

柴金散结方对乳腺增生大鼠的药效作用及机制

李佳林，张晶璇，王铁山，陈聪，任冬玲，王停*
(北京中医药大学 中医学院，北京中医药研究院，北京 100029)

〔摘要〕 目的：考察柴金散结方对大鼠乳腺增生的药效及机制，为中药新药研发提供实验依据。方法：外源性肌注雌、孕激素制备乳腺增生 SD 大鼠模型，造模成功后，大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、柴金散结方（柴金）低、中、高剂量（3.13, 6.26, 12.52 g·kg⁻¹）组及乳癖消（0.517 g·kg⁻¹）组，每组 9 只。给药 28 d，放射免疫法测定雌二醇（E₂），孕酮（P）及泌乳素（PRL），计算子宫、卵巢系数，观察乳头直径、乳腺组织病理，免疫组化法测定乳腺组织中雌激素受体-α（ER-α）表达量，实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR）测定下丘脑、垂体促性腺激素释放激素（GnRH），促性腺激素释放激素受体（GnRH-R）mRNA 表达；ICR 小鼠按体质量随机分为正常组、柴金低、中、高剂量组（5.2, 10.4, 20.8 g·kg⁻¹）与罗通定组（0.038 6 g·kg⁻¹），每组 12 只，给药 7 d，末次给药 30 min 后腹腔注射 0.6% 乙酸，观察 15 min 内扭体次数。结果：与正常组比较，模型组乳头直径增宽，血清 E₂ 显著升高（*P* < 0.01），乳腺组织增生，ER-α 表达增加；与模型组比较，柴金高剂量组乳头直径显著下降（*P* < 0.05）；柴金各剂量组 E₂ 均有下降；柴金中、高剂量组可降低乳腺增生病理积分；柴金各剂量组均能降低下丘脑中 GnRH mRNA 表达；柴金高剂量组小鼠扭体次数减少（*P* < 0.05）。结论：柴金散结方可改善乳腺增生病变情况，作用机制可能与调节下丘脑 GnRH mRNA 表达及降低雌激素受体表达有关。

〔关键词〕 柴金散结方；实验性乳腺增生；药效学；雌激素受体-α（ER-α）；作用机制；逍遥散

〔中图分类号〕 R22；R242；R2-031；R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2019)15-0089-07

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.20191523

〔网络出版地址〕 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190417.1350.017.html>

〔网络出版时间〕 2019-04-18 11:28

Pharmacodynamics and Mechanism of Chaijin Sanjie Prescription on Rats with Mammary Gland Hyperplasia

LI Jia-lin, ZHANG Jing-xuan, WANG Tie-shan, CHEN Cong, REN Dong-ling, WANG Ting*
(College of Traditional Chinese Medicine, Beijing Research Institute of Chinese Medicine,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To investigate the pharmacodynamics and mechanism of Chaijin Sanjie prescription (CJSJP) on rat mammary gland hyperplasia, in order to provide experimental basis for the research and development of new Chinese medicine. **Method:** SD rat model of mammary gland hyperplasia was established through exogenous intramuscular injection with estrogen and progesterone. After successful establishment of the model, the rats were randomly divided into normal group, model group, and low, medium and high-dose CJSJP groups (3.13, 6.26, 12.52 g·kg⁻¹) and Rupixiao (0.517 g·kg⁻¹) group, with 9 rats in each group. After 28 days of administration, estradiol (E₂), progesterone (P) and rolactin (PRL) were measured by radioimmunoassay, uterus and ovary coefficients were calculated; nipple diameter and breast histopathology were observed, estrogen receptor-α (ER-α) expression in mammary gland was measured by immunohistochemistry, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) mRNA

〔收稿日期〕 20190228(009)
〔基金项目〕 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301011)
〔第一作者〕 李佳林,在读硕士,从事中医体质与生殖医学研究,E-mail:lijialin2017abc@sina.com
〔通信作者〕 *王停,博士,教授,从事中药新药研发研究,E-mail:wangting1973@sina.com

expressions in hypothalamus, pituitary were measured by Real-time PCR. ICR mice were randomly divided into normal group, low, medium and high-dose CJSJP groups ($5.2, 10.4, 20.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Luotongding group ($0.0386\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) according to their body weight. Twelve mice in each group were given drugs for 7 days, and 0.6% acetic acid was injected intraperitoneally for 30 minutes after the last administration. The writhing times were observed within 15 minutes. **Result:** Compared with the normal group, the diameter of nipple was widened, serum E_2 was significantly increased ($P<0.01$), breast tissue proliferation and ER- α expression were increased in model group. compared with model group, the diameter of nipple was significantly decreased in high dose group of CJSJP ($P<0.05$), E_2 was decreased in all dose groups of CJSJP, pathological score of breast hyperplasia was decreased in middle and high dose groups of CJSJP, GnRH mRNA in hypothalamus was decreased in all dose groups of CJSJP. The writhing times of mice in high dose group of CJSJP was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Chaijin Sanjie prescription can improve the lesions of breast hyperplasia. The therapeutic mechanism may be related to the regulation of GnRH gene expression in hypothalamus and the decrease of estrogen receptor expression.

[**Key words**] Chaijin Sanjie prescription; experimental hyperplasia of mammary glands; pharmacodynamics; estrogen receptor- α (ER- α); mechanism of action; Xiaoyaosan

乳腺增生病(HDBA)又称为乳腺结构不良,是以乳腺腺泡、导管的上皮细胞及结缔组织增生为基本病理变化的一类疾病的总称。临床主要症状为单侧或双侧乳房疼痛或伴乳房肿块,并随月经周期或情绪波动而呈现周期性变化^[1-2]。乳腺增生是妇科临床常见疾病,有证据表明,我国乳腺增生发病率呈现逐年上升的趋势^[3],2010 年中国人口协会颁布的《中国乳腺疾病调查报告》显示,我国城市妇女的乳腺增生患者高达 49.7%。多项临床研究证实,良性乳腺增生具有可癌变的特点,与乳腺癌发病存在明显相关性,是乳腺癌的重要危险因素之一,因此对乳腺增生进行早干预、早治疗是十分必要的^[4-6]。现代医学认为,体内雌、孕激素水平周期性分泌失调以及雌激素对乳腺组织的刺激性增高是乳腺增生发病的主要原因^[7]。同时雌激素在乳腺癌的发生中可通过代谢转化或诱导表达产生致癌作用^[8]。现代医学对乳腺增生以内分泌治疗为主,常用三苯氧胺等药物。但由于激素受体靶点分布具有多组织性的特点,患者极易在用药一段时间后出现不良反应,如月经失调、白带增多、烦躁、恶心、肝功能损害、眼底改变等^[9]。手术治疗治标不治本,复发率高,创伤性较大,患者不易接受。中医药治疗本病具有副作用小、医从性好、疗效显著等优势。柴金散结方来源于全国名老中医秦月好主任医师的临床经验方,由逍遥散化裁而来,秦老在继承历代医家经验的基础上,结合自身丰富的临床经验,认为乳癖的核心病机为“肝郁气滞,痰瘀互结”,以“疏肝理气,活血通络,化痰散结”为具体治法,并创立柴金散结方^[10],作为基础方随证加减,经本课题组前期观察,此方临床

应用疗效显著,为了进一步系统评估柴金散结方的药效学作用及机制,本研究从整体动物水平,观察其对大鼠乳腺增生模型的作用,同时观察其镇痛药效学作用,以期对柴金散结方的临床应用以及新药研发提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 基本方组成:北柴胡、郁金、鸡内金、当归、莪术、荔枝核、橘核、浙贝母、蒲公英、路路通、瓜蒌,以上中药饮片购自北京本草方源药业有限公司,批号分别为 20171216,20171219,20180106,20171230, 20171122, 20161004, 20170601,20171226,20171219,20171011,20171011。饮片经北京中医药大学中药学院李向日教授鉴定均为正品,原方配比生药 16.5 kg,水煎煮 2 次,每次 30 min,合并煎液,滤过后干燥成干膏,干膏 1 g 相当于生药 4.69 g,粉碎成细粉,密封置于 4℃ 冰箱中保存,备用。临用前,用水分别配成所需浓度。兽用苯甲酸雌二醇注射液(四川金科药业有限公司,批号 20130101);黄体酮注射液(浙江仙琚制药有限公司生产,批号 180210);乳癖消片(辽宁好护士药业有限责任公司,批号 100202);罗通定片(四川迪菲特药业有限公司,批号 170602)。

1.2 动物 SPF 级雌性未孕 SD 大鼠,9 周龄,购于北京维通利华生物科技公司,合格证号 SCXK(京)2018-0006;SPF 级 ICR 小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g,购于北京斯贝福生物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0002;以上动物均饲养于北京中医药研究院屏障环境动物室,实验期间动物自由饮水、摄食,室温 20~25℃,湿度为 40%~70%,光照

周期明暗各 12 h,通风良好。经北京中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理审查编号 BUCM-4-2018041301-2066。

1.3 试剂 苏木素-伊红(HE)染色液(北京九州柏林生物科技有限公司,批号 20180429);雌二醇(E_2),孕酮(P),泌乳素(PRL)放射免疫试剂盒(北京福瑞润泽生物技术有限公司,批号分别为 20180523,20180523,20180523);10% 乙酸溶液(山东临沂永安化验室,批号 20180508);雌激素受体- α (ER- α)抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab32063);ER- α 兔增强聚合法检测试剂盒,DAB 显色试剂盒,磷酸盐缓冲液(PBS),Citrate 柠檬酸盐缓冲液,抗体稀释液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 PV-9001, ZLI-9018, ZLI-9062, ZLI-9065, ZLI-9029);通用型 RNA 提取试剂盒(广州美基生物科技有限公司,批号 R4130-02);Reveraid First Strand cDNA Synthesis Kit,PCR 引物(赛默飞世尔科技有限公司,批号分别为 K1611, QR-07-0001);iTagTM Universal SYBR[®] Green Supermix(美国 Bio-Rad 公司,批号 172-5121);0.1% DEPC 水(江苏凯基生物科技股份有限公司,批号备 KGDN4500)。

1.4 仪器 XH6080 型放射免疫分析仪(西安核仪厂);EG1150H 型石蜡包埋机;ST5020 型染色机/盖片机工作站;RM2245 型轮转式切片机(德国 Leica 公司);Olympus BX41 型光学显微镜(上海赖氏电子科技有限公司);SPX 型生化培养箱(宁波江南仪器厂);MM400 型高通量组织研磨机(德国 Retsch 公司);Q5000 型超微量紫外分光光度仪(美国 Quawell 公司);Centrifuge 5430 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);C1000 型基因扩增仪,CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);奥林巴斯 BX53 正置病理显微成像系统(北京东方奥舟科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠血清激素水平、乳腺病理学的观察

2.1.1 造模 参考经典的乳腺增生造模方法^[11],采用大鼠肌肉注射苯甲酸雌二醇 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日 1 次(qd),连续 25 d,之后改用黄体酮肌肉注射 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,qd,连续 5 d。造模后光镜下观察动物乳腺组织结构及形态,根据乳腺增生动物模型制备规范中病理诊断标准^[11-12],本实验选择以乳腺腺泡增生为造模成功的主要评判依据。

2.1.2 分组及给药 造模成功后,将大鼠按体质量随机分为 6 组,即正常组、模型组、柴金散结方高、

中、低剂量组及乳癖消组。柴金散结方的临床应用剂量为每日生药 73 g,按成人 70 kg 体质量计算,大鼠等效剂量^[13]为 $6.26\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,依次设立大鼠柴金低、中、高剂量组,给药量分别为 3.13, 6.26, $12.52\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;小鼠等效剂量为 $10.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,依次设立 5.2, 10.4, $20.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量组;乳癖消临床应用剂量为 $0.086\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,大鼠等效剂量约为 $0.517\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;罗通定临床应用剂量为 $0.0038\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,小鼠等效剂量约为 $0.0386\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。鼠灌胃量按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 标准,每日灌胃 1 次,正常组、模型组每天以等量水灌胃,连续 28 d。

2.1.3 大鼠乳头直径测量 于造模前、造模后、给药后分别用精密游标卡尺测量大鼠乳头直径,测量前将大鼠用 10% 水合氯醛溶液麻醉,之后将第二对乳头周围皮肤用脱毛膏充分脱毛后擦拭干净,使大鼠保持水平仰卧位,用精密游标卡尺测量其乳头直径。

2.1.4 血清激素水平测定 末次给药 1 h 后用 10% 水合氯醛溶液 $3.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血, $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上层血清,放射免疫法测定 E_2 , P, PRL 含量。

2.1.5 乳腺组织病理学观察 大鼠腹主动脉取血处死之后,取下右侧胸部第 2 个乳头及周围乳腺组织样本,以 10% 甲醛固定,固定标本经组织选块、组织脱水机处理后石蜡包埋制成蜡块,然后切成 $3\text{ }\mu\text{m}$ 组织切片,HE 染色后中性树胶封片,光镜下观察动物乳腺组织结构及形态。根据乳腺增生动物模型制备规范中病理诊断标准^[11-12],本实验以腺泡增生为主要评判依据,根据腺泡增生轻重程度,设立病理评分标准,乳腺组织无诊断标准所述改变,为 0 分;乳腺组织腺泡数量轻微增多,为 3 分;乳腺组织腺泡数量稍有增多,轻度增生,为 6 分;乳腺组织腺泡数量明显增多,中度增生为 9 分;乳腺组织腺泡数量显著增多,重度增生为 12 分。

2.2 对小鼠镇痛作用的检测

2.2.1 分组与给药 ICR 小鼠按体质量随机分为正常组、罗通定组、柴金散结低、中、高剂量组,给药量同 2.1.2 项。各组小鼠每天上午灌胃给药,连续 7 d,正常组每天以等量水灌胃。

2.2.2 小鼠乙酸扭体次数观察^[14] 末次给药后 30 min,每只小鼠腹腔注射 0.6% 乙酸 0.2 mL,注射后观察小鼠 15 min 内出现扭体(腹部内凹、伸展

后肢、臀部抬高)的次数。

2.3 对大鼠乳腺组织 ER- α 蛋白表达及下丘脑、垂体内促性腺激素释放激素 (GnRH),促性腺激素释放激素受体 (GnRH-R)mRNA 的观察

2.3.1 分组与给药 同 2.1.2 项。

2.3.2 免疫组化测定大鼠乳腺组织中 ER- α 蛋白表达 大鼠处死后立刻取乳腺组织,置于 10% 甲醛溶液中固定,脱水、包埋、制成石蜡切片。检测时使用二甲苯,100% 乙醇,95% 乙醇梯度脱蜡,置于柠檬酸盐缓冲液中加热进行抗原修复,使用 SP 二步法免疫组化试剂盒,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min,滴加一抗(1:200),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,滴加反应增强液,室温孵育 20 min,滴加增强酶标山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 聚合物,室温孵育 20 min,DAB 工作液显色,苏木素复染,分化液分化,95% 乙醇,100% 乙醇,二甲苯梯度脱水,中性树脂胶封片,晾干后光镜下观察。

2.3.3 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定下丘脑,GnRH,GnRH-R mRNA 表达 大鼠腹主动脉取血处死后,剖开脑部,取下丘脑和垂体,保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用,按试剂盒说明书操作提取 RNA,逆转录为 CDNA,采用 Real-time PCR 测定 mRNA 相对表达量,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$,3 min 预变性,之后循环 40 次,95 $^{\circ}\text{C}$,15 s 变性,60 $^{\circ}\text{C}$,20 s 退火,72 $^{\circ}\text{C}$,30 s 延伸,进行 PCR 检测。得到每个样品的

C_t 值,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照基因进行校准,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。引物信息见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence		
引物	序列	扩增长度 /bp
GnRH	上游 5'-GGGCAAGGAGGAGGATCAAA-3'	92
	下游 5'-GAGCTCCTCGCAGATCCCTA-3'	
GnRH-R	上游 5'-TCTGCAATGCCAAAATCATC-3'	164
	下游 5'-GTAGGGAGTCCAGCAGATGAC-3'	
GAPDH	上游 5'-GCCCAGCAAGGATACTGAGA-3'	157
	下游 5'-GGTATTTCGAGAGAAGGGAGGG-3'	

2.4 统计学方法 使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据满足正态性及方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析;不满足正态性或方差齐性时,组间比较采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠乳腺增生的影响

3.1.1 对大鼠乳头直径的影响 与正常组比较,模型组大鼠乳头直径较前增宽;与模型组比较,各给药组乳头直径均有下降趋势,其中柴金散结方高剂量组下降明显($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 柴金散结方对乳腺增生大鼠乳头直径的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Effect of Chaixin Sanjie prescription(CJSJP) on nipple's diameter in SD rats with hyperplasia of mammary glands($\bar{x} \pm s, n = 9$) mm

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	乳头直径			给药前后差值
		造模前	造模 30 d	给药 27 d	
正常	-	0.95 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.10	1.16 $\pm$ 0.03	-0.08 $\pm$ 0.12
模型	-	0.98 $\pm$ 0.08	1.50 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.02
柴金散结方	3.13	0.95 $\pm$ 0.10	1.53 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.07	0.07 $\pm$ 0.09
	6.26	0.93 $\pm$ 0.12	1.48 $\pm$ 0.08	1.43 $\pm$ 0.08	0.05 $\pm$ 0.02
	12.52	0.97 $\pm$ 0.07	1.49 $\pm$ 0.11	1.40 $\pm$ 0.10	0.10 $\pm$ 0.02 ¹⁾
乳癖消	0.517	0.96 $\pm$ 0.08	1.53 $\pm$ 0.03	1.44 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.03

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.1.2 对大鼠子宫、卵巢系数的影响 与正常组比较,模型组子宫系数明显增大($P < 0.05$);与模型组比较,柴金散结方低、高剂量组子宫系数显著减小($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组卵巢系数明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组卵巢系数有增加趋势,未出现统计学差异。见表 3。

3.1.3 对乳腺增生大鼠血清激素的影响 与正常

组比较,模型组 E_2 显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,柴金散结方低、高剂量组 E_2 水平明显下降($P < 0.05$)。各组 P, PRL 水平无统计学差异。见表 4。

3.1.4 对大鼠乳腺病理学的影响 正常组乳腺无增生,模型组出现轻微至中度的乳腺腺泡增生,轻度至重度的腺泡腔扩张和轻度至中度的腺泡分泌,乳

表 3 柴金散结方对乳腺增生大鼠子宫、卵巢系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 3 Effect of CJSJP on uterine and ovary organ coefficient in SD rats with hyperplasia of mammary glands($\bar{x} \pm s, n = 9$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	子宫系数	卵巢系数
正常	—	2. 81 ± 1. 26	0. 44 ± 0. 10
模型	—	7. 05 ± 3. 67 ¹⁾	0. 34 ± 0. 09 ¹⁾
柴金散结方	3. 13	2. 45 ± 1. 37 ⁴⁾	0. 39 ± 0. 14
	6. 26	2. 65 ± 0. 82	0. 41 ± 0. 04
	12. 52	2. 20 ± 0. 55 ⁴⁾	0. 36 ± 0. 05
乳癖消	0. 517	2. 64 ± 1. 41 ³⁾	0. 39 ± 0. 10

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0. 05$, ²⁾ $P < 0. 01$;与模型组比较³⁾ $P < 0. 05$, ⁴⁾ $P < 0. 01$ (表 4 ~ 8 同)。

表 4 柴金散结方对乳腺增生大鼠血清激素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 4 Effect of CJSJP on serum hormone in SD rats with hyperplasia of mammary glands($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	E_2 / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	P / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PRL / $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	—	15. 42 ± 14. 97	12. 64 ± 3. 38	100. 7 ± 28. 39
模型	—	54. 07 ± 22. 13 ²⁾	13. 09 ± 4. 31	87. 89 ± 35. 03
柴金散结方	3. 13	13. 20 ± 9. 58 ³⁾	15. 62 ± 4. 33	79. 02 ± 29. 77
	6. 26	12. 61 ± 3. 82	12. 30 ± 2. 60	82. 05 ± 28. 13
	12. 52	11. 12 ± 3. 54 ³⁾	13. 62 ± 6. 62	107. 98 ± 26. 63
乳癖消	0. 517	9. 38 ± 2. 77 ⁴⁾	14. 40 ± 7. 25	119. 94 ± 24. 49

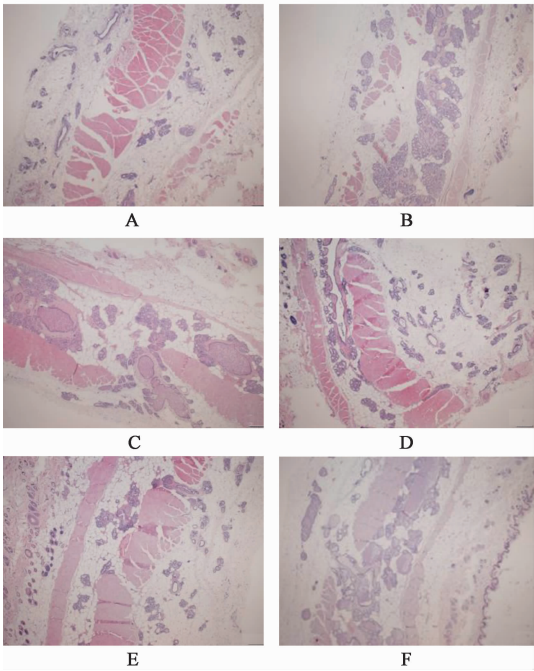
腺导管内可见分泌液;与模型组比较,柴金散结方中、高剂量组以及乳癖消组乳腺增生情况均有不同程度减轻,表现为乳腺小叶数、平均腺泡数明显减少、腺泡直径及数量、腺腔内分泌物明显减少。与正常组比较,模型组乳腺病理积分增加($P < 0. 05$);与模型组比较,柴金散结方中剂量组以及乳癖消组乳腺病理积分降低较为明显。见图 1,表 5。

3. 2 对小鼠镇痛作用的影响 与正常组比较,柴金散结高剂量组与罗通定组小鼠扭体次数均明显下降($P < 0. 05, P < 0. 01$)。见表 6。

3. 3 对大鼠乳腺中 ER- α 蛋白表达以及下丘脑、垂体中 GnRH, GnRH-R mRNA 表达的影响

3. 3. 1 对大鼠乳腺组织中 ER- α 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组乳腺 ER- α 蛋白表达增高;与模型组比较,各给药组 ER- α 蛋白表达不同程度下降,柴金低剂量组下降明显。见图 2。

3. 3. 2 对大鼠下丘脑、垂体内 GnRH, GnRH-R mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组下丘脑



A. 正常组;B. 模型组;C ~ E. 柴金散结方低、中、高剂量组;F. 乳癖消组(图 2 同)

图 1 柴金散结方对乳腺增生大鼠乳腺组织病理学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig.1 Effect of CJSJP on pathology in SD rats with hyperplasia of mammary glands(HE, $\times 200$)

表 5 柴金散结方对乳腺增生大鼠乳腺病理积分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 5 Effect of CJSJP on breast pathological score in SD rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	病理积分/分
正常	—	0
模型	—	4. 33 ± 2. 65 ¹⁾
柴金散结方	3. 13	4. 33 ± 1. 58
	6. 26	3. 67 ± 2. 92
	12. 52	4. 00 ± 3. 35
乳癖消	0. 517	3. 67 ± 2. 92

表 6 柴金散结方对 ICR 小鼠镇痛作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 6 Effect of CJSJP on times of ICR mouse body torsion ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	扭体次数/次
正常	—	15. 33 ± 9. 74
柴金散结方	5. 2	14. 67 ± 8. 23
	10. 4	13. 83 ± 7. 94
	20. 8	9. 33 ± 3. 89 ¹⁾
罗通定	0. 038 6	6. 08 ± 4. 23 ²⁾

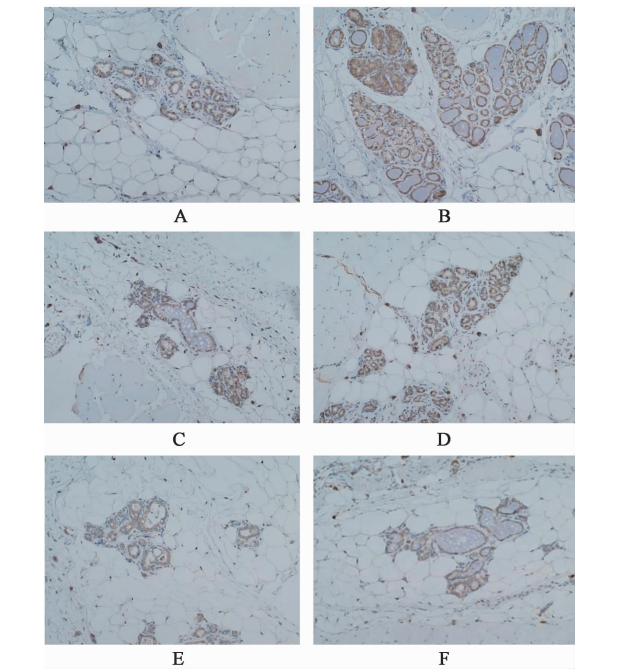


图 2 柴金散结方对乳腺增生大鼠乳腺组织中 ER-α 蛋白表达的影响 (IHC, ×200)

Fig.2 Effect of CJSJP on ER-α expression in SD rats' breast with hyperplasia of mammary glands(IHC, ×200)

内 GnRH mRNA 表达有增加趋势;与模型组比较,柴金散结方各组以及乳癖消组均有下降趋势,其中柴金散结方低、高剂量组下降趋势较为明显,未出现统计学差异;垂体 GnRH-R mRNA 表达量变化趋势不明显。见表 7。

表 7 柴金散结方对大鼠下丘脑、垂体中 GnRH,GNRH-R mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 7 Effect of CJSJP on GnRH and GnRH-R mRNA expressions in SD rats' hypothalamus and hypophysis with hyperplasia of mammary glands($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GnRH	GnRH-R
正常	—	0.72 ± 0.64	1.00 ± 0.20
模型	—	2.99 ± 2.28	0.51 ± 0.37
柴 金 散 结 方	3.13	0.94 ± 0.80	0.56 ± 0.45
	6.26	2.69 ± 1.91	0.41 ± 0.28
	12.52	0.44 ± 0.49	0.54 ± 0.41
	0.517	0.38 ± 0.11	1.07 ± 0.23

4 讨论

乳腺增生是现代妇科临床常见疾病,乳房肿块及疼痛为主要症状,现代医学认为本病的发生机制与雌、孕激素失调以及雌激素对乳腺组织的刺激性增高有关。乳腺增生后,其组织结构发生紊乱,从正常形态发展到增生甚至形成肿瘤^[15]。中医没有

“乳腺增生”的病名,常根据临床症状,将本病归于“乳癖”范畴论治,近、现代医家从不同角度、不同层次对本病进行了广泛而深入的研究,将其病机归纳为情志失调;肝肾不足、冲任失调;痰瘀凝结、乳络受阻;阳明胃热、热伤血络等,临床采用调摄冲任法、化痰消癖法、穴位贴敷等方法论治^[16-20]。本方旨在“疏肝理气,活血通络,化痰散结”,方中北柴胡苦辛微寒,入肝、胆经,其性轻清辛散,善于条达肝气、疏利胆腑;郁金辛苦微寒,主归肝、胆、心经,能行能散,同入气分、血分,善活血止痛、行气解郁、清气化痰,且长于治疗气血瘀滞之痛证。二者配伍同用,疏肝行气、活血消痰并施,共为君药。当归味甘辛、性温,补血行血,补中有动、行中有补,为血中之气药;浙贝母苦、寒,长于清热化痰、散结消痞;瓜蒌味甘微苦、性寒,能利气开郁、清热散结消肿,导痰浊下行而行宽胸散结之功,助北柴胡、郁金增强理气消痰之功。再入荔枝核、橘核行气散结止痛;蒲公英消肿散结、清解郁热;鸡内金健脾化湿、散结消积;莪术消癥化积、行气止痛;路路通“通十二经”,疏理肝经而通络,全方共奏疏肝解郁通络,活血化瘀消痰之功。

本实验在既往临床应用的基础上,对柴金散结方进行了多角度药效学研究,并在药效学基础上,对其治疗乳腺增生的机制进行探究,参考经典的造模方法,选用 12 周龄的性成熟大鼠,符合本病以育龄期妇女为多发群体的实际情况,选择乳腺增生临床常用药物乳癖消作为阳性药物,紧密围绕乳腺增生的病因病机,结合临床具体情况,进行药效学实验。先后观察了柴金散结方对乳腺增生大鼠血清雌、孕激素、泌乳素的影响,乳头直径以及乳腺病理学的变化,在药效学的基础上,从乳腺局部以及下丘脑-垂体-卵巢轴上游入手,多层次探究机制,研究结果显示,造模后大鼠出现烦躁、雌激素上升、乳腺组织增生病变,符合临床乳腺增生患者肝郁气滞的病机,经过治疗后,柴金散结方各剂量组雌激素水平下降,乳腺组织病理程度改善,且柴金散结方能够减少乙酸致小鼠的扭体次数,说明其有一定的镇痛作用。有研究表明,乳腺增生病的发生可能与下丘脑 GnRH 高表达有关^[21],也与本实验中模型组动物 GnRH mRNA 表达升高结果相一致,与模型组比较,各治疗组大鼠下丘脑内 GnRH mRNA 表达下降,乳腺组织内雌激素受体表达降低,这可能是柴金散结方治疗乳腺增生的作用机制。

综上所述,本课题组多角度、多层次对柴金散结方治疗乳腺增生的药效学进行了评价,并初步探讨

了其作用机制,研究表明,本方通过调节激素水平,调节下丘脑 GnRH mRNA,乳腺组织内雌激素受体表达,从而对女性乳腺增生达到一定的治疗作用,改善患者疼痛的临床症状,较好地提高患者生活质量。本研究为临床上应用柴金散结方治疗女性乳腺增生提供了药理学的依据,也为进一步开发新药奠定了基础。

[参考文献]

[1] 王丽,蔡惠,叶尔买克,等. 百麦外用中药制剂对小鼠乳腺增生的实验研究[J]. 北京联合大学学报:自然科学版,2010,24(4):73-75.

[2] 顾乃强. 实用中医乳房病学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993:183.

[3] 张燕燕,周胜利. 中医对乳腺增生病的认识及实验研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志,2015,25(3):314-316.

[4] Dupont W D,Page D L. Risk factors for breast cancer in women with Proliferative breast disease[J]. N Engl J Med,1985,312(3):146-151.

[5] Page D L. The woman at high risk for breast cancer importance of hyperplasia[J]. Surg Clin North Am,1996,76(2):221-230.

[6] 王桂玲,任连成,刘春香. 乳腺增生与乳腺癌相关性研究[J]. 中国医药导刊,2014,16(6):972-973.

[7] 张思浩,崔童星,王刚平,等. 乳腺癌前期病变研究的最新进展[J]. 临床普外科电子杂志,2017,5(1):40-43.

[8] 王肖寒. 乳腺癌的发病机制与治疗[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(63):195.

[9] Mourits M J, De Vries E G, Willemse P H, et al. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a

review[J]. Obstet Gynecol,2001,97(5):855-866.

[10] 李佳林,苏泽琦,彭莉,等. 秦月好治疗乳腺增生病经验[J]. 中医学报,2018,33(5):778-781.

[11] 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):17-22.

[12] 段好刚,魏玉辉,李波霞,等. 疏乳消块丸对大鼠乳腺增生的治疗作用及其机制[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(16):1273-1276.

[13] 杜力军,赵玉男. 实验动物与实验动物模型[M]. 北京:中国医药科技出版社,2012:410.

[14] 雷心雨,黄怡婷,朱翠玲,等. 黄芪总皂苷配伍雷公藤多苷抗炎镇痛作用[J]. 中药与临床,2015,6(6):29-31.

[15] Bundred N J. Aetiological factors in benign breast disease[J]. Br J Surg,1994,81(6):788-789.

[16] 丁晓玲. 青香乳康颗粒治疗乳腺增生病的主要药效学及机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2010.

[17] 赵洋. 化瘀消癖汤治疗乳腺小叶增生疗效观察[J]. 实用中医药杂志,2017,33(5):480-481.

[18] 林旭丰,严梅娣,谢小红,等. 中医周期疗法对乳腺增生伴乳痛患者内分泌激素及症状的改善观察[J]. 中华中医药学刊,2017,35(3):745-748.

[19] 刘胜,陆德铭,唐汉钧. 调摄冲任法治疗乳腺增生病的机理研究[J]. 辽宁中医杂志,2000,27(10):444-445.

[20] 苏莹,陈兴华,黄子培,等. 穴位贴敷治疗乳腺增生病的临床研究[J]. 针灸临床杂志,2017,33(5):4-7.

[21] 黄霖,刘华,杨辉,等. 健乳灵对乳腺增生大鼠 GnRH 及其受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医急症,2006,15(9):1016-1017.

[责任编辑 张丰丰]