

• 临床检验研究论著 •

寿胎丸治疗对反复自然流产患者 Th17/Treg 细胞表达水平的影响*

幸彩梅¹, 钟菊珍², 范世珍¹, 吴莉莉¹, 张明霞²

(1. 福田中医院, 广东深圳 518034; 2. 深圳市第三人民医院研究所, 广东深圳 518112)

摘要:目的 探讨寿胎丸治疗对反复自然流产(RSA)患者调节性 T 细胞(Treg)和辅助性 T 细胞 17(Th17)表达水平的影响。方法 流式细胞术检测 20 例 RSA 患者寿胎丸治疗前及治疗 1、3 个月后外周血 Th17、Treg 细胞表达水平,以 26 例健康孕妇作为对照组。结果 RSA 患者 Th17 细胞表达水平显著升高($P < 0.05$),Treg 表达水平显著降低($P < 0.05$)。治疗 3 个月后,RSA 患者 Th17 细胞数量降低($P < 0.05$),Treg 细胞数量升高($P < 0.05$);治疗前 Th17/Treg 比值高于对照组($P < 0.05$),治疗后逐渐降低,3 个月后恢复至正常水平。结论 Th17 和 Treg 细胞参与了 RSA 免疫应答,Th17/Treg 细胞平衡在维持妊娠中发挥重要作用。寿胎丸可有效改善 RSA 患者 Th17/Treg 细胞失衡。

关键词:流产,自然; 寿胎丸; T 淋巴细胞; 调节性; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0014-02

Impact of Shoutai pills on Th17/Treg in patients with recurrent spontaneous abortion*

Xing Caimei¹, Zhong Juzhen², Fan Shizhen¹, Wu Lili¹, Zhang Mingxia²

(1. Department of Clinical Laboratory, Futian Traditional Chinese Hospital, Shenzhen, Guangdong 518034, China;

2. Department of Research Laboratory, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518112, China)

Abstract: Objective To explore the impact of Shoutai pills on expression levels of regulatory T lymphocyte and T helper lymphocyte 17(Th17) in patients with recurrent spontaneous abortion(RSA). **Methods** Flow cytometry analysis were used to evaluate expression levels of Treg and Th17 cells in peripheral blood from 20 RSA patients, before and 1, 3 months after treatment of Shoutai pills. 26 healthy pregnant women were enrolled and control group. **Results** The frequency of Th17 cells in RSA group was significantly higher than that in control group($P < 0.05$). The frequency of Treg cells was significantly lower in RSA patients than that in control group($P < 0.05$). After 3 months of treatment with Shoutai pills, the number of Th17 cells were reduced($P < 0.05$) and Treg cells were significantly increased($P < 0.05$). The ratio of Th17/Treg was higher than that in control group($P < 0.05$). After 3 months of treatment, it returned to normal levels. **Conclusion** Th17 and Treg cells might participate in immune response of RSA, and the imbalance of Th17/Treg cells could play an important role in RSA. Th17/Treg cell imbalance could be improved after effective treatment with Shoutai pills.

Key words: abortion, spontaneous; shoutai pills; T-lymphocytes, regulatory; flow cytometry

反复自然流产(RSA)可能与免疫因素有关,但确切的免疫学病因及发病机制尚未完全明确^[1-4]。研究表明,RSA 可能与 CD4⁺T 辅助细胞亚群(Th)中的调节性 T 细胞(Treg)数量及 Th1/Th2 比例失调有关,有效的免疫治疗后 CD4⁺细胞各亚群比例失调有较大改善^[5-6]。Th17 细胞具有强大的促炎性作用,在 RSA 发病中也起到重要作用^[7-9]。本研究通过比较健康孕妇对照、RSA 患者寿胎丸治疗过程中外周血 Th17/Treg 细胞应答水平,探讨中药治疗后 Th17/Treg 变化情况,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 10 月至 2012 年 5 月于福田中医院确诊的 20 例 RSA 患者,诊断标准:妊娠早期自然流产 3 次或 3 次以上,妇科及其他检查均排除染色体核型、内分泌、自身免疫等异常;采用寿胎丸加减治疗:菟丝子 20 g,续断 15 g,桑寄生 15 g,阿胶(烊化)10 g,黄芩炭 10 g,白术 15 g,荆芥炭 10 g,杜仲 10 g,山茱萸 10 g,苏梗 10 g,旱莲草 10 g,砂仁(后下)5 g,每日 1 剂,7 d 为 1 个疗程,连用 3~5 个疗程,服至前次流产月份过后,再根据临床需要间日服 1 剂,至孕 4~5 个月后酌情停药或每周 2 剂服至临产。另选择 30 例健康早孕体检者,年龄

分布与 RSA 患者无统计学差异($P > 0.05$)。

1.2 方法 采集健康孕妇和 RSA 患者治疗前及治疗 1、3 个月后肝素锂抗凝全血 4 mL,采用使用 BD 公司 Canto 流式细胞仪及配套试剂进行 CD3-APC-Cy7、CD4-PE-CY5、CD25-FITC 及 CD127-APC 检测,具体操作均参照仪器及试剂说明书。在淋巴细胞设门分析 CD3、CD4 表达情况,在 CD3⁺CD4⁺细胞设门分析 CD25、CD127 表达情况。另取肝素锂抗凝全血 250 μL 与 750 μL 含 10%胎牛血清 1640 培养基充分混匀,1 mL 培养体系中加入刺激物 PMA、Ionomycin 至终浓度 50 ng/mL、1 μg/mL 震荡混匀,于 CO₂ 培养箱 37 °C 孵育 1 h 后加入阻断因子 Brefeldin A(终浓度 10 μg/mL),37 °C 孵育 5 h 后采用 BD 公司 Canto 流式细胞仪及配套试剂进行细胞表面 CD3、CD8 及细胞内 IL-17 检测,具体操作均参照仪器及试剂说明书执行。在淋巴细胞设门分析 CD3、CD8 表达情况,在 CD3⁺CD8⁻细胞设门分析 IL-17 表达情况(由于 PMA 刺激后会导致 CD4 下调,故采用 CD3⁺CD8⁻细胞反圈门方法检测 CD4⁺Th)。Treg 和 Th17 细胞检测均同时采用各种抗体的同型对照进行阳性背景染色的界定。

1.3 统计学处理 采用 Prism4.0 统计软件进行数据分析。

* 基金项目:深圳市科技计划资助项目(201003481)。 作者简介:幸彩梅,女,副主任检验技师,主要从事临床医学检验研究。

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA 分析; 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞检测 RSA 患者治疗前外周血 Treg 细胞表达为 (6.625 ± 1.173)%, 较健康孕妇 (8.419 ± 1.796)% 明显降低 ($P < 0.05$)。RSA 患者治疗 1 个月 Treg 细胞表达为 (6.860 ± 1.763)%, 较治疗前无统计学差异 ($P > 0.05$); 治疗 3 个月 Treg 细胞表达为 (8.820 ± 1.818)%, 较治疗前及治疗 1 个月时明显增加 ($P < 0.05$), 且与健康孕妇比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。健康孕妇及 RSA 患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞流式细胞仪检测结果见图 1。

2.2 IL-17 表达检测 RSA 患者治疗前 IL-17 表达为 (5.057 ± 2.294)%, 较健康孕妇 (3.238 ± 1.205)% 明显增高 ($P < 0.05$)。RSA 患者经治疗后, IL-17 逐渐降低, 治疗 1 个月检测结果为 (3.905 ± 1.124)%, 较治疗前降低不明显 ($P > 0.05$), 治疗 3 个月后检测结果为 (3.276 ± 1.635)%, 明显降低 ($P < 0.05$), 且与健康孕妇比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。健康孕妇及 RSA 患者 Th17 细胞流式细胞仪检测结果见图 2。RSA 患者治疗前 Th17/Treg 比值高于健康孕妇 ($P < 0.05$), 治疗后逐渐降低, 治疗 3 个月后 Th17/Treg 比值与治疗前比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 与健康孕妇比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 3。

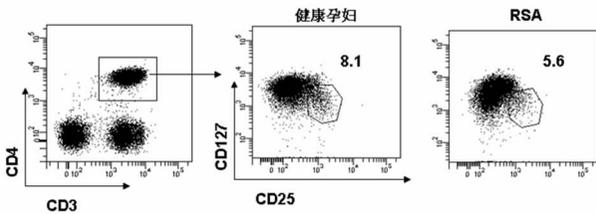


图 1 健康孕妇和 RSA 患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞检测结果

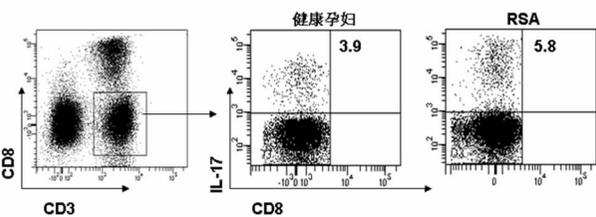


图 2 健康孕妇和 RSA 患者 Th17 细胞流式检测结果

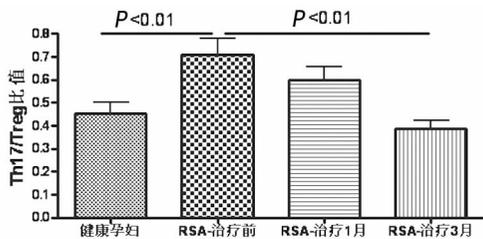


图 3 寿胎丸治疗过程中 RSA 患者 Th17/Treg 比值的变化

3 讨论

寿胎丸配方来源于张锡纯编撰的《医学衷中参西录》, 由菟丝子、续断、桑寄生、阿胶等成分组成, 是治疗 RSA 的有效中药复方, 但作用机制尚未明确。有研究表明寿胎丸可能通过调节小鼠母胎界面细胞因子信号转导负调控因子 SOCS-3 蛋白的

表达而避免流产的发生^[10], 并能抑制 Th 细胞向 Th1 细胞分化, 同时促进 Th 细胞向 Th2 细胞分化^[11], 但有关寿胎丸治疗对 RSA 患者 Th17 和 Treg 细胞的影响未见报道。

Treg 细胞是一种组成性表达 CD25 的 CD4⁺T 细胞亚群, 通过上调 Foxp3 表达而发挥免疫抑制功能。研究发现, Treg 细胞所介导的免疫抑制在移植耐受及母胎耐受中起关键作用, Treg 细胞缺乏可导致母体产生针对胎儿的免疫排斥, 发生流产^[10]。有研究显示 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞低表达 CD127, 因此 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}被认为是一种较为理想的 Treg 细胞表面分子标志^[12]。本研究显示 RSA 患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞水平明显降低, 经寿胎丸治疗后, 逐渐增高并恢复至正常水平, 说明寿胎丸在改善患者细胞免疫功能方面具有重要作用。Th17 细胞与 RSA 的关系也不容忽视。Th17 细胞属于 CD4⁺T 细胞亚群, 但又不同于 Th1 和 Th2 细胞群。Th17 细胞产生的 IL-17 可与靶细胞表面 IL-17 受体 (IL-17R) 结合, 具有动员和富集中性粒细胞及促炎作用, 可有效介导病变组织的炎症反应^[4]。有研究表明妊娠的子宫蜕膜 Th17 细胞水平增高可导致蜕膜微环境紊乱, 造成滋养细胞发育异常, 促使母体免疫系统产生进一步的免疫杀伤作用而导致流产^[5-6]。本研究发现 RSA 患者外周血 Th17 细胞比例明显高于健康孕妇, 经寿胎丸治疗 3 个月后明显下降至接近正常水平; 治疗前 RSA 患者 Th17/Treg 比值显著升高, 有效治疗后逐渐降低, Th17/Treg 失衡现象得以改善。

综上所述, 寿胎丸在治疗 RSA 过程中, 不仅调节母胎界面局部 Th1/Th2 细胞因子的表达, 形成维持正常妊娠所需的 Th2 型免疫偏倚, 同时对 Th17/Treg 细胞也具有重要的调节作用, 可促使部分初始 CD4⁺T 细胞不断分化成 Treg 细胞, 抑制 Th17 细胞的产生, 使 Th17/Treg 比值维持在正常妊娠状态, 从而阻止流产的发生。

参考文献

- [1] 王越, 牛秀琰. 习惯性流产免疫学病因的研究进展[J]. 国外医学妇产科学分册, 2001, 28(6): 348-350.
- [2] 邹丹, 郭兰英, 兰旭青. 不孕及反复自然流产妇女血清抗精子抗体检测分析[J]. 中医临床研究, 2011, 3(21): 117.
- [3] 李静, 杨洋, 张永爱, 等. IL-10 在反复自然流产人绒毛组织的表达及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(10): 1065-1067, 1071.
- [4] 杨默. 反复自然流产的免疫相关因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(26): 4147-4149.
- [5] Yokoo T, Takakuwa K, Ooki I, et al. Alteration of Th1 and Th2 cells by intracellular cytokine detection in patients with unexplained recurrent abortion before and after immunotherapy with the husband's mononuclear cells[J]. Fertil Steril, 2006, 85(5): 1452-1458.
- [6] Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, et al. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases[J]. Mol Hum Reprod, 2004, 110(2): 347-353.
- [7] Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells[J]. Nat Immunol, 2007, 8(6): 950-957.
- [8] Wang WJ, Hao CF, Yi L, et al. Increased prevalence of T helper 17(Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. J Reprod Immunol, 2010, 84(2): 164-170.

3 讨 论

HBsAb 具有中和作用, 一般情况下 HBsAb 阳性表示 HBV 已被清除、人体已产生保护作用。有研究发现慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性的发生率可达 4.9%~9.15%^[8], 本研究中共阳性检出率为 3.86%(60/1 554)。慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性的机制尚不清楚, 多数学者认为可能与 HBV preS 区缺失突变和 S 区氨基酸突变, 特别是 α 决定簇氨基酸突变有关^[3-6, 9-10]。

就分子结构而言, HBV 包膜基因包括 3 个开放阅读框, 即 preS1、preS2、S、preS、S 区突变可能会改变病毒颗粒的免疫原性, 从而影响 HBV 感染患者的临床过程^[5]。S 区主要亲水区的 124~147 号密码子被称为 α 决定簇^[9], 氨基酸突变可改变其空间结构, 从而改变 HBsAg 免疫原性, 常见突变位点为 126、129、133、141、144 和 145^[9]。

体内、体外试验均证实 HBsAg、HBsAb 共阳性情况下的抗原和抗体是不匹配的, 该现象的发生可能与患者感染了不同 HBV 血清型所致^[11]。有学者从共阳性慢性乙肝患者血清中纯化出 HBsAb, 并用酶联免疫吸附法验证了共阳性患者血清中 HBsAg 和 HBsAb 的不匹配性, 同时也对 HBsAg 编码区进行了扩增和测序, 研究结果表明慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性与 HBsAg 编码区突变无关^[8, 12]。

本研究中未在双阳性患者标本中检出 preS 区缺失突变, 而 HBsAg 阳性、HBsAb 阴性患者中存在 preS1 区 15 bp 的缺失; α 决定簇氨基酸点突变率组间比较无统计学差异, 在试验组和对照组中均检出 126 位点的突变, 对照组中还检出 133 位点的突变。因此, 本研究结果并不支持 HBV preS 区缺失突变和 α 决定簇氨基酸点突变造成慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性的观点。

本研究结果与 Zhang 等^[8]的研究结果相似, 即 HBsAg、HBsAb 共阳性与 HBV preS 区缺失突变和 S 区氨基酸点突变无必然联系。在 Zhang 等^[8]的研究中, 入组标本都来源于 HBeAg 阳性、ALT 水平高于正常值两倍、HBV DNA 复制水平高于 1.0×10^5 copy/mL 的免疫激活期的患者^[12], 而本研究不仅包括了免疫激活期和免疫耐受期患者, 还包括了 HBeAg 阴性患者。因此, 可以认为本研究结果为 Zhang 等^[8]的观点提供了客观证据。但本研究标本量较小, 试验组与对照组 HBV 基因型均为 B 型或 C 型, 且试验组的 B 型标本(编号 1~3)来源于同一患者, 因此尚有待扩大样本量后进行更为深入的研究。

参考文献

[1] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical

Practice Guidelines; Management of chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2009, 50(2): 227-242.

[2] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures [J]. J Viral Hepat, 2004, 11(2): 97-107.

[3] Colson P, Borentain P, Motte A, et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers [J]. Virology, 2007, 367(1): 30-40.

[4] Wang L, Liu H, Ning X, et al. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb tests [J]. Hepatol Res, 2010, 40(12): 1212-1218.

[5] Wang YM, Ng WC, Lo SK. Detection of pre-S/S gene mutants in chronic hepatitis B carriers with concurrent hepatitis B surface antibody and hepatitis B surface antigen [J]. J Gastroenterol, 1999, 34(5): 600-606.

[6] Huang X, Qin Y, Zhang P, et al. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies [J]. J Med Virol, 2010, 82(1): 23-31.

[7] 中华医学会肝脏病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版) [J]. 中华肝病杂志, 2011, 19(1): 13-24.

[8] Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis b surface antigen(HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1161-1169.

[9] Lada O, Benhamou Y, Poynard T, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen(HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers; influence of "a" determinant variants [J]. J Virol, 2006, 80(6): 2968-2975.

[10] Jang JS, Kim HS, Kim HJ, et al. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection [J]. J Med Virol, 2009, 81(9): 1531-1538.

[11] Zhang Z, Li L, Tian Y, et al. HBsAg/HBsAb double positive hepatitis B virus infection model in vitro and in vivo [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(5): 575-579.

[12] Gerlich WH. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1170-1172.

(收稿日期: 2012-09-08)

(上接第 15 页)

[9] 刘长明, 丛林, 方慧琴, 等. Treg 和 Th17 在原因不明性复发性流产发病中作用的探讨 [J]. 现代妇产科进展, 2011, 12(20): 944-947.

[10] 何冬梅, 尤昭玲, 雷磊, 等. 寿胎丸对反复自然流产小鼠母胎界面 SOCS1 和 SOCS3 蛋白表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(1): 26-28.

[11] 赖毛华, 尤昭玲, 马红霞, 等. 寿胎丸对母胎界面 Th1/Th2 细胞因

子和妊娠结局的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 3065-3068.

[12] Liu W, Putnam AL, Xu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FOXP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells [J]. J Exp Med, 2006, 203(13): 1701-1711.

(收稿日期: 2012-07-08)