

本文引用:史彦飞,谭枚秀,徐佳,刘奇英,廖杏.穿破石对SOI模型大鼠NF- κ B、MCP-1表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(9):939-942.

穿破石对SOI模型大鼠NF- κ B、MCP-1表达的影响

史彦飞¹,谭枚秀^{2*},徐佳¹,刘奇英²,廖杏¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙410005)

[摘要] **目的** 研究穿破石对输卵管炎性阻塞性不孕症(salpingitic obstructive infertility, SOI)模型大鼠核转录因子Kappa B(nuclear transcription factor Kappa B, NF- κ B)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)表达的影响。**方法** 采用金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和解脲支原体混合菌液接种法建立SOI大鼠模型。造模成功后,随机分成穿破石低、中、高剂量组,妇炎康软胶囊组,假手术组,模型组和空白组7组。予相应药物治疗30 d后,处死大鼠,取各组输卵管组织观察病理学改变,用免疫组化法检测各组大鼠输卵管组织中NF- κ B、MCP-1的表达。**结果** 肉眼观察,与模型组对比,穿破石低、中、高剂量组输卵管肿胀、充血现象均有不同程度减轻,其中,穿破石高剂量组输卵管结构较清晰。光镜下,穿破石低、中、高剂量均不同程度地改善大鼠输卵管组织炎症反应,促进其病变上皮细胞增生修复,减轻内膜充血水肿。与正常组比较,模型组输卵管组织中NF- κ B、MCP-1表达明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,穿破石高、中、低剂量组输卵管组织中NF- κ B、MCP-1表达均明显降低($P<0.01$)。**结论** 穿破石可促进受损组织与细胞的形态结构及其生理功能的恢复,其作用机制可能与抑制NF- κ B的异常活化,从而抑制MCP-1的转录合成有关。

[关键词] 穿破石;输卵管炎性阻塞性不孕;核转录因子Kappa B;单核细胞趋化蛋白-1

[中图分类号]R285.5;R271.14 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.09.005

Effects of Chuanposhi on the Expression of NF- κ B and MCP-1 in SOI Model Rats

SHI Yanfei¹, TAN Meixiu^{2*}, XU Jia¹, LIU Qiyang², LIAO Xing¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Chuanposhi on NF- κ B and MCP-1 level in rats with salpingitic obstructive infertility (SOI). **Methods** The SOI rat models were established by mixed bacteria suspension inoculation method of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Ureaplasma urealyticum*. The successful model rats were randomly divided into 7 groups including high, middle and low dosage of Chuanposhi groups, Fuyankang soft capsule group, sham-operation group, blank group. The model rats were killed after treatment with corresponding medicines for 30 days. Pathologic changes of fallopian tube were measured by a microscope. The NF- κ B and MCP-1 levels in SOI model rats were measured by immunohistochemical method. **Results** Visual inspection: the tubal swelling and hyperemia in high, medium and low dosage of Chuanposhi groups reduced in different degrees compared with those in the model group, and the structures in high dosage of Chuanposhi group were clear. Light microscopic inspection: the low, medium and high dosage of Chuanposhi could improve the oviduct tissue inflammation of rats in different degrees, promote its lesion repair of epithelial cell proliferation, alleviate congestion and edema. The expressions of NF- κ B and MCP-1 in model group were markedly higher than those in normal control group ($P<0.01$). The expressions of NF- κ B and MCP-1 in high, medium, low dosages of Chuanposhi groups model group were

[收稿日期]2017-02-21

[基金项目]湖南省中医药管理局课题(2015115)。

[作者简介]史彦飞,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治不孕不育症。

[通讯作者]* 谭枚秀,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:2373705848@qq.com。

significantly lower than those in the model group ($P<0.01$). **Conclusion** Chuanposhi could promote the recovery of morphology and physiological function of damaged tissues and cells. Its mechanism may be associated with inhibiting the NF- κ B abnormal activation and preventing the transcription of MCP-1 synthesis.

[**Keywords**] Chuanposhi; salpingite obstructive infertility; nuclear transcription factor Kappa B; monocyte chemotactic protein-1

近年来,随着人们生活、生育方式的改变及性传播疾病的增加,女性不孕不育症的发病率呈增长趋势^[1],而输卵管阻塞性不孕(salpingite obstructive infertility, SOI)是导致女性不孕的首要因素,约占女性不孕因素的 1/2^[2],严重降低女性生活质量,影响家庭和谐。通管方是名老中医谢剑南教授总结多年经验的有效验方,匡继林教授采用“通管方”为主治疗输卵管炎性不孕 60 例,总有效率、治愈率分别达 91.7%, 50%^[3]。而穿破石在通管方中剂量最大,活血化瘀、通经活络,是为君药。据此,本实验拟以 SD 大鼠为 SOI 模型,探讨其对 SOI 模型大鼠核转录因子 Kappa B (nuclear transcription factor Kappa B, NF- κ B)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)表达的影响,以期研发中药新药治疗 SOI 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 62 只, SPF 级, 体质量(180~200) g, 由长沙斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证号: SYXK(湘)2013-0005, 饲养于湖南中医药大学实验动物中心。

1.2 药品及试剂

妇炎康软胶囊(深圳市佳泰药业股份有限公司, 批号 161005), 穿破石配方颗粒(广东一方制药有限公司, 批号 6075082), 兔抗鼠 NF- κ B 多克隆抗体(购自武汉博士德生物工程有限公司), MCP-1 试剂编号 BA1254 试剂(购自武汉博士德生物工程有限公司), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 菌种号 ATCC25923), 大肠杆菌(*Escherichia coli*, 菌种号 ATCC25922), 由湖南中医药大学免疫与微生物教研室提供, 解脲脲原体(*M. urealyticum*, 菌种号 52022), 由湖南中医药大学第二附属医院检验科细菌室提供。

1.3 主要仪器

JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), HHS-2 电子恒温不锈钢水浴锅(上海南阳仪器

有限公司), LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司), Haier 医用微波炉(Haier 集团), MIAS 医学图象分析系统(北航公司产), S2-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂), Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司), DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司), Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

1.4 造模方法

参考文献[4]方法, 并加以改进。将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、解脲脲原体按 1:1:1 比例用无菌生理盐水配成 5×10^8 mL 的混合液。用注射器分别抽取等体积的混合菌液, 注入无菌培养皿中, 混合均匀。将医用明胶片剪成 0.5 cm \times 0.5 cm 大小, 置于注有混合菌液的培养皿中, 与混合菌液充分接触。待明胶充分饱和, 一手持鼠尾, 将大鼠倒立, 另一手夹含混合菌液的明胶海绵经阴道塞至大鼠宫腔内, 左右各塞 1 块, 并保持鼠倒立 1~2 min, 隔天 1 次, 连续 8 次。假手术组按相同方法塞入不含菌液的明胶海绵。造模结束 30 d 后, 随机从空白组、假手术组、模型组各抽取 2 只大鼠, 检验造模是否成功。

1.5 分组与给药

将成功建立的模型组大鼠按随机数字表法随机分为 7 组, 每组 8 只。穿破石组低、中、高剂量分别以 1.62 g/(kg \cdot d)、3.24 g/(kg \cdot d)、6.48 g/(kg \cdot d) 浓度灌胃, 妇炎康软胶囊组以 1.62 g/(kg \cdot d) 浓度灌胃, 模型组、空白组及假手术组分别给予蒸馏水灌胃, 灌胃容量 10 mL/kg, 1 次/d, 连续 30 d。

1.6 组织标本的处理

麻醉大鼠, 腹腔采血后, 解剖大鼠, 肉眼观察输卵管形态, 取大鼠双侧输卵管组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水、石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察输卵管组织的病理学改变。

1.7 输卵管组织 NF- κ B、MCP-1 表达的检测

免疫组化法检测 NF- κ B、MCP-1 的表达脱蜡、水化组织切片, 对组织切片进行预处理, 3% H_2O_2 去离子水孵育 1 min; PBS 冲洗, 2 min \times 3 次; 滴加一

抗,37℃孵育2h,PBS冲洗,2min \times 3次;滴加试剂 Polymer Helper,37℃孵育20min,PBS冲洗,2min \times 3次;滴加试剂 Polymeroxidase-anti-mouse/rabbitIgG,37℃孵育20min,PBS冲洗,2min \times 3次;应用 DAB 溶液显色;自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。在200倍光镜下,每张切片随机检测3个视野,使用高清晰度彩色医学图像分析系统评价 NF- κ B、MCP-1 蛋白表达水平。

1.8 统计学处理分析方法

采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行数据处理,各组数据“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,首先进行方差齐性检验,若呈正态分布,则采用单因素方差分析及多重比较,若呈非正态分布,则采用秩和检验。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

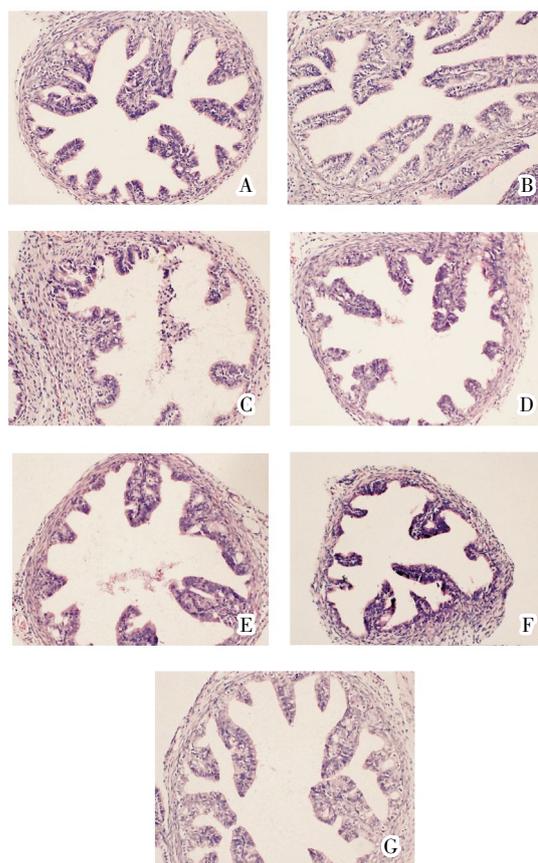
2 结果

2.1 肉眼下观察输卵管组织

正常组、假手术组大鼠输卵管大小、形态正常,结构清晰,浆膜无明显充血及水肿,与盆腔周围组织无粘连。模型组大鼠输卵管组织明显肿胀、充血,结构扭曲,与卵巢及周围组织粘连紧密不易分离,部分可见积水或积脓。给予穿破石治疗后,低剂量组大鼠输卵管增厚,组织粘连,部分输卵管可见积水或积液;中剂量组大鼠输卵管轻微增厚,轻微组织粘连,少部分可见少许积液;高剂量组大鼠输卵管部分轻微增厚,偶可见轻微组织粘连及少许积液。妇炎康软胶囊组大鼠输卵管轻微增厚,部分组织粘连。

2.2 光镜下观察输卵管组织

正常输卵管壁由黏膜层、肌层、浆膜层三层构成。黏膜层主要由单层纤毛柱状上皮细胞组成。空白组和假手术组大鼠输卵管管壁组织结构清晰,黏膜上皮细胞排列整齐,纤毛丰富,管腔通畅。模型组大鼠输卵管管壁结构分界不清,黏膜上皮细胞排列紊乱,呈卵圆形,可见裸露的细胞核,表面纤毛缺失,黏膜皱襞增宽、消失,坏死组织溶解吸收,大量炎性细胞浸润,大量结缔组织增生。给予妇炎康软胶囊治疗后,输卵管黏膜上皮细胞排列欠规整,少量纤毛脱落,可见纤维组织增生。给予穿破石治疗后,低剂量组大鼠输卵管壁各层结构分层不明显,纤毛脱落,炎性细胞浸润,少量结缔组织增生;中剂量组大鼠输卵管黏膜上皮细胞排列尚整齐,纤毛少量脱落;高剂量组大鼠输卵管管壁组织结构尚清晰,纤毛存在,管腔通畅,少量炎性细胞浸润。见图1。



注:A.空白组;B.假手术组;C.模型组;D.妇炎康软胶囊组;E.穿破石低剂量组;F.穿破石中剂量组;G.穿破石高剂量组

图1 各组大鼠输卵管组织病理变化光镜图(HE \times 200)

2.3 大鼠输卵管组织 NF- κ B、MCP-1 的表达

空白组与假手术组差异无统计学意义,与模型组存在显著性差异($P<0.01$),提示 SOI 大鼠模型复制成功;经治疗后,妇炎康软胶囊组、穿破石低、中、高剂量组与模型组比较,NF- κ B、MCP-1 表达均明显降低($P<0.01$),与妇炎康软胶囊组比较,穿破石低、高剂量组 NF- κ B 表达降低($P<0.05$),MCP-1 表达降低($P<0.01$, $P<0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠输卵管组织 NF- κ B、MCP-1 表达的比较

组别	n	($\bar{x}\pm s$, μm)	
		NF- κ B	MCP-1
空白组	8	0.21 \pm 0.02** $\Delta\Delta$	0.16 \pm 0.03** $\Delta\Delta$
假手术组	8	0.21 \pm 0.03** $\Delta\Delta$	0.17 \pm 0.03** $\Delta\Delta$
模型组	8	0.39 \pm 0.03 $\Delta\Delta$	1.31 \pm 0.07 $\Delta\Delta$
妇炎康软胶囊组	8	0.28 \pm 0.04**	0.60 \pm 0.04**
穿破石低	8	0.31 \pm 0.03** Δ	0.66 \pm 0.07** Δ
穿破石中	8	0.28 \pm 0.03**	0.61 \pm 0.03**
穿破石高	8	0.24 \pm 0.04** Δ	0.22 \pm 0.02** $\Delta\Delta$
F 值		35.483	66.886

注:与模型组比较,** $P<0.01$;与妇炎康软胶囊组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3 讨论

本研究建立经阴道塞入含有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、解脲脲原体的混合菌液明胶致炎模型,避免了传统细菌感染致炎法、机械刺激加细菌感染致炎法对实验的干扰,模拟人类生殖道上行性感染病程迁延导致的慢性炎症。模型动物显示:输卵管增粗肥大,与卵巢及周围组织粘连紧密不易分离,病理检验示输卵管各层特别是黏膜层均有广泛的淋巴细胞及浆细胞浸润,上皮细胞增生肥大;免疫组化示大鼠输卵管组织中 NF- κ B、MCP-1 表达显著升高,提示 SOI 模型复制成功。

NF- κ B 是调节趋化因子、黏附分子等表达的重要转录因子,参与炎症过程中的多种信号传导途径,主要趋化单核细胞和 T 淋巴细胞,诱导单核细胞、内皮细胞表达黏附分子,使各种细胞尤其是单核细胞向病变部位聚集^[5],从而扩大炎症反应^[6],其可有效反映炎症状态造成的机体损伤,因此检测价值也较高^[7-8]。目前认为,MCP-1 是介导单核巨噬细胞浸润的主要因子,而 MCP-1 的转录合成是由 NF- κ B 调控的。MCP-1 的基因启动子和增强子序列存在 NF- κ B 的结合位点。因此,NF- κ B 的异常活化可能是引起 MCP-1 表达增加的主要因素。本研究结果显示:模型组大鼠输卵管组织中 NF- κ B、MCP-1 水平均显著高于正常对照组及假手术组($P<0.01$),表明在 SOI 中机体炎症因子平衡被打破,导致炎症的发生和发展,引起组织损伤和纤维增生。予穿破石治疗后,大鼠输卵管组织中 NF- κ B、MCP-1 水平均有降低,使各炎症因子恢复到接近正常水平,与妇炎康软胶囊组相比,穿破石组大鼠炎症因子的恢复情况效果更优($P<0.05$)。

通管方是临床上治疗输卵管阻塞性炎性不孕症的有效方,穿破石作为通管方之君药,具有活血化瘀、通经活络之功效。实验研究发现,以穿破石为君药的通管方有良好的抗炎、抑菌及抑制解脲支原体生长的作用^[9]。现代药理学研究亦发现,穿破石对实验动物模型具有显著的镇痛抗炎作用^[10],但其作用

机制尚不明确。穿破石中富含黄酮、多糖等多种化学成分^[11],而程健等^[12]研究证实黄酮类化合物可通过对 NF- κ B 信号通路的抑制作用来抑制前炎症基因的表达,缓解炎症的发生发展。目前,国内对穿破石作用机制的研究较少,尤其是关于慢性输卵管阻塞性不孕的动物实验和临床研究。本研究发现,穿破石可有效抑制大鼠输卵管组织炎症反应,促进其病变上皮细胞增生修复,减轻浆膜充血水肿,显著降低输卵管组织中 NF- κ B、MCP-1 的表达,其具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李爱玲. 200 例女性不孕不育症病因分析[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(7): 417.
- [2] 王 燕, 肖盈盈, 匡继林. 匡继林治疗输卵管阻塞性不孕经验[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(2): 33.
- [3] 匡继林. 内外合治单纯输卵管炎性继发不孕 60 例[J]. 湖南中医药大学学报, 2003, 23(2): 42-43.
- [4] 李 鑫, 郭建生, 师振宇, 等. 妇科千金片对慢性盆腔炎大鼠血清炎症性细胞因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 225-228.
- [5] 娄桂予. MCP-1 及其在相关疾病中的治疗措施[J]. 生命的化学, 2004, 24(3): 238-240.
- [6] 陈艺菲, 蔡一铃. 盆腔炎患者血清 MCP-1、CRP、GM-CSF、前炎因子及血液流变学的变化研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(24): 2068.
- [7] 叶淑英, 曾素清. 盆腔炎患者外周血 MCP-1 测定及意义[J]. 中国计划生育和妇产科, 2010, 2(5): 71-72.
- [8] 席 凤, 赵 蕾, 李 萍. 桂枝茯苓胶囊对慢性盆腔炎患者血清 hs-CRP 和 MCP-1 的影响[J]. 兵团医学, 2013, 37(3): 30-32.
- [9] 罗 红. 通管丸的抗炎、抑菌及抑制解脲支原体的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013: 10-23.
- [10] 韦健全, 罗 莹, 黄 健, 等. 穿破石抗炎镇痛活性观察及最大给药量测定[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1589-1592.
- [11] 李 波, 翟延君. 柘树与枸棘中总黄酮及多糖含量比较[A]. 中国商品学会中药商品专业委员会. 第三届中国中药商品学术年会暨首届中药葛根国际产业发展研讨会论文集[C]. 长沙: 2012.
- [12] 程 健, 孔玲玲, 李红军, 等. 黄酮类化合物预防放射性肺损伤的分子机制[J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(8): 588-590.

(本文编辑 杨 瑛)