

# 活血化瘀法对慢性盆腔炎大鼠免疫调节的实验研究\*

张海琴<sup>1\*\*</sup>, 刘瑞芬<sup>2</sup>

(1. 济南护理职业学院临床专业科 济南 250000; 2. 山东中医药大学附属医院 济南 250014)

**摘要:**目的 探讨活血化瘀方剂对慢性盆腔炎(CPID)模型大鼠 T 细胞亚群和红细胞免疫功能的影响。方法 75 只 Wistar 大鼠,用混合菌加机械损伤造模法建立 CPID 大鼠模型。将大鼠分为正常组、假手术组、模型组、桂枝茯苓胶囊组、少腹逐瘀胶囊对照组、金刚藤胶囊对照组、桂枝茯苓胶囊对照组、少腹逐瘀胶囊组、金刚藤胶囊对照组分别给予相应药物灌胃。检测各组大鼠脾脏 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞以及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg)数量百分比、血红细胞 C3b 受体花环率(RBC-C3bRR)及红细胞免疫复合物花环率(RBC-ICR)。结果 各组药物均能提高模型鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 细胞数量百分比及 CD4/CD8 T 细胞比值( $P<0.05$ ),均能降低 CD8<sup>+</sup> T 细胞数量百分比( $P<0.05$ )。桂枝茯苓胶囊能明显降低模型大鼠异常升高的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 数量百分比( $P<0.05$ )。桂枝茯苓胶囊及少腹逐瘀胶囊使模型大鼠 RBC-C3bRR 升高( $P<0.05$ ),RBC-ICR 降低( $P<0.05$ )。结论 活血化瘀方通过调控 T 细胞亚群和红细胞的免疫功能,达到治疗 CPID 的目的。

**关键词:** 活血化瘀法 慢性盆腔炎 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞 红细胞免疫

doi: 10.11842/wst.2013.09.032 中图分类号:R711.33 文献标识码:A

慢性盆腔炎(Chronic Pelvic Inflammatory Disease, CPID)病程长、病情缠绵、复发率高,是妇科常见、多发病。西医学运用抗生素治疗 CPID 效果不理想,而临床应用中医中药治疗该病对不孕、慢性盆腔疼痛等慢性病变有确切的疗效和明显的优势<sup>[1]</sup>。本课题用活血化瘀法为主的桂枝茯苓胶囊对慢性盆腔炎模型大鼠进行实验研究,同时用少腹逐瘀胶囊和金刚藤胶囊做对照,旨在探讨活血化瘀法治疗 CPID 的免疫调节机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

75 只 SPF 级未孕成年 Wistar 雌性大鼠,体质量

(200±20)g;桂枝茯苓胶囊,组成:桂枝、茯苓、桃仁、白芍、牡丹皮,规格 0.31 g/粒,成人一日 9 粒,配制浓度为 31 mg·mL<sup>-1</sup>;少腹逐瘀胶囊,组成:当归、蒲黄、五灵脂(醋制)、赤芍、延胡索(醋制)、小茴香、川芎、肉桂,规格 0.45 g/粒,成人一日 9 粒,配制浓度 45 mg·mL<sup>-1</sup>;金刚藤胶囊,金刚藤单味中药组成,规格 0.5 g/粒,成人一日 12 粒,配制浓度 67 mg·mL<sup>-1</sup>;酵母菌试剂购自上海市长海医院血液免疫室;鼠抗人 IgG 抗体及鼠抗人 CD3、CD4、CD8、CD25 单克隆抗体、不同荧光标记的同型对照皆购自美国 BD PharMingen 公司。

### 1.2 CPID 模型制备

采用混合菌加机械损伤造模法<sup>[2]</sup>,开腹,暴露子宫,用 1 mL 注射器抽取 0.2 mL 的混合菌液(大肠杆菌、乙型溶血性链球菌和金黄色葡萄球菌比例为 2:

收稿日期:2013-03-05

修回日期:2013-04-18

\* 科学技术部国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAI20B013-01):慢性盆腔炎中医四联疗法的优化及诊疗规范研究——慢性盆腔炎中医综合疗法的优化研究,负责人:刘瑞芬。

\*\* 通讯作者:张海琴,博士,讲师,主要研究方向:妇产科临床研究。

1:1, 30 亿个/mL), 注入至双侧子宫内, 注入之前用注射器机械损伤子宫内膜组织, 每侧宫腔注入 0.1 mL。假手术组注射等量无菌蒸馏水。

### 1.3 分组及给药

72 只大鼠(造模 75 只, 术后死亡 3 只)按体重完全随机分为 6 组, 每组 12 只。造模术 3 周后开始给药。药物剂量按照人与动物公斤体质量的等效剂量比值进行折算给药<sup>[3]</sup>。正常组、假手术组、模型组: 给予蒸馏水灌胃, 1 mL/100 g; 桂枝茯苓胶囊组: 251 mg·kg<sup>-1</sup>; 少腹逐瘀胶囊对照组: 364 mg·kg<sup>-1</sup>; 金刚藤胶囊对照组: 540 mg·kg<sup>-1</sup>。灌胃皆每日 1 次, 共 14 日。

### 1.4 样品采集、观察指标

给药后的第 15 天清晨予各组大鼠禁食。采用心脏取血方法, 取血 1~2 mL。开腹取子宫组织及脾脏。检测脾脏 T 细胞 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Regulation T cell, Treg), 血红细胞 C3b 受体花环率(RBC-C3bRR)、免疫复合物花环率(RBC-ICR)由山东医学科学院免疫室检测。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件统计分析, 数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠脾脏 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞数量百分比及 CD4/CD8 比较

与模型组比较, 桂枝茯苓胶囊组、少腹逐瘀胶囊组、金刚藤胶囊组均可明显提高模型大鼠脾脏 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 细胞水平及 CD4/CD8 细胞比值 ( $P <$

0.05), 降低 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平 ( $P < 0.05$ ), 使之趋向正常。桂枝茯苓胶囊较少腹逐瘀胶囊、金刚藤胶囊在提高 CD4<sup>+</sup> T 细胞水平上效果更明显。在提高 CD4/CD8 细胞比值上, 少腹逐瘀胶囊效果较差。具体见表 1。

2.2 各组大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 数量百分比比较与模型组比较, 桂枝茯苓胶囊可降低 CPID 模型大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 水平 ( $P < 0.05$ ), 使之趋向正常。具体见表 2, 图 1。

2.3 各组大鼠脾脏 T 细胞亚群之间的相关性分析等级相关分析显示, CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞呈负相关 ( $P < 0.01$ ); CD4/CD8 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞呈正相关 ( $P < 0.01$ ), 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞呈负相关 ( $P < 0.01$ ); CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 与 CD4/CD8 呈负相关 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 各组大鼠血 RBC-C3bRR 及 RBC-ICR 比较

与模型组比较, 桂枝茯苓胶囊、少腹逐瘀胶囊均可明显提高 CPID 模型大鼠 RBC-C3bRR ( $P < 0.05$ ), 降低模型大鼠 RBC-ICR ( $P < 0.05$ ), 使之趋向于正常。具体见表 3。

## 3 讨论

本实验采用活血化瘀方药桂枝茯苓胶囊治疗 CPID 模型大鼠, 以少腹逐瘀胶囊作为对照组, 选清热解毒法为主的金刚藤胶囊用作治法的对照组。实验表明 CPID 大鼠免疫机制发生异常, 活血化瘀法和清热解毒法皆对模型鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫功能有调节作用, 使其趋向正常。其中, 桂枝茯苓胶囊效果更明显。这可能因 CPID 的主要病机为“血瘀”, 桂枝茯苓胶囊的药物少, 功用比较专

表 1 活血化瘀法对大鼠脾脏 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞数量百分比及 CD4/CD8 比率的影响(%  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

组别	CD3 <sup>+</sup> T 细胞	CD4 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> T 细胞	CD4/CD8
正常组	28.39±7.44*	22.13±6.33**	27.81±5.77*	0.79±0.35*
假手术组	24.82±4.27	17.04±4.84	33.03±19.66	0.52±0.21
模型组	20.20±10.53	13.99±7.52	41.53±8.24	0.35±0.31
桂枝茯苓胶囊组	28.81±8.75*	21.94±3.97**	28.71±6.67*	0.76±0.20*
少腹逐瘀胶囊组	28.91±6.27*	18.96±3.95*	31.96±5.50*	0.58±0.29*
金刚藤胶囊组	27.41±8.67*	20.81±4.86*	29.86±7.88*	0.69±0.44*

注: 与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

表2 活血化瘀法对大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 数量百分比影响(%  $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg 细胞
正常组	3.48±1.95*
假手术组	5.89±3.33
模型组	8.81±4.95
桂枝茯苓胶囊组	4.84±2.89*
少腹逐瘀胶囊组	6.75±3.94
金刚藤胶囊组	7.05±3.27

注:与模型组比较,\*P<0.05。

表3 活血化瘀法对大鼠血 RBC-C3bRR 及 RBC-ICR 的影响(%  $\bar{x}\pm s$ , n=12)

组别	RBC-C3bRR	RBC-ICR
正常组	6.50±2.61*	6.71±2.75*
假手术组	6.34±1.86*	7.12±2.33*
模型组	3.76±1.24	9.25±2.95
桂枝茯苓胶囊组	6.10±2.21*	7.15±2.35*
少腹逐瘀胶囊组	5.89±0.97*	7.19±2.44*
金刚藤胶囊组	4.67±1.67	8.48±1.27

注:与模型组比较,\*P<0.05。

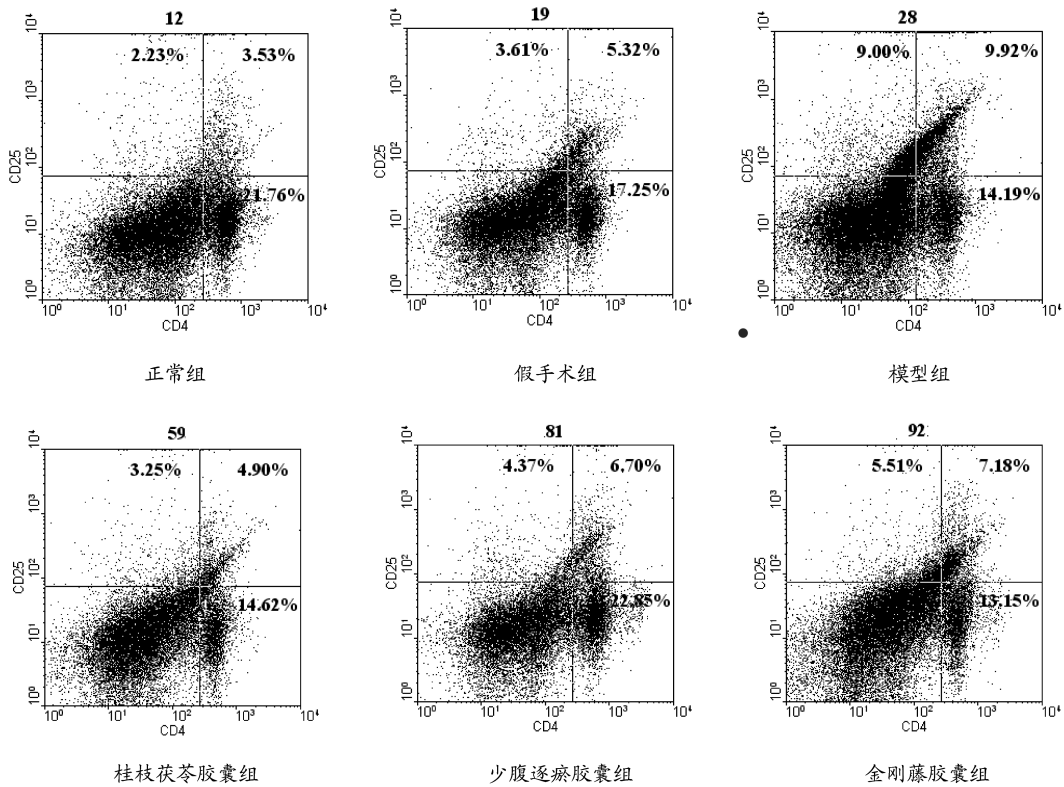


图1 T 细胞亚群 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 二维散点图

一,主要是活血化瘀消癥,故证对而效专。分析少腹逐瘀胶囊的组成,药物多,整体上温散作用更明显,因此考虑可能比较适合于寒凝血瘀证。魏绍斌等<sup>[4]</sup>研究表明金刚藤对湿热瘀结型 CPID 效果好,药理研究证明其具有消炎、镇痛、抗肿瘤等作用<sup>[5,6]</sup>,因此,金刚藤胶囊可能对湿热型或热毒型 CPID 比较

对证。关于适合证型的比较还需进一步研究才能确定。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 具有免疫无能性和免疫抑制性两大功能特征。实验证实<sup>[7]</sup>,减少 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg,可以增强对多种病原体的抗感染免疫。实验表明模型大鼠免疫功能受到抑制,桂枝茯苓胶囊可降低

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 水平,增强受抑制的免疫功能。慢性迁延状态中,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 水平高,而趋向好转时,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 水平逐渐恢复。

T 细胞亚群等级相关性分析表明 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 活化后抑制了 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化和增殖<sup>[8]</sup>,这是其免疫抑制效应的表现。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 能影响其他 T 细胞的功能<sup>[9]</sup>,可通过分泌细胞因子 IL-10 及 TGF-β 对局部免疫反应产生抑制反应<sup>[10]</sup>。桂枝茯苓胶囊可使机体细胞免疫应答反应上调,免疫功能得以改善,原因为降低了 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 水平,从而减弱了对其他细胞的抑制作用。

红细胞膜上的 CR1 受体(RBC-C3bR)通过识别 C3b 并粘附抗原抗体复合物发挥清除血液中的抗原-抗体-补体复合物的作用<sup>[11]</sup>。本实验表明模型大鼠 RBC-C3bRR 降低,RBC-ICR 升高,这可能是体内凝血酶、纤维蛋白酶在血瘀状态下增加<sup>[12]</sup>,破坏了部分 RBC-C3bR,使其活性减弱。同时,体内循环免疫复合物(Circulating Immunocomplex,CIC)因血液循环及微循环障碍而增多,导致过多 IC 粘附于红细胞不易解脱清除,表现为 RBC-ICR 增高。红细胞上 CR1 空位减少,活性下降,进一步降低了红细胞免疫功能。桂枝茯苓胶囊、少腹逐瘀胶囊通过活血化瘀、促进血液循环,加速红细胞对 CIC 的清除,增强 CR1 受体的表达及活化,使 RBC-C3bRR 升高,RBC-ICR 降低。在药物作用下,红细胞借助补体,调

节淋巴细胞的粘附杀伤能力,进一步增强机体的免疫功能。

### 参考文献

- 翁方敏.当归芍药散配合中药保留灌肠治疗慢性盆腔炎疗效观察.现代中西医结合杂志,2011,20(11):1344~1345.
- 刘瑞芬,杨晓娜,李伯勤.盆腔炎颗粒治疗慢性盆腔炎的临床与实验研究.山东中医药大学学报,2003,27(6):422~425.
- 施新猷.现代医学实验动物学.北京:人民军医出版社,2000:332~335.
- 魏绍斌,谢平.金刚藤片治疗慢性盆腔炎临床观察.中药药理与临床,2002,18(5):46~47.
- 仇萍,盛孝邦,邱赛红.菝葜不同工艺提取物对慢性盆腔炎大鼠的治疗作用.中草药,2010,41(12):2046~2049.
- 刘卫东,付庆霞.金刚藤现代研究概述.中外医学研究,2012,10(5):155~156.
- Belkaid Y, Piccirillo C A, Mendez S, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature, 2002, 420(6915):502~507.
- 张莹,姚咏明,盛志勇.调节性 T 细胞研究进展.生理科学进展,2007,38(1):83~88.
- 程佳音,吕小迅.调节性 T 细胞的研究进展.广东药学院学报,2012,28(1):102~106.
- 吴祖群.调节性 T 细胞研究进展.现代免疫学,2004,24(1):77~79.
- Cornoff J B, Hebert L A, Smead W L, et al. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. J Clin Invest, 1983, 71(2):236~248.
- 龙镗,王宗仁,夏天,等.活血通脉片对急性血瘀证大鼠血液流变性和红细胞免疫功能的影响.细胞与分子免疫学杂志,2001,17(5):456~457.

## Study on Immunoregulation by Method of Promoting Blood Flow and Dissipating Phlegm among Rats with Chronic Pelvic Inflammatory Disease

Zhang Haiqin<sup>1</sup>, Liu Ruifen<sup>2</sup>

(1. Clinical Department, Ji'nan Nursing Occupation College, Ji'nan 250000, China;

2. Hospital Affiliated to Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

**Abstract:** This study was aimed to explore the effect on immunological function of T lymphocyte subpopulation and erythrocyte by the method of promoting blood flow and dissipating phlegm of rat with chronic pelvic inflammatory disease (PID). A mixture of bacteria combined with mechanical injury was used in the establishment of a total of 75 Wistar chronic PID rat models. The rats were divided into the normal group, sham-operation group, model group, Gui-Zhi Fu-Ling Capsule (GZFLC) group, Shao-Fu Zhu-Yu Capsule (SFZYC) group, Jin-Gang-Teng Capsule (JGTC) group, and the control group of GZFLC, SFZYC, and JGTC. Intra-gastric administration of each medication was given according to different groups. The percentage of amount of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell (Treg) in the spleen of rats was observed in each group. The RBC-C3bRR and RBC-ICR in the blood serum of

rats were also observed. The results showed that medications used in all treatment group significantly increased the percentage of amount of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD4/CD8 ratio ( $P < 0.05$ ) and reduced the percentage of amount of CD8<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ). GZFLC has significantly decreased the abnormal increased percentage of the amount of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg. GZFLC and SFZYC significantly increased RBC-C3bRR ( $P < 0.05$ ) and decreased RBC-ICR ( $P < 0.05$ ). It was concluded that the prescription of promoting blood flow and dissipating phlegm can treatment chronic PID by adjusting immunity of T lymphocyte subpopulation and erythrocyte.

**Keywords:** Method of promoting blood flow and dissipating phlegm, chronic pelvic inflammatory disease, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg, erythrocyte immunology

(责任编辑 张丰丰 张志华,责任译审 汪 晶)