

复方莪术汤对子宫内膜异位症大鼠 Th1/Th2 平衡的调节作用

曾荣¹, 杨静², 曹保利³, 李继坤^{2*}, 曹超¹

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津南开医院急腹症研究所, 天津 300100;
3. 天津南开医院妇产科, 天津 300100)

[摘要] 目的: 观察复方莪术汤对子宫内膜异位症(EMS)模型大鼠辅助性 T 细胞 1(Th1)与辅助性 T 细胞 2(Th2)的比值(Th1/Th2)平衡的调节作用。方法: 采用自体移植法制作 EMS 大鼠模型, 复方莪术汤 14.58, 29.16 g·kg⁻¹ig, 28 d 后, 肝素抗凝抽取腹主动脉血, 应用流式细胞技术检测 EMS 大鼠外周血 CD4、CD8 及 CD4/CD8 及 Th1/Th2。结果: 模型组外周血 CD4/CD8(1.42 ± 0.22)较空白对照组下降($P < 0.05$), Th2 型细胞较空白对照组显著升高, Th1/Th2(31.46 ± 17.71)比值下降($P < 0.05$)。复方莪术汤组与模型组比较, 外周血 CD3, CD4, CD4/CD8(高、低剂量分别为 2.30 ± 0.67, 2.02 ± 0.53)上升, CD4 IL-4 下降, Th1/Th2(高、低剂量分别为 65.75 ± 29.33, 60.86 ± 25.56)上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 复方莪术汤组与孕三烯酮组比较, 各项指标无统计学差异。结论: EMS 大鼠外周血呈 Th2 优势漂移现象, Th1/Th2 失衡在 EMS 的发病机制中可能具有重要作用。复方莪术汤能有效调节 EMS 大鼠 Th1/Th2 失衡, 在大鼠 EMS 治疗中参与了免疫调节。

[关键词] 复方莪术汤; 子宫内膜异位症; CD4/CD8; Th1/Th2; 流式细胞术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0246-03

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)是具有恶性行为的良性疾病, 是导致女性慢性盆腔痛和不孕的最重要原因之一^[1]。近年来本病发病率呈明显上升趋势, 但发病机制尚不清楚, Sampson 提出的经血逆流所致子宫内膜种植学说被广为接受。但 90% 有经血逆流现象的女性, 仅少数发生 EMS。大量研究表明, EMS 的发生可能与患者腹膜免疫功能异常, 尤其是维持自身稳定的免疫监视及防御功能缺陷有关^[2]。机体允许异位内膜组织在腹腔内种植, 表明机体的免疫系统功能异常^[3]。

辅助性 T 细胞(Th)对机体免疫系统有重要的调节作用, 可分为 Th1 和 Th2 型细胞。γ-干扰素(IFN-γ)是 Th1 细胞分泌的特征性细胞因子; 白细胞介素-4(IL-4)是 Th2 细胞的特征性细胞因子, 是 Th2 型细胞应答强度的重要衡量指标^[4]。2 种类型的细胞因子互相制约, 处于动态平衡, 维持正常的细胞免疫和体液免疫功能, 一旦这种动态平衡被打破将导致疾病的发生及发展^[5]。研究表明 EMS 发病与免疫功能异常有关, 特别是与 Th1/Th2 的变化相关^[6]。观察复方莪术汤对 EMS 模型大鼠 Th1/Th2

平衡的调节作用, 本实验以 IFN-γ, IL-4 分别代表 Th1 及 Th2 型细胞, 应用流式细胞技术检测 EMS 大鼠外周血中的 Th1/Th2。

1 材料

1.1 动物 选用健康雌性未交配过的 Wistar 大鼠, 70 只, 体重(200 ± 20) g, 鼠龄 8 ~ 12 周, 由天津市山川红实验动物科技有限公司中心提供, 合格证号 SCXK(津)2010-001, 自然光照, 常规饲养。

1.2 药物 复方莪术汤由三棱 15 g, 莪术 15 g, 黄芪 15 g, 淫羊藿 15 g, 元胡 10 g 组成, 水煎浓缩成 200% 的药液; 孕三烯酮胶囊, 北京紫竹药业有限公司, 批号 53090205, 蒸馏水溶解后配成相应浓度, 于 4 °C 冰箱中保存备用; 硫酸庆大霉素注射液, 天津华金制药厂; 己烯雌酚, 天津金耀药业有限公司。

1.3 试剂 RPMI-1640 培养基购自天津百若克医药生物技术公司; 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-醋酸盐(phorbol 12-myristate 13 acetate, PMA)、离子霉素(Ionomycin)购自美国 Sigma 公司; 流式抗体 anti-rat CD3, anti-rat CD4, anti-rat IFN-γ, anti-rat IL-4-PE 购自 BioLegend 公司; 红细胞裂解液购自北京天根生化科技有限公司; Brefeldin A Solution(BFA), Fixation Buffer, Permeabilization Wash Buffer 购自 BioLegend 公司。

1.4 仪器 流式细胞检测仪(BD FACE CaLibur 公司), 超净工作台(苏州净化设备有限公司), TE212-L 电子天平(德国 Sartorius)。

[收稿日期] 2011-10-11

[第一作者] 曾荣, 在读硕士, Tel: 13612103485, E-mail: 4162474832@qq.com

[通讯作者] *李继坤, 副主任技师, Tel: 13821673385, E-mail: zengrong2009@163.com

2 方法

2.1 模型制作 在非动情期予雌激素,采用自体移植法制作大鼠 EMS 模型。大鼠适应性喂养 1 周。随机选 10 只为空白对照组,其余 60 只造模,术前连续 5 d ig 己烯雌酚 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。手术在无菌条件下进行,10% 水合氯醛 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉,大鼠仰卧位固定,腹部备皮,碘伏消毒。于腹中线耻骨联合上 1 cm 处做一 2~3 cm 长的纵形切口,开腹,游离右侧子宫,近端离右子宫角 1 cm 处结扎,远端离卵巢 1 cm 处结扎。剪下中间的一段子宫,迅速置于盛有生理盐水的无菌培养皿中,剔除多余脂肪及结缔组织,剥去浆膜层,沿系膜部位纵行切开,剪成 $10 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 子宫内膜组织(含子宫肌层)2 块。内面朝向腹壁,在血管丰富处,使用 6-0 带针无损伤线固定组织 4 个角于两侧腹壁上。生理盐水冲洗腹腔,滴入生理盐水 1:10 稀释的硫酸庆大霉素注射液 1 mL 以预防感染,同时用苦味酸涂抹腹部伤口,防止大鼠将伤口咬开。2-0 丝线间断关腹,常规饲养,术后 10 d ig 己烯雌酚 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 5 d。术后 4 周,再开腹,观察移植物生长情况,用游标卡尺测量移植灶大小,移植物体积 $\geq 8 \text{ mm}^3$ 、出现液体积聚、呈隆起透亮的小囊状、被结缔组织覆盖并有血管形成,即造模成功。

2.2 分组与给药 将 EMS 成模大鼠随机分为 4 组,即模型对照组、复方莪术高、低剂量组 ($29.16, 14.58 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于人等效剂量的 4,2 倍)、孕三烯酮组 ($0.52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。空白组和模型予生理盐水 ig。连续 4 周,给药体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2.3 标本的收集 末次给药后,动物禁食不禁水,24 h 后 10% 水合氯醛 ip 麻醉大鼠,开腹,腹主动脉取血 3 mL,放入肝素抗凝的无菌管中,以备流式分析技术测定 Th1/Th2。

2.4 Th1/Th2 染色 血标本带到超净工作台操作,抗凝全血与 RPMI-1640 1:1 稀释,总体积 2 mL。加入 PMA $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、离子霉素 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、BFA $2 \text{ } \mu\text{L}$,共同刺激细胞, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 孵育 5~6 h。每管分 $300 \text{ } \mu\text{L}$ 细胞(密度 1×10^6 个/mL),加入 CD3 抗体 $1 \text{ } \mu\text{L}$,CD4 抗体 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 进行细胞表面抗原染色,避光室温孵育 20 min。加入 3 倍体积红细胞裂解液,避光室温孵育 5 min,期间颠倒混匀几次, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去上清。加入 2 mL PBS, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去上清,每管留 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 液体。加入 Fixation Buffer $500 \text{ } \mu\text{L}$,避光室温孵育 20 min。 $300 \times g$ 离心 5 min,去上清。加入 $2000 \text{ } \mu\text{L}$

$1 \times \text{Permeabilization Wash buffer}$, $300 \times g$ 离心 5 min,去上清(重复洗涤 2 次)。在残留的液体中加入 IL-4 抗体 $1 \text{ } \mu\text{L}$,IFN- γ 抗体 $2 \text{ } \mu\text{L}$,进行细胞内细胞因子染色,避光室温孵育 20 min。再次用 Permeabilization Wash Buffer 洗涤 2 次。重悬细胞于 $500 \text{ } \mu\text{L}$ PBS 中,将细胞密度调节至 1×10^6 个/mL,应用流式细胞仪进行检测。

2.5 流式细胞仪检测分析 以前向角(FS)和侧向角(SS)散点图设门区分 T 淋巴细胞,对门内的 T 淋巴细胞进行分析,每管收集 1×10^6 个细胞。用 EXPO32 ADC Analysis 软件分析 Th1 ($\text{CD4}^+ \text{IFN-}\gamma^+$) 和 Th2 ($\text{CD4}^+ \text{IL-4}^+$) 的比率,即 Th1/Th2 比值。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义。

3 结果

3.1 外周血 CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 测定 EMS 模型大鼠外周血 CD3, CD4 明显低于空白组 ($P < 0.05$),CD4/CD8 较空白组下降 ($P < 0.05$),CD8 有下降趋势,但差异无统计学意义;各治疗组与模型组比较,CD3, CD4, CD4/CD8 上升,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);中药组与西药组比较,CD3, CD4, CD4/CD8 差异无统计学意义。见表 1。

3.2 外周血 $\text{CD4}^+ \text{IFN-}\gamma^+$, $\text{CD4}^+ \text{IL-4}^+$, Th1/Th2 测定 EMS 模型大鼠外周血 $\text{CD4}^+ \text{IL-4}^+$ 上升 ($P < 0.05$),Th1/Th2 下降 ($P < 0.05$), $\text{CD4}^+ \text{IFN-}\gamma^+$ 无明显变化;复方莪术汤组与模型组比较,CD4⁺ IL-4⁺ 下降, Th1/Th2 上升,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);中药组与西药组比较,CD4⁺ IL-4, Th1/Th2 无统计学差异。见表 2。

4 讨论

子宫内膜异位症外周血 CD4/CD8, Th1/Th2 的变化 1980 年 Weed 和 Arquem—bonrg 发现 EMS 患者子宫内膜周围有淋巴细胞浸润和补体 C₃ 沉积,拉开从免疫角度研究子宫内膜异位症的序幕。越来越多的证据表明免疫监视、免疫杀伤细胞的作用减弱,不能有效清除异位内膜,而免疫活性细胞释放细胞因子促进异位内膜存活、增殖,形成 EMS。当 CD4/CD8 下降或倒置时,免疫功能紊乱。本实验模型组 CD3, CD4, CD4/CD8 比值下降,大鼠成模后免疫功能发生变化。CD4 T 细胞在特定组织微环境的诱导下分化为 Th1/Th2 细胞。Th1 细胞分泌的细胞因子有白细胞介素-2, 12 (IL-2, IL-12), γ -干扰素 (IFN- γ), 肿瘤坏死因子- β , α (TNF- β , TNF- α), CM-CSF,

表 1 复方莪术汤对外周血 CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	CD3/%	CD4/%	CD8/%	CD4/CD8
空白	10	-	71.37 ± 8.34 ¹⁾	48.52 ± 5.62 ¹⁾	22.85 ± 5.09	2.20 ± 0.52 ¹⁾
模型	11	-	47.42 ± 8.36	27.95 ± 6.56	19.46 ± 1.97	1.42 ± 0.22
复方莪术汤	12	29.16	62.93 ± 7.45 ¹⁾	42.96 ± 6.19 ¹⁾	19.97 ± 5.27	2.30 ± 0.67 ¹⁾
	12	14.58	56.43 ± 13.53 ¹⁾	37.75 ± 11.79 ¹⁾	18.68 ± 2.94 ¹⁾	2.02 ± 0.53 ¹⁾
孕三烯酮	12	5.2 × 10 ⁻⁴	57.68 ± 18.67 ¹⁾	38.36 ± 16.49 ¹⁾	19.32 ± 2.95 ¹⁾	1.93 ± 0.73 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05 (表 2 同)。

表 2 复方莪术汤对外周血 Th1/Th2 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ /%	CD4 ⁺ IL-4 ⁺ /%	Th1/Th2
空白	10	-	5.65 ± 3.15	0.07 ± 0.03 ¹⁾	86.30 ± 43.76 ¹⁾
模型	11	-	5.02 ± 1.10	0.19 ± 0.11	31.46 ± 17.71
复方莪术汤	12	29.16	5.39 ± 2.17	0.09 ± 0.03 ¹⁾	65.75 ± 29.33 ¹⁾
	12	14.58	4.96 ± 3.09	0.08 ± 0.03 ¹⁾	60.86 ± 25.56 ¹⁾
孕三烯酮	12	5.2 × 10 ⁻⁴	4.83 ± 2.78	0.09 ± 0.03 ¹⁾	63.60 ± 37.57 ¹⁾

LT 等,参与细胞介导的免疫过程;Th2 细胞分泌的细胞因子有白细胞介素-3,4,5,6,7,10,13(IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL-9,IL-10,IL-13),辅佐 B 淋巴细胞产生抗体,促进抗体介导的体液免疫反应。正常情况下 Th1 和 Th2 两种细胞借助其分泌的细胞因子形成负反馈,相互制约,维持平衡。某些因素作用下一旦失去平衡,则出现 Th1 型或 Th2 型优势反应,引发异常免疫应答,造成病理状态。EMS 患者体内 ThL/Th2 平衡状态破坏,Th2 因子表达增强,Th1 因子表达受抑制,且随着 EMS 临床分期的增加,变化越明显^[7]。本实验模型组 CD4⁺IL-4⁺ 上升,Th1/Th2 下降,Th2 型细胞明显增多,呈 Th2 优势漂移的现象,Th1/Th2 型细胞模式失衡在 EMS 的发病机制中可能具有重要作用。

EMS 在中医属于“癥瘕”范畴,瘕是产生本病临床症状和体征的关键,治疗采用活血祛瘀法。现代药理研究证明大多活血化瘀药可以调节免疫机制,活血化瘀中药对异位内膜具有促进细胞凋亡、促进包块缩小吸收、粘连软化及抑制疼痛的作用^[8]。复方莪术汤是我院妇产科临床用于“癥瘕”肾虚血瘀型的验方,方中莪术、三棱为君药破血化瘀、活血止痛;淫羊藿为臣药填肾精、补肾气、益精生血,并温肾助阳推动血液运行,使冲任调畅,瘀血得化;元胡为佐药化瘀软坚散结,兼止痛;黄芪为佐使药补益元气,使气旺而助血行,化瘀而不伤正。5 药合用,共奏补肾化瘀、消癥散结、行气止痛之效。本实验结果显示,复方莪术汤高、低剂量组 CD3, CD4, CD4/CD8, Th1/Th2 上升,CD4⁺IL-4⁺ 下降,与孕三烯酮组

的疗效比较无明显差异。复方莪术汤在大鼠 EMS 的治疗中参与了免疫调节机制,能够有效调节 EMS 大鼠 Th1/Th2 的平衡。

[参考文献]

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2009:325.
- [2] 胡春萍,胡婷婷,蔡雪婷,等. 桂枝茯苓汤对子宫内膜异位症大鼠脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞数和 NK 细胞杀伤活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):145.
- [3] 王秀霞,张合龙. 子宫内膜异位症的免疫学发病机制及防治[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(12):906.
- [4] 王洪珍,王芳,马春玲. Th1 及 Th2 型细胞的变化与子宫内膜异位症相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3):303.
- [5] Wan Y Y, Flavell R A. How diverse-CD4 effector T cells and their functions[J]. J Molecular Cell Biology, 2009, 1(1):20.
- [6] Siedentop F, Tariverdian N, Rucke M, et al. Immune status, psychosocial distress and reduced quality of life in infertile patients with endometriosis [J]. Am J Reprod Immunol, 2008, 60(5):449.
- [7] 张蕾,吴瑞,瑾林俊. Th1/Th2 漂移与子宫内膜异位症[J]. 国际妇产科学杂志, 2008, 35(4):268.
- [8] 袁小琴,边文会. 子宫内膜异位症从“瘕”论治实验研究进展[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(13):2464.

[责任编辑 何伟]