

地锦草乙醇提取物对白色念珠菌性阴道炎 大鼠模型的治疗作用

张国庆*, 冯文茹, 米沙
(天津市医药科学研究所, 天津 300020)

[摘要] 目的: 观察地锦草乙醇提取物对大鼠白色念珠菌性阴道炎模型的治疗效果及其相关机制。方法: 在卵巢切除加乙烯雌酚联合氯化可的松注射的基础上予白色念珠菌感染法制备大鼠白色念珠菌性阴道炎模型。并予以地锦草乙醇提取物治疗, 连续 7d。治疗结束后, 取阴道分泌物进行真菌培养; 行阴道灌洗, ELISA 法测定灌洗液中单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、巨噬细胞炎性蛋白-2 (MIP-2) 水平; 切取阴道组织行组织病理学观察。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠阴道分泌物培养出的白色念珠菌落数显著增多 ($P < 0.001$), 地锦草乙醇提取物治疗组大鼠阴道分泌物培养出的白色念珠菌落数显著低于模型组 ($P < 0.01$); ELISA 检测显示模型组大鼠阴道灌洗液中 MCP-1 及 MIP-2 水平显著升高; ($P < 0.001$); 地锦草乙醇提取物治疗组大鼠阴道灌洗液中 MCP-1 及 MIP-2 水平显著低于模型组 ($P < 0.01$); 阴道组织病变在光镜下观察发现, 实验动物造模成功后, 阴道充血、分泌物增多。给地锦草乙醇提取物治疗 7d 后, 阴道局部充血病变显著减轻, 分泌物显著减少。结论: 地锦草可以通过抑制真菌的生长, 减少有关趋化因子的产生, 从而发挥了对霉菌性阴道炎的治疗作用。

[关键词] 地锦草乙醇提取物; 白色念珠菌; 霉菌性阴道炎; 趋化因子

[中图分类号] R **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0191-04

Therapeutic Effects of Ethanol Extracts from *Euphorbia humifusa* on Monilial Vaginitis in Rats

ZHANG Guo-qing*, FENG Wen-ru, MI Sha
(Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ethanol extracts from *Euphorbia humifusa* on monilial vaginitis in rats. **Method:** After the candidal vaginitis model establishment, ethanol extracts from *E. humifusa* was intragastrically administered daily for 7 days. *Candida albicans* of the vaginal exudates were cultured and analyzed. The levels of MCP-1 and MIP-2 in vaginal lavage fluid were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The pathological changes of vaginal tissue were examined under light microscope. **Result:** *E. humifusa* ethanol extracts inhibited the *C. albicans* significantly ($P < 0.001$) and decreased the MCP-1 and MIP-2 levels in vaginal lavage fluid remarkably. In addition, the ethanol extracts ameliorated the vaginal pathological changes significantly ($P < 0.001$). **Conclusion:** *E. humifusa* ethanol extracts has remarkable antifungal activity by inhibiting the *C. albicans*.

[Key words] *Euphorbia humifusa* ethanol extracts; *Candida albicans*; monilial vaginitis; chemokines

地锦草为常用中药材, 也是一种传统的维吾尔药材^[1]。其化学成分主要有黄酮、三萜、香豆素、甾

醇、鞣质及酚酸类等化合物^[2]。现代药理学研究证明, 地锦草及其复方具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗过敏、免疫调节、保肝、止血等多种作用, 尤其抗真菌作用突出, 广泛用于真菌感染性疾病的治疗^[3-8]。白色念珠菌性阴道炎又称霉菌性阴道炎, 是一种常见的妇科疾病, 系由一种真菌-白色念珠菌感染引起的生殖器疾病。采用西药抗霉菌治疗又容易复发, 所

[收稿日期] 20120315(019)

[通讯作者] *张国庆, 助理研究员, 从事天然药物化学研究,
Tel: 022-81138026, E-mail: zhangguoqing-11@163.com

以临床上多采用中西医结合治疗,取得了很好疗效。本文通过动物实验,观察并研究了地锦草提取物对大鼠白色念珠菌性阴道炎模型的治疗效果及治疗机制,为临床应用提供了依据。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 Wistar 雌性大鼠,体重 200-220 g,购自医科院放射医学研究所实验动物中心,许可证号 SCXK(津)2010-0001。

1.2 药品及试剂 乙烯雌酚注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 0804231,规格 0.5mg/mL)。注射用氢化可的松琥珀酸钠粉剂(天津生物化学制药有限公司,批号 20090325,规格 50mg/支),念珠菌显色培养基(天津金章医用新技术研究所提供)。大鼠单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)ELISA 试剂盒(购自上海翔升生物科技公司,批号为 20110723)。

1.3 中药提取 地锦草 *Euphorbia humifusa* Willd 产地为新疆和田,由天津中医药大学中药学院生药系马琳教授鉴定为大戟科(Euphorbiaceae)植物地锦草,全草入药粗粉(20 目)1 000 g 加 75% 乙醇 2 000 mL,浸泡 12 h,回流提取 1.5 h,提取 3 次,合并提取液,同收乙醇,加蒸馏水溶解并定容至 200 mL,配成 1 mL 含生药 5g,即 5g 生药/mL,以此作为给药浓度。

1.4 菌种 白色念珠菌菌种由天津市医药科学研究所免疫微生物学实验室提供。

1.5 仪器 752 型紫外分光光度计、7230 型分光光度计(上海分析仪器总厂),光学分析天平、FA160 电子天平(上海天平仪器厂)TGI-16 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂),旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂),KHB ST-360 酶标仪(上海科华)。

2 方法

2.1 模型制作 参考文献方法制备大鼠白念菌性阴道炎模型^[9]。大鼠 10% 水合氯醛 ip 麻醉,无菌条件下开腹,分离双侧卵巢,完全切除双侧卵巢,逐层关腹。术后皮下注射青霉素 10 万 U/只,每天 1 次,连续 3 d 防止感染。术后第 4 天开始做阴道涂片检查,连续 3 d,未见阴道上皮角化细胞,造模大鼠均处于动情间期,证明卵巢摘除完全。术后第 7 天开始皮下注射乙烯雌酚 2 mg·kg⁻¹,每日 1 次,连续 4 d;即日开始除注射乙烯雌酚外,加皮下注射氢化可的松 60 mg·kg⁻¹,每日 1 次,连续 3 d,造成动物全身免疫功能低下。术后第 11 天,用无菌小白鼠灌胃针头,抽取白色念珠菌 0.25 × 10⁶ 个/mL 菌液,造模大白鼠取头朝下位,将 0.1 mL 白色念珠菌液注入阴道

内,原位停留 2 min,以防菌液溢出。24 h 后同法再次阴道内注菌 1 次。感染后造模动物隔日交替皮下注射乙烯雌酚或氢化可的松各 2 次。感染后第 4 天(即术后 15 d),可见造模大白鼠外阴红肿,伴少量白色分泌物,用无菌棉签蘸取分泌物,涂于沙氏培养基表面,25℃ 培养 48 h,肉眼观察可见大小不等的白色菌落,分泌物镜检可见假菌丝和成群孢子,证明造模成功。

2.2 分组及给药 健康雌性 Wistar 大鼠 30 只,随机分为 3 组:假手术组、模型组、地锦草乙醇提取物治疗组,每组各 10 只。假手术组只开腹,不进行卵巢切除。中药治疗组按模型组方法造模,在白念菌感染后第 4 天开始灌胃地锦草乙醇提取物(按生药量计)10 g·kg⁻¹,每日 1 次,连续 7 d。

2.3 阴道分泌物真菌培养 所有动物在手术或造模后第 22 天(即治疗组在治疗后 7d),做阴道分泌物细菌培养:以无菌棉签蘸取阴道分泌物,涂抹接种于沙氏培养基,25℃ 培养 48 h,肉眼观察菌落形成情况、拍摄照片及计数。以菌落数分级判定疗效。治愈:不长菌落;显效:菌落 1~10 个;有效:菌落 11~30 个;好转:菌落 31 个以下,分布稀疏;无效:菌落 31 个以上,分布密集,以等级序值法进行显著性检验。

2.4 阴道灌洗液 MCP-1, MIP-2 水平检测 阴道以无菌生理盐水 2mL/每次,灌洗 2 次,合并灌洗液,3 000 r·min⁻¹,10 min,取上清,ELISA 法测定 MCP-1, MIP-2 水平,测定方法按说明书进行。

2.5 阴道病变光镜检查 大鼠处死后,剖取阴道标本进行病理组织学观察。取阴道组织(1 cm,厚约 0.1~0.3 cm)1 块做普通光镜标本,观察阴道黏膜形态变化。阴道标本按充血、水肿、出血、浸润四项基本指标进行评分^[10]。无充血、水肿、出血、浸润评 0 分,轻度评 1 分,中度评 2 分,重度评 3 分。4 项评分加和为病变总分。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;等级资料统计方法采用 Ridit 法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠阴道分泌物真菌培养及分析 模型组大鼠阴道分泌物培养出的白色念珠菌落数显著增多(*P* < 0.001),证明模型成功;地锦草提取物治疗组大鼠阴道分泌物培养出的白色念珠菌落数显著低于模型组(*P* < 0.01),因此可以判定该药对白色念珠

菌所致大白鼠阴道炎模型真菌感染有显著抑制作用,见表1。

表1 地锦草乙醇提取物对大鼠阴道分泌物白色念珠菌菌落计数分布的影响($n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	菌落数/个				
		0	1~10	11~30	<31个	>31个
假手术	-	10	0	0	0	0
模型	-	0	0	0	1	9 ¹⁾
地锦草乙醇提取物	10	8	2	0	0	0 ²⁾

注:与正常组比¹⁾ $P<0.001$;与模型组比²⁾ $P<0.01$ (表2同)。

3.2 阴道灌洗液 MCP-1, MIP-2 水平 模型组大鼠阴道灌洗液中 MCP-1, MIP-2 水平显著升高($P<0.001$);地锦草提取物治疗组大鼠阴道灌洗液中 MCP-1, MIP-2 水平显著低于模型组($P<0.01$),见表2。

表2 地锦草乙醇提取物对阴道灌洗液单核细胞趋化蛋白-1、巨噬细胞炎性蛋白-2 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$) ng·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MCP-1	MIP-2
		假手术	-
模型	-	67.38 ± 11.36 ¹⁾	14.21 ± 3.17 ¹⁾
地锦草乙醇提取物	10	13.23 ± 3.31 ²⁾	5.21 ± 1.54 ²⁾

3.3 阴道病变光镜检查及评分 动物造模成功后,阴道充血、分泌物增多。给地锦草提取物治疗7d后,阴道局部充血病变显著减轻,分泌物显著减少。用等级序值法(Ridit法)计算,地锦草治疗组与模型对照组比较、模型组与正常组比较均有显著性差异($P<0.01$)。见表3。

表3 地锦草乙醇提取物对大鼠阴道炎模型阴道病变的影响($n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	各病变程度动物数/只			
		-	+	++	+++
假手术	-	10	0	0	0
模型	-	0	0	1	9
地锦草乙醇提取物	10	9	1	0	0

注:-无变化;+轻度充血,少量分泌物;++中度充血,分泌物较多;+++重度充血,分泌物多。

4 讨论

霉菌性阴道炎是妇女常见病之一,临床以带下量多、质稠、外阴瘙痒、红肿热痛等炎症病变为主,抑制病菌、消除炎症是治疗阴道炎的关键。本文重点研究地锦草乙醇提取物对白色念珠菌引起的大鼠阴道炎模型的影响。以往药理研究结果表明:地锦草体外对石膏样毛癣菌、红色毛癣菌、絮状表皮癣菌、石膏样小孢子菌等4种30株具有不同程度的抑菌

作用^[8]。本研究显示地锦草提取物可显著减轻白色念珠菌性阴道炎模型大鼠阴道分泌物中白色念珠菌培养的菌落数,显示出对真菌的良好抑制作用。

白色念珠菌是引起霉菌性阴道炎最主要病菌,选用白色念珠菌作为模型的诱发因素,符合阴道炎的病因学。本研究结果显示地锦草提取物可显著减轻白色念珠菌性阴道炎模型大鼠阴道充血、水肿、分泌物增加等病变。关于地锦草抑制真菌的机制,目前认为麦角甾醇是真菌细胞膜所特有的脂质,是真菌细胞膜的重要结构组成成分,可以通过与磷脂结合,稳定膜结构,具有调节真菌细胞膜流动性的功能,在确保膜结构的完整性、膜结合酶的活性、细胞活力以及物质运输等方面起着重要作用。一旦麦角甾醇缺乏,必将引起真菌细胞膜功能异常,甚至发生细胞破裂。而地锦草的作用机制可能与抑制真菌麦角甾醇和蛋白质的生物合成,从而破坏真菌细胞膜、细胞壁的结构有关^[11]。

目前研究显示白色念珠菌的感染可激活诱导多种炎性相关细胞产生趋化因子,加重炎症反应,这在霉菌性阴道炎发病机制中具有重要作用。例如有研究结果显示白念珠菌可诱导中性粒细胞产生 MIP-1 α 增加。还有研究表明与白念珠菌共培养后,小鼠腹膜巨噬细胞合成 MIP-1, MIP-2 和角质细胞起源趋化因子(keratinocyte-derived chemokine, KC)增加,白念珠菌亦可有效刺激 PBMC 产生高水平的 MCP-1; Kim 等则首次动态观察了正常人 PBMC 与白念珠菌共培养后 18 h 内趋化因子及其受体的表达,结果显示:白念珠菌可诱导正常人 PBMC 高表达 CC 趋化因子 MIP-1a, MIP-1p, MIP-3 a 和 MIP-4; 趋化因子受体 CCR1, CCR5, CCR7 和 CXCR5 的表达亦增加了 3-53 倍^[12]。这些趋化因子及其受体的表达导致了感染炎症细胞在病变局部的募集。本研究显示经地锦草提取物治疗后,阴道灌洗液中 MCP-1 及 MIP-2 水平显著降低,提示其对炎症细胞分泌这些趋化因子有明显的抑制作用,进而减少了炎症细胞在炎症局部的聚集,也就减轻了炎症反应。

总之,地锦草可以通过抑制真菌的生长,减少有关趋化因子的产生,从而发挥了对霉菌性阴道炎的治疗作用,这为临床上的进一步合理使用提供了依据。

[参考文献]

- [1] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准. 上册 [S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1993:99.

六月青多糖对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响

何巧玲, 罗秀, 吕鹏, 郭雪峰, 黄仁彬, 张士军*

(广西医科大学药理教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的:研究六月青多糖(LYQP)对四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)所致大鼠肝纤维化的干预作用及机制。
方法:SD 大鼠随机分成两组,模型组大鼠采用 50% CCl₄ 花生油溶液 1 mL·kg⁻¹ig 造模,每周 2 次,连续 7 周,正常组用生理盐水代替。将病理检查确认肝纤维化已形成的 SD 大鼠 60 只随机分为 LYQP(600,300,150 mg·kg⁻¹)组,秋水仙碱(0.2 mg·kg⁻¹)组,CCl₄ 模型对照组,每组 12 只。于造模的第 8 周开始给药。正常组和 CCl₄ 模型对照组 ig 生理盐水,药物组 ig LYQP 和秋水仙碱,每日 1 次,连续 ig 给药 4 周。检测大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)活性以及肝组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量,采用 Masson 染色观察肝组织纤维化程度。**结果:**LYQP(600,300,150 mg·kg⁻¹)组 ALT 和 AST 活性为(13.53 ± 2.30), (19.89 ± 2.13), (26.31 ± 2.87) U·mL⁻¹, (17.14 ± 2.96), (24.85 ± 3.14), (33.63 ± 3.91) U·mL⁻¹,与模型对照组比较,LYQP 可明显降低 CCl₄ 致大鼠纤维化血清 ALT 和 AST 活性;GSH-Px 活性为(710.4 ± 35.98), (653.8 ± 25.36), (612.0 ± 27.96) U·mg⁻¹,Hyp 含量为(0.382 ± 0.017), (0.446 ± 0.022), (0.517 ± 0.024) mg·g⁻¹与模型对照组比较,LYQP 可明显增高 GSH-Px 活性和降低 Hyp 含量;Masson 染色显示各药物组干预的大鼠肝脏胶原纤维均有所减少。**结论:**六月青多糖可减轻 CCl₄ 诱导的肝纤维化。

[关键词] 六月青;多糖;四氯化碳;肝纤维化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0194-04

Effect of Liuyueqing Polysaccharide on Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

HE Qiao-ling, LUO Xiu, LV Peng, GUO Xue-feng, HUANG Ren-bin, ZHANG Shi-jun*

[收稿日期] 20120327(008)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 10124008-6)

[第一作者] 何巧玲,硕士研究生,从事抗肝纤维化药物研究,Tel: 0771-5358272, E-mail: lingqiaohe.205@163.com

[通讯作者] *张士军,博士,副教授,从事抗肝纤维化药物研究,Tel: 0771-5358272, E-mail: gxykdxzsj@163.com

- [2] 柳润辉,王汉波,孔令义.地锦草化学成分的研究[J].中草药,2001,32(2):107.
- [3] 朱英.地锦草的研究进展[J].现代中药研究与实践,2003,17(5):62.
- [4] 褚小兰,廖万玉,楼兰英,等.地锦类中草药的药理作用研究[J].时珍国医国药,2001,12(3):193.
- [5] 李宝山,巴根那,张听原,等.地锦草总黄酮抗氧化作用研究[J].时珍国医国药,1998,9(4):328.
- [6] 李治建,古力娜·达吾提,斯拉甫·艾白,等.地锦草不同提取部位抗皮肤癣菌作用研究[J].石河子大学学报,2008,26(6):735.
- [7] 李治建,古力娜·达吾提,斯拉甫·艾白.地锦草提取物体外抗真菌作用研究[J].时珍国医国药,2008,19(12):2958.
- [8] 古力娜·达吾提,尤丽吐孜,艾则孜·亚森,等.维药地锦草软膏的体外抗真菌及其对豚鼠皮肤真菌感染的治疗作用研究[J].中药药理与临床,2007,23(5):1782.
- [9] 王玉良,向绍杰,杜佳林,等.大鼠阴道炎模型的改进与妇康液防治作用的实验研究[J].辽宁中医杂志,2003,30(11):948.
- [10] 刘云,马克韶.对家兔阴道粘膜刺激反应的评价方法[J].中国药检药理工作通讯,1990,2(1):4.
- [11] 李治建,古力娜·达吾提,肖威,等.地锦草提取物抗真菌作用研究及对真菌超微结构的影响[J].中草药,2009;40(5):758.
- [12] Kim H S, Choi E H, Khan J, et al. Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to Candida albicans[J]. Infect Immun, 2005, 73(6): 3714.

[责任编辑 聂淑琴]