

红花如意丸治疗大鼠慢性盆腔炎的研究

张樱山¹,李文雅¹,赵晖^{2*},张琪²

(1. 甘肃奇正藏药有限公司,兰州 730100; 2. 首都医科大学中医药学院,北京 100069)

[摘要] **目的:**观察红花如意丸对慢性盆腔炎大鼠血清炎症细胞因子及子宫粘连相关免疫分子变化的影响,从免疫调节角度探讨红花如意丸治疗慢性盆腔炎的作用机制。**方法:**采用苯酚胶浆法制成大鼠慢性盆腔炎模型,随机分为正常组,模型组,红花如意丸低、中、高剂量组(0.156,0.469,1.407 g·kg⁻¹)和桂枝茯苓胶囊(0.326 g·kg⁻¹)组。造模10 d后,各治疗组ig给药20 d,观察子宫内壁的病理变化,酶联免疫吸附法检测各组大鼠血清肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素-2(IL-2)及子宫细胞间黏附分子(ICAM-1)的浓度。**结果:**红花如意丸能明显改善慢性盆腔炎大鼠子宫内壁病变程度,和正常组大鼠相比,模型大鼠血清IL-2明显降低($P < 0.01$),TNF-α明显增高($P < 0.01$);子宫ICAM-1含量明显增高($P < 0.01$);经红花如意丸(1.407 g·kg⁻¹)治疗后,大鼠血清IL-2较模型组明显增高,TNF-α明显降低($P < 0.05$);子宫ICAM-1含量明显降低($P < 0.05$)。**结论:**红花如意丸可通过调节炎症细胞因子和子宫细胞间黏附分子的表达,治疗盆腔炎症,改善盆腔粘连。

[关键词] 盆腔炎性疾病;细胞因子;细胞黏附分子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)15-0180-05

Treatment of Chronic Pelvic Inflammation by Honghua Ruyi Pill in Rats

ZHANG Ying-shan¹, LI Wen-ya¹, ZHAO Hui^{2*}, ZHANG Qi²

(1. Gansu Cheezheng Tibetan Medicine limited Company, Lanzhou 730100, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100013, China)

[Abstract] **Objective:** To probe the mechanism of Honghua Ruyi Pill for treatment of chronic pelvic inflammation through observing inflammatory cytokine in serum and immune molecules relative to metrosynsis. **Method:** The animal model of chronic pelvic inflammation was replicated by injection of phenol mucilage. After

[收稿日期] 20110114(005)
[基金项目] 首都中医药与护理专项基金(11zyh07)
[通讯作者] * 赵晖, Tel:010-83911635, E-mail: zhaohui8957@ sina. com

环境,促进神经元再生,为中医药促进神经再生与修复提供新的研究思路。

[参考文献]

[1] 饶明俐. 中国脑血管病防治指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:1.
[2] Horner P J, Gage, F H. Regenerating the damaged central nervous system[J]. Nature, 2000, 407(6): 963.
[3] Gould E, Gross C. G Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems [J]. J Neurosci, 2002, 22(3): 619.
[4] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and

astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. Science, 1992, 255(5052): 1707.
[5] Kun L J, Mao X Q, David A G. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in vitro ischemia [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000, 97(18): 10242.
[6] Shen Q, Goderie S K, Jin L, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells [J]. Science, 2004, 304(5675): 1338.

[责任编辑 聂淑琴]

10 days, the model was replicated successfully. The rats were divided into six groups randomly, normal group, model group, lower dosage of Honghua Ruyi Pill ($0.156\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle dosage of Honghua Ruyi Pill group ($0.469\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), large dosage of Honghua Ruyi Pill group ($1.407\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Cinnamon twig and Poria capsule group ($0.326\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). After the rats were treated 20 days with corresponding medicine by intragastric administration, the pathological of endometrium was observed and the concentrations of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-2 (IL-2) and intercellular adhesion molecular (ICAM-1) were examined in serum by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Honghua Ruyi Pill could alleviate obviously the pathological damage of endometrium. In comparison with normal group, serum IL-2 in model group was significantly decreased ($P < 0.01$), and TNF- α was significantly elevated ($P < 0.01$); the concentration of ICAM-1 in uterus was significantly elevated ($P < 0.01$). After Honghua Ruyi Pill ($1.407\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) treatment, serum IL-2 was obviously elevated compared with the model group and TNF- α was obviously decreased ($P < 0.05$); the concentration of ICAM-1 in uterus was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Honghua Ruyi Pill can alleviate the inflammation and adhesion of pelvic by regulating the expression of inflammatory cytokines in serum and intercellular adhesion molecules in endometrium.

[**Key words**] pelvic inflammatory disease; cytokine; cell adhesion molecules

慢性盆腔炎是妇女内生殖器及周围结缔组织、盆腔腹膜发生的慢性炎症,为妇科常见病和多发疾病,临床上多因盆腔炎急性期治疗不及时、不彻底或患者抵抗力差,导致病情迁延为慢性盆腔炎。抗生素治疗本病急性期具有较好疗效,慢性盆腔炎因组织中已经基本没有病原菌的感染,或病原菌对药物耐药性形成,使用抗生素不但没有达到治疗目的,反而由于耐药性的产生而使患者更容易发生感染。红花如意丸具有镇痛,调经血之功能,本研究利用慢性盆腔炎动物模型,研究红花如意丸治疗慢性盆腔炎的作用,并从炎症细胞因子及粘连相关免疫分子方面探讨红花如意丸治疗慢性盆腔炎的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 Wistar 大鼠 60 只,体重 180 ~ 200 g,由军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(军)2007-004。

1.2 药物及试剂 红花如意丸,甘南佛阁藏药有限公司,批号 100102;桂枝茯苓胶囊,江苏康缘药业股份有限公司,批号 091129;大鼠白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、子宫细胞间黏附分子 (ICAM-1)酶联免疫试剂盒均由上海森雄科技实业有限公司提供。

1.3 仪器 Biofuge15R 低温离心机, Heraeus sepatech 德国;JA-1003 电子分析天平(上海精科天平厂);超细匀浆器(上海季诺科贸有限公司),水浴锅(型号 02810202,天津市中环实验电炉有限公

司); Multiskan MK3 型酶标仪,芬兰 Thermo Labsystem 公司。

2 方法

2.1 盆腔炎模型制备 参考文献[1],动物麻醉,腹部常规消毒,下腹正中切口约 2 cm,暴露子宫,用 4 号针头分别在子宫分叉处小心进针,向卵巢方向缓慢注入苯酚胶浆 0.05 mL,注射完毕,分层关腹,消毒手术区。

2.2 动物分组、给药 将 60 只大鼠随机选取 8 只作为正常对照。余 52 只造模,造模过程中及造模后 10 d 共死亡 8 只大鼠,造模 10 d 后,所有大鼠腹部伤口已全部愈合,随机抽取 2 只大鼠,麻醉后解剖,大体观察见子宫组织与盆腔其他组织粘连,子宫肿胀、充血明显,其中 1 只大鼠子宫腔上端积液。摘取子宫组织做病理切片,光镜下观察子宫内膜上皮及腺上皮细胞增生,大量淋巴细胞浸润,浆膜层充血水肿,结果提示模型制备成功。将剩余 42 只造模大鼠随机分为:正常组,模型组,红花如意丸低、中、高剂量组 ($0.156, 0.469, 1.407\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、阳性对照组桂枝茯苓胶囊 ($0.326\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。红花如意丸和桂枝茯苓胶囊组 ig 给药 20 d,模型组、正常组 ig 给予等容量的生理盐水。

2.3 取材 末次给药 1 h 后,10% 水合氯醛麻醉,心脏取血 5 mL 置于不加抗凝剂的试管内,分离血清备用;取血后的大鼠腹部皮肤常规消毒,暴露子宫。各组大鼠左侧子宫放入 10% 中性福尔马林溶液中

固定,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,进行病理观察;右侧子宫,称重,按质量体积比加生理盐水制备成 20% 的组织匀浆,进行酶联免疫检测。

2.4 指标检测

2.4.1 子宫内膜病理形态学评分 以子宫内膜病变为观察重点,病变程度评分标准为:0 分,子宫内膜无明显炎细胞浸润,可有轻度上皮细胞增生,无明显上皮细胞退变,无内膜充血水肿;3 分,子宫内膜轻度炎细胞浸润,轻、中度上皮细胞增生,少数上皮细胞退变,内膜轻微充血水肿;6 分,子宫内膜中度炎细胞浸润,轻、中度上皮细胞增生,中度上皮细胞退变,内膜轻微充血水肿;9 分,子宫内膜重度炎细胞浸润,轻、中度上皮细胞增生,中度上皮细胞退变,内膜中度充血水肿;12 分,子宫内膜重度炎细胞浸润,重度上皮细胞增生,重度上皮细胞退变,内膜重度充血水肿。

2.4.2 血清细胞因子 TNF- α , IL-2 测定 将待测血清 100 μ L 加入到预先已用抗大鼠 TNF- α , IL-2 单克隆抗体包被的酶标板上;将反应板充分混匀后置 37 $^{\circ}$ C 温箱 120 min,使对照品、待测样品中的抗原与单抗充分结合;用洗涤液将反应板充分洗涤 4 ~ 6 次,向滤纸上印干;每孔中加入生物素化的一抗(TNF- α /IL-2)工作液 50 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 温箱 60 min;洗板;每孔加辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 抗体工作液 100 μ L,将反应板置 37 $^{\circ}$ C 温箱 60 min,使酶标抗体工作液与生物素化一抗结合成复合物;洗板;每孔加入 OPD(邻苯二胺)底物工作液 100 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 暗处反应 5 min;每孔加入 100 μ L 终止液(2 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 硫酸);在酶标仪上 492 nm 处测各孔吸光度(A)。用 curve expert1.3 软件,以对照品 1 000, 500, 250, 125, 62, 31, 16, 0 pg $\cdot$ mL $^{-1}$ 之 A 做出标准曲线,根据样品 A 在该曲线图上求出 TNF- α , IL-2 的含量。

2.4.3 子宫 ICAM-1 含量测定 将待测子宫匀浆 100 μ L 加入到预先已用抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体包被的酶标板上;将反应板充分混匀后置 37 $^{\circ}$ C 温箱 120 min,使对照品、待测样品中的抗原与单抗充分结合;用洗涤液将反应板充分洗涤 4 ~ 6 次,向滤纸上印干;每孔中加入生物素化的一抗 ICAM-1 工作液 50 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 温箱 60 min;洗板;每孔加辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 抗体工作液 100 μ L,将反应板置 37 $^{\circ}$ C 温箱 60 min,;洗板;每孔加入 OPD

(邻苯二胺)底物工作液 100 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 暗处反应 10 min;每孔加入 100 μ L 终止液(2 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 硫酸);在酶标仪上 492 nm 处测各孔吸光值。用 Curve expert1.3 软件,以对照品 1 000, 500, 250, 125, 62, 31, 16, 0 ng $\cdot$ L $^{-1}$ 之 A 值做出标准曲线,根据样品 A 在该曲线图上求出 ICAM-1 的含量。

2.5 统计方法 运用 SPSS 13.0 for windows 进行数据统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法进行。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

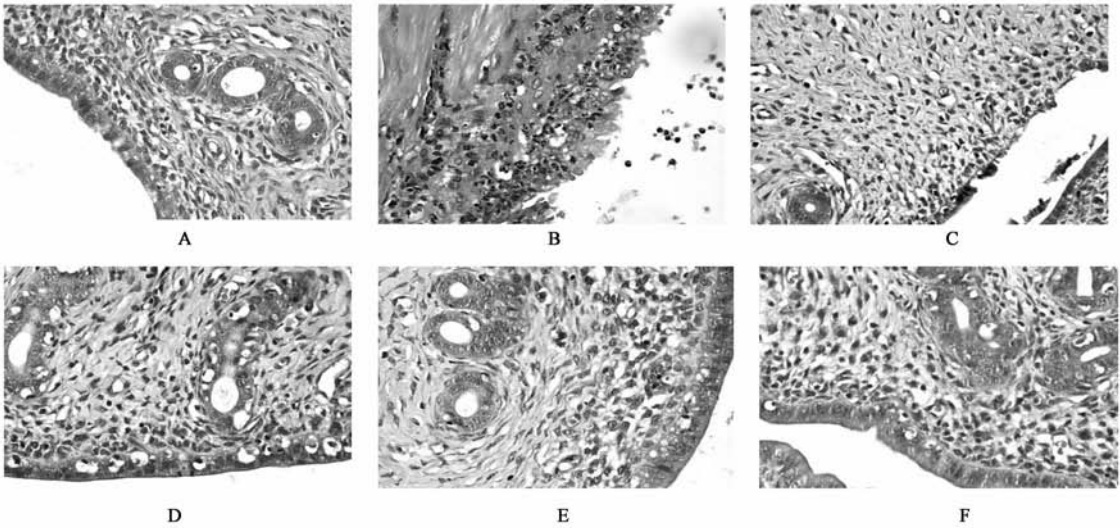
3.1 红花如意丸对慢性盆腔炎大鼠子宫内膜病理改变的影响 子宫组织 HE 染色,光镜观察,正常组大鼠子宫内膜腔壁各层结构正常,上皮细胞呈单柱状,无坏死脱落偶见轻度增生,各层无炎症细胞浸润,无内膜充血水肿;模型组大鼠子宫内膜出现腔壁结构改变,可见上皮细胞变性坏死,有散在或层状性炎细胞浸润,内膜充血水肿。各治疗组子宫内膜表面上皮轻度增生、增厚,炎症细胞浸润明显减轻(见图 1 ~ 6)。各组病变程度分级、评分结果显示红花如意丸能有效改善慢性盆腔炎大鼠子宫内膜组织形态学的病理状态。见表 1。

表 1 各组大鼠子宫内膜病变病理评分比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	剂量/g $\cdot$ kg $^{-1}$	n	病理学评分
模型	—	8	2.63 $\pm$ 0.74
红花如意丸	0.156	6	1.67 $\pm$ 0.82 ²⁾
	0.469	7	1.29 $\pm$ 0.49 ²⁾
	1.407	7	1.14 $\pm$ 0.38 ²⁾
桂枝茯苓胶囊	0.326	6	1.33 $\pm$ 0.52 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 红花如意丸对慢性盆腔炎大鼠血清细胞因子 TNF- α , IL-2 的影响 和正常组大鼠相比,模型大鼠血清 IL-2 含量明显降低($P < 0.01$),TNF- α 明显增高($P < 0.01$);经红花如意丸(1.407 g $\cdot$ kg $^{-1}$)治疗后,大鼠血清 IL-2 较模型组明显增高,TNF- α 明显降低($P < 0.05$);红花如意丸(0.469 g $\cdot$ kg $^{-1}$)及桂枝茯苓胶囊也能明显提高模型大鼠血清 IL-2 含量,和模型组相比,差异显著($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 红花如意丸对慢性盆腔炎大鼠子宫 ICAM-1 的影响 模型组大鼠子宫 ICAM-1 含量明显高于正常组($P < 0.01$);和模型组相比,红花如意丸(1.407 g $\cdot$ kg $^{-1}$)及桂枝茯苓胶囊大鼠子宫 ICAM-1 含量明显降



A. 正常组;B. 模型组;C. 红花如意丸 0.156 g·kg⁻¹组;D. 红花如意丸 0.469 g·kg⁻¹组;E. 红花如意丸 1.407 g·kg⁻¹组;F. 桂枝茯苓胶囊组
图 1 红花如意丸对慢性盆腔炎大鼠子宫内膜病理改变的影响(HE, ×200)

表 2 各组大鼠血清细胞因子 TNF-α,IL-2 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	TNF-α /ng·L ⁻¹	IL-2 /ng·L ⁻¹
正常	-	8	7.32 ± 0.61 ²⁾	80.15 ± 7.17 ²⁾
模型	-	8	10.03 ± 1.27	58.61 ± 16.45
红花如意丸	0.156	9	9.06 ± 0.98	56.50 ± 20.59
	0.469	8	8.70 ± 0.97	77.77 ± 5.05 ²⁾
	1.407	8	7.82 ± 1.31 ¹⁾	73.63 ± 4.66 ¹⁾
桂枝茯苓胶囊	0.326	9	8.53 ± 3.89	75.88 ± 7.94 ²⁾

低($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠子宫 ICAM-1 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ICAM/ng·L ⁻¹
正常	-	8	198.51 ± 88.06 ²⁾
模型	-	8	382.62 ± 114.24
红花如意丸	0.156	9	346.06 ± 20.31
	0.469	8	342.86 ± 36.49
	1.407	8	310.83 ± 43.29 ¹⁾
桂枝茯苓胶囊	0.326	9	303.97 ± 41.38 ¹⁾

4 讨论

慢性盆腔炎包括慢性子宫内膜炎、慢性输卵管炎、输卵管积水、输卵管卵巢炎、输卵管卵巢囊肿及慢性盆腔结缔组织炎等。子宫内膜炎既是盆腔炎的一种,又可因其上行感染引起盆腔其他脏器的炎症,大鼠的子宫呈 Y 型,在其盆腔生殖器官中占有相当大的比例,故一般认为大鼠子宫内膜炎基本可以反

映盆腔的炎症状态。
苯酚胶浆法是慢性盆腔炎实验研究中较为理想和成熟的造模方法^[1]。造模 10 d 后,可见大鼠子宫充血,肿胀,宫腔积水,盆腔内有明显纤维组织粘连;HE 染色,光镜下观察子宫内膜,可见内膜充血水肿,上皮细胞变性坏死、脱落,大量淋巴细胞和浆细胞浸润,其病理变化符合慢性子宫内膜炎及慢性盆腔结缔组织炎的病理变化。经红花如意丸治疗后,模型大鼠子宫充血、肿胀减轻,子宫内膜炎症细胞浸润明显减轻。结果提示红花如意丸有治疗慢性盆腔炎的作用。
慢性盆腔炎患者多数没有细菌感染的临床证据,但病情仍在继续进展,研究认为免疫病理损伤是慢性盆腔炎的主要病理变化,是本病慢性进展的主要原因,与细胞因子的异常表达关系密切,其中 TNF-α,IL-2 的作用较为明确^[2-6]。IL-2 主要由 TH1 细胞和巨噬细胞分泌,IL-2 与 T 细胞、B 细胞、单核细胞表面的 IL-2 受体结合后,能引起 T 细胞活化、增殖,促进细胞毒 T 细胞的杀伤作用,增强 NK 细胞活性,促进 B 细胞分泌 IgG 等免疫反应。临床研究表^[2],盆腔炎患者在发病时血清中 IL-2 呈下降趋势,这在一定程度上提示盆腔炎患者在发病时处于免疫功能低下状态,易遭致病菌侵袭。TNF-α 在炎症反应中起核心作用,既是启动炎症的重要细胞因子,还与腹膜粘连的形成有着显著性联系,是腹膜粘连形成的可靠的生物学标志;TNF-α 在炎症的初始阶段可有助于机体免疫系统的抗感染作用,但持续

升高则导致一系列病理生理改变^[3],当慢性盆腔炎患者因感染而出现慢性炎症时,血清 TNF- α 升高,IL-2 值降低,说明本病存在有免疫功能失调的现象。红花如意丸能有效地改善慢性盆腔炎大鼠炎症细胞的浸润,减轻子宫病理状态,可以增加血清中 IL-2 含量、抑制 TNF- α 的过度分泌。

细胞间黏附分子是介导细胞间或细胞与细胞外基质间相互接触和结合的分子,ICAM-1 促进炎症的发生与发展。研究表明,上皮细胞在炎症介质和促炎症细胞因子的刺激下,通过增加其表面 ICAM-1 的表达,与巨噬细胞表面抗原 Mac-1 结合,介导炎症细胞迁移,并黏附在炎症部位,参与慢性炎症反应过程。一方面巨噬细胞的活化除产生大量的炎症介质、单核细胞趋化因子外,还能释放反应性氧化物、溶蛋白酶等,从而致组织损害。另一方面,这些炎症介质可作用于间质或纤维细胞,导致其增殖,胶原分泌增加及 ICAM-1 的表达,从而导致间质增生及纤维化的发生^[6]。本实验研究表明,模型组大鼠子宫 ICAM-1 较正常组明显升高($P < 0.01$),表明 ICAM-1 与慢性盆腔炎过程密切相关。经药物治疗后,大鼠子宫组织的 ICAM-1 均较模型组有不同程度的降低,特别是红花如意丸($1.407 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及桂枝茯苓胶囊大鼠子宫 ICAM-1 含量较模型组差异显著($P <$

0.05)。

综上所述,红花如意丸可治疗慢性盆腔炎,其作用机制可能通过调节细胞因子及子宫组织 ICAM-1 的表达,防治子宫炎症和粘连的发生、发展。

[参考文献]

- [1] 黄国钧,黄勤挽.医药实验动物模型-制作与应用[M].北京:化学工业出版社,2008:582.
- [2] 余慧敏,陆培新,陆青.急性盆腔炎患者 IL-2、sIL-2R 和 TNF 水平及其临床意义[J].上海医学检验杂志,1999,14(3):158.
- [3] 刘瑞芬,杨晓娜.盆腔炎颗粒对血瘀兼肾虚型慢性盆腔炎患者免疫学指标的影响[J].中国中西医结合杂志,2007,27(9):841.
- [4] 王志国.当归芍药散对慢性盆腔炎模型大鼠的 TNF- α 、IL-2 影响[J].中国药学报,2005,33(5):35.
- [5] 蔡雪芬,王樟连,陈利芳.黄芪注射液穴位注射治疗慢性盆腔炎的实验研究[J].浙江大学学报:医学版,2006,35(4):430.
- [6] 张三元,林仲秋,苏园园.细胞间黏附分子 1/肿瘤坏死因子 α 参与实验性慢性盆腔炎慢性纤维化的研究[J].山西医学杂志,2007,36(6):516.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅 2012 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医结合,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,304 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2012 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发售,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjxzz.com。