

钩藤碱通过抑制 Smad 信号通路磷酸化减轻腹腔粘连发生的作用机制

宋宇*, 张慧, 刘瑞丽, 海广范, 王童, 岳佳新, 张炜丽, 任禹珂

(新乡医学院药学院, 河南 新乡 453000)

摘要: 腹腔粘连是临床上术后常见的并发症, 目前临床上还没有较好的针对性药物, 临床防治主要依靠物理手段或激素。钩藤碱是传统中药钩藤的主要有效成分。本课题观察了钩藤碱对实验性腹腔粘连的防治效果, 实验结果显示, 钩藤碱可剂量依赖地减轻腹腔粘连的程度, 显著降低大鼠血清白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及腹腔液中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 和结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的蛋白含量。表明其防治腹腔粘连作用的机制可能与抑制炎症因子和 TGF- β 1/Smad 信号通路有关。

关键词: 钩藤碱; 腹腔粘连; 转化生长因子 β 1; 结缔组织生长因子

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0229-07

Prevention of abdominal adhesions in rats by rhynchophylline through inhibition of Smad signaling pathway

SONG Yu*, ZHANG Hui, LIU Rui-li, HAI Guang-fan, WANG Tong, YUE Jia-xin,
ZHANG Wei-li, REN Yu-ke

(College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: Postoperative intra-abdominal adhesion is one of the most common complications in the postoperative period. Current remedies are very ineffective to prevent the pathological outcomes except steroid hormones. Rhynchophylline is deemed as a pharmacologically active component from traditional Oriental medicine *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks. (Rubiaceae). This study was designed to investigate the preventative effect of rhynchophylline on the abdominal adhesions in rats. Rhynchophylline relieved the experimental abdominal adhesion and decreased the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the blood serum in a dose-dependent manner. The levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) were reduced significantly in the peritoneal fluid. The potential mechanism of the activity is related to inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling pathway.

Key words: rhynchophylline; abdominal adhesion; transforming growth factor- β 1; connective tissue growth factor

腹腔粘连是腹部外科手术后的常见并发症, 发生率高达 90% 以上, 可导致严重的并发症, 如肠梗

阻、腹痛和女性不孕不育等^[1,2]。多年来, 国内外学者为此进行了大量的实验与临床探索, 迄今尚无理想的预防方法。腹腔粘连形成过程十分复杂, 其发生的确切机制目前尚不完全清楚。腹腔粘连的主要病理学特点是腹膜间皮细胞 (human peritoneal mesothelial cells, HPMC) 的脱落、胶原纤维排列混乱、细胞外基质沉积及基底膜增厚。其形成与多种因素有关, 一方面, 在正常生理情况下, 完整的腹膜间皮细胞具有激

收稿日期: 2016-08-30; 修回日期: 2016-10-27.

基金项目: 江苏省 2012 年度普通高校研究生科研创新计划项目 (CXZZ12_0620); 南京中医药大学基础研究与重点培育项目 (09XPY05); 河南省高等院校基金 (15A31000).

*通讯作者 Tel: 86-373-3029101, E-mail: songyugzyx@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0798

活纤溶酶原的活性以溶解纤维蛋白,使粘连无法形成。当各种因素导致腹膜炎和损伤时,不仅不能激活纤溶酶原的活性,而且受损的间皮细胞可产生纤溶酶原激活抑制物,当纤溶酶原受到抑制后,将形成永久性纤维粘连。另一方面,多种生长因子和细胞因子参与调控纤维蛋白沉积和降解之间的平衡,其中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$)、纤连蛋白 (fibronectin, FN)、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) 与粘连的形成关系密切。其中, TGF- $\beta 1$ 作为组织纤维化病变中最重要的促发因子之一已经得到共识,因此目前的研究多集中在细胞因子参与调控纤维蛋白沉积和降解之间的平衡和炎症因子在其病理过程中的作用^[3, 4]。中药在治疗和预防术后腹腔粘连中有其独特的效果^[5, 6]。钩藤碱 (rhynchophylline, RIN) 是从中药材钩藤中分离、提纯的生物碱,前期研究表明钩藤碱具有钙拮抗剂作用、抗炎作用以及降压和缺血保护等药理效应;钩藤碱的临床应用研究非常广泛,尤其是对中枢炎症的治疗^[7–9]。因此,近年来作者尝试将钩藤及其有效成分钩藤碱用于防治术后腹腔粘连和粘连性肠梗阻。本课题组对钩藤碱进行了药效学实验,研究了钩藤碱对实验性腹腔粘连大鼠的保护作用,通过对血清中白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及腹腔液中 TGF- $\beta 1$ 、CTGF、纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, t-PA)、纤溶酶原激活物抑制剂 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 的含量测定,观察其对腹腔粘连防治作用的效果。同时观察了钩藤碱对 TGF- $\beta 1$ 刺激的腹膜间皮细胞功能的影响和对 Smad 信号通路的调节作用,从多方面阐明了钩藤碱抗腹腔粘连发生的作用机制。

材料与方法

实验动物 雄性 SD 大鼠,体重 (250 ± 20) g, SPF 级,购自山东鲁抗医药股份有限公司实验动物室,生产许可证号: SCKX 鲁 20080003。

试剂与仪器 地塞米松 (dexamethasone) 购自广州白云山制药股份有限公司 (批号: 130632235); IL-6、IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司; TGF- $\beta 1$ 和 CTGF 酶联免疫试剂盒购自北京中杉金桥公司; FN ELISA 检测试剂盒购自上海雄森公司; Multiskun Mk3 酶标仪,美国

Thermo 公司;台式高速低温离心机,德国 Heraeus 公司;电子分析天平,德国 Sartorius 公司;U-2001 型紫外分光光度仪, HITACHI 公司。钩藤碱购自安徽百草实验试剂有限公司,纯度 >98%。-20 °C 保存,使用前生理盐水配制成 1、2 和 4 mg·mL⁻¹ 的工作液。

动物分组及模型制备 大鼠被随机分为 6 组:模型组、正常对照组、钩藤碱高、中、低剂量组、地塞米松阳性对照组,每组 10 只。分别作如下处理:各组大鼠禁食、不禁水,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (45 mg·kg⁻¹) 麻醉,仰卧位固定,消毒,根据文献^[10]要求的腹腔粘连制作方法,在无菌条件下取前正中切口 2.0 cm 进腹,提出盲肠,置于无菌纱布上约 5 min,使浆膜干燥,在回盲部右侧面用什锦锉刀反复磨擦浆膜层至表面针尖状出血点,形成约 2.5 cm × 2.5 cm 的受损创面后纳入腹腔,逐层关腹,缝合消毒。正常对照组开腹但不手术,其余组均手术造模。阳性对照组大鼠腹腔注射地塞米松 2 mg·kg⁻¹ 体重。钩藤碱低中高剂量组分别灌胃给予钩藤碱每天 3、6 和 12 mg·kg⁻¹。从造模后第 1 天起,按上述药量给药 10 天,每天 1 次。

粘连程度分级判断标准 按照 Nair^[11]制定的 5 级分类法,确定分级标准。0 级:完全无粘连;1 级:内脏间或内脏与腹壁间一条粘连带;2 级:内脏间或内脏与腹壁间两条粘连带;3 级:多于二条粘连带,而内脏未直接粘连到腹壁;4 级:内脏直接粘连到腹壁,而不管粘连带多少。实验结束后,将动物处死,取出盲肠部,进行粘连程度评级。

血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 检测 造模后第 11 天,以 3% 水合氯醛腹腔注射麻醉,下腔静脉取血,以 4000 r·min⁻¹ 离心 20 min 分离血清,置于超低温冰箱中保存待测。采用酶联免疫吸附法测定 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平,严格按说明书要求操作。

ELISA 法测定大鼠腹腔液 TGF- $\beta 1$ 、CTGF、PAI 和 t-PA 的含量 按 ELISA 检测试剂盒要求,抽取大鼠腹腔液,5000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液用蒸馏水按照 1:10 稀释,制备成检测样品,同时进行标准品的稀释与加样,加样后的样品用封板膜封板后置 37 °C 孵育 30 min,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,甩干。每孔加入酶标试剂 50 μ L,空白孔除外,各孔先加入显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B 50 μ L,轻轻振荡混匀,37 °C 避光显色 15 min;以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸收度 (OD 值)。

大鼠腹膜间皮细胞的分离、培养和鉴定 在无

菌条件下取健康大鼠部分大网膜, 在 0.25% 胰酶-0.01% EDTA 灭菌离心管中消化 15 min, 用 15% FCS-F12 终止消化, 4 °C、1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 加 5 mL 完全培养基 (15% FCS-F12、0.5 μg·mL⁻¹ 胰岛素、1 μg·mL⁻¹ 氢化可的松、5 μg·mL⁻¹ 转铁蛋白、2 μmol·mL⁻¹ 谷氨酰胺), 转入 0.1% 明胶包被的 25 cm² 培养瓶中, 补充青霉素 100 u·mL⁻¹、链霉素 100 u·mL⁻¹, 置入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞生长融合成单层, 用胰酶消化传代, 取第 3 代用于实验。培养细胞经倒置显微镜、透射电镜及扫描电镜鉴定 95% 以上为间皮细胞特征, 免疫组织化学染色人角蛋白和波形蛋白抗原阳性。

细胞分组和给药 取分离培养的第 2 代腹膜间皮细胞, 待细胞 60%~70% 融合, 更换无血清培养基培养 24 h, 将细胞分成空白组; TGF-β1 刺激组 (TGF-β1 5 ng·mL⁻¹ 刺激细胞 24 h); 钩藤碱组 (TGF-β1 5 ng·mL⁻¹ + 48 μg·L⁻¹ 钩藤碱, 孵育细胞 24 h); 溶剂对照组 (TGF-β1 5 ng·mL⁻¹ + 0.2% DMSO, 孵育细胞 24 h); 实验结束后取细胞上清液和胞体备用。

RT-PCR 方法检测各组细胞的 FN mRNA 表达水平 引物序列利用 Primer Premier 5.0 软件进行设计, 并查询美国 Gene-bank 进行核对后, 委托宝生物工程 (大连) 有限公司合成。细胞总 RNA 的提取方法按试剂盒说明进行, 并测定总 RNA 浓度, 吸收度 ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) 比值在 1.8~2.0。然后将两次测值取平均值, 用 2 400 除以平均值, 就是该样本的 RNA 逆转录时所需的加样量。取总 RNA 2 μg 逆转录, FN 引物序列为: 上游 5'-AGCCGCCACGTGCCAGGATTAC-3', 下游 5'-CTTATGGGGTGGCCGTTGTGG-3', 扩增片段长度为 345 bp。GAPDH 引物序列为: 上游 5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3', 下游 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTTC-3' 扩增片段长度为 251 bp。扩增条件: 65 °C 水浴 5 min 后立即置于冰上, 加入试剂的混合液, 振荡混匀后离心, 37 °C 水浴 60 min, 95 °C 水浴 5 min, -20 °C 保存备用, cDNA 聚合酶链反应 (PCR) 扩增参数: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C (GAPDH)、57 °C (FN) 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 °C 终末延伸 10 min。扩增产物用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳, 结果用凝胶成像及分析系统及相应的软件 Quantity One 进行电泳条带分析, FN 相对含量用其目的条带 (灰度值×面积) 与 GAPDH 的 (灰度值×面积) 之间的比值表示。

ELISA 检测培养上清液中 FN 的含量 按照操作说明书进行 ELISA 检测各组培养上清液 FN 含量,

选择在 490 nm 处检测吸收度值, FN 浓度与吸收度值之间成正比, 通过标准曲线即可求出各组上清液中 FN 的浓度。

Western blot 检测 I 型胶原和 Smad 信号通路相关蛋白表达水平 实验结束后收集各组细胞, 按照磷酸化蛋白提取试剂盒说明书操作提取蛋白, 用 BCA 法蛋白定量。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 上样量为 80 μg 蛋白, 按湿转法将电泳产物转移到 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶粉 4 °C 封闭 2 h, 滴加抗 Smad2/3 (1 : 500)、p-Smad2/3 (1 : 200)、Smad7 (1 : 500) 或 β-actin (1 : 2000) 一抗 4 °C 过夜, TBST 洗 3 次, 辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 500) 室温下孵育 2 h, 10 mL TBST 洗 3 次, 每次洗膜 10 min, ECL 试剂盒显色, 凝胶成像仪采集图像并用 Quantity One 软件进行数分析。

统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计处理。数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。动物的粘连程度分级评分进行秩和检验。

结果

1 整体观察

各组动物均无死亡, 所有动物均无切口裂开, 愈合情况较好。打开腹腔可以看到各组腹腔粘连程度不同。正常组仅有 1 例在第 8 天时于腹壁切口与肠管之间形成一轻微粘连带, 余者皆无粘连形成。模型组粘连组织明显, 呈带状并与肠壁连接紧密, 较难分离, 有 5 例壁层腹膜与网膜间及肠管的创面之间存在带状粘连组织, 粘连牢固。钩藤碱低剂量组均有较严重程度的粘连现象。中剂量情况介于低剂量和高剂量组之间。高剂量组有 4 例形成轻微程度粘连, 疏松易分, 无和腹壁粘连的情况的发生; 2 例子腹膜和肠管形成一定程度的粘连。

2 粘连程度评分

实验所有动物的粘连程度分级评分, 结果见表 1。与模型组比较, 钩藤碱中、高剂量组的腹腔粘连程度均明显减轻 ($P < 0.05$), 其中高剂量组效果最好 ($P < 0.05$), 地塞米松作用相似但更强 ($P < 0.01$)。

3 血清 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 含量的检测

血清中的炎症因子水平见图 1, 与正常组比较, 模型组 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的表达均明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 钩藤碱中、高剂量组能明显降低血清 IL-1β 和 TNF-α 的表达 ($P < 0.05$), 低剂量组 IL-1β、TNF-α 含量无明显变化, 但各给药组的 IL-6 变化不明显。

Table 1 The effect of rhynchophylline (RIN) on the degree of abdominal adhesions ($n = 10$). All animal were treated by different drugs for 10 days, then the adhesions grades were assessed by two persons. The result was analyzed by rank-sum test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs normal group

Group	Dosage /mg·kg ⁻¹	Adhesions grade					Assessed value
		0	1	2	3	4	
Normal group	-	9	1	0	0	0	6.15
Model group	-	0	0	2	3	5	46.80##
Dexamethasone	2	0	4	3	3	0	28.65**
RIN low dosage	3	0	2	2	3	3	39.00
RIN middle dosage	6	0	3	3	3	1	32.55*
RIN high dosage	12	0	4	3	2	1	29.85*

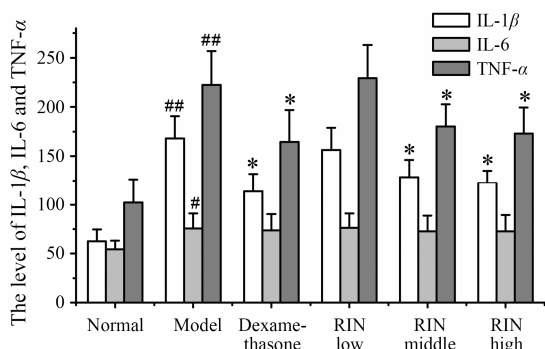


Figure 1 The effect of RIN on the levels (ng·L⁻¹) of IL-6, IL-1 β and TNF- α in serum. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs normal group

4 大鼠腹腔液中 TGF- β 1、CTGF、PAI 和 t-PA 的含量

TGF- β 1 和 CTGF 的含量见图 2, 与正常组对比, 粘连模型组大鼠腹腔液 TGF- β 1 和 CTGF 含量升高具有显著性差异 ($P < 0.05$); 与模型组对比, 钩藤碱中、高剂量组、地塞米松组显著性降低了 TGF- β 1 和 CTGF 水平 ($P < 0.01$), 可见钩藤碱对粘连模型的 TGF- β 1 含量有明显的抑制作用。

PAI 和 t-PA 的含量见图 3, 与正常组对比, 粘连

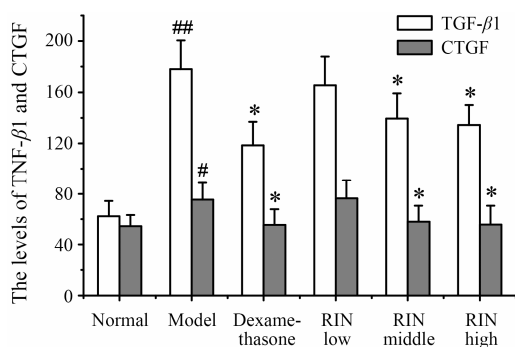


Figure 2 The effect of RIN on the levels (ng·L⁻¹) of TGF- β 1 and CTGF in peritoneal fluid. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs normal group

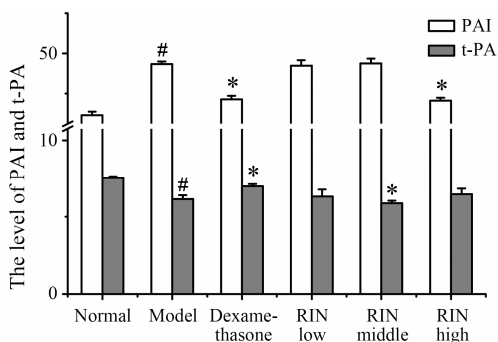


Figure 3 The effect of RIN on the levels (ng·mL⁻¹) of PAI and t-PA in peritoneal fluid. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs normal group

模型组大鼠腹腔液 t-PA 含量显著性的降低 ($P < 0.05$); 与模型组对比, 钩藤碱中剂量组、地塞米松组显著性降低了 t-PA 水平 ($P < 0.05$)。同时, 与正常组对比, 模型组 PAI 的含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组对比, 钩藤碱高剂量组、地塞米松组显著降低了 PAI 的水平 ($P < 0.05$)。

5 腹膜间皮细胞 FN mRNA 和蛋白表达水平的变化

钩藤碱对 FN 的 mRNA 表达量的影响见图 4, 钩藤碱孵育能够显著抑制 FN mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 溶剂对照组的抑制作用不明显。钩藤碱对细胞上清液中 FN 含量的影响见图 5, TGF- β 1 刺激能显著升高细胞上清液中 FN 的含量, 而钩藤碱能够有效地减少细胞上清液中 FN 的表达浓度 ($P < 0.05$)。

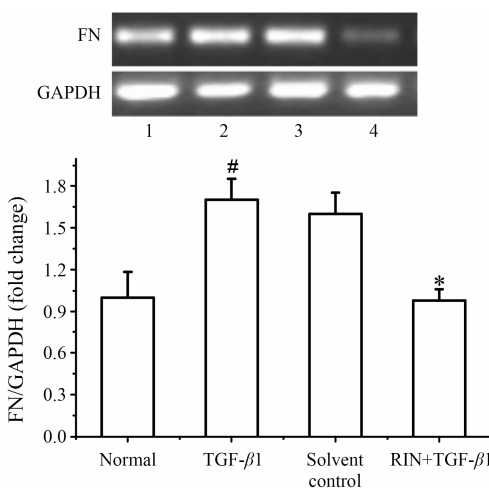


Figure 4 The effect of RIN on the of FN mRNA in peritoneal mesothelial cell. 1: Normal group (cell was incubated with serum-free medium for 24 h); 2: TGF- β 1 stimulation group (cell was incubated with TGF- β 1 5 ng·mL⁻¹ for 24 h); 3: Solvent control group (cell was incubated with TGF- β 1 5 ng·mL⁻¹ and 0.2% DMSO for 24 h); 4: RIN group (cell was incubated with TGF- β 1 5 ng·mL⁻¹ and RIN 48 μ g·L⁻¹ for 24 h); The ratios of FN to GAPDH from the normal group was normalized to 1. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs normal group

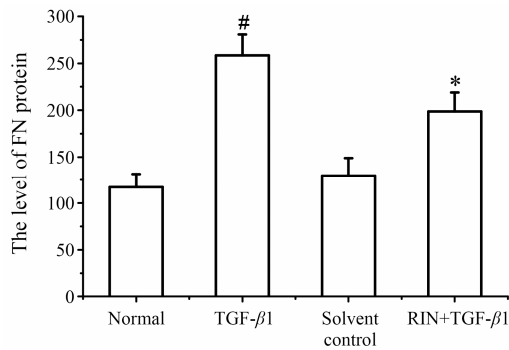


Figure 5 The effect of RIN on FN protein levels ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) of in the supernatant of peritoneal mesothelial cell. Data represent mean \pm SEM of six independent experiments. ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs normal group

6 腹膜间皮细胞 I 型胶原蛋白表达水平的变化

TGF- β 1 刺激能够显著增加腹腔间皮细胞分泌 I 型胶原蛋白, 而钩藤碱处理可以有效降低 I 型胶原的表达水平, 见图 6。

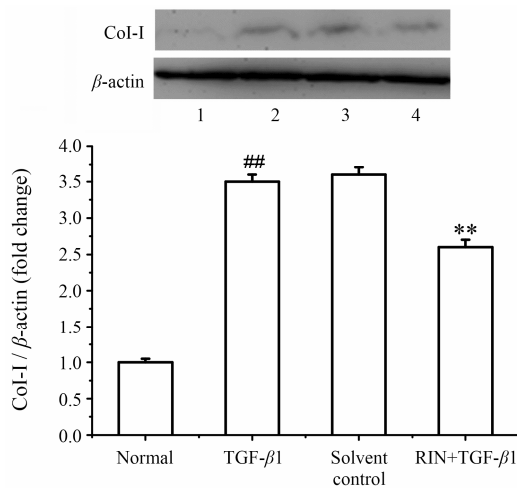


Figure 6 The effect of RIN on the expression of Col-I protein in peritoneal mesothelial cell. The cells were treated by different drugs for 24 h and the protein levels of Col-I were detected by Western blot. 1: Normal group; 2: TGF- β 1 stimulation group; 3: Solvent control group; 4: RIN group. The ratios of Col-I to β -actin from the control group was normalized to 1. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments. ^{**} $P < 0.01$ vs model group; ^{##} $P < 0.01$ vs normal group

7 腹膜间皮细胞中 Smad 信号通路相关蛋白表达水平的变化

如图 7 所示, TGF- β 1 刺激明显增加 p-Smad2/3 的蛋白含量, 与 TGF- β 1 刺激组相比, 钩藤碱可以显著降低 p-Smad2/3 的蛋白表达水平。同时 TGF- β 1 刺激抑制了 Smad7 的表达, 而钩藤碱可以显著提高 Smad7 的蛋白水平, 而溶剂对照组的作用则不明显。

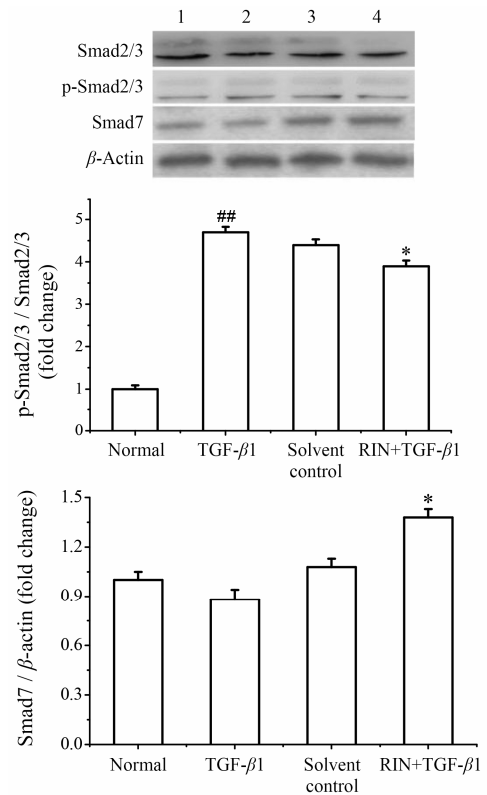


Figure 7 The effect of RIN on the Smad signal pathway in peritoneal mesothelial cell. The cells were treated by different drugs for 24 h and the protein levels of Col-I were detected by Western blot. 1: Normal group; 2: TGF- β 1 stimulation group; 3: Solvent control group; 4: RIN group. The ratios of p-Smad2/3 to Smad2/3 and Smad7 to β -actin from the control group were normalized to 1 respectively. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments. ^{*} $P < 0.05$ vs model group; ^{##} $P < 0.01$ vs normal group

讨论

腹腔粘连是腹腔手术后并发症之一, 许多因素与腹腔粘连的形成有关, 如手术损伤、异物残留和组织缺血等^[12, 13]。多种生长因子和细胞因子参与调控纤维蛋白沉积和降解之间的平衡, 其中 TGF- β 1 和 CTGF 与粘连的形成关系密切, 粘连浸润导致的炎症和炎症因子也对粘连发展具有重要影响^[14-17]。现代中医对临床实践常用验方的治疗机制进行了多方面探讨, 发现有些中药具有抗炎、提高纤溶系统酶活性、改善腹腔脏器的血液循环的功能^[18, 19]。钩藤碱是本课题组在对经典中药钩藤研究的基础上, 结合临床实践效果进行优化得到的有效抗腹腔粘连的生物活性物质。

本实验研究结果显示, 钩藤碱可不同程度降低腹腔粘连级别评分, 但以高剂量组的粘连级别评分降低明显。本实验还观察了钩藤碱对实验性腹腔粘连大鼠血清中炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的含量, 结

果显示, 模型组血清中前述各种炎症因子的含量都明显升高, 而钩藤碱可以剂量依赖地降低 IL-1 β 和 TNF- α 的含量, 尤其高剂量的钩藤碱的作用有显著性差异。但对 IL-6 的含量没有影响。表明钩藤碱具有较好的抗炎作用。

TGF- β 1 和 CTGF 与粘连的形成关系密切。本实验对各组大鼠腹腔液中 TGF- β 1 和 CTGF 的含量进行了检测, 实验结果显示, 模型组大鼠腹腔液中 TGF- β 1 和 CTGF 的含量显著上升, 而钩藤碱可以剂量依赖地降低其含量。与模型组相比, 钩藤碱中、高剂量组的降低作用具有显著性差异。其中高剂量组的效果甚至优于阳性药, 表明钩藤碱具有很强的抗粘连作用, 并且其作用机制可能是通过降低 TGF- β 1 信号通路进而干预了粘连的形成。腹膜损伤后受伤的纤维蛋白胶原开始重建, 腹膜纤溶系统可溶解纤维蛋白, 纤溶系统的激活使纤维蛋白溶酶原转化成纤维蛋白溶酶, 后者高效降解纤维蛋白, 形成其降解产物。本实验对各组大鼠腹腔液中 t-PA、PAI 的含量进行了研究, 结果发现模型组中 t-PA 含量降低, PAI 含量升高。而各给药组与模型组比较, 对 t-PA/PAI 的分泌调节有一定的改善。

在腹腔粘连形成的过程中, 腹膜间皮细胞纤维化具有至关重要的作用, 而研究表明 TGF- β 1 作为组织纤维化病变中最重要的促发因子之一是腹腔粘连发病过程中的关键调节点。TGF- β 1 抑制间皮细胞增殖、刺激腹膜间皮细胞分泌 I 型、III 型、IV 型胶原及 FN 等基质成分和分泌基质蛋白降解酶的抑制物等^[20]。Smad 信号通路是细胞纤维化的一条十分重要的信号途径, 其胞内信号传导分子是胞质蛋白 Smad, 其包括受体调节型 Smads: Smad1、2、3、5、8; 共用介导型 Smad: Smad4; 抑制型 Smads: Smad6、7。其中, Smad2 和 Smad3 是 TGF- β 1 激活的信号通路的下游信号分子, 磷酸化的 Smad2 或 Smad3 可与 Smad4 结合形成多聚体并由胞浆转入胞核, 参与靶基因的转录表达。而 Smad7 可阻断 TPR I 特异性识别和磷酸化 Smad2、3, 使得磷酸化的 Smad2、3 不能与 Smad4 形成多聚体, 从而抑制 TGF- β /Smads 信号通路^[21]。Smad 信号通路在正常情况下处于非激活状态, TGF- β 1 能特异性激活该通路^[22]。Smad2/3 磷酸化水平的高低也反映了纤维化的严重程度^[23]。本课题的实验结果表明 TGF- β 1 刺激的腹膜间皮细胞, 其 p-Smad2/3 的含量明显升高。而钩藤碱孵育显著地抑制了 p-Smad2/3 的含量。而 Smad7 作为 Smad 信号通路的抑制性因子, TGF- β 1 刺激的腹膜间皮细胞 Smad7 的表达明显下降,

而钩藤碱孵育可显著恢复 Smad7 的蛋白含量。表明钩藤碱可以通过调节 Smad 信号通路的激活, 从而减少粘连相关蛋白基因的启动和表达, 进而达到抗粘连发生的作用。FN 和 I 型胶原是细胞外基质的重要组成部分, 其含量的变化也间接地反映了腹腔粘连的形成程度。RT-PCR 检测也发现钩藤碱可以显著降低 TGF- β 1 诱导的 FN 的 mRNA 水平; 同时, 钩藤碱还可以降低 I 型胶原的蛋白表达, 表明钩藤碱有效地减轻粘连的形成。

综上所述, 本实验表明了钩藤碱具有很好的术后腹腔粘连作用, 降低粘连级别评分和血清中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的含量, 并剂量依赖地降低了大鼠腹腔液中 TGF- β 1 和 CTGF 的含量, 有效抑制了腹腔粘连的发生, 并且其抗粘连机制主要是调控 TGF- β 1 及其下游通路发挥作用。

References

- [1] Akakos TL, Thomakos N, Fine PM, et al. Peritoneal adhesions: tiology, pathophy-siology, and clinical significance [J]. *Dig Surg*, 2001, 18: 260–273.
- [2] Zeng J, Li XH. Molecular mechanism of peritoneal adhesion and drugprevention and treatment [J]. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 2003, 11: 1429–1432.
- [3] Liu YH, Yuan F, Xiao P, et al. The effect of TGF-BETAL on extracellular matrix and bFGF of human peritoneal mesothellal cell [J]. *Chin J Mod Med* (中国现代医学杂志), 2005, 12: 10–13.
- [4] Jayyousi R, Medcalf JF, Harris KP. Role of transforming growth factorbeta in peritoneal fibrosis [J]. *Nephrology*, 2002, 7: 216–219.
- [5] Wang CR, Jiang N, Cheng YG. Combination of traditional Chinese and Western medicine treatment of 966 cases of adhesive intestinal obstruction [J]. *Chin J Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2007, 12: 520–522.
- [6] Wang CX, Hou LB, Ma Y. Changtong oral liquid for prevention of postoperative intestinal adhesion: an experimental study [J]. *J First Mil Med Univ* (第一军医大学学报), 2005, 25: 1872–1891.
- [7] Li YL. Effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on the proliferation of rat vascular smooth muscle cell induced by angiotensin II [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2008, 24: 53–58.
- [8] Zheng MZ, Fan YJ, Zhang YC, et al. Neuroprotective effect and mechanism of *Uncariahynchophylla* (Miq.) Jacks extract against MPTP induced mouse model of Parkinson's disease [J]. *Li SZ Med Mat Med Reset* (时珍国医国药), 2015, 26:

- 1035-1037.
- [9] Jiao HC, Li YL, Sun JC, et al. Regulation effect of uncaria alkaloids on proliferation apoptosis related protein of mesenteric arterial cells [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med (山东中医药大学学报)*, 2013, 37: 244-247.
- [10] Zhang H, Song Y, Li Z, et al. Evaluation of ligustrazine on the prevention of experimentally induced abdominal adhesions in rats [J]. *Int J Surg*, 2015, 21: 1-7.
- [11] Nair SK, Bhat IK, Aurora AL. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions [J]. *Arch Surg*, 1974, 108: 849-853.
- [12] Yuzbasioglu MF, Ezberci F, Imrek E, et al. The effect of intraperitoneal catalase on prevention of peritoneal adhesion formation in rats [J]. *Invest Surg*, 2008, 21: 65-69.
- [13] Saba AA, Godziachvili V, Mavani AK, et al. Serum levels of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha correlate with peritoneal adhesion grades in humans after major abdominal surgery [J]. *Am Surg*, 1998, 64: 734-736.
- [14] Sulaiman W, Nguyen DH. Transforming growth factor beta 1, a cytokine with regenerative functions [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11: 1549-1552.
- [15] Naiki Y, Maeda Y, Matsuo K, et al. Involvement of TGF-beta signaling for peritoneal Sclerosing in continuous ambulatory peritoneal dialysis [J]. *J Nephrol*, 2003, 16: 95-102.
- [16] Kaidi AA, Nazzal M, Gurchumelidze T, et al. Preoperative administration of antibodies against tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 and their impact on peritoneal adhesion formation [J]. *Am Surg*, 2005, 61: 569-572.
- [17] Liu YH, Long ZG, Wu DG, et al. Effect of TGF- β 1 stimulation on the Smad signal transduction pathway of human peritoneal mesothelial cells [J]. *J Centr South Univ Med Sci (中南大学学报 (医学版))*, 2004, 29: 142-147.
- [18] Ling LJ, Zeng L, Lin N, et al. Postoperative pathological mouse model adhesion of abdominal cavity adhesion experiment research [J]. *Chin Gen Pract (中国全科医学)*, 2004, 7: 1742-1744.
- [19] Cao ZJ, Zhou SM, Wang LF. Combine traditional Chinese and western medicine treatment of adhesive intestinal obstruction, 117 cases of experience [J]. *Chin J Integr Med (中国中西医结合杂志)*, 2005, 11: 148-149.
- [20] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus [J]. *Cell*, 2003, 113: 685-700.
- [21] Derynck R, Zhang YE. Smad dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling [J]. *Nature*, 2003, 425: 577-584.
- [22] Weng YQ, Tu YY. Prevention of abdominal adhesion with polyclonal antibody of transforming-growth factor beta: an experimental study [J]. *Chin J Gen Surg (中国普通外科杂志)*, 2002, 11: 741-745.
- [23] Huang HC, Li JZ, Wang HY. Connective tissue growth factor inducing renal fibroblasts into myofibroblast [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2002, 47: 37-40.