

乳康胶囊对乳腺增生大鼠激素及细胞凋亡水平的影响

叶延程¹, 丁高恒², 宋鹏³, 杨宁², 高青², 张娜², 赵良存^{1,2}

1. 甘肃省武威肿瘤医院, 甘肃 武威 734500

2. 甘肃中医药大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃中医药大学附属第二医院, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 观察乳康胶囊对乳腺增生症 (Hyperplasia of mammary gland, HMG) 大鼠血清激素、细胞凋亡的影响及治疗作用。方法: 采用注射苯甲酸雌二醇、黄体酮建立大鼠 HMG 模型, 将造模成功的大鼠随机分为 6 组, 即正常组、模型组、阳性药组和乳康胶囊低、中、高剂量组, 给药 30 天后, 测量各组大鼠同侧第 2 对乳头的高度及直径; 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测血清雌二醇 (Estradiol 2, E₂)、孕酮 (Progesterone, P) 和促乳素 (Prolactin, PRL) 的含量; 用免疫组化法检测各组大鼠乳腺组织 B 淋巴细胞瘤相关蛋白质 (B-cell lymphoma-associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠乳头直径、乳头高度增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组乳房直径、乳头高度降低 ($P < 0.05$); 血清 E₂、PRL 含量降低, P 含量升高 ($P < 0.05$); 乳康胶囊高剂量组乳腺组织 Bax 表达升高, Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$); 与阳性药组比较, 乳康胶囊高剂量组乳房直径减小 ($P < 0.05$), 乳康胶囊各剂量组 E₂、PRL、P 含量及 Bax、Bcl-2 表达差异无统计学意义。结论: 乳康胶囊能减轻 HMG 发展, 其作用与降低大鼠血清 E₂、PRL 以及升高 P 含量有关, 可能与通过调节 Bax、Bcl-2 途径促进细胞凋亡有关。

[关键词] 乳康胶囊; 乳腺增生症 (HMG); 雌激素; 细胞凋亡; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 06-0008-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.06.003

Rukang Capsules Has Effect on Levels of Hormones and Apoptosis in Rats with Hyperplasia of Mammary Glands

YE Yancheng, DING Gaoheng, SONG Peng, YANG Ning, GAO Qing, ZHANG Na, ZHAO Liangcun

Abstract: **Objective:** To observe the effect of Rukang capsules on the hormones of serum and apoptosis in rats with hyperplasia of mammary gland (HMG) and its curative effect. **Methods:** The rat models with HMG were established by injecting estradiol benzoate and progesterone. Rats successfully modelled were randomly divided into six groups, namely the normal group, the model group, the positive medicine group and the Rukang capsules groups of low-dose, medium-dose and high-dose. After 30-day administration of medicine, the heights and diameters of the ipsilateral second pair of nipples of rats in each group were measured; the contents of the estradiol 2 (E₂), the progesterone (P) and the prolactin (PRL) in serum were detected through Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); the expressions of B-cell lymphoma-associated X protein (Bax) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) in mammary-glands tissues of rats in each group were detected through the immunohistochemistry. **Results:** Compared with those in the normal group, the height and diameter of the nipples of rats in the model group were increased ($P < 0.05$); compared with those in the model group, the height and diameter of the nipples in each group after administration of medicine were decreased ($P < 0.05$); the contents of E₂ and PRL in serum were decreased while the content of P was increased ($P < 0.05$); the expression of Bax in the mammary-glands tissues in the Rukang capsules group of high-dose was increased, while the expression of Bcl-2 was decreased ($P < 0.05$); compared with those in the positive medicine group, the diameter of the nipples of rats in the Rukang capsules group of high-dose was decreased ($P < 0.05$), and compared with the contents of E₂, PRL and P as well as the expressions of Bax and Bcl-2 in the Rukang capsules groups of each dose respectively, there was no significance in the difference. **Conclusion:** Rukang capsules can

[收稿日期] 2018-11-16

[基金项目] 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室开放基金项目 (GSMBKY2015-11, GSMBKY2015-10); 兰州市城关区科技局基金项目 (2014-4-5)

[作者简介] 叶延程 (1969-), 男, 主任药师, 主要从事临床药学及中药制剂研究。

[通信作者] 赵良存, E-mail: zhaolc@163.com。

alleviate the advancement of HMG, whose effect is related to the decrease of the contents of E_2 and PRL as well as the increase of the content of P in serum in rats and may be related to the promotion of apoptosis through regulating Bax and Bcl-2.

Keywords: Rukang capsules; Hyperplasia of mammary gland(HMG); Estrogen; Apoptosis; Animal experiment; Rats

乳腺增生症(Hyperplasia of mammary gland, HMG)是临床上常见的妇科疾病,也是乳腺癌的主要诱发因素^[1]。随着生活环境改变及生活节奏的加快,HMG发病率逐年升高,已对女性患者身心健康造成严重影响^[2]。目前临床上对HMG还没有一种适用性广且疗效肯定的治疗方案,且其发病机理尚不明确,因此对其机理和治疗进行研究非常必要^[1-3]。目前中西医结合临床治疗HMG得到广泛应用^[4],乳康胶囊作为甘肃省肿瘤医院院内中药制剂,前期研究优选乳康胶囊提取工艺^[5],并对乳康胶囊通过TLC和HPLC方法对乳康胶囊生产进行质量控制研究,临床用于治疗乳痛症和HMG疗效显著^[6]。故本研究利用大鼠HMG模型,观察乳康胶囊治疗HMG作用机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级SD雌性未孕大鼠60只,体质量(198.58 ± 6.78)g,购自甘肃中医药大学实验动物中心,动物生产许可证号SCXK(甘)2015-0002,实验室室温控制在(22 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度45%~55%,动物自由饮水,适应性饲养1周后开始实验。

1.2 试剂及药品 他莫昔芬片(批号20170506),辽宁一成药业有限公司。苯甲酸雌二醇注射液(批号161109),广州白云山明兴制药有限公司。黄体酮注射液(批号170111),浙江仙琚制药股份有限公司。血清雌二醇(Estradiol, E_2)试剂盒,货号:A001-3;孕酮(Progesterone, P)试剂盒,货号:A001-3;以上两检测盒均购于上海酶联生物科技有限公司。乳康胶囊处方浸提液由武威肿瘤医院制备,乳康胶囊处方(中药饮片)纯净水浸泡30min,每次加水3L煎煮,共煎煮3次,将3次煎煮液合并后浓缩,最终制成含生药3g/L的浸提液, -4°C 保存备用,灌胃给药剂量按照临床用量10倍给药,每天1次。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 离心机(北京医用离心机厂);DK-80型电热恒温水浴槽(广东环凯微生物科技有限公司);W-80A漩涡混合器(上海医大仪器厂);酶标仪(美国赛默飞舍公司)。

1.4 模型制备及动物分组 按照文献[7]造模,从60只大鼠中随机选取8只作为正常组,其余52只用雌、孕激素序贯法进行造模,按体质量 $0.5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 于大鼠后肢后外侧肌肉注射苯甲酸雌二醇,每天1次,左右交替,连续25天,继而腹腔注射黄体酮, $5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,每天1次,连续5天,在造模过程中每3天测量1次体质量,根据其体质量的变化及时调整给药量,正常组注射等体积的生理盐水,在造模过程中大鼠乳头会出现红肿、增大等情况,且有部分乳晕出现。连续造模过程

中,随机分批次共取出造模大鼠12只,麻醉处死并通过乳腺组织病理切片观察乳腺腺泡和导管的增生情况以确定造模成功。造模成功后将剩余40只模型大鼠利用SPSS20.0统计软件生成随机数字随机分为5组。各组受试对象体质量、乳头的肿大程度等基本情况差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.5 给药方法 模型组和正常组大鼠按药物同体积生理盐水灌胃,阳性药组按 $4\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的剂量给予他莫昔芬,乳康胶囊低、中、高剂量组按成人剂量生药提取液同体积的5、10、15倍混悬液灌胃,乳康胶囊低剂量组、中剂量组和高剂量组给药剂量分别为: $2.6\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $5.2\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $10.4\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,持续30天。

1.6 指标检测方法 ①利用游标卡尺精确测量大鼠胸部第2对乳头的直径与高度;②实验结束后,用水合氯醛麻醉动物,并通过心脏采血收集各组大鼠血液,在低温离心机 4°C 下,以 $4000\text{ r}/\text{min}$ 离心15min,收集上清液,再用ELISA法测定各组大鼠血清 E_2 、P和促乳素(Prolactin, PRL)的含量;③用免疫组化法测定各组大鼠组织B淋巴细胞瘤相关蛋白(B-cell lymphoma-associated X protein, Bax)、B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)表达,Bax和Bcl-2图像采用Motic Images Advanced 3.2软件进行分析,计算目标总面积占选区总面积的百分比。

1.7 统计学方法 采用SPSS21.0统计软件进行数据处理,服从正态分布的计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠乳头直径、高度结果比较 见表1。与正常组比较,模型组大鼠乳头高度及直径增高增大($P < 0.05$),说明造模成功。当给予药物连续治疗30天后,与模型组比较,乳康胶囊各剂量组乳头高度及直径减小($P < 0.05$)。与阳性药组比较,乳康胶囊高剂量组乳房直径减小($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠乳头直径、高度结果比较($\bar{x} \pm s$) mm

组别	鼠数	乳房直径	乳头高度
正常组	8	0.88 ± 0.06	1.53 ± 0.18
模型组	8	$1.09 \pm 0.17^{\text{①}}$	$1.89 \pm 0.13^{\text{①}}$
阳性药组	8	$0.74 \pm 0.14^{\text{②}}$	$1.33 \pm 0.21^{\text{②}}$
乳康胶囊低剂量组	8	$0.87 \pm 0.09^{\text{②}}$	$1.55 \pm 0.08^{\text{②}}$
乳康胶囊中剂量组	8	$0.80 \pm 0.11^{\text{②}}$	$1.50 \pm 0.18^{\text{②}}$
乳康胶囊高剂量组	8	$0.67 \pm 0.05^{\text{②③}}$	$1.37 \pm 0.30^{\text{②}}$

与正常组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与阳性药组比较,③ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠血清 E₂、PRL、P 检测结果比较 见表 2。与正常组比较,模型组 E₂、PRL 水平升高, P 水平降低(P<0.05)。与模型组比较,乳康胶囊各剂量组血清 E₂、PRL 水平降低, P 水平升高(P<0.05)。与阳性药组比较,乳康胶囊各剂量组 E₂、PRL 和 P 含量差异无统计学意义。

表 2 各组大鼠血清 E₂、PRL 和 P 检测结果比较($\bar{x} \pm s$) pg/mL

组别	鼠数	E ₂	PRL	P
正常组	8	31.24±2.61	47.26±5.31	125.16±16.06
模型组	8	89.63±5.40 ^①	68.19±6.18 ^①	75.75±10.36 ^①
阳性药组	8	41.99±3.77 ^②	50.37±4.82 ^②	120.97±7.17 ^②
乳康胶囊低剂量组	8	49.84±5.17 ^②	61.83±4.37 ^②	94.56±8.79 ^②
乳康胶囊中剂量组	8	43.69±5.77 ^②	57.36±6.42 ^②	103.89±12.65 ^②
乳康胶囊高剂量组	8	39.33±5.39 ^②	52.87±8.04 ^②	118.20±14.10 ^②

与正常组比较, ①P<0.05; 与模型组比较, ②P<0.05

2.3 各组大鼠乳腺组织 Bax、Bcl-2 表达结果比较 见表 3、图 1、图 2。与正常组比较,模型组大鼠乳腺组织 Bax 表达降低, Bcl-2 表达升高(P<0.05); 与模型组比较,乳康胶囊高剂量组中 Bax 表达增高(P<0.05), 而 Bcl-2 表达降低(P<0.05); 与阳性药组比较,乳康胶囊各剂量组 Bax、Bcl-2 表达差异无统计学意义。

表 3 各组大鼠乳腺组织 Bax、Bcl-2 表达结果比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	鼠数	Bax	Bcl-2
正常组	8	8.62±0.68	7.42±1.53
模型组	8	6.91±1.26 ^①	10.01±2.66 ^①
阳性药组	8	8.93±1.27 ^②	6.63±1.93 ^②
乳康胶囊低剂量组	8	7.32±1.89	8.54±1.82
乳康胶囊中剂量组	8	7.79±2.34	8.77±1.94
乳康胶囊高剂量组	8	8.53±0.76 ^②	6.36±1.01 ^②

与正常组比较, ①P<0.05; 与模型组比较, ②P<0.05

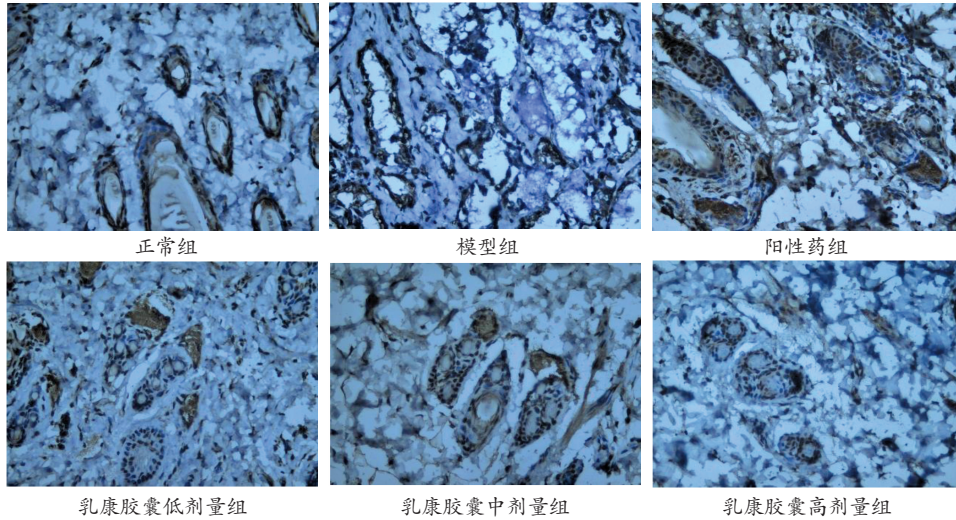


图 1 各组大鼠乳腺组织 Bax 表达结果比较 (×1 000)

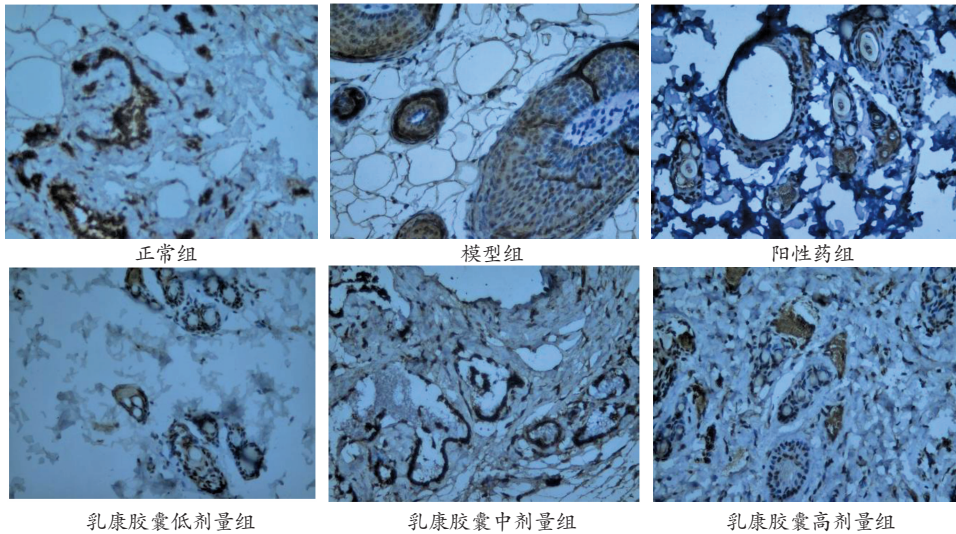


图 2 各组大鼠乳腺组织 Bcl-2 表达结果比较 (×1 000)

3 讨论

HMG属于中医“乳癖”范畴,特征为经前或经期乳房胀满疼痛,甚则乳房结块^[8]。其致病机理尚不明确,尚无特效治疗方法及药物^[1]。有研究认为HMG的发病原因可能与卵巢功能失调,雌、孕激素水平比例失调有关,E₂及PRL水平增高,P水平降低,长期刺激乳腺组织使乳腺导管和小叶增生过度而复旧不全是本病的主要病因^[9-10],故临床治疗药物的选择靶点主要针对激素水平的调节^[11-12]。临床应用显示局部手术切除也可达到治疗HMG的目的,但患者不易接受,且复发率高^[13]。因此,改变血清雌、孕激素及PRL水平,减少乳腺小叶组织对雌、孕激素的反应仍是目前治疗HMG的有效方法^[14]。

本研究采用苯甲酸雌二醇联合黄体酮制备HMG大鼠模型,模型组大鼠乳头直径、乳头高度增加,E₂、PRL水平升高,P水平降低,病理切片进一步证实造模成功。课题组人员在给药后检测发现乳康胶囊可以有效抑制HMG大鼠乳头直径的增大以及乳头高度的增加,此结果与该院内制剂临床使用疗效相吻合。研究显示乳康胶囊作用机制可能与降低E₂、PRL的浓度,升高P的含量有关,该结果进一步提示乳康胶囊与改善机体内环境中的激素水平有关。雌激素可刺激乳腺导管生长,而P恰能对高雌激素状态产生抑制作用,使垂体和卵巢功能受到影响,从而控制病情的进一步恶化^[15]。另外依赖内分泌激素的组织器官在缺乏时可产生细胞凋亡,这种现象同样可发生于肿瘤组织,在雌激素依赖的组织如乳腺,激素可能诱导细胞凋亡^[16-17];本研究显示乳康胶囊可提升Bax、Bcl-2水平,这可能也是其治疗HMG的重要作用机理。

[参考文献]

- [1] LI H T, LIU H H, YANG Y X, et al. Therapeutic effects of a traditional chinese medicine formula plus tamoxifen vs. tamoxifen for the treatment of mammary gland hyperplasia: a meta-analysis of randomized trials [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 45.
- [2] 李政, 任建坤, 邱列泽. 平积汤加味联合三苯氧胺治疗子宫肌瘤并发乳腺增生临床研究[J]. *新中医*, 2018, 50(9): 106-108.
- [3] 蒋孜明, 李媛媛. 中医药治疗乳腺增生病的研究进展[J]. *广西医科大学学报*, 2017, 34(2): 303-306.

- [4] 边丹秀, 张颖. 散结消癖汤联合西药治疗乳腺增生临床观察[J]. *新中医*, 2016, 48(11): 123-124.
- [5] 赵良存, 叶延程, 苑维新. 正交试验优选乳康胶囊提取工艺[J]. *中兽医医药杂志*, 2012, 31(3): 28-30.
- [6] 叶延程, 赵良存. 乳康胶囊质量标准研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13): 125-128.
- [7] 罗伦才, 季小平, 黄兰雅, 等. 均匀设计法用于乳腺增生动物模型复制的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(7): 204-206.
- [8] 郭晓, 徐璐, 吴信祥, 等. 杨丹红治疗乳腺增生经验介绍[J]. *新中医*, 2017, 49(10): 183-184.
- [9] 陆春红, 许慧琴, 刘凯, 等. 消癥九精制剂抗乳腺小叶增生的作用研究[J]. *中国药理与临床杂志*, 2014, 30(3): 119-121.
- [10] 王雄, 吴金虎, 陈永刚, 等. 回乳抑增工号对实验性乳腺增生大鼠的作用及其机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 19(13): 274-279.
- [11] 段好刚, 魏玉辉, 李波霞, 等. 疏乳消块方不同溶媒提取物对大鼠乳腺增生的治疗作用[J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(10): 1058-1062.
- [12] 常秀娟, 周军, 张帅, 等. 桂枝茯苓胶囊对乳腺增生大鼠性激素水平和乳腺组织的影响[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(21): 4139-4142.
- [13] 彭红华. 班秀文治疗乳腺增生经验[J]. *中医杂志*, 2014, 55(2): 103-105.
- [14] 连小龙, 赵敏, 韩涛, 等. 西黄丸对模型大鼠抗乳腺增生作用及其机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(23): 2390-2393.
- [15] 赵颖, 方志沂. 乳腺癌的内分泌治疗[J]. *中国全科医学*, 2002, 5(6): 434-435.
- [16] 徐庆鑫, 谷丽艳, 解静茹, 等. 针刺对乳腺增生大鼠乳腺组织 FasL、Fas 表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(11): 2895-2898.
- [17] 叶志雄, 陈泳晖, 肖柳英. 乳康汤含药血清对大鼠乳腺增生组织 ER 和 PR 表达及细胞凋亡的实验研究[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2013, 10(4): 55-59.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)