

基于 AMPK/TGF- β 1/Smads 通路探究少腹逐瘀汤含药血清对 12Z 细胞纤维化的影响

李冰冰¹, 李文哲¹, 陈相颖¹, 丁美琪¹, 魏超¹, 孙新慧^{2,3*}

1. 济宁医学院, 山东 济宁 272000

2. 北京中医药大学, 北京 100029

3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300000

摘要: 目的 基于腺苷 5'-单磷酸活化蛋白激酶 (AMPK) /转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) /Smad 同源物 (Smads) 信号通路, 探讨少腹逐瘀汤 (SFZY) 含药血清对永生化人子宫内膜异位症细胞 (12Z) 纤维化形成的影响及作用机制。方法 制备 SFZY 大鼠含药血清, 体外培养 12Z 细胞, CCK-8 法筛选 SFZY 含药血清 (5%、10%、15%、20%) 的作用体积分数及时间; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测细胞的 I 型胶原蛋白 (COL1A1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和结缔组织生长因子 (CTGF) mRNA 水平, Western blotting 法检测细胞 α -SMA 的蛋白表达水平, 确定 TGF- β 1 (5、10、15 ng·mL⁻¹) 诱导细胞呈纤维化模型的最佳质量浓度; SFZY 含药血清 (5%、10%、15%) 干预造模后的 12Z 细胞, 采用 Western blotting 实验检测各组细胞的 α -SMA 蛋白表达水平, 确定含药血清抑制纤维化的最佳作用体积分数。将 12Z 细胞分为对照组、模型组、SFZY (添加 10% 的含药血清) 组、CC (添加 AMPK 抑制剂 Compound C 10 μ mol·L⁻¹) 组、SFZY+CC 组, 除对照组外, 其余各组采用 TGF- β 1 诱导细胞纤维化, 造模的同时给药, CC 给药前 2 h 添加; 干预结束后采用 qRT-PCR 法检测 AMPK、TGF- β 1、COL1A1、 α -SMA 和 CTGF 的 mRNA 表达水平, 采用免疫荧光细胞化学法检测 p-AMPK/AMPK、p-Smad2/3/Smad2/3、COL1A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平。结果 SFZY 含药血清 5%、10%、15% 作用 48 h 对细胞存活率无明显影响; 与对照组比较, 5 ng·mL⁻¹ 的 TGF- β 1 干预后的 CTGF、COL1A1、 α -SMA 的 mRNA 表达升高最明显, α -SMA 的蛋白表达升高最明显 ($P < 0.01$ 、0.001), 确定为造模质量浓度; 与模型组相比, 5%、10%、15% 含药血清干预后的 α -SMA 的蛋白表达均明显降低 ($P < 0.001$), 10% 组降低最明显, 确定为后续给药体积分数。与对照组相比, 模型组的 AMPK mRNA 及 p-AMPK/AMPK 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001), TGF- β 1 和 CTGF mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), p-Smad2/3/Smad2/3 的蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$), COL1A1 和 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与模型组相比, SFZY 组的 AMPK mRNA 及 p-AMPK/AMPK 的蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$), TGF- β 1 和 CTGF 的 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.001$), p-Smad2/3/Smad2/3 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), COL1A1 和 α -SMA 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001); CC 可显著抵消 SFZY 的上述作用。结论 SFZY 含药血清可显著抑制 TGF- β 1 刺激后 12Z 细胞纤维化因子的表达, 该作用可能与激活 AMPK 磷酸化从而抑制 TGF- β 1/Smads 通路的活化有关。

关键词: 少腹逐瘀汤; 含药血清; 子宫内膜异位症; 纤维化; AMPK/TGF- β 1/Smads 通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)12-3447-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.004

Effect of serum of Shaofu Zhuyu Decoction on fibrosis of 12Z cells based on AMPK/TGF- β 1/Smads signaling pathway

LI Bingbing¹, LI Wenzhe¹, CHEN Xiangying¹, DING Meiqi¹, WEI Chao¹, SUN Xinhui^{2,3}

1. Jining Medical College, Jining 272000, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300000, China

收稿日期: 2025-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104920); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2021QH129); 山东省中医药重点实验室资助项目 (鲁卫函[2022]4 号)

作者简介: 李冰冰 (1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为子宫内膜异位症的中医药防治。E-mail: lilucky0829@126.com

*通信作者: 孙新慧 (1995—), 女, 博士, 从事子宫内膜异位症的基础及临床研究。E-mail: weimo0827@163.com

Abstract: Objective Based on the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Smad homologs (Smads) signaling pathway, the effect and mechanism of Shaofu Zhuyu Decoction (SFZY)-containing serum on fibrosis formation in immortalized human endometriosis cells (12Z) were investigated. **Methods** SFZY-containing serum from rats was prepared, and 12Z cells were cultured *in vitro*. The action volume fraction and time of SFZY drug-containing serum (5%, 10%, 15%, and 20%) were screened by CCK-8 method. The mRNA levels of type I collagen (*COL1A1*), α -smooth muscle actin (α -SMA), and connective tissue growth factor (*CTGF*) in cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the protein expression level of α -SMA was detected by Western blotting to determine the optimal mass concentration of TGF- β 1 (5, 10, and 15 ng·mL⁻¹) for inducing fibrosis in cells. SFZY drug-containing serum (5%, 10%, 15%) was used to intervene in the 12Z cells after modeling, and the protein expression level of α -SMA in each group of cells was detected by Western blotting to determine the optimal volume fraction of drug-containing serum for inhibiting fibrosis. 12Z cells were divided into the control group, model group, SFZY (adding 10% drug-containing serum) group, CC (adding AMPK inhibitor Compound C 10 μ mol·L⁻¹) group, and SFZY + CC group. Except for the control group, the other groups were induced to fibrosis by TGF- β 1, and the drugs were administered simultaneously during modeling, with CC administered 2 h before. After intervention, the mRNA expression levels of *AMPK*, *TGF- β 1*, *COL1A1*, α -SMA, and *CTGF* were detected by qRT-PCR, and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, p-Smad2/3/Smad2/3, *COL1A1*, and α -SMA were detected by immunofluorescence cell chemistry. **Results** SFZY-containing serum at 5%, 10%, and 15% for 48 h had no significant effect on cell survival rate; compared with control group, the mRNA expression of *CTGF*, *COL1A1*, and α -SMA was significantly increased after intervention with 5 ng·mL⁻¹ TGF- β 1, and the protein expression of α -SMA was significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), which was determined as the modeling concentration; compared with the model group, the protein expression of α -SMA was significantly decreased after intervention with 5%, 10%, and 15% drug-containing serum ($P < 0.001$), with the 10% group was the most significant, which was determined as the subsequent administration volume fraction. Compared with the control group, the mRNA expression of *AMPK* and the protein expression of p-AMPK/AMPK in the model group were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), the mRNA expression of *TGF- β 1* and *CTGF* was significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), the protein expression of p-Smad2/3/Smad2/3 was significantly upregulated ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expression levels of *COL1A1* and α -SMA were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with the model group, the mRNA expression of *AMPK* and the protein expression level of p-AMPK/AMPK in the SFZY group were significantly increased ($P < 0.001$), while the mRNA expression of *TGF- β 1* and *CTGF* were significantly decreased ($P < 0.001$), and the protein expression of p-Smad2/3/Smad2/3 was significantly reduced ($P < 0.01$). The mRNA and protein expression levels of *COL1A1* and α -SMA were also significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). CC could significantly counteract the above effects of SFZY. **Conclusion** SFZYD-containing serum significantly inhibits the expression of fibrotic factors in TGF- β 1-stimulated 12Z cells, potentially by activating AMPK phosphorylation to suppress the TGF- β 1/Smads pathway.

Key words: Shaofu Zhuyu Decoction; containing serum; endometriosis; fibrosis; AMPK/TGF- β 1/Smads pathway

子宫内膜异位症 (EMs) 是一种可以识别子宫内膜基质和上皮的纤维化疾病^[1], 纤维化是所有亚型子宫内膜异位症病变的重要病理特征^[2], 过度纤维化是造成 EMs 女性盆腔黏连、痛经和不孕的重要原因^[1]。纤维化不仅是 EMs 的重要病理特征, 也是疾病进展和临床症状加重的关键驱动因素。通过干预纤维化进程, 不仅可以抑制异位病灶的侵袭和扩散, 还能缓解疼痛和改善生育功能, 从而为 EMs 患者提供更有效的治疗方案。

目前尚无改善 EMs 的有效药物, 现代医学治疗 EMs 主要以非甾体抗炎药 (NASIDs)、孕激素类药物、促性腺激素释放激素 (GnRH) 激动剂/拮抗剂和手术治疗等方式为主, 但不良反应颇多^[3]。因此, 深入探究 EMs 纤维化的发病机制, 并寻找具有

明确靶点的有效药物, 对于改善患者预后和减轻疾病负担具有重要的现实意义。中医学认为“血瘀”是 EMs 的基本病机, 治疗多以活血化瘀为主。少腹逐瘀汤 (SFZY) 出自清代王清任的《医林改错》, 是“五逐瘀汤”中的重要组成部分, 具有活血化瘀、温经止痛的功效^[4], 在治疗 EMs 相关痛经、不孕等方面具有独特功效^[5-6], 具有较好的挖掘意义。所以, 本研究采用转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 刺激永生化人子宫内膜异位症细胞 (12Z) 建立纤维化模型, 以 SFZY 含药血清与腺苷 5'-单磷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 抑制剂 Compound C (CC) 为干预方法, 进一步探究 SFZY 对 AMPK 及纤维化相关因子 TGF- β 1、Smad 同源物 2 (Smad2)、Smad 同源物 3 (Smad3)、I 型胶原蛋白 (COL1A1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -

SMA) 和结缔组织生长因子 (CTGF) 表达水平的影响, 研究其治疗 EMs 纤维化的潜在分子机制。

1 材料

1.1 细胞株与药物

12Z 细胞 (编号 CTCC-001-0695) 购于浙江美森细胞科技有限公司。SFZY 配方颗粒购于江阴天江药业有限公司, 药物组成: 当归 9g、赤芍 6g、延胡索 3g、没药 6g、川芎 9g、蒲黄 9g、五灵脂 6g、小茴香 3g、干姜 3g、肉桂 3g, 参考课题组前期研究利用超高效液相色谱-质谱 (UPLC-MS) 法, 共识别出包含芍药苷、阿魏酸等 157 种化合物成分^[6], 其中芍药苷质量分数为 0.68%, 阿魏酸质量分数为 0.07%。

1.2 动物

用于制备含药血清的 SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只, 体质量 (200±20) g, 购于济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 2022-0006, 饲养于济宁医学院实验动物中心。实验中所有操作均通过济宁医学院实验动物中心伦理审查, 批准编号 JNMC-2021-DW-065。

1.3 培养基及主要试剂

CC (货号 S7306, 美国 Selleck 公司); 胎牛血清 (货号 10099141C)、0.25% 胰蛋白酶 (货号 25200056), 均购自 Gibco 公司; DMEM/F12 细胞培养基 (货号 SH30023.01, Hyclone 公司); 青霉素-链霉素溶液 (货号 UB89609, BIODIN 公司); 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (货号 PB180327, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 无血清细胞冻存液 (货号 C40100, 苏州新赛美生物科技有限公司); 细胞计数 Kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (货号 C0038)、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (P0012)、SDS 上样缓冲液 (P0015L), 上海碧云天生物技术有限公司; TGF- β 1 Protein (货号 10804-HNAC, 北京义翘神州科技股份有限公司); 抗 α -SMA 抗体 (货号 AF1032)、抗 COL1A1 抗体 (货号 AF7001)、抗 TGF- β 1 抗体 (货号 AF1027)、抗 p-AMPK 抗体 (货号 AF3423)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 二抗 (货号 S0001), 均购自 Affinity 公司; 抗 AMPK 抗体 (货号 10929-2-AP, Proteintech 公司); 抗 p-Smad2/3 抗体 (货号 8828)、抗 Smad2/3 抗体 (货号 8685), CST 公司; Trizol 试剂 (AG21101, AG 公司); 反转录试剂盒 (货号 R323-01)、实时聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒 (货号 Q312-02), Vazyme 公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (10%)

(货号 PG112)、TBS/Tween 缓冲液 (货号 PS103S), 上海雅酶生物医药科技有限公司; 电化学发光 (ECL) 试剂盒 (货号 WBKLS0100, Millipore 公司)。

1.4 主要仪器

Forma3131 型细胞恒温培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); QuantStudio 5 Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Ti2-U 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); Olympus BX53 荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司); Bio-Rad PowerPac Basic 凝胶电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 SFZY 含药血清的制备

将 SPF 级健康雄性 SD 大鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为 2 组, 分别为空白组 ($n=20$) 和 SFZY 组 ($n=20$)。根据大鼠用药量及体表面积计算得出大鼠 ig 量为 $5.9375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按照 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 空白组 ig 给予 0.9% NaCl 溶液, SFZY 组 ig 给予 SFZY 配方颗粒溶液, 早晚各 1 次, 间隔 12 h, 共给药 7 次。各组于末次给药 1 h 后 (麻醉前 12 h 禁食), 无菌环境下麻醉后腹主动脉采血, 室温放置, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min 后取血清, 将血清滤过除菌, 56°C 灭活 30 min, 密封, -20°C 冰箱保存备用^[7]。空白组和 SFZY 组大鼠 ig 结束收集到的血清分别为空白血清和含药血清。

2.2 12Z 细胞的培养及传代

细胞在由 89% DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素混合液所制成的完全培养基中培养, 并放置于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱中, 按 1:2 的比例传代细胞。

2.3 含药血清作用体积分数及时间确定

将生长状态良好的 12Z 细胞以每孔 5 000 个的密度接种于 96 孔板, 待细胞融合至 50%~60%时, 吸弃培养液, SFZY 组每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 含不同体积分数 (5%、10%、15%、20%) 含药血清的培养基, 对照组不加药, 每组分别设置 5 个复孔, 空白组不接种细胞。分组给药后将 96 孔板置于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱培养, 在培养 48、72 h 后, 去除培养基, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 配制好的 CCK-8 工作液, 37°C 培养箱孵育 1 h, 用酶标仪定量 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 EMs 纤维化细胞模型构建

选择对数生长期的 12Z 细胞, 铺板浓度为 $2 \times$

10⁴个·cm⁻²，每孔 1 mL，接种于 6 孔板，饥饿处理 6 h，使细胞处于统一生长期，除了对照组孔外，其余孔分别用 5、10、15 ng·mL⁻¹ 的 TGF-β1 干预，干预时间为“2.3”项所得最佳作用时间，干预后采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测各组细胞的 *COL1A1*、*α-SMA*、*CTGF* mRNA 水平，采用 Western blotting 方法测各组细胞 α-SMA 的蛋白表达水平，确定 TGF-β1 诱导细胞呈纤维化模型的最佳质量浓度。

应用筛选出的 TGF-β1 质量浓度作用于 12Z 细胞 24、48 h，光学显微镜下观察细胞形态。

2.5 含药血清最佳疗效体积分数的确定

选择对数生长期的 12Z 细胞，接种于 6 孔板板内，饥饿处理 6 h，使细胞处于统一生长期，除了对照组孔以外，其余各组分别用“2.4”项所得最佳质量浓度 TGF-β1 诱导细胞呈纤维化模型。同时分别用“2.3”项所得含药血清作用的体积分数及最佳作用时间干预，对照和模型组不加药，采用 Western blotting 实验检测各组细胞的 α-SMA 蛋白表达水平，确定含药血清抑制纤维化的最佳作用体积分数。

2.6 细胞分组与处理

选择对数生长期的 12Z 细胞，铺板浓度为 2×10⁴个·cm⁻²，每孔 1 mL，接种于 6 孔板板内。具体分组如下：对照组、模型组、SFZY 组（10%含药血清）、CC（AMPK 抑制剂，10 μmol·L⁻¹[8]）组、SFZY（10%含药血清）+CC（10 μmol·L⁻¹）组。除对照组外，其余各组以 TGF-β1 诱导细胞纤维化模型，同时给予 SFZY 干预 48 h，CC 提前 2 h 加入。

2.7 qRT-PCR 法检测各组细胞 AMPK、TGF-β1、COL1A1、α-SMA 和 CTGF 的 mRNA 表达

干预结束后，收集各组细胞，依据试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA。检测 RNA 浓度后，首先将其逆转录为 cDNA，然后进行 qRT-PCR 检测。扩增循环方案如下：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，40 个循环。表 1 所示的引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司设计。基于参考基因 *GAPDH* 的水平标准化靶 mRNA 表达水平，随后使用 2^{-ΔΔCt} 法分析，评价各组细胞 *AMPK*、*TGF-β1*、*COL1A1*、*α-SMA* 和 *CTGF* mRNA 表达。

2.8 细胞免疫荧光化学法检测各组细胞 p-AMPK、AMPK、p-Smad2/3、Smad2/3、COL1A1 和 α-SMA 蛋白水平

干预结束后，收集各组细胞，弃上清，PBS 冲洗 1 遍，吸净孔内液体。4%的多聚甲醛固定 20 min，

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列 (5'→3')
<i>AMPK</i>	F-TCGATCTTGCCAAAGGAGTGA
	R-GTCACAGATGAGTGACTTCCA
<i>TGF-β1</i>	F-GGAAATTGAGGGCTTTCGCC
	R-TGAACCCGTTGATGTCCACT
<i>COL1A1</i>	F-GAGGGCCAAGACGAAGACATC
	R-CAGATCACGTCATCGCACAAAC
<i>α-SMA</i>	F-GGCATTACGAGACCACCTAC
	R-CGACATGACGTTGTTGGCATACT
<i>CTGF</i>	F-GTTTGGCCCAGACCCAACTA
	R-GGCTCTGCTTCTCTAGCCTG
<i>GAPDH</i>	F-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA
	R-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC

吸去孔内的固定液，并以含有 2 mg·mL⁻¹ 甘氨酸的 PBS 清洗 2 次，每次 5 min。每孔加入 0.5%Triton X-100（用 PBS 稀释）室温通透 5 min，PBST 浸洗爬片 3 次，每次 3 min。使用稀释好的正常山羊血清，室温封闭 30 min。滴加稀释好的一抗，4 ℃冰箱中孵育过夜。PBST 冲洗切片 3 次，每次 3 min，滴加稀释好的荧光二抗 CY3-羊抗兔 IgG，湿盒中 37 ℃避光孵育 1 h，PBST 冲洗切片 4 次，每次 3 min。复染核、封片，荧光显微镜下观察并采集图像，Image J 软件分析荧光强度。

2.9 统计学方法

实验数据使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析并绘图，所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行统计学处理，两两比较采用 LSD 检验，方差不齐时使用 K-W 秩和检验。

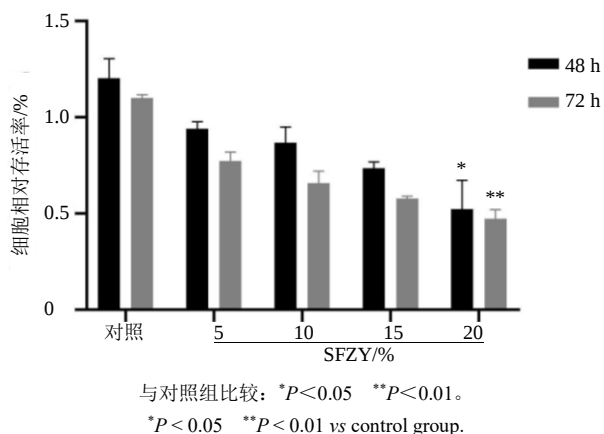
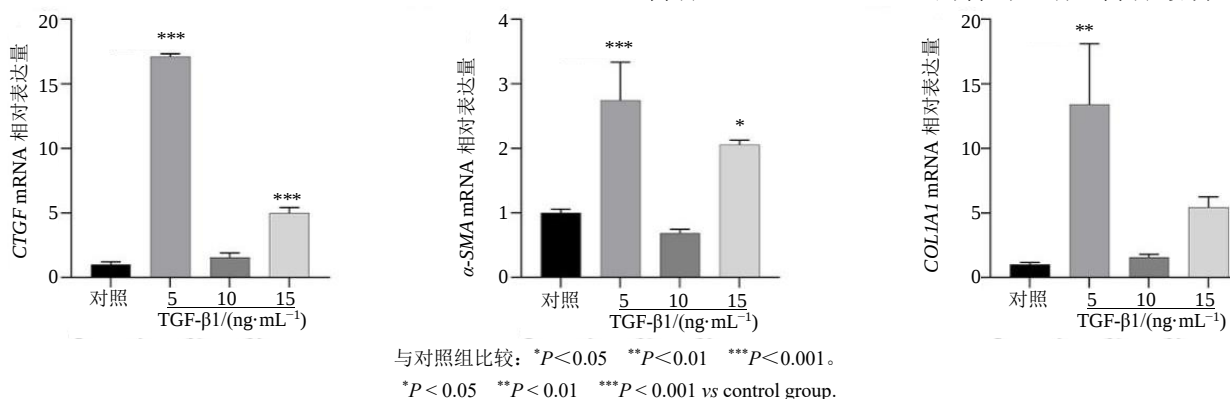
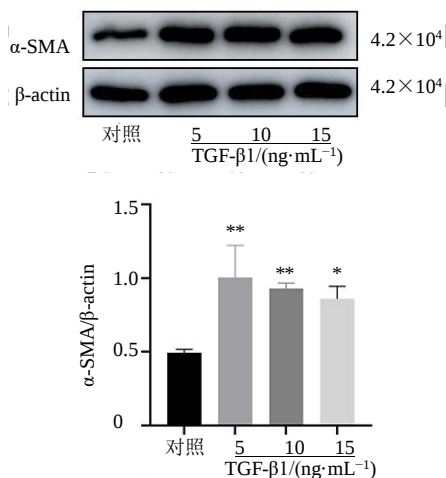
3 结果

3.1 含药血清作用的体积分数及时间的确定

与对照组相比，20%含药血清干预 48、72 h 后，细胞活力均明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。因此，选择安全无毒作用的含药血清 5%、10%、15%用于后续实验。相同体积分数下，作用 48 h 和作用 72 h 相比较，对细胞存活率的影响趋势差异不明显，故确定 48 h 为后续实验的干预时间，见图 1。

3.2 EMs 纤维化细胞模型构建条件的筛选

与对照组相比，不同质量浓度的 TGF-β1 干预后，细胞的 *CTGF*、*COL1A1*、*α-SMA* 的 mRNA 表达均升高，其中 5 ng·mL⁻¹ 的 TGF-β1 干预后的 *CTGF*、*COL1A1*、*α-SMA* 的 mRNA 表达升高最明

图 1 CCK-8 实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 1 Results of CCK-8 assay ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)图 2 不同质量浓度 TGF-β1 干预后各组细胞 CTGF、COL1A1、α-SMA 的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 2 MRNA levels of CTGF, COL1A1 and α-SMA in each group of cells after intervention with different concentrations of TGF-β1 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)图 3 不同质量浓度 TGF-β1 干预后各组细胞 α-SMA 的蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 3 Protein levels of α-SMA in each group of cells after intervention with different concentrations of TGF-β1 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

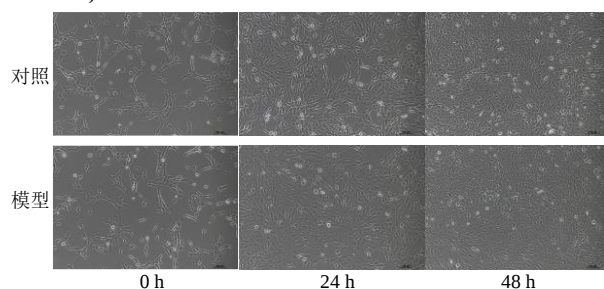
显 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 2。另外, 与对照组相比, 不同质量浓度的 TGF-β1 干预后的细胞 α-SMA 的蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TGF-β1 干预后升高最明显, 确定为最佳造模质量浓度。见图 3。

3.3 细胞形态学观察

使用 TGF-β1 刺激 12Z 细胞构建纤维化模型, 模型组细胞形态较对照组呈梭形改变。见图 4。

3.4 含药血清最佳作用体积分数的确定

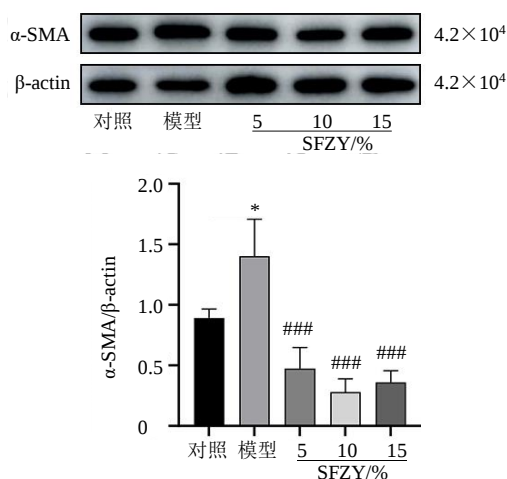
与对照组相比, 模型组的 α-SMA 的蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 5%、10%、15%含药血清干预后的 α-SMA 的蛋白表达均明显降低 ($P < 0.001$), 10%的含药血清组降低最明显,

图 4 细胞形态 ($\times 100$)Fig. 4 Cell morphology ($\times 100$)

确定为含药血清的最佳疗效体积分数用于后续实验。见图 5。

3.5 qRT-PCR 法检测各组细胞 AMPK、TGF-β1、COL1A1、α-SMA 和 CTGF 的 mRNA 表达水平

与对照组相比, 模型组细胞的 AMPK mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), TGF-β1、COL1A1、α-SMA 和 CTGF mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与模型组相比, SFZY 组的 AMPK mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$), TGF-β1、

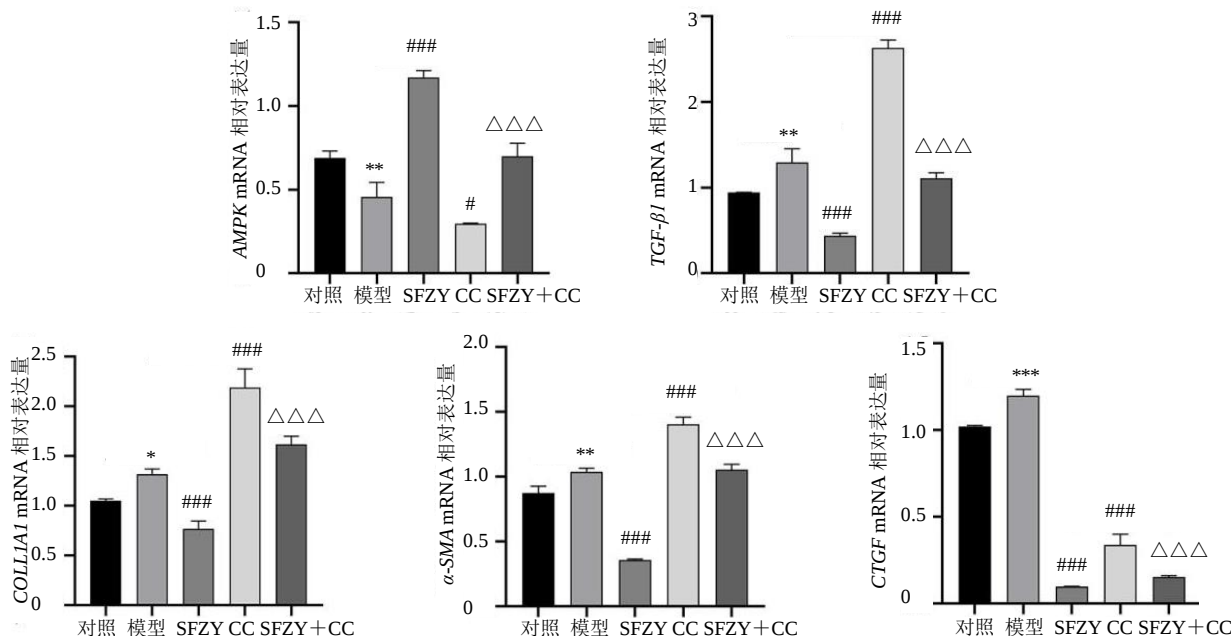


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。

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

图 5 各组细胞 α -SMA 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Expression levels of α -SMA protein in each group of cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



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

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

图 6 各组细胞 AMPK、TGF- β 1、COL1A1、 α -SMA 和 CTGF mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Expression levels of AMPK、TGF- β 1、COL1A1、 α -SMA and CTGF mRNA in each group of cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

($P < 0.001$), p-Smad2/3/Smad2/3、COL1A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); AMPK 抑制剂 CC 组的 p-AMPK/AMPK 的表达水平降低 ($P < 0.05$), p-Smad2/3/Smad2/3、COL1A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)。与 SFZY 组相比, SFZY+CC 组的 p-AMPK/AMPK 的表达水平明显降低 ($P < 0.001$), p-

COL1A1、 α -SMA 和 CTGF mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$); AMPK 抑制剂 CC 组的 AMPK、CTGF mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), TGF- β 1、COL1A1 和 α -SMA mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。与 SFZY 组相比, SFZY+CC 组 AMPK mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.001$), TGF- β 1、COL1A1、 α -SMA 和 CTGF mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。见图 6。

3.6 细胞免疫荧光化学检测各组细胞 p-AMPK/AMPK、p-Smad2/3/Smad2/3、COL1A1、 α -SMA 蛋白表达水平

结果发现, 与对照组相比, 模型组的 p-AMPK/AMPK 的表达水平明显降低 ($P < 0.001$), p-Smad2/3/Smad2/3、COL1A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组相比, SFZY 组的 p-AMPK/AMPK 的表达水平显著升高

Smad2/3/Smad2/3、COL1A1 和 α -SMA 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。见图 7。

4 讨论

EMs 是一种以异位子宫内膜组织在盆腔或其他部位种植生长为特征的慢性炎症性疾病, 慢性炎症长期刺激、重复组织的损伤和修复会导致纤维化形成^[9]。现代研究显示, 纤维化贯穿 EMs 发生的始

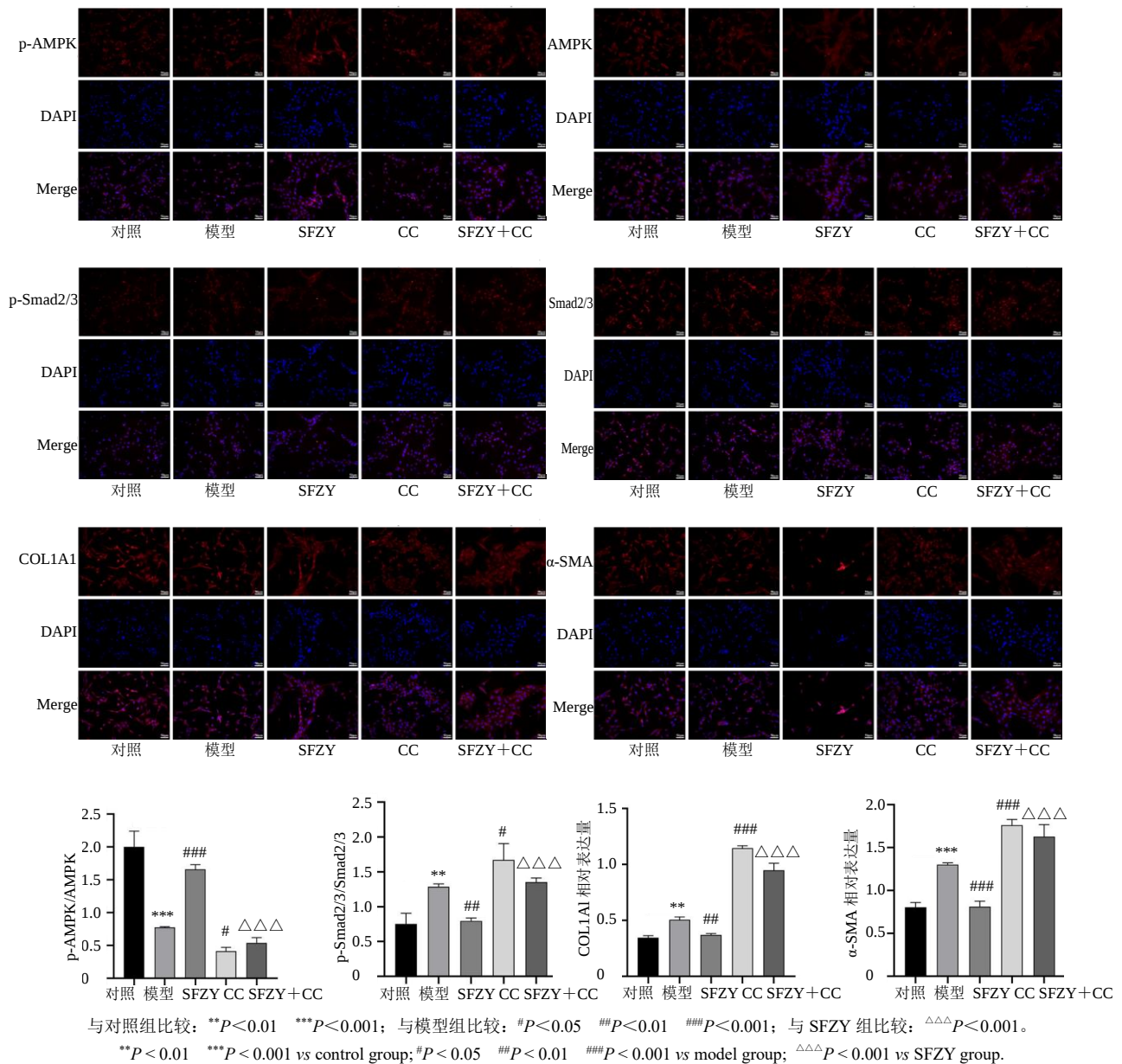


图 7 p-AMPK/AMPK、p-Smad2/3/Smad2/3、COL1A1、α-SMA 免疫荧光染色 (×200)

Fig. 7 Immunofluorescence staining of p-AMPK/AMPK, p-Smad2/3/Smad2/3, COL1A1, and α-SMA (×200)

终, 是造成 EMs 迁延难愈的主要因素^[10]。EMs 纤维化不仅会导致患者出现严重的瘢痕形成, 还会引发慢性盆腔疼痛、痛经、性交痛、排便痛等症状^[11], 严重影响患者的生活质量^[12-13]。因此, 深入研究 EMs 纤维化的发生机制, 寻找有效的抗纤维化治疗方法, 对于改善患者的预后和生活质量具有重要意义。根据 EMs 的临床表现及其纤维化的病理特征, 该病可归属于中医学“癥瘕”范畴, 所以中医药在拮抗 EMs 纤维化方面或许可以挖掘出一定的优势^[4-14]。SFZY 由小茴香、干姜、延胡索、没药、当归、川芎、肉桂、赤芍、蒲黄、五灵脂组成, 方中当归活

血调经, 赤芍清热凉血、祛瘀止痛, 川芎活血祛瘀、行气止痛, 五灵脂散瘀止痛, 延胡索行气止痛, 蒲黄止血化瘀, 没药散瘀定痛, 干姜、肉桂、小茴香能够温中散寒、活血理气止痛, 诸药合用, 共奏温经散寒除湿、活血化瘀止痛之功^[15-16]。

AMPK 是一种具有 α、β 和 γ 3 个亚基的异源三聚体蛋白激酶, 是一种细胞能量感受器, 存在于所有真核细胞中, 有助于维持细胞稳态的平衡^[17]。残基 Thr172 上的磷酸化对于 AMPK 激活至关重要^[18]。研究表明, AMPK 可以调节脂质代谢^[19]、葡萄糖代谢^[20]、自噬^[21]、炎症反应^[22]。同时, 有研究显示

AMPK 亦是减轻或延缓纤维化过程的细胞能量关键传感器,与多种纤维化疾病密切相关^[23]。如有研究^[24]表明,AMPK 激活剂可以显著减轻妊娠小鼠 PM2.5 暴露诱导的肝纤维化样变性。另有研究^[25]显示,在 *AMPK α 1* 基因敲除的小鼠中,肌成纤维细胞的增殖和迁移能力增强,而肌成纤维细胞的分化受到抑制,这种反应与胶原蛋白表达的增加和心肌纤维化的加剧密切相关。在肾脏纤维化的研究中也同样发现激活的 AMPK 可以抑制 TGF- β 1 诱导的肾脏纤维化水平^[26]。所以,AMPK 在纤维化疾病中发挥着一定的调控作用,而其对 EMs 纤维化的作用尚不明确。

TGF- β 包括 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 种亚型,其中 TGF- β 1 对纤维化和炎症的发展至关重要,可引起盆腔纤维化和黏连,促进成纤维细胞的增殖,从而促进 EMs 的发展^[27]。TGF- β 1 信号通路是纤维化经典信号通路之一。研究表明,TGF- β 1 可以激活下游 Smad 信号通路,破坏细胞外基质,激活肌成纤维细胞,增加细胞外基质 (ECM) 的产生,并抑制 ECM 降解^[28-29],进而促进卵巢 EMs 异位病灶周围组织的纤维化^[30]。具体而言,TGF- β 1 通过 TGF- β I 型和 II 型受体发出信号,这些受体募集并磷酸化 Smad2 和 Smad3^[31],激活 Smad2/3 信号通路,促进 ECM 的合成和沉积,最终导致纤维化。AMPK 磷酸酶活化,可以直接或间接抑制 TGF- β 1/Smad3 纤维化活化通路的激活,从而发挥抗肾、肝、心肌等器官纤维化的作用^[32-33]。此外,研究显示不仅 AMPK 作为上游能调控下游 TGF- β 1/Smads 信号通路相关因子的表达^[34],TGF- β 1 也可以抑制 p-AMPK/AMPK 的表达,反过来调控 AMPK 信号通路^[35],即 AMPK 与 TGF- β 1/Smads 信号通路之间存在“相互作用”。COL1A1、 α -SMA 和 CTGF 作为 TGF- β 通路的下游分子,与 EMs 纤维化密切相关。CTGF 是 EMs 异位病灶组织中的关键纤维化标志物,可能影响上皮间质转化从基质成纤维细胞表型转变为肌成纤维细胞样表型,TGF- β 1 可通过 CTGF 介导纤维化过程^[36-37]。此外,有研究表明^[37],EMs 纤维化形成是细胞外基质成分的过度积累^[38-39]。ECM 包括 I 型、III 型胶原和 α -SMA 等,局限于肌成纤维细胞病灶,COL1A1 与 EMs 纤维化密切相关,可能是其治疗的良好靶点^[40]。 α -SMA 是一种在子宫内膜异位病灶组织中高度过表达的促纤维化标志物^[41],其表达升高标志着成纤维细胞向肌成纤维细

胞的转化,这是纤维化形成的关键过程^[42-43]。

中药复方含药血清是一种将中药复方提取物与动物血清结合的研究方法,用于模拟中药在体内的作用机制。本研究采用经典方剂 SFZY,制备含药血清并直接作用于 12Z 细胞,并联合 AMPK 抑制剂 CC 来探究 SFZY 通过调控 AMPK/TGF- β 1/Smads 通路影响 12Z 细胞纤维化的机制。TGF- β 1 是关键促纤维化因子,可以诱导肌成纤维细胞转分化并促进基质积累,在纤维化形成过程中起到至关重要的作用^[44],在 EMs 患者腹腔液、血清及子宫内膜异位病灶中呈现高表达^[45-46]。所以本实验以 TGF- β 1 因子刺激 12Z 细胞构建纤维化模型,在 TGF- β 1 的干预下 12Z 细胞形态发生了梭形改变,且细胞的 AMPK mRNA 表达水平及 p-AMPK/AMPK 的蛋白表达水平显著降低,TGF- β 1、COL1A1、 α -SMA 及 CTGF mRNA 表达水平及 p-Smad2/3/Smad2/3、COL1A1、 α -SMA 的蛋白表达水平显著升高。在采用含药血清干预 12Z 细胞后,结果发现其可激活 AMPK,上调 AMPK mRNA 及 p-AMPK/AMPK 的蛋白表达水平,并下调 TGF- β 1 mRNA 及 p-Smad2/3/Smad2/3 的蛋白表达,抑制 COL1A1、 α -SMA 和 CTGF 纤维化因子的产生,进而影响 EMs 纤维化进展,但 SFZY+AMPK 抑制剂干预后,SFZY 的这些作用被某种程度的抑制,这与 SFZY 含药血清可能通过激活 AMPK 磷酸化,抑制 TGF- β 1/Smads 通路的活化,降低纤维化因子的表达,从而抑制 EMs 纤维化进程有相关性。

本研究从 AMPK/TGF- β 1/Smads 通路,部分阐释了 SFZY 含药血清对 EMs 疾病的作用机制。研究显示 SFZY 可通过多靶点调控 EMs 纤维化进程,鉴于其含药血清中活性成分的组成及相互作用尚未明确,未来可结合代谢组学技术解析关键药效成分,并通过单体化合物验证其作用靶点,进一步完善其对 EMs 纤维化的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Vigano P, Candiani M, Monno A, et al. Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature [J]. Hum Reprod, 2018, 33(3): 347-352.
- [2] Vissers G, Giacomozzi M, Verdurmen W, et al. The role of fibrosis in endometriosis: A systematic review [J]. Hum Reprod Update, 2024, 30(6): 706-750.

- [3] 子宫内异位症疼痛管理指南 (2024 年实践版) [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2024, 40(1): 50-61.
Reproductive Health Society of Chinese Preventive Medicine Association; Endometriosis Group of Chinese Association of Obstetricians, Gynecologists. Management guidelines for pain of endometriosis (2024 practice edition) [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2024, 40(1): 50-61.
- [4] 张作良, 王家兴, 王婉润, 等. 基于 TRL4/NF- κ B/NLRP3 信号通路介导的细胞焦亡探讨加味少腹逐瘀汤拮抗异位子宫内异组织纤维化机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(4): 19-28.
Zhang Z L, Wang J X, Wang W R, et al. Mechanism of modified Shaofu Zhuyutang in antagonising ectopic endometrial tissue fibrosis based on cellular pyroptosis mediated by TRL4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(4): 19-28.
- [5] 马铃, 张雯婷. 少腹逐瘀汤治疗子宫内异位症痛经研究进展 [J]. 光明中医, 2024, 39(21): 4301-4304.
Ma L, Zhang W T. Research progress of Shaofu Zhuyu Decoction in treating dysmenorrhea caused by endometriosis [J]. Guangming J Chin Med, 2024, 39(21): 4301-4304.
- [6] Li B B, Xun Q Q, Wei C, et al. Effects of Shaofu Zhuyu Decoction on intestinal flora and fibrosis in a mouse model of endometriosis [J]. Heliyon, 2024, 10(20): e38701.
- [7] 于丹, 牟琪瑞, 李贺, 等. 基于 Nrf2/ROS 通路探讨补中益气汤调控内质网应激改善非小细胞肺癌的顺铂耐药性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(10): 98-104.
Yu D, Mu Q R, Li H, et al. Buzhong Yiqitang regulates endoplasmic reticulum stress to attenuate cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via Nrf2/ROS pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(10): 98-104.
- [8] Yu P B, Hong C C, Sachidanandan C, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(1): 33-41.
- [9] Zhu S, Wang A Q, Xu W, et al. The heterogeneity of fibrosis and angiogenesis in endometriosis revealed by single-cell RNA-sequencing [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2023, 1869(2): 166602.
- [10] Brichant G, Laraki I, Henry L, et al. New therapeutics in endometriosis: A review of hormonal, non-hormonal, and non-coding RNA treatments [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10498.
- [11] Khan K N, Kitajima M, Fujishita A, et al. Pelvic pain in women with ovarian endometrioma is mostly associated with coexisting peritoneal lesions [J]. Hum Reprod, 2013, 28(1): 109-118.
- [12] 王安琪, 孙佳凡, 徐炜, 等. 子宫内异位症纤维化相关细胞及其活化机制研究进展 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(11): 1637-1642.
Wang A Q, Sun J F, Xu W, et al. Research progress of fibrosis-related cells and their activation mechanism in endometriosis [J]. J Nanjing Med Univ Nat Sci, 2022, 42(11): 1637-1642.
- [13] Yang M J, Jiang H, Ding X Y, et al. Multi-omics integration highlights the role of ubiquitination in endometriosis fibrosis [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 445.
- [14] 程曦, 陈晓瑶, 张悦健, 等. 经典名方与中成药治疗子宫内异位症的临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(7): 1389-1395.
Cheng X, Chen X Y, Zhang Y J, et al. Research progress of classical famous prescription and Chinese patent medicine in treatment of endometriosis [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(7): 1389-1395.
- [15] 李琳, 贺冰, 马本玲. 少腹逐瘀汤对子宫内异容受性不良大鼠的改善作用及机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1376-1382.
Li L, He B, Ma B L, et al. Effect and mechanism of Shaofu Zhuyu Decoction on improving poor endometrial receptivity in rats [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(7): 1389-1395.
- [16] 孙新慧, 马小娜, 李冰冰, 等. 少腹逐瘀汤对子宫内异位症模型小鼠血管生成的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(6): 200-203, 228-229.
Sun X H, Ma X N, Li B B, et al. Effects of Shaofu Zhuyu Decoction (少腹逐瘀汤) on angiogenesis in endometriosis model mice [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2025, 52(6): 200-203, 228-229.
- [17] Huang R S, Guo F, Li Y P, et al. Activation of AMPK by triptolide alleviates nonalcoholic fatty liver disease by improving hepatic lipid metabolism, inflammation and fibrosis [J]. Phytomedicine, 2021, 92: 153739.
- [18] Carling D, Sanders M J, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases [J]. Int J Obes, 2008, 32(Suppl 4): S55-S59.
- [19] Pang Y N, Xu X, Xiang X J, et al. High fat activates O-GlcNAcylation and affects AMPK/ACC pathway to

- regulate lipid metabolism [J]. *Nutrients*, 2021, 13(6): 1740.
- [20] Steinberg G R, Hardie D G. New insights into activation and function of the AMPK [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(4): 255-272.
- [21] Licheva M, Raman B, Kraft C, et al. Phosphoregulation of the autophagy machinery by kinases and phosphatases [J]. *Autophagy*, 2022, 18(1): 104-123.
- [22] Singh V, Ubaid S. Role of silent information regulator 1 (SIRT1) in regulating oxidative stress and inflammation [J]. *Inflammation*, 2020, 43(5): 1589-1598.
- [23] Jiang S, Li T, Yang Z, et al. AMPK orchestrates an elaborate cascade protecting tissue from fibrosis and aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 38: 18-27.
- [24] Wan T, Chen Z, Li J, et al. AMPK agonist AICAR ameliorates maternal hepatic lipid metabolism disorder, inflammation, and fibrosis caused by PM2.5 exposure during pregnancy [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 8689.
- [25] Noppe G, Dufey C, Buchlin P, et al. Reduced scar maturation and contractility lead to exaggerated left ventricular dilation after myocardial infarction in mice lacking AMPK α 1 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74: 32-43.
- [26] Chen K H, Hsu H H, Lee C C, et al. The AMPK agonist AICAR inhibits TGF- β 1 induced activation of kidney myofibroblasts [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106554.
- [27] Han X Y, Hu F F, Chen F, et al. The inhibition of bone morphogenetic protein 1 attenuates endometriosis lesions *in vivo* and *in vitro* [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 302(2): 415-422.
- [28] Bernacchioni C, Capezzuoli T, Vannuzzi V, et al. Sphingosine 1-phosphate receptors are dysregulated in endometriosis: Possible implication in transforming growth factor β -induced fibrosis [J]. *Fertil Steril*, 2021, 115(2): 501-511.
- [29] Zhang Y E. Non-smad signaling pathways of the TGF- β family [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(2): a022129.
- [30] Wen Y, Pang L L, Fan L X, et al. β -sitosterol inhibits the proliferation of endometrial cells via regulating Smad7-mediated TGF- β /smads signaling pathway [J]. *Cell J*, 2023, 25(8): 554-563.
- [31] Derynck R, Budi E H. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(570): eaav5183.
- [32] Jiang Y X, Li W, Wang J, et al. Cardiac dysfunction is attenuated by ginkgolide B via reducing oxidative stress and fibrosis in diabetic rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23: 1078-1084.
- [33] 杨丽霞, 徐丹桂, 陈琦, 等. 基于 SIRT3/AMPK 通路探讨齐墩果酸对病毒性心肌炎小鼠炎症及纤维化损伤的影响 [J]. *中成药*, 2024, 46(7): 2389-2395.
- Yang L X, Xu D G, Chen Q, et al. Effects of oleanolic acid on inflammation and fibrosis in mice with viral myocarditis based on SIRT3/AMPK pathway [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(7): 2389-2395.
- [34] Huang R, Zeng J, Yu X Z, et al. Luteolin alleviates diabetic nephropathy fibrosis involving AMPK/NLRP3/TGF- β pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2024, 17: 2855-2867.
- [35] Zhou Z, Kandhare A D, Kandhare A A, et al. Hesperidin ameliorates bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis via inhibition of TGF- β 1/Smad3/AMPK and IkappaB α /NF- κ B pathways [J]. *Excli J*, 2019, 18: 723-745.
- [36] Chen L, Chen R J, Kemper S, et al. Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by Twist1-dependent microRNA-214 expression: Role of exosomes in horizontal transfer of Twist1 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309(6): G491-G499.
- [37] Yang Y T, Jiang X Y, Xu H L, et al. Autoimmune disease-related hub genes are potential biomarkers and associated with immune microenvironment in endometriosis [J]. *Int J Gen Med*, 2023, 16: 2897-2921.
- [38] 张晨昱. 子宫内膜异位症对卵巢储备的影响及其血管生成机制的探索 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2024.
- Zhang C Y. The impact of endometriosis on ovarian reserve and exploration of its angiogenesis mechanism [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2024.
- [39] Henderson N C, Rieder F, Wynn T A. Fibrosis: From mechanisms to medicines [J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 555-566.
- [40] Yoshino O, Ono Y, Honda M, et al. Relaxin-2 may suppress endometriosis by reducing fibrosis, scar formation, and inflammation [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(11): 467.
- [41] Kula H, Ilgen O, Kurt S, et al. Patterns of proliferation and fibrosis in a rat model of endometriosis following administration of *Allium cepa* [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2024, 51(2): 112-119.
- [42] Duan J, Liu X S, Wang H L, et al. The M2a macrophage

- subset may be critically involved in the fibrogenesis of endometriosis in mice [J]. *Reprod Bio Med Online*, 2018, 37(3): 254-268.
- [43] Malmström J, Lindberg H, Lindberg C, et al. Transforming growth factor- β 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus [J]. *Mol Cell Proteom*, 2004, 3(5): 466-477.
- [44] 吴君, 荆雪宁, 孟繁伟, 等. 五苓散对 TGF- β 1 诱导 HK-2 细胞纤维化、炎症和氧化应激损伤的改善作用及机制 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(5): 1247-1254.
- Wu J, Jing X N, Meng F W, et al. Improvement effect and mechanism of Wuling San on TGF- β 1-induced fibrosis, inflammation, and oxidative stress damage in HK-2 cells [J]. *China J Chin Mater Med*, 2025, 50(5): 1247-1254.
- [45] Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, et al. The involvement of multifunctional TGF- β and related cytokines in pathogenesis of endometriosis [J]. *Immunol Lett*, 2018, 201: 31-37.
- [46] 陈元欢, 毛海燕, 武权生, 等. 补肾活血法治疗子宫内膜异位症作用机制的研究进展 [J/OL]. *中药药理与临床*, 2025: 1-16. (2025-01-15). <https://link.cnki.net/doi/10.13412/j.cnki.zyyl.20250115.001>.
- Chen Y H, Mao H Y, Wu Q S, et al. Research progress on mechanism of bushenhuoxue (补肾活血) method in the treatment of endometriosis [J/OL]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2025: 1-16. (2025-01-15). <https://link.cnki.net/doi/10.13412/j.cnki.zyyl.20250115.001>.

[责任编辑 兰新新]