

· 经典名方 ·

基于 micRNA 表达谱分析加味桂枝茯苓丸干预大鼠 子宫肌瘤的分子机制

郑冬雪¹, 刘津源^{1,2}, 陈如枫^{1,2}, 张莉莉¹, 张云¹, 刘咏梅¹, 刘起华¹, 阚杰¹, 刘新敏^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨加味桂枝茯苓丸干预子宫肌瘤大鼠的分子机制。方法:将72只无特定病原体(SPF)雌性成年SD大鼠随机分为模型组、正常组、预防给药组,模型组及预防性给药组采用雌孕激素负荷法建立子宫肌瘤大鼠模型。造模成功后将模型组大鼠随机分为米非司酮组,加味桂枝茯苓丸大、小剂量组。所有大鼠分别灌胃,正常组和模型组灌胃等量生理盐水,米非司酮组(灌胃米非司酮 $1.04\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),加味桂枝茯苓丸大、小剂量组(分别灌胃加味桂枝茯苓丸 $9.18, 4.59\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、预防给药组(灌胃加味桂枝茯苓丸 $4.59\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),1次/d,连续28 d。采用苏木精-伊红(HE)染色观察子宫形态学变化,采用互补干扰RNA(micRNA)基因芯片检测子宫micRNA基因表达谱,通过生物信息技术筛选出有差异表达的micRNA,通过基因功能富集预测加味桂枝茯苓丸干预子宫肌瘤模型大鼠可能的信号通路。结果:与正常组比较,模型组microRNA上调1个,下调9个。与模型组比较加味桂枝茯苓丸大剂量组上调2个,下调1个;预防给药组上调9个,下调2个。经过基因功能富集分析,4条信号通路与子宫肌瘤密切相关,分别是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,Wnt信号通路,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,血管内皮细胞生长因子(VEGF)信号通路。结论:加味桂枝茯苓丸影响了雌孕激素诱导子宫肌瘤模型大鼠micRNA的表达谱,提示桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤可能涉及到多种生物学过程信号传导及基因调控,是一个复杂的病理生理过程。

[关键词] 子宫肌瘤; 桂枝茯苓丸; 雌孕激素诱导模型; 基因芯片

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202323

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200917.1012.007.html>

[网络出版日期] 2020-9-17 10:37

Molecular Mechanism of Modified Guizhi Fulingwan Intervention on Uterine Fibroids in Rats Based on micRNA Expression Profiling

ZHENG Dong-xue¹, LIU Jin-yuan^{1,2}, CHEN Ru-feng^{1,2}, ZHANG Li-li¹, ZHANG Yun¹, LIU Yong-mei¹,
LIU Qi-hua¹, KAN Jie¹, LIU Xin-min^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

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

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism of modified Guizhi Fulingwan in rats with uterine fibroids. **Method:** Seventy-two female adult SD rats of SPF grade were randomly divided into a model group, a normal group, and a preventive administration group. The model group and preventive administration group were established by estrogen and progestin loading method. After successful modeling, the rats in the model group were randomly divided into a western medicine group (mifepristone), the high-dose traditional Chinese medicine(TCM) group, and a low-dose TCM group. All the rats were dosing as required once a day for 28 consecutive days. Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to observe the morphological changes of the

[收稿日期] 20200611(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273792)

[第一作者] 郑冬雪, 硕士, 主治医师, 从事中医药治疗子宫肌瘤的临床和基础研究, E-mail: zheng_dongx@163.com

[通信作者] * 刘新敏, 博士, 主任医师, 从事中医药治疗子宫肌瘤的临床和基础研究, Tel: 010-88001022, E-mail: beijingliuxm@163.com

uterus. The micRNA gene chip was used to detect the expression profile of uterine micRNA gene. Differential expressions of micRNA were screened by bioinformatics methods. Gene function enrichment was used to predict the possible signaling pathways in rats with uterine fibroids by modified Guizhi Fulingwan. **Result:** Compared with the normal group, microRNA of the model group was 1 up-regulated and 9 down-regulated. Compared with the model group, microRNA of the high-dose group of TCM group was 2 up-regulated and 1 down-regulated, in the preventive administration group, 9 was up-regulated and 2 was down-regulated. Gene function enrichment analysis indicated that four signaling pathways were closely related to uterine fibroids. They were mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, Wnt signaling pathway, mammalian rapamycin target protein (mTOR) signaling pathway and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) signaling pathway. **Conclusion:** Modified Guizhi Fulingwan affected the expression profile of micRNA in rat model of uterine fibroids induced by estrogen and progesterone, suggesting that modified Guizhi Fulingwan may involve in a variety of biological processes such as signal transduction and gene regulation in the treatment of uterine fibroids.

[Key words] uterine fibroids; modified Guizhi Fulingwan; estrogen and progesterone induction model; gene chip

子宫肌瘤是女性最常见的生殖系统良性肿瘤,患病率占育龄期女性的25%,病情轻者一般无明显症状,严重者可引起不规则子宫出血、月经量过多、腹痛、复发性流产、不孕症、继发性贫血等。传统治疗方法多是行子宫切除术,因此该病是行子宫切除术的重要原因^[1]。有生育要求的女性可以选择保留子宫的子宫肌瘤剔除术,但也存在如盆腔粘连、妊娠期子宫破裂等并发症,且术后高复发率也是医患双方均需面对的问题。因此应积极寻找有效的保守治疗方法。中医学中没有“子宫肌瘤”这一病名,根据其临床表现,中医学将“子宫肌瘤”归属于“癥瘕”的范畴。桂枝茯苓丸出自东汉张仲景的《金匮要略》,以温经活血、化瘀消癥见长,是治疗“癥瘕”的经典名方,临床常用该方加减治疗子宫肌瘤,能有效缩小肌瘤体积,改善患者临床症状^[2-4]。本课题组前期临床观察证实,加味桂枝茯苓丸可有效减缓子宫肌瘤的增长速度^[5]。互补干扰RNA(micRNA)是一类非编码单链小分子RNA,通过沉默靶基因转录后过程,进而调控基因表达,影响生物学进程。研究证实多种miRNA在子宫肌瘤组织中表达异常^[6-7],miRNA可以通过调控相应靶基因的表达进而影响肌瘤的发生发展^[8-9],这提示miRNA不但是探索子宫肌瘤发病机制的新途径,同时还可能成为子宫肌瘤诊断、判断预后和治疗的新靶标^[10]。本研究通过分析加味桂枝茯苓丸对雌孕激素诱导子宫肌瘤大鼠模型micRNA基因表达谱的影响,从基因水平探讨加味桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的分子机制。

1 材料和方法

1.1 动物 72只雌性成年SD大鼠,SPF级,体质量180~200 g,购于北京维通利华实验技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2009-0007。消毒饲料喂养于中国中医科学院广安门医院动物中心SPF级动物房,实验动物使用许可证号SYXK(京)2009-0034。动物自由摄食饮水,普通饲料喂养。此动物实验开展经中国中医科学院广安门医院动物伦理委员会审查批准,批准号2012第062号。

1.2 药物与试剂 苯甲酸雌二醇注射液[宁波第二激素厂,兽药字(2011)110252511,2 g·L⁻¹];黄体酮注射液[宁波第二激素厂,兽药字(2011)110251670,10 g·L⁻¹];米非司酮片(北京紫竹药业有限公司,国药准字H10950003,25 mg/片);加味桂枝茯苓丸浸膏(由桂枝、茯苓、赤芍、牡丹皮、桃仁、莪术、三七粉7味药制成),生药购自中国中医科学院广安门医院,由该院中药新药制剂研发中心刘起华药师鉴定均为正品,按标准流程煎制、浓缩,生药含量1.73 g·g⁻¹,4℃保存备用;miRNA荧光定量检测试剂盒(Tiagen公司,批号N2428);trizol(Life Technologies公司,货号Lot113605);逆转录试剂盒(Tiagen公司,货号Lot#03821);miR-187-3p,miR-330-5p及内参miR-U6引物由Tiagen公司合成,批号分别为6106,6420.2,8380.4,miR-187-3p(上游5'-TCGTGTCTTGTGTTGCAGCC-3',20 bp),miR-330-5p(上游5'-CTCTGGCCTGTGTCTTAGGC-3',21 bp);miR-U6(上游5'-TTGGAACGATACAGAGAAGATTAGCAT-3',27 bp),反义引物涉及公司技术机密,暂不提供。

1.3 仪器 MRmiOA6.1 基因芯片(台湾华联生物科技股份有限公司);7900HT 型荧光定量 PCR 仪(美国应用生物公司);Thermo NanoDrop 2000 型分光光度计(美国基因有限公司);5415R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司);DU640 型紫外分光光度计,LE-80K 型超高速离心机(美国 Beckman 公司);CF-15D2 型高速离心机(日本 Hitachi 公司)。

1.4 造模与给药 大鼠子宫肌瘤模型的建立,72 只雌性成年 SD 大鼠给予普通食水喂养 1 周后,随机分为正常组 12 只,模型组 48 只,预防给药组 12 只。参照文献的方法^[11-12]制造子宫肌瘤大鼠模型,模型组及预防给药组大鼠每天腹腔注射苯甲酸雌二醇 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 30 d;黄体酮注射液 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每周四腹腔注射 1 次;给药最后 5 d,2 种激素同时注射。以造模第 30 天随机取 1 只模型组大鼠子宫平滑肌细胞排列紊乱、细胞增大、细胞核密集肥大造模成功。造模成功后正常组每天腹腔注射同等体积的生理盐水。根据临床等效换算方法计算大鼠给药剂量。预防给药组造模的同时加味桂枝茯苓丸灌胃给药($4.59 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。造模结束后,模型组大鼠随机分为模型组,米非司酮组,加味桂枝茯苓丸大、小剂量组各 12 只。造模结束第 2 天开始灌胃给药 28 d,正常组(等量生理盐水),模型组(等量生理盐水),米非司酮组(米非司酮 $1.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),加味桂枝茯苓丸大、小剂量组(加味桂枝茯苓丸 $9.18, 4.59 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),预防给药组(加味桂枝茯苓丸 $4.59 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)均每天 1 次,连续 28 d。

1.5 取材 末次灌胃给药后各组大鼠禁食 12 h,次日称取各组大鼠体质量,10% 水合氯醛($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射,麻醉成功后取仰卧位,打开腹腔,暴露子宫,沿子宫膀胱连接剪取子宫,去净脂肪组织后使之离体、拍照,肉眼观察各组大鼠子宫组织形态和色泽的改变。电子天平称取子宫湿质量,计算子宫系数(子宫湿质量/大鼠体质量, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),用游标卡尺测量子宫分角下最大横径及双侧分角子宫根部横径,计算平均值。沿子宫正中剪开,取左侧子宫,近端 1/2 置入离心管, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.6 基因芯片检测 取 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存的大鼠子宫组织,采用 Agilent 大鼠 miRNA 单通道表达谱芯片,由台湾华联生物科技股份有限公司对 miRNA 进行荧光标记,采用 NanoDrop ND-1000 测定 CyDye 和 RNA 的浓度,Cy5 的标记效率需达到每 1 000 个核苷酸包含 10 染料分子以上。应用台湾华联生物

科技股份有限公司 MRmiOA6.1 芯片检测。华联 miRNA 杂交程序进行杂交。对于双色标记实验,将计算两种检测信号的比值(\log_2)和 *t* 检验的 *P*。以 $P < 0.01$ 定义显著差异性表达。为保证结果的重复性和可靠性,每张芯片重复 1 次。所有芯片数据由台湾华联生物科技股份有限公司进行归一化整理,基于 R 语言,BRB 语言对归一化数据进行差异表达基因分析。

1.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证芯片结果 根据基因芯片结果,选择出现频次多且在部分组间有差异表达的 micRNA,即 miR-187-3p, miR-330-5p,采用 Real-time PCR 进行检测以验证基因芯片的结果是否准确。每组随机取 5 份 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存的子宫组织,使用 trizol 法提取子宫组织总 RNA,检测其纯度和浓度,逆转录 cDNA 后扩增,扩增反应为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 20 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火,延伸 34 s,共 40 个循环。实验中同步进行内对照 miR-U6 的定量检测,以目的基因与 miR-U6 荧光阈值(C_t)之比作为目的基因的相对表达量。扩增反应在 7900HT 型荧光定量 PCR 仪上进行,每个循环电脑自动记录反应管中的荧光信号值,并描绘曲线。反应结束由 7900HT 型荧光定量 PCR 仪 SDS software 分析结果,自动计算定量数值,以 miR-U6 为内参基因,相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,计算得子宫组织 miR-187-3p, miR-330-5p 的相对表达量。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计分析软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验。若方差齐,采用单因素方差分析;若方差不齐,采用多个样本比较的非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 加味桂枝茯苓丸对大鼠体质量、子宫湿重、子宫分角下直径、分角横径的影响 与正常组比较,模型组子宫湿质量、子宫分角下最大横径和分角横径明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,米非司酮组、加味桂枝茯苓丸大、小剂量组,预防给药组子宫湿重、子宫分角下直径均明显减小($P < 0.05, P < 0.01$);加味桂枝茯苓丸小剂量组、预防给药组分角横径也明显减小($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

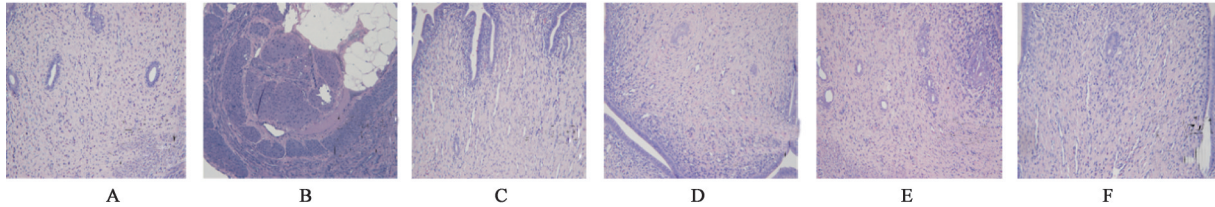
2.2 加味桂枝茯苓丸对大鼠子宫组织形态学影响 正常组子宫平滑肌较薄,肌纤维较长,纵行肌与环形肌排列整齐。模型组平滑肌排列略紊乱,肌层出现多发性、弥漫性增生,平滑肌较正常组增厚,细

表1 加味桂枝茯苓丸对大鼠体质量、子宫湿质量、子宫分角下直径、分角横径的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 1 Effects of modified Guizhi Fulingwan on rat weight, uterine wet weight, sub-angular diameter and transverse diameter of rat in each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	子宫湿质量 /g	分角下直 径/cm	分角横径 /cm
正常		0.53±0.05	0.49±0.05	0.32±0.04
模型		0.69±0.16 ²⁾	0.59±0.09 ²⁾	0.38±0.05 ¹⁾
米非司酮	1.04×10 ⁻³	0.52±0.06 ⁴⁾	0.51±0.08 ³⁾	0.36±0.03
加味桂枝茯苓丸	9.18	0.51±0.04 ⁴⁾	0.43±0.03 ⁴⁾	0.34±0.02
	4.59	0.52±0.06 ⁴⁾	0.46±0.04 ⁴⁾	0.31±0.06 ⁴⁾
预防给药	4.59	0.48±0.09 ⁴⁾	0.45±0.04 ⁴⁾	0.33±0.06 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表3同)。



A. 正常组;B. 模型组;C. 米非司酮组;D, E. 加味桂枝茯苓丸大、小剂量组;F. 预防性给药组

图1 加味桂枝茯苓丸对大鼠子宫组织形态学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of modified Guizhi Fulingwan on morphology of uterus of rats(HE, ×200)

2.2.2 聚类分析 采用无监督层次聚类分析各样本间整体基因表达的相似性,以该探针在所有芯片间的差异基因筛选出前23个基因探针进入分析。图中每一行为一张芯片,每一列为一个基因探针。红绿色阶标示了探针讯号上/下调的变化幅度。线的长度则代表距离指标,同簇样本或基因的相似性高(模式相近)。见图2。

2.2.3 加味桂枝茯苓丸对大鼠 miR-187-3p, miR-330-5p 基因表达的影响 与正常组比较,模型组 miR-187-3p 表达降低,miR-330-5p 表达升高;与模型组比较,加味桂枝茯苓丸大、小剂量组,米非司酮组 miR-187-3p 表达均升高,加味桂枝茯苓丸小剂量组及预防给药组 miR-330-5p 表达均降低,表明基因芯片结果可信。见表3。

2.2.4 基因功能富集分析 用DAVID 6.7软件对加味桂枝茯苓丸大剂量组与模型组比较上调的2个,下调的1个 microRNA 进行靶基因功能富集通路分析,得到的相关通路中有4条与子宫肌瘤密切相关,分别是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路, Wnt 信号通路,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路。见表4。

胞增大,细胞核密集肥大,呈增生现象。加味桂枝茯苓丸大、小剂量组,预防给药组及米非司酮组大鼠子宫平滑肌较薄,无明显排列紊乱现象,未见明确弥漫性增生。见图1。

2.2.1 加味桂枝茯苓丸对大鼠基因芯片的影响 采用 Invariant set 标准化法对数据进行均一化处理,用倍数法筛选差异表达 miRNA, log₂Ratio>0.58 或者 log₂Ratio<-0.05 则认为有差异。根据前期预实验结果,仅选择加味桂枝茯苓丸大剂量组进行实验。结果显示,与正常组比较,模型组 microRNA 上调1个,下调9个。与模型组比较,米非司酮组上调3个,下调2个;加味桂枝茯苓丸大剂量组上调2个,下调2个;预防给药组上调9个,下调1个。见表2。

3 讨论

子宫肌瘤属于中医妇科“癥瘕”范畴。多数学者认为“血瘀证”是该病的核心病机^[13]。桂枝茯苓丸出自《金匮要略·妇人妊娠病脉证并治第二十》,原用于治疗妊娠宿有癥病致漏下不止:“妇人宿有癥病,经断未及三月,而得漏下不止,胎动在脐上者,为癥瘕害……下血者,后断三月衄也。所以血不止者,其癥不去故也,当下其癥,桂枝茯苓丸主之。”该方具有温经活血、化瘀消癥的作用,现多于子宫肌瘤的治疗,有一定的临床疗效^[14-16]。

本课题组在桂枝茯苓丸原有药物的基础上加入莪术、三七,治疗有增长趋势的子宫肌瘤,发现该药可显著减慢子宫肌瘤的增长速度^[5,17]。桂枝茯苓丸加味中桂枝,味辛、甘,性温,可温通经脉,助阳化气,散血脉之寒滞;茯苓味甘,性平,利水渗湿,健脾宁心,能利腰脐间瘀血;赤芍,味苦,性微寒,清热凉血,散瘀止痛,可入血分散血中之瘀血;桃仁,味苦、甘,性平,可活血祛瘀;牡丹皮味辛、苦,性微寒,既能辛以散结,又能清热凉血,活血化瘀。此五味药联用,共奏温阳、行气、化水、活血、祛瘀、消癥之功。莪术,味辛、苦,性温,能行气破血,消积止痛;三七

表 2 加味桂枝茯苓丸对大鼠基因芯片的影响

Table 2 Effect of modified Guizhi Fulingwan on gene chips in rats

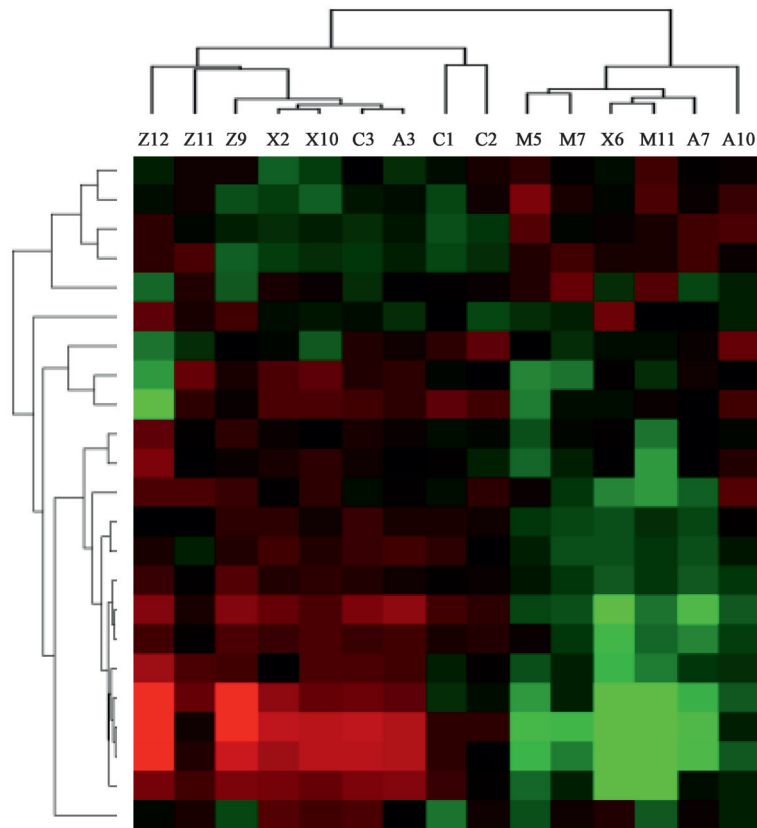
比较组别	ID	名称	log ₂ (Ratio)	调整
模型组与正常组	PH_mr_0000425	rno-miR-146b-5p	0.694 7	上调
	PH_mr_0000900	rno-miR-1-3p	-0.805 6	下调
	PH_mr_0001419	rno-miR-196c-5p	-0.606 35	下调
	PH_mr_0002014	rno-miR-30b-3p	-0.684 07	下调
	PH_mr_0002197	rno-miR-345-5p	-0.804 65	下调
	PH_mr_0002889	rno-miR-672-5p	-2.326 14	下调
	PH_mr_0006118	rno-miR-210-3p	-1.202 04	下调
	PH_mr_0006177	rno-miR-3068-3p	-1.286 05	下调
	PH_mr_0006674	rno-miR-466b-5p	-1.500 31	下调
加味桂枝茯苓丸大剂量组与模型组	PH_mr_0006678	rno-miR-466d	-2.404 84	下调
	PH_mr_0002271	rno-miR-330-5p	0.807 007	上调
	PH_mr_0004148	rno-miR-187-3p	0.696 688	上调
预防给药组与模型组	PH_mr_0006555	rno-miR-25-5p	-0.753 57	下调
	PH_mr_0000514	rno-miR-184	0.647 53	上调
米非司酮组与模型组	PH_mr_0001456	rno-miR-188-5p	0.620 184	上调
	PH_mr_0002271	rno-miR-330-5p	0.686 934	上调
	PH_mr_0002769	rno-miR-1298	0.587 666	上调
	PH_mr_0006177	rno-miR-3068-3p	1.142 79	上调
	PH_mr_0006264	rno-miR-32-3p	2.296 974	上调
	PH_mr_0006383	rno-miR-505-5p	0.733 513	上调
	PH_mr_0006674	rno-miR-466b-5p	1.267 882	上调
	PH_mr_0006707	rno-miR-702-5p	0.588 621	上调
	PH_mr_0000352	rno-miR-34a-5p	-0.663 9	下调
	PH_mr_0006496	rno-miR-874-5p	-0.717 26	下调
	PH_mr_0002271	rno-miR-330-5p	1.045 719	上调
	PH_mr_0004148	rno-miR-187-3p	0.800 164	上调
	PH_mr_0006535	rno-miR-196c-3p	0.727 157	上调
	PH_mr_0000023	rno-miR-126a-3p	-0.665 46	下调
PH_mr_0000425	rno-miR-146b-5p	-0.907 5	下调	

味甘、微苦,性温,具有散瘀止血,消肿定痛之功。近些年来三七、莪术已多次被证实具有抗肿瘤和抗血栓的疗效^[14-15],故二药与桂枝茯苓丸合用以加强其活血化瘀消癥之效。

miRNA 是长度为 21~25 nt 的某些特殊的小型非编码 RNA 组成的家族,这些 miRNA 能够识别特定的目标 mRNA,并在转录后水平通过促进靶 mRNA 的降解和/或抑制翻译过程而发挥负调控基因表达的过程,与个体发育、干细胞分化和疾病发展关系密切。多项研究表明,miRNA 与子宫肌瘤的发生发展有关^[18],如 miR-93/106b 可通过调节炎症反应因子而调控肌瘤的发生^[19];miR26a 在肌瘤组织

中的低表达状态导致平滑肌细胞的增生和肥大,促进了子宫肌瘤的发生和发展^[20];miR-27b,miR221,miR291,miR15,miR222,miR26a,和 miR16 均可调节血管生长因子表达,影响肌瘤体血供而影响子宫肌瘤的增长速度^[21];miR221 和 miR222 在内皮细胞中高表达状态可降低干细胞因子受体的表达,同时通过阻止新管腔的形成来阻止血管新生而影响子宫肌瘤的增长^[22]。

本实验基因芯片结果显示,加味桂枝茯苓丸对子宫肌瘤大鼠 micRNA 基因芯片表达有明显影响,综合分析芯片生物学信息,与模型组比较,加味桂枝茯苓丸各组分别有上调、下调 micRNA 差异基因,



A. 加味桂枝茯苓丸大剂量组; C. 预防给药组; Z. 正常组; M. 模型组; X. 米非司酮组

图2 各组基因表达聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of gene expression in each group

表3 加味桂枝茯苓丸对各组子宫肌瘤大鼠子宫 miR-187-3p, miR-330-5p 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of modified Guizhi Fulingwan on expression of miR-187-3p and miR-330-5p in uterus of rats with uterine fibroids ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	miR-187-3p	miR-330-5p
模型		1.00	1.00
正常		1.02±0.24	0.92±0.24
米非司酮	1.04×10 ⁻³	1.24±0.51	1.35±1.06
加味桂枝茯苓丸	9.18	1.20±0.41	1.10±0.35
	4.59	1.14±0.03	0.98±0.46
预防给药	4.59	0.93±0.15	0.95±1.06

表4 加味桂枝茯苓丸大剂量组与模型组有差异表达的 miRNA 靶基因功能富集分析

Table 4 Functional enrichment analysis of miRNA target genes differentially expressed between high-dose group and model group

信号通路	micRNAs	mRNA	P
MAPK	3	16	0.006 832
Wnt	3	8	0.005 970
mTOR	2	2	0.058 929
VEGF	3	6	0.011 313

这些 micRNA 差异基因共同构成了加味桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤大鼠的差异 micRNA 基因表达谱。各组间 miR-187-3p, miR-330-5p 表达的变化证实了基因芯片结果的可靠性。靶基因功能富集通路分析得出4条与子宫肌瘤密切相关的信号通路提示加味桂枝茯苓丸对子宫肌瘤的治疗机制涉及多种生物学信息信号传递及基因调控的改变,提示加味桂枝茯苓丸有可能通过上调或下调相关的 miRNA,进而调控这4条通路中关键的靶基因达到控制肌瘤生长的疗效。

综上,子宫肌瘤是个多因素参与、多路径调节的复杂过程。加味桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的分子机制可能与影响了不同信号通路的 miRNA 表达有关,其具体机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 陈庆云, 张小燕. 子宫肌瘤发病机制研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(12): 950-952.
- [2] 孙运明, 周珊珊, 唐禹馨. 桂枝茯苓方治疗子宫肌瘤的疗效及对基质金属蛋白酶2、核因子-κB p65 表达水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(5):

- 1212-1214.
- [3] 宋茜. 桂枝茯苓丸联合米非司酮治疗子宫肌瘤患者的疗效及对血清性激素和ER、VEGF、IL-2水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(5):1013-1015.
- [4] 张莉. 桂枝茯苓丸联合米非司酮治疗子宫肌瘤的疗效及对激素水平和血液流变学的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(2):172-174.
- [5] 李文. 桂枝茯苓丸加减治疗有增长趋势的子宫肌瘤的临床观察[D]. 北京:北京中医药大学, 2015.
- [6] TATSUGUCHI M, SEOK Y H, CALLIS E T, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6):1137-1141.
- [7] MARSH E E, LIN Z, YIN P, et al. Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(6):1771-1776.
- [8] HUI P, LI N, JOHNSON C, et al. HMGA proteins in malignant peripheral nerve sheath tumor and synovial sarcoma: preferential expression of HMGA2 in malignant peripheral nerve sheath tumor [J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(11):1519-1526.
- [9] PENG Y, LASER J, SHI G, et al. Antiproliferative effects by Let-7 repression of high-mobility group A₂ in uterine leiomyoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(4):663-673.
- [10] QIANG W, LIU Z, SERNA V A, et al. Down-regulation of mi R-29b is essential for pathogenesis of uterine leiomyoma [J]. *Endocrinology*, 2014; 155(3): 663-669.
- [11] 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.
- [12] 王惠群, 靳家玉. 米非司酮对子宫肌瘤及子宫肌层组织雌、孕激素受体的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(2):79-81.
- [13] 司富春, 李山霞. 近30年临床子宫肌瘤中医证型和用药规律分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(1):45-47, 49.
- [14] 朱聿君. 小剂量米非司酮配伍桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的临床观察[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(30): 4311-4312.
- [15] 李莉, 陈光亮, 谷仿丽, 等. 桂枝茯苓丸防治大鼠子宫肌瘤的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(7):832-835.
- [16] 徐爱玲. 米非司酮联合桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的临床效果分析[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(4):101-102.
- [17] 程冉. 桂枝茯苓丸加味治疗子宫肌瘤的疗效观察及对血清microRNA表达谱的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [18] COMMANDEUR A E, STYER A K, TEIXEIRA J M. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth [J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(5):593-615.
- [19] CHUANG T D, LUO X, PANDA H, et al. miR-93/106b and their host gene, MCM7, are differentially expressed in leiomyomas and functionally target F3 and IL-8 [J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(6): 1028-1042.
- [20] REHFELD F, ROHDE A M, NGUYEN D T, et al. Lin28 and let-7: ancient milestones on the road from Pluripotency to neuro-genesis [J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 359(1):145-160.
- [21] COLLIER H A, FORMAN J J, LEGESSE-MILLER A. "Myc'ed messages": Myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron [J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(8): e146.
- [22] POLISENO L, TUCCOLI A, MARIANI L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HU-VECs [J]. *Blood*, 2006, 108(9): 3068-3071.

[责任编辑 张丰丰]