

黄艳辉,冯丹,丑丹,等. 温经止痛方对子宫内膜异位症模型大鼠 AKT/mTOR 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 21-28.

Huang YH, Feng D, Chou D, et al. Effects of Wenjingzhitong decoction on the AKT/mTOR pathway in endometriosis rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 21-28.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.004

温经止痛方对子宫内膜异位症模型大鼠 AKT/mTOR 信号通路的影响

黄艳辉,冯 丹*,丑 丹,刘 佳,祁 慧,刘雯雯,王 静

(武汉市中医医院妇科,武汉 430010)

【摘要】 目的 探讨温经止痛方对子宫内膜异位症(endometriosis,EMS)模型大鼠 AKT/mTOR 通路相关分子表达的影响。**方法** 将建模成功的 75 只雌性成熟 Wistar 大鼠随机分为 5 组,加假手术组共 6 组,各 15 只,分别给予温经止痛方中药高、中、低剂量、内美通(孕三烯酮)胶囊、生理盐水灌胃给药。Real-time PCR、免疫组化法测异位、在位内膜上 AKT、mTOR mRNA 和蛋白表达。ELISA 法检测血清中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)含量。**结果** 子宫内膜异位症模型大鼠在位、异位内膜上 AKT 及 mTOR mRNA 及其蛋白含量显著高于正常对照组($P < 0.01$),中药高剂量组、西药(孕三烯酮)组在位、异位内膜 AKT、mTOR mRNA 表达含量明显低于造模组($P < 0.05$),EMS 模型组血清 VEGF 水平均高于正常对照组($P < 0.01$)。温阳化瘀法中药高、低剂量组、西药组血清 VEGF 水平明显低于模型组($P < 0.01$);中药中剂量组亦低于模型组($P < 0.05$)。**结论** 子宫内膜异位症发生与 AKT/mTOR 信号通路、以及 VEGF 表达水平有关。温经止痛方可有效抑制 AKT/mTOR 信号通路,降低血清 VEGF 的表达,从而抑制异位内膜的粘附、侵袭、血管生成。

【关键词】 子宫内膜异位症;AKT/mTOR 信号通路;血管内皮生长因子;中医药;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 01-0021-08

Effects of Wenjingzhitong decoction on the AKT/mTOR pathway in endometriosis rats

HUANG Yanhui, FENG Dan*, CHOU Dan, LIU Jia, QI Hui, LIU Wenwen, WANG Jing
(Department of Gynecology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430010, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of Wenjingzhitong decoction (WJZT) on expression of molecules in the AKT/mTOR pathway secreted by eutopic and ectopic endometria of endometriosis (EMS) rats. **Methods** Autologous transplantation of the uterine was used to establish the rat model of endometriosis. Seventy-five endometriosis rats were randomly divided into five groups: WJZT high-, medium-, and low-dose groups, and Nemestran and model control groups. Sham surgery rats were used for the normal control group. The WJZT high-, medium-, and low-dose groups were treated with different concentrations of Wenjingzhitong decoction, respectively. Nemestran (gestrinone) capsule was administered to the Nemestran group, and 0.9% NaCl was administered to model and normal groups. AKT and mTOR mRNA and protein expressions were detected by real-time PCR and immunohistochemistry, respectively. Serum levels of vascular endothelial

[基金项目] 湖北省自然科学基金(2015CFB590);武汉市科技局(2015061701011633);武汉市卫生计生委员会课题(wz15b11);湖北省卫计委 2016—2017 年度中医药科研项目(2015061701011633)。

[作者简介] 黄艳辉(1971—),女,博士,主任医师,研究方向:子宫内膜异位症中医治疗。E-mail: qingfengdingdang@163.com

[通信作者] 冯丹(1978—),女,硕士,主治医师,研究方向:子宫内膜异位症中医治疗。E-mail: fdsbj417@163.com

growth factor (VEGF) were detected by ELISA. **Results** Compared with the normal control group, protein and mRNA expressions of AKT and mTOR in eutopic and ectopic endometria was increased in the model groups ($P < 0.01$). AKT and mTOR mRNA levels in eutopic and ectopic endometria of the WJZT high-dose group and Nemestran (gestrinone) group was lower than that in the model control group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, serum VEGF level in the EMS model groups was increased ($P < 0.01$). Compared with the model control group, serum VEGF levels in the WJZT high- and low- dose groups and the Nemestran group were decreased ($P < 0.01$), and serum VEGF level in the WJZT medium-dose group was also decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Endometriosis is associated with the AKT/mTOR signaling pathway and the levels of VEGF. WJZT inhibits AKT/mTOR and regulates the level of VEGF. Therefore, WJZT can inhibit cell adhesion, invasion, and angiogenesis in the ectopic endometrium.

[Keywords] endometriosis(EMS); AKT/mTOR signaling pathway; vascular endothelial growth factor(VEGF); Traditional Chinese Medicine(TCM); rat

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS), 简称内异症, 是妇科领域中的多发病、疑难病, 其进行性加重的盆腔粘连、疼痛和不孕对女性生理和心理造成了极大的负担, 传统药物治疗手段效果欠佳、不良反应明显, 复发率高, 严重影响了女性的生殖健康和生活质量, 因此防治 EMS 一直是妇科领域的研究重点。

AKT/mTOR 信号通路是被研究最多的细胞膜受体信号转导通路之一, 在促进细胞增殖、抗细胞凋亡、以及促进新血管生成方面发挥重要作用^[1]。Li 等^[2]经研究证实, 激活的 AKT 通路可以上调增殖细胞核抗原、抗凋亡分子、生存素、粘附相关分子、整合素 b1 和整合素 avb3 的表达, 促进异位内膜细胞的增殖、粘附和侵袭。亦有研究发现, 异位内膜 PI3K/AKT 信号转导通路磷酸化, 增强 VEGF 的表达, 促进异位内膜的浸润和种植, 推动 EMS 的发生和发展。^[3-4]

本课题组前期研究表明, 温经止痛方治疗 EMS, 取得较好临床疗效, 可明显缓解患者痛经、慢性盆腔痛、性交痛, 改善生育能力, 促进妊娠等^[5]。本研究以 AKT/mTOR 通路为切入点, 深入探讨温经止痛方治疗 EMS 的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性成熟未交配过的 Wistar 大鼠 120 只, 体重 200~250 g, 鼠龄 8~12 周, 均购于湖北省实验动物研究中心[SCXK(鄂) 2015-0018], 无菌手术在武汉市中医医院药学基地动物实验室进行[SYXK(鄂) 2016-0056], 动物实验经由实验动物管理委员会批准, 审批号: L20170001, 实验动物使用按照 3R 原则给予人道的关怀照顾。

1.2 主要试剂与仪器

实验药物: 温经止痛方: 当归 15 g、桂枝 10 g、赤芍 15 g、细辛 3 g、炙甘草 6 g、吴茱萸 3 g、炮姜 10 g、黄酒 75 mL 等组成, 购自武汉市中医医院药房(天济中药饮片公司), 于我院制剂室煎煮浓缩, 具体步骤如下: 中药生药按上面处方比例调配总计 21.59 kg, 分为两锅, 加水 10 倍, 煎煮 2 次, 第一次 30 min, 第二次 20 min, 合并滤液, 加入黄酒 7 瓶, 浓缩至 8.5 L, 加入防腐剂放入冰箱备用; 孕三烯酮(每粒 2.5 mg, 北京紫竹药业有限公司生产)。

TRIzol, Invitrogen 公司提供(15596018); ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit 及 SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix, 购自 Toyobo 公司(561800, 642800); 兔抗 AKT、mTOR 多克隆抗体浓缩液及 Biotin-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit, 购自武汉三鹰生物技术有限公司(20657-1-AP, 10176-2-AP, SA00004-2); ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程公司(CSB-E08008r, CSB-E08005r)。

电泳仪购自北京六一仪器厂(DYY-6C); 定量 PCR 反应扩增仪购自 ABI 公司(7900HT); 紫外分光光度计购自上海析谱(UV-2202); 移液器购自法国 Gilson 公司; 脱水机、包埋机购自武汉俊杰电子有限公司; 病理切片机购自上海徕卡仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 建立内异症动物模型

参考 Jones 手术移植改良方法建立模型^[6], 120 只雌性成熟 Wistar 大鼠, 定时进行阴道涂片检查, 选择动情期造模。手术在无菌条件下进行, 麻醉大鼠后, 将大鼠固定于手术板上, 腹部剪毛, 皮肤消毒后, 在尿道上端约 2 cm 处, 沿腹部中线切开约 3 cm 的切口, 找到左侧子宫, 分离附着于子宫肌壁的脂肪和结缔组织后, 在离卵巢约 1 cm 处剪取长 2 cm

子宫,断端结扎。将所取子宫组织置于洛氏营养液中,剪取约 0.5 cm × 0.5 cm 大小 3 块内膜,分别缝于子宫分叉处、右卵巢附近,缝合切口,常规饲养。假手术组采用相同大小的大网膜脂肪作移植物,其余处理措施同上。建模 4 周后,择动情期开腹,再次观察移植物生长情况。造模成功的标志为:移植物体积增大,并形成内有液体积聚、表面有血管攀生的透明小泡,同时取移植物送病检证实内膜成活,证明建模成功。

建模后每组选取 2 只观察移植物生长情况;在建模及饲养过程中每组都有大鼠死亡,共有 22 只大鼠死亡。最后中药中剂量组存活最少(15 只),故每组取 15 只检测指标。

1.3.2 分组、给药及处理

将建模成功的大鼠称重后随机分为 5 组,加正常对照组(假手术组)共 6 组,各 15 只。中药高、中、低剂量组,分别给予 7.4 g/mL、3.7 g/mL、1.85 g/mL 的温经止痛方中药,每日 1 mL/100 g 灌胃。西药组:孕三烯酮胶囊 0.05 mg/mL,每次 1 mL/100 g 灌胃,每周 2 次。模型组及正常组:每日生理盐水 1 mL/100 g 灌胃。均给药 8 周。

取材:各组大鼠分别于最后一次灌胃 24 h 后麻醉后腹主动脉取血,分离血清,-20℃ 保存待测,再用两脚规测量移植物的体积:长(cm)×宽(cm)×高(cm)。取下在位子宫内膜及子宫分叉处、右卵巢附近部位的移植病灶,-80℃ 冰箱冻存备检。

1.3.3 HE 染色

组织固定切片脱蜡后,常规染色光镜下进行组织病理学观察。

1.3.4 实时定量 PCR 法检测异位、在位内膜上 AKT、mTOR mRNA 的表达水平

荧光定量 PCR 采用 TRIzol 法提取 RNA,将得到的 RNA 于 BioTek ELx808 酶标仪上行纯度及浓度的测定,按反转录试剂盒(Toyobo 公司)进行逆转录后于 Roche 定量仪器上,按免疫荧光定量试剂盒(Toyobo 公司)进行定量,双 ΔCt 法计算相对表达量。引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。引物序列均为 5'→3' 方向见表 1。

1.3.5 免疫组化法检测 AKT、mTOR 蛋白的表达

采用第二代免疫组化 Elivision 二步法检测。一抗分别为兔抗 AKT、mTOR 多克隆抗体浓缩液,二抗为偶联生物素的抗兔抗体(均购自武汉三鹰生物技术有限公司)。PBS 代替一抗作阴性对照,AKT 用

已知的阳性表达的胰脏切片做阳性对照,mTOR 用已知阳性表达的肝组织切片做阳性对照。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene names	引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences
GAPDH	正向 Forward	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG
	反向 Reverse	CATACTCAGCACCAGCATCACC
AKT	正向 Forward	GGAGGAGGAGACGATGGACTTC
	反向 Reverse	TGGCATAGTAGCGACCTGTGG
mTOR	正向 Forward	CAGAGGGCAGCAACAGTGAAAG
	反向 Reverse	GACAAGGAGATAGAACGGAAGAAGC

1.3.6 采用 ELISA 检测大鼠血清各细胞因子

ELISA 法检测 VEGF 的含量,严格按照试剂盒说明书进行。所有标本在一批内测定,批内误差 < 10%。

1.4 统计学方法

呈正态分布的连续型变量采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计学描述,各组数据比较前先进行正态性及方差齐性检验,满足正态性及方差齐性,组间比较采用 *t* 检验;免疫组化检测 EMS 模型大鼠异位、在位内膜上 AKT 及 mTOR 的表达比较的计数资料,采用秩和检验。以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 实验结果

2.1 EMS 模型大鼠移植物的组织学形态

建模 4 周后,择动情期开腹,观察子宫内膜异位种植生长情况,发现腹膜表面的移植物生长欠佳,卵巢表面及子宫分叉处移植物生长非常良好,移植物体积增大,并形成内有液体积聚、表面有血管攀生的透明小泡,见图 1。HE 染色结果显示,EMS 模型大鼠的异位内膜组织与正常子宫内膜的组织学形态基本相似,异位内膜组织的内膜下层变薄,腺体减少甚至消失,肌层变薄并出现纤维化,没有明

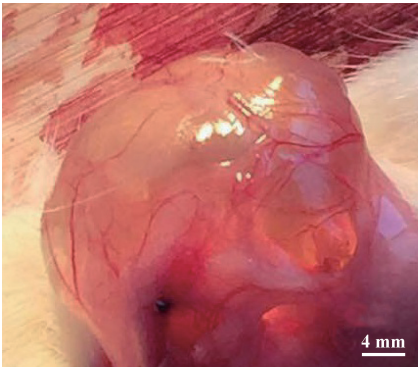


图 1 模型大鼠异位灶

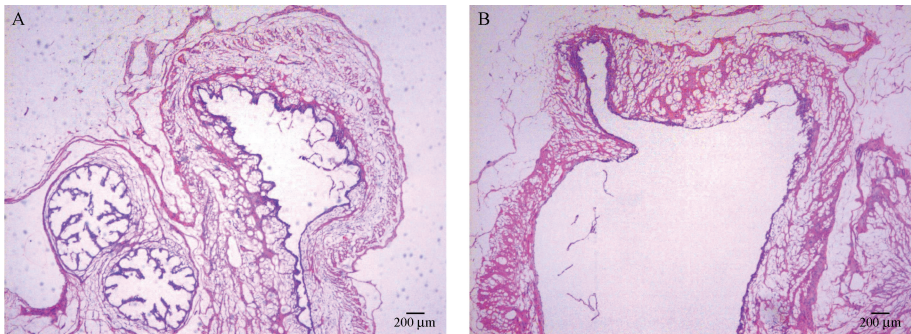
Figure 1 Ectopic focus of endometriosis in a model rat

显的外膜,仅有一些纤维组织包裹。见图 2。

2.2 免疫组化检测 AKT、mTOR 在各组在位、异位内膜上表达情况

AKT 主要在子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的细胞核、细胞质、细胞膜中表达,mTOR 主要在子

宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的细胞质和细胞核中表达,如图 3~4。EMS 模型组异位内膜、在位内膜上 AKT、mTOR 的蛋白表达水平明显高于正常对照组在位内膜($P < 0.01$),见表 2~3。

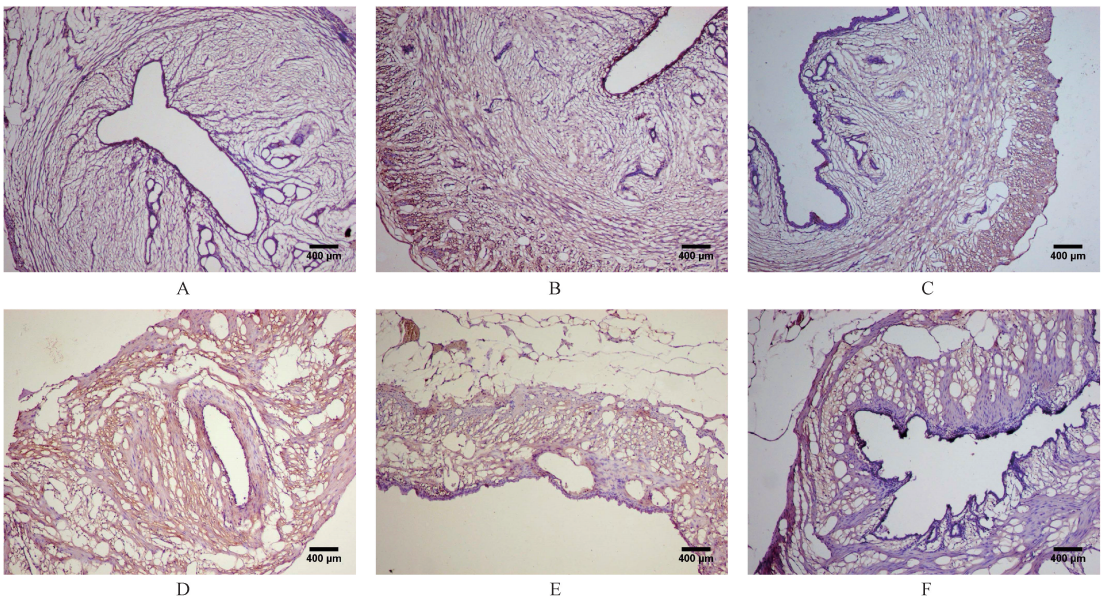


注:A:在位内膜;B:异位内膜。

图 2 EMS 模型大鼠在位和异位内膜的组织学形态(HE 染色,× 100)

Note. A; Eutopic endometrium; B; Ectopic endometria.

Figure 2 Histological features of eutopic and ectopic endometria in EMS model rats. HE staining

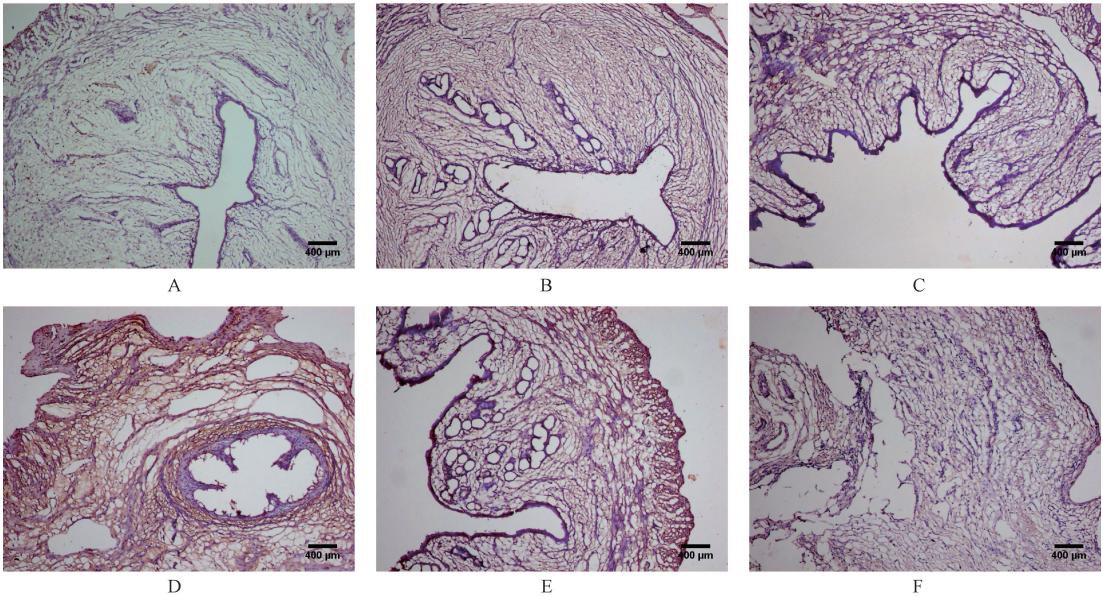


注:A:正常组在位内膜;B:西药组在位内膜;C:中药高剂量组在位内膜;D:模型组异位内膜;E:西药组异位内膜;F:中药高剂量组异位内膜。

图 3 大鼠在位及异位内膜 AKT 的表达情况(免疫组化染色,× 100)

Note. A; Eutopic endometrium in the normal group. B; Eutopic endometrium in the Nemestran group. C; Eutopic endometrium in the WJZT high-dose group. D; Ectopic endometrium in the model group. E; Ectopic endometrium in the Nemestran group. F; Ectopic endometrium in the WJZT high-dose group.

Figure 3 Comparison of AKT protein expression in the rat eutopic and ectopic endometria of different groups. Immunohistochemical staining



注:A:正常组在位内膜;B:西药组在位内膜;C:中药高剂量组在位内膜;D:模型组异位内膜;E:西药组异位内膜;F:中药高剂量组异位内膜。

图 4 大鼠在位及异位内膜上 mTOR 的表达情况 (免疫组化染色, × 100)

Note. A: Eutopic endometrium in the normal group. B: Eutopic endometrium in the Nemestran group. C: Eutopic endometrium in the WJZT high-dose group. D: Ectopic endometrium in the model group. E: Ectopic endometrium in the Nemestran group. F: Ectopic endometrium in the WJZT high-dose group.

Figure 4 Comparison of mTOR protein expression in the rat eutopic and ectopic endometria of different groups. Immunohistochemical staining

表 2 免疫组化检测六组 EMS 模型大鼠异位、在位内膜上 AKT 的表达比较 (n=15)

Table 2 Comparison of AKT expression in eutopic and ectopic endometria of the six groups of EMS model rats by immunohistochemistry

组别 Groups	部位 Sites	AKT 表达 AKT expression				阳性表达率 Positive expression rate	强阳性表达率 Strongly positive expression rate
		阴性 Negative	弱阳性 Weakly positive	阳性 Positive	强阳性 Strongly positive		
中药高剂量组 WJZT high-dose group	在位内膜** Eutopic endometrium	11	4	0	0	26.7%	0.0%
	异位内膜## Ectopic endometrium	12	1	2	0	20.0%	0.0%
中药中剂量组 WJZT medium-dose group	在位内膜** Eutopic endometrium	10	5	0	0	33.3%	0.0%
	异位内膜 Ectopic endometrium	6	8	1	0	60.0%	0.0%
中药低剂量组 WJZT low-dose group	在位内膜 Eutopic endometrium	2	9	3	1	86.7%	6.7%
	异位内膜 Ectopic endometrium	1	4	9	1	60.0%	6.7%
西药组 Nemestran group	在位内膜** Eutopic endometrium	10	4	1	0	33.3%	0.0%
	异位内膜 Ectopic endometrium	3	11	1	0	80.0%	0.0%
模型组 Model group	在位内膜 Eutopic endometrium	1	4	7	3	93.3%	20.0%
	异位内膜 Ectopic endometrium	2	2	8	3	86.7%	20.0%
正常组 Normal group	子宫内膜*** Normal endometrium	14	1	0	0	6.7%	0.0%

注:与模型组在位内膜比较,** P < 0.01;与模型组异位内膜比较,## P < 0.01。
Note. Compared with eutopic endometrium of the model group,** P < 0.01. Compared with ectopic endometrium of the model group,## P < 0.01.

表 3 免疫组化检测六组 EMS 模型大鼠异位、在位内膜上 mTOR 的表达比较($n=15$)

Table 3 Comparison of mTOR expression in in eutopic and ectopic endometria of the six groups of EMS model rats by immunohistochemistry

组别 Groups	部位 Sites	mTOR 表达 mTOR expression				阳性表达率 Positive expression rate	强阳性表达率 Strongly positive expression rate
		阴性 Negative	弱阳性 Weakly positive	阳性 Positive	强阳性 Strongly positive		
中药高剂量组 WJZT high-dose group	在位内膜** Eutopic endometrium	14	1	0	0	6.7%	0.0%
	异位内膜### Ectopic endometrium	10	4	1	0	33.3%	0.0%
中药中剂量组 WJZT medium-dose group	在位内膜** Eutopic endometrium	15	0	0	0	0.0%	0.0%
	异位内膜 Ectopic endometrium	4	5	4	2	73.3%	13.3%
中药低剂量组 WJZT low-dose group	在位内膜 Eutopic endometrium	4	6	4	1	73.3%	6.7%
	异位内膜 Ectopic endometrium	0	3	7	5	100.0%	33.3%
西药组 Nemestran group	在位内膜 Eutopic endometrium	8	5	2	0	46.7%	0.0%
	异位内膜 Ectopic endometrium	3	7	4	1	80.0%	6.7%
模型组 Model group	在位内膜 Eutopic endometrium	2	3	5	5	86.7%	33.3%
	异位内膜 Ectopic endometrium	1	3	8	3	93.3%	20.0%
正常组 Normal group	子宫内膜*** Normal endometrium	15	0	0	0	0.0%	0.0%

注:与模型组在位内膜比较,** $P<0.01$;与模型组异位内膜比较,### $P<0.01$ 。

Note. Compared with eutopic endometrium of the model group, ** $P<0.01$. Compared with ectopic endometrium of the model group, ### $P<0.01$.

温经止痛方中药低、中、高剂量组在位内膜、异位内膜上 AKT、mTOR 表达水平逐渐减弱,中药中、高剂量组在位内膜及中药高剂量组异位内膜上 AKT、mTOR 明显低于模型组($P<0.05$)。西药组在位内膜上 AKT 亦明显低于模型组($P<0.05$)。见表 2~3。提示 EMS 模型组大鼠在位内膜、异位内膜上 AKT、mTOR 表达水平升高,温经止痛方中药可使 EMS 模型大鼠在位内膜、异位内膜上 AKT、mTOR 蛋白表达水平下降,中药高剂量组效果最佳。

2.3 Real-time PCR 法检测 AKT、mTOR mRNA 在各组大鼠在位、异位内膜上表达情况

分别提取在位内膜及异位内膜的总 RNA 及蛋白,用实时定量 PCR 法检测 AKT、mTOR mRNA 的表达。模型组在位、异位内膜 AKT、mTOR mRNA 表达含量高于正常对照组在位内膜,差异有显著性($P<0.01$),详见表 4。

中药高、中剂量组异位内膜 AKT、mTOR mRNA 含量明显低于模型组异位内膜($P<0.05$),中药中剂量组异位内膜 AKT、mTOR mRNA 含量明显低于西药组异位内膜($P<0.05$)。中药高、中、低剂量

组、西药组在位内膜 AKT mRNA 表达含量明显低于模型组在位内膜($P<0.05$),其上 mTOR mRNA 表达含量亦低于模型组,但差异无显著性($P>0.05$),详见表 4。

以上数据说明 EMS 模型组在位内膜、异位内膜上 AKT、mTOR mRNA 表达含量升高,温经止痛方中药、孕三烯酮西药可使 EMS 模型大鼠在位内膜、异位内膜上 AKT、mTOR mRNA 表达水平下降。

2.4 温经止痛方对 EMS 模型大鼠血清中 VEGF 水平的影响

EMS 模型组血清 VEGF 水平均高于正常对照组($P<0.01$)。温阳化瘀法中药高、低剂量组、西药组血清 VEGF 水平明显低于模型组($P<0.01$);中药中剂量组亦低于模型组($P<0.05$)。中药高剂量组血清 VEGF 水平低于中药中、低剂量组,但差异无显著性($P>0.05$),详见表 5。

以上结果提示 EMS 模型大鼠血清 VEGF 水平表达升高,温阳化瘀法中药、孕三烯酮西药可使 EMS 模型大鼠血清 VEGF 水平下降,并随中药浓度升高,其对 VEGF 分泌的抑制作用增强。

表 4 RT-PCR 法检测 AKT、mTOR mRNA 的在各组内膜上表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=15$)
Table 4 Expression of AKT and mTOR mRNAs in the endometria of each group determined by RT-PCR

组别 Groups	AKT mRNA 水平 AKT mRNA levels		mTOR mRNA 水平 mTOR mRNA levels	
	在位内膜 Eutopic endometrium	异位内膜 Ectopic endometrium	在位内膜 Eutopic endometrium	异位内膜 Ectopic endometrium
中药高剂量组 WJZT high-dose group	10.78 ± 6.63 *	11.84 ± 6.69 [#]	3.99 ± 2.73	3.26 ± 1.53 [#]
中药中剂量组 WJZT medium-dose group	10.93 ± 6.79 *	5.61 ± 2.90 ^{#▲}	4.55 ± 2.80	1.75 ± 0.91 ^{#▲}
中药低剂量组 WJZT low-dose group	13.32 ± 8.75 *	16.24 ± 10.38	5.60 ± 3.74	5.31 ± 2.87
西药组 Nemestran group	19.98 ± 9.20 *	20.01 ± 10.14	5.22 ± 3.49	5.86 ± 3.06
模型组 Model group	34.27 ± 10.51	31.51 ± 12.83	7.17 ± 4.07	7.39 ± 3.75
正常组 Normal group	2.89 ± 1.21 * [#]		1.55 ± 0.67 * [#]	

注:与模型组在位内膜比较, * $P < 0.05$;与模型组异位内膜比较, [#] $P < 0.05$;与西药组异位内膜比较, [▲] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with eutopic endometrium of the model group, * $P < 0.05$. Compared with ectopic endometrium of the model group, [#] $P < 0.05$. Compared with ectopic endometrium of the Nemestran group, [▲] $P < 0.05$.

表 5 六组 EMS 模型大鼠血清 VEGF 水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=15$, pg/mL)

Table 5 Comparison of serum VEGF levels in the six groups of EMS model rats

组别 Groups	VEGF
中药高剂量组 WJZT high-dose group	2.30 ± 0.55 **
中药中剂量组 WJZT medium-dose group	2.87 ± 0.67 *
中药低剂量组 WJZT low-dose group	2.64 ± 0.88 **
西药组 Nemestran group	1.97 ± 0.30 **
模型组 Model group	3.77 ± 0.68
正常组 Normal group	1.48 ± 0.50 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

随着研究日渐深入,证实 AKT/mTOR 信号通路参与子宫内膜异位症的发生、发展过程,在 EMS 中存在该信号通路的过度激活,并通过调节细胞自噬、凋亡因子等的表达,影响异位内膜的粘附、侵袭、血管生成及增殖凋亡等过程^[7]。

近年研究发现 AKT 能够磷酸化内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS),其产物 NO 可以促进血管生成,并发现 EMS 患者体内 eNOS 表达明显升高^[8],异位病灶周围血管生成增

多,可能都与 AKT 通路的激活有关^[9-10]。Chang 等^[11]报道,子宫内膜间质细胞中肿瘤转移抑制因子(NME1)的异常低表达,可激活 AKT 通路,进而分泌大量 IL-8 和 VEGF,促进异位病灶处血管内皮细胞的大量生成。Govatati 等^[12]研究发现 EMS 在位内膜中 PTEN 基因的缺失,使 AKT 通路过度激活,活化的 AKT 能够抑制 Bad 活性,产生抑制凋亡作用,Bad 属于 Bcl-2 家族一员,具有促凋亡作用。

Cinar 等^[13]亦证实:EMS 的女性在位内膜 AKT 信号传导通路磷酸化水平高于无 EMS 的女性。Annu 等^[14]实验证实:EMS 中异位灶的粘附与生长过程涉及多条信号通路的相互作用及协调,其中 AKT 信号传导通路发挥了重要作用。

mTOR 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,在细胞生长中处于核心地位,其最主要的功能是调控蛋白质翻译过程。Leconte 等^[15]研究发现,深部浸润型 EMS 患者在位和异位内膜细胞的增殖率均明显升高,认为异位内膜细胞的过度增殖和 mTOR/AKT 通路的激活有关,而 mTOR/AKT 抑制剂能有效抑制异位内膜细胞的增殖。

Feng 等^[16]腹腔镜下观察子宫内膜异位病灶的特点为病灶周围存在大量腹膜血管,组织学检查子宫内膜异位病灶的特点为高度的血管化。因此,新生血管在 EMS 形成的过程中起着重要的作用。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最为关键的血管形成因子,可与血管内皮表面的特异性受体结合,促进血管的形

成^[17]。Kianpour 等^[18]研究发现 EMS 患者腹腔液及病灶中 VEGF 水平较正常对照组明显升高,提示异位子宫内膜病灶中 VEGF 的过度表达,可以增强血管的生成能力。

本课题通过动物实验,采用免疫组化及 PCR 检测,证实 EMS 模型组大鼠在位、异位内膜上 AKT、mTOR mRNA 及蛋白水平升高,显著高于正常空白对照组($P < 0.05$),与文献报道相符^[7-12, 19],提示 AKT、mTOR 异常表达与子宫内膜异位症发生、发展有关。EMS 模型大鼠血清 VEGF 水平表达升高,提示与异位病灶的血管生成有关。而异位内膜 PI3K/AKT 信号转导通路磷酸化,增强 VEGF 的表达,导致异位内膜侵袭、种植、生长,共同促进了子宫内膜异位症的发生和发展。以上研究表明 AKT/mTOR 信号通路中的 AKT、mTOR 做为关键性的调控因子,可能在内异症的发病过程中起到“闸门”的作用。

同时实验研究表明:温经止痛方可降低子宫内膜异位症大鼠的在位内膜、异位内膜上 AKT、mTOR mRNA 及蛋白相对表达量,抑制 AKT/mTOR 信号通路,温阳化瘀法中药、孕三烯酮西药可使 EMS 模型大鼠血清 VEGF 水平下降,并随中药浓度升高,其对 VEGF 分泌的抑制作用增强,呈剂量依赖性。本方可影响异位内膜的粘附、侵袭,血管生成及增殖凋亡等过程;使在位子宫内膜、异位子宫内膜及腹腔局部微环境发生改变,抑制异位内膜生长;从而达到治疗 EMS 目的。如能进一步研究其通路确切机制及上下游相关因子,可促进研发靶向作用更强、临床疗效更好的中西药。

参考文献:

[1] Ettl T, Schwarz-Furlan S, Haubner F, et al. The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localization [J]. Oral Oncol, 2012, 48(9): 822-830.

[2] Li MQ, Shao J, Meng YH, et al. NME1 suppression promotes growth, adhesion and implantation of endometrial stromal cells via Akt and MAPK/Erk1/2 signal pathways in the endometriotic milieu [J]. Hum Reprod, 2013, 28(10): 2822-2831.

[3] Li MQ, Li HP, Meng YH, et al. Chemokine CCL2 enhances survival and invasiveness of endometrial stromal cells in an autocrine manner by activating Akt and MAPK/Erk1/2 signal pathway [J]. Fertil Steril, 2012, 97(4): 919-929.

[4] 李燕,朱君,张煜. PI3K/AKT 信号转导通路和 VEGF 在子宫内膜异位症中的表达 [J]. 中国性医学, 2017, 26(4): 45-47.

[5] 黄艳辉,梁雪芳,林秀华. 当归四逆汤加减治疗子宫内膜异

位症疼痛疗效观察 [J]. 中国中医急诊, 2008, 17(6): 768-769.

[6] Hahn DW, Carraher RP, Foldes RG, et al. Development of an animal model for quantitatively evaluating effects of drugs on endometriosis [J]. Fertil Steril, 1985, 44(3): 410-415.

[7] 汪玉莲,陈小华,温勤坚,等. mTOR 信号通路在卵巢型子宫内膜异位症中的表达及临床意义 [J]. 海南医学院学报, 2014, 20(7): 884-887.

[8] Yeo SG, Won YS, Lee HY, et al. Increased expression of pattern recognition receptors and nitric oxide synthase in patients with endometriosis [J]. Int J Med Sci, 2013, 10(9): 1199-1208.

[9] Liu JX, Luo MQ, Xia M, et al. Marine compound catunaregin inhibits angiogenesis through the modulation of phosphorylation of Akt and eNOS *in vivo* and *in vitro* [J]. Mar Drugs, 2014, 12(5): 2790-2801.

[10] Kang Z, Zhu H, Jiang W, et al. Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013, 113(4): 221-227.

[11] Chang KK, Liu LB, Jin LP, et al. NME1 suppression of endometrial stromal cells promotes angiogenesis in the endometriotic milieu via stimulating the secretion of IL-8 and VEGF [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(10): 2030-2038.

[12] Govatati S, Kodati VL, Deenadayal M, et al. Mutations in the PTEN tumor gene and risk of endometriosis: a case control study [J]. Hum Reprod, 2014, 29(2): 324-336.

[13] Cinar O, Seval Y, Uz YH, et al. Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis [J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(6): 864-871.

[14] Annu M, Madhu MG, Vinita D, et al. PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: an update [J]. Gynecol Endocrinol, 2012, 28(3): 175-181.

[15] Leconte M, Nicco C, Ngo C, et al. The mTOR/AKT inhibitor temsirolimus prevents deep infiltrating endometriosis in mice [J]. Am J Pathol, 2011, 179(2): 880-889.

[16] Feng D, Menger MD, Wang H, et al. Luminal epithelium in endometrial fragments affects their vascularization, growth and morphological development into endometriosis-like lesions in mice [J]. Dis Model Mech, 2014, 7(2): 225-232.

[17] Lai TH, Vlahos N, Shih IM, et al. Expression patterns of VEGF and Flk-1 in human endometrium during the menstrual cycle [J]. J Reprod Infertil, 2015, 16(1): 3-9.

[18] Kianpour M, Nematbakhsh M, Ahmadi SM, et al. Serum and peritoneal fluid levels of vascular endothelial growth factor in women with endometriosis [J]. Int J Fertil Steril, 2013, 7(2): 96-99.

[19] Choi J, Jo M, Lee E, et al. Differential induction of autophagy by mTOR is associated with abnormal apoptosis in ovarian endometriotic cysts [J]. Mol Hum Reprod, 2014, 20(4): 309-317.