DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.01.003

大网膜脂肪干细胞旁分泌HGF与加味补阳还五汤抑制腹膜间皮细胞EMT相关性的体外研究

郑敏麟[1],王亚楠[2],范文江[2],詹倩倩[1],陈锋斌[3]
(1.福建中医药大学中西医结合学院,福建 福州 350122;2.福建中医药大学中西医结合研究院,福建 福州 350122;
3.福建医科大学附属第一医院,福建 福州 350005)

摘要:目的 通过体外研究,探讨加味补阳还五汤抑制的腹膜间皮细胞(PMC)上皮-间充质转化(EMT)防治术后腹腔粘连(PAA)的作用,是否主要通过促进大网膜脂肪干细胞(ADSCs)旁分泌肝细胞生长因子(HGF)。方法 实验1明确加味补阳还五汤抑制PMC的EMT作用,是该方对PMC的直接作用,还是通过调控大网膜中的ADSCs旁分泌的间接作用:使用加味补阳还五汤与加味补阳还五汤培养ADSCs后制取其条件培养基(以下称"中药培养基")分别干预EMT模型的PMC,Western Blot法检测EMT相关的蛋白E-钙黏蛋白(E-Cad)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达水平。实验2明确加味补阳还五汤抑制PMC的EMT作用,是否与大网膜中的ADSCs旁分泌HGF相关:用低表达HGF的ADSCs条件培养基(以下称"低HGF培养基")、正常ADSCs条件培养基(以下称"普通培养基")、中药培养基等3种培养基干预PMC,并检测以下指标:(1)用ELISA法检测在干预PMC之前和之后,3种培养基中HGF的含量。(2)Western Blot法、qPCR法、免疫荧光(IF)法检测干预后各组PMC的EMT相关蛋白表达水平,划痕实验检测各组PMC的迁移能力。结果 实验1:加味补阳还五汤与中药培养基对EMT相关指标的影响。与模型组相比,加味补阳还五汤组上调E-Cad的蛋白表达($P<0.05$),下调α-SMA的蛋白表达($P<0.05$);中药培养基组显著上调了E-Cad的蛋白表达($P<0.01$),显著下调α-SMA的蛋白表达($P<0.01$)。与加味补阳还五汤组相比,中药培养基组上调E-Cad的蛋白表达($P<0.05$),显著下调α-SMA的蛋白表达($P<0.01$)。实验2:(1)作用于PMC前后,3种不同的培养基中HGF含量的比较:作用于PMC前,相比于普通培养基,低HGF培养基中含量显著降低($P<0.01$),中药培养基中含量显著增加($P<0.01$);作用于PMC后,各培养基组含量均显著性下降。(2)EMT相关蛋白表达情况:综合Western Blot、qPCR、IF结果,与模型组相比,各培养基组均可升高E-Cad表达($P<0.05$或$P<0.01$),降低α-SMA、VIM表达($P<0.05$或$P<0.01$),各培养基组均可抑制PMC的EMT,效果依次为中药培养基组>普通培养基组>低HGF培养基组。(3)发生EMT的细胞迁移能力变化情况:干预24、48 h后,与模型组相比,各组愈合率均有显著下降($P<0.01$),各组培养基均可降低EMT模型的R的迁移能力,效果依次为中药培养基组>普通培养基组>低HGF培养基组。(4)EMT相关蛋白表达与HGF含量相关性分析:E-Cad蛋白表达量与HGF含量呈正相关性($P<0.05$),α-SMA、VIM蛋白表达量与HGF含量呈负相关性($P<0.05$或$P<0.01$)。结论 加味补阳还五汤抑制PMC的EMT防治PAA的疗效可能是多靶点的,既有对PMC的直接作用,也有通过增强大网膜中的ADSCs旁分泌HGF的间接作用,而后者更为主要。

关键词:加味补阳还五汤;术后腹腔粘连;腹膜间皮细胞;脂肪间充质干细胞;肝细胞生长因子;上皮-间充质转化
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)01-0011-10

In Vitro Study on Correlation between HGF Paracrine Secretion by ADSCs in Greater Omentum and Inhibition of EMT in Peritoneal Mesothelial Cells by Supplemented Buyang Huanwu Decoction(加味补阳还五汤)

ZHENG Minlin[1],WANG Yanan[2],FAN Wenjiang[2],ZHAN Qianqian[1],CHEN Fengbin[3]
(1. College of Integrative Medicine,Fujian University of Traditional Chinese Medicine,Fuzhou 350122,Fujian,China;
2. Research Institute of Integrative Medicine,Fujian University of Traditional Chinese Medicine,Fuzhou 350122,Fujian,China;
3. The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University,Fuzhou 350005,Fujian,China)

Abstract:*Objective* Through in vitro studies,it explored whether Supplemented Buyang Huanwu Decoction(加味补阳还五

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82274516);福建省自然科学基金面上项目(2022J01842);福建中医药大学校管科研课题-重点项目(自然科学)(X2021003-重点)

作者简介:郑敏麟(1971-),男,福建福州人,教授,博士研究生导师,硕士,研究方向:中医脏腑的理论和临床。

汤,SBHD) could promote adipose stem cells(ADSCs) in greater omentum to paracrine hepatocyte growth factor(HGF) and whether this effect could inhibit the epithelial - mesenchymal transition(EMT) of peritoneal mesothelial cells(PMC) in order to initially clarify the pharmacological mechanism and target of this prescription in preventing and treating postoperative abdominal adhesion(PAA). *Methods* Experiment 1 clarified whether the inhibitory effect of SBHD on the EMT of PMC was a direct effect of the formula on PMC or an indirect effect by regulating the paracrine secretion of ADSCs in the greater omentum. After culturing ADSCs with SBHD, conditional culture media(hereinafter referred to as "Chinese medicine culture media") were prepared to intervene in the PMC of EMT models, and the expression levels of EMT related proteins E - cadherin(E - Cad) and α - smooth muscle actin(α - SMA) were detected by Western Blot. Experiment 2 clarified whether the inhibitory effect of SBHD on EMT of PMC was related to the secretion of HGF by ADSCs in the greater omentum. The intervention of PMC used three types of media: low HGF expressing ADSCs conditioned medium(hereinafter referred to as "low HGF medium"), normal ADSCs conditioned medium(hereinafter referred to as "normal medium") and traditional Chinese medicine medium and the following indicators were detected. (1) ELISA was used to detect the content of HGF in the three media before and after intervention in PMC. (2) Western Blot, qPCR and IF methods were used to detect the expression levels of EMT related proteins in each group of PMCs after intervention, and scratch assay was used to detect the migration ability of PMCs in each group. *Results* Experiment 1: Effect of SBHD and traditional Chinese medicine culture medium on EMT related indicators: Compared with the model group, the SBHD group up - regulated the protein expression of E - Cad($P<0.05$) and down - regulated the protein expression of α - SMA($P<0.05$). The traditional Chinese medicine culture medium group significantly up - regulated the protein expression of E - Cad($P<0.01$) and significantly down - regulated the protein expression of α - SMA($P<0.01$). Compared with the SBHD group, the traditional Chinese medicine culture medium group up - regulated the protein expression of E - Cad($P<0.05$) and significantly down - regulated the protein expression of α - SMA($P<0.01$). Experiment 2: (1)Comparison of HGF contents in three different culture media before and after acting on PMC: Before acting on PMC, compared with the normal medium, the content in low HGF medium was significantly reduced($P<0.01$), while the content in traditional Chinese medicine medium was significantly increased($P<0.01$). After acting on PMC, the content of each culture medium group significantly decreased. (2) Expression of EMT - related proteins: Based on the results of Western Blot, qPCR and IF, compared with the model group, all culture medium groups were able to increase E - Cad expression($P<0.05$ or $P<0.01$) and decrease the expressions of α - SMA and vimentin(VIM)($P<0.05$ or $P<0.01$). All culture medium groups were able to inhibit the EMT of PMC, with the order of effect being Chinese medicine culture medium group > normal medium group > low HGF medium group. (3) Changes in cell migration ability of EMT: After intervention for 24 h and 48 h, the healing rate of each group was significantly decreased compared with that of the model group($P<0.01$). Each group of culture media can reduce the R migration ability of the EMT model, with the order of effect being Chinese medicine culture medium group > normal medium group > low HGF medium group. (4) Correlation analysis of EMT - related protein expression and HGF content: The expression level of E - Cad protein was positively correlated with the content of HGF($P<0.05$). The protein expressions of α - SMA and VIM were negatively correlated with the content of HGF($P<0.05$ or $P<0.01$). *Conclusion* The therapeutic effect of SBHD in inhibiting the EMT of PMC and preventing PAA may be multi - target, with both direct effects on PMC and indirect effects by enhancing the paracrine secretion of HGF by ADSCs in the greater omentum, with the latter being more important.

Keywords: Supplemented Buyang Huanwu Decoction(加味补阳还五汤); postoperative abdominal adhesions(PAA); peritoneal mesothelial cells; adipose - derived stem cells(ADSCs); hepatocyte growth factor(HGF); epithelial - mesenchymal transition(EMT)

术后腹腔粘连(PAA)是腹、盆部手术中常见的严重并发症,可引发慢性顽固性腹痛、不孕症,并增加再次手术的难度;其中很大的一部分可进展为粘连性肠梗阻,甚至危及生命[1]。尽管目前在临床上已经有几种方法(如改进外科术式[2]、药物防治[3-4]及腹腔内使用隔离物[2]等)用于防止粘连的形成,但均因效果不够稳定,导致无法在临床中广泛应用。PAA 对患者的生活质量和社会经济成本都造成了重大影响,防治 PAA 是当今世界外科领域非常关注的前沿问题,也是目前亟须解决的外科方面的世界难题[5-6]。

PAA 的具体发病机制现在仍不十分明确。最新的证据[7]显示,手术中受损的腹膜间皮细胞(PMC)引发的上皮 - 间充质转化(EMT),是 PAA 的关键发病因素。

研究表明,转化生长因子 - β1(TGF - β1)是 EMT 的最主要诱发因子,而脂肪干细胞(ADSCs)能通过旁分泌肝细胞生长因子(HGF)从而抑制 EMT[8]。

大网膜在控制腹腔炎症时有强大的作用,大网膜的脂肪库中富含 ADSCs。然而,大网膜中的 ADSCs 旁分泌 HGF 功能的异常,是否与 PAA 发病密切相关,目前尚未得到深入研究和阐明。本课题组在临床研究中观察到,PAA 患者通常表现为体形消瘦、腹部脂肪较少,且未发现有腹部肥胖的病例出现 PAA

的情况。早期的动物研究表明[9],自体大网膜脂肪细胞再培养后注入腹腔,能有效预防 PAA。本课题组推测,以上现象均应该与其中的 ADSCs 相关。

本课题组应用加味补阳还五汤(SBHD)在临床中治疗 PAA,获得了较好的疗效;同时,在动物实验中发现,该方可以抑制 PMC 的 EMT[10-12]。但尚不明确是否通过调控大网膜的 ADSCs 旁分泌 HGF 实现。本研究拟通过两个序列的细胞实验,对此进行探讨:① 实验 1 通过对比中药培养基(TCM-ADSC-CM),即加味补阳还五汤培养 ADSCs 后制取其条件培养基(CM),与加味补阳还五汤对 PMC 的 EMT 影响,以确定该方的上述疗效是该方对 PMC 的直接作用,还是通过大网膜 ADSCs 的间接作用;② 实验 2 在实验 1 的结果上,进一步明确加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 作用,是否与大网膜中的 ADSCs 旁分泌 HGF 相关。

1 材料

1.1 细胞株

人脂肪间充质干细胞细胞株(简称 ADSCs),购于海星生物有限公司。人 PMC,采用 HMrSV5 细胞株,购于广州吉妮欧生物有限公司。

1.2 实验药物

1.2.1 制备加味补阳还五汤浓缩液 中药购自福建中医药大学附属第三人民医院,黄芪 100 g,红花 10 g,桃仁 15 g,赤芍 15 g,当归 10 g,川芎 10 g,蒲黄 10 g,五灵脂 15 g,土鳖虫 10 g,地龙干 10 g,炙甘草 5 g 等。参照参考文献[13-14],制备采用水煎醇沉法,制取含原生药 2.0 g/mL 的母液,经 0.22 μm 的滤膜进行过滤除菌后,瓶子分装,保存在 -20 ℃冰箱中备用。用于干预细胞时,以 DMEM 高糖培养基临时调配浓度为 10 mg/mL 生药量再使用。

1.2.2 制备各种条件培养基 方法参照参考文献[13,15-17],分别制备正常 ADSCs 条件培养基(普通培养基,Normal-ADSC-CM)、加味补阳还五汤培养的条件培养基(中药培养基,TCM-ADSC-CM)、低表达 HGF 的条件培养基(低 HGF 培养基,Low-HGF-ADSC-CM);其中低 HGF 培养基使用 HGF-SiRNA-652 基因片段(基因片段由福州载基生物提供)转染 ADSCs 取得。实验时用含 3% FBS 的 DMEM 高糖培养基配制成 50% 体积分数。

1.3 实验试剂及仪器

1.3.1 实验试剂 E-钙黏蛋白(E-Cad)抗体(14472S)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)抗体(ab124964)、Vimentin(VIM)抗体(3H9D1)、Human HGF ELISA 试剂盒(EK1H01-96)、DMEM 高糖培养基(8121645)、成人脂肪间充质干细胞完全培养基(ADHX-G101)、PBS(SH30256.01B)、胎牛血清(CCS3001002)、胰蛋白酶(2520007225)、青霉素-链霉素(SV30010)、HRP-羊抗鼠 IgG(SA00013-1)、HRP-羊抗兔 IgG(SA00013-2)、CoraLite488-羊抗兔 IgG(SA00013-2)、CoraLite488-羊抗鼠 IgG(SA00013-1)、抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)(P0131-5 mL)、极超敏化学发光试剂盒(ED0015-B)、SweScript RT I First Strand cDNA Synthesis Kit(G3330-50)、2×SYBR Green qPCR Master Mix(None ROX)(G3320-05)。

1.3.2 实验仪器 高压灭菌锅(LMQ.C80E)、-80 ℃超低温冰箱(ulT1386-5-V41)、细胞培养箱(Cytoperm2)、荧光倒置显微镜(TS-100F)、台式冷冻离心机(Multifuge X3R)、低速离心机(Multifuge X3R)、微孔板酶标仪(Bio-TEKELx800)、小型垂直电泳槽(Mini PROTEAN Tetra)、Trans-Blot 小型转印槽转膜仪(Trans-Blot SD)、基础电泳仪电源(PowerPac Basic)、基因扩增仪(A37028)、超高灵敏度化学发光成像系统(ChemiDoc XRS+)、荧光定量 PCR 仪(CFX96TM Optics Module)。

2 方法

2.1 实验 1

加味补阳还五汤与中药培养基二者抑制 PMC 的 EMT 疗效比较。

2.1.1 实验分组和药物治疗 取第 3 代融合至 70% 左右时接种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个,每组 3 个复孔。细胞贴壁后,更换无血清培养基,对细胞进行饥饿处理,12 h 后加入 10 ng/mL 的 TGF-β1 干预,48 h 后分别加入 10 mg/mL 的加味补阳还五汤与 50% 体积分数的中药培养基。分组如下:正常组:3% FBS+DMEM;模型组:3% FBS+DMEM+TGF-β1;加味补阳还五汤组:3% FBS+DMEM+TGF-β1+加味补阳还五汤浓缩液;中药培养基组:3% FBS+ DMEM+TGF-β1+中药培养基。

2.1.2 Western Blot 检测 E-Cad、α-SMA 蛋白表达 按照试剂盒说明书操作。

2.2 实验 2

加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 作用,与大网膜 ADSCs 旁分泌 HGF 的相关性研究。

2.2.1 实验分组 (1)正常组:3% FBS+DMEM;(2)模型组:3% FBS+DMEM+TGF-β1;(3)中药培养基组(即加味补阳还五汤培养的 ADSCs 条件培养基组):3% FBS+ DMEM+TGF-β1+中药培养基;(4)普通培养基组(即正常 ADSCs 条件培养基组):3% FBS+DMEM+TGF-β1+普通培养基;(5)低 HGF 培养基组(即低表达 HGF 的 ADSCs 条件培养基组):3% FBS+ DMEM+TGF-β1+低 HGF 培养基。

2.2.2 模型构建和药物治疗 方法参照参考文献[13],当第 3 代 PMC 融合至 70% 左右时,按每孔 2×10^5 个,每组 3 个复孔,接种于 6 孔板中。当观察到细胞贴壁后,再更换为无血清培养基;并在 12 h 后,除正常组以外的其他 4 组均加入 10 ng/mL 的 TGF-β1 进行 EMT 的造模;在 48 h 后,中药培养基组、普通培养基组和低 HGF 培养基组再分别加入相应的条件培养基(50% 体积分数),继续培养 24 h。

2.2.3 指标检测 (1)ELISA 法检测各组 CM 在干预 PMC 前、后的 HGF 不同含量:操作方法按该试剂盒的说明书。

(2)Western Blot 检测 PMC 的 E-Cad、α-SMA 蛋白的表达量:操作方法按该试剂盒的说明书。

(3)qPCR 检测 PMC 的 α-SMA 的 mRNA 的表达量:操作方法按该试剂盒的说明书,先分别提取各组 PMC 的总 RNA,通过逆转录取得 cDNA,最后行 qPCR,引物序列见表 1。结果分析,mRNA 的相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$,ΔΔCt = 各组(Ct 目的-Ct 内参)-对照组(Ct 目的-Ct 内参)。

(4)免疫荧光(IF)法检测 PMC 的 E－Cad 荧光相对强度:操作方法按参考文献方法[18－19],在荧光显微镜下观察,然后拍照。

(5)划痕实验检测各组条件培养基干预 PMC 的 EMT 迁移能力的变化:使用记号笔与直尺在 6 孔板背面中间 1 条直线,取第 3 代融合至 70% 左右的 PMC 接种于该 6 孔板中,每组 3 个复孔,每孔 2×10^5 个。细胞融合至 70% 左右时,除正常组以外的组别均加入 TGF－β1(10 ng/mL),继续干预 48 h 后,使用直尺与 200 μL 枪头,垂直于事先划好的直线,力度均匀地每隔 0.5 cm 划 1 条直线。PBS 洗去散落的细胞后,分别加入含各组 CM。分别在 0、24、48 h 于显微镜下拍照记录,根据公式计算愈合率,公式为:愈合率 =[(0 h 划痕面积－某一时间段划痕面积)/0 h 划痕面积]×100%。

表 1 引物序列

基因	引物
GAPDH	5′GGAAGCTTGTCATCAATGGAAATC3′
	5′TGATGACCCTTTTGGCTCCC3′
VIM	5′GGAGGAGATGCTTCAGAGAGAG3′
	5′GGATTTCCTCTTCGTGGAGTTTC3′
α－SMA	5′CAATGTCCTATCAGGGGGCAC3′
	5′CGGCTTCATCGTATTCCTGTT3′

2.3 统计学方法

统计数据采用 SPSS 26.0 软件分析,并用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据符合正态性分布采用方差分析,数据方差齐两两比较采用 LSD 法,数据方差不齐两两比较采用 Games－Howell 法比较;数据不符合正态性分布则采用多样本秩和检验;相关性分析采用皮尔逊法;$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 实验 1

加味补阳还五汤与中药培养基二者抑制 PMC 的 EMT 的疗效比较。

使用加味补阳还五汤、中药培养基分别对 PMC 的 EMT 模型进行干预,应用 Western Blot 法检测 E－Cad、α－SMA 蛋白表达。结果如表 2、图 1 所示:① 与正常组相比,模型组显著下调 E－Cad 的蛋白表达($P<0.01$),显著上调 α－SMA 的蛋白表达($P<0.01$)。② 与模型组相比,加味补阳还五汤组上调 E－Cad 的蛋白表达($P<0.05$),下调 α－SMA 的蛋白表达($P<0.05$);中药培养基组显著上调了 E－Cad 的蛋白表达($P<0.01$),显著下调 α－SMA 的蛋白表达($P<0.01$)。③ 与加味补阳还五汤组相比,中药培养基组上调 E－Cad 的蛋白表达($P<0.05$),显著下调 α－SMA 的蛋白表达($P<0.01$)。

3.2 实验 2

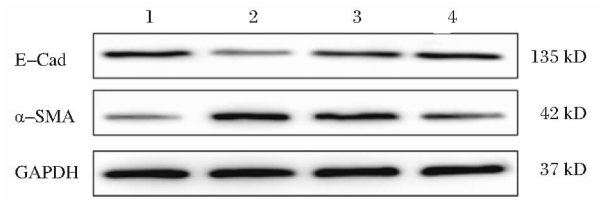
加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 作用,与大网膜 ADSCs 旁分泌 HGF 的相关性研究。

3.2.1 在干预 PMC 前后,ELISA 法检测各组条件培养基中 HGF 含量 详见表 3。干预 PMC 前 HGF 的含量,与普通培养基组比较,中药培养基组显著升高($P<0.01$),低 HGF 培养基组的显著降低($P<0.01$)。与干预前相比,干预 PMC 后,HGF 含量在各组的条件培养基中均显著性下降。

表 2 Western Blot 法检测 PMC 的 E－Cad 和 α－SMA 的蛋白表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	E－Cad	α－SMA
正常组	4	1.32±0.18	0.47±0.07
模型组	4	0.62±0.09**	1.47±0.22**
加味补阳还五汤组	4	0.87±0.14#	1.06±0.12#
中药培养基组	4	1.17±0.21##▲	0.68±0.09##▲▲

注:** 与正常组比较,$P<0.01$;# 与模型组比较,$P<0.05$;## 与模型组比较,$P<0.01$;▲ 与加味补阳还五汤组比较,$P<0.05$;▲▲ 与加味补阳还五汤组比较,$P<0.01$。



注:1. 正常组;2. 模型组;3. 加味补阳还五汤组;4. 中药培养基组。

图 1 Western Blot 法检测 PMC 的 E－Cad 和 α－SMA 的蛋白表达情况

表 3 干预 PMC 前后,各组条件培养基中 HGF 含量变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体积分数/(%)	干预前/(pg/mL)	干预后/(pg/mL)
中药培养基组	3	50	1 147.75±5.15△△	64.25±1.96
普通培养基组	3	50	779.98±6.85	63.12±2.59
低 HGF 培养基组	3	50	489.68±6.12△△	40.05±1.68△△

注:△△ 与普通培养基组比较,$P<0.01$。

3.2.2 各组在相应的不同条件培养基干预后,PMC 的 EMT 相关蛋白表达情况 (1)E－Cad 表达情况。Western Blot 结果详见表 4、图 2。各组 E－Cad 蛋白的表达比较:相较于正常组,模型组的水平显著下调($P<0.01$)。相较于模型组,中药培养基组的表达显著上调($P<0.01$),普通培养基组的表达上调($P<0.05$),而低 HGF 培养基组变化则无统计学意义。IF 结果详见表 5、插页Ⅵ图 3,各组 E－Cad 相对荧光强度比较:相较于正常组,模型组显著减少($P<0.01$)。相较于模型组,各条件培养基组均显著增强($P<0.01$)。相较于普通培养基组,中药培养基组显著增加($P<0.01$),低 HGF 培养基组显著减少($P<0.01$)。这表明,中药培养基组对提高 PMC 的 E－Cad 表达效果优于普通培养基组,而低 HGF 培养基组的效果较为不理想。

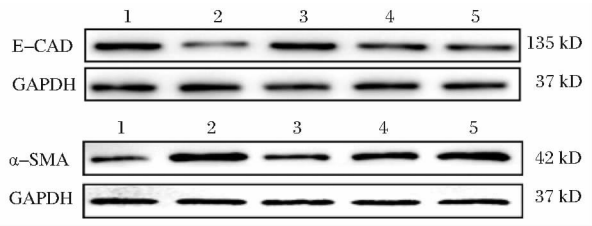
表 4 Western Blot 法检测 PMC 的 E－Cad 和 α－SMA 的蛋白表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体积分数/(%)	E－Cad	α－SMA
正常组	3		1.65±0.05	0.30±0.05
模型组	3		0.73±0.16**	1.14±0.12**
中药培养基组	3	50	1.28±0.17##	0.44±0.11##
普通培养基组	3	50	1.06±0.19#	0.61±0.14##
低 HGF 培养基组	3	50	0.93±0.11	0.84±0.24#△

注:** 与正常组比较,$P<0.01$;# 与模型组比较,$P<0.05$;## 与模型组比较,$P<0.01$;△ 与普通培养基组比较,$P<0.05$。

(2)α－SMA 表达情况。Western Blot 结果详见表 4、图 2。各组 α－SMA 蛋白表达的结果比较:相较于正常组,模型组显

著增加($P<0.01$)。相较于模型组,中药培养基组、普通培养基组均显著下调($P<0.01$),低 HGF 培养基组下调($P<0.05$)。相较于普通培养基组,低 HGF 培养基组上调($P<0.05$)。qPCR 结果详见表 6,各组 α-SMA 的 mRNA 表达结果比较如下:相较于正常组,模型组显著上调($P<0.01$)。相较于模型组,中药培养基组、普通培养基组均显著下调($P<0.01$),低 HGF 培养基组下调($P<0.05$)。相较于普通培养基组,中药培养基组显著下调($P<0.01$),低 HGF 培养基组显著上调($P<0.01$)。说明抑制 PMC α-SMA 表达的效果依次为中药培养基组>普通培养基组>低 HGF 培养基组。



注:1. 正常组;2. 模型组;3. 中药培养基组;4. 普通培养基组;5. 低 HGF 培养基组。

图 2 Western Blot 法检测 PMC 的 E-Cad 和 α-SMA 的蛋白表达情况

表 5 IF 法检测 E-Cad 表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体积分数/(%)	E-Cad
正常组	3		1.00±0.03
模型组	3		0.22±0.02**
中药培养基组	3	50	0.76±0.04##△△
普通培养基组	3	50	0.45±0.04##
低 HGF 培养基组	3	50	0.33±0.03##△△

注:**与正常组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$;△△与普通培养基组比较,$P<0.01$。

表 6 qPCR 法检测 PMC 的 α-SMA 与 VIM 表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体积分数/(%)	α-SMA
正常组	3		1.00±0.00
模型组	3		6.85±0.24**
中药培养基组	3	50	3.04±0.25##△△
普通培养基组	3	50	5.17±0.12##
低 HGF 培养基组	3	50	6.46±0.12#△△

注:**与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$;△△与普通培养基组比较,$P<0.01$。

(3)E-Cad、α-SMA 蛋白表达与 HGF 含量相关性分析。通过皮尔逊相关性分析,结果详见表 7。E-Cad 蛋白表达量与 HGF 含量之间的相关系数 r 为 0.73,说明它们之间呈正相关性($P<0.05$)。α-SMA 与 HGF 含量之间的相关系数 r 为 -1.00,说明它们之间呈负相关性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明各组 CM 抑制 PMC 的 EMT 能力与其 HGF 含量相关。

3.2.3 各组 CM 干预 PMC 的 EMT 迁移能力变化情况 应用划痕实验检测各组 CM 对经 TGF-β1 诱导的 PMC 的迁移能力的影响,结果如表 8、插页Ⅷ图 4 所示。24 h 后,正常组划痕只有轻微愈合,模型组的划痕约愈合了 1/3,48 h 后,正常组划痕稍有愈合,模型组的划痕约愈合了 2/3,两个时间段 3 种上清液组划痕均有愈合,愈合程度依次为中药培养基组<普通培养基组<低 HGF 培养基组。与模型组相比,各组愈合率均有显著下降($P<0.01$);与普通培养基组相比,中药培养基组愈合率下降($P<0.05$),低 HGF 培养基组愈合率显著上升($P<0.01$)。各组 CM 均可降低 EMT 模型的 PMC 的迁移能力。

表 7 PMC 的 EMT 相关蛋白表达与各组 CM 中 HGF 含量相关性分析

EMT 相关指标	相关性	HGF 含量
E-Cad	r 值	0.73
	P 值	<0.05
α-SMA	r 值	-1.00
	P 值	<0.01

表 8 PMC 的划痕愈合率(迁移能力)变化情况($\bar{x}\pm s$) 单位:%

组别	n	24 h 愈合率	48 h 愈合率
正常组	3	5.62±0.61	10.41±1.46
模型组	3	46.17±1.71**	71.90±0.56**
中药培养基组	3	14.80±1.86##△△	37.25±1.64##△△
普通培养基组	3	18.10±1.90##	58.70±0.74##
低 HGF 培养基组	3	23.70±0.71##△△	63.31±0.54##△△

注:**与正常组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$;△△与普通培养基组比较,$P<0.01$。

4 讨论

4.1 PMC 的 EMT 与 PAA 发病机制之间的关系

4.1.1 EMT EMT 是指在上皮细胞转化为间充质细胞的过程,在此过程中,上皮细胞将失去极性,细胞间紧密连接和黏附连接,获得游走迁移的能力[17]。

(1)发生 EMT 时上皮细胞的主要变化。①E-Cad 又名上皮细胞钙黏素,是一种主要在上皮细胞表达、Ca^{2+} 依赖性的跨膜糖蛋白,在介导上皮细胞间彼此连接有重要作用,通过黏附连接,促进上皮细胞之间的黏附,抑制细胞的运动迁移。E-Cad 是上皮细胞的重要标志分子[18-19]。②α-SMA 与 VIM 一起构成细胞骨架,发生 EMT 时,转化中的上皮细胞肌动蛋白中会表达和被掺入 α-SMA,逐渐获得肌成纤维细胞的表型。α-SMA 是肌成纤维细胞的标志分子[20]。③迁移能力:上皮细胞本身拥有顶端-基底极性,通过E-Cad、紧密连接蛋白等介导细胞间黏附、连接的蛋白和桥粒结合固定在基底膜上。在经典的 TGF-β1 诱导的 Smad 信号途径中,下游转录因子 SNAIL1 被激活,上皮细胞结构的主要成分受到抑制,间充质状态相关基因(如 α-SMA 等)激活,立方状、扁平状的上皮细胞顶端-基底极性丢失,细胞骨架重组(顶端收缩、形成肌动蛋白应力纤维),细胞转化成具有前后极性的纺锤状的间充质细胞,迁移能力增强[21]。

在本实验中,与正常组相比,模型组 E-Cad 表达降低,α-SMA 表达升高,划痕实验 24 h 与 48 h 后的愈合率均显著上升,说明 PMC 经历了 EMT,造模成功。

(2)TGF-β1 和 HGF 被认为是 ADSCs 调控 EMT 最重要的一对细胞因子。①TGF-β1 特异性激活 Smad 信号通路,是 EMT 最主要的激发因子[5,15-16]。TGF-β1 与其Ⅰ型受体、Ⅱ型受体结合后,启动下游的信号通路,从而抑制 E-Cad 等上皮基因表达、刺激 α-SMA 等间充质基因表达,启动

EMT[22-24]。经历EMT的上皮细胞失去极性和黏附连接,同时获得间充质细胞表型和更强的迁移能力,这些变化还重塑了细胞与邻近细胞以及基底膜和其他细胞外基质结构的接触[25]。本实验PMC的EMT模型组就是通过TGF-β1诱导制作的。②HGF可以抑制TGF-β1激发EMT。最新的研究认为,HGF是一种有效的抗纤维化蛋白,具备多种生物活性,它可以降低TGF-β1受体的表达数量,从而降低细胞对TGF-β1的敏感性,达到阻断TGF-β1/Smad通路[26-29],抑制促进细胞外基质生成和纤维化的相关基因(如TGF-β1、肿瘤坏死因子、Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原等)表达的作用,最终抑制细胞的EMT及其后续的纤维化过程[30-32]。本实验结果发现,E-Cad蛋白表达量与HGF含量之间呈正相关性,α-SMA蛋白表达量与HGF含量之间呈负相关性,说明HGF是抑制PMC的EMT的关键。

4.1.2 PMC的EMT与PAA的发病机制之间的关系 腹膜是覆盖在腹壁(壁层腹膜)及内脏器官(脏层腹膜)表面的一层浆膜,其主要成分为PMC,是单层、扁平状的上皮细胞。

由于PMC通过松散的细胞间桥连接,腹膜极易受到创伤[2]。手术对腹膜造成的损伤使PMC的完整性受损,基底膜暴露,胶原蛋白、纤维蛋白、纤维连接蛋白等细胞外基质成分渗出、沉积[6-7,33]。之前的研究表明[34],当腹膜受到损伤后,PMC会发生EMT,转化为成纤维细胞和肌成纤维细胞以应对这种损伤。在EMT过程中,新转化成的成纤维细胞和肌成纤维细胞,将会合成大量的细胞外基质,细胞外基质过度沉积就形成腹膜之间的粘连[7,20,24]。同时,失去了PMC被覆的腹膜表面,更为PAA提供了黏贴部位。

4.2 大网膜中的脂肪干细胞与PMC的EMT、PAA的关系

4.2.1 ADSCs ADSCs是从脂肪组织中提取的具有多向分化能力的干细胞。它们在全身脂肪组织中广泛分布、数量庞大[35](1 g脂肪组织含有ADSCs为$3.5\times10^5\sim1\times10^6$个[36])。大网膜具有控制炎症、保护腹腔内脏器的作用,是一个腹腔中功能强大的器官。作为人体主要的脂肪库之一,大网膜中富含ADSCs。

4.2.2 ADSCs旁分泌(TGF-β1、HGF)与EMT的关系 目前研究发现[37-40],ADSCs能够通过合成并释放多种可溶性的、具有生物活性的物质,用以调控其附近细胞的功能,以及调节其生长和发育的进程。在体外培养ADSCs的条件培养基中,可检测到包括TGF-β1、HGF、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子和角化细胞生长因子等在内的多种生长因子,在调节细胞EMT和组织的炎症、纤维化等多个环节发挥了非常重要的作用。其中,TGF-β1和HGF被认为是ADSCs调控EMT最重要的一对细胞因子。

4.2.3 由于大网膜ADSCs旁分泌HGF不足、无法有效抑制PMC的EMT,可能是导致PAA发生的关键原因 腹腔内的大网膜是连在胃的大弯侧和横结肠之间的四层腹膜结构,悬垂覆盖于空肠和回肠的前面。大网膜对腹腔内器官的炎症有强大的防御作用。作为人体主要的脂肪储存库之一,大网膜富含脂肪组织和ADSCs。

较早时有学者发现[9],取出动物大网膜的脂肪细胞,经过体外培养后再注入原动物的腹腔,可以有效预防PAA,考虑到脂肪细胞中富含大量ADSCs,笔者认为应该是ADSCs而非单纯的脂肪细胞,在其中起了关键作用。在临床中,笔者观察到,PAA患者普遍体形消瘦、腹部的脂肪含量较少,而基本少见腹部肥胖的PAA患者;考虑到ADSCs旁分泌HGF对EMT的强大抑制作用,以及PMC的EMT在PAA发病中充当关键角色,因此推测该病可能与大网膜中ADSCs旁分泌HGF不足密切相关。

通过对本实验相关性分析的结果可见,PMC的EMT严重程度与ADSCs旁分泌HGF量的高低之间呈正相关性。与HGF含量正常的普通培养基组相比,HGF含量较低的低HGF培养基组其PMC的EMT程度更加严重;说明大网膜中ADSCs旁分泌的低HGF状态,更容易导致PMC的EMT,更易在腹腔手术后患上PAA。

4.3 加味补阳还五汤抑制PMC的EMT的作用,及其作用的途径和靶点初探

4.3.1 加味补阳还五汤防治PAA的由来 中医药在防治PAA方面有一定作用。大多数学者认为[41-42],PAA由瘀血留滞,肠腑气机不利所致,属里实证;治法以理气导滞通腑,或行气活血化瘀等泻实法为主,用药多以大承气汤、通腑泻热灌肠合剂等。

PAA因腹部手术引起,本课题组在临床研究中发现,患者原本素体就元气不足,手术后元气更加损伤;中医认为,气是推动血液运行的动力,“气行则血行”,气虚无力推动血行则血瘀,瘀久入络,导致肠腑粘连,故发为PAA。其病机应为“本虚标实”,以“元气虚”为本,以“血瘀入络”为标。故治法应为益气活血通络,予以加味补阳还五汤。本课题组运用该方在临床治疗和动物实验中都取得了较好的疗效;并且前期的动物实验表明[7-9],加味补阳还五汤能明显减轻术后的PMC的EMT、纤维化和腹腔粘连。

4.3.2 加味补阳还五汤的组成和方解 加味补阳还五汤是在传统名方“补阳还五汤”的基础上,加入了另一名方“失笑散”(即蒲黄和五灵脂),以及土鳖虫、炙甘草而形成的方剂,全方具有大补元气和活血通络止痛之功,非常切合PAA的病因病机,故笔者在临床中用于治疗该病,效如桴鼓。

补阳还五汤,原本是用于治疗气虚血瘀引起的中风后遗症的主要方剂,源自清代的名医王清任所著的《医林改错》一书。原方中黄芪用至四两(笔者的临床用量为100 g),可以大补术后受损之元气,量大为君,为本方君药,补气以行血,主治PPA气虚血瘀的主要病机;臣以红花、桃仁、赤芍、当归、川芎,以助君药行气活血祛瘀;少佐地龙活血通络,加强全方活血祛瘀之功。

加土鳖虫者,因虫类通络,故土鳖虫擅长逐瘀通络理伤,既能与地龙干配伍以通络,又能调理因手术损伤的肠腑,并加强全方活血祛瘀之功。

加蒲黄、五灵脂者,二药即“失笑散”,为专治瘀血停滞之腹痛,功效卓越的中医名方;《太平惠民和剂局方》说该方能“治产后心腹痛欲死,百药不效,服此顿愈”;《医宗金鉴·删补名医方论》认为该方“小腹结痛,迷闷欲绝……有推陈致新之功,甘不伤脾,辛能散瘀,不觉诸证悉除,直可以一笑而置之矣”;故此二药对 PAA 和由此引起的顽固性腹痛有奇效。更妙的是,失笑散还可将补阳还五汤补气活血的作用专注于腹部,起到“引药归经”的作用。

加炙甘草调和诸药,使“补阳还五汤”合“失笑散”两方合为一方。全方共奏补气活血、通络理伤之功,治疗 PAA 的功效相得益彰。

4.3.3 *关于补阳还五汤现代研究和加味补阳还五汤的前期研究* 多项研究结果指出,补阳还五汤能抑制 EMT 和抗纤维化。在 EMT 和纤维化相关模型中,该方能够显著上调 E-Cad 的表达水平[43],下调 α-SMA[44-45] 的表达水平,并且与 TGF-β1/Smad[46] 等通路密切相关。

加味补阳还五汤是补阳还五汤的强化升级版本。本课题组之前的动物实验也已经证实,该方能有效抑制 PAA 模型大鼠的粘连部位的 TGF-β1/Smad 通路的信号传递以及 PMC 的 EMT,在改善纤维化和粘连方面具有较显著的治疗作用,对预防和治疗 PAA 效果较好[10-12]。

4.3.4 *实验 1 的研究结果表明,加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 作用是多途径、多靶点的,主要是通过调控 ADSCs 旁分泌功能实现* 本课题组的前期的动物实验表明[10-12],加味补阳还五汤可以通过抑制 PMC 的 EMT,从而防治 PAA。目前的研究显示,ADSCs 可通过其旁分泌抑制 EMT[31-32]。那么,加味补阳还五汤对 PMC 的 EMT 的抑制,是该方对 PMC 的直接作用,还是通过调控大网膜 ADSCs 旁分泌的间接作用呢?

加味补阳还五汤极有可能是通过调控大网膜中的 ADSCs 旁分泌,从而实现防治 PAA 的作用。

在本实验 1 的 Western Blot 结果表明:① 与模型组相比,加味补阳还五汤组与中药培养基组均可下调 α-SMA 的蛋白表达,上调 E-Cad 的蛋白表达,说明二者均可抑制 PMC 的 EMT,说明了加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 的作用是多途径、多靶点的;加味补阳还五汤既可以直接作用于 PMC,抑制其 EMT;也可通过调控 ADSCs 旁分泌,降低其中 TGF-β1 的水平,提高 HGF 的水平,从而抑制 PMC 的 EMT。②相比于加味补阳还五汤组,中药培养基组的效果明显强于加味补阳还五汤;说明加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 的作用主要是通过调控 ADSCs 旁分泌功能实现的。

4.3.5 *实验 2 的研究结果表明,加味补阳还五汤主要通过提高大网膜 ADSCs 旁分泌 HGF 的水平,从而抑制 PMC 的 EMT* 在实验 2 中,相较于普通培养基组,中药培养基组中 HGF 含量明显增加,这表明加味补阳还五汤的疗效可能是通过调控 ADSCs 旁分泌功能,促进 HGF 的分泌来实现的。

实验 2 发现,E-Cad 蛋白表达量与 HGF 含量之间呈正相关性,α-SMA 蛋白表达量与 HGF 含量之间呈负相关性,说明各组 ADSCs 的 CM 抑制 PMC 的 EMT 能力与其 HGF 含量相关。

实验 2 还发现,中药培养基组的 CM 中 HGF 含量显著升高;并且 PMC 表达 E-Cad 上升,表达 α-SMA 下降,迁移能力降低,说明加味补阳还五汤能通过增强 ADSCs 旁分泌 HGF 的作用,有效抑制 PMC 的 EMT。

4.4 小结

综上所述,并综合本课题组前期的动物实验的研究结果,得出以下结论:(1)ADSCs 抑制 PMC 的 EMT 的作用与其旁分泌 HGF 的能力呈正相关。(2)PAA 的发生,可能与大网膜中的 ADSCs 旁分泌 HGF 水平低下有关。(3)加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 从而预防和治疗 PAA 的作用是多途径、多靶点的。加味补阳还五汤既可以直接作用于 PMC,抑制其 EMT;也可通过调控大网膜内 ADSCs、促进其旁分泌 HGF,从而抑制 PMC 的 EMT,而后者的作用比前者强得多,因此后者是加味补阳还五汤抑制 PMC 的 EMT 防治 PAA 的主要靶标。

参考文献

[1] 张龙龙, 樊强, 顾越雷, 等. 术后腹腔粘连的研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2018, 25(2): 245-250.
[2] DIAMOND M P. Reduction of postoperative adhesion development [J]. Fertil Steril, 2016, 106(5): 994-997.
[3] 赵宏伟. 链激酶脂肪乳剂预防肠粘连的临床观察[J]. 北京医学, 2003, 25(3): 209.
[4] 杨军军. 非甾体抗炎药防治腹盆腔疾病手术后粘连的应用[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(10):112.
[5] WEI G B, WU Y H, GAO Q, et al. Effect of emodin on preventing postoperative intra-abdominal adhesion formation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 1740317.
[6] HU Q Y, XIA X F, KANG X, et al. A review of physiological and cellular mechanisms underlying fibrotic postoperative adhesion[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(1): 298-306.
[7] 陈妍锜,赵敏,杨丽丽,等. 中医药防治间皮细胞参与 PAA 形成[J]. 中华中医药学刊,2021,39(4):32-35.
[8] WEI J J, TANG L, CHEN L L, et al. Mesenchymal stem cells attenuates TGF-β1-induced EMT by increasing HGF expression in HK-2 cells[J]. Iran J Public Health, 2021, 50(5): 908-918.
[9] 张素兰, 宋杰, 朱宏满, 等. 腹腔内自体脂肪细胞移植预防肠粘连[J]. 中华实验外科杂志, 1996(5): 302-303.
[10] 范文江, 王亚楠, 郑敏麟. 加味补阳还五汤防治术后腹腔粘连大鼠模型的形态学实验研究[J]. 中医临床研究, 2022, 14(13): 18-22.
[11] 王亚楠,范文江,詹倩倩,等. 加味补阳还五汤对术后腹腔粘连上皮-间充质转化和纤溶平衡的影响[J]. 亚太传统医药, 2023,19(5):31-36.
[12] 郑敏麟,范文江,王亚楠,等. 加味补阳还五汤对术后腹腔粘连 TGF-β1-Smad3 通路和腹膜间皮细胞上皮-间充质转化的影响[J]. 中华中医药学刊,2024,42(5):20-27,265-271.
[13] 郑敏麟, 王亚楠, 范文江, 等. 加味补阳还五汤调控大网膜脂肪干细胞旁分泌防治术后腹腔粘连的体外研究[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(2): 223-237.

[14] 贺福元，邓凯文，刘文龙，等. 中药复方药物动力学总量统计矩法的实验验证研究[J]. 中国中药杂志，2013，38(2)：253－262.
[15] 郑晓雪. 淫羊藿苷诱导的牙囊干细胞条件培养基对 MC3T3－E1 增殖、迁移及成骨分化的影响[D]. 长春：吉林大学，2022.
[16] KONINCKX P R，GOMEL V. Introduction：quality of pelvic surgery and postoperative adhesions[J]. Fertil Steril，2016，106(5)：991－993.
[17] 李晓梅，魏育才，唐富天，等. 上皮－间充质转化与能量代谢对胃癌转移的影响[J]. 兰州大学学报(医学版)，2022，48(1)：67－71.
[18] STRIPPOLI R，LOUREIRO J，MORENO V，et al. Caveolin－1 deficiency induces a MEK－ERK1/2－Snail－1－dependent epithelial－mesenchymal transition and fibrosis during peritoneal dialysis[J]. EMBO Mol Med，2015，7(1)：102－123.
[19] 李娜，郑雁，李萍，等. 上皮间质转化在器官纤维化中作用及中药干预机制的研究进展[J]. 中成药，2022，44(8)：2573－2579.
[20] DOLIVO D，WEATHERS P，DOMINKO T. Artemisinin and artemisinin derivatives as anti－fibrotic therapeutics[J]. Acta Pharm Sin B，2021，11(2)：322－339.
[21] BRABLETZ S，SCHUHWERK H，BRABLETZ T，et al. Dynamic EMT：a multi－tool for tumor progression[J]. EMBO J，2021，40(18)：e108647.
[22] BRUUN K，SCHERMER E，SIVENDRA A，et al. Therapeutic applications of adipose－derived stem cells in cardiovascular disease[J]. Am J Stem Cells，2018，7(4)：94－103.
[23] PENG D D，FU M Y，WANG M N，et al. Targeting TGF－β signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. Mol Cancer，2022，21(1)：104.
[24] SHU D Y，BUTCHER E，SAINT－GENIEZ M. EMT and EndMT：emerging roles in age－related macular degeneration[J]. Int J Mol Sci，2020，21(12)：4271.
[25] LEE J H，MASSAGUÉ J. TGF－β in developmental and fibrogenic EMTs[J]. Semin Cancer Biol，2022，86(Pt 2)：136－145.
[26] 刘新越. 基于 BMP7/Gremlin 信号探讨扶肾颗粒对腹膜间皮细胞转分化的干预作用研究[D]. 天津：天津中医药大学，2022.
[27] MATSUO K，MAEDA Y，NAIKI Y，et al. Possible effects of hepatocyte growth factor for the prevention of peritoneal fibrosis[J]. Nephron Exp Nephrol，2005，99(3)：87－94.
[28] 修亦斌. 肝细胞生长因子对高糖诱导的腹膜纤维化的影响[J]. 中国现代医生，2019，57(34)：18－20，25.
[29] BOLDYREVA M A，SHEVCHENKO E K，MOLOKOTINA Y D，et al. Transplantation of adipose stromal cell sheet producing hepatocyte growth factor induces pleiotropic effect in ischemic skeletal muscle[J]. Int J Mol Sci，2019，20(12)：3088.
[30] USUNIER B，BROSSARD C，L'HOMME B，et al. HGF and TSG－6 released by mesenchymal stem cells attenuate colon radiation－induced fibrosis[J]. Int J Mol Sci，2021，22(4)：1790.
[31] ZHUANG L，XIA W，HOU M. Co－culturing with hypoxia pre－conditioned mesenchymal stem cells as a new strategy for the prevention of irradiation－induced fibroblast－to－myofibroblast transition[J]. Oncol Rep，2019，42(5)：1781－1792.
[32] EJAZ A，EPPERLY M W，HOU W，et al. Adipose－derived stem cell therapy ameliorates ionizing irradiation fibrosis via hepatocyte growth factor－mediated transforming growth factor－β downregulation and recruitment of bone marrow cells[J]. Stem Cells，2019，37(6)：791－802.
[33] BEYENE R T，KAVALUKAS S L，BARBUL A. Intra－abdominal adhesions：anatomy，physiology，pathophysiology，and treatment[J]. Curr Probl Surg，2015，52(7)：271－319.
[34] YÁÑEZ－MÓ M，LARA－PEZZI E，SELGAS R，et al. Peritoneal dialysis and epithelial－to－mesenchymal transition of mesothelial cells[J]. N Engl J Med，2003，348(5)：403－413.
[35] 张文超，秦锋，张明子，等. 脂肪来源干细胞在瘢痕防治中抗纤维化机制研究进展[J]. 中国临床研究，2019，32(12)：1720－1723.
[36] DE UGARTE D A，MORIZONO K，ELBARBARY A，et al. Comparison of multi－lineage cells from human adipose tissue and bone marrow[J]. Cells Tissues Organs，2003，174(3)：101－109.
[37] ZHUANG Q，MA R Y，YIN Y S，et al. Mesenchymal stem cells in renal fibrosis：the flame of cytotherapy[J]. Stem Cells Int，2019，2019：8387350.
[38] LI D，LU Z Y，LI X Y，et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells facilitate the up－regulation of miR－153－3p，whereby attenuating MGO－induced peritoneal fibrosis in rats[J]. J Cell Mol Med，2018，22(7)：3452－3463.
[39] SOLA A，SAENZ DEL BURGO L，CIRIZA J，et al. Microencapsulated macrophages releases conditioned medium able to prevent epithelial to mesenchymal transition[J]. Drug Deliv，2018，25(1)：91－101.
[40] GUO Y，CHEN B，CHEN L J，et al. Current status and future prospects of mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis[J]. J Zhejiang Univ Sci B，2016，17(11)：831－841.
[41] 高佳丽，杨瑞雪. 大承气汤保留灌肠对剖宫产术后肠粘连效果研究[J]. 陕西中医，2017，38(1)：59－60.
[42] 郝蕾，谢维捷，陈育忠. 通腑泻热灌肠合剂对粘连性肠梗阻大鼠肠粘连及血清 ET、IL－4、IL－10 的影响[J]. 中医药信息，2013，30(6)：73－76.
[43] 魏莱. 基于 TGF－β1 诱导 A549 的纤维化模型探讨补阳还五汤干预特发性肺纤维化中 EMT 的分子机制研究[D]. 长春：长春中医药大学，2019.
[44] 李桂梅. 基于 EMT 假说探讨补阳还五汤对 IPF 的机制研究[D]. 成都：成都中医药大学，2019.
[45] 郭帅，方敬，郭立芳，等. 补阳还五汤合参芪地黄汤化裁含药血清对高糖诱导人肾小管上皮细胞株间充质转化的影响及机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志，2022，28(8)：1290－1295.
[46] 李水芹，李学君，王飞，等. 补阳还五汤大鼠含药血清对肺成纤维细胞 TGF－β1/Smad/ERK 信号通路的影响[J]. 辽宁中医杂志，2015，42(12)：2436－2439.

大网膜 ADSCs 旁分泌 HGF 与加味补阳还五汤抑制腹膜间皮细胞 EMT 相关性的体外研究

(正文见 11 – 18 页)

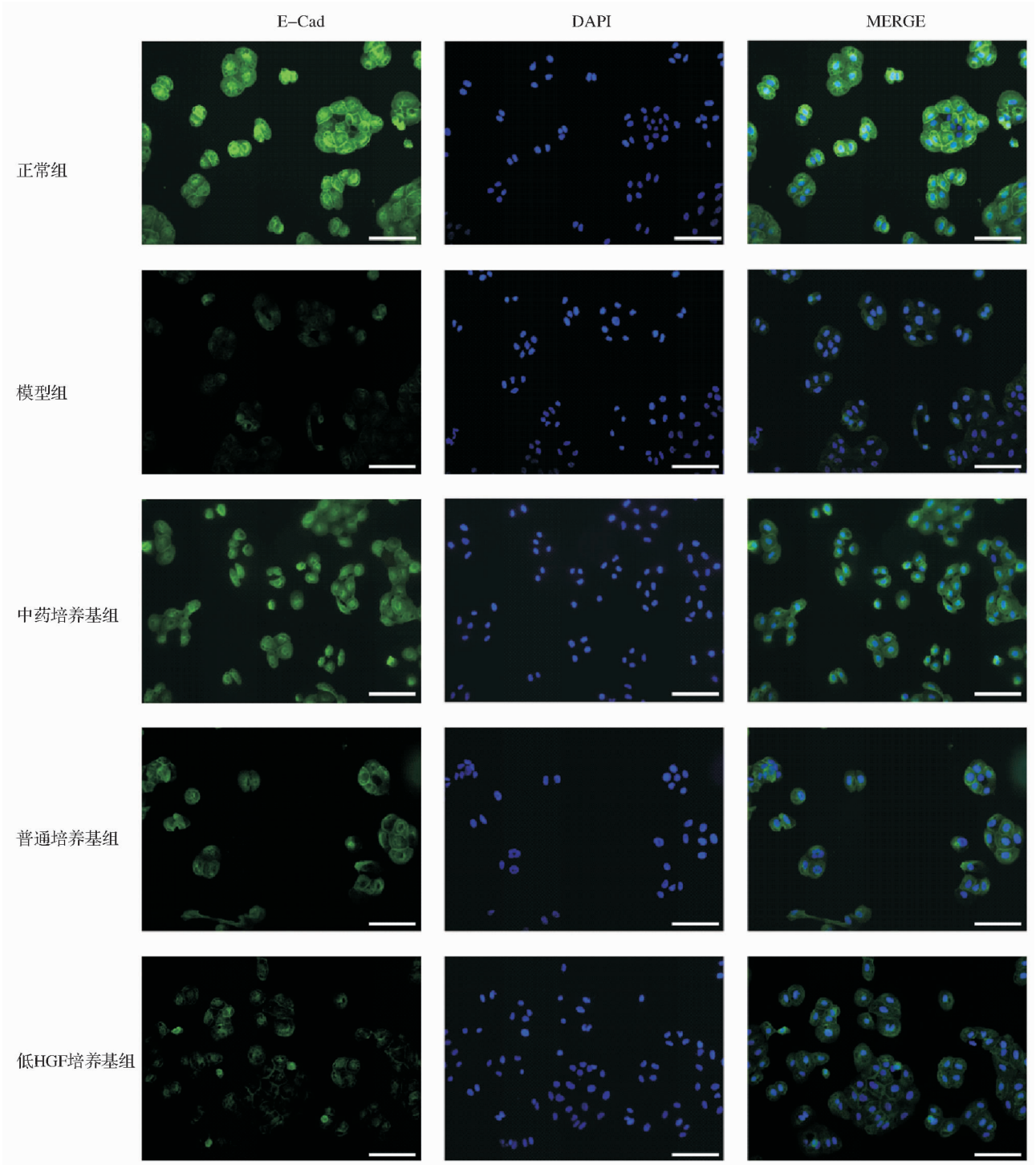


图 3 IF 法检测 PMC 的 E – Cad 相对荧光强度情况(×200,标尺 =50 μm)

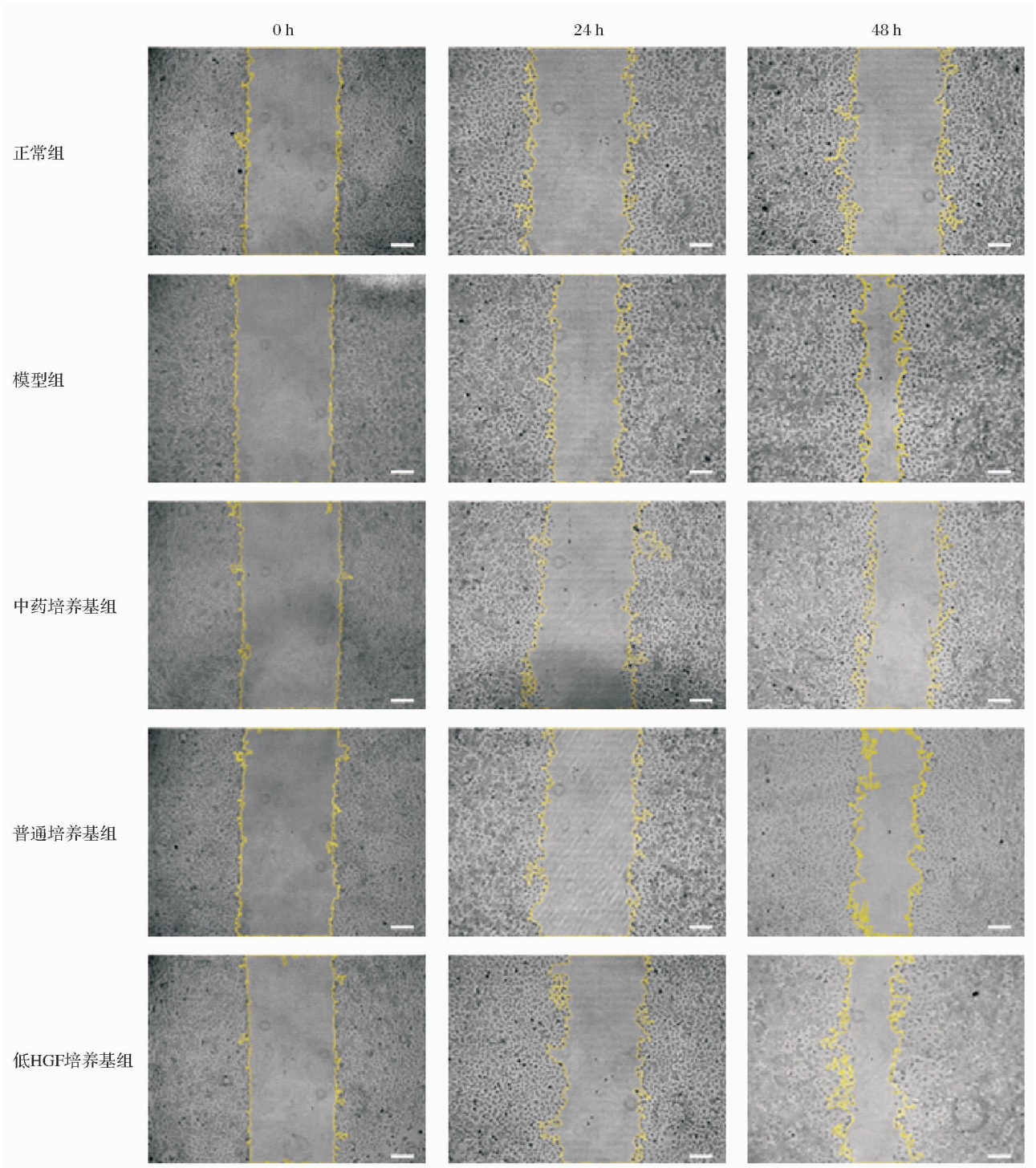


图 4 PMC 的划痕愈合率(迁移能力)变化情况(×40,标尺 = 100 μm)