

T 细胞亚群偏移与药物流产小鼠子宫出血量相关性研究*

刘海静^{1,2} 鞠红梅³ 刘淑娟³ 王 丽¹ 赵向忠¹ 李 霞^{1△}

(¹ 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250062; ² 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067;

³ 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

摘 要 **目的** 探讨药物流产(简称药流)小鼠局部母胎界面 T 淋巴细胞亚群(Th1/Th2/Th17/Treg)偏移状态与子宫出血量相关性,为减轻药流后子宫出血寻找有效途径。**方法** 孕鼠 30 只,随机分为正常妊娠组和米非司酮(RU486)大(1.5 mg/kg/d)、小剂量组(0.88 mg/kg/d),每组 10 只。改良碱性正铁血黄素法检测子宫出血量,流式细胞术检测子宫组织 Th1(CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺)、Th2(CD3⁺CD4⁺IL-4⁺)、Th17(CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺)、Treg(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)亚群比例。**结果** RU486 小剂量组小鼠子宫出血量明显大于大剂量组($P < 0.05$);与正常妊娠组比较,RU486 药流小鼠母胎界面 Th1、Th17 亚群比例升高($P < 0.05$),Th2、Treg 亚群比例降低($P < 0.05$),Th1/Th2、Th17/Treg 比值显著升高($P < 0.05$);药流小鼠子宫出血量与 Th1、Th17 亚群比例及 Th1/Th2、Th17/Treg 比值呈显著负相关($P < 0.05$),与 Th2、Treg 亚群比例呈显著正相关($P < 0.05$)。**结论** 诱导 Th1/Th2/Th17/Treg 亚群偏移是 RU486 药流机制之一,RU486 诱导的 Th1、Th17 偏移状态与子宫出血量间存在密切相关性,靶向诱导 Th1、Th17 亚群偏移的方法可能成为减轻药流子宫出血的有效途径。

关键词 药物流产;子宫出血;T 淋巴细胞;Th1/Th2/Th17/Treg

中图分类号:R392.12 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)04-089-05

The research of correlation between T-cell subsets and uterine bleeding volume of medical abortion mice

LIU Hai-jing, JU Hong-mei, LIU Shu-juan, et al

(Jinan University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between uterine bleeding volume and shift state of T lymphocyte subsets(Th1/Th2/Th17/Treg)at the maternal-fetal interface of medical abortion mice and to find an effective way to reduce the uterine bleeding during medical abortion. **Methods** 30 pregnant mice were divided randomly into normal pregnancy group, mifepristone (RU486) high-dose group (1.5 mg/kg/d) and low-dose group (0.88 mg/kg/d), and 10 mice in each group. The uterine bleeding volume of model mice was detected using alkaline hematin photometric method, and the proportion of Th1(CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺), Th2(CD3⁺CD4⁺IL-4⁺), Th17(CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺) and Treg(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) of uterine tissue were measured by flow cytometry. **Results** The uterine bleeding volume of medical abortion mice in RU486-low-dose group was more grater than that of high-dose group ($P < 0.05$). Compared to normal pregnant-mice, the percentage of Th1 and Th17 subsets at the maternal-fetal interface in medical abortion mice increased; the percentage of Th2 and Treg subsets decreased; the ratios of Th1/Th2 and Th17/Treg increased remarkably ($P < 0.05$). The volume of uterine bleeding of medical abortion mice was negatively related to the proportions of Th1 and Th17 cells as well as the ratios of Th1/Th2 cells and Th17/Treg cells ($P < 0.05$), and positively related to the proportions of Th2 and Treg cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Induction of Th1/Th2/Th17/Treg subsets skew is one of the mechanisms during RU486-induced abortion. The state of T cell subsets skew in RU486 medical abortion was closely related to the uterine bleeding volume. Tar-

* [基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 30901918), 山东省科技发展计划(2012GSF11840), 山东省博士基金项目(No. BS2009YY041), 山东省自然科学基金项目(No. ZR2010HQ066), 山东省计生委项目(No. [2009]8), 山东省中管局项目(No. 2009-173), 济南市青年科技明星计划项目(济科计[2012]16 号, 20120135)

△ [通信作者] 李霞, E-mail: lixia979805@sohu.com

getting to induce T cell subsets skew may become an effective way to reduce the uterine bleeding during medical abortion.

Key words: Medical abortion; Uterine bleeding; T lymphocyte; Th1/Th2/Th17/Treg

药物流产简单方便,痛苦小,临床常广泛应用于终止早期妊娠;但药流后子宫出血量多、出血时间长是药流常见并发症,有报道约6%~10%的药流病例存在异常子宫出血^[1],我们的前期研究也证实与人工流产术比较,药流后子宫出血量明显增加、出血时间显著延长^[2-3]。药流后异常子宫出血严重影响患者身体健康,其发病机理尚未完全阐明,随着生殖免疫学研究逐渐深入,免疫因素在其发病中的作用日益受到关注。T细胞在机体免疫应答与免疫调节中发挥着重要作用,初始T淋巴细胞受到抗原刺激后,在分化诱导因子及特异性核转录因子作用下,分化为Th1/Th2/Th17/Treg亚群,产生特征性细胞因子,主导不同的免疫反应,在维持机体正常免疫功能中发挥着重要作用。已证实Th1/Th2/Th17/Treg亚群偏移参与了米非司酮(RU486)药流的发生^[4-5],但其与药流后子宫出血量之间的关系尚未明确。本研究以T淋巴细胞亚群为切入点,探讨其偏移状态与药流后子宫出血量间的相关性,揭示药流后异常子宫出血的发病机制。为临床治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级BALB/C小鼠,由山东大学实验动物中心提供,10周龄,雌性小鼠未交配过,雄性小鼠证明有生育能力。置于室温24℃,相对湿度60%~65%的超净动物饲养柜内,给予12h光照,12h暗室,自由饮水摄食。雌、雄小鼠按2:1比例于每日下午5:00合笼,次日清晨观察小鼠阴栓,发现阴栓日为妊娠第1天。将孕鼠随机分为正常妊娠组、RU486大剂量组、RU486小剂量组,各10只,观察各组小鼠母胎界面T细胞亚群分化状态及子宫出血量。

1.1.2 实验药品与试剂 RU486(浙江仙琚制药股份有限公司生产,国药准字:H20000648,批号:091102)。大鼠抗小鼠荧光抗体:PC5-CD3、FITC-CD4、PE-IFN γ 、PE-IL-4、PE-IL-17A、PC5-CD25、PE-Foxp3(美国BD Pharmingen)。

1.1.3 实验仪器 FACSCalibur 流式细胞仪

(Epics XL,美国);高速低温离心机(Sorvall Super T21,美国);紫外分光光度计(ND1000,美国);超净工作台(SW-CJ-1F,苏州)。

1.2 实验方法

根据文献报道,得到70%流产率RU486剂量1.5 mg/kg/d作为大剂量,得到50%流产率RU486剂量0.88 mg/kg/d作为小剂量^[6]。自妊娠第1天开始,RU486大、小剂量组小鼠分别灌胃RU486 1.5 mg/kg/d和0.88 mg/kg/d,连续用药3d。

1.3 检测指标

1.3.1 小鼠子宫出血量检测 自RU486处理第1天起,小鼠阴道内置入20g定量棉球,每日更换,4℃密闭保存,改良碱性正铁血红素法检测出血量^[2]。

1.3.2 母胎界面T细胞亚群检测 妊娠第11天小鼠眼球取血,拉颈处死,分离子宫组织,剪碎研磨过滤,1×PBS冲洗,密度梯度法分离单个核细胞,调整为 1×10^6 个/ml,加入佛波酯30 μ g/L、离子霉素1 mg/L、莫能霉素1.7 μ g/L,37℃,5% CO₂孵育4h。收集细胞,加入外标抗体(PC5-CD3、FITC-CD4;FITC-CD4、PC5-CD25),4℃避光孵育30min;BD固定穿膜试剂盒固定穿膜(按说明书操作),加入内标抗体(PE-IFN γ 、PE-IL-4、PE-IL-17A、PC5-CD25、PE-Foxp3),4℃避光孵育30min;穿膜缓冲液洗2次,PBS重悬细胞,上机检测。Winmidi 2.9分析Th1(CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺)、Th2(CD3⁺CD4⁺IL-4⁺)、Th17(CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺)、Treg(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)亚群占CD4⁺细胞百分比。

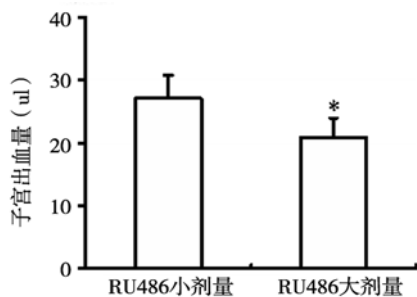
1.4 统计学方法

SPSS11.5软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用One Way-ANOVA方差分析,2组间比较采用Turkey法检验,相关性采用Pearson分析。

2 结果

2.1 药流小鼠子宫出血量

与RU486小剂量组比较,RU486大剂量组药流小鼠子宫出血量明显减少($P=0.000$),见图1。



与 RU486 小剂量组比较, * $P < 0.01$ 。

图 1 药流小鼠子宫出血量

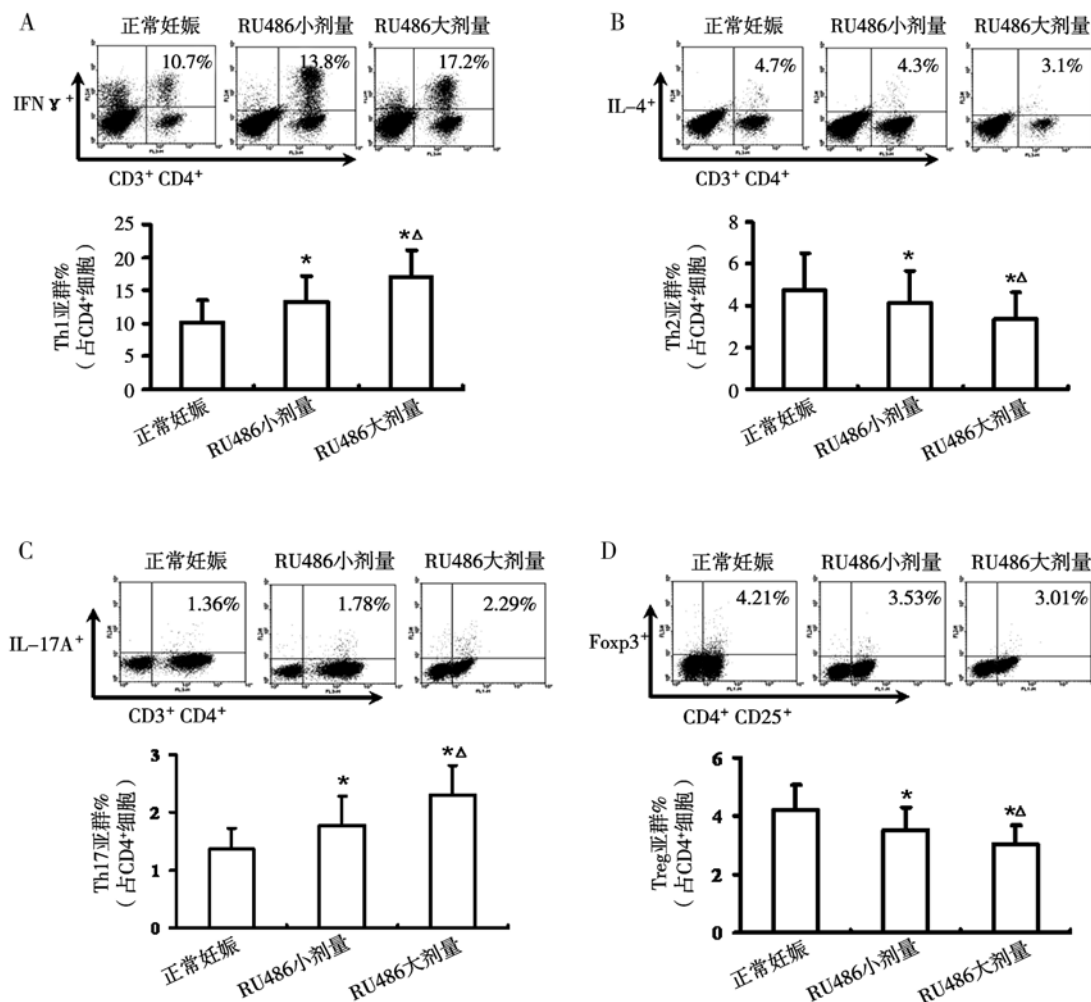
2.2 RU486 诱导小鼠母胎界面 T 细胞亚群偏移

与正常妊娠小鼠比较, RU486 作用后小鼠子宫组织 Th1、Th17 亚群比例显著升高 ($P = 0.008$, $P = 0.012$), 见图 2A,C; Th2、Treg 亚群比例显著

降低 ($P = 0.000$, $P = 0.006$), 见图 2B,D; Th1/Th2 比值及 Th17/Treg 比值显著升高 ($P = 0.011$, $P = 0.004$), 见图 3A,B; 与 RU486 小剂量组比较, RU486 大剂量组 T 细胞亚群变化更明显。

2.3 药流小鼠 T 细胞亚群偏移与子宫出血量相关性

统计结果显示药流后子宫出血量与 T 细胞亚群分化状态密切相关, 其中子宫出血量与 Th1、Th17 亚群比例呈显著负相关 ($P = 0.023$, $P = 0.019$), 与 Th2、Treg 亚群比例呈显著正相关 ($P = 0.005$, $P = 0.011$), 与 Th1/Th2 比值、Th17/Treg 比值呈显著负相关 ($P = 0.000$, $P = 0.010$), 见图 4。

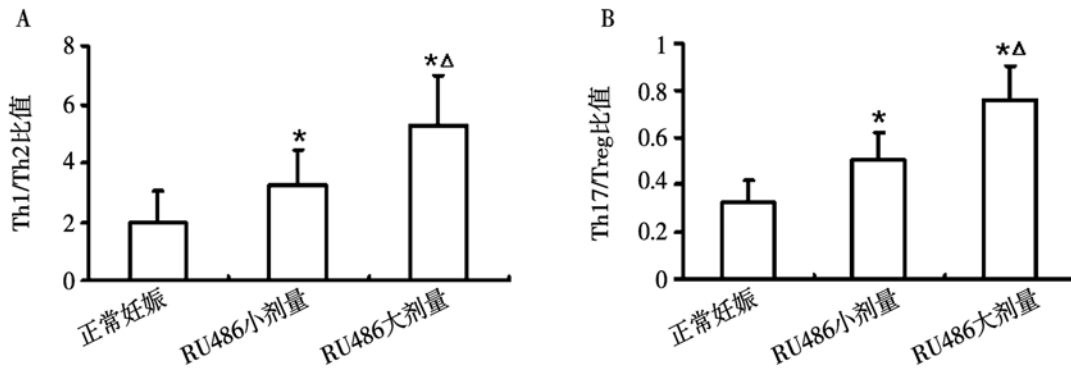


A. RU486 对小鼠子宫组织 Th1 亚群的影响; B. RU486 对小鼠子宫组织 Th2 亚群的影响;

C. RU486 对小鼠子宫组织 Th17 亚群的影响; D. RU486 对小鼠子宫组织 Treg 亚群的影响。

与正常妊娠组比较, * $P < 0.05$; 与 RU486 小剂量组比较, Δ $P < 0.05$ 。

图 2 RU486 对小鼠子宫组织 T 细胞亚群的影响



A. RU486 对小鼠子宫组织 Th1/Th2 比值的影响; B. RU486 对小鼠子宫组织 Th17/Treg 比值的影响。
与正常妊娠组比较, * $P < 0.05$; 与 RU486 小剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 RU486 对小鼠子宫组织 Th1/Th2、Th17/Treg 比值的影响

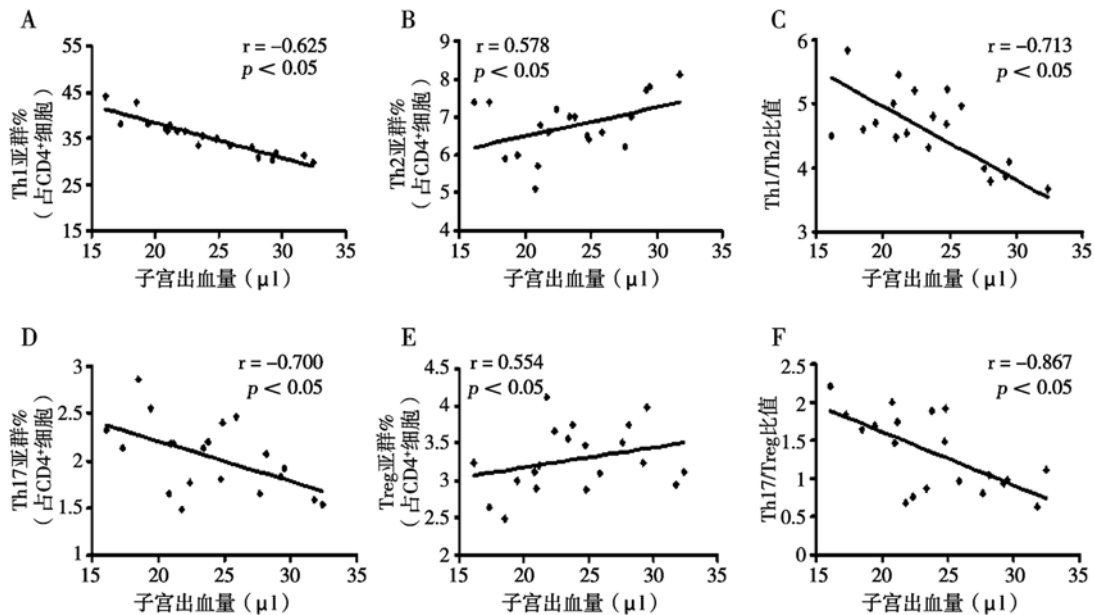


图 4 T 细胞亚群偏移与子宫出血量相关性

3 讨论

药物流产是终止非意愿早期妊娠的重要措施,因其简单方便、痛苦小的优点而被患者广泛接受,但药流后异常子宫出血一直是临床难以解决的问题。由于药流后异常子宫出血的发病机制尚未完全明确,导致缺乏作用靶点明确、临床疗效满意的减轻药流后子宫出血药物。因此,对药流后异常子宫出血发病机制及防治的一直是妇产科领域与生殖免疫领域研究的热点与难点。从免疫学角度,正常妊娠类似成功的半同种异体移植,母胎之间通过精细而复杂的免疫调控诱导并维持母胎免疫耐受

状态。T 细胞在母胎免疫耐受形成过程中发挥着重要作用,初始 T 细胞在 MHC-抗原肽复合物的刺激下,分化为 Th1/Th2/Th17/Treg 亚群,产生不同的细胞因子,在免疫应答中发挥不同作用。Th1、Th2 是经典的 T 细胞亚群,Th1 亚群可分泌特异性细胞因子 IL-2、IFN- γ 诱导细胞免疫应答,其过度表达介导炎症反应,导致流产发生;Th2 亚群可分泌特异性诱导免疫耐受的细胞因子 IL-4、TGF- β ,使胚胎逃离母体免疫排斥,利于妊娠维持^[7]。妊娠时 Th1/Th2 平衡向 Th2 偏移诱导母胎免疫耐受状态^[8],Th1 类细胞因子的过度表达则打破母胎免疫耐受而导致流产^[9]。随着免疫学研

究的不断深入,相继发现两种新 T 细胞亚群 Th17、Treg,从而将 Th1/Th2 模式扩展为 Th1/Th2/Th17/Treg 模式。Th17 细胞的分化由 TGF- β 和 IL-6 共同诱导, Th17 细胞分泌大量的 IL-17A、IL-17F、IL-21 等细胞因子,通过介导炎症反应清除 Th1 和 Th2 细胞免疫无法处理的特定病原体,但其过度表达则可导致炎症损伤^[10]。Treg 细胞与 Th17 细胞来源于同一祖细胞,其分化过程主要由 TGF- β 诱导。Treg 产生 IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子,在调节免疫应答强度、维持免疫耐受中扮演着重要角色^[11]。已证实正常妊娠状态 Th17/Treg 平衡向 Treg 偏移^[12],复发性流产模型动物及患者存在 Th17/Treg 平衡向 Th17 偏移现象^[13]。

随着生殖免疫学研究的不断深入,T 细胞介导的免疫耐受在妊娠及妊娠相关疾病中的作用日益受到关注。RU486 是药物流产主要药物,发现 RU486 在竞争性结合孕激素受体、阻断孕激素作用的同时,对免疫系统具有重要调节作用。临床研究证实,RU486 药流妇女血清及蜕膜组织中 Th1 类细胞因子表达升高、Th2 类细胞因子表达降低^[14];动物实验发现 RU486 作用后,妊娠小鼠母胎界面 IL-17 表达升高,IL-10、TGF- β 表达降低,提示 RU486 诱导了 Th17 亚群偏移^[4]。本研究发现,与正常妊娠小鼠相比,RU486 药物流产小鼠母胎界面 T 细胞向 Th1、Th17 亚群偏移,且 RU486 大剂量组效果更明显,证实 RU486 诱导 T 细胞亚群偏移是其药流作用机制之一。与 RU486 小剂量组比较,RU486 大剂量组小鼠子宫出血量明显减少;以此同时,相关性分析显示 RU486 药物流产小鼠子宫出血量与 T 细胞亚群偏移状态密切相关,子宫出血量与 Th1、Th17 亚群比例及 Th1/Th2、Th17/Treg 比值呈显著负相关,与 Th2、Treg 亚群比例呈显著正相关。以上研究结果提示 T 细胞亚群偏移在 RU486 药流中扮演着重要角色,T 细胞亚群偏移状态与流产效果及子宫出血量密切相关,靶向诱导 T 细胞向 Th1、Th17 亚群偏移、诱导母胎免疫排斥的方法可能成为减轻药流后子宫出血的有效途径。

参考文献:

- [1] Cheng L. Medical abortion in early pregnancy: experience in China[J]. Contraception, 2006, 74(1): 61-65.
- [2] Li X, Liu R, Zhang W, et al. Up-regulation of Fas/FasL activation contribute to the apoptosis enhancement of RU486 by Gong-Qing Decoction, a traditional Chinese prescription[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 134(2): 386-392.
- [3] 李霞, 刘瑞芬, 彭爱新. 宫清颗粒对人早孕绒毛、蜕膜组织细胞凋亡及信号转导的影响[J]. 中国计划生育学杂志, 2009, 17(2): 90-93.
- [4] Mao G, Wang J, Kang Y, et al. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4⁺CD25⁺ treg cells during midterm pregnancy in mice[J]. Endocrinology, 2010, 151(11): 5477-5488.
- [5] Nautiyal J, Kumar PG, Laloraya M. Mifepristone (Ru486) antagonizes monocyte chemotactic protein-3 down-regulation at early mouse pregnancy revealing immunomodulatory events in Ru486 induced abortion[J]. Am J Reprod Immunol, 2004, 52(1): 8-18.
- [6] Yang B, Zhou HJ, He QJ, et al. Termination of early pregnancy in the mouse, rat and hamster with DL111-IT and RU486[J]. Contraception, 2000, 62(4): 211-216.
- [7] Calleja-Agius J, Muttukrishna S, Pizzey AR, et al. Pro- and antiinflammatory cytokines in threatened miscarriages[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 205(1): 83. e8-e16.
- [8] Piccinni MP. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 14: 95-99.
- [9] 董瑞英, 许燕雪, 江森. 不明原因习惯性流产患者 Th1/Th2 型细胞因子的检测[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(3): 187-190.
- [10] Graeber KE, Olsen NJ. Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity[J]. Inflamm Res, 2012, 61(2): 87-96.
- [11] Sun L, Wu J, Yi S. Foxp3 is critical for human natural CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to suppress alloimmune response[J]. Transpl Immunol, 2012, 26(2/3): 71-80.
- [12] Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(6): 601-610.
- [13] Liu YS, Wu L, Tong XH, et al. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 65(5): 503-511.
- [14] 徐海. RU486 终止妊娠与 Th1/Th2 调节的相关性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2009, 17(12): 720-722.

(收稿日期 2013-03-15)