

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 蛻膜中巨噬細胞與第十一型介白質的相關性 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2314-B-002-301-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：國立臺灣大學醫學院婦產科

計畫主持人：何弘能

計畫參與人員：專科畢-專任助理：張淑婷

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96年10月31日

## 蜕膜中巨噬細胞與第十一型介白質的相關性

計畫編號：**NSC 95-2314-B-002-301**

執行期限：95年8月1日至96年7月31日

主持人：何弘能 醫師 國立台灣大學醫學院婦產科

計畫參與人員：張淑婷(助理) 國立台灣大學醫學院婦產科

### 前言

在懷孕的過程中，人類胚胎如何逃過母親免疫系統中免疫細胞的攻擊？胎兒具有與母親不完全相同的基因組成，如何能夠使胚胎逃過母體排斥而發育成功，母體免疫系統適當的調節是必要的，主要有兩種現象：一是母親對胎兒的細胞免疫降低，另一則是母體之體液免疫系統特別旺盛。哺乳類隨著月經週期的變化，子宮內膜細胞會因賀爾蒙的作用而改變型態進行蜕膜化(decidualization)的過程，以利接納胚胎並提供著床的位置，此時也會有許多bone marrow derived cells 聚集。在1994年，Cross JC等人發現胎盤在胚胎與母體之間形成血管網路，進一步提供胚胎發育所需的養分，同時亦提供胚胎作為抵抗母體內免疫細胞攻擊的屏障。一些文獻指出，人類懷孕後，由於胚胎的著床，造成參與免疫反應的免疫細胞大量出現在蜕膜中，但是，這些免疫細胞卻表現出異於身體其他部分的免疫細胞之特徵。如位於蜕膜中的自然殺手細胞之毒殺能力有明顯下降的趨勢；巨噬細胞則會分泌抗發炎分子；T細胞之activation makers在正常懷孕的過程中亦有增加的趨勢；同時，蜕膜中的T細胞則朝向Th2分化，並分泌出抗發炎的細胞激素。由於T淋巴球活化後分化成TH1 /TH2 主要是由抗原呈獻細胞(APC) 所分泌的細胞激素來決定，抗原呈獻細胞包含巨噬細胞、Dendritic cells 以及B淋巴球，其中以巨噬細胞佔最大部分，約為總細胞之30%，而Dendritic cells 與B淋巴球則很少。近期一些研究發現巨噬細胞在各種immunological microenvironment 中，受到不同細胞激素的影響，除了有一般LPS 與IFN  $\gamma$  刺激下活化的classical activation 巨噬細胞(M1) 之外，受到以往認為是抑制性細胞激素IL-4 以及IL-13 刺激下，也可分化出另一型的alternative activation 巨噬細胞(M2)。另外，從缺乏第十一型介白素 $\alpha$ 受體之轉殖基因鼠的模式研究中發現，第十一型介白素在蜕膜化的過程中是很重要的，且第十一型介白素會影響巨噬細胞分泌細胞激素的能力，甚至於可促使T細胞分化成Th2細胞。如此一來，研究第十一型介白素在懷孕的過程中所扮演的角色將有助於了解胚胎逃過母體中免疫細胞攻擊的機制，以了解正常與不正常妊娠不同的機轉，此將有助於在臨床上屢次胚胎著床失敗與習慣性流產的病人之治療。

### 研究目的

1. 完成設立促使單核球分化成巨噬細胞之技術。
2. 觀察單核球細胞 IL-11R $\alpha$ 表現情形，了解在 IL-11 影響下單核球細胞的表現情況。
3. 觀察 macrophage 在 IL-11 的刺激下其分化的情形與分化型態。

## 研究方法

1. **單核球分化成巨噬細胞之培養**: 由人類 acute monocytic leukemia 分離出之 monocytes (THP-1, from ATCC® TIB-2027), 以 RPMI 進行培養至 confluent, 再以 PMA (Sigma® P8139) at 10 ng/mL 培養 48 小時, 使其進一步分化成 macrophage-like cells。
2. **M1-type macrophages 的分化**: 將上述已分化的巨噬細胞加入 LPS (25 ng/mL) & IFN (50 U/mL) 以刺激 macrophage-like cells, 2 hr 進一步進行功能上的分化成 M1 type 之 macrophages。
3. **M2-type macrophages 的分化**: 將上述已分化的巨噬細胞加入 IL-4 (25 ng/mL) 刺激 macrophage-like cells, 2 hr 進一步進行功能上的分化成 M2 type 之 macrophages。
4. **Flow Cytometry**: 利用 flow cytometry 的技術, 以確定 macrophages 細胞表面所表現之 cell surface markers (CD163, CD206, CCR7), 來確定以上刺激方法對 macrophages 之影響。

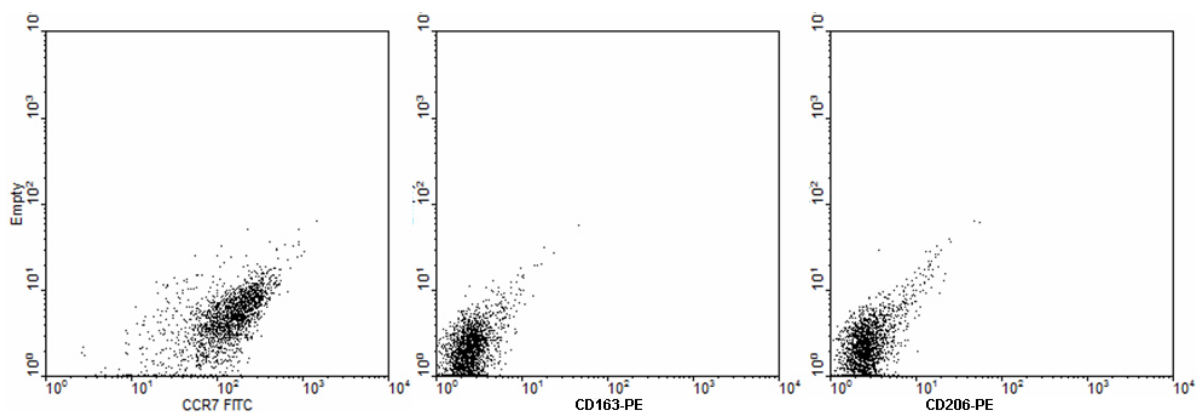
stimulators	M2 (CD163+CD206+CCR7-)		M1 (CD163-CD206-CCR7+)	
	CD163	CD206	CCL18 (PARC)	CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )
M-CSF	+	0	0	0
IL-10	++	0	++	0
Dexamethasone	++	0	0	0
GM-CSF	--	++	0	+
IL-4	--	++	++	0
TGF- $\beta$	-	++	0	0
PGE <sub>2</sub>	0	0	0	0
IFN- $\gamma$	--	0	0	0
TNF- $\alpha$	--	0	0	++
LPS	--	0	+	++

Reference: *Clin Exp Immunol* 2005; 142:481-9.

5. **Progesterone 以及 estrogen 刺激**: 以各種濃度之 Progesterone (0, 5, 10, 20, 40, 80 pg/ml) 以及 estrogen (0, 50, 100, 200, 400 ng/ml) 對 RL95-2 細胞進行處理特定時間 (24 hr, 48 hr) 後, supernatants 以 ELISA 方法測觀察細胞的 IL-11 蛋白質表現量。另外亦使用之前設計的 IL-11 primer, 以 RT-PCR 方法, 觀察 IL-11 之 mRNA 表現量的差異以及使用 Western 方法觀察細胞中 IL-11 蛋白質的表現情形。
6. **IL-11 對於 M1/M2 之細胞激素分泌的影響**: 根據前人研究, M1 type macrophage 主要分泌的細胞激素為 inflammatory cytokines (IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF), 而 M2 type 則較不分泌 inflammatory cytokines, 主要是分泌 IL-10。將未分化巨噬細胞株以及我們分化出的 M1/M2 type macrophage 分別處理適量的 IL-11 特定時間之後, 以 ELISA 方式觀察這些 macrophage 細胞激素的分泌, 另外也觀察 macrophage 細胞內不同的細胞激素與 mRNA 和蛋白質表現是否同樣受到影響。

## 結果與討論

1. **M1-type macrophages 的分化符合預期**: 我們將巨噬細胞加入 LPS (25 ng/mL) & IFN (50 U/mL) 刺激 macrophage-like cells, 只要 2 hr, CCR7 表現就是陽性, 但 CD163 與 CD206 都是陰性。如下圖。



2. **M2-type macrophages 的分化不明顯**：我們將巨噬細胞加入 IL-4，濃度從 20-100 ng/mL，時間從 2 hours 到 48 小時，但從 flow cytometry 看來，並沒有分化良好的 M2 出現。我們還加入 GM-CSF，但是效果仍然不明顯。從文獻的經驗，也差別很大，有的建議加上 IL-13 或 GM-CSF，可見能非常有效率的培養出 M2，可能不容易。也許從 THP-1 細胞株跟一般 PBMC 來的會不一樣效果。
3. **Progesterone 以及 estrogen 刺激**：我們發覺 RL95-2 在 estrogen 刺激之下，IL-11 蛋白質分泌會增加，而黃體素則沒有影響。這結果跟 von Rango U 2004 年的報告有點相似。但是他們用的是 eutopic 與 ectopic endometrium，理論上含有白血球，而我們的細胞株 RL95-2 只是 endometrial cancer cells，所以於 IL-11 的產生上，當然會有一點點不同。
4. **IL-11 對於 M1 之細胞激素分泌的影響**：IL-11 加入後(100 ng/mL)，48 小時之後 IL-12 的分泌量由原先的  $57 \pm 13$  pg/mL 降到  $30 \pm 8$  pg/mL，可以證明 M1 細胞受到 IL-11 的抑制。但是 M2 部分，因為刺激分化不是很理想，所以 IL-10 的測試就沒有作。

由以上的研究可知，在妊娠的過程中，細胞激素對妊娠成功與否是非常重要的。在妊娠的過程中，IL-11 或許會藉著直接影響蛻膜中 macrophage 與 T 淋巴球的作用，而決定其命運朝 Th2 發育，達到抗發炎反應的作用，進一步使胎兒存活。本實驗室已知早期流產的案例，IL-11 的分泌是比較缺乏的，IL-11 對免疫系統之 M1 有抑制情形。過去的文獻中提到，progesterone 在懷孕的過程中參與了 immune tolerance 的機轉，加上我們對 IL-11 之研究成果可知，progesterone 會促使 endometrium epithelial cell 分泌 IL-11，且了解到維持 IL-11 表現量在早期懷孕可能相當重要。

相反地，在 anembryonic pregnancy 之病人中，是否由於其 IL-11 之表現量減少，而使免疫系統趨向毒殺能力較高之 Th1 immune response，進而將胚胎視為外來物而產生排斥作用，導致胚胎死亡，從本實驗可以得到另一佐證。由已發表之文獻中了解，IL-11 會抑制 macrophages 分泌 IL-12。而在子宮內之 macrophages 已被歸為 M2-type，其有較少量 IL-12 之表現。故是否在妊娠的過程中，IL-11 會藉由抑制 macrophages 之 IL-12 的表現，進而使環境中 IL-12 量減少(或其他 inflammatory cytokines)，且減少促使 naïve T cell deviated to Th1 的刺激因子之表現而影響了 T cell 之生成，使 naïve T cell 朝 Th2 發育。如此一來，在妊娠期間，子宮的免疫系統之環境將趨於毒殺能力較低之 Th2 immune response，故妊娠得以繼續。

## 文献探討

1. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Hayrabedyan S, Altankova I, Kyurkchiev S. Female Sex Steroid Hormones Modify Some Regulatory Properties of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:425-433.
2. Singh U, Nicholson G, Urban BC, Sargent IL, Kishore U, Bernal AL. Immunological properties of human decidual macrophages--a possible role in intrauterine immunity. *Reproduction* 2005; 129:631-7.
3. Leng SX, Elias JA. Interleukin-11 inhibits macrophage interleukin-12 production. *J Immunol* 1997; 159:2161-8.
4. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23:549-55. <Review>
5. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:481-9.
6. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:23-35.
7. Lehtonen A, Ahlfors H, Veckman V, Miettinen M, Lahesmaa R, Julkunen I. Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007; 82:710-20.