

中药治疗乳腺增生动物模型评价指标的研究进展

向骏马*, 张蓉#, 邢茂, 雷健(第三军医大学新桥医院药剂科, 重庆 400037)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0550-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.38

摘要 目的:综述中药治疗乳腺增生动物模型的评价指标,为临床中药治疗乳腺增生病提供参考依据。方法:以“中药”“乳腺增生动物模型”“Chinese herb”和“Hyperplasia of mammary glands”等组合作为关键词,在中国知网、维普及万方、PubMed、Eisevier及Springer Link等数据库检索2010—2014年中药对乳腺增生动物模型治疗的评价指标的相关文献,对中药治疗乳腺增生动物模型的相关评价指标进行综述。结果与结论:按照上述检索方法,总共查询到了143篇文献,其中有效文献27篇。通过观察乳腺外观,检测血清中雌二醇、孕酮、睾酮等激素水平,全血黏度、血浆黏度、血沉等血液流变学指标的改变以及病理组织形态学的观察,客观评价中药对乳腺增生动物模型的作用,并总结应用分子生物学技术研究药物干预乳腺增生的分子机制进展。中药治疗乳腺增生动物模型的评价体系的建立,有助于乳腺增生病的治疗药物的研发,从而为中药治疗乳腺增生病提供临床依据。

关键词 乳腺增生动物模型;中药治疗;评价指标

乳腺增生病(Hyperplastic disease of breast, HDBA)以乳房部肿块和疼痛为两大主症,属乳腺结构不良病变,主要包括单纯性乳腺增生症和乳腺囊性增生症2种^[1]。迄今为止, HDBA的病因尚未完全阐明,现代医学认为内分泌失调是乳腺增生的主要因素,目前西医治疗尚未取得满意的疗效。而中医理论认为, HDBA属于中医的“乳癖”范畴,与肝、胃、肾、冲任诸经有密切关系,病机既有肝肾不足之本虚,又有气滞、血瘀、痰凝之标实。所以, HDBA是一种本虚标实、虚实夹杂的疾病^[2]。中医对于HDBA的治疗多根据辨证论治,以内服汤药为主。

中药复方是治疗HDBA的首选用药,且多种方药疗效肯定,已广泛应用于临床。HDBA动物模型实验研究表明,中药

治疗HDBA的作用机制是调节神经内分泌免疫网络,使雌、孕激素达到平衡,增强机体免疫力,改善血液流变学等^[3]。然而,当前针对HDBA动物模型的构建也存在诸多不足,其病理模型的复制还缺少成熟的不典型增生的复制模型方法。在对模型的评价或疗效评价方面,多数实验只对增生发生率或增生程度如轻度增生、重度增生出现率之间进行比较^[4]。因此,为进一步探索中药疗效的机制,建立规范的中药治疗HDBA动物模型的评价体系就显得尤为重要。为此,笔者以“中药”“乳腺增生动物模型”“Chinese herb”和“Hyperplasia of mammary glands”等组合作为关键词,在中国知网、维普及万方、PubMed、Eisevier及Springer Link等数据库检索2010—2014年中药对HDBA

- 小鼠的保护作用研究[J].中国药房,2011,22(43):4 054.
- [26] Hu QH, Jiao RQ, Wang X, *et al.* Simiaopill ameliorates urate underexcretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 128(3):685.
- [27] 姚丽,刘树民.中药穿山龙新的药理作用及其有效部位的实验研究[J].中华中医药学刊,2010,28(9):1 979.
- [28] 周琦,张肿,于栋华,等.穿山龙总皂苷对高尿酸血症的降尿酸及细胞抗炎作用研究[J].中华中医药杂志,2013,28(5):1 444.
- [29] 高红莉,周志彩,曲晓兰,等.穿山龙水提物对小鼠耐缺氧及抗疲劳的作用[J].中国医院药学杂志,2011,31(2):113.
- [30] 焦健,王铁杰,王珏,等.穿山龙提取物联合哈尔满碱对肝癌HepG2细胞增殖及凋亡的影响[J].沈阳药科大学学报,2012,29(10):8.
- [31] Chien MH, Ying TH, Hsieh YS, *et al.* Dioscorea nipponica makino inhibits migration and invasion of human oral cancer HSC-3 cells by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase-2 through modulation of CREB and AP-1 activity[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(3):558.
- [32] Wang TJ, Choi RC, Li J, *et al.* Trillin, a steroidal saponin isolated from the rhizomes of dioscorea nipponica, exerts protective effects against hyperlipidemia and oxidative stress[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 139(1):214.
- [33] Ko BS, Won Lee HW, Kim DS, *et al.* Supplementing with opuntia ficus-indica mill and dioscorea nipponica makino extracts synergistically attenuates menopausal symptoms in estrogen-deficient rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 155(1):267.
- [34] Yu H, Zheng L, Yin L, *et al.* Protective effects of the total saponins from dioscorea nipponica makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation[J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 19(2):233.
- [35] Yuan Y, Zhang L, Dai Y, *et al.* Physicochemical properties of starch obtained from dioscorea nipponica makino comparison with other tuber starches[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 82(4):436.
- [36] 梁秀军,商亚珍,宋鸿儒,等.穿山龙总皂苷对小鼠的急性毒性实验[J].承德医学院学报,2010,27(2):117.
(收稿日期:2014-10-06 修回日期:2014-11-25)
(编辑:杨小军)
- * 药师。研究方向:中药药理学。电话:023-68774770。E-mail: xjmxsteed@163.com
- # 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:中药药理学。电话:023-68755580。E-mail: zrcq73@163.com

动物模型治疗的评价指标的相关文献,就中药治疗HDBA动物模型的相关评价指标进行综述,以期对临床更有效地治疗HDBA提供参考。

1 动物模型的建立

HDBA动物模型的要求与临床病理变化相近,能客观反映被测药物的作用,可作为筛选和鉴定治疗HDBA药物的常用方法。首先,实验动物要选择与人体结构、功能、代谢及疾病特征相似的动物。雌性未孕家兔和大鼠通常被用于此模型。相较于家兔而言,大鼠的操作简单易行、成功率高、重复性好、饲养成本较低,因而大多实验采用大鼠建模。而家兔的优点是其乳腺组织较大鼠明显,有利于形态学的观察,但操作复杂,仅限于需要检测某些特定指标或需要长时间进行实验研究时采用^[5-6]。

2 模型建立方法

雌、孕激素联合复制模型法是公认的HDBA复制模型方法。该法通过扰乱动物体内的性激素分泌,诱导动物的乳腺组织增生。其中,雌激素可刺激乳腺上皮细胞和间质细胞增生,孕激素在一定程度上可对抗雌激素作用,促进腺泡增生。因此,先给予一定剂量的雌激素以刺激乳腺组织增生,随后给予孕激素以进一步促进乳腺腺泡的发育,两者的协同作用可使大鼠的乳腺出现增生^[7]。该法有两种方案:一是手术摘除卵巢后给予雌、孕激素;二是保留卵巢,直接给予雌、孕激素。摘除卵巢可避免内源性雌、孕激素的影响,且可控制雌、孕激素在体内的含量,但手术复杂,对动物有一定的创伤,易诱发感染,也有可能带入外源性干扰因素,因此现在常选择直接给予雌、孕激素的方法。具体给药方法则为:肌肉注射苯甲酸雌二醇0.5 mg/(kg·d),注射25 d;之后再注射黄体酮5 mg/(kg·d),注射5 d;复制模型时间共30 d^[8]。

3 模型药效学评价指标

HDBA动物模型复制成功后,常选用以下药效学评价指标观察药物对HDBA的治疗作用。首先,通过肉眼观察或游标卡尺测量模型组和药物组实验动物乳腺的大小及高度,初步判断药物对HDBA的影响。然后,从病理组织形态学观察、血清生化指标、血液流变学和分子生物学水平等方面评价药物的疗效。

3.1 乳腺外观和病理组织形态学观察

动物乳腺组织做病理切片并进行苏木精-伊红染色(HE染色),则可观察乳腺增生组织病理变化^[9-10];乳腺小叶数量增多,体积增大;小叶内腺泡和导管扩张,管腔内有分泌物;腺上皮细胞肥大,细胞浆透亮。段好刚等^[9]通过研究疏乳消块丸对大鼠HDBA的治疗作用,发现与正常组大鼠比较,模型组大鼠的乳房直径和乳头高度显著增大,疏乳消块丸组与模型组比较,大鼠乳房直径、乳头高度显著减小。疏乳消块丸治疗30 d后,与模型组大鼠比较,其乳腺小叶数、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,且相对于阳性对照组腺泡分泌现象改善更明显,说明疏乳消块丸对HDBA有治疗作用。宋易华等^[11]通过观察乳康方对大鼠HDBA模型的治疗作用,发现乳腺组织病理学可见模型组大鼠乳腺增生呈弥漫性、无局部包块,腺泡和小叶显著增加,脂肪和结缔组织明显减少,腺泡腔和腺导管腔明显扩张,腺泡腔内含分泌物及脱落的细胞。与模型组比较,乳康方I组和乳康方II组乳腺组织上述变化有显著改善,且乳康方II组的改善尤为明显。林峰等^[12]通过消结安胶囊治疗HDBA大鼠实验研究发现,正常组大鼠乳腺导管上皮细胞排列整齐,导管腺泡腔无扩张,小叶及

小叶中腺泡数很少;模型组大鼠乳腺导管上皮细胞排列紊乱、增生,管腔明显扩张,内有脱落的上皮细胞及分泌物,小叶及小叶中腺泡数明显增加。与模型组比较,三苯氧胺组、不同剂量消结安组大鼠的乳头直径、腺泡腔、小叶导管腔缩小,小叶腺泡数减少,说明三苯氧胺、不同剂量消结安治疗均可以有效对抗雌激素引起的乳腺增生。

3.2 血清生化指标测定

3.2.1 血清中激素水平测定 现代医学认为,激素内分泌失调是乳腺增生发病的主要原因。导致内分泌紊乱的因素很多,主要是雌、孕激素平衡失调。通过测定血清中雌二醇、孕酮、睾酮以及催乳素的含量水平,可反映乳腺增生中药对血清中激素水平的影响^[13]。王雄等^[14]通过观察回乳抑增I号(处方组成:麦芽、夏枯草、玄参、浙川贝、郁金、丹参、白芥子、淡昆布、牡蛎、山慈菇)对实验性HDBA大鼠的作用,结果发现,与模型组大鼠比较,回乳抑增I号能显著降低大鼠血清雌二醇、泌乳素、促卵泡激素、促性腺激素释放激素和5-羟色胺的含量,显著提高孕酮、促黄体生成素的含量,显著减轻乳腺小叶数、小叶内腺泡数和分泌物。由此表明,回乳抑增I号能改善大鼠血清激素水平的紊乱,抑制HDBA的发生。郭宇飞等^[15]通过观察利癖消胶囊对HDBA大鼠血清性激素的影响,发现与模型组大鼠比较,利癖消胶囊组大鼠可明显降低血清雌二醇和催乳素的含量,显著升高血清孕酮水平,提示利癖消胶囊能调节雌激素、孕激素比例在正常范围内,以达到治疗乳腺增生的目的。姜云云等^[10]通过研究乳癖消减方抗实验性大鼠乳腺增生作用,发现复制模型大鼠形成乳腺增生后,血清雌二醇水平显著增高,孕酮水平显著降低,其二者的比值增大。经药物治疗后乳癖消减方(8 g/kg)对大鼠HDBA的治疗效果显著,主要表现为可使模型大鼠显著升高的血清雌二醇含量基本恢复到正常水平,使血清孕酮的含量显著上升,从而使二者的比值基本恢复正常。

3.2.2 血清中超氧化物歧化酶(Malondialdehyde, MDA)活性和丙二醛(Superoxide dismutase, SOD)含量的测定 自由基活动增强、脂质过氧化作用增加也是引起HDBA的原因之一。乳腺组织中雌二醇含量增加的同时,伴随着脂质发生过氧化反应,最终产物为MDA;同时,HDBA发生时,体内SOD减少,不能完全催化MDA发生歧化反应变成H₂O和O₂,导致MDA在体内积累。而MDA具有细胞毒性,能导致乳腺细胞损伤^[16]。因此,测量血清中SOD活性和MDA含量也可判断中药对HDBA是否有保护作用。周会等^[17]通过研究抗乳增片对HDBA模型家兔的作用,发现模型组家兔的血清MDA比正常组家兔显著增加,SOD比正常组家兔显著减少。家兔灌胃抗乳增片4周后,血清MDA比模型组家兔显著减少,SOD活性较模型组家兔显著升高。刘聪等^[18]通过探讨柴青消癖胶囊对HDBA模型大鼠的治疗作用,发现模型组大鼠SOD水平较低,与对照组大鼠比较差异有显著性差异;阳性西药组、阳性中药组、柴青消癖胶囊各剂量组大鼠SOD水平较模型组显著升高,而MDA水平有所降低。以上研究提示,中药对家兔HDBA的治疗作用可能与其对抗自由基、防止自由基对乳腺细胞膜的侵害有关。

3.3 血液流变学指标测定

已有文献报道,HDBA患者的血液流变学发生变化,呈高黏状态^[19]。检测全血黏度、血浆黏度、血沉等反应血液流变学指标,可判断中药能否改变血液病理状态、改善全身及乳腺局部的血液循环,从而改善HDBA症状^[17]。唐荣等^[19]通过实验发现,柴瓜消结汤各剂量组家兔全血黏度、血浆黏度、血沉和血

细胞比容均恢复到空白对照组正常水平,与模型组比较差异有统计学意义,表明柴瓜消结汤具有活血化瘀的功效,可明显改善血液流变性。李海华等^[20]通过研究乳癖安胶囊对实验性HDBA大鼠的作用机制,结果显示模型组大鼠与空白对照组大鼠比较,不同切变率、全血黏度及血浆黏度均明显增高,表明乳癖安胶囊可显著降低HDBA大鼠不同切变率下的全血黏度和血浆黏度,改善其血液流变学的异常。赵艳威等^[21]通过观察乳痛消浸膏对实验性HDBA的作用,结果发现药物组血液流变学指标与模型组比较有所改善,乳痛消组全血黏度显著低于模型组,且高剂量组作用优于中、低剂量组。

3.4 分子生物学水平检测

近年来,分子生物学技术的发展为抗HDBA中药作用机制的研究提供了有力工具。韦永芳等^[22]发现,健乳灵所用的鹿角霜、补骨脂、路路通等有明显的调节和对抗雌二醇对乳腺管的刺激增生作用,并通过降低大鼠乳腺组织p16、p53的表达,减弱雌激素在靶细胞上的生物学效应,产生抑制和治疗HDBA的作用。陈树花等^[23]发现,使用乳块消汤能在分子学水平上下调凋亡抑制因子Survivin、上调含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)8的表达,促进细胞凋亡,从而抑制HDBA的进一步发展。

多项研究表明,雌激素受体、孕激素受体的过量表达会加剧HDBA或乳腺癌的发生、发展^[24-26]。王忠超等^[27]通过蛋白免疫印迹法进一步验证M-1号对HDBA大鼠乳腺组织孕激素受体表达的影响,发现对雌激素受体表达量的两种检测方法所得结果具有相同变化趋势,即HDBA大鼠乳腺组织中孕激素受体的表达量较正常对照组大鼠有显著升高,M-1号各剂量组大鼠孕激素受体的表达量较模型对照组大鼠显著降低,虽略高于正常对照组大鼠,但与阳性药对照组大鼠比较差异无统计学意义。

4 结语

综上所述,采用雌性未育大鼠(保留卵巢)给予苯甲酸雌二醇和黄体酮成功建立大鼠HDBA模型,通过乳腺的大小及高度以初步判断药物对HDBA的影响,检测血清中激素的水平以判断药物对雌-孕激素平衡的调节作用;而血液流变学改变可反映药物对乳腺微循环的作用;病理组织形态学和分子水平研究可进一步阐明药物干预HDBA的作用机制。因此,通过以上指标的测定,可更加客观地评价中药对HDBA动物模型的作用。

参考文献

- [1] 周莉娜.乳腺增生的中医药治疗进展[J].中医药导报,2010,16(11):112.
- [2] 王红梅,田春芳,耿刚.中医药治疗乳腺增生病的研究进展[J].内蒙古中医药,2012,16(5):103.
- [3] 丁艳,张福忠,易维真.中医药治疗乳腺增生病的实验研究概况[J].甘肃中医,2007,20(4):31.
- [4] 张栓成,王丽娜,肖红玲,等.消瘀通络散对乳腺增生大鼠乳腺组织形态与内分泌的影响[J].中国中医基础杂志,2012,18(1):58.
- [5] 陈晰,陈翠翠,郭宝良,等.消乳散结胶囊治疗兔乳腺增生的实验研究[J].现代生物医学进展,2012,12(32):6249.
- [6] 黄金华.乳宁外敷膏对家兔乳腺增生模型作用的实验研究[J].现代中西医结合杂志,2004,13(21):2822.
- [7] 倪依东,梁海清,田少鹏,等.乳核散结片对乳腺增生大鼠

- 治疗作用的研究[J].中药药理与临床,2004,20(4):35.
- [8] 陈泳晖,胡耀威,郭志坚.乳康汤对大鼠乳腺增生及调节内分泌激素的作用研究[J].广州医药,2011,42(3):7.
- [9] 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.
- [10] 姜云云,叶光明,沐韦,等.乳癖消减方抗实验性大鼠乳腺增生作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):269.
- [11] 宋易华,马云龙,葛建立.乳康方对乳腺增生大鼠雌孕激素紊乱的作用[J].中国中西医结合外科杂志,2012,18(3):258.
- [12] 林峰,王若红.消结安胶囊治疗乳腺增生大鼠的实验研究[J].临床合理用药杂志,2012,5(21):57.
- [13] 吴晓燕,瞿发林,许立,等.乳康口服液对大鼠乳腺增生及性激素水平的影响[J].解放军药理学学报,2013,29(2):106.
- [14] 王雄,吴金虎,陈永刚,等.回乳抑增I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,2013,19(13):274.
- [15] 郭宇飞,刘爱霞.利癖消胶囊对乳腺增生大鼠血清性激素的影响[J].中医学报,2013,28(1):63.
- [16] 刘聪,岳永花,郝旭亮.柴青消癖胶囊对乳腺增生模型大鼠的治疗作用研究[J].药物评价研究,2013,36(1):13.
- [17] 周会,龙子江,陈明,等.抗乳增片对乳腺增生模型家兔血液流变学的影响[J].湖南中医药大学学报,2007,27(5):47.
- [18] 蒋时红,刘旺根,杨丽萍,等.桂枝茯苓胶囊对大鼠乳腺增生病治疗作用的实验研究[J].中成药,2004,26(12):1040.
- [19] 唐荣,唐毅.柴瓜消结汤对实验性乳腺增生家兔血液流变学的影响[J].中国计划生育学杂志,2005,13(3):170.
- [20] 李海华,江涛,唐春萍,等.乳癖安胶囊对实验性乳腺增生大鼠的作用及其机制研究[J].广东药学院学报,2012,28(3):307.
- [21] 赵艳威,高欣,李玲,等.乳痛消浸膏对实验性乳腺增生的作用[J].中药药理与临床,2013,29(1):147.
- [22] 韦永芳,黄霖,杨辉,等.健乳灵治疗大鼠乳腺增生的病理观察[J].广州医学院学报,2005,33(1):33.
- [23] 陈树花,孙贻安.乳块消汤对大鼠乳腺增生病survivin与caspase-8水平的影响[J].山西中医,2013,29(5):48.
- [24] Jsen JD, Knoop A, Ewertz M, et al. ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous metastases in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132(2):511.
- [25] Boucher BA, Cotterchio M, Curca IA, et al. Intake of phytoestrogen foods and supplements among woman recently diagnosed with breast cancer in ontario, Canada[J]. *Nutr Cancer*, 2012, 64(5):695.
- [26] Adedayo A, Onitilo MD. Breast cancer subtypes based on ER/PR and her-2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival[J]. *Clin Med Res*, 2009, 7(1):4.
- [27] 王忠超,李敏,张彬,等.蒙药乳腺-I号对乳腺增生大鼠抗氧化能力、乳腺组织雌激素受体和孕激素受体表达的影响[J].吉林大学学报,2012,38(6):1052.

(收稿日期:2014-02-20 修回日期:2014-10-20)

(编辑:杨小军)