

癃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

朱晓丹¹, 王梓², 李旭², 吕楠², 左辰¹, 王蕾^{2*}

1. 天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂, 天津 300457

2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要: 目的 通过建立苯酚胶浆所致的慢性盆腔炎大鼠模型, 对癃清片治疗妇科炎症的作用特点和机制进行探讨。方法 将雌性SD大鼠子宫内注射苯酚胶浆造成大鼠慢性盆腔炎模型, 造模7 d后分组, 随机分为6组: 空白对照组、模型对照组及癃清片高、中、低剂量(9.355 2、4.677 6、2.338 8 g生药/kg)组和千金片组, 给药14 d。测定各组大鼠子宫肿胀率及肿胀抑制率、对各组动物子宫、阴道组织进行HE病理学观察以评价炎症反应程度。通过细胞凋亡TUNEL染色观察子宫内膜细胞凋亡程度, 并采用免疫组化染色检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素4 (IL-4)和细胞黏附因子(ICAM-1)的表达。结果 与空白对照组相比, 模型对照组子宫肿胀明显; 与模型对照组相比, 癃清片各剂量组治疗后子宫肿胀率均有所降低, 尤以癃清片中剂量组为佳。与空白对照组相比, 模型对照组子宫可见明显扩张, 内膜充血明显, 水肿程度严重, 而给药各组中充血水肿现象少见。在炎症浸润方面, 模型对照组阴道可见上皮细胞增生, 表层出现黏液层, 以中性粒细胞为主的炎细胞浸润, 给药各组中炎细胞浸润程度较模型组轻。与空白对照组相比, 模型对照组子宫细胞凋亡程度明显增加, 癃清片能够明显改善子宫内膜细胞的凋亡程度。与空白对照组相比, TNF- α 、IL-4及ICAM-1 (CD54)蛋白表达均在胞浆及胞核, 呈棕黄色, 正常对照组大鼠子宫腺体及炎细胞可见弱阳性表达, 模型组大鼠子宫腺体及炎细胞可见强阳性表达, 其余各组表达均较模型组有不同程度减弱。结论 癃清片通过下调模型大鼠子宫组织中TNF- α 、IL-4的表达水平, 从而抑制子宫组织中ICAM-1的表达, 防止和缓解子宫组织的黏连, 达到治疗慢性盆腔炎的作用。

关键词: 癃清片; 慢性盆腔炎; 组织黏连

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 12-2364-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.12.014

Effect of Longqing Tablets on uterus and vagina inflammation and its related factors in rats with chronic pelvic inflammation

ZHU Xiaodan¹, WANG Zi², LI Xu², LV Nan², ZUO Chen¹, WANG Lei²

1. Longshunrong Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China

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

Abstract: Objective By establishing a rat model of chronic pelvic inflammation induced by phenol mortar, the characteristics and mechanism of Longqing Tablets in treatment of gynecological inflammation were discussed. **Methods** Chronic pelvic inflammation model in rats induced by intrauterine injection of phenol mortar in female SD rats. After 7 days of moulding, the chronic pelvic inflammation rats were randomly divided into 6 groups: blank control group, model group, high, medium and low doses of Longqing Tablets (9.355 2, 4.677 6, 2.338 8 g crude drug/kg) groups and Qianjin Tablets group. And all of groups were given drug for 14 d. The rate of uterine edema and its inhibition in each group were determined. The uterus and vagina tissues of each group were observed by HE pathology to evaluate the degree of inflammatory reaction. The degree of apoptosis of endometrium cells was observed by TUNEL staining, and the expression of TNF- α , IL-4, and ICAM-1 was detected by immunohistochemical staining. **Results** Compared with blank control group, the uterine swelling in the model group was significant. Compared with model group, the uterine swelling rate in each dose group of Longqing Tablets were decreased after treatment, especially in the middle dose group of Longqing Tablets. Compared with blank control group, the uterus of the model control group was obviously dilated, endometrial congestion was obvious, and the degree of edema was serious, while the phenomenon of congestion and edema was rare in each

收稿日期: 2019-05-06

第一作者: 朱晓丹(1974—), 女, 硕士, 高级工程师。Tel: 13752649818 E-mail: zxd3288@126.com

*通信作者: 王蕾(1979—), 女, 副研究员, 研究方向为心脑血管药理学。Tel: 022-27236137 E-mail: zws9905@sina.com

group. In terms of inflammatory infiltration, epithelial cell proliferation, mucus layer and neutrophil-dominated inflammatory cell infiltration were observed in the vagina of the model control group. The degree of inflammatory cell infiltration in each group was lighter than that in the model group. Compared with the blank control group, model group in the uterus cell apoptosis was significantly increased, Longqing Tablets could obviously improve the degree of the apoptosis of endometrial cells. Compared with the blank control group, TNF- α , IL-4 and ICAM-1 (CD54) proteins were all expressed in cytoplasm and nucleus, which were brown-yellow. Weak positive expression was observed in uterine glands and inflammatory cells of rats in the normal control group, while strong positive expression was observed in the model group, the expression of the remaining groups was decreased to different degrees compared with that of the model group. **Conclusions** Longqing Tablets by cutting the uterus tissue in rat models of TNF- α and IL-4 levels, thus inhibiting the uterus tissue cells ICAM-1 expression, to prevent and alleviate adhesion of uterus tissue, reach the role of the treatment of chronic pelvic inflammatory disease.

Key words: Longqing Tablets; chronic pelvic inflammatory; tissue adhesion

慢性盆腔炎属于盆腔炎的一种,多由急性盆腔炎治疗不及时或不彻底,或患者体质虚弱病情迁延经久不愈而成^[1]。长期反复发作则会导致输卵管腔狭窄、变形、弯曲,局部引起粘连,甚至造成卵巢脓肿,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^[2]。现阶段在治疗中多采用抗生素,但长期使用易导致耐药性及对肝肾功造成影响。中医治疗以清热解毒为主,辅以活血化瘀等方法进行治疗。癥清片是该法的复方药,主要由泽泻、车前子、败酱草、金银花、牡丹皮、白花蛇舌草、赤芍、仙鹤草、黄连和黄柏十味药组成,具有清热解毒、凉血通淋之功效^[3]。临床用于治疗下焦湿热所致的热淋。现代药理研究亦证明,癥清片具有抗菌抑菌的作用^[4]。但对其在妇科慢性炎症的基础研究资料相对较少。因此,本研究针对癥清片对慢性盆腔炎大鼠的治疗,结合组织病理学观察的结果,以评价其治疗特点,为临床用药提供有效的药理学依据。

1 材料

1.1 仪器

ASP200S 自动真空组织脱水机, Leica EG1150H 自动生物组织包埋机包埋, 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。

1.2 药物与试剂

癥清片,由天津中新药业集团股份有限公司隆顺裕制药厂生产,批号 GB15530,规格 0.6 g/片(含生药量为 1.949 0 g/片)。按说明书服用方法规定,人用每天最大口服剂量为 24 片(含生药量为 46.776 g 生药),根据动物实验剂量换算设计要求^[5],配制方法如下:采用粉碎机将药物片剂打碎,加纯净水配制成相应剂量浓度。癥清片高剂量组:48 片加纯净

水打碎,研磨,加水定容至 100 mL,质量浓度为 935.5 mg 生药/mL,即为临床人用剂量的 12 倍。癥清片中剂量组:24 片加纯净水打碎,研磨,加水定容至 100 mL,质量浓度为 467.8 mg 生药/mL,即为临床人用的等效剂量。癥清片低剂量组:12 片加纯净水打碎,研磨,加水定容至 100 mL,质量浓度为 233.9 mg 生药/mL,即为临床人用剂量的 3 倍。注射用青霉素钠,哈药集团制药总厂,生产批号 18020402-2。千金方片,株洲千金药业股份有限公司生产,生产批号 201706022。水合氯醛,由天津市瑞特金化学品公司提供,有效期至 2018-08-22。

1.3 动物

SD 大鼠,雌性,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。许可证号 SCXK(京)2016-0002。

2 方法

2.1 造模与分组给药

取雌性大鼠采用 10% 水合氯醛 0.35 mL/100 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。术后大鼠给予 10 万 U 青霉素单腹腔注射,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,作为空白对照组。

于造模后 7 d 开始给药,分为空白对照组、模型对照组及癥清片高、中、低 3 个剂量组和阳性药组(妇科千金方)。给药周期 14 d。各剂量组分别 ig 相应受试药液 10 mL/kg, 1 次/d,连续 14 d。空白对照组 ig 等体积纯净水,阳性药物对照组大鼠 ig 千金方 0.178 g/kg(为临床等效剂量)。

2.2 指标检测

2.2.1 子宫肿胀率及肿胀抑制率 于给药后 15 d,

ip 10%水合氯醛麻醉大鼠后,摘取左、右侧子宫,分别称质量,肿胀率=(致炎侧子宫质量-未致炎侧子宫质量)/未致炎子宫质量;抑制率=(模型组子宫平均肿胀率-给药组子宫平均肿胀率)/模型组子宫平均肿胀率。

2.2.2 子宫内膜形态学及细胞凋亡 TUNEL 染色 取双侧造模子宫置于 10% 中性甲醛中固定,HE 常规染色,光学显微镜下观察大鼠子宫病理变化程度。

2.2.3 阴道壁黏膜炎细胞数量 取大鼠阴道样本置于 10% 中性甲醛中固定,HE 常规染色,光学显微镜下观察大鼠子宫的病理变化程度:腔壁结构改变、上皮细胞增生、上皮细胞变性坏死、慢性炎症细胞浸润及内膜充血水肿等。根据炎症病变程度,每项为无(-)、轻度(+)、中度(++)和重度(+++),分别评分为0、1、2、3分,以各组评分之和为炎性评分结果进行统计学分析。

2.2.4 免疫组化染色检测子宫组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 4 (IL-4) 和细胞黏附因子 (ICAM-1) 摘取双侧子宫,置 10% 中性甲醛中固定,常规切片,免疫组化染色。20 倍的光学显微镜下,选择阳性细胞较多的区域,采集 3 个光镜视野计算每张切片阳性细胞面积大小,计算平均值来反应各组不同指标的表达变化情况。

2.3 统计学处理

用 SPSS 11.5 统计学软件对所获得的实验数据进行方差分析(实验统计结果应以 $\bar{x} \pm s$ 表示)。各组之间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 子宫肿胀率及肿胀抑制率结果

与空白对照组相比,模型对照组子宫肿胀明显。与模型对照组相比,癃清片各剂量组治疗后子宫肿胀率均有所降低,尤以癃清片中剂量组为甚。给药组肿胀抑制率各组均高于 50%,说明给药后具有明显抑制子宫水肿的发生。具体结果见表 1。

3.2 子宫内膜形态学及细胞凋亡 TUNEL 染色结果

与空白对照组相比,模型对照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。给药各组中充血水肿现象少见,尤以癃清片中剂量组效果为佳,在炎性浸润方面,癃清片各组改善效果不如千金方组,见图 1。

与空白对照组相比,模型对照组子宫细胞凋亡程度明显增加, TUNEL 染色后阳性细胞评分值(HIS)为 5.0,远高于空白对照组。而癃清片高剂量组的阳性细胞评分值(3.5)明显低于模型对照组。说明癃清片能够明显改善子宫内膜细胞的凋亡程度,从而达到治疗的作用。具体数据见图 2。

表 1 癃清片对慢性盆腔炎模型大鼠子宫肿胀率及肿胀抑制率

Table 1 Uterine swelling rate and inhibition rate of Longqing Tablets on chronic pelvic inflammation model rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	子宫肿胀率/%	肿胀抑制率/%
空白对照	—	7	0.0	-
模型对照	—	8	42.320±12.000**	-
千金片	0.178	7	11.773±16.256##	72.181
癃清片	9.355	8	14.720±10.068##	65.217
	4.678	7	9.600±11.945##	77.317
	2.339	7	12.574±8.014##	70.287

与空白对照组比较:** $P < 0.01$;与模型对照组比较:## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group; ## $P < 0.01$ vs model group

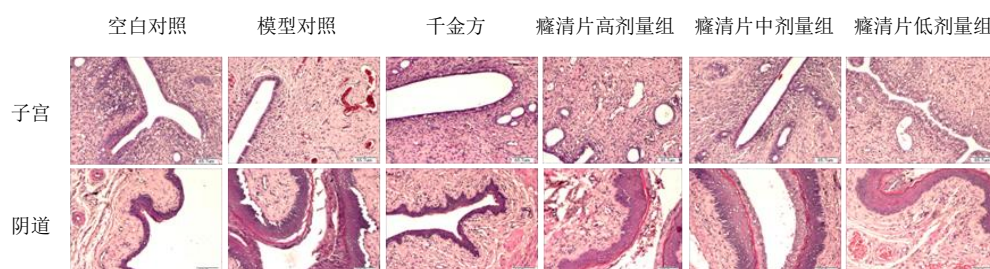
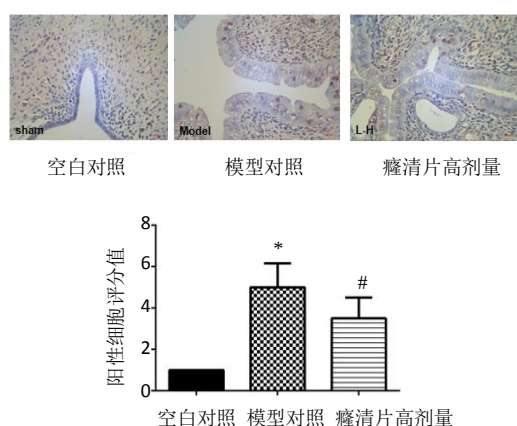


图 1 癃清片对慢性盆腔炎模型大鼠子宫内膜损伤的影响

Fig. 1 Effect of Longqing Tablets on endometrial injury in rats with chronic pelvic inflammation



与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs blank control group; # $P < 0.05$ vs model group

图2 癃清片对慢性盆腔炎模型大鼠子宫细胞凋亡的影响
Fig. 2 Effect of Longqing Tablets on apoptosis of uterine cells in rats with chronic pelvic inflammation

3.3 阴道壁黏膜炎细胞数量检查结果

与空白对照组相比,模型对照组阴道可见上皮细胞增生,表层出现黏液层,以中性粒细胞为主的炎细胞浸润。给药各组中炎细胞浸润程度较模型

组轻,具体数据见表2。

3.4 子宫组织中 TNF- α 、IL-4 和 ICAM-1 免疫组化染色检测结果

TNF- α 、IL-4 及 ICAM-1 (CD54) 蛋白表达均在胞浆及胞核,呈棕黄色,正常对照组大鼠子宫腺体及炎细胞可见弱阳性表达,模型对照组大鼠子宫腺体及炎细胞可见强阳性表达,其余各组表达均较模型组有不同程度减弱。具体数据见表3、图3。

表2 癃清片对慢性盆腔炎模型大鼠阴道炎症细胞浸润的影响

Table 2 Effect of Longqing Tablets on vaginitis cell infiltration in rats with chronic pelvic inflammation

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	阴道炎症评分
空白对照	—	6	2.0±0.89
模型对照	—	6	3.5±2.26*
千金片	0.178	6	2.2±0.84
癃清片	9.355	6	3.6±1.52
	4.678	6	2.2±0.41
	2.339	6	3.5±1.38

空白对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs blank control group

表3 癃清片对慢性盆腔炎模型大鼠子宫组织中免疫组化表达的影响

Table 3 Effect of Longqing Tablets on immunohistochemical expression in uterine tissues of rats with chronic pelvic inflammation

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	ICAM-1	IL-4	TNF- α
空白对照	—	6	10.97±3.82	9.82±2.22	9.87±1.19
模型对照	—	6	12.72±2.69	16.07±4.50*	13.25±4.18*
千金片	0.178	6	9.22±3.74	7.40±1.82	10.30±1.54#
癃清片	9.355	6	10.86±3.96	9.36±4.27	11.26±2.58
	4.678	6	12.88±0.97	15.33±3.35	12.57±3.21
	2.339	6	11.04±2.34	15.29±3.79	12.44±3.23

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs blank control group; # $P < 0.05$ vs model group

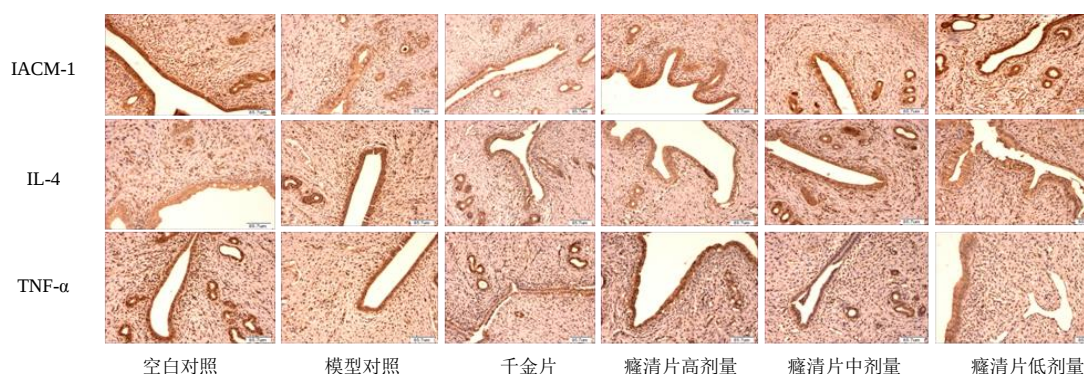


图3 癃清片对慢性盆腔炎模型大鼠子宫免疫组化染色检查结果

Fig. 3 Immunohistochemical staining of uterus in rats with chronic pelvic inflammatory disease by Longqing Tablets

4 讨论

慢性盆腔炎是增生性炎症,慢性炎症黏连形成与多种因素有关,且随病程延长有加重的趋势^[6]。其反复的炎性细胞活化及免疫病理损伤,是促炎/抗炎因子相互作用和局部免疫调节共同参与的结果^[6]。本实验采用慢性盆腔炎模型动物,对子宫及阴道组织的病理变化进行评分,确定该模型具有慢性盆腔炎慢性炎症黏连的特点。文献报道^[7],机体参与免疫系统的炎症因子主要分为前炎症因子和抑炎症因子两类。TNF- α 是一种促炎症因子和免疫调节因子,它持续升高则导致一些病理生理改变^[8]。IL-4是由活化Th2细胞产生的一种重要的细胞因子,对机体的免疫功能和炎症过程具有重要的调节作用^[9]。ICAM-1属于免疫球蛋白超家族成员^[10],具有介导白细胞在血管壁滚动、稳定、黏附和穿越内皮细胞、游出并在炎症区域募集的功能,通过白细胞激活,释放大量炎症介质。在慢性炎症中,其具有诱导组织损伤及局部组织慢性纤维化过程^[11]。

本实验中,模型对照组大鼠子宫组织中TNF- α 、IL-4表达明显高于正常组,证明了子宫中出现了炎症病变,加之ICAM-1表达模型组仍高于正常组,也说明了在子宫出现的炎症程度向组织慢性纤维化演变。而采用癃清片灌胃治疗后,以上3个指标的表达水平均有下调。其中癃清片高剂量组各项指标表达下调最为明显。

综上所述,癃清片通过调节子宫组织中的炎症细胞因子表达水平,来提高抗炎能力,减轻炎症损伤,抑制炎症的发展。同时通过下调大鼠子宫组织中ICAM-1的表达,抑制组织的纤维化,防止和缓解

粘连,从而减轻病情,达到治疗慢性盆腔炎的作用。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 李松芳. 慢性盆腔炎及宫颈炎的危险因素分析及建议 [J]. 临床研究, 2018(5): 90-92.
- [3] 张晓静, 邓雁如, 刘德福, 等. 癃清片抗炎镇痛作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 213-217.
- [4] 厉东亚, 孙文强. 左氧氟沙星胶囊联合癃清片治疗2型糖尿病合并尿路感染的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(1): 68-70.
- [5] 郭瑞臣. 临床药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [6] 刘 明, 张永萍, 梁建东, 等. 盆炎清灌肠剂抗炎及对慢性盆腔炎大鼠血液流变性的影响 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(6): 148-151.
- [7] 孙 晶, 陈 莹. 妇炎宁汤对慢性盆腔炎模型大鼠体内炎症细胞因子及粘连相关指标的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(7): 1729-1732.
- [8] 罗艳琴, 马 云, 宋路瑶, 等. 菝葜活性成份对慢性盆腔炎大鼠子宫组织肿瘤坏死因子- α 和白介素-4的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(2): 236-240.
- [9] 谭超月, 张庆庆, 李 元, 等. 宫颈病变患者血清和阴道灌洗液中IL-2、IL-4、IFN- γ 的表达及相关性研究 [J]. 实用妇产科杂志, 2018, 34(7): 515-518.
- [10] 宗 惠, 刘瑞芬, 于源源. 盆腔炎颗粒对慢性盆腔炎大鼠局部组织病理学及子宫TNF- α 、ICAM-1表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(8): 1781-1784.
- [11] 林淑媛, 范蔚芳, 谢雪玲. 妇科千金片联合抗生素对慢性盆腔炎患者血液流变学及免疫功能的影响 [J]. 世界中医药, 2018, 13(10): 2510-2513.