

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.004

疏肝健脾法对产后缺乳大鼠催乳素及其受体表达的影响研究*

陈宝艳¹ 甄玉花² 赵颖¹ 王淑平¹ 孙雪¹

(1 广州中医药大学第一附属医院 广东 广州 510405; 2 广州中医药大学第三附属医院 广东 广州 510378)

摘要 目的:观察疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠乳腺组织形态学与催乳素(prolactin, PRL)及其受体(prolactin receptor, PRLR)表达的影响。**方法:**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证结合动物模型,随机分为模型组、空白对照组、西药对照组、中药低、中、高剂量组,每组8只,共6组。药物干预后,采用HE染色及免疫组化法比较不同干预方法对产后缺乳大鼠乳腺组织形态与催乳素及其受体表达的影响,匀浆乳腺组织,采用ELISA法检测乳腺组织催乳素(PRL)、血清催乳素(PRL)、胃泌素(GAS)、血清下丘脑-垂体-肾上腺轴(The hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA轴)水平变化;促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(COR)。**结果:**与模型组相比,西药对照组和中药低、中、高剂量组均可促进乳腺组织向泌乳活跃期发育,表现为腺泡腔充盈、腺泡上皮细胞数量增多、结缔组织和脂肪组织退化,同时增加乳腺组织中PRL(空白对照组(145.72±16.332)、中药中剂量组(127.39±10.854)>西药对照组(80.79±18.112)、中药低剂量组(89.42±14.183)、中药高剂量组(88.02±12.064)>模型组(54.32±7.128))(P<0.05)及PRLR(空白对照组(139.76±14.199)、中药中剂量组(129.09±18.755)>西药对照组(87.42±8.390)、中药低剂量组(81.54±11.090)、中药高剂量组(85.167±9.494)>模型组(60.93±11.767))的表达(P<0.05)。与模型组相比,疏肝健脾中药可降低过高的血清CRH、ACTH、COR水平,升高乳腺组织PRL、血清GAS及PRL水平(P<0.05)。其中,中药中剂量组疗效优于其他用药各组(P<0.05)。**结论:**疏肝健脾法促进产后缺乳大鼠的泌乳作用机制与增加PRL及其受体表达、调节胃肠功能、抑制HPA轴的亢进状态,从而促进乳腺组织形态向泌乳活跃期发育密切相关。

关键词:疏肝健脾法;产后缺乳;大鼠;乳腺组织;PRL

中图分类号:R-33;R174.4;R715.3;R271.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-620-06

Research on the Effect of Shugan Jianpi Method on the Morphology, PRL and PRLR in Postpartum Hypogalactia Rats*

CHEN Bao-yan¹, ZHEN Yu-hua², ZHAO Ying¹, WANG Shu-ping¹, SUN Xue¹

(1 The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, 510405, China;

2 The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, 510378, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Shugan Jianpi method on the histology, PRL and PRLR of mammary gland in rats with postpartum hypogalactia of liver stagnation and spleen deficiency syndrome. **Methods:** The rat model of postpartum hypogalactia of liver stagnation and spleen deficiency was reproduced by bromocriptine mesylate solution and chronic binding method. After the drug was gavaged, HE staining and immunohistochemistry were used to compare the effects of different interventions on mammary gland morphology and expression of prolactin and prolactin receptors in postpartum lactating rats. Serum and mammary gland PRL, serum GAS and the hypothalamic (The hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis) related indicators were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): serum corticotropin releasing hormone (CRH), serum adrenocorticotrophic hormone (ACTH), serum cortisol (COR). **Results:** Compared to the model group, the methoxychloropylamine group and Chinese medicine of high, medium and low dose group can promote the development of breast tissue to active lactation, which is characterized by acinar cavity filling, increased number of acinar epithelial cells, and deterioration of connective tissue and adipose tissue. At the same time, the methoxychloropylamine group and Chinese medicine can increase the expression of PRL and PRLR in breast tissue. The effect of Chinese medicine medium dose treatment group is better than the other groups. In breast tissue, the relationship between PRL and PRLR is linearly related ($r=0.845$, $P<0.05$). Compared to the model group, serum COR, CRH and ACTH in the therapy group decreased significantly ($P<0.05$), while serum and mammary gland PRL and serum GAS level increased ($P<0.05$). **Conclusion:** The mechanism of Shugan Jianpi method promoting lactation in postpartum hypogalactia rats is closely related to increasing the expression of PRL and PRL receptor expression, regulating gastrointestinal function, inhibiting hyperactivity of HPA axis, and thus promoting the development of breast tissue morphology to active

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81603653)

作者简介:陈宝艳(1977-),医学博士,副主任医师,研究方向:围产医学与中医药对母胎的保护作用,

电话:13535586407, E-mail: 1027915064@qq.com

(收稿日期:2018-08-10 接受日期:2018-09-06)

lactation.

Key words: Shugan Jianpi method; Postpartum hypogalactia; Rats; Breast tissue; PRL

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R174.4; R715.3; R271.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)04-620-06

前言

产后缺乳,又称“缺乳”、“乳汁不足”,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^[1],且发病率呈现上升的趋势。母乳喂养可促进婴儿脑部健康发展,产后缺乳严重者导致新生儿营养不良和免疫力低下,影响新生儿身体健康。分娩妇女中,产后抑郁症的发病率约为15%,非哺乳产妇或早期停止母乳喂养的产妇,产后抑郁症的患病风险更高^[2]。母乳喂养还可降低母亲患乳腺癌、卵巢癌等生殖系统恶性肿瘤的风险。

中医药作为我国宝贵的传统医药资源,防治产后缺乳源远流长,涵盖中药、中成药、针灸、推拿、按摩等多种方法^[3]。我们的前期研究发现,产后缺乳单一证型并不多见,而是虚实夹杂,实证兼虚,肝郁脾虚证是最常见的证候之一^[4]。临床常用的疏肝方有逍遥散、柴胡疏肝散、一贯煎等,常用的健脾方有四君子汤、健脾散等,对于肝郁脾虚证的产后缺乳病,则需在通络下乳的基础上,辅以疏肝健脾之法加减,病证结合治疗产后缺乳。因此,本研究以Wistar大鼠为载体,在构建动物模型的基础上,探讨疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠乳腺组织形态和催乳素及其受体表达的影响,旨在为催乳中药研发和辨病、辨证论治机理研究提供动物模型平台和实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取健康的SPF级Wistar大鼠为实验动物,体重300~450 g,由广州中医药大学实验中心提供,生产许可证号:SCXK(粤)2013-00034。48只实验大鼠随机分为6组,即:模型组、空白对照组(即正常哺乳期大鼠)、西药对照组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组,每组8只,每笼1只。实验过程通过实验动物伦理委员会批准,符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。实验大鼠在广州中医药大学第一附属医院SPF级实验室饲养(许可证号:SYXK(粤)2013-0092),母、仔鼠按窝同笼饲养,室温控制在22℃~24℃,湿度45%~65%,换气次数10~15次/h。空气洁净度10000级,落菌数≤3个/皿,噪音≤60 dB,昼夜明暗交替时间12/12 h。大鼠体重及对应每窝仔鼠总重量无统计学差异。

1.2 实验仪器与试剂

束缚筒:为塑料制品,主筒长18 cm,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。Multiskan Mk3型酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司)。玻璃匀浆器。

旋转蒸发器(IKA):德国,型号:DV10digital;显微镜:NIKON Eclipse ci,成像系统:NIKON digital sight DS-FI2,MADE IN JAPAN。TS-8型转移脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);甲磺酸溴隐亭片:匈牙利吉瑞大药厂,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);硫化钠:天津市大茂化学试剂厂;PBS缓冲液(pH 7.2~7.4);EDTA修复液(pH 9.0):1L水中加入Tris-base 1.21 g,EDTA 0.372 g(调节pH=9.0);兔IgG SABC和小鼠IgG SABC免疫组化染色试剂盒博士德生物技术有限公司;DAB显色试剂盒:博士德生物技术有限公司;Anti-Prolactin抗体abcam公司编号:ab183967;Anti-Prolactin receptor abcam公司编号:ab2772;Lot:GR266694-3。ELISA检测试剂盒(CRH、ACTH、COR、GAS、PRL):武汉华美生物工程有限公司。

1.3 造模方法

1.3.1 溴隐亭造模方法(实验第1~7天) 根据预实验以及人与动物剂量换算法,溴隐亭溶液用药剂量为0.525 mg/kg,按照330 g大鼠灌胃5 mL的给药体积灌服,换算得到溴隐亭溶液的浓度为0.0693 mg/mL。将适量甲磺酸溴隐亭片用蒸馏水充分溶解后制得所需浓度后置于棕色试剂瓶中4℃避光保存备用。给实验大鼠按照0.525 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌服溴隐亭溶液,每天早、晚8时各1次,连续7天。空白对照组予等体积的蒸馏水灌胃。

1.3.2 慢性束缚造模方法(实验第1~21天) 将自制的大鼠束缚器置于操作台上,每天3个小时(10~13时),连续21天。

1.4 药物干预方法(实验第22~28天)

西药对照组予甲氧氯普胺片,根据预实验以及人与动物剂量换算法,按3.15 mg/kg体重给药,每天早、晚8时各1次,连续7天。模型组、空白对照组予等体积蒸馏水灌胃。

中药组方:在临床实践和前期研究工作基础上^[5,6],本研究采用疏肝健脾法开展实验研究。本课题化裁组方为:柴胡15 g、当归10 g、白芍15 g、川芎10 g、漏芦10 g、通草10 g、桔梗10 g、王不留行10 g、党参30 g、白术15 g、茯苓15 g、炙甘草10 g。中药在广州中医药大学第一附属医院科研药房按标准浓缩制备。课题设计低浓度、中浓度、高浓度三个中药剂量组,观察可能存在的剂量-效应关系,据文献资料和我们前期研究工作积累,结合人与动物剂量换算法,各组的给药剂量分别为:低剂量组为16.8 g/kg,中剂量组为33.6 g/kg,高剂量组为67.2 g/kg(换算后与人的药物剂量关系为1:1、1:2、1:4)。按照330 g大鼠5 mL/只的体积灌服,换算得到的药物浓度分别为1.109 mg/mL、2.218 g/mL、4.435 g/mL。每天早晚8时各1次,连续7天。

1.5 标本取材

实验第21天采用眼眶静脉丛采血法,第29天采用腹主动脉采血法,将采集血液后的采血管室温静置1 h后,离心10 min(3000 r/min),吸取上清液,编号标记后-80℃保存,备检测。大鼠CRH、ACTH、COR、GAS、PRL采用酶联免疫法测定,按试剂盒说明书进行操作。

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,取第二对乳腺组织,将大鼠乳腺组织用4%中性多聚甲醛溶液固定,标记备用。

将适量乳腺组织用眼科剪剪成碎块后放入组织匀浆管中加入 1 mL 预冷的 0.01 M BPS, 匀速旋转 20 次制成匀浆, 然后移入离心管中在液氮中反复冻融 22 次处理以破坏细胞膜, 将组织匀浆在高速离心机中 4℃、5000 r/min 离心 5 min, 吸取适量上清液, 分装至冻存管内, 编号标记后 -80℃ 保存, 备用。采用酶联免疫法测定 PRL, 按试剂盒说明书进行操作。

1.6 HE 染色及免疫组化

24 小时后将乳腺组织从固定液中取出, 常规进行组织蜡块制作、包埋、修整、切片(4 μm 厚)、烘片、HE 染色等制作。Nikon 显微及成像系统对乳腺组织切片进行组织形态观察, 依次选取各组切片进行拍照并保存。

免疫组化法按照 PRL 及 PRLR 免疫组化试剂盒使用说明

书, 按常规操作步骤检测 PRL 及 PRLR 在大鼠乳腺组织中的表达。每张切片观察 6 个视野, 免疫组化结果以单个视野下累积光密度 IOD 来表示。采用 Image-ProPlus 6.0 软件分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件建立数据库, 检验正态性及方差齐性, 正态分布的数据应用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 计量资料采用 t 检验和方差分析, 两组数据相关性分析采用 Pearson 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺组织形态学观察

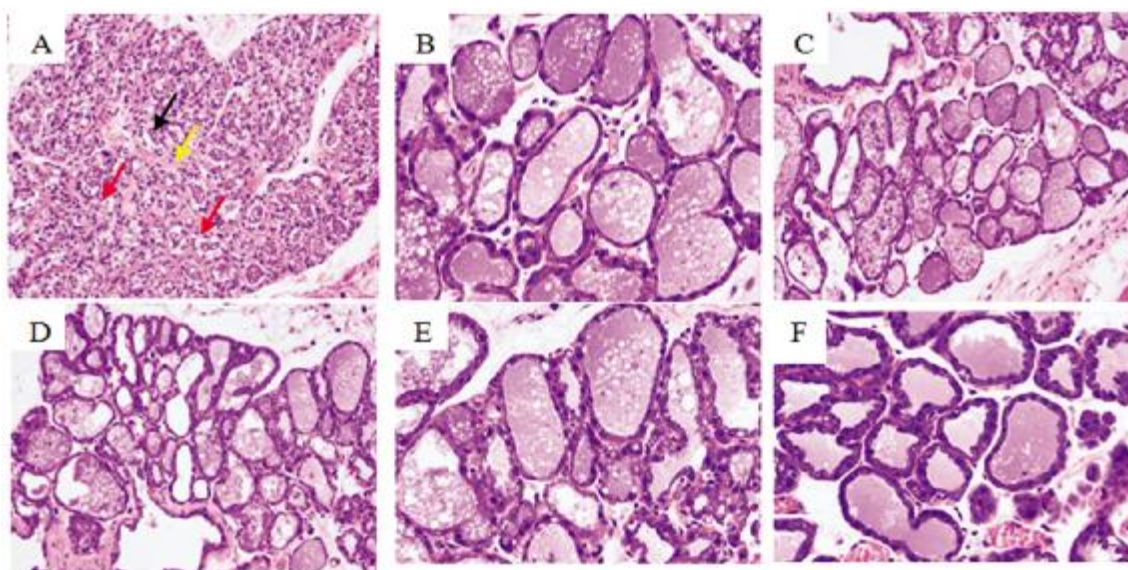


图 1 大鼠乳腺组织病理情况(× 200)

Fig.1 Histopathology of breast tissue in rats(× 200)

Note A: The model group; B: The methoxychloropylamine group; C: Low dose of CM group; D: High dose of CM group; E: Medium dose of CM group; F: The control group.

根据图 1(A)病理结果, 模型组大鼠乳腺组织腺泡发育差, 腺泡腔充盈度欠佳, 腔内分泌物少(黑色箭头), 腺泡上皮细胞数量少, 多见腺泡上皮细胞空泡化(红色箭头); 间质中结缔组织增多(黄色箭头)。

根据图 1(B~D)病理结果显示, 西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组大鼠乳腺组织部分向泌乳期发育, 结缔与脂肪组织减少, 腺上皮细胞数量增多, 腺泡腔大小不一, 充盈尚可。

根据图 1(E~F)病理结果显示, 中药中剂量组与空白对照组大鼠乳腺组织腺泡间结缔组织很少, 主要都是分化完全的成熟腺泡, 腺体的大部分都是充盈的腺泡腔。乳腺处于全面活跃期, 结缔组织和脂肪组织大量退化, 被新发育的腺泡代替, 腺泡呈圆形或椭圆形。

2.2 乳腺组织 PRL、PRLR 免疫组化及 ELISA 结果

表 1 大鼠乳腺免疫组化和 ELISA 结果对比

Table 1 Comparison of immunohistochemical and ELISA results of mammary gland in rats

Groups	N	PRL	PRLR	PRL(ELISA)
Model group	8	54.32± 7.128 ^{**}	60.93± 11.767 ^{**}	22.04± 8.71 ^{**}
Control group	8	145.72± 16.332 ^{▲*}	139.76± 14.199 ^{▲*}	174.70± 14.39 ^{▲7}
Methoxychloropylamine group	8	80.79± 18.112 ^{▲*}	87.42± 8.390 ^{▲*}	66.99± 11.71 ^{▲*}
Low dose of CM group	8	89.42± 14.183 ^{▲*}	81.54± 11.090 ^{▲*}	70.19± 9.62 ^{▲*}
Medium dose of CM group	8	127.39± 10.854 ^{▲*}	129.09± 18.755 ^{▲*}	167.95± 15.81 ^{▲6}
High dose CM of group	8	88.02± 12.064 ^{▲*}	85.167± 9.494 ^{▲*}	73.44± 7.12 ^{▲*}

Note: [▲]Compared to the model group, $P < 0.05$; ^{*}Compared to the control group, $P < 0.05$; ^{*}Compared to the methoxychloropylamine group, $P < 0.05$.

经正态性检验和方差齐性检验,数据符合正态性分布和方差齐。各组 PRL 免疫组化结果对比,采用单因素方差分析, $F=15.329, P<0.05$ 。组间比较,与模型组相比,空白对照组、西药对照组、中药低、中、高剂量组的 PRL 表达均增多($P<0.05$);与空白对照组相比,西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组 PRL 表达均减少($P<0.05$);中药中剂量组与空白对照组相比, PRL 表达无统计学差异($P>0.05$)。各组 PRL ELISA 结果对比,采用单因素方差分析, $F=278.196, P<0.05$ 。组间比较,与模型组相比,空白对照组、西药对照组、中药低、中、高剂量组的 PRL 表达均增多($P<0.05$);与空白对照组相比,西药对照组、中药

低剂量组、中药高剂量组 PRL 表达均减少($P<0.05$);中药中剂量组与空白对照组相比, PRL 表达无统计学差异($P>0.05$)。

各组 PRLR 对比,采用单因素方差分析, $F=45.567, P<0.05$ 。与模型组相比,空白对照组、西药对照组、中药低、中、高剂量组的 PRLR 表达均增多($P<0.05$);与空白对照组相比,西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组 PRLR 表达均减少($P<0.05$),中药中剂量组与空白对照组相比, PRLR 表达无统计学差异($P>0.05$)。

进一步对 PRL 和 PRLR 进行相关性分析,经 Pearson 分析, $r=0.845, P<0.05$,二者存在线性相关关系。

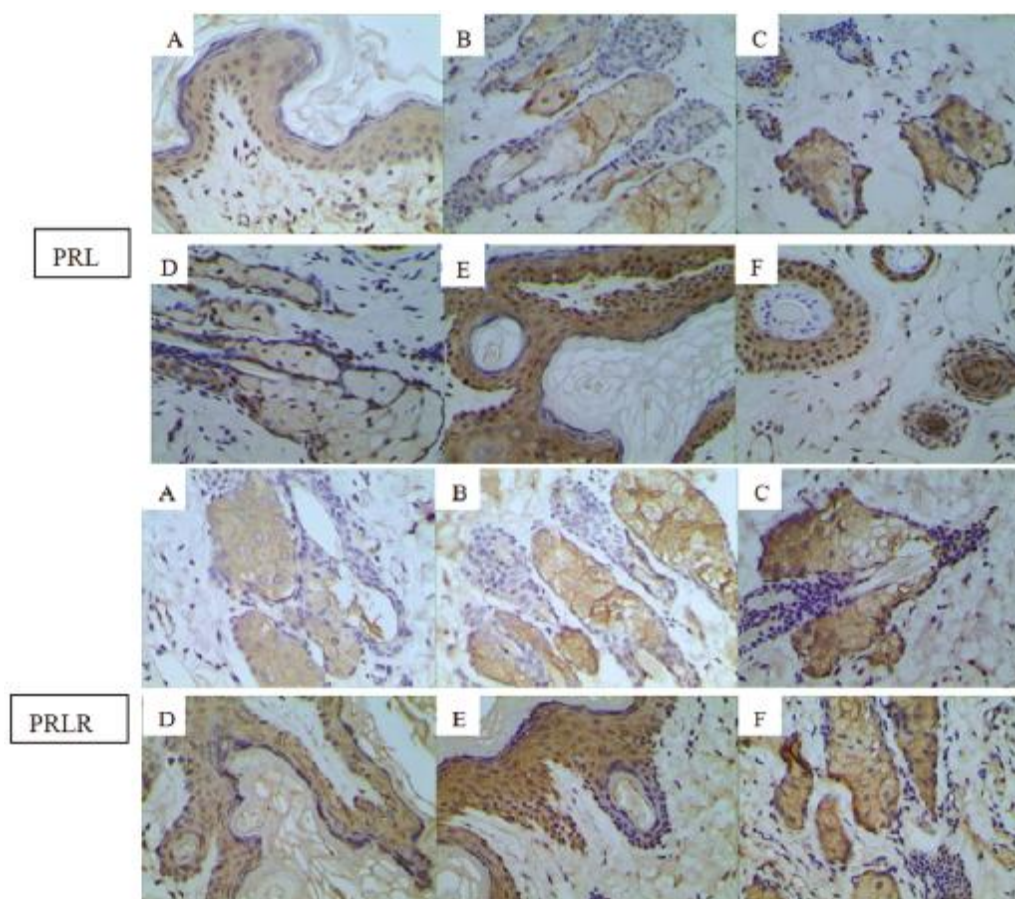


图2 大鼠免疫组化图片(PRL、PRLR)($\times 400$)

Fig.2 Immunohistochemical images of rats(PRL, PRLR)($\times 400$)

Note A: The model group; B: The methoxychloropylamine group; C: Low dose of CM group; D: High dose of CM group; E: Medium dose of CM group; F: The control group.

2.3 大鼠 PRL、GAS 及 HPA 轴激素水平及对比

实验第 21 天,与空白对照组相比,其余五组大鼠血清 CRH、ACTH、COR 明显增加,GAS 及 PRL 水平下降($P<0.05$)。第 29 天,与模型组相比,空白对照组及治疗组大鼠 CRH、ACTH、COR 降低,GAS、PRL 水平升高($P<0.05$)。见表2。

3 讨论

中医学认为,产时失血耗气,加之产后多虚多瘀,哺乳期产妇容易出现脾胃功能虚弱,若饮食不节、劳逸过度或七情所伤,脾胃更易受到损伤则气血不足,可致乳汁缺乏^[4]。产妇生产后情感处于脆弱阶段,情绪波动较大,对承担母亲的角色不适应,担

心婴儿健康,加之社会、家庭环境等慢性应激因素均可能造成心理压力而使产妇出现焦虑抑郁等不良情绪^[7]。产后缺乳单一证型并不多见,肝郁脾虚证是最常见的证候之一。因此本实验复制产后缺乳肝郁脾虚证动物模型,探讨疏肝健脾法对产后缺乳大鼠乳腺组织形态与催乳素及其受体表达的影响。

3.1 疏肝健脾法对大鼠乳腺组织形态的影响

大鼠乳腺发育受营养因素和环境因素影响较大,环境改变诱发的心理应激可引起大鼠内分泌紊乱^[8],导致泌乳不足。本研究采用疏肝健脾法中药治疗,与模型组相比,西药组、中药各剂量组对乳腺组织形态均有积极的干预作用。其中,中药中剂量组效果最好,和空白对照组的大鼠乳腺组织形态表现一致,呈

现腺泡腔充盈饱满的状态,结缔组织和脂肪组织退化,乳腺处于泌乳活跃期状态^[9]。本研究使用的中药在维持大鼠乳腺组织形态学方面的机理,一方面,可能与柴胡、桔梗、通草等的疏肝解郁、宣通乳络功效有关,乳络畅通,不仅有利于乳汁的排泄,还

有利于乳汁的排空,乳汁的排空有助于乳腺分泌活动的维持和增强;四君子汤中益气健脾的中药党参、白术、茯苓等可改善乳腺组织血液循环,增强乳腺组织的营养支持,使药物直达病所,利于药效发挥,提高泌乳质量^[10],故而起到积极的干预作用^[11]。

表 2 大鼠血清 HPA 轴激素水平及 PRL 对比

Table 2 Comparison of serum HPA axis hormone level and PRL in rats

	第 21 天 The 21 st day					第 29 天 The 29 st day				
	CRH	ACTH	COR	GAS	PRL	CRH	ACTH	COR	GAS	PRL
Control group	6.21±	7.32±	256.18±	706.73±	84.70±	5.85±	6.82±	248.19±	730.46±	86.1±
	0.52 [▲]	1.05 [▲]	69.42 [▲]	91.03 [▲]	6.61 [▲]	0.73 ^{▲*}	0.96 ^{▲*}	43.99 ^{▲*}	85.75 ^{▲*}	6.06 ^{▲*}
Model group	7.16±	9.61±	326.7±	424.46±	9.34±	7.62±	9.81±	420.70±	390.46±	9.33±
	0.81 [☆]	1.23 [☆]	47.26 [☆]	93.60 [☆]	4.55 [☆]	0.89 ^{☆*}	1.21 ^{☆*}	45.93 ^{☆*}	111.80 ^{☆*}	4.45 ^{☆*}
Methoxychloropylamine group	7.22±	9.16±	360.2±	443.36±	8.06±	6.65±	8.36±	288.2±	561.36±	39.39±
	0.78 [☆]	1.63 [☆]	66.08 [☆]	107.75 [☆]	5.37 [☆]	0.75 ^{☆*}	0.90 ^{☆*}	49.06 ^{☆*}	69.61 ^{☆*}	6.14 ^{☆*}
Low dose of CM group	7.07±	9.90±	338.36±	446.09±	8.24±	6.69±	7.90±	292.36±	606.09±	41.49±
	0.81 [☆]	1.37 [☆]	69.22 [☆]	80.93 [☆]	5.13 [☆]	0.49 ^{☆*}	1.08 ^{☆*}	37.90 ^{☆*}	69.96 ^{☆*}	6.81 ^{☆*}
Medium dose of CM group	7.36±	9.89±	335.26±	452.22±	9.03±	5.94±	6.89±	239.26±	714.22±	82.95±
	0.81 [☆]	1.54 [☆]	35.34 [☆]	80.81 [☆]	5.22 [☆]	0.71 ^{☆*}	1.07 ^{☆*}	27.07 ^{☆*}	80.35 ^{☆*}	6.72 ^{☆*}
High dose CM of group	6.99±	9.81±	351.67±	472.09±	8.85±	6.67±	8.11±	327.67±	612.09±	36.36±
	0.89 [☆]	1.45 [☆]	47.22 [☆]	76.93 [☆]	5.21 [☆]	0.89 ^{☆*}	1.26 ^{☆*}	36.12 ^{☆*}	90.80 ^{☆*}	4.38 ^{☆*}

Note: [▲]Compared to the model group, P<0.05; [☆]Compared to the control group, P<0.05; ^{*}Compared to the methoxychloropylamine group, P<0.05.

3.2 疏肝健脾法对大鼠乳腺 PRL 和 PRLR 表达的影响

在参与乳腺发育与泌乳的神经、内分泌激素中,PRL 起到至关重要的作用,其他内分泌激素和细胞因子最终均需要通过 PRL 来发挥作用。PRL 因其能刺激多个物种的乳腺生长发育,启动乳汁合成和维持泌乳而得名^[12]。PRL 是由垂体前叶嗜酸细胞分泌的一种蛋白质激素,其分泌受下丘脑释放的多巴胺等神经递质的调控^[13,14],乳腺组织自身也具有合成 PRL 的功能,以旁分泌和自分泌的方式起作用^[15]。PRLR 广泛存在于动物体内,PRLR mRNA 主要在乳腺上皮中表达。研究表明,PRL 发动和维持泌乳的作用与乳腺上皮细胞中 PRLR 在妊娠期和哺乳期的水平表达有关^[16]。PRL 及 PRLR 是乳腺细胞发育和乳汁分泌必不可少的激素及受体,PRL 要实现其生物学功能,必须与 PRLR 结合并导致 PRLR 的激活。我们的研究发现,与模型组相比,西药对照组、中药各剂量组均可增加乳腺组织 PRL 及 PRLR 的表达,其中,中剂量中药组效果最好(表 1)。PRL 与 PRLR 存在一定相关性,PRLR 表达水平随着上皮细胞中 PRL 表达的增加而增加,既往研究表明^[17],乳腺组织越发达,与乳腺发育相关的 PRLR 等受体蛋白表达越高,则泌乳能力越强。

本研究中,西药甲氧氯普胺与中药各剂量组均可提升大鼠乳腺 PRL、PRLR 及血清 PRL 的表达,甲氧氯普胺作为多巴胺 D2 受体拮抗剂,能阻断下丘脑多巴胺受体,抑制催乳激素抑制激素释放,促进 PRL 的分泌而具有中枢性催乳作用^[18],而中药治疗产后缺乳是否与中枢性催乳有关,具体作用机制,有待进一步深入研究。文献研究显示^[19],中药催乳汤可提高溴隐亭所致大鼠产后缺乳模型的乳腺 PRL 水平,黄芪中含有的黄酮类活性成分可作用于下丘脑和垂体,从而引起 PRL 的合成与释放增多,因此,黄芪提取物可提高哺乳母猪泌乳量^[20];八珍颗粒可使产后缺乳的母猪泌乳量明显增加^[21];"芪归"催乳煎剂能提

高母鼠泌乳能力,提升血清泌乳素,促进乳腺腺泡发育^[22];王不留行含有的黄酮苷可促进乳腺细胞的增殖和分泌^[23],王不留行具有确切的催乳疗效^[24,25]。综上所述,本研究中采用的以疏肝健脾法为主中药方促进改善产后缺乳状态的机理,与促进乳腺组织中 PRL 及其受体表达、升高血清 PRL 水平密切相关。

肝郁脾虚证发病的重要机制之一与 HPA 轴功能亢进高度相关,HPA 轴参与机体的应激过程,可调节消化功能、情感状态、免疫功能、能量储存和消耗等多种机体功能,是神经内分泌系统的重要部分。造模后,HPA 轴功能呈现亢进状态,考虑造模后大鼠的宏观表征及泌乳水平下降与 HPA 轴密切相关。中药各组均可提降低 CRH、ACTH、COR 水平,升高 GAS、PRL 水平,且中剂量组效果最佳,提示疏肝健脾中药对大鼠 HPA 具有调节作用,从而改善大鼠胃肠道状态及泌乳水平有关

3.3 疏肝健脾法治疗肝郁脾虚证产后缺乳的中药机理

中药由下乳涌泉散(《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、通络下乳之良方^[27,28],四君子汤是健脾益气的基础方^[29]。君药柴胡具有疏肝行气开郁之力,使得肝气条达气血得运。臣药党参健脾养胃、补后天之本,辅以苦温之白术健脾燥湿,加强益气助运之力;当归、白芍二者合为补血益气、滋养肝体之品。佐以茯苓甘淡,补利兼优,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^[30],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^[31]。以炙甘草、川芎、桔梗司使药之职: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。全方共奏疏肝理气养血、健脾补中益气,通络下乳之功。

方中漏芦、王不留行可活血通络下乳,通草、桔梗理气通络,上药直接作用于乳腺管及其腺泡腔,使泌乳量增加,针对产

后缺乳的疾病动物模型,辨病治疗;而当归、川芎、白芍养血补血,党参、白术、茯苓益气健脾,柴胡疏肝理气,这几味药物并非治疗产后缺乳的特效药物,而是从肝郁脾虚证的证型入手,辨证治疗,针对疾病的根本原因用药。亦有医者提出从肝胃论治产后缺乳^[2],其意同此。全方是辨病与辨证的结合,兼顾疾病的病理变化和中医的证候特征,因而收效较好。药物剂量-效应关系发现,中药中剂量组疗效明显优于低、高剂量组,治疗效果接近空白对照组(正常哺乳期大鼠)水平。表明中剂量组药物浓度合适,药效较好。而高剂量组虽然药物浓度高,但是过于浓稠的药液不仅增加灌胃的阻力,而且不利于脾胃的吸收和运化,过犹不及,而低剂量组可能浓度过低,均无法达到理想的效果。

4 结论

本研究以大鼠产后缺乳肝郁脾虚证病证结合大鼠模型为载体,探索中药治疗产后缺乳的作用机理,研究表明疏肝健脾中药对产后缺乳大鼠的乳腺组织形态和 PRL 及其受体表达有积极的干预作用,为泌乳中药研发、泌乳生物学和泌乳机制调控的深入研究提供了一定的实验依据和基础。

参考文献(References)

- [1] 连方,齐聪. 中西医结合妇产科学[M]. 人民卫生出版社,2012,6(1): 249-251
- [2] De Guzman R M, Saulsbery A I, Workman J L. High nursing demand reduces depression-like behavior despite increasing glucocorticoid concentrations and reducing hippocampal neurogenesis in late postpartum rats[J]. Behav Brain Res, 2018, 353(1): 143-153
- [3] 王彩珊,王朝红. 产后缺乳治疗研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(10): 2232-2234
- [4] 陈宝艳. 产后缺乳与中医体质及中药治疗的临床研究 [D]. 广州中医药大学, 2014
- [5] 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(01): 127-130
- [6] 陈宝艳. 疏肝通络法治肝郁气滞证产后缺乳临床研究[J]. 新中医, 2015, 47(09): 154-156
- [7] 李佳,李晓璇,邓小华. 广东省珠海市产妇产后抑郁现状及影响因素分析[J]. 中国健康教育, 2018, 34(06):537-540
- [8] 王瑞琼,吴国泰,刘峰林,等. 心理应激致孕鼠乳腺发育不良及雌/孕激素和受体水平异常 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(03): 272-277
- [9] 郭旭东,刁其玉,王月影,等. 芦丁对哺乳大鼠乳腺发育及相关激素水平与受体表达量关系的影响 [J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(05): 88-95
- [10] 卢洪彬,夏兰. 加味四君子散对奶牛生产性能的影响[J]. 今日畜牧兽医, 2016, (05): 38-39
- [11] 刘静. 陆德铭教授运用扶正祛邪法治乳腺癌经验 [J]. 中医学报, 2016, 31(04): 470-473
- [12] Guillou A, Romano N, Steyn F, et al. Assessment of lactotroph axis functionality in mice: longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA[J]. Endocrinology, 2015, 156(5): 1924-1930
- [13] Manjarrez-Gutierrez G, Gonzalez-Ramirez M, Boyzo-Montes D O A, et al. Serotonin and dopamine in the hypothalamus of control and malnourished mother rats during pregnancy and lactation and body composition of their offspring [J]. Nutr Neurosci, 2013, 16 (5): 225-232
- [14] Ollier S, Zhao X, Lacasse P. Effects of feed restriction and prolactin-release inhibition at drying off on metabolism and mammary gland involution in cows[J]. J Dairy Sci, 2014, 97(8): 4942-4954
- [15] Uddin R M, Babar M E, Nadeem A, et al. Genetic analysis of prolactin gene in Pakistani cattle [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (10): 5685-5689
- [16] Ueda E K, 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
- [17] 万露. 四乳头湖羊乳腺组织结构与激素受体的表达研究[D]. 西北农林科技大学, 2016
- [18] 董素玲. 研究增乳汤加减联合甲氧氯普胺片治疗产后缺乳的疗效 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(15): 3102-3103
- [19] 董世起. 催乳汤对产后缺乳模型大鼠的治疗作用及其机制研究 [D]. 中国农业大学, 2015
- [20] 邓晓敏,董佳琦,金三俊,等. 王不留行和黄芪提取物对哺乳母猪生长性能和血液生化指标的影响[J]. 中国饲料, 2017, (05): 20-23
- [21] 曹远东,敖清根,周志,等. 八珍颗粒对母猪产前产后疾病的临床应用[J]. 中兽医学杂志, 2014, (04): 50
- [22] 吴妹. "芪归"催乳散促进动物泌乳的作用机理研究 [D]. 福建农林大学, 2011
- [23] Leonoudakis D, Singh M, Mohajer R, et al. Dystroglycan controls signaling of multiple hormones through modulation of STAT5 activity [J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 21): 3683-3692
- [24] 孟海洋,孙晓旭,王立娜,等. 王不留行对奶牛乳蛋白合成信号转导通路的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(4): 121-124
- [25] 赖建彬,刘娟,朱兆荣,等. 王不留行对家兔哺乳期的催乳作用研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(11): 3287-3288
- [26] 王芳芳,武洪志,刁华,等. 王不留行黄酮苷和葛根异黄酮对哺乳母猪泌乳性能及血清激素和抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(12): 3977-3987
- [27] 石国令. 下乳涌泉散治疗产后缺乳 60 例 [J]. 中医临床研究, 2016, (26): 106-107
- [28] 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, (10): 740
- [29] 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(02): 462-467
- [30] 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(01): 295-296
- [31] 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(01): 12-15
- [32] 赵春江,陈瑶,何振,等. 从肝胃论治产后缺乳 [J]. 西部中医药, 2018, 31(03): 111-113