

基于细胞代谢组学技术探讨桂枝茯苓胶囊治疗子宫肌瘤的作用机制

金 彬¹, 胡桂洲¹, 任国庆¹, 许文韬², 王 倩¹, 陈夏霖¹, 曹 亮¹, 王振中¹, 肖 伟^{1*}

1. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室(江苏康缘药业股份有限公司/南京中医药大学), 江苏 南京 210000

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210000

摘要: **目的** 研究桂枝茯苓胶囊(GZFL)对子宫肌瘤细胞增殖的抑制作用, 同时结合代谢组学技术探讨其作用机制。**方法** 子宫肌瘤细胞分为对照组、GZFL(0.4、0.5、0.6、0.7、1.0 mg·mL⁻¹)和米非司酮(RU-486, 20、25、30、40、90 μmol·L⁻¹)组, 药物处理细胞 24 h。MTS 法检测细胞相对存活率并筛选适宜浓度; 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期; 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测人子宫肌瘤细胞 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、增殖细胞核抗原(PCNA)表达; 代谢组学技术研究 GZFL 对子宫肌瘤细胞的作用机制。**结果** 与对照组比较, GZFL 能显著抑制子宫肌瘤细胞增殖($P < 0.01$ 、 0.001)、诱导其发生凋亡并阻滞细胞周期($P < 0.01$ 、 0.001)、且可下调细胞中 Bcl-2、PCNA($P < 0.05$ 、 0.01)蛋白的表达, 均呈浓度相关性。与对照组相比, GZFL 高剂量组中 14 种差异代谢物下调, 4 种差异代谢物上调。对差异代谢物进行进一步通路富集得到 15 条代谢通路, 其中精氨酸和脯氨酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 色氨酸代谢可能是 GZFL 作用的主要途径。**结论** GZFL 对子宫肌瘤细胞具有显著的抑制作用, 可能与干预氨基酸的代谢、进而影响细胞的能量供给及代谢相关。

关键词: 桂枝茯苓胶囊; 子宫肌瘤; 代谢组学; 精氨酸和脯氨酸代谢; 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 色氨酸代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)05-1103-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.003

Exploring mechanism of Guizhi Fuling Capsule in treating uterine fibroids based on cellular metabolomics

JIN Bin¹, HU Guizhou¹, REN Guoqing¹, XU Wentao², WANG Qian¹, CHEN Xialin¹, CAO Liang¹, WANG Zhenzhong¹, XIAO Wei¹

1. State Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd. & Nanjing University of Chinese Medicine), Nanjing 210000, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Guizhi Fuling Capsule (GZFL) on the proliferation of human uterine leiomyoma cells and to explore its mechanism of action using metabolomics technology. **Methods** Human uterine fibroid cells were divided into the control group, the GZFL (0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 1.0 mg·mL⁻¹) group and the mifepristone (RU-486, 20, 25, 30, 40, 90 μmol·L⁻¹) group, and the cells were treated with drugs for 24 h. The relative survival rate of cells was detected by the MTS method and the appropriate concentration was screened. Cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry; The expressions of B-lymphoblastoma-2 (Bcl-2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in human uterine fibroid cells were detected by ELISA. Metabolomics technology was used to study the mechanism of action of GZFL on human uterine fibroid cells. **Results** Compared with the control group, GZFL could significantly inhibit the proliferation of human uterine fibroids cells ($P < 0.01$, 0.001), induce apoptosis and arrest the cell cycle ($P < 0.01$, 0.001), and down-regulate the expression of Bcl-2 and PCNA proteins in cells ($P < 0.05$, 0.01), all in a concentration-dependent manner. Compared with the control group, 14 differential metabolites were down-regulated and four differential metabolites were up-regulated in the high-dose GZFL group. Further pathway enrichment of the differential metabolites yielded 15 metabolic pathways, among which arginine and proline metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism, and tryptophan metabolism might be the main pathways of GZFL action. **Conclusion** GZFL exhibits a significant

收稿日期: 2024-11-18

基金项目: 江苏省基础研究计划自然科学基金--前沿引领技术基础研究专项(BK20232014)

作者简介: 金 彬(1997—), 女, 江苏盐城, 硕士研究生。E-mail: jb18118448531@163.com

*通信作者: 肖 伟, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药研发与过程质量控制研究。E-mail: kanionlunwen@163.com

inhibitory effect on UMCs, possibly by interfering with amino acid metabolism, thereby affecting the cells' energy supply and metabolic demands.

Key words: Guizhi Fuling Capsule; uterine fibroids; metabolomics; arginine and proline metabolism; alanine; aspartate and glutamate metabolism; tryptophan metabolism

子宫肌瘤是激素依赖性女性生殖器良性肿瘤^[1], 常见于 30~50 岁妇女, 过去 30 年子宫肌瘤的患病率在全球范围内显著增加^[2]。子宫肌瘤的主要治疗方式是手术治疗, 患者不仅要承担巨额的医疗费用且易复发^[3]。此外, 药物治疗是一种重要的选择, 可以分为激素治疗和非激素治疗^[4], 西医保守治疗常采用性激素类药物, 但长期使用可能会导致更年期样症状、不可逆的骨矿物质密度损失, 以及严重的肝损伤^[5]。中医无子宫肌瘤病名记载, 依据其症状将其纳入“癥瘕”“石瘕”“崩漏”等范畴, 历代医家对其病因病机均有不同见解^[6], 在临床上, 中医通过辨证论治, 根据病机、症状和体征进行个体化治疗, 具有调理脏腑气血、平衡阴阳的独特优势。中医药作为中国传统医学的瑰宝, 在治疗子宫肌瘤方面展现出显著疗效, 且副作用较小, 不良反应发生率低, 具有广阔的应用前景^[7]。

桂枝茯苓胶囊(GZFL)起源于汉代著名中医张仲景的《金匮要略》, 由 5 种药用植物——桂枝、白芍、牡丹皮、桃仁、茯苓组成, 比例为 1:1:1:1:1^[8]。GZFL 具有活血、化瘀、消癥之功效, 被广泛应用于治疗子宫肌瘤, 临床效果显著^[9]。研究发现, 与单独使用小剂量米非司酮相比, 联合 GZFL 治疗子宫肌瘤可显著降低卵泡雌激素、雌二醇、孕酮、黄体生成素、子宫肌瘤体积等, 提高临床有效率, 不会增加药物不良反应^[10-11]。然而, GZFL 对子宫肌瘤的抗肿瘤机制尚不明确, 国内相关机制研究亟待加强^[12]。代谢组学全面分析代谢物动态变化, 与中医整体观念契合, 为中药作用机制研究及新药研发提供科学依据^[13]。基于此, 本研究拟采用代谢组学技术, 探讨 GZFL 对子宫肌瘤细胞的抑制作用及其作用机制。

1 材料

1.1 药物及试剂

人子宫肌瘤细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司; GZFL (批号 220809-42035, 江苏康缘药业股份有限公司); 米非司酮 (RU-486, 批号 Y02M7D10327, 上海源叶生物科技有限公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号 BC20231110, Bio-Channel

公司); DMEM 培养基 (批号 2764635)、胎牛血清 (批号 A2799564P)、胰蛋白酶 (批号 2500314), Gibco 公司; MTS (批号 0000595688, Promega 公司); Human 增殖细胞核抗原 (PCNA) ELISA Kit (批号 2092031424, Thermo 公司); Human B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) ELISA Kit (批号 A125231035, 联科生物); 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (批号 111222221229)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 061923230919), Beyotime 公司; 甲醇 (批号 FT22k11802, 弗顿生化科技有限公司); 无水乙醇 (批号 20220907, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为超纯水。

1.2 仪器

3111 二氧化碳培养箱、Orbitrap Exploris 120 质谱 (Thermo 公司); CKX31SF 显微镜 (OLYMPUS 公司); HH-4 恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); BY-320A 离心机 (北京白洋医疗器械有限公司); BioTek Epoch 2 酶标仪 (Agilent 公司); THZ-312 台式恒温振荡器 (上海精宏实验设备有限公司); Cytotflex 流式细胞仪 (Beckman 公司); Auto EVA Mini 氮吹仪 (睿科集团股份有限公司); Dalxuot-8S 超声波细胞破碎仪 (上海达洛科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

细胞用含 15% 胎牛血清的高糖培养基 (DMEM), 在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 细胞用 α -actin 抗体进行免疫细胞化学法染色, 鉴定为子宫肌瘤细胞。取生长状态稳定、呈对数生长期细胞用于实验。

2.2 药液配制

使用 50% 甲醇-水溶液对 GZFL 进行超声提取, 抽滤并旋蒸至干。用二甲基亚砜 (DMSO) 复溶作为母液, 临用前再稀释至所需浓度。RU-486 溶解于 DMSO 后作为阳性对照母液, 临用前稀释。

2.3 细胞活力测定

处于对数期的子宫肌瘤细胞胰酶消化后得到细胞悬液, 以每孔约 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 培养 24 h 后进行给药实验。用不同质量浓度的

GZFL (0.4、0.5、0.6、0.7、1.0 mg·mL⁻¹) 和 RU-486 (20、25、30、40、90 μmol·L⁻¹) 处理细胞 24 h, 对照组给予等量 DMSO, 同时设置空白组 (不含细胞和药液), 每组 6 个复孔。随后在 MTS 溶液中孵育 2 h, 使用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 细胞凋亡测定

取对数生长期的细胞, 以每孔约 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 后进行给药。用低、中、高质量浓度的 GZFL (0.4、0.5、0.6 mg·mL⁻¹) 和 RU-486 (20 μmol·L⁻¹) 处理细胞 24 h, 对照组给予等量 DMSO, 每组设 3 个复孔。收集细胞后, 使用 PBS 轻轻重悬。取 10 万重悬细胞, 离心弃去上清液。随后加入 195 μL 结合液、5 μL Annexin V-FITC、10 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液, 轻轻混匀。室温避光孵育 10 min, 流式细胞仪进行上机检测。

2.5 细胞周期测定

取处于对数期的细胞, 接种及给药方式同“2.4”项。收集细胞, 经预冷的 PBS 洗涤后, 细胞团中加入 1 mL 预冷的 70%乙醇, 轻轻吹打混匀, 4 °C 下固定 24 h, 离心后弃上清, 再次加 1 mL 预冷的 PBS 洗涤。最后, 加入 0.5 mL 的 PI 染色液吹打均匀, 在 37 °C 下避光孵育 30 min 后, 用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测荧光信号。

2.6 Bcl-2、PCNA 蛋白表达检测

将细胞悬液接种于培养皿中, 并置于恒温 CO₂ 培养箱内, 培养至 80%融合。给药方式同“2.4”项, 给药处理 24 h 后, 收集细胞。将收集的细胞用预冷 PBS 充分混匀后, 以 800 r·min⁻¹ 离心 5 min, 洗涤 3 次。使用细胞超声破碎仪在 200 W、每次 2 s、间隙 3 s、总时间 5 min 的条件下破碎细胞。随后, 在 4 °C 条件下离心以除去细胞碎片, 收集上清液用于蛋白含量测定和 ELISA 法检测 Bcl-2、PCNA 蛋白表达。

2.7 细胞代谢组学样品制备

细胞接种及给药方式同“2.4”项, 给药处理 24 h 后, 弃去上清液, 加入预冷的 PBS 轻轻的洗涤细胞。随后加入低温的甲醇淬灭细胞, 用无菌刮刀刮取细胞并收集, 使用细胞超声破碎仪破碎细胞。-20 °C 下孵育样品 1 h, 随后在 4 °C 下以 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 除去沉淀蛋白, 收集上清液, 氮吹浓缩后, 加入甲醇溶液 200 μL。搅拌 5 min, 4 °C 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。收集上

清液进行分析。每种样品各取 10 μL 混合, 获得质控样品 (QC), 用于方法验证。

2.8 代谢组学 LC-MS/MS 分析

色谱条件: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 30 °C, 体积流量 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL, 流动相为 0.1% 甲酸溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 2% B; 1~5 min, 2%~46% B; 5~8 min, 46%~50% B; 8~13 min, 50%~60% B; 13~17 min, 60%~76% B; 17~25 min, 76%~90% B; 25~27 min, 90% B; 27~29 min, 90%~2% B。每检测 6 个样品进行 1 次洗柱程序, 确保没有残留杂质。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子模式检测, 离子扫描范围设置为 *m/z* 50~1 500; 雾化气压力 275.79 kPa; 锥孔电压 65 V; 裂解电压 135 V; 毛细管电压, 正离子模式 4 000 V、负离子模式 3 500 V; 干燥气体积流量 10.0 L·min⁻¹; 干燥气温度 350 °C; 碰撞能量分别为 10、20、40 V。

2.9 代谢组学数据处理

将数据导入 Compound Discover 3.3 软件, 对细胞样本标记、分组, 选择 0.2~28.0 min 时间段, 设定最小绝对丰度为 500 000, 基线 (1.5 倍基线)、质量偏差 5×10^{-6} 以内, 对数据进行初步提取。化合物结果选择 mzVault Search、mzCloud Search、predict compositions、ChemSpider Search 等数据库进行初步匹配及鉴定。

所得化合物以原始峰面积利用 Metabo Analyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) 网站进行数据筛选, 数据进行标准化处理: 中位数归一化、对数转换、数据中心化后除以每个变量标准差的算术平方根, 用于后续的无监督的主成分分析 (PCA)、聚类分析、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)。应用倍数变化 (Fold Change, FC) 与 *t* 检验分析 GZFL 组与对照组, 以 $FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.67$, $P < 0.05$ 筛选差异代谢物。利用 Metabo Analyst 平台对筛选鉴定出的差异代谢物进行进一步分析, 以人类 (Homo sapiens) 为研究种属, 结合代谢通路分析, 筛选出与差异代谢物相关的潜在靶标通路。

2.10 统计学方法

运用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差 (ANOVA) 分析, 两组间比较采用 *t* 检验分析。

3 结果

3.1 GZFL 对子宫肌瘤细胞的抑制作用

如图 1 所示,不同质量浓度的 GZFL 处理人子宫肌瘤细胞 24 h 后,细胞的存活率均有不同程度的降低,且呈浓度相关性,在后续实验中设定给药质量浓度为 0.4、0.5、0.6 mg·mL⁻¹。阳性药 RU-486 选择 20 μmol·L⁻¹作为给药浓度。

3.2 GZFL 对子宫肌瘤细胞凋亡的影响

采用 AnnexinV-FITC 和 PI 进行双染,图 2 结果显示,右上象限为 FITC⁺/PI⁺,表示坏死细胞和晚期凋亡细胞;右下象限为 FITC⁺/PI⁻,表示早期凋亡细胞;左下象限为正常细胞。对照组细胞的总凋亡

率为(9.4±0.2)%,GZFL 低、中、高质量浓度组的总凋亡率分别为(41.1±0.7)%、(52.7±1.7)%、(67.1±0.6)%,阳性药 RU-486 组的总凋亡率为(66.2±1.8)%,与对照组比较,GZFL 组子宫肌瘤细胞总凋亡率随着给药浓度的增加而增加,差异有统计学意义($P<0.001$)。提示 GZFL 能明显诱导人子宫肌瘤细胞发生凋亡。

3.3 GZFL 对子宫肌瘤细胞周期的影响

图 3 结果表明,与对照组比较,随着 GZFL 给药浓度的升高,S 期细胞的比例增加,高质量浓度组差异显著($P<0.01$)。结合细胞凋亡结果分析,GZFL 诱导细胞周期在 S 期发生阻滞,进而抑制细胞增殖。

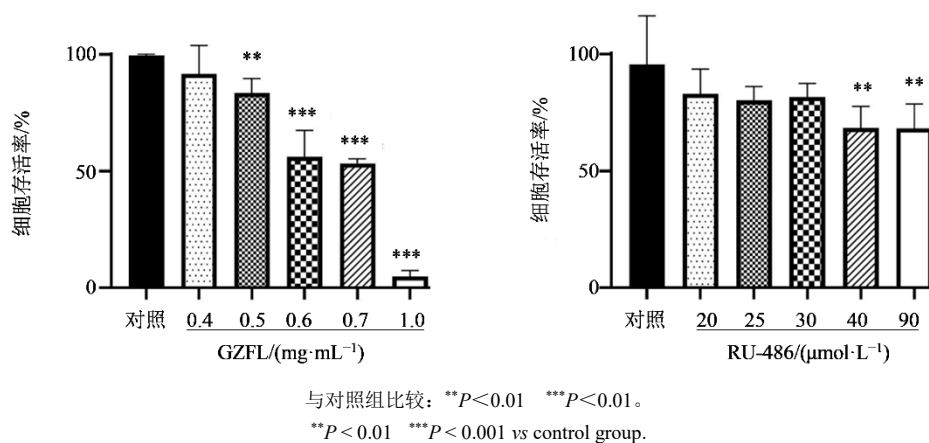


图 1 GZFL、RU-486 对子宫肌瘤细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.1 Effects of GZFL and RU-486 on survival rate of uterine fibroid cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

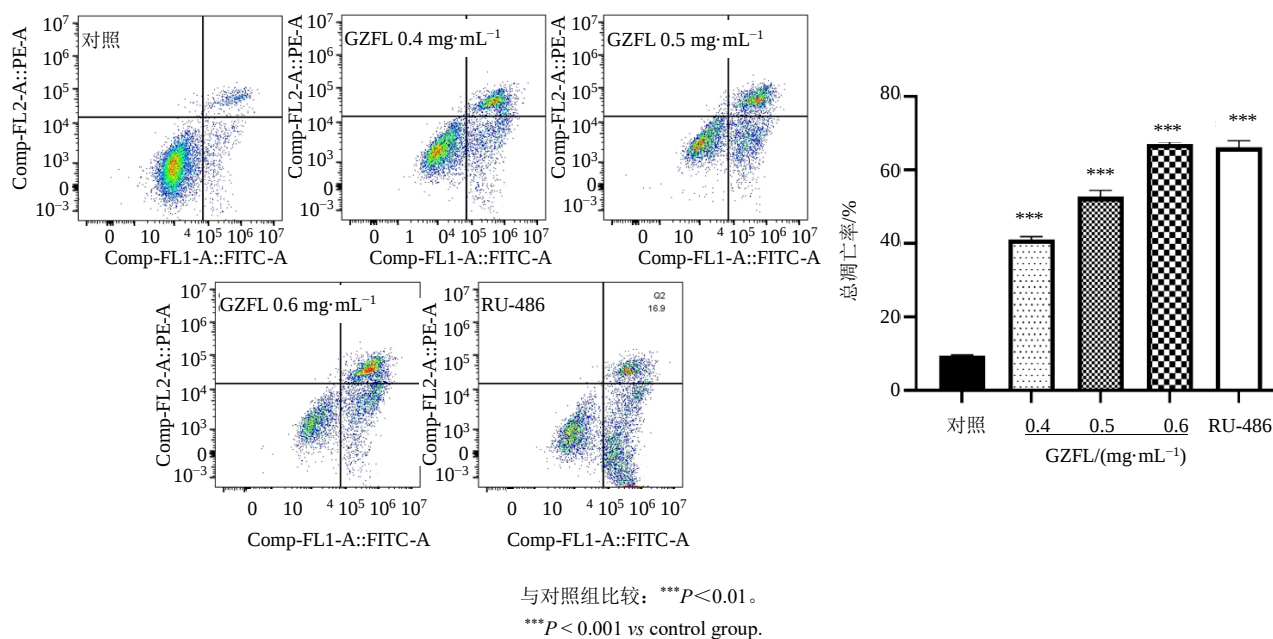
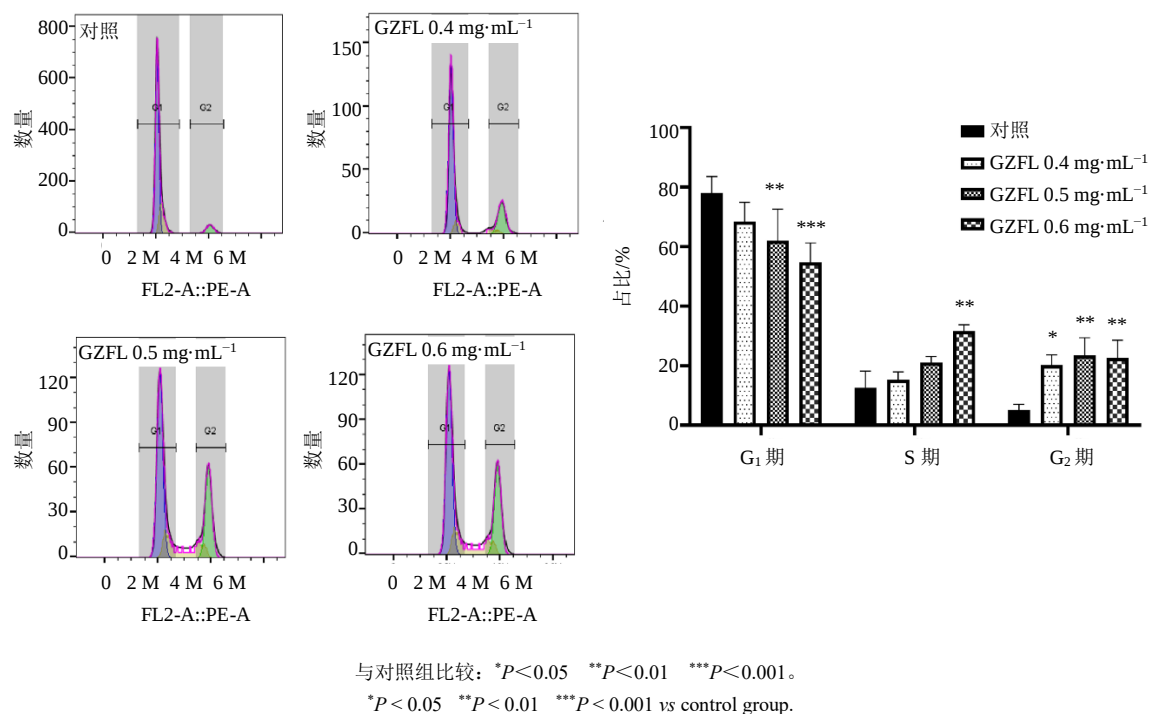


图 2 GZFL 对子宫肌瘤细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effects of GZFL on apoptosis of uterine fibroid cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图 3 GZFL 对子宫肌瘤细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 3 Effects of GZFL on cell cycle of uterine fibroid cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 GZFL 对 Bcl-2、PCNA 蛋白表达的影响

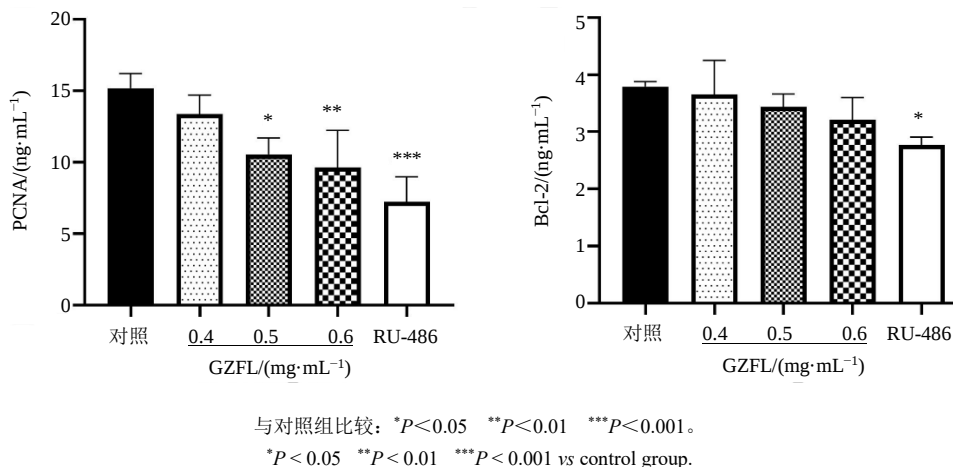
如图 4 所示, 与对照组相比, 0.5、0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ GZFL 及 RU-486 均可下调人子宫肌瘤细胞中 Bcl-2、PCNA 的蛋白表达, 且呈浓度相关性, 其中 0.5、0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ GZFL 组 PCNA 蛋白表达差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01), RU-486 组 Bcl-2、PCNA 的蛋白表达均差异显著 ($P < 0.05$ 、0.001)。

3.5 代谢轮廓表征及可靠性分析

采用质谱技术对各组样品进行检测, 正、负离

子模式下的总离子流见图 5。为确保数据质量的可靠性, 进样前及进样过程中运行 QC 样本, 并对其进行无监督的 PCA。结果显示, QC 样本紧密聚集, 表明实验具有良好的重复性 (图 6)。

数据经预处理后, 共识别出 185 种化合物。针对对照组、RU-486 组及 GZFL 低、中、高质量浓度 (0.4、0.5、0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组, 对其细胞代谢数据进行了无监督的 PCA 和聚类分析。PCA 及聚类热图结果 (图 6) 表明, 各组样本间能够实现明确区分,

图 4 GZFL 对 PCNA、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 4 Effects of GZFL on expression of PCNA and Bcl-2 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

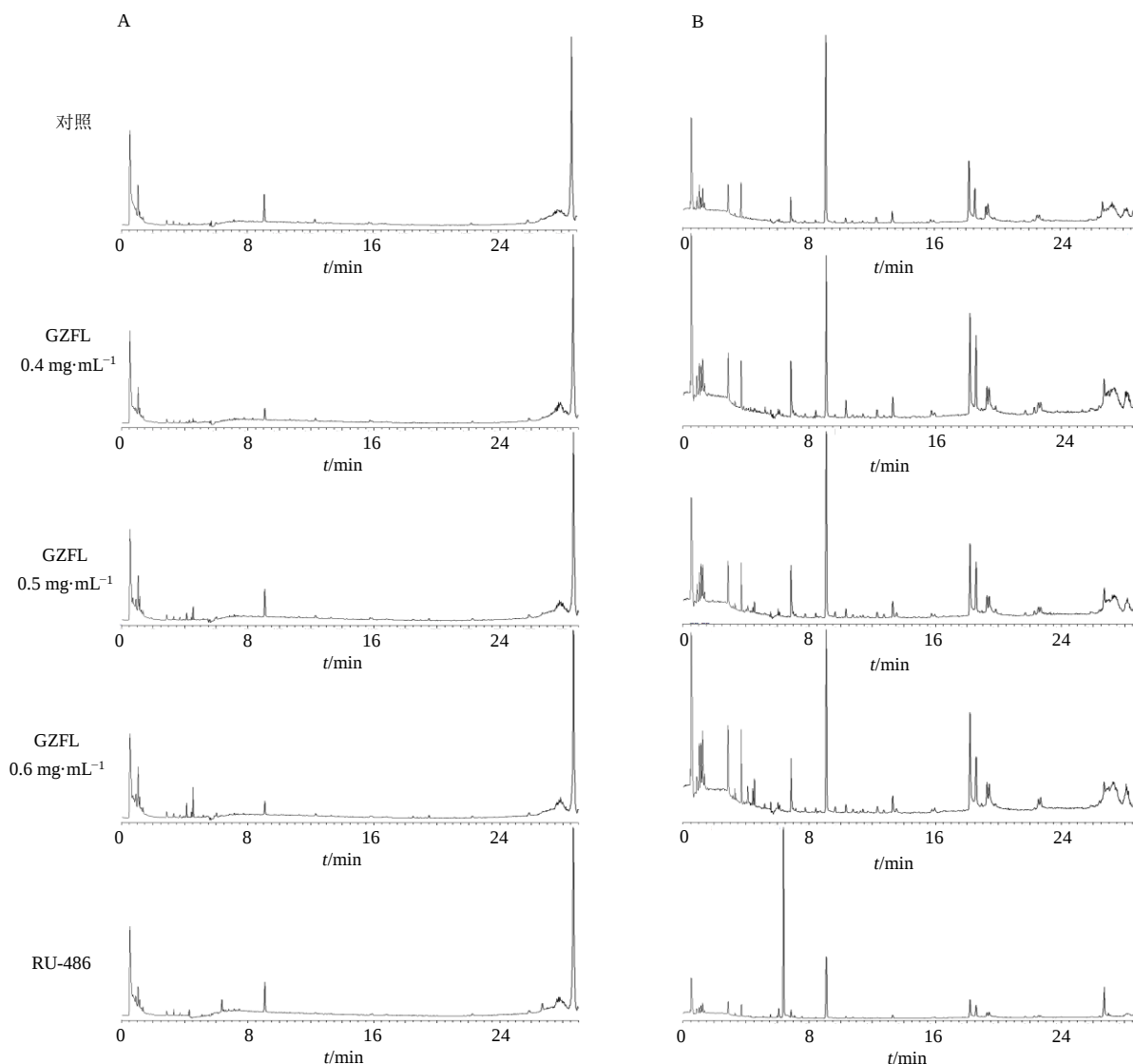


图 5 负(A)、正(B)离子模式下各组样品的总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatograms of samples in negative (A) and positive (B) ion mode

说明药物干预改变了人子宫肌细胞的内源性代谢物谱。偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 结果 (图 7) 显示, 模型的 $R^2_Y(\text{cum})=0.983$, $Q^2(\text{cum})=0.902$, 表明模型具有良好的分类能力和预测能力。同时, 图 7-B 中 Q^2 值的合理分布及其较高斜率进一步验证了模型在当前分割条件下的稳定性。GZFL 高质量浓度组较低、中质量浓度组更偏离于对照组。

3.6 差异代谢物的筛选和鉴定

分析 GZFL 组与对照组, 以 $FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.67$, $P < 0.05$ 筛选差异代谢物, 鉴定得到 18 种差异代谢物, 见表 1。

3.7 差异代谢物的代谢通路分析

利用 Metabo Analyst 网站对 18 个差异代谢物

进行代谢通路的富集分析, 共筛选出 15 条相关的代谢通路 (图 8)。将 $\text{Impact} \geq 0.01$ 、 $P < 0.05$ 作为筛选条件, 最终获得 3 条潜在的关键通路, 见表 2。进一步分析精氨酸和脯氨酸代谢通路中的关键差异代谢物肌酸 (creatine)、4-胍基丁酸 (4-guanidinobutanoate) 及 L-谷氨酸 (L-Glutamate), 见图 9, 与对照组相比, 高质量浓度 GZFL 组中肌酸含量显著下降 ($P < 0.01$), 4-胍基丁酸含量显著升高 ($P < 0.01$), 且 L-谷氨酸含量显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

肿瘤的形成源于细胞增殖与凋亡的失衡, 研究发现 GZFL 可以通过丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路介导 T 淋巴细胞下调细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、人附睾蛋白 4 (HE4) 表达抑制子宫肌

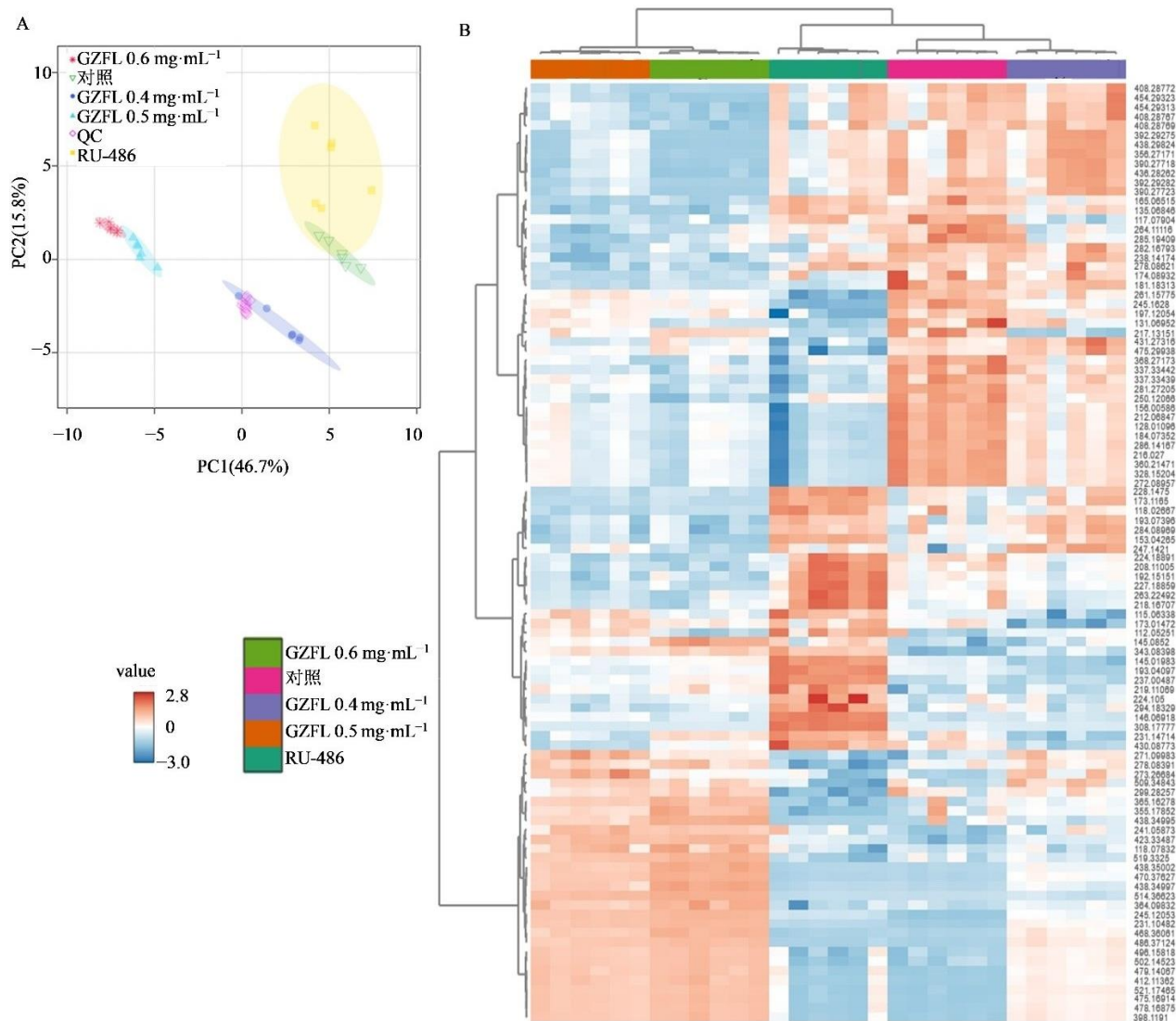


图 6 各实验组样本 PCA 得分图 (A) 及热图 (B)

Fig. 6 PCA score plot (A) and heatmap (B) of samples in each experimental group

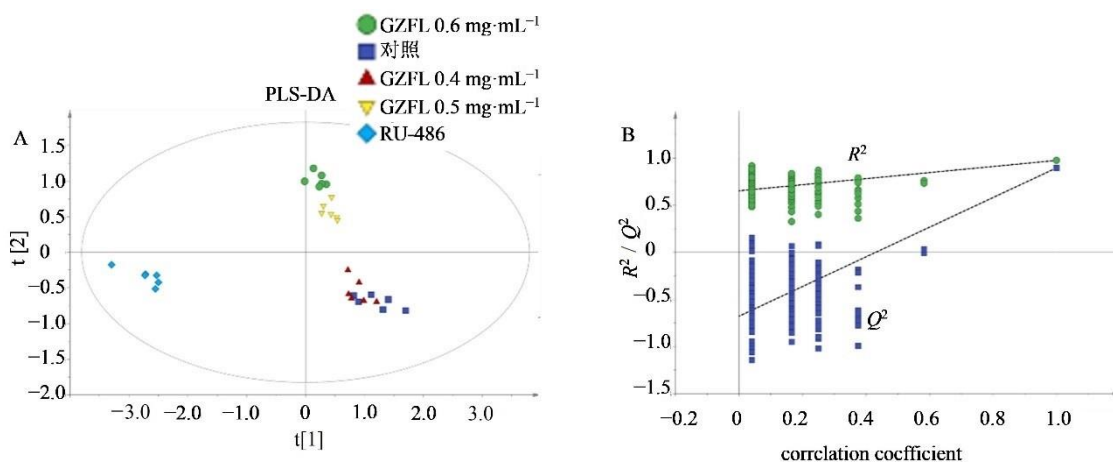


图 7 各实验组样本 PLS-DA 得分图 (A) 及验证 (B)

Fig. 7 PLS-DA score plot (A) and verification (B) of samples in each experimental group

表 1 对照组与 GZFL 高剂量组样品中差异代谢物鉴定结果

Table 1 Identification of differential metabolites between control group and GZFL high-dose group

编号	t _R / min	相对分子 质量	分子式	化合物英文名	化合物中文名	GZFL-L vs 对照	GZFL-M vs 对照	GZFL-H vs 对照	二级碎片	
1	0.997	165.065	15	C ₆ H ₇ N ₅ O	1-methylguanine	1-甲基鸟嘌呤	↓	↓	↓	149.05
2	0.890	145.085	20	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	4-guanidinobutanoate	4-胍基丁酸	↑	↑**	↑**	43.03、44.013、86.06
3	1.511	267.096	94	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	deoxyguanosine	脱氧鸟苷	↓	↓*	↓**	136.06、137.05
4	0.639	131.069	52	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	creatine	肌酸	↓	↓*	↓**	43.03、44.05、90.05
5	1.288	118.026	67	C ₄ H ₆ O ₄	succinate	琥珀酸	↓	↓	↓	73.03、99.01
6	4.031	245.162	80	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	isovalerylcarnitine	异戊酰基肉碱	↓**	↓**	↓**	57.03、85.03、187.10
7	4.778	174.089	32	C ₈ H ₁₄ O ₄	suberic acid	辛二酸	↓	↓**	↓*	111.08、129.09
8	7.786	356.271	71	C ₂₄ H ₃₆ O ₂	tetracosahexaenoic acid	/	↑	↓	↓	55.05、95.09、 131.09、201.16
9	4.281	264.111	16	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	acetyl- <i>N</i> -formyl-5-methoxykynurenamine	<i>N</i> -乙酰基- <i>N</i> -2-甲酰-5-甲氧基犬尿氨酸	↓	↓*	↓*	136.08、220.10
10	11.708	423.334	87	C ₂₅ H ₄₅ NO ₄	linoleyl carnitine	/	↑**	↑**	↑**	55.05、57.03、 60.08、85.03
11	10.783	519.332	50	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	lysoPC(18:2/0:0)	/	↓	↑**	↑**	86.10、104.11、 125.00、184.07
12	4.695	284.089	69	C ₁₃ H ₁₆ O ₇	p-cresol glucuronide	/	↑	↓	↓	59.01、71.01、 87.01、107.05
13	23.791	539.528	12	C ₃₄ H ₆₉ NO ₃	cer(d18:0/16:0)	/	↓	↓*	↓*	256.26、284.29、 522.52
14	1.620	153.042	65	C ₇ H ₇ NO ₃	3-hydroxyanthranilic acid	3-羟基蒺花酸	↑*	↓*	↓	53.04、95.01、 108.04、136.04
15	3.973	496.158	18	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	mycophenolic acid acyl glucuronide	/	↑**	↑**	↑**	59.01、71.01、 87.01、89.02
16	4.835	181.183	13	C ₁₂ H ₂₃ N	dicyclohexylamine	/	↓	↓**	↓**	55.05、83.09、100.11
17	1.780	228.147	50	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	leu-pro	/	↑	↓*	↓	70.65
18	0.598	147.053	21	C ₅ H ₉ NO ₄	<i>L</i> -glutamate	<i>L</i> -谷氨酸	↓	↓	↓*	84.05、85.03、102.06

GZFL-L、GZFL-M、GZFL-H 分别代表 GZFL 低、中、高质量浓度组；与对照组比较：**P*<0.05 ***P*<0.01；↑-上调；↓-下调。

GZFL-L, GZFL-M and GZFL-H represent the low, medium and high mass concentration groups of GZFL respectively; **P*<0.05 ***P*<0.01 vs control group; ↑ -up-regulation; ↓ -down-regulation..

瘤细胞增殖、迁移和侵袭^[14]；还能通过调控介体复合物亚基 12 (Med12) 相关的 Wnt/β-连环蛋白 (β-Catenin) 信号通路，诱导细胞凋亡，抑制细胞增殖^[8]。PCNA 在 DNA 复制和修复中起着重要作用^[15-16]，且在 G₁ 期晚期和 S 期表达急剧增加，是细胞周期进展的标志物^[17]，Maruo 等^[18]研究发现，在整个月经周期中，平滑肌瘤细胞的 PCNA 阳性率高于正常子宫肌层细胞。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白，其在平滑肌瘤细胞中的表达上调往往是平滑肌瘤生长的机制之一^[19]，且可能在翻译水平上影响

呼吸链或核糖体中的蛋白质或酶，从而调节细胞周期^[20]。本研究表明，GZFL 可以诱导人子宫肌瘤细胞凋亡、抑制细胞增殖、阻滞细胞周期进程，下调 PCNA、Bcl-2 的蛋白表达，提示 GZFL 对子宫肌瘤具有抑制作用，可能与 PCNA、Bcl-2 的下调有关。

子宫肌瘤中精氨酸代谢路径的改变与肿瘤的增殖和存活密切相关，精氨酸作为重要的氮源，可以支持肌瘤细胞在高代谢需求条件下的生长和存活^[21]。肌酸、4-胍基丁酸、L-谷氨酸是精氨酸代谢

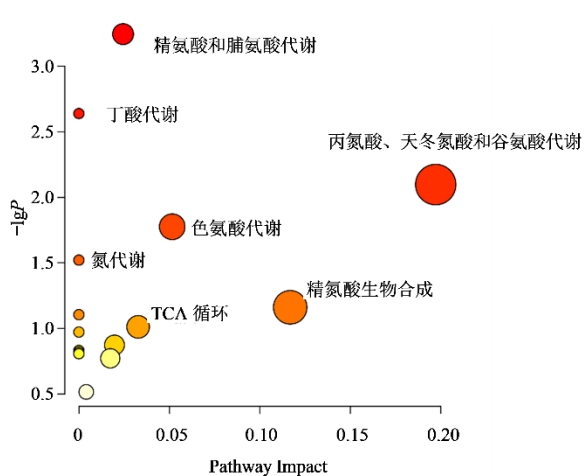


图 8 信号通路分析
Fig. 8 Pathway Analysis

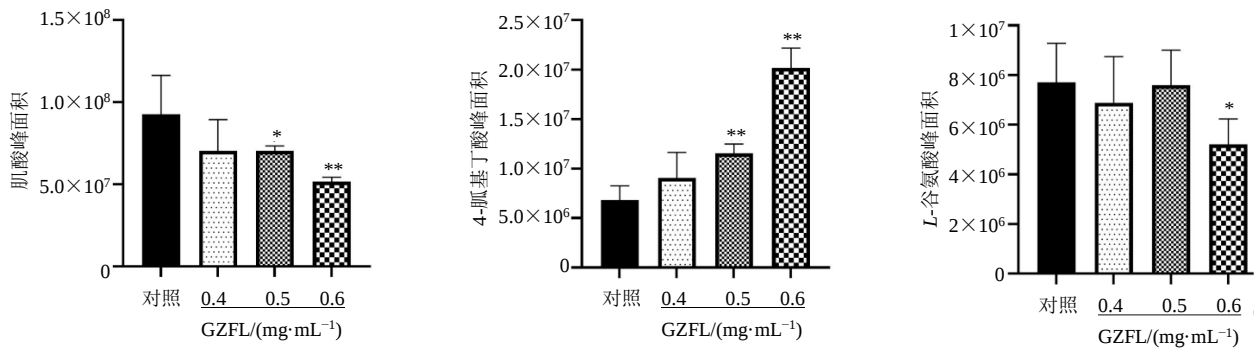
途径中的重要代谢物。子宫肌瘤的形成会引发细胞代谢的显著变化，包括对肌酸需求的增加，肌酸及其衍生物通过促进 ATP 生成来支持子宫肌瘤细胞的生长^[21]，肌酸具有抗氧化作用，可以减少氧化应激在肌瘤细胞中的影响。由于子宫肌瘤通常位于低氧环境中，肌酸的抗氧化功能帮助减少自由基的生成，防止细胞损伤^[22]。药物引起的肌酸下调会导致子宫肌瘤细胞中氧化应激水平升高，从而影响其生长和增殖。4-胍基丁酸是精氨酸代谢途径的中间产物，与氮平衡和氨基酸代谢密切相关，肿瘤细胞利用精氨酸维持细胞内的氮平衡，从而支持代谢需求^[23]。三羧酸循环（TCA）是线粒体中氨基酸代谢的核心途径^[24]，其循环效率与众多中间产物有关。*L*-谷氨酸是由精氨酸代谢产物转化生成的，

表 2 代谢通路信息

Table 2 Information of metabolic pathways

编号	通路	Total	Hits	<i>P</i>	Impact
1	精氨酸和脯氨酸代谢	36	3	0.000 6	0.024 4
2	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	28	2	0.008 0	0.197 1
3	色氨酸代谢	41	2	0.016 8	0.051 6

Total-该代谢通路中总的代谢物数量；Hits-实验中代谢标志物匹配到该通路的数目；*P*-显著性水平；Impact-通路在生物代谢网络中的重要性。
Total-total number of metabolites in this metabolic pathway; Hits-number of metabolic markers matched to this pathway in the experiment; *P*-significance level; Impact- importance of pathways in biological metabolic networks.



与对照组比较：**P*<0.05 ***P*<0.01。
P*<0.05 *P*<0.01 vs control group.

图 9 精氨酸和脯氨酸代谢通路差异代谢物分析($\bar{X} \pm s$, *n*=6)

Fig. 9 Differential metabolite analysis of the arginine and proline metabolism pathway ($\bar{X} \pm s$, *n*=6)

可以通过下游途径生成关键代谢物，包括谷氨酰胺和 α -酮戊二酸，直接参与能量代谢（TCA 循环）。GZFL 可能通过调控精氨酸与脯氨酸代谢通路中的关键代谢物肌酸、4-胍基丁酸及 *L*-谷氨酸，干预能量代谢和氨基酸代谢，从而影响细胞生长环境和代谢平衡，最终抑制人子宫肌瘤细胞的增殖。

琥珀酸是谷氨酸代谢中的一个重要代谢产物，也是 TCA 循环中必需的循环代谢物，有助于线粒体代谢途径中的能量产生。琥珀酸是琥珀酸脱氢酶的底物，琥珀酸脱氢酶现在被定义为肿瘤抑制因子，琥珀酸被定义为肿瘤代谢物^[25]，已有研究表明子宫肌瘤患者存在琥珀酸脱氢酶缺陷^[26]。本研究发

现,相较于对照组,GZFL 干预后,琥珀酸的含量发生下调。提示 GZFL 可能通过调控丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径中的 L-谷氨酸及琥珀酸,干预能量代谢及影响琥珀酸脱氢酶,进而抑制人子宫肌瘤细胞的增殖。

色氨酸通过色氨酸双加氧酶的作用转化为犬尿氨酸,进一步生成 3-羟基犬尿氨酸、3-羟基蒽花酸等,最后生成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺),对细胞能量代谢和免疫调节具有重要意义。研究表明,子宫肌瘤中的色氨酸代谢与正常子宫肌层组织存在差异^[27],色氨酸代谢通过犬尿氨酸途径在子宫肌瘤的发生和进展中扮演重要角色^[28-29]。纠正肌瘤色氨酸异常分解代谢可能是一种有效的治疗肌瘤的方法,其作用是减少肌瘤细胞增殖和细胞外基质的积累^[30]。本研究发现,与对照组相比,GZFL 高质量浓度组中 3-羟基蒽花酸及 N-乙酰基-N-2-甲酰-5-甲氧基犬尿氨酸发生下调,表明 GZFL 可能通过调节色氨酸代谢通路,尤其是犬尿氨酸途径,调节子宫肌瘤细胞的能量代谢和免疫微环境,从而在一定程度上干预细胞的生长与增殖。

本研究基于 UPLC-Orbitrap-MS/MS 的代谢组学技术,探讨了 GZFL 抑制人子宫肌瘤细胞生长的作用机制,为揭示子宫肌瘤的代谢调控机制及开发新的治疗靶点提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 司玉红,朱景华,冀淑英,等. 桂枝茯苓胶囊治子宫肌瘤临床研究[J]. 新中医,2019,51(10): 179-182.
Si Y H, Zhu J H, Ji S Y, et al. Clinical study on Guizhi Fuling Capsules for hysteromayoma [J]. J New Chin Med, 2019, 51(10): 179-182.
- [2] Lou Z, Huang Y Z, Li S T, et al. Global, regional, and national time trends in incidence, prevalence, years lived with disability for uterine fibroids, 1990-2019: An age-period-cohort analysis for the global burden of disease 2019 study [J]. BMC Public Health, 2023, 23(1): 916.
- [3] Micić J, Macura M, Andjić M, et al. Currently available treatment modalities for uterine fibroids [J]. Medicina (Kaunas), 2024, 60(6): 868.
- [4] Combs A, Singh B, Nylander E, et al. A systematic review of vitamin D and fibroids: Pathophysiology, prevention, and treatment [J]. Reprod Sci, 2023, 30(4): 1049-1064.
- [5] Evangelisti G, Ferrero S, Perrone U, et al. Experimental and new investigational drugs for the treatment of uterine fibroids [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2024, 33(5): 497-508.
- [6] 匡清清,李晓萍,张国丽,等. 多发性子宫肌瘤中医病机、证候特点及中医药治疗进展 [J]. 中国计划生育学杂志, 2024, 32(9): 2203-2208.
Kuang Q Q, Li X P, Zhang G L, et al. Progress of the athogenesis, syndrome characteristics and treatment of traditional Chinese medicine for treating multiple uterine fibroids [J]. Chin J Fam Plan, 2024, 32(9): 2203-2208.
- [7] 王熙月,伍涛. 中医药治疗子宫肌瘤的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2023, 30(9): 34-39.
Wang X Y, Wu T. Research progress in the treatment of uterine myoma by traditional Chinese medicine [J]. China Mod Med, 2023, 30(9): 34-39.
- [8] Chen L W, Chen H L, Yang Q W, et al. Guizhi Fuling Capsule inhibits uterine fibroids growth by modulating Med12-mediated Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 290: 115115.
- [9] 金祎敏,谢燕,王东帆,等. 基于小鼠子宫平滑肌收缩活性测定的桂枝茯苓胶囊质量评价研究 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7482-7488.
Jin Y M, Xie Y, Wang D F, et al. Quality evaluation of Guizhi Fuling Capsules based on contractile activity assay of mouse uterine smooth muscle [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(22): 7482-7488.
- [10] 王敏,董洪明,张阳. 桂枝茯苓胶囊治疗子宫肌瘤疗效分析 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2020, 7(22): 49, 51.
Wang M, Dong H M, Zhang Y. Efficacy analysis of Guizhi Fuling Capsule in treating uterine fibroids [J]. Elect J Pract Gynecol Endocrinol, 2020, 7(22): 49, 51.
- [11] Chen N N, Han M, Yang H, et al. Chinese herbal medicine Guizhi Fuling Formula for treatment of uterine fibroids: A systematic review of randomised clinical trials [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 2.
- [12] Lei Y M, Yang L L, Yang H L, et al. The efficacy and safety of Chinese herbal medicine Guizhi Fuling Capsule combined with low dose mifepristone in the treatment of uterine fibroids: A systematic review and Meta-analysis of 28 randomized controlled trials [J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 54.
- [13] 邓书华,朱秀清,李璐,等. 桂枝茯苓胶囊国内研究进展的可视化分析 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(14): 1887-1889.
Deng S H, Zhu X Q, Li L, et al. Visualization analysis of research progress of Guizhi Fuling Capsules [J]. Chin J Clin Pharm, 2021, 37(14): 1887-1889.
- [14] 王景存,田春雨,张帆,等. 代谢组学技术在中药有效

- 成分及作用机制研究中的应用 [J]. 中国民族民间医药, 2024, 33(14): 76-80.
- Wang J C, Tian C Y, Zhang F, et al. Application of metabolomics in the study of active components and mechanism of action of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2024, 33(14): 76-80.
- [15] 潘小虹, 邵敏芳, 王露玉, 等. 桂枝茯苓胶囊通过 MAPK 信号通路介导 T 淋巴细胞下调 ICAM-1、HE4 表达抑制子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(22): 2305-2310.
- Pan X H, Shao M F, Wang L Y, et al. Guizhi Fuling Capsule mediated a down-regulation of ICAM-1 and HE4 expressions of T lymphocytes through MAPK signaling pathway for suppressing the proliferation, migration and invasion of uterine fibroids [J]. Chin J Hosp Pharm, 2021, 41(22): 2305-2310.
- [16] Bártoová E, Suchánková J, Legartová S, et al. PCNA is recruited to irradiated chromatin in late S-phase and is most pronounced in G2 phase of the cell cycle [J]. Protoplasma, 2017, 254(5): 2035-2043.
- [17] Cheon S Y, Jin B R, Kim H J, et al. Oleanolic acid ameliorates benign prostatic hyperplasia by regulating PCNA-dependent cell cycle progression *in vivo* and *in vitro* [J]. J Nat Prod, 2020, 83(4): 1183-1189.
- [18] Mohallem R, Aryal U K. Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal TNF- α -mediated protein functions in hepatocytes [J]. Molecules, 2021, 26(18): 5472.
- [19] Maruo T, Matsuo H, Samoto T, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis [J]. Steroids, 2000, 65(10/11): 585-592.
- [20] Zhang L D, Feng Q L, Wang Z T, et al. Progesterone receptor antagonist provides palliative effects for uterine leiomyoma through a Bcl-2/Bcl-1-dependent mechanism [J]. Biosci Rep, 2019, 39(7): BSR20190094.
- [21] Du X, Xiao J J, Fu X F, et al. A proteomic analysis of Bcl-2 regulation of cell cycle arrest: Insight into the mechanisms [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2021, 22(10): 839-855.
- [22] Tokarz J, Adamski J, Rižner T L. Metabolomics for diagnosis and prognosis of uterine diseases? A systematic review [J]. J Pers Med, 2020, 10(4): 294.
- [23] Kirschen G W, AlAshqar A, Miyashita-Ishiwata M, et al. Vascular biology of uterine fibroids: Connecting fibroids and vascular disorders [J]. Reproduction, 2021, 162(2): R1-R18.
- [24] Albaugh V L, Pinzon-Guzman C, Barbul A. Arginine-Dual roles as an onconutrient and immunonutrient [J]. J Surg Oncol, 2017, 115(3): 273-280.
- [25] Zhang Y J, Yu H, Zhang J, et al. Cul4A-DDB1-mediated monoubiquitination of phosphoglycerate dehydrogenase promotes colorectal cancer metastasis via increased S-adenosylmethionine [J]. J Clin Invest, 2021, 131(21): e146187.
- [26] Dalla Pozza E, Dando I, Pacchiana R, et al. Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer [J]. Semin Cell Dev Biol, 2020, 98: 4-14.
- [27] Jovanović L, Milenković S, Andrić L, et al. Uterine leiomyomas with specific histology features of two fumarate hydratase/succinate dehydrogenase-deficient tumors: A double case report [J]. Medicina (Kaunas), 2024, 60(5): 825.
- [28] Chuang T D, Quintanilla D, Boos D, et al. Further characterization of tryptophan metabolism and its dysregulation in fibroids [J]. F S Sci, 2022, 3(4): 392-400.
- [29] Iizuka T, Yin P, Zuberi A, et al. Mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate promotes uterine leiomyoma cell survival through tryptophan-kynurenine-AHR pathway activation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(47): e2208886119.
- [30] Hutchinson A P, Yin P, Neale I, et al. Tryptophan 2, 3-dioxygenase-2 in uterine leiomyoma: Dysregulation by MED12 mutation status [J]. Reprod Sci, 2022, 29(3): 743-749.
- [31] Chuang T D, Ton N, Rysling S, et al. Therapeutic effects of *in vivo* administration of an inhibitor of tryptophan 2, 3-dioxygenase (680c91) for the treatment of fibroids: a preclinical study [J]. Fertil Steril, 2024, 121(4): 669-678.

[责任编辑 兰新新]