

加味道遥散对 HPRL 大鼠多巴胺受体 cAMP/PKA 信号转导通路的研究

李燕*, 张鸿雁, 凌晓红
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:探讨以肝脾为核心,运用逍遥散加减方治疗实验性高催乳激素血症(HPRL)模型大鼠下丘脑多巴胺受体环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶 A(PKA)信号转导通路机制的影响。方法:腹腔注射甲氧氯普胺,制作 HPRL 大鼠模型。随机分成 6 组:空白对照组、阴性对照组、阳性对照组(溴隐亭组)、逍遥散加减方高、中、低剂量组。给药 30 d 后,采用免疫组化法测定大鼠下丘脑 PKA 阳性表达的数量;采用酶联免疫的法测定大鼠血清 cAMP 的含量、采用免疫组化法及 RT-PCR 检测大鼠下丘脑多巴胺 D1、D2 受体。结果:与阴性对照组相比较,逍遥散加减各剂量组下丘脑 PKA 活性明显降低($P < 0.01$);下丘脑 cAMP 活性显著降低($P < 0.01$)、下丘脑多巴胺 D1 受体数量有增高趋势、D2 受体数量显著增加($P < 0.01$)。结论:逍遥散加减方对能通过多巴胺受体 cAMP-PKA 信号转导通路调节泌乳素水平。

[关键词] 肝脾;高催乳素血症;多巴胺受体;cAMP-PKA 信号转导通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0167-04

[doi] 10.11653/syjf2014020167

Effect of Xiaoyaosan on Dopamine Receptor cAMP/PKA Signal Transduction Pathway in HPRL Rats

LI Yan*, ZHANG Hong-yan, LING Xiao-hong
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of of Xiaoyaosan on dopamine receptor cyclic adenosine monophosphate (cAMP) /protein kinase A (PKA) signal transduction pathway in hyperprolactinemia (HPRL) rats. **Method:** The metoclopramide was injected to establish the animal model, 48 SD rats were randomized into 6 groups: control group, model group, bromocriptine group, high dose modified Xiaoyaosan group, middle dose modified Xiaoyaosan group, low dose modified Xiaoyaosan group. The intervention period lasted 30 days. The immune histochemistry method to observe expression of PKA, D1R, D2R, ELISA method to observe expression of cAMP, fluorescent quantitative PCR method was used to observe expression of D1R and D2R. **Result:** Compared with the control group, modified Xiaoyaosan groups reduced PKA, cAMP activity ($P < 0.01$); dopamine D2 receptor was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The modified Xiaoyaosan can regulate the PRL level through dopamine receptor cAMP/PKA signal transduction pathway.

[Key words] Ganpi; hyperprolactinemia; dopamine receptors; CAPM/PKA signaling pathway

高催乳素血症是指各种原因引起的外周血浆催

乳素($PRL \geq 25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)升高,临床表现为月经量少、闭经、溢乳不孕等症状的临床综合征^[1],是女性常见的内分泌紊乱疾病之一,严重影响妇女的生育健康,我国近年来发病率出现逐年上升趋势。现代医学运用溴隐亭治疗此病,虽能较快降低催乳激素水平,但有副反应重,易复发的缺陷。本研究根据中医肝脾藏象及经络理论提出以“肝脾”为核心,在以

[收稿日期] 20130412(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260549);贵州省科技局项目(2010 筑科农合同字第 1-社-39 号)

[通讯作者] *李燕,博士,教授,从事中医药对内分泌调控的研究, Tel: 0851-5639497, E-mail: liyan2000315@163.com

疏肝健脾法治疗本病取得满意疗效的基础上,提出“以肝脾为核心靶向干预高催乳激素血症大鼠中枢多巴胺受体信号转导通路机制研究”的假说,拟通过对高催乳激素血症大鼠的实验研究,探讨该病对中枢多巴胺受体信号转导通路的影响及其机制,阐明该法对高催乳激素血症的作用途径,进而丰富高催乳激素血症的病机研究。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 SD 雌性性成熟大鼠 48 只,体重(240 ± 20)g,由重庆第三军医大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(渝) 2007-0003,检疫合格。

高催乳激素血症模型:采用腹腔注射盐酸甲氧氯普胺注射液 50 mg·kg⁻¹,1 次/d,连续 10 d 进行造模^[2-3]。

1.2 药物及试剂 药物:逍遥散加减方制备工艺据文献拟定(按柴胡-生麦芽-白芍-当归-茯苓-白术-炙甘草 15:30:30:20:15:15:10 比例制成生药质量浓度为 2.2 g·mL⁻¹的煎剂)。处方中药材均购于贵阳市同济堂药房,经贵阳中医学院第一附属医院药学专家鉴定,均符合《中国药典》相关项下的规定。甲磺酸溴隐亭片(NovarfismaS Farma SPA,批号 T0131);盐酸甲氧氯普胺注射液(河南润弘制药有限公司,批号 1109221)。

试剂与仪器:两步法免疫组化检测试剂盒、DAB 显色剂、PBS 缓冲液(均为武汉博士德生物工程有限公司提供);环磷酸腺苷(cAMP)试剂盒(BIOVALUE 50R-E. 1288);ELX800 型酶标仪(Biotek 公司);TRIzol、逆转录试剂盒购于 TaKaRa 公司;荧光定量引物由 invitrogen 公司合成;荧光定量试剂盒购于 Fermentas 公司;Real-time 用 96 孔板及膜购于 Bio-Rad 公司;ABI Prism 7300 型荧光定量 PCR 仪;图像分析系统(Image-pro plus 6.0)。

1.3 分组与给药 采用 SAS 统计软件 proc plan 过程对实验动物进行完全随机化分组,将 48 只动物进行随机编号,分为 6 组,每组 8 只,无脱失。正常对照组:2~3 月龄的性成熟雌性大鼠;阳性对照组(溴隐亭组),用生理盐水按体重配成悬浊液灌胃,按 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹给药,相当于成人剂量的 10 倍,灌胃 30 d。加味逍遥散高剂量组按 55 g·kg⁻¹·d⁻¹给药,相当于成人剂量的 20 倍;加味逍遥散中剂量组按 27.5 g·kg⁻¹·d⁻¹给药,相当于成人剂量的 10 倍;加味逍遥散低剂量组按 13.75 g·kg⁻¹·d⁻¹给药,相当于成人剂量的 5 倍,中药组均灌胃 30 d,末次灌胃后 24 h 断头处死大鼠。

1.4 组织标本的采集与处理方法

1.4.1 下丘脑蛋白激酶 A(PKA)阳性表达 大鼠断头后迅速将取出的大脑浸入 4% 甲醛液中固定 24 h,梯度脱水,切片(5 μm),每组取 8 只动物,每只动物间隔取片,每个指标取 3 张;采用两步免疫法、DAB 染色、复染,封片;在光镜下观察每张切片的阳性表达面积的积分吸光度,常规设立阴性对照模型,以细胞质膜呈棕黄色颗粒为阳性。

1.4.2 大鼠血清 cAMP 测定 按酶联免疫试剂盒步骤进行。

1.4.3 下丘脑多巴胺 D1, D2 受体测定

1.4.3.1 引物设计 D1R, Forward: 5' GCTGCCA GCGTCATGGTATT 3', Reverse: 5'-CCAGGACATT-GAGGACAAGGAG-3'; D2R, Forward: 5'-TATGT-CAACAGTGCCGTC AAC-3', Reverse: 5'-GGCAT-CGAGCCAAGCTAACA-3'

1.4.3.2 步骤 用 TRIzol 抽提组织总 RNA,加入 0.2 mL 氯仿混匀,4 度 12 000 r·min⁻¹离心,加入等体积异丙醇,混匀后静置,离心弃上清液,用 1 mL 75% 乙醇洗沉淀,离心弃上清,风干,适量 DEPC 水溶解;-80 °C 保存待用。依据 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)试剂盒操作完成 cDNA 合成;依据 Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 ×)(Fermentas)操作检测相对表达量。用软件 DataAssist[™] v3.0 Software(ABI)以 2^{-ΔΔCt}方法来对结果进行分析。ΔΔCt = (Ct 实验组 - Ct 对照组)目的基因 - (Ct 实验组 - Ct 对照组)内参基因。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 软件 17.0 统计处理,计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 下丘脑组织 PKA 测定 结果见表 1。与空白组相比较,阴性对照组下丘脑 PKA 活性明显升高($P < 0.01$);阳性对照组下丘脑 PKA 活性明显升高($P < 0.01$);逍遥散加减高剂量组下丘脑 PKA 活性降低($P < 0.01$),逍遥散加减方中、低剂量组下丘脑 PKA 活性明显升高($P < 0.01$);与阴性对照组相比较,阳性对照组、逍遥散加减高、中、低剂量组下丘脑 PKA 活性明显降低($P < 0.01$);与阳性对照组比较,逍遥散加减高、中剂量组下丘脑 PKA 活性明显降低($P < 0.01$);与逍遥散加减方高剂量组相比较,中、低剂量组下丘脑 PKA 活性明显升高($P < 0.01$);与逍遥散加减方中剂量组比较,低剂量组下丘脑 PKA 活性明显升高($P < 0.01$)。中药各剂量组之间存在量效关系。

表 1 逍遥散加减小鼠脑组织中 PKA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	PKA
空白	-	0.30 ± 0.001
阴性	-	0.46 ± 0.015 ¹⁾
溴隐亭	1×10^{-3}	0.36 ± 0.003 ^{1,2)}
逍遥散加减	55	0.17 ± 0.002 ^{1,2,3)}
	27.5	0.33 ± 0.018 ^{1,2,3,4)}
	13.75	0.36 ± 0.002 ^{1,2,4,5)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与阴性对照组比较²⁾ $P < 0.01$;与溴隐亭组比较³⁾ $P < 0.01$;与逍遥散加减小剂量组比较⁴⁾ $P < 0.01$;与逍遥散加减小剂量组比较⁵⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 酶联免疫法测定大鼠血清 cAMP 结果见表 2。与空白组相比较,阴性对照组、溴隐亭组下丘脑 cAMP 活性明显升高, ($P < 0.01$);与阴性对照组相比较,溴隐亭组、逍遥散加减小、中、低剂量下丘脑 cAMP 活性明显降低, ($P < 0.01$);与阳性对照组相比较,逍遥散加减小、中、低剂量组下丘脑 cAMP 活性明显升高, ($P < 0.01$);与逍遥散加减小高剂量组相比较,低剂量组下丘脑 cAMP 活性升高 ($P < 0.05$)。

表 2 逍遥散加减小鼠血清 cAMP 水平的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	cAMP
空白	-	1.05 ± 0.104
阴性	-	1.32 ± 0.159 ¹⁾
溴隐亭	1×10^{-3}	0.89 ± 0.016 ^{1,2)}
逍遥散加减	55	0.97 ± 0.058 ²⁾
	27.5	1.061 ± 0.67 ^{2,3)}
	13.75	1.10 ± 0.136 ^{2,3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与阴性对照组比较²⁾ $P < 0.01$;与溴隐亭组比较³⁾ $P < 0.01$;与逍遥散加减小剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 下丘脑多巴胺 D1, D2 受体荧光定量 PCR 检测与阴性对照组比较,溴隐亭组、逍遥散加减小高、中、低剂量组使下丘脑多巴胺 D1, D2 受体数量有增加趋势。见表 3。

表 3 荧光定量 PCR 检测 D1R、D2R mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	D1R mRNA	D2R mRNA
空白	-	0.20 ± 0.093	0.27 ± 0.27
阴性	-	0.09 ± 0.042	0.11 ± 0.06 ¹⁾
溴隐亭	1×10^{-3}	0.17 ± 0.156	0.20 ± 0.16
逍遥散加减	55	0.17 ± 0.096	0.18 ± 0.16
	27.5	0.14 ± 0.130	0.10 ± 0.06 ¹⁾
	13.75	0.13 ± 0.075	0.08 ± 0.10 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.4 下丘脑组织 D1, D2 受体免疫组化测定与空白组相比较,阴性对照组下丘脑多巴胺 D1 受体数量降低 ($P < 0.01$);溴隐亭 D1 受体数量减少;逍遥散加减小剂量组、中剂量组、低剂量组 D1 受体数量减少 ($P < 0.05$);与阴性对照组相比较,溴隐亭组 D1 受体数量增加 ($P < 0.05$);逍遥散加减小剂量组、中剂量组、低剂量组 D1 受体数量有增加趋势。见表 4。

表 4 逍遥散加减小鼠脑组织中 D1R、D2R 表达的情况比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	D1 受体	D2 受体
空白	-	0.40 ± 0.078	0.47 ± 0.05
阴性	-	0.29 ± 0.074 ¹⁾	0.28 ± 0.06 ¹⁾
溴隐亭	1×10^{-3}	0.37 ± 0.073 ⁴⁾	0.57 ± 0.08 ^{1,3)}
逍遥散加减	55	0.33 ± 0.057 ²⁾	0.53 ± 0.05 ^{2,3)}
	27.5	0.32 ± 0.019 ²⁾	0.41 ± 0.05 ^{2,3,5,6)}
	13.75	0.32 ± 0.069 ²⁾	0.32 ± 0.02 ^{1,5,6,7)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与阴性对照组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$;与溴隐亭组比较⁵⁾ $P < 0.01$;与逍遥散加减小剂量组比较⁶⁾ $P < 0.01$;与逍遥散加减小剂量组比较⁷⁾ $P < 0.01$ 。

与空白组相比较,阴性对照组 D2 受体数量显著减少 ($P < 0.01$);溴隐亭 D2 受体数量明显增加 ($P < 0.01$);逍遥散加减小、中剂量组 D2 受体数量增加 ($P < 0.05$);低剂量组 D2 受体数量明显下降 ($P < 0.01$);与阴性对照组相比较,溴隐亭组、逍遥散加减小剂量组、中剂量组 D2 受体数量明显增加, ($P < 0.01$),低剂量组 D2 受体数量有增加趋势;与溴隐亭组比较,逍遥散加减小高剂量组 D2 受体数量无差异性,中、低剂量组 D2 受体数量明显降低 ($P < 0.01$);与逍遥散加减小高剂量组相比较,中、低剂量组 D2 受体数量显著降低 ($P < 0.01$);与逍遥散加减小中剂量组比较,低剂量组 D2 受体数量显著降低 ($P < 0.01$)。中药各剂量组之间存在量效关系。

3 讨论

高催乳素血症系指由内外因素引起的,以月经紊乱或闭经、溢乳、无排卵等为特征的综合征,属中医头痛、头晕、闭经、月经不调、乳溢、不孕等范畴。清代王旭高医案云“……乳房属胃,乳汁血之所化,无孩子而乳房膨胀,亦下乳汁,非血之有余,乃不循其道为月水,反随肝气上入乳房,变为乳汁……”。

中医学认为,乳房属阳明胃经,乳头属厥阴肝经^[4]。根据中医藏象经络理论,脾胃同属中焦、互

为表里,在经络循行上相互络属。经血、乳汁同源源于脾胃,其排出溢泻有赖于肝气调达,疏泄有度。肝喜条达而恶抑郁,如情志不遂,肝郁气滞,疏泄失常,气血逆乱,气血不能下归冲任而为月经,反随肝气上逆化为乳汁则出现闭经、泌乳等情况^[5]。故高催乳激素血症与肝脾关系密切,治疗上当以肝脾为核心。肝为木气,全赖土以资培,水以灌溉,土虚不能升木,血少不能养肝,故以经方逍遥散加减肝脾同调,平和气血,使木郁则达之,血循常道。方中柴胡为君药,疏肝解郁,使肝气得条达,其味苦性平、归经、入肝、胆经,能发表、疏肝、解郁、升阳;当归:味辛、甘,性温,归心、肝、脾经,《汤液本草》中所说:“当归,入手少阴,以其心主血也;入足厥阴,以其肝藏血也”。当归乃血中之气药,即可以养血活血,还能理气,血充足则肝柔、味甘则缓急;白芍酸苦微寒,养血和营、柔肝缓急、敛阴平肝;当归和白芍相配伍,共为臣药,柔肝缓急、充养肝血,还能制约柴胡对肝气的疏泄太过;白术、茯苓能健脾益气、脾健运而气血生化有源;炙甘草补中益气、柔肝缓急,为本方中佐使药,炙甘草还可助柴胡疏肝解郁。方中用白芍配伍甘草,可疏肝柔肝。生麦芽性甘,味平,归脾、胃经,能够行气、健脾、退乳消胀,使用小剂量可消食化滞,疏肝解郁而催乳,大剂量消散之力强,耗散气血而回乳。综观全方,逍遥散是调和肝脾的名方,此配伍气血兼顾、肝脾同调、补肝体助肝用,方药全面、用药周全。本研究拟以肝脾为核心对高催乳激素血症模型大鼠展开实验研究,探讨该病对模型动物下丘脑多巴胺受体及其通路的影响及中医药治疗的作用机制和靶点。

泌乳素是由垂体前叶泌乳素细胞所分泌,用于维持 PRL 泌乳的一种肽类激素^[6]。垂体 PRL 的分泌主要受下丘脑的神经内分泌和外周激素的调节,下丘脑对 PRL 的分泌起抑制作用,多巴胺是主要的生理性的 PRL 抑制素^[7],多巴胺(dopamine, DA)是目前认为下丘脑分泌的最主要且作用最强的 PIF,但不是唯一的 PIF^[8]。DR 为 7 个跨膜区域组成的 G 蛋白偶联受体家族^[9]。多巴胺受体通路中, cAMP-PKA 通路是其受体通路中的经典通路。该途径通过细胞信号转导作用,促使下丘脑泌乳素分泌减少,从而起到治疗本病的作用。该通路中 cAMP, PKA 是两个重要的中间环节。D1 类受体和 D2 类受体对 cAMP-PKA 通路的表达有相反的作用。他们能够与 G 蛋白偶联发挥作用,其中 D1 类受体正性调控环磷酸腺苷(cAMP)的水平^[10]。D1 类受体

与 Gs 蛋白偶联,被激活的 Gs 蛋白再激活细胞膜上的腺苷酸环化酶(AC),催化 ATP 脱去一个焦磷酸而生成 cAMP,生成的 cAMP 作为第二信使通过激活 PKA^[11],并通过第 34 位苏氨酸残基磷酸化,产生 PP-1 的底物,发挥生物学效应。D2 类受体的作用正好与之相反,与 Gi 蛋白偶联,发挥负性的作用,使得下丘脑 cAMP 含量减少,抑制 PKA 产生,对 DRPP32 起到去磷酸化,PP-2B 能够活化神经钙蛋白,发挥生物作用。D2 类受体普遍抑制腺苷酸环化酶活动,使细胞内蛋白质磷酸化水平降低,以至 PRL 分泌减少。

综上所述,在对巴胺受体 cAMP/PKA 信号转导通路的实验研究中,逍遥散加减高、中、低治疗组血清 cAMP 水平降低,逍遥散加减高、中、低治疗组 PKA 活性降低。在多巴胺受体通路中的中间反应物质同时含量降低,所以笔者认为,在下丘脑多巴胺受体 cAMP-PKA 转导通路中,逍遥散加减方以选择性 D2 受体通路为主。

[参考文献]

- [1] 李续俊. 妇产科内分泌治疗学[M]. 北京:人民军医出版社,2005:252.
- [2] 伊鸿鹏,夏雷. 抑乳颗粒对高泌乳素血症大鼠性发育影响及其机制[J]. 山东医药,2008,48(29):42.
- [3] 彭晓佳,李燕. 高催乳激素血症动物模型机制探讨[J]. 中医研究,2012,25(2):47.
- [4] 周威,张恩景,高铁祥. 大麦芽提取物治疗实验性高泌乳素血症的研究[J]. 湖北中医杂志,2008,30(10):10.
- [5] 刘福珍,李燕. 加味逍遥散治疗高泌乳素血症 30 例[J]. 光明中医,2008,23(11):1688.
- [6] 吴晶. 催乳素的作用探讨[J]. 中国误诊学杂志,2007,14(7):3200.
- [7] 汤忠华. 高泌乳素血症的中西医认识及治疗进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(5):1266.
- [8] 吕淑兰,曹缙孙. 催乳素的分子结构及分泌调节机制[J]. 实用妇产科杂志,2007,23(2):65.
- [9] 镇学初,张海. 多巴胺受体新型信号转导通路及其在脑机能调节中的意义[J]. 咸宁学院学报,2005,19(6):449.
- [10] 李凡,舒斯云,包新民. 多巴胺受体的结构和功能[J]. 中国神经科学杂志,2003,19(6):405.
- [11] 邓海临,李大鹏. 高等植物及藻类植物中 cAMP 研究进展[J]. 海洋科学,2011,8(8):95.

[责任编辑 邹晓翠]