

引用:王永连,曾晶,周芳,陈嘉盈,刘牧涯.基于NF- $\kappa$ B信号通路探讨养精通络方抗宫腔粘连炎症及纤维化的作用机制[J].中医导报,2026,32(2):7-13.

# 基于NF- $\kappa$ B信号通路探讨养精通络方抗宫腔粘连炎症及纤维化的作用机制\*

王永连<sup>1</sup>,曾晶<sup>2</sup>,周芳<sup>1</sup>,陈嘉盈<sup>1</sup>,刘牧涯<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学第一中医临床学院,湖南长沙410208;

2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

[摘要] 目的:探讨养精通络方(YJTL)抗宫腔粘连大鼠子宫内膜炎症及纤维化的作用机制。方法:40只SPF级SD大鼠随机分为正常组( $n=8$ )和造模组( $n=32$ )。通过机械性子宫内膜刮除联合细菌感染的双重损伤法构建宫腔粘连大鼠动物模型。将造模成功大鼠随机分成模型组、补佳乐组[0.206 mg/(kg·d)]、YJTL低量组[6.43 mg/(kg·d)]及YJTL高量组[12.86 mg/(kg·d)],每组8只。正常组与模型组均予以等体积生理盐水灌胃。各组给药2周后取材待用。对子宫组织进行形态学观察并计算子宫指数;采用苏木精-伊红(HE)染色评估子宫组织病理学改变;通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的水平;运用蛋白质印迹(Western blotting)法分析子宫组织中核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、p65及其磷酸化形式(p-p65)的表达水平;免疫荧光法检测p65及p-p65蛋白表达。结果:(1)大鼠子宫组织肉眼观及子宫指数:与正常组比较,模型组大鼠子宫充血水肿,子宫指数明显上升( $P<0.01$ );与模型组比较,YJTL组子宫组织水肿明显消退,子宫指数显著降低( $P<0.05$ )。(2)HE染色子宫组织病理学图片示:与正常组比较,模型组大鼠内膜间质结构疏松,腺体排列稀疏,大量粒细胞与淋巴细胞浸润;与模型组比较,YJTL高量组大鼠内膜明显增厚,腺体数量增多,粒细胞与淋巴细胞显著减少。(3)ELISA检测结果显示:与正常组比较,模型组大鼠TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,YJTL给药组大鼠TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平显著降低( $P<0.01$ )。(4)Western blotting法及免疫荧光结果显示:YJTL各剂量组可不同程度地抑制NF- $\kappa$ B、p65及p-p65蛋白表达( $P<0.05$ )。结论:养精通络方能够有效抑制NF- $\kappa$ B、p65及p-p65蛋白活性,从而发挥抗炎、抗纤维化作用,其作用机制可能与有效调控NF- $\kappa$ B信号通路密切相关。

[关键词] 宫腔粘连;养精通络方;NF- $\kappa$ B信号通路;炎症因子;纤维化;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2026)02-0007-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.02.002

## Investigating the Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Mechanism of Yangjing Tongluo Formula (养精通络方) in Uterine Adhesions via the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

WANG Yonglian<sup>1</sup>, ZENG Jing<sup>2</sup>, ZHOU Fang<sup>1</sup>, CHEN Jiaying<sup>1</sup>, LIU Muya<sup>1</sup>

(1.The First Clinical College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine,

Changsha Hunan 410208, China; 2.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine,

Changsha Hunan 410007, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of Yangjing Tongluo formula (YJTL) against endometrial inflammation and fibrosis in rats with intrauterine adhesions (IUA). Methods: Totally 40 SPF-grade SD rats were randomly divided into a normal group ( $n=8$ ) and a modeling group ( $n=32$ ). An IUA rat model was established using a dual-injury method combining mechanical endometrial curettage with bacterial infection. Successfully modeled rats were randomly allocated into model group, Prognova group [0.206 mg/(kg·d)], YJTL low-dose group [6.43 mg/(kg·d)], and YJTL high-dose group [12.86 mg/(kg·d)], with 8 rats in each group. Both the normal

\*基金项目:湖南省创新型省份建设专项重点研发计划项目(2023SK2050);长沙市自然科学基金项目(Kq2202452);湖南省卫生健康委重点指导项目(C202305017704);湖南省中医药管理局委托项目(D2023002);2024湖南中医药大学第一附属医院中医药传承创新专项(2024XYLH340);湖南省卫生健康委卫生科研课题一般课题(W20243198);湖南中医药大学校院联合基金重点项目(2023XYLHJJ005);湖南中医药大学校级科研项目一般项目(Z2023XJYB21)

通信作者:曾晶,女,副主任医师,研究方向为中医妇科与生殖研究

and model groups received an equal volume of normal saline via gavage. After two weeks of administration, samples were collected. Uterine morphology was observed and the uterine index was calculated. Histopathological changes were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), p65, and phosphorylated p65 (p-p65) in uterine tissues were analyzed by Western blotting. The expression levels of p65 and phosphorylated p65 (p-p65) in uterine tissues were analyzed by immunofluorescence. Results: (1) Gross observation and uterine index: Compared with the normal group, the model group exhibited marked uterine congestion and edema, along with a significant increase in the uterine index ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the YJTL groups showed obvious alleviation of uterine edema and a significant reduction in the uterine index ( $P<0.05$ ). (2) HE staining: Compared with the normal group, the model group displayed loose endometrial stroma, sparse glandular arrangement, and extensive infiltration of granulocytes and lymphocytes. Compared with the model group, the high-dose YJTL group showed significantly thickened endometrium, increased number of glands, and markedly reduced granulocytes and lymphocytes. (3) ELISA results: Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were significantly elevated in the model group compared with the normal group ( $P<0.01$ ). Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were significantly reduced in the YJTL-treated groups compared with the model group ( $P<0.01$ ). (4) Western blotting and immunofluorescence results: YJTL administration at various doses inhibited the expression of NF- $\kappa$ B, p65, and p-p65 proteins to different extents ( $P<0.05$ ). Conclusion: Yangjing Tongluo formula can effectively inhibit the activity of NF- $\kappa$ B, p65, and p-p65 proteins, thereby exerting anti-inflammatory and anti-fibrotic effects. Its mechanism of action is likely closely associated with the effective regulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

[Keywords] intrauterine adhesions; Yangjing Tongluo formula; NF- $\kappa$ B signaling pathway; inflammatory factors; fibrosis; rats

宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)作为妇科临床常见病,是由多因素致病机制引发的宫腔内瘢痕形成及组织粘连,进而阻碍局部微循环,造成子宫腔部分或完全闭锁。该疾病的病理学本质在于子宫内膜纤维化病变及异常粘连形成,其发病基础在于子宫内膜基底层细胞在各种致病因素作用下遭受不可逆性损伤<sup>[1]</sup>。临床上通常采用宫腔镜治疗,但IUA复发率较高,对女性的生育及健康影响较大,故而对于如何降低IUA复发率备受重视。

中医药疗法在临床实践中日益受到重视。中医学理论认为,该病症的核心病机在于肾精亏虚兼夹瘀血阻滞,其治疗原则当以补肾填精结合活血化瘀为基本大法。本实验中养精通络方(YJTL)由养精神玉汤联合四君子汤加用活血化瘀中药而成。研究证实,养精神玉汤能够促进子宫内膜细胞分化成熟,显著改善子宫内膜容受性,其作用机制可能涉及抑制炎症反应等多重途径<sup>[2]</sup>。四君子汤能够通过调控炎症反应相关通路,发挥抑制炎症级联反应的作用<sup>[3]</sup>。动物及临床研究发现,补肾活血类中药可改善IUA术后子宫内膜血液循环,也可改善月经情况<sup>[4]</sup>。既往实验研究明确,IUA子宫内膜组织呈现持续性炎症反应活化状态,NF- $\kappa$ B信号转导通路的异常活化在子宫内膜纤维化病理进程中有着决定性作用,这一机制构成了IUA发生发展的核心病理基础<sup>[5]</sup>。多项实验数据显示,在IUA患者及动物模型中均有NF- $\kappa$ B表达水平显著上调,该转录因子在IUA发生发展中有重要的调控作用<sup>[6]</sup>。NF- $\kappa$ B信号通路中的NF- $\kappa$ B、p65及p-p65蛋白均有显著抗炎活性,且NF- $\kappa$ B、p65除抗炎效应外还有抗纤维化的调控作用<sup>[7-8]</sup>。实验动物模型研究显示,经机械性子官内膜损伤后,SD大鼠子宫内

膜病理学改变与临床患者子宫内损伤病理特征具有高度相似性<sup>[9]</sup>。故本研究建立IUA大鼠模型,予以不同剂量(低、高)YJTL干预,从NF- $\kappa$ B信号通路角度深入阐释该方剂治疗IUA的分子机制,旨在为IUA的临床预防与治疗提供创新性的理论基础和实验支持。

## 1 材料

1.1 实验动物 40只SPF级雌性SD大鼠,8周龄,体质量180~200 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004;动物质量合格证号:430727241100849645。实验动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心SPF级屏障环境,采用独立通风笼具系统(IVC)饲养,环境参数严格控制:室温维持在(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度控制在(60 $\pm$ 5)% ,光照周期设定为12 h/12 h明暗循环。所有实验用动物均完成为期1周的环境适应性饲养。本研究方案已获湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(伦理审批号:HN-LL-SWST-12)。

1.2 药物与试剂 养精通络方:熟地黄10 g,白芍10 g,当归10 g,人参花10 g,黄芪10 g,炒白术10 g,三七花10 g,炙甘草5 g。全方饮片均由湖南中医药大学第一附属医院提供(批号分别为ZY1980、ZY1681、ZY1730、ZY8926、ZY1828、ZY1690、ZY5114、ZY2323),所有中药材放入砂锅,加入1 L纯净水武火煮沸15 min后,加入500 mL纯净水文火煮沸30 min过滤,终浓度约为88.20 g/L,药液滤出后倒入密封容器中,于4  $^{\circ}$ C冰箱保存。戊酸雌二醇片(商品名:补佳乐,规格:1 mg/片,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号:J20171038),磨研成粉末配以纯净水制成0.020 6 mg/mL溶液。脂多糖(批号:202A031)、HE染

色试剂盒(批号:BA-4041)均购自北京索莱宝科技有限公司;4%多聚甲醛(白鲨生物技术有限公司,批号:23319084);戊巴比妥钠(Sigma公司,批号:SLBG3215V),用蒸馏水作为溶剂,按3:100(质量/体积比)比例配制,制成0.3 mg/mL的贮备液,4℃避光保存;大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒、大鼠白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ )ELISA试剂盒(上海化邦生物科技有限公司,批号:202405);ECL发光液组合装(批号:2512F054)、RIPA裂解液(批号:2511F083)、PMSF(批号:2511F084)、PBS缓冲液(批号:2505M001)、BCA蛋白定量检测试剂盒(批号:2511F095)、PVDF膜 0.45  $\mu$ m(批号:2511O1135)、NF- $\kappa$ B一抗(批号:GB111053)、NF- $\kappa$ B二抗(HRP-山羊抗兔,批号:GB23303)、p65一抗(批号:8242)、p65二抗(HRP-山羊抗兔,批号:GB23303)、p-p65一抗(批号:3033)、p-p65二抗(HRP-山羊抗兔,批号:GB23303)均购自赛维尔生物科技有限公司。

## 2 方 法

**2.1 IUA大鼠模型制备** 40只健康雌性SD大鼠经7 d环境适应期后,实施阴道脱落细胞学检查,持续14 d。通过阴道脱落细胞学监测,筛选出具有规律动情周期的雌性SD大鼠40只,采用随机数字表法分为正常组( $n=8$ )和造模组( $n=32$ )。造模组通过机械性子宫内膜刮除术联合脂多糖(LPS)诱导建立宫腔粘连模型<sup>[10]</sup>。实验操作流程:选取处于动情间期的雌性SD大鼠,经3%戊巴比妥钠溶液(1 mL/kg,腹腔注射)麻醉后,于腹中线处作约2 cm纵向切口,充分暴露子宫组织。在宫颈上方0.2 cm处行子宫壁切开术,微型刮匙进行系统性子宫内膜搔刮,直至宫腔表面呈现明显粗糙质地为止。后将含LPS的手术缝线置入子宫腔内,阴道端保留0.5 cm线尾(24 h后取出缝线),最后逐层缝合。

**2.2 分组及给药方法** 模型成功建立后,根据随机数字表法分为4组:模型组、补佳乐组、YJTL低量组及YJTL高量组,每组各8只。采用体表面积折算方法确定药物给药剂量:补佳乐组[0.206 mg/(kg·d)]、YJTL低量组[6.43 mg/(kg·d)]及YJTL高量组[12.86 mg/(kg·d)]。正常组与模型组均予等体积生理盐水灌胃。1次/d,连续14 d。

**2.3 样本采集** 实验动物禁食处理24 h(允许自由摄取水分),通过腹腔注射3%戊巴比妥钠溶液实施麻醉,在无菌操作条件下采集腹主动脉全血样本。采集后的血液标本于室温条件下静置待其充分分层,随后以离心半径6 cm、3 000 r/min的转速离心15 min,分离获得血清组分,保存于-80℃超低温环境中。获取子宫组织标本,进行肉眼观察(包括组织形态、色泽等)。从各组实验动物左侧子宫组织中精确截取约200 mg样本,经4%多聚甲醛溶液固定,另取等量右侧子宫组织-80℃冻存。

## 2.4 观察指标

**2.4.1 阴道脱落细胞学观察大鼠动情周期** 收集雌性SD大鼠阴道脱落细胞标本,经过瑞氏染色技术处理后,采用光学显微镜系统开展细胞形态学检测。根据阴道黏膜上皮细胞角化指数、有核上皮细胞与白细胞的比值等细胞学特征,连续14 d动态监测实验动物的动情周期变化规律<sup>[11]</sup>。

**2.4.2 肉眼观察大鼠子宫组织形态学、子宫指数变化及大鼠体质量** 实验取材阶段,称量大鼠体质量及子宫湿质量,计算子宫指数。计算公式如下:子宫指数=子宫湿质量(g)/体质量(g) $\times 100\%$ <sup>[12]</sup>。子宫组织获取后,清除周围结缔组织,通过肉眼观察,比较各组子宫组织的形态学特征及色泽变化。

**2.4.3 HE染色观察子宫组织病理学** 经精细剔除周围脂肪组织的子宫标本在4%多聚甲醛溶液中固定后,实施石蜡包埋程序,制作5  $\mu$ m厚度的连续组织切片。样本经HE染色后,通过系列梯度乙醇脱水处理,使用中性的树脂封片剂进行封固,于室温条件下自然干燥。于光学显微镜下观察组织形态学特征并采集显微图像,用Image Scope软件记录。

**2.4.4 ELISA法检测大鼠外周血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平** 采用实验大鼠的外周血样本,依据ELISA检测试剂盒的标准化流程进行处理,将生物样本进行适当稀释后分装,设置标准品对照孔、空白对照孔及待测样本孔。具体实验流程如下:首先向各检测孔中定量加入40  $\mu$ L样本稀释缓冲液,接着在待测样本孔中补充加入10  $\mu$ L待测样本。各检测孔需同时加入50  $\mu$ L酶标记免疫检测试剂,封板后于37℃恒温培养箱中孵育1 h。移除孔内反应液后,通过离心处理消除残留液体,继而每孔加入洗涤缓冲液静置30 s后弃去,该洗涤过程需重复进行5次,确保无液体残留。随后依次向各反应孔中分别加入50  $\mu$ L显色底物A和B,振荡混匀后置于37℃避光环境反应15 min。最后使用酶标仪测定各反应孔的吸光度数值。

**2.4.5 蛋白质印迹(Western blotting)法检测大鼠子宫组织中NF- $\kappa$ B、p65及p-p65蛋白表达** 取大鼠子宫组织100 mg,加入250  $\mu$ L RIPA裂解液,涡旋振荡15 s;采用磷酸盐缓冲液(PBS)对细胞样本进行3次洗涤后去除残留液体。加入适宜体积的RIPA组织裂解液,在冰上孵育30 min以实现充分裂解。随后于4℃条件下以12 000 $\times$ g离心力处理10 min,收集上清液用于BCA法蛋白定量分析。取等质量蛋白样品(100  $\mu$ g)进行SDS-PAGE分离,并转移至PVDF膜上。分别采用以下稀释比例的一抗进行孵育:NF- $\kappa$ B(1:1 000)、p65(1:1 000)、磷酸化p65(1:1 000)及ACTIN(1:5 000)。将转印膜置于含TBST缓冲液的孵育盒中,在4℃摇床条件下与一抗孵育过夜。采用TBST缓冲液充分洗涤后,加入对应种属的二抗,于室温条件下孵育1 h。经TBST漂洗后,应用ECL化学发光检测系统进行显影,并利用凝胶成像系统采集信号。以ACTIN作为内参,通过分析目标蛋白条带与内参蛋白条带的灰度值比值,对目的蛋白的相对表达量进行半定量分析。

**2.4.6 免疫荧光法检测大鼠子宫组织中p65、p-p65蛋白表达** 石蜡切片进行梯度脱蜡和水化处理,再行抗原热修复,自然冷却后用磷酸盐缓冲液(PBS,pH值为7.4)冲洗OCT包埋剂。使画圈血清封闭,继而滴加优化浓度的一抗工作液,于4℃条件下孵育12~16 h。NF- $\kappa$ B一抗(稀释比1:1 000)、NF- $\kappa$ B二抗(HRP-山羊抗兔,稀释比1:5 000)、p65一抗(稀释比1:1 000)、p65二抗(HRP-山羊抗兔,稀释比1:5 000)、p-p65一抗(稀释比1:1 000)、p-p65二抗(HRP-山羊抗兔,稀释比1:5 000)。经PBS(pH值为7.4)充分洗涤(3次 $\times$ 5 min)后,加入荧光标记的二抗工作液,避光条件下孵育50 min。在完成第二次PBS洗涤后,

采用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)进行细胞核染色。经抗荧光淬灭封片剂固定后,利用Image Pro Plus 6.0图像分析系统对样本进行图像采集及定量分析。

2.5 统计学方法 数据分析通过SPSS 29.0、GraphPad Prism 10.1.0及Image J统计软件完成。计量资料用“均数±标准差”( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间使用单因素方差分析,多重比较采用Tukey检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 正常大鼠动情周期的阴道脱落细胞情况 动情前期可观察到大量有核上皮细胞伴少量无核角化细胞;动情期特征性的表现为大量形态不规则的无核角化细胞;动情后期则同时存在有核上皮细胞、白细胞及无核角化细胞的混合分布;至动情间期,镜下视野以白细胞为主,仅零星可见有核上皮细胞。(见图1)

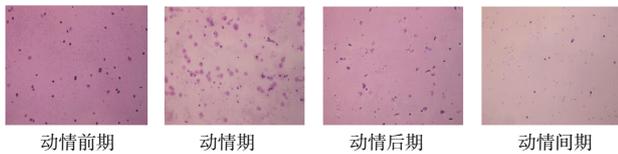
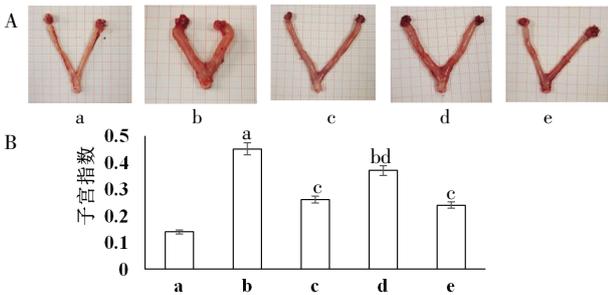


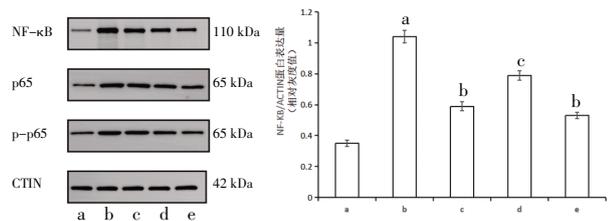
图1 正常大鼠动情周期瑞氏染色 (×40)

3.2 大鼠子宫组织肉眼观察及子宫指数变化 正常组大鼠双侧子宫组织呈现典型生理状态,表现为表面光滑、质地富有弹性;模型组大鼠则出现明显的子宫充血水肿,组织弹性显著降低;YJTL低剂量组较模型组表现出一定程度的改善,子宫体积有所减小,组织弹性部分恢复;而补佳乐组及YJTL高剂量组治疗组大鼠子宫大体形态学特征接近正常组水平,子宫直径趋于均匀,组织弹性恢复良好(见图2A)。与正常组比较,模型组子宫指数明显上升( $P<0.01$ );与模型组比较,补佳乐组及YJTL高剂量组子宫指数均显著降低( $P<0.01$ )(见图2B)。



注:a.正常组;b.模型组;c.补佳乐组;d.YJTL低剂量组;e.YJTL高剂量组。与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ,<sup>d</sup> $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠子宫形态及子宫指数



注:a.正常组;b.模型组;c.补佳乐组;d.YJTL低剂量组;e.YJTL高剂量组。与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠子宫组织 NF-κB 信号通路相关蛋白表达情况

3.3 子宫组织病理学检查结果 正常组大鼠子宫内膜结构完整,由单层柱状上皮及富含细胞的固有层组成,局部可见上皮细胞呈点状坏死(紫色箭头),伴核固缩现象;固有层内基质细胞分布均匀,毛细血管网络清晰可见,局部结缔组织排列略显疏松,仅见极少量粒细胞与淋巴细胞散在浸润(红色箭头);上皮层向固有层内陷形成大量管状子宫腺体结构,腺体密度较高,偶见腺上皮细胞点状坏死(灰色箭头),并呈现核固缩改变。模型组子宫内膜间质明显水肿,组织结构疏松,腺体分布密度显著降低,排列紊乱;损伤区域可见大量粒细胞与淋巴细胞弥漫性浸润,子宫腺体结构几乎完全缺失。与模型组比较,补佳乐组及YJTL干预组子宫内膜变厚,腺体数量增加,粒细胞与淋巴细胞浸润量减少;YJTL低剂量组子宫内膜连续性中断,间质及腺体仍较稀疏,粒细胞与淋巴细胞还存在较多浸润。而补佳乐组、YJTL高剂量组内膜明显增厚,腺体数量增多,见极少量粒细胞与淋巴细胞。表明YJTL有明显增加子宫内膜腺体数量、修复内膜的功效。(见图3)

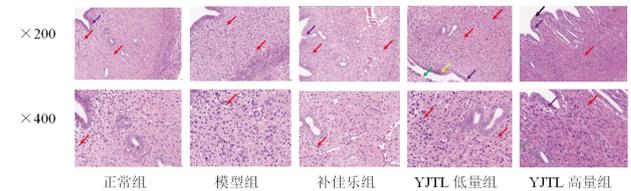


图3 各组子宫组织病理形态 HE 染色

3.4 各组大鼠血清TNF-α、IL-1β水平比较 模型组大鼠血清TNF-α、IL-1β水平较正常组升高( $P<0.01$ );与模型组比较,补佳乐组及YJTL干预组TNF-α、IL-1β水平显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且YJTL高剂量组下降更明显( $P<0.01$ )。(见表1)

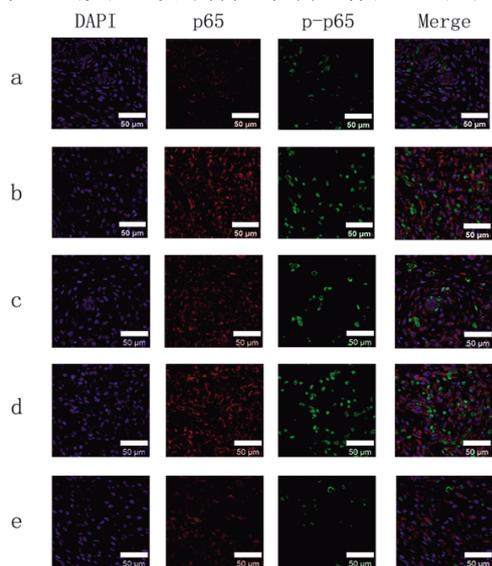
表1 各组大鼠血清 TNF-α、IL-1β 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ , pg/mL)

组别	n	剂量	TNF-α	IL-1β
正常组	8		51.03 ± 1.84	7.35 ± 0.40
模型组	8		374.00 ± 0.75 <sup>a</sup>	70.54 ± 0.43 <sup>a</sup>
补佳乐组	8	0.206 mg/(kg·d)	105.50 ± 1.15 <sup>ac</sup>	17.93 ± 0.66 <sup>ac</sup>
YJTL低剂量组	8	6.43 mg/(kg·d)	263.12 ± 2.62 <sup>ab</sup>	38.49 ± 0.13 <sup>ac</sup>
YJTL高剂量组	8	12.86 mg/(kg·d)	102.24 ± 0.67 <sup>ac</sup>	16.45 ± 0.14 <sup>ac</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

3.5 Western blotting法检测大鼠子宫组织中NF-κB、p65及p-p65的蛋白表达 与正常组比较,模型组大鼠子宫组织NF-κB、p65及p-p65表达均升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,养精通络方及补佳乐可显著下调NF-κB、p65及p-p65的表达,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且补佳乐组和YJTL高剂量组效果更为显著( $P<0.01$ )。(见图4)

3.6 免疫荧光检测大鼠子宫组织中p65、p-p65蛋白表达 与正常组比较,模型组大鼠子宫组织p65、p-p65荧光信号强度均显著上调( $P<0.01$ );经药物干预后,YJTL干预组与补佳乐组荧光强度明显降低,且低于模型组( $P<0.05$ )。值得注意的是,YJTL高量组的荧光强度抑制效应更为显著( $P<0.01$ )。(见图5)



注:a.正常组;b.模型组;c.补佳乐组;d.YJTL低量组;e.YJTL高量组。

图5 各组大鼠子宫组织NF- $\kappa$ B信号通路中p65及p-p65表达免疫荧光图

#### 4 讨 论

宫腔粘连属中医学中“月经过少”“闭经”等范畴<sup>[13]</sup>。古代医家认为其证候分虚实。实者可为寒凝、瘀血、气滞、热结;虚则可为阴虚、气虚<sup>[14]</sup>。现代医家结合宫腔操作的直接病因,认为虚指宫腔手术后经络虚损所致的肾气亏虚、肾精不足,经血缺乏;实指局部气血循环障碍,邪毒、瘀血等病理产物郁结胞宫,致冲任二脉运行不畅<sup>[15]</sup>。核心致病因素为手术创伤,关键病理机制在于肾精不足兼夹瘀血内阻,治疗方向为补肾健脾,活血化瘀。

本研究中养精通络方由经典名方养精神玉汤联合四君子汤,减去收敛之山萸肉,加上三七花而成。养精神玉汤在调经助孕、养血滋阴等方面疗效显著<sup>[16]</sup>。其可能通过多靶点调控机制发挥治疗效应,如调节下丘脑-垂体-卵巢轴神经内分泌功能、改善生殖系统局部微循环状态等协同作用途径<sup>[17]</sup>。四君子汤擅补益脾气、健运中州,其不仅能增强免疫调节功能、促进造血干细胞增殖分化,而且具有显著的抗炎、抗氧化应激等多重生物活性<sup>[18]</sup>。研究发现,两方中含有多种活性成分,如苷类、多糖类等,在调节机体生理功能、抗炎镇痛等方面发挥着关键作用<sup>[19]</sup>。养精通络方中熟地黄滋肾阴、填精髓;人参花益气固本;黄芪补中益气、养血生津;白术健脾益气;当归配伍三七花活血祛瘀;甘草调和诸药。诸药协同,共同滋肾健脾、扶正培本、活血通络、调理冲任。现代药理研究提示,熟地黄、白芍、黄芪中所含多糖类、黄酮类等成分均有抗炎作用,与抑制NF- $\kappa$ B通路激活和减缓炎症相关<sup>[20-21]</sup>。黄芪可抗纤维化<sup>[22]</sup>,白术<sup>[23]</sup>、当归<sup>[24]</sup>、人参花<sup>[25]</sup>可调节炎症因子水平起到抗菌

抗炎作用。故本方具有抑制炎症、抗纤维化、提高机体抵抗力等药理作用,能够加速IUA所致子宫内膜的修复。

IUA本质上属于器质性纤维化病变,其发病机制涉及机械性损伤及继发感染所诱发的炎症级联反应。在IUA的病理发展过程中,子宫内膜基层受损后,间质层发生纤维化改变,腺体呈现柱状上皮化生,致使子宫肌层结构界限模糊,最终导致宫腔纤维性粘连形成<sup>[26]</sup>。IUA子宫内膜组织的炎症反应强度与纤维化程度存在显著正相关性,表现为炎症介质水平越高,组织纤维化病变越明显<sup>[27]</sup>。炎症刺激导致子宫内膜基层损伤,细胞外基质(ECM)蛋白合成与分解失衡,炎症细胞因子分泌紊乱。异常沉积的胶原纤维在子宫内膜间质中积聚,导致组织纤维化改变,致使IUA的形成<sup>[28]</sup>。子宫内膜纤维化改变作为IUA的核心病理学特征,其有效调控已成为IUA防治的关键靶点<sup>[29]</sup>。炎症反应调控着纤维化的进展变化,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 为炎症启动的关键细胞因子,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 可抑制ECM的降解,促进子宫内膜纤维化<sup>[26]</sup>。在IUA患者子宫内膜组织中,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的表达为正反馈改变,同时其改变与IUA的病变程度呈正比<sup>[30]</sup>。有研究表明,NF- $\kappa$ B信号转导通路中的p65蛋白不仅在肾组织中发挥着重要的抗炎及抗纤维化调控作用,也可显著改善肝纤维化病理进程,通过抑制该信号通路的活化可作为慢性肾脏疾病以及肝纤维化治疗的潜在干预策略<sup>[7,31]</sup>。多项实验证实,降低NF- $\kappa$ B蛋白的表达水平能够有效抑制肺部及肾脏纤维化进程,并产生显著的抗炎效应<sup>[9,32]</sup>。NF- $\kappa$ B作为高度保守的核转录调控因子,在调控炎症反应等生理病理中起关键作用。该转录因子可影响细胞周期进程、分化调控等生物活性,它具有重要的负向调控功能<sup>[33]</sup>。当细胞受到刺激时,NF- $\kappa$ B磷酸化激活,入核启动下游信号通路,导致TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等炎症因子合成,加速炎症反应进程<sup>[34]</sup>。当机体受到炎症的激发,NF- $\kappa$ B信号通路因此被激活,IKK复合物活化,关键因子I $\kappa$ B $\alpha$ 被磷酸化,p65被磷酸化后转位至细胞核,导致TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 靶基因的转录,进而引发炎症反应<sup>[35]</sup>。NF- $\kappa$ B信号通路机制图见图6。

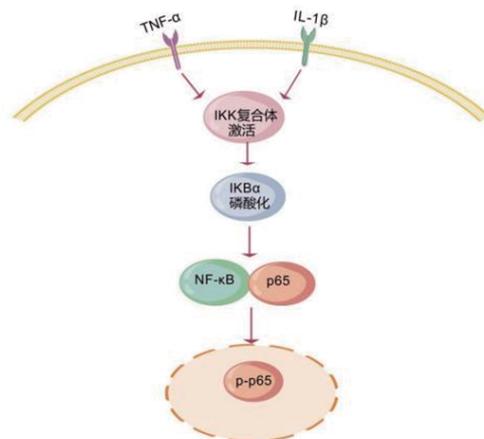


图6 NF- $\kappa$ B信号通路机制图

本研究发现,模型组大鼠子宫充血水肿,弹性变差,而YJTL干预组及补佳乐组大鼠子宫组织水肿明显消退,趋于正常。子宫指数作为评估子宫组织水肿及纤维化程度的客观指标之一,在模型组中显著增高( $P<0.01$ ),这一结果从形态计量

学角度证实IUA动物模型构建成功。经治疗,补佳乐组及YJTL干预组子宫指数均显著降低,说明各药物能显著促进子宫形态恢复,修复子宫内膜功能。HE染色见模型组大鼠子宫组织内膜结构疏松、腺体数量明显减少、多量粒细胞与淋巴细胞散在浸润;而补佳乐组、YJTL高量组大鼠内膜明显增厚,腺体数量增多,见极少量粒细胞与淋巴细胞。表明养精通络方有增加腺体数量、修复内膜的功效。ELISA检测中,模型组大鼠TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平显著升高,补佳乐组及YJTL组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平显著降低。Western blotting结果提示,模型组大鼠子宫组织NF- $\kappa$ B、p65及p-p65蛋白表达均显著上调;与模型组比较,补佳乐组及YJTL干预组大鼠子宫组织NF- $\kappa$ B、p65及p-p65表达水平下调。免疫荧光染色发现,模型组大鼠p65和p-p65荧光强度均增强;与模型组比较,补佳乐组及YJTL组p65和p-p65荧光强度均减弱。本研究NF- $\kappa$ B信号通路中的关键蛋白分子NF- $\kappa$ B、p65不仅可作为炎症反应进程的生物学标志物,同时亦可作为组织纤维化逆过程的客观评价指标。综合以上实验结果可得出本实验相关结论:当大鼠IUA发生后,YJTL可使子宫水肿减轻、纤维化好转、炎症细胞浸润减少,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平显著降低。NF- $\kappa$ B、p65和p-p65蛋白表达下调的作用可能与YJTL中熟地黄、白芍、黄芪等中药的活血成分抗炎作用相关。除黄芪具有抗纤维化作用外,其他药物的抗炎作用也能使纤维化有所好转。YJTL中多种药物具提高人体免疫力中作用,机体正气得复也可使抗炎、抗纤维化效果更加显著。YJTL中多种药物均可能与抑制NF- $\kappa$ B通路激活有关。因此推断YJTL治疗IUA的作用机制可能涉及对NF- $\kappa$ B信号通路的活化抑制,从而介导其抗炎及抗纤维化双重药理效应。YJTL干预后IUA大鼠炎症及纤维化相关指标变化见图7。

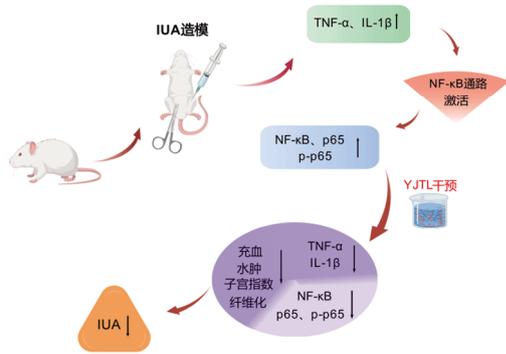


图7 YJTL干预后IUA大鼠炎症及纤维化相关指标变化

分析与回顾本研究,本研究不仅基于NF- $\kappa$ B信号通路证实YJTL治疗IUA的疗效以及作用机制,还将IUA发生过程中的炎症机制以及纤维化反应结合在一起,更加全面地诠释YJTL治疗IUA不单有抗炎效应,同时也具抗纤维化效应。不足之处是IUA大鼠在YJTL治疗后的疗效检验方法有限,因此使实验对NF- $\kappa$ B信号通路对治疗IUA抗纤维化机制的研究存在一定欠缺。虽本实验的大鼠数量有限,但这不影响大鼠造模结果及整个研究质量。通过混合造模法有效缩短了造模及药物干预时间,为实验节省了较大费用,而研究的侧重点及通路有别于既往成果<sup>[9]</sup>,且具有自身创新之处和研究意义,为今后YJTL治疗IUA的应用提供了循证依据。但目前临床和实验

研究中并没有IUA治疗后疗效评估的统一标准,在将来研究中争取制定统一疗效评价标准,进一步深入探索其作用机制,使其作用水平更有信服力。

综上,YJTL在IUA模型大鼠中表现出显著的抗炎及抗纤维化药理活性。其作用机制可能涉及:通过调控NF- $\kappa$ B信号转导通路,显著降低子宫组织中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达,抑制NF- $\kappa$ B、p65及p-p65的表达水平相关,同时整合NF- $\kappa$ B信号通路调控网络与抗炎-抗纤维化协同作用机制,本研究为IUA的临床防治提供了创新的治疗策略和理论依据。未来需一步深入研究NF- $\kappa$ B信号通路与抗子宫内膜纤维化之间的关联,以期对IUA的中医药治疗提供更为精确的分子靶点,并为治疗药物的研发提供理论基础,为临床实践提供更可靠的依据。

参考文献

- [1] 罗梅, 闻洪丽, 邹凌凤, 等. 基于SHH-Gli通路调控EMT探讨补肾活血方防治宫腔重度粘连TCRA分离术后复发的机制[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(11): 2523-2529.
- [2] 祖之慧, 张蕾, 徐丁琳, 等. 养精神玉汤对薄型子宫内膜大鼠白细胞介素-1 $\beta$ 、核因子 $\kappa$ B的影响[J]. 世界中医药, 2024, 19(13): 1966-1970.
- [3] 李鸿, 于官正, 胡雪黎, 等. 基于网络药理学与实验验证探讨四君子汤与痛泻要方“同病异治”溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(3): 52-60.
- [4] 吴丹, 罗健, 陈伟志. 补肾活血法对宫腔粘连术后患者子宫内膜及血流参数影响的临床研究[J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(1): 26-28.
- [5] NING J, ZHANG H T, YANG H W. microRNA-326 inhibits endometrial fibrosis by regulating TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway in intrauterine adhesions[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 2286-2292.
- [6] WANG X Z, MA N N, SUN Q N, et al. Elevated NF- $\kappa$ B signaling in Asherman syndrome patients and animal models[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15399-15406.
- [7] 李光耀, 梁佳敏, 靳梦彤, 等. 小柴碱下调NF- $\kappa$ B p65/TGF- $\beta$ 1/CTGF信号通路缓解小鼠肾纤维化损伤[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(11): 2042-2047.
- [8] 门翔, 党强, 周小果, 等. 槲皮素对基于TGF- $\beta$ 1/P38 MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路抗博来霉素致小鼠肺纤维化的作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(2): 43-47.
- [9] 陈艳玲, 孙冬岩. 大鼠宫腔粘连模型的研究进展[J]. 中国计划生育和妇产科, 2022, 14(1): 49-51.
- [10] SUN L, ZHANG S W, CHANG Q Y, et al. Establishment and comparison of different intrauterine adhesion modelling procedures in rats[J]. Reprod Fertil Dev, 2019, 31(8): 1360.
- [11] 张永裕, 谭国胜, 罗灿桥, 等. 多重损伤法建立大鼠宫腔粘连模型及其对子宫内膜LIF及整合素 $\alpha$ v $\beta$ 3的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2016, 37(1): 15-22.
- [12] 谭雅莉, 徐佳, 蒋冬, 等. 从TGF- $\beta$ 1-PI3K/Akt信号通路研

- 究妇科千金胶囊治疗宫腔粘连大鼠作用机制[J].中国中药杂志,2020,45(19):4705-4711.
- [13] 范龙龙,肖盈盈,马本玲,等.补肾活血方对重度宫腔粘连子宫内膜容受性、Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路及对子宫内膜干细胞标志物的影响[J].中华中医药杂志,2024,39(7):3827-3832.
- [14] 耿丹丹,魏绍斌.宫腔粘连的中医药治疗方法[J].实用妇产科杂志,2024,40(4):251-254.
- [15] 李淑华,王秀芳,刘玉兰,等.化瘀生新合剂联合雷火灸预防人流术后宫腔粘连的临床观察[J].广州中医药大学学报,2024,41(5):1202-1206.
- [16] 张丽娟,王晓燕,刘芳.养精种玉加味方治疗肾阴虚型不孕症临床观察[J].中国中医药信息杂志,2021,28(9):116-119.
- [17] 王晓峰,刘艳丽,李红.养精种玉加味方治疗不孕症的作用机制研究进展[J].中西医结合学报,2019,17(6):641-646.
- [18] 李红,刘晓峰.四君子汤化学成分及其药效物质基础研究进展[J].中草药,2019,50(4):937-943.
- [19] 张晓梅,王丽娟,刘晓峰.养精种玉加味方化学成分的研究[J].中草药,2018,49(4):927-931.
- [20] 葛楠,闫广利,孙晖,等.熟地黄药效物质基础研究进展[J].中草药,2023,54(1):292-302.
- [21] 王秋艳,王世新,隋方宇,等.白芍活性成分、药理作用及成分变化的影响因素研究进展[J].中草药,2025,56(5):1817-1829.
- [22] 王佳俊,向世颢,谢治深,等.黄芪化学成分抗纤维化作用及分子机制研究进展[J].中药新药与临床药理,2023,34(12):1799-1805.
- [23] 杨丹阳,于欢,吴晓莹,等.白术化学成分及其生物活性研究进展[J].中华中医药学刊,2023,41(5):171-182.
- [24] WEI W L, ZENG R, GU C M, et al. *Angelica sinensis* in China—a review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016,190:116-141.
- [25] 邵紫君,李志满,于鹏程,等.氨基酸转化三七花中稀有有人参皂苷及提取液对脂多糖诱导的RAW264.7细胞活性的影响[J].中草药,2021,52(3):702-710.
- [26] 严婧,杨盾,郭东卫,等.乌药对大鼠宫腔粘连纤维化的干预作用及其代谢组学分析[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(15):142-151.
- [27] YAO S M, ZHOU Z H, WANG L M, et al. Targeting endometrial inflammation in intrauterine adhesion ameliorates endometrial fibrosis by priming MSCs to secrete C1INH[J]. *iScience*, 2023,26(7):107201.
- [28] LI W X, LI Y R, ZHAO X P, et al. Diagnosis and treatment of cervical incompetence combined with intrauterine adhesions[J]. *Ann Transl Med*, 2020,8(4):54.
- [29] 辜鸿,王佳,张文文,等.GNMT通过TGF- $\beta$ 1/Smad3信号通路抑制宫腔粘连纤维化及其机制研究[J].陆军军医大学学报,2024,46(18):2110-2120.
- [30] 赵芳芳,迟博,李大海,等.桃红四物汤调控NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1/Smad通路抑制宫腔粘连的机制[J].西部医学,2021,33(12):1732-1736.
- [31] 杨大银,杜毅超,谭鹏,等.Hic-5基因敲除对NF- $\kappa$ B/p65表达及CCl4诱导的肝纤维化小鼠模型的影响[J].临床肝胆病杂志,2019,35(11):2483-2488.
- [32] 马秀英,黄娜,杨成,等.六味地黄汤下调NF- $\kappa$ B/NLRP3信号通路抑制HK-2细胞焦亡延缓肾纤维化[J].中药药理与临床,2025,41(1):28-32.
- [33] WILLIAMS L M, GILMORE T D. Looking Down on NF- $\kappa$ B[J]. *Mol Cell Biol*, 2020,40(15):e00104-e00120.
- [34] DOMINO M, JASINSKI T, KAUTZ E, et al. Expression of genes involved in the NF- $\kappa$ B-dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium[J]. *Theriogenology*, 2020,147:18-24.
- [35] HOBBS S, REYNOSO M, GEDDIS A V, et al. LPS-stimulated NF- $\kappa$ B p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages[J]. *Physiol Rep*, 2018,6(21):e13914.

(收稿日期:2025-05-19 编辑:罗英姣)