



saline. The rats were killed after 10 days of continuous administration. The pathological changes of cervical tissues of rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and mannose-binding lectin (MBL) in cervical tissues of rats were detected by enzyme linked immunosorbent assay. The expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 protein in cervical tissues of rats was detected by Western blot. **Results** HE staining showed that there was no abnormal change in cervical tissues of rats in the normal control group. In the cervicitis group, the changes such as cervical squamous epithelial cells degeneration, necrosis, exfoliation; congestion and edema of mucosa and submucosal lamina propria, obvious infiltration of neutrophils and lymphocytes, some purulent exudates and necrotic tissue were found. Compared with the cervicitis group, the pathological changes in cervical mucosa of rats in the *Xiaomi Yindao Paotengpian* group, low-dose quercetin group and high-dose quercetin group were significantly alleviated. The levels of ICAM-1, IL-1 $\beta$  and MBL in cervical tissues of rats in the cervicitis group were significantly higher than those in the normal control group ( $P < 0.05$ ). The levels of ICAM-1, IL-1 $\beta$  and MBL in cervical tissues of rats in the *Xiaomi Yindao Paotengpian* group, low-dose quercetin group and high-dose quercetin group were significantly lower than those in cervicitis group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the levels of ICAM-1, IL-1 $\beta$  and MBL in cervical tissues of rats among the *Xiaomi Yindao Paotengpian* group, low-dose quercetin group and high-dose quercetin group ( $P > 0.05$ ). The relative expression of NF- $\kappa$ B p65 protein in cervical tissues of rats in the normal control group, cervicitis group, *Xiaomi Yindao Paotengpian* group, low-dose quercetin group and high-dose quercetin group was  $0.13 \pm 0.02$ ,  $0.68 \pm 0.03$ ,  $0.39 \pm 0.02$ ,  $0.37 \pm 0.02$  and  $0.38 \pm 0.02$ , respectively. The relative expression of NF- $\kappa$ B p65 protein in cervical tissues of rats in the cervicitis group was significantly higher than that in the normal control group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of NF- $\kappa$ B p65 protein in cervical tissues of rats in the *Xiaomi Yindao Paotengpian* group, low-dose quercetin group and high-dose quercetin group was significantly lower than that in the cervicitis group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the relative expression of NF- $\kappa$ B p65 protein in cervical tissues of rats among the low-dose quercetin group, high-dose quercetin group and *Xiaomi Yindao Paotengpian* group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Quercetin can inhibit the expression of NF- $\kappa$ B p65, ICAM-1, IL-1 $\beta$  and MBL in cervical tissues, improve cervical inflammatory response in rats, and has a certain effect on cervicitis in rats.

**Key words:** quercetin; cervicitis; intercellular adhesion molecule-1; interleukin-1 $\beta$ ; mannose-binding lectin; nuclear factor- $\kappa$ B

宫颈炎是女性常见疾病,多发于育龄妇女,其发病原因主要为宫颈损伤和病原体感染,主要病理改变为炎症和渗出。槲皮素是一种天然的黄酮类化合物,具有广泛的药理作用。研究显示,槲皮素具有抗炎、抗病毒作用,对慢性宫颈炎有一定的疗效<sup>[1]</sup>,但其作用机制尚不明确。本研究通过观察槲皮素对宫颈炎大鼠宫颈组织中核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) p65、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、甘露糖结合凝集素 (mannose-binding lectin, MBL) 表达的影响,探讨槲皮素对大鼠宫颈炎的治疗作用及机制,以期为临床应用槲皮素防治宫颈炎提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 成年健康雄性 Sprague Dawley 大鼠 50 只,清洁级,体质量 300 ~ 350 g,由河南省实验动物中心提供(合格证号:526117)。将 50 只大鼠随机分为正常对照组、宫颈炎组、消毒阴道泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组,每组 10 只。大鼠常规饲料喂养,自由饮水。

**1.2 主要试剂与仪器** 槲皮素(西安万方生物科技有限公司),NF- $\kappa$ B p65 小鼠抗大鼠单克隆抗体(美国

Santa Cruz 公司), $\alpha$ -tubulin、ICAM-1、IL-1 $\beta$ 、MBL 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);Power-Pac 200 电泳仪、Trans-Blot 电泳转印槽(美国 BIO-RAD 公司),UV-7501 紫外分光光度计(无锡科达仪器厂),ELX 800 全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),光学显微镜(德国 Leica 公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 宫颈炎大鼠模型建立及药物干预** 大鼠适应性喂养 1 周后,宫颈炎组、消毒阴道泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组大鼠制备宫颈炎模型,将注射器插入大鼠阴道约 1 cm 处,注射  $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  苯酚胶浆 0.1 mL,对照组大鼠阴道内注射赋形剂 0.1 mL;每日 2 次,连续 5 d;至大鼠阴道有白色分泌物及阴道红肿、充血时,再次注射 1 次苯酚胶浆。造模成功后,消毒阴道泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组大鼠分别于阴道深处注射  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  消毒阴道泡腾片溶液 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  槲皮素溶液 ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  槲皮素溶液 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每日 2 次,连续 10 d;对照组和宫颈炎组大鼠给予生理盐水。连续给药 10 d 后处死大鼠。

**1.3.2 苏木精-伊红 (hematine-eosin, HE) 染色观察大鼠宫颈组织病理形态学改变** 末次给药后次日,立即处死大鼠,取阴道至子宫分角处组织,体积分数 10% 甲醛溶液固定 24 h;组织连续切片,片厚 5  $\mu\text{m}$ ;二甲苯脱蜡,常规梯度乙醇脱水;自来水冲洗;苏木精染色,自来水冲洗;体积分数 2% 的盐酸乙醇分化,氨水返蓝,自来水冲洗;伊红染色,自来水冲洗;乙醇脱水,二甲苯浸泡透明,中性树胶封片;光学显微镜下观察。

**1.3.3 ELISA 法检测大鼠宫颈组织中 ICAM-1、IL-1 $\beta$  和 MBL 水平** 末次给药后次日处死大鼠,取阴道至子宫分角处组织,称质量后剪碎,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 2 遍;然后,使用双蒸馏水研磨成组织匀浆(1 : 6),3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min;取上清液,采用 ELISA 法检测宫颈组织中 ICAM-1、IL-1 $\beta$  和 MBL 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

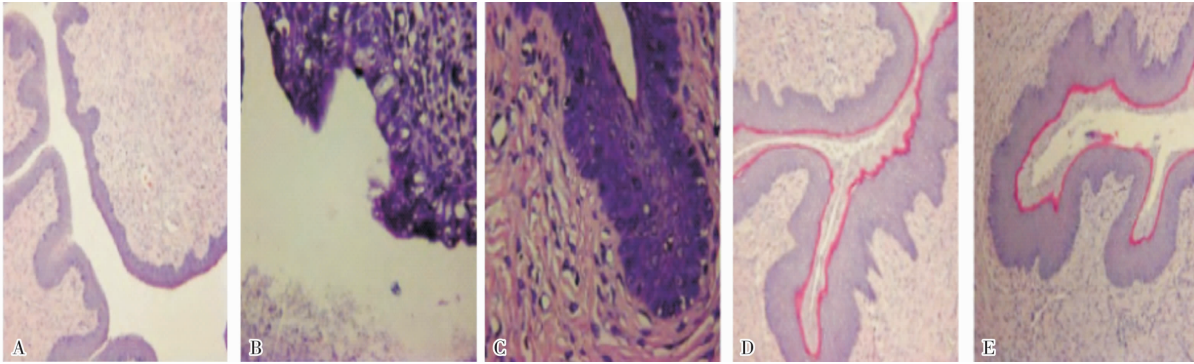
**1.3.4 Western blot 法检测大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达** 取大鼠宫颈组织,使用苯甲基磺酰氟摄取蛋白质,用二喹啉甲酸法测定总蛋白含量;蛋白样品行 100  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至聚偏氟乙烯膜上,封闭;加入 NF- $\kappa\text{B}$  p65 小鼠抗大鼠单克隆抗体(1 : 1 000)一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,除去一抗,含吐温-20 的 Tris-HCl 缓冲

液洗膜 3 次,每次 15 min;加入羊抗小鼠抗体(1 : 5 000)二抗,置于摇床上摇动,室温下孵育 1 h;弃去二抗,含吐温-20 的 Tris-HCl 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min;化学发光剂暗室曝光成像、拍照,使用 Image J 软件分析条带的吸光度值,获取 NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白的相对表达量。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 5 组大鼠宫颈组织病理变化** 结果见图 1。正常对照组大鼠宫颈组织未见明显异常改变。宫颈炎组大鼠宫颈黏膜鳞状上皮细胞变性、坏死、脱落;黏膜及黏膜下固有层充血水肿,淋巴细胞和中性粒细胞等炎细胞浸润明显,可见部分脓性渗出物及坏死组织。消糜阴道泡腾片组和高剂量槲皮素组大鼠宫颈黏膜鳞状上皮出现增生修复,且稍增厚,显示固有层增生,可见极少量炎性细胞浸润,未见炎性渗出物和坏死组织。低剂量槲皮素组大鼠宫颈部分坏死的宫颈黏膜处有肉芽组织机化、黏膜上皮细胞化生、黏膜下固有层内有少许炎性细胞浸润,可见少量炎性渗出物和坏死组织。



A:正常对照组;B:宫颈炎组;C:低剂量槲皮素组;D:高剂量槲皮素组;E:消糜泡腾片组。

图 1 5 组大鼠宫颈组织病理变化(HE 染色,  $\times 200$ )

Fig.1 Pathological changes in cervical tissues of rats in the five groups (HE staining,  $\times 200$ )

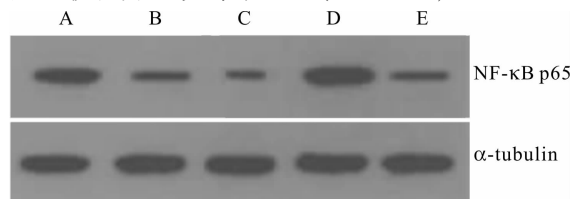
**2.2 5 组大鼠宫颈组织中 ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 水平比较** 结果见表 1。宫颈炎组大鼠宫颈组织中 ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 水平显著高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );消糜泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组大鼠 ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 水平显著低于宫颈炎组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );消糜泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组大鼠 ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 5 组大鼠宫颈组织中 ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 水平比较  
Tab.1 Comparison of the levels of ICAM-1, IL-1 $\beta$  and MBL in cervical tissues of rats among the five groups

( $\bar{x} \pm s$ )				
组别	n	ICAM-1/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	IL-1 $\beta$ /( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	MBL/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
正常对照组	10	9.96 $\pm$ 2.03	76.85 $\pm$ 5.19	9.81 $\pm$ 3.63
宫颈炎组	10	17.87 $\pm$ 3.14 <sup>a</sup>	127.88 $\pm$ 20.13 <sup>a</sup>	20.22 $\pm$ 4.78 <sup>a</sup>
消糜泡腾片组	10	11.12 $\pm$ 2.56 <sup>b</sup>	96.11 $\pm$ 10.53 <sup>b</sup>	15.63 $\pm$ 3.78 <sup>b</sup>
低剂量槲皮素组	10	11.25 $\pm$ 2.71 <sup>b</sup>	97.21 $\pm$ 12.26 <sup>b</sup>	16.87 $\pm$ 3.79 <sup>b</sup>
高剂量槲皮素组	10	10.33 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>	95.02 $\pm$ 4.26 <sup>b</sup>	15.99 $\pm$ 3.89 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与宫颈炎组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

**2.3 5 组大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量比较** 结果见图 2。正常对照组、宫颈炎组、消糜泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量分别为  $0.13 \pm 0.02$ 、 $0.68 \pm 0.03$ 、 $0.39 \pm 0.02$ 、 $0.37 \pm 0.02$ 、 $0.38 \pm 0.02$ ；宫颈炎组大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量显著高于正常对照组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；消糜泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量显著低于宫颈炎组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；低剂量槲皮素组、高剂量槲皮素组和消糜泡腾片组大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



A: 正常对照组; B: 低剂量槲皮素组; C: 高剂量槲皮素组; D: 宫颈炎组; E: 消糜泡腾片组。

**图 2 5 组大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达 (Western blot)**

**Fig. 2 Expression of NF- $\kappa$ B p65 protein in cervical tissues of rats in the five groups (Western blot)**

### 3 讨论

慢性宫颈炎发病率较高，病程较长，且反复发作，严重影响女性的身体健康和生活质量<sup>[2-3]</sup>。宫颈炎的主要临床表现为白带增多且呈现黄白色或红色，有时出现腥臭味，且可并发宫颈糜烂。宫颈炎的主要发病原因包括不洁性生活、经期不卫生、机体抵抗力低下、分娩、流产等。在宫颈炎发生、发展的病理生理机制中，炎症反应起着十分重要的作用。

多种炎症因子的释放已成为宫颈炎发展过程中的重要危险因素<sup>[4-5]</sup>。研究认为，NF- $\kappa$ B 与炎症的发生、发展密切相关<sup>[6]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种能与免疫蛋白特异结合的多效性核转录因子，属于 Rel 蛋白家族成员。当细胞受到病毒、物理创伤等刺激后，NF- $\kappa$ B 被激活进入细胞核，转录功能明显增高，从而启动和调控一系列参与炎症反应的炎症因子基因表达。有研究表明，NF- $\kappa$ B p65 可促进多种炎症介质的释放，导致组织细胞损伤<sup>[6]</sup>。炎症因子 ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 可引起机体氧化应激反应，激活蛋白水解酶，增加氧自由基生成，损伤血管内皮细胞；并能激活单核细胞、单核/巨噬细胞，通过释放肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、血小板衍化生长因子等细胞因子及分泌细胞外基质而加剧炎症反应<sup>[7-8]</sup>。因此，降低 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 等的表达已成为治疗炎症的重要手

段。本研究结果显示，宫颈炎组大鼠宫颈组织中 NF- $\kappa$ B p65、ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 MBL 表达显著升高。

近年来，我国中医药界广泛开展了中医药的抗炎作用研究，并且逐渐显示出了较大的潜力和广阔的应用前景<sup>[9]</sup>。槲皮素是一种天然的黄酮类化合物，具有多种生物活性。研究发现，槲皮素具有抗氧化、清除自由基、抑制炎症因子表达、抗病毒、抑制血小板聚集及免疫调节作用<sup>[10-12]</sup>。本研究结果显示，消糜泡腾片组、低剂量槲皮素组和高剂量槲皮素组大鼠 ICAM-1、IL-1 $\beta$ 、MBL 水平及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量显著低于宫颈炎组，提示槲皮素可抑制宫颈炎大鼠宫颈组织中炎症因子的表达，减轻炎症反应，从而发挥抗炎作用。

综上所述，槲皮素对宫颈炎大鼠有一定治疗作用，其机制可能与通过抑制 NF- $\kappa$ B p65 表达而降低炎症因子水平有关。

### 参考文献:

- [1] 孙玉兰, 顾云鹏, 王宏达, 等. 槲皮素对宫颈炎模型大鼠治疗效果的初步实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(2): 222-225.
- [2] 任国平, 王保莲, 毕春燕, 等. 消糜膏对宫颈炎患者的临床疗效及对宫颈局部 EGF、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(4): 822-824.
- [3] 谢辛, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 255-257.
- [4] BEYAZIT F, BUYUK B. An immunohistochemistry and histopathological study of ankaferd blood stopper in a rat model of cervical inflammation[J]. Rev Assoc Med Bras, 2019, 65(2): 183-190.
- [5] 朱迎萍, 吴燕平. 自拟宫颈方对宫颈炎模型大鼠宫颈组织 VEGF-A、NF- $\kappa$ B 表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(9): 752-755.
- [6] LEE I Y, IM J M, CHO H, et al. MST1 negatively regulates TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B signaling through modulating LUBAC activity[J]. Mol Cell, 2019, 73(6): 1138-1149.
- [7] 韩玉梅, 谢晶莹, 邓盈盈, 等. ICAM-1 在 NF- $\kappa$ B 通路中表达的研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2018, 39(3): 40-45.
- [8] 赵瑞萍, 陈卫东, 常保超, 等. 雷公藤多苷抑制糖尿病大鼠肾组织 MBL 及 MASP2 的表达并减轻肾损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(11): 1498-1503.
- [9] 张昕, 魏江存, 阙祖亮, 等. 中药抗炎作用研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(21): 67-69.
- [10] 李聪, 胡强, 张燕翔, 等. 槲皮素的药理学活性研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(6): 63-66.
- [11] 许银凤, 叶云, 孙琴, 等. 槲皮素对 LPS 刺激的小胶质细胞炎症因子的下调作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(3): 1173-1179.
- [12] 验研究, 王香青, 马振军, 等. 槲皮素通过抑制  $\beta$ -catenin 入核抑制人宫颈癌细胞增殖、迁移的实验研究[J]. 天津中医药, 2019, 36(2): 195-199.

(本文编辑: 徐自超 英文编辑: 徐自超)