

艾附暖宫丸通过调控 MAPK/ERK 信号通路对寒凝血瘀型原发性痛经大鼠的影响

李玉兰¹, 赵娜², 王彦娇², 刘素军³, 聂晓博^{2*}

(1. 邢台市中医院, 河北 邢台 054001; 2. 石家庄医学高等专科学校, 河北 石家庄 050599; 3. 石家庄市第四医院, 河北 石家庄 050021)

摘要: 目的 探讨艾附暖宫丸对寒凝血瘀型原发性痛经 (PD) 大鼠 MAPK/ERK 信号通路的影响。方法 采用冰水浸泡法联合苯甲酸雌二醇和缩宫素建立寒凝血瘀 PD 模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、布洛芬组 (0.06 g/kg) 和艾附暖宫丸低、中、高剂量组 (0.36、0.72、1.44 g/kg), 每组 10 只; 另取 10 只正常饲养的大鼠为空白组, 各组大鼠灌胃给予相应剂量药物, 连续 6 d。给药前后, 分别对大鼠进行症候评分。末次给药后, 观察大鼠扭体反应, 取子宫组织测定平滑肌收缩最大张力和频率; ELISA 法检测子宫组织 PGF_{2α}、IL-6、TNF-α 水平; HE 染色观察子宫组织病理形态; 免疫荧光法观察子宫组织 HSP70 蛋白表达; Western blot 法检测大鼠子宫组织中 p38MAPK 和 ERK1/2 蛋白磷酸化表达。结果 与模型组比较, 艾附暖宫丸各剂量组寒凝血瘀型 PD 的症候评分降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 扭体次数减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 子宫组织中 HSP70 蛋白及 ERK1/2、p38MAPK 蛋白磷酸化表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 艾附暖宫丸中、高剂量组大鼠扭体潜伏期延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 子宫平滑肌收缩的最大强度和频率降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 子宫组织 PGF_{2α}、IL-6、TNF-α 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 艾附暖宫丸对大鼠实验性寒凝血瘀型 PD 有良好的改善作用, 其机制可能与抑制 MAPK/ERK 信号通路活化有关。

关键词: 艾附暖宫丸; 原发性痛经; 寒凝血瘀; MAPK/ERK 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3131-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.048

原发性痛经 (primary dysmenorrhea, PD) 是指经期前后或行经期间出现的下腹痉挛性疼痛, 常伴有头晕、恶心、呕吐、腹泻等症状^[1]。流行病学研究显示, 有超过 40% 的女性受到了痛经的困扰, 严重影响女性的正常生活^[2]。目前, 关于 PD 的发病机制尚不明确, 但多数研究认为 PD 的发生与女性体内前列腺素 E₂ (PGE₂) 和前列腺素 F_{2α} (PGF_{2α}) 的增多有关。所以, 临床多使用萘普生和布洛芬等非甾体抗炎类药物进行治疗, 但此类药物副作用大, 且只能缓解症状而无法预防及治疗^[3]。因此, 寻找相对安全有效的治疗方法尤为重要。中医药因其治疗 PD 具有疗效好、副作用小等优点显示出独特的优势。临床 PD 以寒凝血瘀证较为常见, 多以温经化瘀之法进行治疗。艾附暖宫丸以艾叶、香附为君药, 配伍吴茱萸、黄芪、当归等药, 具有理气活血、暖宫调经之效。既往研究发现 PD 的发生与 MAPK/ERK 信号通路密切相关^[4], 而艾附暖宫丸中的多种药物如吴茱萸、黄芪、当归等皆可对该通路发挥调节作用^[5-8], 因此本研究基于该信号通路探讨艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 的作用机制。

1 材料

1.1 药物 艾附暖宫丸 (水蜜丸, 规格 30 g/瓶, 用量每次 60 粒, 每天 2~3 次, 批号 20181023, 北京同仁堂制药有限公司); 布洛芬缓释胶囊 (规格 0.4 g/粒, 批号 18110645, 中美天津史克制药有限公司); 苯甲酸雌二醇 (规格 2 mg/mL, 批号 20201015, 上海通用药业股份有限公司); 缩宫素注射液 (规格 10 U/mL, 批号 09190102, 上海禾丰制药有限公司)。

1.2 动物 健康 SD 大鼠, SPF 级, 雌性, 体质量 180~220 g, 购自河北伊维沃生物科技有限公司, 饲养于河北中医药大学实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (冀) 2019-008]。大鼠饲养于独立通风笼盒中, 恒定温度及相对湿度, 12 h 白昼, 12 h 黑夜, 以灭菌标准大鼠饲料和去离子水饲养。动物实验经河北中医药大学伦理委员会批准 (伦理批准号 DWLL202311006)。

1.3 试剂 热休克蛋白 (HSP70) 单克隆抗体、ERK1/2 单克隆抗体、ERK1 (phospho T202 + Y204) + ERK2 (phospho T185 + Y187) 单克隆抗体、p38MAPK alpha (pT180/pY182) 单克隆抗体 (货号 ab2787、ab184699、

收稿日期: 2024-04-03

基金项目: 河北省卫健委医学科研项目 (20200150)

作者简介: 李玉兰 (1984—), 女, 主管中药师, 从事中药临床及基础研究。Tel: 13215365448, E-mail: yulan202212@163.com

* 通信作者: 聂晓博 (1984—), 女, 硕士, 副教授, 从事中药生殖药理研究。Tel: 13722868452, E-mail: 251482424@qq.com

ab278538、ab126453, 英国 Abcam 公司); p38MAPK 单克隆抗体 (货号 9212, 美国 Cell Signaling Technology 公司); PGF_{2α} ELISA 检测试剂盒 (批号 A21018234, 上海众华生物科技有限公司); IL-6、TNF-α ELISA 检测试剂盒 (货号 C12PDB、C06PZB, 北京北方生物技术研究所有限公司); TRIzol 试剂盒、SYBR 预混试剂盒 (批号 10296010、A25742, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.4 仪器 通用型电泳仪、165-8001 小型垂直电泳槽、GelDoc2000 型凝胶成像仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司]; IX73-U 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BL-420E 型生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 采用冰水浸泡法联合苯甲酸雌二醇和缩宫素建立寒凝血瘀 PD 模型^[9]。将大鼠每天固定时间浸入直径 40 cm 水深 15~20 cm 内壁光滑的塑料圆筒中, 冰水温度为 0~1 ℃, 浸泡 20 min, 每天 1 次, 连续 2 周。同时, 每天皮下注射苯甲酸雌二醇, 第 1 天和第 12 天每只注射 0.8 mg, 第 2~11 天每只注射 0.4 mg。末次给药 1 h 后腹腔注射缩宫素, 每只 2 U。寒凝血瘀判断标准为: 寒战、蜷缩少动、耸毛、呼吸急促、爪部呈暗紫色、耳部为暗红色、粪便不成型。按照表 1 对大鼠进行症候评分, 得分 ≥7 分为造模成功^[9]。痛经判断标准为观察大鼠扭体反应, 即大鼠腹部肌肉收缩, 伴躯体伸展和后肢伸展。

表 1 寒凝血瘀证大鼠的症候评分

症状程度	常见症状						
	活动度	进食量	体质量增长	毛发	小便	粪便	脉络瘀血 (耳郭、牙龈、爪甲、肛周)
轻	喜聚集 活动量减少 无竖毛 寒战	进食量减少<30%	增长缓慢 (每天 1~1.5 g)	略显散乱 尚有光泽	垫料略湿 需 3 天更换 1 次	排便量增多 形态正常	1 个部位出现少量瘀血
中	喜聚集 蜷缩少动 弓背竖毛 偶发寒战	30% ≤ 进食量减少 < 60%	增长缓慢 (每天 0.5~1 g)	散乱 暗淡无光	垫料较湿 需 2 天更换 1 次	排便量增多 质地软, 尚能成形	2~3 个部位出现瘀血
重	喜聚集 蜷缩不动 弓背竖毛 持续寒战	进食量减少 ≥ 60%	增长缓慢甚至减轻 (每天 < 0.5 g)	散乱 毛色枯槁	垫料湿 需每天更换 1 次	排便量增多 质地软, 不成形	3 个以上部位出现明显瘀血

注: 表中每项症状根据轻、中、重程度分别赋为 1、2、3 分, 各项得分相加的总分为寒凝血瘀证大鼠的症候评分。

2.2 分组与给药 造模成功后, 按大鼠中医症候评分随机分为模型组、布洛芬组和艾附暖宫丸低、中、高剂量组, 每组 10 只; 另取 10 只正常饲养的大鼠为空白组。所有大鼠自造模第 7 天起灌胃给予相应剂量药物, 每天 1 次, 连续 6 d。其中空白组及模型组大鼠给予蒸馏水; 布洛芬组给予 0.06 g/kg 布洛芬; 艾附暖宫丸低、中、高剂量组分别给予 0.36、0.72、1.44 g/kg (相当于临床人剂量的 0.5、1、2 倍) 艾附暖宫丸, 给药容量均为 10 mL/kg。

2.3 检测指标 末次给药后对大鼠进行症候评分, 观察大鼠扭体反应。快速处死后摘取子宫, 部分用于子宫平滑肌收缩运动检测; 部分用 4% 多聚甲醛液固定; 其余分装于无菌离心管中, 于 -80 ℃ 低温保存。

2.3.1 观察大鼠扭体反应 从注射缩宫素开始计时, 根据 Schmauss 等^[10]提出的标准确定大鼠的扭体反应, 身体向左或右偏斜, 后肢伸展, 后爪背屈, 躯体伸展伴频繁地盆骨侧向旋转, 腹部肌肉收缩。计算 20 min 内各组大鼠扭体潜伏时间及扭体次数。

2.3.2 生物机能实验系统检测大鼠子宫平滑肌收缩幅度、频率 大鼠快速处死后取子宫, 在洛氏液中剪下左侧 2 cm 长的子宫段, 剥离脂肪及结缔组织, 下端固定于麦氏浴槽底部的挂钩上, 上端与张力换能器相连。向浴槽中注入 20 mL 洛氏液, 并通以 95% O₂ 和 5% CO₂, 调节温度保持在

(37±0.5) ℃, 以生物机能系统描记子宫收缩张力曲线。除空白组外, 其他各组分别向浴槽中加入缩宫素使终浓度为 1 U/mL; 空白组滴加等剂量生理盐水。待子宫收缩运动稳定后, 记录子宫平滑肌收缩运动 10 min, 并计算子宫收缩幅度和频率。

2.3.3 ELISA 法检测子宫组织 PGF_{2α}、IL-6、TNF-α 水平 用生理盐水冲洗大鼠子宫, 干燥并称量。用预冷的生理盐水按质量体积比 1:9 的比例制备组织匀浆, 离心后取上清, 按照试剂盒说明书分别检测 PGF_{2α}、IL-6、TNF-α 水平。

2.3.4 HE 染色观察子宫组织病理改变 将子宫组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 梯度脱水, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 滴加苏木素染色, 再用伊红染色, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明化, 滴加中性树脂, 加盖玻片封片。24 h 后于显微镜下观察并拍照。参照文献 [11] 方法, 对子宫的病理形态特征进行评分, 无病理改变的子宫计为 0 分, 子宫内膜变性坏死计为 1 分, 固有层水肿计为 2 分, 固有层腺体、血管新增计为 3 分, 固有层炎性细胞浸润计为 4 分。

2.3.5 免疫荧光法检测子宫组织中 HSP70 蛋白表达 将子宫组织于 4% 多聚甲醛中固定, 以 30%、50%、70%、85%、95% 乙醇和正丁醇梯度洗脱, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡后置干载玻片上, 以枸橼酸液修复, 室温封闭 1 h, 滴加 HSP70

抗体, 4℃孵育过夜, 滴加荧光二抗, 避光孵育1h, 滴加DAPI避光孵育15min, 封片后置于荧光显微镜下观察。

2.3.6 Western blot法检测子宫组织中ERK1/2及p38MAPK蛋白磷酸化表达 取冻存的子宫组织500mg, 加入1mL细胞裂解液, 匀浆, 离心后取上清。取50μg蛋白样品上样, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 然后转移到PVDF膜上, 再加入5% BSA于室温下封闭2h。将相应一抗稀释至相应浓度, 浸没PVDF膜, 4℃孵育过夜。用PBST洗膜后, 加入二抗稀释液, 室温孵育1h。洗膜后用化学发光试剂显影, 用凝胶成像处理系统进行灰度分析, 以磷酸化蛋白的灰度值与对应的总蛋白灰度值的比值表示磷酸化表达。

2.4 统计学分析 通过SPSS 26.0软件进行处理, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 先行方差齐性检验, 若方差齐则组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型PD大鼠中医证候评分的影响 由表2可知, 造模后, 模型组大鼠中医证候评分高于空白组 ($P < 0.01$), 说明造模成功; 给药后, 艾附暖宫丸各剂量组证候评分均低于给药前 ($P < 0.05, P < 0.01$), 各给药组证候评分均低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表2 艾附暖宫丸给药前后对寒凝血瘀型PD大鼠中医证候评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	证候评分/分	
	给药前	给药后
空白组	1.3±1.3	1.2±1.2
模型组	15.6±2.0 ^{△△}	16.2±2.0 ^{△△}
布洛芬组	15.9±2.6	13.2±3.4*
艾附暖宫丸低剂量组	16.1±2.5	13.0±3.1*#
艾附暖宫丸中剂量组	16.5±2.5	11.4±2.6***
艾附暖宫丸高剂量组	16.2±1.3	9.5±3.4***

注: 与空白组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同组给药前比较, # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 。

3.2 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型PD大鼠扭体反应的影响 由表3可知, 除空白组外, 其余各组大鼠均出现扭体反应。与模型组比较, 艾附暖宫丸低剂量组大鼠的扭体潜伏期无明显变化 ($P > 0.05$), 但扭体次数减少 ($P < 0.05$); 中、高剂量组扭体潜伏期均延长 ($P < 0.05, P < 0.01$), 扭体次数均减少 ($P < 0.01$)。

表3 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型PD大鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	扭体潜伏期/min	扭体次数/次
空白组	—	—
模型组	5.14±0.85	20.2±3.2
布洛芬组	6.35±0.76**	11.5±3.3**
艾附暖宫丸低剂量组	5.78±0.76	16.5±3.6*
艾附暖宫丸中剂量组	6.06±0.85*	14.4±3.4**
艾附暖宫丸高剂量组	6.19±0.92**	13.2±3.0**

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型PD大鼠子宫平滑肌收缩幅度和频率的影响 由图1、表4可知, 与空白组比较, 模型组大鼠子宫收缩最大张力增加 ($P < 0.01$), 子宫收缩频率也升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 艾附暖宫丸中、高剂量组大鼠子宫收缩最大张力和收缩频率均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 低剂量组大鼠子宫收缩最大张力和收缩频率无明显变化 ($P > 0.05$)。

表4 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型PD大鼠子宫平滑肌收缩幅度和频率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	子宫收缩最大张力/g	子宫收缩频率/(次·10 min ⁻¹)
空白组	3.9±0.5	6.6±1.1
模型组	5.2±0.7 ^{△△}	8.5±1.7 ^{△△}
布洛芬组	3.8±0.5**	7.0±1.4*
艾附暖宫丸低剂量组	4.9±0.8	8.2±2.0
艾附暖宫丸中剂量组	4.5±0.6*	7.1±1.4*
艾附暖宫丸高剂量组	4.3±0.7**	7.0±1.2*

注: 与空白组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

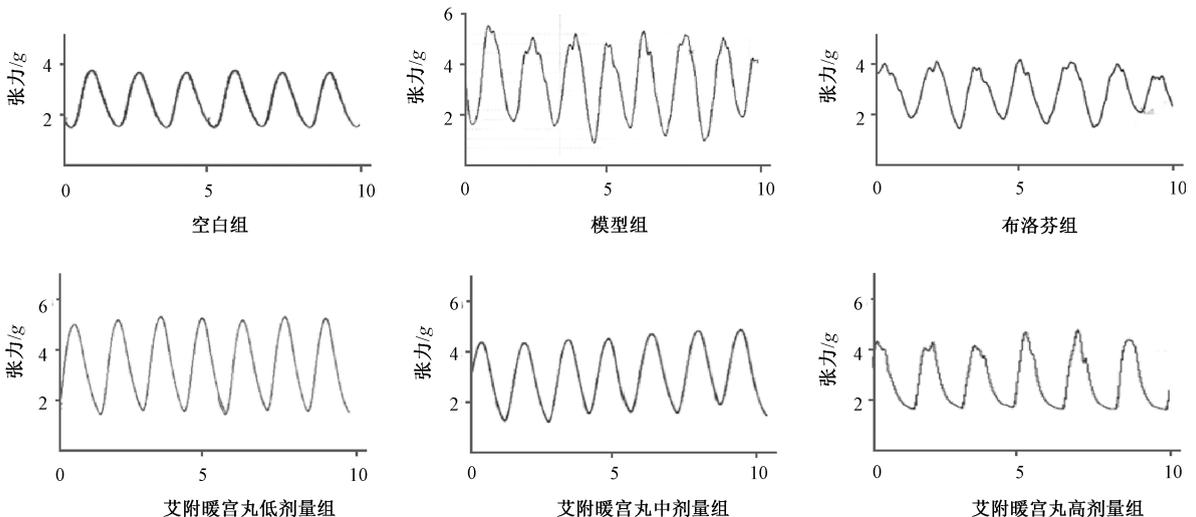


图1 各组大鼠子宫平滑肌收缩幅度和频率结果图

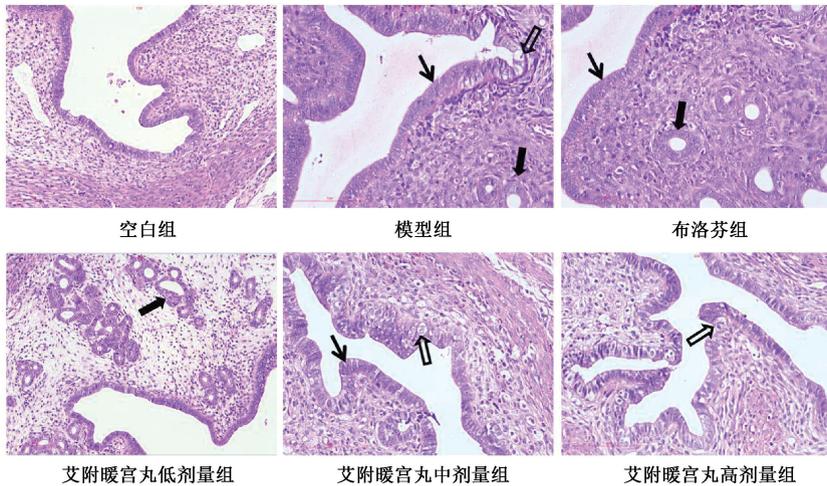
3.4 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织 $PGF_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α 水平的影响 由表 5 可知,与空白组比较,寒凝血瘀型 PD 模型大鼠子宫组织 $PGF_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α 水平均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,艾附暖宫丸中、高剂量组大鼠子宫组织 $PGF_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),低剂量组无明显变化 ($P>0.05$)。

表 5 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织 $PGF_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α 水平的影响 (pg/mg prot, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	$PGF_{2\alpha}$	IL-6	TNF- α
空白组	4.9±1.3	17.6±2.3	18.8±3.8
模型组	7.7±1.4 ^{△△}	23.3±1.6 ^{△△}	23.7±2.9 ^{△△}
布洛芬组	4.6±1.4 ^{**}	18.3±1.6 ^{**}	18.1±3.3 ^{**}
艾附暖宫丸低剂量组	7.0±1.2	21.8±1.9	22.0±3.1
艾附暖宫丸中剂量组	6.3±1.5 [*]	21.2±2.1 [*]	20.8±2.4 [*]
艾附暖宫丸高剂量组	5.9±1.7 ^{**}	19.7±2.0 ^{**}	20.2±3.7 [*]

注:与空白组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

3.5 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织病理形态



注:黑色细箭头指示高柱状上皮细胞,白色空心箭头指示细胞空泡变性,黑色粗箭头指示腺体。

图 2 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织病理形态的影响 ($\times 200$)

3.6 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织中 HSP70 表达的影响 由图 3、表 7 可知,空白组大鼠子宫组织中仅有少量 HSP70 (显红色荧光) 的表达;HSP70 在模型组大鼠子宫内膜中有大量的表达,肌层中也有表达。与空白组比较,模型组大鼠子宫组织中 HSP70 阳性率升高 ($P<0.01$)。艾附暖宫丸低剂量组大鼠子宫内膜中 HSP70 也呈高表达,中剂量组表达量减少,高剂量组则没有明显表达。与模型组比较,各给药组大鼠子宫组织中 HSP70 阳性率均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.7 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织中 ERK1/2 及 p38MAPK 蛋白磷酸化表达的影响 由图 4、表 8 可知,模型组大鼠子宫组织中 ERK1/2 及 p38MAPK 蛋白磷酸化表达均高于空白组 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠子宫组织 ERK1/2 及 p38MAPK 蛋白磷酸化表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

的影响 由图 2、表 6 可知,空白组大鼠子宫内膜被覆单层柱状上皮细胞,排列整齐,固有层内可见腺体和血管,未见明显炎症细胞浸润;与空白组比较,模型组大鼠子宫内膜上皮细胞呈高柱状,有空泡变性,固有层腺体数目增多,未见明显炎症细胞浸润,子宫组织病理评分升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组柱状上皮细胞形态改善,中、高剂量组大鼠子宫固有层腺体减少,大鼠子宫组织病理评分有降低趋势,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 6 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织病理评分的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	子宫组织病理评分/分
空白组	0.2±0.4
模型组	2.6±0.9 ^{△△}
布洛芬组	1.8±1.1
艾附暖宫丸低剂量组	2.2±1.1
艾附暖宫丸中剂量组	1.8±1.1
艾附暖宫丸高剂量组	1.4±0.9

注:与空白组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

表 7 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织中 HSP70 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	HSP70 阳性率/%
空白组	0.062±0.005
模型组	0.151±0.011 ^{△△}
布洛芬组	0.117±0.026 [*]
艾附暖宫丸低剂量组	0.120±0.018 [*]
艾附暖宫丸中剂量组	0.101±0.012 ^{**}
艾附暖宫丸高剂量组	0.082±0.009 ^{**}

注:与空白组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

4 讨论

中医理论认为 PD 的发生通常与胞宫、体质和气血等因素相关,气血阻滞胞宫,不通则痛^[12]。临床 PD 以寒凝血瘀型较为常见,因此多用活血化瘀、温经散寒之药进行治疗。艾附暖宫丸以艾叶、香附,两者味辛,皆入肝脾经,

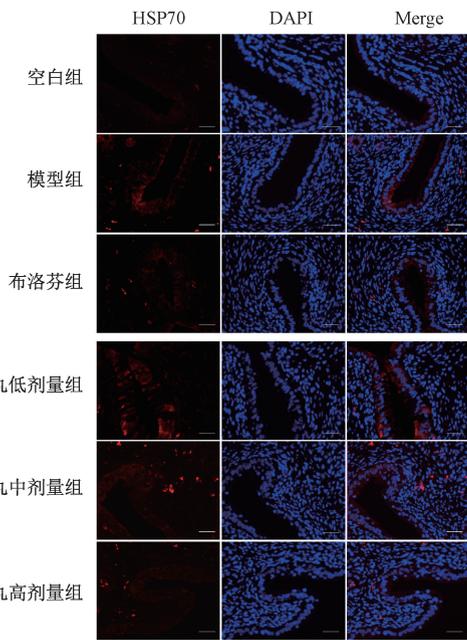
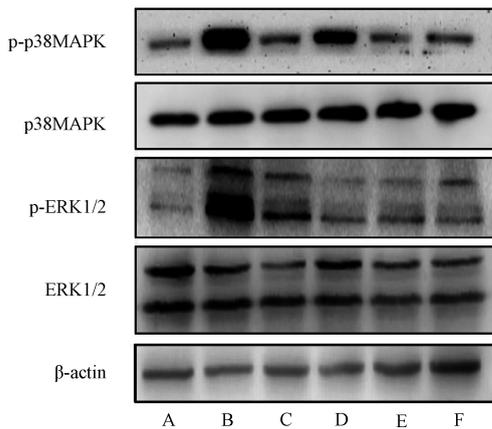


图3 各组大鼠子宫组织中 HSP70 蛋白免疫荧光染色 (×400)



注: A 为空白组, B 为模型组, C 为布洛芬组, D~F 为艾附暖宫丸低、中、高剂量组。

图4 各组大鼠子宫组织中 ERK1/2 及 p38MAPK 磷酸化蛋白电泳图

表8 艾附暖宫丸对寒凝血瘀型 PD 大鼠子宫组织中 ERK1/2 及 p38MAPK 蛋白磷酸化表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-ERK1/2/ERK1/2	p-p38MAPK/p38MAPK
空白组	0.36±0.04	0.49±0.12
模型组	1.11±0.27 ^{△△}	1.32±0.27 ^{△△}
布洛芬组	0.88±0.28	0.79±0.26 ^{**}
艾附暖宫丸低剂量组	0.63±0.11 ^{**}	0.92±0.17 [*]
艾附暖宫丸中剂量组	0.66±0.06 ^{**}	0.61±0.13 ^{**}
艾附暖宫丸高剂量组	0.45±0.17 ^{**}	0.47±0.10 ^{**}

注: 与空白组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

相须使用共奏调经止痛之效; 臣以吴茱萸、肉桂以温经散寒止痛; 佐以当归、川芎、白芍以行气活血, 黄芪、地黄

以滋阴益气, 配伍续断增强活血通经之功。

痛经是由于子宫平滑肌痉挛收缩所引起的疼痛。本研究发现模型组大鼠子宫平滑肌收缩的最大张力和频率均升高, 且有明显频繁的扭体反应; 而艾附暖宫丸干预可以明显抑制子宫平滑肌的收缩, 缓解疼痛, 初步证实本药具有治疗痛经的作用。

正常情况下, HSP70 在细胞内表达较低, 位于细胞浆中; 而在体外环境或体内病理应激条件下, 可诱导 HSP70 的高表达, 并且会包围在核仁附近, 其作用主要为提高生物体的抗应激能力^[13]。中医认为, 寒为阴邪而主收引, 其性凝滞, 受寒后可致气血不通, 不通则痛, 更易引起行经腹痛, 故而临床 PD 以寒凝血瘀型较为常见。在制备寒凝血瘀型痛经模型时, 需突出“寒”的这个病因, 故而本研究采用冰水刺激的方式。李世泽等^[14]发现, 冷刺激能够诱导机体 HSP70 的表达。本研究发现模型大鼠子宫内膜 HSP70 呈高表达, 说明子宫处于应激状态。而给予艾附暖宫丸干预后, 可使子宫组织中 HSP70 表达降低, 表现出抗应激的作用。

目前, 关于 PD 发生的具体机制尚不清楚, 但研究发现 MAPK 信号通路是参与调控 PD 发生的重要通路^[15]。MAPK 信号通路是将信号从细胞表面传入细胞核中的重要传递者, 包括 ERK、JNK、p38、BMK1 亚型, 参与细胞生长、分化、应激、炎症等重要生理过程^[16]。行经时, 腹腔微环境脆弱, 为了祛除感染因子, 防止微生物渗透, 子宫内膜组织中 IL-6、TNF- α 等细胞因子流入增多, 发生炎症反应^[17]。而与正常女性相比, 痛经女性 IL-6、TNF- α 分泌更多^[18]。当 IL-6 等细胞因子与细胞膜上的酪氨酸激酶受体相结合时, 活化的 MEK 进一步与 ERK 结合, 激活 ERK 的磷酸化。磷酸化的 ERK 促进核转录因子- κ B (NF- κ B) 转移到细胞核与 COX-2 启动位点相结合, 参与调控 COX-2 基因表达^[19]。COX 是 PGs 合成过程中的限制速率酶, 参与调控 PGF_{2 α} 的合成。而 PGF_{2 α} 是引起 PD 发生的重要介质, 一方面 PGF_{2 α} 参与子宫和弓状血管的收缩, 限制血流, 导致厌氧物质的积累; 另一方面 PGF_{2 α} 作用于神经感受器, 降低疼痛阈值, 刺激疼痛发生^[20]。既往研究显示, 当归多糖能够通过下调 MAPK/ERK 信号通路改善大鼠的脑缺血再灌注损伤^[5], 吴茱萸中主要成分吴茱萸碱、川芎中的主要成分川芎嗪以及黄芪中的多糖成分等均对此通路有拮抗作用^[6-10]。因此推测, 艾附暖宫丸抗痛经、改善局部炎症环境可能与下调 MAPK/ERK 信号通路有关。

本研究发现, 艾附暖宫丸能够降低模型大鼠子宫组织中 PGF_{2 α} 、IL-6、TNF- α 水平, 下调 p38MAPK、ERK 蛋白磷酸化水平, 说明艾附暖宫丸治疗痛经的机制可能与拮抗 MAPK/ERK 信号通路有关。

参考文献:

[1] Guimarães I, Póvoa A M. Primary dysmenorrhea: assessment and treatment [J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2020, 42(8): 501-507.

- [2] Ju H, Jones M, Mishra G. The prevalence and risk factors of dysmenorrhea[J]. *Epidemiol Rev*, 2014, 36: 104-113.
- [3] Oladosu F A, Tu F F, Hellman K M. Nonsteroidal antiinflammatory drug resistance in dysmenorrhea: epidemiology, causes, and treatment[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 218(4): 390-400.
- [4] Tong H, Yu M, Fei C, et al. Bioactive constituents and the molecular mechanism of *Curcuma Rhizoma* in the treatment of primary dysmenorrhea based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153-558.
- [5] 汤定中, 余春丽, 罗国君. 基于 MAPK/ERK 信号通路探讨当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. *贵州医药*, 2021, 45(7): 1011-1014; 1019.
- [6] 吴雍真, 李倩, 管连城, 等. 黄芪多糖调节维生素 D/p38MAPK/ERK 信号通路改善庆大霉素致肾小管上皮细胞损伤的机制[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(10): 2312-2315.
- [7] 千维娜, 李治, 方瑜, 等. 吴茱萸碱通过 MAPK 信号通路抑制人胃癌细胞的体外实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(16): 1535-1542.
- [8] Zhang Y, Li D D, Jia Z J, et al. Zhizi-Chuanxiong herb pair alleviates atherosclerosis progression in ApoE^{-/-} mice by promoting the methylation of FGFR3 to inhibit MAPK/ERK-mediated apoptosis [J]. *J ethnopharmacol*, 2023, 319 (P1): 117188.
- [9] 许咏思, 嵇波, 胡琅琳, 等. 寒凝血瘀证痛经大鼠模型制备和评价方法述评[J]. *中医药学报*, 2013, 41(4): 25-30.
- [10] Schmauss C, Yaksh T L. *In vivo* studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1984, 228(1): 1-12.
- [11] 王乙钦, 陈凌煜, 莫彬倩, 等. 穴位埋线对原发性痛经大鼠子宫组织核苷酸结合寡聚化结构域受体炎性小体的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(7): 481-485.
- [12] 董玉洁, 蒋沅岐, 刘毅, 等. 中医药治疗痛经的研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3842-3851.
- [13] 湛秋华, 朱清仙. 寒冷应激对机体免疫功能影响分析[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2012, 52(5): 84-86; 95.
- [14] 李士泽, 任宝波, 杨焕民, 等. 不同强度冷应激对大鼠肌肉、脾脏和肝脏中 HSP70 表达的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(2): 235-238.
- [15] Zhang S, Lai X, Wang X, et al. Deciphering the pharmacological mechanisms of Guizhi-Fuling Capsule on primary dysmenorrhea through network pharmacology[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 3(12): 613104.
- [16] Yue J, López J M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2346.
- [17] Barcikowska Z, Rajkowska-Labon E, Grzybowska M E, et al. Inflammatory markers in dysmenorrhea and therapeutic options [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(4): 1191.
- [18] Ma H, Hong M, Duan J, et al. Altered cytokine gene expression in peripheral blood monocytes across the menstrual cycle in primary dysmenorrhea: a case-control study [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55200.
- [19] Lin C C, Hsieh H L, Shih R H, et al. Up-regulation of COX-2/PGE2 by endothelin-1 via MAPK-dependent NF-κB pathway in mouse brain microvascular endothelial cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 11(1): 8.
- [20] Ferries-Rowe E, Corey E, Archer J S. Primary dysmenorrhea: diagnosis and therapy [J]. *Obstet Gynecol*, 2020, 136(5): 1047-1058.