

- 9 He XX, Chang Y, Meng FY, *et al.* MicroRNA - 375 targets AEG - 1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. *Oncogene*, 2012, 31 (28): 3357 - 3369
- 10 Hui AB, Bruce JP, Alajez NM, *et al.* Significance of dysregulated metadherin and microRNA - 375 in head and neck cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (24): 7539 - 7550
- 11 Leidner RS, Ravi L, Leahy P, *et al.* The microRNAs, MiR - 31 and MiR - 375, as candidate markers in Barrett's esophageal carcinogenesis[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012, 51 (5): 473 - 479
(收稿日期:2013 - 04 - 29)
(修回日期:2013 - 05 - 15)

在母胎界面滋养细胞通过调节 Th1/Th2 及 Th17 免疫参与妊娠免疫耐受机制的研究

刘凤娟 王志华 全进毅 董昱岳

摘 要 **目的** 本研究旨在探讨滋养细胞对 T 淋巴细胞细胞因子产生和平衡的影响,以及滋养细胞对 T 淋巴细胞特异性转录因子的影响。**方法** 分离早孕胎盘细胞滋养细胞,收集滋养细胞培养上清液为滋养细胞条件培养基,供淋巴细胞培养用。分离健康未孕妇女的外周血单个核细胞,用人 T 细胞富集柱纯化 CD3⁺ T 淋巴细胞。以佛波酯(PMA)刺激 T 淋巴细胞,酶联免疫吸附分析法测定淋巴细胞产生的细胞因子浓度,实时定量聚合酶链反应检测 T 淋巴细胞中 Th1、Th2 和 Th17 免疫特异性转录因子水平。**结果** 滋养细胞条件培养基显著减少 T 淋巴细胞产生 IL - 2、IFN - γ 和 TNF - α , IL - 4 和 IL - 10 的水平无统计学差异,而 Th1/Th2 (IL - 2/IL - 4、IFN - γ /IL - 4、TNF - α /IL - 4、IL - 2/IL - 10、IFN - γ /IL - 10 和 TNF - α /IL - 10)显著降低;滋养细胞条件培养基显著抑制 T 淋巴细胞产生 IL - 17。滋养细胞条件培养基显著降低 T 淋巴细胞 Th1 特异性转录因子 STAT - 4 的表达,显著增强 Th2 特异性转录因子 STAT - 6 和 GATA - 3 表达;但对 Th1 特异性转录因子 T - bet、Th17 特异性转录因子 RORC 无显著性影响。**结论** 滋养细胞主要通过抑制 T 淋巴细胞 Th1 细胞因子产生而使 Th1/Th2 平衡向 Th2 漂移,并且抑制 Th17 免疫,在妊娠免疫耐受中起着重要的作用。

关键词 滋养细胞 Th1 免疫 Th2 免疫 Th17 免疫

Placental Trophoblasts Regulated the Balance of Th1/Th2 Immunity and Th17 Immunity at the Fetomaternal Interface. Liu Fengjuan, Wang Zhihua, Tong Jinyi, Dong Minyue. *The First People's Hospital of Hangzhou, Zhejiang 310006, China*

Abstract Objective To clarify the effect of placental trophoblasts on T lymphocyte by observing the alteration in the production of cytokines and the expression of specific transcription factors for Th1, Th2 and Th17 immunity in T lymphocyte. **Methods** Placental trophoblasts were isolated from chorionic villi of normal pregnancy and conditioned medium was made after 72 hours culture of trophoblast. PBMC were isolated from healthy female donors and T lymphocytes were purified and cultured in the presence or absence of conditioned medium. Enzyme - linked sorbent immune assay (ELISA) was used to detect the concentration of IL - 2, TNF - γ , IFN - α , IL - 4, IL - 10 and IL - 17 in supernatants of T cell culture and real - time PCR was used to detect the expression of specific transcription factors for Th1 immunity (T - bet and STAT - 4), Th2 (GATA - 3 and STAT - 6) and Th17 (RORC) in T lymphocyte. **Results** The level of IL - 2, IFN - γ , TNF - α and IL - 17 was significantly decreased when the T lymphocytes were cultured in conditioned medium compared with control medium, while the level of IL - 10 and IL - 4 were comparable. The presence of conditioned medium decreased the ratio of Th1/Th2 as indexed by IL - 2/IL - 4, IFN - γ /IL - 4, TNF - α /IL - 4, IL - 2/IL - 10, IFN - γ /IL - 10 and TNF - α /IL - 10 compared with control medium. The expression of GATA - 3 and STAT - 6 were significantly increased and STAT - 4 was reduced when T cells were cultured in conditioned medium, while the expression of T - bet and RORC were comparable. **Conclusion** Placental trophoblast - induced shift of Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibition of Th17 might be among the mechanisms involved in maternal tolerance to fetus.

Key words Trophoblast; Th1 immunity; Th2 immunity; Th17 immunity

妊娠是一种特殊的 Th2 现象。正常妊娠时,母体的 Th2 型免疫应答占优势,Th1 型免疫受到抑制,使 Th1/Th2 平衡向 Th2 漂移。在母胎界面,Th2 型细胞

作者单位:310006 杭州市第一人民医院(刘凤娟、王志华、全进毅);浙江大学医学院附属妇产科医院(董昱岳)

因子白介素 (IL) - 4 和 IL - 10 水平的升高有利于妊娠, 而 Th1 型细胞因子 IL - 2、干扰素 (IFN) - γ 和肿瘤坏死因子 (TNF) - α 的增加与妊娠失败如流产、子痫前期关系密切。然而, 参与 Th2 型免疫优势建立的机制至今仍不明确。妊娠免疫耐受机制是复杂多样的。最近的研究表明 Th17 免疫与人正常妊娠的建立存在相关性, Th17 细胞, 即分泌 IL - 17 的 Th 细胞, 是不同于 Th1 和 Th2 的 CD4⁺ 细胞亚群, 参与多种炎症反应、自身免疫性疾病的发生发展。关于 Th17 免疫的研究是来自小鼠的, 而人类 IL - 17 作用的研究颇少。因此, Th17 免疫是否参与人类母胎免疫耐受还未见研究。本研究旨在探讨滋养细胞对 T 淋巴细胞细胞因子产生和平衡的影响, 以及滋养细胞对 T 淋巴细胞特异性转录因子的影响。

材料与方法

1. 实验材料: ELX800 型酶标仪 (美国 Bio - Tek 公司), 胰酶 (美国 Sigma 公司), DNase (美国 Sigma 公司), 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青公司), 佛波酯 (美国 Sigma 公司), 离子霉素 (美国 Sigma 公司), 人 T 淋巴细胞富集柱 (美国 R&D 公司), 酶联免疫吸附分析试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司), Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司)。

2. 滋养细胞培养和条件培养基制备: 滋养细胞的分离、培养方法参考文献^[1]。无菌采集知情同意的健康志愿终止妊娠者的早孕绒毛, 置无菌 PBS 中 15min 内送细胞室分离滋养细胞。用 PBS 洗去血污, 剪去血管、结缔组织和蜕膜组织; 取适量绒毛组织, 剪碎至约 1 ~ 2mm³ 大小组织块; 用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的含胰酶 (0.1%) 和 DNase (500U/ml) 的 Hank's 液 37℃ 震荡消化 15min, 静置 3 ~ 5min; 吸取上层细胞悬液, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 离心后将沉淀悬浮于 Hank's 液中; 重复消化 2 次, 合并细胞悬液; 过 100 目细胞筛, 用红细胞裂解液裂解红细胞, Hank's 液洗涤 3 次, 悬浮于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中; 计数细胞, 调整细胞密度至 1 × 10⁶/ml, 接种于 24 孔板, 置于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养; 24h 后更换培养液; 继续培养 72h 后收集培养液, 3000r/min 离心 20min 后取上清液为滋养细胞条件培养基, -30℃ 保存, 供淋巴细胞培养用。

3. T 淋巴细胞分离和培养: 无菌抽取知情同意的健康未孕女性志愿者外周静脉血 20ml, 肝素抗凝; 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 对倍稀释, 轻轻铺在 4ml 淋巴细胞分离液上, 2500r/min 离心 30min; 轻轻吸取界面上的外周血单个核细胞 (PBMC), 用 PBS 洗涤 3 次; T 淋巴细胞纯化采用细胞柱负选法, 人 T 淋巴细胞富集柱纯化后 T 细胞纯度 95% 以上, T 细胞回收率约 80%; 将 T 细胞接种于 24 孔板中, 细胞密度为 1 × 10⁶/ml, 培养基为滋养细胞条件培养基, 以含 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基为对照; 各孔加佛波酯和离子霉素终浓度分别为 30ng/ml 和 50ng/ml; 将 T 淋巴细胞置于 37℃、含 5% 二氧

化碳的培养箱中培养 72h; 培养结束收集上清液为淋巴细胞培养上清液, 3000r/min 离心 20min 后 -30℃ 保存, 供测定细胞因子用; 收集 T 淋巴细胞, -70℃ 保存, 供测定 mRNA 用。

4. 细胞因子的测定: 采用酶联免疫吸附分析 (ELISA) 测定淋巴细胞培养上清液细胞因子中白介素 - 2, 干扰素 - γ , 肿瘤坏死因子 - α , 白介素 - 4, 白介素 - 10 和白介素 - 17 的浓度。用 ELX800 型酶标仪测定各孔吸光度 (A), 绘制相应的标准曲线, 并计算样品中细胞因子的浓度。

5. real - time PCR 检测基因: real - time PCR 检测 T 淋巴细胞中转录因子 T - bet、STAT - 4、GATA - 3、STAT - 6 和 RORC 的表达。Trizol 法提取 T 淋巴细胞总 RNA, 合成 cDNA, ABI PRISM 7900 进行 real - time PCR, 两步法 PCR 扩增标准程序: Stage 1 预变性 reps: 1 95℃ 30s; Stage 2 PCR 反应 reps: 40 95℃ 5s, 60℃ 30s。

6. 统计学方法: 采用 SPSS 11.0 软件处理数据。实验均平行重复 3 管或以上, 同一实验重复 3 次或以上。本研究结果代表其中 1 次实验结果。实验数据均呈正态分布, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 差表示。显著性检验采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 条件培养基对 T 淋巴细胞细胞因子产生的影响: 滋养细胞条件培养基显著减少 T 淋巴细胞培养上清液中白介素 - 2 (P = 0.009)、干扰素 - γ (P = 0.020)、肿瘤坏死因子 - α (P = 0.003) 和白介素 - 17 (P = 0.0001) 的产生, 但不影响淋巴细胞产生白介素 - 4 (P = 0.490) 和白介素 - 10 (P = 0.470) (图 1)。Th1/Th2 (IL - 2/IL - 4、IFN - γ /IL - 4、TNF - α /IL - 4、IL - 2/IL - 10、IFN - γ /IL - 10 和 TNF - α /IL - 10) (P = 0.002, 0.040, 0.007, 0.030, 0.047, 0.002) 的比例显著降低 (图 2)。

2. 条件培养基对淋巴细胞特异性转录因子表达的影响: 实时 PCR 检测 T 淋巴细胞中转录因子的水平, 滋养细胞条件培养基显著降低 T 细胞 Th1 免疫特异性转录因子 STAT - 4 (P = 0.006) 的表达, 但对 T - bet (P = 0.960) 没有显著影响; 显著增强 Th2 免疫特异性转录因子 STAT - 6 (P = 0.02) 和 GATA - 3 (P = 0.0028) 的表达; 对 Th17 免疫特异性转录因子 RORC (P = 0.350) 表达无显著影响 (图 3)。

讨 论

由于妊娠免疫耐受的奇妙性与复杂性, 滋养细胞及其产物在妊娠免疫耐受中作用一直是该领域研究的热点。颇多研究提示滋养细胞产生多种免疫调节因子在妊娠免疫耐受中起着关键的作用^[1~4]。妊娠是一种特殊的 Th2 现象, 胚胎通过表达具有胚胎保护作用的 Th2 型细胞因子并下调对胚胎有害的 Th1 型

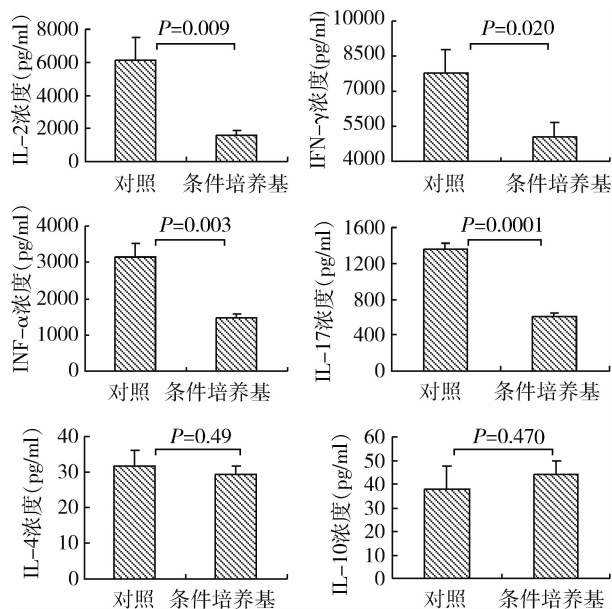


图1 T淋巴细胞培养上清液细胞因子浓度

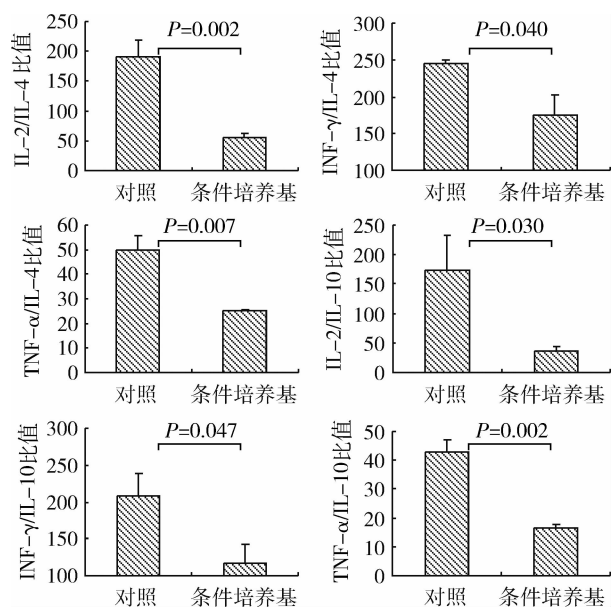


图2 T淋巴细胞培养上清液 Th1/Th2 比值

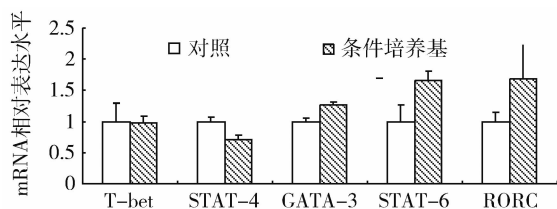


图3 T淋巴细胞特异性转录因子的水平

型细胞因子的水平显著高于正常妊娠妇女,而 Th2 型细胞因子的水平却显著降低, Th1/Th2 平衡偏向 Th1;先兆子痫患者外周血单个核细胞培养上清液中 IL-2 和 IFN-γ 较正常妊娠组显著增加,而 IL-10 的水平显著降低;这些发现均表明流产、子痫前期的发生、发展与母胎界面中 Th1/Th2 失衡存在密切的关系,但是妊娠期间 Th1/Th2 平衡的调节机制不甚清晰。笔者的研究发现滋养细胞条件培养基显著减少淋巴细胞产生白介素-2、干扰素-γ、肿瘤坏死因子-α的产生,且 Th1/Th2 (IL-2/IL-4、IFN-γ/IL-4、TNF-α/IL-4、IL-2/IL-10、IFN-γ/IL-10 和 TNF-α/IL-10) 向 Th2 偏移,从而在细胞因子水平上为证明滋养细胞产物参与调节 Th1/Th2 平衡向 Th2 漂移提供了一定证据。另外,笔者的研究在 T 淋巴细胞特异性转录因子水平亦发现一致的结果,滋养细胞条件培养基显著降低 T 细胞 Th1 免疫特异性转录因子 STAT-4 的表达,同时显著增强 Th2 免疫特异性转录因子 STAT-6 和 GATA-3 的表达,在基因水平调节 Th2 占优势地位。T 淋巴细胞特异性转录因子水平在调节其细胞的分化和细胞因子产生的过程中起着关键的作用, T-bet 与 STAT-4 选择性地表达于 Th1 细胞,其在未分化及已分化的 Th2 细胞中的表达可使其 IFN-γ 分泌量增加,而 IL-4 和 IL-5 的分泌量减少,从而转化为 Th1 细胞^[5]。而 GATA-3 与 STAT6 选择性地表达在 Th2 细胞,在早期分化的 Th1 细胞及已分化的 Th1 细胞中异位表达,可抑制 Th1 细胞分化,使 IL-4 等 Th2 型细胞因子分泌量增加,而 IFN-γ 等 Th1 型细胞因子分泌量减少,进而向 Th2 细胞分化。

IL-17 mRNA 及蛋白表达于人胎盘组织中,并且在妊娠过程中发挥重要作用^[6]。在正常妊娠过程中, Th17 免疫发挥抑制作用^[7-10]。在子痫前期患者外周血中, Th17 细胞数目明显增加^[11],且在自发性早产患者血清中 IL-17 水平显著升高^[12],因此, IL-17 高表达与不良妊娠有密切的关系。然而,在母胎界面, Th17 免疫如何被精确调控是不清楚的。笔者的研究发现胎盘滋养细胞产物可以降低 Th17 型细胞因子 IL-17 的生成,从而抑制 Th17 免疫。然而在转录因子 (RORC) 水平没有得到一致的结果,有待于进一步的研究。

综上所述,胎盘滋养细胞产物抑制 T 淋巴细胞产生 Th1 型和 Th17 型细胞因子,抑制 Th1 免疫特异性转录因子并增强 Th2 免疫特异性转录因子,表明滋养

细胞因子而保护胚胎自身。反复自然流产妇女的外周血单个核细胞在受滋养细胞抗原刺激后产生 Th1

细胞在某种途径上可以通过抑制 Th1 免疫而实现 Th1/Th2 平衡,并且抑制 Th17 免疫,从而在妊娠免疫耐受中发挥一定的作用。然而,妊娠免疫耐受的机制复杂多样,需要深入的研究。

参考文献

- 1 Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, *et al.* 3rd: Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placenta[J]. *Endocrinology*, 1986, 118(4):1567-1582
- 2 Gupta AK, Holzgreve W, Hahn S. Microparticle - free placentally derived soluble factors downmodulate the response of activated T cells [J]. *Hum Immunol*, 2005, 66(9):977-984
- 3 Anurag KG, Wolfgang H, Sinuhe H. Microparticle - free placentally derived soluble factors downmodulate the response of activated T Cells [J]. *Human Immunology*, 2005, 66: 977-984
- 4 Dong M, Ding G, Zhou J, *et al.* The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules - a proteomic analysis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 21: 463-472
- 5 Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, *et al.* T - bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage - specific targeting of distal regulatory elements[J]. *Nat Commun*, 2012, 3:1268
- 6 Pongcharoen S, Somran J, Sritippayawan S, *et al.* Interleukin - 17 expression in the human placenta[J]. *Placenta*, 2007, 28(1):59-

63

- 7 McClain MA, Gatson NN, Powell ND, *et al.* Pregnancy suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through immunoregulatory cytokine production[J]. *J Immunol*, 2007, 179:8146-8152
- 8 Nakashima A, Ito M, Yoneda S, *et al.* Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 63(2): 104-109
- 9 Santner - Nanan B, Peek MJ, Khanam R, *et al.* Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL - 17 - producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia[J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 7023-7030
- 10 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
- 11 Darmochwal KD, Kludka SM, Tabarkiewicz J, *et al.* The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia[J]. *J Reprod Immunol*, 2012, 93(2): 75-81
- 12 Nishizawa H, Hasegawa K, Suzuki M, *et al.* Mouse model for allogeneic immune reaction against fetus recapitulates human pre - eclampsia[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2008, 34(1):1-6

(收稿日期:2013-03-28)

(修回日期:2013-05-07)

改良隐匿式切口腹股沟下显微镜精索静脉结扎术的临床观察

蔡万松 闻立平 蒋祥新 关胜 王琰

摘要 **目的** 利用多普勒彩超测定术前术后睾丸动脉血流参数及精液参数分析评价改良隐匿式切口显微技术腹股沟下精索静脉结扎术的疗效。**方法** 笔者对 26 例临床诊断为左侧精索静脉曲张的患者采用改良腹股沟下隐匿式切口显微镜技术治疗(腹股沟下隐匿式小切口,睾丸不提出切口外,保留睾丸引带静脉及精索外静脉穿支),在术前及术后 3、6、12 个月采用彩色多普勒超声测定双侧睾丸动脉血流参数:收缩期峰值血流速度(PSV),舒张末期血流速度(EDV)和阻力指数(RI)。并同时分析术前及术后 3、6 个月精液参数,观察腹股沟管下途径显微镜技术治疗精索静脉曲张的远期疗效。**结果** 术后随访 6~21 个月,平均随访 13.6 个月,术后左侧睾丸内动脉收缩期峰值血流速度较术前提高($P < 0.05$),阻力指数较术前降低($P < 0.05$),差异有统计学意义。术后 3、6 个月精子浓度较术前改善($P < 0.01$),差异有统计学意义,而精子活力(精子前向运动)无明显改善($P > 0.05$),差异无统计学意义。随访过程中,无一例复发,无一例术后出现睾丸萎缩等严重并发症。**结论** 改良隐匿式切口腹股沟下显微镜镜技术治疗精索静脉曲张能明显改善睾丸血流及精液参数,术后并发症少,安全有效。

关键词 隐匿式切口 改良腹股沟下显微镜精索静脉结扎术 精索静脉曲张

Clinical Effect of Modified Microsurgical Subinguinal Varicocelectomy through Hidden Incision. Cai Wansong, Wen Liping, Jiang Xianxin, Guan Sheng, Wang Yan. Department of Urology, Fuyang People's Hospital, Zhejiang 311400, China

基金项目:杭州市卫生科技计划项目(2011B054)

作者单位:311400 杭州,浙江省富阳市人民医院泌尿外科

通讯作者:蔡万松,副主任医师,电子信箱:caiwansong1977@163.com