

红蓝花酒对大鼠宫腔粘连的改善作用及 TGF- β 1/Smads 通路的调节作用研究*

黄琼, 吴媛媛, 赵军玲, 张胜男, 王东芳, 罗志娟**

(广西中医药大学附属瑞康医院 南宁 530011)

摘要:目的 研究红蓝花酒对大鼠宫腔粘连的改善作用及 TGF- β 1/Smads 通路的调节作用。方法 75 只大鼠随机分为造模组(63 只)及正常对照组(12 只),采用刮勺搔刮法建立宫腔粘连大鼠模型,随机取 3 只大鼠进行造模验证后,分为宫腔粘连模型组、红蓝花酒低、中、高剂量组及阳性对照组,12 只/组。红蓝花酒各剂量组分别灌胃给予大鼠 0.5 g·kg⁻¹、1 g·kg⁻¹、2 g·kg⁻¹ 的红蓝花酒,阳性对照组给予大鼠 1.028 mg·kg⁻¹ 的戊酸雌二醇,宫腔粘连模型组及正常对照组给予大鼠等量生理盐水,每天 1 次,连续给药 24 天。采用酶联免疫吸附法(ELISA)法检测大鼠血清及子宫组织肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1 β 、IL-6 水平,苏木精-伊红(HE)染色法检测大鼠子宫组织病理学变化,并测量子宫内膜厚度,计算子宫内膜腺体数量,实时定量聚合酶链式反应(PCR)检测子宫组织 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 mRNA 水平,免疫印迹法(Western blot)检测大鼠子宫组织 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 蛋白水平。结果 宫腔粘连模型组血清及子宫组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,子宫内膜厚度,子宫组织 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 mRNA 及蛋白水平较正常对照组均显著升高($P < 0.05$),子宫内膜腺体显著减少($P < 0.05$);红蓝花酒各剂量组及阳性对照组血清及子宫组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,子宫内膜厚度,子宫组织 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 mRNA 及蛋白水平较宫腔粘连模型组显著降低($P < 0.05$),大鼠子宫内膜腺体数量显著增加($P < 0.05$),且各项指标变化与红蓝花酒的剂量表现出依赖性。结论 红蓝花酒能够修复大鼠宫腔粘连,抑制大鼠体内及子宫组织炎症水平,进而抑制大鼠子宫内壁的纤维化的发生及进展,其机制可能与调节 TGF- β 1/Smads 通路有关。

关键词:红蓝花酒 宫腔粘连 子宫内膜厚度 子宫内膜腺体 戊酸雌二醇 TGF- β 1/Smads 通路

doi: 10.11842/wst.20220129002 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

宫腔粘连又称为 Asherman 综合征,是由于外科手术及感染等多种诱因引起患者子宫内膜基底层受损,最终导致患者出现月经异常及反复流产等病理性改变^[1-2],严重影响患者生育能力及身心健康。目前临床中对于宫腔粘连的治疗方法有限,目前较为成熟的为宫腔镜治疗等外科治疗手段,但存在复发率高,预后较差等多种缺点,同时,目前尚未有针对宫腔粘连治疗的特异性药物,临床中现有药物只能缓解宫腔粘连

的进展,并不能彻底治愈,所以对于宫腔粘连治疗药物的研发仍是当前的主要任务之一。

TGF- β 1/Smads 通路与宫腔粘连的发生及进展密切相关,研究证实 TGF- β 1/Smads 通路的激活及相关蛋白水平的异常升高是导致宫腔粘连发生及进展的重要因素^[4-5],Zhang 等^[4]研究表明,TGF- β 1/Smads 通路的异常激活会导致子宫内膜纤维化的发生,进而导致宫腔粘连的发生,而抑制 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋

收稿日期:2022-01-29

修回日期:2022-07-10

* 广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题(GZZC2020118):红蓝花酒用于预防人流术后宫腔粘连的临床研究,负责人:黄琼;广西壮族自治区中医药民族医药事业传承与发展专项资金项目([2022]2):罗志娟广西名中医传承工作室建设项目,负责人:罗志娟。

** 通讯作者:罗志娟,主任医师,主要研究方向:不孕不育、生殖内分泌及妇科炎症的临床与科研。

白的异常激活,则能够促进子宫内膜血管生成,增加子宫内膜供血,提高子宫内膜容受性;Chen等^[5]研究表明,TGF- β 1/Smads通路及相关蛋白水平的异常升高会影响子宫内膜腺体数量,导致子宫内膜纤维化面积增大,抑制TGF- β 1/Smads通路蛋白水平则能够显著改善子宫内膜病理性改变。

红蓝花酒是以中医学理论为基础,由中药材红蓝花制成的中药制剂,具有活血化瘀的作用,用于治疗多种妇科疾病^[3]。中医学著作《金匱要略》记载:红蓝花酒具有行血润燥,消肿止痛之功效,具有行血散瘀之功效,主治妇女血凝气滞之症。作者于临床工作中发现红蓝花酒对于宫腔粘连有预防作用,但目前没有红蓝花治疗宫腔粘连的机理研究。本文拟通过研究红蓝花酒对于宫腔粘连大鼠的病理改善作用及对TGF- β 1/Smads通路的调节作用,为红蓝花酒的药理研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

75只雌性SD大鼠,购自广西医科大学,实验动物生产许可证号SCXK(桂)2020-0003,饲养于广西中医药大学实验动物房SYXK(桂)2019-0001,温度22-25℃,相对湿度40%-70%,自然光照,自由饮食。

1.2 药品与试剂

红蓝花酒由红蓝花(*Carthamus tinctorius* L.由广西中医药大学田慧教授鉴定为正品)20g(北京同仁堂责任有限公司,批号1908051),白酒200mL(56°,北京红星股份有限公司)组成,置于煎锅中煎煮制成0.2g·mL⁻¹(以红蓝花含量计)的中药制剂;实时定量PCR检测试剂盒(货号D7268M)、IL-1 β (货号PI303)、TNF- α (货号PT516)、IL-6(货号PI328)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(货号A0208)购自碧云天生物科技有限公司;HE试剂盒(货号G1120)、RNA提取试剂盒(货号R1200)、戊酸雌二醇(货号IE1280)购自北京索莱宝科技有限公司;TGF- β 1(货号ab215715)、Smad2(货号ab40855)、Smad3(货号ab40854)、GAPDH(货号ab181602)兔单克隆抗体艾博抗贸易有限公司;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(万类生物科技有限公司,货号WLA004)PCR引物设计及合成由赛默飞世尔科技有限公司完成。

1.3 仪器与设备

Mini-PROTEAN Tetra Cell电泳仪及Gel Doc XR

凝胶成像仪(美国伯乐生命医学产品有限公司);TGL-18M高速冷冻台式离心机(山东博科科学仪器有限公司);Multiskan FC酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);HM340E石蜡切片机(金华市华速科技有限公司);KH-BL石蜡包埋机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司);CKX53荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);T100 PCR仪(美国伯乐生命医学产品有限公司)。

1.4 造模、分组及给药

75只大鼠随机分为造模组(63只)及正常对照组(12只),造模组大鼠参照文献方法^[6]建立宫腔粘连大鼠模型,具体方法为,大鼠使用10%水合氯醛进行麻醉,取仰卧位,沿腹部中线做2-3cm的纵形切口,取大鼠左侧子宫,于子宫上三分之一处做约3mm纵形切口,用直径为2mm的刮匙搔刮宫腔至宫腔壁出现粗糙感,使用生理盐水冲洗宫腔后缝合切口,继续饲养14天后,随机取3只大鼠进行子宫组织病理学检查,以大鼠子宫组织明显病理性改变视为造模成功。造模完成后,随机分为宫腔粘连模型组、红蓝花酒低、中、高剂量组及阳性对照组,12只/组。红蓝花酒各剂量组分别灌胃给予大鼠0.5g·kg⁻¹、1g·kg⁻¹、2g·kg⁻¹^[7]的红蓝花酒,阳性对照组灌胃给予1.028mg·kg⁻¹^[8]的戊酸雌二醇,宫腔粘连模型组及正常对照组灌胃给予等量生理盐水,每天1次,连续24天^[8]。

1.5 大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平的测定

腹腔注射10%水合氯醛对大鼠麻醉后,腹主动脉取血,4℃静置1h,8000r·min⁻¹,4℃离心10min,取上清液,使用检测试剂盒测定TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。

1.6 大鼠子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平的测定

每组取6只大鼠,分离子宫组织并使用组织匀浆器裂解匀浆,8000r·min⁻¹,4℃条件下,离心10min,取上清液,使用试剂盒检测TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。

1.7 大鼠子宫组织病理学检查

颈椎脱臼法处死大鼠并分离子宫组织,4%中性甲醛中固定24h,然后置于石蜡包埋机中包埋后,使用石蜡切片机切片后,使用HE染色试剂盒常规进行HE染色,每只大鼠取3张切片,每张切片取5个视野,在显微镜下进行盲法进行组织病理学检查,并测量子宫内膜厚度,计算子宫内膜腺体数量。

1.8 大鼠子宫组织TGF- β 1、Smad2及Smad3 mRNA水平测定

颈椎脱臼法处死大鼠后,分离子宫组织,使用试

剂盒提取子宫组织总RNA后逆转录为cDNA,使用梯度PCR仪检测大鼠子宫组织TGF- β 1、Smad2、Smad3、GAPDH表达量。用于实时定量PCR的引物序列为:TGF- β 1:正向引物:5'-TGCTCCACAATGTCAAGG-3',反向引物:5'-CAAAACAGGCACACAAGC-3';Smad2:正向引物:5'-ATCCTGCCAGCCAGCTCCACC G-3',反向引物:5'-TGGTCAAATCCTGTGCTCATACAT-3';Smad3:正向引物:5'-TGAAAAATTGAAC CACCCGGC-3',反向引物:5'-CCAAGGAGTTGCTCC CGTTAG-3';GAPDH:正向引物:5'-GTCTGCTCCTT GCTTTTTGC-3',反向引物:5'-TGCTCGCTTCA GTTAATCC-3'。PCR反应体系为反应缓冲液10 μ L, One-Step Enzyme Mix 2 μ L,正向及反向引物各1 μ L, 模版DNA 2 μ L,加入无RNA酶水调整体积至20 μ L, 反应程序为95 $^{\circ}$ C预变性2 min,95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火/延伸30 s,共计40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算TGF- β 1、Smad2及Smad3相对表达量。

1.9 大鼠子宫组织TGF- β 1、Smad2及Smad3蛋白水平的测定

颈椎脱臼法处死大鼠后,分离子宫组织,置于组织匀浆器中,加入组织裂解液,于冰盒上研磨匀浆后,12000 $r \cdot \min^{-1}$,4 $^{\circ}$ C条件下离心10 min,取上清液,测定总蛋白浓度,取相当于50 μ g蛋白的组织裂解液,上样、电泳分离,使用封闭液封闭,4 $^{\circ}$ C条件下,分别使用TGF- β 1、Smad2、Smad3、GAPDH兔单克隆抗体(1:1000稀释)孵育过夜,使用PBST洗涤3次,每次5 min,使用山羊抗兔IgG抗体(1:2000稀释)在室温条件下孵育1 h,洗涤3次,置于凝胶成像仪拍照,照片使用Image J 1.8.0软件进行定量分析。

1.10 数理统计

所有数据使用SPSS 26.0软件分析,计量资料多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,采用Graphpad 9.2.0软件进行作图。

2 结果

2.1 红蓝花酒对宫腔粘连大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的影响

如表1所示,结果表明,宫腔粘连模型组血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平较正常对照组显著升高($P < 0.05$);与宫腔粘连模型组比较,红蓝花酒各剂量组及

表1 大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6比较结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	TNF- α (ng·L $^{-1}$)	IL-1 β (ng·L $^{-1}$)	IL-6(ng·L $^{-1}$)
正常对照组	56.81 \pm 1.75	234.63 \pm 3.74	7.67 \pm 0.46
宫腔粘连模型组	189.74 \pm 1.23 ^a	537.22 \pm 2.78 ^a	20.14 \pm 1.03 ^a
红蓝花酒低剂量组	143.75 \pm 1.82 [#]	415.60 \pm 2.09 [#]	16.35 \pm 1.65 [#]
红蓝花酒中剂量组	106.04 \pm 1.84 ^{#a}	347.63 \pm 5.17 ^{#a}	12.05 \pm 0.71 ^{#a}
红蓝花酒高剂量组	66.38 \pm 2.09 ^{#ab}	289.57 \pm 3.46 ^{#ab}	9.46 \pm 0.54 ^{#ab}
阳性对照组	78.88 \pm 2.33 ^{#abc}	329.34 \pm 5.41 ^{#abc}	10.71 \pm 0.73 ^{#ab}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与宫腔粘连模型组比较,[#] $P < 0.05$;与红蓝花酒低剂量组比较,[#] $P < 0.05$;与红蓝花酒中剂量组比较,^b $P < 0.05$;与红蓝花酒高剂量组比较,^c $P < 0.05$ 。

表2 大鼠子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6比较结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TNF- α (ng·L $^{-1}$)	IL-1 β (ng·L $^{-1}$)	IL-6(ng·L $^{-1}$)
正常对照组	110.21 \pm 1.23	224.13 \pm 1.32	201.72 \pm 5.61
宫腔粘连模型组	182.16 \pm 0.79 ^a	335.72 \pm 1.67 ^a	468.92 \pm 5.71 ^a
红蓝花酒低剂量组	157.83 \pm 0.83 [#]	289.38 \pm 1.38 [#]	379.53 \pm 5.39 [#]
红蓝花酒中剂量组	139.72 \pm 1.92 ^{#a}	264.29 \pm 1.07 ^{#a}	284.66 \pm 6.67 ^{#a}
红蓝花酒高剂量组	119.04 \pm 0.88 ^{#ab}	237.19 \pm 1.31 ^{#ab}	223.88 \pm 2.24 ^{#ab}
阳性对照组	121.17 \pm 0.73 ^{#ab}	241.97 \pm 0.82 ^{#ab}	261.19 \pm 4.91 ^{#abc}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与宫腔粘连模型组比较,[#] $P < 0.05$;与红蓝花酒低剂量组比较,[#] $P < 0.05$;与红蓝花酒中剂量组比较,^b $P < 0.05$;与红蓝花酒高剂量组比较,^c $P < 0.05$ 。

阳性对照组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著降低($P < 0.05$),且随着红蓝花酒剂量的增加,大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平逐渐降低。

2.2 红蓝花酒对宫腔粘连大鼠子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的影响

如表2所示,结果表明,宫腔粘连模型组子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平较正常对照组显著升高($P < 0.05$);与宫腔粘连模型组比较,红蓝花酒各剂量组及阳性对照组大鼠子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著降低($P < 0.05$),且随着红蓝花酒剂量的增加,大鼠子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平逐渐降低。

2.3 红蓝花酒对宫腔粘连大鼠子宫组织病理学的影响

红蓝花酒对宫腔粘连大鼠子宫组织病理学的影响如图1及表3所示。结果表明,正常对照组大鼠子宫组织细胞结构正常,无明显病理性改变;宫腔粘连模型组与正常对照组比较,子宫内膜厚度增加,细胞排列不整齐,可见炎症浸润;红蓝花酒各剂量组及阳性对照组大鼠与宫腔粘连模型组比较,子宫组织病理学显著恢复。宫腔粘连模型组大鼠子宫内膜厚度较正常对照组显著增加($P < 0.05$),腺体数量显著减少

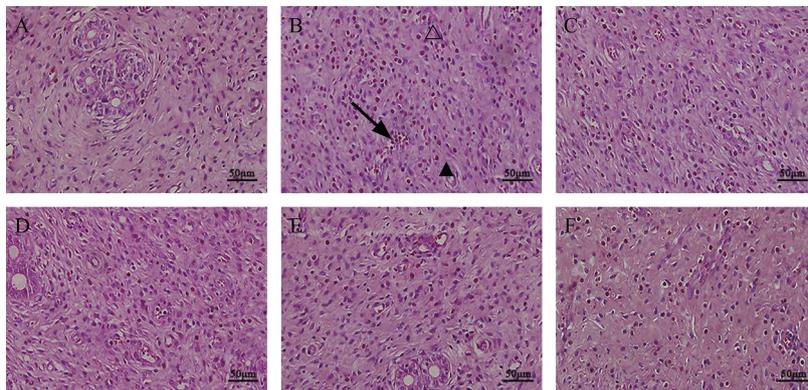


图1 大鼠子宫组织病理学检查结果(200×)

注:A:正常对照组;B:宫腔粘连模型组;C:红蓝花酒低剂量组;D:红蓝花酒中剂量组;E:红蓝花酒高剂量组;F:阳性对照组;∩:炎症浸润;△:子宫内 膜纤维化;▲:子宫内 膜腺体。

表3 大鼠子宫内膜厚度及腺体数量比较结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	子宫内膜厚度(μm)	腺体数量(个)
正常对照组	311.15±8.19	8.08±1.05
宫腔粘连模型组	678.41±6.92 [*]	1.27±0.87 [*]
红蓝花酒低剂量组	539.67±7.32 [#]	2.54±0.62 [#]
红蓝花酒中剂量组	443.11±9.39 ^{#a}	4.87±0.71 ^{#a}
红蓝花酒高剂量组	365.11±7.75 ^{#ab}	6.42±0.63 ^{#ab}
阳性对照组	403.28±9.19 ^{#abc}	5.47±0.46 ^{#abc}

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.05$;与宫腔粘连模型组比较,[#] $P<0.05$;与红蓝花酒低剂量组比较,^a $P<0.05$;与红蓝花酒中剂量组比较,^b $P<0.05$;红蓝花酒高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

表4 大鼠子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3 mRNA水平比较结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	TGF-β1 mRNA	Smad2 mRNA	Smad3 mRNA
正常对照组	0.56±0.07	1.13±0.09	0.72±0.16
宫腔粘连模型组	5.14±0.18 [*]	7.78±0.13 [*]	6.10±0.43 [*]
红蓝花酒低剂量组	3.77±0.24 [#]	5.22±0.44 [#]	5.14±0.61 [#]
红蓝花酒中剂量组	1.38±0.15 ^{#a}	3.39±0.45 ^{#a}	3.38±0.36 ^{#a}
红蓝花酒高剂量组	0.76±0.05 ^{#ab}	1.59±0.18 ^{#ab}	1.05±0.08 ^{#ab}
阳性对照组	0.88±0.08 ^{#abc}	2.04±0.24 ^{#abc}	1.81±0.22 ^{#abc}

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.05$;与宫腔粘连模型组比较,[#] $P<0.05$;与红蓝花酒低剂量组比较,^a $P<0.05$;与红蓝花酒中剂量组比较,^b $P<0.05$;红蓝花酒高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

($P<0.05$);红蓝花酒各剂量组及阳性对照组与宫腔粘连模型组比较,子宫内膜厚度显著降低($P<0.05$),腺体数量显著增加($P<0.05$),且随着红蓝花酒剂量的增加,大鼠子宫内膜厚度逐渐降低,腺体数量逐渐增加。

2.4 红蓝花酒对宫腔粘连大鼠子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3 mRNA水平的影响

红蓝花酒对宫腔粘连大鼠子宫组织TGF-β1、

Smad2及Smad3 mRNA水平的影响如表4所示,结果表明,宫腔粘连模型组子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3 mRNA水平较正常对照组显著升高($P<0.05$),红蓝花酒各剂量组及阳性对照组与宫腔粘连组比较,子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3 mRNA水平显著降低($P<0.05$),且随着红蓝花酒剂量的增加,大鼠子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3 mRNA水平逐渐降低。

2.5 红蓝花酒对宫腔粘连大鼠子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3蛋白水平的影响

红蓝花酒对宫腔粘连大鼠子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3蛋白水平的影响如图2所示,结果表明,与正常对照组比较,宫腔粘连模型组子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3蛋白水平显著升高($P<0.05$);红蓝花酒各剂量组及阳性对照组与宫腔粘连模型组比较,子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3蛋白水平显著降低($P<0.05$),且随着红蓝花酒剂量的增加,大鼠子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3蛋白水平逐渐降低。

3 讨论

宫腔粘连是以月经异常、不孕或反复流产等为主要临床特征的妇科常见疾病,其常见病因为妊娠或非妊娠性子宫创伤等原因引起的子宫内膜损伤,进而导致宫腔部分或全部闭塞。近年来研究表明,宫腔粘连的发生与感染、医源性损伤、流产及遗传因素等多种因素密切相关^[9-10]。目前,对于子宫粘连的治疗,主要采用宫腔镜治疗及开腹手术治疗等外科治疗方式,然而外科治疗方式存在发生穿孔、出血、休克等多种并发症的风险,同时对于不同程度的宫腔粘连患者,其治疗效果不一,且存在复发率高等多种缺点。因此,

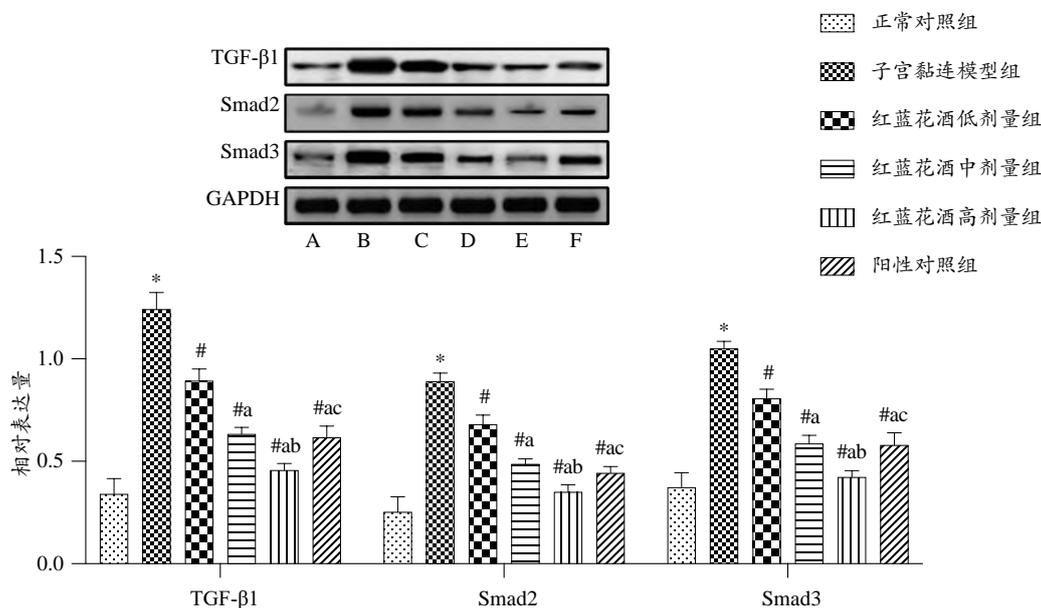


图2 大鼠子宫组织TGF-β1、Smad2及Smad3蛋白比较结果

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与宫腔粘连模型组比较,# $P<0.05$;与红蓝花酒低剂量组比较,^a $P<0.05$;与红蓝花酒中剂量组比较,^b $P<0.05$;与红蓝花酒高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

对于宫腔粘连的治疗药物的探索和研究,仍是目前临床的主要工作。

红蓝花酒是以红蓝花及白酒制成的中药制剂,其最早记载于中医学著作《金贵要略》中,具有消肿止痛、行血润燥的作用,用于治疗妇人血气刺痛证、风邪侵袭、血瘀不行等病症。方中红蓝花具有活血化瘀、利血止痛的功效,白酒温和其血,两者共用,则其效力增加。现代医学研究表明,红蓝花酒具有显著的抗炎镇痛作用^[11];临床研究表明其对于痛经的治疗具有显著的效果^[12]。尽管作者在临床工作发现红蓝花酒在宫腔粘连中的预防作用,但目前红蓝花酒预防宫腔粘连的作用机理尚不明确,因此本文通过研究红蓝花酒对于宫腔粘连的药理作用,为宫腔粘连的治疗药物研发提供参考和依据。

TNF- α 、IL-1 β 及IL-6是反应体内炎症水平的指标,同时参与调节TGF- β 1/Smads通路水平,参与组织器官纤维化的发生。其中,黄莺等^[13]研究表明,抑制子宫组织TNF- α 水平能够阻断TGF β 1/Smads通路,进而抑制组织纤维化的发生;岳薇薇等^[14]通过研究发现,抑制TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平则可以抑制TGF- β 1/Smad2信号通路的激活,缓解组织纤维化的发生;郑敏麟等^[15]研究同样表明IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高与组织纤维化的发生有关,而抑制IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平则下调TGF- β 1/Smad3通路,进而抑制肾组织纤

维化的发生。本实验研究表明,宫腔粘连模型组大鼠血清及子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平较正常对照组升高,给予大鼠不同剂量的红蓝花酒后,大鼠子宫组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平呈剂量依赖性明显降低,同时,大鼠子宫内膜厚度显著降低,腺体数量显著增加,提示红蓝花酒能够显著抑制宫腔粘连大鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平,进而抑制大鼠宫腔粘连的发生及进展,修复宫腔粘连大鼠组织病理改变,抑制宫腔粘连病理进展。

TGF- β 1/Smads通路是与组织纤维化有关的重要信号通路,近年来研究发现TGF- β 1/Smads通路在宫腔粘连的发生发展中起到重要作用。靳灵鸽等^[16]研究表明,TGF- β 1/Smads通路的激活及相关蛋白水平的升高会促进宫腔粘连患者病情进展;谭雅莉等^[17]研究表明,子宫组织TGF- β 1水平的升高与宫腔粘连的发生及进展有关,而抑制TGF- β 1水平能够抑制子宫内膜的纤维化,进而抑制宫腔粘连的发生及进展;张力方等^[18]研究表明中到重度宫腔粘连的发生与子宫组织TGF- β 1水平的升高有关,而抑制子宫内膜TGF- β 1的表达则能够显著提高宫腔粘连患者的宫腔镜治疗效果;高航等^[19]则报道了子宫组织TGF- β 1水平的升高会增加患者子宫内膜息肉术后发生宫腔粘连风险。周曼萍等^[20]研究报道了宫腔粘连患者子宫组织中Smad2和Smad3水平的升高参与宫腔粘连的发生发

展;谭丽萍等^[21]则报道了抑制宫腔粘连大鼠子宫内膜 Smad3 水平可有效缓解子宫内膜纤维化的进展,进而抑制宫腔粘连的发生。由此可见,TGF- β 1/Smads 通路水平的升高与宫腔粘连的发生密切相关,而调节 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白的水平可能是治疗宫腔粘连的有效途径。本实验通过研究红蓝花酒对宫腔粘连大鼠的子宫组织病理学改善作用及对 TGF- β 1/Smads 通路的调节作用,结果表明,与正常对照组比较,宫腔粘连模型组大鼠子宫组织 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 mRNA 及蛋白水平明显升高,给予大鼠不同剂量的红蓝花酒后,大鼠子宫组织 TGF- β 1 及 Smads mRNA 及蛋白水平呈剂量依赖性明显降低,提示红蓝花酒对于子宫粘连大鼠的改善作用可能是通过调节

TGF- β 1/Smads 通路实现的。本研究首次通过研究红蓝花酒对于宫腔粘连模型大鼠的治疗作用,并对其作用机制进行探讨,结果证实了红蓝花酒能够呈剂量依赖性的显著抑制宫腔粘连大鼠体内炎症水平,并显著提高大鼠子宫内膜腺体数量,明显修复大鼠子宫内膜组织病理学病变,同时,本研究首次指出红蓝花酒对于宫腔粘连的治疗作用可能是通过调节 TGF- β 1/Smads 通路实现的,为红蓝花酒在宫腔粘连的治疗中的应用及药理作用研究提供参考。

综上所述,红蓝花酒能够修复大鼠宫腔粘连,抑制大鼠体内及子宫组织炎症水平,进而抑制大鼠子宫内膜的纤维化,其机制可能与调节 TGF- β 1/Smads 通路有关。

参考文献

- Benor A, Gay S, DeCherney A. An update on stem cell therapy for Asherman syndrome. *J Assist Reprod Genet*, 2020, 37(7):1511-1529.
- Dreisler E, Kjer J J. Asherman's syndrome: Current perspectives on diagnosis and management. *Int J Womens Health*, 2019, 11:191-198.
- 冯文全. 红蓝花酒新制剂及相关药效学研究. 太原:山西中医学院硕士学位论文, 2012.
- Zhang Z H, Li S, Deng J, et al. Aspirin inhibits endometrial fibrosis by suppressing the TGF- β 1-Smad2/Smad3 pathway in intrauterine adhesions. *Int J Mol Med*, 2020, 45(5):1351-1360.
- Chen J X, Yi X J, Gu P L, et al. The role of KDR in intrauterine adhesions may involve the TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(10):e8324.
- 汪沙, 郭正晨, 汤一群, 等. 人脐带间充质干细胞促进宫腔粘连大鼠子宫内膜增殖与分化. *国际妇产科学杂志*, 2021, 48(3):309-313.
- 李玉香, 赵云芳, 刘茂林, 等. 红蓝花酒口服液治疗痛经 63 例临床观察. *河南中医药学刊*, 1994, 9(5):39-40.
- 王显, 何援利, 蔡慧华, 等. 戊酸雌二醇对大鼠宫腔粘连形成的预防作用观察. *解放军医学杂志*, 2016, 41(3):175-179.
- Salazar C A, Isaacson K, Morris S. A comprehensive review of Asherman's syndrome: Causes, symptoms and treatment options. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2017, 29(4):249-256.
- Wang Y G, Lyu W F, Xu W C, et al. Asherman syndrome in adenomyosis treated with uterine artery embolization: Incidence predictive factors. *Radiol Med*, 2020, 125(5):437-443.
- 苗明三. 对红蓝花酒抗炎镇痛作用的研究. *中国医药学报*, 1997, 12(4):26-27.
- 李玉香, 赵云芳, 刘茂林, 等. 红蓝花酒口服液治疗痛经 110 例. *北京中医药大学学报*, 1995, 18(4):37-38.
- 黄莺, 徐芳. 虎杖总黄酮对肺间质纤维化大鼠上皮间质转化过程中 TGF β 1-smad 信号通路的影响. *中成药*, 2021, 43(1):204-207.
- 岳薇薇, 叶婷, 王卫群. 黄葵素对糖尿病肾病大鼠氧化应激、炎症反应和 TGF- β 1/Smad2 信号通路的影响. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(11):1156-1161.
- 郑敏麟, 伞勤, 刘广. 益肾降浊冲剂对 5/6 肾切除模型大鼠肾纤维化及 NF- κ B 和 TGF- β 1/Smad3 信号通路的影响. *山西中医药大学学报*, 2021, 22(2):105-109.
- 靳灵鸽, 巫剑红, 张宇迪. MiR-195 在宫腔粘连组织中的表达及其与 TGF- β 1/Smads、FGF2/FGFR1/ERK 通路的关系. *海南医学院学报*, 2020, 26(7):529-532.
- 谭雅莉, 徐佳, 蒋冬, 等. 从 TGF- β 1-PI3K/Akt 信号通路研究妇科千金胶囊治疗宫腔粘连大鼠作用机制. *中国中药杂志*, 2020, 45(19):4705-4711.
- 张力方, 赵艳玲, 于波, 等. 宫腔镜电切术联合地塞米松宫腔灌注对中重度宫腔粘连患者 VEGF、ER 和 TGF- β 1 的影响研究. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(1):70-73.
- 高航, 师振华, 刘湘萍, 等. 子宫内膜息肉患者 PAI-1、TGF- β 1 表达与息肉切除术后发生宫腔粘连关系. *中国计划生育学杂志*, 2021, 29(1):156-159.
- 周曼萍, 何援利, 乔琳, 等. 转化生长因子- β 1 及 Smad2/3 在宫腔粘连患者子宫内膜组织中的表达及意义. *广东医学*, 2014, 35(12):1844-1847.
- 谭丽萍, 吴美丽, 任婧婧, 等. 丹白颗粒对宫腔粘连大鼠 TGF- β 1/Smad 信号通路及内膜纤维化的影响. *河北医学*, 2021, 27(7):1057-1062.

Study on the Improvement Effect of Honglanhua Wine on Rat Uterine Adhesion and the Regulation Effect of TGF- β 1/Smads Pathway

Huang Qiong, Wu Yuanyuan, Zhao Junling, Zhang Shengnan, Wang Dongfang, Luo Zhijuan
(Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

Abstract: Objective To study the effect of Honglanhua wine on the improvement of intrauterine adhesions in rats and the regulation of TGF- β 1/Smads pathway. Methods 75 rats were randomly divided into model building group (63 rats) and normal control group (12 rats). A rat model of intrauterine adhesions was established by scraping with a spatula, and 3 rats were randomly selected for model verification. The rest of rats were randomly divided into uterine adhesion model group, honglanhua wine low, medium and high dose groups and positive control group, with 12 rats per group. Rats in the low, medium and high doses of honglanhua wine were given 0.5 g·kg⁻¹, 1 g·kg⁻¹, 2 g·kg⁻¹ honglanhua wine by gavage respectively, while the positive control group was given Estradiol valerate of 1.028 mg·kg⁻¹ by gavage, intrauterine adhesion model group and normal control group were given the same amount of normal saline, once a day for 24 days. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect rat serum and uterine tissue TNF- α , IL-1 β , IL-6 levels, hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to detect rat uterine histopathological changes, and measure the endometrial thickness, calculate the number of endometrial glands. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the levels of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 mRNA in the endometrial tissue, and Western blot was used to detect rats Uterine tissue TGF- β 1, Smad2 and Smad3 protein levels. Results Compared with the normal control group, the uterine adhesion model group rat serum and endometrial tissue TNF- α , IL-1 β , IL-6 levels, endometrial thickness, endometrial tissue TGF- β 1, Smad2 and Smad3 mRNA and protein levels were significantly increased ($P<0.05$), and the number of endometrial glands in rats was significantly reduced ($P<0.05$); compared with the uterine adhesion model group, the serum levels and endometrial tissue TNF- α , IL-1 β , IL-6 levels of the rats in the honglanhua wine groups and the positive control group, endometrial thickness, endometrial tissue TGF- β , Smad2 and Smad3 mRNA and protein levels were significantly reduced ($P<0.05$), the number of rat endometrial glands was increased significantly ($P<0.05$), and the changes of various indicators were dependent on the dose of Safflower wine. Conclusion Safflower wine repaired the state of intrauterine adhesions in rats, and inhibited the level of inflammation of rats with intrauterine adhesions, and thereby inhibited endometrial fibrosis in rats. The mechanism may be related to the regulation of the TGF- β 1/Smads pathway.

Keywords: Honglanhua wine, Intrauterine adhesions, Endometrial thickness, Endometrial glands, Estradiol valerate, TGF- β 1/Smads pathway

(责任编辑: 李青)