

inhibitor protects against blood-brain barrier dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes *via* the AMPK/HO-1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524 (2): 354-359.

[17] Chen X, Gawryluk J W, Wagener J F, *et al.* Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer’s disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 40.

[18] 薛文静, 杨一格, 柴若宁, 等. Rho/ROCK 信号通路炎症细胞因子的研究进展[J]. 心脏杂志, 2023, 35(1): 94-98.

[19] Xie X, Chang X, Chen L, *et al.* Berberine ameliorates experimental diabetes-induced renal inflammation and fibronectin by inhibiting the activation of RhoA/ROCK signaling[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 381(1-2): 56-65.

[20] Feng S, Zou L, Wang H J, *et al.* RhoA/ROCK-2 pathway inhibition and tight junction protein upregulation by catalpol suppresses lipopolysaccharide-induced disruption of blood-brain barrier permeability[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2371.

[21] Kim Y, Cho A Y, Kim H C, *et al.* Effects of natural polyphenols on oxidative stress-mediated blood-brain barrier dysfunction[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(2): 197.

基于 Raf/MEK/ERK 信号通路探讨内异康复片对 hEM15A 细胞的影响

周奕含, 庞丽丽, 杨 唯, 尹小兰, 张 颖, 张丽叶, 文 怡*
(成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072)

摘要: **目的** 探讨内异康复片对子宫内膜异位症 (EMT) 内膜间质细胞 hEM15A 的影响。**方法** 制备内异康复片含药血清, 将 hEM15A 细胞分为空白对照组, 阴性对照组, 5%、10%、20% 含药血清组。采用 CCK-8 法检测细胞活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡, Transwell 法检测细胞迁移, Western blo 法检测 RKIP 及 Raf/MEK/ERK 通路相关蛋白表达。再将 hEM15A 细胞分为阴性对照组、10% 含药血清组、si-RKIP-1 组、si-RKIP-1+10% 含药血清组, 观察上述检测指标的变化。**结果** 与阴性对照组比较, 各浓度含药血清组 hEM15A 细胞活性降低 ($P<0.05$), 凋亡率、RKIP 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 10% 及 20% 含药血清组 hEM15A 细胞迁移数、p-MEK 及 p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P<0.05$), p-Raf 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与阴性对照组比较, si-RKIP-1 组 hEM15A 细胞活性、迁移数升高 ($P<0.05$), RKIP 蛋白表达降低 ($P<0.05$), p-Raf、p-ERK1/2、p-MEK 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与 10% 含药血清组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组 hEM15A 细胞活性、迁移数升高 ($P<0.05$), 凋亡率降低 ($P<0.05$), RKIP 蛋白表达降低 ($P<0.05$), p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。**结论** 内异康复片可能通过调节 RKIP 及其介导的 Raf/MEK/ERK 信号通路抑制 hEM15A 细胞活性和迁移, 促进 ESC 凋亡, 发挥改善 EMT 的作用。

关键词: 内异康复片; 子宫内膜异位症; Raf 激酶抑制蛋白 (RKIP); Raf/MEK/ERK 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)06-2062-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.049

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMT) 多发于育龄期女性^[1], 严重危害着女性的生殖健康和生活质量, 其发病机制尚不明确。目前存在手术治疗后易复发、术后盆腔粘连, 且激素治疗存在副作用较大、疗效难以持久、不能同时兼顾妊娠需求等问题。在长期的临床实践中发现, 中医药治疗 EMT 在缓解痛经、控制病灶生长、提高妊娠率等方面有较好的疗效, 其机制研究已经成为妇科领域的热点。

内异康复片是成都中医药大学附属医院的院内制剂, 已应用于临床数十年并取得了良好的疗效^[2]。前期研究发现, Ras 蛋白在模型小鼠在位及异位内膜中的表达升高, 且经过内异康复片干预后表达下降^[3-4]。而目前已有研究证实 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路受 Raf 激酶抑制蛋白 (Raf kinase inhibitory protein, RKIP) 调控^[5]。本研究通过观察内异康复片含药血清干预后, EMT 子宫在位内膜间质细胞 hEM15A 活性、迁移、凋亡的变化, 及 RKIP 与 Raf/MEK/ERK 信号通路相关蛋白的表达变化, 探讨内异康复片治疗 EMT 的分子生物学机制。

收稿日期: 2023-06-15

基金项目: 成都中医药大学“杏林学者”人才科研提升计划项目 (XSGG2019018); 成都中医药大学附属医院科技发展基金项目 (18PY02, 20-Y09)

作者简介: 周奕含 (1994—), 女, 硕士, 从事中医药防治妇科痛症、炎症性疾病研究。Tel: 19953688613, E-mail: 563256204@qq.com

* 通信作者: 文 怡 (1978—), 女 (满族), 博士, 副教授, 从事中医药防治妇科痛症、炎症性疾病研究。Tel: 13094431644, E-mail: wenyi@cdutcm.edu.cn

1 材料

1.1 细胞 子宫内膜异位症 (EMT) 内膜间质细胞系 hEM15A 细胞 (货号 XY-XB-2132, 美国 ATCC 中心)。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠购自成都达硕实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2020-030], 饲养于成都中医药大学 [实验动物使用许可证号 SYXK (川) 2020-124], 实验经成都中医药大学附属医院实验动物伦理委员会审查通过 (伦理号 2021DL-012 号)。

1.3 药物 内异康复片 (批准文号川药制字 Z20070659, 批号 20200603) 购自成都中医药大学附属医院, 为院内制剂, 组方药材水蛭、三棱、莪术、大血藤、半枝莲、大黄、桃仁、土鳖虫、薏苡仁、浙贝母、牡蛎、鳖甲。

1.4 试剂 Annexin V-APC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物科技股份有限公司; Western、IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; RiboFect™ CP Transfection Kit、Si-h-RKIP_001 Standard 购自广东博锐集团有限公司; β -actin 兔克隆抗体、预染蛋白 Marker、MEK 兔克隆抗体、p-MEK 兔克隆抗体、p-ERK1/2 兔克隆抗体、ERK1/2 兔克隆抗体均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; p-Raf 兔克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; RKIP 兔克隆抗体、Raf 兔克隆抗体、生物素化山羊抗兔 IgG (H+L) 均购自英国 Abcam 公司。

2 方法

2.1 含药血清制备 选取雄性 SD 大鼠, 分为正常组和给药组, 每组 5 只。按照临床 7 倍用量, 给药组每天灌胃给予 0.63 g/kg 内异康复片溶液, 正常组灌胃给予等体积蒸馏水, 连续 3 d 后, 腹主动脉取血, 4 ℃ 静置过夜, 1 500 r/min 离心 15 min, 收集血清, 56 ℃ 水浴灭活 30 min, 过滤后分装, -20 ℃ 保存。

2.2 细胞转染 将 hEM15A 细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 转染 2 个 siRNA (编号 1, 位置 599-624, 5'-CGAGTGGGATGACTATGTGCCCAA-3'; 编号 2, 位置 622-646, 5'-AACTGTACGAGCAGCTGTCTGGGAA-3')。方法为将 siRNA 冻干粉使用 RNase-free Water 配制成为贮存液, 经 riboFect™ CP 缓冲液稀释后混匀, 加入 riboFect™ CP 试剂后吹打混匀, 室温孵育, riboFect™ CP 混合液加入细胞培养基中配制成转染试剂, 加入 6 孔板, 于 37 ℃ 培养箱培养。

2.3 分组及培养 ①内异康复片含药血清干预实验, 将细胞分为空白对照组 (100% 培养基)、阴性对照组 (10% 空白血清+90% 培养基)、5% 含药血清组 (5% 含药血清+95% 培养基)、10% 含药血清组 (10% 含药血清+90% 培养基)、20% 含药血清组 (20% 含药血清+80% 培养基)。②siRNA 转染抑制 RKIP 实验, 将细胞分为 si-NC 组 (空载体转染)、si-RKIP-1 组 (编号 1 siRNA 转染)、si-RKIP-2 组 (编号 2 siRNA 转染)。③转染 si-RKIP 对含药血清的影响实验, 将细胞分为阴性对照组 (10% 空白血清+90% 培养基)、10%

含药血清组 (10% 含药血清+90% 培养基)、si-RKIP-1 组 (编号 1 siRNA 转染)、si-RKIP-1+10% 含药血清组 (编号 1 siRNA 转染+10% 含药血清+90% 培养基)。PBS 洗涤 hEM15A 细胞, 经常规胰酶消化, 常温下离心 5 min, 吸弃上清液后再加适量培养基, 种板后于 37 ℃、5% CO₂ 恒温细胞箱中培养 48 h。

2.4 CCK-8 法检测细胞活性 每组 4 个复孔, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 培养 2 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度 (OD) 值。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 每组 3 个复孔, 吸取上清液, hEM15A 细胞经 PBS 洗涤后弃上清液, 经不含有 EDTA 的胰酶消化, 加入培养基终止消化, 离心 5 min, 吸弃上清液, 加入 PBS 离心 5 min, 弃上清液, 收集细胞沉淀, 用结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-APC/PI 染液吹匀后加入 5 μ L PI, 避光孵育 15 min, 上机检测。

2.6 Transwell 小室迁移实验 每组 3 个复孔, 于 Transwell 下室板中加入 FBS 完全培养基, 小室放进培养板内, 加入细胞悬液孵育箱培养 24 h。取出小室并吸出上室液体, 移至加入含预冷甲醇的孔中室温固定 30 min, 结晶紫溶液染色 30 min, PBS 洗涤 3 次, 取出小室, 除去上室液体, 擦去膜表面的细胞和染液晾干封片, 于显微镜下拍照。

2.7 Western blot 法检测细胞 RKIP、p-Raf、p-MEK、p-ERK 蛋白表达 提取各组 hEM15A 细胞总蛋白, 使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 蛋白变性后上样电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 加一抗 4 ℃ 孵育过夜, TBS 洗涤 4 次, 加二抗室温孵育 2.5 h, TBS 洗涤 3 次后, 滴加 ECL 发光试剂, 于化学发光凝胶成像仪的暗室中曝光, 扫描条带。以 β -actin 为内参, 以目的蛋白积分光密度与内参积分光密度值比值表示各蛋白相对表达量。

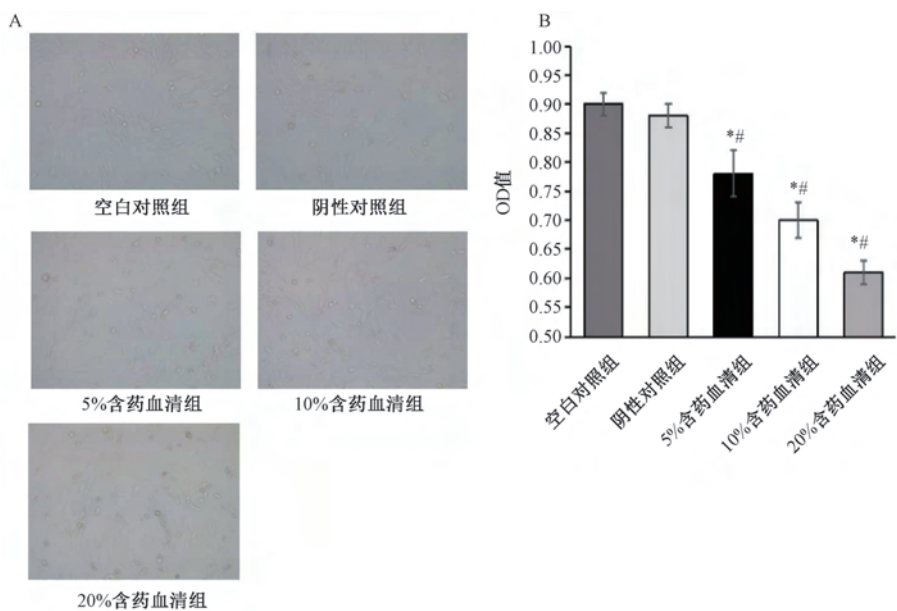
2.8 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用均 LSD 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞活性的影响 与空白对照组比较, 阴性对照组细胞活性无明显变化 ($P>0.05$); 与阴性对照组及空白对照组比较, 各浓度含药血清组细胞活性均降低 ($P<0.05$), 且呈浓度依赖性, 见图 1。

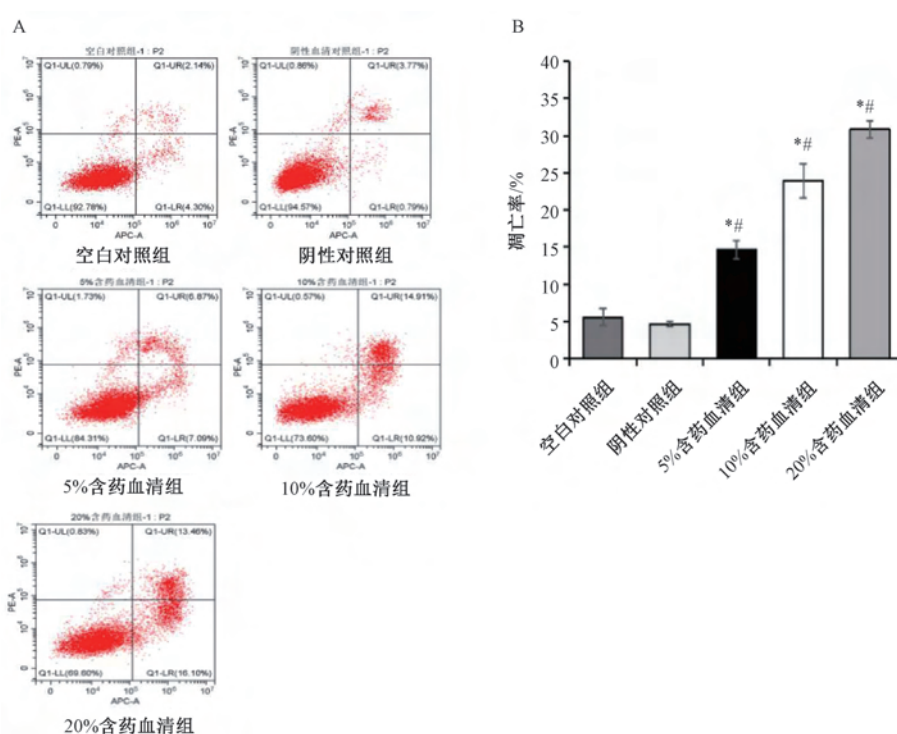
3.2 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞凋亡的影响 与空白对照组比较, 阴性对照组细胞凋亡率无明显变化 ($P>0.05$); 与阴性对照组及空白对照组比较, 各浓度含药血清组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), 且呈浓度依赖性, 见图 2。

3.3 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞迁移的影响 与空白对照组比较, 阴性对照组细胞迁移数无明显变化 ($P>0.05$); 与空白对照组比较, 5% 含药血清组细胞活性降低 ($P<0.05$); 与空白对照组及阴性对照组比较, 各浓度含药血清组细胞迁移数均降低 ($P<0.05$), 且呈浓度依赖性,



注：与空白对照组比较,**P*<0.05; 与阴性对照组比较,#*P*<0.05。

图 1 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=4)



注：与空白对照组比较,**P*<0.05; 与阴性对照组比较,#*P*<0.05。

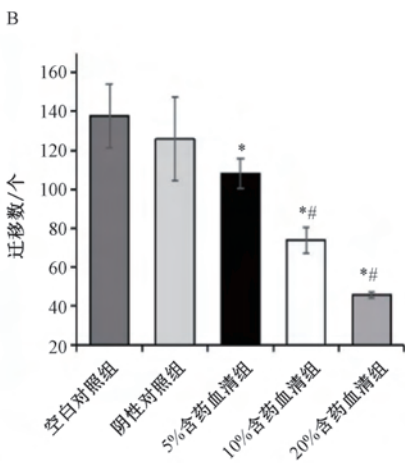
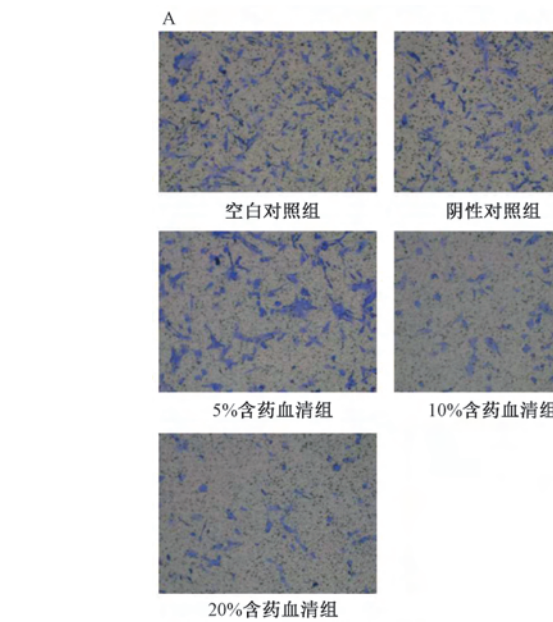
图 2 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

见图 3。

3.4 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞 RKIP、p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 与空白对照组比较, 阴性对照组细胞 RKIP、p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2、Raf、MEK、ERK1/2 蛋白表达均无明显变化 (*P*>0.05); 与空白对照组及阴性对照组比较, 各浓度含药血清组细胞 Raf、MEK、ERK1/2 蛋白表达均无明显变化 (*P*>0.05), RKIP

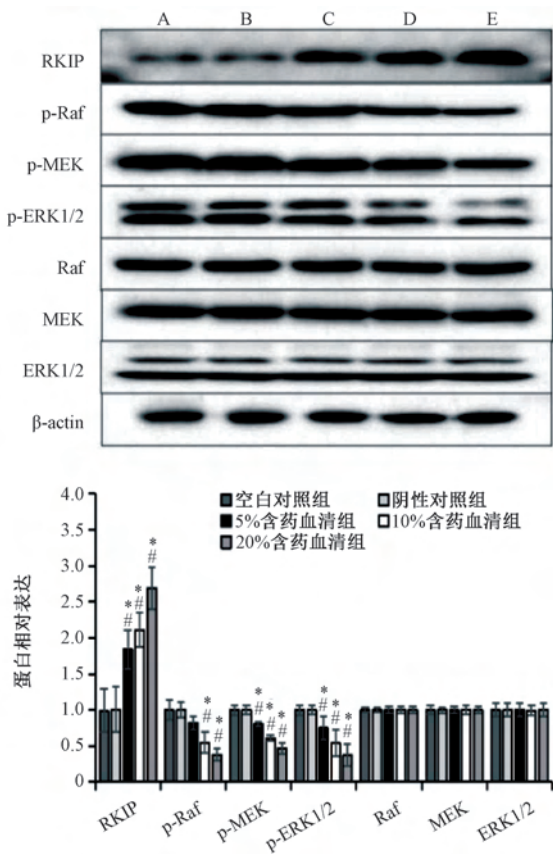
蛋白表达升高 (*P*<0.05), p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达均降低 (*P*<0.05), 10% 和 20% 含药血清组细胞 p-Raf 蛋白表达降低 (*P*<0.05), 且呈浓度依赖性, 见图 4。

3.5 si-RKIP 转染效果比较 与 si-NC 组比较, si-RKIP-1 组细胞 RKIP 蛋白表达降低 (*P*<0.05), si-RKIP-2 组细胞 RKIP 蛋白表达无明显变化 (*P*>0.05), 见图 5。因此选择 si-RKIP-1 组进行下一步实验。



注：与空白对照组比较,* $P<0.05$ ；与阴性对照组比较,# $P<0.05$ 。

图 3 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞迁移的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：A 为空白对照组，B 为阴性对照组，C~E 分别为 5%、10%、20% 含药血清组。与空白对照组比较,* $P<0.05$ ；与阴性对照组比较,# $P<0.05$ 。

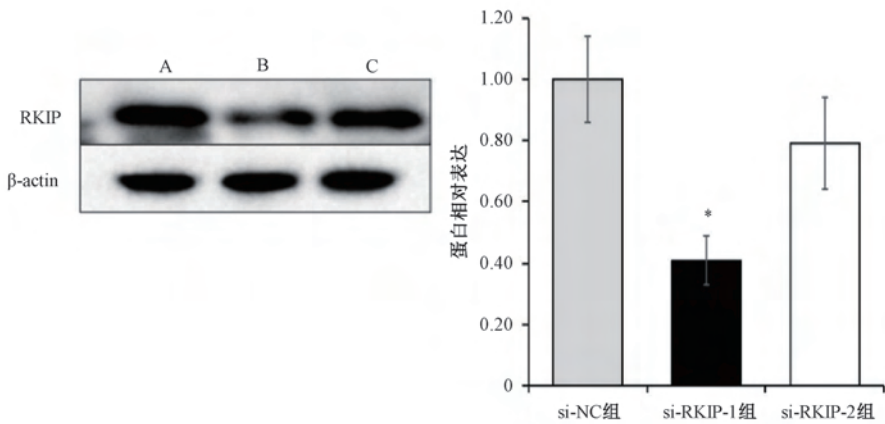
图 4 内异康复片含药血清对 hEM15A 细胞 RKIP、p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.6 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞活性的影响 与阴性对照组比较,10% 含药血清组细胞活性降低 ($P<0.05$), si-RKIP-1 组细胞活性升高 ($P<0.05$); 与 10% 含药血清组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组细胞活性升高 ($P<0.05$); 与 si-RKIP-1 组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组细胞活性降低 ($P<0.05$), 见图 6。

3.7 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞凋亡的影响 与阴性对照组比较,10% 含药血清组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), si-RKIP-1 组细胞凋亡率无明显变化 ($P>0.05$); 与 10% 含药血清组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组细胞凋亡率降低 ($P<0.05$); 与 si-RKIP-1 组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), 见图 7。

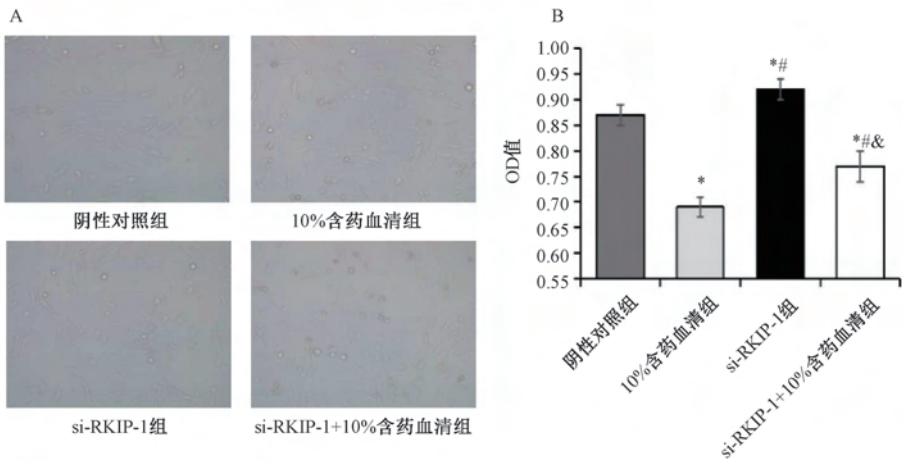
3.8 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞迁移的影响 与阴性对照组比较,10% 含药血清组细胞迁移数降低 ($P<0.05$), si-RKIP-1 组细胞迁移数升高 ($P<0.05$); 与 10% 含药血清组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组细胞迁移数升高 ($P<0.05$); 与 si-RKIP-1 组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组细胞迁移数降低 ($P<0.05$), 见图 8。

3.9 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞 RKIP、p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 与阴性对照组比较,10% 含药血清组细胞 RKIP 蛋白表达升高 ($P<0.05$), p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P<0.05$), si-RKIP-1 组细胞 RKIP 蛋白表达降低 ($P<0.05$), p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与 10% 含药血清组比较, si-RKIP-1+10% 含药血清组 RKIP 蛋白表达降低 ($P<0.05$), p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与 si-RKIP-1 组比较, si-RKIP-1+10%



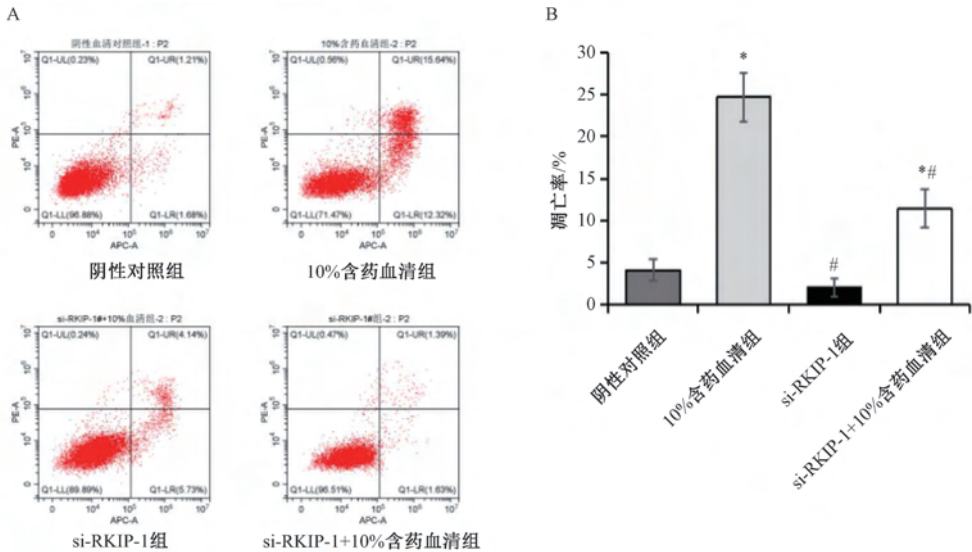
注：A 为 si-NC 组，B 为 si-RKIP-1 组，C 为 si-RKIP-2 组。与 si-NC 组比较，* $P<0.05$ 。

图 5 si-RKIP 转染效果比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



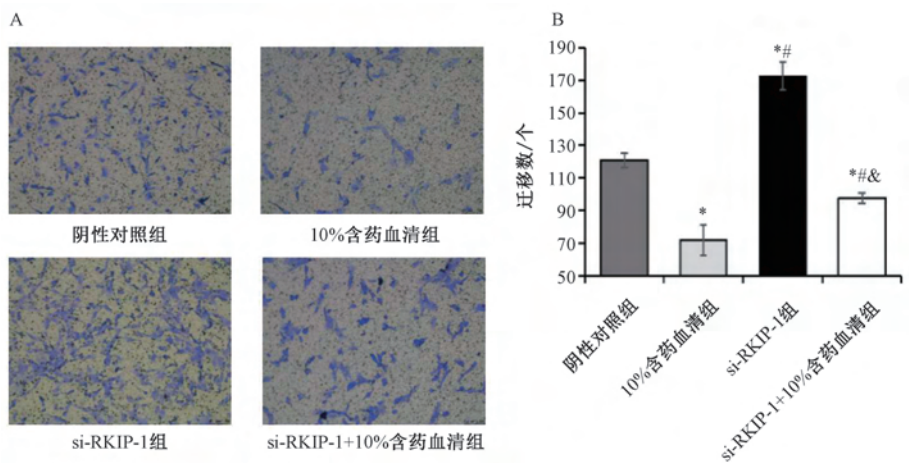
注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ；与 10% 含药血清组比较，# $P<0.05$ ；与 si-RKIP-1 组比较，& $P<0.05$ 。

图 6 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)



注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ；与 10% 含药血清组比较，# $P<0.05$ ；与 si-RKIP-1 组比较，& $P<0.05$ 。

图 7 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

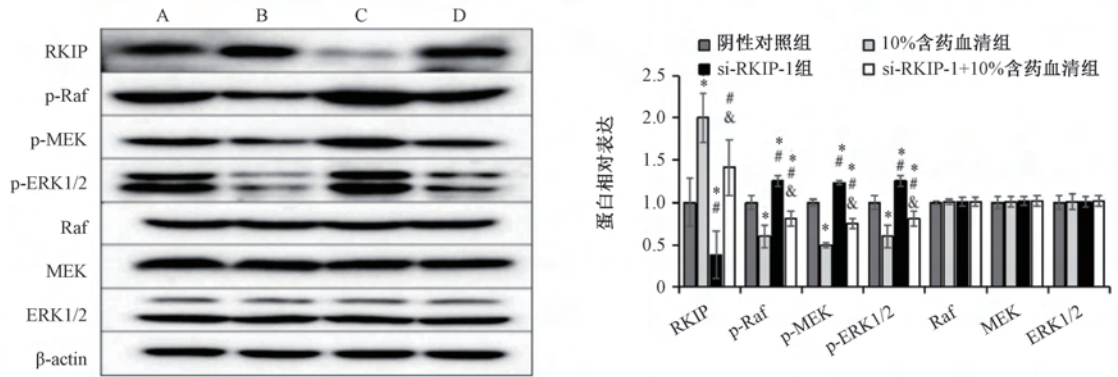


注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ；与 10% 含药血清组比较，# $P<0.05$ ；与 si-RKIP-1 组比较，& $P<0.05$ 。

图 8 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞迁移的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

含药血清组细胞 RKIP 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，p-Raf、p-ERK1/2、p-MEK 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)；各组细胞

Raf、ERK1/2、MEK 蛋白表达均无差异 ($P>0.05$)，见图 9。



注：A 为阴性对照组，B 为 10% 含药血清组，C 为 si-RKIP-1 组，D 为 si-RKIP-1+10% 含药血清组。与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ；与 10% 含药血清组比较，# $P<0.05$ ；与 si-RKIP-1 组比较，& $P<0.05$ 。

图 9 内异康复片含药血清对 si-RKIP 转染 hEM15A 细胞 RKIP、p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

内异康复片是根据成都中医药大学附属医院魏绍斌教授的临床经验，针对 EMT“瘀血内阻”的病机及四川湿热的气候特点研制的院内制剂，具有清湿化痰、消癥散结之效，迄今已应用于临床数十年，疗效良好^[6-7]。既往研究表明，内异康复片可以通过调控 Wnt^[8]、COX2-PGE2-P450arom^[9]、GPER-Ras-STAT^[3]等通路来抑制子宫内膜异位性疾病的发展，也可以通过降低雌激素水平^[10]达到治疗 EMT 的效果。由此可知，内异康复片治疗 EMT 的机制复杂，它可能通过多靶点、多通路、多环节达到治疗目的，有必要进一步探索其疗效的分子机制。

Raf/MEK/ERK 信号通路通过磷酸化联级反应将外界信号传入细胞核内，以此介导特异蛋白发生反应，可以被广泛激活^[11]，参与细胞的分化、增殖、凋亡、应激等过程^[12]，并与肿瘤的增殖、侵袭、迁移等密切相关^[13]。已有研究发现，该通路与 EMT 细胞的侵袭迁移有关^[14]。王芳

等^[15]研究发现 Ras、MEK 在 EMT 在位及异位内膜组织中均呈高表达，且两者的表达呈正相关趋势。Chen 等^[16]发现激活 Raf/MEK/ERK 信号通路能够使 EMT 子宫内膜间质细胞凋亡受到抑制，同时促进其增殖和迁移。也有研究发现，降低 MEK1/2 的表达可以减少 EMT 间质细胞的增殖和侵袭^[17]。

RKIP 因能与 Raf-1 结合而抑制 MEK 的磷酸化与激活而得名^[5]，是一种肿瘤抑制因子，可以促进肿瘤细胞凋亡，影响转移，并且可提高肿瘤细胞对化疗药物及放射线的敏感性^[18-19]。RKIP 在各个系统的肿瘤中表达均发生变化^[20]，在妇科方面，RKIP 在宫颈癌^[21]、子宫内膜癌^[22]、卵巢癌^[23]表达降低。目前已证实 RKIP 可以通过复杂的调节机制对 Raf/MEK/ERK 信号通路产生影响^[24-25]。本研究抑制 RKIP 表达后，p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 表达均升高，也证实了 RKIP 对于 Raf/MEK/ERK 信号通路的调控作用。

本研究发现各浓度含药血清组细胞活性、迁移率均低于阴性对照组，凋亡率升高，并且作用效果呈浓度依赖性，这进一步证实了内异康复片对 EMT 的干预作用。10% 和 20% 含药血清组组细胞 p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达较阴性对照组均降低。提示内异康复片可以上调 hEM15A 细胞 RKIP 的表达，抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路磷酸化联级反应。通过进一步实验，本研究发现抑制 RKIP 表达后，hEM15A 细胞活性和迁移数降低，而凋亡有所降低，但差异无统计学意义，这可能与 hEM15A 细胞基础凋亡率本身较低有关。与 10% 含药血清组比较，si-RKIP-1+10% 含药血清组 hEM15A 细胞活性和迁移数有所增加，凋亡率降低，细胞 p-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 蛋白表达均升高，提示 RKIP 的下调可以降低内异康复片对 Raf/MEK/ERK 信号通路的调节作用，RKIP 可能是内异康复片干预 EMT 的关键作用靶点之一。

综上所述，本研究发现内异康复片可能通过上调 RKIP 的表达，抑制其介导的 Raf/MEK/ERK 信号通路，从而抑制细胞活性、迁移，促进凋亡，达到治疗 EMT 的目的。但是，中成药成分复杂，作用靶点众多，内异康复片是否还通过其他通路发挥作用尚不明确，应更深入地明确其机制，为该药在临床的应用提供进一步的理论依据，也为 EMT 的中医治疗提供新思路。

参考文献：

[1] 谢 幸,孔北华,段 涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

[2] 王秋香. 内异康复片治疗湿热瘀阻型子宫内膜异位症盆腔疼痛的临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.

[3] 冯婷婷,王 烨,屈丽媛,等. 内异康复片调控 GPER-Ras-STAT3 通路治疗子宫腺肌病的机制[J]. 中成药, 2017, 39(4): 665-671.

[4] 冯婷婷. 清湿化痰法调控子宫腺肌病小鼠雌激素效应相关因子 ER α 、ER β 、PR-A、PR-B、GPER、Akt、p-Akt、NF- κ B 表达的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.

[5] Yeung K, Seitz T, Li S, *et al.* Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP[J]. *Nature*, 1999, 401(6749): 173-177.

[6] 李贞贞. 探究内异康复片对子宫腺肌病的治疗作用及其可能作用机制[J]. 临床研究, 2019, 27(3): 119-121.

[7] 查 娟,谢 萍,王 琳,等. 谢萍内外合治腹壁切口子宫内膜异位症验案 1 则[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(4): 116-117.

[8] 黄映红,徐晓娟,秦旭华,等. 内异康复片对 EMT 大鼠 VEGF、MMP-9、HGF 及 Wnt4、Wnt5 α 的调控机制研究[J]. 新中医, 2016, 48(9): 217-221.

[9] 王 烨,范小雪,屈丽媛,等. 清湿化痰法对子宫腺肌病小鼠 Ras 基因和 COX2-PGE2-P450arom 正反馈环调控机制变化的研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2094-2096.

[10] 徐晓娟,秦旭华,王婧婧,等. 内异康复片对 EM 大鼠血

清及异位内膜细胞中 ARO、COX-2、E₂ 水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(5): 596-598.

[11] 王 雪,张评许. Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路参与自噬调控作用的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1): 110-116.

[12] Sun Y, Liu W Z, Liu T, *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.

[13] Guo Y J, Pan W W, Liu S B, *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.

[14] 张 颀. MicroRNA-202 通过抑制 Raf1/MEK/ERK 信号通路抑制子宫内膜间质细胞的迁移和侵袭[D]. 南京: 南京医科大学, 2020.

[15] 王 芳,王丽春,商丽红,等. 子宫内膜异位症大鼠在位及异位内膜组织中 RAS 与 MEK 的表达[J]. 海南医学, 2022, 33(4): 409-413.

[16] Chen Q, Hang Y Y, Zhang T T, *et al.* USP10 promotes proliferation and migration and inhibits apoptosis of endometrial stromal cells in endometriosis through activating the Raf-1/MEK/ERK pathway[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(6): 863-872.

[17] 商丽红,杨玉娥,王 芳,等. 子宫内膜异位症间质细胞中蛋白激酶 C β 1 对 MEK1/2 表达及细胞增殖侵袭性的影响[J]. 现代妇产科进展, 2021, 30(11): 833-838; 842.

[18] Apostolos Z, Benjamin B, Ekaterini C, *et al.* RKIP: a key regulator in tumor metastasis initiation and resistance to apoptosis: therapeutic targeting and impact [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(9): 287.

[19] 韩 冲,于洋洋,党 军,等. Raf 激酶抑制蛋白表达水平与非小细胞肺癌放射敏感性的关系[J]. 中国医科大学学报, 2021, 50(9): 789-793.

[20] Farooqi A A, Li Y, Sarkan F H. The biological complexity of RKIP signaling in human cancers[J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(9): 185.

[21] 胡春杰,周 磊,赵宏辉,等. RKIP 影响人宫颈癌 Hela 细胞增殖、侵袭及其机制的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2018, 52(3): 238-241.

[22] 吴景丽. Raf 激酶抑制蛋白在子宫内膜癌治疗作用机制研究[J]. 实用妇科内分泌杂志(电子版), 2016, 3(18): 111-112.

[23] 左 艳,邓鹏飞. 肿瘤抑制候选基因 4 及 Raf 激酶抑制蛋白在不同级别卵巢浆液性腺癌中的表达[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(11): 918-921.

[24] Li B, Sun B L, Zhu J W, *et al.* Expression of RKIP in chronic myelogenous leukemia K562 cell and inhibits cell proliferation by regulating the ERK/MAPK pathway [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10057-10066.

[25] 聂金兰,白法承,黄权芳,等. 敲低 Raf 激酶抑制蛋白促进 LX-2 人肝星状细胞增殖[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(1): 53-56; 61.