

白头翁皂苷 B₄对慢性子宫内膜炎大鼠的治疗作用及其相关因子的影响

王玲玲^{1,2}, 崔亚茹¹, 陈兰英^{1,2*}, 李雪亮¹, 罗颖颖^{1,2}, 张国松^{1,2}, 程林辉^{1,2}

(1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

2. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004)

【摘要】 目的:通过体内外实验研究白头翁皂苷 B₄对子宫内膜炎大鼠的影响。方法:动物实验采用25%的苯酚胶浆制备子宫内膜炎模型,60只SD雌性大鼠随机分为空白组、模型组、苦参凝胶组(0.005 g·kg⁻¹),白头翁皂苷 B₄凝胶低、中、高剂量组(0.005, 0.01, 0.02 g·kg⁻¹),每组10只,除空白组外,各组大鼠每2 d向其阴道内注入25%苯酚胶浆,造模持续30 d。造模后当天开始给药,白头翁皂苷 B₄凝胶低、中、高剂量组每日直肠给药,苦参凝胶组每日阴道给药,空白组和模型组以同样的方法给予等量的生理盐水,给药连续30 d。末次给药后,取各组大鼠子宫及其附件,进行大鼠子宫形态、子宫指数分析;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠子宫组织病理变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠子宫组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-1β(IL-1β),白细胞介素-6(IL-6),信号转导蛋白130(gp130),信号传导及转录激活因子3(STAT3) mRNA的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠子宫组织中IL-6和STAT3蛋白的表达;细胞实验,以脂多糖(LPS)诱导大鼠子宫内膜上皮细胞制备体外炎症模型,Real-time PCR检测各组大鼠子宫内膜上皮细胞中IL-6, gp130和STAT3 mRNA的表达。结果:动物实验结果显示,与空白组比较,模型组大鼠子宫宫腔粘连不全,子宫内膜出现水肿及充血病变;与模型组比较,白头翁皂苷 B₄凝胶高剂量组和苦参凝胶组大鼠子宫宫腔无粘连现象,子宫组织较为完整,子宫病理结构得到明显的改善。与空白组比较,模型组大鼠子宫指数明显升高($P<0.05$),子宫组织中IL-1β mRNA表达明显升高($P<0.05$),子宫组织中IL-6, STAT3的mRNA和蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,白头翁皂苷 B₄凝胶高剂量组中子宫指数明显降低($P<0.05$),子宫组织中IL-6, STAT3的mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),对TNF-α和IL-1β的mRNA表达与模型组比较差异无统计学意义。细胞实验结果显示,与空白组比较,模型组大鼠子宫内膜上皮细胞中IL-6和gp130的mRNA表达显著升高($P<0.01$),STAT3的mRNA表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,白头翁皂苷 B₄高剂量组中IL-6, gp130和STAT3的mRNA表达水平明显下降($P<0.05$)。结论:白头翁皂苷 B₄可改善大鼠慢性子宫内膜炎的炎症反应,降低炎症因子IL-6的释放,其机制可能与IL-6/STAT3通路的下调有关。

【关键词】 子宫内膜炎; 白头翁皂苷 B₄; 子宫内膜上皮细胞; 白细胞介素-6(IL-6)/信号转导和转录激活因子3(STAT3); 炎症反应

【中图分类号】 R2-0; R285.5; R289; R711.32 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2020)15-0054-07

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20201537

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200527.0848.002.html>

【网络出版日期】 2020-5-27 14:08

Therapeutic Effect of Anemoside B₄ on Chronic Endometritis in Rats and Its Related Factors

WANG Ling-ling^{1,2}, CUI Ya-ru¹, CHEN Lan-ying^{1,2*}, LI Xue-liang¹, LUO Ying-ying^{1,2},

ZHANG Guo-song^{1,2}, CHENG Lin-hui^{1,2}

(1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine,

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330006, China;

2. College of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

【收稿日期】 20191219(015)

【基金项目】 江西省重点研发计划项目(20181ACG70014)

【第一作者】 王玲玲, 硕士, 从事中药药效评价与新药研究, E-mail: 2584032268@qq.com

【通信作者】 * 陈兰英, 博士, 教授, 从事中药药效评价与新药研究, E-mail: clyxy2513@163.com

[Abstract] **Objective:** The effects of anemoside B₄ on endometritis rats were studied through *in vivo* and *in vitro* experiments. **Method:** Animal experiments used 25% phenol glue to prepare endometritis models. 60 female SD rats were randomly divided into blank group, model group, Kushen gel group (0.005 g·kg⁻¹), anemoside B₄ gel low, medium and high dose groups (0.005, 0.01, 0.02 g·kg⁻¹), 10 rats in each group, except for the blank group, rats in each group were injected with 25% phenol glue into their vagina every 2 days, and the modeling continued for 30 days. Administration started on the day after modeling. Anemoside B₄ gel low, medium and high dose groups were administered rectal daily, Kushen gel group was given daily vaginal administration. The blank group and model group were given the same amount of normal saline in the same way for 30 consecutive days. After the last administration, the uterus and its attachments of each group of rats were taken to analyze the uterine morphology and index. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of rat uterus. Real-time PCR was used to detect tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6), signal transduction protein 130 (gp130), signal transduction and transcription activator 3 (STAT3) mRNA expression. Detection of IL-6 and STAT3 protein expression in rat uterus by Western blot. In cell experiments, lipopolysaccharide (LPS) was used to induce rat endometrial epithelial cells to prepare an *in vitro* inflammation model, and Real-time PCR was used to detect the expression of IL-6, gp130 and STAT3 mRNA in each group of rat endometrial epithelial cells. **Result:** The results of animal experiments showed that compared with the blank group, the model group had inadequate uterine cavity adhesions, endometrial edema and hyperemia. Compared with model group, there was no adhesion in the uterine cavity of the rats in the high dose anemoside B₄ gel group and the Kushen gel group. The uterine tissue was relatively complete, and the uterine pathological structure was significantly improved. Compared with the blank group, the uterine index of the model group was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of IL-1 β mRNA in the uterine tissue was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of mRNA and protein of IL-6 and STAT3 in the uterine tissue significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the uterine index in anemoside B₄ gel high dose group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expression levels of IL-6 and STAT3 in the uterine tissue were significantly reduced ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference between the TNF- α and IL-1 β mRNA expression compared with the model group. Cell experiment results showed that compared with the blank group, the mRNA expression of IL-6 and gp130 in model group endometrial epithelial cells was significantly increased ($P < 0.01$), STAT3 mRNA expression was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the mRNA expression levels of IL-6, gp130 and STAT3 in anemoside B₄ high dose group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Anemoside B₄ can improve the inflammatory response of chronic endometritis in rats and reduce the release of inflammatory factor IL-6. The mechanism may be related to the down-regulation of IL-6/STAT3 pathway.

[Key words] endometritis; anemoside B₄; endometrial epithelial cells; interleukin-6 (IL-6)/signal transduction and transcription activator 3 (STAT3); inflammatory response

慢性子宫内膜炎(CE)属于盆腔炎性疾病的一种,是子宫内膜的局部炎症,绝大部分慢性子宫内膜炎没有特异性症状,常常仅有下腹部不适感或者白带增多等症状,临床上难以早期筛查及诊断。在疾病进展过程中,受损细胞会激活炎症细胞持续分泌大量的炎症介质,如白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- β (IFN- β),白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-18(IL-18)是作为胞质前体产生的,炎症介质的分泌也受到炎性蛋白的调

控。目前西医多采用抗菌药物治疗慢性子宫内膜炎,但由于其病情较顽固,病程较长,长期使用抗菌药物会增加耐药性,进而导致病情反复发作^[1]。因此临床上,迫切需要对新的治疗方法进行研究开发。近年来,中医药治疗CE得到了广泛关注,有报道中医药可通过提高机体免疫力、抗氧化应激等作用来改善慢性炎症^[2-3]。

白头翁为毛茛科植物的干燥根,其性寒、味苦。《神农本草经》《本草经集注》等历代医书中均有关

于白头翁的记载。白头翁皂苷 B_4 是中药白头翁中的五环三萜皂苷类化合物,现代研究表明其具有抗炎、抗肿瘤等药理作用^[4]。本研究旨在探索白头翁皂苷 B_4 对慢性子宫内膜炎的作用以及其可能机制,为其对CE的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 60只SPF级实验SD雌性大鼠,190~210 g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SYXK(湘)2016-0002,实验单位使用许可证号SYXK(赣)2018-0002。实验室普通清洁环境下饲养,适应性喂养3 d后开始进行实验。本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号为JZLLSC2018-0116。

1.2 细胞、药物及试剂 大鼠子宫内膜上皮细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号CP-R049),用大鼠子宫内膜上皮细胞完全培养基(WH01111906XP)于37℃,5% CO₂培养箱中培养并稳定传至第3代;白头翁皂苷 B_4 粉末,由江西本草天工责任有限公司提供(批号20180402),白头翁皂苷 B_4 粉末以大鼠子宫内膜上皮细胞完全培养基为溶剂配置成质量浓度为100 mg·L⁻¹母液,0.2 μm微孔滤膜过滤除菌备用,分别配制得白头翁皂苷 B_4 低剂量组(5 mg·L⁻¹)和高剂量组(20 mg·L⁻¹)后放入4℃冰箱以备用;苦参凝胶(贵州新天药业股份有限公司,批号20180207);脂多糖(LPS),苏木素-伊红(HE)染色液(美国Sigma公司,批号分别为L2880,517-28-2);苯酚,甘油(西陇科学股份有限公司,批号分别为20180202,20180314);西黄蓍胶(山东西亚化学股份有限公司,批号F8745);逆转录试剂盒,SYBR Green mix试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号分别为K1622,4472908);RIPA裂解液,BCA检测试剂盒,ECL显影试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B,P0012S,P0018S);IL-6抗体(美国Abcam公司,批号ab7291);STAT3抗体,p-STAT3抗体(美国CST公司,批号分别为4904S,9134S);二抗,β-肌动蛋白(β-actin)抗体(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为A0208,T0022)。

1.4 仪器 CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司);RM2016型轮转式切片机(德国Leica公司);亚光YB-6LF型生物组织石蜡包埋机(孝感市亚光医用电子技术有限公司);RWD510型气体麻醉机(深圳市瑞沃德公司);SpectraMax I3型多功能酶标仪(奥地利MD公司);Centrifuge5810R型高速冷冻

离心机(德国Eppendorf公司);Chemi Doc XRS型凝胶成像仪,PowerPac型电泳仪(美国Bio-Rad公司);ABI750型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);DYY-7C型转膜仪(北京市六一生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 白头翁皂苷 B_4 凝胶的制备 将白头翁皂苷 B_4 原料药(1.2 g)粉末在72 mL双蒸馏水中进行磁力搅拌,在约45℃条件下溶解1 h,得到白头翁皂苷 B_4 的水溶液,过滤后备用。称取卡波姆941(0.4 g)缓慢加入到 B_4 水溶液中,边加边搅拌,直至混匀;再加入甘油(8 mL)继续搅拌3 min,通过加入适量的三乙醇胺调节pH至6~7,磁搅拌均匀混合30 min后,分别制得白头翁皂苷 B_4 水凝胶制剂0.005,0.01,0.02 g·kg⁻¹的剂量^[5],分别放入4℃冰箱以备用。

2.2 动物分组、造模及给药 将60只SPF级SD雌性大鼠随机分为空白组、模型组、白头翁皂苷 B_4 凝胶低剂量组(0.005 g·kg⁻¹),中剂量组(0.01 g·kg⁻¹),高剂量组(0.02 g·kg⁻¹),苦参凝胶组(0.005 g·kg⁻¹),每组10只。参照文献[6-7]方法,采用25%的苯酚胶浆(取苯酚5 mL,西黄蓍胶1 g,甘油4 mL,加蒸馏水至20 mL配制得25%的苯酚胶浆)来制备慢性子宫内膜炎模型,除空白组外,各组大鼠每2 d向其阴道内注入25%苯酚胶浆0.1 mL。空白组大鼠向其阴道内注入生理盐水0.1 mL,持续30 d。造模成功表现为大鼠阴道有白色分泌物,阴道红肿,阴道内充血^[7]。实验室前期研究结果显示^[5],在实验性急性肾功能损伤模型实验中,白头翁皂苷 B_4 的有效剂量范围为0.005~0.02 g·kg⁻¹,因此基于此研究,本实验探究白头翁皂苷 B_4 在0.005~0.02 g·kg⁻¹剂量范围内对大鼠子宫内膜炎的影响及其药效学作用。造模当天开始给药,白头翁皂苷 B_4 凝胶分别按照0.005,0.01,0.02 g·kg⁻¹的剂量进行直肠给药^[8],苦参凝胶按照0.005 g·kg⁻¹的剂量进行阴道给药,给药容量为1 mL·kg⁻¹,空白组和模型组大鼠以同样的方法给予等体积生理盐水,2次/d,持续给药至30 d。

2.3 细胞培养及分组 大鼠子宫内膜上皮细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,用大鼠子宫内膜上皮细胞完全培养基于37℃ 5% CO₂培养箱中进行培养并稳定传至第3代进行实验。实验分为空白组、模型组、白头翁皂苷 B_4 低剂量组(5 mg·L⁻¹)和高剂量组(20 mg·L⁻¹)。经细胞传代、胰蛋白酶消化后,细胞以1×10⁶个/皿浓度种板于60 mm细胞培养皿中,经白头翁皂苷 B_4 低剂量组(5 mg·L⁻¹),高剂量

组($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[9]进行预处理24 h,空白组和模型组使用完全培养基处理24 h。24 h后,除空白组外,所有细胞均暴露于 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的LPS中刺激24 h,同时除模型组外给予白头翁皂苷 B_4 进行药物治疗,而后收集细胞进行下一步实验。

2.4 指标检测

2.4.1 大鼠子宫脏器指数的检测 末次给药后,取各组大鼠子宫及其附件。收集各组大鼠子宫、阴道,进行称质量,子宫脏器指数公式:子宫脏器指数=子宫脏器质量(g)/体质量(g) $\times 100\%$ 。

2.4.2 HE染色观察大鼠子宫组织病理学变化 取各组大鼠子宫组织用10%甲醛固定24 h,脱水后包埋于石蜡中。切片厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$,经苏木素及伊红染色、脱水透明及中性树胶封固等步骤后于显微镜下进行观察拍照。

2.4.3 Real-time PCR检测各组mRNA的表达水平 提取大鼠子宫组织或细胞RNA。加入trizol裂解液1 mL,研磨混匀,静置5 min后,加入三氯甲烷 $400\text{ }\mu\text{L}$,混匀静置,经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min后,吸取上清液加入异丙醇 $400\text{ }\mu\text{L}$,混匀静置, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,弃上清后,加入经预冷的75%乙醇1 mL,混匀经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min后,弃上清用分光光度计测定总RNA的质量和浓度。使用逆转录试剂盒将各样本进行逆转录以合成cDNA,加样过程参照逆转录试剂盒说明书。根据荧光定量试剂盒说明书进行加样后,置RCR仪中进行实时荧光扩增,扩增条件按活化 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,1个循环;预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 s,1个循环;变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 s,退火 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s,40个循环进行。以 β -actin作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组mRNA相对表达量。所有引物由深圳华大基因股份有限公司合成,引物序列见表1。

2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠子宫组织中IL-6和STAT3蛋白的表达 取大鼠子宫组织在预冷的RIPA裂解液中进行匀浆处理,而后收集各大鼠子宫组织总蛋白,使用BCA试剂盒进行蛋白定量。用8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,转移到PVDF膜上,用5% BSA在TBST中封闭60 min,加入内参 β -actin一抗(1:1 000),IL-6一抗(1:1 000),STAT3一抗(1:1 000),p-STAT3一抗(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。经TBST洗涤3次,每次15 min后,按说明书稀释并加入经辣根过氧化物酶标记的二抗(1:8 000),室温孵育60 min,用TBST洗膜3次,每次15 min,最后用化学发光显影法进行

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL-1 β	上游 AGCTTCAGGAAGGCAGTGTC	167
	下游 ATCCCACGAGTCACAGAGGA	
TNF- α	上游 ACTGAACCTTCGGGGTGATCG	123
	下游 GCTTGGTGGTTTGTCTACGAC	
IL-6	上游 CCACTGCCTTCCCTACTTCA	111
	下游 ACAGTGCATCATCGCTGTTC	
STAT3	上游 GAGTGCTGGAGATTGTCCCA	200
	下游 TTCCAGTCGGCCAGTTCTTTC	
gp130	上游 CCCTGAGTTTCCAGTTGTCC	344
	下游 ATGGTTTGTCTCCACACGA	
β -actin	上游 ACAGTGGAGAAGCTGTGAGCA	150
	下游 CTGCTCCCGGTTAGAGTAGG	

显影。于凝胶成像系统中采集图像信息,以 β -actin为内参,用Image J软件来分析各组蛋白条带的灰度值。

2.5 统计学分析 统计数据用SPSS 21.0进行处理,实验数据符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用最小显著性差异法LSD,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CE大鼠子宫形态及子宫脏器指数的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫、阴道内结节肿胀明显;与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 凝胶高剂量组可明显减少肿胀程度,苦参凝胶也对大鼠子宫和阴道的形态有明显的改善作用,见图1。在子宫脏器指数中,与空白组比较,模型组大鼠子宫指数明显升高($P<0.05$);与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 凝胶高剂量组大鼠子宫指数明显下降($P<0.05$)。见表2。

3.2 对CE大鼠子宫组织病理学的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫宫腔粘连不全,子宫组织的完整性被破坏,子宫内膜出现水肿及充血病变,表明CE模型制备成功;与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 凝胶高剂量组和苦参凝胶组大鼠子宫宫腔无粘连现象,子宫组织较为完整,子宫内膜的水肿和充血的病理结构得到明显的改善。见图2。

3.3 对CE大鼠子宫组织中TNF- α , IL-1 β , IL-6和STAT3的mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫组织中IL-1 β 和IL-6的mRNA相对表达

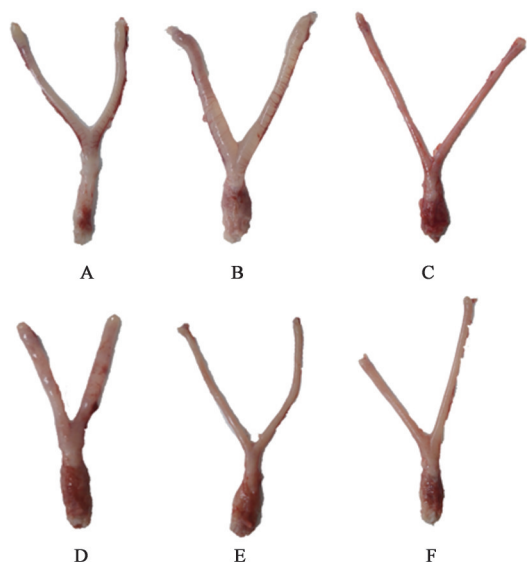


图1 白头翁皂苷 B_4 凝胶对CE大鼠子宫形态的影响
A.空白组;B.模型组;C.苦参凝胶组;D.白头翁皂苷 B_4 凝胶低剂量组;E.白头翁皂苷 B_4 凝胶中剂量组;F.白头翁皂苷 B_4 凝胶高剂量组(图2同)

图1 白头翁皂苷 B_4 凝胶对CE大鼠子宫形态的影响

Fig. 1 Effect of anemoside B_4 gel on uterine morphology of CE rats

表2 白头翁皂苷 B_4 凝胶对CE大鼠子宫指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of anemoside B_4 gel on uterine index of CE rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	子宫指数
空白	—	0.73 ± 0.16
模型	—	$0.98 \pm 0.28^{1)}$
苦参凝胶	0.005	0.78 ± 0.18
白头翁皂苷 B_4	0.005	1.00 ± 0.20
	0.01	0.80 ± 0.22
	0.02	$0.72 \pm 0.05^{3)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3~5同)。

量明显升高($P<0.05, P<0.01$),而TNF- α 的mRNA相对表达量差异没有统计学意义;与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 凝胶高剂量组大鼠子宫组织中IL-6的mRNA相对表达量明显降低($P<0.05$),而IL-1 β mRNA相对表达量差异无统计学意义。与空白组

表3 白头翁皂苷 B_4 凝胶对CE大鼠子宫组织中TNF- α , IL-1 β , IL-6和STAT3 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of anemoside B_4 gel on mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and STAT3 in CE rat uterus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TNF- α	IL-1 β	IL-6	STAT3
模型	—	0.75 ± 0.33	$3.05 \pm 0.93^{1)}$	$5.09 \pm 1.42^{2)}$	$2.57 \pm 0.35^{2)}$
白头翁皂苷 B_4	0.005	1.23 ± 0.47	5.27 ± 2.75	7.01 ± 4.70	4.38 ± 0.80
	0.01	1.16 ± 0.76	5.45 ± 3.56	3.61 ± 2.90	3.44 ± 0.77
	0.02	1.21 ± 0.70	5.16 ± 3.43	$2.37 \pm 1.24^{3)}$	$1.45 \pm 0.54^{3)}$

注:空白组各mRNA含量设为1(表5同)。

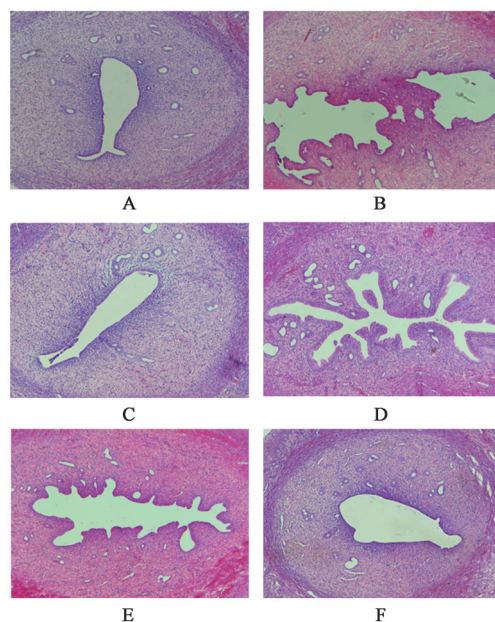


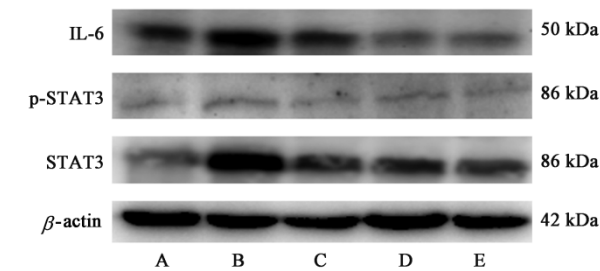
图2 白头翁皂苷 B_4 凝胶对各组大鼠子宫组织病理学的影响(HE, $\times 50$)

Fig. 2 Effect of anemoside B_4 gel on Histopathology of Rats (HE, $\times 50$)

比较,模型组大鼠中子宫组织中STAT3 mRNA相对表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 凝胶高剂量组大鼠子宫组织中STAT3的mRNA相对表达量明显降低($P<0.05$)。见表3。

3.4 对大鼠子宫组织中IL-6, STAT3和p-STAT3蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫组织中IL-6和p-STAT3蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 凝胶高剂量组的大鼠子宫组织中IL-6和p-STAT3蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图3,表4。

3.5 对CE大鼠子宫内膜上皮细胞IL-6, gp130和STAT3 mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫内膜上皮细胞中IL-6, gp130和STAT3 mRNA相对表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 高剂量组大鼠子宫内膜上皮细胞中IL-6, gp130和STAT3 mRNA表达量明显降低($P<0.05$)。见表5。



A. 空白组; B. 模型组; C. 白头翁皂苷 B₄ 凝胶低剂量组; D. 白头翁皂苷 B₄ 凝胶中剂量组; E. 白头翁皂苷 B₄ 凝胶高剂量组

图 3 大鼠子宫组织中 IL-6, p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of IL-6, p-STAT3 and STAT3 protein expression in rat uterine tissue

表 4 白头翁皂苷 B₄ 凝胶对大鼠子宫组织中 IL-6, STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of anemoside B₄ gel on IL-6, p-STAT3 and STAT3 protein expression in rat uterine tissues ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6/β-actin	p-STAT3/STAT3
模型	—	2.07±0.31 ¹⁾	1.90±0.26 ¹⁾
白头翁皂苷 B ₄	0.005	1.73±0.25	1.77±0.25
	0.01	1.40±0.30	1.27±0.31
	0.02	0.93±0.15 ³⁾	0.93±0.32 ³⁾

注: 设空白组各蛋白表达量均为 1。

表 5 白头翁皂苷 B₄ 对大鼠子宫内膜上皮细胞 IL-6, gp130, STAT3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Anemoside B₄ on mRNA expression of IL-6, gp130 and STAT3 in rat endometrial epithelial cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	gp130	STAT3
模型	—	7.89±1.23 ²⁾	2.49±0.22 ²⁾	1.31±0.10 ¹⁾
白头翁皂苷 B ₄	0.005	5.20±1.17	2.09±0.33	0.87±0.38
	0.02	2.76±0.38 ³⁾	1.53±0.35 ³⁾	0.74±0.25 ³⁾

4 讨论

盆腔炎是女性上生殖系统的一种炎症性疾病, 以子宫、宫颈、附件的炎症和压痛为特征。CE 属于盆腔炎性疾病的一种, 是子宫内膜的炎症变化, 有研究报道可以通过苯酚胶浆制备 CE 动物模型^[5-6]。苯酚胶浆可以引起子宫内膜损伤, 输卵管及宫腔内梗阻^[10], 因此本实验采用 25% 苯酚胶浆来制备大鼠 CE 模型, 病理结果显示 CE 模型组大鼠的子宫组织粘连, 子宫内膜充血, 提示 CE 大鼠模型制备成功^[5]。本课题组前期研究发现白头翁皂苷 B₄ 对一些急慢性炎症动物模型的炎症程度和炎症因子释放有明显改善作用^[4]。本实验主要对白头翁皂苷 B₄ 对 CE 大鼠的药效学作用和作用机制进行了研究, HE 染色结果显示白头翁皂苷 B₄ 凝胶能明显改善大鼠子宫内膜水肿及充血病变, 改善大鼠子宫宫腔粘连及子宫组织的完整性, 明显改善苯酚胶浆所致的 CE 大鼠子宫病理变化。

慢性子宫内膜炎是由各种原因所致的子宫内膜组织结构发生改变的炎症反应, 是慢性盆腔炎的一种病理改变, 严重威胁着女性的健康^[5]。前炎症细胞因子广泛参与机体免疫、炎症、感染等反应, 影响疾病的发生与发展。其中 TNF-α, IL-1β, IL-6 等是重要的前炎症细胞因子, 可触发炎症细胞级联反应从而激活或扩大炎症反应^[11]。为了研究白头翁皂苷 B₄ 凝胶的抗炎作用, 检测了各组大鼠子宫组织中促炎细胞因子 (IL-1β, TNF-α, IL-6) 的 mRNA 相

对表达量。实验结果显示白头翁皂苷 B₄ 凝胶高剂量组对大鼠子宫组织中 IL-6 的 mRNA 表达水平有显著的影响, 而对 IL-1β, TNF-α mRNA 表达水平没有显著的影响作用。这表明白头翁皂苷 B₄ 凝胶可通过减少 IL-6 的生成减轻 CE 大鼠的炎症反应。

IL-6 是一种较为典型的多功能细胞因子, 是在不同的条件下由多种细胞包括内皮细胞、免疫细胞和肿瘤细胞产生的。IL-6 也是一种具有广泛生物活性的促炎细胞因子, 可在免疫调节、炎症反应、肿瘤发生等过程中发挥重要作用, 可通过 IL-6/STAT3 信号通路发挥生物学效应。IL-6 与 IL-6 受体结合形成复合物后可激活细胞膜表面的 gp130, 进而激活相关传导通路, 如 JAK/STAT 通路, Ras/ERK/MAPK 通路和 PI3K/Akt 通路来参与细胞的信号转导^[12]。JAK/STAT 信号通路是一类非受体酪氨酸激酶信号通路, 主要由细胞因子刺激控制的信号转导通路^[13]。JAK 家族主要包括 JAK1, JAK2, JAK3 及 TYK2, 是胞质内非受体型可溶性酪氨酸蛋白激酶^[14]。STAT 家族包括 7 个成员, 分别为 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b 及 STAT6, STAT 可与下游的靶基因相互作用, 从而调控 DNA 胞浆蛋白家族^[15]。JAK/STAT 信号通路的表达主要分为 3 个过程, 包括酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 JAK 和转录因子 STAT^[11]。在 JAK/STAT 途径中^[16], IL-6 与受体结合形成复合物, 该复合物对细胞膜表面的 gp130 进一步活化并与膜糖蛋白 gp130

相互作用,使与 gp130 相关联的 JAK 激酶磷酸化而被激活,并使 STAT3 的表达增加。这种激酶级联反应可进一步磷酸化 STAT3 使之能够进入细胞核内,进而对炎性细胞因子的表达进行调控。IL-6/gp130/STAT3 为其中最重要的通路,生物机体通过此信号途径,来实现抗炎和保护的功能^[17]。

本研究结果显示白头翁皂苷 B₄ 凝胶能明显降低 CE 模型大鼠子宫组织中 IL-6, STAT3 的 mRNA 和蛋白的表达水平,且能下调 STAT3 的活化形式 p-STAT3 的蛋白表达;大鼠子宫内上皮细胞实验结果同样显示白头翁皂苷 B₄ 能明显降低 LPS 刺激大鼠子宫内上皮细胞产生的 IL-6, gp130 和 STAT3 mRNA 表达水平。综上,可以推测白头翁皂苷 B₄ 的抗炎作用机制可能与抑制 IL-6/gp130/STAT3 信号通路有关,本实验结果为白头翁皂苷 B₄ 在治疗慢性盆腔炎的临床应用提供了实验依据,为开发抗慢性盆腔炎的药物奠定了基础。

[参考文献]

- [1] DUARTE R, FUHRICH D, ROSS J D. A review of antibiotic therapy for pelvic inflammatory disease[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 46(3): 272-277.
- [2] ZHANG L J, ZHU J Y, SUN M Y, et al. Anti-inflammatory effect of Man-Pen-Fang, a Chinese herbal compound, on chronic pelvic inflammation in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 208: 57-65.
- [3] OH Y, KWON Y S, JUNG B D. Anti-inflammatory effects of the natural compounds Cortex Phellodendri and *Humulus japonicus* on pelvic inflammatory disease in mice [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(8): 729-734.
- [4] 周朦静, 陈兰英, 胡宏辉, 等. 白头翁皂苷 B₄ 对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护作用研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(6): 664-670.
- [5] 龚琴, 王木兰, 何鹿玲, 等. 白头翁皂苷 B₄ 对实验性急性肾功能损伤的保护作用[J]. *中国现代中药*, 2019, 21(1): 62-67, 70.
- [6] 黄谱, 周筠, 崔刚, 等. 妇炎舒胶囊对慢性子宫内膜炎大鼠的治疗作用及其机制[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2015, 36(3): 404-407, 413.
- [7] 丁宁, 董立莎, 张亚洲, 等. 抗妇炎糜泡腾栓对苯酚胶浆致大鼠阴道炎及宫颈炎模型的影响[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(5): 125-127.
- [8] 肖萍, 林彩霞, 盘冰洁, 等. 岩黄连栓治疗慢性盆腔炎大鼠的药效学研究[J]. *中南药学*, 2019, 17(12): 2052-2058.
- [9] 胡屹屹, 穆祥, 胡元亮. 白头翁汤及其主要成分对脂多糖诱导的内皮细胞体外分泌 IL-1 α 和 IL-6 及 ET-1 的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(2): 116-120.
- [10] MITCHELL C, PRABHU M. Pelvic inflammatory disease: current concepts in pathogenesis, diagnosis and treatment[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2013, 27(4): 793-809.
- [11] 代洪波, 张艳. IL-6 和 TNF- α 在子宫内膜异位症不孕患者血清中水平的变化及意义研究[J]. *中国性科学*, 2016, 25(5): 54-56.
- [12] YAO X, HUANG J, ZHONG H, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(2): 125-139.
- [13] 杨伟娜, 杨军娜, 姚伊. 桃核承气汤通过 JAK2/STAT1 信号通路干预急性盆腔炎模型大鼠的研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2019, 19(9): 1075-1078, 1082.
- [14] WEN S H, LI Y, LI C, et al. Ischemic postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury and mucosal cell apoptosis by inhibiting JAK/STAT signaling activation [J]. *Shock*, 2012, 38(4): 411-419.
- [15] SMITH C C, DIXON R A, WYNNE A M, et al. Leptin induced cardio-protection involves JAK/STAT signaling that may be linked to the mitochondrial permeability transition pore [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(4): H1265-1270.
- [16] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R, et al. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 234-248.
- [17] ROSE-JOHN S. The soluble interleukin 6 receptor: advanced therapeutic options in inflammation [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102(4): 591-598.

[责任编辑 孙丛丛]