

散结镇痛胶囊对慢性盆腔炎大鼠抗炎及抗纤维化研究

吕耀中^{1,3}, 宗绍波², 李芳^{2,3}, 胡晗绯², 周军², 王振中^{2,3}, 肖伟^{2,3*}

1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 研究散结镇痛胶囊(SJZT)对大鼠慢性盆腔炎模型的抗炎、抗纤维化作用及相关机制。方法 取 60 只成年未孕雌性大鼠, 随机选取 10 只进行假手术, 其余 50 只大鼠采用子宫内注射苯酚胶浆法复制大鼠慢性盆腔炎模型, 术后正常喂养。第 14 天, 根据体质量将其随机分为模型组、地塞米松(DEX)组及 SJZT 低、中、高剂量(0.192、0.384、0.768 g/kg)组, ig 给药, 假手术组、模型组大鼠 ig 0.5% CMC-Na 溶液, 每天 1 次, 连续 30 d。末次给药后, 大鼠取血、子宫组织, HE 和 Masson 染色观察子宫病理形态改变, ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、基质血小板衍生生长因子(PDGF)、金属蛋白酶抑制因子(TIMP)水平, Western blotting 法检测子宫组织中磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-Erk1/2)、核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、p-JNK、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、MMP-9 蛋白表达水平。结果 与模型组比较, SJZT 能显著改善慢性盆腔炎大鼠子宫腔壁结构, 减轻表面上皮细胞变性坏死、炎细胞浸润及固有层充血, 减轻子宫固有层胶原纤维增生程度; 显著降低血清中 TNF- α 、IL-1 β 、PDGF、TIMP 水平。同时 SJZT 能抑制大鼠子宫 p-ERK1/2、p-JNK、NF- κ B p65 蛋白表达, 促进 MMP-2、MMP-9 蛋白表达。结论 SJZT 能够有效改善苯酚胶浆致大鼠慢性盆腔炎模型的炎症反应及组织纤维化, 其作用机制可能与调控 NF- κ B 及 MAPK 信号通路相关, 抑制体内炎症反应, 同时使细胞外基质合成减少与分解增加, 促进纤维化修复。

关键词: 散结镇痛胶囊; 慢性盆腔炎; 炎症; 细胞外基质; 纤维化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)20-5011-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.024

Anti-inflammatory and anti-fibrosis effects of Sanjie Zhentong Capsule on chronic pelvic inflammatory disease in rats

LV Yao-zhong^{1,3}, ZONG Shao-bo², LI Fang^{2,3}, HU Han-fei², ZHOU Jun², WANG Zhen-zhong^{2,3}, XIAO Wei^{2,3*}

1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective The anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of Sanjie Zhentong Capsule (SJZT) on chronic pelvic inflammation in rats were investigated and its underlying mechanisms were explored. **Methods** Ten rats regarded as normal group with sham operation were randomly selected from 60 female SD rats, and the remaining rats were injected with phenol mucilage in the left uteri to replicate chronic pelvic inflammatory disease. On day 14, after the operation, according to body weight, the 50 rats were randomly allocated to model group, dexamethasone (DEX) group, SJZT low dose group (0.192 g/kg), SJZT middle dose group (0.384 g/kg), and SJZT high dose group (0.768 g/kg). The drugs were dissolved in 0.5% CMC-Na solution and administered respectively, while 0.5% CMC-Na solution was given to the normal and model group. After all the animals were treated by oral gavage once a day for 30 d, the blood and the left uteri were collected. The uterine tissues were fixed and stained with haematoxylin-eosin (HE) and Masson's trichrome for histopathology examination and the concentrations of TNF- α , IL-1 β , PDGF, and TIMP in serum were assayed by ELISA. The protein expression levels of p-ERK1/2, p-JNK, NF- κ B p65, MMP-2, and MMP-9 in the uteri were also detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, SJZT could effectively improve the arrangement disorder of cavity wall,

收稿日期: 2019-05-22

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药科技平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 吕耀中, 男, 博士研究生在读, 主要从事中药药理毒理学研究。Tel: (0518)81152297/18651706318 E-mail: yaozhonglv@sina.com

*通信作者 肖伟, 男, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药研制和开发研究。Tel: (0518)81152367 E-mail: wzzh-nj@163.net

reduce the degeneration and necrosis of epithelial cells, the infiltration of inflammatory cells and the congestion of lamina propria, and alleviate the proliferation of collagen fibers in lamina propria. SJZT could also reduce the concentrations of TNF- α , IL-1 β , PDGF, and TIMP in serum. Moreover, the protein expression of p-ERK1/2, p-JNK, and NF- κ B p65 in the uteri were inhibited significantly, and at the same time the protein expression of MMP-2 and MMP-9 was increased markedly by SJZT. **Conclusion** SJZT exhibits robust anti-inflammatory and anti-fibrosis effects in chronic pelvic inflammatory disease model induced by phenol mucilage. Its mechanisms may be related to regulating NF- κ B and MAPK signaling pathways, inhibiting inflammation, reducing the synthesis of extracellular matrix (ECM), increasing the degradation of ECM and promoting the repair of fibrosis.

Key words: Sanjie Zhentong Capsule; chronic pelvic inflammatory disease; inflammatory; extracellular matrix; fibrosis

盆腔炎是在女性子宫及其周边结缔组织、盆腔腹膜发生的炎症。而慢性盆腔炎 (CPID) 一般由于盆腔炎患者体质较差或未及时治疗所致, 常伴有疼痛、月经异常、下腹部坠胀及腰骶部酸痛等症状, 严重影响患者身心健康^[1]。目前 CPID 主要通过抗菌药物治疗, 但 70% 以上患者的体内检测不到致病菌, 其表现为病变部位的慢性炎症、纤维化增生^[2], 所以单纯使用抗生素的效果不佳, 而中药治疗的效果相对较好^[3]。散结镇痛胶囊 (SJZT) 由龙血竭、三七、浙贝母及薏苡仁 4 种药材组成, 主治痰瘀互结兼气滞症所致的多种妇科病症, 临床上 SJZT 对 CPID 所致炎性包块也有较好效果^[4], 但其发挥疗效的机制尚不清楚。因此, 本研究通过建立苯酚胶浆诱导的大鼠 CPID 模型, 评价 SJZT 对 CPID 大鼠抗炎、抗纤维化作用, 并探索相关作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雌性大鼠, 体质量 (150~180) g, 性成熟未交配, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2016-0011, 合格证号 11400700165567。对动物的处置符合相关的伦理学规定。

1.2 仪器

ChemiDoc XRS 系统 (美国 Bio-Rad 公司); BS224S 电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); 5804R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); FlexStation 3 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 电热恒温水浴箱 (金坛市瑞华仪器有限公司)。

1.3 药物与试剂

SJZT (批号 20160216), 江苏康缘药业股份有限公司; 醋酸地塞米松片 (批号 170001), 成都第一制药有限公司; 苯酚 (批号 T20160718)、甘油 (批号 T20161030)、黄蓍树胶粉 (批号 WG20160323)、水合氯醛 (批号 WG20160323)、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 批号 20180110), 国药集团化学试剂有

限公司; 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、MMP-9、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK1/2)、核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、GAPDH 抗体及羊抗兔 IgG-HRP、兔抗鼠 IgG-HRP 购自英国 Abcam 公司; p-JNK (Thr183/Tyr185) 抗体, 美国 CST 公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、基质血小板衍生生长因子 (PDGF)、金属蛋白酶抑制因子 (TIMP) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 CPID 大鼠模型制备

60 只成年未孕雌鼠, ip 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 麻醉, 随机取 10 只作为假手术组, 仅做开腹、关腹手术。其余 50 只大鼠, 腹部分别用碘伏和 75% 酒精消毒后, 下腹部正中切口约 2 cm, 暴露子宫, 由左侧子宫向卵巢方向缓慢注入 15% 苯酚胶浆 0.1 mL (液化苯酚 5 mL、黄蓍树胶粉 1 g、甘油 2 mL 制成的混和液中加蒸馏水至 33.3 mL, 配成 15% 的苯酚胶浆), 注毕, 分层关腹, 消毒, 术后正常喂养。

2.2 剂量选择与给药

SJZT 临床服用量为一次 4 粒, 3 次/d, 每粒胶囊含 0.4 g 内容物, 故人服用制剂药量为 4.8 g/d。根据人与动物的体表面积给药量换算方法, 大鼠等效剂量为 0.384 g/kg, 设为中剂量, 再分别设低、高剂量组。造模后第 14 天, 50 只造模大鼠按体质量随机分为模型组、地塞米松 (DEX) 组 (2 mg/kg) 及 SJZT 低、中、高剂量 (0.192、0.384、0.768 g/kg) 组, 每组 10 只。分组当天开始大鼠 ig 给药, 给药体积 10 mL/kg (药物溶解于 0.5% CMC-Na 溶液), 假手术组和模型组给予相同体积 0.5% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 30 d。

2.3 取材

实验结束前 1 d, 大鼠禁食不禁水 12 h。末次给药后 1 h, 10% 水合氯醛麻醉动物, 腹主动脉采血后, 3 000 r/min 离心 10 min 取血清待测。剪取大鼠左侧

子宫组织,在冷生理盐水中清洗后,切成小段供后续病理染色、Western blotting 检测。待测样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

2.4 组织染色实验

参考文献方法^[5],取左侧子宫部分组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定,常规切片,分别进行 HE 和

Masson 染色观察。

2.4.1 HE 染色 观察指标:(1)子宫腔有无黏连、闭塞或扩张;(2)子宫壁结构有无改变;(3)子宫内膜上皮细胞有无变性坏死;(4)子宫壁有无慢性炎细胞浸润;(5)子宫内膜有无充血水肿。具体评分标准见表 1,最后累加所有分数,得出总分。

表 1 大鼠 CPID 模型病理评分标准
Table 1 Pathological scoring criteria in CPID rats

评分	宫腔黏连、闭塞或扩张	腔壁结构病变	上皮细胞变性坏死	炎细胞浸润	内膜充血水肿
0	无明显病变	无明显病变	无明显病变	无明显炎症	无明显病变
1	范围 $<1/3$	范围 $<1/3$	范围 $<1/3$	浸润 $<10\%$	范围 $<25\%$
2	范围 $1/3\sim 2/3$	范围 $1/3\sim 2/3$	范围 $1/3\sim 2/3$	浸润 $10\%\sim 25\%$	范围 $25\%\sim 50\%$
3	范围 $>2/3$	范围 $>2/3$	范围 $>2/3$	浸润 $>25\%$	范围 $>50\%$

2.4.2 Masson 染色 观察子宫壁中蓝色胶原的面积,根据占子宫固有层的比例,依次定量为 0~4 分。评分标准为:基本正常,记为 0 分;轻微,蓝色胶原的面积 $<12\%$,记为 0.5 分;轻度,蓝色胶原的面积约占 $12\%\sim 25\%$,记为 1 分;中度,蓝色胶原的面积约占 $25\%\sim 50\%$,记为 2 分;重度,蓝色胶原的面积约占 $50\%\sim 75\%$,记为 3 分;极重度,蓝色胶原的面积 $>75\%$,记为 4 分。

2.5 血清样品检测

取血清样品,分别按照 ELISA 试剂盒说明书,检测 TNF- α 、IL-1 β 、PDGF、TIMP 水平。

2.6 子宫组织蛋白检测

称取适量的子宫组织,用裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。各样品按总蛋白 $50\text{ }\mu\text{g}$ 量取样,进行 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿法转膜法转至硝酸纤维素滤膜上后,5%脱脂牛奶封闭 2 h 后,加入对应的一抗(p-ERK1/2、p-JNK、NF- κ B p65、MMP-2、MMP-9)稀释液(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,孵育过夜。次日 TBST 洗涤后加入二抗(1:1 000),室温孵育 2 h。TBST 缓冲液洗膜 3 次后,ECL 法显色后,于凝胶成像系统中采集图像信息及采用 Image Lab 4.1 软件分析测定条带的灰度值。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 14.0 软件进行统计学分析,所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。所有数据进行正态性检验,多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析。方差齐性者两两比较采用 LSD 法,方差不齐者进行 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 SJZT 对 CPID 大鼠子宫组织病理学评分的影响

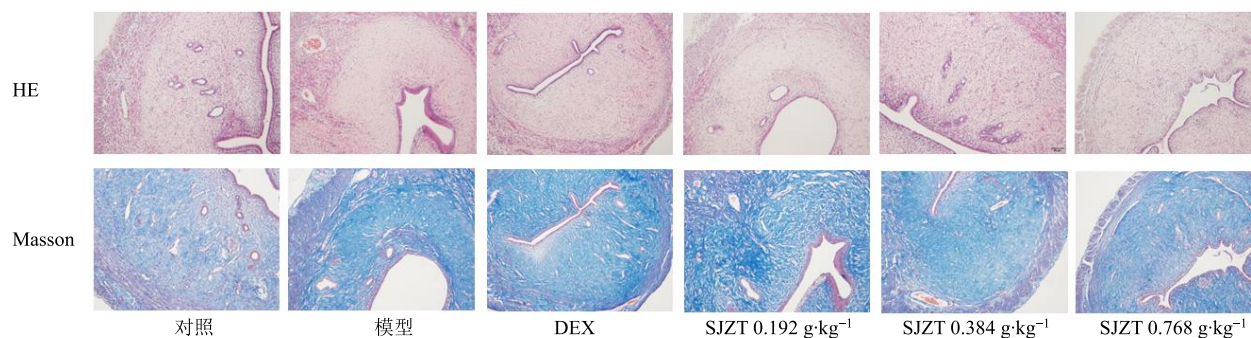
HE 染色结果表明与假手术组比较,模型组大鼠子宫组织可见宫腔缩小;子宫壁局部固有层和肌层分界不清,固有层腺体减少;宫壁有大量炎细胞浸润;子宫内膜充血、水肿($P<0.05$)。与模型组比较,SJZT 中、高剂量及 DEX 能改善 CPID 大鼠子宫腔壁结构,减轻内膜表面上皮细胞变性坏死、炎细胞浸润及固有层充血($P<0.05$)。Masson 染色结果表明,与假手术组比较,模型组大鼠子宫内膜层胶原纤维显著增多、增粗,有融合现象($P<0.01$)。与模型组比较,SJZT 中、高剂量及 DEX 能显著减轻 CPID 大鼠子宫固有层胶原纤维增生程度($P<0.05$)。说明 SJZT 能明显改善 CPID 模型大鼠子宫的炎症及纤维增生程度。结果见图 1 和表 2。

3.2 SJZT 对 CPID 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、PDGF、TIMP 水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、PDGF、TIMP 水平均显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,SJZT 低、中、高剂量与 DEX 均能显著降低 CPID 大鼠血清中 IL-1 β 水平($P<0.05$),SJZT 中、高剂量与 DEX 能显著降低大鼠血清中 TNF- α 、PDGF 水平($P<0.05$),SJZT 中、高剂量能显著降低血清中 TIMP 水平($P<0.05$)。结果见表 3。

3.3 SJZT 对 CPID 大鼠子宫组织中 p-ERK1/2、p-JNK、NF- κ B p65、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠子宫组织中

图 1 CPID 大鼠子宫 HE 和 Masson 染色病理切片 ($\times 100$)Fig. 1 HE and Masson staining pathological section of uterine tissues in CPID rats ($\times 100$)表 2 SJZT 对 CPID 大鼠子宫组织病理学评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of SJZT on histopathology score of rat uterine tissues ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	HE 染色病理 评分	Masson 染色病 理评分
假手术	—	0.83 ± 0.29	0.50 ± 0.32
模型	—	5.17 ± 2.36 [#]	2.60 ± 0.89 ^{##}
DEX	0.002	2.33 ± 0.76 [*]	1.60 ± 0.55 [*]
SJZT	0.192	3.83 ± 0.29	1.90 ± 1.14
	0.384	2.83 ± 0.76 [*]	1.60 ± 0.89 [*]
	0.768	2.17 ± 1.26 [*]	1.20 ± 0.84 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group表 3 SJZT 对 CPID 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、PDGF、TIMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of SJZT on serum levels of TNF- α , IL-1 β , PDGF, and TIMP in CPID rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	PDGF/(ng·mL ⁻¹)	TIMP/(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	194.2 ± 18.1	12.1 ± 2.0	1.47 ± 0.69	31.9 ± 11.5
模型	—	243.5 ± 43.1 [#]	16.8 ± 4.1 [#]	2.75 ± 1.39 [#]	53.6 ± 11.1 ^{##}
DEX	0.002	166.6 ± 42.2 ^{**}	11.4 ± 3.9 [*]	1.33 ± 0.30 [*]	42.9 ± 12.7
SJZT	0.192	226.5 ± 32.4	12.5 ± 3.5 [*]	1.73 ± 0.59	42.3 ± 15.9
	0.384	184.0 ± 34.2 [*]	11.6 ± 3.2 [*]	1.48 ± 0.35 [*]	38.9 ± 10.9 [*]
	0.768	192.3 ± 32.0 [*]	11.9 ± 3.3 [*]	1.42 ± 0.39 [*]	38.2 ± 9.7 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

不孕^[6]。CPID 患者有时无急性发病史,起病缓慢,但病情反复顽固不愈。现有西医治疗方法,一般采用抗生素、激素类药物、手术等,副作用较大且治疗效果不理想,而中药治疗 CPID 得到越来越多的临床肯定^[3,7]。

SJZT 源自中药古方血竭散和消瘰丸,临床用于治疗继发性痛经、月经不调、盆腔包块、不孕、子宫内膜异位等疾病。其中龙血竭能祛腐生肌、活血

p-ERK1/2、p-JNK、NF- κ B p65、MMP-9 蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组比较, SJZT 中、高剂量组大鼠的 p-ERK1/2、p-JNK 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), SJZT 低、中、高剂量组与 DEX 组大鼠 NF- κ B p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), SJZT 低、中、高剂量组大鼠 MMP-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), SJZT 高剂量组大鼠 MMP-9 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

4 讨论

CPID 也称“盆腔炎性疾病后遗症”,大多由于盆腔炎未得到及时有效治疗,继而造成女性生殖道及周边组织发生破坏、黏连及瘢痕增生等一系列症状,输卵管黏连阻塞严重时,还可能导致异位妊娠、

化瘀、消肿止痛,为君药;三七具有散瘀止血、活血消肿定痛之功,为臣药,二者合用入血分以攻其瘀,瘀去则新生;浙贝母清热化痰、散结解毒,薏苡仁清热、利尿,湿去热除,为佐使。现代研究表明,龙血竭及其黄酮类成分能抑制血小板聚集、组织纤维化^[8-9];三七中皂苷类成分具有抗炎、抗氧化等作用^[10-11];而且 SJZT 临床用于盆腔炎及其后遗症也取得较好疗效^[4,12]。

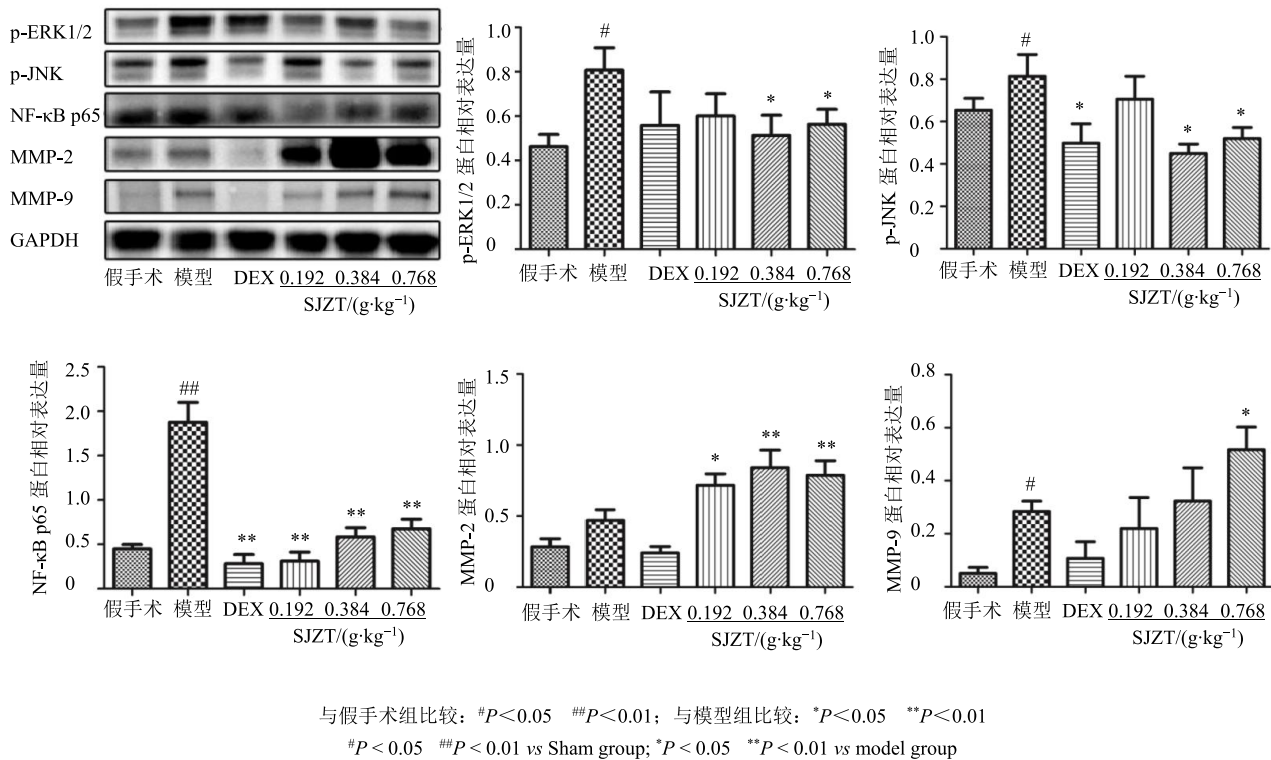


图 2 SJZT 对 CPID 大鼠子宫中 p-ERK1/2、p-JNK、NF-κB p65、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Fig. 2 Effects of SJZT on protein expression of p-ERK1/2, p-JNK, NF-κB p65, MMP-2, and MMP-9 in uterus of CPID rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

CPID 动物模型制备主要有苯酚胶浆法、细菌感染致炎 2 种方法。苯酚胶浆法属于化学性烧伤法, 发病特点虽与临床不同, 但其操作简单、造模时间短, 可造成子宫炎症反应与盆腔粘连, 特别适用于盆腔炎后遗症中阻塞性输卵管炎及不孕等研究^[13]。本实验中采用苯酚胶浆法制备 CPID 大鼠模型, 组织病理切片 HE 染色可见子宫宫腔缩小, 宫壁局部固有层和肌层分界不清, 同时有大量炎细胞浸润, 固有层腺体减少; Masson 染色表明大鼠子宫固有层中胶原纤维明显增多增粗, 有融合现象。SJZT 给药 30 d 后, 大鼠子宫腔壁结构显著改善、上皮细胞变性程度变轻、炎细胞浸润及固有层充血均显著减轻, Masson 染色中子宫固有层胶原纤维增生程度也明显减轻。说明 SJZT 对 CPID 模型大鼠有明显的抗炎及抗纤维化作用, 抑制盆腔组织粘连、异常增生, 缩小或消除已有病灶, 阻止盆腔包块形成, 改善 CPID 的预后。

炎症是 CPID 多种症状发生、发展的关键因素。TNF-α、IL-1β 是炎症反应早期主要的促炎性细胞因子, 也是炎症反应的关键介质和启动因子, 过量的 TNF-α 不仅会呈现细胞毒性作用, 还能诱导分泌大

量 IL-1β 等促炎症因子, 进一步放大炎症反应^[14]。而 CPID 患者体内持续的炎症反应可导致子宫及周围组织发生损伤, 诱使细胞外基质 (ECM) 大量增生对缺损组织进行持续修复, 进而导致子宫粘连及盆腔组织的纤维化, 其病理学表现为子宫内膜功能层和基底层分界消失, 功能层由对性激素刺激无反应的单层上皮细胞所替代, 宫腔内形成纤维性粘连^[15]。

组织纤维化的形成机制目前尚不明确, 但 ECM 异常沉积是其主要特征。正常情况下体内 ECM 合成和降解维持相对平衡, 与之有关的调控因子有血 PDGF、TIMP、MMP-2、MMP-9 等。其中 PDGF 是一种贮存在血小板 α 颗粒中的碱性蛋白质, 当组织受损伤时激活释放, 能够刺激成纤维细胞、平滑肌细胞等多种细胞分裂增殖, 促进 ECM 合成与组织纤维化的发生^[16]; MMP2、MMP-9 能降解 ECM 中的各种蛋白成分, 抑制组织纤维化^[17], 而 TIMP-1 是 MMPs 的关键调节因子, 能抑制其对细胞外基质的分解, 在子宫纤维化中同样起重要作用^[18]。

实验结果表明, SJZT 给药后, CPID 模型大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 水平显著降低, 可见 SJZT 能够通过抑制体内促炎性细胞因子的产生, 来减轻

CPID 的炎症进程。同时大鼠血清中 PDGF、TIMP 水平也显著降低,说明 SJZT 不仅能通过降低体内 PDGF 水平来减少 ECM 产生,还能降低 TIMP 水平,解除对 MMPs 抑制来增加 ECM 降解。

本研究还对子宫组织中与炎症、纤维化相关的 p-ERK1/2、p-JNK、NF- κ B p65、MMP-2、MMP-9 等蛋白表达进行了检测。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是体内最广泛存在的信号通路,ERK1/2、JNK 是其重要的两条信号通路,能将细胞外的一系列信号刺激,转导至细胞核内发挥调节细胞生长、增殖、分化、凋亡的作用^[19]。JNK 信号通路是促分裂活化蛋白激酶超家族的成员之一,在细胞分化、细胞凋亡、应激反应以及组织纤维化发展中起着重要的作用^[20]。ERK1/2 能够介导 PDGF 等多种生长因子的信号转导,p-ERK1/2 能够由胞浆移位至细胞核,从而激活多种细胞增殖与分化密切相关的转录因子,进而促进成纤维细胞、平滑肌细胞、结缔组织细胞等增殖分裂,并促进 ECM 增多,导致组织黏连及纤维化发生^[21]。另外细胞受外界刺激后,还能激活 NF- κ B 信号通路,活化后的 NF- κ B p65 能够进入细胞核能调控基因大量表达 TNF- α 、IL-1 β 等促炎症因子,促进炎症发展^[22]。实验结果表明,SJZT 能够显著抑制 CPID 模型大鼠子宫中 p-ERK1/2、p-JNK、NF- κ B p65 蛋白表达,表明 SJZT 能通过调控 MAPK 信号通路中 p-ERK1/2、p-JNK 等关键蛋白表达,进而抑制子宫组织黏连及纤维化,还能抑制 NF- κ B 信号通路,减少相关炎症反应。

通过检测子宫组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平发现,模型组大鼠子宫中 MMP-9 蛋白表达水平明显高于假手术组,可能涉及机体自身对组织损伤的慢性修复,这与临床研究发现盆腔炎患者体内的 MMP-9 水平要高于正常人相符合^[23]。与模型组相比,SJZT 给药后能更加促进大鼠子宫组织中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达,增加 ECM 降解,抑制组织纤维化。而阳性药 DEX 能降低 PDGF 水平,但对 TIMP 水平、子宫 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平未见显著影响。说明 SJZT 既能抑制体内 PDGF 水平来减少 ECM 的合成,还能促进组织中 MMP-2、MMP-9 产生,增加 ECM 的降解。SJZT 对 ECM 的这种多重抑制作用可能与其配伍组成相关,还有待深入研究。

综上所述,SJZT 对苯酚胶浆致大鼠 CPID 模型有明显的抗炎及抗纤维化作用。其机制可能通过抑

制体内 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子及调控 NF- κ B 信号通路来产生抗炎作用,还能调控 MAPK 信号通路中 p-ERK1/2、p-JNK 等蛋白表达,抑制纤维化相关细胞增生,使 ECM 合成减少与分解增加,最终促进 CPID 组织纤维化的恢复。

参考文献

- [1] Zhou J, Qu F. Treating gynaecological disorders with traditional chinese medicine: A review [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2009, 6(4): 494-517.
- [2] Burnett A M, Anderson C P, Zwank M D. Laboratory-confirmed gonorrhea and/or chlamydia rates in clinically diagnosed pelvic inflammatory disease and cervicitis [J]. *Am J Emerg Med*, 2012, 30(7): 1114-1117.
- [3] 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, 20(2): 202-204.
- [4] 张慧, 徐辉, 张国桃. 散结镇痛胶囊治疗盆腔炎性包块 48 例 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(23): 270-273.
- [5] Irani J, Levillain P, Goujon J M, et al. Inflammation in benign prostatic hyperplasia: Correlation with prostate specific antigen value [J]. *J Urol*, 1997, 157(4): 1301-1303.
- [6] Mitchell C, Prabhu M. Pelvic inflammatory disease: Current concepts in pathogenesis, diagnosis and treatment [J]. *Infect Dis Clin N Am*, 2013, doi: 10.1016/j.idc.2013.08.004.
- [7] 黄燕, 苏玥辉. 宫炎平胶囊联合氟罗沙星治疗慢性盆腔炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(3): 625-628.
- [8] 陈福锋, 郑亚男, 杜文杰, 等. 龙血竭胶囊抗慢性血瘀证作用的研究 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(3): 274-278.
- [9] 聂莉, 程德云, 朱刚艳, 等. 龙血竭对肺纤维化大鼠肺组织转化生长因子 β 1 mRNA 及 I 型胶原蛋白表达的影响 [J]. *河北中医*, 2010, 32(7): 1071-1074.
- [10] 吴颖, 孙冰, 肖静, 等. 三七皂苷 R₁ 对 LPS 诱导的小鼠心肌损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2): 179-184.
- [11] 黄积武, 李创军, 杨敬芝, 等. 三七叶的化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(21): 4381-4386.
- [12] 张岩雪, 王长虹, 田凌, 等. 散结镇痛胶囊配合蒸热治疗盆腔炎性疾病后遗症的临床研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2013, 8(12): 1229-1231.
- [13] 黄丽, 孙培文, 罗隽, 等. 慢性盆腔炎模型的建立与评价 [J]. *中南药学*, 2010, 8(6): 469-472.
- [14] Barratt-Due A, Thorgersen E B, Lindstad J K, et al. Selective inhibition of TNF-alpha or IL-1 beta does not affect *E. coli*-induced inflammation in human whole

- blood [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(9): 1774-1782.
- [15] 蔡 竞, 贺丰杰, 朱虹丽, 等. 康妇炎胶囊对兔盆腔炎性疾病后遗症炎症因子影响的实验研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2015, 16(4): 347-350.
- [16] Keck P J, Hauser S D, Krivi G, *et al.* Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF [J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1309-1312.
- [17] Misra S, Fu A A, Puggioni A, *et al.* Increased shear stress with upregulation of VEGF-A and its receptors and MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 in venous stenosis of hemodialysis grafts [J]. *Am J Physiol Heart Circul Physiol*, 2008, 294(5): 2219-2230.
- [18] Uchida C, Haas T L. Endothelial cell TIMP-1 is upregulated by shear stress via Sp-1 and the TGF β 1 signaling pathways [J]. *Biochem Cell Biol*, 2014, doi: 10.1139/bcb-2013-0086.
- [19] Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: Roles in cell growth, death, and cancer [J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60(3): 261-310.
- [20] 曹凤菊, 刘学军, 钟剑克. JNK 信号通路通过介导细胞凋亡对肺纤维化的调控作用 [J]. 中国药物与临床, 2012, 12(3): 300-302.
- [21] Peng Y, Yang H, Zhu T, *et al.* The antihepatic fibrotic effects of fluorofenidone via MAPK signalling pathways [J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(4): 358-368.
- [22] 姜程曦, 吴 亮, 吴 洁, 等. 姜黄素类似物抑制 ERK/JNK 以及 NF- κ B 信号通路发挥抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2871-2876.
- [23] Wang P H, Tsai H T, Tee Y T, *et al.* Significant elevation of plasma matrix metalloproteinase-9 level and its ratio to matrix metalloproteinase-2 in patients with pelvic inflammatory disease [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(5): 1679-1684.