

基于 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路探讨桂枝茯苓胶囊-散结镇痛胶囊-宫血宁胶囊联用抑制子宫腺肌病进展的作用机制

王楚矗¹, 王 信², 于敏敏², 王 哲², 曹 涵¹, 师 伟^{2*}, 刘志勇^{2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

摘要: 目的 探究桂枝茯苓胶囊-散结镇痛胶囊-宫血宁胶囊联用 (GSG) 方案对人子宫腺肌病异位内膜衍生细胞 (adenomyosis derived cells, AMDC) 异常增殖的抑制作用, 评价对子宫腺肌病 (adenomyosis, AM) 模型小鼠的改善效果, 并探讨相关分子机制。方法 提取 AMDC 原代细胞并培养, 采用 CCK-8 法检测 GSG 对 AMDC 活力的影响; 采用克隆形成实验、EdU 增殖检测实验确定 GSG 对 AMDC 克隆形成和增殖能力的影响。新生 ICR 小鼠滴喂他莫昔芬制备 AM 模型, 分为对照组、模型组、复方米非司酮 (3.25 mg/kg) 组和 GSG 低、中、高剂量 (0.635、1.270、2.539 g/kg) 组, 给药干预后, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠子宫、肝、脾和肾的形态学改变; 免疫组化法检测子宫组织中磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的表达; 检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平。结果 GSG 能有效抑制 AMDC 活力和克隆形成能力, 并呈剂量相关性抑制 AMDC 增殖能力 ($P < 0.001$)。子宫 HE 染色结果显示, 模型组子宫内膜与肌层边界模糊, 多处腺体深度侵入子宫肌层; GSG 低剂量组边界欠清晰, 有腺体侵入子宫肌层, 浸润深度减轻, 数量减少; 复方米非司酮组和 GSG 中剂量组边界较清晰, 偶见腺体侵入肌层; GSG 高剂量组边界清晰, 少见明显腺体侵入肌层。免疫组化结果表明, 与对照组比较, 模型组子宫组织 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1 α 表达显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 各给药组 p-PI3K、p-Akt 的表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 复方米非司酮组和 GSG 中、高剂量组 HIF-1 α 的表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。各组肝、脾和肾形态学均未见明显改变, 血清 ALT 活性和 BUN 水平无显著性差异。结论 GSG 方案在体内实验中可通过抑制 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路阻断 AM 进展, 所选 GSG 剂量在动物体内未见明显不良反应, 是潜在的 AM 治疗方案。

关键词: 桂枝茯苓胶囊-散结镇痛胶囊-宫血宁胶囊联用; 子宫腺肌病; 子宫腺肌病异位内膜衍生细胞; 增殖; 小鼠模型; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/缺氧诱导因子-1 α 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0842-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.015

Mechanism of Guizhi Fuling Capsules-Sanjie Zhentong Capsules-Gongxue Ning Capsules combination in inhibiting progression of adenomyosis based on PI3K/Akt/HIF-1 α pathway

WANG Chuchu¹, WANG Xin², YU Minmin², WANG Zhe², CAO Han¹, SHI Wei², LIU Zhiyong²

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of Guizhi Fuling Capsules (桂枝茯苓胶囊)-Sanjie Zhentong Capsules (散结镇痛胶囊)-Gongxue Ning Capsules (宫血宁胶囊) combination (GSG) on abnormal proliferation of human adenomyosis-derived cells (AMDC), and evaluate its therapeutic efficacy and mechanism in a mouse model of adenomyosis (AM). **Methods** Primary AMDCs were collected and cultured, cell viability was assessed using CCK-8 assay. The effects of GSG on AMDC colony formation

收稿日期: 2023-10-26

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2022M722000); 泰山学者青年专家项目 (tsqn201909185); 山东省自然联合基金项目 (ZR2023LZY024)

作者简介: 王楚矗, 硕士研究生, 研究方向为妇科常见病、产前产后疾病的中医药防治。E-mail: sdwcc2021@126.com

*通信作者: 刘志勇, 副主任技师, 硕士生导师, 研究方向为子宫腺肌病发病机制及中药治疗药物筛选。E-mail: zhiyonglq@163.com

师 伟, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治妇科痛经与血症。E-mail: sw19781214@163.com

and proliferation capabilities were determined through colony formation and EdU proliferation assays. Neonatal ICR mice were orally administered with tamoxifen to induce AM model and divided into control group, model group, compound mifepristone (3.25 mg/kg) group and GSG low-, medium-, and high-dose (0.635, 1.270, 2.539 g/kg) groups. After drugs intervention, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe morphological changes in uterus, liver, spleen and kidney tissues of mice. Immunohistochemistry (IHC) was employed to detect the expressions of phosphorylated phosphoinositide 3-kinase (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in uterine tissues of mice. Alanine aminotransferase (ALT) activity and blood urea nitrogen (BUN) level in serum were measured. **Results** GSG effectively inhibited the viability and colony formation capacity of AMDCs and showed a dose-dependent inhibition of AMDC proliferation ($P < 0.001$). HE staining results indicated that the boundary between the endometrium and myometrium was unclear in model group, with extensive glandular infiltration into the myometrium. In GSG low-dose group, the boundary was less clear, with glandular infiltration into the myometrium and reduced depth and number of glandular infiltrations. The boundary was relatively clear with occasional glandular infiltration in compound mifepristone group and GSG medium-dose group. In GSG high-dose group, the boundary was clear, and significant glandular infiltration was rare. IHC results showed a significant increase in expressions of p-PI3K, p-Akt and HIF-1 α in model group compared to control group ($P < 0.01, 0.001$). Compared to model group, the expressions of p-PI3K and p-Akt were significantly reduced in each administration group ($P < 0.01, 0.001$), and HIF-1 α expression was significantly reduced in compound mifepristone group and GSG medium-, high-dose groups ($P < 0.05, 0.01$). There were no significant changes in the morphology of liver, spleen and kidney in each group, and there was no significant difference in ALT activity and BUN level in serum. **Conclusion** GSG therapy can blockade of AM progression by inhibiting PI3K/Akt/HIF-1 α pathway in *in vivo* experiments, with the selected GSG dose showing no significant adverse reactions in animals, indicating it is a potential treatment option for AM.

Key words: Guizhi Fuling Capsules-Sanjie Zhentong Capsules-Gongxue Ning Capsules combination; adenomyosis; adenomyosis derived cells; proliferation; mice model; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/hypoxia-inducible factor-1 α pathway

子宫腺肌病 (adenomyosis, AM) 是一种妇科常见疑难病, 以子宫内膜腺体与间质侵入子宫肌层为主要病理特征^[1]。近年来, 越来越多证据表明 AM 的发病率呈逐年上升和年轻化趋势^[2-3]。主要临床症状包括进行性痛经加重、月经量过多及慢性盆腔疼痛等, 可导致不孕并对辅助生殖技术助孕产生不利影响^[4-5], 严重威胁女性身心健康。尽管现代医学采用孕激素、促性腺激素类似物等控制疾病进展^[6], 但也存在明显的不良反应, 且复发率高; 手术切除子宫虽为根治性解决方案, 但难以兼顾女性生育需求。因此, 寻求更加安全有效的 AM 治疗方法是当下亟待解决的问题。

AM 的发病机制十分复杂, 至今尚未完全阐明。AM 虽被归类为良性疾病, 但却表现出与恶性肿瘤相似的异常增殖生长特点。已有报道表明, 与正常内膜细胞相比, AM 异位内膜细胞增殖能力明显增强^[7], 这可能进一步导致子宫内膜-肌层交界区 (endometrial-myometrial interface, EMI) 的不规则增厚并引发功能异常^[8]。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 通路是一个调控细胞增殖等生物过程的重要信号轴^[9], 该通路的异常激活

常在癌症^[10]及炎症损伤相关疾病^[11-12]中被热切关注。同时, 研究表明 p-Akt 与 HIF-1 α 的表达水平在 AM 中也明显上调^[13-15]。提示 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路在 AM 的发生、发展中可能起到关键作用。

与化学药治疗不良反应较大、容易反复相比, 中医治疗 AM 具有其独特的优势, 如控制痛经症状、调经助孕等, 被 2020 年《子宫腺肌病诊治中国专家共识》治疗指南所推荐^[16]。近年来, 中医药疗法在治疗 AM 中展现出独特的优势。AM 在中医古籍中并无病名记载, 可归于“痛经”“癥瘕”“月经过多”等, 以“瘀血阻滞”为主要病机^[17]。本课题组认为, AM 病程长、症状重且缠绵难愈, “久病入络”^[18], 当行通阳化瘀法, 故治以桂枝茯苓胶囊-散结镇痛胶囊-宫血宁胶囊联用 (简称 GSG) 方案, 在临床诊疗中效果较好。因此, 本研究基于 PI3K/Akt/HIF-1 α 信号通路, 探究 GSG 方案对 AM 的改善作用, 并阐释相关分子机制。

1 材料

1.1 AM 患者组织收集

选择 2019 年 6 月在临沂市中心医院接受腹腔镜手术的 AM 患者 1 例, 年龄 42 岁, 术前 3 个月内未进行激素治疗, 于手术室无菌获取 AM 病灶组织。本研究方案已获得山东中医药大学附属医院伦

理委员会的批准(批准号 2019ky061), 遵循赫尔辛基宣言进行, 患者已签署知情同意书。

1.2 动物

7 周龄 SPF 级 ICR 雌鼠 24 只及雄鼠 12 只, 购自维通利华有限公司 [SYXK(鲁)2018-0015], 饲养于山东中医药大学附属医院动物实验中心的 SPF 屏蔽环境, 饲养条件为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的稳定饲养温度, 12 h/12 h 昼夜循环, 常规喂养。动物实验经山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号 AWE-2022-071)。

1.3 药品与试剂

桂枝茯苓胶囊(国药准字 Z10950005, 批号 220914)、散结镇痛胶囊(国药准字 Z20030127, 批号 220909)购自江苏康缘药业股份有限公司; 宫血宁胶囊(国药准字 Z20020087, 批号 ZHC2301)购自云南白药集团股份有限公司; 米非司酮(批号 26593)购自美国 MedChemExpress 公司; 复方米非司酮片(国药准字 H20040365, 批号 07221001)购自武汉九珑人福药业有限责任公司; 他莫昔芬(批号 WXBD7619V)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; DMEM-F12 培养基(批号 F3023N1)、磷酸盐缓冲液(批号 C2123N3)购自中科迈晨(北京)科技有限责任公司; 胎牛血清(批号 TA01501)购自苏州双洙生物科技有限公司; 0.25%胰蛋白酶(批号 J121102)、青链霉素混合液(批号 J121004)购自上海源培生物科技股份有限公司; 4%组织细胞固定液(批号 20191217)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 批号 1130W052)、Triton X-100(批号 304L022)、2.5%结晶紫染色液(批号 202111009)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒(批号 2306001)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测试剂盒(批号 2305001)购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 E-CK-A362)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; kFluor488-Edu 法细胞增殖检测试剂盒(批号 20221114)购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 HADGP)、DAB 显色试剂盒(批号 DUKLY)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 HPHHP)购自山东思科捷生物技术有限公司; p-Akt 抗体(批号 3523071101)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司; p-PI3K 抗体(批号 6)购自美国 CST 公司; HIF-1 α 抗体(批号 10017918)购自美国 Proteintech 公司。

1.4 仪器

Memmert 二氧化碳培养箱(德国 Memmert 公司); 5424R 型高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司); DK-8D 型电热恒温水浴锅(上海比朗仪器制造有限公司); Multiskan Go1510 型酶标仪(美国 Thermo 公司); Axiovert 40 型倒置相差显微镜(德国 Carlzeiss 公司); DHG-9070A 型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); HP30 型自动组织脱水机[达科为(深圳)医疗设备有限公司]; BM450A 型包埋机、BM450 型包埋冷冻台、PH60 型病理组织漂烘仪(常州派斯杰医疗设备有限公司); 531CM-Y43 型轮转式切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 给药溶液的制备

参照药品说明书中的标准临床用量与药物规格, 将桂枝茯苓胶囊、散结镇痛胶囊、宫血宁胶囊以 0.47:0.80:0.13 的比例充分混合, 溶解至 14 mL PBS 中, 以 37°C 、50 Hz 超声振荡 30 min 后, 使用滤菌器滤过, 制成质量浓度为 100 mg/mL 的 GSG 母液。称取米非司酮粉末 25 mg, 溶解于 100 μL 二甲基亚砜中, 制成 250 mg/mL 的米非司酮母液。母液存于 -20°C 长期避光保存, 用前以培养基稀释, 用于体外实验。

按人与小鼠体表面积比值换算法计算不同给药组各药剂量, GSG 的 1/2、1、2 倍临床剂量相当于 0.635、1.270、2.539 g/kg, 复方米非司酮的 1 倍临床剂量相当于 3.25 mg/kg。根据各组剂量, 将桂枝茯苓胶囊、散结镇痛胶囊、宫血宁胶囊按比例充分混合后溶解于生理盐水中, 复方米非司酮片溶解至生理盐水中^[19], 用于体内实验。

2.2 体外实验

2.2.1 原代细胞提取及培养 取 AM 患者新鲜子宫组织, 剪切至 1 mm³ 大小, 利用胶原酶 IV 在 37°C 下消化 4 h, 期间每隔 10 min 振荡混匀 1 次, 至组织呈乳糜状, 先后使用 70 μm 和 40 μm 的过滤器滤过, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀后使用 PBS 清洗, 再次离心后加入含 10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的 DMEM/F12 完全培养基, 置于 37°C 、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。参照 Suzuki-Kakisaka 等^[20]方法对原代细胞进行表型鉴定, 确定为 AM 异位内膜衍生细胞(adenomyosis derived cells, AMDC)。取 3~10 代原代培养细胞用于后续实验。

2.2.2 CCK-8 法检测细胞活力 AMDC 以 3.5×10^3

个/孔接种至 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 后, 加入不同质量浓度 (1、2、4、8、16 mg/mL) 的 GSG 溶液或不同质量浓度 (12.89、25.78、51.55、103.10、206.20 μ g/mL) 的米非司酮, 对照组加入不含药物的培养基, 每组设置 3 个复孔。干预 48 h 后, 更换为含 10% CCK-8 试剂的完全培养基, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 2 h, 采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (A) 值。通过 GraphPad Prism 9 软件对数据进行统计分析, 计算药物处理 AMDC 后的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50})。

2.2.3 克隆形成实验 AMDC 以 2×10^3 个/孔接种至 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后, 分别加入不同质量浓度 (0.2、0.4、0.8 mg/mL) 的 GSG 溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 置于培养箱中继续培养, 每 3 天换液 1 次, 10 d 后终止培养。使用 4% 组织细胞固定液固定细胞 30 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 冲洗 2 次, 待干燥后拍照并计数。

2.2.4 EdU 法检测细胞增殖能力 AMDC 以 2×10^5 个/孔接种至 24 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后, 分别加入不同质量浓度 (0.4、0.8、1.6 mg/mL) 的 GSG 溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 干预 48 h 后终止培养, 按照试剂盒说明书加入 $2 \times$ EdU 工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 弃去培养基, 使用 4% 组织细胞固定液、0.5% Triton X-100 固定及通透, 以 3% BSA 冲洗 2 次, 每次 5 min, 加入 Click 反应液均匀覆盖各孔底部, 避光孵育 30 min。再次以 3% BSA 冲洗 2 次, 每次 5 min, PBS 冲洗 5 min, 加入 Hoechst 33342 溶液, 避光孵育 10 min, 吸出后以 PBS 冲洗 2 次, 每次 5 min, 最后进行荧光拍照。

2.3 AM 发病机制的生信分析

2.3.1 AM 数据集检索及差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 分析 从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/#>) 中检索 “adenomyosis”、种属为 “homo sapiens”、表达类型为 “expression profiling by array” 的数据集。通过 GEO2R 在线分析网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 对 DEGs 进行归一化与差异分析, 获取满足 $P < 0.05$ 、 $|\log_2 FC| > 1$ 的 DEGs。利用 R 4.2.1 软件 ggplot2 包对差异结果进行可视化。

2.3.2 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 对获取的 DEGs 进行 ID 转换, 导入 R 4.2.1 软件 clusterProfiler

包进行 GO 和 KEGG 富集分析, 利用 ggplot2 包对结果进行可视化。

2.4 体内实验

2.4.1 动物造模、分组与给药 ICR 小鼠适应性饲养 1 周后, 以雌雄为 2:1 的比例合笼饲养, 获取新生雌性 ICR 小鼠 48 只, 通过随机法将小鼠分为对照组、模型组、复方米非司酮 (3.25 mg/kg) 组和 GSG 低、中、高剂量 (0.635、1.270、2.539 g/kg) 组, 每组 8 只。对照组小鼠于出生第 2~5 天滴喂 5 μ L/g 的花生油-卵磷脂-炼乳混合液 (2:0.2:3), 每天 1 次。除对照组外, 其余小鼠于出生第 2~5 天滴喂 5 μ L/g 花生油-卵磷脂-炼乳 + 2.7 μ mol/kg 他莫昔芬, 每天 1 次。造模后常规饲养 90 d, 各给药组小鼠每日 ig 100 μ L 给药溶液, 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 连续干预 30 d。小鼠 ip 150 mg/kg 戊巴比妥钠处死, 获取子宫、肝、脾、肾组织和血液样本, 置于 4% 组织细胞固定液中固定过夜。

2.4.2 HE 染色观察子宫及肝脾肾病理形态 将经固定的各组小鼠子宫、肝、脾、肾组织脱水包埋, 放入切片机中切片, 将切片展开并黏附于载玻片上, 晾干。对切片进行脱蜡水化, 苏木素染色 20 s、伊红复染 30 s 并流水冲洗, 再对切片进行脱水透明处理, 用封片剂封片, 对切片进行镜下观察与拍照, 子宫组织切片以 20、40 倍镜分别拍摄, 肝、脾、肾组织切片均以 20 倍镜拍摄。请经验丰富的病理科于敏敏医师对切片的形态学改变情况进行判断。

2.4.3 免疫组化检测子宫组织中 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1 α 蛋白表达 将子宫组织切片进行脱蜡水化, 再通过内源性过氧化物酶封闭液封闭去除内源性过氧化物酶。将切片置于稀释后的柠檬酸钠抗原修复液中, 95 $^{\circ}$ C 水浴条件下修复 25 min, 用山羊血清封闭液封闭 30 min, 滴加一抗孵育过夜 (p-Akt 抗体稀释比为 1:150、p-PI3K 抗体稀释比为 1:100、HIF-1 α 抗体稀释比为 1:200), 滴加二抗孵育 40 min (稀释比为 1:200), 加入 DAB 工作液后根据显微镜下观察的情况终止显色。苏木素染色液复染 30 s, 进行脱水透明处理后封片, 观察 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1 α 免疫组化染色情况。使用 Image J 软件 IHC Profiler 插件根据染色强度与染色面积统计阳性面积比。

2.4.4 血清 ALT 活性和 BUN 含量的检测 取各组小鼠血液, 3 200 r/min 离心 15 min 后, 获得上清液, 按照试剂盒说明书测定 ALT 活性和 BUN 含量。

2.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据采用 One-way ANOVA 分析。

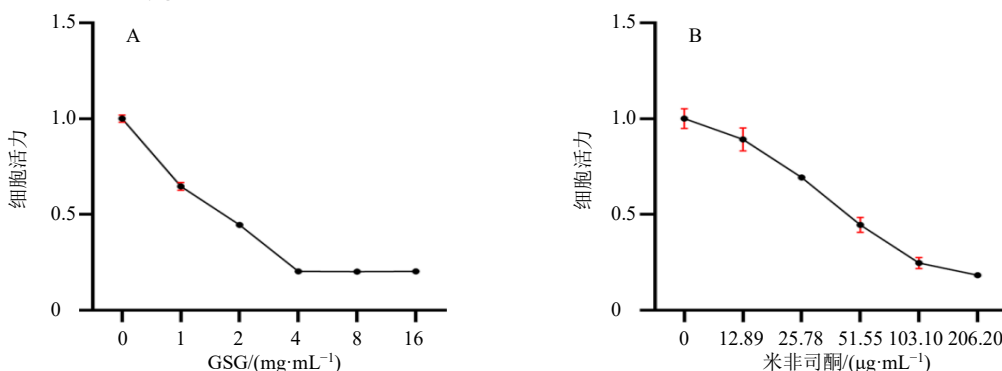
3 结果

3.1 体外实验

3.1.1 GSG 和米非司酮对 AMDC 活力的影响 为探究细胞对药物的敏感性, 利用梯度质量浓度的 GSG 溶液及阳性对照药米非司酮分别干预 AMDC 48 h 后, 采用 CCK-8 法对细胞活力进行检测。如图 1 所示, GSG 和米非司酮均能有效抑制 AMDC 活力, GSG 和米非司酮的 IC_{50} 值分别为 (1.59 ± 0.04) mg/mL、 (47.94 ± 2.73) μ g/mL, 表明 GSG 对 AMDC

活力的具有较强的抑制作用。因此, 后续采用梯度质量浓度 (0.4、0.8、1.6 mg/mL) 的 GSG 溶液处理 AMDC, 检测相关指标改变。

3.1.2 GSG 抑制 AMDC 的克隆形成能力 AM 具有恶性肿瘤的特征, 利用克隆形成实验检测 GSG 对 AMDC 克隆能力的影响。由于以 1.6 mg/mL 的 GSG 溶液干预细胞后无法产生细胞团, 故以梯度质量浓度 (0.2、0.4、0.8 mg/mL) 的 GSG 溶液干预 AMDC 10 d, 4%组织细胞固定液固定染色后晾干, 拍照并统计各孔内细胞数量 > 50 个的细胞团数量。如图 2 所示, 与对照组比较, GSG (0.4、0.8 mg/mL) 组细胞克隆形成数目均显著降低 ($P < 0.001$), 表明 GSG 能够有效抑制 AMDC 的克隆形成能力。

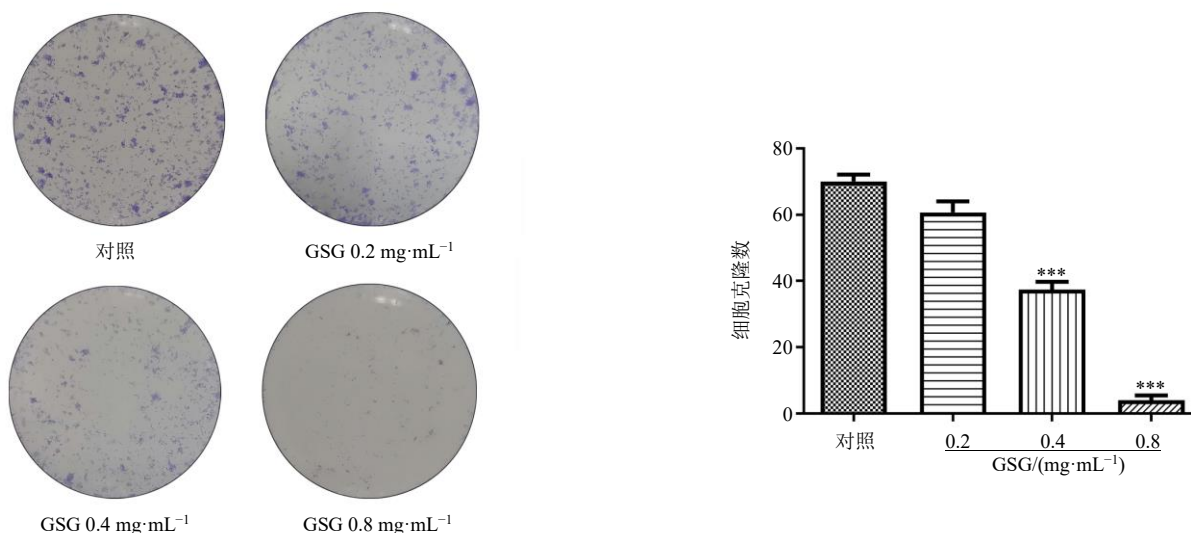


GSG-桂枝茯苓胶囊-散结镇痛胶囊-宫血宁胶囊, 下图同。

GSG-Guizhi Fuling Capsules-Sanjie Zhentong Capsules-Gongxue Ning Capsules, same as below figures.

图 1 GSG (A) 和米非司酮 (B) 对 AMDC 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of GSG (A) and mifepristone (B) on viability of AMDC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$, 图 3 同。

*** $P < 0.001$ vs control group, same as fig. 3.

图 2 GSG 抑制 AMDC 的克隆形成能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 GSG inhibits clonal formation ability of AMDC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.1.3 GSG 抑制 AMDC 的增殖能力 克隆形成与细胞增殖密切相关，为了更直观地评估药物对 AMDC 增殖能力的影响，采用 EdU 增殖检测试剂盒检测 GSG 对 AMDC 增殖能力的影响。以梯度质量浓度的 GSG 溶液干预 AMDC 48 h 后，使用 EdU 工作液孵育处理 2 h，4% 组织细胞固定液固定染色，检测其在 2 h 内的细胞增殖情况。如图 3 所示，与对照组比较，GSG (0.4、0.8、1.6 mg/mL) 组细胞增殖率显著降低 ($P < 0.001$)，表明 GSG 对 AMDC

增殖能力具有较强的抑制作用。

3.2 AM 发病机制的生信分析

为探究 AM 发病相关分子机制，在 GEO 数据库中获取鉴定 AMDEGs 的数据集 GSE68870 (包括 4 个 AM 组织样本和 4 个正常组织样本)。通过 GEO2R 在线分析网站对本数据集包含的 70 523 个基因进行归一化及差异分析，共获得来自 GSE68870 数据集的 266 个 DEGs，其中包括 111 个上调基因和 155 个下调基因 (图 4-A)。

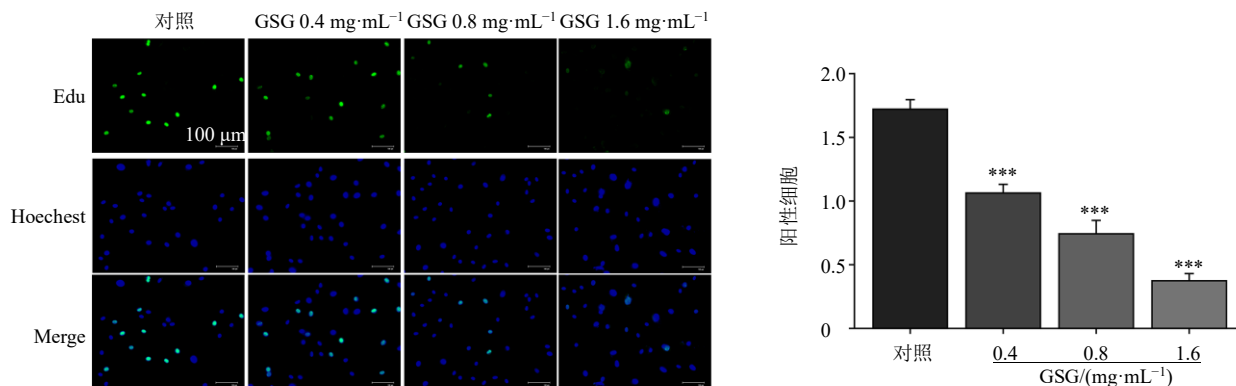
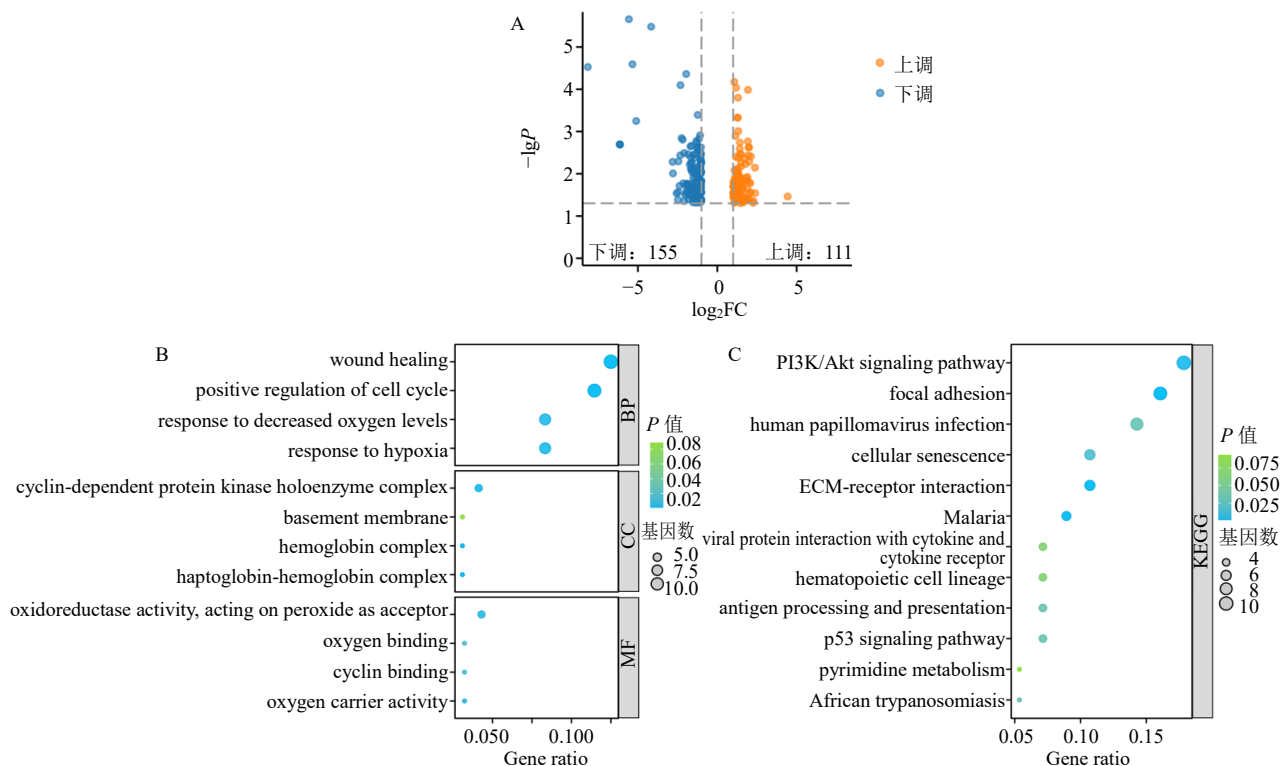


图 3 GSG 抑制 AMDC 的增殖能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 GSG inhibits proliferation ability of AMDC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-GSE68870 数据集 DEGs 的火山图; B-GO 功能富集分析; C-KEGG 通路富集分析。

A-volcano plot of DEGs from GSE68870 dataset; B-GO function enrichment analysis; C-KEGG pathway enrichment analysis.

图 4 AM 发病机制的生信分析

Fig. 4 Bioinformatics analysis of pathogenesis of AM

基于 DEGs 在疾病的起源与进展中扮演重要角色, 进一步分析了其主要影响的生物学过程及信号通路。对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 结果显示, 缺氧反应相关条目在 GO 分析中富集 (图 4-B), PI3K/Akt 信号通路则在 KEGG 分析中富集 (图 4-C)。已有报道表明, AM 异位内膜组织中可能存在缺氧环境, 并促进疾病进展, 引起异常增殖^[21], PI3K/Akt 信号通路在 AM 异位内膜细胞增殖中发挥重要作用, 并且低氧环境中 HIF-1 α 稳定表达, 是 PI3K/Akt 通路下游重要的调控因子^[22], 并对缺氧环境做出应答^[23]。以上结果提示 PI3K/Akt 通路介导的 HIF-1 α 激活是缺氧环境下 AM 异位内膜细胞异常增殖的驱动因素。因此, 进一步通过体内实验验证 GSG 方案是否通过该通路发挥作用。

3.3 体内实验

3.3.1 GSG 改善 AM 小鼠模型中腺体向肌层侵袭
基于 AM 是以子宫内壁的腺体、间质侵入肌层为病理特征性疾病, 利用滴喂他莫昔芬法构建小鼠 AM 模型, 采用 HE 染色法观察各组小鼠子宫的病理学改变。如图 5 所示, 对照组小鼠子宫内壁与肌层边界清晰, 无子宫内壁腺体与间质侵入子宫肌层表现; 模型组小鼠子宫内壁与肌层边界模糊, 可见多处子宫内壁腺体与间质侵入肌层深部, 腺体增多; GSG 低剂量组子宫内壁与肌层边界欠清晰, 可见子宫内壁腺体与间质侵入肌层, 较模型组浸润深度减轻、数量较少; 复方米非司酮组和 GSG 中剂量组子宫内壁与肌层边界较清晰, 偶见腺体与间质侵入肌层, 较模型组浸润深度明显减轻、数量减少; GSG 高剂量组子宫内壁与肌层边界清晰, 肌层连续, 少见明显子宫内壁腺体与间质侵入肌层。表明 GSG 能够改善 AM 的病理进展, 以高剂量组改善效果最为明显, 子宫肌层结构恢复最接近对照组, 腺体侵入肌层数量明显减少; GSG 中剂量组和复方米非司酮组改善效果相似, 即中剂量的 GSG 与米非司酮药效基本相同。

3.3.2 GSG 抑制 AM 小鼠模型子宫组织中 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1 α 的表达
生信分析结果提示 PI3K/Akt 通路及 HIF-1 α 表达与 AM 发病密切相关, 采用免疫组化法检测各组小鼠子宫组织中 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1 α 的表达, 如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠子宫组织中 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1 α 表达水平显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 各给药组子宫组织 p-PI3K、p-Akt 表达均显著降低

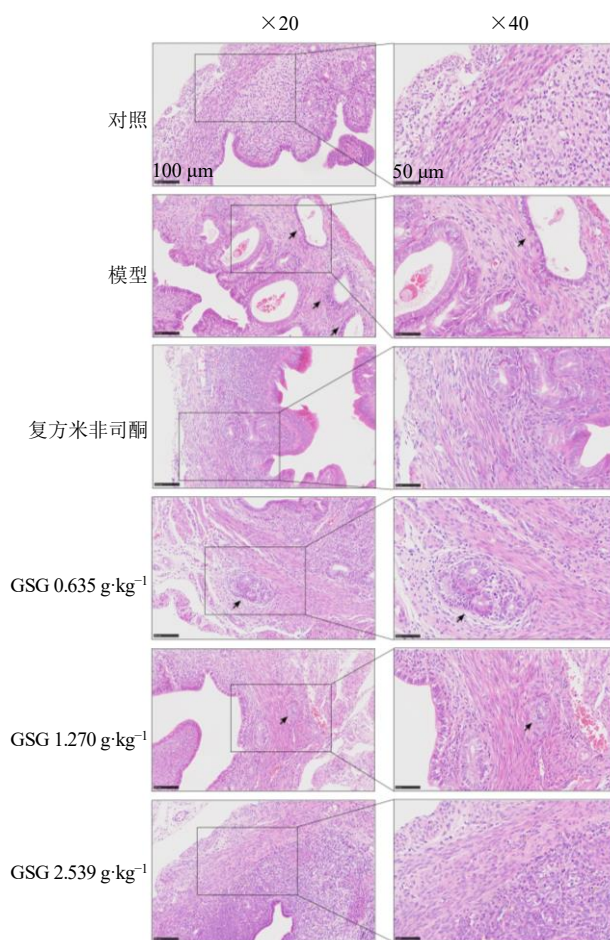


图 5 各组小鼠子宫组织 HE 染色

Fig. 5 HE staining of uterine tissue of mice in each group

($P < 0.01$ 、 0.001), 复方米非司酮组和 GSG 中、高剂量组 HIF-1 α 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。综合以上结果, GSG 能够降低 AM 小鼠子宫组织中 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1 α 的表达, 抑制 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路。

3.3.3 GSG 对 AM 模型小鼠肝、脾、肾组织病理变化的影响
为观察 GSG 对肝、脾和肾组织是否具有损伤性, 采用 HE 染色观察各组小鼠肝、脾和肾组织的形态学改变。如图 7 所示, 各组小鼠肝、脾和肾组织病理形态均未见明显改变, 表明 GSG 处理未引起 AM 模型小鼠肝、脾和肾的病理学变化。

3.3.4 GSG 对 AM 模型小鼠血清 ALT 活性和 BUN 水平的影响
ALT 是一种指示肝功能的常规指标, 其活性升高提示肝功能受损。BUN 是由肾脏排出的代谢废物, 其水平升高通常提示肾功能异常。如图 8 所示, 各给药组血清 ALT 活性和 BUN 水平无统计学差异, 表明 GSG 处理未引起 AM 模型小鼠明显肝、肾功能损伤。

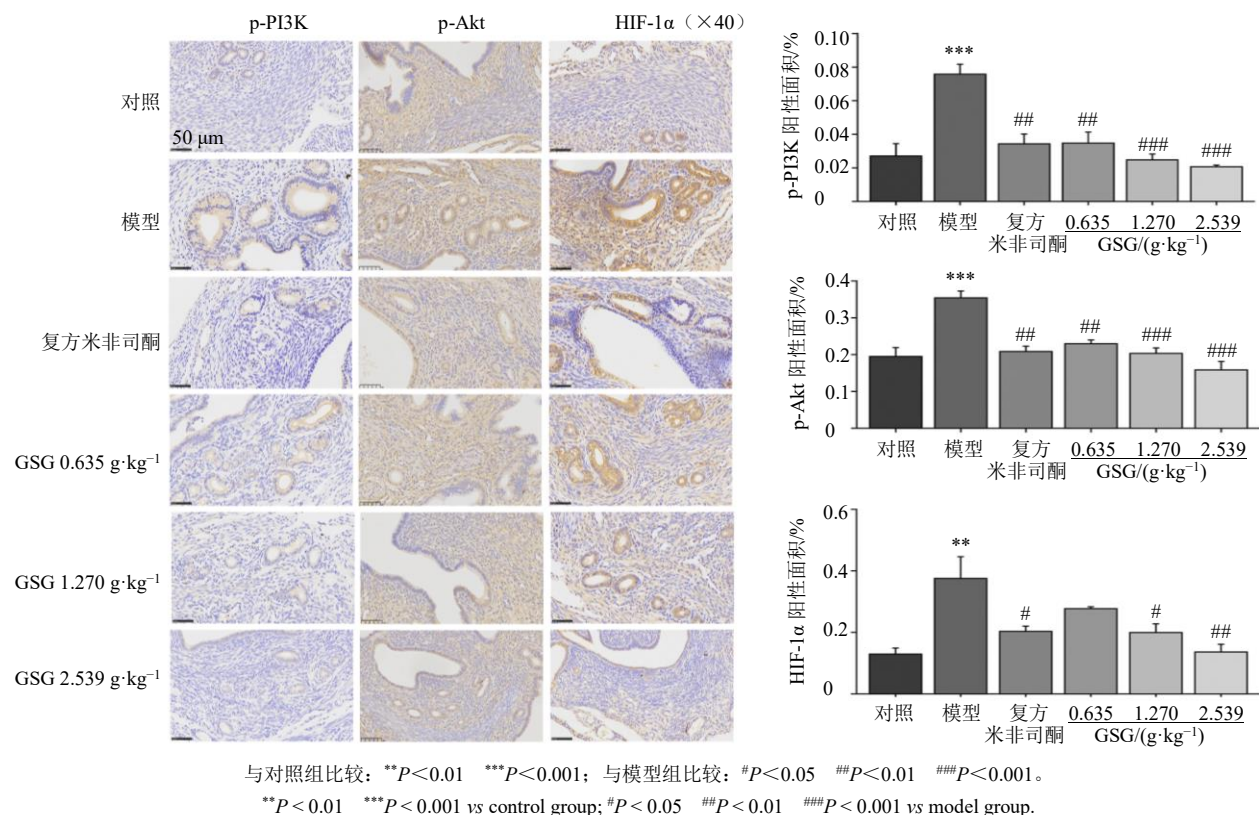


图 6 免疫组化检测各组小鼠子宫组织中 p-PI3K、p-Akt 和 HIF-1α 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 p-PI3K, p-Akt and HIF-1α expressions in uterine tissue of mice in each group by immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

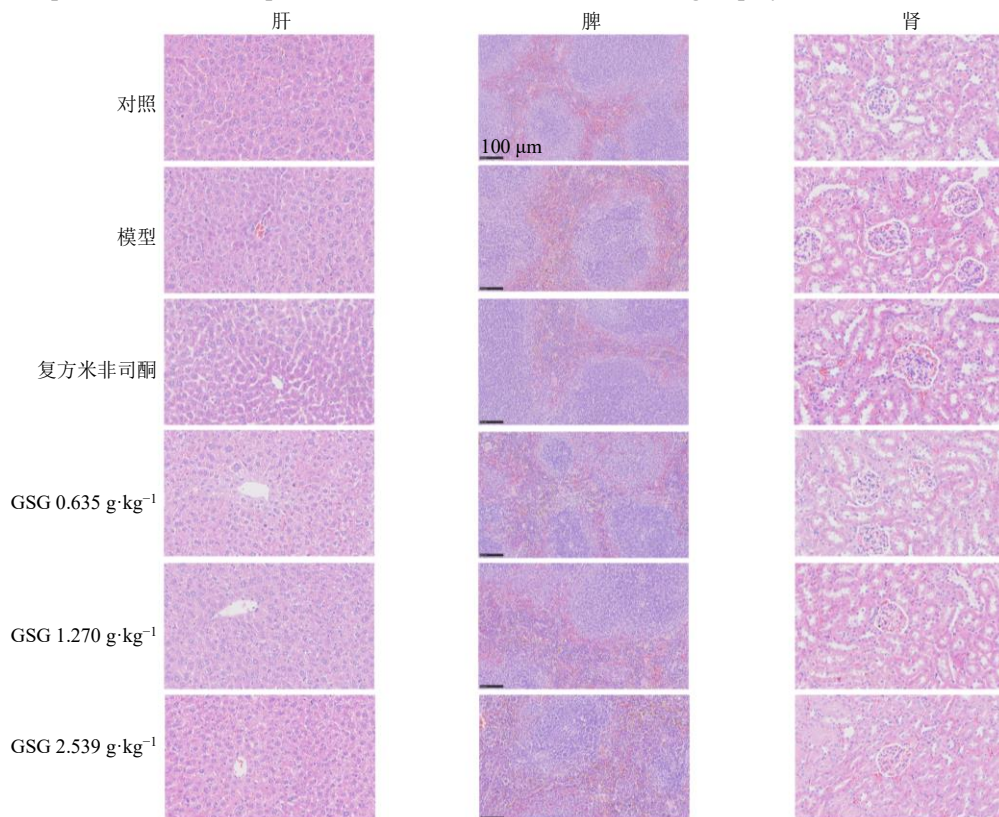


图 7 各组小鼠肝、脾和肾组织 HE 染色 (×20)

Fig. 7 HE staining of liver, spleen and kidney tissues of mice in each group (×20)

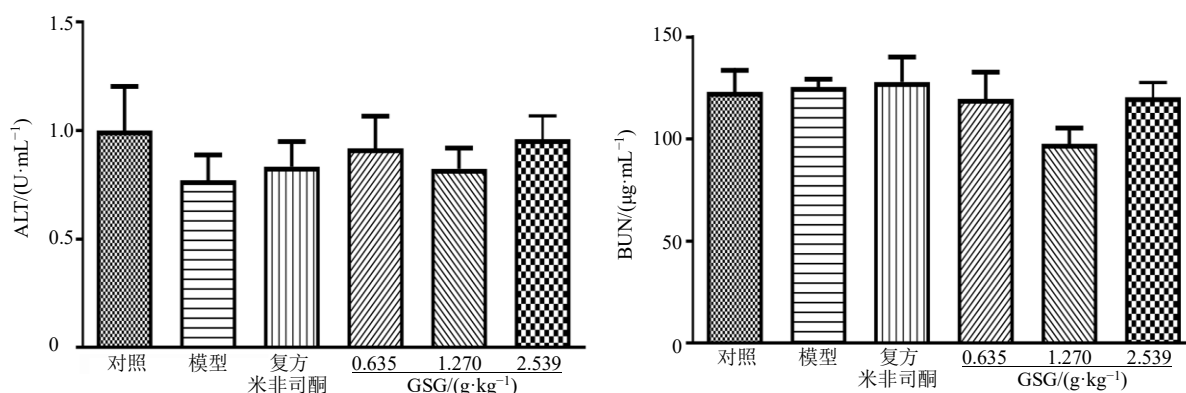


图 8 GSG 对 AM 模型小鼠血清 ALT 活性和 BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 8 Effect of GSG on ALT activity and BUN level in serum of AM model mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

AM 是一种易反复的妇科常见疑难病,严重影响患者生活质量。近年来,随着生育需求的增加,现有医学方法难以同时满足 AM 患者的症状控制与生育问题。然而,中医药在改善症状、调经助孕方面显示出潜在优势,中成药因应用便捷和对控制症状的积极效果广泛应用于临床。《中成药治疗痛经临床应用指南(2021 年)》^[24]明确推荐,在 AM 的治疗中,桂枝茯苓胶囊可以缩小异位病灶,散结镇痛胶囊可缓解痛经、降低复发率。《宫血宁胶囊妇产科临床应用指导建议》^[25]也明确指出宫血宁胶囊能够减少异常子宫出血患者的出血量。此 3 药针对 AM 的症状各有所长,且有研究表明,中成药联用可打破单用的局限性,减毒增效,更贴合中医辨证论治的特点^[26]。本课题组常以 GSG 方案用于临床,收效甚佳,但其作用机制尚不明确,故本研究结合体内外实验对此展开深入探讨。

在中医理论中,AM 的主要病理因素为“瘀血”。《临证指南医案》曰:“初为气结在经,久则血伤入络”,气滞血停,久病入络,瘀血胶着阻滞络脉,则易积聚为癥瘕,缠绵难愈^[27]。故以“通阳化瘀”法通利络脉、祛瘀消癥,治以 GSG 方案。桂枝茯苓胶囊源于经方桂枝茯苓丸,是治疗“癥瘕”的基础用方。其中桂枝温经通阳,可以辛散之性引诸药于营卫络脉之中;茯苓甘淡,利水渗湿;桃仁辛润入络、丹皮辛寒入血、赤芍苦平除血痹,三者入络消癥、清热凉血;诸药合用可通阳化瘀、清热利湿。散结镇痛胶囊药简力繁,其中血竭味咸,可入络搜邪,破癥祛瘀止痛;三七通脉行瘀,和营止血;浙贝、薏苡仁清热散结,通利络脉;诸药合用可破癥祛瘀、化痰散结。宫血宁胶囊由重楼单味药组成,长于清

热解毒、散肿止痛、化瘀止血^[28]。现代药理研究表明,重楼还具有抗肿瘤、抗菌消炎、抗病毒、止痛镇痛的作用^[29]。GSG 方案基于消癥化瘀,以辛散温通之品引诸药入络,直达病所,同时避免苦寒之品凝滞气血,多药协同,辨证灵活。

子宫内膜腺体与间质异位并侵入肌层是 AM 的病理基础,异位内膜细胞的异常增殖可加重 AM 进展^[30]。Xu 等^[31]研究显示,槲皮素可以通过抑制子宫异位内膜基质细胞的增殖能力,影响细胞迁移与侵袭能力,进而改善 AM。因此,抑制异位内膜细胞增殖是干预 AM 发生过程的重要措施。本研究发现,GSG 可抑制 AMDC 活力,0.8 mg/mL GSG 溶液可有效抑制 AMDC 克隆形成和增殖能力。

在表观遗传学研究中,疾病的 DEGs 富集情况常指示疾病潜在的分子机制。本研究对 AM 的 DEGs 进行分析后发现,GO 分析中与缺氧相关的条目被富集,这与 AM 组织中可能存在缺氧微环境相一致,PI3K/Akt 信号通路则富集在 KEGG 分析中。PI3K 作为脂质激酶家族成员^[32],可以通过诱导磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2)向磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP3)的转化进而促进 Akt 磷酸化,介导下游重要效应因子的表达^[33-34],进而调节细胞增殖。研究提出,在 AM 发生过程中,异位内膜细胞的快速增殖与炎症反应的发生通常导致了氧气快速消耗并造成组织缺血缺氧状态^[35]。此时,具有调节多种细胞功能能力的 PI3K/Akt 通路可通过调节促进或抑制细胞凋亡的相关蛋白参与对缺血缺氧状态的抗性反应,并诱导 HIF-1 α 表达,进一步诱导下游蛋白表达,促进细胞发生适应性改变。在缺氧条件下,AM 异位内膜中

的 HIF-1 α 与 p-Akt 表达增加, 且 p-Akt 表达峰值早于 HIF-1 α ^[35]。因此, PI3K/Akt/HIF-1 α 通路是参与 AM 发生发展的重要通路。

基于 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路在 AM 中的重要作用, 本研究进行了 GSG 的体内实验研究, 以评估药物在真实生理环境中的治疗效果。结果表明, 在子宫病理学形态改变上, 低、中、高剂量的 GSG 均能减轻 AM 病灶腺体浸润深度, 减少腺体数量, 且中剂量的 GSG 与米非司酮显示出大致相同的疗效。同时发现, GSG 可降低子宫组织中 p-Akt、p-PI3K 和 HIF-1 α 蛋白表达, 显示出对 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路的下调作用。提示 GSG 对 AM 小鼠的改善作用可能与抑制 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路相关。而中剂量的 GSG 和米非司酮之所以能够达到相似的疗效, 可能是由于两药通过影响不同的生物学过程, 但导致了相似的治疗结果。米非司酮作为孕激素受体拮抗剂, 可阻断孕酮, 抑制腺体分泌, 缩小病灶, 并改善临床症状^[36]。而中剂量的 GSG 可能是通过 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路抑制 AMDC 增殖、减轻腺体和间质侵入肌层的倾向从而改善 AM。这也说明 AM 的发病机制具有多样性和复杂性, 不同的治疗方法间可能存在协同作用。

桂枝茯苓胶囊-散结镇痛胶囊-宫血宁胶囊联用中的 3 种中成药分别经安全性分析, 显示总体安全性较好^[37-39]。鉴于联合用药可能增加肝、肾损伤风险, 本研究进行了体内实验以对 GSG 方案进行药物安全性评估。研究发现, AM 小鼠经 GSG 连续干预 30 d 后, 各组肝、脾和肾形态学均未见明显改变, 血清 ALT 活性和 BUN 水平无显著性差异。即使在 2.539 g/kg 药物剂量下, 即相当于 2 倍人的临床用量, 在动物体内也未见明显不良反应, 这些初步结果提示, GSG 方案是安全的治疗选择。但目前研究仅集中于体外及动物实验中, 尚未进行广泛的临床试验, 接下来可将联用方案进行临床研究拓展, 以验证其安全性与有效性。

综上, GSG 方案可能通过抑制 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路来降低 AMDC 增殖, 阻断 AM 模型小鼠疾病进展, 且不良反应有限, 提示其是针对 AM 临床治疗的潜在可用方案。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 吴晚英. 子宫腺肌病的临床诊疗研究进展 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2023, 10(6): 36-39.

[2] Upson K, Missmer S A. Epidemiology of adenomyosis [J]. *Semin Reprod Med*, 2020, 38(2/3): 89-107.

[3] Mishra I, Melo P, Easter C, *et al.* Prevalence of adenomyosis in women with subfertility: Systematic review and meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2023, 62(1): 23-41.

[4] 叶荣慧, 何雪梅, 邓冰冰, 等. 子宫腺肌病相关性不孕的发病机制及治疗进展 [J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(12): 918-922.

[5] García-Solares J, Donnez J, Donnez O, *et al.* Pathogenesis of uterine adenomyosis: Invagination or metaplasia? [J]. *Fertil Steril*, 2018, 109(3): 371-379.

[6] 彭超, 周应芳. 子宫腺肌病的药物治疗进展 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2022, 60(7): 20-25.

[7] 徐小云, 刘发英, 万磊. 子宫腺肌病原代内膜间质细胞培养及功能学鉴定 [J]. 中国现代医生, 2021, 59(3): 32-37.

[8] Brosens J J, de Souza N M, Barker F G. Uterine junctional zone: Function and disease [J]. *Lancet*, 1995, 346(8974): 558-560.

[9] 刘帅, 孙佳琪, 朱启森, 等. BPA 通过 PI3K/AKT 通路对细胞增殖、迁移及凋亡的研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2022, 36(5): 460-463.

[10] Mazurakova A, Koklesova L, Csizmar S H, *et al.* Significance of flavonoids targeting PI3K/Akt/HIF-1 α signaling pathway in therapy-resistant cancer cells—A potential contribution to the predictive, preventive, and personalized medicine [J]. *J Adv Res*, 2024, 55: 103-118.

[11] Wei Y C, Hong H M, Zhang X Q, *et al.* Salidroside inhibits inflammation through PI3K/Akt/HIF signaling after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Inflammation*, 2017, 40(4): 1297-1309.

[12] Yu Z P, Yu H Q, Li J, *et al.* Troxerutin attenuates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced oxidative stress and inflammation by enhancing the PI3K/AKT/HIF-1 α signaling pathway in H9C2 cardiomyocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 1351-1361.

[13] 刘姝, 张辉, 赵兴波, 等. 子宫腺肌病中 PTEN 和 Akt 的表达及其相关性研究 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(10): 86-90.

[14] Goteri G, Lucarini G, Montik N, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), and microvessel density in endometrial tissue in women with adenomyosis [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2009, 28(2): 157-163.

[15] 薛源, 林雪艳, 徐歌, 等. 低氧诱导因子-1 α 在子宫内膜异位症患者血清中的表达和对在位子宫内膜间质细

- 胞上皮-间质转化的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2021, 59(2): 41-47.
- [16] 中国医师协会妇产科医师分会子宫内膜异位症专业委员会. 子宫腺肌病诊治中国专家共识 [J]. 中华妇产科杂志, 2020, 55(6): 376-383.
- [17] 谈勇. 中医妇科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019: 635.
- [18] 王新, 王雁飞, 刁翰林, 等. 从“久病入络”理论辨治子宫腺肌病探微 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(6): 729-732.
- [19] 林益, 李咏倩, 齐聪, 等. 米非司酮致胚胎着床障碍动物模型的再评价 [J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(5): 650-656.
- [20] Suzuki-Kakisaka H, Murakami T, Hirano T, *et al.* Effects of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid on cultured human adenomyosis-derived cells [J]. *Fertil Steril*, 2007, 87(1): 33-38.
- [21] Guo S W. The pathogenesis of adenomyosis vis-à-vis endometriosis [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2): 485.
- [22] 曹俊岩, 张帆, 曾莉, 等. 更年汤含药血清对大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2200-2206.
- [23] Semenza G L. Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(4): 207-214.
- [24] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗痛经临床应用指南 (2021 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(12): 1413-1425.
- [25] 陈蓉, 贺丰杰, 李长忠, 等. 宫血宁胶囊妇产科临床应用指导建议 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 33(4): 383-384.
- [26] 李澄, 李盼盼, 张芳, 等. 中成药在子宫腺肌病治疗中的应用研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41(12): 2973-2977.
- [27] 温雅轩, 柳红芳, 蒋威, 等. 基于“络病理论”探讨藤类药在糖尿病肾病中的应用 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(23): 156-159.
- [28] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 117-118.
- [29] 张勇, 骆亮生, 储华健, 等. 重楼在抗肿瘤等方面的研究进展 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(9): 38-39.
- [30] Bazot M, Daraï E. Role of transvaginal sonography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of uterine adenomyosis [J]. *Fertil Steril*, 2018, 109(3): 389-397.
- [31] Xu W B, Song Y Z, Li K H, *et al.* Quercetin inhibits adenomyosis by attenuating cell proliferation, migration and invasion of ectopic endometrial stromal cells [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2020, 14: 3815-3826.
- [32] Fruman D A, Meyers R E, Cantley L C. Phosphoinositide kinases [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 481-507.
- [33] Fresno Vara J A, Casado E, de Castro J, *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2): 193-204.
- [34] Zhang F J, Ding T T, Yu L N, *et al.* Dexmedetomidine protects against oxygen-glucose deprivation-induced injury through the I₂ imidazoline receptor-PI3K/AKT pathway in rat C6 glioma cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(1): 120-127.
- [35] Zhang Z, Yao L, Yang J H, *et al.* PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (review) [J]. *Mol Med Report*, 2018, 18(4): 3547-3554.
- [36] 赵锦丽. 不同剂量米非司酮治疗子宫腺肌病伴痛经效果及不良反应发生率比较 [J]. 慢性病学杂志, 2017, 18(6): 700-701.
- [37] 李亚, 菅晓霞, 郝晏云. 吲哚美辛、布洛芬联合桂枝茯苓胶囊治疗卵巢囊肿的效果及安全性 [J]. 临床医学工程, 2022, 29(12): 1683-1684.
- [38] 胡昭怡. 散结镇痛胶囊与米非司酮治疗子宫内膜异位症的疗效对比分析 [J]. 吉林医学, 2010, 31(2): 167-168.
- [39] 盛妮妮. 宫血宁治疗上环术后月经过多的临床效果及安全性观察 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2020, 7(14): 2.

[责任编辑 李亚楠]