

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.06.013

基于 NCOA4/NF- κ B 信号通路介导的铁自噬探讨祛瘀解毒方对子宫内膜异位症模型大鼠子宫异位组织的影响

刘一鸣¹, 刘志宏², 连方³✉

1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250000; 2. 山东中医药高等专科学校; 3. 山东中医药大学附属医院

[摘要] **目的** 从核受体共激活因子 4/核因子 κ B (NCOA4/NF- κ B) 信号通路介导的铁自噬角度探讨祛瘀解毒方治疗子宫内膜异位症的可能作用机制。**方法** 将 50 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、米非司酮组和祛瘀解毒方低、高剂量组, 每组 10 只。假手术组仅行开腹后关腹操作, 其余各组均采用自体移植的方法建立子宫内膜异位症大鼠模型。造模成功后次日, 假手术组和模型组予生理盐水 2 ml/d 灌胃, 米非司酮组予米非司酮悬浊液 1.05 mg/(kg·d) 灌胃, 祛瘀解毒方低、高剂量组分别予祛瘀解毒方 12.23、48.92 g/(kg·d) 灌胃, 各组均连续给药 4 周。4 周后假手术组大鼠剪取正常子宫内膜组织, 其余 4 组摘取大鼠全部异位内膜组织。测量模型组、米非司酮组和祛瘀解毒方低、高剂量组大鼠异位病灶体积; HE 染色观察各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织的病理学改变; 检测子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、铁蛋白重链 (FTH1)、红杉 (P62)、微管相关蛋白 1 轻链 3 β (LC3B)、核因子 (P-NF- κ B) 蛋白表达及 NCOA4、FTH1、LC3B、P62 mRNA 表达; 检测子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、LC3B 的共定位情况, 游离铁含量, 白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。**结果** 假手术组未见异位病灶。模型组大鼠异位组织出现了明显的病理损伤, 而各给药组大鼠异位组织病理损伤不同程度减轻。与模型组相比, 米非司酮组及祛瘀解毒方高、低剂量组异位病灶体积均缩小, 并且祛瘀解毒方高剂量组和米非司酮组大鼠异位病灶体积明显小于祛瘀解毒方低剂量组 ($P < 0.01$)。与假手术组相比, 模型组异位组织 LC3B II/LC3B I 值及 NCOA4、P-NF- κ B 蛋白表达上调, P62、FTH1 蛋白表达下调, 游离铁含量及 IL-6、TNF- α 水平升高, NCOA4、LC3B 共定位阳性率及共定位细胞密度增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 祛瘀解毒方低、高剂量及米非司酮组异位内膜组织 LC3B II/LC3B I 值及 NCOA4、P-NF- κ B 蛋白表达下调, NCOA4、LC3B 共定位阳性率明显减少, 游离铁含量及 IL-6 水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与米非司酮组相比, 祛瘀解毒方高剂量组 P62 蛋白上调更明显, TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$)。与祛瘀解毒方低剂量组比较, 祛瘀解毒方高剂量组大鼠异位组织游离铁含量及 IL-6、TNF- α 水平降低 ($P < 0.01$)。**结论** 祛瘀解毒方治疗子宫内膜异位症机制可能与抑制子宫内膜异位组织 NCOA4/NF- κ B 信号通路介导的铁自噬, 从而改善子宫内膜炎症有关。

[关键词] 子宫内膜异位症; 祛瘀解毒方; 铁自噬; 炎症; 核受体共激活因子 4; 核因子 κ B

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是具有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔被覆黏膜以外的身体其他部位所引起的一种疾病^[1], 免疫异常和慢性炎症使其不断进展^[2-3], 故如何改善 EMs 患者的免疫状态和炎症反应越来越受到关注。研究

证实, 铁自噬过度会使核转录因子 κ B (NF- κ B) 异常活化, 引起白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等免疫炎症因子分泌增加, 导致细胞的炎症反应和免疫应答^[4-5]。核受体共激活因子 4 (NCOA4) 介导的铁自噬是游离铁产生的重要途径, 对于维持细胞内铁稳态意义重大^[6]。研究发现, 铁过载广泛存在于 EMs 患者的异位内膜组织

基金项目: 国家自然科学基金 (82174429, 81974577)

✉ 通讯作者: 2021110665@sduetcm.edu.cn

中,并且这种铁过载现象与NF- κ B通路异常激活密切相关^[7]。由此推测,NCOA4/NF- κ B信号通路异常激活可能是EMs进展的关键。

现代中医学认为,EMs病机本质是血瘀,目前其中医证型分类尚不统一,多分为气滞血瘀、寒凝血瘀、气虚血瘀、肾虚血瘀等证型^[8]。本研究团队在EMs“血瘀”的基础上,提出了“瘀毒”学说,指出血瘀蕴毒伤络是引起EMs气血阴阳失调的根本^[9]。血瘀日久,可转化为毒,令毒蕴更深;毒蕴又会加重血瘀,令瘀血难消,导致病情缠绵难愈^[10]。由此拟定治疗EMs的专方祛瘀解毒方。前期临床研究发现,祛瘀解毒法可以通过下调EMs患者体内IL-6、白细胞介素1(IL-1)等促炎因子的表达水平,调节其免疫状态,有效改善血瘀蕴毒证候^[11-12]。本研究从NCOA4/NF- κ B信号通路探讨其治疗EMs的可能作用机制,以期为本方治疗EMs提供更多实验室证据。本研究经过山东中医药大学实验动物伦理委员会审查和批准(伦理审批号:AWE2022053)。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级健康未孕雌性SD大鼠50只,8周龄,体质量180~220 g,购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)2019 0003。动物饲养于山东中医药大学实验动物中心(SPF级),室温21~25℃,相对湿度40%~60%,自由摄食饮水。

1.2 药物

祛瘀解毒方组成:大血藤15 g,玫瑰花15 g,金银花30 g,连翘15 g,当归12 g,白芍15 g,生地黄12 g,炙甘草6 g,川芎12 g,丹参15 g。药物购自山东省中医院,水煎两次、过滤后,微火浓缩至每毫升药液含生药量2.65 g;米非司酮片,浙江仙琚制药股份有限公司生产,25 mg/片,批号:181003;注射用青霉素钠,荣佳润动物医药有限公司,货号:20220507。

1.3 主要试剂及仪器

亚铁离子比色法测试盒(Elabscience公司,批号:GY12R0627507);TNF- α 、IL-6 Elisa检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司,批号:A30630425、A3823042);SPARKeasy组织/细胞RNA快速提取试剂盒、SPARKscript II RT Plus试剂盒、2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix试剂盒(SparkJade公司,货号:AG0304、AH0104、GD0003);一抗 β -action、NCOA4、

铁蛋白重链(FTH1)、红杉(P62)、微管相关蛋白1轻链3 β (LC3B)、核因数(P-NF- κ B)(ABclonal公司,货号:AC026、A5695、A19700、A19544、A19665、AP0123);二抗HRP标记山羊抗兔(Servicebio公司,货号:GB23303);TSA荧光双重染色试剂盒、苏木素染液、伊红Y染液(Servicebio公司,货号:G235-100T、CR2301041-2、CR2303033-5);高效RIPA裂解液(Solarbio公司,批号:2311006);BCA蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime公司,批号:060723230913);DAPI染色试剂(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:G1012);二甲苯(上海凌峰化学试剂有限公司,批号:20230609)。

高速冷冻离心机(Dynamica公司,型号:VELOCITY 18R);基础电泳仪(Bio-Rad公司,型号:PowerPac Basic);转印电泳仪(Servicebio公司,型号:SVE-2);胶成像仪(上海天能科技有限公司,型号:Tanon 1600);微量分光光度计(杭州奥盛仪器公司,型号:Nano-300);普通PCR仪(力康公司,型号:K960);实时定量PCR仪(Roche公司,型号:Roche LightCycler 480);全景切片扫描仪(Hungary公司,型号:PANNORAMIC DESK/MIDI/250/1000);正置光学显微镜(日本尼康公司,型号:ECLIPSE 80i);酶标仪(Molecular Devices公司,型号:Cmax Plus)。

1.4 分组、造模及给药

将50只大鼠适应性饲养1周后,按随机数字表法分为假手术组、模型组、米非司酮组、祛瘀解毒方高、低剂量组,每组10只。除假手术组外,其余各组大鼠使用自体移植^[13]的方法建立子宫内膜异位症大鼠模型,术前禁食不禁水24 h,大鼠经麻醉后开腹,结扎左侧子宫并切除子宫角,纵向切开子宫组织,剪出5 mm $\times$ 5 mm的组织块2块,随后将组织块移植到两侧腹壁内壁血管丰富部位,并使用可吸收缝合线固定,逐层关闭腹腔。假手术组10只大鼠仅麻醉后行开腹后关腹操作。所有大鼠关腹操作完成后均腹腔注射青霉素8万U预防感染,术后第二天起,每日每只腹腔注射青霉素8万U,连续3日。自造模当天开始计算,1周后对所有造模组大鼠行开腹探查造模情况。当观察到移植物体积增大,移植物处有新生血管形成,移植物形成透明、半透明囊肿,呈现暗红色或鲜红色,内见清亮液体,视为造模成功^[13-14],验证造模成功后进行缝合,并于次日起开始给药,期间不再予抗感染药物。

共造模成功38只,其中模型组10只、米非司

酮组 9 只、祛瘀解毒方高剂量组 10 只、祛瘀解毒方低剂量组 9 只。根据人鼠体表面积换算公式^[15]将祛瘀解毒方的成人常用剂量换算成等效剂量，祛瘀解毒方低剂量组为人鼠等效剂量，祛瘀解毒方高剂量组为人鼠等效剂量的 4 倍。假手术组和模型组予生理盐水 2 ml/d 灌胃，米非司酮组予米非司酮悬浊液 1.05 mg/(kg·d) 灌胃，祛瘀解毒方低、高剂量组分别予祛瘀解毒方 12.23、48.92 g/(kg·d) 灌胃。各组均连续给药 4 周。

1.5 观察指标及方法

最后一次灌胃后次日进行取材，假手术组大鼠剪取正常子宫内膜组织约 180 mg，其余 4 组大鼠摘取全部异位内膜组织，每组采用随机数字表法选择 3 只大鼠的内膜组织样本约 50 mg/只，使用多聚甲醛固定，其余样本使用无菌无酶的 EP 管分装标记后放于-80℃冰箱保存。

1.5.1 异位病灶体积测定 采用直尺快速测量模型组、米非司酮组和祛瘀解毒方低、高剂量组大鼠异位病灶长、宽、高，并根据公式 [异位病灶体积 (mm³) =0.52×长×宽×高]^[16] 计算异位病灶体积。

1.5.2 子宫内膜/异位内膜组织病理学观察 将固定于多聚甲醛中的子宫内膜组织约 50 mg 使用病理切片机行石蜡切片，经二甲苯脱蜡、酒精梯度脱水，行 HE 染色、二甲苯透明、封片，在显微镜下观察病理学改变。

1.5.3 检测大鼠子宫内膜/异位内膜组织中 IL-6、TNF-α 水平及游离铁含量 每组采用随机数字表法选取冻存的 3 只大鼠的内膜组织样本约 80 mg/只，使用 ELISA 试剂盒检测内膜组织中 IL-6、TNF-α 的表达水平，使用亚铁离子比色法测试盒检测内膜组织中游离铁含量，操作参照说明书进行。

1.5.4 Western blot 法检测大鼠子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、FTH1、LC3B、P62、P-NF-κB 蛋白表达 每组采用随机数字表法选取冻存的 4 只大鼠的内膜组织样本 20 mg/只，使用 RIPA 裂解液裂解组织，提取组织总蛋白，BCA 法定量蛋白浓度。每孔加入 8 μg 变性后的蛋白样品，使用垂直电泳仪进行电泳，使用转印电泳仪进行电转、封闭，随后使用一抗 NCOA4 (1:500)、FTH1 (1:2000)、LC3B (1:1000)、P62 (1:1000)、P-NF-κB (1:5000)、β-actin (1:500 000) 孵育过夜，加二抗 (1:3000) 孵育 1 h，显影液中浸泡显影，其中 LC3B 显影为 LC3B I 和 LC3B II 两条条带，根据 LC3B II/LC3B I 值可估计自噬水平的高低。使用

Image J win64 软件对条带进行测量和分析。

1.5.5 qPCR 法检测大鼠子宫内 膜/异位内膜组织 NCOA4、FTH1、LC3B、P62 mRNA 表达 每组采用随机数字表法选取冻存的 3 只大鼠的内膜组织样本约 30 mg/只，使用 SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒提取组织中总 RNA 并利用基础电泳仪跑胶验证内膜组织 RNA 完整度，使用 SPARKscript II RT Plus、2×SYBR Green qPCR Mix 试剂盒将其逆转录为 cDNA，随后参照 2×SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书添加 cDNA、目的基因及其内参基因的特异性引物 (由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成)，配制 qRT-PCR 反应体系，在实时定量 PCR 仪上进行扩增。以 β-actin 为内参基因，采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 NCOA4、FTH1、LC3B、P62 的 mRNA 表达水平，引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
NCOA4	正向 ATATTAAGCCTCTGAGTTGCCTATGC	85
	反向 CTCTATGGTAATGTCACTGTGGGAAG	
FTH1	正向 TGCCATCAACCGCCAGATCAAC	155
	反向 TCAGTTTCTCAGCAIGTTCCCTCTC	
LC3B	正向 CAAGCCTTCTTCCTCCTGGTGAAT	140
	反向 AGTGCTGTCCCGAACGTCTCC	
P62	正向 TGGTCGTGGGGTGTCTGTGAG	130
	反向 TCTGGTGATGGAGCCTCTTACTGG	
β-actin	正向 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	反向 TTTAATGTCACGCACGATTTC	

注：NCOA4，核受体共激活因子 4；FTH1，铁蛋白重链；P62，红杉；LC3B，微管相关蛋白 1 轻链 3β。

1.5.6 荧光共定位检测大鼠子宫内膜/异位内膜组织中 NCOA4、LC3B 的共定位情况 将固定于多聚甲醛中的正常子宫内膜/异位子宫内膜组织约 50 mg 使用冰冻切片机行石蜡切片，脱蜡至水，抗原修复，双氧水封闭，血清封闭，加第一种一抗 NCOA4 (1:200)，加对应的 HRP 标记的二抗 (1:500)，加 CY3-TSA，微波处理，加第二种一抗 LC3B (1:200)，加对应的二抗 (1:500)，DAPI 复染细胞核，自发荧光淬灭，封片后在显微镜下进行镜检拍照，每张切片随机选择 3 个部位进行分析，分析结果由 Aipathwell 数字病理图像分析软件 C. V. 2.4 版本通过循迹、选色、运算得出。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析，定量资料

均满足正态分布以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。方差齐时多组间比较选择单因素方差分析,两两比较采用LSD法。方差不齐者多组间采用Welch检验,组间两两比较采用Kruskal-Wallis秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

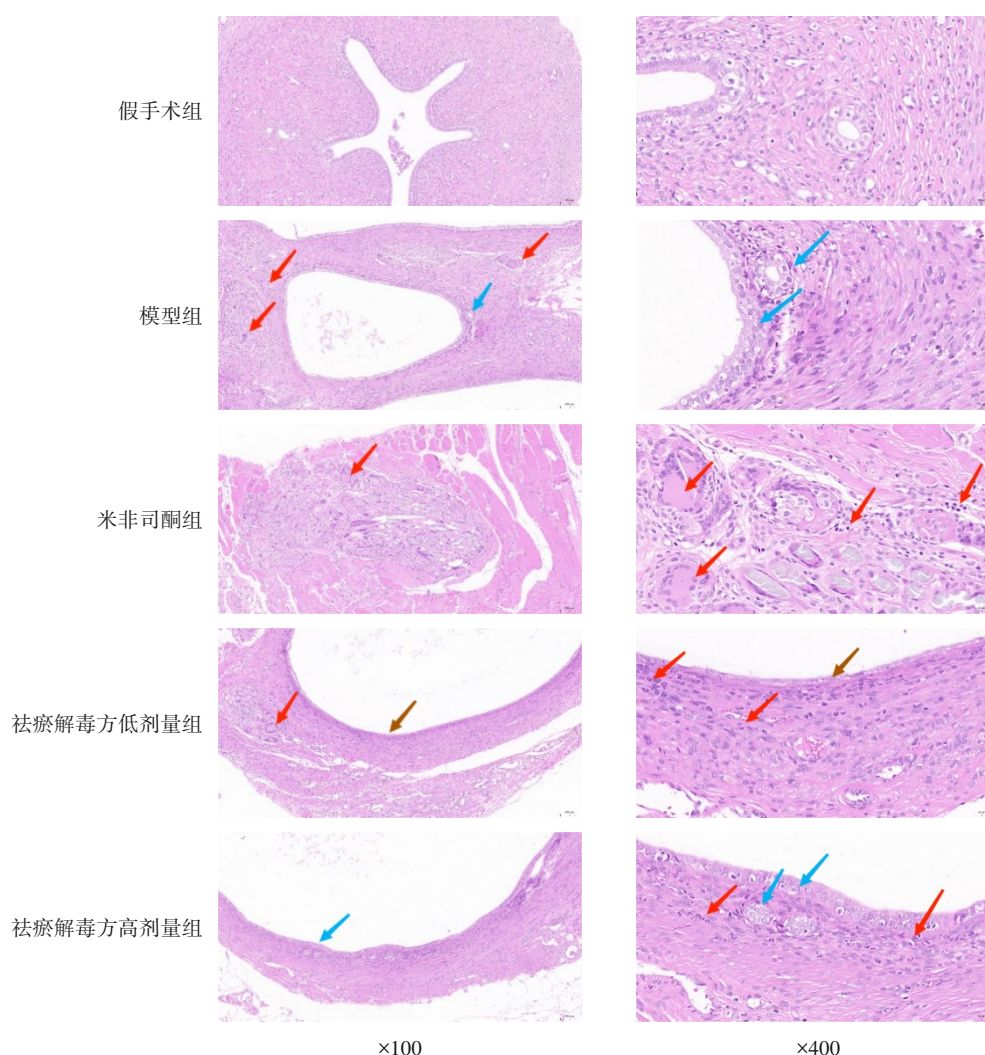
2.1 各组大鼠异位病灶体积比较

假手术组未见异位病灶。模型组大鼠异位病灶体积为 $(265.96\pm 86.64)\text{mm}^3$,米非司酮组为 $(52.93\pm 27.88)\text{mm}^3$,祛瘀解毒方低剂量组为 $(185.19\pm 50.20)\text{mm}^3$,祛瘀解毒方高剂量组为 $(56.25\pm 27.29)\text{mm}^3$ 。与模型组相比,米非司酮组及祛瘀解毒方高、低剂量组异位病灶体积均缩小($P<0.01$),并且祛瘀解毒方高剂量组米非司酮组大鼠异位病灶体积明显小于祛瘀解毒方低剂量组($P<$

0.01),而祛瘀解毒方高剂量组与米非司酮组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织病理学观察结果比较

HE染色结果(图1)示,假手术组视野内可见较多子宫内膜及子宫腺上皮,固有层厚,基质细胞数量丰富,并见少量子宫腺。模型组视野内子宫内膜上皮形成小的空腔结构,可见大量子宫内膜及子宫腺上皮变性,胞质疏松淡染,较多基质细胞,有粒细胞散在浸润并伴有多核巨细胞及巨噬细胞浸润。米非司酮组视野内未见明显的子宫内膜结构,有少量多核巨细胞小灶性聚集及巨噬细胞、淋巴细胞散在浸润。祛瘀解毒方低剂量组视野内子宫内膜上皮形成较大的空腔结构,子宫内膜上皮扁平化,有少量粒细胞及多核巨噬细胞散在浸润。祛瘀解毒



注:蓝色箭头指示为胞质疏松淡染;红色箭头指示为粒细胞及巨噬细胞浸润;棕色箭头指示为子宫内膜上皮扁平化。

图1 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织病理图(HE染色)

Figure 1 Histopathological picture of endometrium/ectopic endometrium of rats in each group (HE staining)

方高剂量组视野内见子宫内膜上皮形成较大的空腔结构,少量子宫内膜及子宫腺上皮变性,胞质疏松淡染,未见明显子宫腺,有少量粒细胞散在浸润。

2.3 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织游离铁含量及 IL-6、TNF-α 水平比较

表 2 示,与假手术组比较,模型组大鼠异位组织游离铁含量及 IL-6、TNF-α 水平明显增多 ($P<0.01$)。与模型组比较,祛瘀解毒方低、高剂量组及米非司酮组大鼠异位组织游离铁含量、IL-6 水平降低,祛瘀解毒方高剂量组及米非司酮组 TNF-α 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与米非司酮组比较,祛瘀解毒方高剂量组 TNF-α 水平降低,祛瘀解毒方低剂量组 TNF-α 水平升高 ($P<0.05$)。与祛瘀解毒方低剂量组比较,祛瘀解毒方高剂量组大鼠异位组织游离铁含量及 IL-6、TNF-α 水平降低 ($P<0.01$)。

2.4 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、FTH1、P62、P-NF-κB 蛋白表达及 LC3B II/LC3B I 值比较

表 3 示,与假手术组比较,模型组异位内膜组

织 LC3B II/LC3B I 值及 NCOA4、P-NF-κB 蛋白表达上调,P62、FTH1 蛋白表达下调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,祛瘀解毒方低、高剂量组及米非司酮组异位内膜组织 LC3B II/LC3B I 值及 NCOA4、P-NF-κB 蛋白表达下调,祛瘀解毒方高剂量组及米非司酮组异位内膜组织 P62、FTH1 蛋白表达上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与米非司酮组比较,祛瘀解毒方高剂量组 P62 蛋白表达上调 ($P<0.05$)。各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、FTH1、LC3B II、LC3B I、P62、P-NF-κB 蛋白电泳图见图 2。

2.5 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、FTH1、LC3B、P62 mRNA 表达比较

表 4 示,与假手术组比较,模型组大鼠异位内膜组织 NCOA4、LC3B mRNA 表达明显上调,FTH1、P62 mRNA 表达明显下调 ($P<0.01$)。与模型组比较,祛瘀解毒方低剂量、高剂量组及米非司酮组异位内膜组织 FTH1、P62、LC3B、NCOA4 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织游离铁含量及 IL-6、TNF-α 水平比较

Table 2 Comparison of free iron content and levels of IL-6 and TNF-α in endometrial/eutopic endometrial tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	游离铁 / $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$
假手术组	3	394.95±57.97	1.22±0.83	6.15±0.06
模型组	3	756.01±51.79 ^{a)}	17.90±2.95 ^{a)}	17.31±3.78 ^{a)}
米非司酮组	3	566.39±71.70 ^{b)}	5.84±2.07 ^{c)}	10.95±0.64 ^{b)}
祛瘀解毒方低剂量组	3	416.91±136.59 ^{c)}	7.67±0.39 ^{c)}	12.74±0.52 ^{d)}
祛瘀解毒方高剂量组	3	208.71±149.00 ^{c) e)}	2.63±0.89 ^{c) e)}	8.71±0.85 ^{b) d) e)}

注: IL-6, 白细胞介素-6; TNF-α, 肿瘤坏死因子 α。

a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与米非司酮组比较, $P<0.05$; e) 与祛瘀解毒方低剂量比较, $P<0.01$ 。

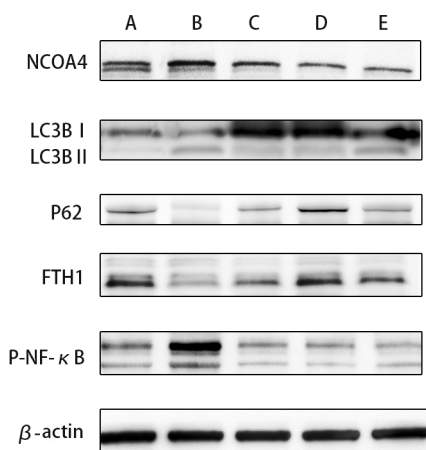
表 3 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、FTH1、P62、P-NF-κB 蛋白相对表达量及 LC3B II/LC3B I 值比较

Table 3 Comparison of relative expression of NCOA4, FTH1, P62, P-NF-κB proteins and LC3B II/LC3B I values in endometrial/eutopic endometrial tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NCOA4/β-actin	FTH1/β-actin	P62/β-actin	P-NF-κB/β-actin	LC3B II/LC3B I
假手术组	4	0.42±0.32	1.12±0.19	0.85±0.07	0.71±0.04	0.55±0.27
模型组	4	0.88±0.16 ^{a)}	0.86±0.05 ^{a)}	0.33±0.09 ^{b)}	1.03±0.10 ^{b)}	1.88±0.99 ^{b)}
米非司酮组	4	0.42±0.15 ^{c)}	1.00±0.07 ^{d)}	0.49±0.01 ^{d)}	0.62±0.23 ^{d)}	0.27±0.14 ^{c)}
祛瘀解毒方低剂量组	4	0.46±0.21 ^{d)}	0.95±0.08	0.63±0.28	0.62±0.25 ^{d)}	0.51±0.32 ^{c)}
祛瘀解毒方高剂量组	4	0.41±0.20 ^{c)}	1.00±0.06 ^{d)}	0.72±0.18 ^{c) e)}	0.58±0.24 ^{d)}	0.74±0.53 ^{d)}

注: NCOA4, 核受体共激活因子 4; FTH1, 铁蛋白重链; P62, 红杉; P-NF-κB, 核因子; LC3B II, 微管相关蛋白 1 轻链 3β II; LC3B I, 微管相关蛋白 1 轻链 3β I。

a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与假手术组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与模型组比较, $P<0.05$; e) 与米非司酮组比较, $P<0.05$ 。



注：A，假手术组；B，模型组；C，米非司酮组；D，祛瘀解毒方低剂量组；E，祛瘀解毒方高剂量组；NCOA4，核受体共激活因子4；LC3B I，微管相关蛋白1轻链3β I；LC3B II，微管相关蛋白1轻链3β II；P62，红杉；FTH1，铁蛋白重链；P-NF-κB，核因数。

图2 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织NCOA4、FTH1、LC3B II、LC3B I、P62、P-NF-κB蛋白电泳图
Figure 1 Protein electrophoresis of NCOA4, FTH1, LC3B II, LC3B I, P62, P-NF-κB proteins in endometrial/eutopic endometrial tissues of rats in each group

2.6 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、LC3B 免疫荧光共定位情况比较

表 5 示，与假手术组比较，模型组大鼠异位内膜组织 NCOA4、LC3B 共定位阳性率、共定位细胞密度明显增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，祛瘀解毒方低剂量、高剂量组及米非司酮组异位内膜组织 NCOA4、LC3B 共定位阳性率明显减少，祛瘀解毒方高剂量组共定位细胞密度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

根据临床表现，EMs 可归于中医学“痛经”“不孕”“癥瘕”等范畴。《血证论》云：“离经之

表 5 各组大鼠子宫内膜组织 NCOA4、LC3B 免疫荧光共定位情况比较

Table 5 Comparison of immunofluorescence co-localisation of NCOA4 and LC3B in endometrial tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	共定位阳性率/%	共定位细胞密度/mm ²
假手术组	3	11.55±1.13	132.05±23.02
模型组	3	80.71±4.51 ^{a)}	4437.31±214.44 ^{a)}
米非司酮组	3	65.74±3.51 ^{b)}	5829.33±191.67
祛瘀解毒方低剂量组	3	69.25±5.29 ^{b)}	6575.34±152.87
祛瘀解毒方高剂量组	3	26.06±3.61 ^{c)}	2176.99±72.32 ^{c)}

注：NCOA4，核受体共激活因子4；LC3B，微管相关蛋白1轻链3β。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

血，虽为清血、鲜血，亦是瘀血。”异位内膜的脱落、出血属中医学“离经之血”，《妇人大全良方》云：“夫妇人腹中瘀血者，由月经痞涩不通，或产后余秽不尽，瘀久不消则变成积聚癥瘕也”。在古今认知基础上，本团队结合多年临床经验认为 EMs 的治疗应谨守血瘀蕴毒的基本病机，以化瘀解毒为要。祛瘀解毒方中大血藤、玫瑰花散瘀解毒止痛为君；金银花、连翘消痈散结并透达营分之热毒为臣；丹参、当归、白芍、川芎、生地黄清热凉血散瘀兼清血分实热为佐；炙甘草调和诸药为使。组方精简，共奏活血祛瘀、解毒散结之功，临床疗效肯定^[17-18]。本研究结果显示，祛瘀解毒方高剂量在缩小异位病灶方面与米非司酮疗效相当，且优于祛瘀解毒方低剂量。病理结果亦显示，祛瘀解毒方高、中剂量组和米非司酮组异位内膜病理均有不同程度的改善，再次证明祛瘀解毒方具有减少异位病灶和改善病理的疗效。

研究^[19]发现，EMs 患者病灶处的游离铁浓度

表 4 各组大鼠子宫内膜/异位内膜组织 NCOA4、LC3B、FTH1、P62 mRNA 相对表达量比较

Table 4 Comparison of relative expression of NCOA4, LC3B, FTH1, and P62 mRNA in endometrial/eutopic endometrial tissues of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NCOA4 mRNA	LC3B mRNA	FTH1 mRNA	P62 mRNA
假手术组	3	1.08±0.54	1.11±0.59	1.38±0.99	1.33±1.01
模型组	3	13.37±2.25 ^{a)}	22.71±13.89 ^{a)}	0.05±0.04 ^{a)}	0.40±0.16 ^{a)}
米非司酮组	3	10.71±2.48	7.29±4.81	0.43±0.32	1.06±0.74
祛瘀解毒方低剂量组	3	12.35±3.69	18.97±12.87	0.28±0.22	1.03±0.76
祛瘀解毒方高剂量组	3	9.32±1.82	17.15±11.74	0.48±0.36	1.11±0.78

注：NCOA4，核受体共激活因子4；LC3B，微管相关蛋白1轻链3β；FTH1，铁蛋白重链；P62，红杉。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ 。

明显升高。异常升高的游离铁会诱导氧化应激、激活 NF- κ B 及其下游促炎因子等, 导致 EMs 患者的免疫失衡和炎症反应^[20-21]。本研究中对铁自噬关键因子 NCOA4、LC3B、FTH1、P62 蛋白及 mRNA 的检测发现, 与假手术组相比, 模型组大鼠异位组织 NCOA4、LC3B 蛋白及 mRNA 上调, FTH1、P62 蛋白及 mRNA 下调, NCOA4 和 LC3B 共定位阳性率、共定位细胞密度增加, 提示模型组大鼠异位组织铁自噬增强。与模型组相比, 祛瘀解毒方高剂量组及米非司酮组大鼠异位内膜组织 LC3B II/LC3B I 值及 NCOA4 蛋白表达减少, P62、FTH1 蛋白表达增加, 并且与米非司酮组相比, 祛瘀解毒方高剂量组 P62 蛋白上调更明显。虽然各用药组较模型组 FTH1、P62、LC3B、NCOA4 mRNA 表达差异均无统计学意义, 但祛瘀解毒方低剂量、高剂量组及米非司酮组异位内膜组织 NCOA4、LC3B 共定位阳性率明显减少, 祛瘀解毒方高剂量组共定位细胞密度降低, 提示祛瘀解毒方高剂量及米非司酮均能明显改善 EMs 大鼠异位组织铁自噬的异常激活。游离铁含量检测显示, 模型组大鼠异位组织游离铁含量较假手术组明显升高, 各用药组大鼠游离铁含量明显降低, 且祛瘀解毒方高剂量下调作用优于低剂量。因此, 祛瘀解毒方可通过抑制 EMs 大鼠异位组织铁自噬通路的异常激活, 降低异位组织游离铁含量, 并且祛瘀解毒方高剂量效果优于低剂量, 与米非司酮效果相当。

炎症是影响 EMs 发生发展的下游关键环节, 异常增高的游离铁可激活 NF- κ B 通路, 引起机体免疫应答和炎症反应^[22]。NF- κ B 是炎症反应、免疫应答的关键^[23], IL-6 和 TNF- α 是重要的促炎因子, IL-6 可促使淋巴细胞增殖活化, 引起自身免疫炎症损伤^[24]; TNF- α 调节免疫、介导炎症, 与细胞粘连和血管生成有关, TNF- α 升高将导致细胞因子失调, 引发病理性损伤^[25]。活化的 NF- κ B 进入促炎因子启动子区域与 κ B 结合, 会形成 NF- κ B 活化的正反馈, 加重机体炎症反应^[26]。本研究结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠异位内膜组织 P-NF- κ B 蛋白表达上调, IL-6 及 TNF- α 水平升高, 提示存在免疫炎症反应。与模型组相比, 祛瘀解毒方高、低剂量组及米非司酮组 P-NF- κ B 蛋白下调, 祛瘀解毒方高剂量组 IL-6 及 TNF- α 水平显著下降, 且显著低于祛瘀解毒方低剂量组, 祛瘀解毒方高剂量组 TNF- α 水平亦明显低于米非司酮组, 表明祛瘀解毒方高剂量能显著抑制下游 NF- κ B 通路的活化, 减轻

免疫炎症损伤。

综上, 祛瘀解毒方治疗 EMs 的可能机制与有效抑制子宫异位组织 NCOA4/NF- κ B 信号通路介导的铁自噬, 减轻大鼠异位组织的免疫炎症损伤有关。由于样本量较少, 动物模型未与中医证候相结合, 结果可能有偏差, 有待日后优化完善。

参考文献

- [1] 罗颂平, 刘雁峰. 中医妇科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 270.
- [2] VALLVÉ-JUANICO J, HOUSHDARAN S, GIUDICE LC. The endometrial immune environment of women with endometriosis[J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(5): 564-591.
- [3] SYMONS LK, MILLER JE, KAY VR, et al. The immunopathophysiology of endometriosis [J]. Trends Mol Med, 2018, 24(9): 748-762.
- [4] DEFREERE S, LOUSSE JC, GONZALEZ-RAMOS R, et al. Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis [J]. Mol Hum Reprod, 2008, 14 (7): 377-385.
- [5] LI Q, VERMA IM. NF-kappaB regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10): 725-734.
- [6] MANCIAS JD, PONTANO VAITES L, NISSIM S, et al. Ferritinophagy via NCOA4 is required for erythropoiesis and is regulated by iron dependent HERC2-mediated proteolysis [J]. Elife, 2015, 4: e10308. doi: 10.7554/eLife.10308.
- [7] WYATT J, FERNANDO SM, POWELL SG, et al. The role of iron in the pathogenesis of endometriosis: a systematic review [J]. Hum Reprod Open, 2023 (3): hoad033. doi: 10.1093/hropen/hoad033.
- [8] 武梅, 程雯, 张丹英, 等. 子宫内膜异位症中医证型研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 253-255.
- [9] 连方. 子宫内膜异位症病机: 瘀毒学说[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(11): 968-969.
- [10] 连方, 王希波, 张建伟, 等. 中医治疗子宫内膜异位症的思路与方法[J]. 中医杂志, 2002, 43(7): 545-546.
- [11] 连方, 刘海萍, 王云霞, 等. 祛瘀解毒法治疗瘀毒型子宫内膜异位症的机理探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(2): 110-113.
- [12] 孙金龙, 连方, 郭琼, 等. 祛瘀解毒法对子宫内膜异位症患者腹腔液 IL-6、IL-13 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(5): 1003-1006.
- [13] 张薇, 沈洪沁, 黄启玲, 等. 非动情期 SD 大鼠子宫内膜异位症模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(1): 21-24.
- [14] 肖纯, 黄桂林, 刘小刚, 等. 证、病结合的子宫内膜异位

- 症动物模型的复制[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(3):30-33.
- [15] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5):52-53.
- [16] 卢建军, 戴晓怡, 李响, 等. 萝卜硫素对子宫内膜异位症模型大鼠在位内膜增殖、血管生成及 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(11): 1297-1301, 1307.
- [17] 连方, 赵文晓, 齐英华, 等. 祛瘀解毒方治疗血瘀蕴毒型子宫内膜异位症 30 例临床观察[J]. 中医杂志, 2015, 56(1):44-47.
- [18] 连方, 韩春艳. 祛瘀解毒方治疗血瘀蕴毒型子宫内膜异位症患者 35 例临床观察[J]. 中医杂志, 2011, 52(23):2013-2016.
- [19] YAMAGUCHI K, MANDAI M, TOYOKUNI S, et al. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(1):32-40.
- [20] ALVARADO-DÍAZ CP, NÚÑEZ MT, DEVOTO L, et al. Iron overload modulated nuclear factor kappa-B activation in human endometrial stromal cells as a mechanism postulated in endometriosis pathogenesis[J]. Fertil Steril, 2015, 103(2):439-447.
- [21] GONZÁLEZ-RAMOS R, DEFRERE S, DEVOTO L. Nuclear factor-kappaB: a main regulator of inflammation and cell survival in endometriosis pathophysiology [J]. Fertil Steril, 2012, 98(3):520-528.
- [22] LIANG H, YANG X, LIU C, et al. Effect of NF- κ B signaling pathway on the expression of MIF, TNF- α , IL-6 in the regulation of intervertebral disc degeneration [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2018, 18(4):551-556.
- [23] SIEBENLIST U, FRANZUSO G, Structure BROWN R, regulation and function of NF-kappa B [J]. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10(2):405-455.
- [24] 赵冬梅, 耿旭景, 谭丽, 等. IL-6 在子宫内膜异位患者血清中的表达及其潜在作用机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(11):1707-1711, 1715.
- [25] 谢岚, 蒲丽蓉, 张思沉. 血清及腹腔液中 IL-6、IL-37、TNF- α 水平与子宫内膜异位症不孕关系[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(7):1497-1501.
- [26] BLACKWELL TS, CHRISTIMAN JW. The role of nuclear factor- κ B in cyto-kine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(1):3-9.

Exploring the Effects of *Quyu Jiedu Formula* (祛瘀解毒方) on the Ectopic Tissues of the Rat Uterus in An Endometriosis Model Based on Iron Autophagy Mediated by the NCOA4/NF- κ B Signalling Pathway

LIU Yiming¹, LIU Zhihong², LIAN Fang³

1. The First School of Clinical Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250000; 2. Shandong College Of Traditional Chinese Medicine; 3. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Quyu Jiedu Formula* (祛瘀解毒方) in the treatment of endometriosis in terms of iron autophagy mediated by nuclear receptor coactivator 4/nuclear factor κ B (NCOA4/NF- κ B) signalling pathway. **Methods** Fifty female SD rats were randomly divided into sham surgery group, model group, mifepristone group, low- and high-dose *Quyu Jiedu Formula* group, with 10 rats in each group. In the sham surgery group, only operation of opening and closing abdomen was performed, and in the remaining groups, the rat with endometriosis was modelled by autotransplantation. On the next day after successful modelling, saline 2 ml/d was given by gavage to the sham surgery group and the model group; mifepristone 1.05 mg/(kg·d) was given by gavage to the mifepristone group; *Quyu Jiedu Formula* 12.23 g/(kg·d) and 48.92 g/(kg·d) were given to the low- and high-dosage *Quyu Jiedu Formula* groups, respectively administered for 4 weeks consecutively. In the remaining 4 groups, all ectopic endometrial tissues were removed from the rats. The volume of ectopic lesions was measured in the model group, the mifepristone group, and the low- and high-dose *Quyu Jiedu Formula* groups, and the pathological changes of endometrial/ectopic tissues were observed by HE staining, and the protein expression and expression of NCOA4, Ferritin Heavy Chain 1 (FTH1), Panax quinquefolium (P62), Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 β (LC3B), and P-NF- κ B protein expression and NCOA4, FTH1, LC3B, P62 mRNA expression were detected in the endometrium and ectopic tissues; the co-localisation of NCOA4 and LC3B, free iron content, and levels of interleukin 6 (IL-6) and tumour necrosis factor α (TNF- α) in endometrial/eutopic endometrial tissues were also detected. **Results** No ectopic lesions were seen in the sham surgery group. The ectopic tissues of rats in the model group showed obvious pathological damage, while the pathological damage of the ectopic tissues of rats in each

administration group was reduced to different degrees. Compared with the model group, the volume of ectopic lesions was reduced in the mifepristone group and the high- and low-dose *Quyū Jiedu Formula* groups, and the volume of ectopic lesions in the high-dose *Quyū Jiedu Formula* group and the mifepristone group was significantly smaller than that in the low-dose *Quyū Jiedu Formula* group ($P < 0.01$). Compared with the sham surgery group, the ectopic tissues of the model group showed up-regulation of LC3B II/LC3B I values, NCOA4, and P-NF- κ B protein expression, down-regulation of P62 and FTH1 protein expression, increase in free iron content and IL-6 and TNF- α levels, and increase in the co-localisation positivity rate and co-localised cell density of NCOA4 and LC3B ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the ectopic endothelial tissue LC3B II/LC3B I values and the expression of NCOA4 and P-NF- κ B proteins were down-regulated in the low- and high-dose *Quyū Jiedu Formula* group and mifepristone group, the co-localisation positivity rate of NCOA4 and LC3B significantly reduced, and the content of free iron and the level of IL-6 decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the mifepristone group, P62 more obvious up-regulated and TNF- α level reduced in the high-dose *Quyū Jiedu Formula* group ($P < 0.05$). Compared with the low-dose *Quyū Jiedu Formula* group, the free iron content of ectopic tissues and the levels of IL-6 and TNF- α reduced in the high-dose *Quyū Jiedu Formula* group ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of endometriosis treatment by *Quyū Jiedu Formula* may be related to the inhibition of iron autophagy mediated by the NCOA4/NF- κ B signalling pathway in endometriotic tissues, which improves endometrial inflammation.

Keywords endometriosis; *Quyū Jiedu Formula* (祛瘀解毒方); iron autophagy; inflammation; nuclear receptor co-activator factor 4; nuclear factor κ B

(收稿日期: 2023-10-29; 修回日期: 2023-12-14)

[编辑: 邓媛]

· 信 息 窗 ·

国家药监局发布两个中药制剂技术指导原则

日前,国家药监局药审中心发布《中药制剂特征图谱研究技术指导原则(试行)》《中药制剂稳定性研究技术指导原则(试行)》。分别明确了中药制剂特征图谱和稳定性研究技术的基本原则、主要内容、试验方法等内容。

特征图谱技术指导原则适用于中药制剂的特征图谱研究,中药材、饮片、提取物等特征图谱研究可参照执行。根据该指导原则,中药制剂特征图谱应当反映其质量特征,应当具有特征性、重现性和实用性,测定方法具有可操作性,体现品种特点。中药制剂特征图谱应当根据中医药特点以及质量设计要求开展针对性的研究。研究内容一般包括检测方法选择、供试品制备、特征图谱制定、方法学验证、评价方法等。

稳定性技术指导原则鼓励采用新技术、新方法开展中药制剂稳定性研究。适用于中药制剂申请临床试验、上市许可、上市后变更等研究过程中的稳定性研究,中药制剂中间产物、天然药物稳定性研究亦可参考本技术指导原则。根据该指导原则,稳定性研究应当反映中药制剂的整体质量以及质量变化情况,根据研究目的和条件的不同,稳定性试验可分为影响因素试验、加速试验和长期试验等。稳定性研究的内容应当根据注册申请的分类以及药品的具体情况,围绕稳定性研究的目的进行设计和开展,并明确了申请临床试验、申请上市许可以及上市后变更中药制剂稳定性研究的具体要求。

(本文来源《中国中医药报》)