

论 著

· 实验研究 ·

妇可靖胶囊治疗慢性盆腔炎大鼠疗效 及其作用机制研究^{*}

崔蕾^{1**} 郭延丽² 卫培峰² 朱丽红^{1***}

(1. 咸阳市中心医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046;
3. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 通过妇可靖胶囊(FKJC)干预慢性盆腔炎(chronic pelvic inflammatory disease, CPID)模型大鼠, 观察FKJC对CPID大鼠的治疗作用, 并从形态学、病理学、分子生物学层面, 对其可能的作用机制进行初步探讨, 为FKJC的临床推广应用提供理论依据。**方法** 65只SD雌性大鼠随机抽取10只为空白对照组, 造模15d后随机抽取5只模型大鼠进行形态学和病理学观察用于模型验证, 造模成功后, 随机分为模型组($n=10$)、坤复康胶囊组($n=10$)、FKJC低、中、高剂量组($n=10$)。空白对照组和模型组灌服蒸馏水, 其余各组分别灌胃给药, 1次/d, 持续28d。每天观察大鼠情况, 每7d测量大鼠体重。末次给药后, 禁食不禁水12h, 处理动物。腹主动脉中收集血液, 切除子宫组织。ELISA法检测血清中IL-1 β 和TNF- α 水平, 蛋白免疫印迹(WB)法检测子宫组织中FGF-2、IGF-1蛋白表达水平。**结果** 造模15d后模型大鼠的观察结果符合CPID病理特征, 表明模型建立成功。治疗后, 各治疗组血清中IL-1 β 及TNF- α 的含量相比于模型组均下降($p<0.05$)。子宫大体形态观察, 模型组宫腔缩小, 子宫内膜充血, 骨盆粘连; 各治疗组均较模型组有所好转。WB蛋白表达趋势显示模型组子宫组织FGF-2、IGF-1蛋白表达增加, 经药物干预后, FKJC高、中剂量组FGF-2、IGF-1的蛋白表达量较模型组减少($p<0.05$), 且这种变化趋势在FKJC各剂量组表现出剂量依赖性, 剂量越大, 变化越明显。**结论** FKJC可以明显改善慢性盆腔炎大鼠病理症状, 这可能与抑制炎症介质IL-1 β 和TNF- α 的释放及下调子宫FGF-2、IGF-1的蛋白表达有着密切的关系。

关键词: 妇可靖胶囊; CPID; IL-1 β ; TNF- α ; FGF-2; IGF-1

中图分类号: R734 文献标识码: A 文章编号: 2096-1340(2021)03-0069-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2021.03.016

Effects of Fukejing Capsule on Chronic Pelvic Inflammatory Rats and Its Mechanism

CUI Lei¹ GUO Yanli² WEI Peifeng² ZHU Lihong¹

(1. Xianyang Central Hospital, Shaanxi Xianyang 712000, China;

2. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China;

3. The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine; Shaanxi Xianyang 712000, China)

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81303243)

** 作者简介: 崔蕾(1978—), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事妇科疾病研究。E-mail: 1246889173@qq.com

*** 通讯作者: 朱丽红, 博士, 副主任医师。E-mail: 647537629@qq.com

Abstract: Objective To observe the therapeutic effect of Fukejing Capsule(FKJC) on the rats with chronic pelvic inflammatory disease (CPID), and to explore the possible mechanism of FKJC from the aspects of morphology, pathology and molecular biology, and provide theoretical basis for the clinical application of FKJC. **Methods** 65 SD female rats were randomly divided into blank control group (sham operation group, $n = 10$). After 15 days of model making, 5 rats were randomly selected for morphological and pathological observation for model verification. After the model was successfully established, they were randomly divided into model group ($n = 10$), Kunfukang capsule group ($n = 10$), FKJC low, medium and high dose group ($n = 10$). The blank control group and model group were given distilled water, and the rest groups were given the medicine once a day for 28 days. Observe the rat every day and measure the weight every 7 days. Blood was collected from abdominal aorta and uterus was removed. The levels of IL-1 β and TNF- α in serum were detected by ELISA, and the expression levels of FGF-2 and IGF-1 in uterus were detected by Western blot (WB). **Results** The results of the model rats were in accordance with the pathological characteristics of CPID 15 days after the model was established, which indicated that the model was successfully established. After the treatment, the levels of IL-1 β and TNF- α in serum of each treatment group were lower than those in the model group ($p < 0.05$). The uterus morphology was observed, the uterine cavity in the model group was reduced, the endometrium was congested and the pelvis was attached. After administration, the treatment group was better than the model group. WB protein expression trend showed that the expression of FGF-2 and IGF-1 in uterus tissue of model group increased. After the intervention of drug, the protein expression of FGF-2 and IGF-1 in FKJC high and medium dose group was lower than that in model group ($p < 0.05$). The change trend showed dose dependence in FKJC dose group, the greater the dose, the more obvious the change. **Conclusion** FKJC can improve the pathological symptoms of chronic pelvic inflammatory rats. It may be closely related to the inhibition of the release of inflammatory media IL-1 β and TNF- α and down regulation of the expression of FGF-2 and IGF-1 in uterus.

Keywords: Fukejing capsule (FKJC); CPID; IL-1 β ; TNF- α ; FGF-2; IGF-1

盆腔炎性疾病指女性上生殖道及其周围组织的发生感染类的疾病,若盆腔炎性疾病没有得到及时正确的治疗,则会发展成为慢性盆腔炎,现代医学称为盆腔炎性疾病后遗症^[1]。慢性盆腔炎(chronic pelvic inflammatory disease, CPID)^[2]是在女性内生殖器及其周围结缔组织中发生的一种慢性感染性疾病,例如,子宫内膜炎、输卵管炎、卵巢炎等,盆腔炎是中医中常见且困难的妇科类别,其特点是病程长,复发率高且难以根治。在古书医籍中,未曾出现过“盆腔炎”“慢性盆腔炎”或“盆腔炎性疾病后遗症”等词,但根据其临床表现,可将这类疾病归属于“带下病”“癥瘕”“腹痛”“月经失调”“不孕”“热入血室”等范畴^[3]。目前,西医主要使用抗生素来治疗 CPID,激素和理疗也有一定的作用,但无法达到根治的目的,因而大多数患者体内仍会残留少量致病菌,若是使用大量的抗生素,人体会产生耐药性,并伴随着多种不良反应^[4]。近年来,中医药显示出高治愈率,低毒和副作用等优点,并引起了越来越多的关注^[5]。中华

中医药学会组编《中成药临床应用指南 感染性疾病分册》^[6]中将慢性盆腔炎性疾病分为湿热瘀阻、气滞血瘀、气虚血瘀、寒湿瘀阻 4 个证型。FKJC 由北败酱、延胡索、香附、红花和其他中药组成,可利湿清热、散结行气、补气血,临床医师常用来治疗 CPID 且效果明显^[7],但其治疗机理尚不清楚。在该试验中,建立了 CPID 大鼠模型,观察大鼠子宫组织形态,大鼠血清相关炎性介质及子宫组织中相关基因表达的变化,探讨 FKJC 对 CPID 患者的疗效及作用机理,从现代医学的角度进行阐述。

1 材料与方法

1.1 试验药物 FKJC,甘肃省西峰制药有限公司;KFKC,陕西康惠制药有限公司。FKJC 辅以蒸馏水配制成低、中、高,分别为 0.27 g/kg,0.54 g/kg,1.08 g/kg 的混悬液;KFKC 配置成 0.65 g/kg 的混悬液。

1.2 试验动物 雌性 SD 大鼠 65 只(河北医科大学实验动物中心,许可证号:SYXK(冀)2018-0048)。

1.3 试剂 南京宁康化工有限公司生产的批号为20180708的苯酚;南京建成生物工程研究所生产的ELASA试剂盒;大鼠肿瘤坏死因子 α ;上海哈灵生物试剂检测中心生产的戊巴比妥钠;白介素-1 β ;采血器;将苯酚液化取5 mL加入西黄芪胶1 g和甘油4 mL,最后用蒸馏水定容到20 mL即可得到25%苯酚胶浆;成纤维细胞生长因子2、胰岛素样生长因子1;购买美国Abcam公司生产的一抗、二抗。

1.4 仪器 绍兴精博检测仪器有限公司生产型号为4XC的显微镜;无锡明垚化工设备有限公司生产的石蜡切片机;韩国BIONEER公司生产的PCR仪;北京澎昆博远公司生产的凝胶成像系统;日本SANYO公司生产的超低温冰箱;深圳亚王万相科技有限公司生产的电泳仪及电泳槽;高速冷冻离心机(GL10MA)。

1.5 方法

1.5.1 造模 购买65只SD雌性大鼠,喂养1周,随后,任取55只大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠40 mg/kg,将其周围毛发剔除,碘伏处理,从下腹正中间,切口直径0.8 cm~1cm,使子宫暴露,注射器吸取提前制备好的25%苯酚胶浆0.08 mL,将针头慢慢的插入子宫分叉处,逐层缝合,用碘伏消毒防止感染。随后将剩余的10只大鼠用相同的方式进行麻醉,打开腹腔,再使用标准注射器将等量的生理盐水注入子宫^[8]。造模完成14 d后,随机选择其中的五只大鼠,检验是否造模成功。

1.5.2 分组 随机分为6组,空白对照组即假手术组,模型组, KFKC组, FKJC高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组10只。

1.5.3 给药方法 分组之后,分别对阳性药

KFKC组(0.65 g/kg)、FKJC高(1.08 g/kg)、中(0.54 g/kg)、低(0.27 g/kg)剂量组,灌胃治疗,按10 mL/kg给药剂量给予假手术组和模型组等量的生理盐水作对照,1次/天,持续28d。

1.5.4 测定血清中1L-1 β 和TNF- α 的含量 最后一次给药后,禁食12h天后处理,每千克加入40毫克的戊巴比妥钠麻醉,收集腹主动脉的血液,静置半小时,以3000 r/min离心十分钟,取上清液,按酶联免疫吸附试验试剂盒说明书分别对血清1L-1 β 和TNF- α 的含量进行检测。

1.5.5 观察大鼠子宫组织 腹主动脉收集血液之后,取出卵巢,观察子宫形态。记录其是否正常,将子宫分为两部分处理,一部分用石蜡包埋切片法,具体步骤参照吕耀中作者的文献中所采用的方法。对大鼠CPID模型病理评分标准参照黄露学者文献中的标准^[10]。

测定子宫组织FGF-2和IGF-1蛋白表达水平 剩余部分子宫组织采用蛋白免疫印迹法(Western blot)法,检测FGF-2、IGF-1蛋白表达水平。具体步骤参照朱兰^[14]文献中的方法。

1.5.6 统计学方法 采用SPSS 25.0软件对数据进行分析,数据用(XS)表示, $p < 0.05$,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FKJC对CPID大鼠血清中1L-1 β ,TNF- α 含量的影响 假手术组与模型组之间存在着显著性差异,表明建模成功。即模型组1L-1 β 及TNF- α 的含量明显升高($p < 0.05$),经给药治疗以后,各治疗组相比于模型组均下降($p < 0.05$)。FKJC各剂量组之间差异均有统计学意义($p < 0.05$)。见表1。

表1 FKJC对CPID大鼠血清中TNF- α 、IL-1水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	TNF- α ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照(假手术)	-	204.1 \pm 19.3**	13.2 \pm 2.1*
模型对照	-	343.5 \pm 43.1	17.9 \pm 4.2
KFKC	0.65	207.4 \pm 31.3**	12.3 \pm 3.7*
FKJC	0.27	276.5 \pm 32.4*	13.6 \pm 3.4*
	0.54	191.2 \pm 30.4**	12.2 \pm 3.1*
	1.08	212.6 \pm 27.7**	12.8 \pm 3.6*

注:与模型组相比 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (下同)

2.2 FKJC 对 CPID 大鼠子宫组织病理学评分的影响 假手术组大鼠子宫正常。模型组的子宫组织出现了宫腔缩小,内分泌液增多,宫体水肿粗大,末端呈球状凸起,子宫内膜充血,骨盆黏连的症状,与模型组比较,FKJC 高、中剂量组能改善

CPID 大鼠的子宫腔壁结构,减轻了内膜表面上皮细胞坏死、炎细胞浸润以及固有层充血的症状。表明用 FKJC 治疗后,子宫充血肿胀的现象明显减轻。见表 2。

表 2 CPID 大鼠子宫组织病理学评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	HE 染色病理评分
空白对照(假手术)	-	0.94 ± 0.27 *
模型对照	-	5.89 ± 1.95
KFKC	0.65	3.21 ± 0.69 *
FKJC	0.27	4.79 ± 0.31
	0.54	3.68 ± 0.89 *
	1.08	3.14 ± 0.98 **

2.3 FKJC 对 CPID 大鼠子宫 FGF-2、IGF-1 蛋白表达的影响 模型组大鼠的子宫组织 IGF-1、FGF-2 蛋白含量显著增加;与模型组相比,FKJC 高、中剂量组 FGF-2、IGF-1 蛋白表达减少

($P < 0.05$),且这种变化趋势在妇可靖胶囊各剂量组表现出剂量依赖性,剂量越大,变化越明显。见表 3。

表 3 CPID 大鼠子宫组织中 FGF-2、IGF-1 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	FGF-2	IGF-1
空白对照(假手术)	-	0.43 ± 0.11 **	0.41 ± 0.08 **
模型对照	-	0.86 ± 0.10	0.77 ± 0.11
KFKC	0.65	0.60 ± 0.08 *	0.52 ± 0.09 **
FKJC	0.27	0.71 ± 0.12	0.68 ± 0.06
	0.54	0.55 ± 0.08 *	0.51 ± 0.10 *
	1.08	0.57 ± 0.10 *	0.46 ± 0.13 **

3 讨论

慢性盆腔炎(CPID)^[12]属于妇科常见病,发病率逐年增加。现代西方医学认为^[13],盆腔炎性疾病的病原体有外源性和内源性两种。内源性病原体:主要来源寄居于阴道内的菌群,包括需氧菌及厌氧菌。外源性病原体:中支原体、衣原体感染与输卵管积水相关性较大。西医常对症下药,主要根据药敏实验选用抗生素,杀死或抑制致病菌,此治疗措施仅对急性盆腔炎患者疗效显著,对 CPID 的疗效较差,安全性较低^[14-15]。中医学采用整体观念,辨证论治,认为此病诱因多由湿热瘀结、气

滞血瘀、寒湿血瘀、气虚血瘀、肾虚血瘀等引起。治疗也采用辨证论治,如清热利湿、化瘀止痛,疏肝行气、活血化瘀,温经通络、化瘀止痛或补肾活血、散结止痛等^[16]。近年来,研究表明,中药可明显改善盆腔炎临床症状,且毒副作用较小,优于西药^[17]。FKJC^[7]是由北败酱草、延胡索、香附、红花、柴胡等制成的中成药,具有利湿清热、散结行气的作用。现代药理学研究表明活血化瘀药可以改善血液动力学、血液流变学、抗血栓、抗炎、镇痛^[18]。清热药可以抗菌、抗炎,抗病原微生物等^[19]。

研究表明^[20], CPID 患者不只是感染炎症, 还可能与细胞因子 (TNF- α 、1L-1 β) 的异常表达密切相关。TNF- α 是由单核细胞和巨噬细胞分泌的一种单核因子, 具有双向调节作用。当 TNF- α 大量释放时, 加速了炎性细胞的聚集活化, 使炎症加重, 当 TN- α 释放量适中时, 可以增强机体的免疫应答, 从而抵抗病原体的入侵, 阻止炎症的扩散。1L-1 β 是由胶质、内皮及神经元细胞合成分泌而来, 可以诱导炎性介质产生, 使白细胞与内皮细胞的黏附力增强^[23]。FGF-2 通过与特异性受体结合, 对成纤维细胞和血管内皮细胞具有强烈的调节作用。FGF-2 在病理状态下, 过度表达, 会刺激成纤维细胞和血管内皮细胞增殖活化失常, 导致胶原蛋白产生速度大于消耗速度, ECM 代谢失衡, 沉积于细胞之间, 组织发生增生纤维化改变^[24]。IGF-1 是一种在分子结构上与胰岛素类似的多肽类蛋白质。它可以促进机体有丝分裂, 参与机体的新陈代谢等多种代谢途径^[25]。

本研究通过观察子宫形态, 结合病理学评分, 发现子宫肿胀、充血及黏连程度有显著改善。FKJC 组大鼠治疗后, 血清炎性因子 1L-1 β 、TNF- α 的含量显著降低; 验证了 FKJC 对 CPID 产生积极的治疗效果。相关研究发现^[22], FGF-2 和 IGF-1 可能参与宫腔黏连的形成, 原因在于当宫腔黏连加重时, 也会增加 FGF-2 和 IGF-1 在黏连组织中的表达, 成纤维细胞的过度增殖和分化就是由于 FGF-2 过表达, IGF-1 加速子宫内膜纤维化的形成^[7]。

综上所述, FKJC 可能通过降低炎症组织中 FGF-2、IGF-1 蛋白表达水平, 从而减轻 CPID 的症状。这为后续 FKJC 治疗 CPID 的临床疗效及可能作用机制提供了理论支持。

参考文献

[1] 马云. 菟葵治疗慢性盆腔炎的活性部位筛选及作用机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.

[2] 刘素香. 妇可靖胶囊对盆腔炎患者血清中转化生长因子- β 和血管细胞黏附分子-1和氧自由基水平的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(22): 3257-3259.

[3] 赵诗韵. 慢性盆腔炎患者的不同中医证型与生存质量的相关性研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.

[4] The development and efficacy of an interdisciplinary chro-

nic pelvic pain program. [J]. Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada, 2020.

[5] 陈海霞, 谷晓芬, 刘雁峰. 慢性盆腔炎的中医药治疗概况[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2013, 20(5): 40-43.

[6] 王永炎. 中成药临床应用指南感染性疾病分册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 161.

[7] 陈振连. 妇可靖胶囊联合奥硝唑分散片治疗慢性盆腔炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(2): 307-310.

[8] 陈明. 中药治疗慢性盆腔炎的药效学实验研究概述[J]. 中医药临床杂志, 2008(2): 202-204.

[9] 段成兵. 病理 HE 染色制片技术的探讨[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(8): 137.

[10] 吕耀中, 宗绍波, 李芳, 等. 散结镇痛胶囊对慢性盆腔炎大鼠抗炎及抗纤维化研究[J]. 中草药, 2019, 50(20): 5011-5017.

[11] 秦翠梅, 于洪建, 陈建梅, 等. 三棱-莪术有效组分配伍液对慢性盆腔炎大鼠盆腔粘连的影响[J]. 中成药, 2018, 40(6): 1233-1237.

[12] 黄露. 奥硝唑分散片联合妇可靖胶囊对慢性盆腔炎患者炎性因子及免疫功能的影响[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(5): 713-715.

[13] 吴碧辉, 冷嫦娥, 蒋贵林. 支原体感染与输卵管性不孕之间的研究进展[J]. 中国民康医学, 2011, 23(13): 1654-1655.

[14] 朱兰, 赵煜, 刘军, 等. 慢性盆腔炎国内外的研究现状[J]. 西南国防医药, 2007, (3): 376-378.

[15] 宫雪梅. 盆腔炎炎症性疾病的研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2003, (5): 473-475.

[16] 张嘉晔. 坤复康胶囊对盆腔炎性疾病后遗症红细胞免疫影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.

[17] 周玉海. 中医药治疗慢性盆腔炎的临床研究进展[J]. 湖南中医药导报, 2002(6): 316-317.

[18] 高冲, 刘璐, 胡爱菊, 等. 活血化瘀中药的药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2013, 36(1): 64-68.

[19] 李瑞奇, 白明, 苗明三. 清热药的特点及现代研究[J]. 中医学报, 2013, 28(7): 1003-1005.

[20] 黄灵霞. 妇可靖胶囊联合头孢替唑钠与替硝唑治疗急性盆腔炎患者的临床效果分析[J]. 中国药物经济学, 2018, 13(8): 88-90.

[21] 舒琪, 杨雅荣, 马辉平. 妇可靖胶囊治疗慢性盆腔炎患者的效果及对免疫功能、氧自由基水平的影响[J].

临床医学研究与实践,2019,4(31):130-132.

[22] 曾薇薇,姚吉龙,李军. 胰岛素样生长因子-1 和转化生长因子-β-1 在宫腔粘连患者子宫内膜表达的研究[J]. 广西医学,2015,37(4):470-472.

[23] 陈龙,王文华,朱胜强,等. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注后 1L-1β 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 临床医药实践,2009,18(24):561-562.

[24] 杨静. 甲连盆腔胶囊对盆腔炎性疾病后遗症模型大鼠 sICAM-1、FGF-2 及 TGF-β1/Smads 通路的影响[D]. 泸州:西南医科大学,2020.

[25] 李丽华. 血清中 IGF-1 及 PI3K/Akt 信号通路在 P-COS 患者体内表达的变化及意义[J]. 实验与检验医学,2018,36(3):333-336.

(收稿日期:2020-09-09 编辑:宋蓓)