

麦芽 4 个化学部位通过多巴胺 D2 受体对产后缺乳模型大鼠催乳作用研究

夏敬胜¹, 陈永刚^{1,2}, 邹吉利^{1*}, 安靖^{1,2}, 孟军华^{1,2}, 王雄^{1,2}, 吴金虎²

1. 武汉市第三医院 药学部, 湖北 武汉 430060

2. 武汉市第三医院 中心实验室, 湖北 武汉 430060

摘要: 目的 基于多巴胺 D2 受体 (DRD2), 考察小剂量麦芽 4 个化学部位的催乳作用, 初步探讨小剂量麦芽生物碱对产后缺乳模型大鼠泌乳素 (PRL) 分泌的调节机制。方法 采用 ig 甲磺酸溴隐亭方法制备缺乳大鼠模型, 造模成功后, 各给药组均 ig 给予相应的药物, 应用 ELISA 法检测各组大鼠血清 PRL、雌二醇 (E₂)、孕酮 (P) 水平; HE 染色观察各组大鼠乳腺组织病理改变; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测各组大鼠脑垂体中泌乳素受体及 DRD2 mRNA 表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 PRL、P 及 E₂ 水平、脑垂体 PRL mRNA 表达水平显著降低; 脑垂体 DRD2 mRNA 表达水平显著升高。与模型组比较, 麦芽总生物碱组大鼠乳腺小叶体积明显增加, 导管明显扩张, 且导管及腺泡内含有大量乳汁。麦芽总生物碱明显增加模型大鼠血清中 PRL、P、E₂ 水平及脑垂体 PRL mRNA 表达水平, 降低脑垂体 DRD2 mRNA 表达水平。结论 麦芽催乳的主要药效物质为总生物碱, 其作用机制可能与促进 PRL 分泌, 增加脑垂体 PRL 受体、降低 DRD2 mRNA 表达水平有关。

关键词: 麦芽; 生物碱; 产后缺乳; 催乳作用; 泌乳素; 多巴胺 D2 受体; 总生物碱; 总多糖; 总黄酮; 总酚

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0682-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.018

Effects of lactagogue of four total alkaloids of barley malt via dopamine D2 receptor in postpartum hypogalactia rat

XIA Jing-sheng¹, CHEN Yong-gang^{1,2}, ZOU Ji-li¹, AN Jing^{1,2}, MENG Jun-hua^{1,2}, WANG Xiong^{1,2}, WU Jin-hu²

1. Department of Pharmacy, The Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, China

2. The Central Laboratory, The Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, China

Abstract: Objective To explore the regulatory effect of malt alkaloid on prolactin (PRL) secretion in the model rat with postpartum hypogalactia induced by bromocriptine based on dopamine D2 receptor, and determine the active fraction of the malt with galactagogue effect. **Methods** The postpartum hypogalactia model was established by intragastric administration of bromocriptine mesylate. After the model was successfully established, all groups were given corresponding drug treatment. The concentration of serum PRL, estradiol (E₂) and progesterone (P) in each group was detected by ELISA kits. HE staining was used to observe the pathologic changes of breast tissue. RT-PCR was used to determine the mRNA levels of prolactin receptor (PRLR) and dopamine D2 receptor (DRD2) in pituitary gland of rats. **Results** Compared with the control group, the levels of serum PRL, P, and E₂ were significantly decreased in the model group as well as the mRNA expression of the pituitary PRL cells. But the mRNA expression of the pituitary DRD2 in the model group was significantly increased compared with the control group. Compared with the model group, the malt total alkaloid significantly increased the volume of mammary lobule and dilated the duct. There was a lot of milk in the duct and acinar in the malt total alkaloid group. Besides, the total alkaloids increased the concentration of serum PRL, P, and E₂ and the mRNA expression of the pituitary PRL cells, and decreased the mRNA expression of the pituitary DRD2. **Conclusion** The primary the active fraction of malt for galactagogue action is total alkaloids, and its mechanism may be related to promoting PRL secretion, increasing serum PRL receptor level and decreasing the mRNA expression of dopamine D2 receptor.

Key words: barley malt; total alkaloids; postpartum hypogalactia; lactogenesis; prolactin; DRD2 receptor; total alkaloids; total polysaccharide; total flavones; total phenols

收稿日期: 2019-10-11

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2018CFB530); 武汉市卫生计生委科研项目 (WZ17A06); 武汉市卫生计生委科研项目 (WZ18E06)

作者简介: 夏敬胜 (1975—), 男, 主管药师, 研究方向为药物新剂型、新制剂研究。E-mail: 461981818@qq.com

*通信作者 邹吉利 (1986—), 女, 主管中药师, 研究方向为药物新剂型、新制剂研究。E-mail: 75301082@qq.com

随着我国《计划生育法》新政出台及人民生活水平的日益提高,二胎家庭日益增加,母乳喂养更受到人们的青睐。多部中医药医籍均明确记载^[1-2]:麦芽有独特的回乳之功,凡妇女需断奶回乳者,可单用麦芽大剂量服用。对乳汁郁积,乳房胀痛者,小量麦芽又有通乳之功,常用生品。在我国应用历史悠久,毒副作用小,患者耐受性高^[3]。

母乳的产生是一个复杂的生理过程,涉及生理和情感因素以及多种激素的相互作用,其中最重要的是泌乳素^[4]。随着胎盘的排出和分娩,黄体酮水平下降,母乳供应开始充分,即泌乳发生^[5]。泌乳素(PRL)及多巴胺 D2 受体(DRD2)是调节乳汁分泌的关键因子^[6]。PRL 由垂体前叶泌乳素细胞分泌,受下丘脑 PRL 释放因子及 PRL 抑制因子的双重调节。多巴胺(DA)作为重要的 PRL 抑制因子之一,通过与 PRL 细胞膜表面 DRD2 受体结合,抑制 PRL 分泌^[7]。

麦芽主要含有多糖类、黄酮类、生物碱类与多酚类等 4 大类化学物质^[8-10],在前期研究麦芽回乳实验中,发现大剂量麦芽中生物碱能显著抑制高泌乳素血症大鼠血清中 PRL 含量,减少脑垂体 PRL 细胞阳性率及 PRL mRNA 表达,抑制乳汁异常分泌^[10]。推测小剂量麦芽中生物碱成分可能也是通过调控 PRL 及 DRD2 活性,促进乳汁分泌,但麦芽含有的黄酮类、多糖类及多酚类物质是否也可促进乳汁分泌,目前尚缺乏实验证据。本实验通过研究麦芽的 4 种化学部位(总生物碱、总黄酮、总多糖及总酚部位)对产后缺乳模型大鼠的催乳作用,观察麦芽各化学部位对产后缺乳大鼠 PRL、雌二醇(E₂)、孕酮(P)水平的影响及大鼠脑垂体中 PRL 受体及 DRD2 mRNA 表达的影响,为进一步明确麦芽的催乳功效及药效物质基础的确定提供理论依据。

1 材料

1.1 试药与试剂

生麦芽购于安徽省亳州市,经武汉市第三医院药学部陈永刚副主任中药师鉴定,为禾本科植物大麦 *Hordeum vulgare* L. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品;甲磺酸溴隐亭片(匈牙利吉瑞大药厂,规格 2.5 mg,批号 T55538A);PRL、E₂、P 的 ELISA 酶联免疫试剂盒(上海丽臣生物有限公司);DAKO 组化试剂盒 DAB 显色剂(国药集团化学试剂有限公司);PRL 及 DRD2 抗体(Santa Cruz 公司);二抗(Servicebio 公司);PRL 受体及 DRD2 引物(上

海生工生物工程股份有限公司);苏木精(上海顺强化学试剂有限公司);伊红(上海三爱思试剂有限公司)。

1.2 仪器

Epoch 酶标检测仪(BioTeK 公司);Nikon Eclipse Ti-SR 正置荧光显微镜(日本尼康公司);Motic BA400T 生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);Stepone plus 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司);NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo 公司);BT25S 型十万分之一分析天平[Sartorius(中国)公司]。

1.3 动物

SD 大鼠,体质量(230±20)g,购于湖北省疾病预防控制中心,动物生产许可证号 No. 42010200001263。实验地点为武汉市第三医院实验动物中心,许可证号 SYXK(鄂)2014-0080。SD 大鼠配种前均在实验室适应饲养 1 周,环境条件为室温 22~28℃,光照 12 h。将雌雄大鼠按 1:2 同笼饲养,同笼 1 周后,取出雄鼠,将确认怀孕的雌鼠单笼饲养直至分娩。

2 方法

2.1 麦芽化学部位的制备

麦芽 4 个化学部位的制备方法及含量测定参照文献报道方法^[10],麦芽总生物碱、总多糖、总黄酮及总酚部位的质量分数分别为 56.64%、98.09%、9.83%、4.84% g/g。

2.2 产后缺乳大鼠模型制备及分组给药

将产仔时间不超过 24 h 的产后雌鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为对照组、模型组、麦芽总生物碱组(总生物碱)、麦芽总多糖组(总多糖)、麦芽总黄酮组(总黄酮)、麦芽总酚组(总酚)。对照组 ig 生理盐水 4 mL,每天 1 次,连续 10 d。模型组在雌鼠产后 48 h 内 ig 甲磺酸溴隐亭和蒸馏水各 2 mL(记为第 1 天),甲磺酸溴隐亭给药剂量为 0.5 mg/kg。其余 4 组雌鼠 ig 给予甲磺酸溴隐亭和相应麦芽化学部位提取物各 2 mL,总生物碱、总多糖、总黄酮、总酚剂量依次为 0.22、392.50、14.46、25.85 mg/(kg·d)[按照成人(70 kg)日服生麦芽剂量 15 g 折算]。所有给药操作每天上午 1 次,连续 10 d。

2.3 血清中 PRL、E₂、P 水平检测

末次给药 24 h 后,所有大鼠禁食 12 h,自由饮水。于次日上午用 20%乌拉坦麻醉各组大鼠后,腹主动脉取血约 3 mL 置于非抗凝真空采血管中,3 000 r/min 离心 6 min,分离上清液至 2 mL EDTA

抗凝管中,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定各组大鼠血清中 PRL、E₂、P 水平,严格按照 ELISA 试剂盒说明书中操作流程进行。

2.4 乳腺组织形态学观察

取各组雌鼠第二对乳腺组织,于 4%多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,切片(3~4 μm)。使用二甲苯脱蜡,依次放入无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、蒸馏水浸泡 2 min,苏木素染色 10 min,蒸馏水洗 30 s,0.5%盐酸乙醇分化,自来水洗 5 min,PBS 反蓝后 0.5%伊红乙醇染色 1 min,80%乙醇分化,依次放入 95%乙醇 3 min,无水乙醇 3 min,二甲苯 5 min,晾片,封片。显微镜下(×200、×400)观察组织形态。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测脑垂体 PRL 及 DRD2 基因表达

将雌鼠脑垂体组织匀浆后严格按照 RNA 提取步骤进行操作,并将提取的 RNA 溶液进行适当比例稀释。取适量 RNA 溶液进行反转录,每个反转录产物配制 3 管,进行 PCR 扩增,扩增方式:预变性,95 °C,10 min;循环(40 次),95 °C,15 s→60 °C,60 s;熔解曲线,75 °C→95 °C,每 20 秒升温 1 °C。结果采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。
β-actin 正向引物:5'-TGCTATGTTGCCCTA-GACTTCG-3',反向引物:5'-GTTGGCATAGAGG-TCTTTACGG-3' (240 bp); PRL 受体正向引物:5'-AACAAGCCCAGAAAGTCCCTC-3',反向引物:5'-GCAGGCACCGAATGTTGTTAT-3' (318 bp); DRD2 正向引物:5'-GGTAATGCCGTGGGTT-GTCT-3',反向引物:5'-TTGTTGAGTCCGAAGA-GCAGT-3' (270 bp)。

2.6 统计方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

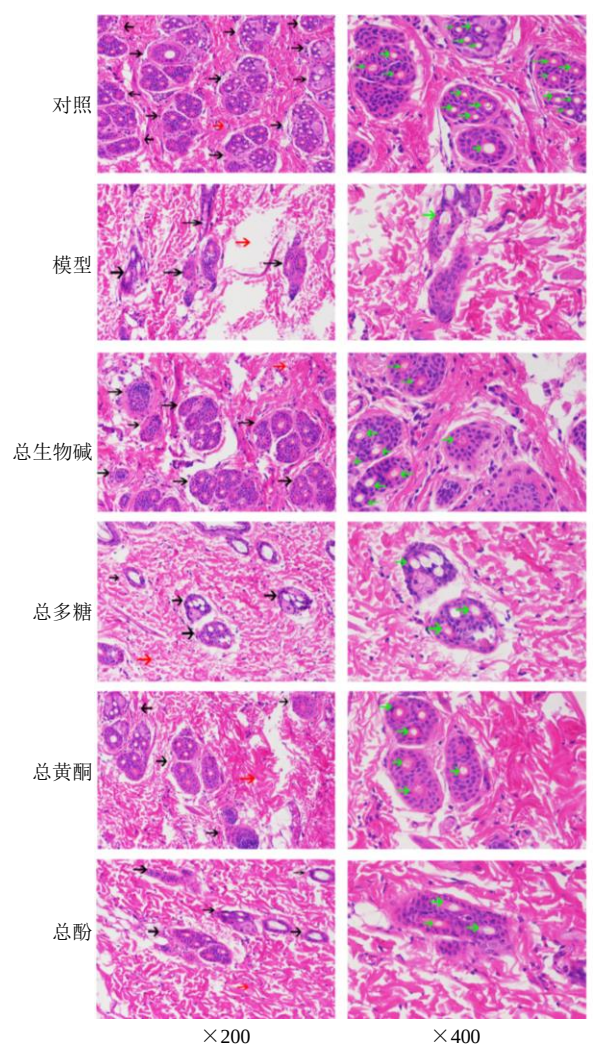
3.1 各组母鼠乳腺组织病理观察

如图 1 所示,对照组乳腺处于泌乳期,乳腺组织内乳腺小叶(黑色箭头)体积明显增大,结缔组织(红色箭头)被大量乳腺小叶挤压,因此结缔组织体积明显减少,导管及腺泡(绿色箭头)明显增大且含有大量乳汁。模型组乳腺处于静止期,乳腺组织由极少乳腺小叶及大量结缔组织构成。模型组与对照组相比,乳腺小叶体积明显减少,腺泡及导管体积小且含极少量乳汁。与模型组相比,总生物

碱组乳腺组织结缔组织减少,乳腺小叶体积明显增加,导管明显扩张,且导管及腺泡内含有大量乳汁。与模型组相比,总多糖组、总黄酮组及总酚组乳腺组织内乳腺小叶数量减少,结缔组织体积增大,乳腺导管无扩张,腺泡及导管内含有少量乳汁。

3.2 对产后缺乳大鼠血清中 PRL、P、E₂ 水平的影响

由图 2 可知,与对照组比较,模型组大鼠血清中 PRL、P、E₂ 水平明显降低($P<0.01$);与模型组比较,总生物碱组大鼠血清中 PRL、P、E₂ 水平均明显升高($P<0.05$);总多糖组、总黄酮组及总酚组大鼠血清对 PRL、P、E₂ 水平无明显影响($P>0.05$)。



黑色箭头-乳腺小叶 红色箭头-结缔组织 绿色箭头-导管及管内乳汁
black arrow-lobules of mammary gland red arrow-connective tissue
green arrow-duct and latex

图 1 麦芽化学部位对缺乳大鼠乳腺组织的影响
Fig. 1 Effects of different chemical fraction of malt on mammary tissue of postpartum hypogalactia rats

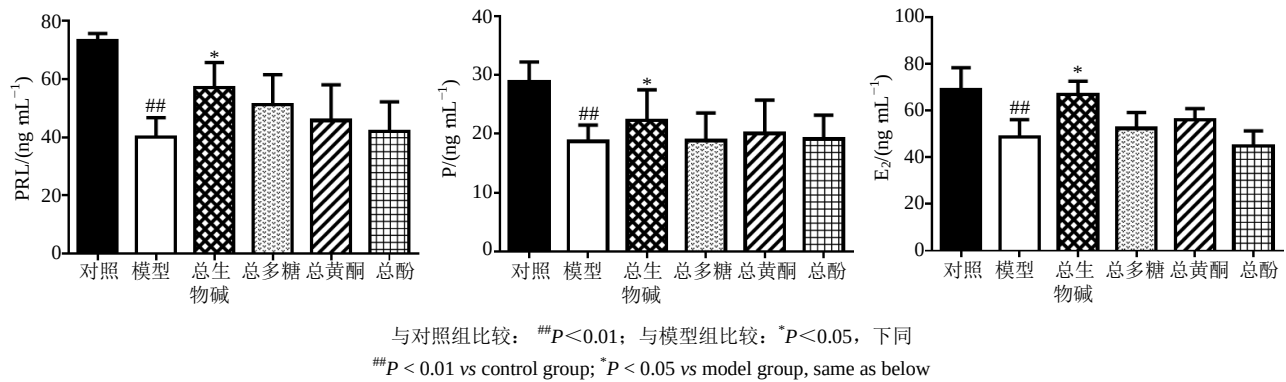


图 2 麦芽化学部位对缺乳大鼠血清 PRL、P、E₂ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effects of different chemical fraction of malt on serum PRL, P, and E₂ levels of postpartum hypogalactia rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.3 对产后缺乳大鼠脑垂体 PRL 及 DRD2 mRNA 表达的影响

由图 3 可知, 与对照组比较, 模型组大鼠脑垂体 PRL 受体 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.01$), DRD2 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 总生物碱组大鼠 PRL 受体 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$), DRD2 mRNA 表达量明显下调 ($P < 0.05$); 总多糖、总黄酮及总酚对 PRL 受体和 DRD2 mRNA 表达无影响 ($P > 0.05$)。

4 讨论

乳汁的合成及分泌极其复杂, 是由下丘脑、垂体、乳腺、卵巢等脏器及 PRL、E₂、P、DA 等多种激素共同调节完成的生理性过程^[7]。PRL 在雌激素和黄体酮启动后引起乳房泌乳。它对乳房的影响包括增加信使核糖核酸 (mRNA) 的作用, 增加酪蛋白和乳蛋白的产生。怀孕期间血清中 PRL 浓度的增加会导致乳腺增大, 增加泌乳的产生^[11], 此现象在本实验中也观察到。在妊娠期, 由于血液中雌激

素、孕激素浓度过高, 与 PRL 竞争乳腺细胞受体, 抑制 PRL 的泌乳作用。而分娩后, 血中雌激素、孕激素浓度降低, PRL 发挥启动和维持泌乳作用。在本研究中使用多巴胺受体激动剂甲磺酸溴隐亭, 有效降低了产后母鼠体内 PRL 水平, 减少了乳汁分泌。

麦芽是一味具有双向调节乳汁分泌的中药, 推测这种双向调节作用与其生物碱含量高低有关, 即“大剂量 (大于 60 g)”与“小剂量 (15 g)”药材用量密切相关。在前期回乳实验研究用麦芽剂量在 60 g 以上, 在该剂量下生物碱物质能使 PRL 显著降低, 有效抑制高泌乳素血症模型雌鼠的异常泌乳^[10]。本研究中麦芽用量为 15 g, 此剂量下的总生物碱物质使缺乳模型雌鼠乳腺小叶数量与体积增加, 促进导管扩张并分泌大量乳汁, 增加 PRL 水平, 增加 PRL 水平, 较好改善了缺乳大鼠的泌乳能力, 说明不同剂量的麦芽生物碱具有双向调控乳汁分泌作用, 也证明了推测结果与实验结果一致。

下丘脑释放的 DA 对 PRL 有重要的调控作用。

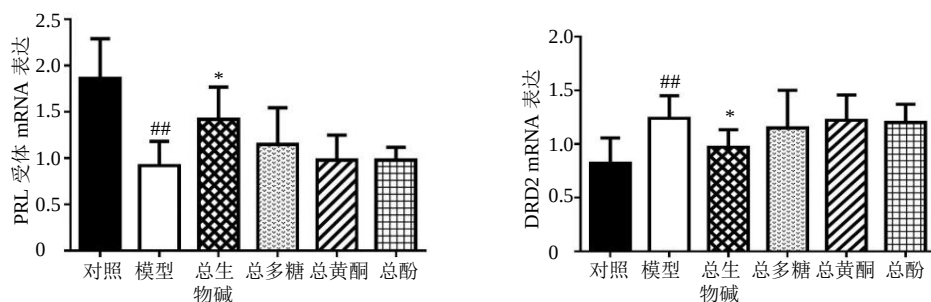


图 3 麦芽化学部位对缺乳大鼠脑垂体 PRL 及 DRD2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effects of different chemical fraction of malt on mRNA expression of PRL and DRD2 in postpartum hypogalactia rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

DA 是一种神经传导的化学物质, 其作为 PRL 释放抑制因子 (PRIF), 能直接与 DRD2 受体结合, 抑制 PRL 分泌, 通过 DRD2 介导经 cAMP/PKA/CREB 信号通路调控乳汁分泌^[12]。前期研究也发现, 大剂量麦芽总生物碱还能直接作用于脑垂体 PRL 细胞抑制 PRL 分泌^[13]。本研究中小剂量麦芽总生物碱却是上调泌乳素细胞 PRL mRNA 表达, 下调 DRD2 mRNA 表达, 促进乳汁分泌。此外, PRL 还能与催乳素受体 (PRLR) 结合后激活 JAK2 激酶, 活化的 JAK2 激酶能激活 STAT5 及下游 cyclinD1 信号通路, 进而促进乳腺小叶发育及泌乳^[14-15]。具体不同剂量的麦芽生物碱双向调控乳汁分泌 cAMP/PKA/CREB 或者 JAK/STATs 信号通路中的哪一条为主, 需要进一步研究阐明麦芽生物碱双向调节乳汁分泌分子机制。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 项育民. 关于麦芽“催乳”和“回乳”双向性的讨论 [J]. 中国药理学杂志, 1990, 25(3): 169-170.
- [4] Ibáñez-Costa A, Luque R M, Castaño J P. Cortistatin: A new link between the growth hormone/prolactin axis, stress, and metabolism [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2017, 33(4): 23-27.
- [5] Neville M C, Morton J, Unemura S. Lactogenesis: Transition from pregnancy to lactation [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2001, 48(1): 35-52.
- [6] Hyacinth I. Effect of methanolic crude extract of *Aframomum melegueta* (A. m) seeds on selected lactogenic hormones of Albino rats [J]. *Int J Biochem Mol Biol*, 2019, 10(2): 9-16.
- [7] Rabinovich I H, Gómez R C, Mouriz M G, et al. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of prolactinoma and hyperprolactinemia [J]. *Endocrinol Nutr*, 2013, 60(6): 308-319.
- [8] Zhao H F, Fan W, Dong J J, et al. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties [J]. *Food Chem*, 2008, 107(1): 296-304.
- [9] Bettenhausen H M, Barr L, Broeckling C D, et al. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability [J]. *Food Res Int*, 2018, 113(11): 487-504.
- [10] 王莉, 王艳明, 陈永刚, 等. 麦芽有效部位对高泌乳素血症模型大鼠激素水平及脑垂体 PRL mRNA 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(5): 1027-1031.
- [11] Kroneberg H M, Melmed S, Polonsky K S, et al. *Williams Textbook of Endocrinology* [M]. Philadelphia: W. B. Saunders Ltd., 2008.
- [12] Fu S P, Wang W, Liu B R, et al. β -Hydroxybutyric sodium salt inhibition of growth hormone and prolactin secretion via the cAMP/PKA/CREB and AMPK signaling pathways in dairy cow anterior pituitary cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 4265-4280.
- [13] 李丽姣. 麦芽治疗高泌乳素血症有效部位筛选及其作用机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.
- [14] Fiorella C V A, Andres P F, Belén H M, et al. Hypothyroidism decreases JAK/STAT signaling pathway in lactating rat mammary gland [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 450(7): 14-23.
- [15] Li Z L, Li T, Leng Y, et al. Hormonal changes and folliculogenesis in female offspring of rats exposed to cadmium during gestation and lactation [J]. *Environm Poll*, 2018, 238(7): 336-347.