

消炎汤调节肠道微生态改善大鼠慢性盆腔炎的研究

陈燕¹, 李旭², 郝迪², 叶娟¹, 米莹¹, 孙国珍¹, 贾淑杰^{2*}

1. 天津市中心妇产科医院, 天津 300100

2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要: **目的** 探讨消炎汤通过调节肠道微生态的变化对慢性盆腔炎大鼠的治疗作用。**方法** 采用子宫内注射苯酚胶浆建立大鼠慢性盆腔炎模型, 造模2周后ig消炎汤5、10、20 g/kg, 连续14 d, 观察大鼠子宫内膜形态, qPCR检测子宫组织中细胞间黏附分子(ICAM-1mRNA)表达情况, 并采用16S rRNA高通量测序观察慢性盆腔炎大鼠肠道菌群的构成和比例。

结果 各给药组中充血水肿现象少见, 且炎症浸润程度好于妇科千金片组。与模型组相比, 消炎汤各剂量组子宫组织中ICAM-1mRNA的表达均有下调, 尤以消炎汤20 g/kg组为甚($P < 0.01$)。与模型组相比, 消炎汤20 g/kg组Simpson指数显著上升($P < 0.05$)。给予消炎汤治疗后肠道菌群多样性、丰度均得到一定程度改善, 但未见统计学差异。与模型组相比, 消炎汤10、20 g/kg组乳杆菌、梭状芽孢杆菌OUT比例有不同程度升高。治疗后, 消炎汤20、10 g/kg组OUT比例较模型组明显下降。**结论** 消炎汤能够明显改善慢性盆腔炎大鼠子宫的炎症程度, 有效减少黏连的发生, 作用机制与其调节肠道微生态影响雌激素代谢有关。

关键词: 消炎汤; 慢性盆腔炎; 大鼠; 子宫内膜形态; 细胞间黏附分子表达; 肠道菌群

中图分类号: R966; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)05-0849-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.05.005

Improvement of Xiaoyan Decoction on chronic pelvic inflammatory disease in rats by regulating intestinal microecology

CHEN Yan¹, LI Xu², HAO Di², YE Juan¹, MI Ying¹, SUN Guo-zhen¹, JIA Shu-jie²

1. Tianjin Central Hospital of Gynecology Obstetrics, Tianjin 300100, China

2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic effect of Xiaoyan Decoction on chronic pelvic inflammatory disease in rats by regulating the changes of intestinal microecology. **Methods** Chronic pelvic inflammatory disease models in rats were established with injection of phenol mucilage in uterus. After 2 weeks of model establish, rats in Xiaoyan Decoction were ig administered with 5, 10, and 20 g/kg for 14 d. Endometrial morphology in rats was observed, cell adhesion molecule ICAM-1 expression was detected by qPCR method, intestinal flora composition and proportion in chronic pelvic inflammation rat was adopted with 16S rRNA high channel sequencing. **Results** Hyperemia and edema were rare in each group, and the degree of inflammatory infiltration was better than that in Fuke Qianjin Tablets group. Compared with the model group, the expression of ICAM-1mRNA in the uterus tissues of Xiaoyan Decoction was down-regulated, especially in 20 g/kg group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Simpson index was significantly increased in 20 g/kg Xiaoyan Decoction group ($P < 0.05$). After the treatment of Xiaoyan Decoction, the diversity and abundance of intestinal flora were improved to some extent, but there was no statistical difference. Compared with the model group, the OUT ratio of *Lactobacillus* and *Clostridium* in the 10 and 20 g/kg Xiaoyan Decoction groups was increased in different degrees. After treatment, the proportion of OUT in 10 and 20 g/kg Xiaoyan Decoction group was significantly lower than that in the model group. **Conclusion** Xiaoyan decoction can significantly improve the inflammatory degree of uterus in rats with chronic pelvic inflammatory disease, and effectively reduce the occurrence of adhesion. The mechanism of action is related to the regulation of intestinal microecology and the influence of estrogen metabolism.

Key words: Xiaoyan Decoction; chronic pelvic inflammation; rat; endometrial morphology; ICAM-1 expression; intestinal flora

收稿日期: 2020-04-03

基金项目: 天津市卫生健康委员会中医中西医结合科研课题(2017066)

作者简介: 陈燕(1982—), 女, 河南濮阳人, 主管药师, 硕士, 研究方向为药理学。Tel: (022) 58287600 E-mail: 48579075@qq.com

*通信作者 贾淑杰, 女, 主任技师, 研究方向为药物化学。Tel: (022)27236182 E-mail: 64641001@163.com

现代医学认为盆腔炎主要由诱发感染的因素使病原微生物乘虚而入、上行感染所致^[1]。急性盆腔炎多采用抗生素治疗,而慢性盆腔炎因组织中基本没有病原菌的感染,或其病原菌对药物抗药性形成,临床治疗十分棘手,目前尚无特效治疗方法^[2]。消炎汤由丹参、金银花、桑寄生、败酱草等8味中药组成,具有活血化瘀、清热解毒之功效,临床用于盆腔炎、附件炎等急慢性炎症。近年来,肠道菌群的相关研究一直是热点,特别是在中药对肠道菌群的调节和改善有独特的效果,并且能够从新的角度找到一些疾病潜在的发病机制^[3]。报道发现,慢性盆腔炎患者的子宫颈管中存在肠道菌群^[4],其对多种抗生素天然耐药^[5],影响了阴道内正常的菌群^[6]。因此,对肠道细菌的监测、调控将会为慢性盆腔炎临床诊断、治疗提供新的研究方向和靶点。本研究对消炎汤治疗慢性盆腔炎进行考察,求证其对盆腔炎肠道菌群是否具有调控作用,且该调控作用与改善盆腔炎症状之间的关系,为寻求新的药物靶点和创新思路提供了参考。

1 材料

1.1 仪器

ASP200S 自动真空组织脱水机, Leica EG1150 H 自动生物组织包埋机, Leica RM2255 切片机, Nikon Ci-L 显微镜, HMIAS-2000 高清晰度数码显微图像分析系统; PL-203 电子天平由梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产; PCR-96 型 PCR 反应扩增仪由 BBI 出产; DYY-6C 电泳仪由北京六一生产; SW-CJ-1D 洁净工作台由江苏洁净化设备厂出产; FR980 凝胶成像系统由上海复日科技有限公司出产。美国 ABI 3730XL 测序仪; SMA4000 微量分光光度计由 Merinton Instrument Inc 出产; QL-902 涡旋振荡仪由海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Centrifuge 5415D 离心机由 Eppendorf 公司生产; Eppendorf BioPhotometer 生物分光光度计; ABI7500 荧光定量 PCR 仪由 Applied Biosystems 生产。

1.2 药物与试剂

消炎汤为天津市中心妇产科医院提供处方,由天津市医药科学研究所制剂中心制备,棕褐色浸膏,1 g 浸膏相当于生药 2.3 g,含绿原酸 3.0 mg/g。注射用青霉素钠:哈药集团制药总厂,产品批号 18020402-2。妇科千金片:株洲千金药业股份有限公司生产,规格 0.32 g/片,产品批号 201706022。水合氯醛由天津市瑞特金化学品公司提供。Ezup 柱

式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒:生工生物,批号 B518259; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒:生工生物,批号 B518131; TaqPlusDNA 聚合酶: BBI,批号 B600090; 琼脂糖 B: BBI,批号 A600014; 4SRedPlus 核酸染色剂(10 000×水溶液): BBI,批号 A606695; GeneRuler DNA Ladder Mix: Thermo Scientific,批号 B300721; Trizol: Invitrogen,批号 15596-026; DEPC 水由北京索莱宝科技有限公司生产; TIANScript RT KIT: 天根生物科技有限公司; 批号 KR104-02; SuperReal PreMix Plus (SYBR Green): 天根生物科技有限公司,批号 FP205; 氯仿、异丙醇、无水乙醇由天津市永大化学试剂有限公司生产; 所用 PCR 引物均来源于上海生工合成。

1.3 动物

60 只雌性 SD 大鼠,体质量(210±10) g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2016-0002,饲养于合格的环境中。

2 方法

2.1 造模方法^[7]

取雌性大鼠采用 10%水合氯醛 3.5 μL/g 腹腔麻醉后剪去下腹正中毛,酒精棉球消毒,于下腹部正中切口 2 cm,暴露子宫,用 0.1 mL 注射器于子宫分岔处进针入子宫腔内,朝右侧方向缓慢推注 25% 苯酚胶浆 0.06 mL,左侧子宫不注射作为自身对照。术后 ip 10 万单位青霉素,连用 3 d 预防感染。注射完成后分层关腹,消毒术区。保留 10 只仅进行开腹和关腹手术,不注射苯酚胶浆造模,作为假手术组。

2.2 分组和给药方法

假手术组取 10 只。术后存活的慢性盆腔炎雌性大鼠按体质量随机分为模型组、妇科千金片(0.576 g/kg)组以及消炎汤 5、10、20 g/kg 组,每组各 10 只。妇科千金片组给予妇科千金片 0.576 g/kg,为临床人用量 18 片(0.32 g/片)/d 的等效剂量。消炎汤 5、10、20 g/kg 组分别给予 5、10、20 g 生药/kg,分别相当于临床人用剂量的 3.5、7、14 倍。假手术组、模型组 ig 同体积饮用水。各组大鼠均从术后 20 d 开始给药,ig 体积 10 mL/kg,1 次/d,连续 14 d。

2.3 子宫内膜形态学观察

取双侧造模子宫,置 10%中性甲醛中固定,HE 常规染色,光学显微镜下对苯酚胶浆致大鼠阴道炎、宫颈炎模型治疗结束,放血处死大鼠,立即剖取大鼠,取阴道壁黏膜、子宫颈组织块标本,放入 FAA 固定液内浸泡固定。进行组织块标逐级酒精

脱水,二甲苯透明,浸蜡、石蜡包埋,常规切片 4 μm , HE 染色。显微镜下观察大鼠子宫的内膜变化程度。

2.4. qPCR 检测子宫组织中细胞间黏附分子(ICAM-1mRNA)表达

大鼠 ICAM-1 上游引物: 5'-GGTGGGCAAGA ACCTCATCCT-3'; 下游引物: 5'-CTGGCGGCTCAG TGTCTCATT-3', 产物长度 103 bp。大鼠 β -actin 上游引物: 5'-CCTAGACTTCGAGCAAGAGA-3'; 下游引物: 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGA-3', 产物长度 140 bp。大鼠子宫组织经 Trizol 法提取 RNA, 鉴定完 RNA 纯度和完整性后, 反转录制备 cDNA; PCR 反应条件为: 预变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 退火: 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 延伸: 72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 循环 40 次; 以 ICAM-1/ β -actin 比值代表各自相对表达水平, 计算 ICAM-1mRNA 的相对表达强度。对同一样品做 3 个复孔(即同一试验重复 3 次)。

2.5 16S rRNA 高通量测序

剖取除消炎汤 5 g/kg 组、妇科千金片组以外的其他组大鼠结肠内容物留存, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 16S rRNA 高通量测序的方法测定大鼠粪便, 确定肠道细菌在盆腔炎发生发展中的变化情况, 通过样本 Alpha 多样性分析可以反映肠道微生物的多样性和丰度。计算菌群多样性的指数有 Shannon 指数、Simpson 指数, 计算菌群丰度的指数有 Chao 指数、Ace 指数。在属分类水平下对各组大鼠肠道微生物进行分析并计算 OUT 值, 从而判断消炎汤是否调节肠道菌群的变化。

肠道微生物 DNA 进行提取、扩增、16S rDNA 高通量测序, 按照 Qiagen QIAamp DNA Stool MiniKit 说明书进行提取, 抽提所得 DNA 采用 Qubit 2.0 和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行质检。按照实验操作说明对纯化的基因组 DNA 进行两轮 PCR 扩增, 扩增的引物上游为 ACTCCTACGGGAGGCAGCAG, 下游为 GGACTACHVGGGTWTCTAAT, 完成测序样本文库的构建。按照 MiSeq 用户指南准备测序试剂, 采用双末端测序程序测序并进行数据分析。

2.6 统计方法

应用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析。计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较单因素方差分析。

3 结果

3.1 子宫内膜形态学观察

与假手术组相比, 模型组子宫可见明显扩张,

内膜受压变得菲薄, 内膜充血明显, 水肿程度严重。各给药组中充血水肿现象少见, 且炎症浸润程度好于妇科千金片组, 见图 1。

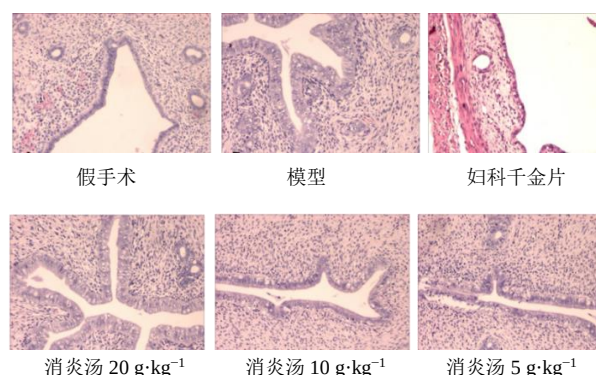


图 1 消炎汤对慢性盆腔炎大鼠子宫组织 HE 染色

Fig. 1 HE staining on uterine tissue of rats with chronic pelvic inflammation by Xiaoyan Decoction

3.2 子宫组织中 ICAM-1 mRNA 的测定

与假手术组相比, 模型组子宫组织中 ICAM-1 mRNA 的表达均上调明显 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 消炎汤各剂量组子宫组织中 ICAM-1mRNA 的表达均有下调, 尤以消炎汤 20 g/kg 组为甚 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 消炎汤对慢性盆腔炎大鼠子宫组织中 ICAM-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of Xiaoyan Decoction on ICAM-1 expression in uterine tissue of rats with chronic pelvic inflammation ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ICAM-1 mRNA
假手术	—	0.998 ± 0.095
模型	—	3.514 ± 0.535 ^{##}
妇科千金片	0.576	3.020 ± 0.237
消炎汤	5	3.351 ± 0.570
	10	2.968 ± 0.870
	20	2.593 ± 0.277 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

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

3.3 消炎汤对慢性盆腔炎大鼠肠道微生物多样性、群落分布丰度的影响

与假手术组相比, 模型组 Simpson 指数明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 消炎汤 20 g/kg 组 Simpson 指数显著上升 ($P < 0.05$), 提示慢性盆腔炎大鼠的肠道微生物种类明显改变, 给予消炎汤治疗后肠道菌群趋于假手术组。与假手术组相比, 模

型组大鼠 ACE 指数、Chao 指数均下降, 给予消炎汤治疗后肠道菌群多样性、丰度均得到一定程度改善, 但未见统计学差异, 见表 2。

3.4 消炎汤对慢性盆腔炎大鼠在属分类水平上肠道微生物种类、比例的影响

与假手术组相比, 模型组乳杆菌属、梭状芽孢

杆菌的 OTU 比例明显下降; 与模型组相比, 消炎汤 10、20 g/kg 组乳杆菌、梭状芽孢杆菌 OUT 比例有不同程度升高。与假手术组相比, 模型组葡萄球菌属、梭菌属的 OTU 比例显著升高; 治疗后, 消炎汤 20、10 g/kg 组 OUT 比例较模型组明显下降。见图 2。

表 2 消炎汤对慢性盆腔炎大鼠肠道微生物 Shannon、Simpson、ACE 和 Chao 指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of Xiaoyan Decoction on Shannon index, Simpson index, ACE index, and Chao index of intestinal microorganisms in rats with chronic pelvic inflammation ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Shannon 指数	Simpson 指数	ACE 指数	Chao 指数
假手术	—	3.623 ± 0.947	0.153 ± 0.036	1 348.820 ± 271.830	1 208.377 ± 162.725
模型	—	3.883 ± 0.352	0.083 ± 0.035 ^{##}	1 291.373 ± 53.006	1 193.250 ± 36.819
消炎汤	10	4.143 ± 0.569	0.053 ± 0.032	1 451.603 ± 133.346	1 364.190 ± 140.172
	20	3.633 ± 0.388	0.117 ± 0.055 [*]	1 387.997 ± 124.557	1 294.033 ± 113.172

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

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

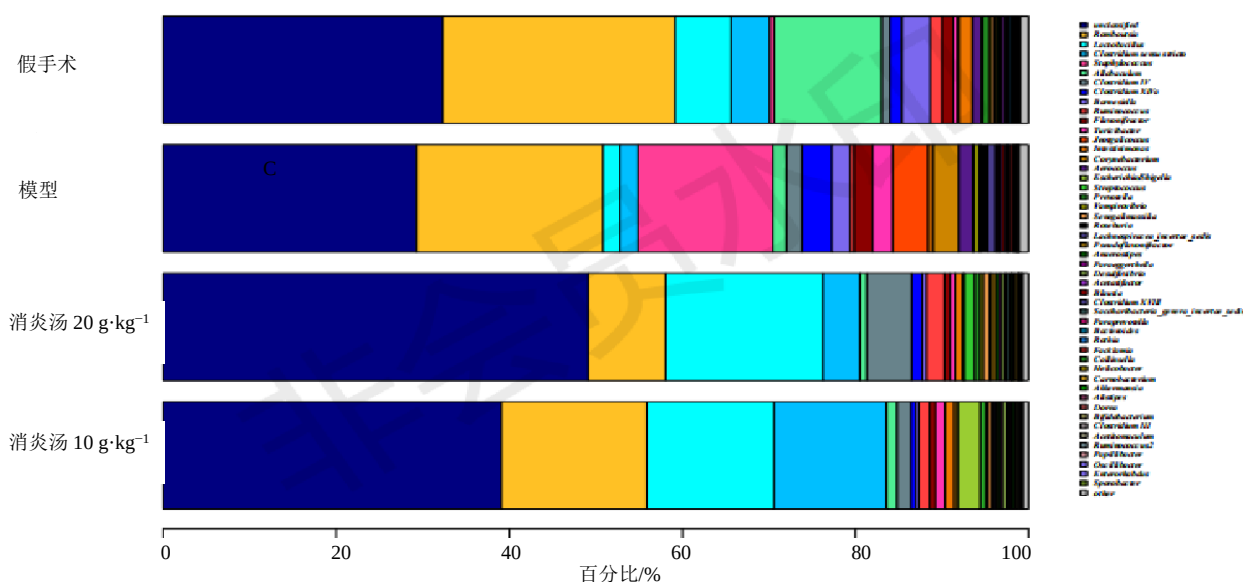


图 2 在属分类水平上大鼠肠道菌群聚类树与柱状图组合分析图

Fig. 2 Community composition of dominant species in the intestinal flora of rats at the level of genus classification

4 讨论

慢性盆腔炎是一种较为常见的妇科疾病, 通常是由于急性盆腔炎治疗不彻底、炎症发生变化导致盆腔结缔组织增生, 进而形成黏连性慢性病灶, 对患者的生活质量、身体健康造成不利的影响^[8]。慢性盆腔炎主要表现为反复下腹部疼痛、性交痛或性交后出血, 腰骶坠胀, 白带异常伴有异味, 经期延长或经期腹痛等。主要特点为病情顽固、较长, 反复发作。长期反复发作的盆腔炎易造成输卵管管腔

狭窄、变形、弯曲, 局部引起黏连或伞端闭锁, 子宫内膜化脓甚至坏死, 卵巢脓肿, 不孕、异位妊娠等严重后果, 严重影响了女性的生理、心理健康, 给患者的生活造成了极大的困扰^[9]。

目前西医治疗盆腔炎多采用抗生素进行抗炎治疗, 多种抗生素联合使用比单一抗生素效果更佳, 但长期使用抗生素易导致耐药性、对肝肾功能造成影响, 故临床疗效不尽人意^[10]。中医治疗盆腔炎方法多样, 中医内治法将该病辨证为气滞血瘀型、湿

热瘀结型、寒湿凝滞型和气虚血瘀型等,在治法上多突出为活血、化瘀、止痛^[11]。消炎汤是由金银花、续断、桑寄生、丹参、败酱草、乌药、赤芍、薏仁组成,具有活血化瘀、清热解毒之功效,用于妇科炎症、附件炎的治疗。消炎汤组方中的丹参为活血化瘀药,能改善血循环,减轻组织损伤,控制炎症的发生。金银花、败酱草具有清热解毒功效,抗菌、抗炎作用明显。桑寄生在治疗妇科流产等方面具有较好的疗效。消炎汤的组方科学、严谨,在宏观辨证的基础上充分把握其微观作用,体现了扶正祛邪、标本兼治的治疗特点。

研究认为,盆腔炎后遗症是由于盆腔炎性疾病持续存在的慢性炎症状态引发的^[12]。大量研究也发现有一部分盆腔炎性疾病并无病原体存在。认为免疫病理损伤是慢性盆腔炎的主要病理变化,是导致病情进展的主要原因^[13]。组织黏连的形成与细胞因子的调控有关已被证实,ICAM-1 是重要的黏附分子之一,具有在炎症区域募集的功能,通过白细胞激活,释放大炎症介质。在慢性炎症中,其具有诱导组织损伤、局部组织慢性纤维化过程^[14],因此下调 ICAM-1 的表达或抑制细胞因子对 ICAM-1 的表达诱导,能有效抑制炎症反应。采用苯酚胶浆所致大鼠慢性盆腔炎动物模型,从病变特点上较符合人类慢性盆腔炎病理模型;苯酚胶浆化学灼烧所致的炎症造成输卵管的堵塞和子宫、盆腔充血化脓等病变,甚至导致血瘀、气血运行不畅,符合盆腔炎的症状^[15]。本实验通过观察消炎汤对苯酚胶浆致慢性盆腔炎大鼠模型的子宫病理性炎症有明显的改善作用,且对子宫细胞黏附因子 ICAM-1 有下调的作用,也充分证明了消炎汤在慢性盆腔炎子宫内炎症、炎症引起的组织黏连具有明显的治疗效果,对盆腔炎的复发有预防作用。

近年,肠道微生物作为新的治疗靶点和方向为人类的健康带来了希望,有报道通过人体实验证实肠道微生物能够调节雌激素水平。微生物在科、种水平上有多达 55 个菌群,能够调节雌激素含量,其中厚壁菌门的梭状杆菌属、瘤胃球菌科的 3 个菌种对雌激素代谢的影响最为显著^[5, 16]。本实验中对慢性盆腔炎大鼠模型粪便中肠道菌群 16S rRNA 序列测定,发现消炎汤对慢性盆腔炎大鼠模型厚壁菌门下的梭状杆菌属有明显的调节作用。而报道中认为梭状杆菌属的变化与体内雌激素的代谢有关^[17]。根

据消炎汤的药味组成分析,桑寄生、续断片等均为强筋骨、补肝肾的妇科要药,且对这些药物成分的报道均存在雌激素样物质。以上结果提示消炎汤肝郁化热、湿热下注的治疗作用机制与其调节肠道微生态影响雌激素代谢有关。

参考文献

- [1] 农玉莺,李建学.慢性盆腔炎中医治疗概况[J].内科,2019,14(1):53-55.
- [2] 马玲,张延荃,李桂梅,等.中药灌肠治疗慢性盆腔炎疗效及对血液流变学和炎症及氧化应激指标的影响[J].现代中西医结合杂志,2019,28(8):822-825.
- [3] 汤齐,高霞,耿婷,等.肠道菌群与中药相互作用的研究进展[J].中草药,2017,48(17):3629-3635.
- [4] Т Ю 别斯特利科娃, И В 尤拉索夫, Е А 尤拉索娃,等.肠道微生物菌群致盆腔炎性疾病及抗生素的敏感性研究[J].哈尔滨医科大学学报,2013,47(6):561-562.
- [5] 王仁存,徐守宁.盆腔炎性疾病病原菌的分布特征与治疗探讨[J].中国当代医药,2015,22(31):158-160.
- [6] 张海琼,丁燕玲,蒋渝采,等.370例慢性盆腔炎性疾病综合征患者阴道微生态状况[J].热带医学杂志,2018,18(4):497-500.
- [7] 余晓晖,王志旺,邵晶,等.复方当归妇炎微灌肠剂的抗炎作用及机制研究[J].中药药理与临床,2018,34(2):88-93.
- [8] 翟琴.中西医结合治疗慢性盆腔炎的临床效果观察[J].中外医学研究,2017,15(27):36-37.
- [9] 孙蕾.中西医结合对慢性盆腔炎患者疗效及复发率的影响[J].基层医学论坛,2015,19(32):4537-4538.
- [10] 杨通飞.慢性盆腔炎的临床治疗研究进展综述[J].实用妇科内分泌杂志:电子版,2018,5(30):16,23.
- [11] 强尧.中西医诊治慢性盆腔炎综述[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(72):145-146,148.
- [12] 农夏欣.中西医结合治疗慢性盆腔炎的临床疗效观察[J].中外女性健康研究,2019(1):49,65.
- [13] 王新斌,薛淑萍,马睿玲,等.清热祛瘀方对大鼠慢性盆腔炎模型的干预作用[J].临床合理用药杂志,2018,11(1):102-104.
- [14] 岳秀永,李国利,方应权,等.当归四逆汤对慢性盆腔炎模型大鼠的实验研究[J].中成药,2017,39(7):1483-1486.
- [15] 朱晓丹,王梓,李旭,等.癥清片对慢性盆腔炎大鼠子宫阴道炎症及其相关因子变化研究[J].药物评价研究,2019,42(12):2364-2368.
- [16] 林璋,祖先鹏,谢海胜,等.肠道菌群与人体疾病发病机制的研究进展[J].药学报,2016,51(6):843-852.
- [17] 丁佳,王慧艳,何秋雯,等.益生菌对雌激素代谢及相关疾病的影响[J].食品科学,2016,37(11):248-254.