

## 方药纵横

引用:张兰,李楠,郭婷,等.补肾更年方对围绝经期综合征大鼠神经-内分泌-免疫网络功能的影响[J].现代中医药,2024,44(5):88-94.

## 补肾更年方对围绝经期综合征大鼠 神经-内分泌-免疫网络功能的影响<sup>\*</sup>

张兰<sup>1\*\*</sup> 李楠<sup>1</sup> 郭婷<sup>2</sup> 任博<sup>3</sup> 杨鉴冰<sup>1</sup> 崔正<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 陕西中医药大学附属医院,陕西 咸阳 712000;2. 西安国际医学中心医院,  
陕西 西安 710068;3. 西安医学院第一附属医院,陕西 西安 710077)

**摘要:**目的 通过观察补肾更年方对围绝经期综合征大鼠行为学指标、胸腺、子宫、肾上腺指数、血清和下丘脑 NE、5-HT 含量和子宫 HSP70、ER $\alpha$ 36 蛋白表达的影响,探讨其对围绝经期综合征(perimenopausal syndrome, PMS)大鼠神经-内分泌-免疫网络功能的效应机制。**方法** 采用摘除卵巢法复制 PMS 大鼠模型,将连续 5 d 动情周期紊乱的大鼠随机分为模型组、西药组、补肾更年方大、中、小剂量组,每组 10 只,10 只为对照组大鼠,西药组采用 1 mL/100 g 剂量的己烯雌酚水溶液灌胃,补肾更年方三种剂量组分别以 0.015 mL·g<sup>-1</sup>、0.010 mL·g<sup>-1</sup>、0.005 mL·g<sup>-1</sup> 剂量的水煎液灌胃,对照组和模型组以 1 mL/100 g 的生理盐水灌胃,连续灌胃 45 d,干预结束后,观察各组大鼠一般情况,采用旷场实验和高架十字迷宫实验测试大鼠行为学改变,计算各组大鼠胸腺、子宫、肾上腺指数,采用放免法和化学发光法分别检测各组大鼠血清、下丘脑 NE、5-HT 含量,采用 western blot 法检测各组大鼠子宫 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达。**结果** 与模型组比较,西药和补肾更年方三个剂量干预均可改善大鼠一般情况;与模型组比较,西药和补肾更年方大、中剂量干预可明显增加大鼠中央区域停留时间、总移动距离、开臂停留时间和开臂进入次数( $P<0.05$ ),升高大鼠胸腺、子宫、肾上腺指数( $P<0.05$ ),降低大鼠血清、下丘脑 NE、5-HT 含量( $P<0.05$ ),上调大鼠子宫 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达( $P<0.05$ )。**结论** 补肾更年方可能通过提高 PMS 大鼠胸腺、子宫、肾上腺指数,降低其血清、下丘脑 NE、5-HT 含量,上调其子宫 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达,综合调控 PMS 大鼠神经-内分泌-免疫网络功能,改善焦虑样行为,发挥对 PMS 的治疗效应。

**关键词:** 补肾更年方;围绝经期综合征;神经-内分泌-免疫网络

中图分类号:R256.5

文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2024)05-0088-07

DOI:10.13424/j.cnki.mtem.2024.05.017

## Effect and Mechanism of Bushen Gengnian Formula on the Function of Neuroendocrine Immune Network in Rats with Perimenopausal Syndrome

ZHANG Lan<sup>1</sup> LI Nan<sup>1</sup> GUO Ting<sup>2</sup> REN Bo<sup>3</sup> YANG Jianbing<sup>1</sup> CUI Zheng<sup>1</sup>

(1. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China; 2. Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710068, China; 3. First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China)

**\* 基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81603656);陕西中医药大学附属医院院级项目(2020MS015);陕西中医药大学青年基金项目(2015QN34);全国第六批名老中医药专家学术经验继承项目(国中医药人教发[2017]29号);全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号)

**\*\* 作者简介:**张兰,副主任医师,研究方向:中西医结合治疗生殖内分泌疾病的基础与临床研究。E-mail:Candi506@126.com

**\*\*\* 通讯作者:**崔正,助理研究员。E-mail:1006963927@qq.com

**Abstract: Objective** To investigate the effects of the Bushen Gengnian formula on behavioral indicators, thymus, uterus, adrenal index, serum and hypothalamic NE and 5-HT content, and uterine HSP70 and ER $\alpha$ 36 protein expression in rats with perimenopausal syndrome, and to explore its mechanism of action on the neuroendocrine immune network function of PMS rats. **Methods** The PMS rat model was replicated by ovariectomy. Rats with disrupted estrous cycles for 5 consecutive days were randomly divided into a model group, a western medicine group, and a large, medium, and small dose group of Bushen Gengnian formula, with 10 rats in each group. The control group consisted of 10 rats. The western medicine group was given a 1 mL/100 g dose of diethylstilbestrol aqueous solution by gavage, while the Bushen Gengnian formula three dose groups were given 0.015 mL  $\cdot$  g<sup>-1</sup>, 0.010 mL  $\cdot$  g<sup>-1</sup>, 0.005 mL  $\cdot$  g<sup>-1</sup> doses of decoction by gavage, respectively. The control group and model group were given 1 mL/100g of physiological saline by gavage for 45 consecutive days. After the intervention, the general condition of each group of rats was observed, and an open field experiment was conducted. The elevated cross maze experiment was used to test the behavioral changes of rats, and the thymus, uterus, and adrenal indices of each group of rats were calculated. The serum, hypothalamic NE, and 5-HT contents of each group of rats were detected by radioimmunoassay and chemiluminescence, respectively, Western blot was used to detect the expression of HSP70 and ER $\alpha$ 36 proteins in the uterus of rats in each group. **Results** Compared with the model group, the three doses of Western medicine and Bushen Gengnian formula intervention can improve the general condition of rats; Compared with the model group, Western medicine and the Bushen Gengnian formula at high and medium doses significantly increased the central area residence time, total movement distance, arm opening residence time, and number of arm opening entries in rats ( $P < 0.05$ ), increased thymus, uterus, and adrenal indices ( $P < 0.05$ ), decreased serum and hypothalamic NE and 5-HT levels in rats ( $P < 0.05$ ), and upregulated HSP70 and ER $\alpha$ 36 protein expression in rats' uterus ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The Bushen Gengnian formula may enhance the thymus, uterus, and adrenal indices of PMS rats, reduce their serum and hypothalamic NE and 5-HT levels, upregulate their uterine HSP70 and ER  $\alpha$ 36 protein expression, comprehensively regulate the neuroendocrine immune network function of PMS rats, improve anxiety like behavior, and exert therapeutic effects on PMS.

**Key words:** Bushen Gengnian formula; Perimenopausal syndrome; Neuroendocrine immune network

围绝经期综合征 (Perimenopausal syndrome, PMS) 是育龄妇女的一种自然妇科疾病<sup>[1]</sup>, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 将其定义为由卵巢卵泡功能丧失导致的经期永久性停止和卵巢类固醇激素 (雌激素和孕激素) 水平下降, 以潮热、盗汗、失眠、抑郁、阴道干燥、情绪低落等紊乱、疲劳或能量损失等为其主要临床表现<sup>[2-3]</sup>, 同时, 它是引发各种老年退行性疾病高发病率的主要原因, 可导致高血压和冠心病的发病率增加 5~6 倍, 亦可导致骨质疏松症的发病率呈上升趋势, 对妇女的正常生活产生极大的负面影响<sup>[4-6]</sup>。因此, 如何有效防治 PMS 在保护围绝经期妇女身心健康方面起着至关重要的作用。

目前, 现代医学主要应用激素替代疗法 (hormone replacement therapy, HRT) 治疗本病, 但其最小有效剂量和潜在的副作用仍有争议, 或可增加冠心病、中风、乳腺癌和子宫内膜癌的患病风险<sup>[7-14]</sup>, 而中医药以其安全性和有效性成为防治 PMS 的理想选择<sup>[15-16]</sup>。课题组近年来以 PMS 作为主要研究对象, 发现补肾更年方可以改善 PMS 患者临床症状, 并在前期机制研究中发现本方干预可改善 PMS 大

鼠性激素促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol, E2) 水平<sup>[17-18]</sup>, 为了进一步明晰本方作用机制, 本研究拟观察补肾更年方对 PMS 大鼠行为学指标、胸腺、子宫、肾上腺指数、血清和下丘脑去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 含量以及子宫热休克蛋白 (heat shock protein, HSP70)、新型雌激素受体 (novel estrogen receptor, ER $\alpha$ 36) 蛋白表达水平等的影响, 从神经-内分泌-免疫网络视角探讨补肾更年方对 PMS 的作用机制, 以期阐明本方效应机制开辟新的切入点。

### 1 仪器与材料

**1.1 仪器** YP202N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); SIGMA 1-14 型台式高速离心机 (德国 Sigma 公司); Gel Doc EZ 型凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); Image-proplus 6.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司);  $\gamma$ -911 型全自动放免计数仪 (中国科技大学实业总公司); UniCel DxI 800 型 ACCESS 化学发光免疫分析系统 (美国 Beckman 公司); ZS-KC 型旷场实验箱 (北京众实迪创科

技发展有限公司); EVN-560 型高架十字迷宫行为分析系统(美国 Med Associates 公司)。

**1.2 试药** 补肾更年方:熟地黄 15 g, 酸枣仁 15 g, 山药 10 g, 淫羊藿 10 g, 知母 10 g, 白芍 15 g, 地骨皮 12 g, 黄柏 10 g, 炙甘草 6 g(中药饮片购于陕西中医药大学附属医院, 依照《医疗机构中药煎药室管理规范》相关要求, 均在煎药室煎煮中药, 药液采用旋转蒸发仪浓缩至不同剂量要求的浓度); 己烯雌酚片(天津力生制药股份有限公司, 批准文号: 国药准字 H12020154); 兔抗鼠 ER $\alpha$ 36 蛋白抗体(批号: ab2907)、兔抗鼠 HSP70 蛋白抗体(批号: ab5439)、兔抗鼠 GAPDH 抗体(批号: ab8245)、NE 化学发光免疫试剂盒(批号: 20210508)、5-HT 化学发光免疫试剂盒(批号: 20210327)、NE 放射免疫试剂盒(批号: 20210615)、5-HT 放射免疫试剂盒(批号: 20210522, 均购自上海信帆生物科技有限公司)。

**1.3 实验动物** 2~3 月龄清洁级 SD 雌性大鼠 70 只, 体质量( $230\pm 10$ )g, 购于西安交通大学动物实验中心, 合格证号: SCXK(陕)2020-003。实验前大鼠适应性喂养一周, 动物饲养环境: 温控( $22\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 55%, 光照 12 h。整体实验过程均按照陕西中医药大学实验动物使用相关伦理要求执行。

## 2 方法

**2.1 动物造模、分组及干预方法** 60 只雌性未孕 SD 大鼠, 采用摘除双侧卵巢法复制 PMS 大鼠模型<sup>[19]</sup>, 筛选出连续 5 d 动情周期紊乱<sup>[20]</sup>的 50 只大鼠为 PMS 模型大鼠, 随机分为模型组、西药组、补肾更年方大、中、小剂量组共计 5 组, 每组 10 只, 另设对照组 10 只(即假手术组, 麻醉、体位、切口、消毒、缝合模型大鼠制备方法, 但不切除卵巢, 而是将卵巢周围少量脂肪组织清除)。补肾更年方大、中、小剂量组分别按  $0.015\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.010\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.005\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  的剂量给予补肾更年方水煎液灌胃干预; 西药组按  $0.010\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  的剂量给予含有己烯雌酚  $0.01\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  水溶液灌胃干预; 对照组和模型组均于每日同时段同程度抓取按  $0.010\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  的剂量给予生理盐水灌胃干预。以上各组连续干预 45 d, 1 次/日。

### 2.2 指标检测方法

**2.2.1 一般情况观察** 干预结束后, 对大鼠摄食、活动、毛发等情况进行观察。

**2.2.2 旷场实验** 将大鼠提前 1 h 放置于测试室中, 令其对环境产生适应性, 在旷场实验箱的中央区放置大鼠, 将其头部固定并朝向同一方向, 对大鼠活动进行记录, 时长为 10 min, 采用运动轨迹跟踪系统记录大鼠总移动距离和中央区域停留时间。实验结束后清理每只大鼠尿液和粪便, 用酒精棉清除测试区域, 消除气味避免对后续测试大鼠产生影响。

**2.2.3 高架十字迷宫实验** 将大鼠提前 1 h 放置于测试室中, 令其对环境产生适应性, 高架十字迷宫由两个开臂、中心区域和两个闭臂组成, 其离地高度为 55 cm, 于中心区域放置大鼠, 令其头部朝向其中一侧的开臂方向, 通过自动分析系统对其开臂停留时间和进入开臂的次数进行记录, 活动时长为 10 min。实验结束后同 2.2.2 清理测试区域。

**2.2.4 大鼠脏器指数测定方法** 干预结束后, 麻醉大鼠, 取胸腺、子宫、肾上腺, 称其质量。脏器指数 = 脏器质量/体质量 $\times 100\%$ 。

**2.2.5 放免法检测大鼠血清 NE、5-HT 含量** 干预结束后, 麻醉大鼠, 从其腹主动脉采血, 将血液样本存放于试管中, 放置于  $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速的离心机中, 运行 10 min, 分离血清, 将血清标本存放于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱, 严格按照放免试剂盒说明书操作要求对大鼠血清 NE、5-HT 含量进行检测。

**2.2.6 化学发光法检测大鼠下丘脑 NE、5-HT 含量** 干预结束后, 麻醉大鼠, 分离其下丘脑并称量, 存放于冰袋中进行保存, 加入  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸 1 mL, 匀浆 1 min, 匀浆液于  $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速的离心机离心 20 min, 温度调控于  $4^{\circ}\text{C}$  状态, 离心结束后, 取  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 1 mL 溶液对其进行中和, 将标本存放于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱, 采用 ACCESS 化学发光免疫分析系统对下丘脑 NE、5-HT 含量进行检测, 对于抗原或抗体的标记, 采用碱性磷酸酶对其进行标记, 载体为雌性微粒, 发光底物为 AMPPD, 严格按照仪器使用说明书操作, 采用夹心法对 NE、5-HT 含量进行检测。

**2.2.7 免疫蛋白印迹法(Western Blot)检测** 大鼠子宫 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达干预结束后, 麻醉大鼠, 对子宫组织进行分离, 置于冰上碾磨, 蛋白上清液于离心匀浆后取出, 对蛋白浓度进行检测, 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳对总蛋白( $40\text{ }\mu\text{g}$ )进行蛋白质分离, 将分离的蛋白在电泳结束后转移, 载体为 PVDF 膜, 将脱脂奶粉( $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )于

室温下封闭 1 h,加入 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 (浓度为 1 :1000)孵育过夜,温度调控于 4 ℃ 状态,将由辣根过氧化物酶标记的二抗(浓度为 1 :5000)加入其中并进行孵育(常温态下),将 PVDF 膜按操作要求放置于图像扫描仪,对目标蛋白 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 进行曝光,最后采用 Image-proplus 6.0 图像分析系统对图像进行分析处理。

**2.3 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 进行统计学处理,所有数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用单因素方差分析对各组间均数进行比较,采用最小显著差数法对各组间均数进行两两比较,差异有统计学意义的标准以  $P<0.05$  进行评定。

3 结果

**3.1 各组大鼠一般情况** 干预结束后,对照组大鼠摄食正常,活动自如,毛发光滑;模型组大鼠摄食减少,活动较多,毛发光泽度明显降低;西药组和补肾更年方三个剂量组大鼠摄食较正常,活动较自如,毛

发欠光泽。

**3.2 各组大鼠旷场活动变化** 如表 1、图 1 所示,对于各组大鼠旷场总移动距离和中央区域停留时间,与对照组相比,模型组显著降低( $P<0.01$ );与模型组相比,西药组和大、中剂量组明显增加( $P<0.05$ ),小剂量组无显著性差异( $P>0.05$ );西药组与大剂量组相比无显著性差异( $P>0.05$ )。

表 1 各组大鼠旷场总移动距离、中央区域停留时间的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	旷场总移动距离(cm)	旷场中央区域停留时间(s)
对照组	10	2570.69±563.44	24.31±4.80
模型组	10	1855.69±413.45 **	11.24±3.24 **
西药组	10	2494.23±583.66 #	22.55±5.16 #
大剂量组	10	2324.54±460.62 #	18.51±3.48 #
中剂量组	10	2258.70±284.96 #	16.74±3.62 #
小剂量组	10	1994.11±341.12	12.30±4.35

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

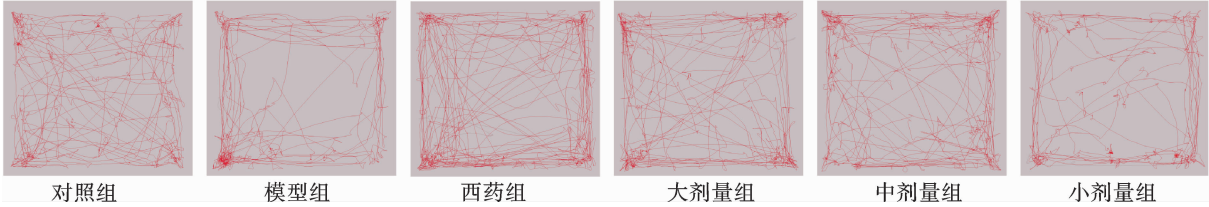


图 1 各组大鼠旷场运动轨迹

**3.3 各组大鼠高架十字迷宫实验变化** 如表 2、图 2 所示,对于各组大鼠开臂停留时间和开臂进入次数,与对照组相比,模型组显著降低( $P<0.01$ );与模

型组相比,西药组和大、中剂量组明显增加( $P<0.05$ ),小剂量组无显著性差异( $P>0.05$ );西药组与大剂量组相比无显著性差异( $P>0.05$ )。

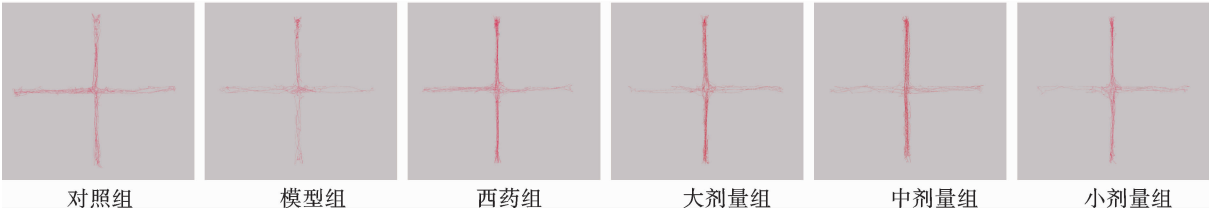


图 2 各组大鼠高架十字迷宫运动轨迹

表 2 各组大鼠高架十字迷宫开臂停留时间、开臂进入次数的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	开臂停留时间(s)	开臂进入次数(次)
对照组	10	45.72±6.59	26.31±5.12
模型组	10	25.43±4.46 **	10.55±2.89 **
西药组	10	41.47±6.64 #	20.31±4.57 #
大剂量组	10	37.85±4.84 #	19.73±3.82 #
中剂量组	10	33.64±4.96 #	17.46±4.01 #
小剂量组	10	26.89±5.43	13.25±3.28

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

**3.4 各组大鼠脏器指数**如表 3 所示,对于各组大鼠胸腺、子宫、肾上腺指数,与对照组相比,模型组显著降低( $P<0.01$ );与模型组相比,西药组和大、中剂量组明显升高( $P<0.05$ ),小剂量组无显著性差异( $P>0.05$ );西药组与大剂量组相比无显著性差异( $P>0.05$ )。

**3.5 各组大鼠血清 NE、5-HT 含量** 如表 4 所示,对于各组大鼠血清 NE、5-HT 含量,与对照组相比,模型组显著升高( $P<0.01$ );与模型组相比,西药组

和大、中剂量组明显降低 ( $P<0.05$ ), 小剂量组无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 西药组与大剂量组相比无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

表 3 各组大鼠脏器指数的比较 ( $\bar{x}\pm s, \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )

组别	<i>n</i>	胸腺指数	子宫指数	肾上腺指数
对照组	10	2.12±0.43	1.56±0.28	0.95±0.17
模型组	10	1.25±0.39**	0.43±0.12**	0.31±0.06**
西药组	10	1.89±0.67 <sup>#</sup>	1.02±0.37 <sup>#</sup>	0.72±0.15 <sup>#</sup>
大剂量组	10	1.83±0.55 <sup>#</sup>	0.89±0.52 <sup>#</sup>	0.61±0.13 <sup>#</sup>
中剂量组	10	1.76±0.73 <sup>#</sup>	0.96±0.45 <sup>#</sup>	0.67±0.12 <sup>#</sup>
小剂量组	10	1.32±0.26	0.51±0.08	0.42±0.09

注:与对照组比较, \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup>  $P<0.05$

**3.6 各组大鼠下丘脑 NE、5-HT 含量** 如表 5 所示,对于各组大鼠下丘脑 NE、5-HT 含量,与对照组相比,模型组显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组相比,西药组和大、中剂量组明显降低 ( $P<0.05$ ),小剂量组无显著性差异 ( $P>0.05$ );西药组与大剂量组相比无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

表 4 各组大鼠血清 NE、5-HT 含量的比较 ( $\bar{x}\pm s, \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

组别	<i>n</i>	NE	5-HT
对照组	10	0.46±0.23	0.59±0.56
模型组	10	0.79±0.35**	0.96±0.72**
西药组	10	0.54±0.28 <sup>#</sup>	0.68±0.49 <sup>#</sup>
大剂量组	10	0.49±0.39 <sup>#</sup>	0.72±0.51 <sup>#</sup>
中剂量组	10	0.58±0.26 <sup>#</sup>	0.77±0.45 <sup>#</sup>
小剂量组	10	0.72±0.32	0.87±0.63

注:与对照组比较, \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup>  $P<0.05$

表 5 各组大鼠下丘脑 NE、5-HT 含量的比较 ( $\bar{x}\pm s, \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

组别	<i>n</i>	NE	5-HT
对照组	10	12.36±2.57	32.73±5.22
模型组	10	27.12±4.64**	57.42±6.71**
西药组	10	16.85±3.72 <sup>#</sup>	39.75±4.84 <sup>#</sup>
大剂量组	10	15.99±3.53 <sup>#</sup>	41.33±3.56 <sup>#</sup>
中剂量组	10	17.53±2.96 <sup>#</sup>	40.86±4.93 <sup>#</sup>
小剂量组	10	23.78±3.09	52.76±5.68

注:与对照组比较, \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup>  $P<0.05$

**3.7 各组大鼠子宫 HSP70 蛋白表达水平** 如图 3 所示,对于各组大鼠子宫 HSP70 蛋白表达水平,与对照组相比,模型组显著下调 ( $P<0.01$ );与模型组相比,西药组和大、中剂量组明显上调 ( $P<0.05$ ),小剂量组无显著性差异 ( $P>0.05$ );西药组与大剂量组相比无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

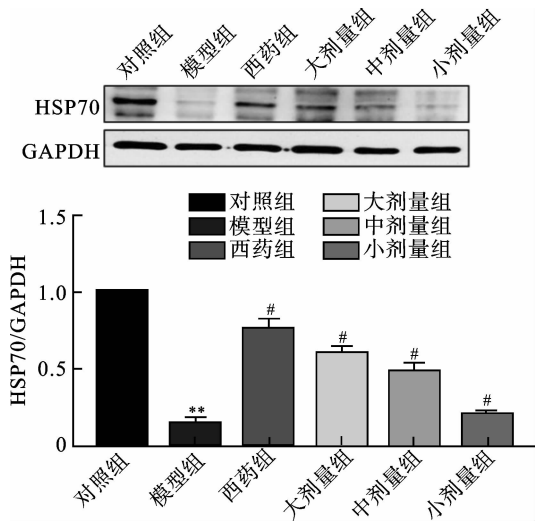


图 3 各组大鼠子宫 HSP70 蛋白表达水平比较

**3.8 各组大鼠子宫 ERα36 蛋白表达水平** 如图 4 所示,对于各组大鼠子宫 ERα36 蛋白表达水平,与对照组相比,模型组显著下调 ( $P<0.01$ );与模型组相比,西药组和大、中剂量组明显上调 ( $P<0.05$ ),小剂量组无显著性差异 ( $P>0.05$ );西药组与大剂量组相比无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

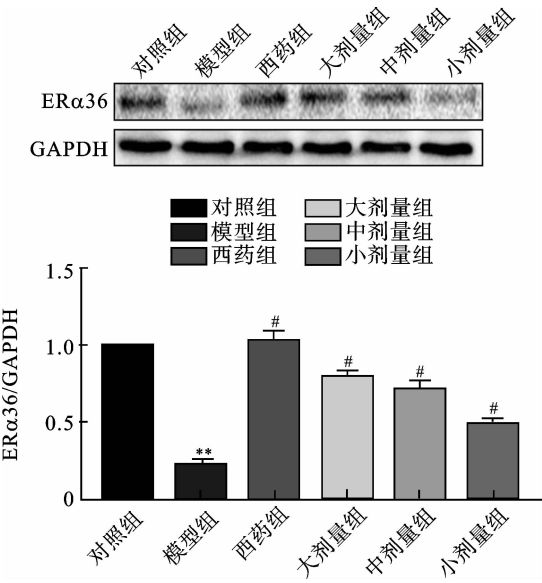


图 4 各组大鼠子宫 ERα36 蛋白表达水平的比较

4 讨论

关于 PMS 的发病机制,诸多研究共性认为围绝经期女性内分泌紊乱和下丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamus-pituitary-ovary axis, HPOA) 的平衡失调是本病发病的主要原因<sup>[21-24]</sup>,作为机体调控整合系统的神经-内分泌-免疫网络功能的异常是导致本病发病的主要机制<sup>[25-26]</sup>。PMS 属中医学“经断前后诸证”范畴,《素问·上古天真论》曰:“七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”

七七之年肾气渐亏,天癸将竭,阴气衰半,自然出现阴虚现象,又因此期妇女历经经、孕、产、乳,数伤于血,易处于“阴常不足,阳常有余”的状态,进而肾阴更见不足,故其发病病机以肾虚为主,兼有冲任二脉虚损,精血不足,气血失调。

有鉴于 PMS 病因病机,本研究团队以“滋阴降火”立法,认为本病宜常养其阴,阴平阳秘,则水能制火,自拟补肾更年期方,从组方君、臣、佐、使而言:①君药,方中熟地,功可养血滋阴,补精益髓,《本草正》曰:“阴虚而神散者,非熟地之守,不足以聚之,阴虚而火升者,非熟地之重,不足以降之,阴虚而躁动,非熟地之静,不足以镇之,阴虚而刚急者,非熟地之甘,不足以缓之。”地骨皮,功可凉血清热退蒸,《汤液本草》谓其能:“泻肾火,降肺中伏火,去胞中火,退热,补正气。”本方中熟地重在滋补肾阴,与地骨皮配伍滋阴养血与降火除热并进,滋阴以治本,降火以治标,使阴固而水能制火,热清则耗阴无由,合而为君。②臣药,山药,功可益气养阴,补肾固涩,《本经》称其:“主伤中,补虚羸,除寒热邪气,补中、益气力,长肌肉,强阴。”知母,功可滋阴润燥,清热泻火,《本草纲目》谓:“知母泻无根之肾火,疗有汗之骨蒸,止虚劳之热,滋化源之阴。”能上清肺火,中清胃火,下清肾火且能润燥滋阴,治阴虚发热;黄柏,味功可清热解暑,泻肾中伏火,主治阴虚劳热,《兰室秘藏》谓其能“泻冲脉之邪。”并云:“如有燥热欲去衣者,肾中伏火也,宜加之。”《得配本草》有黄柏“得知母,滋阴降火”的记载,临床上二者相须为用共奏退虚热、制相火之效,上述诸药共用,起到滋肾阴,降虚火的功效,共为臣药。③佐药,白芍,功可养血调经,平肝止痛,《药品化义》曰:“白芍药微苦能补阴,略酸能收敛。因酸走肝,暂用之生肝。肝性欲散恶敛,又取酸以抑肝。故谓白芍能补复能泻,专行血海,女人调经胎产……悉宜用之调和血气。”白芍养血调经,酸枣仁养心安神,二者均可敛阴止汗共为佐助;仙灵脾,功可补肾助阳,调摄冲任,《本草纲目》言其可“益精气,补腰膝,强心力。”其补肾特点是温而不燥,补而不峻,助阳而不伤阴;本方少佐淫羊藿奏温肾助阳之功,寓阳中求阴之意,正所谓“善补阴者,必于阳中求阴,阴得阳升,而泉源不竭。”④使药,炙甘草,甘缓和中、调和诸药。全方既滋阴补肾,又解虚火上炎之表,补而不燥,组方平和,标本兼

顾,达到补肾养阴降火、调补冲任之效,对改善和控制 PMS 有良好作用。

本研究对神经-内分泌-免疫网络的链条效应进行系统研究,主要分为以下几部分:第一,采用观察法评价大鼠一般情况,结果表明:模型组大鼠摄食减少,活动较多,毛发光泽度明显降低,西药组和补肾更年期方大、中、小剂量组大鼠摄食较正常,活动较自如,毛发欠光泽,证实己烯雌酚和补肾更年期方干预均可在一定程度上改善 PMS 大鼠一般情况。第二,采用旷场实验和高架十字迷宫实验测试大鼠行为学,结果表明:模型组大鼠中央区域停留时间、总移动距离、开臂停留时间和开臂进入次数均显著低于对照组( $P<0.01$ ),西药组和大、中剂量组大鼠中央区域停留时间、总移动距离、开臂停留时间和开臂进入次数明显增加( $P<0.05$ ),说明己烯雌酚和补肾更年期方大、中剂量干预均可增加中央区域停留时间、总移动距离、开臂停留时间和开臂进入次数,在一定程度上改善大鼠焦虑样行为。第三,采用质量比重法测定大鼠脏器指数,结果表明:模型组大鼠胸腺、子宫、肾上腺指数均显著低于对照组( $P<0.01$ ),西药组和大、中剂量组大鼠胸腺、子宫、肾上腺指数明显升高( $P<0.05$ ),说明己烯雌酚和补肾更年期方大、中剂量干预均可增加胸腺、子宫、肾上腺指数,在一定程度上调节 HPOA 平衡的失调,提高机体免疫功能。第四,采用放免法和化学发光法检测大鼠血清和下丘脑 NE、5-HT 含量,结果表明:模型组大鼠血清和下丘脑 NE、5-HT 含量均显著高于对照组( $P<0.01$ ),西药组和大、中剂量组大鼠血清和下丘脑 NE、5-HT 含量明显降低( $P<0.05$ ),说明己烯雌酚和补肾更年期方大、中剂量干预可降低单胺类神经递质 NE、5-HT 含量,良性调节神经细胞间及神经细胞与内分泌、免疫系统之间的信息传递,改善内分泌-下丘脑-垂体功能紊乱状态,进而调节植物神经功能,发挥治疗效应。第五,采用 WB 法检测大鼠子宫 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达,结果表明:模型组大鼠子宫 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达水平显著低于对照组( $P<0.01$ ),西药组和补肾更年期方大、中剂量组大鼠子宫 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达水平平均明显上调( $P<0.05$ ),说明己烯雌酚和补肾更年期方大、中剂量干预可上调子宫热休克蛋白 HSP70 和新型膜性雌激素受体 ER $\alpha$ 36 表达,提示可调节雌激素水平分泌,在

一定程度上减轻由卵巢功能衰退和应激激素所致的子宫组织结构损伤,对其发挥保护作用,恢复紊乱的内分泌水平并抑制 PMS 发展。

综上所述,补肾更年方大、中剂量可能通过纠正单胺类神经递质紊乱、增强雌激素生物活性和免疫功能、调节生殖内分泌激素,多途径调控去势大鼠神经-内分泌-免疫网络功能,进而调节 HPOA 轴的平衡,改善围绝经期综合征植物神经功能紊乱,促进机体恢复稳态,为其临床应用提供一定的实验依据。同时,我们进行了深入思考,补肾更年方是通过何种信号途径激活 HSP70 和 ER $\alpha$ 36 蛋白表达? 不同模型构建方式或不同治疗周期干预效应有何差异? 这些问题有待于在进一步研究中进行印证,将对本方的临床推广应用奠定一定的理论基础。

参考文献

[1] ZHONG ZY, DONG HX, WANG H, et al. Electroacupuncture for the treatment of perimenopausal syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Acupuncture in Medicine: Journal of the British Medical Acupuncture Society*, 2022, 40 (2): 111-122.

[2] XU YP, ZHAO L. Therapeutic effect of low-dose estrogen and progesterone replacement therapy on perimenopausal syndrome [J]. *Minerva Pediatrics*, 2022, 74 (5): 619-621.

[3] MENG F, DUAN PB, ZHU JY, et al. Effect of Gua Sha therapy on perimenopausal syndrome: a randomized controlled trial [J]. *Menopause*, 2017, 24 (3): 299-307.

[4] XUE BB, CHEN XP, WANG XL, et al. Application of multivariate statistical analysis and network pharmacology to explore the mechanism of Danggui Liu Huang Tang in treating perimenopausal syndrome [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 284: 114543.

[5] XING WY, WANG X, ZHU WT. Effects of acupoint application therapy combined with Chinese herbal medicine on perimenopausal syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Complementary Therapies in Medicine*, 2023, 72: 102916.

[6] 邱林杰, 付燕来, 杲春阳, 等. 基于中医养生理论探讨传统功法对绝经后骨质疏松症的防治 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2022, 45 (2): 57-61.

[7] EL-BANA MA, EL-DALY SM, OMARA EA, et al. Preparation of pumpkin oil-based nanoemulsion as a potential estrogen replacement therapy to alleviate neural-immune interactions in an experimental postmenopausal model [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2023, 166: 106730.

[8] MANYONDA I, TALAULIKAR V, PIRHADI R, et al. Perimenopausal estrogen could prevent breast cancer-For: Estrogen replacement therapy and breast cancer [J]. *BJOG: an International Journal of Obstetrics*

and Gynaecology, 2021, 128 (8): 1384.

[9] LI Y, ZHENG H, ZHENG QH, et al. Use acupuncture to relieve perimenopausal syndrome: study protocol of a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2014, 15: 198.

[10] MANSON JE, HSIA J, JOHNSON KC, et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349 (6): 523-534.

[11] WASSERTHEIL-SMOLLER S, HENDRIX SL, LIMACHER M, et al. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial [J]. *JAMA* 2003, 289 (20): 2673-2684.

[12] 潘琳. 低剂量雌激素替代疗法治疗围绝经期综合征的临床效果 [J]. *临床合理用药杂志*, 2022, 15 (26): 99-101.

[13] 张晓静, 杜小利, 李娜, 等. 围绝经期综合征的临床研究概况 [J]. *现代中医药*, 2019, 39 (2): 117-120.

[14] BERAL V, BULL D, REEVES G, et al. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study [J]. *Lancet*, 2005, 365 (9470): 1543-1551.

[15] 崔淑兰, 吴晨燕, 张平, 等. 围绝经期综合征中医证候及用药规律文献研究 [J]. *中医杂志*, 2019, 60 (22): 1968-1971.

[16] 王洪雪, 王杰琼, 高杰. 围绝经期综合征的中医药研究进展 [J]. *西部中医药*, 2022, 35 (7): 144-147.

[17] 张兰, 崔正, 邵迎春, 等. 补肾更年方对更年期综合征大鼠血清 FSH、LH 水平及子宫 ER $\alpha$  蛋白表达的影响 [J]. *四川中医*, 2018, 36 (9): 47-50.

[18] 张兰, 邵迎春, 王渊, 等. 补肾更年方对去除卵巢大鼠血清 E2 水平及下丘脑 ER $\alpha$  蛋白表达的影响 [J]. *现代中医药*, 2018, 38 (5): 112-115, 120.

[19] 杜力军, 赵玉男. 实验动物与实验动物模型 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 410.

[20] 印丹丹, 封瑞, 任丽菲, 等. 阴道涂片法鉴定大鼠生理周期的应用评价 [J]. *解剖科学进展*, 2014, 20 (4): 360-363.

[21] 秦尔奇, 鲁凌云, 贾必燕, 等. 针刺治疗围绝经期综合征现代分子机制研究综述 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31 (3): 951-953.

[22] LI RL, FU JY, DENG YY, et al. Review of acupuncture treatment for perimenopausal syndrome [J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2015, 13 (2): 129-133.

[23] 肖敏, 梁凤霞. 针刺治疗围绝经期综合征机制研究进展和思考 [J]. *中国针灸*, 2021, 41 (6): 699-702.

[24] 刘蒙蒙, 方朝晖. 方朝晖教授治疗围绝经期综合征诊疗经验 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2019, 42 (3): 28-29, 34.

[25] 严兴海, 吴斌, 蔡基鸿, 等. 何氏葛九膏对围绝经期综合征患者神经内分泌免疫网络的影响 [J]. *国际中医中药杂志*, 2019, 41 (11): 1174-1178.

[26] 靳庆丰, 靳紫薇, 马晓玲, 等. 应用百合固金汤与利维爱对更年期综合征患者内分泌以及神经内分泌免疫网络的影响 [J]. *世界中医药*, 2019, 14 (5): 1222-1226.