

· 临床论著 ·

趋化因子受体 CXCR7 在人早孕期滋养细胞和蜕膜基质细胞的表达

周雯慧 任亮 刘越 张元珍

【摘要】 目的 研究趋化因子受体 CXCR7 在人早孕期母-胎界面的表达特征。**方法** 收集人早孕期绒毛与蜕膜组织,免疫组织化学技术分析趋化因子受体 CXCR7 及 CXCR4 在母-胎界面的表达情况;分别分离培养人早孕期滋养细胞及蜕膜基质细胞,免疫细胞化学技术分析 CXCR7 和 CXCR4 在两种细胞的表达。**结果** 人早孕期绒毛与蜕膜组织及体外分离培养的人早孕期滋养细胞、蜕膜基质细胞均可观察到特异性 CXCR7 和 CXCR4 阳性染色,但两种细胞 CXCR7 染色强度(平均光密度值)均略低于 CXCR4,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 人早孕期滋养细胞及蜕膜基质细胞共表达趋化因子受体 CXCR7 和 CXCR4,提示 CXCR7 可能在母-胎免疫微环境形成中也起重要作用。

【关键词】 母-胎界面; 滋养细胞; 蜕膜基质细胞; CXCR7; CXCR4

Expression of chemokine receptor CXCR7 in human first-trimester trophoblasts and decidual stromal cells

ZHOU Wen-hui, REN Liang, LIU Yue, ZHANG Yuan-zhen. Reproductive Medicine Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: ZHANG Yuan-zhen, Email: zhangyuanzhen@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To explore the expression of chemokine receptor CXCR 7 at the materno-fetal interface during human first-trimester pregnancy. **Methods** Human first-trimester pregnancy villous and decidual tissues were collected, and primary trophoblast cells (TC) and decidual stromal cells (DSC) were isolated and cultured. The protein expression of CXCR7 and CXCR4 were examined by immunohistochemistry (IHC) and immunocytochemistry (ICC), respectively. **Results** IHC and ICC disclosed specific staining for both CXCR 7 and CXCR4 protein in TC and DSC, respectively. However, the mean density of CXCR7 in TC and DSC was significantly lower than that of CXCR4 ($P < 0.05$). **Conclusions** CXCR7 and CXCR4 are co-expressed in human first-trimester pregnancy TC and DSC, which contributes to the establishment of materno-fetal immune microenvironment.

【Key words】 Materno-fetal interface; Trophoblasts; Decidual stromal cells; CXCR7; CXCR4

从生殖免疫学角度,独特的母-胎界面免疫微环境是维持携带父系抗原的胎儿在母体子宫内正常生长发育直至分娩的关键因素。现代免疫学认为母-胎界面存在复杂的细胞-细胞因子网络调控系统,其中趋化因子及其受体由于其独特的生物学功能正逐渐引起大家的重视^[1]。我们课题组前期研究发现 CXCL12/CXCR4 信号通路参与调控人早孕期滋养细胞(trophoblast cells)和蜕膜基质细胞(decidual stromal cell)的增殖与侵袭^[2-3],提示 CXCL12/CXCR4 在母-胎界面免疫微环境形成中有重要作用。最近发现另一趋化因子受体

CXCR7(曾被称为 RDC1 或 CCX-CKR2)与 CXCL12 具有高亲和力^[4-5]。尽管初步研究显示 CXCR7 可能参与生物发育及肿瘤的发生发展^[6-8],但是 CXCR7 在人早孕期母-胎界面的表达情况及其与 CXCL12/CXCR4 轴的相互作用机制尚不清楚。在前期课题基础上,本研究拟分析 CXCR7 在母-胎界面的表达情况,并比较其与 CXCR4 表达模式是否存在差异,以进一步解析和完善 CXCL12/CXCR4/CXCR7 信号通路在正常妊娠维持中的生物学作用。

材料与方 法

1. 标本收集:于武汉大学中南医院妇产科门诊手术室收集正常妊娠 6~10 周绒毛及蜕膜组织各 5 例,置于冷 RPMI-1640 培养液中 2 h 内运至实验室。标本收集经武汉大学中南医院伦理委员会批准及患者本人知情同意。

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.04.018

基金项目:国家自然科学基金项目(81270753,30801240);湖北省自然科学基金创新群体项目(2008CDA008)

作者单位:430071 武汉大学中南医院生殖医学中心[周雯慧(现工作于北京朝阳医院生殖医学中心)、任亮、张元珍],肿瘤科(刘越)

通讯作者:张元珍,Email:zhangyuanzhen@vip.sina.com

2. 试剂:胎牛血清及 DMEM 培养液(Gibco 公司);胰蛋白酶(Amersco 公司);密度梯度分离液(Pharmacia 公司);细胞外基质胶(extracellular matrix, ECM);DNA 酶(Sigma 公司);小鼠抗人 CXCR4 单克隆抗体(R&D 公司);兔抗人 CXCR7 多克隆抗体(Abcam 公司);S-P 免疫组化试剂盒(福州迈新);DAB 显色液(福州迈新)。

3. 免疫组织化学染色:石蜡包埋的人早孕期绒毛及蜕膜组织各 5 例,常规切片、脱蜡、抗原修复后进行免疫组织化学染色。切片依次加入过氧化酶阻断溶液及封闭血清,然后分别加入小鼠抗人 CXCR4 单抗(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及兔抗人 CXCR7 多抗(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日按 S-P 试剂盒说明进行 DAB 显色分析。结果由两位病理专家分别判断,细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性表达,以细胞质着色为基准,应用 Image-Pro Plus 6.0 软件对结果进行分析,分别测出绒毛滋养细胞(villous cytotrophoblast, VCT)、合体滋养细胞(syncytiotrophoblast, ST)、绒毛外细胞滋养细胞(extravillous cytotrophoblast, EVCT)及蜕膜基质细胞的阳性 IOD 值,并分别测出 VCT、EVCT、ST 和蜕膜基质细胞的细胞总面积。阳性 IOD 值除以相应的细胞总面积得出各部分阳性的平均光密度值(mean density)。阳性的平均光密度值越大表示阳性表达越强。

4. 人早孕期滋养细胞的分离培养:根据课题组前期培养方法分离滋养细胞^[2-3]。将绒毛组织充分洗涤、去除黏附于组织表面的血块及蜕膜组织,眼科剪仔仔细去除中间轴心部分,剪下细小绒毛继续剪切成约 1 mm^3 大小的碎片剪碎后,加入 0.25% 胰蛋白酶与 2.5 kU/ml DNA 酶 I 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴轻柔振荡消化 10 min 后,吸取上清 10% 小牛血清终止消化。剩余组织重复此步骤 3~4 次。将消化液分别过 80 目、300 目筛网,细胞团重悬后铺于不连续 Percoll 梯度液上(25%~65%,每 5% 一个梯度),1000 $\times g$ 离心 20 min。吸取 1.048~1.062 g/ml 密度范围的细胞即为滋养细胞,DMEM 洗涤后加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液(含 100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素),种植于预先包被 ECM 的培养板,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,根据贴壁情况换液。此方法获得的滋养细胞纯度 >95%^[2-3]。

5. 人早孕期蜕膜基质细胞的分离培养:根据课题组前期培养方法分离蜕膜基质细胞^[2-3]。蜕膜组织去除血污后分装入小瓶剪碎至糊状(约 1 mm^3 大小),加入 0.25% 胰蛋白酶,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴震荡 20 min,吸取上清 10% 小牛血清终止消化。重复此步骤 2~3 次。收集的消化液经 100 目、300 目网筛过滤,750 $\times g$ 离心 10 min。将分次离心获得的细胞团重悬于 DMEM 中,小心铺于不连续密度梯度液上(20%、40%、60%),

1000 $\times g$ 离心 20 min,吸取 20%~40% 之间的细胞,DMEM 冲洗,750 $\times g$ 离心 10 min 后将细胞团重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中,接种于培养瓶,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,根据贴壁情况换液。此方法获得的蜕膜基质细胞纯度 >95%^[2-3]。

6. 免疫细胞化学染色:新鲜分离的滋养细胞和蜕膜基质细胞分别接种于预先放置无菌盖玻片的 6 孔板,培养 48 h 后取出盖玻片,4% 多聚甲醛固定 30 min 及 0.1% TritonX-100 处理细胞 15 min 后按照上述免疫组织化学染色方法检测两种细胞中 CXCR7 及 CXCR4 的表达。结果判定采用 HSCORE 评分^[9],排除爬片边缘的细胞,200 倍高倍镜下,顺时针盲法选取 5 个细胞分布均匀的视野,每个视野下计数 50 个细胞。阳性染色为细胞质内出现棕黄色颗粒,根据细胞着色的强弱分为 4 个等级:无着色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。 $\text{HSCORE} = \sum P(i+1)$ [$i=0,1,2,3$; $P(i)$ 表示评分为 i 的比例],计算 HSCORE 得分。该评分法考虑到了单个细胞是否阳性及其强弱,能更客观地反映细胞蛋白的表达情况。

7. 统计学分析:用 SPSS 17.0 统计软件,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用完全随机设计两样本比较的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CXCR7/CXCR4 在人早孕期绒毛组织的表达: Image-Pro Plus 6.0 软件分析 CXCR7 及 CXCR4 在 5 例绒毛组织的表达,发现各种类型人早孕期滋养细胞包括 VCT、ST 及 EVCT 均表达 CXCR7 及 CXCR4 蛋白,在细胞质和胞膜均可观察到明显的棕褐色阳性染色,但各种类型细胞的 CXCR7 染色强度均略低于 CXCR4,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1,表 1)。

表 1 绒毛和蜕膜组织 CXCR7 与 CXCR4 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	CXCR4	CXCR7	P 值
VCT	0.0957 \pm 0.0119	0.0293 \pm 0.0083	0.0002
EVCT	0.1055 \pm 0.0059	0.0290 \pm 0.0211	0.0002
ST	0.0050 \pm 0.0012	0.0010 \pm 0.0006	0.0016
蜕膜基质细胞	0.0326 \pm 0.0072	0.0206 \pm 0.0010	0.0467

注:VCT; villous cytotrophoblast, 绒毛细胞滋养细胞; EVCT; extravillous cytotrophoblast, 绒毛外细胞滋养细胞; ST; syncytio trophoblast, 合体滋养细胞

2. CXCR7/CXCR4 在人早孕期蜕膜组织的表达: Image-Pro Plus 6.0 软件分析 CXCR7 及 CXCR4 在 5 例蜕膜组织的表达,发现人早孕期蜕膜基质细胞也共表达 CXCR7 与 CXCR4 蛋白,在细胞的胞质和胞膜均可观察到 CXCR7 与 CXCR4 的阳性染色,与绒毛组织结

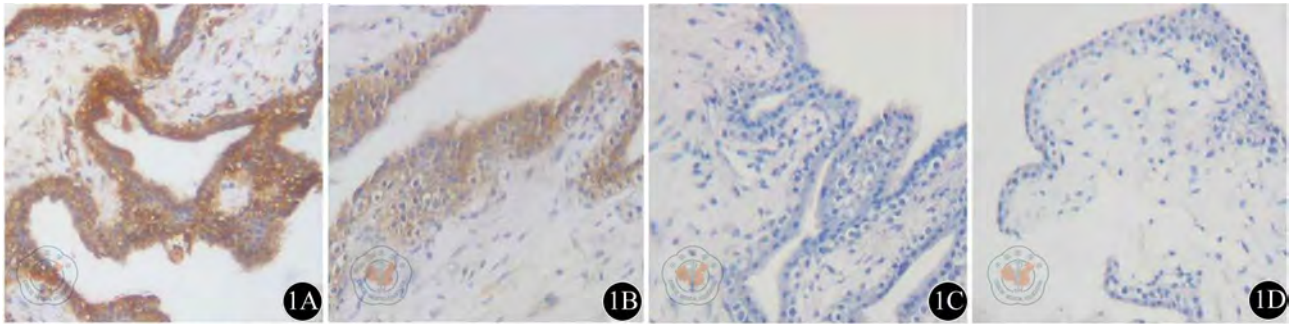


图1 CXCR4/CXCR7在人早孕期绒毛组织的表达(免疫组织化学 ×200)。1A: CXCR4; 1B: CXCR7; 1C: 小鼠同型对照; 1D: 兔同型对照

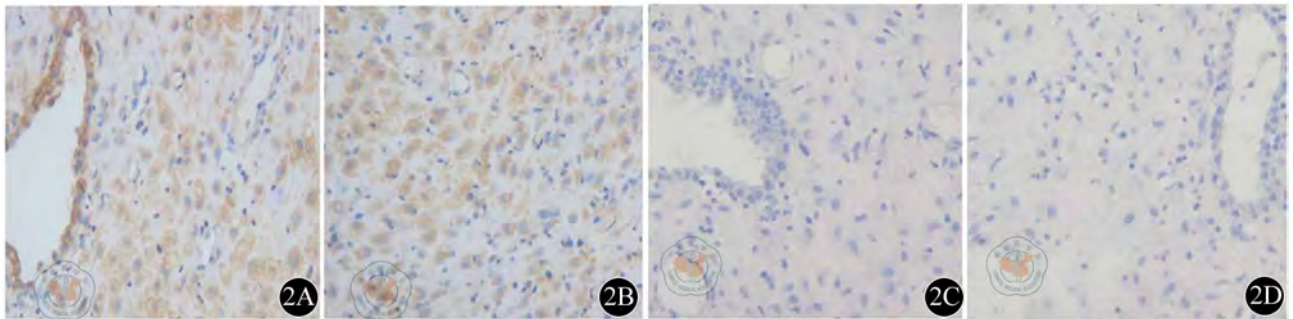


图2 CXCR4/CXCR7在人早孕期蜕膜组织的表达(免疫组织化学 ×200)。2A: CXCR4; 2B: CXCR7; 2C: 小鼠同型对照; 2D: 兔同型对照

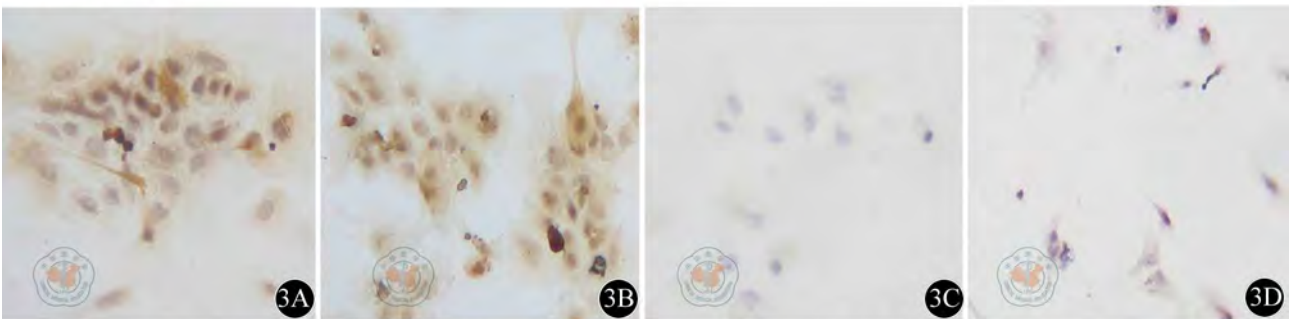


图3 CXCR4/CXCR7在人早孕期滋养细胞的表达(免疫细胞化学 ×200)。3A: CXCR4; 3B: CXCR7; 3C: 小鼠同型对照; 3D: 兔同型对照

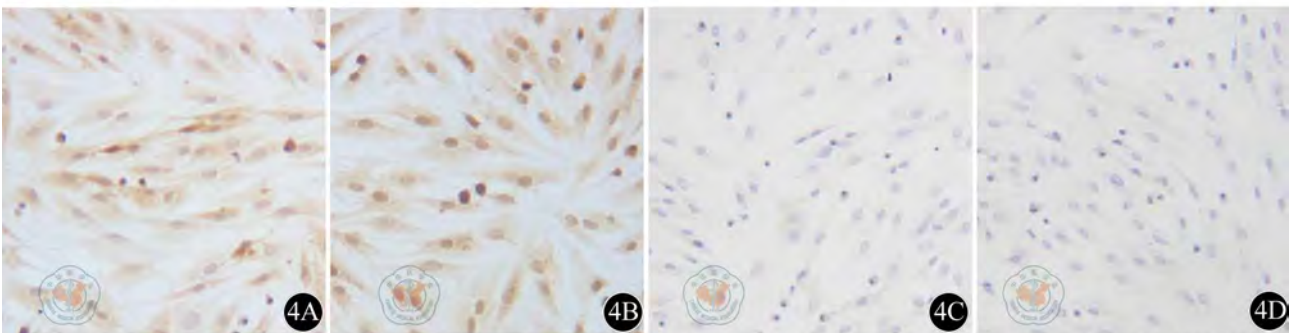


图4 CXCR4/CXCR7在人早孕期蜕膜基质细胞的表达(免疫细胞化学 ×200)。4A: CXCR4; 4B: CXCR7; 4C: 小鼠同型对照; 4D: 兔同型对照

果一致, CXCR7 染色强度略低于 CXCR4, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 2, 表 1)。

3. 人早孕期滋养细胞及蜕膜基质细胞共表达 CXCR7/CXCR4 蛋白; 免疫细胞化学染色结果显示, 原代培养的人早孕期滋养细胞和蜕膜基质细胞均同时表达 CXCR7 与 CXCR4 蛋白, 两种细胞的细胞膜及细胞质均可观

察到棕褐色阳性染色, 同样 CXCR7 染色强度也均略低于 CXCR4, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2, 图 3, 4)。

讨 论

滋养细胞是母-胎界面唯一与母体免疫系统直接接触的胎儿来源的细胞, 具有重要的生物学功能。位于

表2 滋养细胞和蜕膜基质细胞 CXCR7 与 CXCR4 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	CXCR7	CXCR4	P 值
滋养细胞	1.649 ± 0.052	1.763 ± 0.084	0.033
蜕膜基质细胞	1.786 ± 0.035	1.938 ± 0.043	0.015

绒毛内层的 VCT 一方面融合为覆盖于绒毛表面的 ST, 作为母-胎间物质交换的屏障; 另一方面可分化为 EVCT, 入侵至蜕膜深部, 参与完成血管重塑。本研究发现, 人早孕期 VCT、ST 及 EVCT 均表达 CXCR7 蛋白, 提示其可能在滋养细胞增殖及分化过程中起重要作用。我们前期研究已证实人早孕期滋养细胞共表达趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4, 且滋养细胞可通过 CXCL12/CXCR4 信号通路促进自身增殖与侵袭^[2], 因此我们还比较了 CXCR7 与 CXCR4 在滋养细胞的表达模式是否存在不同。结果发现, 虽然 CXCR4 与 CXCR7 表达强度略有不同, 但三种类型的滋养细胞均同时表达 CXCR7 和 CXCR4 两种蛋白。作为新近发现的 CXCL12 的第二受体, CXCR7 与 CXCL12 的亲合力是 CXCR4 的 10 倍^[4]。CXCR7 与 CXCL12 结合后也并不引起经典的细胞内钙离子内流, CXCR7 介导的促细胞生长和黏附作用也不依赖于 CXCR4^[4,10-11], 提示虽然同为 CXCL12 的受体, CXCR7 和 CXCR4 可能启动细胞内不同信号通路。因此虽然本研究发现 CXCR7 和 CXCR4 在滋养细胞存在共表达模式, 但是这种表达方式的生理学意义还有待进一步研究探讨。

蜕膜基质细胞是母-胎界面母体来源的重要功能细胞, 当 EVCT 侵入母体蜕膜后, 与大量蜕膜基质细胞密切接触。本研究发现与滋养细胞非常相似, 人早孕期蜕膜基质细胞也共表达 CXCR7 和 CXCR4 蛋白。我们和李大金课题组前期研究已证实滋养细胞是 CXCL12 的主要来源^[2,12], 因此有理由推测蜕膜基质细胞共表达 CXCL12 的两种受体可能也是确保滋养细胞来源的信号有效传递至蜕膜基质细胞的重要分子机制。这也符合自然界重要生物信号多途径传导的自我保护机制。当然, 其具体作用机制和作用方式尤其 CXCR7 与 CXCR4 的相互调节关系还有待我们去进一步发现。

研究发现母-胎界面存在其他趋化因子及趋化因子受体, 例如滋养细胞表达 CXCL16、CCL3、CCL14、CXCR6、CCR5、CCR7; 蜕膜淋巴细胞表达 CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR5、CCR7; 蜕膜基质细胞表达 CCL2、CCR2、CCL5、CXCL8 等^[13-15]。本研究发现 CXCR7 和 CXCR4 共表达于人早孕期母-胎界面滋养细胞和蜕膜基质细胞, 前期研究也已证实人早孕期绒毛组织和滋养细胞表达其配体 CXCL12^[2]。因此在母-胎界

面可能不仅仅是某一两对趋化因子参与妊娠的维持, 而是存在一个复杂交织的趋化因子调控网络。滋养细胞或母体来源的细胞如蜕膜基质细胞、蜕膜淋巴细胞等可通过共表达趋化因子及其受体调节自身功能, 又可通过旁分泌趋化因子调控邻近细胞, 从而建立细胞间及自身的多重联系, 调节妊娠这一复杂的生命现象。

虽然妊娠时胎盘起到一定的天然屏障作用, 但是人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 母婴垂直传播的分子机制一直是个棘手的问题。滋养细胞虽然充分暴露于母体血窦中, 但是其不表达经典的 HIV 协同受体 CD4 分子, 病毒颗粒也无法通过直接弥散的方式进入胎盘, 因此必然存在其他 HIV 穿过胎盘的替代途径。目前已有证据显示 CXCR4 是 HIV 感染的重要协同受体^[16-17]。Shimizu 等^[18]的研究还发现, CXCR7 是脑部血管来源的细胞感染 HIV-1 和 HIV-2 病毒株的协同受体。而本研究发现人早孕期胎儿来源的滋养细胞和母体来源的蜕膜基质细胞除了表达 CXCR4 外, 还表达 CXCR7, 并且这两种蛋白在母-胎界面的表达模式十分相似。这些研究结果提示母-胎界面可能也存在不依赖于 CD4 分子的 HIV 感染途径。因此, 除了参与母-胎界面众多的关键生物学事件, 趋化因子受体在 HIV 母婴垂直传播中可能也起一定作用。

综上所述, 本研究发现人早孕期 EVCT、ST、VCT 和蜕膜基质细胞均表达趋化因子受体 CXCR7, 提示 CXCR7 可能在母胎免疫调节中起一定作用。以 CXCL12/CXCR4/CXCR7 为线索, 研究其在母-胎免疫调节中的功能机制, 将有助于揭示母-胎界面趋化因子调控网络在母-胎界面的生物学作用, 为病理妊娠、妊娠期并发症的临床治疗及阻断 HIV 母婴垂直传播提供新的切入点。

参 考 文 献

- [1] Red-Horse K, Drake PM, Fisher SJ. Human pregnancy: the role of chemokine networks at the fetal-maternal interface. *Expert Rev Mol Med*, 2004, 6: 1-14.
- [2] Zhou WH, Du MR, Dong L, et al. Chemokine CXCL12 promotes the cross-talk between trophoblasts and decidual stromal cells in human first-trimester pregnancy. *Hum Reprod*, 2008, 23: 2669-2679.
- [3] Ren L, Liu YQ, Zhou WH, et al. Trophoblast-derived chemokine CXCL12 promotes CXCR4 expression and invasion of human first-trimester decidual stromal cells. *Hum Reprod*, 2012, 27: 366-374.
- [4] Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion and tumor development. *J Exp Med*, 2006, 203: 2201-2213.
- [5] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 2005, 280: 35760-35766.
- [6] Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29: 709-722.
- [7] Dambly-Chaudière C, Cubedo N, Ghysen A. Control of cell migration

in the development of the posterior lateral line; antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. BMC Dev Biol, 2007, 7;23.

[8] Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, et al. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is link-ed to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. Cancer, 2009, 115; 2580-2593.

[9] Grazul-Bilska AT, Caton JS, Arndt W, et al. Cellular proliferation and vascularization in ovine fetal ovaries :effects of undernutrition and selenium in maternal diet. Reproduction, 2009, 37;699-707.

[10] Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. J Exp Med, 2008, 205;479-490.

[11] 吕世剑, 李明清, 孙婵, 等. CXCR 7 分子对人早孕滋养细胞的调节作用. 中国免疫学杂志, 2011, 27;524-528.

[12] Wu X, Jin LP, Yuan MM, et al. Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56brightCD16-NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1. J Immunol, 2005, 175;61-68.

[13] Huang Y, Zhu XY, Du MR, et al. Human trophoblasts recruited T lym-

phocytes and monocytes into decidua by secretion of chemokine CXCL16 and interaction with CXCR6 in the first-trimester pregnancy. J Immunol, 2008, 180;2367-2375.

[14] Matta P, Lockwood CJ, Schatz F, et al. Thrombin regulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in human first trimester and term decidua cells. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196;268. e1-8.

[15] Engert S, Rieger L, Kapp M, et al. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. Am J Reprod Immunol, 2007, 58;129-137.

[16] Gorry PR, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. Curr HIV/AIDS Rep, 2011, 8;45-53.

[17] Patrucci L, Baldari CT. The CXCL12/CXCR4 axis as a therapeutic target in cancer and HIV-1 infection. Curr Med Chem, 2011, 18; 497-512.

[18] Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, et al. A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. J Virol, 2000, 74;619-626.

(收稿日期:2012-09-19)

(本文编辑:戚红丹)

周雯慧, 任亮, 刘越, 等. 趋化因子受体 CXCR7 在人早孕期滋养细胞和蜕膜基质细胞的表达[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(4):1436-1440.

