

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<sup>1</sup>,杨静<sup>2</sup>,曹保利<sup>3</sup>,李继坤<sup>2\*</sup>,曹超<sup>1</sup>

(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<sup>-1</sup>ig,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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。

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。 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。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<sup>[6]</sup>。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- $\gamma$ ,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℃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- $\gamma$ ,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%  $\text{CO}_2$  孵育 5~6 h。每管分 300  $\mu\text{L}$  细胞(密度  $1 \times 10^6$  个/mL),加入 CD3 抗体 1  $\mu\text{L}$ ,CD4 抗体 1  $\mu\text{L}$  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,  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,去上清。加入 2 mL PBS,  $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,去上清,每管留 100  $\mu\text{L}$  液体。加入 Fixation Buffer 500  $\mu\text{L}$ ,避光室温孵育 20 min。  $300 \times g$  离心 5 min,去上清。加入 2 000  $\mu\text{L}$

1  $\times$  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  $\mu\text{L}$ ,IFN- $\gamma$  抗体 2  $\mu\text{L}$ ,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  $\mu\text{L}$  PBS 中,将细胞密度调节至  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^6$  个细胞。用 EXPO32 ADC Analysis 软件分析 Th1 (CD4 $^{+}$  IFN- $\gamma^{+}$ ) 和 Th2 (CD4 $^{+}$  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 CD4 $^{+}$  IFN- $\gamma^{+}$ , CD4 $^{+}$  IL-4 $^{+}$ , Th1/Th2 测定** EMS 模型大鼠外周血 CD4 $^{+}$  IL-4 $^{+}$  上升 ( $P < 0.05$ ), Th1/Th2 下降 ( $P < 0.05$ ), CD4 $^{+}$  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 C $_3$  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),  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ), 肿瘤坏死因子- $\beta$ ,  $\alpha$  (TNF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), 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 <sup>-1</sup>  | CD3/%                       | CD4/%                       | CD8/%                      | CD4/CD8                   |
|-------|----|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 空白    | 10 | —                      | 71.37 ± 8.34 <sup>1)</sup>  | 48.52 ± 5.62 <sup>1)</sup>  | 22.85 ± 5.09               | 2.20 ± 0.52 <sup>1)</sup> |
| 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 <sup>1)</sup>  | 42.96 ± 6.19 <sup>1)</sup>  | 19.97 ± 5.27               | 2.30 ± 0.67 <sup>1)</sup> |
|       | 12 | 14.58                  | 56.43 ± 13.53 <sup>1)</sup> | 37.75 ± 11.79 <sup>1)</sup> | 18.68 ± 2.94 <sup>1)</sup> | 2.02 ± 0.53 <sup>1)</sup> |
| 孕三烯酮  | 12 | 5.2 × 10 <sup>-4</sup> | 57.68 ± 18.67 <sup>1)</sup> | 38.36 ± 16.49 <sup>1)</sup> | 19.32 ± 2.95 <sup>1)</sup> | 1.93 ± 0.73 <sup>1)</sup> |

注:与模型组比较<sup>1)</sup>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 <sup>-1</sup>  | CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> /% | CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> /% | Th1/Th2                     |
|-------|----|------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 空白    | 10 | —                      | 5.65 ± 3.15                                    | 0.07 ± 0.03 <sup>1)</sup>             | 86.30 ± 43.76 <sup>1)</sup> |
| 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 <sup>1)</sup>             | 65.75 ± 29.33 <sup>1)</sup> |
|       | 12 | 14.58                  | 4.96 ± 3.09                                    | 0.08 ± 0.03 <sup>1)</sup>             | 60.86 ± 25.56 <sup>1)</sup> |
| 孕三烯酮  | 12 | 5.2 × 10 <sup>-4</sup> | 4.83 ± 2.78                                    | 0.09 ± 0.03 <sup>1)</sup>             | 63.60 ± 37.57 <sup>1)</sup> |

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<sup>[7]</sup>。本实验模型组 CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>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,瘀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<sup>[8]</sup>。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<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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“瘀”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]