基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0810-03

小鼠子宫蜕膜化对 uNK 细胞分布及成熟性的影响

张 莉,徐 宏,张保平,彭 婧,况海斌
(南昌大学医学院生理学教研室,南昌 330006)

【摘 要】目的:探讨子宫自然杀伤(Uterine natural killer, uNK)细胞在小鼠妊娠早期子宫的分布及其调节。方法:用 uNK 细胞特异性的 DBA-lectin 抗体,对正常妊娠、延缓着床和人工诱导蜕膜化子宫壁内 uNK 细胞进行免疫组织化学标记。结果:在胚胎着床前,DBA-lectin 染色主要分布于一些血管内皮细胞。至妊娠第 5 d,胚胎着床以后,NK 细胞分布于子宫的系膜侧基质中,主要是一些小的、未成熟的 uNK 细胞。至妊娠第 7、8 d 时,NK 细胞分布于子宫的系膜侧蜕膜中,且逐渐变大和成熟,胞浆颗粒变得越来越致密。在人工诱导蜕膜化模型中,uNK 细胞在子宫内膜的分布及成熟性与正常妊娠过程基本相似。结论:在妊娠早期,小鼠 uNK 细胞分布及成熟性主要受子宫内膜蜕膜化的影响。

【关键词】子宫自然杀伤细胞;子宫;妊娠早期;蜕膜化
【中国图书分类法分类号】R34 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-14

The effect of mouse uterine decidualization on NK cell distribution and maturation

ZHANG Li, et al
(*Department of Physiology, Medical College of Nanchang University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the distribution and regulation of uterine NK cells in mouse uterus during early pregnancy. *Methods*: Using a unique uNK cell marker, Dolichos biflorus agglutinin (DBA) lectin, to localize NK cells in uterus of normal pregnancy, delayed implantation and artificially induced decidualization. *Results*: DBA staining is mainly distributed in some vascular endothelial cells during embryo pre-implantation. In D5 of pregnancy after embryo implantation, NK cells were distributed in the stroma of uterine mesometrial pole, with round, immature and small lymphocyte-like cells. During D7 and D8 of pregnancy, the immunostaining results showed that uNK cells were increasingly accumulated in the mesometrial pole of implantation sites, with their morphology changing from small round cells with scattered cytoplasm to large and mature cells with heavy cytoplasmic granules. In the artificially induced decidualization model, the distribution and maturity of NK cells are similar to those of the normal pregnancy in the mouse uteri. *Conclusion*: The distribution and maturation of uterine NK cells are dependent of uterine decidualization in mouse early pregnancy.

【Key words】uNK cell; Uterus; Early pregnancy; Decidualization

胚胎植入的成功与否,一方面取决于早期胚胎发育形成具有着床能力的囊胚,同时子宫内膜协同性的进入接受状态,即胚胎植入的"窗口期"[1]。子宫内膜的接受性受很多因素的影响,其中一个重要因素是母体的免疫细胞调节[2]。子宫自然杀伤细胞(Uterine natural killer cell,uNK cell)是妊娠过程中最重要的一种免疫细胞,它在重建子宫的高容量、低阻力血管以及随后的胎盘发育过程中具有十分重要意义[3]。

妊娠相关的 uNK 细胞来源于骨髓的淋巴细胞,当其迁移至子宫时,分化为 uNK 细胞,其胞浆中含有丰富、致密的颗粒,可通过 PAS 法(Periodic acid shiff,PAS)来检测其胞浆中颗粒,反应 uNK 细胞的表达[4]。近年来发展一种新型 uNK 细胞特异性标志物:DBA-lectin 法(Dolichos biflorus agglutinin,DBA)研究显示此方法比 PAS 法更敏感,且能检测 uNK 细胞膜成份的变化[5,6]。虽然国外有研究曾用 PAS 法检测妊娠早期小鼠子宫内膜 uNK 细胞的变化[3,7],但迄今国内外均未系统的采用 DBA-lectin 法检测围植入期间小鼠子宫内膜 uNK 细胞的变化。故本研究拟采用 uNK 细胞特异性标志物 DBA-lectin 法,检测 uNK 细胞在妊娠早期小鼠子宫的分布及其调节,以探索 uNK 细胞在妊娠早期小鼠子宫壁内存在意义。

作者介绍:张 莉(1983-),女,硕士,
研究方向:生殖生理与肿瘤。
通讯作者:况海斌,男,博士,副教授,E-mail: hb.kuang@gmail.com。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30760071,30960118);江西省教育厅基金(编号:GJJ08106,09132)。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理

成年雌、雄性昆白小鼠（30 g 左右）购于南昌大学医学院实验动物饲养中心，在室温 25℃左右、光照周期 12L:12D 的条件下饲养。将处于动情期雌鼠分别与同品系雄鼠或结扎的雄鼠进行交配，次日早晨检出阴栓日定为妊娠第 1 d 或假孕第 1 d。妊娠第 1～4 d 的小鼠子宫以从输卵管或子宫中冲出胚胎为准，妊娠 5～8 d 的子宫通过胚胎的植入位点加以证实。于每天早上 9:00 取子宫标本。

延缓着床模型：将妊娠小鼠在妊娠第 4 d 早晨 8:00 至 9:00 之间摘除卵巢，之后在妊娠 5～7 d，每天注射孕酮（P4，1 mg/ 只）以维持延缓着床状态，在妊娠第 7 d 同时给予雌二醇（E2，25 ng/ 只）结束延缓着床促进胚胎着床。于注射雌二醇 12 h 后取子宫进行分析。延缓着床孕鼠只有从子宫中冲出胚胎才能采用，而将没有冲出胚胎的子宫作为对照。

人工诱导蜕膜化：在小鼠假孕第 4 d，一侧宫腔注射植物油 20 μl，另一侧作为对照。通过注射苔盼蓝、称重以及形态的观察，判断人工诱导蜕膜化是否成功。于假孕第 5、6、7、8 d 的 9:00 分别取人工诱导蜕膜化的子宫。

1.2 免疫组织化学

参照刘彬等[8]人的方法，作适当修改，将上述处理的标本固定于 Bouin 氏液中，经逐步脱水处理后包埋于石蜡中。组织切片（5 μm），脱蜡、入水，5% BSA 室温封闭 60 min，再将切片浸入含 3%双氧水的 PBS 中 10 min 以灭活内源性的过氧化物酶，加入生物素化 DBA 凝集素一抗（1:1 500，Sigma）4℃过夜。切片经过 PBS 冲洗后，分别加入的 HRP 标记链霉卵白素的二抗（北京中杉金桥生物技术有限公司），37℃孵育 1 h 后，用 DAB 方法显色。对于 uNK 细胞的分类与成熟性的判断参照 Paffaro VA 等[5]方法。

2 结 果

2.1 妊娠对 uNK 细胞分布、成熟的影响。

在胚胎着床前，DBA 染色主要分布于一些血管内皮细胞。另外，也出现在一些小的 uNK 细胞中，直径大小 6 μm，数目非常少，主要分布于子宫基质中。至妊娠第 5 d（图 1A），胚胎着床以后，uNK 细胞分布于子宫的系膜侧基质中，主要是一些小的、直径大约为 9 μm，胞浆染色颗粒少或没有，未成熟的 uNK 细胞（图 1A，B）。至妊娠第 7、8 d 时（图 1C，D），uNK 细胞分布于子宫的系膜侧蜕膜中，且逐渐变大（直径约为 20 μm）和成熟，胞浆颗粒变得越来越致密。另外，uNK 细胞膜也出现染色。

2.2 延缓着床对 uNK 细胞分布、成熟的影响。

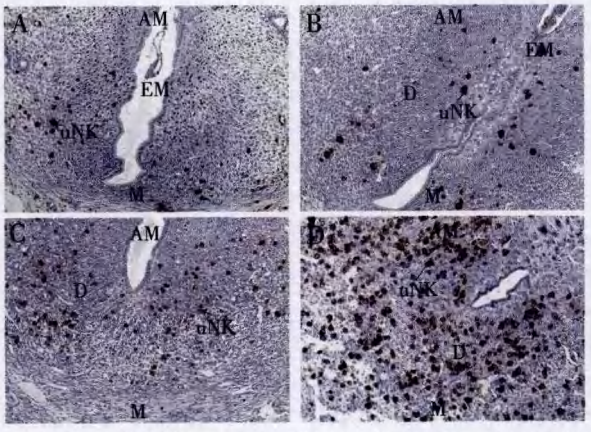
为了检测 uNK 细胞在子宫内膜的表达是否受胚胎着床的影响，我们进一步采用了延缓着床模型。研究结果显示，在胚胎未着床时，子宫内膜几乎没有 uNK 细胞的表达（图 2A），注射雌二醇 12 h 后（图 2B），胚胎一植入，在胚胎着床边缘的基质中，出现了少量 uNK 细胞的表达，但细胞分布比较弥散、数目少且形态小，主要是一些未成熟的 uNK 细胞。

2.3 人工诱导蜕膜化对 uNK 细胞分布、成熟的影响。

根据以上实验结果，推测 uNK 细胞的表达和成熟可能受子宫内膜蜕膜进程的影响，故我们进一步通过人工诱导蜕膜化模型，检测蜕膜化进程对 uNK 细胞分布与成熟性的影响。研究结果显示，在人工诱导蜕膜化模型中，uNK 细胞在子宫内膜的分布及成熟性与正常妊娠过程相似。主要分布于子宫的系膜侧蜕膜中，且随着子宫内膜蜕膜化的进展，uNK 细胞逐渐变大和成熟，胞浆颗粒变得越来越致密，uNK 细胞膜上也出现染色（图 2C，D）。而在未蜕膜化子宫中，DAB 染色主要出现在一些血管内皮上（图 2E）。与相同正常妊娠时间的子宫相比，人工诱导蜕膜化的子宫中 uNK 细胞的数量相对少一些，细胞直径约小 2～3 μm。

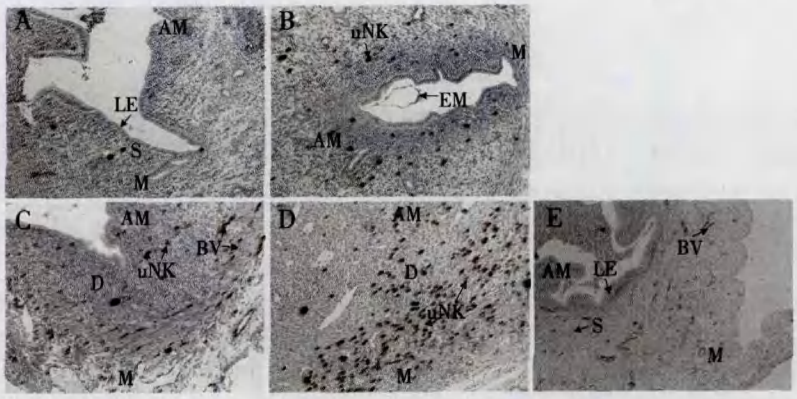
3 讨 论

研究显示，在小鼠胚胎着床的早期妊娠期间，随着子宫内膜蜕膜化进程，许多免疫细胞被归巢至子宫，且被激活分泌许多细胞因子[9]。uNK 细胞是子宫内膜特有的免疫细胞。通过基因敲除方法研究显示，在缺乏 NK/uNK 细胞的妊娠小鼠中，胎盘滋养层细胞的侵入明显变浅，子宫内膜蜕膜化及子



A～D 分别代表小鼠妊娠第 5、6、7、8 d 的子宫。放大倍数 × 100. M. 系膜侧；AM. 对系膜侧；EM. 胚胎；D. 蜕膜；uNK. 子宫 NK 细胞。

图 1 妊娠早期 uNK 细胞在小鼠子宫内分布



A 代表未注射 E2 时的子宫，B 代表注射 E2 12 h 后胚胎着床以后的子宫。C 和 D 分别代表人工诱导蜕膜化假孕第 5 d 和 8 d 的子宫，E 为假孕第 8 d 未注射植物油侧的子宫。放大倍数 × 100.
M.系膜侧；AM. 对系膜侧；LE.腔上皮；S. 基质；D. 蜕膜；uNK.子宫 NK 细胞；BV.血管。

图 2　uNK 细胞在延缓着床和人工诱导蜕膜化的子宫内分布

宫螺旋动脉血管的重建出现明显障碍[3]，这表明 uNK 细胞在胚胎着床过程中可能起着重要调节作用。

uNK 细胞来源于血液循环中淋巴细胞，但与循环中的 NK 细胞具有明显不同，在其细胞膜及胞浆中含有特异性 N-乙酰半乳糖胺的糖结合物，通过 DBA-lectin 染色可以特异性识别 uNK 细胞[5,6]。与 PAS 法相比较，DBA-lectin 染色法更敏感，且能检测 uNK 细胞膜成份的变化。本研究采用 DBA-lectin 法系统检测了 uNK 细胞在小鼠正常妊娠早期子宫内分布，所得结果与 Herington JL 等[7]基本相一致。

胚胎着床以后，随着妊娠进展，uNK 细胞主要分布于子宫蜕膜的系膜侧，且逐渐变大和成熟（主要表现为细胞的变大和胞浆颗粒的出现）。然而，在延缓着床过程中，uNK 细胞表达量少且均为一些未成熟的 uNK 细胞。这就提示，随着妊娠进展，uNK 细胞逐渐增多和成熟，可能受到子宫蜕膜化影响，而不依赖胚胎的出现。故本研究进一步采用了人工诱导蜕膜化模型，结果显示，在人工诱导的蜕膜化子宫内 uNK 细胞的分布及成熟性与正常妊娠过程相似。由此证实，uNK 细胞分布和成熟性的主要受子宫内膜蜕膜进程的影响。子宫内膜细胞在蜕膜化过程中，其基质细胞可能通过分泌一些细胞因子（如 IL-15），支持和促进由外周进入子宫内淋巴细胞增殖分化成 uNK 细胞[10]。而在子宫内膜未蜕膜化时，其主要出现在血管的内皮细胞，这提示 NK 细胞的一些特殊细胞成份首先被招募至血管，而且此过程可能受激素的调控。对 uNK 细胞在子宫内分布及成熟性是否也受卵巢甾体激素调控，还有待于进一步研究。

uNK 细胞被招募子宫内膜时，其通过自分泌或旁分泌形式分泌 IFN-γ、LIF、TGFβ 等与生殖有密切关系的细胞因子，然后通过这些细胞因子调节子宫的内膜的免疫耐受与血管重建[9,11]。另外，被招募至局部的 uNK 细胞通过其抑制性受体，如免疫球蛋白样受体（Killer cell immunoglobulin receptors，KIR），与胚胎滋养层细胞表面 MHC 分子（如 HLA-C，HLA-G 和 HLA-E）结合，形成母 - 胎界面的免疫耐受和免疫平衡，也将有助于半异源性的胚胎在子宫内膜的着床[11]。因此，检测小鼠妊娠早期 uNK 细胞在子宫的分布及其调节将具有十分重要意义。

参 考 文 献

[1] Wang H, Dey S K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models[J]. Nat Rev Genet, 2006,7(3):185-199.

[2] 石永云，凌　斌.自然杀伤细胞与妊娠研究进展[J].国外医学妇产科学分册，2007,34(4):269-271.

[3] Bilinski M J, Thorne J G, Oh M J, et al. Uterine NK cells in murine pregnancy[J]. Reprod Biomed Online, 2008,16(2):218-226.

[4] Stewart I,Peel S. Granulated metrial gland cells in the virgin and early pregnant mouse uterus[J]. J Anat, 1981,133(Pt 4):535-541.

[5] Paffaro V A,Jr.,Bizinotto M C, Joazeiro P P,et al. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity[J]. Placenta,2003,24(5):479-488.

[6] Stewart J, Bebington C R,Mukhtar D D. Lectin binding characteristics of mouse placental cells[J]. J Anat, 2000,196 (Pt 3):371-378.

[7] Herington J L,Bany B M.Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and function in the mouse uterus during decidualization[J]. Biol Reprod, 2007,76(4):579-588.

[8] 刘　彬，程　勇，李　役. Notch1 与 Smad4 在大肠癌中的表达及其临床意义[J].重庆医科大学学报，2009,34(3): 300-303.

[9] 刁红录，徐立滨，杨增明. 妊娠期间子宫内免疫细胞的分布及其功能[J].生理科学进展，2003,34(3):285-287.

[10] 赵丽丽，王　俐，曲　迅，等 妊娠期子宫 NK 细胞功能的研究进展[J].现代免疫学，2005,25(1):85-88.

[11] 贾咏存，周生建，魏莎莉，等.HOXa-10 在早孕小鼠子宫内膜中的表达[J]. 重庆医科大学学报，2007,32(12):1260-1265.

（责任编辑：关蕴良）