

## 基于 p38 MAPK 通路探讨乌丹丸对子宫内膜异位症 寒凝血瘀证巨噬细胞极化的影响

祝洁, 薛晓鸥, 贺稚平, 代勇, 李军, 张家蔚, 孙海芸\*  
(北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 基于 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38 MAPK)探讨乌丹丸对子宫内膜异位症(EMT)寒凝血瘀证模型大鼠巨噬细胞 M1/M2 极化的影响。方法: 选取雌性 SD 大鼠, 随机数字法分为假手术组、模型组、乌丹丸高、中、低剂量组(2.4、1.2、0.6 g·kg<sup>-1</sup>)、中成药组和西药组, 采用冰水浴联合自体子宫内膜移植法建立子宫内膜异位症寒凝血瘀证大鼠模型, 连续给药 4 周处死取材。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-4、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )炎性因子的表达评估炎症; 其次, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测一氧化氮合成酶(iNOS)、TNF- $\alpha$ 、精氨酸酶 1(Arg1)、甘露糖受体(CD206)转录水平评价巨噬细胞极化; 蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫荧光技术(IF)检测 iNOS、Arg1 蛋白的表达佐证巨噬细胞极化。Western blot 和 Real-time PCR 检测 p38 MAPK 信号通路相关蛋白表达。结果: 与假手术组比较, 模型组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、IL-4 含量均明显升高( $P < 0.05$ ), 异位内膜组织中 iNOS、TNF- $\alpha$ 、p-p38 MAPK、酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)蛋白明显升高, iNOS、TNF- $\alpha$ 、MAPK、ERK mRNA 水平明显升高, Arg1、CD206 mRNA 及蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 异位内膜组织 iNOS 阳性细胞数明显升高, Arg1 阳性细胞数明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 各给药组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、IL-4 表达量均有不同程度降低, 乌丹丸高、中剂量组和西药组尤为明显( $P < 0.05$ ), 乌丹丸高、中剂量组及中成药、西药组大鼠异位子宫内膜组织中 iNOS、TNF- $\alpha$ 、p-p38 MAPK、p-ERK 蛋白明显降低, iNOS、TNF- $\alpha$ 、MAPK、ERK mRNA 水平明显降低, Arg1、CD206 mRNA 及蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 乌丹丸高、中剂量组及中成药、西药组大鼠异位子宫内膜组织中 iNOS 细胞阳性数量明显降低, Arg1 蛋白阳性数明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 乌丹丸低、中、高剂量呈剂量依赖性, 高剂量组与西药组疗效相近。结论: 乌丹丸可以降低子宫内膜异位症寒凝血瘀证大鼠模型的炎症反应, 减少 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、TGF- $\beta$  炎性因子的表达, 促使巨噬细胞从 M1 型向 M2 型极化, 其机制可能与 p38 MAPK 信号通路相关。

**[关键词]** 子宫内膜异位症; 寒凝血瘀证; 炎症因子; 巨噬细胞极化; p38 丝裂素活化蛋白激酶

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0105-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20222428

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221025.1139.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-10-25 19:00

### Effect of Wudan Pill on Polarization of Macrophages in Endometriosis with Cold Congeal and Blood Stasis Syndrome Based on p38 MAPK Pathway

ZHU Jie, XUE Xiaoou, HE Zhiping, DAI Yong, LI Jun, ZHANG Jiawei, SUN Haiyun\*  
(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Wudan pill on the polarization of macrophages in the rat model of endometriosis (EMT) with cold congeal and blood stasis syndrome based on p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK). **Method:** Female SD rats with regular motility cycles were selected and randomly divided into sham-operated group, model group, Wudan pill high, medium, and low-dose groups (2.4, 1.2,

**[收稿日期]** 2022-08-17

**[基金项目]** 北京中医药大学青年教师项目(2019-jms-JYB-JS-082);王子瑜教授全国名老中医传承工作室项目;北京中医药大学新奥基金“名老中医药专家经验挖掘学术研究重点项目”

**[第一作者]** 祝洁, 博士, 住院医师, 从事中西医结合防治妇科内分泌相关疾病研究, E-mail: zhujiefuke@163.com

**[通信作者]** \* 孙海芸, 主治医师, 从事中西医结合治疗妇科疾病研究, E-mail: sunhaiyun1979@163.com

and  $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), Chinese patent medicine group, and western medicine group by the random number table method. The method of ice water bath + autologous endometrial transplantation was used to establish the rat model of EMT with cold congeal and blood stasis, and the rats were executed after 4 weeks of continuous drug administration to collect materials. Expression levels of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-4, and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to assess inflammation. The real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was performed to determine the inducible nitric oxide synthase (iNOS), TNF- $\alpha$ , arginase 1 (Arg1), and human mannose receptor (CD206) transcriptional levels to evaluate macrophage polarization. Western blot (WB) and immunofluorescence (IF) assays were used to determine the protein expression levels of iNOS and Arg1 to corroborate macrophage polarization. WB and Real-time PCR were used to determine the protein expression levels of the p38 MAPK pathway. **Result:** As compared with sham-operated group, the levels of serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , and IL-4 of rats in the model group were significantly higher ( $P < 0.05$ ). In the model group, the protein levels of iNOS, TNF- $\alpha$ , p-p38 MAPK, and phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) in endothelial tissues were significantly higher, the mRNA levels of iNOS, TNF- $\alpha$ , MAPK, and ERK were significantly higher, and the mRNA and protein expression levels of Arg1 and CD206 were significantly lower ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The number of iNOS positive cells in endothelial tissues was significantly increased, and the number of Arg1 positive cells in endothelial tissues in the model group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , and IL-4 in each administration group was reduced to different degrees, which was especially significant in the Wudan pill high and medium-dose groups and the western medicine group ( $P < 0.05$ ). The protein expression levels of iNOS, TNF- $\alpha$ , p-p38 MAPK, and p-ERK in endometrial tissues of rats in the Wudan pill high and medium-dose groups, the Chinese patent medicine group, and the western medicine group were significantly lower, the mRNA expression levels of iNOS, TNF- $\alpha$ , MAPK, and ERK were significantly lower, and the protein expression levels of Arg1 and CD206 were significantly higher ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The number of iNOS positive cells in endometrial tissues of rats was significantly decreased in the Wudan pill high and medium-dose groups, the Chinese patent medicine group, and the western medicine group, whereas the number of Arg1 positive cells was increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The low, medium, and high doses of Wudan pill were dose-dependent, and the efficacy of the Wudan pill high-dose group was similar to that of the western medicine group. **Conclusion:** Wudan pill reduces the inflammatory response in rat model of EMT with cold congeal and blood stasis syndrome and decreases expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, and TGF- $\beta$ , thereby prompting polarization of macrophages from M1 to M2 type. The mechanism is presumedly related to p38 MAPK signaling pathway.

**[Keywords]** endometriosis; cold congeal and blood stasis; inflammatory factors; macrophage polarization; p38 mitogen activated protein kinases

子宫内膜异位症(EMT)是一种常见的妇科疾病,其特征是子宫内膜组织植入于子宫以外部位,导致慢性炎症、疼痛和不孕<sup>[1]</sup>。EMT病变广泛,形态多样,极具侵袭性和复发性,是难治之症,有10%~15%的育龄女性一生中会遭遇,近年发病率上升,严重影响女性的健康和生活质量<sup>[2]</sup>。虽然内异症历史久远,但现代医学尚未揭示其确切的发病机制。西医治疗方法集中于抑制雌激素,包括促性腺激素类似物(GnRHa)和孕激素或必要时行手术治疗<sup>[3]</sup>,但前者不良反应较大,停药后病情反复,后者

剔除病灶后也不能根治,患者常不易接受。中医药治疗对垂体、卵巢无抑制作用,不干扰正常的月经周期,对解除病痛、控制病灶的发展及调理月经,均有明显疗效,且治疗期间不影响受孕<sup>[4]</sup>。王子瑜教授是全国名老中医、首都国医名师,行医70余载,擅长治疗子宫内膜异位症等妇科常见疑难杂病。王教授认为子宫内膜异位症是血瘀之重症,临床表现以实证为主,治疗以“血实者宜决之”的原则,证型以寒凝血瘀多见。乌丹丸活血益肾、散寒止痛,是北京中医药大学东直门医院的院内制剂,已运用于

临床近30年,对子宫内膜异位症痛经、性交痛、肛门坠痛、盆腔包块、妊娠率等症状均有显著疗效<sup>[5-8]</sup>。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雌性SD大鼠49只,6周龄,体重(200.51±10.63)g,购自北京维通利华实验动物中心,合格证号SCXK(京)2016-0006,实验动物饲养于北京中医药大学东直门医院生物安全Ⅱ级实验室室内温度(22±2)℃,相对湿度45%~55%,自由饮食、饮水,每日光照12 h,适应性喂养7 d后予以造模。实验方案经北京中医药大学动物伦理委员会批准(编号19-52)。

**1.2 药品** 乌丹丸是北京中医药大学东直门医院院内制剂(批准号17031,84 g/盒),由丹参、赤芍、桃仁、牡丹皮、三棱、莪术、醋鳖甲、水蛭、肉桂、乌药、细辛等22味药组成,具有活血化瘀、消癥软坚、散寒止痛之功效,用于治疗子宫内膜异位症,1日3次,1日4 g;乌丹丸高、中、低剂量组生药含量分别为2.4、1.2、0.6 g·kg<sup>-1</sup>。地诺孕素片(拜耳医药保健有限公司,批准文号WES4U8),主治子宫内膜异位症,口服,每日1片(2 mg);散结镇痛胶囊(江苏康缘药业股份有限公司,国药准字Z20030127),具有软坚散结、化瘀定痛功效,用于治疗痛经、月经不调、子宫内膜异位症等,口服,1日3次,1次4粒;溶于温蒸馏水50 mL中,玻璃棒搅拌混匀,质量浓度为0.05 g·mL<sup>-1</sup>,置于4℃冰箱备用。

**1.3 试剂** 盐酸肾上腺素注射液(哈尔滨市大兽有限责任公司,兽药字080111221);苯甲酸雌二醇注射液(上海全宇生物生物科技动物药业有限公司,兽药字163232511);白细胞介素(IL)-1β、IL-4、转化生长因子-β(TGF-β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(杭州联科生物公司,批号分别为EK301B/3-0、EK304/2-01、EK981-01、EK382/3-02);BCA蛋白定量试剂盒(北京MDL公司,产品批号MD913053);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒、TRIzol、RNA溶解液(中国全式金公司,批号分别为AQ131-01、H10318、H10323);总RNA提取试剂盒(上海羽朵生物科技有限公司,批号00266);引物合成FastKing cDNA第一链合成试剂盒[上海捷瑞生物工程有限公司天根生化科技(北京)有限公司,批号KR118-02];蛋白免疫印迹法(Western blot)及IP细胞裂解液、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013、A0216);磷酸化(p)-p38一抗(美

国Abcam公司,批号ab47363);酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)一抗(美国Affinity公司,批号AF1015);一氧化氮合成酶(iNOS)、精氨酸酶1(Arg1)一抗(中国Proteintech公司,批号分别为18985-1-AP、16001-1-AP);苏木素-伊红(HE)染色液(北京迈德康纳生物技术有限公司,批号分别为MC-28-2、MC-87-1)。

**1.4 仪器** BG-subMIDI型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司);VE-586型转移电泳槽(上海天能科技有限公司);ChemiDoc MP型化学发光成像系统、SDS-PAGE型电泳系统、C1000型转膜仪(美国Bio-Rad公司);CYTATION 3型多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);LightCycler 480 II型PCR仪(瑞士Roche公司);801型荧光显微镜(日本尼康公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备** 采用按随机数字法将49只大鼠随机假手术组、模型组、乌丹丸高、中、低剂量组、中成药组和西药组共7组,每组7只。手术组以外的6组采用“自体移植手术+冰水浸泡法<sup>[9-10]</sup>制备大鼠模型。冰水浴:每日将大鼠浸泡于0~1℃冰水混合物至出现呼吸微弱、反应迟钝、腿部僵直时从冰水中捞出后并迅速用毛巾擦干,同时用电动吹风机吹至干爽,注意保温。

在第7日和第14日,皮下注射0.1%盐酸肾上腺素0.8 mg·kg<sup>-1</sup>,4 h后再次注射,2次注射之间进行冰水浴5 min。第14天起,给造模组大鼠肌注2 g·L<sup>-1</sup>的苯甲酸雌二醇0.1 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续2 d,以诱导大鼠发情。假手术组肌注射生理盐水0.1 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。1.5%巴比妥钠3 mL·kg<sup>-1</sup>将大鼠麻醉,打开腹腔,在左侧子宫角处切下5 mm左右片段,置入无菌磷酸盐缓冲液(PBS),分离子宫内膜与肌层,再移植到大鼠右侧腹壁,缝合伤口。假手术组开腹后缝合。查无活动性出血后,于腹腔中注射抗生素预防感染。手术1周后,将缝合刀口处贴医用防水胶布,再次冰水浴刺激1周。手术后4周随机抽取模型3只,观察耳缘紫暗、舌质紫暗等寒凝血瘀证的症状;开腹观察异位造生长情况,移植物呈现为椭圆形或圆形、淡红色的囊泡,充满透明或含血液体,表面覆盖大量血管,清晰可见,与周围组织粘连紧密,表示造模成功。造模过程中,因冰水游泳死亡3只。

**2.2 分组与给药** 子宫内膜异位症寒凝血瘀证大鼠模型造模成功后给药,假手术组和模型组每日灌服生理盐水10 mL·kg<sup>-1</sup>;按照人常用剂量(26 g·d<sup>-1</sup>)为等效剂量,经等效体表面积公式<sup>[11]</sup>换算乌丹丸

高、中、低剂量(2.4、1.2、0.6 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃,相当于临床剂量的4、2、1倍,散结镇痛组每天按照0.48 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,地诺孕素每天按照0.2 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃,连续给药4周。

**2.3 标本** 采集末次给药结束24 h,1%戊巴比妥钠麻醉,开腹在腹主动脉处采血5 mL,静置后离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min,离心半径7 cm),收集血清冻存在-80 °C冰箱;取假手术组正常子宫内膜组织和其余各组异位子宫内膜组织,漂洗后各剪取0.5 g冻存在液氮中备用;剩余子宫组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切片为5 μm的常规病理切片。

**2.4 检测指标**

**2.4.1 HE染色** 观察在位及异位内膜组织病理变化 取切片,进行HE染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察异位内膜组织学形态。

**2.4.2 ELISA检测血清中炎症因子表达** 各组大鼠血清在4 °C解冻,按TNF-α、IL-1β、IL-4、TGF-β ELISA试剂盒说明书的步骤检测。

**2.4.3 Real-time PCR检测组织中iNOS、TNF-α、Arg1、CD206、p-p38 MAPK、p-ERK转录水平** 取液氮冻存组织,加入TRIzol RNA-solv Regent匀浆,提取总RNA,测定浓度,按照Real-time PCR试剂盒操作说明书逆转录合成第一链cDNA,按照试剂说明书进行PCR扩增,PCR反应条件:95 °C预变性1 min;95 °C变性30 s,55 °C退火20 s,72 °C延伸20 s,共40个循环。扩增结束计算2<sup>-ΔΔCt</sup>。引物序列由北京博尔迈生物技术有限公司合成。见表1。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
GAPDH	上游 GATGACATCAAGAAGGTGGTGA	250
	下游 ACCCTGTTGCTGTAGCCATATC	
TNF-α	上游 CTCAAGCCCTGGTATGAGCC	150
	下游 GGCTGGGTAGAGAACGGATG	
iNOS	上游 CAAGGTGACCTGAAAGAGGA	160
	下游 GTCCAGGGATTCTGGAACAT	
Arg1	上游 TAGAGATTATCGGAGCGCCT	250
	下游 TCACAATTTGAAAGGGGCTG	
CD206	上游 TCTGTGTACTCTGCTGGCG	280
	下游 CACATTGTCCACACGCTTCT	
ERK1/2	上游 CTTCCAACCTCCTGCTGAAC	209
	下游 TCAGCTGGTCAAGGTAATGC	
p38 MAPK	上游 ACATCGTGTGGCAGTGAAGA	240
	下游 ACGTGGTCATCGGTAAGCTT	

**2.4.4 Western blot检测异位内膜组织iNOS、Arg1、p-p38 MAPK、p-ERK蛋白表达** 检测冻存子宫组织0.5 g,使用蛋白提取试剂盒、BCA试剂盒提取总蛋白并测定其总浓度,各组分取蛋白样品20 μg在电泳仪中进行电泳,转膜,加入5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,加入iNOS、Arg1、p-p38、p-ERK(1:500)、Arg1(1:1 000)一抗溶液4 °C孵育过夜,使用TBST漂洗3次,加入羊抗兔二抗溶液室温孵育2 h,用TBST漂洗3次,采用化学发光法显色,以凝胶成像仪拍摄图像并对图像进行分析得出各组蛋白的相对表达量。

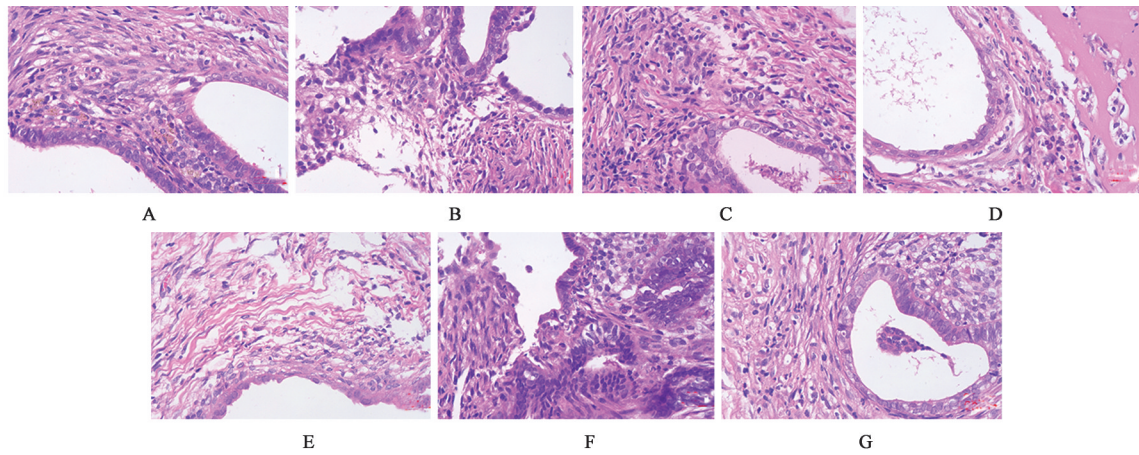
**2.4.5 免疫荧光法检测iNOS、Arg1蛋白表达** 石蜡切片,抗原修复处理,加一抗、二抗洗,DAPI复染细胞核后封片,荧光显微镜观察。DAPI染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性表达为相应荧光素标记的绿色。

**2.5 统计学方法** 所有实验数据采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行,符合正态分布采用单因素方差分析,方差齐组间比较采用最小显著性差异(LSD)-*t*检验,不符合正态分布采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对EMT大鼠内膜组织病理形态学的影响** 假手术组子宫内膜组织结构正常,可见明显子宫内膜上皮及基质,层次清晰,基质呈少许纤维化,未见明显变性;模型组子宫内膜组织结构重度异常,内腺体具有明显的核下空泡,间质偶见红细胞浸润;高剂量组子宫内膜组织结构轻度异常,扩张后的腺体内可见部分分泌物,并可见少量炎症细胞浸润。乌丹丸中剂量组子宫内膜组织结构轻度异常,腺体内个别细胞可见空泡化,并可见少量炎症细胞浸润。乌丹丸低剂量组子宫内膜组织结构中度异常,组织内可见细胞大小不一,部分细胞核破碎,可见红细胞浸润及部分炎症细胞浸润;中成药组子宫内膜组织结构轻度异常,腺体内可见少量分泌物,并可见少量炎症细胞浸润。西药组子宫内膜组织结构轻度异常,组织内偶见个别淋巴细胞浸润。见图1。

**3.2 对寒凝血瘀型EMT大鼠血清TNF-α、IL-1β、TGF-β、IL-4的影响** 与假手术组比较,模型组血清TNF-α、IL-1β、TGF-β、IL-4含量均明显升高( $P < 0.05$ ),与模型组比较,各给药组IL-1β、TGF-β、IL-4表达量均有不同程度降低,乌丹丸高、中剂量组和西药组尤为明显( $P < 0.05$ )。乌丹丸低剂量组



注:A.假手术组;B.模型组;C~E.乌丹丸高、中、低剂量组;F.中成药组;G.西药组(图2-图5同)

图1 乌丹丸对大鼠子宫内膜组织病理形态的影响(HE,×400)

Fig.1 Effect of Wudan pill on histopathology of endometrium of rats (HE,×400)

和中成药组可明显降低 TNF- $\alpha$  表达( $P<0.05$ )。见表2。

表2 乌丹丸对EMS寒凝血瘀证大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、IL-4含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Wudan pill on serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and IL-4 in EMS rats with cold clotting and blood stasis ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  
ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	TGF- $\beta$	IL-4
假手术组		88.15±4.27	527.91±11.96	111.50±11.02	42.61±2.25
模型组		141.33±16.22 <sup>1)</sup>	1 171.00±23.51 <sup>1)</sup>	188.20±6.64 <sup>1)</sup>	73.03±8.49 <sup>1)</sup>
乌丹丸高剂量组	2.4	110.22±9.41 <sup>3)</sup>	821.00±23.63 <sup>3)</sup>	117.70±10.91 <sup>3)</sup>	51.08±6.29 <sup>3)</sup>
乌丹丸中剂量组	1.2	111.17±6.90 <sup>3)</sup>	916.35±31.10 <sup>3)</sup>	134.30±22.08 <sup>3)</sup>	59.09±4.52 <sup>3)</sup>
乌丹丸低剂量组	0.6	124.25±9.80 <sup>2)</sup>	1 060.79±14.39	163.80±4.76	66.93±6.98
中成药组	0.48	111.65±8.02 <sup>3)</sup>	992.78±18.15 <sup>2)</sup>	158.80±14.86 <sup>2)</sup>	59.94±2.61 <sup>2)</sup>
西药组	2×10 <sup>-4</sup>	109.71±2.66 <sup>3)</sup>	804.04±30.42 <sup>3)</sup>	117.50±16.70 <sup>3)</sup>	44.70±2.23 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3-表5、表7同)

### 3.3 对乌丹丸对寒凝血瘀型EMT大鼠内膜组织巨噬细胞M1型(iNOS、TNF- $\alpha$ )、M2型(Arg1、CD206)极化的影响

**3.3.1 对iNOS、TNF- $\alpha$ 、Arg1、CD206 mRNA表达的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠在位子宫内膜组织中iNOS、TNF- $\alpha$  mRNA显著升高( $P<0.01$ ), Arg1、CD206 mRNA表达明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,乌丹丸高、中、低剂量组、中成药、西药组大鼠在位子宫内膜组织中iNOS、TNF- $\alpha$ 显著降低( $P<0.01$ );乌丹丸高、中剂量组、中成药和西药组大鼠在位子宫内膜组织中Arg1、CD206表达显著升高( $P<0.01$ );低剂量组CD206 mRNA明显增高( $P<0.05$ )。见表3。

**3.3.2 对iNOS、Arg1蛋白表达的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠在位子宫内膜组织中iNOS蛋白表达量明显升高,Arg1蛋白表达量明显降低( $P<$

$0.05, P<0.01$ );与模型组比较,乌丹丸高、中剂量组及中成药、西药组大鼠在位子宫内膜组织中iNOS蛋白表达明显降低,Arg1蛋白表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见图2、表4。

**3.3.3 免疫荧光相关蛋白表达** 与假手术组比较,模型组在位子宫内膜组织中iNOS表达显著升高( $P<0.01$ ),Arg1表达明显降低( $P<0.05$ );与模型组比较,乌丹丸高、中、低剂量组、中成药和西药组大鼠在位子宫内膜组织中iNOS表达量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),Arg1表达显著升高( $P<0.01$ )。见表5、图3、图4。

### 3.4 对EMT大鼠内膜组织p-p38 MAPK、p-ERK mRNA及蛋白表达的影响

**3.4.1 对p-p38 MAPK、p-ERK mRNA表达的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠在位子宫内膜组织中p-p38 MAPK、p-ERK mRNA表达显著增高( $P<$

表3 乌丹丸对EMS寒凝血瘀证大鼠内膜组织iNOS、TNF- $\alpha$ 、Arg1、CD206 mRNA的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Wudan pill on iNOS, TNF- $\alpha$ , Arg1, CD206 mRNA in endothelial tissue of EMS rats with cold clotting and blood stasis ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	iNOS	TNF- $\alpha$	Arg1	CD206
假手术组		1.00±0.06	1.01±0.15	0.97±0.13	0.65±0.07
模型组		5.35±0.37 <sup>2)</sup>	5.58±0.18 <sup>2)</sup>	1.41±0.18 <sup>1)</sup>	0.99±0.06 <sup>1)</sup>
乌丹丸高剂量组	2.4	2.05±0.12 <sup>4)</sup>	2.81±0.09 <sup>4)</sup>	2.36±0.31 <sup>4)</sup>	2.63±0.20 <sup>4)</sup>
乌丹丸中剂量组	1.2	3.06±0.21 <sup>4)</sup>	2.99±0.21 <sup>4)</sup>	2.02±0.23 <sup>4)</sup>	1.90±0.12 <sup>4)</sup>
乌丹丸低剂量组	0.6	4.82±0.24 <sup>4)</sup>	4.30±0.24 <sup>4)</sup>	1.71±0.17	1.36±0.21 <sup>3)</sup>
中成药组	0.48	2.85±0.25 <sup>4)</sup>	3.12±0.15 <sup>4)</sup>	2.11±0.19 <sup>4)</sup>	2.50±0.25 <sup>4)</sup>
西药组	2×10 <sup>-4</sup>	1.73±0.19 <sup>4)</sup>	1.47±0.14 <sup>4)</sup>	2.41±0.45 <sup>4)</sup>	2.76±0.41 <sup>4)</sup>

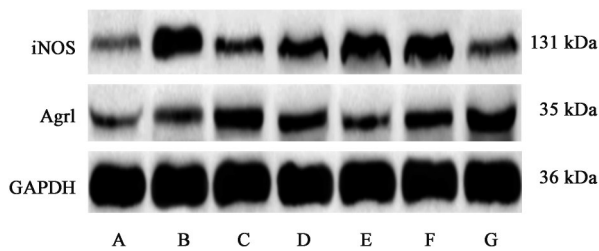


图2 各组内膜组织iNOS、Arg1蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of iNOS and Arg1 protein expression in endometrial tissues of each group

表4 乌丹丸对大鼠内膜组织iNOS、Arg1蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Wudan pill on iNOS and Arg1 protein expression in endometrial tissues of rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	iNOS/GAPDH	Arg1/GAPDH
假手术组		0.31±0.05	0.35±0.02
模型组		0.52±0.09 <sup>1)</sup>	0.58±0.06 <sup>1)</sup>
乌丹丸高剂量组	2.4	0.52±0.09 <sup>3)</sup>	0.76±0.08 <sup>3)</sup>
乌丹丸中剂量组	1.2	0.59±0.08 <sup>3)</sup>	0.67±0.08 <sup>3)</sup>
乌丹丸低剂量组	0.6	0.77±0.07 <sup>4)</sup>	0.57±0.04
中成药组	0.48	0.66±0.05 <sup>3)</sup>	0.63±0.05 <sup>3)</sup>
西药组	2×10 <sup>-4</sup>	0.45±0.06 <sup>3)</sup>	0.84±0.03 <sup>3)</sup>

表5 乌丹丸对大鼠子宫内膜组织中iNOS、Arg1阳性细胞表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Wudan pill on iNOS and Arg1 positive cells in endometrial tissue of rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	iNOS	Arg1
假手术组		0.14±0.04	0.30±0.01
模型组		3.31±0.55 <sup>2)</sup>	0.56±0.06 <sup>1)</sup>
乌丹丸高剂量组	2.4	0.36±0.04 <sup>4)</sup>	2.14±0.13 <sup>4)</sup>
乌丹丸中剂量组	1.2	1.02±0.20 <sup>4)</sup>	0.96±0.16 <sup>4)</sup>
乌丹丸低剂量组	0.6	2.46±0.28 <sup>3)</sup>	0.59±0.06
中成药组	0.48	0.77±0.10 <sup>4)</sup>	1.29±0.06 <sup>4)</sup>
西药组	2×10 <sup>-4</sup>	0.27±0.03 <sup>4)</sup>	2.38±0.06 <sup>4)</sup>

0.01);与模型组比较,乌丹丸高、中剂量组及中成药、西药组大鼠在位子宫内膜组织中p-p38 MAPK、p-ERK mRNA显著降低( $P<0.01$ )。见表6。

3.4.2 对p-p38 MAPK、p-ERK蛋白表达的影响  
与假手术组比较,模型组大鼠在位子宫内膜组织中p-p38 MAPK、p-ERK蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,乌丹丸高、中剂量组及中成药、西药组大鼠在位子宫内膜组织中p-p38 MAPK、p-ERK蛋白显著降低( $P<0.01$ )。见图5、表7。

#### 4 讨论

EMT是女性中常见的慢性炎症性疾病,其特征是子宫内膜组织存在于子宫腔以外,影响约10%的育龄期女性。人体内炎症因子异常增加或积聚往往导致该病发生、发展<sup>[12]</sup>。中医认为,本病的基本病机是瘀血阻滞,传统医学的血瘀证和现代医学炎症反应有着密不可分的关系<sup>[13]</sup>,从炎症介质的整体性来研究血瘀证是重要的新方法<sup>[14]</sup>。研究证实通过传统中医药活血化瘀之法治疗EMT,可明显缓减或改善EMT炎症反应<sup>[15-16]</sup>。

王子瑜教授认为寒主收引,凝滞气血,寒邪占据血室,瘀血阻滞,气血筋脉运行不畅,久则瘀积癥瘕内生。根据“温则消而去之”,治以温经散寒化瘀,血得温则行,血行则瘀散,诸症皆消,研制了乌丹丸。方中丹参、赤芍、桃仁、牡丹皮活血祛瘀,三棱、莪术、醋鳖甲、水蛭破血逐瘀,消散瘀结通经;配肉桂温肾阳,鼓动元气,促进血液循环,乌药辛温,温肾散寒、行气止痛,细辛温经通络,血得温则流畅,以达温通活血。以乌药、乳香、没药、延胡索行气止痛;以丹参养血活血,续断补肾助阳,以免损伤正气;丹参凉而不寒,赤芍微寒并有活血作用,以防温燥伤阴,共奏活血益肾、散寒止痛之功。

IL-4是辅助性T细胞2(Th2)分泌的可抑制促炎因子释放的免疫调节因子,有证据表明子宫内膜异

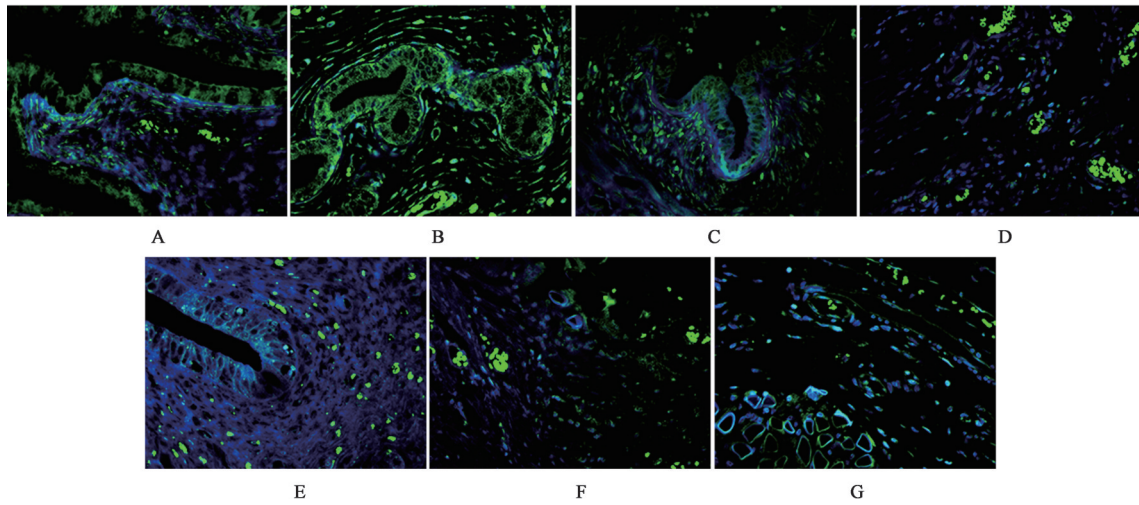


图3 乌丹丸对大鼠异位子宫内膜组织 iNOS 表达的影响 (免疫荧光法, ×400)

Fig. 3 Effect of Wudan pill on iNOS in various groups of ectopic endometrial tissues of rats (IF, ×400)

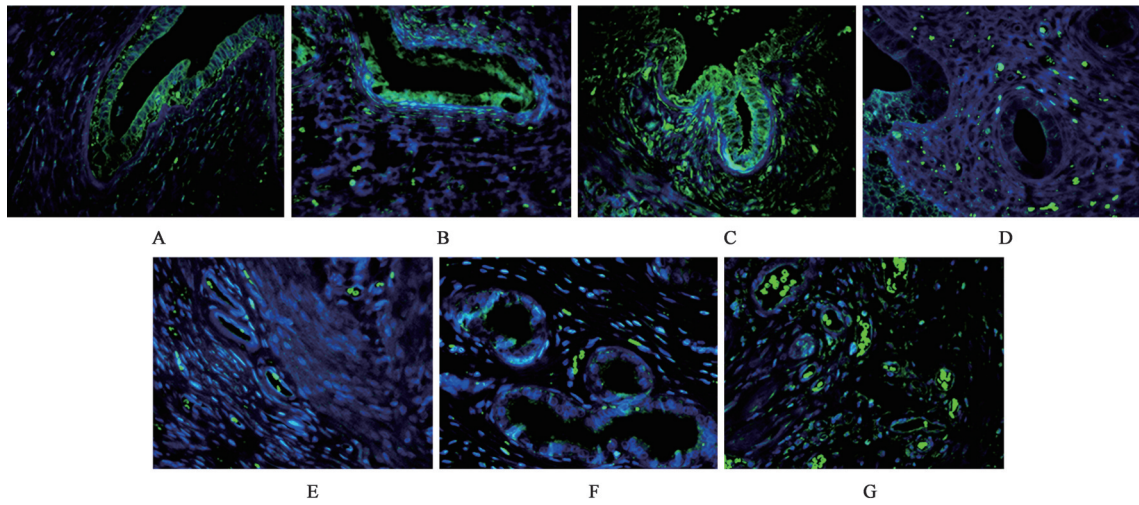


图4 乌丹丸对大鼠异位子宫内膜组织 Arg1 表达的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 4 Effect of Wudan pill on Arg1 in various groups of ectopic endometrial tissues of rats (IF, ×400)

表6 乌丹丸对大鼠内膜组织 p-p38 MAPK、p-ERK mRNA 的影响 (x̄±s, n=3)

Table 6 Effect of Wudan pill on p-p38 MAPK and p-ERK mRNA on endothelial tissue of rats (x̄±s, n=3)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-p38 MAPK	p-ERK
假手术组		1.00±0.08	1.00±0.10
模型组		6.47±0.76 <sup>1)</sup>	8.13±0.56 <sup>1)</sup>
乌丹丸高剂量组	2.4	3.49±0.40 <sup>2)</sup>	2.74±0.15 <sup>2)</sup>
乌丹丸中剂量组	1.2	2.27±0.39 <sup>2)</sup>	3.50±0.42 <sup>2)</sup>
乌丹丸低剂量组	0.6	3.65±0.44 <sup>2)</sup>	4.97±0.58 <sup>2)</sup>
中成药组	0.48	2.08±0.32 <sup>2)</sup>	2.33±0.24 <sup>2)</sup>
西药组	2×10 <sup>-4</sup>	1.82±0.29 <sup>2)</sup>	1.82±0.29 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.01

位症患者血清、腹腔及病灶组织抗炎细胞因子 IL-4 急剧增加<sup>[17-18]</sup>。TGF-β 也是一种抗炎细胞因子,其

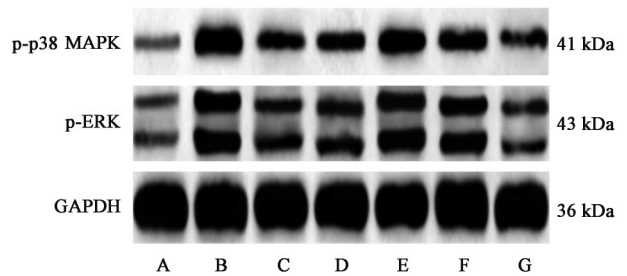


图5 各组内膜组织 p-p38 MAPK、p-ERK 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of p-p38 MAPK and p-ERK protein expression in endothelial tissue of each group

可以抑制或逆转巨噬细胞活化,从而下调炎症细胞因子。研究证实 TGF-β 和相关细胞因子参与子宫内膜异位症的发病过程<sup>[19]</sup>。M2 巨噬细胞可以被 IL-4、IL-10 或 TGF-β 激活,从而参与抗炎和组织修复、血管生成和血管正常化。TNF-α 是细胞因子和其他炎症介质合成的关键调节因子,在子宫内膜异

表7 乌丹丸对大鼠内膜组织 p-p38 MAPK、p-ERK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Wudan pill on p-p38 MAPK, p-ERK protein expression in endosomal tissues of rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-p38 MAPK /GAPDH	p-ERK /GAPDH
假手术组		0.36±0.06	0.50±0.04
模型组		0.84±0.03 <sup>1)</sup>	0.89±0.02 <sup>1)</sup>
乌丹丸高剂量组	2.4	0.57±0.06 <sup>3)</sup>	0.61±0.06 <sup>3)</sup>
乌丹丸中剂量组	1.2	0.61±0.03 <sup>3)</sup>	0.67±0.07 <sup>3)</sup>
乌丹丸低剂量组	0.6	0.75±0.03	0.73±0.03 <sup>4)</sup>
中成药组	0.48	0.67±0.03 <sup>3)</sup>	0.69±0.03 <sup>3)</sup>
西药组	2×10 <sup>-4</sup>	0.53±0.06 <sup>3)</sup>	0.57±0.06 <sup>3)</sup>

位症的发展中具有重要作用。研究证实在子宫内膜异位症女性腹膜液中呈高水平,并与疾病严重程度相关<sup>[20]</sup>。抗 TNF- $\alpha$  治疗可抑制实验性大鼠子宫内膜异位症的发展并缓解人类子宫内膜异位症相关的疼痛<sup>[21]</sup>。IL-1 $\beta$  多出现在血循环中主要通过刺激炎症和子宫内膜异位症相关基因的表达,在免疫调节及炎症进程中扮演着重要角色<sup>[22]</sup>。IL-1 $\beta$  表达与 EMs 病变深度呈正相关,并可使异位子宫内膜细胞分泌单核细胞趋化蛋白(MCP)-1,趋化单核细胞进入腹腔,完成巨噬细胞的自我招募、补充,使得 EMT 继续发展<sup>[23]</sup>。M1 型巨噬细胞被称为经典激活巨噬细胞,具有抑制和杀伤肿瘤细胞等功能。研究显示,子宫内膜异位女性的异位子宫内膜中巨噬细胞活化的经典 M1 极化特征<sup>[24]</sup>。M2 型巨噬细胞又被称为诱导型活化型巨噬细胞,通过吞噬作用积极清除病原体和组织碎片,促进愈合和组织重塑<sup>[25]</sup>。中药及中药复方可以通过调节巨噬细胞极化来抑制炎症反应,已成为研究热点<sup>[26]</sup>。MAPK 信号通路在子宫内膜异位症微环境中具有多种作用,MAPK 在迁移、植入、生长、侵入盆腔结构、增殖和细胞凋亡中的异常激活导致子宫内膜异位症的形成,还参与调控巨噬细胞极化<sup>[27]</sup>。子宫内膜异位症发病机制仍不明确,但慢性炎症通过 MAPK 信号通路发挥关键作用。研究发现,炎症介质和 p38 MAPK 之间形成正反馈效应,共同促进 EMT 的发生发展<sup>[28-29]</sup>。研究发现子宫内膜异位症细胞中 p38 MAPK 活性的增加通过促进局部炎症环境促进子宫内膜异位症的发病机制<sup>[30]</sup>。在信号转导通路水平上阻断和调节 p38 MAPK 的表达或有望成为防治子宫内膜异位症的新策略<sup>[31]</sup>。因此本研究基于 MAPK 信号通路探讨乌丹丸防治 EMT 的炎症相关机制。

本研究发现,与假手术组比较,模型组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、IL-4 含量均显著升高,各给药组炎症因子表达均有降低,与近年研究结果<sup>[32]</sup>发现子宫内膜异位症患者外周血及腹腔液中炎症因子水平增高相符。乌丹丸还能够降低 M1 相关基因(iNOS、TNF- $\alpha$ )的表达,增加 M2 相关基因(Arg1、CD206)的表达,且在巨噬细胞细胞转移到 M2 极化方面的能力成剂量依赖,高剂量组更强大,优于中成药组,也与西药组相近,说明乌丹丸参与巨噬细胞 M1/M2 平衡的调节,在促使从 M1 转移到 M2 中起着强有力的作用。研究发现 IL-4 刺激 RAW264.7 细胞后诱导巨噬细胞 M2 型极化模型评价小金丹的调节作用,结果发现其能明显抑制 M2 型巨噬细胞标志物 CD206、Arg-1 表达,提示小金丹能逆转 IL-4 诱导的巨噬细胞 M2 型极化<sup>[33]</sup>。杨延军等<sup>[34]</sup>发现常山酮可直接作用于巨噬细胞,维持 EMT 模型鼠炎症微环境的平衡,促进巨噬细胞向 M1 型极化,增强免疫反应,减少异位内膜病灶体积。本研究发现乌丹丸降低 EMT 寒凝血瘀证大鼠模型子宫内膜异位内膜 p-p38 MAPK、p-ERK mRNA 和蛋白表达,表明乌丹丸调控巨噬细胞极化。炎症介质和 p38 MAPK 促进 EMT 的发生发展,乌丹丸能够阻断和调节 p38 MAPK 表达,在治疗子宫内膜异位症中发挥着关键作用。

综上,乌丹丸对子宫内膜异位症寒凝血瘀证大鼠模型炎性反应有一定的抑制作用,使异位内膜组织中巨噬细胞从 M1 向 M2 极化,血清炎性因子表达降低,其作用机制可能与 p38 MAPK 信号通路相关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] PATEL B G, LENK E E, LEBOVIC D I, et al. Pathogenesis of endometriosis: Interaction between endocrine and inflammatory pathways [J]. Best Pract Res Cl Ga, 2018, 50(1): 50-60.
- [2] 郎景和. 对子宫内膜异位症认识的历史、现状与发展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(3): 193-196.
- [3] HUGH S T. Emerging therapies for endometriosis [J]. Fertil Steril, 2021, 115(2): 317-318.
- [4] 李红, 王东梅. 中医药治疗子宫内膜异位症的研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2021, 27(1): 71-74.
- [5] 张春玲, 宋昌红. 王子瑜教授治疗子宫内膜异位症经验 [J]. 河北中医, 2006(6): 409-410.
- [6] 魏爱平, 贺稚平, 王子瑜. 活血益肾法治疗子宫内膜异位不孕症 30 例 [J]. 北京中医药大学学报, 1995(6): 44-45.
- [7] 张丽. 王子瑜教授治疗子宫内膜异位症痛经的经验

- 总结[D]. 北京:北京中医药大学,2007.
- [ 8 ] 甘小金. 基于数据挖掘的王子瑜治疗子宫内膜异位性疾病辨证与用药规律研究[D]. 北京:北京中医药大学,2020.
- [ 9 ] 刘校彤,吕光华,王巧稚,等. 血瘀证动物模型制备的研究进展[J]. 中国实验动物学报,2021,29(3):371-380.
- [10] 丛慧芳,谷栩萌,张天婵,等. 寒凝血瘀型子宫内膜异位症大鼠模型的制备[J]. 中医药学报,2018,46(1):74-79.
- [11] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:203-206.
- [12] 王鑫丹,郑萍. 子宫内膜异位症的免疫机制研究进展[J]. 国际妇产科学杂志,2019,46(5):536-540.
- [13] 武梅,翟东霞,张丹英,等. 子宫内膜异位症炎症效应与血瘀证相关性研究进展[J]. 中华中医药杂志,2016,31(7):2712-2715.
- [14] 肖雪,王乐琪,谢志茹,等. 炎症介质:探讨血瘀证生物学基础新思路[J]. 中华中医药杂志,2021,36(1):32-36.
- [15] 樊琼,韦玉娜,尹玲,等. 大黄庶虫丸治疗子宫内膜异位症盆腔疼痛气滞血瘀证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(12):121-126.
- [16] 庄梦斐,曹阳,谢丹丹,等. 温经汤对子宫内膜异位症小鼠异位内膜生长及炎症因子水平的影响[J]. 中医学报,2020,35(5):1040-1044.
- [17] MALUTAN A M, DRUGAN T, CIORTEA R, et al. Serum anti-inflammatory cytokines for the evaluation of inflammatory status in endometriosis[J]. J Res Med Sci,2015,20(7):668-674.
- [18] MALUTAN A M, DRUGAN C, DRUGAN T, et al. The association between interleukin-4-590C/T genetic polymorphism, IL-4 serum level, and advanced endometriosis[J]. Cent Eur J Immunol,2016,41(2):176-181.
- [19] 王兰兰. 血清NGF、TGF- $\beta_1$ 和PTGFR在子宫内膜异位症患者中的水平变化及诊断价值[J]. 检验医学与床,2022,19(2):209-212.
- [20] KYAMA C M, OVERBERGH L, DEBROCK S, et al. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis[J]. Fertil Steril,2006,85(6):1667-1675.
- [21] D'ANTONIO M, MARTELLI F, PEANO S, et al. Ability of recombinant human TNF binding protein-1 (r-hTBP-1) to inhibit the development of experimentally-induced endometriosis in rats [J]. J Reprod Immunol,2000,48(2):81-98.
- [22] PALSSONMCDERMOTT E M, CURTIS A M, GOEL G, et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 $\alpha$  activity and IL-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages[J]. Cell Metab,2015,21(1):65-80.
- [23] CAO W G, MORIN M, METZ C, et al. Stimulation of macrophage migration inhibitory factor expression in endometrial stromal cells by interleukin1, beta involving the nuclear transcription factor NF kappaB [J]. Biol Reprod,2005,73(3):565-570.
- [24] TAKEBAYASHI A, KIMURA F, KISHI Y, et al. Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients [J]. Am J Reprod Immunol,2015,73(3):221-31.
- [25] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol,2018,233(9):6425-6440.
- [26] MERCI N M, BUEM C S, EUN J K, et al. Sea hare hydrolysate-induced reduction of human non-small cell lung cancer cell growth through regulation of macrophage polarization and non-apoptotic regulate-d cell death pathways[J]. Cancers,2020,12(3):726.
- [27] BORA G, YABA A. The role of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in endometriosis[J]. J Obstet Gynaecol Res,2021,47(5):1610-1623.
- [28] 崔宇红,吴晶,蔡玮,等. 基于GPER2/MAPK/STAT1轴研究少腹逐瘀汤治疗子宫内膜异位症痛经分子机制[J]. 中国中药杂志,2018,43(16):3362.
- [29] MORI T, ITO F, KOSHIBA A, et al. Local estrogen formation and its regulation in endometriosis [J]. Reprod Med Biol,2019,18(4):305.
- [30] CAKMAK H, SEVAL C Y, ARLIER S, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in the pathogenesis of endometriosis by modulating inflammation, but not cell survival [J]. Reprod Sci,2018,25(4):587-597.
- [31] 周卫东,陈琼华,陈清西. p38 MAPK及其抑制剂在子宫内膜异位症中的作用[J]. 药学报,2010,45(5):548-554.
- [32] 张艳. 子宫内膜异位症凝血指标、炎症因子与盆腔粘连程度关系[J]. 中国计划生育学杂志,2021,29(5):971.
- [33] 彭博,练东银,张广平,等. 基于PI3K/Akt信号通路探讨小金丹对巨噬细胞极化的调控作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(9):36-42.
- [34] 杨延军,梁静,李芳,等. 常山酮对小鼠子宫内膜异位症巨噬细胞极化的调控作用[J]. 山东大学学报:医学版,2016,54(9):26-31,40.

[责任编辑 张丰丰]