

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research

当归有效组分对原发性痛经模型小鼠下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴的调控作用研究

Study on the regulatory effect of Angelica sinensis effective components on hypothalamic - pituitary - ovarian axis in primary dysmenorrhea model mice

王瑞琼^{1a,1b}, 王志旺^{1a,1b}, 杜丽东^{1a,1b},
李泉洋^{1a}, 王晓禹^{1a}, 吴国泰^{1a,1b}(1. 甘肃中医药大学, a. 药学院; b. 甘肃省中药
药理与毒理学重点实验室, 甘肃 兰州 730000)WANG Rui - qiong^{1a,1b},
WANG Zhi - wang^{1a,1b},
DU Li - dong^{1a,1b}, LI Quan - yang^{1a},
WANG Xiao - yu^{1a}, WU Guo - tai^{1a,1b}(1. a. College of Pharmacy; b. Key
Laboratory of Pharmacology and
Toxicology for Traditional Chinese
Medicine of Gansu Province, Gansu
University of Traditional Chinese
Medicine, Lanzhou 730000, Gansu
Province, China)基金项目: 国家自然科学基金地区基金资助项
目(81660653); 甘肃省青年博士基金
资助项目(2021QB - 074)作者简介: 王瑞琼(1981 -), 女, 博士, 副教授,
主要从事中药药理与毒理学方面的
研究通信作者: 吴国泰, 副教授, 硕士生导师
Tel: (0931) 5161175
E - mail: wgt@gszy.edu.cn

摘要:目的 基于肿瘤转移抑制基因 Kisspeptin/G 蛋白偶联受体 54 (GPR54) 系统探究当归有效组分对原发性痛经 (PD) 模型小鼠下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴 (HPOA) 的调控作用。方法 采用戊酸雌二醇联合缩宫素建立小鼠原发性痛经模型, 将 72 只雌性未孕 KM 小鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组 (67 mg · kg⁻¹ 布洛芬灌胃给药) 和低、中、高剂量实验组 (分别用 150、300、600 mg · kg⁻¹ 当归有效组分灌胃给药), 每组 12 只。以酶联免疫吸附法测定各组小鼠血清中雌二醇 (E₂)、孕酮 (P) 的含量; 以免疫组化法检测各组小鼠下丘脑 GPR54 蛋白表达水平; 以逆转录聚合酶链反应法检测各组小鼠下丘脑组织中 GPR54 mRNA 水平的表达。结果 正常组、模型组、阳性对照组和低、中、高剂量实验组血清中 E₂ 含量分别为 (23.62 ± 2.26)、(30.29 ± 2.57)、(24.49 ± 2.13)、(29.46 ± 3.68)、(27.04 ± 3.57) 和 (27.15 ± 3.25) pmol · L⁻¹; P 含量分别为 (885.13 ± 78.71)、(522.63 ± 61.33)、(716.96 ± 56.80)、(588.81 ± 81.11)、(591.63 ± 43.69) 和 (634.30 ± 84.96) pmol · L⁻¹; 下丘脑 GPR54 蛋白表达水平分别为 0.17 ± 0.03、0.32 ± 0.04、0.25 ± 0.04、0.26 ± 0.04、0.25 ± 0.05 和 0.21 ± 0.03; GPR54 蛋白表达水平分别为 1.00 ± 0.03、1.46 ± 0.12、1.28 ± 0.09、1.41 ± 0.09、1.36 ± 0.07 和 1.35 ± 0.08。模型组上述指标与正常组比较, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.01); 中、高剂量实验组上述指标与模型组比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.01, P < 0.05)。基因结果的趋势与蛋白一致。结论 当归有效组分可有效防治 PD, 其机制可能与下调下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴 Kisspeptin/GPR54 系统表达有关。

关键词: 当归有效组分; 原发性痛经; 下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴; 肿瘤转移抑制基因; G 蛋白偶联受体 54

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.05.021

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2023)05-0708-05

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of Angelica sinensis effective components on hypothalamic - pituitary - ovarian axis in primary dysmenorrhea model mice based on kisspeptin/GPR54 system.

Methods The mouse model of primary dysmenorrhea was established by estradiol valerate combined with oxytocin. And then the 72 unfertilized female KM mice were randomly divided into the normal group, the model group, positive control group (67 mg · kg⁻¹ ibuprofen irrigation stomach), and experimental - L, - M, - H groups (150, 300, 600 mg · kg⁻¹ Angelica sinensis effective components irrigation stomach), with 12 mice in each group. Enzyme - linked immunosorbent assay was used to measure the levels of E₂, P in serum of mice. Immunohistochemical

method was used to detect the expression levels of GPR54 in hypothalamus. Reverse transcription polymerase chain reaction was also used to detect the expression of *GPR54* mRNA in hypothalamus tissues. **Results** The serum E_2 content in normal group, model group, positive control group and experimental - L, - M, - H groups were (23.62 ± 2.26) , (30.29 ± 2.57) , (24.49 ± 2.13) , (29.46 ± 3.68) , (27.04 ± 3.57) and (27.15 ± 3.25) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; P content were (885.13 ± 78.71) , (522.63 ± 61.33) , (716.96 ± 56.80) , (588.81 ± 81.11) , (591.63 ± 43.69) and (634.30 ± 84.96) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the relative expression of GPR54 protein in hypothalamus tissues were 0.17 ± 0.03 , 0.32 ± 0.04 , 0.25 ± 0.04 , 0.26 ± 0.04 , 0.25 ± 0.05 and 0.21 ± 0.03 , respectively; the relative expression of *GPR54* mRNA in hypothalamus tissues were 1.00 ± 0.03 , 1.46 ± 0.12 , 1.28 ± 0.09 , 1.41 ± 0.09 , 1.36 ± 0.07 and 1.35 ± 0.08 , respectively. Compared with the control group, the above indexes in the model group were all significantly different (all $P < 0.01$); Compared with the model group, the above indexes in the experimental - M, - H groups were all significantly different ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The trend of gene results is consistent with that of protein. **Conclusion** The *Angelica sinensis* effective components can effectively prevention and cure PD, and its mechanism may be related to down regulating the expression of kisspeptin/GPR54 system in hypothalamic - pituitary - ovarian axis.

Key words: *Angelica sinensis* effective components; primary dysmenorrhea; hypothalamic - pituitary - ovarian axis; metastasis suppressor gene; G protein - coupled receptor 54

原发性痛经(primary dysmenorrhea, PD)是青年女性中常见的疾病之一,发病率高^[1]。下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴(hypothalamus - pituitary - ovary axis, HPOA)功能紊乱是引发PD的重要因素^[2],而HPOA功能活动又受肿瘤转移抑制基因 Kisspeptin(Metastasis suppressor gene, Kisspeptin)/G蛋白偶联受体54(G protein - coupled receptor 54, GPR54)系统的调控^[3]。当归为中医妇科调经止痛要药,本课题组前期研究发现当归中低极性组分是缓解平滑肌痉挛与治疗痛经的高效组分^[4]。本研究旨在探究当归效应组分是否通过 Kisspeptin/GPR54 系统对PD模型小鼠HPOA起调控作用。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级雌性未孕昆明种小鼠,体质量18~22 g,购自甘肃中医药大学实验动物中心。动物许可证号:SCXK(甘)2015-0001。本实验方案获得甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号:2016-062)。

药品与试剂 当归药材,购于甘肃省兰州市黄河药材市场,经甘肃中医药大学药用植物鉴定教研室强正泽副教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。戊酸雌二醇片,规格:每片10 mg,批号:576A,批准文号:国药准字 J20080036,法国 DELPHARM Lille S. A. S 公司生产;精氨酸布洛芬片,规格:每片0.4 g,批号:1002812,批准文号:国药准字

H20110028,海南赞邦制药有限公司生产;缩宫素注射液,规格:每支1 mL/10 U,批号:09200102,批准文号:国药准字 H31020850,上海禾丰制药有限公司生产。雌激素(Estradiol, E_2)、孕激素(progesterone, P)酶联免疫吸附试剂盒,均购于江苏菲亚生物科技有限公司;总RNA抽提试剂 Trizol Reagent,购于美国 Invitrogen 公司;聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物,由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司设计并合成;反转录试剂盒,购于上海翊圣公司;荧光定量PCR试剂盒,购于北京全式金生物技术有限公司。

仪器 Benchmark Plus 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司产品;BI-2000 医学图像分析系统,成都泰盟科技有限公司产品;JXFSTPRP-24L 全自动样品快速研磨仪,上海净信公司产品;RS232C 微量核酸测定仪,德国 Eppendorf 公司产品;ABI-9700PCR 扩增仪,美国 Applied biosystems 公司产品;Quantstudio 3 荧光定量PCR仪,美国 Thermofisher 公司产品。

2 实验方法

2.1 当归效应组分的制备^[4]

称取当归粉末2 kg,80%乙醇浸提,减压低温(40℃)回收滤液,石油醚萃取,减压浓缩至浸膏状。石油醚溶解浸膏,硅胶拌样,硅胶柱色谱分离,先后用①1:9乙酸乙酯-石油醚1 500 mL,②4:6乙酸乙酯-石油醚1 000 mL,③乙酸乙酯1 000 mL,④甲醇1 000 mL洗脱,依次得到Fr1, Fr2, Fr3, Fr4洗脱片段。取Fr1段80 g,进行硅胶柱色谱分离纯化,得当归治疗PD效应组分5 g,将该组分用10%吐温-80溶液分别

配制一定的浓度,备用。

2.2 用戊酸雌二醇联合缩宫素法建立小鼠原发性痛经模型^[5-6]

采用灌胃戊酸雌二醇,每日1次,连续4 d(第1次和第4次为 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,第2次和第3次为 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);末次给药30 min后,腹腔注射缩宫素注射液,每只3 U,以复制小鼠原发性痛经模型。以小鼠扭体反应作为行为学评价指标,以精神状况、毛发情况等大体状况作为症状评价指标。

2.3 实验分组与给药^[5,7]

将雌性未孕昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组和低、中、高剂量实验组,每组12只。阳性对照组灌胃布洛芬 $67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,低、中、高剂量实验组分别灌胃 150 、 300 、 $600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 当归效应组分,正常组、模型组灌胃蒸馏水,灌胃体积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每天1次,连续10 d。从第7天起,正常组小鼠常规饲养,其余各组小鼠均进行造模处理。

2.4 一般体征及扭体潜伏期、扭体次数观察^[6-7]

每日观察各组小鼠的精神状态、活动度、毛色情况等。给药第10天,观察注射缩宫素后30 min内各组小鼠扭体反应发生的潜伏期和扭体次数,计算扭体抑制率。扭体反应标准:腹部内凹、躯体扭曲、后肢伸展、臀部抬高、蠕行。扭体反应抑制率=(模型组平均扭体次数-实验组平均扭体次数)/模型组平均扭体次数 $\times 100\%$ 。

2.5 用酶联免疫吸附(enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA)法检测小鼠血清中 E_2 、P水平^[8]

扭体反应指标检测完毕后,各组小鼠股动脉采血 1.5 mL ,室温静置4 h,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,分离血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。按试剂盒说明书,采用ELISA法测定各组小鼠血清中 E_2 、P的含量。

2.6 用免疫组化法检测小鼠下丘脑GPR54蛋白的表达^[9]

取血完毕后,将各组小鼠颈椎脱臼处死,于冰面上快速分离下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织,肉眼观察各组织形态、色泽、质地、活动度、有无水肿等情况。用电子分析天平精密称重并纪录,计算脏器系数,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。脏器系数=脏器重量(g)/体重(g)。

取各组小鼠下丘脑组织,切片后按免疫组化试剂盒操作说明进行染色,以胞浆出现清晰黄棕色或棕褐色为阳性标记。每张切片随机分析5个视野,在400倍镜下采集图像,用BI-2000型医学图像分析系统,

以积分光密度(integral optical density, IOD)值代表蛋白表达水平,并进行半定量分析。IOD值=阳性面积 \times 平均OD值。

2.7 用逆转录聚合酶链反应(Retrieve transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测小鼠下丘脑组织GPR54 mRNA水平^[9]

精密称取各组小鼠下丘脑组织 0.1 g ,采用Trizol法提取总RNA,按试剂盒说明书进行进行逆转录,合成cDNA,用cDNA模板对小鼠GPR54及内参基因 β -actin分别在荧光定量PCR仪上进行PCR扩增。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s 变性, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s 退火, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 延伸,共40个循环。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组目标基因相对表达水平。

3 统计学处理

用SPSS 21.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),2组间均数比较用LSD t 检验。

结 果

1 当归效应组分对PD模型小鼠扭体潜伏期、扭体次数的影响

将小鼠随机分为正常组(正常饲养)、模型组(PD模型)、阳性对照组(灌胃布洛芬 $67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和低、中、高剂量实验组(分别灌胃 150 、 300 、 $600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 当归效应组分)。

模型组与正常组比较,扭体次数显著增多,潜伏期显著缩短,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);中、高剂量实验组与模型组比较,扭体次数显著减少,潜伏期显著延长,差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。提示当归效应组分对PD具有显著的镇痛作用,见表1。

2 当归效应组分对PD模型小鼠血清 E_2 、P水平的影响

与正常组相比,模型组小鼠 E_2 含量显著升高,而P含量显著下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);中、高剂量实验组与模型组比较,小鼠血清 E_2 水平显著下降,P含量显著上升,差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$),见表2。

3 当归效应组分对PD模型小鼠HPOA组织脏器系数的影响

与正常组小鼠比较,模型组小鼠下丘脑、垂体系数差异无统计学意义($P>0.05$),但子宫及卵巢系数明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组相

表 1 当归效应组分对原发性痛经(PD)模型小鼠扭体潜伏期、扭体次数的影响($\bar{x} \pm s$)**Table 1** Effects of Angelica effect components on latent period and writhing times of primary dysmenorrhea (PD) model mice($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose (mg · kg ⁻¹)	n	Latent period(s)	Writhing times(30 min)	Inhibition rate(%)
Normal	—	12	—	—	—
Model	—	12	325.45 ± 20.14	30.58 ± 4.64	—
Positive control	67	12	487.55 ± 57.39 ^{##}	10.87 ± 5.78 ^{##}	64.45
Experimental - L	150	12	328.14 ± 25.97	25.54 ± 5.03 [#]	16.48
Experimental - M	300	12	357.48 ± 42.69 [#]	14.57 ± 5.91 [#]	52.35
Experimental - H	600	12	407.58 ± 47.33 ^{##}	12.74 ± 3.74 ^{##}	58.34

Normal and model groups: Distilled water; Positive control group: 67 mg · kg⁻¹ ibuprofen; Experimental - H, - M, - L groups: 150, 300, 600 mg · kg⁻¹ angelica effector components; Compared with model group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01

表 2 当归效应组分对 PD 模型小鼠血清 E₂、P 水平的影响($\bar{x} \pm s$)**Table 2** Effects of Angelica effect components on levels of E₂ and P of serum in PD model mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	E ₂ (pmol · L ⁻¹)	P (pmol · L ⁻¹)
Normal	23.62 ± 2.26	885.13 ± 78.71
Model	30.29 ± 2.57 ^{**}	522.63 ± 61.33 ^{**}
Positive control	24.49 ± 2.13 ^{##}	716.96 ± 56.80 ^{##}
Experimental - L	29.46 ± 3.68	588.81 ± 81.11 [#]
Experimental - M	27.04 ± 3.57 [#]	591.63 ± 43.69 ^{##}
Experimental - H	27.15 ± 3.25 [#]	634.30 ± 84.96 ^{##}

Dose and n: Refer to table 1; E₂: Estrogen; P: Progesterone; Compared with normal group, ^{**}*P* < 0.01; Compared with model group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01.

表 3 当归效应组分对 PD 模型小鼠 HPOA 组织脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$)**Table 3** Effect of Angelica effect components on organ index of HPOA tissue in PD model mice($\bar{x} \pm s$)

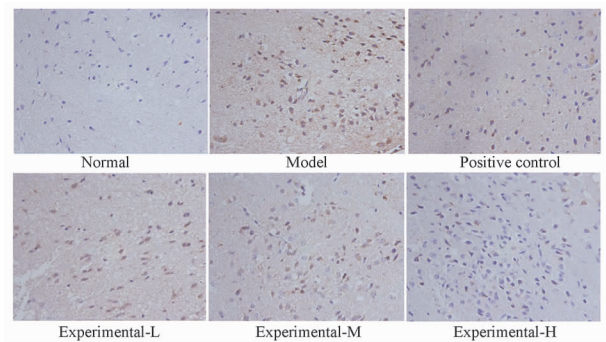
Group	Hypothalamus organ index	Pituitary gland organ index	Ovarian organ index	Uterine organ index
Normal	(0.74 ± 0.09) × 10 ³	(0.06 ± 0.04) × 10 ³	(1.05 ± 0.08) × 10 ³	(4.72 ± 0.33) × 10 ³
Model	(0.82 ± 0.15) × 10 ³	(0.10 ± 0.05) × 10 ³	(1.31 ± 0.10) × 10 ³ ^{**}	(5.46 ± 0.57) × 10 ³ ^{**}
Positive control	(0.81 ± 0.14) × 10 ³	(0.05 ± 0.02) × 10 ³	(1.16 ± 0.06) × 10 ³ ^{##}	(4.95 ± 0.55) × 10 ³ [#]
Experimental - L	(0.67 ± 0.11) × 10 ³	(0.06 ± 0.03) × 10 ³	(1.28 ± 0.08) × 10 ³	(5.35 ± 0.61) × 10 ³
Experimental - M	(0.84 ± 0.14) × 10 ³	(0.05 ± 0.02) × 10 ³	(1.23 ± 0.06) × 10 ³ [#]	(5.24 ± 0.48) × 10 ³
Experimental - H	(0.79 ± 0.08) × 10 ³	(0.06 ± 0.04) × 10 ³	(1.11 ± 0.07) × 10 ³ ^{##}	(4.98 ± 0.49) × 10 ³ [#]

Dose and n: Refer to table 1; HPOA: Hypothalamus - pituitary - ovary axis; Compared with normal group, ^{**}*P* < 0.01; Compared with model group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01.

比,各给药组小鼠下丘脑、垂体系数变化不明显,但卵巢及子宫系数明显降低(*P* < 0.01, *P* < 0.05),以高剂量实验组最为明显,见表 3。

4 当归效应组分对 PD 模型小鼠下丘脑 GPR54 蛋白表达的影响

正常组、模型组、阳性对照组和低、中、高剂量实验组 GPR54 蛋白表达水平分别为 0.17 ± 0.03, 0.32 ± 0.04, 0.25 ± 0.04, 0.26 ± 0.04, 0.25 ± 0.05 和 0.21 ± 0.03。模型组与正常组相比,小鼠下丘脑 GPR54 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义

**图 1** 当归效应组分对 PD 模型小鼠下丘脑组织 GPR54 蛋白表达的影响(×400)**Figure 1** Effect of Angelica effect components on GPR54 expression in hypothalamus tissue of PD model mice (×400)

(*P* < 0.01);与模型组相比,各给药组小鼠下丘脑 GPR54 蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.01, *P* < 0.05),见图 1。

5 当归效应组分对 PD 模型小鼠下丘脑组织中 GPR54 mRNA 水平的影响

正常组、模型组、阳性对照组和低、中、高剂量实验组 GPR54 mRNA 水平分别为 1.00 ± 0.03, 1.46 ± 0.12, 1.28 ± 0.09, 1.41 ± 0.09, 1.36 ± 0.07 和 1.35 ± 0.08。与正常组相比,模型组小鼠下丘脑中 GPR54 mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义

($P < 0.01$);与模型组比较,中、高剂量实验组小鼠下丘脑中 *GPR54* mRNA 表达水平均显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

讨 论

PD 多见于初潮后青春期少女,在行经前后或月经期出现下腹部疼痛、坠胀,伴有腰酸或其他不适,严重时伴有恶心、呕吐、手足冷、甚至晕厥等,严重影响患者的工作和生活^[10]。研究发现下丘脑-垂体-卵巢轴功能紊乱是引发 PD 的重要因素,中医亦认为肾-天癸-冲任-胞宫生殖轴失调是妇科疾病的主要发病机制^[11]。近年来 Kisspeptin/*GPR54* 系统被认为是当前神经内分泌学领域的一个重大突破^[12], *KISS-1*/*GPR54* 系统作用于下丘脑弓状核等部位的神经元, Kisspeptin 与 *GPR54* 耦联引发级联反应,刺激促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经细胞脉冲式分泌 GnRH^[12-13],下丘脑释放的 GnRH 经血液输送到腺垂体与 GnRH 结合,又进而影响垂体分泌 FSH 和 LH,后两者作用于卵巢,使其产生 P 和 E_2 。另一方面, P 和 E_2 又能对 HPOA 轴 *KISS-1*/*GPR54* 系统产生负反馈调节,整个系统动态平衡,形成一种闭合循环^[2,12-13]。痛经期间,机体 P 分泌减少, E_2 分泌增加,导致细胞膜磷脂中的花生四烯酸被释放,通过环氧化酶分解,引发子宫内前列腺素等一系列致痛物质的生成,而痛经引发的 E_2 和 P 分泌紊乱,又导致下丘脑 GnRH 脉冲分泌亢进,形成恶性循环^[2,12-13]。当归作为中医妇科调经止痛的要药,素有“十方九归”之称,常用于治疗月经不调、经闭痛经、血虚眩晕、肠燥便秘等疾病。早期报道当归的水煎液、多糖、挥发油及其制剂等通过抗炎、镇痛、抑制子宫平滑肌等途径,进而发挥治疗原发性痛经的作用^[14],本课题组前期亦研究发现当归中低极性组分是缓解平滑肌痉挛与治疗痛经的高效组分^[4]。

本研究结果显示,当归效应组分能延长模型小鼠扭体发生的潜伏期,抑制扭体反应的发生次数,降低血清 E_2 而升高 P 含量,降低卵巢及子宫系数,降低下丘脑 *GPR54* 蛋白及基因的表达。提示当归效应组分对 PD 具有治疗作用,其机制可

能是通过下调 HPOA 轴 Kisspeptin/*GPR54* 系统相关蛋白及基因的表达,进而抑制 E_2 生成,改善痛经症状。

参考文献:

- [1] 曹如冰,吴国泰,马清林,等. 当归治疗原发性痛经作用机制研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报,2020,37(6):82-85.
- [2] 吴珊,汪蒙蒙,彭代银,等. 桃红四物颗粒对寒凝血瘀痛经大鼠的治疗作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):111-116.
- [3] 王连群,侯芳,周岭,等. Kisspeptin/*GPR54* 信号通路对下丘脑-脑垂体-性腺轴的调节机制[J/OL]. 黑龙江畜牧兽医,2015(7):52-54. 2015-04-10 [2022-08-05]. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/hljxmsy201504013>.
- [4] 刘峰林,任远,赵磊,等. 当归松驰子宫平滑肌活性组分富集片段捕获[J]. 中药药理与临床,2015,31(3):78-82.
- [5] 冉鑫,尹洁,王瑞琼,等. 当归精油对原发性痛经小鼠子宫 $PGF_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、AVP 的影响[J]. 时珍国医国药,2022,33(3):530-532.
- [6] 陈兆恒,任奎羽,李雪梅,等. 不同中医证型原发性痛经动物模型制备及评价的研究进展[J]. 成都中医药大学学报,2020,43(3):52-56.
- [7] 李凤金,雷易朋,李贵森,等. 五加生化胶囊治疗原发性痛经的作用及机制研究[J]. 中药药理与临床,2021,37(5):109-115.
- [8] 赵敏,连小龙,刘景楠,等. 西黄丸对大鼠卵巢相关激素的基因和蛋白表达水平的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(11):1160-1162,1188.
- [9] 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]. 黑龙江 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020.
- [10] 王歌,王瑞琼,魏兴民,等. 甘肃中医药大学女大学生原发性痛经人群中医证型分布情况及自我护理研究[J]. 中医药导报,2021,27(1):175-177,181.
- [11] 黄玲,江媚. 从肾-天癸-冲任-胞宫生殖轴论补肾活血法改善子宫内膜容受性低下[J]. 辽宁中医杂志,2021,48(10):45-48.
- [12] ZHAI L L, ZHAO J B, YING L W, et al. Combined effects of obesity and di-(2-ethylhexyl) phthalate on testosterone levels and kisspeptin/*GPR54* expression in hypothalamus and testes of male mice[J]. J Chin Med Assoc, 2020,83(11):1020-1028.
- [13] 徐瑞,严翊,谢敏豪. 性激素反馈调节下丘脑 ARC 和 AVPV 中 kisspeptin-*GPR54* 信号通路的核团差异[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2018,34(8):810-817.
- [14] 孙敏,刘峰林,任远. 原发性痛经的现代医学认识及治疗研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(7):29-30.

(定稿日期 2022-12-19; 本文编辑 孟海峰)