

# TGF- $\beta$ 1 对人蜕膜基质细胞中趋化因子及其受体表达的影响

张玉杰<sup>①②</sup> 彭景榭<sup>②</sup> 卿素珠<sup>①\*</sup>

① 西北农林科技大学动物医学院 杨凌 712100;

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 100101

**摘要:**为探讨转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 在蜕膜基质细胞中发挥免疫调节作用的机制,本研究以人妊娠初期的蜕膜基质细胞为研究对象,经 0 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml 和 10 ng/ml 的 TGF- $\beta$ 1 处理后,运用 RT-PCR 方法检测趋化因子 mRNA 的表达,Western-blot 检测趋化因子蛋白质的表达。结果表明:在 mRNA 水平和蛋白水平,高浓度的 TGF- $\beta$ 1 能够显著的下调蜕膜基质细胞中趋化因子配体 CX3CL1、CXCL12 和 CXCL16 的表达,有意义的上调趋化因子受体 CXCR4 和 CXCR6 的表达。研究结果提示,TGF- $\beta$ 1 对趋化因子配体/受体有显著的调节作用,并通过趋化因子参与母胎界面的免疫调节。

**关键词:**转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1); 人蜕膜基质细胞; 趋化因子; 免疫调节

中图分类号: S85 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2012)02-36-10

## The Effect of TGF- $\beta$ 1 on Expression of Chemokine and Its Receptor in Human Decidual Stromal Cells

ZHANG Yu-Jie<sup>①②</sup> PENG Jing-Pian<sup>②</sup> QING Su-Zhu<sup>①\*</sup>

① *College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100;*

② *State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

**Abstract:** To explore the mechanism of immune regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in human decidual stromal cells, the expression of chemokine in early human decidual stromal cells after treatment with four different concentrations of TGF- $\beta$ 1 (0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml and 10 ng/ml) were detected by RT-PCR and Western blot. The results showed that high concentration of TGF- $\beta$ 1 significantly up-regulated the expression of chemokine ligand CX3CL1, CXCL12 and CXCL16, while down-regulated the expression of chemokine receptor CXCR4 and CXCR6 at the mRNA and protein levels. This study suggests that TGF- $\beta$ 1 plays a significant role in regulating chemokine ligand/receptor expression and may participate in immune tolerance of maternal-fetal interface by chemokines.

**Key words:** Transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1); Human decidual stromal cells; Chemokine; Immune regulation

TGF- $\beta$  是一类具有多种生理功能的调节多肽,它能够调节多种细胞的增殖、分化和凋亡。许多免疫细胞,如 B、T 细胞、树突状细胞和巨噬细胞都能够分泌 TGF- $\beta$ , 释放的 TGF- $\beta$  可以负调节这些免疫细胞的活性,进而抑制细胞因

**基金项目** 973 计划项目 (No. 2011CB944402), 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (No. QN2009024);

\* 通讯作者, E-mail: suzhuqing@163.com;

**第一作者介绍** 张玉杰, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物神经内分泌与免疫调控; E-mail: ddzhang2008-2009@163.com。

收稿日期: 2011-10-27, 修回日期: 2012-01-05

子的分泌<sup>[1]</sup>。研究表明,人蜕膜基质细胞能够表达 TGF- $\beta$ 1、2、3,并且 0.5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 可以促进催乳素 (prolactin, PRL) 的释放,刺激子宫内膜基质细胞合成基质蛋白,进而使子宫内膜基质细胞发生蜕膜化<sup>[2]</sup>,蜕膜细胞特异性表达 lefty A 和 follistatin,两者是 TGF- $\beta$ 1 的拮抗剂<sup>[3]</sup>,并共同调节蜕膜组织中 TGF- $\beta$ 1 含量的相对稳定。TGF- $\beta$  能够抑制 Th1 型细胞因子的分泌,Th1 型细胞因子不利于妊娠,因而 TGF- $\beta$  具有维持妊娠的作用。研究证实,母胎界面局部免疫活性细胞、蜕膜基质细胞及滋养层细胞均能表达趋化因子及其受体,趋化因子及其受体在母胎界面局部免疫活性细胞的募集和归巢中起着关键作用。趋化因子 CXCL12 对母胎界面淋巴细胞的募集和滋养层的浸润有重要作用,它可以募集 Treg 细胞,调节机体免疫反应,这一作用是通过滋养层细胞和蜕膜基质细胞表面受体 CXCR4 来实现的<sup>[4]</sup>;趋化因子 CXCL16 能够通过 CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK 细胞表面受体 CXCR6 趋化免疫耐受型 NK 细胞,从而起到维持妊娠的作用<sup>[5]</sup>;CX3CL1 主要定位于子宫腺上皮和蜕膜基质细胞上,其受体 CX3CR1 表达于妊娠前期的血管滋养层细胞、合体滋养层细胞、滋养层细胞系和子宫内膜上皮细胞,体外实验表明 CX3CL1 通过与其受体的结合调节滋养层细胞的迁移和血管的生成<sup>[6]</sup>。母胎界面趋化因子及其受体表达的异常可能引起母胎免疫失衡<sup>[7]</sup>。由此可见,TGF- $\beta$  和趋化因子均参与妊娠时的局部免疫反应,TGF- $\beta$  和趋化因子在母胎界面的免疫调节中可能存在一定的相互关系。本论文以人的蜕膜基质细胞为材料,对 TGF- $\beta$ 1 与趋化因子的关系进行了初步研究,以探讨两者在免疫调控网络中的相互关系。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 实验所需的人蜕膜组织样本来自北京大学第三医院妇科门诊手术室健康人工流产患者 5 例,孕龄均在 8~10 周之间,取得每位患者的知情同意,并经伦理委员会批准,无菌取得蜕膜组织,4℃ 条件下送到细胞间进行无

菌操作。

**1.2 主要试剂** 人 TGF- $\beta$ 1 重组蛋白 (Prepro Tech, Catalog# 100-21C);兔抗人 CXCL16 抗体 (Prepro Tech, Catalog# 500-P200);兔抗人 CXCR6 抗体 (Epitomics, Catalog# S0471);兔抗人 CX3CL1 抗体 (Abcam, Catalog# ab25088);鼠抗人波形蛋白 (Vimentin) 抗体 (Sigma, Catalog# V5255);兔抗人催乳素 (PRL) 抗体 (武汉博士德, Catalog# BA0380);鼠抗人 Actin 抗体 (Santa cruz, Catalog# sc-47778);DMEM/F12 细胞培养液 (Gibco, 美国)、胎牛血清 (Gibco, 美国);二甲亚砜 (Sigma, 美国);RNA 提取试剂盒 (百泰克, 北京);M-MLV 逆转录酶、小牛血清白蛋白 BSA (Promega, 美国);ECL 荧光显色液 (Engreen, 北京)。

**1.3 蜕膜基质细胞的分离培养** 蜕膜基质细胞分离方法参照相关文献<sup>[8]</sup>,简述如下:取发育正常新鲜且较厚实的蜕膜组织,于无菌超净台内用含 100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的无菌 PBS 洗 5~10 遍,去除血污及黏性组织,将肥厚的蜕膜组织充分剪碎至糊状,约 1 mm<sup>3</sup>/块,用 0.25% 的胶原酶和 Dnase I (15 U/ml),37℃ 消化 60 min,每隔 10 min 用枪头来回吹打几次便于消化,200 目、400 目筛网过滤,1 000 r/min 离心 5~10 min,去除上清,细胞团重悬于 2 ml DMEM/F-12 完全培养基中清洗 3 遍,最后用无血清的培养基调整细胞密度为 1  $\times$  10<sup>5</sup> 个/ml,将细胞接种于 60 mm 培养皿内,37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养过夜,第 2 天换液除去未贴壁的细胞,每隔 48 h 换液一次,5~6 d 后传代。

**1.4 蜕膜基质细胞体外诱导蜕膜化** 待人蜕膜基质细胞传代生长稳定并连成片时即细胞所传代数 N $\geq$ 3 代时,0.25% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液,5  $\times$  10<sup>4</sup> 个/ml 接种于事先放置有盖玻片的 35 mm 培养皿中,并用含 10 nmol/L 雌激素的 10% 胎牛血清 DMEM/F-12 培养基进行预处理。待细胞融合率达到 50% 时,进行如下处理<sup>[9]</sup>:10 nmol/L 雌激素和 100 nmol/L 孕酮的 2% 胎牛血清 DMEM/F-12 培养基连续处理 2

周,最后用含 10 nmol/L 雌激素和 100 nmol/L 孕酮的无血清 DMEM/F-12 培养基处理 1 周,每隔 48 h 换液一次。

### 1.5 人蜕膜基质细胞的鉴定

**1.5.1 形态学鉴定** 随着细胞培养时间的延长,普通倒置相差显微镜下观察离体培养的人蜕膜基质细胞及诱导蜕膜化后的人蜕膜基质细胞的形态特征及生长规律;诱导蜕膜化后的人蜕膜基质细胞用结晶紫染色并拍照。

**1.5.2 免疫细胞化学鉴定** 细胞免疫荧光检测基质细胞标记分子 Vimentin 及蜕膜化标志分子 PRL,取出盖玻片,PBS 漂洗 5 min × 3 遍,4% 多聚甲醛室温固定 20 min,0.3% 的 Triton X-100 通透 20 min,PBS 洗 5 min × 3 遍,1% BSA 室温封闭 1 h,加入封闭液稀释的一抗(兔抗人 PRL 1:200 稀释,鼠抗人 Vimentin 1:200 稀释,无关兔源 IgG 1:200 稀释),4℃ 过夜,PBS 洗 5 min × 3 遍,加 FITC 标记的二抗(1:500 稀释),37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 5 min × 3 遍,加入 PI 染核(1:100 稀释),37℃ 孵育 20 min。加入防淬灭剂封片,Confocle 观察、拍照。材料来自 3 个样本,实验重复 5 次。

**1.6 人蜕膜基质细胞的 TGF-β1 处理** 经鉴定的人蜕膜基质细胞继续培养,待细胞生长稳定并连接成片时,用 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液,以  $1 \times 10^6$  个/ml 的密度接种于 60 mm 培养皿,10% 胎牛血清的完全培养基生长 24 h,

2% 胎牛血清的完全培养基静养 12 h,然后加入不同浓度的 TGF-β1,浓度值参照相关文献报道<sup>[10]</sup>,分别为 0 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml。加药后再培养 48 h 后,分别提取细胞总 RNA 和总蛋白。

### 1.7 蜕膜基质细胞总 RNA 的提取和 RT-PCR

用 RNA 试剂盒提取细胞总 RNA,并反转录;然后 PCR 扩增趋化因子和 GAPDH,RT-PCR 的条件为 70℃ 5 min;42℃ 60 min,95℃ 5 min;94℃ 3 min,退火 30 s,72℃ 30 s,进行 30 个循环;72℃ 5 min。趋化因子和 GAPDH 的引物序列、退火温度及扩增产物长度见表 1。产物在 1.5% 琼脂糖凝胶(含终浓度 0.5 mg/L 溴化乙锭)上电泳,电泳图谱用 Quantity One 软件(Bio-Rad Inc.)进行分析,将条带的亮度转化成数值,并经内参 GAPDH 校正,对校正值进行统计学分析。材料来自 5 个样本,实验重复 3 次。

### 1.8 蜕膜基质细胞总蛋白的提取和 Western-blot

提取人蜕膜基质细胞总蛋白,考马斯亮蓝测定蛋白质的浓度。以 50 μg 蛋白上样量进行 SDS-PAGE,5% 浓缩胶,12% 分离胶,程序为 60 V 30 min,90 V 2 h。当溴酚蓝接近分离胶底部时结束电泳。湿式电转移法将蛋白转至硝酸纤维素膜上,电流 200 mA,转膜 100 min。将膜在 5% 脱脂奶粉液中 37℃ 封闭 2 h。加入适当稀释(Actin 1:800 稀释,CX3CL1 1:50 稀释,CXCL16 1:500 稀释,CXCR6 1:1 000 稀释)的

表 1 趋化因子和内参 GAPDH 的引物序列及产物长度

Table 1 Primers and expanding product size of chemokine and GAPDH in RT-PCR

引物 Primers	序列(5' - 3') Sequence	退火温度(℃) Melting temperature	产物长度(bp) Product size
CX3CL1 上游 Up	CCACCTTCTGCCATCTGACT	60.0	175
CX3CL1 下游 Down	CTGTGCTGTCTCGTCTCCAA		
CXCL16 上游 Up	GTGGACATGCTTACTCGGGG	62.0	173
CXCL16 下游 Down	GGACAGTGATCCTACTGGGAG		
CXCR6 上游 Up	CAGGAGGAGCATCAAGAC	58.5	214
CXCR6 下游 Down	CTGCATAGGCCAGAAAGG		
CXCL12 上游 Up	ATGAACGCCAAGGTCGTGGTC	59.0	202
CXCL12 下游 Down	TGTTGTTGTTCTTCAGCCG		
CXCR4 上游 Up	GAACTTCTATGCAAGGCAGTCC	61.0	302
CXCR4 下游 Down	CCATGATGTCTGAAACTGGAAC		
GAPDH 上游 Up	GGGGAGCCAAAAGGTCATCATCT	64.0	235
GAPDH 下游 Down	GAGGGCCATCCACAGTCTTCT		

一抗,4℃孵育过夜,TBST洗 $3 \times 15$  min;加入1:5 000稀释的二抗,室温孵育2 h,TBST洗 $3 \times 15$  min后;ECL显色,暗室X光片放射自显影。X光片用HP扫描仪灰度扫描,并用Quantity One软件(Bio-Rad Inc.)进行分析,将条带的亮度转化成数值,并经内参Actin校正,对校正值进行统计学分析。材料来自5个样本,实验重复3次。

**1.9 统计学处理** 各组数据均采用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行检验,组间的差异比较采用Student's *t*-检验,显著性差异以 $P < 0.05$ 为标准,数据分析采用SPSS 15.0。

## 2 结果

**2.1 人蜕膜基质细胞的体外培养特征** 刚分离的蜕膜基质细胞呈典型的圆形,培养12 h大部分即可贴壁,初期呈梭形和不规则星形,核呈卵圆形,位于细胞的中央,核仁清晰可见,分2~3叶,胞质较丰富,后期细胞呈细长纤维母细胞状,成片铺展生长,呈现一定的极性效应。10 nmol/L雌激素和100 nmol/L孕酮诱导3周后细胞形态逐渐由狭长的纤维样变为钝圆形(鱼鳞状),极性效应逐渐消失。细胞生长较快,每4~5 d可传代1次,传3代以后细胞纯度较高。结晶紫染色后,细胞轮廓清晰,胞浆颗粒丰富(图1)。

### 2.2 人蜕膜基质细胞的免疫细胞化学鉴定

免疫细胞化学鉴定:波形蛋白(Vimentin)是基质细胞的骨架蛋白,免疫荧光鉴定95%的细胞Vimentin染色呈阳性;DSC具有合成催乳素(PRL)的特性,胞浆中储存有PRL,免疫荧光阳性细胞计数结果显示95%的细胞PRL染色呈阳性(图2)。

梭形细胞的中央有椭圆形的细胞核,细胞核周围PRL染色较深,颗粒丰富;接近细胞膜PRL染色变浅,颗粒较少,这可能是因为PRL由靠近细胞核的粗面内质网合成后,然后再向胞外分泌的缘故。

### 2.3 人蜕膜基质细胞中TGF- $\beta$ 1对趋化因子mRNA水平和蛋白水平的影响

正常条件下,趋化因子CXCL12/CXCR4、CXCL16/CXCR6及CX3CL1都有一定的表达。当以不同浓度的TGF- $\beta$ 1处理之后,在mRNA水平,趋化因子配体CXCL12、CXCL16和CX3CL1的表达量都有所降低。其中TGF- $\beta$ 1对CX3CL1的抑制效应最为明显,对照组与各处理组之间均有极显著性差异( $P < 0.01$ );与CX3CL1不同,在1 ng/ml和5 ng/ml的TGF- $\beta$ 1处理下,CXCL12与对照组相比反而有所升高,这可能是误差较大或样本量较少的缘故,但10 ng/ml的TGF- $\beta$ 1处理后,CXCL12较对照组有所下降,统计结果并无显著性差异,较前两个处理却有显著性的差异( $P < 0.05$ ),因此,就总体而言,高剂量的TGF- $\beta$ 1对CXCL12有一定的抑制作用;CXCL16也受TGF- $\beta$ 1的调节,5 ng/ml的TGF- $\beta$ 1对CXCL16有显著地抑制效应( $P < 0.05$ )。与趋化因子配体不同,TGF- $\beta$ 1能够上调相应受体CXCR4和CXCR6的表达。其中,TGF- $\beta$ 1对CXCR4的上调作用最为明显,对照组与10 ng/ml的TGF- $\beta$ 1处理组之间有显著性差异( $P < 0.05$ );对CXCR6而言,对照组和10 ng/ml的TGF- $\beta$ 1处理组之间也有显著性差异( $P < 0.05$ )(表2,图3)。在蛋白水平,TGF- $\beta$ 1同样可以下调趋化因子配体CXCL16和CX3CL1的表达,10 ng/ml的TGF- $\beta$ 1能够极显著下调CX3CL1的表达( $P < 0.01$ ),显著下调CXCL16的表达( $P < 0.05$ )。对趋化因子受体CXCR6,对照组和10 ng/ml的TGF- $\beta$ 1处理组之间有显著性差异( $P < 0.05$ )(表3,图4)。

## 3 讨论

正常生理条件下,人子宫内膜基质细胞能够分泌TGF- $\beta$ 1、2、3三种亚型,这对于女性月经周期的调节是必需的。月经期间的分泌中期和晚期,TGF- $\beta$ 1 mRNA水平的表达量是正常情况下的1.5倍左右,子宫内膜冰冻切片的免疫组化显示TGF- $\beta$ 1主要分布于基质细胞,并且

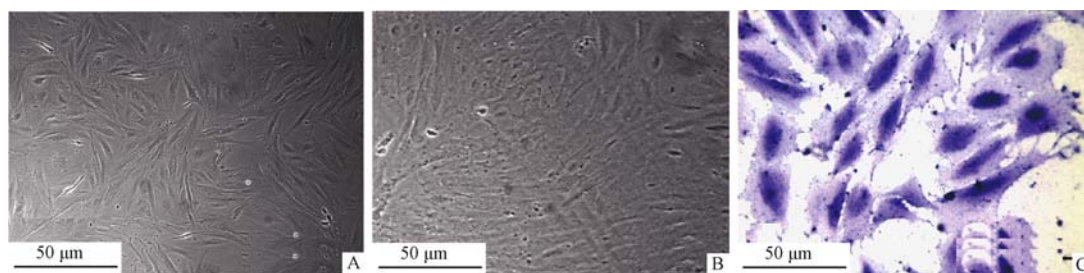


图 1 原代分离培养的人蜕膜基质细胞及诱导蜕膜化后的人蜕膜基质细胞

Fig. 1 Primary human decidual stromal cells and decidualization of human decidual stromal cells

A: 原代分离培养的人蜕膜基质细胞连续培养 4 d 后的形态特征; B: 原代培养的人蜕膜基质细胞单层用雌激素和孕酮诱导蜕膜化后, 细胞的形态由狭长形变得大而圆; C: 雌激素和孕酮诱导人蜕膜基质细胞蜕膜化后, 结晶紫染色的细胞大且具有双核。标尺 = 50 μm。

A: Primary human decidual stromal cells after culturing for 4 d; B: After decidualization of confluent human decidual stromal cells monolayers by treatment with E<sub>2</sub> in combination with P<sub>4</sub> for a long time, spindle-shaped cells transformed into larger and rounder cells; C: After decidualization of human decidual stromal cells with E<sub>2</sub> in combination with P<sub>4</sub>, larger and binucleated cells stained with crystal violet were observed. Bar = 50 μm.

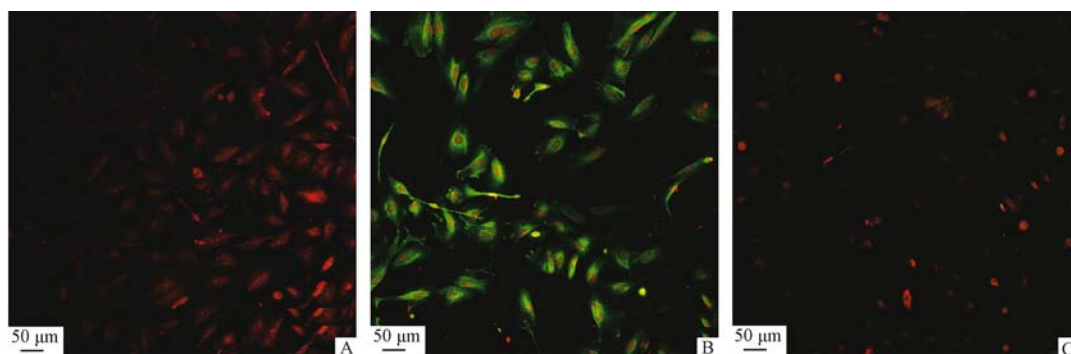


图 2 人蜕膜基质细胞标记分子波形蛋白和催乳素的免疫细胞化学染色

Fig. 2 Immunocytochemistry staining of human DSC for vimentin and PRL

A: 人蜕膜基质细胞同种型 IgG 对照; B: 人蜕膜基质细胞鼠抗人波形蛋白抗体染色; C: 人蜕膜基质细胞兔抗人催乳素抗体染色。标尺 = 50 μm。

A: Rabbit IgG as isotypic control for DSC; B: Mouse anti-human Vimentin pAb staining for DSC; C: Rabbit anti-human Prolactin pAb staining for DSC. Bar = 50 μm.

表 2 不同浓度的 TGF-β1 对人蜕膜基质细胞中趋化因子 mRNA 水平表达的影响

Table 2 The effect of different concentrations of TGF-β1 on the expression of chemokine mRNA in human decidual stromal cells (n = 3)

	TGF-β1 (ng/ml)			
	0	1	5	10
CX3CL1	0.520 ± 0.111	0.130 ± 0.020	0.070 ± 0.024	0.100 ± 0.024
CXCL16	1.020 ± 0.144	0.940 ± 0.109	0.700 ± 0.015	0.760 ± 0.258
CXCR6	0.380 ± 0.038	0.400 ± 0.049	0.400 ± 0.049	0.540 ± 0.064
CXCL12	1.080 ± 0.077	1.250 ± 0.153	1.160 ± 0.022	0.610 ± 0.254
CXCR4	0.200 ± 0.045	0.500 ± 0.049	0.540 ± 0.085	0.980 ± 0.236

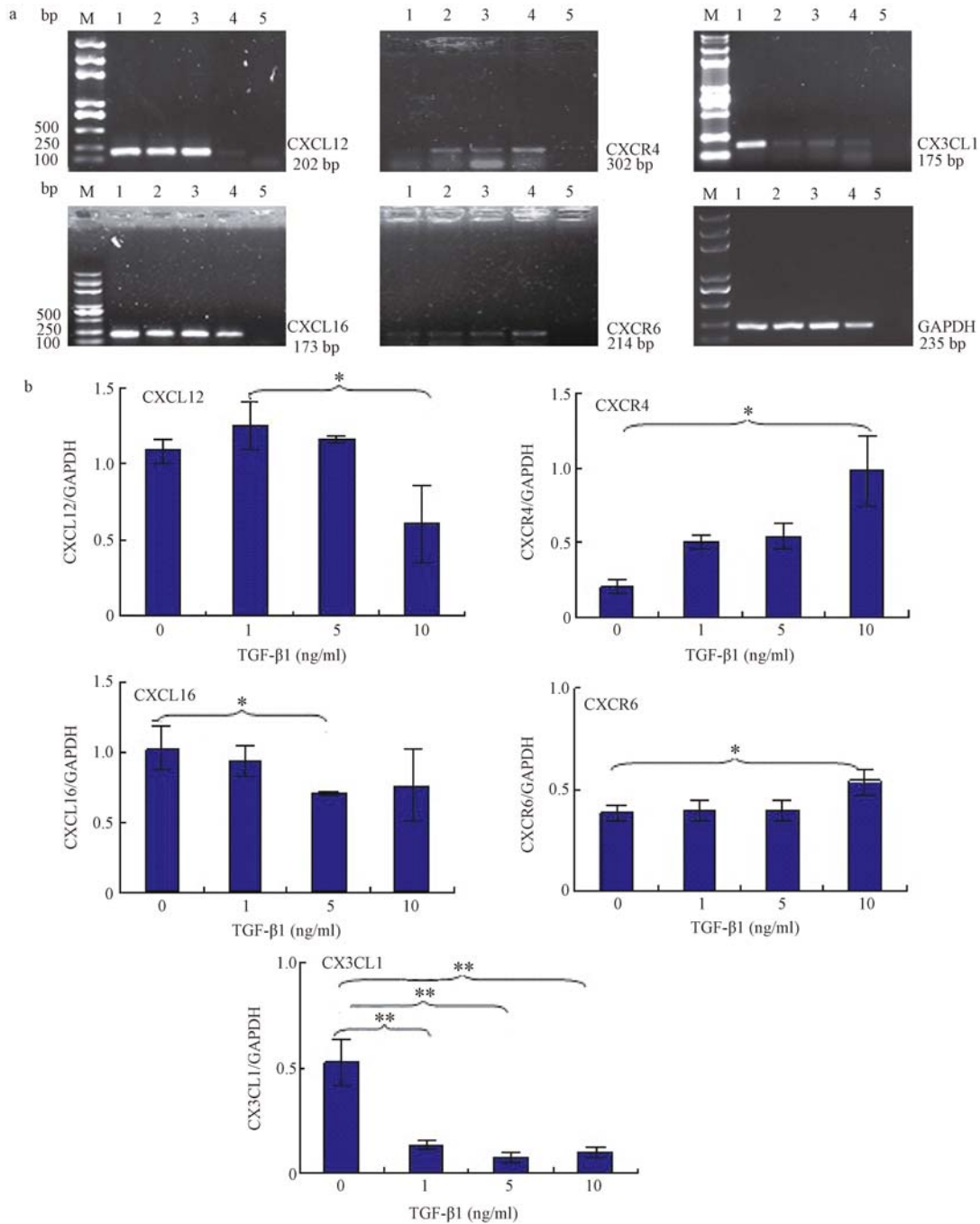


图 3 TGF-β1 调节人蜕膜基质细胞中趋化因子 mRNA 水平的表达

Fig 3 TGF-β1 regulated the expression of chemokine mRNA of human decidual stromal cells

a: 表示不同浓度(0 ng/ml,1 ng/ml,5 ng/ml,10 ng/ml) TGF-β1 处理人蜕膜基质细胞后,趋化因子的 RT-PCR 产物。M. 5 kb DNA 分子量标准; 1、2、3 和 4 分别表示 0 ng/ml,1 ng/ml,5 ng/ml,10 ng/ml 的 TGF-β1 处理下趋化因子 RT-PCR 产物条带; 5 为阴性对照。b: 密度灰度扫描值统计图。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

a: Showing the PCR products of chemokine expression in human decidual stromal cells after treatment with different concentrations (0 ng/ml,1 ng/ml,5 ng/ml,10 ng/ml) of TGF-β1. M. 5 kb DNA ladder marker; 1,2,3 and 4 indicate human decidual stromal cells chemokine expression after treatment with 0 ng/ml,1 ng/ml, 5 ng/ml,10 ng/ml of TGF-β1 respectively;5 served as a negative control. b: Statistical analysis of optical density value. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

表 3 不同浓度的 TGF-β1 对人蜕膜基质细胞中趋化因子蛋白水平表达的影响  
**Table 3 The effect of different concentrations of TGF-β1 on the expression of chemokine protein in human decidual stromal cells (n = 3)**

	TGF-β1 (ng/ml)			
	0	1	5	10
CX3CL1	0.77 ± 0.010	0.68 ± 0.009	0.63 ± 0.019	0.51 ± 0.078
CXCL16	0.50 ± 0.046	0.42 ± 0.080	0.37 ± 0.031	0.29 ± 0.045
CXCR6	0.78 ± 0.080	0.84 ± 0.014	0.99 ± 0.111	1.10 ± 0.025

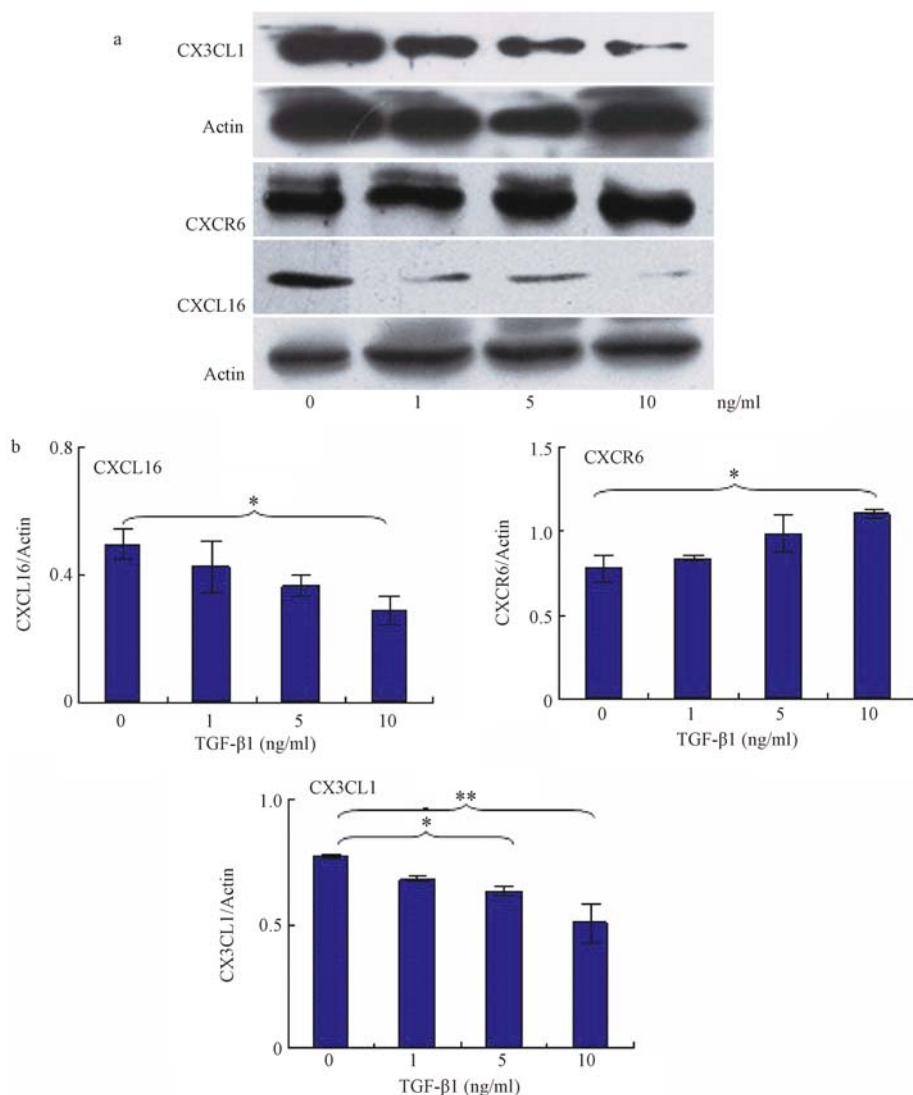


图 4 TGF-β1 调节人蜕膜基质细胞中趋化因子蛋白水平的表达

**Fig. 4 TGF-β1 regulated the expression of chemokine protein of human decidual stromal cells**

a: 表示不同浓度(0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) TGF-β1 处理人蜕膜基质细胞后, 趋化因子的 Western-blot 结果图; b: 密度灰度扫描值统计图。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

a: Indicating chemokine protein expression in human decidual stromal cells after treatment with different concentrations (0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml and 10 ng/ml) of TGF-β1. b: statistical analysis of optical density value. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .



呈同源性分布<sup>[11]</sup>,这说明子宫内膜基质细胞在生理周期内能够高表达 TGF- $\beta$ 1,表明了 TGF- $\beta$ 1 在这一生理时期内的重要作用。RT-PCR 和原位杂交技术显示,TGF- $\beta$ 1 在妊娠初期的胎盘中稳定表达,并与滋养层细胞的侵入特性有关<sup>[12]</sup>。另有研究指出,适当浓度的 TGF- $\beta$ 1 有利于蜕膜化反应,高浓度的 TGF- $\beta$ 1 能够抑制蜕膜化反应<sup>[2]</sup>,蜕膜化反应是妊娠期间的一种特有现象,表现为基质细胞形态学和功能学的变化,蜕膜化的基质细胞有利于妊娠的维持,蜕膜基质细胞在滋养层细胞的浸润过程中起到了关键性的作用。蜕膜基质细胞表达 TGF- $\beta$ 1,不但可以通过自分泌的方式调节蜕膜化反应,又可以通过旁分泌的方式调节滋养层细胞的浸润,蜕膜化反应可以抑制滋养层细胞的过度浸润,滋养层细胞浸润不足或过度浸润都会引起妊娠疾病,而不利于妊娠的进行。

在大鼠(*Rattus norvegicus*)的小神经胶质细胞中,TGF- $\beta$ 1 能够上调 CX3CR1 并且下调 CX3CL1 在 mRNA 和蛋白水平的表达,抑制 CX3CL1 激活的信号通路,即 TGF- $\beta$ 1 抑制 CX3CL1 激活的 ERK1/2 通路;TGF- $\beta$ 1 增加 CX3CR1 在小神经胶质细胞中的表达,可能是通过增强 CX3CR1 基因的转录实现的<sup>[10,13]</sup>。本研究中,TGF- $\beta$ 1 下调趋化因子 CX3CL1 的表达可能对滋养层细胞的过度浸润有抑制作用;已有的研究表明,CX3CL1 除了作为分泌型的趋化因子又可以作为一种粘附分子,母胎界面的 CX3CL1 主要介导细胞之间的粘附,对滋养层细胞的浸润有重要作用。TGF- $\beta$ 1 基因敲除鼠易患多部位的炎性疾病,这些疾病都与全身的前炎症因子表达上调有关。有资料表明,TGF- $\beta$ 1 能够上调人外周血 NK 细胞表面趋化因子受体 CXCR3 和 CXCR4 的表达<sup>[14]</sup>,从而调节机体炎症部位 NK 细胞的分布;炎症部位通常伴有大量的趋化因子等细胞因子,NK 细胞表面分布有种类繁多的趋化因子受体,TGF- $\beta$ 1 通过调节 NK 细胞表面趋化因子受体的上调,使趋化因子能够从外周血募集具有趋化因子受体的 NK 细胞到炎症部位,进而行使 NK 细胞

的免疫功能。通常 TGF- $\beta$ 1 诱导外周血的 CD4<sup>+</sup>T 细胞高表达 CXCR4,IFN- $\gamma$ 、PMA、IL-2、IL-15 和 SDF-1 能够下调 CXCR4 的表达<sup>[15]</sup>;CD4<sup>+</sup>T 细胞与前炎症反应有关,炎症部位的 CD4<sup>+</sup>T 细胞可能是通过趋化因子 CXCL12 与细胞表面的受体 CXCR4 结合募集而来的。TGF- $\beta$ 1 诱导人幼稚 T 细胞归巢的研究表明,TGF- $\beta$ 1 调节迁移的机制可能是上调 SDF-1 受体 CXCR4 的表达<sup>[16]</sup>。本研究分别从 mRNA 和蛋白水平探究了 TGF- $\beta$ 1 与趋化因子 CXCL12 和 CXCL16 配体/受体的关系,结果表明,TGF- $\beta$ 1 能够下调人蜕膜基质细胞中趋化因子 CXCL12 和 CXCL16 的表达,上调 CXCR4 和 CXCR6 的表达;而 CXCL12 对淋巴细胞有强烈的趋化作用并且能够调节滋养层细胞的浸润和淋巴细胞的募集,滋养层细胞和蜕膜基质细胞表面表达 CXCR4,体外培养的滋养层细胞能分泌 CXCL12,以自分泌的方式调节滋养层细胞的浸润<sup>[17]</sup>。TGF- $\beta$ 1 能够抑制滋养层细胞的浸润,它的这一作用很可能是通过调节趋化因子 CXCL12 和 CXCL16 实现的。Lin 等<sup>[18]</sup>首次证明了 CXCL12 能够募集 Treg 细胞,参与免疫耐受的形成。蜕膜组织中的 CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK 细胞表面表达 CXCR4 和 CXCR6 受体,人蜕膜基质细胞和滋养层细胞分泌的 CXCL12 和 CXCL16 能够趋化蜕膜组织中的 CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK 细胞,从而发挥免疫调节作用<sup>[19-20]</sup>;本文中 TGF- $\beta$ 1 通过对 CXCL12 及 CXCL16 的调节作用间接地影响了蜕膜组织中 Treg 细胞和 CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK 细胞的分布,对妊娠的维持具有重要作用。根据本文的研究结果,推测 TGF- $\beta$ 1 发挥免疫调节作用的可能机制是,通过调节蜕膜基质细胞表面的趋化因子配体/受体上调或下调,从而达到蜕膜基质细胞在母胎界面处募集免疫细胞和趋化因子调节滋养层细胞浸润的双重作用。本研究从趋化因子受体和配体两个方面证实了 TGF- $\beta$ 1 与趋化因子之间的调控关系,但趋化因子配体和受体对 TGF- $\beta$ 1 的效应是不同的;推测这可能是 TGF- $\beta$ 1 对调节对象的一种负反馈调节机制,通过对趋化因



子配体的下调,使得趋化因子配体募集免疫细胞的能力下降,对趋化因子受体的上调,使得蜕膜细胞结合趋化因子配体-免疫细胞复合体的机会大大减少,而主要表现为蜕膜细胞本身趋化因子配体-受体的自分泌调节作用,这两方面的共同作用使得蜕膜组织募集免疫细胞的能力有所下降,从而有利于妊娠的维持。

蜕膜基质细胞分泌的趋化因子配体主要与蜕膜免疫活性细胞的募集和滋养层细胞的浸润特性有关,蜕膜基质细胞表面的趋化因子受体则主要与蜕膜免疫活性细胞的募集有关。妊娠期间的母胎界面是一种免疫耐受环境,有着大量的免疫细胞和免疫分子参与到这一环境中,TGF- $\beta$ 1 作为一种维持妊娠分子,调节趋化因子的分泌;趋化因子能够趋化特定的免疫细胞到母胎界面,参与妊娠免疫耐受的形成;蜕膜细胞作为基质细胞的一种特化形式,其周围有着大量的蜕膜免疫活性细胞并能分泌 TGF- $\beta$ 1。本实验结果可以推测 TGF- $\beta$ 1、趋化因子和免疫细胞是母胎界面免疫调控网络的重要组成部分。

我们初步研究了 TGF- $\beta$ 1 与趋化因子配体、受体的关系,但对它们之间信号通路以及趋化因子趋化特性还有待于进一步探索。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Alleva D G, Elgert K D. Promotion of macrophage-stimulated autoreactive T cell proliferation by interleukin-10; counteraction of macrophage suppressor activity during tumor growth. *Immunobiology*, 1995, 192 (3/4): 155 - 171.
- [ 2 ] Stoikos C J, Harrison C A, Salamonsen L A, et al. A distinct cohort of the TGF $\beta$  superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. *Hum Reprod*, 2008, 23 (6): 1447 - 1456.
- [ 3 ] Tang M Y, Taylor H S, Tabibzadeh S. *In vivo* gene transfer of lefty leads to implantation failure in mice. *Hum Reprod*, 2005, 20 (7): 1772 - 1778.
- [ 4 ] Wu H X, Guo P F, Jin L P, et al. Functional regulation of thymic stromal lymphopoietin on proliferation and invasion of trophoblasts in human first-trimester pregnancy. *Hum Reprod*, 2010, 25 (5): 1146 - 1152.
- [ 5 ] 于洁, 黄煜, 崔竹梅, 等. 趋化因子 CXCL16 对人早孕蜕膜免疫细胞的迁移及分泌细胞因子的调节作用. *现代免疫学*, 2009, 29 (3): 235 - 239.
- [ 6 ] Hannan N J, Salamonsen L A. CX3CL1 and CCL14 regulate extracellular matrix and adhesion molecules in the trophoblast; potential roles in human embryo implantation. *Biol Reprod*, 2008, 79 (1): 58 - 65.
- [ 7 ] Tamaki K, Kakinuma T, Saeki H, et al. Serum levels of CCL17/TARC in various skin diseases. *J Dermatol*, 2006, 33 (4): 300 - 302.
- [ 8 ] García-Pacheco J M, Oliver C, Kimatrai M, et al. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7 (12): 1151 - 1157.
- [ 9 ] Cho J H, Yoon M S, Koo J B, et al. The progesterone receptor as a transcription factor regulates phospholipase D1 expression through independent activation of protein kinase A and Ras during 8-Br-cAMP-induced decidualization in human endometrial stromal cells. *Biochem J*, 2011, 436 (1): 181 - 191.
- [ 10 ] Chen S Z, Luo D F, Streit W J, et al. TGF- $\beta$ 1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia. *J Neuroimmunol*, 2002, 133 (1/2): 46 - 55.
- [ 11 ] Johnson M C, Torres M, Alves A, et al. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis; expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, 3: 45.
- [ 12 ] Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, et al. Inhibition of TGF- $\beta$ <sub>3</sub> restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest*, 1999, 103 (12): 1641 - 1650.
- [ 13 ] Harrison J K, Jiang Y, Chen S Z, et al. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (18): 10896 - 10901.
- [ 14 ] Inngjerdigen M, Damaj B, Maghazachi A A. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood*, 2001, 97 (2): 367 - 375.
- [ 15 ] Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay C R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*, 1998, 19 (12): 568 - 574.
- [ 16 ] Franitza S, Kollet O, Brill A, et al. TGF-beta1 enhances SDF-1alpha-induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules. *Eur J Immunol*, 2002, 32 (1): 193 - 202.
- [ 17 ] Zhou W H, Du M R, 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(12): 2669–2679.
- [18] Lin Y, Xu L, Jin H Y, et al. CXCL12 enhances exogenous CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cell migration and prevents embryo loss in non-obese diabetic mice. *Fertil Steril*, 2009, 91(6): 2687–2696.
- [19] Wu X, Jin L P, Yuan M M, et al. Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1. *J Immunol*, 2005, 175(1): 61–68.
- [20] Huang Y, Zhu X Y, Du M R, et al. Human trophoblasts recruited T lymphocytes and monocytes into decidua by secretion of chemokine CXCL16 and interaction with CXCR6 in the first-trimester pregnancy. *J Immunol*, 2008, 180(4): 2367–2375.

(上接第 22 页)

- [2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Tesudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, 33(6): 38–45.
- ②专著:作者. 书名. 版本(第一版不标注). 出版地:出版者,出版年:起止页码. 示例:  
[3]孙儒泳. 动物生态学原理. 2 版. 北京:北京师范大学出版社,1992: 329–330.
- [4]Jiang Z G. Conservation Biology. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997: 160–164.
- ③论文集:作者. 题名//编者. 论文集名. 出版地:出版者,出版年:起止页码. 示例:  
[5]陈大元. 动物显微受精与克隆研究//中国动物学会. 中国动物科学研究. 北京:中国林业出版社,1999: 59–64.
- [6]Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China//Song D X. Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China. Beijing: Science Press, 1997: 395–399.
- ④学位论文:作者. 论文题目. 保存单位所在地:保存单位,保存年:起止页码. 示例:  
[7]张劲硕. 中国蝙蝠的整合研究. 北京:中国科学院动物研究所博士学位论文, 2010.
- ⑤电子文献:主要责任者. 电子文献题名[文献类型标志/文献载体标志]. [引用日期]. 电子文献的出处或可获得的地址,发表或更新日期. 示例:  
[8]IUCN 2010. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010. 4 [BD/OL]. [2010-12-23]. www.iucnredlist.org.