

基于下丘脑催乳素受体泛素化探讨补肾助孕方对高催乳素血症模型大鼠的影响

冯 华^{1*}, 蒋金金¹, 丁世彬¹, 沈 斌¹, 张 晶¹, 张 清¹, 王诗玥¹, 周惠芳^{2*}

1. 江苏医药职业学院, 江苏 盐城 224005

2. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 观察补肾助孕方对高催乳素血症 (HPRL) 模型大鼠生殖功能的影响, 并探讨催乳素受体 (PRLR) 泛素化在其中的作用机制。方法 将 40 只雌性 SD 大鼠随机分为 5 组, 分别为对照组、模型组、溴隐亭 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组、补肾助孕方低、高剂量 ($9, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 低剂量为临床等效剂量) 组。大鼠颈部 sc 甲氧氯普胺 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 连续 20 d, 对照组 sc 给予等量 0.9% 氯化钠溶液, 制备 HPRL 模型。造模成功后开始给药, 每天 1 次, 连续 ig 给药 30 d, 对照组、模型组给予等体积纯水。采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察大鼠下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织的形态学变化; 酶联免疫吸附 (ELISA) 测定大鼠血清催乳素 (PRL)、促卵泡激素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、雌二醇 (E_2) 水平; Western blotting 检测下丘脑吻素 (Kisspeptin)、PRLR 以及 Janus 激酶 2/信号转导及转录激活因子 5 (JAK2/STAT5) 信号通路相关蛋白表达; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 Kisspeptin mRNA 表达水平; 免疫荧光共聚焦观察 PRLR 与 Kisspeptin 神经元的共定位表达; 免疫共沉淀 (Co-IP) 检测 PRLR 泛素化水平, PRLR 与去泛素化酶 COP9 信号复合体亚基 5 (CSN5) 结合水平。结果 与对照组比较, 模型组大鼠下丘脑神经元、垂体、卵巢、子宫组织出现病理性改变; 大鼠血清 PRL 水平显著上升, FSH、LH 和 E_2 水平显著下降 ($P < 0.01$); 大鼠下丘脑 PRLR、Kisspeptin、CSN5 蛋白表达水平以及磷酸化 JAK2 和 STAT5 蛋白水平显著下降 ($P < 0.01$); kisspeptin mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$); PRLR 泛素化水平升高; PRLR 与去泛素化酶 CSN5 结合水平显著下降。与模型组相比, 溴隐亭组和补肾助孕方低、高剂量组下丘脑区神经细胞排列较规整, 胞质胞核较清晰, 炎症细胞数量有所减轻; 溴隐亭组和补肾助孕方高剂量组 PRL 水平显著下降, FSH、LH 和 E_2 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); PRLR、Kisspeptin、CSN5 蛋白表达水平以及磷酸化 JAK2 和 STAT5 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); PRLR 泛素化水平显著下降, 且 PRLR 与 CSN5 的结合水平上升。结论 补肾助孕方能够降低过高的 PRL 水平, 使 HPRL 大鼠下丘脑中 Kisspeptin 表达增加, 从而改善生殖轴功能, 其机制可能与其增加 PRLR 与去泛素化酶 CSN5 结合, 降低 PRLR 泛素化水平, 提高 PRLR 介导 JAK2/STAT5 信号通路表达有关, 同时也证明该方具有调节心 (脑) -肾-子宫轴的作用。

关键词: 补肾助孕方; 高催乳素血症; Kisspeptin; 催乳素受体; 泛素化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)03-0638-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.03.010

Effect of Bushen Zhuyun Decoction on hyperprolactinemia model rats based on hypothalamic prolactin receptor ubiquitination

FENG Hua¹, JIANG Jinjin¹, DING Shibin¹, SHEN Bin¹, ZHANG Jing¹, ZHANG Qing¹, WANG Shiyue¹, ZHOU Huifang²

1. Jiangsu Medical College, Yancheng 224005, China

2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Bushen Zhuyun Decoction (BZD) on the reproductive function of HPRL rat model and the mechanism of PRLR ubiquitination involved in it. **Methods** Forty female SD rats were randomly divided into five groups, including the normal control group, the high prolactin model group, the bromocriptine group, the low-dose herbal medicine group, and

收稿日期: 2024-09-24

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82205160); 江苏省中医药管理局面上项目 (MS2021103)

作者简介: 冯 华 (1982—), 女 (汉族), 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事不孕症的基础与临床研究。E-mail: 12097@jsmc.edu.cn

*通信作者: 周惠芳 (1962—), 女 (汉族), 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事不孕症的基础与临床研究工作。

E-mail: zhouhuifang2011301@163.com

the high-dose herbal medicine group. The model was established by sc metoclopramide $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in the neck of rats once a day for 20 d. Equal volume of 0.9% NaCl solution was given to the control sc. After successful modeling, the drug was started to be administered once a day for 30 d consecutive ig administration, and equal volume of pure water was given to the control and model groups. The morphological changes of the hypothalamus, pituitary gland, ovary, and uterus tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of PRL, FSH, LH, and E_2 in the blood were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of Kisspeptin, PRLR, and JAK2/STAT5 signaling pathway-related proteins in the hypothalamus were detected by Western blotting. The expression level of *Kisspeptin* mRNA was detected by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The co-localization expression of PRLR and Kisspeptin neurons was observed by immunofluorescence confocal microscopy. The level of PRLR ubiquitination was detected by immunoprecipitation (Co-IP), and the binding level of PRLR with deubiquitinase CSN5 was detected. **Results** Compared with the normal control group, Model group of rats showed pathological changes in hypothalamic neurons, pituitary gland, ovary, and uterine tissues; Significant increase in serum PRL levels in rats, FSH, LH and E_2 levels decreased significantly ($P < 0.01$); The expression levels of PRLR, Kisspeptin, CSN5 and phosphorylated JAK2 and STAT5 in rats ($P < 0.01$); *kisspeptin* mRNA Expression level was significantly reduced ($P < 0.01$); The PRLR ubiquitination level is increased; PRLR binds at a significantly less significant level to the deubiquitinating enzyme CSN5. Compared with the model group, nerve cells in the hypothalamic region were organized at low and high doses, and the number of inflammatory cells decreased; PRL decreased and FSH, LH and E_2 increased ($P < 0.05, 0.01$); PRLR, Kisspeptin, CSN5 protein expression levels and phosphorylated JAK2 and STAT5 levels increased ($P < 0.05, 0.01$); PRLR ubiquitination decreased, and PRLR binding to CSN5 levels increased. **Conclusion** BZD can reduce the high PRL level and increase the expression of Kisspeptin in the hypothalamus of HPRL rats, improving the reproductive axis function. The mechanism may be related to the increase of PRLR and the deubiquitinating enzyme CSN5, reduce the level of PRLR ubiquitylation, and improve the expression of PRLR to mediate the JAK2/STAT5 signaling pathway, and also prove the function of regulating the cardiac (brain) -kidney-uterine axis.

Key words: Bushen Zhuyun Decoction; hyperprolactinemia; Kisspeptin; PRLR; ubiquitination

高催乳素血症 (HPRL) 常引起促性腺激素释放激素 (GnRH)、促黄体生成素 (LH) 和促卵泡激素 (FSH) 分泌紊乱, 是育龄期女性不孕的主要原因之一^[1]。近年来随着生活节奏的加快、社会竞争的加剧, 女性心理压力大为增加, 本病的发病率有升高的趋势^[2]。国医大师夏桂成教授提出心 (脑) -肾-子宫轴理论, 强调心 (脑) 对女性生殖功能的重要调节作用, 补肾助孕方是在该理论指导下, 周惠芳教授经过 30 多年反复临床及实验筛选凝练而成, 全方具有调心疏肝, 补肾助孕的作用, 已广泛应用于临床。课题组前期临床研究表明补肾助孕方能够显著改善 HPRL 不孕患者异常的性激素水平以及妊娠结局^[3]。吻素 (Kisspeptin) 是由 *KISS-1* 基因编码的多肽激素, 可调节 GnRH 的分泌, 是下丘脑-垂体-卵巢 (HPO) 轴的上游因子, 对生殖功能起着重要的作用。课题组前期实验研究证实补肾助孕方含药脑脊液能够明显降低高催乳素环境下 GT1-7 神经细胞 Kisspeptin 水平^[4]。本实验在前期研究基础上, 进一步探索补肾助孕方对 HPRL 模型大鼠生殖功能的影响, 并从催乳素受体 (PRLR) 泛素化过程展开研究, 阐释补肾助孕方调节下丘脑 Kisspeptin 表达的作用机制, 为临床治疗 HPRL 不孕症提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量 (220 ± 20) g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司提供, 动物生产许可证号 SCXK (苏) 2021-0013, 饲养于 (22 ± 2) °C 的 SPF 环境中, 自由摄食和饮水, 室内温度控制在 $21 \sim 25$ °C, 相对湿度 40%~70%, 光照和黑暗各 12 h 交替进行, 在实验前均适应性喂养 1 周, 实验操作经江苏医药职业学院动物伦理委员会批准 (批准号 XMLL-2021-003)。

1.2 实验药物

补肾助孕方由炒白芍 10 g、山萸肉 10 g、淮山药 15 g、醋柴胡 10 g、菟丝子 15 g、鹿角片 10 g、莲子心 6 g、首乌藤 10 g 组成, 中药饮片购自南京中医药大学盐城附属医院, 并由医院出具合格报告。采用传统煎药法煎煮: 取总药材 8 倍量的水浸泡 30 min 后, 鹿角片先煎煮 30 min 后, 将剩余药物加入, 药液煮沸后再小火煎煮 30 min, 滤过煎煮液; 再加 6 倍量水, 沸后煎 30 min 并滤过; 最后加 4 倍量水, 沸后煎 30 min 并滤过。将 3 次中药水煎液充分混匀、滤过。采用浓缩旋转蒸发法将水煎液浓缩至含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4 °C 保存备用, 用于实验, 给

药前复温至 25~28 °C。采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用方法 (UPLC-Q-TOF/MS) 进行分析, 样品中单萜类化合物质量分数为 55.39% (其中莫诺苷为 12.33%)、苯丙素类化合物质量分数为 17.64%、有机酸质量分数为 7.23%、黄酮类化合物质量分数为 4.79%、酚类化合物质量分数为 4.40%。

甲磺酸溴隐亭片 (匈牙利吉瑞大药厂, 规格每片 2.5 mg); 盐酸甲氧氯普胺注射剂 (天津药业集团新郑股份有限公司, 规格每支 10 mg)。ELISA 试剂盒: 大鼠催乳素 (PRL) (英国 Abcam 公司, 货号 ab272780); 大鼠 FSH (美国 Lifespan biosciences 公司, 货号 LS-F38636); 大鼠 LH (英国 Abbexa 公司, 货号 abx255786); 雌二醇 (E₂) (美国 R&D Systems 公司, 货号 KGE014)。抗体: PRLR、kisspeptin、GAPDH (英国 Abcam 公司, 货号 AB170935、AB19028、AB8245); COP9 信号复合体亚基 5 (CSN5) (美国 Novusbio 公司, 货号 NBP2-75546); p-Janus 激酶 2 (p-JAK2)、JAK2、p-转录激活因子 5 (STAT5)、STAT5 (美国 CST 公司, 货号 3771、3230、9314、94205)。

1.3 主要试剂和仪器

全自动酶标仪 (美国 Thermo 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司); 低温离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 实验动物模型构建

将 8 周龄 SD 实验大鼠用随机数字法分为 5 组, 每组 8 只, 分别为对照组、模型组、溴隐亭 (2 mg·kg⁻¹) 组、补肾助孕方低、高剂量 (9、18 g·kg⁻¹, 低剂量为临床等效剂量) 组。沿用本课题组前期建模方法, 大鼠颈部 sc 甲氧氯普胺 40 mg·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 20 d, 对照组 sc 给予等量 0.9% 氯化钠溶液, 第 20 天取血测定血 PRL, 血清 PRL > 100 μg·L⁻¹ 为造模成功。造模成功后开始给药, 每天 1 次, 连续 ig 给药 30 d, 对照组、模型组给予等体积纯水, 给药结束第 2 天处死大鼠, 留取血清, 收集下丘脑、垂体、卵巢和子宫组织进行后续研究。

2.2 HE 染色观察下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织病理学改变

下丘脑、垂体、卵巢和子宫标本用 10% 缓冲福尔马林固定, 在乙醇中脱水, 石蜡包埋并切成切片。将干燥的石蜡切片进行常规二甲苯脱蜡, 下行梯度乙醇水化, 蒸馏水洗。苏木精染色 2 min 后, 盐酸

酒精分化数秒, 水洗返蓝。载玻片用伊红染色, 再用水洗冲掉残留染液, 脱水并密封。用显微镜随机选择一个视野观察并拍照。

2.3 ELISA 法检测大鼠血清 PRL、E₂、FSH 和 LH 水平

配备标准品孔、样品孔和对照孔, 准备标准品和样品, 每孔分别加入 100 μL 标准品溶液或样品溶液, 室温孵育, 弃液洗板。每孔加入 100 μL 一抗 37 °C 孵育, 弃液洗板。每孔加入 100 μL 入酶标抗体工作液, 弃液洗板。加入反应底物溶液, 在室温下离光孵育 30 min。最后, 加入 50 μL 终止液停止反应, 使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.4 Western blotting 法检测下丘脑相关蛋白表达

将适量下丘脑组织粉碎并在 RIPA 中裂解, 然后 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液按照 BCA 试剂盒的说明书测定总蛋白浓度。根据待测蛋白分子量, 配胶, 常规转膜完成后封闭, 加入用 TBST 稀释至适当浓度的一抗, 包括 GAPDH (1:10 000)、Kisspeptin (1:2 000)、PRLR (1:1 000)、phos-JAK2 (1:1 000)、JAK2 (1:1 000)、p-STAT5 (1:1 000)、STAT5 (1:1 000)、CSN5 (1:1 000), 4 °C 过夜。洗膜, 加入适量适当浓度的二抗, 室温下孵育 1 h。洗膜, 加显影液处理后进行检测, 并使用 Image J 软件对灰度值进行分析, 将待测蛋白水平与内参 GAPDH 蛋白水平进行对比, 表示蛋白相对表达水平。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测下丘脑 Kisspeptin mRNA 表达量

取适量下丘脑组织, 剪碎浸泡于 TRIzol 试剂中提大鼠下丘脑组织总 RNA。cDNA 合成采用 20 μL 体系。反应条件为: 25 °C 反应 5 min, 42 °C 反应 30 min, 85 °C 反应 5 min, 获得 cDNA, -70 °C 保存。qRT-PCR 采用 20 μL 体系, 将预混好的试剂加入 8 联管内, 封好, 放入仪器内, 设置反应参数, 进行扩增, 结果采用 2^{-ΔΔCt} 进行计算。Kisspeptin 引物序列 (5' → 3') 如下: 上游 CTCTGTGTCGCCA CCTATGG, 下游 AGGCTTGCTCTCTGCATACC; GAPDH 引物序列 (5' → 3') 如下: 上游 CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA, 下游 GGCA TGGACTGTGGTC ATGA。

2.6 免疫共沉淀 (CO-IP) 检测 PRLR 泛素化水平

将粉碎的下丘脑组织在 4 °C 的 RIPA 缓冲液中裂解 30 min。14 000×g 离心 15 min 后, 将上清液

与 protein A/G-agarose 工作液在 4 °C 下孵育 10 min。在 4 °C、14 000×g 离心 15 min 后，再次转移上清液。采用 BCA 法检测总蛋白浓度，稀释至 3 μg·μL⁻¹。加入 5 μL 的抗体 (PRLR 1:200) (对照组加入 IgG 抗体)，4 °C 下孵育过夜。加入 100 μL protein A/G-agarose 微球来捕捉抗原抗体复合物，收集上清，用合适体积的上样缓冲液重悬，然后进行 Western blotting 检测泛素化水平。

2.7 激光共聚焦检测 PRLR 与 Kisspeptin 表达

将干燥的石蜡切片在柠檬酸抗原修复液 (pH=6.0) 中进行抗原修复，用 5% BSA 封闭 30 min 后，用一抗 PRLR (1:20) 和二标一抗 (Kisspeptin 1:500) 在 4 °C 下孵育过夜。切片与荧光二抗 Goat Anti-Mouse IgG H&L (1:1 000) 和 Goat Anti-Rabbit IgG H&L (1:1 000) 在室温下孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次后，用 DAPI 孵育 15 min。最后，用 PBS 洗涤 3 次，每次 10 min，然后密封，用激光共聚焦显微镜 (630 倍) 检测。

2.8 数据分析

使用统计分析软件 SPSS 21 进行统计分析，对各组定量资料进行正态性检验，符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。为了在实验组之间进行比较，

采用了单向方差分析和图基检验。

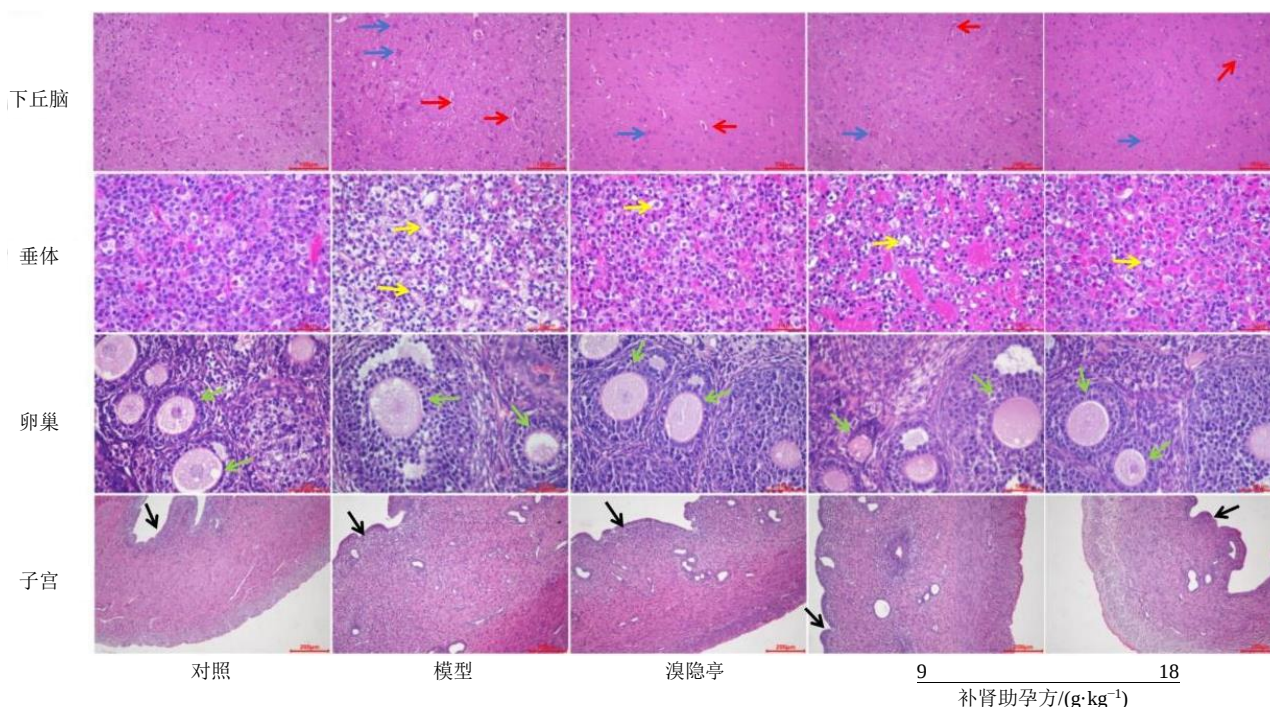
3 结果

3.1 补肾助孕方对 HPRL 大鼠下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织结构的影响

如图 1 所示，对照组下丘脑细胞结构正常，神经元胞体呈多角形，胞质中充满深紫色小块或颗粒状尼氏体；神经胶质细胞胞体、胞核均较大；也有少突胶质细胞，胞体小，圆或卵圆形。模型组下丘脑区神经细胞排列紊乱，形态欠规整，胞质胞核染色欠清晰；神经纤维结构疏松，炎症细胞数目明显增多。与模型组比较，溴隐亭组和补肾助孕方低、高剂量组下丘脑区神经细胞排列较规整，胞质胞核较清晰，炎症细胞数量有所减轻。

对照组垂体组织未见明显异常，腺管腔无扩大或缩小，细胞排列整齐有序；模型组垂体组织正常形态结构消失，垂体细胞排列紊乱，大小各异，形态多样；与模型组比较，溴隐亭和补肾助孕方低、高剂量组垂体组织细胞排列恢复整齐有序。

对照组卵巢组织可见数个生长期卵泡，皮质和髓质的间质结构正常；模型组退变卵泡及黄体，未见原始卵泡及成熟卵泡，间质纤维组织增生；经过溴隐亭和补肾助孕方低、高剂量治疗后，卵泡数目



蓝色箭头-炎症细胞；红色箭头-神经元；黄色箭头-间质透明变性；绿色箭头-卵泡。

Blue arrow-inflammatory cells; red arrow-neurons; yellow arrow-stromal hyalinosis; blue arrow-follicles; black arrow-endometrium.

图 1 各组下丘脑 (×400)、垂体 (×200)、卵巢 (×200)、子宫 (×100) HE 染色

Fig. 1 HE staining of hypothalamus (×400), pituitary gland (×200), ovary (×200), uterus (×100) in each group

有所恢复。

对照组子宫内膜可见单层高柱状被覆上皮，上皮完整无剥脱，其下可见数量、形态正常的腺体；内膜间质细胞清晰，未见增生，其间可见正常量散在淋巴细胞，肌层及内膜血管未见异常。模型组子宫内膜可见被复上皮单层，柱状或低柱状。经过溴隐亭和补肾助孕方低、高剂量治疗后，子宫内膜被覆上皮高柱状，排列紧密。

表 1 各组血清 PRL、E₂、FSH 和 LH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 1 Comparison of serum PRL, E₂, FSH and LH levels in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PRL/(ng·mL ⁻¹)	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	FSH/(ng·mL ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)
对照	—	7.83±2.74	110.79±16.87	8.43±1.78	18.39±1.64
模型	—	130.11±14.35**	55.52±7.58**	3.33±1.30**	8.61±1.19**
溴隐亭	0.002	55.15±7.51##	96.44±6.81##	6.41±1.09#	17.08±2.35##
补肾助孕方	9	106.21±10.33#	78.11±12.64	4.25±0.93	11.83±1.85
	18	68.49±6.83##	93.17±15.55##	6.02±0.37#	15.53±2.61##

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

3.3 补肾助孕方对 HPRL 大鼠下丘脑 Kisspeptin mRNA 相对表达的影响

如表 2 所示，与对照组相比，模型组 Kisspeptin mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.01$)；与模型组相比，经过溴隐亭和补肾助孕方高剂量治疗后，Kisspeptin mRNA 相对表达量显著上升 ($P<0.01$)。

3.4 补肾助孕方对 HPRL 大鼠下丘脑关键蛋白表达水平的影响

如图 2 和表 3 所示，与对照组相比，模型组 Kisspeptin、PRLR、p-JAK2 和 p-STAT5、CSN5 蛋白表达量显著降低 ($P<0.01$)；与模型组相比，经过溴隐亭和补肾助孕方高剂量治疗后，Kisspeptin、

3.2 补肾助孕方对 HPRL 大鼠血清 PRL、E₂、FSH 和 LH 的影响

如表 1 所示，与对照组相比，模型组血清 PRL 水平显著上升，FSH、LH 和 E₂ 水平均显著下降 ($P<0.01$)；与模型组相比，各治疗组 PRL 水平均显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01)，经溴隐亭和补肾助孕方高剂量治疗后，FSH、LH 和 E₂ 含量显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01)。

表 2 各组 Kisspeptin mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 2 Comparison of Kisspeptin mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Kisspeptin mRNA 相对表达量
对照	—	1.00±0.09
模型	—	0.43±0.04**
溴隐亭	0.002	0.93±0.11##
补肾助孕方	9	0.51±0.04
	18	0.89±0.05##

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs model group.

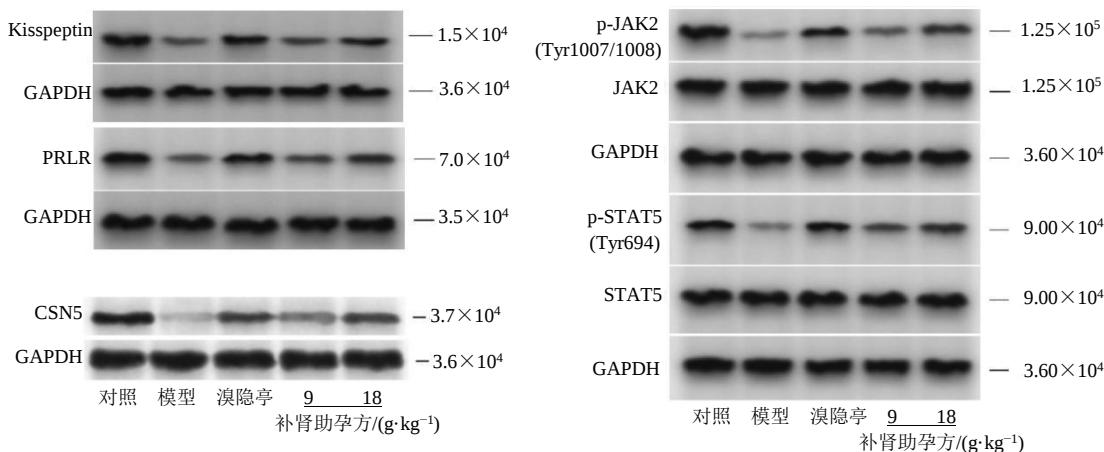


图 2 各组大鼠下丘脑关键蛋白表达比较

Fig. 2 Comparison of key protein expression in hypothalamus of rats

表 3 各组下丘脑关键蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 3 Comparison of key hypothalamic protein levels ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Kisspeptin/ GAPDH	PRLR/ GAPDH	p-JAK2/ GAPDH	JAK2/ GAPDH	p-STAT5/ GAPDH	STAT5/ GAPDH	CSN5/ GAPDH
对照	—	1.000±0.137	1.000±0.197	1.000±0.129	1.000±0.161	1.000±0.162	1.000±0.035	1.000±0.066
模型	—	0.412±0.064**	0.521±0.049**	0.324±0.030**	0.928±0.116	0.466±0.020**	1.123±0.124	0.347±0.032**
溴隐亭	0.002	0.897±0.088##	0.899±0.153##	0.654±0.140##	0.956±0.198	0.876±0.155##	1.053±0.260	0.859±0.101##
补肾助孕	9	0.566±0.080	0.694±0.109	0.422±0.058	0.964±0.092	0.534±0.119	1.208±0.229	0.418±0.039
孕方	18	0.729±0.097##	0.847±0.083#	0.609±0.100##	0.950±0.152	0.811±0.070##	1.075±0.069	0.737±0.069##

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.01$ ## $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

PRLR、p-JAK2 和 p-STAT5、CSN5 蛋白水平显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01), 补肾助孕方低剂量治疗虽有提高, 但差异均无统计学意义。此外, 各组 JAK2 和 STAT5 蛋白水平差异无明显统计学意义。

3.5 补肾助孕方对 HPRL 大鼠下丘脑 PRLR 和 Kisspeptin 表达水平的影响

如图 3 和表 4 所示, 与对照组相比, 模型组 PRLR 和 Kisspeptin 表达量显著下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 经过溴隐亭和补肾助孕方高剂量治疗后, PRLR 和 Kisspeptin 表达量显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01), 补肾助孕方低剂量治疗虽有提高, 但差异均无统计学意义。

3.6 补肾助孕方对 HPRL 大鼠下丘脑 PRLR 泛素化的影响

如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组 PRLR 泛素化水平升高; 与模型组比较, 经过溴隐亭和补肾助孕方高剂量治疗后, PRLR 泛素化水平降低。

3.7 补肾助孕方对 HPRL 大鼠下丘脑 PRLR 与 CSN5 的结合水平的影响

如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠下丘脑部 PRLR 与 CSN5 的结合水平下降; 与模型组相比, 溴隐亭组和补肾助孕方高剂量组 PRLR 与 CSN5 的结合水平显著上升。

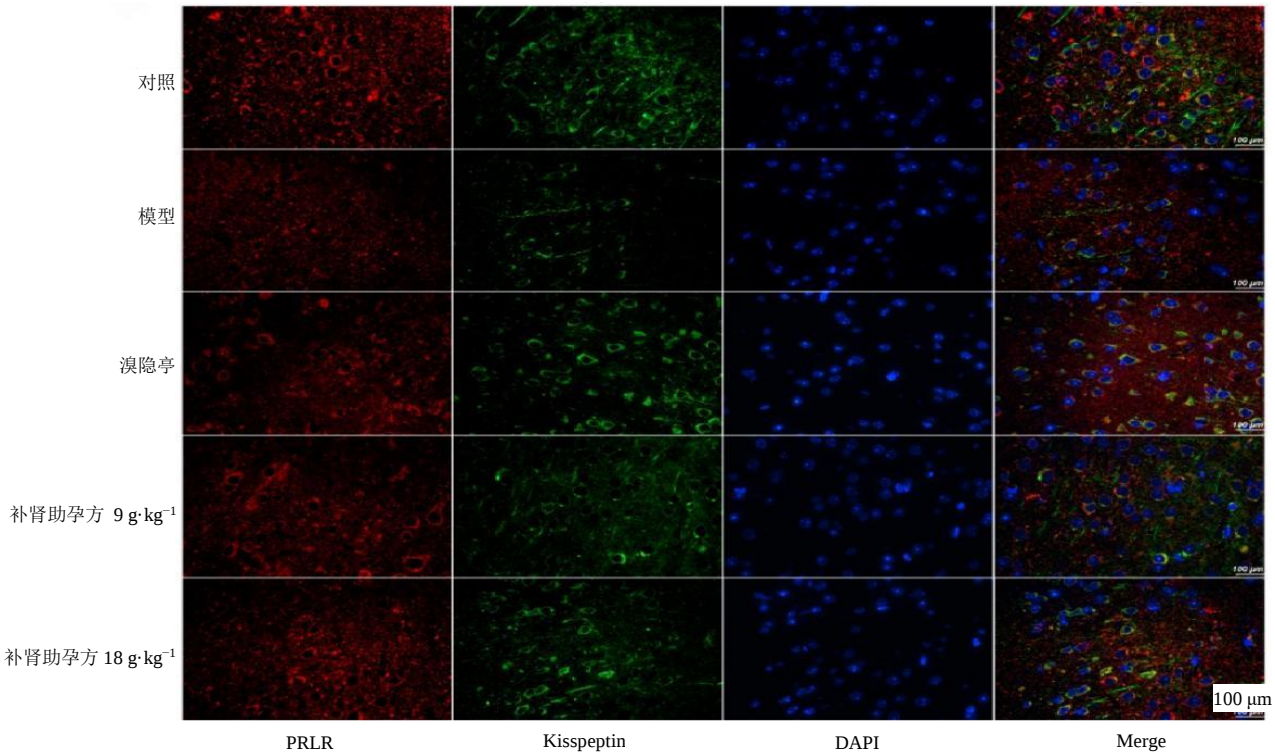


图 3 各组大鼠下丘脑中 PRLR 和 Kisspeptin 表达比较
Fig. 3 Comparison of PRLR and Kisspeptin expression in hypothalamus of rats

表 4 各组 PRLR 和 Kisspeptin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 4 Comparison of PRLR and Kisspeptin protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)			
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	PRLR 蛋白荧 光强度	Kisspeptin 蛋白 荧光强度
对照	—	29.33±6.16	24.64±3.97
模型	—	13.44±1.22**	7.17±0.66**
溴隐亭	0.002	21.54±2.70 [#]	20.64±1.31 ^{##}
补肾助	9	17.78±1.11	11.23±0.88
孕方	18	20.78±1.12 [#]	17.94±1.89 ^{##}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.01$ ^{##} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group.

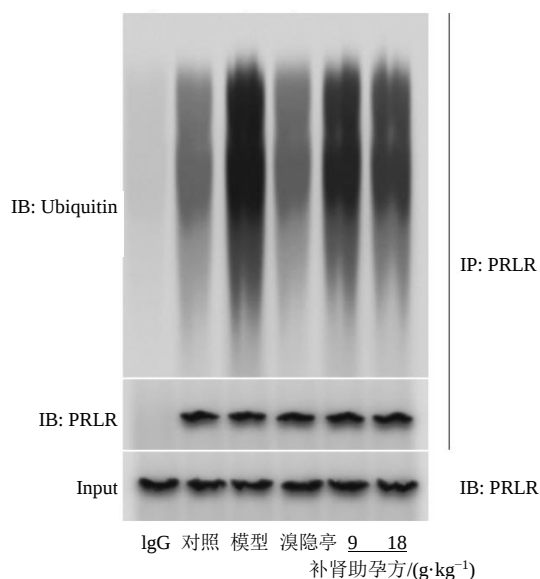


图 4 各组大鼠下丘脑中 PRLR 泛素化比较

Fig. 4 Comparison of PRLR ubiquitination in each group

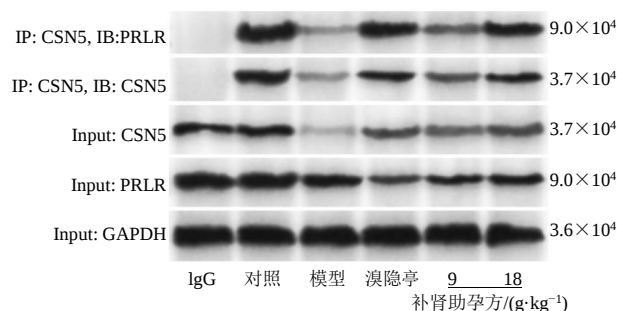


图 5 每组大鼠下丘脑 PRLR 与 CSN5 结合水平比较

Fig. 5 Comparison of PRLR and CSN5 binding levels in each group

4 讨论

HPRL 在育龄期妇女会导致排卵障碍、黄体功能不全,也是引起低促性腺激素性无排卵最常见原

因。HPRL 在中医古籍中无本病名记载,根据其临床证候可归于“月经后期”“月经过少”“闭经”“乳泣”“不孕症”等范畴,著名国医大师夏桂成教授首创了心(脑)-肾-子宫轴学说,强调心(脑)对女性生殖轴调控作用,他指出心为五脏六腑之大主,实属脑的功能,相当于西医学女性生殖内分泌轴(下丘脑-垂体-卵巢轴)中下丘脑、垂体的作用,对靶器官卵巢、子宫起主导作用。不孕症患者出现 PRL 升高主要病机为肾虚心肝气郁,心肾失济,难于成孕,因此在治疗中强调调心(脑),在此理论指导下,经过周惠芳教授多年临床经验和实验总结而形成的补肾助孕方,临床中广泛应用于心肝气郁、肾虚偏阳的不孕患者和月经失调者,取得了满意的疗效。课题组在前期研究中发现,补肾助孕方可使黄体功能不全(LPD)模型大鼠下丘脑 Kisspeptin 表达增加,进而调节 FSH、LH 的分泌^[5-7],恢复生殖轴功能,也证实了补肾助孕方的调心(脑)作用。

尽管 HPRL 影响下丘脑 GnRH 分泌,但研究表明只有极少数 GnRH 神经元表达 PRLR^[8-9],而 Kisspeptin 神经元却高表达 PRLR^[10-11], Kisspeptin 通过 GnRH 神经元上的 Kiss-1 受体,也称为 G 蛋白偶联受体 54 (GPR54),激活 GnRH 的释放^[6],从而调控下丘脑-垂体-性腺轴,因此, Kisspeptin 是促进 GnRH 分泌的上游因子。研究证明^[12-14],当 PRL 过高时会抑制下丘脑弓状核(ARC)中 Kisspeptin 神经元,引起 Kisspeptin 表达减少,而弓状核中 Kisspeptin 神经元参与 GnRH 脉冲式分泌,调节 LH,促进卵泡发育和黄体形成。

PRLR 是细胞因子受体超家族的单一膜结合蛋白,PRL 与 PRLR 结合后,激活细胞内 JAK2/STAT5 信号转导通路,引起目标基因的转录和表达^[15]。JAK2 是一种胞质内酪氨酸激酶,当 PRLR 激活后,JAK2 与受体膜内区富含脯氨酸的部分相结合,从而被磷酸化(p-JAK2),进而使下游底物 STAT5 也磷酸化(p-STAT5)。2 个 p-STAT5 结合形成二聚体,进入细胞核,与靶基因结合并最终调控基因转录^[15]。

本研究发现在高 PRL 水平下,PRLR 泛素化水平上升,PRLR 含量下降,PRLR mRNA 表达却未受影响,而是 PRLR 与去泛素化酶 CSN5 结合增多,因此导致 PRLR 介导的 JAK2 和 STAT5 的磷酸化水平下降,从而抑制了靶基因 Kisspeptin 的表达。而补肾助孕方可以减少 PRLR 与 CSN5 的结合,从而上调 Kisspeptin 的表达。进一步为证明了中医心(脑)

对女性生殖轴调控作用, 并且说明补肾助孕方可以有效治疗 HPRL 性引起的生殖轴功能紊乱。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Arefi S, Fallah N. Comparison of pct after vaginal and oral bromocriptine use in women with hyperprolactinemia and infertility [J]. J Reprod Infertil, 2002, 3: 36-41.
- [2] Borba V V, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Prolactin and autoimmunity: The hormone as an inflammatory cytokine [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(6): 101324.
- [3] Feng H, Zhong Q X, Zhou H F, et al. The effects of combined bromocriptine and Bu-Shen-Zhu-Yun decoction on serum hormones, anxiety, and pregnancy in hyperprolactinemic infertility patients [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(12): 12230-12243.
- [4] Feng H, Zhou H F, Lu J X, et al. Bu-Shen-Zhu-Yun decoction induces PRLR deubiquitination and JAK2/STAT5 activation via CSN5 in vitro [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(16): 20418-20437.
- [5] Jiang X F, Zhou H F, Shi M Q, et al. Bu-Shen-Zhu-Yun decoction promotes synthesis and secretion of FSH β and LH β in anterior pituitary cells in vitro [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 494-501.
- [6] 刘贝, 周惠芳, 周伯如, 等. 补肾助孕方对大鼠垂体细胞促性腺激素的调节 [J]. 医学研究生学报, 2018, 31(7): 703-708.
Liu B, Zhou H F, Zhou B R, et al. Regulation of Bu Shen Zhu Yun Decotion on gonadotropin in rat pituitary cells [J]. J Med Postgrad, 2018, 31(7): 703-708.
- [7] 唐星冉, 周惠芳, 冯华, 等. 基于 MAPKs 信号通路探讨补肾助孕方改善 BN 大鼠黄体功能的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 78-85.
Tang X R, Zhou H F, Feng H, et al. Mechanism of Bushen Zhuyun prescription on improving luteal function of brown Norway rats based on MAPKs signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(12): 78-85.
- [8] Brown R E, Piet R, Herbison A E, et al. Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons [J]. Endocrinology, 2012, 153(5): 2375-2384.
- [9] Goffin V, Touraine P. The prolactin receptor as a therapeutic target in human diseases: Browsing new potential indications [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(9): 1229-1244.
- [10] Clarke H, Dhillon W S, Jayasena C N. Comprehensive review on kisspeptin and its role in reproductive disorders [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2015, 30(2): 124-141.
- [11] Hu K L, Zhao H C, Yu Y, et al. Kisspeptin as a potential biomarker throughout pregnancy [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2019, 240: 261-266.
- [12] Hackney A C, Davis H C, Lane A R. Growth hormone-insulin-like growth factor axis, thyroid axis, prolactin, and exercise [J]. Front Horm Res, 2016, 47: 1-11.
- [13] Millar R P, Sonigo C, Anderson R A, et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis reactivation by kisspeptin-10 in hyperprolactinemic women with chronic amenorrhea [J]. J Endocr Soc, 2017, 1(11): 1362-1371.
- [14] Pepin M E, Bickerton H H, Bethea M, et al. Prolactin receptor signaling regulates a pregnancy-specific transcriptional program in mouse islets [J]. Endocrinology, 2019, 160(5): 1150-1163.
- [15] de Dios N, Orrillo S, Irizarri M, et al. JAK2/STAT5 pathway mediates prolactin-induced apoptosis of lactotropes [J]. Neuroendocrinology, 2019, 108(2): 84-97.

[责任编辑 兰新新]