

紫金化毒栓治疗宫颈炎的药效学评价

郭姗姗¹, 高英杰¹, 包蕾¹, 金亚宏¹, 李艳英², 崔晓兰^{1*}, 萧伟^{3*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京因科瑞斯药物研究院有限公司, 北京 102209;
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

[摘要] **目的:**观察紫金化毒栓在体内外对病毒、细菌、苯酚致宫颈炎的药效作用,为评价其治疗宫颈炎的药效作用提供实验依据。**方法:**SD 大鼠 70 只,随机分为正常组,模型组,妇宁栓组(0.15 g·kg⁻¹·d⁻¹),聚甲酚磺醛栓组(8.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹)及紫金化毒栓高、中、低剂量组(1.2, 0.6, 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组 10 只,除正常组外,其余各组采用针头刮擦 3 次,造成子宫表面损伤,每隔 2 日注入 1 次,共 3 次,造成感染模型,造模成功后阴道内给药,每日 1 次,连续 12 d,采用 HE 染色病理切片观察大鼠宫颈炎病变,采用 ELISA 检测宫颈组织中病毒的表达。体外实验观察对单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)的抑制作用,采用 RT-PCR 和 CPE 法观察紫金化毒栓对病毒的抑制作用、采用比浊法观察抑菌作用。**结果:**在 HPV16 感染的大鼠宫颈炎模型上,紫金化毒栓 1.2, 0.6, 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量组对大鼠宫颈组织中 HPV16 表达具有明显的抑制作用,1.2, 0.6 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量组对宫颈组织病理改变具有明显的抑制作用;在大肠埃希菌、淋球菌和金黄色葡萄球菌混合感染的大鼠宫颈炎模型上,紫金化毒栓 1.2, 0.6 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量组对大鼠宫颈的病理改变具有明显的抑制作用;在化学物质致大鼠宫颈炎的模型上,紫金化毒栓 1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量组对大鼠阴道、宫颈病变具有明显的抑制作用。紫金化毒栓在体外对疱疹病毒 2 型、人乳头瘤病毒 16 型、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型链球菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌、变形杆菌、淋球菌、白色念珠菌具有明显的抑制作用。**结论:**紫金化毒栓在体外对病毒、细菌均有明显的抑制作用,对苯酚致宫颈炎的具有明显的改善作用。

[关键词] 紫金化毒栓; 宫颈炎; 人乳头瘤病毒 16 型; 细菌混合感染; 苯酚胶浆

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0115-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050115

Pharmacodynamics of Zijin Huadu Suppository in Treatment of Cervicitis

GUO Shan-shan¹, GAO Ying-jie¹, BAO Lei¹, JIN Ya-hong¹, LI Yan-ying², CUI Xiao-lan^{1*}, XIAO Wei^{3*}

(1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*
2. *Beijing Increase Pharmaceutical Institute Co. Ltd., Beijing 102209, China;*
3. *Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the pharmacodynamic effect of Zijin Huadu suppository on treatment of cervicitis induced by virus, bacteria and phenol *in vivo* and *in vitro*, and provide experimental basis for evaluating its therapeutic effects for cervicitis. **Method:** The 70 SD rats were randomly divided into normal group, model group, Funing suppository group (0.15 g·kg⁻¹·d⁻¹), policresulen suppository group (8.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹), Zijin Huadu suppository high dose group, middle dose group and low dose group (1.2, 0.6, 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹), *n* = 10 in each group. Needle scraping was done for three times in all the other groups except the normal group to induce surface damage of uterus, and infusion was done once every 2 days for 3 times in total to induce infection models. After successful modeling, vagina administering was done once a day for continuous 12 days. HE staining

[收稿日期] 20150213(012)

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所重点学科联合课题项目(2011ZDXK-03)

[第一作者] 郭姗姗, 博士, 副研究员, 从事中药抗病毒研究, Tel:86-10-84252805-4102, E-mail: ruochushan@163.com

[通讯作者] * 崔晓兰, 博士, 研究员, 从事中药抗病毒研究, Tel:86-10-84015200, E-mail: cuixl2812@sina.com;

* 萧伟, Tel:86-518-81152367, E-mail: kanionlunwen@163.com

pathological dyeing was used to observe the cervicitis lesions of rats; ELISA assay was used to detect the expression of virus in cervical tissues; *in vitro* test was used to observe its inhibitory effect on herpes simplex virus-2 (HSV-2); RT-PCR and CPE method were used to observe the inhibitory effect of Zijin Huadu suppository on virus replication and its bacteriostasis activity was observed by turbidimetry. **Result:** The results demonstrated that in HPV16-infected cervicitis rat models, Zijin Huadu suppositories at doses of 1.2, 0.6, 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹ had significant inhibitory effect on expression of HPV16 in cervical tissues, and the doses of 1.2, 0.6 g·kg⁻¹·d⁻¹ had significant inhibitory effect on pathological changes of cervical tissues. In cervicitis rat models with mixed infection of *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus*, Zijin Huadu suppositories at doses of 1.2, 0.6 g·kg⁻¹·d⁻¹ had significant inhibitory effect on pathological changes of cervical tissues. In cervicitis rat models induced by chemical substances, Zijin Huadu suppositories at dose of 1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹ had significant inhibitory effect on vagina and cervix lesions in rats. *In vitro*, Zijin Huadu suppository showed obvious inhibitory effect on HSV-2, HPV16, *S. aureus*, *S. albus*, *S. epidermidis*, group B *Streptococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus bacillus vulgaris*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Candida albicans*. **Conclusion:** Zijin Huadu suppository has obvious inhibitory effect *in vitro* on viruses and bacteria, and has obvious improvement for all the phenol-induced cervicitis.

[**Key words**] Zijin Huadu suppository; cervicitis; HPV16; bacteria mixed infection; phenol mucilage

紫金化毒栓由金银花、连翘、黄柏、紫草等药味制成,来源于临床经验方,具有清热解毒、活血燥湿的作用,在临床上用于治疗宫颈炎及宫颈高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染。

宫颈炎是妇科常见疾病之一,其病变包括子宫颈阴道部炎症及子宫颈管黏膜炎症。由于子宫颈管黏膜上皮为单层柱状上皮,抗感染能力较差,易发生感染。临床多见的宫颈炎是急性子宫颈管黏膜炎,若急性宫颈炎未经及时诊治或病原体持续存在,可导致慢性宫颈炎^[1-2]。宫颈炎的主要病因因为病原微生物感染,细菌、病毒、支原体等均为引起宫颈炎的主要病因。其中金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、淋球菌、甲型溶血性链球菌等为临床上宫颈炎的常见致病菌^[3-4],HPV 是引起宫颈炎的最常见病毒^[5],在宫颈炎组织中,基因芯片检测出的高危型 HPV 感染率为 8.33%^[6],其中 HPV16 为主要的 高危致病亚型。

本研究采用细菌混合感染,HPV16 病毒感染和化学物质致大鼠宫颈炎的模型首次对紫金化毒栓治疗宫颈炎的作用进行了研究,并在体外对其抗菌、抗病毒作用进行可观察,为证实紫金化毒栓治疗宫颈炎的药效作用提供了试验依据。

1 材料

1.1 动物及菌毒株、细胞株 SD 大鼠,SPF 级,雌性,体重 210~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。HPV16 转染细胞株:ARPE-19/HPV-16 细胞,购自美

国 ATCC 毒菌种保藏中心,批号 CRL-2502;非洲绿猴肾细胞(Vero)购自北京协和医学院基础学院细胞中心;病毒:单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)来自中国医学科学院生物与技术研究所,半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)为 1×10^{-5.5},-80℃冰箱保存。细菌株:金黄色葡萄球菌 26003,331,360,361 株;白色葡萄球菌 26101 株;表皮葡萄球菌标准株,104,108 株;大肠埃希菌 44113,23,117,178 株;绿脓杆菌 10102,209,210,211 株;乙型链球菌 10,12 株;变形杆菌标准株;淋球菌标准株;白色念珠菌标准株,购自中国食品药品检定研究院菌种室。

1.2 药物及试剂 紫金化毒栓(由北京因科瑞斯药物研究院有限公司提供,含绿原酸 16.2 mg·g⁻¹干膏粉,连翘苷 1.52 mg·g⁻¹干膏粉,批号 20130404),妇宁栓(哈药集团世一堂制药厂,批号 1210419),聚甲酚磺醛栓(葫芦岛国帝药业有限责任公司,批号 120601.39),阿昔洛韦片(石药集团欧意药业有限公司,批号 269130801),体外试验前用高纯水配成 10 g·L⁻¹母液,过滤除菌后备用;盐酸左氧氟沙星胶囊[世贸天阶制药(江苏)有限责任公司,批号 20131113,体外试验前用高纯水配成 10 g·L⁻¹母液,过滤除菌后备用],Ezup 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程股份有限公司,批号 14043471Y),SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 AK3101),HPV16 酶联免疫试剂盒(上海泛科生物技术有限公司,批号 201406),DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司,批号

1420768), 营养肉汤(NB, 北京奥博生物技术有限责任公司, 批号 20100905)。

1.3 仪器 Piko Real96 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司), Enspire 型多功能酶标仪(Perkin Elmer), IX71 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 731 型 CO₂ 培养箱和 MSC1.8 型生物安全柜(均购自美国 Thermo 公司), TP1020 型自动脱水机和 EG1140H 型石蜡包埋机(均购自德国 Leica 公司), HM355S 型切片机(德国 Microm 公司), DM2500 型数字照像生物显微镜和 DMLB-HC 型自动照相生物显微镜(均购自德国 Leica 公司)。

1.4 引物序列 HPV16 E6 基因的引物, 上游 5'-TCAAAAGCCACTGTGTCC-3', 下游 5'-TTACAGCTGGGTTTCTCT-3', 人 GAPDH 基因的引物, 上游 5'-CTCCTCCACCTTTGCGACTG-3', 下游 5'-TCCTCTTGCTCTTGCTGG-3', 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司设计合成。

2 方法

2.1 剂量设置 根据人临床剂量换算, 紫金化毒栓: 大鼠实验用剂量为 1.2, 0.6, 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹; 妇宁栓: 大鼠实验用剂量为 0.15 g·kg⁻¹·d⁻¹; 聚甲酚磺醛栓: 大鼠实验用剂量为 8.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

在体外对 HSV-2 的抑制作用。取已长成单层细胞的培养板接种 100TCID₅₀ 的病毒液, 100 μL/孔, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h 后, 再分别加入相应稀释度的紫金化毒栓, 同时设正常细胞组、病毒组和阳性药组。置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每日倒置显微镜下观察细胞病变情况, 当病毒组细胞病变为 III 时记录试验结果。细胞病变按 6 级标准判断: “-”, 细胞生长正常, 无病变出现; “±”, 细胞病变少于整个单层的 10%; “+”, 细胞病变约占整个单层细胞的 25% 以下; “++”, 细胞病变约占整个单层细胞的 50% 以下; “+++”, 细胞病变约占整个单层细胞的 75% 以下; “++++”, 细胞病变约占整个单层细胞的 75% 以上。按 Reed-Muench 计算 50% 抑制浓度(IC₅₀) 和治疗指数(TI), TI = TC₅₀/IC₅₀。

2.2 对 HPV16 E6 基因表达的抑制作用 将 ARPE-19/HPV-16 细胞接种于培养瓶中, 待细胞长至 80%, 加入相应稀释度的紫金化毒栓, 37 °C 5% CO₂ 培养 48 h 后, 采用 DNA 抽提试剂盒进行 DNA 提取。PCR 反应: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s, 59 °C, 30 s, 共 55 个循环; 溶解曲线分析。使用 sequence detection system 软件分析 PCR 过程各检测样本的 C_t 值。采用 ΔΔC_t 法计算 HPV16 病毒的相对表

达量。

2.3 体外抗菌试验 将 96 孔培养板内加入营养肉汤, 药物孔加入等体积的药液, 共设 7 个稀释度, 另设一排细菌组。将 37 °C 培养 18 h 的菌液, 用营养肉汤稀释成每毫升含 1 × 10⁵ 个细菌, 在每孔加入各菌液 10 μL, 将培养板放入 37 °C 培养箱内培养 24 h, 以浊度为指标检查各孔有无细菌生长, 以不显示浊度, 细菌无生长的那一孔的药液稀释度作为最低抑菌浓度(MIC)。

2.4 对大鼠宫颈炎模型的影响 分为 HPV16 感染、细菌混合感染(大肠埃希菌、淋球菌和金黄色葡萄球菌)、化学物质感染 3 批实验。

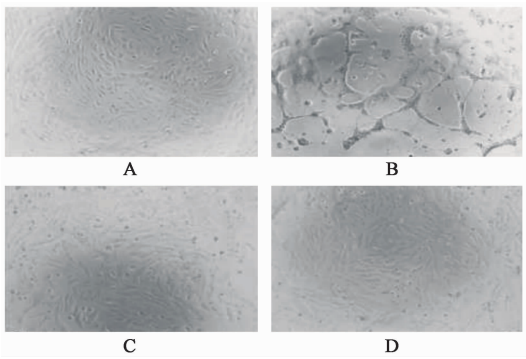
每批试验取雌性大鼠 70 只, 随机分为正常组、模型组、妇宁栓组、聚甲酚磺醛栓组及紫金化毒栓高、中、低 3 个剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 3 批实验分别用密度 1 × 10⁶ 个/mL 的 HPV16 细胞液、密度 6 × 10⁶ 个/mL 的混合菌液或 25% 的苯酚胶浆, 注入大鼠宫颈处, 0.2 mL/只。注入前先用针头刮擦 3 次, 造成子宫表面损伤。每隔 2 日注入 1 次, 共 3 次, 造成感染模型, 正常组在同等条件下注入蒸馏水。造模 24 h 后开始阴道内给药, 500 μL·kg⁻¹ 体重, 每日 1 次, 连续 12 d, 正常组和模型组在同等条件下给基质。末次给药后第 2 天解剖动物, 摘取宫颈和阴道。HPV 感染模型取一部分宫颈测定 HPV16 表达(吸光度 A 表示), 其余部分及阴道组织做病理检查; 细菌感染模型取阴道、宫颈做病理检查。宫颈肉眼观察判定标准: “-”, 大鼠阴道、宫颈无肿胀, 无充血, 颜色正常; “+”, 大鼠阴道、宫颈有轻度充血, 肿胀不明显, 颜色正常; “++”, 大鼠阴道、宫颈有瘀血, 宫颈肿胀; “+++”, 大鼠阴道病变轻。宫颈有明显瘀血, 颜色暗紫色, 宫颈有明显肿胀, 外观宫颈较厚。镜下观察判定标准: “-”, 大鼠宫颈上皮未见有增厚, 未见有退行性变, 上皮未见有瘀血、炎症, 结构正常; “+”, 大鼠宫颈上皮有增生不明显, 上皮有轻度充血, 未见有明显炎症; “++”, 大鼠宫颈上皮有轻度增生, 上皮有充血、瘀血, 有轻度炎症细胞浸润; “+++”, 大鼠宫颈上皮大面积增厚, 上皮有大面积炎症浸润, 上皮细胞有空泡变, 神经退行性变。阴道肉眼观察判定标: “-”, 大鼠阴道上皮角化正常, 未见增生, 未见退行性变, 结构正常; “+”, 大鼠阴道上皮角化增生不明显, 上皮未见炎症; “++”, 大鼠阴道上皮有轻度增生, 皮下有轻度炎症; “+++”, 大鼠阴道上皮增生明显, 并有细胞分裂, 有退行性变。化学物质感染模型每日观察外阴病变, 并于给药后

第 13 天解剖观察阴道、宫颈病变情况。外阴病变等级判断标准：“-”，阴道、宫颈黏膜呈粉色，无充血肿胀、无异常分泌物；“+”，阴道、宫颈黏膜轻微充血、肿胀不明显、无异常分泌物；“++”，阴道、宫颈黏膜充血肿胀明显、有一定的分泌物；“+++”，阴道、宫颈黏膜充血肿胀明显、异常分泌物、有散在出血点或小点状糜烂。“++++”，阴道、宫颈黏膜充血明显、溃烂或有脓性分泌物、积水。

3 结果

3.1 紫金化毒栓体外抗病毒作用

3.1.1 体外抗 HSV-2 病毒作用 紫金化毒栓在体外对 HSV-2 具有明显的抑制作用，其 IC_{50} 为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，TI 为 5.6。见图 1，表 1。



A. 空白组; B. 病毒组; C. 紫金化毒栓 $0.39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 紫金化毒栓 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 紫金化毒栓对 HSV-2 感染 Vero 细胞后细胞病变的影响
Fig. 1 Effects of Zijin Huadu suppository on cytopathy in HSV-2 infected Vero cells

表 1 紫金化毒栓的体外抗 HSV-2 的病变情况

Table 1 Resistance to HSV-2 of Zijin Huadu suppository *in vitro*

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	病变 (CPE)
空白	-	----
病毒	-	+++
紫金化毒栓	0.39	± ± ± ±
	0.20	± ± ± ±
	0.10	-- ± ±
	0.05	+++
阿昔洛韦	0.62	----

3.1.2 体外对 HPV16 E6 基因的抑制作用

紫金化毒栓在体外对 HPV16 E6 基因具有明显的抑制作用，其中 $0.39, 0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组 E6 基因表达的 log 值与病毒组比较具有显著性差异。见表 2。

3.2 紫金化毒栓体外抗菌作用

紫金化毒栓在体

表 2 紫金化毒栓对 HPV16 E6 基因表达的抑制作用

Table 2 Inhibiting effect of Zijin Huadu suppository on expression of E6 gene in HPV16

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	E6	病毒抑制/%
紫金化毒栓	0.39	$4.73 \pm 0.33^{1)}$	80.51
	0.20	$4.74 \pm 0.38^{1)}$	79.98
	0.10	5.21 ± 0.30	60.72
	0.05	5.07 ± 0.32	57.47
病毒	-	5.31 ± 0.47	-

注:与病毒对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

外对金黄色葡萄球菌 26003, 331, 360, 361 号, 白色葡萄球菌 26101 号, 表皮葡萄球菌标准株, 104, 108 号, 乙型链球菌 10, 12 号, 大肠埃希菌 44113, 23, 117, 178 号, 绿脓杆菌 10102, 209, 210, 211 号, 变形杆菌标准株, 淋球菌标准株, 白色念珠菌标准株均具有明显的抑制作用, 其最低抑菌质量浓度分别为 0.78, 1.56, 1.56, 1.56, 3.12, 0.78, 0.78, 1.56, 0.78, 1.56, 12.50, 12.50, 12.50, 12.50, 6.25, 12.50, 12.50, 25, 0.78, 1.56, 12.50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 3。

表 3 紫金化毒栓在体外对细菌的抑制作用

Table 3 Inhibiting effect of Zijin Huadu suppository on bacteria *in vitro*

菌株	菌号	MIC/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
金黄色葡萄球菌	26003	0.78
金黄色葡萄球菌	331	1.56
金黄色葡萄球菌	360	1.56
金黄色葡萄球菌	361	1.56
白色葡萄球菌	26101	3.12
表皮葡萄球菌	标准株	0.78
表皮葡萄球菌	104	0.78
表皮葡萄球菌	108	1.56
乙型链球菌	10	0.78
乙型链球菌	12	1.56
大肠埃希菌	44113	12.50
大肠埃希菌	23	12.50
大肠埃希菌	117	12.50
大肠埃希菌	178	12.50
绿脓杆菌	10102	6.25
绿脓杆菌	209	12.50
绿脓杆菌	210	12.50
绿脓杆菌	211	25.00
变形杆菌	标准株	0.78
淋球菌	标准株	1.56
白色念珠菌	标准株	12.50

3.3 对 HPV16 感染致大鼠宫颈炎模型的影响

3.3.1 对 HPV16 感染致大鼠慢性宫颈炎的影响

肉眼观察正常组大鼠阴道、宫颈无肿胀,无充血,颜色正常;模型组部分大鼠阴道、宫颈有明显肿胀,外观宫颈较厚,颜色较正常,病变程度与正常组比较更明显;紫金化毒栓 3 个剂量组阴道、宫颈从颜色到切面,病变均有不同程度的减轻,与模型组比较明显改善。见表 4。

表 4 肉眼下紫金化毒栓对 HPV16 感染致大鼠慢性宫颈炎的影响 (n=10)

Table 4 Effects of Zijin Huadu suppository on chronic cervicitis induced by HPV16 in rats under naked eye (n=10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	“-” /只	“+” /只	“++” /只	“+++” /只
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	3	5	2
妇宁栓	0.15	1	6	3	0
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	0	8	2	0
紫金化毒栓	1.2	2	7	1	0
	0.6	3	6	1	0
	0.3	4	4	2	0

3.3.2 对 HPV16 感染致大鼠慢性宫颈炎的影响

镜下观察正常组大鼠宫颈上皮未见有增厚,上皮细胞未见有退行性变,皮下未见有充血、瘀血,未见有炎症细胞浸润,结构正常;模型组部分大鼠宫颈上皮有不同程度增生、增厚,上皮下有大量炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主,并有少量淋巴细胞和其他细胞,个别动物上皮细胞有退行性变,皮下血管有轻度充血,病变程度与正常组比较更明显;紫金化毒栓高、中剂量组宫颈病变均有不同程度的减轻,与模型

组比较有明显改善。见表 5,图 2。

表 5 紫金化毒栓对 HPV16 感染致大鼠宫颈炎的影响 (n=10)
Table 5 Effects of Zijin Huadu suppository on cervical inflammation induced by HPV16 in rats (n=10)

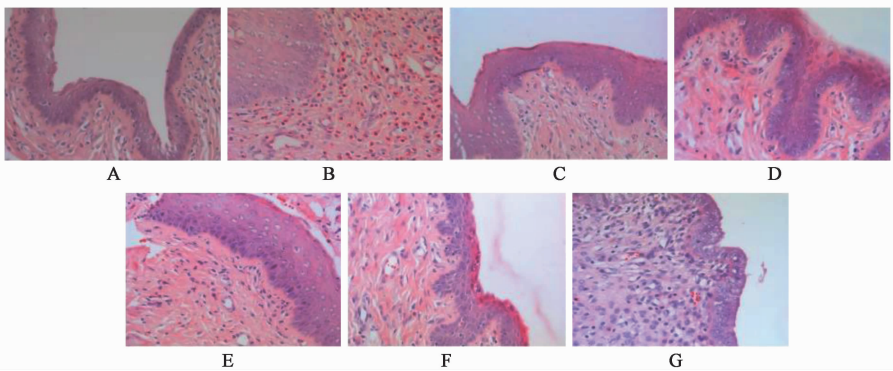
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	“-” /只	“+” /只	“++” /只	“+++” /只
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	2	4	4
妇宁栓	0.15	0	7	3	0
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	0	5	5	0
紫金化毒栓	1.2	0	7	3	0
	0.6	0	8	2	0
	0.3	0	5	5	0

3.3.3 对 HPV16 感染致大鼠阴道炎症的影响

镜下正常组大鼠阴道结构正常,模型组阴道上皮轻度增生,皮下有轻度炎症,病变较轻;紫金化毒栓 3 个剂量组阴道病变有轻微的减轻,但与模型组比较没有明显改善。见表 6,图 3。

表 6 紫金化毒栓对 HPV16 感染致大鼠阴道炎症的影响 (n=10)
Table 6 Effects of Zijin Huadu suppository on inflammation of vagina induced by HPV16 in rats (n=10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	“-” /只	“+” /只	“++” /只	“+++” /只
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	6	3	1
妇宁栓	0.15	0	9	1	0
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	0	8	2	0
紫金化毒栓	1.2	0	8	2	0
	0.6	0	9	1	0
	0.3	0	7	3	0



A. 正常组; B. 模型组; C. 妇宁栓组; D. 聚甲酚磺醛栓组; E. 紫金化毒栓 1.2 g·kg⁻¹ 组; F. 紫金化毒栓 0.6 g·kg⁻¹ 组; G. 紫金化毒栓 0.3 g·kg⁻¹ 组 (图 3~5 同)

图 2 紫金化毒栓对 HPV16 感染致大鼠宫颈炎的宫颈组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effects of Zijin Huadu suppository on cervical tissue pathology in chronic cervicitis induced by HPV16 in rats (HE, ×200)

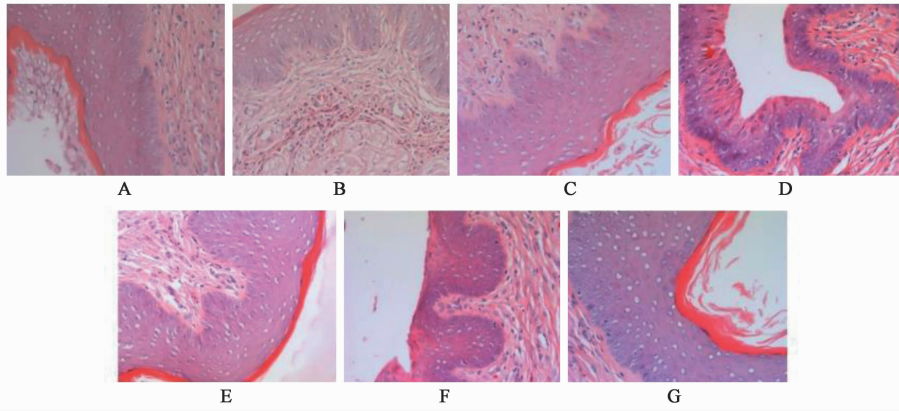


图 3 紫金化毒栓对 HPV16 感染致大鼠宫颈炎的阴道组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effects of Zijin Huadu suppository on vaginal tissue pathology in cervicitis induced by HPV16 in rats (HE, ×200)

3.4 对大鼠宫颈组织中 HPV16 表达的影响 与正常组比较,模型组的 HPV16 表达明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,紫金化毒栓 3 个剂量组均可以明显降低 HPV16 表达 ($P < 0.01$)。见表 7。

表 7 紫金化毒栓对大鼠宫颈组织内 HPV16 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effects of Zijin Huadu suppository on HPV16 in cervical tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	HPV16(A)
正常	-	0.07 ± 0.01
模型	-	0.18 ± 0.05 ¹⁾
妇宁栓	0.15	0.11 ± 0.05 ²⁾
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	0.06 ± 0.01 ²⁾
紫金化毒栓	1.2	0.10 ± 0.04 ²⁾
	0.6	0.10 ± 0.04 ²⁾
	0.3	0.10 ± 0.05 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 对细菌混合感染致大鼠慢性宫颈炎模型的影响

3.5.1 对细菌混合感染致大鼠慢性宫颈炎的影响 肉眼观察正常组大鼠阴道、宫颈无肿胀,无充血,颜色正常;模型组部分大鼠阴道、宫颈有明显肿胀,外观宫颈较厚,颜色表面暗紫色,切面宫颈较厚,个别动物宫腔内有少量粉色黏液渗出,病变程度与正常组比较更明显;紫金化毒栓 3 个剂量组阴道、宫颈从颜色到切面,病变均有不同程度的减轻,与模型组比较有明显改善。见表 8。

3.5.2 对细菌混合感染致大鼠宫颈炎症的影响 镜下观察正常组大鼠宫颈上皮未见有增厚,上皮细胞未见有退行性变,皮下未见有充血、瘀血,未

表 8 肉眼下紫金化毒栓对细菌混合感染致大鼠慢性宫颈炎的影响 ($n = 10$)

Table 8 Effects of Zijin Huadu suppository on chronic cervicitis induced by mixed bacterial in rats ($n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	“-” /只	“+” /只	“++” /只	“+++” /只
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	5	3	2
妇宁栓	0.15	5	4	1	0
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	5	3	2	0
紫金化毒栓	1.2	6	4	0	0
	0.6	8	2	0	0
	0.3	5	5	0	0

见有炎症细胞浸润,结构正常;模型组部分大鼠宫颈上皮有不同程度增生、增厚,上皮下有大量炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主,并有少量淋巴细胞和其他细胞,少部分上皮细胞有退行性变,皮下血管有轻度充血,病变程度与正常组比较更明显;紫金化毒栓高、中剂量组宫颈病变均有不同程度的减轻,与模型组比较有明显改善。见表 9,图 4。

表 9 紫金化毒栓对细菌混合感染致大鼠宫颈炎症的影响 ($n = 10$)

Table 9 Effects of Zijin Huadu suppository on chronic cervicitis induced by mixed bacterial in rats ($n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	“-” /只	“+” /只	“++” /只	“+++” /只
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	2	5	3
妇宁栓	0.15	0	6	4	0
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	0	7	2	1
紫金化毒栓	1.2	0	7	3	0
	0.6	0	8	2	0
	0.3	0	6	4	0

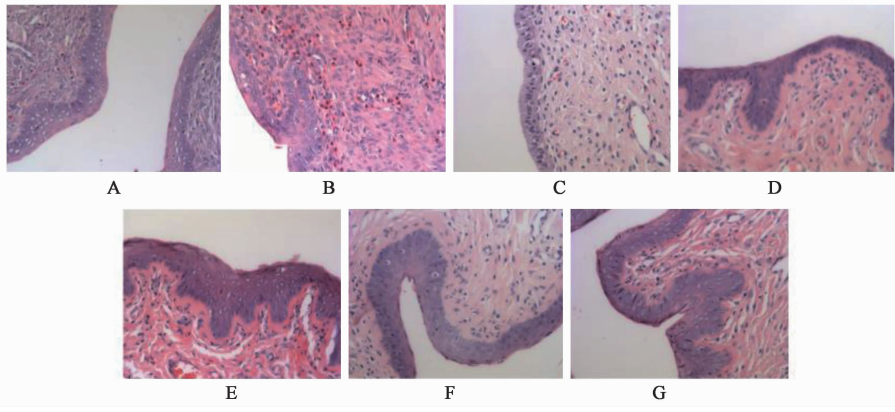


图 4 紫金化毒栓对细菌混合感染致大鼠宫颈炎的宫颈组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 4 Effects of Zijin Huadu suppository on cervical tissue pathology in chronic cervicitis induced by mixed bacterial in rats (HE, ×200)

3.5.3 对细菌混合感染致大鼠阴道炎症的影响

镜下正常组大鼠阴道结构正常,模型组阴道上皮轻度增生,皮下有轻度炎症,病变较轻;紫金化毒栓 3 个剂量组阴道病变有轻微的减轻,但与模型组比较没有明显改善。见表 10,图 5。

表 10 紫金化毒栓对细菌混合感染致大鼠阴道炎症的影响 (n = 10)

Table 10 Effects of Zijin Huadu suppository on vaginitis induced by mixed bacterial in rats (n = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	“-” /只	“+” /只	“++” /只	“+++” /只
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	6	3	1
妇宁栓	0.15	0	8	2	0
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	0	6	4	0
紫金化毒栓	1.2	0	8	2	0
	0.6	0	9	1	0
	0.3	0	7	3	0

3.6 对化学物质致大鼠慢性宫颈炎模型的影响

正常大鼠阴道、宫颈没有明显的病变,模型组大鼠出现出血、肿胀、分泌物等病变,“+”级病变为 8 只,“++”级病变为 2 只,其病变程度与正常组比较更明显;紫金化毒栓高剂量组可以明显降低大鼠阴道、宫颈的病变程度,与模型组比较有明显改善。见表 11。

表 11 紫金化毒栓对苯酚胶浆致大鼠慢性宫颈炎的影响 (n = 10)

Table 11 Effects of Zijin Huadu suppository on chronic cervicitis induced by phenol mucilage in rats (n = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	“-” /只	“+” /只	“++” /只	“+++” /只	“++++” /只
正常	-	10	0	0	0	0
模型	-	0	8	2	0	0
妇宁栓	0.15	4	6	0	0	0
聚甲酚磺醛栓	0.008 4	5	5	0	0	0
紫金化毒栓	1.2	5	5	0	0	0
	0.6	4	6	0	0	0
	0.3	3	7	0	0	0

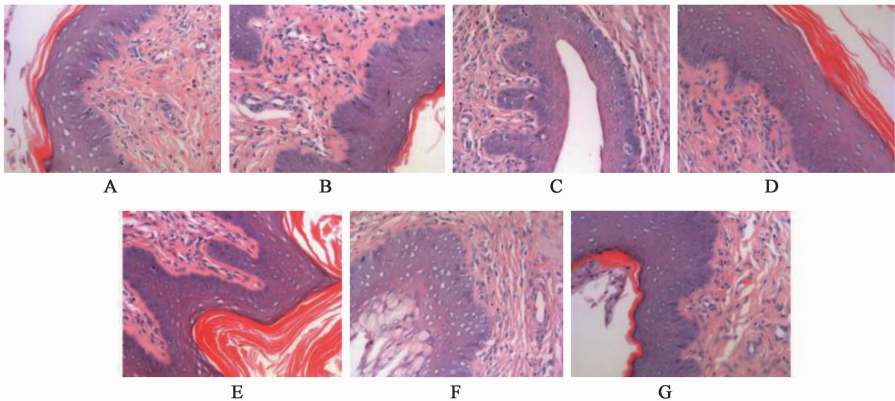


图 5 紫金化毒栓对细菌混合感染致大鼠宫颈炎的阴道组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 5 Effects of Zijin Huadu suppository on vaginal tissue pathology in chronic cervicitis induced by mixed bacterial in rats (HE, ×200)

4 讨论

宫颈炎一直是影响育龄期妇女生殖系统健康的常见和多发性疾病,尤其是病毒性宫颈炎,常见病毒为HPV,HSV及巨细胞病毒(HCMV)等,病情迁延难愈,严重时可并发输卵管炎、宫颈水肿狭窄、导致不孕等,且与宫颈癌有一定的关联^[7-8]。尤其是近年来随着人们生活方式的改变,其发病率呈明显增高趋势。

中药外治剂型在临床上对治疗宫颈炎、阴道炎具有明显的优势^[9],主要包括栓剂、泡腾片、冲洗剂、凝胶剂等,具有药物直接作用患处、易于吸收、制剂剂量低及安全性高等特点,在临床上应用广泛^[10]。

本研究针对宫颈炎的常见病因建立了病毒感染、细菌混合感染、苯酚胶浆致大鼠宫颈炎的模型,在此基础上发现紫金化毒栓对三种原因所致宫颈炎均具有明显的改善作用。对于病毒感染所致宫颈炎,比较从国外引进了HPV16基因转染的细胞株,通过实时荧光定量PCR试验的检测,明确了HPV E6基因在细胞中的稳定表达,并通过大鼠宫颈划伤、隔日多次感染的方式,建立了病毒感染大鼠的宫颈炎模型。紫金化毒栓在体外对HPV16的E6基因表达、在体内对大鼠宫颈组织中HPV表达均具有明显的抑制作用;对于细菌感染所致宫颈炎,紫金化毒栓在体外对金黄色葡萄球菌、淋球菌、大肠埃希菌等菌株均具有明显的抑制作用。紫金化毒栓对大鼠阴道、宫颈炎症均有一定程度的改善,但是对宫颈病变的改善作用优于阴道,分析其原因可能与造模对宫颈的病变更为显著,且给药时部位更接近宫颈有关。

综上所述,紫金化毒栓对不同病因所致大鼠宫颈炎均具有显著的疗效,试验证实其可以通过直接抑制病毒和细菌来发挥作用,下一步可以从炎症因

子、病理损伤等细胞或分子机制入手,来揭示其作用机制。

[参考文献]

- [1] 李娟清,石一复. 子宫颈炎性疾病[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2004,20(7):387-388.
- [2] 侯萌,安瑞芳,吴静. 宫颈炎康栓治疗宫颈高危型人乳头瘤病毒感染疗效观察[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2013,29(7):579-583.
- [3] 祁丽亚. 宫颈炎病原学及影响因素探讨[J]. 中国妇幼保健,2014,29(6):855-856.
- [4] 杨晓晖,李学杰,吴尚魁,等. 妇科消炎栓的药效作用与临床疗效观察[J]. 中国药学杂志,1997,32(8):496-498.
- [5] Liu W, Wu E Q, Yu X H, et al. Detection of human papillomavirus genotypes associated with mucopurulent cervicitis and cervical cancer in Changchun[J]. China Int J Gynaecol Obstet,2013,120(2):124-126.
- [6] 范文生,李亚里,杨怡卓,等. 基因芯片技术检测宫颈病变中HPV感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(7):745-747.
- [7] Zhao Y, Cao X, Zheng Y, et al. Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2[J]. J Med Virol,2012,84(12):1920-1927.
- [8] Qian Y S, Lv W, Sui L H, et al. Study on the relationship between genesis and development of cervical cancer and the infection of human papillomavirus type 16/18, human herpesvirus II and cytomegalovirus[J]. Chin J Epidemiol, 2005,26(8):622-625.
- [9] 刘玠,翟春梅,褚利娟. 中药凝胶剂在宫颈炎中的应用进展[J]. 中医药学报,2011,39(5):88-90.
- [10] 栾瑞玲,程海兴,沙红玉. 国内阴道给药的若干剂型[J]. 现代医药卫生,2006,22(1):136-137.

[责任编辑 周冰冰]