

基于 MAPK/CREB 信号通路探讨南珠蜂蜜液对围绝经期综合征大鼠的影响

邓亚胜^{1,2,3}, 梁天薇¹, 黄慧¹, 范燕萍¹, 郑艺清¹, 刘永辉¹, 倪召兵¹, 陈秋², 黄语嫣³, 林江^{1*}

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530200; 2. 成都中医药大学附属医院, 四川成都 610075; 3. 防城港市中医医院, 广西防城港 538000)

摘要: 目的 探讨南珠蜂蜜液改善围绝经期综合征大鼠症状的作用。方法 采用双侧卵巢切除术建立围绝经期综合征大鼠模型, 随机分为假手术组、模型组、坤泰胶囊组 (0.63 g/kg) 和南珠蜂蜜液低、中、高剂量组 (0.0315、0.063、0.126 g/kg), 连续干预 15 d。HE 染色观察子宫组织形态学变化和动情周期变化; ELISA 法检测血清雌二醇 (E_2)、卵泡刺激素 (FSH) 和黄体生成素 (LH) 水平; RT-qPCR 法检测子宫和下丘脑组织 $ER\alpha$ 、MAP2K1、ERK1/2、CREB mRNA 表达; Western blot 法检测下丘脑组织 ERK 信号通路关键蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠子宫和下丘脑系数降低 ($P<0.01$); 血清 E_2 水平降低 ($P<0.01$), FSH 和 LH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 子宫组织结构紊乱, 内膜上皮细胞低柱状改变, 固有层腺体数量减少, 毛细血管分布稀疏; 子宫和下丘脑组织 $ER\alpha$ 、MAP2K1、ERK1/2 (p-ERK) 和 CREB (p-CREB) mRNA 及蛋白表达均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 坤泰胶囊组和南珠蜂蜜液高剂量组大鼠子宫和下丘脑系数升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 血清 E_2 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSH 和 LH 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 子宫组织结构明显改善, 管径增粗、内膜增厚、上皮细胞恢复单层柱状排列, 固有层腺体数量增加并可见新生毛细血管; 子宫和下丘脑组织 $ER\alpha$ 、MAP2K1、ERK1/2 (p-ERK) 和 CREB (p-CREB) mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 南珠蜂蜜液可能通过上调 MAP2K1、ERK 和 CREB 表达, 激活 MAPK 信号通路, 从而改善围绝经期综合征大鼠的性激素水平, 修复子宫和下丘脑组织的病理损伤。

关键词: 南珠蜂蜜液; 围绝经期综合征; 下丘脑; 性激素; $ER\alpha$; MAPK/CREB 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)12-3968-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.12.012

Effects of Nanzhu Honey Liquid on a rat model of perimenopausal syndrome via MAPK/CREB signaling pathway

DENG Ya-sheng^{1,2,3}, LIANG Tian-wei¹, HUANG Hui¹, FAN Yan-ping¹, ZHENG Yi-qing¹,

LIU Yong-hui¹, NI Zhao-bing¹, CHEN Qiu², HUANG Yu-yan³, LIN Jiang^{1*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. The Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. Fangchenggang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fangchenggang 538000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Nanzhu Honey Liquid on symptoms improvement in a rat model of perimenopausal syndrome. **METHODS** With the rat models of perimenopausal syndrome established by bilateral ovarioectomy, rats were randomly divided into the sham operation group, the model group, the Kuntai

收稿日期: 2025-04-26

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2025GXNSFDA069048); 全国高校黄大年式教师团队“中西医基础课程教师团队”项目 (教育部教师函 [2022] 2 号); 广西名中医林江传承工作室项目 (桂中医药科教发 [2021] 6 号); 中医学广西一流学科项目 (桂教科研 [2022] 1 号); 广西中医药多学科交叉创新团队项目 (GZKJ2302)

作者简介: 邓亚胜 (1993—), 男, 博士, 主治医师, 从事内分泌代谢性疾病的中西医结合基础研究。Tel: 15678104341, E-mail: 1440362586@qq.com

* 通信作者: 林江 (1963—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事方剂组方原理、临床应用及实验研究。Tel: 13377115675, E-mail: 1713552545@qq.com

Capsule group (0.63 g/kg) and the low-dose, medium-dose and high-dose Nanzhu Honey Liquid groups (0.0315, 0.063 and 0.126 g/kg), for 15 days respective drug administration. HE staining was employed to assess uterine tissue morphology and estrous cycle alteration. Serum levels of estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were quantified using ELISA. RT-qPCR measured mRNA expressions of $ER\alpha$, $MAP2K1$, $ERK1/2$ and $CREB$ in both uterus and hypothalamic tissues. Western blot further examined key protein expressions within the ERK signaling pathway in the hypothalamus. **RESULTS** Compared to the sham operation group, the model group showed significant reductions in uterine and hypothalamic indices ($P<0.01$); markedly decreased serum E_2 level ($P<0.01$), elevated FSH and LH levels ($P<0.05$, $P<0.01$); disorganized uterine tissue architecture, atrophic endometrial epithelium with reduced glandular density in the lamina propria, and sparse capillary distribution; and downregulated mRNA and protein expressions of $ER\alpha$, $MAP2K1$, $ERK1/2$ (p-ERK) and $CREB$ (p-CREB) in uterus and hypothalamus ($P<0.01$). Compared to the model group, the groups treated with Kuntai Capsule or high-dose Nanzhu Honey Liquid exhibited significantly increased uterine and hypothalamic indices ($P<0.05$, $P<0.01$); elevated serum E_2 level ($P<0.05$, $P<0.01$) and reduced FSH and LH levels ($P<0.05$, $P<0.01$); restored uterine architecture with increased endometrial thickness, transition to single-layer columnar epithelium, enhanced glandular density in the lamina propria, and formation of new capillaries; and increased mRNA and protein expressions of $ER\alpha$, $MAP2K1$, $ERK1/2$ (p-ERK) and $CREB$ (p-CREB) in both uterus and hypothalamus ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Nanzhu Honey Liquid may activate MAPK signaling pathway by up-regulating the expressions of $MAP2K1$, ERK and CREB, thereby enhancing sex hormone levels in rats with perimenopausal syndrome and mitigating the pathological damage of the uterus and hypothalamus.

KEY WORDS: Nanzhu Honey Liquid; perimenopausal syndrome; hypothalamus; sex hormones; $ER\alpha$; MAPK/ $CREB$ signaling pathway

围绝经期综合征是女性绝经前后因雌激素下降引发的症候群，表现为潮热、情绪障碍等症状，会增加绝经后骨质疏松、冠心病、糖尿病等远期风险^[1-3]。全球约10亿围绝经期综合征患者，年新增4 700万例，是重大公共卫生问题^[4-5]。激素替代疗法虽有效，但长期使用存在致癌和血栓风险，亟需开发安全替代方案^[6]。

南珠（合浦珍珠）作为传统中药，《本草纲目》记载其具有“安魂魄”等功效。现代研究证实，南珠对围绝经期综合征有疗效且安全性良好^[7-8]。本课题组采用蜂蜜活性酶水解技术制备南珠蜂蜜液，提升了生物利用度，前期研究证实其具有促血管内皮增殖和抗氧化作用^[9-10]。促分裂原活化蛋白激酶激酶1（mitogen-activated protein kinase kinase 1, $MAP2K1$ ）/细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase, ERK）通路在围绝经期综合征发病中起关键作用，雌激素下降可抑制该通路，导致内分泌紊乱^[11-12]。本研究通过构建卵巢切除大鼠模型，探讨南珠蜂蜜液对雌激素水平、子宫组织形态学及MAPK/CREB信号通路的影响，以阐明其对围绝经期综合征的作用机制，

以期为开发新型药物提供依据。

1 材料

1.1 动物 2月龄SPF级雌性SD大鼠60只，体质量（ 220 ± 20 ）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司〔实验动物生产许可证号SCXK（湘）2019-0004〕，饲养于广西中医药大学动物房〔实验动物使用许可证号SYXK（桂）2019-0001〕，室温 $20\sim26$ ℃，相对湿度50%~60%，12 h/12 h循环光照，自由摄食、饮水，适应性喂养1周。动物实验已通过广西中医药大学伦理审查委员会审批（伦理号DW20230411-074）。

1.2 药物和试剂 南珠蜂蜜液（桂药制字Z20220002，批号20220727）购自广西中医药大学附属瑞康医院药研中心；注射用青霉素钠（山东圣旺药业股份有限公司，批号20211101）；坤泰胶囊（贵阳新天药业股份有限公司，批号220903）。卵泡刺激素（follicle stimulating hormone, FSH）、促黄体生成素（luteinizing hormone, LH）、雌二醇（estrogen, E_2 ）ELISA试剂盒（上海江莱生物科技有限公司，货号JL13251、JL21049、JL11473）；TRIpure总RNA提取试剂〔科鹿（武汉）生物科

技有限责任公司, 货号 EP013]; 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 货号 C0105); RNA 逆转录试剂、荧光定量 PCR 试剂[莫纳(武汉)生物技术有限公司, 货号 MR05101、MQ00701]; RIPA 总蛋白裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、磷酸化蛋白酶抑制剂、ECL 化学发光检测试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)记免抗绵羊二抗、HRP 标记兔抗大鼠二抗(武汉阿斯本生物技术有限公司, 货号 AS1004、AS1086、AS1008、AS1059、AS1114、AS1093); ER α 、GAPDH 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司, 货号 ab32063、ab181602]; MAP2K1 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 67872-1-Ig); p-ERK、p-CREB 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 4370、9198)。

1.3 仪器 多功能酶标仪(德国 Diatek 公司, 型号 DR-200Bs); 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 型号 TGL-16); 脱水机、包埋机(武汉俊杰电子有限公司, 型号 JT-12J、JB-P5); 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司, 型号 RM2016,); 普通光学显微镜(日本 Olympus 公司, 型号 CX21); 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司, 型号 ABI7500); 超净工作台(济南鑫贝西生物技术有限公司, 型号 BSC-1100IIA2-X); 电泳仪、转移电泳仪槽、垂直电泳槽(北京六一生物科技有限公司, 型号 DYY-6C、DYCZ-400D、DYCZ-24DN)。

2 方法

2.1 大鼠分组、造模和给药 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、坤泰胶囊组和南珠蜂蜜液低、中、高剂量组, 每组 10 只, 采用双侧卵巢切除法制备围绝经期综合征模型。大鼠术前禁食 12 h 后称重, 麻醉后固定, 备皮, 消毒手术区; 于左侧腰背部最末肋骨端下约 1 cm 和腋中线上距脊柱约 2 cm 交汇处做 1.5 cm 左右切口, 打开腹腔, 找到卵巢, 将卵巢和输卵管轻拉出切口, 在卵巢底部靠近输卵管侧用止血钳夹住, 结扎卵巢后用手术剪刀切除卵巢, 逐层缝合皮肤, 皮肤切口处用碘伏消毒。假手术组仅切除卵巢周围部分脂肪组织, 其余同法处理。术后连续 3 d 注射 8 万单位的青霉素预防感染, 术后第 6 天起连续 5 d 进行阴道脱落细胞涂片以观察动情周期, HE 染色观察大鼠脱落细胞变化, 以此确认造模是否成功。造模成功后, 南珠蜂蜜液低、中、高组灌胃 0.031 5、0.063、0.126 g/kg 南珠蜂蜜液; 坤泰胶囊组灌胃 0.63 g/kg 坤泰

胶囊溶液, 连续给药 15 d; 假手术组和模型组灌胃等量生理盐水。给药期间观察大鼠一般状态、体质量等, 并根据体质量调整给药量。

2.2 血清性激素水平检测 大鼠末次给药后禁食不禁水 12 h, 称定体质量后麻醉, 取腹主动脉血, 室温静置 1 h, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min, 取血清, 于-80 ℃保存, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测血清性激素 E₂、FSH、LH 水平。

2.3 子宫、下丘脑系数测定 采集腹主动脉血后, 立即分离子宫及下丘脑组织, 仔细剔除周围脂肪组织, 称量子宫和下丘脑湿重并记录, 计算子宫、下丘脑系数, 公式为子宫/下丘脑系数 = (子宫/下丘脑湿重/体质量) × 100%。取部分子宫组织固定于 4% 多聚甲醛中, 用于后续组织形态学观察, 剩余组织迅速转移至-80 ℃冰箱保存, 用于 RT-qPCR 和 Western blot 检测。

2.4 阴道脱落细胞涂片 HE 染色 阴道涂片晾干后用 95% 乙醇固定细胞 5 min; 苏木素染液浸泡涂片 7~10 min 使细胞核着色, 冲洗 3~5 次; 1% 盐酸分化液浸泡 5~10 s 去除多余苏木精, 冲洗 1 min; 伊红浸泡 4~6 min 使胞质着色, 冲洗 2~3 次; 二甲苯中浸泡 5~7 min 透明细胞; 晾干, 中性树胶封片风干后于显微镜下观察。

2.5 子宫组织 HE 染色 取出固定 24 h 后的子宫组织, 经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片处理; 切片脱蜡至水后行常规 HE 染色, 再次梯度脱水, 二甲苯透明, 封片, 于显微镜下观察子宫形态学变化。

2.6 RT-qPCR 法检测子宫、下丘脑组织 ER α 、MAP2K1、ERK1/2、CREB mRNA 表达 用 TRIpure 总 RNA 提取试剂提取大鼠子宫、下丘脑组织总 RNA, 检测总 RNA 浓度, 按照反转录试剂盒说明书进行逆转录反应, 按照 qPCR 试剂盒说明书进行扩增反应, 反应条件为 95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 结果以 C_t 值呈现, 以 β -actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 相对表达, 引物由科鹿(武汉)生物技术有限责任公司合成, 序列见表 1。

2.7 Western blot 法检测子宫、下丘脑组织 ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB 蛋白表达 取适量的子宫组织, 加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液提取总蛋白, 冰浴下匀浆, 裂解 30 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清,

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

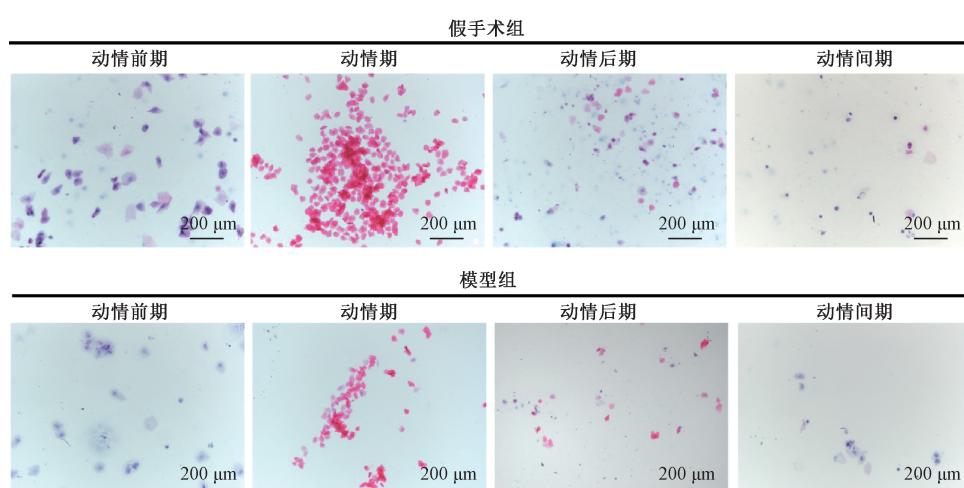
基因	引物序列(5'→3')
β -actin	正向 CGTGACATCCGTAAGAACCTC 反向 TAGGAGCCAGGGCACTAATCT
ER α	正向 CAGTGAAGCCTCAATGATGGG 反向 AGAAGGTGAAGTGTGAG
MAP2K1	正向 GATCAACTGCTGAAGAAAGCTG 反向 CTAGAATGTTGAAAGGCTTGACAT
ERK1	正向 CTGGCTTCTGACCAGTATGT 反向 AATTAGGTCTCTTGGATGG
ERK2	正向 GCACCAACCATTGAGCAGAT 反向 TCACGGTGCAGAACATTAGCT
CREB	正向 CCCAGGGAGGAGCAATACAG 反向 GGTGCTGTGCGAATCTGGTAT

采用BCA法测定样品蛋白浓度。根据蛋白分子量大小选择制胶浓度，制胶后上样，电泳，转膜，封闭后加一抗 ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB、GAPDH于4℃孵育过夜，次日洗膜后加二抗室温孵育30 min。加入现配的显影液，曝光、显影，应用AlphaEaseFC软件分析蛋白条带灰度值。

2.8 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理，计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，满足正态分布和方差齐的，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法；方差不齐者采用Dunnett's T3检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 造模情况 假手术组具有正常的动情周期变化，动情前期可见有核上皮细胞，形态结构完整，核蓝染；动情期可见大量红染的角化细胞，形态不一，呈堆积状；动情后期可见角化细胞和白细胞均匀分布，可见散在的角化细胞；动情间期可见大量白细胞，少量角化细胞和上皮细胞。模型组在切除卵巢后呈现动情周期紊乱，具体表现为动情期或动情间期延长或动情后期缺失，各时期变化缺失规律周期；且与假手术组比较，涂片显示各期细胞数量减少，见图1。

图1 假手术组和模型组大鼠阴道脱落细胞HE染色($\times 100$)Fig. 1 HE staining of vaginal exfoliated cells in rats in sham operation group and model group ($\times 100$)

3.2 南珠蜂蜜液对围绝经期综合征大鼠子宫和下丘脑系数的影响 与假手术组比较，模型组大鼠子宫、下丘脑系数均降低($P<0.01$)；与模型组比

较，坤泰胶囊组和南珠蜂蜜液高剂量组大鼠子宫、下丘脑系数均升高($P<0.01$)，见表2。

表2 各组大鼠子宫和下丘脑系数比较($\bar{x}\pm s$, n=5)Tab. 2 Comparison of uterine and hypothalamic coefficients of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	下丘脑湿重/mg	子宫湿重/mg	下丘脑系数/(mg·g ⁻¹)	子宫系数/(mg·g ⁻¹)
假手术组	49.40±4.86	404.03±56.71	0.16±0.01	1.33±0.22
模型组	36.05±7.27 **	150.15±91.13 **	0.12±0.03 **	0.51±0.35 **
坤泰胶囊组	46.40±3.49##	285.98±75.81##	0.15±0.01##	0.91±0.25##
南珠蜂蜜液低剂量组	39.07±7.42	173.22±45.72	0.12±0.02	0.53±0.13
南珠蜂蜜液中剂量组	41.92±7.65	177.82±49.07	0.13±0.02	0.56±0.16
南珠蜂蜜液高剂量组	46.85±4.56##	266.48±84.04##	0.15±0.01##	0.81±0.25##

注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

3.3 南珠蜂蜜液对围绝经期综合征大鼠血清 E₂、FSH、LH 水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清 E₂ 水平降低 ($P<0.01$), FSH、LH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,坤泰胶囊组及南珠蜂蜜液中、高剂量组 E₂ 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、LH 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 南珠蜂蜜液低剂量组大鼠血清 FSH、LH 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表3。
表3 各组大鼠血清 E₂、FSH、LH 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, n=5)

Tab.3 Comparison of serum E₂, FSH and LH levels in rats of each group (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, n=5)

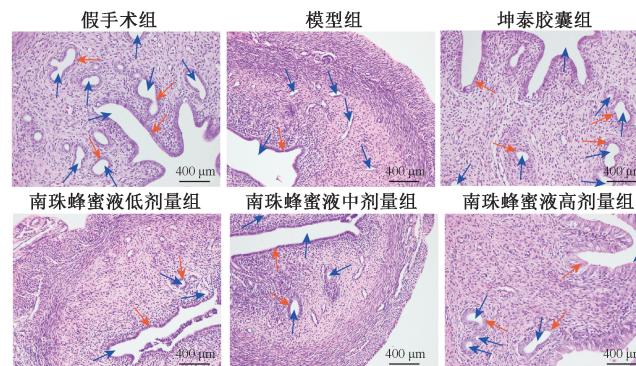
组别	E ₂	FSH	LH
假手术组	364.21±94.96	2.20±0.22	0.80±0.11
模型组	112.22±22.03 **	3.08±1.01 **	2.33±0.62 *
坤泰胶囊组	205.83±47.38##	1.92±0.18#	0.71±0.09##
南珠蜂蜜液低剂量组	119.95±28.55	2.21±0.54##	1.30±0.29#
南珠蜂蜜液中剂量组	164.52±50.07#	1.75±0.28##	0.87±0.16##
南珠蜂蜜液高剂量组	236.10±57.75##	1.77±0.33##	0.81±0.10##

注:与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较,
$P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.4 南珠蜂蜜液对围绝经期综合征大鼠子宫组织形态学变化的影响 假手术组大鼠子宫整体结构整齐,分层明显,各层细胞排列紧密;子宫管径较

粗,宫腔光滑饱满,子宫内膜深厚,表面可见单层柱状上皮细胞形态正常,呈单层柱状上皮状排列;子宫内膜固有层内有丰富的子宫腺体分布,周围可见丰富的毛细血管。模型组大鼠子宫腔变窄,整体结构紊乱,内膜变薄,内膜上的单层柱状上皮细胞呈低柱状态甚至低平状,固有层内的腺体腔变窄,腺体数量明显减少,周围毛细血管稀疏。坤泰胶囊组及南珠蜂蜜液各剂量组大鼠子宫管径增粗,内膜增厚,单层柱状上皮细胞形态基本恢复正常,子宫腺体数量增多,截面呈多样性,并且分布的新生毛细血管增多,以高剂量组较为著。结果见图2。

3.5 南珠蜂蜜液对围绝经期综合征大鼠子宫和下丘脑组织 ERα、MAP2K1、ERK1/2、CREB mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠子宫组织和下丘脑组织 ERα、MAP2K1、ERK1/2、CREB mRNA 表达均降低 ($P<0.01$);与模型组比较,除南珠蜂蜜液低剂量组大鼠下丘脑组织 ERα mRNA 表达无明显变化外,坤泰胶囊组及南珠蜂蜜液各剂量组大鼠子宫组织和下丘脑组织 ERα、MAP2K1、ERK1/2、CREB mRNA 表达均升高 ($P<0.01$),见表4~5。



注:蓝色箭头表示宫腔,橙色箭头表示单层柱状上皮细胞。

图2 各组大鼠子宫组织病理形态变化 (×200)

Fig.2 Histopathological changes in uterine tissues of rats in each group (×200)

表4 各组大鼠子宫组织 ERα、MAP2K1、ERK1/2、CREB mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	ERα	MAP2K1	ERK1	ERK2	CREB
假手术组	0.99±0.09	0.95±0.05	0.95±0.05	0.95±0.05	0.94±0.07
模型组	0.15±0.03 **	0.20±0.01 **	0.20±0.01 **	0.20±0.01 **	0.23±0.02 **
坤泰胶囊组	0.53±0.01##	0.46±0.02##	0.46±0.02##	0.46±0.02##	0.45±0.02##
南珠蜂蜜液低剂量组	0.29±0.01##	0.36±0.01##	0.36±0.01##	0.36±0.01##	0.33±0.01##
南珠蜂蜜液中剂量组	0.56±0.03##	0.51±0.01##	0.51±0.01##	0.51±0.01##	0.46±0.03##
南珠蜂蜜液高剂量组	0.70±0.02##	0.67±0.03##	0.67±0.03##	0.67±0.03##	0.71±0.02##

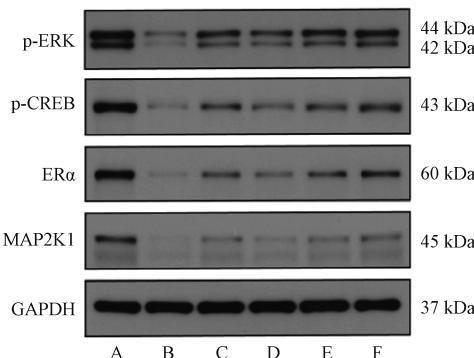
注:与假手术组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

表5 各组大鼠下丘脑组织ER α 、MAP2K1、ERK1/2及CREB mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$, n=3)Tab. 5 Comparison of mRNA expressions of ER α , MAP2K1, ERK1/2 and CREB in hypothalamic tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	ER α	MAP2K1	ERK1	ERK2	CREB
假手术组	1.00±0.15	1.00±0.17	1.08±0.17	1.00±0.09	1.00±0.20
模型组	0.49±0.06 **	0.28±0.03 **	0.20±0.08 **	0.16±0.00 **	0.11±0.02 **
坤泰胶囊组	0.69±0.07 ##	0.89±0.10 ##	0.60±0.10 ##	1.03±0.22 ##	1.00±0.10 ##
南珠蜂蜜液低剂量组	0.53±0.07	0.56±0.02 ##	0.43±0.10 ##	0.58±0.04 ##	0.43±0.07 ##
南珠蜂蜜液中剂量组	0.81±0.08 ##	0.66±0.11 ##	0.47±0.06 ##	0.69±0.07 ##	0.75±0.10 ##
南珠蜂蜜液高剂量组	1.14±0.08 ##	0.98±0.16 ##	0.57±0.05 ##	0.95±0.04 ##	1.12±0.30 ##

注: 与假手术组比较, ** P<0.01; 与模型组比较, ## P<0.01。

3.6 南珠蜂蜜液对围绝经期综合征大鼠子宫和下丘脑组织ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠子宫和下丘脑组织ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB蛋白表达均降低(P<0.01)。与模型组比较, 坤泰胶囊组及南珠蜂蜜液中、高剂量组大鼠子宫及下丘脑组织p-ERK、p-CREB蛋白表达, 下丘脑组织ER α 、MAP2K1蛋白表达均升高(P<0.05, P<0.01); 南珠蜂蜜液低剂量组大鼠子宫组织p-ERK蛋白表达, 下丘脑组织MAP2K1、p-CREB蛋白表达升高(P<0.05, P<0.01); 南珠蜂蜜液高剂量组子宫组织ER α 、MAP2K1蛋白表达升高(P<0.05, P<0.01)。结果见图3~4、表6~7。

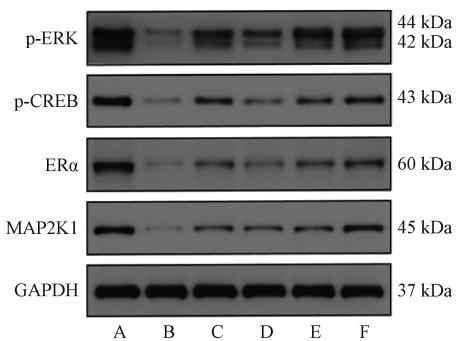


注: A为假手术组, B为模型组, C为坤泰胶囊组, D~F为南珠蜂蜜液低、中、高剂量组。

图3 各组大鼠子宫组织ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB蛋白条带图Fig. 3 Protein bands of ER α , MAP2K1, p-ERK and p-CREB in uterus of rats in each group表6 各组大鼠子宫组织ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, n=3)Tab. 6 Comparison of protein expressions of ER α , MAP2K1, p-ERK and p-CREB in uterus of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	ER α	MAP2K1	p-ERK	p-CREB
假手术组	0.35±0.17	0.27±0.09	1.18±0.13	0.70±0.12
模型组	0.03±0.01 **	0.02±0.01 **	0.23±0.08 **	0.07±0.02 **
坤泰胶囊组	0.13±0.06	0.08±0.02	0.64±0.08 ##	0.30±0.10 ##
南珠蜂蜜液低剂量组	0.10±0.06	0.06±0.02	0.47±0.06 ##	0.14±0.03
南珠蜂蜜液中剂量组	0.13±0.06	0.08±0.02	0.67±0.05 ##	0.27±0.09 #
南珠蜂蜜液高剂量组	0.25±0.13 #	0.14±0.06 ##	0.93±0.04 ##	0.40±0.10 ##

注: 与假手术组比较, ** P<0.01; 与模型组比较, # P<0.05, ## P<0.01。



注: A为假手术组, B为模型组, C为坤泰胶囊组, D~F为南珠蜂蜜液低、中、高剂量组。

图4 各组大鼠下丘脑组织ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB蛋白条带图Fig. 4 Protein bands of ER α , MAP2K1, p-ERK and p-CREB in hypothalamus of rats in each group

4 讨论

卵巢是分泌E₂的主要器官, 其功能受下丘脑正负反馈调节以维持E₂稳态^[13]。研究表明, 卵巢切除后体内E₂水平急剧下降, 此为围绝经期综合征发生的关键始动因素^[14]。Xiong、Tian等^[15-16]通过切除卵巢成功构建围绝经期综合征大鼠模型, 证实其血清E₂水平降低, FSH水平升高, 并出现子宫萎缩等类似围绝经期综合征患者的病理改变。本研究采用双侧卵巢切除术建立围绝经期综合征大鼠模型, 术后阴道涂片显示模型组动情周期紊乱, 以白细胞为主, 角化及上皮细胞显著减少; 血清E₂水平降低, FSH水平升高, 子宫呈现腺体减少及

萎缩等类似围绝经期综合征患者的病理改变。

表7 各组大鼠下丘脑组织ER α 、MAP2K1、p-ERK、p-CREB蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, n=3)Tab. 7 Comparison of protein expressions of ER α , MAP2K1, p-ERK and p-CREB in hypothalamus of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	ER α	MAP2K1	p-ERK	p-CREB
假手术组	0.46±0.06	0.53±0.05	1.34±0.06	0.62±0.05
模型组	0.04±0.01 **	0.05±0.02 **	0.32±0.10 **	0.09±0.02 **
坤泰胶囊组	0.15±0.05 ##	0.23±0.03 ##	0.69±0.13 ##	0.27±0.05 ##
南珠蜂蜜液低剂量组	0.09±0.02	0.12±0.02 #	0.50±0.12	0.16±0.02 #
南珠蜂蜜液中剂量组	0.16±0.05 ##	0.23±0.02 ##	0.72±0.14 ##	0.26±0.03 ##
南珠蜂蜜液高剂量组	0.24±0.03 ##	0.34±0.05 ##	1.06±0.13 ##	0.35±0.02 ##

注：与假手术组比较，** P<0.01；与模型组比较，#P<0.05, ##P<0.01。

内膜萎缩，证明造模成功。经南珠蜂蜜液干预后，大鼠血清E₂水平升高，子宫形态结构改善，表明南珠蜂蜜液可有效调控激素水平并缓解卵巢切除引起的病理变化。

ER α 是介导E₂保护作用的关键分子，在下丘脑和子宫等靶器官中识别并结合E₂，调控内分泌稳态^[17]。卵巢切除后，体内E₂水平急剧下降，导致下丘脑和子宫中ER α 表达减少，对E₂的敏感性降低，加剧激素紊乱^[18]。为模拟围绝经期综合征发病过程，研究常于去势后延迟造模，以更真实反映低水平E₂诱导的器官功能改变^[19-20]。此时，ER α 表达显著下调，进一步抑制E₂合成与信号传导，加速内分泌失衡^[21-22]。研究表明，黑升麻和杜仲总黄酮可通过上调下丘脑和子宫ER α 表达，提高E₂水平，改善围绝经期综合征症状^[23-24]。本研究显示，南珠蜂蜜液可显著提高ER α 蛋白及血清E₂水平，提示其可能通过调控ER α 表达以恢复E₂稳态，从而缓解围绝经期综合征。MAP2K1和ERK作为MAPK信号通路中的关键蛋白，广泛存在于胞质内，对细胞增殖、分化及生长调控具有重要作用^[25]。研究表明，围绝经期综合征的发生与MAPK信号通路功能失调密切相关，其认为机体随着卵巢衰老，长期处于低E₂状态，导致MAPK通路活性下降，关键蛋白活化受阻，进一步抑制雌激素合成与分泌^[26]。与此同时，ERK信号通路的异常活化或抑制也参与多种与衰老相关的病理过程^[27]。CREB作为ERK下游的重要转录调控因子，尤其在神经系统中高度表达^[28]。MAPK通路激活后可触发CREB磷酸化，进而参与细胞生长、分化及蛋白转录的调控^[29]。磷酸化CREB不仅可提高突触可塑性和传递效能，还是ER α 通过ERK通路调节E₂水平的关键环节^[30-31]。ERK通过磷酸化CREB激活多种功能蛋白，广泛参与神经内分泌调节，并在性激素平衡中发挥核心作用^[32]。研究表

明，ERK级联反应的下调与FSH等促性腺激素水平升高密切相关^[33]。本研究发现，各给药组大鼠下丘脑和子宫组织中p-ERK、p-CREB蛋白表达均高于模型组，尤以坤泰组和南珠蜂蜜液高剂量组效果显著。已有研究证实，固本安神方和越橘花青素均可通过上调p-ERK和p-CREB表达，改善子宫病理状态，提高E₂水平，缓解围绝经期综合征症状^[34-35]，本研究结果与之一致。这表明南珠蜂蜜液可能通过激活MAPK/CREB信号通路，在延缓围绝经期综合征进展中发挥保护作用。

综上所述，南珠蜂蜜液可显著提升去卵巢大鼠血清E₂水平、降低FSH水平，改善性激素紊乱，并减轻子宫损伤，促进内膜腺体及毛细血管增生，从而缓解围绝经期综合征症状，其机制与上调MAPK/CREB通路关键蛋白表达、延缓脏器衰老密切相关。本研究从内分泌角度揭示了该制剂治疗围绝经期综合征的作用机制，为其临床应用提供了依据。未来可结合多组学等技术，进一步探讨珍珠单方或配伍治疗围绝经期综合征的深层机制。

参考文献：

- Fu X, Wang H, Gai M, et al. Integrating network pharmacology with experimental validation to investigate the mechanism of Wuwei Zishen Formula in improving perimenopausal syndrome[J]. Am J Transl Res, 2024, 16(6): 2190-2211.
- Wang W, Yang W, Wang F, et al. Kunxinning Granules alleviate perimenopausal syndrome by supplementing estrogen deficiency[J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1554479.
- Erdélyi A, Pálfi E, Túú L, et al. The importance of nutrition in menopause and perimenopause—a review[J]. Nutrients, 2023, 16(1): 27.
- Sourouni M, Zangerer M, Honermann L, et al. Assessment of the climacteric syndrome: a narrative review[J]. Arch Gynecol Obstet, 2021, 304(4): 855-862.
- Santoro N. Perimenopause: from research to practice[J]. J Womens Health (Larchmt), 2016, 25(4): 332-339.
- Nappi R E, Siddiqui E, Todorova L, et al. Prevalence and

- quality-of-life burden of vasomotor symptoms associated with menopause: a European cross-sectional survey[J]. *Maturitas*, 2023, 167: 66-74.
- [7] 张璐砾, 戴 铭, 杨亚龙, 等. 班秀文治疗围绝经期综合征经验[J]. 中医杂志, 2019, 60(24): 2083-2085.
- [8] 方 媛, 张蓓蓓, 马嘉泽, 等. 珍枣胶囊对阴虚火旺型中老年失眠伴抑郁状态的改善作用研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(4): 70-72.
- [9] 岑妍慧, 林 涌, 林 江, 等. 水解南珠液能促进人微血管内皮细胞的增殖和迁移[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(16): 2564-2569.
- [10] 刘 鹏, 林 江, 贾 微, 等. 水解南珠液抑制细胞自噬减轻人微血管内皮细胞氧化损伤[J]. 生物技术, 2020, 30(4): 389-396.
- [11] Sun Y, Liu W Z, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [12] Kawvised S, Wattanathorn J, Thukham-Mee W. Neuroprotective and cognitive-enhancing effects of microencapsulation of mulberry fruit extract in animal model of menopausal women with metabolic syndrome[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2962316.
- [13] Devillers M M, Mhaouty-Kodja S, Guigon C J. Deciphering the roles & regulation of estradiol signaling during female mini-puberty: insights from mouse models[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 13695.
- [14] Stanczyk F Z, Chaikittisilpa S, Sripraser I, et al. Circulating androgen levels before and after oophorectomy in premenopausal and postmenopausal women[J]. *Climacteric*, 2019, 22(2): 169-174.
- [15] Xiong J L, Cai X Y, Zhang Z J, et al. Elucidating the estrogen-like effects and biocompatibility of the herbal components in the Qing' E Formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114735.
- [16] Tian S, Miao M S, Li X M, et al. Study on neuroendocrine-immune function of phenylethanoid glycosides of *Desertliving cistanche* herb in perimenopausal rat model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111884.
- [17] Ye Y, Zhang B, Li Y, et al. Yin Huo Tang, a traditional Chinese herbal formula, relieves ovariectomy and empty bottle stimulation-induced menopause-like symptoms in mice[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 994642.
- [18] Eriksson H A. Different regulation of the concentration of estrogen receptors in the rat liver and uterus following ovariectomy[J]. *FEBS Lett*, 1982, 149(1): 91-95.
- [19] Long T, Yao J K, Li J, et al. Comparison of transitional vs surgical menopause on monoamine and amino acid levels in the rat brain[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 476: 139-147.
- [20] Ye Y, Liu C Z, Wang R, et al. A new animal model for menopausal transition: combination of ovariectomy and empty bottle stimulation[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(10): 840-844.
- [21] Zheng H X, Zhao Y, Xu Y, et al. Long-time Qingyan Formula extract treatment exerts estrogenic activities on reproductive tissues without side effects in ovariectomized rats and via active ER to ERE-independent gene regulation[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(12): 4032-4049.
- [22] Lan X Y, Yu H, Chen Q J, et al. Effect of liquiritin on neuroendocrine-immune network in menopausal rat model[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(10): 2665-2674.
- [23] Stute P, Ehrentraut S, Henneicke-Von Zepelin H H, et al. Gene expression analyses on multi-target mode of action of black cohosh in menopausal complaints—a pilot study in rodents[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2022, 305(1): 275-286.
- [24] 田 硕, 白 明, 苗明三, 杜仲叶总黄酮对围绝经期大鼠模型的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5386-5391.
- [25] Miningou N, Blackwell K T. The road to ERK activation: do neurons take alternate routes? [J]. *Cell Signal*, 2020, 68: 109541.
- [26] Liu Q, Wei F, Wang J, et al. Molecular mechanisms regulating natural menopause in the female ovary: a study based on transcriptomic data[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1004245.
- [27] Tabibzadeh S. Signaling pathways and effectors of aging[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26(1): 50-96.
- [28] Chowdhury M A R, An J, Jeong S. The pleiotropic face of CREB family transcription factors[J]. *Mol Cells*, 2023, 46(7): 399-413.
- [29] Khakha N, Khan H, Kaur A, et al. Therapeutic implications of phosphorylation- and dephosphorylation-dependent factors of cAMP-response element-binding protein (CREB) in neurodegeneration[J]. *Pharmacol Rep*, 2023, 75(5): 1152-1165.
- [30] Yin F, Yao J, Sancheti H, et al. The perimenopausal aging transition in the female rat brain: decline in bioenergetic systems and synaptic plasticity[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(7): 2282-2295.
- [31] Jaballah A, Soltani I, Bahia W, et al. The relationship between menopause and metabolic syndrome: experimental and bioinformatics analysis[J]. *Biochem Genet*, 2021, 59(6): 1558-1581.
- [32] Sheppard P A S, Puri T A, Galea L A M. Sex differences and estradiol effects in MAPK and Akt cell signaling across subregions of the hippocampus[J]. *Neuroendocrinology*, 2022, 112(7): 621-635.
- [33] Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, et al. The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis[J]. *J Biotechnol Biomed*, 2023, 6(1): 1-12.
- [34] 郭珊珊, 周晓辉, 王淑梅, 等. 固本安神方对绝经综合征模型大鼠的改善作用机制研究[J]. 中国药房, 2022, 33(19): 2364-2368.
- [35] Li N, Li J, Hao J, et al. Bilberry anthocyanin improves the serum cholesterol in aging perimenopausal rats via the estrogen receptor signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2019, 10(6): 3430-3438.