

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.02.016

庞氏安胎汤对先兆流产大鼠血清免疫因子及激素水平的影响

马丽亚¹, 张大伟^{*}, 张颖¹, 庞玉琴¹, 王磊², 赵君玫², 霍磊², 李宾玲³, 杜玉洁²

(1. 河南中医药大学第三附属医院, 河南省郑州市金水区东明路 63 号, 450008; 2. 河南中医药大学; 3. 河南省人口与计划生育科研院)

摘要 目的 探讨庞氏安胎汤治疗先兆流产的可能作用机制。方法 60 只孕 1 天大鼠随机分为正常组、模型组、地屈孕酮组和庞氏安胎汤 (简称安胎汤) 高、中、低剂量组, 每组 10 只。安胎汤高、中、低剂量组在孕 1~12 天分别灌胃安胎汤 89.6、44.8、22.4 g/(kg·d), 地屈孕酮组给予地屈孕酮片溶液 3.02 mg/(kg·d), 每日 1 次。孕 12 天, 除正常组外其余各组一次性灌胃米非司酮片溶液 3.75 mg/kg 建立先兆流产大鼠模型。各组大鼠孕 13 天检测血清中 γ 干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 10 (IL-10) 以及血清雌二醇、孕激素、 β 人绒毛膜促性腺激素 (β -HCG) 水平。结果 与正常组比较, 模型组大鼠血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 水平升高, IL-4、IL-6、IL-10 水平降低, 血清雌二醇、孕激素、 β -HCG 水平亦降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 安胎汤中、高剂量组 IFN- γ 、IL-2 水平降低, IL-4 水平升高 ($P < 0.05$); 安胎汤中、低剂量组 TNF- α 水平降低, IL-6、IL-10 水平升高 ($P < 0.05$); 各给药组大鼠血清雌二醇、 β -HCG 和孕激素水平均升高 ($P < 0.05$)。安胎汤中剂量组血清中雌二醇、 β -HCG 和孕激素水平高于安胎汤低剂量组、地屈孕酮组 ($P < 0.05$)。结论 安胎汤可调节先兆流产大鼠免疫因子, 使 Th1/Th2 值向 Th2 偏移, 提高激素水平, 从而达到保胎的目的。

关键词 先兆流产; 庞氏安胎汤; 保胎; 免疫因子; 性激素; 地屈孕酮

先兆流产属于中医学“胎漏”“胎动不安”等范畴。先兆流产的病因复杂, 与胚胎因素、内分泌异常、免疫功能异常、子宫异常、创伤刺激、不良习惯 (吸烟、酗酒、吗啡等)、环境等多方面因素有关, 其中 60%~70% 原因不明^[1], 原因不明的流产中 50% 与免疫因素有关^[2]。庞氏安胎汤 (简称安胎汤) 为河南省中原庞氏妇科流派全国名老中医庞清治经 60 余年的经验总结而来, 临床效果显著^[3]。本研究通过建立先兆流产大鼠模型, 观察安胎汤对血清中 γ 干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 10 (IL-10) 细胞因子以及对血清中雌二醇、孕激素、 β 人绒毛膜促性腺激素 (β -HCG) 的影响, 以进一步探讨安胎汤保胎的可能作用机制。

基金项目: 河南省中医药科学研究专项 (2015ZY02046); 河南省科技发展计划 (162102310444); 河南省高等学校重点科研项目 (17A360023)

* 通讯作者: 13938427612@126.com

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 70 只, 雄性大鼠 30 只, 周龄 9~10 周, 体重: 雌性 220~280 g, 雄性 250~320 g。购自郑州大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCKK (豫) 2011-00002。饲养环境: 室温 22~26℃, 相对湿度 40%~70%。

1.2 药物

安胎汤由黄芩 10 g、知母 30 g、金银花 30 g、蒲公英 30 g、荷叶 10 g、茯苓 30 g、砂仁 6 g、紫苏梗 15 g、白芍 10 g、山萸肉 30 g、白术 10 g、甘草 4 g 等药物组成, 由河南中医药大学药剂室制备为浓度 6 mg/ml 溶液; 地屈孕酮片, 10 mg/片, 批号: 349816, Abbott Biologicals B. V. 公司; 米非司酮片, 25 mg/片, 批号: 43150909, 华润紫竹药业有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

IFN- γ (批号: X20012628)、TNF- α (批号:

W08018804)、IL-4 (批号: X20012630)、IL-10 (批号: X05018805)、IL-2 (批号: V24012629)、IL-6 (批号: Y05012631)、孕激素 (批号: C0358470133)、雌二醇 (批号: C695847) ELISA 试剂盒, 武汉华美生物工程有限公司; β -HCG ELISA 试剂盒 (批号: 20160410A), 北京冬歌博业生物科技有限公司。

0.5 ~ 10 μ l 移液器 (货号: 3120000224), Eppendorf 公司; W-30ZZHR 型高速冷冻离心机, 安徽嘉文仪器设备有限公司; 20111543 型电子精密天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; Multiskan FC 型酶标仪, 赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司; WD-2103A 型自动洗板机, 北京市六一仪器厂; 96 孔微孔板混匀仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.4 动物筛选及分组

大鼠雌雄分笼常规适应性喂养 1 周后, 用移液器吸取少量生理盐水放入雌鼠阴道内吸取阴道分泌物制作阴道涂片, 在显微镜下观察雌鼠性周期, 根据雌鼠动情周期阴道细胞变化特点, 选择在动情周期内的雌性大鼠。将动情期雌鼠与雄鼠 2 : 1 合笼过夜, 次日早晨 6:00 开始每天在雌鼠阴道涂片观察精子, 发现精子者为孕 1 天。将孕 1 天的雌鼠选出并采用随机数字表法分为正常组、模型组、地屈孕酮组和安胎汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。

1.5 造模及给药方法

安胎汤高、中、低剂量组在孕 1 ~ 12 天期间, 分别按大鼠与成人等效剂量公式换算^[4]之后按成

人临床用量的 4、2、1 倍灌胃安胎汤, 即 89.6、44.8、22.4 g/(kg · d), 每日 1 次。地屈孕酮组按照 3.02 mg/(kg · d) 剂量灌服孕鼠地屈孕酮片溶液, 每日 1 次。孕 12 天, 除正常组外其余各组按照参考文献 [5] 中方法建立先兆流产大鼠模型, 即一次性灌胃米非司酮片溶液 3.75 mg/kg。

1.6 观察指标及方法

血清免疫因子及激素检测: 各组大鼠孕 13 天腹主动脉抽血, 离心, 取血清, 采用酶联免疫法检测其 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、雌二醇、孕激素、 β -HCG 水平, 操作依照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠激素水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清雌二醇、 β -HCG 和孕激素水平均降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠血清雌二醇、 β -HCG 和孕激素水平均升高 ($P < 0.05$)。安胎汤中剂量组血清雌二醇、 β -HCG 和孕激素水平高于安胎汤低剂量组、地屈孕酮组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠血清免疫因子水平比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组血清中 IFN- γ 、

表 1 各组大鼠血清雌二醇、 β -HCG 和孕激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	雌二醇 (pg/ml)	β -HCG (mIU/ml)	孕激素 (ng/ml)
正常组	10	1.21 $\pm$ 0.26	1.99 $\pm$ 0.12	0.147 $\pm$ 0.034
模型组	10	0.63 $\pm$ 0.35*	1.65 $\pm$ 0.19*	0.076 $\pm$ 0.010*
地屈孕酮组	10	0.83 $\pm$ 0.19 Δ Δ	1.77 $\pm$ 0.15 Δ Δ	0.102 $\pm$ 0.016 Δ Δ
安胎汤高剂量组	10	1.03 $\pm$ 0.39 Δ	1.84 $\pm$ 0.07 Δ	0.122 $\pm$ 0.030 Δ
安胎汤中剂量组	10	1.11 $\pm$ 0.15 Δ	1.91 $\pm$ 0.15 Δ	0.138 $\pm$ 0.022 Δ
安胎汤低剂量组	10	0.85 $\pm$ 0.17 Δ Δ	1.78 $\pm$ 0.09 Δ Δ	0.113 $\pm$ 0.035 Δ Δ

注: β -HCG, β 人绒毛膜促性腺激素; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$; 与安胎汤中剂量组比较, Δ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6 及 IL-10 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IFN- γ	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
正常组	10	2.86 $\pm$ 0.78	8.90 $\pm$ 2.58	47.46 $\pm$ 8.58	27.61 $\pm$ 6.05	5.67 $\pm$ 1.00	13.50 $\pm$ 3.37
模型组	10	5.48 $\pm$ 1.56*	19.03 $\pm$ 5.04*	65.85 $\pm$ 11.45*	17.00 $\pm$ 3.45*	4.07 $\pm$ 0.30*	8.05 $\pm$ 2.34*
地屈孕酮组	10	4.38 $\pm$ 1.18 Δ	14.39 $\pm$ 5.07 Δ	56.49 $\pm$ 7.02 Δ	22.38 $\pm$ 4.32 Δ	4.76 $\pm$ 0.64 Δ	10.50 $\pm$ 1.91 Δ
安胎汤高剂量组	10	3.63 $\pm$ 0.93 Δ	13.22 $\pm$ 3.42	54.35 $\pm$ 9.33 Δ	24.85 $\pm$ 4.46 Δ	4.83 $\pm$ 0.56	10.90 $\pm$ 2.36
安胎汤中剂量组	10	2.73 $\pm$ 0.69 Δ	9.40 $\pm$ 2.43 Δ	48.03 $\pm$ 6.05 Δ	28.08 $\pm$ 7.44 Δ	5.60 $\pm$ 1.02 Δ	13.30 $\pm$ 1.75 Δ
安胎汤低剂量组	10	4.37 $\pm$ 1.23 Δ	11.76 $\pm$ 2.90 Δ Δ	55.88 $\pm$ 7.78 Δ	23.01 $\pm$ 5.48 Δ	5.18 $\pm$ 0.62 Δ Δ	11.90 $\pm$ 2.70 Δ Δ

注: IFN- γ , γ 干扰素; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-2, 白细胞介素 2; IL-4, 白细胞介素 4; IL-6, 白细胞介素 6; IL-10, 白细胞介素 10; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$; 与安胎汤中剂量组比较, Δ $P < 0.05$

TNF- α 、IL-2 水平升高, IL-4、IL-6、IL-10 水平降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 安胎汤中、高剂量组 IFN- γ 、IL-2 水平降低, IL-4 水平升高 ($P < 0.05$); 安胎汤中、低剂量组 TNF- α 水平降低, IL-6、IL-10 水平升高 ($P < 0.05$)。地屈孕酮组各指标与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。安胎汤中剂量组各指标与地屈孕酮组、安胎汤低剂量组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

先兆流产是妇产科的常见疾病, 主要发生在妊娠早期, 患者阴道少量出血, 同时伴有腰酸、腹痛、下坠感等临床症状^[1]。中原庞氏妇科流派认为, “热”为妇女妊娠期间发病的基本病因之一, 治疗妊娠病时需对胎前之热尤为重视。妇女妊后阴血下注冲任以养胎, 人体阴血有限, 聚以养胎, 易使机体阴血偏虚、阳气偏旺, 血热内生。同时, 孕后因七情所伤郁而生热, 或因嗜食炙烤辛辣肥甘之物致胃火内生而生胎热等, 使“热”贯穿妊娠病的全过程^[2]。因此, 在保胎治疗中, 针对女性妊娠期间的特殊生理病理特点, 将体质与病症相结合, 创立庞氏安胎汤, 强调孕期有热的患者以清热安胎为治则, 兼以补肾、健脾、理气, 从而纠正妊娠期体内阴阳失衡, 以达到阴平阳秘。方中黄芩为君药, 安胎, 清虚热。臣以知母、金银花、蒲公英、荷叶, 知母滋阴降火; 金银花和蒲公英清热解毒, 可防治呼吸及生殖系统感染, 增强孕期的免疫能力^[3]; 荷叶具有升发、凉血止血功效, 起到凉血止血安胎的作用。佐以紫苏梗、砂仁、白术、茯苓、山萸肉、白芍, 砂仁、紫苏梗理气和胃安胎, 气机调畅则胎安; 白术健脾安胎, 茯苓渗湿利水、健脾、宁心安神, 白术与紫苏梗、砂仁合用可理气祛湿治疗气滞湿郁、痰湿内停等证; 山萸肉、白芍固肾养血柔肝而安胎; 诸药合用既可滋补阴血又不会阻胃碍湿, 理气祛湿而不伤津。甘草既可益气健脾又可调和诸药, 缓急止痛, 故为使药。全方共奏清热养阴、理气安胎的功效。我们临床中以此为基本方, 热重者加大清热药用量, 气滞重者加陈皮、香附等, 中虚甚者加党参、黄芪等, 肾虚较甚加续断、杜仲等, 随证加减, 应用灵活。

妊娠是一个复杂的同种异体移植, 母体常表现为免疫耐受状态, 母胎界面建立免疫平衡, 两者之间平衡, 胎儿才能正常生长直至分娩^[4]。近年研究表明, 机体内免疫及炎症相关细胞因子的异常表

达与先兆流产的发生密切相关, Th1/Th2 型细胞因子之间的平衡对妊娠结局有很大影响^[5]。正常妊娠情况下, 主要表现为一种偏向 Th2 现象, Th1 处于抑制状态, 当向 Th1 型细胞因子过度表达时, 将导致流产发生^[6-12]。Th1 型细胞因子 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等主要参与细胞免疫, Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等主要参与体液免疫^[13]。本研究结果显示, 模型组大鼠血清中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 水平较正常组升高, IL-4、IL-6、IL-10 水平降低, 而中药各剂量组能在不同程度上逆转上述改变, 且以中剂量组效果最好, 说明安胎汤能够调节免疫细胞因子, 使 Th1/Th2 比值向 Th2 偏移。

同时, 正常的妊娠过程需要下丘脑、垂体、卵巢和胎盘所分泌的各种激素, 以及它们之间相互作用来维持, β -HCG、雌二醇、孕酮水平在维持妊娠方面有着重要的作用, 对早孕期预防先兆流产、降低因卵巢及黄体功能不全引起的流产有重要的价值^[14]。正常妊娠期 β -HCG 水平升高可较好地抑制子宫平滑肌的兴奋, 还可降低子宫对宫缩素的敏感性, 起到缓解子宫收缩的作用^[15]。本研究结果显示, 模型组大鼠血清孕酮、雌二醇、 β -HCG 水平均较正常组降低, 而安胎汤各剂量组和地屈孕酮组均能升高孕酮、雌二醇、 β -HCG 水平, 且以中剂量组效果最好, 说明安胎汤能够维持较高激素水平。综上所述, 安胎汤能够降低血清中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 水平, 提高 IL-4、IL-6、IL-10 水平, 使 Th1/Th2 比值向 Th2 偏移, 同时其能够维持妊娠必需激素水平, 从而达到保胎的目的。

参考文献

- [1] 丰有吉, 沈铿, 马丁. 妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 68.
- [2] 蒋晓萍, 叶平. 自身免疫性反复流产的基础与研究进展 [J]. 黑龙江中医药, 2014, 43(2): 96-98.
- [3] 张大伟. 庞清治治疗热证胎漏、胎动不安的经验 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(9): 839-840.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [5] 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.
- [6] XIE YJ, CHEN M, CHEN SJ. Prediction of pregnancy outcomes with combined ultrasound scanning of yolk sacs and serum CA125 determinations in early threatened abortion [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014, 41(2): 186-

- 189.
- [7] 严秀娟, 张大伟. 庞氏妇科清热安胎法述要 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(21): 93-94.
- [8] 丰有吉. 妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 41.
- [9] 曹霞, 王莲莲, 罗娜. 复发性自然流产育龄期妇女母-胎界面中细胞因子表达分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(3): 311-312.
- [10] TYLER C, KAPUR A, FELDER M, et al. The mucin MUC16 (CA125) binds to NK cells and monocytes from peripheral blood of women with healthy pregnancy and preeclampsia [J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 68(1): 28-37.
- [11] 吕兴钰, 蔡霞. 复发性流产患者绒毛和蜕膜组织中 IL-10 及 TNF- α 的表达 [J]. 兵团医学, 2012, 31(1): 23-25.
- [12] LIU F, LUO SP. Effect of Chinese herbal treatment on Th1-and Th2-type cytokines, progesterone and beta-human chorionic gonadotropin in early pregnant women of threatened abortion [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(5): 353-358.
- [13] CHAIWORAPONGSA T, ROMERO R, GOTSCH F, et al. Acute pyelonephritis during pregnancy changes the balance of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma [J]. Matern Fetal Neonatal Med, 2010, 23(2): 167-178.
- [14] 赖有行, 叶青, 黄瑞玉, 等. 动态监测血清 β -HCG、孕酮和雌二醇在预测早期先兆流产预后的临床意义 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(3): 83.
- [15] 夏书琴, 马宏生, 王维琴, 等. 联合检测血清 β -HCG、雌二醇、孕酮及抗心磷脂抗体预测先兆流产妊娠结局 [J]. 中国基层医药, 2015, 22(3): 321-323.

Effects of *Pangshi Antai Decoction* (庞氏安胎汤) on Serum Immune Factors and Hormone Levels in Rats with Threatened Abortion

MA Liya¹, ZHANG Dawei¹, ZHANG Ying¹, PANG Yuqin¹, WANG Lei², ZHAO Junmei², HUO Lei², LI Binling³, DU Yujie²

(1. Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine; 3. Population and Family Planning Science and Technology Research Institute of Henan Province)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Pangshi Antai Decoction* (庞氏安胎汤) in treating threatened abortion. **Methods** A total of 60 first-day pregnant rats were randomly divided into normal group, model group, dydrogesterone group and *Pangshi Antai Decoction* high, middle, and low dose groups, with 10 rats in each group. The high, middle, and low dose groups were given *Pangshi Antai Decoction* 89.6, 44.8, and 22.4 g/(kg·d), respectively, from 1 to 12 days of gestation, and the dydrogesterone group was given dydrogesterone tablet solution 3.02 mg/(kg·d) once a day. On the 12th day of gestation, a rat model of threatened abortion was established by intragastric administration of 3.75 mg/kg of mifepristone tablet solution except for the normal group. Serum levels of interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and serum levels of estradiol, progesterone, and β -human chorionic gonadotropin (β -HCG) were measured on the 13th day of gestation in each group of rats. **Results** Compared with the normal group, the levels of serum IFN- γ , TNF- α , IL-2 increased, IL-4, IL-6, IL-10, estradiol, progesterone, and β -HCG decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of IFN- γ and IL-2 were decreased and the level of IL-4 was increased in the middle and high dose groups of *Pangshi Antai Decoction* ($P < 0.05$); the levels of TNF- α were decreased and the levels of IL-6 and IL-10 were increased in the middle and low dose groups of *Pangshi Antai Decoction* ($P < 0.05$); the levels of serum estradiol, β -HCG and progesterone were increased in each group ($P < 0.05$). The serum levels of estradiol, β -HCG and progesterone in the middle dose of *Pangshi Antai Decoction* were higher than those in the low dose group and dydrogesterone group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Pangshi Antai Decoction* can regulate the immune factors of threatened abortion rats, shift the Th1/Th2 value to Th2, and increase the hormone level, so as to achieve the purpose of preserving the fetus.

Keywords threatened abortion; *Pangshi Antai Decoction*; prevent miscarriages; immune factors; sexul; hormone dydrogesterone

(收稿日期: 2018-05-28; 修回日期: 2018-10-14)

编辑: 邓 媛