

·实验研究·

本文引用:刘灿纹,唐 标. 桂枝茯苓丸对原发性痛经大鼠子宫组织 NF- κ B/COX-2/PGF_{2 α} 通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 873-877.

桂枝茯苓丸对原发性痛经大鼠子宫组织 NF- κ B/COX-2/PGF_{2 α} 通路的影响

刘灿纹,唐 标*

(湖南中医药大学医学院,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕目的 观察桂枝茯苓丸对原发性痛经(primary dysmenorrhea, PD)大鼠子宫组织核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)/环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)/前列腺素 F_{2 α} (prostaglandin F_{2 α} , PGF_{2 α})通路的影响,探讨桂枝茯苓丸干预 PD 的机制。方法 SD 雌性大鼠随机分为正常组、模型组、桂枝茯苓丸组、布洛芬组,每组 10 只。采用苯甲酸雌二醇联合缩宫素建立 PD 大鼠模型。桂枝茯苓丸组、布洛芬组分别灌胃桂枝茯苓丸 310 mg/kg、布洛芬 1 mg/kg;正常组、模型组均灌胃生理盐水 10 mL/kg。灌胃 10 d 后,第 11 天记录各组大鼠扭体次数和潜伏期;观察子宫形态改变;ELISA 法检测子宫组织中 PGF_{2 α} 含量;Western blot 检测子宫组织 COX-2、NF- κ B 和磷酸化的 NF- κ B 的水平。结果 与正常组相比,模型组大鼠出现扭体反应,扭体次数显著增多($P<0.01$),扭体潜伏期显著延长($P<0.01$),子宫内膜大范围剥脱并有较严重的水肿,子宫组织 PGF_{2 α} 含量以及 COX-2、NF- κ B 以及磷酸化的 NF- κ B 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,桂枝茯苓丸组大鼠扭体次数显著减少($P<0.01$),扭体潜伏期显著延长($P<0.01$),子宫内膜剥脱少见且水肿程度较轻,子宫组织 PGF_{2 α} 含量、COX-2 和磷酸化的 NF- κ B 水平显著降低($P<0.01$)。结论 桂枝茯苓丸能有效干预 PD 大鼠,其作用机制可能与抑制 PD 大鼠子宫组织 NF- κ B/COX-2/PGF_{2 α} 通路有关。

〔关键词〕 桂枝茯苓丸;原发性痛经;前列腺素 F_{2 α} ;核因子 κ B;环氧化酶-2

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.06.001

Effect of Guizhi Fuling Pill on NF- κ B/COX-2/PGF_{2 α} pathway in uterine tissue of rats with primary dysmenorrhea

LIU Canwen, TANG Biao*

(Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 **Objective** To observe the effect of Guizhi Fuling Pill on nuclear factor- κ B (NF- κ B)/cyclooxygenase-2 (COX-2)/prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) pathway in uterine tissue of rats with primary dysmenorrhea (PD), so as to explore the mechanism of Guizhi Fuling Pill on PD. **Methods** SD female rats were randomly divided into normal group, model group, Guizhi Fuling Pill group, and ibuprofen group, with ten rats in each group. The PD rats model was established by estradiol benzoate and oxytocin. Guizhi Fuling Pill group and ibuprofen group were gavaged with Guizhi Fuling Pill 310 mg/kg, ibuprofen 1 mg/kg; normal group and model group were gavaged with normal saline 10 mL/kg. After 10 days of intragastric administration of Guizhi Fuling Pill for 10 days, the number of writhing and latency of rats in each group were recorded on the 11th day; the changes of rat uterus were observed; the level of PGF_{2 α} was detected by ELISA; the levels of COX-2, NF- κ B and phosphorylated NF- κ B were analyzed by Western blot. **Results** Compared with normal group, rats in model group showed writhing reaction, the number of writhing of rats was significantly increased ($P<0.01$), and the writhing latency was significantly prolonged ($P<0.01$), extensive endometrium peeling and severe edema,

〔收稿日期〕 2021-08-10

〔基金项目〕 湖南省中医药科研计划项目(2021215)。

〔第一作者〕 刘灿纹,女,硕士研究生,研究方向:中药药理研究。

〔通信作者〕 *唐 标,男,博士,副教授, E-mail: njtangbiao@126.com。

and the content of $\text{PGF}_{2\alpha}$, COX-2, NF- κ B and phosphorylated NF- κ B in uterine tissue of rats was significantly increased ($P<0.01$). Compared with model group, the number of writhing of rats in Guizhi Fuling Pill group was significantly reduced ($P<0.01$), and the writhing latency was significantly prolonged ($P<0.01$), endometrial exfoliation was less frequent and edema was less severe, and the content of $\text{PGF}_{2\alpha}$, COX-2 and phosphorylated NF- κ B in uterine tissue was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Guizhi Fuling Pill has a significant effect on the intervention of PD rats, and mechanism of action may be related to the inhibition of NF- κ B/COX-2/ $\text{PGF}_{2\alpha}$ pathway in PD rats uterine tissue.

[**Keywords**] Guizhi Fuling Pill; primary dysmenorrhea; prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$; nuclear factor κ -B; cyclooxygenase-2

原发性痛经(primary dysmenorrhea, PD)是一种以行经前或行经期剧烈下腹痛为主要症状的妇科疾病,严重影响患者的日常学习、工作和生活^[1]。前列腺素(prostaglandin, PG)过多的合成和释放是PD的主要发病机制,其中前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ (prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$)的释放导致子宫强烈收缩,造成组织缺血缺氧,引起疼痛^[2-3]。环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在 PG 合成过程中发挥关键调控作用,其可催化花生四烯酸转换为 PG,加剧子宫组织收缩,诱发疼痛^[4-5]。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是调控 COX-2 生成的关键因子,NF- κ B被磷酸化激活后转位入核,调控 COX-2 的表达,研究表明 NF- κ B/COX-2 通路是调控 PG 合成的关键通路,在 PD 中发挥了重要作用^[6-7]。

桂枝茯苓丸出自医圣张仲景所著《金匱要略》,是治疗妇科疾病的经典方剂,由桂枝、桃仁、茯苓、牡丹皮、赤芍组成,治疗痛经疗效确切^[8-10],但是其治疗 PD 的机制还不明确。本实验通过建立 PD 大鼠模型,在桂枝茯苓丸的干预下,观察大鼠子宫组织中NF- κ B、COX-2、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的变化,从 NF- κ B/COX-2/ $\text{PGF}_{2\alpha}$ 通路探讨桂枝茯苓丸干预 PD 的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂

1.1.1 实验动物 成年雌性 SPF 级 SD 大鼠 40 只,动物合格证号:SYXK(湘)2019-0009,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,2~3 月龄,体质量(220 ± 20) g。方案获得湖南中医药大学伦理委员会的批准(LL2020041208)。

1.1.2 药品、主要试剂与仪器 桂枝茯苓丸(国药准字:Z20027562,批号:170103,成都九芝堂金鼎药业有限公司);布洛芬(国药准字:H10900089,批号:13050442,天津史克制药有限公司);苯甲酸雌二醇(国药准字H12020529,批号:08070710,天津

金耀药业有限公司);缩宫素(批号:A605015,生工生物工程股份有限公司);NF- κ B 抗体(批号:#4746)、磷酸化的 NF- κ B 抗体(批号:#3033)、COX-2 抗体(批号:12282)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; β -actin 鼠抗单克隆抗体(批号:A5316,美国 Sigma 公司);PVDF 膜(批号:ISEQ00010)、山羊抗兔二抗(批号:AP132P)、山羊抗鼠二抗(批号:AP124P)均购自德国 Merck Millipore 公司; $\text{PGF}_{2\alpha}$ 试剂盒(批号:516011,美国 Cayman Chemical 公司);TGL20M 台式高速冷冻离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);BioTek Cytation 5 细胞成像多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组、模型制备及给药 采用随机数字表法将大鼠分为正常组、模型组、布洛芬组和桂枝茯苓丸组,10 只/组。参照前期研究^[11]通过注射苯甲酸雌二醇和缩宫素构建 PD 大鼠模型。苯甲酸雌二醇采用股部皮下注射,第 1 天 0.5 mg/只,第 2~9 天 0.2 mg/只,第 10 天 0.5 mg/只,共持续 10 d。第 11 天腹腔注射缩宫素 2 U/只。正常组注射生理盐水。缩宫素注射后出现扭体反应为模型成功的标准^[3-4,11]。桂枝茯苓丸组和布洛芬组均采用灌胃给药,从第 1 天开始,每天 1 次,连续 10 d,其中桂枝茯苓丸剂量为成人临床用量的等效剂量(310 mg/kg),布洛芬给药剂量参照前期研究为 1 mg/只^[4,7]。正常组及模型组灌胃 10 mL/kg 生理盐水。

1.2.2 扭体反应观察 缩宫素注射后,观察 30 min 内的扭体反应,记录扭体次数和潜伏期。腹部内凹收缩,后肢伸直为出现扭体反应;从缩宫素注射到开始出现扭体反应之间的间隔时间为扭体潜伏期^[3-4,7]。

1.2.3 HE 染色法观察子宫组织病理变化 参照前期研究^[3-4,7],对大鼠进行麻醉后,在冰盘上迅速取出各组大鼠子宫组织,取各组大鼠同侧同位段子宫组织,4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋切片后进行 HE

染色,封片后于显微镜下拍照并观察子宫内膜形态的改变。

1.2.4 ELISA 法检测子宫组织中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量 按照试剂盒说明书操作,参照前期研究^[3-4,7],检测各组子宫匀浆上清中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的浓度和各组子宫匀浆上清蛋白的浓度,并以子宫匀浆上清的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量与 BCA 蛋白定量子宫匀浆上清的蛋白含量的比值表示 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的相对含量。

1.2.5 Western blot 检测子宫组织 COX-2、磷酸化的 NF- κ B 和 NF- κ B 水平 参照前期研究^[3-4,7],每组随机抽取 5 只大鼠,提取各组子宫组织蛋白,蛋白定量后配平,蛋白变性后,经电泳、转膜、封闭。将膜与一抗抗体磷酸化的 NF- κ B(1:1000)、NF- κ B(1:1000)、COX-2(1:1000)、 β -actin(1:5000)于 4℃ 孵育过夜,洗膜后,与二抗(1:10 000)于室温摇床上孵育 60 min。ECL 显色曝光,磷酸化的 NF- κ B p65、NF- κ B p65、COX-2 蛋白以 β -actin 为内参蛋白,用 Quantity One1-D(4.6.7)软件测定光密度(optical density, OD)值,计算目的蛋白与内参蛋白 OD 的比值,以此表示蛋白相对含量。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 进行统计分析,所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,数据进行正态性、方差齐性检测,若符合正态性和方差齐性检验,两样本均数间的比较采用 *t* 检验,多个样本间的比较采用单因素方法分析;对于不符合正态性和方差齐性检验的,两样本均数间的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,多个样本间的比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 桂枝茯苓丸对 PD 大鼠扭体反应的影响

正常组大鼠无扭体反应。与正常组比较,模型组出现扭体反应,且扭体次数增多,潜伏期延长($P < 0.01$);桂枝茯苓丸组和布洛芬组大鼠扭体次数显著减少,扭体潜伏期延长($P < 0.01$);桂枝茯苓丸组与布洛芬组大鼠扭体次数和扭体潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 1。

2.2 桂枝茯苓丸对 PD 大鼠子宫内膜组织形态的影响

正常组大鼠子宫内膜完整,无水肿等病理形态改变;模型组大鼠子宫有大范围内膜剥脱和水肿;桂

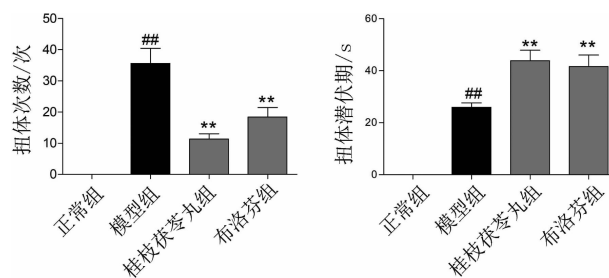


图 1 各组大鼠扭体次数和潜伏期比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

枝茯苓丸组和布洛芬组大鼠子宫内膜剥脱和水肿程度较轻。详见图 2。

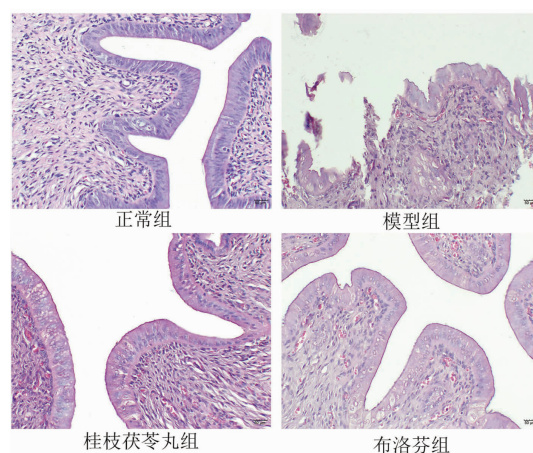


图 2 各组大鼠子宫内膜形态(HE, $\times 200$)

2.3 桂枝茯苓丸对 PD 大鼠子宫 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量的影响

与正常组相比,模型组大鼠子宫 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,桂枝茯苓丸组和布洛芬组大鼠子宫 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量显著降低($P < 0.01$);桂枝茯苓丸组与布洛芬组大鼠子宫 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 3。

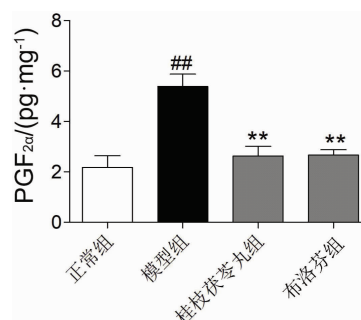


图 3 各组大鼠子宫 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

2.4 桂枝茯苓丸对 PD 大鼠子宫 COX-2 水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠子宫 COX-2 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,桂枝茯苓丸组和布洛芬组大鼠子宫组织 COX-2 水平显著降低($P < 0.01$);

桂枝茯苓丸组与布洛芬组大鼠子宫组织 COX-2 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见图 4。

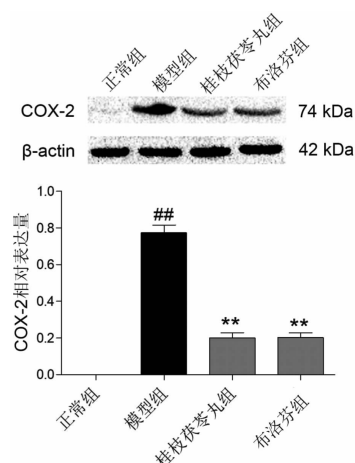


图 4 各组大鼠子宫 COX-2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

注:与正常组比较, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{**}P<0.01$ 。

2.5 桂枝茯苓丸对 PD 大鼠子宫磷酸化的 NF- κ B 和 NF- κ B 水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠子宫磷酸化的 NF- κ B 和 NF- κ B 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,桂枝茯苓丸组大鼠子宫磷酸化的 NF- κ B 水平显著降低 ($P<0.01$),而 NF- κ B 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$);与模型组比较,布洛芬组大鼠子宫 NF- κ B 和磷酸化的 NF- κ B 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见图 5。

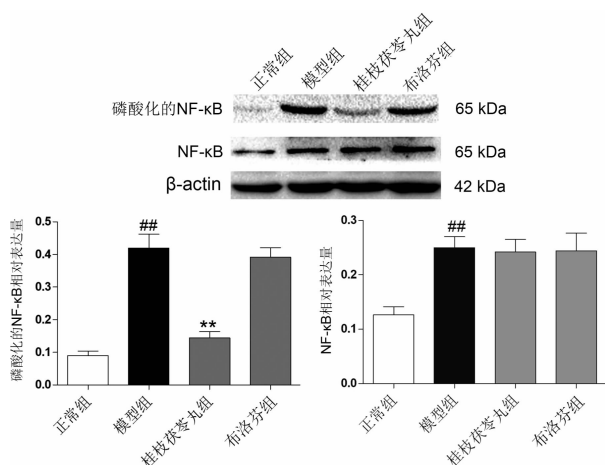


图 5 各组大鼠子宫磷酸化的 NF- κ B 和 NF- κ B 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

注:与正常组比较, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{**}P<0.01$ 。

3 讨论

桂枝茯苓丸为经典名方,具有活血化瘀、缓消癥块之功,使瘀化癥消,诸症皆愈,治疗妇科疾病以及

PD 临床疗效确切^[8,12]。桂枝为君药,温通血脉;桃仁为臣药,活血祛瘀;牡丹皮、赤芍和茯苓为佐药,牡丹皮和赤芍可凉血和活血散瘀,茯苓健脾益胃、渗湿祛痰,以扶正气^[12]。本研究采用人临床用量等效剂量的桂枝茯苓丸干预 PD 大鼠,结果显示,桂枝茯苓丸的干预能减少 PD 大鼠扭体次数,延长扭体潜伏期,并能改善子宫组织病理损伤,且其效应与布洛芬相当,表明该剂量的桂枝茯苓丸能有效干预 PD 大鼠。

有实验研究报道,桂枝茯苓丸干预 PD 的机制与抑制子宫组织过度收缩以及抗炎等机制有关^[13-15]。已有研究揭示,PGF_{2 α} 可引起子宫肌过度收缩,加重 PD 的疼痛,抑制 PGF_{2 α} 的合成和释放能减轻 PD 疼痛^[16]。本研究实验结果揭示,桂枝茯苓丸和布洛芬的干预均能降低 PD 大鼠子宫组织 PGF_{2 α} 的含量,提示调控 PGF_{2 α} 的合成、降低子宫组织 PGF_{2 α} 的含量可能为桂枝茯苓丸干预 PD 的重要机制。

COX-2 为 PG 合成过程中的关键限速酶。已有研究揭示,正常情况下,组织中 COX-2 的含量较低,在月经期前 COX-2 的表达明显增加并同时催化花生四烯酸合成 PG,继而产生痉挛性疼痛,布洛芬等非甾体抗炎药可以抑制 COX-2 的活化,降低 PG 的水平,在 PD 中发挥有效的干预作用^[17-19]。本研究揭示,正常大鼠子宫 COX-2 水平很低,而 PD 模型大鼠子宫 COX-2 水平较正常大鼠显著升高,桂枝茯苓丸和布洛芬干预能显著降低子宫 COX-2 水平,这表明桂枝茯苓丸和布洛芬可能通过降低 PD 大鼠子宫 COX-2 的水平来减少 PGF_{2 α} 的合成和释放。

NF- κ B 是一种调控 COX-2 合成的重要转录因子,已有研究揭示,在 PD 中存在 NF- κ B 的活化,并且 NF- κ B 的活化可以进一步促进 COX-2 的表达^[20]。本研究实验结果揭示,PD 大鼠子宫组织中磷酸化的 NF- κ B 和 NF- κ B 水平显著升高,表明存在 NF- κ B 的活化;桂枝茯苓丸组大鼠子宫磷酸化的 NF- κ B 水平降低,提示桂枝茯苓丸可抑制 NF- κ B 的磷酸化,抑制 NF- κ B 活化。

综上所述,桂枝茯苓丸能有效改善 PD,其机制可能与抑制 NF- κ B 磷酸化、降低 COX-2 水平,从而有效调节 PGF_{2 α} 水平有关。

参考文献

- [1] TSONIS O, GKROZOU F, BARMALIA Z, et al. Integrating lifestyle focused approaches into the management of primary dysmenorrhea: Impact on quality of life[J]. *International Journal of Women's Health*, 2021, 13: 327-336.
- [2] SHARGHI M, MANSURKHANI S M, LARKY D A, et al. An update and systematic review on the treatment of primary dysmenorrhea[J]. *JBRA Assisted Reproduction*, 2019, 23(1): 51-57.
- [3] TANG B, DAN L, CHEN L Y, et al. NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 attenuates primary dysmenorrhea in mice via the NF- κ B/COX-2/PG pathway[J]. *Journal of Inflammation*, 2020, 17: 22.
- [4] 唐文静,王乙钦,唐 标.穴位埋线对原发性痛经大鼠子宫组织前列腺素相关因子和核转录因子 κ B 的影响[J].*针刺研究*,2020,45(7):548-551,556.
- [5] FERRIES-ROWE E, COREY E, ARCHER J S. Primary dysmenorrhea: Diagnosis and therapy[J]. *Obstetrics and Gynecology*, 2020, 136(5): 1047-1058.
- [6] KELLY R W, KING A E, CRITCHLEY H O. Cytokine control in human endometrium[J]. *Reproduction*, 2001, 121(1): 3-19.
- [7] LIU Y, TANG W J, WANG Y Q, et al. Effects of electroacupuncture on uterine prostaglandin $F_{2\alpha}$, cyclooxygenase 2 and nuclear factor- κ B in rats with primary dysmenorrhea[J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*, 2020, 18 (6): 418-424.
- [8] ZHANG S Q, LAI X X, WANG X, et al. Deciphering the pharmacological mechanisms of Guizhi-Fuling capsule on primary dysmenorrhea through network pharmacology[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 613104.
- [9] 唐小芳,蒋鹏飞,陈 锋.桂枝茯苓丸联合超声引导下聚桂醇治疗盆腔囊肿的临床研究[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(6):919-923.
- [10] 李雪妍,王 昕.基于“体质可调”论原发性痛经预防[J].*辽宁中医药大学学报*,2020,22(2):179-182.
- [11] YANG L, CAO Z Y, YU B Y, et al. An in vivo mouse model of primary dysmenorrhea[J]. *Experimental Animals*, 2015, 64(3): 295-303.
- [12] 李 娜,王 信,孙 萍,等.桂枝茯苓方治疗妇科血瘀证类疾病的物质基础研究进展[J].*中草药*,2019,50(9):2210-2218.
- [13] SUN L, LIU L N, ZONG S B, et al. Traditional Chinese medicine Guizhi Fuling capsule used for therapy of dysmenorrhea via attenuating uterus contraction[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 191: 273-279.
- [14] 仲云熙,孙建国,王广基.桂枝茯苓胶囊药理作用与临床应用研究进展[J].*中草药*,2016,47(17):3115-3120.
- [15] WANG X, SHI Y X, XU L, et al. Traditional Chinese medicine prescription Guizhi Fuling Pills in the treatment of endometriosis[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2021, 18(11): 2401-2408.
- [16] XU Y, ZHAO W L, LI T, et al. Effects of acupoint-stimulation for the treatment of primary dysmenorrhoea compared with NSAIDs: A systematic review and meta-analysis of 19 RCTs[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 436.
- [17] MARJORIBANKS J, AYELEKE R O, FARQUHAR C, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea[J]. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(7): CD001751.
- [18] SUN L, LIU L N, LI J C, et al. The essential oil from the twigs of *Cinnamomum cassia* Presl inhibits oxytocin-induced uterine contraction in vitro and in vivo[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 206: 107-114.
- [19] 吕 静,钟伟兰,马 兰,等.木香元胡胶囊联合布洛芬缓释胶囊治疗原发性痛经临床疗效观察[J].*中医临床研究*,2019,11(20): 129-131.
- [20] NAKANO R, KITANAKA T, NAMBA S, et al. Non-transcriptional and translational function of canonical NF- κ B signaling in activating ERK1/2 in IL-1 β -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 579266.

(本文编辑 周 旦)