

文章编号:1005-0957(2025)03-0355-11

• 动物实验 •

针药并用对子宫内膜异位症疼痛大鼠 CLEC5A、NLRP3 和 IL-1 β 表达的影响

胡佳玮¹, 吴楚婷¹, 徐丹丹², 高源¹, 李云翼¹, 李铭旸², 李语然¹, 张春雁^{1,3}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 2. 上海市闵行区梅陇社区卫生服务中心, 上海 201108; 3. 义乌市中医医院, 义乌 322000)

【摘要】 目的 观察针药并用对子宫内膜异位症疼痛大鼠 CLEC5A、NLRP3 和 IL-1 β 表达的影响, 探讨针药并用缓解子宫内膜异位症疼痛的作用机制。**方法** 从 48 只大鼠随机选取 8 只进行假手术作为假手术组, 剩余 40 只进行子宫内膜异位症造模, 模型建立后根据异位囊肿总体积再区组随机分为模型组、布洛芬组、针灸组、中药组和针药组, 每组 8 只。假手术组、模型组固定并给予等量 0.9% 生理盐水灌胃, 布洛芬组固定并给予布洛芬和 0.9% 生理盐水混悬液灌胃, 针灸组给予固定针灸干预, 中药组固定并给予加味没竭片和 0.9% 生理盐水混悬液灌胃, 针药组给予固定针灸和加味没竭片 0.9% 生理盐水混悬液灌胃。造模后和干预后测量并计算子宫内膜异位症大鼠异位囊肿体积, 并测量 6 组大鼠痛阈。干预后检测 6 组内膜组织 C 型凝集素结构域家族 5 成员 A (C-type lectin domain family 5 member A, CLEC5A)、NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3, NLRP3)、白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** 针灸组、针药组干预后异位囊肿体积减少值和痛阈增加值均优于模型组 ($P < 0.05$)。模型组在位及异位内膜组织中 CLEC5A、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平高于正常子宫内膜组织 ($P < 0.05$)。针灸组、针药组在位及异位内膜组织中 CLEC5A 和 NLRP3 蛋白表达水平及异位内膜组织中 IL-1 β 蛋白表达水平低于模型组 ($P < 0.05$), 针灸组在位内膜 IL-1 β 表达显著低于模型组 ($P < 0.05$)。针药组在位内膜组织 CLEC5A 蛋白表达水平低于布洛芬组和中药组 ($P < 0.05$), NLRP3 蛋白表达水平低于布洛芬组 ($P < 0.05$); 异位内膜组织 CLEC5A 蛋白表达水平低于针灸组、布洛芬组和中药组 ($P < 0.05$), NLRP3 蛋白表达水平低于布洛芬组和中药组 ($P < 0.05$), IL-1 β 蛋白表达水平显著低于布洛芬组 ($P < 0.05$)。模型组在位和异位内膜 CLEC5A mRNA 水平高于假手术组子宫内膜 ($P < 0.05$), 模型组在位内膜 IL-1 β mRNA 水平显著高于假手术组子宫内膜 ($P < 0.05$)。布洛芬组、针灸组、中药组和针药组异位内膜 CLEC5A mRNA 水平低于模型组 ($P < 0.05$); 中药组异位内膜 NLRP3、IL-1 β mRNA 水平低于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 针药并用可能通过下调在位及异位内膜组织中 CLEC5A mRNA 及蛋白表达, 调节 NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平, 缩小异位囊肿体积, 提高痛阈, 进而缓解大鼠子宫内膜异位症疼痛。

【关键词】 针药并用; 子宫内膜异位症; 疼痛; C 型凝集素结构域家族 5 成员 A; NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3; 白细胞介素-1 β ; 大鼠

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2025.03.0355

基金项目: 上海市“科技创新行动计划”启明星培育-扬帆专项(22YF1444200); 国家自然科学基金青年项目(82405565); 上海市东方英才计划青年项目; 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项(202240054); 金华市科学技术局重点项目(2024-3-140); 上海市“科技创新行动计划”科技成果转化服务体系建设项目(23ZC2520700); 上海中医药大学“杏林学者”; 上海申康医院发展中心促进市级医院临床技能与临床创新能力三年行动计划项目(SHDC2020CR3093B)

作者简介: 胡佳玮(1997—), 女, 2021 级硕士生, Email:1057739280@qq.com

通信作者: 张春雁(1981—), 女, 主任医师, 博士, Email:zh_ch_yan@163.com

Effects of the combination of acupuncture and medicines on the expression of CLEC5A, NLRP3 and IL-1 β in rats with endometriosis pain HU Jiawei¹, WU Chuting¹, XU Dandan², GAO Yuan¹, LI Yunyi¹, LI Mingyang², LI Yuran¹, ZHANG Chunyan^{1,3}. 1.Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2.Meilong Community Health Center, Minhang District, Shanghai 201108, China; 3.Yiwu Traditional Chinese Medicine Hospital, Yiwu 322000, China

[Abstract] Objective To observe the effects of the combination of acupuncture and medicines on the expression of CLEC5A, NLRP3 and IL-1 β in rats with endometriosis pain, and to explore the mechanism of acupuncture and medicines in relieving endometriosis pain. **Method** Eight rats were randomly selected from 48 rats for sham operation as the sham operation group, and the remaining 40 rats were modeled for endometriosis. After the model was established, according to the total volume of the ectopic cysts, they were randomly divided into the model group, the ibuprofen group, the acupuncture-moxibustion group, the traditional Chinese medicines group, and the acupuncture plus medicines group, with 8 rats in each group. The sham-operated group and model group were fixed and given an equal amount of 0.9% saline by gavage, the ibuprofen group was fixed and given ibuprofen + 0.9% saline by gavage, the acupuncture-moxibustion group was given fixed acupuncture-moxibustion intervention, the traditional Chinese medicines group was fixed and given Jiawei Mojie tablets + 0.9% saline by gavage, and the acupuncture plus medicines group was given fixed acupuncture-moxibustion and Jiawei Mojie tablets + 0.9% saline by gavage. The volume of ectopic cysts in rats with endometriosis was measured and calculated after modeling and intervention, and the pain thresholds of rats in the six groups were measured. The endometrial tissues of the six groups were examined for C-type lectin domain family 5 member A (CLEC5A), NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3), interleukin 1 β (IL-1 β) protein and mRNA expression levels. **Result** The values of volume reduction of ectopic cysts and increase in pain threshold after intervention in the acupuncture-moxibustion and acupuncture plus medicines groups were better than those in the model group ($P < 0.05$). The protein expression levels of CLEC5A, NLRP3, and IL-1 β were higher than those of normal endometrial tissues in both in situ and ectopic endometrial tissues of the model group ($P < 0.05$). The protein expression levels of CLEC5A and NLRP3 in the in situ and ectopic endometrial tissues and IL-1 β in the ectopic endometrial tissues of the acupuncture-moxibustion and acupuncture plus medicines groups were lower than those of the model group ($P < 0.05$), and the expression of IL-1 β in the ectopic endometrium of the acupuncture-moxibustion group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). [The protein expression level of CLEC5A in the situ endothelial tissue of the acupuncture plus medicines group was lower than that of the ibuprofen group and the traditional Chinese medicines group ($P < 0.05$), and NLRP3 of the acupuncture plus medicines group was lower than that of the ibuprofen group ($P < 0.05$).] The protein expression level of CLEC5A in the ectopic endothelial tissue of the acupuncture plus medicines group was lower than that of the acupuncture-moxibustion group, the ibuprofen group and the traditional Chinese medicines group ($P < 0.05$), NLRP3 of the acupuncture plus medicines group was lower than that of the ibuprofen group and the traditional Chinese medicines group, and IL-1 β of the acupuncture plus medicines group was lower than that of the ibuprofen group ($P < 0.05$). The levels of CLEC5A mRNA in the in situ and ectopic endometrium of the model group were higher than those in the endometrium of the sham operation group ($P < 0.05$), and the levels of IL-1 β mRNA in the in situ endometrium of the model group were significantly higher than those in the endometrium of the sham operation group ($P < 0.05$). The level of CLEC5A mRNA in ectopic endometrium of ibuprofen group, acupuncture-moxibustion group, traditional Chinese medicines group and acupuncture plus medicines group was lower than that in the model group ($P < 0.05$); the level of NLRP3 and IL-1 β mRNA in ectopic endometrium of traditional Chinese medicines group was lower than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The combined use of acupuncture and medicines may reduce the

volume of ectopic cysts and increase the pain threshold by down-regulating the expression of CLEC5A mRNA and protein and regulating the expression levels of NLRP3 and IL-1 β protein in the tissues of the in situ and ectopic endometrium, thus alleviating the pain of endometriosis in rats.

[Key words] Acupuncture medication combined; Endometriosis; Pain; C-type lectin structural domain family 5 member A; NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3; Interleukin-1 β ; Rats

子宫内膜异位症(内异症)是指子宫内膜组织(腺体和间质)在子宫腔被覆内膜及子宫以外的部位出现、生长、浸润,反复出血,继而引发疼痛、不孕及结节或包块等^[1]。疼痛是子宫内膜异位症的主要症状之一^[2],疾病所产生的疼痛会严重影响患者的生活质量,同时也会对心理健康造成负面影响,因此疼痛治疗是临床广大患者的主要诉求。

在子宫内膜异位症疼痛治疗上,现代医学主要选择药物或手术作为治疗手段。其中,药物治疗包括口服避孕药、孕激素、非甾体类抗炎药等^[3]。若异位囊肿大小超过手术指征,则考虑以腹腔镜为首选的手术治疗^[4]。然而药物易产生不良反应,如肝肾毒性,消化道反应等,手术治疗价格昂贵且复发率高,需寻求更加安全有效的治疗方式。中医学认为该病属于“经行腹痛”“癥瘕”等范畴,临床上多呈现虚实夹杂、本虚标实的特点,针灸与中药联合互补互用,能更好地发挥中医治疗优势。课题组采用针药并用防治子宫内膜异位症,疗效肯定,能有效预防术后复发^[5-6],动物实验表明其作用机制可能与调控相关因子表达水平有关^[7-9]。课题组从正常子宫内膜、在位内膜和异位内膜组织中的 C 型凝集素结构域家族 5 成员 A(C-type lectin domain family 5 member A, CLEC5A)、NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3, NLRP3)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)蛋白和 mRNA 表达水平角度切入,探索针药并用缓解子宫内膜异位症疼痛的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠 48 只(雌性成熟未交配,经阴道脱落细胞涂片筛选处于同一动情周期)购自斯莱克公司(许可证号 SCXK2018-0040),体质量(180 $\pm$ 20)g。动物饲养于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中心,给予标准光照周期(14 h 光照、10 h

黑暗),室内温度(20 $\pm$ 2)℃,湿度(50 $\pm$ 10)%,标准饲料,高压灭菌垫料和饮水,适应性饲养后进行子宫内膜异位症手术造模。动物实验经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物保护福利伦理委员会审核(动物实验伦理许可号 YYLAC-2023-187)。

1.2 主要试剂

清艾条(国药准字 Z32020253,货号 170707,江苏康美制药有限公司);加味没竭片(沪药制字 Z5050329,货号 2006001,上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院院内制剂);布洛芬缓释胶囊(国药准字 H31022720,货号 72220828,上海信谊天平药业有限公司)。鼠抗 CLEC5A 抗体(货号 Orb-58899,武汉 Biorbyt 公司);鼠抗 NLRP3 抗体(货号 MA5-32255,美国赛默飞世尔科技公司);鼠抗 IL-1 β 抗体(货号 ab283818,美国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶兔抗鼠二抗、缓冲液、DAB 染色剂、高 pH 抗原修复液(货号 20080931、20080321、20077406、20080332,丹麦 Dako Cytomation 公司);Tissue RNA Purification Kit Plus(美国 EZB-bioscience 公司,货号 EZB-RN001-PLUS);Prime Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green Premix Ex Taq[™] II FAST qPCR(货号 RR047A、CN830A,日本 Takara 生物技术公司);CLEC5A、NLRP3、IL-1 β 、Gapdh 扩增引物(中国生工生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

0.22 mm $\times$ 13 mm 毫针(货号 20162270970,苏州医疗用品厂有限公司);Von Frey 电子测痛仪(型号 38450,美国 IITC 公司);组织脱水机、组织包埋机、轮转组织切片机(型号 ASP300S、HISTOCORE Arcadia H、RM2235,德国 Leica 公司);全自动免疫组化染色系统(型号 AUTOSTAINER LINK48,丹麦 Dako 公司);研究级显微镜(型号 BX51,日本 Olympus 株式会社);全自动组织处理器(型号 gentleMACS,德国美天旎生物技术公司);冷冻离心机(型号 5427R,德国 Eppendorf 公司);纳米滴定分光光度计、荧光定量聚合酶反应(PCR)仪(型号 ND-ONE、AB17500,美国赛默飞世尔科技公司);基因扩

增仪(型号 TC96/9/9c, 博日科技有限公司)。

1.4 模型制备与分组

将 48 只大鼠随机分为 8 只进行假手术和 40 只进行子宫内膜异位症造模, 成模后根据异位囊肿总体积将造模大鼠随机分为模型组、布洛芬组、针灸组、中药组和针药组, 每组 8 只。参考文献^[10-11]进行子宫内膜异位症疼痛大鼠造模与模型鉴定。经大鼠经阴道涂片检查, 将处于同 1 个动情周期的大鼠进行手术造模, 造模前 24 h, 大鼠禁食, 不禁水。手术在无菌条件下进行, 大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠(剂量为 40 mg/kg), 根据大鼠体重进行麻醉。大鼠麻醉后固定于手术板上, 腹部剃毛, 乙醇棉球消毒皮肤后, 于腹中线耻骨联合上 1 cm 处, 做 2~3 cm 长的纵行切口, 打开腹腔, 找到右侧子宫角, 结扎局部血管及需切除的子宫段两端, 切下右侧子宫角, 置于 0.9%生理盐水溶液中, 纵行切开并将子宫内膜与肌层分离, 剪成 5 mm×5 mm 的子宫内膜组织片段, 令其上皮对着左侧卵巢、子宫韧带和腹膜, 用缝合线固定, 子宫内膜组织片段缝合完成后, 连续缝合肌肉和表皮, 分层关闭腹腔。假手术组进行假手术, 腹腔注射戊巴比妥钠进行开腹, 开腹方法同上, 将右侧子宫角旁的脂肪组织移植于左侧卵巢、子宫韧带和腹膜, 用缝合线固定, 分层缝合关闭腹腔同上。以手术后常规饲养 28 d 为准, 观察异位囊肿和痛阈进行模型鉴定。开腹观察异位囊肿体积增大, 有血管增生或呈小囊状, 内含清亮液体, 取部分囊肿, 经组织病理学观察见呈现子宫内膜结构, 内膜层薄, 间质排列不规则, 腺管丰富, 血管分布丰富且不均匀, 以确定子宫内膜异位症成模。采用 Von Frey 电子测痛仪测量大鼠痛阈, 与假手术组比, 子宫内膜异位症大鼠痛阈降低, 证实疼痛模型成立。本实验造模成功率为 100%。

1.5 干预方法

确定子宫内膜异位症疼痛模型成立后进行干预。

1.5.1 假手术组

固定并给予等量 0.9%生理盐水灌胃。根据大鼠体重, 按照 10 mL/kg 计算灌胃量。每日 1 次。

1.5.2 模型组

固定并给予等量 0.9%生理盐水灌胃。具体同假手术组。

1.5.3 布洛芬组

固定并给予布洛芬 0.9%生理盐水混悬液灌胃。参考《实验动物学》^[12], 根据成人药物剂量换算布洛芬等

效剂量为 0.25 g/kg, 溶于 0.9%生理盐水配置混悬液。按照 10 mL/kg 计算灌胃量。每日 1 次。

1.5.4 针灸组

固定针灸并给予 0.9%生理盐水灌胃。灌胃同假手术组。大鼠用固定器俯卧位悬空固定, 参考《实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分: 大鼠》^[13]穴位取血海、三阴交和关元。采用 0.22 mm×13 mm 毫针直刺单侧血海和三阴交, 进针深度 2 mm, 每日 1 次。次日换另一侧穴位, 双侧交替治疗。15 mm×20 mm 艾条段在距离关元穴区皮肤 3 cm 处点燃施灸, 每次 10 min, 每日 1 次。

1.5.5 中药组

固定并给予加味没竭片与 0.9%生理盐水混悬液灌胃。参考《实验动物学》^[12], 根据成人药物剂量换算加味没竭片等效剂量为 3.74 mg/kg, 溶于 0.9%生理盐水配置混悬液。按照 10 mL/kg 计算灌胃量。每日 1 次。

1.5.6 针药组

固定针灸并给予加味没竭片与 0.9%生理盐水混悬液灌胃。针灸操作同针灸组。灌胃操作同中药组。

28 d 为 1 个疗程, 共治疗 1 个疗程。

1.6 取材

大鼠麻醉后固定, 皮肤常规消毒后, 于腹部做纵行切口, 打开腹腔。假手术组大鼠取子宫, 其余各组大鼠取子宫、异位囊肿。正常子宫内膜取自假手术组大鼠子宫, 在位内膜取自子宫内膜异位症模型大鼠子宫, 异位内膜取自子宫内膜异位症模型大鼠异位囊肿。部分子宫、异位囊肿放于 10%中性福尔马林以苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、免疫组化(immune-histochemistry, IHC)检测, 部分子宫剥取内膜、异位囊肿去除囊液置于 -80 ℃冰箱冻存, 以备 PCR 实验。

1.7 观察指标

1.7.1 异位囊肿体积

造模后及干预后, 用游标卡尺测量子宫内膜异位症模型大鼠异位囊肿三径, 并采用椭圆球体公式 $V = 0.52 \times d_1 \times d_2 \times d_3$ 计算囊肿体积(V 的单位为 mm^3 ; d_1 、 d_2 、 d_3 为异位囊肿的 3 个相互垂直平面的直径, 单位为 mm)。造模后, 开腹测量异位囊肿大小并关腹, 常规饲养大鼠, 干预后再次测量同一位置的异位囊肿大小。

1.7.2 痛阈

造模后及干预后, 用机械测痛仪测量大鼠对机械刺激的疼痛阈值(痛阈单位为 g)。将大鼠放入测痛架中, 使其熟悉环境约 10 min, 使用测痛仪垂直刺激其后

足底,记录出现缩足反应的数值,测量 1 次后静候 5 min 再次测量,重复 3 次取平均值记为机械痛阈值。

1.7.3 内膜组织 CLEC5A、NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达

置于 10%中性福尔马林溶液中固定的子宫、异位囊肿组织进行免疫组织化学染色,鼠一抗抗体稀释比例为 CLEC5A 1:300,NLRP3 1:300,IL-1 β 1:400。以显示棕黄色染色为阳性。结果采用 Image J 软件进行分析,使用 IHC Profiler 插件^[14],根据染色强度深浅及阳性细胞占比判定阳性强度。染色强度分为 0、1+、2+ 和 3+,估算相应强度所占百分比 0%~100%。染色强度

与阳性面积百分比各项相乘,乘积相加得出评分。

1.7.4 内膜组织 CLEC5A、NLRP3 和 IL-1 β mRNA 表达

置于 - 80 ℃冰箱冻存的子宫、异位囊肿组织,以 Gapdh 为内参基因,进行 RT-qPCR,检测大鼠子宫内膜、在位内膜和异位内膜中 CLEC5A、NLRP3 和 IL-1 β 的 mRNA 表达。引物序列见表 1。引物反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s 循环,共 40 个循环,每组设置两个复孔。根据反应结束后获取的循环阈值(Ct 值),采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 CLEC5A、NLRP3 和 IL-1 β mRNA 表达水平。

表 1 RT-qPCR 反应引物序列

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
CLEC5A	上游:5' -CTTCTCTACCTCTGAATCACCTTGG-3'	221
	下游:5' -TCTGCTCCTGATTGGTAACATTGC-3'	
NLRP3	上游:5' -GTGGATAGGTTTGCTGGGATTCTC-3'	230
	下游:5' -GTCCTGCCAATGGTCAAGAGTTC-3'	
IL-1 β	上游:5' -TCTGTGACTCGTGGGATGATGAC-3'	206
	下游:5' -TTTGTGCTTGCTTGTCTCTCCTTG-3'	
Gapdh	上游:5' -GGTCGGTGTGAACGGATTGG-3'	226
	下游:5' -TCGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'	

1.8 统计学方法

采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布计量资料,以均数±标准差表示,比较采用单因素方差分析,组间差异采用 LSD-*t* 检验;不符合正态分布的计量资料,以中位数(四分位数间距)表示,比较采用秩和检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

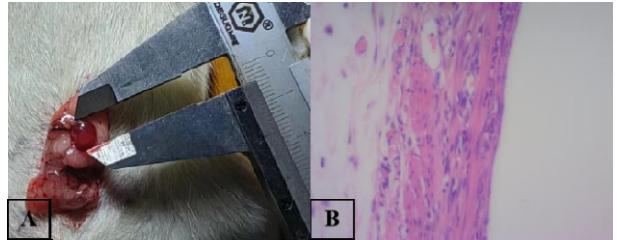
2 结果

2.1 6 组干预前后异位囊肿体积比较

针灸组和针药组干预后异位囊肿体积显著缩小($P<0.05$),针灸组和针药组干预前后异位囊肿体积差值显著大于模型组($P<0.05$),布洛芬组和中药组干预前后异位囊肿体积差值与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 1 和表 2。

2.2 6 组干预前后痛阈比较

针灸组和针药组干预后痛阈显著提高($P<0.05$),针灸组干预前后痛阈差值显著高于假手术组和模型组($P<0.05$),针药组干预前后痛阈差值显著高于假手术组、模型组和布洛芬组($P<0.05$)。详见表 3。



注:A 为异位囊肿三径测量;B 为异位组织病理形态(HE 染色,×400)。

图 1 异位囊肿测量及 HE 染色图片

表 2 6 组干预前后异位囊肿体积比较 [$M(IQR)$]

单位:mm ³				
组别	<i>n</i>	干预前	干预后	差值 (干预后-干预前)
假手术组	8			
模型组	8	17.68(44.33)	6.50(38.09)	-3.64(12.35)
布洛芬组	8	20.02(54.08)	4.16(7.41)	-5.20(49.79)
针灸组	8	30.16(65.65)	4.42(6.24) ¹⁾	-12.48(59.64) ²⁾
中药组	8	8.58(82.94)	2.34(23.08)	-7.02(57.07)
针药组	8	14.30(43.46)	4.16(10.66) ¹⁾	-11.96(37.11) ²⁾

注:与干预前比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ 。

2.3 6组内膜组织 CLEC5A 蛋白和 mRNA 表达水平比较

2.3.1 6组内膜组织 CLEC5A 蛋白表达水平比较

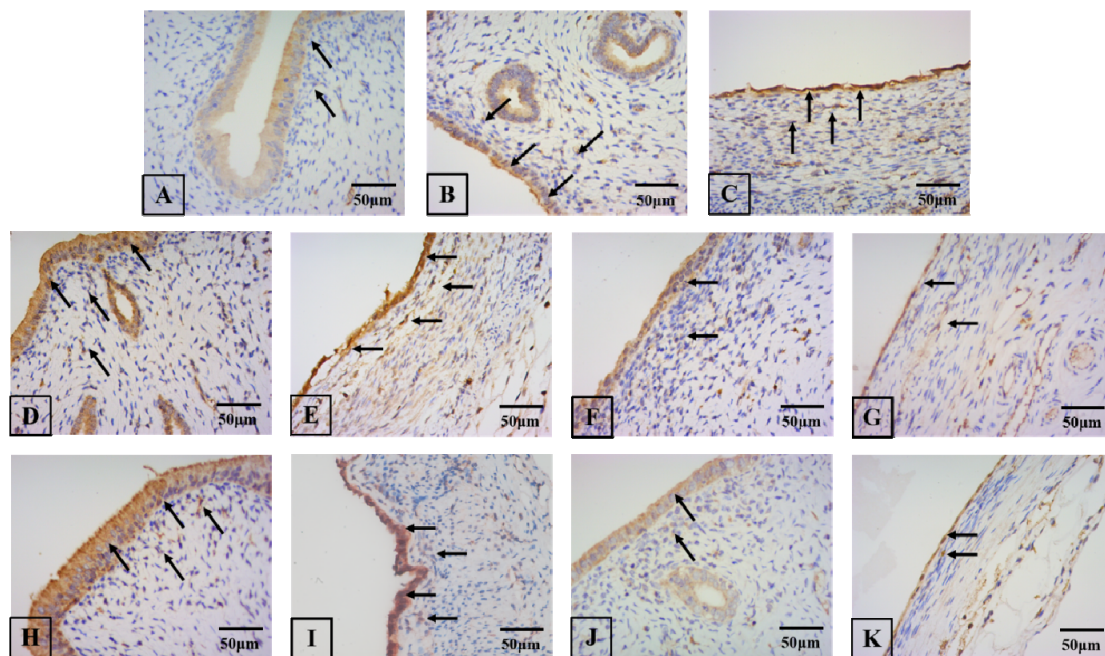
CLEC5A 阳性表达定位于上皮细胞和间质细胞胞质。模型组在位内膜 CLEC5A 蛋白表达水平高于假手术组子宫内膜 ($P<0.05$); 针灸组和针药组在位内膜 CLEC5A 蛋白表达水平低于模型组、布洛芬组和中药组 ($P<0.05$); 布洛芬组和中药组在位内膜 CLEC5A 蛋白表达水平与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。模型组异位内膜 CLEC5A 蛋白表达水平高于假手术组子宫内膜 ($P<0.05$); 布洛芬组、针灸组和针药组异位内膜 CLEC5A 蛋白表达水平低于模型组 ($P<0.05$); 针药组异位内膜 CLEC5A 蛋白表达水平低于布

洛芬组、针灸组和中药组 ($P<0.05$)。详见图 2 和图 3。

表 3 6组干预前后痛阈比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位: g

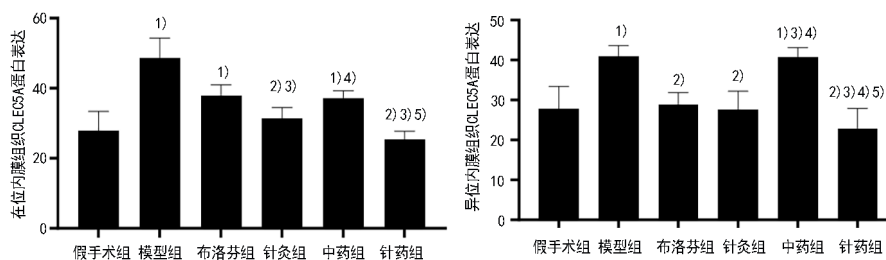
组别	n	干预前	干预后	差值(干预后-干预前)
假手术组	8	48.18 $\pm$ 1.81	48.14 $\pm$ 2.43	-0.03 $\pm$ 3.12
模型组	8	41.28 $\pm$ 1.55	40.36 $\pm$ 2.56	-0.91 $\pm$ 2.17
布洛芬组	8	40.30 $\pm$ 2.08	41.53 $\pm$ 2.65	1.22 $\pm$ 3.18
针灸组	8	40.21 $\pm$ 2.68	42.81 $\pm$ 2.32 ¹⁾	2.60 $\pm$ 2.35 ²⁾³⁾
中药组	8	47.31 $\pm$ 3.09	48.93 $\pm$ 4.62	1.61 $\pm$ 4.77
针药组	8	41.93 $\pm$ 2.79	46.31 $\pm$ 2.60 ¹⁾	4.38 $\pm$ 2.36 ²⁾³⁾⁴⁾

注: 与干预前比较 ¹⁾ $P<0.05$; 与假手术组比较 ²⁾ $P<0.05$; 与模型组比较 ³⁾ $P<0.05$; 与布洛芬组比较 ⁴⁾ $P<0.05$ 。



注: A 假手术组大鼠子宫内膜组织; B 模型组大鼠在位内膜组织; C 模型组大鼠异位内膜组织; D. 布洛芬组大鼠在位内膜组织; E 布洛芬组大鼠异位内膜组织; F 针灸组大鼠在位内膜组织; G 针灸组大鼠异位内膜组织; H 中药组大鼠在位内膜组织; I 中药组大鼠异位内膜组织; J 针药组大鼠在位内膜组织; K 针药组大鼠异位内膜组织。

图 2 6组内膜组织 CLEC5A 蛋白表达水平 (IHC, $\times 400$)



注: 与假手术组比较 ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$; 与布洛芬组比较 ³⁾ $P<0.05$; 与针灸组比较 ⁴⁾ $P<0.05$; 与中药组比较 ⁵⁾ $P<0.05$ 。

图 3 6组内膜组织 CLEC5A 蛋白表达水平比较

2.3.2 6 组内膜组织 CLEC5A mRNA 表达水平比较

模型组在位和异位内膜 CLEC5A mRNA 水平高于假手术组子宫内膜 ($P<0.05$);布洛芬在位内膜 CLEC5A mRNA 水平低于模型组 ($P<0.05$);布洛芬组、针灸组、中药组和针药组异位内膜 CLEC5A mRNA 水平低于模型组 ($P<0.05$)。详见表 4。

2.4 6 组内膜组织 NLRP3 蛋白和 mRNA 表达水平比较

2.4.1 6 组内膜组织 NLRP3 蛋白表达水平比较

NLRP3 阳性表达定位于上皮细胞和间质细胞胞质。模型组、布洛芬组、中药组和针药组在位内膜 NLRP3 蛋白表达水平高于假手术组子宫内膜 ($P<0.05$);针灸组、中药组和针药组在位内膜 NLRP3 蛋白表达水平低于模型组 ($P<0.05$);布洛芬组在位内膜 NLRP3 蛋白表达水平与模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);针灸组、中药组和针药组在位内膜 NLRP3 蛋白表达水平低于布洛芬组 ($P<0.05$)。模型组、布洛芬组和中药组异位内膜 NLRP3 蛋白表达水平高于假手术组子宫内膜 ($P<0.05$);布洛芬组、针灸组和针药组

异位内膜 NLRP3 蛋白表达水平低于模型组 ($P<0.05$);针灸组和针药组异位内膜 NLRP3 蛋白表达水平低于布洛芬组和中药组 ($P<0.05$)。详见图 4 和图 5。

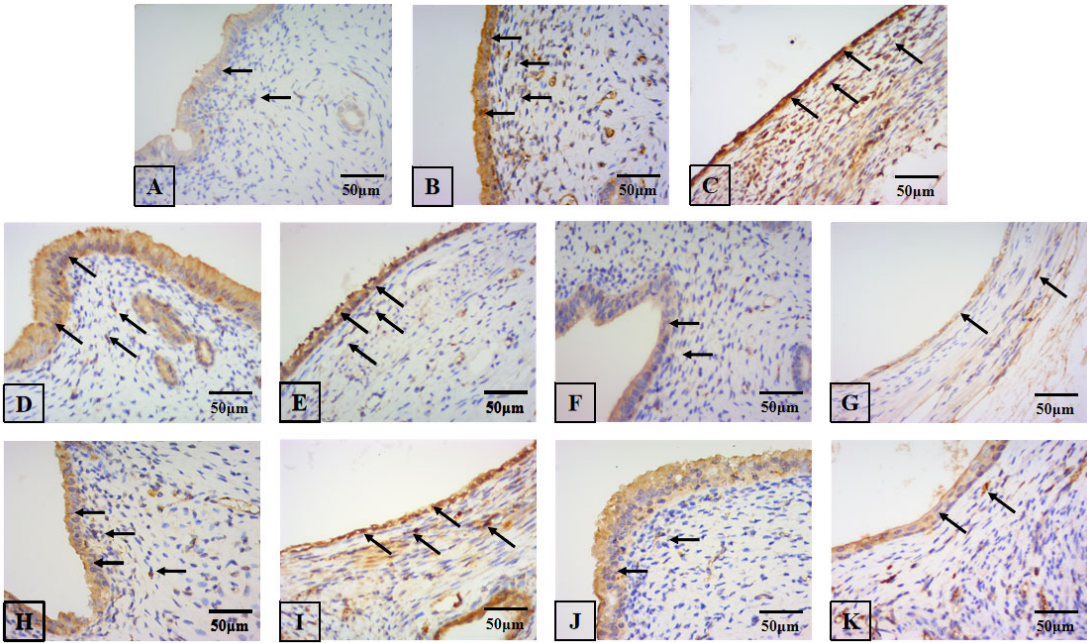
2.4.2 6 组内膜组织 NLRP3 mRNA 表达水平比较

假手术组子宫内膜 NLRP3 mRNA 水平与其余各组在位内膜比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。中药组异位内膜 NLRP3 mRNA 水平显著低于模型组 ($P<0.05$)。详见表 5。

表 4 6 组内膜组织 CLEC5A mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

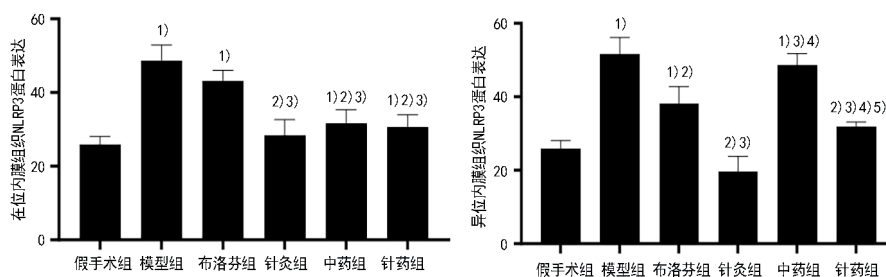
组别	<i>n</i>	子宫内 膜	在位内 膜	异位内 膜
假手术组	8	1.07±0.06		
模型组	8		2.21±0.48 ¹⁾	2.32±0.18 ¹⁾
布洛芬组	8		0.99±0.06 ²⁾	1.22±0.07 ²⁾
针灸组	8		1.49±0.02	0.99±0.06 ²⁾
中药组	8		1.23±0.07	0.66±0.05 ²⁾
针药组	8		1.24±0.01	1.18±0.08 ²⁾

注:与假手术组比较 ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$ 。



注:A 假手术组大鼠子宫内膜组织;B 模型组大鼠在位内膜组织;C 模型组大鼠异位内膜组织;D 布洛芬组大鼠在位内膜组织;E 布洛芬组大鼠异位内膜组织;F 针灸组大鼠在位内膜组织;G 针灸组大鼠异位内膜组织;H 中药组大鼠在位内膜组织;I 中药组大鼠异位内膜组织;J 针药组大鼠在位内膜组织;K 针药组大鼠异位内膜组织。

图 4 6 组内膜组织 NLRP3 蛋白表达水平 (IHC, ×400)



注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与布洛芬组比较³⁾ $P<0.05$;
与针灸组比较⁴⁾ $P<0.05$;与中药组比较⁵⁾ $P<0.05$ 。

图5 6组内膜组织NLRP3蛋白表达水平比较

表5 6组内膜组织NLRP3 mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	子宫内膜	在位内膜	异位内膜
假手术组	8	1.23±0.27		
模型组	8		2.04±0.14	1.46±0.11
布洛芬组	8		1.76±0.22	1.00±0.06
针灸组	8		1.28±0.07	0.88±0.03
中药组	8		1.51±0.09	0.34±0.09 ¹⁾
针药组	8		1.35±0.06	1.23±0.08

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$ 。

2.5 6组内膜组织IL-1 β 蛋白和mRNA表达水平比较

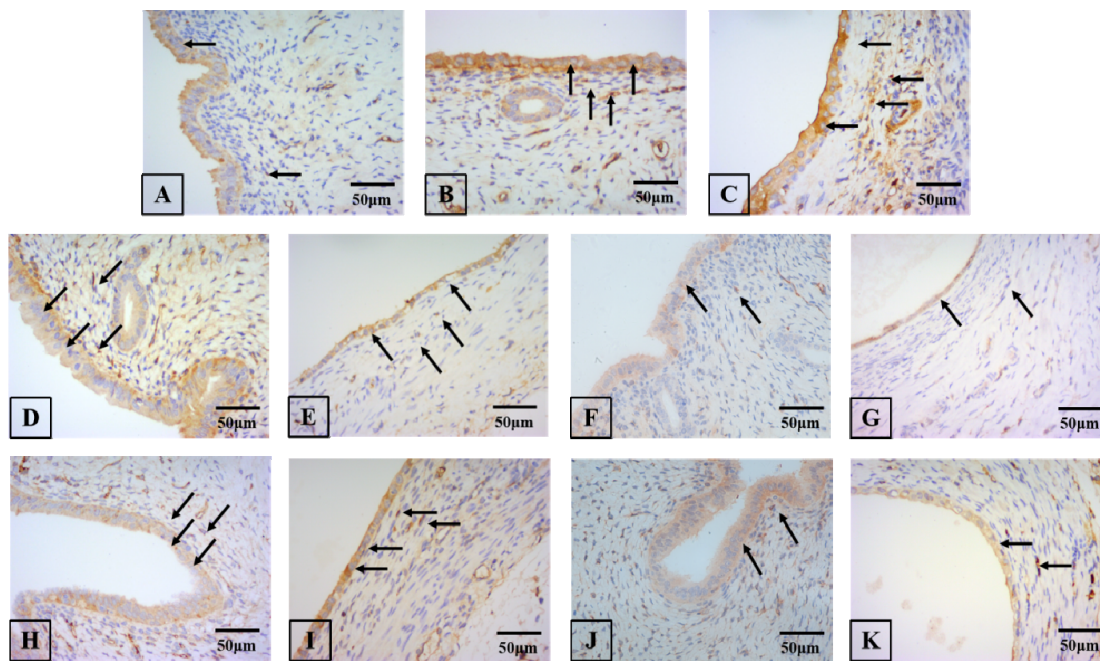
2.5.1 6组内膜组织IL-1 β 蛋白表达水平比较

IL-1 β 阳性表达定位于上皮细胞和间质细胞胞质;

模型组、布洛芬组、中药组和针药组在位内膜IL-1 β 蛋白表达水平高于假手术组子宫内膜($P<0.05$);针灸组在位内膜IL-1 β 蛋白表达水平低于模型组和布洛芬组($P<0.05$)。模型组、布洛芬组异位内膜IL-1 β 蛋白表达水平高于假手术组子宫内膜($P<0.05$);针灸组和针药组异位内膜IL-1 β 蛋白表达水平低于模型组($P<0.05$);针灸组、中药组和针药组异位内膜IL-1 β 蛋白表达水平低于布洛芬组($P<0.05$)。详见图6和图7。

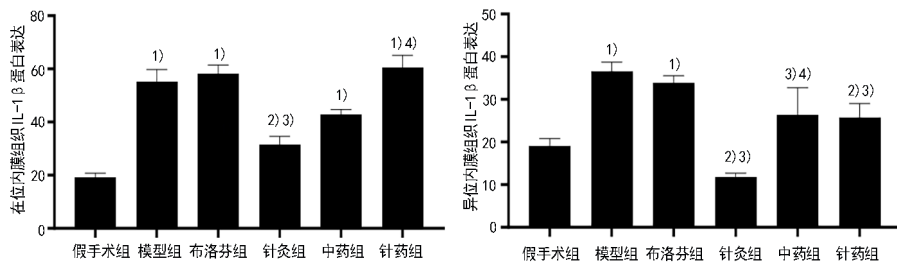
2.5.2 6组内膜组织IL-1 β mRNA表达水平比较

模型组在位内膜IL-1 β mRNA水平显著高于假手术组子宫内膜($P<0.05$)。中药组异位内膜IL-1 β mRNA水平显著低于模型组和针灸组($P<0.05$)。详见表6。



注:A假手术组大鼠子宫内膜组织;B模型组大鼠在位内膜组织;C模型组大鼠异位内膜组织;D布洛芬组大鼠在位内膜组织;E布洛芬组大鼠异位内膜组织;F针灸组大鼠在位内膜组织;G针灸组大鼠异位内膜组织;H中药组大鼠在位内膜组织;I中药组大鼠异位内膜组织;J针药组大鼠在位内膜组织;K针药组大鼠异位内膜组织。

图6 6组内膜组织IL-1 β 蛋白表达(IHC, $\times 400$)



注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与布洛芬组比较³⁾ $P<0.05$;与针灸组比较⁴⁾ $P<0.05$ 。

图 7 6 组内膜组织 IL-1β 蛋白表达水平比较

表 6 6 组内膜组织 IL-1β mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	子宫内膜	在位内膜	异位内膜
假手术组	8	1.06±0.06		
模型组	8		2.60±0.49 ¹⁾	2.00±0.43
布洛芬组	8		1.54±0.38	0.77±0.06
针灸组	8		1.38±0.36	2.00±0.13
中药组	8		1.98±0.38	0.15±0.01 ²⁾³⁾
针药组	8		2.03±0.15	0.93±0.07

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与针灸组比较³⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

目前研究认为子宫内膜异位症疼痛的发病机制与激素^[15]、炎症介质^[16]及神经纤维^[17]相关。近年来,炎症因素受到重视,有研究认为子宫内膜异位症是一种免疫相关的炎症性疾病^[18],其局部病灶炎症反应所产生的疼痛也被称为炎性疼痛^[19]。临床多采用非甾体类抗炎药缓解疼痛,布洛芬是代表药物之一,然而此类药物有耐药性且易产生消化道不适等不良反应。针灸和中药作为中医学最主要的治疗方法在子宫内膜异位症的治疗上具有疗效肯定、不良反应小的优势。

中医学认为子宫内膜异位症引起的疼痛可归为“经行腹痛”“痛经”等范畴,患者通常在月经期疼痛加重,经期结束后疼痛减轻,疼痛的产生与瘀血留滞胞宫、经络涩滞、气血运行不畅及瘀滞不通有关。中国中西医结合学会妇产科专业委员会认为,血瘀是子宫内膜异位症的基本病理基础,贯穿其发生发展的过程^[20]。女性的生理特点是以血为本,以血为用,如果体内血脉运行通畅,则病不得生,但如果“离经之血”不能够正常排出体外,导致瘀血在胞宫阻滞,冲任二脉失调,气血运行不畅,不通则痛^[21]。课题组临床上长期采

用针药并用治疗子宫内膜异位症,有丰富的临床经验和实践基础,通过针药并用能够显著缓解疼痛程度,使患者不再受痛经困扰,提高生存质量,同时临床还发现针药并用能有效预防子宫内膜异位症术后复发,促进不孕症患者受孕。根据临床经验,本研究选用血海、三阴交和关元作为针灸治疗子宫内膜异位症疼痛的主要穴位。血海为足太阴脾经腧穴,具有双向调节作用,补可以益气养血,理血调经;泻可以活血化瘀,疏经止痛。三阴交为足三阴经的交会穴,能够调畅肝、脾、肾三经的气机,行气活血,疏经止痛。关元为足三阴、任脉之会,小肠之募穴,具有培肾固元、活血通经的功效。针灸穴位的作用体现在可以通过调整脏腑经络之气,使胞宫气血运行通畅来缓解子宫内膜异位症疼痛。在针灸的基础上加以加味没竭片,方中以生蒲黄、血竭为君药,破气行滞,活血化瘀;乳香、没药、赤芍、地龙活血散瘀定痛;五灵脂祛瘀止痛;三棱、莪术、土鳖虫共用以达破气行血之功效。针药并用共奏缓解子宫内膜异位症疼痛之功效。

炎症是引起子宫内膜异位症疼痛的因素之一,逆流经血中的子宫内膜碎片可以引起腹腔局部炎症反应,导致炎症介质释放,刺激巨噬细胞活化增殖,分泌各种炎症介质,促进子宫强烈收缩、产生局部炎症、组织坏死纤维化,从而导致疼痛^[22]。诸多炎症介质中 IL-1β 发挥着重要作用,研究表明,子宫内膜异位症患者静脉血中 IL-1β 含量高于正常女性^[23],IL-1β 可以刺激神经生长因子的表达,与子宫内膜异位症疼痛的局部神经发生有关^[24],IL-1β 激活环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 继而催化前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 的合成^[25-26],促进局部巨噬细胞的招募和神经血管生成^[27-28]并与感觉神经元相互作用,导致子宫内膜异位症疼痛。这些研究提示 IL-1β 可能是子宫内膜异位症

炎性疼痛的一个重要指标。本研究结果发现, IL-1 β 蛋白和 mRNA 水平在假手术组大鼠子宫内膜中呈低表达, 而模型组大鼠在位内膜及异位内膜中呈高表达, 与上述报道相一致。中药可下调异位内膜组织中异常高表达的 IL-1 β mRNA 水平, 针灸及针药并用均可下调在位及异位内膜组织中异常高表达的 IL-1 β 蛋白水平。

近年有研究显示, 子宫内膜异位症的发病机制中可能涉及 NLRP3 的激活^[29]。IL-1 β 是 NLRP3 炎症小体下游被激活和分泌的重要促炎细胞因子, NLRP3 炎症小体激活后活化 IL-1 β 前体, 使其成为成熟 IL-1 β , 分泌至胞外, 诱发炎症反应^[30]。NLRP3 激活分泌的 IL-1 β 可能导致子宫内膜异位症疼痛, 所以研究 NLRP3/IL-1 β 信号通路对探索子宫内膜异位症疼痛的机制至关重要。NLRP3 可以通过结合雌激素受体 β (Estrogen receptor β , ER β)促进子宫内膜异位症发生发展^[31], 前期研究亦发现 ER β 在异位组织中异常升高^[9], 可能与调控子宫内膜异位症患者子宫内膜容受性有关, 是导致子宫内膜异位症不孕的发病机制之一^[32]。NLRP3 在子宫内膜异位症病灶水平表达比正常子宫高^[31]。本研究结果发现, NLRP3 蛋白和 mRNA 在假手术组大鼠子宫内膜中呈低表达, 而模型组大鼠在位内膜及异位内膜中呈高表达, 与上述报道相一致。中药可下调异位内膜组织中异常高表达的 NLRP3 mRNA 水平, 针灸及针药并用均可下调在位及异位内膜组织中异常高表达的 NLRP3 蛋白水平。

NLRP3/IL-1 β 信号通路在子宫内膜异位症中因什么而激活继而引起炎症反应不明, 靶向 NLRP3/IL-1 β 信号通路治疗可能是研究的新思路。有研究表明 CLEC5A 和 NLRP3 之间存在正向调控关系, 但 CLEC5A 在子宫内膜异位症中尚无报道。CLEC5A 为 II 型跨膜蛋白, 在多种炎症疾病中发挥着重要作用, 如肺炎^[33]、脑炎^[34]等, 登革病毒诱导的人类巨噬细胞可以通过 CLEC5A 来激活 NLRP3 炎症小体^[35], CLEC5A 敲低后可以通过抑制巨噬细胞极化, 抑制 NLRP3 炎症小体激活预防心功能不全^[36]。本研究结果发现, 子宫内膜异位症中 CLEC5A 蛋白和 mRNA 高表达可能是激活 NLRP3/IL-1 β 信号通路导致疼痛的因素。针灸、中药、针药并用、布洛芬均可下调异位内膜 CLEC5A mRNA, 针灸及针药并用均可下调在位及异位内膜组织中异常高表达的 CLEC5A 蛋白水平, 针药并用下调异位内膜组织中 CLEC5A 蛋白水平作用优于单纯应用针灸、中药。

本研究提示, 针药并用可能通过下调在位及异位内膜组织中 CLEC5A 蛋白及 mRNA 表达水平, 调节 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白水平, 进而达到缩小异位囊肿体积、提高子宫内膜异位症大鼠痛阈的效应。但 NLRP3 和 IL-1 β 是否为 CLEC5A 调控, 他们之间存在怎样的关系, 均有待进一步的后续探究, 以期阐释针药并用缓解子宫内膜异位症疼痛的科学机制。

参考文献

- [1] 中国医师协会妇产科医师分会, 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症诊治指南(第三版)[J]. 中华妇产科杂志, 2021(12):812-824.
- [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(3):193-196.
- [3] 陈竹灵, 程静. 子宫内膜异位症疼痛药物治疗[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019(9):1063-1066.
- [4] 刘平, 马成斌, 劳国颖. 卵巢子宫内膜异位囊肿患者盆腔病灶分布与疼痛、不孕的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2014(1):25-28.
- [5] 张春雁, 张晓云, 李连波, 等. 针药结合预防子宫内膜异位症手术后复发的临床疗效评价[J]. 中国针灸, 2016(3):237-242.
- [6] 张晓云, 张春雁. 针药结合预防子宫内膜异位症腹腔镜手术后复发疗效观察[J]. 中国针灸, 2014(2):139-144.
- [7] 陈云飞, 张春雁, 张晓云, 等. 针药结合对子宫内膜异位症大鼠基质金属蛋白酶-2 的影响[J]. 中国针灸, 2008(9):675-680.
- [8] 张春雁, 张晓云, 李连波, 等. 针药并用对子宫内膜异位症大鼠血管内皮生长因子的影响[J]. 上海针灸杂志, 2014(8):764-768.
- [9] 吴楚婷, 李铭旸, 张晓云, 等. 针药结合调控子宫内膜异位症大鼠内膜组织 ER α 、ER β 的作用[J]. 上海中医药杂志, 2021(11):59-65.
- [10] JONES R C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, a and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat[J]. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1984(2):282-288.
- [11] ALVAREZ P, CHEN X, HENDRICH J, *et al.* Ectopic uterine tissue as a chronic pain generator[J]. *Neuroscience*, 2012:269-282.

- [12] 孙敬方. 实验动物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2021: 356-358.
- [13] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分:大鼠[J]. 针刺研究, 2021(4):351-352.
- [14] VARGHESE F, BUKHARI A B, MALHOTRA R, *et al.* IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples[J]. *PLoS One*, 2014(5):e96801.
- [15] LIANG Y, XIE H, WU J, *et al.* Villainous role of estrogen in macrophage-nerve interaction in endometriosis[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018(1):122.
- [16] WEI Y, LIANG Y, LIN H, *et al.* Autonomic nervous system and inflammation interaction in endometriosis-associated pain[J]. *J Neuroinflammation*, 2020(1):80.
- [17] 罗喜, 黄紫薇, 张伶俐. 子宫内膜异位性疼痛的神经新生机制研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2023(7):1512-1516.
- [18] SURYAWANSHI S, HUANG X, ELISHAEV E, *et al.* Complement pathway is frequently altered in endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014(23):6163-6174.
- [19] 顾永忠, 孙湛博. 子宫内膜异位症相关疼痛机制研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010(10):801-804.
- [20] 子宫内膜异位症中西医结合诊治指南[J]. 中国中西医结合志, 2019(10):1169-1176.
- [21] 李运峰, 陆爱芳, 吴继祖. 治疗子宫内膜异位症痛经经验[J]. 药物与人, 2014(4):234.
- [22] 陈思凯, 郑萍, 冷金花. 子宫内膜异位症相关疼痛的免疫学研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2019(11):828-831.
- [23] 任伟俏, 孙高高, 李晶, 等. 子宫内膜异位症患者血清 CD38、缩宫素、白介素-1 β 表达情况及相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2019(7):1660-1663.
- [24] PENG B, ALOTAIBI F T, SEDIQI S, *et al.* Role of interleukin-1 β in nerve growth factor expression, neurogenesis and deep dyspareunia in endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2020(4):901-912.
- [25] 刘炜, 李江, 李同瑶, 等. 苗药吉祥草含药血清对气道平滑肌细胞增殖及 IL-1 β /COX-2 信号通路的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2023(4):872-876.
- [26] 苏晓华, 宋殿荣, 张崴, 等. 妇痛宁对子宫内膜异位症 COX2-PGE2 作用途径的影响[J]. 天津中医药, 2016(8):481-486.
- [27] YU J, FRANCISCO A, PATEL B G, *et al.* IL-1 β stimulates brain-derived neurotrophic factor production in eutopic endometriosis stromal cell cultures: a model for cytokine regulation of neuroangiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2018(10):2281-2292.
- [28] MIYASHITA M, KOGA K, TAKEUCHI A, *et al.* Expression of nerve injury-induced protein1 (ninj1) in endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2019(8):1105-1110.
- [29] BULLON P, NAVARRO J M. Inflammasome as a key pathogenic mechanism in endometriosis[J]. *Curr Drug Targets*, 2017(9):997-1002.
- [30] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023:301-316.
- [31] HAN S J, JUNG S Y, WU S P, *et al.* Estrogen receptor β modulates apoptosis complexes and the inflammasome to drive the pathogenesis of endometriosis[J]. *Cell*, 2015(4):960-974.
- [32] GRASSO E, GORI S, SOCZEWSKI E, *et al.* Impact of the reticular stress and unfolded protein response on the inflammatory response in endometrial stromal cells[J]. *Sci Rep*, 2018(1):12274.
- [33] SUNG P S, YANG S P, PENG Y C, *et al.* CLEC5A and TLR2 are critical in SARS-CoV-2-induced NET formation and lung inflammation[J]. *J Biomed Sci*, 2022(1):52.
- [34] CHEN S T, LIU R S, WU M F, *et al.* CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality[J]. *PLoS Pathog*, 2012(4):e1002655.
- [35] WU M F, CHEN S T, YANG A H, *et al.* CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages[J]. *Blood*, 2013(1):95-106.
- [36] WANG X, HU Y, WANG Y, *et al.* CLEC5A knockdown protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction by suppressing macrophage polarization, NLRP3 inflammasome activation, and pyroptosis[J]. *Biochem Cell Biol*, 2021(5):655-665.