

• 论 著 •

菝葜总黄酮对慢性盆腔炎大鼠的保护作用研究*

宋路瑶¹,施婷婷¹,马 云²,冯海兴³,刘文钦²,侯楚祺^{2△}

(1. 南方医科大学珠江医院药学部, 广东 广州 510280; 2. 南方医科大学南方医院临床药学中心, 广东 广州 510515; 3. 深圳大学第一附属医院神经内科, 广东 深圳 518025)

[摘 要] 目的 探讨菝葜总黄酮对慢性盆腔炎(CPID)模型大鼠的治疗作用。方法 建立 CPID 大鼠模型(苯酚胶浆化学烧伤法),将造模成功的 SD 大鼠按随机数字表法分为模型对照组、菝葜总黄酮高[32.4 g/(kg·d)]、中[16.2 g/(kg·d)]、低[8.1 g/(kg·d)]剂量组,金刚藤胶囊组,地塞米松组,各 10 只。假手术处理大鼠按随机数字表法分为假手术组与本底对照组,各 10 只。另外设立空白对照组(10 只)不作任何处理。给药 14 d 后检测各组大鼠血液流变学及血常规指标;观察大鼠左右侧子宫的形态变化,计算子宫肿胀率及肿胀抑制率,苏木精-伊红(HE)染色及 Masson 染色观察大鼠子宫病理改变。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠子宫组织炎症因子白细胞介素 1β(IL-1β)、IL-4、IL-6 和 IL-10 的表达。结果 与模型对照组及金刚藤胶囊组比较,菝葜总黄酮各剂量组均能显著降低 CPID 模型大鼠血液中白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞数及各项血液流变学指标,降低大鼠子宫肿胀率,抑制大鼠子宫组织 IL-1β 及 IL-6 的表达,促进 IL-4 及 IL-10 的表达,并能显著减轻子宫充血、水肿症状,减少炎症细胞浸润,减轻腺体周围纤维结缔组织增生,改善子宫内膜增生及纤维化,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结论 菝葜总黄酮能综合改善 CPID 模型大鼠症状,增强其血液流动性,改善局部血液循环,并同时抑制 CPID 模型大鼠子宫炎症反应及子宫纤维化增生。

[关键词] 菝葜; 黄酮; 慢性盆腔炎; 子宫; 纤维化; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.05.002 中图法分类号:R965.1;R984

文章编号:1009-5519(2024)05-0727-08 文献标识码:A

Protective effect of total flavonoids of Sarsaparilla on chronic pelvic inflammatory disease in rats*

SONG Luyao¹,SHI Tingting¹,MA Yun²,FENG Haixing³,LIU Wenqin²,HOU Chuqi^{2△}

(1. Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Clinical Pharmacy Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 3. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Guangzhou, Guangdong 518025, China)

[Abstract] Objective To investigate the therapeutic effect of total flavonoids of Sarsaparilla on chronic pelvic inflammatory disease (CPID) model rats. Methods CPID rat model were performed by injecting phenol mucilage into the right uterus. The SD rats were divided into the model control group, the high dose group [32.4 g/(kg·d)], the medium dose group [16.2 g/(kg·d)], the low dose group [8.1 g/(kg·d)], the Jingangteng capsule group, the dexamethasone group according to the random number table method, with ten animals each. Rats treated with sham operation were divided into the sham operation group and the background control group according to the random number table method, with ten animals each. In addition, the blank control group (ten animals) was established without any treatment. The hemorheology and routine blood indexes of each group were detected 14 days after administration. The morphological changes of the left and right sides of the uterus were observed, the swelling rate and swelling inhibition rate of the uterus were calculated, and the pathological changes of the uterus were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. The expression of interleukin-1β (IL-1β), IL-4, IL-6 and IL-10 in uterine tissue of rats was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results Compared with the model control group and the Jingangteng capsule group, all dose groups of total flavonoids from Sarsaparilla can significantly reduce the number of

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(82004048); 广东省中医药局科研项目(20212146); 广东省广州市科技局科技计划项目(202102020539)。

作者简介: 宋路瑶(1991—), 博士研究生, 主管药师, 主要从事炎症及纤维化疾病的机制及药物靶点研究。 △ 通信作者, E-mail: houchuqi90@163.com。

white blood cells, lymphocytes, neutrophils, and various hemorheological indicators in the blood of CPID model rats, reduce the rate of uterine swelling in rats, and inhibit the expression of L-1 β and IL-6 in rat uterine tissue, and promote the expression of IL-4 and IL-10 and can significantly reduce uterine congestion and edema, reduce inflammatory cell infiltration, alleviate fibrous connective tissue proliferation around glands, and improve endometrial hyperplasia and fibrosis, with statistical significance ($P < 0.01$). **Conclusion** Total flavonoids of Sarsaparilla can improve the symptoms of CPID model rats, enhance blood flow, improve local blood circulation, and inhibit uterine inflammation and fibrotic hyperplasia in CPID model rats.

[Key words] Sarsaparilla; Flavonoids; Chronic pelvic inflammatory disease; Uterus; Fibrosis; Rats

菝葜又名“金刚藤”，为百合科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根茎，具有抗炎镇痛、活血化瘀的作用，其粗提物制剂金刚藤胶囊已在临床用于治疗妇科炎症多年，疗效确切。近年来，国内外学者对菝葜的活性成分及药理作用进行了大量研究，发现菝葜具有非常好的抗炎作用，并发现了多种活性成分，如落新妇苷^[1]、黄杞苷^[2]、表儿茶素^[3]等。课题组前期对菝葜活性部位进行了系统的药效学筛选及活性成分鉴定，发现在慢性盆腔炎模型大鼠中起治疗作用的主要为黄酮类成分^[4-9]，并进一步对其工艺进行优化，得到了黄酮类成分含量达 50% 以上的菝葜总黄酮。通过单体化合物的分离，确定了菝葜总黄酮中的主要成分为落新妇苷、新落新妇苷、异落新妇苷、新异落新妇苷和黄杞苷。因此，本研究在课题组前期研究的基础上，拟进一步评价菝葜总黄酮对慢性盆腔炎(CPID)模型大鼠的药效作用，通过苯酚胶浆化学烧伤法建立 CPID 大鼠模型，采用不同剂量的菝葜总黄酮进行干预后，考察大鼠的血液流变学指标、血常规指标、子宫组织病理学检测及子宫组织炎症因子表达水平，以期全面探讨菝葜总黄酮防治 CPID 模型大鼠疾病进展的药效，为菝葜总黄酮治疗 CPID 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 将菝葜根茎粉碎为粗粉，粉碎后的药材用 95% 乙醇回流提取 3 次，每次煮沸 1 h，提取液过滤合并，减压浓缩至无醇味，得到浓缩液；上大孔树脂进行分离，40% 乙醇洗脱，收集洗脱液，浓缩；取浓缩液，上聚酰胺柱洗脱液进行分离，收集 20% 乙醇洗脱液，真空干燥，得到菝葜总黄酮提取物。加蒸馏水溶解，配成含生药量 3.24 g/mL 的药物溶液。根据说明书，人临床每天用药剂量为 6 g，换算成大鼠剂量为 0.54 g/kg，相当于 8.1 g/kg 生药量。高剂量组为临床等效剂量的 4 倍即 32.4 g/kg，200 g 大鼠需给药 6.48 g，即需要 2 mL 含生药量 3.24 g/mL 的菝葜总黄酮提取物，中剂量及低剂量以含生药量 3.24 g/mL 的母液依次等倍稀释。菝葜由湖北省中药材公司提供，经南方医科大学中医药学院刘传明教授鉴定为百合科植物菝葜的根茎。金刚藤胶囊由湖北福人药业股份有限公司生产；地塞米松片由广东华南药业集团有限公司生产。

1.1.2 动物 SPF 级 SD 大鼠，雌性，体重 180 ~ 220 g，由南方医科大学实验动物中心提供[许可证号：SCXK(粤)2011-0015，合格证号：44002100008324]。动物饲养环境室内温度 20 ~ 24 ℃，实验期间自由摄食饮水。术前大鼠适应性喂养 1 周，并于术前 24 h 禁食、不禁水。动物实验伦理审批号：NFYY-2014-109。

1.1.3 试剂 戊巴比妥钠(德国 Merck 公司)；25% 苯酚胶浆(液化苯酚 5 mL，西黄耆胶 1 g，甘油 4 mL，加蒸馏水至 20 mL 研磨配制)；苯酚(广东光华化学厂有限公司)；西黄耆胶(上海汉光化学试剂有限公司)；甘油(广东光华科技股份有限公司)；福尔马林(广州维格斯生物科技有限公司)；大鼠白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-4、IL-10 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 EBioscienc 公司)。

1.1.4 实验仪器 LBY-N6G 血液流变分析仪(北京利普生仪器有限公司)；HST302 型全自动血细胞分析流水线(日本 SYSMEX 公司)；大鼠采血针、采血管(美国 BD 公司)；RM2135 轮转切片机、石蜡包埋机、TP1020 生物组织全自动脱水机、HI1220 型烤片机、HI1210 型摊片机(德国 Leica 公司)；B-480 型水浴锅(瑞士 BUCHI 公司)；BSA224S 电子分析天平(万分之一精确度，北京赛多利斯科学仪器有限公司)；IX71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)；5810R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)；各种微量加样器(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CPID 大鼠模型建立^[5] 取 SPF 级 SD 雌性大鼠，禁食、不禁水 24 h，3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉后，剪去下腹正中毛，酒精棉球消毒，于下腹部正中切口 1.5 cm，暴露子宫，用 1 mL 注射器于子宫分岔处进针入子宫腔内，朝右侧方向缓慢推注 25% 苯酚胶浆 0.06 mL 制作 CPID 大鼠模型，左侧子宫不注射作为自身对照。假手术处理大鼠除不注射苯酚胶浆外，其余操作同上。完成后逐层缝合并关闭腹腔，再次用 2% 碘酊和 75% 乙醇消毒，放回大鼠饲养笼内。

1.2.2 分组及给药 将造模成功的 SD 大鼠按随机数字表法分为 6 组(各 10 只)，分别为：菝葜总黄酮高剂量组[32.4 g/(kg · d)，相当于临床等效剂量的 4 倍]、菝葜总黄酮中剂量组[16.2 g/(kg · d)，相当于

临床等效剂量的 2 倍]、菝葜总黄酮低剂量组[8.1 g/(kg·d),相当于临床等效剂量的 1 倍]、金刚藤胶囊组[16.2 g/(kg·d),相当于临床活性剂量的 2 倍]、地塞米松组[1.08 mg/(kg·d),相当于临床的活性剂量]、模型对照组(0.9%生理盐水);假手术处理的大鼠按随机数字表法分为 2 组(各 10 只),即假手术组(0.9%生理盐水)、本底对照组[32.4 g/(kg·d)]。另外设立空白对照组(10 只,0.9%生理盐水)不作任何处理。于造模后第 7 天开始给药,每天 1 次,连续给药 14 d。

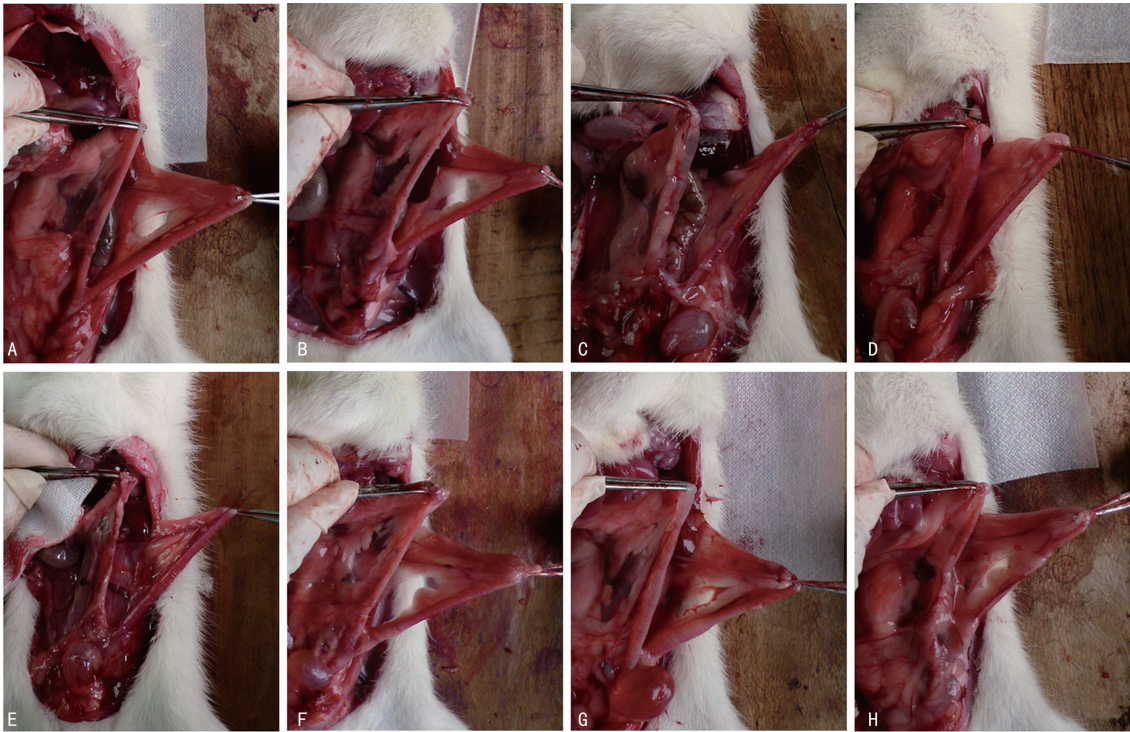
1.2.3 观察指标 (1)于第 15 天,大鼠麻醉后,腹主动脉采血,采用全自动血细胞分析流水线对大鼠血常规指标白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数等进行检测;采用血液流变分析仪检测大鼠全血黏度指标。(2)观察大鼠左右侧子宫的形态变化,并取两侧子宫分别称重,计算子宫肿胀率及肿胀抑制率;将右侧造模子宫用生理盐水漂洗去除血污后,分成 2 份,1 份组织浸泡于 4%多聚甲醛固定液中,进行苏木精-伊红(HE)染色及 Masson 染色;另 1 份组织以-80℃冻存,以备子宫组织匀浆等实验。光学显微镜下观察大鼠子宫切片;根据炎症的病变程度,每项为无(-)、轻度(+)、中度(++)和重度(+++),分别评分为 0、1、2、3 分^[4-5],观察大鼠子宫炎症细胞浸润情况、内膜充血水肿、上皮细胞增生、上皮细胞变性坏死及腔壁结构改变等,以各组评分之和进行统计学分析。(3)另外取 200 mg 大鼠子宫组织进行组织匀浆,取上清液进行 IL-1β、IL-4、IL-6 和 IL-10 水平测定。(4)子宫

肿胀率=(右侧子宫重量-左侧子宫重量)/左侧子宫重量×100%,肿胀抑制率=(模型组平均肿胀率-给药组平均肿胀率)/模型组平均肿胀率×100%。

1.3 统计学处理 所有数据均采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间病理评分采用 Kruskal-Wallis 秩和检验进行组间总体差异的比较,两两比较采用 2 个独立样本的秩和检验,并经 Bonfferoni 校正。两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,完全随机资料的多重比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐性采用 LSD-*t* 检验,方差不齐则先采用 Welch 法校正,再用 Dennett's *T*3 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠子宫形态的影响 肉眼观察各组大鼠子宫形态(图 1),可见模型对照组大鼠右侧子宫末端膨大积水,宫腔内可见黄色脓液或清亮液体、子宫细长、管壁变薄、浆膜面明显肿胀、颜色暗红,盆腔脏器粘连充血严重。菝葜总黄酮各剂量组大鼠子宫充血水肿,与周围结缔组织粘连情况均有不同程度改善。尤其以菝葜总黄酮高剂量组的效果最好,宫腔内未见黄色液体,浆膜面未见明显肿胀,子宫与盆腔结缔组织粘连较轻。而金刚藤胶囊组大鼠子宫水肿的情况并未得到很好改善,并且子宫与盆腔结缔组织粘连。地塞米松组降低了大鼠子宫的充血水肿,但改善子宫粘连的效果不明显,子宫与盆腔结缔组织粘连严重。



注:A.假手术组;B.本底对照组;C.模型对照组;D.菝葜总黄酮低剂量组;E.菝葜总黄酮中剂量组;F.菝葜总黄酮高剂量组;G.金刚藤胶囊组;H.地塞米松组。

图 1 各组大鼠子宫形态学变化

2.2 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠子宫肿胀率的影响 大鼠子宫注射苯酚胶浆后会引引起子宫肿胀度增加。与假手术组、本底对照组比较,模型对照组大鼠子宫肿胀程度明显增高,差异均有统计学意义($P<0.01$),菝葜总黄酮各剂量组均能不同程度地降低造模引起的子宫水肿,差异均有统计学意义($P<0.01$)。并且菝葜总黄酮各剂量组肿胀抑制率呈剂量依赖关系,尤以菝葜总黄酮中、高剂量组改善肿胀效果最好,并且菝葜总黄酮中剂量组与地塞米松组效果相当,差异无统计学意义($P>0.05$),而菝葜总黄酮高剂量组效果要优于地塞米松组与金刚藤胶囊组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠子宫肿胀率的影响($n=10$)		
组别	子宫肿胀率($\bar{x}\pm s, \%$)	肿胀抑制率($\%$)
假手术组	3.45 $\pm$ 0.63 ^{abc}	—
本底对照组	3.24 $\pm$ 0.42 ^{abc}	—
模型对照组	27.07 $\pm$ 1.24	—
菝葜总黄酮低剂量组	20.07 $\pm$ 0.89 ^{abc}	23.94
菝葜总黄酮中剂量组	14.95 $\pm$ 1.38 ^a	43.36
菝葜总黄酮高剂量组	8.15 $\pm$ 0.98 ^{abc}	69.12
金刚藤胶囊组	17.15 $\pm$ 1.59 ^a	35.01
地塞米松组	16.31 $\pm$ 1.56 ^a	38.19

注:—表示无此项;与模型对照组比较,^a $P<0.01$;与地塞米松组比较,^b $P<0.01$;与金刚藤胶囊组比较,^c $P<0.05$ 。

2.3 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠血常规的影响 模型对照组大鼠血液中白细胞数、淋巴细胞数及中性粒细胞数均显著高于假手术组及本底对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型对照组比较,菝葜总黄酮各剂量组大鼠血液中的白细胞数显著降低,

差异均有统计学意义($P<0.05$),且呈现一定的剂量依赖性;菝葜总黄酮中剂量组白细胞数与地塞米松组及金刚藤胶囊组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),菝葜总黄酮高剂量组对白细胞的抑制效果优于地塞米松组及金刚藤胶囊组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型对照组比较,菝葜总黄酮高、中剂量组大鼠血液淋巴细胞数显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),且呈现一定的剂量依赖性;菝葜总黄酮高剂量组对淋巴细胞的抑制效果优于地塞米松组及金刚藤胶囊组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型对照组比较,菝葜总黄酮各剂量组大鼠血液中性粒细胞数显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),且呈现一定的剂量依赖性;菝葜总黄酮低、中剂量组大鼠血液中性粒细胞数与地塞米松组、金刚藤胶囊组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),菝葜总黄酮高剂量组对中性粒细胞的抑制效果优于地塞米松组及金刚藤胶囊组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.4 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠血液流变学的影响 与假手术组、本底对照组比较,模型对照组大鼠各项血液流变学指标均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$),菝葜总黄酮各剂量组均能不同程度地降低 CPID 模型大鼠的全血黏度,差异均有统计学意义($P<0.05$),并且呈剂量依赖关系。金刚藤胶囊组与地塞米松组也能显著降低 CPID 模型大鼠的血液流变学指标,差异均有统计学意义($P<0.05$)。菝葜总黄酮中剂量组降低 BGH60 与 BGH100 的效果与地塞米松组及金刚藤胶囊组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。菝葜总黄酮高剂量组降低 BGH10 与 BGH60 的效果优于地塞米松组、金刚藤胶囊组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 2 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠血常规的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)			
组别	白细胞($\times 10^9 L^{-1}$)	淋巴细胞($\times 10^9 L^{-1}$)	中性粒细胞($\times 10^9 L^{-1}$)
假手术组	4.72 $\pm$ 0.79 ^{bde}	2.42 $\pm$ 0.13 ^{bde}	1.64 $\pm$ 0.28 ^{bde}
本底对照组	4.71 $\pm$ 0.63 ^{bde}	2.47 $\pm$ 0.32 ^{bde}	1.45 $\pm$ 0.33 ^{bde}
模型对照组	9.98 $\pm$ 0.90	5.41 $\pm$ 0.45	3.96 $\pm$ 0.42
菝葜总黄酮低剂量组	7.59 $\pm$ 0.88 ^{ac}	4.18 $\pm$ 0.97 ^{ce}	2.82 $\pm$ 0.37 ^a
菝葜总黄酮中剂量组	6.42 $\pm$ 0.81 ^{ab}	3.12 $\pm$ 0.38 ^b	2.51 $\pm$ 0.25 ^a
菝葜总黄酮高剂量组	5.64 $\pm$ 0.22 ^{ace}	2.85 $\pm$ 0.36 ^{bde}	2.15 $\pm$ 0.30 ^{ace}
金刚藤胶囊组	6.91 $\pm$ 0.62 ^b	3.44 $\pm$ 0.64 ^b	2.49 $\pm$ 0.75 ^b
地塞米松组	6.44 $\pm$ 0.75 ^b	3.31 $\pm$ 0.63 ^b	2.46 $\pm$ 0.67 ^b

注:部分组别存在大鼠采血量不够或血液凝固问题,缺失部分数据,则 $n=8$;与模型对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与地塞米松组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与金刚藤胶囊组比较,^e $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠子宫组织病理学检查结果 HE 染色结果表明(图 2):假手术组及本底对照组大鼠子宫内

膜无充血、水肿,无炎症细胞浸润。模型对照组大鼠子宫内

膜充血、水肿,并有大量炎症细胞浸润,以中性

粒细胞、浆细胞及淋巴细胞浸润为主。子宫内膜纤维结缔组织增生,部分腺体坏死并被纤维结缔组织填充;菝葜总黄酮各剂量组与模型对照组比较,基本病变情况相同,均可见炎症细胞浸润等症状,但减轻程

度明显不同。对子宫组织切片进行病理评分,各组间比较,差异有统计学意义($\chi^2=230.494, P<0.001$),两两比较经 Bonferroni 校正:与模型对照组比较,菝葜总黄酮各剂量组均能显著改善子宫组织病变症状(减轻子宫充血、水肿,减少炎症细胞浸润,减轻腺体周围纤维结缔组织增生),差异均有统计学意义($P<$

0.05);菝葜总黄酮各剂量组病理评分与地塞米松组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),而菝葜总黄酮高剂量组病理评分明显优于金刚藤胶囊组,差异有统计学意义($P<0.05$),但菝葜总黄酮中、低剂量组病理评分与金刚藤胶囊组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 3 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠血液流变学的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	全血黏度 (mPa·s)			
	BGH10	BGM60	BGH100	BGH150
假手术组	11.97±1.57 ^{bd}	6.51±0.91 ^{bd}	5.98±0.74 ^b	5.37±0.37 ^{bd}
本底对照组	11.99±1.36 ^{bc}	6.64±0.63 ^{bc}	5.94±0.58 ^b	5.33±0.51 ^{bd}
模型对照组	16.40±1.31	8.78±0.69	7.28±0.76	7.09±0.34
菝葜总黄酮低剂量组	14.57±1.50 ^a	7.63±1.09 ^a	6.70±0.82 ^a	6.55±0.75 ^a
菝葜总黄酮中剂量组	12.64±1.10 ^{ac}	7.32±0.67 ^a	6.34±0.31 ^a	5.85±0.38 ^a
菝葜总黄酮高剂量组	11.55±1.69 ^{ace}	6.35±0.75 ^{ace}	6.06±0.58 ^a	5.69±0.36 ^{ac}
金刚藤胶囊组	13.69±2.94 ^b	7.45±0.80 ^b	6.48±0.74 ^a	6.10±0.47 ^b
地塞米松组	14.39±0.86 ^a	7.88±0.62 ^a	6.39±0.62 ^a	6.30±0.64 ^b

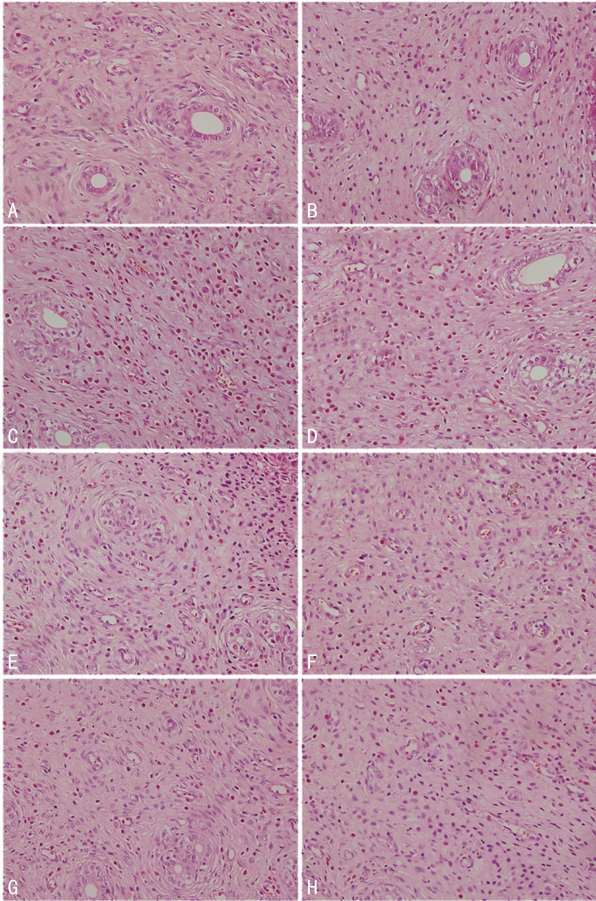
注:部分组别存在大鼠采血量不够或血液凝固问题,缺失部分数据,则 $n=8$;与模型对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与地塞米松组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与金刚藤胶囊组比较,^e $P<0.05$ 。

表 4 菝葜总黄酮对 CPID 模型大鼠子宫组织病理评分的影响($n=10$)

组别	病理评分(分)				
	0	1	2	3	平均等级
假手术组	42	8	0	0	75.04 ^{bcd}
本底对照组	46	4	0	0	65.52 ^{bcd}
模型对照组	3	4	6	37	326.70 ^{cd}
菝葜总黄酮低剂量组	3	15	25	7	252.80 ^a
菝葜总黄酮中剂量组	4	26	15	5	219.58 ^b
菝葜总黄酮高剂量组	7	34	9	0	179.04 ^{bd}
金刚藤胶囊组	2	21	24	6	248.96 ^a
地塞米松组	4	18	24	4	236.36 ^b

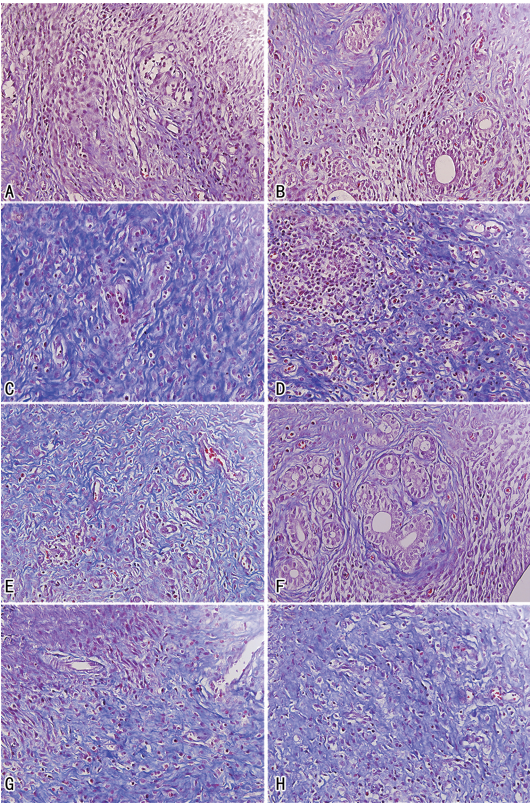
注:与模型对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与地塞米松组比较,^c $P<0.01$;与金刚藤胶囊组比较,^d $P<0.05$ 。

Masson 染色结果表明(图 3):假手术组及本底对照组子宫内膜腺上皮结构清晰,形态正常,无纤维化组织增生。而模型对照组子宫内膜间质及腺上皮周围有大量纤维组织增生。给予不同剂量菝葜总黄酮治疗后,纤维组织增生均有不同程度减轻,其中菝葜总黄酮中、高剂量组效果最好。对子宫 Masson 染色图片积分光密度(OD)值进行半定量分析:与模型对照组比较,菝葜总黄酮各剂量组均能显著改善子宫内膜的增生和纤维化情况,差异均有统计学意义($P<0.01$),且 OD 值呈剂量依赖性降低,菝葜总黄酮中、高剂量组显著优于金刚藤胶囊组、地塞米松组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表 5。



注:A.假手术组;B.本底对照组;C.模型对照组;D.菝葜总黄酮低剂量组;E.菝葜总黄酮中剂量组;F.菝葜总黄酮高剂量组;G.金刚藤胶囊组;H.地塞米松组。

图 2 各组大鼠子宫组织病理学检查结果(HE 染色,400×)



注：A. 假手术组；B. 本底对照组；C. 模型对照组；D. 菝葜总黄酮低剂量组；E. 菝葜总黄酮中剂量组；F. 菝葜总黄酮高剂量组；G. 金刚藤胶囊组；H. 地塞米松组。

图 3 各组大鼠子宫组织病理学检查结果 (Masson 染色, 400×)

2.6 菝葜总黄酮对 CPID 大鼠子宫组织炎症因子的影响 与假手术组及本底对照组比较,模型对照组大鼠子宫组织 IL-1β 及 IL-6 表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。菝葜总黄酮高、中剂量组 IL-1β 及 IL-6 表达水平均显著低于模型对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$),且呈剂量依赖性降低;菝葜总黄酮高剂量组 IL-1β 及 IL-6 表达水平显著低于

地塞米松组,差异均有统计学意义($P<0.01$),但与金刚藤胶囊组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与假手术组及本底对照组比较,模型对照组大鼠子宫组织 IL-4 及 IL-10 表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型对照组比较,菝葜总黄酮各剂量组均能显著增加抗炎细胞因子 IL-4 在大鼠子宫组织中的表达水平,差异均有统计学意义($P<0.01$),且呈剂量依赖性升高;菝葜总黄酮高剂量组 IL-4 表达水平显著高于地塞米松组与金刚藤胶囊组,差异均有统计学意义($P<0.01$),菝葜总黄酮中剂量组 IL-4 表达水平与地塞米松组及金刚藤胶囊组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。菝葜总黄酮高、中剂量组 IL-10 表达水平均显著高于模型对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$),而菝葜总黄酮低剂量组 IL-10 表达水平与模型对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);菝葜总黄酮高剂量组 IL-10 表达水平显著高于地塞米松组与金刚藤胶囊组,差异均有统计学意义($P<0.01$),菝葜总黄酮中剂量组 IL-10 表达水平与地塞米松组、金刚藤胶囊组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 6。

表 5 各组大鼠子宫组织 Masson 染色 IOD 值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IOD (%)
假手术组	10	0.162±0.014 ^{abc}
本底对照组	10	0.164±0.013 ^{abc}
模型对照组	10	0.768±0.027
菝葜总黄酮低剂量组	10	0.645±0.024 ^a
菝葜总黄酮中剂量组	10	0.442±0.030 ^{abc}
菝葜总黄酮高剂量组	10	0.269±0.016 ^{abc}
金刚藤胶囊组	10	0.535±0.028 ^a
地塞米松组	10	0.511±0.022 ^a

注：与模型对照组比较,^a $P<0.01$;与地塞米松组比较,^b $P<0.01$;与金刚藤胶囊组比较,^c $P<0.05$ 。

表 6 菝葜总黄酮对 CPID 大鼠子宫组织炎症因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
假手术组	196.86±15.26 ^{acd}	463.77±22.95 ^{acd}	12.43±0.81 ^{acd}	67.60±5.55 ^{acd}
本底对照组	202.18±17.22 ^{acd}	465.61±28.33 ^{acd}	12.47±0.79 ^{acd}	66.01±7.66 ^{acd}
模型对照组	347.40±16.72	1182.01±166.58	3.46±0.55	39.12±2.62
菝葜总黄酮低剂量组	308.25±19.31 ^{cd}	1011.44±192.27 ^d	4.52±0.43 ^{acd}	38.51±5.65 ^{bd}
菝葜总黄酮中剂量组	289.71±16.64 ^{ad}	765.13±81.55 ^a	5.71±0.52 ^a	47.68±5.04 ^a
菝葜总黄酮高剂量组	242.84±12.58 ^{ab}	566.01±56.46 ^{ab}	8.57±0.71 ^{acd}	54.18±2.65 ^{acd}
金刚藤胶囊组	252.63±19.21 ^{ac}	645.21±98.81 ^a	5.42±0.82 ^a	46.20±6.19 ^a
地塞米松组	278.87±7.81 ^a	742.38±108.99 ^a	5.83±0.93 ^a	44.19±6.31 ^a

注：与模型对照组比较,^a $P<0.01$;与地塞米松组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与金刚藤胶囊组比较,^d $P<0.05$ 。

3 讨 论

CPID 由于其病程长、治愈率低、后遗症多和复发率高等临床特点,目前临床缺乏有效的治疗手段与方法。而中医药在治疗妇科疾病方面具有独特优势,金

刚藤(亦称菝葜)胶囊,作为单方制剂,在临床治疗 CPID 方面已使用多年,在抗生素(单用或联用)或其他方法疗效不佳的情况下,仍能显示其良好临床疗效。但是传统中药也有服用剂量大、物质基础不明确的缺点,

已成为制约中医药现代化和国际化的“瓶颈”。因此,开发莼蕒有效部位制剂,并对其治疗 CPID 的药效进行考察是实现中药现代化的重要途径。

为排除药物本身对大鼠的影响,本研究设置了本底对照组,给予高剂量的莼蕒总黄酮,以观察莼蕒总黄酮的安全性。本研究结果表明,本底对照组大鼠的血液学指标、血常规指标及病理切片评分等,均与假手术组无明显差别。这也充分表明了莼蕒总黄酮并无明显毒性反应,对本研究中苯酚胶浆造模所引起的各项指标与病理改变均无明显的干扰作用,可以客观反映和评价莼蕒总黄酮对 CPID 模型大鼠的治疗作用。课题组前期也对莼蕒活性成分的安全性进行了研究,给予昆明小鼠灌胃给药相当于成人临床用药量 64 倍的莼蕒活性部位 14 d,实验小鼠未发生不良反应,提示莼蕒有效成分在相当大的治疗剂量范围内是安全的^[10]。此外,本研究采用金刚藤胶囊与地塞米松双阳性对照。金刚藤胶囊作为治疗 CPID 的单方中药制剂,在临床已经使用多年,效果确切。由于 CPID 多为急性盆腔炎后的无菌性炎症,选用抗生素作为阳性对照并不合适,而目前西药治疗 CPID 尚无特殊有效的方法,因此,本研究选择了甾体类抗炎药物作为阳性对照药。本研究结果显示,高、中、低剂量的莼蕒总黄酮对 CPID 均有较好的治疗作用,尤其是莼蕒总黄酮高剂量组明显优于金刚藤胶囊组及地塞米松组,尽管莼蕒总黄酮中剂量组与金刚藤胶囊组相比无统计学差异,但不管是子宫肿胀度还是血常规及血液流变学指标,其绝对值均优于金刚藤胶囊组。莼蕒总黄酮低剂量组的效果劣于金刚藤胶囊组,表明尽管黄酮类成分为莼蕒治疗 CPID 的主要活性成分,在治疗 CPID 中发挥主要作用,但可能存在其他活性成分也参与了 CPID 治疗的情况。有研究结果表明,莼蕒多糖类成分也可降低 CPID 模型大鼠的全血黏度^[11],通过抑制炎症介质分泌、调节细胞免疫功能的作用机制来发挥治疗 CPID 的作用^[12]。提示了单一成分的黄酮类成分可能没有多个部位组成的有效部位群的治疗作用好。因此,后续可以进一步研究开发物质基础明确莼蕒多部位群制剂。

在 CPID 的病变部位常观察到大量的炎症细胞聚集,包括巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞等^[13-15],同时伴随着各种细胞因子的异常表达。炎症细胞在这些致炎因子及趋化因子的趋化下,进一步产生和分泌更多的致炎因子,最终导致炎症反应的持续与级联放大,最终激活炎症病理性损伤,导致纤维化增生^[2]。这也与本研究结果一致,模型对照组大鼠子宫有大量炎症细胞浸润,子宫内膜纤维结缔组织增生,部分腺体坏死并被纤维结缔组织填充;而莼蕒总黄酮各剂量组均能显著降低 CPID 大鼠血液中的白细胞数、淋巴细胞数、中性粒细胞数,减轻大鼠全身炎症反应;并且能显著抑制 CPID 大鼠子宫组织炎症细胞浸润及胶原增

生,改善局部的充血水肿。提示莼蕒总黄酮能够通过减轻 CPID 模型大鼠全身及子宫组织局部炎症反应,抑制胶原增生,从而发挥治疗 CPID 的作用。

大量研究表明,在 CPID 及其他女性生殖道感染中,多种炎症因子的表达均有异常,在 CPID 发病及进展中起关键作用^[16-17]。IL-1 β 及 IL-6 可以直接激活免疫细胞,激活细胞信号传导通路,扩大炎症反应,形成级联式瀑布效应,加剧炎症进程^[18-19]。IL-4 及 IL-10 作为抗炎细胞因子,在免疫功能和炎症过程中具有重要的调节作用。IL-4 能抑制辅助性 T 淋巴细胞 1(Th1)的活化及发挥抗炎作用^[20],IL-10 能下调单核细胞表面主要组织相容性复合体 II 的表达,降低其抗原呈递作用,下调 T 淋巴细胞活性,抑制炎症细胞的激活、迁移和黏附^[21]。在实验性 CPID 模型大鼠子宫内,IL-1 β 及 IL-6 表达水平显著升高^[22],IL-4 及 IL-10 表达水平显著降低,而降低 IL-1 β 及 IL-6 表达水平、升高 IL-4 及 IL-10 表达水平能够减轻 CPID 大鼠炎症反应^[23]。而莼蕒总黄酮能显著降低子宫组织中致炎细胞因子 IL-1 β 与 IL-6 的表达水平,升高抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 的表达水平,通过抑制子宫组织致炎细胞因子的表达,升高抗炎细胞因子的表达,从而减轻子宫局部炎症,发挥治疗 CPID 的作用。而莼蕒总黄酮对炎症因子的影响可能与其中的活性成分密切相关。有研究结果显示,莼蕒总黄酮含量较多的落新妇苷及黄杞苷均有较好的抗炎作用,其中落新妇苷能抑制活化 T 淋巴细胞释放穿孔素和颗粒酶,使免疫反应由 Th1 型转向 Th2 型,进而通过抑制免疫反应达到抑制炎症的目的^[24-25];而黄杞苷能通过核因子 κ B(NF- κ B)及 MAPK 通路,有效减轻 CPID 模型大鼠及脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞的炎症反应^[2]。这些均说明了莼蕒总黄酮在治疗 CPID 抑制子宫炎症方面具有确切的效果。

近年来,有研究结果发现血流动力学异常也在 CPID 的发生、发展过程中起重要作用^[14]。炎症可以致瘀,又同时是瘀证的表现形式之一。在致炎细胞因子的刺激下,炎症局部可发生血流动力学和流变学改变,可使血流阻力增大,血液流动性降低,最终出现局部血流循环障碍,进一步加重局部组织的炎症损伤。既往研究证实,CPID 患者的血浆黏度、全血黏度及红细胞聚集指数等血流动力学指标均有明显异常,血液呈浓、黏、凝、滞状态^[26]。而现代药理研究证明,活血化瘀类中药能够改善盆腔局部的微循环和组织营养,降低血液黏度,增强血液流动性,调节合成代谢,促进炎症物质的消散吸收,松解瘢痕粘连^[27-28]。本研究结果表明,CPID 模型大鼠的各血液流变学指标明显升高,而莼蕒总黄酮能使大鼠各血液流变学指标均显著降低,增强血液流动性,较好地改善了 CPID 大鼠的血液黏度,并且其效果要明显优于金刚藤胶囊、地塞米松。

综上所述,炎症微环境下各种炎症因子对 CPID

的发生、形成与发展起到关键性作用。而通过调控这些炎症因子的表达,可以达到防治 CPID 的效果。菝葜总黄酮能够通过抑制炎症反应,减轻组织损伤,延缓 CPID 的进程,同时抑制子宫内胶原增生预防纤维化。本研究为菝葜总黄酮治疗 CPID 提供科学依据,为进一步开发菝葜有效部分制剂,实现中药现代化提供数据参考。

参考文献

[1] XU Y M, WU K Y, HAN S, et al. Astilbin combined with lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory B cells via the STAT 3 signalling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110450.

[2] WANG C M, LA L, FENG H X, et al. Aldose reductase inhibitor engeletin suppresses pelvic inflammatory disease by blocking the phospholipase C/protein kinase C-Dependent/NF-κB and MAPK cascades[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(42):11747-11757.

[3] KIM S R, SEONG K J, KIM W J, et al. Epigallocatechin gallate protects against Hypoxia-Induced inflammation in microglia via NF-κB suppression and Nrf-2/HO-1 activation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7):4004.

[4] 马云, 罗艳琴, 宋路遥, 等. 菝葜治疗慢性盆腔炎有效部位的药效学筛选研究[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(1):145-149.

[5] 罗艳琴, 马云, 宋路遥, 等. 菝葜活性成份对慢性盆腔炎大鼠子宫组织肿瘤坏死因子-α 和白介素-4 的影响[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(2):236-240.

[6] SONG L Y, TIAN L W, MA Y, et al. Protection of flavonoids from *Smilax China L.* rhizome on phenol mucilage-induced pelvic inflammation in rats by attenuating inflammation and fibrosis[J]. J Funct Foods, 2017, 28:194-204.

[7] FENG H X, HE Y L, LA L, et al. The flavonoid-enriched extract from the root of *Smilax China L.* inhibits inflammatory responses via the TLR-4-mediated signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 256:112785.

[8] FAN Y, XIANG H, LUO Y, et al. Preparative separation and purification of three flavonoids from the anti-inflammatory effective fraction of *Smilax China L.* by high-speed counter-current chromatography[J]. Separat Sci Technol, 2014, 49(13):2090.

[9] FAN Y Z, DUAN W J, LUO Y Q, et al. Preparative separation and purification of two fla-

vanols from *Smilax China L.* using high-speed counter-current chromatography[J]. Euro Food Res Technol, 2015, 240(1):33-39.

[10] 罗艳琴. 菝葜有效部位抗炎及其抗慢性盆腔炎的药效学筛选研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014.

[11] 梅明, 谢岱, 林世和, 等. 金刚藤多糖的水提工艺及影响大鼠慢性盆腔炎血液流变研究[J]. 中国药师, 2021, 24(8):436-439.

[12] 齐进, 崔颖娜. 金刚藤多糖对慢性盆腔炎大鼠炎症介质、细胞凋亡及免疫功能的影响[J]. 海南医学院学报, 2018, 24(13):1219-1221.

[13] 孙雁群, 赵瑞英, 何松芝, 等. 基于代谢组学的慢性盆腔炎发病机制研究[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(7):1610-1612.

[14] HILLIER S L, BERNSTEIN K T, ARAL S. A review of the challenges and complexities in the diagnosis, etiology, epidemiology, and pathogenesis of pelvic inflammatory disease[J]. J Infect Dis, 2021, 224(12 Suppl 2):S23-S28.

[15] DARVILLE T. Pelvic inflammatory disease due to neisseria gonorrhoeae and chlamydia trachomatis: Immune evasion mechanisms and pathogenic disease pathways[J]. J Infect Dis, 2021, 224(12 Suppl 2):S39-S46.

[16] 石磊, 刘李文姬. 通元针法联合温针灸治疗气带血瘀型慢性盆腔炎的疗效及对血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平影响[J]. 四川中医, 2021, 39(12):202-204.

[17] ZHAO C, LI J, CAI H, et al. An injectable hydrogel scaffold with IL-1β-activated MSC-derived exosomes for the treatment of endometritis[J]. Biomater Sci, 2023, 11(4):1422-1436.

[18] VAN SNICK J. Interleukin-6: An overview[J]. Annu Rev Immunol, 1990, 8:253-278.

[19] MANTOVANI A, DINARELLO C A, MORGORA M, et al. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity[J]. Immunity, 2019, 50(4):778-795.

[20] GARTNER Y, BITAR L, ZIPP F, et al. Interleukin-4 as a therapeutic target[J]. Pharmacol Ther, 2023, 242:108348.

[21] SARAIVA M, VIEIRA P, O'GARRA A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10[J]. J Exp Med, 2020, 217(1):e20190418.

[22] 马慧敏, 杨丽红, 金瑞林, 等. 慢性盆腔炎模型大鼠中 miR-29 及炎症信号通路分子的表达水平及其作用机制研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(6):14-18.

3032-3036.

[6] CHENG Y, WANG Q M, LI K, et al. Anlotinib vs placebo as third- or further-line treatment for patients with small cell lung cancer: A randomised, double-blind, placebo-controlled Phase 2 study[J]. Br J Cancer, 2021, 125(3):366-371.

[7] 金晨星, 赵翌, 刘基巍. 安罗替尼在肺癌治疗中的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2022, 27(5): 460-466.

[8] 朱立建, 宋文灿, 鲍瑜, 等. 安罗替尼单药治疗多线治疗进展后晚期肺癌伴脑转移的疗效、安全性观察及 Kaplan-Meier 生存分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(10):1042-1045.

[9] 王伟, 刘娟. 三维适形放疗联合替莫唑胺化疗对恶性脑胶质瘤患者术后不良反应发生率及生存质量的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(10):1183.

[10] 连好瑾, 宋丽杰, 杨闵洁, 等. 卡培他滨联合替莫唑胺治疗晚期神经内分泌肿瘤的临床分析[J]. 中华消化杂志, 2019, 39(12):862-864.

[11] 朱正飞, 郑明英. 预防性脑放疗不能延长广泛期小细胞肺癌患者的总生存期[J]. 循证医学, 2017, 17(4):218-221.

[12] 周建西, 孙云川, 肖丽, 等. 局限期小细胞肺癌完全切除预后及脑转移高危因素分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2023, 32(3):207-214.

[13] 王静怡, 董量, 付浩宇, 等. 安罗替尼二三线治疗的广泛期小细胞肺癌患者预后分析[J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(1):38-41.

[14] AL-TOUBAH T, PELLE E, VALONE T, et al. Efficacy and toxicity analysis of capecitabine and temozolomide in neuroendocrine neoplasms[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 20(1):29-36.

[15] 任玉莲, 王磊, 孙建光. 替莫唑胺联合安罗替尼化疗后肝损伤 1 例并文献复习[J]. 中国医药导报, 2021, 18(18):176-178.

[16] 祁清华, 王银华. 安罗替尼联合替莫唑胺治疗复发性胶质母细胞瘤 1 例[J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(24):1291-1292.

[17] 王朝杰, 阴明妹, 赵正, 等. 安罗替尼联合替莫唑胺治疗复发性高级别脑胶质瘤疗效观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2022, 36(9):942-946.

[18] 吕雪彤. 局限期小细胞肺癌预防性脑照射对生存影响的回顾性分析[D]. 济南: 山东大学, 2019.

[19] RECK M, MOK T S K, MANSFIELD A, et al. Brief report: Exploratory analysis of maintenance therapy in patients with Extensive-Stage SCLC treated first line with atezolizumab plus carboplatin and etoposide[J]. J Thorac Oncol, 2022, 17(9):1122-1129.

[20] 王朝杰, 阴明妹, 赵正, 等. 安罗替尼联合替莫唑胺治疗复发性高级别脑胶质瘤疗效观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2022, 36(9):942-946.

[21] 孙新苑, 何超然, 娄安琦, 等. 安罗替尼三线治疗晚期肺癌的临床疗效及安全性分析[J]. 临床药物治疗杂志, 2020, 18(4):54-57.

[22] 卢美君, 赵燕仪, 康马飞. 影响安罗替尼临床疗效和预后的多因素分析[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(10):1831-1835.

(收稿日期:2023-08-26 修回日期:2024-01-22)

(上接第 734 页)

[23] 王霞, 桑飞, 郭鑫, 等. 赤芍总苷对慢性盆腔炎大鼠炎症抑制作用及 NF- κ B 通路的调节作用研究[J]. 河北医药, 2022, 44(6):805-809.

[24] SHARMA A, GUPTA S, CHAUHAN S, et al. ASTILBIN: A promising unexplored compound with multidimensional medicinal and health benefits[J]. Pharmacol Res, 2020, 158:104894.

[25] DI T T, RUAN Z T, ZHAO J X, et al. Astilbin inhibits Th17 cell differentiation and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice via Jak3/Stat3 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 32: 32-38.

[26] 付杰, 李慧慧, 郝云云. 红藤汤加减保留灌肠联合甲硝唑、左氧氟沙星对湿热瘀结型慢性盆腔炎患者血液流变学及免疫功能的影响[J]. 妇儿健康导刊, 2023, 2(22):38-40.

[27] 杨崇一, 戴希望, 刘杰, 等. 除湿活血化癥方治疗慢性盆腔炎的疗效观察及对血液流变学、CRP 水平的影响[J]. 中国中医药科技, 2023, 30(6): 1159-1161.

[28] 周芳怡, 孙莉, 单建学, 等. 金英胶囊联合阿奇霉素对慢性盆腔炎患者盆腔血流动力学、炎症细胞因子和 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(13):2578-2581.

(收稿日期:2024-01-28 修回日期:2024-02-21)