

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2019.06.003

• 实验研究 •

乳痛软坚片对肝郁痰凝型乳腺增生大鼠 E_2 、P、PRL 水平的影响*

刘 慧¹ 李松莲² 谭程丹² 凌 洁² 黄维芳² 刘丽芳[△]

¹湖南中医药大学第一附属医院,长沙 410007

²湖南中医药大学,长沙 410207

摘要 目的 观察乳痛软坚片对肝郁痰凝型乳腺增生大鼠血清雌二醇(E_2)、孕酮(progesterone,P)、催乳素(prolactin,PRL)水平的影响。方法 通过雌孕激素联合注射及夹尾刺激建立肝郁痰凝型乳腺增生大鼠模型,造模成功后随机分为 5 组,每组 8 只大鼠。A 组为正常对照组,B 组为模型对照组,C、D、E 组分别予以乳痛软坚片低、中、高剂量进行干预,F 组予以红金消结浓缩丸进行干预。每天灌胃 1 次,连续灌胃 1 个月取材,比较 2 组大鼠行为学评分、乳房毛发裸区直径、乳腺导管上皮细胞增生层数及血清 E_2 、P、PRL 水平。结果 造模后,与 A 组比较,B 组大鼠行为学评分显著升高($P < 0.05$),乳房毛发裸区直径显著增大($P < 0.05$),乳腺导管上皮细胞增生层数明显增多($P < 0.05$),血清 E_2 、PRL 水平明显升高,血清 P 水平明显下降($P < 0.05$)。治疗后,各组大鼠行为学评分均出现不同程度下降($P < 0.05$),乳房毛发裸区直径缩小($P < 0.05$),乳腺导管上皮细胞增生层数减少($P < 0.05$),血清 E_2 、PRL 水平降低,血清 P 水平升高($P < 0.05$)。结论 乳痛软坚片干预肝郁痰凝型乳腺增生大鼠可降低行为学评分,缩小乳房毛发裸区直径,减少乳腺导管上皮细胞增生,降低血清 E_2 、PRL 水平,升高血清 P 水平,且高剂量乳痛软坚片疗效更为显著。

关键词 乳腺增生;肝郁痰凝;乳痛软坚片;性激素

Effect of Rutong Ruanjian Tablet on E_2 , P and PRL Levels in Rats with Hyperplasia of Mammary Glands with Pattern of Liver Depression and Phlegm Coagulation

LIU Hui¹, LI Songlian², TAN Chengdan², LING Jie², HUANG Weifang², LIU Lifang^{1△}

¹The First Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China

²Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410207, China

Abstract Objective To observe the effect of Rutong Ruanjian tablet on the levels of serum estradiol(E_2) and progesterone(P), prolactin(PRL) in rats with hyperplasia of mammary glands with pattern of liver depression and phlegm coagulation. **Methods** The rat model of hyperplasia of mammary glands with pattern of liver depression and phlegm coagulation was established by combined injection of estrogen and progesterone and tail clamping stimulation. After successful establishment of the model, the rats were randomly divided into 5 groups with 8 rats in each group. Group A was normal control group, group B was model control group, group C, D, E was treated with low, medium and high doses of Rutong Ruanjian tablet, and group F was treated with Hongjin Xiaojie concentrated pill. The rats in each group were given intragastric administration once a day. After one month, the behavioral score, the diameter of naked area of breast hair, the number of the hyperplasia of mammary duct epithelial cells and the levels of serum E_2 , P, and PRL were compared between the groups. **Results** After modeling, compared with

* 湖南省自然科学基金青年基金(No. 2018JJ3403)

△通信作者, Corresponding author, E-mail: liulff@126.com

group A, the behavioral score of group B was significantly higher ($P < 0.05$), the diameter of naked area of breast hair was significantly increased ($P < 0.05$), the number of hyperplasia of mammary duct epithelial cells was significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of serum E_2 , PRL were significantly increased, the level of serum P was significantly decreased ($P < 0.05$). After treatment, the behavioral score of rats in each group decreased in varying degrees ($P < 0.05$), the diameter of naked area of breast hair decreased ($P < 0.05$), the number of hyperplasia of mammary duct epithelial cells decreased ($P < 0.05$), and the levels of serum E_2 , PRL decreased, the levels of serum P increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Rutong Ruanjian tablet in the treatment of hyperplasia of mammary glands with pattern of liver depression and phlegm coagulation could reduce the behavioral score, reduce the diameter of naked area of breast hair, reduce the number of hyperplasia of mammary duct epithelial cells, reduce the levels of serum E_2 , PRL, increase the level of serum P, and the effect of high dose Rutong Ruanjian tablet is more significant.

Key words hyperplasia of mammary glands; liver depression and phlegm coagulation; Rutong Ruanjian tablet; sex hormone

乳腺增生是女性最常见的乳房疾病, 临床表现为一侧或两侧乳房结节、乳腺增大、局部周期性疼痛等, 多见于 30~50 岁女性, 男性也可发生。不典型增生属于乳腺高危病变, 其发生乳腺癌的危险性明显增加^[1]。乳腺增生的发生, 本质上是由于乳腺实质和间质不同程度地增生与复旧不全所致的乳腺正常结构紊乱, 可能与卵巢功能失调有关, 也可能为黄体素与雌激素比例不平衡所致, 目前尚无定论, 多认为与体内内分泌紊乱及激素水平失调有关。西医主要采取激素类药物, 易反复而难治愈, 或手术切除增生肿块, 增加患者的精神负担。乳痛软坚片是本院院内制剂, 已经在临床上使用多年, 成分稳定^[2], 疗效确切。本研究将进一步从激素水平探讨其治疗乳腺增生的作用机理, 现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

60 只健康未孕雌性 SD 大鼠, SPF 级, 70~80 日龄, 体重 180~230 g, 由湖南中医药大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号 SCXK(湘)2009-0012。全价颗粒饲料由湖南中医药大学提供, 批号 100811。

1.2 药 物

乳痛软坚片, 由柴胡、陈皮、川楝子、延胡索、莪术、当归、白芍、党参、浙贝母、海蛤粉、甘草等中药组成, 由湖南中医药大学第一附属医院制剂室制备(规格 0.3 g × 100 片, 湘药制字 Z20160364, 批号 161009)。红金消结浓缩丸, 由金荞麦、三七、五香血藤、柴胡、八角莲、大红袍、香附、鼠妇虫、黑蚂蚁、鸡矢藤等中药组成, 云南楚雄云中制药有限公司(规格 0.2 g × 60 丸, 国药准字 Z20160511, 批号 160514)。黄体

酮注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 国药准字 H12020534, 批号 1612091); 苯甲酸雌二醇注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 国药准字 H12020529, 批号 1605061)。

1.3 主要试剂及仪器

主要试剂: 大鼠雌激素 ELISA 检测试剂盒(美国 DRG, 批号 JKSJ-2636); 大鼠孕激素 ELISA 检测试剂盒(cusabio, 批号 CSB-E07282r); 大鼠泌乳素 ELISA 检测试剂盒(武汉纯度生物, 批号 CD-108818-ELISA); 磷酸缓冲盐溶液、枸橼酸钠缓冲液均由博士德提供; 无水乙醇、苏木素、盐酸、二甲苯、多聚甲醛、0.9% NaCl 注射液等均为国产分析纯。

主要仪器: 三目生物显微镜(Carl Zeiss 3120000469), 电子天平(WTI1001R), 图像分析系统(Motic Images Advanced 3.2), 生物组织自动脱水机, 生物组织包埋中心, 石蜡切片机(DQP-9010), 摊片烤片机, 微波炉, 电子恒温水浴箱, 隔水式电热恒温培养箱, 恒温电烤箱, 自制大鼠灌胃器, 镊子, 自制大鼠固定器, 试管架, 盖玻片, 移液器等。

1.4 动物模型的制备

60 只 SD 大鼠, 自由进水、进食, 12 h 明暗交替, 室温 20℃~23℃, 相对湿度 55%, 适应性喂养 1 周, 适应环境后开始实验。正常对照组(A 组 10 只)大鼠大腿外侧肌注 0.9% NaCl 注射液(0.5 mg/kg), 1 次/d, 连续 30 d。参照文献^[3]制备乳腺增生肝郁痰凝型大鼠模型, 模型制备组(50 只)肌注苯甲酸雌二醇注射液(0.5 mg/kg), 1 次/d, 持续 25 d; 接着肌注黄体酮注射液(4 mg/kg), 1 次/d, 持续 5 d; 模型制备组同时予以每日夹尾(距尾巴末梢 25 cm 的地方)刺激 30 min, 共 30 d。

造模后,模型动物出现性情改变,毛色枯黄,体重增加减慢甚至停滞等现象;肉眼观察,模型动物的乳头高度及直径、乳房毛发裸露区直径明显大于正常对照组;随机抽取 10 只模型制备组大鼠、2 只正常对照组大鼠,取大鼠的前 1 对或 2 对乳房做病理切片,光镜下显示模型制备组较正常对照组大鼠乳腺小叶数目增多、腺泡明显扩张等乳腺增生病理改变,血清雌激素水平显著升高,表示造模成功。

1.5 动物干预方法

对造模成功的大鼠进行随机均衡分组,A 组仍为正常对照组,B 组为模型对照组,实验组设 C、D、E 组分别为乳痛软坚片低、中、高剂量组,F 组为红金消结浓缩丸阳性对照组,每组 8 只大鼠。乳痛软坚片中剂量组换算为临床日用量等效剂量,低、中、高剂量组按 1:2:4 比例用药,分别为 0.32 g/kg、0.64 g/kg、1.28 g/kg;F 组给药剂量为 0.55 g/kg。药物研末,分别称取,用蒸馏水溶解稀释,置于 4℃ 冰箱内保存备用。A、B 组大鼠灌以 10 mL/kg 的生理盐水,C、D、E、F 各组每日以 10 mL/kg 的药物溶剂灌胃,连续灌胃 1 个月。实验结束时,各组大鼠均成活。

1.6 检测指标及方法

①大鼠行为学指标 观察大鼠是否存在“皮毛欠光、竖毛、脱毛、弓背、怕冷、倦怠、反应迟钝、易激惹、急躁”等反应,分别按“无、轻微、明显”计 0、1、2 分^[4];9 项总分为 0~5 分者终得分计为 0 分,6~11 分者终得分计为 1 分,12~18 分者终得分计为 2 分。

②乳房毛发裸露区直径 对大鼠乳房外形进行观察,用游标卡尺对双侧第 2 对乳房毛发裸露区直径进行精确测量。

③血清 E₂、P、PRL 水平 于末次给药后 1 h,大鼠尾静脉采血,离心取血清,分装后冷冻保存,采用酶联免疫分析方法,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行实验操作,检测血清 E₂、P、PRL 水平。

④乳腺病理观察 脱颈椎处死大鼠,用 20%Na₂S 脱毛,取大鼠第 2、3 对乳房,分别用 10%福尔马林固定 24 h;经过脱水、透明、透蜡、包埋、切片、展片、烤片、HE 染色等处理后进行镜检。光镜下观察乳腺组织切片的形态结构,利用图像分析软件采集图像并测量乳腺导管上皮细胞层数,每张病理切片观测 3 个视野后取其平均值作为统计数据。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验或 Dunnett's T3 法;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为学评分及乳房毛发裸露区直径

造模后,与 A 组比较,B、C 组大鼠行为学评分显著升高($P < 0.05$)。治疗后,与 B 组比较,D、E、F 组大鼠行为学评分明显降低($P < 0.05$);与 C 组比较,D、E、F 组大鼠行为学评分明显降低($P < 0.05$)。

造模后,与 A 组比较,B、C、D、E、F 组大鼠乳房毛发裸露区直径均显著增大($P < 0.05$)。治疗后,与 B 组比较,D、E、F 组大鼠乳房毛发裸露区直径明显缩小($P < 0.05$);与 C 组比较,D、E、F 组大鼠乳房毛发裸露区直径明显缩小($P < 0.05$);与 D 组比较,E、F 组大鼠乳房毛发裸露区直径明显缩小($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠行为学评分及乳房毛发裸露区直径($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	行为学评分(分)	乳房毛发裸露区直径(cm)
A 组	1.13±0.35	0.55±0.09
B 组	2.75±0.46*	1.37±0.10*
C 组	2.38±0.52*	1.36±0.12*
D 组	1.38±0.52 [△]	1.20±0.08 [△]
E 组	1.38±0.52 [△]	0.70±0.10 [△] [□]
F 组	1.13±0.35 [△]	0.73±0.10 [△] [□]

与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,[△] $P < 0.05$;与 C 组比较,[△] $P < 0.05$;与 D 组比较,[□] $P < 0.05$

2.2 乳腺导管上皮细胞增生层数

造模后,B 组大鼠乳腺导管上皮细胞增生层数明显多于 A 组($P < 0.05$);治疗后,E 组大鼠乳腺导管上皮细胞增生层数明显少于 B 组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 乳腺导管上皮细胞增生层数($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞增生层数(层/视野)
A 组	2.13±0.35
B 组	3.13±0.64*
C 组	2.88±0.64
D 组	2.50±0.53
E 组	2.13±0.35 [△]
F 组	2.38±0.52

与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,[△] $P < 0.05$

2.3 血清 E₂、P、PRL 水平比较

造模后,B 组大鼠血清 E₂、PRL 水平明显高于 A 组,血清 P 水平明显低于 A 组($P < 0.05$);治疗后,D、

E、F 组大鼠血清 E₂ 水平显著低于 B 组 ($P < 0.05$), F 组大鼠血清 P 水平显著高于 B 组 ($P < 0.05$), E、F 组大鼠血清 PRL 水平显著低于 B 组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血清 E₂、P、PRL 水平比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	E ₂ (pmol/L)	P(ng/mL)	PRL(ng/L)
A 组	44.27±18.30	13.17±1.64	4.11±0.13
B 组	71.67±24.89*	10.98±1.53*	5.52±0.18*
C 组	67.21±19.62	11.63±1.22	5.49±0.19
D 组	63.31±23.98 [△]	11.54±1.06	4.98±0.21
E 组	50.23±27.86 [△]	11.60±1.55	4.23±0.17 [△]
F 组	48.25±19.12 [△]	13.22±1.73 [△]	4.31±0.09 [△]

与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, [△] $P < 0.05$

3 讨论

多数学者认为, 乳腺增生与下丘脑-垂体-卵巢-乳腺内分泌轴紊乱有关, 雌、孕激素比例失调使乳腺在雌激素的刺激下实质增生过度 and 复旧不全^[5], 而 PRL 水平长期升高不仅可直接刺激腺泡增生, 还可通过刺激雌激素的产生及对孕激素的抑制从而导致乳腺腺体增生^[6]。枸橼酸他莫昔芬片为一种雌激素受体拮抗剂, 结构类似雌激素, 能与 E₂ 竞争雌激素受体并形成稳定复合物, 导致雌激素无法发挥作用, 虽可应用于治疗乳腺增生、预防乳腺癌, 但不良反应较多而难以被患者接受^[7]。

情志因素所导致的肝气不舒是肝郁气滞型乳腺增生疾病发生的最主要原因, 其主要机理为肝郁气滞, 日久痰凝血瘀, 形成增生结节伴疼痛。乳痛软坚片是本院经典制剂, 具有疏肝解郁、化痰散结、活血止痛之功, 成分稳定, 疗效确切, 并具有降低大鼠乳腺增生组织血管内皮生长因子 (VEGF) 表达, 抑制新生血管形成, 降低微血管密度 (MVD), 改善腺体微循环及病理性增生的作用^[8]。其基本药物组成为柴胡、陈皮、川楝子、延胡索、当归、白芍、莪术、海蛤粉、浙贝母、党参、甘草等。柴胡解表退热、疏肝解郁, 陈皮理气健脾、燥湿化痰, 川楝子行气止痛, 延胡索活血、行气、止痛, 当归补血调经、活血止痛, 白芍养血敛阴、柔肝止痛、平抑肝阳, 莪术破血行气、消积止痛, 海蛤粉清肺化痰、软坚散结, 浙贝母清热化痰、散结消痈, 党参补脾肺气、补血生津, 甘草补脾益气、缓急止痛、清热解毒、调和药性; 全方配伍, 共奏疏肝解郁、化痰散结、活血止痛之功。

本研究结果表明, 造模后大鼠出现“倦怠、弓背、怕冷、竖毛、皮毛欠光、脱毛、反应迟钝、易激惹、急躁”等行行为学表现, 行为学评分显著升高; 肉眼观察大鼠乳房可见乳头周围毛发裸区直径明显变大并隆起; 乳腺组织可见到典型的乳腺增生灶, 导管上皮细胞结构紊乱、增生层数明显增多; 血清 E₂、PRL 水平明显升高, 血清 P 水平明显降低, 表明肝郁痰凝型乳腺增生大鼠造模成功。治疗后, 大鼠行为学评分下降, 乳房毛发裸区直径缩小, 乳腺导管上皮细胞排列基本规则、增生层数减少, 血清 E₂、PRL 水平降低, 血清 P 水平升高, 表明乳痛软坚片干预后均出现不同程度的改善。本课题组前期临床观察^[9]、徐玲^[10]等研究发现疏肝活血药物可改善患者性激素水平, 这与本研究结果相一致。

综上所述, 乳痛软坚片干预肝郁痰凝型乳腺增生大鼠可降低行为学评分, 缩小乳房毛发裸区直径, 减少乳腺导管上皮细胞增生, 降低血清 E₂、PRL 水平, 升高血清 P 水平, 且高剂量乳痛软坚片疗效更为显著。

参 考 文 献

- [1] Reimers LL, Crew KD, Terry MB. Atypical hyperplasia of the breast[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(13):1270-1271.
- [2] 周宜, 唐林, 乔勇, 等. 正交设计优选乳痛软坚片醇提工艺研究[J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(23):32-34.
- [3] 朱愉, 多秀瀛. 实验动物的疾病模型[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1997:392-394.
- [4] 马朝群. 补肾疏肝法对乳腺增生型大鼠疗效观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [5] 中华预防医学会妇女保健分会乳腺保健与乳腺疾病防治学组. 乳腺增生症诊治专家共识[J]. *中国实用外科杂志*, 2016, 36(7):759-762.
- [6] Sun L, Guo DH, Liu F, et al. A mouse model of mammary hyperplasia induced by oral hormone administration[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2017, 14(4):247-252.
- [7] 丁瑜莉, 王海霞, 俞腾飞. 他莫昔芬临床应用研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(2):275-279.
- [8] 刘慧, 刘丽芳, 姚菲. 乳痛软坚片对大鼠乳腺组织 VEGF、MVD 表达研究[J]. *中成药*, 2014, 36(10):2199-2202.
- [9] 陈其华, 刘慧. 乳痛软坚片治疗乳腺增生病 41 例[J]. *中医杂志*, 2011, 52(23):2048-2049.
- [10] 徐玲, 郭丽珍, 吕雄, 等. 加味逍遥散调周法对乳腺增生患者血清性激素水平的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(4):487-491.

(收稿日期: 2019-07-21)