

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.06.014

逍遥散加减方对高催乳激素血症肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑多巴胺能神经元细胞凋亡及内质网应激的影响

代康莉, 李燕[✉], 张震, 刘凯鑫, 梁盈盈

贵州中医药大学, 贵州省贵阳市南明区市东路50号, 550001

[摘要] **目的** 探讨逍遥散加减方治疗高催乳激素血症 (HPRL) 肝郁脾虚证的可能作用机制。**方法** 126 只 SD 大鼠随机分成空白组, 模型组, 甲磺酸溴隐亭组, 逍遥散加减方高、中、低剂量组, 每组 21 只。除空白组外, 其他各组均采用甲氧氯普胺腹腔注射联合慢性复合应激法制作 HPRL 肝郁脾虚证病证结合大鼠模型, 总造模周期 21 天。实验第 22 天开始空白组与模型组给予 4 ml 生理盐水灌胃, 甲磺酸溴隐亭组给予甲磺酸溴隐亭片 0.001 g/(kg·d) 灌胃, 逍遥散加减方高、中、低剂量组分别给予逍遥散加减方 60、30、15 g/(kg·d) 灌胃, 各组大鼠均灌胃共 14 天。给药结束次日称量大鼠体质量后, 采用免疫荧光法测定下丘脑酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性细胞数; 采用 ELISA 法检测血清催乳素 (PRL) 含量; 采用蛋白免疫印记法检测下丘脑的活化型半胱氨酸蛋白酶 3 (Cleaved-Caspase3)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 蛋白含量; 原代培养多巴胺能神经元 1 周后, 采用流式细胞仪检测多巴胺能神经元细胞凋亡。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠体质量、TH 阳性细胞数降低, PRL 含量及大鼠下丘脑组织 CHOP、Cleaved-Caspase3 蛋白表达量显著升高, 多巴胺能神经元细胞凋亡率亦升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方高、中、低剂量组血清 PRL 含量显著降低, TH 阳性细胞数升高; 甲磺酸溴隐亭组及逍遥散加减方高剂量组 CHOP 蛋白表达降低, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方各剂量组 Cleaved-Caspase3 蛋白表达亦降低; 甲磺酸溴隐亭组多巴胺能神经元细胞凋亡率显著升高, 而逍遥散加减方各剂量组细胞凋亡率降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与逍遥散加减方中剂量组比较, 逍遥散加减方高、低剂量组血清 PRL 含量显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方高剂量组比较, 逍遥散加减方中、低剂量组 CHOP 蛋白表达升高, 逍遥散加减方低剂量组 Cleaved-Caspase3 蛋白降低 ($P<0.01$)。**结论** 逍遥散加减方可能通过抑制 CHOP 介导的内质网应激相关凋亡通路减轻 HPRL 大鼠模型的多巴胺能神经元损伤。

[关键词] 高催乳素血症; 逍遥散; 肝郁脾虚; 多巴胺能神经元; 内质网应激; 酪氨酸羟化酶; 催乳素; 细胞凋亡

高催乳素血症 (hyperprolactinemia, HPRL) 是妇女不孕的常见原因之一, 在不孕妇女中可高达 16%~30%^[1], 对妇女的生殖功能及身心健康有严重影响。研究显示, 由下丘脑结节漏斗多巴胺能 (tuberoinfundibular dopaminergic, TIDA) 神经元分泌的多巴胺是最重要的催乳素释放抑制因子^[2], TIDA 神经元功能的降低可使多巴胺合成减少并导致 HPRL^[3]。另有研究显示, 各种原因破坏内质网的稳态, 导致错误折叠的蛋白质堆积的状态称之为

内质网应激^[4], 持续的内质网应激会激活细胞的凋亡通路, 促使细胞凋亡, 多种神经损伤性疾病的发病机理与之密切相关^[5]。内质网应激参与慢性应激引起的下丘脑神经元的病理变化^[6], 但内质网应激是否参与 TIDA 的神经元损伤并且引起 HPRL 尚未见相关报道。

逍遥散加减方化裁于《太平惠民和剂局方》中的逍遥散, 本课题组在原方基础上去疏肝健脾作用较弱之薄荷、生姜, 加入具有回乳消胀功效的生麦芽。前期研究显示, 逍遥散加减方能显著降低 HPRL 患者催乳素水平^[7], 其机制可能通过激动下

基金项目: 国家自然科学基金(81774361)

✉ 通讯作者: 987570074@qq.com, (0851)88233089

丘脑多巴胺 D2 受体, 抑制 D1 受体, 抑制多巴胺转运体的再摄取, 提高多巴胺的利用率, 以达到降低催乳素 (PRL) 的作用^[8-9]。本实验采用慢性复合应激联合腹腔注射甲氧氯普胺制作 HPRL 肝郁脾虚病证结合模型, 观察逍遥散加减方对内质网应激诱导的细胞凋亡及下丘脑多巴胺能神经元细胞的影响, 为其临床应用提供科学依据。本实验方案遵循动物福利和伦理原则, 并通过贵州医科大学动物伦理委员会批准 (1900656)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 126 只, 8 周龄, 体质量 (200±20) g, 购自中国人民解放军第四军医大学, 实验动物许可证号: SCXK (军) 2017-0011。大鼠饲养于贵州医科大学临床实验中心 SPF 级动物实验室, 环境温度为 22.5~25.5℃, 相对湿度为 40%~60%, 光照/黑暗 12 h 交替, 自由饮水、摄食。

1.2 药物

逍遥散加减方组成: 北柴胡 15 g, 当归 15 g, 生麦芽 30 g, 白芍 20 g, 茯苓 15 g, 白术 15 g, 炙甘草 10 g, 饮片均购于贵阳市同济堂药房, 经贵州中医药大学第一附属医院药学专家鉴定, 由贵州中医药大学第一附属医院药剂科制备为含生药分别为 6、3、1.5 g/ml 浓度的汤剂, 放置在 4℃ 冰箱内保存备用。盐酸甲氧氯普胺注射液 (批号: 1109221), 河南润弘制药股份有限公司; 甲磺酸溴隐亭片 (批号: TIA393A), Novartis Pharma S. p. A 公司。

1.3 主要试剂及仪器

RIPA 细胞裂解液 (批号: C1053), 北京普利莱基因技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: E-BC-K318-M), Elabscience 公司; 鼠单克隆抗 GAPDH (批号: TA-08)、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (H+L) (批号: ZB-2305), 中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗大鼠活化型半胱氨酸蛋白酶 3 (Cleaved-Caspase3) 抗体 (批号: ab179517)、兔抗大鼠 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 抗体 (批号: ab11419), Abcam 公司; β -actin (批号: 05-0079), 京天成生物技术有限公司; 兔抗鼠酪氨酸羟化酶 (TH) 抗体 (批号: AF6113), Affinity 公司; 山羊抗兔 IgG cy3 (批号: AS007), ABdonal 公司; DAPI 染液 (批号: KGA215-50)、DMEM/F12 (批号: KGM12800S)、DMEM/F12 (批号: KGM12800S),

凯基生物科技股份有限公司; 大鼠 PRL 酶联免疫试剂盒 (批号: E-EL-R0052c), 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (批号: AP101-100-kit), 杭州联科生物技术有限公司; 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (批号: T1300)、Hank's (批号: H1045-500)、牛血清白蛋白 (BSA) (批号: A8020)、多聚甲醛 (批号: P1110), Solarbio 公司; 曲拉通 (批号: T109026)、三氯乙醛水合物 (批号: B2217168), 阿拉丁公司。

DYY-6C 型蛋白垂直电泳仪、WD-2102B 型全自动酶标仪 (北京市六一仪器厂); TC-100B 型恒温摇床 (上海领成生物科技有限公司); Tiss-12 型全自动样品快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); NovoCyte™ 型流式细胞仪 [艾森生物 (杭州) 有限公司]; Chemi Doc™ XRS+ 型超高灵敏度化学发光成像系统 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司]; CKX53 型荧光显微镜 (Olympus 公司); Tanon-5200 型全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司); AUW-220D 型电子天平 (日本岛津公司); BPN-80CW 型 CO₂ 培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); TD4A 型离心机 (长沙英泰仪器有限公司); BBS-SDC 型洁净工作台 (Biobase 公司)。

1.4 模型制备

参考文献 [8, 10-12] 及预实验结果, 采用甲氧氯普胺腹腔注射联合慢性复合应激造模法共同制作 HPRL 肝郁脾虚证病证结合动物模型, 以期更加符合当代女性 HPRL 发病特点。慢性复合应激: 昼夜颠倒、束缚填塞 (4 h/次)、禁水 (24 h/次)、禁食 (24 h/次)、夹尾、潮湿垫料、4℃ 冰水游泳 (5 min/次) 共 7 种方式, 每天随机安排一种应激方法 (其中禁食时不禁水, 禁水时不禁食, 禁水禁食不连续进行)。第 6 天开始, 配合每次腹腔注射甲氧氯普胺 75 mg/kg, 每日 2 次, 连续 15 天。总造模周期 21 天。造模大鼠血清 PRL 水平显著高于正常大鼠, 差异有统计学意义证明 HPRL 模型成功^[10]。模型大鼠出现明显的精神差、反应性降低、活动减少、摄食减少、大便稀溏、体质量增长缓慢甚至不增长、皮毛无光泽、易怒等症状时, 认为肝郁脾虚证候模型造模成功^[13]。

1.5 分组与给药

采用随机数字表法将大鼠分为空白组, 模型组, 甲磺酸溴隐亭组及逍遥散加减方高、中、低剂量组, 每组 21 只。除空白组外其余各组大鼠建立

HPRL 肝郁脾虚证病证结合模型后, 实验第 22 天依据动物与人体表面积换算公式^[14], 计算甲磺酸溴隐亭片、逍遥散加减方的临床等效剂量。空白组与模型组给予 4 ml 生理盐水灌胃, 甲磺酸溴隐亭组给予甲磺酸溴隐亭片 0.001 g/(kg·d) 灌胃(将 2.5 mg/片甲磺酸溴隐亭片加蒸馏水制备成 0.1 g/L 混悬液), 逍遥散加减方高、中、低剂量组分别给予逍遥散加减方 60、30、15 g/(kg·d) 灌胃, 其中中剂量为人临床等效剂量。各组大鼠均灌胃共 14 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠一般行为情况 实验期间观察大鼠精神状态、反应性、活动量、摄食量、大便性状、皮毛状态、情绪, 实验结束次日电子天平测量体质量。

1.6.2 酶联免疫吸附法检测血清 PRL 含量 于实验结束次日测量体质量后, 给予三氯乙醛水合物(浓度 10%, 给药体积 3 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 采用随机数字表法从每组的 21 只大鼠中选取 13 只腹主动脉采血, 血液静置 1 h, 以 4℃、3000 r/min(离心半径 13.5 cm) 离心 12 min 收集血清, -20℃ 保存备用。依据酶联免疫试剂盒说明书方法检测血清 PRL 含量, 全自动酶标仪读取 450 nm 处 OD 值, 制作标准曲线, 计算各组大鼠血清 PRL 含量。

1.6.3 免疫荧光法测定大鼠下丘脑 TH 阳性细胞数 采用随机数字表法再从每组 21 只大鼠中各选取 9 只, 测定大鼠下丘脑 TH 阳性细胞数。大鼠迅速断颈处死, 取出大脑, 0~4℃ 低温环境中小心剥离出所需下丘脑组织, 称重, 放入 4% 多聚甲醛液中固定 24 h, 经脱水, 透明, 再移入石蜡中包埋, 将石蜡包埋的下丘脑组织使用组织切片机切片, 二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 切片抗原修复, 室温通透 20 min, 37℃ 封闭 30 min, 滴加一抗(鼠单克隆抗 GAPDH) 4℃ 孵育过夜; 滴加二抗(辣根酶标记山羊抗鼠 IgG) 湿盒中 37℃ 孵育 45 min; 滴加 DAPI 避光孵育 3 min, 对标本进行染核; 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。倒置显微镜拍照。每张切片随机选取 3 个视野采集 400 倍显微图像, 采用 Image J 1.8.0 软件进行荧光细胞计数。

1.6.4 蛋白免疫印迹法检测大鼠下丘脑 Cleaved-Caspase3、CHOP 蛋白表达 采用随机数字表法从各组剩余的 12 只大鼠中选取 6 只, 检测 Cleaved-Caspase3、CHOP 蛋白表达。按上文方法取下丘脑, 以 50 mg 下丘脑组织加入 1 ml 裂解液的比例研磨充分, 以 4℃、12 000 r/min(离心半径 5.8 cm) 离心 10 min。取上清液, 移至新的 EP 管(BCA 法

测定), 计算样品中的蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳后用 300 mA 恒流转膜。根据分子量选择相应条带, 封闭, 加入一抗: Cleaved-Caspase3(1:500)、CHOP(1:500)、GAPDH(1:2000)、 β -actin(1:200) 4℃ 孵育过夜; 洗膜, 二抗孵育 2 h, 加入显色液显影, 使用 Image J 1.8.0 软件分析条带灰度。

1.6.5 流式细胞仪检测多巴胺能神经元细胞凋亡 各组剩余大鼠各 6 只, 断颈处死后, 酒精浸泡消毒, 置于超净台中, 取完整下丘脑组织, 置于装有 Hank's 溶液的培养皿, 立即进行大鼠下丘脑神经元细胞分离。在培养皿中, 小心剥除下丘脑组织外膜, 剪碎下丘脑, 加入胰蛋白酶-EDTA 消化液, 37℃ 下消化 5 min, 加入 DMEM/F12 完全培养基终止消化, 并用 1 ml 的移液器吹打细胞, 100 目滤网过滤细胞匀浆, 离心重悬, 接种到预先包被了多聚赖氨酸的培养板中, 做好标记, 置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 1 周后进行抗 TH 免疫荧光鉴定: PBS 浸洗多巴胺能神经元细胞培养皿 3 次, 多聚甲醛固定, PBS 浸洗培养皿 3 次, 0.5% 曲拉通通透 15 min, PBS 浸洗培养皿 3 次, 移液枪吸干 PBS, 滴加 5% BSA, 封闭。滴加一抗 TH(1:200), 孵育 3 h。滴加荧光二抗 Cy3(1:200), 孵育 30 min; DAPI 避光孵育 5 min, PBS 冲洗; 封闭, 荧光显微镜下阅片。流式细胞仪检测细胞凋亡: 将进行细胞培养的各组收集 1×10⁶ 个细胞, 离心, 用 Binding 缓冲液重悬细胞。每组各加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI, 混匀, 避光室温孵育 15 min。再向每组中加入 200 μ l Binding 缓冲液。上仪器检测细胞凋亡情况, 重复 3 次。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 26.0 统计软件处理数据, 计量数据均符合正态分布且方差齐, 用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较, 采用 LSD 检验进行组间两两比较, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠表现活跃, 皮毛亮泽滑顺, 饲料摄入和粪便排出正常, 体质量正常增长。模型组大鼠精神较差, 易怒, 反应性降低, 食量降低, 大便稀溏, 体质量增长缓慢。逍遥散加减方各剂量组大鼠精神、情绪、反应性、摄食量均较模型组有所改

善, 体质量增长正常。甲磺酸溴隐亭组大鼠精神、反应性、情绪等未见明显改善, 摄食量、体质量都低于模型组。表 1 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠体质量均显著降低 ($P<0.01$)。模型组、甲磺酸溴隐亭组、逍遥散加减方各剂量组体质量差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠体质量比较

Table 1 Comparison of body weight of rats among groups
(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量
空白组	21	247.857±15.35
模型组	21	219.429±14.78 ^{a)}
甲磺酸溴隐亭组	21	217.857±14.39 ^{a)}
逍遥散加减方高剂量组	21	224.476±13.31 ^{a)}
逍遥散加减方中剂量组	21	222.381±11.17 ^{a)}
逍遥散加减方低剂量组	21	221.476±18.01 ^{a)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠血清 PRL 水平比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组和逍遥散加减方高、低剂量组血清 PRL 含量显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方高、中、低剂量组血清 PRL 含量显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与甲磺酸溴隐亭组比较, 逍遥散加减方高、低剂量组血清 PRL 含量显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与逍遥散加减方中剂量组比较, 逍遥散加减方高、低剂量组血清 PRL 含量显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组大鼠血清 PRL 含量比较

Table 2 Comparison of serum PRL of rats in each group
($\mu\text{g/L}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PRL 含量
空白组	13	1.905±1.297
模型组	13	6.095±2.732 ^{a)}
甲磺酸溴隐亭组	13	2.406±2.086 ^{b)}
逍遥散加减方高剂量组	13	4.463±1.365 ^{a) c) d) f)}
逍遥散加减方中剂量组	13	2.355±1.944 ^{b)}
逍遥散加减方低剂量组	13	4.136±1.442 ^{a) b) c) g)}

注: PRL, 催乳素。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与甲磺酸溴隐亭组比较, $P<0.01$; e) 与甲磺酸溴隐亭组比较, $P<0.05$; f) 与逍遥散加减方中剂量组比较, $P<0.01$; g) 与逍遥散加减方中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠下丘脑多巴胺能神经元细胞凋亡率比较

多巴胺能神经元细胞培养 1 周之后, 进行抗

TH 免疫荧光鉴定成功。表 3 示, 与空白组比较, 模型组、甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方中剂量组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 甲磺酸溴隐亭组细胞凋亡率显著升高, 逍遥散加减方各剂量组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$); 与甲磺酸溴隐亭组比较, 逍遥散加减方各剂量组细胞凋亡率均显著降低 ($P<0.01$); 与逍遥散加减方中剂量组相比, 逍遥散加减方高、低剂量组细胞凋亡率显著降低 ($P<0.01$)。

表 3 各组大鼠下丘脑多巴胺神经元细胞凋亡率比较

Table 3 Comparison of dopamine neurons apoptosis
in hypothalamus of rats among groups (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	细胞凋亡率
空白组	6	4.670±0.161
模型组	6	12.217±0.444 ^{a)}
甲磺酸溴隐亭组	6	14.207±0.448 ^{a) b)}
逍遥散加减方高剂量组	6	4.663±0.301 ^{b) c) d)}
逍遥散加减方中剂量组	6	9.353±0.137 ^{a) b) c)}
逍遥散加减方低剂量组	6	4.360±0.178 ^{b) c) d)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较 $P<0.01$; c) 与甲磺酸溴隐亭组比较, $P<0.01$; d) 与逍遥散加减方中剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠下丘脑组织 CHOP、Cleaved-Caspase3 蛋白表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠下丘脑组织 Cleaved-Caspase3 蛋白表达显著升高, 模型组和逍遥散加减方中、低剂量组 CHOP 蛋白表达亦显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 甲磺酸溴隐亭组及逍遥散加减方高剂量组 CHOP 蛋白表达降低, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方各剂量组 Cleaved-Caspase3 蛋白表达亦降低 ($P<0.01$)。与甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方高剂量组比较, 逍遥散加减方中、低剂量组 CHOP 蛋白表达升高, 逍遥散加减方低剂量组 Cleaved-Caspase3 蛋白亦降低 ($P<0.01$)。与逍遥散加减方中剂量组比较, 逍遥散加减方低剂量组 CHOP 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。各组大鼠下丘脑 CHOP 蛋白电泳图见图 1, 各组大鼠下丘脑 Cleaved-Caspase3 蛋白电泳图见图 2。

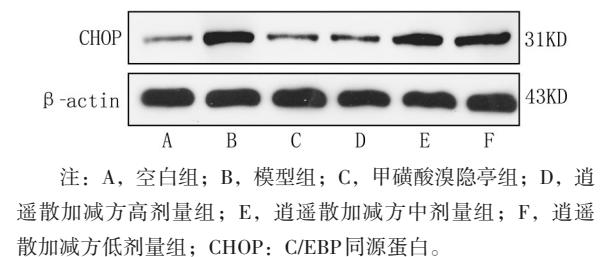
2.5 各组大鼠下丘脑 TH 阳性细胞数比较

表 5、图 3 示, 与空白组相比, 模型组和逍遥散加减方低剂量组 TH 阳性细胞数显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相比, 逍遥散加减方

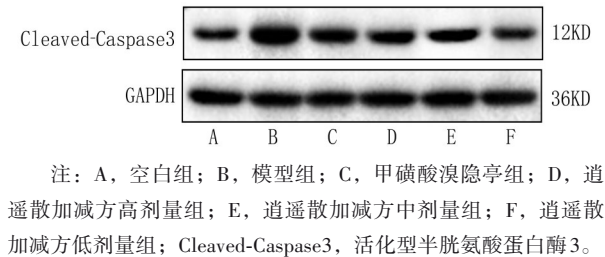
表4 各组大鼠下丘脑CHOP、Cleaved-Caspase3蛋白表达比较
Table 4 Comparison of CHOP and Cleaved-Caspase3 expression in the hypothalamus among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CHOP/ β -actin	Cleaved-Caspase3/GAPDH
空白组	6	0.168 $\pm$ 0.031	0.393 $\pm$ 0.076
模型组	6	0.508 $\pm$ 0.044 ^{a)}	1.404 $\pm$ 0.034 ^{a)}
甲磺酸溴隐亭组	6	0.193 $\pm$ 0.028 ^{b)}	0.798 $\pm$ 0.106 ^{a) b)}
逍遥散加减方高剂量组	6	0.181 $\pm$ 0.031 ^{b)}	0.857 $\pm$ 0.082 ^{a) b)}
逍遥散加减方中剂量组	6	0.490 $\pm$ 0.045 ^{a) c) d)}	0.849 $\pm$ 0.143 ^{a) b)}
逍遥散加减方低剂量组	6	0.496 $\pm$ 0.048 ^{a) c) d)}	0.534 $\pm$ 0.063 ^{a) b) c) d) e)}

注：CHOP：C/EBP同源蛋白；Cleaved-Caspase3，活化型半胱氨酸蛋白酶3。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与甲磺酸溴隐亭组比较， $P<0.01$ ；d) 与逍遥散加减方高剂量组相比， $P<0.01$ ；e) 与逍遥散加减方中剂量组相比， $P<0.01$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，甲磺酸溴隐亭组；D，逍遥散加减方高剂量组；E，逍遥散加减方中剂量组；F，逍遥散加减方低剂量组；CHOP：C/EBP同源蛋白。
Figure 1 Electrophoresis of CHOP in the hypothalamus of rats among groups



注：A，空白组；B，模型组；C，甲磺酸溴隐亭组；D，逍遥散加减方高剂量组；E，逍遥散加减方中剂量组；F，逍遥散加减方低剂量组；Cleaved-Caspase3，活化型半胱氨酸蛋白酶3。
Figure 2 Electrophoresis of Cleaved-Caspase3 in the hypothalamus of rats among groups

高、中、低剂量组和甲磺酸溴隐亭组TH阳性细胞数显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与甲磺酸溴隐亭组相比，逍遥散加减方高剂量组TH阳性细胞数升高 ($P<0.05$)。与逍遥散加减方高剂量组比较，逍遥散加减方低剂量组TH阳性细胞数降低 ($P<0.05$)。逍遥散加减方中、低剂量组TH阳性细胞数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

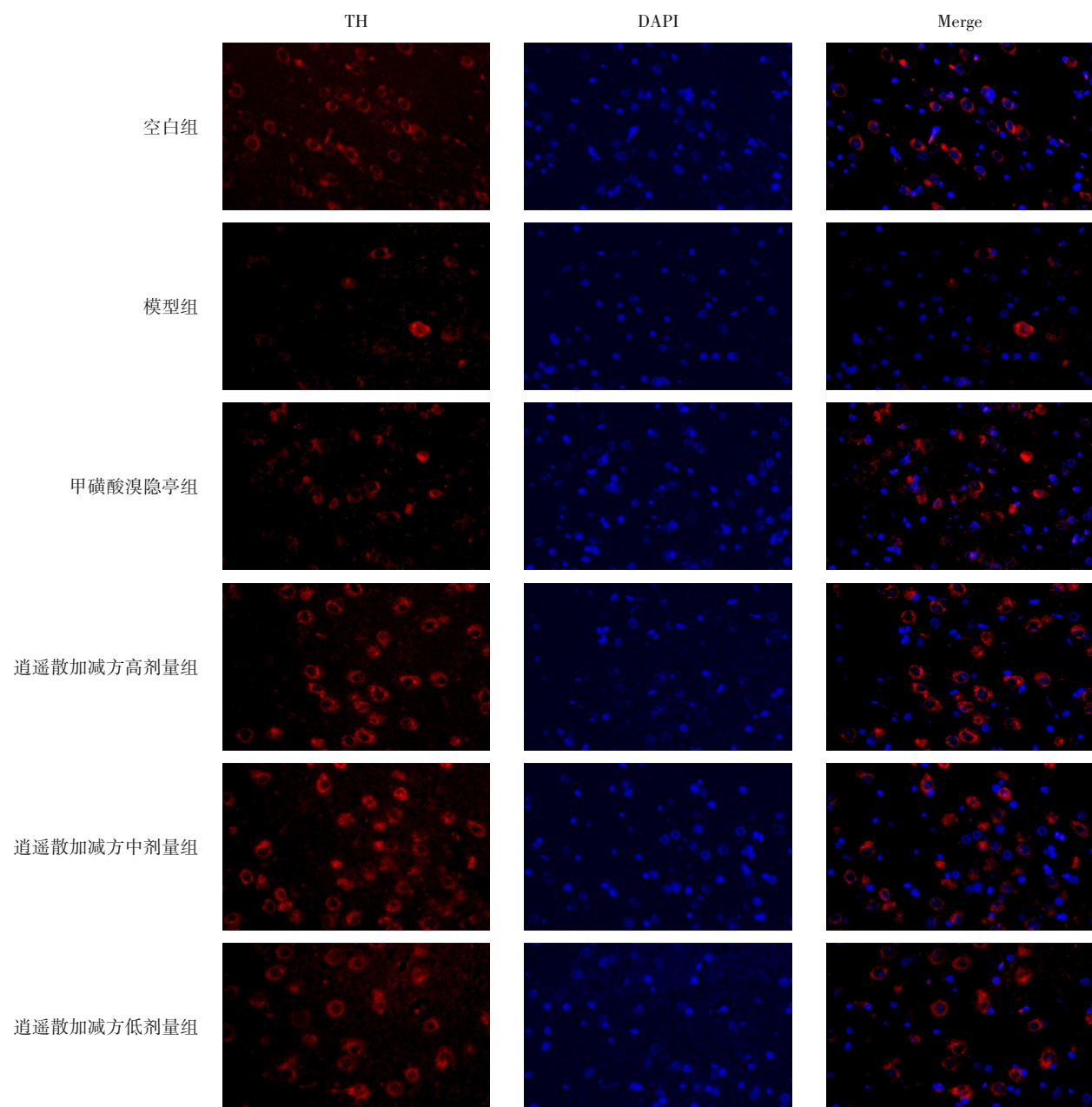
根据HPRL临床症状可归属于中医学“乳泣”“月经不调”“闭经”“不孕”等疾病范畴。《河间六书》曰“天癸既行从厥阴论”，为该年龄段当从肝论治提供了依据。清代王旭高医案云：“……乳汁血之所化，无孩子而乳房膨胀，亦下乳汁，非血之

表5 各组大鼠下丘脑TH阳性细胞数比较
Table 5 Comparison of the number of TH positive cells in the hypothalamus in each group (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TH
空白组	9	16.222 $\pm$ 6.888
模型组	9	8.556 $\pm$ 4.035 ^{a)}
甲磺酸溴隐亭组	9	13.778 $\pm$ 3.232 ^{d)}
逍遥散加减方高剂量组	9	18.556 $\pm$ 5.341 ^{e)}
逍遥散加减方中剂量组	9	15.778 $\pm$ 3.898 ^{e)}
逍遥散加减方低剂量组	9	13.111 $\pm$ 3.18 ^{b) d) f)}

注：TH，酪氨酸羟化酶。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与甲磺酸溴隐亭组比较， $P<0.05$ ；f) 与逍遥散加减方高剂量组比较， $P<0.05$ 。

有余，乃不循其道为月水，反随肝气上入乳房，变为乳汁”，更加明确地阐释了HPRL的病机以及肝的主导作用。国医大师刘尚义教授诊治月经病提出的“本土相依，肝脾平和，气机轮转，清浊复位”思想，治疗月经不调重在调肝，在活血补血、滋养肝肾的基础上常辅以理气、祛湿、化痰等法^[15]。本课题组提出以肝脾论治HPRL为核心的治疗原则，而逍遥散加减方是在疏肝健脾的基础上，加入生麦芽以消胀回乳，全方疏肝兼以养脾，使气机条达，共奏疏肝健脾抑乳之效。本研究观察到模型组大鼠的行为学改变以及血清PRL水平显著增高，说明造模成功。甲磺酸溴隐亭组选用多巴胺受体激动剂甲磺酸溴隐亭，为西医治疗HPRL的首选药物，能有效降低患者血清PRL水平^[16]。经高、中、低剂量逍遥散加减方和阳性药干预后，HPRL肝郁脾虚病证结合模型大鼠PRL含量得到有效控制，且甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方中剂量组在降低PRL含量方面疗效相当，说明逍遥散加减方治疗HPRL肝郁脾虚证切实有效。



注：TH，酪氨酸羟化酶。用DAPI标记细胞核，显示蓝色荧光；TH标记多巴胺神经元细胞，显示红色荧光；Merge为蓝色荧光与红色荧光的融合荧光。

图3 各组大鼠下丘脑TH免疫荧光图（×400）

Figure 3 TH immunofluorescence staining of rat hypothalamus in each group (×400)

细胞凋亡是维持细胞形成和细胞死亡之间动态平衡的程序性死亡方式，包括线粒体途径、死亡受体途径以及内质网应激途径^[17]。内质网的主要功能是合成、折叠和修饰各种蛋白质，但多种因素包括缺氧、氧化应激、感染等都会破坏内质网的蛋白质折叠能力，使错误折叠或未折叠蛋白质异常积累，导致内质网应激^[18]。未折叠蛋白反应是一种可调节细胞的蛋白质折叠能力以维持细胞稳态的信号通路，它可以诱导一系列的转录和翻译事件以恢

复内质网功能^[19]。然而，如果内质网应激长期持续处于高水平，则未折叠蛋白反应通过激活PERK、IRE-1和ATF6等三条通路，诱导CHOP的上调而启动细胞凋亡^[20]。CHOP是参与内质网应激相关细胞凋亡的一个非常重要的标志物^[21]。在正常生理过程中，CHOP普遍以非常低的水平表达，然而，病理条件或各种压力引起的内质网应激导致CHOP的表达急剧上升，会引起细胞凋亡的核心成分半胱氨酸蛋白酶（Caspase）链“瀑布式”的级联反应^[22]。

CHOP 通过激活 Caspase-12, 诱导位于最下游的凋亡执行蛋白 Caspase-3 激活, 生成 Cleaved-Caspase3, 进一步促进凋亡小体的形成, 执行细胞凋亡, 导致细胞损伤^[23]。TH 是多巴胺能神经元中多巴胺合成的限速酶, 并且是鉴定多巴胺能神经元的金标准标志物^[24]。因此, 本研究从细胞凋亡和内质网应激角度探讨逍遥散加减方治疗 HPRL 肝郁脾虚证的可能作用机制。

本研究结果发现, 模型组大鼠下丘脑组织 TH 含量降低, 而各剂量逍遥散和阳性药干预后 TH 含量增加, 与 PRL 变化趋势相反, 提示多巴胺神经元损伤可能是 PRL 增加的重要原因, 而逍遥散加减方和甲磺酸溴隐亭片可能通过纠正多巴胺神经元损伤达到降低 PRL 的作用。但溴隐亭可能有一定的胃肠道副作用, 如大鼠摄食量和体质量较模型组低, 而逍遥散加减方各高剂量组大鼠体质量均高于模型组。同时, 模型组 CHOP、Cleaved-Caspase3 蛋白表达、多巴胺神经元凋亡率较空白组增加, 经逍遥散加减方干预后, CHOP、Cleaved-Caspase3 表达量下降、多巴胺神经元凋亡率下降, 提示逍遥散加减方可能通过抑制 CHOP 介导的内质网应激相关凋亡通路, 保护多巴胺能神经元, 恢复其功能, 增加多巴胺的释放达到抑制 PRL 的分泌的作用。然而实验中发现虽然逍遥散加减方中、低剂量组对下丘脑组织 CHOP 蛋白的影响不明显, 却能显著降低下丘脑组织 Cleaved-Caspase3 蛋白、多巴胺能神经元细胞凋亡率, 提示逍遥散加减方还可能通过其他凋亡通路起作用, 在本课题后续阶段可深入研究。鉴于中药多靶点、多途径作用, 以及不同剂量组对蛋白、组织、激素的反应性有所差异, 逍遥散加减方高、低剂量组虽然也能有效降低内质网应激反应, 降低多巴胺神经元凋亡率, 增加多巴胺神经元水平, 达到降低血清 PRL 的效果, 基于本研究结果进行综合比较, 仍以逍遥散中剂量组疗效最佳, 更适宜于推广临床。

综上所述, 逍遥散加减方可以缓解 HPRL 模型大鼠下丘脑多巴胺能神经元细胞凋亡状态, 有效降低 PRL 水平。但此次研究未从基因层面进行研究, 并且观察到在此模型中不止内质网应激会引起多巴胺神经元的凋亡, 在后续的研究中, 将进一步继续探索逍遥散加减方治疗 HPRL 的有效机制。

参考文献

[1] ILHAN M, TURGUT S. Evaluation of the patients with hyperprolactinemia [J]. Med J Islam World Acad Sci,

2017, 25(2): 25-30.

- [2] SAMPERI I, LITHGOW K, KARAVITAKI N. Hyperprolactinaemia [J]. J Clin Med, 2019, 8(12): 2203.
- [3] MOHANKUMAR SM, KASTURI BS, SHIN AC, et al. Chronic estradiol exposure induces oxidative stress in the hypothalamus to decrease hypothalamic dopamine and cause hyperprolactinemia [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 300(3): R693-R699.
- [4] ALMANZA A, CARLESSO A, CHINTHA C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling-from basic mechanisms to clinical applications [J]. FEBS J, 2019, 286(2): 241-278.
- [5] 丁良才, 白波. 神经退行性疾病与内质网应激 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2017, 26(2): 183-187.
- [6] YI S, CHEN K, ZHANG L, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in stress-induced hypothalamic neuronal injury in rats via the PERK-ATF4-CHOP and IRE1-ASK1-JNK pathways [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 190. doi: 10.3389/fncel.2019.00190.
- [7] 刘福珍, 刘青青. 逍遥散加减汤治疗高泌乳素血症临床研究 [J]. 新中医, 2016, 48(6): 153-155.
- [8] 刘凯鑫, 李燕, 黄世梅, 等. 逍遥散加减方对高催乳素血症大鼠多巴胺转运体的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 51-57.
- [9] 许露, 李燕, 张芳, 等. 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 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 70-76.
- [10] 王培培, 姚树永, 杜向东. 高催乳素血症动物模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(11): 2110-2113.
- [11] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 99: 101-116. doi: 10.1016/j.neubiorev.
- [12] 赵博, 柴丽, 吴大梅, 等. 复合多因素方法复制肝郁脾虚证动物模型的实验研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2013, 36(3): 10-14.
- [13] 刘佳, 许可, 张兰. 肝郁脾虚证动物模型评价方法 [J]. 中医药导报, 2019, 25(23): 120-122.
- [14] 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.
- [15] 唐东昕, 杨柱, 金露露, 等. 刘尚义治疗月经不调用药规律数据挖掘 [J]. 中医杂志, 2016, 57(12): 1019-1022.
- [16] 周姗姗, 高彩霞, 张新霞. 高泌乳素血症的中西医治疗进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(68): 52-53.
- [17] HU H, TIAN M, DING C, et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial

- infection [J]. *Front Immunol*, 2019, 9: 3083. doi: 10.3389/fimmu.2018.03083.
- [18] IURLARO R, MUNOZ-PINEDO C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *FEBS J*, 2016, 283 (14): 2640–2652.
- [19] OAKES SA, PAPA FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 173–194. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
- [20] 董彪. 内质网源性转录因子CHOP在肾脏缺血再灌注损伤中的作用和机制研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2014.
- [21] 张振英, 刘秀华, 孙胜, 等. C/EBP同源蛋白介导的内质网应激相关凋亡途径参与腹主动脉狭窄致大鼠心肌肥厚[J]. *生理学报*, 2009, 61(2): 161–168.
- [22] 张思泉, 张莹雯, 帅瑜, 等. 当归补血汤对糖尿病肾病大鼠肾组织ATF6、CHOP、Caspase-3表达的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(4): 91–95.
- [23] HUANG H, AN Y, JIAO W, et al. CHOP/caspase-3 signal pathway involves in mitigative effect of selenium on lead-induced apoptosis via endoplasmic reticulum pathway in chicken testes [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(19): 18838–18845.
- [24] WHITE RB, THOMAS MG. Moving beyond tyrosine hydroxylase to define dopaminergic neurons for use in cell replacement therapies for Parkinson's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(4): 340–349.

Effects of *Modified Xiaoyao Powder* (逍遥散加减方) on Hypothalamic Dopaminergic Neurons Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress in Hyperprolactinemia Model Rats with Liver Constraint and Spleen Deficiency Syndrome

DAI Kangli, LI Yan, ZHANG Zhen, LIU Kaixin, LIANG Yingying

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550001

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Modified Xiaoyao Powder* (逍遥散加减方, MXP) in the treatment of hyperprolactinemia (HPRL) with liver constraint and spleen deficiency syndrome. **Methods** A total of 126 SD rats were randomly divided into blank group, model group, bromocriptine mesylate group, high-, medium- and low-dose MXP groups, with 21 rats in each group. Except for the blank group, all other groups used intraperitoneal injection of metoclopramide plus chronic compound stress method to develop the HPRL model with liver constraint and spleen deficiency syndrome, taking a total modeling period of 21 days. Since the 22nd day of the experiment, the blank group and the model group were given intragastric administration of 4 ml of normal saline, and the bromocriptine mesylate group was given 0.001 g/(kg·d) of bromocriptine mesylate tablets by gavage; MXP at the dosage of 60, 30, and 15 g/(kg·d) was administered by gavage in the high-, medium- and low-dose group, respectively. The administration period was 14 days for all groups. After weighing the rats on the next day of last administration, the number of hypothalamic tyrosine hydroxylase (TH) positive cells was determined by immunofluorescence; the serum prolactin (PRL) content was detected by ELISA; the protein content of activated cysteine protease 3 (Cleaved-Caspase3) and C/EBP homologous protein (CHOP) in the hypothalamus was detected by Western blotting. The apoptosis of dopaminergic neurons was detected by flow cytometry after primary culture for 1 week. **Results** Compared to those in the blank group, the body weight and the number of TH positive cells in the model group decreased, while the content of PRL, the expression of CHOP and Cleaved-Caspase3 proteins in the hypothalamus tissue increased significantly, as well as the apoptosis rate of dopaminergic neurons ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the serum PRL content significantly decreased while the number of TH positive cells increased in the bromocriptine mesylate group and high-, medium-, and low-dose MXP groups; the expression of CHOP protein decreased in the bromocriptine mesylate group and the high-dose MXP group; the expression of Cleaved-Caspase3 protein in the bromocriptine mesylate group and MXP all dose groups also decreased; the apoptosis rate of dopaminergic neurons in the bromocriptine mesylate group increased significantly, while that of MXP all dose groups decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the medium-dose MXP group, the serum PRL level in the high- and low-dose groups significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the bromocriptine mesylate group and the high-dose MXP group, the expression of CHOP protein in the medium- and low-dose groups increased, and the Cleaved-Caspase3 protein in the low-dose group decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** MXP may alleviate dopaminergic neuron damage in HPRL rat model by inhibiting CHOP-mediated endoplasmic reticulum stress-related apoptosis pathway.

Keywords hyperprolactinemia; *Xiaoyao Powder* (逍遥散); liver constraint and spleen deficiency; dopaminergic neurons; endoplasmic reticulum stress; tyrosine hydroxylase; prolactin; apoptosis

(收稿日期: 2022-07-21; 修回日期: 2022-10-27)

[编辑: 邓媛]