

# 盆炎汤对感染解脲脲原体小鼠生殖细胞凋亡的影响

左 玲 贝鹏剑 胡国华

(上海中医药大学附属上海市中医医院妇科, 上海市闸北区芷江中路 274 号, 200071)

**摘要** 目的:利用小鼠生殖道感染支原体的模型,研究盆炎汤对小鼠生殖细胞凋亡的影响。方法:昆明雌小鼠 63 只,随机分 7 组,采用注射外源性雌激素、阴道接种血清 8 型 Uu 菌株的方法建立模型。西药采用阿奇霉素、中药用朱南孙教授的经验方盆炎汤。结果:1) 白介素-1 $\beta$  模型组与正常组相比较有统计学意义( $P < 0.05$ ),其余各组之间相比较无统计学意义( $P > 0.05$ );白介素-6 各组间相比较无统计学意义( $P > 0.05$ );2) 子宫组织细胞凋亡率各组之间无统计学意义( $P > 0.05$ );阴道组织细胞凋亡各组与模型组相比较均有统计学意义( $P < 0.05$ );但各干预组之间无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:盆炎汤对 Uu 的生长有一定的抑制作用;盆炎汤可以减轻支原体对机体的病理损伤,抑制炎症因子的产生及生殖细胞的凋亡。

**关键词** 解脲脲原体/中药;盆炎汤;细胞凋亡

## The Effects of Pen Yan Tang on Germ Cells Apoptosis of Mice Colonized with Ureaplasma Urealyticum

Zuo Ling, Bei Pengjian, Hu Guohua

(Department of TCM Gynecology, Affiliated Shanghai hospital of TCM, Shanghai University of TCM, Add.: No. 274, Zhijiang Road, Zhabei District, Shanghai City, Post code: 200071)

**Abstract Objective:** Through investigating the expressions of cells apoptosis of vagina and uteri, to discuss the mechanism of Pen Yan Tang curing Ureaplasma urealyticum. **Methods:** Young adult female mice of strain KM were used. Sixty-three mice were divided into 7 groups randomly to be observed and compared in the trial. The medicine were Azithromycin and Pen Yan Tang. All mice were given Estradiol benzoate subcutaneously on four occasions, at weekly intervals. The serovar 8 of Ureaplasma urealyticum was inoculated intravaginally into all of the mice except the normal group at the same time as the mice received the second dose of Estradiol benzoate. **Results:** 1) The IL-1 $\beta$  level of the model group was increased, the difference with normal group was statistically significant ( $P < 0.05$ ); The IL-1 $\beta$  levels of all the treatment groups had no significantly difference ( $P > 0.05$ ); The IL-6 levels of all the groups had no significantly difference ( $P > 0.05$ ); 2) The uteri cells apoptosis rates of all the groups had no significantly difference ( $P > 0.05$ ); The vagina cells apoptosis rate of the model group was higher than the other groups ( $P < 0.05$ ); the vagina cells apoptosis rates of all the treatment groups had no significantly difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Pen Yan Tang can inhibit the growth of Uu. Pen Yan Tang could reduce the pathological damage to the host, inhibit the expressions of inflammatory factor and germ cell apoptosis.

**Key Words** Ureaplasma urealyticum/Traditional Chinese Medicine; Pen Yan Tang; Cells apoptosis

解脲脲原体是泌尿生殖道感染的常见病原体之一,它不仅引起 NGU,还可导致盆腔炎、不孕症、自然流产、早产、妊娠期感染、新生儿感染等疾病。近年来,在临床上中药治疗支原体的优势越来越受到重视。胡国华教授进行中草药体外抗 Uu 的药敏研究,发现清热解毒类的中药具有较好的抗支原体作用<sup>[1-2]</sup>,盆炎汤是名老中医朱南孙教授治疗慢性盆腔炎的经验方,临床上疗效确切。现将 2009 年 9 月至 2010 年 3 月于上海市中医医院中心实验室所做的动物试验——盆炎汤治疗 Uu 感染小鼠生殖系统的疗效报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性昆明种小鼠,体重(30 $\pm$ 2)g,清洁级,8~10 周,共 63 只,由上海斯莱克实验动物有限

责任公司提供。63 只小鼠随机分为 7 组,每组 9 只。1) 正常组:注射雌激素,不接种 Uu 菌液;2) 模型组:注射雌激素,阴道接种 Uu 菌液;3) 西药组:注射雌激素,阴道接种 Uu 菌液;4) 中西药结合组:注射雌激素,阴道接种 Uu 菌液;5) 盆炎汤大剂量组:注射雌激素,阴道接种 Uu 菌液;6) 盆炎汤中剂量组:注射雌激素,阴道接种 Uu 菌液;7) 盆炎汤小剂量组:注射雌激素,阴道接种 Uu 菌液。

1.2 试剂及药品 Uu 液体无菌培养液、Uu 固体无菌培养基(以上均由上海恩康生物科技有限公司提供),血清 8 型 Uu 菌株(购于美国菌种收藏中心,复苏传代),阿奇霉素片(规格:0.25g/片,湖北广济药业股份有限公司生产,批号:20090201)(参照 2006 年美国疾病预防控制中心性病治疗指南专辑),苯甲酸雌二醇(规格:2mg/mL,上海通用药业股份有限公司生产,批

号:070402), 中药盆腔炎汤组成: 蒲公英 30g, 红藤 30g, 延胡索 15g, 刘寄奴 12g, 续断 12g。煎煮浓缩后计算得所浓缩的最大浓度约为 4.5g/mL。(上海市中医医院提供)。

### 1.3 方法

1.3.1 造模 参照文献造模<sup>[3-4]</sup>: 1) 所有小鼠颈部皮下均注射苯甲酸雌二醇 0.4mg/只, 每周 1 次, 共 4 次; 2) 所有小鼠注射雌激素 1 周后, 除正常组外, 其余小鼠均感染 Uu。用微量移液器吸取处于对数生长期的 Uu 菌液 50 $\mu$ L, 伸入小鼠阴道约 0.5cm, 将 Uu 菌液缓缓注入小鼠阴道内, 注入完毕后将小鼠倒置半分钟, 使 Uu 菌液能充分与生殖道内壁接触。1 周后取小鼠阴道分泌物进行培养, 显微镜下观察到 Uu 菌落表明造模成功。

1.3.2 药物治疗 造模成功后开始用药。1) 正常组: 无菌纯净水灌胃 0.5mL/次  $\times$  14d; 2) 模型组: 无菌纯净水灌胃 0.5mL/次  $\times$  14d; 3) 西药组: 阿齐霉素 0.21g/kg, 灌胃、顿服; 4) 中西药结合组: 阿齐霉素 0.21g/kg, 顿服; 盆腔炎汤小剂量灌胃  $\times$  13d; 5) 盆腔炎汤大、中、小剂量组: 分别用 4.5g/mL、2.25g/mL、1.13g/mL 的中药汤剂灌胃 0.5mL/次  $\times$  14d。

1.3.3 观察 实验过程中观察小鼠的饮食、饮水情况, 体重变化, 毛色变化, 生殖道分泌物及大小便情况。

1.3.4 白介素检测 处死小鼠前采用股动脉取血法, 将所取血液及时离心后取上清液, 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测小鼠血清中白介素-1 $\beta$ 、白介素-6 的浓度。

1.3.5 凋亡 实验结束处死各组小鼠, 剖腹, 肉眼观察小鼠阴道分泌物、子宫等腹腔内情况。取部分阴道、子宫组织, 用 10% 甲醛固定, 做病理 HE 染色, 切片。用 TUNEL 法检测小鼠阴道、子宫组织凋亡细胞数量。

1.3.6 统计分析 利用 SPSS18.0 软件完成, 采用方差分析方法(剔除偏差太大的数值, 检测方差齐)。

## 2 结果

2.1 观察结果 接种 Uu 菌液后第 2~3 周小鼠的饮水量明显增加, 阴道周围红肿, 分泌物增多, 个别小鼠生殖道周围有脱毛伴液体渗出现象。小鼠的尿液气味臭秽, 尿量增多, 色黄。处死小鼠时发现部分小鼠有子宫增粗、水肿, 子宫壁变薄, 剪开子宫组织可见有腔内有透明液体流出, 部分小鼠有子宫变硬的现象。也可见小鼠膀胱内脓性分泌物, 膀胱壁变厚, 甚则坏死。

2.2 白介素-1 $\beta$  及白介素-6 比较结果 经 F 检验, 白介素-1 $\beta$  模型组、西药组及中药小剂量组与正常组相比较有统计学意义( $P < 0.05$ ), 从均值可以看出, 中

西药结合组、中药大、中剂量组的白介素-1 $\beta$  较其他组有降低的趋势; 白介素-6 各干预组存在较模型组降低的趋势, 其中中药大剂量组的降低最为明显, 见表 1。

表 1 白介素-1 $\beta$  及白介素-6 比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 例数 | IL-1 $\beta$ (pg/mL) | IL-6 (pg/mL)      |
|-------|----|----------------------|-------------------|
| 正常组   | 8  | 29.37 $\pm$ 16.41    | 29.38 $\pm$ 19.51 |
| 模型组   | 8  | 45.47 $\pm$ 11.72 *  | 30.22 $\pm$ 11.05 |
| 西药组   | 9  | 47.60 $\pm$ 20.27 *  | 26.29 $\pm$ 9.21  |
| 中西药组  | 9  | 36.65 $\pm$ 10.33    | 24.15 $\pm$ 7.08  |
| 中药大剂量 | 9  | 39.43 $\pm$ 13.73    | 27.89 $\pm$ 8.69  |
| 中药中剂量 | 8  | 34.0 $\pm$ 9.93      | 26.78 $\pm$ 8.20  |
| 中药小剂量 | 9  | 47.10 $\pm$ 16.68 *  | 27.67 $\pm$ 6.97  |

注: 模型组、西药组、中药小剂量组与正常组比较, \*  $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠子宫组织及阴道组织凋亡比较结果 从均值可以看出子宫组织细胞凋亡率干预各组存在较模型组降低的趋势, 尤以西药组、中西药组、中药大剂量组为明显。与模型组相比较各组阴道组织细胞凋亡率均有明显降低的趋势, 且以中药大剂量组最为明显。见表 2。

表 2 各组小鼠子宫组织及阴道组织凋亡比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 例数 | 子宫组织            | 阴道组织               |
|-------|----|-----------------|--------------------|
| 正常组   | 8  | 7.11 $\pm$ 2.80 | 5.74 $\pm$ 2.80 ** |
| 模型组   | 8  | 7.38 $\pm$ 3.03 | 9.88 $\pm$ 3.00    |
| 西药组   | 9  | 6.41 $\pm$ 1.97 | 7.53 $\pm$ 1.91 *  |
| 中西药组  | 9  | 5.31 $\pm$ 0.94 | 6.89 $\pm$ 2.57 ** |
| 中药大剂量 | 9  | 5.46 $\pm$ 1.86 | 5.93 $\pm$ 1.59 ** |
| 中药中剂量 | 8  | 6.91 $\pm$ 2.41 | 7.01 $\pm$ 1.20 *  |
| 中药小剂量 | 9  | 5.96 $\pm$ 1.22 | 7.26 $\pm$ 2.39 *  |

注: 正常组、中西药组、中药大剂量组与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 西药组、中药中剂量组与模型组比较, \*  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

细胞凋亡是 1972 年首先由英国科学家 Kerr 提出的, 细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象, 但是细胞凋亡过多将导致组织损伤和功能紊乱。支原体细胞膜中含有丰富的脂蛋白, 称为脂质相关膜蛋白, 有学者认为支原体的致病性可能与该膜蛋白有关。支原体 LAMPs 主要通过直接致病作用和免疫损伤等机制参与宿主细胞的损伤和凋亡<sup>[5]</sup>, LAMPs 能影响淋巴细胞和单核细胞膜的通透性, 从而诱导这些细胞释放 ATP, 后者能与免疫细胞膜上的 P2 嘌呤受体结合, 从而诱导细胞凋亡或坏死<sup>[6]</sup>。LAMPs 具有很强的抗原性, 并能以较高的频率发生相变异。它可以刺激人单核细胞、巨噬细胞等分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$ 、白介素-6, 而肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$  等都是前炎症的细胞因子, 是启动急性炎症反应的关键性细胞因子,

是启动细胞凋亡的重要细胞因子,与细胞凋亡关系密切<sup>[7-10]</sup>。本实验中观察到 Uu 感染小鼠不同程度的出现膀胱病变、子宫组织水肿等,及白介素-1 $\beta$  浓度模型组、西药组及中药小剂量组与正常组相比较有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 Uu 感染后可以上行感染,刺激炎症反应。张迅<sup>[11]</sup>等研究表明 Uu 可致生殖细胞凋亡增加,阴道组织细胞凋亡各组与模型组相比较均有统计学意义,其中正常组、中西药组、中药大剂量组与模型组相比较有统计学意义( $P < 0.01$ ),西药组、中药中、小剂量组与模型组相比较有统计学意义( $P < 0.05$ );说明 Uu 感染后阴道组织细胞凋亡增加,用药后可以减少炎症反应,从而抑制细胞凋亡的产生,其中以中西药结合及中药大剂量对阴道组织细胞的凋亡抑制作用最为显著;西药、中药中、小剂量对阴道组织细胞的凋亡也有抑制作用。均值提示子宫组织细胞凋亡干预各组存在较模型组降低的趋势,尤以西药组、中西药组、中药大剂量组为明显;阴道组织细胞凋亡各组与模型组相比较均有明显降低的趋势,中药大剂量组降低最为明显。

综上,盆腔炎可以抑制白介素-1 $\beta$  及白介素-6 的产生,从而减轻支原体感染炎症反应所造成的病理损伤,降低支原体感染所造成的生殖细胞凋亡,并且这种作用随着用药剂量的增加而增强。

#### 参考文献

- [1] Taylor-robinson D., Furr P. M.. Observations on experimental colonisation of mice by ureaplasmas of human origin[J]. Med Microbiol, 2002, 51:866-870.
- [2] 潘展砚,黄欣,黄峥烨,等.解脲脲原体阴道炎动物模型建立及强力霉素治疗疗效观察[J].中国皮肤性病杂志,2007,21(12):741-743.
- [3] 胡国华,叶元康,夏英,等.抗解脲脲原体的中草药筛选的实验研究[J].天津中医学院学报,1998,17(3):43-45.
- [4] 左玲,胡国华.中药对乳酸杆菌与解脲脲原体临床分离株的体外抑制实验研究[J].时珍国医国药,2008,19(12):2999-3000.
- [5] 何军,吴移谋.支原体脂质相关膜蛋白的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2008,24(11):1074-1076.
- [6] Into T, Okada K, Inoue N, et al. Extracellular ATP regulates cell death of lymphocytes and monocytes induced by membrane-bound lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma salivarium*[J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(10):667-675.
- [7] Muhlradt, P. F., Frisch, M. Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6[J]. Infect Immun, 1994, 62(9):3801-3807.
- [8] 曾焱华,吴移谋,邓仲良,等.穿透支原体脂质相关膜蛋白诱导人单核细胞产生炎症性细胞因子[J].中华传染病杂志,2006,24(4):251-253.
- [9] Bijangi - Vishehsaraei K, Saadatzaheh M. R, Werne A, et al. Enhanced TNF- $\alpha$  - induced apoptosis in Fanconi anemia type C - deficient cells is dependent on apoptosis signal-regulating kinase 1[J]. Blood, 2005, 106(13):4124-4130.
- [10] 鲁杰,赵小元,孙宝岭,等.肺炎支原体对小鼠腹腔巨噬细胞激活作用的研究[J].中国人兽共患病学报,2006,22(5):477-478.
- [11] 张迅,何清湖,刘朝圣.知柏地黄汤对解脲脲原体感染大鼠动物模型生殖细胞凋亡及 Fas、FasL 表达的影响[J].湖南中医学院学报, 2005, 25(1):9-11.

(2012-03-12 收稿)

## 世界中联被联合国教科文组织认证为非物质文化遗产保护咨询机构

联合国教科文组织《非物质文化遗产保护公约》第四届缔约国大会于 2012 年 6 月 4 日至 8 日在法国巴黎联合国教科文组织总部召开。世界中联通过该大会认证,正式成为联合国教科文组织《非物质文化遗产保护公约》第四届缔约国大会认证的咨询机构。

根据联合国教科文组织非物质文化遗产委员会公布资料显示,委员会共收到来自世界各国共计 888 份申请,经过专家委员会的审议,最后确定了 59 家机构提交本次缔约国大会表决。世界中医药学会联合会获得专家委员会提名进入大会认证表决程序。经过大会最终表决,世界中医药学会联合会等 59 家机构获得了大会认

证。

世界中联申报联合国教科文组织非物质文化遗产保护咨询机构的认证是在中国文化部和国家中医药管理局的支持和指导下,历经 2 年的资料准备和申报审查过程,最终得到批准。这是中国传统中医药机构首次得到联合国教科文组织《非物质文化遗产保护公约》缔约国大会的认证,成为联合国教科文组织的咨询机构,将有利于中医药文化的交流与合作,推动中医药国际认可与传播,为中医药文化进一步国际发展注入新的活力。