

# 从胶原代谢环节探讨补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者盆底结缔组织的影响

王之通<sup>1</sup>, 蒋 健<sup>1</sup>, 吴 雨<sup>1</sup>, 陈文文<sup>1</sup>, 沈明洁<sup>1</sup>, 钱 麟<sup>1</sup>, 胡 慧<sup>1</sup>, 谭 丽<sup>2</sup>,  
贺 敏<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属岳阳医院, 上海 200437)

**摘要:**目的 围绕胶原代谢环节, 探讨补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者盆底结缔组织的影响。方法 采集子宫脱垂中气下陷证患者的子宫主韧带标本, 进行体外原代细胞培养; 予补中益气汤原药、补中益气汤含药血清、空白血清和阴性对照(无干预组)对子宫主韧带成纤维细胞进行干预; 采用羟脯氨酸法测定各组的总胶原含有量; 采用分子生物学方法测定胶原合成(I型胶原、III型胶原、LOX、TGF- $\beta$ 、CTGF和DCN), 降解(MMP-1、MMP-2、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3)主要环节的变化。结果 与空白血清组或无干预组比较, 全方血清组和全方原药组细胞培养液中总胶原的含量均明显增加; 全方血清组和全方原药组子宫主韧带成纤维细胞III型胶原 mRNA 及蛋白的表达明显增加, MMP-2 mRNA 及蛋白的表达减少, LOX mRNA 表达增加; 全方血清组子宫成纤维细胞 MMP-1 mRNA 及蛋白表达减少, TIMP-1 和 TIMP-3 的 mRNA 及蛋白表达增加。结论 补中益气汤能提高子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞总胶原的含有量, 且以III型胶原为主; 其机制与降低成纤维细胞 MMP-1 和 MMP-2 的表达, 增加成纤维细胞 TIMP-1 和 TIMP-3 的表达有关。

**关键词:** 补中益气汤; 胶原; 子宫脱垂; 中气下陷证; 盆底结缔组织

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)02-0492-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.039

子宫脱垂是盆腔器官脱垂(pelvic organ prolapse, POP)的主要表现之一, 属于盆底功能障碍性疾病, 是中老年女性的常见病, 对14 180例已婚妇女妇科普查情况分析结果显示51~60岁的妇女子宫脱垂发病率为0.33%, 60岁以上为0.71%。子宫脱垂虽不威胁生命, 但严重影响妇女的健康和生活方式<sup>[1-2]</sup>。

盆底结缔组织是盆腔的重要支持成分, 以盆底筋膜和韧带结构为主, 其中主韧带-宫骶韧带复合体, 是盆底最主要的支持力量<sup>[1]</sup>。胶原是韧带和筋膜的主要成分, 由盆底结缔组织中的成纤维细胞生成。盆底结缔组织正常支持功能的行使有赖于胶原合成与降解的动态平衡, 胶原代谢状态的改变会影响盆底支持组织的强度和弹性从而导致POP的发生<sup>[1-2]</sup>。赖氨酰氧化酶(Lysyl Oxidase, LOX)、转化生长因子 $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、结缔组织生长因子(Connective Tissue Growth Factor, CTGF)和核心蛋白聚糖(Decorin, DCN)是影响胶原合成的重要因素。基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)及其抑制物(Tissue Inhibitors of Metalloproteinases,

TIMPs)则与胶原降解密切相关, 在子宫脱垂患者子宫韧带组织中MMPs表达的增加均伴随着TIMPs表达的减少<sup>[2-8]</sup>。

升阳举陷法作为中医经典治法之一被广泛应用于脏器下垂、泄泻、崩漏等疾病。补中益气汤是升阳举陷法的代表方, 治疗中气下陷证子宫脱垂历史悠久, 随着现代医学的发展, 重度子宫脱垂虽已以手术治疗为主, 但其仍是子宫脱垂治疗的重要手段之一<sup>[9-11]</sup>。

目前, 由于中医证候模型研究进展缓慢, 使得从“病证-治法-方药”这一中医药传统观念出发, 研究中医治法理论的设想举步为艰, 中医治法理论实验研究多选用健康动物, 或套用现成的西医病的模型, 影响了具有标准中医药意义的现代研究。

因此, 本研究在病证结合、方证相应理论的指导下, 参考盆底结缔组织胶原代谢异常是子宫脱垂的主要因素和子宫脱垂中气下陷证患者盆底结缔组织I型、III型胶原含有量减少的研究进展<sup>[1-2, 12]</sup>, 以具体的病证“子宫脱垂之中气下陷证”为载体, 从胶原代谢环节探讨补中益气汤对子

**收稿日期:** 2019-09-18

**基金项目:** 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(新教师类)(20123107120002); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(ZY3-CCCX-3-2007)

**作者简介:** 王之通(1984—), 男, 博士, 主治医师, 从事中医临床及教学工作。Tel: (021) 20256029, E-mail: wongzt@163.com

\* **通信作者:** 贺 敏(1974—), 女, 博士, 副研究员, 从事中医临床及基础研究。Tel: (021) 20256053, E-mail: heminmiao@163.com

宫脱垂中气下陷证患者盆底结缔组织的影响。

### 1 材料

1.1 动物 SD大鼠, 清洁级, 生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005, 体质量 (300±20) g, 雌雄各半, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 并在该动物中心进行饲养。

1.2 药物 参考文献 [9], 补中益气汤由黄芪 18 g、炙甘草 9 g、党参 6 g、白术 6 g、升麻 6 g、柴胡 6 g、当归 6 g、橘皮 6 g 组成。黄芪配方颗粒 (批号 1409005)、炙甘草配方颗粒 (批号 1409149)、党参配方颗粒 (批号 1408032)、白术配方颗粒 (批号 1408136)、升麻配方颗粒 (批号 140303)、柴胡配方颗粒 (批号 1408024)、当归配方颗粒 (批号 1409140)、橘皮配方颗粒 (批号 1407024) 均购自江阴天江药业有限公司。

### 1.3 试剂

1.3.1 real-time PCR 检测试剂 Trizol (美国 invitrogen 公司); PCR 逆转录 FastQuant RT Kit (With gDNase)、荧光定量 PCR 试剂盒 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (天根生化科技有限公司); 无水乙醇、异丙醇、氯仿 (分析纯) (国药集团化学试剂有限公司)。β-actin、I 型胶原、III 型胶原、LOX、CTGF、DCN、TGF-β、MMP-1、MMP-2、TIMP-1、TIMP-2 和 TIMP-3 引物由上海冠泰生物科技有限公司设计合成。序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	片段长度/bp
β-actin	正向 5'-TGACGAGGCCAGACGAAGA-3'	331
	反向 5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3'	
Col1a1	正向 5'-GACATCCACCAATCACCTG-3'	118
	反向 5'-CGTCATCGCACACACCTGT-3'	
Col3a1	正向 5'-CCAATCCTTTGAATGTTCCA-3'	103
	反向 5'-CTAAACTGAAAACCACCATC3'	
LOX	正向 5'-TTGAGTCCTGGCTGTTATGA-3'	109
	反向 5'-TGGGGTTTACTGACCTTT-3'	
CTGF	正向 5'-TGGCTTTAGGAGCAGTGGTG-3'	135
	反向 5'-CTACAGGCAGTCACTGAGC-3'	
DCN	正向 5'-TTCTTATTCGGGTGTGAGTC-3'	68
	反向 5'-TGAAGGTGGATGGCTGACT-3'	
TGF-β	正向 5'-ACCTGAACCCGTGTGCTCT-3'	286
	反向 5'-GAACCCGTGATGTCCACTT-3'	
MMP-1	正向 5'-GATGTGGCTCAGTTTGTCT-3'	184
	反向 5'-CTTGACCCTCAGAGACCTTG-3'	
MMP-2	正向 5'-TTTGACGGTAAGGACGGACT-3'	128
	反向 5'-CCATACTTCACAGGACCAC-3'	
TIMP-1	正向 5'-GGACACCAGAAGTCAACCAT-3'	147
	反向 5'-GGAAGTATCCGCAGACACTC-3'	
TIMP-2	正向 5'-CCAGAAGAAGACCTGAACC-3'	122
	反向 5'-CTGTGACCCAGTCCATCCAG-3'	
TIMP-3	正向 5'-GAAGGAAGTACAAGAGAGTC-3'	85
	反向 5'-CAGGAACATCTGGTCAACAC-3'	

1.3.2 Western blot 检测试剂 蛋白酶磷酸酶抑制剂 (美

国 Thermo Scientific 公司); Tris、Glycerine、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、APS、N, N, N, N-四甲基乙二胺、30% 丙烯酰胺 (美国 Biorad 公司); BCA protein Assay kit、RIPA 裂解液 (强)、SDS-PAGE protein loading buffer (碧云天生物技术研究); 单克隆 Anti-Collagen III 抗体、单克隆 Anti-LOX 抗体、单克隆 Anti-MMP1 抗体、单克隆 Anti-MMP2 抗体、单克隆 Anti-TIMP1 抗体、多克隆 Anti-TIMP3 抗体 (英国 Abcam 公司); Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP、Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP、Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) HRP (美国 Jackson Immuno 公司); β-actin 抗体 (TIANGEN 生化科技有限公司)。  
1.4 仪器 超净工作台、HERAcell 240i 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); CKX41SF 型倒置显微镜、NanoVue 浓度检测仪 (日本 Olympus 公司); centrifuge 5415R 型低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); MQX200R 型微孔板扫描分光光度计、微孔板扫描分光光度计 (多功能酶标仪) (美国 BIO-TEK 公司); 荧光定量 PCR 扩增仪 ViiA7 (美国 life technology 公司); Cycler PCR 仪、Western blot 电泳系统、转膜仪 (美国 Bio Rad 公司)。

### 2 方法

2.1 药物血清制备 将 SD 大鼠按体质量随机分为空白血清组和全方血清组 (每天 9.47 g/kg), 每组 6 只, 雌雄各半, 每天灌胃给药 2 次, 连续 3 天, 次日晨再灌 1 次, 空白血清组予同容积的饮用水, 末次给药前禁食 12 h。末次给药 1 h 后, 在无菌条件下自门静脉采血, 血液样本静置 3~4 h, 4 °C 离心 (3 500 r/min、15 min), 分离血清, 然后将血清置于 56 °C 水浴 30 min, 经 0.22 μm 微孔滤膜除菌后, -80 °C 贮存备用。

2.2 原药全方溶液配制 精密称取全方配方颗粒 10.78 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用 PBS 定容至刻度, 得质量浓度为 1.078 mg/mL 的全方贮备液; 精密量取原药全方贮备液适量, 以 PBS 作为稀释液, 配制质量浓度为 100 μg/mL 原药全方溶液, -80 °C 贮存备用。

### 2.3 人子宫主韧带成纤维细胞的培养

2.3.1 病例选择 在曙光医院妇科病房因子宫 III、IV 度脱垂行盆底重建或子宫切除术的患者 (中医证属中气下陷证), 且满足自然绝经 2 年以上, 未行激素替代治疗。既往无子宫内异位症、妇科恶性肿瘤、糖尿病、结缔组织病、慢性盆腔炎症、盆腔手术史、慢性阻塞性肺病等疾病。

2.3.2 组织标本的采集 开腹或阴式子宫全切术中取患者废弃的子宫主韧带组织, 分成约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小组织 1~3 块, 尽量去除可见的脂肪组织及血管组织, 用 PBS 冲净。

2.3.3 人子宫主韧带成纤维细胞的原代培养、纯化、传代和鉴定 采用胶原酶消化法进行原代细胞培养, 取回的组织用含 1×10<sup>5</sup> U/L 双抗的 PBS 反复清洗 3~5 遍, 至液体清亮, 用眼科剪清除表面坏死组织和脂肪, 并快速将组织剪成碎块, 转入培养瓶中加入 1% I 型胶原酶 3 mL, 培养箱

中消化约3 h, 此时肉眼可见液体变浑浊黏稠, 组织块呈明显蓬松状, 组织转入离心管, 1 500 rpm, 离心3 min, 弃上清, 收集沉淀, 予含20%胎牛血清的DMEM高糖培养基5 mL, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱内中培养。3 d后观察细胞情况, 并换液, 之后每3~4天换液1次, 倒掉未贴壁的组织块和不贴壁的少量红细胞, 贴壁组织及细胞继续培养。当生长的细胞铺满瓶底70%~80%时, 采用差时贴壁法对培养出的主韧带细胞进行纯化。第2次纯化后的细胞铺满瓶底70%~80%时, 进行传代培养。取4代细胞采用免疫组化法进行成纤维细胞鉴定。4~9代的细胞用于本实验。

2.4 药物毒性实验 采用CCK-8试剂盒测定血清毒性。

2.5 分组及给药 分为全方原药组、全方血清组、空白血清组和无干预组。全方血清和空白血清分别用培养基稀释至终浓度为20%, 原药用培养基稀释至终浓度为100 μg/mL, 然后加入培养皿中与细胞共同培养; 无干预组加入等体积的培养基, 均置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱孵育24 h。

2.6 子宫主韧带成纤维细胞总胶原含量测定 按“2.5”项下操作后, 收集细胞上清液, 采用羟脯氨酸测试盒检测细胞培养液中羟脯氨酸含量, 操作步骤按说明书执行。

2.7 RT-PCR检测 按“2.5”项下操作后, 采用Trizol法提取总RNA, 然后逆转录成cDNA, 采用RT-PCR法检测各指标mRNA的相对表达量, 操作步骤按说明书执行。各组指标均以空白血清组1为对照的mRNA表达半定量分析。

2.8 Western blot检测 按“2.5”项下操作后, 提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度, 将蛋白样品及标准蛋白与4倍样品缓冲液混合后沸水煮5~10 min变性, 每组上样定量10 μg蛋白质。使用转移电泳装置电转90~120 min, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。后经封闭, 一抗、二抗孵育, 显色; 将显示条带的胶片加ECL、曝光、显影、定影; 然后计算机扫描蛋白质条带, 通过图像分析软件进行分析。以蛋白条带的灰度值代表蛋白的表达量, 用内参蛋白的灰度值进行校正后代表蛋白相对表达水平。

2.9 数据处理 各组数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组组间比

表3 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原合成相关基因mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	LOX	DCN	TGF-β	CTGF
无干预组	0.995±0.0045	0.655±0.045 <sup>ΔΔ</sup>	0.931±0.157	1.135±0.125
空白血清组	1.000±0.024	1.000±0.071 <sup>**</sup>	1.000±0.025	1.000±0.220
全方原药组	1.310±0.140 <sup>**ΔΔ</sup>	0.792±0.074 <sup>*ΔΔ</sup>	0.937±0.045	1.125±0.150
全方血清组	1.447±0.114 <sup>**ΔΔ</sup>	0.994±0.064 <sup>**</sup>	0.942±0.013	1.235±0.013

注:与无干预组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与空白血清组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$ 。

表4 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原降解相关基因mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	MMP-1	MMP-2	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
无干预组	1.101±0.015	1.090±0.007	0.339±0.726	1.102±0.054	1.012±0.040
空白血清组	1.000±0.028 <sup>*</sup>	1.000±0.089	1.001±0.979	1.000±0.185	1.000±0.031
全方原药组	0.984±0.038 <sup>*</sup>	0.636±0.097 <sup>**ΔΔ</sup>	0.639±1.313	1.167±0.130	0.995±0.067
全方血清组	0.825±0.033 <sup>**ΔΔ#</sup>	0.808±0.037 <sup>**ΔΔ#</sup>	3.094±0.899 <sup>**ΔΔ#</sup>	1.160±0.018	1.204±0.052 <sup>**ΔΔ##</sup>

注:与无干预组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与空白血清组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$ ;与全方原药组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

较使用*t*检验,多组组间比较采用LSD检验。运用DAS3.0统计软件包进行处理分析,以 $P<0.05$ 为差异统计学意义。

### 3 结果

3.1 药物毒性实验 经纯化后培养的细胞为长梭型,波状蛋白呈阳性,角蛋白呈阴性,提示从子宫主韧带培养出来的是成纤维细胞。与无干预组比较,20%大鼠血清组、20%全方血清组和全方原药组(100 μg/mL)的细胞存活率均无统计学差异。

3.2 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞总胶原含量、I型胶原和III型胶原mRNA表达的影响 如表2所示,与空白血清组或无干预组比较,全方血清组和全方原药组细胞培养液中总胶原的含有量均明显增加( $P<0.01$ ),全方血清组和全方原药组子宫主韧带成纤维细胞的III型胶原mRNA表达均明显增加( $P<0.01$ ),而I型胶原mRNA的表达无明显变化。

表2 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞总胶原含量、I型胶原和III型胶原mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	总胶原/(μg·mL <sup>-1</sup> )	I型胶原mRNA	III型胶原mRNA
无干预组	1.597±0.158	1.093±0.127	0.987±0.091
空白血清组	1.650±0.316	1.000±0.279	1.000±0.042
全方原药组	2.360±0.353 <sup>**ΔΔ</sup>	1.102±0.151	1.305±0.106 <sup>**ΔΔ</sup>
全方血清组	2.180±0.141 <sup>**ΔΔ</sup>	1.177±0.153	1.209±0.010 <sup>**ΔΔ</sup>

注:与无干预组比较,\*\* $P<0.01$ ;与空白血清组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

3.3 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原合成、降解相关基因表达的影响 如表3~4所示,与空白血清组或无干预组比较,全方血清组和全方原药组子宫主韧带成纤维细胞的LOX mRNA表达明显增加( $P<0.01$ ),MMP-2mRNA表达明显减少( $P<0.01$ ),且全方原药组MMP-2mRNA表达的减少优于全方血清组( $P<0.05$ );全方血清组子宫主韧带成纤维细胞的MMP-1表达明显减少( $P<0.01$ ),TIMP-1和TIMP-3 mRNA表达明显增加( $P<0.01$ ),且变化优于全方原药组。

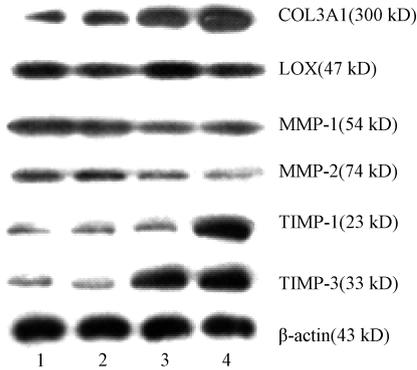
3.4 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原合成、降解相关蛋白表达的影响 如表5所示,与空白血清组或无干预组比较,全方血清组和全方原药组子宫主韧带成纤维细胞的Ⅲ型胶原蛋白表达增加,

MMP-2 蛋白表达减少;全方血清组子宫主韧带成纤维细胞的TIMP-1和TIMP-3蛋白表达均增加,MMP-1蛋白表达减少,且TIMP-1蛋白表达的增加优于全方原药组。见图1。

表5 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原合成、降解相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	Ⅲ型胶原	LOX	MMP-1	MMP-2	TIMP-1	TIMP-3
无干预组	0.917±0.191	1.079±0.069	1.167±0.265	1.736±0.344	1.069±0.072	1.461±0.461
空白血清组	1.272±0.232	1.189±0.205	1.062±0.190	1.459±0.388	1.098±0.090	1.651±0.244
全方原药组	2.886±0.208 ** $\Delta\Delta$	1.483±0.190 *	0.666±0.213 *	0.808±0.315 ** $\Delta$	1.179±0.067	3.355±0.826
全方血清组	2.668±0.205 ** $\Delta\Delta$	1.455±0.230 *	0.576±0.289 * $\Delta$	0.750±0.254 ** $\Delta$	3.668±0.124 ** $\Delta\Delta$ ##	4.081±2.103 * $\Delta$

注:与无干预组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与空白血清组比较, $\Delta P<0.05$ , $\Delta\Delta P<0.01$ ;与全方原药组比较,## $P<0.01$ 。



注:1~4 分别为无干预组、空白血清组、全方原药组、全方血清组。

图1 Western blotting 检测子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原合成、降解相关蛋白的表达

#### 4 讨论

4.1 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原的影响 胶原主要由盆底结缔组织的成纤维细胞生成。I和Ⅲ型胶是盆底筋膜、韧带的主要成分,I型胶原直径较粗,起支持作用,Ⅲ型胶原直径较细,与弹性有关<sup>[13-3]</sup>。Ⅲ型胶原减少与子宫脱垂的发生关系密切<sup>[13-17]</sup>。本研究结果显示补中益气汤能增加子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞总胶原的含量,且以Ⅲ型胶原为主,提示其治疗作用与增加胶原含量,进而改善子宫主韧带结构及功能有关。

4.2 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原合成代谢环节的影响 LOX是胶原纤维发育成熟和保持内环境稳态的关键酶,能影响胶原与弹性纤维的交联<sup>[6,17]</sup>。本研究结果显示补中益气汤能增加LOX mRNA的表达,但对LOX蛋白表达无影响。TGF- $\beta$ 能够刺激细胞中胶原 mRNA 水平的提高,同时抑制 MMPs 的分泌和刺激其抑制物 TIMPs 的表达,从而抑制胶原降解<sup>[17]</sup>。CTGF 可通过介导 TGF- $\beta$  或自分泌作用刺激胶原合成<sup>[2,17]</sup>。DCN 通过其核心蛋白与胶原的相互作用调节胶原纤维的生成速度<sup>[18]</sup>。本研究未发现补中益气汤对 TGF- $\beta$ 、CTGF 和 DCN 的表达有影响。

4.3 补中益气汤对子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞胶原分解代谢环节的影响 MMPs 是降解胶原最

重要的蛋白酶,其中 MMP-1 和 MMP-2 与 POP 的发生关系尤为密切<sup>[19-22]</sup>。MMPs 的活性主要通过 TIMPs 调节,TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制物,能抑制 MMPs 的活性,从而调节胶原降解的速率<sup>[2,17]</sup>。TIMP-1 主要与 MMP-1 和 MMP-3 结合,抑制其对 I 型、Ⅲ型胶原的降解;TIMP-2 不仅能结合激活状态的 MMP-2,还能结合 MMP-2 酶原,并可终止 MMPs 家族中所有成员的水解活性;TIMP-3 存在于细胞外基质中,能抑制 MMP-2 对胶原的降解<sup>[2,17,23-25]</sup>。MMPs/TIMPs 的组合与比例,对胶原的降解代谢具有重要影响。本研究结果显示补中益气汤能够降低子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞 MMP-1、MMP-2 的表达,增强 TIMP-1、TIMP-3 的表达,提示补中益气汤主要作用于胶原降解环节。

另外,本研究结果还发现,全方含药血清能降低 MMP-1 mRNA 的表达,且优于全方原药;全方含药血清能增加 TIMP-3 和 TIMP-1 mRNA 及蛋白的表达,而全方原药与空白血清对 TIMP-3、TIMP-1 mRNA 及其蛋白的表达均无影响,提示补中益气汤经体内代谢过程后有效成分的组成和含量可能产生了变化,进而导致其相应的作用点或程度也随之变化。此现象与文献报道<sup>[26-28]</sup>含药血清与原药的药效不一致的现象相似,方剂是一个系统的整体,其用药的本质是多成分的配伍效应,方剂中除原形成分外,还存在经人体吸收代谢后的成分,这些成分在人体内配伍而产生协同或拮抗作用,而这些作用整合后表现出具有自身配伍特点的生物学效应<sup>[29]</sup>。

综上,本研究结果显示补中益气汤能增加子宫脱垂中气下陷证患者子宫主韧带成纤维细胞总胶原的含量,且以Ⅲ型胶原为主;其机制与降低成纤维细胞 MMP-1 和 MMP-2 的表达,增加成纤维细胞 TIMP-1 和 TIMP-3 的表达有关。

#### 参考文献:

[1] 金玲,王建六. 女性盆底结构功能障碍性疾病基础研究现状[J]. 实用妇产科杂志, 2005, 21(3): 130-132.

[2] 李玢,朱兰. 胶原代谢与盆腔器官脱垂[J]. 协和医学杂志, 2011, 2(2): 163-166.

[3] 严斌,马庆良,汪希鹏. 胶原蛋白与盆底功能障碍性疾病的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2008, 35(6): 422-425.

- [ 4 ] Kobak W, Lu J, Hardart A, *et al.* Expression of lysyl oxidase and transforming growth factor beta 2 in women with severe pelvic organ prolapse [J]. *J Reprod Med*, 2005, 50(11): 827-831.
- [ 5 ] 陈国梁, 贺翠莲. 胶原蛋白的研究进展[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2000, 19(2): 78-81.
- [ 6 ] 张琳琳, 张师前, 于浩. 子宫主韧带中弹性蛋白、赖氨酰氧化酶表达与盆底器官膨出的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(1): 177-185.
- [ 7 ] Giampuzzi M, Botti G, Duca M D, *et al.* Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagene III promoter[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(46): 36341-36349.
- [ 8 ] 余燕, 宋岩峰. 核心蛋白聚糖与盆底功能障碍的相关性研究[J]. 现代妇产科进展, 2007, 16(2): 143-145.
- [ 9 ] 李飞. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 796-802.
- [ 10 ] 陆海英. 补中益气汤加味联合肌电生物反馈治疗盆腔器官脱垂的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2010: 1-26.
- [ 11 ] 苏卫华. 盆底重建术配合补中益气汤治疗盆腔器官脱垂的临床观察[D]. 福州: 福建中医学院, 2009.
- [ 12 ] 王小红, 陈捷, 李奕祺. 盆腔脏器脱垂中医证的规律探讨及其与胶原纤维关系的研究[J]. 福建中医药, 2009, 40(4): 1-3.
- [ 13 ] 胡帅, 王慧桂, 但卫华, 等. 胶原蛋白结构的研究进展[J]. 西部皮革, 2008, 30(8): 16-19.
- [ 14 ] Moalli P A, Shand S H, Zyczynski H M, *et al.* Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse [J]. *Obstet Gynecol*, 2005, 106(5 Pt1): 953-963.
- [ 15 ] Lin S Y, Tee Y T, Ng S C, *et al.* Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse [J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2007, 18(1): 43-48.
- [ 16 ] Goepel C, Hefler L, Methfessel H D, *et al.* Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence[J]. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 2003, 82(7): 659-664.
- [ 17 ] 周慧娟, 李怀芳. 胶原代谢与盆腔脏器脱垂的相关性研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2011, 32(5): 109-113.
- [ 18 ] 余燕, 宋岩峰. 核心蛋白聚糖与盆底功能障碍的相关性研究[J]. 现代妇产科进展, 2007, 16(2): 143-145.
- [ 19 ] Strinic T, Vulic M, Tomic S, *et al.* Matrix metalloproteinases-1, -2 expressions in uterosacral ligaments from women with pelvic organ prolapse[J]. *Maturitas*, 2009, 64(2): 132-135.
- [ 20 ] Gabriel B, Watermann D, Hancke K, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in uterosacral ligaments is associated with pelvic organ prolapse[J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2006, 17(5): 478-482.
- [ 21 ] 邵阳. HOXA11及MMP-2在盆腔器官脱垂患者子宫骶骨韧带组织中的表达及意义[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [ 22 ] 肖玢, 魏鸿麟, 李晓星. 基质金属蛋白酶MMP-1及其抑制物TIMP-1在盆腔器官脱垂患者子宫主韧带中的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(36): 6003-6006.
- [ 23 ] 张丽丽. TGF- $\beta$ 1、MMP-1、TIMP-1在绝经后盆腔器官脱垂患者阴道壁组织中表达的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- [ 24 ] Rapti M, Knauper V, Murphy G, *et al.* Characterization of the AB loop region of TIMP-2. involvement in pro-MMP-2 activation[J]. *J Bio Chem*, 2006, 281(33): 23386-23394.
- [ 25 ] Han X, Zhang H, Jia M, *et al.* Expression of TIMP-3 gene by construction of eukaryotic cell expression vector and its role in reduction of metastasis in a human breast cancer cell line[J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(4): 308-310.
- [ 26 ] 张英华, 武桂兰. 当归补血汤及其含药血清对小鼠红系造血祖细胞克隆的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(4): 33-36.
- [ 27 ] 孙健, 温庆辉, 李夏, 等. 黄连解毒汤及其含药血清的化学成分及抗肿瘤作用对比研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(18): 1526-1529.
- [ 28 ] 杨洁, 刘萍. 黄芩提取物及含药血清体外抑制呼吸道合胞病毒作用的实验研究[J]. 科学技术与工程, 2007, 7(12): 2784-2786.
- [ 29 ] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789-792.