

固本安神方对绝经综合征模型大鼠的改善作用机制研究[△]

郭珊珊*, 周晓辉, 王淑梅, 宗传杰, 刁丽(沧州市人民医院药物临床机构, 河北 沧州 061000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)19-2364-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.19.12



摘要 目的 研究固本安神方对绝经综合征模型大鼠的改善作用及机制。方法 随机取70只大鼠切除双侧卵巢以复制绝经综合征模型,另取10只未造模大鼠作为假手术组。将造模成功的60只大鼠分为模型组、更年安片组(中药阳性对照组,0.56 g/kg)、戊酸雌二醇片(化学药阳性对照组,0.1 mg/kg)和固本安神方高、中、低剂量组(18.0、9.0、4.5 g/kg),每组10只。模型组和假手术组大鼠灌胃生理盐水,各给药组大鼠灌胃相应药物,每天1次,连续4周。末次给药后,检测大鼠血浆中促黄体生成素(LH)、促卵泡生长激素(FSH)、雌二醇(E₂)含量,检测大鼠子宫、肾上腺、脾、胸腺脏器指数,观察大鼠子宫组织病理形态学变化,检测大鼠下丘脑组织中亲吻素1(Kiss-1)、三磷酸肌醇受体1(IP₃R1)、促性腺激素释放激素(GnRH)mRNA及Kiss-1、细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠血浆中LH、FSH含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),E₂含量、各脏器指数以及下丘脑组织中Kiss-1、IP₃R1、GnRH mRNA和Kiss-1、p-ERK1/2蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);子宫腺体减少、固有层细胞密集。与模型组比较,固本安神方各剂量组大鼠上述指标水平(低剂量组E₂含量除外)均显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$);子宫腺体增多,单层柱状上皮细胞排列较为整齐(低剂量组除外)。**结论** 固本安神方可通过升高大鼠下丘脑组织中Kiss-1、IP₃R、GnRH mRNA和Kiss-1、p-ERK1/2蛋白的表达水平,激活GnRH分泌信号通路,从而改善绝经综合征。

关键词 固本安神方;绝经综合征;促性腺激素释放激素;机制

Study on the improvement effects of Gubenanshen decoction on menopausal syndrome model rats

GUO Shanshan, ZHOU Xiaohui, WANG Shumei, ZONG Chuanjie, DIAO Li (Drug Clinical Trial Institution, Cangzhou Municipal People's Hospital, Hebei Cangzhou 061000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the improvement effect and mechanism of Gubenanshen decoction on menopausal syndrome model rats. **METHODS** Totally 70 rats were anesthetized and placed on the operating table for bilateral ovariectomy to induce menopausal syndrome model. Other 10 rats without modeling were taken as sham operation group. Sixty model rats were divided into model group, Gengnianpian group (TCM positive control group, 0.56 g/kg), Estradiol valerate tablet group (chemical drug positive control group, 0.1 mg/kg), Gubenanshen decoction high-dose, medium-dose and low-dose groups (18.0, 9.0, 4.5 g/kg), with 10 rats in each group. Model group and sham operation group were given normal saline intragastrically; administration groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 4 weeks. After last administration, the plasma contents of luteinizing hormone (LH), follicle stimulating growth hormone (FSH) and estradiol (E₂) were determined. The indexes of uterus, adrenal gland, spleen and thymus were measured; pathological changes of rat uterus were observed; mRNA expressions of kisspenptin 1 (Kiss-1), inositol triphosphate receptor 1 (IP₃R1) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in hypothalamic tissues were detected, and the protein expressions of Kiss-1, ERK1/2 and p-ERK1/2 were also detected. **RESULTS** Compared with sham operation group, the contents of LH and FSH in the plasma of rats were significantly increased in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The contents of E₂, organ index, mRNA expressions of Kiss-1, IP₃R1 and GnRH and protein expressions of Kiss-1 and p-ERK1/2 were decreased significantly in hypothalamic tissues ($P<0.05$ or $P<0.01$). The glands of the uterus were reduced and the cells in the lamina propria were dense. Compared with model group, above indexes of Gubenanshen decoction groups (except for the content of E₂ in the low-dose group) were reversed significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of uterine glands increased, and single columnar epithelial cells were arranged orderly (except for the low-dose group). **CONCLUSIONS** Gubenanshen decoction can increase mRNA expressions of Kiss-1, IP₃R and GnRH and protein expressions of Kiss-1 and p-ERK1/2

in hypothalamic tissues of rats, and activate GnRH secretion signaling pathways so as to improve the menopausal syndrome.

KEYWORDS Gubenanshen decoction; menopausal syndrome; GnRH; mechanism

[△] 基金项目 河北省中医药管理局中医药指令性计划课题(No. 2021288)

* 第一作者 主管中药师。研究方向:临床药理与药学研究。E-mail: guosss274401519@126.com

绝经综合征又称为“围绝经期综合征”或“更年期综合征”,大多数患者会出现头晕、出汗、烦躁、易怒、失眠健忘、腰膝酸软等一系列症状。目前,我国约有1.3亿女性处于绝经期,其中出现绝经综合征者占比高于90%,严重影响绝经期女性的身心健康和^[1]生活质量。

现代医学认为,绝经综合征的发生机制与下丘脑-垂体-卵巢轴(hypothalamus-pituitary-ovary, HPO)功能失调有关^[2-3]。女子进入绝经期阶段后,卵巢功能日渐退化,性激素分泌异常,使HPO功能异常,进而引起生殖、内分泌等系统功能失调,形成多系统、多症状的女性绝经期症候群^[4]。针对该病的治疗手段,现代医学多用性激素代替疗法,可随着医疗水平的进步,逐渐发现性激素代替疗法疗效欠佳,且易引起诸多不良反应,如心脑血管性疾病、子宫内膜癌、乳腺癌、卵巢癌等^[5-7]。因此,寻找新的治疗绝经综合征的药物具有重要意义。

二仙汤出自《中医方剂临床手册》,具有补肾泻火、调理冲任的作用。固本安神方在二仙汤的基础上化裁加味而来,主要由葛根、黄芩、远志、夜交藤等12味药材组成,临床上治疗肾阴阳俱虚证有较好的疗效,沧州市人民医院(以下简称“我院”)拟将其开发为治疗绝经综合征的药物。有研究表明,促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)既可接受雌二醇(estradiol, E₂)的反馈调节,又可调节促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和促卵泡生长激素(follicle stimulating hormone, FSH)的释放,在HPO轴中发挥重要作用^[2]。基于此,本研究基于GnRH分泌信号通路,探讨固本安神方对绝经综合征的改善作用及机制,以期为该方治疗绝经综合征提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有TGL16M型台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)、LABOSPECT 008AS型全自动生化分析仪[日立高新技术(上海)国际贸易有限公司]、Rayto RT-6100型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)、ME155D型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)、BX53型显微镜(日本Olympus公司)、NANO 2000型紫外分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Exicycler 96型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(韩国Bioneer公司)、WD-9413B型凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

固本安神方煎煮液由我院中药房自制[将葛根、黄芩、五味子、生地、淫羊藿、巴戟天、仙茅、知母、丹皮、夜交藤、酸枣仁、远志12味中药按处方比例称取适量,然后用10倍量(mL/g)水浸泡0.5 h后,回流提取2次,时间分

别为90、60 min,合并2次煎液并浓缩成质量浓度为1.8 g/mL的药液(以生药量计)]。其他药品与试剂有更年期安片(中药阳性对照药,江西南昌桑海制药有限责任公司,批号190387),戊酸雌二醇片(化学药阳性对照药,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号491A),LH、FSH、E₂酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号分别为MM-0624R1、MM-0566R1、MM-0575R1),全蛋白提取试剂盒、BCA试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒、ECL发光液(沈阳万类生物科技有限公司,货号分别为WLA019、WLA004、WLA013、WLA003)。本研究所用兔源亲吻素1(kiss-peptin 1, Kiss-1)、细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(phosphorylated, p-ERK1/2)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(二抗)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体均购自沈阳万类生物科技有限公司(货号分别为WL02651、WL01864、WLP1512、WLA023、WL01372);三磷酸肌醇受体1(inositol triphosphate receptor 1, IP₃R1)、Kiss-1、GnRH、β-actin的PCR引物均由金斯瑞生物科技有限公司合成(引物序列及扩增产物长度见表1)。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	序列(5'→3')	产物长度
IP ₃ R1	上游引物:GATGGACCTGGTGTAGA	238
	下游引物:AGCGAGGATGTAGATGTTA	
Kiss-1	上游引物:CACCCGACGTCGCCTGATCC	114
	下游引物:ACCTGCCTCCTGCCGTAGCG	
GnRH	上游引物:GCCGCTGTTGTCTGT	132
	下游引物:CTCCTCCTGCCCCATCT	
β-actin	上游引物:GGAGATTACTGGCTGCCTAGC	155
	下游引物:GGCCCGACTCATCGTACTCCTGCTT	

1.3 动物

本研究所用动物为健康SD雌性大鼠,清洁级,体质量220~250 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(辽)2020-0001。大鼠饲养于河北省人民医院实验动物中心,环境温度为22~25 °C,相对湿度为50%~55%,光照时间为12 h,明暗交替。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

将80只大鼠适应性喂养7 d后,随机取70只大鼠参考文献[8-9]方法复制绝经综合征模型:大鼠侧卧于手术台上,于肋脊角下方2 cm与脊柱外侧2 cm交叉处剪毛、消毒;切开皮肤,钝性剥离筋膜膜层、肌肉层、腹膜层;结扎输卵管和周围脂肪组织,切除卵巢及周围脂肪组织,撒敷适量青霉素粉,分层缝合组织。同法将大鼠另一侧卵巢及周围脂肪组织切除。术后第5天开始,对每只大鼠进行阴道涂片检查,每天1次,连续7 d。当镜

下仅见白细胞和少量角化细胞而无成熟上皮细胞时,表明造模成功。本研究共造模成功60只大鼠。

将造模成功的大鼠分为模型组、更年安片组(0.56 g/kg,剂量根据临床等效剂量换算而得)、戊酸雌二醇片组(0.1 mg/kg,剂量根据临床等效剂量换算而得)和固本安神方高、中、低剂量组(18.0、9.0、4.5 g/kg,中剂量根据临床等效剂量换算而得),每组10只。另取10只未造模大鼠作为假手术组(仅切除卵巢周围适量脂肪组织,其余手术方法同上)。模型组和假手术组大鼠灌胃生理盐水,各给药组大鼠灌胃相应药物,每天1次,连续4周。

2.2 取材

大鼠取材前12 h开始禁食不禁水。于末次给药30 min后,进行麻醉取材:自大鼠髂动脉采血,分别置于有抗凝剂的采血管中;剖取大鼠下丘脑组织,滤纸吸干表面水分及少许血液,迅速装入冻存管中,置于-80 °C冰箱保存;剖取大鼠子宫、肾上腺、脾、胸腺,滤纸吸干表面水分及少许血液后称质量,然后将大鼠子宫固定于10%甲醛溶液中用于病理形态学观察。

2.3 大鼠血浆中LH、FSH、E₂含量的检测

取“2.2”项下大鼠血浆样品,以3 000 r/min离心10 min,吸取上清液按试剂盒说明书相关方法操作,检测大鼠血浆中LH、FSH、E₂的含量。

2.4 大鼠脏器指数的测定

取“2.2”项下大鼠子宫、肾上腺、脾、胸腺称定质量后,计算脏器指数(脏器指数=脏器质量/体质量)。

2.5 大鼠子宫组织病理形态学观察

取“2.2”项下各组固定于10%甲醛溶液中的子宫组织适量,经常规包埋、切片、透明、脱蜡、脱水后,以苏木精染色8 min;水洗后,以伊红染色2 min,再次水洗、脱水、透明2次;经中性树胶封片后,置于光镜下观察。

2.6 大鼠下丘脑组织中Kiss-1、IP₃R1、GnRH mRNA表达水平的检测

各组取3只大鼠的下丘脑组织样本5 mg进行总RNA提取,并检测RNA浓度,然后反转录得到cDNA,再以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR。PCR反应体系为cDNA模板1 μL,上下游引物各0.5 μL,SYBR GREEN mastermix 10 μL, ddH₂O 8 μL。PCR反应条件为94 °C预变性5 min,94 °C变性10 s,60 °C退火20 s,72 °C延伸30 s,40个循环。以β-actin作为内参,采用2^{-ΔΔCt}法分析目的基因的表达水平。

2.7 大鼠下丘脑组织中Kiss-1、p-ERK1/2、ERK1/2蛋白表达水平的检测

各组取3只大鼠的下丘脑组织样本5 mg进行总蛋白提取,并采用BCA法检测蛋白浓度,然后再进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜;以5%脱脂奶

粉室温封闭1 h,分别加入Kiss-1(稀释度为1:1 000)、ERK1/2(稀释度为1:1 000)、p-ERK1/2(稀释度为1:500)、β-actin(稀释度为1:400)一抗,4 °C孵育过夜;以TBST洗膜4次,每次5 min,加入二抗(稀释度为1:5 000)孵育2 h;以TBST洗膜6次,每次5 min,经ECL显色后,曝光成像。采用凝胶成像系统进行灰度值分析,以β-actin蛋白为内参,以目的蛋白与内参β-actin的灰度比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 固本安神方对模型大鼠血浆中LH、FSH、E₂含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血浆中LH、FSH含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),E₂含量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血浆中LH、FSH含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),E₂含量(固本安神方低剂量组除外)均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表2。

表2 各组大鼠血浆中LH、FSH、E₂含量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LH/(mIU/mL)	FSH/(IU/L)	E ₂ /(pmol/L)
假手术组	41.38±3.32	8.20±1.43	35.03±4.91
模型组	49.25±7.00 ^a	10.64±1.21 ^b	24.03±8.37 ^b
更年安片组	39.19±5.06 ^c	9.37±1.28 ^c	34.41±9.45 ^d
戊酸雌二醇片组	37.54±8.94 ^c	8.64±1.63 ^d	35.33±6.60 ^c
固本安神方高剂量组	41.17±5.45 ^c	9.20±0.69 ^c	31.45±6.41 ^d
固本安神方中剂量组	41.51±5.37 ^d	9.33±0.71 ^c	32.48±8.88 ^d
固本安神方低剂量组	42.43±9.11 ^d	9.56±0.96 ^d	29.30±7.07

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与假手术组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.01$;d:与模型组比较, $P<0.05$

3.2 固本安神方对模型大鼠脏器指数的影响

与假手术组比较,模型组大鼠子宫、肾上腺、脾、胸腺脏器指数均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠子宫、肾上腺、脾(戊酸雌二醇片组除外)、胸腺脏器指数均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表3。

表3 各组大鼠子宫、肾上腺、脾、胸腺脏器指数的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	子宫	肾上腺	脾	胸腺
假手术组	2.370±0.374	0.290±0.049	2.556±0.323	2.427±0.459
模型组	0.529±0.062 ^a	0.229±0.028 ^a	2.212±0.204 ^a	1.531±0.387 ^b
更年安片组	0.625±0.140 ^b	0.277±0.071 ^b	2.592±0.339 ^b	2.201±0.552 ^c
戊酸雌二醇片组	1.056±0.493 ^c	0.261±0.031 ^b	2.221±0.243	2.081±0.426 ^c
固本安神方高剂量组	0.584±0.048 ^b	0.261±0.041 ^b	2.439±0.260 ^b	1.990±0.437 ^b
固本安神方中剂量组	0.613±0.018 ^b	0.262±0.033 ^b	2.466±0.273 ^b	2.100±0.381 ^c
固本安神方低剂量组	0.588±0.062 ^b	0.255±0.026 ^b	2.470±0.317 ^b	1.957±0.387 ^b

a:与假手术组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$

3.3 固本安神方对模型大鼠子宫组织病理形态学的影响

假手术组大鼠子宫腺体丰富、单层柱状上皮细胞排列整齐。模型组大鼠子宫腺体减少,固有层细胞密集。更年安片组和戊酸雌二醇片组大鼠子宫腺体较为丰富,单层柱状上皮细胞排列较为整齐。固本安神方高、中剂量组大鼠子宫腺体相比模型组增多,单层柱状上皮细胞排列较为整齐;固本安神方低剂量大鼠子宫腺体增多,固有层细胞略密集。结果见图1(固本安神方低剂量组图略)。

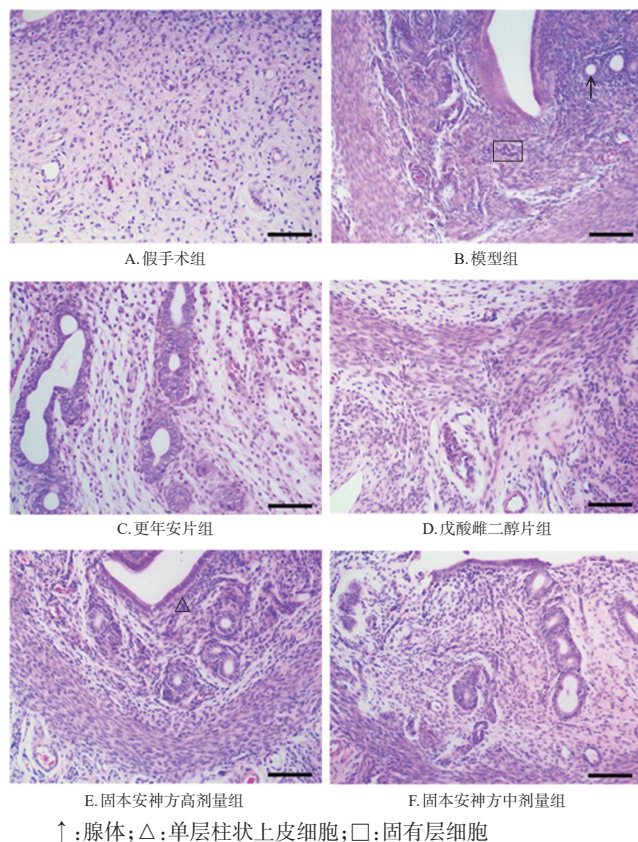


图1 各组大鼠子宫组织病理形态学观察结果

3.4 固本安神方对绝经综合征模型大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、IP₃R1、GnRH mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、IP₃R1、GnRH mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、IP₃R1、GnRH mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表4。

3.5 固本安神方对绝经综合征模型大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、p-ERK1/2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、p-ERK1/2 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图2、表5。

表4 各组大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、IP₃R、GnRH mRNA 表达水平的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Kiss-1 mRNA	IP ₃ R1 mRNA	GnRH mRNA
假手术组	0.96 ± 0.04	0.96 ± 0.05	1.01 ± 0.08
模型组	0.60 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	0.41 ± 0.03 ^a
更年安片组	0.90 ± 0.07 ^b	0.81 ± 0.06 ^b	0.59 ± 0.03 ^b
戊酸雌二醇片组	1.46 ± 0.13 ^b	0.85 ± 0.08 ^b	0.83 ± 0.05 ^b
固本安神方高剂量组	1.79 ± 0.03 ^b	0.60 ± 0.05 ^c	0.86 ± 0.06 ^c
固本安神方中剂量组	2.07 ± 0.21 ^b	0.68 ± 0.04 ^c	0.80 ± 0.04 ^c
固本安神方低剂量组	1.96 ± 0.14 ^b	0.80 ± 0.06 ^c	0.81 ± 0.04 ^c

a: 与假手术组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与模型组比较, $P < 0.05$

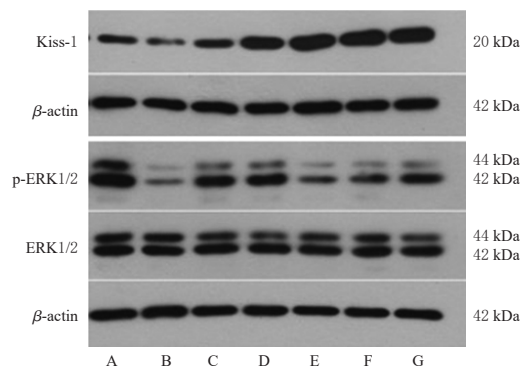


图2 各组大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠下丘脑组织中 Kiss-1、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Kiss-1	ERK1/2	p-ERK1/2
假手术组	1.11 ± 0.12	1.03 ± 0.10	1.06 ± 0.11
模型组	0.53 ± 0.03 ^a	0.97 ± 0.07	0.12 ± 0.02 ^a
更年安片组	1.17 ± 0.13 ^b	0.98 ± 0.08	0.52 ± 0.06 ^b
戊酸雌二醇片组	2.20 ± 0.21 ^b	0.96 ± 0.08	0.53 ± 0.05 ^b
固本安神方高剂量组	2.79 ± 0.23 ^b	1.01 ± 0.09	0.40 ± 0.04 ^b
固本安神方中剂量组	2.83 ± 0.29 ^b	0.98 ± 0.07	0.27 ± 0.03 ^b
固本安神方低剂量组	2.75 ± 0.28 ^b	0.98 ± 0.06	0.22 ± 0.03 ^b

a: 与假手术组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$

4 讨论

去势动物模型是研究绝经综合征的最佳动物模型,能够复制出人类绝经综合征多种临床表现,如循环系统疾病、代谢紊乱以及骨质疏松等^[10]。本研究采用去势动物模型,术后涂片观察大鼠动情周期变化,发现假手术组大鼠的动情周期正常,剩余各组均发生明显改变,且镜下仅见白细胞和少量角化细胞而无成熟上皮细胞,这表明绝经综合征模型复制成功。

更年安片是目前临床上应用较多且临床疗效确切的中成药,其组成成分、适用范围与本方十分相近,能有效改善围绝经期患者血清中性激素分泌水平,缓解绝经综合征症状^[11]。戊酸雌二醇片是西医治疗绝经综合征的常用药物,其活性成分为 E₂^[5]。据报道, E₂ 能有效改善

大鼠绝经综合征,其作用机制与GnRH受体有关^[12]。因此,本研究以这2种药物作为阳性对照药,从中药、化学药2个角度进行研究,评价固本安神方对绝经综合征的改善作用及机制。

基于HPO理论,卵巢的分泌活动受下丘脑和垂体的调控,且卵巢分泌的激素可影响子宫内膜发生周期性变化^[13]。本研究结果发现,与模型组比较,经固本安神方干预后,大鼠血浆中E₂含量和子宫脏器指数均较显著升高,血浆中LH、FSH含量均显著降低,子宫腺体增多,单层柱状上皮细胞排列较为整齐。

下丘脑GnRH神经元是分泌信号形成的重要部位,其信号传导与Kiss-1及Kiss-1受体关系密切,Kiss-1可通过去极化诱导GnRH神经元持续放电而有效地刺激GnRH的释放^[14]。在GnRH分泌信号通路中,GnRH受体与Gq/11蛋白结合后,可激活磷脂酶C将信号传递给IP₃,然后刺激细胞内钙的释放,从而影响GnRH的合成与释放(此过程同时也受ERK调节),进而影响FSH和LH的生成^[15-16]。本研究检测了下丘脑和GnRH分泌信号通路中关键基因和蛋白的表达,结果发现,经固本安神方干预后,大鼠下丘脑组织中Kiss-1、IP₃R、GnRH mRNA以及Kiss-1、p-ERK1/2蛋白的表达水平均显著升高,这表明固本安神方可能是通过激活GnRH分泌信号通路来改善大鼠绝经综合征。

综上所述,固本安神方可通过升高大鼠下丘脑组织中Kiss-1、IP₃R、GnRH mRNA和Kiss-1、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白的表达水平,激活GnRH分泌信号通路,从而改善绝经综合征。

参考文献

[1] 高仙维,高铭璟,傅逸君,等.调更汤加味联合耳穴贴压治疗更年期综合征的临床观察[J].中华中医药杂志,2021,36(10):6245-6249.

[2] BATES G W, BOWLING M. Physiology of the female reproductive axis[J]. *Periodontol* 2000, 2013, 61(1): 89-102.

[3] 蒋希荣,任路,李春日.电针对围绝经期抑郁症大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴的影响[J].针刺研究,2017,42(1):45-49.

[4] SILBERSTEIN S D, MERRIAM G R. Physiology of the menstrual cycle[J]. *Cephalalgia*, 2000, 20(3): 148-154.

[5] 彭莉,苏泽琦,赵保胜,等.滋阴安神方对实验性更年期模型大鼠的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(15):137-142.

[6] 靳冉,岳枫,朱晓光,等.加味逍遥丸对更年期大鼠行为学及神经-内分泌的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(7):3289-3291.

[7] 陈雪娟,安方玉,颜春鲁,等.玫瑰红芪当归水煎剂对围绝经期大鼠子宫病理形态及ER表达的影响[J].生物学杂志,2020,37(5):71-75.

[8] 赵铭宇.五加丹方对去势雌性大鼠下丘脑Kiss-1/GPR54/GnRH信号通路影响的研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020.

[9] 王芳.红人归胶囊治疗更年期综合征的药效学研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2007.

[10] 周丹妮,卫若楠,康梦娇,等.围绝经期综合征动物模型研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(18):243-250.

[11] 黄燕贞.更年安片对阴虚型围绝经期综合征患者Kupperman评分的影响[J].中国中医药科技,2012,19(4):377-378.

[12] 金吉如.戊酸雌二醇片联合黄体酮胶囊及更年安片对PPS患者FSH、LH、E₂及骨密度水平的影响[J].中国妇幼保健,2020,35(18):3434-3436.

[13] KAGAWA Y, UMARU B A, SHIL S K, et al. Mitochondrial dysfunction in GnRH neurons impaired GnRH production[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 530(1):329-335.

[14] NAOR Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2009, 30(1): 10-29.

[15] CAUNT C J, FINCH A R, SEDGLEY K R, et al. GnRH receptor signalling to ERK: kinetics and compartmentalization[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(8): 308-313.

[16] BLISS S P, NAVRATIL A M, XIE J J, et al. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2010, 31(3): 322-340.

(收稿日期:2022-03-25 修回日期:2022-08-24)

(编辑:唐晓莲)