

紫草素通过调节 ERK 信号通路对子宫肌瘤大鼠的影响

王芳芳*, 燕飞虎, 李伟, 王燕, 况鹏娟
(海南省肿瘤医院, 海口 570100)

[摘要] 目的:探讨紫草素对子宫肌瘤大鼠的作用及其分子机制。方法:SPF级别SD大鼠60只,雌性,体质量200~250 g,随机分为空白组、模型组、紫草素低、中、高剂量组(5, 10, 20 mg·kg⁻¹)和米非司酮组;建立子宫肌瘤大鼠模型,连续给药4周后检测子宫湿重、子宫系数和平滑肌厚度的变化;采用苏木素-伊红(HE)染色观察子宫组织的病理染色变化;采用酶联免疫吸附测定试验(ELISA)检测血清和子宫中雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测子宫组织中ER, PR, 磷酸化细胞外调节激酶(p-ERK)和ERK的蛋白水平。结果:与空白组比较,模型组大鼠的子宫湿重、子宫系数和平滑肌厚度显著升高($P<0.01$);子宫发生畸变,平滑肌细胞局灶性坏死和增生,且伴有中性粒细胞浸润等病理变化;血清ER和PR含量显著升高($P<0.01$);子宫组织ER, PR和p-ERK的蛋白表达升高($P<0.01$)。与模型组比较,紫草素中剂量组、高剂量组和米非司酮组大鼠的子宫湿重、子宫系数和平滑肌厚度显著降低($P<0.01$);子宫病理变化缓解,且血清ER和PR含量降低,子宫组织ER, PR和p-ERK的蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。紫草素低剂量组较模型组大鼠子宫湿重、平滑肌层厚度、血清中ER水平,子宫组织PR和p-ERK蛋白表达水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。结论:紫草素可能通过抑制ERK信号活化,从而产生抗子宫肌瘤活性。

[关键词] 紫草素; 子宫肌瘤; 细胞外调节激酶(ERK)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)21-0131-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212194

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210906.1637.001.html>

[网络出版日期] 2021-09-06 17:52

Shikonin Affects Uterine Leiomyoma in Rats by Regulating ERK Signaling Pathway

WANG Fang-fang*, YAN Fei-hu, LI Wei, WANG Yan, KUANG Peng-juan
(Hainan Tumor Hospital, Haikou 570100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of shikonin on uterine leiomyoma in rats and its molecular mechanism. **Method:** Sixty female SD rats, of SPF grade and weighing 200-250 g, were randomly divided into the control group, model group, low-, medium-, and high-dose (5, 10, 20 mg·kg⁻¹) shikonin groups, and mifepristone group. A rat model of uterine leiomyoma was established, and the changes in uterine wet weight, uterine coefficient, and smooth muscle thickness were detected after drug administration for four successive weeks. The pathological changes in uterine tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The contents of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in serum and uterus were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expression levels of ER, PR, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), and ERK in the uterine tissue were assayed by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the model group exhibited significantly increased uterine wet weight, uterine coefficient, and smooth muscle thickness ($P<0.01$), uterus deformity, focal smooth muscle cell necrosis and hyperplasia, neutrophil infiltration. elevated serum and uterine ER and PR ($P<0.01$), and up-regulated p-ERK protein expression in the uterine tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, shikonin

[收稿日期] 20210426(006)

[基金项目] 海南省自然科学基金项目(813265)

[通信作者] *王芳芳, 硕士, 从事中西妇科基础与临床研究, Tel: 0898-68686405, E-mail: yeaaa152@163.com

at the middle and high doses and mifepristone significantly reduced the uterine wet weight, uterine coefficient, and smooth muscle thickness ($P<0.01$), relieved the pathological changes in uterus, and lowered serum and uterine ER and PR, and down-regulated the p-ERK protein expression in the uterine tissue ($P<0.05$). In addition, the uterine wet weight, smooth muscle thickness, serum ER, and uterine PR and p-ERK protein expression in the low-dose shikonin group were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion:** Shikonin produces the anti-uterine leiomyoma activity possibly by inhibiting the activation of ERK pathway.

[Keywords] shikonin; uterine leiomyoma; extracellular signal-regulated kinase(ERK) signaling pathway

子宫肌瘤(UL)又称子宫平滑肌瘤,是一种常见的良性平滑肌肿瘤^[1]。临床症状主要表现为下腹部疼痛、坠胀及子宫异常出血,能够引起膀胱与肠功能障碍和不育,严重威胁女性的健康,对社会造成严重的经济负担^[2]。目前,手术干预是子宫肌瘤的标准和最有效的治疗方法,但子宫切除术的风险和成本较高,尤其是对于希望保持生育能力的女性而言^[3]。因此,开发有效且非手术的治疗策略是女性医疗保健的重要需求。中医理论认为子宫肌瘤属有形之实邪,围绝经期合并子宫肌瘤者,证结胞中,肾水已亏,肝火偏旺,治疗应遵“五旬经水未断者,应断其经水,症结自缩”的原则,宜攻补兼施,治以清肝益肾,软坚消瘤。

紫草消瘤断经汤具有平肝清热、消瘤防癌之效,其君药紫草具有凉血活血,清热解毒,透疹之功效,临床配伍多种药材组成方剂用于治疗宫颈癌和阴道癌等妇科癌症,并且具有雌激素拮抗活性。紫草素是传统中药紫草的主要活性成分,具有广泛的生物学活性,尤其是抗癌活性^[4]。紫草素对多种癌症具有很强的抗肿瘤活性,包括白血病、胃肠癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌及泌尿生殖系统癌症等,且涉及机制主要包括抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和抑制细胞迁移与侵袭^[5-7]。近期报道,紫草素通过抑制蛋白激酶B(Akt)信号通路来促进自噬,并通过调节雄激素受体来抑制人前列腺癌细胞的生长^[8-10]。另外,紫草素还可以抑制微管蛋白,将癌细胞阻滞在G₂/M期,发挥抗癌活性^[11]。紫草素可以抑制卵巢癌细胞SKOV3增殖,暗示着抗卵巢癌活性,并且紫草素通过活化凋亡信号通路抑制了乳腺癌细胞增殖^[12-13]。上述这些说明紫草素具有广谱的抗肿瘤活性,但紫草素对子宫肌瘤的研究鲜有报道。

子宫肌瘤的发展与机体激素变化密切相关,主要包括雌激素与孕激素,雌激素可以刺激子宫平滑肌细胞,参与子宫肌瘤的病理过程。另外,孕激素在与雌激素共同调节作用下,共同促进女性第二性

特征发育和成熟,与子宫肌瘤的发展密切相关。细胞外调节激酶(ERK)作为一种胞质蛋白,与子宫平滑肌细胞的增殖密切相关,研究表明紫草素可以抑制ERK信号活化来诱导细胞凋亡,并抑制肿瘤细胞黏附侵袭和增殖^[7]。上述这些暗示着紫草素可能具有抗子宫肌瘤的活性,并与ERK信号及激素介导的子宫平滑肌细胞异常有关。因此,本文通过复制子宫肌瘤大鼠模型,连续4周给予药物干预研究,通过比对空白组和模型组的变化来证明模型复制的成功与否。另外,比较模型组与紫草素干预组来表明紫草素的治疗效果,分析其对子宫肌瘤大鼠ERK信号的影响,并探讨了作用机制,为临床治疗子宫肌瘤提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 SPF级别SD大鼠60只,生产许可证号SCXK(琼)2020-0007,许可证号SYXK(琼)2017-0013,雌性,体质量200~250 g,随机分为空白组,模型组,紫草素低、中、高剂量组(5, 10, 20 mg·kg⁻¹),阳性药(米非司酮)组,每组10只。所有动物试验均经过海南省肿瘤医院单位动物伦理委员会的同意和批准,批号SY2020198。

1.2 试剂 大鼠孕激素受体(PR),大鼠雌激素受体(ER)酶联免疫吸附测定试验(ELISA)试剂盒(美国BG公司,批号分别为E02P0090, E02P0025); Loading buffer(5×),苏木素-伊红(HE)试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0015L, C0105S);磷酸化细胞外调节激酶(p-ERK), ERK, PR, ER, β -肌动蛋白(β -actin)一抗抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(IG)二抗抗体(美国CST公司,批号分别为#4370, #4695, #3172, #8644, #4970, #7074);紫草素,米非司酮(阿拉丁生化科技有限公司,批号分别为S115193, M126999);苯甲酸雌二醇注射液(天津金耀药业有限公司,国药准字H12020529, 5 g·L⁻¹);黄体酮注射液(天津金耀氨基酸有限公司,国药准字

H12020534, 10 g·L⁻¹)。

1.3 仪器 小型垂直电泳仪,小型湿转印槽(美国伯乐公司);pfm3004M型轮转式切片机[达科为(深圳)医疗设备有限公司];BX53型奥林巴斯显微镜(日本奥林巴斯);Varioskan LUX多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);聚偏佛乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司)。

1.4 造模方法 参照既往文献操作步骤造模^[14-15],将大鼠随机分为空白组和模型组,空白组10只,模型组50只,模型组大鼠腹腔注射苯甲酸雌二醇0.5 mg·kg⁻¹,每天1次,连续30 d,腹腔注射黄体酮注射液4 mg·kg⁻¹,每周1次,给药前5 d,两种激素同时注射。同时,空白组腹腔注射等体积生理盐水。空白组随机挑选5只,模型组随机挑选25只,取材,通过比较子宫湿重,子宫系数等形态学变化,HE病理染色关节及血清中ER和PR含量,模型组大鼠表现为子宫湿重和系数增加,并且出现子宫平滑肌细胞增厚,另外血清中ER和PR含量升高,综合判断模型建立成功。

1.5 药物干预 将模型建立成功的大鼠随机分为模型组、紫草素低、中、高剂量组和米非司酮组($n=5$)。紫草素给药剂量参考既往研究文献^[16],每天灌胃给药紫草素5, 10, 20 mg·kg⁻¹,连续4周,阳性空白组灌胃给予米非司酮1 mg·kg⁻¹,空白组和模型组均给予等体积生理盐水。

1.6 形态学检测 给药结束后,大鼠腹主动脉取血,脱颈椎处死,解剖分离大鼠子宫组织,称取子宫质量即子宫湿质量;子宫系数=子宫湿质量(mg)/大鼠体质量(g)。取子宫组织置于4%多聚甲醛中固定24 h,石蜡包埋,切片,染色,封片,光镜观察,计算子宫平滑肌的厚度。

1.7 HE染色观察大鼠子宫组织病理学改变 将大鼠子宫组织石蜡切片,进行HE染色,采用光学显微镜观察子宫组织的病理形态学变化。按以下标准评分:①炎性细胞浸润,无炎细胞浸润记为0分,少量记为1分,黏膜固有层有少量或灶状、达肌层记为2分,多数散在或层状浸润、并累及全层记为3分;②子宫壁层平滑肌厚薄,无明显变化记为0分,轻度弥漫性增生记为1分,在上述基础上局部增厚,致肌层厚薄不一记为2分,多处平滑肌增生、致宫壁高度厚薄不一,严重时伸入固有层或子宫系膜区的记为3分。

1.8 ELISA检测大鼠血清PR, ER水平 采用ELISA试剂盒,根据说明书检测大鼠血清中PR和

ER的水平。

1.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测子宫组织中PR, ER, p-ERK, ERK蛋白表达水平 分离收集实验大鼠的子宫组织,采用Western blot检测子宫组织中PR, ER, p-ERK和ERK的蛋白表达水平。根据说明操作提取组织总蛋白,采用BCA法对蛋白进行定量,加入Loading buffer(5×)于100 °C煮沸5 min,然后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳来达到分离蛋白的目的,电泳条件为80 V, 30 min; 120 V, 60 min。随后采用100 V, 90 min将电泳分离后的蛋白转移至聚偏佛乙烯(PVDF)膜,用5% BSA封闭60 min, TBST洗涤5次, 5 min/次,用一抗(PR, ER, p-ERK, ERK及 β -actin, 1:1 000)4 °C孵育过夜, TBST洗涤5次, 5 min/次,用二抗(HRP标记山羊抗兔IG, 1:1万)孵育90 min, TBST洗涤5次, 5 min/次,用ECL化学发光法显影检测, Image J分析灰度值。

1.10 统计学方法 所有数据均采用GraphPad Prism 5.0软件分析,用One-Way ANOVA进行多组数据的检验,所有计量资料结果表示为 $\bar{x}\pm s$,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫湿重、子宫系数和平滑肌层厚度的影响 形态学检测结果表明,与空白组比较,模型组大鼠的子宫湿重、子宫系数和子宫平滑肌层厚度均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,米非司酮组的大鼠子宫湿重、子宫系数和子宫平滑肌层厚度显著降低($P<0.01$),紫草素中剂量组和高剂量组的大鼠子宫湿重、子宫系数和子宫平滑肌层厚度显著降低($P<0.01$),紫草素低剂量组子宫湿重、平滑肌层厚度明显降低($P<0.05$)。见表1。

2.2 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织病理学的影响 HE病理染色结果显示,空白组大鼠子宫平滑肌细胞交错成束整齐排列,平滑肌细胞呈纺锤形,细胞核均匀分布;模型组大鼠子宫发生畸变,平滑肌细胞局灶性坏死和增生,且伴有中性粒细胞浸润;紫草素低剂量组子宫平滑肌细胞坏死减少;紫草素中剂量组子宫平滑肌细胞呈纺锤形均匀整齐分布,但还是存在部分增生和坏死;紫草素高剂量和米非司酮组子宫平滑肌细胞呈纺锤形均匀整齐分布,中性粒细胞浸润减少。与空白组比较,模型组大鼠子宫组织的病理评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,紫草素各剂量组及米非司酮组大鼠

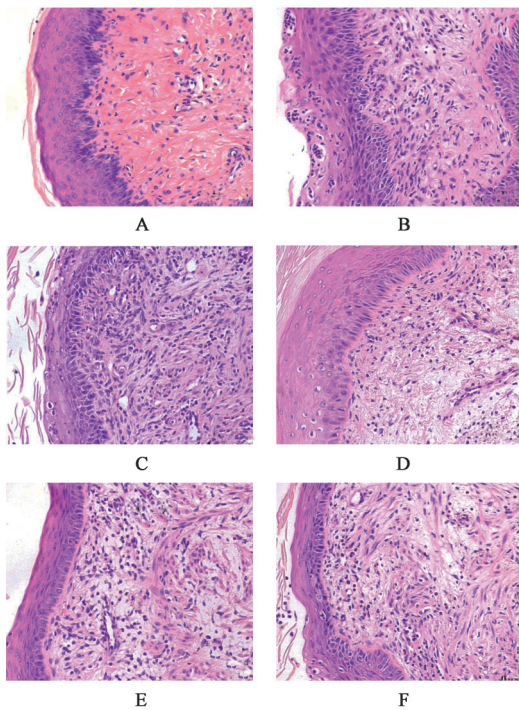
表1 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫湿重、子宫系数和平滑肌层厚度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Effect of shikonin on uterine wet weight, uterine coefficient and smooth muscle layer thickness in rats with uterine fibroids ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	子宫湿质量/ g	子宫系数/ ×10 ⁻³	平滑肌层厚度/ μm
空白		0.53±0.03	1.71±0.08	165.4±9.52
模型		0.70±0.12 ¹⁾	2.27±0.05 ¹⁾	233.9±12.55 ¹⁾
紫草素	5	0.65±0.02 ²⁾	2.09±0.11	212.3±11.64 ²⁾
	10	0.63±0.08 ³⁾	2.02±0.10 ³⁾	202.5±11.34 ³⁾
	20	0.53±0.02 ³⁾	1.73±0.12 ³⁾	195.5±9.64 ³⁾
米非司酮	1	0.54±0.01 ³⁾	1.75±0.10 ³⁾	192.2±9.83 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表3,4同)。

子宫组织的病理评分显著降低($P<0.01$)。见图1,表2。



A. 空白组;B. 模型组;C~E. 紫草素低、中、高剂量组;F. 米非司酮组(图2,3同)

图1 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织病理学的影响(HE,×40)

Fig. 1 Effect of shikonin on histopathology of uterine fibroids model rats (HE,×40)

2.3 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠血清中ER和PR的影响 ELISA结果表明,与空白组比较,模型组大鼠血清中ER和PR的含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,紫草素中、高剂量组及米非司酮组大

表2 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织的病理评分 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of shikonin on pathological scoring of uterine tissue in uterine fibroids model rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	病理评分/分
空白		0.33±0.14
模型		2.83±0.11 ¹⁾
紫草素	5	1.83±0.16 ²⁾
	10	1.75±0.13 ²⁾
	20	1.33±0.14 ²⁾
米非司酮	1	1.67±0.14 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表5同)。

鼠血清中ER和PR的含量显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);紫草素低剂量组大鼠血清中ER水平明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠血清中ER和PR水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of shikonin on levels of ER and PR in serum of rats with uterine fibroids ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ER	PR
空白		600.9±49.41	290.8±27.34
模型		1 001.0±37.23 ¹⁾	423.2±22.18 ¹⁾
紫草素	5	905.2±42.54 ²⁾	376.3±30.12
	10	731.4±46.01 ³⁾	354.2±26.66 ³⁾
	20	673.4±39.38 ³⁾	317.3±25.38 ³⁾
米非司酮	1	664.7±56.80 ³⁾	308.6±24.49 ³⁾

2.4 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织中ER和PR蛋白表达的影响 Western blot结果表明,与空白组比较,模型组大鼠子宫组织中ER和PR的蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,紫草素中、高剂量组及米非司酮组大鼠子宫组织中ER和PR蛋白表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$),紫草素低剂量组PR蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图2,表4。

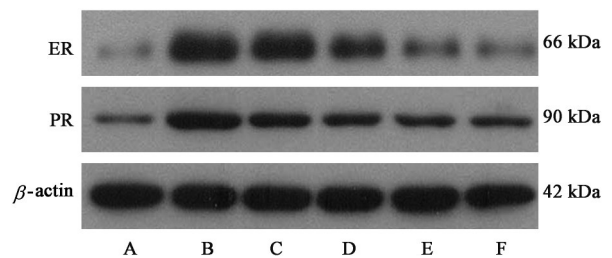


图2 子宫肌瘤模型大鼠子宫组织中ER和PR蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of ER and PR in uterine tissue of uterine fibroids model rats

表4 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织中ER和PR蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of shikonin on expression of ER and PR protein in uterine tissue of rats with uterine fibroids ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ER/ β -actin	PR/ β -actin
空白		0.540±0.021	0.675±0.035
模型		0.936±0.017 ¹⁾	0.942±0.035 ¹⁾
紫草素	5	0.897±0.011	0.836±0.028 ²⁾
	10	0.750±0.035 ³⁾	0.708±0.048 ²⁾
	20	0.621±0.014 ³⁾	0.687±0.011 ³⁾
米非司酮	1	0.581±0.017 ³⁾	0.730±0.042 ³⁾

2.5 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织中ERK通路蛋白表达的影响 Western blot结果表明,与空白组比较,模型组大鼠子宫组织中p-ERK的蛋白表达水平显著上升($P<0.01$),子宫组织中ERK的蛋白表达水平差异无统计学意义;与模型组比较,紫草素各剂量组及米非司酮组大鼠子宫组织中p-ERK的蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),ERK的蛋白表达水平并无统计学差异。见图3,表5。

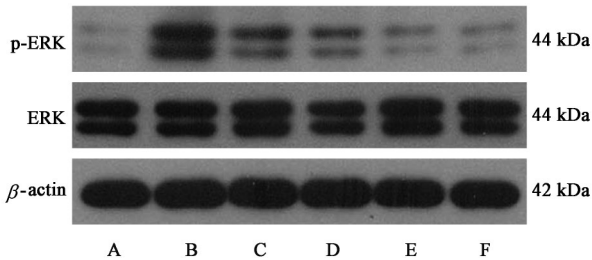


图3 子宫肌瘤模型大鼠子宫组织中ERK信号通路蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of proteins of ERK signaling pathway in uterine tissue of uterine fibroids model rats

表5 紫草素对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织中p-ERK和ERK蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of shikonin on expression of p-ERK and ERK protein in uterine tissue of uterine fibroids model rats($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-ERK/ β -actin	ERK/ β -actin
空白		0.554±0.028	0.960±0.091
模型		0.983±0.033 ¹⁾	0.974±0.021
紫草素	5	0.781±0.017 ²⁾	0.939±0.035
	10	0.682±0.021 ²⁾	0.935±0.071
	20	0.558±0.013 ³⁾	1.051±0.076
米非司酮	1	0.566±0.028 ²⁾	1.036±0.087

3 讨论

UL是女性最常见的盆腔肿瘤之一,目前子宫切除手术普遍应用于子宫肌瘤治疗,但具有严重不良反应,并对患者的生活质量及生殖能力具有重要

影响。因此,迫切需要开发非手术性治疗药物。中医理论认为子宫肌瘤属“癥瘕”范畴,主要是因为寒邪入侵胞络引起肾气渐衰和冲任失调,最终引起气血不和及瘀血凝滞所致。紫草具有凉血活血,清热解毒,透疹之功效,中医药理论认为紫草可用于治疗痤疮、湿疹等疾病,并被收录于《中华人民共和国药典》^[17]。以紫草为君药配伍的紫草消瘤断经汤是用于治疗子宫肌瘤的有效方剂,临床观察发现对子宫肌瘤疗效显著。紫草素作为紫草的主要活性成分之一,具有降血糖、保肝、抗炎及抗肿瘤活性。但紫草素对子宫肌瘤的作用鲜有研究,故本研究评价了紫草素对子宫肌瘤的作用及相关机制。

苯甲酸雌二醇诱导子宫肌瘤大鼠模型广泛应用于子宫肌瘤的病理研究和药物开发^[18-20]。故本研究采用苯甲酸雌二醇注射液腹腔注射模拟子宫肌瘤的病理变化,评价了紫草素对子宫肌瘤的作用。研究发现模型组大鼠呈现出子宫平滑肌细胞增生和局灶性坏死,且排列紊乱,伴随有大量的炎性细胞浸润。另外,子宫肌瘤是一种激素依赖性肿瘤,多发于性激素功能活跃的育龄女性,研究表明雌激素和孕激素能够促进肌瘤的发展^[15]。机体内激素的生物学效应主要与受体结合产生,同一水平激素情况下激素的生物学效应与靶受体呈正相关,并且靶组织激素的保留量与受体密切相关。故子宫肌瘤的发展与ER和PR含量密切相关,同时患者血液中ER和PR含量显著增加^[21-22]。子宫肌瘤主要与平滑肌瘤细胞异常增殖有关,平滑肌瘤细胞异常增殖可导致ER和PR异常活化,进一步通过调节细胞内信号通路促进子宫平滑肌瘤细胞增殖。据报道,孕激素含量减少或ER拮抗均可以抑制子宫平滑肌瘤细胞的异常增殖,发挥抗子宫肌瘤活性^[23-24]。

ERK作为一种胞质蛋白,是介导体内细胞增殖相关信号传导的重要蛋白,与平滑肌细胞增殖密切相关。据报道,表皮生长因子(EGF)可以激活表皮生长因子受体(EGFR)/ERK1/2和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)3/MAPK1(ERK1/2)信号通路促进平滑肌细胞的增殖^[25]。血小板衍生生长因子(PDGF)能够通过细胞内活性氧的产生激活ERK1/2信号,并增加原发性平滑肌瘤细胞的增殖^[26]。另外,胰岛素样生长因子(IGF)可以增加ERK的磷酸化介导平滑肌瘤细胞增殖^[27-28]。研究发现转化生长因子- β (TGF- β)的抗平滑肌细胞增殖活性与ERK1/2信号激活密切相关^[29-31]。既往文献报道,紫草素在牙周膜细胞中能够抑制ERK信号活化,且促进人白血病

细胞NB4细胞p38和c-Jun氨基末端激酶(JNK)的磷酸化并抑制ERK磷酸化诱导细胞凋亡^[31]。另外,紫草素能够抑制ERK1/2信号来抑制A549肺癌细胞的黏附侵袭和增殖^[7]。这些均提示紫草素的抗子宫肌瘤活性与ERK信号介导的平滑肌细胞增殖密切相关。

本研究发现模型组大鼠血清和子宫组织中的ER和PR含量均显著增加,与临床一致。这些结果均表明本研究初步建立了子宫肌瘤大鼠模型。更重要的是,本研究发现紫草素组和米非司酮组较模型组大鼠的子宫湿重、子宫系数和平滑肌厚度均明显减小,结合病理形态学结果表明紫草素能够缓解子宫肌瘤大鼠的平滑肌增生,并缓解炎性细胞浸润,并且紫草素20 mg·kg⁻¹组的效果最好。本研究也发现紫草素组和米非司酮组大鼠血清和子宫中ER和PR含量显著减小。紫草素可以抑制ER和PR异常表达,这说明紫草素的抗子宫肌瘤活性可能与抑制平滑肌细胞增殖有关。本研究发现紫草素显著抑制子宫肌瘤大鼠子宫组织中ERK磷酸化水平,抑制ERK信号通路的活化。上述结果初步表明紫草素具有体内抗子宫肌瘤活性。综上所述,紫草素能够抑制ERK信号活化,从而产生抗子宫肌瘤活性。但是,紫草素是否直接作用于ERK信号通路,或还有其他信号调节作用依然未知,仍需进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张美龄,韩凤贤,周冰,等. 戈那瑞林注射液联合米非司酮片治疗子宫平滑肌瘤的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(19):2252-2254.
- [2] 梁丽. 系统护理干预对子宫肌瘤术后患者治疗效果的影响[J]. 中外医学研究,2018,16(15):92-94.
- [3] BULUN S E, MORAVEK M B, YIN P, et al. Uterine leiomyoma stem cells: linking progesterone to growth [J]. *Semin Reprod Med*, 2015, 33(5):357-365.
- [4] WANG F, YAO X, ZHANG Y, et al. Synthesis, biological function and evaluation of shikonin in cancer therapy[J]. *Fitoterapia*, 2019, 134:329-339.
- [5] ZHANG X, CUI J H, MENG Q Q, et al. Advance in anti-tumor mechanisms of shikonin, alkannin and their derivatives [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2018, 18(2): 164-172.
- [6] GUO C, HE J, SONG X, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin-A review in recent years[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 149:104463.

- [7] 陈阳,陈忠坚,高赞,等. 紫草素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(14):3503-3509.
- [8] CHEN Y, ZHENG L, LIU J, et al. Shikonin inhibits prostate cancer cells metastasis by reducing matrix metalloproteinase-2/-9 expression via Akt/mTOR and ROS/ERK1/2 pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(2):447-455.
- [9] LEE M J, KAO S H, HUNAG J E, et al. Shikonin time-dependently induced necrosis or apoptosis in gastric cancer cells via generation of reactive oxygen species [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 211:44-53.
- [10] JANG S Y, JANG E H, JEONG S Y, et al. Shikonin inhibits the growth of human prostate cancer cells via modulation of the androgen receptor [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(5):1455-1460.
- [11] ZHANG D F, ZHAO D X, LIU X Z, et al. Effect of shikonin on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cell SKOV3: a protocol of systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine*, 2020, 99(22): e20450.
- [12] LIN H Y, HAN H W, WANG Y S, et al. Shikonin and 4-hydroxytamoxifen synergistically inhibit the proliferation of breast cancer cells through activating apoptosis signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Med*, 2020, 15:23.
- [13] CHEN K, YAN Z, WANG Y, et al. Shikonin mitigates ovariectomy-induced bone loss and RANKL-induced osteoclastogenesis via TRAF6-mediated signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110067.
- [14] 李文,刘新敏. 子宫肌瘤动物模型构建方法的实验研究概况[J]. *现代妇产科进展*, 2014, 23(11):917-919.
- [15] 郑冬雪,刘津源,程冉,等. 桂枝茯苓丸加味对子宫肌瘤模型大鼠的影响[J]. *环球医药*, 2019, 12(5): 655-659.
- [16] CHEN X, YANG L, OPPENHEIM J J, et al. Howard Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(3): 199-209.
- [17] 刘美平. 黄芪多糖对子宫肌瘤模型大鼠肿瘤组织的抑制作用[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(10):32-37.
- [18] 李文,程冉,郑冬雪,等. 莪七煎膏对大鼠子宫平滑肌细胞增殖及凋亡相关蛋白的影响[J]. *中医学报*, 2019, 34(9):1912-1915.
- [19] 玉环. Survivin/P53/ER/PR在子宫平滑肌瘤中的表达及临床意义[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(9):2010-2012.
- [20] SEFTON E C, KIM J J. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma

- [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 358(2): 223-231.
- [21] SABRY M, AI-HENDY A. Medical treatment of uterine leiomyoma [J]. *Reprod Sci*, 2012, 19 (4) : 339-353.
- [22] CHEN Q, XU T, LI D, et al. JNK/PI3K/Akt signaling pathway is involved in myocardial ischemia / reperfusion injury in diabetic rats: effects of salvianolic acid A intervention [J]. *Am J Translat Res*, 2016, 8(6) : 2534-2548.
- [23] CHANG H, WANG Q, SHI T, et al. Effect of DanQi Pill on PPAR α , lipid disorders and arachidonic acid pathway in rat model of coronary heart disease [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 103.
- [24] REN Y, YIN H, TIAN R, et al. Different effects of epidermal growth factor on smooth muscle cells derived from human myometrium and from leiomyoma [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96: 1015-1020.
- [25] MESQUITA F S, DYER S N, HEINRICH D A, et al. Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82: 341-351.
- [26] YU L, SAILE K, SWARTZ C D, et al. Differential expression of receptor tyrosine kinases (RTKs) and IGF- I pathway activation in human uterine leiomyomas [J]. *Mol Med*, 2008, 14: 264-275.
- [27] GAO Z, MATSUO H, WANG Y, et al. Up-regulation by IGF- I of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression in human uterine leiomyoma cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 5593-5599.
- [28] CIARMELA P, CARRARELLI P, ISLAM M S, et al. Ulipristal acetate modulates the expression and functions of activin A in leiomyoma cells [J]. *Reprod Sci*, 2014, 21: 1120-1125.
- [29] KARRA L, SHUSHAN A, BEN-MEIR A, et al. Changes related to phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in leiomyomas: possible involvement of glycogen synthase kinase 3 α and cyclin D2 in the pathophysiology [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93: 2646-2651.
- [30] CRABTREE J S, JELINSKY S A, HARRIS H A, et al. Comparison of human and rat uterine leiomyomata: identification of a dysregulated mammalian target of rapamycin pathway [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 6171-6178.
- [31] SHAN Z L, ZHONG L, XIAO C L, et al. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and cMyc [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3) : 3055-3060.

[责任编辑 王鑫]