

# 蠲痛饮对子宫内位症大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白的影响

张亚萍<sup>1,2</sup>, 李卫红<sup>1\*</sup>, 李婧<sup>3</sup>, 李卫民<sup>1</sup>, 韦玉竹<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065;  
3. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**探讨蠲痛饮对子宫内位症(EMS)大鼠磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶分子(mTOR)信号通路蛋白的影响。**方法:**采用自体子宫内位移植法建立 EMS 大鼠模型,随机将 48 只大鼠分为正常组、模型组、蠲痛饮低、中、高剂量组、通路阻滞剂组(LY294002)6 组,分别给予蠲痛饮高、中、低剂量(42.9,14.3,4.8 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃,通路阻滞剂组予 PI3K 通路阻滞剂 LY294002(0.04 g·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射,正常组及模型组每天按照 10 mL·kg<sup>-1</sup>给予生理盐水灌胃,各组持续用药 28 d。应用透射电镜观察大鼠异位内膜组织超微结构,免疫组化法检测异位内膜组织 PI3K, Akt, mTOR 蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K) mRNA 相对含量。**结果:**与正常组比较,模型组异位内膜 PI3K, Akt, mTOR 蛋白和 p70S6K mRNA 的表达都明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,蠲痛饮中、高剂量、通路阻滞剂组干预后 PI3K, Akt, mTOR 蛋白和 p70S6K mRNA 的表达明显降低( $P < 0.05$ )。透射电镜下可见蠲痛饮低、中、高剂量组和通路阻滞剂组均能促进腺上皮细胞萎缩或欠整齐,微绒毛减少或消失,胞核固缩,胞内线粒体肿胀或减少,间质细胞凋亡。**结论:**PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与子宫内位症发生;蠲痛饮可能通过下调 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白的表达及 p70S6K mRNA 表达,从而抑制上皮间质细胞活性,促进细胞凋亡,治疗子宫内位症。

**[关键词]** 蠲痛饮; 子宫内位症; 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶分子(mTOR)信号通路; 当归芍药散; 芍药甘草汤

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)16-0024-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191404

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190403.1504.011.html>

**[网络出版时间]** 2019-04-04 14:39

## Effect of Juantong Decoction on PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway Proteins in Rats with Endometriosis

ZHANG Ya-ping<sup>1,2</sup>, LI Wei-hong<sup>1\*</sup>, LI Jing<sup>3</sup>, LI Wei-min<sup>1</sup>, WEI Yu-zhu<sup>1</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the effect of Juantong decoction on phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway proteins in rats with endometriosis (EMS). **Method:** The EMS Rat model was established by autologous endometrial transplantation. And 48 rats were randomly divided into 6 group, namely the sham operation group, the model group, the low-dose Juantong decoction group, the middle-dose Juantong decoction group, high-dose Juantong decoction group, and the PI3K pathway blocker group (LY294002). Then, the high-dose Juantong decoction group, the middle-dose

**[收稿日期]** 20181212(001)

**[基金项目]** 广西自然科学基金面上项目(2015GXNSFAA139112);广西中医药大学校级重点课题项目(ZD2012001)

**[第一作者]** 张亚萍,博士,副教授,从事中医药防治妇科疾病的研究,E-mail:1067545641@qq.com

**[通信作者]** \*李卫红,博士,教授,硕士生导师,从事中医药防治妇科疾病的研究,E-mail:794431024@qq.com

Juantong decoction group and the low-dose Juantong decoction group were given different doses (42.9, 14.3, 4.8 g·kg<sup>-1</sup>). The pathway blocker group (LY294002) was given LY294002 (0.04 g·kg<sup>-1</sup>) through peritoneal injection weekly. The sham operation group and the model group were given saline irrigation (10 mL·kg<sup>-1</sup>). The administration lasted for 28 days. At last, the ectopic endometrial tissues in rats were observed by transmission electron microscope, the proteins of PI3K, Akt and mTOR in the tissue were detected by immunohistochemical method, and the p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) mRNA expression of ectopic endometrial tissue was tested by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) method. **Result:** Compared with the normal group, the protein expressions of PI3K, Akt and mTOR and the mRNA expression of p70S6K of ectopic endometrium in the model group increased significantly ( $P < 0.05$ ). And compared with the model group, the protein expressions of PI3K, Akt and mTOR and the mRNA expression of p70S6K decreased significantly after the intervention with middle and high doses of Juantong decoction and Western medicine Group ( $P < 0.05$ ). Under the lens, the glandular epithelial cells in middle and high-dose Juantong decoction and western medicine groups were atrophy or untidy, the microvilli decreased or disappeared, the cell nuclei were shrunk, the mitochondria were visible, and there were apoptotic mesenchymal cells. The glandular epithelial cells in low-dose Juantong decoction group were irregular, the microvilli were decreased, and the mitochondrial swelling was visible in the cytoplasm. **Conclusion:** The proteins of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway participate in the occurrence of endometriosis. Juantong decoction can inhibit the activity of epithelial mesenchymal cells and promote apoptosis by reducing the protein expressions of PI3K, Akt and mTOR and the mRNA expression of P70S6K in endometriotic tissues of model rats, thus inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of endometriosis.

[**Key words**] Juantong decoction; endometriosis; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway; Danggui Shaoyaosan; Shaoyao Gancaotang

子宫内膜异位症(简称内异症,EMS)是指具有生长活性的子宫内膜异位种植到子宫腔被覆粘膜以外的部位,临床上多发生于育龄妇女,以痛经、月经失调、盆腔包块和不孕等为特点<sup>[1]</sup>。EMS近年发病有上升趋势,发病率高达10%~15%,妇科手术中有5%~15%患者被发现同时合并EMS<sup>[2]</sup>,严重影响患者的健康和生活质量<sup>[3]</sup>。EMS发生的主要学说有经血逆流学说、体腔上皮化生学说、种植学说、血液和淋巴播散学说及免疫学说等<sup>[4]</sup>。然而其分子病理机制并不十分清楚。研究表明子宫内膜迁移、黏附、侵袭以及血管形成是EMS发病过程的关键步骤<sup>[5]</sup>。内异症在位内膜细胞存活及凋亡异常促进内膜细胞在宫腔外播散和种植的能力是引起并促进EMS发生发展的重要因素之一。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/雷帕霉素靶分子(mTOR)信号通路是调控细胞生长和增殖的关键途径<sup>[6]</sup>,在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、血管生成、自噬等过程中发挥着极其重要的生物学功能,该通路的紊乱会引起一系列的疾病,包括炎症、癌症、神经病变、自身免疫性疾病和造血型疾病。当炎症反复刺激下导致该信号通路过度激活而引起EMS<sup>[7]</sup>。Mahaut等<sup>[8]</sup>建立了小鼠EMS模型,并利用mTOR/

Akt抑制剂抑制PI3K/Akt/mTOR通路,发现EMS细胞增殖率下降。因此,PI3K/Akt/mTOR通路与EMS关系密切。

国医大师班秀文教授根据内异症少腹及小腹坠痛,痛点固定,疼痛缠绵难愈发病特点,提出其病机为湿瘀互结,总结出治疗本病的经验方蠲痛饮,临床疗效确切<sup>[9]</sup>。班秀文教授认为内异症以痛经、癥瘕、不孕、月经失调为临床表现,其病机为瘀血内停是不容置疑的,但该病缠绵难愈,反复发作,与湿瘀阻滞的特点有关。胞宫胞脉位于下焦,由于湿为阴邪,其性重浊粘滞,易趋下焦,阻滞气机,气滞则血瘀,湿瘀互结,稽留冲任,蕴结胞宫,久病入络,变化多端,在一定的条件下还可寒化或热化,其临床表现与单纯的血瘀内停有所区别。根据湿瘀致病的特点,班秀文教授在治疗中兼顾湿瘀两方面因素,将利湿药和活血化瘀药有机结合,才能解除湿瘀胶着之病势,使有形之癥积缓消于无形之中,创制蠲痛饮,该方是在当归芍药散和芍药甘草汤的经方基础上化裁而成,当归芍药散是《金匮要略》治疗“妇人腹中诸疼痛”的著名方剂,芍药甘草汤出自《伤寒论》,为缓急止痛之要剂,在此基础上加用补肾活血化瘀的方药,不仅承袭了当归芍药散调和肝脾、化瘀利湿的

功用,并加强了温肾化痰助孕、行气止痛散结的功效。基于此,本实验通过运用罂粟饮治疗 EMS 大鼠,从 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白表达及其下游因子表达等方面探讨其治疗 EMS 的作用机制,为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 于湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买清洁级雌性健康未孕 SD 大鼠,体质量 195 ~ 225 g,适应性饲养 1 周,广西中医药大学动物实验伦理审查备案编号 2016-03-01-1。饲养环境为光照环境为光照与黑暗每 12 h 交替进行饲养。室内温度保持在  $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,相对湿度 65%。

**1.2 药物** 罂粟饮药物组成:鸡血藤 20 g,土茯苓 20 g,丹参 15 g,赤芍 10 g,当归 10 g,三七粉 10 g,补骨脂 10 g,白术 10 g,泽兰 10 g,龙血竭 6 g,川芎 6 g,炙甘草 6 g。由广西中医药大学第一附属医院中药房提供,均经本院中药师杨立农鉴定后,用蒸馏水煎煮,浓缩成生药质量浓度为  $4.29 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的药液,过滤分装  $4 ^\circ\text{C}$  低温保存。戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号 4892);PI3K 抑制剂 LY294002(英国 Abcam 公司,货号 ab120243)。

**1.3 试剂** PI3K p85 $\beta$ ,Akt,mTOR,核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)兔抗体(英国 Abcam 公司,货号分别为 ab180967,ab8805,ab32028,ab32359);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 聚合物,通用型 SP 试剂盒,DAB 显色剂,磷酸盐缓冲液(PBS),中性树胶(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 18112A11,K182718E,K186621D,113I0227,108-95-2);柠檬酸修复液(福州迈新生物技术开发有限公司,批号 15050502);二甲苯(天津市富宇精细化工有限公司,批号 20171022);苏木素,4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 329D0311,P1110);无水乙醇(天津市大茂化学试剂厂,批号 20170401);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,货号 302A0327);逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司,批号 DRR047A);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(德国 Roche 公司,批号 4913914001);总 RNA 提取试剂盒 trizol 试剂(北京天根生化科技有限公司,批号 15596026)。

**1.4 仪器** Gel Doc 200 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);220 型多通道 PCR 扩增仪(美国 MJ 公司);5810R 型高速低温离心机,7500 型 Real-time PCR 仪(德国 Eppendorf Centrifuge 公司);Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司);DMR +

Q550 型病理图像分析仪(德国 Leica 公司);SK-1 型快速震荡混匀器(金坛市神科仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 动物造模、分组及鉴定** 将 48 只 8 周龄大鼠适应性喂养 1 周,按体量随机分为罂粟饮高、中、低剂量组及通路阻滞剂组,模型组,正常组,每组 8 只。除正常组行开腹假手术外,其余各组大鼠予以造模,造模方法参照前期研究基础<sup>[10]</sup>。造模 4 周末,开腹观察各组大鼠的移植物呈囊性结节,并有血管形成;各组随机取 2 只大鼠的异位组织送病检,显示有子宫内膜腺体,证实造模成功。

**2.2 药物制备及给药** 造模 4 周开始给药,正常组及模型组按照  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  给予生理盐水灌胃;罂粟饮低、中、高剂量组按 1,2,4 倍的成人用药剂量给药,分别予以  $4.8, 14.3, 42.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  灌胃<sup>[11]</sup>;通路阻滞剂组将 LY294002 溶于 DMSO 中,配成  $36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  常温避光备用,每周给予以  $0.04 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  腹腔注射;各组持续用药 28 d。

**2.3 透射电镜检测各组内膜超微结构变化** 用生理盐水将采集的组织冲洗干净,修剪成  $1 \text{ mm}^3$  组织块,置于 4% 戊二醛固定液,送广西医科大学电镜中心行透射电镜检查,观察各组内膜超微结构的变化。

**2.4 免疫组化检测各组异位内膜 PI3K, Akt, mTOR 蛋白含量** 取出待检的内膜组织,用 4% 多聚甲醛固定 48 h 后,常规水洗,脱水,透明,浸蜡,石蜡包埋,将蜡块进行连续切片,片厚  $4 \mu\text{m}$ 。采用 SP 两步法进行 PI3K, Akt, mTOR 免疫组化检测,采用病理图像分析仪对切片进行拍照,镜下观察 PI3K, Akt, mTOR 阳性细胞,阳性细胞表现为黄色或棕黄色,阴性细胞为蓝色或浅蓝色。采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行阳性细胞计数,每张切片随机取 5 个等面积、不重叠的高倍镜(400 倍)视野,计数其阳性细胞数,取其平均值作为该大鼠的阳性细胞数。

**2.5 Real-time PCR 检测各组内膜 p70S6K mRNA 的表达** 在无菌低温环境下将内膜组织剪碎,加入 RNAiso Plus 0.8 mL,混匀,按说明书提取内膜组织 RNA。然后用微量紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,根据  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  计算其纯度,当  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  在 1.8 ~ 2.2 时,则表示提取的 RNA 合格,取样品 RNA 1 500 ng 进行反转录合成 cDNA。将取得的 cDNA 按 PCR 说明书要求,进行配制成总体积为 RT-PCR 反应体系  $10 \mu\text{L}$ ,采用全自动 PCR 仪按以下条件进行 PCR 反应:  $95 ^\circ\text{C}$  变性 30 s;  $95 ^\circ\text{C}$  退火 5 s;  $60 ^\circ\text{C}$  延伸 34 s; 进行 40 次循环。反应结束后获取循环阈

值,分析实验数据。采用 Primer 5.0 软件设计引物,以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参基因。扩增引物序列为 p70S6K (421 bp) 上游 5'-TTTTGGCTCGGAAGGTGG-3, 下游 5-TGTCGGATTGGAAGTGGC-3; 内参序列(150 bp)上游 5-GGAGATTAC TGCCCTGGCTCCTA-3, 下游 5-GACTCATCGTACTCC TGCTTGCTG-3,由宝生物工程(大连)有限公司合成。所有反应均设立 3 个复孔。记录每个反应管中标本的  $C_t$  值,实验结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对定量分析。

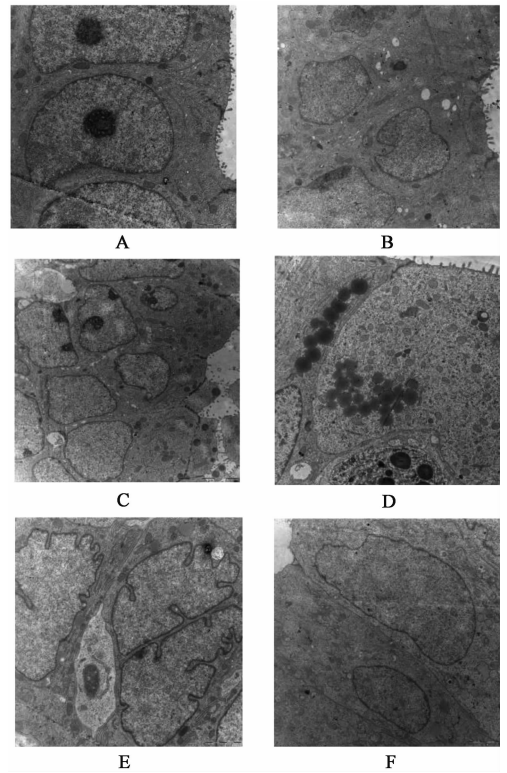
**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,不符合正态分布及方差齐性的采用秩和检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠一般情况** 正常组术后 3 d 内,活动、进食减少,饮水增加,半天后可正常排便,毛杂乱暗淡,爪甲呈淡粉色,舌头呈暗紫红色;术后第 4 天活动恢复正常,毛色恢复光亮,爪甲呈粉红色,舌头呈紫红色,饮食恢复至正常量。造模组术后活动量及进食减少,饮水量增加;部分大鼠术口恢复缓慢,出现腹部鼓胀,无排便,予青霉素治疗后,可恢复排便,腹部鼓胀消失,但较为暴躁;爪甲呈暗红色,舌头呈暗紫红色,毛色暗淡杂乱,活动较前稍减少。在实验灌胃由于呛入气管导致罂痛饮高剂量组大鼠死亡 1 只。

**3.2 对 EMS 大鼠内膜超微结构的影响** 透射电镜观察各组大鼠子宫位内膜,可见正常组细胞内细胞核及细胞器形态正常,核仁明显,细胞形态完整,多为近似柱状;模型组腺上皮细胞排列相对整齐,具备微绒毛,细胞形态基本正常,胞核增大;罂痛饮中、高剂量组和通路阻滞剂组观察腺上皮细胞萎缩或欠整齐,细胞形态改变,且形态多样化,有切迹及凹陷,微绒毛减少或消失,细胞胞核固缩,胞内线粒体减少,并且出现凋亡的间质细胞;罂痛饮低剂量组腺上皮细胞排列不规则,细胞形态不规则,微绒毛减少,胞浆中可见线粒体肿胀,可见脂滴及空泡。见图 1。

**3.3 对 EMS 大鼠内膜 PI3K, Akt, mTOR 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组异位内膜 PI3K, Akt, mTOR 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,罂痛饮中、高剂量、通路阻滞剂组内膜 PI3K, Akt, mTOR 蛋白的表达明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,罂痛饮低剂量组差异无统计学意义;罂痛饮高、中剂量组及通路阻滞剂组之间比较,差异无统计学意义。见图 2~4,表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 通路阻滞剂组;D. 罂痛饮低剂量组;E. 罂痛饮中剂量组;F. 罂痛饮高剂量组(图 2~4 同)

图 1 罂痛饮对 EMS 大鼠内膜超微结构的影响(扫描电镜,  $\times 12\ 000$ )

Fig. 1 Effect of Jiantong decoction on ultra-structure of endometrium in EMS rats(SEM,  $\times 12\ 000$ )

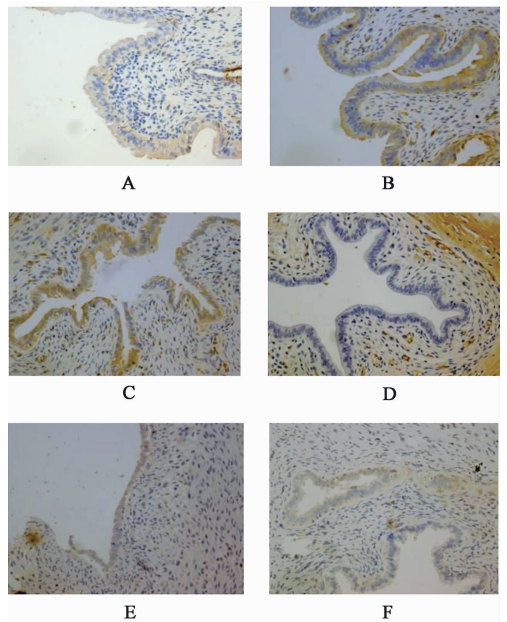


图 2 罂痛饮对 EMS 大鼠内膜组织 PI3K 蛋白表达的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of Jiantong decoction on expression of PI3K protein in EMS rats(IHC,  $\times 400$ )

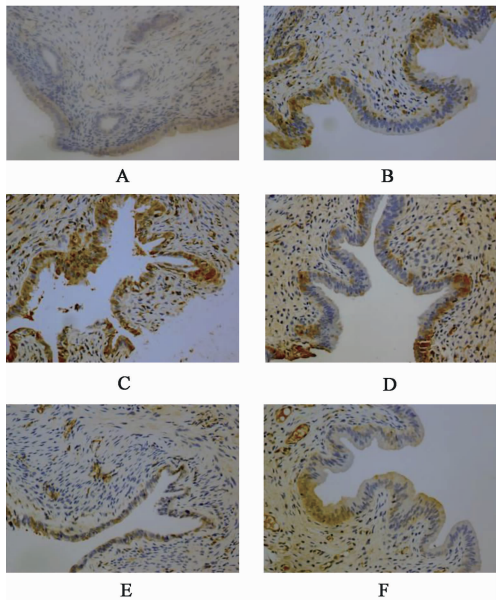


图 3 薏痛饮对 EMS 大鼠内膜组织 Akt 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig.3 Effect of Jiantong decoction on expression of Akt protein in EMS rats(IHC, ×400)

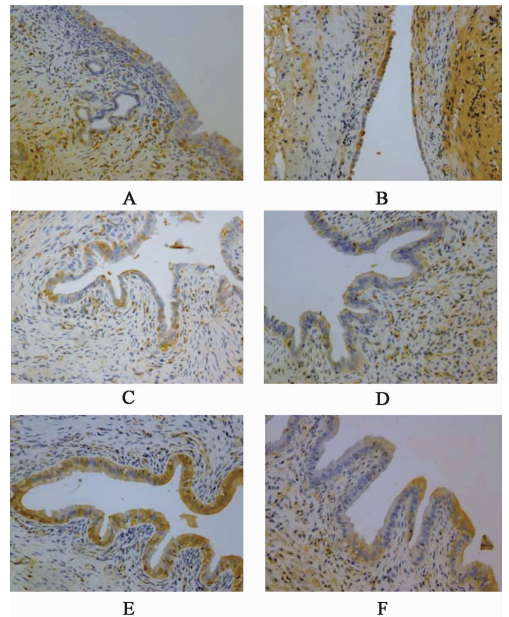


图 4 薏痛饮对 EMS 大鼠内膜组织 mTOR 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig.4 Effect of Jiantong decoction on expression of mTOR protein in EMS rats(IHC, ×400)

表 1 薏痛饮对 EMS 大鼠内膜 PI3K, Akt, mTOR 蛋白表达的影响(̄x ± s)

Table1 Effect of Jiantong decoction on protein expression of PI3K, Akt and mTOR in EMS rats(̄x ± s)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	PI3K	Akt	mTOR
正常	-	8	98.44 ± 15.34	82.14 ± 40.00	78.78 ± 38.18
模型	-	8	179.63 ± 54.45 <sup>1)</sup>	209.02 ± 77.96 <sup>1)</sup>	176.14 ± 82.21 <sup>1)</sup>
薏痛饮	4.8	8	162.84 ± 42.30	200.83 ± 73.32	168.96 ± 72.74
	14.3	8	103.21 ± 17.47 <sup>2,3)</sup>	105.72 ± 28.71 <sup>2,3)</sup>	89.56 ± 34.81 <sup>2,3)</sup>
	42.9	7	115.56 ± 26.14 <sup>2,3)</sup>	109.42 ± 37.00 <sup>2,3)</sup>	96.04 ± 41.55 <sup>2,3)</sup>
通路阻滞剂	0.04	8	118.44 ± 26.86 <sup>2,3)</sup>	115.67 ± 54.63 <sup>2,3)</sup>	95.40 ± 32.98 <sup>2,3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05;与薏痛饮低剂量组比较<sup>3)</sup> P < 0.05(表 2 同)。

### 3.4 对 EMS 大鼠内膜 p70S6K mRNA 表达的影响

与正常组比较,模型组内膜组织 p70S6K mRNA 表达明显升高(P < 0.05);与模型组比较,薏痛饮中、高剂量、通路阻滞剂组 p70S6K mRNA 表达明显降低(P < 0.05),薏痛饮低剂量组差异则无统计学意义;薏痛饮高、中剂量组及阻断剂组之间比较,差异无统计学意义。见表 2。

## 4 讨论

中医虽无 EMS 之名,国医大师班秀文教授根据 EMS 的痛经、不孕、盆腔包块等临床表现,其病程反复发作,缠绵难愈,认为该病的病机为“湿瘀互结”,从湿瘀论治该病,以经验方薏痛饮治疗。课题组

表 2 薏痛饮对 EMS 大鼠内膜组织中 p70S6K mRNA 表达的影响(̄x ± s)

Table 2 Effect of Jiantong decoction on mRNA expression of p70S6K in EMS rats(̄x ± s)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	p70S6K
正常	-	8	0.77 ± 0.41
模型	-	8	2.23 ± 1.24 <sup>1)</sup>
薏痛饮	4.8	8	2.10 ± 1.22
	14.3	8	0.90 ± 0.52 <sup>2,3)</sup>
	42.9	7	0.96 ± 0.55 <sup>2,3)</sup>
通路阻滞剂	0.04	8	0.93 ± 0.71 <sup>2,3)</sup>

前期研究表明罂痛饮通过降低 EMS 大鼠血清 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), 基质金属蛋白酶 2 (MMP-2), 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的水平, 降低异位内膜中 ICAM-1, VEGF 和整合素 ( $\alpha v\beta 3$ ) 的表达, 抑制异位组织新生血管形成进而达到治疗 EMS 的目的<sup>[12-14]</sup>。有研究也表明, 运用活血祛瘀法辨证治疗 EMS, 能下调患者的 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 等促炎因子水平, 从而对 EMS 病情起改善作用<sup>[15]</sup>。另外, 运用活血祛瘀法可抑制多种促血管生成因子的表达, 从而抑制内异症患者新生血管的形成, 从而抑制了异位病灶生长、发展, 起到缓解 EMS 症状, 控制了其病情发展的作用<sup>[16]</sup>。

EMS 发生与细胞的黏附、侵袭和血管形成等密切相关, 如何有效积极防治细胞的黏附、侵袭和血管形成已成为预防 EMS 关键所在。本研究结果发现, 模型组超微结构可见腺上皮细胞排列相对整齐, 具备微绒毛, 细胞形态基本正常, 胞核增大, 证实造模成功。治疗组和阻滞剂组与模型组比较, 可见腺上皮细胞萎缩或欠整齐, 微绒毛减少或消失, 胞核固缩, 胞内线粒体减少, 间质细胞凋亡, 其中以中、高剂量组和阻滞剂组促进细胞凋亡显著, 说明罂痛饮具有抑制上皮间质细胞活性, 促进细胞凋亡, 治疗 EMS。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路主要由 PI3K, Akt 和 mTOR 组成, 是蛋白质合成的主要信号调节通路, 具有调节细胞的生长、增殖、凋亡以及自噬的作用<sup>[17]</sup>。PI3K 属于脂质激酶家族, 是与细胞内信号转导有关的脂类第二信使, 当炎症因子等刺激细胞后, 活化细胞内 PI3K, 将其底物 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 磷酸化转变为 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3)<sup>[18]</sup>。Akt 是 PI3K 通路下游的调节分子, PIP3 与血小板-白细胞 C 激酶同源区结合, 并通过磷脂酰肌醇依赖性激酶 1,2 (PDK1, PDK2) 的第 308 位上的苏氨酸位点 (Thr308) 和第 473 位上的丝氨酸位点 (Ser473) 磷酸化激活 Akt<sup>[19]</sup>。激活后的 PI3K/Akt 通过磷酸化进一步激活其靶向调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR 等下游分子<sup>[20]</sup>。mTOR 是信号通路交汇的重要枢纽, 在哺乳动物中主要以雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mTORC1) 和雷帕霉素靶蛋白复合物 2 (mTORC2) 存在。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是 PI3K 相关的蛋白激酶家族成员。mTOR 丝氨酸 2448 位点易被 PI3K/Akt 等激酶激活而发生磷酸化, 磷酸化后的 mTOR 具有生物活性, 进一步

磷酸化下游位点 p70S6K, p70S6K 在苏氨酸 389 位点被磷酸化后而激活, 进一步影响后续的进程。p70S6K 磷酸化后激活其功能, 同样促进蛋白质的合成<sup>[21]</sup>。活化后的 mTOR 既能加速细胞周期, 也可通过抑制自噬的发生调控细胞的生长<sup>[22]</sup>。本研究结果发现, 与正常组比较, 模型组 PI3K, Akt, mTOR 蛋白含量增加, p70S6K mRNA 表达明显高于正常水平, 说明 EMS PI3K/Akt/mTOR 通路处于激活状态。与模型组比较, 罂痛饮中、高剂量组和阻滞剂组 PI3K, Akt, mTOR 蛋白含量减少, p70S6K mRNA 表达下调。

罂痛饮方中龙血竭、三七粉化瘀止痛, 消癥散结; 鸡血藤、丹参活血通经, 祛瘀止痛; 在活血化瘀的基础注意兼顾女子阴常不足、易虚易瘀特点, 用当归、川芎、赤芍养血补血, 活血化瘀; 由于“血不利则为水”, 在活血化瘀的基础上予以白术、土茯苓温肾健脾利湿, 补骨脂温肾壮阳, 温化水湿; 泽兰活血化瘀, 通经, 利水消肿, 既能利水祛湿, 又能活血化瘀, 使湿祛瘀化, 利湿而不伤阴; 炙甘草合芍药缓急止痛, 共奏化瘀止痛、健脾化湿、温肾助孕的功效。

本研究结果显示罂痛饮中、高剂量可降低大鼠异位内膜组织中 PI3K, Akt, mTOR 的蛋白含量, 下调 p70S6K mRNA 表达, 使腺上皮细胞萎缩, 微绒毛减少, 细胞胞核固缩, 线粒体减少, 间质细胞凋亡而达到治疗的目的。因此罂痛饮能够抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路的激活, 从而促进细胞的凋亡, 这可能是其作用于 EMS 的机制之一。本研究探讨了罂痛饮对 EMS 的调节效应, 佐证中医病机“湿瘀互结”的理论内涵, 为中医药从湿瘀论治 EMS 提供客观依据, 也为中药复方多靶点多通路作用的起效模式的论证提供了科学依据, 可为治疗 EMS 开辟新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Schliep K C, Mumford S L, Peterson C M, et al. Pain typology and incident endometriosis[J]. Hum Reprod, 2015,30(10):2427-2438.
- [2] Saba L, Sulcis R, Melis G B, et al. Endometriosis: the role of magnetic resonance imaging[J]. Acta Radiol, 2015,56(3):355-367.
- [3] Vercellini P, Vigano P, Somigliana E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014,10(5):261-275.
- [4] Burney R O, Giudice L C. Pathogenesis and

- pathophysiology of endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(3): 511-519.
- [5] GUAN Y T, HUANG Y Q, WU J B, et al. Overexpression of chloride channel-3 is associated with the increased migration and invasion ability of ectopic endometrial cells from patients with endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(5): 986-998.
- [6] Nissim H, Nahum S. Upstream and downstream of mTOR [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1926-1945
- [7] 万鹏云, 傅芬. PI3K/Akt/mTOR 信号通路对子宫内膜异位症的调节作用 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(33): 5577-5579.
- [8] Mahaut L, Carole N, Charlotte N, et al. The mTOR/Akt inhibitor tEMSirolimus prevents deep infiltrating endometriosis in mice [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(2): 880-889.
- [9] 李卫红, 李莉, 李卫民, 等. 罂痛饮治疗子宫内膜异位症的临床观察 [J]. *四川中医*, 2009, 27(10): 79-80.
- [10] 李卫红, 谭文举, 李莉. 罂痛饮对大鼠子宫内膜异位症 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(24): 4029-4032.
- [11] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203-204.
- [12] 李卫红, 谭文举, 李莉. 罂痛饮对大鼠子宫内膜异位症 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(24): 4029-4032.
- [13] 李卫红, 李莉, 宋小燕. 罂痛饮对子宫内膜异位症大鼠血管生长因子的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2010, 17(1): 34-35.
- [14] 李卫红, 李莉, 谭文举. 罂痛饮对大鼠子宫内膜异位症微血管密度的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(22): 181-183.
- [15] 刘洁云, 郭洁, 吴雅俊, 等. 琥珀散加减辨治子宫内膜异位症疼痛(血瘀证)的疗效作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17): 205-230.
- [16] 周艳, 刘明珠, 宫瘤消胶囊对子宫内膜异位症气滞血瘀证血管生成机制的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21): 200-205.
- [17] XU G, ZHANG W, Bertram P, et al. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-Akt-mTOR pathway in common human tumors [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(4): 893-900.
- [18] Pene F, Claessens Y E, Muller O, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma [J]. *Oncogene*, 2002, 21(43): 6587-6597.
- [19] Otto C, Wessler S, Fritzemeier K H. Exploiting nongenomic estrogen receptor-mediated signaling for the development of pathway-selective estrogen receptor ligands [J]. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 2006(1): 163-181.
- [20] HUANG S, Houghton P J. Targeting mTOR signaling for cancer therapy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(4): 371-377.
- [21] ZHOU X, TAN M, Hawthorne V S, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6779-6788.
- [22] Jung C H, Ro S H, CAO J, et al. mTOR regulation of autophagy [J]. *Febs Lett*, 2010, 584(7): 1287-1295.

[责任编辑 周冰冰]