

• 药理与临床 •

大黄-桃仁药对调控子宫腺肌病在位内膜线粒体稳态的机制研究

易永丽, 雷 娅[#], 王 坤, 付先芸*, 蔡三金*

三峡大学医学院, 国家中医药管理局中药药理肿瘤科研三级实验室, 湖北 宜昌 443000

摘要:目的 探索大黄-桃仁药对对子宫腺肌病 (adenomyosis, AM) 在位内膜线粒体稳态的调控机制。方法 同种异体垂体移植法构建 AM 小鼠模型, 光镜及透射电镜 (TEM) 观察大黄-桃仁药对治疗前后子宫组织病理及超微结构改变; 免疫荧光检测线粒体自噬通路 PTEN 诱导的推定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森蛋白 (Parkinson protein, Parkin) 蛋白表达。培养人永生子宫内位异位症在位内膜间质细胞 hEM15A, 观察大黄-桃仁药对处理前后细胞增殖能力、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、抗氧化酶系、线粒体膜电位、线粒体自噬小体、线粒体自噬蛋白的变化。结果 病理切片显示, 经大黄-桃仁药对治疗后, 中、重度的浸润比例较模型组减少。TEM 观察发现模型组子宫内膜上皮细胞及间质细胞线粒体肿胀、线粒体脊消失, 部分形成线粒体自噬体; 经大黄-桃仁药对治疗后子宫内膜上皮细胞及间质细胞线粒体数量增加, 无明显肿胀、线粒体脊清晰可见。与对照组比较, 造模后子宫内膜层 PINK1、Parkin 表达显著上调 ($P < 0.001$); 经大黄-桃仁药对治疗后, PINK1、Parkin 表达显著下降 ($P < 0.05, 0.001$)。体外实验结果表明, hEM15A 细胞线粒体膜电位下降, ROS 呈较高水平; 经大黄-桃仁药对处理后, hEM15A 细胞的增殖及侵袭能力下降 ($P < 0.05, 0.001$), 线粒体膜电位升高, ROS 水平下降 ($P < 0.001$), 抗氧化酶系统 Cu-Zn 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、Mn-SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性上调 ($P < 0.01, 0.001$), 氧化损伤指标丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平下调 ($P < 0.01$)。hEM15A 细胞线粒体与溶酶体之间存在较强的共定位关系, 经大黄-桃仁药对处理后, 线粒体与溶酶体共定位的数量显著减少 ($P < 0.05$), PINK1、Parkin 及其下游视神经蛋白 (Optineurin, OPTIN)、核点蛋白 52 (nuclear dot protein 52, NDP52) 经大黄-桃仁药对处理后显著下调 ($P < 0.01, 0.001$)。结论 大黄-桃仁药对可通过改善线粒体抗氧化酶系、调控线粒体自噬水平、恢复线粒体膜电位等多途径维护 AM 在位内膜细胞乏氧线粒体稳态, 从而减轻氧化应激损伤。

关键词: 大黄-桃仁药对; 子宫腺肌病; 在位内膜线粒体稳态; 线粒体自噬; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4709-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.014

Mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* drug pair on regulating endometrial mitochondrial homeostasis in adenomyosis

YI Yong-li, LEI Ya, WANG Kun, FU Xian-yun, CAI San-jin

Medical college of China Three Gorges University, Third-Grade Pharmacological Laboratory on Chinese Medicine Approved by State Administration of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443000, China

Abstract: Objective To explore the regulation mechanism of Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*)-Taoren (*Persicae Semen*) drug pair (RP) on endometrial mitochondrial homeostasis in adenomyosis (AM). **Methods** AM mice model was established by allogeneic pituitary transplantation. Histopathological and ultrastructural changes of uterus before and after treatment with RP were observed by light microscope and transmission electron microscope (TEM). Immunofluorescence was used to detect PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkinson protein (Parkin) expressions. Human immortalized endometriosis eutopic endometrial stromal cells hEM15A were

收稿日期: 2022-03-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973897)

作者简介: 易永丽, 硕士研究生, 研究方向为中药药理研究。E-mail: 728113811@qq.com

*通信作者: 付先芸, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为子宫内位异位性疾病及慢性盆腔疼痛。E-mail: dinnar1@163.com

蔡三金, 副教授, 研究方向为中医药治疗妇科疾病。E-mail: 106680558@qq.com

#共同第一作者: 雷 娅, 硕士研究生, 研究方向为慢性盆腔疼痛。E-mail: 283392724@qq.com

cultured, and the effects of RP on cell proliferation, reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes, mitochondrial membrane potential, mitophagosomes and mitophagy proteins changes. **Results** Pathological sections showed that compared with model group, proportion of moderate and severe infiltration was reduced after treatment with RP. TEM observation showed that mitochondria of endometrial epithelial cells and interstitial cells in model group were swollen, mitochondrial ridges were disappeared and some mitophagosomes were formed; The number of mitochondria in endometrial epithelial cells and interstitial cells were increased after treatment with RP, there was no obvious swelling, and mitochondrial ridges were clearly visible. Compared with control group, PINK1 and Parkin expressions in endometrial layer after modeling were significantly up-regulated ($P < 0.001$); After treatment with RP, PINK1 and Parkin expressions were significantly decreased ($P < 0.05, 0.001$). The results of *in vitro* experiments showed that mitochondrial membrane potential of hEM15A cells was decreased, and ROS level was higher; After treatment with RP, proliferation and invasion abilities of hEM15A cells were decreased ($P < 0.05, 0.001$), mitochondrial membrane potential was increased, ROS level was decreased ($P < 0.001$), antioxidant enzyme systems Cu-Zn superoxide dismutase (SOD), Mn-SOD and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were up-regulated ($P < 0.01, 0.001$), and oxidative damage index malondialdehyde (MDA) level was down-regulated ($P < 0.01$). There was a strong co-localization relationship between mitochondria and lysosomes in hEM15A cells. After treatment with RP, number of mitochondria and lysosomes co-localized was significantly reduced ($P < 0.05$), PINK1, Parkin and their downstream proteins Optineurin (OPTIN), nuclear dot protein 52 (NDP52) were significantly down-regulated after treatment with RP ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** RP can maintain hypoxic mitochondrial homeostasis of AM resident endomembrane cells by improving mitochondrial antioxidant enzymes, regulating level of mitophagy and restoring mitochondrial membrane potential, thereby reducing oxidative stress injury.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* drug pair; adenomyosis; endometrial mitochondrial homeostasis; mitophagy; oxidative stress

子宫腺肌病 (adenomyosis, AM) 发病率高^[1], 90% 的患者伴有痛经、月经过多、性交困难、不孕等临床症状^[2], 对其生活和工作造成极大的困扰^[3]。除手术外, 目前临床采用非甾体抗炎药和激素控制 AM 的疼痛症状和异常子宫出血^[4]。但现有保守治疗方法伴随着排卵抑制、肝肾功能受损、疗效差、复发率高等问题, 严重影响患者身心健康^[3]。中医药因具有显著改善 AM 临床症状和病理浸润程度, 且干扰正常内分泌的独特优势日益引起广泛的关注^[5]。本课题组前期实验证实, AM 的发生是在位内膜缺氧损伤的结果^[6], 线粒体是细胞内最高级的反应性传感系统, 对缺氧损伤极为敏感。线粒体损伤诱发的能量代谢异常是内膜异位发生的重要前提和潜在治疗靶点^[7]。目前研究证实, 化瘀类中药可以调控缺氧微环境下线粒体呼吸链酶系及抗氧化酶系, 调控线粒体膜的稳定性, 从而修复受损线粒体, 抑制细胞异常增殖能力^[8-9]。本研究拟以在位内膜线粒体稳态为靶点, 探索化瘀核心药对大黄-桃仁治疗 AM 的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 8 周龄雌性 ICR 小鼠 (体质量 23.1~26.4 g) 及 10 周龄雄性小鼠 (体质量 25.2~29.7 g), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2016-0006。小鼠每笼 4 只, 置

于实验动物房屏障环境饲养, 温度 (24±2) °C, 相对湿度为 40%~70%, 12 h 灯光照射, 12 h 黑暗。动物实验经三峡大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 20190801)。

1.2 细胞

人子宫内膜异位症患者在位内膜间质细胞永生代化细胞 hEM15A (编号 GDC0601) 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心细胞库。

1.3 药品与试剂

PTEN 诱导的推定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) 兔多抗 (批号 23274-1-AP)、帕金森病蛋白 (Parkinson protein, Parkin) 兔多抗 (批号 14060-1-AP)、视神经蛋白 (optineurin, OPTIN) 兔多抗 (批号 10837-1-AP)、核点蛋白 52 (nuclear dot protein 52, NDP52) 兔多抗 (批号 12229-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔多抗 (批号 AB-P-R001) 购自杭州贤至生物有限公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 BA1054) 购自武汉博士德生物工程有限公司; CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (批号 HY-K0301) 购自美国 MedChemExpress 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0010)、线粒体膜电位 JC-1 检测试剂盒 (批号 C2006)、Mito-Tracker Green 线粒体绿色荧光探

针(批号 040721210826)、Lyso-Tracker Red 溶酶体红色荧光探针(批号 012621210827)、ROS 检测试剂盒(批号 S0033)均购自碧云天生物技术有限公司;谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测试试剂盒(批号 A005)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试试剂盒(批号 A001-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试试剂盒(批号 A003-4)均购自南京建成生物工程研究所;大黄免煎剂(批号 19004961, 酒炙法炮制, 1 g 免煎剂相当于 5 g 临床剂量)、桃仁免煎剂(批号 19006412, 1 g 免煎剂相当于 20 g 临床剂量)由北京康仁堂制药有限公司提供;丙泊酚乳状注射液(国药准字 H19990282, 批号 21803281)购自西安立邦制药有限公司;对照品芦荟大黄素(批号 110795-201710, 质量分数为 98.3%)、大黄酸(批号 110757-201607, 质量分数为 99.3%)、大黄素(批号 110756-201512, 质量分数为 98.7%)、大黄酚(批号 110796-201621, 质量分数为 99.2%)、大黄素甲醚(批号 110758-201621, 质量分数为 99.0%)均购自国家食品药品监督检验研究院;苦杏仁苷对照品(批号 K-001-171216, 质量分数为 98.0%)购自成都瑞芬斯生物技术有限公司。

1.4 仪器

MCO175 型 CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);Multiskan GO 型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);电泳仪、170-8280 型 ChemiDocMP 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司);BOM-1000 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);2391Model 型透射电子显微镜(TEM, 美国 IITC 公司);LC-2010A 型系列液相色谱仪(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 大黄-桃仁药对的高效液相色谱分析

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,加甲醇分别配制成含芦荟大黄素 50 μg/mL、大黄酸 50 μg/mL、大黄素 50 μg/mL、大黄酚 50 μg/mL、大黄素甲醚 25 μg/mL 的溶液,分别精密量取上述对照品溶液各 2 mL 混匀。

精密称取苦杏仁苷对照品适量,加甲醇配制成含苦杏仁苷 0.1 mg/mL 的溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 溶液制备方法及色谱条件按照国家药品监督管理局国家药品标准(酒大黄配方颗粒, YBZ-PFKL-2021075; 桃仁配方颗粒,

YBZ-PFKL-2021120)进行。

(1) 大黄免煎剂溶液的制备:精密称取大黄免煎剂 0.156 1 g,加入 70%甲醇 25 mL,加热回流 1 h。取滤液 5 mL,挥去溶剂,加 8%盐酸溶液 10 mL,超声处理 2 min,再加三氯甲烷 10 mL,加热回流 1 h 后,分液漏斗分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷提取 3 次,每次量取 10 mL,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,加甲醇至 10 mL,摇匀,滤过,取续滤液即得。

(2) 桃仁免煎剂溶液的制备:精密称取桃仁免煎剂 0.101 4 g,加入 70%甲醇 50 mL,超声 30 min 后,摇匀,滤过,取续滤液 5 mL,置量瓶中,加 50%甲醇至 10 mL,摇匀,即得。

2.1.3 色谱条件

(1) 大黄免煎剂及混合对照品溶液的色谱条件: Dikma C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(85:15);进样量为 10 μL;检测波长为 254 nm。

(2) 桃仁免煎剂及苦杏仁苷对照品溶液的色谱条件: 依利特 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(1:4);进样量为 10 μL;检测波长为 210 nm。

2.2 体内实验

2.2.1 动物模型的建立 采用同种异体垂体移植法建立 AM 小鼠模型^[10]。ICR 雌性小鼠 ip 丙泊酚乳状注射液麻醉(0.1 mg/g)。局部消毒后下腹正中纵切口 2 cm,分离右侧子宫。取 ICR 雄性小鼠,断颈处死,取垂体,与少量生理盐水混匀,形成垂体生理盐水悬浊液。取 50 mL 套管穿刺针,吸入垂体生理盐水悬浊液,穿刺并推入宫腔,滴入庆大霉素溶液 0.25 mL(1000 U/g),常规缝合。术后常规饲养。

2.2.2 实验分组及给药 雌性 ICR 小鼠随机抽取 6 只为对照组,其余 25 只手术造模。术后手术组随机抽取 11 只为模型组,另 14 只为大黄-桃仁药对(4.25 g/kg)组。大黄-桃仁药对组小鼠按 1:1(临床等效剂量)比例 ig 大黄和桃仁免煎剂。模型组及对照组 ig 等体积生理盐水,1 次/d,连续 8 周,后引颈处死,剖腹取出右侧子宫组织。

2.2.3 苏木素-伊红(HE)染色 各组子宫用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋。65 °C 干燥 30 min 后,将组织切成 5 μm 连续切片,进行 HE 染色,于显微镜下观察病理浸润程度。

2.2.4 TEM 观察子宫内膜-肌层交界(endometrial

myometrial interface, EMI) 处子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞的线粒体自噬情况 取 1 mm^3 离体组织或单层培养细胞以戊二醛及锇酸双固定, 丙酮梯度脱水, 环氧丙烷浸透, 包埋剂包埋、聚合; 超薄切片机切片, 甲苯胺蓝定位; 醋酸铀及柠檬酸铅依次染色。观察 EMI 处线粒体、溶酶体超微结构变化, 观察自噬小体数量。

2.2.5 PINK1 和 Parkin 免疫荧光染色 子宫切片脱蜡漂洗, 依次加入山羊血清、PINK1 抗体、Parkin 抗体及二抗, 分别用 PBS 溶液漂洗 3 次, 每次 5 min。切片上加入 DAPI 复染细胞核, PBS 孵育 3 次, 每次 5 min。最后加入抗荧光淬灭剂, 对切片进行密封。观察染色结果。

2.3 体外实验

2.3.1 子宫内膜间质细胞培养 hEM15A 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F-12 培养基, 于 5% CO_2 、37 °C、饱和湿度的培养箱中培养。

2.3.2 CCK-8 实验 收集处于对数生长期的 hEM15A 细胞, 以 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 培养至细胞贴壁。将大黄-桃仁药对免煎颗粒粉碎, 称取适量, 溶解于 0.9% 生理盐水中, 在磁力加热搅拌器上 60 °C 加热并搅拌 1 h, 配制成质量浓度为 20 mg/mL 的药液, 经 0.22 μm 的针式过滤器滤过, 最后用无血清培养基分别将滤液配制成质量浓度为 0.5、1、3、5、10、20 mg/mL 的溶液, 加入药物处理 48 h, 对照组加入不含药物的培养基。加入 10 μL CCK-8 溶液, 并继续培养 3 h。采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.3.3 线粒体膜电位检测 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 终止消化后收集细胞, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重悬于 0.5 mL 细胞培养液中; 加入 0.5 mL JC-1 染色工作液, 混匀, 37 °C 孵育 20 min; 4 °C、1200 r/min 离心 3 min, 弃上清, 洗涤 2 次; 加入 1 mL JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 4 °C、1200 r/min 离心 3 min, 弃上清; 再加入 1 mL JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 4 °C、1200 r/min 离心 3 min, 弃上清; 以 500 μL JC-1 染色缓冲液重悬后, 采用流式细胞仪检测。

2.3.4 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 终止消化后收集, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清, 以 PBS 溶液重悬; 用 PBS 溶液将细胞润洗 2 次, 1200 r/min 离心 5 min; 弃去 PBS 溶液, 加入 1 mL 稀释的 DCFH-

DA, 37 °C 孵育 20 min, 每 3 分钟混匀 1 次; 用无血清培养基洗涤细胞 3 次, 采用流式细胞仪检测。

2.3.5 抗氧化酶系及氧化损伤检测 按 GSH-Px 及 SOD 试剂盒说明书加入样本和试剂, 涡旋混匀, 37 °C 孵育 40 min, 加入特定的显色剂显色, 室温静置 10 min, 用 1 cm 光径石英皿, 采用分光光度计测定 412 nm 处的 A 值, 计算 GSH-Px 活性; 测定 550 nm 处的 A 值, 计算 Mn^{2+} SOD 及 Cu-Zn SOD 活性。

按 MDA 试剂盒说明书加入样本和试剂, 涡旋混匀, 95 °C 水浴 40 min, 冷却, 离心, 测定 532 nm 处的 A 值, 计算 MDA 含量。

2.3.6 免疫荧光标记细胞内的线粒体自噬 分别配制线粒体特异性荧光探针 Mito-Tracker Green 及溶酶体特异性荧光探针 Lyso-Tracker Red 工作液, 37 °C 孵育后, 与细胞共同孵育 40 min。吸出染色工作液, 在细胞培养皿中更换培养基, 于激光共聚焦显微镜下观察。其中绿色的荧光点为线粒体, 红色荧光点为溶酶体, 溶酶体和线粒体的共定位细胞中形成黄色荧光即线粒体自噬阳性点。

2.3.7 Western blotting 检测自噬蛋白表达 加入裂解液提取各组细胞蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 室温封闭, 漂洗后分别加入 NDP52、OPTIN、PINK1、Parkin 和 GAPDH 抗体 (1:1000), 4 °C 孵育过夜; 洗膜后加入 HRP 标记的二抗 (1:10000), 室温孵育 2 h, 漂洗后加入化学发光剂, 采用 Image J 软件测定条带灰度值。

2.3.8 Transwell 实验 胰酶消化后离心细胞, 加入培养液重悬细胞; 在 24 孔板中加入 800 μL 预冷的 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基, 并放入 Transwell 小室, 在 Transwell 小室上室加入 100 μL 用无血清培养基稀释的 Matrigel (1 mg/mL), 37 °C 孵育 4~5 h 使其成胶状, 待 Matrigel 干成胶状后在 Transwell 上室分别接入 200 μL 各组细胞悬液, 培养 48 h; 用镊子取出小室, 小室倒扣, 弃去小室中培养基, 加入 1 mL 甲醇固定 10 min, 苏木素染色 15 min, 棉签擦拭, 清除小室内残留的细胞; 沿小室边缘将膜切下, 中性树胶封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 定量指标用单因素方差分析, 组间比较用 LSD、SNK 分析和 Tamhane's T_2 检验。

3 结果

3.1 大黄-桃仁药对的 HPLC 分析

如图 1 所示, 大黄免煎剂的指纹图谱在 254 nm 处检测出芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚, 桃仁免煎剂的指纹图谱在 210 nm 处检测出苦杏仁苷。

3.2 体内实验结果

3.2.1 HE 染色观察浸润程度 HE 染色 (图 2) 观察表明, 造模后子宫内膜间质及腺体向肌层浸润, 成功形成 AM 模型, 其成模率可达 90%。经大黄-桃仁药对治疗后, 中、重度 (2、3 级) 的浸润比例较模型组减少。

3.2.2 TEM 观察大黄-桃仁药对治疗前后内膜细胞、间质细胞、平滑肌细胞的线粒体超微结构变化 如图 3 所示, 对照组 EMI 处子宫内膜上皮细胞及间质细胞中线粒体丰富, 大小形态正常, 线粒体脊清晰可见; 模型组 EMI 处子宫内膜上皮细胞及间质细胞线粒体肿胀、线粒体脊消失, 部分形成线粒体自噬体; 经大黄-桃仁药对治疗后, 子宫内膜上皮细胞及间质细胞线粒体数量增加, 无明显肿胀、线粒体脊清晰可见。

3.2.3 免疫荧光染色观察大黄-桃仁药对治疗前后不同部位 (上皮细胞、间质细胞) 线粒体自噬通路 PINK1、Parkin 蛋白表达的变化 如图 4 所示, PINK1、Parkin 蛋白在各组大鼠子宫内膜肌层交界

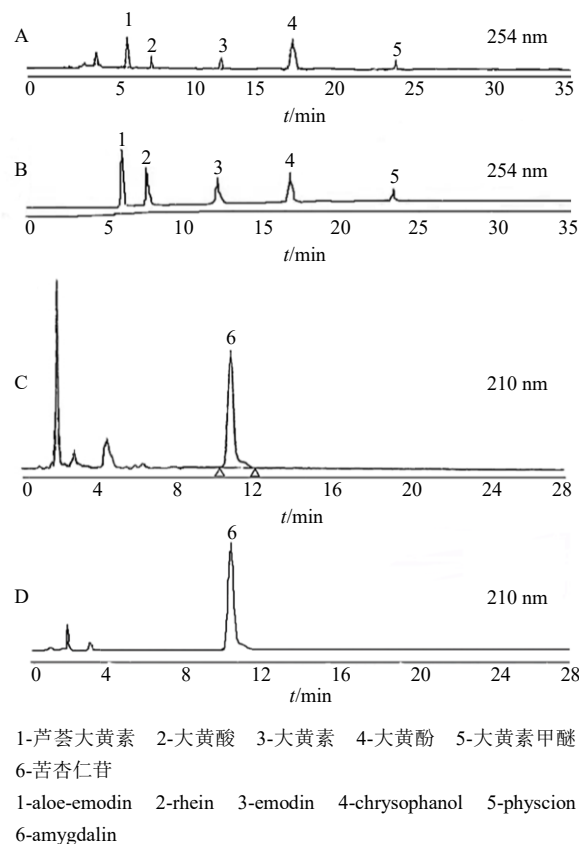
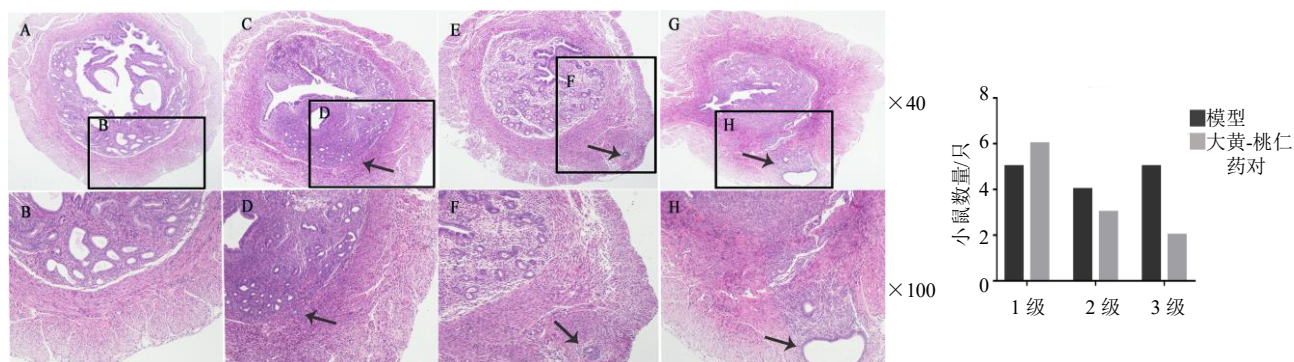


图 1 大黄样品 (A)、混合对照品溶液 (B)、桃仁样品 (C) 和苦杏仁苷对照品 (D) 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprinting of *Rhei Radix et Rhizoma* (A), mixed reference solution (B), *Persicae Semen* (C) and amygdalin reference solution (D)



A、B-正常子宫横切面 箭头指示造模后子宫内膜腺体及间质逐渐浸润入内肌层 (C、D, 1 级)、外肌层 (E、F, 2 级)、浆膜下 (G、H, 腺肌瘤, 3 级), 形成异位灶

A, B-transsections of normal uterus arrows indicated that after modeling, endometrial glands and stroma gradually infiltrated into the inner myometrium (C, D, grade 1), outer myometrium (E, F, 2 grades) and subserosal (G, H, adenomyoma, 3 grade)

图 2 大黄-桃仁药对降低 AM 小鼠子宫组织病理浸润程度

Fig. 2 *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* drug pair reduced uterine histopathological infiltration degree in AM mice

处的在位内膜腺上皮细胞、间质细胞及平滑肌细胞中均有表达。与对照组比较, 造模后子宫内膜层 PINK1 有上调趋势, 经大黄-桃仁药对治疗后,

PINK1 表达显著下降 ($P < 0.001$); Parkin 表达在模型组显著上调 ($P < 0.001$), 经大黄-桃仁药对治疗后, 其表达显著下降 ($P < 0.05$)。

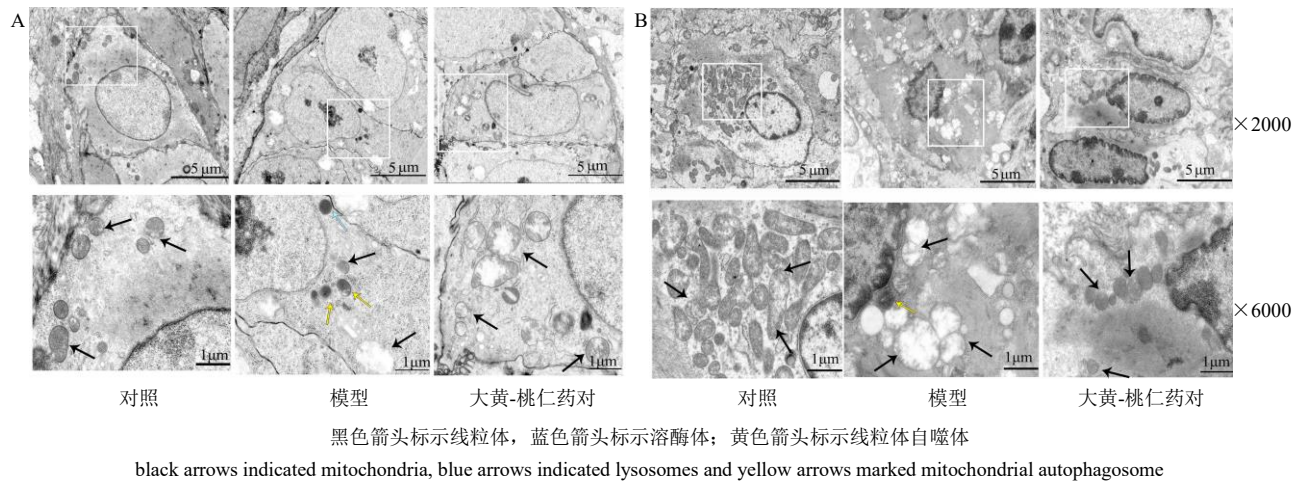
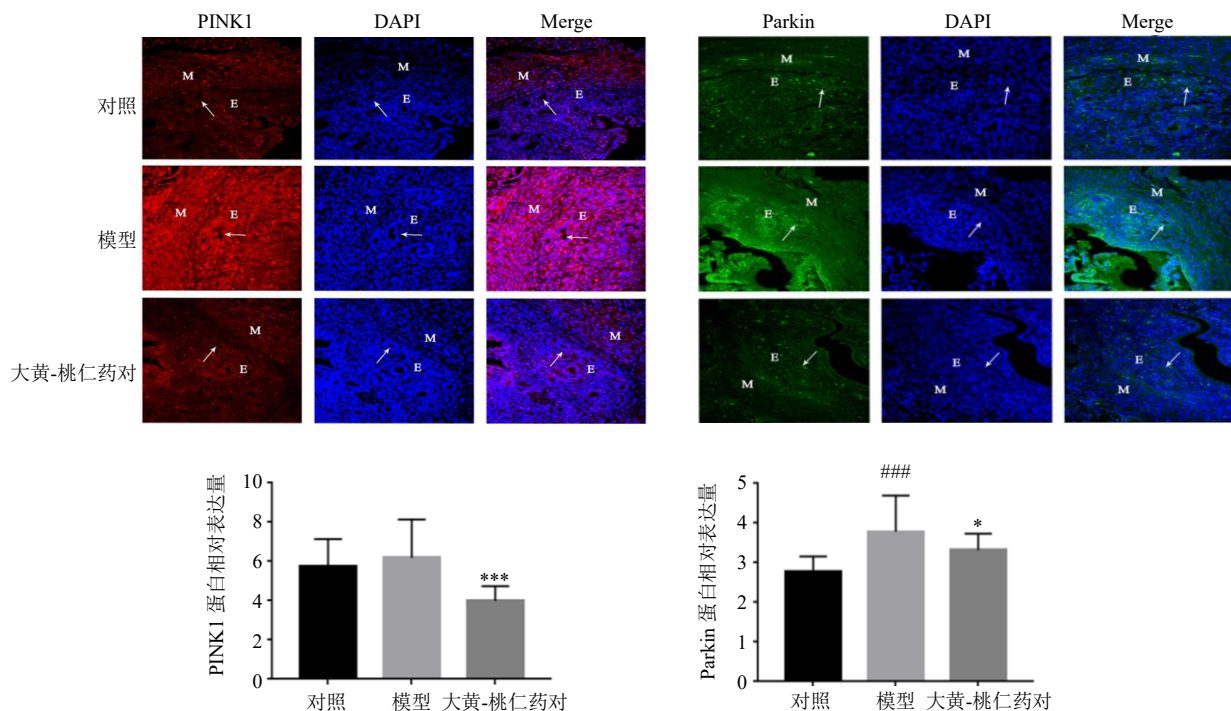


图 3 在位子宫内膜上皮细胞 (A) 和间质细胞 (B) 线粒体超微结构的变化

Fig. 3 Changes in mitochondrial ultrastructure in eutopic endometrial epithelial cells (A) and stromal cells (B)

M 为子宫平滑肌层, E 为子宫内膜层, 箭头为 EMI 处内膜腺体 与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ M is smooth muscle layer, E is endometrial layer, arrows indicate endometrial glands at EMI ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group图 4 EMI 处 PINK1 和 Parkin 蛋白表达 ($\times 200$)Fig. 4 PINK1 and Parkin protein expressions in EMI ($\times 200$)

3.3 体外实验结果

3.3.1 hEM15A 细胞的培养及鉴定 如图 5 所示, 镜下可见大量子宫内膜间质细胞, 呈梭形。对其进行免疫荧光染色, 波形蛋白染色阳性 (红色), 角蛋白染色阴性 (绿色), 细胞纯化率达 90% 以上。

3.3.2 CCK-8 实验 如图 6 所示, hEM15A 细胞增殖能力在大黄-桃仁药对处理 48 h 后显著下降, 并呈剂量相关性。根据 CCK-8 实验结果, 选择 1 mg/mL

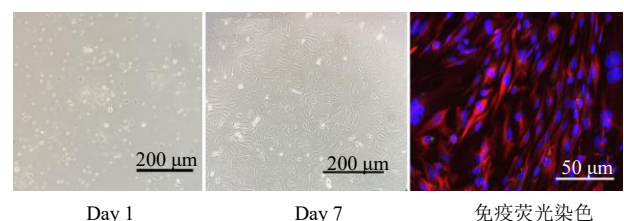


图 5 hEM15A 细胞的培养及鉴定

Fig. 5 Culture and identification of hEM15A cells

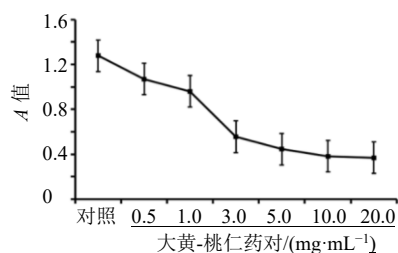


图 6 大黄-桃仁药对对 hEM15A 细胞增殖的影响

Fig. 6 Effect of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* drug pair on proliferation of hEM15A cells

大黄-桃仁药对给药 48 h 进行后续实验。

3.3.3 Transwell 实验检测大黄-桃仁药对处理前后 hEM15A 细胞的侵袭能力 如图 7 所示, 经大黄-桃仁药对处理后, 细胞的侵袭能力显著下降 ($P < 0.05$)。

3.3.4 线粒体膜电位、ROS 及抗氧化酶系的变化 如图 8-A 所示, hEM15A 细胞有部分呈现 JC-1 单体形式, 表示线粒体膜电位下降; 经大黄-桃仁药对处理后, 膜电位升高。如图 8-B 所示, hEM15A 细胞 ROS 呈较高水平, 经大黄-桃仁药对处理后 ROS 水平显著下降 ($P < 0.001$)。如图 8-C 所示, 经大黄-桃仁药对处理后, hEM15A 细胞抗氧化酶系统 (Cu-Zn SOD、Mn SOD、GSH-Px) 活性上调 ($P < 0.01$ 、

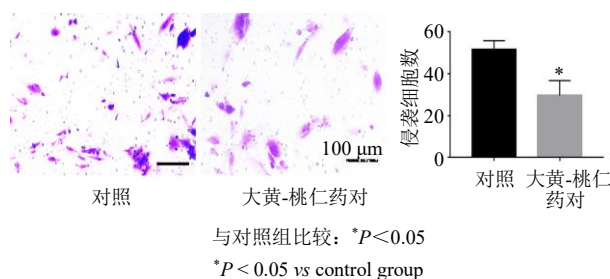
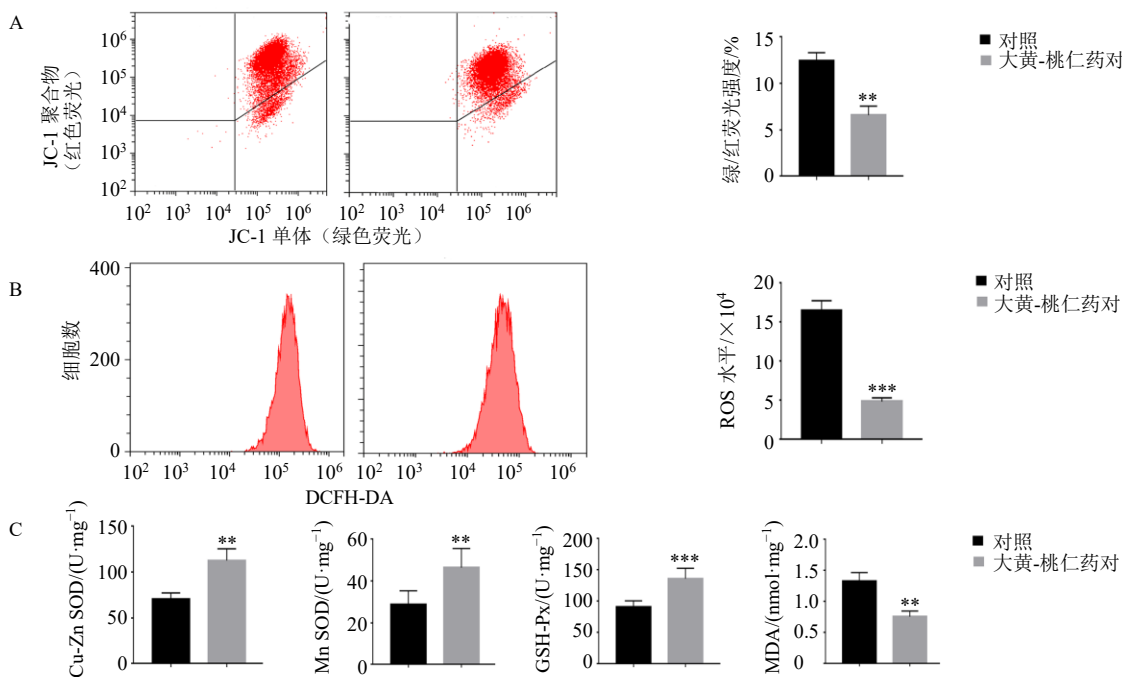


图 7 大黄-桃仁药对抑制 hEM15A 细胞侵袭

Fig. 7 Inhibition effect of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* drug pair on invasion of hEM15A cells

0.001), 氧化损伤指标 MDA 水平下调 ($P < 0.01$)。

3.3.5 免疫荧光双染观察大黄-桃仁药对处理前后 hEM15A 细胞线粒体自噬水平变化 如图 9-A、B 所示, hEM15A 细胞线粒体与溶酶体之间存在较强的共定位关系, 经大黄-桃仁药对处理后, 线粒体与溶酶体共定位的数量显著减少 ($P < 0.05$)。Western blotting 观察大黄-桃仁药对处理前后 hEM15A 细胞 PINK1/Parkin 通路及下游蛋白表达变化 (图 9-C), 结果显示, 经大黄-桃仁药对处理后 PINK1、Parkin 及其下游蛋白 OPTIN、NDP52 显著下调 ($P < 0.01$ 、0.001)。

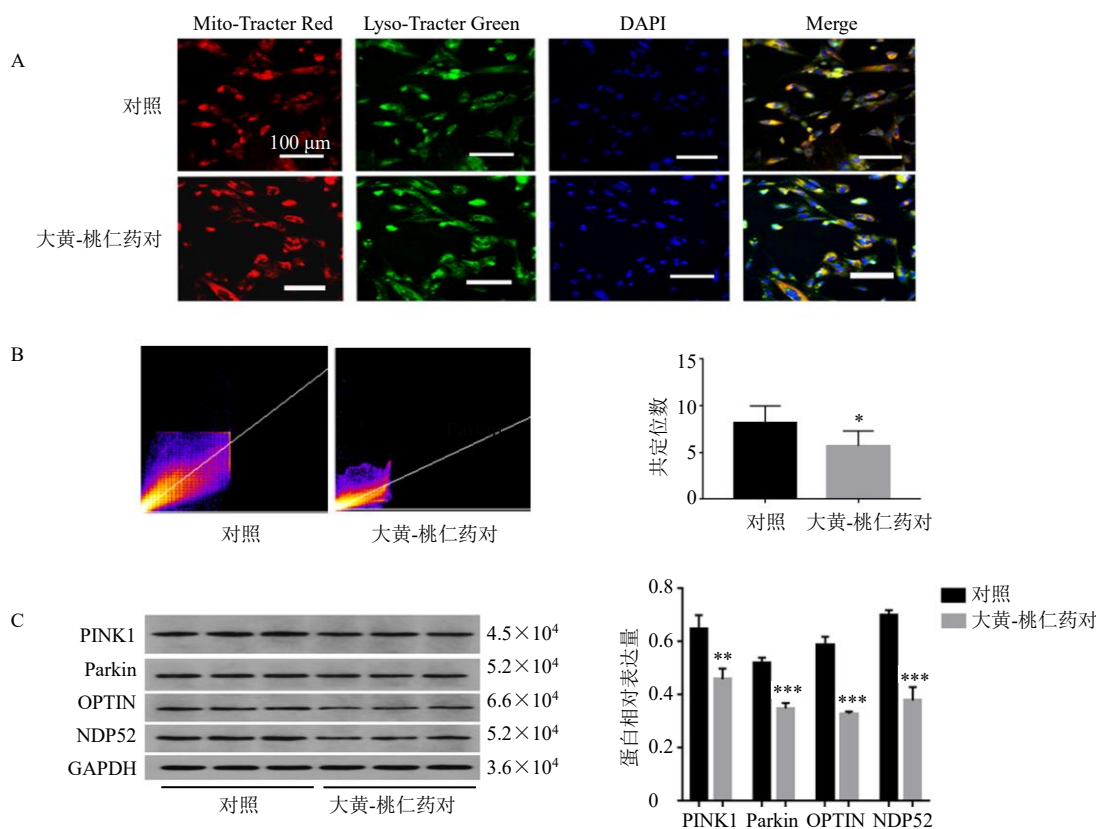


A-JC-1 荧光染色 B-hEM15A 细胞 ROS 水平 C-抗氧化酶系统 Cu-Zn SOD、Mn SOD、GSH-Px 活性及氧化损伤指标 MDA 水平 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

A-fluorescence staining of JC-1 B-ROS level in hEM15A cells C-antioxidant enzyme system Cu-Zn SOD, Mn SOD, GSH-Px activities and oxidative damage indicator MDA level ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 8 hEM15A 细胞线粒体膜电位、ROS 及抗氧化酶系变化

Fig. 8 Mitochondrial membrane potential, ROS and antioxidant enzymes in hEM15A cells



A-免疫荧光双染观察大黄-桃仁药对处理前后 hEM15A 细胞线粒体自噬水平 (红色荧光标记线粒体, 绿色荧光标记溶酶体, 两者共定位黄色荧光为线粒体自噬) B-线粒体-溶酶体共定位散点图 C-线粒体自噬通路相关蛋白表达 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

A-mitophagy level in hEM15A cells before and after treatment with *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* drug pair observed by immunofluorescence double staining (red fluorescence marked mitochondria, green fluorescence marked lysosomes, and two co-localized yellow fluorescence was mitophagy) B-mitochondrial-lysosome body co-localization scatter plot C-mitophagy pathway-related protein expressions * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 9 大黄-桃仁药对对 hEM15A 细胞线粒体自噬的影响

Fig. 9 Effect of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* drug pair on mitophagy in hEM15A cells

4 讨论

AM 临床表现为进行性加重的痛经, 属于中医中“癥瘕”的范畴。中医理论认为, 情志内伤、外邪入侵、体质因素或手术损伤导致气血失和、冲任损伤, 瘀血恶血壅于肌肉, 内结成块而致癥。因此, “瘀血致癥”是 AM 的核心病机环节, 活血化瘀为其基本治疗大法^[11]。化瘀类药物在 AM 治疗中获得高频次选用^[12]。大黄-桃仁药对来源于中医经典活血化瘀方, 桃核承气汤、下瘀血汤、大黄虻虫丸、抵挡丸 (汤)、鳖甲煎丸、大黄牡丹汤均含有该药对。其中, 大黄下瘀血、破癥瘕积聚、推陈出新, 桃仁活血化瘀、润肠通便, 两者同用, 刚柔相济、攻逐瘀血、直下胞宫^[13]。本研究结果显示, 经大黄-桃仁药对治疗的 AM 小鼠病理浸润程度减轻, 中、重度浸润的比例下降。体外实验结果表明, 大黄-桃仁药对可显著抑制 hEM15A 细胞增殖, 并呈剂量相关性。

有研究者指出, 在位内膜的超微结构变化可能对子宫内膜细胞特性起决定作用^[14], 其中, 在位内膜乏氧线粒体损伤导致能量代谢异常是内膜异位发生的重要前提和潜在治疗靶点^[7]。线粒体能量代谢异常, 呼吸链在传递电子过程中发生电子丢失, 可产生 ROS。生理情况下产生的少量 ROS, 可由抗氧化酶系清除。当缺氧等特殊病理状态下时, 线粒体抗氧化酶系 (如 Mn SOD、GSH) 的防御功能减弱, ROS 可持续累积, 造成线粒体 DNA、蛋白质和膜脂质的氧化损伤, 跨膜电位下降, 并可进一步导致线粒体受损、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 合成障碍, 进而形成恶性循环, 形成持续的氧化应激状态。研究表明, ROS 可根据浓度对细胞增殖产生相反的影响^[15], 高浓度的 ROS 可直接诱导肿瘤细胞的死亡, 但在慢性缺氧状态下, 低于肿瘤细胞死亡阈值的亚临床剂量的 ROS 的累积^[16], 可通过

激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等多种信号通路, 增强胰腺癌^[17]、乳腺癌^[18]、淋巴瘤^[19]、涎腺腺样囊性癌^[20]等多种肿瘤细胞的侵袭能力。AM 是一类有肿瘤样恶性增殖能力的疾病, 有研究显示氧化应激与内膜异位的严重程度密切相关, ROS 的特异性产物可作为患者预后评估的指标^[16]。本研究结果显示, AM 在位子宫内层线粒体肿胀、脊消失, 伴随线粒体膜电位下降及 ROS 的异常累积。

目前研究表明, 化瘀类中药可以调控缺氧微环境下线粒体呼吸链酶系及抗氧化酶系, 调控线粒体膜的稳定性, 从而修复受损线粒体, 抑制细胞异常增殖能力。川芎嗪可以通过保护线粒体酶和膜电位, 减少 ROS 产生^[21]; 八珍汤^[22]、大黄酚^[23]等可通过调节线粒体 ROS 合成酶还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamideadenine dinucleotide phosphate, NADPH) 及 ROS 清除酶 SOD、GSH 活性, 直接清除 OH^- 、 O_2^- ; 泽兰^[24]、紫草^[25]、丹皮酚^[26]等能抑制 ROS 诱导的氧化炎症级联反应, 防止线粒体的进一步损伤。含有大黄-桃仁核心药对的中医经典活血化瘀方大黄蛰虫丸可通过调节缺氧应激条件下的线粒体能量代谢^[9]抑制细胞异常侵袭能力^[8]。本研究结果得到相似的结论, 证实化瘀药对大黄-桃仁能够有效改善在位内层间质细胞线粒体膜电位, 减少 ROS 产生, 调控抗氧化酶系, 减少氧化损伤。

线粒体自噬是调控受损线粒体质量的重要机制之一, 可隔离并清除功能失调且具有潜在危险的线粒体, 是维持细胞内环境稳定的关键^[27]。线粒体自噬需要识别受损的线粒体成分, 并将线粒体与溶酶体融合为线粒体吞噬小体^[28]。PINK1 是线粒体损伤的主要探测器, 健康线粒体 PINK1 蛋白含量极低^[29], 去极化的线粒体抑制 PINK1 的降解途径, 导致 PINK1 在线粒体外膜的磷酸化激活及蓄积。激活的 PINK1 介导 Parkin 从胞质转位到损伤的线粒体外膜。Parkin 具有泛素-蛋白连接酶活性^[30], 介导线粒体外膜蛋白的泛素化。自噬受体蛋白 NDP52、OPTIN 等可识别泛素化的线粒体, 同时锚定自噬囊泡膜, 形成线粒体-自噬溶酶体, 最终移除损伤线粒体^[31]。目前对线粒体自噬在子宫内层异位症中的调控存在争议。有研究者认为, 下调线粒体自噬可显著降低子宫内层间质细胞的迁移和存活能力^[32]; 但

另有研究者持相反的看法, 认为激活线粒体自噬通路有助于病变体积、面积和直径的减少^[33]。本研究对 AM 小鼠子宫在位内层细胞的电镜观察发现, 与正常小鼠相比, 无论间质细胞还是腺上皮细胞, 其线粒体数量均显著减少, 线粒体发生了肿胀、线粒体脊消失, 病变线粒体周围溶酶体显著增多, 并可见到线粒体与溶酶体融合的增加。与此同时, AM 模型小鼠 PINK1 和 Parkin 蛋白显著上调。因此推测在 AM 中存在线粒体受损、其形态结构发生异常, 而伴随的线粒体自噬的过度激活, 可使损伤线粒体被清除而不是被修复, 致线粒体数量的减少, 最终发生细胞功能的异常和缺陷。进一步研究发现, 经大黄-桃仁药对治疗后, 线粒体与溶酶体融合的线粒体吞噬小体减少, 线粒体的数量增加, 形态趋于正常, 线粒体双层膜结构及线粒体脊清晰可见。在体外研究中, 发现大黄-桃仁药对可减少线粒体自噬的数量, 并显著下调 PINK1、Parkin、NDP52、OPTIN 蛋白表达, 证实大黄-桃仁药对可介导 PINK1/Parkin 信号通路调控线粒体自噬水平。

综上, 化瘀药对大黄-桃仁可通过改善线粒体抗氧化酶系、调控线粒体自噬水平、恢复线粒体膜电位等多途径减轻 AM 在位内层细胞缺氧线粒体损伤, 下调氧化应激水平, 最终抑制细胞的异常增殖。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Upson K, Missmer S A. Epidemiology of adenomyosis [J]. *Semin Reprod Med*, 2020, 38(2/3): 89-107.
- [2] Yu O, Schulze-Rath R, Grafton J, *et al*. Adenomyosis incidence, prevalence and treatment: United States population-based study 2006-2015 [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2020, 223(1): 94.
- [3] Alcalde A M, Martínez-Zamora M Á, Gracia M, *et al*. Impact of adenomyosis on women's psychological health and work productivity: A comparative cross-sectional study [J]. *J Womens Health*, 2021, 30(11): 1653-1659.
- [4] Vannuccini S, Luisi S, Tosti C, *et al*. Role of medical therapy in the management of uterine adenomyosis [J]. *Fertil Steril*, 2018, 109(3): 398-405.
- [5] Wang H X, Zhang J H, Zhu Q Q, *et al*. Integrating network pharmacology and experimental validation deciphers the mechanism of Guizhi Fuling Wan against adenomyosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6034147.
- [6] 付先芸, 魏绍斌. 子宫腺肌病小鼠血管生成及雌激素效应因子的相互作用机制 [J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2015, 36(6): 883-886.
- [7] Govatati S, Deenadayal M, Shivaji S, *et al*. Mitochondrial

- NADH: Ubiquinone oxidoreductase alterations are associated with endometriosis [J]. *Mitochondrion*, 2013, 13(6): 782-790.
- [8] 李萍, 舒琦瑾. 大黄廑虫丸对 Lewis 肺癌小鼠血管生成的影响及机制 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 175-178.
- [9] 吴丽, 倪子惠, 赵佳好, 等. 大黄 虫丸含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞能量代谢的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(7): 1473-1478.
- [10] Zhang X M, Yuan H, Deng L, *et al.* Evaluation of the efficacy of a danazol-loaded intrauterine contraceptive device on adenomyosis in an ICR mouse model [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(9): 2024-2030.
- [11] 毕映雪. 基于数据挖掘的子宫腺肌病痛经用药规律分析及临床疗效观察 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [12] 王领弟, 李盼盼, 张芳, 等. 基于中医传承辅助平台的中医药治疗子宫腺肌病用药规律分析及研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(3): 742-744.
- [13] 廖姿, 张家琼, 付先芸, 等. 基于网络药理学的“大黄-桃仁”配伍治疗子宫腺肌病的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4112-4119.
- [14] 张颖, 周莉, 王红月, 等. 子宫结合带区肌细胞超微结构特点的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(1): 37-40.
- [15] Vilema-Enriquez G, Arroyo A, Grijalva M, *et al.* Molecular and cellular effects of hydrogen peroxide on human lung cancer cells: Potential therapeutic implications [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1908164.
- [16] 孙博, 申爱荣. 子宫内异位症并不孕患者血清、腹腔液中 8-iso-PGF₂ α 、GSH-PX 的表达 [J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(27): 3936-3938.
- [17] Li W, Ma Z H, Ma J G, *et al.* Hydrogen peroxide mediates hyperglycemia-induced invasive activity via ERK and p38 MAPK in human pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31119-31133.
- [18] Guo J Y, Xu Y, Ji W W, *et al.* Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 234(3): 201-210.
- [19] 于卫华, 周庆彪, 刘颖, 等. 活性氧调控炎症诱发肿瘤机制的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(2): 158-161.
- [20] Chang B Y, Yang H, Jiao Y, *et al.* SOD2 deregulation enhances migration, invasion and has poor prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25918.
- [21] Gong X Z, Ivanov V N, Davidson M M, *et al.* Tetramethylpyrazine (TMP) protects against sodium arsenite-induced nephrotoxicity by suppressing ROS production, mitochondrial dysfunction, pro-inflammatory signaling pathways and programmed cell death [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(7): 1057-1070.
- [22] Song E Q, Fu J L, Xia X M, *et al.* Bazhen Decoction protects against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107405.
- [23] Lin F Q, Zhang C, Chen X Z, *et al.* Chrysophanol affords neuroprotection against microglial activation and free radical-mediated oxidative damage in BV₂ murine microglia [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3): 3447-3455.
- [24] Tsai M H, Lin Z C, Liang C J, *et al.* Eupafolin inhibits PGE₂ production and COX2 expression in LPS-stimulated human dermal fibroblasts by blocking JNK/AP-1 and Nox2/p47(phox) pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 279(2): 240-251.
- [25] Prasad R G, Choi Y H, Kim G Y. Shikonin isolated from *Lithospermum erythrorhizon* downregulates proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV₂ microglial cells by suppressing crosstalk between reactive oxygen species and NF- κ B [J]. *Biomol Ther*, 2015, 23(2): 110-118.
- [26] Lin C, Lin H Y, Chen J H, *et al.* Effects of paeonol on anti-neuroinflammatory responses in microglial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 8844-8860.
- [27] Strack R. A clearer view of mitophagy [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(7): 656.
- [28] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.
- [29] Thomas R E, Andrews L A, Burman J L, *et al.* PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(5): e1004279.
- [30] Harper J W, Ordureau A, Heo J M. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2): 93-108.
- [31] Fu T, Liu J P, Wang Y L, *et al.* Mechanistic insights into the interactions of NAP1 with the SKICH domains of NDP52 and TAX1BP1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(50): E11651-E11660.
- [32] Zhao Q D, Ye M X, Yang W, *et al.* Effect of Mst1 on endometriosis apoptosis and migration: Role of Drp1-related mitochondrial fission and parkin-required mitophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(3): 1172-1190.
- [33] Siracusa R, D'Amico R, Impellizzeri D, *et al.* Autophagy and mitophagy promotion in a rat model of endometriosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5074.

[责任编辑 李亚楠]