

益气消癥法方含药血清干预 EA.hy 926 细胞 MAPK 信号转导通路 ERK1/2 表达的研究

李 爽¹, 刘丽丽², 夏 天³, 邓高丕⁴, 宋卓敏^{5*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510504

2. 粤北人民医院, 广东 韶关 512026

3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

4. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510504

5. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193

摘 要: **目的** 研究益气消癥法方含药血清对 EA.hy926 细胞丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路上细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 表达的影响, 探索其抑制子宫肌瘤血管新生的作用机制。**方法** SD 大鼠随机分为: 对照组, 益气消癥法方高、中、低剂量 (生药剂量 24、12、6 g/kg) 组, ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 5 d, 腹主动脉取血, 分离血清, 灭活、过滤除菌; 体外培养 EA.hy926 细胞, 随机分为 6 组: 对照血清组、模型组及益气消癥法方高、中、低剂量血清组和氟维司群 (ICI, 阳性药) 组, 除对照血清组外, 其余组别给予雌二醇 (E_2), 诱导细胞增殖, 制备子宫肌瘤血管模型; 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及 Western blotting 法检测 MEK2 和 ERK1/2 基因与蛋白的表达。**结果** 模型组 MEK2 和 ERK1/2 基因与蛋白的表达水平明显高于对照血清组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, ICI 和益气消癥法方高剂量血清组 MEK2 和 ERK1/2 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 益气消癥法方含药血清通过降调 ERK1/2 表达, 阻断 MAPK/ERK1/2 信号转导, 抑制雌激素诱导的血管内皮细胞增殖, 减少子宫肌瘤血液供应。

关键词: 益气消癥法方含药血清; 子宫肌瘤; EA.hy926 细胞; MAPK 信号转导通路; ERK1/2

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2016) 05-0763-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.011

Intervention of Yiqi Xiaozheng Prescription-contained serum on expression of ERK1/2 based on MAPK signal pathway in EA.hy 926 cells

LI Shuang¹, LIU Li-li², XIA Tian³, DENG Gao-pi⁴, SONG Zhou-min⁵

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510504, China

2. Yuebei People's Hospital, Shaoguan 512026, China

3. First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

4. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

5. Research Institute of TCM, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the intervention of Yiqi Xiaozheng Prescription (YXP)-contained serum on expression of extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) based on mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway in EA.hy926 cells, and to investigate the mechanism of inhibiting angiogenesis in uterine leiomyoma. **Methods** SD rats were divided into four groups: control group; YXP low, medium, and high dose groups (24, 12, and 6 g/kg at crude drug dosage). After sc administration once daily for 5 d, blood plasma was collected by abdominal aortic method, serum was isolated, inactivated, and filtrated rid of bacterium. EA.hy926 cells cultured *in vitro* were divided into six groups: control serum group; model group, YXP low, medium, and high dose contained serum group, and filtration (ICI, positive drug) group. Proliferation of EA.hy926 cells was induced by 17β -estradiol (E_2)

收稿日期: 2015-11-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30973768)

作者简介: 李 爽, 女, 博士后, 医师, 研究方向为生殖内分泌。Tel: 18322346617 E-mail: 1059809757@qq.com

*通信作者 宋卓敏, 女, E-mail: gaos67@126.com

to simulate angiogenesis in uterine leiomyoma except control serum group. Real-time fluorescence quantification PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the gene and protein expression of MEK2 and ERK1/2. **Results** MEK2 and ERK1/2 gene and protein expression levels of model group were significantly higher than those of control group ($P < 0.01$); Compared with model group, MEK2 and ERK1/2 expression levels of YXP high dose contained serum group and ICI group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** YXP-contained serum could down-regulate the expression of ERK1/2, block the MAPK/ERK1/2 signal transduction, and inhibit the proliferation of vascular endothelial cells which was induced by estrogen in order to control angiogenesis and reduce blood supply of uterine leiomyoma.

Key words: YXP-contained serum; uterine leiomyoma; EA.hy926 Cells; MAPK/ERK signaling pathway; ERK1/2

子宫肌瘤 (uterine leiomyoma, UL) 又称子宫平滑肌瘤, 是女性生殖系统中最常见的良性肿瘤, 由平滑肌及少量的纤维结缔组织组成。其症状因肿瘤生长的部位及大小不同而有所不同, 主要表现为不规则的阴道出血、月经量多、经期延长、周期缩短、继发性贫血、腹部包块、疼痛以及子宫增大所致的压迫症状等。近年来 UL 呈逐年上升趋势, 且发病年龄趋于年轻化^[1]。中医药治疗 UL 疗效确切, 具有毒副作用小、简便廉价的优势, 逐渐受到患者的青睐。宋卓敏教授在总结名老中医哈荔田、哈孝贤教授临床经验基础上, 通过长期实践总结, 应用益气消癥法方药治疗子宫肌瘤 30 余年, 疗效显著^[2]。

UL 是性激素依赖性肿瘤, 它的生长依赖于足够的局部血管生成, 以维持肿瘤的充分血液供应。本课题组前期研究表明^[3-4], 益气消癥法方药均可抑制人脐静脉细胞融合细胞 (EA.hy926) 增殖及血管新生。本实验应用雌二醇诱导 EA.hy926 细胞增殖, 制备子宫肌瘤血管模型, 研究益气消癥法方含药血清对丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路中细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular-signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) 的影响, 以此探讨该法方药抑制血管内皮细胞增殖、控制血管新生、减少瘤体血液供应, 从而达到缩消子宫肌瘤的作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级成年雌性 SD 大鼠, 60 只, 体质量 (200 ± 20) g, 由天津实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (津) 2010-0002。

1.2 细胞

人脐静脉细胞融合细胞 (EA.hy926), 购自中国科学院上海细胞库。

1.3 药物及主要试剂

益气消癥法方药组成包括: 党参 30 g、川续断 15 g、莪术 15 g、郁金 10 g、白芥子 15 g、鳖甲 30 g

等, 应用喷雾干燥法获得中药干粉, 由天津中医药大学中医药研究院制剂室提供。制备工艺如下: 依据单味药药效物质基础将益气消癥法方药分为水提药材及醇提药材两部分分别提取, 最终水提取液与醇提取液合并, 继续浓缩至总药材量 2 倍量, 制成生药浓度约为 0.5 g/mL 的药液, 喷雾干燥。最终中药干粉与生药比例为 1 : 4.5, 常温干燥条件下贮存备用。

17β-雌二醇 (17β-estradiol, 简称 E₂, 生产批号 1D/127636)、氟维司群 (fulvestrant, ICI182780, 简称 ICI, 生产批号 20A/134126), 英国 Tocris 公司; DMEM 培养基、优质小牛血清, 杭州四季青生物工程有限公司; RNA 抽提试剂 Trizol Invitrogen、反转录试剂盒 MBI Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒 cDNA Synthesis and SYBR® Green Master Mix Kits, 大连宝生物工程有限公司; MEK2、ERK1/2、actin 抗体, 北京基诺莱普生物技术有限公司。

1.4 主要仪器

超净台 (苏州安泰公司); 电泳仪 (北京百晶生物技术有限公司); 凝胶玻璃板、固定夹、垂直电泳槽、转移电泳槽、凝胶成像分析系统、PCR 扩增 (美国 BIO-Rad 公司); 紫外分光光度计 (美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

60 只 SD 大鼠按体质量随机分为: 对照组, 益气消癥法方高、中、低剂量 (24、12、6 g/kg) 组。大鼠 ig 益气消癥法方药液之前禁食、禁水 3 h, 药物剂量根据成人日用药量, 按大鼠体质量比率换算成等效剂量, 益气消癥法方中剂量 2.7 g 干粉/kg (相当于 12 g/kg 生药) 为等效剂量, 高、低剂量分别为中剂量的 2、0.5 倍, 给药体积为 1 mL/100 g, 每天给药 1 次, 连续给药 5 d, 对照组大鼠 ig 等体积生理盐水。第 5 天给药后 1 h, 乙醚麻醉后处死, 腹

主动脉取血 7 mL 左右, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清约 2 mL, 56 °C 水浴锅中灭活 30 min, 0.22 μm 微孔膜过滤除菌, 密封, 置于-20 °C 冰箱冻存备用。

2.2 细胞培养

将 EA.hy926 细胞接种于 6 孔板中, DMEM 培养液培养, 培养液中加入 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素, 细胞培养箱保持 37 °C、5% CO₂、饱和湿度, 待 EA.hy926 细胞铺满板底后开始实验。

2.3 细胞分组及干预

将 EA.hy926 细胞随机分为 6 组: 对照组(对照组大鼠血清)、模型(加入 E₂)组, 益气消癥法方高、中、低剂量组(益气消癥法方 24、12、6 g/kg 血清)及 ICI(阳性药)组。用 DMEM 培养液配成

终浓度为 15%的含药血清或对照血清, 培养液中 E₂ 终浓度为 1×10⁻⁸ mol/L, ICI 终浓度为 1×10⁻⁷ mol/L。

2.4 qRT-PCR 技术检测 MEK2 和 ERK1/2 mRNA 表达

将 EA.hy926 细胞以 5×10⁵/mL、每孔 2 mL 浓度接种到 6 孔板, 每组 6 个复孔, 按“2.3”项方法给药后, 继续孵育 48 h, 收集细胞, 按照 Invitrogen 公司的 Trizol kit 说明书提取细胞总 RNA, 于-80 °C 冰箱保存备用。测定 RNA 浓度, 取 2 μg 总 RNA 进行逆转录反应, 具体操作严格按照反转录试剂盒 MBI RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。qRT-PCR 技术检测 MEK2、ERK1/2 mRNA 表达, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

采用 Beacon 7.0 软件设计引物, 由北京基诺莱普生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物统计信息
Table 1 Primers statistics

引物		引物序列	片段长度/bp
MEK2	正向引物	TGAACCTCCTGGACTATATTGTG	157
	反向引物	CCGCTTGATGAAGGTGTG	157
ERK1/2	正向引物	TACATCCACTCCGCCAAC	154
	反向引物	TAGCCACATACTCCGTCAG	154
actin	正向引物	CATTACAGAGACCACCTAC	204
	反向引物	ATCCACACCGAGTATTTGC	204

2.5 Western blotting 法检测 MEK2、ERK1/2 蛋白表达

EA.hy926 细胞以 5×10⁵/mL、每孔 2 mL 浓度接种到 6 孔培养板, 每组 6 个复孔, 按“2.3”项方法加入不同浓度的含药血清或试剂, 继续孵育 48 h; 置于冰上, PBS 洗涤 3 次, 加入 RIPA 裂解液, 收集各孔总蛋白, BSA 法测定蛋白浓度, 各组取等量总蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳; 电转法转移到硝酸纤维素膜上, 转膜结束后浸泡在封闭液中, 置于摇床上摇动 1 h; 封闭后的膜放入稀释 1 000 倍的一抗工作液中, 室温震荡, 4 °C 放置过夜; TBST 洗膜 3 次, 放入稀释 3 000 倍的二抗工作液中, 室温震荡孵育 1 h; TBST 洗膜 3 次后, ECL 显影, 应用软件 Image J 分析条带灰度值。

2.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件, 应用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行比较,

单因素方差分析后, 采用 Games-Howell 法进行两两比较。

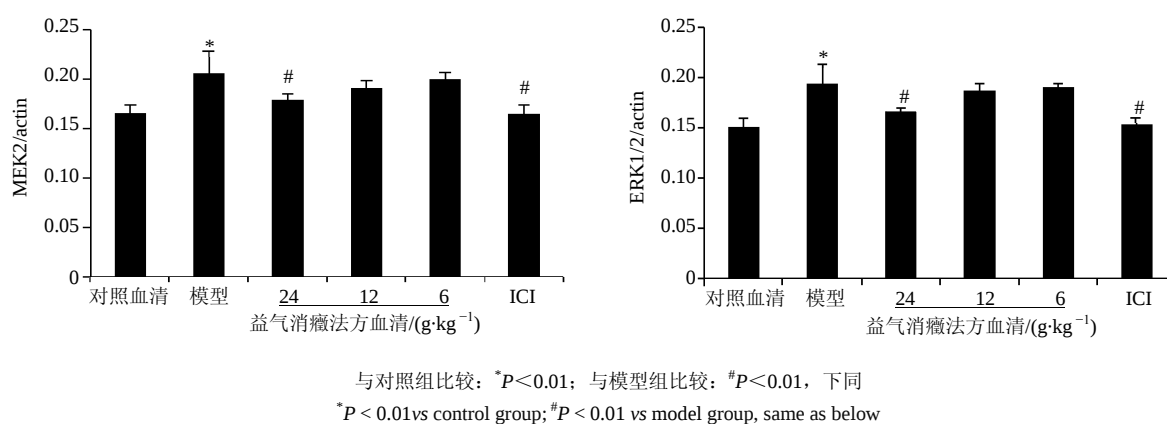
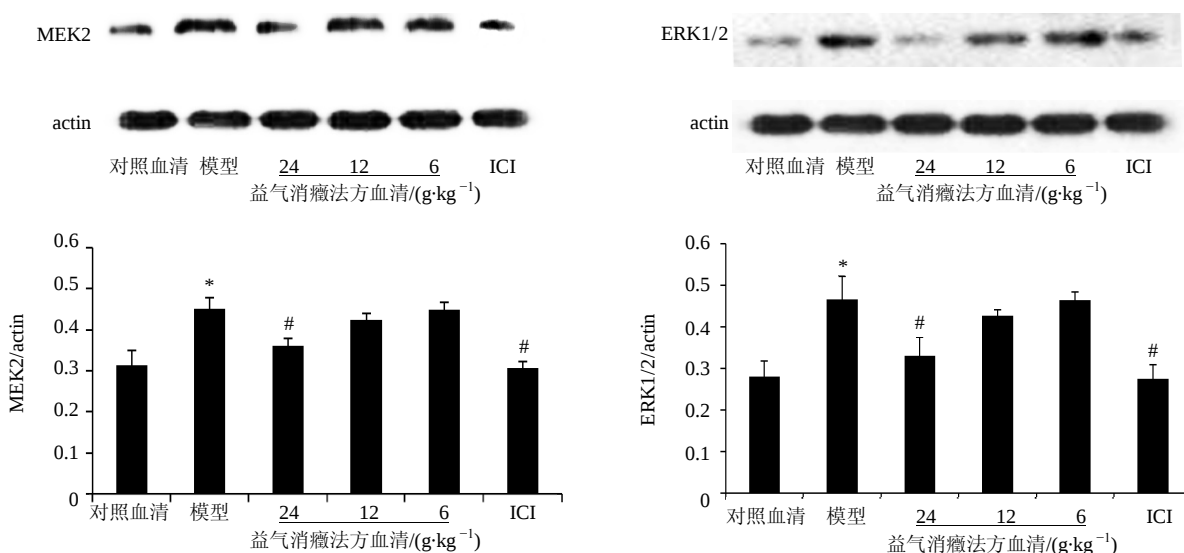
3 结果

3.1 对 EA.hy926 细胞 MEK2 和 ERK1/2 mRNA 表达的影响

与对照血清组比较, 模型组 MEK2 和 ERK1/2 mRNA 表达明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益气消癥法方高剂量血清组及 ICI 组 MEK2 和 ERK1/2 mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$), 结果见图 1。

3.2 对 EA.hy926 细胞 MEK2 和 ERK1/2 蛋白表达的影响

与对照血清组比较, 模型组 MEK2 和 ERK1/2 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益气消癥法方高剂量血清组及 ICI 组的 MEK2 和 ERK1/2 蛋白表达明显降低 ($P<0.01$), 结果见图 2。

图1 各组 EA.hy926 细胞 MEK2、ERK1/2 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Comparison on MEK2 and ERK1/2 mRNA expression in EA.hy926 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图2 各组 EA. hy926 细胞 MEK2、ERK1/2 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 2 Comparison on MEK2 and ERK1/2 protein expression in EA.hy926 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

子宫肌瘤在祖国医学中属“癥瘕”范畴,辨证归于脏腑虚弱、六淫侵袭、七情内伤,致气血逆乱、气滞血瘀、痰湿内生,最终导致痰瘀互结而成癥瘕。吾导师宋卓敏教授在总结名老中医哈荔田、哈孝贤教授治疗子宫肌瘤的经验基础上,结合自己经过长期临床实践,确立益气化瘀、祛湿涤痰、软坚消瘕法治疗子宫肌瘤,疗效显著。

西医学认为子宫肌瘤的生长、转移与瘤体血管新生密不可分。因此以肿瘤血管为靶点的治疗策略日益受到重视。血管新生是指产生新的血管或从已存在的血管中芽生出新血管的过程^[5],涉及血管内皮细胞的活化迁移,基底膜降解,管腔的形成和重

塑等生物学过程。其中血管内皮细胞增殖是血管新生的重要环节。

MAPK 信号转导通路是生物信号传递网络中的最重要的传导途径之一,参与细胞的生长、发育、分化、凋亡等一系列细胞生理活动^[6-7]。其主要信号通路有 4 条: ERK 转导通路、P38 MAPK 转导通路、C-Jun 氨基末端激酶转导通路等^[8-9]。在细胞中 ERK1/2 有无活性非磷酸化状态和有活性磷酸化状态两种存在形式, ERK1/2 一旦被激活将通过转位进入胞核,激活转录因子和激酶等,进而调控转录相关基因的表达活性^[10]。MAPK 的激活途径很保守,为 3 级酶促级联反应,通过激活其下游的转录因子参与细胞的各项功能调节,并与多种疾病的发

生、发展密切相关,其中 MAPK 是该信号通路的枢纽^[11]。

研究表明,雌激素在血管新生中发挥重要作用,MAPK 信号通道的磷酸化靶物包括雌激素受体(ER)。雌激素能通过 MAPK 信号通道的非基因组激活诱导 ER α 的 Ser118 等磷酸化,增强 ER 二聚体形成、核移位和受体转录活性。ICI 是一种对雌激素受体有拮抗作用的非甾体类雌激素受体抑制剂,是 ER 的特异性拮抗剂,可通过与 ER 结合阻断 ER 活性,产生抗雌激素样作用。MAPK/ERK 信号通路参与血管新生,MEK2 是 ERK 通路级联反应的重要一环。ERK 通路可通过增加血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)及碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)促进血管新生^[10-11]。

本研究结果显示,在 E₂ 的作用下,模型组及益气消癥法方高、中、低剂量血清组 EA.hy926 细胞 MEK2 和 ERK1/2 的表达水平明显高于对照血清组;而与模型组比较,ICI 组和益气消癥法方高剂量血清组 MEK2 和 ERK1/2 表达水平显著降低。

因此,本研究表明益气消癥法方药含药血清能够通过降调 MEK2 和 ERK1/2 表达,阻断 ER 介导的 MAPK/ERK1/2 信号转导通路,影响雌激素效应的发挥,抑制雌激素诱导的 EA.hy926 细胞增殖,进而控制血管新生,减少瘤体血液供应,最终达到缩小子宫肌瘤、改善临床症状的目的。

参考文献

- [1] 陈庆云, 张小燕. 子宫肌瘤发病机制研究进展 [J]. 中国实用妇科与产科, 2012, 28(12): 950-952.
- [2] 哈孝贤, 董素芹, 刘永志, 等. 肌瘤丸治疗子宫肌瘤的临床研究 (附 384 例病例报告) [J]. 天津中医, 1996, 13(2): 1-3.
- [3] 刘丽丽, 李 爽, 李海东, 等. 益气消癥法中药含药血清干预 ER mRNA 及 VEGFR mRNA 表达抑制 EA.hy926 增殖的研究 [J]. 天津中医药, 2014, 31(1): 36-41.
- [4] 李 爽, 刘丽丽, 李海东, 等. 益气消癥法方药含药血清对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响 [J]. 四川中医, 2013, 31(6): 50-52.
- [5] Syed I S, Sanborn T A, Rosengart T K. Therapeutic angiogenesis: A biologic bypass [J]. *Cardiology*, 2004, 101(1/3): 131.
- [6] Zhang Y, Nallaparaju K C, Liu X, et al. MAPK Phosphatase 7 Regulates T Cell Differentiation via Inhibiting ERK-Mediated IL-2 Expression [J]. *J Immunol*, 2015, 194(7): 3088-3095.
- [7] Zhang Y, Wei L, Yu J, et al. Targeting of the beta6 gene to suppress degradation of ECM via inactivation of the MAPK pathway in breast adenocarcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 1787-1795.
- [8] Urošević J, Nebreda A R, Gomis R R. MAPK signaling control of colon cancer metastasis [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(17): 2641-2642.
- [9] de Souza A P, Vale V L, Silva Mda C, et al. MAPK involvement in cytokine production in response to corynebacterium pseudotuberculosis infection [J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14(1): 230.
- [10] Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, et al. Activation of Ras/MEK/ERK signaling in chronic subdural hematoma outer membranes [J]. *Brain Res*, 2012, 1489(18): 98-103.
- [11] 张美荣, 刘 举, 王 洋. 丝裂原激活蛋白激酶相关疾病及其药物的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2014, 24(3): 231-240.