

益肾安宫方治疗复发性自然流产临床观察 及对外周血 Th17 和 Treg 的影响

张伟, 王晨晔, 丁彩飞, 孙忻

杭州市红十字会医院, 浙江 杭州 310003

[摘要] 目的: 观察益肾安宫方治疗复发性自然流产 (RSA) 的临床疗效及对患者外周血辅助性 T 细胞 17 (Th17) 和调节性 T 细胞 (Treg) 的影响, 进一步阐明益肾安宫方治疗 RSA 的机制。方法: 将 RSA 患者 60 例随机分为治疗组与对照组, 每组各 30 例。对照组根据血孕酮水平给予黄体酮针肌肉注射; 治疗组在对照组治疗的基础上, 辨证选用益肾安宫 I 号方、益肾安宫 II 号方内服治疗。另选正常早孕期女性 30 例为空白对照组。观察患者临床疗效, 采用流式细胞仪测定各样本中 Th17 和 Treg 细胞比例。结果: 总有效率治疗组为 93.33%, 对照组为 73.33%, 2 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗前, 治疗组及对照组患者外周血 Th17 较空白对照组升高 ($P < 0.05$), Treg 值降低 ($P < 0.05$); 而治疗组与对照组 Th17、Treg 值组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后, 治疗组患者外周血 Th17 值降低、Treg 值升高, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后, 对照组 Th17、Treg 值与治疗前比较改善不大 ($P > 0.05$); 而与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 益肾安宫方有助于降低 RSA 患者外周血 Th17 细胞比例, 升高 RSA 患者外周血 Treg 细胞比例, 维持免疫耐受状态, 有利于妊娠结局。

[关键词] 复发性自然流产; 中西医结合疗法; 益肾安宫方; Th17 细胞; Treg 细胞

[中图分类号] R714.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 04-0200-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.04.061

Clinical Observation of Yishen Angong Prescription for Recurrent Spontaneous Abortion and Its Effect on Th17 and Treg in Peripheral Blood

ZHANG Wei, WANG Chenye, DING Caifei, SUN Xin

Abstract: **Objective:** To observe the clinical effect of Yishen Angong prescription for recurrent spontaneous abortion(RSA) and its effect on T helper 17 cells(Th17) and regulatory T cells(Treg) in peripheral blood of patients and further explain the mechanism of Yishen Angong prescription for RSA. **Methods:** A total of 60 cases of patients with RSA were randomly divided into the treatment group and the control group, 30 cases in each group. The control group was given intramuscular injection of progesterone according to the level of blood progesterone, and the treatment group was additionally given the Yishen Angong prescription I and the Yishen Angong prescription II orally according to syndrome differentiation based on the treatment of the control group. Another 30 cases of normal women with early pregnancy were selected as the blank-control group. The clinical effect of the two groups was observed, and the proportions of Th17 and Treg in each sample were measured by flow cytometry. **Results:** The total effective rate was 93.33% in the treatment group and 73.33% in the control group, the difference being significant($P < 0.05$). Before treatment, the number of Th17 in peripheral blood of patients in the treatment group and the control group was increased when compared with that in the blank-control group($P < 0.05$), and the number of Treg was decreased($P < 0.05$). There was no significant difference being found in the comparisons of the number of Th17 and Treg between the treatment group and the control group($P > 0.05$). After treatment, the number of Th17 in peripheral blood was decreased and the number of Treg was increased in the treatment group; when compared with those in the control group, the difference was significant($P < 0.05$), and when compared with those in the blank-control group, there was no significance in the difference($P > 0.05$). After treatment, the number of Th17 and Treg in the control group was not

[收稿日期] 2018-04-10

[基金项目] 2015年杭州市科学技术引导项目(2015YD24)

[作者简介] 张伟(1984-),女,主治医师,研究方向:中医妇科学。

[通信作者] 丁彩飞, E-mail: Dingcaifei@163.com。

significantly improved when compared with that before treatment respectively ($P > 0.05$), and when compared with that in the blank control group respectively, the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The adoption of Yishen Angong prescription is beneficial to decreasing the proportion of Th17 and increasing the proportion of Treg in peripheral blood of patients with RSA, and maintain the immune tolerance, which is contributed to pregnancy outcomes.

Keywords: Recurrent spontaneous abortion; Integrated Chinese and western medicine therapy; Yishen Angong prescription; T helper 17 cells; Regulatory T cells

复发性自然流产(RSA)指与同一性伴侣连续出现2次或超过2次的自然流产,是一种常见的妊娠并发症,在育龄妇女中的发病率约为1%~3%^[1]。复发性自然流产是造成育龄女性无法成功生育的其中一项关键因素。此病成因众多且复杂,同时在临床表现上不具备特异性。现今已证实的病因有以下几大类:遗传因素、母体的全身性疾病、感染因素、环境因素、解剖因素、易栓症、免疫因素、内分泌因素等。除此之外临床上仍有50%~60%的复发性自然流产找不到明确的病因,称为原因不明复发性流产(URSA)。近期研究证实,免疫因素,尤其是影响免疫调节的细胞因子与调节细胞对于RSA发病机制表现出关键性影响^[2-4]。近几年证实,辅助性T细胞17(Th17)以及调节性T细胞(Treg)这两类淋巴细胞同免疫调节存在显著关联,绝大多数研究者的观点是,这两类淋巴细胞的免疫调节存在相互抑制效应,同时,双向间的平衡对诸多疾病进展存在影响^[5-6]。上述两类细胞与相关的细胞因子构成一个网络,对机体免疫应答施以调控,在维持健康妊娠过程中发挥重要作用,已成为当前研究的一个热点。笔者临床中以益肾安宫方治疗RSA患者,取得满意临床疗效。本研究通过临床对照研究,观察益肾安宫方对RSA患者外周血Th17和Treg细胞比例的影响,进一步阐明益肾安宫方治疗RSA的机制,结果报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 选择2016年7月—2017年12月于本院生殖医学科就诊的RSA患者(妊娠12周内,有RSA病史)共60例,签署知情同意后,随机分为治疗组与对照组,每组各30例。治疗组年龄25~45岁,平均(31.60±5.06)岁;孕周5~10周,平均孕周(6.18±1.46)周;其中自然流产2次者20例,3次以上者10例。对照组年龄24~45岁,平均(31.83±5.56)岁;孕周5~10周,平均孕周(6.77±1.47)周;其中自然流产2次者20例,3次以上者10例。2组年龄、孕周、自然流产次数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。另选择同期于本院生殖医学科就诊的正常早孕女性(妊娠12周内,无自然流产病史)30例作为空白对照组:年龄23~41岁,平均年龄(29.87±3.93)岁;孕周5~11周,平均孕周(7.29±1.52)周。

1.2 诊断标准 西医诊断参照《妇产科学》^[7]中相关标准:连续2次或2次以上在妊娠20周之前自然流产,每次发生流产的时间在或不在同一妊娠月份。中医诊断参照《中医妇科学》^[8]《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[9]中相关标准:屡孕屡堕

连续2次或2次以上;且辨证分属以下证型:①肾虚血热型:屡孕屡堕连续2次或2次以上,心烦多梦,烦躁不宁,口干咽燥,两颧潮红,潮热盗汗,或形体消瘦,舌质红,少苔或无苔,脉细滑数。②脾肾两虚型:屡孕屡堕连续2次或2次以上,精神萎靡,头晕耳鸣,腰膝酸软,夜尿频数,眼眶暗黑或有暗斑,伴气短,神疲乏力,纳食少,便溏,呕吐,面色萎黄或白,肌肤不润,舌质淡嫩苔薄白,脉沉细滑,尺脉弱。

1.3 纳入标准 ①孕周<12周;②既往2次或2次以上自然流产病史;③育龄期妇女;④血凝分析检测正常;⑤激素水平经内分泌检测显示正常;⑥检测夫妇双方染色体显示正常。

1.4 排除标准 ①女方存在生殖道畸形问题;②近段时间患慢性或急性感染性疾病;③身患免疫系统疾病;④男方精液异常;⑤存在糖皮质激素与其他免疫抑制剂近期服用史;⑥合并造血系统、心、肾与肝重度疾病,精神病人;⑦没有按规定服药,资料缺失或不能判断疗效病人。

2 治疗方法

2.1 对照组 根据患者血孕酮水平给予黄体酮针(浙江仙琚制药股份有限公司,国药准字H33020828)20~40mg肌肉注射,每天1次。7天为1疗程,连续使用至孕12周。

2.2 治疗组 在对照组治疗的基础上加用中医辨证施治。肾虚血热型:选择益肾安宫I号方(即保阴煎加减)治疗,处方:旱莲草、阿胶珠(烊兑)各12g,桑寄生、生地黄、黄芩、熟地黄、炒续断、炒白芍、山药各15g,甘草5g。脾肾两虚型选用益肾安宫II号方(即寿胎丸合四君子汤加减)治疗,处方:炒白术、茯苓、阿胶珠(烊兑)各12g,炒党参、炒续断、桑寄生、杜仲、炒白芍、熟地黄各15g,菟丝子30g,甘草5g。水煎服,每天1剂,分早、晚2次服用,7天为1疗程,连续服用至孕12周。

3 观察项目与统计学方法

3.1 观察项目 分别于治疗前、治疗后(孕12周时)对治疗组及对照组抽取静脉血,空白对照组于首次就诊时抽取静脉血。所有观察对象均在清晨空腹状态下,采集3mL静脉血放置在肝素钠抗凝管内,借助Ficoll淋巴细胞分离液将外周血单个核淋巴细胞(PBMC)分离。借助流式细胞仪对各样本内所含Th17与Treg比例进行分别测定,具体操作方法按照试剂盒说明规范进行。治疗结束后对治疗组及对照组进行疗效统计。

3.2 统计学方法 采用SPSS17.0软件进行分析。计量资料以

($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 t 检验; 计数资料以%表示, 采用 χ^2 检验。检验水准为 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

4 疗效标准与治疗结果

4.1 疗效标准 参照《妇产科学》^[7]以及《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[8]相关内容拟定。治愈: 妊娠在 20 周以上, 孕 20 周时 B 超检测确认胎儿发育正常, 同孕周保持一致; 伴随体征与临床表现明显改善或消失; 好转: 妊娠超过以往流产最长孕周, 但低于 20 周, 于以往流产孕周进行 B 超检测确认胚胎(胎儿)发育正常, 同孕周保持一致; 伴随体征与临床表现出现一定程度的缓解; 未愈: 妊娠未超过以往流产最长孕周时即出现流产, 伴随体征与临床表现未缓解, 或更为严重; B 超检测确认子宫大小同孕周相比较小, 或两者大致相符; 胚胎未正常发育, 或发育停止。

4.2 2 组临床疗效比较 见表 1。总有效率治疗组为 93.33%, 对照组为 73.33%, 2 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 2 组临床疗效比较

组别	n	治愈	好转	未愈	总有效率(%)
治疗组	30	22	6	2	93.33 ^①
对照组	30	15	7	8	73.33

与对照组比较, ① $P < 0.05$

4.3 3 组外周血 Th17、Treg 细胞比较 见表 2。治疗前, 治疗组、对照组患者外周血 Th17 较空白对照组升高($P < 0.05$), Treg 值降低($P < 0.05$); 而治疗组与对照组 Th17、Treg 值组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后, 治疗组患者外周血 Th17 值降低、Treg 值升高, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而与空白对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后, 对照组 Th17、Treg 值与治疗前比较改善不大($P > 0.05$); 与空白对照组比较, 差异仍有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组外周血细胞 Th17 与 Treg 细胞百分率比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	时间	Th17	Treg
治疗组	30	治疗前	2.31 ± 0.35 ^①	4.14 ± 0.29 ^①
		治疗后	1.62 ± 0.53 ^{②③}	4.45 ± 0.25 ^{②③}
对照组	30	治疗前	2.14 ± 0.49 ^①	4.15 ± 0.21 ^①
		治疗后	2.19 ± 0.52 ^①	4.23 ± 0.21 ^①
空白对照组	30	-	1.44 ± 0.37	4.53 ± 0.22

与空白对照组比较, ① $P < 0.05$; 与本组治疗前比较, ② $P < 0.05$; 与对照组治疗后比较, ③ $P < 0.05$

5 讨论

RSA 属于一类发生率较高的妊娠并发症, 其界定为连续出现 2 次或超过 2 次的自然流产。在女性生育率下降与生育年龄延后影响下, 研究主流开始逐渐聚焦为 RSA 病人的发病、诊断与治疗。RSA 的发病原因较为多样化, 由多种机制引发,

涉及解剖因素、免疫学因素、内分泌紊乱、生殖系统感染、染色体功能和结构异常等, 现今 50%左右的 RSA 未充分探明原因, 大部分致因可能为母胎丧失了正常的免疫调节功能。近些年来, 证实 RSA 的发生同免疫因素存在显著关联。现代生殖免疫学认为, 可基本将妊娠视为半同种异体移植行为^[9], 胚胎刚开始孕育时, 最早且直接接触母体的通常为蜕膜与绒毛膜组织, 由此构成的母-胎界面为母体和胎儿双方复杂对话提供了渠道, 同时会生成母-胎界面上独特的免疫耐受表现, 产生了早期妊娠排斥同耐受两者的互相平衡, 方可保证胎儿正常发育直至分娩^[10]。但是若上述平衡丧失, 会导致流产。研究证实, Treg 与 Th17 这两类细胞都源自 CD4⁺T 细胞亚群, 它们在分化环节存在很多交集, 但是在功能上却相互拮抗。Th17 细胞与 Treg 细胞两者的互相作用为现今研究的核心, 通过研究众多疾病模型, 均发现这两类细胞之间具备互相抑制表现^[12-13]。同时, 此类互相抑制在很大程度上有助于妊娠的维持^[14]。Th17 细胞主要通过分泌 IL-17 这一促炎细胞因子而对炎性反应施以主要的介导作用, IL-17 能够结合在靶细胞表面分布的 IL-17 受体(IL-17R), 发挥富集与动员中性粒细胞与促炎功能, 能够对病变组织的炎症反应施以有效介导^[15]。在机体防御诸多病原体(包括病毒、真菌与细菌等)感染方面, Th17 细胞具备积极作用, 且对诸多自身免疫性疾病(包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎症性肠炎、多发性硬化等)与急性排斥反应的产生进行方面发挥关键性影响。故而, 可能受到此类促炎作用的影响, Th17 细胞会影响胚胎免疫排斥的形成。与此相反, 以 CD4⁺CD25⁺Treg 为主的 Treg 细胞属于 T 细胞亚群, 其可对免疫耐受施以诱导, 且具备独特免疫调节作用。有研究人员发现, 在妊娠免疫耐受的产生方面, CD4⁺CD25⁺Treg 起着非常关键性的影响, Treg 失调会对妊娠结局产生直接影响^[16]。最近通过研究复发性自然流产病人的蜕膜组织与外周血液发现, 在这两个系统内 Treg 细胞数量出现较大幅度降低, 同时在免疫抑制活性方面, 相比健康妊娠女性也显著较低^[17-18]。本研究结果也证实: 治疗前, RSA 治疗组与 RSA 对照组外周血中 Th17 细胞比例均高于空白对照组, 提示 RSA 患者外周血中 Th17 细胞比例高于健康孕妇; RSA 治疗组与 RSA 对照组外周血中 Treg 细胞比例均低于空白对照组, 提示 RSA 患者外周血中 Treg 细胞比例低于健康孕妇。

中医学将 RSA 归为滑胎范畴, 又名屡孕屡堕、数堕胎等。导致滑胎的机理主要为母体冲任损伤, 胎元不健。胎儿在母体内存在, 需要完全凭借母体肾、气、血、冲任来供养与维系。如果母体肾气、气血、充任均正常且良好, 那么母安胎固; 反之则导致滑胎。导致胎元不健的原因通常为父母先天缺乏充足精气, 虽然两精能够结合, 但是由于先天禀赋缺乏, 导致胚胎受损, 甚至无法成形。或虽成形但损伤几率极高, 因此引发复发性自然流产。本病病性以虚为主, 或为虚实夹杂之证。对滑胎者, 治疗当“预培其损”, 孕前宜以补肾健脾, 益气养血,

调理冲任为主；孕后即应积极进行保胎治疗。在本课题组之前的研究中已经证实，益肾安宫方可在极大程度上增强血清抑制素 A 水平，使血清 CA125 水平下降，同时有助于血清 β -HCG、P 与 E_2 水平升高，使保胎有效率提升。推测益肾安宫方通过调节患者内分泌功能，可使胎盘功能得到改善，降低蜕膜细胞破坏，抑制滋养层细胞同蜕膜分离，给胚胎的顺利生长提供良好的内环境，使妊娠得以继续^①。笔者以益肾安宫方治疗复发性自然流产患者，亦取得满意的临床疗效。本研究结果表明，益肾安宫方能够提高 RSA 病人保胎有效率。益肾安宫 I 号方化裁于中医经典名方保阴煎，益肾安宫 II 号方化裁于寿胎丸合四君子汤。I 号方内桑寄生、炒续断有补肾固冲之效，阿胶珠、熟地黄有补血养阴之效，黄芩清热安胎，旱莲草滋补肝肾，生地黄清热凉血，山药健脾养胃，白芍养血敛阴，甘草调和诸药。全方共奏清热凉血、益肾养阴、固冲安胎之功。II 号方内杜仲、菟丝子、桑寄生、炒续断益精补肾，茯苓、炒白术、炒党参益气健脾，阿胶珠、熟地养阴补血，炒白芍养血敛阴，甘草调和诸药。全方共奏益气养血、补肾健脾、固冲安胎之功。本次研究发现，联合使用益肾安宫方治疗后，RSA 患者外周血 Th17 细胞比例下降至接近健康孕妇水平，其降低 RSA 患者外周血 Th17 细胞比例的效果优于单纯使用黄体酮针。与此相反，联合使用益肾安宫方治疗后，RSA 患者外周血 Treg 细胞比例上升至接近健康孕妇水平，其升高 RSA 患者外周血 Treg 细胞比例的效果优于单纯使用黄体酮针。

综上所述，益肾安宫方有助于降低 RSA 患者外周血 Th17 细胞比例，同时促进病人外周血 Treg 细胞比例上升，进而发挥维持妊娠所需免疫耐受状态作用，对妊娠结局起到积极影响，具有较好的临床推广应用价值。

[参考文献]

- [1] Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2005, 17(6): 591-597.
- [2] Choi YK, Kwak-Kim J. Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 60(2): 91-110.
- [3] Raghupathy R, Kalinka J. Cytokine imbalance in pregnancy-complications and its modulation[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 985-994.
- [4] 田晶, 王峰, 薛金凤, 等. 2 型腺相关病毒载体介导正常人 β 珠蛋白基因在重型地中海贫血造血细胞中的表达[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(11): 2028-2033.
- [5] Yang J, Yang X, Zou H, et al. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2011, 50(8): 1366-1372.
- [6] Ruan Q, CHEN YH. Nuclear factor-kappaB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 946: 207-221.
- [7] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 83-85.
- [8] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 219-223.
- [9] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 254-256.
- [10] Leber A, Zenclussen ML, Teles A, et al. Pregnancy: tolerance and suppression of immuneresponses[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 19(7): 397-417.
- [11] 李大金. 重视协同刺激分子在母胎免疫耐受中的调控作用[J]. *国际妇产科学杂志*, 2009, 36(1): 1-3.
- [12] Hanidziar D, Koulmanda M. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in-transplant rejection and tolerance[J]. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 2010, 15(4): 411-415.
- [13] Heo YJ, Joo YB, Oh HJ, et al. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4⁺Tcell population of rheumatoid arthritis patients [J]. *Immunology Letters*, 2010, 127(2): 150-156.
- [14] Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2010, 63(6): 601-610.
- [15] 杨默. 反复自然流产的免疫相关因素分析[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(26): 4147-4149.
- [16] Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, et al. The dynamic evolution of memory and regulatory CD4⁺T cells in the periphery[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(3): 231-237.
- [17] Arruvito L, Sanz M, Banham AH, et al. Expansion of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction [J]. *J Immunol*, 2007, 178(4): 2572-2578.
- [18] Liu YS, Wu L, Tong XH, et al. Study on the relationship between Th17 cells and explained recurrent spontaneous abortion[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2011, 65(5): 503-511.
- [19] 张伟, 丁彩飞. 益肾安宫方对先兆流产患者血清抑制素 A、CA125、 β -HCG、P、 E_2 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(4): 958-963.

(责任编辑: 冯天保)