

- drug candidates on CYP2E1 *in vitro* [J]. J Ocean Univ Qingdao(中国海洋大学学报), 2005, 35(3): 478-482.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社. 2002.
- [9] ZHU M, WANG R, ZHANG Y Q, et al. Study on hepatic cytochromes P450 methodology in wistar rats [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2004, 9(5): 500-503.
- [10] WANG D C, GAO X S, JI Y X, et al. Effect of puerarin on the hepatic microsomal cytochrome P450 in mice and rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2004, 20(10): 1194-1195.
- [11] SUN M. Effects of three anti-tumor triterpenoids isolated from herbals on cytochrome P450 enzyme activity [M]. Shanghai: East China Normal University, 2014.
- [12] KRAJINOVIC M, SINNETT H, RICHER C, et al. Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. International Journal of Cancer, 2002, 97(2): 230-236.
- [13] WHITLOCK J P. Induction of cytochrome P4501A1 [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999(39): 103-125.
- [14] PELKONEN O, TURPEINEN M, HAKKOLA J, et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status [J]. Arch Toxicol 2008, 82(10): 667-715.
- [15] OBACH R S, WALSKY R L, VENKATKRISHNAN K. Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions [J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(2): 246-255.
- 收稿日期: 2016-02-29

采用优化家兔阴道刺激模型评价乙酸阴道热敏凝胶剂的阴道免疫炎症毒性研究

陆珍¹, 田芳¹, 王玉柱¹, 夏敏杰¹, 孙冰^{1,2}, 黄超¹, 丁训诚¹, 李卫华¹, 陈华^{3*} (1.上海市计划生育科学研究所, 国家计划生育药具重点实验室, 上海 200032; 2.复旦大学公共卫生学院, 上海 200032; 3.复旦大学附属妇产科医院, 上海 200011)

摘要: 目的 采用优化家兔阴道刺激模型评价乙酸阴道热敏凝胶剂(acetic acid vaginal thermosensitive *in situ* gel, Acid-TISG)对家兔阴道黏膜的免疫炎症毒性。方法 将 24 只♀家兔随机分为空白凝胶组、Acid-TISG 组(12.11 mg·mL⁻¹)、壬苯醇醚(nonoxynol-9, N-9)凝胶组(5.6 mg·mL⁻¹)。阴道给予 3 mL 凝胶, 每天 1 次, 连续 10 d, 给药前和给药后 24 h 收集家兔阴道灌洗液(cervicovaginal lavages, CVLs), 检测 CVL 中白介素 6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α, TNF-α)的含量。家兔处死后取阴道组织做病理学检查, HE 染色观察家兔阴道黏膜组织损伤并进行评分。运用免疫组化技术检测阴道黏膜内白细胞共同抗原-CD45RB 和核增殖抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达。结果 与空白凝胶组相比, Acid-TISG 组黏膜上皮完整, 无明显炎症浸润、充血和水肿, N-9 凝胶组黏膜上皮出现脱落, 固有层炎症细胞明显增多($P<0.05$); 空白凝胶组和 Acid-TISG 组阴道黏膜无明显 CD45RB 阳性表达, N-9 凝胶组阴道黏膜固有层出现较多的 CD45RB 阳性表达细胞。与空白凝胶组相比, Acid-TISG 组的阴道黏膜 PCNA 表达增多, 但无显著性差异, N-9 凝胶组的阴道黏膜 PCNA 阳性表达细胞明显增多($P<0.05$)。与给药前相比, 给药后 24 h 时 CVL 中 IL-6 和 TNF-α 含量在空白凝胶组和 Acid-TISG 组无明显改变, N-9 凝胶组明显升高($P<0.05$)。结论 Acid-TISG 对家兔阴道黏膜无明显免疫炎症毒性, 优化的家兔阴道刺激模型可用来评价生殖道外用药物对阴道黏膜的免疫炎症毒性。

关键词: 乙酸; 热敏凝胶; 阴道黏膜; 免疫炎症毒性; CD45RB; PCNA

中图分类号: R965 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)11-1372-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.005

Study on Using the Optimized Vaginal Irritation Model of the Rabbit to Evaluate the Vaginal Mucosal Immuno-inflammatory Toxicity of the Acetic Acid Vaginal Thermosensitive *In Situ* Gel

LU Zhen¹, TIAN Fang¹, WANG Yuzhu¹, XIA Minjie¹, SUN Bing^{1,2}, HUANG Chao¹, DING Xuncheng¹, LI Weihua¹, CHEN Hua^{3*} (1.State Key Labs of Family Planning Devices, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032 China; 2.School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3.Obstetrics and Gynecology

基金项目: 上海市科委项目(13431900801, 1514091200); 上海市环境卫生和劳动卫生学重点学科建设项目(15GWZK0201); 国家科技部中青年科技创新领军人才项目(万人计划)

作者简介: 陆珍, 女, 实验师 Tel: (021)64037013 E-mail: luzhen3451@163.com *通信作者: 陈华, 女, 副主任医师 Tel: 13918350466 E-mail: huachen7@yahoo.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the immuno-inflammatory toxicity of vaginal mucosa of acetic acid vaginal thermosensitive *in situ* gel(Acid-TISG) by using the optimized vaginal irritation model in the rabbits. **METHODS** Twenty-four rabbits were divided randomly into the blank gel group, Acid-TISG group ($12.11 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and positive nonoxynol-9 (N-9) group ($5.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Gel was administered through vagina to rabbits at 3 mL per day for 10 d. Cervicovaginal lavages (CVLs) were collected at pre-administration and 24 h after the last administration. The concentrations of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the CVLs were detected. The pathological examination of the vaginal tissues was conducted, and the vaginal irritation was assessed and scored. The expression of leukocyte common antigen-CD45RB and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the vaginal mucosa was detected by the immuno-histochemistry (IHC) assay. **RESULTS** The vaginal mucosal epithelium in the rabbits of the Acid-TISG group was intact with no obvious inflammation infiltration, congestion and edema; while the exfoliation of mucosal epithelium cells and the increase of the inflammatory cells were obviously observed in N-9 gel group($P<0.05$). There was no obvious positive expression of CD45RB cells both in the blank gel group and the Acid-TISG group, but the positive expression of CD45RB cells increased significantly in the N-9 gel group($P<0.05$). The concentrations of IL-6 and TNF- α in CVLs, were significantly increased in the N-9 gel group($P<0.05$) 24 h after administration while there were no significantly increase in both blank gel group and the Acid-TISG group compared with predose. **CONCLUSION** Acid-TISG is unlikely to cause vaginal mucosal irritation in the rabbits. The optimized rabbit vaginal irritation model can be used to evaluate the topical toxicity of the candidate vaginal drugs. **KEYWORDS:** acetic acid; thermosensitive *in situ* gel; vaginal mucosa; immuno-inflammatory toxicity; CD45RB; PCNA

早在 20 世纪 60 年代, Eckstein 等就建立家兔阴道刺激性(rabbit vaginal irritation, RVI)模型的实验方法和阴道组织学评价标准^[1], 该模型优点为家兔的阴道黏膜上皮为单层柱状上皮细胞结构, 对外界刺激具有较高的敏感性。但 RVI 模型主要评价的是家兔阴道组织解剖学和病理方面的变化, 无法预测阴道免疫炎症毒性, 因此, Doncel 等^[2]在原来评价指标的基础上, 增加了更为敏感分子水平的检测指标, 包括黏膜中可溶性炎症分子和细胞标志物等指标, 这样不仅能够反映出黏膜的炎症情况, 而且能反映出炎症细胞的活化状况。

本研究采用优化的 RVI 模型, 以壬苯醇醚(nonoxynol-9, N-9)凝胶剂为阳性对照药物, 在经典家兔阴道刺激模型的病理评价的基础上, 增加了检测家兔阴道灌洗液(cervicovaginal lavages, CVLs)中细胞因子白介素 6(Interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)指标和阴道组织黏膜中白细胞共同抗原-CD45RB 和核增殖抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)蛋白的表达, 以评价乙酸阴道热敏凝胶剂(acetic acid vaginal thermosensitive *in situ* gel, Acid-TISG)对家兔阴道组织的免疫炎症毒性。本研究将为进一步改进阴道外用药物家兔阴道刺激性的临床前安全性评价方法提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器和动物

泊洛沙姆 407(Poloxamer 407, P407, 德国 BASF 公司, 批号: VPAJ5088); 羟丙甲基纤维素

(Hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC, 美国 DOW 公司, 批号: D180EA6001); 苯甲酸雌二醇注射液(上海通用药业股份有限公司, 批号: 110518); 壬苯醇醚(N-9)凝胶剂(商品名“乐乐迷”, 中国药科大学制药有限公司, 批号: 110305); 曲拉通 X-100(Triton X-100, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: T20110401); Harris 苏木素染色液(上海艾研生物科技科技有限公司, 批号: 517-282); 伊红(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20140818); 30%过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯, 批号: 20101019); 柠檬酸盐抗原修复液(pH 6.0, 福州迈新生物技术开发有限公司, 批号: MVS0066); 磷酸盐缓冲液(pH 7.4~7.6, 瑞楚生物公司, 批号: 201508253); 兔白介素 6(IL-6)酶联免疫检测试剂盒和兔肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司); 鼠抗人 CD45RB 抗体(英国 abd serotec 公司, 批号: 0414); PCNA 抗体(武汉博士德生物有限公司, 批号: BM0104); 生物素-链霉卵白素免疫组化试剂盒(SP-9002, 中杉金桥试剂公司, 批号: 13780A03); 浓缩型 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)试剂盒(中杉金桥试剂公司, 批号: 14138A11); 中性树胶(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20111215); 其余试剂均为分析纯。

全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); OLYMPUS BX43 型生物显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

普通级日本大耳兔, ♀, 体质量(2.5 ± 0.2)kg, 购自上海市松联实验动物场, 动物许可证号:

SCXK(沪)2012-0011。上海市计划生育科学研究所毒理评价检测中心清洁级饲养室, 室温 22~24℃, 换气量每小时 12 次, 自动控制明暗周期, 自由摄食饮水。

1.2 Acid TISG 的制备^[4]

将处方量的 HPMC 和甘油加入到 12.11 mg·mL⁻¹ 乙酸缓冲液(pH 3.6)中, 搅拌溶解, 然后加入处方量 P407, 搅拌使其分散均匀, 置于 4℃ 下至聚合物完全溶解, 得到无色澄明的凝胶溶液。

1.3 家兔阴道刺激模型制备及分组

24 只兔购入后适应环境 7 d, 随机分为 3 组, 分别为空白凝胶组(无药热敏凝胶); Acid TISG 组(12.11 mg·mL⁻¹, 体外杀精 ED₅₀ 的 70 倍); N-9 凝胶组(5.6 mg·mL⁻¹, 体外杀精 ED₅₀ 的 70 倍)。

每只家兔在给药前 24 h 皮下注射醋酸甲羟孕酮 0.1 mg, 调整家兔发情周期。给药时, 把家兔置入固定器内, 处于头低臀高的倒斜立位, 阴道给药, 每天 1 次, 每次 3 mL, 连续 10 d。

1.4 阴道取材、HE 染色观察组织病变和评分

末次给药后 24 h 处死家兔, 剖开阴道组织肉眼观察后, 分离出阴道组织, 中性福尔马林固定, 固定后的阴道组织分为上中下 3 段, 每一段在肉眼观察病变最严重处取材, 包埋, 切片, 进行 HE 染色, 光学显微镜下观察。参考世界卫生组织认可的 Eckstein 试验方法和评价标准^[1,3], 根据阴道黏膜组织发生的黏膜水肿, 血管充血, 白细胞浸润, 上皮溃疡 4 种病变的不同程度进行评分, 每项以 0~4 分记录, 最高为 16 分, 若总分值在 0~8 分之间, 表明该药的黏膜刺激性是临床可接受的, 9~10 分为边界范围, >11 分为不可接受范围。

1.5 免疫组化检测阴道组织上皮细胞 CD45RB 和 PCNA 的表达

烘箱内取出石蜡切片, 脱蜡、脱水, 0.3% Triton X-100 增加细胞膜的通透性, 0.3% 过氧化氢甲醇封闭内源性过氧化氢酶, 柠檬酸缓冲液水浴煮沸 30 min 抗原修复, 正常羊血清封闭液孵育 10 min, 滴加对兔特异性的适当稀释的一抗抗体, 生物素标记羊抗兔 IgG 工作液孵育 30 min, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液孵育 60 min, DAB 显色, 苏木素轻度复染, 脱水、透明、封片, 光学显微镜下观察并采集图片, 采用 Image-Proplus 6.0 病理图像分析软件对所选视野内的免

疫组化阳性细胞进行半定量分析, 并记录数据。

1.6 IL-6 和 TNF-α 含量测定

家兔末次给药后 24 h 用 5 mL 无菌生理盐水对各组家兔进行阴道灌洗, 用精液收集杯收集 CVL, 置于 10 mL 离心管中, 500×g 4℃ 下离心 5 min, 取上清液, 按照检测试剂盒说明书, 检测 IL-6 和 TNF-α 含量。

1.7 统计分析方法

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用 SPSS 20.0 (PASW) 进行统计分析。采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 家兔阴道黏膜 HE 染色结果

3 个给药组的家兔阴道黏膜的病理改变见图 1。根据阴道黏膜组织发生的黏膜水肿, 血管充血, 白细胞浸润, 上皮溃疡 4 种病变的不同程度, 每项以 0~4 分记录, 进行评分。

空白凝胶组家兔阴道黏膜上皮结构完整, 黏膜固有层无明显水肿、充血和炎症浸润, Acid TISG 组和空白凝胶组相比, 阴道黏膜上皮结构和黏膜固有层均无明显变化, N-9 凝胶组阴道黏膜上皮损伤明显, 出现局部黏膜上皮脱落, 黏膜固有层出现白细胞增多, 伴随血管充血和出现, 水肿不明显, 结果见图 1。空白凝胶组的阴道黏膜刺激性评分为 2.60 ± 1.34 , 与 Acid TISG 组(2.80 ± 0.84)无统计学差异, N-9 凝胶组评分(6.80 ± 1.48)明显高于空白凝胶组和 Acid TISG 组($P<0.05$), 结果见表 1。

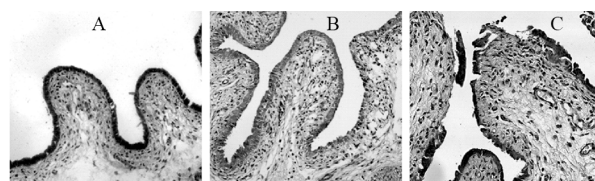


图 1 家兔阴道黏膜的组织病理学变化($n=8$, HE, 20×)

A-空白凝胶组; B-Acid TISG 组; C-N-9 凝胶组。

Fig. 1 Histopathologic changes of vaginal mucosa of rabbits ($n=8$, HE, 20×)

A-blank gel group; B-Acid-TISG group; C-N-9 gel group.

2.2 阴道黏膜 CD45RB 表达

空白凝胶组和 Acid TISG 组的家兔阴道黏膜均未见明显 CD45RB 表达, N-9 凝胶组的家兔阴道黏膜出现较多的 CD45RB 阳性表达细胞, 主要分布在黏膜固有层, 染色深, 散在分布, 每个视野内有 6~25 个阳性细胞, 结果见图 2, 表 2。

表 1 家兔阴道黏膜评分结果 (n=8)

Tab. 1 Results of vaginal mucosa irritation scores (n=8)

分 组	阴道黏膜病变分值				总分
	上皮	白细胞浸润	血管充血	水肿	
空白凝胶组	0.80±0.84	0.80±0.45	0.60±0.55	0.40±0.55	2.60±1.34 ²⁾
Acid TISG 组	0.80±0.84	0.60±0.89	1.00±0.71	0.40±0.55	2.80±0.84 ²⁾
N-9 凝胶组	3.00±0.71	2.00±0.71	1.20±0.84	0.60±0.89	6.80±1.48 ¹⁾

注：与空白凝胶组相比，¹⁾P<0.05；与 N-9 凝胶组相比，²⁾P<0.05。

Note: Compared with blank gel group, ¹⁾P<0.05; compared with N-9 gel group, ²⁾P<0.05.

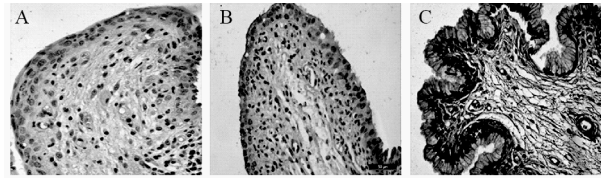


图 2 家兔阴道黏膜 CD45RB 的表达 (n=8, 40×)

A-空白凝胶组; B-Acid TISG 组; C-N-9 凝胶组。

Fig. 2 The expression of CD45RB on the vaginal mucosa of rabbits (n=8, 40×)

A-blank gel group; B-Acid-TISG group; C-N-9 gel group.

表 2 家兔阴道黏膜 CD45RB 表达的半定量分析 (n=8)

Tab. 2 The semi-quantitative analysis of CD45RB on the vaginal mucosa of rabbits (n=8)

分 组	CD45RB 表达强度
空白凝胶组	-
Acid TISG 组	-
N-9 凝胶组	++

注：-：视野内无阳性细胞；+：视野内有 1~5 个阳性细胞；++：视野内有 6~25 个阳性细胞；+++：视野内有 26~50 个阳性细胞；++++：视野内有 >50 个阳性细胞。

Note: -: no positive cells; +: 1-5 positive cells; ++: 6-25 positive cells; +++: 26-50 positive cells; ++++: >50 positive cells.

2.3 阴道黏膜 PCNA 蛋白的表达

家兔阴道黏膜 PCNA 染色结果显示，空白凝胶组仅黏膜上皮出现少量 PCNA 表达，Acid TISG 组黏膜上皮 PCNA 蛋白表达的阳性细胞增多，黏膜固有层出现少量 PCNA 蛋白表达阳性细胞，N-9 凝胶组的黏膜上皮和黏膜固有层 PCNA 表达阳性细胞大量增多，细胞核棕褐色深染，结果见图 3。PCNA 蛋白表达的面积和累积光密度统计学分析显示，与空白凝胶组相比，Acid TISG 组没有统计学差异，阳性对照组的表达均明显升高(P<0.05)，结果见表 3。

2.4 CVL 中炎症因子测定

与给药前相比，末次给药后 24 h，空白凝胶组家兔 CVL 中炎症因子 IL-6 和 TNF-α 含量无明显变化；Acid TISG 组的家兔 CVL 中 IL-6 亦无明显

变化，TNF-α 水平明显升高(P<0.01)；N-9 凝胶组家兔 CVL 中炎症因子 IL-6 和 TNF-α 含量均明显升高(P<0.01)，结果见图 4~5。

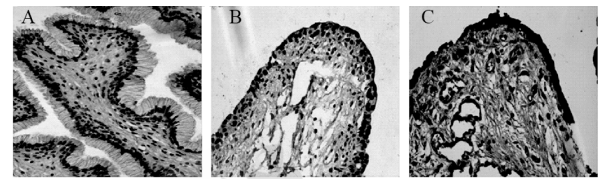


图 3 家兔阴道黏膜 PCNA 的表达 (n=8, 40×)

A-空白凝胶组; B-Acid TISG 组; C-N-9 凝胶组。

Fig. 3 The expression of PCNA on the vaginal mucosa of rabbits (n=8, 40×)

A-blank gel group; B-Acid-TISG group; C-N-9 gel group.

表 3 家兔阴道黏膜 PCNA 蛋白表达的半定量分析 (n=8)

Tab. 3 The semi-quantitative analysis of PCNA on the vaginal mucosa of rabbits (n=8)

分 组	面积/像素	累积光密度
空白凝胶组	84 120.2±41 910.65	41 393.84±19 157.54
Acid TISG 组	107 819.2±29 999.29	58 789.97±18 549.96
N-9 凝胶组	341 694.4±91 553.73 ¹⁾	341 490.7±105 631.2 ¹⁾

注：与空白凝胶组相比，¹⁾P<0.05。

Note: Compared with blank gel group, ¹⁾P<0.05.

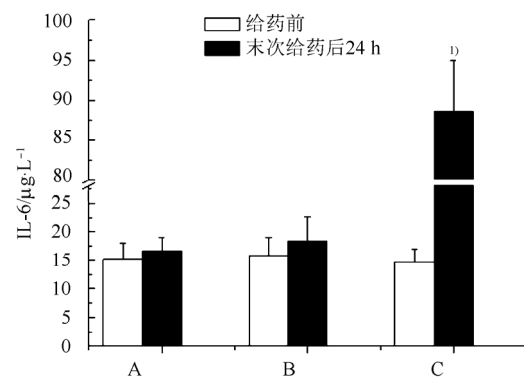


图 4 家兔阴道灌流液中 IL-6 的表达 (n=8)

A-空白凝胶组; B-Acid TISG 组; C-N-9 凝胶组; 与给药前相比，¹⁾P<0.05。

Fig. 4 The expression of IL-6 in CVLs of rabbits

A-blank gel group; B-Acid-TISG group; C-N-9 gel group; compared with before administration, ¹⁾P<0.05.

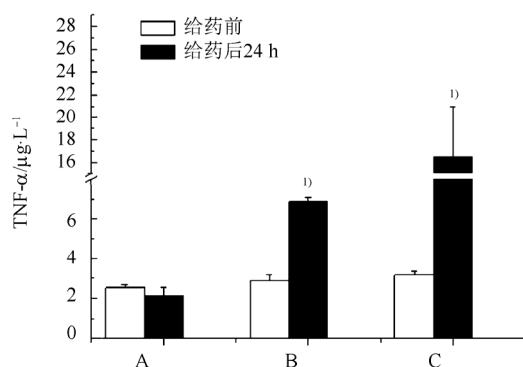


图5 家兔阴道灌流液中 TNF- α 的表达($n=8$)

A-空白凝胶组; B-Acid TISG 组; C-N-9 凝胶组; 与给药前相比, ^{b)} $P<0.05$ 。

Fig. 5 The expression of TNF- α in CVLs of rabbits($n=8$)

A-blank gel group; B-Acid-TISG group; C-N-9 gel group; compared with before administration, ^{b)} $P<0.05$.

3 讨论

美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)推荐的 RVI 模型是生殖道外用药物包括外用避孕药和阴道杀微生物剂等药品在临床前阴道刺激性评价的经典模型^[5]。RVI 模型根据组织病理学评分, 刺激严重程度分为轻微、温和、中等、严重 4 个等级, 本实验中 3 组阴道病理评分分别为空白凝胶组(2.60 ± 1.34)、Acid TISG 组(2.80 ± 0.84)、N-9 凝胶组(6.80 ± 1.48), 均在临床可接受的范围。但 2002 年临床 III 期试验^[6]和后来的 Meta 分析^[7]均显示, 使用 N-9 凝胶后 HIV 的感染率明显上升, 推测其原因为临床前毒性评价采用的经典 RVI 模型不能反映出阴道黏膜上皮炎症因子的变化和免疫细胞的活化状态, 所以不能提供是否会增加 HIV/STDs 感染风险的信息。目前, 生殖道外用药物临床前研究评价的技术关键在于^[8-9]: 保证最大药效和最小黏膜炎症免疫反应之间寻找平衡点。该类阴道外用药物应不仅不损伤阴道黏膜上皮屏障完整性, 还要特别注意所诱发的免疫炎症反应要在可接受的安全范围内。

国外一些专家在经典 RVI 模型的病理学指标基础上, 增加了 CVL 中细胞炎症因子(IL-1 β , IL-6, IL-8 和 TNF- α)和免疫调节因子(IL-10 和 GM-CSF)等作为标志物, 以及 CD45 和 PCNA 在阴道黏膜上皮的表达检测等^[2,10-12], 评价阴道外用药物对阴道黏膜的刺激性和免疫反应。TNF- α 是内皮活化因子, 可促进中性粒细胞、嗜酸性粒细

胞等与内皮细胞的黏附, 促进其向炎症部位的迁移, IL-6 是典型的炎症因子, 其过度或不适当的表达是早期炎症反应的敏感指标, 也有研究显示 IL-6 和 TNF- α 的检测结果在不同实验室检测结果具有良好的一致性^[13-14]。

本研究结果显示, 与给药前相比, 空白凝胶组和 Acid TISG 组的家兔 CVL 中 IL-6 和 TNF- α 含量变化不明显, 而 N-9 凝胶组家兔阴道 CVL 中炎症因子 IL-6 及 TNF- α 含量明显升高($P<0.01$), 提示 N-9 凝胶诱导了家兔阴道黏膜组织炎症的发生。国外研究也显示 N-9 能引起阴道黏膜上皮的损伤和组织炎症反应, 激活 IL-1 的分泌和 NF-KB 的转录, 从而导致细胞因子(IL-1, IL-6 和 TNF- α)和趋化因子(IL-8, IL-10 和吞噬细胞炎症蛋白)等的释放, 家兔 CVL 中的 IL-6 和 TNF- α 的含量升高, 与阴道黏膜免疫炎症反应和 HIV 感染风险增加相关^[15]。

当阴道黏膜受到刺激, 促炎症因子大量释放, 引起免疫细胞的聚集和激活^[16], 其活化状态是验证阴道黏膜炎症反应的重要标志^[12]。CD45RB 主要表达在 T 细胞、B 细胞和单核细胞, 均为重要的免疫细胞, 在体内产生特异性免疫应答中发挥重要的作用。CD45RB 免疫组化染色结果显示: N-9 凝胶组阴道黏膜组织 CD45RB 蛋白阳性表达细胞明显较空白凝胶组和 Acid TISG 组增多。

PCNA 具有多种生物学功能, 在细胞增殖的启动过程中, 参与细胞 DNA 合成及分裂增殖, 其含量和表达程度可作为评价细胞增殖状态的指标^[17], 亦可评估黏膜损伤程度^[18], PCNA 蛋白广泛表达于家兔阴道黏膜细胞核、上皮细胞和间质细胞^[19], 阳性表达细胞为细胞核棕色深染。与空白凝胶组相比, N-9 凝胶组可以诱导家兔阴道黏膜 PCNA 蛋白表达的升高($P<0.05$), 而 Acid TISG 组黏膜 PCNA 蛋白表达无明显升高。这与阴道上皮(VK₂/E₆E₇)细胞模型观察到的 VK₂/E₆E₇ 细胞凋亡发生率相一致^[20]。PCNA 是 1 个中转分子或锚定分子, 作为分子整合者, 把一些参与控制细胞周期、DNA 复制、DNA 修复和细胞凋亡/死亡的分子整合起来^[21]。PCNA 可与凋亡相关蛋白 P21 结合形成复合体, 活化 P21, 然后使细胞不能通过 G1 期转折点进入 S 期^[22], 引发阴道黏膜细胞按其

分化扩展的方向不断发生凋亡/死亡^[22-23], 促进阴道黏膜的炎症反应^[24]。

本研究在经典的 RVI 模型的病理评价指标基础上, 扩展了 RVI 模型的研究终点, 特别是增加了 CVL 中 IL-6 和 TNF- α 炎性因子以及阴道黏膜 CD45RB 和 PCNA 蛋白分子的检测指标。结果显示在相同体外杀精 EC₅₀ 的 70 倍条件下, N-9 凝胶组与 Acid TISG 组对家兔黏膜病理损伤和免疫炎症反应有明显不同, 验证了可用 N-9 作为阳性药物制备优化 RVI 模型, 评价生殖道外用药物对家兔阴道黏膜免疫炎症反应。

REFERENCES

- [1] ECKSTEIN P, JACKSON M C, MILLMAN N, et al. Comparison of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys [J]. *J Reprod Fertil*, 1969, 20(1): 85-93.
- [2] DONCEL G F, CHANDRA N, FICHOROVA R N. Preclinical assessment of the proinflammatory potential of microbicide candidates [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004, 37(Suppl 3): S174-S180.
- [3] JIN Y, XU F, WANG X W, et al. Suggestions for unifying the experimental methods of vaginal stimulation test in drug safety evaluation [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2013, 22(12): 1383-1384.
- [4] ZHI R N, TIAN F, WANG Y Z, et al. Vaginal irritation of acetic thermosensitive in situ gel in mini-pigs [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2014, 23(23): 2798-2802.
- [5] LARD-WHITEFORD S L, MATECKA D, O'REAR J J, et al. Recommendations for the nonclinical development of topical microbicides for prevention of HIV transmission: an update [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004, 36(1): 541-552.
- [6] WILKINSON D, THOLANDI M, RAMJEE G, et al. Nonoxynol-9 spermicide for prevention of vaginally acquired HIV and other sexually transmitted infections: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials including more than 5 000 women [J]. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2(10): 613-617.
- [7] OBIERO J, MWETHERA P G, HUSSEY G D, et al. Vaginal microbicides for reducing the risk of sexual acquisition of HIV infection in women: systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1): 289.
- [8] COSTIN G E, RAABE H A, PRISTON R, et al. Vaginal irritation models: the current status of available alternative and in vitro tests [J]. *Altern Lab Anim*, 2011, 39(4): 317-337.
- [9] 李卫华. 双功能外用避孕药物的研发进展[J]. *生殖与避孕*, 2011, 31(11): 761-765.
- [10] D'CRUZ O J, UCKUN F M. Intravaginal toxicity studies of a gel-microemulsion formulation of spermicidal vanadocenes in rabbits [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 170(2): 104-112.
- [11] FICHOROVA R N, BAJPAI M, CHANDRA N, et al. Interleukin (IL)-1, IL-6, and IL-8 predict mucosal toxicity of vaginal microbicide contraceptives [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(3): 761-769.
- [12] CUMMINS J J, DONCEL G F. Biomarkers of cervicovaginal inflammation for the assessment of microbicide safety [J]. *Sex Transm Dis*, 2009, 36(3 Suppl): S84-S91.
- [13] SCOTT M E, WILSON S S, COSENTINO L A, et al. Interlaboratory reproducibility of female genital tract cytokine measurements by Luminex: implications for microbicide safety studies [J]. *Cytokine*, 2011, 56(2): 430-434.
- [14] YANG J, LI L, JIN H, et al. Vaginal gel formulation based on theaflavin derivatives as a microbicide to prevent HIV sexual transmission [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2012, 28(11): 1498-1508.
- [15] ZALENSKAYA I A, CEROCCHI O G, JOSEPH T, et al. Increased COX-2 expression in human vaginal epithelial cells exposed to nonoxynol-9, a vaginal contraceptive microbicide that failed to protect women from HIV-1 infection [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2011, 65(6): 569-577.
- [16] TRIFONOVA R T, BAJPAI M, PASICZNYK J M, et al. Biomarkers of leukocyte traffic and activation in the vaginal mucosa [J]. *Biomarkers*, 2007, 12(6): 608-622.
- [17] MAGA G, HUBSCHER U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 15): 3051-3060.
- [18] VASCONCELOS P C, SEITO L N, DI STASI L C, et al. Epicatechin used in the treatment of intestinal inflammatory disease: an analysis by experimental models [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012: 508902. Doi: 10.1155/2012/508902.
- [19] D'CRUZ O J, SAMUEL P, WAURZYNIAK B, UCKUN F M. Development and evaluation of a thermoreversible ovule formulation of stampidine, a novel nonspermicidal broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus microbicide [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(6): 1843-1851.
- [20] PEPLOW P V, CHATTERJEE M P. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration [J]. *Cytokine*, 2013, 62(1): 1-21.
- [21] MORROW P W, TUNG H Y, HEMMINGS H J. Rapamycin causes activation of protein phosphatase-2A1 and nuclear translocation of PCNA in CD4+ T cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(2): 645-651.
- [22] ZHANG H, XIONG Y, BEACH D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes [J]. *Mol Biol Cell*, 1993, 4(9): 897-906.
- [23] SUBOJ P, BABYKUTTY S, SRINIVAS P, et al. Aloe emodin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via activation of caspase-6 in human colon cancer cells [J]. *Pharmacology*, 2012, 89(1/2): 91-98.
- [24] CHIARA A D, PEDERZOLI-RIBEIL M, BURGEL P R, et al. Targeting cytosolic proliferating cell nuclear antigen in neutrophil-dominated inflammation [J]. *Front Immunol*, 2012(3): 311.

收稿日期: 2016-03-16