

# 补肾健脾法治疗原因不明复发性流产临床研究\*

李爱青 焦榕芳 刘洁 曾怡

(南昌大学第四附属医院 江西南昌 330003)

**摘要:**目的:探讨补肾健脾法对原因不明复发性流产(URSA)外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Tr)的影响。方法:南昌大学第四附属医院 2008 年 1 月~2009 年 12 月就诊的 20 例 URSA 患者,采用双荧光标记流式细胞分析技术,检测补肾健脾治疗前后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞表达频率的变化。结果:补肾健脾中药治疗后,URSA 患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 较治疗前明显增加( $P < 0.05$ ),中药安胎妊娠成功妇女 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 显著高于妊娠失败者。结论:补肾健脾可提高外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 数量,能够提高机体保护性免疫功能,维持机体内环境稳定,为 URSA 的有效治疗方法。

**关键词:**流产;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞;补肾健脾

**Abstract:**Objective:To investigate the influence of nourishing kidney and strengthening spleen on peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr regulatory cells of unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) patient.Methods:20 URSA patients were enrolled in our study from January,2008 to December,2009 in the fourth Affiliated Hospital of NanChang University .The percentage of D4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr in peripheral blood were measured by double-label flow cytometric analysis before and after treatment.Results:After nourishing kidney and strengthening spleen therapy ,the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr increased significantly ( $P < 0.05$ ).The percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr was significantly higher in successful pregnant women than those in pregnant loss after the Traditional Chinese Medicine therapy. Conclusions: Nourishing kidney and strengthening spleen therapy can enhance the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr in peripheral blood,can increase protecting immune function,and maintain the organism inner environment,as to be an effective cure method.

**Key words:**Abortion;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells; nourishing kidney and strengthening spleen

中图分类号:R 714.21

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.03.005

生殖免疫学观点认为,妊娠是一种成功的半同种移植,而流产被设想为半同种移植的失败,妊娠的成功有赖于妊娠妇女对胚胎半同种抗原免疫耐受。近年来很多研究表明 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞在人类体内对诱导和维持免疫耐受起着中枢作用<sup>[1]</sup>。现代中医临床和实验证明中医中药具有调节内分泌免疫等多系统功能,补肾健脾法为传统的安胎治法,临床证明切实有效。本研究观察补肾健脾对 URSA 患者治疗前后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 表达频率的变化,探讨补肾健脾中药在安胎治疗中发挥的免疫调节作用,为补肾健脾法安胎治疗提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** URSA 患者 20 例,2008 年 1 月~2009 年 12 月就诊于南昌大学第四附属医院,年龄(28.3±3.59)岁,中医辨证为脾肾两虚型。入选标准:(1)流产次数 2 次或 2 次以上。(2)夫妇双方和(或)胚胎染色体正常,无家族遗传病史。(3)妇科检查、超声检查和(或)子宫输卵管造影等检查排除器质性病变和生殖器官解剖畸形。(4)月经周期正常,基础体温双相,超声监测排卵正常。(5)男方精液分析正常。(6)性激素、甲状腺功能、空腹血糖、胰岛素等内分泌检查均正常。(7)排除生殖道感染性疾病,如假丝酵母菌、支原体、衣原体等感染。(8)自身抗体包括:抗核抗体(ANA)、抗可提取核抗原(ENA)抗体、抗心磷脂抗体(ACL)。(9)与血凝有关的检查:包括血小板聚集实验(PagT)、D-二聚体、血小板颗粒膜蛋白-140(GMP-140)、血凝系列、全血分析均正常。(10)巨细胞病毒、弓形虫等病原体检查为阴性。

(11) 全身免疫功能状态检查,包括 IgG、IgM、IgA、C3、C4、CH50、B 因子均正常。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 服药及采血时间** 孕前 2 个月开始服用补肾健脾中药(补肾固冲丸为基础方随证加减),月经周期第 5 天开始服药,20d 为 1 个疗程,第 3 个月鼓励患者自然受孕,受孕后连续服药至孕 3 个月,B 超显示有胎心胎动,随访至妊娠结束。服中药前及孕 2 个月时分别抽取患者外周血 1mL 进行流式细胞检测,治疗过程中失败者流产时抽血检测。

**1.2.2 流式细胞检测方法** 抽取外周静脉血 1mL 48h 内检测,取肝素抗凝血 50μL 加入 CD4-PE(BD PharMingen,USA) 及 CD25-FITC (BD PharMingen, USA) 各 5μL,混匀,室温下避光 15min;加入 1mL 红细胞裂解液,混匀,室温下避光 10min;以 1 000r/min 离心 5min,弃上清,悬浮细胞,PBS 液 1mL 洗涤;以 1 000r/min 离心 5min,弃上清,悬浮细胞,上机检测。

**1.3 统计学分析** 应用 SPSS11.5 软件,数据以( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用配对  $t$  检验进行统计学分析。

## 2 结果

补肾健脾安胎后 URSA 外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 表达频率较治疗前明显升高,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),CD25<sup>+</sup> mean 即 CD25<sup>+</sup> 平均荧光强度差异无显著性( $P > 0.05$ ),CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 较治疗前升高( $P < 0.05$ )。URSA 患者中药治疗后,其中 10 例保胎成功,5 例患者妊娠后再次流产,成功妊娠者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞表达频率显著高于

\* 江西省卫生厅中医药科研基金(编号:2008L0046)

妊娠失败者 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 20 例 URSA 患者中药治疗前后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 表达频率的比较 ( $\bar{X} \pm S$ )

|           | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (%) | CD25 <sup>+</sup> mean    | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> |
|-----------|--|---------------------------|--|
| 治疗前(n=20) | 7.32± 1.57                             | 21.36± 3.67               | 3.96± 1.46   |
| 治疗后(n=20) | 11.23± 3.58*                           | 23.12± 3.252 <sup>a</sup> | 5.69± 1.67*  |

注:治疗前后比较,\* $P < 0.05$ ,<sup>a</sup> $P > 0.05$ 。

### 3 讨论

随着生殖免疫学科的兴起,发展,中西医结合学者对流产的免疫学病因病理、诊断及治疗进行较为系统研究。复发性流产中医学属“滑胎”范畴,流产主要源于肾不载胎,脾失摄养,对流产的治疗除注重补肾外还必健脾益气,使脾与肾、先天与后天相互促进以固胎元。生殖免疫学角度的研究发现,补肾益气安胎中药可能通过双相调节 Th 细胞因子的平衡,来调控母胎界面免疫内分泌网络以维持妊娠<sup>[2]</sup>,补肾健脾药可以增强母胎保护性免疫功能,降低母胎损伤性免疫功能,调节内分泌,对妊娠细胞因子有着重要影响<sup>[3,4]</sup>。本研究着重从补肾健脾法入手,采用补肾固冲丸为基础方补肾健脾调冲任以安胎,方中菟丝子、续断、巴戟天、杜仲、鹿角霜补肾固冲;当归、熟地、枸杞、阿胶养肝滋血;党参、白术、大枣补脾益气;砂仁理气调冲;全方肾脾肝气血同治,使肾气壮实,胎有所系,气血充足,胎有所养,先天与后天相互支持,相互促进以益冲任之本。

近代生理免疫学研究发现,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞是机体以主动方式获得和维持自身免疫耐受的一种重要方式,Tr 细胞可通过抑制自身反应性 T 细胞的免疫反应,抑制传统 T 细胞的活动以及促进一些抑制性细胞因子,在维持机体内环境的稳定、诱导移植物的耐受中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。有研究报道,URSA 和正常早孕妇女孕早期外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>Tr 均显著高于正常未孕妇女,URSA 患者外周血和蜕膜 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>Tr 均显著低于正常早孕妇女,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>Tr 参与了正常妊娠的维持,有可能是调控母胎界面局部免疫耐受形成的一

(上接第 7 页)节新陈代谢等生化过程发挥药疗作用,使关节周围的血管扩张,血液循环和代谢增强,促进关节液分泌,营养关节,血液循环加快,加强关节内瘀血吸收,减轻关节水肿。牛俐等<sup>[2]</sup>采用中药舒筋汤熏蒸治疗 46 例患者,10d 为 1 个疗程,结果优 28 例,良 16 例,差 2 例,优良率 95.7%。宋鹤龄<sup>[3]</sup>运用中药熏洗方治疗骨折后期关节僵硬患者 163 例,结果优 112 例,良 45 例,差 6 例,优良率 96%。

本法运用中医理论“结者散之,寒者温之”的原则,以独活辛散,善祛潜伏骨节之邪,路路通、威灵仙善祛风湿,通经络,止痹痛为君药;配以千年健、刘寄奴、透骨草、宽筋藤活血通络,活络止痛;佐以

个重要因素<sup>[6]</sup>。人类调节性 T 细胞仅存在于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> 亚群,而 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>dim</sup>T 细胞亚群主要是正常活化的 T 细胞<sup>[7,8]</sup>。本研究辨证采用补肾健脾法治疗脾肾两虚型 URSA 患者,通过检测治疗前后及不同妊娠结局外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞的变化,发现补肾健脾中药安胎后,URSA 患者血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 数量较治疗前明显升高 ( $P < 0.05$ ),且妊娠成功妇女 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 显著高于妊娠失败者 ( $P < 0.05$ ),CD25<sup>+</sup> 平均荧光强度无明显变化,提示补肾健脾中药可能提高了外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>Tr 细胞数量,降低了 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>dim</sup>Tr 细胞数量,参与了母胎免疫调控,增强母体保护性免疫,有利于维持内环境的稳定,从而维持了妊娠。

目前,对 URSA 的研究表明,该病与母胎外周系统免疫及母胎界面局部免疫密切相关,本研究仅从外周血中 Tr 细胞角度探讨补肾健脾治法对机体的免疫调节作用,对是否参与其他免疫环节的调控尚有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1]Baecher-Allan C,Viglietta V,Hafner DA.Human regulatory T cells[J].Semin Immunol,2004,16(2):89-98
- [2]归绥琪,许钧,俞而慨,等.中药治疗自然流产对封闭抗体、β-HCG、孕酮、雌二醇的影响 [J].中国中西医结合杂志,1997,17(11):645-648
- [3]钟秀会,周占祥.黄芩白术对 IPS 诱导流产小鼠的保胎作用及子宫内膜 TNF-α 含量的影响[J].畜牧兽医学报,2000,31(5):430
- [4]蒋立辉,归绥琪.中药对溴隐亭流产大鼠保胎机理的实验研究[J].中国免疫学杂志,2002,18(10):704-706
- [5]Paust S,Cantor H.Regulatory T cells and autoimmune disease [J].Immunol Rev,2005,204:195-207
- [6]邱丽华,林其德.调节性 T 淋巴细胞与原因不明复发性流产相关性研究[J].中华妇产科杂志,2004,39(12):816-820
- [7]Baeche-Allan C, Brown JA,Freeman GJ,et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> high regulatory cells in human peripheral blood [J].J Immunol,2001,167(3):1245-1253
- [8]Saito S,Sasaki Y,Sasaki M.CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in human pregnancy[J].J Report Immunol,2005,65(2):111-120

(收稿日期:2010-01-25)

苏木、荆芥、防风祛风除湿:诸药合用,通过对僵硬肿胀关节熏蒸,疏通腠理,使玄府洞开,药力经毛窍而入,直达病变部位,起到疏通气血、活血化瘀、祛风寒湿邪的功能。中药熏蒸通过热、药双重作用,丰富的热能加对症药物持续作用于人体,出现一系列物理药理效应。再配合手法松解,通过手法对僵硬关节的部位进行按摩可缓解粘连,松弛挛缩肌肉筋脉,有利关节功能恢复,从而达到良好的治疗效果。

#### 参考文献

- [1]陆继娣,沈鹰.熏蒸疗法的历史沿革[J].中医杂志,2006,47(7):556
- [2]牛俐,卢勇.舒筋汤熏洗治疗骨折后并发关节僵硬 46 例[J].中国民间疗法,2006,14(3):25
- [3]宋鹤龄.中药熏洗治疗骨折后期关节僵硬 163 例 [J].陕西中医,2006,26(9):1085

(收稿日期:2009-11-03)