

· 基础研究 ·

盆痛灵方对子宫内膜异位症模型大鼠
镇痛作用机制的研究章仕雯¹ 付金荣² 徐 英¹ 张 婕² 夏 玉¹ 温欢欢²

摘要 目的 基于神经生长因子 (NGF) 调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 信号通路探讨盆痛灵方对子宫内膜异位症 (EMs) 模型大鼠的镇痛机制。方法 采用自体内膜移植法建立 SD 大鼠 EMs 疼痛模型, 将模型大鼠按随机数字表法分为鞘内注射 4 组 [对照组、NGF 诱导剂组 (NGF 组)、NGF 抑制剂组 (鞘 K 组)、p38MAPK 抑制剂组 (鞘 S 组)], 每组 15 只; 直肠给药 5 组 (模型组、盆痛灵方低、中、高剂量组、西药组), 每组 15 只; 另设假手术组 15 只。采用机械刺痛法观察鞘内注射组的痛阈值变化, 免疫组化染色法检测鞘内干预后模型大鼠内异位 NGF、磷酸化 p38 (p-p38)、瞬时受体电位辣椒素亚型 I (TRPV1) 蛋白表达, 并用蛋白免疫印迹 (Western Blot)、反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测鞘内干预后内异位及背根神经节 (DRG) 中 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白及基因表达水平的变化以及盆痛灵方灌肠干预后 p-p38 蛋白及基因表达。结果 鞘内注射干预后, 与对照组比较, NGF 组痛阈值下降, 鞘 K、鞘 S 组痛阈值上升 ($P<0.01$); 内异位及 DRG 内 NGF 诱导剂组 NGF、p38、TRPV1 mRNA 及蛋白表达均升高, 内异位内鞘 K、鞘 S 组 NGF mRNA 及蛋白表达均下降 ($P<0.01$), p-p38、TRPV1 蛋白表达下降 ($P<0.01$); DRG 内鞘 K 组 NGF、p38 mRNA 及蛋白表达下降, 鞘 S 组 p38、TRPV1 mRNA 及蛋白表达下降 ($P<0.05$); 及 NGF、p-p38 蛋白表达下降 ($P<0.01$)。直肠给药干预后, 与假手术组比较, 模型组中 p38 mRNA 及蛋白表达增加; 与模型组比较, 西药组及盆痛灵高剂量组 p38 mRNA 及蛋白表达均降低 ($P<0.01$), 盆痛灵低、中剂量组 p-p38 蛋白表达下降 ($P<0.01$)。结论 NGF-p38MAPK 信号通路的激活降调 TRPV1 基因和蛋白的表达参与 EMs 疼痛的发生, 盆痛灵方通过调控 NGF-p38MAPK-TRPV1 信号通路逆转 EMs 疼痛。

关键词 盆痛灵方; 子宫内膜异位症; 疼痛; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 神经生长因子; 信号通路

Analgesic Mechanism of Pentonglin Recipe on Model Rats with Endometriosis ZHANG Shi-wen¹, FU Jin-rong², XU Ying¹, ZHANG Jie², XIA Yu¹, and WEN Huan-huan² ¹ Longhua Clinical Medical College, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032); ² Department of Gynecology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032)

ABSTRACT Objective To study analgesic mechanism of Pengtonglin Recipe (PTLR) on endometriosis (EMs) rats based on the regulation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) signaling pathway by nerve growth factor (NGF). **Methods** The SD rat pain models of EMs were established by autologous endometrial transplantation. The model rats were divided into intrathecal injection 4 groups [control group, NGF inducer group (NGF group), NGF inhibitor group (sheath K group), p38MAPK inhibitor group (sheath S group), $n=15$]; rectal administration 5 groups (model group, low, medium, and high dose PTLR groups, Western medicine group, $n=15$) by using a completely randomized design. Another 15 rats were included as the sham-operation group. The changes of pain threshold in the intrathecal injection group were observed by mechanical stabbing. The expressions of NGF, phosphorylated p38 (p-p38), transient receptor potential capsaicin subtype I (TRPV1) protein in the intrathecal foci of the model rats were localized and detected by immunohistochemical

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81674009)

作者单位: 1. 上海中医药大学龙华临床医学院 (上海 200032); 2. 上海中医药大学附属龙华医院妇科 (上海 200032)

通讯作者: 付金荣, Tel: 021-64385700, E-mail: fujinrong2006@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210623.302

staining. The changes of NGF, p-p38, TRPV1 protein and gene expression levels in the intrathecal foci and dorsal root ganglion (DRG) after intrathecal intervention, and the expression of p-p38 protein and gene after pelvic pain relief enema intervention were detected by Western Blot and reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After intrathecal injection intervention, as compared with the control group, the pain threshold decreased in the NGF group and increased in the sheath K and sheath S groups ($P<0.01$); NGF, p38, TRPV1 mRNA and protein expressions increased in the intrathecal foci and intrathecal NGF inducer group in DRG, and decreased in the intrathecal foci sheath K and sheath S groups ($P<0.01$), and p-p38, TRPV1 protein expression decreased ($P<0.01$); NGF, p38 mRNA and protein expression decreased in the DRG intrathecal K group, p38, TRPV1 mRNA and protein expression decreased in the sheath S group ($P<0.05$), and NGF, p-p38 protein expression decreased ($P<0.01$). After rectal administration intervention, p38 mRNA and protein expression increased in the model group, Compared with the sham-operated group; compared with the model group, p38 mRNA and protein expressions decreased in the Western medicine group and the pentongling highdose group ($P<0.01$), and p-p38 protein expression decreased in the pelvic pentongling low and mediumdose groups ($P<0.01$). **Conclusion** Activation of NGF-p38MAPK signaling pathway down-regulated TRPV1 gene and protein expressions involved in the occurrence of pain in EMs, and PTLR reversed pain in EMs by regulating NGF-p38MAPK-TRPV1 signaling pathway.

KEYWORDS Pentonglin Recipe; endometriosis; pain; p38 mitogen-activated protein kinase; nerve growth factor; signaling pathway

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是一种雌激素依赖性疾病, 其特点是子宫内膜上皮细胞和基质细胞在子宫腔以外的部位生长, 通常伴有慢性盆腔痛、不孕及卵巢癌风险增加的特征, 在育龄期女性中的发病率可达 6%~10%^[1,2]。EMs 相关疼痛临床治疗困难, 发病机制复杂。付金荣教授结合多年中医妇科诊疗经验, 拟定活血化瘀, 清热利湿治则, 采用盆痛灵方治疗 EMs, 临床取得较好的疗效^[3]。本课题组前期的研究表明盆痛灵能提高 EMs 模型大鼠机械痛阈值, 降低内异灶内神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 及其受体酪氨酸激酶受体 A (tropomyosin receptor kinase A, TrkA)、神经营养因子受体 p75 (p75 neurotrophic receptor, p75NTR) 以及瞬时受体电位辣椒素亚型 I (transient receptor potential vanilloid receptor 1, TRPV1) 的表达^[4-6]。顾永忠等^[7]发现, NGF 与其受体结合后可以激活下游信号通路参与疼痛信号的传导, 其中包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 通路。本研究将在此基础上, 探讨 NGF 调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK) 通路介导 TRPV1, 以探明盆痛灵方逆转 EMs 模型大鼠的镇痛机制。

材料与方法

1 动物及分组 选用 9 周龄的 SPF 级 SD 大鼠 150 只, 雌性, 体重为 (180 ± 20) g, 采购自上海

中医药大学动物实验中心, 合格证号: SCXK (沪) 2014-0016。150 只大鼠按随机数字表法分为假手术组 (15 只) 和造模组 (135 只)。造模成功后按随机数字表法分为鞘内注射组和直肠给药组, 鞘内注射组又分为对照组、NGF 组、鞘 K 组、鞘 S 组, 每组 15 只。直肠给药组又分为模型组, 盆痛灵高、中、低剂量组以及西药组, 每组大鼠 15 只。动物实验严格遵守上海中医药大学实验动物伦理委员会的要求 (No. SZY201809005)。

2 药物

2.1 盆痛灵方水煎剂 (由三棱 9 g 莪术 9 g 延胡索 12 g 川楝子 9 g 虎杖 9 g 组成), 于上海中医药大学附属龙华医院采购。按成人 50 kg 体重计算, 每日生药量为 51 g, 盆痛灵高、中、低剂量组每天给药剂量分别为 40.8、20.4、10.2 g/kg (相当于人临床用量 40、20、10 倍)^[8]。

2.2 消炎痛混悬液 (消炎痛片, 每片含药量 0.1 g, 湖北东信药业有限公司, 批号: H42021462) 按成人每日用量 25 mg, 给药剂量根据“千克体重剂量换算公式”^[9]计算: $Db=Da \cdot Rab$; $Rab (ka/kb) \cdot (wa/wb)$ 1/3, 按每天 3 μ g/g 与 1 mL 生理盐水配制成混悬液。

2.3 鞘内注射药物 NGF 诱导剂 (recombinant rat beta-NGF protein, 货号: 556-NG-100, R&D 公司), 每只 3 μ g/d, NGF 抑制剂 (K-252a, 货号: 05288-100UG-F, Sigma 公司), 每只每次 2 μ g, 1 μ g 溶于 PBS, p38MAPK 抑制剂 (SB203580, 每

支 1 mg, 货号: 559389, Merck 公司), 每只每次 1 μ g, 2 μ g 溶于 10 μ L PBS。

3 主要试剂和仪器 试剂: PrimeScript RT 逆转录试剂盒 (批号: RR037A, TaKaRa 公司), 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (批号: A0208, 碧云天生物工程有限公司), NGF 抗体 (批号: Ab52918, Abcam 公司), p-p38 抗体 (批号: #4511, CST 公司), TRPV1 抗体 (批号: Ab6166, Abcam 公司), SYBR Premix Ex Taq II 试剂 (批号: RR420A, TaKaRa 公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0010, 碧云天生物工程有限公司), Trizol Reagent (批号: 15596026, Ambion 公司), 硝酸纤维素 (NC) 膜 (批号: HATF00010, 美国 Millipore 公司)。仪器: von Frey 机械性测痛仪 (型号: 2390, 意大利 UGO BASILE 公司), 荧光化学发光成像系统 (型号: ChemoQ460, 上海勤翔仪器), 荧光定量 PCR 仪 (型号: LightCycler96, 瑞士 Roche 公司), 低温高速离心机 (型号: MIKRO220R, 德国 Hettich 公司), 转移电泳槽 (型号: VE186, 上海天能科技有限公司), 酶标仪 (型号: MK3, 美国 Thermo 公司) 等。

4 造模及给药方法 除假手术组, 其余各组大鼠造模方法采用 Berkley KJ 等^[10]方法, 即将大鼠内膜进行自身种植, 内膜组织异位后会因积液形成凸起, 测量内异灶的长、宽、高, 计算异位灶体积, 积液高度 >1.5 mm 即为造模成功^[11]。假手术组则是在开腹后对一侧子宫进行结扎。两周后假手术组与造模组同样进行常规的开关腹手术。

直肠干预给药: 模型组及假手术组 (每日灌肠 1 mL 生理盐水)、西药组 (每日灌肠 1 mL 消炎痛混悬液) 及盆痛灵高、中、低剂量组每天以 40.8、20.4、10.2 g/kg 剂量配成 1 mL 药液灌肠, 连续给药 4 周, 麻醉处死后, 取大鼠异位灶和 L5-L6 脊髓背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG)。鞘内干预: 对照组 10 μ L/d 生理盐水, NGF 诱导剂组 (NGF 组) 10 μ L/d NGF, NGF 抑制剂组 (鞘 K 组) 10 μ L/d K252a, p38AMPK 抑制剂组 (鞘 S 组) 10 μ L/d SB203580, 连续给药 5 天, 麻醉处死取内异灶及 DRG。

5 检测指标及方法

5.1 机械痛阈的测量 将大鼠放置于自制的透明塑料箱里, 塑料箱被分割为 10 个大小相等的区域, 上方有一塑料板用来遮盖, 以防在测量过程中大鼠逃脱, 下方为金属网格制成的铁架, 每次放置 10 只大

鼠测量, 大鼠放入 30 min 后使其适应环境后开始进行测定。使用机械性电子测痛仪来测量, 探针沿铁丝网边缘匀速施加压力刺向大鼠后爪脚掌正中, 当大鼠出现缩腿或逃跑行为时记录仪器屏幕上显示的压力值 (精确度 0.1 g), 此压力值即为机械痛阈值 (paw withdrawal threshold, PWT)。每只大鼠重复测定 3 次, 每次测量间隔均等, 取平均值^[12]。

5.2 反转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测内异灶及 DRG 内 NGF、p38、TRPV1 mRNA 表达 取 50 mg 组织样本研磨后加入 Trizol 裂解法提取总 RNA, 测定样品的 RNA 浓度和纯度。使用逆转录试剂盒进行 cDNA 的合成。以逆转录的 cDNA 为模板设计引物序列, 引物序列见表 1。使用 TaKaRa 公司提供的 SYBR Premix Ex Taq II 试剂进行 RT-PCR。每个样本做 3 次重复对照。设定 PCR 程序, 上机扩增, 进行 40 次的循环。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其 mRNA 相对表达量。

表 1 PCR 反应引物序列

引物名称	引物序列	产物大小 (bp)
β -actin	上游: 5' -GGAGAAGATTTGGCACCACAC-3'	173
	下游: 5' -ACACAGCCTGGATGGCTACG-3'	
NGF	上游: 5' -CATCCACCCACCCAGTCTTC-3'	107
	上游: 5' -CACCTCCTTGCCCTTGATGT-3'	
p38	上游: 5' -TGGATATTTGGTCCGTGGGC-3'	110
	上游: 5' -CCCCGTCAGACGCATTATCT-3'	
TRPV1	上游: 5' -CATGGGTGAGACCGTCAACA-3'	116
	上游: 5' -AGGCCTTCCTCATGCACTTC-3'	

5.3 Western Blot 法检测内异灶及 DRG 内 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白表达 取适量组织, 用冰 PBS 洗涤 3 次。充分裂解后放入离心机 11 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 测定其蛋白浓度。将样本和蛋白质 Marker 上样并加入电泳液电泳, 后将凝胶蛋白转移至 NC 膜。加入脱脂牛奶封闭 1.5 h。然后分别加入稀释过的相应抗体 (NGF、p-p38 按 1:1 000 稀释; TRPV1 按 1:500 稀释), 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。第 2 天, TBST 洗膜 3 次, 每次 5~10 min, 后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (体积稀释比例为 1:1 000), 摇床上振荡孵育 1.5 h, 再用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5~10 min。最后取 ECL 发光试剂, 以 A 液:B 液=1:1 的剂量混合后滴加于 NC 膜上, 荧光化学发光成像仪中曝光 3 次, 选取重叠值。利用各蛋白灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值反应各蛋

白含量。

5.4 免疫组化染色法检测 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白表达 取甲醛固定的组织石蜡包埋和厚度 $4\mu\text{m}$ 切片后二甲苯中脱蜡，在按浓度梯度递减的乙醇中脱去二甲苯，3% H_2O_2 甲醇以消除内源性过氧化氢酶，然后利用柠檬酸钠修复液对其进行高温修复，加入一抗（兔抗鼠）工作液后于 4°C 冰箱保存，加入二抗（羊抗兔）前用 PBS 洗涤， 37°C 孵育 2 h。DAB 显色后用苏木素染液复染，乙醇二甲苯脱水后透明，最后封片于显微镜下观察拍片。Image-pro 软件进行图像分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 25.0 进行统计分析，计量资料首先对数据进行正态性检验及方差齐性检验，若满足正态性及方差齐性，统计描述方法为 $\bar{x} \pm s$ ，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较选用 SNK 检验；若不满足正态性或方差齐性，则采用中位数和百分位数进行统计描述，非参数检验进行统计分析， $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1 鞘内干预前后 4 组大鼠痛阈值比较（表 2） 造模成功 7 天后，与对照组比较，各药物组痛阈值差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。鞘内给予生理盐水及药物干预后，NGF 组痛阈值下降，鞘 K、鞘 S 组痛阈值上升，差异均有统计学意义（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）。

2 鞘内干预后 4 组大鼠内异灶及 DRG 内 NGF、p38、TRPV1 mRNA 表达水平比较（表 3） 内异灶中，与对照组比较，NGF 组 NGF、p38、TRPV1

表 2 鞘内干预前后 4 组大鼠痛阈值比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	n	时间	痛阈值（g）
对照	9	干预前	44.56 ± 7.52
		干预后	43.19 ± 4.89
NGF	9	干预前	45.41 ± 3.24
		干预后	$39.48 \pm 2.88^*$
鞘 K	12	干预前	40.17 ± 4.77
		干预后	$50.91 \pm 3.70^{**}$
鞘 S	11	干预前	42.79 ± 5.79
		干预后	$48.00 \pm 3.65^{**}$

注：与对照组同期比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

mRNA 表达升高，鞘 K、鞘 S 组 NGF mRNA 表达下降，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）；DRG 中，与对照组比较，NGF 组 NGF、p38、TRPV1 mRNA 表达增加，鞘 K 组 NGF、p38 mRNA 表达下降，鞘 S 组 p38、TRPV1 mRNA 表达下降，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），鞘 S 组 NGF mRNA 表达差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

3 鞘内干预后 4 组 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白表达水平比较（表 4、5，图 1、2） 免疫组化结果显示，蓝色为染色后目标蛋白的细胞核，内异灶中，与对照组比较，NGF 组 NGF、TRPV1 相对蛋白表达增加（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），p-p38 蛋白表达差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；鞘 K、鞘 S 组 p-p38 蛋白表达均下降，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

Western Blot 结果显示，与对照组比较，内异灶及 DRG 中 NGF 组 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白水平均升高；鞘 S、鞘 K 组均下降，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）。

4 盆痛灵方直肠干预后 6 组大鼠内异灶及

表 3 鞘内干预后 4 组大鼠内异灶及 DRG 内 NGF、p38、TRPV1 mRNA 表达水平比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	n	NGF		p38		TRPV1	
		内异灶	DRG	内异灶	DRG	内异灶	DRG
对照	9	1.10 ± 0.14	1.00 ± 0.15	1.28 ± 0.97	0.82 ± 0.09	0.97 ± 0.31	0.74 ± 0.16
NGF	9	$1.78 \pm 0.52^{**}$	$2.02 \pm 0.20^{**}$	$2.68 \pm 0.22^{**}$	$1.06 \pm 0.16^{**}$	$2.22 \pm 0.25^{**}$	$2.13 \pm 0.34^{**}$
鞘 K	9	$0.43 \pm 0.09^{**}$	$0.80 \pm 0.21^*$	0.82 ± 0.44	$0.64 \pm 0.25^*$	0.85 ± 0.58	0.65 ± 0.12
鞘 S	9	$0.65 \pm 0.18^{**}$	1.03 ± 0.12	1.21 ± 0.50	$0.65 \pm 0.12^*$	0.81 ± 0.22	$0.96 \pm 0.14^*$

注：与对照组同部位比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

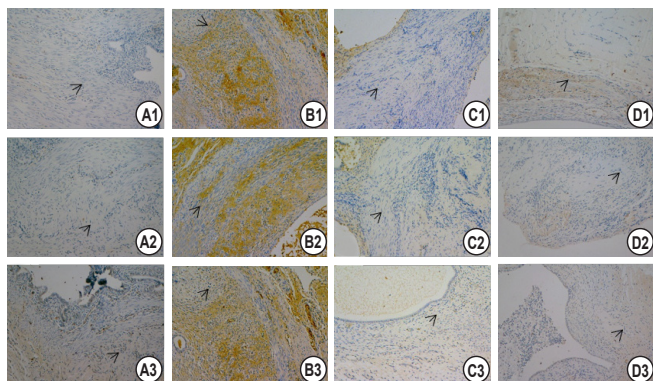
表 4 免疫组化检测鞘内干预后 4 组 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白表达水平比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	n	NGF	p-p38	TRPV1
对照	5	$54\ 008\ 468 \pm 27\ 254\ 705$	$90\ 313\ 402 \pm 39\ 901\ 119$	$56\ 502\ 162 \pm 26\ 263\ 948$
NGF	5	$151\ 084\ 037 \pm 66\ 393\ 868^{**}$	$109\ 530\ 409 \pm 51\ 087\ 185$	$100\ 920\ 634 \pm 45\ 164\ 121^*$
鞘 K	5	$24\ 169\ 862 \pm 11\ 783\ 881$	$38\ 673\ 496 \pm 19\ 190\ 705^*$	$58\ 0676\ 14 \pm 25\ 846\ 356$
鞘 S	5	$39\ 855\ 563 \pm 19\ 701\ 217$	$32\ 221\ 713 \pm 14\ 659\ 518^*$	$51\ 511\ 820 \pm 24\ 659\ 451$

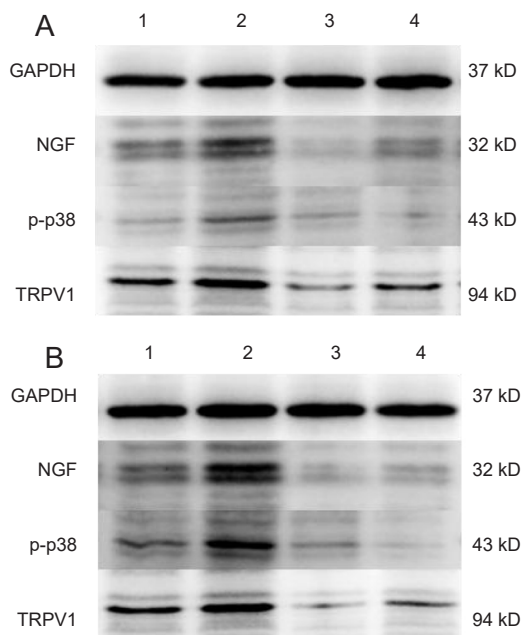
注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

表 5 鞘内干预后 4 组大鼠内异灶及 DRG 内 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NGF		p-p38		TRPV1	
		内异灶	DRG	内异灶	DRG	内异灶	DRG
对照	9	1.23 ± 0.02	1.06 ± 0.04	0.32 ± 0.01	0.53 ± 0.02	1.07 ± 0.01	0.89 ± 0.01
NGF	9	1.58 ± 0.05*	1.79 ± 0.01*	0.57 ± 0.04*	0.75 ± 0.02*	1.37 ± 0.01*	1.12 ± 0.05*
鞘 K	9	0.40 ± 0.02*	0.48 ± 0.01*	0.23 ± 0.01*	0.30 ± 0.02*	0.42 ± 0.01*	0.27 ± 0.02*
鞘 S	9	0.77 ± 0.02*	0.58 ± 0.01*	0.16 ± 0.01*	0.11 ± 0.01*	0.66 ± 0.01*	0.53 ± 0.01*

注: 与对照组同部位比较, * $P < 0.01$ 

注: A 为对照组, B 为 NGF 组, C 为鞘 K 组, D 为鞘 S 组; A1~D1 为 NGF, A2~D2 为 p-p38, A3~D3 为 TRPV1

图 1 4 组异位内膜组织中 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白表达比较 (免疫组化, $\times 400$)

注: A 为内异灶, B 为 DRG; 1 为对照组; 2 为 NGF 组; 3 为鞘 K 组; 4 为鞘 S 组

图 2 鞘内注射干预后 4 组大鼠内异灶及 DRG 内 NGF、p-p38、TRPV1 蛋白表达电泳图

DRG 内 p38 mRNA 表达水平比较 (表 6) 内异灶及 DRG 中, 与假手术组比较, 模型组 p38 mRNA 的表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西

表 6 盆痛灵方直肠干预后 6 组大鼠内异灶及 DRG 中 p38 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p38	
		内异灶	DRG
假手术	3	1.08 ± 0.14	1.06 ± 0.09
模型	3	3.49 ± 0.66*	1.48 ± 0.16*
西药	3	1.48 ± 0.25 $\Delta\Delta$	1.13 ± 0.06 $\Delta\Delta$
盆痛灵高剂量	3	2.17 ± 0.14 $\Delta\Delta$	1.19 ± 0.01 $\Delta\Delta$
中剂量	3	2.61 ± 0.67 Δ	1.33 ± 0.12
低剂量	3	3.48 ± 0.42	1.56 ± 0.12

注: 与假手术组同部位比较, * $P < 0.01$; 与模型组同部位比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

药组及盆痛灵高剂量组 p38 mRNA 表达均降低, ($P < 0.01$); 盆痛灵中剂量组 p38 mRNA 表达在内异灶中亦降低 ($P < 0.05$), 而在 DRG 中差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

5 盆痛灵方直肠干预后 6 组内膜组织中 p-p38 蛋白表达水平比较 (表 7、8, 图 3、4) 免疫组化结果提示, 内膜组织中, 与假手术组比较, 模型组内 p-p38 蛋白表达升高; 与模型组比较, 西药组及盆痛灵高剂量组中 p-p38 蛋白表达下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

Western Blot 结果提示, 与假手术组比较, 模型组内异灶及 DRG 中 p-p38 的蛋白表达量均升高 ($P < 0.01$)。西药组, 盆痛灵高、中、低剂量组 p-p38 的蛋白表达量较模型组均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 7 免疫组化检测 6 组 p-p38 蛋白在内膜组织中表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

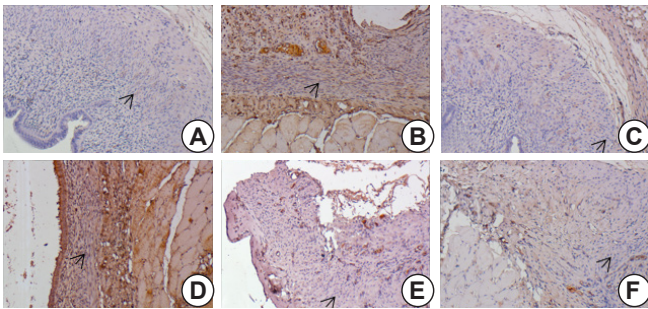
组别	n	p-p38
假手术	5	19 806 835 ± 8 804 596
模型	5	268 178 467 ± 129 155 186*
西药	5	61 958 808 ± 30 644 325 Δ
盆痛灵高剂量	5	80 775 550 ± 40 096 335 Δ
中剂量	5	77 237 105 ± 36 308 845
低剂量	5	201 619 974 ± 91 870 900

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$, 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

表 8 6 组大鼠内异灶及 DRG 中 p-p38 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

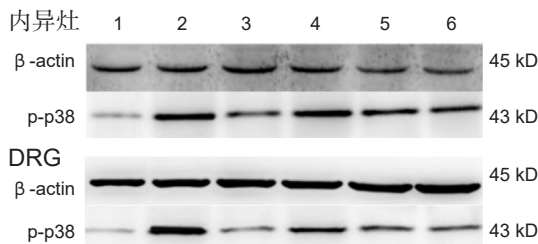
组别	n	p-p38	
		内异灶	DRG
假手术	3	0.39 ± 0.01	0.11 ± 0.00
模型	3	1.98 ± 0.03*	0.69 ± 0.01*
西药	3	0.94 ± 0.01 [△]	0.22 ± 0.01 [△]
盆痛灵高剂量	3	1.20 ± 0.01 [△]	0.31 ± 0.00 [△]
中剂量	3	1.41 ± 0.01 [△]	0.36 ± 0.00 [△]
低剂量	3	1.86 ± 0.01 [△]	0.49 ± 0.01 [△]

注: 与假手术组同部位比较, * $P < 0.01$; 与模型组同部位比较, $^{\Delta} P < 0.01$



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为西药组; D 为盆痛灵低剂量组; E 为盆痛灵中剂量组; F 盆痛灵高剂量组

图 3 6 组 p-p38 蛋白在内膜组织中表达结果 (免疫组化, $\times 200$)



注: 1 为假手术组; 2 为模型组; 3 为西药组; 4 为盆痛灵低剂量组; 5 为盆痛灵中剂量组; 6 为盆痛灵高剂量组

图 4 6 组大鼠内异灶及 DRG 中 p-p38 蛋白表达电泳图

讨 论

EMs 属中医学“妇人腹痛”“痛经”等范畴, 付金荣教授提出湿、热、瘀并存, 是 EMs 发病的主要病机, 拟盆痛灵方治疗内异症疼痛。方中三棱, 为肝经血分之药, 可破血中之气; 莪术, 又可破气中之血, 消癥瘕积聚, 兼可益气, 二者常合用, 共奏破瘀血行气滞之功效; 虎杖善泄肝胆湿热, 又可破瘀通经, 佐以延胡索、川楝子活血利气; 全方清热利湿, 活血止痛。EMs 临床表现多样, 长期反复的疼痛使得患者常常伴有焦虑、抑郁等精神障碍, 严重影响了女性的生活质量。其疼痛的发生机制尚不明确, 目前的研究认为^[13], EMs 病灶可形成独特的微环境, 其特征在于炎症失衡, 氧化应激和铁浓度的升高, 同时与多种

激酶信号通路相互作用, 参与周围神经纤维的敏化和活化, 从而促进内异症疼痛的发展。

MAPK 是哺乳动物体内广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可以被一系列的细胞外信号或刺激激活, 调节细胞内的反应, 引起下游信号分子的变化^[14]。p38 是 MAPK 家族中重要的一员, 可被应激刺激 (热休克和缺氧等)、炎症因子 (肿瘤坏死因子 α 、白介素-1 β 和 NGF 等) 及脂多糖等成分激活发生双磷酸化^[14-17], 进而激活各种转录因子参与调节细胞因子的表达, 从外周及中枢水平影响疼痛信号的传导^[18]。Ji RR 等^[19]发现, 在利用完全弗氏佐剂建立的炎性痛动物模型的 DRG 内, 磷酸化的 p38 水平会显著升高, 提示 p38 与疼痛敏感性高度相关, 鞘内注射 p38 阻断剂 SB203580 阻断 DRG 内 p38 的磷酸化过程后, 炎性痛模型大鼠对伤害性热刺激的痛敏明显降低, 且在造模前后注射 SB203580, 均可使大鼠的热性痛敏降低。本实验同样发现, 自体构建 EMs 疼痛模型大鼠后, 与假手术组比较, 模型组大鼠内异灶及 DRG 内磷酸化的 p38 表达明显升高, 鞘内注射 p38MAPK 抑制剂 (SB203580) 干预后磷酸化的 p38 表达下降, 大鼠痛阈较对照组明显升高。由此可见, p38MAPK 与子宫内膜异位症疼痛关系密切。

NGF 可通过调节多种疼痛相关受体, 参与脊髓 DRG 内疼痛信号的传导。有研究显示^[18, 20, 21], DRG 胞体内的 p38MAPK 可被 NGF 激活, 磷酸化的 p38MAPK 则通过调节下游的转录因子, 促进各种疼痛因子的合成及释放, 产生疼痛过敏。前期实验发现^[5], 在 EMs 疼痛模型大鼠内异灶内 NGF 及其受体 TrkA、p75NTR 的表达增加。本实验通过鞘内给予 NGF 诱导剂干预后发现, 内异灶及 DRG 内 NGF、p-p38 表达升高, 大鼠痛阈较对照组下降; NGF 受体抑制剂 (K252a) 干预后, 与对照组比较, NGF 以及磷酸化的 p38 表达水平下降, NGF 与其受体结合过程被阻断, 抑制了 p38 的磷酸化过程, 大鼠痛阈升高, 提示 NGF 可能通过与其受体结合激活了 p38, 促进了 EMs 疼痛敏化的发展。

研究发现, NGF 激活 p38MAPK 后还可引起 TRPV1 表达的增加, 鞘内给予 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可阻止大鼠坐骨神经和后爪皮肤内 TRPV1 的增加并减轻动物的热痛觉过敏^[19, 22]。TRPV1 是机体内重要的痛觉传感器, 可以将伤害性疼痛信号转化为化学信号向中枢传递, 是联系中枢与外周的重要媒介。前期实验发现^[23], TRPV1 在 EMs 模型大鼠内异灶及 DRG 内的表达明显升高, 本实验

利用鞘内注射 p38MAPK 抑制剂干预模型大鼠后发现, 大鼠痛阈升高, TRPV1 的表达下降, 提示当抑制了 p38MAPK 对 TRPV1 的激活过程, 机体的伤害性疼痛信号由外周向中枢的传递过程被阻断, 大鼠痛敏下降。

由此推测, 盆痛灵方对 EMs 疼痛大鼠的镇痛机制可能是干预了 NGF 与其受体结合激活 p38 通路的过程, 同时通过抑制 p38 激活, 调控下游信号分子 TRPV1 的表达抑制痛觉敏化, 其确切的中枢机制有待进一步实验探明。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Vercellini P, Vigano P, Somigliana E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10 (5): 261–275.
- [2] Giudice LC, Kao LC. Endometriosis[J]. Lancet, 2004, 364 (9447): 1789–1799.
- [3] 付金荣, 郑锦, 胡晓梅, 等. 盆痛灵直肠给药治疗子宫内位异位症盆腔痛的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41 (3): 35–36.
- [4] 葛曼, 唐虹, 付金荣. 盆痛灵及加味盆痛灵镇痛作用的比较研究[J]. 黑龙江中医药, 2013, 42 (2): 24–25.
- [5] 徐英, 付金荣, 沈宇凤, 等. 盆痛灵方对子宫内位异位症大鼠神经生长因子及其受体表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33 (6): 45–50.
- [6] 付金荣, 朱姝, 徐英, 等. 盆痛灵灌肠对子宫内位异位症模型大鼠疼痛行为的影响及其机理探讨[J]. 中医药学报, 2020, 48 (1): 17–21.
- [7] 顾永忠, 孙湛博. 子宫内位异位症相关疼痛机制研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26 (10): 801–804.
- [8] 葛曼, 付金荣, 唐虹, 等. 加味盆痛灵对子宫内位异位症模型大鼠血清及腹腔液 IL-1 β 、NGF 的影响[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47 (3): 79–81.
- [9] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (9): 1069–1072.
- [10] Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, et al. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (30): 11094–11098.
- [11] 刘学军, 何援利. 子宫内位异位症动物模型的建立及应用[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2002, 18 (7): 444–445.
- [12] Scholl B, Bersinger NA, Kuhn A, et al. Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis[J]. Gynecol Endocrinol, 2009, 25 (11): 701–706.
- [13] McKinnon BD, Kocbek V, Nirgianakis K, et al. Kinase signaling pathways in endometriosis: potential targets for non-hormonal therapeutics[J]. Hum Reprod Update, 2016, 22 (3): 382–403.
- [14] Morotti M, Vincent K, Brawn J, et al. Peripheral changes in endometriosis-associated pain[J]. Hum Reprod Update, 2014, 20 (5): 717–736.
- [15] Olajide OA, Aderogba MA, Okorji UP, et al. *Bridelia ferruginea* produces antineuro-inflammatory activity through inhibition of nuclear factor-kappa B and p38 MAPK signaling[J]. Evid Based Complem Alternat Med, 2012 (22): 546873.
- [16] Lin X, Wang M, Zhang J, et al. p38 MAPK: a potential target of chronic pain[J]. Curr Med Chemistry, 2014, 21 (38): 4405–4418.
- [17] Taro M, Ingela T, Majlis B, et al. p38MAPK kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis[J]. Cell Biol, 2002, 156: 149–160.
- [18] Anand P, Shenoy R, Palmer JE, et al. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor diltapimod in neuropathic pain following nerve injury[J]. Eur J Pain, 2012, 15 (10): 1040–1048.
- [19] 张涛, 杨承祥, 王汉兵. p38 MAPK 信号通路疼痛的关系[J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 18 (3): 177–180.
- [20] Ji RR, Samad TA, Jin SX, et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia[J]. Neuron, 2002, 36 (1): 57–68.
- [21] Huang F, Jing C, Liu Q, et al. MAPK/ERK signal pathway involved expression of COX-2 and VEGF by IL-1 β induced in human endometriosis stromal cells *in vitro*[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6 (10): 2129–2136.
- [22] Rocha MG, Silva J, Ribeiro D, et al. TRPV1 expression on peritoneal endometriosis foci is associated with chronic pelvic pain[J]. Reprod Sci, 2011, 18 (6): 511–515.
- [23] Svensson CI, Fitzsimmons B, Azizi S, et al. Spinal p38 β isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization[J]. Neurochemistry, 2005, 92 (6): 1508–1520.
- [24] 温欢欢, 付金荣, 徐英, 等. 盆痛灵方对子宫内位异位症模型大鼠 TRPV1 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40 (9): 1070–1074.

(收稿: 2021-02-07 在线: 2021-07-26)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶