

## 经 Toll 样受体 4/核因子 $\kappa$ B 通路探讨复方黄柏液涂剂对细菌性阴道病模型大鼠 Th1/Th2 的调节及抑炎机制

程文秀,魏绍斌,张楠楠,杨佳医,李茂雅,邵 钰  
(成都中医药大学附属医院妇科,成都 610075)

**[摘要]** 目的:通过 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)4/核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路探索复方黄柏液涂剂治疗细菌性阴道病模型大鼠的疗效及作用机制。方法:选取 55 只 SPF 级 SD 雌性大鼠,采用混合菌液接种法制备细菌性阴道病大鼠模型。造模成功后分别给予复方黄柏液涂剂、甲硝唑阴道凝胶、红核妇洁洗液连续治疗 7 d,HE 染色观察大鼠阴道组织中炎性细胞浸润及糖原堆积情况;酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠阴道灌洗液中白介素(IL)-1 $\beta$ ,IL-2,IL-10,IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  表达水平;免疫组化定位大鼠阴道组织中 NF- $\kappa$ B p65 分布情况;Western blot 法检测大鼠阴道组织中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平。结果:与模型组相比,黄柏组大鼠阴道组织中炎性细胞浸润减轻,糖原堆积明显增多( $P < 0.01$ ),阴道灌洗液中 IL-1 $\beta$ ,IL-6 浓度降低( $P < 0.01$ , $P < 0.05$ ),IL-2,TNF- $\alpha$  浓度下降,IL-10 浓度升高( $P > 0.05$ ),TLR4,NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平均下降( $P < 0.05$ ),NF- $\kappa$ B p65 核易位细胞数减少( $P < 0.01$ )。结论:复方黄柏液涂剂对细菌性阴道病模型大鼠具有治疗作用,其机制可能与抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路、减少炎症介质分泌、调节 Th1/Th2 免疫失衡有关。

**[关键词]** 细菌性阴道病;复方黄柏液涂剂;炎性细胞;TLR4/NF- $\kappa$ B 通路;Th1/Th2 免疫失衡

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)20-2106-07

## Roles of compound cortex phellodendri fluid in anti-inflammatory and regulating Th1/Th2 of bacterial vaginosis model rats via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway

CHENG Wen-xiu, WEI Shao-bin, ZHANG Nan-nan, YANG Jia-yi, LI Mao-ya, SHAO Yu

(Department of Gynecology, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect and mechanism of compound cortex phellodendri fluid in bacterial vaginosis rats via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. **Methods:** Fifty-five SD female rats were selected to construct bacterial vaginosis model by injection of mixed bacterial liquid. After successful modeling, the rats were treated with compound cortex phellodendri fluid, metronidazole vaginal gel, and Honghe fujie lotion, respectively. After 7 d of continuous treatment, inflammatory cell infiltration and glycogen accumulation in rat vaginal tissues were observed by HE staining. ELISA method was used to detect the expression level of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$  in the vaginal lavage. The distribution of NF- $\kappa$ B p65 in rat vaginal tissues were located by immunohistochemical method. And the protein expression level of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 were detected by Western blot. **Results:** Compared with those of the model group, the infiltration of inflammatory cells in compound cortex phellodendri fluid group was reduced, and the accumulation of glycogen was significantly increased ( $P < 0.01$ ), the concentrations of IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ), IL-6 ( $P < 0.05$ ), IL-2, and TNF- $\alpha$  in the vaginal lavage were decreased, while the IL-10

**[作者简介]** 程文秀,女,博士研究生,主要从事中医药防治妇科痛症、炎症性疾病研究。E-mail:964282968@qq.com。

**[通讯作者]** 魏绍斌,女,主任医师,教授,博士生导师,主要从事中医药防治妇科痛症、炎症性疾病研究。联系方式:(028)87767022,E-mail:wsb2012gcp@163.com。

concentration increased ( $P > 0.05$ ), the protein expression level of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 decreased ( $P < 0.05$ ), and the NF- $\kappa$ B p65's translocated nuclear were suppressed ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Compound cortex phellodendri fluid has a definite therapeutic effect on bacterial vaginosis rats. Its mechanism may be related to the inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway and adjuvion of immune imbalance on Th1/Th2.

**[Key words]** bacterial vaginosis; compound cortex phellodendri fluid; inflammatory cell; TLR4/NF- $\kappa$ B pathway; immune imbalance on Th1/Th2

细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)是常见的女性下生殖道感染性疾病,主要特征为阴道内乳杆菌数量减少或消失,而阴道加德纳菌及厌氧菌等微生物数量显著增多。该病好发于育龄期女性,10%~40%的患者无症状,有症状者主要表现为阴道分泌物增多,有鱼腥味,性交后加重,伴外阴瘙痒、潮湿、烧灼感<sup>[1-2]</sup>。BV相关并发症较多,如盆腔炎性疾病、人乳头瘤病毒(HPV)感染、不孕症、妇科术后感染等,持续存在还会增加妊娠期流产、早产及新生儿不良结局的风险<sup>[3]</sup>。BV复发率较高,治疗后12个月的复发率可高达60%,严重影响患者生活质量。目前西医治疗有一定疗效,但仍存在部分问题,寻求安全有效的治疗方法是BV研究中亟待解决的难题。

复方黄柏液涂剂是一种外用中成药液体制剂,药理研究表明其具有抑菌、抗炎作用,亦可增强巨噬细胞活性、提高机体的非特异性免疫<sup>[4-5]</sup>。现扩展应用治疗多种妇科炎症类疾病,如阴道炎<sup>[6]</sup>、盆腔炎性疾病后遗症<sup>[7]</sup>、会阴伤口感染<sup>[8]</sup>。但尚缺乏该药治疗BV的作用机制研究。甲硝唑是指南推荐治疗BV的一线药物,临床初始治愈率可达70%~90%,但存在菌群耐药、阴道微生态失调等情况,致使疾病反复发作、难以彻底治愈<sup>[9-10]</sup>。一项前瞻性随机多中心非劣效临床研究表明红核妇洁洗液治疗BV疗效非劣于甲硝唑,可明显改善阴道微生态,且疾病复发率更低,安全有效<sup>[11]</sup>。因此,本研究拟通过混合菌液法制备BV大鼠模型,将甲硝唑与红核妇洁洗液作为阳性对照药,旨在探索复方黄柏液涂剂对BV大鼠的治疗效果及作用机制,为临床应用复方黄柏液涂剂治疗BV提供实验依据。

## 材料与方 法

### 1 实验动物及菌种

8周龄SPF级健康、雌性未交配SD大鼠55只,体重180~220g,由成都达硕实验动物有限公司提供,使用许可证编号:SYXK(川)2021-246。金黄色

葡萄球菌、大肠埃希菌(成都里来思诺生物科技有限公司,批号:ATCC25923,ATCC25922)按1:1比例混合后备用。

动物饲养及实验操作经成都中医药大学附属医院伦理审查委员会审批通过,实验伦理编号:2021DL-021。

### 2 实验药物

实验组药物:复方黄柏液涂剂(山东汉方制药有限公司,生产批号:21102311,国药准字:Z10950097)。

对照组药物:甲硝唑阴道凝胶(同方药业集团有限公司,生产批号:210706,国药准字:H20041426);红核妇洁洗液(山东步长神州制药有限公司,生产批号:210628,国药准字:Z10980131)。

其他药物:苯甲酸雌二醇注射液(兽用)[上海全宇(驻马店)动物药业有限公司,生产批号:210809,兽药字(2016)163232511]。

### 3 主要试剂

苏木素染液、伊红染液(武汉塞维尔生物科技有限公司);甲醛(成都市科隆化学有限公司);AR级无水乙醇(成都海兴化工试剂厂);AR级二甲苯(天津市致远化学试剂有限公司);AR级盐酸(成都西陇科学有限公司);中性树胶(Biosharp生物公司);白介素(IL)-1 $\beta$ ,IL-2,IL-10,IL-6和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime生物公司);DAB试剂盒、正常山羊血清、二抗(北京中杉金桥生物有限公司);PAGE凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司);ECL化学发光显影试剂盒(HRP Substrate生物公司);Toll样受体(Toll-like receptors,TLR)4、核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65一抗抗体(Abclonal生物公司); $\beta$ -tubulin抗体鼠克隆抗体(ZSGB-BIO生物公司)等。

### 4 主要仪器

垂直电泳槽、电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);数字切片扫描仪[3DHISTECH(Hungary)]

公司];修复仪(Thermo Shandon Limited 公司);漩涡混匀仪(江苏新康医疗器械有限公司);多功能酶标仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司)等。

## 5 BV 大鼠模型的建立

大鼠适应性喂养 4 d 后向阴道内注入 PBS 溶液进行连续 6 d 的脱污处理。脱污后皮下注射兽用苯甲酸雌二醇建立大鼠假动情期<sup>[12]</sup>。随机选取 45 只大鼠建立 BV 模型,具体操作如下:固定大鼠后,将 5 号头皮针硅胶管使用无菌石蜡油润滑,随后缓慢插入大鼠阴道约 1.5 cm 处,向阴道内接种混合菌液 50  $\mu\text{L}$ ,接种后提起大鼠尾部停留约 2 min,避免菌液流出<sup>[13]</sup>。接种 4 d 后,肉眼观察大鼠阴道情况,取阴道组织样本进行 HE 染色,若见炎性细胞浸润即为造模成功<sup>[14]</sup>。

## 6 分组及给药

将造模成功的 40 只大鼠随机分为 4 组,根据“人和动物间按体表面积折算的等效剂量”公式,将各组治疗药物临床等效剂量换算出大鼠每日用药量。其中模型组以生理盐水 2 mL $\cdot\text{kg}^{-1}$ 阴道注药;黄柏组以 2 mL $\cdot\text{kg}^{-1}$ 阴道注药;甲硝唑组以 1 g $\cdot\text{kg}^{-1}$ 阴道注药;红核组以洗液 10 倍稀释后 2 mL $\cdot\text{kg}^{-1}$ 阴道注药。另设空白组以生理盐水 2 mL $\cdot\text{kg}^{-1}$ 阴道注药。每天定时给药 1 次,连续 7 d。

## 7 观察指标

**7.1 阴道组织病理改变** 取保存于 10% 中性甲醛溶液中的阴道组织,包埋切片后行 HE 染色。光镜下观察形态学变化。用 3DHISTECH(Hungary)公司生产的 Panoramic 250 数字切片扫描仪对切片进行图像采集。首先将病理切片放置于 100 倍镜下观察大致病变情况,然后于 400 倍镜下计数视野下炎性细胞、糖原堆积数量,每只大鼠取 3 个密集区域数量之平均数进行比较。

**7.2 ELISA 检测相关因子的表达** 取阴道灌洗液标本,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行复温与加

样、配液与洗涤、显色与终止,测定 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  水平。

**7.3 免疫组化定位 NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白** 取保存于 10% 中性甲醛溶液中的阴道组织,包埋切片后脱蜡、水化,采用柠檬酸缓冲液进行抗原热修复,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  浸泡 10 min 阻断内源性过氧化氢酶,血清封闭,滴加一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育,二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,用 DAB 法进行显色,随后复染、脱水、透明,干燥后用中性树胶封片,置于显微镜下观察染色结果,使用 Halo 数据分析系统计算每张图像阳性占比。

**7.4 Western blot 法检测 TLR4, NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达水平** 取大鼠阴道组织标本,经研磨、裂解、匀浆、离心,取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白量,SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜,将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中封闭,分别用 TLR4, NF- $\kappa\text{B}$  p65 一抗(浓度 1:2 000)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,二抗(浓度 1:5 000)室温孵育 2~3 h, TBST 清洗后 ECL 化学发光、显影,天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 对条带进行曝光扫描。

## 8 统计学分析

用 SPSS Statistics 23.0 软件进行统计,定量资料以 Mean  $\pm$  SD 表示,组间比较采用 one-way ANOVA 检验,方差齐的多组数据采用 LSD-*t* 检验,方差不齐的多组间数据采用 Tamhane-T2 检验;不满足正态分布采用非参数检验里的 Kruskal-Wallis 检验。设置检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

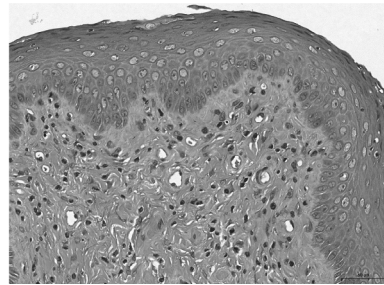
## 结 果

### 1 阴道组织病理改变

**1.1 阴道组织病理形态变化** 空白组大鼠阴道组织形态正常,上皮脚增粗不明显,见上皮糖原堆积,未见炎性细胞浸润;模型组见上皮脚增生,糖原堆积较空白组减少,组织内大量中性粒细胞及嗜酸性粒细胞浸润,证明 BV 模型造模成功;经各治疗组干预后,上述病理改变均减轻。见图 1。



A 空白组



B 模型组

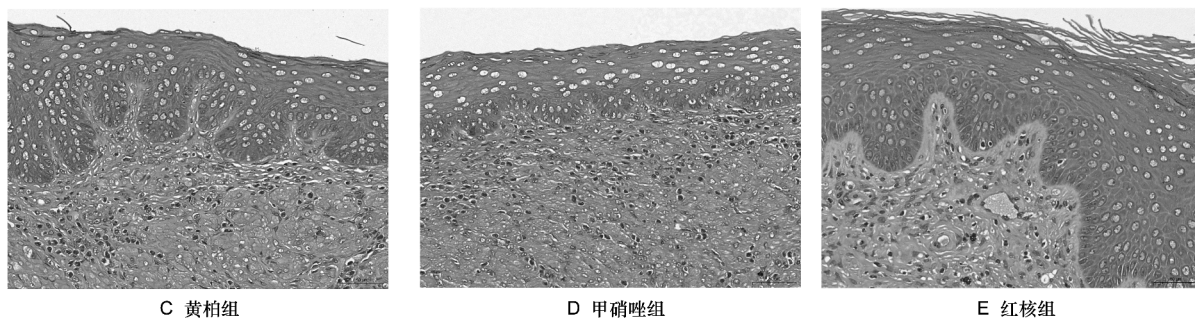


图1 各组大鼠阴道组织病理形态(HE染色×400)

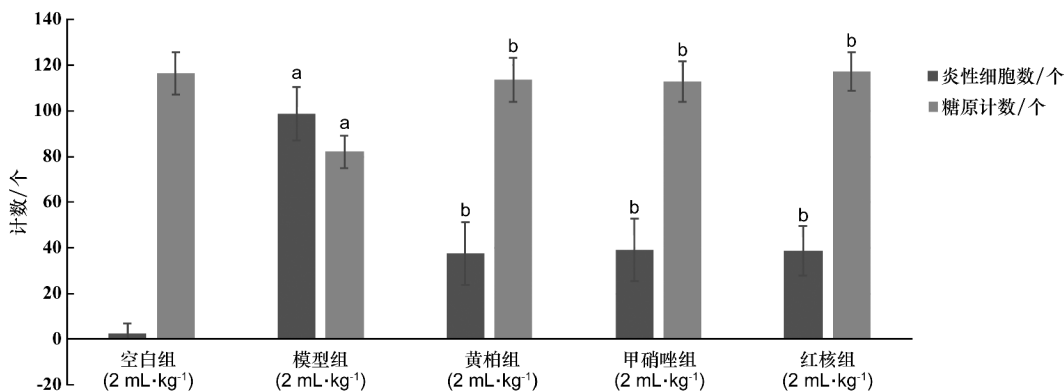
**1.2 炎性细胞及糖原堆积** 与空白组相比,模型组炎性细胞浸润明显,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组相比,黄柏组、甲硝唑组及红核组炎性细胞浸润减轻,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。各治疗组间炎性细胞浸润差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

与空白组相比,模型组糖原堆积减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组相比,黄柏组、甲硝唑组及红核组糖原堆积增多,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。各治疗组间糖原堆积差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体见表1和图2。

表1 各组大鼠炎性细胞及糖原堆积情况

组别	例数/例	炎性细胞数/个	糖原计数/个
空白组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	10	2.500 ± 4.536	116.375 ± 9.410
模型组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	10	98.625 ± 11.771 <sup>a</sup>	82.125 ± 6.958 <sup>a</sup>
黄柏组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	10	37.500 ± 13.617 <sup>b</sup>	113.500 ± 9.666 <sup>b</sup>
甲硝唑组(1 g·kg <sup>-1</sup> )	10	39.375 ± 13.684 <sup>b</sup>	112.875 ± 8.806 <sup>b</sup>
红核组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	10	38.750 ± 10.796 <sup>b</sup>	117.125 ± 8.408 <sup>b</sup>

与空白组相比,a: $P < 0.01$ ;与模型组相比,b: $P < 0.01$



与空白组相比,a: $P < 0.01$ ;与模型组相比,b: $P < 0.01$

图2 各组大鼠炎性细胞及糖原堆积情况

## 2 大鼠阴道灌洗液中相关炎症介质的表达水平

与空白组相比,模型组 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  的浓度均升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), IL-10 浓度降低,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

与模型组相比,黄柏组 IL-1 $\beta$ , IL-6 浓度降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), IL-2, TNF- $\alpha$  浓度下降, IL-10 浓度升高,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );甲硝唑组 IL-6 浓度降低,差异有统计学意义

( $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$  浓度下降, IL-10 浓度升高,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );红核组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  浓度降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), IL-2 浓度下降, IL-10 浓度升高,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

各治疗组两两相比,上述炎症介质的表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表2。

表2 各组大鼠阴道灌洗液中炎症介质的表达水平

组别	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-10	IL-6	TNF- $\alpha$
空白组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	0.687 ± 0.251	48.393 ± 11.232	1.862 ± 0.130	1.627 ± 0.851	10.588 ± 2.603
模型组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	2.001 ± 0.506 <sup>a</sup>	70.918 ± 10.974 <sup>a</sup>	1.533 ± 0.497	3.218 ± 1.081 <sup>a</sup>	17.421 ± 3.550 <sup>a</sup>
黄柏组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	1.325 ± 0.501 <sup>c</sup>	66.812 ± 4.973	1.870 ± 0.318	2.398 ± 0.724 <sup>b</sup>	15.285 ± 4.109
甲硝唑组(1 g·kg <sup>-1</sup> )	1.498 ± 1.294	63.377 ± 7.558	1.846 ± 0.283	2.183 ± 0.904 <sup>c</sup>	15.055 ± 2.461
红核组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	1.054 ± 0.204 <sup>b</sup>	64.676 ± 6.713	1.650 ± 0.345	2.013 ± 0.547 <sup>b</sup>	13.008 ± 1.915 <sup>c</sup>

与空白组相比,a: $P < 0.01$ ;与模型组相比,b: $P < 0.05$ ,c: $P < 0.01$

### 3 NF- $\kappa$ B p65 蛋白定位情况

光镜下观察到空白组阴道组织细胞中 NF- $\kappa$ B p65 定位于细胞质,可见苏木素染色的蓝色细胞核,DAB 染色 NF- $\kappa$ B p65 阳性表达为棕黄色或褐色。与空白组相比,模型组 NF- $\kappa$ B p65 的表达可见核易位( $P < 0.05$ ),见细颗粒状或细丝状棕黄色或褐色。与模型组相比,各治疗组核易位的 NF- $\kappa$ B p65 表达显著减少( $P < 0.01$ )。见表3和图3。

表3 各组大鼠 NF- $\kappa$ B p65 核易位细胞数占比

组别	例数/例	阳性占比/%
空白组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	8	2.929 7 ± 1.044 9
模型组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	8	4.072 2 ± 1.288 6 <sup>a</sup>
黄柏组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	8	2.176 5 ± 0.854 4 <sup>b</sup>
甲硝唑组(1 g·kg <sup>-1</sup> )	8	2.036 6 ± 1.032 3 <sup>b</sup>
红核组(2 mL·kg <sup>-1</sup> )	8	2.680 9 ± 0.719 4 <sup>b</sup>

与空白组相比,a: $P < 0.05$ ;与模型组相比,b: $P < 0.01$

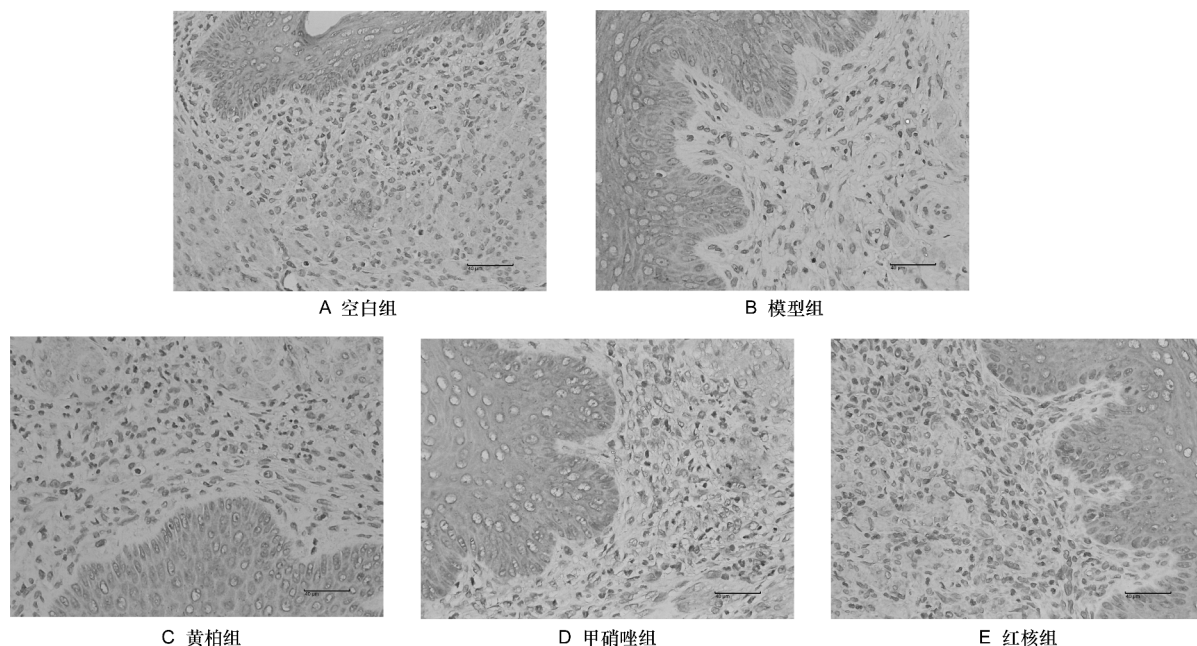


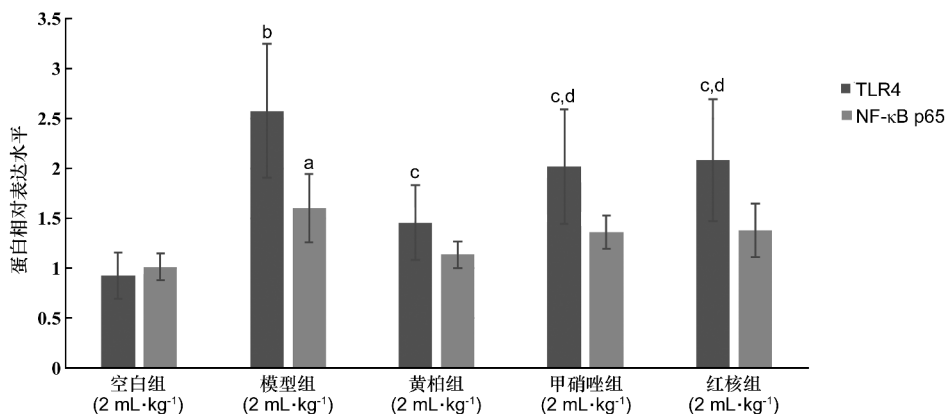
图3 各组大鼠阴道组织细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白定位情况(免疫组化 × 400)

### 4 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达水平

与空白组相比,模型组 TLR4 表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组相比,黄柏组、甲硝唑组及红核组 TLR4 均下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且黄柏组下降趋势优于甲硝唑组、红核

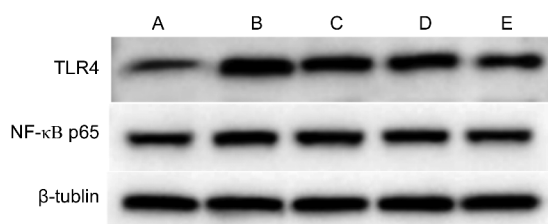
组( $P < 0.05$ )。

与空白组相比,模型组 NF- $\kappa$ B p65 表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组相比,各治疗组 NF- $\kappa$ B p65 的表达呈下降趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图4和图5。



与空白组相比, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, c:  $P < 0.05$ ; 与黄柏组相比, d:  $P < 0.05$

图4 TLR4, NF-κB p65 蛋白相对表达水平



A: 空白组; B: 模型组; C: 红核组; D: 甲硝唑组; E: 黄柏组

图5 TLR4, NF-κB p65 蛋白相对表达水平

## 讨论

中医理论将 BV 归于“带下病”、“阴痒”等疾病范畴。“带下病”始见于《内经》,《素问·玄机原病式》中又提出:“下部任脉湿热甚者,津液涌溢而为带下也”。《傅青主女科》云:“夫带下俱是湿症”。因此, BV 的主要病机为下焦湿热互结,任带失约,治疗上应以清热利湿止带为主。复方黄柏液涂剂是由山东汉方制药有限公司上市的中成药,方中以黄柏、连翘相须为君,黄柏苦寒,《本草拾遗》记载其可“主热疮疱起,虫疮”,擅治下焦湿热,体外实验研究表明黄柏提取物可通过抑制 NF-κB 活化,降低 IL-1β, IL-6 的表达水平而抑制炎症反应<sup>[15]</sup>。连翘功擅清热解毒、散结消肿,药理研究显示连翘可调控机体内多条炎症通路以发挥抗炎、抑菌的作用<sup>[16]</sup>。金银花、蒲公英共为臣药,可增强君药清热解毒之功,谷晓雨等<sup>[17]</sup>通过体外抑菌实验证明二药合用的抑菌效果明显增强,可有效抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌等多种致病菌的感染。《医学衷中参西录》谓蜈蚣“性有微毒,而转善解毒,凡一切疮疡诸毒皆能消之”,为佐药以增全方解毒之力,蜈蚣

醇提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等常见菌有明显抑菌作用<sup>[18]</sup>。药理学研究发现复方黄柏液涂剂具有良好的抗炎、抑菌作用,可通过介导 NF-κB 等相关通路降低炎症介质的表达水平,减轻机体的炎症反应<sup>[19]</sup>。本品对多种细菌具有确切的抑制作用,并能增强巨噬细胞的吞噬功能,提高机体非特异性免疫<sup>[20]</sup>。

针对 BV 模型制备,本研究采用金黄色葡萄球菌与大肠杆菌 1:1 混合接种感染法制备 BV 大鼠模型,接种 4 d 后,肉眼观察见脓性分泌物自大鼠阴道口流出,HE 染色显示有大量炎性细胞浸润,糖原堆积明显减少,提示 SD 大鼠 BV 模型复刻成功<sup>[14]</sup>。实验结果显示,与模型组对比,黄柏组炎性细胞浸润明显减轻,糖原堆积明显增多,提示复方黄柏液涂剂可改善阴道微环境、减轻炎症反应<sup>[21]</sup>。

TLRs 是固有免疫系统的重要组成部分,是识别微生物病原体和启动免疫系统的决定因素<sup>[22]</sup>。TLR4 是哺乳动物中最早被发现的 TLRs,其在阴道上皮细胞中表达,调节阴道的免疫炎症反应<sup>[23-24]</sup>。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,微生物侵入机体后通过释放 LPS 与 TLR4 受体结合<sup>[25]</sup>。TLR4 信号激活后,启动炎症反应,释放 IL-1β, IL-6, TNF-α 等炎症介质,进一步活化下游 NF-κB 通路<sup>[26]</sup>。NF-κB 是一种细胞核转录因子,参与机体的免疫炎症反应,主要以 p50 与 p65 这 2 种形式存在,当机体受到刺激时, NF-κB 抑制蛋白游离释放, NF-κB 解聚, NF-κB p65 易位入细胞核,调控相关基因表达,激活 TNF-α, IL-6 的释放<sup>[27-28]</sup>。TLR4/NF-κB 通路激活可导致 Th1/Th2 免疫失衡,加快炎症进展<sup>[29]</sup>。正常情况下 Th1, Th2

处于动态平衡,在机体免疫中发挥重要作用,机体受到刺激后容易失衡引起相应变化。Th1 细胞分泌的 IL-2, TNF- $\alpha$  作为促炎因子诱导机体的炎症反应, Th2 细胞分泌的 IL-10 则作为抑炎因子抑制炎症细胞的激活<sup>[30-31]</sup>。本研究模型组大鼠阴道组织中 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 表达水平增加,且 NF- $\kappa$ B p65 可见核易位,阴道灌洗液中 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  浓度明显升高,IL-10 浓度降低。验证 BV 的发病可能与 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路激活并介导 Th1/Th2 免疫失衡有关,经复方黄柏液涂剂干预后,TLR4, NF- $\kappa$ B p65 表达水平下降,NF- $\kappa$ B p65 核易位细胞数显著减少,且 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  等炎症介质浓度下降,IL-10 浓度升高。

近年来,诸多研究认为 BV 与机体的免疫炎症反应有关,但尚未开展系统的机制研究。本研究从 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路介导 Th1/Th2 免疫平衡出发,根据本病湿热互结的核心病机,选取复方黄柏液涂剂为研究对象,探究其治疗 BV 的疗效及作用机制。研究结果显示复方黄柏液涂剂一方面可通过下调或沉默 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 的表达及活化,抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路,减少相关炎症介质的释放,另一方面可通过促进 IL-10 的表达、抑制 IL-2 的表达以调节 Th1/Th2 免疫失衡状态,从而起到治疗 BV 的作用。本研究在复方黄柏液涂剂有效治疗 BV 模型大鼠的基础上,探索其治疗 BV 的免疫炎症机制及作用靶点,为临床拓展应用复方黄柏液涂剂治疗 BV 提供了实验依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组. 细菌性阴道病诊治指南(草案)[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(4): 317-317.
- [2] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 243-245.
- [3] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组. 细菌性阴道病诊治指南(2021 修订版)[J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56(1): 3-6.
- [4] 张硕峰, 贾占红, 吴金英, 等. 复方黄柏液对家兔皮肤破损创口愈合的影响及其抗菌活性[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(11): 1330-1332, 1236.
- [5] 卢灿省, 张鑫龙, 石健, 等. 复方黄柏液涂剂保留灌肠治疗湿热型溃疡性结肠炎的疗效观察及其对血清炎症因子的影响[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(15): 1776-1780.
- [6] 张冬玲. 复方黄柏液坐浴联合康妇炎胶囊对细菌性阴道炎患者阴道微环境的影响[J]. 中医外治杂志, 2020, 29(3): 32-33.
- [7] 徐云霞, 李格格, 郭敏敏, 等. 复方黄柏液涂剂保留灌肠治疗湿热蕴结型盆腔炎性疾病后遗症疗效观察[J]. 四川中医, 2021, 39(2): 166-169.
- [8] 姚俊, 赵霞. 复方黄柏液最新临床应用进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(3): 308-312, 337.
- [9] BRADSHAW CS, MORTON AN, HOCKING J, et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recur-

- rence[J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(11): 1478-1486.
- [10] American College of Obstetricians and Gynecologists. Vaginitis in nonpregnant patients. ACOG Practice Bulletin No. 215[J]. *Obstet Gynecol*, 2020, 135: e1-e17.
- [11] 路遥, 刘朝晖, 楼姣英, 等. 红核妇洁洗液治疗细菌性阴道病的有效性及其安全性评价研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(11): 1125-1128.
- [12] 黄瑜, 蒙春莲, 黄国爱, 等. 缩醛磷脂对混合细菌感染大鼠阴道炎的改善效果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(18): 2731-2735.
- [13] 张冬梅, 李红娟, 周芹. 黄柏碱对细菌性阴道病小鼠模型的保护作用[J]. 中草药, 2018, 49(24): 5849-5853.
- [14] 张巧妮. 一种小鼠细菌性阴道病模型的构建和鉴定[D]. 大理: 大理大学, 2023.
- [15] CHOI YY, KIM MH, HAN JM, et al. The anti-inflammatory potential of Cortex Phellodendron *in vivo* and *in vitro*: down-regulation of NO and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B and MAPK activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(2): 214-220.
- [16] 景奉堂, 冯帅, 王静, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的连翘质量标志物预测分析[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 293-298, 307.
- [17] 谷晓雨, 李会, 张佩, 等. 蒲公英、金银花水提剂及颗粒剂对 4 种致病菌的抑菌作用[J]. 临床合理用药杂志, 2023, 16(1): 5-8.
- [18] 周莉莉, 黄迎春, 任超. 蜈蚣醇提取物和水提取物部分药理作用比较[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2697-2698.
- [19] 李冬琳, 管忠安. 复方黄柏液涂剂干预溃疡性结肠炎的网络药理学及分子对接研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2022, 28(1): 47-52.
- [20] 孙绪丁, 刘振勋, 樊苗, 等. 复方黄柏液涂剂体外抑菌效果研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(9): 9-10.
- [21] 蒋丽, 叶世芸, 郑立青, 等. 基于 NF- $\kappa$ B/HO-1/NF- $\kappa$ B 通路探讨苦参膜对混合细菌性阴道炎大鼠的治疗作用[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3): 127-134.
- [22] WICHERSKA-PAWŁOWSKA K, WRÓBEL T, RYBKA J. Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), and RIG-I-like receptors (RLRs) in innate immunity. TLRs, NLRs, and RLRs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13397.
- [23] PIŁÓCIENNIKOWSKA A, HRMADA-JUDYCKA A, BORZEŃKA K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3): 557-581.
- [24] MANDAL S, BANDYOPADHYAY S, TYAGI K, et al. Human microbial dysbiosis as driver of gynecological malignancies[J]. *Biochimie*, 2022, 197: 86-95.
- [25] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [26] JHA AK, GAIROLA S, KUNDU S, et al. Toll-like receptor 4: an attractive therapeutic target for acute kidney injury[J]. *Life Sci*, 2021, 271: 119155.
- [27] ZHANG Q, LENARDO MJ, BALTIMORE D. 30 years of NF- $\kappa$ B: a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [28] HOWELL JA, BIDWELL GL III. Targeting the NF- $\kappa$ B pathway for therapy of ischemic stroke[J]. *Ther Deliv*, 2020, 11(2): 113-123.
- [29] XUE B, LIU XL, DONG WW, et al. EGCG maintains Th1/Th2 balance and mitigates ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium through TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2017: 3057268.
- [30] MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. *J Immunol*, 1986, 136(7): 2348-2357.
- [31] FU DD, MA JX, GONG QM, et al. Fractalkine mediates lymphocyte inflammation and tubulointerstitial lesions by modifying the Treg/Th17 balance in lupus-prone MRL/lpr mice[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(10): 6170-6186.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2023-08-28