

逍遥散加减对高泌乳素血症模型大鼠中枢多巴胺受体 ERK 信号转导通路的影响

许露¹, 李燕^{2*}, 张芳², 陈婧²

(1. 六安市中医院, 安徽 六安 237000;

2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:**以疏肝健脾为核心,运用逍遥散加减治疗高泌乳素血症(HPRL)模型大鼠,探讨逍遥散加减对 HPRL 大鼠模型中多巴胺受体细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号转导通路的作用机制。**方法:**96只SD雌性大鼠,随机分为正常组、模型组,溴隐亭组(0.001 g·kg⁻¹),逍遥散加减高、中、低剂量组(60, 30, 15 g·kg⁻¹),多巴胺第一受体(D1R)拮抗剂组(SCH23390组, SCH23390+逍遥散加减中剂量组, SCH23390+溴隐亭组),多巴胺第二受体(D2R)拮抗剂组(氟哌啶醇组, 氟哌啶醇组+逍遥散加减中剂量组, 氟哌啶醇组+溴隐亭组)。采用垂体移植法制作HPRL大鼠模型,给药30d后,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠下丘脑癌蛋白 Ras, Raf 蛋白的表达;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠下丘脑丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)激酶 1/2(MEK1/2)mRNA, 细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)mRNA 的表达;采用电镜观察卵巢颗粒细胞超微结构。**结果:**与正常组比较,模型组 Ras, Raf 蛋白, MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达显著降低($P < 0.01$);运用 SCH23390 拮抗 D1R 后,与模型组比较, SCH23390 组 Ras, Raf 蛋白, MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达有升高趋势,运用氟哌啶醇拮抗 D2R 后,与模型组比较,氟哌啶醇组 Ras, Raf 蛋白表达有下降趋势, MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达显著下降($P < 0.01$);运用逍遥散加减治疗后,能显著提高 Ras, Raf 蛋白, MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达($P < 0.01$),且逍遥散加减高、中剂量组表达增加最明显($P < 0.01$),效果优于溴隐亭组。电镜下模型组卵巢颗粒细胞形态及线粒体数量、结构异常,运用逍遥散加减治疗后,颗粒细胞形态和线粒体结构趋于正常。**结论:**逍遥散加减通过激动 D2R,抑制 D1R,调节 ERK/MAPK 信号通路,并有效改善卵巢颗粒细胞线粒体功能,促进卵泡发育,说明逍遥散加减治疗 HPRL 是多靶点的作用机制。

[关键词] 高泌乳素血症;疏肝健脾法;细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路;作用机制

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0070-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191640

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190505.0956.023.html>

[网络出版时间] 2019-05-08 15:00

Effect of Modified Xiaoyaosan on ERK Signal Transduction Pathway of Dopamine Receptor Model Rats with Hyperprolactinemia

XU Lu¹, LI Yan^{2*}, ZHANG Fang², CHEN Jing²

(1. Traditional Chinese Hospital of Liuan, Liuan 237000, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of modified Xiaoyaosan on extracellular regulated protein kinase (ERK) signal transduction pathway of central dopamine receptor in hyperprolactinemia (HPRL) model rats by treating them with Shugan Jianpi as the core. **Method:** The 96 SD female rats were randomly divided into normal group, model group, Bromocriptine group (0.001 g·kg⁻¹), modified Xiaoyaosan high, medium and

[收稿日期] 20181220(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260549)

[第一作者] 许露, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合妇科的研究, E-mail: 1013231194@qq.com

[通信作者] *李燕, 博士, 主任医师, 教授, 从事中医药对女性生殖轴调控机制的研究, E-mail: 987570074@qq.com

low dose group (60, 30, 15 g·kg⁻¹), dopamine D1 receptor (D1R) antagonist group (SCH23390, SCH23390 + modified Xiaoyaosan group, SCH23390 + bromocriptine group), dopamine D2 receptor (D2R) antagonist group (haloperidol group, haloperidol + modified Xiaoyaosan group, haloperidol + bromocriptine group). HPRL rat model was established by pituitary transplantation. After 30 days of administration, renin-angiotensin system Ras and Raf protein expressions in thypothalamus of rats were detected by Western blot, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase 1/2 (MEK1/2) mRNA and extracellular signaling regulates kinase 1/2 (ERK1/2) mRNA expressions in the hypothalamus of rats were detected by Real-time PCR. The microstructures of mitochondria in ovarian granulosa cells were observed by electron microscopy. **Result:** The Ras, Raf protein, MEK1/2 and ERK1/2 mRNA expression were significantly decreased in model group compared with normal group ($P < 0.01$). After SCH23390 antagonistic DIR was applied, Ras, Raf pprotein, MEK1/2 and ERK1/2 mRNA expression in SCH23390 group showed an increased trend compared with model group, and when haloperidol was used to antagonistic D2R, Ras and Raf expression in haloperidol group showed a decreased trend compared with model group, and MEK1/2 and ERK1/2 mRNA expression significantly decreased ($P < 0.01$). The expression of Ras, Raf protein, MEK1/2 and ERK1/2 mRNA was significantly increased after using modified Xiaoyaosan ($P < 0.01$), and the expression was significantly increased in the high and medium-dose groups of prescription ($P < 0.01$). The effect was better than that of bromocriptine group. The morphology of granulosa cells and the number and structure of mitochondria in model group were abnormal under electron microscope. After treatment with modified Xiaoyaosan, the morphology and structure of granulosa cells tended to be normal. **Conclusion:** Modified Xiaoyaosan stimulates D2R, inhibits D1R, regulates ERK/MAPK signaling pathway. It also effectively improve the mitochondrial function of ovarian granulosa cells and promote follicular development. It is suggested that the modified Xiaoyaosan with a multi-target mechanism in treating HPRL.

[**Key words**] hyperprolactinemia; Shugan Jianpi method; extracellularregulated protein kinase (ERK) signaling pathway; mechanism of action

高泌乳素血症 (HPRL) 是指各种原因所导致血清泌乳素 (PRL) 含量增多的一种病理状态, 临床主要表现为女性月经周期、经期及经量的紊乱、异常泌乳、不孕、性功能改变^[1]、生殖器萎缩, 严重者致骨质疏松^[2], 普通人群中患病率为 0.4%, 在生殖功能障碍患者中占 9% ~ 17%^[3]。有学者对苏格兰泰赛地区进行 HPRL 流行病学调查显示, 该病的发病率由 1993 年的 0.02% 上升到 2013 年的 0.23%, 其中 IH 占总发病率的 15%^[4]。随着该病发病率的逐年上升, 已严重影响女性生理、心理及生殖健康。现代医学运用多巴胺受体激动剂治疗此病, 以溴隐亭为首选药物, 虽能较快降低 PRL 水平, 但其缺点亦不能忽视, 如出现较重的副作用、停药后复发率较高等。HPRL 作为一种生殖轴功能失调的疑难疾病, 其病因病机主要在周围和中枢 2 个方面。逍遥散加减由出自《太平惠民和剂局方》的逍遥散加减而来, 前期本课题组研究证实, 逍遥散加减方作用于 HPRL 模型大鼠外周循环时, 能促进颗粒细胞增殖, 降低颗粒细胞凋亡指数^[5-6], 调节卵巢间隙连接蛋白的表达^[7], 增加周围血中卵泡刺激素受

体的表达量^[8], 进而促进卵泡的发育, 改善卵巢的功能。逍遥散加减方作用于 HPRL 模型大鼠中枢神经系统时能增加下丘脑 D2R 数量, 调节腺苷酸环化酶机制^[9], 改变下丘脑多巴胺 (DA) 的功能, 降低血清 PRL 水平。但目前对中枢作用机制的研究尚未完全清楚。在下丘脑多巴胺受体 (DR) 信号通路中丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 激酶 (MEK) 通路控制着细胞多种重要的生理过程, 如细胞的生长、发育、分裂、死亡等, 而癌蛋白 Ras/Raf/MEK/细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号通路参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、自噬等功能, 是 MAPK 信号通路中一条重要通路, 故本项目以中医藏象和经络理论结合为指导, 在临床运用疏肝健脾法治疗 HPRL 疗效满意的基础上, 提出了以“疏肝健脾法”为核心对多巴胺 Ras/Raf/MEK 通路的干预研究, 从蛋白表达、基因水平、颗粒细胞微结构改变等不同层次研究多巴胺 Ras/Raf/ERK/MEK 通路的调控机制来验证假说, 探讨中枢多巴胺调控机制对 HPRL 的影响, 明确“疏肝健脾”法治疗本病的作用途径。

1 材料

1.1 动物 96 只 SPF 级雌性 SD 大鼠, 2~3 月龄, 体质量(220 ± 20) g, 购自重庆第三军医大学动物实验中心, 合格证号 SCXK(军)2012-0003。本实验获得贵阳中医学院第一附属医院科研伦理委员会批准, 批准号 K2012004。

1.2 药物 逍遥散加减由炒麦芽 30 g, 当归 30 g, 北柴胡 15 g, 白芍 20 g, 茯苓 15 g, 白术 15 g, 炙甘草 10 g 等组成, 饮片均由同仁堂提供, 经贵州省中医院药学专家潘定举副主任药师鉴定, 依据 2015 年版《中国药典》, 均为正品。根据传统中药煎煮方法, 在药材加入适量蒸馏水, 浸泡 30 min, 大火烧开, 小火煎 30 min, 过滤药液, 在药渣继续加入蒸馏水, 按上述方法再煎煮 2 次。混合 3 份药液, 浓缩制成质量浓度为 2 200 g·L⁻¹ 的汤剂, 放置于 4 °C 冰箱内保存备用。甲磺酸溴隐亭片(意大利 Novartis Farma S. p. A 公司, 进口药品注册号 H20100353, 批号 TIA393A); 氟哌啶醇(湖南洞庭药业股份有限公司, 批号 H43020555); SCH23390(美国 Sigma 公司, CAS 号 125941-87-9, 批号 D054)。

1.3 试剂 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus), ROX plus, PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser, DL2 000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司, 批号分别为 RR820A, RR82LR, RR047B, 3427Q); DAB 显示液(上海长岛生物技术有限公司, 批号 GK800511); trizol 总 RNA 提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司, 批号 DP405-02]; RIPA Lysis Buffer (Strong), 蛋白酶抑制剂, BCA 蛋白定量试剂盒, SDS-PAGE loading buffer, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, ECL 高灵敏度化学发光检测试剂盒, 一步法快速(HRP)试剂盒(鼠)(北京康为世纪公司, 批号分别为 01408, 60345, 30324, 50346, 20335, 30330, 30324); 预染蛋白 Maker(美国 Thermo 公司, 批号 00459134); Ras 抗体, Raf1 抗体, β -肌动蛋白(β -actin) 抗体, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab52939, ab137435, ab179467, ab6721); 醋酸双氧铀(美国 Spi-Chem 公司, 批号 02624-AB); 柠檬酸铅(北京海德创业生物有限公司, 批号 HD17800)。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)引物序列由北京 Invitrogen 公司设计合成, 引物序列见表 1。

1.4 仪器 164-5050 型电泳仪, Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System 型蛋白电泳槽, Mini-

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'~3')	长度/bp
MEK1/2	上游 ACTCTGCGATTTTGGGGTCA	186
	下游 TCAGGAGGAGGAATGGGGTA	
ERK1/2	上游 CCAGAGTGCTATCAAGAAG	123
	下游 GGATGTCTCGGATGCCTA	

Trans-Blot 型蛋白转印系统(美国 Bio-Rad 公司); Centrifuge 5415D 型离心机(德国艾本德股份公司); 202-2AB 型电热恒温箱(天津泰斯特仪器有限公司); RS-25S 型超声波细胞粉碎机(宁波荣顺科技仪器有限公司); TY-80 型脱色摇床(江苏金坛宏华仪器厂); ZS-2 板式酶标仪(北京新风机电有限公司); ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Centrifuge 5415D 型 Eppendorf 离心机(北京伯乐生命科学发展有限公司); JSM-6490 型扫描电镜(日本电子株式会社); PPT-A + 100 型电子天平(美国康州 HZ 电子科技有限公司); MLS-3750-SV 型高压蒸汽灭菌锅(日本三洋公司)。

2 方法

2.1 造模 本实验采用垂体移植术进行造模^[10-12]。取 184 只大鼠予普通饮食进行适应性喂养 3 d, 随后选取 88 只与供体鼠同窝的大鼠作为受体鼠, 以 4% 水合氯醛麻醉, 备皮, 消毒, 暴露肾脏, 取供体鼠脑垂体, 置入肾包膜内, 缝合, 予青霉素预防感染, 继续进行普通饮食喂养 18 d, 此时模型大鼠血清 PRL 水平下降最为明显, 双侧卵巢育不良卵泡数量明显增多、成熟卵泡数量明显减少, 造模完成^[13]。

2.2 分组及给药 取 SD 雌性大鼠 96 只, 将未进行造模的 8 只大鼠定为正常组, 造模后的 88 只大鼠随机分成 11 组, 分别为模型组, 溴隐亭组, 逍遥散加减高、中、低剂量组, SCH23390 组, SCH23390 + 逍遥散加减中剂量组, SCH23390 + 溴隐亭组, 氟哌啶醇组, 氟哌啶醇 + 逍遥散加减中剂量组, 氟哌啶醇 + 溴隐亭组, 每组 8 只, 并各自予以对应处理; 前期实验研究证明, SCH23390 和氟哌啶醇剂量为 0.001 g·kg⁻¹·d⁻¹ 时, 对 DR 抑制效果最优^[14]。将氟哌啶醇注射液及 SCH23390 分别用生理盐水稀释至 1 g·L⁻¹, 分别以腹腔注射方式给药。溴隐亭组剂量为 0.001 g·kg⁻¹·d⁻¹, 将溴隐亭研磨至粉, 加入 0.9% 生理盐水制成溴隐亭悬浮液; 根据人与大鼠换算公式换算逍遥散加减各组的剂量^[15], 逍遥散加减高、中、低剂量分别为 60, 30, 15 g·kg⁻¹·d⁻¹。分别

以灌胃方式给药,腹腔注射与灌胃间隔 30 min。

2.3 标本采集 治疗 30 d 后,按以下方式采集标本:检查模型大鼠移植垂体,选择有血供的模型大鼠,在大鼠枕骨大孔处使用剪刀剪断大鼠头部,在冰块上快速打开大鼠颅腔,取出脑组织,仔细分离出下丘脑,置于去酶离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于检测。断头后迅速将卵巢取出,用于电镜观察。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测模型动物下丘脑 Ras, Raf 蛋白的表达 取冷冻下丘脑组织块于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的匀浆缓冲液中匀浆, $1\text{ 万 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液作为样品。电泳,转膜,取出膜,切条备用。将有蛋白标准的条带染色、脱色,至背景清晰,洗涤,风干保存,留作对比。把转膜后的蛋白膜用 Western 洗涤液 25 mL 洗 5 min,置膜于 25 mL 封闭液中 1 h, TBS 15 mL 洗 3 次,每次 5 min,分别加入 Ras (1 : 1 000), Raf (1 : 1 000) 一抗, β -actin (1 : 2 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h,缓慢摇动。TBS 15 mL 洗 3 次,共 15 min,加入稀释度为 1 : 2 000 的 IgG,室温孵育 1 h,缓慢摇动。TBS 15 mL 洗 3 次,每次 5 min,加入显色液,避光显色。使用 Gel-Pro analyzer 4 图像分析软件读取灰度值并统计分析。

2.5 Real-time PCR 法检测大鼠下丘脑 MEK1/2, ERK1/2 mRNA 的表达 提取大鼠下丘脑 RNA,紫外吸收法测定浓度及纯度,变性琼脂糖凝胶电泳测定(制胶、准备 RNA 样品、电泳、紫外透射光下观察并拍照);按逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。cDNA 产物分别用 MEK1/2, ERK1/2 mRNA 的 PCR 引物,反应体系用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus), ROX plus 进行扩增。扩增程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, 45 个循环。溶解曲线从 $60\sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$,记录并分析结果,反应结束后确认 Real-time PCR 的扩增曲线和融解曲线。根据相应公式计算出 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值。

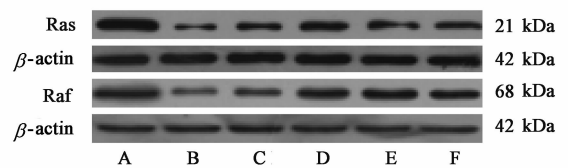
2.6 电镜观测该法对卵巢颗粒细胞超微结构的影响 将从活体刚取下的卵巢立即投入预冷的 2.5% 戊二醛中,将组织修成 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 大小长条形,厚度 $< 0.1\text{ }\mu\text{m}$ 的超薄切片。在 $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 2.5% 戊二醛固定液中固定 3 h, PBS 洗 3 次,每次 10 min,梯度乙醇脱水,在培养皿中放入经石蜡浸过的滤纸,滴入醋酸铀,将捞有切片的载网置于染液上染 20 min,再将载网置于柠檬酸铅染液上,染 10 min,用 H_2O_2 洗切片、吸干,放入干净的培养皿内备用,打开扫描电镜,待真空度达到要求;样品室放

气,打开样品室装入切片,按下“VENT”进行抽真空;待真空准备好后,开高压即可观察样品,调节聚焦、亮度、对比度、放大倍数等,得到合适的放大图像,拍照保存。

2.7 统计学方法 运用 SPSS 20.0 软件统计,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 One-way ANOVA 方差分析,两组间比较采用 LSD 及 S-N-K 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不运用拮抗剂组,逍遥散加减对 HPRL 大鼠下丘脑 ERK 通路的影响 与正常组比较,模型组大鼠 Ras, Raf 蛋白及 MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,溴隐亭组及逍遥散加减高、中、低剂量组 Ras, Raf 蛋白及 MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),逍遥散加减高、中剂量组表达增加最明显;与溴隐亭组比较,逍遥散加减中、高剂量组 MEK1/2, ERK1/2 mRNA 显著升高 ($P < 0.01$)。见图 1,表 2。



A. 空白组; B. 模型组; C. 逍遥散加减低剂量组; D. 逍遥散加减中剂量组; E. 逍遥散加减高剂量组; F. 溴隐亭组(图 4 同)

图 1 不使用拮抗剂,各治疗组大鼠下丘脑 Ras, Raf 蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of protein expressions of Ras and Raf in hypothalamus of rats in each treatment group without using antagonists

3.2 使用 D1R 拮抗剂,逍遥散加减对 HPRL 大鼠下丘脑 ERK 通路的影响 运用 SCH23390 拮抗 DIR 后,与模型组比较, SCH23390 组 Ras, Raf 蛋白及 MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$);与 SCH23390 组比较, SCH23390 + 溴隐亭组及 SCH23390 + 逍遥散加减中剂量组 Ras, Raf 蛋白及 MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$),与 SCH23390 + 溴隐亭组比较, SCH23390 + 逍遥散加减中剂量组 ERK1/2 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见图 2,表 3。

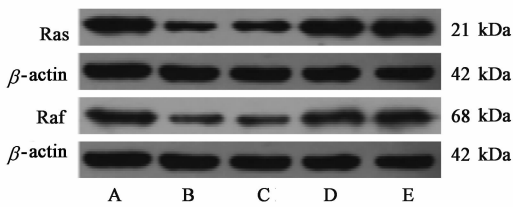
3.3 运用 D2R 拮抗剂,逍遥散加减对 HPRL 大鼠 ERK 通路的影响 运用氟哌啶醇拮抗 D2R 后,与模型组比较,氟哌啶醇组 Ras, Raf 蛋白表达有下降趋势, MEK1/2, ERK1/2 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$);与氟哌啶醇组比较,氟哌啶醇 + 溴隐亭组及

表 2 逍遥散加减对 HPRL 大鼠下丘脑 ERK 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of modified Xiaoyaosan on ERK pathway in hypothalamus of HPRL rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ras/ β -actin	Raf/ β -actin	MEK1/2 mRNA	ERK1/2 mRNA
正常	-	1.243 ± 0.708	2.366 ± 0.982	1.853 ± 0.200	1.976 ± 0.142
模型	-	0.095 ± 0.116 ¹⁾	0.459 ± 0.247 ¹⁾	0.904 ± 0.155 ¹⁾	0.966 ± 0.182 ¹⁾
溴隐亭	0.001	0.506 ± 0.345	1.055 ± 0.746	1.291 ± 0.124 ⁴⁾	1.229 ± 0.163 ⁴⁾
逍遥散加减	60	0.991 ± 0.706 ^{3,4)}	1.644 ± 1.058 ³⁾	1.836 ± 0.123 ^{3,5)}	1.927 ± 0.195 ^{3,5)}
	30	0.729 ± 0.467 ²⁾	1.499 ± 0.666 ³⁾	1.701 ± 0.143 ^{3,5)}	1.720 ± 0.137 ³⁾
	15	0.253 ± 0.170	0.609 ± 0.274	1.201 ± 0.133 ³⁾	1.280 ± 0.092 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与溴隐亭组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组; B. 模型组; C. SCH23390 组; D. SCH23390 + 逍遥散加减中剂量组; E. SCH23390 + 溴隐亭组 (图 3 同)

图 2 拮抗 D1R, 各治疗组大鼠下丘脑 Ras, Raf 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of Ras and Raf in hypothalamus of rats in each treatment group with using antagonistic D1R

表 3 拮抗 DIR 后逍遥散加减对 HPRL 大鼠下丘脑 ERK 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of modified Xiaoyaosan on ERK pathway in hypothalamus of HPRL rats with using antagonistic DIR ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ras/ β -actin	Raf/ β -actin	MEK1/2 mRNA	ERK1/2 mRNA
正常	-	1.334 ± 0.579	2.433 ± 2.374	1.853 ± 0.200	1.976 ± 0.142
模型	-	0.334 ± 0.246 ¹⁾	0.578 ± 0.733 ¹⁾	0.904 ± 0.155 ¹⁾	0.966 ± 0.182 ¹⁾
SCH23390	0.001	0.553 ± 0.447 ²⁾	0.645 ± 0.816 ²⁾	1.156 ± 0.100 ²⁾	1.097 ± 0.105 ²⁾
SCH23390 + 逍遥散加减中剂量	0.001 + 30	1.266 ± 0.730 ^{2,3)}	2.413 ± 2.404 ^{2,3)}	1.559 ± 0.115 ^{2,3)}	1.680 ± 0.185 ^{2,3,4)}
SCH23390 + 溴隐亭	0.001 + 0.001	1.105 ± 0.445 ^{2,3)}	1.944 ± 2.107 ^{2,3)}	1.403 ± 0.189 ^{2,3)}	1.404 ± 0.149 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与 SCH23390 组比较³⁾ $P < 0.01$;与 SCH23390 + 溴隐亭组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

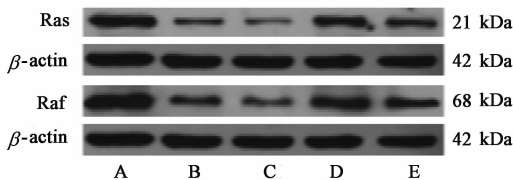


图 3 拮抗 D2R, 各治疗组大鼠下丘脑 Ras, Raf 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of Ras and Raf in hypothalamus of rats in each treatment group with using antagonistic D2R

细胞器清晰可见, 线粒体数量较正常组减少。逍遥散加减低剂量组颗粒细胞形态较差, 细胞核核膜皱缩, 核形不整、核增大、染色质凝聚、细胞核固缩, 细

胞器减少; 胞质内线粒体数量明显减少, 体积轻度肿胀。模型组的颗粒细胞形态差, 细胞核核膜内陷, 核形不整, 核增大、染色质高度凝聚、边缘化, 细胞核固缩, 细胞器减少; 胞质内线粒体数量明显减少, 体积增大, 细胞内见大量脂肪聚集。见图 4。

3.4 对大鼠卵巢颗粒细胞超微结构的影响 电镜下见正常组和逍遥散加减高剂量组的颗粒细胞的超微结构完整, 形态规则, 细胞核和细胞质密度均匀, 细胞浆内有较多滑面内质网, 无扩张现象, 可见大量线粒体, 形态规则。逍遥散加减中剂量组及溴隐亭组次之, 细胞核形态欠规则, 细胞质密度均匀, 各类

胞器减少; 胞质内线粒体数量明显减少, 体积轻度肿胀。模型组的颗粒细胞形态差, 细胞核核膜内陷, 核形不整, 核增大、染色质高度凝聚、边缘化, 细胞核固缩, 细胞器减少; 胞质内线粒体数量明显减少, 体积增大, 细胞内见大量脂肪聚集。见图 4。

4 讨论

据古籍记载, 高泌乳素血症可归于“闭经”“溢乳”“不孕”“月经不调”等范畴。明·武之望在《济阴纲目》乳病门中提出:“有未产前乳汁出者谓之乳泣, 生子都不育, 经带尚未论及……肝脾郁怒用加味归脾汤。”对于未产前出现乳溢的现象分析, 认为是肝脾郁怒, 当从肝脾论治。中医理论提出乳房属胃,

表 4 拮抗 D2R 后逍遥散加减对 HPRL 大鼠下丘脑 ERK 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of modified Xiaoyaosan on ERK pathway in hypothalamus of HPRL rats with using antagonistic D2R ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ras/ β -actin	Raf/ β -actin	MEK1/2 mRNA	ERK1/2 mRNA
正常	-	1.038 ± 0.529	1.656 ± 1.087	1.853 ± 0.200	1.976 ± 0.142
模型	-	0.420 ± 0.338 ¹⁾	0.521 ± 0.596 ¹⁾	0.904 ± 0.155 ¹⁾	0.966 ± 0.182 ¹⁾
氟哌啶醇	0.001	0.211 ± 0.171	0.380 ± 0.386	0.588 ± 0.123 ²⁾	0.722 ± 0.163 ²⁾
氟哌啶醇 + 逍遥散加减中剂量	0.001 + 30	0.853 ± 0.540 ^{2,3)}	1.500 ± 1.024 ^{2,3)}	1.373 ± 0.215 ^{2,3,4)}	1.438 ± 0.156 ^{2,3,4)}
氟哌啶醇 + 溴隐亭	0.001 + 0.001	0.658 ± 0.365 ^{2,3)}	1.276 ± 1.074 ^{2,3)}	1.067 ± 0.101 ^{2,3)}	1.202 ± 0.110 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与氟哌啶醇组比较³⁾ $P < 0.01$;与氟哌啶醇 + 溴隐亭组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

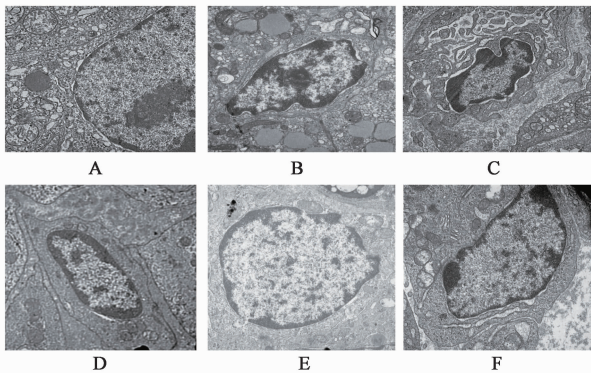


图 4 逍遥散加减方对模型动物卵巢颗粒细胞超微结构的影响 (电镜扫描, $\times 3000$)

Fig. 4 Effect of modified Xiaoyaosan on ultrastructure of ovarian granular cells in model rats (TEM, $\times 3000$)

乳头属肝,结合清代王旭高认为闭经溢乳当责之于肝气上逆,又与阳明经关系密切,因此肝气郁脾虚穿着本病的始终。国医大师刘尚义认为:“木土相依,肝脾平和,气机轮转,清浊复位”是月经病诊疗的中心思想。肝为藏血之脏,喜条达,恶抑郁;若情志不舒,肝木失于条达,气机逆乱,以致肝郁血虚,因足厥阴肝经走胁肋,故出现胸胁胀痛,久之郁而化火,火炎其上,故经血逆行;肝木既病,易传脾土,出现肝郁脾弱,脾为后天之本,气血生化之源,故多表现为闭经、月经不调、乳房胀痛、溢乳等,当治以疏肝解郁,养血健脾^[16]。前期研究证明逍遥散加减方能有效降低模型大鼠 PRL 的水平,故本课题组在结合前期研究基础上选择该方为基础方,深入探究该方在下丘脑多巴胺信号通路上的作用机制。方中北柴胡辛开苦降,调畅肝气;重用生麦芽以健脾和胃、回乳消胀,与柴胡配伍,能增强疏肝解郁之效,共为君药。当归补血养肝平肝、活血调经,芍药养血敛阴,柔肝平肝,归、芍与柴胡共用补肝体而助肝用,使血和则肝和,血充则肝柔。“见肝病,则知肝传脾”,故以“健脾第一要药”的白术配伍茯苓实土以御木侮,甘草味甘性微寒,补益脾气,柔肝缓急。全方能将调达

肝气与健脾养血并驾齐驱,回乳消胀,肝脾同调,可达使气血平和、血不外溢而循常道之目的。

PRL 是由垂体前叶的 PRL 细胞分泌的一种肽类激素^[17],其分泌主要受到下丘脑泌乳素释放抑制因子(PIF)和泌乳素释放因子(PRF)的调节。其中 PIF 占主导地位,目前 PIF 以 DA 为主^[18],DA 是一种儿茶酚胺类神经递质,通过 4 条神经通路发挥其生理作用。目前研究发现其主要通过其中两条通路对 PRL 发挥抑制作用,即结节垂体束和结节漏斗多巴胺能系统。这两条通路均位于下丘脑弓状核。DR 是一种由 7 种跨膜区域组成的 GTP 结合蛋白耦联受体家族,当 DA 与 DR 结合后,方能产生生物学效应。目前已知的 DR 有 5 种,即 D1, D2, D3, D4, D5, Bymaster 等^[19]根据 DR 与细胞内信号转导耦联的关系,将 DR 分为 D1R 和 D2R。D1R 和 D2R 除脑内和周围组织表达外,主要在下丘脑表达。Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路作为 D2R 上的一条经典通路,具有参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、自噬等多种功能,为了进一步探索逍遥散加减作用于 HPRL 模型大鼠的中枢作用机制,本研究从这一通路展开研究。该信号通路包括 1 个 G 蛋白偶联蛋白 Ras, 3 个蛋白激酶 Raf, MEK, ERK。

实验结果发现,通过结合前期实验血清 PRL 结果,HPRL 模型大鼠下丘脑 D2R 受到抑制,致 Ras 蛋白表达降低,Raf 含量减少。当中药逍遥散加减干预后,HPRL 模型大鼠下丘脑 D2R 受到激动,并抑制 D1R, Ras 蛋白表达量增加, Ras 结合三磷酸鸟苷(GTP),形成 Ras-GTP,处于活性状态^[20];与膜结合的 Ras/GTP 和额外的修饰磷酸化激活,在细胞膜上激活 Raf,发生构象变化,暴露作用的磷酸化位点,这时磷酸化的 Raf 进一步形成异源性寡聚体,MEK1 与 MEK2 被 Raf 下游的两个磷酸化的丝氨酸残基所活化^[21]。MEK 具有双重特异性激酶,在被激活以后, Tyr 和 Thr 2 个调节位点磷酸化而激活 ERKs 并

将其转移到胞核或其他活化位点,使 ERKs 发生磷酸化及二聚体化,再进一步磷酸化下游底物,介导激活下游产物发生转录,参与细胞增殖与分化、维持细胞形态、以及细胞凋亡等多种生物学反应。ERK1/2 被激活后通过调控转录相关基因的表达,抑制垂体前叶分泌过多的 PRL,可以有效改善靶器官卵巢卵泡的发育,改善女性的生殖功能。项目组前期研究显示 HPRL 模型动物卵巢卵泡发育不良,这可能与高 PRL 状态下导致卵巢颗粒细胞凋亡有关。细胞核作为细胞遗传与代谢的调控中心,内含大量的遗传物质,而模型组的颗粒细胞形态差,细胞核核膜内陷,核形不整,核增大、染色质高度凝聚、边缘化,细胞核固缩,细胞器减少;胞质内线粒体数量明显减少,体积增大,细胞内见大量脂肪聚集。线粒体作为细胞内的能量发生器,在脊椎动物细胞的凋亡过程中,起着调控作用,研究发现,凋亡早期线粒体结构保持完整,而坏死细胞的线粒体则发生肿胀,因此将其作为凋亡与坏死的一个重要区别。模型组中线粒体发生肿胀,导致的结构和功能的改变,能加速核凋亡特征的出现。实验结果显示,模型组动物卵巢颗粒细胞在运用逍遥散加减方后可以有效改善细胞核形态和线粒体数量,改善颗粒细胞的功能,促进卵泡的发育。

综上所述,逍遥散加减治疗 HPRL 的作用机制之一可能是通过其对下丘脑多巴胺 ERK/MAPK 通路的作用。逍遥散加减通过激动 D2R,抑制 D1R,增加 Ras, Raf 蛋白, MEK1/2, ERK1/2 mRNA 的表达,促进细胞的增殖分化及调节,以达到提升 DA 的利用率,从而发挥降低 PRL 的作用,并有效改善卵巢颗粒细胞线粒体功能,促进卵泡发育,改善女性生殖功能,说明逍遥散加减治疗 HPRL 是多靶点的作用机制。

[参考文献]

[1] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 367-368.

[2] Shibli-Rahhal A, Schlechte J. The effects of hyperprolactinemia on bone and fat[J]. Pituitary, 2009, 12(2): 96-104.

[3] 华克勤, 丰有吉. 实用妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 441.

[4] Soto-Pedre E, Newey P J, Bevan J S, et al. The epidemiology of hyperprolactinaemia over 20 years in the tayside region of scotland: the prolactin epidemiology, audit, and research study (PROLEARS) [J]. Clin Endocrinol, 2016, 86(1): 60-67.

[5] 李燕, 李肖梅. 逍遥散加减方对高催乳激素血症大鼠卵巢颗粒细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 88-91.

[6] 张泰魏, 李燕, 许露, 等. 逍遥散加减方对 HPRL 模型大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及相关蛋白的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 3909-3912.

[7] 张泰魏, 李燕. 间隙连接蛋白在高催乳激素血症大鼠卵巢中的表达及肝脾调控的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1): 30-32.

[8] 许露, 李燕, 张泰魏. 逍遥散加减干预高催乳激素血症模型动物促卵泡刺激素受体的表达及意义[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(3): 533-534.

[9] 李燕, 张鸿雁, 凌晓红. 加味逍遥散对 HPRL 大鼠多巴胺受体 cAMP/PKA 信号转导通路的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 167-170.

[10] 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): 47-48.

[11] Taya K. Induction of superovulation in prepubertal females by anterior pituitary transplant[J]. J Reprod Fertil, 1983, 69(1): 265-270.

[12] Reis F M, Jr R O A, Guerra R M, et al. Blood glucose and prolactin in hyperprolactinemic rats exposed to restraint and surgical stress [J]. Life Sci, 1996, 58(2): 155.

[13] 凌晓红, 李燕. 垂体移植术制作大鼠高催乳素血症模型[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(8): 810-813.

[14] 凌晓红. 以肝脾为核心干预 HPRL 模型大鼠下丘脑多巴胺腺苷酸环化酶通路机制的探索[D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2015.

[15] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

[16] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 85.

[17] 吴晶. 催乳素的作用探讨[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(14): 3200.

[18] 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): 1266-1269.

[19] Bymaster F P, Mckinzie D L, Felder C C, et al. Use of M1-M5 Muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system [J]. Neurochem Res, 2003, 28(3/4): 437-442.

[20] 王雪, 张评浒. Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路参与自噬调控作用的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1): 110-116.

[21] Eva Chung, Motonari Kondo. Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development [J]. Immunol Res, 2011, 49(1/3): 248-268.

[责任编辑 孙丛丛]