

本文引用: 李 静, 余 涛, 齐耀群, 张小容, 戢佳慧, 李汉超. 三黄四物汤不同溶剂提取物的抗炎作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 2024-2031.

三黄四物汤不同溶剂提取物的抗炎作用研究

李 静*, 余 涛, 齐耀群, 张小容, 戢佳慧, 李汉超

九江学院附属医院, 江西 九江 332000

〔摘要〕 **目的** 探索三黄四物汤(SST)不同溶剂提取物的体外抗炎作用及其相关机制, 分析其主要成分与抗炎作用的关系, 并探索其体内抗炎作用。**方法** 通过制备三黄四物汤水提物(SSTW)及乙醇提取物(95%乙醇提取物 SSTE, 50%乙醇提取物 SSTWE); 采用高效液相色谱法(HPLC)分析其主要成分; 通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立炎症模型, 并采用苯酚胶浆法建立大鼠慢性盆腔炎(chronic pelvic inflammatory disease, CPID)模型; 使用 MTT 法检测细胞存活率, Griess 法检测 NO 水平, ELISA 法检测 PGE2、IL-6、TNF- α 水平, Western blot 法检测 COX-2、iNOS 及 MAPKs 通路、NF- κ B 通路相关蛋白表达水平, 并通过病理切片观察大鼠子宫病理改变。**结果** SSTWE 0.78-25 μ g/mL 组与正常组相比, 细胞存活率无显著差异($P>0.05$)。SSTWE 12.5 μ g/mL 抗炎作用弱于 SSTE 而类似于 SSTW, SSTWE 25 μ g/mL 抗炎作用强于 SSTW 而类似于 SSTE。SSTW、SSTE 和 SSTWE 均明显降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达($P<0.05$); SSTWE 明显降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 ERK 磷酸化蛋白表达、I κ B- α 磷酸化蛋白表达及细胞核中 p65 蛋白表达, 同时增加 I κ B- α 总蛋白表达及细胞质中 p65 蛋白的表达水平($P<0.05$)。SST 明显抑制 CPID 大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 含量($P<0.05$), 减轻盆腔局部组织粘连, 改善子宫病理形态。**结论** 三黄四物汤有显著体外抗炎作用, 其机制均与炎症通路 MAPKs 和 NF- κ B 有关; 其不同提取物抗炎作用及细胞毒性不同, 可能与当归成分有关; SST 对大鼠 CPID 有显著抗炎作用, 可作为慢性盆腔炎的候选药物。

〔关键词〕 三黄四物汤; 炎症; 慢性盆腔炎; 信号通路; 提取物

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.012

Anti-inflammatory effects of extracts from Sanhuang-Siwu-Tang in different solvents

LI Jing*, YU Tao, QI Yaoqun, ZHANG Xiaorong, JI Jiahui, LI Hanchao

Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China

〔Abstract〕 **Objective** To explore the in vitro anti-inflammatory effects and related mechanisms of different solvent extracts of Sanhuang-Siwu-Tang (SST), analyze the relationship between its main components and anti-inflammatory effects, and investigate its in vivo anti-inflammatory effects. **Methods** SST water extract (SSTW), as well as 95% ethanol extract (SSTE) and 50% ethanol extract (SSTWE) were prepared. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to analyze the main components. An inflammatory model was established by inducing RAW264.7 cells with LPS, and a rat model of chronic pelvic inflammatory disease (CPID) was established by phenol mucilage method. Cell viability was determined by MTT; NO level was measured by Griess; PGE2, IL-6, and TNF- α levels were examined by ELISA; COX-2, iNOS, MAPKs, and NF- κ B protein expressions were measured by Western blot; pathological changes in the rat uterus were observed through pathological sections. **Results** There was no significant difference in

〔收稿日期〕 2024-02-20

〔基金项目〕 江西省教育厅科学技术青年项目(GJJ211841); 江西省卫生健康委员会科技计划(SKJP220219734); 江西省中医药管理局科技计划(2022B1032)。

〔通信作者〕 *李 静, 女, 博士, 主管药师, E-mail: ajing2008.cool@163.com。

cell viability between the SSTWE groups at various concentrations from 0.78 to 25 $\mu\text{g/mL}$ and normal group ($P>0.05$). The anti-inflammatory effects of SSTWE at 12.5 $\mu\text{g/mL}$ were weaker than those of SSTW but similar to those of SSTW, while the anti-inflammatory effects of SSTWE at 25 $\mu\text{g/mL}$ were stronger than those of SSTW but similar to those of SSTW. SSTW, SSTW, and SSTWE all significantly reduced iNOS and COX-2 protein expressions in LPS-induced RAW264.7 cells ($P<0.05$). SSTWE significantly reduced the protein expressions of p-ERK, p-I κ B- α , and nuclear p65 in LPS-induced RAW264.7 cells, while increasing I κ B- α total protein expression and cytosolic p65 protein expression ($P<0.05$). SST significantly lowered serum TNF- α and IL-6 levels in CPID rats ($P<0.05$), reduced local pelvic tissue adhesion, and improved pathological morphology of the uterus. **Conclusion** SST has significant in vitro anti-inflammatory effects, and its mechanisms are related to the inflammatory pathways of MAPKs and NF- κ B. Its different extracts have varying anti-inflammatory effects and cytotoxicity, possibly related to the components of Danggui (Radix Angelicae Sinensis). Moreover, SST has significant anti-inflammatory effects on CPID in rats and can be considered as a candidate drug for CPID.

[**Keywords**] Sanhuang-Siwu-Tang; inflammation; chronic pelvic inflammatory disease; signaling pathway; extract

三黄四物汤(Sanhuang-Siwu-Tang, SST)由当归、川芎、白芍、地黄、黄芩、黄连和大黄7种药物组成,主要用于治疗热盛、经前吐衄等妇科疾病^[1]。前期研究表明, SST具有较好的体外抗炎活性,并与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B)信号转导通路相关^[2]。故结合 SST对妇科疾病治疗作用,开展 SST对妇科炎症性疾病的研究。慢性盆腔炎(chronic pelvic inflammatory disease, CPID)是妇科常见疾病,主要表现为女性盆腔生殖器官、周围结缔组织和盆腔腹膜的慢性炎症,其发病率高、病程长,严重影响了育龄妇女生殖健康和生活质量^[3]。CPID常见证为“湿热瘀结证”,中医治法为清热除湿、活血化瘀,恰与 SST的功效益一致。因此,本研究旨在评估 SST的不同提取物体外抗炎作用及机制,分析其主要成分与抗炎作用的关系,并进一步探索 SST对 CPID大鼠的抗炎作用。

1 材料

1.1 药材、动物、细胞来源

药材:当归、川芎、白芍、熟地黄、黄芩、黄连、大黄(由于实验前期在韩国圆光大学进行,因此实验所用中药材均购自韩国,均由圆光大学 Jang Kyukwan 教授鉴定);RAW264.7 细胞(韩国圆光大学药学院);动物:SPF 级 SD 大鼠(购自江西中医药大学,许可证编号:SCXK 赣 12018-0003)。

1.2 试剂

黄芩苷(纯度 $\geq 98.0\%$, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.);小檗碱、黄芩素、汉黄芩素(纯度 $\geq 98.0\%$, 北京盛世康普化工技术研究院);ELISA 试剂盒(美国 R & D systems 公司);Nuclear extraction 试剂盒(美国 Cayman Chemical 公司);iNOS、COX-2、MAPK

(P-ERK、P-p38、P-JNK、ERK、P-38、JNK)、NF- κ B (p65、p-I κ B- α 、I κ B- α)抗体以及 PCNA、anti-actin (美国 Cell signaling Technology 公司);二抗(德国 Santa Cruz Biotechnology 公司);MTT(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)。HPLC 用水和乙腈均为色谱纯(美国 J.T.Baker 公司),其他试剂为分析纯(日本 Tokyo 公司);RPMI Medium 1640 和小牛血清(美国 Gibco BRL Co.公司);液化苯酚、黄耆树胶粉(上海麦克林生化科技股份有限公司);甘油(国药控股星鲨制药有限公司);妇科千金片(株洲千金药业股份有限公司)。

2 方法

2.1 提取物的制备

取干燥药材, SST 复方(当归 10 g, 川芎 10 g, 白芍 15 g, 熟地黄 10 g, 黄芩 10 g, 黄连 10 g, 大黄 10 g), 500 mL 溶剂回流提取 2.5 h, 共 2 次, 合并提取液并浓缩, 得总浸膏。SST 水提取物(SSTW)、95% 乙醇提取物(SSTE)、50% 乙醇提取物(SSTWE), 得率分别为 38.85%、33.64%、42.67%。

2.2 HPLC 图谱分析

2.2.1 仪器及软件 YL9100 HPLC 系统(Young In Chromass Co. Korea); YL9101 真空脱气机, YL9110 高压输液泵, YL9160 PDA 检测器。分析软件: YLclarity(Young Lin Instruments Co. Inc. Version 4.0.3.876)。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Gemini NXC₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)。梯度洗脱程序(B%): 0~20 min, 5%~25% B; 20~30 min, 25% B; 30~45 min, 25%~45% B; 45~50 min, 45%~100% B; 50~60 min, 100% B。样品质量浓度: 10 mg/mL; 进样量: 10 μL ; 流速: 0.7 mL/min; 检测波长: 280 nm。

2.2.3 相对含量计算 相对含量的计算基于 HPLC 检测中各成分峰面积与内标峰面积的比值。采用外标法进行定量分析,标准曲线的线性范围为 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$,相关系数(R^2)均大于 0.999。计算公式:相对含量=(样品峰面积/内标峰面积) $\times$ 标准品浓度。

2.2.4 精密度试验 各样品分别在上述色谱条件下连续进样 6 次,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差(RSD)均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 各提取物分别在上述色谱条件下分别于 0、2、4、6、8、12、24、32、48 h 进样,测各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 每个提取物平行制备 5 份,分别在上述色谱条件下测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.3 细胞实验

2.3.1 MTT 法检测细胞存活率 RAW264.7 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,使用含 10%胎牛血清的 RMPI 培养液培养。细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数为 1×10^4 ,每组 6 孔,细胞贴壁后,分别加入不同浓度的 SST 提取物,对照组加入等体积 RMPI 培养基,孵育 24 h。加入终质量浓度 0.5 mg/mL MTT 溶液,继续培养 3 h,吸除上清液,每孔加入 150 μL DMSO,完全溶解后于 540 nm 处检测吸光度值。计算细胞存活率:细胞存活率=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值) $\times 100\%$ 。

2.3.2 ELISA 检测细胞上清液 NO 及 PGE_2 、IL-6、TNF- α 水平 细胞悬液调整至 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于 24 孔培养板,每组 3 孔,细胞贴壁后,分别加入不同浓度的 SST 提取物,对照组加入等体积 RMPI 培养基,培养 4 h 后加入 LPS(终浓度 1 $\mu\text{g/mL}$),继续培养 24 h。收集上清液,用 Griess 法检测 NO 浓度,用 ELISA 试剂盒检测 PGE_2 、IL-6、TNF- α 水平。

2.3.3 Western blot 检测细胞中 iNOS、COX-2、MAPKs、NF- κB 蛋白 细胞悬液调整至 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于 6 孔培养板。细胞贴壁后,分别加入不同浓度的 SST 提取物,对照组加入等体积 RMPI 培养基,培养 4 h 后加入 LPS(终浓度 1 $\mu\text{g/mL}$)。(1)COX-2、iNOS 蛋白提取:继续培养 18 h 后提取 COX-2、iNOS 蛋白,提取液为细胞裂解液;(2)MAPK 蛋白提取:继续培养 1 h 后提取 MAPK 蛋白,蛋白提取液为裂解液与蛋白酶及磷酸酶抑制剂混合液比率为 100:3;

(3)NF- κB 蛋白提取:细胞培养 1.5 h 后提取 NF- κB 蛋白,使用 Nuclearextraction 试剂盒,方法参照产品说明书。提取蛋白后,每个样品 30 μg 蛋白上样,用 7.5%~12% SDS-PAGE 浓缩胶及分离胶进行 120 V 垂直电泳及 45 V 转膜,用 5%脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下与一抗溶液孵育过夜,于室温条件下与二抗溶液孵育 1 h,每个步骤用含 0.05% Tween-20 TBS 溶液洗涤,最后 ECL 显色。

2.3.4 综合评估 SSTWE 的相对抗炎作用 为综合评估 SSTWE 相对于 SSTW 及 SSE 的抗炎作用,我们采用评分表,标准如下:若 SSTWE 显著弱于 SSTW 或 SSE ($P < 0.05$),得分为 -1;若 SSTWE 显著强于 SSTW 或 SSE ($P < 0.05$),得分为 1;若 SSTWE 与 SSTW 或 SSE 无明显差异 ($P > 0.05$),得分为 0。

2.4 动物实验

2.4.1 实验动物及分组 选用 20 只雌性未孕 SPF 级 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,随机分为正常组、模型组、阳性对照组和 SST 组,每组 5 只。

2.4.2 苯酚胶浆法造模^[4] 造模前 12 h 禁食不禁水,麻醉后在大鼠下腹正中切开 2 cm 暴露子宫,向左侧宫腔缓慢注射 0.02 mL 25%苯酚胶浆,关腹消毒后放入鼠笼复苏。

2.4.3 药物干预 造模第 11 天开始每天中午灌胃给药,持续 14 d。阳性对照组给予妇科千金片(2片/kg),SST 组给予 SSTWE(7.8 g/kg),其余组大鼠灌胃生理盐水。

2.4.4 指标检测

(1)一般情况观察 观察大鼠精神状态、饮食、排便及活动情况,记录手术切口感染及死亡情况。

(2)标本采集 末次灌胃后禁食 12 h,麻醉后腹主动脉采血,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液保存备用。开腹取左侧子宫组织,用 4%多聚甲醛固定。

(3)子宫组织学观察 肉眼观察子宫形态及质地,记录有无粘连、积液。取子宫组织固定后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片 HE 染色,光镜下观察组织结构变化。

(4)大鼠血清炎症因子 IL-6、TNF- α 水平检测 使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学分析

数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,应用 Graphpad 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HPLC 谱图

各提取物按 2.2.2 色谱条件测定结果,详见图 1、表 1。

表 1 峰 1~11 的保留时间、来源及化合物类别

Table 1 Retention times, compound sources, and compound categories for peaks 1~11

峰	保留时间 /min	来源	化合物
1	8.8	白芍	
2	22.6	黄连	
3	24.3	大黄	
4	25.1~25.3	黄连	
5	25.5~25.9	黄连	小檗碱
6	33.5~33.7	黄芩	黄芩苷
7	42.1, 42.2	黄芩	
8	47.5	黄芩	黄芩黄素
9	52.1	黄芩	汉黄芩素
10	54.4	当归	
11	50.6	大黄	

3.2 SST 对 RAW264.7 细胞抗炎活性作用

3.2.1 SST 对 RAW264.7 细胞生存率的影响 干预组分别给予 SSTWE 0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、

50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 。SSTWE 0.78~25 $\mu\text{g/mL}$ 组与正常组相比,细胞存活率无显著差异($P>0.05$);50~200 $\mu\text{g/mL}$ 组与正常组相比,细胞存活率显著下降($P<0.001$)。详见图 2。

3.2.2 SST 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、PGE₂、TNF- α 、IL-6 含量的影响 SSTWE 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 NO 和 PGE₂ 的抑制作用弱于 SSTW ($P<0.05$, $P<0.001$) 和 SSE ($P<0.001$, $P<0.001$);对 TNF- α 的抑制作用强于 SSTW ($P<0.001$) 但弱于 SSE ($P<0.001$),对 IL-6 的抑制作用强于 SSTW ($P<0.01$) 但相似于 SSE ($P>0.05$)。SSTWE 25 $\mu\text{g/mL}$ 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 NO 的抑制作用强于 SSTW ($P<0.001$) 但弱于 SSE ($P<0.001$);对 PGE₂ 的抑制作用与 SSTW 相似 ($P<0.001$) 但弱于 SSE ($P<0.001$),对 TNF- α 和 IL-6 的抑制作用强于 SSTW ($P<0.001$, $P<0.001$) 和 SSE ($P<0.001$, $P<0.05$) (图 3)。评分表结果显示, SSTWE 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 相对于 SSTW 为 0 分,相对于 SSE 为 -3 分; SSTWE 25 $\mu\text{g/mL}$ 相对于 SSTW 为 3 分,相对于 SSE 为 0 分。详见表 2。

3.2.3 SST 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响 干预组分别给予

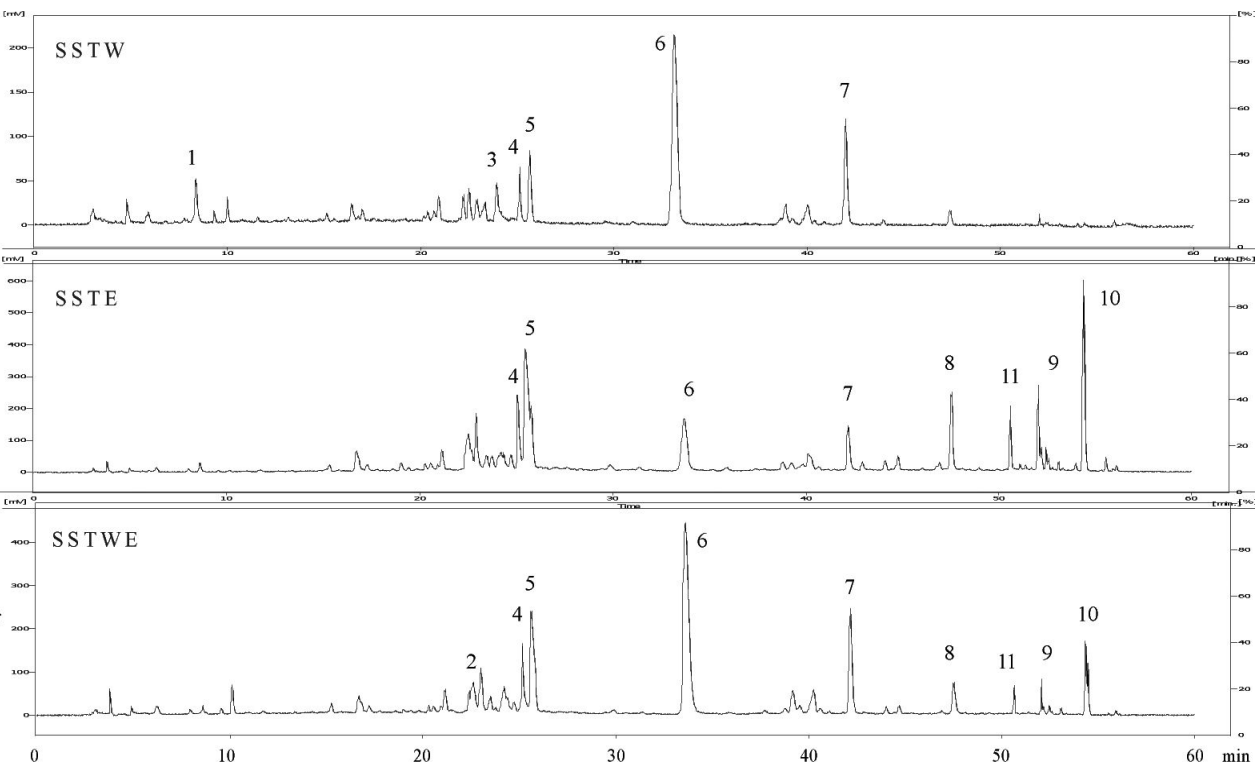


图 1 SSTW、SSE、SSTWE 的 HPLC 谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of SSTW, SSE, and SSTWE

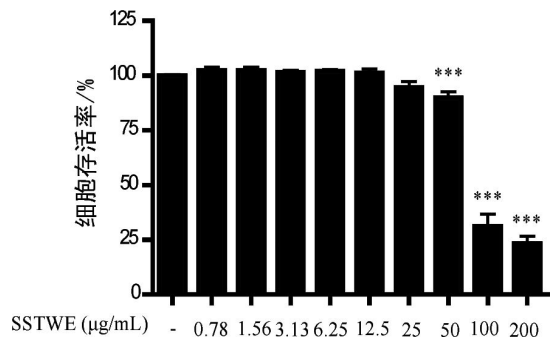


图 2 SSTWE 对 RAW264.7 细胞生存率的影响

Fig.2 Effects of SSTWE on the viability of RAW264.7 cells
注:与正常组比较,*** $P<0.001$ 。

表 2 SSTWE 相对抗炎作用评分表

Table 2 Scoring table for the relative anti-inflammatory effects of SSTWE

SSTWE 相比较	12.5 $\mu\text{g/mL}$		25 $\mu\text{g/mL}$	
	SSTW	SSTE	SSTW	SSTE
NO	-1	-1	+1	-1
PGE ₂	-1	-1	0	-1
TNF- α	+1	-1	+1	+1
IL-6	+1	0	+1	+1
总分	0	-3	+3	0

SSTW 50 $\mu\text{g/mL}$,SSTE 12.5 $\mu\text{g/mL}$,SSTWE 12.5 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 。LPS 诱导后,细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达均明显增高($P<0.05$);与 LPS 组相比,SSTW、SSTE和 SSTWE 各组 iNOS 和 COX-2 蛋白表达均明显降低($P<0.05$)。详见图 4。

3.2.4 SST 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 MAPKs 蛋白表达的影响 LPS 诱导后,细胞 ERK、JNK、p38 磷酸化蛋白表达均明显增高($P<0.05$);与 LPS 组相比,SSTWE 组 ERK 磷酸化蛋白表达明显降低($P<0.05$),p38 和 JNK 磷酸化蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。详见图 5。

3.2.5 SST 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响 LPS 诱导后细胞 I κ B- α 磷酸化蛋白表达及降解均显著增加($P<0.05$),细胞核中 p65 蛋白表达显著增加($P<0.05$),细胞质中的 p65 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与 LPS 组相比,SSTWE 组明显降低 I κ B- α 磷酸化蛋白表达($P<0.05$)及细胞核中 p65 蛋白表达($P<0.05$),同时增加 I κ B- α 总蛋白表达($P<0.05$)及细胞质中 p65 蛋白的表达水平($P<0.05$)。详见图 6。

3.3 SST 对 CPID 大鼠抗炎作用

3.3.1 一般情况观察 整个实验周期正常组大鼠精

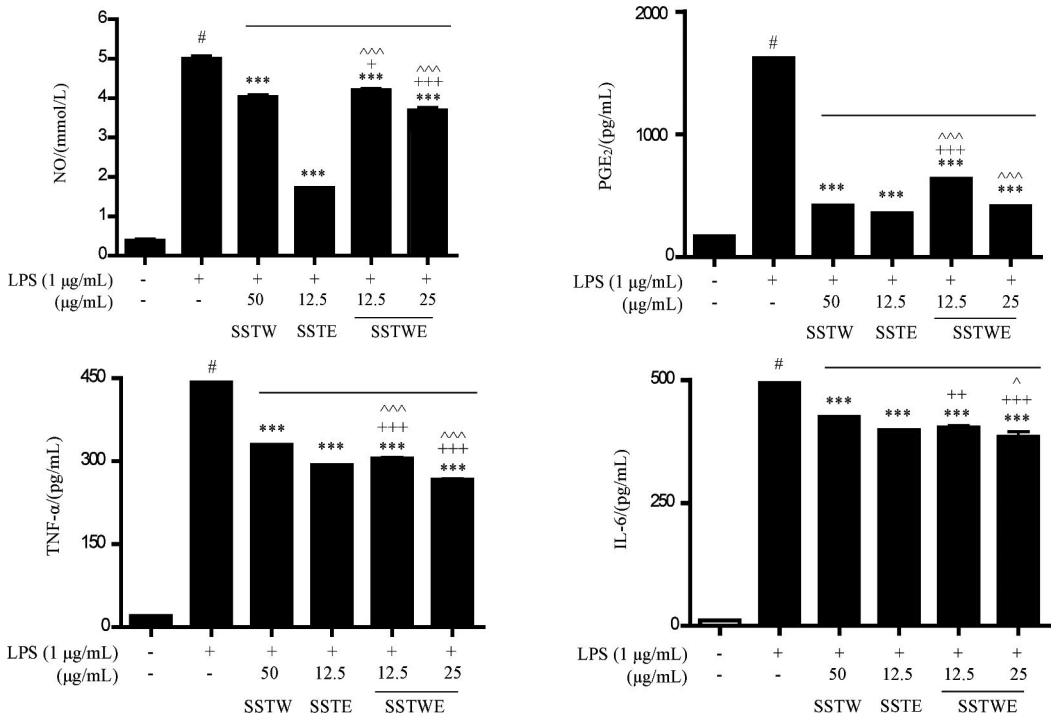


图 3 SSTW、SSTE 和 SSTWE 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、PGE₂、TNF- α 、和 IL-6 的影响

Fig.3 Effects of SSTW, SSTE, and SSTWE on NO, PGE₂, TNF- α , and IL-6 in LPS-induced RAW264.7 cells

注:与正常组比较,* $P<0.001$;与 LPS 组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与 SSTW 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与 SSTE 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

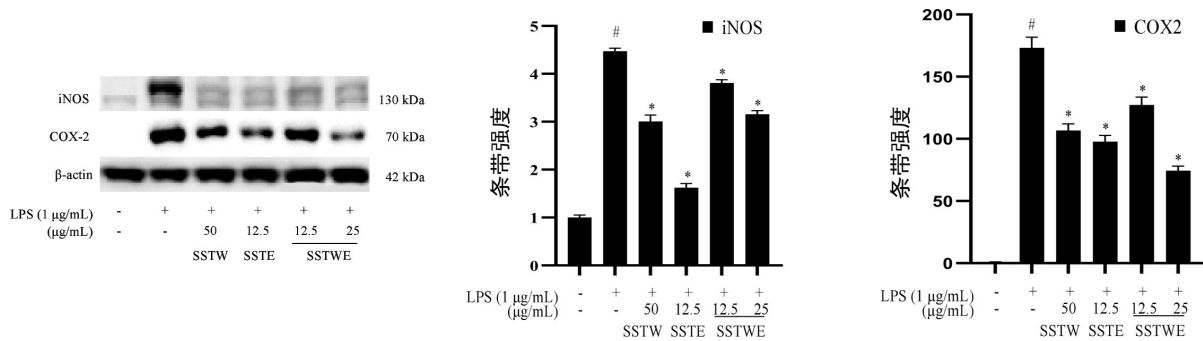


图4 SSTW、SSE和SSTWE对LPS诱导的RAW264.7细胞iNOS和COX-2蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of SSTW, SSE, and SSTWE on iNOS and COX-2 protein expressions in LPS-induced RAW264.7 cells

注:与正常组比较,# $P<0.05$;与LPS组比较,* $P<0.05$ 。

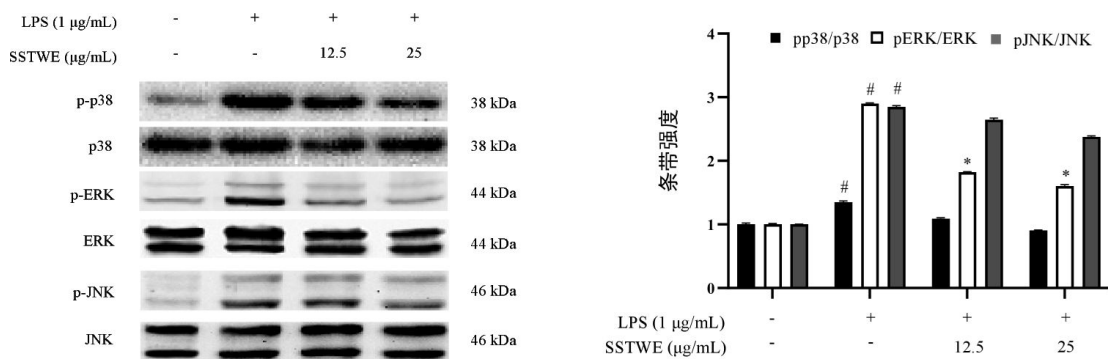


图5 SSTWE对LPS诱导RAW264.7细胞MAPKs(p-p38、p38、p-ERK、ERK、p-JNK和JNK)蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of SSTWE on MAPKs (including p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK, and JNK) protein expressions in LPS-induced RAW264.7 cells

注:与正常组比较,# $P<0.05$;与LPS组比较,* $P<0.05$ 。

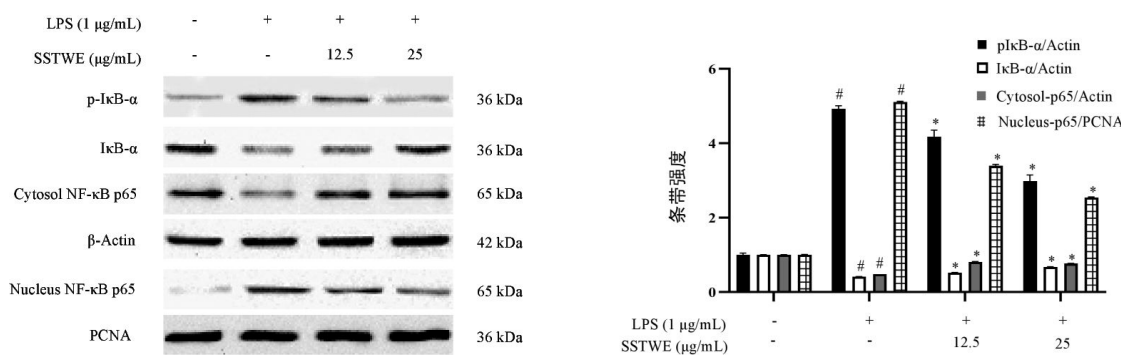


图6 SSTWE对LPS诱导RAW264.7细胞p65、p-IκB-α和IκB-α蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of SSTWE on p65, p-IκB-α, and IκB-α protein expressions in LPS-induced RAW264.7 cells

注:与正常组比较,# $P<0.05$;与LPS组比较,* $P<0.05$ 。

神状态良好,活动、饮食、二便均正常,体质量正常增长;造模组大鼠所有大鼠术后手术切口未见感染,无一意外死亡,稍有不安情绪,饮食、二便稍有减少,体质量较正常组大鼠减轻。

3.3.2 SST对CPID大鼠子宫组织的影响 正常组:

肉眼观察子宫形态外观基本正常,子宫质地柔软,盆腔脏器与结缔组织无粘连;光镜下观察子宫壁组织结构清晰,各层分界明显,子宫内膜组织结构完整,上皮细胞排列整齐,平滑肌组织内各层血管无充血水肿,无炎性细胞浸润,纤维组织无明显增生、粘连,

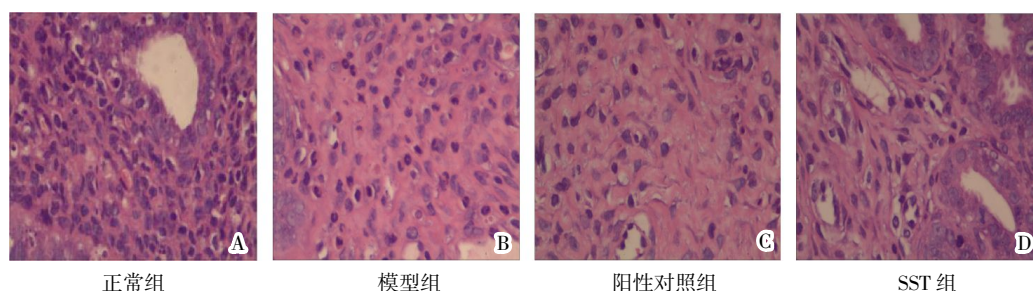
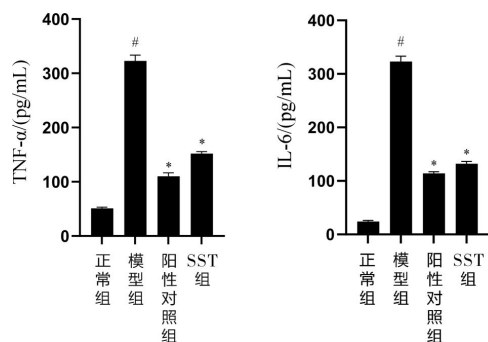


图 7 光镜下子宫组织形态(HE,×40)

Fig.7 Uterine tissue morphology under light microscope (HE,×40)

间质无充血、水肿。模型组:肉眼观察子宫有不同程度的肿胀变形,质地变硬,盆腔脏器与结缔组织明显粘连;光镜下观察子宫壁组织结构不清晰,各层分界不明显,子宫内膜组织缺失,上皮细胞排列变性、坏死、脱落,可见炎性细胞浸润,子宫平滑肌纤维组织明显增生、粘连,间质充血、水肿。阳性对照组:肉眼观察子宫形态大致正常,质地较柔软,盆腔脏器与结缔组织稍有粘连;光镜下观察子宫壁组织结构基本清晰,子宫内膜上皮细胞基本完整,排列基本规则,偶可见少许变性、坏死、脱落,少许炎性细胞浸润,子宫平滑肌纤维组织无明显增生、粘连。SST 组:肉眼观察子宫形态大致正常,可见轻度肿胀及充血,质地较柔软,盆腔脏器与结缔组织稍有粘连;光镜下观察子宫壁组织结构基本清晰,子宫内膜上皮细胞欠完整,排列欠规则,部分可见少许变性、坏死、脱落,少许炎性细胞浸润,子宫平滑肌纤维组织稍见增生、粘连。详见图 7。

3.3.3 SST 对 CPID 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量的影响 模型组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 含量较正常组均显著增加($P<0.05$),SST 组和阳性对照组血清 TNF- α 和 IL-6 含量较模型组均显著降低($P<0.05$)。详见图 8。

图 8 SSTWE 对大鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量的影响Fig.8 Effects of SSTWE on serum levels of TNF- α and IL-6 in rats

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

4 讨论

本研究对 SST 的抗炎作用进行了探索,揭示了 SST 在抑制炎症反应中的作用及其潜在机制。体外细胞实验以 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模型,评估 SST 对炎症因子(NO、PGE₂、IL-6、TNF- α)释放以及炎症相关蛋白(iNOS、COX-2、MAPK、NF- κ B)表达的影响,体内实验通过苯酚胶浆法建立大鼠慢性盆腔炎模型,观察提取物对整体炎症反应的调控效果,包括对大鼠子宫组织学变化和血清炎症因子水平的影响。

RAW264.7 小鼠巨噬细胞常用作体外炎症模型,LPS 诱导 RAW264.7 细胞后产生大量炎症因子如 NO、iNOS、PGE₂、COX-2、ILs、TNF- α 等,从而引起炎症反应和组织损伤^[5-6]。本研究显示,SST 的 3 种不同提取物(SSTW、SSTE、SSTWE)在体外均能显著抑制炎症因子的释放,降低 iNOS 和 COX-2 等炎症蛋白的表达。评分结果表明,SSTWE 12.5 μ g/mL 抗炎作用弱于 SSTE 而与 SSTW 相似,SSTWE 25 μ g/mL 抗炎作用强于 SSTW 而与 SSTE 相似,故 SSTWE 的抗炎作用介于 SSTW 和 SSTE 之间。细胞生存率结果表明,SSTW 100~200 μ g/mL^[9]、SSTE 25~200 μ g/mL^[1]、SSTWE 50~200 μ g/mL 范围内对细胞存活率有显著影响。因此,SSTWE 的细胞毒性与抗炎作用均介于 SSTW 和 SSTE 之间,表现出较优的整体特性。LPS 诱导 RAW264.7 细胞后激活 MAPK 和 NF- κ B 信号转导通路^[7]。MAPK 信号通路主要由 ERK、p38 和 JNK 组成,这些蛋白在炎症刺激下被磷酸化,从而激活下游的炎症反应。NF- κ B 在炎症及免疫反应中起着关键作用,被激活后细胞质中 I κ B- α 磷酸化并降解,p65 蛋白则进入细胞核中与 DNA 结合,从而促进炎症因子的大量表达^[7-9]。前期研究表明,SSTW 可显著降低 ERK 磷酸化蛋白表达,SSTE 可显著降低 p38 和 ERK 磷酸化蛋白表达^[1]。本研究表明,SSTWE 可显著降低 ERK 磷酸化蛋白表达。综合表明,SSTW

和 SSTWE 可通过 ERK 通路抑制炎症反应,而 SSTE 可通过 p38 和 ERK 通路抑制炎症反应。前期研究^[1]及本研究表明,SST 3 种提取物均减少 IkB- α 磷酸化使得 IkB- α 总蛋白表达增加,同时增加细胞质 p65 蛋白表达、降低细胞核 p65 蛋白表达,表明 3 种提取物均可通过 NF- κ B 通路抑制炎症的发生。根据 HPLC 谱图分析,SSTW 的主要成分来自黄芩、黄连和白芍,SSTE 和 SSTWE 的主要成分均来自黄芩、黄连和当归,后两者当归含量远高于前者,与本研究发现 SSTE 和 SSTWE 抗炎作用及细胞毒性均强于 SSTW 相一致,提示抗炎作用可能与当归含量有较大关联。

结合 SST 对妇科疾病治疗作用,本研究开展 SST 对妇科炎症性疾病的研究。中医学认为,CPID 常见证为“湿热瘀结证”,治法为清热除湿、活血化瘀,恰与 SST 的功效相一致。因此,本研究探索 SST 对 CPID 大鼠的抗炎作用。CPID 是一种常见的妇科炎症性疾病,其临床表现主要包括盆腔局部的炎性渗出、粘连和增生,并伴随异常的细胞因子表达^[10]。传统的抗生素治疗由于耐药性和副作用等问题,仍存在很多弊端。然而,中药以复方用药为主,其多成分、多途径、多靶点作用,以及毒副作用低等特点,显示出独特的优势^[11]。已有大量研究发现,免疫因素是引起 CPID 的关键因素^[12-13],其组织粘连、增生纤维化等病理损伤与细胞因子如 TNF- α 、IL-6 等的异常表达相关^[14-15]。本研究显示,SST 组大鼠子宫组织病理形态学表现和血清 TNF- α 、IL-6 含量均较模型组有显著改善,表明 SST 可通过抑制炎症因子、减轻盆腔局部组织粘连、改善子宫病理形态等,最终对 CPID 发挥治疗作用。

5 结论

综上所述,三黄四物汤有显著抗炎作用,其机制与炎症通路 MAPKs 和 NF- κ B 有关;其不同提取物抗炎作用及细胞毒性不同,可能与当归含量有较大关联,提示在实际应用中,可通过改变煎煮方法取得更好的临床疗效;同时,其对慢性盆腔炎大鼠有显著抗炎作用,从而为今后临床应用及进一步研究奠定了基础。

参考文献

[1] 李 静,金倫喆.三黄四物汤对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用[J].免疫学杂志,2021,37(7):560-567.

- [2] LI J, KIM K W, OH H, et al. Anti-inflammatory effects of Sanhuang-siwu-Tang in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages and BV2 microglial cells[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2021, 44(4): 535-543.
- [3] ZHANG Z Y, XIE Z Y, LV S J, et al. Integrated metabolomics and network pharmacology study on the mechanism of kangfuxiaoyan suppository for treating chronic pelvic inflammatory disease[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 812587.
- [4] 樊美秀.红金丹对盆腔炎模型大鼠 TNF- α 、IL-10 及 IKK/NF- κ Bp65 信号通路的影响[D].恩施:湖北民族学院,2016.
- [5] DAI J N, ZONG Y, ZHONG L M, et al. Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21891.
- [6] YUAN L, WU Y C, REN X M, et al. Isoorientin attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of ROS-related MAPK/NF- κ B signaling pathway in BV-2 microglia[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 386(1): 153-165.
- [7] XU Z C, LIN R Y, HOU X N, et al. Immunomodulatory mechanism of a purified polysaccharide isolated from Isaria cicadae Miquel on RAW264.7 cells via activating TLR4-MAPK-NF- κ B signaling pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 4329-4338.
- [8] KIM M, AN J, SHIN S A, et al. Anti-inflammatory effects of TP1 in LPS-induced Raw264.7 macrophages[J]. Applied Biological Chemistry, 2024, 67(1): 16.
- [9] 孙 兰,刘莉娜,李家春,等.丹皮酚对 LPS 诱导小鼠子宫内炎症 NF- κ B 信号通路的影响[J].免疫学杂志,2019,35(11):960-964,971.
- [10] ZHANG Z Y, XIE Z Y, LV S J, et al. Integrated metabolomics and network pharmacology study on the mechanism of kangfuxiaoyan suppository for treating chronic pelvic inflammatory disease[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 812587.
- [11] 马 堃,罗颂平,李 敏,等.中医药防治盆腔炎性疾病优势与证据研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(8):1449-1454.
- [12] 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- κ B and MAPK cascades[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(42): 11747-11757.
- [13] 熊 冰,王志萍,张 波,等.慢性盆腔炎免疫抗炎机制的实验研究进展[J].广西中医药,2016,39(1):8-11.
- [14] 王 艳.红金丹对盆腔炎大鼠 IL-2、IL-6 及 JAK2/STAT3 信号通路的影响[D].恩施:湖北民族学院,2016.
- [15] 朱肄懿.完带汤对盆腔炎性疾病后遗症大鼠血清 TGF- β 1、TNF- α 的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2020.