

左归丸逆转 Th1/Th2 亚群偏移减轻雌激素缺乏骨丢失*

谢宝华^{1,2} 鞠红梅³ 王 丽¹ 周宪宾¹ 郭钰琪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 探讨雌激素缺乏状态下 Th1/Th2 亚群偏移与骨丢失的相关性及左归丸逆转 Th1/Th2 亚群偏移减轻雌激素缺乏骨丢失的作用机制。**方法** 纳入未绝经妇女、绝经妇女、绝经中药组妇女各 15 例, 电化学发光法检测血清 E₂ 水平; 分离静脉血单个核细胞, 流式检测 Th1/Th2 亚群比例; Western blot 检测 Th1/Th2 亚群特异性核转录因子(T-bet, GATA-3)蛋白表达; RT-PCR 法检测血清 Th1/Th2 亚群特征性细胞因子(TNF- α , IL-4)mRNA 表达水平; 双能 X 线骨密度仪测定研究对象腰椎 2~4(L2~4)前后位 BMD。**结果** 与未绝经妇女比较, 绝经妇女血清 E₂ 表达及 BMD 均明显降低 ($P < 0.05$), Th1 亚群比例明显升高 ($P < 0.05$), Th2 亚群比例明显降低 ($P < 0.05$), T 细胞向 Th1 亚群偏移。相关性分析显示, BMD 与 E₂ 水平、Th2 亚群比例呈显著正相关 ($P < 0.05$), 与 Th1 亚群比例呈显著负相关 ($P < 0.05$); E₂ 水平与 Th1 亚群比例呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与 Th2 亚群比例呈显著正相关 ($P < 0.05$)。与绝经组比较, 左归丸治疗后绝经妇女腰椎 BMD 明显升高 ($P < 0.05$), Th1 亚群比例明显降低 ($P < 0.05$), Th2 亚群比例明显升高 ($P < 0.05$), T 细胞向 Th2 亚群偏移, T-bet 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), GATA-3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), TNF- α mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), IL-4 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), 血清 E₂ 表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** 雌激素缺乏状态下 Th1/Th2 亚群偏移与骨丢失密切相关, 左归丸调节 T 细胞亚群特异性核转录因子表达, 逆转雌激素缺乏导致的 Th1 亚群偏移状态, 减少骨丢失, 促进骨形成。

关键词 左归丸; T 细胞亚群; Th1; Th2; 雌激素缺乏; 骨丢失

中图分类号: R285.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2013)06-174-05

Mechanism of Zuogui pills on the shift of Th1/Th2 to set-back bone loss caused by estrogen deficiency

XIE Bao-hua, JU Hong-mei, WANG Li, et al

(School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

Abstract: Objective To analyse the correlation between shift of Th1/Th2 and bone loss in the state of estrogen deficiency and the mechanism of Zuogui pills set-backing the shift of Th1/Th2 to alleviate bone loss caused by estrogen deficiency. **Methods** 15 cases of premenopause women, 15 cases of postmenopause women and 15 cases of postmenopause women taking Zuogui pills were selected in this study. The serum estradiol(E₂) were detected by electrochemiluminescence immunoassay. Venous blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation, and the percentages of Th1/Th2 subsets were detected by flow cytometry. T-bet and GATA-3 were detected by Western blot. TNF- α mRNA and IL-4 mRNA were detected by RT-PCR. BMD of lumbar vertebrae 2~4 was measured with dual energy X ray absorptiometry. **Results** Compared with premenopause women, the expression of E₂ and BMD of postmenopause women were decreased obviously ($P < 0.05$). The percentage of Th1 subset was increased obviously ($P < 0.05$), and the percentage of Th2 subset were decreased obviously ($P < 0.05$). T-cells subsets offset into Th1 subset. BMD were positively correlated with the expression of E₂ and the percentage of Th2 subset ($P < 0.05$). BMD were negatively correlated with the percentage of Th1 subset ($P < 0.05$). The expression of E₂ was negatively correlated with the percentage of Th1 subset ($P < 0.05$). The expression of E₂ was positively

* [基金项目] 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2010HQ066)

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

correlated with the percentage of Th2 subset ($P < 0.05$). After taking Zuogui pills, BMD of postmenopause women were increased obviously ($P < 0.05$). The percentage of Th1 subset were decreased obviously ($P < 0.05$). And the percentage of Th2 were increased obviously ($P < 0.05$). T-cells subsets offset into Th2 subset. The expression of T-bet were decreased obviously ($P < 0.05$). The expression of GATA-3 were increased obviously ($P < 0.05$), and the mRNA expression of TNF- α were decreased obviously ($P < 0.05$). The mRNA expression of IL-4 was increased obviously ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of serum E_2 ($P > 0.05$). **Conclusion** The bone loss is closely related to Th1/Th2 subsets shift in the state of estrogen deficiency. Zuogui pills regulates cytokines expression in T-cell subset, reverses the shift of Th1 subset due to estrogen deficiency, and inhibits the loss and formation of bone.

Key words: Zuogui pills; T cell subsets; Th1; Th2; Estrogen deficiency; Bone loss

正常骨代谢是成骨细胞(OB)与破骨细胞(OC)参与的骨形成和骨吸收的动态平衡过程,此过程受内分泌、免疫系统调节;内分泌—免疫—骨代谢网络失衡会导致多种骨代谢性疾病发生,如成骨不全、骨质疏松症(OP)等,严重危害患者健康。雌激素是人体重要的性激素,研究发现绝经后骨质疏松发病率随着年龄的增长而增高,并与雌二醇水平呈负相关^[1]。T细胞是机体免疫系统中重要的细胞群体,Th1、Th2是经典的T细胞亚群,生理条件下,机体的Th1和Th2细胞处于平衡状态,如果Th1/Th2的极化发生偏移容易诱发病理改变^[2]。雌激素—T细胞—骨代谢三者的关系成为本领域研究的焦点问题。我们前期研究证实骨密度与雌激素水平及T细胞亚群相关细胞因子表达存在显著相关性^[3]。补肾经典方剂左归丸治疗骨代谢疾病效果显著,研究发现左归丸可明显改善Th1/Th2的漂移状态,显著提高Th2细胞因子IL-10的表达,逆转Th1优势^[4]。本研究以逆转Th1/Th2亚群偏移为切入点,探讨雌激素缺乏导致的T细胞亚群偏移与骨代谢的相关性,阐释左归丸逆转Th1/Th2亚群偏移状态减轻雌激素缺乏骨丢失的作用与机制,为指导临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择2010年1月至2012年11月在山东中医药大学附院查体的自然绝经妇女30例,年龄45~65岁,平均(55.93 $\pm$ 5.61)岁,绝经时间最长18a,最短3a,随机分为绝经组与中药组,各15例。选取同期在妇科及骨科门诊查体的健康未绝经妇女15例,年龄25~45岁,平均(35.30 $\pm$ 6.22)岁,平素月经规律,身体健康,未妊娠,纳入未绝经组。3组均排除其它影响骨代谢的疾病,未用雌激素替代治疗及其它治疗。本研究经山东中医药大学附院

伦理委员会批准,所有研究对象签署知情同意书。

1.2 左归丸提取制备

采用水提、醇溶法提取左归丸溶液,左归丸由熟地黄、山药、枸杞、山茱萸、鹿角胶、龟板胶、川牛膝、菟丝子按8:4:4:4:4:4:4:3配伍,煎煮滤取药液,加入烊化的龟板胶和鹿角胶,水浴浓缩,依次加入65%、75%、85%乙醇,沉淀过夜,滤取上清,水浴减压法回收乙醇,获取左归丸溶液。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 空腹采集研究对象静脉血4ml,其中1.5ml离心后取血清,电化学发光法检测血清雌二醇(E_2)水平;剩余2.5ml采用EDTA抗凝,Ficoll密度梯度离心法分离单个核细胞(PBMC),用于流式、Western blot及RT-PCR检测。

1.3.2 主要试剂 E_2 检测试剂盒购于德国罗氏公司;M-MLV购于Fermentas公司;RNA抑制剂购于上海生工生物有限公司;Ionomycin、PMA购于Sigma公司;DEPC、GIT、L-Gln购于AMRESCO公司;FBS购于杭州四季青生物公司;RPMI Medium 1640购于GIBCO公司。

1.3.3 流式细胞术检测 分离静脉血制备单个核细胞悬液,PBS洗2遍,用1640培养液调整细胞浓度为 1×10^7 /ml,接种于24孔板(1ml/孔),分别加入PMA 30ng/ml、Ionomycin 1 μ g/ml、Monensin 1.7 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳刺激培养4h后,收集培养细胞,PBA(PBS+0.1%NaN₃+0.1%BSA)洗两遍,重悬于PBA缓冲液,按说明书加入CD4-FITC和CD3-Cy5荧光抗体,4 $^{\circ}$ C避光染色30min,PBA清洗3遍,加入100 μ l固定液,4 $^{\circ}$ C,避光固定30min;穿膜液清洗1次,重悬于100 μ l穿膜液中,加入新鲜小鼠血清20 μ l/管,4 $^{\circ}$ C,避光封闭30min;分别加入PE标记的TNF- α 、IL-4荧光抗体,室温避光染色1h,用穿膜液和PBA各洗1遍后重悬于PBA中,用于流式细胞术胞内外因子的检测。

1.3.4 Western blot 法检测 T 细胞亚群特异性核转录因子蛋白水平 RIPA 裂解液裂解 PBMC 蛋白, 高速离心: 12000g 离心 30min, 吸取上清蛋白, 混匀, 沸水中煮 3min, 取出, 12000g 离心 1min, 取上清; 电泳分离转膜; 25ml TBS 洗膜 5min, 室温, 摇动; 置膜于 25ml 封闭缓冲液中 1h, 室温, 摇动; 15ml TBS/T 洗 3 次(5 min/T); 加入 1:250 稀释的 T-bet、GATA3 一抗, 室温孵育 1h, 缓慢摇动; 15 ml TBS/T 洗 3 次(5 min/T); 加入 1:1000 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 室温孵育 1h, 缓慢摇动, 15 ml TBS/T 洗 3 次(5 min/T), 15 ml TBS 洗 1 次; 化学发光法检测蛋白表达。

1.3.5 RT-PCR 检测 T 细胞亚群特征性细胞因子转录水平 RNA 提取: 采用异硫氰酸胍一步法提取 PBMC 总 mRNA, 紫外分光光度仪检测 A260/A280 比值, 验证 RNA 浓度和纯度。RT 反应: 采用 oligo dT 为 RT 反应引物, 取 2.5 μ g 总 RNA 按 RT 试剂盒说明书逆转录合成 cDNA 20 μ l; PCR 反应: 总反应体系为 25 μ l, 包含 RT 产物 5 μ l, 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ l, 25mM MgCl₂ 2 μ l, 上下游引物各 0.25 μ l (25pmol), 10mM DNTP 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l, DEPC 水 14 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 58~60 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 26 个循环后, 70 $^{\circ}$ C 延长 10min。1.5%凝胶(EB 染色)水平电泳, 采用 Alpha 凝胶成像系统分析图像: 以 β -actin 为内参照, 计算目的基因与同步 β -actin 灰度值比值作为相对表达量。

1.3.6 腰椎骨矿物质密度(BMD)测定 研究对象平躺在测量床上, 双能 X 线骨密度仪测定研究对象腰椎 2~4(L2~4)前后位 BMD。

1.4 统计学方法

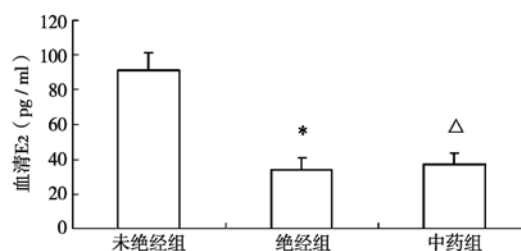
所有实验数据采用 SPSS 11.5 软件做统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 One Way-ANOVA 方差分析, 两组间比较采用 Turkey 法检验, 数据间相关性用 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 血清 E₂ 水平比较

未绝经组血清 E₂ 平均为 (91.11 $\pm$ 10.01) pg/ml, 绝经组平均为 (33.73 $\pm$ 7.12) pg/ml, 中药组平均为 (37.09 $\pm$ 6.23) pg/ml。与未绝经组比较, 绝经后妇女血清 E₂ 水平明显降低 ($t=18.092$, $P<0.05$); 与绝经组比较, 中药组绝经妇女 E₂ 表达无显著性差异 ($t=1.374$, $P>0.05$), 表明左归丸对

绝经妇女 E₂ 表达无影响, 无明显雌激素样作用。见图 1。

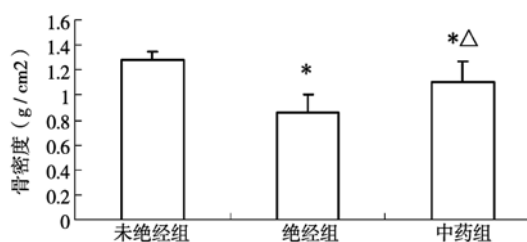


与未绝经组比较, * $P<0.05$; 与绝经组比较, $\Delta P>0.05$

图 1 血清 E₂ 水平比较

2.2 腰椎 L2~4 BMD 比较

未绝经组 L2~4 BMD 平均为 (1.28 $\pm$ 0.07) g/cm², 绝经组平均为 (0.87 $\pm$ 0.14) g/cm², 中药组平均为 (1.10 $\pm$ 0.16) g/cm²。与未绝经组相比, 绝经后妇女腰椎 BMD 明显降低 ($t=10.559$, $P<0.05$); 与绝经组比较, 中药组绝经妇女腰椎 BMD 明显升高 ($t=4.304$, $P<0.05$), 见图 2。

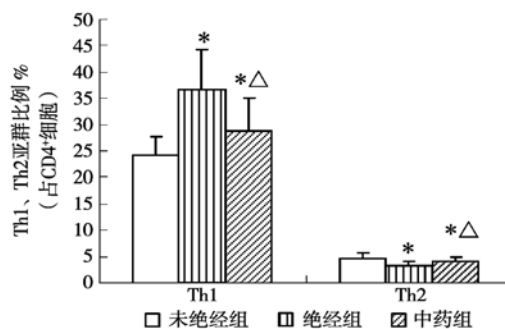


与未绝经组比较, * $P<0.05$; 与绝经组比较, $\Delta P<0.05$

图 2 腰椎 2~4 骨密度比较

2.3 Th1/Th2 亚群比例比较

与未绝经组相比, 绝经组 Th1 亚群比例明显升高 ($t=5.760$, $P<0.05$), Th2 亚群比例明显降低 ($t=3.605$, $P<0.05$), T 细胞向 Th1 亚群偏移。与绝经组相比, 中药组绝经妇女 Th1 亚群比例明显降低 ($t=3.128$, $P<0.05$), Th2 亚群比例明显升高 ($t=2.424$, $P<0.05$)。见图 3。



与未绝经组比较, * $P<0.05$; 与绝经组比较, $\Delta P<0.05$

图 3 Th1/Th2 亚群比例比较

2.4 E₂、骨密度、Th1/Th2 亚群比例相关性分析

相关性分析显示 E₂ 表达与骨密度呈显著正相关($P<0.05$);骨密度与 Th1 亚群比例呈显著负相关($P<0.05$),与 Th2 亚群比例呈显著正相关($P<0.05$);E₂ 表达与 Th1 亚群比例呈显著负相关($P<0.05$),与 Th2 亚群比例呈显著正相关($P<0.05$),见表 1。

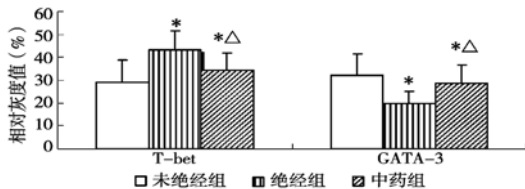
表 1 E₂、BMD 与 Th1/Th2 亚群比例的相关性分析

	Th1	Th2	BMD
E ₂	-0.531**	0.472**	0.685**
BMD	-0.7**	0.493**	—

** 相关性分析 $P<0.01$

2.5 Th1/Th2 亚群特异性核转录因子(T-bet、GATA-3)蛋白表达比较

与未绝经组比较,绝经组 Th1 亚群特异性核转录因子(T-bet)蛋白表达明显升高($t=4.343, P<0.05$),Th2 亚群特异性核转录因子(GATA-3)蛋白表达明显降低($t=4.721, P<0.05$);与绝经组比较,中药组绝经妇女 T-bet 蛋白表达明显降低($t=3.086, P<0.05$),GATA-3 蛋白表达明显升高($t=3.535, P<0.05$)。见图 4。

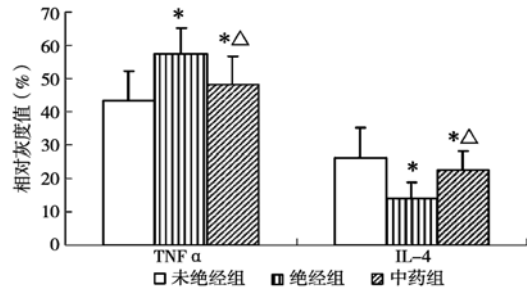


与未绝经组比较, * $P<0.05$;与绝经组比较, Δ $P<0.05$

图 4 T-bet、GATA-3 蛋白表达比较

2.6 Th1/Th2 亚群特征性细胞因子(TNF-α、IL-4)mRNA 表达比较

与未绝经妇女比较,绝经后妇女 Th1 亚群特征性细胞因子(TNF-α)mRNA 相对灰度值明显升高($t=4.557, P<0.05$),Th2 亚群特征性细胞因子(IL-4)mRNA 相对灰度值明显降低($t=4.669, P<0.05$);与绝经妇女相比,中药组绝经妇女 TNF-α mRNA 相对灰度值明显降低($t=3.092, P<0.05$),IL-4 mRNA 相对灰度值明显升高($t=4.257, P<0.05$)。见图 5。



与未绝经组比较, * $P<0.05$;与绝经组比较, Δ $P<0.05$

图 5 TNF-α、IL-4 mRNA 表达比较

3 讨论

初始 T 细胞遇抗原刺激后在特异性核转录因子与分化诱导因子作用下,分化为不同亚群,分泌特征性细胞因子,介导不同的免疫反应,对骨代谢发挥正向和负向调控作用。RANKL 是 OC 分化的关键调控因子,其受体是位于 OC 上的 RANK, RANKL 与 RANK 结合,启动 OC 的分化、成熟和活化过程^[5]。Th1、Th2 是经典的 T 细胞亚群。Th1 类细胞因子 TNF-α 被称为溶骨性细胞因子,是一种多功能的炎症介质,可通过诱导 OB 表达 RANKL,间接促进 OC 分化、成熟,也可直接促进 RANKL 诱导的 OC 形成和骨吸收^[6]。Th2 类细胞因子 IL-4 能抑制 RANKL 诱导的生理性骨吸收和病理情况下 TNF-α 诱导 OC 生成,体外研究显示 IL-4 一定条件下能抑制破骨细胞前体向 OC 分化及抑制成熟 OC 的活性,同时 IL-4 还抑制 OC 的 RANK 表达^[7]。因此,影响 T 细胞极化的因素均可影响 T 细胞亚群细胞因子的表达,从而影响骨代谢。随着对神经—内分泌—免疫网络研究的不断深入,发现雌激素对 T 细胞亚群极化有重要调节作用。雌激素是重要的性激素,E₂ 是女性和男性雌激素主要来源。衰老、应激、过度体力活动、低体重等状态均可出现雌激素缺乏,导致 OP 等骨代谢疾病发生,说明雌激素缺乏对骨代谢有重要影响。研究发现,T 细胞上存在雌激素受体,雌激素水平变化可直接影响 T 细胞增殖、活化和极化,雌激素缺乏可诱导 T 细胞向 Th1 漂移,导致 T 细胞亚群失衡^[8]。因此推断雌激素—T 细胞—骨代谢三者间有密切的联系。临床上,雌激素替代及免疫调节疗法治疗骨代谢性疾病有确切疗效,但存在诱发子宫内膜癌、宫颈癌、乳腺癌、代谢紊乱、感染等危险,且不适用于男性骨代谢疾病患者。因次,寻

找能够逆转或改善雌激素缺乏诱导的 T 细胞亚群极化、纠正骨代谢失调,又无雌激素样及免疫治疗副作用的药物具有良好的应用前景。

中医认为“肾主骨生髓”。现代医学研究发现中医“肾”的功能覆盖了神经、内分泌、免疫系统,构成了完整的人体调节网络,肾虚可导致神经—内分泌—免疫网络功能失调,引起骨代谢疾病发生^[9]。以补肾法为原则治疗骨代谢疾病疗效确切。研究证实补肾中药能促进 OB 增殖,抑制 OC 形成,上调骨组织 I 型胶原和骨矿化相关蛋白表达,减少尿钙排泄,升高大鼠骨密度^[10]。补肾经典方剂左归丸治疗 OP 等骨代谢疾病效果显著,可通过调节 OB 中 RANKL 表达实现对 OC 的抑制^[11]。中药免疫药理研究证实左归丸能调节卵巢早衰雌激素缺乏小鼠 CD4⁺/CD8⁺ 亚群平衡,改善卵巢早衰小鼠免疫功能^[12]。但尚未见对左归丸及其它补肾方剂逆转或改善雌激素缺乏诱导的 T 细胞亚群极化异常调节骨代谢的研究报道。

本研究显示,妇女绝经后血清 E₂ 水平与骨密度均明显降低、Th1 亚群比例升高、Th2 亚群比例降低;血清 E₂ 表达与骨密度呈正相关;骨密度、E₂ 表达与 Th1 亚群比例呈负相关,与 Th2 亚群比例呈正相关。此结果进一步证实雌激素缺乏状态诱导 Th1/Th2 亚群向 Th1 偏移,且与骨密度降低关系密切。同时绝经妇女 T-bet 蛋白表达、TNF- α mRNA 表达升高,GATA-3 蛋白表达、IL-4 mRNA 表达降低,表明雌激素缺乏状态下,促进骨吸收细胞因子表达升高,导致骨密度下降。绝经妇女服用左归丸后,血清 E₂ 水平无明显变化,表明左归丸对机体无明显雌激素样作用;骨密度、Th2 亚群比例升高,Th1 亚群比例降低,T-bet 蛋白表达、TNF- α mRNA 表达降低,GATA-3 蛋白表达、IL-4 mRNA 表达升高,表明左归丸通过下调 T-bet 蛋白表达、上调 GATA-3 蛋白表达,诱导 T 细胞向 Th2 亚群分化,进而抑制 TNF- α mRNA 与蛋白表达、促进 IL-4 mRNA 与蛋白表达,抑制骨吸收,升高骨密度。综合以上研究结果,雌激素缺乏导致的 Th1/Th2 亚群向 Th1 偏移是骨丢失发生的原因;

中药方剂左归丸通过干预 T 细胞亚群特异性核转录因子表达,逆转雌激素缺乏导致的 Th1/Th2 亚群偏移,抑制骨吸收细胞因子产生,促进骨形成细胞因子表达,从而减少骨丢失,促进骨形成。

参考文献:

- [1] 李恩,闫素云,谷丽敏,等.原发性骨质疏松发病的相关因素[J].中国骨质疏松杂志,1997,3(2):1-3.
- [2] 何维.医学免疫学[M].北京:人民卫生出版社,2005:197-198.
- [3] 李霞,孙建丽,王彬,等.绝经妇女外周血单个核细胞骨代谢调控因子表达变化[J].中国免疫学杂志,2011,8:49-53.
- [4] 姚成芳,王丽.阴虚阳亢小鼠 Th1/Th2 类细胞因子的漂移现象及中药左归丸的干预研究[J].山东大学学报,2004,42(3):349-352.
- [5] Varenna M, Gatti D. The role of rank-ligand inhibition in the treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. Reumatismo, 2010,62(3):163-171.
- [6] Fuller K, Murphy C, Kirstein B, et al. TNF alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL[J]. Endocrinology, 2002, 143:1108-1118.
- [7] Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, et al. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL[J]. Blood, 2003,102(3):1078-1086.
- [8] Wilder RL. Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol Suppl, 1996,44:10-12.
- [9] 杨裕华,李震.补肾中药对肾虚动物模型神经内分泌免疫系统影响的实验研究进展[J].天津中医药,2007,24(3):262-264.
- [10] 李恩,孔德娟.补肾方药对骨质疏松防治的实验研究[J].中国骨质疏松杂志,2002,8(2):166-170.
- [11] 刘梅洁,鞠大宏.“肾主骨”的机理研究—左归丸含药血清对破骨细胞分化调控因子 OPG、RANKL 蛋白表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2009,5(3):184-188.
- [12] Shen JJ, Lin CJ. The effect of liu-wei-di-huang wan on cytokine gene expression from human peripheral blood lymphocytes[J]. Am J Chin Med, 2003;31(2):247-257.

(收稿日期 2013-04-30)