

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

人類胚胎著床時細胞動力素-11 對母體免疫調適所扮演的角  
色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-378-

執行期間：91年08月01日至92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：張淑婷、呂佳玲

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 28 日

人類胚胎著床時細胞動力素 IL-11 對母體免疫調適所扮演的角色

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC - 91 - 2314 - B002 - 378

執行期間：91年 8 月 1 日至 92年 7 月 31 日

計畫主持人：何弘能

共同主持人：趙光漢

計畫參與人員：呂佳玲 張淑婷

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學醫學院婦產科

## (一) 計畫中文摘要

懷孕是非常複雜的過程，根據 1953 年 Medawar 所提出的” fetal allograft analogy”的理論，其視胎兒為逃過母體免疫系統攻擊的半移植體。然而，包含在此過程的機制，至今未明。對於成功的妊娠，母體本身必須調適其子宮中的免疫機制，避免攻擊自己的胎兒。

在正常懷孕母體免疫系統有兩種特殊現象：一是母體對胎兒的免疫力降低；在母體子宮蛻膜化的過程中發現，子宮蛻膜處的 T 淋巴球、自然殺手細胞和巨噬細胞的反應能力較低。我們過去的研究發現，子宮蛻膜處的 T 淋巴球受到細胞激素的影響而分化成 Th2 細胞，並分泌 IL-4、IL-5 與 IL-10，進一步使母體內於蛻膜處的免疫反應趨向非發炎反應。

由動物實驗發現，如果將 IL-11 特殊性受體 IL-11R $\alpha$  去除，胎盤的形成會發生問題，進而造成類似人類萎縮卵或胎死腹中的病理表現。在 2001 年，Curti 等人在人類免疫細胞的 *in vitro* 實驗中，發現 IL-11 可以抑制單核球分泌 IL-12，而免疫反應中 IL-12 被視為會促進 Th1 細胞發育的細胞激素。此外，IL-11 也可直接影響 naïve T 細胞發育為 Th2 細胞。故 IL-11 必定參與影響免疫反應的重要角色。1982 年，Siiteri 等人就發現胎盤所分泌的大量 progesterone 會抑制免疫反應的發生。此外，progesterone 亦可經由 LIF 而使 Th1/Th2 平衡朝向 Th2 發展，此有助於懷孕的成功。故在懷孕時，經由卵巢激素的調節，使子宮內某些細胞激素能夠表現並分泌，進而改變免疫細胞的功能，使妊娠成功。

在懷孕的過程中，由於 progesterone 會幫助 Th1/Th2 平衡朝向 Th2 發展，而使母體免疫細胞降低對胚胎的攻擊性，再加上母體子宮蛻膜上皮細胞會分泌 IL-11，尤其是黃體期和懷孕早期 IL-11 的大量表現與歷年來對 IL-11 之研究結果，不僅使我們聯想到在母體對胎兒免疫的容忍性的機制中 IL-11 可能扮演一重要的角色。此研究想要進一步探討其中機制，並釐清 IL-11 的功能。我們希望研究結果對懷孕機制的研究有所助益，且將來在臨床對習慣性流產病人的治療上提供一個治療的選擇。

## (二) 計畫英文摘要

Pregnancy is a very complicated issue. In 1953, Medawar proposed a thesis that fetal is an allograft that escapes from attacking of mother's immune system. However, the mechanism is uncertain. For successful pregnancy, mother's immune system must be modified in the uterus, especially during early pregnancy.

In pregnancy, two characteristics usually are found. First, the immunocytes reduces the reactivity to the embryo to avoid destroying it through immune reaction. In the decidua, killer cells have lower cytotoxicity, and macrophages are a group of suppressor macrophages which secrete IL-10 and IL-1R-antagonist instead of IFN- $\gamma$  or LPS. Second, the decidual T cell was found to have Th2 polarization and then secreted non-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-10. As we know, Th2 lymphocyte can induce humoral response. Therefore, there is dominant humoral response in decidua.

It has been found that IL-11R $\alpha$  knock out animal had a problem of placenta forming with a phenotype being similar to blighted ovum in human. In addition, in 2001, Curti *et al.*, found that *in vitro* IL-11 can inhibit IL-12 secretion by monocytes that can promote dominant Th1 polarization. Furthermore IL-11 exerts a direct effect on CD4<sup>+</sup> cells, make them toward Th2 polarization. According to the researches above, IL-11 must involve in the regulation of immune system. In 1982, Siiteri et al. found the progesterone secreted by placenta would inhibit the immune response. In addition, progesterone can promote Th2 cell polarization by mediating secretion of LIF. In a word, the ovarian hormones can promote some cytokines expressing in uterus and regulate the immune response to make pregnancy successful.

The progesterone can promote dominant Th2 polarization and avoid fetus attacked by mother's immune system. In the other hand, IL-11 secreted by endometrium varies throughout the menstrual cycle and during pregnancy, dependent on the hormonal change. Because, during luteal phase and early pregnancy, IL-11 is highly expressed, it may play a role in implantation. In this study, we want to explore the role of IL-11 and involved mechanism in the feta-placental tolerance and further demonstrate whether ovarian hormones, such as progesterone, would influence secretion of IL-11 and promote Th2 polarization in pregnancy. We wish this study would extend our knowledge on possible immunological mechanisms in the pregnancy and could be applied to clinical therapy of recurrent spontaneous abortion.

## (一) 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，是個非常令人難以理解的過程，而其中複雜的程度是不言而喻的。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親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。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(Robb et al., 1998)，其會影響巨噬細胞分泌細胞激素的能力，並可促使 T 細胞分化成 Th2 細胞(Trepicchio WL et al, unpublished)。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，進而分析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的治療。

## (二) 研究目的

比較正常與不正常懷孕之過程中，分別在濾泡期、早期分泌期與晚期分泌期三種時期中，第十一型介白素、第十一型介白素 $\alpha$ 受體與 GP130 在蜕膜化的過程中於組織中的表現且加以定量，以確立第十一型介白素在懷孕的過程中佔有不可或缺的角色。

## (三) 文獻探討

哺乳類懷孕的機制一直是個很複雜的問題。最廣為大家所接受的理論是 1953 年由 Medawar 所提出之“Fetal allograft analogy”的理論。如今也有許多假說被提出來解釋此種成功的半異體移植的現象。

在妊娠發生的過程中，懷孕成功與否則視其母體內細胞激素對免疫細胞的反應，因此產生“使經由局部細胞激素作用促使母體免疫反應能產生，會影響胎兒 - 胎盤單元 (fetoplacental unit) 的生長與存活”之假說。1998 年 Petra Bilinski 等人發現，在 homozygous IL-11R $\alpha$  mutant female mice 中，蜕膜化的過程失敗，使其發育出不正常的胎盤，進而造成胎兒的死亡。此外，於 2001 年，Cork BA 等人發表 IL-11 在子宮內膜之表現是隨著月經週期而改變，與我們之前的研究結果相吻合，故 IL-11 在蜕膜化的過程中扮演重要的角色，進而影響妊娠的成功。但是，IL-11 究竟是如何影響妊娠的過程一直是個未解的謎。

IL-11 在妊娠發生的過程中所扮演的角色，所知並不多，由之前的研究中可知，IL-11 可透過抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12 與 NO 之產生，進而調節巨噬細胞的功能，甚至藉著抑制 NF- $\kappa$ B 促進 I $\kappa$ -B 的機制，以進一步抑制巨噬細胞中 pro-inflammatory cytokine gene 的表現，達到 anti-inflammatory activity 的功能。至於對淋巴球的作用，IL-11 不但可以促進 B 細胞的分化；2001 年 Cuti A 等人更發現，IL-11 也會直接作用在 T 淋巴球，或使巨噬細胞減少 IL-12 之分泌量而抑制其分化成 Th1 細胞。

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。再加上對 IL-11 的研究可知，或許在妊娠的過程中，IL-11 會藉著直接影響蜕膜中 T 淋巴球的作用，而決定其命運朝 Th2 發育，或者以間接的方式影響巨噬細胞的功能而達到抗發炎反應的作用，使胎兒能存活下去。

## (四) 研究方法

### 1. 檢體收集

自 2002 年 8 月至 2003 年 7 月採集不同月經週期的人類子宮內膜與早期懷孕的蜕膜：從 20-25 位患有子宮肌瘤女性經由全子宮切除手術後取出之檢體，分別收集

early follicle phase, early secretory phase 和 late secretory phase 之子宮內膜，另外從 10-15 位選擇性流產與 10-15 位萎縮卵婦女，取得妊娠 6-8 周子宮擴刮術後檢體。

2. RNA 的萃取、定量、品質確認

3. 石臘或冷凍包埋檢體

(A) 檢體包埋

(B) 切片

4. 以 RT-PCR 來反製 cDNA

| Primers         | PCR 溫度條件 |         |    |       |    |       |    |                 |    |         |
|-----------------|----------|---------|----|-------|----|-------|----|-----------------|----|---------|
| IL-11           | 94       | (10min) | 94 | (45s) | 63 | (45s) | 72 | (2min)/35cycles | 72 | (10min) |
| IL-11R $\alpha$ | 94       | (10min) | 94 | (60s) | 65 | (60s) | 72 | (1min)/38cycles | 72 | (10min) |
| Gp130           | 94       | (10min) | 94 | (30s) | 63 | (30s) | 72 | (1min)/32cycles | 72 | (10min) |
| $\beta$ -actin  | 94       | (10min) | 94 | (45s) | 63 | (45s) | 72 | (2min)/30cycles | 72 | (10min) |

5. 以 Real Time PCR 來定量 RT-PCR 之產量

6. 以 Immunohistochemistry 來觀察組織切片中 IL-11、IL-11R $\alpha$ 、GP130 蛋白質的表現

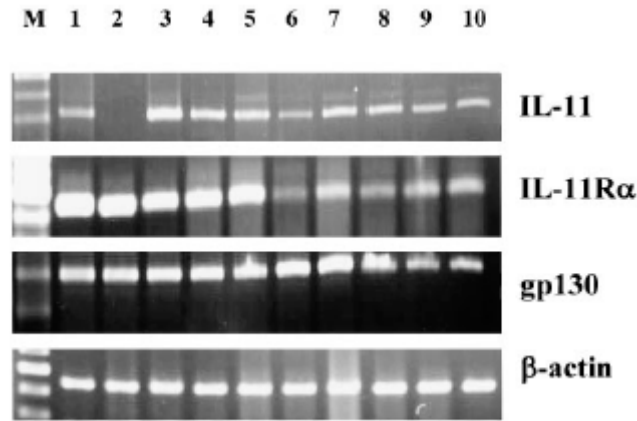
#### (五) 結果

根據之前對於 IL-11 之研究而發現，IL-11R $\alpha$ 有缺陷的母小鼠有蛻膜化缺陷導致妊娠失敗的現象，所以我們進一步想要確定 IL-11 在人類懷孕的過程中所扮演的角色。首先則是觀察 IL-11 在人類各種細胞中的表現情形，而由圖一的 RT-PCR 之結果可知，除了 MRC-5 與 proliferative phase endometrium ( data not show)並未表現 IL-11 外，其他如 K562 以 IL-1 $\alpha$  和 PMA 刺激 24 小時後的 MRC-5 cells ( positive control)、Hela cells、human PBMC、secretory phase endometrium、25 位正常懷孕者之 decidua 和 villi、25 位 anembryonic pregnancy 病人之 decidua 和 villi 皆有 IL-11 的表現。此外，在本實驗所有選用之細胞與組織均有 IL-11R $\alpha$  和 gp130 的表現。

在了解 IL-11 與 IL-11R $\alpha$ 於 endometrium 表現之情形後，藉由 quantitative RT-PCR 之實驗方法，以進一步了解 IL-11 在懷孕之過程中所扮演之角色。由圖二、三所得到的實驗結果分別可發現，IL-11 在 normal pregnancy 之 decidua 表現量比在 anembryonic pregnancy 中來的高，且 normal pregnancy 的 villi 表現量也遠比 anembryonic pregnancy 的表現量高出許多。由此可知，IL-11 從 secretory phase 開始出現，而且懷孕後子宮蛻膜會增高其表現量。此外，在 anembryonic pregnancy 時，子宮內 IL-11 的表現量會減少，不管是蛻膜和 villi，其 IL-11 的量比起正常懷孕都是有意義之減少。同樣 villi 的 IL-11 表現量在不同群中仍比 decidua 高。

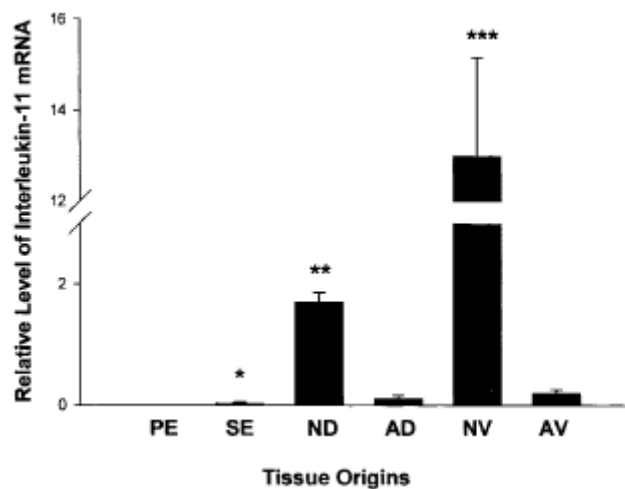
為了進一步觀察 IL-11 在組織內蛋白質層次的表現及位置而以免疫化學染色方法偵測到 IL-11 會明顯表現在許多細胞中，包括 normal pregnancy 和 anembryonic pregnancy 之 decidua 中的 stromal cells 及 gland cells 及兩者 villi 上的 syncytiotrophoblast 和 cytotrophoblast cells 其中又以 gland cells 比 stroma cells 的染色強，normal pregnancy villi 比 anembryonic pregnancy villi 染色強 而在不同時期的 endometrium IL-11 表現則非常不明顯 至於 IL-11Ra mRNA 於組織切片上之表現情形，發現在 proliferative phase 之 endometrium 內基質細胞有

IL-11Ra mRNA 之表現，而 gland cells 則無。但於 secretory phase 中，兩種細胞均有表現。此外，發現 villi 上的 trophoblast 也都有相同情形可在 anembryonic pregnancy 中發現。



**Fig 1.** Detection of IL-11 (322 bp), IL-11R<sub>α</sub> (443 bp), gp130 (292 bp), and  $\beta$ -actin (626 bp) mRNA expression in various samples by conventional RT-PCR. The PCR product was resolved in 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.  $\beta$ -actin was used as an internal control. M, marker

DNA marker; 1, K562 cells; 2, unstimulated MRC-5 cells; 3, MRC-5 cells stimulated with 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate and 1 ng/ml IL-1 for 24 h; 4, HeLa cells; 5, human peripheral mononuclear cells; 6, human secretory phase endometrium; 7, decidua from NP; 8, chorionic villi from NP; 9, decidua from AP; and 10, chorionic villi from AP. IL-11, IL-11R<sub>α</sub>, gp130, and  $\beta$ -actin mRNA were detected in all samples, except for the absence of IL-11 mRNA in unstimulated MRC-5 cells and proliferative phase endometrium (not shown)



**Fig 2.** Comparison of the level of IL-11 mRNA in various samples by real-time quantitative PCR. *Longitudinal axis* indicates the relative values of IL-11 mRNA. The level of stimulated MRC-5 cell mRNA was used as the reference. PE, Proliferative phase endometrium; SE, secretory phase endometrium; ND, decidua from NP; AD, decidua from AP; NV, chorionic villi from NP; and AV, chorionic villi from AP. \*,  $P < 0.004$ , comparison between PE and SE. \*\*,  $P < 0.001$ , comparison between ND and AD. \*\*\*,  $P < 0.03$ , comparison between NV and AV.

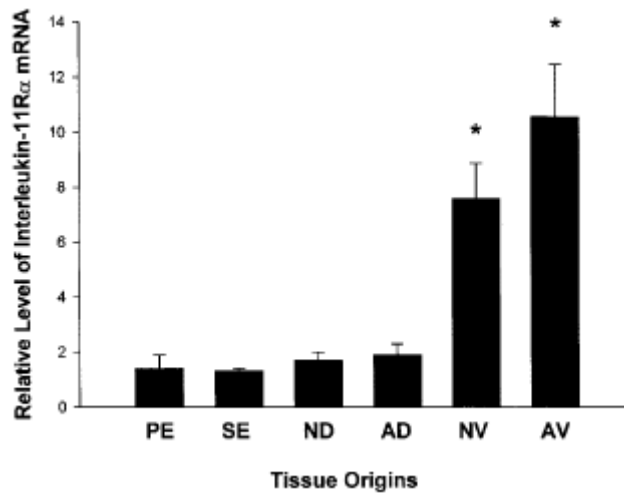


Fig 3 Comparison of the level of IL-11R<sub>α</sub> mRNA in various samples by real-time quantitative PCR. *Longitudinal axis* indicates the relative values of IL-11R<sub>α</sub> mRNA. PE, Proliferative phase endometrium; SE, secretory phase endometrium; ND, decidua from NP; AD, decidua from AP; NV, chorionic villi from NP; and AV, chorionic villi from AP. \*,  $P < 0.05$  compared with PE, SE, ND, or AD

#### (六) 討論

在今年度完成觀察正常與異常懷孕的婦女之子宮內膜上皮中 IL-11、IL-11R $\alpha$ 和 GP-130 的基因表現情形，且完成比較正常與異常懷孕的婦女之子宮內膜上皮中 IL-11、IL-11R $\alpha$ 和 GP-130 的蛋白質於組織中表現分布情形。已進一步證明 IL-11 在蛻膜化的過程中確實佔有一個關鍵之角色。由本年度實驗中得知 IL-11 的表現量會隨著月經週期而變化，於 mid-secretory phase 就開始出現，也發現懷孕前子宮內膜細胞中的 stromal cells 在黃體期時亦有高量 IL-11 之表現，故是否在女性月經週期中佔有相當角色之性腺賀爾蒙，亦會影響 endometrium 中 IL-11 之表現進而影響妊娠之進行，是個值得深入討論的話題。

此外，由今年度完成之成果可知，維持 IL-11 表現量在早期懷孕可能相當重要，至於是否因為胚胎死亡後產生的 IL-11 量減少，或因為 IL-11 量的減少造成 decidualization 產生問題，以致於胚胎死亡而發生 anembryonic pregnancy，這之間的因果關係還需要更多實驗證明。