

· 基础研究 ·

益气补肾实验方对自然流产模型小鼠 foxp3、STAT5、NF- κ B mRNA 表达的影响

叶 平¹ 舒昊旭² 鲁颖晔³ 王欢欢¹ 叶 骞¹ 张 丽⁴

摘要 **目的** 观察益气补肾实验方对自然流产模型小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞中 foxp3 mRNA 表达及蜕膜组织 foxp3、STAT5、NF- κ B mRNA 表达的影响。**方法** 将雌性 CBA/J 与雄性 DBA/2 或雄性 BALB/c 小鼠以 2:1 合笼交配,制备自然流产模型。将 CBA/J 孕鼠分为 5 组:阴性对照组、阳性对照组、中药高剂量治疗组、中药中剂量治疗组、中药低剂量治疗组,每组 10 只;阴性对照组于妊娠第 0 天至处死日每天以 10 mg/kg 的剂量灌服生理盐水 1 次;阳性对照组于妊娠第 4 天以 10 mg/kg 的剂量单次灌服环孢素 A 溶液;中药高、中、低剂量治疗组于妊娠第 0 天至处死日每日分别按 48、24、12 g/kg 的剂量灌服益气补肾实验方 1 次。将孕鼠于妊娠第 9、14 天处死,取新鲜脾脏用于提取 Treg 细胞,并取孕鼠蜕膜组织 -80 ℃ 冻存。采用磁珠分选的方法分离和纯化脾脏 CD4⁺CD25⁺细胞,采用流式细胞术鉴定分选前后 CD4⁺CD25⁺的纯度,运用 RT-PCR 分析 CD4⁺CD25⁺细胞中 foxp3 mRNA 的表达情况;运用 RT-PCR 分析蜕膜组织中 foxp3、STAT5A、STAT5B、NF- κ B mRNA 的表达情况。**结果** CD4⁺CD25⁺Treg 的纯度可达到 88% 以上,经台盼蓝检测其活性大于 95%。纯化分离前 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 平均为 13.20%;纯化分离后 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 平均为 91.43%。与阴性对照组比较,阳性对照组、中药高剂量治疗组 Treg 细胞中 foxp3 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$);中药高剂量治疗组较中、低剂量组小鼠脾脏 Treg 中 foxp3 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与阴性对照组比较,阳性对照组、中药高、中剂量组 9、14 天蜕膜组织 foxp3、STAT5B mRNA 表达升高 ($P < 0.05$);阳性对照组、中药高剂量组 9、14 天及中药中剂量组蜕膜组织 STAT5A mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);阳性对照组及中药各剂量组蜕膜组织 NF- κ B mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 益气补肾实验方可上调自然流产模型小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺T 细胞 foxp3 mRNA 及蜕膜组织中 foxp3、STAT5 mRNA 表达,下调母胎界面组织中 NF- κ B mRNA 的表达,促进妊娠免疫耐受状态的维持。

关键词 自然流产模型;转录因子 foxp3;转录信号转导子与激活子 5;核转录因子 - κ B;益气补肾实验方

Effects of Yiqi Bushen Experimental Recipe on mRNA Expressions of foxp3, STAT5, and NF- κ B in Decidua Tissue of Natural Abortion Model Mice YE Ping¹, SHU Hao-xu², LU Ying-ye³, WANG Huan-huan¹, YE Qian¹, and ZHANG Li¹ 1 Department of Reproductive Immunology, Zhejiang Provincial Tongde Hospital, Hangzhou (310012); 2 Faculty of Statistics and Mathematics, University of Alberta, Canada (T5J3Y4); 3 First Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 4 Department of Gynecology, Zhejiang Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou (310006)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Yiqi Bushen Experimental Recipe (YBER, a recipe for benefiting qi and Shen supplementing) on mRNA expression of foxp3 in splenic CD4⁺CD25⁺Treg cells and mRNA expressions of foxp3, STAT5, and NF- κ B in decidua tissue of natural abortion (NA)

基金项目:浙江省中医药重点研究计划项目(No. 2012ZZ004)

作者单位:1.浙江省立同德医院生殖免疫科(杭州 310012);2.阿尔伯塔大学数学与统计科学学部(加拿大 T5J3Y4);3.浙江中医药大学第一临床医学院(杭州 310053);4.浙江省中医院妇科(杭州 310006)

通讯作者:叶 平, Tel:0571-89975946, E-mail: yepinghz@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 08. 0946

model mice. Methods Female CBA/J mice were caged and mated to male DBA/2 mice or male BALB/c mice in 2:1 for NA model. Pregnant CBA/J mice were randomly divided into 5 groups, i.e., the negative control group, the positive control group, high, middle, and low dose YBER groups, 10 in each group. Mice in the NS control group were administered with normal saline by gastrogavage from day 0 to their death, 10 mg/kg, once per day. Mice in the positive control group were administered with Cyclosporine A solution by gastrogavage on the 4th day of pregnancy. YBER (48, 24, 12 g/kg) was respectively administered to mice in the 3 dose YBER groups by gastrogavage from day 0 to their death, once per day. Pregnant mice were sacrificed at day 9 and 14, and fresh spleens were taken out for extracting Treg cells. Decidua tissues were collected and stored in -80°C for frozen. Splenic CD4^{+} cells CD25^{+} were isolated and purified by magnetic bead. The purity of CD4^{+} cells CD25^{+} was identified by flow cytometry (FCM) before and after magnetic bead. mRNA expressions of *foxp3*, *STAT5A*, *STAT5B*, and *NF- κ B* in decidua tissue were analyzed by RT-PCR. **Results** The purity of CD4^{+} Treg CD25^{+} could arrived at 88% plus. Its activity could be over 95% after trypan blue test. The average ratio of CD4^{+} $\text{CD25}^{+}/\text{CD4}^{+}$ was 13.20% before purified isolation, while it was 91.43% after purified isolation. Compared with the negative control group, *foxp3* mRNA expression level in Treg cells was obviously elevated in the positive control group and the high dose YBER group ($P < 0.05$). *foxp3* mRNA expression level in Treg cells was obviously elevated more in the high dose YBER group than in the middle dose YBER group and the low dose YBER group ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, mRNA expression levels of *foxp3* and *STAT5B* in decidua tissue increased in the positive control group, high and middle dose YBER groups ($P < 0.05$). mRNA expression level of *STAT5A* increased in the positive control group and the high dose YBER group at day 9 and 14; as well as in the middle dose YBER group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *NF- κ B* mRNA expression level in decidua tissue was reduced in the positive control group and 3 dose YBER groups ($P < 0.01$). **Conclusion** YBER could up-regulate the expression of *foxp3* mRNA in splenic CD4^{+} CD25^{+} Treg cells and mRNA expressions of *foxp3* and *STAT5* in decidua tissues of NA model mice, down-regulate *NF- κ B* mRNA expression in maternal-fetal interface, and promote the maintenance of immune tolerance state.

KEYWORDS spontaneous abortion model; *foxp3*; signal transducer and activator of transcription 5; nuclear factor κ B; Yiqi Bushen Experimental Recipe

自然流产 (spontaneous abortion) 是指未使用人工方法, 在妊娠 28 周前, 胚胎或胎儿体重不足 1 000 g 而终止者, 其发病率占生育年龄妇女的 0.4% ~ 0.8%^[1], 占妊娠总数的 10% ~ 15%, 其中早期流产占 80% 以上^[2]。目前已明确的病因包括: 生殖道畸形等解剖因素 (0.5%)、内分泌因素 (15.0%)、感染性因素 (15.0%)、自身抗体因素 (15.0%)、染色体因素 (1.0%), 其余约 50% 左右原因不明, 其中相当一部分与母-胎界面的免疫耐受有关^[3,4], 一旦这种耐受平衡格局被打破, 母体对胚胎产生免疫排斥则将导致流产^[5]。临床上益气补肾中药治疗免疫性自然流产疗效显著, 与配偶淋巴细胞体外诱生免疫治疗的临床疗效相近^[6]。且前期的实验研究表明益气补肾中药可上调自然流产模型小鼠孕早期及中晚期脾脏 CD4^{+} CD25^{+} T 细胞表达, 益气补肾中药联合环孢素 A 干预可上调自然流产模型小鼠孕中晚期母胎界面

CD4^{+} CD25^{+} T 细胞的表达, 提示益气补肾中药有助于妊娠时免疫耐受状态的维持^[7]。为进一步探讨益气补肾中药在防治免疫性自然流产中的作用机制, 本实验以益气补肾实验方应用于自然流产模型小鼠, 观察其对自然流产模型小鼠脾脏 CD4^{+} CD25^{+} T 细胞中 *foxp3* mRNA 表达的影响及对自然流产模型小鼠母胎界面组织 *foxp3*、*STAT5*、*NF- κ B* mRNA 表达的影响。

材料与方

1 动物 雌性 CBA/J 50 只、雄性 DBA/2 30 只, 均为 8 ~ 10 周龄, 体重 20 g 左右, 购于北京华康实验动物有限公司, 动物使用许可证号: SCXK (京) 2009-0004。饲养于浙江中医药大学动物实验中心, 设施条件合格证号 SYXK (浙) 2008-0115。实验小鼠饲养在清洁级动物房内, 环境温度: 18 ~ 22 $^{\circ}\text{C}$, 相对

湿度:50%~60%,氨浓度不超过 20 ppm;换气次数:10~20 次/h;光照:150~200Lx,12 h 明暗交替。适应性饲养 1 周。

2 药物 益气补肾实验方组成为:黄芪 36 g 党参 12 g 当归 6 g 陈皮 12 g 升麻 12 g 柴胡 12 g 白术 18 g 菟丝子 30 g,由浙江省中医院药房煎制,水煎浓缩至含生药量为 1.6、0.8、0.4 g/mL,4℃保存备用。环孢素软胶囊(商品名:新山地明),内为淡黄色液体,25 mg/粒,由诺华制药提供(批号:S0027B);生理盐水:杭州民生药业有限公司生产(产品批号:S21210183)。

3 试剂及仪器 PBS 缓冲液由凯基生物医药技术有限公司生产;红细胞裂解液,博士德生物生产;MiniMACS、MidiMACS 磁珠分选器及 LD 柱、MS 柱、小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞分离试剂盒、FITC anti-mouse CD4、PE anti-mouse CD25 由均购自德国 Miltenyi Biotec 公司;流式细胞仪为 BD FACS-Canto™ II,购自美国 BD 公司。cDNA 逆转录试剂盒(cat RR036A),DNA 扩增试剂盒(cat RR820S)均购自 TAKALA 公司,DNA 扩增仪(型号 IQ5)购自 Bio-Rad 公司。

4 造模、分组及给药方法 采用 Clark DA 等^[8]建立的经典妊娠模型,将雌性 CBA/J 小鼠分别与雄性 DBA/2 小鼠以 2:1 合笼交配建立小鼠自然流产模型,每日晨 8:00-9:00 检查雌鼠阴道,若见阴栓,则造模成功,视为孕 0 天;若未见阴栓,则继续合笼。共造自然流产模型 50 只。采用随机数字表法将自然流产模型小鼠分为阴性对照组 10 只(于妊娠第 0 天至处死日每天以 10 mg/kg 的剂量灌服生理盐水 1 次)、阳性对照 10 只(于妊娠第 4 天以 10 mg/kg 的剂量单次灌服环孢素 A 溶液)、中药高、中、低剂量每组 10 只(于妊娠第 0 天至处死日每天分别按 48、24、12 g/kg 的剂量灌服益气补肾实验方 1 次)。

5 脾脏 CD4⁺CD25⁺细胞中 foxp3 mRNA 检测

5.1 小鼠脾脏单个核细胞分离 将孕鼠随机均分为 2 批,分别于孕 9 及 14 日(相当于小鼠妊娠早期及中晚期)以颈椎脱臼处死,每次处死 5 只。无菌条件下取用脾脏,置于预先准备的 PBS 缓冲液中,快速至超净台,将脾脏倒入平皿中,去除多余组织,加 PBS 缓冲液 5 mL 左右冲洗 2 次后,将组织剪成小块,置于 2 块无菌载玻片的粗糙面,相互挤压,用 PBS 冲洗载玻片挤压处,过 400 目滤网;收集细胞悬液注入 50 mL 离心管中,300 ×g,离心 10 min 后弃上清,加

入红细胞裂解 3~4 mL 室温静置 2 min,再加入 PBS 约 5 mL,300 ×g,离心 10 min,弃上清,再用 PBS 缓冲液洗 1 次后,用 20 mL PBS 重悬。取 20 μL 细胞悬液加 0.4% 台盼蓝 40 μL 计数,取 4 × 10⁵ 细胞用于分选前的流式检测,其余悬液用于磁珠分选。

5.2 磁珠分选 CD4⁺CD25⁺T 细胞及流式鉴定

采用 MidiMACS 和 MiniMACS 免疫磁性分离系统两步法分选 Treg 细胞。(1)每 10⁷ 细胞加入 10 μL Biotin antibody Cocktail,4℃避光 10 min。后加入 20 μL 抗-生物素磁珠(Anti-Biotin MicroBeads)和 10 μL CD25-PE 抗体,4℃避光 15 min,300 ×g,10 min 离心洗涤。1 mL buffer 重悬细胞,通过 LD 柱阴性分选后收集留出的细胞悬液,离心洗涤获得 CD4⁺T 细胞,收集细胞并计数,进行下一步分选。(2)每 10⁷ 个细胞加入 10 μL 抗-PE MicroBeads,混匀,4℃避光 15 min,300 ×g,10 min 离心洗涤。500 μL buffer 重悬细胞后过 MS 柱,流出的细胞悬液为 CD4⁺CD25⁻T 细胞,收集悬液并将分离柱移出磁场,加 1 mL buffer,用柱芯加压洗脱,阳选获得 CD4⁺CD25⁺Treg,收集细胞,取 10 μL 细胞悬液加 10 μL 0.4% 台盼蓝检测分离细胞的存活率。取部分分离的 CD4⁺CD25⁺Treg 及分选前的细胞悬液加入 FITC 标记的抗小鼠 CD4、PE 标记的抗小鼠 CD25 抗体,流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的纯度。

5.3 半定量和 RT-PCR 检测 CD4⁺CD25⁺Treg 内 foxp3 mRNA 表达 将各组孕鼠 9 日及 14 日脾脏 CD4⁺CD25⁺细胞及脾组织按照 TaKaRa 逆转录及扩增试剂盒说明进行 RNA 抽提、cDNA 合成和扩增。foxp3 和 GAPDH 引物应用 Primer Premier 5.0 软件自行设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成。序列如下:foxp3:上游 5'-AGGAGAAAGCGGATACCAAA-3';下游 5'-GGAAGGACATACCCAGAAGC-3';GAPDH:上游 5'-TGCAC-CACCAACTGCTTAG-3';下游 5'-GGATGCAGG-GATGATGTTC-3'。半定量 PCR 反应产物由 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 70 min(70V),于型号为 Mini-PROTEAN 凝胶图像分析系统下观察并摄像。RT-PCR 用 IQ5 仪器进行扩增,每个 cDNA 设 3 个复孔。分析各孔 Ct 值,计算出标化后的 2^{-ΔΔCt} 值,先算出 -ΔΔCt = -(试验原始 Ct 值 - 试验 GAPDH 的 Ct 值) - (对照组原始 Ct 值 - 对照组 GAPDH 的 Ct 值)。

6 小鼠蜕膜组织 foxp3、STAT5、NF-κB mRNA 表达检测

6.1 蜕膜组织总 RNA 的提取 分别收集孕鼠 9

日或 14 日蜕膜组织 100 mg,用研钵研成粉末,加 1 mL 的 Trizol 置旋窝混合器充分混合均匀。室温静置 5 min,充分裂解样品。加入 200 μ L 氯仿,振荡 10 s,混匀后室温放置 2~3 min 使其自然分相。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,转移上清无色水相到新的离心管。加入等体积异丙醇,颠倒混匀后室温下静置 10 min,2~8 $^{\circ}$ C 12 000 r/min,离心 10 min。弃上清,加入 1 mL 75% 乙醇,旋涡振荡洗涤。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,保留沉淀,晾干。用 0.1% DEPC 水溶解 RNA,吹打混匀。取 1~2 μ L 溶解后的 RNA 用紫外分光光度计上测定 RNA 浓度,确定 RNA 的纯度及浓度, A_{260}/A_{280} 应在 1.8~2.0 之间。

6.2 cDNA 的合成和扩增 将各组孕鼠母胎界面组织按照 TaKaRa 逆转录及扩增试剂盒进行 cDNA 的合成和扩增。foxp3、STAT5、NF- κ B mRNA 和 GAPDH 引物应用 Primer Premier5.0 软件自行设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成。序列如下:foxp3: 5-AGGAGAAAGCGGATACCAAA-3, 5-GGAAGGACATACCCAGAAGC-3; STAT5A: 5-GACCGAAACCTCTGGAATCTG-3, 5-GTAGCCCTGTGAAACGTGCA-3; STAT5B: 5-TGGCTGTTTC-CCGTTTCT-3, 5-CAGGCCTACGCCAGTGTCT-3; NF- κ B: 5-CTAAAT-GGGAAACCGTATGA-3, 5-TGGGCTGTCTCCAGTAAGA-3; RT-PCR 用 IQ5 仪器进行扩增,每个 cDNA 设 3 个复孔。分析各孔 Ct 值,计算出标化后的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值,先算出 $-\Delta\Delta Ct = -[(\text{试验原始 Ct 值} - \text{试验 GAPDH 的 Ct 值}) - (\text{对照组原始 Ct 值} - \text{对照组 GAPDH 的 Ct 值})]$ 。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件对进行数据统计分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析,两两比较应用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 纯度结果(图 1) CD4⁺CD25⁺Treg 的纯度可达到 88% 以上,经台盼蓝检测其活性大于 95%。纯化分离前 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺平均为 13.2%;纯化分离后 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺平均为 91.43%。

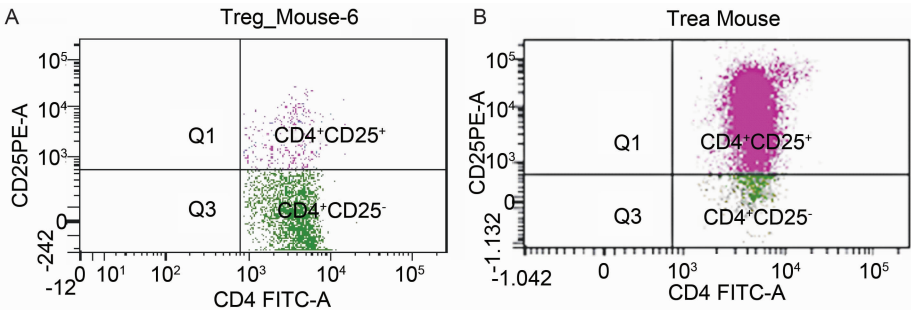
2 各组小鼠 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁻T 细胞中 foxp3 mRNA 表达水平比较(表 1,图 2) 与阴性对照组比较,阳性对照组、中药高剂量治疗组 foxp3 mRNA 表达水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药高剂量治疗组较中、低剂量组小鼠脾脏 Treg 中 foxp3 mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁻T 细胞中 foxp3 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T 细胞
阴性对照	10	1.0	1.00
阳性对照	10	4.20 $\pm$ 2.77 *	0.43 $\pm$ 0.32
中药高剂量	10	3.49 $\pm$ 2.03 *	0.94 $\pm$ 0.77
中药中剂量	10	1.79 $\pm$ 1.02 Δ	0.58 $\pm$ 0.40
中药低剂量	10	1.96 $\pm$ 2.33 Δ	0.57 $\pm$ 0.29

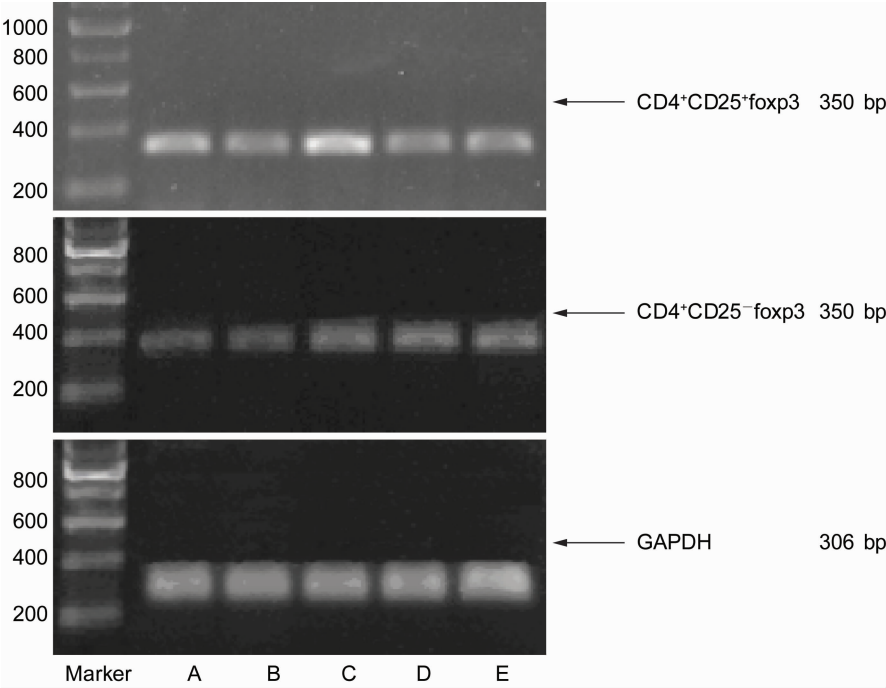
注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与中药高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组小鼠蜕膜组织中 foxp3、STAT5、NF- κ B mRNA 表达水平比较(表 2) 与阴性对照组比较,阳性对照组、中药高、中剂量组 9、14 日蜕膜组织 foxp3、STAT5B mRNA 表达升高($P < 0.05$);阳性对照组、中药高剂量组 9、14 日及中药中剂量组蜕膜组织 STAT5A mRNA 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);阳性对照组及中药各剂量组蜕膜 NF- κ B mRNA 表达降低($P < 0.01$)。



注:A 为小鼠脾脏细胞纯化分离前;B 为小鼠脾脏细胞纯化分离后

图 1 小鼠脾脏细胞纯化分离前后 CD4⁺CD25⁺Treg 的比例



注:A 为阳性对照组;B 为阴性对照组;C 为中药高剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药低剂量组

图 2 各组小鼠脾脏 Treg 细胞中 foxp3 mRNA 的表达

表 2 各组小鼠母胎界面组织中 foxp3、STAT5A、STAT5B、NF-κB mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	foxp3/GAPDH	STAT5A/GAPDH	STAT5B/GAPDH	NF-κB/GAPDH
阴性对照	5	9 日	1.00	1.00	1.00	1.00
		14 日	1.00	1.00	1.00	1.00
阳性对照	5	9 日	3.93 ± 2.10 *	4.29 ± 2.46 *	3.38 ± 1.23 *	0.34 ± 0.18 **
		14 日	5.08 ± 2.67 *	5.57 ± 2.90 **	5.15 ± 2.88 *	0.15 ± 0.10 **
中药高剂量	5	9 日	3.65 ± 1.06 *	4.47 ± 2.22 *	3.53 ± 2.02 *	0.31 ± 0.18 **
		14 日	4.53 ± 3.16 *	6.11 ± 3.23 **	5.46 ± 3.08 *	0.25 ± 0.18 **
中药中剂量	5	9 日	3.43 ± 2.62 *	3.59 ± 3.00	3.22 ± 1.58 *	0.42 ± 0.27 **
		14 日	4.48 ± 2.52 *	4.72 ± 2.34 *	4.89 ± 3.81 *	0.32 ± 0.28 **
中药低剂量	5	9 日	2.28 ± 1.60	2.69 ± 1.44	2.37 ± 1.21	0.41 ± 0.25 **
		14 日	3.23 ± 1.95	3.82 ± 3.13	3.61 ± 2.12	0.32 ± 0.20 **

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

中医学认为,“肾主生殖”,“肾气盛”乃“有子”。因此“益气补肾”历来被认为是治疗滑胎的根本大法。本实验选取的益气补肾实验方中,黄芪、菟丝子补肾益气安胎;党参、白术甘温益气;当归养血合营;陈皮理气调中;升麻、柴胡助黄芪升提益气之效。全方益气补肾,固摄安胎。现代药理研究证实益气补肾实验方具有免疫调节作用,有利于母胎界面免疫耐受状态的维持,且不良反应小,安全有效,是临床保胎治疗的常用药物^[9]。益气补肾实验方以益气补肾为治疗原则,用中医药治疗反复自然流产优势显著,近年来大量医学

临床研究也取得明显的效果。田葱等^[10]对不明原因复发性流产进行临床研究,将 64 例病例随机分为中药治疗组 33 例和免疫治疗组 31 例,中药治疗组采用以补肾益气为原则制成的安胎种子丸(菟丝子、黄芩、续断、杜仲、炒白术各 10 g,党参、当归、白芍各 15 g)治疗,免疫治疗组采用主动免疫治疗,发现两组妊娠成功率和封闭抗体转阳率差异无统计学意义,益气补肾中药治疗复发性流产疗效显著,能提高母胎界面保护性抗体,调节母胎免疫。陈凤玉^[11]以益气补肾固冲为大法治疗习惯性流产患者 40 例,自拟方(山茱萸、熟地黄、党参、炒白术、桑寄生、菟丝子、鹿角霜、续断、炒杜仲、枸杞子各 10 g,淮山药 20 g),于计划妊娠前 3

个月开始服药,至孕后既往出现流产时间的 2 周以上,结果治愈 39 例,占 97.5%,未愈 1 例,占 2.5%。王海燕等^[12]探讨益气补肾方对不明原因反复自然流产患者外周血 Treg 细胞研究的结果显示:益气补肾中药方治疗后患者外周血 Treg 细胞数量(5.85 ± 2.76)明显高于治疗前(3.26 ± 1.19),表明益气补肾方能够调节母体内 Treg 细胞表达水平,改变其细胞因子分泌模式,诱导母体微环境的抗炎环境,抑制母体免疫细胞对胚胎的攻击,维持妊娠免疫耐受,保护胎儿不被母体排斥,改善妊娠结局。

随着分子生物学和人类基因组学的发展,人们对自然流产的病因病机认识得到进一步加深,CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在妊娠的母胎免疫耐受中起重要作用,FoxP3 是 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的特异性标记,通过上调 FoxP3 的表达,CD4⁺CD25⁺T 细胞具有免疫抑制功能,在母胎免疫耐受方面发挥关键作用^[13]。有研究发现 CD4⁺CD25⁺Treg 的发育分化受转录因子 Foxp3 调控,而转录因子 Foxp3 的表达和调控受 STAT5 蛋白活化的调控,JAK-STAT 信号转导途径是细胞因子信号由胞膜向核内传递的主要途径,STAT 是这条途径的核心分子。IL-2R 受体信号调节首先有赖于 JAK-1 和 JAK-3 的活化以及 STAT3 和 STAT5 的磷酸化和活化。这些转录因子转向核内,开始了一系列复杂的转录活动,导致了 IL-2R 刺激的一系列功能效应。foxp3 与 JAK-STAT 信号途径的 STAT5 的结构基因水平上具有相关性,因此认为 STAT5 与 Foxp3 表达的调节密切相关^[14]。近几年的研究发现,炎症介质的基因表达是通过转录机制来调节的,NF- κ B 作为一种重要的转录因子,在各种细胞外刺激介导的细胞信号转导调控中起核心作用^[15]。NF- κ B 被激活移位入细胞核,与 DNA NF- κ B 元件结合诱导 NF- κ B 依赖的基因转录,如编码内皮 ICAM、iNOS、IL 家族(如 IL-2、IL-6 等)及 TNF- α 等前炎症细胞因子的基因,从而参与休克、炎症、自身免疫性等疾病的病理过程;同时,NF- κ B 与局部免疫动态平衡相关,是妊娠局部微环境的重要调节因子,即可诱导与自然流产有关的 TNF- α 等下游因子的表达,又可对抗 TNF 引起的凋亡^[16]。前期的研究表明益气补肾中药可上调自然流产模型小鼠孕早期及中晚期脾脏 CD4⁺CD25⁺T 细胞表达,益气补肾中药联合环孢素 A 干预可上调自然流产模型小鼠孕中晚期母胎界面 CD4⁺CD25⁺T 细胞的表达,提示益气补肾中药有助于妊娠时免疫耐受状态的维持^[17]。

本实验研究益气补肾实验方对 CD4⁺CD25⁺

Treg 细胞中 foxp3 mRNA 的调控作用,发现益气补肾实验方高剂量治疗组可上调 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞中 foxp3 mRNA 的表达,与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与阳性对照组比较,无统计学意义($P > 0.05$),提示实验方可上调 foxp3 mRNA 的表达。当观察流产小鼠母胎界面组织时,发现益气补肾中药高剂量治疗组同时可上调自然流产小鼠母胎界面组织 foxp3、STAT5 mRNA 的表达,与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),进一步说明益气补肾实验方可以上调自然流产小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及母胎界面组织中 foxp3 mRNA 的表达,同时也可以上调母胎界面组织中 STAT5 mRNA 的表达。研究发现益气补肾实验方对自然流产小鼠母胎界面组织 NF- κ B mRNA 表达影响,与阴性对照组比较,中药各组的表达明显下调,且有统计学意义($P < 0.01$)。

本实验提示:益气补肾实验方高剂量组可上调小鼠脾脏 Treg 细胞中 foxp3 mRNA 及蜕膜组织中 foxp3 mRNA、STAT5 mRNA 的表达,与西药环孢素 A 比较无统计学意义,使母胎界面的免疫耐受得以维持;同时益气补肾实验方可以下调 NF- κ B mRNA 的表达,有利于妊娠结局向好的方向发展,为益气补肾实验方在临床的应用提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Tuckerman E, Laird SM, Stewart R, et al. Markers of endometrial function in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a comparison between morphologically normal and retarded endometrium [J]. Hum Reprod, 2004, 19(1): 196-205.
- [2] Rai R, Regan L. Recurrent in miscarriage [J]. Lancet, 2006, 368(9535): 601-611.
- [3] Liu YS, Wu L, Tong XH, et al. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 65(5): 503-511.
- [4] Cramer DW, Wise LA. The epidemiology of recurrent pregnancy loss [J]. Semin Reprod Med, 2000, 18(4): 331-339.
- [5] Li X, Wang B, Li Y, et al. The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice [J]. J Ethnopharmacol, 2013 (145): 241-253.
- [6] 金华丽,叶平,张丽,等.补中益气汤对封闭抗体缺乏的反复自然流产患者生殖免疫调节研究[J].中华中医药学刊, 2010, 28(4): 827-829.
- [7] 胡蓝雅文,叶平,黄丹云,等.益气补肾中药对自然流产模型小鼠脾脏和母胎界面 CD4⁺CD25⁺T 细胞表达的

- 影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3): 359 - 362.
- [8] Clark DA, McDermott M, Sczewzuk MR. Impairment of host *versus* graft reaction in pregnant mice. II. Selective suppression of cytotoxic cell generation correlates with soluble suppressor activity and successful allogeneic pregnancy [J]. Cell Immunol, 1980, 52(1): 106 - 118.
- [9] 武美丽, 柳肃芬. 反复自然流产的免疫学研究进展与展望[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(12): 1707 - 1708.
- [10] 田葱, 李娟, 常兴隆. 安胎种子丸治疗不明原因复发性流产临床研究[J]. 新中医, 2011, 43(1): 53 - 55.
- [11] 陈凤玉. 固胎方治疗习惯性流产[J]. 四川中医, 2009, 27(5): 95 - 98.
- [12] 王海燕, 吕蓓丽, 黄书慧, 等. 补肾益气方对不明原因反复自然流产患者外周血 Foxp3/Treg/Th1/Th17 细胞的影响[J]. 现代免疫学, 2012, 32(3): 243 - 246.
- [13] Peunou P, Poulin L, Habran C, et al. CD4⁺ CD25⁺ and CD4⁺ CD25⁻ T cells act as inducer and effector T suppressor cells in superantigen-induced tolerance [J]. Immunology, 2003, 171(7): 3475 - 3484.
- [14] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003, 299: 1057 - 1061.
- [15] Murawski MR, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, et al. Up-regulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis [J]. New York Acad Sci Annals, 2006, 1079: 198 - 204.
- [16] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells [J]. Blood, 2001, 97(1): 46 - 55.
- [17] Aradhya S, Nelson DL. NF-kappaB signaling and human disease[J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(3): 300 - 306.

(收稿: 2015 - 03 - 30 修回: 2016 - 05 - 13)

2015“中国最具国际影响力学术期刊”名单发布

中国学术期刊未来论坛于 2015 年 12 月 18—19 日在北京举行, 并由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、清华大学图书馆发布“2015 中国最具国际影响力学术期刊”和“中国国际影响力优秀学术期刊”。

根据遴选结果, *Chinese Journal of Integrative Medicine* 再次获得“中国最具国际影响力学术期刊”。其国际影响力指数 CI 为 101.710, 国际他引总被引频次 704 次, 国际他引影响因子 1.027。《中国中西医结合杂志》再次获得“中国国际影响力优秀学术期刊”。其国际影响力指数 CI 为 79.389, 国际他引总引频次 1 025 次, 国际他引影响因子 0.140。

Chinese Journal of Integrative Medicine 创办于 1995 年创刊, 主编为陈可冀院士, 是我国第一本被 SCI 收录的中医、替代医学及结合医学领域的杂志。2014 年 6 月公布本刊最新影响因子为 1.217。

《中国中西医结合杂志》创办于 1981 年, 主编为陈可冀院士, 由中国科协主管, 中国中西医结合学会和中国中医科学院主办, 是国内第一本全国性中西医结合综合性学术期刊, 国内外公开发行。主要宣传我国中医药政策和中西医结合方针, 报道我国以及其他国家和地区中西医结合在临床、科研、预防、教学等方面的经验和成果, 探讨中西医结合的思路和方法, 介绍国内外有关本专业的进展, 促进中外学术交流, 开展学术争鸣, 为继承和发扬我国传统医药学, 提高中西医结合学术水平, 促进我国医学科学现代化, 为人类健康服务。本刊按国际标准编排, 印有英文版权页、目次、摘要等。年发行量数十万册。除国内 31 个省市自治区外, 国外订户分布于美国、日本、新加坡、韩国、英国、德国及澳大利亚等 20 多个国家和地区。