

中药胎宝抑制抗精子抗体的实验研究*

赖安妮¹ 宋济范² 刘先菊² 李俊芳¹

刘 莉¹ 董 彬¹ 林育樵^{1△}

内容提要 目的:测定中药胎宝对生殖免疫的作用。方法:将人精子膜抗原注入雌性小鼠腹腔,测定精子抗体为阳性者确定为免疫不育动物模型。分别灌胃中药胎宝高剂量($46.8\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、低剂量($31.2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),并以强的松($6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和生理盐水作对照,观察胎宝抑制实验小鼠抗精子抗体、促进妊娠的作用。结果:生理盐水组受孕率38.89%,强的松组47.06%,胎宝高、低剂量组分别为70.00%、75.00%。胎宝低剂量组与生理盐水组比较有显著性差异($P < 0.05$)。胎宝低剂量组孕鼠平均着床数(10.93 ± 2.91)明显高于强的松组(6.75 ± 4.59)。酶联免疫吸附试验(ELISA)和微量细胞毒试验测定抗精子抗体,显示胎宝组精子抗体下降,胎宝高剂量组和强的松组细胞毒性百分率均显著低于生理盐水组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:中药胎宝对生殖免疫有调节作用,能抑制精子细胞毒抗体,从而促进免疫不育小鼠生育力。

关键词 免疫性不育 抗精子抗体 受孕率 中药胎宝

An Experimental Study on Inhibitory Effect of Chinese Medicine Tai-bao on Antisperm Antibody
LAI An-ni, SONG Ji-fan, LIU Xian-ju, et al *Xiguan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)*

Objective: to investigate whether Chinese medicine Tai-bao could inhibit antisperm antibody in experimental mice. **Methods:** The experimental immunoinfertility mice were due to antisperm antibody induced by injection of human sperm membrane antigens. The experimental immuno-infertile mice used in the present study were divided into four groups including Tai-bao high dose group ($46.8\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Tai-bao low dose group ($31.2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), prednisone group and normal saline group. The enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) and microcytotoxic assay were used for detection of antisperm antibody. The change of levels of antisperm antibody before and after treatment, pregnant rate, and the number of implantation were investigated in tested mice. **Results:** The pregnant rates in normal saline group, prednisone group, Tai-bao high dose group and low dose were 38.89%, 47.06%, 70.00% and 75.00% respectively. The rate of pregnancy in Tai-bao low dose group was significantly higher as compared with normal saline group ($P < 0.05$). The rate of implantation in Tai-bao low dose group was significantly higher than that in prednisone group ($P < 0.05$). The results of detection of the cytotoxic antibody to sperm showed that cytotoxic percentages in Tai-bao high dose group ($63.0 \pm 10.3\%$) and prednisone group ($56.3 \pm 13.7\%$) were significantly lower ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) than that in normal saline group ($72.84 \pm 5.05\%$). **Conclusion:** Chinese medicine Tai-bao possesses regulatory effect on reproductive immune function, inhibitory effect on antisperm cytotoxic antibody, and promoting effect on pregnancy.

Key words immunoinfertility, antisperm antibody, pregnant rate, Chinese medicine Tai-bao

免疫不育在以往不明原因的不育症中占 40%~

50%^{〔1〕}。生殖系统的炎症、损伤、梗阻或自身免疫功能紊乱,可以使患者产生抗精子抗体,不仅造成男性自身免疫性不育,也可引起女方免疫性不孕或习惯性流产。国外主要以类固醇药物及避孕套隔离法来治疗抗精子免疫性不育^{〔2〕}。近年来国内以中医药治疗此病,取

* 国家自然科学基金资助课题

1. 中国中医研究院西苑医院(北京 100091); 2. 国家计划生育委员会科学技术研究所;△指导

得了可喜的疗效。为探讨中医药治疗免疫性不育的机理,我们根据中医肾藏精,主生殖,为先天之本,脾主运化为后天之源及胎居母腹,赖血养、气载、肾系的理论,拟定补肾健脾、和血清热为主的中药——胎宝,用以治疗免疫性不育症,取得了较好的疗效,并对该药进行了动物实验研究,现报告如下。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 成年健康 NIH 小鼠,体重 25~30g,共 112 只,其中雌性 84 只,雄性 28 只,由军事医学科学院和国家计划生育委员会科研所动物中心提供。

1.2 药品 中药胎宝:由菟丝子、黄芪、丹参、虎杖、当归、川续断、甘草等 12 味中药组成。由西苑医院妇科组方,西苑医院药厂制备,浓缩浸膏,每克浸膏含生药 3.4g;强的松:每片 5mg,天津力生制药厂出品,批号:9412015。

1.3 试剂 0.5%Nonidlt (NP)-40 为诺乃洗涤剂,Sigma 公司产品;Freund 完全佐剂与 Freund 不完全佐剂,均由国家计划生育委员会科研所免疫室配制。

2 方法

2.1 免疫性不育小鼠模型的建立 取常规检查正常的人精液 20 份,2000rpm 离心 30min,弃精浆,精子用生理盐水洗涤 5 次,然后加入 0.5%NP-40,震荡 2h,离心后取上清液加生理盐水透析,适当浓缩后测定蛋白浓度。用上述提取的精子膜抗原伴 Freund 完全佐剂,对雌性小鼠进行腹腔免疫,每只小鼠注射抗原量为 150 μ g,2 周后用不完全 Freund 佐剂抗原加强免疫 1 次,隔 1 周后用生理盐水抗原再腹腔加强免疫 1 次。所有免疫小鼠血清经 ELISA⁽³⁾检测证实抗精子抗体 (Antisperm antibalg, ASAb) 呈阳性反应。

2.2 分组及给药方法 将实验免疫性不孕雌鼠 (84 只) 随机分成 4 组,每组 21 只。中药胎宝高剂量组 (46.8g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)、胎宝低剂量组 (31.2g $\cdot$ kg⁻¹

$\cdot$ d⁻¹)、强的松组 (6mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹) 及生理盐水组。于小鼠第 3 次免疫后 1 周开始给药及生理盐水,每日 1 次,连续 3 周。因喂法不当,生理盐水组小鼠死亡 3 只、强的松组死亡 4 只、胎宝高、低剂量组分别死亡 11 只与 1 只。

2.3 交配试验 免疫并服药后雌性小鼠与正常雄性 NIH 小鼠按 3:1 比例合笼 2 周,再饲养 5 天后处死,剖腹观察子宫着床点数,计算受孕率及孕鼠平均着床点数。

2.4 小鼠血清 ASAb 测定 免疫后、服药后及小鼠交配试验后,分别经眼眶取血,分离血清,采用 ELISA 法测定 ASAb;另外在每组中取 10 份血样,进行精子微量细胞毒抗体⁽⁴⁾测定。

2.5 统计学处理 采用均数 t 检验及 χ^2 检验。

结 果

1 中药胎宝对免疫性不育小鼠生育力的影响 用药各组小鼠的受孕率高于生理盐水组,胎宝高、低剂量组的受孕率也都高于强的松组。经统计学检验,胎宝低剂量组与生理盐水组比较有显著性差异 ($P<0.05$)。两个中药组与生理盐水组孕鼠平均着床数大抵相似,强的松组着床数下降,与中药低剂量组比较差异显著 ($P<0.05$)。详见表 1。

2 胎宝对免疫性不育小鼠 ASAb 的影响

2.1 ELISA 测定免疫后小鼠 ASAb 雌性试验小鼠在免疫前经 ELISA 检验 ASAb,吸收光值 (OD) 测值均接近于 0。3 次腹腔免疫后再次检测 OD 均值为 1.20 ± 0.49 ,证实该小鼠符合实验要求,此后随机分组进行实验治疗,治疗 3 周后检测各组 ASAb 均呈下降趋势,3 个用药组下降差值都大于生理盐水组,但没有显著性差异,见表 2。另外,胎宝治疗后怀孕小鼠 (22 只) ASAb 的 OD 均值 (0.72 ± 0.50),低于未孕小鼠 (8 只) OD 均值 (0.87 ± 0.46),但二者比较无显著性差异。

表 1 中药胎宝对免疫性不育小鼠生育力的影响

组 别	鼠数	受孕数	受孕率 (%)	着床数	平均着床数 ($\bar{x} \pm s$)
生理盐水	18	7	38.89	65	9.29 ± 0.95
强的松	17	8	47.06	54	6.75 ± 4.59
胎宝高剂量	10	7	70.00	65	9.29 ± 3.95
胎宝低剂量	20	15	75.00*	164	$10.93 \pm 2.91^{\Delta}$

注:与生理盐水组比较,* $P<0.05$;与强的松组比较, $\Delta P<0.05$

表 2 胎宝对免疫性不育小鼠 ASAb 水平的影响 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	治疗前	治疗 3 周后	治疗前后差值
生理盐水	18	1.10 ± 0.54	0.82 ± 0.45	0.28 ± 0.34
强的松	17	1.32 ± 0.46	0.77 ± 0.46	0.55 ± 0.47
胎宝高剂量	10	1.25 ± 0.44	0.83 ± 0.54	0.42 ± 0.34
胎宝低剂量	20	1.13 ± 0.51	0.73 ± 0.48	0.41 ± 0.21

2.2 微量细胞毒抗体实验法测定精子细胞毒抗体 胎宝治疗后其高剂量组与生理盐水组比较, 细胞毒百分数有明显下降 ($P < 0.05$)。强的松组治疗后精子细胞毒抗体下降更为明显 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 胎宝对小鼠抗精子细胞毒抗体的影响 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	细胞毒性百分数	
		治疗前	治疗 3 周后
生理盐水	10	85.42 ± 5.95	72.84 ± 5.01
强的松	10	83.20 ± 5.49	56.03 ± 13.70**
胎宝高剂量	10	82.21 ± 6.88	63.00 ± 10.32*
胎宝低剂量	10	83.40 ± 4.45	70.71 ± 6.93

注: 与生理盐水组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

中医认为肾藏精, 生髓, 主生殖。脾主运化, 为生化之源, 后天之本。现代医学研究发现, 肾对人体的生殖与免疫起着稳定调节作用, 是免疫之本。补肾法通过提高垂体-肾上腺皮质系统兴奋改善免疫功能^[5]。脾则是免疫活动的物质基础, 具有促进免疫功能的作用^[6]。免疫性不育发生的直接诱因是感染邪毒, 气血不畅而阻碍精卵结合。因而我们以补肾健脾为主, 兼以和血清热治疗此病。本研究中药胎宝两个剂量组小鼠受孕率都高于生理盐水组及强的松组, 且用两种方法检验 ASAb 均呈下降趋势, 提示中药胎宝有抑制 ASAb 抗体, 促孕的作用。

国外治疗免疫性不育主要用类固醇药物。本研究以强的松为阳性对照, 结果表明胎宝两个剂量组与生理盐水组孕鼠平均着床数与正常小鼠相近。强的松组平均着床数只有 6.75 ± 4.59 , 胎宝低剂量组 (10.93 ± 2.91) 与其比较有显著性差别 ($P < 0.05$)。中药低剂量组小鼠受孕率高于生理盐水组, 在孕鼠平均着床数方面也优于强的松组。但在用两种方法检测的 ASAb 下降水平中, 强的松组比胎宝组下降值大。这是因为强的松免疫抑制的效应无特异性, 既抑制异常的免疫

反应, 也抑制正常的免疫反应, 因而对免疫性不育虽有一定治疗作用, 但疗效不高。另外类固醇药物通过负反馈作用, 抑制垂体及卵巢, 这也可能是强的松组疗效不高的原因之一。中药胎宝低剂量组平均着床数高于强的松组, 体现了中医的整体观及双向免疫调节作用的优势。胎宝运用补肾健脾、和血清热法, 通过调节机体的阴阳, 改善内环境, 使紊乱的免疫环节恢复平衡与稳定。同时既兴奋、增强低下的免疫功能, 又抑制亢进、过高的免疫反应, 并减轻、消除针对精子的免疫损害, 从而达到促孕的作用。胎宝中的菟丝子、川续断有填精补髓, 调血脉增加免疫功能的作用。黄芪、甘草补中益气, 健脾益胃, 药理实验表明有增强免疫、抗变态反应的作用。当归、丹参补血和血, 有促进清除抗原、防止免疫复合物产生, 抑制抗原抗体免疫反应所引起的病理性损害的作用。虎杖清热解毒, 活血化瘀, 有抑制病理性免疫反应的作用^[6]。另外, 黄芪、甘草有促进雌激素样作用。当归使子宫组织 DNA 含量增加, 促进子宫增生^[7]。由此可见中药胎宝不仅有调节免疫功能的作用, 尚有调节内分泌功能的作用, 这也许是本研究中胎宝组小鼠受孕率较高的原因之一。

参 考 文 献

1. 李大金, 李超荆, 朱 影. 滋阴降火中药治疗免疫不孕症. 中国中西医结合杂志 1995; 15 (1): 3—5.
2. 朱为筑. 精子抗体引起免疫性不孕症的类固醇疗法. 实用妇产科杂志 1992; 8 (3): 131—133.
3. 宋济范, 刘先菊. 使用免疫印迹试验筛选与不孕相关的精子抗原研究. 中国计划生育学杂志 1996; 4 (5): 283—286.
4. 北京医学院微生物教研组. 实验免疫学, 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 470.
5. 上海第一医学院. 对祖国医学“肾”本质的探讨. 中华内科杂志 1976; 1 (2): 80.
6. 寇华胜, 林建予. 中医免疫医学. 第 1 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1990: 20—31, 130—147.
7. 马大正. 中医妇科临床药物手册. 第 1 版. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1992: 140, 237, 563.

(收稿: 1996—03—10 修回: 1997 01—10)