

本文引用: 邝梓君, 卢洁, 贾金金, 曾诚, 韩慧, 李佩琼, 曾玉燕. 基于实验及网络药理学探讨芍药甘草汤治疗子宫腺肌病的机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2211-2222.

基于实验及网络药理学探讨芍药甘草汤治疗子宫腺肌病的机制

邝梓君¹, 卢洁², 贾金金², 曾诚³, 韩慧¹, 李佩琼¹, 曾玉燕^{4*}

1. 佛山市第一人民医院, 广东 佛山 528000; 2. 广州中医药大学 广东 广州 510405;
3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 4. 广东省中医院, 广东 广州 510120

[摘要] **目的** 研究芍药甘草汤对子宫腺肌病(adenomyosis, AM)间质细胞的影响,并基于网络药理学探讨芍药甘草汤治疗 AM 的分子机制。**方法** 原代培养 AM 原代间质细胞,制备芍药甘草汤 SD 大鼠含药血清,采用随机数字法将其分为空白组、正常血清组、芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组。采用 MTT 法检测芍药甘草汤含药血清对 AM 间质细胞增殖的影响;采用划痕实验检测 AM 间质细胞的迁移情况;采用流式细胞术检测 AM 间质细胞的凋亡情况;采用网络药理学方法研究芍药甘草汤治疗 AM 的主要活性成分、关键靶点和通路。**结果** 与干预 24 h 后比较,干预 48 h 后芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量各组 AM 间质细胞增殖率均降低($P<0.05$),筛选出 48 h 干预时间的细胞进行后续实验;与空白组、正常血清组比较,干预 24 h 后芍药甘草汤含药血清中、高剂量组 AM 间质细胞增殖率降低($P<0.05$),干预 48 h 后芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组 AM 间质细胞增殖率降低、迁移距离缩短、凋亡率升高($P<0.05$)。与芍药甘草汤含药血清低剂量组比较,干预 48 h 后芍药甘草汤含药血清中、高剂量组 AM 间质细胞增殖率降低、迁移距离缩短、凋亡率升高($P<0.05$);与芍药甘草汤含药血清中剂量组比较,干预 48 h 后芍药甘草汤含药血清高剂量组 AM 间质细胞增殖率降低、迁移距离缩短、凋亡率升高($P<0.05$)。网络药理学提示芍药甘草汤治疗 AM 的中药成分涉及 98 个中药成分,58 个关键靶点,其中核心靶点有 13 个,主要作用于磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B 信号(Phosphatidylinositol 3-kinase-RAC serine/threonine-protein kinase, PI3K-Akt)通路、局部黏附、缺氧诱导因子-1 信号(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)通路、雌激素信号通路、类固醇激素生物合成、丝裂原活化蛋白激酶信号(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路、卵巢类固醇合成等 130 条信号通路。**结论** 芍药甘草汤通过抑制 AM 间质细胞增殖、迁移,促进 AM 间质细胞凋亡从而发挥治疗作用,其效果呈浓度和时间依赖性;芍药甘草汤可能通过多成分、多靶点、多信号通路相互作用抑制 AM 的发生发展,缓解痛经,为下一步深入探讨芍药甘草汤治疗 AM 的起效靶点和具体调控机制提供科学依据。

[关键词] 网络药理学;芍药甘草汤;子宫腺肌病;细胞增殖;细胞凋亡;细胞迁移

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.011

Molecular mechanism of Shaoyao Gancao Decoction in the treatment of adenomyosis based on experiment and network pharmacology

KUANG Zijun¹, LU Jie², JIA Jinjin², ZENG Cheng³, HAN Hui¹, LI Peiqiong¹, ZENG Yuyan^{4*}

1. The First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 3. The First Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 4. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China.

[收稿日期] 2023-08-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904233);广东省中医院朝阳人才课题项目(ZY2022KY04)。

[第一作者] 邝梓君,女,硕士,住院医师,研究方向:中医药防治妇科疾病。

[通信作者] * 曾玉燕 女,博士,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:459577808@qq.com。

[Abstract] Objective To study the effect of Shaoyao Gancao Decoction (SYGCD) on stromal cells of adenomyosis (AM), and to explore the molecular mechanism of SYGCD in the treatment of adenomyosis based on network pharmacology. **Methods** Stromal cells of AM were cultivated. The SYGCD for SD rats was prepared. They were randomly divided into a blank group, normal serum group, and groups with low-, medium-, and high-dose of SYGCD. The MTT method was used to detect the effects of SYGCD on the proliferation of AM stromal cells, the scratch test was used to detect the migration of AM stromal cells, and flow cytometry was used to detect the apoptosis of AM stromal cells. Network pharmacology methods were taken to determine the main active ingredients, key targets, and pathways of SYGCD in treating AM. **Results** Compared with 24 h of intervention, the proliferation rate of the low-, medium-, and high-dose of SYGCD decreased after 48 h of intervention ($P<0.05$). Therefore, a 48 h intervention time was selected for subsequent experiments. Compared with the blank group and normal serum group, after 24 h of intervention with SYGCD, the medium-, and high-dose of SYGCD had a significant inhibitory effect on AM stromal cell proliferation ($P<0.05$). Compared with the blank group and normal serum group, after 48 h of intervention, the proliferation rate, and migration distance of AM stromal cells in the low-, medium-, and high-dose groups of SYGCD showed a gradually decreasing trend ($P<0.05$), and the apoptosis rate gradually increased ($P<0.05$). Compared with the low-dose SYGCD group, after 48 h of intervention, the proliferation rate, and migration distance of AM stromal cells in the medium-, and high-dose SYGCD groups showed a gradually decreasing trend ($P<0.05$), and the apoptosis rate gradually increased ($P<0.05$). Compared with the medium-dose SYGCD group, after 48 h of intervention, the proliferation rate, and migration distance of AM stromal cells in the high-dose SYGCD group showed a gradually decreasing trend ($P<0.05$), and the apoptosis rate gradually increased ($P<0.05$). Network pharmacology suggests that SYGCD in treating AM involves 98 Chinese medicines components and 58 targets, of which 13 are core targets. The key targets mainly acted on 130 signaling pathways, including Phosphatidylinositol 3-kinase-RAC serine/threonine-protein kinase (PI3K-Akt) signaling pathway, local adhesion, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling pathway, estrogen signaling pathway, steroid hormone biosynthesis, steroid hormone biosynthesis, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, and ovarian steroidogenesis. **Conclusion** SYGCD can inhibit the proliferation and migration of AM stromal cells, and promote AM stromal cell apoptosis to treat AM. Its effect is concentration and time dependent. SYGCD functions to inhibit the AM development and relieve dysmenorrhea probably by the interactions of multiple components, multiple targets, and multiple signal pathways, and it provides a scientific basis for further exploring the effective targets and specific regulatory mechanisms in the treatment of AM.

[Keywords] network pharmacology; Shaoyao Gancao Decoction; adenomyosis; cell proliferation; cell apoptosis; cell migration

子宫腺肌病(adenomyosis, AM)是指具有活性的子宫内膜腺体和间质侵入正常的子宫肌层,形成弥漫性或局限性的病变,进而引起渐进性痛经、月经过多、不孕等临床表现,严重影响患者的身心健康^[1]。AM在育龄期女性中的发病率为7%~23%,且逐渐年轻化^[2]。该病发病机制复杂,与子宫内膜底部内陷及组织损伤修复、子宫肌层内的胚胎多能干细胞化生、炎症刺激、上皮-间质转化、血管生成、遗传、免疫反应等机制相关^[2]。其根治性方法是行子宫全切除术,但考虑到年龄、生育要求等因素,该方法只适用于少数患者。而非甾体抗炎药、孕激素类药物、促性腺激素释放激素激动剂等药物治疗可缓解患者临床症状,但临床疗效短暂,具有一定毒副作用,停药后容易复发。

AM归属于中医学“月经过多”“痛经”“癥瘕”“不孕”等疾病范畴。中医药对缓解AM相关症状,尤其是缓解疼痛方面疗效显著,可控制病灶,不影

响患者的生育需求^[3]。芍药甘草汤出自《伤寒杂病论·辨太阳病脉证并治》,以芍药为君、甘草为臣,仅此二药配伍而成,组方精简,具有养血敛阴、调和肝脾、缓急止痛之功效。现代药理学和临床研究表明,芍药甘草汤具有显著的解痉镇痛等作用^[4-5],常用于治疗痉挛性、疼痛性、炎症性疾病以及妇科疾病等^[6]。本研究旨在探讨经典名方芍药甘草汤对AM间质细胞的影响,并通过网络药理学研究进一步发掘芍药甘草汤治疗AM可能涉及的分子作用机制。

1 实验研究

1.1 主要试剂

DMEM(武汉 Servicebio 生物科技有限公司,批号:G4510);澳洲胎牛血清、胰酶+酚红+0.25%EDTA(美国 GIBCO 公司,批号分别为:10099-141、25200056);胶原酶 I 型(美国 Sigma 公司,批号:C0130);广谱细胞角蛋白抗体、波形蛋白抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为:ZM-0069、ZM-0260);

酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物(上海 Gene Tech 公司,批号:GK500505A);青霉素-链霉素溶液(双抗,100×)(武汉 Procell 公司,批号:PB180120);PBS 缓冲液(1X)(Biosharp 公司,批号:BL302A);MTT(美国 MCE 公司,批号:HY-15924);Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号:KGA1026);二甲基亚砷(DMSO)(美国 MP 公司,批号:196055)。

1.2 主要仪器

CO₂ 恒温培养箱[上海一恒科学仪器有限公司,型号:BPN-150CH(UV)];倒置显微镜(广州 Mshot 科技有限公司,型号:MF52-N);台式低速离心机、台式高速离心机(湖南可成仪器设备有限公司,型号分别为:L3-5K、H1-16K);恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司,型号:HH-2);流式细胞仪(美国 BECKMAN 公司,型号:CytoFLEX);酶联免疫分析仪(山东 BIOBASE 公司,型号:BK-EL10C)。

1.3 标本取材

实验所需人体组织取自 2020 年 9 月至 2021 年 12 月于广东省中医院妇科住院并要求行全子宫切除手术治疗的 AM 痛经患者共 10 例。子宫离体后,在无菌条件下解剖子宫,取较硬处病灶 3 cm×3 cm×2 cm。该实验通过广东省中医院伦理委员会同意(伦理审批号:BF-2020-123-01)。

1.4 实验方法

1.4.1 AM 原代细胞培养及细胞鉴定 标本用无菌眼科剪碎组织至 1 mm×1 mm×1 mm,加入 I 型胶原酶,为组织体积 2~3 倍。置于 37 ℃ 恒温水浴箱中消化 4~6 h 后终止消化,以 100 目滤网过滤后 400 目复滤,留取滤出的混悬液,置于离心机以 1 000 r/min 离心 10 min(离心半径 62.5 mm),共 2 次,弃上清液,向装有沉淀物的离心管中加入含 10% FBS 的 DMEM 细胞完全培养基 4 mL,以 5×10⁵ 种植至 25 cm×25 cm 的细胞培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。48 h 后第 1 次换液,之后视细胞生长情况 3~5 d 换液 1 次,在细胞生长融合达到 80%~90% 时,进行细胞传代培养,取第 2~3 代细胞进行实验。免疫细胞化学染色法(immunocytochemistry, ICC)以波形蛋白抗体、角蛋白抗体对 AM 间质细胞进行染色鉴定。

1.4.2 芍药甘草汤水煎液药物制备 购置白芍

180 g、甘草 72 g(购于广东省中医院中药房,批号分别为 2111005、G042171),药材分别碎成粉末状,再次配比,8 倍量蒸馏水煮沸 10 min,转文火煮 50 min。在 80 ℃ 下浓缩至流浸膏状,定容至 1 mL 含生药 0.3 g 的芍药甘草汤水煎液。

1.4.3 含药血清的制备 根据含药血清剂量不同,分为:正常血清组,芍药甘草汤低、中、高剂量组。大鼠的给药剂量按《药理实验方法学》^[7]标准动物的等效剂量折算系数的 5 倍。芍药甘草汤低、中、高剂量分别为 1.15×10³、2.31×10³、4.62×10³ mg/(kg·d)。含药血清制备方法参照课题组前期研究^[8]:将上述浓度配制后,每只大鼠灌胃 2 mL,正常血清组予等量的生理盐水。早晚各 1 次,间隔 12 h,共 3 d。第 3 天给药时禁食不禁饮,最后 1 次给药 1 h 后对大鼠进行腹主动脉取血,血清在室温静置 1 h,离心、分离,同组血清混匀,56 ℃ 水浴 30 min 作灭活处理,0.22 μm 微孔滤膜除菌,所得血清分装保存于 -80 ℃ 冰箱备用,避免反复冻融。

1.4.4 MTT 法检测细胞增殖 取对数期生长的 AM 间质细胞种植于 96 孔版中,每孔约 1×10⁴ 个细胞。分为以下 5 组:空白组(AM 原代细胞),正常血清组(AM 原代细胞+正常血清),AM 原代细胞+芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组,各组依次培养,干预 24 h、48 h 之后换成完全培养基 100 μL,每孔加入 MTT 溶液 10 μL,CO₂ 培养箱中继续培养 2 h,吸出培养基,加入 150 μL DMSO 震荡 10 min,酶标仪上以 570 nm 波长检测各孔吸光度(OD),计算细胞增殖率,筛选出效果更显著的干预时间继续下一步的实验步骤。细胞生长增殖率(%)=(用药组 OD-空白组 OD)/(正常血清组 OD-空白组 OD)×100%。

1.4.5 细胞划痕检测细胞迁移水平 取对数期生长的 AM 间质细胞,分组同“1.4.4”。根据 MTT 实验结果筛选出干预时间为 48 h。马克笔在 6 孔板背后,均匀地划横线,横穿过孔;以 1×10⁶ 个/孔接种于细胞培养 6 孔板,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养过夜;待细胞密度达到 90% 以上,铺满 6 孔板底部,用枪头垂至于背后的横线划痕;用 PBS 洗涤细胞 3 次,去除划下的细胞,加入对应血清,同时拍摄照片;放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,拍取 48 h 照片。

1.4.6 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期、生长状态良好的 AM 细胞,分组同“1.4.4”。以 5×10^5 个/孔接种于细胞培养 6 孔板,分别加入对应血清,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,胰酶消化收集细胞,用 PBS 将细胞润洗 2 次,1 200 r/min, 5 min 离心(离心半径 62.5 mm),加入 500 μ L Binding Buffer,重悬细胞,加入 5 μ L AnnexinV-APC 混匀后加入 5 μ L 7-AAD,混匀,室温避光反应 5~15 min,流式细胞仪上机检测,计算细胞凋亡率。

1.5 统计分析

使用 SPSS 29.0 软件进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,对于多组计量资料进行正态性检验及方差齐性检验;满足正态分布、方差齐的条件,则采用单因素 ANOVA 检验,有统计学意义则使用 LSD 法进行组间差异性比较;若满足正态分布,但不满足方差齐的条件,则采用塔姆黑尼法比较组间差异性;若不满足正态分布,则需要采用 Kruskal-Wallis 进行非参数检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 网络药理学分析

2.1 数据库与软件

TCMSP 数据库(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>), PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), Swiss-ADME 网络数据库(<http://www.swissadme.ch/index.php>), Swiss Target Prediction 网络数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>), GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>), STRING 数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>), Metascape 数据库(<http://metascape.org/gp/index.html>), 微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>), 易汉博生物信息在线作图(<http://www.ehbio.com/ImageGP/index.php/Home/Index/GOenrichmentplot.html>), 网络拓扑属性分析软件 Cytoscape 3.6.0。

2.2 芍药甘草汤活性成分的筛选

将“白芍”“甘草”作为 Herd name 输入 TCMSP 数据库,检索其化学成分,并根据文献进行补充。在 TCMSP 数据库设置口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 及类药性(druglikeness, DL) ≥ 0.18 , 获得白芍和甘草的主要活性成分。根据文献补充的化合物以“经胃肠可吸收度=‘HIGH’, DL ≥ 2 个‘YES’”为条件在 SwissADME 数据库进行筛选。

2.3 药物作用靶点的预测及疾病靶点的获取

经过上述方法筛选获得芍药甘草汤的主要活性成分后,通过 PubChem 数据库获得其 Canonical SMILE 结构,并输入 Swiss Target Prediction 网络数据库进行主要活性成分的靶点预测分析,提取可能性大于 0 的作用靶点。把“adenomyosis”作为检索词在 GeneCards 数据库获得 AM 的相关靶点。

2.4 药物-活性成分-关键靶点网络的构建

将疾病靶点与药物作用靶点取交集,得到芍药甘草汤治疗 AM 的关键靶点。借助在线制作工具 Draw Venn Diagram 绘制韦恩图。利用 Cytoscape 3.6.0 软件构建“药物-活性成分-关键靶点”网络并进行网络拓扑异构学分析,寻找芍药甘草汤治疗 AM 的重要活性成分和靶点。

2.5 靶点蛋白相关互作网络的构建

采用 STRING 数据库对芍药甘草汤治疗 AM 的关键靶点进行蛋白质相互作用分析,并借助 Cytoscape 3.6.0 对蛋白互作关系进行可视化分析,以节点度值(Degree)、中介中心度(Betweenness Centrality)、紧密中心性(Closeness Centrality)等作为筛选指标,首先以“Degree \geq 中位数”作为筛选条件进行第一次靶点提取分析,随后以“Degree、Betweenness Centrality、Closeness Centrality \geq 中位数”作为筛选条件进行第二次靶点提取分析,逐步筛选出芍药甘草汤治疗 AM 的核心靶点。利用 Metascape 数据库,依据分子复合物检测算法(molecular complex detection, MCODE)对关键靶点的 PPI 网络进行模块分析及功能注释。

2.6 关键靶点 GO 和 KEGG 通路富集分析

借助 Metascape 数据库对芍药甘草汤治疗 AM 的关键靶点进行基因功能 GO 富集分析和 KEGG 通路分析,选择 $P < 0.01$, 最小计数 3, 富集因子 > 1.5 的基因功能群分别进行分子功能、生物过程、细胞组成以及 KEGG 通路进行分析。同时,利用在线作图工具微生信平台及易汉博生物信息在线作图构建 GO 富集分析柱状图和 KEGG 通路信息图。

3 结果

3.1 原代细胞培养及鉴定

在提取原代细胞 48~72 h 后,显微镜下观察部分细胞可贴壁。培养过程中 AM 间质细胞呈典型梭形生长,相互平行排列,活力较好。细胞冻存复苏后

细胞活性稳定,形态大致与原代细胞相同。ICC结果显示,间质细胞标志性蛋白波形蛋白成强阳性表达,而上皮细胞标志性蛋白角蛋白呈阴性表达,说明细胞活性和纯度均较高,可用于后续实验研究。详见图1。

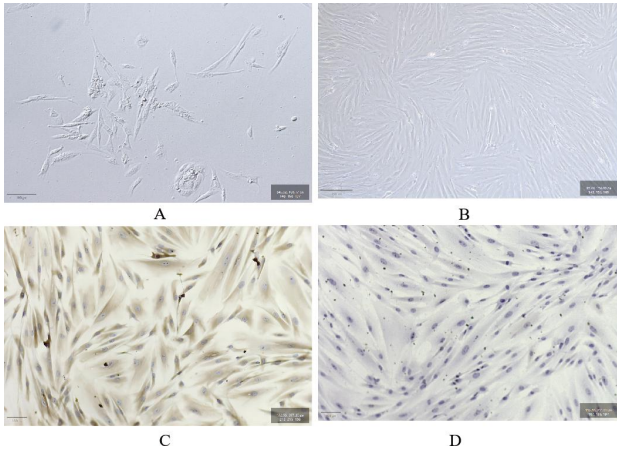


图1 AM间质细胞图(ICC×100)

注:A.AM间质细胞培养48h;B.AM间质细胞培养7d;C.AM间质细胞波形蛋白;D.AM间质细胞角蛋白。

3.2 芍药甘草汤对AM间质细胞增殖率的影响

与干预24h后比较,干预48h后芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量各组细胞增殖率均降低($P<0.05$),提示48h抑制细胞增殖率明显强于24h,效果呈时间依赖性,故筛选出48h干预时间的细胞进行后续实验。与空白组、正常血清组比较,干预24h后芍药甘草汤含药血清中、高剂量组细胞增殖率降低($P<0.05$),干预48h后芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组细胞增殖率降低($P<0.05$)。与芍药甘草汤含药血清低剂量组比较,干预48h后芍药甘草汤含药血清中、高剂量组细胞增殖率降低($P<0.05$);与

芍药甘草汤含药血清中剂量组比较,芍药甘草汤含药血清高剂量组细胞增殖率降低($P<0.05$)。详见表1。

表1 芍药甘草汤含药血清对AM间质细胞增殖率的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	24 h		48 h	
	OD值	增殖率/%	OD值	增殖率/%
A	0.65±0.03	1.00	0.88±0.03	1.00
B	0.64±0.01	0.98±0.05	0.86±0.01	0.97±0.05
C	0.61±0.02	0.93±0.02	0.75±0.01	0.84±0.02**
D	0.53±0.02	0.81±0.06**	0.67±0.03	0.75±0.03** [△]
E	0.48±0.02	0.72±0.06**	0.54±0.02	0.58±0.04** ^{△▲}

注:A.空白组;B.正常血清组;C、D、E组分别为芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组。与24h比较,** $P<0.05$;与空白组比较,* $P<0.05$;与正常血清组比较,* $P<0.05$;与芍药甘草汤含药血清低剂量组比较,[△] $P<0.05$;与芍药甘草汤含药血清中剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

3.3 芍药甘草汤对AM间质细胞迁移的影响

与空白组、正常血清组比较,干预48h后芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组细胞迁移距离均缩短($P<0.05$)。与芍药甘草汤含药血清低剂量组比较,干预48h后芍药甘草汤含药血清中、高剂量组细胞迁移距离缩短($P<0.05$);与芍药甘草汤含药血清中剂量组比较,芍药甘草汤含药血清高剂量组细胞迁移距离缩短($P<0.05$)。详见表2、图2。

表2 芍药甘草汤含药血清对AM间质细胞迁移的影响

分组	48 h 迁移距离(像素)
空白组	631.00±5.66
正常血清组	643.33±13.20
芍药甘草汤含药低剂量组	491.67±8.81**
芍药甘草汤含药中剂量组	421.00±0.82** [△]
芍药甘草汤含药高剂量组	241.67±7.76** ^{△▲}

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与正常血清组比较,** $P<0.05$;与芍药甘草汤含药血清低剂量组比较,[△] $P<0.05$;与芍药甘草汤含药血清中剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

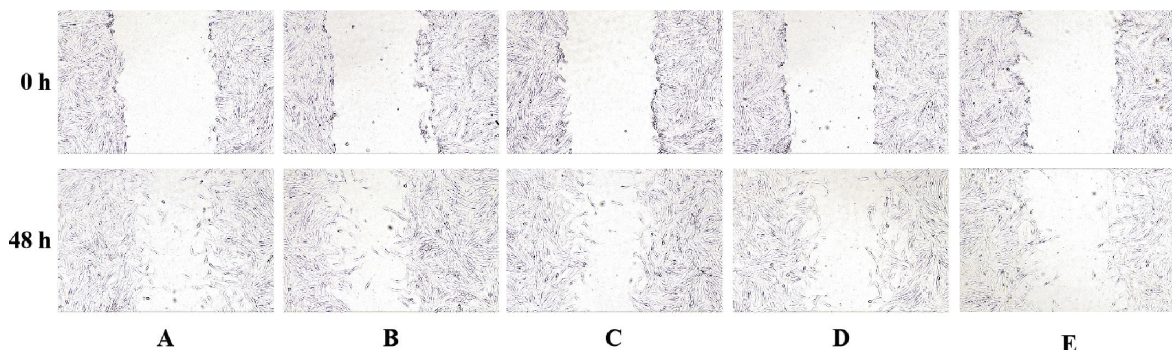


图2 细胞划痕实验(ICC×100)

注:A.空白组;B.正常血清组;C、D、E组分别为芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组。

3.4 芍药甘草汤对 AM 间质细胞凋亡的影响

与空白组、正常血清组比较,干预 48 h 后芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)。与芍药甘草汤含药血清低剂量组比较,干预 48 h 后芍药甘草汤含药血清中、高剂量组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$);与芍药甘草汤含药血清中剂量组比较,芍药甘草汤含药血清高剂量组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)。详见表 3、图 3。

表 3 芍药甘草汤含药血清对 AM 间质细胞凋亡的影响

分组	48 h 总凋亡率/%
空白组	0.054 7±0.007 4
正常血清组	0.056 2±0.004 7
芍药甘草汤含药低剂量组	0.132 9±0.007 0**
芍药甘草汤含药中剂量组	0.181 0±0.002 0**△
芍药甘草汤含药高剂量组	0.318 4±0.004 7**△▲

注:与空白组比较, * $P<0.05$;与正常血清组比较, * $P<0.05$;与芍药甘草汤含药血清低剂量组比较, △ $P<0.05$;与芍药甘草汤含药血清中剂量组比较, ▲ $P<0.05$ 。

3.5 芍药甘草汤活性成分及靶点的筛选

根据 TCMSp 数据库,共获得白芍化合物 85 个,甘草化合物 92 个。根据文献报道,补充了白芍化合

物 36 个。但限于 OB、DL、胃肠可吸收度等条件及 Pubchem、Swiss Target Prediction 数据库的筛选,最终得到白芍化合物 21 个、甘草化合物 86 个,二者共有化合物 3 个,分别为白桦脂酸、谷甾醇、山柰酚。通过 Swiss Target Prediction 数据库的预测,共获得芍药甘草的作用靶点共 822 个。以“adenomyosis”作为检索词在 GeneCards 数据库检索得到 AM 的相关靶点 294 个。二者进行交集,并制作韦恩图,详见图 4。得到芍药甘草汤治疗 AM 的关键靶点 58 个,涉及 98 个中药成分,约占总活性成分 95%。

通过 Cytoscape 3.6.0 构建“药物-活性成分-关键靶点”网络并行性网络拓扑异构学分析,详见图 5。该网络图包含 158 个节点、917 条边,其中绿色三角形节点代表中药,五边形橙色节点代表活性成分,圆形红色节点代表关键靶点。Degree 值越大,则节点面积越大,颜色越深。根据 Degree 值排名,前十的化学成分甘草宁 G(Gancaonin G)、鳞叶甘草素 A(Glepidotin A)、刺果甘草查尔酮(Glypallichalcone)、Kanzonol F、8 α -羟基甘草次酸(18 α -hydroxyglycyrrhetic acid)、白藜芦醇(Resveratrol)、苜蓿毒素(Medicarpin)、7-甲氧基-2-甲基异黄酮(7-Methoxy-2-methyl isoflav-

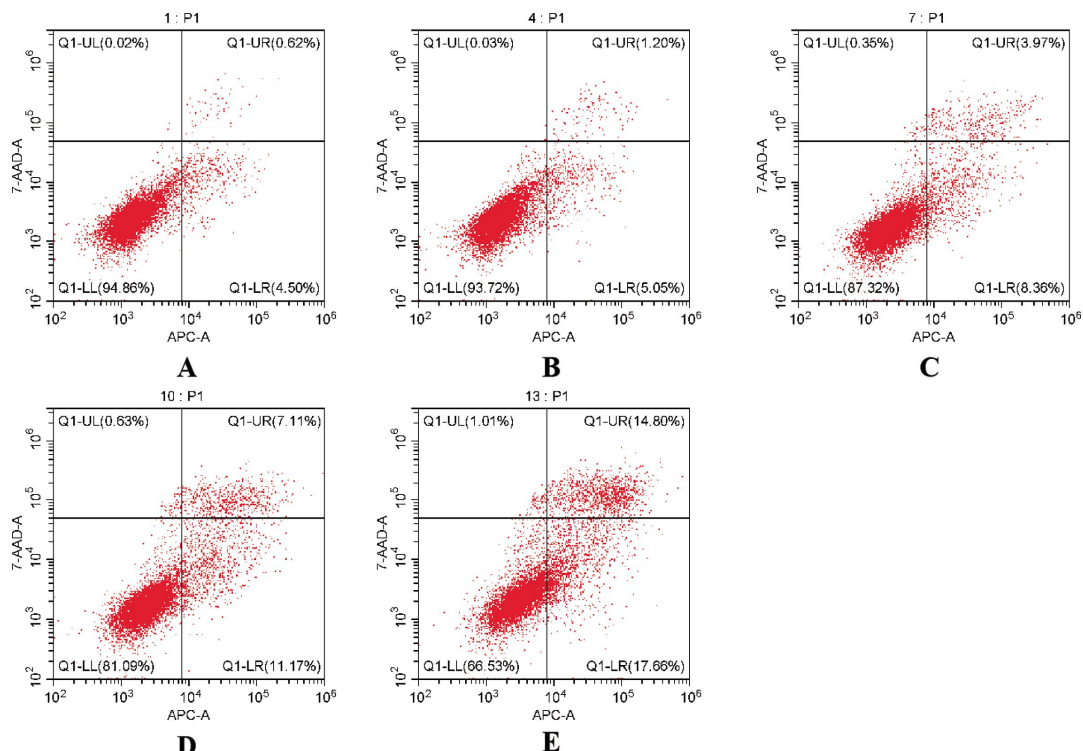


图 3 流式检测细胞凋亡实验

注:A.空白组;B.正常血清组;C、D、E组分别为芍药甘草汤含药血清低、中、高剂量组。

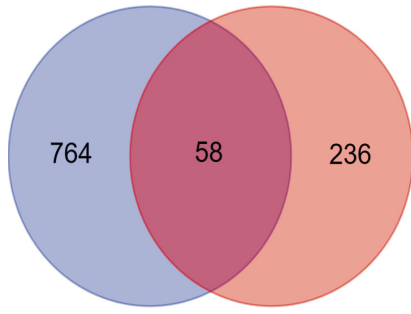


图4 疾病与药物靶点的韦恩图

one)、山柰酚(kaempferol)、异三醇(Isotrifoliol)。排名前十的靶点为雌激素β受体(estrogen receptor β, ESRβ)、雌激素α受体(estrogen receptor α, ESRα)、P450芳香化酶基因(cytochrome P-450AROM, CYP19A1)、17-β-羟基类固醇脱氢酶2型(17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, HSD17B2)、表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)、基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、多不饱和脂肪酸5-脂氧合酶(polyunsaturated fatty acid 5-lipoxygenase, ALOX5)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)。详见表4。

3.6 靶点蛋白相关互作网络的构建与分析

利用STRING数据库对芍药甘草汤的作用靶点进行蛋白质相互作用分析,获取其蛋白质相互作用关系,借助Cytoscape3.6.0构建PPI网络。该网络包含58个节点,相互关系440条,Degree值中位数为12。以“Degree ≥ 12”为条件筛选提取核心网络,进行网络拓扑异构学分析,计算得到Degree、Betweenness

Centrality、Closeness Centrality 中位数后,以“Degree ≥ 16, Betweenness Centrality ≥ 0.006 782 9, Closeness Centrality ≥ 0.681 818 18”作为条件,进行第2次核心网络的提取,过程如图6。最终得到PPI网络含有13个节点,包括血管生长内皮因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、EGFR、MMP-9、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(serine/threonine-protein kinase mTOR, mTOR)、细胞周期蛋白D1(G1/S-specific cyclin-D1, CCND1)、前列腺素内环氧化物合成酶2(prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、MMP-2、RAC-α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、纤维母细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF2)、ESR1、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ)、孕激素受体(progesterone receptor, PGR)是芍药甘草汤治疗AM的核心靶点。

3.7 分子复合物检测

通过Metascape数据库的MCODE算法对关键靶点的PPI网络进行模块预测,结果显示靶蛋白中有功能相似的蛋白复合物,K-core值>3的共有5个。每个模块中的蛋白有着紧密的联系,协同参与调控某条信号通路、某项生物过程或某种分子功能。各模块蛋白聚集的生物过程和通路分析。详见表5。

3.8 GO基因富集分析

利用Metascape数据库对关键靶点进行GO富集分析,筛选P<0.01,最小计数3,富集因子>1.5的条目,显示芍药甘草汤治疗AM涉及1 164个生物过

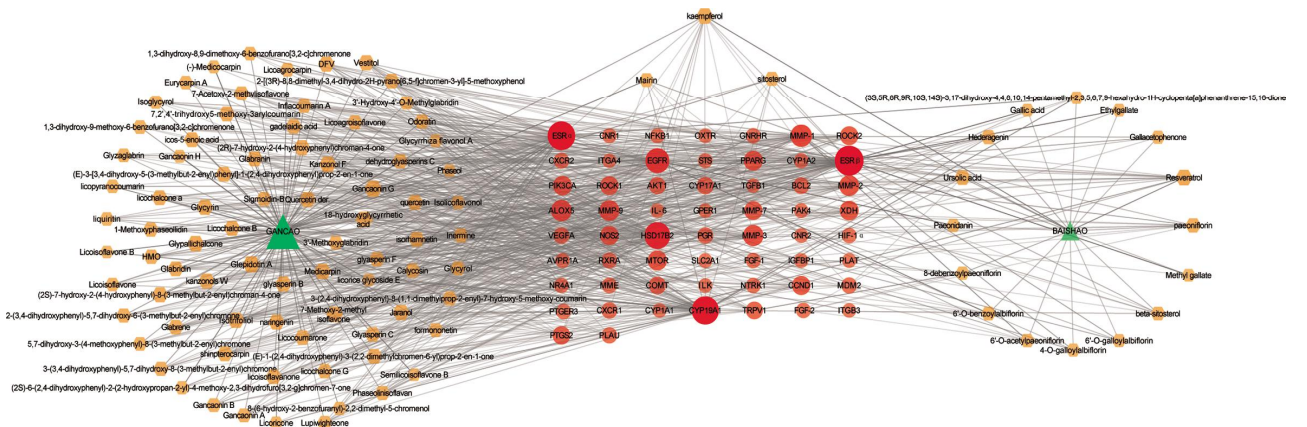


图5 芍药甘草汤“药物-活性成分-关键靶点”网络图

表 4 Degree 排名前十的活性成分及关键靶点信息

活性成分	节点度值	中介中心度	紧密中心性	邻域连通性	来源
Gancaoanin G	19	0.022 005	0.464 497	9.902 439	甘草
Glepidotin A	18	0.022 334	0.459 064	7.105 263	甘草
Glypallichalcone	16	0.008 168	0.448 571	27.666 670	甘草
Kanzonol F	16	0.028 996	0.451 149	35.307 690	甘草
18 α -hydroxyglycyrrhetic acid	16	0.034 152	0.451 149	31.285 710	甘草
Resveratrol	16	0.025 127	0.459 064	32.750 000	白芍
Medicarpin	15	0.008 069	0.448 571	38.285 710	甘草
7-Methoxy-2-methyl isoflavone	15	0.013 034	0.453 757	34.866 670	甘草
kaempferol	15	0.009 805	0.456 395	37.416 670	甘草、白芍
Isotrifoliol	15	0.021 982	0.451 149	42.125 000	甘草
ESR β	64	0.121 141	0.537 671	10.531 250	甘草、白芍
ESR α	59	0.088 825	0.519 868	10.610 169	甘草、白芍
CYP19A1	57	0.090 073	0.509 740	10.421 053	甘草、白芍
HSD17B2	51	0.056 624	0.487 578	11.215 686	甘草、白芍
EGFR	43	0.063 739	0.459 064	10.744 186	甘草、白芍
MMP-1	33	0.038 850	0.422 043	10.787 879	甘草、白芍
ALOX5	29	0.019 253	0.415 344	12.034 483	甘草、白芍
MMP-3	28	0.018 207	0.417 553	13.142 857	甘草、白芍
MMP-2	26	0.013 700	0.410 995	12.807 692	甘草、白芍
MMP-9	26	0.020 197	0.404 639	11.961 538	甘草、白芍

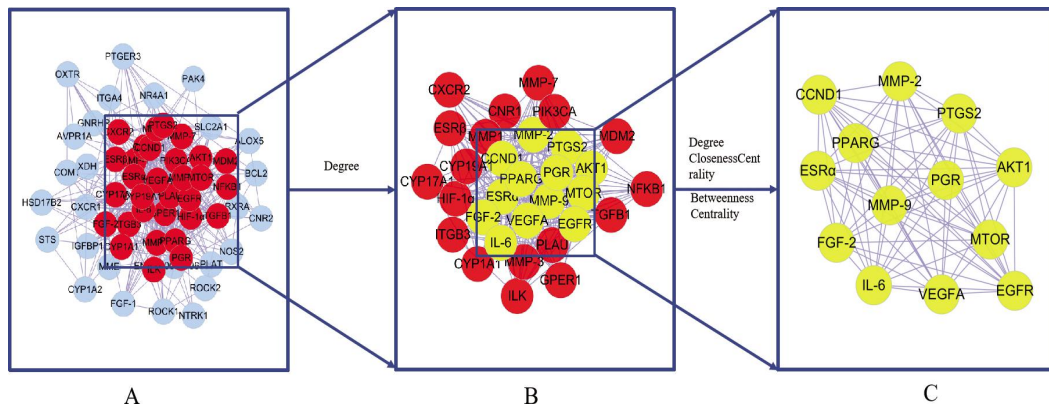


图 6 芍药甘草汤关键靶点 PPI 网络

注:A.PPI 网络(58nodes, 440edges);B.“Degree ≥ 12 ”的核心网络(31nodes, 265edges);C.“Degree ≥ 16 , Betweenness Centrality ≥ 0.0067829 , Closeness Centrality ≥ 0.681818 ”的核心网络(13nodes, 75edges)。

表 5 芍药甘草汤关键靶点 PPI 网络 MCODE 模块分析

MCODE(模块)	蛋白	生物过程	通路
MCODE1	NTRK1、FGF-1、FGF-2、PIK3CA、AKT1、MDM2、HIF-1 α 、MTOR	调节蛋白激酶 B 信号转导、激活蛋白激酶活性	癌症通路、PI3K Akt 信号通路、癌症中心碳代谢途径
MCODE2	GPER1、CNR1、CXCR1、CXCR2、CNR2、PTGER3	第二信使介导的信号转导、胞浆钙离子浓度正调控	神经活性配体-受体相互作用通路
MCODE3	MMP-2、TGFB1、VEGFA、ROCK1、ROCK2、ITGB3	蛋白主要与组织重塑、血管形态发生、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路	癌症中的蛋白多糖、癌症通路
MCODE4	NR4A1、RXRA、NFKB1、ESR α 、ESR β	蛋白主要与激素刺激的细胞反应、RNA 聚合酶 II 启动子的转录起始、DNA 模板转录起始	催乳素信号通路、癌症通路
MCODE5	CYP1A1、CYP1A2、CYP17A1、CYP19A1	细胞激素代谢过程、雌激素代谢过程、激素代谢过程	类固醇激素生物合成、卵巢类固醇生成

程、50个细胞组成、69个分子功能。根据P值排名,生物过程、细胞组成和分子功能各前二十的富集条目,详见图7。结果提示芍药甘草汤治疗AM主要参与细胞迁移、细胞运动、细胞成分运动的正调控,上皮细胞增殖、血管发育、腺体发育等生物过程,调控发挥核受体活性、转录因子活性、类固醇激素受体活性、趋化因子结合、雌激素受体活性等分子功能,涉

及核膜、细胞外基质、细胞体、轴突、神经元细胞体等细胞组成。

3.9 KEGG 通路分析

利用Metascape数据库对关键靶点进行GO富集分析,筛选 $P < 0.01$ 、最小计数3、富集因子 > 1.5 的条目,共得到130条。根据P值排名,前二十名通路详见图8。以癌症居多,包括癌症通路、癌症的微小

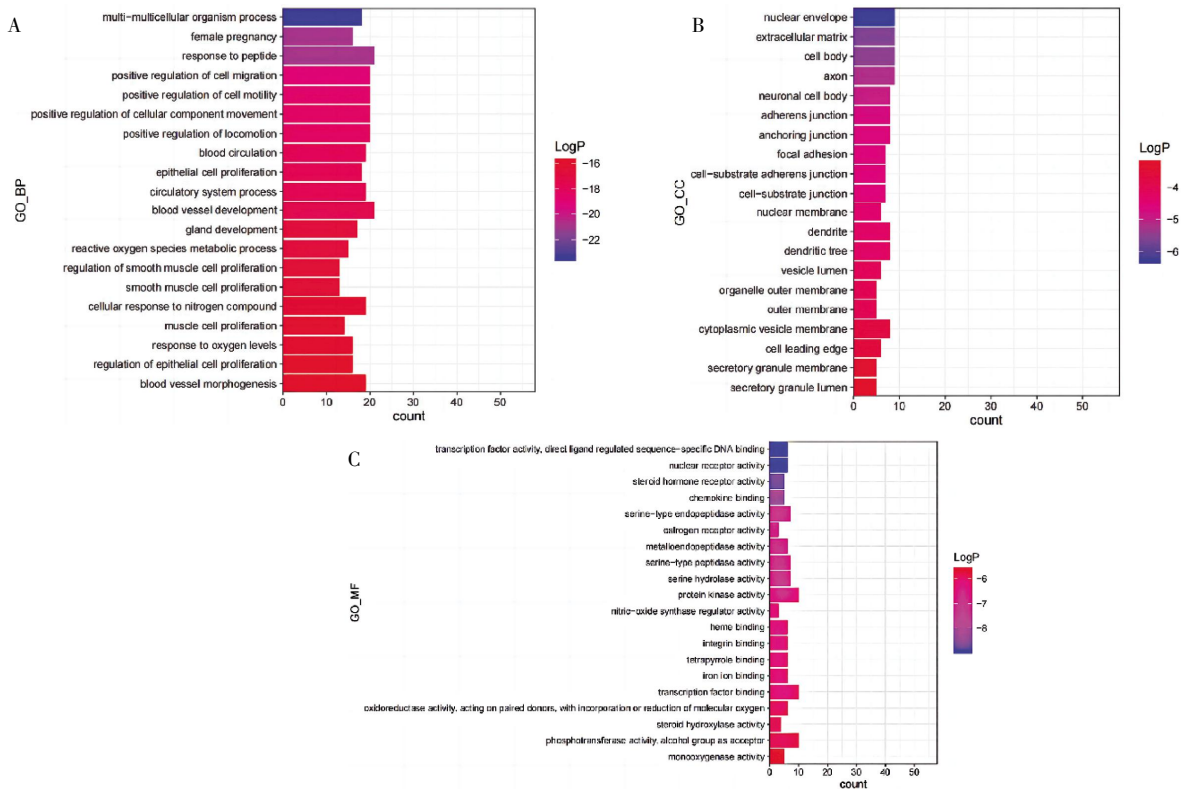


图7 芍药甘草汤 GO 富集分析

注: A.生物过程; B.细胞组成; C.分子功能。

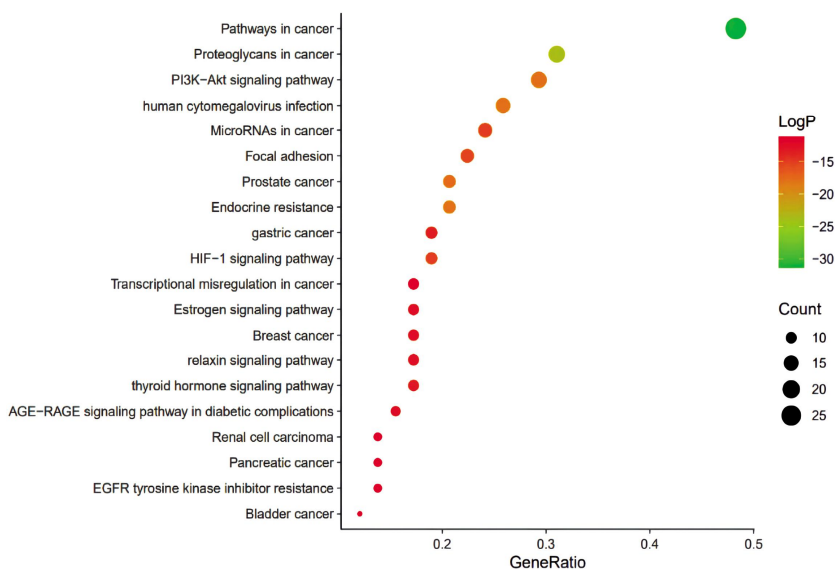


图8 芍药甘草汤 KEGG 通路富集分析

RNA、前列腺癌、胃癌、癌症中的转录失调、乳腺癌、肾细胞癌、胰腺癌、膀胱癌等,提示芍药甘草汤可能具有潜在的抗癌治疗作用,有待进一步验证。在富集的条目中,芍药甘草汤治疗AM可能涉及的通路主要包括内分泌抵抗、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶B信号(Phosphatidylinositol 3-kinase-RAC serine/threonine-protein kinase, PI3K-Akt)信号通路、局部黏附、缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)信号通路、雌激素信号通路、类固醇激素生物合成、丝裂原活化蛋白激酶信号(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、卵巢类固醇生成等,这些通路主要与血管生成、炎症反应、细胞增殖、细胞迁移侵袭、细胞凋亡、性激素合成代谢等相关。

4 讨论

AM发病率逐年增高,其中15%~30%的患者痛经,AM也可导致继发性不孕、早期流产^[9]等,给患者造成极大的心理负担。中医学认为AM的根本病机是机体气血失和,脏腑功能失调、冲任损伤,致部分经血不循常道而逆行,“离经”之血瘀积,蓄积胞宫,瘀滞日久则为癥瘕^[10]。芍药甘草汤是缓急止痛名方,方中白芍具有养血调经、柔肝止痛、平抑肝阳功效;甘草补益脾气、清热解毒、缓急止痛、调和诸药。临床上芍药甘草汤常用于治疗颈肩腰腿痛证、消化性溃疡、三叉神经痛等多种痛症^[11]。郑仁省等^[12]研究结果提示,芍药甘草汤治疗痛经可有效改善临床症状,降低炎症指标,缓解疼痛。现代药理学研究证实,芍药甘草汤具有抗炎镇痛、神经保护、解痉镇痛等作用^[13]。本研究表明,芍药甘草汤含药血清能显著抑制AM间质细胞的增殖、迁移,促进AM间质细胞凋亡,疗效呈浓度和时间依赖性,其中以高浓度芍药甘草汤含药血清干预48 h效果最好。

结合实验结果及网络药理学结果,本课题组认为芍药甘草汤是通过MMP、EGFR、CCND1、HIF-1、PI3K-Akt信号通路等多成分、多靶点、多信号通路的相互作用,抑制AM间质细胞增殖、迁移、促进细胞凋亡,干预AM的发生发展,缓解痛经。MMP是降解和重建细胞外基质的重要蛋白酶,它可以通过蛋白质水解法降解细胞外基质的各种成分,使细胞能

够入侵组织。研究证实,MMP-9、MMP-2在AM患者中显著表达,且与VEGF的表达呈正相关,MMP-9、MMP-2的高表达促进了子宫内膜细胞的迁移、侵袭的过程以及血管生成过程^[14]。EGFR是一种细胞膜表面的糖蛋白受体,具有酪氨酸激酶活性。当EGFR内在蛋白激酶被激活,形成磷酸化的EGFR后,可参与多种下游信号通路调控细胞的增殖、抑制细胞凋亡、诱发肿瘤血管产生、增强肿瘤细胞的迁移和侵袭。磷酸化信号传导与转录激活因子3(phospho-signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)是位于EGFR下游的细胞质转录因子,能促进内皮细胞的迁移及微血管的形成,降解肿瘤基底膜和细胞外基质,降低细胞间黏附能力,以此来促进肿瘤细胞的侵袭和转移。EGFR、STAT3在AM在位内膜及异位内膜中的表达均高于正常内膜组。研究证实,加味芍药甘草汤可抑制EGFR和p-EGFR,使其下游STAT3和p-STAT3的表达下降,从而抑制AM细胞的迁移和增殖^[15]。EGFR与VEGF受体VEGFR具有的共同下游信号通路PI3K/AKT/mTOR与血管生成、细胞增殖、生长、转移和黏附相关。Akt1参与调节细胞代谢、增殖、凋亡和血管生成等。PI3K-Akt信号通路参与多种生长因子、细胞因子和细胞外机制的信号转导,并可调控细胞增殖、分化、凋亡、存活等生物过程^[16-17]。mTOR是Akt下游的一个重要作用靶点,介导细胞内外多种信号对细胞代谢、生长、增殖等重要生命活动的调节^[18-19]。PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活促进了AM病灶细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成^[20-21]。此外,局灶黏附与细胞的增殖、生长、迁移有关,该信号中的重要启动因子局部黏着斑激酶被证实AM患者的在位内膜中高表达,其下游通路有MAPK信号通路和PI3K-Akt信号通路,共同调节细胞与细胞外基质的黏附,促进内膜细胞向肌层侵入,形成异位内膜病灶^[22-23]。人类CCND1基因位于11号染色体长臂上,其编码的细胞周期蛋白cyclin D1是细胞周期从G1-S过度的关键调控因子,主要通过细胞增殖途径参与肿瘤的形成^[24]。最新研究表明,采用PI3K α 抑制剂BYL719或mTOR抑制剂everolimus靶向抑制PI3K/mTOR信号通路相关因子的表达可下调cyclin D1蛋白水平^[25]。Cyclin D1过表达主要与周期蛋白依赖性蛋白激酶4(cyclin-

dependent kinase4, CDK4)或CDK6、CDK2 结合成复合物,加快细胞通过 G1 检查点,具有推动细胞周期进程的作用,与异位子宫内膜的异常生长、增殖、浸润、转移及复发等恶性生物学表现有关^[26]。研究发现,AM 作为一种雌激素依赖性疾病,雌激素受体过度激活可以下调细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂和上调细胞周期蛋白依赖性激酶、cyclin D1、CDK2、CDK2、CDK6,参与AM 的发生过程^[27]。HIF-1 在 AM 组织中也存在高表达,被认为从血管生成、细胞侵袭等方面参与了AM 的发生发展过程^[28-30],但具体机制研究较少。AM 与子宫内膜异位症在发病过程、症状、治疗均有相似之处。在子宫内膜异位症中,HIF-1 α 可上调异位内膜基质细胞中转化生长因子- β 1(transforming growth factor beta-1 proprotein, TGF- β 1)的分泌,激活 TGF- β 1/母体抗生物皮肤生长因子同源物(transforming growth factor beta-1 proprotein/mothers against decapentaplegic homolog, TGF- β 1/Smad)信号通路,从而促进整合蛋白表达,增强异位子宫内膜间质细胞的黏附能力^[31]。此外,HIF-1 α 表达激活了 β -连环蛋白/T 细胞因子(β -catenin/T-cell factor)信号通路,诱导 VEGFR 和 MMP-9 的表达^[32],HIF-1 α 可以通过诱导自噬从而触发上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[33-34],促进异位子宫内膜细胞的迁移和侵袭能力。以上机制也可能促进 AM 的发生。

综上所述,芍药甘草汤可能通过干预 MMP-9、MMP-2、VEGF、EGFR、CCND1、局部黏着斑激酶、HIF-1 等多个靶点的表达,及调控以上靶点与 PI3K/Akt/mTOR、HIF-1、MAPK 等多个信号通路的相互作用,从而抑制 AM 细胞的增殖、迁移和血管生成从而发挥治疗效果。

此外,网络药理学研究结果提示,芍药甘草汤可能通过调控类固醇激素和抗炎镇痛等机制治疗 AM。课题组前期研究证明,AM 组织中雌激素及受体表达水平升高,且通过雌激素激活及剥夺状态证实雌激素及其受体可促进 AM 病灶细胞增殖^[35]。后续实验也证实,以芍药、甘草为主的中药复方及其含药血清均能明显降低细胞雌激素受体水平,并通过干预雌激素受体与 miR-21 介导的 Ras/Raf 通路形成的信号交通网,对 AM 痛经患者起治疗作用^[36-37]。

5 结语

本研究证实了芍药甘草汤含药血清通过抑制间质细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡发挥治疗作用,并通过网络药理学分析芍药甘草汤治疗 AM 的主要活血成分、关键靶点及可能涉及的分子机制,体现了 AM 发病机制的复杂性以及中药复方芍药甘草汤“多成分-多靶点-多途径”的药物特点,课题组下一步将对主要调控的靶点进行实验验证,并通过其进行靶向调控等实验,并探索具体的分子机制。

参考文献

- [1] 郭孙伟,刘惜时. 子宫腺肌病发病机制和病理生理研究进展[J]. 山东大学学报(医学版), 2022, 60(7): 6-19.
- [2] 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.
- [3] 王舒鹤,朱颖,金季玲. 金季玲以肾为核心治疗子宫腺肌病经验探析[J]. 中医药导报, 2022, 28(7): 151-154.
- [4] 续艳丽,李少泓,李坚,等. 经典名方芍药甘草汤解痉功效的关键质量属性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 721-729.
- [5] 陈平,曾瑾,杨安东,等. 古代经典名方芍药甘草汤的处方及关键信息考证[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(6): 195-203.
- [6] 曲缘章,马生军,朱广伟,等. 芍药甘草汤的历史沿革与现代研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 216-225.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 203.
- [8] ZENG Y Y, LI K Y. Effects of Jiawei Shaoyao-Gancao Decoction and its drug-containing serum on proliferation, apoptosis, and ultrastructure of human adenomyosis foci cells[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017: 7821095.
- [9] 子宫腺肌病伴不孕症诊疗中国专家共识编写组. 子宫腺肌病伴不孕症诊疗中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(4): 287-295.
- [10] 罗颂平,刘雁峰. 中医妇科学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2016: 271.
- [11] 肖垚垚,朱菁,刘心雨,等. 芍药甘草汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(24): 7960-7969.
- [12] 郑仁省,刘金里. 芍药甘草汤对痛经患者血清 IL-1 β 、TNF- α 及疼痛的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(4): 614-616.
- [13] 鲍斌,赵咏麟,王辉俊,等. 芍药甘草汤化学成分、药动学及药效学研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(4): 98-105.

- [14] LI T, LI Y G, PU D M. Matrix metalloproteinase-2 and-9 expression correlated with angiogenesis in human adenomyosis[J]. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 2006, 62(4): 229-235.
- [15] 姜心禅, 范为之, 王 帅, 等. 加味芍药甘草汤对子宫腺肌症细胞增殖和迁移能力的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(2): 292-295.
- [16] 钟佳琳, 郑 立, 贺 花, 等. PI3K/Akt 信号通路相关的生物学调控机制研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(1): 143-147.
- [17] 宋亚静, 马玉聪, 杜惠兰. PI3K-AKT 信号通路在复发性流产的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(19): 2876-2880.
- [18] 郭宇丹. 加味芍药甘草汤对子宫腺肌病 PTEN 调控 PI3K/Akt 信号通路的干预[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [19] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [20] GUO J B, GAO J M, YU X H, et al. Expression of DJ-1 and mTOR in eutopic and ectopic endometria of patients with endometriosis and adenomyosis[J]. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 2015, 79(3): 195-200.
- [21] DRIVA T S, SCHATZ C, SOBOČAN M, et al. The role of mTOR and eIF signaling in benign endometrial diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3416.
- [22] ZHENG D X, DUAN H, WANG S, et al. FAK regulates epithelial-mesenchymal transition in adenomyosis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 18(6): 5461-5472.
- [23] 郑德璇, 段 华, 汪 沙, 等. 局部粘着斑激酶和钙粘素 E 在子宫腺肌病子宫内层中的表达与意义[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2018, 10(2): 27-31.
- [24] 于贺军, 李 冰, 薛秀娟, 等. 细胞周期蛋白 D1、p27 及增殖细胞核抗原在前列腺癌中的表达及意义[J]. *癌症进展*, 2020, 18(19): 2033-2036.
- [25] CAI Z J, WANG J R, LI Y D, et al. Overexpressed Cyclin D1 and CDK4 proteins are responsible for the resistance to CDK4/6 inhibitor in breast cancer that can be reversed by PI3K/mTOR inhibitors[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(1): 94-109.
- [26] 张爱群, 孙富国. 细胞周期蛋白 D1 在卵巢子宫内层异位症中的表达及意义[J]. *天津医药*, 2010, 38(11): 1001-1002.
- [27] SUN F Q, DUAN H, WANG S, et al. 17 β -estradiol induces overproliferation in adenomyotic human uterine smooth muscle cells of the junctional zone through hyperactivation of the estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK signaling pathway[J]. *Reproductive Sciences*, 2015, 22(11): 1436-1444.
- [28] 贺凌云, 朱 炜, 罗君玲. 子宫腺肌病中缺氧诱导因子-1 的表达及其临床意义[J]. *中国医学创新*, 2017, 14(7): 27-30.
- [29] 张继红, 余繁荣, 张 蓉. 子宫腺肌病中 HIF-1 α 与 MMP-2 的表达及临床意义[J]. *中国现代医生*, 2013, 51(6): 63-65.
- [30] 徐 歌, 李 青, 张灿灿, 等. 子宫腺肌病组织及原代细胞中 PARP-1、HIF-1 α 的表达及临床意义[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2022, 60(4): 55-61.
- [31] LIN X, DAI Y D, XU W Z, et al. Hypoxia promotes ectopic adhesion ability of endometrial stromal cells via TGF- β 1/smad signaling in endometriosis[J]. *Endocrinology*, 2018, 159 (4): 1630-1641.
- [32] XIONG W Q, ZHANG L, XIONG Y, et al. Hypoxia promotes invasion of endometrial stromal cells via hypoxia-inducible factor 1 α upregulation-mediated β -catenin activation in endometriosis[J]. *Reproductive Sciences*, 2016, 23(4): 531-541.
- [33] XIONG Y, LIU Y, XIONG W Q, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α -induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells may contribute to the development of endometriosis[J]. *Human Reproduction*, 2016, 31(6): 1327-1338.
- [34] LIU H W, DU Y, ZHANG Z B, et al. Autophagy contributes to hypoxia-induced epithelial to mesenchymal transition of endometrial epithelial cells in endometriosis[J]. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(5): 968-981.
- [35] 曾玉燕, 关永格, 李坤寅. 雌激素及其受体、芳香化酶在子宫腺肌病中的作用[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(3): 383-387.
- [36] 曾玉燕. 子宫腺肌病 ER 及 miR-21 介导的 Ras/Raf 通路作用机制及加味芍药甘草汤对其的干预[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [37] 曾玉燕, 李坤寅, 关永格. 加味芍药甘草汤及含药血清对子宫腺肌病 E2、ER 及芳香化酶 P450 的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(9): 722-728.

(本文编辑 田梦妍)