

# 子宫自然杀伤细胞在人类早孕蜕膜血管生成中的作用研究

李国华<sup>①</sup> 黄薇<sup>①\*</sup> 夏庆杰<sup>②</sup> 杨开选<sup>③</sup> 刘尧芳<sup>①</sup> 朱慧莉<sup>①</sup> 江维<sup>④</sup>

(四川大学 ① 华西第二医院妇产科; ② 华西医院分子遗传实验室; ③ 华西第二医院病理科; ④ 华西医院病理科, 成都 610041)

**摘要** 子宫内膜蜕膜化过程伴随着活跃的血管生成是妊娠时新血管形成的关键步骤. 本研究旨在明确子宫自然杀伤细胞(uNK, CD56<sup>+</sup>细胞)在人类早期妊娠蜕膜组织中的分布, 并观察这类细胞是否表达血管内皮生长因子(VEGF-A)和促血管生成素 2(Ang2). 免疫组化研究发现, uNK细胞(CD56<sup>+</sup>)大量存在于子宫蜕膜间质中, 主要集中在血管和腺体周围的间质组织, 蛋白水平的VEGF-A和Ang2 表达于蜕膜间质细胞、微血管内皮细胞和腺上皮细胞中, uNK细胞在子宫蜕膜间质中的阳性率与平均微血管密度(MVD)、uNK细胞的阳性率与VEGF-A蛋白阳性表达率呈正相关关系, 而与Ang2 无相关性. 另外, 在激光微切获得的单个uNK细胞进行巢式PCR的研究结果显示, 人类蜕膜的uNK细胞能够表达VEGF mRNA, 未测得Ang2 mRNA在单个uNK细胞表达. 表明人类早孕子宫蜕膜中的uNK细胞通过表达VEGF-A, 在蜕膜化过程和胎盘早期形成时的血管生成中发挥重要作用.

**关键词** 子宫自然杀伤细胞 蜕膜 血管生成 血管内皮生长因子 促血管生成素 2

子宫内膜的蜕膜化过程在胚胎种植和早孕期间非常重要, 但是确切的调节机制尚不清楚. 在此期间, 一群特殊类型的淋巴细胞亚群被激活, 其数量急剧增多、细胞长大、胞浆颗粒增多, 并启动免疫细胞因子的产生, 这种细胞属于自然杀伤细胞, 因其细胞表型为CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>而被称为子宫自然杀伤细胞(uNK), 故在人类也被称为蜕膜CD56 阳性细胞<sup>[1~4]</sup>, 在小鼠则称为颗粒内膜腺细胞(GMG)<sup>[5]</sup>.

在子宫内膜蜕膜化过程中, 一个重要的变化是血管生成和血管重建, 为宫内胎儿发育提供足够的血供和营养物质<sup>[6,7]</sup>, 否则, 会出现流产、早产、胎儿宫内发育迟缓和妊娠高血压疾病等妊娠失败或合并症. 迄今为止, 在小鼠已证实uNK细胞参与绒毛植入

和胎盘发育过程中的血管重建, 在uNK细胞和内膜血管生成尤其是蜕膜化的内膜间具有唯一的、确定的关系<sup>[8~10]</sup>. 在人类尚待研究证实.

血管生成/血管重建过程机制复杂, 主要由数种促血管生成因子调控, 其中最主要的是血管内皮细胞生长因子(VEGF)和促血管生成素(Ang)家族, VEGF-A对血管内皮细胞有促细胞分裂作用<sup>[11]</sup>, VEGF-A和VEGF-C表达于妊娠小鼠的GMG细胞<sup>[12,13]</sup>、人类子宫内膜和胎盘床组织的uNK细胞上<sup>[14,15]</sup>. 促血管生成素家族的主要功能是维持血管内皮细胞的稳定性和促进新血管的重建, 其成员之一Ang2 被认为具有去除已建立血管的稳定性, 引起新血管形成的作用<sup>[16]</sup>. 原位杂交和免疫组化研究发现人类子宫内膜的Ang2 杂

交信号出现在uNK细胞上<sup>[4,17]</sup>.

本研究通过免疫组化研究, 观察uNK细胞在人类早孕蜕膜的分布, 并通过激光微切和巢式PCR联合检测CD56<sup>+</sup>uNK细胞是否能够表达VEGF-A和Ang2 mRNA.

## 1 材料和方法

### 1.1 组织采集

本研究经四川大学伦理委员会批准, 病人签署知情同意书. 于2005年9月至2006年3月在四川大学华西第二医院因非意愿妊娠需要终止妊娠的45名早孕妇女(平均年龄 $(27.8 \pm 5.4)$ 岁)中进行, 平均孕周为6~8周. 所有妇女具有规律的月经, 末次月经日期准确, 孕期无腹痛、阴道出血和任何不适, 以往无不良妊娠史, B超确定为宫内妊娠. 手术后立即将蜕膜组织放入液氮保存.

### 1.2 免疫组化

从45名妇女采集到的蜕膜组织在CM800冷冻切片仪上(Leica Instruments Nussloch, 德国)进行连续切片(8  $\mu$ m), OCT包埋. 分别采用鼠抗人单克隆抗体CD56, CD31, VEGF-A, 多克隆体抗Ang2, Flk-1, Tie2进行免疫组化染色, 通过预实验确定每种抗体的工作浓度(表1), 一抗加入后在4℃过夜, 其余免疫组化过程按常规SP法进行.

以显微镜下出现细胞膜或细胞浆的棕黄色为阳性. 在每张切片随机取5个高倍视野( $\times 400$ )下计数蜕膜CD56, VEGF-A和Ang2阳性细胞数, 以其平均值为其在蜕膜间质的阳性率. 将所有CD31染色阳性的微血管在高倍镜下( $\times 400$ )计数, 5个随机视野的平均值为该切片的微血管密度(MVD).

### 1.3 激光显微切割(LMD)和逆转录

将免疫组化中CD56表达良好的5份标本的冷冻切片, 采用同样的步骤进行免疫组化, 唯一的区别是一抗加入后在37℃孵30 min, 整个过程只需1~2 h. 确定CD56免疫阳性的uNK细胞.

为避免免疫组化过程的影响, 将免疫组化染色确定CD56<sup>+</sup>切片邻近的冰冻切片置于灭菌的PET衬托的金属框架上, 然后放置在激光显微切割仪载物台(Lesia, 德国)上, 切割面放在下面, 把经过高温消毒的0.5 mL Eppendorf(EP)管放置在收集器中, EP管的管盖中放入DEPC水(11.5  $\mu$ L), 收集器放在载物台下, 设定激光参数(孔径8, 强度44, 速度2)后再仔细观察免疫组织切片, 在染色阳性切片所对应的邻近冰冻切片同一部位进行激光切割, 切割的细胞跌入EP管的管盖内, 取出收集器, 将管盖直接盖在EP管上并倒置于冰上.

将获得的uNK细胞采用逆转录cDNA合成试剂盒(MBI)直接逆转录成cDNA: 在EP管加入1  $\mu$ L的随机引物, 混匀3~5 s, 94℃孵5 min, 冰上冷却. 随即加入以下成分: 5 $\times$ 缓冲液4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 核糖核酸酶抑制剂(20 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV逆转录酶(200 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 在以下条件下合成cDNA: 25℃, 10 min, 42℃, 60 min, 70℃, 5 min. 最后在冰上冷却.

### 1.4 巢式PCR

(1) 外侧引物扩增. 根据www.ensemble.org的cDNA库设计VEGF-A和Ang2引物和探针(表2), 由上海生物工程公司合成, 取获得的cDNA产物5  $\mu$ L用于下列反应体系(30  $\mu$ L): 10 $\times$ buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 3  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 1.8  $\mu$ L, dNTP(25 mmol/L) 0.36  $\mu$ L,

表1 用于免疫组化的抗体

抗体	克隆	滴度	一抗孵育时间	种系
CD56 <sup>a)</sup>	ZM-0057	1/25	4℃过夜	鼠
CD31 <sup>b)</sup>	GM0823	1/50	4℃过夜	鼠
VEGF-A <sup>a)</sup>	ZM-0265	即用型	4℃过夜	鼠
Ang2 <sup>c)</sup>	BA1530	1/200	4℃过夜	兔
Flk-1 <sup>c)</sup>	BA0486	1/50	4℃过夜	兔
Tie2 <sup>c)</sup>	BA1433	1/50	4℃过夜	兔

a) Zymed Laboratories Inc(California, 美国); b) DakoCytomation (丹麦); c) BOSTER (武汉, 中国)

表 2 实时 RT-PCR 的引物和探针序列

基因	顺义引物	反义引物	bP
VEGF-A			
VEGF1F/1R	5'-GCAGAATCATCACGAAGTGGT-3'	5'-CATCAGGGGCACACAGGAT-3'	142
VEGF2F/2R	5'-GTGAAGTTCATGGATGTCTATCA-3'	5'-TGAAGATGTAATCGATCTCATCA-3'	100
VEGF Taqman probe	CCCTGGTGGACATCTTCCAGG		
Ang2			
ANG2-1F/1R	5'-AGTGGCTAATGAAGCTTGAGA-3'	5'-CAAGTCTCGTGGTCTGATTT-3'	195
ANG2-2F/2R	5'-ATCCAGGACAACATGAAGAA-3'	5'-ACTTGGGCTTCCACATCA'	146
ANG2 Taqman probe	CAGAACCAGACGGCTGTGATGA		

上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Taq酶(5 u/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 17.54  $\mu\text{L}$ , cDNA 5  $\mu\text{L}$ . 在标准扩增模式下扩增.

(2) 内侧引物扩增. 将扩增的外侧引物置于内侧引物的模板上, 探针用 6-FAM和 6-TAMRA标记在 5'和 3'端, 5  $\mu\text{L}$  VEGF-A或Ang2的扩增产物分别加入以下反应体系(30  $\mu\text{L}$ ), 按次序分别加入下列试剂: 10 $\times$ 缓冲液(Mg<sup>2+</sup> free)3  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 3.0  $\mu\text{L}$ , dNTP (25 mmol/L) 0.36  $\mu\text{L}$ , 上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Taq酶(5 u/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , Taqman探针 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 15.44  $\mu\text{L}$ . 反应体系在FTC2000型荧光定量PCR仪上进行, 绘制每一反应管的扩增动力学曲线. 根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数(Ct值). 以上过程设有阳性对照和阴性对照, 阴性对照采用空白模板, 其余条件相同; 阳性对照以 5 份进行LMD和巢式PCR的标本组织用Trizol试剂盒提取RNA, 通过电泳、逆转录成cDNA, 采用一对上游和下游引物(VEGF 1F/VEGF 2R, Ang2 2F/ Ang2 1R)和相同的探针进行RT-PCR, 扩增条件相同.

## 1.5 统计分析

所有数据输入计算机利用SPSS13.0 软件进行统计分析, 定量数据采用MEDIAN $\pm$ Q<sub>U</sub>-Q<sub>L</sub> 或MEAN $\pm$ SD表示. 数据检验主要用秩相关,  $P < 0.05$  被认为有统计学上的显著差异.

## 2 结果

### 2.1 CD56 和 MVD 在人类早孕蜕膜的表达

CD56 阳性的 uNK 细胞主要集中在血管和腺体周围的间质, 细胞膜或胞浆呈现阳性(图 1(a)), 间质

中 uNK 细胞阳性表达率为(19 $\pm$ 14)%(M $\pm$ Q).

CD31 表达在蜕膜血管内皮细胞胞膜, 蜕膜组织中可见大量血管围绕在腺体周围. CD31 表达于蜕膜组织丰富的微血管内皮细胞上, 其 MVD 为 5.5 $\pm$ 2.3(均数 $\pm$ 标准差)(图 1(b)). 蜕膜间质中 uNK 细胞阳性率与 MVD 呈正相关( $r = 0.648$ ,  $P < 0.01$ )(图 2(a)).

### 2.2 VEGF-A 及其受体 Flk-1 在人类早孕蜕膜的表达

VEGF-A 在蜕膜腺上皮细胞、血管内皮细胞以及间质细胞中皆有表达, 棕黄色颗粒位于胞浆内(图 1(c)). VEGF-A 在蜕膜间质中的阳性表达率为(12 $\pm$ 16)%(M $\pm$ Q), 与蜕膜间质 uNK 细胞的阳性表达率及 MVD 皆呈正相关, 相关系数分别为 0.53, 0.89 ( $P < 0.01$ )(图 2(b)和(c)). VEGF 受体 Flk-1(VEGFR-2)在蜕膜的血管内皮细胞也有丰富的表达(图 1(d)).

### 2.3 Ang2 及其受体 Tie2 在人类早孕蜕膜的表达

Ang2 在腺上皮细胞、蜕膜间质细胞中都有表达, 呈现胞膜阳性或胞浆阳性, 尤以腺体的最内层细胞阳性表达较强(图 1(e)). 蜕膜间质中 Ang2 的阳性表达率为(13 $\pm$ 8)%(M $\pm$ Q). 相关性分析显示, 间质中 Ang2 阳性表达率与 uNK 细胞阳性表达率以及与 MVD 均无相关性, 相关系数分别为 0.24 和 0.217( $P > 0.05$ )(图 2(d)和(e)). Ang2 受体 Tie2 表达在血管内皮细胞(图 1(f)).

### 2.4 VEGF-A 和 Ang2 mRNA 在人类早孕蜕膜 uNK 细胞的表达

通过激光显微切割和巢式 PCR, VEGF-A mRNA 在 5 份人类早孕蜕膜的 uNK 细胞均有表达, Ct 值分别为 20.5, 21.5, 26.5, 27.0 和 35.0(图 3). 但是, 这 5 份标本均未测到 Ang2 的 mRNA 表达(图 4).

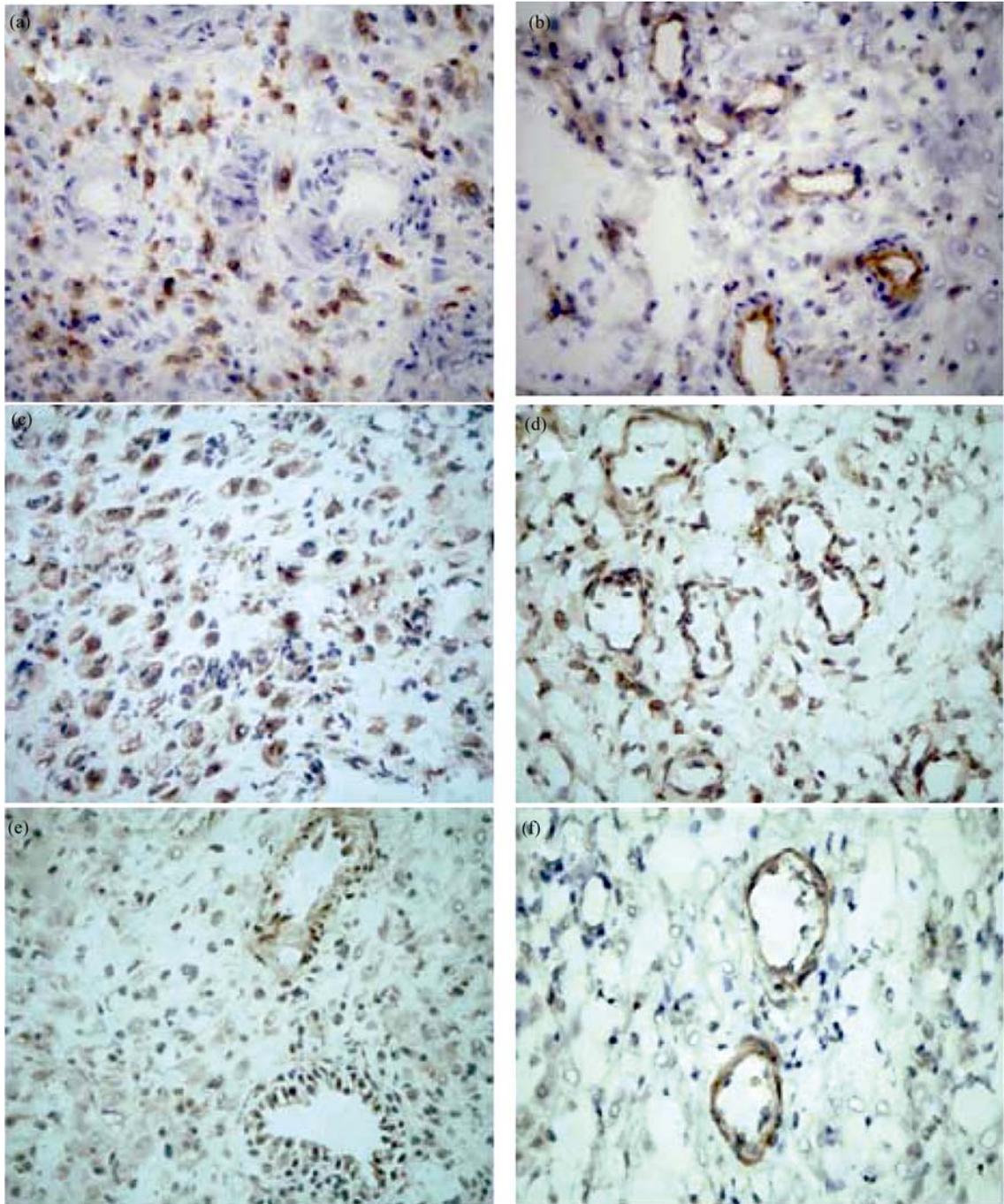


图 1 人类早孕蜕膜的免疫组化结果

(a) 蜕膜间质中 CD56-阳性细胞(SP × 400); (b) 微血管上 CD31 阳性染色(SP × 200); (c) 蜕膜间质的 VEGF-A 表达(SP × 400); (d) 微血管内皮细胞上的 Flk-1 表达(SP × 200); (e) 蜕膜腺体上皮细胞上的 Ang2 表达(SP × 200); (f) 微血管内皮细胞的 Tie2 表达(SP × 200)

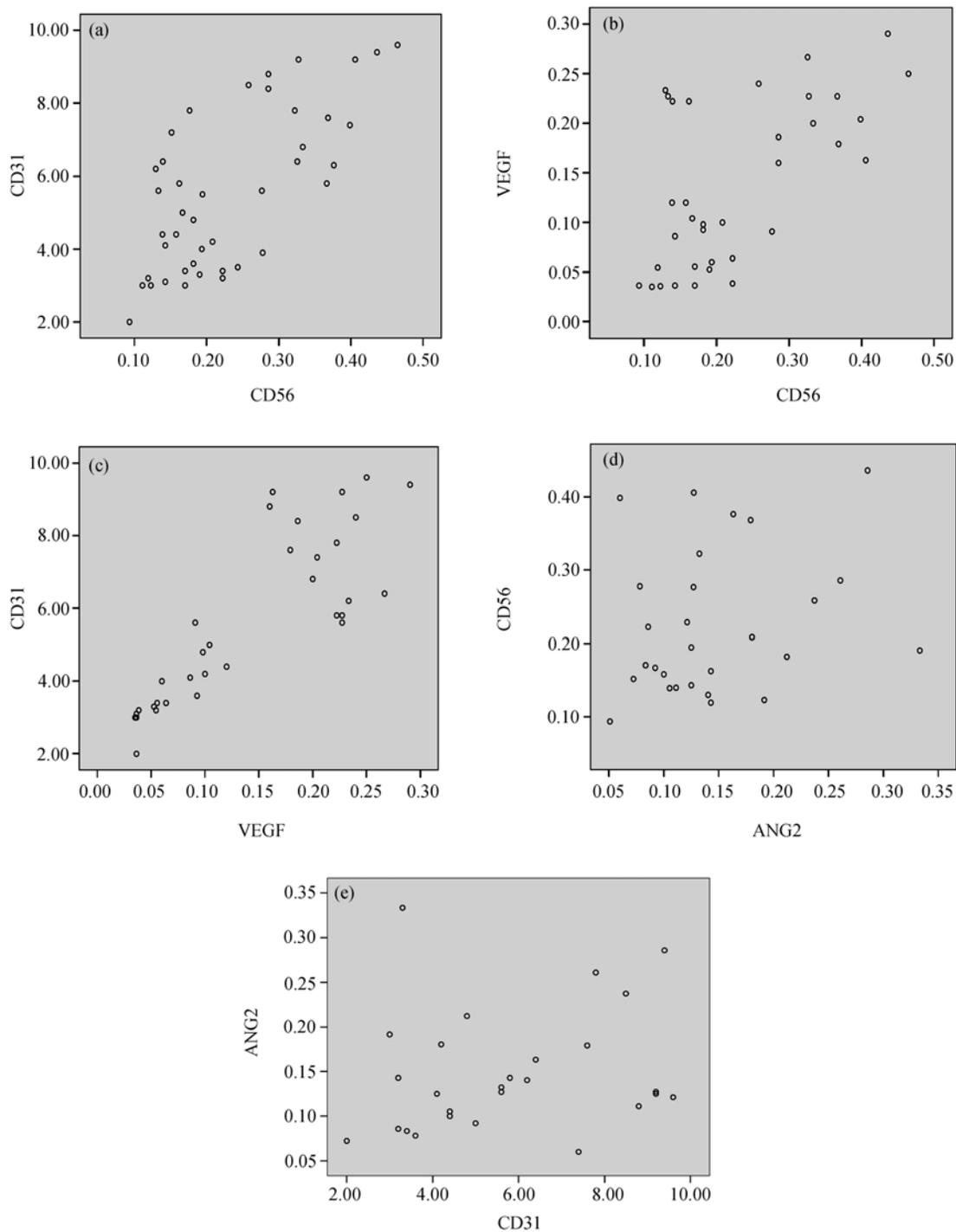


图 2 人类蜕膜 uNK 细胞, VEGF-A, Ang2 和 MVD 间的线性相关散点图

(a) uNK 细胞和 MVD; (b) VEGF-A 和 uNK 细胞; (c) VEGF-A 和 MVD; (d) uNK 细胞和 Ang2; (e) Ang2 和 MVD, 相关系数分别为 0.648, 0.53, 0.89, 0.24 和 0.217

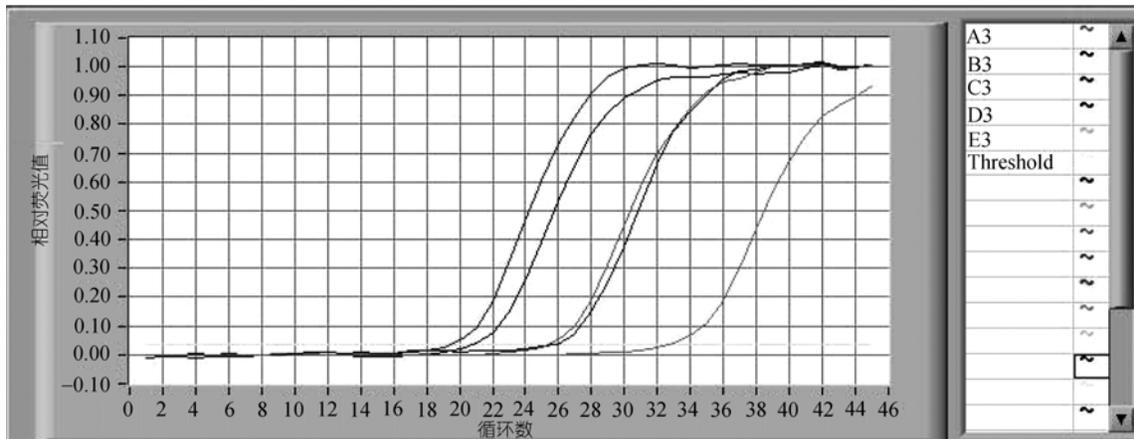


图3 VEGF-A mRNA 在单个 uNK 细胞的表达

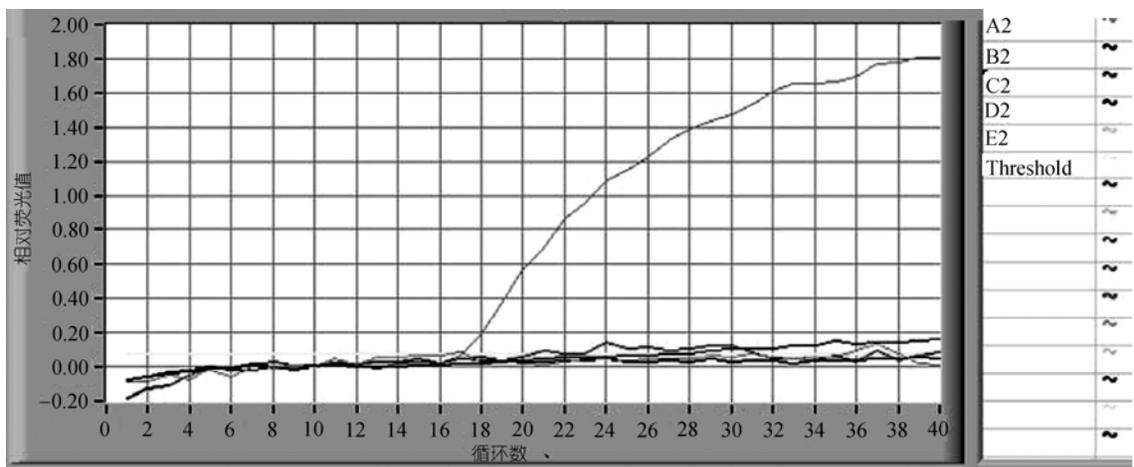


图4 Ang2 mRNA 在单个 uNK 细胞的表达(E2 为阳性对照)

### 3 讨论

在人类子宫内膜蜕膜化过程中uNK细胞很丰富,其细胞表型为 $CD56^+CD16^-$ ,有别于外周血NK细胞的 $CD56^+CD16^+$ 。在非妊娠的子宫内膜,uNK的数量随着月经周期而变化,在排卵前的增生期数量较少,排卵后在黄体中期逐渐增加,到了分泌晚期达到高峰,约占间质细胞的30%~40%<sup>[18]</sup>。妊娠发生后,uNK细胞在妊娠的子宫蜕膜持续增多,在种植窗达到高峰,尤其在种植部位底蜕膜数量显著增多,常紧密靠近内膜腺体和螺旋血管。uNK细胞在子宫蜕膜的存在是早孕的一个特征,因为妊娠20周后uNK细胞数量开始下降,在足月蜕膜中消失<sup>[19]</sup>。尽管进行大量研究,但是uNK细胞的确切作用仍未明确。

与以往研究结果类似<sup>[1~4]</sup>,本研究的免疫组化研

究发现uNK细胞大量存在于蜕膜间质中,在血管及腺体周围尤为明显,uNK细胞约占蜕膜间质细胞的 $19\% \pm 14\%$ ,是间质组织的主要成员,uNK细胞积聚在靠近绒毛滋养层的种植部位,预示其可能在胚胎种植和胎盘形成时的内膜生物学活动中发挥关键性作用。最近的动物研究显示,妊娠小鼠的uNK细胞在蜕膜化、胚胎种植、子宫血管重塑过程中都起到重要作用<sup>[8~10,20]</sup>。

微血管密度(MVD)是评价血管生成的指标,往往采用包括CD31 内皮标记物测定。本研究显示有大量 $CD31^+$ 的新生血管存在于人类早孕蜕膜组织中,说明其血管生成活跃;研究还显示MVD与 $CD56^+$ uNK细胞数量呈正相关,这与Wang等人<sup>[12]</sup>的报道相同,他们发现妊娠小鼠子宫GMG细胞的大量增加与血管

密度增加相平行. 除了诱导血管内皮细胞增殖, VEGF还可增加血管的通透性和维持血管的稳定. Shiraishi等人<sup>[21]</sup>研究发现除了合体滋养细胞和绒毛膜细胞可以表达VEGF外, 在人类早孕子宫中蜕膜细胞也可以表达 VEGF. 本研究进一步证实VEGF-A在蜕膜的腺上皮细胞、血管内皮细胞、间质细胞中皆有表达, 并且与组织CD56<sup>+</sup>uNK细胞数目成正相关, 另外, VEGF受体Flk-1在蜕膜的血管内皮表达也较丰富, 表明早孕蜕膜的血管生成活跃, VEGF参与其中.

Ang家族的4个成员分别为Ang1, Ang2, Ang3和Ang4, 研究表明Ang1和Ang2参与血管生成调节. 在人类和小鼠, Ang2选择性地表达于卵巢、子宫和胎盘<sup>[22]</sup>, 而Ang1广泛的表达于胎儿和成人中<sup>[23]</sup>, 两者的受体均为Tie2. Ang1诱导Tie2的磷酸化, 刺激内皮细胞趋化, 反之, Ang2则竞争性抑制这一作用<sup>[24]</sup>. Hirchenhain等人<sup>[17]</sup>发现人类正常月经周期中增生和分泌期子宫内膜的腺上皮细胞、间质细胞中都有Ang2蛋白和mRNA表达. 而Li等人<sup>[14]</sup>通过原位杂交的方法和联合连续性切片的免疫组化也发现, Ang2的杂交信号局限内膜的uNK细胞. 但是, 以上研究均采用子宫内膜标本, 而本研究采用人类早孕蜕膜组织, 发现Ang2在蜕膜腺上皮细胞和间质细胞中皆有表达, 其受体Tie2也表达在组织的血管内皮细胞中, 但蛋白水平的Ang2表达与蜕膜CD56<sup>+</sup>uNK细胞数量无相关性, 表明uNK细胞不是Ang2的来源.

激光显微切割技术(laser microdissection, LMD)是一项新的研究工具, 可以对组织病理学上特定的细胞群进行研究, 甚至可以精确到一个特定的细胞. 巢式PCR又称套组PCR, 是用两对以上的引物扩增出不同长度片段的技术. 激光显微切割技术和巢式PCR的联合应用, 可以非常敏感和特异地检测单细胞中某一因子mRNA的表达. 采用以上方法, 本研究发现单个uNK细胞可以表达VEGF-A mRNA, 此结果与Lash等人<sup>[15]</sup>的近期报道一致. 因此我们认为uNK细胞通过表达VEGF-A在人类早孕子宫蜕膜血管生成和胎盘发育中起重要作用.

遗憾的是, 采用激光微切和巢式PCR, 本研究未能测到早孕蜕膜uNK细胞表达Ang2 mRNA, 仅在蜕膜组织提取的RNA中测到Ang2 mRNA, 结果与Li等人<sup>[14]</sup>的原位杂交和Lash等人<sup>[15]</sup>的报道不一致, 在后

一研究中, 作者发现早孕蜕膜是促血管生成因子的主要来源, uNK细胞是胎盘床Ang1, Ang2, TGF- $\beta$ 1和VEGF-C的重要来源. 我们认为这种结果的不一致可能与所采用的研究方法不同有关, 我们将在进一步的研究中观察和证实之.

## 4 结论

免疫组化结果表明人类早孕蜕膜组织中 uNK 细胞数目与微血管密度和 VEGF-A 表达呈正相关, 而激光微切联合巢式 PCR 发现人类蜕膜 uNK 细胞能够表达 VEGF-A mRNA, 本研究说明人类早孕蜕膜的 uNK 细胞通过表达 VEGF-A, 在蜕膜血管生成和早期胎盘发育中起着重要作用.

## 参 考 文 献

- 1 Croy B A, Chantakru S, Esadeg S, et al. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development. *J Reprod Immunol*, 2002, 57: 151—168 [\[DOI\]](#)
- 2 Koopman L A, Kopcow H D, Rybalov B, et al. Human decidual natural killer a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*, 2003, 198: 1201—1212 [\[DOI\]](#)
- 3 King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*, 2000, 6: 28—36 [\[DOI\]](#)
- 4 Eriksson M, Meadows S K, Wira C R, et al. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF- $\beta$ . *J Leuko Biol*, 2004, 76: 667—675 [\[DOI\]](#)
- 5 Croy B A, Kiso Y. Granulated metrial gland cells: A natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Micro Res Tech*, 1993, 25: 189—200 [\[DOI\]](#)
- 6 Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 110: S10—18 [\[DOI\]](#)
- 7 Veenstra van Nieuwenhoven A L, Heineman M J, Faas M M. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update*, 2003, 9: 347—357 [\[DOI\]](#)
- 8 Guimond M J, Luross J A, Wang B, et al. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod*, 1997, 56: 169—179 [\[DOI\]](#)
- 9 Greenwood J D, Minhas K, di Santo J P, et al. Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta*, 2000, 21: 693—702 [\[DOI\]](#)
- 10 Ashkar A A, Di Santo J P, Croy B A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med*, 2000, 192: 259—270 [\[DOI\]](#)
- 11 Celec P, Yonemitsu Y. Vascular endothelial growth factor-basic science and its clinical implications. *Pathophysiology*, 2004, 11: 69—75 [\[DOI\]](#)
- 12 Wang C, Umesaki N, Nakamura H, et al. Expression of vascular

- endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell Tiss Res*, 2000, 300: 285—293 [\[DOI\]](#)
- 13 Wang C, Tanaka T, Nakamura H, et al. Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. *Microsc Res Tech*, 2003, 60: 420—429 [\[DOI\]](#)
- 14 Li X F, Charnock-Jones D S, Zhang E, et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrin Metab*, 2001, 86: 1823—1834 [\[DOI\]](#)
- 15 Lash G E, Schiessilm B, Kirkley M, et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leuk Biol*, 2006, 80: 572—580 [\[DOI\]](#)
- 16 Jones P F. Not just angiogenesis-wider roles for the angiopoietins. *J Pathol*, 2003, 201: 515—527 [\[DOI\]](#)
- 17 Hirchenhain J, Huse I, Hess A, et al. Differential expression of angiopoietins 1 and 2 and their receptor Tie-2 in human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2003, 9: 663—669 [\[DOI\]](#)
- 18 Bulmer J N, Morrison L, Longfellow M, et al. lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod*, 1991, 6: 791—798
- 19 Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*, 2004, 63: 1—12 [\[DOI\]](#)
- 20 Guimond M J, Wang B, Croy B A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. *J Exp Med*, 1998, 187: 217—223 [\[DOI\]](#)
- 21 Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, et al. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta*, 1996, 17: 111—121 [\[DOI\]](#)
- 22 Maisonpierre P C, Suri C, Jones P F, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 1997, 277: 55—60 [\[DOI\]](#)
- 23 Davis S, Aldrich T H, Jones P F, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 1996, 87: 1161—1169 [\[DOI\]](#)
- 24 Lobov I B, Brooks P C, Lang R A, et al. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 11205—11210 [\[DOI\]](#)