

·方药研究·

本文引用:刘文娥,张婉妮,周意,陈青.盆腔炎丸对小鼠解脲支原体感染生殖器组织学变化的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(10):1110-1114.

盆腔炎丸对小鼠解脲支原体感染生殖器组织学变化的实验研究

刘文娥¹,张婉妮²,周意²,陈青^{3*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院妇产科,湖南长沙410007;2.湖南中医药大学,湖南长沙410208;
3.湖南中医药大学第一附属医院感染科,湖南长沙410007)

〔摘要〕目的 观察盆腔炎丸对解脲支原体(*ureaplasma urealyticum*,UU)感染小鼠组织形态学的影响,初步探讨盆腔炎丸对UU感染的治疗机制。**方法** 采用皮下注射苯甲酸雌二醇,阴道接种解脲支原体标准菌株的方法,制备UU感染小鼠模型,造模组造模成功后随机分为中药组、西药组、模型组,另设空白组,前2组分别予以盆腔炎丸、克拉霉素,后2组予以等容量生理盐水灌胃,连续2周后观察小鼠一般情况、生殖器外观及镜下阴道、宫颈组织形态学及图像分析炎症细胞比例。**结果** 模型组小鼠一般情况欠佳,外阴溃烂明显,溃烂面积大,阴道分泌物明显增加;中药组、西药组小鼠一般情况可,阴道分泌物增加,外阴红肿,部分可见溃烂,面积较小。模型组小鼠阴道、子宫充血水肿,宫颈肥大,输卵管积水,增粗,弹性差,僵硬,个别出现盆腔粘连;中药组以疏松水肿为主,西药组充血水肿,程度较轻。镜下观察:模型组小鼠可见阴道黏膜、间质层不同程度中性粒细胞浸润,黏膜层、间质明显疏松水肿,宫颈腺体扩张或增生,黏膜及黏膜下组织可见嗜酸性粒细胞及浆细胞浸润。与模型组相比,中药组阴道组织及宫颈组织炎症明显消退,炎症细胞比例差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 盆腔炎丸可改善动物一般情况,减轻UU感染小鼠阴道组织损伤程度及宫颈组织炎症。

〔关键词〕 盆腔炎丸;解脲支原体;阴道;宫颈;组织形态

〔中图分类号〕R285.5;R711.3

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.10.004

Effect of Penyan Pill on Changes in Genital Histology in Mice Infected with *Ureaplasma urealyticum*

LIU Wen'e¹, ZHANG Wann², ZHOU Yi², CHEN Qing^{3*}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of Penyan Pill on genital histomorphology in mice infected with *Ureaplasma urealyticum* (UU), and to preliminarily investigate the therapeutic mechanism of Penyan Pill on UU infection. **Methods** A UU-infected mouse model was established by subcutaneous injection of estradiol benzoate and vaginal inoculation of standard UU strain. The model mice were randomly divided into traditional Chinese medicine (TCM) group, Western medicine group,

〔收稿日期〕2016-03-21

〔基金项目〕湖南省自然科学基金项目(2015JJ4040);湖南省科技厅项目(2012TT2024);湖南省中医药管理局项目(2016103)。

〔作者简介〕刘文娥,女,副主任医师,研究方向:妇科炎症性疾病中医药防治研究。

〔通讯作者〕*陈青,女,主任护师,E-mail:liuwene@163.com。

and model group, and a blank group was set; these mice were given Penyan Pill, clarithromycin, the same volume of saline, and the same volume of saline by gavage, respectively. After two weeks of treatment, the general status, genital appearance, and the microscopic morphology of the vagina and cervical tissue were observed, and the proportions of inflammatory cells were analyzed by Motic image analysis software. **Results** Compared with the blank group, the model group had a poor general status, obvious and large vulva ulceration, and significantly increased vaginal discharge; the TCM group and the Western medicine group had a fair general status, increased vaginal discharge, red and swollen vulva, and small ulceration in some vulvas. Compared with the blank group, the model group had hyperemia and edema of the vagina and uterus, cervical hypertrophy, hydrosalpinx, enlargement, poor elasticity, and stiffness of the fallopian tube, and pelvic adhesion in some mice; the TCM group mainly had loosening and edema of the vagina and uterus; the Western medicine group had mild hyperemia and edema of the vagina and uterus. Compared with the blank group, the model group had varying degrees of neutrophil infiltration in the vaginal mucosa and mesenchyme, obviously loose and swollen mucous membrane and mesenchyme, enlargement or hyperplasia of the cervical gland, and eosinophils and plasma cell infiltration in the cervical mucosal and submucosal tissue. Compared with the model group, the TCM group had significantly obvious inflammation resolution in the vaginal tissue and cervical tissue ($P < 0.01$). There were significant differences in the proportions of inflammatory cells between the model group and the TCM group ($P < 0.01$). **Conclusion** Penyan Pill can improve general status and reduce damage of the vaginal tissue and inflammation of the cervical tissue in UU-infected mice.

[**Keywords**] Penyan Pill; *Ureaplasma urealyticum*; vagina; cervix; histomorphology

解脲支原体 (*ureaplasma urealyticum*, UU) 是一种条件致病性微生物, 在成年女性生殖道内有一定的定植率。当女性生殖道免疫力下降或黏膜受损时, 潜伏在生殖道的 UU 可大量繁殖而致病。近年来, UU 发病率越来越高, 而治疗难度也越来越大。一方面大部分女性感染 UU 后并无症状, 或只有轻度的疼痛、白带增多等症状, 造成很多女性患者误诊或漏诊, 引发宫颈炎、尿道炎、盆腔器官炎症改变^[1], 甚至导致不孕^[2]、复发性流产^[3]、异位妊娠^[4]、及不良围产结局^[5]等。另一方面, 临床上对宫颈分泌物检测 UU 阳性的患者, 常盲目使用抗生素, 导致 UU 的耐药菌株不断增多, UU 发病率、复发率及耐药率逐年增高^[6-7], 给 UU 感染的彻底治疗带来了很大的困难。目前关于 UU 的研究很多, 但研究结果各不相同, 具体致病机制也未明确。UU 的治疗存在很多争议, 随着临床上抗生素滥用及耐药株的产生, 如何采取中医药诊治 UU 感染并探讨中医药治疗机制已经变得刻不容缓。

本课题组通过多年的临床研究发现采用益气化痰、清热解毒之盆腔炎丸治疗 UU 感染确有良效^[8-9], 但具体机制尚不明确, 本实验从组织形态学的角度观察盆腔炎丸对 BALB/c 雌性小鼠生殖道 UU 感染的作用, 探讨盆腔炎丸的疗效及作用机制, 现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠 40 只, 鼠龄 8 周, 雌性, SPF 级, 体重质量 (20 ± 2)g。购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证号: HNSLKJ20113382。实验前进行支原体检测阴性者方可使用。(预实验时造模过程中小鼠死亡率约为 20%, 故实验多备小鼠 8 只)。

1.2 实验药物

盆腔炎丸: 120 g/瓶, 由黄芪、丹参、莪术、白术、红藤等药组成, 由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供, 生产批号: 20120223。取盆腔炎丸 10 g 充分研磨溶散于 20 mL 蒸馏水内, 装入三角杯中并在电炉上加热至沸腾, 盖好橡皮塞, 以 2 000 r/min 的速度离心, 制备成混悬液, 即 1 mL 水含生药 0.5 g, 备用。苯甲酸雌二醇注射液: 4 mg/mL, 由苏州市苏牧动物药业有限公司生产, 批号: 20120301。克拉霉素胶囊: 0.25 g/粒, 由江苏方强制药厂有限公司生产, 批号: 20120326。

1.3 实验菌株

UU 标准菌株 3 型, 由南华大学微生物学教研室提供。

1.4 培养基

UU 液体培养基: 珠海银科生物工程有限公司

生产。

1.5 主要仪器设备

SW-CJ-2D 超净工作台,苏州净化公司;HHQ-202 石蜡切片机,杭州爱普仪器;TCL16M 高速离心机,长沙湘仪贝克仪器仪表公司;IX2-ILL100 光学显微镜,日本 Olympus 公司;Motic 高清晰度彩色病理分析系统等。

2 实验方法

2.1 UU 感染液的制备及浓度测定

2.1.1 UU 感染液的制备 复苏冻存的 UU3 型菌液,取 0.2 mL 无菌接种于 UU 液体培养基,37 °C 恒温箱中培养,见培养基由黄变红,且液体澄清透亮无浑浊,可确认有 UU 生长,经转种 2~3 次后,取对数生长期菌液备用。

2.1.2 浓度测定 将上述培养基分装至 24 孔酶标板小孔中,每孔 0.9 mL,第一管中加入 0.1 mL 被检菌液,充分混匀,再吸取 0.1 mL 至第二孔,以此类推,10 倍递增稀释。置于 37 °C 恒温箱中培养 24 h,配成 1×10^5 CCU/mL 浓度备用。

2.2 造模方法

采用 Taylor-robinson D^[10]、刘弘等^[11]报道的造模方法。小鼠适应环境 1 周后,随机分为 2 组:空白组 8 只,UU 感染组 32 只。UU 感染组开始每周颈部皮下注射苯甲酸雌二醇注射液 1 次,剂量为 0.5 mg/只,连续 4 次。第 2 次雌激素处理 2 d 后阴道接种 UU 菌液。采用移液枪和一次性枪头,伸入小鼠阴道约 0.5 cm,取 50 μ L UU 菌液注入小鼠阴道,将小鼠倒立 5 min,待菌液被阴道黏膜完全吸收后,放回笼内,分笼饲养,每天 1 次,连续 3 d,第 7 天加强接种 1 次;空白组同时颈部皮下注射生理盐水及接种无 UU 液体菌培养基。

2.3 模型确认

在 UU 感染第 21 天通过肉眼观察、阴道分泌物 UU 培养及组织病理学检测等确认造模情况。从造模组中随机取出 2 只小鼠观察,小鼠一般情况表现为喜蜷卧,毛色黄、竖毛,食量减少,外阴红肿溃烂,分泌物增多;阴道分泌物 UU 培养为阳性;组织形态肉眼可见宫颈肥大,子宫充血水肿,输卵管迂曲僵硬、积水、弹性差等,病理学示间质疏松水肿、炎性细胞浸润、宫颈腺体扩张等,表明造模成功。

2.4 分组与干预

感染 UU 后第 22 天将 UU 感染组剩余小鼠随机分成 3 组:模型组、中药组、西药组,每组 9 只,每天分 2 次灌胃给药,连续 2 周。

小鼠灌胃量为 0.2 mL/d。参考黄继汉等^[12]文献计算小鼠药量,按照成人质量 60 kg 计算,盆炎丸成人用量为 0.5 g/(kg·d),小鼠用量为 6.17 g/(kg·d),则药物浓度为 0.3 g/mL。克拉霉素胶囊成人用量为 8.33 mg/(kg·d),小鼠用量为 102.7 mg/(kg·d),则药物浓度为 5 mg/mL。空白组、模型组分别给予等容量无菌生理盐水灌胃。

2.5 检测方法

2.5.1 一般情况 观察及记录各组小鼠活动度、饮食、毛发、外生殖道变化等情况。

2.5.2 组织肉眼观察 颈椎脱臼法处死小鼠,取出阴道、宫颈、子宫及输卵管等部位,观察其大体形态,如外观形状、色泽改变、与周围组织粘连情况、积水化脓、弹性变化等情况。

2.5.3 组织镜下观察 取小鼠新鲜阴道、宫颈、子宫组织镜下观察,甲醛固定,二甲苯透明浸腊,石蜡包埋,切片,HE 染色后,光学显微镜下观察组织形态学特点并采集数据,利用 Motic 图像分析系统计算组织炎症细胞所占比例。

2.6 统计学方法

实验数据使用 SPSS 21.0 进行处理,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。组间比较若满足正态性者,使用单因素方差分析,其中方差齐者采用 LSD 法,方差不齐者采用 Games-howell 法,不满足正态性资料用秩和检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

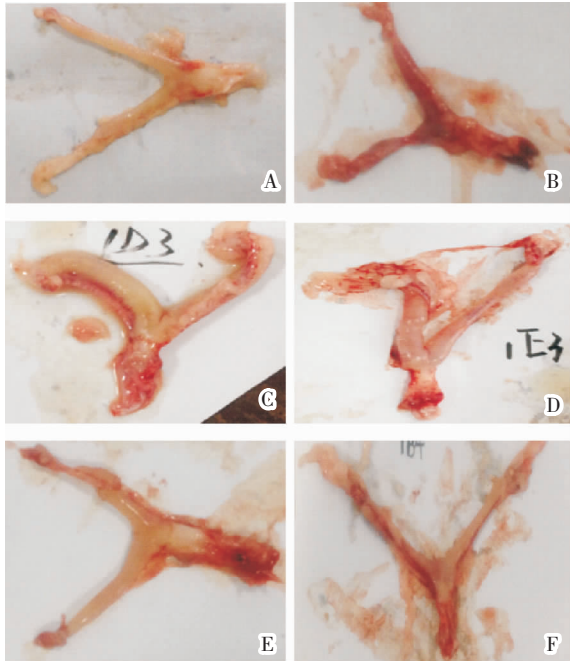
3.1 一般情况观察结果

模型组 2 只小鼠死亡,观察小鼠一般情况及结合解剖分析,死亡原因为急性感染所致。西药组 1 只小鼠灌胃后出现死亡,考虑灌胃针损伤气道所致。

模型组小鼠一般情况欠佳,喜蜷卧,食量减少,毛发发黄,竖毛,外阴溃烂明显,溃烂面积大,阴道分泌物明显增加;中药组、西药组小鼠一般情况可,食量可,毛发稍发黄,无竖毛,阴道分泌物增加,外阴红肿,部分可见溃烂,面积较小;空白组小鼠活跃,毛色光滑,外阴正常。

3.2 小鼠生殖器官组织形态学观察

肉眼可见空白组小鼠生殖道组织柔软,活动度好;模型组小鼠阴道、子宫充血水肿,宫颈肥大,输卵管积水,增粗,僵硬,弹性差,个别出现盆腔囊肿及盆腔粘连;中药组以疏松水肿为主;西药组充血水肿,程度较轻。见图 1。



注:A.空白组;B-D.模型组;E.中药组;F.西药组。

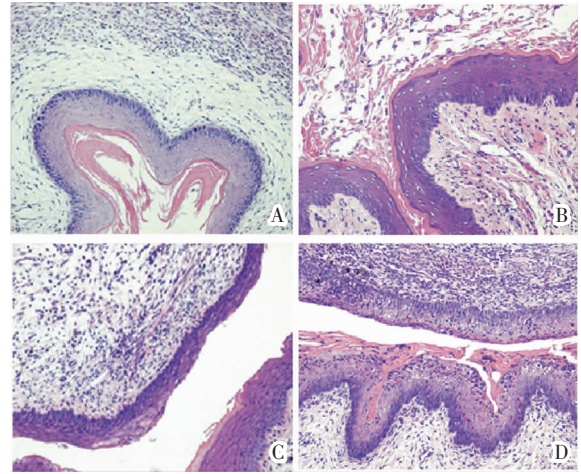
图 1 各组小鼠生殖器官肉眼观察结果

3.3 各组小鼠阴道组织病理学变化比较

HE 染色后,在光镜下观察可见:空白组小鼠阴道组织结构清晰,有少量炎症细胞,宫颈腺体内可见均匀粉染的分泌物,上皮细胞角化不全或过度;模型组小鼠可见黏膜、间质层不同程度中性粒细胞浸润,黏膜层、间质明显疏松水肿,宫颈腺体扩张或增生,黏膜及黏膜下组织可见嗜酸性粒细胞及浆细胞浸润。中药组病理损伤程度较模型组轻,炎性分泌物较少,宫颈腺体扩张不明显,以疏松组织水肿为主;西药组充血水肿程度较轻,宫颈腺体轻度扩张,炎性分泌物少。见图 2-3。

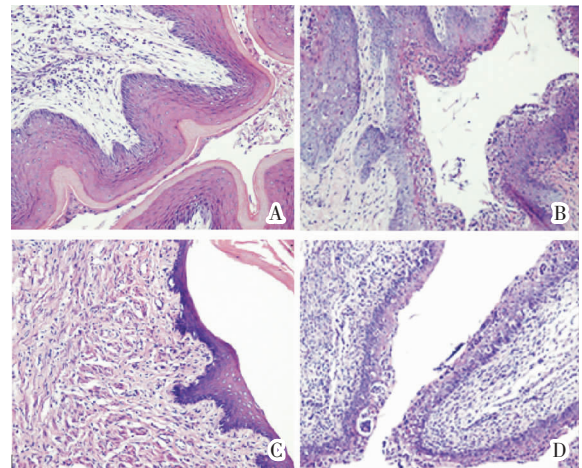
3.4 各组间炎症细胞比例比较

阴道组织模型组、宫颈组织模型组与空白组比较,均 $P < 0.01$,说明造模是成功的。阴道组织中药组、西药组与模型组比较,比值明显降低($P < 0.01$),宫颈组织中药组、西药组与模型组比较,比值明显降低($P < 0.01$)。见表 1。



注:A.空白组;B.模型组;C.中药组;D.西药组。

图 2 各组小鼠阴道组织病理观察光镜图(HE,×200)



注:A.空白组;B.模型组;C.中药组;D.西药组。

图 3 各组小鼠宫颈组织病理观察光镜图(HE,×200)

表 1 各组小鼠不同组织中炎症细胞所占比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	宫颈	阴道
空白组	8	12.32±0.89	3.69±0.72
模型组	9	26.28±0.63**	29.29±0.63**
中药组	9	17.13±0.77##	18.28±0.94##
西药组	9	17.42±0.65##	18.51±0.72##

注:与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医学古籍中并没有支原体感染的记载,根据其症状及影响,可归属于带下病、阴痒、盆腔炎等范畴。中医认为由虫毒感染所致,发病多由房事不洁,秽浊之邪上犯或湿热内生,湿浊下注膀胱所致,病程日久者可致脾肾亏虚,膀胱气化无权。其病性为本虚标实,以虚为本,湿热为标。

本课题组通过多年的临床研究认为支原体感染

虽与湿邪密切相关,但其病情缠绵难愈多与其“久病多虚”有关。《素问》有云:“正气存内,邪不可干”“邪之所凑,其气必虚”。说明人体发病与气虚关系密切,女性生殖道UU可正常存在,只有在机体抵抗力下降的情况下,支原体才会经破损的生殖道黏膜引起感染,这和中医所讲的气虚病机符合。人体气血,贵在流通,一受病邪,气血必碍,故临床中多以益气化瘀为治疗原则。

盆腔炎为湖南中医药大学第一附属医院自制药,多用于治疗女性生殖道感染性疾病,已在临床应用30余年,主要由黄芪、丹参、莪术、白术、红藤等组成。其中以黄芪为君,有益气固表、利水消肿、托毒排脓的作用,现代研究表明黄芪能增强机体免疫功能^[13],且有抗炎和较广泛的抗菌作用^[14]。白术为臣,能健脾益气、燥湿利水,现代研究表明白术具有免疫调节、扩张血管、抗炎抗菌等作用^[15]。丹参活血调经,祛瘀止痛,凉血消痈,能扩张血管,改善微循环,对体外的多种细菌有抑制作用^[16];红藤清热解毒、活血通络;莪术破血祛瘀,行气止痛,共为佐药,共奏行气益气、活血化瘀、清热解毒之效。全方扶正祛邪,攻补兼施从而达到使机体气血调畅,局部经络通顺,邪去病愈的目的。

本文研究中发现盆腔炎能改善动物一般情况,减轻生殖器组织损伤程度,在组织学水平上进一步肯定了盆腔炎治疗生殖道UU感染的疗效。研究以盆腔炎为干预药物,通过观察小鼠模型生殖系统组织学改变,研究盆腔炎对UU感染动物模型的治疗作用,分析盆腔炎的作用机制,在炎症细胞所占比例的图像分析中发现盆腔炎对阴道及宫颈组织的炎症修复有统计学意义,有待进一步验证。

参考文献:

[1] 杨 丽.妇科炎症患者解脲支原体与沙眼衣原体的感染情况研究

[J].中外医学研究,2018,3(16):179-171.

- [2] 梁玉玲,任 波.不育不孕夫妇生殖道衣原体和支原体感染检测分析 [J].医学信息,2016,29(15):229.
- [3] 王贵田.解脲支原体、沙眼衣原体感染与复发性自然流产的相关性分析[J].河南医学研究,2017,26(15):2794-2795.
- [4] 胡金群.输卵管妊娠与生殖道解脲支原体和沙眼衣原体感染的关系分析[J].实用妇科内分泌杂志,2017,6(4):109-110.
- [5] 娄琼琼.解脲支原体感染对胎膜早破及早产的影响分析[J].中外医学研究,2017,15(13):54-55.
- [6] 苗 慧,柳凤芝,齐志红.阿奇霉素联合阴道抑菌凝胶治疗女性生殖道解脲支原体感染的临床观察[J].现代药物与临床,2013,28(3):361-363.
- [7] 王国英,黄海平,周海燕.泌尿生殖道支原体感染三年检测及药敏分析[J].中国消毒学杂志,2015,32(8):830-831.
- [8] 刘文娥,谈珍瑜,夏如意,等.盆腔炎治疗女性生殖道解脲支原体感染气虚血瘀证的临床观察[J].中国中西医结合杂志,2013,33(5):590-593.
- [9] 夏如意,谈珍瑜,刘文娥,等.盆腔炎治疗多重耐药解脲支原体感染的临床观察[J].湖南中医药大学学报,2012,32(3):53-55.
- [10] TAYLOR-ROBINSON D, FURR P M. Observations on experimental colonisation of mice by ureaplasmas of human origin[J]. Med Microbiol 2002,51(10):866-870.
- [11] 刘 弘,赵 红,苑贺英,等.解脲支原体血清8型感染小鼠盆腔炎炎症性疾病模型的建立[J].中日友好医院学报,2011,25(2):98-100,121.
- [12] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [13] 王桂芬.中药黄芪的药理作用及临床应用效果观察[J].临床医药文献,2017,16(4):3115-3116.
- [14] 郑荣先.黄芪的药理作用及在临床中的应用研究[J].中国实用医药,2016,32(11):190-191.
- [15] 岳美颖,潘 媛,敖 慧.白术化学、药理与临床研究进展[J].亚太传统医药,2016,5(12):66-68.
- [16] 冯 彦.丹参的现代药理研究及临床应用[J].中医临床研究,2017,30(9):46-47.

(本文编辑 杨 璞)