  约为 43 作为内参, 因其与 IDO 蛋白  $M_r$  约为 45 接近, 因此利用 2 块胶以相同条件进行。电转移法将胶上蛋白条带转移到 PVDF 膜上, TBS 液漂洗, 50 g/L 脱脂奶粉封闭, TBS 液漂洗, 一抗(兔抗 IDO 0.5  $\mu$ g/mL 或小鼠抗  $\beta$ -actin 1:100 稀释)孵育 60 min。TBS 液洗膜后, 二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG 1:1000 稀释, 兔抗小鼠 IgG 1:5000 稀释)孵育 60 min。TBS 液漂洗, ECL 发光 X 光片显像, 分析成像。

统计学处理:统计软件为 SPSS12.0 获得的数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计方法用方差分析。

## 2 结果

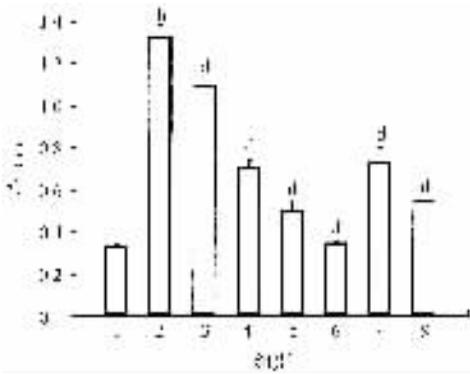
2.1 胎盘绒毛提取物对人 T 细胞活化的影响 各期的绒毛提取物对静息态的人 T 细胞 CD69 和 CD25 分子表达, CD69<sup>+</sup>T 细胞为 7% 左右, CD25<sup>+</sup>T 细胞为 9% 左右)均无显著影响, 但对 PHA 诱导的 T 细胞 CD69 和 CD25 表达均具有显著的抑制作用( $P < 0.01$ )。表 1 显示各组抑制率, 抑制率按 [(PHA-Control) - (PHA + % extract-Control)] / (PHA-Control)  $\times$  100% 计。

2.2 胎盘绒毛提取物对人 T 细胞增殖的影响 鉴于 15% 的绒毛提取物对 T 细胞活化的抑制作用过强, 因此选取 5% 和 10% 这 2 个浓度研究其对 T 细胞增殖的影响。培养 48 h 后, WST-1 法检测各孔细胞吸光值。PHA 对照组与空白对照组比较细胞明显增殖( $P < 0.01$ ), 加入 5% 或 10% 各期绒毛提取物, PHA 诱导的增殖被明显抑制( $P < 0.01$ ), 其中以 20 wk 提取物的抑制作用最强(图 1)。

表1 不同体积百分比各期绒毛提取物对 PHA 诱导的人 T 细胞 CD69 和 CD25 表达的抑制率 (n=5, %,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	5% extract		10% extract		15% extract	
	CD69	CD25	CD69	CD25	CD69	CD25
PHA + 10 wk	11.79 ± 1.28	9.92 ± 1.34	50.30 ± 2.13	32.92 ± 1.86	59.14 ± 2.05	60.79 ± 2.77
PHA + 20 wk	44.37 ± 1.07 <sup>bd</sup>	43.95 ± 2.16 <sup>bd</sup>	78.30 ± 2.24 <sup>bd</sup>	64.63 ± 2.58 <sup>bd</sup>	84.46 ± 2.31 <sup>bd</sup>	72.99 ± 2.43 <sup>bd</sup>
PHA + 37 wk	13.80 ± 1.86	16.57 ± 1.96 <sup>f</sup>	50.40 ± 1.57	29.74 ± 2.04	66.70 ± 2.01 <sup>f</sup>	49.16 ± 2.17 <sup>f</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs PHA + 10 wk ; <sup>d</sup>P < 0.01 vs PHA + 37 wk ; <sup>f</sup>P < 0.01 vs PHA + 10 wk.

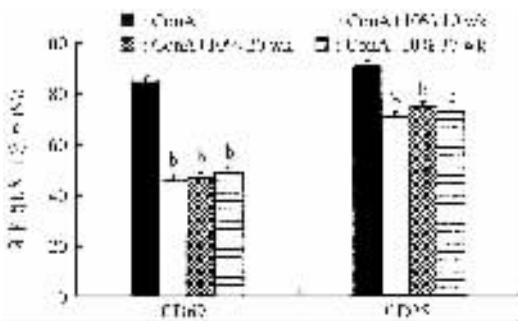


1 : control ; 2 : PHA ; 3 : PHA + 5% 10 wk ; 4 : PHA + 10% 10 wk ; 5 : PHA + 5% 20 wk ; 6 : PHA + 10% 20 wk ; 7 : PHA + 5% 37 wk ; 8 : PHA + 10% 37 wk. <sup>b</sup>P < 0.01 vs 1 ; <sup>d</sup>P < 0.01 vs 2.

图1 胎盘绒毛提取物对 PHA 诱导的人 T 细胞增殖的影响 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

2.3 胎盘绒毛提取物对小鼠 T 细胞活化的影响

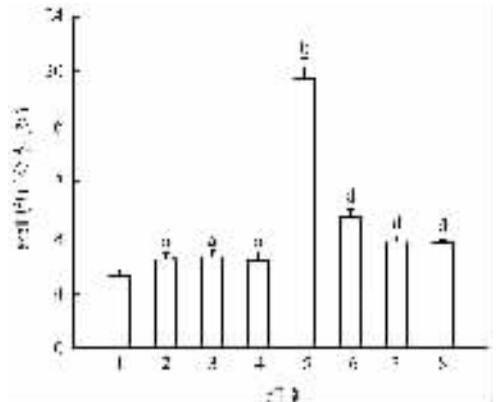
10% 体积比的各期胎盘绒毛提取物对 ConA 诱导的小鼠 T 细胞 CD69 和 CD25 表达均具有显著的抑制作用 (P < 0.01 图 2)。



<sup>b</sup>P < 0.01 vs ConA.

图2 胎盘绒毛提取物对 ConA 诱导的小鼠 T 细胞活化的影响 (n=4,  $\bar{x} \pm s$ )

2.4 胎盘绒毛提取物对细胞活力的影响 培养 24 h 后, 加入不同百分比 20 wk 提取物的各组死亡细胞百分率略高于空白对照组 (P < 0.05), PHA 对照组死亡细胞百分率明显高于空白对照组 (P < 0.01), 但 PHA 加提取物的各组死亡细胞百分率均明显低于 PHA 对照组 (P < 0.01 图 3)。



1 : control ; 2 : 5% ; 3 : 10% ; 4 : 15% ; 5 : PHA ; 6 : PHA + 5% ; 7 : PHA + 10% ; 8 : PHA + 15%. <sup>a</sup>P < 0.05 vs 1 ; <sup>b</sup>P < 0.01 vs 1 ; <sup>d</sup>P < 0.01 vs 5.

图3 培养 24 h 后各组死细胞百分率 (n=4,  $\bar{x} \pm s$ )

2.5 孕早、中、晚期胎盘绒毛提取物 IDO 蛋白含量

Western 印迹法检测, 20 wk 提取物中 IDO 蛋白的含量最高, 37 wk 提取物次之, 而 10 wk 提取物中只含有微量的 IDO 蛋白 (图 4)。

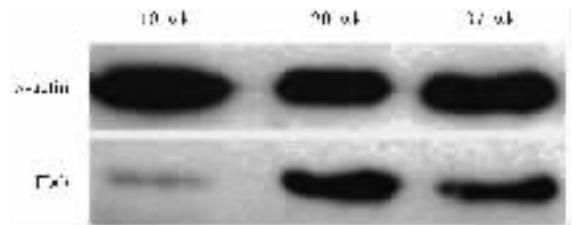


图4 各期胎盘绒毛提取物中 IDO 蛋白的相对含量

2.6 胎盘绒毛提取物对 PBMC 分泌细胞因子的影响

培养 6 h 后, 未加刺激剂的各组无论有否加胎盘绒毛提取物, 培养上清中 6 种细胞因子均未检出; 培养 24 h 后, 空白对照组培养上清 IFN- $\gamma$  为 (54.2 ± 5.1) pg/mL, 加入 10% 体积各期提取物后, 均检测不出。经 PHA 刺激 6 和 24 h 后, 10% 体积比各期提取物对细胞因子的影响见表 2。全部样品 IL-4, IL-5 和 IL-10 均未检出。

表2 各期10%胎盘绒毛提取物对细胞因子分泌的抑制作用

(n=4, pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	6 h			24 h		
	IL-2	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-2	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
PHA	127.4 $\pm$ 5.5	33.9 $\pm$ 3.3	134.6 $\pm$ 5.7	1561.1 $\pm$ 36.7	457.3 $\pm$ 25.9	650.9 $\pm$ 34.8
PHA + 10 wk	61.4 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	$\leq$ 20	40.9 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	405.3 $\pm$ 33.2 <sup>b</sup>	223.5 $\pm$ 29.8 <sup>b</sup>	300.7 $\pm$ 31.6 <sup>b</sup>
PHA + 20 wk	63.7 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	$\leq$ 20	42.8 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	975.3 $\pm$ 35.2 <sup>b</sup>	210.8 $\pm$ 29.4 <sup>b</sup>	374.7 $\pm$ 29.3 <sup>b</sup>
PHA + 37 wk	63.2 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	$\leq$ 20	50.9 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	599.0 $\pm$ 36.0 <sup>b</sup>	292.5 $\pm$ 31.5 <sup>b</sup>	332.1 $\pm$ 28.7 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs PHA.

### 3 讨论

胎儿对于母体来说相当于半同种异基因移植物,而同种移植排斥反应的实质是受者T细胞介导的针对供者同种异基因抗原的免疫应答,因此本课题主要研究绒毛提取物对T细胞应答的影响。结果显示,孕早、中、晚期的胎盘绒毛提取物均能抑制PHA诱导的人外周血T细胞活化、增殖和细胞因子分泌,而且这些作用并非由细胞毒性引起。提示在母胎免疫耐受的维持中,胎儿来源的滋养细胞除不表达某些主要的MHC I类分子而减少母体免疫系统的攻击外,还具有一套能够主动抑制母体免疫攻击的“防御系统”。人胎盘绒毛提取物对小鼠T细胞活化的抑制作用提示绒毛提取物中存在一些保守的、无种属特异性的免疫抑制因素,如高浓度的雌、孕激素对人和小鼠的T细胞活化、增殖均具有抑制作用<sup>[6]</sup>。

IDO是细胞内一种催化色氨酸(Trp)沿犬尿酸途径降解的限速酶,体内、外研究都表明,IDO能够抑制T细胞增殖,是机体天然存在的免疫抑制机制<sup>[3,7]</sup>。一般认为,IDO抑制T细胞增殖的原因是它降解Trp,造成缺乏Trp的微环境,这对一般细胞影响似不明显,而T细胞由于存在一个对Trp敏感的检查点,使细胞增殖停滞于G1期中期<sup>[8]</sup>。胎盘滋养层细胞产生的IDO能阻断针对胎儿组织表达的父本HLA等位基因产物的母体活化T细胞攻击,因而是防止母体T细胞排斥同种异基因胎儿的必要因素<sup>[4]</sup>。本研究结果显示,20 wk提取物中IDO的浓度最高,37 wk提取物次之,而10 wk提取物中只含有微量的IDO,与文献报道的IDO于胎盘种植后13 wk时才明显表达相符<sup>[9]</sup>。这一结果与前述绒毛提取物对T细胞增殖的抑制能力20 wk最强,37 wk次之,10 wk最弱有很好的-一致性;由于IDO并不影响T细胞的活化<sup>[10]</sup>,因此与前述37 wk和10 wk提取物对T细胞活化的抑制效应相近并不矛盾,20 wk提取物对活化的抑制作用最强可能是由提取物中的其他因素引起的。

本研究发现,妊娠不同时期的胎盘绒毛提取物对

T细胞不同行为的抑制效应存在分离现象,提示妊娠不同时期滋养细胞表达抑制因子的模式(质和量)不同,不同时期提取物中IDO含量的差异就是一个例子。母胎耐受是多种因素整合的结果,在妊娠期的不同时空组合中,各种耐受机制可能有着不同的贡献度。以胎盘绒毛提取物为切入点,借助蛋白组学等高通量的研究手段,很可能发现新的耐受相关分子和耐受相关机制。

### 【参考文献】

- [1] Thellin O, Coumans B, Zorzi W, et al. Tolerance to the foeto-placental 'graft': Ten ways to support a child for nine months [J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12(6): 731-737.
- [2] Erlebacher A. Why isn't the fetus rejected [J]? *Curr Opin Immunol*, 2001, 13(5): 590-593.
- [3] Mellor A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulation of T cell immunity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(1): 20-24.
- [4] Honig 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.
- [5] 肇静娴, 曾耀英, 王青, 等. 喘可治注射液对人外周血单个核细胞Th1/Th2细胞因子谱的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(4): 356-359.
- [6] 肇静娴, 曾耀英, 王青, 等. 雌二醇、孕酮对小鼠同种异基因移植物的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(2): 129-131.
- [7] Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(10): 762-774.
- [8] Le Rond S, Gonzalez A, Gonzalez AS, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and human leucocyte antigen-G inhibit the T-cell alloproliferative response through two independent pathways [J]. *Immunology*, 2005, 116(3): 297-307.
- [9] Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and nature killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(4): 459-468.
- [10] Ligam P, Manuelpillai U, Wallace EM, et al. Localisation of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: Implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy [J]. *Placenta*, 2005, 26(6): 498-504.

编辑 杨湘华