

· 基础研究 ·

补肾活血方对子宫自然杀伤细胞与子宫间质细胞旁分泌基因表达谱的影响

贡 欣 金 哲 鲁秋丹 楼姣英

摘要 目的 观察补肾活血方对子宫自然杀伤(uterine natural killer, uNK)细胞与子宫间质细胞旁分泌基因表达谱的影响。**方法** 从育龄期妇女的增殖期子宫内膜提取人间质细胞,分为空白组、对照组和中药组。中药组加入 DMEM/F12 稀释至终浓度为 2 mg/mL 的补肾活血方药液,空白组和对照组加入等体积的 DMEM/F12,对照组和中药组培养 24 h 后再加入 20% 无血清 DMEM 加 80% uNK 细胞分泌提取液,于 37 °C, 5% CO₂ 培养 6 h,提取 3 组细胞 RNA。运用基因芯片技术检测各组间质细胞的基因表达谱,同时应用 qRT-PCR 和 ELISA 法检测筛选基因粒细胞趋化蛋白 1 (CXCL1)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、IL-8 和白血病抑制因子(leukocyte inhibitor factor, LIF) mRNA 和蛋白表达。**结果** 与空白组比较,对照组和中药组上升 4 倍的差异基因表达谱基本一致,共 63 个基因。与对照组比较,中药组 IL-15 受体 α (IL-15RA) 上调 1.27 倍,血管内皮生长因子 (VEGF) 上调 1.55 倍, LIF 上调 1.45 倍, IL-8 上调 1.10 倍, IL-11 上调 1.23 倍,转化生长因子-β (TGF-β) 上调 1.40 倍,表皮生长因子 (EGF) 上调 1.10 倍,单核细胞趋化蛋白 8 (CCL8) 上调 1.13 倍,运输蛋白 1 (TAP 1) 上调 1.02 倍,细胞表面趋化因子受体 2 (CXCR2) 上调 1.22 倍, ICAM-1 上调 1.15 倍 ($P < 0.05$)。**结论** uNK 细胞旁分泌作用对提高子宫内膜容受性和种植妊娠率发挥着重要的作用,补肾活血方可改善并提高此旁分泌系统的功能。

关键词 基因芯片;间质细胞;旁分泌作用;子宫内膜容受性

Effect of Bushen Huoxue Recipe on Paracrine Gene Expression Profiling of Uterine Natural Killer Cells and Uterine Stromal Cells GONG Xin, JIN Zhe, LU Qiu-dan, and LOU Jiao-ying Department of Gynecology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Bushen Huoxue Recipe (BHR) on paracrine gene expression profiling of uterine natural killer cells (uNK cells) and uterine stromal cells. **Methods** Human stromal cells were extracted from proliferative phase endometrium of child-bearing age females, which were then divided into the blank group, the control group, and the BHR group. DMEM/F12 was added in cells of the BHR group to dilute into final concentration of 2 mg/mL herbal liquor. Equal volume of DMEM/F12 was added to cells in the normal group and the control group. Cells in the control group and the BHR group were cultured for 24 h, with 20% serum-free DMEM plus 80% uNK cell secretion extracting solution added. Then they were cultured in 5% CO₂ at 37 °C for 6 h. Total RNAs were extracted after culture. The gene expression profile of stromal cells was detected using gene chip technology. At the same time mRNA and protein expressions of chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), IL-8, and leukocyte inhibitor factor (LIF) were screened and detected using qRT-PCR and ELISA. **Results** Compared with the blank group, profiles of differentiated genes with 4-fold increase (a total of 63 genes) were basically agreeable in the control group and the BHR group. Compared with the control group, IL-15 receptor alpha (IL-15RA) was up-regulated by 1.27 times, vascular endotheli-

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No.81173292)

作者单位:北京中医药大学东方医院妇科 (北京 100078)

通讯作者:金 哲, Tel: 010-67689705, E-mail: zjin0129@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170204. 020

al growth factor (VEGF) up-regulated by 1.55 times, LIF up-regulated by 1.45 times, IL-8 up-regulated by 1.10 times, IL-11 up-regulated by 1.23 times, transforming growth factor- β (TGF- β) up-regulated by 1.40 times, epidermal growth factor (EGF) up-regulated by 1.10 times, chemokine (C-C motif) ligand 8 (CCL8) up-regulated by 1.13 times, transporter 1 (TAP1) up-regulated by 1.02 times, chemokine (C-X-C motif) receptor 2 (CXCR2) up-regulated by 1.22 times, ICAM-1 up-regulated by 1.15 times ($P < 0.05$) in the BHR group. Conclusion uNK paracrine played an important role in elevating endometrial receptivity and embryo implantation, and BHR could improve and elevate the function of this paracrine system.

KEYWORDS gene chip; stromal cell; paracrine; endometrial receptivity

影响子宫内膜容受性的因素很多,免疫细胞的调节作用是其中一个重要因素^[1]。子宫自然杀伤细胞(uterine natural killer cell, uNK cell)随月经周期波动,并于分泌早期(LH+3)达到高峰,占蜕膜淋巴细胞总数的70%^[2]。uNK细胞介导并参与种植期的胚泡着床以及子宫内膜细胞形态和功能的改变^[3]。uNK细胞在生殖方面的作用很大程度上依赖于细胞自身的增殖反应。在小鼠组织中uNK细胞受孕激素的调节^[4],然而人uNK细胞表面并没有孕酮受体。研究表明uNK细胞与子宫内膜间质细胞的旁分泌系统可能在uNK细胞的增殖过程中发挥重要的生理作用^[5]。中医药在辅助生育和治疗不孕方面具有一定的优势。本研究运用基因芯片技术观察uNK细胞和间质细胞的相互作用以及可能的旁分泌系统,以期明确补肾活血方在此生理过程中的调节作用。

材料与方法

1 标本来源 选择2013年6—9月在东方医院妇科就诊患者,取拟行人工流产术的健康妊娠妇女(孕7~8周)蜕膜组织及滋养层组织;取育龄期妇女增殖期子宫内膜组织,术前3个月未使用任何性激素。内膜于无菌状态下从子宫底刮下,立即投入含青霉素100 IU/mL,链霉素100 IU/mL的无Ca²⁺、Mg²⁺的D-Hank's平衡盐溶液中,低温条件下1~3 h转移到实验室进行分离培养。

2 药物 补肾活血方(由丹参10 g、党参10 g、当归12 g、川断15 g、熟地15 g、杜仲12 g、山药15 g等10味药组成)按常规方法煎煮取汁,浓缩液含生药10.3 mg/mL,药物由东方医院药剂科提供。

3 试剂及仪器 DMEM/F12培养基(批号:11039-021)、RPMI 1640培养基(批号:11835-030)、Hank's(批号:14025076)、新生牛血清(批号:16010-159)、胎牛血清(批号:10099-141)、胶原酶I(批号:17100-017)、TRIzol(批号:

15596-018)、LIVE/DEAD Viability(批号:L3224)试剂盒均购于美国Life Technology公司;胰酶(批号:CC012)、PBS(批号:CC006)、青链霉素(批号:CC004)、细胞用水(批号:CC003)购于迈晨科技北京有限公司;GeneChip 3'IVT Express Kit(批号:901228)、GeneChip PrimeView 人基因表达谱芯片(批号:901837)、Fluidics Station 450(批号:00-0079)购于美国Affymetrix公司;M-MLV逆转录酶(批号:D2640B)、dNTP(10 mmol/L)(批号:D4030RA)、2' Ex TaqMix(批号:DRR390A)、DL2000分子量标准(批号:ML1285)购于宝生物工程(大连)有限公司;DNase I(批号:EN0521)、6×Loading Buffer(批号:R0891)购于美国Fermentas(MBI)公司;琼脂糖(批号:91622)购于西班牙Biowest公司;RNase-free H₂O(批号:B131800)购于韩国Walgene公司;Eva green(批号:31000)购于美国Biotium公司;PCR引物购于北京中美泰和生物技术有限公司;MiniMACS磁珠分离系统(批号:130-090-312)购于德国Miltenyi公司;CD-45包被的Dynabeads(批号:11153D)、Collection Epithelial Dynabeads(批号:16203)购于美国DynaL Biotech公司;Insert transwell小室(批号:140640)购于美国Thermo公司;IL-15(批号:JT-W1514)和基因粒细胞趋化蛋白1[Chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL 1,批号:JT-A-00025]ELISA试剂盒购于上海晶天生物科技有限公司。

4 uNK细胞分泌液提取 参照参考文献[5]。将蜕膜组织剪成0.5~1.0 mm³大小的碎块,加入0.1%胶原酶消化。在细胞悬液中加适量鼠抗人CD56抗体磁珠,运用MiniMACS分离器得到uNK细胞。经流式细胞仪检测细胞纯度>90%。DMEM/F12重悬uNK细胞,调整细胞浓度为5×10⁵/mL,每孔细胞悬液1300 μL,置于0.4 μm insert transwell小室上层,小室下层为1500 μL完全培养基。

于 37 ℃, 5% CO₂ 培养 24 h 后, 将下层 uNK 细胞分泌液保留至 -80 ℃ 冰箱, 上层 uNK 细胞离心提取后运用 live/dead viability 试剂盒检测细胞存活率, 当 uNK 细胞死亡率 <35% 时, 提示 uNK 细胞分泌液提取成功可继续后续实验。

5 人间质细胞分离提取及分组 取育龄期妇女的增殖期子宫内膜, 加入 0.1% 胶原酶 I 消化后经 Dynabeads CD45 移除白细胞, 阴选后的细胞再经过 CELLection Epithelial Enrich 提纯, 阴选得到间质细胞。流式细胞仪检测细胞纯度, 纯度 >90%。将人子宫内膜间质细胞培养于 DMEM/F12 + 10% FBS 培养液体中分为空白组、对照组和中药组。

6 检测指标及方法

6.1 人子宫内膜间质细胞旁分泌的基因表达谱检测 中药组加入 DMEM/F12 稀释至终浓度为 2 mg/mL 的中药液 (浓度根据预实验确定), 空白组 and 对照组加入等体积的 DMEM/F12, 于 37 ℃, 5% CO₂ 培养 24 h。对照组和中药组洗涤后再加入 20% 无血清 DMEM 加 80% uNK 细胞分泌提取液, 空白组洗涤后加入等体积的 DMEM, 于 37 ℃, 5% CO₂ 培养 6 h。培养后提取 3 组细胞的 RNA。采用 cDNA 直接标记法对 RNA 进行标记后利用等量的探针进行杂交, 取杂交液滴加于芯片上, 运用 Fluidics Station 450 于 55 ℃ 进行洗片。芯片结果采用 Scanner 3000 扫描仪进行扫描, 软件读取数据, 最后采用 Genespring 进行 Normalize 处理分析。每组 3 个样本, 筛选上调基因。

6.2 qRT-PCR 根据基因芯片检测结果, 筛选 CXCL1、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、IL-8 和白血病抑制因子 (leukaemia inhibitor factor, LIF)。采用 TRIzol 提取间质细胞总 mRNA, 紫外吸光度以检验纯度并计算 RNA 浓度, 取 1 mg 总 RNA 合成 cDNA。引物设计如下: CXCL1 (194 bp), 上游: 5'-ATAGCCA-CACTCAAGAATG-3', 下游: 5'-TCTGCAGCTGTGTCTCTCTT-3'; ICAM-1 (141 bp), 上游: 5'-GACGAGGATGTGGCTGTTGAGA-3', 下游: 5'-GGAGATGAGGTGATGGGCGAG-3'; IL-8 (292 bp), 上游: 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3', 下游: 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTC-3'; LIF (206 bp), 上游: 5'-GAGGAAGGAG-CAAGACTCAA-3', 下游: 5'-AGCATACCCAATAG-GCAGCAAG-3'; β -actin (285 bp), 上游: 5'-CAC-CCTTTCTTGACAAAACCT-3', 下游: 5'-AGT-

GGGGTGGCTTT TAGGA-3'。在 20 μ L 反应体系中加入阳性标准品及待测样本 cDNA 1.0 μ L。在 ABI Prism 7700 型荧光定量 PCR 仪中进行扩展反应, 条件如下: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 65 ℃ 35 s, 45 个循环; 72 ℃ 5 min。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析数据。

6.3 细胞上清液 IL-8 蛋白含量检测 采用生物素双抗体夹心 ELISA 技术, 按说明书操作, 根据标准曲线计算 IL-8 蛋白表达水平。为保证测量 IL-8 含量的准确性, 实验扣除了培养基中 IL-8 的基础含量。试剂盒灵敏度为 0.23 ng/L。

7 统计学方法 运用 SPSS 17.0 统计软件数据包处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间采用 one-way ANOVA, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。基因芯片的差异基因筛选方法为筛查表达上升或下降 4 倍以上, 且 $P < 0.01$ 的基因, 并运用 Benjamini-Hochberg (BH) 进行错误发现率检测 (FDR)。

结 果

1 各组间质细胞基因芯片差异基因筛选情况 (表 1) 与空白组比较, 对照组和中药组上升 4 倍的基因表达谱基本一致, 共 63 个基因。与对照组比较, 中药组与子宫内膜容受性和胚胎种植密切相关的因子表达量升高, 在此 63 个基因中 IL-15RA 上调 1.27 倍, LIF 上调 1.45 倍, IL-8 上调 1.10 倍, TAP 1 上调 1.02 倍, ICAM-1 上调 1.15 倍; 除此 63 个基因, 中药组与子宫内膜容受性密切相关的重要因子也有不同程度的升高: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 上调 1.55 倍, IL-11 上调 1.23 倍, 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 上调 1.40 倍, 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 上调 1.10 倍, 单核细胞趋化蛋白 8 [chemokine (C-C motif) ligand 8, CCL 8] 上调 1.13 倍, 细胞表面趋化因子受体 2 [chemokine (C-X-C motif) receptor 2, CXCR2] 上调 1.22 倍。

2 各组 CXCL 1、ICAM-1、IL-8 及 LIF mRNA 表达水平比较 (表 2) 与空白组比较, 对照组 CXCL 1、ICAM-1、IL-8 及 LIF mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 中药组 IL-8 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$)。

3 各组 IL-8 蛋白含量比较 与空白组 [(23.0 $\pm$ 1.2) ng/L] 比较, 对照组人子宫内膜间质细胞上清液 IL-8 蛋白含量 [(246.5 $\pm$ 20.3) ng/L] 升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 中药组 IL-8 蛋白含量 [(300.0 $\pm$ 13.1) ng/L] 升高 ($P < 0.05$)。

表 1 对照组较空白组上升 4 倍的基因

基因名称 (功能分类)	差异 倍数	基因 ID	基因名称 (功能分类)	差异 倍数	基因 ID	基因名称 (功能分类)	差异 倍数	基因 ID	基因名称 (功能分类)	差异 倍数	基因 ID
细胞凋亡			ETV7	4.29	51 513	GCH1	28.31	2 643	IFIT3	6.14	3 437
TNFAIP8	4.25	25 816	DDX60	4.32	55 601	激素分泌			NPY1R	10.28	4 886
C8orf4	4.46	56 892	RNF213	4.78	57 674	STC1	4.09	6 781	结构因子		
CASP7	4.53	840	IFIH1	11.14	64 135	离子束缚			TFPI2	4.21	7 980
CASP1	6.18	834	酶活力			APOBEC3G	5.03	60 489	MAP2	5.01	4 133
细胞黏附			DTX3L	4.32	151 636	C1R	5.82	715	GIMAP2	6.15	26 157
ICAM-1	7.98	3 383	TAP2	4.42	6 891	XAF1	6.02	54 739	CLDN1	7.03	9 076
细胞因子/趋化因子			GBP5	4.53	115 362	激酶			转录相关		
LIF	4.70	3 976	ACSL5	4.70	51 703	IRAK2	6.45	3 656	TRIM25	4.08	7 706
IL-15	5.90	3 600	RARRES3	4.96	5 920	TNFAIP3	11.73	7 128	SP100	4.53	6 672
IL-15RA	3.87	3 601	TAP1	5.01	6 890	CMPK2	15.07	129 607	NMI	4.74	9 111
CXCL6	10.53	6 372	PARP9	5.30	83 666	分子功能			PARP14	9.45	54 625
CXCL11	13.92	6 373	PTGS2	5.67	5 743	G0S2	4.76	50 486	STAT1	11.11	6 772
IL-6	15.07	3 569	HSD11B1	6.67	3 290	AIM1	6.37	202	IRF1	13.08	3 659
IL-8	48.04	3 576	CTSS	7.52	1 520	核苷酸代谢			色氨酸代谢		
CXCL1	55.68	2 919	SERPINB2	7.58	5 055	ALDH1A3	10.84	220	IDO1	22.50	3 620
CXCL10	178.99	3 627	BIRC3	7.90	330	GBP1	13.52	2 633	WARS	4.18	7 453
DNA/RNA 形成			GBP7	9.27	388 646	信号转导					
DDX58	4.08	23 586	GBP4	16.57	115 361	GBP3	4.48	2 635			
ATF3	4.25	467	SOD2	17.61	6 648	GBP2	4.58	2 634			

表 2 各组子宫内质间质细胞因子 mRNA
表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CXCL 1	ICAM-1	IL-8
正常	3	0.96 ± 0.06 *	1.007 ± 0.011 *	0.96 ± 0.23 *
对照	3	194.72 ± 8.98	14.522 ± 0.266	19.85 ± 0.18
中药	3	197.37 ± 17.05	15.982 ± 0.873	21.28 ± 0.15 *

注:与对照组比较,*P<0.01

讨 论

uNK 细胞对子宫内膜的血管生成与重建有重要的作用^[6],IFN-γ 可以上调与种植相关的细胞因子 CXCL10 和 CCL8,酶活性相关蛋白 GBP5、TAP1、SOD2 和凋亡因子 CASP1,以及转录相关因子 IRF1 等^[7]。而 IFN-γ 所引起的上述相关反应与 uNK 细胞同时促进滋养细胞迁移^[8]和胚胎着床部位的血管生成^[9,10],本课题组实验也验证了此协同作用的存在。uNK 细胞数量不足可以导致蜕膜的血管重塑明显减退,并增加胎儿成长受限及先兆子痫的发病率^[11]。

虽然 NK 细胞具有细胞毒作用,但 uNK 细胞却对母体一胎儿之间产生免疫性保护应答。有研究认为 IL-15 与此免疫保护相关^[12]。另外,uNK 细胞的保护性免疫应答可能通过识别目标细胞的表面主要组织相容性复合体(MHC class) I 因子而起到抑制 uNK 细胞杀伤的功能^[13]。TAP1 是促进形成 MHC class I 的必需因子之一,因此外周 NK 细胞缺少表达 TAP1 时细胞毒性增高。本研究发现,uNK 细胞可促使子宫

内膜间质细胞分泌更多的 TAP1,笔者推测 uNK 细胞可能通过间质细胞旁分泌系统抑制自身的免疫毒性。

实验发现 uNK 细胞分泌液中含有大量促进 uNK 细胞增殖的因子,包括 IL-15 和 IL-15RA。IL-15 可以促进 T 细胞的扩增,同时可以激活其他细胞毒效应细胞和单核细胞^[14,15]。uNK 细胞与子宫内膜间质细胞的旁分泌作用与骨髓 NK 细胞的增生方式极为相似,均是以 IL-15 和 IL-15RA 的相互作用为基础^[16]。由此笔者推测 uNK 细胞通过与间质细胞的旁分泌作用,即“IL-15—IL-15RA—uNK 扩增循环轴”,来维持子宫内膜内免疫细胞的内稳态并执行 uNK 细胞的各项生理功能。

目前,子宫内膜容受性下降是制约 ART 发展的瓶颈,本研究在中医“肾主生殖”的经典理论指导下,以补肾活血法指导临床用药,自制补肾活血方,使肾精得充,阴血得养,胞络气血调畅。前期研究表明补肾活血方可以通过改善大鼠子宫内膜内微血管密度(microvessel density,MVD)和 LIF 的表达提高子宫内膜容受性的作用^[17]。本研究中,通过检测 CXCL-1、ICAM-1、IL-8 及 LIF mRNA 表达量和 IL-8 蛋白的表达量,得到了和基因芯片相类似的结果,验证了基因芯片的结果。本研究发现补肾活血方可以不同程度地上调 CXCL-10、CCL8、TAP1、CXCR2、VEGF 和 LIF 等因子的表达,从而促进 uNK 细胞的旁分泌作用,最终达到提高子宫内膜容受性和种植妊娠率的治疗作用。另一方面,ICAM-1 是参与滋养层细胞系的迁移及细胞网络形成的主要因子^[18],本实验研究也与此结论相

一致。中药可以明显提高该因子的表达,因此认为中药可以通过上调 ICAM-1 加强 uNK 细胞和间质细胞的联系,达到促进 uNK 旁分泌的作用。另外,子宫内膜间质细胞可通过分泌 IL-8,加强 IL-15 与 IL-15RA 之间的相互作用^[19],从而进一步稳定 IL-15—IL-15RA—uNK 扩增循环轴。

综上所述,中药补肾活血方可以通过干预 uNK 细胞与间质细胞的旁分泌系统,起到促进胚胎种植,改善子宫内膜容受性,提高临床妊娠率的作用。

参 考 文 献

- [1] Zhang J, Chen Z, Smith GN, et al. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth[J]. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8(1): 1–11.
- [2] Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, et al. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies[J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(6): 791–798.
- [3] Quenby S, Nik H, Innes B, et al. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(1): 45–54.
- [4] Choe YS, Shim C, Choi D, et al. Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation[J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48(2): 261–266.
- [5] Germeyer A, Sharkey AM, Prasadajudio M, et al. Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts[J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(1): 39–48.
- [6] Wallace AE, Fraser R, Gurung S, et al. Increased angiogenic factor secretion by decidual natural killer cells from pregnancies with high uterine artery resistance alters trophoblast function[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(4): 652–660.
- [7] Kitaya K, Yasuo T, Yamaguchi T, et al. Genes regulated by interferon- γ in human uterine microvascular endothelial cells[J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(5): 689–697.
- [8] Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface[J]. *Nat Med*, 2006, 12(9): 1065–1074.
- [9] Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(9): 656–663.
- [10] Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2009, 24(3): 147–158.
- [11] Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon[J]. *Immunol Today*, 1993, 14(7): 353–356.
- [12] Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, et al. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface[J]. *J Immunol*, 2009, 182(7): 4085–4092.
- [13] Riley JK, Yokoyama WM. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 59(5): 371–387.
- [14] Leong JW, Chase JM, Romee R, et al. Pre-activation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20(4): 463–473.
- [15] Waldmann T, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin 15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens[J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17(1): 19–49.
- [16] Iizuka K, Chaplin DD, Wang Y, et al. Requirement for membrane lymphotoxin in natural killer cell development[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1999, 96(11): 6336–6340.
- [17] Gong X, Yu Y, Tong Q, et al. Effects of Bushen Huoxue Decoction on the endometrial morphology and expression of leukaemia inhibitory factor in the rat uterus during the oestrous cycle[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013: 496036.
- [18] Hu Y, Eastabrook G, Tan R, et al. Decidual NK cell-derived conditioned medium enhances capillary tube and network organization in an extravillous cytotrophoblast cell line[J]. *Placenta*, 2010, 31(3): 213–221.
- [19] Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, et al. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells *in vitro* [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(12): 4765–4770.

(收稿: 2014-04-10 修回: 2015-05-02)

责任编辑: 赵芳芳

英文责编: 张晶晶