

寿胎丸减味方对肾虚自然流产模型小鼠 IL-17 的影响

郝晓丽¹ 王冬盈¹ 郜洁¹ 罗颂平²

【摘要】 目的 探讨寿胎丸减味方对肾虚自然流产(SA)模型小鼠血清白介素 17(IL-17)和蜕膜组织中 IL-17 基因(mRNA)及蛋白表达的影响。方法 CBA/J 小鼠确定妊娠后,用羟基脲建立肾虚-SA 模型,用寿胎丸减味方水提液高、中、低剂量进行治疗,并设立空白组。比较各组小鼠行为差异、流产率、血清 IL-17 和 IL-17 mRNA、蛋白的表达差异。结果 寿胎丸减味方干预下中药组与模型组相比,能够显著改善孕鼠的行为、流产率、血清 IL-17 水平;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)及蛋白印迹法(Western blot)结果显示:寿胎丸减味方能显著降低小鼠蜕膜组织中 IL-17、IL-17 mRNA、蛋白的表达。结论 寿胎丸减味方降低肾虚-SA 小鼠流产率的机制,可能与降低蜕膜组织 IL-17 mRNA、蛋白的表达,以及影响孕鼠血清 IL-17 的这一免疫调节机制有关。

【关键词】 寿胎丸减味方;肾虚;自然流产;蜕膜;IL-17

【中图分类号】R285.5 **【文献标识码】**A

Effect of modified Shoutai Pills on IL-17 in mice model of spontaneous abortion due to kidney deficiency

HAO Xiao-li¹, WANG Dong-ying¹, GAO Jie¹, LUO Song-ping²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510405; 2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou Guangdong 510405)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of modified Shoutai Pills on protein expression of interleukin-17 (IL-17) in serum and decidua tissue in mice model of spontaneous abortion(SA) due to kidney deficiency. **Methods** The kidney deficiency-SA model was established by hydroxyurea after the pregnancy of CBA/J mice. High-dose, medium-dose and low-dose of water extracts of modified Shoutai Pills were applied for treatment. The blank group was set. Behaviors, abortion rate and the expressions of serum IL-17, IL-17 mRNA and protein in all groups were compared. **Results** Compared with the model group, the modified Shoutai Pills group had significant improvement in behaviors, abortion rate, serum IL-17 levels of pregnant mice. RT-qPCR and western blot showed that modified Shoutai Pills can significantly reduce the expressions of IL-17, IL-17 mRNA and protein in decidua tissue of mice. **Conclusion** The possible mechanism of modified Shoutai Pills in reducing kidney deficiency-SD mice abortion rate may be associated with the reduction of the expression of IL-17 mRNA and protein in decidua tissue and the immune regulation mechanism of serum IL-17.

【Keywords】 Modified Shoutai Pills; Kidney deficiency; Spontaneous abortion; Decidua; IL-17

自然流产(SA)是指妊娠未足月,胎儿体重不足 1 kg 而妊娠不能继续进行,在所有妊娠中,本病的发病率约为 10%~15%。在正常妊娠的早期阶段,携带父亲染色体的胚胎种植于母体的子宫中,被认为是半同种异体移植。胚胎之所以得以在母亲宫腔内长期存活^[1],是因为受益于母胎界面-免疫耐受机制的保护,来自蜕膜的免疫细胞及其分泌的免疫

因子,在雌激素和孕酮等因素的影响下,发生一系列的生理变化,从而形成天然的母胎免疫屏障^[2],进而防止母体免疫系统对胎儿的攻击。一旦上述保护机制受损即母胎免疫失衡,则可导致 SA、复发性流产(RSA)、早产(PLT)及先兆子痫等产科并发症及围生儿死亡率较高的胎儿宫内生长受限(FGR)等病理妊娠的发生^[3],对孕母的身心健康造成严重损害。近年在对母胎界面免疫耐受性研究中,Th17 细胞因子被认为是导致母胎界面免疫失衡从而致胚胎丢失的关键因子之一,IL-17 是 Th17 特征性分泌的效应因子,可以介导相应的妊娠组织细胞中出现诱导炎症反应的趋化因子,进而诱发母体对妊娠组织的同种半异体移植物的免疫排斥效

DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.200220

基金项目:国家自然科学基金项目(81373672);2015 年中医药强省专项基金医院中药制剂建设项目(粤中医办函[2015]102 号);中医药防治生殖障碍的协同创新研究(2014KZDXM024)

作者单位:1. 广州中医药大学,广东 广州 510405;2. 广州中医药大学第一附属医院,广东 广州 510405

通信作者:罗颂平,Email: songpingluo@hotmail.com

应。寿胎丸由清代医家张锡纯在《医学衷中参西录》中首次提出,这一方由菟丝子、桑寄生、续断、阿胶四种药物组成,寿胎丸减味方即寿胎丸减去恐滋腻碍胃、生热动火之阿胶而成,全方以补肾安胎为核心方义,充分体现了中医小方治大病之精髓,既往临床及基础研究均证实寿胎丸减味方在治疗 SA 时疗效确切^[4-6],但是,其降低流产率的作用机制尚不清楚。本研究在肾虚-SA 模型的基础上,探究 IL-17 血清、mRNA、蛋白在各组妊娠小鼠间的表达差异,从而进一步探讨寿胎丸减味方可能的安胎机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

48 只 SPF 级雌性 CBA/J 小鼠、21 只雄性 DBA/2 小鼠、4 只雄性 BALB/c 小鼠,以上小鼠的合格证号分别为: SCXK(京) 2014-0004; SCXK(京) 2012-0001; SCXK(粤) 2013-0092; 以上小鼠体重 18~22 g, 8~10 周龄,适应性喂养并检疫 1 周后备用。

1.1.2 药物与试剂

实验所用药品均购自广中医一附院,菟丝子、桑寄生、续断按 4:3:3 的药物配比比例,并高、中、低剂量浓度比为 4:2:1,水提浓缩至 8.2 g/kg(按罗颂平教授临床用药经验:每 60 kg 成人服用菟丝子 20 g,桑寄生 15 g,续断 15 g,换算成小鼠等剂量即为中药中剂量);羟甲基纤维素片混悬液 650 mg/kg(批号:503014Lc),产自齐鲁制药有限公司。IL-17 引物序列: Forward Primer: 5'-AGGCCCTCAGACTACCT-CAACC-3', Reverse Primer: 5'-ATTCATGTGGTG-GTCCAGCTTT-3'。

1.1.3 仪器

R-215 型旋转蒸发仪系统(Swiss BUCHI 公司);3-30K 高速冷冻离心机(Germany Sigma 公司);Thermo Fisher technology 公司: Multiskan FC 多功能酶标仪、Wellwash 全自动洗板机。America Bio-rad 公司: C1000 Thermal cycler 型 PCR 仪、台式高通量 DNA 合成仪;微型蛋白电泳系统(小套蛋白电泳系统)、电转系统、成像系统等。

1.2 方法

1.2.1 动物造模、分组、给药

于雌鼠动情期,雄雌小鼠按数量 1:2 比例进行合笼,次日 8:00 早上检查雌鼠阴栓,有阴栓者确诊为妊娠,并指定为妊娠第 0 天,其中 CBA/J × DBA/2

建立 SA 模型组, CBA/J × BALB/c 建立空白组,每组 8 只孕鼠。妊娠第 1~9 天灌胃:模型组(CBA/J × DBA/2):每日上午灌服超纯水,下午灌服羟甲基脲;自然流产组(CBA/J × DBA/2):每日上下午灌服超纯水;空白组(CBA/J × BALB/c):每日上下午灌服超纯水;中药 3 个剂量组(CBA/J × DBA/2):每日上午灌服寿胎丸减味方药液,下午灌服羟甲基脲。

1.2.2 观察指标

1.2.2.1 一般情况

观察各组妊娠小鼠的毛色的变化,振奋或萎靡,活动次数是否减少,进食、水量是否发生变化、每日灌胃前称重等。

1.2.2.2 流产率

正常胚胎:子宫如串珠样圆球形增大,色鲜红,剖开后见胚胎完好;流产胚胎:子宫外观间断性或连续性暗红色节段,剖开后见瘀血坏死胚胎或胚胎吸收呈点状,或仅见暗红色血凝块。

流产率 = (流产胚胎数 / 总胚胎数) × 100%

1.2.2.3 血清 IL-17 水平检测

实验结束后,小鼠去眼球取血,全血低温离心后取上清后酶联免疫法(ELISA)检测孕鼠血清 IL-17 水平。

1.2.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 法检测蜕膜组织中 IL-17mRNA 表达检测

实验结束后,冰盒上解剖小鼠,小鼠蜕膜组织去除脂肪及多余组织,并储存在 -80℃ 冰箱中备用。TRIZOL Reagent 试剂盒法提取蜕膜组织总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 电泳谱,取 4 μl RNA 做逆转录反应 40 个循环 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(相对定量方法)计算 IL-17mRNA 相对表达量。

1.2.2.5 蛋白印迹法(Western blot) 检测蜕膜组织中 IL-17 蛋白表达检测

提取蜕膜组织总蛋白后,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,蛋白上样与 SDS-PAGE 胶中后分离电泳,转膜(聚偏二氟乙烯),封闭,孵育一抗、二抗,用 ECL 显色试剂盒显色,并在暗室中使用多功能成像仪显影,用 Image J 软件分析结果。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件处理,符合正态分布的数据组间比较采用 One-Way ANOVA,如不符合正态分布,则采用 Rank sum test,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肾虚-自然流产模型小鼠一般情况

肾虚的评价:小鼠蜷缩少动、体毛枯疏、进食、饮水量下降,体重增长缓慢甚则下降,大便稀溏、肛门粘有黏腻稀便;或妊娠期间出现阴道出血、胚胎在阴道口排出,与小鼠肾虚的表现一致,提示肾虚-SA模型建立成功。空白组及中药中、低剂量组的小鼠活动如常,体毛有光泽,进食、进水量与造模前无差异,且体重较实验前增加。

2.2 各组孕鼠流产率分析比较

模型组、自然流产组流产率显著高于空白组 ($P < 0.01$);中药中剂量、低剂量组的流产率显著低于模型组 ($P < 0.01$),二者组间无差异 ($P > 0.05$);中药高剂量组与模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组孕鼠流产率分析比较

组别	n	流产胚胎数	胚胎总数	小鼠流产率(%)
空白组	8	5	85	5.9
模型组	8	14	56	25.0 ^a
自然流产组	8	10	43	23.3 ^a
高剂量组	8	10	50	20.0
中剂量组	8	8	76	10.5 ^b
低剂量组	8	7	66	10.6 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$

2.3 各组孕鼠血清 IL-17 水平比较

模型组、自然流产组 IL-17 值显著高于空白组 ($P < 0.01$);自然流产组、中药高、中、低剂量组中 IL-17 水平显著低于模型组 ($P < 0.01$)。高剂量组与中剂量组、低剂量组,差异具有显著性 ($P < 0.01$);中剂量组与低剂量组相比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组孕鼠血清 IL-17 水平比较 (pg/ml $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17
空白组	8	5.43 ± 0.76
模型组	8	34.20 ± 2.97 ^a
自然流产组	8	20.21 ± 2.02 ^{ab}
高剂量组	8	14.77 ± 1.58 ^b
中剂量组	8	8.01 ± 1.21 ^b
低剂量组	8	9.85 ± 0.54 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$

2.4 各组孕鼠妊娠子宫蜕膜组织中 IL-17 mRNA 的表达结果比较

各组孕鼠妊娠子宫蜕膜组织中 IL-17 mRNA 的表达,模型组显著高于空白组 ($P < 0.01$);自然流产组高于空白组 ($P < 0.05$);中药高、中、低剂量组显著低于模型组 ($P < 0.01$)。高剂量与中剂量、中剂量与低剂量组之组间差异具有显著性 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 各组孕鼠妊娠子宫蜕膜组织中 IL-17 mRNA 的表达结果比较 (pg/ml $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17 mRNA
空白组	8	21.22 ± 0.07
模型组	8	24.67 ± 0.49 ^b
自然流产组	8	22.11 ± 0.73 ^{ac}
高剂量组	8	21.00 ± 0.19 ^c
中剂量组	8	18.89 ± 0.10 ^c
低剂量组	8	20.28 ± 0.31 ^c

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.01$

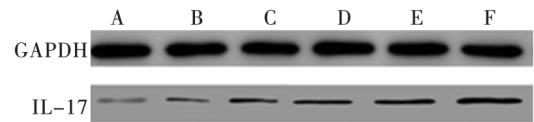
2.5 各组孕鼠蜕膜组织中 IL-17 蛋白表达结果比较

各组孕鼠蜕膜组织中 IL-17 蛋白的表达,模型组、自然流产组显著高于空白组 ($P < 0.01$);自然流产组、中药高、中、低剂量组低于模型组比较 ($P < 0.05$)。高剂量组、低剂量组、中剂量组之组间差异具有显著性 ($P < 0.01$)。结果见表 4、图 1。

表 4 各组孕鼠蜕膜组织中 IL-17 蛋白的表达结果比较 (pg/ml $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17/GAPDH
空白组	8	0.3277 ± 0.0169
模型组	8	0.5823 ± 0.0203 ^a
自然流产组	8	0.4140 ± 0.0402 ^{ab}
高剂量组	8	0.2313 ± 0.0077 ^b
中剂量组	8	0.1006 ± 0.0070 ^b
低剂量组	8	0.1179 ± 0.0090 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$



注:A.中剂量组;B.低剂量组;C.高剂量组;D.空白组;E.自然流产组;F.模型组

图 1 内参蛋白 GAPDH、蛋白 IL-17 显影条带图

3 讨论

中医学并无自然流产之名,肾虚-SA属于胎漏、胎动不安、滑胎范畴,本病主责于肾,因孕母先天肾中精气不足,加之后天房事不节或调摄失当损伤肾气,肾虚致冲任不固,胎元失去固摄之力,故致殒堕,治疗以补肾固胎为大法^[7-8]。本研究立足于肾主生殖理论,选用寿胎丸减味方。马红霞等^[9-11]研究发现菟丝子主要成分总黄酮可降低SD大鼠胚胎丢失率,并能改善流产其妊娠组织的病理结构,且通过调节滋养细胞的增殖与凋亡从而调节母胎界面内分泌、免疫平衡。郜洁等^[12]发现川续断可以激活原代蜕膜细胞上的孕激素受体启动子,通过增加PR表达,诱导子宫内膜蜕膜化从而使受精卵种植于宫腔,从而有助于正常妊娠的维持。张秀敏等^[13]发现桑寄生主治腰膝酸软、胎动不安、崩中漏

下,且具有良好的免疫调节作用。综上所述,寿胎丸减味方全方共奏补肾固精,固摄冲任之功,固肾壮腰以系胎,肾旺自能荫胎。李亚迪^[14]发现寿胎丸减味方通过上调血清雌二醇水平对大鼠 POI 模型具有雌激素样作用。方家等^[15]发现寿胎丸减味方干预后的妊娠小鼠,血清 HCG、孕酮值较模型组上升,并且可以使母胎界面 CCL17、CCL22 蛋白的表达增加,从而从多靶点防治 RSA。

近年来,人们发现 Th17/Treg 免疫系统失衡将会导致一系列病理妊娠的发生,在妊娠早期为 SA、RSA,妊娠中晚期则可能出现 FGR、PLT 及先兆子痫等病理妊娠的发生。Th17 主要分泌白介素 17、21、22 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等趋化因子,参与靶组织中 DC(树突)细胞、多形核嗜中性粒细胞的增殖分化,从而致炎细胞在妊娠组织周围聚集,进而引起组织损伤,诱发免疫排斥反应^[16]。IL-17 受体表达于滋养细胞、蜕膜细胞表面,且前者中的含量较后者高,蜕膜组织中的 IL-17 亚型 IL-17A 含有大量免疫细胞和成纤维细胞,含 IL-17 受体(IL-17R)的细胞成为 IL-17 的靶细胞,当母胎界面免疫调节不平衡时,IL-17 作用于 IL-17R、IL-17AR 引起上述免疫排斥反应成为病理性妊娠的原因^[17-19]。研究发现^[20],先兆流产患者和难免流产患者血清 IL-17 表达增高,且血清 IL-17 与孕妇孕酮水平呈负相关性,推测孕酮可能通过 PR 下调 Th17 细胞的表达,从而抑制 IL-17 的分泌,利于妊娠维持至足月。不明原因复发性流产(URSA)患者血清 IL-17 及蜕膜组织中 IL-17mRN 水平显著高于正常妊娠者($P < 0.05$),肾上腺皮质类激素药物强的松做为免疫抑制剂,抑制炎症因子 Th17,从而减少 IL-17 的分泌,下调 IL-17mRNA 的表达水平,从而达到治疗不明原因 RSA 及反复胚胎移植失败的目的^[21]。且补肾安胎中药的免疫调节功能已在临床上得到了广泛的证实,据此,为了进一步探讨寿胎丸减味方治疗自然流产的作用机制,本实验建立了肾虚-SA 病证结合小鼠模型,考察寿胎丸减味方的安胎效果,结果显示寿胎丸减味方能有效减低模型小鼠流产率,并能降低小鼠 IL-17 在血清、mRNA 及蛋白中的表达,且以中药中剂量组效力最佳,在寿胎丸减味方的作用下,模型组小鼠中的免疫炎症反应的到了抑制,而这种免疫调节作用很可能为寿胎丸减味方的安胎作用机制之一。

参 考 文 献

[1] BABAN B, CHANDLER P R, SHARMA M D, et al. IDO activates

regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J Immunol* 2009, 183(4): 2475-2483.

- [2] 赵宏伟, 田秀珠. 母胎界面与免疫耐受[J]. 山西医科大学学报, 2004(4): 407-410.
- [3] 李雪莲, 秦玲, 杨芬红, 等. 早期自然流产患者外周血中 Tim-3 的表达及与 Th17/Treg 细胞的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018(1): 16-18.
- [4] 冯婷. 寿胎丸减味方补肾安胎有效部位对 RU486 诱导滋养细胞损伤模型的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [5] 刘秀明. 寿胎丸减味方提取工艺及其有效成分的药理学和血清药理学研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [6] 刘新玉, 罗颂平. 减味寿胎丸及其君药菟丝子提取物对人早孕滋养层细胞影响的实验研究[J]. 吉林中医药, 2016(4): 382-385.
- [7] 罗颂平, 谈勇. 中医妇科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 25.
- [8] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 215.
- [9] 马红霞, 尤昭玲, 王若光. 菟丝子总黄酮对大鼠流产模型血清 P-PR、Th1/Th2 细胞因子表达的影响[J]. 中药材, 2008(8): 1201-1204.
- [10] 马红霞, 尤昭玲, 王小云. 菟丝子总黄酮对大鼠流产模型母-胎界面 Fas/FasL、PCNA、HB-EGF 表达的影响[J]. 中药材, 2008(11): 1706-1709.
- [11] 刘华, 韦炳华, 马红霞, 等. 菟丝子黄酮对流产大鼠模型母胎免疫平衡因子的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 7(10): 837-841.
- [12] GAO J, ZHOU C, LI Y, et al. Asperosaponin VI promotes progesterone receptor expression in decidual cells via the notch signaling pathway[J]. *Fitoterapia* 2016(113): 58-63.
- [13] 张秀敏, 刘冉, 许津. 中药桑寄生的抗 I 型变态反应作用[J]. 中国药师, 2005, 8(1): 5-7.
- [14] 李亚迪. 基于大鼠 POI 模型对寿胎丸减味方雌激素样作用的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [15] 方家, 刁军成, 李林. 减味寿胎丸对复发性自然流产(RSA)小鼠蜕膜中树突状细胞(DCs)表达干预研究[J]. 中国民族民间医药, 2016(1): 12-13.
- [16] KIMURA A, KISHIMOTO T. Th17 cells in inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2011, 11(3): 319-322.
- [17] SAIPI B, REZAEI SA, TAJIK N, et al. Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window[J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 29(4): 481-489.
- [18] HOSSEINI S, SHOKRI F, ANSARI POUR S, et al. A shift in the balance of T17 and Treg cells in menstrual blood of women with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *J Reprod Immunol*, 2016(116): 13-22.
- [19] 赵晓英. CSA 对流产模型鼠和先兆流产患 Th17、IL17mRNA 及妊娠结局的调控作用研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [20] 孔艳. ICP 患者血清及胎盘组织中 CD83⁺ DCs、CD1a⁺ DCs、IL-17 及 IL-35 的表达及临床意义[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [21] 吴艳凤. 从 IL-23/IL-17 炎症轴探讨强的松对母胎免疫耐受的分子机制[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.

(收稿日期: 2019-12-02)