

· 药理 ·

良方温经汤调控内质网应激减轻细胞凋亡改善寒凝血瘀证 大鼠卵巢微血管损伤机制

吕天元¹, 马学妍¹, 胡月¹, 冯立群¹, 宋晓丹¹, 梅连敏¹, 成秀梅^{1,2*}

(1. 河北中医药大学, 石家庄 050200; 2. 河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室, 石家庄 050091)

【摘要】 目的:观察寒凝血瘀证大鼠卵巢微血管损伤情况,探讨良方温经汤改善寒凝血瘀证大鼠卵巢微血管损伤的机制。
方法:50只SPF级雌性SD大鼠随机分为空白组,模型组,良方温经汤低、高剂量组(8.1、16.2 g·kg⁻¹)和4-苯基丁酸(0.1 g·kg⁻¹)组,每组10只。采用冰水浴法建立寒凝血瘀证大鼠模型。造模同时干预,良方温经汤连续治疗21 d,每日1次。观察大鼠寒凝血瘀证候表现,记录动情周期;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清生殖激素和卵巢组织中内皮素-1(ET-1)、一氧化氮(NO)、血栓调节蛋白(TM)和血管性血友病因子(vWF)含量;测定凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB);激光散斑血流成像技术检测卵巢微循环血流灌注量;苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢组织病理形态;流式细胞术检测卵巢凋亡率;透射电镜观察卵巢微血管内皮细胞超微结构;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测一氧化氮合成酶(eNOS)、磷酸化(p)-eNOS、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、肌醇依赖性激酶1 α (IRE1 α)、p-IRE1 α 、凋亡信号调节激酶1(ASK1)、p-ASK1、c-JUN氨基末端激酶(JNK)、p-JNK蛋白表达情况;免疫荧光法检测卵巢微血管内皮细胞中Bax、Bcl-2表达情况。
结果:与空白组比较,模型组大鼠出现寒凝血瘀证候表现,动情周期延长,生殖激素紊乱,病理结果显示各级卵泡数目减少,颗粒细胞排列紊乱;卵巢微循环血流灌注量显著下降($P<0.01$),PT、APTT、TT降低($P<0.05$, $P<0.01$),FIB含量升高($P<0.05$),卵巢组织中NO含量降低,ET-1、vWF和TM显著升高($P<0.01$),卵巢细胞凋亡率显著升高($P<0.01$),p-eNOS/eNOS、Bcl-2明显降低($P<0.05$),Bax、剪切的(cleaved)-Caspase3/Caspase3、GRP78、CHOP、p-IRE1 α /IRE1 α 、p-ASK1/ASK1、p-JNK/JNK明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,良方温经汤干预后,寒凝血瘀证候表现有所缓解,动情周期逐渐恢复,卵巢组织病理形态和内皮细胞超微结构有所恢复。微循环血流灌注量明显升高($P<0.05$),卵巢组织中NO含量升高,ET-1、vWF和TM含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),p-eNOS/eNOS、Bcl-2明显升高($P<0.05$),Bax、cleaved-Caspase3/Caspase3、GRP78、CHOP、p-IRE1 α /IRE1 α 、p-ASK1/ASK1、p-JNK/JNK明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。
结论:良方温经汤可能调控IRE1 α /ASK1/JNK信号通路抑制内质网应激减轻细胞凋亡,改善寒凝血瘀证大鼠卵巢微血管内皮损伤。

【关键词】 良方温经汤;寒凝血瘀证;内质网应激;细胞凋亡;微血管内皮功能

【中图分类号】 R289;R259;R285 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2025)20-0103-12

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20250809

【网络出版地址】 <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250520.1937.010>

【网络出版日期】 2025-05-21 10:42:04



Mechanism of Liangfang Wenjing Decoction in Regulating Endoplasmic Reticulum Stress to Reduce Apoptosis and Alleviate Ovarian Microvascular Injury in Rats with Cold Coagulation and Blood Stasis Syndrome

LYU Tianyuan¹, MA Xueyan¹, HU Yue¹, FENG Liquan¹, SONG Xiaodan¹,
MEI Lianmin¹, CHENG Xiumei^{1,2*}

【收稿日期】 2025-03-20

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82174426);河北省自然科学基金面上项目(H2021423020);河北中医药大学燕赵医学资助项目(YZZZ2024010);河北省研究生创新能力培养项目(CXZZBS2024148)

【第一作者】 吕天元,在读博士,从事月经病寒证生物学基础及中药干预研究,E-mail:lvtianyuan1106@hebcm.edu.com

【通信作者】 *成秀梅,博士,教授,博士生导师,从事月经病寒证生物学基础及中药干预研究,E-mail:chengxiumei@hebcm.edu.cn

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Hebei Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

[Abstract] **Objective:** To observe ovarian microvascular damage in rats with cold coagulation and blood stasis syndrome and to explore the mechanism by which Liangfang Wenjing decoction improves this condition in rats. **Methods:** Fifty SPF female SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, low-dose ($8.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high-dose groups ($16.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) of Liangfang Wenjing decoction, and a 4-phenylbutyric acid ($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, with 10 rats in each group. The ice-water bath method was employed to establish the rat model of cold coagulation and blood stasis syndrome. Concurrent with modeling, Liangfang Wenjing decoction was administered continuously for 21 days, once daily. The rats' syndrome manifestations and estrous cycles were recorded. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum reproductive hormone levels and levels of endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO), thrombomodulin (TM), and von Willebrand factor (vWF) in ovarian tissue. Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), and fibrinogen (FIB) were measured. The ovarian microcirculatory blood perfusion was detected by laser speckle contrast imaging. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the ovarian histopathology, flow cytometry to detect ovarian apoptosis rate, and transmission electron microscopy to observe the ultrastructure of ovarian microvascular endothelial cells. Western blot was employed to detect the protein expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated eNOS (p-eNOS), Caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), glucose-regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), inositol-requiring enzyme1 α (IRE1 α), p-IRE1 α , apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), p-ASK1, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p-JNK. Immunofluorescence was used to detect ovarian Bax and Bcl-2 expression in microvascular endothelial cells. **Results:** Compared with the blank group, the model group showed signs of cold coagulation and blood stasis syndrome, prolonged estrus cycles, and reproductive hormone disorders. Histopathological results revealed a decrease in follicle counts at all stages and disorganized granulosa cell arrangement. Ovarian microcirculatory perfusion was significantly decreased ($P<0.01$). PT, APTT, and TT were reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), while FIB levels were increased ($P<0.05$). In ovarian tissue, NO content was decreased, while ET-1, vWF, and TM levels were increased significantly ($P<0.01$). The apoptosis rate of ovarian cells was markedly increased ($P<0.01$). Furthermore, p-eNOS/eNOS and Bcl-2 were decreased ($P<0.05$), whereas Bax, cleaved-Caspase-3/Caspase-3, GRP78, CHOP, p-IRE1 α /IRE1 α , p-ASK1/ASK1, and p-JNK/JNK expression showed significant increases ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, Liangfang Wenjing decoction intervention alleviated the symptoms of cold coagulation and blood stasis, gradually restored the estrus cycle, and improved ovarian histopathology and endothelial cell ultrastructure. Microcirculatory blood perfusion was significantly elevated ($P<0.05$). NO content in ovarian tissue was elevated, while ET-1, vWF, and TM levels were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The p-eNOS/eNOS ratio and Bcl-2 expression were significantly elevated ($P<0.05$), while the expression of Bax, cleaved-Caspase-3/Caspase-3, GRP78, CHOP, p-IRE1 α /IRE1 α , p-ASK1/ASK1, and p-JNK/JNK was significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Liangfang Wenjing decoction may regulate the IRE1 α /ASK1/JNK signaling pathway to inhibit endoplasmic reticulum stress, attenuate apoptosis, and improve microvascular endothelial injury in ovaries of rats with cold coagulation and blood stasis syndrome.

[Keywords] Liangfang Wenjing decoction; cold coagulation and blood stasis syndrome; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; microvascular endothelial function

在寒冷环境中,人体可能因暴露于低温而承受寒冷应激,这种状态会触发一系列的病理变化^[1-2]。生殖系统对寒冷刺激尤为敏感,研究表明低温暴露可造成生殖内分泌紊乱,引发月经失调、闭经或不孕等病症^[3-5]。寒凝血瘀证是妇科常见证候,中医理论认为,寒为阴邪,主收引凝滞。寒邪侵袭人体,会导致阳气受损,失于温煦濡养。当寒邪侵入胞宫时,胞络瘀阻,气血运行不畅,从而引发多种妇科疾病。《黄帝内经·素问·至真要大论》中云“寒者热之”,寒凝血瘀证治疗当以温经散寒,活血祛瘀。

良方温经汤出自南宋陈自明《妇人大全良方》,是我国第一部妇科专著,该方2018年被收录到《古代经典名方目录(第一批)》,是治疗妇科寒凝血瘀

证的经典方剂^[6]。课题组前期研究表明,寒凝血瘀证模型大鼠血液流变学异常,卵巢子宫组织血管内皮分泌的血管活性因子、炎性因子、凝血-抗凝血因子失衡,存在生殖器官微循环功能障碍和血管内皮功能损伤^[7-10]。良方温经汤可有效缓解寒凝血瘀证大鼠子宫和卵巢的微循环障碍并改善血管内皮功能^[11-13],但具体的作用机制尚不明确。

内皮细胞凋亡是引起血管内皮损伤的重要因素^[14]。内质网应激(ERS)是近年来新发现的一种介导细胞凋亡的途径,经证明与内皮损伤关系密切^[15]。干预ERS可有效对抗内皮细胞凋亡,从而起到保护内皮功能的作用^[16-18]。因此,本研究建立寒凝血瘀证大鼠模型,探究良方温经汤调控ERS减轻

细胞凋亡改善寒凝血瘀证大鼠卵巢血管内皮损伤的机制,为进一步完善良方温经汤对寒凝血瘀证的治疗机制提供依据。

1 材料

1.1 动物 50只SPF级SD雌性大鼠,体质量(180±20)g,6周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2021-0006。本实验已通过河北中医药大学伦理委员会审批(伦理审查批号为DWLL2021025)。大鼠饲养于河北中医药大学实验动物中心SPF级环境中,期间大鼠进食饮水自由,昼夜节律光照,室温22~25℃,湿度40%~60%,通风良好。

1.2 药物与试剂 4-苯基丁酸(美国Med Chem Express公司,货号HY-A0281);良方温经汤方(《妇人良方大全》)组成:当归15g(批号21052131)、白芍15g(批号21080631)、肉桂15g(批号21031272)、牡丹皮15g(批号210440121)、川芎15g(批号21071811)、莪术15g(批号21050861)、牛膝30g(批号21052831)、人参30g(批号210661541)、甘草30g(批号20082641),选取神威药业有限公司制成良方温经汤颗粒剂。Annexin V/PI流式凋亡试剂盒、苏木素-伊红(HE)染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为CA1020、G1220);葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、山羊抗鼠荧光二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为66574-1-IG、26593-1-AP、15204-1-AP、27120-1-AP、60004-1-IG、SA00013-1);Bcl-2相关X蛋白(Bax)、 β -微管蛋白(β -tubulin)抗体(武汉塞维尔生物技术有限公司,货号分别为GB114122、GB15139);胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、细胞凋亡信号调节激酶1(ASK1)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、磷酸化(p)-JNK、肌醇依赖酶1 α (IRE1 α)、p-eNOS抗体(美国CST公司,货号分别为9662、8662、9252、4668、3294、9571);CD34、山羊抗兔荧光二抗(美国Abcam公司,货号分别为ab150078、ab812889);p-ASK1、p-IRE1 α 抗体(美国Thermo公司,货号分别为MA5-36973、PA1-16927);内皮素(ET-1)、一氧化氮(NO)、血栓调节蛋白(TM)、血管性血友病因子(vWF)、雌二醇(E₂)、促卵泡激素(FSH)、促黄体激素(LH)试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,货号分别为RA20560、BTK006、RA20658、RA20453、RA20666、RA20044、RA20133)。

1.3 仪器 EG1150H型石蜡包埋机(德国Leica公司);Epoch型酶标仪(美国BioTek公司),激光散斑成像系统(英国Moor公司);LAS4010型化学发光成像仪(美国Image Quant公司);WIX EP300型韦克斯电泳仪(北京韦克斯公司);Semi Day型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司);VanoxDM-10AD奥林巴斯病理图文采集系统(日本Olympus公司);RAC-1830型全自动凝血分析仪(武汉塞维尔生物技术有限公司);Fresco21型冷冻高速离心机(赛默飞科技中国有限公司);EVOSFL型荧光显微镜、Attune NXT型流式细胞仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 分组及造模、给药 大鼠适应性喂养7d后,采用亚甲基蓝染色观察大鼠阴道上皮脱落细胞涂片,将动情周期正常的50只大鼠按SPSS 27.0软件随机分为空白组、模型组、良方温经汤低剂量组、良方温经汤高剂量组、4-苯基丁酸组,每组10只。除空白组外,其余各组均采用冰水浴法建立妇科寒凝血瘀大鼠模型^[19-20],将大鼠置于0℃冰水中20min,水位以没过下腹部为宜,1次/d,连续21d。造模同时开始干预,根据人与大鼠体表面积进行等效折算^[21],良方温经汤低、高剂量组灌服良方温经汤颗粒剂水溶液(8.1、16.2g·kg⁻¹),空白组、模型组、4-苯基丁酸组给予同体积蒸馏水(8mL·kg⁻¹)灌胃,1次/d,共21d。造模7d后,4-苯基丁酸组开始腹腔注射4-苯基丁酸溶液(0.1g·kg⁻¹·d⁻¹),其余各组均给予等体积生理盐水腹腔注射,1次/d,共14d。

2.2 观察寒凝血瘀证候表现 在造模期间,观察各组大鼠的精神状态、粪便性状及质地、动情周期等一般情况变化,同时观察耳廓和舌下络脉的瘀血情况,评估寒凝血瘀证候表现。

2.3 激光散斑成像系统检测卵巢微循环血流灌注量 腹腔注射2%戊巴比妥钠(50mg·kg⁻¹)麻醉大鼠,待大鼠无意识后充分暴露大鼠卵巢,调节激光散斑实时成像系统,垂直置于大鼠待测部位上方15~20cm处,通过变焦对焦焦距至图像清晰,图像采集速25帧/s,图像采集间隔为1s,每只大鼠实时连续采集1min。使用MoorF LPI-2 Review V5.0软件计算血流灌注量。

2.4 样本采集与处理 微循环血流灌注量检测结束后,腹主动脉取血于普通采血管和枸橼酸钠抗凝管中,3000r·min⁻¹,4℃,离心15min(离心半径15cm,下同),收集上层血清,保存于-80℃冰箱备用。取血后暴露并剥离卵巢组织,取卵巢组织

1 mm³置于戊二醛固定液,作为超微透射电镜样本。取卵巢组织1 mm³置于预冷磷酸缓冲液(PBS)中,做为流式细胞术样本。剩余组织一部分固定于4%多聚甲醛溶液中备用,另一部分组织用滤纸吸净水分后放入-80℃冰箱备用。

2.5 全自动凝血分析仪检测凝血功能 从-80℃冰箱将检测所需的血浆取出,37℃恒温水浴快速融化,轻微混匀后采用全自动凝血分析仪检测凝血四项PT、APTT、TT、FIB的含量。

2.6 ELISA检测血清生殖激素和卵巢内皮功能指标 从-80℃冰箱将检测所需的血清和卵巢组织取出,ELISA试剂盒检测血清生殖激素E₂、FSH、LH和卵巢组织内皮功能指标ET-1、NO、TM、vWF含量,严格按试剂盒说明书操作,酶标仪检测吸光度,根据标准曲线计算各指标含量。

2.7 HE染色观察卵巢组织病理变化 取出4%多聚甲醛固定48 h的卵巢组织,后进行乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切成6 μm切片,置于载玻片上。进行脱蜡、水化、苏木素染色、分化、伊红染色和脱水后,置于二甲苯2 min,中性树脂封片,在光学显微镜下观察拍照,观察卵巢组织的病理变化。

2.8 流式细胞术检测卵巢组织凋亡率 遇冷PBS中的卵巢组织样本用消化液37℃恒温水浴消化10 min,用含有血清的培养基终止消化,用细胞筛网过滤掉未消化的组织,制备单细胞悬液,后严格按照AnnexinV/PI流式凋亡试剂盒说明书操作,同时制备单染管和空白管,1 h内上机检测。使用Flow Jo软件分析。

2.9 透射电镜观察卵巢血管内皮细胞超微结构 戊二醛溶液中的卵巢组织样本经PBS冲洗后,于四氧化锇固定1.5 h,再用PBS冲洗3次,以1%乙酸铀浸泡2 h,分别用梯度乙醇和丙酮依次脱水,用环氧树脂-丙酮浸泡2 h后,包埋切片,通过透射电镜观察内皮细胞的超微结构。

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织中相关蛋白表达 称量卵巢组织,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,设置匀浆程序进行匀浆,12 000 r·min⁻¹,4℃,离心10 min,收集上清液,BCA法测定蛋白含量,并调整蛋白浓度。配制聚丙烯酰胺凝胶,根据蛋白浓度计算上样蛋白量,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离蛋白后,湿式转移法转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭2 h后分别加入相应抗体eNOS、p-eNOS、Caspase-3、Bax、Bcl-2、IRE1α、p-IRE1α、ASK1、

p-ASK1、JNK、p-JNK(1:1 000),GRP78(1:5 000),CHOP(1:2 000),4℃过夜孵育。用含聚山梨酯-20的Tris缓冲盐溶液(TBST)清洗洗涤3次后,敷育二抗(1:5 000)1 h,再次使用TBST清洗3次,后使用多功能成像仪进行成像,利用Image J软件对蛋白条带灰度值定量分析。

2.11 免疫荧光检测卵巢组织血管内皮细胞Bax、Bcl-2表达情况 将卵巢组织石蜡切片脱蜡后进行高温抗原修复,PBS清洗3次,10%山羊血清室温孵育1 h,滴加一抗Bax、Bcl-2、CD34(1:200),4℃孵育过夜,PBS漂洗3次,后滴加二抗(1:200)避光孵育1 h,避光加入含DAPI抗荧光淬灭剂封片,使用荧光显微镜图像采集。利用Image J软件对阳性染色区域进行共定位分析。

2.12 统计学方法 采用SPSS 27.0统计软件对数据处理与分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 来表示,对于符合正态分布且方差齐性的数据,采用单因素方差分析,组间比较采用SNK检验;数据呈正态分布但方差不齐时,采用Dunnett's T3方法进行组间比较;对于非正态分布的数据,采用Mann-Whitney U检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 良方温经汤对大鼠寒凝血瘀证候表现的影响

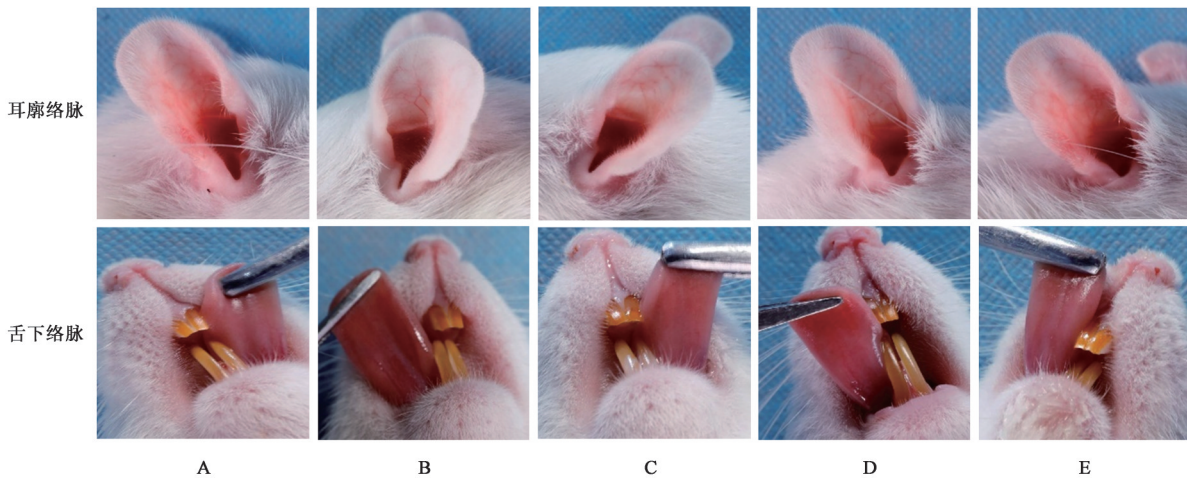
空白组大鼠精神状态良好,毛发浓密光洁,粪便性状正常,体质量增长平稳,耳廓润泽,络脉清晰,舌质淡红润泽,舌下络脉清晰可见。模型组大鼠出现畏寒蜷缩,毛色暗淡,食欲不振,体质量增长缓慢,大便稀软,耳廓、舌下络脉紫暗增粗等寒凝血瘀证候表现;良方温经汤低、高剂量组及4-苯基丁酸组大鼠的一般状态较好,表现为精神状态良好,体质量增长较快,毛发整洁顺滑,粪质偏硬,耳廓和舌下络脉较为润泽清晰。提示良方温经汤能够改善寒凝血瘀证候表现。见图1。

3.2 良方温经汤对大鼠动情周期的影响

空白组大鼠阴道涂片显示大鼠动情周期规律,动情周期为4~5 d,动情期间阴道图片观察以完全角化上皮细胞为主。与空白组比较,模型组大鼠动情周期紊乱且周期延长($P<0.01$),脱落细胞以少量白细胞和中间层细胞为主;与模型组比较,良方温经汤低、高剂量组及4-苯基丁酸组在治疗过程中动情周期逐渐恢复($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2、表1。

3.3 良方温经汤对大鼠血清生殖激素的影响

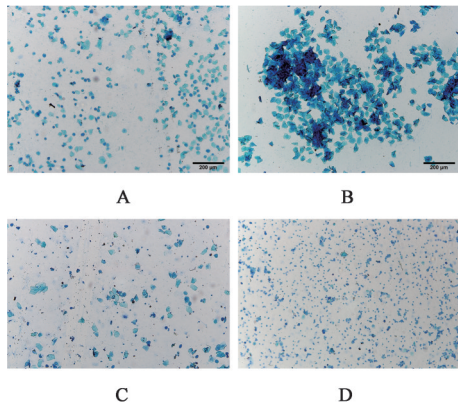
与空白组比较,模型组血清E₂含量显著降低($P<0.01$),FSH、LH含量显著升高($P<0.01$);与模型组



注:A.空白组;B.模型组;C.良方温经汤低剂量组;D.良方温经汤高剂量组;E.4-苯基丁酸组(图3-图10同)

图1 良方温经汤对大鼠耳廓络脉和舌下络脉的影响

Fig. 1 Effect of Liangfang Wenjingtang on auricular collaterals and sublingual collaterals in rats



注:A.动情前期;B.动情期;C.动情后期;D.动情间期

图2 不同动情周期阴道脱落细胞形态(美兰染色,×200)

Fig. 2 Morphology of vaginal exfoliated cells from different estrous cycles (Mylan staining, ×200)

比较,良方温经汤低剂量组FSH含量显著降低

表1 良方温经汤对大鼠动情周期和生殖激素的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 1 Effect of Liangfang Wenjing decoction on estrous cycle and reproductive hormones in rats ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	动情周期/d	LH/U·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹
空白组		4.75±0.50	10.87±2.95	8.74±1.80	146.93±17.41
模型组		6.25±0.83 ²⁾	19.12±3.21 ²⁾	30.85±3.73 ²⁾	45.89±8.34 ²⁾
良方温经汤低剂量组	10.08	5.48±0.70 ³⁾	15.98±2.88	21.74±1.90 ⁴⁾	82.27±12.48 ⁴⁾
良方温经汤高剂量组	20.16	5.17±0.41 ⁴⁾	12.09±1.60 ⁴⁾	14.07±1.47 ⁴⁾	111.67±11.16 ⁴⁾
4-苯基丁酸组	0.1	5.17±0.47 ⁴⁾	14.13±1.63 ⁴⁾	15.51±1.22 ⁴⁾	109.30±8.89 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表2-表5同)

3.5 良方温经汤对大鼠卵巢血流灌注量影响 与空白组比较,模型组卵巢表面微循环血流灌注量明显下降($P<0.01$);与模型组比较,良方温经汤低、高剂量组及4-苯基丁酸组卵巢表面微循环血流灌注量明显升高($P<0.05$)。见图3、表2。

($P<0.01$),E₂含量显著升高($P<0.01$),LH含量降低,但差异无统计学意义,良方温经汤高剂量组和4-苯基丁酸组E₂含量显著升高($P<0.01$),FSH、LH含量显著降低($P<0.01$)。提示寒凝血瘀证大鼠卵巢功能受到影响,良方温经汤能够改善寒凝血瘀证大鼠卵巢功能。见表1。

3.4 良方温经汤对大鼠凝血功能的影响 与空白组比较,模型组PT、APTT、TT明显缩短($P<0.05, P<0.01$),FIB含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,良方温经汤低剂量组PT、APTT、TT延长,FIB含量降低,差异无统计学意义,良方温经汤高剂量组PT、APTT、TT明显延长($P<0.05, P<0.01$),FIB含量显著降低($P<0.01$),4-苯基丁酸组PT、TT延长($P<0.01$),FIB含量显著降低($P<0.01$),APTT延长,差异无统计学意义。见表2。

3.6 良方温经汤对大鼠卵巢组织病理形态学的影响 HE染色结果显示,空白组大鼠卵巢结构形态无异常,可见各级卵泡和黄体组织,颗粒细胞排列紧密整齐,表明卵巢组织未出现明显病变。模型组大鼠卵巢各级卵泡数量减少,颗粒细胞稀疏排列,

表2 良方温经汤对大鼠凝血功能和卵巢血流灌注量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 2 Effect of Liangfang Wenjing decoction on coagulation function and ovarian blood perfusion in rats ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/g·L ⁻¹	灌注量/PU
空白组		18.32±0.89	20.76±2.50	37.18±1.52	1.25±0.05	1 398.78±395.28
模型组		17.10±0.83 ²⁾	15.64±3.19 ¹⁾	30.68±3.53 ²⁾	1.38±0.04 ¹⁾	461.15±92.97 ²⁾
良方温经汤低剂量组	10.08	17.84±0.43	18.28±3.08	33.82±1.68	1.26±0.08	1 026.67±117.25 ³⁾
良方温经汤高剂量组	20.16	18.26±0.36 ³⁾	20.52±3.54 ³⁾	36.12±2.56 ⁴⁾	1.24±0.04 ⁴⁾	1 178.91±170.12 ³⁾
4-苯基丁酸组	0.1	18.54±0.64 ⁴⁾	18.24±2.82	36.68±3.03 ⁴⁾	1.27±0.01 ⁴⁾	981.64±205.55 ³⁾

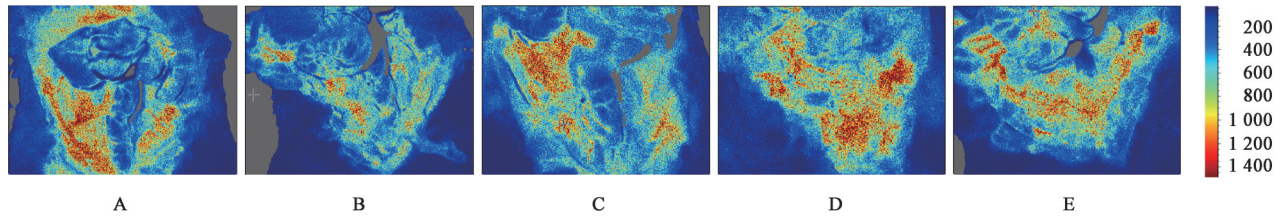


图3 良方温经汤对大鼠卵巢血流灌注量的影响

Fig. 3 Effect of Liangfang Wenjing decoction on ovarian blood perfusion in rats

闭锁卵泡增多,微血管管径变细。良方温经汤低、高剂量组和4-苯基丁酸组可见各级卵泡数量增多,

血管结构无异常,表明良方温经汤能够改善寒凝血瘀证大鼠卵巢组织的病理损伤。见图4。

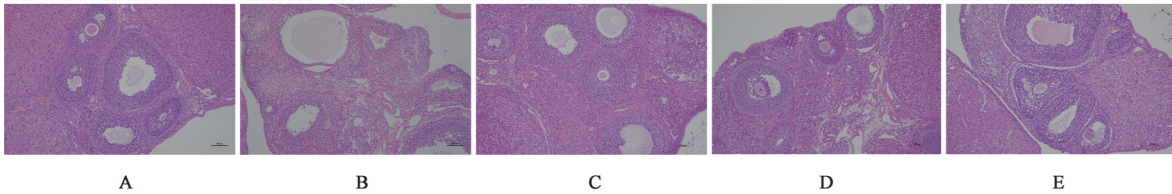


图4 良方温经汤对大鼠卵巢组织病理形态学的影响(HE, ×200)

Fig. 4 Effect of Liangfang Wenjing decoction on pathological morphology of ovary in rats (HE, ×200)

3.7 良方温经汤对大鼠卵巢微血管内皮细胞超微结构的影响 透射电镜观察,空白组微血管内皮细胞细胞器丰富,内质网和线粒体形态基本正常。内质网无扩张肿胀表现,线粒体嵴清晰完整。模型组细胞器视野电子密度低,细胞器数量减少,内质网

扩张,线粒体存在嵴断裂、空泡化表现,线粒体外膜不完整。良方温经汤和4-苯基丁酸干预后细胞器增多,内质网肿胀扩张程度减轻,线粒体嵴断裂减少,内质网线粒体形态基本正常,说明良方温经汤能够改善血管内皮细胞超微结构。见图5。

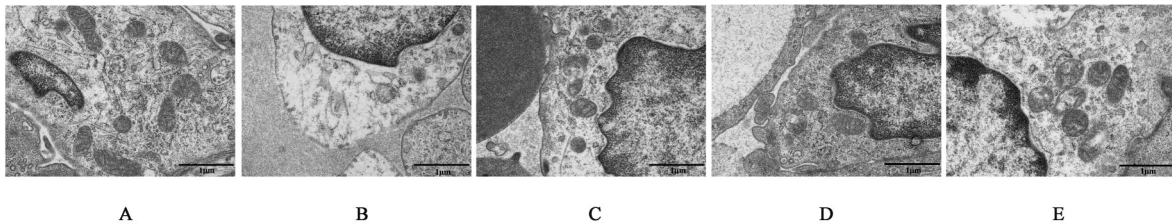


图5 良方温经汤对卵巢微血管内皮细胞超微结构的影响(透射电镜, ×15 000)

Fig. 5 Effect of Liangfang Wenjing decoction on ultrastructure of ovarian microvascular endothelial cells (TEM, ×15 000)

3.8 良方温经汤对卵巢微血管内皮功能损伤标志物影响 与空白组比较,模型组卵巢组织中内皮功能损伤标志物 ET-1、vWF、TM 含量显著升高($P<0.01$), p-eNOS/eNOS、NO 含量显著降低($P<0.01$); 与模型组比较,良方温经汤低剂量组 ET-1、TM 含量

显著降低($P<0.01$), NO 含量明显升高($P<0.05$), p-eNOS/eNOS 升高,差异无统计学意义,良方温经汤高剂量组 ET-1、vWF、TM 含量显著降低($P<0.01$), p-eNOS/eNOS、NO 含量显著升高($P<0.05, P<0.01$), 4-苯基丁酸组 ET-1、vWF、TM 含量降低,

p-eNOS/eNOS、NO含量升高,差异无统计学意义。见表3、图6。

表3 良方温经汤对卵巢微血管内皮功能损伤标志物影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Liangfang Wenjing decoction on markers of ovarian microvascular endothelial function impairment ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ET-1/ng·L ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹	vWF/μg·L ⁻¹	TM/μg·L ⁻¹	p-eNOS/eNOS
空白组		2.67±0.86	3.69±1.40	0.28±0.14	8.83±3.13	1.30±0.40
模型组		10.43±2.24 ²⁾	0.74±0.68 ²⁾	1.74±0.49 ²⁾	32.32±9.74 ²⁾	0.53±0.11 ¹⁾
良方温经汤低剂量组	10.08	6.20±1.54 ⁴⁾	2.39±0.69 ³⁾	0.67±0.28	20.75±3.37 ⁴⁾	0.97±0.33
良方温经汤高剂量组	20.16	5.42±1.24 ⁴⁾	2.46±0.63 ⁴⁾	0.48±0.24 ⁴⁾	15.78±3.24 ⁴⁾	1.24±0.58 ³⁾
4-苯基丁酸组	0.1	8.98±1.04	2.12±0.85	0.72±0.17	25.21±4.68	0.90±0.29

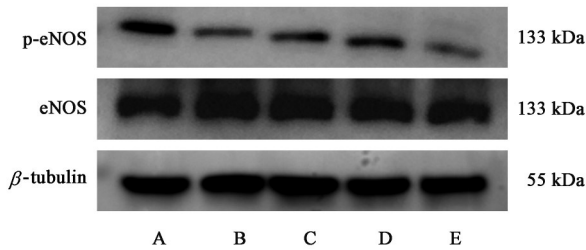


图6 大鼠卵巢组织 p-eNOS、eNOS 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of p-eNOS and eNOS protein expression in ovarian tissue

3.9 良方温经汤对卵巢组织细胞凋亡的影响 与空白组比较,模型组卵巢组织凋亡率、cleaved Caspase3/Caspase3、Bax 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$); 与模型组比较,良方温经汤低、高剂量组及 4-苯基丁酸组卵巢组织凋亡率、cleaved Caspase3/Caspase 及 Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$), 良方温经汤高剂量组 Bcl-2 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$), 良方温经汤低剂

量和 4-苯基丁酸组 Bcl-2 蛋白表达升高,但差异无统计学意义。说明寒凝血瘀证大鼠卵巢组织凋亡,良方温经汤能够减轻寒凝血瘀证大鼠卵巢组织凋亡,且高剂量效果最佳。见图 7、表 4。

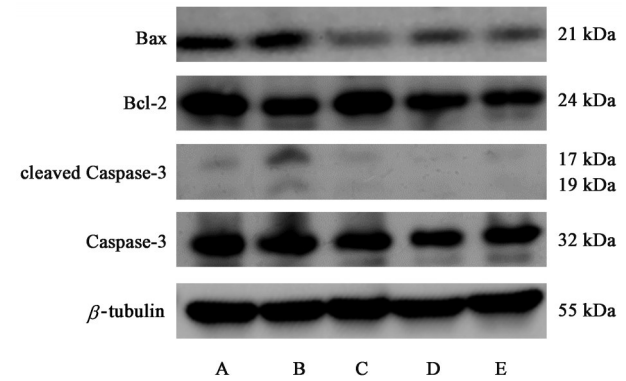


图7 大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 和 Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3 and Caspase-3 protein expression in ovarian tissue

表4 良方温经汤对卵巢组织细胞凋亡蛋白表达及凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Liangfang Wenjing decoction on apoptosis proteins and apoptosis rate of ovarian tissue ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	cleaved-Caspase3/Caspase3	Bcl-2/β-tubulin	Bax/β-tubulin	凋亡率/%
空白组		0.38±0.15	1.02±0.43	0.71±0.06	3.24±0.50
模型组		1.07±0.15 ²⁾	0.36±0.12 ¹⁾	1.38±0.17 ²⁾	23.03±5.56 ²⁾
良方温经汤低剂量组	10.08	0.40±0.18 ⁴⁾	0.85±0.33	0.89±0.23 ⁴⁾	13.50±3.51 ³⁾
良方温经汤高剂量组	20.16	0.31±0.11 ⁴⁾	0.97±0.30 ³⁾	0.91±0.23 ⁴⁾	5.66±2.56 ⁴⁾
4-苯基丁酸组	0.1	0.34±0.19 ⁴⁾	0.85±0.29	0.74±0.15 ⁴⁾	6.66±1.75 ⁴⁾

3.10 良方温经汤对卵巢微血管内皮细胞 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 用 CD34 标记卵巢微血管内皮细胞,观察 Bax 和 Bcl-2 表达。与空白组比较,模型组 CD34(红色)与 Bax(绿色)共定位增多 ($P<0.01$), CD34 与 Bcl-2(绿色)共定位减少 ($P<0.01$),说明模型组卵巢微血管内皮细胞中促凋亡蛋白 Bax 表达增多,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少;与模型组比较,良方温经汤低、高剂量组和 4-苯基丁酸组 CD34 与

Bax 共定位减少 ($P<0.05, P<0.01$), CD34 与 Bcl-2 共定位增多 ($P<0.01$)。见图 8、图 9、表 5。

3.11 良方温经汤对卵巢组织内质网应激及相关通路蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组内质网应激标志蛋白 GRP78、CHOP 蛋白表达及信号通路相关蛋白 p-IRE1α/IRE1α、p-ASK1/ASK1、p-JNK/JNK 均明显升高 ($P<0.05, P<0.01$); 与模型组比较,良方温经汤低剂量组 GRP78、CHOP 蛋白表达及

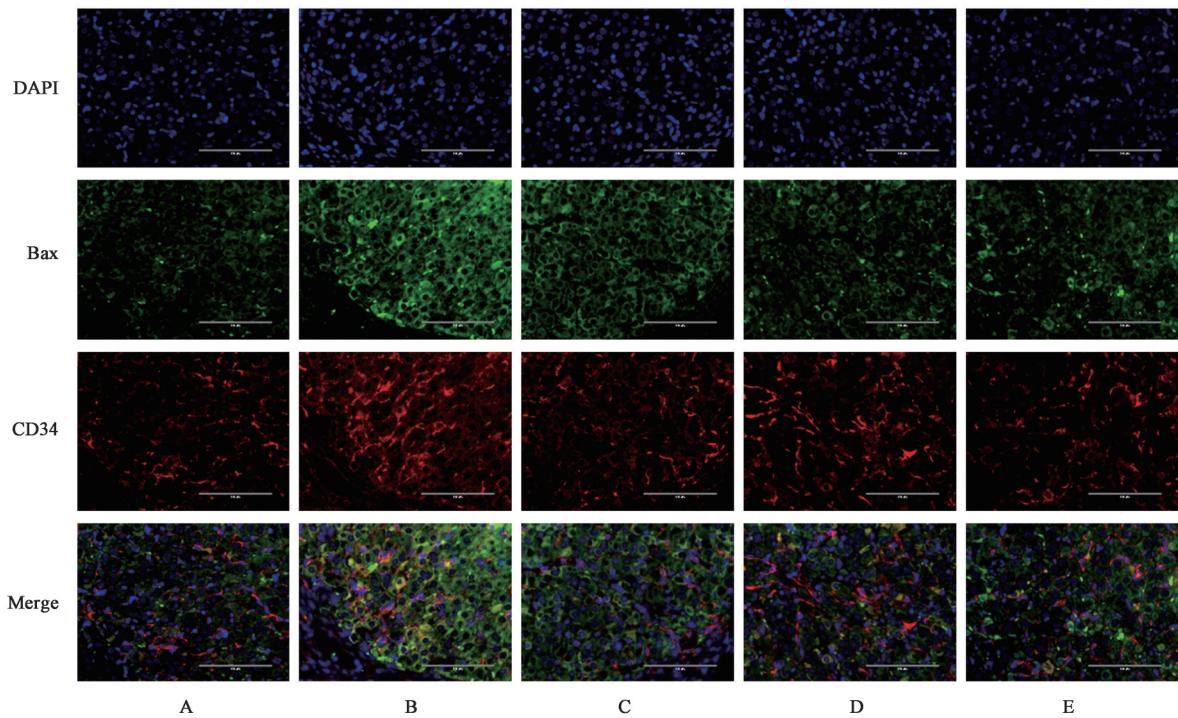


图8 良方温经汤对大鼠卵巢微血管内皮细胞Bax蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 8 Effect of Liangfang Wenjing decoction on Bax protein expression in ovarian microvascular endothelial cells (IF, ×400)

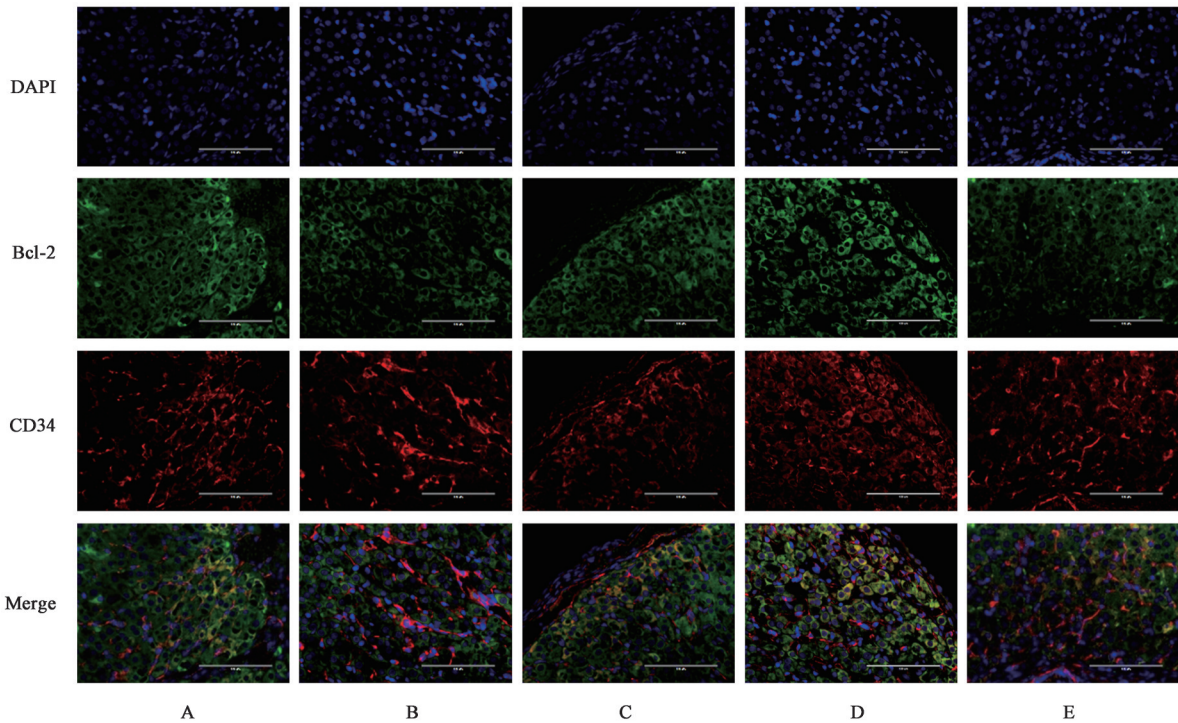


图9 良方温经汤对大鼠卵巢微血管内皮细胞Bcl-2蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 9 Effect of Liangfang Wenjing decoction on Bcl-2 protein expression in ovarian microvascular endothelial cells (IF, ×400)

p-ASK1/ASK1显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$), p-IRE1 α /IRE1 α 、p-JNK/JNK降低,但无统计学差异,良方温经汤高剂量组 GRP78、CHOP、p-IRE1 α /IRE1 α 、p-ASK1/ASK1、p-JNK/JNK明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 4-苯基

丁酸组 GRP78、CHOP、p-IRE1 α /IRE1 α 、p-ASK1/ASK1明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), p-JNK/JNK也降低,但差异无统计学意义。这些结果表明,IRE1 α /ASK1/JNK信号通路在寒凝血瘀证大鼠中发挥作用,良方温经汤干预后能够从不同程度上抑制

表5 良方温经汤对卵巢微血管内皮细胞 Bax、Bcl-2 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 5 Effect of Liangfang Wenjing decoction on Bax and Bcl-2 in ovarian microvascular endothelial cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Bax+CD34 /CD34	Bcl-2+CD34 /CD34
空白组		0.17±0.03	0.63±0.14
模型组		0.51±0.04 ²⁾	0.19±0.09 ²⁾
良方温经汤低剂量组	10.08	0.39±0.12 ³⁾	0.58±0.07 ⁴⁾
良方温经汤高剂量组	20.16	0.22±0.05 ⁴⁾	0.61±0.05 ⁴⁾
4-苯基丁酸组	0.1	0.22±0.10 ⁴⁾	0.57±0.08 ⁴⁾

IRE1 α /ASK1/JNK 通路的激活,进一步减轻 ERS,改善内皮细胞损伤。见图 10、表 6。

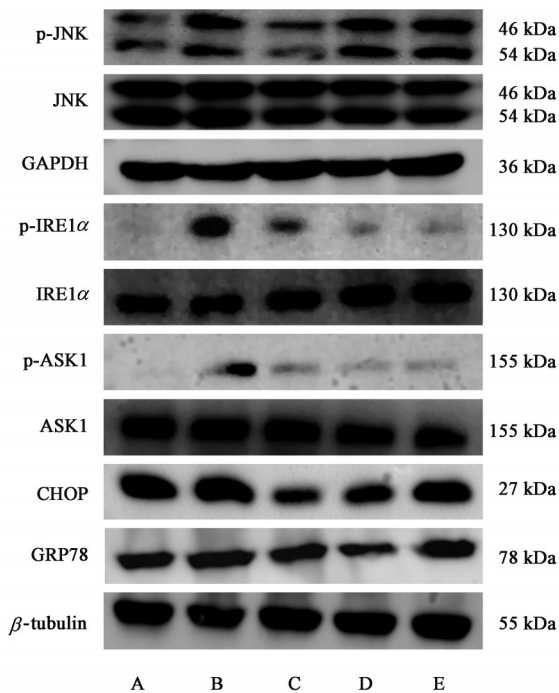


图 10 大鼠卵巢组织 GRP78、CHOP、p-IRE1 α 、IRE1 α 、p-ASK1、ASK1、p-JNK、JNK 蛋白表达电泳

Fig. 10 Electrophoresis of GRP78, CHOP, p-IRE1 α , IRE1 α , p-ASK1, ASK1, p-JNK and JNK protein expression in ovarian tissue

表 6 良方温经汤对卵巢组织内质网应激及通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 6 Effect of Liangfang Wenjing decoction on endoplasmic reticulum stress and pathway protein expression in ovarian tissues ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GRP78/ β -tubulin	CHOP/ β -tubulin	p-IRE1 α /IRE1 α	p-ASK1/ASK1	p-JNK/JNK
空白组		0.84±0.13	1.28±0.19	0.43±0.15	0.31±0.15	0.70±0.14
模型组		1.18±0.11 ²⁾	1.73±0.19 ²⁾	1.36±0.43 ²⁾	1.03±0.31 ²⁾	1.19±0.24 ¹⁾
良方温经汤低剂量组	10.08	0.92±0.11 ⁴⁾	1.14±0.17 ⁴⁾	0.90±0.35	0.45±0.16 ⁴⁾	0.80±0.14
良方温经汤高剂量组	20.16	0.72±0.09 ⁴⁾	1.00±0.17 ⁴⁾	0.74±0.25 ³⁾	0.40±0.27 ⁴⁾	0.64±0.37 ³⁾
4-苯基丁酸组	0.1	0.82±0.09 ⁴⁾	1.22±0.22 ⁴⁾	0.73±0.27 ³⁾	0.36±0.19 ⁴⁾	0.76±0.22

4 讨论

寒凝血瘀证是中医妇科临床常见证候,感受寒邪是妇科寒凝血瘀证的主要原因。寒邪侵袭,胞脉血行瘀滞不畅,发为痛经;胞宫经血不能按时满溢,可见行经不畅、月经延迟、月经量少、闭经等表现,临床可涉及多种妇科疾病,如原发性痛经、功能失调性子宫出血、子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征等^[22]。本实验采用冰水浴法模拟妇科寒凝血瘀证,符合中医理论对妇人感受寒凉所致寒客胞宫、血脉瘀阻的发病机制。结果显示模型大鼠出现畏寒蜷缩、运动迟缓,大便稀溏,耳廓和舌下脉络瘀血等寒凝血瘀证候表现,凝血功能异常,微循环障碍,伴有动情周期延长,生殖激素紊乱,表明妇科寒凝血瘀证模型制备成功。良方温经汤干预后可减轻寒凝血瘀证候表现,改善凝血功能和微循环障碍,恢复卵巢形态和功能。

良方温经汤临床上常用于治疗寒凝血瘀所引起原发性痛经、子宫内膜异位症、子宫息肉、月经不调等妇科疾病。方中肉桂温经散寒,当归养血活血、调经止痛,川芎行血中之气,三药配伍,温经散寒、调经止痛;人参、莪术、牡丹皮、牛膝养血活血、凉血散瘀,且牛膝具有引血下行之功,助当归、川芎通行血滞;白芍、甘草缓急止痛。现代药理研究表明,其主要成分为川芎嗪、阿魏酸、芍药苷、丹皮酚、桂皮醛,均具有保护血管正常结构和功能的作用^[23]。川芎嗪和阿魏酸能够通过调节 ET-1 和 NO 的平衡来改善血管舒缩功能^[24-26]。研究表明阿魏酸通过上调 eNOS 的表达,增加 NO 的释放,从而改善血管内皮功能。桂皮醛可以抑制高糖诱导氧化应激,减少细胞凋亡,保护内皮功能^[27]。芍药苷能够预防脂多糖刺激的人脐静脉内皮细胞中的内质网应激相关炎症^[28]。丹皮酚能够通过降低心肌肥厚模型大鼠中内质网标志蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达,减轻心肌肥厚和血管损伤^[29]。前期临床研究表

明,良方温经汤可调节月经病寒凝血瘀证患者体内的ET-1和NO水平,改善血管舒张功能和血液高凝状态,从而缓解月经病寒凝血瘀证患者月经量少、痛经、月经延期等症状^[30]。本研究也证实模型组大鼠卵巢组织中ET-1、TM、vWF含量升高,NO含量、p-eNOS/eNOS降低,微血管内皮细胞出现细胞器减少、内质网肿胀扩张线粒体嵴断裂等超微结构变化,这些结果表明寒凝血瘀证大鼠出现血管内皮功能损伤;良方温经汤干预后ET-1、TM、vWF含量降低,NO含量、p-eNOS/eNOS升高,内皮细胞超微结构有所恢复,说明良方温经汤能够减轻寒凝血瘀证大鼠卵巢微血管内皮功能损伤,起到保护微血管内皮功能的作用。

寒冷作为外部环境变化,常引发细胞内部改变。多项研究显示,不同强度与时段的寒冷应激会使小鼠肺、肝、神经元、心脏等多器官组织出现细胞凋亡^[31-32]。本研究也显示,寒凝血瘀证大鼠卵巢组织凋亡率、促凋亡蛋白Bax、cleaved Caspase-3/Caspase-3升高,抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少。良方温经汤干预后,卵巢组织细胞凋亡率、Bax、cleaved Caspase-3/Caspase-3下降,Bcl-2表达增多。同时微血管内皮细胞中Bax减少,Bcl-2增多。这表明良方温经汤通过减轻细胞凋亡有效改善卵巢微血管内皮细胞损伤。ERS是内皮功能损伤的重要发病机制^[33]。当细胞受干扰功能的不良刺激时,未折叠或错误折叠蛋白在内质网积聚,引发ERS。适度ERS可启动未折叠蛋白反应(UPR)维持细胞稳态,过度ERS则导致细胞凋亡^[34]。GRP78和CHOP是内质网应激的关键标志和凋亡触发因素^[35]。研究表明,寒冷作为应激源能触发内质网应激,增加动脉粥样硬化模型斑块的不稳定性,促进结肠炎症^[36]。本研究结果显示,模型组大鼠卵巢组织内质网应激标志物GRP78和CHOP蛋白表达增多,提示了寒凝血瘀证大鼠卵巢微血管内皮细胞凋亡与内质网应激有关。良方温经汤可改善上述现象,说明可能通过抑制内质网应激减轻内皮细胞的凋亡。

IRE1 α 是细胞抵抗内质网应激的关键感受器。早期可激活下游信号通路恢复内质网功能,应激过强启动细胞凋亡程序^[37]。内质网稳态条件下,分子伴侣蛋白GRP78与IRE1 α 结合,使其处于静默状态,ERS时,内质网中错误或未折叠蛋白可以竞争性结合GRP78,导致IRE1 α 磷酸化或二聚化,活化后的IRE1 α 通过自身的激酶活性和RNA酶活性介导下游ASK1/JNK信号通路^[38]。IRE1 α /ASK1/JNK

通路是ERS诱导细胞凋亡的信号通路中较为清晰明确的路径^[39-40]。本研究证实,模型大鼠卵巢p-IRE1 α 、p-JNK、p-ASK1蛋白表达升高,表明寒凝血瘀证大鼠激活了IRE1 α /ASK1/JNK信号通路,诱导卵巢微血管内皮细胞凋亡。良方温经汤干预后,上述分子蛋白表达明显下调,表明良方温经汤可能通过调控IRE1 α /ASK1/JNK通路抑制内质网应激,减轻细胞凋亡,缓解内皮损伤。4-苯基丁酸作为内质网应激抑制剂,同良方温经汤一样可降低大鼠卵巢组织凋亡率、降低cleaved Caspase-3/Caspase-3、Bax、GRP78、CHOP、p-IRE1 α 、p-JNK、p-ASK1蛋白表达,佐证了抑制内质网应激可减轻细胞凋亡,也支持了良方温经汤改善微血管内皮损伤与减轻内质网应激诱导细胞凋亡密切相关。

综上所述,良方温经汤能够减轻寒凝血瘀证候表现,恢复卵巢结构和功能,改善内皮细胞的超微结构,减轻微血管损伤。其机制可能与调控IRE1 α /ASK1/JNK通路,抑制内质网应激,减轻内皮细胞凋亡密切相关,这为良方温经汤在临床防治妇科疾病提供了实验依据与理论基础。后续将通过体外实验结合多组学分析进一步研究良方温经汤改善寒冷刺激内皮细胞损伤的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LV H, XIA S, HE Y, et al. Effect of chronic cold stress on gut microbial diversity, intestinal inflammation and pyroptosis in mice[J]. *J Physiol Biochem*, 2024, 80 (2): 465-477.
- [2] TENG T, ZHENG Y, ZHANG M, et al. Chronic cold stress promotes inflammation and ER stress via inhibiting GLP-1R signaling, and exacerbates the risk of ferroptosis in the liver and pancreas[J]. *Environ Pollut*, 2024, 360: 124647.
- [3] DING M, LU Y, WEN Q, et al. Ovarian PERK/Nrf2/CX43/StAR/progesterone pathway activation mediates female reproductive dysfunction induced by cold exposure[J]. *Sci Rep*, 2024, 14 (1): 10248.
- [4] GAO S J, LI X L, GAO R, et al. Danggui Buxue decoction alleviates primary dysmenorrhea in rats by regulating the MEK1/2/ERK1/2/NF- κ B pathway[J]. *Fitoterapia*, 2025, 180: 106315.
- [5] 胥彤. 冷暴露对雌性大鼠生殖功能的影响及其机制的初步研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019.
- [6] XU T. Effect of cold exposure on reproductive function of female rats and its preliminary mechanism [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2019.
- [6] 张小会, 李彦玲, 刘艳, 等. 经典方温经汤的处方考证和临床应用研究概况[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(23): 44-55.

- ZHANG X H, LI Y L, LIU Y, et al. Prescription research and clinical application of Wenjingtang [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(23): 44-55.
- [7] 王迪, 成秀梅, 李新华, 等. 加减温经汤对妇科寒凝血瘀证大鼠 Rho/ROCK 信号通路相关因子表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(8): 51-56.
- WANG D, CHENG X M, LI X H, et al. Effects of modified Wenjing decoction on Rho/ROCK signaling pathway related factors expression in rats with gynecological cold coagulation and blood stasis syndrome [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2020, 27(8): 51-56.
- [8] 王晓松, 刘小花, 路帅, 等. 温经汤对月经病实寒证患者卵巢及子宫血流动力学的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(2): 861-863.
- WANG X S, LIU X H, LU S, et al. Effects of Wenjing decoction on ovarian and uterine blood flow dynamics of menstrual disease cold syndrome patients [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(2): 861-863.
- [9] WANG D, CHENG X, FANG H, et al. Effect of cold stress on ovarian & uterine microcirculation in rats and the role of endothelin system [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 29.
- [10] 王晓松, 王蓓, 姚晓光, 等. 温经汤对妇科实寒证模型大鼠子宫 HIF-1 α 、ET-1 及 VEGF 表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(1): 15-17.
- WANG X S, WANG B, YAO X G, et al. Effect of Wenjing decoction on the expressions of HIF-1 α , ET-1 and VEGF in the uterus of gynecological excess cold syndrome model Rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2017, 28(1): 15-17.
- [11] 果金玉, 邢易, 刘鹏, 等. 良方温经汤对寒凝血瘀证大鼠子宫及卵巢糖酵解关键酶表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(12): 3215-3223.
- GUO J Y, XING Y, LIU P, et al. Mechanism of Liangfang Wenjing decoction in treatment of hypoxia on endometriosis with cold coagulation and blood stasis by regulating CHCHD4 expression [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(12): 3215-3223.
- [12] WANG D, CHENG X, FANG H, et al. Effects of modified Wenjing decoction on microcirculation in reproductive organs in rats with symptom patterns of cold coagulation and blood stasis [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 40(2): 212-223.
- [13] 果金玉. 基于调控 CHCHD4/HIF-1 α 轴探讨良方温经汤对寒凝血瘀型子宫内膜异位症的治疗作用及机制 [D]. 石家庄: 河北中医药大学, 2023.
- GUO J Y. The effect and mechanism of Lang Fang WenJing decoction on endometriosis with cold coagulation and blood stasis based on the regulation of CHCHD4/HIF-1 α axis [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Chinese Medicine, 2023.
- [14] 魏伟, 李惠红, 徐沛韬, 等. 24-乙酰泽泻醇 A 通过 miR-98-5p/TRPM2 改善脑微血管内皮细胞缺血/再灌注损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(4): 695-702.
- WEI W, LI H H, XU P T, et al. Alisol A 24-acetate ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury in brain microvascular endothelial cells via miR-98-5p/TRPM2 [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2025, 41(4): 695-702.
- [15] MING S, TIAN J, MA K, et al. Oxalate-induced apoptosis through ERS-ROS-NF- κ B signalling pathway in renal tubular epithelial cell [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 88.
- [16] 张森, 王先伟, 黄家明, 等. 流体剪应力对人脐静脉内皮细胞葡萄糖调节蛋白 78 和 C/EBP 同源蛋白表达的影响 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2024, 21(6): 388-395.
- ZHANG S, WANG X W, HUANG J M, et al. Effect of fluid shear force on the expression of glucose-regulated protein 78 and C/EBP homologous proteins in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin J Cerebrovasc Dis*, 2024, 21(6): 388-395.
- [17] YAO W, WANG K, WANG X, et al. Icaritin ameliorates endothelial dysfunction in type 1 diabetic rats by suppressing ER stress via the PPAR α /Sirt1/AMPK α pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3): 1889-1902.
- [18] 马长淞, 黄帅, 瓦庆德, 等. 银杏内酯 B 通过抑制内质网应激拮抗血管内皮损伤的作用机制 [J]. *实用医学杂志*, 2023, 39(24): 3175-3181.
- MA C S, HUANG S, WA Q D, et al. Mechanism of ginkgolide B antagonizing vascular endothelial injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *J Pract Med*, 2023, 39(24): 3175-3181.
- [19] 宋晓丹, 成秀梅, 周湘, 等. 寒凝血瘀证动物模型研究现状 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(15): 267-274.
- SONG X D, CHENG X M, ZHOU X, et al. Animal model of cold congeal and blood stasis syndrome: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(15): 267-274.
- [20] 成秀梅, 杜惠兰, 王蓓, 等. 桃红四物汤对寒凝血瘀证大鼠 HO/CO 系统的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(7): 1757-1758.
- CHENG X M, DU H L, WANG B, et al. Effect of modified Taohong Siwu decoction on model rat of blood stasis due to accumulation of cold in HO/CO system [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2014, 25(7): 1757-1758.
- [21] 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: 1069-1072.
- HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Equivalent dose conversion between animals and between animals and humans in pharmacological experiments [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 9: 1069-1072.
- [22] 刘小花. 月经病实寒症患者卵巢子宫血流动力学变化及对生殖内分泌的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- LIU X H. The changes of ovarian and uterine hemodynamics for the patients with emmeniopathy of excess cold and its effects on reproductive endocrine [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2013.
- [23] 汤志锋, 张云羽, 石德志, 等. 经典名方温经汤基准样品 HPLC-Q-TOF/MS 分析与指纹图谱研究 [J]. *南京中医药大学*

- 学学报,2023,39(5):452-466.
- TANG Z F, ZHANG Y Y, SHI D Z, et al. Study on HPLC-Q-TOF/MS analysis and fingerprint of classic prescription Wenjing decoction substance benchmarks[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 39(5):452-466.
- [24] 陈露萍,杨轶童,赵苗苗,等. 川芎嗪通过激活SIRT1信号通路减轻内皮细胞炎症损伤的机制研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2024, 26(9):967-973.
- CHEN L P, YANG Y T, ZHAO M M, et al. Mechanism of tetramethylpyrazine attenuates inflammatory injury in endothelial cells by activating the SIRT1 signaling pathway [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2024, 26(9):967-973.
- [25] 肖慧,邹晓玲,张熙,等. 阿魏酸调控内皮祖细胞分泌外泌体及对表达血管新生微小RNA的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(20):2444-2448.
- XIAO H, ZOU X L, ZHANG X, et al. Effects of ferulic acid on secretion of exosomes and expression of angiogenic microRNA in endothelial progenitor cells [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38(20):2444-2448.
- [26] REN Z, ZHANG R, LI Y, et al. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(5):1444-1456.
- [27] KIM T W. Cinnamaldehyde induces autophagy-mediated cell death through ER stress and epigenetic modification in gastric cancer cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(3):712-723.
- [28] CHEN J, ZHANG M, ZHU M, et al. Paeoniflorin prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation in lipopolysaccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells via the IRE1 α /NF- κ B signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2018, 9(4):2386-2397.
- [29] CHOY K W, MUSTAFA M R, LAU Y S, et al. Paeonol protects against endoplasmic reticulum stress-induced endothelial dysfunction via AMPK/PPAR δ signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 116:51-62.
- [30] 芦剑峰,成秀梅,路帅,等. 加减温经汤对寒凝血瘀月经病患者干预效果及血清TXB2/6-keto-PGF1 α 、t-PA/PAI-1变化的影响[J]. *河北中医药学报*, 2022, 37(6):42-45.
- LU J F, CHENG X M, LU S, et al. The effects of plus-minus Wenjing decoction on serum NO/ET-1 and TF/TFPI in patients with menstrual disease with solid cold syndrome[J]. *J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol*, 2022, 37(6):42-45.
- [31] XU B, LANG L M, LI S Z, et al. Cortisol excess-mediated mitochondrial damage induced hippocampal neuronal apoptosis in mice following cold exposure[J]. *Cells*, 2019, 8(6):8060612.
- [32] CONG P, LIU Y, LIU N, et al. Cold exposure induced oxidative stress and apoptosis in the myocardium by inhibiting the Nrf2-Keap1 signaling pathway [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1):36.
- [33] BATTSON M L, LEE D M, GENTILE C L. Endoplasmic reticulum stress and the development of endothelial dysfunction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(3):H355-H367.
- [34] HETZ C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2):89-102.
- [35] 刘鹏,邢易,郭权磊,等. 温经汤调控活化转录因子6/转录因子C/EBP同源蛋白通路抑制内质网应激改善卵巢储备功能下降模型的机制研究[J]. *中草药*, 2025, 56(1):121-132.
- LIU P, XING Y, GUO Q L, et al. Mechanism of Wenjing decoction regulating activating transcription factor 6/C/EBP homologous protein pathway and inhibiting endoplasmic reticulum stress to improve model of decreased ovarian reserve[J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2025, 56(1):121-132.
- [36] GUO J, HU H, CHEN Z, et al. Cold exposure induces intestinal barrier damage and endoplasmic reticulum stress in the colon via the SIRT1/Nrf2 signaling pathway [J]. *Front Physiol*, 2022, 13:822348.
- [37] SHI G, LIU L, CAO Y, et al. Inhibition of neutrophil extracellular trap formation ameliorates neuroinflammation and neuronal apoptosis via STING-dependent IRE1 α /ASK1/JNK signaling pathway in mice with traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1):222.
- [38] URANO F, WANG X, BERTOLOTTI A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 [J]. *Science*, 2000, 287(5453):664-666.
- [39] 施学丽,黄辰杰,张玉梅,等. 对药酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠行为学及内质网应激IRE1 α /ASK1/JNK通路蛋白表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(6):1324-1327.
- SHI X L, HUANG C J, ZHANG Y M, et al. Effects of sour jujube seed - Albizia Flower on behavioral changes and endoplasmic reticulum stress IRE1 α /ASK1/JNK pathway protein expression in depressive model rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2024, 35(6):1324-1327.
- [40] ZHAO X Q, MAO W J, LIN Z J, et al. Heat stress induced hepatocyte apoptosis in largemouth bass *Micropterus salmoides* via IRE1 α /TRAF2/ASK1/JNK pathway [J]. *J Oceanol Limnol*, 2024, 42(3):988-1000.

[责任编辑 周冰冰]