

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0943.014

桂枝茯苓胶囊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

胡春萍¹, 胡婷婷², 蔡雪婷¹, 王志刚¹, 卢悟广¹, 万贵平¹, 曹鹏^{1*}

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028;

2. 南京市江北人民医院, 南京 210035)

[摘要] 目的:观察桂枝茯苓胶囊对子宫内膜异位症(EMs)模型大鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞数和NK细胞杀伤活性的影响。方法:改进制作大鼠子宫内膜异位症动物模型,ig桂枝茯苓胶囊0.256,1.024 g·kg⁻¹,28 d后取脾脏,分离淋巴细胞,采用流式细胞分析术测定大鼠脾脏中CD4⁺T淋巴细胞数;将分离的NK细胞与K562细胞共孵育后,MTT法检测其杀伤活性。结果:低剂量组CD4⁺T淋巴细胞数比模型组提高19.0%,NK细胞杀伤活性提高54.1%,具有显著意义。结论:桂枝茯苓胶囊可显著提高CD4⁺T淋巴细胞数和NK细胞杀伤活性。

[关键词] 桂枝茯苓胶囊;子宫内膜异位症;CD4⁺T细胞;NK细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0145-04

Effects of Guizhi Fuling Capsule on Quantity of CD4⁺T Lymphocytes and Cytotoxic Activity of NK Cells in Spleen of Rats with Endometriotics

HU Chun-ping¹, HU Ting-ting², CAI Xue-ting¹,

WANG Zhi-gang¹, LU Wu-guang¹, WAN Gui-ping¹, CAO Peng^{1*}

(1. Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Institute of

Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210028, China;

2. People's Hospital of Nanjing Jiangbei District, Nanjing, 210035, China)

[收稿日期] 2010-12-03

[基金项目] 康缘中医药科技创新基金项目(HV0813KY)

[第一作者] 胡春萍,副研究员,从事中药药理研究,Tel:025-85608666,E-mail:njhcp66@126.com

[通讯作者] *曹鹏,副研究员,从事分子药理学研究,Tel:025-85608666,E-mail:pcao79@yahoo.com

[网络出版时间] 2011-03-14 09:43

- [2] 林茂. 密花豆藤化学成分的研究. 中草药[J]. 1989, 20(2): 5.
- [3] 唐勇,王笑民,何薇,等. 鸡血藤提取物体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(4): 306.
- [4] 唐勇,何薇,王玉芝,等. 鸡血藤黄酮类组分抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(2): 51.
- [5] 唐勇,富琦,何薇,等. 鸡血藤抗肿瘤有效部位诱导A549肺癌细胞非凋亡性程序化死亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 2040.
- [6] 崔艳君,刘屏,陈若芸,等. 鸡血藤有效成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 121.
- [7] 严启新,李萍,王迪. 鸡血藤脂溶性化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(5): 336.
- [8] 严启新,李萍,胡安明. 鸡血藤化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(10): 876.
- [9] 成军,梁鸿,王媛,等. 中药鸡血藤化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1153.
- (责任编辑 何伟)

[**Abstract**] **Objective:** To observe the effects of Guizhi Fuling Capsule on the quantity of CD4⁺ T lymphocytes and the cytotoxic activity of NK cells in spleen of with rats endometriosis. **Method:** Rat model of endometriosis was created by self-transplant, and then administrated with 0.256 or 1.024 g·kg⁻¹ Guizhi Fuling Capsule orally for 28 days. Lymphocytes and NK cells were separated from the spleen. The quantity of CD4⁺ T lymphocytes was measured by flow cytometry. The cytotoxic activity of NK cells were tested by MTT assay while incubated with K562 cells. **Result:** CD4⁺ T lymphocytes were 19.0% higher in low-dose group than model group. Compared with model group, the cytotoxic activity of NK cells in low-dose group increased about 0.5 fold. **Conclusion:** The quantity of CD4⁺ T lymphocytes and the cytotoxic activity of NK cells in EMs can be significantly increased by Guizhi Fuling Capsule.

[**Key words**] Guizhi Fuling Capsule; endometriosis; CD4⁺ T lymphocytes; NK cells

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是一种妇科常见病,目前 EMs 发病率呈上升趋势,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。大量研究资料还表明, 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,腹膜中的免疫系统是一个很复杂的系统,它包括几种不同的细胞类型及其分泌物的相互作用。

有研究发现, EMs 患者的 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺, CD8⁺ 的数量发生变化,平衡机制遭到破坏,随着免疫功能失调加重 EMs 症状亦加重^[2]。根据 Sampson 的逆行月经理论,细胞免疫缺陷尤其是自然杀伤细胞(NK cell)的功能损伤,使得子宫内膜细胞能在 EMs 患者体内植入并存活,是 EMs 发生的病因之一。T 细胞的活性下降和异常也是导致 NK 细胞活性损伤的主要原因之一。本实验采用杨萍等的方法改进建立 EMs 动物模型,观察桂枝茯苓胶囊对子宫内膜异位症模型大鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞数和 NK 细胞活性的影响。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级雌性 SD 大鼠 60 只,体重(200±20)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.2 器械 常规手术器械包 2 套;超净工作台,苏州净化设备有限公司;生物安全柜,美国 Labcon 公司;显微镜,日本 Olympus 公司;TE212-L 电子天平,德国 Sartorius;流式细胞仪, BD 公司;全波长酶标仪, Thermo 公司。

1.3 药品与试剂 桂枝茯苓胶囊:0.31 g/粒,批号 2009426,江苏康缘药业股份有限公司;散结镇痛胶囊:0.4 g/粒,批号 2009426,江苏康缘药业有限

公司;戊巴比妥钠:中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号 F2002-0915;0.9% 氯化钠注射液,批号 08052304,南京小营药业集团有限公司。K562 细胞购自中国科学院上海细胞库;RPMI 1640、胎牛血清购自 Invitrogen 公司;大鼠淋巴细胞分离液和 NK 细胞分离液购自天津灏洋生物公司;FITC 标记的抗大鼠 CD4 单克隆抗体购自 Bio Legend 公司;MTT, DMSO 购自 Sigma 公司。

2 方法

2.1 动物模型制作 60 只大鼠,留取 10 只为假手术组,其余 50 只为造模组,根据杨萍等的方法改进制作 EMs 动物模型^[1]。大鼠皮肤常规消毒后,下腹部正中切口长约 3 cm,进腹后在膀胱背侧找到子宫。游离左侧子宫,近端离左子宫角 1 cm 处结扎,远端离卵巢 1 cm 处结扎。将切下的子宫组织放在盛有无菌生理盐水的培养皿中,纵行剖开子宫段,剪取 3 mm×5 mm 的子宫内膜组织(含子宫肌层)1 块。在腹壁切口右侧从腹肌与皮下筋膜层之间打隧道,以正好能置入子宫片为宜,将子宫内膜组织块平整地置入右侧隧道底部,使内膜面紧贴腹肌,常规关腹。假手术组大鼠皮肤常规消毒后,下腹部正中切口长约 3 cm,逐层打开腹腔,然后常规关腹。术后连续 3 d 注射青霉素 40 万 u/只,正常喂养。术后次日开始 im 雌二醇 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,每隔 4 d 1 次,共 3 次,以促进异位内膜生长。术后每周触摸包块 2 次,观察包块有无及大小。第 21 天 3.5% 戊巴比妥钠 ip 麻醉(10 mL·kg⁻¹)下,固定大鼠于超净工作台上,腹部剃毛,皮肤常规消毒,下腹部正中切口长约 3 cm,逐层开腹,观察模型大鼠的异位内膜形态学变化,并用游标卡尺测量异位内膜组织体积,体积增大≥8 mm³,出现液体积聚,呈隆起透亮的小囊状,即造

模成功。

2.2 分组与给药 将已造模成功的 36 只 SD 大鼠随机分成 4 组,每组 9 只:模型对照组,桂枝茯苓低、高剂量组(含生药 0.256,1.024 g·kg⁻¹),散结镇痛组(含生药 0.44 g·kg⁻¹),假手术组随机选 9 只。次日开始给药,给药量为 10 mL·kg⁻¹,假手术组及模型对照组 ig 同体积蒸馏水,连续 28 d 后,将各组大鼠处死,快速摘取脾脏,泡于 PBS 中,采用流式分析技术测定大鼠脾脏中 CD4⁺T 淋巴细胞数;将 NK 细胞与 K562 细胞共孵育后,MTT 法检测其杀伤活性。

2.3 大鼠脾脏 CD4⁺T 细胞数的测定

2.3.1 T 淋巴细胞分离 将脾脏用 PBS 冲洗后,用灭菌手术剪剪碎,并在钢丝网上用研磨棒研磨,研磨的同时用 PBS 冲洗。取淋巴细胞分离液 3 mL 于 15 mL 离心管内,沿试管壁缓慢加入用 PBS 稀释的脾细胞悬液 9 mL,2 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,小心吸取中间白色分层至另 1 离心管,加 PBS 洗涤后离心,弃上清,加入 PBS 重悬沉淀,离心,重复洗涤 1 次,将细胞密度调节至 1 × 10⁷ 个/mL。

2.3.2 CD4⁺T 淋巴细胞测定 取稀释的单个核细胞液 100 μL,加入 1 μL 的 FITC 抗大鼠 CD4,4 ℃ 孵育 30 min,用 PBS 洗涤 2 次,1 000 r·min⁻¹,10 min,去除游离抗体。用流式细胞仪进行分析,在散射光参数图上选取淋巴细胞群,在荧光参数图上选取绿色荧光阳性的细胞群进行分选统计。

2.4 MTT 法检测大鼠脾脏 NK 细胞活性

2.4.1 NK 细胞分离 脾脏研磨过程同 2.3.1,取 NK 细胞分离液 3 mL 于 15 mL 离心管内,沿试管壁缓慢加入用 PBS 稀释的脾细胞液 9 mL,离心 2 000 r·min⁻¹,15 min,小心吸取中间白色分层至另一离心管,加 PBS 洗涤后离心,弃上清,加入 PBS 重悬沉淀,离心。重复洗涤 1 次,将细胞密度调节至 1 × 10⁷ 个/mL。

2.4.2 NK 细胞活性测定 靶细胞 K562,用 RPMI 1640 完全培养基培养,调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL。按效应细胞与靶细胞之比为 40:1 加样作为实验孔,同时设空白对照、靶细胞对照及效应细胞对照孔,于 5% CO₂,37 ℃ 条件下恒温孵育 24 h,每孔加入 10 μL MTT (5 g·L⁻¹),继续孵育 4 h 后,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后小心吸掉上清,每孔加入 100 μL 的 DMSO 震荡 10 min 后,酶标仪上读取相应波长的吸光度(A)。NK 细胞活性按下列公式

计算:

$$\text{NK 细胞活性} = [1 - A_{\text{实验孔}} / (A_{\text{效应细胞孔}} + A_{\text{靶细胞孔}})] \times 100\%$$

2.5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,*t* 检验比较组间差异,*P* < 0.05 有显著性差异。

3 结果

3.1 桂枝茯苓胶囊对大鼠脾脏 CD4⁺T 细胞数的影响 与假手术组相比,模型对照组 CD4⁺含量大幅下降,而桂枝茯苓低剂量组和高剂量组的 CD4⁺含量,得到明显提高,低剂量组比模型组提高了 19.0%。散结镇痛组 CD4⁺含量降低。见表 1。

表 1 桂枝茯苓胶囊对大鼠脾脏 CD4⁺T 细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ T 细胞数/%
假手术	-	43.57 ± 2.66
模型对照	-	34.73 ± 3.73
桂枝茯苓胶囊	0.256	41.33 ± 2.53 ¹⁾
	1.024	35.00 ± 4.31
散结镇痛胶囊	0.44	27.30 ± 3.55

注:与模型对照组比较¹⁾ *P* < 0.05(表 2 同)。

3.2 桂枝茯苓胶囊对大鼠脾 NK 细胞杀伤活性的影响 与假手术组相比,模型对照组 NK 细胞杀伤活性呈大幅度下降,而桂枝茯苓低剂量组和高剂量组的 NK 细胞杀伤活性明显提高,低剂量组和高剂量组分别比模型组提高了 54.1% 和 57.3%。散结镇痛组 NK 细胞杀伤活性也有很大程度的提高。见表 2。

表 2 桂枝茯苓胶囊对大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NK 杀伤力/%
假手术	-	26.282 ± 4.218
模型对照	-	15.793 ± 4.245
桂枝茯苓胶囊	0.256	24.332 ± 6.329 ¹⁾
	1.024	24.847 ± 5.543 ¹⁾
散结镇痛胶囊	0.44	21.072 ± 5.567

4 讨论

子宫内膜异位症是子宫内膜组织能够在子宫以外的部位生长并能引起全身性的炎症反应,绝大多数病变出现在盆腔内生殖器和其邻近器官的腹膜面。

近来的研究表明,EMs 与免疫效应尤其是细胞免疫密切相关。1980 年,Weed 和 Arquemoarg 通过

免疫荧光技术发现 EMs 患者子宫内膜中有淋巴细胞浸润和补体 C₃ 的沉积,首次提出免疫学与 EMs 发病有关。之后的研究确认免疫机制在异位内膜的种植、生长及增殖等过程中起着重要作用。EMs 患者体内 Th1 细胞受损,Th1 和 Th2 细胞之间的平衡发生改变,偏向 Th2,可能缘于 EMs 免疫防御机制被破坏^[3-5]。Hong-Nerng Ho 等研究发现,在 EMs 患者腹腔中,T 淋巴细胞活性的下降主要表现在 CD4⁺T 细胞亚群而非 CD8⁺T 细胞亚群^[6],T 亚群细胞能反映宿主免疫调节能力。EMs 的发生意味着子宫内膜成功地在异位种植生长,而 T 淋巴细胞行使的细胞免疫功能与细胞生长及种植有关。

NK 细胞为非特异性杀伤细胞,直接分泌细胞因子或间接通过 T 细胞介导的抗体依赖性细胞毒作用杀伤靶细胞,在机体防止肿瘤发生和抵抗病毒感染中发挥重要的免疫监护作用。NK 细胞通过特征性的杀伤细胞激活受体(KAR)和杀伤细胞抑制受体(KIRs)识别靶细胞^[7]。EMs 外周血和腹腔液 KIRs 亚型 KIR2DL1,NKB1,EB6 表达增加,并可通过抑制白细胞 K562 而使 NK 细胞活性降低。NK 细胞功能缺陷,可导致 B 细胞去抑制,活化、增殖产生自身抗体,引起抗原抗体反应及各种免疫复合物生成,造成体液免疫功能的紊乱^[8]。

桂枝茯苓丸由桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、赤芍组成,方中桂枝温通血脉,茯苓渗湿下行而益心脾之气,有助于行瘀血,共为君药。宿有癥块,郁久多能化热,故又配伍牡丹皮、赤芍合桃仁以化瘀血,并能清瘀热,共为臣佐药。丸以白蜜起到缓消的作用,以为使。诸药合用,共奏活血化瘀、缓消癥块之效。由于其“破结而不伤精败血,消癥而不损正”为缓消痞结之要剂,故为历代医家所喜用,多用于治疗妇科癥瘕、积聚。桂枝茯苓胶囊运用现代新型药物辅料β环糊精,对药物中丹皮酚、桂皮醛等挥发性、刺激性成分进行包裹而成的现代胶囊制剂,具有活血化瘀、缓消瘤块之功能,可用于妇女血癖所致的各种病证,是妇女卵巢囊肿、子宫肌瘤、痛经、子宫内膜异位症等多种疾病的临床主导药品。

本研究中模型对照组异位症大鼠脾脏中 CD4⁺T 细胞数量降低,提示 EMs 患者体内存在淋巴细胞

免疫失调,免疫功能的降低使机体不能很好地清除异位的子宫内膜细胞,导致异位的子宫内膜种植生长,经过 4 周的给药处理后,桂枝茯苓胶囊低剂量组和高剂量组的 CD4⁺T 淋巴细胞数显著提高,低剂量组比模型组提高了 19.0%,几乎接近正常水平,散结镇痛组 CD4⁺T 含量细胞数反而下降,可能其作用机制与桂枝茯苓胶囊有异;桂枝茯苓组 NK 细胞杀伤活性明显提高,其低剂量组和高剂量组分别比模型组提高了 54.1% 和 57.3%,散结镇痛组 NK 细胞杀伤活性也有很大程度的提高。但不如桂枝茯苓胶囊组提高明显。本研究为桂枝茯苓胶囊治疗子宫内膜异位症应用提供了可靠的实验依据。

[参考文献]

- [1] 杨萍,纳冬荃,熊亚龙,等. 大鼠子宫内膜异位模型的建立与组织学观察[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2): 139.
- [2] 董伟,徐晓玉,李傲. 三棱丸对子宫内膜异位症大鼠 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 8.
- [3] 李央,林金芳. 子宫内膜异位症发病机理研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(1): 55.
- [4] 汪临兰,陈穗,赖秀慧. 子宫内膜异位症患者 T 细胞亚群测定及临床意义[J]. 现代医院, 2004, 4(6): 52.
- [5] 蒋红清. 子宫内膜异位症免疫学研究进展[J]. 国外医学·妇产科学分册, 2006, 33(2): 79.
- [6] Hong-Nerng Ho, Ming-Yih Wu, Kuang-Han Chao, et al. Peritoneal interleukin-10 increases with decrease in activated CD4⁺ T lymphocytes in women with endometriosis[J]. Human Reproduction, 1997, 12(11): 2528.
- [7] Wilson T J, Hertzog P J, Angus D, et al. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis [J]. Fertil Steril, 1994, 62:1086.
- [8] 王燕,陈双厚,刘瑞华,等. 桂附胶囊治疗子宫内膜异位症实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(11): 801.

[责任编辑 何伟]