

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.25.007

文章编号: 1005-8982(2017)25-0032-05

硝夫太尔制霉菌素和甲硝唑栓对妊娠合并细菌性阴道病患者绒毛超微结构及 Caspase-3 表达的影响

张琼, 胡静, 罗春叶

(云南省第二人民医院 生殖医学科, 云南 昆明 650021)

摘要:目的 探讨硝夫太尔制霉菌素和甲硝唑栓对妊娠合并细菌性阴道病患者的绒毛超微结构及不良妊娠结局的影响。**方法** 将 2013 年 4 月 -2015 年 7 月在云南省第二人民医院就诊的妊娠合并细菌性阴道病患者分为 A 组(未用药)37 例、B 组(硝夫太尔制霉菌素)62 例、C 组(甲硝唑)60 例,并选同期正常妊娠者为 D 组(正常组)60 例,比较 B、C 两组的治疗效果,比较 4 组不良妊娠结局发生以及绒毛超微结构、细胞凋亡蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)表达上的差异。**结果** B、C 两组的治疗总有效率及不良反应发生率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但疾病复发率,差异有统计学意义($P<0.05$),B 组(1.61%)低于 C 组(18.33%);不良妊娠结局发生率比较,B、C、D 3 组均低于 A 组;绒毛超微结构及 Caspase-3 表达比较,A、B、C 3 组两两比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 硝夫太尔制霉菌素在治疗妊娠合并细菌性阴道病患者时,具有较高的治疗有效率及低复发率,且有利于避免绒毛组织结构进一步损伤及细胞凋亡的发生。

关键词: 硝夫太尔制霉菌素;甲硝唑;细菌性阴道病;妊娠

中图分类号: R711.31

文献标识码: A

Effect of Nifuratel nystatin and Metronidazole suppositories on villus ultrastructure and caspase-3 expression of pregnant women with bacterial vaginosis

Qiong Zhang, Jing Hu, Chun-ye Luo

(Division of Reproductive Medicine, the Second People's Hospital of Yunnan, Kunming, Yunnan 650021, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Nifuratel nystatin and Metronidazole suppositories on villus ultrastructure and adverse pregnancy outcomes in pregnant women with bacterial vaginosis. **Methods** The pregnant women with bacterial vaginosis who were admitted to our hospital from April 2013 to July 2015 were divided into group A (37 cases without medication), group B (62 cases treated with Nifuratel nystatin) and group C (60 cases treated with Metronidazole suppositories); at the same time 60 normal pregnant women were enrolled into group D (normal group). The treatment effect was compared between the groups B and C. The adverse pregnancy outcomes, villus ultrastructure and expression of apoptosis protein caspase-3 were compared among the four groups. **Results** There was no significant difference in the total effective rate or incidence of side effects between the groups B and C ($P>0.05$), but the recurrence rate in the group B (1.61%) was lower than that in the group C (18.33%, $P<0.05$). The incidences of adverse pregnancy outcomes in the groups B, C and D were lower than that in the group A ($P<0.05$). There were significant differences in the villous ultrastructure and caspase-3 expression among the groups A, B and C ($P<0.05$). **Conclusions** Nifuratel nystatin has high efficiency and a low recurrence rate in the treatment of bacterial vaginosis in pregnant women, and helps to avoid further damage to villus structure and the occurrence of apoptosis.

Keywords: Nifuratel nystatin; Metronidazole; bacterial vaginosis; pregnancy

细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)是育龄女性中较为常见的一种下生殖道感染性疾病,其发病率在 10%~30%^[1]。临床研究资料显示,妊娠期合并 BV 与如胎膜早破、早产、产褥感染等不良妊娠结局发生有相关性^[2],但其具体作用机制尚不清楚。而近年来临床研究显示,细菌感染导致母胎界面微环境改变或许对不良妊娠结局负有直接责任^[3]。而作为治疗妊娠合并 BV 常用药物,甲硝唑虽然短期效果明显,但高复发率在一定程度上限制了其应用。而这与微环境改变直接相关。持续细菌感染往往会加重机体炎症反应,并引起机体释放大量炎症因子,诱发绒毛等组织细胞凋亡,而绒毛滋养层细胞的增殖是维持妊娠顺利进行的必要条件^[4-5]。因此,一旦发生细胞凋亡,也就意味着妊娠无法顺利完成。此外,细胞凋亡蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)作为启动 Caspase 级联反应并导致细胞凋亡的重要蛋白,Caspase-3 活性增加意味着细胞凋亡的不可逆转变。因而,本研究通过观察妊娠合并 BV 患者绒毛超微结构、Caspase-3 及不良妊娠结局的发生情况,探讨硝夫太尔制霉素及甲硝唑在临床治疗效果上的差异,为更好地指导临床用药提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 4 月-2015 年 7 月来云南省第二人民医院就诊且符合纳入标准的妊娠合并细菌性阴道病患者共计 159 例。其中将不愿接受治疗的 37 例患者纳入 A 组(未用药),剩余 122 例患者根据不同用药随机纳入 B 组(硝夫太尔制霉素)62 例,C 组(甲硝唑栓)60 例,并选同期正常妊娠者 62 例纳入 D 组(正常组)。纳入标准:①经妇科检查、分泌物镜检结果确诊且符合 Amsel 临床有关诊断观点^[6];②入院前未采取任何其他药物治疗;③孕周 >14 周。排除标准:①合并有其他妊娠性疾病;②合并有糖尿病、高血压等慢性疾病。各组在年龄、体重、孕周、孕次、产次上差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

以上研究经本院伦理委员会批示通过,且参与研究者知情并签署知情同意书。

1.2 方法

B 组给予硝夫太尔制霉素阴道软胶囊(北京朗依制药有限公司,国药准字 H20051563),给药方法为

患者在每晚入睡前清洗外阴,将本品 1 粒(含 500 mg 硝夫太尔 +20 万 u 制霉素)放入阴道后穹隆处,以 7 d 为 1 个疗程;C 组给予甲硝唑栓(成都第一药业有限公司,国药准字 H51023193),给药方法为患者每晚入睡前清洗外阴,将甲硝唑 2 粒(250 mg/粒)放入阴道后穹隆处,以 7 d 为 1 个疗程。两组均治疗 1 个疗程。B、C 两组在进行 1 个疗程治疗后的第 1、4 和 12 周进行复诊,其中治疗效果判断依据第 4 周复查结果,复发情况针对第 4 周仍有效后进行第 12 周的复查。A、D 组均未给药,且在首次就诊时、就诊后第 4 和 12 周进行相同检查。研究期间,需对 4 组患者进行跟踪随访,直至产褥期结束,并记录各组患者出现胎膜早破、早产、产褥感染、新生儿感染及新生儿窒息的发生情况。

1.3 评估标准

B、C 组在治疗 1 个疗程后的第 4 周,A、D 组在就诊后第 4 周,分别按如下标准进行各项指标比较。

1.3.1 标本采集 待流产或早产孕妇胎盘分娩出后,先进行大体标本检查,随后在距离脐带 4 cm 处无出血坏死的新鲜胎盘和蜕膜全层中选取面积大约 1.0 cm × 1.0 cm 的胎盘绒毛。

1.3.2 疗效判断^[7] 评价指标包括:①线索细胞 <20%;②氨试验结果阴性;③阴道 pH 值 <4.5。其中痊愈:患者各项临床症状、体征均消失,阴道清洁度 I 度且符合上述 3 项评价标准;显效:患者各项临床症状及体征均明显减轻,阴道清洁度 II 度,且至少符合上述 2 项标准;有效:患者临床症状及体征有所减轻,阴道清洁度 III、IV 度符合上述 1 项标准;无效:患者临床症状及体征无改善或加重,不符合上述任何一项评价标准。复发是指治疗有效以上患者 3 个月后复诊,其临床症状及体征复现,且至少不符合上述评价标准中 2 项。治疗有效率=(痊愈例数 + 显效例数 + 无效例数)/本组总例数。

1.3.3 绒毛超微结构观察 取各组绒毛组织,经生理盐水冲洗后分成 2 份,1 份剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右组织块,浸泡入电镜固定液中,经脱水、浸透、包埋、聚合、切片、染色步骤后,采用透射电子显微镜(JEOL-1400 日本电子株式会社)对绒毛组织超微结构进行观察。

1.3.4 Caspase-3 表达阳性检测 取上述另 1 份绒毛组织进行免疫组织化学 SP 染色。其中以细胞胞浆中可见棕黄色颗粒或片状染色为阳性细胞。具体

步骤如下:在 400 倍镜下随机挑选 5 个不重叠区域,依据染色程度及细胞比例进行评分,其中染色程度计分为 0 分(无显色)、1 分(浅黄色)、2 分(棕黄色)、3 分(棕褐色);阳性细胞数比例计分为 0 分($\leq 5\%$)、1 分(6%~25%)、2 分(26%~50%)、3 分(51%~75%)、4 分($>75\%$)。总分为以上两项乘积。按总分分为阴性(0~3 分)、弱阳性(4~6 分)、阳性(7~9 分)、强阳性(>9 分)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料进行 χ^2 检验,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行 LSD- t 检验。两组间直接比较,当 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,在 4 组比较的基础上,采用了 χ^2 分割法进行两两比较, $P < 0.007$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

各组在年龄、体重、孕周、孕次、产次上比较,差异均无统计学差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 疗效比较

B、C 组治疗总有效率比较,经 χ^2 检验,差异无统计学意义($\chi^2=0.607, P=0.962$),但两组疾病复发率比较,差异具有统计学意义($\chi^2=9.612, P=0.048$)。见表 2。

2.3 药物不良反应

本次研究中共 5 例患者主诉外阴有灼热感、干涩或皮肤瘙痒,其中 B 组 2 例、C 组 3 例,差异无统计学意义($\chi^2=0.244, P=0.993$)。5 例患者均未进行特殊治疗,症状在停药后自行缓解。

2.4 不良妊娠结局比较

4 组不良妊娠结局发生率比较,经 χ^2 检验,差异具有统计学意义($\chi^2=5.743, P=0.000$),采用 χ^2 分割法进行两两比较(α 值 = 0.05 (4(4-1)/2+1)=0.007),结果显示 A 组 vs D 组、A 组 vs B 组、A 组 vs C 组,均差异具有统计学意义($\chi^2=7.124, 4.113$ 和 $6.982, P=0.000, 0.005$ 和 0.003)。见表 3。

2.5 各组绒毛超微结构

A 组电镜下可见细胞胞质明显空泡化,细胞器数量减少,细胞变性如细胞核固缩、染色质异常等(见附图 A);B、C 组细胞形态正常,但仍可见部分细胞表面存在微绒毛减少及增粗,且 C 组较 B 组明显(见附图 B、C);D 组细胞形态正常,细胞膜清晰可见,胞质中有丰富细胞器,染色质分布均匀(见附图 D)。

2.6 Caspase-3 阳性结果

各组 Caspase-3 表达阳性率比较,经 LSD- t 检验,A 组 vs B 组、B 组 vs C 组、C 组 vs A 组、A 组 vs D 组均差异具有统计学意义($t=7.432, 3.116, 7.432$ 和 $8.351, P=0.004, 0.034, 0.004$ 和 0.001)。见表 4。

表 1 各组一般临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

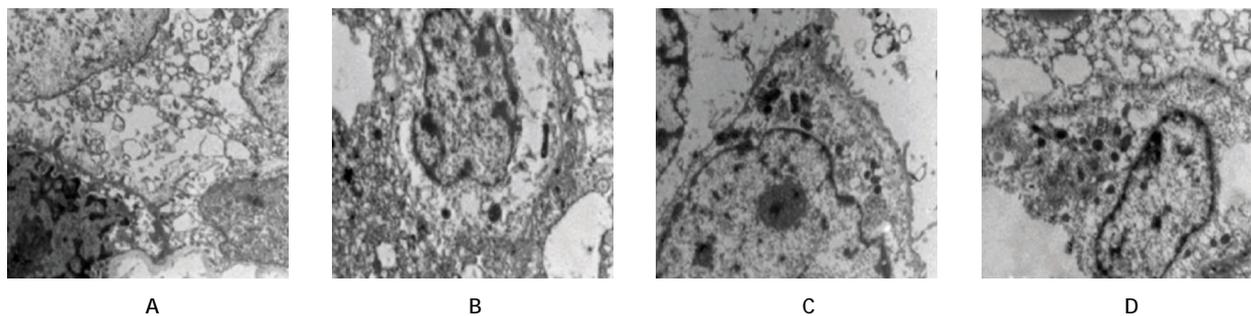
组别	年龄 / 岁	体重 / kg	孕周 / 周	孕次 / 次	产次 / 次
A 组(n=37)	25.63 \pm 3.23	49.62 \pm 2.84	18.74 \pm 4.19	2.11 \pm 0.24	0.53 \pm 0.14
B 组(n=62)	25.15 \pm 3.52	49.45 \pm 2.75	19.13 \pm 4.32	2.05 \pm 0.25	0.48 \pm 0.17
C 组(n=60)	25.53 \pm 3.41	50.04 \pm 2.81	19.29 \pm 4.41	2.15 \pm 0.22	0.62 \pm 0.11
D 组(n=62)	25.78 \pm 3.33	49.71 \pm 2.85	18.77 \pm 4.28	2.32 \pm 0.27	0.55 \pm 0.13
F 值	0.785	0.894	0.862	0.847	1.214
P 值	0.962	0.846	0.873	0.866	0.718

表 2 B、C 组治疗效果比较 例(%)

组别	痊愈	显效	有效	无效	总有效率	复发率
B 组(n=62)	51(82.26)	5(8.06)	3(4.84)	3(4.84)	59(95.2)	1(1.61)
C 组(n=60)	48(80.00)	4(6.67)	3(5.00)	5(8.33)	55(91.7)	11(18.33)

表 3 各组不良妊娠结局比较 例(%)

组别	胎膜早破	早产	产褥感染	新生儿感染	新生儿窒息	总计
A 组(n=37)	9(24.32)	7(18.92)	7(18.92)	6(16.22)	1(2.7)	30(81.1)
B 组(n=62)	2(3.23)	4(6.45)	3(4.84)	3(4.84)	0(0)	12(19.4)
C 组(n=60)	3(5.00)	4(6.67)	3(5.00)	4(6.67)	0(0)	14(23.3)
D 组(n=62)	1(1.61)	2(3.23)	1(1.61)	3(4.84)	0(0)	7(11.3)



附图 各组绒毛超微结构图 (透射电镜×400)

表 4 各组 Caspase-3 表达阳性率

组别	阴性 例(%)	弱阳性 例(%)	阳性 例(%)	强阳性 例(%)	总分 $I(\bar{x} \pm s)$
A 组($n=37$)	6(16.2)	10(27.0)	11(29.7)	10(27.0)	8.24 ± 3.34
B 组($n=62$)	16(25.8)	27(43.5)	12(19.4)	7(11.3)	3.52 ± 2.54
C 组($n=60$)	14(23.3)	25(41.7)	11(18.3)	10(16.7)	4.73 ± 2.89
D 组($n=62$)	17(27.4)	30(48.4)	10(16.1)	5(8.1)	2.46 ± 2.34

3 讨论

正常生理下,以乳酸杆菌为代表的优势菌群可分泌乳酸等酸性物质来维持女性阴道微环境处于弱酸性,并分泌 H_2O_2 来抑制其他致病菌的增殖。但是,当女性处于妊娠状态时,雌激素的激增为病原菌增殖带来丰富的糖原,阴道微环境改变,如黏膜水肿、细胞通透性增加也给其他病原菌入侵提供了便利^[7-8]。此外以加德纳菌为主的病原微生物还可分泌唾液酸酶及黏蛋白酶来分解黏蛋白及脂质,为细菌入侵宫颈上皮细胞及进入羊膜腔提供条件,并对滋养层组织微环境结构造成影响,从而引起细胞凋亡等病理改变^[9]。而一旦细菌进入羊膜腔,不仅能引起胎膜水肿和张力下降,还可引起细胞凋亡及其他一系列免疫反应,并最终引发胎膜早破、早产等不良妊娠结局的发生。因此,提高妊娠期 BV 治疗效果具有一定的临床意义。

本研究比较硝夫太尔制霉素和甲硝唑栓的临床治疗效果,并针对高复发率问题做进一步分析。结果显示,用药的 B、C 组在治疗效果及药物不良反应率上差异无统计学意义;但在复发率上,给予甲硝唑栓治疗的 C 组复发率高于 B 组,且 C 组的复发率基本与前人研究报道相符合。以往研究^[10]认为甲硝唑短期有效率可达 85% 以上,但 3 个月后,复发率可为 20%~40%。高复发率的原因之一是女性阴道微环境的改变现状并未得到有效逆转。本研究针对各组的绒毛超微结构研究进一步证实,D 组绒毛结构清

晰,细胞形态正常,细胞胞浆内含有丰富细胞器,而 B、C 组虽然细胞形态无明显异常,但 B、C 两组绒毛组织均有微绒毛减少现象,其中 C 组可见部分凋亡细胞;A 组不仅微绒毛减少,细胞变性,且大部分细胞胞质空泡化。通过各组 Caspase-3 细胞表达阳性率比较可知,B 组、D 组无明显细胞凋亡,但是 C 组、A 组细胞凋亡较为明显。由于凋亡蛋白 Caspase-3 在滋养层细胞凋亡中起到关键作用,且一旦细胞高表达 Caspase-3 即意味着细胞已经进入不可逆转的凋亡阶段,而凋亡细胞增多,不仅会加剧组织微环境进一步损伤,也使患者治疗后恢复效果较差。由此认为,甲硝唑栓虽然短期疗效明显,但在抑制减少细胞凋亡上,并无明显作用,而细胞凋亡是加剧阴道微环境改变的重要因素,以至于虽然短期致病菌大量被杀死,但毫无保护的阴道依然是病原菌重点侵袭部位^[11],而这或许是导致治疗高复发率的重要因素之一。硝夫太尔临床研究显示^[12],该药物不仅具有广谱抗菌特性,还有加德纳菌强抑制作用及对乳酸杆菌无抑制作用等优点,从而保证了较高的治疗效果。本研究还发现,硝夫太尔制霉素在抑制细胞凋亡上具有一定作用,但其具体作用机制还需进一步研究。

综上所述,对妊娠合并细菌性阴道病患者,给予硝夫太尔制霉素药物治疗,治疗效果明显,复发率低,且药物在一定程度上可减少细胞凋亡的发生,有助于改善阴道微环境。但是,鉴于此研究样本数较少,后续还需进行大样本、随机、双盲实验,以便获得更为可信的结论。

参 考 文 献:

- [1] VERSTRAELEN H, SWIDSINSKI A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment[J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2013, 26(1): 86-89.
- [2] 蔡叶萍, 李荣淘, 邓丽贞. 孕期细菌性阴道病与不良妊娠结局关系的探讨[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2014, 6(8): 34-36.
- [3] 苑媛, 刘家丰. 两种方案治疗妊娠合并细菌性阴道病及对不良妊娠结局的影响[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2013, 47(2): 191-193.
- [4] KANG J H, SONG H O, RYU J S, et al. *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating capase-3 and reducing Mcl-1 expression[J]. *Parasite Immunol*, 2006, 28(9): 439-446.
- [5] SATOSAR A, RAMIREZ N C, BARTHOLOMEW D, et al. Histologic correlates of viral and bacterial infection of the placenta associated with severe morbidity and mortality in the newborn[J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(5): 536-545.
- [6] BHARATHI M, PADMAJA I J. Comparison of nugen's and am-sel's criteria in the diagnosis of bacterial vaginosis[J]. *The Indian Practitioner*, 2014, 67(6): 349-352.
- [7] 周正菊, 杨章元, 明亮, 等. 420 例孕妇细菌性阴道病检测及其与妊娠结局的关系[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(22): 3624-3624.
- [8] 汤飒爽, 刘睿, 陈洁. 妊娠期细菌性阴道病的研究进展[J]. *海峡药学*, 2012, 24(4): 18-20.
- [9] 余竑敏, 苏婷婷, 隋龙. 加德纳菌生物膜在难治性细菌性阴道病中的研究[J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(3): 267-271.
- [10] AGUIN T, AKINS R A, SOBEL J D. High-dose vaginal maintenance metronidazole for recurrent bacterial vaginosis: a pilot study[J]. *Sexually Transmitted Diseases*, 2014, 41(5): 290-291.
- [11] AGUIN T J, AKINS R A, SOBEL J D. High-dose vaginal metronidazole for recurrent bacterial vaginosis-A pilot study[J]. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 2014, 18(2): 156-161.
- [12] 王丽君. 妊娠合并细菌性阴道病不同治疗方法对妊娠结局的影响[J]. *中国医药指南*, 2015, 13(27): 94-95.

(张蕾 编辑)