

交泰丸对高脂饮食诱导肥胖小鼠血脑屏障损伤的影响及机制研究

王啸南, 袁琳, 胡娜, 钟霄毓, 林敏, 姜逸, 陆敏, 王晖, 陆雄*
(上海中医药大学科技实验中心细胞生物与组织病理学实验室, 上海 201203)

摘要: **目的** 研究交泰丸对高脂饮食诱导的肥胖小鼠大脑皮质血脑屏障的影响。**方法** 将小鼠随机分为正常组 (15只) 和造模组 (45只), 高脂饮食喂养8周进行造模, 以造模组体质量平均值高出正常组体质量的20%, 视为小鼠肥胖模型建立成功。将造模成功的小鼠随机分为模型组、交泰丸组和阳性药组 (二甲双胍), 每组15只。给药4周后检测体质量及空腹血糖 (FBG) 水平, 免疫荧光检测大脑皮质中紧密连接蛋白 Claudin-5、ZO-1 以及血管外渗 IgG 的表达; 分离大脑皮质血管后采用 Western blot 法检测 RhoA、ROCK2 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠体质量和 FBG 水平升高 ($P<0.01$), 大脑皮质血脑屏障紧密连接受损, Claudin-5、ZO-1 表达降低 ($P<0.01$), 血管外渗 IgG 表达升高 ($P<0.01$), RhoA、ROCK2 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 二甲双胍组和交泰丸组小鼠体质量和 FBG 水平降低 ($P<0.05$), 大脑皮质血脑屏障紧密连接形态改善, 且 Claudin-5 和 ZO-1 表达升高 ($P<0.05$), 血管外渗 IgG 表达降低 ($P<0.01$), RhoA、ROCK2 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 交泰丸能够改善高脂饮食诱导肥胖小鼠大脑皮质中紧密连接结构和血脑屏障功能, 其机制与抑制 RhoA/ROCK2 信号通路有关。

关键词: 交泰丸; 高脂饮食; 糖尿病; 血脑屏障; 紧密连接; RhoA/ROCK2

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)06-2058-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.048

进食高脂饮食会导致肥胖症及高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等相关代谢性疾病的发生^[1]。高血糖会破坏血脑屏障 (blood brain barrier, BBB)^[2], 而修复损伤的 BBB 对于保护神经元有积极作用, 可确保大脑发挥调节代谢的功能^[3]。BBB 由脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 及其间紧密连接 (tight junctions, TJs)、基底膜、星形胶质细胞终足和周细胞组成^[4], 其通过调节血液和大脑之间的离子、分子和细胞的运动, 阻隔血液中有毒物质进入脑实质, 从而维持脑内环境稳定^[5-7]。生理条件下, TJs 蛋白 Claudins 通过多个闭锁小带蛋白 (zonula occludens, ZO) 固定在肌动蛋白细胞骨架上, 它们之间的动态相互作用对维持 BBB 的完整性至关重要^[8]。《素问·奇病论》提出过食肥甘、中满内热是消渴病发生的核心病机, 过量进食高脂饮食导致肠道湿热应属于糖尿病前期。交泰丸由黄连、肉桂组成, 其“清心泻火、交通心肾”之功与消渴病心火炽盛、心肾失调的病机十分吻合^[9]。Rho GTP 酶属于 Ras 超家族, 其激活下游 ROCK 后通过级联反应改变了 TJs 的结构, 影响了血管通透性等多种生理功能, 这与糖尿病的众多并发症有关^[10]。因此, 本

研究以高脂饮食诱导建立肥胖小鼠模型, 探究交泰丸对肥胖小鼠血脑屏障损伤的改善作用及作用机制。

1 材料

1.1 药物 黄连、肉桂颗粒剂 (黄连产地四川, 批号为 21010851, 每 1 g 相当于生药量 6 g; 肉桂产地广西, 批号为 21015423, 每 1 g 相当于生药量 6 g), 购自江阴天江药业有限公司, 黄连、肉桂颗粒以 10:1 比例溶于蒸馏水中, 制得交泰丸溶液, 置于 4℃ 冰箱保存备用。盐酸二甲双胍片 (规格 0.5 g, 批号 ABX1849), 购自中美上海施贵宝制药有限公司。

1.2 试剂 RhoA 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体、ProLong® Gold Antifade Reagent (货号 2117、7074、9071S), 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 重组 Anti-ROCK2 抗体 (货号 ab125025), 购自英国 Abcam 公司; ZO-1、Claudin 5 单克隆抗体 (货号 617300、352588), 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; CD31 单克隆抗体 (货号 553370), 购自美国 BD 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白上样缓冲液 (5×)、彩色预染蛋白分子量标准 (6.5~270 kDa)、FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体、Cy3 标记山羊抗

收稿日期: 2023-03-13

基金项目: 上海中医药大学预算内项目 (2020LK009, 2021LK038)

作者简介: 王啸南 (1998—), 男, 硕士生, 从事中医药治疗糖尿病及其并发症的相关研究。Tel: (027) 51322374, E-mail: wxn123212021@163.com

* **通信作者:** 陆雄 (1965—), 男, 博士, 研究员, 从事中医药治疗糖尿病及其并发症的相关研究。Tel: (027) 51322374, E-mail: xionglu93@126.com

网络出版日期: 2023-04-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230417.1643.002.html>

大鼠 IgG 抗体、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体、超敏 ECL 化学发光试剂盒、免疫染色封闭液、免疫染色一抗稀释液、免疫染色二抗稀释液（货号 P0010S、P0015L、P0072、A0562、A0567、A0568、P0018、P0102、P0103、P0108），均购自上海碧云天生物技术有限公司；DEXTRAN70 右旋糖苷（货号 31390），购自美国 Sigma-Aldrich 公司；RIPA 裂解液（货号 WB0102），购自上海威奥生物科技有限公司。

1.3 动物 60 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠，5 周龄，体质量 21~25 g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，实验动物生产许可证号 SCXK（沪）2017-0005，质量合格证号 20170005048390。小鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室，自由摄食与饮水。动物实验经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准（伦理号 PZSHUTCM210312014）。

1.4 仪器 SPECTRA MAX190 型酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；AI600 型超灵敏多功能成像仪（美国 GE 公司）；冰冻切片机（德国 Microm 公司）；激光共聚焦显微镜（德国 Leica 公司）

2 方法

2.1 小鼠肥胖模型建立 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 3 周后，随机分为正常组（15 只）和造模组（45 只），正常组以常规鼠饲料喂养，造模组以高脂饲料（主要成分配比蛋白质 20.0%，碳水化合物 19.1%，脂肪 59.9%，维生素 1%）喂养，自由进食水，8 周后，称定小鼠体质量，以造模组小鼠体质量高于正常组平均体质量的 20%，视为小鼠肥胖模型建立成功。

2.2 分组与给药 将造模成功的小鼠随机分为模型组、二甲双胍组和交泰丸组，每组 15 只。根据《韩氏医通》记载及前期研究结果，交泰丸组灌胃给予 8.36 g/kg 交泰丸溶液；二甲双胍组灌胃给予 250 mg/kg 盐酸二甲双胍片溶液；正常组和模型组灌胃给予生理盐水，每天 1 次，连续 4 周，给药期间各组继续给予常规鼠饲料或高脂饲料饲养。

2.3 样本采集 给药 4 周后，小鼠禁食不禁水 12 h，称重后尾静脉取血，检测空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）。小鼠麻醉后，其中 5 只经左心室灌流磷酸缓冲液（Phosphate buffered saline，PBS），取脑，于液氮速冻后移至-80 ℃冰箱保存；4 只经左心室灌流 PBS 和 4% 多聚甲醛，取脑组织，于 4% 多聚甲醛固定液中固定，于 4 ℃冰箱保存；另外 6 只小鼠取大脑用于电镜观察（另发文）。

2.4 血管分离 取于-80 ℃冰箱中保存的小鼠脑组织，转移至冰上解冻，在含 2% 胎牛血清（FBS）的冷 PBS 中去除脑膜，分离脑皮质并将其切碎，用含 2% FBS 的 PBS 和玻璃均质器均质，加入 16% 右旋糖酐，混匀，6 000 r/min 离心 15 min，收集沉底的微血管颗粒，并依次通过 100、40 μm 细胞过滤器过滤，在 PBS 中收集 40 μm 细胞过滤器上残留的毛细血管，用于后续 Western blot 检测。

2.5 免疫荧光染色观察脑皮质 TJs 蛋白 Claudin-5、ZO-1 以及血管外渗 IgG 表达 取固定于 4% 多聚甲醛的小鼠脑组织，30% 蔗糖脱水，冷冻包埋剂包埋，30 μm 连续冰冻切片，PBS 清洗 3 次，免疫染色封闭液室温封闭 1 h，加一抗（1：250，免疫染色一抗稀释液稀释）4 ℃摇床孵育过夜，PBS 清洗 3 次，加二抗（1：500，免疫染色二抗稀释液稀释）室温避光摇床孵育 2 h，PBS 清洗 3 次，滴上防淬灭封片剂后封片。激光共聚焦显微镜下观察并拍照，用 Image J 软件分析荧光强度。

2.6 Western blot 法检测脑皮质分离血管 RhoA、ROCK2 蛋白表达 取“2.4”项下所得血管，加入 RIPA 裂解液，冰浴超声提取总蛋白，BCA 法检测蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量蛋白样本，随后转移至 PVDF 膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h，加入一抗（1：1 000）4 ℃孵育过夜，TBST 清洗后，加入二抗（1：3 000）室温孵育 1 h，滴加 ECL 化学发光试剂，成像仪成像后用 Image J 软件分析条带灰度值，以 β-actin 为内参计算目的蛋白相对表达。

2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型评价 如表 1 所示，高脂饮食喂养 8 周后，与正常组比较，造模组小鼠体质量、FBG 水平升高均升高（ $P<0.01$ ），且体质量高于正常组的 20%，表明小鼠肥胖模型建立成功。

表 1 造模后小鼠体质量、FBG 水平比较（ $\bar{x}\pm s$ ）			
组别	动物数/只	体质量/g	FBG/(mmol·L ⁻¹)
正常组	15	31.79±0.63	4.79±0.09
造模组	45	45.55±1.74 ^{##}	8.11±0.33 ^{##}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ 。

3.2 交泰丸对肥胖小鼠体质量和 FBG 水平的影响 如表 2 所示，与正常组比较，模型组小鼠体质量、FBG 水平均升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，二甲双胍组和交泰丸组小鼠体质量、FBG 水平均降低（ $P<0.05$ ）。

表 2 各组小鼠体质量、FBG 比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=15$ ）		
组别	体质量/g	FBG/(mmol·L ⁻¹)
正常组	31.79±0.63	4.79±0.09
模型组	45.55±1.74 ^{##}	8.11±0.33 ^{##}
二甲双胍组	40.83±1.80 [*]	4.41±0.27 [*]
交泰丸组	43.16±1.73 [*]	6.91±0.45 [*]

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。

3.3 交泰丸对肥胖小鼠脑皮质 BBB 紧密连接的影响 如图 1、表 3 所示，与正常组比较，模型组小鼠脑皮质 TJs 蛋白 Claudin-5 与 ZO-1 荧光分布中断、血管样结构明显消失，荧光强度减弱（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，二甲双胍组与交泰丸组小鼠脑皮质 TJs 蛋白荧光恢复血管样排列，Claudin-5 与 ZO-1 荧光强度增强（ $P<0.05$ ）。

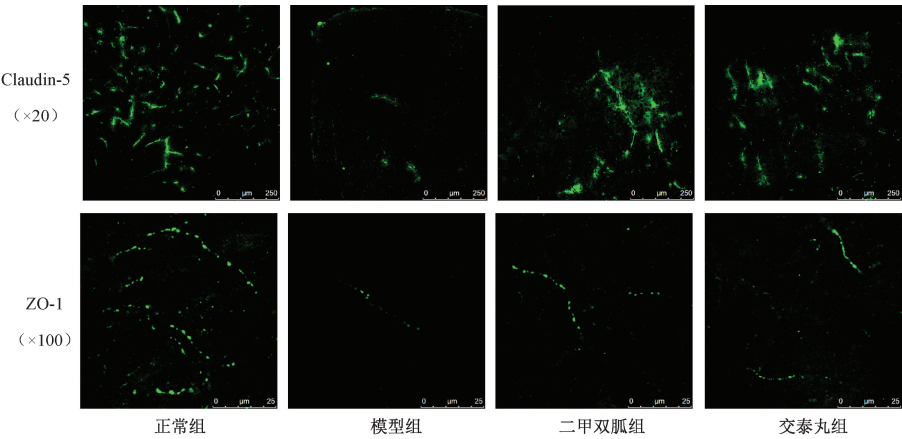
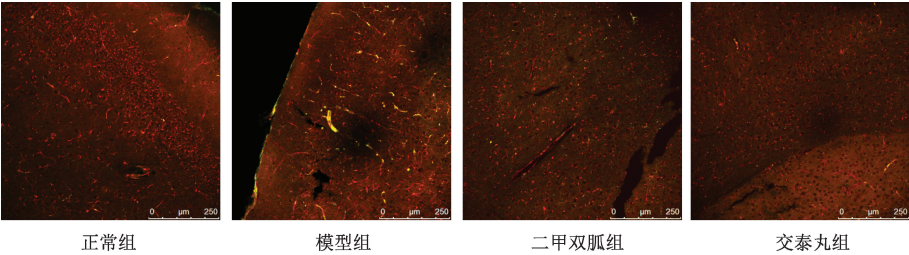


图 1 各组小鼠脑皮质 TJs 蛋白 Claudin-5、ZO-1 免疫荧光染色

表 3 各组小鼠 TJs 蛋白 Claudin-5、ZO-1 荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	Claudin-5 荧光强度	ZO-1 荧光强度
正常组	66.49±4.15	53.84±2.53
模型组	13.16±1.32 ^{##}	8.31±1.44 ^{##}
二甲双胍组	28.46±1.64 [*]	21.14±2.45 [*]
交泰丸组	27.32±3.48 [*]	24.34±3.37 [*]

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。



注：红色为 CD31 阳性，绿色为 IgG 阳性。

图 2 各组小鼠脑皮质血管外渗 IgG 免疫荧光染色 ($\times 20$)

表 4 各组小鼠脑皮质血管外渗 IgG 免疫荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	IgG 荧光强度
正常组	2.28±0.12
模型组	27.82±2.48 ^{##}
二甲双胍组	5.46±0.23 ^{**}
交泰丸组	9.15±0.61 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

质血管 RhoA、ROCK2 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，二甲双胍组与交泰丸组小鼠脑皮质血管 RhoA、ROCK2 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。

4 讨论

好食肥甘厚腻的不良饮食习惯被认为是肥胖和 2 型糖尿病的触发因素^[11]。目前，常以高脂饲料喂养 C57BL6 小鼠制备肥胖、糖尿病前期代谢综合征动物模型^[12-13]。与之前研究一致，本研究中模型组小鼠体质量、FBG 水平较正常组升高，提示代谢受损。

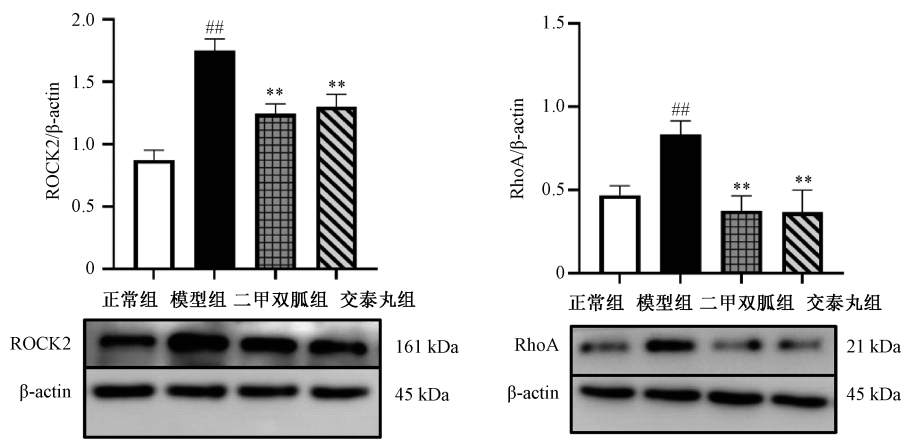
BBB 结构与功能的完整性是脑内环境稳态的重要保障。

3.4 交泰丸对肥胖小鼠脑皮质 BBB 通透性的影响 如图 2、表 4 所示，正常组小鼠脑皮质镜下血管周围未见明显 IgG 荧光表达。与正常组比较，模型组小鼠脑皮质血管周围 IgG 荧光强度增强 ($P<0.01$)；与模型组比较，二甲双胍组与交泰丸组小鼠脑皮质血管周围 IgG 荧光强度减弱 ($P<0.01$)。

3.5 交泰丸对肥胖小鼠脑皮质血管 RhoA、ROCK2 蛋白表达的影响 如图 3 所示，与正常组比较，模型组小鼠脑皮

BMECs 通过 TJs 蛋白所构成的 TJs 结构相互联系，这是构成 BBB 的基础^[14]，TJs 蛋白的丢失可导致进行性神经变性^[15]。高脂饮食所诱导的高血糖与 BBB 系统损伤密切相关^[16]。本研究通过免疫荧光染色观察高脂饮食诱导肥胖小鼠脑皮质 BBB 系统的 2 种主要 TJs 蛋白 ZO-1、claudin-5，发现模型组小鼠脑皮质 TJs 蛋白荧光分布中断、血管样结构明显消失且荧光强度减弱，证实高脂饮食对 TJs 结构造成破坏。当 BBB 的 TJs 蛋白损伤时，血浆中的小分子会率先渗漏到脑实质中，导致 BBB 结构进一步的破坏和更大分子的渗漏，最终使得脑部功能紊乱^[17]。本研究免疫荧光共染结果显示，模型组小鼠脑皮质血管周围出现了正常组小鼠中未见的 IgG 荧光表达，提示 BBB 屏障功能受损，也从侧面反映 BBB 结构损伤。

RhoA 是 Rho GTP 酶中最主要的成员之一，ROCK 是目前研究最多的 Rho 下游分子，并且脑中以 ROCK2 亚型高表达。激活的 Rho 与下游 ROCK 结合后会使其肌球蛋白轻链激酶活化，上调肌球蛋白轻链的磷酸化水平，在诱导细胞骨架重组和应力纤维形成的同时还可以磷酸化 TJs 蛋白^[18-19]。



注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。
图 3 各组小鼠脑皮质血管 RhoA、ROCK2 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, *n*=5)

这使得 TJs 蛋白的空间分布发生变化，血脑屏障通透性增加^[20]。本研究发现，与正常组比较，模型组小鼠脑皮质血管中 RhoA、ROCK2 蛋白表达升高，提示 Rho/ROCK 信号通路被活化。

交泰丸由黄连、肉桂组成，黄连为苦寒药，主入心、大肠经，多用于清热泻火；肉桂性味甘辛大热，主入肾经，引药下行，以温补肾阳之不足，两药配伍达到“交通心肾”的功效，其用药理论与消渴病心火炽盛、心肾失调的病机吻合。本研究结果显示，经交泰丸干预后，肥胖小鼠体重与 FBG 水平均降低。黄连与肉桂中的多种成分均已经被证明能改善 BBB 损伤，并且与 Rho/ROCK 信号通路的抑制有关^[21]。本研究结果显示，经交泰丸干预后，肥胖小鼠受损的 TJs 蛋白恢复血管样排列且荧光强度增强，同时血管外渗 IgG 表达降低，伴随着脑皮质血管 RhoA 与 ROCK2 蛋白表达降低，提示交泰丸能逆转高脂饮食带来的 BBB 结构与功能损伤，并抑制 Rho/ROCK 信号通路。

综上所述，本研究证实了交泰丸可以改善高脂饮食导致的肥胖小鼠代谢损伤与 BBB 结构功能破坏，其作用机制可能与抑制 Rho/ROCK 信号通路有关。

参考文献:

[1] Canfora E E, Meex R C R, Venema K, *et al.* Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(5): 261-273.

[2] Sharma H S, Patnaik R, Sharma A. Diabetes aggravates nanoparticles induced breakdown of the blood-brain barrier permeability, brain edema formation, alterations in cerebral blood flow and neuronal injury. An experimental study using physiological and morphological investigations in the rat [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10(12): 7931-7945.

[3] Ning R, Chopp M, Zacharek A, *et al.* Neamine induces neuroprotection after acute ischemic stroke in type one diabetic rats [J]. *Neuroscience*, 2014, 257: 76-85.

[4] Pinchi E, Frati P, Arcangeli M, *et al.* MicroRNAs: The new challenge for traumatic brain injury diagnosis [J]. *Curr*

Neuropharmacol, 2020, 18(4): 319-331.

[5] Ding G F, Shao Q Y, Yu H Y, *et al.* Tight junctions, the key factor in virus-related disease [J]. *Pathogens*, 2022, 11(10): 1200.

[6] Constant O, Maarifi G, Barthelemy J, *et al.* Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood-brain barrier integrity [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12(1): 2156815.

[7] Ramasubramanian B, Reddy V S, Chellappan V, *et al.* Emerging materials, wearables, and diagnostic advancements in therapeutic treatment of brain diseases [J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(12): 1176.

[8] Scalise A A, Kakogiannos N, Zanardi F, *et al.* The blood-brain and gut-vascular barriers; from the perspective of claudins [J]. *Tissue Barriers*, 2021, 9(3): 1926190.

[9] Knox E G, Aburto M R, Clarke G, *et al.* The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(6): 2659-2673.

[10] 王雪萍, 张皓月, 王 婷, 等. 交泰丸中小檗碱联合 cinnamtannin D1 的降血糖作用 [J]. *中成药*, 2018, 40(12): 2613-2618.

[11] 韩佳寅, 易 艳, 梁爱华, 等. Rho/ROCK 信号通路研究进展 [J]. *药学报*, 2016, 51(6): 853-859.

[12] Guo S, Nighot M, Al-Sadi R, *et al.* Lipopolysaccharide regulation of intestinal tight junction permeability is mediated by TLR4 signal transduction pathway activation of FAK and MyD88 [J]. *J Immunol*, 2015, 195(10): 4999-5010.

[13] 董 明, 刘 东, 梁运海, 等. 高脂饮食喂养肥胖模型小鼠的构建: 分析营养因素和代谢综合征的关系 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(40): 6542-6546.

[14] 郭 妍, 迟晓丽, 马 渊, 等. 六味地黄汤活性成分组方 LW-AFC 对高热量饲料诱导小鼠代谢综合征的改善作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(3): 367-373.

[15] Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2019, 16(1): 3.

[16] Wu J, Zhao Y, Fan Z, *et al.* Soluble epoxide hydrolase

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