

本文引用: 乔江, 吴肖男, 王叶, 刘祎, 陈智芬. 基于 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路研究丹荔疏通汤对慢性输卵管炎性阻塞模型大鼠的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(11): 1855-1862.

## 基于 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路研究丹荔疏通汤对慢性输卵管炎性阻塞模型大鼠的影响

乔江<sup>1</sup>, 吴肖男<sup>2</sup>, 王叶<sup>2</sup>, 刘祎<sup>2</sup>, 陈智芬<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 通过 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路, 研究丹荔疏通汤对慢性输卵管炎性阻塞模型大鼠的影响。**方法** 将造模后大鼠随机分为模型组、高剂量灌胃+灌肠组(14 g·kg<sup>-1</sup>)、中剂量灌胃+灌肠组(7 g·kg<sup>-1</sup>)、低剂量灌胃+灌肠组(3.5 g·kg<sup>-1</sup>)、中剂量灌胃组(7 g·kg<sup>-1</sup>)、对照组(阿奇霉素, 1 mg·kg<sup>-1</sup>), 另设空白组。予相应药物治疗 30 d 后处死全部大鼠, 取输卵管组织, 病理检测观察输卵管组织的组织形态变化, 以 RT-PCR、Western blot 检测各组大鼠输卵管组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 与蛋白的表达。**结果** 与模型组相比, 各组大鼠输卵管肿胀、充血等表现均有所减轻, 各组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 与蛋白的表达均明显降低( $P < 0.01$ ); 高剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃+灌肠组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 与蛋白的表达均低于低剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃组、对照组( $P < 0.01$ )。**结论** 丹荔疏通汤能明显改善输卵管炎性阻塞模型大鼠输卵管组织炎症反应, 改善纤维化水平, 其可能通过下调 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 与蛋白表达, 通过 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路发挥作用。

**[关键词]** 慢性输卵管炎; 输卵管炎性阻塞性不孕; 丹荔疏通汤; TGF- $\beta$ 1/Smads; TGF- $\beta$ 1; Smad2; Smad3

**[中图分类号]** R271.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.11.014

### Effects of Danli Shutong Decoction on chronic tubal inflammatory obstruction in rats based on TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway

QIAO Jiang<sup>1</sup>, WU Xiaonan<sup>2</sup>, WANG Ye<sup>2</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>, CHEN Zhifen<sup>2</sup>

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of Danli Shutong Decoction on rats with chronic tubal inflammatory obstruction based on TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway. **Methods** The modeled rats were randomly divided into model group, high-dose intragastric gavage+enema group (14 g·kg<sup>-1</sup>), middle-dose intragastric gavage+enema group (7 g·kg<sup>-1</sup>), low-dose intragastric gavage+enema group (3.5 g·kg<sup>-1</sup>), middle-dose intragastric group (7 g·kg<sup>-1</sup>), control group (azithromycin, 1 mg·kg<sup>-1</sup>), and blank group. After 30 d of corresponding drug treatment, all rats were sacrificed, and then their fallopian tube tissues were then taken out. We carried out pathological detection of the tissue morphological changes of fallopian tube tissue. The expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3 mRNA

**[收稿日期]** 2021-07-12

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2021JJ70032); 湖南省教育厅重点项目(18A210)。

**[第一作者]** 乔江, 女, 副主任医师, 硕士研究生导师, 第四批全国名老中医药专家学术经验继承人, 研究方向: 中医妇科临床, E-mail: qiao-jiang6688@126.com。

and the protein in fallopian tube tissues of each group was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with model group, the swelling and congestion of fallopian tubes of rats in each group was reduced. The expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3 mRNA and the protein in fallopian tubes of rats in each group decreased significantly ( $P<0.01$ ); the expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3 mRNA and the protein in oviduct tissue of rats in high-dose intragastric gavage+enema group and middle-dose intragastric gavage+enema group were lower than that in middle-dose intragastric gavage+enema group, low-dose intragastric gavage group and control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Danli Shutong Decoction could significantly improve the inflammatory reaction of fallopian tube tissue and the level of fibrosis in rats with fallopian tube inflammatory obstruction, which may play a role by TGF- $\beta$ 1/Smad2 signaling pathway through down regulating the expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3 mRNA and the protein.

[**Keywords**] chronic salpingitis; tubal inflammatory obstructive infertility; Danli Shutong Decoction; TGF- $\beta$ 1/Smads; TGF- $\beta$ 1; Smad2; Smad3

输卵管炎性阻塞性不孕症(salpingitis obstructive infertility, SOI)是指由于急、慢性输卵管炎导致输卵管粘连、堵塞等异常情况而导致的不孕,主要表现为下腹疼痛、阴道分泌物增多等。研究发现,SOI占女性不孕症的25%~35%<sup>[1]</sup>,给广大女性的身心健康与家庭和谐带来严重影响,是亟须解决的临床难题。目前,西医主要采用输卵管介入再通治疗SOI<sup>[2]</sup>,然而超过20%的患者在介入再通后预后不佳<sup>[3]</sup>。研究表明,中医药作为输卵管再通的辅助治疗,不仅可以缩短治疗时间,而且可以预防再梗阻,提高受孕率<sup>[4-5]</sup>。因此,发挥中医药优势对于提高SOI的临床疗效具有重要意义。

丹荔输通汤系全国名老中医药专家杨秉秀教授治疗SOI的经验方,临床治疗中发现,本方能降低SOI患者临床中医证候积分,治疗组总有效率为89.66%,输卵管通畅率为77.59%,均明显高于对照组(庆大霉素混悬液宫腔注药),临床疗效显著<sup>[6]</sup>,但其具体作用机制尚不清楚。故以慢性输卵管炎性阻塞模型大鼠,经不同剂量丹荔输通汤灌胃、灌肠治疗30 d后,检测模型大鼠输卵管组织中TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3蛋白的表达,探讨丹荔输通汤对慢性输卵管炎性阻塞模型大鼠的影响和作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

健康SD雌性大鼠84只,鼠龄8~12周,体质量180~200 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供(SPF级),合格证书编号:1107272011007368。将所有大鼠于湖南中医药大学动物实验中心进行饲养,实验室饲养温度为18~24℃,湿度为30%~70%。动

物实验伦理编号:LLBH-20190720006。

### 1.2 实验药物及主要仪器

丹荔输通汤的药物组成:丹参15 g,荔枝核15 g,刘寄奴15 g,王不留行10 g,桃仁10 g,赤芍10 g,生黄芪15 g,太子参15 g等,中药饮片购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。西药混悬液:阿奇霉素干混悬剂(辉瑞制药有限公司),批号:200101,规格:0.1 g/包,购自湖南中医药大学第一附属医院西药房,加蒸馏水10 mL,制成阿奇霉素混悬液。造模药物:液化苯酚(500 g $\times$ 1瓶),购自湖南麦克林试剂有限公司,药品批号:P815401;羧甲基纤维素钠(500 g $\times$ 1瓶),购自湖南麦克林试剂有限公司,药品批号:C804625。主要试剂:#41003型GelRed染料(Biotium);兔抗鼠TGF- $\beta$ 1、Smad2多克隆抗体(武汉proteintech公司);Smad3单克隆抗体(武汉proteintech公司);山羊抗兔IgG二抗(武汉proteintech公司)。主要仪器:轮转石蜡切片机(徕卡RM2235);生物组织摊片机(金迪YD-A);电热恒温培养箱(上海一恒DNP-9162);数码医学图像分析系统(Motic 6.0);实时荧光定量PCR仪(WaferGen Biosystems);电泳仪(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模药物制备

15%苯酚糊剂:液化苯酚3 mL,加蒸馏水至20 mL,加入适量羧甲基纤维素钠,用玻璃搅拌棒充分搅拌,调制成糊剂。

### 2.2 模型制备

采用苯酚明胶化学法制备慢性输卵管炎性阻塞大鼠模型<sup>[7]</sup>,以10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻

醉,待麻醉生效后,将大鼠仰卧固定于手术台上,腹部剪毛备皮,聚维酮碘消毒,铺无菌巾,于耻骨联合向上约0.5 cm处作长1.0~1.5 cm纵形切口,打开腹腔,暴露Y形子宫,沿子宫向上寻找双侧输卵管,于子宫角靠近输卵管处向两侧输卵管分别注入15%苯酚糊剂各0.03 mL,逐层缝合创口,关闭腹腔。术中如发现大鼠存在子宫炎症或注入药物时有阻力,予以剔除。术后消毒术区,铺无菌垫料。

将84只SD雌性大鼠适应性喂养7 d后,按照随机数字表法随机选取11只作为空白组,余下73只大鼠依照上述造模方式进行造模,于造模第25天,空白组及模型组分别随机选取3只大鼠,以10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉,待麻醉生效后,取大鼠双侧输卵管组织进行肉眼及光镜下HE染色病理观察是否造模成功。见空白组大鼠输卵管管腔形态规则,管壁富有弹性,质地柔软,色泽鲜亮,未见充血、肿胀、扭曲等病变,与周围组织无粘连。模型组大鼠输卵管管腔扭曲、畸形,管壁结缔组织增生纤维化,质硬,管壁增粗、阻塞,充血、水肿较为明显,大量炎性细胞浸润,与周围组织广泛粘连。确定模型制备成功,在制备模型过程中,有4只大鼠死亡。

### 2.3 分组及给药

将84只雌性SD大鼠随机选取11只大鼠作为空白组,余下73只大鼠制备慢性输卵管炎性阻塞大鼠模型,将造模后大鼠随机分为模型组、高剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃+灌肠组、低剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃组、对照组,每组各11只。

模型制备成功后,将中药饮片水煎至生药含量7 g/mL浓缩煎剂,按人体用药量换算成大鼠等效剂量作为大鼠用药量<sup>[8]</sup>,高剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃+灌肠组、低剂量灌胃+灌肠组给药量分别为14、7、3.5 g/(kg·d),灌胃容积均为3 mL,灌肠容积为2 mL,1次/d。

造模第31天开始,予模型组生理盐水灌胃30 d,予高剂量灌胃+灌肠组14 g/(kg·d)、中剂量灌胃+灌肠组7 g/(kg·d)、低剂量灌胃+灌肠组3.5g/(kg·d)丹荔疏通汤灌胃,灌肠30 d,予中剂量灌胃组丹荔疏通汤中剂量7 g/(kg·d)灌胃30 d,予对照组阿奇霉素混悬液(10 mg·kg<sup>-1</sup>)灌胃7 d,1次/d,其余23 d灌胃等容积生理盐水,1次/d,灌胃容积均为3 mL,灌肠容积为2 mL。

### 2.4 标本采集

各组大鼠不同剂量灌胃、灌肠30 d后,于当天

21:00开始,禁食不禁饮12 h后,次日9:00以10%水合氯醛0.3 mL/100 g进行腹腔注射麻醉,待麻醉生效后,将大鼠仰卧固定于手术台上,腹部剪毛备皮,碘酊消毒,铺巾,于耻骨联合向上约0.5 cm处剪纵形切口,长1.0~1.5 cm,打开腹腔,暴露Y形子宫,沿子宫向上寻找双侧输卵管,取双侧输卵管组织,用4%多聚甲醛组织固定液固定标本,HE染色后光镜下观察其病理学改变情况。采用RT-PCR及Western blot检测输卵管组织TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3含量。

### 2.5 RT-PCR检测输卵管组织中TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3转录表达

提取大鼠输卵管组织总RNA,进行酶标仪定量,取2  $\mu$ L RNA样品于PCR管中,加入3  $\mu$ L RNA Loading Buffer,振荡混匀,瞬时离心直接点样,140 V,20 min,进行反转录,操作规范参考Thermo公司反转录酶说明书。实时荧光PCR反应,mRNA根据实验样本数量选择对应规格并在冰上配制如下反应体系。引物设计与合成:TGF- $\beta$ 1上游引物GACCG-CAACAACGCAATCTAT;下游引物CGTGTGCTC-CACAGTTGAC。Smad2上游引物CGTCGGAAGAG-GAAGGAACAA;下游引物TGGTAAATCTACCCTG-CACCC。Smad3上游引物GGAGGAGAAGTGGTGC-GAGAA;下游引物GCCACAAGCGGCAGTA GAT。PCR反应体系:配制逆转录反应体系(20  $\mu$ L),置于PCR仪中,65  $^{\circ}$ C 5 min,25  $^{\circ}$ C 5 min,42  $^{\circ}$ C 60 min,循环40次,70  $^{\circ}$ C 5 min。PCR产物长度:160、83、200 bp。采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算大鼠输卵管组织中TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3相对表达水平。

### 2.6 Western blot法检测输卵管组织标本中TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3蛋白的表达

提取输卵管组织蛋白,BCA法蛋白定量,电泳,湿转法转膜完成,丽春红染色试剂染色,观察转膜效果,泳道标记,浸没膜于3%BSA-TBST中室温轻摇30 min封闭,3%BSA-TBST稀释一抗,室温孵育10 min,放4  $^{\circ}$ C过夜,第2天在室温孵育30 min。TBST洗膜5次,每次3 min,二抗孵育,5%脱脂奶粉-TBST稀释二抗,山羊抗兔IgG(H+L) HRP,1:10 000,室温轻摇40 min。洗膜:TBST洗膜6次,每次3 min,随后将ECL加到膜上后反应3~5 min,胶片曝光定影后扫描,以 $\beta$ -actin为内参照,软件Total Lab Quant V11.5读取条带积分光密度值。

## 2.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析,所有计量资料实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,首先对各组数据进行正态性检验,若各组数据满足正态分布,采用方差齐性检验,若不满足正态分布,则用秩和检验;若方差齐,采用 ANOVA 检验,若方差不齐,则采用 Dunnett's 检验进行组间比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠输卵管形态肉眼观察结果

经实验给药 30 d 后,处死全部大鼠,取各组大鼠子宫及输卵管组织,肉眼观察各组大鼠输卵管组织解剖形态变化。空白组输卵管形态正常,色泽红润,有光泽,质地柔软,管壁弹性佳,与周围组织无明显粘连,无积水或积脓;模型组见输卵管形态明显增粗、肿胀、扭曲,色苍白,无光泽,质地硬,管壁弹性差,与周围组织致密粘连,积水明显,部分积脓;高剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃+灌肠组、低剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃组、对照组的输卵管形态、色泽、质地、管壁弹性、与周围组织粘连、积水或积脓情况均较模型组改善,且高剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃+灌肠组、低剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃组的输卵管形态、色泽、质地、管壁弹性均优于对照组。

### 3.2 各组大鼠输卵管 HE 染色观察结果

经实验给药 30 d 后,处死全部大鼠,取各组大鼠输卵管组织,HE 染色后光镜下观察其病理学改变情况。

空白组:输卵管管壁及管腔大小正常,黏膜光

滑,皱襞数量多,纤毛蠕动正常,细胞形态正常,未见明显纤维化渗出物。模型组:输卵管管壁增厚,管腔狭窄、堵塞,黏膜充血,皱襞数量极少,细胞水肿明显,大量炎性细胞浸润,可见纤维化渗出物及结缔组织增生。高剂量灌胃+灌肠组:输卵管管壁稍增粗,管腔通畅,管腔大小正常,结构较清晰,黏膜光滑,皱襞数量多,细胞形态大致正常,可见极少量纤维化渗出物。中剂量灌胃+灌肠组:输卵管尚通畅,管壁稍增厚,管腔大小正常,结构较清晰,黏膜光滑,皱襞数量较多,细胞形态大致正常,可见极少量纤维化渗出物及结缔组织增生。低剂量灌胃+灌肠组:输卵管尚通畅,管壁稍增厚,管腔缩小,结构稍紊乱,黏膜轻度充血,皱襞数量减少,炎性细胞浸润,可见少量纤维化渗出物及结缔组织增生。中剂量灌胃组:输卵管尚通畅,管壁稍增厚,管腔缩小,结构稍紊乱,黏膜轻度充血,皱襞数量减少,炎性细胞浸润,可见少量纤维化渗出物及结缔组织增生。对照组:输卵管尚通畅,偶见轻度堵塞,管壁稍增厚,管腔缩小,结构稍紊乱,黏膜轻度充血,皱襞数量减少,细胞轻度水肿,可见少量纤维化渗出物及结缔组织增生。详见图 1。

### 3.3 各组输卵管组织 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 表达结果

与空白组相比,模型组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 表达量明显增高,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。治疗后,与模型组相比,高剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃+灌肠组、低剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃组、对照组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 表达量明显降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。高、中剂量灌胃+

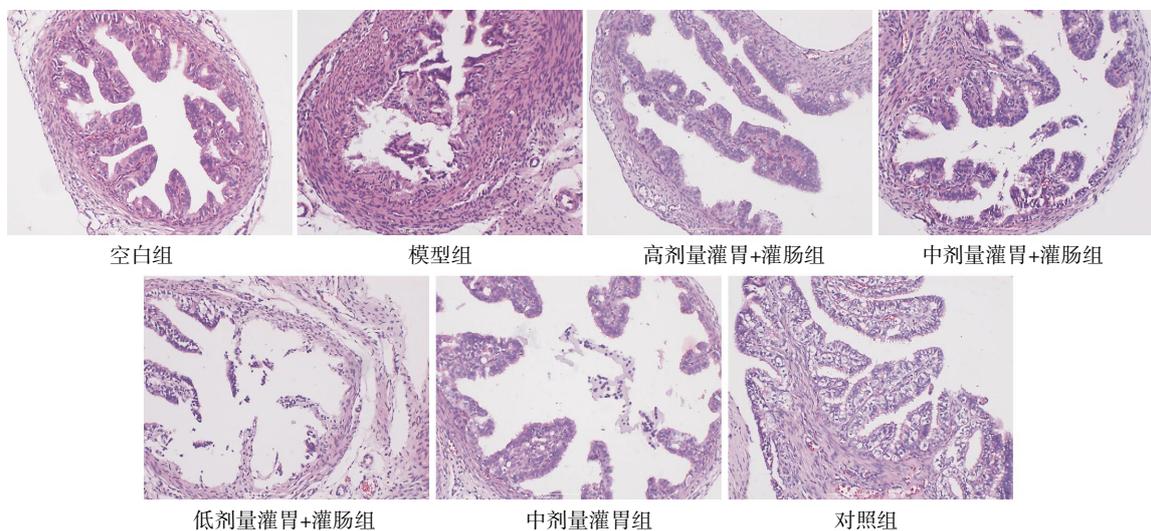


图 1 各组大鼠输卵管形态结果(HE 染色,  $\times 200$ )

灌肠组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但两组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 表达量均低于低剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃组、对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。详见表 1, 图 2-4。

### 3.4 各组输卵管组织 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 蛋白表达结果

TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 蛋白在各组大鼠输卵管组织中均有表达, 与空白组相比, 模型组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 蛋白表达明显增高, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。治疗后, 与模型组相比, 高、中、低剂量灌胃+灌肠组, 中剂量灌胃组, 对照组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3

蛋白的表达明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。高、中剂量灌胃+灌肠组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但两组大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 蛋白的表达均低于低剂量灌胃+灌肠组、中剂量灌胃组、对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。详见图 5-8。

## 4 讨论

SOI 在中医古籍中并无相同病名, 根据 SOI 的临床表现, 其可归属于“不孕症”“断续”“无子”“妇人腹痛”“癥瘕”等疾病范畴<sup>[9]</sup>。中医古籍多认为, 血瘀为本病发生发展的主要病机<sup>[10]</sup>, 究其形成原因, 多因肝气郁结、寒湿外袭、热瘀互结、肾气不足等导致血行

表 1 各组大鼠输卵管组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别        | 剂量(g/kg·d <sup>-1</sup> ) | TGF- $\beta$ 1           | Smad2                    | Smad3                    |
|-----------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白组       | 10                        | 1.06±0.37                | 1.08±0.43                | 1.10±0.49                |
| 模型组       | 10                        | 7.70±0.86 <sup>Δ</sup>   | 6.23±0.58 <sup>Δ</sup>   | 7.08±0.65 <sup>Δ</sup>   |
| 高剂量灌胃+灌肠组 | 14                        | 4.61±0.57 <sup>○</sup>   | 3.44±0.51 <sup>○</sup>   | 3.70±0.57 <sup>○</sup>   |
| 中剂量灌胃+灌肠组 | 7                         | 4.80±0.61 <sup>○</sup>   | 3.46±0.54 <sup>○</sup>   | 3.51±0.38 <sup>○</sup>   |
| 低剂量灌胃+灌肠组 | 3.5                       | 6.15±0.33 <sup>○**</sup> | 4.53±0.44 <sup>○**</sup> | 5.52±0.42 <sup>○**</sup> |
| 中剂量灌胃组    | 7                         | 6.48±0.66 <sup>○**</sup> | 4.50±0.55 <sup>○**</sup> | 5.48±0.50 <sup>○**</sup> |
| 对照组       | 0.01                      | 6.67±0.44 <sup>○**</sup> | 4.42±0.51 <sup>○**</sup> | 5.58±0.58 <sup>○**</sup> |

注: 与空白组相比, <sup>Δ</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>○</sup> $P<0.01$ ; 与高剂量灌胃+灌肠组相比, <sup>\*</sup> $P<0.01$ ; 与中剂量灌胃+灌肠组相比, <sup>◆</sup> $P<0.01$ 。

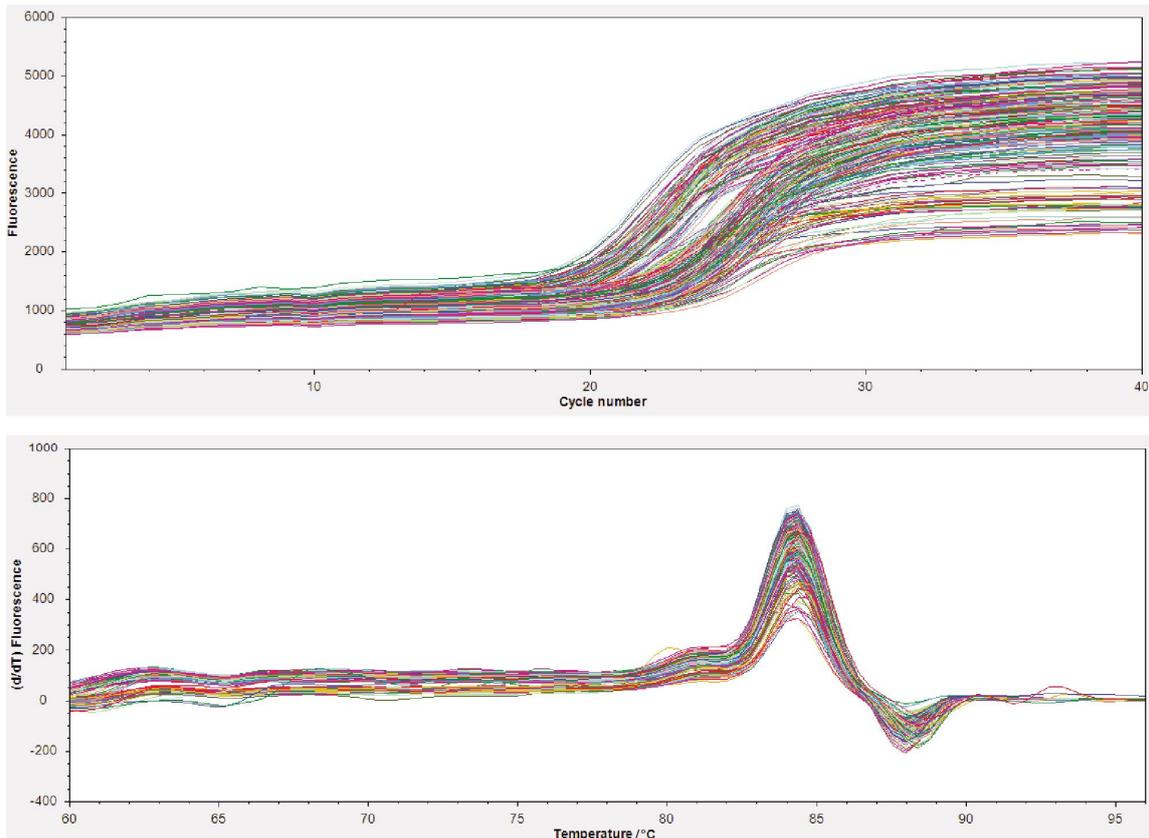


图 2 TGF- $\beta$ 1 mRNA PCR 扩增动力学曲线(上)和溶解曲线(下)

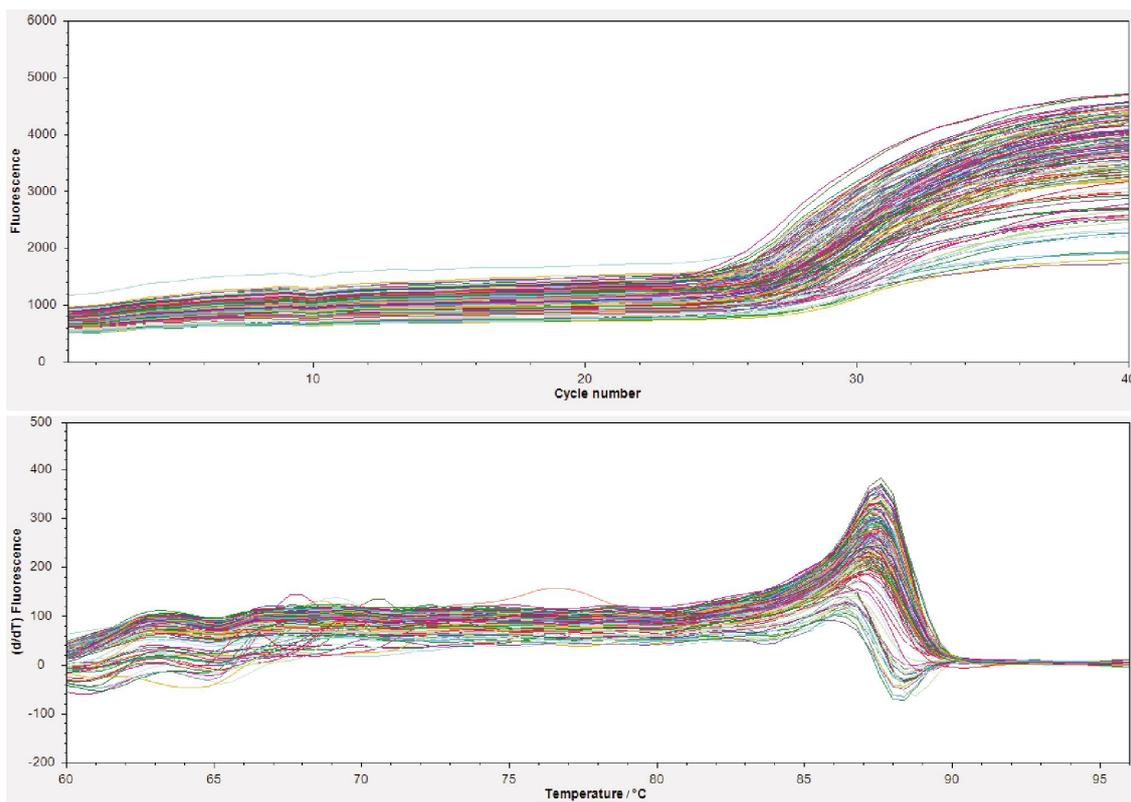


图 3 Smad2 mRNA PCR 扩增动力学曲线(上)和熔解曲线(下)

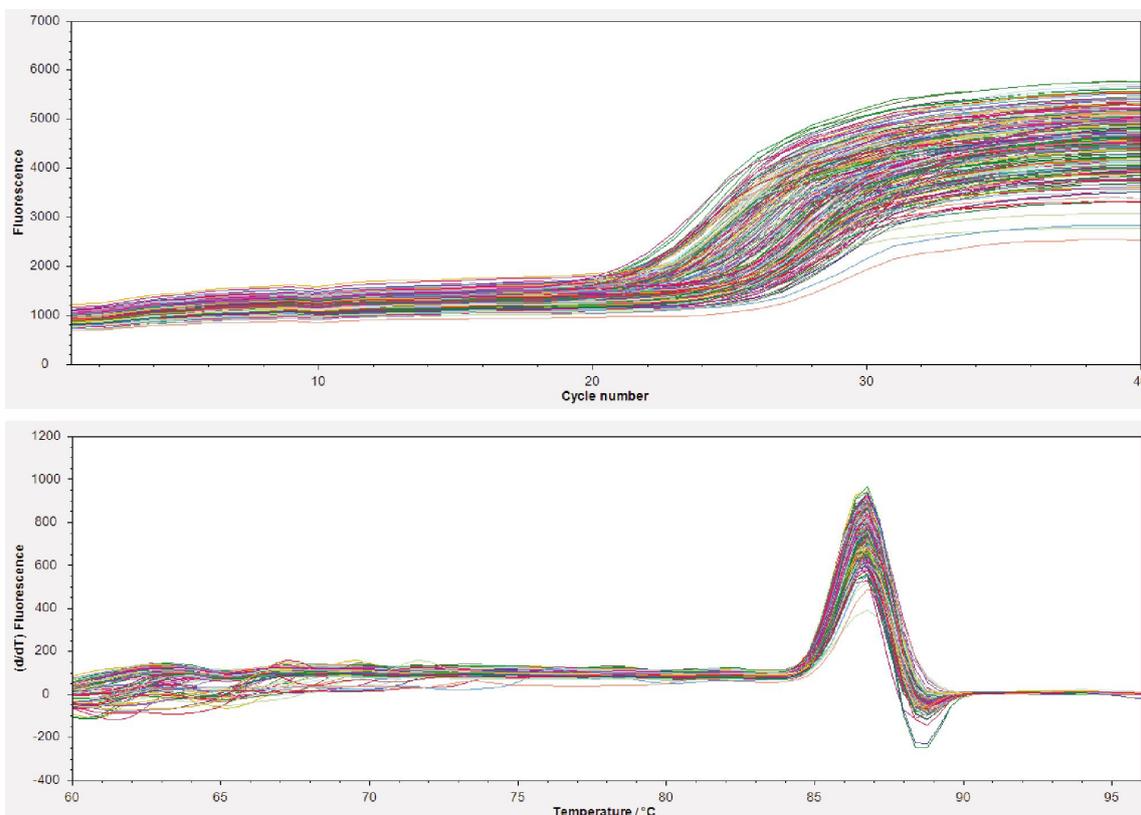


图 4 Smad3 mRNA PCR 扩增动力学曲线(上)和熔解曲线(下)

停滞成瘀,瘀阻胞络,故不能摄精成孕。气为血之帅,气机调畅则血液运行畅通无阻,女子素体易郁,加之思虑过度,导致肝气郁结,气滞不行则血液运行停

滞,气滞血瘀则孕卵不能正常排出,女子难以受孕。外感寒邪,或久食生冷之品,寒湿内生,阻滞冲任,亦可孕卵排出受阻。过食辛辣或肥甘厚腻之品,或血

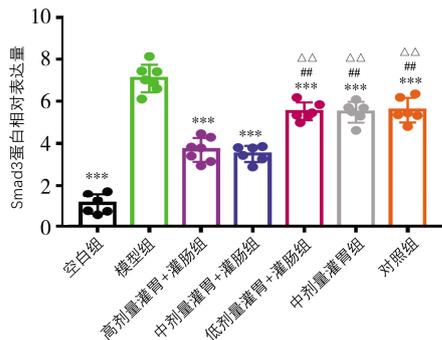


图5 各组输卵管组织 Smad3 蛋白表达

注:与模型组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与高剂量灌胃+灌肠组比较, $\#P<0.01$ ;与中剂量灌胃+灌肠组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

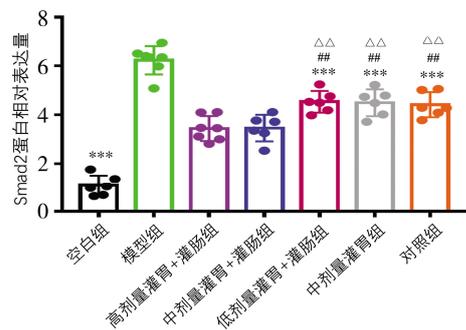


图6 各组输卵管组织 Smad2 蛋白表达

注:与模型组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与高剂量灌胃+灌肠组比较, $\#P<0.01$ ;与中剂量灌胃+灌肠组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

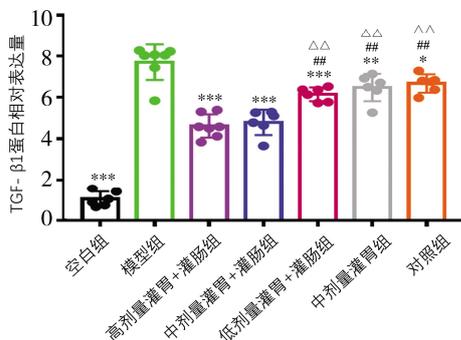


图7 各组输卵管组织 TGF-β1 蛋白表达

注:与模型组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与高剂量灌胃+灌肠组比较, $\#P<0.01$ ;与中剂量灌胃+灌肠组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

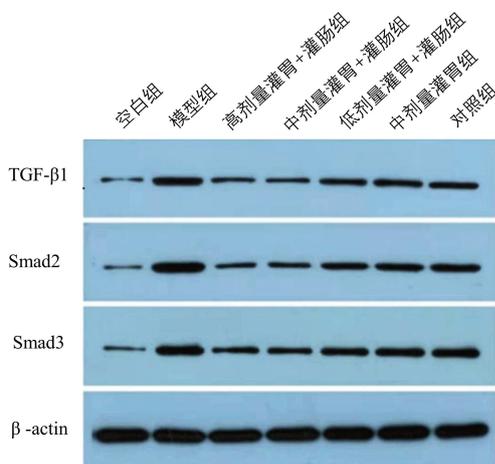


图8 Western blot 检测各组大鼠输卵管组织 TGF-β1、Smad2、Smad3 蛋白表达

瘀日久化热,瘀热互结于冲任,则精卵难以结合。肾精亏虚,则冲任不充,气血失调,血行停滞,日久成瘀,在此基础上,历代医家建立了活血化瘀的治疗原则。输卵管炎型不孕症以气滞血瘀证型多见<sup>[11]</sup>,如匡继林选用活血化瘀通络之通管方治疗宫腹腔镜术后输卵管性不孕症患者,降低其炎症因子血清 IL-6、TNF-α 水平表达,有效提高了临床妊娠率<sup>[12]</sup>。

第四批全国老中医药专家学术经验继承指导老师杨秉秀教授经过 60 余年临床探索,研制出丹荔疏通汤治疗 SOI,取得较好的临床疗效,该方主要由丹参、荔枝核、刘寄奴、王不留行、桃仁、赤芍、生黄芪、太子参等药物组成。君药为丹参,丹参味苦,性微寒,归肝、胃经,具有活血化瘀、凉血消痈的作用。臣药为荔枝核、刘寄奴、王不留行、桃仁、赤芍,荔枝核具有行气散结,祛寒止痛的效果;刘寄奴有破血通经,止血消肿之功;王不留行有活血通经,消肿利尿的作用;桃仁长于活血祛瘀;赤芍具有清热凉血、散瘀止痛的功效,四药均有活血化瘀的作用,合用则活血化瘀效果愈彰。佐药为生黄芪、太子参,生黄芪有补气固表,托毒排脓,利尿,生肌的作用,且行气以助血行,上下通行脉络,瘀血难生;太子参功擅益气健脾,生津润肺,气能行血,气能行瘀,生黄芪、太子参能健脾益气,脾气健运则血液运行无阻,扶正祛邪,二药还可达到固护脾胃的作用,使诸药行气活血、化痰消癥而无碍脾胃。全方标本兼施,体现攻补兼施、消散结合、气血兼顾的治疗特点,使得气血旺盛、瘀血荡涤、脉络通畅,从而使输卵管的充血消退、水肿减轻、纤维化缓解。

TGF-β 超家族在哺乳动物基因组编码主要存在 3 种亚型,即 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3,3 种亚型具有相似的细胞靶标<sup>[13]</sup>。其中,TGF-β1 是组织纤维化发展最主要的因子<sup>[14]</sup>。目前,发现哺乳动物中的 Smads 蛋白至少有 8 种,可根据结构和功能特点的不同分为 3 种亚型<sup>[15]</sup>,其中,Smad2、Smad3 为受体激活型<sup>[16]</sup>。研究发现,TGF-β1/Smads 信号通路参与了输卵管的炎症,是妇科临床及实验研究的热点所在。程晓嫒等<sup>[17]</sup>临床应用针灸调冲任法对 SOI 模型大鼠进行干预,发现治疗后模型大鼠输卵管组织中 TGF-β1、Smad3 蛋白的表达水平显著降低,输卵管组织纤维化程度得到良好改善。罗志娟等<sup>[18]</sup>在临床研究发现,道地通管汤可下调输卵管炎性大鼠输卵管组织中 TGF-β1、Smad3 表达,说明道地通

管汤可以抑制 TGF- $\beta$ 1 及 Smads 的增多,对组织炎症的病变起到抑制作用,在一定程度上说明道地通管汤的疗效与抑制 TGF- $\beta$ 1 及 Smads 有关,且给药 30 d 治疗效果优于给药 15 d。

本次实验中,丹荔输通汤能够抑制慢性输卵管炎性阻塞模型大鼠输卵管组织中的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 蛋白及 mRNA 的表达,以高、中剂量灌胃+灌肠组的疗效最为显著( $P<0.01$ )。在给药途径与剂量上,高、中剂量灌胃+灌肠组疗效明显优于中剂量灌胃组( $P<0.01$ )。中药灌肠给药是中医外治法之一,直肠给药能透达盆腔病灶,相对减轻肝脏对药物的首过效应,减少对胃肠黏膜刺激,从而使药物吸收及利用率得以增强。此外,中药灌肠也可能通过改善机体血液流变学,增加局部的血液循环及营养状况,提高毛细血管的通透性,促进炎症的快速吸收,加快细胞新陈代谢,改善输卵管局部微环境,减轻炎症及氧化应激反应等。因此,高、中剂量灌胃+灌肠组联合用药具有良好的抗炎作用,可减少炎性渗出及结缔组织增生,抑制输卵管组织纤维化,将在输卵管炎性不孕疾病的治疗中发挥重要作用。

综上所述,丹荔输通汤可能通过降低输卵管炎性阻塞模型大鼠输卵管组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 mRNA 与蛋白的表达,抑制 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的传导,从而减轻模型大鼠输卵管组织炎症及纤维化程度,改善输卵管功能,发挥治疗作用。但是丹荔输通汤具体如何参与 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路,哪些蛋白是关键因子尚未明确,这些均为后续研究的重点。本次研究为临床治疗慢性输卵管炎及 SOI 提供了科学客观的实验依据,亦为中药新药的研发提供了研究基础。

## 参考文献

- [1] HONORÉ G M, HOLDEN A E C, SCHENKEN R S. Pathophysiology and management of proximal tubal blockage[J]. *Fertility and Sterility*, 1999, 71(5): 785-795.
- [2] MARLOW J A, PICUS D, GOULD J, et al. Outcomes after successful fallopian tube recanalization: A single institution experience: Observational retrospective study[J]. *Clinical Imaging*, 2021, 76: 70-73.
- [3] SHEN H W, CAI M J, CHEN T W, et al. Factors affecting the

success of fallopian tube recanalization in treatment of tubal obstructive infertility[J]. *The Journal of International Medical Research*, 2020, 48(12): 300060520979218.

- [4] LIU C, QIU H, HUANG R, et al. Therapeutic mechanism and clinical observation of traditional Chinese medicine combined with interventional recanalization for tubal infertility[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021: 2842250.
- [5] LIAO Y H, LIN J G, LIN C C, et al. Traditional Chinese medicine treatment associated with female infertility in Taiwan: A population-based case-control study[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2020: 3951741.
- [6] 乔江,胡雪晴,陈怀敏,等.丹荔输通汤治疗输卵管阻塞 29 例临床观察[J].*湖南中医杂志*,2018,34(12):6-9.
- [7] 环璐瑶,梁海燕,凌斌.实验动物管腔内皮损伤造模研究进展[J].*中日友好医院学报*,2020,34(6):360-362.
- [8] 徐叔云.药理学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002.
- [9] 李兰,钟达源,肖小芹.中医外治法治疗输卵管性不孕研究进展[J].*中国中医基础医学杂志*,2021,27(7):1195-1198.
- [10] 李盼盼,高慧,刘玉兰,等.输卵管阻塞性不孕症的中西医结合研究进展[J].*现代中西医结合杂志*,2021,30(23):2605-2610.
- [11] 程英龙,马晓荣,胡喜姣,等.膈下逐瘀汤加减方对气滞血瘀型输卵管炎性不孕模型大鼠 DA、NE 表达的影响[J].*中医药学报*,2021,49(4):20-24.
- [12] 黄紫纯,匡继林,朱维昊.通管方治疗腹腔镜术后输卵管性不孕患者的疗效及其对炎症因子、子宫动脉血流的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2020,40(12):1539-1543.
- [13] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(5): a021873.
- [14] 郭罗培,隋龙.TGF- $\beta$  在宫腔粘连纤维化中的研究进展[J].*现代妇产科进展*,2018,27(5):394-396.
- [15] MIYAZAWA K, MIYAZONO K. Regulation of TGF- $\beta$  family signaling by inhibitory smads[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2017, 9(3): a022095.
- [16] BAI J B, XI Q R. Crosstalk between TGF- $\beta$  signaling and epigenome[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2017, 50(1): 60-67.
- [17] 程晓嫒,田丽颖.针灸调冲任法对输卵管炎性阻塞性不孕症大鼠 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路相关蛋白的影响[J].*世界最新医学信息文摘*,2019,19(66):239-240.
- [18] 罗志娟,钟义惠,吴媛媛,等.道地通管汤对输卵管炎性大鼠 TGF- $\beta$ 1、smad3 作用机制的研究[J].*辽宁中医杂志*,2019,46(10):2205-2208,2243.

(本文编辑 贺慧娥)