

[专题研究]

蜕膜组织 NF- κ B 介导趋化因子与细胞因子调控子宫 NK 功能

余海鲲,茅佳钦,陈书强,王晓红

(空军军医大学唐都医院妇产科生殖医学中心,陕西 西安 710038)

[摘要]目的 探讨人子宫内膜基质细胞(hESC)蜕膜化过程中核因子 κ B(NF- κ B)介导调控趋化因子、细胞因子产生进而影响子宫自然杀伤细胞(uNK)功能。方法 选取2022年10月1日至2023年3月1日在空军军医大学唐都医院妇产科行人工流产终止妊娠的20名健康孕妇,收集其蜕膜组织并分离纯化出人uNK。将hESC转染 siRel A 以抑制 NF- κ B 的活性,随后体外诱导蜕膜化,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测相关趋化因子、细胞因子的 mRNA 水平。再转染 siRel A 的 hESC 诱导蜕膜化后与人原代 uNK 共培养,分别收获 uNK 和细胞上清液,采用流式细胞术检测 uNK 细胞因子分泌水平,通过体外成管实验、侵袭和划痕实验评估 uNK 上清体外促血管形成和促滋养层细胞侵袭迁移的能力。结果 转染 siRel A 后诱导蜕膜化产生的蜕膜基质细胞(DSC)内干扰素 γ (IFN- γ)、基质金属蛋白酶(MMP)9、趋化因子 CCL2 的 mRNA 表达水平均显著降低(t 值分别为 3.290、6.415、5.095, $P < 0.05$)。抑制 NF- κ B 活性并诱导蜕膜化产生的 DSC 与 uNK 共培养后,抑制了 uNK 相关因子血管内皮生长因子(VEGF)、胎盘生长因子(PLGF)和 IFN- γ 的分泌(t 值分别为 6.641、7.743、8.886, $P < 0.05$)。此外,共培养后产生的 uNK 上清体外促血管形成能力受损(t 值分别为 4.629、5.522, $P < 0.05$),并且促滋养层细胞侵袭和迁移能力均显著下降(t 值分别为 8.329、7.190, $P < 0.05$)。结论 NF- κ B 调控蜕膜基质细胞趋化因子、细胞因子的表达,进而影响子宫自然杀伤细胞功能。

[关键词] NF- κ B;蜕膜基质细胞;细胞因子;趋化因子;自然杀伤细胞

Doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2024.04.002

[中图分类号] R173

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-5293(2024)04-0010-08

NF- κ B mediated chemokines and cytokines regulate of uterine NK cell function in decidual tissue

YU Haikun, MAO Jiaqin, CHEN Shuqiang, WANG Xiaohong

(Reproductive Medicine Center, Department of Gynecology and Obstetrics,

Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Shannxi Xi'an 710038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of nuclear factor κ B (NF- κ B) in mediating the regulation of chemokine and cytokine production during human endometrial stromal cell (hESC) decidualization, thus affecting the function of uterine natural killer cell (uNK). **Methods** 20 healthy pregnant women who underwent artificial abortion to terminate pregnancy at Department of Gynecology and Obstetrics, Tangdu Hospital, Air Force Medical University from October 1, 2022 to March 1, 2023 were selected. Their decidual tissues were collected, and pure human uNK cells were isolated. The hESC were transfected with siRel A to inhibit NF- κ B activity, followed by in vitro decidualization induction. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect mRNA levels of relevant chemokines and cytokines. After inducing decidualization of siRel A-transfected hESC, they were co-cultured with primary human uNK cells, and uNK cells and cell supernatants were harvested separately. Flow cytometry was used to detect the cytokine secretion function of uNK. The supernatant of uNK was used for vitro tube formation assay, invasion assay and scratch assay to investigate the function of adjusting angiogenesis and trophoblast cells invasion and migration ability. **Results** Transfection with siRel A significantly decreased the mRNA expression levels of interferon- γ (IFN- γ), matrix metalloproteinase (MMP) 9, and chemokine CCL2 in decidual stromal cells (DSC) induced by decidualization ($t = 3.290$, 6.415 and 5.095, respectively, $P < 0.05$). Inhibiting NF- κ B activity and inducing decidualization of DSC suppressed the secretion of uNK-related factors vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PLGF), and IFN- γ after co-culture with uNK cells ($t = 6.641$, 7.743 and 8.886, respectively, $P < 0.05$). The ability of uNK cell supernatants to promote angiogenesis was impaired after co-culture ($t = 4.629$ and 5.522, $P < 0.05$), and trophoblast invasion and migration were significantly reduced ($t = 8.329$ and 7.190, $P < 0.05$). **Conclusion** NF- κ B regulates the expression of chemokines and cytokines in DSC, thus influencing the function of uNK.

[Key words] NF- κ B; decidual stromal cell; cytokines; chemokines; natural killer cell

[收稿日期] 2023-12-14

[基金项目] 国家自然科学基金(8227060612)

[作者简介] 余海鲲(1998—),女,在读博士研究生,主要从事生殖免疫与生殖内分泌研究。

[通讯作者] 王晓红,主任医师/教授。

人体妊娠分为三个阶段,第一阶段即蜕膜化及胚胎植入阶段,母体发生 Th1 型炎症反应^[1],蜕膜组织核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)处于激活状态^[2],并诱导产生大量促炎性细胞因子^[3]。NF- κ B 家族由 Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF- κ B1 (p50)和 NF- κ B2 (p52) 5 种亚基组成,其中 RelA 和 NF- κ B1 形成经典 NF- κ B 二聚体发挥作用^[4]。妊娠早期,人子宫内膜基质细胞(human endometrial stromal cell, hESC)在激素作用下发生蜕膜化,增殖分化为蜕膜基质细胞(decidual stromal cell, DSC),并伴随 NF- κ B 的活化^[5]。DSC 为胚胎早期发育提供营养支持和适宜微环境^[6-8],还可分泌大量趋化因子、细胞因子等调控免疫细胞的募集分化^[9],参与维持免疫稳态^[10]。目前蜕膜基质细胞 NF- κ B 激活的作用及意义尚不明确,但根据 NF- κ B 在趋化因子、细胞因子合成中的调控作用,推测其可能参与调节 DSC 的免疫调节作用。

妊娠早期蜕膜组织含量最多的免疫细胞是子宫自然杀伤细胞(uterine natural killer cell, uNK),占到总免疫细胞的 70%^[11-12]。它可以分泌多种趋化因子和血管生成因子,促进胎盘血管形成和子宫螺旋动脉重塑^[13],促进滋养细胞侵袭^[14],调控胎盘的发生和功能发育^[15]。在蜕膜组织中, uNK 与 DSC 联系紧密,并且妊娠早期 DSC 与 uNK 之间的交叉对话是母胎免疫耐受的前提^[16]。NF- κ B 是否参与 DSC 对 uNK 的调控过程?本研究通过转染 siRel A 以抑制基质细胞 NF- κ B 活性,探究其细胞因子分泌水平,并通过共培养实验探究 DSC 对 uNK 功能的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象与材料

选取于 2022 年 10 月 1 日至 2023 年 3 月 1 日来空军军医大学唐都医院妇产科门诊行人工流产术的患者,并留取人工流产患者蜕膜组织。纳入标准:①年龄小于 35 周岁;②处于 6~8 孕周。排除标准:①夫妇中一方有家族遗传病史;②生殖道及子宫解剖结构畸形;③生殖道感染;④患有结核、糖尿病和甲状腺疾病等影响妊娠的基础疾病;⑤患有自身免疫性疾病;⑥有既往血栓史。hESC 系由厦门大学王海滨教授团队惠赠, HTR-8/Svneo 绒毛滋养细胞系和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)系由空军军医大学唐都医

院妇产科生殖医学中心常规保存。本实验方案经空军军医大学唐都医院医学伦理委员会讨论批准,所有临床样本的获取均通过患者及其家属的知情同意。

1.1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基(不含酚红)、RPMI1640 培养基均购自博士德公司,碳吸附血清(charcoal stripped foetal bovin serum, CS-FBS)、生长因子减量(growth factor reduction, GFR)基质膜基质、Transwell 小室(直径 0.4 μ m 和 8 μ m)购自 Corning 公司, Percoll 淋巴细胞分选液、IV 型胶原蛋白酶、DNA 酶 I 购自 Sigma 公司,小干扰 RNA siRel A 购自擎科生物, Lipofectamine 2000 (lipo 2000)、M-PERTM哺乳动物蛋白抽提试剂、RNA 提取试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司, 8-bromo-cAMP、甲羟孕酮(medroxyprogesterone, MPA)购自 MCE 公司, 40g/L~200g/L 蛋白预制胶、快速转膜试剂盒购自 Bio-Rad 公司, ECL 化学发光液购自 Millipore 公司,兔抗人 Rel A 抗体、小鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)购自 Cell Signaling Technology 公司,逆转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,人 NK 细胞分选试剂盒、磁力分选架购自 Miltenyi 公司,小鼠抗人血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体、兔抗人胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)抗体购自 NOVUS 公司,藻红蛋白(phycoerythrin, PE)抗人 CD56 抗体、别藻青蛋白(allophycocyanin, APC)抗人 CD16 抗体、APC/Cyanine7 山羊抗小鼠 IgG 抗体、Alexa Fluor 647 驴抗兔 IgG 抗体、APC 抗人内干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)抗体及其同型对照抗体、人 Fc 受体阻断剂购自 Biolegend 公司。

1.1.3 实验仪器

细胞培养箱购自热默尔公司,超速离心机购自 Eppendorf 公司,电泳仪、半干式电转仪、实时荧光定量 PCR 仪、化学发光仪购自 Bio-Rad 公司,倒置显微镜购自 ZEISS 公司,流式细胞仪购自 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 hESC 系培养、小干扰 RNA 转染和体外诱导蜕膜化

在含有 10%CS-FBS、1% ITS、1mmol/L 丙酮酸钠、500ng/mL 嘌呤霉素、1%青、链霉素的 DMEM/F12(无酚红)培养基中培养 hESC 系,培养条件为 37℃、5% CO₂。细胞密度达 90%时,0.25%胰蛋白酶消化 hESC, 2min 后血清终止消化, 800r 离心

5min,重悬细胞并计数。以 6×10^5 个细胞/孔加入六孔板中,待细胞融合至 70% 进行小干扰 RNA 转染。将 2.5 μ L 的 lipo 2000 加入 2 个 125 μ L 的 Opti-MEM 培养基,2.5 μ L 浓度为 20 μ M 的小干扰 RNA siRel A 也加入 2 个 125 μ L 的 Opti-MEM 培养基中,随后将两者等体积混合,室温孵育 20min 后每孔轻柔地加入 250 μ L 上述混合转染液,6h 后换液。随后使用含有 2% CS-FBS、0.5mM 8-bromo-cAMP 和 1 μ M MPA 的 DMEM/F12(无酚红)培养基中培养 72h,以体外诱导 hESC 蜕膜化。

1.2.2 Western Blot 检测

使用 M-PER™ 哺乳动物蛋白抽提试剂提取 hESC 蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。提取的蛋白悬液加入上样缓冲液,95℃加热 10min,制备蛋白样品。随后根据 BCA 定量结果上样,进行电泳以分离蛋白,使用快速转膜试剂盒配合半干式电转仪将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭 2h,加入兔抗人 Rel A(P65)抗体(1:1 000)4℃孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 次,并加入二抗(1:5 000),室温孵育 40min,吐温 Tris 缓冲盐溶液(tris-buffered saline-Tween,TBST)洗膜 3 次,滴加增强化学发光试剂(enhanced chemiluminescence,ECL)发光液并于 Bio-Rad 发光系统中曝光。以 β -actin 作为内参,使用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.2.3 实时定量 PCR

使用 RNA 提取试剂盒提取 hESC 的 RNA,用 NanoDrop 2000 进行 RNA 的浓度定量。根据 TaKaRa 试剂盒说明进行反转录和实时定量 PCR。GAPDH 作为内参,RNA 相对表达量计算通过法。

1.2.4 分离纯化 uNK

临床收取人工流产患者的样本组织,泡于无菌预冷 PBS。于生物安全柜内用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)冲洗去除血块,挑选出蜕膜组织。将蜕膜剪至 1mm $\times$ 1mm $\times$ 1mm 碎块,用消化液(RPMI1640 + 0.1% IV 型胶原酶 + 0.01% DAN 酶 I)在 37℃摇床消化 90min。消化液依次通过 100 μ m、70 μ m、40 μ m 滤网,随后将过滤后的组织消化悬液收集至 15mL 离心管中,通过离心机 300g 离心 5min,PBS 重悬,随后用 Percoll 分离蜕膜免疫细胞。离心管依次加入 600mL/L Percoll,400mL/L Percoll,200mL/L Percoll 和细胞悬液,将上述细胞-Percoll 混合液通过离心机 800g 于 4℃下

离心 25min。液体分为 3 层,600mL/L 和 400mL/L Percoll 层间为蜕膜免疫细胞,吸取蜕膜免疫细胞层,并重悬于含有 10% CS-FBS、1% 青霉素、1% 链霉素的 RPMI1640 培养基中,过夜去除贴壁细胞。次日收集未贴壁细胞,利用磁珠分选法纯化 uNK,具体方法参照产品说明书进行。

1.2.5 DSC 与 uNK 共培养

将转染小干扰 RNA 并体外诱导蜕膜化的 DSC 以 2×10^6 个细胞/孔种于六孔板下室中,纯化后的 uNK 以 1×10^6 个细胞/孔种于孔径为 0.4 μ m 的 transwell 上室中,培养 24h。随后收集 uNK,于不含血清的 RPMI1640 培养基中单独培养 24h,分别收集细胞上清和 uNK 进行后续实验。

1.2.6 流式细胞术检测

1×10^6 个 uNK 细胞重悬于 100 μ L 细胞染色缓冲液并加入 5 μ L 人 Fc 受体阻断剂,室温孵育 10min。加入 5 μ L PE-CD56、APC-CD16 及相应同型对照抗体,冰上避光孵育 20min。检测 VEGF、PLGF 时,先固定和透化细胞,具体步骤参照说明书。透化后的细胞悬液加入 1 μ L 鼠抗人 VEGF 抗体或 1 μ L 兔抗人 PLGF 抗体,室温孵育 1h,离心去除多余抗体,分别加入 5 μ L APC/Cyanine7 山羊抗小鼠 IgG 抗体或 Alexa Fluor 647 驴抗兔 IgG 抗体,室温避光孵育 20min。细胞 IFN- γ 染色时,固定透化后加入 5 μ L APC-IFN- γ 抗体,室温避光孵育 20min,上述染色后细胞用 2mL 细胞染色缓冲液洗涤 2 次,行流式分析。

1.2.7 成管实验

生长因子减量基质胶 4℃过夜解冻,次日于 48 孔板中每孔加 100 μ L,37℃孵育 1h。HUVEC 细胞按 4×10^6 个细胞/mL 重悬于 uNK 上清,每孔加入 100 μ L,培养 2~6h,倒置显微镜下观察成管情况并拍照记录。采用 Image J 软件测定成管数及成管长度,检测 uNK 上清促 HUVEC 成管能力。

1.2.8 侵袭实验

采用孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室进行侵袭试验。用 RPMI 1640 按 1:8 的比例稀释基质胶,上室加入 60 μ L 基质胶,37℃孵育 3h,下室加入含有 10% FBS 的 uNK 上清。HTR-8/Svneo 细胞重悬于无血清培养基中,以 3×10^6 个细胞/孔的密度接种于上室。培养 36h 后,取出小室,4% 多聚甲醛固定 15min,PBS 洗涤,室温下用 0.1% 结晶紫染色 15min,PBS 洗去浮色,然后用棉签仔细去除小室膜上表面细胞,倒置显微镜下观察拍摄,用 Image J 软

件计算侵袭细胞的数量,探究 uNK 上清体外促 HTR-8/Svneo 细胞侵袭能力。

1.2.9 划痕实验

HTR-8/Svneo 细胞接种于 6 孔板,待细胞铺满后,用 200 μ L 的吸管尖在孔板中心划直线。然后用 PBS 洗涤 2 次,用 uNK 上清培养 48h。在倒置显微镜下于 0h 和 48h 拍摄,通过 Image J 软件计算迁移面积百分比,探究 uNK 上清体外促 HTR-8/Svneo 细胞迁移能力。

1.3 统计学分析

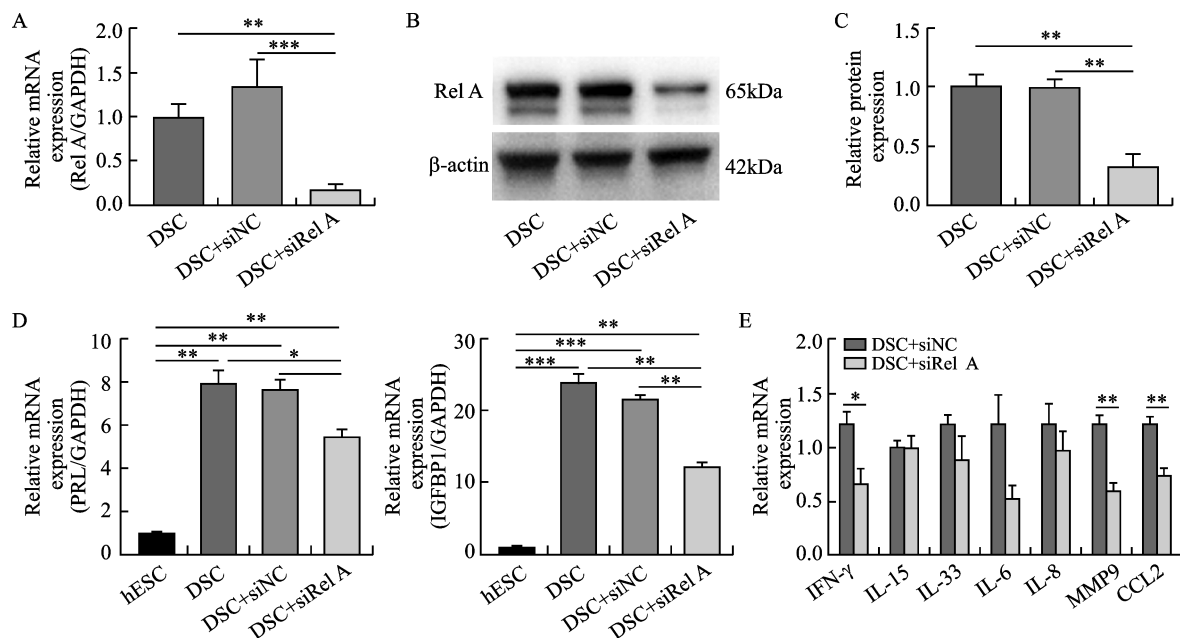
流式结果采用 FlowJo_v 10.8.1 进行分析,数据的统计学分析使用 Prism 8.3.0 进行。描述性分析使用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较使用非配对 t 检验,多组间比较使用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 NF- κ B 活性导致 DSC 趋化因子、细胞因子表达异常

通过实时定量 PCR 和 Western blot 法检测 hESC 转染小干扰 RNA 并诱导蜕膜化后 Rel A 的沉默效果。与转染无意义序列组相比,转染 siRel A 后,可显著降低 Rel A 的 mRNA ($t = 10.470, P < 0.05$)和

蛋白表达水平($t = 7.301, P < 0.05$)(图 1A、图 1B、图 1C),表明转染成功,转染 siRel A 并诱导蜕膜化产生的 DSC 中 NF- κ B 活性受到抑制。与未转染且未诱导组(hESC 组)相比,DSC 组、DSC+siNC 组、DSC+siRel A 组的蜕膜化标志物泌乳素(prolactin,PRL)和胰岛素样生长因子结合蛋白 1(insulin-like growth factor binding protein 1,IGFBP-1)的 mRNA 表达水平均显著升高,表明 hESC 蜕膜化诱导成功(PRL: t 值分别为 7.971、7.709、5.478;IGFBP1: t 值分别为 23.99、21.64、12.06, $P < 0.05$)。转染无意义序列的 DSC+siNC 组与未转染的 DSC 组,两组蜕膜化标志物水平相近。然而 DSC+siRel A 组 PRL 和 IGFBP1 的 mRNA 表达水平显著低于 DSC+siNC 组(t 值分别为 5.478、12.06, $P < 0.05$),表明转染操作本身不会影响蜕膜化,而通过转染 siRel A 抑制 NF- κ B 活性,进而抑制基质细胞蜕膜化的程度(图 1D)。通过实时定量 PCR 检测 DSC 趋化因子、细胞因子的 mRNA 表达水平,结果显示与对照组相比,多种因子的表达水平均下降,其中 IFN- γ 、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)9、CCL2 差异有统计学意义(t 值分别为 3.290、6.415、5.095, $P < 0.05$)(图 1E)。以上结果表明沉默 Rel A 抑制 DSC 的 NF- κ B 活性可导致蜕膜化过程中相关细胞因子、趋化因子的表达减少。



注:A图为 RT-qPCR 检验基质细胞 Rel A 的沉默效果($n=3$);B图为 Western blot 验证基质细胞转染 siRel A 后 Rel A 的沉默效果;C 图为 Western blot 条带灰度值分析($n=3$);D 图为 RT-qPCR 检测 hESC 诱导蜕膜化前后 PRL、IGFBP1 的 mRNA 表达水平($n=3$);E 图为 RT-qPCR 检测基质细胞转染 siNC 或 siRel A 并诱导蜕膜化后相关细胞因子的 mRNA 表达水平($n=3$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

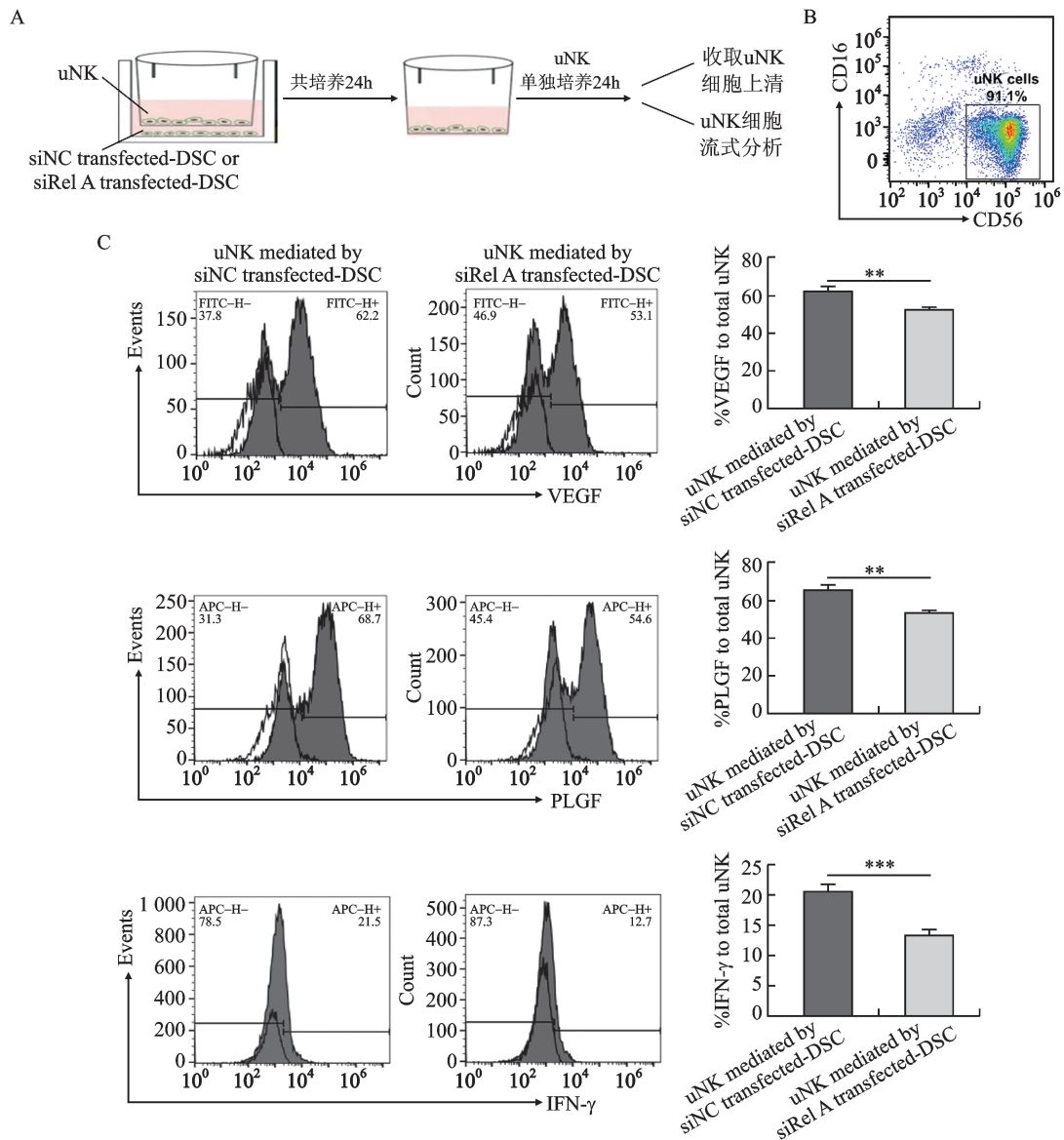
图 1 基质细胞 Rel A 的沉默效果与趋化因子及细胞因子表达水平

Fig.1 Silencing effect of Rel A in stromal cells and expression levels of chemokines and cytokines

2.2 与抑制 NF- κ B 活性的 DSC 共培养导致 uNK 的 VEGF、PLGF、IFN- γ 合成分泌显著减少

构建 DSC-uNK 间接培养体系,收获 uNK 和细胞上清用于后续实验(图 2A)。通过流式细胞术鉴定人原代 uNK 及纯度,标记的细胞即为 uNK,占提纯后细胞的 91.1%,纯度较高,可用于后续实验(图 2B)。随后流式检测 uNK 因子分泌水平,结果表

明与转染 siRel A 并诱导蜕膜化产生的 DSC 共培养后,uNK 的 VEGF、PLGF、IFN- γ 的阳性比例显著降低(t 值分别为 6.641、7.743、8.886, $P < 0.05$) (图 2C),说明 NF- κ B 活性受损的 DSC 与 uNK 上述细胞因子的表达分泌减少显著相关,提示 uNK 分泌上述细胞因子的功能受损。



注:A 图为转染 siNC 或 siRel A 的 DSC 与 uNK 共培养实验示意图;B 图为流式细胞术鉴定提取人原代 uNK 的纯度;C 图为流式细胞术检测共培养后 uNK 分泌 VEGF、PLGF、IFN- γ 的水平($n=3$)。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 与转染后 DSC 共培养 uNK 的 VEGF、PLGF、IFN- γ 表达水平

Fig.2 The expressions of VEGF, PLGF and IFN- γ in uNK co-cultured with the transfected DSC

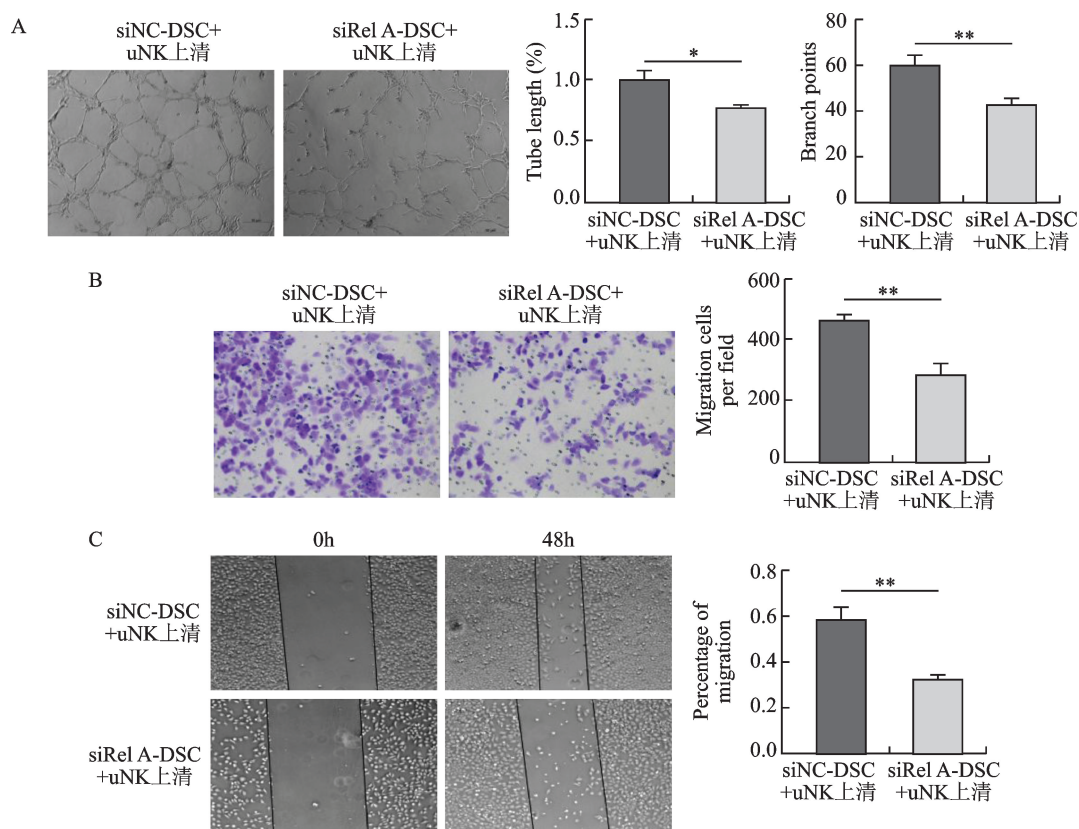
2.3 与抑制 NF- κ B 活性的 DSC 共培养导致 uNK 促 HUVEC 体外成管能力和 HTR-8/Svneo 细胞侵袭迁移能力减弱

DSC-uNK 共培养后,收取 uNK 上清作为条件

培养基,体外培养 HUVEC 和 HTR-8/Svneo 细胞。体外成管实验结果表明,与对照组相比,uNK 与转染 siRel A 并诱导蜕膜化产生的 DSC 共培养后,其细胞上清促 HUVEC 细胞体外总管腔长度和成管数

显著减少(t 值分别为 4.629、5.522, $P < 0.05$) (图 3A), 提示 siRel A-DSC 抑制了 uNK 体外促血管形成能力。侵袭实验和划痕实验结果表明, 相较于与 siNC-DSC 共培养组, 与 siRel A-DSC 共培养后的 uNK 上清促 HTR-8/Svneo 细胞侵袭数量和迁移率

均显著下降($t = 8.329$ 、7.190, $P < 0.05$) (图 3B、图 3C)。以上结果表明, NF- κ B 活性受损的 DSC 可通过细胞间沟通的方式减弱 uNK 促血管形成和促滋养层细胞侵袭迁移的能力。



注: A 图为共培养后获取的 uNK 上清对 HUVEC 体外成管长度和成管数目的作用($n=3$); B 图为 Transwell 实验, 检测共培养后 uNK 上清对 HTR-8/Svneo 细胞侵袭能力的作用($n=3$); C 图为划痕实验, 检测共培养后 uNK 上清对 HTR-8/Svneo 细胞迁移能力的影响($n=3$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 与转染后 DSC 共培养的 uNK 上清促 HUVEC 体外成管和 HTR-8/Svneo 细胞侵袭迁移的能力

Fig.3 The ability of uNK supernatant co-cultured with the transfected DSC to promote HUVEC tube formation in vitro and invasion and migration of HTR-8/Svneo cells

3 讨论

3.1 NF- κ B 与细胞因子、趋化因子

研究发现在蜕膜化及胚胎植入阶段, 基质细胞会在孕酮和雌二醇作用下经历蜕膜化的过程, 分泌大量因子, 如白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、IFN- γ 、CCL2、MMP2、MMP9 等, 同时蜕膜组织 NF- κ B 处于激活状态^[17]。已有研究表明, NF- κ B 广泛参与调控促炎因子的合成。在 U-937 和 HeLa 细胞系中, NF- κ B 是激活 IL-6 相关基因表达的重要介质之一, NF- κ B 还能调控 IL-8 相关基因表达^[18]。此

外, NF- κ B 二聚体还可直接结合在 MMP9 启动子区域-600~-591 的碱基序列, 以调控 MMP9 的转录^[19]。而有关蜕膜基质细胞中 NF- κ B 作用的研究较少, 本实验通过将 hESC 转染 siRel A 随后体外诱导蜕膜化, 发现抑制基质细胞 NF- κ B 活性后, 多种趋化因子、细胞因子的 mRNA 表达水平均下降, 其中 IFN- γ 、CCL2、MMP9 的差异有统计学意义。以上结果表明, NF- κ B 参与调控基质细胞的趋化因子、细胞因子的合成。

3.2 基质细胞对 uNK 功能的调控

基质细胞作为蜕膜组织中含量最高的细胞, 在

妊娠早期发挥着重要的免疫调节作用。uNK 不仅是妊娠早期含量最多的免疫细胞亚群,还发挥重要作用^[20]。多项研究发现,蜕膜基质细胞可以通过旁分泌多种细胞因子、趋化因子等对 uNK 进行一系列精密调控,包括促进 uNK 募集分化,调节 uNK 细胞毒性和细胞因子分泌功能。具体来说,DSC 可以通过分泌 IL-12、IL-15 等诱导子宫内膜中的造血前体向功能型 uNK 分化^[21]。其中,IL-15 的作用是支持 NK 的发育,在促进 NK、T 细胞的增殖分化和功能激活等具有重要作用^[22]。此外,在分泌期和妊娠早期,蜕膜微环境中雌、孕激素可诱导 DSC 分泌多种趋化因子如 CXCL10/IP-10、CXCL12、CX3CL1、CCL2 等^[23-25],这些趋化因子将外周 NK 招募到蜕膜组织中^[26]。DSC 还可以分泌 IL-33,参与 uNK 功能的调节,在妊娠维持中起重要作用^[27]。本研究使用 8-bromo-cAMP 联合 MPA 体外诱导 hESC 蜕膜化,并与 uNK 共培养。流式检测结果显示,与正常 DSC 共培养组相比,与 siRel A 转染 DSC 共培养组的 uNK 细胞 VEGF、PLGF、IFN- γ 三种因子的表达均减少。此外 uNK 上清促 HUVEC 体外成管能力和促 HTR-8/Svneo 细胞侵袭迁移能力均下降。以上结果表明,蜕膜基质细胞参与调控 uNK 的功能,而 NF- κ B 活性受到抑制的基质细胞调控作用则被减弱。

综上所述,本研究利用体外诱导蜕膜化和共培养模型,基质细胞通过转染 siRel A 抑制 NF- κ B 活性,探讨了蜕膜化过程中,NF- κ B 在基质细胞趋化因子、细胞因子合成中的作用和 DSC 对 uNK 功能的影响,证实了 NF- κ B 通过调控蜕膜基质细胞趋化因子、细胞因子的产生,进而间接影响 uNK 功能。

[参考文献]

- [1] Munro S K, Balakrishnan B, Lissaman A C, et al. Cytokines and pregnancy: potential regulation by histone deacetylases[J]. *Mol Reprod Dev*, 2021, 88(5): 321-337.
- [2] 朱霞, 李慧珍, 刘丹, 等. 胚胎植入的相关信号通路[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2022, 41(5): 409-413.
- [3] Yang X, Tian Y, Zheng L, et al. The update immune-regulatory role of pro- and anti-inflammatory cytokines in recurrent pregnancy losses[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 132.
- [4] Zhang Q, Lenardo M J, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [5] 张丹妮, 刘迪, 王丽. 核因子- κ B 对妊娠及分娩影响[J]. *临床军医杂志*, 2019, 47(11): 1276-1278.
- [6] Liu H, Huang X, Mor G, et al. Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(11): 2091-2101.
- [7] Ma Q, Beal J R, Bhurke A, et al. Extracellular vesicles secreted by human uterine stromal cells regulate decidualization, angiogenesis, and trophoblast differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(38): e2200252119.
- [8] Ramhorst R, Grasso E, Vota D, et al. From decidualization to pregnancy progression: an overview of immune and metabolic effects of VIP[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2022, 88(4): e13601.
- [9] Wu H M, Chen L H, Hsu L T, et al. Immune tolerance of embryo implantation and pregnancy: the role of human decidual stromal cell- and embryonic-derived extracellular vesicles[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13382.
- [10] Bao S, Chen Z, Qin D, et al. Single-cell profiling reveals mechanisms of uncontrolled inflammation and glycolysis in decidual stromal cell subtypes in recurrent miscarriage[J]. *Hum Reprod*, 2023, 38(1): 57-74.
- [11] Sojka D K, Yang L, Yokoyama W M. Uterine natural killer cells[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 960.
- [12] 盛秋, 李芬. 子宫自然杀伤细胞的研究进展[J]. *中国妇幼健康研究*, 2013, 24(6): 960-962.
- [13] Xu X, Zhou Y, Fu B, et al. Uterine NK cell functions at maternal-fetal interface[J]. *Biol Reprod*, 2022, 107(1): 327-338.
- [14] Díaz-Hernández I, Alecsandru D, García-Velasco J A, et al. Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction[J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(4): 720-746.
- [15] Gamliel M, Goldman-Wohl D, Isaacson B, et al. Trained memory of human uterine NK cells enhances their function in subsequent pregnancies[J]. *Immunity*, 2018, 48(5): 951-962.e5.
- [16] Strunz B, Bister J, Jönsson H, et al. Continuous human uterine NK cell differentiation in response to endometrial regeneration and pregnancy[J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(56): eabb7800.
- [17] Gómez-Chávez F, Correa D, Navarrete-Meneses P, et

- al.NF- κ B and its regulators during pregnancy[J].Front Immunol,2021,12:679106.
- [18]Sakowicz A.The role of NF κ B in the three stages of pregnancy-implantation,maintenance,and labour;a review article[J].BJOG,2018,125(11):1379-1387.
- [19]Yan C,Boyd D D.Regulation of matrix metalloproteinase gene expression[J].J Cell Physiol,2007,211(1):19-26.
- [20]黎俏.子宫内膜 NK 细胞在胚胎种植中的研究进展[J].海南医学,2023,34(15):2277-2280.
- [21]James-Allan L B,Buckley R J,Whitley G S,et al.The phenotype of decidual CD56⁺ lymphocytes is influenced by secreted factors from decidual stromal cells but not macrophages in the first trimester of pregnancy [J].J Reprod Immunol,2020,138:103082.
- [22]Gordon S M.Interleukin-15 in outcomes of pregnancy [J].Int J Mol Sci,2021,22(20):11094.
- [23]Ashley R L,Runyan C L,Maestas M M,et al.Inhibition of the C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4 reduces utero-placental expression of the VEGF system and increases utero-placental autophagy[J].Front Vet Sci,2021,8:650687.
- [24]Wang Q,Sun Y,Fan R,et al.Role of inflammatory factors in the etiology and treatment of recurrent implantation failure[J].Reprod Biol,2022,22(4):100698.
- [25]Zheng J, Wang H, Zhou W. Modulatory effects of trophoblast-secreted CXCL12 on the migration and invasion of human first-trimester decidual epithelial cells are mediated by CXCR4 rather than CXCR7 [J].Reprod Biol Endocrinol,2018,16(1):17.
- [26]Meyer N,Zenclussen A C.Immune cells in the uterine remodeling:are they the target of endocrine disrupting chemicals? [J].Front Immunol,2020,11:246.
- [27]曹小宛,陈黎,宋珍珍,等.白细胞介素 33 在妊娠相关疾病中的作用[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2021,40(5):427-430.
- [专业责任编辑:王 丽]
[中文编辑:向婉婉;英文编辑:牛 惠]