

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160804

葛根素在卵巢早衰患者中的免疫调节作用

张金慧, 杜洪灵, 周琼青

上海市普陀区人民医院妇产科, 上海 200060

[摘要] **目的:**探讨葛根素(Puerarin)对卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)患者的免疫调节机制。**方法:**随机选取抗卵巢抗体(AoAb)阳性的 POF 患者 40 例,采用葛根素-安宫黄体酮序贯治疗。在治疗前和治疗第 12 个周期采用 Kupperman 评分法评价该方法的临床疗效;并检测患者 AoAb、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞, CD4⁺/CD8⁺ 值, CD19⁺ B 淋巴细胞, 抗核抗体(ANA)等指标。统计治疗过程中不良反应的发生情况。**结果:**治疗后患者的 Kupperman 评分、ANA 转阴率、AoAb 转阴率和 AoAb 浓度降低($P<0.05$)。治疗后 CD8⁺ T 细胞数明显增加;而 CD3⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞, CD4⁺/CD8⁺ 比值, CD19⁺ B 淋巴细胞数明显减少或降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。Kupperman 评分改变与 AoAb、CD3⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞数, CD19⁺ B 淋巴细胞数, ANA 变化正相关($P<0.05$);Kupperman 评分与 CD8⁺ T 细胞计数负相关($P<0.05$)。**结论:**葛根素-安宫黄体酮序贯疗法可能通过调节 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞功能来调节机体免疫功能,通过抑制 CD19⁺ B 淋巴细胞的增殖及 ANA、AoAb 等的分泌来消除 POF 的免疫性损伤,从而实现卵巢的自我修复和功能恢复。

[关键词] 卵巢早衰;葛根素-安宫黄体酮序贯疗法;抗卵巢抗体;抗核抗体;T 淋巴细胞;B 淋巴细胞

[中图分类号] R 711.75 **[文献标志码]** A

Effect of Puerarin on the immune regulation of patients with premature ovarian failure

ZHANG Jin-hui, DU Hong-ling, ZHOU Qiong-qing

Department of Obstetrics and Gynecology, Putuo District People's Hospital, Shanghai 200060, China

[Abstract] **Objective:** To discuss the immune regulation mechanism of Puerarin in patients with premature ovarian failure (POF), and to study the anti-ovary anti-body (AoAb), antinuclear antibody (ANA), CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte cell and CD4⁺/CD8⁺ and changes of CD19⁺ B lymphocyte cell before and after treatment. **Methods:** Totally 40 POF cases with AoAb positive, treated with Puerarin-progesterone sequential treatment, were random selected. The clinical efficacy was analyzed before treatment and at the 12th cycle of treatment by using Kupperman, and the AoAb, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ B lymphocyte cell, ANA and other indicators were recorded and analyzed. The incidence rate of adverse reactions in the treatment process was recorded. **Results:** Kupperman score, ANA negative rate, AoAb negative rate and concentration of antibody after treatment were significantly decreased ($P<0.05$). The CD8⁺ T cell counts increased significantly, while the CD3⁺, CD4⁺ T cells, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ B lymphocytes were significantly reduced after treatment ($P<0.05$). Kupperman score was positively correlated with the number of AoAb, CD3⁺, CD4⁺ T cells, CD19⁺ B cell count, and ANA ($P<0.05$), and negative correlated with CD8⁺ T cell count ($P<0.05$). **Conclusions:** Puerarin-progesterone sequential treatment is a safe and effective method for the POF. Puerarin may regulate immune function through the CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, eliminate the immune injury of the POF by inhibiting the CD19⁺ B cell, and secretion of ANA and AoAb to realize the self-repairing and functional recovery of ovarian.

[Key Words] premature ovarian failure; puerarin-progesterone method; anti-ovary antibody; antinuclear antibody; T cell; B cell

女性 40 岁之前发生卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 的比率为 1%~3%, 其中抗卵巢抗体 (antiovary antibody, AoAb) 阳性率达 70%; 自体免疫因素是其主要发病机制之一^[1-2]。长

期使用糖皮质激素治疗可以增加 POF 患者的雌激素水平, 从而缓解 POF 的症状, 但会引起其他不良反应。前期研究^[3]发现, 葛根素 (Puerarin) 具有有效缓解 POF 症状且不增加血雌激素水平和不诱发

[收稿日期] 2016-08-13 **[接受日期]** 2016-11-05

[基金项目] 上海市普陀区科学技术委员会基金(KW15201)。Supported by the Putuo District Science and Technology Project of Shanghai (KW15201)。

[作者简介] 张金慧, 副主任医师。E-mail: zjinhui68@126.com

妇科肿瘤的优点,部分患者甚至可以痊愈。本研究旨在探索葛根素是否具有通过调节机体免疫机能来抑制 AoAb 的产生,从而达到有效治疗 POF 的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本课题组 2012 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月治疗 POF 患者共 40 例,年龄 31~40 岁,平均 (36.12 ± 4.32) 岁;用药时间 12~31 个周期,平均 (24.22 ± 7.64) 个周期。入选标准:(1)符合 POF 诊断标准,AoAb 阳性;(2)患者愿意采用葛根素+安宫黄体酮序贯治疗。排除患有乳腺癌、子宫内膜癌等妇科肿瘤,结核、血液病等病理性停经,采用其他卵巢和女性激素药物治疗的患者。对照组采用张志君等^[4]研究中的健康人群对照组。本研究通过医院医学伦理委员会审核。入选研究对象均签署知情同意书。

1.2 用药方法 应用葛根片和安宫黄体酮序贯疗法建立月经人工周期。患者每日口服葛根素片(野葛根提取物片,剂量为 0.33 g/片,由上海仁济大药房提供;上海市预防医学研究院检测示,每片含有异黄酮 0.429 mg)1 片,1 次/d,28 d 为 1 个周期;于每个周期的 19~28 d 加安宫黄体酮 10 mg 口服,1 次/d。对于已婚者应用避孕套避孕,定期门诊随访。

1.3 抗体检测 检测治疗前和治疗后第 12 个月经周期患者的 AoAb。月经干净后 3 d 抽患者空腹静脉血,离心后低温保存备用。用化学发光免疫检测方法[微粒子酶免疫分析法(MEIA),德国罗氏诊断有限公司全自动化学发光免疫分析仪]测定各对象血清卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)水平。采用上海抚生实业有限公司生产的 AoAb 等抗体试剂盒,用 ELISA 法检测血液 AoAb。采用欧蒙(杭州)医学实验诊断有限公司的 IgG 检测试剂盒,间接免疫荧光法检测抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)。CD19⁺B 淋巴细胞,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞亚群和 CD4⁺/CD8⁺比值检测,免疫标化后应用上海汇中细胞生物科技有限公司 Cytocounter 系列全自动可视化细胞检测仪进行计数分析。

1.4 疗效评价 采用 Kupperman 评分法^[5],按照更年期症状计分:潮热出汗 4 分;失眠、烦躁、焦虑各 2 分;睡眠中断、心悸、疲倦、紧张、抑郁、痒感和痛感、易哭、注意力不集中、阴道干燥、性欲减退、性交

痛各占 1 分。每种症状的评分根据程度(无、轻、中、重)分别乘以 0、1、2、3 后计算总分,满分为 63 分(最严重)。治疗前后对照,降低的分数作为疗效评判指标。总分 5 分以下者,停药 3 个周期。症状缓解,月经规律且色、量正常判为治愈。症状部分缓解,停药后疗效难以维持者继续按照标准用药治疗。

1.5 安全性评估 在用药前和用药后每半年体检,进行宫颈防癌涂片、乳腺、 E_2 水平、肝肾功能等检测,B 超检查子宫、卵巢的大小及子宫内膜厚度等,以筛查雌激素相关性疾病。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验、 χ^2 检验以及相关性检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 POF 患者的临床疗效评价 结果(表 1)表明:治疗后第 12 个周期患者的 Kupperman 评分较治疗前明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。40 例患者中,治愈 14 例,治愈率为 35%。与对照组相比,治疗前患者的 FSH、LH 明显增高($P < 0.05$), E_2 明显降低($P < 0.05$)。治疗后患者的 FSH 和 LH 水平较治疗前降低($P < 0.05$), E_2 无明显变化。治疗后与对照组 FSH 和 LH 水平差异无显著性,治疗后 E_2 较对照组明显降低($P < 0.05$)。

2.2 POF 患者的免疫指标测定 用药第 12 个月经周期,CD19⁺B 细胞计数及 CD3⁺、CD4⁺T 细胞计数和 CD4⁺/CD8⁺比值明显减小,而 CD8⁺计数明显增加,AoAb 浓度降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。本组患者中有 14 例 AoAb 转为阴性,转阴率为 35%;ANA 阳性率由 90%下降到 45%,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。Kupperman 评分与 AoAb 浓度,CD3⁺、CD4⁺T 细胞数,CD4⁺/CD8⁺比值,CD19⁺B 细胞数变化正相关($P < 0.05$),而与 CD8⁺T 细胞数负相关($P < 0.05$),与 ANA 正相关。AoAb 浓度变化与 CD3⁺、CD4⁺T 细胞数,CD4⁺/CD8⁺比值,CD19⁺B 细胞数变化正相关($P < 0.05$),而与 CD8⁺T 细胞数负相关($P < 0.05$),与 ANA 正相关($P < 0.05$)。

2.3 不良反应 患者在治疗后 2~3 个月经周期开始恢复月经规律;6 个周期后月经色、量基本稳定;12 个周期时 Kupperman 评分比较稳定,其中 35% 的患者治疗 12 个周期评分 5 分以下,获得治愈,停药。因此,将第 12 个周期的指标月经水平用以评估

疗效,患者依从性好,结果较为准确,之后的化验结果易受到其他环境和生活因素干扰。研究总计观测 12~31 个周期,平均 (24.22 ± 7.64) 个周期,发现

月经情况稳定,葛根素治疗耐受良好,均未发现明显药物不良反应及乳腺、卵巢、子宫部位的雌激素依赖性肿瘤的发生。

表 1 POF 患者激素水平改变

$\bar{x}\pm s$

组 别	<i>n</i>	FSH $\bar{x}_B/(U\cdot L^{-1})$	LH $\bar{x}_B/(U\cdot L^{-1})$	E ₂ $\bar{x}_B/(pg\cdot L^{-1})$	Kupperman 评分(分)
对照组	52	6.52±6.40	4.59±3.19	51.5±8.87	0
治疗前	40	81.8±19.3*	59.4±22.4*	35.2±11.2*	48.0±18.2
治疗后	40	22.3±17.6 Δ	25.4±17.2 Δ	39.1±15.4*	21.0±13.6 Δ

* $P<0.05$ 与对照组相比; $\Delta P<0.05$ 与治疗前相比

表 2 POF 患者治疗前与治疗第 12 个周期后免疫指标比较

$\bar{x}\pm s$

组 别	<i>n</i>	AoAb U/mL	ANA	CD19 ⁺ B	CD3 ⁺ T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Kupperman 评分(分)
治疗前	40	6.91±2.37	36	457±148	2 261±443	1 152±337	285±149	1.54±0.84	48±18.15
治疗后	40	3.72±2.54*	18*	226±124*	816±254*	424±234*	1 067±385*	0.83±0.24*	21±13.57*

* $P<0.05$ 与治疗前相比

3 讨 论

POF 免疫性损伤的发病机制尚不清楚,以 AoAb 介导的自身免疫性损伤被认为是该病的主要发病机制。AoAb 是自身免疫系统将卵巢组织作为抗原进行攻击而产生的自身抗体,主要包括抗透明带抗体、抗颗粒细胞抗体和抗内膜细胞抗体等^[6]。其主要产生机制为:(1)排卵过程中卵泡破裂,免疫屏障暂时开放和部分细胞外溢,导致卵巢组织抗原暴露,产生自身抗体;(2)反复多次助孕穿刺取卵导致的卵巢组织免疫屏障破坏致使抗原性暴露,产生自身免疫;(3)炎症、人流、痛经、囊肿破裂、子宫内膜异位等导致卵巢免疫屏障破坏^[7],相关抗原暴露诱导抗体产生;(4)宫外孕、卵巢囊肿等手术直接导致屏障破坏和抗原暴露;(5)自身免疫功能异常导致产生一系列自身免疫性疾病等。文献^[8]报道,POF 患者 AoAb、CD4、CD8 等细胞因子均有异常,卵巢抗原暴露的同时产生细胞免疫和体液免疫,损害卵巢。卵巢免疫性损害的主要机制可能在于:(1)AoAb 包裹卵细胞并影响其排出;(2)AoAb 在补体作用下产生细胞毒作用,破坏卵巢细胞,引起卵泡发育不全及 POF;(3)AoAb 干扰孕卵破壳而妨碍着床;(4)AoAb 损害卵巢内分泌功能,导致雌激素水平降低。CD19⁺B 淋巴细胞代表 B 淋巴细胞总数及抗体分泌能力。而 CD3⁺T 淋巴细胞代表成熟 T 淋巴细胞及细胞免疫水平。CD4⁺T 淋巴细胞属

于辅助 T 细胞,而 CD8⁺T 淋巴细胞属抑制性 T 细胞。CD4⁺/CD8⁺代表机体免疫状态,明显增高表示免疫机能处于过度活跃状态,降低提示机体处于免疫抑制状态^[8]。本研究发现,葛根素-安宫黄体酮治疗后,患者血液中 AoAb 和 ANA 水平均明显下降,部分患者转为阴性,而 CD19⁺B 细胞亚群数明显下降,说明机体抗体分泌水平降低;同时 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显降低,而 CD8⁺亚群明显增加,说明 T 细胞系统调节机制发挥明显作用。T 细胞进一步抑制 B 淋巴细胞抗体分泌,使得 AoAb 分泌减少或停止排放,卵巢的免疫性损害停止并在机体修复机制作用下得以康复。由于 AoAb 引起的卵巢炎在早期对原始卵泡影响较小且治疗效果明显,因此及早进行 AoAb 测定对于不孕不育患者有重要意义。

葛根素治疗前后 Kupperman 评分与 AoAb 浓度的变化均与 CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞数,CD4⁺/CD8⁺ 比值,CD19⁺B 淋巴细胞数正相关,而与 CD8⁺T 淋巴细胞数负相关,反映了 AoAb 浓度的变化与 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞免疫水平之间的相关性。本研究结论支持 POF 以体液免疫为主的疾病,而非染色体异常所致的推测^[9]。本研究发现葛根素不但可以有效缓解 POF 的临床症状,降低 Kupperman 评分,还可抑制 FSH、LH 分泌而不增加血液 E₂ 浓度,避免雌激素依赖性肿瘤的发生,在部分患者中取得了治愈的效果。本研究在临床效

果、激素水平、安全性等都与前期研究取得了相似结果。治疗后 AoAb 转阴率达 35%，浓度明显降低，而 ANA 转阴率 45%，说明葛根素-安宫黄体酮序贯治疗对于 AoAb、ANA 都有明显抑制作用。本研究还显示，该疗法无糖皮质激素治疗的不良反应。

该序贯疗法中，安宫黄体酮作为人工合成孕激素，无调节免疫的作用。葛根素可有效治疗 POF 得益于葛根富含的异黄酮等 20 余种生物活性成分，其药理作用主要有：(1)改善微循环，促进组织血流，改善供血，有利于组织修复和功能恢复；(2)类雌激素作用可以部分替代雌激素作用而产生直接治疗效果；(3)促进炎性介质疏散、缓解平滑肌痉挛，发挥解热、解痉、消炎、镇痛作用，缓解组织炎性反应，对于局部炎症起到直接治疗作用，有利于自身修复；(4)加强细胞组织基底膜的修复作用，促使卵巢生物屏障的修复，隔离暴露的抗原，阻碍抗体产生；(5)直接作用于淋巴系统，抑制 T 细胞系统功能，干扰 B 淋巴细胞的分泌和释放抗体能力，并影响其活性。研究提示葛根素治疗卵巢早衰不是一种成分作用的结果，而是各种成分的多节点、多环节、多机制作用的结果^[10]。应充分发挥其安定心神、平衡免疫、增加营养、调节代谢的全身性治疗作用。

POF 患者的发病原因并不明确，有研究提出了卵巢自身抗体学说、基因突变学说等^[11]，而葛根素-安宫黄体酮序贯疗法可通过抑制 AoAb 产生或使其部分转阴，从而抑制自身免疫对卵巢的损害，使紊乱的内分泌轴重新获得协调并“重启动”。大部分患者只是症状得到缓解或部分缓解，说明 POF 患者的发病基础呈多样性，可能存在着难以治愈的病理基础^[12]。

参考文献

[1] ROBLES A, CHECA M A, PRAT M, et al. Medical alternatives to oocyte donation in women with premature ovarian failure: a systematic review[J]. *Gynecol Endocrinol*,

2013, 29(7):632-637.

- [2] 刘素英,徐 军,曹 翔,等. 抗苗勒管激素对多囊卵巢综合征卵巢反应的预测作用[J]. *中国临床医学*, 2015, 22(5): 621-623.
- [3] 张金慧,王慧丽,陈蓓蓓,等. 葛根素-安宫黄体酮序贯疗法治疗卵巢早衰的临床研究[J]. *中国初级卫生保健*, 2012, 11(10):880-883.
- [4] 张志君,刘 惠. 女性闭经患者血清 FSH、LH、PRL 水平测定分析[J]. *中国性科学*, 2016, 25(9):29-31.
- [5] KOKCU A. Premature ovarian failure from current perspective[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2010, 26(8):555-562.
- [6] SASSARINI J, LUMSDEN M A, CRITCHLEY H O. Sex hormone replacement in ovarian failure- new treatment concepts[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015, 29(1):105-114.
- [7] AYABE T, ISHIZUKA B, MARUYAMA T, et al. Association of primary ovarian insufficiency with a specific human leukocyte antigen haplotype (A* 24:02-C* 03:03-B* 35:01) in Japanese women [J]. *Sex Dev*, 2011, 5(5): 235-240.
- [8] FRAWLEY R, WHITE K J R, BROWN R, et al. Gene expression in immune system pathways in the thymus after exposure to immunosuppressive chemicals[J]. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(3):371-376.
- [9] GELBAYA T, VITTHALA S, NARDO L, et al. Optimizing hormone therapy for future reproductive performance in women with premature ovarian failure[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2011, 27(1):1-7.
- [10] WEI S Y, CHEN Y, XU X Y. Progress on the pharmacological research of Puerarin: a review[J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(6):407-414.
- [11] WANG H, LI G, ZHANG J, et al. Novel WT1 missense mutations in Han Chinese women with premature ovarian failure[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:13983.
- [12] FONSECA D J, PATIÑO L C, SUÁREZ Y C, et al. Next generation sequencing in women affected by onsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(1): 154-162.

[本文编辑] 叶 婷, 晓 璐