

文章编号:1000-5404(2013)12-1267-04

论著

菝葜各化学部位对大鼠慢性盆腔炎模型的治疗作用

马云¹, 罗艳琴¹, 宋路瑶¹, 龚恬², 侯连兵¹ (510515 广州, 南方医科大学南方医院药学部¹; 510500 广州, 解放军76171部队²)

[摘要] **目的** 研究菝葜乙醇总提取物及各化学部位对慢性盆腔炎疾病(chronic pelvic inflammatory disease, CPID)模型大鼠的血液学及病理形态学改变的影响, 筛选出菝葜抗慢性盆腔炎的主要活性部位。**方法** 160只SD雌性大鼠按随机数字表法分为16个组, 除空白对照组和假手术组, 其余各组均采用苯酚胶浆注入大鼠子宫造成大鼠CPID模型。其中4个化学部位的高、中、低剂量组, 均分别灌胃给予32.4、16.2、8.1 g/kg, 金刚藤胶囊组16.2 g/kg灌胃给药, 模型对照组、空白对照组和假手术组均给予等体积蒸馏水。每日1次, 连续给药10 d。末次给药24 h后, 各组大鼠腹主动脉采血进行血液学指标检测; 摘除双侧子宫观察大鼠子宫的病理改变。**结果** 菝葜的乙酸乙酯部位高、中剂量组能显著降低CPID模型大鼠的子宫炎症反应, 较模型对照组均有统计学差异($P < 0.01$)。病理观察显示菝葜乙酸乙酯部位能明显改善大鼠子宫肿胀程度, 镜下观察其抗炎效果与菝葜乙醇提取液组相当, 明显优于正丁醇组和水液组。**结论** 菝葜的乙酸乙酯部位为菝葜抗慢性盆腔炎的主要活性部位。

[关键词] 菝葜; 慢性盆腔炎; 活性部位; 化学部位

[中图分类号] R-332; R282.71; R711.33

[文献标志码] A

Therapeutic effect of chemical fractions of Smilax china on Chronic pelvic inflammation disease in rats

Ma Yun¹, Luo Yanqin¹, Song Luyao¹, Gong Tian², Hou Lianbing¹ (¹Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; ²76171 Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of the total ethanol extract and separated chemical fractions of Smilax China on hematological and pathomorphological alterations in rats with chronic pelvic inflammation disease (CPID), and to identify the active sites of Smilax China for treating CPID. **Methods** One hundred and sixty female Sprague-Dawley rats were randomly divided into 16 groups. Rat CPID model were constructed by intrauterine injection of phenol mucilage. Each of the four chemical fractions of Smilax China was administered to the model rats by gavage with three different doses (32.4, 16.2 and 8.1 g/kg) for 10 consecutive days, once per day. Jingangteng capsule was administered in a dose of 16.2 g/kg as a positive control group. The rats of model control group, control group and sham-operated group were administered with the same amount of distilled water. Twenty-four hours after the last drug administration, the rats were killed and blood was collected from the abdominal aorta for hematological analysis, while the two uteri were removed for pathomorphological analysis. **Results** Compared with the model control group, the ethyl acetate fraction of Smilax significantly ameliorated the inflammatory response in uterus at its high and middle dose ($P < 0.01$). Pathological analysis indicated that the uterus swelling extent decreased in Smilax China ethyl acetate fraction group. The anti-inflammation effect of Smilax China ethyl acetate fraction was equal to that of the total Smilax China ethanol extract, and was much better than that of Smilax China n-butanol fraction group and water fraction group. **Conclusion** The ethyl acetate fraction of Smilax China is the main active fraction against CPID.

[Key words] Smilax; chronic pelvic inflammation; active fraction; chemical fraction

Corresponding author: Hou Lianbing, Tel: 86-20-61642175, E-mail: hlianbing@163.com

[通信作者] 侯连兵, 电话: (020)61642175, E-mail: hlianbing@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1106.026.html> (2013-03-21)

菝葜(Smilax China L.)系百合科菝葜属植物,其根、茎、叶均可入药,尤以根茎入药最为常见。在全世界范围内,其总提物制剂广泛应用于慢性盆腔炎、梅毒、急性细菌性痢疾和慢性肾炎^[1]。尤其对于妇科慢

性炎症、附件炎以及调节免疫、活血化瘀等病症疗效显著。近年来,中药有效部位研究成为中药现代化进程的重要组成部分,有研究表明,菝葜有效部位群对慢性盆腔炎疾病(chronic pelvic inflammatory disease, CPID)有较好的抗炎镇痛作用^[2]。该有效部位群含多个化学部位,本研究在此基础上选用菝葜的根部,采用乙醇提取,经乙酸乙酯、正丁醇萃取后得到的3个化学部位,观察菝葜乙醇提取液及3个化学部位,其中包括乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水液部位对苯酚胶浆所致CPID模型大鼠血液学及病理形态学改变的影响,探讨菝葜治疗CPID的单一活性部位,从而使有效物质富集度高,药效物质相对明确、药理活性相对特定、治疗标准相对稳定,体现中药科学性和现代化^[3],也为进一步开发菝葜抗CPID单体提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 金刚藤胶囊:湖北福人药业股份有限公司提供,批号:20110318;醋酸泼尼松:天津药业焦作有限公司,批号:12010211;以上药物均在实验时以蒸馏水配成所需浓度的溶液。

1.1.2 实验动物 SPF级SD大鼠160只,雌性,体质量180~220g,由南方医科大学实验动物中心提供(动物合格证号:0108038)。实验前将动物置室内适应性饲养3d,室温20~24℃。

1.1.3 试剂 苯酚:广东光华化工厂,批号:20101204;西黄耆胶:上海汉光化学试剂有限公司,批号:20120109;甘油:广东光华科技股份有限公司,批号:20110918;戊巴比妥钠:Merck公司,批号:1212013。

1.1.4 仪器 BA110S分析天平:德国Sartorius;eclipse Ti-s型荧光倒置显微镜:日本Nikon。

1.2 CPID大鼠模型制作

取SD雌性大鼠160只,禁食不禁水12h,3%戊巴比妥钠30mg/kg腹腔注射麻醉后,下腹常规消毒后于正中切口,暴露子宫,用0.2mL注射器配0.1mL注射器的针头,于子宫分岔处进入子宫腔内,朝右侧卵巢方向缓慢推注25%苯酚胶浆0.06mL,左侧子宫不注射作为自身对照。造模完成后分层关腹,消毒术区。保留10只仅进行开腹和关腹手术,未注射苯酚胶浆造模,作为假手术对照组^[4]。

1.3 分组及给药

将160只SD大鼠按随机表法分为16组:菝葜乙醇提取液,乙酸乙酯层,正丁醇层和水液层的高、中、低剂量组,均分别灌胃给予32.4、16.2、8.1g/kg(按生药量计,即相当于临床等效剂量的4、2、1倍),金刚藤胶囊组按生药量计以16.2g/kg灌胃给药(相当于临床等效剂量的2倍),模型对照组、空白组和假手术组均给予等体积蒸馏水。于造模后第7天开始给药,每日1次,连续给药10d。

1.4 观察指标

于第11天,即末次给药24h后,各组大鼠以3%戊巴比妥钠30mg/kg腹腔注射麻醉后,腹主动脉采血进行血常规、血流

变检测;肉眼观察大鼠子宫造模侧的形态变化;摘除双侧子宫置10%甲醛固定液浸泡,HE常规染色,镜下观察大鼠子宫的病理改变:腔壁结构改变,上皮细胞增生的程度;上皮细胞是否变性坏死;慢性炎症细胞浸润的范围、数量及内膜有无充血水肿。根据炎症病变的程度,每项为正常(-)、轻度(+),中度(++),和重度(+++),分别评分为0、1、2、3分^[5],以各组评分之和为炎性评分结果进行统计学分析。

1.5 统计学处理

所有数据采用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析,计量资料统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,完全随机设计资料的多个样本均数比较采用单因素方差分析;组间两两比较,方差齐性时采用Least-significant Difference法(LSD),方差不齐时采用Dunnnett's T3法;病理评分采用非参数检验的秩和检验进行统计学处理。

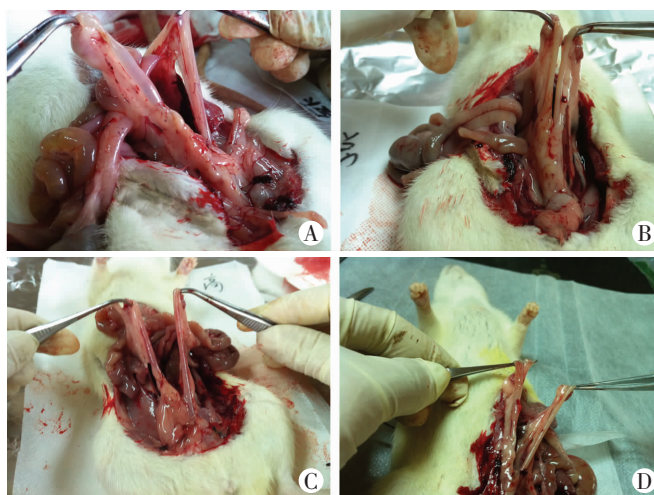
2 结果

2.1 慢性盆腔炎模型大鼠血液学指标的变化

由表1可知,模型对照组各项血液学指标较空白对照组有显著增高($P < 0.01$)。菝葜乙醇提取液组与乙酸乙酯层组的高、中剂量能显著降低大鼠增高的全血黏度,与模型对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);乙酸乙酯层的高剂量可使大鼠血浆黏度显著降低($P < 0.01$);同时菝葜乙醇提取液组的高剂量和乙酸乙酯部位的高剂量组均能降低大鼠红细胞聚集指数和变形指数($P < 0.01, P < 0.05$),效果与阳性对照药相当;除正丁醇部位和水液部位,其余各组均能显著降低大鼠白细胞水平($P < 0.01$)。总体来说,菝葜乙醇提取液组抗大鼠CPID作用与乙酸乙酯层相当;正丁醇层高剂量效果与乙酸乙酯层中剂量抗大鼠CPID效果相当,其余各组与模型对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 形态观察

肉眼观察模型对照组大鼠右侧子宫(注入苯酚胶浆侧)明显水肿、炎性包块,与周围组织几乎完全粘连,而大鼠左侧子宫光滑成条状,无粘连(图1A)。菝葜乙醇提取部位与乙酸乙酯部位大鼠子宫炎症反应和粘连情况明显好转,子宫腔通畅(图1B、C),而正丁醇部位和水液部位效果不明显(图1D)。



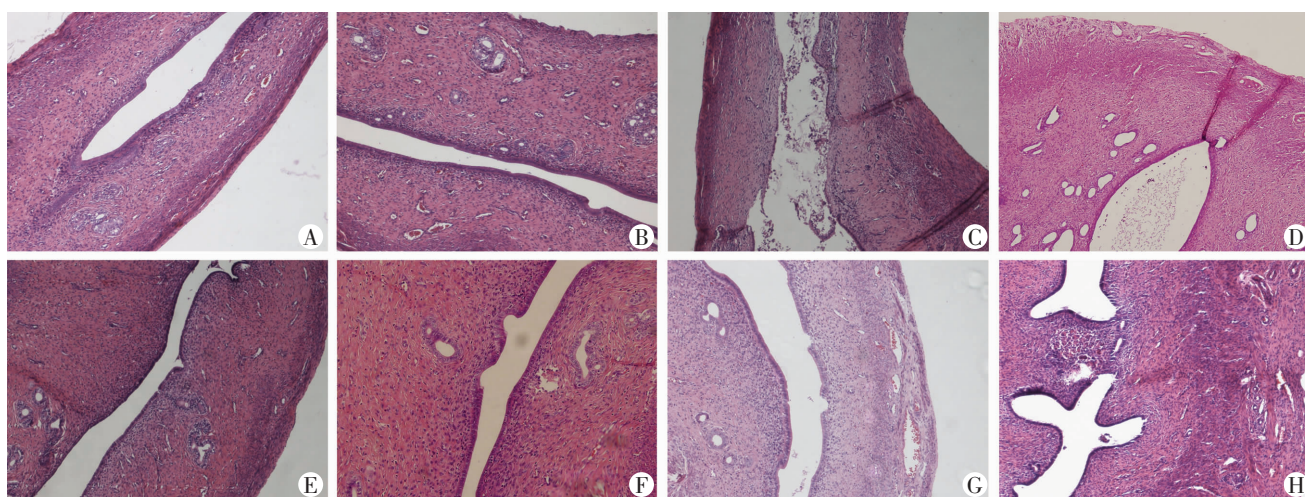
A:模型对照组;B:菝葜乙醇提取液组(32.4g/kg);C:菝葜乙酸乙酯层组(32.4g/kg);D:菝葜正丁醇层组(32.4g/kg)

图1 各组大鼠给药10d后大鼠双侧子宫大体观察

表1 菝葜各化学部位对慢性盆腔炎大鼠血液学指标变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	全血黏度(mPa·s)			血浆黏度 (mPa·s)	红细胞聚 集指数	红细胞变 形指数	白细胞计数 ($\times 10^9/L$)
	高切(100)	中切(60)	低切(10)				
模型对照组	6.24 ± 0.62 ^d	7.29 ± 1.05 ^d	14.62 ± 2.7 ^c	1.36 ± 0.08 ^d	2.43 ± 1.19	1.26 ± 0.09	13.34 ± 5.69
空白对照组	4.98 ± 0.89 ^b	5.56 ± 0.79 ^b	10.78 ± 2.50 ^b	1.08 ± 0.07 ^b	2.19 ± 0.09 ^{bd}	1.17 ± 0.06 ^a	4.28 ± 4.05 ^b
假手术组	5.15 ± 0.68 ^b	5.60 ± 0.95 ^b	12.41 ± 1.68 ^a	1.14 ± 0.20 ^b	2.35 ± 0.29	1.19 ± 0.13	4.36 ± 4.26 ^b
菝葜乙醇提取液 32.4 g/kg 组	5.12 ± 0.58 ^b	5.64 ± 0.64 ^b	11.07 ± 1.32 ^b	1.16 ± 0.09 ^a	2.22 ± 0.09 ^b	1.16 ± 0.07 ^a	5.78 ± 3.01 ^b
菝葜乙醇提取液 16.2 g/kg 组	5.32 ± 0.84 ^b	6.04 ± 1.08 ^b	11.68 ± 2.72 ^b	1.17 ± 0.18 ^a	2.38 ± 0.09	1.19 ± 0.08	7.65 ± 5.79 ^b
菝葜乙醇提取液 8.1 g/kg 组	5.42 ± 0.47 ^b	6.24 ± 0.66 ^b	12.65 ± 1.95 ^a	1.27 ± 0.11	2.43 ± 0.12	1.23 ± 0.09	7.32 ± 5.98 ^b
乙酸乙酯层 32.4 g/kg 组	5.28 ± 0.60 ^b	6.10 ± 0.69 ^{bd}	11.07 ± 1.32 ^b	1.13 ± 0.35 ^b	2.23 ± 0.09 ^a	1.17 ± 0.07 ^a	2.59 ± 2.89 ^b
乙酸乙酯层 16.2 g/kg 组	5.44 ± 0.75 ^b	6.48 ± 0.83 ^{ad}	12.36 ± 1.73 ^a	1.16 ± 0.21 ^a	2.37 ± 0.18	1.19 ± 0.07	3.39 ± 3.70 ^b
乙酸乙酯层 8.1 g/kg 组	5.72 ± 0.78	6.66 ± 0.56	14.94 ± 2.07 ^c	1.28 ± 0.09	2.43 ± 0.24	1.23 ± 0.10	5.96 ± 3.29 ^b
正丁醇层 32.4 g/kg 组	5.56 ± 0.49 ^b	6.29 ± 0.63 ^b	11.40 ± 1.59 ^b	1.21 ± 0.16 ^a	2.40 ± 0.33	1.22 ± 0.11	7.93 ± 3.47 ^a
正丁醇层 16.2 g/kg 组	5.68 ± 0.68	6.49 ± 0.79 ^{ad}	12.82 ± 2.14	1.29 ± 0.08	2.51 ± 0.11	1.24 ± 0.11	11.71 ± 4.99 ^d
正丁醇层 8.1 g/kg 组	5.96 ± 0.79 ^d	7.29 ± 0.82 ^d	13.33 ± 1.65	1.33 ± 0.12 ^c	2.54 ± 0.19 ^c	1.26 ± 0.08	11.69 ± 7.67 ^d
水液层 32.4 g/kg 组	6.05 ± 0.51 ^d	7.00 ± 0.66 ^d	14.34 ± 1.98 ^d	1.27 ± 1.15 ^d	2.57 ± 0.20 ^d	1.29 ± 0.05 ^c	9.64 ± 4.64 ^d
水液层 16.2 g/kg 组	6.21 ± 1.05 ^d	7.34 ± 1.08 ^d	14.60 ± 2.53 ^d	1.28 ± 1.10 ^d	2.57 ± 0.13 ^d	1.30 ± 0.13 ^c	13.24 ± 7.15 ^d
水液层 8.1 g/kg 组	6.39 ± 1.06 ^d	7.45 ± 1.39 ^d	15.46 ± 2.50 ^d	1.31 ± 1.19 ^d	2.57 ± 0.13 ^d	1.33 ± 0.15 ^d	15.31 ± 7.03
金刚藤胶囊 16.2 g/kg 组	5.43 ± 0.70 ^b	6.33 ± 0.96 ^b	12.15 ± 2.49 ^b	1.21 ± 1.15 ^b	2.26 ± 0.10 ^a	1.18 ± 0.10	6.33 ± 2.74 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与假手术组比较



A: 空白对照组; B: 假手术组; C: 模型对照组; D: 金刚藤胶囊组; E: 菝葜乙醇提取液高剂量组; F: 乙酸乙酯高剂量组; G: 正丁醇高剂量组; H: 水液层高剂量组

图2 各组大鼠给药 10 d 后子宫组织标本病理学变化 (HE × 100)

2.3 病理学观察

镜下观察显示:空白对照组腔壁各层结构清晰,子宫腺体结构正常,子宫黏膜上皮细胞间质疏松,细胞形态正常,内膜无充血水肿,宫腔内无脱落物(图2A);假手术组腔壁各层结构完整、清晰,黏膜上皮细胞呈低柱状,有少量慢性炎症细胞浸润,无内膜充血水肿(图2B);模型对照组,腔壁结构紊乱,腺体萎缩变形,内部有大量分泌物,黏膜上皮细胞密集增生呈低乳头状突入宫腔,全层可见大量慢性炎症细胞浸润,内膜充血水肿明显(图2C);中药阳性对照组,黏膜上皮细胞变性呈空泡状,固有层和肌层可见中等量慢性炎症细胞浸润,内膜部分充血、水肿(图2D);菝葜乙醇提取液高剂量组:黏膜上皮细胞呈低柱状排列整齐,局部上皮细胞变性坏死脱落,内膜浆膜层组织水肿情况显著降低,子宫病变基本恢复正常(图2E);乙酸乙酯高剂

量组:腔壁结构基本正常,少量慢性炎症细胞散在黏膜上皮细胞,形态基本正常,内膜轻度水肿(图2F);正丁醇高剂量组:宫腔扩张,腔壁结构损害,中等量慢性炎症细胞浸润,膜内上皮细胞形态及分布基本正常,内膜部分充血水肿(图2G);水液高剂量组:宫腔粘连、扩张,腔壁结构紊乱,腺体萎缩变形,黏膜上皮细胞密集增生以低柱状为主,慢性炎症细胞多数散在浸润,内膜部分充血水肿(图2H)。通过病理评分可知:菝葜乙醇提取液组和乙酸乙酯层组能明显改善上述症状,减少慢性炎症细胞浸润,改善充血、水肿和宫壁各层结构,大部分腺体结构清晰完整,随着剂量增高,效果越明显。正丁醇层高剂量组炎症改善不如乙酸乙酯层明显。水液层与模型对照组比较镜下观察无明显差异。见表2。

表2 菝葜各化学部位对各组慢性盆腔炎大鼠子宫病理组织积分的影响 (n=10)

组别	病变等级(分)				秩平均值
	-	+	++	+++	
模型对照组	0	8	14	28	628.00
假手术组	29	12	6	3	218.85 ^b
空白对照组	40	9	1	0	115.71 ^b
金刚藤胶囊组	14	21	17	2	322.94 ^b
菝葜乙醇提取液 32.4 g/kg 组	11	25	11	3	318.42 ^b
菝葜乙醇提取液 16.2 g/kg 组	7	33	7	3	388.43 ^b
菝葜乙醇提取液 8.1 g/kg 组	6	25	12	7	454.22 ^b
乙酸乙酯层 32.4 g/kg 组	3	19	20	8	302.21 ^b
乙酸乙酯层 16.2 g/kg 组	6	37	5	2	398.14 ^b
乙酸乙酯层 8.1 g/kg 组	4	26	14	6	498.35 ^b
正丁醇层 32.4 g/kg 组	1	16	23	10	381.06 ^b
正丁醇层 16.2 g/kg 组	6	24	16	4	556.37 ^a
正丁醇层 8.1 g/kg 组	1	10	23	16	589.64
水液层 32.4 g/kg 组	1	7	22	20	622.91
水液层 16.2 g/kg 组	1	4	21	24	586.17
水液层 8.1 g/kg 组	2	9	15	24	564.87

a: P < 0.05, b: P < 0.01, 与模型对照组比较

3 讨论

慢性盆腔炎属于妇科常见病、多发病,该病病情顽固,复发率高。在发展中国家,因该病的住院率在生育年龄组已经高达40%^[6],主要临床表现为低热、倦怠乏力、腹痛、月经不调、痛经、不育。如已形成慢性附件炎,则可触及肿块^[7]。目前西医的药物治主要用二联以上抗生素。但对于CPID长期炎症刺激引起的周围器官粘连、组织增厚、疤痕粘连、局部血液循环障碍者,抗生素难以渗入组织发挥作用。同时由于抗生素滥用,易造成严重耐药,致使病情反复发作。慢性盆腔炎的中医临床表现为出现血证、痛证及癥瘕肿块,月经不调等,主要表现在血液呈现“浓、黏、凝”的状态,也即是血液流变学的改变。血液流变学改变是血液循环和微循环障碍发生的原因和基础,从而导致一系列疾病。目前,血液流变性、血液黏度的异常被认为是血瘀证的病理基础之一^[8]。

本实验通过血液学研究结果表明,菝葜乙醇提取液组和乙酸乙酯部位的中、高剂量组均能显著降低炎症大鼠的全血黏度、血浆黏度,表明该化学部位能促使大鼠盆腔血流速相对加快,局部血流灌注增加,同时促进毛细血管增生,改善局部病灶的血液循环,促进局部水肿的消退和炎症的吸收;通过改善红细胞的弹性和变形性,降低红细胞在微血管流动时的黏度,缓解血液“浓、黏、聚、凝”状态,缓解血瘀症状,起到治疗慢性盆腔炎的作用。此外还能降低CPID大鼠血液中白细胞指标,从而改善炎症反应。然而,引起血液学指标改变的因素很多,感染、冠心病、恶性肿瘤、白血病等均可使

血液黏度增高。因此,本课题同时对大鼠子宫进行了大量病理观察,进一步判定菝葜抗CPID的有效部位。

本实验对苯酚胶浆所致CPID大鼠子宫病理切片均从子宫中轴竖切,观察子宫中段宫腔周围组织的病理改变,结果表明:菝葜乙醇提取液组和乙酸乙酯部位能明显减少炎症细胞的浸润,促进组织修复,更好的改善病变子宫的炎症状态,且当乙酸乙酯部位浓度高于临床等效剂量的2倍以上时,效果尤为明显。正丁醇高剂量组有明显的充血水肿,且腔内有散见上皮细胞坏死脱落至宫腔,中、低剂量及水液部位3个剂量组大鼠子宫均明显水肿,周围粘连程度较高,抗炎效果不明显。

本研究通过血液学和病理学研究结果证明菝葜乙醇提取液组和乙酸乙酯部位均具有良好的抗炎作用,但乙酸乙酯部位比乙醇提取液含生药量更高,如果开发成制剂,可减少患者服用次数和服用剂量,且有效部位比总提取液质量更可控,符合中药现代化的研究目标。

本实验通过大孔树脂对乙酸乙酯部位进行进一步分离、纯化,经HPLC测定其所含物质主要为落新妇苷、黄杞苷和芦丁,其含量可达30%左右,其余成分还在进一步分离验证中。我们认为乙酸乙酯部位可作为菝葜治疗CPID的主要活性部位,可进一步开发成临床疗效确切、毒副作用低、质量可控的菝葜有效成分新制剂。

参考文献:

- [1] Khan I, Nisar M, Ebad F, et al. Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from Smilax china Linn: experimental and computational studies[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(1): 175-177.
- [2] 黄显章, 邹鹏程, 高秋芳, 等. 金刚藤有效部位群治疗慢性盆腔炎的抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 114-117.
- [3] 吴文博, 魏晨玲, 齐俊英. 对中药复方不同提取部位的相关研究之思考[J]. 医学与哲学: 人文社会医学版, 2007, 28(3): 76-77.
- [4] 张樱山, 李文雅, 赵晖, 等. 红花如意丸治疗大鼠慢性盆腔炎的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 180-184.
- [5] 向海燕, 王羽伦, 侯连兵, 等. 金刚藤分散片对大鼠慢性盆腔炎血液流变学与病理组织形态学的影响[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(2): 38-41.
- [6] Khan Z E, Rizvi J H. Pelvic inflammatory disease and pelvic abscesses [J]. Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice, 2006, 6(3/4): 185-191.
- [7] Zhou J, Qu F. Treating gynaecological disorders with traditional Chinese medicine: a review[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2009, 6(4): 494-517.
- [8] 冯书梅, 孙维峰. 慢性盆腔炎动物模型子宫病理学改变与血流变学关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(5): 484-486.

(收稿:2012-11-26;修回:2013-03-10)

(编辑 张 维)