

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.14.011

实验研究

活血消异方对卵巢型子宫内膜异位症模型大鼠异位组织中Tfh细胞及JAK/STAT通路的影响

范伟森¹, 张永嘉¹, 王雅倩², 雷红², 阎慧婷², 侯睿捷¹, 王新¹, 陶钰¹, 赵瑞华¹✉

1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁5号, 100053; 2. 山东中医药大学第一临床医学院

[摘要] **目的** 从滤泡辅助性T (Tfh) 细胞和Janus激酶/信号转导与转录激活因子 (JAK/STAT) 通路探讨活血消异方治疗卵巢型子宫内膜异位症的可能作用机制。**方法** 使用GEO数据库下载人类增殖期子宫内膜异位症异位组织与正常女性增殖期的子宫组织测序数据。将具有正常动情周期的45只雌性SD大鼠随机分为活血消异方组、模型组和正常组, 每组15只。采用异位组织插入法建立卵巢型子宫内膜异位症大鼠模型, 造模成功后活血消异方组予活血消异方溶液5.85 g/(kg·d)灌胃, 模型组和正常组予生理盐水1 ml/d灌胃, 均连续14天。采用转录组学技术测序分析各组大鼠卵巢异位组织和正常子宫组织的基因表达情况, 与人类数据进行比较, 以探讨增殖期异位组织中JAK/STAT通路激活情况, 使用免疫组化法检测大鼠卵巢异位组织和正常子宫组织中CXCR5趋化因子受体5 (CXCR5)、白细胞介素21 (IL-21) 阳性表达, Western Blot法检测IL-21、白细胞介素21受体 (IL-21R)、Janus激酶1 (JAK1)、信号转导与转录激活因子6 (STAT6)、B淋巴细胞瘤2 (Bcl-2) 蛋白水平, 免疫浸润法分析滤泡辅助性T (Tfh) 细胞情况。**结果** 通过基因集富集分析发现, 与正常子宫组织比较, 人类增殖期子宫内膜异位症异位组织JAK/STAT通路被明显激活。与正常组比较, 模型组大鼠卵巢异位组织中JAK/STAT通路被明显激活; 与模型组比较, 活血消异方组大鼠卵巢异位组织中JAK/STAT通路被抑制。与正常组子宫组织比较, 模型组卵巢异位组织中Tfh细胞组分评分, IL-21及CXCR5阳性表达, IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6及Bcl-2蛋白水平均升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 活血消异方组卵巢异位组织中IL-21及CXCR5阳性表达, IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6及Bcl-2蛋白水平均降低 ($P<0.05$)。**结论** 活血消异方可能通过抑制Tfh细胞分泌IL-21来抑制卵巢型子宫内膜异位症模型大鼠异位组织中JAK/STAT通路的激活, 从而发挥治疗卵巢型子宫内膜异位症的作用。

[关键词] 卵巢型子宫内膜异位症; 活血消异方; 滤泡辅助性T细胞; Janus激酶; 信号转导与转录激活因子

卵巢型子宫内膜异位症 (ovarian endometriosis, OEM) 是妇产科常见的良性囊肿疾病, 不仅会导致痛经, 还会损伤卵巢的生殖功能, 进而影响患者正常妊娠^[1]。目前现代医学主要以激素和手术治疗OEM, 但均不能完全解决OEM带来的各种难题, 且激素治疗可能会导致患者月经紊乱, 还会出现围绝经期症状^[2]。中医药在治疗OEM方面具有减轻患者痛经症状、缩小囊肿、提高妊娠和预防复发的作用, 且安全性较高^[3-5]。活血消异方是本团队治

疗子宫内膜异位症的经验方, 具有解郁、活血、消积的功效。前期临床研究表明, 该方能够缩小OEM患者的囊肿体积^[6], 减轻痛经症状^[7]和焦虑、抑郁状态^[8], 降低盆腔子宫内膜异位症术后的复发率^[9], 提高子宫内膜异位症所致不孕患者的妊娠率和活产率^[10]。

有研究表明, Janus激酶/信号转导与转录激活因子 (JAK/STAT) 通路在子宫内膜异位症的发病中占据重要作用, 该通路的下游因子主要包括抗凋亡因子和细胞周期蛋白, 其可在异位组织中激活, 增强细胞抗凋亡能力^[11]。滤泡辅助性T (Tfh) 细胞是自身免疫激活的重要参与者, 在子宫内膜异位

基金项目: 国家自然科学基金 (82374513, 82074485); 北京市重大疑难疾病中西医协同攻关项目 (2023BJSZDYNJBXTGC-009)

✉ 通讯作者: rhzh801@126.com

症患者外周血中 Tfh 细胞标志物明显升高^[12]。Tfh 细胞分泌的白细胞介素 21 (IL-21) 能够通过白细胞介素 21 受体(IL-21R)激活 JAK/STAT 通路^[13]。由于目前尚未有研究明确 JAK/STAT 通路在增殖期人类异位组织和大鼠模型异位组织中的状态,因此本研究在结合转录组学分析基础上,观察活血消异方对大鼠异位组织中增殖期 Tfh 细胞和 JAK/STAT 通路的影响,以探讨活血消异方治疗 OEM 的分子机制。本实验已通过山东中医药大学动物伦理委员会批准(批件号:SDUTCM20240623034)。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 45 只,9 周龄,体质量为 200~230 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。所有大鼠饲养于山东中医药大学动物实验中心 SPF 级环境下,温度 25℃,湿度 60%,12 h 明暗交替,通风良好,自由进食。

1.2 药物

活血消异方组成:赤芍 10 g,鸡内金 30 g,莪术 10 g,醋香附 10 g,薏苡仁 30 g,皂角刺 10 g,丹参 20 g,北柴胡 10 g。所有中药由山东新中鲁中医医院药剂科提供,并制成浓度为 0.65 g/ml 的水煎液。

1.3 主要试剂与仪器

苯甲酸雌二醇(批号:240337),上海全宇生物科技有限公司;芝麻油(批号:BYBZ23929),上海源叶生物科技有限公司;青霉素钠(批号:QMS-50),山东博美生物科技有限公司;结晶紫溶液(批号:BL802A),白鲨生物科技有限公司;苏木素-伊红(HE)染液试剂盒(批号:G1005-100ML)、Janus 激酶 1 (JAK1) 抗体(批号:GB115719-100)、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号:GB15004-100)、DAB 显色试剂盒(批号:G1212-200T)、山羊抗兔二抗(批号:G1213-100UL)、山羊抗兔 IgG(批号:GB23303)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号:G2026-200T),武汉塞维尔生物科技有限公司;CXC 趋化因子受体 5 (CXCR5) 抗体(批号:bsm-54319R),IL-21R 抗体(批号:bs-2622R)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2) 抗体(批号:bs-20163R),博奥森生物技术有限公司;IL-21 抗体(批号:A26074)、信号转导与转录激活因子 6 (STAT6) 抗体(批号:A0755),爱博泰克生物科技有限

公司;TRIzol® Reagent(批号:15596-026),美国 Invitrogen 公司。

凝胶成像系统(型号:2200),美国 Alpha 公司;电泳仪(型号:EC250-90),美国 Thermo 公司;冰冻切片机(型号:CRYOSTAR NX50),赛默飞世尔科技公司;钟摆式脱色摇床(型号:DS-2S100)、掌上离心机(型号:D1008E),武汉赛维尔生物科技有限公司;微量分光光度计(型号:Nanodrop2000)、测序平台机(型号:NovaSeq X Plus),美国 Illumina 公司。

1.4 动物分组、造模及给药方法

使用结晶紫染色法对大鼠阴道涂片染色并连续观察 10 天,确认 45 只大鼠均具有正常动情周期后,采用随机数字表法分为活血消异方组、模型组和正常组,每组 15 只。采用随机数字表法从正常组中抽取 6 只作为供体大鼠,活血消异方组与模型组为受体大鼠。活血消异方组与模型组以文献[14]中方法为参考建立 OEM 大鼠模型:术前使用苯甲酸雌二醇与芝麻油按照 1:3 的比例配制混合液,供体大鼠予每 4 天腹腔注射苯甲酸雌二醇混合液 100 μg/kg 一次,共注射 2 次,末次注射 4 天后造模。所有大鼠术前禁食 12 h 后进行备皮和消毒,使用 2% 异氟烷进行吸入麻醉,侧腹部平行大鼠脊柱剪开约 1.5 cm 的切口;剪取供体大鼠子宫组织,修剪为 1 cm×2 mm 的长条状,浸泡在细胞培养液中;使用齿镊轻轻夹出受体大鼠卵巢并固定,使用细头镊子将供体大鼠子宫组织作为异位组织插入受体大鼠一侧卵巢底部脂肪中,贯穿卵巢底部的脂肪,随后将卵巢推入腹腔,逐层缝合,受体大鼠的另一侧卵巢不处理。术后每只大鼠连续 3 天腹腔注射青霉素钠 8 U/d 以避免感染。受体大鼠再予每 4 天腹腔注射苯甲酸雌二醇混合液 200 μg/kg,连续注射 2 次。术后第 8 天,采用随机数字表法在活血消异方组和模型组中各抽取 2 只大鼠打开腹腔观察情况,发现卵巢周围存在异位囊肿即证明造模成功。

大鼠造模成功后,活血消异方组予活血消异方溶液 5.85 g/(kg·d) 灌胃,本次采用既往研究^[15]的半剂量进行灌胃(换算至大鼠的临床等效剂量^[16]为 11.7 g/kg);模型组和正常组每只大鼠予生理盐水 1 ml/d 灌胃,均连续 14 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 人异位组织基因表达分析 选用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索人类有关子宫内膜异位症增殖期的转录组测序本。利用 R

语言从 GEO 数据中下载人类增殖期子宫内膜异位症异位组织与正常女性增殖期的子宫内膜组织测序数据。同时将基因 ID 转换为 symbol, 然后利用 limma 包进行样本间批次效应处理, 对两类组织进行基因表达分析。

1.5.2 转录组学测序 采用随机数字表法, 活血消异方组和模型组各选取 5 只取卵巢异位组织, 正常组选取 3 只取正常子宫组织。取材前 1 周, 大鼠予颈部皮下注射苯甲酸雌二醇混合液 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 连续 7 天。取材时予 2% 异氟烷吸入麻醉, 取出各组大鼠的相关组织。

RNA 测序由美吉生物医药科技有限公司完成。根据说明书, 使用 TRIzol® Reagent 从各种大鼠组织中提取总 RNA 并进行纯化, 随后测定 RNA 的质量, 并使用 Nanodrop2000 微量分光光度计进行定量。选用高质量的 RNA 构建测序文库, 使用 1 μg 异位组织的总 RNA, 从 Illumina 中制备 RNA-seq 转录组文库, 在 Illumina 测序平台机上机测序。使用 HISAT2 软件^[17] 以定向模式将纯净序列与参考基因组进行独立比对, 并对结果进行质量评估。每个样本的映射序列由 StringTie 软件^[18] 按照参考方法组装。在鉴定差异表达基因时, 每个转录本的表达根据转录本每百万读取方法计算, 以基于最大期望算法的 RNA 测序分析^[19] 定量基因丰度。

1.5.3 HE 染色观察大鼠卵巢异位组织病理形态

将取材后的模型组大鼠卵巢异位组织利用液氮快速冷冻, 采用冷冻切片机将经液氮冷冻的大鼠卵巢异位组织进行回温, 再加入少量冷冻切片包埋剂, 控制好温度后进行切片固定, 常规 HE 染色、脱水、透明、封片, 在显微镜下观察卵巢中异位组织的病理形态变化。

1.5.4 免疫组化检测大鼠卵巢异位组织和正常子宫组织中 CXCR5、IL-21 阳性表达 取材后采用随机数字表法选取活血消异方组、模型组大鼠卵巢异位组织和正常组大鼠正常子宫组织各 3 个。利用液氮快速冷冻并切片, 将组织切片室温晾干, 烘烤后使用甲醇固定, 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。滴加抗原修复液进行抗原修复, 予 3% 双氧水溶液阻断内源性过氧化物酶, 封闭后分别滴加一抗 CXCR5、IL-21 (稀释比例分别为 1 : 200、1 : 100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日 PBS 清洗 3 次, 滴加二抗 (稀释比例分别为 1 : 400、1 : 200) 室温孵育 50 min, 加入 DAB 显色液, 苏木素复染 3 min, 苏木素返蓝液返蓝, 流水冲洗, 脱水封片后置于显微镜下观察

卵巢异位组织和正常子宫组织中 CXCR5、IL-21 阳性表达情况, 出现褐色颗粒状着色者为阳性细胞。

1.5.5 Western Blot 法检测大鼠卵巢异位组织和正常子宫组织中 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白水平 将上述组织切片研磨成粉, 加入 RIPA 裂解液提取组织总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白, 湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 室温封闭 15 h, 分别滴加 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 一抗稀释液 (稀释比例依次为 1 : 1000、1 : 1000、1 : 500、1 : 500、1 : 1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 次日用 HRP 标记二抗 (稀释比例依次为 1 : 2000、1 : 2000、1 : 1000、1 : 1000、1 : 2000) 室温孵育 2 h, 凝胶成像系统曝光蛋白条带, 采用 ImageJ-win64 软件测定蛋白灰度值, 以 GAPDH 为内参, 以目的蛋白与内参灰度值的比值表示目的蛋白水平。

1.6 数据分析方法

使用基因集富集分析 (GSEA) 分析^[20] 对人类和大鼠异位组织及正常组织测序数据进行分析, 观察大鼠和人类异位组织及正常组织 JAK/STAT 通路变化, 使用趋势图进行展示。使用 Cibersort 对各组大鼠进行 T_H 细胞免疫浸润分析, 并以提琴图展示各组大鼠 T_H 细胞组分评分, 细胞组分评分为细胞在组织中所占比例, 评分越高代表细胞比例越高^[21-22]。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料均符合正态分布以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较方差齐采用单因素方差分析, 方差不齐采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

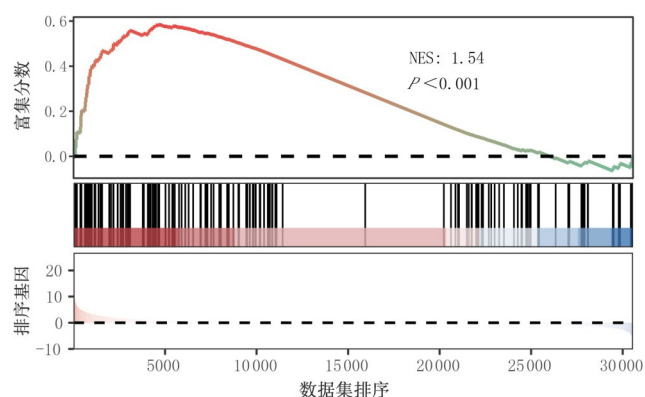
2 结果

2.1 人异位组织差异表达基因获取结果

本文选取人类增殖期转录组学样本的芯片为 GSE5108、GSE25628、GSE153739 和 GSE201912, 共涉及 21 个子宫内膜异位组织样本和 11 个正常子宫内膜组织样本。经 GSEA 分析后, 可知增殖期子宫内膜异位组织与正常子宫内膜组织相比, JAK/STAT 通路被明显激活。详见图 1。

2.2 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织转录组学测序结果

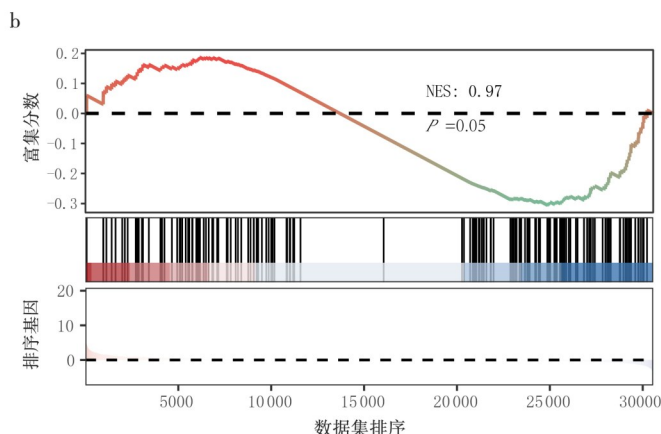
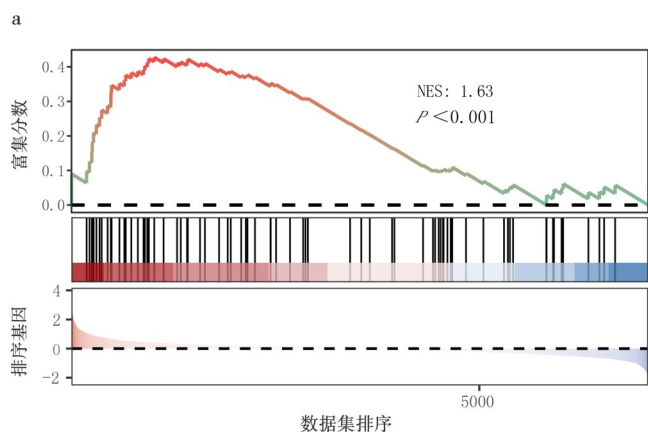
同样采用 GSEA 分析基因表达情况。图 2 示, 模型组与正常组比较, 大鼠卵巢异位组织中 JAK/STAT 通路被明显激活; 活血消异方组与模型组比较, 大鼠卵巢异位组织中 JAK/STAT 通路被抑制。



注：NES 为富集分数的峰值，正值表示基因集上调，负值表示基因集下调； P 值为富集可信度，是用来评估基因集富集结果显著性的统计量，当 $P < 0.05$ 时可信度较高。

图 1 增殖期子宫内膜异位症患者异位组织与正常子宫内膜组织中 Janus 激酶/信号转导与转录激活因子通路的变化趋势图

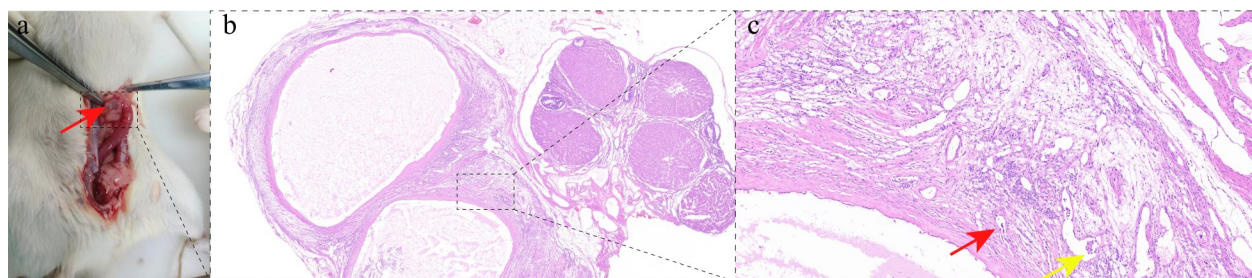
Figure 1 Trend chart of changes in the JAK/STAT pathway between ectopic and normal endometrial tissues in patients with proliferative-phase endometriosis



注：图 a 为模型组卵巢异位组织与正常组正常子宫组织 Janus 激酶/信号转导与转录激活因子通路的变化趋势；图 b 为活血消异方组与模型组卵巢异位组织 Janus 激酶/信号转导与转录激活因子通路的变化趋势；NES 为富集分数的峰值，正值表示基因集上调，负值表示基因集下调； P 值为富集可信度，是用来评估基因集富集结果显著性的统计量，当 $P < 0.05$ 时可信度较高。

图 2 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织基因集富集分析图

Figure 2 Gene set enrichment analysis of ovarian ectopic tissues or normal uterine tissues in each rat group



注：a 图中红色箭头指子宫内膜异位囊肿，可见囊肿与卵巢连接紧密，异位组织在苯甲酸雌二醇的作用下明显形成囊肿；b 图为异位囊肿紧密连接卵巢组织的 HE 染色图，为显微镜下放大 2 倍；c 图为卵巢异位组织的显微镜下放大 10 倍微观图，图中可明显见到子宫内膜间质细胞和腺体，红色箭头指示子宫内膜间质细胞，黄色箭头指示腺体。

图 3 模型组大鼠卵巢外观和异位组织 HE 染色图

Figure 3 Macroscopic appearance of ovaries and HE staining of ectopic tissues in the model group rats

2.3 模型组大鼠卵巢外观和异位组织 HE 染色图

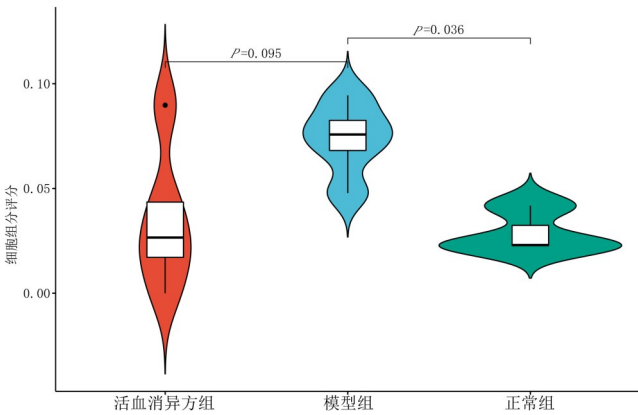
手术造模后第 8 天打开模型组大鼠腹腔，可见附着在卵巢部的异位组织在苯甲酸雌二醇的作用下形成明显的囊肿，且与卵巢组织连接紧密，证明造模成功。图 3 示，卵巢异位组织形成的囊肿与卵巢组织紧密连接，囊肿壁中可见子宫内膜间质细胞和腺体，提示造模成功。

2.4 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织中 Tfh 细胞免疫浸润分析结果

图 4 示，模型组大鼠卵巢异位组织中 Tfh 细胞组分评分较正常组大鼠子宫组织升高 ($P < 0.05$)；活血消异方组大鼠卵巢异位组织中 Tfh 细胞组分评分与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，但活血消异方组 Tfh 细胞组分评分均值低于模型组。

2.5 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织中 CXCR5、IL-21 阳性表达情况比较

表 1 示，与正常组子宫组织比较，模型组大鼠



注：提琴图中两组之间的数值为 P 值。

图4 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织中滤泡辅助性T细胞的免疫浸润分析提琴图

Figure 4 Violin plot of immune infiltration analysis of Tfh cells in ovarian ectopic tissues or normal uterine tissues in each rat group

卵巢异位组织中 IL-21、CXCR5 阳性表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，活血消异方组大鼠卵巢异位组织中 IL-21、CXCR5 阳性表达降低 ($P<0.05$)。各组大鼠卵巢异位组织和正常子宫组织中 CXCR5、IL-21 阳性表达免疫组化图见图 5。

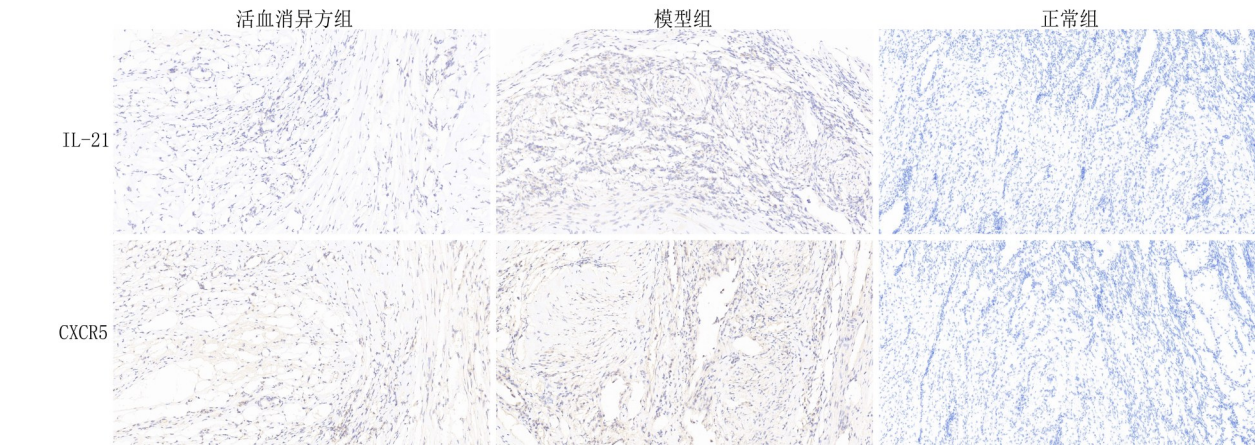
表1 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织中 CXCR5、IL-21 阳性表达情况比较

Table 1 Comparison of CXCR5 and IL-21 positive expression in ovarian ectopic tissues or normal uterine tissues			
in each rat group			(%, $\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	CXCR5	IL-21
正常组	3	0.19 $\pm$ 0.19	0.16 $\pm$ 0.01
模型组	3	0.37 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.25 $\pm$ 0.01 ^{a)}
活血消异方组	3	0.30 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.20 $\pm$ 0.01 ^{b)}

注：CXCR5，CXC 趋化因子受体 5；IL-21，白细胞介素 21。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.6 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织中 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白水平比较

表 2 示，与正常组子宫组织比较，模型组大鼠卵巢异位组织中 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，活血消异方组大鼠卵巢异位组织中 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。各组大鼠卵巢异位组织和正常子宫组织中 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白电泳图见图 6。



注：褐色颗粒状着色者代表阳性表达；IL-21，白细胞介素 21；CXCR5，CXC 趋化因子受体 5。

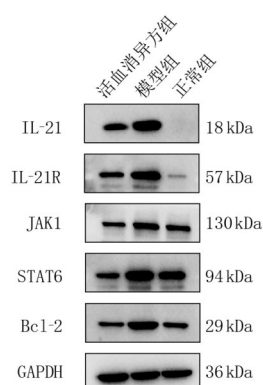
图5 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织中 CXCR5、IL-21 阳性表达免疫组化图 ($\times 20$)

Figure 5 Immunohistochemical staining images showing CXCR5 and IL-21 positive expression in ovarian ectopic and normal uterine tissues across rat groups ($\times 20$)

表2 各组大鼠卵巢异位组织/正常子宫组织中 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白水平比较

Table 2 Comparison of IL-21, IL-21R, JAK1, STAT6, and Bcl-2 protein levels in ovarian ectopic and normal uterine tissues across rat groups						
						(/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	IL-21	IL-21R	JAK1	STAT6	Bcl-2
正常组	3	0.25 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.00	0.92 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.05	0.72 $\pm$ 0.01
模型组	3	1.16 $\pm$ 0.07 ^{a)}	1.25 $\pm$ 0.07 ^{a)}	1.18 $\pm$ 0.03 ^{a)}	1.10 $\pm$ 0.04 ^{a)}	1.24 $\pm$ 0.03 ^{a)}
活血消异方组	3	0.60 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.63 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.78 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.51 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.70 $\pm$ 0.03 ^{b)}

注：IL-21，白细胞介素 21；IL-21R，白细胞介素 21 受体；JAK1，Janus 激酶 1；STAT6，信号转导与转录激活因子 6；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤 2。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



注: IL-21, 白细胞介素 21; IL-21R, 白细胞介素 21 受体; JAK1, Janus 激酶 1; STAT6, 信号转导与转录激活因子 6; Bcl-2, B 淋巴细胞瘤 2。

图 6 各组大鼠卵巢异位组织和正常子宫组织中 IL-21、IL-21R、JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白电泳图

Figure 6 Western Blot analysis of IL-21, IL-21R, JAK1, STAT6, and Bcl-2 proteins in ovarian ectopic and normal uterine tissues across rat groups

3 讨论

目前子宫内膜异位症的模型构建多采用腹膜内缝合的方法, 所种植的异位组织位于腹膜^[23], 并未直接影响卵巢。腹腔注射内膜碎片的方法虽然能够种植腹腔中的各个部位, 但无法保证精确地种植到卵巢中^[24]。还有研究^[25]采用内膜碎片卵巢膜下注射的方法建立 OEM 模型, 但该方法操作困难, 且对种植于卵巢上的异位组织进行取材时操作困难, 故不适合推广。本团队前期使用内膜缝合置于卵巢部的的方法建立 OEM 模型^[26], 但缝合线的压力以及缝合线的存在可能会对动物卵巢产生一定的影响, 完全将内膜组织缝合至卵巢上操作较难。因此, 本团队前期研究提出采用正常子宫内膜组织插入卵巢底部脂肪组织法建立 OEM 大鼠模型, 使内膜组织与卵巢组织紧密连接, 既可避免缝合子宫内膜时缝合线对卵巢的影响, 又可提高造模效率^[14], 本次研究我们第一次将该方法应用到模型构建中。

OEM 属于中医学“癥瘕”范畴, 多由瘀血痰湿结聚而成^[27]。活血消异方能够行气活血、消积化痰, 恰为瘀血痰湿结聚病机而设, 方以柴胡、香附疏肝解郁, 畅行气机; 丹参、赤芍活血化瘀; 薏苡仁、鸡内金消积散结的同时健脾化痰; 莪术和皂角刺利气活血散结, 除顽癥坚瘕。

本研究结果表明, 与正常大鼠子宫组织和人类子宫内膜组织相比, 大鼠异位组织、人类异位组织增殖期时 JAK/STAT 通路均处于激活状态, 证明了 OEM 的发病机制与 JAK/STAT 通路的激活密切相

关, 这尽可能保证了动物实验研究与人类组织的一致性。JAK/STAT 通路的激活不仅会导致免疫细胞的活化与炎症因子的释放, 还会激活下游 Bcl-2, 而 Bcl-2 具有抗凋亡作用, 能够抑制子宫内膜细胞凋亡^[28]。模型组大鼠卵巢异位组织中 JAK1、STAT6、Bcl-2 蛋白水平较正常组升高, 而活血消异方能降低上述蛋白水平, 提示活血消异方能够一定程度上抑制卵巢异位组织中 JAK/STAT 通路的激活。Tfh 细胞参与自身免疫激活的发生, 能够特异性表达 CXCR5, 产生 IL-21, 并通过 IL-21R 激活 JAK/STAT 通路^[29-30]。CXCR5 是一种 G 蛋白偶联的 7 跨膜受体, 属于 CXCR 趋化因子受体, 是 Tfh 细胞的特异性标志物^[29]。由 Tfh 细胞分泌的 IL-21 具有调节免疫和抗肿瘤的作用^[30]。本研究中模型组卵巢异位组织中 Tfh 细胞组分评分、CXCR5 及 IL-21 阳性表达、IL-21 及 IL-21R 蛋白水平均较正常组子宫组织升高, 提示卵巢异位组织中升高的 IL-21 可能是由 Tfh 细胞分泌增加所致。活血消异方能够降低卵巢异位组织中 CXCR5 阳性表达以及 IL-21、IL-21R 蛋白水平, 且 Tfh 细胞组分评分也呈现降低趋势, 提示该方可能通过降低 Tfh 细胞分泌 IL-21 来抑制 JAK/STAT 通路的激活。综上, 活血消异方能够调节 Tfh 细胞, 抑制 IL-21 的产生, 从而抑制卵巢异位组织中 JAK/STAT 通路的激活, 降低抗凋亡因子 Bcl-2 的表达。

本研究使用异位组织插入法建立 OEM 大鼠模型, 使用转录组学方法确定了 OEM 大鼠模型增殖期异位组织与人类异位组织中 JAK/STAT 通路激活的趋势相同, 并在蛋白层面验证了活血消异方抑制卵巢异位组织中 JAK/STAT 通路激活的作用机制。本研究仅在动物层面进行验证, 未经细胞验证, 仍存在一定局限性。此外, Tfh 细胞具有促炎和抗炎的双重特性, 其在 OEM 中的作用机制尚不完全明确, 仍需要进一步探索。

参考文献

- [1] BONAVINA G, TAYLOR HS. Endometriosis-associated infertility: from pathophysiology to tailored treatment [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 1020827. doi: 10.3389/fendo.2022.1020827.
- [2] VERCELLINI P, VIGANÒ P, SOMIGLIANA E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment [J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(5): 261-275.
- [3] 周华, 齐聪. 补肾活血法治疗复发性卵巢子宫内膜异位囊肿 30 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2008, 49(7): 618-621.

- [4]梁齐桁,程兰,钟庭开. 中医慢病管理模式下卵巢子宫内膜异位症术后复发及妊娠情况观察[J]. 山东医药, 2022,62(17):73-75.
- [5]DING D, LIU S, LIU F, et al. Exploring the role of Chinese herbal medicine in the long-term management of postoperative ovarian endometriotic cysts: a systematic review and meta-analysis[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1376037. doi:10.3389/fphar.2024.1376037.
- [6]李田田,赵双俏,文胜,等. 活血消异方治疗气滞血瘀型卵巢子宫内膜异位囊肿临床观察[J]. 现代中西医结合杂志,2018,27(5):484-487,549.
- [7]张玉,张永嘉,赵瑞华,等. 子宫内膜异位症痛经症状特点及活血消异方疗效分析[J]. 时珍国医国药,2022,33(9):2176-2178.
- [8]张永嘉,刘永,时光,等. 活血消异方加减治疗子宫内膜异位症伴抑郁焦虑患者的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志,2021,41(7):873-876.
- [9]王娜娜,赵瑞华,夏文艳. 活血消异方抑制盆腔子宫内膜异位症保守术后复发的病例研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(8):3861-3864.
- [10]YANG XC, LIU Y, SUN WW, et al. Efficacy of Chinese herbal medicines on pregnancy outcomes in patients with endometriosis in long-term management: a multicenter retrospective cohort study[J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(11):971-979.
- [11]KOTLYAR AM, MAMILLAPALLI R, FLORES VA, et al. Tofacitinib alters STAT3 signaling and leads to endometriosis lesion regression[J]. Mol Hum Reprod, 2021,27(4):gaab016.
- [12]陈颖,仇茜,许琳玲,等. 滤泡辅助性T细胞CD4⁺T细胞的表达与子宫内膜异位症伴不孕症患者发病及自身抗体的相关性[J]. 中国性科学,2022,31(6):62-65.
- [13]CHEN B, LIU Y, CHENG L. IL-21 enhances the degradation of cartilage through the JAK-STAT signaling pathway during osteonecrosis of femoral head cartilage[J]. Inflammation, 2018,41(2):595-605.
- [14]FAN W, ZHANG Y, DAI Y, et al. Creation of a rat model of ovarian endometriosis: a novel and easy approach to simulating chocolate cysts[J]. Exp Cell Res, 2025, 448(1):114553.
- [15]时光,杨新春,崔景润,等. 活血消异方对子宫内膜异位症大鼠卵巢功能及妊娠结局的影响研究[J]. 北京中医药大学学报,2024,47(3):374-382.
- [16]魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:69-72.
- [17]KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nat Methods, 2015, 12(4):357-360.
- [18]PERTEA M, PERTEA GM, ANTONESCU CM, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(3):290-295.
- [19]LI B, DEWEY CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323. doi:10.1186/1471-2105-12-323.
- [20]LI L, LI L, SUN Q. High expression of cuproptosis-related SLC31A1 gene in relation to unfavorable outcome and deregulated immune cell infiltration in breast cancer: an analysis based on public databases[J]. BMC Bioinformatics, 2022,23(1):350.
- [21]HE Y, WU Y, LIU Z, et al. Identification of signature genes associated with invasiveness and the construction of a prognostic model that predicts the overall survival of bladder cancer[J]. Front Genet, 2021, 12: 694777. doi:10.3389/fgene.2021.694777.
- [22]YANG Q, CHU W, YANG W, et al. Identification of RNA transcript makers associated with prognosis of kidney renal clear cell carcinoma by a competing endogenous RNA network analysis[J]. Front Genet, 2020, 11: 540094. doi:10.3389/fgene.2020.540094.
- [23]秦翠梅,聂晓博,王炎,等. 基于 JAK 2/STAT 3 信号通路探讨三棱莪术及配伍干预大鼠子宫内膜异位症的配伍研究[J]. 中药药理与临床,2022,38(1):134-139.
- [24]单婧,程雯,翟东霞,等. 子宫内膜异位症啮齿类动物模型研究进展[J]. 生殖医学杂志,2017,26(5):498-501.
- [25]HAYASHI S, NAKAMURA T, MOTOOKA Y, et al. Novel ovarian endometriosis model causes infertility via iron-mediated oxidative stress in mice[J]. Redox Biol, 2020,37:101726. doi:10.1016/j.redox.2020.101726.
- [26]时光,刘永,孙伟伟,等. 中药活血补肾序贯治疗对子宫内膜异位症大鼠卵泡发育与颗粒细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志,2019,34(5):2155-2159.
- [27]王新,吴建林,石雅馨,等. 从“瘀、毒、痰湿”谈子宫内膜异位症之病机与治疗[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022,28(7):1160-1163,1167.
- [28]范伟森,刘姣,张英杰,等. 中医药治疗子宫内膜异位症的相关通路研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023,29(3):233-243.
- [29]FU G, GUY CS, CHAPMAN NM, et al. Metabolic control of TFH cells and humoral immunity by phosphatidylethanolamine[J]. Nature, 2021,595(7869):724-729.
- [30]AHEARNE MJ, WILLIMOTT S, PIÑON L, et al. Enhancement of CD154/IL4 proliferation by the T follicular

helper (Tfh) cytokine, IL-21 and increased numbers of circulating cells resembling Tfh cells in chronic lympho-

cytic leukaemia [J]. Br J Haematol, 2013, 162 (3) : 360-370.

Effects of *Huoxue Xiaoyi Formula* (活血消异方) on Tfh Cells and the JAK/STAT Pathway in Ectopic Tissues of Ovarian Endometriosis Model Rats

FAN Weisen¹, ZHANG Yongjia¹, WANG Yaqian², LEI Hong², YAN Huiting², HOU Ruijie¹, WANG Xin¹, TAO Yu¹, ZHAO Ruihua¹

1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053; 2. The First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Huoxue Xiaoyi Formula* (活血消异方, HXF) in treating ovarian endometriosis (OEM) from the perspective of T follicular helper (Tfh) cells and the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signaling pathway. **Methods** Forty-five female SD rats with normal estrous cycles were randomly divided into three groups, HXF group, model group, and normal group, with 15 rats in each group. A rat model of OEM was established by autologous endometrial tissue implantation. After successful modeling, the treatment group received HXF at 5.85 g/(kg·d) by gavage for 14 consecutive days. The model group and normal group received 1 mL/d of normal saline by gavage. RNA-sequencing data from human proliferative-phase endometriotic and normal endometrial tissues were downloaded from the GEO database. Transcriptomic sequencing was used to analyze gene expression in rat ovarian ectopic tissues and normal uterine tissues, and comparisons were made with human data to verify JAK/STAT pathway activation in proliferative-phase ectopic tissues. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression of CXC chemokine receptor 5 (CXCR5) and interleukin-21 (IL-21) in rat ovarian ectopic and normal uterine tissues. Western Blotting was performed to detect the protein levels of IL-21, IL-21 receptor (IL-21R), Janus kinase 1 (JAK1), signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6), and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2). Tfh cell infiltration was analyzed using immune cell infiltration methods. **Results**

Gene set enrichment analysis showed that the JAK/STAT pathway was significantly activated in human proliferative-phase endometriotic tissues compared to normal endometrial tissues. Similarly, the JAK/STAT pathway was markedly activated in rat ovarian ectopic tissues in the model group compared to the normal group, but suppressed in the HXF group compared to the model group. Compared with normal uterine tissues, ovarian ectopic tissues in the model group showed increased Tfh cell infiltration scores, higher CXCR5 and IL-21 expression, and elevated levels of IL-21, IL-21R, JAK1, STAT6, and Bcl-2 proteins. Compared with the model group, HXF group showed reduced CXCR5 and IL-21 expression and decreased protein levels of IL-21, IL-21R, JAK1, STAT6, and Bcl-2. **Conclusion** HXF may suppress activation of the JAK/STAT signaling pathway in ovarian endometriotic tissues by inhibiting IL-21 secretion from Tfh cells.

Keywords ovarian endometriosis; *Huoxue Xiaoyi Formula* (活血消异方); Tfh cells; Janus kinase; signal transducer and activator of transcription

(收稿日期: 2025-02-06; 修回日期: 2025-04-24)

[编辑: 姜冰]