

# 芍药甘草汤治疗高泌乳素血症的组方优化及机制初探

孟延兵

广州医科大学附属第五医院中医科, 广东 广州 510700

**[摘要]** 目的: 优化芍药甘草汤治疗高泌乳素血症 (HPRL) 的组方, 并对其疗效机制进行初步探讨。方法: 60 只雌性 NIH 小鼠, 随机分为 6 组, 每组 10 只。除 10 只为空白组、仅进行生理盐水灌胃外, 其他 5 组均经甲氧氯普胺连续皮下注射 50 天获得 HPRL 小鼠动物模型, 随后再随机分配治疗方案: 芍药甘草汤-1、2、3 组 (SG-1、2、3), 分别给予 1:3、1:1 及 3:1 芍药/甘草配比的芍药甘草汤, 阳性对照组给予溴隐亭, 模型组给予生理盐水; 均连续灌胃 30 天。以 ELISA 法比较不同药物对血清泌乳素 (PRL) 水平的影响; 同时观察血清卵泡刺激素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、睾酮 (T)、雌二醇 ( $E_2$ ) 水平的改变; 并以定量 PCR 法检测垂体表达泌乳素 (Prl) mRNA、泌乳素调节元件结合蛋白 (Preb) mRNA 的改变。结果: 造模后 50 只小鼠的 PRL 明显升高, FSH、LH、T 和  $E_2$  均明显降低 (均  $P < 0.01$ )。阳性对照组经溴隐亭治疗后, PRL 明显降低, FSH、LH 和  $E_2$  均明显提高 (均  $P < 0.05$ )。SG-1、2、3 组的 PRL 均较模型组有明显降低 (均  $P < 0.05$ ), 但仅 SG-3 组与阳性对照组的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。此外, SG-2、SG-3 组治疗后血清 FSH 升高 ( $P < 0.05$ )、而 T、LH、 $E_2$  的改变不明显。SG-1、2、3 组均可使垂体 Prl mRNA 显著降低 (均为  $P < 0.01$ )。SG-2、3 组还可见 Preb mRNA 显著降低 (分别为  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。结论: 芍药甘草汤能有效降低甲氧氯普胺注射小鼠的血清泌乳素的水平, 且重用芍药效果最明显; 其机制可能与升高 FSH、抑制垂体 Prl、Preb mRNA 的表达有关。

**[关键词]** 高泌乳素血症; 芍药甘草汤; 泌乳素; 泌乳素调节元件结合蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 11-0197-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.088

## Composition Optimization and Effective Mechanisms of *Shaoyao Ganciao Tang* for Hyperprolactinemia

MENG Yanbing

**Abstract:** Objectives: To re-optimize the composition of *Shaoyao Ganciao* (SG) tang sepcifically for hyperprolactinemia treatment, and to reveal its underlying effective mechanisms. Methods: Sixty female mice were assigned to 6 groups randomly comprised of 10 mice for each group. Mice in blank group received only oral administration of normal saline, while all mice in the other 5 groups were induced hyperprolactinemia by subcutaneous metoclopramide injection for 50 consecutive days, and thereafter received treatment as follows: SG decoctions in 3 different proportions as 1:3, 1:1 and 3:1 (respectively named as SG-1, 2 and 3 group), bromocriptine(positive control group), or nature saline (model group). The sera content of prolactin (PRL), as well as follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T), and estradiol ( $E_2$ ) were determined by ELISA. The pituitary Prl mRNA and prolactin regulatory element-binding protein (Preb) mRNA were also quantified with real-time PCR. Results: The sera content of PRL in all 50 mice in SG-1, 2 and 3 group was increased significantly ( $P < 0.01$ ), contrarily, FSH, LH, T and  $E_2$  was decreased significantly ( $P < 0.01$ ). In positive control group, the sera content of PRL was declined while FSH, LH and  $E_2$  was elevated after bromocriptine treatment ( $P < 0.05$ ). The sera content of PRL in SG-1, 2, 3 group was decreased more significantly than that in the model group ( $P < 0.05$ ), however, only SG-3 achieving similar effect with bromocriptine ( $P > 0.05$ ). Moreover, the sera content of FSH in SG-2 and SG-3 groups was increased ( $P < 0.05$ ), while exert no effect on LH, T and  $E_2$ . The levels of Pituitary Prl mRNA were decreased in all SG-1, 2, 3 group ( $P < 0.01$ ), particularly in SG-3 group, it being decreased more significantly than those in SG-1 group ( $P < 0.01$ ). The levels of Pituitary Preb mRNA were also decreased in SG-2 and SG-3 group ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). Conclusion: SG tang, particularly for more

**[收稿日期]** 2015-04-21

**[基金项目]** 广州市卫生局医药卫生科技项目 (20132A011038)

**[作者简介]** 孟延兵 (1973-), 女, 副主任中医师, 研究方向: 妇科疾病的中医药治疗。

Shaoyao, can effectively decreased sera PRL in hyperprolactinemia mice induced by metoclopramide injection. This effect is probably mediated by increasing FSH and decreasing pituitary Prl and Preb expression.

Keywords: Hyperprolactinemia; *Shaoyao Gancao* tang; Prolactin (PRL); Prolactin regulatory element-binding protein (Preb)

高泌乳素血症(Hyperprolactinemia, HPRL)是指外周血中垂体分泌的泌乳素(prolactin, PRL)水平明显高于正常,继而引起闭经、溢乳、月经失调、不孕等症状。临床常用溴隐亭治疗,但存在易耐药、副反应严重等问题,且可激活多巴胺受体,对于正在服用抗精神病药物的患者尤为棘手。已有多项研究显示,中药古方“芍药甘草汤”对 HPRL 安全有效,且没有精神方面的副作用<sup>[1-2]</sup>;但其疗效机制尚不清楚。此外,该方常规被用于消炎镇痛<sup>[3]</sup>,如将其用于 HPRL 的治疗,其最佳组方配比尚有待探讨。因此本研究以血清 PRL 为指标,探讨芍药、甘草的最佳配比,并对其疗效机制进行初步探讨。

## 1 材料与与方法

1.1 动物分组及处理 雌性 SPF 级 NIH 小鼠 60 只,3 月龄,体重(25±2)g,由广东省医学实验动物中心提供(动物合格证号:00001579)。所有动物随机分为 6 组,每组各 10 只,分别为空白组、模型组、芍药甘草汤(SG)-1、2、3 组和阳性对照组。除空白组外,所有动物均参照文献[4]使用甲氧氯普胺注射液造 HPRL 的模型。造模方法为:甲氧氯普胺注射液皮下注射 0.2 mg/天,以生理盐水稀释至 0.1 mL,连续 50 天皮下注射。从第 50 天开始按以下方案处理:SG-1、2、3 组分别给予芍药:甘草配比为 1:3、1:1、3:1 的芍药甘草汤水煎液灌胃。阳性对照组以溴隐亭 25 μg/只(1 mg/kg),溶解至 0.5 mL 生理盐水中灌胃;模型组和空白组直接以 0.5 mL 生理盐水灌胃。均为每天 1 次、连续灌胃 30 天。

1.2 药物与试剂 甲氧氯普胺注射液(国药集团容生制药有限公司,批号:05141104);溴隐亭(匈牙利吉瑞大药厂,批号:T4B688A);芍药甘草汤,原方剂量为各 10 g,按照 60 kg 成人、20 g 小鼠之间的换算系数为 12.33,换算得到 25 g 小鼠的临床等效剂量为芍药、甘草各 51.4 mg;在此基础上设 3 个不同芍药/甘草配比的组方(SG-1、2、3),其剂量比分别为 1:3、1:1、3:1。分别混合水煎,并调整浓度至每只小鼠灌胃 0.5 mL 药液。

1.3 观察指标与检测方法 分别于造模前、造模后及末次给药后次日清晨眼眶静脉采血 1 次,采血前动物须禁食 12 h。离心收集血清后,采用 ELISA 法检测:PRL、睾酮(Testosterone, T)、卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和雌二醇(Estradiol, E<sub>2</sub>)的水平;试剂盒均购自 Cloud-clone 公司(美国),按说明书进行操作,并使用 Thermo Multiskan MK3 酶标仪进行检测。脑垂体组织中 Prl(泌乳素)、Preb(泌乳

素调节元件结合蛋白, prolactin regulatory element-binding protein)的 mRNA 表达:尸检时分离脑垂体,留取标本冻存于 -80℃,使用 TRIzol (Invitrogen) 提取 mRNA、随后使用 Superscript First-Strand Synthesis System(Invitrogen)试剂盒按说明书以随机引物逆转录得到 cDNA,并使用 ABI 公司的 SYBR GREEN 试剂盒进行检测。引物及反应条件:PrI (NM\_011164):正向引物 5'-CTT CTT CCC TGG CTA CAC-3';反向引物:5'-CTT TGG CTC TTG ATA GGA T-3'。Preb(NM\_016703):正向引物 5'-GCC GGG GTG TGG AGC TGT ACC-3';反向引物:5'-GCT CTA GCT GCA GAA AAT GCA CGC-3'。反应条件均为:50℃ 2 min, 95℃ 10 s, 继以 95℃ 5 s、60℃ 1 min 40 个循环。Gapdh (NM\_008084)作为内参:正向引物 5'-CCA GAA CAT CAT CCC TGC AT-3',反向引物 5'-GTT CAG CTC TGG GAT GAC CT-3',反应条件为 94℃ 10 s, 58℃ 30 s, 45 个循环。各反应均继以 55~95℃(15 s)的融解曲线以确认无明显非特异性扩增。ABI 7300 实时荧光 PCR 仪检测。在得到各个基因检测的 CT 值(cycle threshold, 即每个反应孔内的荧光信号到达仪器自动设定的阈值时所经历的循环数)后,计算 PrI 和 Preb 基因的 mRNA 与 Gapdh mRNA 的“表达比”,即  $2^{-\Delta CT}(\Delta CT$  指每个样本  $CT_{PrI/Preb} - CT_{Gapdh}$  的差值)。

1.4 统计学方法 使用 IBM SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。血清 PRL 和 T、FSH、LH、E<sub>2</sub> 等激素水平的分析采用重复测量法,组间多重比较用 Turkey 多重范围检验。各组之间 PrI、Preb mRNA 表达量的比较采用单因素方差分析,组间比较用 Dunnett's 检验(各组均与模型组比较)。数据表述为( $\bar{x} \pm s$ )。

## 2 结果

2.1 各组血清 PRL 比较 见图 1。造模前,所有小鼠的平均血清 PRL 浓度为(49.6±13.3)ng/mL;经方差分析显示各组间 PRL 水平的差异不显著( $P > 0.05$ )。而甲氧氯普胺注射后,造模小鼠的 PRL 升高至平均(175.5±15.5)ng/mL,显著高于造模前( $P < 0.01$ );各组造模动物之间比较,差异也无统计学意义( $P > 0.05$ )。到用药结束时,模型组的 PRL 水平回落至(143.4±12.6)ng/mL,显著低于治疗前( $P < 0.05$ )。阳性对照组经溴隐亭治疗后,血清 PRL 降低最为明显( $P < 0.01$ )。各组的均值为:模型组 > SG-1 组 > SG-2 组 > SG-3 组 > 阳性对照组 > 空白组;经 Turkey 多重范围比较,各配比的芍药甘草汤均较模型组明显降低( $P < 0.05$ ),但仅 SG-3 组与阳性对照组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

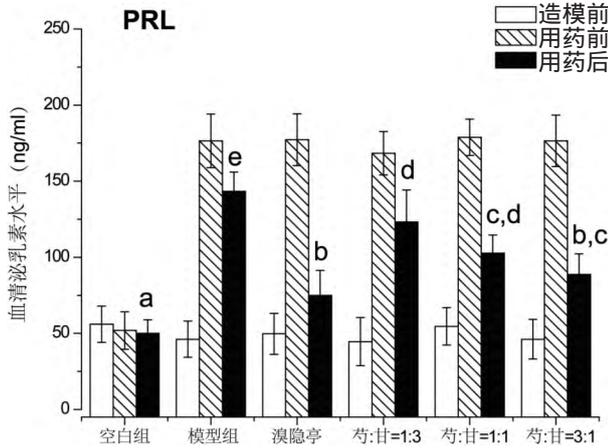


图 1 各组血清 PRL 比较( $\bar{x} \pm s$ )

2.2 各组血清其他激素水平比较 见图 2。在甲氧氯普胺注射造模前，所有动物的血清各激素指标的水平分别为 FSH

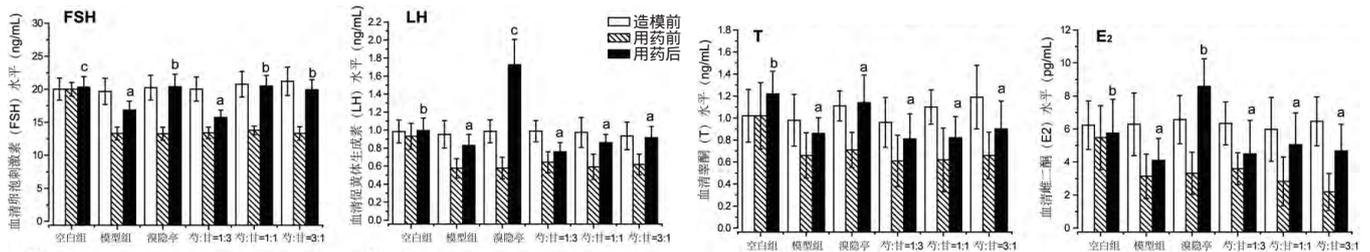


图 2 各组血清其他激素水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

2.3 各组垂体 Prl 和 Preb mRNA 与 Gapdh mRNA 表达比的比较 见图 3。模型组的 Prl 和 Preb mRNA 的水平明显高于空白组，其与 Gapdh mRNA 表达比分别从(2.92 ± 0.14)与(3.07 ± 0.14)上升为(4.02 ± 0.33)( $P < 0.01$ )与(3.80 ± 0.35)( $P < 0.01$ )。与模型组比较，溴隐亭能明显降低动物 Prl 和 Preb mRNA 的表达( $P < 0.01$ )。而不同配比组方的芍药甘草汤也能显著降低 Prl mRNA (均  $P < 0.01$ )，并且 SG-3 组显著低于 SG-1 组。SG-2、SG-3 组能显著降低 Preb mRNA(分别为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )，而 SG-1 组对 Preb mRNA 表达的改变不明显( $P > 0.05$ )。不同配比组方的芍药甘草汤之间，SG-3 组的 Preb mRNA 低于 SG-1 组( $P < 0.05$ )。

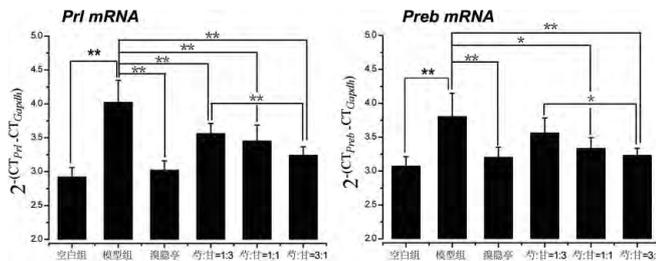


图 3 各组垂体 Prl 和 Preb mRNA 与 Gapdh mRNA 表达比的比较( $\bar{x} \pm s$ )

(20.3 ± 1.9)ng/mL、LH (0.97 ± 0.14)ng/mL、T (1.06 ± 0.23) ng/mL 和 E<sub>2</sub>(6.31 ± 1.55)pg/mL，各组间差异均不显著( $P > 0.05$ )，提示分组均匀。经甲氧氯普胺注射后，所有造模小鼠的总平均 FSH 降低至(13.4 ± 0.9)ng/mL、LH 降低为(0.60 ± 0.12)ng/mL、T 降至(0.7 ± 0.2)ng/mL、E<sub>2</sub> 降至(3.02 ± 1.29) pg/mL(均为  $P < 0.01$ )，显示造模后 FSH、LH、T、E<sub>2</sub> 均明显降低。逐个对每个激素水平进行各组的 Turkey 多重范围比较。FSH，经溴隐亭治疗后明显升高，与模型组比较，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。SG-2、SG-3 组升高 FSH 的幅度高于 SG-1 组及模型组( $P < 0.05$ )，接近阳性对照组( $P > 0.05$ )。LH，经溴隐亭治疗后明显升高，与模型组比较，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而各配比组方的芍药甘草汤对 LH 的改变不明显。所有治疗均未明显提高血清 T 的水平。经溴隐亭治疗后 E<sub>2</sub> 明显升高，与模型组比较，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，而各配比组方的芍药甘草汤对 E<sub>2</sub> 的改变不明显。

### 3 讨论

中医治疗 HPRL 有不错的疗效，但这些研究通常个体差异较大、样本数较少，需要通过动物实验来加以验证并阐释其疗效机制。甲氧氯普胺可特异性作用于垂体内多巴胺 D-2 受体，抑制促泌乳素细胞的凋亡，在小鼠模拟出高泌乳素血症的症状，并导致性激素的紊乱。本研究也证实，小鼠注射甲氧氯普胺后血清 PRL 明显高于阴性对照组，且同时存在 FSH、LH、T、E<sub>2</sub> 的明显降低。

本研究还发现，使用阳性对照药物溴隐亭，以及不同配比组方的芍药甘草汤均能明显降低雌性小鼠血清 PRL 水平，其中芍药：甘草为 3：1 剂量配比时，效果最好。该结果提示，虽然芍药甘草汤在常规运用于消炎镇痛时常按 1：1 配伍组方，但如将其用于 HPRL 的治疗，重用芍药应能取得更好的效果。

此外，本研究还发现芍药甘草汤能提高 HPRL 小鼠血清 FSH 的水平，对 LH、E<sub>2</sub> 和 T 等激素的改变不明显。同时，芍药甘草汤还可降低垂体 Prl、Preb mRNA 的表达；而 Preb 是调节 Prl 基因启动子活性的转录因子。这些结果提示 FSH、泌乳素调节元件结合蛋白(PREB)可能参与了芍药甘草汤治疗 HPRL 的机制，为该方的深度开发研究提供了实验依据。虽然

芍药甘草汤对这些指标的影响均弱于阳性对照药物溴隐亭,但考虑到溴隐亭的副作用及其在精神科患者的使用限制,对其的深入研究与开发有良好的前景。

本项研究还只是初步的探索,尚存在大量值得研究的问题。首先,芍药甘草汤适用于哪些原因引起的 HPRL 患者,仍有待于研究。其次,芍药甘草汤的疗效机制尚有待细化。第三,本研究采用溴隐亭作为阳性对照药物,而随着研究的进展,不断出现更高效、更低副作用的药物。那么芍药甘草汤在低副作用方面的优势,尚需重新比较、评估。第四,PREB 可能是芍药甘草汤在代谢、炎症等多方面发挥疗效的基础,是非常值得进一步研究的课题。

#### [参考文献]

[1] 徐吉祥,王丽华,朱鸣琴.加味芍药甘草汤治疗高泌乳

素血症型男性不育症 67 例[J].中国中西医结合杂志,1997,17(11):693.

[2] 徐吉祥.芍药甘草汤治疗高泌乳素血症型女性不孕症临床观察[J].中国中西医结合杂志,2003,23(8):602.

[3] 朱广伟,张贵君,汪萌.配伍组分、配伍比例对芍药甘草汤抗炎镇痛作用的影响[J].药学与临床研究,2014,22(4):323-325.

[4] Amaral VC, Maciel GA, Carvalho KC, et al. Metoclopramide-induced hyperprolactinemia effects on the pituitary and uterine prolactin receptor expression[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 189: 105-110.

(责任编辑:骆欢欢)

## 裸鼠阳虚证乳腺癌骨转移模型的建立

龚辉,黄立中,毛丹,冯磊,刘吉勇

湖南中医药大学,湖南 长沙 410007

**[摘要]** 目的:采用病、证复合模型的方法建立裸鼠阳虚证乳腺癌骨转移模型。方法:采用臀部肌肉注射氢化可的松的方法建立裸鼠阳虚证模型;采用左心室注射乳腺癌细胞 MDA-MB-231 悬液建立裸鼠乳腺癌骨转移模型;动态观察各组裸鼠生存情况、体重变化,进行 X 线摄像观察,测定环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP)、血清甲状腺三碘原氨酸 (T3) 等值。结果:肌注氢化可的松后,裸鼠出现畏寒肢冷、活动减少、精神萎靡、皮毛少光泽、饮食减少、大便清稀等阳虚表现,且 cAMP 明显下降、cGMP 明显升高、cAMP/cGMP 值下降, T3 值明显升高;左心室注射乳腺癌细胞悬液后裸鼠出现不同程度的骨转移,且经 X 线摄像检查确诊。结论:对裸鼠肌注氢化可的松可成功建立阳虚证模型;左心室注射法建立乳腺癌骨转移模型的成功率较高。

**[关键词]** 乳腺癌;骨转移;阳虚证;裸鼠模型

**[中图分类号]** R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 11-0200-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.089

## Establishment of Nude Mouse Model of Yang Deficiency and Bone Metastasis of Breast Cancer

GONG Hui, HUANG Lizhong, MAO Dan, FENG Lei, LIU Jiyong

**Abstract:** Objectives: To establish nude mouse model of Yang deficiency and bone metastasis of breast cancer by the combination of disease and syndrome method. Methods: Intramuscular injecting hydrocortisone to establish the Yang deficiency syndrome model, and injecting breast cancer MDA-MB-231 cells suspension into the left Ventricle to establish bone metastasis model. Nude mice survival, the body weight changes, the X-ray imaging, and the levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), testosterone (T3) were observed. Results: After injecting

**[收稿日期]** 2015-04-12

**[基金项目]** 高等学校博士学科点专项科研基金 (2011432311006); 湖南省自然科学基金 (12JJ5055); 湖南省研究生创新课题 (CX2014B353)

**[作者简介]** 龚辉 (1986-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗肿瘤。

**[通讯作者]** 黄立中, E-mail: hlz992002@163.com