

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.03.015

逍遥散加减方对高催乳素血症肝郁脾虚型模型大鼠下丘脑多巴胺能神经元细胞程序性坏死的影响

李燕, 李燕[✉]△, 刘凯鑫, 代康莉, 刘晓, 杨惠, 罗丹

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肝郁脾虚型高催乳素血症 (HPRL) 的可能作用机制。方法 96 只 SD 雌性大鼠随机分为正常组 16 只, 造模组 80 只。造模组大鼠采用慢性不可预知应激联合甲氧氯普胺腹腔注射构建 HPRL 肝郁脾虚型模型大鼠。将 80 只造模成功的大鼠随机分为模型组, 逍遥散加减方高、中、低剂量组和甲磺酸溴隐亭组, 每组 16 只。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, 甲磺酸溴隐亭组予以甲磺酸溴隐亭片 1 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组及模型组给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 连续给药 14 天。ELISA 法检测血清催乳素 (PRL) 含量; 免疫组化测定大鼠下丘脑肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和酪氨酸羟化酶 (TH) 表达; 采用 Western blot 法检测下丘脑肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 蛋白表达; RT-PCR 法检测下丘脑受体相互作用蛋白激酶 3 (RIP3) mRNA 表达; 免疫荧光法检测 RIP3 和多巴胺能神经元的共表达情况。结果 与正常组比较, 模型组血清 PRL 含量升高, 下丘脑 TNF- α 、TNFR1、RIP3 mRNA 及 RIP3 与多巴胺能神经元共表达阳性细胞数显著升高, TH 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方低剂量组下丘脑 TNF- α 表达降低, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方中、高剂量组 TH 表达显著升高, 逍遥散加减方各剂量组和甲磺酸溴隐亭组血清 PRL 含量, 下丘脑 TNFR1、RIP3 mRNA, RIP3 与多巴胺能神经元共表达阳性细胞数均显著降低 ($P < 0.05$ 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, 逍遥散加减方中剂量组 TH 表达显著升高, 逍遥散加减方低剂量组下丘脑 RIP3 mRNA 表达降低, 逍遥散加减方高剂量组 RIP3 与多巴胺能神经元共表达阳性细胞数显著升高 ($P < 0.01$)。结论 逍遥散加减方可调节下丘脑多巴胺能神经元细胞程序性坏死, 影响 DA 表达, 从而调节 PRL 水平, 可能是其治疗 HPRL 肝郁脾虚型的机制之一。

[关键词] 高催乳素血症; 逍遥散; 下丘脑; 多巴胺能神经元; 疏肝健脾法; 程序性坏死

高催乳素血症 (hyperprolactinemia, HPRL) 是一种常见的女性生殖内分泌疾病, 由各种原因造成血清催乳素 (PRL) 水平异常升高, 临床多表现为溢乳、月经量少、稀发甚至闭经、不孕等^[1]。近几年 HPRL 的发病率不断上升, 发病人群多以 25 ~ 34 岁妇女为主, 年发病率为 23.9/10 万, 严重影响女性生殖健康^[2]。HPRL 的致病原因复杂多样, 目前西医治疗首选疗效确切的甲磺酸溴隐亭片, 但用药后可出现头晕、恶心、呕吐等不良反应, 且停药

后易复发^[3]。HPRL 属中医学“乳汁自溢”“闭经”等范畴, 肝郁脾虚为临床常见证型。逍遥散始载于《太平惠民和剂局方》, 具有疏肝健脾的功效。本课题组在逍遥散基础上去疏肝健脾作用较弱之生姜、薄荷, 加入具有回乳消胀的生麦芽, 更加符合 HPRL 的临床特征。课题组前期研究发现, 逍遥散加减方可以通过影响中枢多巴胺 (DA), 降低 PRL 水平, 从而改善 HPRL^[4-5]。DA 是重要的 PRL 释放抑制因子, 而多巴胺能神经元是下丘脑 DA 合成与释放的主要场所。程序性坏死是一种新发现的细胞死亡形式, 其细胞死亡的形态特征与坏死相似, 但死亡过程受到细胞内在信号分子的调节。近年来的研究提

基金项目: 国家自然科学基金 (81774361)

✉ 通讯作者: 987570074@qq.com

△与第一作者姓名相同

示, 程序性细胞坏死参与多巴胺能神经元死亡的病理过程^[6]。因此, 本研究拟从多巴胺能神经元程序性坏死的角度探讨逍遥散加减方治疗 HPRL 肝郁脾虚型的可能作用机制, 为其临床应用提供科学依据。本实验经贵州医科大学动物伦理委员会批准(审批号: 1900656)。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 96 只, 8 周龄, 体质量(220±20) g, 购于中国人民解放军第四军医大学, 实验动物使用合格证号: SCXK(军) 2017-0011。所有实验大鼠由贵州医科大学临床实验中心饲养, 饲养环境温度为(24.0±1.5)℃, 湿度为 40%~60%, 并利用高效过滤器换气 10~15 次/h, 光照/黑暗 12 h 交替, 自由摄食、饮水。

1.2 药物及制备

逍遥散加减方由北柴胡 15 g、生麦芽 30 g、当归 15 g、白芍 20 g、茯苓 15 g、白术 15 g、炙甘草 10 g 组成, 购自贵阳市同济堂药房, 经贵州中医药大学第一附属医院药学专家鉴定质量合格, 并由药剂科制备为含生药浓度 6、3、1.5 g/ml 的煎剂, 4℃冷藏备用。盐酸甲氧氯普胺注射液, 由上海禾丰制药有限公司生产, 批号: H31021522; 甲磺酸溴隐亭片, 瑞士 Novartis 公司生产, 批号: T87612A, 规格: 2.5 mg/片。

1.3 主要试剂及仪器

大鼠 PRL ELISA 试剂盒(批号 E-EL-R0052c, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 兔抗肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1, 批号 PA5-95585)、超敏发光液(批号 RJ239676), 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G (H+L)(批号 ZB-2301)、山羊抗兔 IgG/488 (批号 ZF-0511)、浓缩型 DAB 试剂盒(批号 K135925C), 北京中杉金桥生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛(批号 20180312, 国药集团); 小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 单克隆抗体(货号 ab220210)、小鼠酪氨酸羟化酶 (TH) 单克隆抗体(货号 ab129991), 美国 Abcam 公司; 总 RNA 提取试剂盒(货号 RE-03014)、RT Easy TMII (货号 RT-01023)、Real Time PCR Easy TM (货号 QP-01014), FOREGENE 公司; 即用型 DAPI 染液(批号 KGA215-50, 凯基生物科技股份有限公司); TH (批号 AF6113, 美国 Affinity 公司); 受体相互作用蛋白激酶 3 (RIP3,

批号 17563-1-AP, 美国 Proteintech 公司); Cy3 山羊抗兔 IgG (H+L, 批号 AS007, 武汉爱博泰克生物科技有限公司); 三氯乙醛水合物(批号 B2217168, 阿拉丁公司); 苏木素(批号 LM10N13, 北京百灵威科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒(批号 30324, 北京康为世纪生物科技有限公司); RevertAid RT 逆转录试剂盒(货号 K1691, 美国 ThermoFisher 公司)。

ZS-2 型板式酶标仪(北京新凤机电公司); AUW-220D 型电子分析天平(日本岛津公司); TGL20M 型台式高速冷冻离心机(湘仪贝克仪器仪表有限公司); TC-100B 型恒温摇床(上海领成生物科技有限公司); KD-TS3S1 型组织脱水机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); HistoCoreArca-dia 型石蜡包埋机、HistoCoreBIOCUT 型切片机, 德国 Leica 公司; BA400Digital 型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); Tiss-12 全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司); PHY-III 型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司); PIKORed96 型实时荧光定量仪(美国 ThermoFisher 公司); DYY-6C 型蛋白垂直电泳仪(北京市六一仪器厂); DHP-9054 型热恒温培养箱(山东博科生物产业有限公司); BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.4 模型制备

96 只 SD 大鼠采用随机数字表法分成造模组 80 只, 正常组 16 只。造模组大鼠参照文献[7-8], 采用慢性不可预知应激(CUMS)联合甲氧氯普胺腹腔注射构建肝郁脾虚型 HPRL 大鼠模型。CUMS 采取昼夜颠倒、束缚填塞、禁食、禁水、夹尾、潮湿垫料、4℃冰水游泳 7 种方式, 每天随机安排一种应激方法, 同种应激方法不连续出现, 禁水、禁食不连续进行, 共进行 21 天。第 6 天开始配合腹腔注射甲氧氯普胺, 每次 75 mg/kg, 每日 2 次, 连续 15 天。当造模组大鼠出现明显的倦怠少动、呼吸急促、易怒、毛发枯黄、尾部眼周瘀斑等症状, 且大鼠血清 PRL 水平显著高于正常组, 差异具有统计学意义, 说明肝郁脾虚型 HPRL 大鼠造模成功^[8-9]。

1.5 动物分组及给药

按照随机数字表法将造模成功的 80 只大鼠分为模型组, 逍遥散加减方高、中、低剂量组和甲磺酸溴隐亭组, 每组 16 只。各给药组给药剂量按照成人日用量与大鼠体表面积折算为等效剂量^[10]。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，中剂量为人与大鼠等效剂量；甲磺酸溴隐亭组予以甲磺酸溴隐亭片 1 mg/(kg·d) 灌胃，正常组及模型组大鼠给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃。各组均每日灌胃 1 次，连续 14 天。

1.6 标本采集

最后一次灌胃后次日，各组大鼠予以三氯乙醛水合物（浓度 10%，给药体积 3 ml/kg）腹腔注射麻醉后腹主动脉取血，4℃、3000 r/min 离心 12 min（离心半径 12.5 cm）后取上清，用于 ELISA 检测。取血后大鼠断颈处死，取下丘脑组织，采用随机数字表法每组选取 8 个样本，予以 4% 多聚甲醛进行固定，制作石蜡切片。各组剩余大鼠下丘脑组织 -80℃ 冰箱内冻存备用。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 ELISA 法检测血清 PRL 含量 采用随机数字表法从每组 16 只大鼠中选取 8 只大鼠，检测血清 PRL 含量。按照大鼠试剂盒说明书步骤，在酶标仪 450 nm 波长处测量 OA 值，标准曲线下计算血清 PRL 含量。

1.7.2 免疫组化法检测下丘脑 TH、TNF-α 蛋白表达 将固定的下丘脑组织切片后放入双氧水中避光 10 min；利用 PBS 浸洗后将切片浸入柠檬酸盐缓冲液，微波炉中高火加热至沸腾后断电 5 min，重复 1 次，冷却后用 PBS 浸洗；滴加山羊血清封闭液；接着滴加一抗（1：100），4℃ 过夜后滴加生物素化二抗（1：100），37℃、30 min；PBS 水洗后利用 DAB 显色，最后苏木素轻度复染，脱水，透明，中性树胶封片。采用数码三目摄像显微镜对切片进行图像采集。利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集图像的光密度（IOD）和面积（Area），并计算平均光密度。

1.7.3 免疫荧光法检测下丘脑 RIP3 与多巴胺能神经元共表达情况 按照随机数字表法每组选取 6 个石蜡切片。在切片上加入柠檬酸缓冲液加热煮沸后自然冷却，弃去抗原修复液，利用 PBS 浸洗玻片进行封闭。接着吸掉封闭液，在每张玻片滴加足够量的 RIP3（1：200）一抗，放入湿盒 4℃ 环境下孵育过夜；玻片复温至室温后用 PBS 浸洗，滴加荧光二抗 Cy3（1：200），37℃ 环境下于湿盒中孵育 30 min。重复上述抗原修复、冲洗、封闭过程后，在每张玻片滴加足够量的 TH（1：100）一抗，并放入湿盒，4℃ 孵育过夜；浸洗后滴加荧光二抗 IgG/488（1：100），于湿盒 37℃ 下孵育 45 min 后滴加 DAPI 避光

孵育 3 min，对标本进行染核，接下来用 PBS 与自来水冲洗多余的 DAPI；封片后置于荧光显微镜下观察并采集图像，利用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件进行荧光细胞计数。

1.7.4 RT-PCR 法检测下丘脑 RIP3 mRNA 表达 取各组 8 只冻存的大鼠下丘脑组织 10~20 mg，研磨均匀后加入裂解液，4℃、12 000 r/min（离心半径 12.5 cm）离心 15 min 后在水相层加入异丙醇混合以沉淀 RNA，再次离心后移除上清液，加入等体积 75% 乙醇，清洗 RNA 沉淀。吸出乙醇溶液，使 RNA 沉淀在室温空气中干燥 5~10 min。然后加入 40 μl 无 RNA 酶的水，用移液枪反复吹打充分溶解 RNA 后置于 -80℃ 下保存。按逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。cDNA 产物用 RIP3 mRNA 的 PCR 引物，反应体系用 SYBRPremixExTaq™ II（TliRNaseHPlus），ROXplus 进行扩增。扩增程序为 95℃ 预变性 30 s；95℃ 变性 5 s；55℃ 退火 30 s；72℃ 充分延伸，采集荧光 5 s，45 个循环。以 β-actin 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 RIP3 mRNA 的相对表达水平。引物由上海生工生物工程技术有限公司设计合成，RIP3：上游 GGACATCATCTGACACCTTG-GCTGGC，下游 CCGAACTGTGCTGGCTCCTTCTT-GG，扩增长度 265 bp；β-actin：上游 GAAGATCAAGATCATTTGCTCCT，下游 TACTCCTGCTTGCT-GATCCA，扩增长度 163 bp。

1.7.5 Western blot 法检测下丘脑 TNFR1 蛋白表达 采用随机数字表法取各组 3 只冻存的大鼠剩余下丘脑组织 50 mg，解冻，于 4℃ 预冷的匀浆缓冲液中匀浆、离心后取上清，BCA 定量试剂盒测定蛋白含量。SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜，接着加入封闭液，将封闭后的 PVDF 膜用漂洗液洗 1 次。然后将混匀的一抗与二抗 HRP 加入一步法抗体稀释液，一抗：TNFR1（1：1000），GAPDH（1：2000），4℃ 摇床上孵育 12 h。用 TBST 洗膜 3 次后加入二抗（1：2000）孵育 2 h，加入发光液显影。利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析目的蛋白灰度值。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析。计量数据均符合正态分布用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间采用单因素方差分析，采用 LSD 检验进行组间两两比较，方差不齐时采用 Welch 检验，组间两两比较采用 GamesHowell's 多重检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 PRL 和下丘脑 TH、TNF- α 蛋白表达比较

免疫组化显示, 正常组可见大量棕黄色 TH 阳性细胞, 少量黄色 TNF- α 阳性细胞; 与正常组比较, 模型组 TH 阳性细胞减少, TNF- α 阳性细胞增加; 与模型组比较, 逍遥散加减方高、中剂量组 TH 阳性细胞表达增加, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方各剂量组 TNF- α 阳性细胞表达减少, 见附图 1、附图 2 (请扫描本文二维码获取)。表 1 示, 与正常组比较, 模型组血清 PRL 含量显著升高, 下丘脑 TH 表达显著降低, TNF- α 表达显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方各剂量组血清 PRL 含量显著降低, 逍遥散加减方高、中剂量组 TH 表达升高, 甲磺酸溴隐亭组和逍遥散加减方低剂量组 TNF- α 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与甲磺酸溴隐亭组比较, 逍遥散加减方各剂量组血清 PRL 含量及逍遥散加减方中剂量组 TH 表达显著升高 ($P<0.01$); 与逍遥散加减方高剂量组比较, 逍遥散加减方中剂量组 PRL 含量及逍遥散加减方低剂量组 TNF- α 表达显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与逍遥散加减方中剂量组比较, 逍遥散加减方低剂量组血清 PRL 含量升高, TNF- α 表达降低 ($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠下丘脑 TNFR1 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 TNFR1 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 逍遥散加减方各剂量组及甲磺酸溴隐亭组 TNFR1 表达显著降低 ($P<0.01$); 与逍遥散加减方高剂量组比较, 逍遥散加减方低剂量组 TNFR1 表达显著降低 ($P<0.01$)。各组大鼠下丘脑 TNFR1 蛋白电泳图见图 1。

表 2 各组大鼠下丘脑 TNFR1 蛋白表达比较

Table 2 Comparison of hypothalamic TNFR1 protein expression in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNFR1
正常组	3	0.588 $\pm$ 0.074
模型组	3	1.367 $\pm$ 0.048 ^{a)}
溴隐亭组	3	0.771 $\pm$ 0.098 ^{b)}
逍遥散加减方高剂量组	3	0.862 $\pm$ 0.092 ^{b)}
逍遥散加减方中剂量组	3	0.694 $\pm$ 0.087 ^{b)}
逍遥散加减方低剂量组	3	0.598 $\pm$ 0.160 ^{b) c)}

注: TNFR1: 肿瘤坏死因子受体 1。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与逍遥散加减方高剂量组比较, $P<0.01$ 。



注: A, 正常组; 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; TNFR1: 肿瘤坏死因子受体 1。

图 1 各组大鼠下丘脑 TNFR1 蛋白电泳图

Figure 1 Western blot analysis of hypothalamic TNFR1 protein expression in each group of rats

2.3 各组大鼠下丘脑 RIP3 mRNA 和 RIP3 与多巴胺能神经元共表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组下丘脑 RIP3 mRNA 表达及 RIP3 与多巴胺能神经元共表达阳性细胞数显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 逍遥散加减方各剂量组及甲磺酸溴隐亭组 RIP3 mRNA 表达和 RIP3 与多巴胺能神经元共表达阳性细胞数均显著降低 ($P<0.01$); 与甲磺酸溴隐亭组比较, 逍遥散加减方低剂量组下丘脑 RIP3 mRNA 表达降低, 逍遥散加减方高剂量组 RIP3 与多巴胺

表 1 各组大鼠血清 PRL 和下丘脑 TH、TNF- α 蛋白表达比较

Table 1 Comparison of serum PRL levels and hypothalamic TH and TNF- α protein expression in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PRL/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	TH/平均光密度	TNF- α /平均光密度
正常组	8	1.490 $\pm$ 0.298	0.329 $\pm$ 0.023	0.208 $\pm$ 0.009
模型组	8	6.223 $\pm$ 0.930 ^{a)}	0.288 $\pm$ 0.006 ^{a)}	0.219 $\pm$ 0.010 ^{b)}
甲磺酸溴隐亭组	8	1.716 $\pm$ 0.623 ^{c)}	0.302 $\pm$ 0.002	0.208 $\pm$ 0.011 ^{d)}
逍遥散加减方高剂量组	8	4.327 $\pm$ 0.581 ^{e) f)}	0.312 $\pm$ 0.014 ^{d)}	0.213 $\pm$ 0.009
逍遥散加减方中剂量组	8	2.964 $\pm$ 1.246 ^{e) f)}	0.321 $\pm$ 0.002 ^{e) f)}	0.213 $\pm$ 0.009
逍遥散加减方低剂量组	8	3.924 $\pm$ 0.518 ^{e) f) h)}	0.306 $\pm$ 0.020	0.202 $\pm$ 0.005 ^{e) g) h)}

注: PRL, 催乳素; TH, 酪氨酸羟化酶; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与正常组比较, $P<0.05$; 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, $P<0.01$; f) 与逍遥散加减方高剂量组比较, $P<0.01$; g) 与逍遥散加减方高剂量组比较, $P<0.05$; h) 与逍遥散加减方中剂量组比较, $P<0.05$ 。

能神经元共表达阳性细胞数显著升高 ($P<0.01$); 与逍遥散加减方高剂量组比较, 逍遥散加减方中、低剂量组 RIP3 与多巴胺能神经元共表达细胞数显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组下丘脑 RIP3 与多巴胺能神经元共表达情况见附图 3 (请扫描本文二维码获取)。

表 3 各组大鼠下丘脑 RIP3 mRNA 表达和 RIP3 与多巴胺能神经元共表达比较

Table 3 Comparison of hypothalamic RIP3 mRNA expression and co-expression of RIP3 with dopamine neurons in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)		
组别	RIP3 mRNA/ $2^{-\Delta\Delta CT}$	RIP3 与多巴胺能神经元 共表达阳性细胞数/个
正常组	1.013 $\pm$ 0.171(8)	36.50 $\pm$ 15.745(6)
模型组	1.909 $\pm$ 0.416 ^a (8)	88.167 $\pm$ 7.026 ^a (6)
甲磺酸溴隐亭组	1.354 $\pm$ 0.336 ^b (8)	44.333 $\pm$ 3.204 ^b (6)
逍遥散加减方高剂量组	1.143 $\pm$ 0.265 ^b (8)	65.167 $\pm$ 3.601 ^{b,c} (6)
逍遥散加减方中剂量组	1.109 $\pm$ 0.361 ^b (8)	44.50 $\pm$ 11.432 ^{b,d} (6)
逍遥散加减方低剂量组	0.883 $\pm$ 0.150 ^{b,e} (8)	50.833 $\pm$ 4.262 ^{b,e} (6)

注: RIP3, 受体相互作用蛋白激酶 3; 括号内为鼠数。
a) 与正常组比较, $P<0.01$; 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比较, $P<0.05$; e) 与逍遥散加减方高剂量组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

HPRL 属于中医学“乳汁自溢”“闭经”等范畴。《女科撮要》谓:“夫经水者, 阴血也, 属冲任二脉所主, 上为乳汁, 下为血海, 气血冲和, 经乳则各行其道”, 说明了经、乳同源。若肝气不舒、脾气虚弱, 气血运行失调则血脉循行逆乱, 发为本病。国医大师刘尚义提出:“木土相依, 肝脾平和, 气机轮转, 清浊复位”的思想, 强调“调经治肝, 治肝必治气治血”, 在治疗月经不调时重在调肝^[11]。吕艳等^[12]对治疗高 HPRL 的中医复方进行数据挖掘, 结果显示治疗 HPRL 多以疏肝健脾益肾、补血行气回乳的药物为主。综上所述, HPRL 发病的根本原因在于肝失疏泄, 兼有脾虚, 治宜疏肝健脾。逍遥散加减方是在逍遥散的基础上加入生麦芽以回乳消胀, 使肝郁得疏, 脾弱得复, 气血兼顾, 肝脾同治。本课题组前期研究发现, 逍遥散加减方可能通过抑制内质网应激相关凋亡通路, 减轻模型大鼠的多巴胺能神经元损伤^[13], 从而改善 HPRL。

催乳素由垂体前叶的泌乳素细胞分泌, 主要由下丘脑 DA 以抑制方式调节^[14], 而 DA 由多巴胺能

神经元合成与释放, 当血清 PRL 含量升高时, 提示多巴胺能神经元可能受到损伤。本研究结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清 PRL 含量显著升高; 与模型组比较, 甲磺酸溴隐亭组及逍遥散加减方各剂量组血清 PRL 含量显著降低, 说明逍遥散加减方有降低血清 PRL 含量的效果。各药物组之间比较, 逍遥散加减方中剂量组在降低血清 PRL 含量方面优于高、低剂量组, 而甲磺酸溴隐亭组优于逍遥散加减方各剂量组, 说明逍遥散加减方中剂量组在改善血清 PRL 方面效果较佳, 但与甲磺酸溴隐亭片的治疗效果仍有差距。

程序性坏死是由炎症信号触发的坏死调节过程, 并且依赖于受体相互作用蛋白激酶 1 (RIPK1) 和受体相互作用蛋白激酶 3 (RIPK3)^[15]。大多数关于程序性坏死的研究涉及肿瘤坏死因子 (TNF) 信号传导, 其是启动程序性坏死的关键因子^[16]。此外, 在 TNF 受体超家族中, TNFR1 是研究最充分的受体^[17]。RIP3 是细胞程序性坏死信号通路中的重要激酶, 其表达水平和活性情况可以决定细胞的命运^[18]。TH 是多巴胺能神经元的关键标志物^[19]。本研究用 TH 定位多巴胺能神经元, 通过 RIP3 与 TH 阳性神经元的共表达情况, 分析程序性坏死对多巴胺能神经元的潜在作用。

本研究结果发现, 与正常组比较, 模型组下丘脑 RIP3 mRNA 及 TNF- α 、TNFR1 蛋白表达升高, 说明肝郁脾虚型 HPRL 大鼠可能发生了程序性坏死, 且模型组 RIP3 与 TH 标记的多巴胺能神经元共表达阳性细胞数显著增加, 提示程序性坏死可能发生在下丘脑多巴胺能神经元细胞中。经逍遥散加减方各剂量和甲磺酸溴隐亭片干预后, 下丘脑 RIP3 mRNA 和 TNFR1 蛋白表达下降, RIP3 与多巴胺能神经元共表达阳性细胞数降低, 提示逍遥散加减方各剂量及甲磺酸溴隐亭可能通过抑制 RIP3 及其上游相关分子的表达来抑制程序性坏死, 进而保护多巴胺能神经元。同时结果亦显示, 逍遥散加减方低剂量组在下调下丘脑 TNF- α 方面优于逍遥散加减方高、中剂量组, 与甲磺酸溴隐亭疗效相当, 在下调 TNFR1 表达以及 RIP3 与多巴胺能神经元共表达阳性细胞数方面优于逍遥散加减方高剂量组, 与逍遥散加减方中剂量组疗效相当, 在降低 RIP3 mRNA 方面优于甲磺酸溴隐亭组, 说明逍遥散加减方低剂量在通过调节程序性坏死改善多巴胺能神经元损伤方面优于逍遥散加减方高剂量。此外, 与正常组比较, 模型组大鼠下丘脑 TH 表达降低, 血清 PRL 含

量升高,当逍遥散加减方高、中剂量组干预后 TH 表达升高,而 PRL 含量降低,提示多巴胺能神经元的损伤可能会导致 PRL 分泌的增加。基于本实验结果及综合分析,逍遥散加减方中、低剂量组可能通过调节程序性坏死减轻多巴胺能神经元损伤,从而改善 HPRL,其中以逍遥散加减方中剂量组效果最佳。

综上所述,逍遥散加减方可能通过降低下丘脑 TNF- α 、TNFR1 表达,从而抑制 RIP3,以调节多巴胺能神经元细胞的程序性坏死,最终改善 HPRL。由于 HPRL 发病机制是一个复杂过程,本课题仅研究了多巴胺能神经元细胞程序性坏死机制,未来需进一步深入研究相关通路,以期逍遥散加减方治疗 HPRL 提供依据。

参考文献

- [1]谢幸,孔北华,段涛.妇产科学[M].北京:人民卫生出版社,2018:356-357.
- [2]中华医学会妇产科学分会内分泌学组.女性高催乳素血症诊治共识[J].中华妇产科杂志,2016,51(3):161-168.
- [3]李淑红,薛惠英.甲磺酸溴隐亭、促性腺激素不同促排卵方案对高泌乳素血症不孕患者妊娠结局的影响[J].实用中西医结合临床,2021,21(4):37-38.
- [4]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.
- [5]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.
- [6]钱奕茗,孙凤艳.程序性细胞坏死参与急性慢性损伤脑内神经元死亡的研究进展[J].复旦学报(医学版),2021,48(2):240-247.
- [7]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.

- [8]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):2110-2113,2118.
- [9]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.
- [10]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.
- [11]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.
- [12]吕艳,陈艳奇,范源.基于数据挖掘中医药治疗高泌乳素血症的用药规律分析[J].中医药临床杂志,2022,34(12):2323-2328.
- [13]代康莉,李燕,张震,等.逍遥散加减方对高催乳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[J].中医杂志,2023,64(6):625-632.
- [14]FUKUHARA N, NISHIYAMA M, IWASAKI Y. Update in pathogenesis, diagnosis, and therapy of prolactinoma[J].Cancers (Basel),2022,14(15):3604.
- [15]陈丽香,李顺,周晓辉.程序性细胞坏死及细胞焦亡信号通路研究进展概述[J].中华微生物学和免疫学杂志,2020,40(3),231-237.
- [16]LIU Y, LIU T, LEI T, et al. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review)[J].Int J Mol Med,2019,44(3):771-786.
- [17]TAO Y, MURAKAMI Y, VAVVAS DG, et al. Necroptosis and neuroinflammation in retinal degeneration[J].Front Neurosci,2022,16:911430. doi: 10.3389/fnins.2022.911430.
- [18]DUAN C, XU X, LU X, et al. RIP3 knockdown inhibits necroptosis of human intestinal epithelial cells via TLR4/MyD88/NF- κ B signaling and ameliorates murine colitis[J].BMC Gastroenterol,2022,22(1):137.
- [19]林清松. RIP1/RIP3/MLKL 介导帕金森病多巴胺能神经元程序性坏死的机制研究[D].福州:福建医科大学,2019.

Effects of Modified Xiaoyao Powder (逍遥散) on the Programmed Cell Death of Hypothalamic Dopaminergic Neurons in Rat Model of Hyperprolactinemia with Liver Depression and Spleen Deficiency

LI Yan, LI Yan, LIU Kaixin, DAI Kangli, LIU Xiao, Yang Hui, Luo Dan

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550001

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanisms of modified *Xiaoyao Powder* (逍遥散) in the treatment of hyperprolactinemia (HPRL) with liver constraint and spleen deficiency. **Methods** Ninety-six female SD rats were randomly divided into a normal group (n=16) and a modeling group (n=80). In the modeling group, rats were subjected to chronic unpredictable stress combined with intraperitoneal injection of metoclopramide to establish a rat model of HPRL with liver constraint and spleen deficiency. The 80 successfully modeled rats were randomly divided

into a model group, a high, medium, and low-dose group of modified *Xiaoyao Powder*, and a bromocriptine group, with 16 rats in each group. The high, medium, and low-dose groups of modified *Xiaoyao Powder* were orally administered doses of 60, 30, and 15 g/(kg·d) respectively, the bromocriptine group was orally administered bromocriptine tablets at a dose of 1 mg/(kg·d), and the normal group and model group were orally administered 10 ml/(kg·d) of normal saline for 14 consecutive days. ELISA was used to detect serum prolactin (PRL) level; immunohistochemistry was used to determine the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and tyrosine hydroxylase (TH) in the hypothalamus; Western blot was used to detect the protein expression of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) in the hypothalamus; Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of receptor interacting protein kinase 3 (RIP3) in the hypothalamus; immunofluorescence was used to detect the co-expression of RIP3 and dopamine neurons in the hypothalamus. **Results** Compared with the normal group, the serum PRL levels were increased in the model group, and the expression of hypothalamic TNF- α , TNFR1, RIP3 mRNA, and the co-expression of RIP3 with dopamine neurons were significantly increased, while TH expression was decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of hypothalamic TNF- α was decreased in the bromocriptine group and low-dose group of modified *Xiaoyao Powder*, and the expression of TH was significantly increased in the medium and high-dose groups of modified *Xiaoyao Powder* and the bromocriptine group. The serum PRL levels, hypothalamic TNFR1 and RIP3 mRNA expression, and the co-expression of RIP3 with dopamine neurons were significantly decreased in all dose groups of modified *Xiaoyao Powder* and the bromocriptine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the bromocriptine group, the serum PRL level were significantly increased in the high and low-dose groups of modified *Xiaoyao Powder*, TH expression was significantly increased in the medium-dose group of modified *Xiaoyao Powder*, hypothalamic RIP3 mRNA expression was decreased in the low-dose group of modified *Xiaoyao Powder*, and the co-expression of RIP3 with dopamine neurons was significantly increased in the high-dose group of modified *Xiaoyao Powder* ($P < 0.01$). **Conclusion** Modified *Xiaoyao Powder* can regulate the programmed cell death of hypothalamic dopamine neurons, affect DA expression, and regulate PRL levels, which may be one of its mechanisms in the treatment of HPRL with liver constraint and spleen deficiency.

Keywords hyperprolactinemia; *Xiaoyao Powder*; hypothalamus; dopaminergic neurons; soothe the liver and fortify the spleen; programmed cell death

(收稿日期: 2023-08-20; 修回日期: 2023-11-09)

[编辑: 王利芬]

读者·作者·编者

稿件中数字的用法

稿件中用于表示数量的数字一般应使用阿拉伯数字。在表示数值的范围时,可采用浪纹式连接号“~”或连接号“-”。前后两个数值的附加符号或计量单位相同时,在不造成歧义的情况下,前一个数值的附加符号或计量单位可省略。如果省略数值的附加符号或计量单位会造成歧义,则不应省略。如: 100~150 kg, 2亿~3亿(不能写为2~3亿)、15%~30%(不写为15~30%)、 $4.5 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^4$ (不能写为4.5~5.5 $\times 10^4$)。

在某些特定情况下应使用汉字数字。干支纪年、农历月日、历史朝代纪年及其他传统上采用汉字形式的非公历纪年等,应采用汉字数字,如丙寅年三月十五日,正月初八,清咸丰十年九月二十日,日本庆应三年。数字连用表示的概数、含“几”的概数应采用汉字数字,如三四个月,四十五六岁,二十几,几万分之一。数字作为词素构成定型词、词组、惯用语、缩略语或具有修辞色彩的词句,应使用汉字,如一氧化碳,“十一五”规划,十二指肠等。

(本刊编辑部)