

## 少腹逐瘀汤对输卵管炎性不孕大鼠 NLRP3 炎症小体的作用研究

洪金妮<sup>1,2</sup>, 林达涛<sup>3</sup>, 陈仔颖<sup>1</sup>, 李素敏<sup>1\*</sup>

1. 福建中医药大学附属人民医院 妇科, 福建 福州 350004

2. 广东省人民医院(广东省医学科学院) 中医科, 广东 广州 510080

3. 中山大学中山医学院 寄生虫学教研室, 广东 广州 510080

**摘要:** 目的 研究少腹逐瘀汤对输卵管炎性不孕大鼠 Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体的作用。方法 采用金黄色葡萄球菌法构建大鼠输卵管炎性不孕模型, 造模成功雌性大鼠随机分为 3 组: 模型组、少腹逐瘀汤(以生药计 5 g·kg<sup>-1</sup>, 临床等效剂量)组、盐酸左氧氟沙星(阳性药, 80 mg·kg<sup>-1</sup>)组, 另取 10 只大鼠作为对照组。各组于成模后第 8 天开始 ig 给药, 每天 1 次, 连续 30 d, 对照组和模型组 ig 等量 0.9% 氯化钠注射液。各组雌鼠与成熟雄鼠按 2:1 合笼, 观察受孕率; HE 染色观察各组大鼠输卵管病理变化; Western blotting 法检测输卵管组织中 NLRP3 蛋白表达; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测输卵管组织中 NLRP3 和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) mRNA 水平。原代培养大鼠输卵管上皮细胞, 10 nmol·L<sup>-1</sup> 脂多糖(LPS)刺激 24 h 制备炎症模型, 造模同时给予 10 mg·L<sup>-1</sup> 盐酸左氧氟沙星、10 mg·L<sup>-1</sup> 少腹逐瘀汤处理, Western blotting 法检测细胞 NLRP3 蛋白表达; qRT-PCR 法检测细胞中 NLRP3、IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 水平。**结果** 对照组的受孕率为 60%, 模型组的受孕率为 40%, 盐酸左氧氟沙星组和少腹逐瘀汤组的受孕率均为 80%。对照组大鼠输卵管结构清晰, 黏膜皱褶丰富, 黏膜上皮细胞排列整齐, 管腔通畅; 模型组大鼠的输卵管结构分界欠清, 黏膜皱褶消失, 黏膜上皮细胞排列紊乱, 管腔狭窄, 出现梗阻和大量炎性细胞浸润等情况; 盐酸左氧氟沙星组与少腹逐瘀汤组大鼠输卵管结构有改善, 管壁组织结构尚清晰, 黏膜上皮细胞排列欠规整, 管腔通畅, 仅少量炎性细胞浸润。与对照组比较, 模型组大鼠输卵管组织的 NLRP3 蛋白和 NLRP3、IL-1 $\beta$  mRNA 水平显著上调( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 少腹逐瘀汤组输卵管组织的 NLRP3 蛋白和 NLRP3、IL-1 $\beta$  mRNA 水平显著下降( $P < 0.05, 0.001$ )。与对照组比较, 模型组输卵管上皮细胞 NLRP3 蛋白和 NLRP3、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 水平显著上调( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ); 与模型组比较, 少腹逐瘀汤组 NLRP3 蛋白和 NLRP3、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 水平显著下降( $P < 0.05, 0.01$ )。**结论** 少腹逐瘀汤治疗输卵管炎性不孕症的作用机制可能与调节 NLRP3 介导的炎症反应有关。

**关键词:** 少腹逐瘀汤; 输卵管炎性不孕; NLRP3 炎症小体; 白细胞介素-1 $\beta$

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2486-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.012

## Effect of Shaofu Zhuyu Decoction on NLRP3 inflammatorome of salpingitis infertility rats

HONG Jinni<sup>1,2</sup>, LIN Datao<sup>3</sup>, CHEN Ziyang<sup>1</sup>, LI Sumin<sup>1</sup>

1. Department of Gynecology, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangzhou 510080, China

3. Department of Parasitology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

**Abstract: Objective** To study the effect of Shaofu Zhuyu Decoction on NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in salpingitis infertility rats. **Methods** *Staphylococcus aureus* method was used to construct a rat tubal inflammatory infertility model, and the female model rats were randomly divided into three groups: model group, Shaofu Zhuyu Decoction (5 g·kg<sup>-1</sup> crude drug,

收稿日期: 2022-06-12

基金项目: 福建省自然科学基金青创项目(2020J05061); 福建省中青年教育科研项目(JAT190249); 福建省自然科学基金面上项目(2020J011041); 正大天晴医学项目研究(201511669); 福建省卫生计生科研人才培养项目-医学创新课题(2018-CX-44)

第一作者: 洪金妮 E-mail: hongjinni@126.com

\*通信作者: 李素敏 E-mail: 564492032@qq.com

clinical equivalent dose) group, and levofloxacin hydrochloride (80 mg·kg<sup>-1</sup>, positive drug) group, and 10 normal rats were selected as control group. Each group was given ig on the 8th day after modeling, once a day, for 30 days, control group and model group were given the same amount of 0.9% sodium chloride injection. After 30 days of continuous administration, female mice and mature male mice in each group were combined in cage at 2 : 1 to observe the conception rate. HE staining was used to observe the pathological changes of oviduct in each group. NLRP3 protein expression in fallopian tubes was detected by Western blotting. Real-time quantitative fluorescence PCR (qRT-PCR) was used to detect NLRP3 and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA levels in fallopian tubes. The primary cultured rat oviduct epithelial cells were stimulated with 10 nmol·L<sup>-1</sup> lipopolysaccharide (LPS) for 24 h to make an inflammatory model. At the same time, the cells were treated with 10 mg·L<sup>-1</sup> levofloxacin hydrochloride group and 10 mg·L<sup>-1</sup> Shaofu Zhuyu Decoction. The NLRP3 protein expression was detected by Western blotting method. The mRNA levels of *NLRP3*, *IL-1 $\beta$* , interleukin-6 (*IL-6*) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) were detected by qRT-PCR. **Results** The pregnancy rate of the normal control group was 60%, that of the model group, Shaofu Zhuyu Decoction group, and levofloxacin hydrochloride group was 40%, 80%, 80% respectively. In control group, the structure of fallopian tube was clear, the mucosal folds were abundant, the mucosal epithelial cells were arranged neatly, and the lumen was unobstructed. In the model group, the structure boundary of fallopian tube was not clear, the mucosal folds disappeared, the arrangement of mucosal epithelial cells was disordered, the lumen was narrow, obstruction and a large number of inflammatory cell infiltration occurred. In Shaofu Zhuyu Decoction and levofloxacin hydrochloride group group, the structure of fallopian tube was improved, the tissue structure of tube wall was clear, the arrangement of mucosal epithelial cells was irregular, the lumen was unobstructed, and only a small amount of inflammatory cells infiltrated. Compared with control group, NLRP3 protein expression, *NLRP3* and *IL-1 $\beta$*  mRNA level in model group were significantly up-regulated ( $P < 0.001$ ). Compared with model group, NLRP3 protein expression, *NLRP3* and *IL-1 $\beta$*  mRNA level in tubal tissue of Shaofu Zhuyu Decoction group were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.001$ ). Compared with control group, NLRP3 protein expression and mRNA levels of *NLRP3*, *IL-1 $\beta$* , *IL-6* and *TNF- $\alpha$*  were significantly up-regulated in model group ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Compared with model group, NLRP3 protein expression and mRNA levels of *NLRP3*, *IL-1 $\beta$* , *IL-6* and *TNF- $\alpha$*  in Shaofu Zhuyu Decoction group were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** The mechanism of Shaofu Zhuyu Decoction in the treatment of salpingitic infertility may be related to the regulation of NLRP3 mediated inflammatory response.

**Key words:** Shaofu Zhuyu Decoction; salpingitis infertility; NLRP3 inflammasome; IL-1 $\beta$

世界卫生组织(WHO)将不孕症定义为“婚后至少1年,同居有正常性生活、未避孕而未怀孕者”<sup>[1]</sup>。流行病学显示,全球范围内不孕症发病人群已达9 000万,在我国不孕症发病率为育龄夫妇的7%~10%,且呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>。不孕症致病因素复杂,输卵管原因引起的不孕约占不孕女性的40%,其中输卵管炎症占输卵管原因的50%<sup>[2-3]</sup>。输卵管炎性不孕是指急性或慢性输卵管炎继发不孕,是各种因素作用于输卵管,使得管壁收缩功能衰退、纤毛节律性蠕动振幅弱化,继而黏连、阻塞、积水以致卵子不能正常运送,精子不能与卵子相遇而导致不孕的一种疾病。输卵管炎性不孕的发病机制主要包括先天畸形、细胞毒性免疫和炎性损伤<sup>[4]</sup>。目前研究认为,炎性损伤与输卵管炎性不孕密切相关。Nod样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)组成,在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用,可能参与不孕症的疾病进展<sup>[5-6]</sup>。

在治疗方面,宫腹腔镜联合输卵管间质部插管通液术是目前治疗输卵管炎性不孕的主要方法,微

创手术治疗虽可取得一定效果,但术后常伴有再黏连、再阻塞等并发症。广谱抗生素消炎与抗细菌感染的疗法治疗输卵管炎性不孕疗效不甚理想、不良反应较多,无法彻底治疗因慢性炎症引起的输卵管功能障碍。因此,寻求一种替换或提高广谱抗生素消炎与抗细菌感染功效的其他疗法来治疗输卵管炎性不孕已迫在眉睫。中药处方具有多靶点、副反应小的特点,通过中医学治疗输卵管炎性不孕具有独特优势,近年来取得较大进展<sup>[7]</sup>。

本课题组既往临床研究证实少腹逐瘀汤可有效治疗输卵管炎性不孕<sup>[8-9]</sup>,本研究拟在此基础上进一步研究少腹逐瘀汤对输卵管炎性不孕症的抗炎机制,为输卵管炎性不孕症的发病机制提供新的实验依据,为该病的临床治疗提供新的靶点。同时丰富中医药理论,以期为中医药治疗输卵管炎性不孕症的进一步深入研究带来启发和思路。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康SPF级SD大鼠,7周龄,雌性50只、雄性20只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验

动物生产许可证号 SCXK(湘)2019-0004。所有动物普通饲料饲养,自由饮水,在室温(22±1)°C、12 h 光照周期的 SPF 环境中适应性饲养 1 周后开始实验。动物实验已通过动物实验伦理委员会批准,批准文号 2021031701。

## 1.2 细胞

本实验采用的是原代培养的大鼠输卵管上皮细胞。取性成熟但未交配生育的 8 周龄雌性 SPF 级 SD 大鼠,处死后取出输卵管组织,剪除输卵管浆膜和脂肪组织后放入含 10× 双抗的磷酸盐缓冲液(PBS)中冲洗。充分暴露输卵管管腔,放入含 10× 双抗的 PBS 中冲洗 3 次后 37 °C、0.05% 胰酶消化 5 min,加入含 20% 胎牛血清的培养液终止消化。用灭菌的载玻片轻轻刮取输卵管内层,用移液器吹打刮下的细胞,使其尽量分散成单细胞。1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,用移液器轻轻吸去上清,用含 1× 双抗的 PBS 洗涤再离心,用 PBS 洗 2 次后,加入含 20% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养液,接种于 10 cm<sup>2</sup> 培养皿中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,48 h 换液 1 次,细胞密度达 80% 左右消化传代,用于后续实验。通过细胞角蛋白-18 免疫荧光染色法对大鼠输卵管上皮细胞进行鉴定。

## 1.3 少腹逐瘀汤的制备及配制

**1.3.1 少腹逐瘀汤的制备** 当归 18 g、赤芍 12 g、川芎 12 g、炒五灵脂 12 g、生蒲黄 18 g、醋延胡索 15 g、醋没药 12 g、干姜 3 g、肉桂 6 g、炒小茴香 9 g 均采用药材,购自福建中医药大学附属人民医院中药房,由福建中医药大学中药学研究室廖华军副教授按《中国药典》2020 年版完成鉴定,鉴定结果合格。取处方量药材,加 7 倍量水,浸泡 1 h,加热回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,减压浓缩,干燥,得到水提取物,4 °C 避光保存备用。

**1.3.2 动物实验用药** 根据本课题组既往研究结果中人用剂量<sup>[8-9]</sup>、粉末与生药比例(36.75%)及人与大鼠体表面积换算法,得到大鼠的用药剂量,将少腹逐瘀汤水提取物溶于双蒸水中配制生药质量浓度为 10 g·L<sup>-1</sup> 的溶液,立即使用或保存于 4 °C 冰箱备用。为保障中药疗效,每次中药保存时间不超过 48 h。

**1.3.3 细胞实验用药** 少腹逐瘀汤水提取物溶于双蒸水中,根据粉末与生药比例,换算并配成生药质量浓度为 10 g·L<sup>-1</sup> 的中药。超声 3 h 至颗粒肉眼观察完全溶解,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清,

通过 0.22 μm 的过滤器滤过,立即使用或 -80 °C 冻存备用。

## 1.4 阳性药物及主要试剂

盐酸左氧氟沙星片(山东鲁抗药业有限公司,批号 200105,规格每片 0.5 g);NLRP3 抗体(北京博奥森生物技术有限公司);CCK8 试剂盒、全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所);cDNA 逆转录试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司);第一链 cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo scientific 公司);电泳仪、电转仪(美国 Bio-RAD 公司);BCA 蛋白浓度定量试剂盒(碧云天生物技术研究);聚偏氟乙烯 PVDF 膜购于(美国 Millipore 公司);牛血清白蛋白(BSA,美国 AMRESCO 公司)。

## 1.5 主要仪器

7500 实时荧光定量 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司);infinite M200 酶标仪(瑞士 TECAN 公司);VELOCITY-18R 型离心机(澳大利亚 Dynamica 公司);MB100-2A 型微孔板恒温振荡器(杭州奥盛仪器有限公司);ES-1100(长沙湘平科技发展有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物实验

**2.1.1 动物造模** 参考文献报道方法<sup>[10]</sup>,采用金黄色葡萄球菌法构建大鼠输卵管炎性不孕模型:备皮,向大鼠 ip 10% 的水合氯醛 300 mg·kg<sup>-1</sup>,下腹部消毒开口,向上找到卵巢,用一次性胰岛素注射器抽取 100 μL 4×10<sup>9</sup>·mL<sup>-1</sup> 金黄色葡萄球菌沿输卵管注射入卵巢方向,注射后针头停留 2 min 后拔出,棉签轻按压输卵管至无液体溢出,左右两侧均注射 50 μL,注射完毕后输卵管放回原位,肠管复位,3-0 缝合线缝合肌肉,2-0 缝合线缝合皮肤,置于保温垫待动物苏醒放回鼠笼饲养。随机取出 10 只雌性与 5 只雄性大鼠以 2:1 比例进行合笼,观察 7 d 后,解剖雌性大鼠查看子宫是否有胚胎形成,以判断造模是否成功,未见胚胎形成,提示造模成功,该模型可用。

**2.1.2 动物分组及给药** 造模成功的 30 只雌性大鼠按随机数法随机分为 3 组:模型组、少腹逐瘀汤(以生药计 5 g·kg<sup>-1</sup>,临床等效剂量)组、盐酸左氧氟沙星(阳性药,80 mg·kg<sup>-1</sup>)组,另取 10 只大鼠作为对照组。各组于成模后第 8 天开始 ig 给药,每天上午 8:00 时给药 1 次,连续处理 30 d。对照组和模型组 ig 等量 0.9% 氯化钠注射液。

**2.1.3 动物受孕率观察** 连续给药 30 d 后,各组雌

鼠与成熟雄鼠按2:1于20:00时关灯合笼过夜,次日晨8:00检查,阴道口有阴道栓者判为已孕,无阴道栓为未孕。未孕雌鼠则继续合笼,连续3 d,最后统计各组大鼠受孕率。

受孕率=组内受孕鼠数/组内配种雌鼠总数

**2.1.4 动物取材** 受孕率观察实验结束后,将大鼠空腹8 h后,5%戊巴比妥钠麻醉后处死,取部分输卵管组织保存于-80℃冰箱,另取一部分输卵管组织保存于福尔马林用于石蜡包埋。

**2.1.5 HE染色观察输卵管组织结构** 取石蜡包埋的输卵管组织,5 μm切片,石蜡切片脱蜡、水化;过碘酸酒清液浸泡10 min,流水冲洗10 min;无色品红液浸泡10 min,流水冲洗5 min;苏木精染核3 min;流水冲洗5 min;脱水、透明、封片,于OLYMPUS DY07显微镜下观察和拍照。

**2.1.6 Western blotting法检测输卵管组织中NLRP3表达** 冰上提取组织蛋白,进行蛋白定量。取适量蛋白样品在电泳槽中进行聚丙烯酰胺电泳,电转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。5% BSA封闭1 h,加入1:1 000稀释的NLRP3,1:1 500稀释的GAPDH,4℃摇床中过夜,TBST洗膜3次,每次10 min;二抗室温孵育2 h,TBST再次洗膜3次,每次10 min,化学发光法成像。蛋白含量用Image J软件进行定量分析,以一抗/GAPDH比值表示蛋白相对表达量。

**2.1.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测输卵管组织中NLRP3和白细胞介素-1β(IL-1β)mRNA水平** 用Trizol提取输卵管组织中RNA,逆转录成cDNA,用7 500实时荧光定量PCR系统进行实时定量,引物序列见表1。反应体系如下:SYBR Green mix 10.0 μL,双蒸水8.0 μL,上下游引物各0.5 μL,反转录产物1.0 μL。扩增反应程序设置如下:94℃、5 min,94℃、30 s,55℃、45 s,72℃、30 s,40个循环,重复5次。将待测基因与内参GAPDH比值的均数作为待测基因mRNA的相对表达量,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

## 2.2 细胞实验

**2.2.1 脂多糖(LPS)造模时间及少腹逐瘀汤作用浓度探索** 取原代提取大鼠输卵管上皮细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 、每孔200 μL接种于96孔板,待细胞贴壁后,分成对照组、模型组和少腹逐瘀汤0.1、1.0、10.0、100.0 mg·L<sup>-1</sup>组。对照组不干预,模型组用10 nmol·L<sup>-1</sup> LPS造模,少腹逐瘀汤组造模同时加药。干预12、24、48、72 h,按照试剂盒说明书进行CCK-8实验,检测细胞吸光度(A)值。

取原代提取大鼠输卵管上皮细胞接种于96孔板,待细胞贴壁后,分成对照组、模型组、盐酸左氧氟沙星10 mg·L<sup>-1</sup>组、少腹逐瘀汤10 mg·L<sup>-1</sup>组。对照组不干预,模型组用10 nmol·L<sup>-1</sup> LPS造模,造模同时加药。干预12、24、48、72 h后,取上清,按照试剂盒说明书检测LDH水平。

**2.2.2 Western blotting法检测细胞中NLRP3的表达** 取原代提取大鼠输卵管上皮细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 、每孔2 mL接种于6孔板,细胞分组及给药方法同“2.2.1”项。加入蛋白裂解液,冰上提取细胞蛋白,进行蛋白定量。Western blotting法检测细胞中NLRP3的表达,方法同“2.1.6”项。

**2.2.3 qRT-PCR法检测细胞中NLRP3、IL-1β、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)mRNA水平** 用Trizol提取细胞中RNA,逆转录成cDNA,用7500实时荧光定量PCR系统进行实时定量,引物序列见表1。具体方法见“2.1.7”项。

## 2.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,进行单因素方差分析,组间比较使用LSD。

## 3 结果

### 3.1 受孕率比较

如表2所示,对照组的受孕率为60%,模型组的受孕率为40%,盐酸左氧氟沙星组和少腹逐瘀汤组的受孕率均为80%

### 3.2 卵巢组织HE染色比较

如图1所示,对照组大鼠输卵管结构清晰,黏膜

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
NLRP3	GCTGCTCAGCTCTGACCTCT	AGGTGAGGCTGCAGTTGTCT
TNF-α	ATGGTCACCCTCAGATCAGC	TTGACCGCTGAAGAGACCCCT
IL-1β	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
IL-6	ATTGTATGAACAGCGATGATGCAC	CCAGGTAGAAACGGAACCTCCAGA
GAPDH	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

表 2 各组大鼠受孕率观察

Table 2 Observation of conception rate of rats in each group

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	受孕率/%
对照	—	60
模型	—	40
盐酸左氧氟沙星	0.08	80
少腹逐瘀汤	5	80

皱褶丰富,黏膜上皮细胞排列整齐,管腔通畅;模型组大鼠的输卵管结构分界欠清,黏膜皱褶消失,黏膜上皮细胞排列紊乱,管腔狭窄,出现梗阻和大量炎性细胞浸润等情况;盐酸左氧氟沙星组大鼠输卵管结构有改善,管壁组织结构尚清晰,黏膜上皮细胞排列欠规整,管腔通畅,仅少量炎性细胞浸润;少腹逐瘀汤组大鼠输卵管结构与盐酸左氧氟沙星组类似,输卵管结构有改善,管壁组织结构尚清晰。

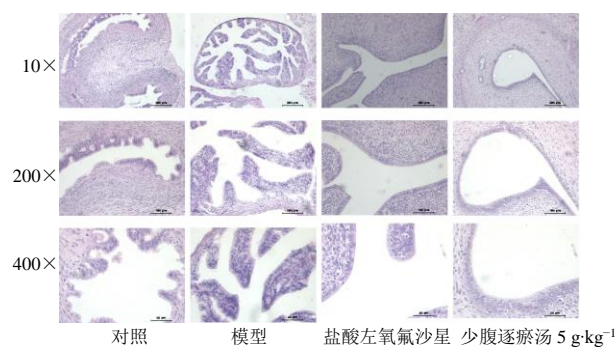
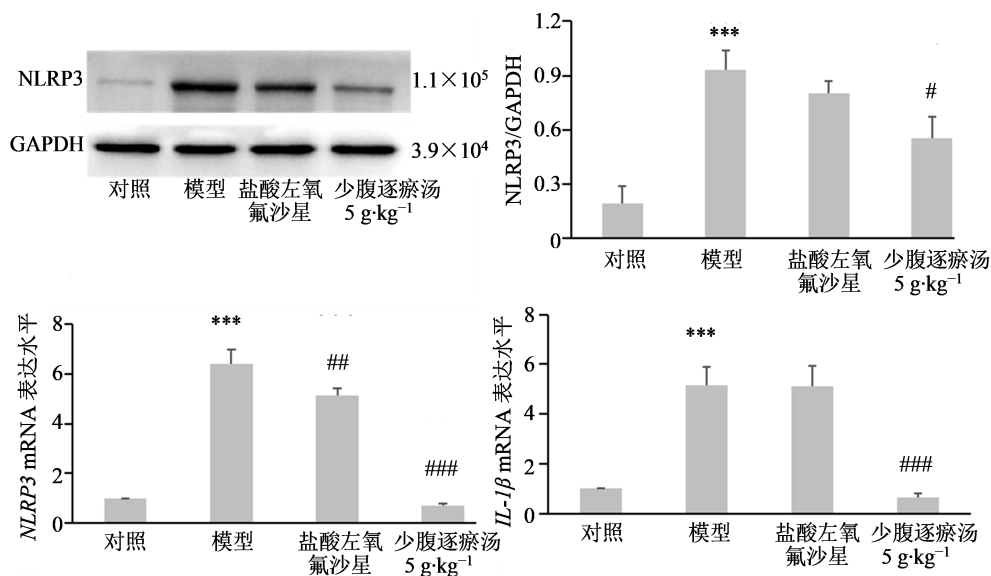


图 1 卵巢组织的 HE 染色

Fig. 1 HE staining of ovarian tissue



与对照组比较:\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较:# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$   
 \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group

图 2 输卵管组织中 NLRP3、IL-1 $\beta$  表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 2 Expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$  in fallopian tubes ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.3 输卵管组织中 NLRP3、IL-1 $\beta$ 的表达比较

如图 2 所示,与对照组比较,模型组 NLRP3 蛋白表达明显上调,具有统计学差异( $P < 0.001$ )。与模型组比较,盐酸左氧氟沙星组 NLRP3 蛋白表达下降,但无统计学差异;少腹逐瘀汤组 NLRP3 蛋白表达明显下降,具有统计学差异( $P < 0.05$ )。

进一步通过 qRT-PCR 检测发现,与对照组比较,模型组的 NLRP3、IL-1 $\beta$  mRNA 水平明显上调,具有统计学差异( $P < 0.001$ );与模型组比较,盐酸左氧氟沙星组和少腹逐瘀汤组 NLRP3 mRNA 水平显著下降,具有统计学差异( $P < 0.01, 0.001$ );少腹逐瘀汤组的 IL-1 $\beta$  mRNA 水平明显下降,具有统计学差异( $P < 0.001$ )。

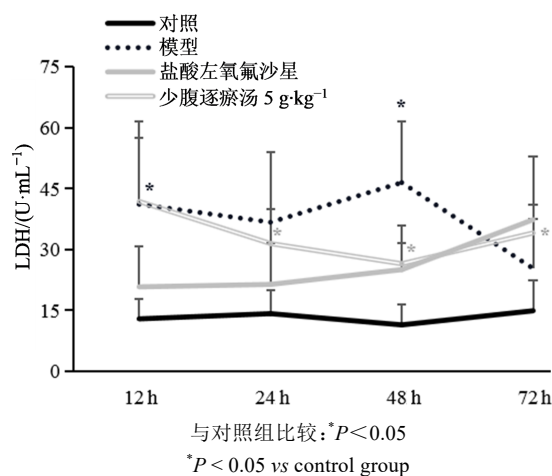
### 3.4 LPS 造模时间及少腹逐瘀汤作用浓度探索

如表 3 所示,与对照组比较,LPS 诱导 24、48 h 输卵管上皮细胞的活性显著下降( $P < 0.05, 0.01$ ),LPS 干预 24 h 后细胞活性约为对照组的 58%,干预 48 h 后细胞活性约为对照组的 37%;与模型组比较,少腹逐瘀汤 10 mg·L<sup>-1</sup> 作用 12~72 h 细胞活性显著升高( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ),少腹逐瘀汤 100 mg·L<sup>-1</sup> 作用 12~72 h 细胞活性下降。

如图 3 所示,LPS 干预 48 h 后,与对照组比较,细胞上清 LDH 水平显著升高( $P < 0.05$ ),明显高于干预 24 h;给药后 LDH 水平呈降低趋势。故选择 LPS 造模时间 24 h,少腹逐瘀汤 10 mg·L<sup>-1</sup> 进行后续研究。

表3 不同浓度的少腹逐瘀汤对LPS诱导的输卵管上皮细胞的活性的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 3 Effect of Shaofu Zhuyu Decoction on activity of LPS-induced oviduct epithelial cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	A值			
		12 h	24 h	48 h	72 h
对照	—	0.456±0.08	0.438±0.05	0.714±0.23	1.203±0.12
模型	—	0.323±0.05	0.254±0.11*	0.264±0.05**	1.127±0.07
少腹逐瘀汤	0.1	0.338±0.16	0.304±0.16	0.300±0.76	0.965±0.36
	1.0	0.315±0.07	0.319±0.09	0.470±0.11	1.057±0.52
	10.0	0.597±0.01###	0.633±0.08##	1.592±0.15###	1.613±0.21#
	100.0	0.227±0.02#	0.217±0.02	0.180±0.01	0.122±0.01###

与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: # $P<0.05$  ## $P<0.01$  ### $P<0.001$ \* $P<0.001$  \*\* $P<0.001$  vs control group; # $P<0.05$  ## $P<0.01$  ### $P<0.001$  vs model group图3 细胞上清LDH水平( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Fig. 3 LDH level of cell supernatant ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

### 3.5 输卵管上皮细胞中NLRP3及炎症因子表达

如图4所示,与对照组比较,模型组的NLRP3蛋白水平明显上调,具有统计学差异( $P<0.001$ );与模型组比较,盐酸左氧氟沙星组和少腹逐瘀汤组的NLRP3蛋白水平下降,具有统计学差异( $P<0.05, 0.01$ )。

与对照组比较,模型组的NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的mRNA水平上调,具有统计学差异( $P<0.05, 0.01, 0.001$ )。与模型组比较,盐酸左氧氟沙星组和少腹逐瘀汤组NLRP3和TNF- $\alpha$  mRNA水平下降,具有统计学差异( $P<0.05, 0.01$ );盐酸左氧氟沙星组的IL-1 $\beta$ 和IL-6的mRNA水平稍下降,无统计学差异;少腹逐瘀汤组的IL-1 $\beta$ 和IL-6的mRNA水平下降,具有统计学差异( $P<0.05$ )。

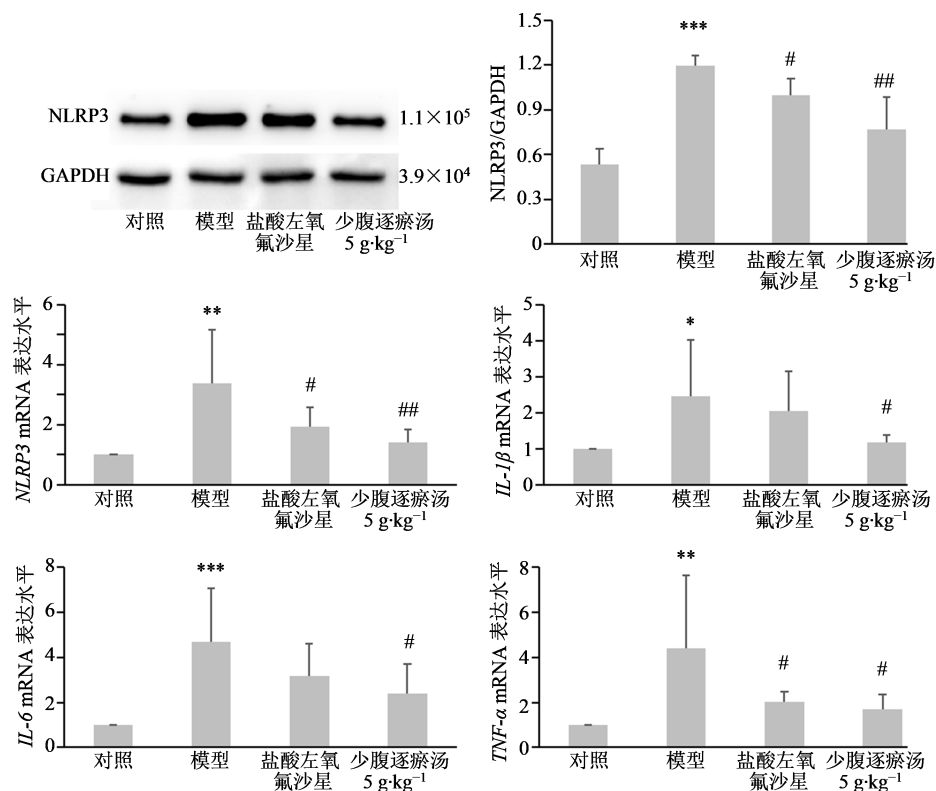
## 4 讨论

目前研究表明,输卵管炎性不孕症与机体细胞因子的异常表达有关,当各种外界致病因素刺激机体时,引起患者盆腔出现炎症反应,导致机体内炎

症细胞因子分泌过多<sup>[6]</sup>。病原菌入侵机体后可被机体免疫系统的模式识别受体识别出来,引起机体的固有免疫反应,进而介导炎症反应,引起组织器官的免疫损伤<sup>[5]</sup>。研究报道,NLRP3炎症小体可直接诱导无活性的IL-1 $\beta$ 、IL-18的基因转录,促进炎症因子的分泌;其还可通过激活NLRP3-ASC-Caspase-1炎症小体诱导Caspase-1的活化,进而促进IL-1 $\beta$ 的活化<sup>[5]</sup>。研究发现,急性盆腔炎性疾病动物模型血清的NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 表达均高于对照组,通过抑制NLRP3炎症小体可抑制IL-1 $\beta$ 的表达,提示NLRP3炎症小体介导的IL-1 $\beta$ 表达参与盆腔炎的疾病进展<sup>[11]</sup>。本研究对此进行验证,通过动物实验发现,与对照组比较,输卵管炎性不孕大鼠模型的NLRP3蛋白表达和mRNA水平升高。

少腹逐瘀汤源于《医林改错》,具有活血祛瘀、温经止痛的功效。王清任认为其“种子如神”,主治少腹积块,疼痛或不痛,或痛而无积块,或少腹胀满等症。方中官桂、小茴香、干姜温经散寒除湿,当归、川芎、赤芍养血、活血、化瘀,元胡、五灵脂、蒲黄、没药化瘀止痛,诸药合用,共奏温经散寒、活血祛瘀止痛之功。现代药理学研究表明,少腹逐瘀汤加减治疗寒湿凝滞型慢性盆腔炎的临床疗效确切<sup>[12]</sup>。少腹逐瘀汤亦被广泛用于不孕症<sup>[13]</sup>,且疗效高达80%~90%<sup>[8]</sup>。

而在机制方面,目前研究发现少腹逐瘀汤治疗盆腔炎性疾病的机制集中在改善血液流变性、抗炎、镇痛、解痉和抗凝血。刘丹等<sup>[14]</sup>通过动物实验发现,少腹逐瘀汤可有效调节血瘀证大鼠体内氧化应激因子IL-6、TNF- $\alpha$ 及血管舒缩因子变化。本团队前期动物研究发现<sup>[9]</sup>,少腹逐瘀汤可有效改善盆腔炎性疾病模型大鼠的子宫形态,其中的机制可能与抑制p38 MAPK通路,降低IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 有关。



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

图 4 输卵管上皮细胞中 NLRP3 及炎症因子表达 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Expression of NLRP3 and inflammatory factors in oviduct epithelial cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

本研究对机制进一步研究发现,少腹逐瘀汤可降低输卵管炎性不孕症大鼠的 NLRP3 蛋白和 mRNA 水平,以及其下游的 *IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 水平。提示少腹逐瘀汤的抗炎机制可能与调节 NLRP3 有关。

本研究结果提示 NLRP3 炎症小体在输卵管炎性不孕症中发挥重要作用,少腹逐瘀汤治疗输卵管炎性不孕症的作用机制可能与调节 NLRP3 介导的炎症反应有关,但具体机制有待进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 韦贞汁, 权丽丽, 薛丽霞, 等. 暖宫孕子胶囊联合黄体酮治疗黄体功能不全不孕对子宫内膜厚度、炎症因子及妊娠结局效果 [J]. 中国计划生育学杂志, 2022, 30(3): 520-523.  
Wei Z Z, Quan L L, Xue L X, et al. Effects of Nuangong yunzi capsules combined with progesterone for treating infertility patients induced by luteal phase deficiency on their endometrial thickness, inflammatory factors, and pregnancy outcomes [J]. Chin J Fam Plan, 2022, 30(3): 520-523.

[2] 朱慧莉, 黄薇. 输卵管性不孕的流行病学及病因 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016, 35(3): 212-216.  
Zhu H L, Huang W. Epidemiology and etiology of oviduct infertility [J]. J Int Reproductive Heal Plan, 2016, 35(3): 212-216.

[3] Ng K Y B, Cheong Y. Hydrosalpinx - salpingostomy, salpingectomy or tubal occlusion [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2019, 59: 41-47.

[4] 黄紫纯, 匡继林, 朱维昊. 通管方治疗宫腹腔镜术后输卵管性不孕患者的疗效及其对炎症因子、子宫动脉血流的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(12): 1539-1543.  
Huang Z C, Kuang J L, Zhu W H. Efficacy of Tongguan prescription in treating tubal infertility patients after hysteroscopy combined with laparoscopic surgery and its effects on inflammatory factors and uterine artery blood flow [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2020, 40(12): 1539-1543.

[5] Hong J N, Li G B, Zhang Q H, et al. D-ribose induces podocyte NLRP3 inflammasome activation and glomerular injury via AGEs/RAGE pathway [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 259.

[6] Bryan E R, Kim J, Beagley K W, et al. Testicular

- inflammation and infertility: Could chlamydial infections be contributing? [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2020, 84(3): e13286.
- [7] 张大伟. 中药辅助治疗输卵管炎性不孕的价值 [J]. 山西卫生健康职业学院学报, 2021, 31(3): 93-94.  
Zhang D W. Value of Chinese medicine in the treatment of tubal inflammatory infertility [J]. *J Shanxi Heal Vocat Coll*, 2021, 31(3): 93-94.
- [8] 李素敏, 施梦云, 章均, 等. 少腹逐瘀汤灌肠疗法治疗输卵管炎性不孕症临床观察 [J]. 福建中医药, 2022, 53(1): 1-3.  
Li S M, Shi M Y, Zhang J, et al. Clinical observation of Shaofu Zhuyu Decoction *Enema* in the treatment of tubal factor infertility [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2022, 53(1): 1-3.
- [9] 李素敏, 陈捷, 陈丽笙, 等. 少腹逐瘀汤直肠给药治疗盆腔炎性疾病的效果及机制研究 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(35): 6827-6830.  
Li S M, Chen J, Chen L S, et al. Research on the therapeutic effect and the mechanisms of Shaofu Zhuyu Tang for treating pelvic inflammatory diseases with rectal administration [J]. *Prog Mod Biomed*, 2016, 16(35): 6827-6830.
- [10] 刘丽, 袁孟珂, 李月, 等. 膈下逐瘀汤对输卵管炎性不孕模型大鼠的影响 [J]. 中医学报, 2021, 36(8): 1729-1733.  
Liu L, Yuan M K, Li Y, et al. Effects of Gexia Zhuyu Decoction on rats with oviduct inflammatory infertility [J]. *Acta Chin Med*, 2021, 36(8): 1729-1733.
- [11] Filip L, Duică F, Prădatu A, et al. Endometriosis associated infertility: A critical review and analysis on etiopathogenesis and therapeutic approaches [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(9): E460.
- [12] 毛海燕, 陈元欢, 武权生, 等. 加味少腹逐瘀汤对子宫内膜异位症寒凝血瘀证盆腔疼痛神经血管生成的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 141-147.  
Mao H Y, Chen Y H, Wu Q S, et al. Effect of modified Shaofu Zhuyutang on neural angiogenesis and pelvic pain of endometriosis with syndrome of cold congeal and blood stasis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(12): 141-147.
- [13] 李琳, 贺冰, 马本玲. 少腹逐瘀汤对子宫内膜容受性不良大鼠的改善作用及机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1376-1382.  
Li L, He B, Ma B L. Effect and mechanism of Shaofu Zhuyu Decoction on improving poor endometrial receptivity in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(5): 1376-1382.
- [13] 刘丹, 池玉梅, 邓海山, 等. 少腹逐瘀汤对寒凝血瘀模型大鼠氧化应激因子、炎性介质及血管舒缩因子的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(3): 249-253.  
Liu D, Chi Y M, Deng H S, et al. Effects of Shaofu Zhuyu Decoction on oxidative stress factors, inflammatory mediators and vasomotion factors in rat model of blood stasis due to cold syndrome [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2014, 30(3): 249-253.

[责任编辑 兰新新]