

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.10.015

疏肝健脾方对产后缺乳肝郁脾虚证模型大鼠 JAK2/STAT5A 信号通路的影响

陈宝艳^{*}, 李坤寅², 甄玉花²

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市白云区机场路 16 号, 510405; 2. 广州中医药大学第三附属医院)

摘要 目的 探讨疏肝健脾方治疗产后缺乳肝郁脾虚证的可能作用机制。方法 60 只 Wistar 临产期孕鼠随机分为模型组、空白对照组、西药对照组和疏肝健脾方低、中、高剂量组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组大鼠产后采用甲磺酸溴隐亭溶液 + 慢性束缚法复制大鼠产后缺乳肝郁脾虚病证模型。造模后西药对照组予甲氧氯普胺片溶液 3.15 mg/(kg · d) 灌胃, 疏肝健脾方低、中、高剂量组分别给予浓度为 1.109、2.218、4.435 g/ml 疏肝健脾方溶液每只 5 ml 灌胃, 模型组、空白对照组予等体积蒸馏水灌胃, 各组均每日早、晚各灌胃 1 次, 连续 7 天。采用 RT-PCR 法检测乳腺组织中酪氨酸激酶 2 (JAK2)、信号传导及转录激活因子 5A (STAT5A)、催乳素受体 (PRLR) 和 β -酪蛋白 (β -casein) mRNA 表达, 采用 Western blot 法检测乳腺组织中 JAK2、STAT5A、PRLR 和 β -casein 蛋白表达。结果 与空白对照组比较, 模型组、西药组和疏肝健脾方低、高剂量组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR 及 β -casein mRNA 及蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$), 而疏肝健脾方中剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 西药对照组和疏肝健脾方各剂量组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR 及 β -casein mRNA 及蛋白水平均升高, 且疏肝健脾方中剂量组明显高于其余给药组 ($P < 0.05$)。结论 疏肝健脾方治疗产后缺乳肝郁脾虚证的机制可能与其促进催乳素与其受体结合, 激活 JAK2/STAT5A 信号转导通路, 并上调 β -casein 基因表达相关。

关键词 疏肝健脾方; 产后缺乳; 催乳素; 酪氨酸激酶 2; 信号传导及转录激活因子 5A

母乳是婴幼儿最适宜的天然食物, 有利于婴幼儿身心健康发育, 母乳喂养还可促进产妇产后子宫复旧, 减少晚期产后出血, 降低乳腺癌、卵巢癌的发生率^[1]。产后缺乳是指产妇哺乳期间乳汁减少或无乳汁, 而无法满足婴儿需求, 近年来发病率呈现上升趋势^[2]。中医学认为, 产后缺乳的病因多与气血虚弱、肝郁脾虚、肝郁气滞等有关。我们前期研究提示, 约 47% 的产后缺乳与肝郁有关^[3], 疏肝健脾法可改善缺乳大鼠的宏观表征、增加大鼠体质量和仔鼠净增重, 增加大鼠每小时泌乳量^[4]。催乳素 (prolactin, PRL) 及催乳素受体 (prolactin receptor, PRLR) 是乳腺细胞发育和乳汁分泌必不可缺的激素及受体, PRL 与 PRLR 结合后激活多条信号通路, 其中酪氨酸激酶 2/信号传导及转录激活因子 5A (JAK2/STAT5A) 通路是调控乳腺发育及泌乳的最为重要的途径^[5]。本研究观察疏肝健

脾方对产后缺乳模型大鼠乳腺组织 JAK2/STAT5A 信号通路相关因子表达的影响, 探讨疏肝健脾方治疗产后缺乳的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 Wistar 临产期孕鼠, 20 ~ 24 周, 体重 300 ~ 400 g, 均由广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (粤) 2013-00034。实验大鼠饲养在广州中医药大学第一附属医院 SPF 级实验室, 母、仔鼠按窝同笼饲养, 室温控制在 22 ~ 24℃, 湿度 45% ~ 65%, 昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。

1.2 药物

疏肝健脾方组成: 北柴胡 15 g, 白芍 15 g, 白术 15 g, 茯苓 15 g, 当归 10 g, 川芎 10 g, 漏芦 10 g, 通草 10 g, 桔梗 10 g, 王不留行 10 g, 炙甘草 10 g, 党参 30 g, 由广州中医药大学第一附属医院科研药房按标准浓缩制备。甲磺酸溴隐亭片: 匈牙利

基金项目: 国家自然科学基金(81603653)

* 通讯作者: 1027915064@qq.com

利吉瑞大药厂, 2.5 mg/片, 进口药品注册证号: H20110116。甲氧氯普胺片: 天津力生制药股份有限公司, 5 mg/片, 国药准字: H12020161。

1.3 主要试剂及仪器

Maxima™ SYBRGreen/ROXqPCR Master Mix (2X) (货号: K0221), Thermo Fisher Scientific 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号: LS1040), 上海 Promega 公司; 反转录试剂盒 (货号: K1622), Thermo 公司; Marker1 (货号: M1081), 东盛生物公司; 无水乙醇 (批号: 20180401-2), 广州化学试剂厂; 硫化钠 (批号: 20160428), 天津大茂化学试剂厂; 戊巴比妥钠 (批号: 626Y7618), Sigma 公司; RIPA 总蛋白试剂盒 (货号: R0127)、BCA-400 蛋白定量分析试剂盒 (货号: K3000), 上海博彩生物科技有限公司; JAK2 (货号: 41081)、STAT5A (货号: 21048), Signalway 公司; Prolactin (货号: ab170935), Abcam 公司; β -酪蛋白 (β -casein, 货号: sc-466530), Santa 公司; GAPDH 小鼠单抗 (货号: KC-5G4), 上海康成生物工程有限公司; HRP 羊抗小鼠 IgG (货号: BA1050)、HRP 羊抗兔 IgG (货号: BA1054), 武汉博士德生物工程有限公司; ECL Enhanced 发光液 (货号: H31500-1), Smart-lifesciences 公司; BSA (批号: 0021624103), MB-cHEM 公司。

自制束缚筒: 为塑料制品, 主筒长 18cm, 筒口直径长 6.5 cm, 前端有一透气孔, 便于大鼠呼吸空气, 后端为可调节的闸门。FastPrep-24 匀浆机 (MP 公司); LX-400 手掌型离心机、GL-3250A 磁力搅拌器 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); TGL-46 台式高速冷冻离心机 (Cence 公司); Ultra Pure UF 纯水系统 (上海和泰仪器有限公司); YXQ-LS-30S II 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 恒温磁力搅拌器 (精凿科技上海有限公司); SKG-01 电热恒温干燥箱 (湖北省黄石市医疗器械厂); JS-680A 自动凝胶图像分析仪 (上海培清科技有限公司); Step One QPCR 仪 (Applied Biosystems 公司); 漩涡混合器 (上海青浦沪西仪器厂); VE-480A 微型垂直电泳槽 (上海天能科技有限公司); VE-486 转移电泳槽 (上海天能科技有限公司); TS-4 脱色摇床 (金坛市富华仪器有限公司); AX-II X 射线摄影暗匣 (广东粤华医疗器械厂有限公司)。

1.4 动物模型的建立

采用甲磺酸溴隐亭溶液 + 慢性束缚法复制大鼠

产后缺乳肝郁脾虚病证结合动物模型^[8]。实验第 1~7 天给大鼠按照 0.525 mg/(kg·d) 灌服甲磺酸溴隐亭片溶液, 每天早、晚 8:00 各 1 次, 配制完成的溴隐亭放置于棕色瓶中或用锡箔纸包裹的玻璃瓶, 4℃ 避光保存备用。实验第 1~21 天将大鼠束缚于自制束缚筒内, 每天 3 h (10:00~13:00)。

1.5 实验分组及给药

采用随机数字表法将 60 只大鼠分为模型组、空白对照组、西药对照组和疏肝健脾方低、中、高剂量组, 每组 10 只, 每笼 1 只。空白对照组在实验第 1~21 天灌胃 5 ml 蒸馏水, 不束缚; 其余各组大鼠建立产后缺乳肝郁脾虚模型。在实验第 22~28 天, 西药对照组予甲氧氯普胺片溶液 3.15 mg/(kg·d) 灌胃; 参照前期研究^[9]并结合人与动物剂量换算方法^[10], 疏肝健脾方低、中、高剂量组分别给予浓度为 1.109、2.218、4.435 g/ml 疏肝健脾方溶液每只 5 ml 灌胃 (分别相当于人临床药量的等效剂量、2 倍、4 倍); 模型组、空白对照组予等体积蒸馏水灌胃。各组均每日早、晚 8:00 各灌胃 1 次, 连续 7 天。

1.6 观察指标及方法

末次给药后大鼠禁食、不禁饮 12 h 取材。大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (1 ml/kg) 麻醉, 胸腹部乳腺周围涂硫化钠液脱毛。75% 酒精消毒皮肤, 取第 3 和第 4 对乳腺组织, 将大鼠乳腺组织迅速放入冻存管, 并用液氮转移 -80℃ 冰箱备用。

1.6.1 RT-PCR 法检测乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein mRNA 提取组织 RNA, 然后进行逆转录合成 cDNA, 冰上操作, 在 EP 管中加入相同量的约 0.5 μ g 模板 RNA, 1 μ l Oligo (dT) 18 引物, DEPC 水定容至 12 μ l; 65℃ 水浴 5 min 后, 冰上冷冻; 短暂离心后, 冰上操作: 加入 4 μ l 5 × reaction Buffer, 1 μ l Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor, 2 μ l (10mmol) dNTP mix, 1 μ l (200U/ μ l) ReverAid M-MuLV 反转录酶 (总反应体积 20 μ l); 42℃ 水浴 60 min 进行反转录; 70℃ 水浴 5 min 灭活逆转录酶, 终止反应, 再冰上冷冻; QPCR 反应体系为 10 μ l, 具体为: CDNA 模板 1 μ l, SYBR-Green/ROXqPCR Master Mix (2 ×) 5 μ l, 引物-1 (10 μ mol/L) 0.6 μ l, 引物-2 (10 μ mol/L) 0.6 μ l, ddH₂O 补水至 10 μ l。 β -actin: 上游 GATCAAGAT-CATTGCTCCTCCTG, 下游 AGGGTGTAAACG-CAGCTCA, 扩增片段 183 bp; JAK2: 上游 CCAGC-CGTGCTTGAAAACAT, 下游 CTCAACGGCAAAG-

GTCAGGA, 扩增片段 159 bp; STAT5A: 上游 TGAAGAACCCGTGTCAGTTGT, 下游 CCACTACTT-TAGCCAGACCCC, 扩增片段 98 bp; PRLR: 上游 GAATCCTGGGACAGATGGAGG, 下游 GGCTCTG-GCTCAACGATGTA, 扩增片段 243 bp; β -casein: 上游 TCTTCTCTCTTGTCTCCGCT, 下游 TGT-TCAACGGATTCTCACTGG, 扩增片段 150 bp; 结果的分析通过相对定量的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.6.2 Western blot 法检测乳腺组织中 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein 蛋白 提取蛋白、制胶、加样、电泳、切胶、膜的封闭, 一抗孵育 4℃ 过夜 [一抗稀释比例: JAK2 (150 ×)、STAT5A (1000 ×)、PRLR (200 ×)、 β -casein (150 ×)], 用 TBST 洗涤膜 10 min × 3 次, 二抗孵育 1 h [二抗稀释比例: JAK2 (15000 ×)、STAT5A (20000 ×)、PRLR (20000 ×)、 β -casein (15000 ×)], 洗膜 10 min × 3 次, ECL 化学发光、显影、定影, 用 JS-680A 自动凝胶成像分析仪器中 SensiAnsys 软件 (软件著作登记号: 2005SR00607) 进行目的条带的灰度分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件建立数据库, 计量数据呈正态分布且方差齐性用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 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 各组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein mRNA 比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组、西药对照组和疏肝健脾方低、高剂量组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR 及 β -casein mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$), 而疏肝健脾方中剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 西药对照组和疏肝健脾方各剂量组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR 及 β -casein mRNA 水平均升高, 且疏肝健脾方中剂量组明显高于其余给药组 ($P < 0.05$)。疏肝健脾方低剂量组与疏肝健脾方高剂量大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein mRNA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠乳腺组织中 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型组、西药对照组和疏肝健脾方低、高剂量组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR 及 β -casein 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 而疏肝健脾方中剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 西药对照组和疏肝健脾方各剂量组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR 及 β -casein 蛋白表达水平

表 1 各组大鼠乳腺组织中 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein mRNA 比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	JAK2	STAT5A	PRLR	β -casein
空白对照组	10	1.15 ± 0.41	2.86 ± 0.33	1.06 ± 0.35	4.57 ± 0.62
模型组	10	0.12 ± 0.04*	0.42 ± 0.38*	0.34 ± 0.22*	0.67 ± 0.24*
西药对照组	10	0.49 ± 0.17*△▲	1.47 ± 0.36*△▲	0.75 ± 0.25*△▲	1.93 ± 0.55*△▲
疏肝健脾方低剂量组	10	0.59 ± 0.15*△▲	1.59 ± 0.39*△▲	0.74 ± 0.27*△▲	2.36 ± 0.56*△▲
疏肝健脾方中剂量组	10	1.02 ± 0.37△	2.70 ± 0.57△	1.08 ± 0.34△	4.15 ± 0.86△
疏肝健脾方高剂量组	10	0.70 ± 0.14*△▲	1.72 ± 0.41*△▲	0.72 ± 0.24*△▲	2.02 ± 0.54*△▲

注: JAK2, 酪氨酸激酶 2; STAT5A, 信号传导及转录激活因子 5A; PRLR, 催乳素受体; β -casein, β -酪蛋白; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与健脾疏肝方中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠乳腺组织中 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein 蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	JAK2	STAT5A	PRLR	β -casein
空白对照组	10	0.34 ± 0.02	0.96 ± 0.10	0.37 ± 0.03	0.46 ± 0.02
模型组	10	0.13 ± 0.02*	0.10 ± 0.03*	0.14 ± 0.01*	0.25 ± 0.00*
西药对照组	10	0.22 ± 0.02*△▲	0.47 ± 0.07*△▲	0.23 ± 0.04*△▲	0.35 ± 0.02*△▲
疏肝健脾方低剂量组	10	0.21 ± 0.01*△▲	0.56 ± 0.03*△▲	0.23 ± 0.03*△▲	0.37 ± 0.00*△▲
疏肝健脾方中剂量组	10	0.32 ± 0.01△	0.85 ± 0.06△	0.33 ± 0.03△	0.43 ± 0.01△
疏肝健脾方高剂量组	10	0.23 ± 0.02*△▲	0.44 ± 0.03*△▲	0.24 ± 0.02*△▲	0.36 ± 0.01*△▲

注: JAK2, 酪氨酸激酶 2; STAT5A, 信号传导及转录激活因子 5A; PRLR, 催乳素受体; β -casein, β -酪蛋白; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与疏肝健脾方中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$

均升高,且疏肝健脾方中剂量组明显高于其余给药组 ($P < 0.05$)。疏肝健脾方低剂量组与疏肝健脾方高剂量组大鼠乳腺组织 JAK2、STAT5A、PRLR、 β -casein 蛋白比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

现代医学认为,产后缺乳的发病原因可能与乳腺发育不全、情绪焦虑或抑郁、产后哺乳不当、体质虚弱或营养不良等因素有关^[8]。而中医学认为,肝与脾在生理、病理方面联系密切、相互影响,肝气郁滞,肝失疏泄,横逆犯脾而克脾土,脾失健运,则乳汁生化乏源,因此肝郁脾虚证是产后缺乳常见的中医证型,治疗应以疏肝理气、健脾养血、通络下乳为主要治法。临床研究结果显示,疏肝通络法能促进肝郁气滞证产后缺乳患者血清催乳素的分泌,临床疗效显著^[9]。本研究所用疏肝健脾方由下乳涌泉散(《清太医院配方》)和四君子汤(《太平惠民和剂局方》)化裁而来。下乳涌泉散为疏肝养血、通络下乳的良方^[10-11],四君子汤是健脾益气的基础方^[12]。方中君药柴胡具疏肝行气之功,臣以党参健脾养胃、补后天之本,辅以白术健脾燥湿,加强益气助运之力;当归、白芍为补血益气、滋养肝体之品。佐以茯苓甘淡,健脾利水,配白术健脾祛湿之功益著;王不留行、通草、漏芦均为通乳之要药,均可通络下乳^[13],兼有行血活血清利之力,通草、漏芦在治疗产后缺乳中出现频率较高^[14]。炙甘草、川芎、桔梗为使药,炙甘草具有补脾和胃功效;川芎为血中之气药,具有活血行气等功效;桔梗既升且降,善于开提肺气,引药上行。全方共奏疏肝理气、健脾养血、补中益气、通络下乳之功。

研究表明,PRL 发动和维持泌乳的作用与乳腺上皮细胞中 PRLR 在妊娠期及哺乳期的高水平表达有关^[15]。PRL 及 PRLR 是乳腺细胞发育和乳汁分泌不可缺少的激素及受体,既往研究表明,PRL 与 PRLR 结合后,激活细胞内 JAK2, JAK2 的底物是 STAT5, STAT5 与 JAK2 结合后到细胞核内与细胞核内特定的基因结合,从而调节泌乳相关基因的表达,在调控乳腺泌乳中起到重要作用^[16]。STAT5 在 PRL 调节乳腺上皮细胞增殖、泌乳及 β -casein 启动子的激活中发挥重要作用^[17]。STAT5 有 STAT5A、STAT5B 两种不同的形式,二者功能上具有重叠性,但作用并不完全相同^[18]。研究表明,STAT5A 敲除的小鼠妊娠期乳腺小泡组织发育不

足,造成分娩后不能泌乳,STAT5A 是乳腺组织发育和催乳过程中的关键因子^[19]。 β -casein 是酪蛋白的一种,由乳腺组织中的腺泡上皮细胞产生,乳汁中的 β -casein 占酪蛋白总量的 48%,比例恒定,故 β -casein 合成量与基因表达常被作为乳腺合成蛋白质能力及细胞功能状态的标志^[20]。

本研究结果表明,与模型组比较,疏肝健脾方低、中、高剂量组和西药对照组大鼠乳腺组织 PRLR、JAK2、STAT5A、 β -casein mRNA 及蛋白表达水平均升高,且疏肝健脾方中剂量组升高较其余给药组更明显,与正常泌乳期大鼠表达基本一致。因此,疏肝健脾方可能通过促进催乳素与其受体结合,激活 JAK2/STAT5A 信号转导通路,上调乳蛋白基因 β -casein,从而使机体催乳素分泌增加促进泌乳。疏肝健脾方促进产后缺乳大鼠泌乳的具体作用靶点仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 陈宝艳. 中医体质与产后缺乳及证型的相关性研究 [J]. 新中医, 2016, 48(1): 127-130.
- [2] 连方, 齐聪. 中西医结合妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 249-251.
- [3] 陈宝艳. 产后缺乳与中医体质及中药治疗的临床研究 [J]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [4] 陈宝艳, 李坤寅, 甄玉花. 疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠泌乳干预作用的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(12): 1374-1379.
- [5] BUNTIN JD, BUNTIN L. Increased STAT5 signaling in the ring dove brain in response to prolactin administration and spontaneous elevations in prolactin during the breeding cycle [J]. Gen Comp Endocrinol, 2014, 200: 1-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.02.006.
- [6] 陈宝艳, 甄玉花. 产后缺乳肝郁脾虚证结合大鼠模型的建立与评价 [J]. 中医药导报, 2018, 24(24): 30-33.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [8] 谢萍, 乔峰妮, 冯俭, 等. 产后缺乳相关因素分析 [J]. 中医药导报, 2008, 14(8): 78, 81.
- [9] 陈宝艳. 疏肝通络法治疗肝郁气滞证产后缺乳临床研究 [J]. 新中医, 2015, 47(9): 154-156.
- [10] 石国令. 下乳涌泉散治疗产后缺乳 60 例 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(26): 106-107.
- [11] 何菊. 下乳涌泉散加味治疗产后缺乳 56 例 [J]. 浙江中医杂志, 2015, 50(10): 740.
- [12] 高蓓蓓, 彭颖, 李晓波. 四君子汤复方多糖肠道免疫调节作用及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 462-467.

- [3] 丁祥华. 通乳汤治疗产后缺乳的效果观察 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 295-296.
- [4] 康晨, 宋幸幸, 田会玲, 等. 基于知识发现的催乳方剂及中药配伍规律挖掘 [J]. 中国中医药图书情报杂志, 2015, 39(1): 12-15.
- [5] UEDA EK, HUANG K, NGUYEN V, et al. Distribution of prolactin receptors suggests an intraductal role for prolactin in the mouse and human mammary gland, a finding supported by analysis of signaling in polarized monolayer cultures [J]. Cell Tissue Res, 2011, 346(2): 175-189.
- [6] MURNEY R, STELWAGEN K, WHEELER TT, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) is linked to beta1-integrin protein abundance in unilaterally milked bovine mammary glands [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(5): 3133-3142.
- [7] BUONFIGLIO DC, RAMOS-LOBO AM, SILVEIRA MA, et al. Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice [J]. Horm Behav, 2015, 71: 60-68. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.04.004.
- [8] SCHALLER-SCHONITZ M, BARZAN D, WILLIAMSON AJ, et al. BCR-ABL affects STAT5A and STAT5B differentially [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97243.
- [9] CHAN CB, LIU X, ENSSLIN MA, et al. PIKE-A is required for prolactin-mediated STAT5a activation in mammary gland development [J]. EMBO J, 2010, 29(5): 956-968.
- [20] 史琳琳. 奶牛乳腺上皮细胞 JAK2-STAT5 和 mTOR 信号通路协同调控乳蛋白合成 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.

Effects of *Shugan Jianpi Recipe* (疏肝健脾方) on JAK2/STAT5A Signaling Pathway in Model Rats of Postpartum Hypogalactia With Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome

CHEN Baoyan¹, LI Kunyuan², ZHEN Yuhua²

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510405; 2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Shugan Jianpi Recipe* (疏肝健脾方) in the treatment of postpartum hypogalactia of liver depression and spleen deficiency syndrome. **Methods** A total of 60 Wistar pregnant rats with due date were randomly divided into model group, blank control group, western medicine control group and *Shugan Jianpi Recipe* low, medium and high dose groups, with 10 rats in each group. Except the blank control group, the rats were established the model of postpartum hypogalactia of liver depression and spleen deficiency syndrome using bromocriptine mesylate + chronic restraint method. After modeling, the western medicine control group was given 3.15 mg/(kg·d) of metoclopramide tablet solution, and the *Shugan Jianpi Recipe* low, medium and high dose groups were intragastrically administered with 1.109, 2.218, 4.435 g/ml of *Shugan Jianpi Recipe* solution respectively, 5 ml per rat. The model group and the blank control group were intragastrically administered with equal volume of distilled water. Each group was intragastrically administered once in the morning and evening for 7 days. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of tyrosine kinase 2 (JAK2), signaling and transcriptional activator 5A (STAT5A), prolactin receptor (PRLR) and β -casein mRNA in breast tissue. The expression of JAK2, STAT5A, PRLR and β -casein protein in breast tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with the blank control group, the levels of JAK2, STAT5A, PRLR and β -casein mRNA and protein in the mammary gland in the model group, the western medicine group and the *Shugan Jianpi Recipe* low and high dose group were significantly decreased ($P < 0.05$), while there was no significant difference in the *Shugan Jianpi Recipe* middle dose group ($P > 0.05$). Compared with the model group, the levels of JAK2, STAT5A, PRLR and β -casein mRNA and protein in the mammary gland of rats in the western medicine control group and all *Shugan Jianpi Recipe* groups were increased, and the middle dose group was significantly higher than the other drug groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of *Shugan Jianpi Recipe* in the treatment of postpartum hypogalactia of liver depression and spleen deficiency syndrome may be related to the promotion of prolactin binding to its receptor, activation of JAK2/STAT5A signal transduction pathway, and up-regulation of β -casein gene expression.

Keywords *Shugan Jianpi Recipe* (疏肝健脾方); postpartum hypogalactia; prolactin; tyrosine kinase 2; signaling and transcriptional activator 5A

(收稿日期: 2018-10-16; 修回日期: 2019-02-28)

编辑: 邓 媛