

[参考文献]

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2007, 132(17): 2557- 2576.
- [2] 杨富春, 郑树森, 蒋天安. 改良法大鼠原发性肝癌模型的建立 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84 (23): 2018-2019.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1427- 1428, 1431- 1432.
- [4] 何球藻, 吴厚生. 医学免疫学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997: 5- 7.

(编辑: 马力)

补肾健脾方干预对肾虚 - 黄体抑制流产模型大鼠内分泌 - 免疫的影响

刘芳¹, 王俊玲¹, 姚静²

1. 南方医科大学附属深圳市妇幼保健院, 广东 深圳 518028; 2. 深圳市福田区中医院, 广东 深圳 518000

[摘要] 目的: 研究补肾健脾方干预对肾虚 - 黄体抑制流产模型大鼠内分泌 - 免疫的影响。方法: SPF 级 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 15 只。A 组为补肾健脾方干预组, 用羟基脲加米非司酮加补肾健脾方水提液灌服; B 组为肾虚 - 黄体抑制流产模型组, 用羟基脲加米非司酮灌服; C 组灌服生理盐水。酶联免疫法检测大鼠血清孕酮 (P) 和子宫蜕膜组织的细胞因子白细胞介素 - 2 (IL-2)、白细胞介素 - 10 (IL-10)、转化生长因子 - β 1 (TGF- β 1) 的浓度。结果: A 组、B 组流产率均显著高于 C 组 ($P < 0.01$); A 组流产率显著低于 B 组 ($P < 0.05$)。A 组第 12 天 P 显著高于 B 组 ($P < 0.01$), A 组显著低于 C 组 ($P < 0.05$); B 组显著低于 C 组 ($P < 0.01$)。A、B 组的 IL-2 显著高于 C 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), B 组的 IL-10 显著低于 C 组 ($P < 0.01$), A 组的 IL-10 显著高于 B 组 ($P < 0.01$)。Th1/Th2 细胞因子浓度 B 组显著高于 A、C 组 ($P < 0.01$); Th1/Th3 细胞因子 B 组显著高于 A、C 组 ($P < 0.01$), A 组和 C 组比较有差异 ($P < 0.05$)。结论: 补肾健脾方通过提升血清孕激素分泌, 促进母胎界面妊娠保护性 Th2、Th3 型细胞因子的分泌, 调节免疫失衡, 诱导免疫耐受, 从而发挥抗流产效应。

[关键词] 自然流产; 补肾健脾方; 肾虚-黄体抑制; 大鼠; 孕酮; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256- 7415 (2012) 12- 0145- 03

自然流产是妇产科常见病, 流行病学调查其发生率约占全部妊娠的 15%~40%, 现代研究认为其原因与内分泌 - 免疫密切相关, 因而从内分泌 - 免疫角度探讨自然流产的防治是妇产科研究的热点^[1]。补肾健脾方是以补肾健脾并重, 固本安胎的中药方剂。笔者前期应用于临床治疗肾虚或脾肾两虚型自然流产疗效甚佳。为研究该方作用机理, 笔者参照罗颂平等^[2]的方法建立大鼠肾虚 - 黄体抑制流产模型, 通过观察补肾健脾方对肾虚 - 黄体抑制流产模型大鼠血清孕激素水平和子宫蜕膜组织上细胞因子的影响, 从内分泌 - 免疫角度探讨其防治自然流产的内在机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 药物 补肾健脾方水提液, 由菟丝子、党参、阿胶、白术、黄芪、桑寄生、续断、白芍、炙甘草、金樱子按 6:4:2:2:4:3:3:3:3:1 组成, 准确称量后混合, 加蒸馏水浸泡 1h, 然后煮沸 0.25h, 以双层纱布滤过, 将药渣加水再煎 0.5h, 复用双层纱布滤过。2 次药液合并后水浴蒸发, 浓缩至水煎液浓度为 1mL 含生药 1.33g, 经机器无菌真空加压包装, 每包 150mL, 4℃保存。羟基脲片: 齐鲁制药有限公司产品, 规格: 每片 0.5g。米非司酮: 湖北葛店人福药业有限责任公司生产, 规格: 每片 25mg。

[收稿日期] 2012-09-17

[基金项目] 2007 年深圳科技计划项目 (编号: 200703260); 2011 年深圳科技计划项目 (编号: 201103204)

[作者简介] 刘芳 (1978-), 女, 医学硕士, 副主任中医师, 主要从事自然流产的中医药防治的研究。

[通讯作者] 王俊玲, E-mail: tulip78119@sohu.com。

1.2 试剂 大鼠血清孕酮(P)浓度检测酶联免疫法(ELISA)试剂盒由北京培爱康生物技术有限公司提供。大鼠子宫蜕膜 Th1 细胞因子白细胞介素-2(IL-2)、Th2 细胞因子白细胞介素-10(IL-10)、Th3 细胞因子转化生长因子(TGF)- β 1 的 ELISA 试剂盒,由武汉新启迪生物技术有限公司提供。

1.3 实验动物 SPF 级 SD 纯种大鼠 55 只。雌鼠 45 只,均为健康、未产,10~12 周龄,体重 180~200g;雄鼠 10 只,为健康,体重 240~300g。

1.4 方法 SD 大鼠雌性与雄性大鼠合笼,此后每天早晨观察雌鼠阴道涂片,发现大量精子为妊娠第 1 天(d1)。将妊娠大鼠随机分为补肾健脾方干预组(A组)、肾虚-黄体抑制流产模型组(B组)、正常组(C组),每组 15 只。d1~d10, A 组采取灌服补肾健脾方中药水提液[12.5g/(kg·d)]和羟基脲(450mg/kg), B 组灌服羟基脲和生理盐水, C 组灌服生理盐水。d10, A、B 组均灌服米非司酮(3.75mg/kg), C 组灌服等量生理盐水。给药 48h 后处理大鼠。

1.5 监测指标

1.5.1 一般情况 每天记录形态、体毛、食量、饮水量、活动等日常情况;第 12 天处死动物后,观察子宫变化,包括子宫形态、颜色、宫腔内变化,记录着床胚胎数和流产胚胎数,计算流产率。正常子宫与胚胎的判定标准:正常子宫粗大如串珠状,呈粉红色,解剖后见胚胎完好。流产子宫和胚胎的判断标准:子宫呈竹节状,宫腔内见瘀血或坏死胚胎;或仅见胚胎着床点,未见胚胎,体重下降 10g/48h;或胚胎呈褐色或曾经出现阴道出血。流产率的计算:流产率=流产胚胎数/(流产胚胎数+正常胚胎数) \times 100%。

1.5.2 大鼠血清 P 的浓度测定 所有大鼠 d1 用药前和 d12 处死前均眼眶后静脉取血 0.5mL,离心 5min 后取上清,-80℃保存。参照 ELISA 试剂盒检测。

1.5.3 大鼠子宫蜕膜组织 IL-2、IL-10、TGF- β 1 浓度测定 取孕 d12 一侧子宫蜕膜,用生理盐水漂洗数次,以清洁表面的血迹,按组织净重(g):裂解液(mL)=1:10 的比例,加入相应体积的裂解液进行匀浆。用玻璃匀浆器匀浆,直至充分裂解,充分裂解后,离心 20min,取上清,-80℃保存。参照 ELISA 试剂盒进行检测。

1.6 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,多样本之间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),用($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 3 组大鼠一般情况观察 A 组、B 组妊娠大鼠灌服羟基脲后均出现不同程度的毛发干枯、蜷缩、弓背、反应迟钝、活动力下降、纳食减少;B 组程度重于 A 组;而 C 组未见此改变,表明肾虚造模成功。

2.2 3 组大鼠流产率比较 见表 1。A 组、B 组流产率均显著高于 C 组($P < 0.01$);A 组流产率显著低于 B 组($P < 0.05$)。

表1 3组大鼠流产率比较($\bar{x}\pm s$) %

组别	n	流产率
A组	15	24.40 \pm 9.04 ^{①②}
B组	15	67.38 \pm 16.97 ^①
C组	15	12.90 \pm 6.90

与C组比较, ① $P < 0.01$; 与B组比较, ② $P < 0.05$

2.3 3 组大鼠血清 P 浓度比较 见表 2。3 组 d1 P 组间比较,差异无显著性意义($P > 0.05$),说明组间均衡。A 组与 B 组比较,A 组 d12 P 显著高于 B 组($P < 0.01$);A 组与 C 组比较,A 组显著低于 C 组($P < 0.05$);B 组与 C 组比较,B 组显著低于 C 组($P < 0.01$)。

表2 3组大鼠血清P浓度比较($\bar{x}\pm s$) nmol/L

组别	n	孕 d1 的 P 浓度	孕 d12 的 P 浓度
A组	15	27.628 \pm 1.703	82.753 \pm 19.214 ^{①②}
B组	15	28.711 \pm 1.703	42.600 \pm 4.835 ^③
C组	15	27.445 \pm 1.703	107.084 \pm 10.308

与B组比较, ① $P < 0.01$; 与C组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

2.4 3 组大鼠子宫蜕膜 TGF- β 1、IL-2、IL-10 浓度比较 见表 3。A、B 组的 TGF- β 1 均显著低于 C 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),但 A 组的 TGF- β 1 又显著高于 B 组($P < 0.01$);A、B 组的 IL-2 显著高于 C 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),A 组与 B 组的 IL-2 比较无显著差异($P > 0.05$);B 组的 IL-10 显著低于 C 组($P < 0.01$),A 组的 IL-10 显著高于 B 组($P < 0.01$),A 组与 C 组的 IL-10 比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表3 3组大鼠子宫蜕膜TGF- β 1、IL-2、IL-10浓度比较($\bar{x}\pm s$) nmol/L

组别	n	TGF- β 1	IL-2	IL-10
A组	15	59.458 \pm 16.433 ^{①③}	70.636 \pm 11.915 ^②	56.273 \pm 5.055 ^③
B组	15	31.031 \pm 7.550 ^②	76.875 \pm 5.972 ^①	43.003 \pm 6.688 ^②
C组	15	71.412 \pm 12.748	59.199 \pm 13.063	57.771 \pm 7.449

与C组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与B组比较, ③ $P < 0.01$

2.5 3 组大鼠子宫蜕膜 Th1/Th2、Th1/Th3 细胞因子浓度比值比较 见表 4。Th1/Th2 细胞因子 B 组显著高于 A、C 组($P < 0.01$),A 组和 C 组比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。Th1/Th3 细胞因子比较,B 组显著高于 A、C 组,差异有显著性意义($P < 0.05$),A 组和 C 组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

中医学认为自然流产病因病机主要责之脾肾二脏。脾肾亏虚是导致流产发生的关键,安胎重在补肾健脾。补肾健脾方中菟丝子补肾益精,固冲安胎;桑寄生、续断、金樱子补益肝肾;党参、黄芪、白术健脾益气;阿胶养血安胎;白芍、炙甘草养血柔肝,缓急止痛安胎。前期补肾健脾方加减后临床治疗

表4 3组大鼠子宫蜕膜Th1/Th2、Th1/Th3细胞因子浓度比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1/Th2	Th1/Th3
A组	15	1.269± 0.266 ^①	1.303± 0.535 ^{②③}
B组	15	1.830± 0.325	2.632± 0.720
C组	15	1.049± 0.292 ^①	0.855± 0.223 ^②

与B组比较, ① $P < 0.01$, ② $P < 0.05$; 与C组比较, ③ $P < 0.05$

早孕肾虚和脾肾亏虚型先兆流产有效率高达 90%^[9], 可促进孕妇早孕期胎盘分泌 HCG 并使其分泌稳步上升, 提高孕激素水平改善黄体功能; 抑制血清干扰素- γ 的分泌, 促进血清 IL-2 的分泌, 减轻免疫杀伤增强母胎免疫保护作用; 并且对照研究显示补肾健脾方对自然流产妇女内分泌-免疫的影响是不同于传统西药安胎的^[9]。

3.1 提升血清 P 水平, 改善孕期黄体功能 本研究中妊娠大鼠运用羟基脲加米非司酮造模后出现了肾虚的一系列症状, 流产率显著升高, 血清 P 水平明显低于正常组, 表明肾虚-黄体抑制流产模型大鼠造模成功。而运用补肾健脾方干预的流产模型组大鼠流产率明显低于模型组, 在 d12 的 P 水平显著高于模型组。已知 P 对维持早期妊娠具有抑制子宫收缩、促进内膜发育、免疫等重要作用^[4]。故推测补肾健脾方安胎的内分泌机制之一在于促进母体血清 P 的分泌。

3.2 促进母胎界面 IL-10、TGF- β 1 的分泌, 改善 Th1/Th2、Th1/Th3 细胞因子病理性失衡 生殖医学认为, 妊娠是成功的半同种移植, 母体对胎儿的免疫耐受受母胎界面上的多种细胞因子调控。目前研究证实母胎界面上同时存在 Th1、Th2、Th3 型细胞因子。正常妊娠者母胎界面上 Th1/Th2/Th3 型细胞因子处于动态平衡中, Th1/Th2/Th3 型细胞因子病理性失衡是导致自然流产发生的重要内在机制^[9]。

本研究发现肾虚-黄体抑制流产模型大鼠与正常妊娠大鼠比较: 子宫蜕膜上 IL-2 浓度显著升高, 而 IL-10 和 TGF- β 1 浓度显著降低; Th1/Th2 和 Th1/Th3 型细胞因子浓度比值显著升高。表明: 在肾虚-黄体抑制流产大鼠子宫蜕膜上存在 IL-2 过度分泌, IL-10、TGF- β 1 的分泌减少, 母胎界面 Th1/Th2 和 Th1/Th3 细胞因子平衡向 Th1 方向偏移, 最终

导致流产, 此结论与国内外学者的临床和实验研究^[6-7]相一致。而运用补肾健脾方进行干预的模型大鼠子宫蜕膜上 IL-2 浓度与肾虚-黄体抑制流产模型大鼠比较无显著差异, 都显著高于正常妊娠大鼠; IL-10 的浓度显著高于肾虚-黄体抑制流产模型大鼠, 与正常妊娠大鼠比较无显著差异; Th1/Th2 的比值显著低于肾虚-黄体抑制流产模型组, 与正常妊娠组比较无显著差异; Th1/Th3 浓度的比值虽然显著高于正常妊娠大鼠 ($P < 0.01$), 但与肾虚-黄体抑制流产模型组比较, 已有显著下降 ($P < 0.05$)。故我们推论补肾健脾方有促进肾虚-黄体抑制流产大鼠子宫蜕膜上 IL-10、TGF- β 1 分泌, 促使母胎界面 Th1/Th2、Th1/Th3 的细胞因子平衡向 Th2、Th3 方向偏移, 改善母胎界面 Th1/Th2、Th1/Th3 细胞因子病理性失衡, 增强母胎免疫保护作用, 从而发挥抗流产、安胎效应。

【参考文献】

- [1] 林其德. 免疫所致复发性流产和习惯性流产[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(12): 760-762.
- [2] 罗颂平, 梁国珍, 张玉珍, 等. 助孕 3 号方防治大鼠自然流产的机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(7): 522-525.
- [3] 刘芳, 孟庆春, 姚静, 等. 补肾健脾方治疗先兆流产 30 例的临床研究[J]. 新中医, 2009, 10(6): 30-32.
- [4] 于传鑫, 李诵絃. 实用妇科内分泌学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 60.
- [5] 刘芳, 罗颂平, 欧汝强. 自然流产妊娠期细胞因子失衡及治疗的干预[J]. 中国免疫学, 2003, 19(12): 874-878.
- [6] 刘科, 黄小琼, 饶子亮, 等. 大鼠肾虚自然流产模型的建立及相关因子的表达[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(6), 448-451.
- [7] 邱丽华, 林其德, 李东至, 等. 转化生长因子 β 1 与原因不明习惯性流产的关系的初步研究[J]. 现代妇产科进展, 2002, 11(3): 203-205.

(编辑: 马力)