

补肾活血方联合宫腔灌注治疗对宫腔粘连相关机制 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 的影响分析

汤懿懿, 刘恒炼, 白殊同, 翁双燕

(重庆市中医院妇科/重庆市中医院中医药防治自身免疫疾病重庆市重点实验室, 重庆 400021)

【摘要】目的:探讨补肾活血方及宫腔灌注治疗对宫腔粘连患者临床症状的改善及对转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、Smad2 和 Smad3 的影响。**方法:**选择 2017 年 7 月至 2018 年 7 月重庆市中医院妇科收治的宫腔粘连患者 60 例, 依据随机数字表法分为实验组和对照组, 每组各 30 例。对照组采用戊酸雌二醇治疗, 观察组采用补肾活血方联合丹参注射液宫腔灌注治疗。观察 2 组患者临床症状改善情况。采用 ELISA 法检测 2 组基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinases-3, MMP-3)及基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)水平的变化。采用 Western blot 和 Q-RT-PCR 法检测 2 组患者治疗前后子宫内膜组织 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平及 mRNA 水平。**结果:**与治疗前比较, 2 组患者子宫内膜厚度、MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 水平明显增加, 子宫内膜血流参数(pulsatility index, PI)、阻力指数(resistance index, RI)、粘连类型、粘连范围、月经情况及总分均有所降低。实验组子宫内膜厚度、MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 水平高于对照组, PI、RI、粘连类型、粘连范围、月经情况及总分均低于对照组(均 $P < 0.05$)。与治疗前比较, 2 组患者 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平及 mRNA 水平均有所降低。实验组 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平及 mRNA 水平均低于对照组($P < 0.05$)。**结论:**补肾活血方及宫腔灌注治疗可改善宫腔粘连血流参数, 预防宫腔粘连的再次发生, 其机制可能与上调 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 的表达, 下调 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 表达水平有关。

【关键词】补肾活血方; 宫腔灌注治疗; 宫腔粘连; 转化生长因子- β 1; Smad2/3

【中图分类号】R711.74

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-03-14

Effect of kidney-tonifying and blood-activating decoction combined with intrauterine perfusion on intrauterine adhesion mechanisms of TGF- β 1, Smad2 and Smad3

Tang Sisi, Liu Henglian, Bai Shutong, Weng Shuangyan

(Department of Gynecology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine/Chongqing
Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine to Prevent and Treat Autoimmune Diseases,
Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of kidney-tonifying and blood-activating decoction combined with intrauterine perfusion on improvement of clinical symptoms and transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), Smad2, and Smad3 in patients with intrauterine adhesions. **Methods:** A total of 60 patients with intrauterine adhesions admitted to our hospital from July 2017 to July 2018 were enrolled and equally divided into the experimental group and the control group in accordance with the random number table. The control group was treated with estradiol valerate, and the experimental group was treated with kidney-tonifying and blood-activating decoction combined with intrauterine perfusion of Danshen injection. Clinical improvement in two groups was observed. Levels of matrix metalloproteinases-2(MMP-2), matrix metalloproteinases-3(MMP-3) and matrix metalloproteinases-9(MMP-9) in two groups were detected by ELISA. Levels of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 protein and mRNA in the endometrial tissues in two groups before and after treatment were detected by Western blot and Q-RT-PCR.

Results: After treatment, the endometrium thickness, MMP-2, MMP-3 and MMP-9 levels were significantly increased in both groups, and the endometrial blood flow parameters of pulsatility index(PI), resistance index(RI), adhesion type, adhesion range, menstrual status and total score were all decreased. The en-

作者简介: 汤懿懿, Email: 224130985@qq.com,

研究方向: 女性不孕、盆腔炎、子宫内膜异位症等妇科疾病。

通信作者: 翁双燕, Email: 382550331@qq.com。

基金项目: 重庆市卫计委中医药科技资助项目(编号: ZY201702007)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190912.1341.004.html>

(2019-09-16)

ometrium thickness, MMP-2, MMP-3 and MMP-9 levels in the experimental group were higher than those in the control group; the PI, RI, adhesion type, adhesion range, menstrual status and total score were lower than those in the control group (all $P < 0.05$). After treatment, levels of TGF- β 1, Smad2, and Smad3 protein and mRNA were reduced in both groups. Levels of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 protein and mRNA in the experimental group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Kidney-tonifying and blood-activating decoction and intrauterine perfusion can improve the blood flow parameters of intrauterine adhesion and prevent the recurrence of intrauterine adhesion. The mechanism may be related to the up-regulation of MMP-2, MMP-3 and MMP-9 expression, and the down-regulation of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 expression.

[Key words] kidney-tonifying and blood-activating decoction; intrauterine perfusion; intrauterine adhesion; transforming growth factor- β 1; Smad2/3

宫腔粘连 (intrauterine adhesion, IUA) 主要是由创伤和感染等原因损伤内膜基层细胞, 使得子宫壁发生粘连, 进而导致宫腔形态和功能异常的妇科疾病, 临床常表现为月经量较少、继发性闭经及复发性流产等^[1]。大多数宫腔粘连患者有人工流产及子宫内膜切除术等宫腔操作史或宫内感染史, 其中 90% 与人工流产有关^[2-3]。IUA 发病机制尚未完全阐明。研究表明, IUA 的形成机制是子宫内膜纤维化, 其过程可能与体内某些促进与抑制组织纤维化的细胞因子的变化密切相关^[4]。如转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、Smad3、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、激素受体 (estrogen receptor, ER)、胰岛素样生长因子及其受体 (insulin-like growth factor-I and its receptor, IGF-I/IGF-IR)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等, 可能参与宫腔粘连的形成, 其中研究比较多的是 TGF- β 1、Smad3、MMP-9 等。TGF- β 1 是纤维化发生发展中的关键启动因子, Smad 蛋白是 TGF- β 1 作用的直接底物, TGF- β 1 与特异性受体结合激活 TGF- β 1/Smad 信号通路, 促使成纤维细胞增殖和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积, 诱导组织纤维化; 其中 Smad2 或 Smad3 的磷酸化是 TGF- β 1/Smad 通路激活的标志。而补肾活血方是补肾温阳及活血祛瘀类药物。研究发现, 补肾类中药能有效缓解腰膝酸软等症状, 温阳类中药可明显改善腹痛和畏寒等症状^[5]。肾为冲任之本, 生殖之源, 肾气充盛则天癸盈足, 改善垂体-下丘脑-卵巢-

性腺轴功能。活血类药物可以祛瘀血, 生新血, 血行气运, 改善子宫动静脉血液循环。因此本研究通过观察补肾活血方及宫腔灌注治疗对宫腔粘连患者临床症状的改善及对 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 的影响, 分析药效并研究可能的机制。因此, 本研究拟对宫腔粘连患者应用补肾活血方及宫腔灌注治疗干预方法, 观察补肾活血方及宫腔灌注治疗对宫腔粘连患者临床症状的改善及对 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 的影响和可能机制, 探讨补肾活血方及宫腔灌注治疗宫腔粘连的可能性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2017 年 7 月至 2018 年 7 月重庆市中医院妇科收治的宫腔粘连患者 60 例, 所有患者均符合《妇产科学》中 IUA 的诊断标准^[6], 且近期内未服用同类中药及激素。依据随机数字表法分为实验组和对照组, 每组各 30 例。实验组患者年龄 21~40 岁, 平均年龄 (30.25 ± 3.17) 岁; 已婚 17 例, 未婚 13 例。对照组患者年龄 20~40 岁, 平均年龄 (31.45 ± 3.29) 岁; 已婚 16 例, 未婚 14 例。2 组患者年龄及婚姻状况等一般资料比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。本研究获重庆市中医院医学伦理委员会批准。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 参照《妇产科学》《中华妇产科学》《现代宫腔镜诊断治疗学》及《妇科内镜学》2001 版拟定: ①有人工流产、药物流产后清宫、中期妊娠引产或足月产后刮宫、诊断性刮宫、子宫肌瘤摘除术、子宫内膜切除术等宫腔操作史或宫腔感染史; ②宫腔操作术后出现月经过少、稀发、继发甚或闭经; 或有流产、不孕; 或伴有周期性下腹痛、腰痛、肛门坠胀; ③闭经者尿人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic go-

nadotropin, HCG) 检测、血清激素水平测定正常;雌、孕激素序贯试验:阴性。④盆腔 B 超:宫腔内膜线不规则,或内膜菲薄,回声紊乱或宫颈和(或)宫腔内可见积血;⑤子宫输卵管造影术、宫腔镜检见宫腔内粘连影像。

1.2.2 中医诊断标准 参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》《中医妇科学》及《中医诊断学》拟定宫腔粘连肾虚血瘀证。①主症:宫腔手术后经量明显渐少,经行时间明显缩短;少于 2 d,甚或点滴即净;经色淡暗或紫暗,质稀,有血块;甚或月经停闭不行。②次症:经行少腹隐痛或刺痛;经前乳胀,头晕耳鸣,腰膝酸软,面色黯淡或无华,倦怠乏力,双腿尤甚,畏寒肢冷,夜尿频多,性欲减退,口干不欲饮,失眠健忘。③舌脉:舌质淡黯,舌边有瘀点或有瘀斑,苔少,脉沉涩或细弦。具备 2 项或 2 项以上主症,1 项或 1 项以上次症,结合舌、脉即可诊断。

1.2.3 纳入标准 ①符合西医宫腔粘连诊断标准者,经宫腔镜检查确诊为宫腔粘连者;②符合中医辨证属肾虚血瘀型;③本试验前 1 个月未进行相关治疗,或虽经外院治疗,但病情无明显改善,已放弃原治疗方案者;④闭经者人工周期测试阴性,基础体温呈双相,性激素六项在正常范围,年龄 19~45 岁;⑤白带常规、生殖道衣原体、支原体正常,子宫附件 B 超提示无异常病变;⑥愿意参加本临床试验配合观察并签署书面知情同意书。

1.2.4 排除标准(包括不适应证及剔除标准) ①急性、亚急性生殖道炎症患者;②各种因素致探针或宫腔镜不能进入宫腔者;③合并有心脑血管、肝、肾及造血系统等严重疾病者;④下丘脑-垂体-卵巢轴异常所致的月经失调;⑤患有其他可导致月经异常的内分泌疾病;⑥生殖系统先天性缺陷和畸形;⑦对本试验药物已知成分过敏者;⑧宫腔镜手术证实合并有其他子宫内疾患者;⑨近期(3 个月内)有子宫穿孔或子宫手术史者;需长期使用抗凝药物者;近 1 个月内用激素治疗者;⑩术前 3 d 有同房史者,或 β -HCG 检测阳性者。

1.3 治疗方法

治疗前 2 组患者均于月经干净后 3 d 进行宫腔镜检查评分并接受宫腔镜下粘连分离术治疗。手术主刀:由高年资主治以上并取得宫腔粘连分离术手术准入资格医师操作。患者取截石位,用宫颈钳夹宫颈前唇。以探针探明宫腔深度和方向。宫颈扩张棒逐号扩张宫颈 4.5~9.5 号。用生理性氯化钠作为膨宫介质连续灌注膨宫,膨宫压为 80~110 mmHg。宫腔镜下仔细观察宫颈管、宫颈内口、宫腔形态、内膜结构等,检查宫底,宫腔前、后、左、右壁,再检查双侧子宫角及双侧输卵管开口。根据粘连的范围、性质和程度评分,分别应用探针、扩张棒、刮匙、微型剪、针状电极等器械分离,直至恢复正常宫腔结构。膜性粘连可以用微型剪刀分离,肌性粘连可用针状电极或环状电极分离。操作应沿宫腔中线向两侧进行,注

意子宫腔的对称性。最终将宫腔镜置于宫腔中央宫颈内口上方位置可以同时看到双侧输卵管开口为满意宫腔。锥取少许粘连组织或内膜送病理检查。术后上圆形或 T 形节育器 3 个月。对于宫底粘连者上 T 环,双侧壁粘连者上圆形环,若混合粘连则上 T+圆环。术后应用 48 h 抗生素预防感染。

对照组:于术后第 2 天口服戊酸雌二醇(补佳乐, Bayer Vital GmbH, 国药准字 H20120369) 2 mg/次, 2 次/d, 连服 21 d 后停药, 10 d 后改用地屈孕酮(达芙通, Duphaston, 雅培贸易有限公司, 批件号: 2013S00092) 10 mg/次, 2 次/d。有月经者来潮后第 5 天开始进行下一周期治疗, 无月经者于停药 7 d 后开始进行下一周期治疗, 连续进行 3 个月经周期的治疗(实验使用药物的周期)。并于患者阴道出血干净后 3 d, 阴道环境良好, 常规消毒后, 将自制宫腔注射管顺子宫曲度缓慢插入宫腔, 当接触至子宫底部时, 后退 1~2 cm, 采用自制宫腔注射管将 5 mL 0.9% 生理盐水在无阻力的情况下缓慢注入宫腔, 注射完后, 抽吸少许空气将剩余药物全部推入宫腔。患者平卧休息 30 min 后结束。一个周期连续 3 次, 连续治疗 3 个周期。

实验组:于术后第 2 天开始服用补肾活血方, 方药组成:菟丝子、茯苓、鹿角霜、川牛膝、莪术及紫河车各 12 g, 制黄精、杜仲、丹参、熟地、当归、益母草各 15 g, 制香附、白芍、山茱萸、淫羊藿、桂枝、乳香、没药、巴戟天各 10 g, 桃仁、红花及血竭各 6 g(重庆市中医院中药房)。每次 50 mL, 3 次/d, 连服 3 个周期。并于患者阴道出血干净后 3 d, 阴道环境良好, 常规消毒后, 将自制宫腔注射管顺子宫曲度缓慢插入宫腔, 当接触至子宫底部时, 后退 1~2 cm, 采用宫腔注射管将 5 mL 丹参注射液(正大青春宝)在无阻力的情况下缓慢注入宫腔, 注射完后, 抽吸少许空气将剩余药物全部推入宫腔。患者平卧休息 30 min 后结束。一个周期连续 3 次, 连续治疗 3 个周期。2 组患者于疗程结束后复查宫腔镜并取样送检。

1.4 观察指标

1.4.1 粘连范围 2 组患者治疗前 1 d 和治疗后 1 d 根据宫腔粘连严重程度分别评分。依据粘连范围、粘连类型和月经情况将宫腔粘连分为 I、II、III 3 型。宫腔粘连 I 级:总分 1~4 分;宫腔粘连 II 级:总分 5~8 分;宫腔粘连 III 级:总分 9~12 分;粘连范围:1/3 计 1 分, 1/3~2/3 计 2 分, >2/3 计 4 分;粘连类型:薄膜计 1 分, 纤维性计 2 分;致密肌计 4 分;月经状况:恢复正常计 1 分;月经稀少计 2 分;闭经计 4 分。

1.4.2 子宫内膜厚度 使用阴道超声检测 2 组患者治疗前 1 d 和治疗后 1 d 子宫内膜厚度, 取矢状断面距宫底 2 cm 处测量子宫肌层与内膜交界面距离。

1.4.3 子宫内膜血流参数 采用阴道超声检测患者治疗前 1 d 和治疗后 1 d 子宫内膜血流参数搏动指数(pulsatility index, PI)和阻力指数(resistance index, RI)。

1.4.4 2 组患者 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 水平 采用子宫内
膜取样器取出患者治疗前 1 d 和治疗后 1 d 的子宫内
膜组织,用生理盐水洗净残留血液后进行研磨,将配置好含有蛋
白酶抑制剂的哺乳动物组织蛋白裂解液 500 μ L 加入 1.5 mL
离心管,将研磨好的组织转移到 1.5 mL 离心管中,充分混
匀,静置 10 min,14 000 r/min 离心 10 min,取上清,按照试剂
盒的操作流程,采用 ELISA 法测定 MMP-2(试剂盒批号:lot
0727180171)、MMP-3(试剂盒批号:lot 0728180172)和 MMP-
9(试剂盒批号:lot 0727180174)水平,上述 ELISA 试剂盒均
购自温州普诺生物有限公司。

1.4.5 2 组患者 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平 使用
Western blot 测定。采用子宫内
膜取样器取出患者治疗前 1 d
和治疗后 1 d 的子宫内
膜组织,用生理盐水洗净残留血液后
进行研磨,将配置好含有蛋白酶抑制剂的哺乳动物组织蛋白
裂解液 500 μ L 加入 1.5 mL 离心管,将研磨好的组织转移到
1.5 mL 离心管中,充分混匀,静置 10 min,14 000 r/min 离心
10 min,取上清,加入新的 1.5 mL 离心管中,一抗孵育 PVDF
膜(4 $^{\circ}$ C,14 h),一抗孵育结束后,用 TBST 洗液洗膜,5 min/
次,共 4 次。洗好后将 PVDF 膜与稀释后的二抗室温孵育 1 h;
二抗孵育完毕,取出 PVDF 膜,用 TBST 洗液洗膜,10 min/次,
共 3 次。滴加显色液显色,静置 3 min,借助凝胶成像系统扫
描分析拍照。

1.4.6 2 组患者 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 基因水平 使用
Q-RT-PCR 法测定 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 mRNA[引物合
成公司:生工生物工程(上海)股份有限公司]水平。严格按照
说明书提取组织总 RNA 并将总 RNA 逆转录为 cDNA,进行
q-PCR 反应。

1.4.7 引物序列 引物序列见表 1。

1.4.8 实验用仪器及耗材 A1300 生物安全柜(Thermo 公
司,美国);CO₂ 细胞培养箱(Thermo 公司,美国);蛋白质电泳

仪(BIO-RAD 公司,美国);ChemiDoc XRS+成像系统(BIO-
RAD 公司,美国);EVOS-FL 型倒置显微镜[赛默飞世尔科技
(中国)有限公司];Fresco 17 型离心机(美国 Bio-Rad Labo-
ratories 公司);Synergy HTX 型酶标仪(香港 Gene Company
Limited 公司);Bio-Rad CFX Connect 荧光定量 PCR 仪(BIO-
RAD 公司,美国)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计学分析,TGF- β 1、
Smad2 和 Smad3 水平等计量指标采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表
示,组间 TGF- β 1 等指标水平比较采用独立 t 检验,治疗前后
比较采用配对 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组子宫内膜厚度及其血流参数的比较

治疗前,2 组之间的子宫内膜厚度、PI 和 RI 无统计学差
异($t=0.447, 0.580, 0.365, P=0.539, 0.412, 0.627$)。治疗后,对
照组的子宫内膜厚度、PI 和 RI 较治疗前无统计学差异($t=$
 $0.668, 0.593, 0.484, P=0.331, 0.405, 0.511$),实验组的子宫内
膜厚度较治疗前明显增加($t=2.887, P=0.039$),PI 和 RI 较治
疗前明显降低($t=2.963, 2.752, P=0.036, 0.041$),实验组的子
宫内膜厚度明显大于对照组($t=3.227, P=0.028$),PI 和 RI 明显
小于对照组($t=3.136, 3.020, P=0.030, 0.032$)。见表 2。

2.2 2 组粘连评分的比较

治疗前,2 组患者粘连类型、粘连范围、月经情况及总分
比较,均无统计学差异($t=0.474, 0.218, 0.556, 0.320, P=0.518,$
 $0.803, 0.443, 0.679$)。治疗后,实验组与对照组的粘连类型、
粘连范围、月经情况及总分均较治疗前明显降低($t=2.816,$
 $2.977, 3.074, 3.352, 3.257, 0.290, 3.709, 3.549, P=0.038, 0.035,$
 $0.031, 0.012, 0.018, 0.038, 0.000, 0.000$),且实验组的粘连类

表 1 引物序列

序列名称	上游	下游
TGF- β 1	5'-CCAAGCTTATGCCGCCCTCCGGGC-3'	5'-GCGTCGACCAGCTGCACCTGCAGGAG-3'
Smad2	5'-TTCCAGACTTTGTGCTGTCCAGTAA-3'	5'-AGGGCAGAGGCTCCACTGACTA-3'
Smad3	5'-AAACCAGGCTGGCTAAACAAGTG-3'	5'-GCAACAGCAGCAGTGAAGGTG-3'
GADPH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-ATGCTGCTGAAGACGCCACT-3'

表 2 2 组子宫内膜厚度及其血流参数比较($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	时间	子宫内膜厚度(mm)	PI	RI
对照组	治疗前	7.86 $\pm$ 0.86	1.67 $\pm$ 0.17	1.05 $\pm$ 0.12
	治疗后	8.12 $\pm$ 0.82	1.58 $\pm$ 0.16	1.02 $\pm$ 0.12
实验组	治疗前	7.88 $\pm$ 0.87	1.68 $\pm$ 0.18	1.07 $\pm$ 0.11
	治疗后	8.96 $\pm$ 0.95 ^{ab}	1.41 $\pm$ 0.15 ^{ab}	0.92 $\pm$ 0.10 ^{ab}

注:a,与治疗前比较, $P<0.05$;b:与对照组比较, $P<0.05$

型、粘连范围、月经情况及总分均明显低于对照组($t=3.158$ 、 3.804 、 3.915 、 0.320 , $P=0.020$ 、 0.000 、 0.000 、 0.006)。见表 3。

2.3 2 组 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 水平的比较

治疗前,2 组的 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 蛋白水平比较,无统计学差异($t=0.614$ 、 0.573 、 0.297 , $P=0.381$ 、 0.422 、 0.803)。治疗后,实验组与对照组的 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 水平均较治疗前明显升高($t=3.872$ 、 3.580 、 3.057 、 2.979 、 3.608 、 2.875 , $P=0.000$ 、 0.000 、 0.032 、 0.035 、 0.000 、 0.039),且实验组的 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 水平均明显高于对照组($t=4.226$ 、 3.917 、 4.254 , $P=0.000$ 、 0.000 、 0.000)。见表 4。

2.4 2 组 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平的比较

治疗前,2 组的 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平比较,无统计学差异($t=0.512$ 、 0.373 、 0.526 , $P=0.486$ 、 0.623 、 0.479)。

治疗后,实验组与对照组的 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白均较治疗前明显降低($t=3.779$ 、 3.680 、 3.904 、 3.877 、 3.795 、 3.669 , $P=0.000$ 、 0.000 、 0.000 、 0.000 、 0.000 、 0.000),且实验组的 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白均明显低于对照组($t=4.447$ 、 4.168 、 4.230 , $P=0.000$ 、 0.000 、 0.000)。如图 1 所示。

2.5 2 组 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 mRNA 水平的比较

治疗前,2 组的 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 mRNA 水平比较,无统计学差异($t=0.281$ 、 0.342 、 0.430 , $P=0.813$ 、 0.657 、 0.562)。治疗后,实验组与对照组的 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 mRNA 均较治疗前明显降低($t=3.813$ 、 3.779 、 4.075 、 3.877 、 3.926 、 3.897 , $P=0.000$ 、 0.000 、 0.000 、 0.000 、 0.000 、 0.000),且实验组 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 mRNA 均明显低于对照组($t=4.316$ 、 4.252 、 4.419 , $P=0.000$ 、 0.000 、 0.000)。如图 2 所示。

表 3 2 组粘连评分的比较 ($n=30$, $\bar{x} \pm s$, 分)

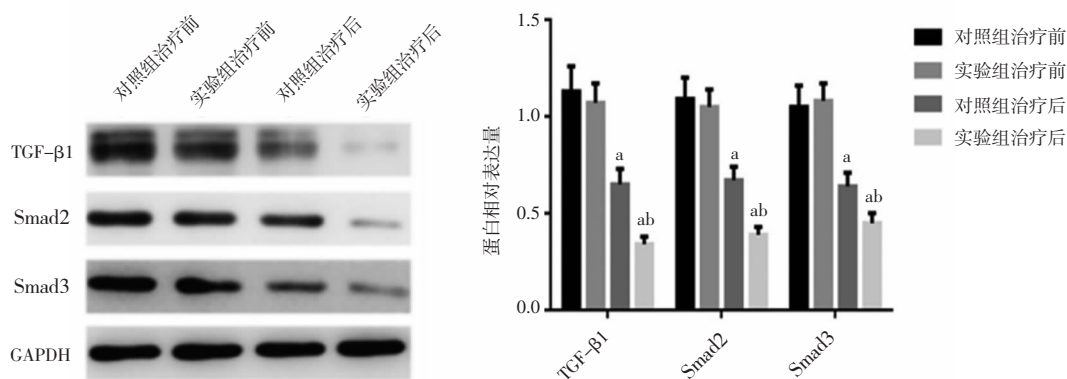
组别	时间	粘连类型	粘连范围	月经情况	总分
对照组	治疗前	3.72 ± 0.38	3.62 ± 0.36	3.29 ± 0.33	10.64 ± 0.11
	治疗后	2.94 ± 0.29^a	2.54 ± 0.25^a	2.68 ± 0.27^a	8.16 ± 0.82^a
实验组	治疗前	3.81 ± 0.38	3.67 ± 0.37	3.34 ± 0.33	10.75 ± 0.10
	治疗后	2.34 ± 0.24^{ab}	2.31 ± 0.23^{ab}	2.26 ± 0.23^{ab}	6.97 ± 0.70^{ab}

注:a,与治疗前比较, $P < 0.05$; ab:与对照组比较, $P < 0.05$

表 4 2 组 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 水平的比较 ($n=30$, $\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	时间	MMP-2	MMP-3	MMP-9
对照组	治疗前	1.79 ± 0.18	1.74 ± 0.20	2.06 ± 0.21
	治疗后	6.14 ± 0.61^a	5.27 ± 0.53^a	6.38 ± 0.64^a
实验组	治疗前	1.83 ± 0.18	1.67 ± 0.17	2.09 ± 0.20
	治疗后	7.55 ± 0.76^{ab}	8.01 ± 0.80^{ab}	9.47 ± 0.95^{ab}

注:a,与治疗前比较, $P < 0.05$; ab:与对照组比较, $P < 0.05$

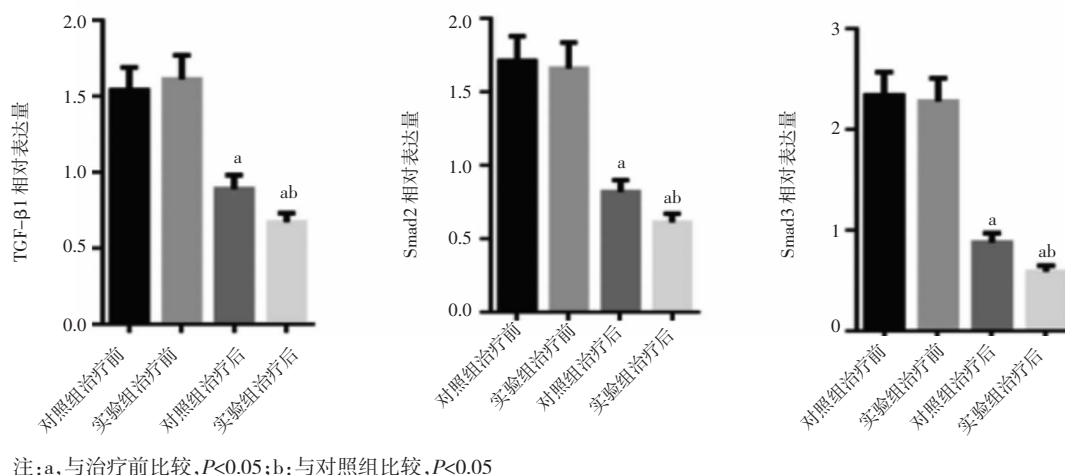


注:a,与治疗前比较, $P < 0.05$; b:与对照组比较, $P < 0.05$

A. 各组 TGF- β 1、Smad2/3 蛋白表达情况

B. 各组 TGF- β 1、Smad2/3 蛋白相对表达量

图 1 两组 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平的比较



注:a,与治疗前比较, $P<0.05$;b:与对照组比较, $P<0.05$

图2 2组 TGF-β1、Smad2 和 Smad3 mRNA 水平的比较

3 讨论

宫腔镜下宫腔粘连分离术(transcervical resection adhesions, TCRA)是临床治疗 IUA 的主要方法,优点是有效治疗宫腔粘连,缺点是粘连易复发^[7]。目前临床常用的预防宫腔再粘连的治疗措施主要是激素序贯治疗及放置宫内节育器等,疗效欠佳,且易引起一系列副反应和并发症^[8]。中医认为 IUA 核心为肾虚血瘀,而补肾化瘀法对 IUA 引起的月经异常等具有良好的疗效^[9]。因此,本研究采用自拟补肾活血方及宫腔灌注治疗宫腔粘连患者,探讨其疗效及其对 TGF-β1、Smad2 和 Smad3 蛋白的影响。

研究发现,IUA 与子宫内膜基底层损伤具有密切关系^[10]。现代药理学证实,补肾类中药具有增强下丘脑-垂体-卵巢性腺轴的功能,可修复子宫内膜,促进子宫生长。而活血化瘀类中药扩张周围小血管,改善微循环和宫腔内血流动力学,减少血流阻力,改善子宫血供^[11]。自拟补肾活血方是依据本院多年临床经验形成的方子,方中女贞子、杜仲、菟丝子、山茱萸滋肾填精,辅以当归、茯苓、白芍、桂枝理气活血,白芍、红花、益母草养血调经。结果发现,对照组接受治疗后子宫内膜厚度、PI 和 RI 无明显变化。与对照组比较,实验组患者治疗后子宫内膜厚度明显增加,PI 和 RI 明显降低,提示补肾活血方及宫腔灌注治疗可增加子宫内膜厚度和改善血流参数。推测可能的原因是补肾活血方及宫腔灌注治疗可促进子宫内膜修复和生长,改善子宫内膜环境,进而预防 IUA 再形成。进一步研究发现,治疗后 2 组患者

粘连类型、粘连范围、月经情况及总分均较治疗前明显降低,且实验组粘连类型、粘连范围、月经情况及总分均低于对照组,提示补肾活血方及宫腔灌注治疗预防宫腔粘连的复方与以往研究一致^[12]。

IUA 主要由宫内膜基底层损伤后异常修复、纤维化所导致的结果^[13]。纤维化是实质细胞坏死、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度堆积、瘢痕形成的过程。MMPs 是 ECM 蛋白降解酶的体系之一,通过降解多种胶原及非胶原成分,在抗纤维化方面发挥重要作用。有研究发现,MMP-9 低表达可降低蛋白水解活性,破坏 ECM 降解的正常平衡,造成 ECM 的堆积。ECM 在子宫内膜内累积过多,结缔组织就会取代子宫内膜,促进子宫内膜纤维化而致粘连,形成 IUA^[14]。本研究发现,给予雌孕激素治疗或补肾活血方治疗后,2 组患者 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 水平均明显上升,并且实验组各蛋白水平高于对照组,提示补肾活血方及丹参宫腔灌注治疗通过提高 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 的表达,促进 ECM 的降解,改善宫腔粘连,其机制仍需进一步研究。

TGF-β 是迄今发现最主要的促纤维形成细胞启动因子,创伤后 TGF-β 由血小板释放至损伤部位,与剂量正相关的趋化为成纤维细胞、单核细胞、中性粒细胞等,由中介分子 Smad2、Smad3 经胞质传导至细胞核内,进而刺激和诱导基质蛋白(包括纤维粘连蛋白和 I、III、V、VI 胶原蛋白)等靶基因的转录,并控制 ECM 的合成和降解,导致组织重构、功能破坏,形成粘连。TGF-β 主要于子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞中均有表达,IUA 的形成与其在腺上皮细胞中的过度表达有关,TGF-β 在 IUA 患者子宫内膜组

组织中的表达明显高于非 IUA 者,且与粘连严重程度呈正相关。IUA 患者子宫内膜中的 Smad2、Smad3 的表达量也较非 IUA 者明显升高,与其严重程度也呈正相关,其变化趋势与 TGF- β 相似且与其呈明显正相关,这也与 Smad2、Smad3 作为 TGF- β 1 的下游分子进行信号转导的理论相符,因此推理出 IUA 的形成可能与 Smad2、Smad3 的过度表达相关。从而得出 TGF- β 及 Smad2、Smad3 的过度表达,一方面影响有效子宫内膜的修复再生,另一方面促进宫腔中纤维结缔组织形成,增生的纤维结缔组织逐渐取代原有子宫内膜,致使宫腔变形、有效容积减少、子宫内膜瘢痕化,形成不同程度的宫腔粘连带,促进 IUA 的发生。已知的 TGF 主要包括 TGF- α 和 TGF- β ,实验证实 Smad2、Smad3 将 TGF- β 传导信号至核内,调节粘连蛋白与胶原蛋白等靶基因转录,抑制 ECM 降解,促进纤维化^[15]。研究发现,杜仲可清除机体内氧自由基及抑制 TGF- α 和 TGF- β 1 等炎症因子的生成,改善股骨头坏死^[16]。菟丝子具有类激素样的作用,可调节 TGF- β 1 分泌表达。丹参可下调慢性肾功能衰竭患者 TGF- β 1 的表达,抑制肾纤维化,改善肾功能^[17]。由上可知,补肾活血方中多味中药均可调节 TGF- β 1 的表达。本研究发现,治疗后 2 组患者 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平和 mRNA 水平较治疗前均有所降低。实验组 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 蛋白水平和 mRNA 水平均低于对照组,提示补肾活血方及丹参宫腔灌注治疗通过抑制 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 的表达,抑制 ECM 的合成,加速其降解,抑制及改善纤维化的形成,促进子宫内膜再生修复,进而预防粘连复发。其可能的原因是补肾活血方可调节下丘脑-垂体-卵巢轴的功能,提高雌激素受体的应答,改善子宫动静脉的血液循环,下调 TGF- β 、Smad2、Smad3 在子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞中的表达;血流顺畅,沉积物减少也符合中医活血祛瘀理论。而子宫内膜厚薄可被认为是肾中精血、胞宫气血充盈与否的一种表现,补肾活血方祛瘀生新同时不忘调补肾中精气血液,精血互相化生日渐充沛,内膜得以生长。

综上所述,补肾活血方及丹参宫腔灌注治疗可改善宫腔粘连血流参数,增厚子宫内膜,促进子宫内膜的修复,预防宫腔粘连的再次发生,其机制与上调 MMP-2、MMP-3 及 MMP-9 的表达,下调 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 表达水平有关。

参 考 文 献

- [1] 张文萍,刘景春. 宫腔粘连分离术联合雌激素治疗宫腔粘连的疗效和安全性[J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(17):1870-1873.
- [2] Chen L,Zhang H,Wang Q,et al. Reproductive outcome in patients with intrauterine adhesions following hysteroscopic adhesiolysis: experience from the Largest Women's Hospital in China[J]. J Minim Invasive Gynecol,2017,24(2):299-304.
- [3] 张蔚苓,常淑华. 补肾活血周期治疗联合西药对宫腔粘连术后子宫内膜影响的临床研究[J]. 中华中医药学刊,2016,34(5):1169-1172.
- [4] Li L,Shi J,Zhang QF,et al. Effect of curettage and copper wire on rabbit endometrium;a novel rabbit model of endometrial mechanical injury[J]. Chin Med J(Engl),2011,124(11):1708-1713.
- [5] 刘铭山. 从 TGF- β 1、Smad3 角度探讨补肾化瘀方治疗宫腔粘连术后的机制研究[D]. 广州:广州中医药大学,2016.
- [6] 谢 幸,苟文丽. 妇产科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2013.
- [7] Liu AZ,Zhao HG,Gao Y,et al. Effectiveness of estrogen treatment before transcervical resection of adhesions on moderate and severe uterine adhesion patients[J]. Gynecol Endocrinol,2016,32(9):737-740.
- [8] Johary J,Xue M,Zhu X,et al. Efficacy of estrogen therapy in patients with intrauterine adhesions:systematic review[J]. J Minim Invasive Gynecol,2014,21(1):44-54.
- [9] 翁兆银. 补肾化瘀法联合雌孕激素序贯疗法对宫腔粘连术后子宫内膜影响的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2014.
- [10] 蒋 楠,邹一梅,张金凤. 两种雌激素治疗方案治疗宫腔粘连的前瞻性研究[J]. 山西医药杂志,2017,46(11):1324-1326.
- [11] 潘 丽,庞丽萍,赵丽娟,等. 补肾化瘀法联合雌孕激素治疗及预防宫腔粘连的临床研究[J]. 宁夏医科大学学报,2016,38(12):1414-1417.
- [12] 吴 丹,罗 健,陈伟志. 补肾活血法对宫腔粘连术后患者子宫内膜及血流参数影响的临床研究[J]. 成都中医药大学学报,2017,40(1):26-28.
- [13] 王 显. 戊酸雌二醇调节 ER- α 及 TGF- β 1、MMP9 在预防及治疗大鼠宫腔粘连中的作用探讨[D]. 广州:南方医科大学,2016.
- [14] 朱 姝,黄晓兰,张克良,等. 中西医结合对宫腔粘连患者血清 MMP-9 和瘦素的影响[J]. 中医学报,2017,32(11):2234-2236.
- [15] 周曼萍,何援利,刘 芳. miR-29a、TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 在宫腔粘连中的表达及意义[J]. 实用医学杂志,2014,30(8):1231-1234.
- [16] 王金国,房经武,闫秀中,等. 杜仲补肾健骨颗粒对激素性股骨头缺血性坏死的疗效及血清 PINP、BGP、VEGF、TGF- β 1 和骨密度影响的研究[J]. 中国医刊,2017,52(6):36-39.
- [17] 管海玉. 丹参川芎嗪辅助治疗对慢性肾功能衰竭患者肾功能、肾血流灌注及 CTGF、TGF- β 1 含量的影响[J]. 海南医学院学报,2017,23(1):59-61,65.

(责任编辑:唐秋姗)