

本事琥珀散对子宫内膜异位症大鼠 Th1/Th2 漂移的影响^{*}

★ 刘彤彤¹ 张小勇 马小娜 王冬 赵伟鹏 孙良明 赵妍 王庆国^{**} (北京中医药大学 2009 级博士研究生 北京 100029; 2. 北京中医药大学 北京 100029)

摘要:目的:通过比较本事琥珀散治疗前后子宫内膜异位症(EMs)大鼠模型血清辅助性 T 淋巴细胞(Th 细胞)分泌干扰素- γ (IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)及其比值的变化,探讨本事琥珀散对 EMs Th1/Th2 漂移的影响。方法:采用自体内膜移植法建立 EMs 大鼠模型,随机分为正常组、伪手术组、疾病模型组、本事琥珀散组和达那唑组,给药 4 周后 ELISA 法检测血清 IFN- γ 和 IL-4 水平,并计算 IFN- γ /IL-4 比值。结果:与疾病模型组比较,本事琥珀散组 IFN- γ /IL-4 比值明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:EMs 大鼠模型血清 Th 细胞存在 Th2 向 Th1 漂移的现象,对异位内膜的生长具有促进作用。本事琥珀散能够纠正 Th1/Th2 的漂移,对 EMs 一定的具有治疗作用。

关键词:本事琥珀散;子宫内膜异位症;大鼠;Th1/Th2 漂移;干扰素- γ ;白细胞介素-4

中图分类号:R 711.71 **文献标识码:**A

Effects of BenShiHuPoSan on Th1/Th2 Drift in Endometriosis Model Rats

LIU Dan-tong, ZHANG Xiao-yong, MA Xiao-na, WANG Dong, ZHAO Wei-peng, SUN Liang-ming, ZHAO yan, WANG Qing-guo

Beijing University Of Chinese Medicine, Beijing 100029

Abstract: Objective: By comparing the changes of IFN- γ and IL-4 in endometriosis model rats in before and after using BenShiHu-

(上接第 14 页)疫的治疗水平和流行情况,留下了宝贵的研究资料;从 1901 年《鼠疫约编》成书到 1935 年《鼠疫治疗全书》出版,前后 34 年,这段时间不但是鼠疫横行的时期,也是中西医交汇撞击的时期,李健颐衷中参西,结合西医医理来认识鼠疫病症,治疗中也大胆创制运用新剂型解毒注射液,反映了当时闽医在中西医汇通中的实践精神,比之《鼠疫约编》的治疗水平有了新的发展。综上所述,两部鼠疫专著反映了近代福建地区中医防治鼠疫的临床经验,对于当今的疫病防治,具有一定的临床价值,对于研究近代福建鼠疫流行病史,也有重要的文献参考价值。

参考文献

- [1] 中国医学科学院流行病学微生物学研究编.《中国鼠疫流行史》[M]. 北京:内部修订本,1973:2.
- [2] 俞慎初. 闽台医林人物志[M]. 福州:福建科学技术出版社,1988:118.
- [3] 李健颐. 鼠疫治疗全书[M]. 福州:福建余庆堂药局铅印本,1935:1.
- [4] 周易,刘德荣. 清代福建医家编撰的部分医籍述[J]. 福建中医学院学报 2008,18(1):88.
- [5-6] 陈杰士.《鼠疫治法》[M]. 福建省政府秘书处印,1941 年铅印本,1.
- [7-9] 李健颐. 鼠疫治疗全书[M]. 福州:福建余庆堂药局铅印本,1935,题词.
- [10] 吴文清. 李健颐《鼠疫治疗全书》学术特点与成就[J]. 中华医史杂志,2005,34(2):88.

(收稿日期:2011-11-22)

* 基金资助:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2011CB505100)

** 通讯作者:王庆国(1952-),男,教授,主任医师,博士生导师。国家级重点学科——中医临床基础学科带头人,北京市教学名师,国家级精品课程——《伤寒论》主讲教师。现任北京中医药大学副校长,国家重大基础研究(973)计划(证候规范及其与疾病方剂相关性研究)及(基于“肝藏血主疏泄”的脏象理论研究)首席科学家。研究方向:经方作用机理及配伍规律研究;基于经方的中药新药开发研究;中医证候规范及其生物学基础研究。Tel:010-64286871, E-mail: Wangqg8558@sina.com

PoSan(BSHPS), we discuss about the Effects of BSHPS on Th1/Th2 drift in Endometriosis. Methods: First, establish the rat model of EMs by transplanting autologous endometrium to the abdominal wall. Then divide the rats randomly into 5 groups: normal group, pseudo operation group, disease group, BSHPS group and danazol group. Finally, detect the levels of IFN- γ and IL-4 by ELISA, after dosing for 4 weeks. Results: Compared with the disease group, the ratio of IFN - Y / IL-4 in BSHPS group is significantly reduced ($P < 0.05$). Conclusion: Th2 cells drift to Th1 cells in EMs model rats, that has a stimulative effect on the growth of ectopic endometrium. BSHPS can correct the Th1 / Th2 drift, and has a certainly therapeutic effect on EMs.

Key words: BenShiHuPoSan; Endometriosis; rat; Th1/Th2 drift; IFN- γ ; IL-4

子宫内膜异位症(EMs)是指具有生长能力的子宫内膜组织(腺体和间质)出现在子宫腔被覆黏膜以外的身体其他部位的一种疾病,以痛经、性交不适、不孕等为主要临床症状^[1]。近年来,EMs 发病率有逐年上升的趋势,且治疗后复发率高,成为育龄期妇女的常见病、多发病,严重影响女性的生活质量。本事琥珀散出自宋·许叔微的《普济本事方》,由三棱、莪术、赤芍、刘寄奴、丹皮、肉桂、熟地、当归、乌药、元胡组成,具有行气活血,温经止痛的功效,本为治疗女子痛经所设,现代亦常用来治疗子宫内膜异位症、输卵管阻塞性不孕等妇科疾病。在 EMs 的发病过程中,免疫失衡具有重要意义。Th1/Th2 细胞的相互关系能够反映机体的免疫状态,因此 Th1/Th2 漂移与 EMs 密切相关。本研究拟探讨本事琥珀散对 EMs Th1/Th2 细胞漂移的影响,为寻找本事琥珀散治疗 EMs 的作用靶点打下基础。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级 SD 雌性成熟未孕大鼠,体重 180g - 200g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号 SCXK(京):2008 - 0001,标准化环境(湿度:50% - 70%,12h 昼夜交替)饲养,每笼 5 只,予以灭菌饲料及饮水。

1.2 实验药品

本事琥珀散组成及用量:三棱 10g,莪术 10g,赤芍 15g,刘寄奴 10g,丹皮 6g,肉桂 10g,熟地 10g,乌药 10g,元胡 10g,当归 15g。药物剂量来自王庆国教授经验用量。饮片均购自北京中医药大学国医堂门诊部,由北京同仁堂药店提供。药物经水浸泡半小时,煎煮 40min 后倒出药液,再加水煎煮 25min,将两次煎得的药液混合后加热浓缩得到浓缩液。达那唑胶囊由江苏联环药业股份有限公司生产(生产批号:20110102)。将胶囊打开,药粉兑入蒸馏水中,按比例配制成悬浮液。以上药品配制完成后置于 4℃ 冰箱保存备用,每周更换一次药液。

水合氯醛,天津市光复精细化工研究所,批号:20071129;注射用氨苄西林钠,中诺药业(石家庄)

有限公司生产,批号:09089024;己烯雌酚,合肥久联制药有限公司,批号:20080616;生理盐水由中诺药业(石家庄)有限公司生产,批号:20090123。IFN- γ 、IL-4 试剂盒,德国 BENDER 公司。

2 方法

2.1 分组及给药

50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,即正常组、伪手术组、疾病模型组、本事琥珀散组和达那唑组。正常组常规饲养;伪手术组做大网移植;疾病模型组、本事琥珀散组和达那唑组均采用自体移植法复制子宫内膜异位症模型。于术前第 5 天和术后第 10 天开始给予己烯雌酚灌胃 0.02 mg/kg,连续 5 d,使手术时大鼠统一处于动情期;术后给予氨苄青霉素肌注 16 万 u/kg,连续 5 d。

造模 1 周后,各组开始灌胃给药,连续 4 周。正常组和疾病模型组给予 2ml 生理盐水灌胃,每日 1 次。其余各组药量参照文献换算,本事琥珀散组按成人公斤体重的 8 倍给药(含生药量为 14g),达那唑组按成人公斤体重的 8 倍给药,16 mg/200g。

2.2 模型制作

(1) 取雌性成熟未孕 SD 大鼠,于术前第 5 日和术后第 10 日开始给予己烯雌酚 0.02mg/kg 灌胃,每日一次,连续 5 日,使手术时大鼠统一处于动情期。

(2) 手术在室温 23℃ ~ 28℃ 环境下进行,无菌操作。以 10% 水合氯醛(0.4ml/100g,腹腔注射)麻醉大鼠。

(3) 待麻醉后,将大鼠固定于手术板上,腹部备皮,常规消毒铺巾。选取尿道口上端约 1cm 处为切入点,沿腹中线切开 1.5 ~ 2 cm 的纵形切口,逐层分离腹壁进入盆腔。探查大鼠子宫(呈 V 型),细丝线结扎左侧局部子宫血管以及需切除的子宫上下端。

(4) 取大鼠左侧子宫角长约 1 ~ 2 cm,立即放入 PBS 溶液中,修剪去除子宫浆膜外的脂肪组织,纵向切开子宫腔,切取 5 × 5 mm 大小的子宫片段,使其内膜面与右侧腹膜相对,用 5 - 0 号丝线将其四角缝于右侧腹壁,缝合处尽量远离手术切口,以减少组织

粘连,并防止取材再次开腹时损伤已种植的异位组织。剩余部分子宫片进行组织学观察,以证实移植植物确为子宫内膜组织。

(5)关腹前向腹腔滴入以0.9%生理盐水溶解的氨苄青霉素16万u/kg进行腹腔消毒,逐层缝合关腹。术后第1日开始给予氨苄青霉素16万u/kg肌肉注射,每日一次,连续5日。

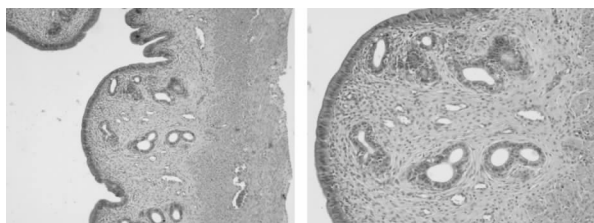
(6)术后大鼠分笼单放,自然苏醒,常规饲养。

建模4周后随机选取2只模型大鼠开腹检查移植物生长情况,并送病检,验证造模效果(结果如下图)。



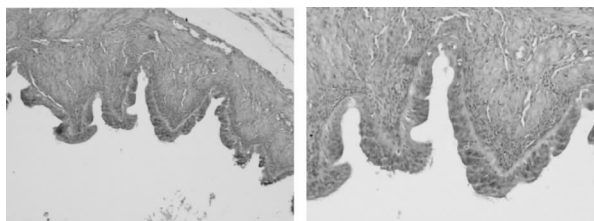
种植在腹壁上的子宫内膜

手术4周后典型移植物外观



正常组1 (HE × 100)

正常组1 (HE × 200)



疾病模型组1 (HE × 100)

疾病模型组1 (HE × 200)

由上图可见,疾病模型大鼠手术4周后移植物体积明显增大,呈圆形,内有半透明囊液,表面有结缔组织覆盖和血管形成,质软。病理检查可见正常大鼠子宫内膜上皮细胞排列整齐,呈长柱状,肌层较厚,结构完整,腺体和血管丰富;疾病模型大鼠移植物囊内壁有内膜上皮细胞及间质细胞生长,上皮细胞呈低柱状,较扁平,细胞结构不清,肌层较薄,腺体较少。根据大体观察以及病理检查结果,可以认为EMs模型复制成功。

2.3 成模标准

取材时开腹观察移植植物,可见移植物体积增大,呈圆形或椭圆形囊泡,内有透明或半透明囊液,部分为粘稠不透明液体,表面有血管形成。用游标卡尺

测量移植物体积,根据Katsuki方法:体积(V) = 长 × 宽 × 高,移植物体积 $\geq 8\text{mm}^3$ 者,即为模型复制成功^[2,3]。

2.4 指标检测

于造模后第5周,用10%的水合氯醛0.4ml/100g腹腔注射麻醉动物,开腹(开腹时尽量避开造模时子宫内膜种植部位)后,腹主动脉采血,用ELISA法检测血清IFN- γ 、IL-4水平。

2.5 统计分析

实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析及LSD检验。应用SPSS16.0软件作统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

与正常组比较,疾病模型组大鼠血清IFN- γ 和IL-4含量分别呈升高和降低趋势;与疾病模型组比较,本事琥珀散组IFN- γ 和IL-4均有所降低和升高。疾病模型组IFN- γ /IL-4较正常组明显升高,较本事琥珀散组明显降低,组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。见下表。

组别	n	IFN- γ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ /IL-4
正常组	10	14.58 $\pm$ 2.77	17.25 $\pm$ 4.93	0.91 $\pm$ 0.13 *
伪手术组	10	19.29 $\pm$ 2.68	8.39 $\pm$ 0.75	2.35 $\pm$ 0.26
疾病模型组	8	20 $\pm$ 4.52	10 $\pm$ 2.59	3.82 $\pm$ 1.45
本事琥珀散组	9	11.53 $\pm$ 1.5	14.58 $\pm$ 4.67	1.71 $\pm$ 0.62 *
达那唑组	9	12.97 $\pm$ 3.05	10.14 $\pm$ 1.82	2.18 $\pm$ 0.91

本事琥珀散对EMs大鼠血清IFN- γ 、IL-4含量的影响,注:与疾病模型组相比★ $P < 0.05$ 。

4 讨论

作为适应性免疫应答的功能组成部分,T细胞在人体的免疫系统中占有重要地位,其中的辅助性T淋巴细胞(Th)与EMs存在着密切联系。经抗原刺激的前体细胞(Thp)分化而来的Th0经细胞因子等多种因素影响向Th1或Th2分化发育。Th1、Th2细胞既在增殖分化的过程中受到细胞因子的影响,分化后又通过分泌多种细胞因子参与免疫调节并抑制Th0向另一类型Th细胞分化。Th1、Th2细胞和这些细胞因子之间相互作用,相互制约,调节着机体的免疫平衡状态,维持正常的细胞免疫和体液免疫功能^[4]。在某种状态下,Th1/Th2的动态平衡被打破,出现偏向Th1或Th2的优势应答,就称为Th1/Th2漂移^[5],会引起疾病的发生。目前已经证实,许多肿瘤和自身免疫性疾病患者体内均存在Th1/Th2漂移现象,且与肿瘤的恶性程度密切相关。

Th1细胞主要是在抗原激活了静息的细胞毒性T细胞(CTL)后协助其发育成为效应性T细胞,通过分泌细胞因子、激活巨噬细胞而介导细胞免疫效

应和迟发性超敏反应。IFN- γ 和 IL-12 通过信号传导使 T 细胞增殖分化为 Th1 细胞,分化后的 Th1 细胞主要产生 IFN- γ 、IL-2^[6]。Th2 细胞则主要辅助 B 细胞增殖分化成浆细胞,产生抗体,介导体液免疫效应。IL-4 是促进初始 T 细胞分化为 Th2 细胞的重要因子,而 Th2 细胞又会产生 IL-4、IL-5、IL-10 等细胞因子。一般认为,在同种器官的移植中,Th1 参与了急性移植物的排斥,而 Th2 则更易于诱导移植耐受^[7]。IFN- γ 和 IL-4 作为 Th1、Th2 细胞分泌的特征性细胞因子其含量及比值的变化被认为能够间接反映 Th1/Th2 的平衡状态^[8]。

Hsu 等^[9]在 1997 年发现 EMT 患者外周血单核细胞和腹腔液中 Th1 细胞群功能下降,并认为这可能对 EMT 的发生具有始动作用。此后,许多研究均发现^[10]、^[11]EMs 患者血清和腹腔液中存在 IFN- γ 、IL-2 水平低于正常妇女,而 IL-4、IL-10 水平升高的现象。但亦有研究表明在 EMs 或合并不孕患者的腹腔液中 IL-2 有所增高^[12]、^[13],并认为正是因为 IL-2 的增多,诱导、促进了多种细胞毒细胞的活性,增强了机体免疫应答,从而导致了炎症、疼痛和不孕的发生。

本实验结果显示:疾病模型组较正常组具有 IFN- γ 升高和 IL-4 降低的趋势,尤其是 IFN- γ /IL-4 明显升高。IFN- γ 能够激活巨噬细胞和 NK 细胞活性,促进机体免疫反应,并激活血管内皮细胞,刺激 ICAM-1 表达,客观上为移植物的种植生长提供了条件。IL-4 能够促进 Th2 细胞的分化、抑制 Th1 细胞增殖及应答。血清 IFN- γ 的升高和 IL-4 的降低提示机体免疫有由 Th2 向 Th1 漂移的倾向。考虑本实验中没有出现被认为是 EMs 发生始动因素的 Th1 向 Th2 漂移现象,可能是 EMs 患者和动物模型的差别造成的。EMs 患者的异位内膜是主动异位,即首先是患者自身存在细胞免疫状态的低下,继而引起随逆流经血进入腹腔的子宫内膜成功逃脱免疫监视而种植下来;而 EMs 模型大鼠的异位内膜则是被动异位,即子宫内膜经人为剥离种植在腹腔,种植之前大鼠本身并没有机体免疫低下的情况存在。

本事琥珀散及达那唑均对 EMs 模型大鼠外周血 Th2 向 Th1 漂移的情况有纠正作用。虽然在 IFN- γ 和 IL-4 血清含量方面,本事琥珀散组和疾病模型组比较没有显著性差异,但 IFN- γ /IL-4 比值却存在明显变化。IFN- γ 所代表的 Th1 细胞和 IL-4 所代表的 Th2 细胞之间存在一种相互抑制的关系。疾病模型组相较于正常组 IFN- γ /IL-4 比值的升高,提

示 Th1 细胞占优势。此时,Th1 细胞会凭借自身分泌和旁分泌的功能,以及其所分泌细胞因子对 Th2 细胞的抑制作用,并且随着病情的发展,Th1 细胞的优势被逐渐放大。而本事琥珀散组 IFN- γ /IL-4 比疾病模型组明显降低,说明在本事琥珀散的作用下,Th1 细胞的优势被抑制,从而起到了对 EMs Th1/Th2 漂移的调节作用。

本事琥珀散对细胞免疫的调节作用可能与其行气活血的功效有关。有研究^[14]发现柴胡疏肝散能够调节肝郁证大鼠 Th2 向 Th1 漂移的现象。柴胡疏肝散是疏肝行气活血的代表方之一,因而可以推断行气活血功效在调节 Th/Th2 漂移方面有所作为,但其作用机制尚需进一步研究。至于本事琥珀散是否对 Th1/Th2 的漂移具有双向调节作用,即是否会对造成 EMs 发生的细胞免疫低下状态有改善作用,还需进一步的临床观察。

参考文献

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005,354.
- [2] 常暖,韩冰,李同玺. 大鼠子宫内膜异位症模型的建立及其病理学观察[J]. 临床与实验病理学杂志,1998,14(1):67-69.
- [3] 叶兰. 加味三棱丸主要成分抗大鼠子宫内膜异位症血管生成与侵袭及其作用机制研究[D]. 重庆医科大学,2009.
- [4] Wan YY, Flavell RA. How diverse-CD4 effector T cells and their functions[J]. J Mol Cell Biol,2009,1(1):20-36
- [5] 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):268-271.
- [6] 裴非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2009:162.
- [7] 钟逵逸,任燕,杨业金,等. 免疫因素在子宫内膜异位症发病机制中的研究进展[J]. 现代预防医学,2009,36(5):996-1001.
- [8] Enriquez J, Klinger J, Arturo JA, et al. Peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: cytokines in peritoneal fluid and blood [J]. Adv Perit Dial,2002,18:177-183.
- [9] Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis[J]. Fertil Steril,1997,67:1059-1064.
- [10] Hill JA Immunology and endometriosis [J]. Fertil Steril,1992,58(3):262.
- [11] 左阳花,苏兆亮,王胜军,许化溪. 子宫内膜异位症患者血清 IL-4/IFN- γ 和 TGF- β /IL-17 的变化及意义[J]. 免疫学杂志,2011,27(10):883-885,889.
- [12] Hill JA, Ahclerson DJ. Lymphocyte activity in the presence of peritoneal fluid from fertile women and infertile women with and without endometriosis[J]. Am J Obstet Gynecol,1989,161:861-864.
- [13] 郎景和. 关于子宫内膜异位症的再认识及其意义[J]. 中国工程科学,2009,11(10):137-142.
- [14] 杨冬花,李家邦,郑爱华,蒋荣鑫. 肝气郁结模型大鼠 T 细胞免疫功能的改变及柴胡疏肝散的治疗作用[J]. 四川中医,2006,24(4):14-16.

(收稿日期:2011-12-04)