

“消癖煎”对乳腺增生模型大鼠的治疗作用及其机理研究

汪 怡 蒋洁君 李青松
(昆山市中医医院,江苏昆山215300)

摘 要 目的:观察消癖煎对乳腺增生模型大鼠的治疗作用,并初步探索其治疗机理。方法:60只雌性未孕Wistar大鼠随机取10只作为空白对照组,其余大鼠采用注射苯甲酸雌二醇和黄体酮的方法建立大鼠乳腺增生模型。造模成功的大鼠随机分为模型对照组、阳性药物组(枸橼酸他莫昔芬1.8 mg/kg)和消癖煎高、中、低剂量组(2.65、5.30、10.60 g/kg),每组10只。各组分别灌胃相应药物或生理盐水(每日1次,连续30 d)后,测量各组大鼠第二对乳头的高度及直径;腹主动脉取血,分离血清,采用放射免疫法测定雌二醇(E_2)、孕酮(P)、泌乳素(PRL)含量;取下第二对完整的乳房,光镜下观察乳腺组织病理形态。结果:与空白对照组比较,模型对照组大鼠乳头直径和乳头高度明显增加($P<0.05$);消癖煎高、中剂量组和阳性药物组大鼠乳头直径、乳头高度均明显低于模型对照组($P<0.05$),且呈现出一定的剂量依赖性。与空白对照组比较,模型对照组大鼠血清 E_2 、PRL水平明显升高($P<0.05$),P水平明显降低($P<0.05$);各给药组大鼠上述指标均较模型对照组有不同程度的改善(消癖煎低剂量组P水平与模型对照组比较无统计学差异,其余均 $P<0.05$),且呈现出一定的剂量依赖性。空白对照组大鼠乳腺组织基本无增生现象;模型对照组大鼠乳腺组织出现乳腺小叶体积增大、腺泡上皮增生等明显的病理变化,乳腺增生病理分级较空白对照组明显严重($P<0.05$);各给药组大鼠乳腺增生情况均得到改善,乳腺增生病理分级较模型对照组有不同程度的减轻。结论:消癖煎可减轻乳腺增生模型大鼠乳腺组织的增生情况,这种作用可能与对体内激素水平的调节有关。

关键词 乳腺增生;消癖煎;乳腺;病理学;血清性激素;Wistar大鼠;雌性;实验研究

中图分类号 R655.805 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2021)04-0077-03

基金项目 江苏省药学会基金项目(201512)

乳腺增生好发于25~45岁女性,是育龄期妇女最常见的乳房良性疾病,其发病率占乳腺疾病的首位^[1]。有文献报道,乳腺增生是乳腺癌发病的危险因素^[2]。目前,对于乳腺增生的病因及发病机制尚不明确。现代医学认为本病的发生与卵巢内分泌失调关系密切,西医采用激素类药物缓解乳腺增生症状,但往往伴随着许多副作用和严重并发症,不适合长期治疗,外科手术也很难被多数人接受,且术后易复发^[3]。中医药能有效治疗乳腺增生^[4-6],且毒副作用较小。消癖煎是昆山市中医医院院内中药制剂,具有活血祛瘀、疏肝理气之功效,多年来用于治疗乳腺增生具有良好的临床疗效。本实验制备大鼠乳腺增生模型,观察消癖煎对模型大鼠乳腺组织病理和血清性激素等的影响,探索消癖煎治疗乳腺增生的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级Wistar雌性未孕大鼠,体重180~200 g,由南通大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(苏)2019-0001。

1.2 药品与试剂 消癖煎(昆山市中医医院制剂生产研发中心自制,按制剂处方取柴胡、赤芍、白芍、

生山楂、橘叶、橘核、黄药子、路路通、紫苏梗、浙贝母、白芥子、夏枯草各10 g,当归、全瓜蒌、香附、牡丹皮各12 g,枳实、枳壳各8 g,生牡蛎、石见穿、生麦芽各15 g,青皮5 g,川芎、生甘草各6 g,加约8倍量水浸泡2 h后煎煮2 h,滤出药液后再加5倍量水煎煮1 h,合并2次药液,浓缩后加入适量95%乙醇至约60%醇浓度,充分搅拌,静置过夜,再滤出上清液,回收乙醇,加纯水制成含生药0.984 g/mL的浸提液,-4℃保存备用)。苯甲酸雌二醇注射液(杭州动物药品厂,批号180429),黄体酮注射液(浙江仙琚药业,批号180107),枸橼酸他莫昔芬片(扬子江药业,批号18122412)。血清雌二醇(E_2)放免试剂盒、血清孕酮(P)放免试剂盒、血清垂体泌乳素(PRL)放免试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号20190828);苏木精、伊红(上海麦克林生化科技有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器 游标卡尺(上海汇一尺业有限公司),XH-6020型全自动放免计数仪(西安核仪器厂),2235型轮转切片仪(德国Leica公司),AUTOSTAINER XL全自动染色机(德国Leica公司),

EC350-1冷热台包埋机(德国Microm公司), ASP300S全自动生物组织脱水机(德国Leica公司), TEC2500病理组织烘漂仪(常州郝思琳医用仪器公司), CX41生物显微镜(日本Olympus光学工业株式会社), DP72显微成像系统(日本Olympus光学工业株式会社)。

2 实验方法

2.1 造模 参考《乳腺增生动物模型制备规范(草案)》^[7]制备乳腺增生大鼠模型。大鼠适应性饲养1周后,选取部分作为造模组进行造模,肌肉注射苯甲酸雌二醇注射液0.5 mg/(kg·d),连续25 d,随后肌肉注射黄体酮注射液4 mg/(kg·d),连续5 d。另选取部分大鼠作为空白对照组,同法肌肉注射等量生理盐水,连续30 d。各组分别取3只大鼠,光镜下对比乳腺组织结构及形态,确定造模成功。

2.2 分组与给药 将造模成功的大鼠随机分为模型对照组、阳性药物组和消癥煎高、中、低剂量组,每组10只。阳性药物组按1.8 mg/(kg·d)给予枸橼酸他莫昔芬,消癥煎高、中、低剂量组给药剂量分别为2.65 g/(kg·d)、5.30 g/(kg·d)、10.60 g/(kg·d),另取空白对照组10只和模型对照组分别给予同体积生理盐水,各组均灌胃给药,1次/d,连续30 d。

2.3 指标观察

2.3.1 乳头直径和高度 各组大鼠末次给药24 h后,10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉,水平仰卧位,将第二对乳头周围充分脱毛,擦拭干净,用游标卡尺精密测量第二对乳头的直径和高度。

2.3.2 血清激素水平 各组大鼠麻醉后,腹主动脉取血约5 mL,离心半径10 cm、3000 r/min高速冷冻离心15 min,取上层血清,放射免疫法测定E₂、P和PRL含量。

2.3.3 乳腺组织病理形态 各组大鼠腹主动脉取血后处死,取下第二对完整的乳房,10%甲醛溶液固定,石蜡包埋切片(4 μm),HE染色,光学显微镜下观察乳腺组织的结构及形态,对乳腺小叶、腺泡等计数,按文献[8]中的标准对乳腺增生情况进行评级,评级标准见表1。

2.4 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件对数据进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据均进行正态性检验,符合正态分布,组间比较采用独立样本t检验;等

级资料采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠乳头直径和高度比较 结果见表2。

3.2 各组大鼠血清E₂、P、PRL水平比较 结果见表3。

3.3 各组大鼠乳腺组织病理形态比较 光镜下,空白对照组大鼠乳腺组织基本无增生现象。与空白对照组比较,模型对照组大鼠乳腺组织出现乳腺小叶体积增大,腺泡数量增多,腺泡和导管明显扩张,腺泡腔及导管内可见大量分泌物,腺泡上皮出现增生等明显的病理变化,乳腺增生病理分级趋向严重。与模型对照组比较,各给药组大鼠乳腺增生情况得到改善,腺泡数目减少,腺泡开始萎缩,腔内分泌物亦减少,乳腺增生病理分级亦有不同程度减轻。结果见图1、表4。

4 讨论

乳腺增生可归属于中医学“乳癖”范畴,始见于《中藏经》,龚居中《外科活人定本》首次将乳癖与乳房肿块联系在一起,并为乳癖设立了独立篇章,曰:“乳癖,此症生于正乳之上,乃厥阴、阳明之经所属也……何谓之癖,若硬而不痛,如顽核之类。”中医学认为乳腺增生是由于郁怒伤肝、思虑伤脾、气滞血

表1 大鼠乳腺增生评级标准

评级	乳腺增生情况
-	仅见几个小叶稀疏分布,每小叶内腺泡数<5,导管内无分泌
+	小叶分布稀疏,每个小叶内有5~10个腺泡数,腺泡间有结缔组织
++	小叶稍增,每个低倍视野可见5~10个小叶,小叶中的腺泡数增至10个左右,腺泡间有少量结缔组织,有的乳管扩张
+++	低倍下可见10多个小叶,广泛分布,每小叶中有近20个腺泡数,腺体呈“靠背”状,导管扩张或分泌

表2 各组大鼠乳头直径和高度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	乳头直径/mm	乳头高度/mm
空白对照组	10	0.93 ± 0.07	1.14 ± 0.12
模型对照组	10	1.40 ± 0.25*	1.77 ± 0.20*
阳性药物组	10	1.07 ± 0.13**	1.31 ± 0.16**
消癥煎低剂量组	10	1.33 ± 0.20**△	1.64 ± 0.16**△
消癥煎中剂量组	10	1.19 ± 0.15**	1.55 ± 0.18**△
消癥煎高剂量组	10	1.11 ± 0.14**	1.30 ± 0.24#

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$;与阳性药物组比较,△ $P < 0.05$;与消癥煎高剂量组比较,△ $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠血清中E₂、P、PRL水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	E ₂ /(pg/mL)	P/(ng/mL)	PRL/(μIU/mL)
空白对照组	10	33.743 ± 11.046	29.658 ± 7.215	34.273 ± 3.548
模型对照组	10	79.332 ± 9.752*	14.797 ± 5.574*	48.505 ± 5.110*
阳性药物组	10	41.588 ± 10.053#	26.069 ± 8.257#	32.642 ± 5.847#
消癥煎低剂量组	10	60.883 ± 9.189**△	19.638 ± 7.012*△	41.804 ± 7.439**△
消癥煎中剂量组	10	45.510 ± 11.031**△	24.199 ± 10.705#	35.416 ± 4.364#
消癥煎高剂量组	10	37.649 ± 8.911#	29.684 ± 7.013#	33.823 ± 5.071#

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$;与阳性药物组比较,△ $P < 0.05$;与消癥煎高剂量组比较,△ $P < 0.05$ 。

瘀、痰凝成核所致，治以活血散瘀、疏肝理气^[9]。消癥煎是我院乳腺外科专家经多年临床经验总结开发的中药复方院内制剂，方中柴胡、青皮、香附、全瓜蒌疏肝理气、调理冲任；川芎并合当归活血化瘀止痛；夏枯草、贝母化痰解郁；白芍、甘草酸甘化阴、柔肝平肝^[10]。全方共奏疏肝理气、活血祛瘀之效，药证合拍。

本实验采用苯甲酸雌二醇联合黄体酮制备乳腺增生大鼠模型，造模后大鼠乳头直径增大，高度增加，病理切片显示有明显的乳腺组织增生现象，血清E₂、PRL水平升高，P水平降低，提示造模成功。乳腺直径和高度变化是乳腺的外观表现，乳腺组织病理形态学改变是乳腺的内在改变，乳腺的外观表现和内在改变是乳腺增生疾病临床表现的重要组成部分，可以了解疾病的发生发展及严重程度。本研究结果表明，消癥煎可以有效抑制乳腺增生模型大鼠乳头直径的增大和乳头高度的增加，以高剂量组效果最为明显，且与阳性药物治疗效果相当，病理切片进一步证实消癥煎可有效抑制乳腺组织增生，从动物实验角度证实消癥煎对乳腺增生的治疗作用。目前，国内外大部分研究表明体内雌、孕激素分泌紊乱是引发乳腺增生症的直接推动力：雌、孕激素比例失调，使乳腺实质增生过度 and 复旧不全；催乳素升高，影响乳腺生长、发育和泌乳功能，同时影响下丘脑—垂体—性腺轴功能^[9,11]。本研究结果提示消癥煎治疗乳腺增生的作用机制可能与调节体内激素水平有关。

下一步拟对乳腺组织雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）表达进行研究，从而进一步揭示消癥煎治疗乳腺增生的作用机制。

参考文献

[1] 艾比拜姆·喀迪尔,米哈古丽·阿布力孜.浅谈乳腺增生症的发病机制及研究进展[J].世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (62): 34.

[2] 孙二虎,刘小丰,周茜,等.南京地区 2354 例女性乳腺疾病的流行病学调查及影响因素研究[J].中国妇幼保健, 2015, 30 (29): 5042.

[3] LI X L, XIN P, WANG C F, et al. Mechanisms of traditional Chinese medicine in the treatment of mammary gland

hyperplasia[J].Am J Chin Med, 2017, 45 (3): 443.

[4] 陈发莉,彭梅,杨艳,等.乳安消片对乳腺增生大鼠的治疗作用[J].中成药, 2019, 41 (1): 60.

[5] 李佳林,张晶璇,王铁山,等.柴金散结方对乳腺增生大鼠的药效作用及机制[J].中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (15): 89.

[6] 叶延程,丁高恒,宋鹏,等.乳康胶囊对乳腺增生大鼠激素及细胞凋亡水平的影响[J].新中医, 2019, 51 (6): 8.

[7] 苗明三,温亚娟,白明,等.乳腺增生动物模型制备规范(草案)[J].中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (24): 17.

[8] 魏谭军,梁源,王毅,等.理气散结颗粒对大鼠乳腺增生的影响[J].中成药, 2019, 41 (2): 304.

[9] 陈佃红.乳腺增生疾病研究进展[J].世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (26): 112.

[10] 沈胡刚.消癥煎加小金丸治疗乳腺增生病临床疗效观察[J].内蒙古中医药, 2013, 32 (7): 37.

[11] 林淑雯,李天禹.乳腺增生症中西医发病机制及治疗的认知[J].齐齐哈尔医学院学报, 2020, 41 (6): 742.

第一作者:汪怡(1981—),女,硕士,副主任中药师,研究方向为中药及中药制剂。

通讯作者:李青松,本科学历,主任中药师。liqinsong99@126.com

修回日期:2020-11-05

编辑:吴宁

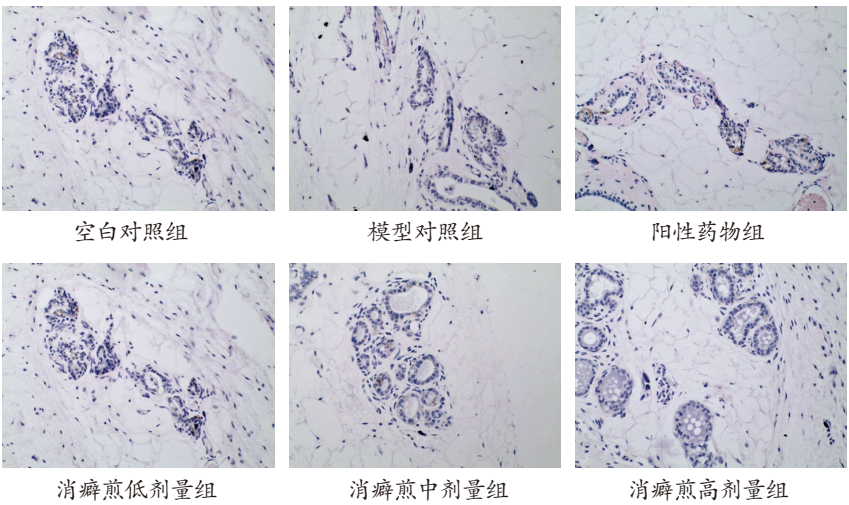


图1 各组大鼠乳腺组织病理形态(HE染色,×200)

表4 各组大鼠乳腺组织病理切片评级比较

组别	动物数/只	病理切片评级			
		-	+	++	+++
空白对照组	10	9	1	0	0
模型对照组*	10	0	3	4	3
阳性药物组**	10	0	7	3	0
消癥煎低剂量组*	10	0	5	5	0
消癥煎中剂量组**	10	0	8	2	0
消癥煎高剂量组**	10	0	9	1	0

注:与空白对照组比较,*P<0.05;与模型对照组比较,#P<0.05。