

盆舒颗粒对宫腔黏连模型大鼠子宫内膜 TGF- β 1、Smad3 的影响

蒋敏, 赵宏利, 杨汉铭

杭州市中医院, 浙江 杭州 310007

[摘要] 目的: 观察盆舒颗粒对宫腔黏连模型大鼠子宫内膜转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、信号传导蛋白 (Smad3) 的影响。
方法: 将 50 只成年雌性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组, 每组 10 只, 采用自制刮宫勺刮伤大鼠子宫内膜制作宫腔黏连模型, 各组分别给予相应的干预措施。在干预第 15 天摘取双侧子宫, 观察各组大鼠宫腔组织损伤病变情况, 并采用免疫组化法检测各组大鼠子宫组织中 TGF- β 1, Smad3 含量。**结果:** 模型组与正常组 95% 可信区间无重叠, 说明有显著性差异; 模型组与中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组 95% 可信区间均无重叠, 说明有显著性差异; 中药治疗组与 TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组 95% 可信区间重叠, 说明无显著性差异。TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组疗效最好。与正常组比较, 模型组大鼠子宫内膜上皮细胞 TGF- β 1、Smad3 表达显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组大鼠子宫内膜上皮细胞 TGF- β 1、Smad3 表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组 3 组大鼠子宫内膜上皮细胞 TGF- β 1、Smad3 表达之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 盆舒颗粒、TGF- β 1 抗体能改善宫腔黏连模型大鼠子宫病理变化, 降低 TGF- β 1、Smad3 表达, 具有潜在防治宫腔黏连的作用, 二者联合使用作用效果更为显著。

[关键词] 宫腔黏连; 盆舒颗粒; 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1); 信号传导蛋白 (Smad3); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R711.74 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0022-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.007

Penshu Granules Have Effect on TGF- β 1 and Smad3 of Endometrium in Model Rats with Intrauterine Adhesion

JIANG Min, ZHAO Hongli, YANG Hanming

Abstract: Objective: To observe the effect of Penshu granules on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and signal transduction proteins (Smad3) of endometrium in model rats with intrauterine adhesion. **Methods:** Divided 50 cases of adult female SD rats into the normal group, the model group, the Chinese medicine treatment group, the TGF- β 1 antibody intervention group and the TGF- β 1 antibody intervention plus Chinese medicine treatment group randomly, 10 cases in each group. After establishing model of intrauterine adhesion by using self-made curettage spoon to scratch the endometrium in model rats. Each group was given corresponding intervention, the bilateral uterus was taken to observe the lesion of uterine tissues of rats in each group on the 15th day of treatment, and the contents of TGF- β 1 and Smad3 of rats in each group were detected by immunohistochemical method. **Results:** The 95% confidence interval between the model group and the normal group was not overlapped, indicating significant difference. The 95% confidence interval between the model group and the Chinese medicine treatment group, the TGF- β 1 antibody intervention group or the TGF- β 1 antibody intervention plus Chinese medicine treatment group was not overlapped, indicating significant difference. The 95% confidence interval between the Chinese medicine treatment group and the TGF- β 1 antibody intervention group or the TGF- β 1 antibody intervention plus Chinese medicine treatment group was overlapped, indicating no significant difference. The curative effect in the TGF- β 1 antibody intervention plus Chinese medicine treatment group was the best. Compared with the normal group, the expression of TGF- β 1 and Smad3 of epithelial cells in endometrium was significantly increased in the model group, differences being

[收稿日期] 2017-10-18

[基金项目] 杭州市科技局项目 (20130733Q19)

[作者简介] 蒋敏 (1988-), 女, 医师, 研究方向: 中医妇科疾病。

[通信作者] 赵宏利, E-mail: z6hl@163.com。

significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of TGF- β 1 and Smad3 of epithelial cells in endometrium was significantly decreased in the Chinese medicine treatment group, the TGF- β 1 antibody intervention group and the TGF- β 1 antibody intervention plus Chinese medicine treatment group, differences being significant ($P < 0.05$). No significant difference was found in the comparisons of expression of TGF- β 1 and Smad3 between the the Chinese medicine treatment group, the TGF- β 1 antibody intervention group and the TGF- β 1 antibody intervention plus Chinese medicine treatment group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Penshu granules and TGF- β 1 antibody can improve the pathological changes of model rats with intrauterine adhesion, reduce the expression of TGF- β 1 and Smad3, and have the potential to control the intrauterine adhesion. The effect of the combination of the two is the more significant.

Keywords: Intrauterine adhesion; Penshu granules; Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1); Signal transduction proteins (Smad3); Animal experiment; Rats

宫腔黏连(IUA)是子宫内膜的一种损伤性疾病,临床表现为经期腹痛、月经量少、闭经、不孕等^[1]。近年来随着人工流产率的增加,宫腔黏连发病率逐年上升。有报道指出:宫腔黏连的发生有90%以上系刮宫所致^[2],其发病机制可能与体内促进或抑制组织纤维化的细胞因子转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、金属蛋白酶9(MMP-9)发生变化有关。本研究采用自制刮宫勺刮伤大鼠子宫内膜,制作符合宫腔黏连发病机制的模型,观察盆舒颗粒对宫腔黏连大鼠子宫 TGF- β 1、信号传导蛋白(Smad3)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用成年雌性SD大鼠50只,体质量(230 \pm 20)g,由浙江省实验动物中心提供,符合国家动物实验设施屏障环境标准,动物实验条件合格证号:SYXK(浙)2008-0113。

1.2 药物、试剂和设备 中药制剂“盆舒颗粒”,由当归、炒白术、延胡索、红藤、浙贝母、王不留行子等中药组成,由杭州市中医院制成颗粒剂。兔抗鼠 TGF- β 1 抗体、兔抗鼠 Smad3 抗体、兔免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);光学显微镜(蔡司光学仪器上海国际贸易有限公司)。

1.3 分组和模型的建立 利用 SPSS13.0 软件将选用的 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,即正常组、模型组、中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组,每组 10 只。除正常组外,其他 4 组大鼠用戊巴比妥钠(浓度为 0.4%)腹腔注射麻醉大鼠(50 mg/kg)后,无菌条件下,取下腹正中切口约 0.8~1.0 cm,开腹后暴露并固定子宫,用自制小刮勺刮伤子宫内膜,连续缝合完全关闭切口。需 TGF- β 1 抗体干预的 2 组实验大鼠在关腹前将 TGF- β 1 抗体注入子宫后关腹。

1.4 造模后处理 各组大鼠均于造模后第 2 天开始灌胃给药。中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组:每天按体表面积给予等效剂量的盆舒颗粒,按每只大鼠 10 g/(kg·d)灌胃给药,正常组、模型组、抗体干预组给予等容量生理盐水,共 14 天,中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组由于灌胃失误导致各有 1 只大鼠死亡,其余各组大鼠无死亡,将大鼠称体质量

后,开腹,手术摘取双侧子宫,将供 HE 染色、免疫组化检测的组织放入到 10%甲醛中固定。

1.5 HE 染色及免疫组化法 HE 染色方法:(1)烘片:37℃过夜;(2)脱蜡:二甲苯 I, 5 min;二甲苯 II, 15 min;无水酒精, 1 min;95%酒精, 1 min;80%酒精, 2 min;自来水洗, 3 次;(3)染色:苏木素染液, 5 min;自来水洗, 3 次;伊红酒精, 2 min;(4)透明、固封:80%酒精, 1 min;95%酒精 I, 2 min;95%酒精 II, 5 min;无水酒精 I, 10 min;无水酒精 II, 10 min;二甲苯 I, 5 min;二甲苯 II, 5 min;中性树胶封片。免疫组织化学检测方法:(1)60℃烤片 2 h;(2)脱蜡,二甲苯脱蜡 15 min, 3 次;(3)水化,依次经过无水乙醇,95%,90%,80%,70%,各 5 min,蒸馏水 5 min;(4)PBS 洗 5 min, 3 次;(5)热修复抗原:枸橼酸盐缓冲液(约 92~95℃)煮沸(沸水浴)修复 15 min,自然凉至室温。PBS 洗 5 min, 3 次;(6)3%双氧水封闭 20 min, PBS 洗 5 min, 3 次;(7)正常山羊血清封闭,37℃ 20 min;(8)一抗孵育,4℃过夜;(9)复温 20 min, PBS 洗 5 min, 3 次;(10)二抗孵育,37℃ 20 min(二抗为生物素标记的羊抗兔 IgG)PBS 洗 5 min, 3 次;(11)DBA 显色;(12)苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。

1.6 观察指标及检测方法 采用光学显微镜观察各组大鼠子宫组织的光镜形态学变化,病理分级标准见表 1。采用免疫组化法检测各组大鼠子宫组织中 TGF- β 1, Smad3 表达情况。

1.7 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 各组大鼠子宫病变程度比较 见表 2。经 Ridit 分析,除模型组外,其他各组 Ridit 值均小于 0.5。模型组与正常组 95%可信区间无重叠,说明有显著性差异;模型组与中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组 95%可信区间均无重叠,说明有显著性差异;中药治疗组与 TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预+中药治疗组 95%可信区间重叠,说明无显著性差异。结果还提示:3 个治疗组间存在疗效差异,由于病变程度等级是按“好”到“差”排列,

所以 Ridit 值最小者疗效最优，故 TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组疗效最好。

表 1 病理分级标准

病变程度	宫腔上皮黏连融合	腔壁结构改变	上皮细胞变性坏死	内膜充血水肿	腺体形态失常	急慢性炎细胞浸润	成纤维细胞增生	分
正常	0	0	0	0	0	0	0	
轻度	1	1	1	1	1	1	1	
中度	2	2	2	2	2	2	2	
重度	3	3	3	3	3	3	3	

注：按上述规定标准，将每项指标相加得分后，根据分数将大鼠子宫总体病变程度由正常、轻度、中度、重度分为四级：0~2 分为 0 级；3~5 分为 I 级；6~8 分为 II 级；大于等于 9 分为 III 级。

表 2 各组大鼠子宫病变程度比较

组别	n	病变程度(例)				Ridit 值	95%可信区间
		0 级	I 级	II 级	III 级		
正常组	10	7	3	0	0	0.201 7	0.143 7~0.423 7
模型组	10	0	0	2	8	0.792 1	0.613 2~0.971 0
中药治疗组	9	0	3	5	1	0.406 4	0.217 8~0.595 0
TGF-β1 抗体干预组	9	0	2	7	0	0.404 9	0.216 3~0.593 5
TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组	10	0	4	5	1	0.377 6	0.198 7~0.556 6

2.2 各组大鼠子宫内膜上皮细胞 TGF-β1 表达比较 见表 3。与正常组比较，模型组大鼠子宫内膜上皮细胞 TGF-β1 表达显著升高，差异有统计学意义(P < 0.05)。与模型组比较，中药治疗组、TGF-β1 抗体干预组、TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组大鼠子宫内膜上皮细胞 TGF-β1 表达显著降低，差异均有统计学意义(P < 0.05)。中药治疗组、TGF-β1 抗体干预组、TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组 3 组之间比较无统计学差异(P > 0.05)。

表 3 各组大鼠子宫内膜上皮细胞 TGF-β1 表达比较(̄x ± s)

组别	n	TGF-β1
正常组	10	10.000 0 ± 1.563 4
模型组	10	13.500 0 ± 0.849 8 ^①
中药治疗组	9	11.444 4 ± 1.236 0 ^②
TGF-β1 抗体干预组	9	11.000 0 ± 1.500 0 ^②
TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组	10	10.500 0 ± 1.354 0 ^②

与正常组比较，①P < 0.05；与模型组比较，②P < 0.05

2.3 各组大鼠子宫内膜上皮细胞 Smad3 表达比较 见表 4。与正常组比较，模型组大鼠子宫内膜上皮细胞 Smad3 表达显著升高，差异有统计学意义(P < 0.05)。与模型组比较，中药治疗组、TGF-β1 抗体干预组、TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组大鼠子宫内膜上皮细胞 Smad3 表达显著下降，差异均有统计学意义(P < 0.05)。中药治疗组、TGF-β1 抗体干预组、TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组 3 组之间比较无统计学差异(P > 0.05)。

表 4 各组大鼠子宫内膜上皮细胞 Smad3 表达比较(̄x ± s)

组别	n	Smad3
正常组	10	8.400 0 ± 1.712 7
模型组	10	13.500 0 ± 1.354 0 ^①
中药治疗组	9	9.555 6 ± 1.424 0 ^②
TGF-β1 抗体干预组	9	9.444 4 ± 1.424 0 ^②
TGF-β1 抗体干预 + 中药治疗组	10	9.200 0 ± 1.316 5 ^②

与正常组比较，①P < 0.05；与模型组比较，②P < 0.05

3 讨论

宫腔黏连为现代医学病名，散见于中医月经过少、闭经、腹痛等病证之中。宫腔手术损伤胞宫气血，扰乱肾—天癸—冲任—胞宫轴，导致肾气亏损，精血匮乏，冲任失养，胞脉空虚，不能按时蓄溢；《景岳全书·妇人规》曰：“瘀血留滞作癥，唯妇人 有之，其证或由经期，或由产后，凡内伤生冷，或外受风寒……总由血动之时，余血未净，而一有所逆，则留滞日积，而渐以成癥矣”，而后余血未净，邪气乘虚入侵与血搏结，凝结成瘀，内阻胞宫。现代中医研究表明，气滞血瘀、脾虚失运、湿浊内阻会引起黏连性腹痛^[4]，也有学者认为宫腔黏连术后月经量少的主要病机以肾虚为本，血瘀为标^[5-6]。

本课题组在继承古人理论的基础上，结合现代医学知识，根据宫腔黏连临床表现及危害特点，归纳宫腔操作后宫腔黏连病因病机，主要为虚、瘀、湿三端。针对宫腔黏连的发病特点，运用传统的中医经典理论，在继承老中医学术经验的基础上，总结“通经养血，散结除湿”治法，创立中药复方“益舒

颗粒”：当归乃补血之圣药，和血补血；白芍养血敛阴，柔肝止痛；白术为脾脏补气健脾第一要药；泽泻、茯苓渗水利湿，利尿消肿；川芎是血中之气药，活血行气止痛，善“下调经水，中开郁结”；上六味源自《金匱要略》当归芍药散，旨在疏肝健脾，活血化瘀，健脾利湿，佐以延胡索活血散瘀，利气止痛；莪术破血行气消积；红藤清热解毒除湿；使以牛膝逐瘀通经，引血下行；浙贝母清热化痰，散结消痞；王不留行子活血通经。合方共奏活血化瘀、通经祛湿止痛之效。

TGF- β 是一种强效免疫抑制因子，在急性炎症反应中，该因子可以增加巨噬细胞对炎性细胞和受损伤实质细胞的吞噬作用，同时抑制组织中的巨噬细胞活性。TGF- β 可直接增加间质蛋白质的合成与分泌，促进胶原与基质的黏附作用，参与最初的炎性反应、血管形成、胶原沉积以及最终组织塑形，是诱导瘢痕形成的重要因子，在宫腔黏连患者子宫内膜中呈高表达^[7-8]。Smad 蛋白是转化生长因子信号转导通路中关键的介质，可将信号由细胞膜转至细胞核，使得 TGF- β 能在不同的环境下发挥它的多种功能，产生各种效应^[9]。TGF- β 发挥作用主要是通过与其靶细胞(主要是成纤维细胞)上的受体结合而激活 TGF- β /Smads 信号转导通路，使胶原过度沉积导致纤维化的发生发展。相关研究表明 Smad3 通路抑制剂的表达可以阻断 TGF- β 信号转导途径，该方法可能为纤维化疾病提供一种新的治疗手段^[10-11]。

本实验研究发现，模型组大鼠子宫内膜 TGF- β 1 及 Smad3 较正常组显著增高($P < 0.05$)，中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组与 TGF- β 1 抗体干预 + 中药治疗组 TGF- β 1 及 Smad3 的表达较模型组明显降低($P < 0.05$)。Smad3 在子宫损伤大鼠子宫内膜中呈高表达，中药治疗组、TGF- β 1 抗体干预组、TGF- β 1 抗体干预 + 中药治疗组子宫内膜组织中的 Smad3 的表达受抑制，说明 TGF- β 1/Smad3 信号环节是子宫黏连形成的途径之一。中药复方盆舒颗粒、TGF- β 1 抗体预防宫腔黏连的作用可能是通过抑制这一通路来实现的。

[参考文献]

- [1] 杨志伟, 姜凯辉, 周世英. 宫腔内粘连的诊断[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(16): 2011-2013.
- [2] Kodaman PH, Arici A. Intra-uterine adhesions and fertility outcome: how to optimize success? [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007, 19(3): 207-214.
- [3] 王静, 杨军, 刘超. 盆腔炎颗粒对大鼠慢性子宫内膜炎疗效的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(1): 56-58.
- [4] 陈奇. 粘连性腹痛的辨治体会[J]. 井冈山医专学报, 2005, 12(1): 96-97.
- [5] 叶青, 高进军, 郭瑞华. 活血补肾法加宫腔镜分离术治疗宫腔粘连所致月经过少、继发性闭经、继发不孕 57 例临床观察[J]. 中医杂志, 2007, 48(9): 806-808.
- [6] 江伟华, 徐旭群. 麝灵汤周期疗法配合宫腔镜治疗宫腔粘连 49 例[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(3): 170.
- [7] 谷庆阳. TGF- β 及其信号分子 smad3 在伤口愈合过程中的作用[J]. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 2002, 22(1): 67-69.
- [8] 刘琳琳, 刘玉环, 蒋东桥, 等. CTGF 和 TGF- β 1 的表达与宫腔粘连形成的相关性[J]. 山东医药, 2012, 52(12): 17-19.
- [9] 陈琛, 叶冬梅. 转化生长因子- β /Smad 信号通路研究进展[J]. 医学分子生物学杂志, 2006, 3(2): 126-128.
- [10] 田建广, 雄杰, 夏照帆. TGF- β 1/Smad3 信号通路与创伤修复[J]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2007, 2(6): 349-350.
- [11] 苏丽婷, 夏时海. Smad 蛋白在转化生长因子- β 信号转导通路中的作用与机制[J]. 医学分子生物学杂志, 2008, 5(4): 352-355.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)