

白头翁皂苷 B₄治疗大鼠子宫肌瘤的作用机制研究

高翔¹, 陈厦特¹, 王琴琴², 李佶朗¹, 梁晓伟¹, 苑仁祎坤^{1*}, 高红伟^{1*}, 杨世林²

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330000

摘要: 目的 基于大鼠体内实验以及网络药理学探讨白头翁皂苷 B₄治疗子宫肌瘤的作用机制。方法 大鼠按体重随机分为6组:对照组、模型组、米非司酮(阳性药, 1.25 mg·kg⁻¹)组和白头翁皂苷 B₄低、中、高剂量(5、10、20 mg·kg⁻¹)组, 每组8只。采用雌激素负荷法制备子宫肌瘤模型, 于造模成功后 ip 给药, 对照组及模型组每天 ip 等量 0.9% 氯化钠溶液。通过对大鼠一般行为的观察、子宫组织的明场以及病理 HE 染色切片观察、ELISA 试剂盒检测血清与子宫组织中雌二醇、孕酮、雌激素受体的表达水平, 明确白头翁皂苷 B₄对大鼠子宫肌瘤是否有治疗作用; 通过网络药理学收集白头翁皂苷 B₄与子宫肌瘤的交互靶点, 并对其进行蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络信息的构建以及基因功能富集分析, 并将靶点以及药物进行 AutoDock Vina 分子对接分析, 确定作用靶点; 最终对组织进行相关靶点 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白水平的 Western blotting 检测进行验证。结果 体内实验结果显示, 与模型组比较, 白头翁皂苷 B₄组大鼠子宫形态明显好转, 子宫指数显著降低 ($P < 0.001$); HE 染色显示, 白头翁皂苷 B₄组大鼠子宫平滑细胞排列整齐, 形态正常, 色泽均一, 肌层炎症细胞浸润减少; 血清及子宫组织中雌二醇、孕酮、雌激素受体的水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。通过 Pubchem 数据库筛选得到白头翁皂苷 B₄相关作用靶点 23 个, 与子宫肌瘤共同作用靶点 8 个, 富集得到 69 条 KEGG 信号通路, 主要包括细胞凋亡、脂质和动脉粥样硬化、IL-17、NF- κ B、小细胞肺癌、MAPK 等相关信号通路。AutoDock Vina 结果显示白头翁皂苷 B₄与关键靶点 BCL2、BAX、Caspase3 结合良好。与模型组比较, 白头翁皂苷 B₄中、高剂量组 Bax、Caspase-3 蛋白水平显著升高 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.001$)。结论 白头翁皂苷 B₄可能通过 BCL2、BAX、Caspase-3 等关键靶点诱导凋亡, 同时降低雌二醇、孕酮、雌激素受体的表达, 从而治疗子宫肌瘤。

关键词: 白头翁皂苷 B₄; 子宫肌瘤; 网络药理学; Caspase-3; BCL2; BAX; 凋亡; 雌二醇; 孕酮; 雌激素受体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 07-1444-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.003

Study on mechanism of *Pulsatilla* saponin B₄ in treatment of uterine fibroids in rats

GAO Xiang¹, CHEN Xiate¹, WANG Qinqin², LI Jilang¹, LIANG Xiaowei¹, YUAN Renyikun¹, GAO Hongwei¹, YANG Shilin²

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic mechanism of *Pulsatilla* saponin B₄ on leiomyomas in rats based on *in vivo* experiments and network pharmacology. **Methods** Rats were randomly divided into six groups according to body weight: control group, model group, mifepristone (positive drug, 1.25 mg·kg⁻¹) group, and *Pulsatilla* saponin B₄ low, medium, and high dose (5, 10, 20 mg·kg⁻¹) groups, with eight rats in each group. The leiomyoma model was established by hormone loading, and ip injection was given after the model was established. The control group and model group were injected with an equal volume of 0.9% sodium chloride solution daily. The general behavior of rats was observed, the uterine tissue was observed under bright field, and the pathological HE staining sections were observed. The expression levels of estradiol, progesterone, and estrogen receptor in serum and uterine tissue were detected by ELISA kits, to determine whether *Pulsatilla* saponin B₄ had a therapeutic effect on rat leiomyomas. The interactive targets of *Pulsatilla* saponin B₄ and leiomyoma were collected by network pharmacology, and the protein interaction network information was constructed and gene function enrichment analysis was performed. The targets and

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 2022年广西科技基地和人才专项(2022AC18022)

第一作者: 高翔(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: g15577108260@163.com

*共同通信作者: 苑仁祎坤, 女, 副研究员, 研究方向为中药抗炎及抗肿瘤。E-mail: yryk0808@163.com

高红伟, 男, 研究员, 研究方向为中药抗炎及抗肿瘤。E-mail: gaohongwei06@126.com

drugs were subjected to AutoDock Vina molecular docking analysis to determine the action targets. Finally, the protein levels of related targets Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in the tissue were detected by Western blotting, and validated. **Results** The *in vivo* experiment results showed that compared with the model group, the uterine morphology of rats treated with *Pulsatilla* saponin B₄ improved significantly, and the uterine coefficient was significantly lower ($P < 0.001$); HE staining showed that rat uterine smooth cells were arranged in a regular pattern, with normal morphology, uniform color, and reduced inflammatory cell infiltration in the muscle layer. Serum and uterine tissue levels of estradiol, progesterone, and estrogen receptors were significantly lower ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). Using the Pubchem database, 23 targets related to *Pulsatilla* saponin B₄ were screened, 8 of which were common targets with leiomyoma. Sixty-nine KEGG signaling pathways were enriched, including apoptosis, lipid and atherosclerosis, IL-17, NF- κ B, small cell lung cancer, and MAPK related signaling pathways. The AutoDock Vina results showed that *Pulsatilla* saponin B₄ bound well to key targets BCL2, BAX, and Caspase3. Compared with the model group, the middle and high dose groups of *Pulsatilla* saponin B₄ showed significantly increased levels of Bax and Caspase-3 protein ($P < 0.001$), and significantly decreased levels of Bcl-2 protein ($P < 0.001$). **Conclusion** *Pulsatilla* saponin B₄ may induce apoptosis through key targets such as BCL2, BAX, and Caspase3, while reducing the expression of estrogen, progesterone, and estrogen receptors, thereby treating leiomyoma.

Key words: *Pulsatilla* saponin B₄; uterine fibroids; network pharmacology; Caspase3; BCL2; BAX; apoptosis; estradiol; progesterone; estrogen receptor

子宫肌瘤亦称子宫平滑肌瘤,或子宫纤维瘤,是最常见的女性生殖系统良性肿瘤^[1],育龄期女性发病率在20%~40%,50岁以上的女性中发病率高达70%^[2]。其常见症状包括月经过多、流产、不孕^[3]、慢性盆腔痛、尿频、便秘^[4]等,这些症状严重影响患者的生活质量和日常工作,同时也为患者家庭和国家带来沉重的经济负担^[5]。目前针对子宫肌瘤的治疗方案包括药物治疗和手术治疗,但是这些方案存在药物副作用多、价格昂贵、术后并发症多等问题,因此寻找能够有效缓解症状并且不良反应较小的治疗药物仍具有十分重要的意义^[6]。

在中医理论中,子宫肌瘤被认为是“癥瘕积聚”之病^[7],主要表现为肿块,发病主要原因是瘀血内阻、痰湿郁结、气血瘀滞、寒凝血瘀、湿热瘀阻等^[8]。现代研究发现,子宫肌瘤的发生与发展,同炎症细胞因子、趋化因子所导致的炎症内环境密不可分。随着中药在临床上的应用越来越广泛,利用中药来治疗子宫肌瘤得到了人们广泛的关注。白头翁是毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根,其性寒味苦,归大肠经和胃经,具有凉血止痢、清热解毒的功效,临床上常用于治疗热毒血痢、阿米巴病以及阴痒带下等^[9],其主要成分白头翁皂苷 B₄ 含量丰富、价格低廉、易转化为临床药物,具有抗肿瘤、抗炎等活性^[10]。本实验探究白头翁皂苷 B₄ 对子宫肌瘤的发生与发展是否具有抑制作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 试剂与主要药物

苯甲酸雌二醇注射液(批号 110252511)、黄体

酮注射液(批号 110251670),均购自宁波第二激素厂;白头翁皂苷 B₄,质量分数>98%,由实验室制备提供;壳聚糖(批号 9012-76-4),购自阿拉丁有限公司;15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯(批号 73059868E0),购自凤礼精求有限公司;米非司酮(批号 M830038),购自麦克林有限公司;大鼠雌二醇 ELISA 试剂盒(批号 MM-0575R1)、大鼠雌激素受体 ELISA 试剂盒(批号 MM-0567R1)、大鼠孕酮 ELISA 试剂盒(批号 MM-0551R1),均购自江苏酶免实业有限公司。

1.2 仪器

Centrifuge 型微量离心机,购自德国 Eppendorf 公司;KZ-III-F 型研磨仪、MV-100 型涡旋混匀仪,购自武汉赛维尔生物科技有限公司;MPR-512HI 型医用冷藏箱、MDF-682 型医用超低温保存箱,购自冰山松洋生物科技(大连)有限公司;THZ-103B 型恒温培养摇床,购自上海一恒科学仪器有限公司;Synergy H1 型多功能微孔板检测仪,购自美国 BioTek 公司;ME204E 型电子天平,购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;MP60 型显微照相系统、RM2125 型切片机,购自德国 Leica 公司。

1.3 动物

SD 雌性未孕 SPF 级大鼠,体质量 200~220 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号 SCXK(浙)2019-0001,合格证编号 20210624Aazz0619000227。动物饲养房自然明暗周期,室温,动物自由摄食、饮水。本实验获得广西中医药大学动物实验伦理委员会批准(编号 DW20220603-036)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备及给药

大鼠适应性饲养3 d后,按体质量随机分为6组,分别为对照组、模型组、米非司酮($1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组和白头翁皂苷 B_4 低、中、高剂量(5 、 10 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,每组8只。采用雌激素负荷法造模^[11]:除对照组外,各组大鼠每天均im给予苯甲酸雌二醇注射液($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),隔天每只大鼠增加im黄体酮注射液($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续注射9周,每天称体质量1次,并根据体质量调整造模药物用量。大鼠子宫病理学显示腺体增生及肌纤维明显增生提示造模成功。于造模成功后ip给药,对照组及模型组每天ip等量0.9%的氯化钠溶液,连续给药4周。

2.2 病理学检测

给药4周后打开腹腔,观察子宫和肌瘤形态,沿子宫膀胱连接处剪取子宫,剥离脂肪,拍照,称质量,计算子宫脏器指数。并将新鲜病变组织于多聚甲醛中固定,进行苏木精-伊红(HE)染色。

子宫指数=子宫质量/体质量

2.3 血清及子宫组织中雌二醇、孕酮、雌激素受体的表达水平检测

大鼠麻醉后进行腹主动脉取血,收集全血于无抗凝剂的普通采血管中,室温放置1 h,然后于 4°C 、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,分离血清,保存于 -80°C 中以备指标检测;精密称取80 mg子宫组织,于1.5 mL EP管中,加入9倍量体积的0.9%氯化钠溶液,并于组织研磨机中进行研磨,将EP管置于 4°C 、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心20 min,分离组织上清,于 -80°C 中保存用于检测。按照试剂盒说明,检测血清与子宫组织中雌二醇、孕酮、雌激素受体的表达水平。

2.4 白头翁皂苷 B_4 的作用靶点收集

采用 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)及相关文献,以“anemoside B_4 ”“白头翁皂苷 B_4 ”为关键词,对白头翁皂苷 B_4 的相关靶点进行收集。

2.5 疾病靶点预测以及交互靶点

以“uterine fibroide”作为检索词纳入人类基因数据库(Genecard, <https://www.genecards.org/>)进行检索,获取子宫肌瘤相关靶点,再采用基迪奥生信云平台(<https://www.genedenovo.com/>)进行药物与疾病的靶点交互,获取交互靶点蛋白,并制作韦恩图。

2.6 构建交互靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图

将交互靶点蛋白信息导入 STRING 数据

库(<https://cn.string-db.org/>),选择 Multiple Protein 分析,物种限定 Homo sapiens,最低互动分数(medium confidence)设置为0.4,点击“hide disconnected nodes in the network”将不存在互作关系的蛋白进行隐藏,其余设置按照系统默认设置,构建PPI网络图。

2.7 交互靶点基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

将交互靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>),物种来源为 Homo sapiens,进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,从细胞组成(CC)、分子功能(MF)、生物过程(BP)以及 KEGG 信号通路等方面提供基因功能的详细信息,并绘制功能富集柱状图以及 KEGG 通路富集气泡图。

2.8 交互靶点与药物的分子对接

从 Pubchem 数据库获取白头翁皂苷 B_4 的 SDF 格式的 2D 结构,用 ChemBio3D 能量最小化转为三维结构,保存为 mol2 格式;从 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取靶标蛋白的 3D 结构,并使用 PyMol 软件删除水分子和原配体。以蛋白作为受体,药物作为配体,根据靶蛋白复合物中配体的坐标确定分子对接的活性位点,采用 AutoDock Vina 进行分子对接,通过 PyMol 软件进行绘图。

2.9 Western blotting 检测子宫组织蛋白水平

将大鼠子宫组织于0.9%的氯化钠溶液中轻轻摇晃,后用滤纸吸去多余水分。用手术剪剪取约100 mg的组织,按照组织质量:裂解液(1:9)加入裂解液,放于1.5 mL的EP管中,进行组织研磨。研磨完毕,将EP管进行离心(4°C 、 $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min),所得上清用于 Western blotting 测定 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达。通过 BCA 蛋白定量测定蛋白浓度,吸取相同蛋白含量的上清,加入1/5体积的 $5\times$ loading进行 97°C 煮沸变性,之后将 SDS-PAGE 胶组装在电泳系统上,加入电泳缓冲液,每孔上样30 μg 进行电泳。电泳结束后通过湿转法将蛋白转移至PVDF膜上,转膜结束后通过5%脱脂牛奶对PVDF膜进行封闭,之后进行一抗、二抗的孵育,孵育结束后,TBST将膜洗净,使用ECL发光剂均匀的喷洒在PVDF条带上,于化学发光仪中进行显影。

2.10 统计学分析

通过 GraphPad Prism6 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,多组比较采用单因素方差

分析,组间比较采用 t 检验分析。

3 结果

3.1 大鼠体内实验结果

3.1.1 白头翁皂苷 B_4 对大鼠一般行为学的影响
造模前各组大鼠性情温和,毛色润泽柔顺,进食饮水良好。造模3周左右大鼠毛色开始发黄、凌乱,部分大鼠还有脱毛症状,且随造模时间延长,脱毛面积增大,且大鼠处于易激怒状态,不易抓取,喜斗殴。给药后情况有所改善。

3.1.2 白头翁皂苷 B_4 对大鼠子宫形态的影响
如图1所示,对照组子宫组织质地均匀,颜色鲜亮,两侧子宫对称,呈Y形,未见结节或囊肿。模型组部分子宫根部明显增粗,颜色黯淡,并可触摸到不同程度米粒大小肿块。给药各组的子宫质地均匀,颜色较淡,未见明显的肿胀、结节及囊肿。与对照组比较,模型组大鼠子宫指数显著升高($P<0.001$),表明其受到了损伤;与模型组比较,给药之后,大鼠子宫指数显著降低($P<0.001$),见图1。说明药物对大鼠子宫具有一定的保护作用。

3.1.3 白头翁皂苷 B_4 对大鼠子宫病理形态的影响
对照组大鼠子宫平滑细胞排列整齐,紧密,形态正常,色泽均一,肌层未见炎症细胞浸润,未出现增生;模型组大鼠子宫平滑肌增厚,细胞边界不清晰,

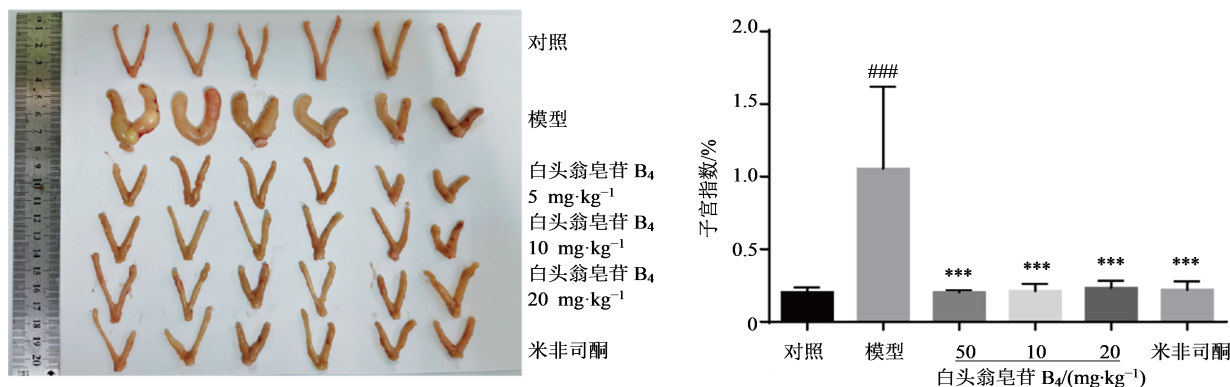
细胞核出现扁圆形状,肌纤维排列紊乱无序,可见明显炎症细胞浸润。给药后,大鼠子宫平滑细胞排列整齐,形态正常,色泽均一,肌层炎症细胞浸润减少。结果见图2。

3.1.4 白头翁皂苷 B_4 对大鼠血清中雌二醇、孕酮、雌激素受体水平的影响
如图3所示,与对照组相比,模型组大鼠血清中雌二醇、孕酮、雌激素受体的水平显著升高($P<0.001$);与模型组相比,各给药组血清中雌二醇、孕酮、雌激素受体的水平显著降低($P<0.05, 0.01, 0.001$)。

3.1.5 白头翁皂苷 B_4 对大鼠子宫组织中雌二醇、孕酮、雌激素受体水平的影响
如图4所示,与对照组相比,模型组大鼠子宫组织中雌二醇、孕酮、雌激素受体水平显著升高($P<0.01, 0.001$);与模型组相比,各给药组雌二醇、孕酮、雌激素受体水平显著降低($P<0.05, 0.01, 0.001$)。

3.2 网络药理学分析结果

3.2.1 白头翁皂苷 B_4 的作用靶点
实验结果证明,白头翁皂苷 B_4 可以改善子宫肌瘤模型大鼠组织损伤,降低相关激素水平,对大鼠子宫肌瘤模型具有一定的治疗作用,基于此通过网络药理学对白头翁皂苷 B_4 治疗大鼠子宫肌瘤的作用机制进行进一步的探讨。在Pubchem数据库中收集白头翁皂苷 B_4



与对照组比较:### $P<0.001$;与模型组比较:*** $P<0.001$ 。

$P<0.001$ vs control group; *** $P<0.001$ vs model group.

图1 白头翁皂苷 B_4 对大鼠子宫形态的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 1 Effects of Pulsatilla saponin B_4 on morphology of rat uterus ($\bar{x}\pm s, n=6$)

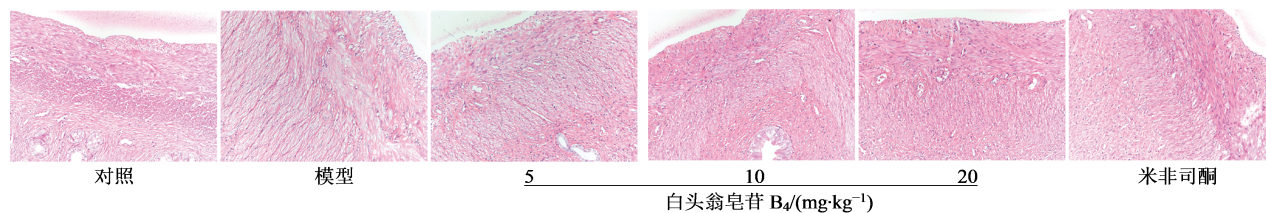
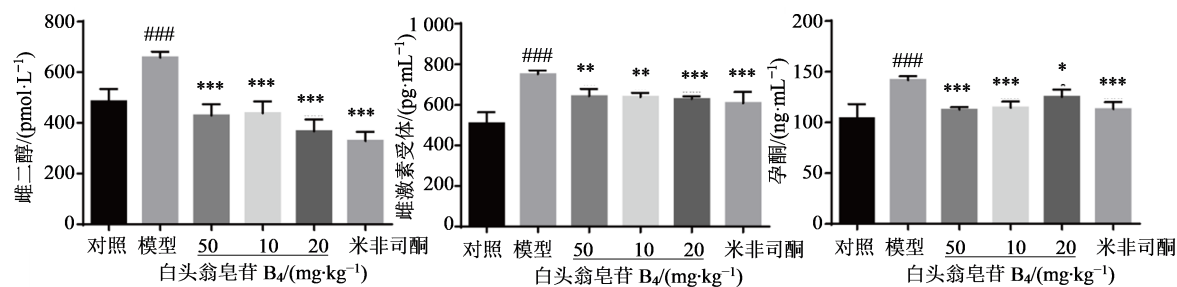


图2 大鼠子宫 HE 染色 ($\times 200$)

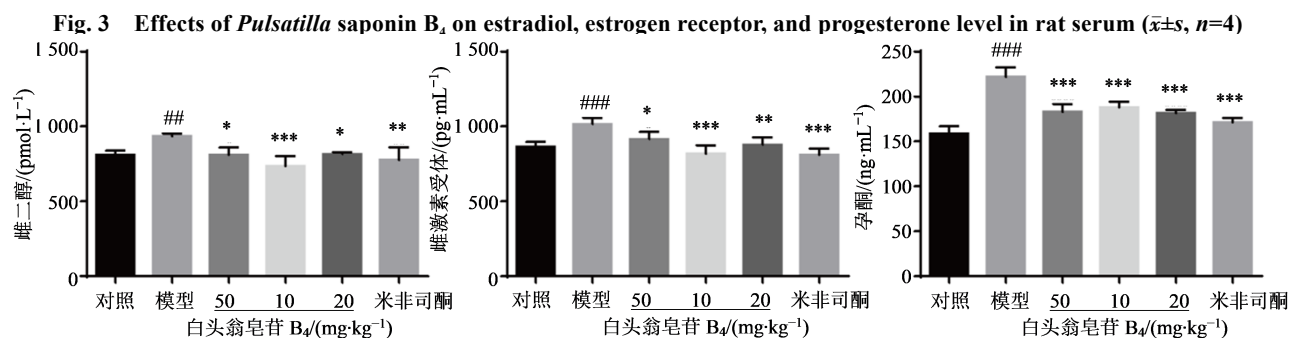
Fig. 2 HE staining of rat uterus ($\times 200$)



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图3 白头翁皂苷对大鼠血清中雌二醇、雌激素受体、孕酮水平的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)



与对照组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$;与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图4 白头翁皂苷对大鼠子宫组织中雌二醇、雌激素受体、孕酮水平的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 4 Effects of *Pulsatilla* saponin B₄ on levels of estradiol, estrogen receptor, and progesterone in rat uterine tissue ($\bar{x} \pm s, n=4$)

的相关作用靶点23个,包括BAX、BCL2、BECN1、CASP3、CASP9、CAT、CCL2、CHUK、IKBKB、IL1B、IL6、ITPR1、MAPK1、MAPK3、MAPK8、NFKBIA、NOS2、PLCG1、PTGS2、RELA、SQSTM1、STAT3、TNF。

3.2.2 子宫肌瘤靶点预测以及“白头翁皂苷B₄-子宫肌瘤”交互靶点的筛选 在GeneCards数据库中输入关键词“uterine fibroids”检索疾病相关靶点,得到子宫肌瘤相关靶点1 077个,通过基迪奥生信云平台工具,将白头翁皂苷B₄与疾病的相关靶点输入,得到交互靶点8个,包括BCL2、TNF、PTGS2、ITPR1、CASP3、RELA、CAT、BAX,韦恩图见图5。

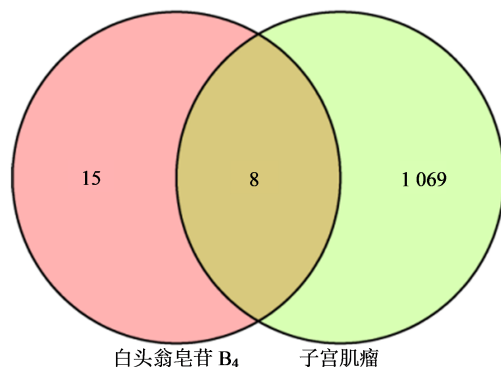


图5 白头翁皂苷B₄与子宫肌瘤交互靶点韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of interaction targets between *Pulsatilla* saponin B₄ and uterine fibroids

3.2.3 “白头翁皂苷B₄-子宫肌瘤”交互靶点PPI网络构建 利用STRING数据库对交互靶点进行PPI网络分析,并绘制PPI网络图(图6)。图中网络节点有8个,相互作用连线有17条,平均节点度值为4.25。图中网络节点表示蛋白质,节点图案表示蛋白质的三维结构,连线表示蛋白之间的互作关系,连线的颜色表示互作类型。

3.2.4 “白头翁皂苷B₄-子宫肌瘤”交互靶点富集分析 从DAVID数据库中对交互靶点进行分析,得到GO条目99条,其中BP条目81条,主要包括对糖皮质激素、外来刺激、过氧化氢、雌二醇等的反应,对

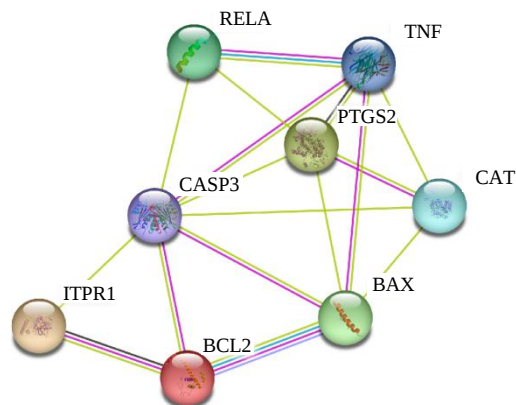


图6 交互靶点PPI网络图

Fig. 6 Interaction target PPI network diagram

凋亡过程、响应内质网应激的内在凋亡、响应DNA损伤的内在凋亡、上皮细胞凋亡、神经元凋亡、 β -淀粉样蛋白形成、NF- κ B转录因子的调控过程等；MF条目8条，包括通道、蛋白同二聚化活性，与转录顺式调节区、蛋白酶、酶、重组蛋白、血红素、BH3结构域的结合；CC条目10条，包括孔复合体、线粒体外膜、核内膜、膜、脂筏、线粒体、内质网、内质网膜、蛋白质复合物、胞质溶胶。以上条目根据富集强度的大小，选取前10个条目进行作图（少于10个条目的选取全部），具体见图7。KEGG富集信号通路78条，主要包括细胞凋亡、IL-17、p53、小细胞肺癌、NF- κ B、TNF、军团病等信号通路，根据富集强度排列，选取前20个进行作图统计，见图8。

3.2.5 分子对接结果 为了进一步验证白头翁皂苷 B_4 的作用靶点，将交互靶点与药物进行分子对接，发现BCL2、BAX、CASP3这3个凋亡相关蛋白与药物结合分数较高，结合模式图见图9。说明白头翁皂苷 B_4 有可能是通过调节凋亡相关靶点从而影响子宫肌瘤的发生与发展。

3.3 组织蛋白水平检测验证

对大鼠子宫组织中的Bcl-2、Bax、Caspase-3的

蛋白水平进行检测。与对照组比较，模型组的Bax、Caspase-3蛋白水平显著降低，Bcl-2蛋白水平显著升高($P<0.01$ 、 0.001)；与模型组比较，白头翁皂苷 B_4 中、高剂量组Bax、Caspase-3蛋白水平显著升高($P<0.001$)，Bcl-2蛋白水平显著降低($P<0.001$)，见图10。结果表明，白头翁皂苷 B_4 可以促进子宫肌瘤组织中的肿瘤细胞发生凋亡。

4 讨论

本实验通过网络药理学寻找白头翁皂苷 B_4 -子宫肌瘤交互靶点，并通过GO、KEGG通路富集分析，发现交互靶点大多与细胞凋亡相关通路相关。通过Autodock Vina进行分子互作发现，与白头翁皂苷 B_4 结合分数较高的关键靶点为BAX、BCL2、Caspase3。Bax为细胞凋亡调节因子，属于高等动物中生存和死亡信号整合因子Bcl-2家族中的多域的促凋亡因子。在细胞凋亡中，Bax与其他促凋亡蛋白被激活，导致线粒体外膜透化(MOMP)，使得线粒体内促凋亡因子细胞色素C释放出来，从而导致细胞凋亡^[12]。Bcl-2为细胞凋亡蛋白家族中的抗凋亡蛋白，它通过其BH1和BH2结构域与促凋亡蛋白Bax结合，抑制Bax的促凋亡作用。Bcl-2还可调

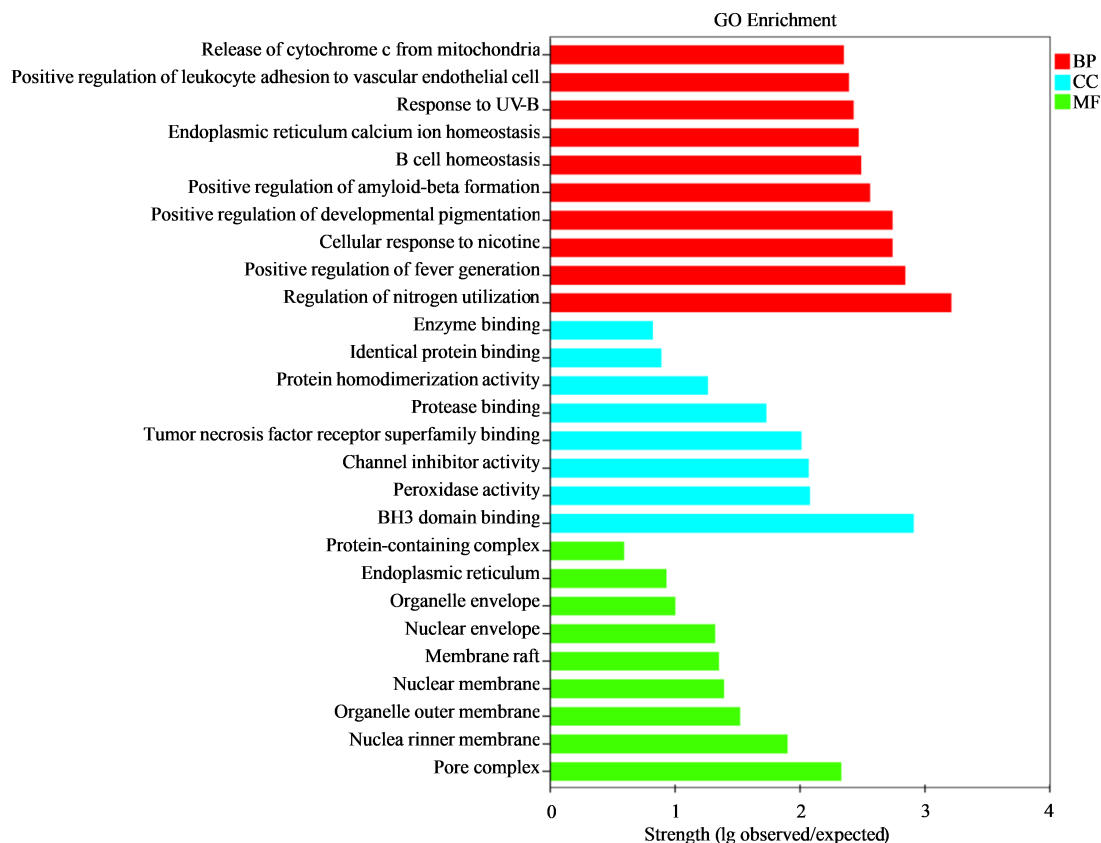


图7 靶点GO富集分析

Fig. 7 Target GO enrichment analysis

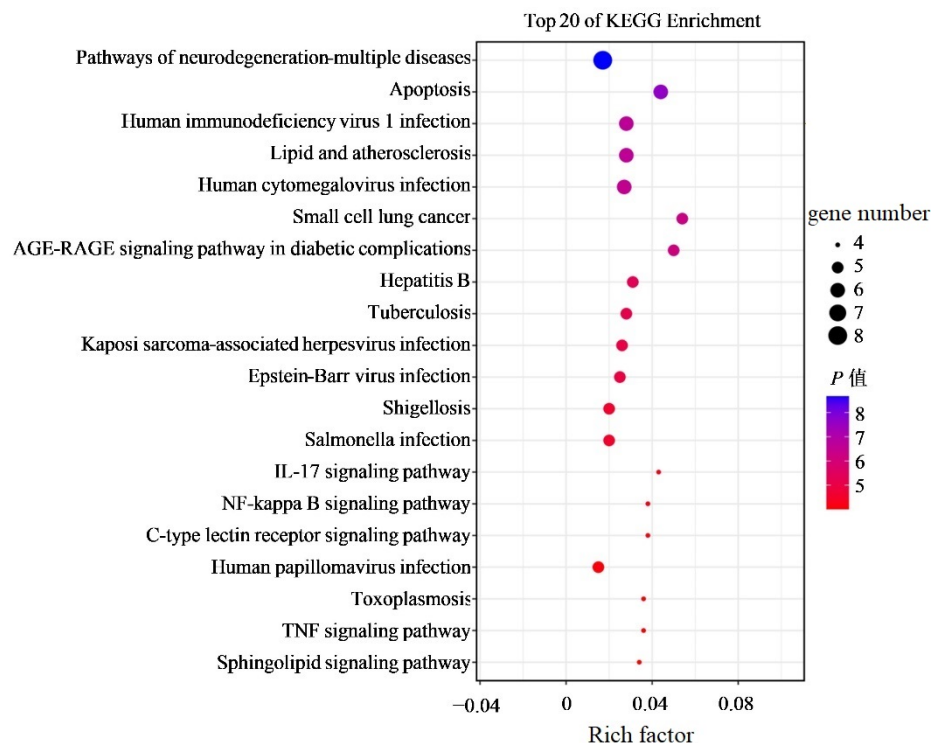


图8 KEGG通路富集分析
Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis

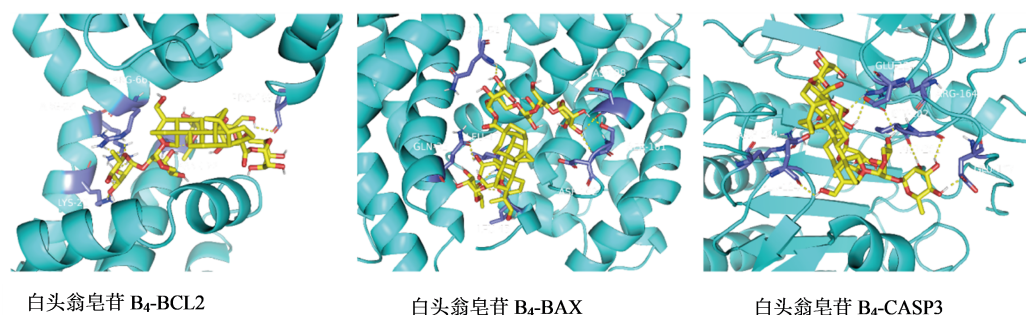
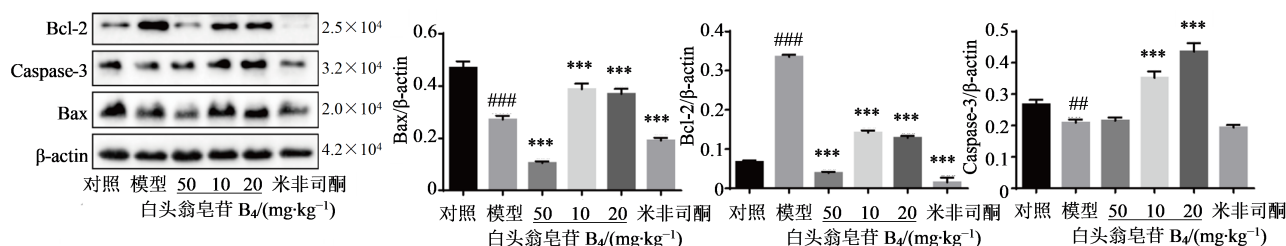


图9 白头翁皂苷 B₄与关键靶点的分子对接模式图
Fig. 9 Molecular docking model of *Pulsatilla* saponin B₄ and key targets



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P < 0.001$ 。
^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图10 子宫组织中凋亡相关蛋白水平表达 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Fig. 10 Expression of apoptosis-related proteins in uterine tissue ($\bar{x} \pm s, n=4$)

节许多转录因子如 Beclin-1、p53、NF-κB、PARP1 等, 从而抑制自噬、调节细胞凋亡、修复 DNA 双链断裂等^[13]。Caspase-3 是半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族成员, 同时也是细胞凋亡的执行人, 通过线粒体途

径释放的细胞色素 C 等凋亡因子激活了 Caspase-3, 活化的 Caspase-3 切割裂解多个靶蛋白, 从而使细胞发生凋亡^[14]。

子宫肌瘤为激素依赖性肿瘤, 主要认为与雌、

孕激素及其受体有关^[1]。大量临床数据证明,子宫肌瘤多数发生于性成熟期,在生育期发展、怀孕期间扩大,并经常在绝经后消退。现代研究认为,雌激素和孕激素对子宫肌瘤的促生长作用,可能是通过平滑肌细胞和成纤维细胞产生的生长因子的促有丝分裂作用介导,雌二醇C-4、C-16羟基化代谢产物同样具有强大的雌激素活性^[14],因此雌二醇、雌激素受体、孕酮水平能够反映子宫肌瘤的发生发展情况。

现代研究发现,子宫肌瘤的发生发展与细胞凋亡之间密不可分,由于雌激素、孕激素诱导的细胞生长因子抑制了细胞凋亡的发生,从而导致肿瘤细胞的堆积、子宫肌瘤的持续恶化。通过网络药理学及实验验证发现白头翁皂苷B₄可能调节细胞凋亡相关蛋白,影响凋亡相关通路,从而促进肿瘤细胞的凋亡,同时降低雌激素、孕激素、雌二醇的水平,从而达到治疗子宫肌瘤的目的。本研究为开发白头翁皂苷B₄治疗子宫肌瘤提供了新思路和研究基础。但本实验仍存在一定的局限性,未进行体外实验研究药物具体作用机制,药物量效关系未能明显展现,因此白头翁皂苷B₄治疗子宫肌瘤的具体作用机制仍有待深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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杂志, 2012, 28(12): 950-952.
Chen Q Y, Zhang X Y. Research progress on the pathogenesis of uterine fibroids [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2012, 28(12): 950-952.
- [2] 李虎, 胡丽娜. 子宫肌瘤的非手术治疗进展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(8): 872-877.
Li H, Hu L N. Non-surgical management of uterine myoma [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2019, 35(8): 872-877.
- [3] 郝子兰, 马惠荣, 林雄坡, 等. 女性子宫肌瘤发病危险因素的Meta分析 [J]. 中国性科学, 2023, 32(2): 64-68.
Hao Z L, Ma H R, Lin X P, et al. Risk factors of female uterine fibroids: A Meta-analysis [J]. Chin J Hum Sex, 2023, 32(2): 64-68.
- [4] Parker W H. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas [J]. Fertil Steril, 2007, 87(4): 725-736.
- [5] Qiwei Y, Michal C, Victoria B M, et al. Comprehensive review of uterine fibroids: Developmental origin, pathogenesis, and treatment [J]. Endocr Rev, 2022, 43(4): 678-719.
- [6] 汪雯雯, 王世宣. 子宫肌瘤诊治相关指南解读 [J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(2): 101-103.
Wang W W, Wang S X. Interpretation of guidelines for diagnosis and treatment of hysteromyoma [J]. J Pract Obstet Gynecol, 2022, 38(2): 101-103.
- [7] 杨相海, 阳乐, 陈欢, 等. 中药治疗子宫肌瘤的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2629-2631.
Yang X H, Yang L, Chen H, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in the treatment of uterine leiomyoma [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(6): 2629-2631.
- [8] 李悦. 金梦贤治疗子宫肌瘤经验 [J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(3): 22-23.
Li Y. Jin Mengxian's experience in treating uterine myoma [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2017, 33(3): 22-23.
- [9] 苏晓悦, 徐驰, 杜鑫, 等. 白头翁化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(3): 76-82.
Su X Y, Xu C, Du X, et al. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of *Pulsatilla chinensis* [J]. Inf Tradit Chin Med, 2023, 40(3): 76-82.
- [10] 袁进, 张丽峰, 高红伟, 等. 白头翁皂苷B₄药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(7): 2229-2233.
Yuan J, Zhang L F, Gao H W, et al. Research progress on the pharmacological effects of Baitouweng saponin B₄ [J]. Tradit Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(7): 2229-2233.
- [11] 谭薇, 王众, 代芳芳, 等. 子宫肌瘤动物造模的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 393-398.
Tan W, Wang Z, Dai F F, et al. Advances in animal modeling of uterine fibroids [J]. Chin J Exper Anim, 2021, 29(3): 393-398.
- [12] Riley J S, Quarato G, Cloix C, et al. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis [J]. EMBO J, 2018, 37(17): e99238.
- [13] Hardwick J M, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(2): a008722.
- [14] Eskandari E, Eaves C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis [J]. J Cell Biol, 2022, 221(6): e202201159.
- [15] Flake G P, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: A review [J]. Environ Health Perspect, 2003, 111(8): 1037-1054.

[责任编辑 兰新新]