



人参皂苷 Rg₃ 通过 PI3K/Akt 信号通路 抑制大鼠卵巢型子宫内膜异位症 血管生成相关因子表达机制研究*

李晨阳, 张学红[△]

兰州大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 探讨人参皂苷 Rg₃ 抑制卵巢型子宫内膜异位症 (ovarian endometriosis, OEMs) 大鼠血管生成相关因子表达及其机制。方法: 采用异位移植的方法建造大鼠 OEMs 模型, 给予人参皂苷 Rg₃ 干预治疗, 检测大鼠体质量; 干预后采集大鼠卵巢型异位子宫, 记录其体积和质量, 利用定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 法检测子宫血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA、血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) mRNA、缺氧诱导因子 1α 多肽 (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1α) mRNA、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) mRNA、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) mRNA 的表达, 蛋白印记 Western blot 和免疫组化法检测子宫磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol 3-hydroxykinase, PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol 3-hydroxykinase, p-PI3K)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinase, Akt1)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinase, p-Akt1)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular regulated protein kinases, p-ERK1/2) 蛋白。结果: 人参皂苷 Rg₃ 可浓度依赖性减缓子宫异位大鼠体质量下降幅度, 降低异位子宫质量和体积, 降低异位子宫组织中血管生成相关因子 VEGF、VEGFR-2、HIF-1α、MMP-9、MMP-2 的 mRNA 表达及蛋白表达和 p-PI3K、p-Akt1、p-ERK1/2 蛋白表达, 对 PI3K、Akt 1、ERK1/2 总蛋白无影响。结论: 人参皂苷 Rg₃ 可抑制 OEMs PI3K/Akt 通路的激活, 降低血管生成相关因子表达和 ERK1/ERK2 磷酸化水平, 抑制 OEMs 血管生成。

[关键词] 子宫内膜异位症, 卵巢型; PI3K/Akt 信号通路; 血管生成相关因子; 人参皂苷 Rg₃

[中图分类号] R271.19 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2022)11-0066-07

Study on the Mechanism of Inhibiting Angiogenesis-related Factors Expression in Ovarian Endometriosis Rats by Ginsenoside Rg₃ via PI3K/Akt Signaling Pathway

LI Chenyang, ZHANG Xuehong[△]

First Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract Objective: To discuss the inhibitory effects of ginsenoside Rg₃ on the expressions of angiogenesis-related factors in ovarian endometriosis (OEMs) rats and its mechanism. Methods: Heterotopic transplantation was adopted to establish rat model with OEMs, and the models were intervened and treated with ginsenoside Rg₃, to detect body mass of the rats; after the intervention, ovarian type ectopic uterus of the rats were collected to record the volume and mass, qPCR was used to determine the expressions of VEGF mRNA, VEGFR-2 mRNA, HIF-1α mRNA, MMP-9 mRNA and MMP-2 mRNA of the uterus, Western blot and immunohistochemical method were applied to measure P13K, p-P13K, Akt1, p-Akt1, ERK1/2, p-ERK1/2 protein in the womb. Results: Ginsenoside Rg₃ could slow down the decrease of body mass of the rat model in a dose-dependent manner, reduce the mass and volume of ectopic uterus, lower the expressions of angiogenesis-related factors VEGF-2 mRNA, VEGFR mRNA, HIF-1α mRNA, MMP-9 mRNA and MMP-2 mRNA, and the contents of p-P13K, p-Akt1, p-ERK1/2 protein of the uterus, while it shows no influence on total protein of P13K, Akt1 and ERK1/2. Conclusion: Rg₃ could inhibit the activation of P13K/Akt signaling pathway in OEMs rats, lower the expressions of angiogenesis-related factors and ERK1/ERK2 phosphorylation level, and refrain angiogenesis in OEMs.

Keywords ovarian endometriosis; P13K/Akt signaling pathway; angiogenesis-related factors; ginsenoside Rg₃

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是由子宫内膜组织异位恶性侵袭其他脏器而引起的一系列病症,易复发,不易根治,对患者的生殖健康带来不同程度影响,严重者导致不孕^[1]。由于EMs的发病机制较为复杂,目前临床尚无有效且毒副作用小的治疗手段^[2]。卵巢是受子宫异位组织侵袭的主要器官之一^[3-4],据国内数据统计,卵巢子宫内膜异位症(ovarian endometriosis, OEMs)占子宫内膜异位症的一半以上,严重影响卵巢功能^[5]。

人参皂苷Rg₃是人参的主要有效成分之一,具有抗血管生成、抗肿瘤等功效,能抑制癌细胞浸润转移,增强机体免疫力^[6-7]。血管生成对于EMs病灶存活和生长有重要作用,利用人参皂苷Rg₃抑制血管生成治疗EMs的策略具有可行性。但是人参皂苷Rg₃对OEMs血管生成的影响未见报道,因此本研究首次通过异位移植的方法建立OEMs大鼠模型,探索人参皂苷Rg₃对OEMs血管生成相关因子的影响及其机制,为人参皂苷Rg₃治疗OEMs提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 动物 60只健康雌性SD大鼠,体质量180~200 g,购自兰州大学动物实验中心,动物许可证号:SYXK(甘)2015-0005,适宜环境饲养,自由摄食摄水,适应环境7天后进入实验。

1.2 试剂及仪器 人参皂苷Rg₃(亚泰制药,国药准字Z20030044,规格:10 mg/粒);孕三烯酮(紫竹药业,国药准字H19980020,规格:2.5 mg/粒);戊酸雌二醇(拜耳医药,国药准字J20171038,规格:1 mg/片);RIPA裂解液(P0013B,Beyotime);BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0010,Beyotime);增强型化学发光试剂(P0018,Beyotime);PVDF膜(HVHP29325,Merck Millipore);SDS-PAGE凝胶试剂盒(P0012A,Beyotime);兔抗Akt1多克隆抗体(ab235958,Abcam);兔抗p-Akt1单克隆抗体(ab81283,Abcam);兔抗ERK1/2多克隆抗体(ab17942,Abcam);兔抗p-ERK1/2多克隆抗体(ab214362,Abcam);兔抗PI3K单克隆抗体(ab191606,Abcam);兔抗p-PI3K多克隆抗体(ab182651,Abcam);SYBR Premix Ex TaqTM II(RR820L,Takara);Trizol(9109,Takara);Prime-Script TM RT reagent Kit with gDNA Eraser,(RR047A,Takara)。HX202T型体重秤(天东衡器厂);TP1020型组织脱水机(Leica);KEDEE-KD-BMII型石蜡包埋机(上海科迪);RM2245型石蜡切片机(Leica);907型-80 °C冰箱(Thermo);IX73型显微镜(Olympus);101-2A型烘箱(天津泰斯特);

Fisher Micro型4 °C离心机(Thermo);QL-901型涡旋混合器(其林贝尔);J32392E型移液器(Eppendorf);MCT-150-C型无酶EP管(Axygen);BS-15-M型普通EP管(Biosharp);188105W型载玻片(CITOTEST);0677-1型盖玻片(帆船);0638型研钵;Nanodrop 2000型分光光度计(Thermo);S1000型逆转录仪(BIO-RAD);Mx3000p型荧光定量PCR仪(Agilent);MySpin12型瞬时离心机(Thermo);PCR-0208-C型0.2 mL八连管(Axygen)。

1.3 方法

1.3.1 分组 采用随机数字表法将大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组、阳性药物组及人参皂苷Rg₃低、中、高剂量组。

1.3.2 大鼠 OEMs 模型的建立 参考文献[8]构建模型方法,建模前2天选非发情期雌性SD大鼠,每只给予0.2 mg戊酸雌二醇。在无菌条件下,用3%异氟醚将大鼠麻醉后,仰卧位固定于手术板上,腹部手术备皮,于腹部下方正中耻骨联合上1 cm处纵行2~3 cm切口,开腹后找到子宫所在位置,剪下右侧子宫,置于无菌生理盐水中,剖开,分离子宫内膜与肌层,剪取大小为5 mm×5 mm的子宫内膜组织,并用可吸收线将其贴于左侧卵巢并缝合,然后用青霉素和链霉素的稀释液冲洗手术大鼠腹腔,常规缝合关腹。待大鼠苏醒后常规饲养,观察伤口恢复及生活情况。手术后第1天开始,大鼠肌肉注射16万U/kg青霉素和链霉素,每日1次,连续注射3天。假手术组除不进行子宫内膜缝合在卵巢上,其余操作相同。

1.3.3 给药 第4天造模成功后各组大鼠灌胃给药,阳性药物组灌胃0.5 mg/(kg·d)孕三烯酮,人参皂苷Rg₃低、中、高剂量组分别灌胃5、10、15 mg/(kg·d)人参皂苷Rg₃。假手术组和模型组灌胃等剂量生理盐水,每日1次,持续灌胃21天。

1.3.4 样本采集 灌胃21天后,腹腔麻醉大鼠,在原切口处取出卵巢处的子宫内膜移植物。参照FANG等^[9]方法记录移植植物大体特点,电子天平称取其质量,用游标卡尺测量其长、高、宽,计算体积:体积=0.52×长×宽×高。所取子宫与异位子宫组织部分液氮速冻,部分4%多聚甲醛固定。

1.3.5 苏木精-伊红(HE)染色 取出4%多聚甲醛固定的子宫与异位子宫组织,石蜡包埋切片,HE染色,显微镜拍照观察组织病理变化,包括子宫内膜上皮、腺体结构,间质细胞排列及炎症细胞浸润情况等。

1.3.6 免疫组化 取出4%多聚甲醛固定的子宫与异位子宫组织,脱水、石蜡包埋,切片机切成4~

5 μm 厚的切片,贴于载玻片,依次脱蜡、水化、微波酸修复、阻断内源性氧化酶、封闭、孵育一抗过夜[其中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase, Akt1)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase, p-Akt1)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylated extracellular regulated protein kinases, p-ERK1/2)抗体均以1:200稀释、洗涤、室温孵育生物素标记二抗、室温孵育HRP标记的链霉素,DAB显色、拍照]。

1.3.7 蛋白印记Western blot实验 取出液氮保存的子宫与异位子宫组织,放于提前液氮冷却的研钵中研磨,4℃条件下静置30 min,4℃离心半径13.5 cm,13000 rpm/min离心10 min,利用BCA试剂盒检测上清中蛋白浓度后,取上清加入上样缓冲液,加热煮沸使蛋白变性,加入到SDS-PAGE胶中上样,电泳分离后进行转膜、背景封闭;将一抗磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol 3-hydroxykinase, PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphorylated phosphatidylinositol 3-hydroxykinase, p-PI3K)、Akt1、ERK1/2、p-ERK1/2均以1:1000稀释,p-Akt1抗体以1:5000稀释,稀释后在4℃条件下孵育,洗脱后室温条件下孵育二抗、显色、显影、定影等,并拍照分析数据。

1.3.8 定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)实验 取液氮保存的子宫与异位子宫组织,置于提前用液氮冷冻的研钵中研磨后加入Trizol 1.5 mL研磨成匀浆,静置5 min充分裂解后,4℃离心半径13.5 cm,13000 rpm/min离心10 min,取上清液,加入等量氯仿,充分混匀后离心,所得上清加入预冷的异丙醇,轻轻颠倒混匀,离心弃上清,所得白色沉淀用预冷的75%乙醇清洗干燥后向沉淀中加入DEPC处理水进行溶解,-80℃冰箱保存。qPCR实验反应程序为预变性:95℃,10 min;扩增:95℃,15 s;60℃,15 s;72℃,30 s;循环数为40。引物序列信息见表1。

表1 qPCR引物序列信息

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	长度(bp)
VEGF	CTGGCTTACTGCTGTACCTCCACC	GGCACACAGGACGGCTTGAA	151
VEGFR-2	AAGAGATTGTTCCGGATGG	CGGCAGATAGCTCAATTCA	214
HIF-1α	ACTGCACAGGCCACATTCA	CGAGGCTGTGTCGACTGAGA	168
MMP-9	GCATCTGTATGGCTGGCT	CTGTAGGGCCTCAGAAGGA	206
MMP-2	ATCGCAGACTCTGGATGC	AGCCAGTCCGATTGATGCT	158
GAPDH	GCGCCGCAGGGACACACAC	AAGGATGAAGCGCACTTA	161

1.4 统计学方法 用SPSS 21.0软件分析数据,组间两两比较用LSD-t检验,多组间比较用单因素方差分析,方差不齐时用Dunnett's方法分析用比较,P<0.05为差异具有统计学意义。

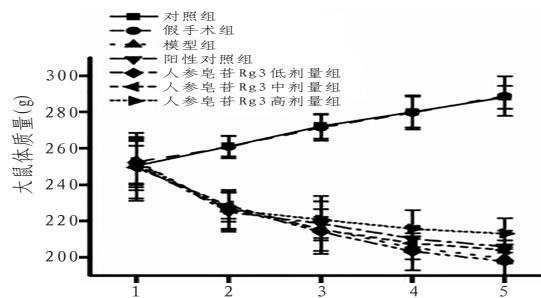
2 结果

2.1 子宫移植 肉眼观察大鼠OEMs模型,可见暗红色或者透亮的囊泡,说明移植组织显著变大,且部分大鼠子宫内出现多房充满液体的囊肿,移植组织表面有血管生成,可与周围组织发生粘连,提示通过移植方法成功建立大鼠OEMs模型。见图1。



图1 大鼠 OEMs 模型

2.2 大鼠体质量 对照组与假手术组大鼠体质量随饲养时间的增加缓慢稳定增加;模型组大鼠体质量随饲养时间的增加逐渐降低,干预后异位子宫大鼠体质量下降幅度减缓,并随药物浓度增加体质量下降幅度减小。见图2。



注:1造模前体质量;2造模后第2周体质量;3给药后第1周体质量;4给药后第2周体质量;5给药后第3周体质量

图2 各组大鼠体质量变化情况

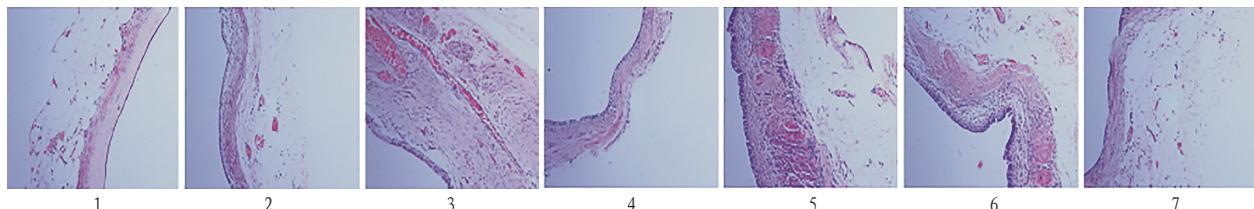
2.3 大鼠异位子宫体积及质量 模型组大鼠异位子宫体积与体质量随饲养时间的增加逐渐增加;与模型组相比,人参皂苷Rg₃干预后,大鼠异位子宫体积与质量均下降,并随药物干预浓度的增加,体积与质量下降幅度越大。见表2。

2.4 异位子宫病理变化 对照组子宫内膜上皮结构连续完整,间质细胞排列紧密,腺体结构清晰。与对照组相比,假手术组子宫组织结构无明显变化;模型组异位子宫内膜上皮组织破坏,产生大量炎性细胞,以淋巴细胞和中性粒细胞为主。阳性药物组及人参皂苷Rg₃低、中、高剂量组随着药物浓度的增加异位子宫结构趋于对照组,炎性细胞逐渐减少。见图3。

表2 各组大鼠子宫内膜异位组织大小($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(mg/kg)	异位组织	
			体积(mm^3)	质量(mg)
对照组	6	等剂量生理盐水	-	-
模型组	9	等剂量生理盐水	144.454 ± 14.663	211.866 ± 16.698
假手术组	9	等剂量生理盐水	-	-
阳性药物组	9	0.5	$87.474 \pm 13.953^{**}$	$137.36 \pm 17.352^{**}$
人参皂苷Rg ₃ 低剂量组	9	5.00	134.08 ± 12.656	204.918 ± 12.038
人参皂苷Rg ₃ 中剂量组	9	10.00	$90.074 \pm 16.831^*$	$133.164 \pm 20.021^{**}$
人参皂苷Rg ₃ 高剂量组	9	15.00	$62.972 \pm 16.049^{**}$	$89.678 \pm 16.736^{**}$

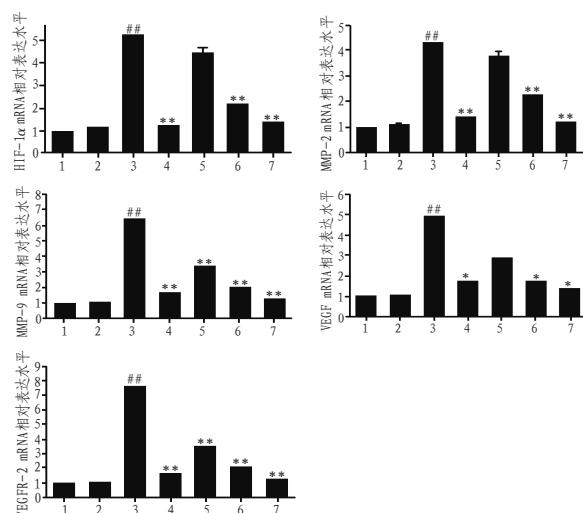
注:与模型组相比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$;“-”表示无异位组织体积与质量



注:1对照组;2假手术组、3模型组、4阳性对照组;5人参皂苷Rg₃低剂量组;6人参皂苷Rg₃中剂量组;7人参皂苷Rg₃高剂量组。1、2为子宫组织病理变化;3~7是子宫内膜异位组织的病理改变

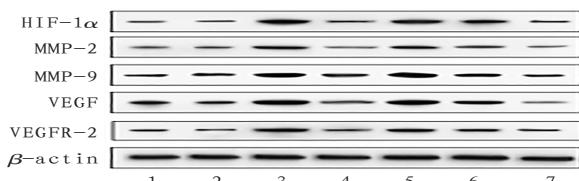
图3 各组大鼠子宫及异位子宫病理改变(×200)

2.5 子宫异位组织中 VEGF、VEGFR-2、HIF-1α、MMP-9、MMP-2 的 mRNA 表达 与对照组相比,假手术组异位子宫组织中 VEGF、VEGFR-2、HIF-1α、MMP-9、MMP-2 的 mRNA 表达无变化,模型组以上各因子 mRNA 的表达均上升($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组各因子 mRNA 的表达均下降($P < 0.05$),人参皂苷 Rg₃ 低、中、高剂量组各因子 mRNA 的表达随浓度升高逐渐下降($P < 0.05$)。见图4—6。



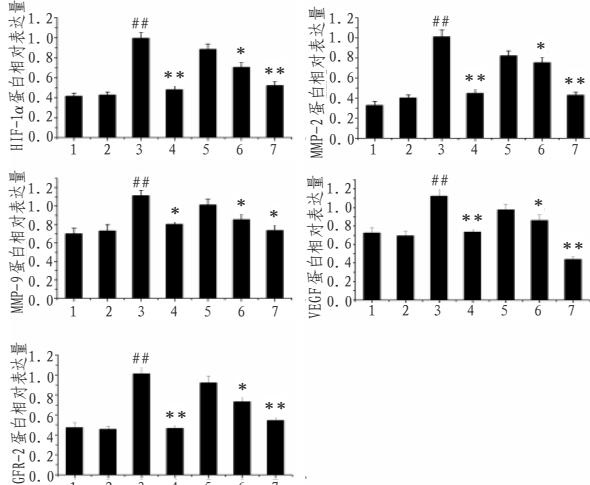
注:1对照组,2假手术组,3模型组,4阳性对照组,5人参皂苷Rg₃低剂量组,6人参皂苷Rg₃中剂量组,7人参皂苷Rg₃高剂量组;##表示与对照组比较, $P < 0.01$;**表示与模型组比较, $P < 0.01$

图4 子宫异位组织中血管生成相关因子 mRNA 表达



注:1对照组,2假手术组,3模型组,4阳性对照组,5人参皂苷Rg₃低剂量组,6人参皂苷Rg₃中剂量组,7人参皂苷Rg₃高剂量组

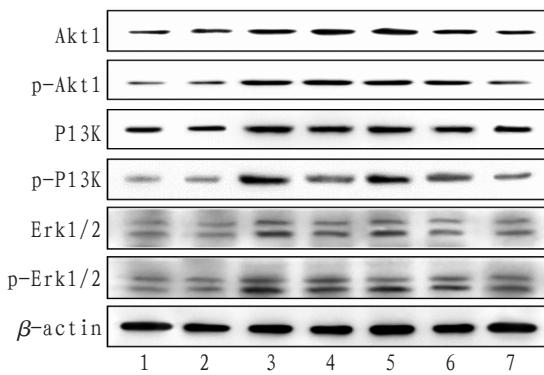
图5 子宫异位组织中血管生成相关因子蛋白表达



注:1对照组,2假手术组,3模型组,4阳性对照组,5人参皂苷Rg₃低剂量组,6人参皂苷Rg₃中剂量组,7人参皂苷Rg₃高剂量组;##表示与对照组比较, $P < 0.01$;**表示与模型组比较, $P < 0.01$

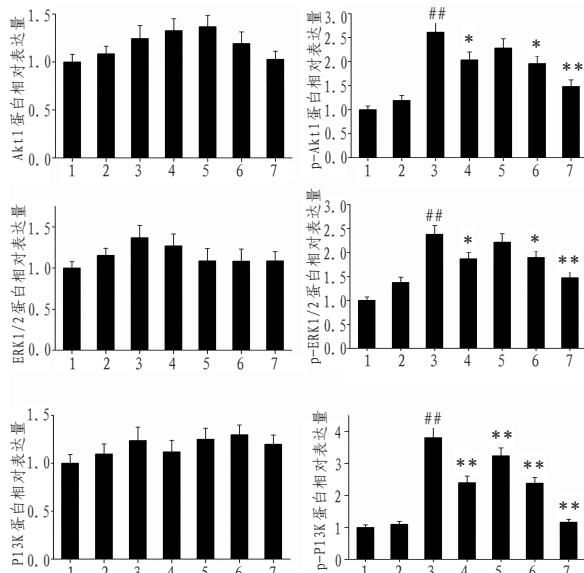
图6 子宫异位组织中血管生成相关因子蛋白表达柱状图

2.6 异位子宫组织中PI3K、p-PI3K、Akt1、p-Akt1、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达 与对照组相比,假手术组各因子蛋白表达无变化,模型组p-PI3K、p-ERK1/2、p-AKT1表达均上升($P<0.05$);与模型组比较,阳性对照组p-PI3K、p-ERK1/2、p-Akt1表达均下降($P<0.05$),人参皂苷Rg₃低、中、高剂量组p-ERK1/2、p-Akt1表达随参皂苷Rg₃浓度升高逐渐下降($P<0.05$),各组间PI3K、Akt1、ERK1/2总蛋白表达比较无明显变化。见图7—8,附图1。



注:1对照组,2假手术组,3模型组,4阳性对照组,5人参皂苷Rg₃低剂量组,6人参皂苷Rg₃中剂量组,7人参皂苷Rg₃高剂量组

图7 子宫内膜异位组织中各因子蛋白表达



注:1对照组,2假手术组,3模型组,4阳性对照组,5人参皂苷Rg₃低剂量组,6人参皂苷Rg₃中剂量组,7人参皂苷Rg₃高剂量组;与对照组比较,##表示 $P<0.01$;与模型组比较,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$

图8 子宫内膜异位组织中各因子蛋白表达柱状图

3 讨论

子宫内膜异位组织侵袭卵巢形成囊肿后影响

卵巢功能,引起卵子质量下降,从而患者生育能力降低^[10]。而异位组织的种植生长需要充足的血液供应,新血管形成是EMs发展的关键步骤^[11]。因此,抑制血管生成、维持稳定的血管平衡状态成为临床治疗EMs的新方向。目前传统EMs药物治疗方法是通过将机体的雌激素水平降至绝经后水平,从而抑制异位病灶生长,使之萎缩,但会产生严重副作用如潮热、体质量增加、骨质疏松、情绪易变等^[12]。而抗血管生成药物治疗EMs具有特异性强、不易产生耐药性,且复发率与副作用低等特点^[13]。人参皂苷Rg₃是从人参中分离提纯的四环三萜类人参二醇型皂苷单体,具有抗肿瘤血管生成作用,可通过降低肿瘤细胞分泌基质金属蛋白酶抑制细胞间质和细胞外基质黏附、侵袭和血管生成;能阻断纤维黏连层蛋白和层黏连蛋白的结合,调节某些细胞因子、VEG的增殖生长和新生血管形成,阻断细胞在血管壁着床,抑制肿瘤血管内皮细胞增长和血管生成。有研究发现人参皂苷Rg₃在体内外可通过调节miRNA-27b降低EMs纤维化和侵袭^[14];通过抑制VEGFR-2介导的PI3K/AKT/mTOR通路的激活抑制腹膜型EMs血管生成^[15]。

本研究发现通过异位移植的方式建立OEMs模型后,OEMs大鼠体质量随饲养时间的增加逐渐降低,给予人参皂苷Rg₃干预OEMs大鼠,可减缓大鼠体质量下降及其异位子宫的上皮组织结构以及炎症细胞的数量趋于正常化,提示人参皂苷Rg₃具有缓解OEMs病情的作用。

子宫内膜异位组织移植理论认为腹腔中出现脱落的子宫内膜组织,是随着经血逆流而来,脱落组织经“黏附-侵袭-血管形成”步骤移植于其他脏器^[16]。而在经期内子宫内膜处于缺氧状态,脱落的内膜组织进入腹腔后持续处于缺氧状态^[17],细胞为应对缺氧环境表达缺氧诱导因子进行调节,调节因子HIF-1在各种细胞中均有表达,多项研究表明HIF-1α在异位内膜组织中的表达高于正常内膜组织^[18-19]。本研究发现异位子宫组织中HIF-1α mRNA高于对照组和假手术组,与文献研究结果一致,HIF-1α在缺氧环境下的稳定表达促进异位内膜组织的侵袭能力^[20],促进了血管生成相关基因转录^[21],包括MMPs、VEGF等,其中VEGF是血管内皮生长因子,在促进血管生成中发挥着关键作用,VEGF启动子区的HRE与HIF-1结合后激活转录,同时HIF-1α也可间接延长ERK活性,ERK的持续活化能够促进一系列血管生成因子表达^[22]。本研究发现人参皂苷Rg₃可浓度依赖性降

低异位子宫组织中HIF-1 α 、VEGF、VEGFR、MMP2、MMP9的mRNA表达以及ERK1/2的磷酸化水平,提示人参皂苷Rg₃可抑制异位子宫中血管生成相关因子表达,进而通过抑制异位子宫血管生成抑制异位子宫生长。

研究显示,信号通路PI3K/Akt/mTOR在促进细胞增殖和新血管生成方面起关键作用,在PI3K/Akt信号通路中Akt蛋白激酶起关键作用,通过磷酸化,达到最大活化效应^[23]。据Gordan等^[24]研究,PI3K/Akt信号通路可促进HIF-1 α 表达,进而促使血管形成。CHANG等^[25]报道内膜间质细胞中PI3K/Akt通路经异常低表达的肿瘤转移抑制因子(NME1)激活后,IL-8和VEGF大量表达,CD62E和CD105血管生成相关分子表达量增加,进而促使异位病灶处生成大量血管内皮细胞。研究发现^[26-27]内皮型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)被Akt磷酸化后生成NO,进而促进血管生成,而EMs患者体内eNOS表达升高^[28],异位病灶周围血管生成增多,可能与PI3K/Akt通路激活相关。本研究发现人参皂苷Rg₃可降低PI3K/Akt通路PI3K、Akt的磷酸化水平,对PI3K/Akt通路的激活具有抑制作用,进而通过抑制PI3K/Akt通路控制的下游因子如HIF-1 α 、eNOS、VEGF、IL-8、CD62E和CD105等抑制异位子宫血管生成。但本研究只从已报道PI3K/Akt/mTOR通路与血管生成关系的角度推测人参皂苷Rg₃可通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路抑制EMs血管生成,但未在实验中直接证明该推测,因此本课题组将进一步设计实验直接验证这种推测。

综上所述,人参皂苷Rg₃可抑制OEMs中PI3K/Akt通路的激活,降低血管生成相关因子HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2、MMP-2、MMP-9的表达和ERK1/ERK2的磷酸化水平,抑制OEMs血管生成。

参考文献

- [1] 周应芳. 子宫内膜异位症的临床诊断和治疗[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(1):67-70.
- [2] 胡秋霞, 彭新月, 石杰敏, 等. CXCL12/CXCR4/CXCR7轴在子宫内膜异位症中的研究进展[J]. 生命的化学, 2020, 40(2): 262-268.
- [3] 萧倩敏, 徐婉媚, 肖玲丽. 卵巢子宫内膜异位症与卵巢癌的超声鉴别诊断[J]. 吉林医学, 2020, 41(2):284-285.
- [4] 姚书忠, 梁炎春. 重视子宫内膜异位症手术治疗的恰当性和彻底性[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(1):45-49.
- [5] 徐梅, 杨琳, 肖翔, 等. LYPmRNA在卵巢子宫内膜异位症外周血及卵巢组织的表达[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(1):67-68.
- [6] ZOU J F, SU H F, ZOU C L, et al. Ginsenoside Rg₃ suppresses the growth of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells by upregulating lncRNA-CASC2 and activating PTEN signaling[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2020, 34(6):e22480.
- [7] TIAN L L, SHEN D C, LI X D, et al. Ginsenoside Rg₃ inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4[J]. Oncotarget, 2016, 7(2):1619-1632.
- [8] PELCH K E, SHARPE-TIMMS K L, NAGEL S C. Mouse model of surgically-induced endometriosis by autotransplantation of uterine tissue[J]. J Vis Exp, 2012 (59):e3396.
- [9] FANG F, GONG L L, WANG X J, et al. The association between vascular endothelial growth factor (VEGF)+405G>C genetic polymorphism and endometriosis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(9):1177-1182.
- [10] SANCHEZ A M, VANNI V S, BARTIROMO L, et al. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature[J]. J Ovarian Res, 2010(1):43.
- [11] 张新艳, 刘彦. 子宫内膜异位症的血管生成与抗血管生成治疗[J]. 生殖与避孕, 2007, 27(2):133-136.
- [12] VERCELLINI P, VIGANÒ P, SOMIGLIANA E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(5):261-275.
- [13] VERCELLINI P, SOMIGLIANA E, VIGANÒ P, et al. Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments[J]. Drugs, 2019, 69(6):649.
- [14] KIM M K, LEE S K, PARK J H, et al. Ginsenoside Rg₃ decreases fibrotic and invasive nature of endometriosis by modulating miRNA-27b: in vitro and in vivo studies[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):17670.
- [15] CAO Y, YE Q, ZHUANG M F, et al. Ginsenoside Rg₃ inhibits angiogenesis in a rat model of endometriosis through the VEGFR-2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Plos One, 2017, 12(11):e0186520.
- [16] BURNET R O, GIUDICE L C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis[J]. Fertil Steril, 2012, 98(3):511-519.
- [17] COUSINS F L, MURRAY A A, SCANLON J P, et al. Hypoxia-probe reveals dynamic spatial and temporal changes in hypoxia in a mouse model of endometrial breakdown and repair[J]. Bmc Res Notes, 2016, 9:30.
- [18] FILIPPI I, CARRARELLI P, LUISI S, et al. Different expression of hypoxic and angiogenic factors in human endometriotic lesions[J]. Reprod Sci, 2016, 23(4):492-497.
- [19] LIU H W, ZHANG Z B, XIONG W Q, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α promotes endometrial stromal cells migration and invasion by upregulating autophagy in endometriosis[J]. Reproduction, 2017, 153(6):809-820.
- [20] XIONG W Q, ZHANG L, XIONG Y, et al. Hypoxia promotes invasion of endometrial stromal cells via hypoxia-inducible factor-1 α upregulation-mediated β -catenin activation in endometriosis[J]. Reprod Sci, 2016, 23(4):531-541.
- [21] LIN S C, WANG C C, WU M H, et al. Hypoxia-Induced mi-

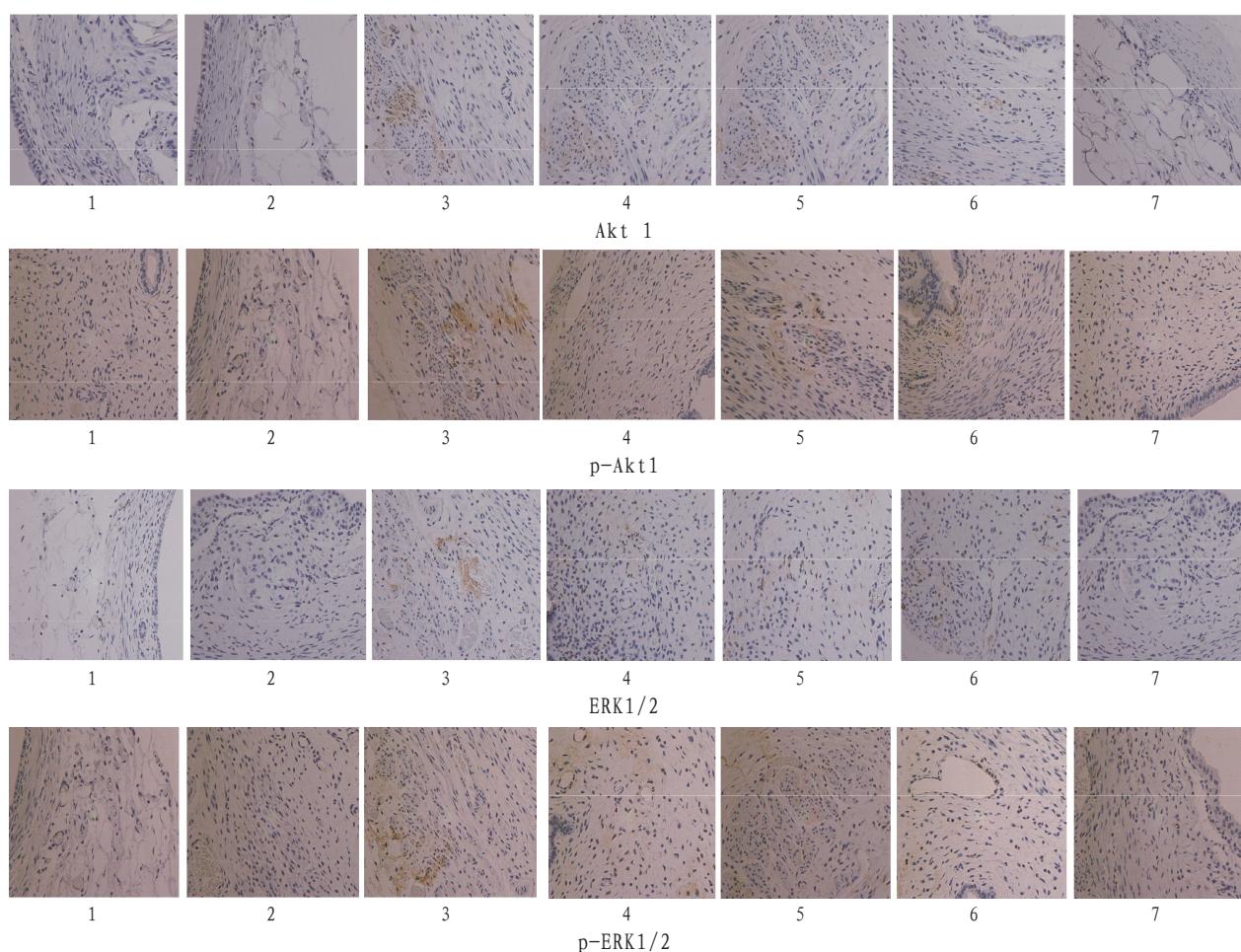
- croRNA-20a expression increases ERK phosphorylation and angiogenic gene expression in endometriotic stromal cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(8):e1515-1523.
- [22] YU Y X, XIU Y L, CHEN X, et al. Transforming growth factor-beta 1 involved in the pathogenesis of endometriosis through regulating expression of vascular endothelial growth factor under hypoxia [J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(8):950-956.
- [23] 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 localisation [J]. Oral Oncol, 2012, 48(9):822-830.
- [24] GORDAN J D, SIMON M C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype [J]. Curr Opin Genet Dev, 2007, 17(1):71-77.
- [25] CHANG K K, LIU L B, JIN L P, 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.
- [26] LIU J X, LUO M Q, MENG X, 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.
- [27] KANG Z C, ZHU H B, JIANG W L, et al. Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013, 113(4):221-227.
- [28] YEO S G, WON Y S, LEE H Y, 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.

收稿日期:2022-04-03

*基金项目:甘肃省自然科学基金(18JR3RA350/092NKDA009)。

作者简介:李晨阳(1987—),女,硕士学位,医师。研究方向:妇产科。

△通讯作者:张学红(1967—),女,硕士学位,主任医师,教授。研究方向:妇产科。



注:1对照组,2假手术组,3模型组,4阳性对照组,人参皂苷Rg₃低剂量组,6人参皂苷Rg₃中剂量组,7人参皂苷Rg₃高剂量组

附图1 子宫内膜异位组织中Akt1、p-Akt1、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达(×200)