

引用:李琳,马本玲,贺冰,张翼,邢敏. 茯苓酸调节 AMPK/GSK-3 β /Nrf2 信号通路对子宫内膜异位症大鼠内膜基质细胞铁死亡的影响[J]. 湖南中医杂志,2024,40(6):175-182.

茯苓酸调节 AMPK/GSK-3 β /Nrf2 信号通路 对子宫内膜异位症大鼠内膜基质细胞铁死亡的影响

李琳,马本玲,贺冰,张翼,邢敏

(湖南中医药大学第二附属医院,湖南 长沙,410005)

[摘要] 目的:探索茯苓酸调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)/核因子E2相关因子2(Nrf2)信号通路对子宫内膜异位症(EM)大鼠基质细胞铁死亡的影响。方法:将51只SD大鼠于腹腔内异位移植子宫内膜组织构建EM大鼠模型,并将其随机分为模型组、茯苓酸低剂量(3.5 mg/kg)组、茯苓酸高剂量(7.0 mg/kg)组、茯苓酸高剂量(7.0 mg/kg)+盐酸多索啡(0.2 mg/kg)组,每组各12只,另取12只SD大鼠只开腹不移植,设为假手术组,药物分组处理后测定各组大鼠异位子宫内膜体积、异位子宫内膜组织铁死亡指标[谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)水平、铁含量]、血清及异位子宫内膜组织炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)]水平、异位子宫内膜组织铁死亡相关蛋白[长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4)、环加氧酶2(PTGS2)]与AMPK/GSK-3 β /Nrf2通路相关蛋白表达。原代培养EM大鼠子宫内膜基质细胞,并将其随机分为对照组、茯苓酸低浓度(40 mg/L)组、茯苓酸高浓度(80 mg/L)组、茯苓酸高浓度(80 mg/L)+盐酸多索啡(10 μ mol/L)组,以药物分组处理后,以CCK-8法、流式细胞术分别测定各组细胞增殖及凋亡;以试剂盒检测各组细胞铁死亡指标GSH及MDA水平、铁含量;以免疫印迹实验检测各组细胞铁死亡相关蛋白及AMPK/GSK-3 β /Nrf2通路相关蛋白表达。结果:与假手术组相比,模型组大鼠异位子宫内膜体积、MDA水平及铁含量、血清及异位子宫内膜组织TNF- α 及IL-6水平、ACSL4及PTGS2蛋白表达升高($P<0.05$),GSH水平、p-AMPK/AMPK、p-GSK-3 β /GSK-3 β 及Nrf2蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组相比,茯苓酸低、高剂量组大鼠异位子宫内膜体积、MDA水平及铁含量、血清及异位子宫内膜组织TNF- α 及IL-6水平、ACSL4及PTGS2蛋白表达降低($P<0.05$),GSH水平、p-AMPK/AMPK、p-GSK-3 β /GSK-3 β 及Nrf2蛋白表达升高($P<0.05$),且高剂量茯苓酸作用更强;盐酸多索啡可减弱高剂量茯苓酸对EM模型大鼠的作用。与对照组相比,茯苓酸低、高浓度组大鼠子宫内膜基质细胞活力、MDA水平及铁含量、ACSL4及PTGS2蛋白表达降低($P<0.05$),凋亡率、GSH水平、p-AMPK/AMPK、p-GSK-3 β /GSK-3 β 及Nrf2蛋白表达升高($P<0.05$),且高浓度茯苓酸作用更强;盐酸多索啡可减弱高剂量茯苓酸对EM大鼠内膜基质细胞的作用。结论:茯苓酸可减轻EM大鼠炎症及铁死亡,抑制其子宫内膜基质细胞增殖及异位内膜生长,其作用机制可能是通过激活AMPK/GSK-3 β /Nrf2信号通路来实现的。

[关键词] 茯苓酸;AMPK/GSK-3 β /Nrf2;子宫内膜异位症;子宫内膜基质细胞;铁死亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2024.06.040

Effect of pachymic acid on ferroptosis of endometrial stromal cells in rats with endometriosis by regulating the adenosine monophosphate-activated protein kinase/glycogen synthase kinase-3 β /nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling pathway

LI Lin, MA Benling, HE Bing, ZHANG Yi, XING Min

(The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China)

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(21C0231)

第一作者:李琳,女,医学硕士,主治医师,研究方向:中医药防治妇科内分泌疾病

通信作者:马本玲,女,医学硕士,副主任医师,研究方向:中医药防治妇科内分泌疾病, E-mail:781000624@qq.com

[Abstract] Objective: To investigate the effect of pachymic acid on ferroptosis of endometrial stromal cells in rats with endometriosis (EM) by regulating the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway. Methods: A total of 51 Sprague-Dawley rats were given ectopic transplantation of endometrial tissue in the abdominal cavity to establish a rat model of EM, and then they were randomly divided into model group, low-dose pachymic acid (3.5 mg/kg) group, high-dose pachymic acid (7.0 mg/kg) group, high-dose pachymic acid (7.0 mg/kg)+dorsomorphin dihydrochloride (0.2 mg/kg) group, with 12 rats in each group; another 12 Sprague-Dawley rats were given laparotomy without transplantation and were established as sham-operation group. Related indicators were measured after grouping and treatment, including the volume of ectopic endometrium, ferroptosis markers in ectopic endometrium (glutathione [GSH], malondialdehyde [MDA], and iron content), inflammatory factors in serum and ectopic endometrium (tumor necrosis factor- α [TNF- α] and interleukin-6 [IL-6]), ferroptosis-related proteins in ectopic endometrium (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 [ACSL4] and prostaglandin endoperoxide synthase 2 [PTGS2]), and the expression of proteins associated with the AMPK/GSK-3 β /Nrf2 pathway. Primary cultured endometrial stromal cells of EM rats were randomly divided into control group, low-concentration pachymic acid (40 mg/L) group, high-concentration pachymic acid (80 mg/L) group, high-concentration pachymic acid (80 mg/L)+dorsomorphin dihydrochloride (10 μ mol/L) group. After grouping and treatment, CCK-8 assay and flow cytometry were used to measure cell proliferation and apoptosis; kits were used to measure the levels of the ferroptosis markers GSH and MDA and the content of iron; Western blotting was used to measure the expression of ferroptosis-related proteins and proteins associated with the AMPK/GSK-3 β /Nrf2 pathway. Results: Compared with the sham-operation group, the model group had significant increases in the volume of ectopic endometrium, the level of MDA, the content of iron, and the levels of TNF- α and IL-6 and the protein expression levels of ACSL4 and PTGS2 in serum and ectopic endometrium ($P<0.05$), as well as significant reductions in the level of GSH and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, p-GSK-3 β /GSK-3 β , and Nrf2 ($P<0.05$). Compared with the model group, the low- and high-dose pachymic acid groups had significant reductions in the volume of ectopic endometrium, the level of MDA, the content of iron, and the levels of TNF- α and IL-6 and the protein expression levels of ACSL4 and PTGS2 in serum and ectopic endometrium ($P<0.05$), as well as significant increases in the level of GSH and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, p-GSK-3 β /GSK-3 β , and Nrf2 ($P<0.05$), and high-dose pachymic acid tended to have a stronger effect; dorsomorphin dihydrochloride could alleviate the effect of high-dose pachymic acid on EM model rats. Compared with the control group, the low- and high-concentration groups had significant reductions in the viability of endometrial stromal cells, the level of MDA, the content of iron, and the protein expression levels of ACSL4 and PTGS2 ($P<0.05$) and significant increases in apoptosis rate, the level of GSH, and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, p-GSK-3 β /GSK-3 β , and Nrf2 ($P<0.05$), and high-dose pachymic acid tended to have a stronger effect; dorsomorphin dihydrochloride could alleviate the effect of high-dose pachymic acid on the endometrial stromal cells of EM rats. Conclusion: Pachymic acid can alleviate inflammation and ferroptosis in EM rats and inhibit the proliferation of endometrial stromal cells and the growth of ectopic endometrium, possibly by activating the AMPK/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway.

[Keywords] pachymic acid; adenosine monophosphate-activated protein kinase/glycogen synthase kinase-3 β /nuclear factor erythroid 2-related factor 2; endometriosis; endometrial stromal cells; ferroptosis

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是一种常见的妇科疾病,其主要特征是具有生长功能的子宫

内膜组织在子宫腔以外部位存活并发生扩散,造成月经异常、继发性痛经、不孕等^[1-2]。子宫内膜固有

层中的基质细胞于宫腔外黏附、增生、侵袭、转移等是 EM 的主要发病过程,铁死亡和炎症对于子宫内膜基质细胞的存活、植入至关重要,抑制炎症及铁死亡是治疗 EM 的有效方法^[3-4]。茯苓酸作为药食同源食品茯苓的关键功能性成分,不仅具有镇静止痛、抗炎、抗癌的药理活性^[5],还是桂枝茯苓丸的主要有效成分之一,而桂枝茯苓丸具有止痛、抗炎和改善血流动力学的作用,并已广泛应用于 EM 的临床治疗^[6],基于这些研究,我们推测茯苓酸可能对 EM 起到治疗作用。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)/核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是调控组织细胞铁死亡及炎症的重要信号,对其进行激活来促进 AMPK、GSK-3 β 磷酸化及 Nrf2 表达,可抑制炎症、减轻铁死亡^[7-8];且有研究显示,AMPK、GSK-3 β 在 EM 发生发展中发挥调控作用,激活 AMPK 可改善 EM 症状^[9],而 GSK-3 β 在 EM 患者体内磷酸化增强^[10],由此可知 AMPK/GSK-3 β /Nrf2 是 EM 的潜在治疗靶点。任丽娟等^[11]的研究显示茯苓酸可激活 Nrf2/Keap1/ARE 信号,因此推测茯苓酸可能通过激活 AMPK/GSK-3 β /Nrf2 信号来治疗 EM。基于上述研究,笔者对茯苓酸调节 AMPK/GSK-3 β /Nrf2 信号而影响 EM 大鼠内膜基质细胞铁死亡的作用进行探究。

1 实验材料

1.1 动物 SD 大鼠 51 只,SPF 级,雌性,体质量 (225 $\pm$ 15)g,7~8 周龄,购自哈尔滨医科大学科技园利民生物医药科技发展有限公司,生产许可证号:SCXK(黑)2021-005。大鼠饲养在温度 23.5~25℃、湿度 50%~60%、光照 12h/12h 明暗轮替循环的动物房内,动物房维持屏障环境,且大鼠自由饮水采食。

1.2 药物及试剂 茯苓酸(批号:29070-92-6)、盐酸多索啡(纯度 $\geq$ 98%,批号:1219168-18-9)均采购于上海源叶生物科技有限公司;CKK-8 试剂盒(货号:CA1210)、铁含量检测试剂盒(货号:BC4355)、大鼠白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号:SEKR-0005)、大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(货号:SEKR-0009)、丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(货号:BC0025)均采购于北京索莱宝科技有限公司;

Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒(货号:G003-1-2)、谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(货号:A006-2-1)、高强度 RIPA 裂解液(货号:W062-1-1)均采购于南京建成生物工程研究所有限公司;兔源抗大鼠 Nrf2 一抗采购于上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 主要仪器 ELX-808 酶标仪采购于美国 BioTek 公司;流式细胞仪采购于思百拓(上海)仪器科技有限公司;EPS-300 基础电泳仪电源、VE-180 微型垂直电泳槽、VE-180 蛋白转移电泳槽、Tanon Fine Do X6 全自动化学发光图像分析系统均采购于上海天能科技有限公司。

2 实验方法

2.1 模型制备与动物分组 参照文献[12]制备 EM 大鼠模型。取 51 只大鼠进行造模,造模前 48 h 以每只 4 mg 苯甲酸雌二醇皮下注射诱发大鼠处于相同的动情周期,禁食 12 h 后以戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,纵向切开腹部后暴露子宫,将子宫两端血管结扎后剪取分离部分子宫内膜,修剪为 4 mm $\times$ 4 mm 的片层结构后缝合移植在自身左腹肠系膜血管丰富部位,缝合伤口后腹腔注射硫酸庆大霉素(每天 1 次),5 d 后随机选择 3 只大鼠开腹观察其异位内膜,若大鼠异位内膜呈透明囊状结构,内有积液且有血管生成,则提示造模成功。将造模成功的 48 只大鼠随机分为模型组、茯苓酸低剂量组、茯苓酸高剂量组、茯苓酸高剂量+盐酸多索啡组,每组各 12 只,另选 12 只大鼠只截取子宫内膜不移植作为假手术组。

2.2 分组给药与取材 茯苓酸低剂量组、茯苓酸高剂量组大鼠分别腹腔注射 3.5、7 mg/kg 茯苓酸(0.35、0.7 mg/ml 的茯苓酸溶液,10 ml/kg,每天 1 次)^[13],同时尾静脉注射 10 ml/kg 0.9%氯化钠注射液(每天 1 次);茯苓酸高剂量+盐酸多索啡组大鼠腹腔注射 7 mg/kg 茯苓酸(0.7 mg/ml 的茯苓酸溶液,10 ml/kg,每天 1 次),尾静脉注射 0.2 mg/kg 盐酸多索啡(0.02 mg/ml 的盐酸多索啡溶液,10 ml/kg,每天 1 次)^[14];模型组、假手术组大鼠均于腹腔注射及尾静脉注射 0.9%氯化钠注射液(10 ml/kg,每天 1 次),各组大鼠均处理 14 d。

取 EM 大鼠异位子宫内膜组织,以 75%乙醇漂

洗后再以无菌 0.9% 氯化钠注射液冲洗, 无菌条件下剪碎后加入 0.25% 胰酶 2 ml 及 0.1% 胶原酶 1 ml 消化 15 min, 以含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化, 以枪头反复吹打后依次用 200 目、400 目细胞筛过滤, 得到单细胞悬液计数后以 1×10^7 个/ml 的密度接种在培养瓶内进行原代培养, 观察细胞形态, 发现细胞呈梭形或多角形贴壁生长, 随细胞生长时间延长, 梭形细胞延伸成长梭形并平行排列成束, 多角形细胞明显增大并出现蜕膜样转化, 由此可知 EM 大鼠子宫内膜基质细胞原代培养成功。

原代培养的 EM 大鼠子宫内膜基质细胞传代后以每孔 1.5×10^5 个的密度接种在 24 孔板内培养 36 h, 再将其随机分为对照组、茯苓酸低浓度组、茯苓酸高浓度组、茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组, 对照组细胞不做任何处理, 茯苓酸低浓度组、茯苓酸高浓度组细胞分别以终浓度 40、80 mg/L 茯苓酸处理^[15], 茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组细胞以终浓度 80 mg/L 茯苓酸和终浓度 10 μ mol/L 盐酸多索啡联合^[16]处理, 各组均处理 24 h 后收集其细胞冻存在液氮内备用。

2.3 观察指标

2.3.1 大鼠异位子宫内膜体积 按照“2.1”项中的方法注射戊巴比妥钠麻醉各组大鼠, 断尾后取血, 离心后将上清吸出后冻存在 -80°C 冰箱内备用; 将各组大鼠开腹取出异位子宫内膜并计量其体积[量出长径 a 和短径 b 后采用公式 $(a \times b^2)/2$ 算出]。

2.3.2 大鼠异位子宫内膜组织铁死亡指标、大鼠异位子宫内膜组织与血清炎症因子水平 测定异位子宫内膜体积后剪下约 0.9 g 子宫内膜组织, 精确量取 0.4 g 剪碎后加入 0.9% 氯化钠注射液研磨匀浆, 离心后将上清吸出, 以 BCA 法测出其中蛋白浓度后每组取出 0.25 ml, 用试剂盒测量异位子宫内膜组织样品液中 GSH 及 MDA 水平、铁含量, 使用 ELISA 试剂盒测量异位子宫内膜组织样品液及血清中 TNF- α 、IL-6 水平, 参照各说明书进行操作。

2.3.3 免疫印迹法测定大鼠异位子宫内膜组织铁死亡相关蛋白及 AMPK/GSK-3 β /Nrf2 通路相关蛋白表达 取炎症因子水平检测后剩余的各组

大鼠异位子宫内膜组织样品液, 置于沸水浴内变性, 每组取出 30 μ g 总蛋白跑电泳分离后电转, 移到硝酸纤维素膜上后浸没于 5% 的脱脂奶粉溶液内封闭其非特异位点, 剪下 ACSL4、PTGS2、AMPK、GSK-3 β 、Nrf2、p-AMPK、p-GSK-3 β 、GAPDH 蛋白条带后分别孵育其对应的一抗, 洗膜后孵育相对应的二抗, 洗膜后用化学发光法显色各组蛋白条带, 采集其图像用 Image J 软件定量分析各组蛋白相对表达。

2.3.4 CCK-8 法、流式细胞术分别测定各组细胞增殖及凋亡 取原代培养的 EM 大鼠子宫内膜基质细胞, 传代后以每孔 1×10^4 个的密度接种在 96 孔板内培养 36 h, 按照“2.2”项中的方法分组处理 24 h 后(同时设置不接种细胞的空白对照组), 加入 CCK-8 工作液孵育 2 h 后依据 CCK-8 试剂盒说明指导测定各组细胞吸光度, 根据公式(实验组细胞吸光度-空白对照组细胞吸光度)/(对照组细胞吸光度-空白对照组细胞吸光度) $\times 100\%$ 计算出各组细胞活力。

取原代培养的 EM 大鼠子宫内膜基质细胞, 传代后以每孔 1.5×10^5 个的密度接种在 24 孔板内培养 36 h, 按照“2.2”项中的方法分组处理 24 h 后胰酶消化后收集各组细胞沉淀, 以 PBS 缓冲液分别洗涤后计数, 每组取约 1.5×10^5 个细胞依次孵育 FITC、PI, 依据 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒说明指导上机检测各组细胞凋亡率。

2.3.5 检测各组细胞铁死亡指标(GSH 及 MDA 水平、铁含量) 取“2.2”项中收集的各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞, 以高强度 RIPA 裂解液裂解后离心, 以 BCA 法测定上清中总蛋白浓度后采用试剂盒测量其中 GSH 及 MDA 水平、铁含量, 具体参照各自说明书进行操作。

2.3.6 免疫印迹实验检测各组细胞铁死亡相关蛋白及 AMPK/GSK-3 β /Nrf2 通路相关蛋白表达 取“2.2”项中收集的各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞, 以高强度 RIPA 裂解液提出其中总蛋白后进行免疫印迹实验检测 ACSL4、PTGS2、Nrf2 相对表达及 AMPK、GSK-3 β 磷酸化水平, 具体按“2.3.3”项中方法检测。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 实验数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行描

述,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两进一步比较采用 LSD-t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠异位子宫内膜生长及异位子宫内膜组织铁死亡指标比较 与假手术组相比,模型组异位子宫内膜体积、异位子宫内膜组织 MDA 水平、铁含量升高($P<0.05$),异位子宫内膜组织 GSH 水平降低($P<0.05$);与模型组相比,茯苓酸低、高剂量组异位子宫内膜体积、异位子宫内膜组织 MDA 水平、铁含量降低($P<0.05$),异位子宫内膜组织 GSH 水平升高($P<0.05$);与茯苓酸低剂量组相比,茯苓酸高剂量组异位子宫内膜体积、异位子宫内膜组织 MDA 水平、铁含量降低($P<0.05$),异位子宫内膜组织 GSH 水平升高($P<0.05$);与茯苓酸高剂量组相比,茯苓酸高剂量+盐酸多索啡组异位子宫内膜体积、异位子宫内膜组织 MDA 水平、铁含量升高($P<0.05$),异位子宫内膜组织 GSH 水平降低($P<0.05$)。(见表 1)

表 1 各组大鼠异位子宫内膜体积及异位子宫内膜组织铁死亡指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	异位子宫内膜 体积/ mm^3	GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	铁含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$
假手术组	12	00.00±0.00	16.44±2.35	0.21±0.04	8.32±1.04
模型组	12	119.32±17.60 ^a	8.76±0.80 ^a	0.89±0.13 ^a	17.59±2.61 ^a
茯苓酸低剂量组	12	68.95±8.32 ^b	12.05±1.31 ^b	0.55±0.09 ^b	13.05±1.57 ^b
茯苓酸高剂量组	12	11.02±2.38 ^{bc}	15.73±1.69 ^{bc}	0.26±0.07 ^{bc}	8.90±1.13 ^{bc}
茯苓酸高剂量+ 盐酸多索啡组	12	108.53±20.17 ^d	9.32±0.92 ^d	0.81±0.11 ^d	16.98±2.70 ^d

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与茯苓酸低剂量组比较,^c $P<0.05$;与茯苓酸高剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

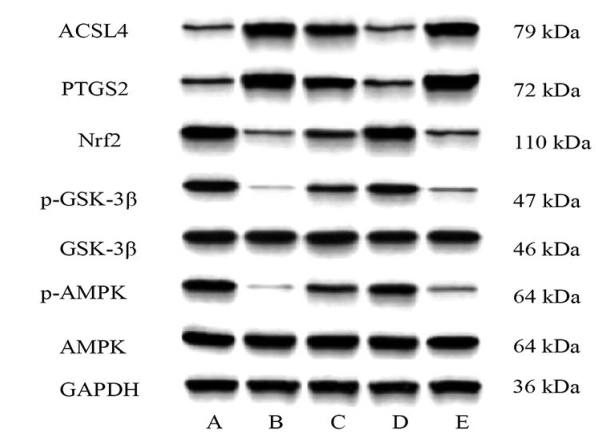
3.2 各组大鼠血清及异位子宫内膜组织炎症因子水平比较 与假手术组相比,模型组血清及异位子宫内膜组织 TNF-α、IL-6 水平升高($P<0.05$);与模型组相比,茯苓酸低、高剂量组血清及异位子宫内膜组织 TNF-α、IL-6 水平降低($P<0.05$);与茯苓酸低剂量组相比,茯苓酸高剂量组血清及异位子宫内膜组织 TNF-α、IL-6 水平降低($P<0.05$);与茯苓酸高剂量组相比,茯苓酸高剂量+盐酸多索啡组血清及异位子宫内膜组织 TNF-α、IL-6 水平升高($P<0.05$)。(见表 2)

表 2 各组大鼠血清及异位子宫内膜组织 TNF-α、IL-6 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	血清		异位子宫内膜组织	
		TNF-α/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	TNF-α/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$
假手术组	12	40.35±6.02	54.48±8.78	34.23±5.13	47.39±6.53
模型组	12	156.26±25.68 ^a	186.73±23.81 ^a	141.84±20.64 ^a	165.58±19.64 ^a
茯苓酸低剂量组	12	103.92±14.36 ^b	123.04±16.32 ^b	89.62±15.07 ^b	108.34±11.59 ^b
茯苓酸高剂量组	12	51.01±8.42 ^{bc}	63.52±9.63 ^{bc}	40.25±7.12 ^{bc}	55.92±8.14 ^{bc}
茯苓酸高剂量+ 盐酸多索啡组	12	142.10±19.15 ^d	174.31±22.94 ^d	129.02±21.13 ^d	153.81±21.06 ^d

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与茯苓酸低剂量组比较,^c $P<0.05$;与茯苓酸高剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠异位子宫内膜组织铁死亡及 AMPK/GSK-3β/Nrf2 通路相关蛋白表达 与假手术组相比,模型组异位子宫内膜组织 ACSL4、PTGS2 表达升高($P<0.05$),p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β 及 Nrf2 蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组相比,茯苓酸低、高剂量组异位子宫内膜组织 ACSL4、PTGS2 表达降低($P<0.05$),p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β 及 Nrf2 蛋白表达升高($P<0.05$);与茯苓酸低剂量组相比,茯苓酸高剂量组异位子宫内膜组织 ACSL4、PTGS2 表达降低($P<0.05$),p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β 及 Nrf2 蛋白表达升高($P<0.05$);与茯苓酸高剂量组相比,茯苓酸高剂量+盐酸多索啡组异位子宫内膜组织 ACSL4、PTGS2 表达升高($P<0.05$),p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β 及 Nrf2 蛋白表达降低($P<0.05$)。(见图 1、表 3)



注:A—假手术组;B—模型组;C—茯苓酸低剂量组;D—茯苓酸高剂量组;E—茯苓酸高剂量+盐酸多索啡组。

图 1 各组大鼠异位子宫内膜组织铁死亡及 AMPK/GSK-3β/Nrf2 通路相关蛋白表达

表 3 各组大鼠异位子宫内膜组织铁死亡及 AMPK/GSK-3β/Nrf2 通路相关蛋白相对表达($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	ACSL4/GAPDH	PTGS2/GAPDH	p-AMPK/AMPK	p-GSK-3β/GSK-3β	Nrf2/GAPDH
假手术组	12	0.22±0.04	0.31±0.07	0.91±0.09	0.93±0.07	1.16±0.18
模型组	12	1.41±0.21 ^a	1.54±0.20 ^a	0.08±0.02 ^a	0.07±0.01 ^a	0.19±0.05 ^a
茯苓酸低剂量组	12	0.82±0.13 ^b	0.93±0.14 ^b	0.47±0.08 ^b	0.48±0.10 ^b	0.61±0.11 ^b
茯苓酸高剂量组	12	0.26±0.06 ^{bc}	0.34±0.05 ^{bc}	0.88±0.12 ^{bc}	0.89±0.11 ^{bc}	1.12±0.14 ^{bc}
茯苓酸高剂量+盐酸多索啡组	12	1.36±0.19 ^d	1.50±0.22 ^d	0.10±0.03 ^d	0.09±0.03 ^d	0.22±0.06 ^d

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与茯苓酸低剂量组比较,^c $P<0.05$;与茯苓酸高剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

3.4 各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞增殖及凋亡的影响 与对照组相比,茯苓酸低、高浓度组大鼠子宫内膜基质细胞活力降低($P<0.05$),凋亡率升高($P<0.05$);与茯苓酸低浓度组相比,茯苓酸高浓度组大鼠子宫内膜基质细胞活力降低($P<0.05$),凋亡率升高($P<0.05$);与茯苓酸高浓度组相比,茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组大鼠子宫内膜基质细胞活力升高($P<0.05$),凋亡率降低($P<0.05$)。(见图 2、表 4)

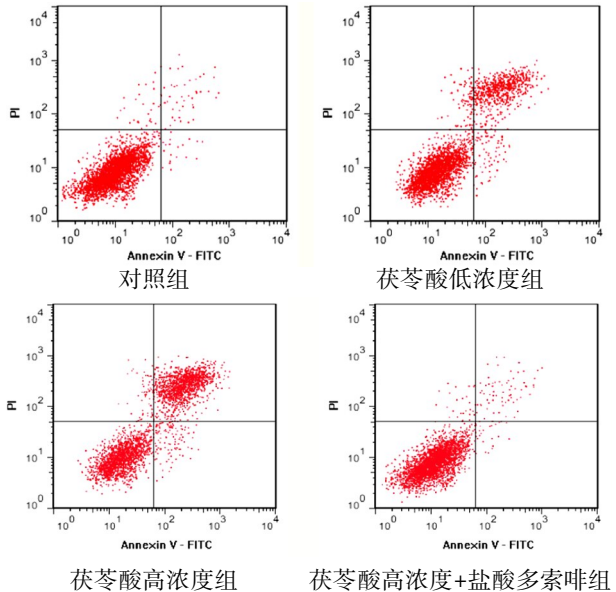


图 2 流式细胞术测定各组细胞凋亡

表 4 各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞活力、凋亡率($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	例数	细胞活力	凋亡率
对照组	6	100.00±0.00	0.63±0.14
茯苓酸低浓度组	6	69.36±8.35 ^a	28.97±1.74 ^a
茯苓酸高浓度组	6	40.31±6.02 ^{ab}	59.74±2.63 ^{ab}
茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组	6	90.54±11.13 ^c	1.16±0.33 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与茯苓酸低浓度组比较,^b $P<0.05$;与茯苓酸高浓度组比较,^c $P<0.05$ 。

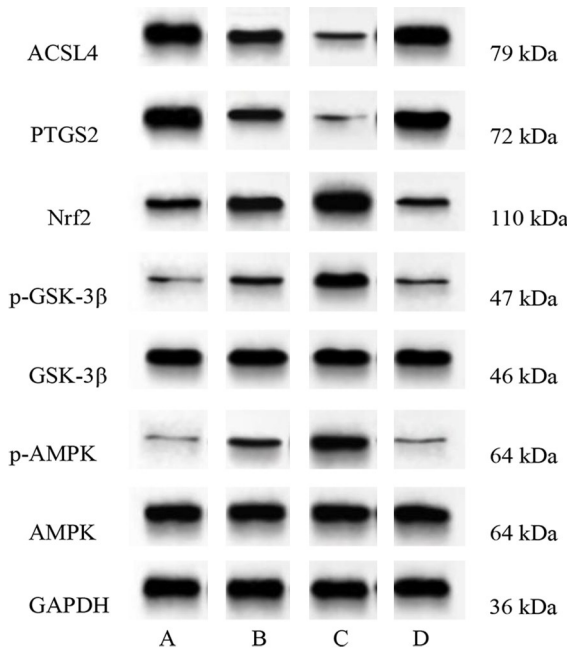
3.5 各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡指标比较 与对照组相比,茯苓酸低、高浓度组大鼠子宫内膜基质细胞 MDA 水平、铁含量降低($P<0.05$),GSH 水平升高($P<0.05$);与茯苓酸低浓度组相比,茯苓酸高浓度组大鼠子宫内膜基质细胞 MDA 水平、铁含量降低降低($P<0.05$),GSH 水平升高($P<0.05$);与茯苓酸高浓度组相比,茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组大鼠子宫内膜基质细胞 MDA 水平、铁含量升高($P<0.05$),GSH 水平降低($P<0.05$)。(见表 5)

表 5 各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$	铁含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$
对照组	6	10.26±1.37	1.53±0.15	19.67±2.04
茯苓酸低浓度组	6	15.79±1.82 ^a	0.75±0.11 ^a	10.12±1.65 ^a
茯苓酸高浓度组	6	21.34±2.06 ^{ab}	0.13±0.03 ^{ab}	1.73±0.52 ^{ab}
茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组	6	10.85±1.51 ^c	1.40±0.14 ^c	18.94±2.11 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与茯苓酸低浓度组比较,^b $P<0.05$;与茯苓酸高浓度组比较,^c $P<0.05$ 。

3.6 各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡指标比较 与对照组相比,茯苓酸低、高浓度组大鼠子宫内膜基质细胞 ACSL4、PTGS2 表达降低($P<0.05$),p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β 及 Nrf2 蛋白表达升高($P<0.05$);与茯苓酸低浓度组相比,茯苓酸高浓度组大鼠子宫内膜基质细胞 ACSL4、PTGS2 表达降低($P<0.05$),p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β 及 Nrf2 蛋白表达升高($P<0.05$);与茯苓酸高浓度组相比,茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组大鼠子宫内膜基质细胞 ACSL4、PTGS2 表达升高($P<0.05$),p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β 及 Nrf2 蛋白表达降低($P<0.05$)。(见图 3、表 6)



注:A—对照组;B—茯苓酸低浓度组;C—茯苓酸高浓度组;D—茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组

图 3 免疫印迹检测 EM 大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡及 AMPK/GSK-3β/Nrf2 通路相关蛋白表达

表 6 各组 EM 大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡及 AMPK/GSK-3β/Nrf2 通路相关蛋白相对表达($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	ACSL4/GAPDH	PTGS2/GAPDH	p-AMPK/AMPK	p-GSK-3β/GSK-3β	Nrf2/GAPDH
对照组	6	1.23±0.17	1.19±0.13	0.06±0.01	0.09±0.03	0.40±0.06
茯苓酸低浓度组	6	0.73±0.11 ^a	0.64±0.08 ^a	0.44±0.06 ^a	0.43±0.07 ^a	0.87±0.13 ^a
茯苓酸高浓度组	6	0.29±0.04 ^{ab}	0.13±0.03 ^{ab}	0.85±0.10 ^{ab}	0.84±0.11 ^{ab}	1.39±0.12 ^{ab}
茯苓酸高浓度+盐酸多索啡组	6	1.19±0.14 ^c	1.15±0.12 ^c	0.08±0.02 ^c	0.11±0.01 ^c	0.43±0.08 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与茯苓酸低浓度组比较,^b $P<0.05$;与茯苓酸高浓度组比较,^c $P<0.05$ 。

4 讨 论

EM 作为育龄妇女常见病,主要治疗方法为口服激素类药物和手术,但长期服用口服激素类药物会导致肝肾损伤、绝经等毒副作用,手术治疗又易复发,因此需探寻开发新型治疗方法^[17]。通过在 SD 大鼠腹腔内异位移植子宫内膜组织的方法构建 EM 大鼠模型,结果显示异位子宫内膜体积、MDA 水平及铁含量、促炎因子 TNF-α 及 IL-6 水平升高, GSH 水平降低,发生明显铁死亡及炎症,且大鼠异位内膜呈透明囊状结构且体积增大,内有积液,其表面存在丰富血管,提示 EM 大鼠造模成功。

EM 虽然是良性疾病,但具有类似恶性肿瘤的黏附、浸润、侵袭等生物学表现,子宫内膜基质细胞的异常增殖、铁死亡及炎症与 EM 的发病显著相关,促进子宫内膜基质细胞凋亡并减弱铁死亡及炎症可有效改善 EM 症状^[18]。本文以不同剂量茯苓酸处理 EM 模型大鼠,可降低大鼠异位子宫内膜体积、

MDA 水平及铁含量、TNF-α 及 IL-6 水平、ACSL4 及 PTGS2 蛋白表达,升高 GSH 水平,表明茯苓酸可抑制 EM 大鼠炎症、铁死亡及异位子宫内膜生长,延缓 EM 进展;以不同浓度茯苓酸处理 EM 大鼠子宫内膜基质细胞,可降低其细胞活力、MDA 水平及铁含量、ACSL4 及 PTGS2 蛋白表达,升高其凋亡率、GSH 水平,表明茯苓酸可抑制 EM 大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡及增殖,并促进其凋亡,揭示茯苓酸可延缓 EM 病情进展,在其临床治疗中具有很好的开发应用前景。

AMPK/GSK-3β/Nrf2 信号可调控细胞存活、生长、凋亡、铁死亡及炎症过程,激活该信号可通过抑制铁死亡来保护心脏免受缺血再灌注引发的损伤^[19],从而减轻内毒素血症小鼠血脑屏障损伤; Felgueiras 等^[20]的研究表明,促进 AMPK 磷酸化可减轻 EM 小鼠心脏氧化反应,治疗过程中 AMPK 被激活,因而激活 AMPK/GSK-3β/Nrf2 信号可能是

治疗EM的有效策略。本研究结果显示,EM大鼠及其子宫内膜基质细胞中p-AMPK/AMPK、p-GSK-3β/GSK-3β及Nrf2蛋白表达比对照组降低,茯苓酸处理后可逆转其变化趋势,表明AMPK/GSK-3β/Nrf2信号参与介导茯苓酸对EM大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡的抑制过程;茯苓酸和AMPK特异性抑制剂盐酸多索啡联合处理EM大鼠及其子宫内膜基质细胞,可减弱茯苓酸对大鼠异位子宫内膜生长、炎症及铁死亡的抑制作用,消除其对EM大鼠子宫内膜基质细胞的促凋亡及抗增殖功效,最终逆转茯苓酸对EM进展的延缓作用,揭示茯苓酸减弱子宫内膜异位症大鼠子宫内膜基质细胞铁死亡是通过激活AMPK信号实现的。

综上所述,茯苓酸可增强AMPK、GSK-3β磷酸化及Nrf2表达,进而减轻炎症及铁超载,抑制铁死亡及异位子宫内膜病灶生长,促进EM大鼠子宫内膜基质细胞凋亡,最终延缓EM进展,激活AMPK/GSK-3β/Nrf2信号可能是其作用机制之一,本研究证实了茯苓酸可作为治疗EM的潜在候选药物,并为其临床推广应用提供了理论依据。

参考文献

[1] BÄUMLER M, HEISS N, DRUCKMANN R. Endometriosis at all ages; Diagnostic ultrasound [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2022, 43(2):151-157.

[2] FRANÇA P R C, LONTRA A C P, FERNANDES P D. Endometriosis: A disease with few direct treatment options [J]. *Molecules*, 2022, 27(13):4034-4053.

[3] NG S W, NORWITZ S G, TAYLOR H S, et al. Endometriosis: The role of iron overload and ferroptosis [J]. *Reprod Sci*, 2020, 27(7):1383-1390.

[4] DOLMANS M M, DONNEZ J. Emerging drug targets for endometriosis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11):1654-1667.

[5] 徐德宏, 谭朝阳, 郑慧, 等. 茯苓功效成分茯苓酸的研究进展 [J]. *食品科学*, 2022, 43(7):273-280.

[6] WANG X, SHI Y, XU L, et al. Traditional Chinese medicine prescription guizhi fuling pills in the treatment of endometriosis [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(11):2401-2408.

[7] LI Y, ZHAO Y, TAN X, et al. Isoorientin inhibits inflammation in macrophages and endotoxemia mice by regulating glycogen synthase kinase 3β [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020(1):8704146-8704155.

[8] LU H, XIAO H, DAI M, et al. Britanin relieves ferroptosis-media-

ted myocardial ischaemia/reperfusion damage by upregulating GPX4 through activation of AMPK/GSK3β/Nrf2 signalling [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1):38-45.

[9] WU P L, ZENG C, ZHOU Y F, et al. Farnesoid X receptor agonist GW4064 inhibits aromatase and ERβ Expression in Human endometrial stromal cells [J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(8):1111-1120.

[10] MIURA R, YOKOI A, MATSUMOTO T, et al. Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in ovarian endometriosis-clear cell carcinoma lesions [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):308-320.

[11] 任丽娟, 杨广林, 陈文静, 等. 茯苓酸调节Nrf2/Keap1/ARE信号通路改善脂多糖诱导肺泡上皮细胞氧化应激损伤研究 [J]. *中国药师*, 2022, 25(9):1525-1530.

[12] 陈慧, 刘艳玲, 郎茂竹, 等. 血管内皮生长因子对子宫内膜异位症大鼠缺氧及炎症微环境的作用机制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(2):281-286.

[13] 杨依, 陈凡, 冯瑞兴, 等. 茯苓酸对小鼠急性放射性肺损伤的防护作用机制 [J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2022, 43(4):268-274.

[14] 马蒂达, 吴洋, 王显, 等. 桃叶珊瑚苷通过AMPK/NLRP3通路对心肌梗死大鼠心功能的影响及机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2021, 46(7):773-780.

[15] 王佳, 梁葵香, 刘艳妮, 等. 茯苓酸通过上调miR-133a影响子宫肌瘤细胞增殖凋亡及表皮生长因子的水平 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(9):1069-1074.

[16] LU X, CHAN T, CHENG Z, et al. The 5'-AMP-Activated protein kinase regulates the function and expression of human organic anion transporting polypeptide 1A2 [J]. *Mol Pharmacol*, 2018, 94(6):1412-1420.

[17] CLOWER L, FLESHMAN T, GELDENHUYS WJ, et al. Targeting oxidative stress involved in endometriosis and its pain [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(8):1055-1076.

[18] YI Z H, LI S Q, KE J Y, et al. Baicalein relieves ferroptosis-mediated phagocytosis inhibition of macrophages in ovarian endometriosis [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(12):6189-6204.

[19] WANG Z, YAO M, JIANG L, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis via AMPK/GSK-3β/Nrf2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154:113572-113586.

[20] FELGUEIRAS R, NETO AC, RODRIGUES AR, et al. Anti-oxidant effect of metformin through AMPK/SIRT1/PGC-1α/SIRT3-independent GPx1 expression in the heart of mice with endometriosis [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2022, 43(4):405-414.

(收稿日期:2023-12-04)

[编辑:徐霜俐]