

## 基于MAPK/ERK信号通路探讨温经化瘀止痛法治疗 寒凝血瘀证原发性痛经的机制

翟凤婷<sup>1</sup>, 王东梅<sup>1\*</sup>, 王丹丹<sup>2</sup>, 曹卫平<sup>1</sup>, 马青<sup>1</sup>

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

**[摘要]** 目的:通过研究温经化瘀止痛法(香延止痛方)对原发性痛经(PD)大鼠丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路的影响,探讨PD的发病机制及温经化瘀止痛法治疗PD的作用机制。方法:将48只SPF级雌性Wistar大鼠随机分为正常组,模型组,阳性药组,香延止痛方低、中、高剂量组,每组各8只。除正常组外,其余各组大鼠均采用寒冷刺激联合苯甲酸雌二醇和缩宫素建立寒凝血瘀证PD模型,正常组及模型组给予蒸馏水,阳性药组给予布洛芬( $0.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),香延止痛方组分别给予低剂量香延止痛方( $6.55\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),中剂量香延止痛方( $13.09\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),高剂量香延止痛方( $26.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),连续灌胃6 d。记录寒凝血瘀证大鼠症状和体征量化评分并观察大鼠注射缩宫素后的扭体潜伏时间和30 min内扭体次数。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠子宫组织中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(B-Raf),细胞外调节激酶1/2(MEK1/2), ERK1/2, p-MEK1/2, 磷酸化(p)-ERK1/2, c-Jun, 环氧化酶-2(COX-2)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Rea-time PCR)法检测大鼠子宫组织B-Raf, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2, c-Jun, COX-2 mRNA表达。结果:与模型组比较,各治疗组大鼠扭体潜伏时间均有所延长,但差异无统计学意义,扭体次数显著减少( $P<0.01$ );造模第6天,各治疗组症状和体征量化评分无明显差异,造模第12天,与模型组比较,布洛芬组及香延止痛方低剂量组差异无明显统计学意义,香延止痛方中、高剂量组显著降低( $P<0.01$ );与正常组比较,模型组大鼠p-MEK1/2, p-ERK1/2, B-Raf, c-Jun, COX-2蛋白表达及相应mRNA转录水平均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,布洛芬组及香延止痛方中、高剂量组p-MEK1/2, p-ERK1/2, B-Raf, c-Jun, COX-2蛋白表达及相应mRNA均降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:温经化瘀止痛法治疗寒凝血瘀证PD的作用机制可能与其下调MAPK/ERK信号通路有关。

**[关键词]** 原发性痛经; 寒凝血瘀证; 温经化瘀止痛法; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)17-0066-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211109

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210414.1040.002.html>

[网络出版日期] 2021-04-14 11:22

### Mechanisms of Wenjing Huayu Zhitong Therapy for Primary Dysmenorrhea with Cold Coagulation and Blood Stasis Syndrome Based on MAPK/ERK Signaling Pathway

ZHAI Feng-ting<sup>1</sup>, WANG Dong-mei<sup>1\*</sup>, WANG Dan-dan<sup>2</sup>, CAO Wei-ping<sup>1</sup>, MA Qing<sup>1</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China*; 2. *Shandong University of TCM, Jinan 250355, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Wenjing Huayu Zhitong therapy (Xiangyan Zhitong prescription, XZP) on the mitogen activated protein kinase (MAPK)/extracellular regulated protein kinase (ERK) signaling pathway of primary dysmenorrhea (PD) rats, and explore the pathogenesis of PD and the

[收稿日期] 20210213(003)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2019MH083);全国名老中医药专家李广文传承工作室项目;王东梅山东省名老中医药专家传承工作室项目

[第一作者] 翟凤婷, 博士, 主治医师, 从事女性生殖内分泌研究, E-mail: zft0326@163.com

[通信作者] \* 王东梅, 博士, 主任医师, 从事女性生殖内分泌研究, Tel: 0531-68616058, E-mail: 912510096@qq.com

mechanism of action of Wenjing Huayu Zhitong therapy. **Method:** Forty-eight female SPF-grade Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, western medicine group, low-dose XZP group, medium-dose XZP group, and high-dose XZP group, with 8 rats in each group. In addition to the blank group, dysmenorrhea rat model with cold coagulation and blood stasis syndrome was established by cold stimulation combined with estradiol benzoate and oxytocin. The rats in the blank group, model group, western medicine group, low-dose XZP group, medium-dose XZP group, and high-dose XZP group were given distilled water, distilled water,  $0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ibuprofen,  $6.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  XZP,  $13.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  XZP, and  $26.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  XZP, respectively, by gavage for 6 days. The writhing latency and writhing frequency of rats were recorded within 30 min after oxytocin injection. Western blot was used to detect the protein expression of B-Raf, mitogen activates extracellular regulated kinases1/2 (MEK1/2), extracellular regulated kinases1/2 (ERK1/2), p-MEK1/2, p-ERK1/2, c-Jun, and cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat uterus. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was employed to detect the mRNA expression of B-Raf, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2, c-Jun, and cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat uterus. **Result:** Compared with the model group, the treatment groups showed insignificantly prolonged writhing latency and significantly reduced writhing frequency ( $P < 0.01$ ). On the 6<sup>th</sup> day of modeling, there was no significant difference in the quantitative scores of symptoms and signs among the treatment groups. On the 12<sup>th</sup> day of modeling, the scores changed little in the western medicine group and the low-dose XZP group and decreased significantly in the medium- and high-dose XZP groups ( $P < 0.01$ ) compared with those in the model group. Compared with those in the blank group, the protein and mRNA levels of p-MEK1/2, p-ERK, B-Raf, c-Jun, and COX-2 in the model group were significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with those in the model group, the protein and mRNA levels of p-MEK1/2, p-ERK1/2, B-Raf, c-Jun, and COX-2 in the western medicine group, medium-dose XZP group, and high-dose XZP group were significantly down-regulated ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** The mechanism of Wenjing Huayu Zhitong therapy in treating PD with cold coagulation and blood stasis syndrome may be related to the down-regulation of MAPK/ERK signaling pathway.

[**Keywords**] primary dysmenorrhea; cold coagulation and blood stasis syndrome; Wenjing Huayu Zhitong therapy; mitogen activated protein kinase (MAPK)/extracellular regulated protein kinase (ERK) signaling pathway

原发性痛经(PD)是指伴随月经发生的周期性下腹疼痛而无生殖器官器质性病变的疾病,常伴有恶心、呕吐、腹泻、出汗、疲劳和睡眠障碍等全身症状,持续时间一般不超过3 d<sup>[1-2]</sup>,是最常见的妇科疼痛性疾病。流行病学调查显示,不同国家PD的患病率在45%~90%<sup>[3-4]</sup>,国内PD的发生率在40%~80%<sup>[5-6]</sup>,其中轻度痛经占50.26%,中度占34.55%,重度占12.04%<sup>[7]</sup>,严重影响女性正常的学习与工作,降低生活质量<sup>[8]</sup>。此外,长期严重的PD,可导致经血逆流,增加子宫内膜异位症的发生率,进而导致不孕症的发生<sup>[9-10]</sup>。

研究表明,PD的危险因素包括以下几个方面,初潮年龄早、未产、月经周期长、月经过多、家族史、吸烟、饮酒和体育活动减少等<sup>[11-13]</sup>。但其发病机制尚未完全明确,多数学者认为PD的发生主要与子宫内膜前列腺素 $F_{2\alpha}$ ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ )含量升高有关。目前

PD的一线治疗药物为布洛芬等非甾体类抗炎药,但长期使用该类药可能会增加消化系统及中枢神经系统等不良反应的发生率,部分患者不能接受。因此,进一步探究PD的发病机制,寻求安全有效的治疗措施具有重要意义。

中药治疗PD具有疗效好,不良反应小的优点。PD虽有寒、热、虚、实之分,但临床以寒凝血瘀导致的实证最为多见。基于数据挖掘分析王东梅教授治疗PD的中药配伍规律,结果表明治疗药物以甘温、辛温为主,常用方剂组合以少腹逐瘀汤为主,主要发挥温经散寒、活血止痛之功<sup>[14]</sup>。课题组前期着眼于“温”“通”之法,针对寒凝血瘀证PD确立了温经化瘀止痛法,并应用由王清任“少腹逐瘀汤”加重温经活血药分量化裁而来的具有温经化瘀止痛功效的香延止痛方治疗寒凝血瘀证PD取得良好疗效<sup>[15-16]</sup>,但温经化瘀止痛法治疗PD的作用机制尚需

进一步证实。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者,调节着细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种重要的细胞生理病理过程<sup>[17]</sup>,与PD的发病最为相关,是介导PD发生发展的重要调控因子和通路<sup>[18]</sup>。周凌等<sup>[19]</sup>证实肉桂醛能抑制成纤维细胞MAPK信号通路相关蛋白细胞外调节蛋白激酶(ERK)的活化,小茴香能显著抑制ERK的磷酸化<sup>[20]</sup>,当归能通过MAPK/ERK信号通路的介导来改善小鼠大脑中动脉闭塞情况<sup>[21]</sup>,白芍总苷能显著下调大鼠磷酸化(p)-ERK1/2表达<sup>[22]</sup>。由此可见,温经化瘀止痛方剂香延止痛方中多个药物能够调控MAPK/ERK信号通路相关因子的表达。本研究通过建立寒凝血瘀证PD大鼠模型,并分别检测大鼠子宫组织MAPK/ERK信号通路中丝裂原活化细胞外调节激酶1/2(MEK1/2),ERK1/2蛋白表达,磷酸化水平,mRNA转录水平,及上下游相关因子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(B-Raf),c-Jun,环氧化酶-2(COX-2)蛋白表达及其mRNA转录水平,进一步探讨温经化瘀止痛法治寒凝血瘀证PD的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级性成熟雌性Wistar大鼠48只,7~8周龄,体质量(200±10)g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物合格证号SCXK(鲁)2014-0007。于山东中医药大学附属医院实验室动物中心饲养,实验室室温23~25℃,相对湿度50%~60%,日光灯光照,明暗交替各12h,自由摄食、饮水。该实验方案已通过山东中医药大学附属医院动物伦理委员会审核(伦理批件号AWE-2019-011)。

**1.2 药物** 香延止痛方,处方为醋延胡索18g(批号18121841),肉桂6g(批号18100681),盐小茴香6g(批号18092211),醋香附12g(批号18021421),当归9g(批号1811038),川芎9g(批号18017941),白芍15g(批号18015361),赤芍9g(批号18030511),生蒲黄9g(批号18092481),制没药9g(批号18023641),干姜9g(批号18016762),煨肉豆蔻10g(批号18070401),陈皮9g(批号18018141),甘草9g(批号1901050),取相当于饮片等量的各味药颗粒剂,配方颗粒均购于山东中医药大学附属医院,北京康仁堂药业有限公司生产;布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,批号18110645);苯甲酸雌二醇注射液(宁波第二激素厂,批号181214);缩宫素注射液(马鞍山丰原制药有限公

司,批号180912-1)。

**1.3 试剂** 兔ERK1/ERK2, p-ERK(Thr202/Tyr204)抗体(美国CST公司,批号分别为ab52918, #9106);兔MEK1/MEK2, p-MEK1/2抗体(美国Affinity公司,批号分别为AF6385, AF3385);兔c-Jun, BRAF抗体(中国艾博抗公司,批号分别为ab32137, ab33899);兔COX-2,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔, RNA提取液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB11077-2, GB12001, GB23303, G3013);RevertAid First Strand cDNA合成试剂盒(美国Thermo公司,批号#K1622);FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(瑞士Roche公司,批号04913914001)。

**1.4 仪器** Stepone plus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司), T-Gradient型梯度PCR扩增仪(德国Biometra公司), 2200型凝胶成像系统(美国Alpha公司), EC250-90型电泳仪(美国Thermo公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 适应性饲养1周后,将所有大鼠按随机数字表法随机分为正常组、模型组、布洛芬组、香延止痛方低、中、高剂量组,每组8只,并用苦味酸标记,实验过程中,香延止痛方低、中剂量组大鼠各死亡1只。

**2.2 参考文献[23]建立寒凝血瘀证PD大鼠模型**

采用寒冷刺激联合苯甲酸雌二醇及缩宫素建立寒凝血瘀证PD大鼠模型。除正常组外,其余各组大鼠每日固定时间置于冰块上20min,每日1次,连续12d。同时,每日给予大鼠皮下注射苯甲酸雌二醇注射液0.4mg/只,第1天和第12天各0.8mg/只,末次注射苯甲酸雌二醇1h后腹腔注射缩宫素2U/只。寒凝血瘀证造模验证:寒战,蜷缩少动,喜扎堆,呼吸弱,弓背竖毛,爪尾部紫暗,耳色暗红,毛色枯槁,舌质紫暗,舌下脉络增粗增长,粪质不成形。痛经造模验证:观察大鼠扭体反应,即大鼠腹部收缩内凹,躯干与后肢伸展,臀部与一侧肢体内旋。

**2.3 给药方法** 所有大鼠自造模第7天起给予灌胃处理,每日1次,连续6d。各用药组分别按体表面积折算成人的等效剂量计算布洛芬组及香延止痛方各组的给药量,以下中药剂量均为生药剂量。香延止痛方分别配制为0.655, 1.309, 2.618 g·mL<sup>-1</sup>水溶液。其中,正常组及模型组大鼠予蒸馏水灌胃2mL,布洛芬组大鼠按0.06 g·kg<sup>-1</sup>体质量予布洛芬缓释胶囊溶液灌胃,香延止痛方低、中、高剂量组分

别按 6.55, 13.09, 26.18 g·kg<sup>-1</sup> 体质量予香延止痛方。

**2.4 取材方法** 末次给药 1 h 后, 腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL·kg<sup>-1</sup>, 腹主动脉取血, 分离血清, 并摘取子宫, 分装于无菌离心管中, -80 °C 冰箱冷冻保存。

**2.5 指标检测**

**2.5.1 观察扭体反应** 从注射缩宫素开始计时, 观

察除正常组外所有大鼠扭体反应潜伏时间及 30 min 内扭体次数。

**2.5.2 记录寒凝血瘀证大鼠症状和体征量化评分** 分别于造模第 6 天(即给药前)及造模第 12 天(即给药后)记录各组大鼠寒凝血瘀证大鼠症状和体征量化评分, 评分标准见表 1<sup>[24]</sup>。

表 1 寒凝血瘀证大鼠症状和体征量化评分表

Table 1 Quantitative score of symptoms and signs of rats with cold coagulation and blood stasis syndrome(CDSS)

|                         | 0分                    | 1分                     | 2分                                  | 3分                               |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 精神状态                    | 活泼好动, 反应敏捷, 进食正常      | 喜扎堆蜷缩, 活动量减少, 食量减少<1/3 | 喜扎堆, 蜷缩少动, 弓背竖毛, 偶有寒战, 食量减少 1/3~2/3 | 喜扎堆, 蜷缩不动, 弓背竖毛, 寒战明显, 进食量减少>2/3 |
| 皮肤毛发                    | 皮肤与脂肪连接紧密柔韧有弹性毛发光亮、柔顺 | 皮肤略松弛, 张力减少, 毛发缺乏光泽    | 毛发发黄, 皮肤松弛, 少许脂肪, 易抓取               | 毛发枯槁直立, 皮肤松弛, 皮下无脂肪, 抓之触骨        |
| 大便                      | 大便成形而干                | 大便量稍增多, 湿度尚正常          | 大便明显增多, 粪质变软, 尚成形                   | 大便明显增多, 粪质软, 不成形                 |
| 脉络瘀血(口周、舌质、爪甲、耳缘、舌尾、肛周) | 无脉络瘀血                 | 一个部位少量脉络瘀血             | 2~3个部位脉络瘀血                          | 3个以上部位严重脉、络瘀血或针刺部位皮下瘀斑明显         |

**2.5.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠子宫组织中 MEK1/2, ERK1/2, p-MEK1/2, p-ERK1/2, B-Raf, c-Jun, COX-2 蛋白表达** 取大鼠子宫组织约 30 mg, 剪成小块后置于研钵中, 加入 PFMS 3 μL 及 RIPA 300 μL, 随后加入少量液氮, 将其研磨至匀浆状态, 30 min 冰浴后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min(离心半径 10 cm), 取上清, 即为总蛋白溶液, 用 BCA 蛋白定量测定法对蛋白总浓度进行测定。SDS-PAGE 电泳、湿法转膜、封闭 1 h, 稀释一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜。TBST 洗 5 遍, 将膜放入稀释的二抗(1:5 000)中, 孵育 1 h。在暗室中将 ECLA 及 ECLB 等体积混合配制显影液, 将膜浸泡到显影液中。胶片扫描存档, Image J 软件处理系统分析目标条带的灰度值。

**2.5.4 Real-time PCR 法检测大鼠子宫组织 MEK1, MEK2, ERK1, ERK2, B-Raf, c-Jun, COX-2 mRNA 表达** 取大鼠子宫组织 50 mg 剪成小块, 提取子宫组织中总 RNA, 逆转录为 cDNA; 取 0.2 mL PCR 管, 配制如下反应体系为 2×Real-time PCR Mix 12.5 μL, 7.5 μmol·L<sup>-1</sup> 基因引物 2.0 μL, 反转录产物 2.5 μL, 8.0 μL 双蒸水, 每个反转录产物配制 3 管; 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法分析数据。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 见表 2。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据处理, 统计资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 当数据满足正态性和方差齐性时, 组间比较采用单因素方差分析, 否则,

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequence of PCR

| 引物      | 序列                                 | 长度/bp |
|---------|------------------------------------|-------|
| B-Raf   | 上游 5'-CGCAAGATGTGGTGTAAACGG-3'     | 201   |
|         | 下游 5'-AAGTTGTGGGTTGTCAGAGGAA-3'    |       |
| MEK1    | 上游 5'-CCTTCTACAGTGACGGCGAGAT-3'    | 108   |
|         | 下游 5'-TTCCTAAAATTTGCTCAGGAATTCT-3' |       |
| MEK2    | 上游 5'-TGAATGAGCCACCTCCCAAG-3'      | 174   |
|         | 下游 5'-ATAGCCAGCCAGCGAAGTCC-3'      |       |
| ERK1    | 上游 5'-TTCAGGACCTCATGGAGACGG-3'     | 256   |
|         | 下游 5'-GCCACATACTCGGTCAGAAAGC-3'    |       |
| ERK2    | 上游 5'-CTCGTACATCGGAGAAGGCG-3'      | 159   |
|         | 下游 5'-TCATGTCTGAAGCGCAGTAGGA-3'    |       |
| c-Jun   | 上游 5'-GCAATGGGCACATCACCCTAC-3'     | 142   |
|         | 下游 5'-GTGACACTGGGCAGCGTATTCT-3'    |       |
| COX-2   | 上游 5'-TATCAGGTATCGGTGGAGAGG-3'     | 262   |
|         | 下游 5'-TGGTTTGGAAACAGTCGCTCGT-3'    |       |
| β-actin | 上游 5'-TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'    | 240   |
|         | 下游 5'-GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3'    |       |

组间比较采用秩和检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对寒凝血瘀证 PD 大鼠扭体反应的影响** 与模型组比较, 各治疗组大鼠扭体潜伏时间均有所延长, 但差异均无统计学意义, 各治疗组扭体次数均显著减少( $P < 0.01$ ); 各治疗组间比较, 布洛芬组和香延止痛方中、高剂量组间两两比较差异均无统计学

意义,且均少于香延止痛方低剂量组( $P<0.05, P<0.01$ )。见表3。

表3 香延止痛方对寒凝血瘀证PD大鼠扭体反应的影响( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 3 Effect of Xiangyan Zhitong prescription on writhing reaction in PD rats with CDSS ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | n | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 扭体潜伏时间/min | 扭体数/次                      |
|-------|---|-----------------------|------------|----------------------------|
| 正常    | 8 |                       | -          | -                          |
| 模型    | 8 |                       | 6.25±0.71  | 19.75±2.49                 |
| 布洛芬   | 8 | 0.06                  | 7.25±1.04  | 11.88±1.81 <sup>1)</sup>   |
| 香延止痛方 | 7 | 6.55                  | 6.43±1.40  | 15.29±2.14 <sup>1,2)</sup> |
|       | 7 | 13.09                 | 6.86±1.35  | 12.29±1.80 <sup>1,4)</sup> |
|       | 8 | 26.18                 | 6.75±0.71  | 13.13±1.73 <sup>1,3)</sup> |

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与布洛芬组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与香延止痛方低剂量组比较<sup>3)</sup> $P<0.05, ^4)$  $P<0.01$ 。

3.2 对寒凝血瘀证PD大鼠症状和体征量化评分的影响 造模第6天比较,各组大鼠评分差异无统计

表4 香延止痛方对寒凝血瘀证PD大鼠症状和体征量化评分的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | n | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 造模第6天     | 造模第12天                      |
|-------|---|-----------------------|-----------|-----------------------------|
| 正常    | 8 |                       | -         | -                           |
| 模型    | 8 |                       | 5.38±0.92 | 7.63±0.74                   |
| 布洛芬   | 8 | 0.06                  | 5.13±1.25 | 7.38±1.69                   |
| 香延止痛方 | 7 | 6.55                  | 5.00±1.00 | 7.00±0.82                   |
|       | 7 | 13.09                 | 5.20±0.76 | 5.86±0.38 <sup>1,2,3)</sup> |
|       | 8 | 26.18                 | 5.38±0.74 | 5.63±0.92 <sup>1,2,3)</sup> |

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与布洛芬组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与香延止痛方低剂量组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

表5 香延止痛方对寒凝血瘀证PD大鼠p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Xiangyan Zhitong prescription on p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2 levels in PD rats with CDSS ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | p-MEK1/2/MEK1/2           | p-ERK1/2/ERK1/2           |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常    |                       | 0.38±0.02                 | 0.37±0.08                 |
| 模型    |                       | 0.94±0.12 <sup>1)</sup>   | 0.72±0.15 <sup>1)</sup>   |
| 布洛芬   | 0.06                  | 0.51±0.03 <sup>3)</sup>   | 0.52±0.07 <sup>2)</sup>   |
| 香延止痛方 | 6.55                  | 0.93±0.09 <sup>4)</sup>   | 0.82±0.13 <sup>4)</sup>   |
|       | 13.09                 | 0.59±0.07 <sup>3,5)</sup> | 0.54±0.05 <sup>2,5)</sup> |
|       | 26.18                 | 0.55±0.08 <sup>3,5)</sup> | 0.52±0.06 <sup>2,5)</sup> |

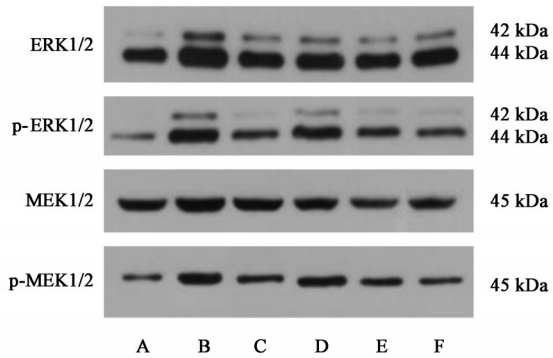
注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05, ^3)$  $P<0.01$ ;与布洛芬组比较<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;与香延止痛方低剂量组比较<sup>5)</sup> $P<0.01$ 。

3.4 对寒凝血瘀证PD大鼠B-Raf, c-Jun, COX-2蛋白水平的影响 与正常组比较,模型组显著升高B-Raf, c-Jun, COX-2水平( $P<0.01$ );与模型组比较,布洛芬组及香延止痛方中、高剂量组明显降低B-Raf, c-Jun, COX-2水平( $P<0.05, P<0.01$ ),香延止痛方低剂量组明显降低B-Raf, COX-2水平

学意义;造模第12天,与模型组比较,布洛芬组及香延止痛方低剂量组差异无统计学意义,香延止痛方中、高剂量组显著降低症状和体征量化评分( $P<0.01$ );各治疗组间比较,布洛芬组与香延止痛方低剂量组间差异无统计学意义,均较香延止痛方中、低剂量组升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4。

3.3 对寒凝血瘀证PD大鼠p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2水平的影响 与正常组比较,模型组显著升高p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2水平( $P<0.01$ );与模型组比较,香延止痛方低剂量组差异无统计学意义,布洛芬组及香延止痛方中、高剂量组明显降低p-MEK1/2/MEK1/2水平( $P<0.05$ ),明显降低p-ERK1/2/ERK1/2水平( $P<0.05$ );各治疗组间比较,布洛芬组及香延止痛方中、高剂量组间两两比较无明显差异,均较香延止痛方低剂量组显著降低p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2水平( $P<0.01$ )。见表5,图1。

( $P<0.05, P<0.01$ );各治疗组间比较,香延止痛方中、高剂量组B-Raf, c-Jun水平差异无统计学意义,均低于布洛芬组及香延止痛方低剂量组( $P<0.05, P<0.01$ );香延止痛方高剂量组与布洛芬组COX-2水平差异无统计学意义,均低于香延止痛方低、中剂量组( $P<0.05, P<0.01$ )。见表6,图2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 布洛芬组; D. 香延止痛方低剂量组; E. 香延止痛方中剂量组; F. 香延止痛方高剂量组(图 2 同)

图 1 各组大鼠子宫组织中 p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2 protein expression in uterus tissue of each groups rats

3.5 对寒凝血瘀证 PD 大鼠子宫组织中 MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 mRNA 的影响 与正常组比较, 模型组显著升高 MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各治疗组均降低 MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 mRNA 水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 差异有统计学意义; 各治疗组间比较, 布洛芬组及香延止痛方中、高剂量组间 MEK1,

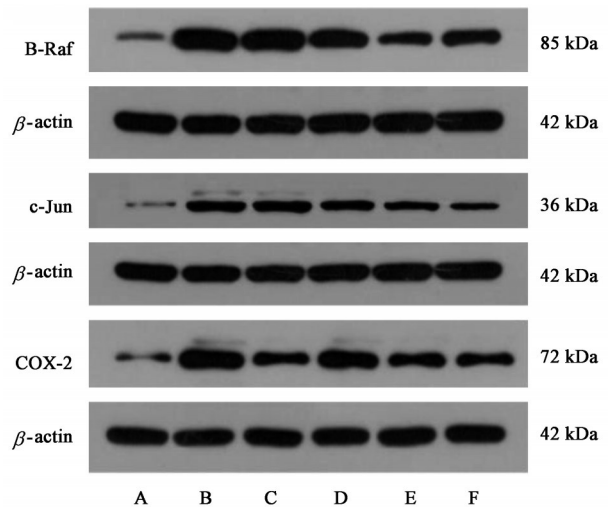


图 2 各组大鼠子宫组织中 B-Raf, c-Jun, COX-2 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of B-Raf, c-Jun, COX-2 protein expression in uterus tissue of each groups rats

ERK1, ERK2 mRNA 水平差异无统计学意义, 香延止痛方中剂量组 MEK2 mRNA 水平明显低于高剂量组 ( $P < 0.05$ ), 布洛芬组及香延止痛方中、高剂量组 MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 mRNA 水平均显著低于香延止痛方低剂量组 ( $P < 0.01$ ), 差异有统计学意义。见表 7。

表 6 香延止痛方对寒凝血瘀证 PD 大鼠 B-Raf, c-Jun, COX-2 蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Xiangyan Zhitong prescription on protein levels of B-Raf, c-Jun and COX-2 in PD rats with CDSS ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | B-Raf/ $\beta$ -actin       | c-Jun/ $\beta$ -actin       | COX-2/ $\beta$ -actin       |
|-------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常    |                       | 0.18±0.89                   | 0.32±0.09                   | 0.41±0.15                   |
| 模型    |                       | 1.14±0.12 <sup>1)</sup>     | 0.99±0.12 <sup>1)</sup>     | 1.63±0.19 <sup>1)</sup>     |
| 布洛芬   | 0.06                  | 0.88±0.12 <sup>2)</sup>     | 0.77±0.08 <sup>2)</sup>     | 0.77±0.15 <sup>3)</sup>     |
| 香延止痛方 | 6.55                  | 0.90±0.20 <sup>2)</sup>     | 0.82±0.14                   | 1.22±0.04 <sup>3,5)</sup>   |
|       | 13.09                 | 0.56±0.08 <sup>3,4,6)</sup> | 0.58±0.09 <sup>3,4,6)</sup> | 1.01±0.13 <sup>3,4)</sup>   |
|       | 26.18                 | 0.58±0.14 <sup>3,4,7)</sup> | 0.45±0.13 <sup>3,5,7)</sup> | 0.68±0.08 <sup>3,7,8)</sup> |

注: 与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ ; 与布洛芬组比较<sup>4)</sup> $P < 0.05$ , <sup>5)</sup> $P < 0.01$ ; 与香延止痛方低剂量组比较<sup>6)</sup> $P < 0.05$ , <sup>7)</sup> $P < 0.01$ ; 与香延止痛方中剂量组比较<sup>8)</sup> $P < 0.05$ 。

表 7 香延止痛方对寒凝血瘀证 PD 大鼠子宫组织中 MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Xiangyan Zhitong prescription on MEK1, MEK2, ERK1 and ERK2 mRNA in uterine tissue of rats in PD rats with CDSS ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | MEK1                      | MEK2                        | ERK1                      | ERK2                      |
|-------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 模型    |                       | 2.15±0.30 <sup>1)</sup>   | 3.20±0.27 <sup>1)</sup>     | 2.27±0.01 <sup>1)</sup>   | 4.66±0.22 <sup>1)</sup>   |
| 布洛芬   | 0.06                  | 1.46±0.19 <sup>3)</sup>   | 1.89±0.12 <sup>3)</sup>     | 1.61±0.09 <sup>3)</sup>   | 1.62±0.12 <sup>3)</sup>   |
| 香延止痛方 | 6.55                  | 1.89±0.09 <sup>2,4)</sup> | 2.65±0.14 <sup>3,4)</sup>   | 1.95±0.17 <sup>3,4)</sup> | 3.16±0.80 <sup>3,4)</sup> |
|       | 13.09                 | 1.53±0.10 <sup>3,5)</sup> | 1.70±0.28 <sup>3,5)</sup>   | 1.60±0.12 <sup>3,5)</sup> | 1.70±0.15 <sup>3,5)</sup> |
|       | 26.18                 | 1.46±0.11 <sup>3,5)</sup> | 2.04±0.09 <sup>3,5,6)</sup> | 1.55±0.11 <sup>3,5)</sup> | 1.54±0.14 <sup>3,5)</sup> |

注: 正常组各指标 mRNA 相对表达量为 1; 与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ ; 与布洛芬组比较<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ; 与香延止痛方低剂量组比较<sup>5)</sup> $P < 0.01$ ; 与香延止痛方中剂量组比较<sup>6)</sup> $P < 0.05$ 。

3.6 对寒凝血瘀证PD大鼠子宫组织中B-Raf, c-Jun, COX-2 mRNA的影响 与正常组比较,模型组显著升高B-Raf, c-Jun, COX-2 mRNA水平( $P<0.01$ );与模型组比较,各治疗组显著降低B-Raf, c-Jun mRNA水平( $P<0.01$ ),布洛芬组与香延止痛方中、高剂量组显著降低COX-2 mRNA水平( $P<0.01$ );各治疗组间比较,布洛芬组及香延止痛方

中、高剂量组间B-Raf, COX-2 mRNA差异无统计学意义,均低于香延止痛方低剂量组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );布洛芬组c-Jun mRNA水平低于香延止痛方低、中剂量组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),与香延止痛方高剂量组间差异无统计学意义;香延止痛方中剂量组c-Jun mRNA水平显著低于低剂量组( $P<0.01$ ),与高剂量组差异无统计学意义。见表8。

表8 香延止痛方对寒凝血瘀证PD大鼠子宫组织中B-Raf, c-Jun, COX-2 mRNA的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Xiangyan Zhitong prescription on B-Raf, c-Jun and COX-2 mRNA in uterine tissue of rats in PD rats with CDSS ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | B-Raf                     | c-Jun                       | COX-2                     |
|-------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 模型    |                       | 3.77±0.76 <sup>1)</sup>   | 4.40±0.31 <sup>1)</sup>     | 3.20±0.32 <sup>1)</sup>   |
| 布洛芬   | 0.06                  | 2.00±0.41 <sup>2)</sup>   | 1.29±0.14 <sup>2)</sup>     | 1.32±0.27 <sup>2)</sup>   |
| 香延止痛方 | 6.55                  | 2.81±0.24 <sup>2,3)</sup> | 2.12±0.11 <sup>2,4)</sup>   | 2.71±0.35 <sup>4)</sup>   |
|       | 13.09                 | 2.13±0.15 <sup>2,5)</sup> | 1.61±0.24 <sup>2,3,6)</sup> | 1.61±0.36 <sup>2,6)</sup> |
|       | 26.18                 | 2.02±0.16 <sup>2,5)</sup> | 1.42±0.11 <sup>2,6)</sup>   | 1.76±0.46 <sup>2,6)</sup> |

注:正常组各指标mRNA相对表达量为1;与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与布洛芬组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;与香延止痛方低剂量组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ ,<sup>6)</sup> $P<0.01$ 。

#### 4 讨论

中医学认为,PD的发生主要在于邪气内伏或精血素亏,更值经期前后冲任二脉气血的生理变化急剧,导致胞宫的气血运行不畅,“不通则痛”;或冲任、胞宫失于濡养,“不荣则痛”。其中,临床上又以“不通则痛”中的寒凝血瘀证最为多见<sup>[25]</sup>,因此,温经化瘀止痛法是PD的重要治法。实验中所用温经化瘀止痛方剂香延止痛方是王东梅教授多年经验方,方中君以醋延胡索、肉桂,共奏温经散寒,行气止痛之功;臣以盐小茴香以散寒止痛,醋香附、当归、川芎、白芍以行气活血止痛;佐以赤芍、生蒲黄、醋没药、干姜、煨肉豆蔻、陈皮以增强温经散寒,化瘀止痛之功;生甘草作为使药以调和诸药,缓急止痛。前期研究证实温经化瘀止痛法能够通过降低雌二醇(E<sub>2</sub>)水平、靶向调控T细胞亚群及特征性细胞因子表达,从而降低PGF<sub>2α</sub>和血栓素B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)水平,升高血清前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)及6-酮前列腺素F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>),解除子宫肌痉挛,有效治疗PD<sup>[26-28]</sup>。

MAPKs信号通路是体内调节炎症反应及免疫应答的重要通路,p38 MAPK, ERK1/2, JNK通路是不同的MAPKs通路亚型。在不同的生长因子、细胞因子或病原体刺激下,p38 MAPK, ERK1/2, JNK通路被激活,并通过影响通路下游多种细胞因子的参与免疫应答的调控或炎症反应<sup>[29-32]</sup>。其中MAPK/ERK信号通路可被应激刺激激活,对疼痛发生、发展起着重要的作用<sup>[33]</sup>。Raf即MAPKK激酶

或MAPKKK,是MAPK级联反应的第一个分子,从而启动了MAPK的三级级联激活,活化的Raf通过磷酸化促分裂原激活的MEK环上的丝氨酸残基而将其激活。MEK再将促分裂原激活的ERK激活,MEK, ERK磷酸化后进入细胞核,可启动一些转录因子的表达,如c-Jun,核转录因子-κB(NF-κB)等<sup>[29,34]</sup>,并进一步调控COX-2的表达<sup>[35]</sup>。COX-2作为PGF<sub>2α</sub>转化过程中的重要限速酶,控制着其转换速度,影响PGF<sub>2α</sub>的合成。PGF<sub>2α</sub>一方面能够引起子宫收缩而限制子宫血流速度,另一方面可直接作用于血管,引起血管收缩,在这两方面因素的共同作用下,可导致子宫局部缺血缺氧,进而导致无氧代谢产物的积累,刺激疼痛受体,产生痛经<sup>[36]</sup>。由此推断,抑制MAPK/ERK信号通路中各因子的表达能够起到缓解PD的作用。HUANG等<sup>[18]</sup>证实,芍药苷可以降低PD大鼠MAPK信号通路级联反应中ERK的磷酸化过程,为进一步探讨温经化瘀止痛法治疗PD的作用机制提供依据。

本研究结果显示,寒凝血瘀证PD大鼠模型子宫组织中MEK1/2, ERK1/2磷酸化水平, B-Raf, c-Jun, COX-2蛋白表达及mRNA转录水平升高,而温经化瘀止痛法能够降低PD大鼠扭体次数,改善寒凝血瘀证大鼠症状和体征量化评分,下调MAPK/ERK信号通路中相关因子蛋白表达、磷酸化水平及mRNA转录水平,表明MAPK/ERK信号通路可能介导了PD的发病,而抑制MAPK/ERK信号通路可能

是温经化瘀止痛法治疗PD的作用机制之一。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TUGAY N, AKBAYRAK T, DEMIRTÜRK F, et al. Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation and interferential current in primary dysmenorrhea[J]. *Pain Med*, 2007, 8(4):295-300.
- [2] DE SANCTIS V, SOLIMAN A, BERNASCONI S, et al. Primary dysmenorrhea in adolescents: prevalence, impact and recent knowledge [J]. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2015, 13(2):512-520.
- [3] FANNI R, MÁRTA P, M S P F, et al. Bleeding out the quality-adjusted life years: evaluating the burden of primary dysmenorrhea using time trade-off and willingness-to-pay methods [J]. *Pain*, 2017, 158(11):2259-2267.
- [4] PROCTOR M, FARQUHAR C. Diagnosis and management of dysmenorrhoea [J]. *BMJ*, 2006, 332(7550):1134-1138.
- [5] 孟文苓,王宁宁,李苹,等.女大学生原发性痛经的流行病学现况调查及影响因素分析[J].*泰山医学院学报*,2013,34(8):579-583.
- [6] 孙艳明,王玲,李戈.女大学生痛经影响因素调查分析[C]//中华中医药学会第九次全国中医妇科学术大会.广州:出版者不详,2009.
- [7] 花琰,李晋华,范艳婷,等.某医学院在校女大学生痛经现状及其影响因素分析[J].*实用临床护理学电子杂志*,2018,3(1):96-97.
- [8] QUICK F, MOHAMMAD-ALIZADEH-CHARANDABI S, MIRGHAFOURVAND M. Primary dysmenorrhea with and without premenstrual syndrome: variation in quality of life over menstrual phases [J]. *Qual Life Res*, 2019, 28(1):99-107.
- [9] 宋秀媛,付曙光,李红彩.隔药灸治疗子宫内位异位性痛经[J].*世界中医药*,2019,14(10):2762-2765.
- [10] 黄永俐,沈洁.不孕症妇女的危险因素研究[J].*中国妇产科临床杂志*,2018,19(1):65-66.
- [11] AL-MATOUQ S, AL-MUTAIRI H, AL-MUTAIRI O, et al. Dysmenorrhea among high-school students and its associated factors in Kuwait. *BMC Pediatr*. 2019;19(1):80.
- [12] HAILEMESKEL S, DEMISSIE A, ASSEFA N. Primary dysmenorrhea magnitude, associated risk factors, and its effect on academic performance: evidence from female university students in Ethiopia [J]. *Int J Womens Health*, 2016, 8:489-496.
- [13] IACOVIDES S, AVIDON I, BAKER F C. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review [J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(6):762-778.
- [14] 高欢,王东梅.基于数据挖掘研究王东梅教授治疗原发性痛经中药配伍规律[J].*海南医学院学报*,2020,doi:10.13210/j.cnki.jhmu.20200825.005.
- [15] 马青,刘少玲,师伟,等.温经化瘀法治疗原发性痛经(寒凝血瘀证)即时止痛的临床研究[J].*时珍国医国药*,2016,27(12):2946-2948.
- [16] 刘少玲.温经化瘀法治疗原发性痛经(寒凝血瘀证)即时止痛临床疗效观察[D].济南:山东中医药大学,2015.
- [17] LEE Y, KIM Y J, KIM M H, et al. MAPK Cascades in Guard Cell Signal Transduction [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7:80.
- [18] HUANG X, SU S, DUAN J A, et al. Effects and mechanisms of Shaofu-Zhuyu decoction and its major bioactive component for cold-stagnation and blood-stasis primary dysmenorrhea rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186:234-243.
- [19] 周凌,晏洪波.肉桂醛对UVA照射后体外成纤维细胞表达MMP-1,MMP-3和MAPK信号的影响[J].*中国皮肤性病学杂志*,2015,29(2):114-117.
- [20] SUN Z, PARK S Y, HWANG E, et al. Dietary Foeniculum vulgare mill extract attenuated UVB irradiation-induced skin photoaging by activating of Nrf2 and inhibiting MAPK pathways [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(12):1273-1284.
- [21] LEE S E, KIM J H, LIM C, et al. Neuroprotective effect of Angelica gigas root in a mouse model of ischemic brain injury through MAPK signaling pathway regulation [J]. *Chin Med*, 2020, doi: 10.1186/s13020-020-00383-1.
- [22] 郑琳颖,潘竞镡,杨以琳,等.白芍总苷下调果糖-高脂诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病ERK1/2,TLR4和TRL9蛋白表达的作用[J].*中国药理学杂志*,2014,49(24):2168-2172.
- [23] 马青.温经化瘀止痛法调控T细胞亚群分化治疗原发性痛经的机制以及原发性痛经现代文献用药规律的研究[D].山东中医药大学,2017.
- [24] 王宽,呼雪庆,黄玉萨,等.不同施灸方向对寒凝血瘀证大鼠血液流变学的影响[J].*针灸推拿医学:英文版*,2016,14(1):10-15.
- [25] 杜慧玲.原发性痛经患者中医体质、证型分布及相关性因素研究[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [26] 王丹丹,王东梅,马青,等.温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证痛经大鼠Th17、Treg细胞分化及其细胞因子表达的影响[J].*时珍国医国药*,2019,30(2):308-310.

- [27] 曹卫平,马青,师伟,等. 香延止痛方对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠的治疗效果及其作用机制[J]. 山东医药,2017,57(19):40-42.
- [28] 马青,师伟,刘少玲,等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠血清  $E_2$ 、P、 $PGE_2$ 、 $PGF_{2\alpha}$ 、TXB<sub>2</sub> 及 6-keto- $PGF_{1\alpha}$  的影响[J]. 中华中医药学刊,2017,35(5):1281-1284.
- [29] 王帅. 加味芍药甘草汤对子宫腺肌病 MAPK/ERK 信号通路干预机制[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [30] WANG K, WANG F, BAO J P, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  modulates sodium-activated potassium channel SLICK in rat dorsal horn neurons via p38 MAPK activation pathway [J]. J Pain Res, 2017, 10: 1265-1271.
- [31] CHEN N F, CHEN W F, SUNG C S, et al. Contributions of p38 and ERK to the antinociceptive effects of TGF- $\beta_1$  in chronic constriction injury-induced neuropathic rats [J]. J Headache Pain, 2016, 17(1):72.
- [32] WORSLEY M A, ALLEN C E, BILLINTON A, et al. Chronic tooth pulp inflammation induces persistent expression of phosphorylated ERK (pERK) and phosphorylated p38 (pp38) in trigeminal subnucleus caudalis [J]. Neuroscience, 2014, 269(100):318-330.
- [33] 卢国林,林财珠. MAPK/ERK 信号转导通路与疼痛敏化调控[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2007, 28(6): 561-564.
- [34] 王美丽. 从 MAPK/ERK 信号通路探讨电针分娩疼痛的镇痛机制[D]. 南宁:广西中医药大学,2016.
- [35] LI Y, ZHANG T, TU J, et al. Tangeretin inhibits IL-1 $\beta$  induced proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts and the production of COX-2,  $PGE_2$  and MMPs via modulation of p38 MAPK/ERK/JNK pathways [J]. Bangladesh J Pharmacol, 2015, 10(3): 714-725.
- [36] FERRIES-ROWE E, COREY E, ARCHER J S. Primary dysmenorrhea: diagnosis and therapy [J]. Obstet Gynecol, 2020, 136(5): 1047-1058.

[责任编辑 周冰冰]