

基于Nrf2/HO-1通路探讨二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠的治疗作用及机制

张赫林^{1, 2}, 龚春香^{3*}, 赵解南², 朱彦蓉², 谢和兵^{1, 2*}, 袁志兵^{2, 4}

1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230013

2. 江苏神猴医药研究有限公司, 江苏 南通 226133

3. 南京中医药大学附属常州中医医院病理科, 江苏 常州 213003

4. 广西医科大学脊谷医学检验实验室, 广西 南宁 530000

摘要: **目的** 研究藏药二十五味鬼臼丸对苯酚胶浆致宫颈炎模型大鼠的治疗作用及机制。**方法** 将雌性SD大鼠48只随机分为对照组、模型组及二十五味鬼臼丸低、中、高剂量(0.2、0.4、0.8 g·kg⁻¹)组和抗宫颈炎片(0.47 g·kg⁻¹)组, 每组8只。除对照组外, 其余5组建立25%苯酚胶浆致宫颈炎大鼠模型, 各药物组分别以相应药物ig给药, 每日1次, 连续给药12 d后取材。观察大鼠外阴炎症程度评分、子宫指数、子宫解剖形态学改变; 采用苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠子宫组织病理学改变; 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测子宫组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量变化; 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法和蛋白免疫印迹(Western blotting)法检测子宫组织中核因子E2相关因子(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)、NADPH氧化酶4(Nox4)的mRNA和蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠外阴炎症评分、子宫指数、子宫组织中MDA水平、Nox4的mRNA和蛋白表达均显著升高($P<0.01$), 体质量、SOD活性、Nrf2、HO-1的mRNA和蛋白表达均显著降低($P<0.01$), 子宫组织出现不同程度的病理变化; 与模型组比较, 二十五味鬼臼丸能明显降低外阴炎症评分、子宫指数、子宫组织中MDA水平、Nox4的mRNA和蛋白表达($P<0.05$ 、 0.01), 升高体质量及子宫组织中SOD活性和Nrf2、HO-1的mRNA和蛋白表达($P<0.05$ 、 0.01), 减轻子宫颈炎损伤程度。**结论** 二十五味鬼臼丸可能通过抑制Nox4的表达, 激活Nrf2/HO-1通路, 发挥抗氧化作用, 减轻炎症反应, 从而抑制宫颈炎发展。

关键词: 二十五味鬼臼丸; 宫颈炎; 苯酚胶浆; 核因子E2相关因子; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)12-2608-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.015

Study on therapeutic effects and mechanism of Ershiwuwei Guijiu pills on cervicitis rats based on Nrf2/HO-1 pathway

ZHANG Helin^{1, 2}, GONG Chunxiang³, ZHAO Jienan², ZHU Yanrong², XIE Hebing^{1, 2}, YUAN Zhibing^{2, 4}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230013, China

2. Jiangsu Shenhui Pharmaceutical Research Co., Ltd., Nantong 226133, China

3. Department of Pathology, Changzhou Traditional Chinese Medicine Hospital affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213003, China

4. Rexplo Medical Laboratory of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China

Abstract: **Objective** To study the therapeutic effects and mechanism of Tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu pills (EGP) on cervicitis model rats induced by phenol mucilage. **Methods** Totally 48 female SD rats were randomly divided into control group, model group, EGP low, medium and high dose group (0.2, 0.4, 0.8 g·kg⁻¹) and Kanggongyan Tablets group (0.47 g·kg⁻¹), with eight rats in each group. Except for control group, the rats in the other five groups were successfully established with 25% phenol mucilage cervicitis, and then the rats in each drug group were given the corresponding drugs by gavage once a day for 12 consecutive days. The vulvar inflammation degree score, uterine index, and uterine anatomical morphological changes were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of the uterus in rats. The contents of

收稿日期: 2023-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81470247)

第一作者: 张赫林,男,硕士研究生,研究方向为中药学。E-mail:1072140865@qq.com

*共同通信作者: 龚春香,女,硕士,副主任医师。E-mail: binhe_8213@163.com

谢和兵,男,副主任药师,硕士生导师。E-mail:76445044@qq.com

superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in uterine tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent (ELISA). The expression of mRNA and protein in uterine tissues by nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and NADPH oxidase 4 (Nox4) were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting. **Results** Compared with control group, the vulvar inflammation score, uterine index, the content of MDA, the expression of Nox4 mRNA and protein in uterine tissue of the model group were significantly increased ($P < 0.01$), the activity of SOD and the expression of Nrf2, HO-1 mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.01$), and different degrees of pathological changes were observed in uterine tissue; Compared with model group, each dose of EGP group could significantly decrease the vulva inflammation score, uterine index, the content of MDA, the expression of Nox4 mRNA and protein in uterine tissue ($P < 0.05$ and 0.01), and increase the activity of SOD and the expression of Nrf2, HO-1 mRNA and protein in uterine tissue ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** EGP may inhibit the development of cervicitis by inhibiting the expression of Nox4, activating the Nrf2/HO-1 pathway, exerting antioxidant effects, and reducing the inflammatory response, thereby inhibiting the development of cervicitis.

Key words: Ershiwuwei Guijiu pills; cervicitis; phenol mucilage; nuclear factor E2 related factor; oxidative stress

宫颈炎是一种常见于育龄期妇女的临床炎症综合征,病程较长,易复发且愈合较慢,严重影响患者的生活和身心健康^[1]。其主要病因是宫颈损伤和病原体感染,临床症状通常表现为阴道分泌物增多,月经间期出血,并伴有灼烧感和下腹疼痛^[2-3]。宫颈感染始于下生殖道,长期不愈可逐渐发展为宫颈糜烂、子宫内膜炎、盆腔炎等多种疾病,甚至可诱发宫颈癌^[4]。目前临床治疗宫颈炎主要以经验性抗生素为主,但长期使用抗生素会导致耐药性增加、自身菌群失调、免疫力下降等^[5-6]。近年来,中药单方及复方因具有多靶点、多成分的特点,在治疗宫颈炎过程中显示出更安全有效且副作用小的独特优势^[7]。因此,中医药治疗可能为宫颈炎的临床治疗提供新的选择。

二十五味鬼臼丸是传统藏药方剂,收载于卫生部颁药品标准(藏药第一册)中,由鬼臼、藏茜草、藏紫草、肉桂、巴夏嘎、榜嘎、藏木香、诃子、熊胆、喜马拉雅紫茉莉、余甘子、降香、肉豆蔻等25种藏药组成,具有祛风镇痛、调经血作用,对宫颈炎、盆腔炎、阴道炎、子宫内膜炎等妇科生殖系统疾病有良好的治疗效果,但其作用机制研究尚不明确^[8-10]。本研究通过苯酚胶浆诱导建立宫颈炎大鼠模型,基于核因子E2相关因子(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)通路探讨二十五味鬼臼丸对宫颈炎的治疗作用及作用机制,以期为该制剂后续治疗宫颈炎的临床推广和二次开发提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

SD雌性大鼠48只,体质量180~200 g,购自广西医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(桂)2020-0003。本研究所涉及的实验均符

合动物伦理委员会的相关要求(伦理审批号202208003)。实验前适应性喂养1周,饲养期间自由进食和饮水。

1.2 药物与主要试剂

二十五味鬼臼丸(西藏神猴药业有限责任公司,批号20210101,规格1 g×10丸);抗宫炎片(江西京通美联药业有限公司,批号220606,规格0.25 g×100片);苯酚(上海麦克林生化科技有限公司,批号P815401);甘油、阿拉伯树胶粉(上海源叶生物科技有限公司,批号S24784、S11034);大鼠超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号ml077379、ml077384);TriQuick Reagent总RNA提取试剂(北京索莱宝生物科技有限公司,批号R1100);MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsNase试剂盒(武汉莫纳生物科技有限公司,批号MR05101);Universal SYBR qPCR Master Mix通用荧光定量PCR试剂盒、ECL化学发光底物(特超敏)(Biosharp公司,批号H8216980、BL520A);苯甲基磺酰氟(PMSF, 100 mmol·L⁻¹)、蛋白磷酸酶抑制剂混合物(北京索莱宝生物科技有限公司,批号P0100、P1260);兔一抗Nrf2、HO-1、Nox4、山羊抗兔二抗(英国Abcam公司,批号ab92946、ab68477、ab154244、ab6721);β-actin一抗(美国ABclonal公司,批号AC026);脱脂奶粉(英国OXOID公司,批号LP0033B)。

1.3 主要仪器

AriaMx Real-Time PCR System(美国安捷伦科技公司);FC-1100超微量核酸检测仪(杭州遂真生物技术有限公司);5418R低温离心机(德国Eppendorf公司);HX-20G2恒温金属浴(上海沪析

实业有限公司); IKA mini 涡旋仪、T18 组织匀浆机(德国 IKA 公司); FilterMax F3 多功能酶标仪(美国 MD 公司); Mini TBT 转印槽(武汉莫纳生物科技有限公司); Power Pac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon-5200 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); TS-3D 水平摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司); Veriti™ 96-Well Thermal Cycler(英国 Thermo Fisher 公司); DM 2500 光学显微镜、Leica HI1210 组织烤片机、Leica RM2235 组织切片机、Leica HI1210 组织摊片机(德国 Leica 公司); BX-53 光学显微镜(日本 Olympus 公司); Excelsior AS 世尔脱水机(英国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型建立及给药

将 48 只雌性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、抗宫炎片(阳性药)组和二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组, 每组 8 只。取苯酚 5.0 g、阿拉伯树胶粉 1.0 g、甘油 4 mL、加蒸馏水至 20 mL, 配成浓度为 25% 的苯酚胶浆溶液。除对照组外, 其余均用连接灌胃针的 1 mL 注射器向大鼠阴道深部约 1 cm 处注入苯酚胶浆, 每只大鼠注入 0.1 mL, 注入同时缓慢撤针, 每天注入 1 次。每次给药结束后, 塞入无菌棉签到阴道口, 以防造模药物流出^[11-12]。对照组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液。每天观察大鼠的状态, 造模直至大鼠外阴红肿, 阴道出现白色分泌物且分泌物较多, 则提示宫颈炎模型复制成功。

造模结束后 24 h 开始 ig 给药, 对照组和模型组 ig 等剂量蒸馏水, 二十五味鬼臼丸的成人临床给药剂量为 4 g·d⁻¹, 根据《药理实验方法学》^[13], 以体表面积换算, 按照成人临床常用剂量换算为大鼠给药剂量, 二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组大鼠 ig 剂量分别为 0.2、0.4、0.8 g·kg⁻¹, 阳性药组抗宫炎片大鼠 ig 剂量为 0.47 g·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 12 d, 给药体积均为 10 mL·kg⁻¹。

2.2 取材

末次给药后禁食不禁水, 24 h 后 ip 2% 戊巴比妥钠(0.04 g·kg⁻¹)麻醉大鼠, 在大鼠尿道上方 2~3 cm, 用手术剪纵向切开皮肤和肌肉层, 完整取材阴道至子宫角处组织, 并用 0.9% 氯化钠溶液清洗干净后, 将部分组织置于组织固定液中固定, 用于 HE 染色, 部分组织 -80 °C 冷冻保存, 用于其他指标检测。

2.3 大鼠一般情况观察

从造模开始, 每天观察各实验组大鼠状态并记

录大鼠宫颈口和阴道分泌物情况, 主要包括有无干燥、红斑、红肿、充血、流液及分泌物。根据《中药药理研究方法学》^[14]中的外阴炎症反应评分标准(表 1), 分别于给药后第 1、6、12 天进行评分。

表 1 外阴炎症反应评分标准

Table 1 Scoring standard of vulvar inflammatory reaction

红斑	外阴红肿	阴道分泌物	评分
无	无	无	0
非常轻度	非常轻度	很少	1
轻度	轻度	少	2
中度	中度	中	3
重度	重度	多	4

2.4 大鼠子宫指数的测定

取各组大鼠子宫组织, 去除周围脂肪组织, 0.9% 氯化钠溶液中浸洗 2~3 次, 用滤纸吸干水分, 电子天平称量子宫组织质量, 计算大鼠子宫指数。

2.5 HE 染色法观察大鼠子宫组织病理学改变

取出已固定好的各组大鼠宫颈组织, 用组织切片机调整切片厚度为 3 μm 进行切片; 切片常规脱蜡至水, 常规梯度乙醇脱水, 自来水冲洗; 苏木素染色, 流水冲洗; 盐酸酒精分化液分化, 流水冲洗; 伊红液染色, 流水冲洗; 乙醇脱水, 浸蜡脱蜡透明液透明; 中性树胶封片, 晾干; 光学显微镜下镜检。

2.6 ELISA 法检测大鼠子宫组织中 SOD、MDA 的水平

用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗子宫组织, 去除残留血液, 滤纸吸干水分; 称取各组大鼠组织质量约 50 mg, 用组织剪剪切成尽可能小的碎块, 按 1:9 的比例加入预冷的 PBS; 在样本中加入 5 倍的含 1% PMSF 的 1×PBS 缓冲液, 使 PMSF 终浓度为 1 mmol·L⁻¹, 用匀浆器在冰浴中充分匀浆。4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测子宫组织中 *Nrf2*、*HO-1*、*Nox4* mRNA 的表达情况

从各组大鼠子宫组织中提取总 RNA, 用 NanoDrop 检测其纯度和浓度。按照 MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsNase 反转录试剂盒操作方法将 RNA 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应体系由 (20 μL) 包括 1.0 μL cDNA 模板、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、10.0 μL Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)、无菌水补足至 20 μL。

反应条件为95℃预变性3 min,95℃变性15 s,退火20 s,72℃延伸20 s,共40个循环。引物序列见表

2。以 β -actin作内参,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行数据分析计算mRNA的相对表达量。

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>Nrf2</i>	TCTGACTCCGGCATTTCACCT	TGTTGGCTGTGCTTTAGGTC
<i>HO-1</i>	GCACTGTCCCAGGATTTGTCC	GGTCTGCTTGTTTCGCTCT
<i>Nox4</i>	CCTCAGTCAAACAGATGGGATA	GTCTTGGAATAGAACTGGGTC
β -actin	CGTAAAGACCTCTATGCCAACA	TAGGAGCCAGGGCAGTAATC

2.8 Western blotting 法检测子宫组织中 Nrf2、HO-1、Nox4 蛋白表达水平

取各组大鼠子宫组织适量,加入RIPA组织裂解液250 μ L,匀浆充分后于冰上裂解30 min,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液并用BCA定量法测定蛋白含量,加入5×loading buffer,100℃加热变性10 min并保存。随后取变性后的蛋白样本进行SDS-PAGE凝胶电泳,转PVDF膜,用8%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗膜后,加入相应的一抗Nrf2(1:1 000)、HO-1(1:1 000)、Nox4(1:1 000)、 β -actin(1:40 000),4℃孵育过夜,用TBST洗涤3次,每次5 min,随后加入IgG-HRP二抗(1:8 000),37℃孵育1 h,TBST洗涤3次,每次5 min,ECL显影并采集图像,随后采用Image J软件进行灰度值分析,计算目的蛋白条带的相对表达水平。

2.9 统计学分析

采用SPSS 25.0和GraphPad Prism 8.0软件进行处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用LSD-*t*检验。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察

3.1.1 对宫颈炎大鼠一般状态的影响 造模期间,对照组大鼠活动正常,且大鼠阴道外观正常;与对

照组比较,各造模组大鼠食欲减退,活动次数减少,扎堆,易怒,且阴道口红肿并有大量分泌物流出,大鼠体质量增长显著性缓慢($P<0.01$);与模型组比较,二十五味鬼臼丸各给药剂量组大鼠上述症状均得到不同程度的改善,二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组体质量均有较为显著的增长趋势($P<0.01$)。见表3。

3.1.2 对宫颈炎大鼠外阴炎症程度的影响 给药前,各组间大鼠外阴炎症评分基本无差异;与对照组比较,模型组大鼠外阴炎症评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,在给药第12天时,二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组外阴炎症评分均显著性降低($P<0.01$)。见表4。

3.2 二十五味鬼臼丸对大鼠子宫指数的影响

与对照组比较,模型组大鼠子宫指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二十五味鬼臼丸各剂量组子宫指数均有不同程度的下降趋势,且二十五味鬼臼丸中、高剂量组下降较为明显($P<0.05$)。见表5。

3.3 二十五味鬼臼丸对大鼠子宫组织形态的影响

肉眼观察各组大鼠子宫组织形态,对照组大鼠子宫腔道较细,未见明显的病理改变,且形态正常;模型组大鼠子宫可观察到不同程度的肿胀,管腔内

表3 各组大鼠体质量的比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3 Comparison of rat body weight in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g		
		造模前	给药前	给药后
对照	—	178.3±8.2	202.7±10.1	235.6±11.1
模型	—	175.8±4.6	187.2±10.2	199.5±10.2**
二十五味鬼臼丸	0.2	174.8±3.5	187.4±8.6	229.8±2.9 ^{##}
	0.4	174.1±5.7	187.2±8.2	233.8±3.3 ^{##}
	0.8	173.7±6.1	191.8±8.4	234.8±6.9 ^{##}
抗宫炎片	0.47	174.0±6.1	187.6±11.1	232.1±5.8 ^{##}

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:^{##} $P<0.01$

^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

表4 二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠外阴炎症的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)Table 4 Effect of EGP on vulvar inflammation in rats with cervicitis ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	外阴炎症反应评分		
		第1天	第6天	第12天
对照	—	0	0	0
模型	—	6.19±0.75**	6.38±1.19**	6.69±1.31**
二十五味鬼臼丸	0.2	6.13±0.64	5.75±0.89	4.56±0.73 ^{##}
	0.4	6.19±0.96	5.25±1.04	4.06±0.86 ^{##}
	0.8	6.00±0.76	5.00±0.53	3.38±0.74 ^{##}
抗宫炎片	0.47	6.13±0.99	5.38±0.92	4.44±0.82 ^{##}

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group表5 二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠子宫指数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)Table 5 Effect of EGP on uterine index in rats with cervicitis ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	子宫指数/(g·100 g ⁻¹)
对照	—	2.4±0.2
模型	—	3.3±0.2**
二十五味鬼臼丸	0.2	2.6±0.2
	0.4	2.5±0.1 [#]
	0.8	2.5±0.1 [#]
抗宫炎片	0.47	2.6±0.2

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

充满气体,并扩张迂曲,末端膨大;与模型组比较,二十五味鬼臼丸低剂量组大鼠子宫仍有部分肿胀,

无明显腔道液,二十五味鬼臼丸中、高剂量组病理改善明显。见图1。

3.4 二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠子宫组织病理组织形态的影响

对照组大鼠宫颈组织未见明显充血水肿和炎性细胞浸润,腺体结构正常;模型组大鼠宫颈组织有大量鳞状上皮丢失及脱落,炎性细胞浸润黏膜下层;与模型组比较,二十五味鬼臼丸低剂量组炎性细胞浸润减少,鳞状上皮丢失及脱落减少,二十五味鬼臼丸中、高剂量组炎性细胞浸润明显减少,无明显水肿,炎症程度减轻。见图2。

3.5 二十五味鬼臼丸对大鼠子宫组织中SOD、MDA水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠子宫组织中SOD活性显著降低($P<0.01$),MDA水平显著升高($P<$

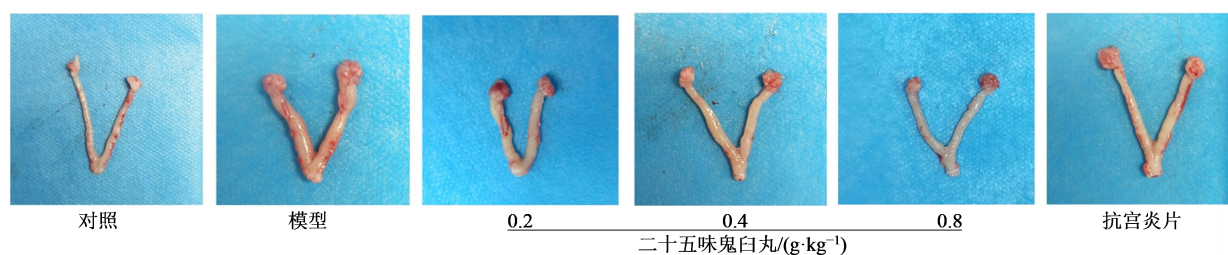
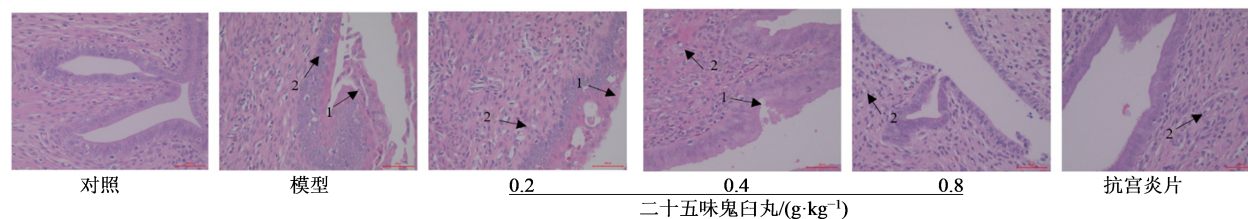


图1 二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠子宫组织形态的影响

Fig. 1 Effect of EGP on uterine tissue morphology in rats with cervicitis



1-鳞状上皮丢失或脱落; 2-炎性细胞浸润

1-loss of squamous epithelium; 2-inflammatory cell infiltration

图2 二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠子宫组织病理学变化的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of EGP on histopathological changes of uterine tissue in rats with cervicitis (HE, ×200)

0.01);与模型组比较,二十五味鬼臼丸各剂量组SOD活性明显升高($P<0.05$),MDA水平明显降低($P<0.05$)。见表6。

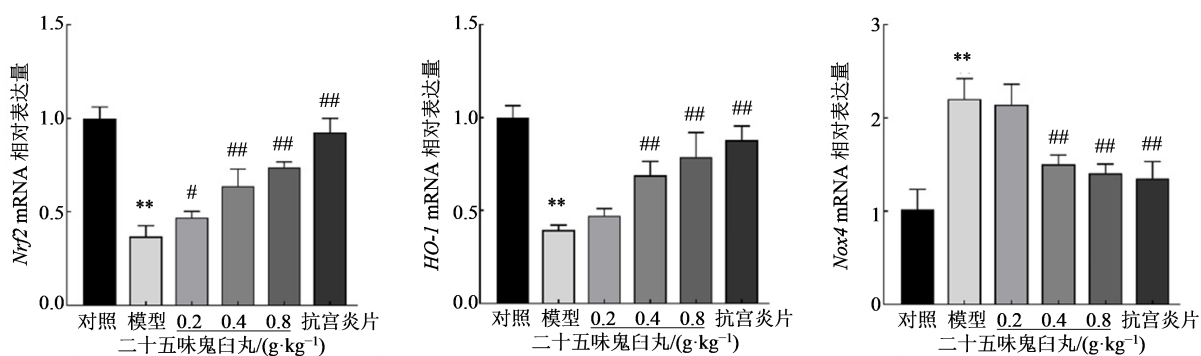
表6 二十五味鬼臼丸对大鼠子宫组织中SOD、MDA水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 6 Effect of EGP on content of SOD and MDA in rats uterine tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)
对照	—	24.74±0.90	0.67±0.04
模型	—	11.15±0.65**	2.45±0.26**
二十五味	0.2	13.00±1.08 [#]	1.95±0.04 [#]
鬼臼丸	0.4	16.91±1.02 [#]	1.18±0.08 [#]
	0.8	19.55±1.69 [#]	0.94±0.33 [#]
抗宫炎片	0.47	15.34±0.64 [#]	1.59±0.13 [#]

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group



与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

图3 二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠子宫组织中Nrf2、HO-1、Nox4 mRNA表达情况($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Fig. 3 Effect of EGP on Nrf2, HO-1, Nox4 mRNA in uterine tissue of rats with cervicitis expression ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

达($P<0.01$),显著降低Nox4蛋白的表达($P<0.05$ 、0.01)。见图4。

4 讨论

二十五味鬼臼丸始载于藏医药学家乌金丹增编著的《纪要美饰甘露药库》,以活血化瘀、调经养血的鬼臼为君药,辅以藏紫草、花蛇肉、枸杞、山柰以助药活血化瘀之效,并有补血之功,紫草茸、矮紫堇清热、敛坏血,光明盐、藏木香、余甘子、胡椒、喜马拉雅紫茉莉、芫荽果为温中和胃、消炎利胆、调理气血、强身壮体之药,可健运脾胃,活血行气,肉豆蔻、沉香养心祛风,解热止痛,朱砂散结化瘀、活血通经。诸药组方,具有祛风止痛、调经活血之效^[15]。现代药理研究表明,鬼臼、藏紫草具有很好的抗肿瘤、抗炎等药理作用,矮紫堇具有显著的镇痛、抗炎

3.6 二十五味鬼臼丸对大鼠子宫组织中Nrf2、HO-1、Nox4 mRNA表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠子宫组织Nrf2、HO-1 mRNA表达显著降低($P<0.01$),Nox4 mRNA表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组均可升高Nrf2、HO-1 mRNA的表达,降低Nox4 mRNA的表达,低剂量组显著增加Nrf2 mRNA的表达($P<0.05$),对HO-1、Nox4 mRNA表达无显著影响,中、高剂量组显著增加Nrf2、HO-1 mRNA的表达($P<0.01$),显著降低Nox4 mRNA的表达($P<0.01$)。见图3。

3.7 二十五味鬼臼丸对大鼠子宫组织中Nrf2、HO-1、Nox4蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠子宫组织Nrf2、HO-1蛋白表达显著降低($P<0.01$),Nox4蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二十五味鬼臼丸低、中、高剂量组均可显著增加Nrf2、HO-1蛋白的表

作用,藏木香及其提取物在抗菌、抗炎等方面具有较好的药理作用,余甘子具有抗炎和抑制氧化应激作用^[16-20]。

氧化应激是机体内抗氧化系统反应发生失衡,被认为是启动或促进女性生殖疾病的关键因素^[21-22]。机体发生氧化应激时会发生脂质过氧化并产生MDA的一系列复杂化合物,从而损伤机体,MDA的含量反映了机体的炎症程度^[23]。SOD能够清除机体内氧自由基,对机体的氧化与抗氧化平衡有着关键作用,SOD活性代表抵抗自由基损伤的能力^[24]。Nrf2/HO-1通路是机体重要的防御氧化应激的机制之一,且与抗炎、抗氧化等密切相关,Nrf2是维持细胞氧化还原稳态的关键调节因子^[25-26]。在氧化应激过程中,Nrf2被激活与抗氧化反应元件结

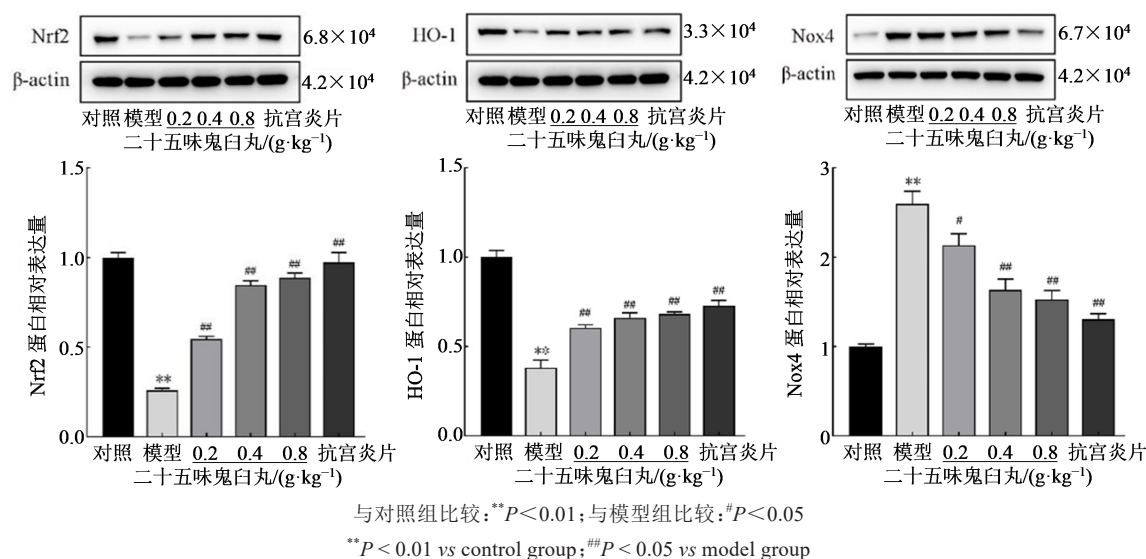


图4 二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠子宫组织中Nrf2、HO-1、Nox4蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 4 Effect of EGP on Nrf2, HO-1, and Nox4 protein expression in uterine tissue of rats with cervicitis ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

合, Nrf2表达升高并激活下游HO-1、SOD等抗氧化酶的表达,加速清除机体内过多的ROS和MDA等氧化物质,促进SOD等抗氧化酶的生成,提高机体总抗氧化能力,对机体产生保护作用^[27-29]。研究表明^[30], Nrf2信号通路介导的氧化应激在女性生殖系统疾病中具有重要作用, Nrf2通过降低过量的ROS产生,调节抗氧化基因的表达,抑制抗氧化酶的表达,减少氧化应激损伤,以参与调节卵巢、子宫等女性生殖器官的抗氧化和抗炎作用^[31]。

本研究采用25%苯酚胶浆复制了大鼠宫颈炎模型发现,经二十五味鬼臼丸治疗后能有效修复大鼠宫颈组织损伤,减少组织充血和水肿,增加SOD活性,促进Nrf2、HO-1 mRNA和蛋白的表达,同时下调Nox4的表达,降低MDA含量,表明二十五味鬼臼丸能够激活Nrf2/HO-1通路,进一步激活HO-1、SOD抗氧化酶的表达,提高宫颈炎大鼠机体抗氧化能力,有效抵御氧化应激对子宫组织的损伤,从而改善宫颈炎大鼠子宫组织的形态。研究结果表明二十五味鬼臼丸治疗宫颈炎与Nrf2/HO-1通路参与宫颈炎大鼠子宫组织内抗氧化应激的调节有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ortiz-de la Tabla V, Gutiérrez F. Cervicitis: Etiology, diagnosis and treatment [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2019, 37(10): 661-667.
- [2] Duan X, Xu Y, Li X, et al. To explore the therapeutic effect of Kangfuxiaomi shuan II on cervicitis in rats [J].

Acta Cir Bra, 2021, 36(10): e361006.

- [3] 郭姗姗, 高英杰, 包蕾, 等. 紫金化毒栓治疗宫颈炎的体内药效学评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 115-122.
- [4] Guo S S, Gao Y J, Bao L, et al. Pharmacodynamics of Zijin Huadu suppository in treatment of cervicitis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(5): 115-122.
- [5] Zhang X, He M, Lei S, et al. An integrative investigation of the therapeutic mechanism of ainsliaea fragrans champ. in cervicitis using liquid chromatography tandem mass spectrometry based on a rat plasma metabolomics strategy [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 156: 221-231.
- [6] Manhart L E, Jensen J S, Bradshaw C S, et al. Efficacy of antimicrobial therapy for mycoplasma genitalium infections [J]. Clin Infect Dis, 2015(61 Suppl 8): S802-S817.
- [7] Lahra M M, Martin I, Demczuk W, et al. Cooperative recognition of internationally disseminated ceftriaxone-resistant neisseria gonorrhoeae strain [J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(4): 735-740.
- [8] 张丽霞, 何健, 田小英, 等. 加减知柏地黄汤对慢性宫颈炎患者的效果 [J]. 中药材, 2021, 44(12): 2952-2954.
- [9] Zhang L X, He J, Tian X Y, et al. The effect of modified Zhibai Dihuang decoction on patients with chronic cervicitis [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(12): 2952-2954.
- [10] 王宁宁, 赵宇, 张丁丹, 等. 二十五味鬼臼丸联合重组人干扰素 $\alpha 2a$ 栓治疗慢性宫颈炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(6): 1277-1280.
- [11] Wang N N, Zhao Y, Zhang D D, et al. Clinical study on Ershiwuwei Guijiu pills combined with recombinant

- human interferon $\alpha 2a$ vaginal suppository in treatment of chronic cervicitis [J]. *Drugs Clin*, 2021, 36(6): 1277-1280.
- [9] 李亚芳. 藏药二十五味鬼臼丸治疗慢性盆腔炎的临床观察 [J]. *中国民族医药杂志*, 2020, 26(6): 19-21.
- Li Y F. Clinical observation on the treatment of chronic pelvic inflammation with tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu pills [J]. *J Med Pharm Chin Minor*, 2020, 26(6): 19-21.
- [10] 中华人民共和国卫生部颁药品标准. 藏药(第一册)[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 156.
- Drug Standards Issued by the Ministry of Health of the People's Republic of China. Tibetan Medicine (Volume 1) [S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1995: 156.
- [11] 龙子江, 吕晓英, 王桐生, 等. 阴道及宫颈炎大鼠动物模型的研究 [J]. *安徽中医学院学报*, 2005(4): 35-36.
- Long Z J, Lv X Y, Wang T S, et al. Research on the animal model with colpitis and cervicitis [J]. *J Anhui Univ Chin Med*, 2005(4): 35-36.
- [12] 张烨, 韩霞, 钟海英. 白及胶对宫颈炎大鼠 EGF 及 EGFR 的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(5): 8-9.
- Zhang Y, Han X, Zhong H Y. Influences of Bletillastriatagelatin on EGF and EGFR expression in cervicitis model rats [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2011, 13(5): 8-9.
- [13] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- Wei W, Wu X M, Li Y J. *Experimental Methodology of Pharmacology* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.
- [14] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- Chen Q. *Research Methods in Pharmacology of Chinese Materia Medica* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.
- [15] 李淑桢, 王琦, 李沁园, 等. 基于下丘脑-垂体-卵巢轴探讨藏药二十五味鬼臼丸对绝经后骨质疏松症大鼠的干预作用 [J]. *中草药*, 2021, 52(20): 6282-6290.
- Li S Z, Wang Q, Li Q Y, et al. Study on intervention effect of Tibetan medicine Ershiwuwei Guijiu Pill on PMOP rats based on HPOA [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(20): 6282-6290.
- [16] 严淑婷, 樊浩, 李若岚, 等. 桃儿七化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2020, 39(7): 43-50.
- Yan S T, Fan H, Li R L, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of sinopodophyllum hexandrum [J]. *Chin Wild Plant Resources*, 2020, 39(7): 43-50.
- [17] 阿呷尔布, 梁晓霞, 杜宝中, 等. 2 种藏紫草体外抗氧化及抗菌活性比较 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(11): 1314-1318.
- AGa E B, Liang X X, Du B Z, et al. Comparison on the antioxidant activity and antibacterial activity of two origins of radix onosmatis [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(11): 1314-1318.
- [18] 魏春华, 程虹毓, 高燕萍, 等. 藏药矮紫堇解热镇痛抗炎作用的研究 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(3): 337-342.
- Wei C H, Cheng H Y, Gao Y P, et al. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory effects of *Corydalis hendersonii* hemsl [J]. *Chin J New Drugs*, 2017, 26(3): 337-342.
- [19] 田其健, 包旭宏, 许宗仁, 等. 藏木香化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国民族医药杂志*, 2021, 27(7): 45-49.
- Tian Q J, Bao X H, Xu Z R, et al. Chemical composition and pharmacologic action of tibetan medicine inula racemosa hook. f [J]. *J Med Pharm Chin Minor*, 2021, 27(7): 45-49.
- [20] Wang H M, Fu L, Cheng C C, et al. Inhibition of LPS-induced oxidative damages and potential anti-inflammatory effects of phyllanthus emblica extract via down-regulating NF- κ B, COX-2, and iNOS in RAW 264.7 cells [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 270.
- [21] Bai R, Guo J, Ye X, et al. Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 77: 101619.
- [22] 李仲康, 郑嘉华, 田彦鹏, 等. 间充质干细胞治疗卵巢早衰的最新进展及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(1): 141-147.
- Li Z K, Zheng J H, Tian Y P, et al. Latest progress and mechanisms of mesenchymal stem cells on premature ovarian failure [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(1): 141-147.
- [23] Frijhoff J, Winyard P G, Zarkovic N, et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(14): 1144-1170.
- [24] Scutiero G, Iannone P, Bernardi G, et al. Oxidative stress and endometriosis: a systematic review of the literature [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 7265238.
- [25] Shen K, Jia Y, Wang X, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate the inflammation and oxidative stress via regulating Nrf2/HO-1 axis in macrophages [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 165: 54-66.
- [26] Mansouri A, Reiner Ž, Ruscica M, et al. Antioxidant effects of statins by modulating Nrf2 and Nrf2/HO-1 signaling in different diseases [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(5): 1313.

- [27] Dodson M, de la Vega M R, Cholanians A B, et al. Modulating NRF2 in disease: timing is everything [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 555-575.
- [28] Akino N, Wada-Hiraike O, Terao H, et al. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 470: 96-104.
- [29] He F, Ru X, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (13): 4777.
- [30] 官文征, 王秀霞. 核因子E2相关因子2在妇产科疾病中的作用研究进展 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(6): 715-719.
- [31] 卢铃菁, 李娟, 马红霞, 等. 核因子E2相关因子2在女性生殖系统中的作用 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2022, 41(2): 134-138.
- Lu L J, Li J, Ma H X, et al. The role of Nrf2 in female reproductive system [J]. *J Int Reprod Health/Fam Plann*, 2022, 41(2): 134-138.

[责任编辑 兰新新]