

Study on the Active Parts of *Peristrophe japonica* (Thunb.) Bremek of Colpomycosis Treatment Effect

Judi Fan^{1*}, Zhiyao Qian², Yiguo Long³, Ronggui Qin^{1#}

¹School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou

²School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou

³Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou
Email: 310526207@qq.com, #1346812934@qq.com

Received: Jul. 3rd, 2020; accepted: Jul. 20th, 2020; published: Jul. 27th, 2020

Abstract

Objective: To study the active parts of *Peristrophe japonica* of colpomycosis treatment effect. **Methods:** The colpomycosis model was established by injecting the blastomyces albicans into the vagina of the mice and the treatment effect of each extract of *Peristrophe japonica* was observed. **Results:** The results showed three drug administration groups (including water extract of *Peristrophe japonica*, ligarine fraction and water fraction) showed marked treatment effect on the vaginitis models. The effect of water extract of *Peristrophe japonica* group was stronger than that of the ligarine fraction and water fraction groups. The pathogens seroconversion rates in blastomyces albicans were orderly as follows: 90%, 80%, 70%. **Conclusion:** The ligarine fraction and water fraction of *Peristrophe japonica* might be the active extracts of curing colpomycosis.

Keywords

Peristrophe japonica, Colpomycosis, Vaginitis, Pharmacodynamic Active Extracts

九头狮子草治疗霉菌性阴道炎有效部位的筛选研究

范菊娣^{1*}, 钱志瑶², 龙义国³, 覃容贵^{1#}

¹贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳

²贵州医科大学公共卫生学院, 贵州 贵阳

*第一作者。

#通讯作者。

³贵州医科大学附属医院病理科, 贵州 贵阳
Email: 310526207@qq.com, #1346812934@qq.com

收稿日期: 2020年7月3日; 录用日期: 2020年7月20日; 发布日期: 2020年7月27日

摘要

目的: 筛选九头狮子草治疗小鼠霉菌性阴道炎的有效部位。**方法:** 采用白色念珠菌悬液注入小鼠阴道建立小鼠霉菌性阴道炎动物模型, 观察九头狮子草不同溶剂提取的各极性部位对小鼠霉菌性阴道炎的治疗作用。**结果:** 九头狮子草水提液、石油醚提取部位和70%乙醇提取部位对病原菌转阴率和阴道黏膜炎症的治愈程度均有明显提高, 其中, 水提液组、石油醚提取部位组和70%乙醇提取部位组对白色念珠菌的转阴率分别为90%, 80%, 70%。**结论:** 九头狮子草石油醚提取部位和70%乙醇提取部位为其治疗霉菌性阴道炎的有效部位。

关键词

九头狮子草, 霉菌性阴道炎, 阴道炎, 有效部位

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

九头狮子草为爵床科植物九头狮子草[*Peristrophe japonica* (Thunb.) Bremek.]全草, 其性味辛、凉, 具有清热解毒、抗菌消炎、行气止血之功效[1][2], 常被贵州黔东南地区世居苗族妇女习用于治疗妇科泌尿感染, 是苗家人房前屋后皆有种植的家庭常备草药。主产于贵州, 已收载于2003年版《贵州省中药、民族药质量标准》, 同时, 九头狮子草药用方法在福建、浙江、川藏等地民间的草药书上也均有收载。现代研究发现, 九头狮子草以烷烃和甾醇类化合物为其主要成分, 也含少量黄酮、木脂素类等类型化合物, 具有很好的解热镇痛、镇咳祛痰、杀菌止痒、抗炎、抗肝炎病毒等作用[3]。

阴道炎是阴道黏膜及黏膜下结缔组织的炎症, 每当阴道生态环境改变和阴道免疫功能失衡, 或感染致病的病原体, 则阴道易发生多种阴道炎。临床上常见的阴道炎有霉菌性阴道炎、细菌性阴道炎、滴虫性阴道炎等, 在各年龄层次的妇女均可发生, 给妇女的身心健康和工作学习带来了严重的影响。目前西医治疗阴道炎主要应用抗生素和化学药剂, 近期疗效较好, 而长时间口服抗生素会产生毒副作用, 若通过阴道给药又常引起菌群失调导致真菌性阴道炎等, 同时应用抗生素与化学药剂还易产生耐药性, 且复发率高, 因此临床应用受到一定的限制。临床研究表明, 中药治疗阴道炎临床疗效良好, 无明显不良反应, 标本兼治, 起效迅速, 愈后无复发, 经济方便, 安全可靠。贵州省以九头狮子草为主药生产的用于治疗妇科阴道感染不适症状以及日常保洁的苗草护阴液也已上市, 九头狮子草用于治疗妇科炎症, 疗效良好, 但其药用有效部位尚未明确。课题组前期研究已明确了九头狮子草解热、抗菌、止痒和抗炎的作用[4][5], 在此基础上, 本文对其治疗霉菌性阴道炎的有效部位进行筛选研究, 以期为九头狮子草的抗菌药效物质基础研究及深度开发利用奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 动物

昆明种小鼠，清洁级，雌性，体质量 20~25 g，由贵州医科大学实验动物中心提供，合格证号：SYXK(黔) 2002-0001。本实验涉及动物试验程序和内容已通过本校医学伦理委员会审核并批准。

2.2. 药品与试剂

九头狮子草干燥药材，购自贵阳市万东药材市场，经贵州医科大学药学院中药学教研室覃容贵教授鉴定为正品，药材标本保留于贵州医科大学中药、民族药标本馆。苯甲酸雌二醇注射液(上海通用药业股份有限公司，批号 120703)；妇科千金片(株洲千金药业股份有限公司，批号 20120413)。白色念珠菌(临床分离菌株)由贵州医科大学微生物学教研室提供。营养肉汤培养基，上海康瑞生物科技有限公司，批号 120221；营养琼脂，上海盛思生化科技有限公司，批号 121118；沙氏琼脂培养基，上海科兴商贸有限公司，批号：120921；液体沙氏培养基，北京朋利驰科技有限公司，批号：121124。

2.3. 仪器与设备

旋转蒸发仪，W3-100SP；数显电热培养箱，303A-型；电热恒温箱，WSZ-134-75；不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器，YXQ-SG46-280SA；超净工作台，SW-CJ-1F；光学显微镜，CX31-32C02。

2.4. 水提液与不同极性部位的制备[6]

九头狮子草临床用药采用水煮汤药，因此制备水提液作为比较，分析各不同极性部位治疗小鼠阴道炎的作用。取干燥九头狮子草适量，剪碎，以 20 倍量蒸馏水回流提取 2 次，各 2 h，静置过滤，合并滤液，水浴浓缩至稠膏。取干燥九头狮子草适量剪碎，以 20 倍量 70%乙醇回流提取 2 次，各 2 h，静置过滤，合并滤液，减压回收乙醇至无醇味。依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取，萃取液减压浓缩得稠浸膏，回收有机溶剂，记为石油醚部位浸膏、乙酸乙酯部位浸膏和正丁醇部位浸膏，剩余溶液浓缩得乙醇浸膏。

2.5. 剂量设定与样品制备

水提液以人的临床用量换算成的小鼠用量为基础，人的临床剂量为 100 g/d，根据人与小鼠的每公斤体重折算系数计算得到小鼠剂量。不同极性部位的剂量以人的临床用量换算成的小鼠用量为基础，结合各个部位得膏率，根据人与小鼠的每公斤体重折算系数计算得到理论的小鼠用量，再参考预试验结果进行调整。为了保证达到筛选药效的目的，设定剂量在临床用量的基础上有所提高。样品制备则分别取适量各不同极性部位浸膏，置于研钵中，少量乙醇润湿，加 0.5%羧甲基纤维素钠，研磨均匀得混悬液，并配制成所需剂量，即得为石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和 70%乙醇提取部位试验样品；水提液以蒸馏水配制成所需剂量样品。以妇科千金片作阳性治疗药，同法用 0.5%羧甲基纤维素钠配成均匀混悬液。

2.6. 体外抑菌实验

分别将白色念珠菌悬液于培养基平板上均匀涂抹，盖好平皿置室温干燥 5 min 备用。分别将直径为 5.0 mm 的无菌纸片浸入已制备好的九头狮子草石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和 70%乙醇提取部位试验样品以及水提液样品中作为药敏纸片，同时设定空白对照。将含有不同提取液的药敏纸片以及空白对照纸片均匀贴在已接种好的平板上，盖好平皿，置 37℃培养 18~24 h 观察结果，测量抑菌圈。

2.7. 九头狮子草各部位对霉菌性阴道炎模型小鼠的影响

2.7.1. 霉菌性阴道炎模型制作

取健康雌性小鼠 165 只, 于颈背部皮下注射 0.05 mL 苯甲酸雌二醇注射液, 浓度为 2 mg/mL, 隔天 1 次, 连续 3 次; 于第 6 天将浓度为 1×10^7 cfu/mL 的白色念珠菌悬液 20 μ L 注入手术吸收性止血海绵中, 并塞于小鼠阴道内, 作为造模组; 另取 25 只小鼠, 同法给予苯甲酸雌二醇注射液, 于第 6 天将已注入 20 μ L 生理盐水的手术吸收性止血海绵塞于小鼠阴道内, 作为空白对照备选组[7]。接种后的第 4 天, 取阴道分泌物涂片镜检, 观察孢子及假菌丝的生长状况, 确定是否感染成功[8]。

2.7.2. 阴道分泌物镜检

从造模组中随机挑选出 140 只感染成功的小鼠, 每组 20 只, 分成 7 组, 分别标记为模型阳性对照组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、70%乙醇部位组、水提组和妇科千金片治疗对照组, 从空白对照备选组中随机挑选阴道分泌物镜检为阴性的小鼠 20 只作为空白对照组。各组小鼠分别按剂量等容积不等浓度灌胃给药 2 mL/100g, 模型阳性对照组及空白对照组灌胃给予同体积蒸馏水, 连续 10 天, 每天 1 次, 于停药后第 1、4 天用无菌棉签取阴道分泌物涂片, 革兰氏染色镜检, 2 次镜检结果均为白色念珠菌阴性者为转阴, 计算转阴率。

2.8. 阴道组织病理学分析

颈椎脱臼处死小鼠, 取小鼠阴道组织, 10%中性甲醛溶液进行固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色后进行病理组织学检查, 对小鼠阴道黏膜的病理组织改变进行划分等级, 等级划分分为 0~III 级[9]: 0 级为黏膜上皮光滑, 组织无坏死脱落, 黏膜下无出血、充血、水肿、炎细胞浸润现象, 且阴道内无炎性渗出物; I 级为黏膜上皮无坏死脱落; 黏膜下有水肿、充血现象, 阴道内无炎性渗出物; II 级为黏膜上皮组织有灶性坏死脱落, 黏膜下出现点状出血、水肿、充血, 有少量炎细胞浸润, 阴道内有少量炎性渗出物; III 级为黏膜上皮出现坏死脱落, 黏膜下表现为片状出血、水肿、充血、炎细胞浸润, 且阴道内有大量炎性渗出物。

2.9. 统计学分析

所有数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 采用多组独立样本比较的秩和检验进行计算[10]。

3. 结果

3.1. 体外抑菌的测定

分别对九头狮子草各提取部位样品的平板培养抑菌实验进行抑菌圈的测量, 结果显示, 在九头狮子草提取液对白色念珠菌的抑制实验中, 以水提液和石油醚部位的抑菌圈较大, 平均值分别为 18.00 mm、15.25 mm, 抑菌圈的大小依次为: 水提液(18.00 mm) > 石油醚部位(15.25 mm) > 70%乙醇部位组(14.00 mm) > 正丁醇部位组(9.50 mm) \geq 乙酸乙酯部位组(9.25 mm)。

3.2. 九头狮子草各部位对霉菌性阴道炎模型小鼠的影响

造模组小鼠接种 4 天后, 观察发现, 其阴道的白色分泌物、黄色分泌物增加, 将分泌物涂片镜检, 发现白色念珠菌其孢子与假菌丝生长密集, 即判断小鼠霉菌性阴道炎模型造模成功。通过对九头狮子草进行各活性部位的提取, 并作用于各造模成功的小鼠阴道内, 从实验结果可知, 九头狮子草各部位提取液所作用的患阴道炎小鼠, 其大部分小鼠阴道转为洁净, 少数有少量白色、黄色分泌物, 不同部位提取

液所呈现出的治疗效果有一定的差异。经统计, (表 1), 九头狮子草的水提液、70%乙醇以及石油醚、乙酸乙酯、正丁醇部位提取液对小鼠霉菌性阴道炎有不同程度的治疗作用, 但抑菌效果具有明显差异, 其中水提组、70%乙醇部位以及石油醚部位提取液组对小鼠霉菌性阴道炎具有明显的抑菌作用, 有统计学意义($P < 0.05$), 霉菌性阴道炎的转阴率结果显示, 其中水提组治疗作用最好, 其次依次为石油醚部位组、70%乙醇部位组。由于模型阳性对照组小鼠阴道未经九头狮子草各部位提取液治疗, 小鼠阴道大部分表现出白色念珠菌阳性, 各给药部位组与模型阳性对照组相比, 霉菌性阴道炎模型小鼠的转阴率均有所提高(见表 1)。

Table 1. Effects of extracts from *Peristrophe* on colpomycosis model mice

表 1. 九头狮子草各部位提取物对霉菌性阴道炎模型小鼠的影响

组别	剂量(g/kg)	阴性动物数(只)	阳性动物数(只)	转阴率(%)
空白对照组	-	20*	0	-
模型阳性对照组	-	2	18	10
石油醚部位组	0.8	16*	4	80
乙酸乙酯部位组	0.8	4	16	20
正丁醇部位组	0.8	6	14	30
70%乙醇部位组	2.8	14*	6	70
水提组	15	18*	2	90
妇科千金片治疗对照组	1.8	18*	2	90

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, 以下同。

接种模型建立后, 病理切片分析, 各模型小鼠阴道均有不同程度的组织病变, 表现为粘膜坏死脱落、充血、水肿、出血, 阴道腔内有炎性渗出物及不同量的假菌丝。各给药组则有不同程度的治愈效果, 水提组、石油醚部位组以及 70%乙醇部位组的治疗情况较好, 其中, 水提组有 14 例造模小鼠为 0 级, 6 例为 I 级; 石油醚部位组有 14 例造模小鼠为 0 级, 4 例 I 级, 2 例 II 级; 70%乙醇部位组有 10 例为 0 级, 6 例 I 级, 4 例 II 级。乙酸乙酯部位组和正丁醇部位组病变情况有所改善, 但效果不如以上 3 组明显(见表 2)。

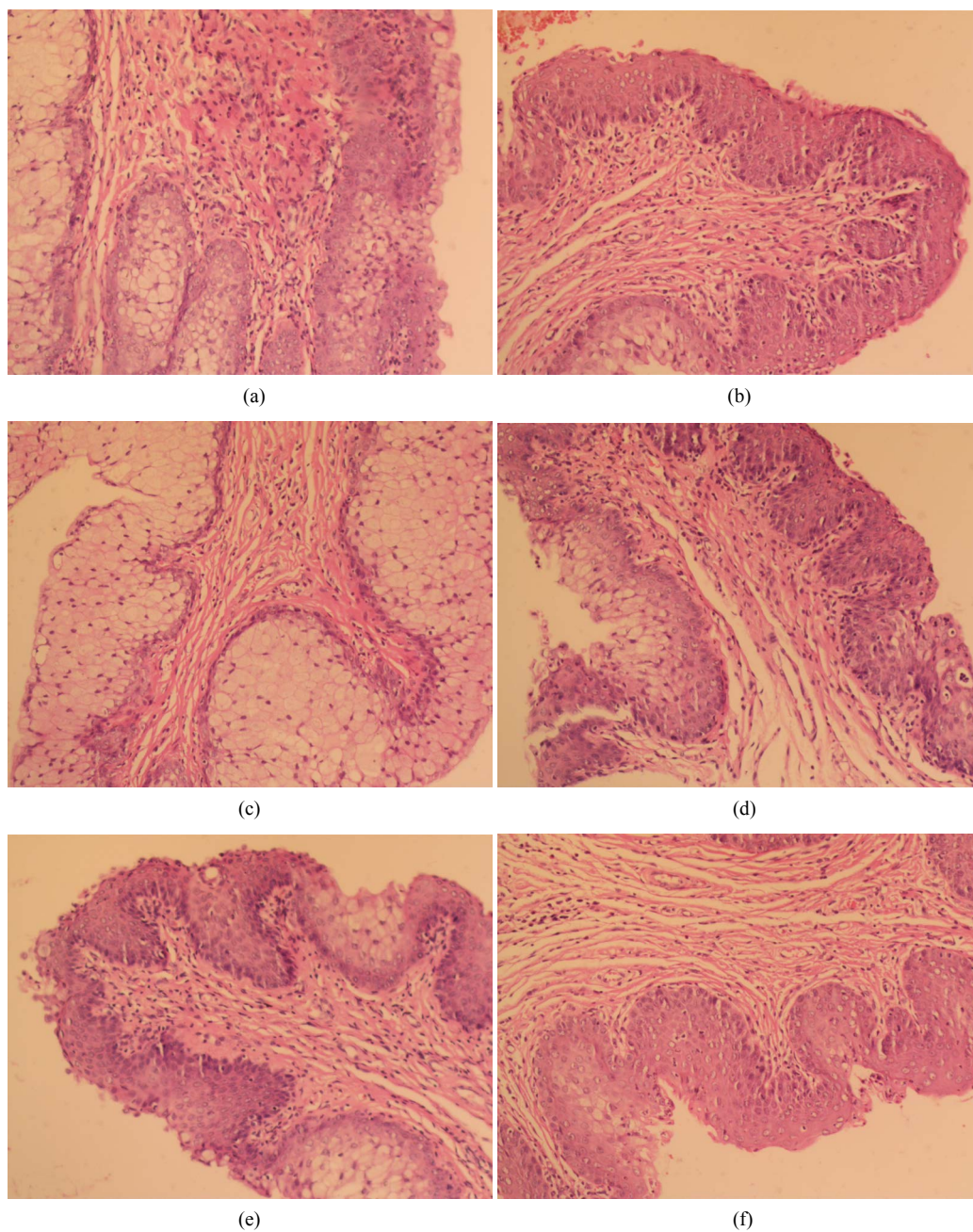
Table 2. Effects of *Peristrophe* on vaginal pathology in mice with colpomycosis

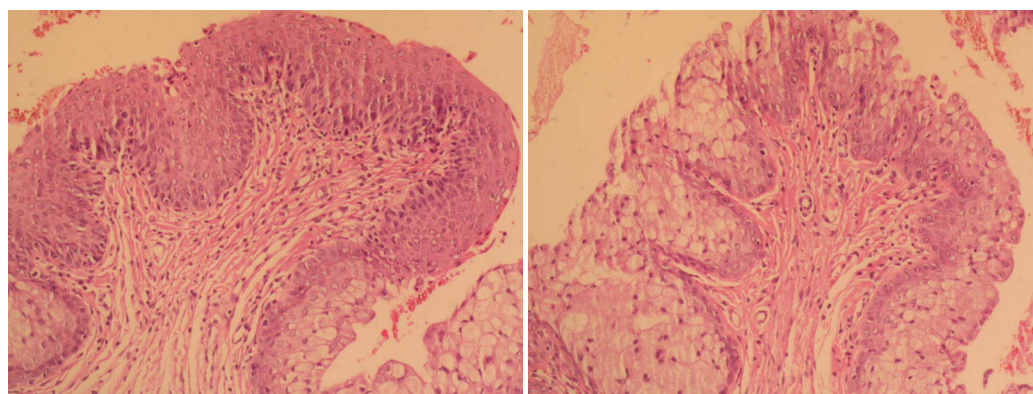
表 2. 九头狮子草各部位对霉菌性阴道炎模型小鼠阴道病理组织影响

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)			
		0 级	I 级	II 级	III 级
空白对照组	-	20	0	0	0
模型阳性对照组	-	2	4	8	6
石油醚部位组	0.8	14	4	2	0
乙酸乙酯部位组	0.8	2	8	6	4
正丁醇部位组	0.8	4	10	4	2
70%乙醇部位组	2.8	10	6	4	0
水提组	15	14	6	0	0
妇科千金片治疗对照组	1.8	14	4	2	0

3.3. 对小鼠阴道黏膜炎症的病理学形态影响

镜下正常小鼠阴道壁组织结构清楚, 粘膜被覆鳞状上皮完整, 未见糜烂及性粒细胞浸润, 粘膜下层血管轻度扩张充血, 伴个别炎细胞浸润; 模型对照组阴道壁组织结构清楚, 粘膜被覆鳞状上皮重度糜烂, 伴较多中性粒细胞浸润, 粘膜下层血管中度扩张充血, 伴较多炎细胞浸润。其他有效部位组阴道病变有所减轻, 与妇科千金片治疗组比较, 乙酸乙酯组、正丁醇组粘膜被覆鳞状上皮中度糜烂, 伴少量中性粒细胞浸润, 粘膜下层血管中度扩张充血, 伴少量炎细胞浸润。水提组、石油醚组和 70%乙醇部位组粘膜被覆鳞状上皮轻度糜烂, 伴少量中性粒细胞浸润, 粘膜下层血管轻度扩张充血, 伴少量炎细胞浸润效果相当。见图 1。





(g) (h)
 (a) 模型对照组; (b) 阳性对照组; (c) 空白对照组; (d) 乙酸乙酯组; (e) 正丁醇组; (f) 70%乙醇组; (g) 水提组; (h) 石油醚组

Figure 1. Effects of extracts from *Peristrophe* on vaginal tissue pathology in mice with colpomycosis vaginitis (HE $\times 100$)

图 1. 九头狮子草各组组分对小鼠霉菌性阴道炎其组织病理学的影响(HE $\times 100$)

4. 讨论

在贵州省民间,九头狮子草用于治疗妇科炎症,疗效良好,本研究结果也表明,九头狮子草水提液、石油醚部位及 70%乙醇部位提取液对霉菌性阴道炎及细菌性阴道炎均有较好的治疗作用,但石油醚部位及 70%乙醇部位提取液作用弱于水提液,正丁醇部位及乙酸乙酯部位作用不明显,因此判断九头狮子草治疗霉菌性阴道炎的有效部位主要为石油醚部位及 70%乙醇提取部位,石油醚部位作用强于 70%乙醇提取部位。

霉菌性阴道炎属于“阴痒”、“带下”等中医范畴,认为此病主要与湿、热、虫三邪有关[11],说明消除炎症、抑制病菌是治疗阴道炎的关键。九头狮子草在《闽南民间草药》记载有“解毒,消肿,疗疔疮,散热”等作用,张丽娟等通过对九头狮子草不同组分抗菌活性研究发现丙酮洗脱部位抗菌活性最强,GC-MS 分析表明该组分中主要含有脂肪酸及其衍生物,推断其可能为九头狮子草的主要抗菌成分[12],由此推断其结果与我们石油醚部位成分相吻合。课题组前期研究结果表明,九头狮子草对金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌有不同程度的抑制作用[13],可降低右旋糖酐所致小鼠的瘙痒次数及瘙痒持续总时间,并提高磷酸组胺所致豚鼠的致痒阈,具有显著的止痒作用[14];也能降低二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀度和新鲜鸡蛋清所致的小鼠足跖肿胀度,提高肿胀抑制率,还能显著降低炎性足 PGE2 含量,提高 PGE2 抑制率,具有显著的抗炎作用[5],说明九头狮子草既有抑菌、抗炎、止痒的作用,同时能提高阴道炎动物模型病原菌转阴率和阴道黏膜炎症的治愈程度。在后期研究中,有必要研究九头狮子草抗菌活性部位,找出其药效成分或药效团,进行结构优化,以期得到更为有效的抗霉菌性阴道炎治疗药物。

基金项目

贵州省科技厅社会发展攻关项目(黔科合 LG 字[2011] 030);贵州医科大学 2019 年校级教学内容和课程体系改革项目(JG201971)。

参考文献

[1] 国家中医药管理局.《中华本草》编委会,中华本草(第七卷)[M].上海:上海科学技术出版社,1999:7467-7469.

-
- [2] 中科院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第四册) [M]. 北京: 科学出版社, 1975: 172.
- [3] 何平, 陈琳, 赵超, 等. 九头狮子草研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 34(1): 239-241.
- [4] 覃容贵, 范菊娣, 龙庆德, 等. 民族药九头狮子草解热有效部位的筛选[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(22): 1797-1800.
- [5] 罗忠圣, 周镁, 黄秀平, 等. 九头狮子草对小鼠的抑菌、止痒、抗炎作用[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3): 555-557.
- [6] 李文媛. 蒙药玉簪花的化学成分及生物活性初步研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中科技大学, 2009: 1-58.
- [7] 张国庆, 冯文茹, 米雪. 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[J]. 中国实验方剂学, 2012, 19(18): 191-194.
- [8] Kongkathip, N., Samang, P., Kongkathip, B., *et al.* (2009) Development of Patchouli Extraction with Quality Control and Isolation of Active Compounds with Antibacterial Activity. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, **43**, 519.
- [9] 张传香, 李红玉, 李淑华. 酯型儿茶素载体栓对大兔细菌性阴道炎作用[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(5): 621-622.
- [10] 胡耶芳, 易春霞. 六味地黄汤配合中药熏洗治疗细菌性阴道炎的疗效[J]. 中国医药科学, 2017, 7(12): 15-18.
- [11] 程渝. 龙胆草水提物对细菌性、霉菌性阴道炎模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2012, 23(31): 2895-2896.
- [12] 张丽娟, 王正, 廖尚高. 九头狮子草抗菌有效组分分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(11): 38-40, 46.
- [13] 覃容贵, 李淑芳. 九头狮子草的抗菌作用研究[J]. 贵阳医学院院报, 2006, 25(2): 130-131.
- [14] 覃容贵, 罗忠圣. 九头狮子草醇提物药效学的实验研究[J]. 中药材, 2006, 29(9): 961-963.