

- 胞分化的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(5): 650-654.
- [16] Pilichou A, Papassotiropoulos I, Michalakakou K, et al. High levels of synovial fluid osteoprotegerin (OPG) and increased serum ratio of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) to OPG correlate with disease severity in patients with primary knee osteoarthritis[J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(9): 746-749.
- [17] 王 南, 唐 琴, 姬芳玲, 等. 天山雪莲细胞培养物对 RANKL 诱导破骨细胞的影响[J]. 中成药, 2016, 38(1): 1-6.
- [18] Wu C L, Liu X Q, Sun R X, et al. Targeting anion exchange of osteoclast, a new strategy for preventing wear particles induced-osteolysis[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1291.
- [19] Huang G, Xu Z Z, Huang Y, et al. Curcumin protects against collagen-induced arthritis via suppression of BAFF production[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(3): 550-557.
- [20] Hussan F, Ibraheem N G, Kamarudin T A, et al. Curcumin protects against ovariectomy-induced bone changes in rat model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 174916.

壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠的抗炎作用

蒋雅娴^{1,2}, 王志萍^{1,2*}, 陈 俊^{1*}, 黎 芳^{1,2}, 李晓霞^{1,2}, 苏佳昇^{1,2}

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 2. 广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室, 广西南宁 530001)

摘要:目的 探讨壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠的抗炎作用。方法 将 70 只 SD 雌性大鼠随机分为空白组、模型组、花红颗粒组、醋酸地塞米松组、壮药金母颗粒高、中、低剂量组, 通过金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的混合菌液加机械损伤法建立盆腔炎性疾病后遗症大鼠模型。给药 14 d 后, 各组大鼠取血并解剖, 子宫组织行 HE 染色并进行评分, 采用 ELISA 法检测血清中 IL-1 β 、IL-10 水平, RT-qPCR 法及 Western blot 法检测大鼠子宫匀浆中 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠子宫组织病理评分、血清 IL-1 β 水平和 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.01$), IL-10 水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 壮药金母颗粒高剂量组大鼠子宫组织病理评分降低 ($P<0.05$), 血清 IL-10 水平升高 ($P<0.05$), 壮药金母颗粒各剂量组大鼠血清 IL-1 β 水平和子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠具有抗炎作用, 其机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的表达有关。

关键词: 壮药金母颗粒; 盆腔炎性疾病后遗症; 抗炎; TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2299-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.042

盆腔炎性疾病后遗症是指女性上生殖道的一组感染性疾病, 常为急性盆腔炎没有得到彻底治疗而引发的疾病^[1], 症状为白带异常、腹痛, 其主要病理机制为炎症反应。IL-10 主要抑制炎症反应, 促进组织的修复和再生, 具有减轻炎症细胞过度活化状态的作用^[2]。TLR4 通路在介导炎症反应过程中起关键作用, TLR 可能是细菌感染与炎症形成的桥梁, 细菌性病原体与 TLR4 结合, 激活 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路调控下游炎症介质, 参与盆腔炎大鼠炎症进程^[3]。研究发现, 抑制 TLR4 通路可获得较好的

抗炎效果^[4], 如 TLR4 抑制剂能改善慢性盆腔炎大鼠病理形态学^[5]。

在壮医临床实践中, “咪花肠”疾病中月经病、白带病的症状与盆腔炎性疾病后遗症相同。壮药金母颗粒由金刚刺、火炭母、土茯苓、虎杖、白背叶根、大血藤、苦参、梨头草、黄柏组成, 治疗白带病效果好。其原方(妇雅净颗粒)能够干预盆腔炎性疾病后遗症大鼠 NF- κ B 信号通路, 起到改善盆腔炎性疾病后遗症的作用^[6], 但对于壮药金母颗粒的抗炎作用未见报道。本研究通过检测壮药金母

收稿日期: 2020-10-19

基金项目: 广西科技重大专项项目(桂科 AA18126003)

作者简介: 蒋雅娴, 硕士, 研究方向为中药、民族药新剂型、新制剂的研制与开发。Tel: 18276192086, E-mail: 1427471516@qq.com

*通信作者: 王志萍, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药、民族药新剂型、新制剂的研制与开发。Tel: 13878818902, E-mail: 318007460@qq.com

陈 俊, 博士, 高级实验师, 研究方向为中药药效筛选与机制。Tel: (0771) 2279423, E-mail: Junch_2005@163.com

颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路表达的影响,探讨壮药金母颗粒发挥抗盆腔炎性疾病后遗症的作用机制,为治疗盆腔炎性疾病后遗症的药物开发提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雌性大鼠 70 只,体质量(200 $\pm$ 20) g,购于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)2019-0002。饲养于广西中医药大学动物房,饲养环境温度为(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为 40%~60%,12 h/12 h 明暗交替。实验前适应性喂养 7 d,自由进食饮水。

1.2 试剂与药物 壮药金母颗粒(广西高校中药制剂共性技术重点实验室研制,每 1 g 颗粒相当于 3.63 g 生药,批号 G20190601);花红颗粒(广西壮族自治区花红药业集团股份有限公司,批号 20180403);复方醋酸地塞米松片(广东南国药业有限公司,批号 171202)。RIPA 细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号 R0020);大鼠 IL-1 β 、IL-10 试剂盒(武汉华联科生物技术有限公司,批号 RA20020-S、RA20090);总 RNA 试剂提取盒(美国 Promega 公司,批号 LS1040);cDNA 第一条链合成试剂盒康为试剂(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2582M);ECL 发光试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 sc-2048);TLR4 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs20595R);NF- κ B p65 抗体(美国 Affinity 公司,批号 AF5006);MyD88 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA2321)。混合菌液由广西中医药大学微生物与免疫实验中心提供。

1.3 仪器 低温高速离心机、蛋白浓度定量仪(德国 Eppendorf 公司);全波长扫描酶标仪(上海天能科技有限公司);PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);超低温冰箱(日本三洋电机株式会社);电热恒温箱(上海精宏实验设备有限公司);全电脑自动组织脱水机、全自动组织包埋机、漂烘处理仪(常州市华利电子有限责任公司);恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);石蜡切片机(上海创迅医疗器械有限公司);正置荧光数码成像显微镜(日本 Olympus 公司);电泳仪(北京六一生物科技有限公司);半干转膜仪系统(美国 ATTO 公司);涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 将 70 只大鼠随机分为空白组,模型组,花红颗粒组(2.70 g/kg),醋酸地塞米松组(0.135 $\times$ 10 $^{-3}$ g/kg),壮药金母颗粒高、中、低剂量组(5.40、2.70、1.35 g/kg),每组 10 只。造模前 24 h 禁食不禁水,模型组与各给药组大鼠次日腹腔注射 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)进行麻醉,剪去下腹正中部的毛,使皮肤暴露,用碘伏、医用酒精消毒后于下腹正中切 1 小口(0.8~1 cm),开腹后使子宫暴露并固定,用磨去针头尖的 4 号针头在子宫分叉处分别朝两侧子宫方向进针,并于子

宫宫腔内往返抽拉 2 次,注射 1.5 $\times$ 10 8 /mL 细菌混悬液 0.1 mL,分离肌肉层和皮肤层,缝合腹部,消毒手术区;空白组大鼠不做任何处理,手术后恢复饮水,正常饲养,用碘伏消毒手术区 7 d。造模后第 15 天,各给药组大鼠灌胃给予相应药物,模型组与空白组大鼠灌胃给予等体积纯净水,剂量为 10 mL/kg,每天 1 次,连续 14 d。

2.2 ELISA 法检测大鼠血清 IL-1 β 、IL-10 水平 给药 14 d 后,用 10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血后进行解剖。血液室温静置 2 h,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min,取上清,分装保存于-80 $^{\circ}$ C。按照 ELISA 试剂盒说明书,检测大鼠血清 IL-1 β 、IL-10 水平。

2.3 子宫组织病理检测 剪取一半大鼠子宫,用 4%多聚甲醛固定,经脱水、透化、石蜡包埋后,制备 2~3 μ m 组织切片,HE 染色后用中性树胶进行封片,在光镜下($\times$ 100)观察切片,根据表 1 对子宫病理形态变化进行分级。

表 1 分级标准

项目	分级	标准
宫腔粘连或扩张	0 级	无粘连或扩张
	I 级	粘连或扩张<1/3
	II 级	粘连或扩张 1/3~2/3
	III 级	粘连或扩张>2/3
内膜充血水肿	0 级	无内膜充血水肿
	I 级	固有膜轻微充血水肿
	II 级	明显充血水肿
	III 级	全层充血水肿
上皮细胞增生	0 级	上皮细胞呈单层柱状,间质疏松
	I 级	上皮细胞呈高柱状,可见核分裂相
	II 级	上皮细胞增生呈低乳头状,增生密集
	III 级	上皮细胞增生呈分支乳头状

2.4 RT-qPCR 法检测大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达 取大鼠子宫组织 30~100 mg,按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,再按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录 cDNA 合成,配制所需的反应液,反应条件为 25 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 50 min,95 $^{\circ}$ C 5 min。使用 Real-time PCR 仪进行扩增,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火、延伸 30 s,共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析,以 β -actin 为内参,采用 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达。引物序列见表 2。

表 2 引物序列

基因	序列(5'→3')	长度/bp
TLR4	正向 GTATCGGTGGTCAGTGTGCTT	111
	反向 GCTTCTCCTCTGCTGTAATTTT	
NF- κ B p65	正向 TCTGTTTCCCCTCATCTTTCCC	156
	反向 GTGGTATCTGTGCTTCTCTCCCC	
MyD88	正向 CGACGCCTTTCATCTGCTACTGC	176
	反向 CCATGCGACGACACCTTTTCTC	
β -actin	正向 CCTAGACTTCGAGCAAGAGA	140
	反向 GGAAGGAAGGCTGGAAGA	

2.5 Western blot 检测大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达 取适量大鼠子宫组织,剪碎后置于离心

管中,加入 RIPA 裂解液提取蛋白质,用 BCA 法检测蛋白质浓度,加入 4 倍量蛋白质上样缓冲液,95 ℃ 变性 10 min。各组取等量蛋白,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,250 mA 恒流转移到 PVDF 膜,封闭液中室温封闭 2 h,加入一抗工作液 4 ℃ 孵育过夜,加入二抗(1:3 000)室温孵育 90 min,ECL 试剂盒发光显影。采用凝胶成像分析系统扫描,检测各目的蛋白及内参蛋白 β -actin 条带灰度值,计算目的蛋白相对表达。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。 $P<$

0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫病理形态的影响

3.1.1 宫腔黏连与扩张病理评分 与空白组比较,模型组大鼠宫腔黏连与扩张评分升高($P<0.01$);与模型组比较,壮药金母颗粒高剂量组和醋酸地塞米松组大鼠宫腔黏连与扩张评分降低($P<0.05$),其余各给药组大鼠宫腔黏连与扩张评分差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠宫腔黏连与扩张情况的影响 ($n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	病理评分各级动物数/只				P 值
		0 级	I 级	II 级	III 级	
空白组	—	9	1	0	0	—
模型组	—	0	2	7	1	<0.01
花红颗粒组	2.70	3	6	1	0	>0.05
醋酸地塞米松组	0.135×10 ⁻³	6	3	1	0	<0.05
壮药金母颗粒高剂量组	5.40	5	5	0	0	<0.05
壮药金母颗粒中剂量组	2.70	3	5	1	1	>0.05
壮药金母颗粒低剂量组	1.35	2	7	0	1	>0.05

3.1.2 内膜充血水肿病理评分 与空白组比较,模型组大鼠子宫内膜充血水肿评分升高($P<0.01$);与模型组比较,壮药金母颗粒高剂量组和醋酸地塞米松组大鼠子宫内膜充血水肿评分降低($P<0.01$),其余各给药组大鼠子宫内膜充血水肿评分差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

3.1.3 上皮细胞增生病理评分 与空白组比较,模型组大鼠子宫上皮细胞增生评分升高($P<0.01$);与模型组比较,壮药金母颗粒高剂量组、花红颗粒组和醋酸地塞米松组大鼠子宫上皮细胞增生评分降低($P<0.05$, $P<0.01$),见表 5。

表 4 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫内膜充血水肿情况的影响 ($n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	病理评分各级动物数/只				P 值
		0 级	I 级	II 级	III 级	
空白组	—	8	2	0	0	—
模型组	—	0	2	6	2	<0.01
花红颗粒组	2.70	2	7	1	0	>0.05
醋酸地塞米松组	0.135×10 ⁻³	6	4	0	0	<0.01
壮药金母颗粒高剂量组	5.40	7	3	0	0	<0.01
壮药金母颗粒中剂量组	2.70	3	5	2	0	>0.05
壮药金母颗粒低剂量组	1.35	2	8	0	0	>0.05

表 5 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫上皮细胞增生情况的影响 ($n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	病理评分各级动物数/只				P 值
		0 级	I 级	II 级	III 级	
空白组	—	7	3	0	0	—
模型组	—	0	1	7	2	<0.01
花红颗粒组	2.70	4	5	1	0	<0.05
醋酸地塞米松组	0.135×10 ⁻³	4	6	0	0	<0.01
壮药金母颗粒高剂量组	5.40	2	8	0	0	<0.05
壮药金母颗粒中剂量组	2.70	3	4	3	0	>0.05
壮药金母颗粒低剂量组	1.35	1	9	0	0	>0.05

3.1.4 子宫组织病理形态学 空白组大鼠子宫宫腔结构层次基本清晰,子宫内膜上皮完整,无充血、红肿现象;模型组大鼠主要病变为子宫宫腔粘连或扩张,内膜充血水肿,上皮细胞增生呈分支乳头状,伴有一定程度炎症细胞浸润等病变,基本符合临床盆腔炎性疾病后遗症病变特征;壮药金母颗粒高剂量组和醋酸地塞米松组大鼠子宫宫腔结构

层次基本清晰,内膜上皮完整,偶可见宫腔粘连或扩张<1/3或上皮细胞呈高柱状、固有膜轻微充血水肿;花红颗粒组大鼠子宫组织轻微扩张但未见粘连,内膜局部充血红肿,但能改善上皮细胞增生情况;壮药金母颗粒中、低剂量组大鼠宫腔粘连或扩张 1/3~2/3,个别有明显充血水肿,上皮细胞呈高柱状,见图 1。

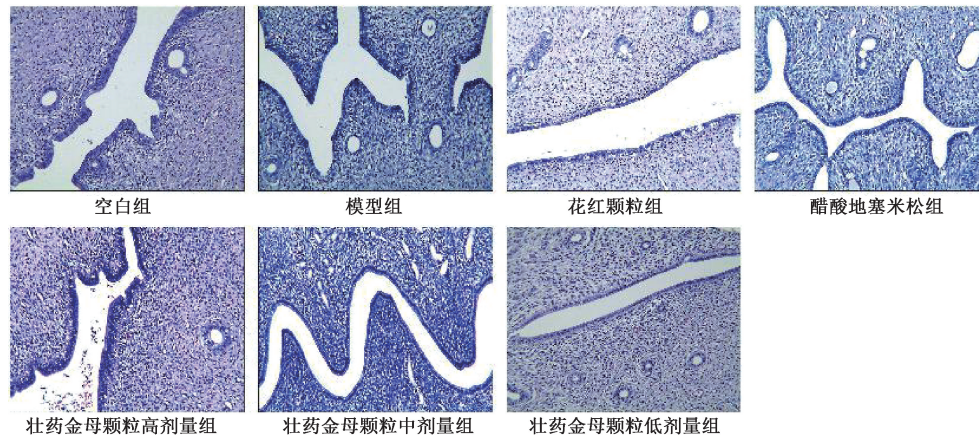


图 1 各组大鼠子宫组织病理形态 (HE, ×100)

3.2 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠血清 IL-1 β 、IL-10 水平的影响 与空白组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 水平升高 ($P<0.01$), IL-10 水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 母颗粒高、中剂量组, 花红颗粒组和醋酸地塞米松组大鼠血清 IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$), 壮药金母颗粒高剂量组和醋酸地塞米松组大鼠血清 IL-10 水平升高 ($P<0.05$), 见表 6。

表 6 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠血清 IL-1 β 、IL-10 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
空白组	—	33.52 $\pm$ 1.90	52.68 $\pm$ 10.40
模型组	—	37.73 $\pm$ 1.32 $\Delta\Delta$	41.51 $\pm$ 5.34 Δ
花红颗粒组	2.70	34.74 $\pm$ 1.67*	48.02 $\pm$ 7.93
醋酸地塞米松组	0.135 $\times 10^{-3}$	34.72 $\pm$ 2.21*	51.23 $\pm$ 8.91*
壮药金母颗粒高剂量组	5.40	34.30 $\pm$ 2.52*	43.70 $\pm$ 3.74
壮药金母颗粒中剂量组	2.70	34.27 $\pm$ 8.40*	45.02 $\pm$ 5.70
壮药金母颗粒低剂量组	1.35	35.62 $\pm$ 1.92	50.88 $\pm$ 6.77*

注: 与空白组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$ 。

3.3 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠子宫组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达均降低 ($P<0.01$), 见表 7。

表 7 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TLR4	MyD88	NF- κ B p65
空白组	—	0.834 $\pm$ 0.184	1.010 $\pm$ 0.060	0.916 $\pm$ 0.098
模型组	—	10.987 $\pm$ 0.904 $\Delta\Delta$	7.192 $\pm$ 0.553 $\Delta\Delta$	20.283 $\pm$ 1.377 $\Delta\Delta$
花红颗粒组	2.70	4.894 $\pm$ 0.837**	3.023 $\pm$ 0.707**	8.161 $\pm$ 1.020**
醋酸地塞米松组	0.135 $\times 10^{-3}$	2.277 $\pm$ 0.278**	2.009 $\pm$ 0.183**	3.538 $\pm$ 0.612**
壮药金母颗粒高剂量组	5.40	1.873 $\pm$ 0.072**	1.687 $\pm$ 0.166**	1.634 $\pm$ 0.252**
壮药金母颗粒中剂量组	2.70	4.720 $\pm$ 0.734**	2.748 $\pm$ 0.756**	6.915 $\pm$ 0.433**
壮药金母颗粒低剂量组	1.35	6.408 $\pm$ 0.039**	4.735 $\pm$ 0.517**	10.539 $\pm$ 0.717**

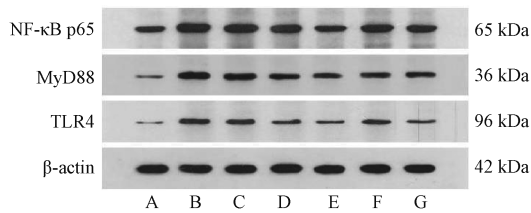
注: 与空白组比较, $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较, ** $P<0.01$ 。

3.4 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠子宫组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达均降低 ($P<0.01$), 见表 8、图 2。

表 8 壮药金母颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TLR4	MyD88	NF- κ B p65
空白组	—	0.041 $\pm$ 0.016	0.048 $\pm$ 0.0190	0.246 $\pm$ 0.086
模型组	—	0.474 $\pm$ 0.133 $\Delta\Delta$	0.743 $\pm$ 0.122 $\Delta\Delta$	1.089 $\pm$ 0.117 $\Delta\Delta$
花红颗粒组	2.70	0.275 $\pm$ 0.050**	0.320 $\pm$ 0.104**	0.662 $\pm$ 0.216**
醋酸地塞米松组	0.135 $\times 10^{-3}$	0.175 $\pm$ 0.069**	0.296 $\pm$ 0.068**	0.497 $\pm$ 0.159**
壮药金母颗粒高剂量组	5.40	0.131 $\pm$ 0.026**	0.215 $\pm$ 0.047**	0.378 $\pm$ 0.129**
壮药金母颗粒中剂量组	2.70	0.242 $\pm$ 0.081**	0.363 $\pm$ 0.090**	0.648 $\pm$ 0.128**
壮药金母颗粒低剂量组	1.35	0.341 $\pm$ 0.055**	0.612 $\pm$ 0.125	0.899 $\pm$ 0.139

注: 与空白组比较, $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较, ** $P<0.01$ 。



注: A~G 分别为空白组, 模型组, 花红颗粒组, 复方醋酸地塞米松组, 壮药金母颗粒高、中、低剂量组。

图 2 各组大鼠子宫组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达

4 讨论

盆腔炎性疾病后遗症病名在古籍中没有记载, 根据其症状, 中医认为该病属于带下病、痛经、癥瘕、经病疼痛、经不调、妇人腹痛、不孕症等病症范畴^[7], 而壮医认为其属于“月经病”“带下病”^[8], 病机是由于湿热下注而使带下量多, 热毒积蒸、损伤龙路, 湿毒积结、淤阻花肠, 故小腹疼痛、腰骶痠痛^[9], 治则清热毒, 除湿毒。又因积湿化热, 湿热积结于火路, 日久生虫, 虫毒侵蚀阴部则痒痛不宁, 龙路、火路失调, 花肠功能失调, 故使带下量多, 色黄如脓、稠粘臭秽。湿热浸渍, 则阴部瘙痒, 甚则灼痛, 治则以清热解暑祛湿、补花肠、杀虫止痒、调理三道二路。壮药金母颗粒是由课题组前期研制的获得专利授权的新制剂改良而来, 由金刚刺、火炭母等组成, 具有清热毒、除湿毒、灭虫毒、止瘙痒、消肿痛等功效。

Toll 样受体 4 (TLR4) / 髓样分化因子 88 (MyD88) / 核转录因子-κB (NF-κB) 信号通路在免疫及炎症机制中发挥作用^[10]。TLR4 为跨膜蛋白, 是 Toll 样受体家族成员之一。外源性配体主要是病原体相关分子如细菌性病原体、真菌性病原体等^[11-12], 与 TLR4 结合, 引起炎症瀑布反应。白细胞介素 (如 IL-1β、IL-6) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 等与 TLR4 结合, 胞外炎性信号呈递给胞内 MyD88^[13], 募集转导分子发生级联反应, 磷酸化 IKK 激酶 (IKK) 复合物 (如 IKKα、IKKβ、IKKγ) 将 IκB 磷酸化, NF-κB 与 IκB 解离, 活化并进入细胞核与下游基因上的特定位点结合, 启动并调控下游基因的转录, 合成并释放细胞因子 (如 IL-1β、IL-2、IL-6、TNF-α 等)^[14-15]。细胞因子又通过正反馈调节激活炎症 NF-κB 通路^[16], 加重炎症反应。多种抑制该信号通路的抗炎药均能起到较好的抗炎效果^[17], 以 TLR4/MyD88/NF-κB 为靶标, 将成为治疗盆腔炎性疾病后遗症的新思路。

本研究运用金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的混合菌液加机械损伤法建立盆腔炎性疾病后遗症大鼠模型。结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠子宫病理组织评分升高, 符合临床盆腔炎性疾病后遗症病变特征, 证明造模成功^[5]。模型组大鼠 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 及蛋白表达升高, 提示 TLR4、MyD88、NF-κB p65 被活化, 诱导炎症因子的转录, 产生炎症效应, 增加活化的 NF-κB p65 能促进下游 IL-1β 炎症因子的合成与分泌。与模型组比较, 壮药

金母颗粒高剂量组大鼠子宫病理组织评分降低, 证实其可以抑制盆腔炎性疾病后遗症的炎症反应。壮药金母颗粒各剂量组大鼠组织 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 及蛋白表达降低, 提示壮药金母颗粒可通过抑制 TLR4、MyD88、NF-κB p65 的表达, 减少下游 IL-1β 炎症因子的合成与分泌。IL-1β 作为 TLR4/MyD88/NF-κB 通路下游的炎症因子, 高、中剂量壮药金母颗粒对其有抑制效果, 但低剂量抑制效果不明显。IL-10 是促进组织修复和再生的因子, 而盆腔炎性疾病后遗症是需要较长时间形成的慢性炎症, 修复组织是需要漫长的过程, 因此, 壮药金母颗粒对 IL-10 水平的影响敏感度不高, 可能该通路是通过影响其他炎症因子起到抗炎作用的, 有待开展进一步研究。

综上所述, 壮药金母颗粒能够抑制盆腔炎性疾病后遗症大鼠的炎症反应, 其机制可能是通过调控 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的传导而实现的。

参考文献:

- [1] 孙智霞. 中西医结合治疗慢性盆腔炎 60 例[J]. 吉林中医药, 2010, 30(9): 780-781.
- [2] 闫亚楠, 刘 敏, 高 升, 等. 采用正交设计析因分析法对当归芍药散治疗慢性盆腔炎模型大鼠的组方优化研究[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5): 11-15.
- [3] 袁建菱, 李 萍, 文琦琪, 等. 妇科千金片对盆腔炎大鼠 TLR2/4-NF-κB 信号通路影响的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(11): 13-17.
- [4] Hua F, Tang H L, Wang J, et al. TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35(4): 536-542.
- [5] 王春梅, 康 燕, 靳紫薇, 等. TLR4 抑制剂 Tak-242 对慢性盆腔炎大鼠炎症指标及病理形态学改变的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(5): 1053-1055.
- [6] 熊 冰. 壮药妇雅净颗粒新制剂的制备及对大鼠盆腔炎性疾病后遗症的作用机制研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2016.
- [7] 付建华. 浅析妇科盆腔炎临床治疗研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(33): 41.
- [8] 唐琴艳. 慢性盆腔炎的治疗进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(34): 17-18; 64.
- [9] 黄汉儒. 壮医理论体系概述[J]. 中国中医基础医学杂志, 1996, 15(6): 3-7.
- [10] 鲍璐璐, 崔立红. TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(5): 568-572.
- [11] Roeder A, Kirschning C J, Rupec R A, et al. Toll-like receptors and innate antifungal responses[J]. Trends Microbiol, 2004, 12(1): 44-49.
- [12] Seong S Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(6): 469-478.
- [13] Xu X M, Ning Y C, Wang W J, et al. Anti-inflamm-aging effects of long-term caloric restriction via overexpression of

- SIGIRR to inhibit NF- κ B signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4): 1257-1270.
- [14] Bowie A G, Haga I R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(8): 859-867.
- [15] 尚立芝, 季书, 王国强, 等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 65-72.
- [16] Liu L, Gu H L, Liu H M, et al. Protective effect of resveratrol against IL-1 β -induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway: an "in vitro study" [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 6925-6940.
- [17] 周岐鸣, 张一凡, 郑培永, 等. 清肠栓脐贴调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻小鼠溃疡性结肠炎[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(3): 68-74.

白藜芦醇对 PM2.5 诱导的血管平滑肌细胞增殖与迁移的影响

吴玉莲¹, 李昕倡¹, 李明², 孙雪¹, 罗雨渊², 赵佳仪², 李岩^{1*}

(1. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006; 2. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 研究白藜芦醇对 PM2.5 诱导的血管平滑肌细胞增殖与迁移的影响。方法 体外培养人血管平滑肌细胞, 分为对照组、PM2.5 组 (12.5 μ g/mL)、白藜芦醇组 (5、10、20 μ mol/L), 采用 CCK8 法、EdU 法检测细胞增殖情况, 划痕实验、Transwell 实验检测细胞迁移能力, Western blot 法检测 p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达。结果 白藜芦醇干预后, 血管平滑肌细胞增殖率和 EdU 阳性细胞比例均降低, 血管平滑肌细胞划痕愈合率和穿膜细胞数减少, p38 MAPK、JNK 蛋白磷酸化表达降低 ($P < 0.05$)。结论 白藜芦醇可通过降低 p38 MAPK 和 JNK 蛋白磷酸化表达来抑制 PM2.5 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移, 有望作为防治 PM2.5 心血管毒性的有效手段。

关键词: 白藜芦醇; 血管平滑肌细胞; 增殖; 迁移; PM2.5; p38 MAPK; JNK

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2304-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.043

动脉粥样硬化是严重影响健康的常见疾病, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 在其中扮演着重要角色, 衣原体、氧化低密度脂蛋白等通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、PI3K/Akt、NF- κ B 等信号通路, 促使中膜 VSMCs 增殖、肥大, 最终导致病情发生^[1-2]。研究表明, 抑制 VSMCs 增殖和迁移可有效减缓动脉粥样硬化斑块形成, 这不仅证实了它在动脉粥样硬化发生发展中的重要作用, 也为相关治疗提供了靶点^[3-4]。目前发现, 益气固本汤、白藜芦醇、红景天等多种中药复方或单体都具有抗 VSMCs 增殖和迁移作用^[5-7]。

PM2.5 作为新发现的动脉粥样硬化致病因素, 它与该病发生发展的关系已经得到确认^[8]。课题组前期发现 PM2.5 不仅可引起血管内皮细胞凋亡, 还能促进 VSMCs 的

增殖和迁移, 并且 MAPKs 家族中的 p38 MAPK 和 JNK 参与该过程^[9-10], 但中药对 PM2.5 诱导的 VSMCs 增殖和迁移的影响尚不明确。因此, 本实验建立 PM2.5 染毒的 VSMCs 模型, 采用白藜芦醇进行干预, 观察该成分对 VSMCs 增殖和迁移的影响, 并探讨其作用机制, 以期寻找防治 PM2.5 心血管毒性的新方法。

1 材料

1.1 细胞株 VSMCs 购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司, 用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2 试剂 白藜芦醇 (纯度 $\geq 99\%$, 货号 R5010-100MG, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 参考 Gueguen 等^[11]报道的方法, 用 DMSO 配制成 40 mmol/L 贮存液, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存, 实验时取适量加入完全培养基中稀释至所需终浓

收稿日期: 2021-03-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017A020215140, 2017A020215145)

作者简介: 吴玉莲 (1990—), 女, 硕士生, 从事心血管方向的中西医结合基础研究。Tel: 13317569289, E-mail: 1123586393@qq.com

***通信作者:** 李岩 (1977—), 女, 副教授, 从事心血管方向的中西医结合基础研究。Tel: (020) 39358007, E-mail: Liy506@gzucm.edu.cn

网络出版日期: 2021-08-18

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210818.1045.002.html>