

## 淫羊藿苷对子宫内膜异位症大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、NF- $\kappa$ B 和磷酸化 NF- $\kappa$ B 水平的影响

王 平<sup>1</sup>, 曹保利<sup>2</sup>, 李棣华<sup>2</sup>, 杨 磊<sup>2</sup>, 刘 帅<sup>2</sup>, 曹 颖<sup>2</sup>, 刘俊红<sup>2</sup>, 吕沅珊<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300100; 2. 天津南开医院 妇产科)

**摘要:**目的:探讨淫羊藿苷对子宫内膜异位症大鼠 TNF- $\alpha$  和炎症因子 IL-6、IL-8 和 NF- $\kappa$ B 和磷酸化 NF- $\kappa$ B 水平的影响。方法:自体移植法建造大鼠 EMs 模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组(model group)、淫羊藿苷高剂量组(icariin-h)、淫羊藿苷低剂量组(icariin-l)和空白对照组(blank group),每组 7 只,分别给模型组 0.9% 生理盐水 15mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、淫羊藿苷高剂量组 100mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、淫羊藿苷低剂量组 50mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、空白对照组 0.9% 生理盐水 15mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续给药 28 天,取材,病理 HE 染色,观察镜下病理组织变化。采用 ELISA 法测大鼠血清 TNF- $\alpha$  和白细胞介素 IL-6、IL-8 水平。以免疫印迹法检测异位内膜组织中的 NF- $\kappa$ B 和磷酸化 NF- $\kappa$ B 水平。结果:模型组与空白组相比较显示,模型组中大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 明显高于空白组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),给药组与模型组相比较显示,淫羊藿苷给药组(高剂量组、低剂量组)大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平明显低于模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:淫羊藿苷(Icariin)通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,降低子宫内膜异位症大鼠的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平,抑制 EMs 的生长。

**关键词:**淫羊藿苷; TNF- $\alpha$ ; 子宫内膜异位症; 炎症因子; NF- $\kappa$ B

**中图分类号:** R71

**文献标识码:** B

**文章编号:** 2095-512X(2020)04-0428-04

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是生育期妇女常见疾病,是一种良性的妇科疾病,以具有活性的子宫内膜异位于子宫以外的其它地方为特征,是一种炎症性、雌激素依赖性疾病,常引起痛经、盆腔炎症和不孕等并发症。临床上约有 10%~15% 的生育期妇女患有此疾病,而不孕的妇女中有 20%~40% 的女性患有 EMs,是一种需要终身治疗的慢性疾病<sup>[1-3]</sup>。虽然 EMs 是一种良性的妇科疾病,但以恶性肿瘤的方式存在,对女性的健康产生重大的威胁<sup>[4]</sup>。目前,临床上治疗 EMs 的药物并不是很理想,对 EMs 的治疗还处在探索阶段。淫羊藿苷(icariin, ICA)是中草药淫羊藿的提取物,其具有抗炎、镇痛的作用<sup>[5]</sup>,相关研究表明,淫羊藿有雌激素样作用,可以提高去卵巢大鼠的骨密度与骨重量<sup>[6]</sup>。本文目的是探讨淫羊藿苷对 EMs 大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 和 NF- $\kappa$ B 和 p-NF- $\kappa$ Bp65 水平的影响,为 EMs 的治疗提供新的理论依据。

### 1 研究材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 药品与试剂** 淫羊藿苷,规格:20mg,中国生物制品检定所,批号 110737-201415;硫酸庆大霉素注射液,华中药业股份有限公司,国药准字 H42021503;10%水合氯醛(0.3mL/100g 体重),天津市南开医院分子生物研究实验室提供;10%福尔马林溶液,天津市南开医院病理实验室;无菌 PBS 缓冲液,购自中奥天元生物有限公司;大鼠白细胞介素-6(IL-6)、大鼠白细胞介素-8(IL-8)、大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的酶链免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒,均购自上海康朗生物科技有限公司;小鼠抗人磷酸化核因子  $\kappa$ B (Ser536)单克隆抗体,购自上海碧云天生物技术有限公司。

**1.1.2 仪器** 全自动脱水机(ASP300S,德国 Leica 公司)、病理石蜡包埋机(德国 Leica 公司)、切片机(德国 Leica 公司)、摊片机(德国 Leica 公司)、烤片机(德国 Leica 公司)、电热恒温水浴箱(型号 DKB-600D,上海横一科学仪器有限公司生产)、电热鼓风干燥箱(型号 DHG-101 3 型,上海昕仪仪器仪表有限公

收稿日期:2020-04-04; 修回日期:2020-07-10

基金项目:天津中医药管理局项目(11014)

作者简介:王平(1989-),天津中医药大学 2016 级在读硕士研究生。

通讯作者:曹保利,主任医师, E-mail: xiaomh66@sina.com 天津市南开医院妇产科, 300100

司)、研究型正置荧光显微镜(型号DM4000B,德国Leica公司,摄像头为DFC500,图像采集软件为LAS V3.7)。多功能酶标仪(型号varioskanflash3001,thermo fisher scientific公司)

**1.1.3 实验动物** 清洁级健康未交配过的SD雌性大鼠30只(中国食品药品检定研究所,国家实验动物质量检测中心,SCXK(京)2014-0013),体重180~220g,常规饲养,室温,自然光照。分笼饲养,每笼6只。适应性喂养7天。本实验经天津中医药大学动物实验中心动物伦理委员会审批许可,审批号为TCM-LAEC2018026。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠EMs模型的建立及成模情况** 参考非动情期大鼠EMs模型的建立方法<sup>[7,8]</sup>,30只雌性SD大鼠,经腹腔注射10%的水合氯醛(0.3mL/100g)进行麻醉,待麻醉满意后,将大鼠移至鼠板,固定其头与四肢,暴露腹部,备皮,手术用阿尔碘消毒,铺无菌孔巾,开腹,找到“Y”字形子宫,将大鼠右侧子宫分离暴露,近卵巢约1cm处与右侧子宫宫颈处两端结扎,将子宫剪断,长约2cm,迅速将剪下的组织放置于盛有0.9%生理盐水的无菌培养皿中;在无菌培养皿中将多余的脂肪和结缔组织剔除,沿系膜部位将组织纵行剪开,将组织剪成大小约4mm\*4mm的内膜组织片段2段;将子宫内表面上皮与腹壁相贴合,左右两侧腹壁血管丰富处各缝一块,用7-0带针无损伤线将剪下来组织的四个角缝合在腹壁血管丰厚处上;用生理盐水将腹腔冲洗干净,然后在大鼠腹腔内滴入用生理盐水稀释过的盐酸庆大霉素注射液2~3mL预防感染,用4-0丝线关腹缝合,用苦味酸涂抹伤口,以防大鼠撕咬伤口;术后2只大鼠因腹腔感染死亡,其余28只均成模。

**1.2.2 分组及给药方法** 随机将大鼠分为4组:空白对照组,模型组,ICA高剂量组,ICA低剂量组,每组7只。空白对照组、模型组:15mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,ICA高剂量组:100mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,ICA低剂量组:50mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续给药28天。

**1.2.3 EMs标本采集及处理** 连续灌胃给药28天后,在末次给药24h内,用10%的水合氯醛经腹腔注射麻醉大鼠,经目内眦静脉采血1mL,开腹,剪取腹壁移植,及空白组剪取子宫,每个组织在无菌PBS中冲洗样本3次,尽量去除血液。用吸水纸将组织上液体尽量吸干。将该组织,分别切割3份,其中一份组织放入多聚甲醛/福尔马林中离心管中,封口膜封口,待HE检测,另外两份放置-80℃冰箱过夜,转

移至液氮罐中保存待其他检测。

**1.2.4 EMs组织HE染色** 将固定在福尔马林中的组织进行脱水,经石蜡包埋好,准备切片,将切片好的组织进行常规操作染色,最后用中性树胶封片于光镜下观察组织变化。

**1.2.5 ELISA法检测血清中TNF-α、IL-6、IL-8含量** 将采取的静脉血置于离心机,1000r,20min,离心,分离血清,-20℃保存,待检用。采用ELISA法检测血清中TNF-α、IL-6、IL-8水平,操作严格按照试剂盒所标示的步骤进行。酶标仪在450nm波长处测定各孔的光密度(OD)值,在加终止液15min内进行检测,根据标准曲线,将大鼠血清中的TNF-α、IL-6、IL-8含量进行计算,得出数值。

**1.2.6 以免疫印迹法检测异位内膜组织中的NF-κB和磷酸化NF-κB水平** 将存于液氮罐中的内膜异位组织取出,将组织样品称取适量,放置于液氮预冷的研钵中,在研钵中加液氮将样品充分研磨至粉末。加入粉末4倍体积裂解缓冲液(8M尿素,1%蛋白酶抑制剂和2mMEDTA),超声裂解。4℃,12000g离心10min,去除细胞碎片,将上清液置入新的离心管中,利用BCA试剂盒测定蛋白浓度。加入上样缓冲液,煮沸变性5~10min,制备SDS-PAGE凝胶,电泳并转至PVDF膜,封闭,依次孵育一抗、二抗,ECL化学发光法显影。Image-ProPlus6.0软件对其进行分析处理。

## 1.3 统计学处理方法

采用SPSS20.0统计软件对实验数据进行数据统计分析, $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,多个样本之间采用方差分析( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠内异症组织病理学观察

空白组光镜下可见黏膜上皮完整,细胞呈柱状,细胞分布均匀,腺体数量多且完整。模型组光镜下可见宫内膜腺体,子宫内膜间质及含铁血黄素;移植腺体增生,腺上皮呈高柱状排列。淫羊藿苷高剂量组与淫羊藿苷低剂量组在光镜下均可见移植组织内膜粘膜上皮变薄,呈萎缩性改变,呈缝隙状改变,移植组织内膜腺体可见明显减少,腺腔较模型组明显变窄,腺上皮萎缩明显,呈扁平状或矮立方状,间质中有少量白细胞浸润,部分异位组织腺上皮明显被破坏甚至消失(见图1~4)。

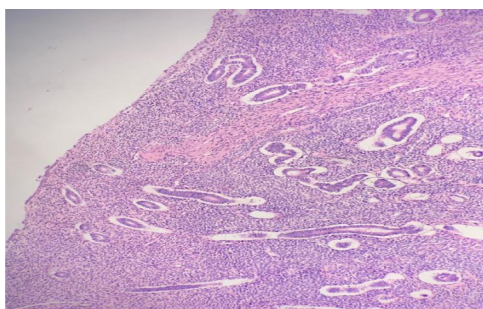


图1 空白组

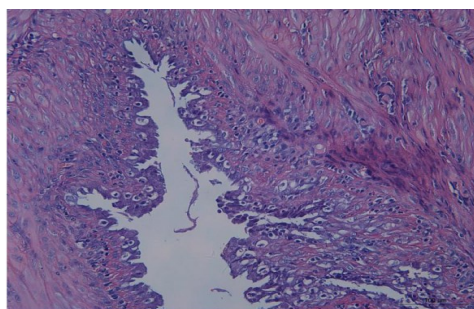


图2 模型组

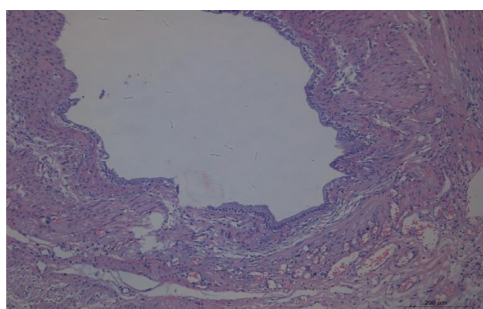


图3 淫羊藿苷-L

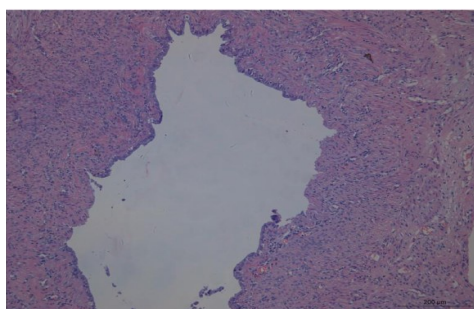


图4 淫羊藿苷-H

## 2.2 ICA 对大鼠血清中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 含量的影响

以模型组作为参照,空白组与之相比较,TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 含量的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。ICA 低剂量组与高剂量组与之相比较,TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 含量差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )(见表1)。

## 2.3 ICA 对大鼠 EMs 组织中 NF- $\kappa$ B 和磷酸化 NF- $\kappa$ B 蛋白水平的影响

模型组作为参照,空白组与之相比较,磷酸化 NF- $\kappa$ B 表达差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。ICA 低剂量组与 ICA 高剂量组与之相比较,磷酸化 NF- $\kappa$ B 表达差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )(见表2,图5)。

表1 ICA对大鼠血清中白细胞介素-6(IL-6 $\cdot$ ng $\times$ L $^{-1}$ )白细胞介素-8(IL-8 $\cdot$ ng $\times$ L $^{-1}$ )和肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$  $\cdot$ ng $\times$ L $^{-1}$ )水平的影响( $\bar{x}\pm s, n$ )

Group	n	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
Blank	7	119.64 $\pm$ 2.55	113.52 $\pm$ 2.79	61.94 $\pm$ 4.73
Model	7	347.42 $\pm$ 7.95 <sup>##</sup>	418.12 $\pm$ 10.49 <sup>#</sup>	293.16 $\pm$ 19.21 <sup>#</sup>
Icariin-L	7	252.74 $\pm$ 2.58 <sup>**</sup>	225.74 $\pm$ 24.74 <sup>*</sup>	173.60 $\pm$ 6.35 <sup>*</sup>
Icariin-H	7	211.37 $\pm$ 2.48 <sup>**</sup>	216.01 $\pm$ 3.45 <sup>*</sup>	134.30 $\pm$ 4.82 <sup>*</sup>

空白组与模型组:0.9%的生理盐水 15mL $\cdot$ kg $^{-1}$ d $^{-1}$   
ICA低剂量(L)和ICA高剂量(H)两组分别给予 50mg $\cdot$ kg $^{-1}$ d $^{-1}$ 和 100mg $\cdot$ kg $^{-1}$ d $^{-1}$ 。与空白组相比较( $P<0.05^*$ ),与模型组相比较( $P<0.05^*$ ,  $P<0.01^{**}$ )。

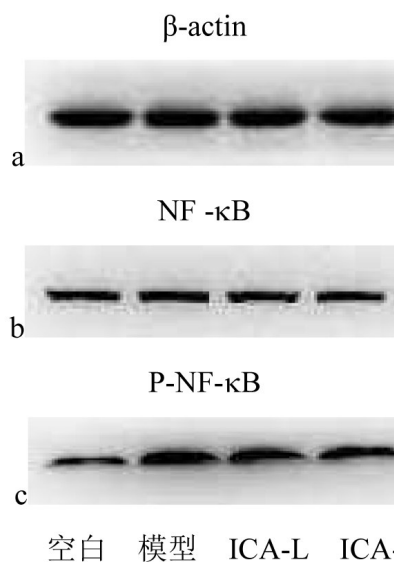


图5 a 蛋白表达内参  $\beta$ -actin  
b ICA对异位组织中 NF- $\kappa$ B 蛋白水平的影响  
c ICA对异位组织中 p-NF- $\kappa$ B 蛋白水平的影响

表2 ICA对大鼠EMs模型异位内膜组织中核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)蛋白和磷酸化核因子 $\kappa$ B(p-NF- $\kappa$ B)表达水平的影响

Group	n	NF- $\kappa$ B	p-NF- $\kappa$ B p65
Blank	7	1.08 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.04
Model	7	1.37 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>	0.74 $\pm$ 0.11 <sup>##</sup>
Icariin-L	7	1.21 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	0.68 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>
Icariin-H	7	1.09 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	0.60 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>



### 3 讨论

EMs是妇科常见的疾病,是一种炎症性、雌激素依赖性疾病,也是临床上引发不孕的危险因素之一<sup>[9,10]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8都是重要的炎症因子,对EMs的诊断具有一定的临床意义<sup>[11]</sup>。相关研究表明IL-6可以作为炎症早期的因子,促进其他炎症因子的分泌,使炎症反应放大<sup>[12]</sup>。IL-8是通过巨噬细胞和其他细胞分泌,可使中性粒细胞趋化,促使新的血管形成,在炎症的反应中起着至关重要的作用<sup>[13]</sup>。TNF- $\alpha$ 在机体处于正常水平下其水平表现较低,当机体处于炎症反应时其水平明显升高,这是由于单核巨噬细胞分泌的具有防御和治疗双重作用的细胞因子所导致<sup>[14]</sup>。NF- $\kappa$ B在调解细胞反应中有着重要的作用,在细胞的炎症反应、免疫应答等过程中起着关键的作用。NF- $\kappa$ B可以通过调节与炎症细胞浸入有关的因子基因表达,在炎症反应与免疫反应中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。ICA是淫羊藿的提取物,淫羊藿中被分离鉴定的单体化合物有260余种,但其中以ICA的含量最高。王坤雅通过研究证实,淫羊藿苷可以下调EMs细胞分泌MMP-2、MMP-9蛋白,从而抑制EMs细胞的增殖。有研究发现ICA通过抑制NF- $\kappa$ B p65蛋白的磷酸化和阻断I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白降解,提高GR-mRNA和蛋白的表达水平,调节GR受体,抑制NF- $\kappa$ B活化及下游炎性因子产生发挥抗炎作用。ICA通过抑制由NF- $\kappa$ B和PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 介导的炎症反应对大鼠缺血性中风具有神经保护作用。

本研究结果显示,ICA可以显著降低大鼠EMs组织中的TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8的含量。并且,ICA高剂量组和ICA低剂量组都可以对异位内膜起到抑制作用。高剂量组强于低剂量组。说明ICA通过抑制EMs异位组织促炎症因子的释放,改善EMs。其改善可能由于ICA通过对NF- $\kappa$ B信号通路的抑制而发挥的作用。从实验结果可知ICA可以显著降低EMs大鼠异位组织中的NF- $\kappa$ B蛋白的磷酸化水平。从某种程度上也说明ICA可以抑制内膜异位组织中的NF- $\kappa$ B蛋白的激活,抑制下游炎症基因的转录,抑制促炎因子的释放,起到缓解EMs的作用。

### 参考文献

- [1] Wang XM, Ma ZY, Song N. Inflammatory cytokines IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  and peritoneal fluid flora were associated with infertility in patients with endometriosis. European review for medical and pharmacological sciences. 2018;22:2513-8
- [2] Abbott J, Bowyer L, Finn M. Obstetrics & gynaecology: an evidence-based guide. 2nd ed. Churchill Livingstone; Elsevier; 2014
- [3] American Society for Reproductive Medicine. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: A committee opinion. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). 2014;101(4):927-35
- [4] 刘君,王凤丽,李银凤.血清CA125、FS在卵巢子宫内膜异位症中的临床应用价值[J].疾病监测与控制,2017;11(06):442-443+437
- [5] LI L, SUN J, XU C, et al. Icariin ameliorates cigarette smoke induced inflammatory responses via suppression of NF- $\kappa$ B and modulation of GR in vivo and in vitro[J]. PLoS One, 2014; 9(8): e102345
- [6] 高小明,师建平.淫羊藿提取物对去卵巢大鼠离体骨密度及骨重量的影响[J].内蒙古医科大学学报,2013;35(6):442-445
- [7] 张薇,沈洪心,黄启玲.非动情期SD大鼠子宫内膜异位症模型的建立[J].中国实验动物学报,2003;153-159
- [8] 杜娟.经痛愈舒对子宫内膜异位症大鼠NF- $\kappa$ B表达的防治作用[D].黑龙江中医药大学,黑龙江:哈尔滨市,2014:1-101
- [9] Baranov VS, Ivaschenko TE, Liehr T, et al. Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015;185:59-65
- [10] 张琪,游存后.子宫内膜异位症诊疗新进展[J].疾病检测与控制,2016;10(10):809-811
- [11] 朱定军,叶梅. IL-6、IL-8、MCP-1和TNF- $\alpha$ 在子宫内膜异位症诊断中的临床价值[J].中国生育健康杂志,2019;30(1):53-56
- [12] 朱翠香,彭玲玲,等.一次性硬膜外麻醉导管气管切开插管留置大鼠模型的建立[J].中华实验外科杂志,2015;32(10):2480-2480
- [13] Lee KE, Khoi PN, Xia Y, et al. Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2013; 19(45):8192-8202
- [14] Wang HT, Fang YQ, Bao XC, et al. Expression changes of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in the rat lung of decompression sickness induced by fast buoyancy ascent escape[J]. Undersea Hyperb Med, 2015;42(1):23-31
- [15] 李楠,陈璐,等.核转录因子(NF- $\kappa$ B)信号通路与子宫内膜异位症发病关系的研究及针对性治疗[J].中国免疫学杂志,2019;39(4):509-513

[1] Wang XM, Ma ZY, Song N. Inflammatory cytokines IL-6,