

## · 基础研究 ·

# 活血消异方对子宫内膜异位症盆腔粘连大鼠 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路相关因子的影响

李田田<sup>1,2</sup> 孙伟伟<sup>1</sup> 赵瑞华<sup>1</sup> 余燧薇<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 观察活血消异方对子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)盆腔粘连大鼠 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路相关因子的影响。**方法** 将造模大鼠自体子宫内膜移植于肠系膜上建立 EMs 盆腔粘连大鼠模型,随机分为模型组(简称 C 组),术后第 1 天中药给药组(简称 D1 组),术后第 3 天中药给药组(简称 D2 组),术后第 5 天中药给药组(简称 D3 组),术后第 1 天西药给药组(简称 E1 组),术后第 3 天西药给药组(简称 E2 组),术后第 5 天西药给药组(简称 E3 组)。中药组予活血消异方灌胃,西药组予促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)肌肉注射。连续给药 28 天后,开腹进行盆腔粘连评分,再分别取造模大鼠粘连腹膜组织、空白组(简称 A 组)和假手术组(简称 B 组)正常腹膜组织,采用免疫组化、反转录酶-聚合酶链锁反应(RT-PCR)检测腹膜组织中 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_3$ 、Smad3、Smad7 蛋白和 mRNA 表达。**结果** 与 B 组比较,C 组盆腔粘连评分显著升高( $P < 0.05$ ),与 C 组比较,D1、D2、D3、E1、E2、E3 组盆腔粘连评分均显著降低( $P < 0.05$ );D1、D2 组盆腔粘连评分显著低于 D3 组( $P < 0.05$ );E1 组显著低于 E2、E3 组( $P < 0.05$ );C 组大鼠 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_3$ 、Smad3、Smad7 mRNA 及蛋白表达量显著高于 B 组( $P < 0.05$ );D1、D2、D3、E1、E2、E3 组 TGF- $\beta_1$ 、Smad3 mRNA 和蛋白表达均显著低于 C 组( $P < 0.05$ ),TGF- $\beta_3$  mRNA 和蛋白表达均高于 C 组( $P < 0.05$ ),Smad7 mRNA 和蛋白表达均与 C 组相当( $P > 0.05$ );D1、D2、D3 组间 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_3$  mRNA 和蛋白表达量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),E1、E2、E3 组间 TGF- $\beta_3$  mRNA 和蛋白表达量差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** EMs 可导致大鼠严重、广泛的盆腔粘连;活血消异方能过调控 TGF- $\beta$ /Smads 信号传导通路相关因子的表达,改善 EMs 盆腔粘连程度,且中药干预越早,改善盆腔粘连程度疗效越显著。

**关键词** 活血消异方;子宫内膜异位症;盆腔粘连;腹膜;TGF- $\beta$ /Smads

Effect of Huoxue Xiaoyi Recipe on TGF- $\beta$ /Smads Signaling Pathway of Pelvic Adhesions of Endometriosis Rats LI Tian-tian<sup>1,2</sup>, SUN Wei-wei<sup>1</sup>, ZHAO Rui-hua<sup>1</sup>, and YU Yi-wei<sup>1</sup> 1 Department of Traditional Chinese Medicine Gynecology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053); 2 Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Moslem People's Hospital, Beijing (100054)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of Hoxue Xiaoyi Recipe (HXR) on TGF- $\beta$ /Smads signal transduction pathway in rats with endometriosis (EM) pelvic adhesion. **Methods** The model of EM pelvic adhesion was established by transplanting rat endometrium into mesentery. And then modeled rats were randomly divided into the model group, the post-operational 1st, 3rd, 5th day HXR administration groups, the post-operational 1st, 3rd, 5th day Western medicine (WM) administration groups. Rats in HXR groups were administered with HXR by gastrogavage. GnRH-a was intramuscularly injected to rats in the WM groups. After 28 days of continuous medication, the pelvic adhesion was scored. And then adhesive peritoneal tissues of modeled rats were collected, and normal peritoneal tissues of the blank group and the sham-operation group were collected. Protein and mRNA expressions of TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_3$ , Smad3, and Smad7 were detected by immunohistochemistry and RT-PCR respectively. **Results** Com-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81373678)

作者单位:1.中国中医科学院广安门医院中医妇科(北京 100053);2.北京市回民医院妇产科(北京 100054)

通讯作者:赵瑞华, Tel: 18201015706, E-mail: Rhz801@sohu.com.

DOI: 10.7661/j. cjim. 20180518. 110

pared with the sham-operation group, the pelvic adhesion score of the model group significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the pelvic adhesion score of significantly decreased in each HXR group and each WM group ( $P < 0.05$ ). The pelvic adhesion scores were significantly lower in the post-operational 1st day and 3rd day HXR administration groups than in the post-operational 5th day HXR administration group ( $P < 0.05$ ). The pelvic adhesion scores were significantly lower in the post-operational 1st day HXR administration groups than in the post-operational 5th and 3rd day HXR administration group ( $P < 0.05$ ). Protein and mRNA expressions of TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_3$ , Smad3, and Smad7 were significantly higher in the model group than in the blank group and the sham-operation group ( $P < 0.05$ ). Protein and mRNA expressions of TGF- $\beta_1$  and Smad3 were significantly lower in each HXR group and each WM group than in the model group ( $P < 0.05$ ). Protein and mRNA expressions of TGF- $\beta_3$  were significantly higher in each HXR group and each WM group than in the model group ( $P < 0.05$ ). Protein and mRNA expressions of Smad7 in each HXR group and each WM group were equivalent to those of the model group ( $P > 0.05$ ). Protein and mRNA expressions of TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_3$  showed statistical difference among each HXR group ( $P < 0.05$ ). Protein and mRNA expressions of TGF- $\beta_3$  showed statistical difference among each WM group ( $P < 0.05$ ). Conclusions EM could lead to severe and extensive pelvic adhesion. HXR could improve the degree of EM pelvic adhesion by regulating the expressions of TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway related factors. And the earlier HXR intervened, the better therapeutic effect got.

**KEYWORDS** Huoxue Xiaoyi Recipe; endometriosis; pelvic adhesion; peritoneum; TGF- $\beta$ /Smads

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)的主要病理过程即盆腔炎症及纤维化<sup>[1]</sup>,常在盆腔壁层腹膜以及子宫、卵巢、输卵管、直肠等脏层腹膜发生盆腔粘连。EMs 盆腔粘连不仅可造成痛经、慢性盆腔痛、不孕、宫外孕等并发症,也与 EMs 复发相关。笔者结合腹膜间皮细胞在粘连形成中的重要作用以及国内外围绕 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路的系列研究成果<sup>[2,3]</sup>,拟从 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路角度,探讨活血消异方改善 EMs 盆腔粘连的疗效机制。

## 材料与方法

**1 动物** 清洁级,健康性成熟未孕雌性 SD 大鼠 108 只,体重( $220 \pm 20$ )g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2012-0001。实验动物的处置严格按照中国中医科学院广安门医院实验动物中心的伦理相关规定进行。

**2 药物** 水合氯醛(中国国药集团化学试剂有限公司,批号:20140304);苯甲酸雌二醇(4 mg/2 mL,宁波市三生药业有限公司,批号:B131204);青霉素钠(每支 80 万 U,华北制药股份有限公司);注射用醋酸亮丙瑞林(每支 3.75 mg,IPSEN PHARMA BIOTECH-Signes-法国);活血消异方由丹参、莪术、赤芍、鸡内金、生薏仁等组成(由中医科学院广安门医院中药房提供),以上生药加 10 倍量水,煎煮 2 次,合并煎液、过滤,药物浓缩使药物浓度为 1.8 g 生药/

mL,药液 4 ℃ 冰箱保存。

**3 试剂及仪器** TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_3$ 、Smad3、Smad7 免疫组化相关试剂均由中国中医科学院广安门医院病理科提供。兔抗 TGF- $\beta_1$  多克隆抗体(型号:25121)、兔抗 TGF- $\beta_3$  多克隆抗体(型号:ab15537)、兔抗 Smad3 多克隆抗体(型号:ab40854),均为美国 Abcam 产品;兔抗 Smad7 多克隆抗体(型号:BA1399)中国博士德生物工程有限公司;超纯 RNA 提取试剂盒(CWbio.Co.Ltd, Cat# CW0581);HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(CWbio.Co.Ltd, Cat# CW0744);移液器(德国 Eppendorf);荧光定量 PCR 仪(Bioer Linegene9600,杭州博日科技有限公司);凝胶成像仪(Tanon 4100,上海天能科技有限公司);离心机(XiangyiH1650,湖南湘仪离心机仪器有限公司);分光光度计(UV-2000,上海尤尼柯公司)。

## 4 方法

**4.1 造模方法** 参考 Haber E 等<sup>[4]</sup>造模方法,取 84 只大鼠造模,术前 2 天每天肌肉注射 4 mg/2 mL 的苯甲酸雌二醇 0.1 mg/kg,使其处于同一动情周期,大鼠禁食 12 h 后,称重,编号,10% 水合氯醛(0.38 mL/100 g)腹腔麻醉,置于超净台,腹部备皮,在尿道口上约 1 cm 处靠左侧做平行于正中中线长约 1.5 cm 的纵切口进腹,进腹后在膀胱背侧找到子宫,游离左侧子宫,近端离左子宫角 1 cm 处结扎,远端离

卵巢 2 cm 处结扎,并结扎两端间的子宫系膜血管,切除约 1.0 cm 长子宫段,立即放入盛有无菌生理盐水的培养皿中,用眼科剪沿系膜部剪开管状子宫,切割成 3 mm×3 mm 大小的碎片,共 4 片,注意区分肌层与内膜面,内膜面朝向肠系膜,用 5~0 线缝合于右侧肠系膜血管丰富处,检查腹腔无出血后,腹腔留置青霉素钠 0.25 mL,5~0 线缝合腹壁,2~0 线缝合皮肤进行逐层关腹。分笼喂养,待其自然苏醒。术后连续 3 天肌肉注射青霉素钠 0.25 mL,每天 1 次,以预防术后感染,术后第 2 天开始每天肌肉注射苯甲酸雌二醇 0.1 mg/kg,以促进异位灶的生长。采用随机数字表法随机分为模型组(简称 C 组)、术后第 1 天中药给药组(简称 D1 组)、术后第 3 天中药给药组(简称 D2 组)、术后第 5 天中药给药组(简称 D3 组)、术后第 1 天西药给药组(简称 E1 组)、术后第 3 天西药给药组(简称 E2 组)、术后第 5 天西药给药组(简称 E3 组),每组 12 只。假手术组(简称 B 组)12 只,术前准备、麻醉、子宫的切除方法同 C 组,紧贴肠系膜缝 4 针 5/0 尼龙线。

4.2 给药方法 取 12 只正常大鼠作为空白对照组(简称 A 组),D1、D2、D3 组大鼠根据体表面积换算系数<sup>[5]</sup>的方法进行大鼠用药剂量的换算(大鼠与人的每 kg 体重剂量折算系数为 6.25),2.5 mg/(kg·d)[相当于成人 2 g/(kg·d)],计算大鼠每天灌胃活血消异方汤液 1.2 mL/100 g 给药,每天 1 次,连续灌胃 28 天;西药组大鼠每天肌肉注射 GnRH-a 0.04 mg/kg,连续给药至 7 天,后 21 天按起始剂量的 1/5 维持。B、C 组每日按体重予等量的蒸馏水灌胃,共连续灌胃 28 天。

4.3 观察指标及测定方法

4.3.1 粘连评分 给药结束后,腹腔麻醉,开腹,采用 Haber E 盆腔粘连评分方法<sup>[4]</sup>进行评分。造模大鼠分别留取异位病灶附着点附近的腹膜组织、A、B 组留取盆腔正常腹膜组织,用冰冷生理盐水清洗后,每块组织分成两份。

4.3.2 免疫组化检测 一份组织迅速于 10% 甲醛溶液中固定,采用免疫组化检测组织中 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 蛋白相对表达量。具体方法:切片依次于二甲苯、梯度乙醇中脱蜡、水化。PBS(pH7.4)冲洗 3 min×3 次。浸入枸橼酸溶液中,100℃抗原修复。PBS 冲洗 3 min×3 次。过氧化氢阻断剂室温孵育 10 min。PBS 冲洗 3 min×3 次。室温孵育一抗,4℃过夜。PBS 冲洗 5 min×3 次。室温孵育 10 min。PBS 冲洗 3 min×3 次。二抗孵育 10 min。链霉菌抗

生物素蛋白-过氧化酶室温孵育 10 min。PBS 冲洗 3 min×3 次。DAB 显色。自来水冲洗,苏木精染色 30 s,自来水冲洗返蓝。梯度乙醇脱水。透明。封片。用计算机图像处理软件半定量测定各组 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 蛋白的含量,采用平均光密度(MOD)表示各指标的相对表达量,MOD 值越大,阳性反应越强,表示蛋白表达量越高。

4.3.3 RT-PCR 检测 另一份组织包于锡箔纸中,迅速置于-80℃条件下迅速冰冻。采用 RT-PCR 检测组织中 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 mRNA 相对表达量。先将组织置去酶冷冻管,液氮研磨,提取总 RNA 3 μg,按照逆转录试剂盒说明书方法进行逆转录。使用 Premier5 软件基因序列号设计引物,各引物序列见表 1。循环扩增结束后,取反应产物上机行凝胶电泳,利用紫外凝胶成像系统对条带进行密度分析,以 β-actin 为内参,计算电泳各条带的光密度(OD),以 TGFβ<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 与 β-actin 的 OD 的比值作为表达的相对含量,以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算目标基因相对表达量。

表 1 基因引物序列和扩增长度

| 引物名称               | 引物序列(5' to 3')            | 扩增产物大小(bp) |
|--------------------|---------------------------|------------|
| TGF-β <sub>1</sub> | 上游:CACTCCCGTGGCTCTCTAGTG  | 145        |
|                    | 下游:GGACTGGCGAGCCTTAGTTT   |            |
| Smad3              | 上游:GGGAGACATTCCACGCTTCG   | 128        |
|                    | 下游:CCTTGTAAGCTCCACGGCTG   |            |
| Smad7              | 上游:CGGAAGTCAAGAGGCTGTGT   | 168        |
|                    | 下游:CGTCTGGACAGTCTGCAGTT   |            |
| TGF-β <sub>3</sub> | 上游:GGACTTCGGCCACATCAAGA   | 144        |
|                    | 下游:TGATAGGGGACGTGGGTCAT   |            |
| β-actin            | 上游:CCCATCTATGAGGGTTACGC   | 150        |
|                    | 下游:TTTAATGTCACGCACGATTTTC |            |

4.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料描述采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,方差齐性,采用 LSD 检验,方差不齐,采用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠给药后盆腔粘连情况比较(表 2) 给药过程中,C 组因感染死亡 3 只,D3 组死亡 1 只。C 组盆腔粘连评分最高,显著高于 B 组及 D1、D2、D3、E1、E2、E3 组( $P < 0.05$ );与 D3 组比较,D1、D2 组盆腔粘连评分更低( $P < 0.05$ )。与 E1 组比较,E2、E3 组盆腔粘连评分更高( $P < 0.05$ )。中药、西药组间

同期比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 2 各组大鼠给药后盆腔粘连情况比较 (分,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别 | n  | 粘连评分                    |
|----|----|-------------------------|
| A  | 12 | 0                       |
| B  | 12 | 0.55±0.60               |
| C  | 9  | 7.17±1.17*              |
| D1 | 12 | 4.22±1.28 <sup>△△</sup> |
| D2 | 12 | 4.83±1.32 <sup>△△</sup> |
| D3 | 11 | 6.06±1.29 <sup>△</sup>  |
| E1 | 12 | 3.44±0.81 <sup>△</sup>  |
| E2 | 12 | 5.06±1.29 <sup>△○</sup> |
| E3 | 12 | 5.39±1.54 <sup>△○</sup> |

注:与 B 组比较,\* $P<0.05$ ;与 C 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与 D3 组比较,<sup>△△</sup> $P<0.05$ ;与 E1 组比较,<sup>○</sup> $P<0.05$

2 各组大鼠腹膜组织病理形态观察(图 1) A、B 组可见腹膜连续间皮细胞,无纤维组织组织增生,无炎性细胞浸润。C 组腹膜大量间皮细胞破坏,不连续,间质裸露明显,大量纤维组织增生,可见大量炎性细胞浸润。D1、D2、D3、E1、E2、E3 组腹膜间皮细胞破坏,间质裸露不明显,可见纤维组织增生及炎细胞浸润。

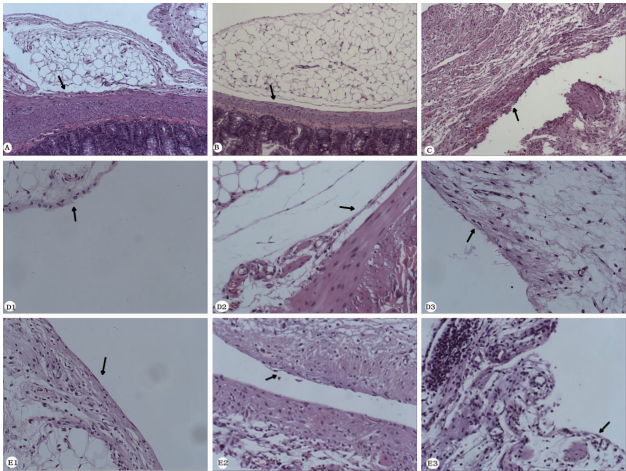


图 1 各组大鼠腹膜组织病理观察

(HE,A、B、C 组×10,D1、D2、D3、E1、E2、E3 组×20)

3 各组大鼠腹膜组织 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 蛋白及 mRNA 表达水平比较(表 3、4) C 组 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 mRNA 和蛋白表达量显著高于 B 组( $P<0.05$ );与 C 组比较,D1、D2、D3、E1、E2、E3 组 TGF-β<sub>1</sub>、Smad3 mRNA 和蛋白表达均显著下调( $P<0.05$ ),TGF-β<sub>3</sub> mRNA 和蛋白表达均显著升高( $P<0.05$ );D1、D2、E1、E2、E3 组 Smad7 蛋白及 mRNA 表达下调;D1、D2 组 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 和蛋白表达量显著低于 D3 组( $P<0.05$ ),TGF-β<sub>3</sub> mRNA 及蛋白表达高于 D3 组( $P<$

0.05)。E1、E2、E3 组间 TGF-β<sub>1</sub>、Smad3 mRNA 和蛋白表达相当( $P>0.05$ )。E3 组 TGF-β<sub>3</sub> mRNA 显著低于同期 E1、E2 组,Smad7 mRNA 及蛋白表达高于 E1、E2 组( $P<0.05$ )。D1 组 Smad7 mRNA 及蛋白平均表达量显著低于 D3 组( $P<0.05$ ),E1、E2 组 Smad7 mRNA 和蛋白平均表达量显著低于 E3 组( $P<0.05$ )。

表 3 各组大鼠 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 蛋白表达比较 (MOD 值,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别 | n | TGF-β <sub>1</sub>      | TGF-β <sub>3</sub>      | Samd3                  | Smad7                   |
|----|---|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| A  | 8 | 0.32±0.02               | 0.25±0.05               | 0.16±0.03              | 0.22±0.02               |
| B  | 8 | 0.33±0.02               | 0.22±0.02               | 0.16±0.02              | 0.20±0.02               |
| C  | 8 | 0.77±0.07*              | 0.42±0.04*              | 0.31±0.02*             | 0.66±0.02*              |
| D1 | 8 | 0.41±0.02 <sup>△△</sup> | 0.66±0.07 <sup>△△</sup> | 0.23±0.02 <sup>△</sup> | 0.56±0.04 <sup>△△</sup> |
| D2 | 8 | 0.43±0.03 <sup>△△</sup> | 0.64±0.02 <sup>△△</sup> | 0.24±0.02 <sup>△</sup> | 0.61±0.02 <sup>△</sup>  |
| D3 | 8 | 0.56±0.07 <sup>△</sup>  | 0.61±0.03 <sup>△</sup>  | 0.25±0.01 <sup>△</sup> | 0.64±0.03               |
| E1 | 8 | 0.39±0.02 <sup>△</sup>  | 0.67±0.02 <sup>△○</sup> | 0.23±0.03 <sup>△</sup> | 0.36±0.02 <sup>△○</sup> |
| E2 | 8 | 0.42±0.03 <sup>△</sup>  | 0.65±0.02 <sup>△○</sup> | 0.24±0.03 <sup>△</sup> | 0.46±0.06 <sup>△○</sup> |
| E3 | 8 | 0.49±0.08 <sup>△</sup>  | 0.62±0.03 <sup>△</sup>  | 0.22±0.05 <sup>△</sup> | 0.55±0.05 <sup>△</sup>  |

注:与 B 组比较,\* $P<0.05$ ;与 C 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与 D3 组比较,<sup>△△</sup> $P<0.05$ ;与 E3 组比较,<sup>○</sup> $P<0.05$ ;表 4 同

表 4 各组大鼠 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>3</sub>、Smad3、Smad7 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别 | n | TGF-β <sub>1</sub>      | TGF-β <sub>3</sub>      | Smad3                  | Samd7                   |
|----|---|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| A  | 5 | 1.06±0.14               | 1.52±0.47               | 1.18±0.34              | 1.16±0.10               |
| B  | 5 | 1.23±0.16               | 1.16±0.22               | 1.32±0.34              | 1.08±0.18               |
| C  | 5 | 4.16±0.33*              | 2.25±0.17*              | 2.32±0.43*             | 3.60±0.08*              |
| D1 | 5 | 1.92±0.10 <sup>△△</sup> | 3.62±0.19 <sup>△△</sup> | 1.45±0.30 <sup>△</sup> | 2.65±0.15 <sup>△△</sup> |
| D2 | 5 | 2.27±0.24 <sup>△△</sup> | 3.31±0.10 <sup>△</sup>  | 1.37±0.24 <sup>△</sup> | 2.92±0.11 <sup>△△</sup> |
| D3 | 5 | 2.67±0.27 <sup>△</sup>  | 3.03±0.28 <sup>△</sup>  | 1.47±0.23 <sup>△</sup> | 3.37±0.19               |
| E1 | 5 | 1.92±0.27 <sup>△</sup>  | 3.84±0.18 <sup>△○</sup> | 1.27±0.26 <sup>△</sup> | 1.75±0.05 <sup>△○</sup> |
| E2 | 5 | 2.04±0.22 <sup>△</sup>  | 3.43±0.14 <sup>△</sup>  | 1.46±0.41 <sup>△</sup> | 2.36±0.14 <sup>△○</sup> |
| E3 | 5 | 2.00±0.20 <sup>△</sup>  | 3.13±0.41 <sup>△</sup>  | 1.49±0.23 <sup>△</sup> | 2.61±0.22 <sup>△</sup>  |

讨 论

TGF-β 超家族由结构和功能相关的多肽生长因子组成,现发现有 6 种亚型(TGF-β<sub>1</sub>-6),TGF-β<sub>1</sub>、TGF-β<sub>2</sub>、TGF-β<sub>3</sub> 主要存在于哺乳动物体内<sup>[6]</sup>。TGF-β<sub>3</sub> 可部分阻断或下调 TGF-β<sub>1</sub> 的激活或表达,拮抗 TGF-β<sub>1</sub> 的作用<sup>[7]</sup>。Smad 蛋白存在于细胞质中,是目前发现的 TGF-β 唯一的作用底物,能是把 TGF-β 信号从细胞外传递到细胞核内,进而使相关 mRNA 表达<sup>[8]</sup>。激活的 TGF-β 与其特异性的细胞表面受体结合,通过胞内信号途径的各级磷酸化过程启动多种 Smad 成分,参与多脏器纤维化<sup>[9]</sup> 及各种粘连等疾病<sup>[10]</sup>。Smad 3 是 TGF-β 信号系统发挥促粘连作用的主要信号传递蛋白,Smad 7 具有抑制 Smad 3 磷

酸化从而阻断 TGF- $\beta$  信号系统的作用<sup>[11]</sup>。盆腔粘连其形成的病理生理机制包括间皮细胞的损伤和缺失、组织缺氧和炎症<sup>[12]</sup>，而 TGF- $\beta_1$  在通过抑制自然杀伤细胞促进内异细胞侵袭、增殖<sup>[13]</sup>，促进血管生成、浸润生长等多个环节中均存在重要作用，尤其在粘连的发生中更起到使动作用<sup>[14]</sup>。TGF- $\beta_1$  促进纤维母细胞增生胶原沉积和纤维蛋白形成，增加细胞外基质胶原合成，并减少降解，致使盆腔纤维化和粘连<sup>[15]</sup>，促使 EMS 症的发展，导致不孕。TGF- $\beta_1$  还可以作用于腹膜间皮细胞，诱导大鼠腹膜间皮细胞凋亡、破坏腹膜表层结构完整性<sup>[16]</sup>，最终导致腹膜纤维化或粘连形成。TGF- $\beta$  与 Smads 表达存在相关性，TGF- $\beta$  家族蛋白可能激活 Smad 蛋白并使其在细胞中的表达增加，如 TGF- $\beta_1$  可诱导细胞 Smad3 磷酸化，参与上皮间质化过程，促进纤维化发展<sup>[17]</sup>。故高表达的 TGF- $\beta_1$  与 TGF- $\beta_3$  有可能同时提高 Smad3 与 Smad7 表达。

EMS 属中医学“癥瘕”、“痛经”、“不孕”等范畴，其病理实质是“血瘀”，瘀血阻滞，日久不化而成癥瘕。笔者在师承李教授学术思想的基础上，提出从“郁”论治，提炼核心药物组成活血消异方。有研究表明活血化瘀中药能达到调节免疫及内分泌、改善局部血液循环、抑制血管生成的作用，可促进异位内膜细胞凋亡、粘连软化、包块吸收、恢复卵巢功能<sup>[18]</sup>。活血消异方以丹参、赤芍、莪术等活血消癥中药为主，共奏活血化癥、缓消癥块之效，另外配伍柴胡、香附疏肝理气，气顺则血调，达到调其气而破气血的作用。

本研究结果显示，活血消异方和 GnRH-a 在预防和治疗 MEs 盆腔粘连中有一定的作用，而且与药物开始干预时间有关，干预越早，盆腔粘连评分越低，疗效越好。可能是由于活血消异方可显著下调 TGF- $\beta_1$ 、Smad3，间接使抑制型 Smad7 表达降低。然而活血消异方如何协调发挥调控 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路的作用，仍有待进一步研究探索。

利益冲突：无。

## 参 考 文 献

- [1] Omwandho CO, Konrad L, Halis G, et al. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis[J]. Hum Reprod, 2010, 25(1): 101-109.
- [2] Pathil A, Mueller J, Ludwig JM, et al. Ursodeoxycholyt lysophosphatidylethanolamide attenuates hepatofibrogenesis by impairment of TGF- $\alpha$ 1, Smad2/3 signalling[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(22): 5113-5126.
- [3] 贺欣, 陶贵周. 丹参多酚酸盐通过 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路预防大鼠心肌纤维化的发展[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 85-89.
- [4] Haber E, Danenberg HD, Koroukhov N, et al. Peritoneal macrophage depletion by liposomal bisphosphonate attenuates endometriosis in the rat model[J]. Human Reprod, 2009, 24(2): 398-407.
- [5] 杨艳环, 赵瑞华, 徐彩. 活血消异方对子宫内异位症复发风险大鼠模型的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(7): 1911-1933.
- [6] Aupperle H, Baldauf K, März I. An immunohistochemical study of feline myocardial fibrosis[J]. J Comp Pathol, 2011, 145(2-3): 158-173.
- [7] 宋江南, 李校堃, 苏志坚, 等. TGF- $\beta_3$  生物学特性、功能与临床应用前景[J]. 药物生物技术, 2006, 13(2): 154-158.
- [8] Firszt R, Francisco D, Church TD, et al. Interleukin-13 induces collagen type-1 expression through matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor- $\beta_1$  in airway fibroblasts in asthma[J]. Eur Respir J, 2014, 43(2): 464-473.
- [9] Lan HY. Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [10] 朱燕, 曾莉, 李文林, 等. 川芎嗪纳米喷雾剂调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路抗术后大鼠腹腔粘连的实验研究[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(4): 347-350.
- [11] 武贵群, 高翔, 梅长林. TGF- $\beta$ /Smads 通路及肾脏纤维化研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(5): 459-461.
- [12] Atta HM. Prevention of peritoneal adhesions: A promising role for gene therapy[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(46): 5049-5058.
- [13] Young VJ, Ahmad SF, Brown JK, et al. Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF-beta $_1$  through an ID1 pathway in women with endometriosis[J]. Sci Rep, 2015, 5(18): 16859-16868.
- [14] Young VJ, Brown JK, Maybin JA, et al. Transforming growth factor-beta induced Warburg-like metabolic reprogramming may underpin the development of peritoneal endometriosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(9): 3450-3459.
- [15] Kumarswamy R, Volkman I, Jazbutyte V, et al. Transforming growth factor-beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32: 361-369.
- [16] 刘小贤, 汪卫, 汪圳, 等. 转化生长因子- $\beta_1$  对大鼠腹膜间皮细胞炎症因子及细胞外基质表达的影响[J]. 浙江医学, 2015, 37(4): 273-277.
- [17] 徐速, 曾莉. 三棱丸方对肠上皮细胞上皮间质转化 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(1): 125-127.
- [18] 陈晨, 刘倩, 高华. 活血化瘀药药理作用研究进展[J]. 中国药事, 2011, 25(6): 603-605.

(收稿: 2017-06-19 在线: 2018-06-04)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶