

黄柏碱对细菌性阴道病小鼠模型的保护作用

张冬梅, 李红娟, 周 芹

郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450007

摘要: **目的** 探讨黄柏碱改善实验性细菌性阴道病小鼠的作用及机制。**方法** 采用大肠杆菌-金黄色葡萄球菌混合液制备细菌性阴道病模型。ig 不同剂量黄柏碱 (10、20、40 mg/kg) 进行干预治疗, 对照组、模型组每日 ig 等量生理盐水。7 d 后观察阴道黏膜病理学变化, ELISA 法检测阴道分泌物中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量及子宫组织中前列腺素 E₂ (PGE₂)、前列腺素 F_{2 α} (PGF_{2 α}) 水平, Western blotting 法检测组织中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、Toll 样受体 4 (TLR4) 及核转录因子- κ B (NF- κ B) 蛋白表达水平。**结果** 黄柏碱可有效减轻模型小鼠阴道黏膜病变, 显著降低模型小鼠阴道中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 等炎症因子含量, 下调子宫组织中 PGE₂、PGF_{2 α} 水平及 MMP-9、TLR4、NF- κ B 蛋白表达水平。**结论** 黄柏碱可有效改善细菌性阴道炎模型小鼠阴道炎症, 同时抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路, 从而改善细菌性阴道病及相应早产风险。

关键词: 黄柏碱; 细菌性阴道病; 早产; TLR4/NF- κ B 信号; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)24-5849-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.018

Protective effect of phellodendrine on bacterial vaginosis mice

ZHANG Dong-mei, LI Hong-juan, ZHOU Qin

Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China

Abstract: Objective To investigate the impact of phellodendrine on treating bacterial vaginosis (BV) mice. **Methods** BV model mice were induced by vaginal injecting with EPEC and MRSA. After the mice in control and model groups being administrated with phellodendrine (10, 20, and 40 mg/kg) for 7 d, the mice were sacrificed under deep anesthesia. The mice vaginal pathology changes were observed using HE staining method. IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α secretion in vagina and PGE₂, PGF_{2 α} levels in uterus were detected using ELISA assay. Uterine MMP-9, TLR4, and NF- κ B expression levels were measured using western blotting. **Results** Vaginal pathology changes were improved by phellodendrine. Specifically, phellodendrine could reduce IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α secretion in vagina, it could also reduce PGE₂ and PGF_{2 α} content, and inhibit MMP-9, TLR4, and NF- κ B expression levels in uterus tissue. **Conclusion** Phellodendrine could effectively treat BV and reduce the rise of pre-term birth by simultaneously inhibiting endovaginal inflammatory response and regulating intrauterine TLR4/NF- κ B signal pathway in BV mice.

Key words: phellodendrine; bacterial vaginosis; pre-term birth; TLR4/NF- κ B signaling pathway; inflammatory factors

早产是世界性产科问题, 是新生儿患病及死亡的主要原因。在众多发病因素中细菌性阴道病 (bacterial vaginosis, BV) 占据重要角色。BV 作为常见的生殖道感染, 由于正常阴道酸性失衡, 厌氧微生物扩增, 导致感染发生, 临床表现为外阴瘙痒、白带增多、黏稠及阴道分泌物异常等^[1]。BV 在孕期发病率高达 30%, 是导致不良妊娠结局 (早产、胎膜早破、流产、低体质量儿等) 的主要原因^[2]。临床采用抗生素治疗具有一定效果, 但有效率仅有 60%,

而复发率高达 30%, 严重影响患者的生活质量^[3]。因此, 寻找新的有效治疗 BV 的药物, 对改善患者生活质量, 降低妊娠期早产风险具有重大意义。

黄柏药用历史悠久, 为芸香科乔木植物黄皮树 *Phellodendron chinese* Schneid. 树皮, 其味苦、性寒, 具有清热燥湿、泻火解毒、消肿祛腐等功效。现代研究表明黄柏具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化等作用, 临床常用于湿热带下、泻痢、黄疸等症状^[4-5]。黄柏碱 (phellodendrine) 属于异喹啉生物碱, 是黄

收稿日期: 2018-10-05

作者简介: 张冬梅, 女, 主要从事妇产科的临床和基础研究。Tel: 13523407607

柏中的活性成分及质控成分^[6], 具有较好的降血压、抗肾炎、抑制细胞免疫等作用^[7]。但其是否作为重要成分参与黄柏临床治疗湿热带下尚未见报道。因此, 本实验拟采用大肠杆菌-金黄色葡萄球菌混合液建立 BV 小鼠模型, 考察黄柏碱改善小鼠 BV 的功效及降低早产风险的机制, 为更好地治疗 BV 提供科学策略及参考。

1 材料

1.1 实验动物

雌性昆明种小鼠, 清洁级, 体质量 18~22 g, 动物合格证号 SCXK (沪) 2012-0002。

1.2 实验试剂

黄柏碱 (质量分数 \geq 98%, 批号 H-100718-03), 成都瑞芬思生物科技有限公司提供; 加替沙星 (批号 111207), 西安万隆制药有限责任公司; 苯甲酸雌二醇 (批号 20160101), 天津必佳药业集团有限公司; 金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)、大肠杆菌 (ATCC25922), 中国食品药品检定研究院; 前列腺素 E₂ (PGE₂)、前列腺素 F_{2 α} (PGF_{2 α})、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司; 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、Toll 样受体 4 (TLR4)、核转录因子- κ B (NF- κ B) 抗体, 美国 Abcam 公司; 微管蛋白 (β -Tubulin)、二抗, 南京巴傲得生物科技有限公司; ECL 化学发光显影试剂盒, 美国 Thermo 公司。

1.3 实验仪器

Synergy HT 酶标仪 (美国 BioTeK 公司); Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳仪、Trans-Blot SD 半干转膜系统 (美国 Bio-rad 公司); Direct-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 5417R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); IKA T18 basic 匀浆器 (德国 ULTRATURRAX 公司); AX70 显微照相系统 (日本 Olympus 公司); ImageQuant LAS 4000 全自动图像分析系统 (美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 BV 小鼠模型制备

取健康小鼠, sc 0.2 mL 苯甲酸雌二醇注射液 (0.5 mg/mL), 每 2 天 1 次, 共 3 次。6 d 后采用无菌 PBS 溶液灌洗小鼠阴道 3 次, 将无菌石蜡油涂抹 5 号头皮针硅胶管, 随后缓慢插入小鼠阴道约 1.5 cm 处, 向阴道内接种大肠杆菌 (1×10^9 cfu/mL) 及金黄色葡萄球菌 (1×10^9 cfu/mL) 混合菌液, 接种 4 d 后采集阴道分泌物涂片, 进行革兰染色镜检, 考察金

黄色葡萄球菌及大肠杆菌感染情况, 确定 BV 模型是否成功 (当小鼠阴道明显充血、红肿并伴有大量脓性分泌物时, 取分泌物涂片, 镜下可见大量的感染菌和坏死细胞, 表明小鼠 BV 模型制备成功^[8-9])。

2.2 分组及给药

从 67 只造模成功小鼠 (成功率 \approx 84%) 中取出 50 只小鼠, 随机分为模型组、黄柏碱 (10、20、40 mg/kg) 组及加替沙星 (20 mg/kg) 组, 另取健康小鼠设为对照组, 每组 10 只。各给药组小鼠分别 ig 对应药物 7 d, 对照组和模型组小鼠 ig 等量生理盐水。停药 4 d 后每只小鼠用无菌 PBS 液充分灌洗阴道, 每只均取阴道灌洗液 200 μ L, 并收集于无菌试管中。次日脱颈椎处死小鼠, 剪开腹正中线, 将阴道及子宫剥离保存。

2.3 ELISA 法检测小鼠阴道分泌物中炎症因子

收集小鼠阴道灌洗液, 同时取小鼠部分子宫组织, 经研磨、裂解、匀浆、离心, 取上清液, 按试剂盒操作说明进行阴道灌洗液 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 水平及子宫组织 PGE₂、PGF_{2 α} 含量检测。采用酶标仪检测 450 nm 波长下各孔吸光度 (A) 值。

2.4 HE 染色考察小鼠阴道组织病变程度

取小鼠部分阴道组织保存于 10% 甲醛固定, 经脱水、透明、浸蜡、切片 (4 μ m), HE 染色后, 置显微镜进行形态学分析和评分^[8]。参考充血、水肿、出血、浸润 4 项进行评分, 无明显病变评 0 分, 轻度评 1 分, 中度评 2 分, 重度评 3 分。0 分: 黏膜上皮光滑, 无坏死脱落, 黏膜下无充血、水肿、出血、炎细胞浸润, 阴道内无炎性渗出物; 1 分: 黏膜上皮无坏死脱落, 黏膜下充血、水肿, 阴道内无炎性渗出物; 2 分: 黏膜上皮有灶性坏死脱落, 黏膜下充血、水肿、点状出血、少量炎细胞浸润, 阴道内有少量炎性渗出物; 3 分: 黏膜上皮坏死脱落, 黏膜下充血、水肿、片状出血、炎细胞浸润, 阴道内有大量炎性渗出物。

2.5 Western blotting 法检测小鼠子宫组织 TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达

取小鼠部分子宫组织, 经研磨、裂解、匀浆、离心, 取上清液, 进行 BCA 蛋白定量, SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。浸于 5% BSA 封闭, 分别用 MMP-9、TLR4 及 NF- κ B 一抗低温过夜孵育 (1:2 000, 4 $^{\circ}$ C)。次日漂洗后更换二抗孵育 30 min (1:5 000, 常温), 漂洗后 ECL 化学发光、显影。ImageQuant 软件扫描并分析相应灰度值, 检测需重复 3 次。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 BV 小鼠阴道中炎症分子分泌的影响

与对照组比较, BV 模型小鼠阴道分泌物中炎症因子水平显著增加 ($P < 0.01$), 给予不同剂量黄柏碱干预后, 小鼠阴道分泌物中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 水平均下降。在 IL-1 β 方面, 与模型组比较, 黄柏碱 (20、40 mg/kg) 与加替沙星可明显减少小鼠阴道分泌物中 IL-1 β 表达 ($P < 0.05$ 、0.01); 在 IL-6 方面, 与模型组比较, 黄柏碱 (10、20、40 mg/kg) 与加替沙星可明显减少小鼠阴道分泌物中 IL-6 表达 ($P < 0.05$ 、0.01); 在 IL-8 方面, 与模型组比较, 黄柏碱 (10、20、40 mg/kg) 与加替沙星可明显减少小鼠阴道分泌物中 IL-8 表达 ($P < 0.05$ 、0.01); 在 TNF- α 方面, 与模型组比较, 黄柏碱 (10、

20、40 mg/kg) 与加替沙星可明显减少小鼠阴道分泌物中 TNF- α 表达 ($P < 0.05$ 、0.01)。在减少 IL-1 β 、IL-6 分泌中以黄柏碱 (40 mg/kg) 与加替沙星作用最强, 在减少 IL-8、TNF- α 分泌中以黄柏碱 (20、40 mg/kg) 与加替沙星作用最佳。结果见表 1。

3.2 对 BV 小鼠阴道组织病理学改变的影响

经评分, 模型组小鼠阴道病变情况普遍严重, 病变小鼠数量较多, 而给药各组均得到有效改善, 其中以黄柏碱 (40 mg/kg) 与加替沙星改善作用最为明显。经观察, 模型组小鼠阴道黏膜上皮坏死脱落、溃烂, 出现炎性细胞浸润、黏膜充血及大量炎性物渗出等。给予不同剂量黄柏碱或加替沙星治疗后, BV 小鼠阴道病变得不同程度的缓解, 充血水肿、细胞浸润、组织溃烂、上皮坏死等均得到改善。经 HE 染色发现, 模型组小鼠阴道切片中有大量炎性细胞分布, 而给药组均得到不同程度缓解, HE 染色结果见图 1, 病理评分结果见表 2。

表 1 黄柏碱对 BV 小鼠阴道分泌物中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of phellodendrine on levels IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α in vaginal secretions of BV mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	53.74 ± 6.89	25.82 ± 1.48	29.20 ± 3.04	43.96 ± 8.01
模型	—	106.15 ± 4.78 ^{##}	60.47 ± 2.18 ^{##}	74.46 ± 7.32 ^{##}	140.53 ± 16.65 ^{##}
黄柏碱	10	98.68 ± 6.73	50.57 ± 3.27*	59.47 ± 2.61*	107.07 ± 11.65*
	20	87.68 ± 7.04*	49.36 ± 5.38*	44.35 ± 6.78**	77.12 ± 6.19**
	40	79.00 ± 6.11**	45.30 ± 3.63**	40.75 ± 4.61**	69.44 ± 10.89**
加替沙星	20	78.45 ± 6.15**	42.84 ± 5.09**	36.21 ± 2.52**	61.35 ± 6.94**

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

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

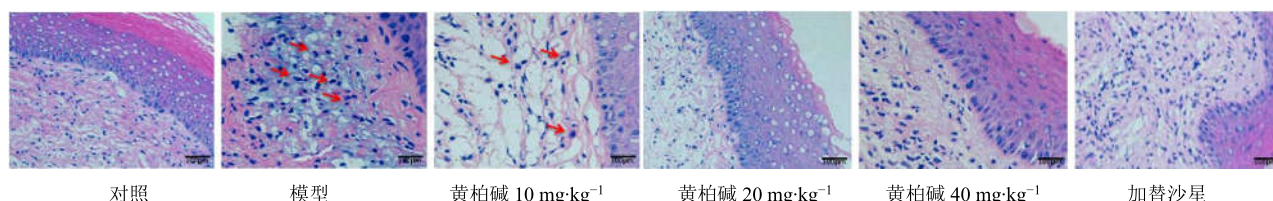


图 1 黄柏碱对 BV 小鼠阴道组织病变的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of phellodendrine on pathological changes of vagina of BV mice (HE, ×400)

表 2 黄柏碱对 BV 小鼠阴道组织病变评分的影响

Table 2 Effect of phellodendrine on pathological scores of BV mice vagina tissue

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	不同病例评分的动物数量/只			
			0 分	1 分	2 分	3 分
对照	—	10	8	2	0	0
模型	—	10	0	2	3	5
黄柏碱	10	10	0	5	4	1
	20	10	3	4	2	1
	40	10	6	2	2	0
加替沙星	20	10	6	3	1	0

3.3 对 BV 小鼠子宫组织中 PGF_{2α} 及 PGE₂ 水平的影响

与对照组比较, BV 模型小鼠子宫中 PGF_{2α} 及 PGE₂ 水平显著增高 ($P < 0.01$); 给予不同剂量黄柏碱治疗后, PGF_{2α} 及 PGE₂ 水平下降。与模型组比较, 黄柏碱 (20、40 mg/kg) 与加替沙星可明显减少 PGF_{2α} 水平 ($P < 0.05、0.01$), 同时黄柏碱 (10、20、40 mg/kg) 与加替沙星均可有效降低 PGE₂ 水平 ($P < 0.05、0.01$)。在 PGF_{2α} 及 PGE₂ 水平抑制作用方面, 以黄柏碱 (40 mg/kg) 作用强度最大。结果见表 3。

表 3 黄柏碱对 BV 小鼠子宫组织中 PGF_{2α} 及 PGE₂ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of phellodendrine on PGF_{2α} and PGE₂ levels of BV mice uterus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	PGF _{2α} /(pg·mL ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	65.94 ± 6.87	158.68 ± 17.05
模型	—	151.33 ± 14.88 ^{##}	255.46 ± 22.41 ^{##}
黄柏碱	10	134.30 ± 5.90	221.36 ± 17.29*
	20	125.43 ± 5.91*	198.82 ± 26.52*
	40	81.77 ± 5.70**	160.77 ± 22.23**
加替沙星	20	99.52 ± 15.61*	184.46 ± 31.42*

3.4 对 BV 小鼠子宫组织中 TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, BV 模型组小鼠子宫组织中 TLR4 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$), 各剂量黄柏碱与加替沙星可减少小鼠子宫组织中 TLR4 表达。黄柏碱 (20、40 mg/kg) 与加替沙星均可有效降低小鼠子宫组织中 TLR4 表达量, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05、0.01$)。结果见图 2。

与对照组比较, BV 模型组小鼠子宫组织中 NF-κB 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$), 不同剂量黄柏碱与加替沙星可减少小鼠子宫组织中 NF-κB 表达。黄柏碱 (10、20、40 mg/kg) 与加替沙星均可有效降低小鼠子宫组织中 NF-κB 表达量, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05、0.01$)。结果见图 2。

与对照组比较, BV 模型组小鼠子宫组织中 MMP-9 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$), 不同剂量黄柏碱与加替沙星可减少小鼠子宫组织中 MMP-9 表达。黄柏碱 (20、40 mg/kg) 与加替沙星均可有效降低小鼠子宫组织中 MMP-9 表达量, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05、0.01$)。结果见图 2。

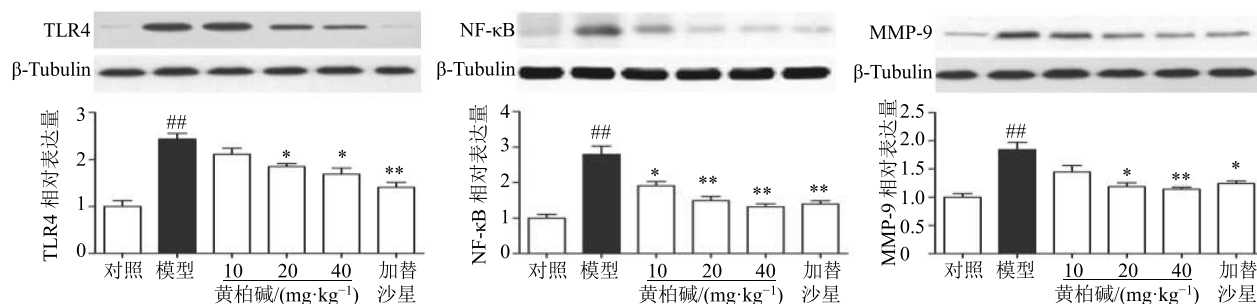


图 2 黄柏碱对 BV 小鼠子宫组织中 TLR4、NF-κB 和 MMP-9 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of phellodendrine on protein expression of TLR4, NF-κB, and MMP-9 in uterus of BV mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

女性阴道为半开放体腔, 其中各类微生物组成处于动态平衡。青春期前以厌氧菌为主, 随着雌性激素分泌增加, 其阴道黏膜糖原含量增加, 则该平衡逐渐倾向乳酸杆菌^[9]。BV 主要受社会阶级、经济地位、教育程度、性行为及生殖等因素影响^[10], 作为妇科临床常见疾病, 其中以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为主的病原体占据重要角色^[11]。研究表明, BV 可通过刺激子宫继而诱发早产, 主要表现为微生物激活宿主免疫反应和炎症反应, 分泌相关因子, 促进子宫收缩; 同时诱发 MMP 释放, 引起胎膜早破^[12], 因此 BV 与早产存在毋庸置疑的关系。传统

中医认为, BV 属“阴蚀”“阴痒”“带下”范畴, 主要受湿、热、虫邪侵体影响^[13]。作为辨证施治的代表性中药, 黄柏长期应用于该病症治疗。因此, 本实验主要围绕阴道炎症反应、子宫 TLR4/NF-κB 信号通路, 探讨黄柏中代表成分黄柏碱抗阴道炎、防早产的作用及机制。

大量研究表明, 细菌感染后可活化内皮细胞、巨噬细胞及中性粒细胞等, 释放大量的炎症因子, 对机体产生损伤、破坏^[14]。临床发现, 早产患者宫颈阴道分泌物中存在较高水平的炎症因子, 主要包括 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α^[15]。其中 TNF-α 为感染后分泌最早、影响最大的促炎因子, 诱导体内 IL-1β、

IL-6 和 IL-8 等炎症因子释放, 继而促进炎性细胞活化、黏附分子合成、氧化应激等, 扩大组织器官损伤^[16]。本研究结果表明, 黄柏碱可通过抑制小鼠阴道分泌物中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 合成, 继而缓解细菌感染后的阴道炎症反应。同时, IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 作为炎症介质, 可诱导前列腺素分泌, 其代表成分 PGE₂ 与 PGF_{2 α} 可刺激哺乳动物分娩行为。PGE₂ 可促进宫颈成熟, PGF_{2 α} 可诱导子宫收缩。因此阴道炎症病变通过激活此机制, 可诱导子宫收缩、宫颈软化扩张等^[17]。本实验证实在给予黄柏碱治疗后, 小鼠子宫组织中 PGE₂、PGF_{2 α} 水平明显减少。提示黄柏碱可通过减少 PGF_{2 α} 、PGE₂ 表达, 抑制异常的子宫收缩和宫颈成熟。近年研究发现, TLR4/NF- κ B 信号通路主要参与内毒素诱导的炎症反应, 且该通路与早产关系密切^[18]。机体感染后微生物释放脂多糖 (LPS), 与子宫胎盘内羊膜、绒毛膜和蜕膜等部位 TLR4 受体结合, 激活下游核转录因子 NF- κ B, 调控胶原降解酶 MMP-9 大量合成^[19-20]。然而胎膜细胞外基质中含多种胶原, 可被 MMP-9 降解, 破坏胎膜完整性, 继而导致胎膜早破、早产等情况发生^[21]。本实验研究结果表明, 黄柏碱可抑制细菌引起的 TLR4/NF- κ B 信号传导, 减少下游通路中 MMP-9 表达, 从而有效防止胎膜早破、胎儿早产的情况发生。

综上所述, 黄柏碱可通过下调阴道炎症反应, 缓解子宫中 PGE₂、PGF_{2 α} 诱发的宫颈成熟与子宫收缩; 同时可通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活化, 减少 MMP-9 合成, 保护胎膜完整性。因此, 黄柏碱通过减轻细菌性阴道炎症, 改善宫颈成熟、子宫收缩及胎膜受损等异常病变, 从而有效治疗 BV 及其诱发的早产。然而 BV 引起的早产机制复杂, 未来研究还需在体内、体外实验中进一步挖掘其客观作用机制。

参考文献

[1] Donati L, Di V A, Nucci M, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy [J]. *Arch Gynecol Obst*, 2010, 281(4): 589-600.
 [2] Zhu J W, Jing L I. Relationship between bacterial vaginosis in pregnancy period and pregnancy outcome [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2011, 21(9): 1798-1799.
 [3] Turovskiy Y, Cheryian T, Algburi A, et al. Susceptibility of *Gardnerella vaginalis* biofilms to natural antimicrobials subtilisin, ϵ -poly-L-lysine, and lauramide arginine ethyl ester [J]. *Infect Dis Obst Gynecol*, 2012, doi: 10.1155/2012/284762.
 [4] 张义虎, 孙 静. 黄柏的临床应用总述 [J]. 中国医学

创新, 2010, 7(3): 182-183.
 [5] 李 玲. 黄柏碱抗 ROS 介导的氧化应激相关机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017.
 [6] 李红玲, 莫炫永. HPLC 法同时测定川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的含量 [J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2562-2564.
 [7] 罗 鸿. 黄柏中黄柏碱的提取纯化工艺研究 [D]. 西安: 西南交通大学, 2014.
 [8] 罗 琳, 陈洪轩, 胡海廷, 等. 复方妇康安阴道泡腾片的毒理学研究 [J]. 中国药房, 2005, 16(2): 97-98.
 [9] Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina [J]. *Arch Gynecol Obst*, 2006, 273(4): 195-202.
 [10] Simhan H N, Bodnar L M, Krohn M A. Paternal race and bacterial vaginosis during the first trimester of pregnancy [J]. *Amer J Obst Gynecol*, 2008, doi: 10.1016/j.ajog.2007.09.006.
 [11] 刘佳明, 袁杰利. 细菌性阴道病的病因与治疗的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(4): 202-205.
 [12] 魏玉梅, 杨慧霞. 细菌性阴道病与早产的关系 [J]. 中国医刊, 2006, 41(9): 8-10.
 [13] 吴 谦. 医宗金鉴 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
 [14] 吕根法, 王国治, 石宏伟, 等. 中草药拮抗内毒素作用机制研究进展 [J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2010, 28(3): 230-232.
 [15] Discacciati M G, Simoes J A, Silva M G, et al. Microbiological characteristics and inflammatory cytokines associated with preterm labor [J]. *Arch Gynecol Obst*, 2011, 283(3): 501-508.
 [16] 苏艳丽, 王 红, 张淑文, 等. 芪参活血颗粒在重度脓毒症治疗中的抗炎作用研究 [J]. 中国中医急症, 2007, 16(12): 1441-1442.
 [17] Bogavac M, Brkić S, Simin N, et al. Do bacterial vaginosis and chlamydial infection affect serum cytokine level? [J]. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 2010, 138(7/8): 444-448.
 [18] 邢志伟, 赵富玺. Toll 样受体 4/核因子 κ B 与早产 [J]. 医学综述, 2009, 15(5): 644-647.
 [19] Sarria E E, Rita M, Yao W, et al. Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways [J]. *Amer J Obst Gynecol*, 2002, 187(5): 1159-1162.
 [20] Li H, Xu H, Sun B. Lipopolysaccharide regulates MMP-9 expression through TLR4/NF- κ B signaling, in human arterial smooth muscle cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(4): 774-778.
 [21] Park K H, Chaiworapongsa T, Kim Y M, et al. Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity [J]. *J Perin Med*, 2003, 31(1): 12-22.