

# 基于PTEN/PI3K/Akt信号通路探讨归芍运脾汤防治 乳腺增生的机制

郑君\*, 王煜, 屈红, 吕永鑫, 王磊, 刘迎萍  
(甘肃省中医院, 兰州 730050)

**[摘要]** 目的: 基于磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路研究归芍运脾汤防治乳腺增生大鼠的作用机制。方法: 将70只SPF级SD大鼠随机分为正常组( $n=15$ )和造模组( $n=55$ ), 造模组大鼠采用综合造模法(饥饱失常法+夹尾刺激法+苯甲酸雌二醇+黄体酮)复制乳腺增生模型, 随后各取5只进行模型验证。模型复制成功后将造模组大鼠随机分为模型组、枸橼酸他莫昔芬组和归芍运脾汤高、中、低剂量组, 共5组, 每组10只。正常组和模型组大鼠给予 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 蒸馏水灌胃, 归芍运脾汤高、中、低剂量组分别给予 $17.2$ 、 $8.6$ 、 $4.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 归芍运脾汤汤剂灌胃, 枸橼酸他莫昔芬组给予 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 枸橼酸他莫昔芬灌胃, 治疗30 d后观察大鼠一般生存状况, 采用超声诊断仪测定乳腺组织厚度, 采用旷场实验阳性反应进行行为学评价, 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定乳腺组织中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的含量, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测乳腺组织中PTEN、PI3K、Akt mRNA表达水平, 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PTEN、PI3K、Akt、磷酸化(p)-Akt蛋白表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠暴躁易激惹, 扎堆蜷卧, 旷场实验反应阳性, 乳头肿胀明显, 乳腺厚度明显增加( $P<0.05$ ); 乳腺组织中Bcl-2含量明显升高、Bax含量明显降低( $P<0.05$ ), 乳腺组织中PTEN mRNA表达水平明显降低, PI3K、Akt mRNA表达水平明显升高( $P<0.05$ ), PTEN、PI3K、Akt蛋白表达水平与mRNA基本一致; 与模型组比较, 各给药组大鼠一般生存状态、乳头肿胀程度不同程度缓解, 旷场实验反应阳性不同程度改善, 乳腺厚度变薄( $P<0.05$ ), 乳腺组织中Bcl-2含量明显降低、Bax含量明显升高( $P<0.05$ ), 乳腺组织中PTEN mRNA表达水平明显升高, PI3K、Akt mRNA表达水平明显降低( $P<0.05$ ), PTEN、PI3K和Akt蛋白表达水平与mRNA基本一致。结论: 归芍运脾汤能够有效改善乳腺增生大鼠一般生存状况, 减轻乳腺增生程度, 其具体机制可能与归芍运脾汤有效调控PTEN/PI3K/Akt通路而实现。

**[关键词]** 归芍运脾汤; 乳腺增生; 磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)11-0113-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221701

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220830.1555.023.html>

[网络出版日期] 2022-08-31 10:32

## Mechanism of Guishao Yunpi Decoction in Prevention and Treatment of Mammary Gland Hyperplasia Based on PTEN/PI3K/Akt Signaling Pathway

ZHENG Jun\*, WANG Yu, QU Hong, LYU Yongxin, WANG Lei, LIU Yingping  
(Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract]** **Objective:** Study on the mechanism of Guishao Yunpi decoction in preventing and treating breast hyperplasia based on phosphatase and tensin homolog (PTEN)/ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/ protein kinase B (Akt) pathway. **Method:** Seventy SPF-grade SD rats were randomly assigned into blank group ( $n=15$ ) and modeling group ( $n=55$ ). The mammary gland hyperplasia model of liver stagnation and spleen deficiency was established by the comprehensive modeling method (hunger and satiety abnormality + tail

[收稿日期] 2022-06-03

[基金项目] 甘肃省科技厅自然科学基金项目(21JR1RA051)

[通信作者] \* 郑君, 博士, 副主任医师, 从事妇科病及内科杂症的中医诊治, E-mail: 294523586@qq.com

stimulation + estradiol benzoate + progesterone), and then 5 rats were randomly selected for model verification. The modeled rats were then randomly assigned into five groups: model group, positive control (4 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> tamoxifen) group, and high-, medium-, and low-dose (17.2, 8.6, 4.3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectively) Guishao Yunpi decoction groups, with 10 rats in each group. The rats in the blank group and model group were given 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> distilled water, and those in other groups were orally administrated with corresponding drugs. After 30 days of treatment, the general living conditions of rats were observed, and the thickness of breast tissue was measured by an ultrasonic diagnostic instrument. The open field test was carried out for behavioral evaluation. The levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X (Bax) in the breast tissue were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein levels of PTEN, PI3K, and Akt in the breast tissue were determined by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with those in the blank group, the rats in the model group were irritable, curled up in clusters, and showed positive behavior in the open field test. The modeling led to nipple swelling and increased the breast thickness ( $P<0.05$ ). Moreover, the modeling elevated the level of Bcl-2 and lowered that of Bax in the breast tissue ( $P<0.05$ ), down-regulated the mRNA and protein levels of PTEN, and up-regulated the mRNA and protein levels of PI3K and Akt ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, drug administration relieved the general survival state, the degree of nipple swelling, and the positive behavior in the open field test and reduced the breast thickness ( $P<0.05$ ). In addition, drug administration reduced the level of Bcl-2 and increased that of Bax in the breast tissue ( $P<0.05$ ), up-regulated the mRNA and protein levels of PTEN, and down-regulated the mRNA and protein levels of PI3K and Akt ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Guishao Yunpi decoction can improve the general living conditions and alleviate the mammary gland hyperplasia of rats with the syndrome of liver depression and spleen deficiency, which may be realized by the regulation of the PTEN/PI3K/Akt pathway.

**[Keywords]** GuishaoYunpi decoction; mammary gland hyperplasia; phosphatase and tensin homolog (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway

乳腺增生是指由于内分泌失调及乳腺导管和乳腺小叶的结构退化而导致的乳腺上皮和纤维组织增生,好发于育龄阶段女性,临床表现以单侧或双侧乳房肿块和疼痛为主<sup>[1]</sup>。近年来,乳腺增生的发病率逐年增加,而乳腺增生患者患乳腺癌的概率为1.4:1,比健康女性高5倍,尽早诊断与治疗乳腺增生是预防乳腺癌发生与降低致死率的有效手段<sup>[2]</sup>。目前,现代医学对该病的防治尚缺乏有效策略,而中医药对该病的防治有着独特优势,在乳腺增生的防治过程中发挥重要作用<sup>[3-5]</sup>。基础研究同样证实大量中草药及其活性成分能够显著改善乳腺增生的疾病进展<sup>[6]</sup>。

中医理论认为该病病机主要责于肝脾,肝郁脾虚是该病的关键病机之一,疏肝理脾法是临床治疗乳腺增生的主要治法之一<sup>[7-9]</sup>。而国医大师王自立教授认为肝体阴用阳,非柔养不和,脾胃为机体枢纽,以运为补,故临床自创归芍运脾汤,该方以当归、白芍柔养肝体之阴,以佛手、炒麦芽、枳壳疏达肝用之阳;再以四君子坐镇中州,大补脾气,全方共

奏养肝健脾,疏肝运脾之功效,临床治疗乳腺增生疗效确切<sup>[10]</sup>。目前,关于归芍运脾汤防治乳腺增生的具体机制尚不明晰。故本文拟复制乳腺增生大鼠模型,在观察大鼠一般生存状况、乳头形态及乳腺厚度基础上,进一步基于与组织细胞增殖进程关系密切的磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路探讨归芍运脾汤对乳腺增生大鼠的防治作用及机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级12周龄SD雌性性成熟大鼠70只,体质量(180±20)g,由甘肃中医药大学医学实验中心提供,动物合格证号SCXK(甘)2015-0009,伦理审查编号2021-173。

**1.2 药物与试剂** 实验所需中药饮片购自甘肃省中医院中药房,并经甘肃省中医院药剂科李喜香主任鉴定,均为正品。归芍运脾汤处方中党参10g、白术10g、茯苓10g、当归10g、白芍10g、佛手10g、炒麦芽10g、枳壳10g、炙甘草6g,常规浸泡1h,煎煮2次,每次40min,得到药液浓缩至每毫升药液含

生药 1 g,冷却后置 4 °C 冰箱备用;枸橼酸他莫昔芬(上海复旦复华药业有限公司,批号 200905);PTEN、PI3K 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 GR62840-23、GR3192684-9);磷酸化(p)-Akt、内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 ImmunoWay 公司,批号分别为 B0601、B1501);cDNA 反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)扩增试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号分别为 H6110040、H4104620);苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G1003)。

**1.3 仪器** S1000 型逆转录仪、Chemi DOC XRS+ 型凝胶成像分析系统、CFX96 型 Optics Module PCR 仪、10705 型酶标仪、CG05 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、BJYX2017002 型逆转录仪(美国 Bio-Rad 公司);REF 411410 型超声诊断仪(荷兰 Esaote Europe B.V. 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物模型复制及评价标准

**2.1.1 模型复制** 本文参考文献[11]选择了两步法的造模方法,首先参考文献[12]复制了现代医学关于乳腺增生“病”的疾病模型,随后参考文献[13]复制了中医学关于肝郁脾虚“证”的疾病模型,使其更贴合与中医临床的治证的诊疗特色。而且妇科疾病由于其临床影响因素众多致使证候模型的构建显得尤为重要<sup>[14]</sup>。采用苯甲酸雌二醇联合黄体酮复制乳腺增生大鼠模型,再采用夹尾刺激联合饥饿失常复制肝郁脾虚大鼠模型<sup>[15-16]</sup>。大鼠造模前 20 d 每日固定上午 9:00 在其后肢外侧肌肉注射药物,前 20 d 给药苯甲酸雌二醇( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),后 5 d 给药黄体酮注射液( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ );随后以长尾夹进行夹尾刺激,夹子固定在大鼠尾巴中外 1/3 处,以大鼠愤怒反抗或撕咬为度,每次连续不间断刺激 30 min,每日 2 次,每次间隔 3 h;造模期间大鼠单日给食,双日禁食,连续造模 25 d。使该动物模型更贴合与中医临床的治证的诊疗特色<sup>[14]</sup>。

**2.1.2 模型评价** 待造模 25 d 结束后,观察大鼠一般生存状态(体质量、性情、毛发光泽度)评价肝郁脾虚模型;肉眼观察造模大鼠腹部各乳头情况(皮色、形状、体积),取大鼠第二对乳头制成石蜡切片,通过 HE 染色进行大鼠乳腺病理组织学检查(腺小叶数目、腺泡数目、乳腺导管形态、乳腺上皮细胞排列)评价乳腺增生模型。观察大鼠一般症状、体征及旷场行为学测定主要是用来宏观评价大鼠肝郁

脾虚证型的建立及归芍运脾汤的干预效果,体质量、毛发光泽等指标一般用来评价大鼠脾虚状态,性情易激惹一般被认为是肝郁的表现,旷场实验通常被用来评价大鼠抑郁状态,同样是肝郁脾虚的常用指标<sup>[13,15]</sup>。

**2.2 动物分组及给药** 选取 SPF 级 2 月龄 SD 雌性大鼠 70 只纳入实验,按照随机数字表法随机选取 15 只作为正常组,剩余大鼠全部按上述方法造模,正常组大鼠肌注生理盐水。造模结束后,分别取空白鼠和造模大鼠各 5 只进行模型评价。随后将成模大鼠随机分为 5 组,分别为模型组、枸橼酸他莫昔芬组、归芍运脾汤高、中、低剂量组,每组 10 只。归芍运脾汤高、中、低剂量组每日分别给予 17.2、8.6、4.3  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  归芍运脾汤药剂灌胃(等效剂量相当于 70 kg 成人剂量的 12、6、3 倍);枸橼酸他莫昔芬组每日给予 4  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  枸橼酸他莫昔芬灌胃(相当于 70 kg 成人剂量的 6 倍),等效剂量按人与动物体型系数折算<sup>[16]</sup>。正常组和模型组每日给与等量蒸馏水灌胃,持续干预 30 d。

**2.3 标本采集** 于末次灌胃给药后,各组大鼠禁食不禁水 24 h,采用 1% 戊巴比妥钠按 1  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射进行麻醉后,采用超声诊断仪测定大鼠乳腺腺体厚度,心脏采血,自胸骨剑突下横开胸膈,沿肋骨角自下而上钝性剥离胸骨,取“乳腺-皮层”组织,沿腹部中线剪开,左侧采用多聚甲醛固定,以备病理切片制备,右侧在体视显微镜下分离皮层,保留乳腺组织,-80 °C 冻存,以备后续分子生物学检测。

**2.4 常规观察大鼠一般症状、体征** 实验过程中观察各组大鼠一般生存状况(体质量、性情、毛发等)和大鼠乳头(形态、皮色等)。

**2.5 超声诊断仪测定大鼠乳腺腺体厚度** 大鼠麻醉后,将大鼠第二对乳头周围脱毛,脱毛后大鼠腹部向上置于超声操作台,使用医用胶带固定其四肢,与第二对乳头上方点涂抹适量耦合剂,使用 Mylabfive 超声诊断系统,将超高频探头,以垂直于胸壁的角度在乳头上方的耦合剂中移动(探头频率为 22 MHz),在超声成像显示屏上寻找大鼠乳腺位置,并记录成像,按统一标准测定大鼠乳腺腺体厚度。

**2.6 HE 染色观察大鼠乳腺组织病理学改变** 按照 2.3 项中方法分离“乳腺-皮层”组织,采用 4% 多聚甲醛固定,沿第二对乳头纵切“乳腺-皮层”组织,进行包埋,常规制备蜡块后切片,采用 HE 染色,显微镜下观察。主要观察腺小叶数目、腺泡数目、乳腺

导管形态、乳腺上皮细胞排列。

**2.7 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠乳腺组织匀浆液中Bcl-2、Bax含量** 取乳腺组织0.1 g,加入磷酸盐缓冲液(PBS)0.9 mL,制备乳腺组织匀浆液,离心(转速3 000 r·min<sup>-1</sup>,时间10 min,离心半径18 cm)取上清,严格ELISA试剂盒操作步骤检测指标。

**2.8 Real-time PCR检测大鼠乳腺组织中PTEN、PI3K、Akt mRNA表达水平** 取乳腺组织0.1 g,采用组织总RNA提取试剂盒抽提组织中总RNA,测定RNA浓度(吸光度A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>在1.8~2.0)。采用上海翊圣公司反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA以备PCR扩增反应,引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成,见表1。以GAPDH作为内参基因,采用上海翊圣公司扩增试剂盒严格按照说明书中程序和上样方式进行扩增(95 °C预变性5 min,94 °C变性10 s、60 °C退火30 s、40个循环)。得到目的基因和内参基因的循环阈值(C<sub>t</sub>)值,采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>计算目的蛋白mRNA相对表达量。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150
	下游 GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG	
PTEN	上游 CCAATGGCTAAGTGAAGACGACAA	197
	下游 CATAGCGCTCTGACTGGGAATA	
PI3K	上游 CTGGAGAGCTTGAGGACGA	159
	下游 TCGCAAGAACCAGAATAAGAAGTG	
Akt	上游 ATGGACTCCGGTCAGGTTCA	126
	下游 GCCCTTGCCAGTAGCTTCA	

**2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠乳腺组织中PTEN、PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达水平** 取乳腺组织0.1 g,加入裂解液(PMSF+RIPA)后匀浆、离心取上清,使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加5×上样缓冲液制备蛋白上样;采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白(80 V);使用电转仪转移蛋白于PVDF膜上(120 V,2 h);摇床上常温使用封闭液(TBST+脱脂奶粉)封闭2 h,洗膜(3次,10 min/次);孵育一抗(4 °C,12 h;抗体稀释比例1:1 000),同上洗膜;孵育二抗(室温,2 h;抗体稀释比例1:5 000),同上洗膜;发光液(A、B液等比配制)发光,采集数据,使用Image J软件分析数据。

**2.10 统计学方法** 采用SPSS 24.0统计软件进行

分析,实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时采用Tamhane's *T*<sub>2</sub>法检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠一般症状与体征** 正常组大鼠始终状态良好,皮毛光泽顺滑,体质量稳定增长,乳头色淡,隐约可见;模型组大鼠生存状态差,喜扎堆、反应迟缓,易受激惹,脾气暴躁,体质量增加减缓,腹部毛发脱落明显,乳头色红,明显肿大,高于皮肤,以上症状随造模时间延长而加重;与模型组比较,各给药组大鼠生存状态不同程度改善,乳头肿胀明显缓解。归芍运脾汤防治效果存在量效关系,尤以高剂量组显著。

**3.2 对乳腺增生大鼠乳腺腺体厚度的影响** 与正常组比较,模型组大鼠乳腺腺体明显增厚( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠乳腺腺体厚度不同程度变薄,归芍运脾汤高、中剂量组乳腺腺体明显变薄( $P < 0.05$ )。见表2、图1。

表2 归芍运脾汤对乳腺增生大鼠乳腺腺体厚度的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

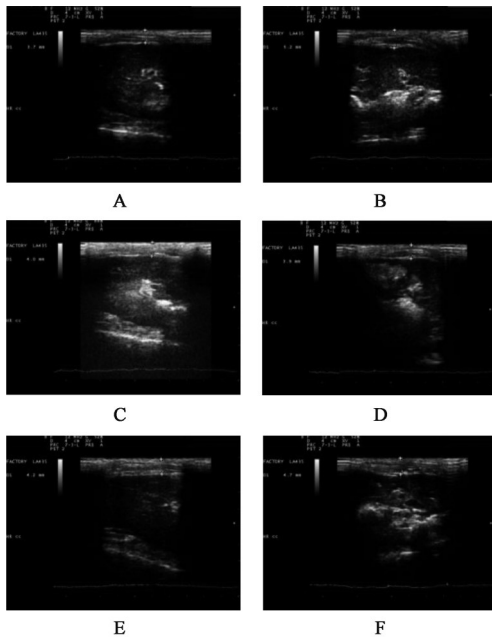
Table 2 Effect of Guishao Yunpi decoction on thickness of mammary glands of mammary gland hyperplasia rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	乳腺腺体厚度/mm
正常组		3.53±0.35
模型组		5.30±0.58 <sup>1)</sup>
枸橼酸他莫昔芬组	0.004	4.56±0.60 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤高剂量组	17.2	3.93±0.41 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤中剂量组	8.6	4.43±0.43 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤低剂量组	4.3	4.73±0.62

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表3-表5同)

**3.3 对乳腺增生大鼠乳腺组织病理学的影响** 正常组大鼠乳腺组织内腺体较少,乳腺导管清晰可见,乳腺导管及管腔没有明显扩张及分泌物;模型组大鼠乳腺组织内腺体增多,面积增大,乳腺导管明显扩张,腺泡腔面积增大,内可见大量分泌物;与模型组比较,各给药组大鼠乳腺病理改变不同程度减轻,腺体数目减少,乳腺导管扩张减轻、乳腺导管管腔分泌物减少,归芍运脾汤干预效果存在显著量效关系,尤以高剂量组显著。见图2。

**3.4 对乳腺增生大鼠乳腺组织匀浆液中Bcl-2、Bax含量的影响** 与正常组比较,模型组大鼠乳腺组织中Bcl-2含量显著升高,Bax含量明显降低( $P <$



注:A.正常组;B.模型组;C.枸橼酸他莫昔芬组;D.归芍运脾汤高剂量组;E.归芍运脾汤中剂量组;F.归芍运脾汤低剂量组(图2和图3同)

图1 归芍运脾汤对乳腺增生大鼠乳腺腺体厚度的影响  
Fig. 1 Effect of Guishao Yunpi decoction on thickness of mammary glands of mammary gland hyperplasia rats

0.05);与模型组比较,各给药组乳腺组织中 Bcl-2 含量不同程度降低,Bax 含量不同程度升高,差异有显著统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

**3.5 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 PTEN、PI3K、Akt mRNA 表达水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠乳腺组织中 PTEN mRNA 表达明显下调,PI3K、Akt mRNA 表达明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组乳腺组织中 PTEN mRNA 表达明显升高,

表4 归芍运脾汤对乳腺增生大鼠乳腺组织中 PTEN、PI3K、Akt mRNA 表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Guishao Yunpi decoction on expression levels of PTEN, PI3K and Akt mRNA in mammary tissue of mammary gland hyperplasia rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PTEN	PI3K	Akt
模型组		0.36±0.07 <sup>1)</sup>	1.92±0.11 <sup>1)</sup>	2.14±0.11 <sup>1)</sup>
枸橼酸他莫昔芬组	0.004	0.72±0.06 <sup>2)</sup>	1.60±0.15 <sup>2)</sup>	1.67±0.13 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤高剂量组	17.2	0.84±0.06 <sup>2)</sup>	1.37±0.09 <sup>2)</sup>	1.51±0.13 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤中剂量组	8.6	0.67±0.08 <sup>2)</sup>	1.56±0.07 <sup>2)</sup>	1.70±0.12
归芍运脾汤低剂量组	4.3	0.52±0.08 <sup>2)</sup>	1.78±0.11	1.86±0.11

注:设空白组各 mRNA 表达量均为 1

**3.6 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 PTEN、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠乳腺组织中 PTEN 蛋白表达明显下调,PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达均明显升高( $P<0.05$ );与

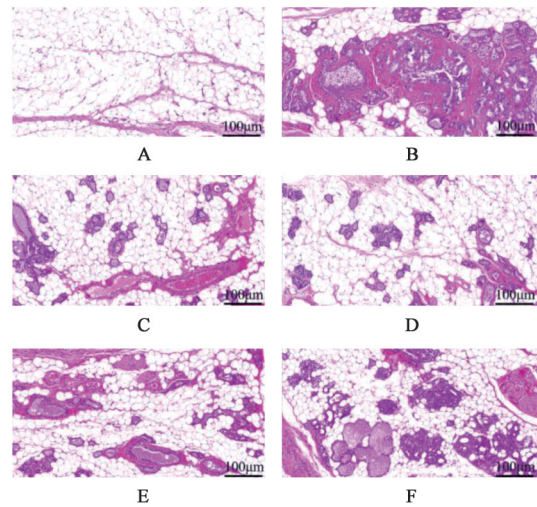


图2 归芍运脾汤对乳腺增生大鼠乳腺组织病理学改变的影响(HE,×100)

Fig. 2 Effect of Guishao Yunpi decoction on histopathological changes in mammary gland tissue of mammary gland hyperplasia rats (HE,×100)

表3 归芍运脾汤对乳腺增生大鼠乳腺组织匀浆液中 Bcl-2、Bax 含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Guishao Yunpi decoction on content of Bcl-2 and Bax in homogenate of mammary gland tissue of mammary gland hyperplasia rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2	Bax
正常组		65.70±8.99	152.74±20.65
模型组		130.38±22.55 <sup>1)</sup>	63.57±14.81 <sup>1)</sup>
枸橼酸他莫昔芬组	0.004	95.25±18.06 <sup>2)</sup>	93.38±17.69 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤高剂量组	17.2	82.50±13.93 <sup>2)</sup>	121.86±17.39 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤中剂量组	8.6	92.47±10.82 <sup>2)</sup>	95.78±18.04 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤低剂量组	4.3	143.10±10.64	71.85±17.73 <sup>2)</sup>

PI3K、Akt mRNA 表达明显下调( $P<0.05$ )。见表4。

模型组比较,归芍运脾汤高剂量组乳腺组织中 PTEN 蛋白表达明显升高,PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达明显下调,归芍运脾汤中、低剂量组 PI3K、Akt 蛋白表达明显下调( $P<0.05$ )。见表5、图3。

表5 归芍运脾汤对乳腺增生大鼠乳腺组织中PTEN、PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Guishao Yunpi decoction on expression levels of PTEN, PI3K, Akt and p-Akt proteins in mammary tissue of mammary gland hyperplasia rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PTEN/GAPDH	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH
空白组		0.80±0.03	0.86±0.05	0.94±0.13	0.49±0.04
模型组		0.49±0.04 <sup>1)</sup>	1.61±0.05 <sup>1)</sup>	2.05±0.10 <sup>1)</sup>	0.75±0.03 <sup>1)</sup>
枸橼酸他莫昔芬组	0.004	0.54±0.06 <sup>2)</sup>	1.22±0.01 <sup>2)</sup>	1.31±0.09 <sup>2)</sup>	0.63±0.02 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤高剂量组	17.2	0.70±0.05 <sup>2)</sup>	0.89±0.02 <sup>2)</sup>	1.09±0.07 <sup>2)</sup>	0.61±0.02 <sup>2)</sup>
归芍运脾汤中剂量组	8.6	0.58±0.03	1.11±0.02 <sup>2)</sup>	1.39±0.07 <sup>2)</sup>	0.64±0.01
归芍运脾汤低剂量组	4.3	0.50±0.05	1.19±0.03 <sup>2)</sup>	1.57±0.08 <sup>2)</sup>	0.68±0.04

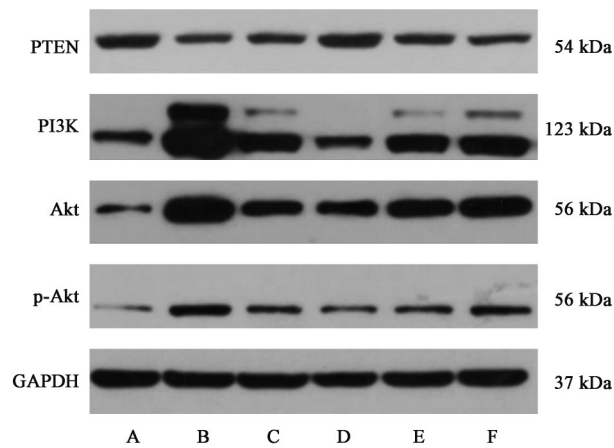


图3 各组大鼠乳腺组织中PTEN、PI3K、Akt、p-Akt蛋白电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of PTEN, PI3K, Akt and p-Akt proteins in mammary tissues of various groups of rats

#### 4 讨论

乳腺增生是女性常见的良性增生性疾病，其临床表现以单侧或双侧乳房周期性疼痛为主。在中医学理论中未有“乳腺增生”的病名，而根据其临床主要症状，应归属于中医学“乳癖”“乳粟”“乳痞”“乳中结核”等范畴<sup>[17]</sup>。隋·巢元方《诸病源候论》云：“癖者……在于两胁之间，有时而痛是也。”而明·龚居中《外科活人定本》亦云：“乳癖，此症生于正乳之上……何谓之癖，若硬而不痛，如顽核之类。”其论述与现代医学所述乳腺增生临床症状基本一致。中医理论认为肝郁脾虚是该病发生的关键病机，临床亦多以疏肝理脾之法进行论治，大量临床研究证实疏肝理脾之代表方逍遥散治疗乳腺增生疗效显著<sup>[18-19]</sup>。

《妇科玉尺》云：“(妇女)乳房属胃，乳头属肝，人不知调养，忿怒所逆，郁闷所遇，厚味所奉，以致厥阴血不行，遂令窍闭而不通，阳明之血壅沸，更令热甚而化脓，是以结核而成证。”指出乳房疾病与肝和脾胃关系最为密切。王自立教授指出乳腺增生的疾病进展同样主要责之于肝与脾胃，认为女子

以肝为先天，肝主疏泄，调畅气血，且肝与冲任关联密切。王自立教授认为治肝之法甚多，惟柔肝之法最顺肝刚烈之性，以甘缓养血育阴之药以养肝体，使其顺达调畅，从而达到柔肝的目的，强调以柔为养、顺达为主是治疗肝病的基础和关键<sup>[10]</sup>。脾为气血生化之源，胃为水谷之海，脾主运，胃主化，脾胃互为表里，脾胃和健则人体气血生化无穷。另外“足阳明胃经……从缺盆，下乳内廉”，经络所过，主治所及。因此，王自立教授从柔肝与运脾两个角度确立乳腺增生的论治方法，落脚于肝与脾胃的生理特性，自拟方剂归芍运脾汤，该方是脾虚血弱导致土虚木乘，肝气相对旺盛而表现为乳腺、胁部胀痛，生气及经前加重，属虚中夹实，且以脾虚为主，故以党参、白术、茯苓、炙甘草健脾益气养血为主，健脾助运，促使脾胃功能恢复正常，气血生化有源，而肝有所藏，肝血足而肝气不能亢而有害，以达柔肝疏肝之目的。当归、芍药养肝血而补肝体，枳壳、佛手行气疏肝止痛以治标，本方以健脾养血柔肝为主、疏肝理气止痛为辅，脾健气血生化有源则肝血得藏，肝体得柔，而肝气自疏，不用疏肝药而起到疏肝的目的。全方以当归、芍药养肝血柔肝之体，党参、白术、茯苓可以健脾促运，调气和胃，佛手、枳壳等药物行气疏肝理脾，共奏柔肝疏肝、运脾健脾之功效，临床用于脾虚肝郁型乳腺增生，疗效颇丰<sup>[10]</sup>。现代临床研究证实归芍运脾汤的组成药物为目前临床治疗乳腺增生的常用药物，如当归、白芍、茯苓、佛手、枳壳等<sup>[7-8]</sup>，而药理学研究同样证实该类物质中含有大量活性化合物成分能够抑制细胞的异常增殖，阻断细胞纤维化的进程<sup>[20-23]</sup>。

PI3K/Akt信号通路是细胞内重要的信号转导通路，参与调节细胞的凋亡、增生、迁移、分化和代谢，大量研究已经证实该信号通路的异常响应广泛参与了乳腺增生的疾病进程<sup>[24-25]</sup>。同时研究证实乳腺上皮细胞中PI3K/Akt信号通路激活能够抑制雌

激素的生长抑制作用,从而促进乳腺上皮细胞的增生性改变<sup>[26]</sup>。抑癌基因PTEN为人体第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因,具有磷酸酯酶的活性,其作为PI3K/Akt信号通路的关键负向调节因子,能够显著抑制PI3K/Akt通路的活化以达到抑制细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[27-29]</sup>。Bcl-2和Bax作为Bcl-2家族的关键成员之一,可以通过影响线粒体与细胞溶胶之间的通透性来调控细胞的凋亡,Bcl-2主要执行抑制凋亡的作用,Bax主要执行抑制凋亡的作用,已经有研究证实Bcl-2和Bax的表达在乳腺增生疾病进展过程中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。目前,已经有研究证实归芍运脾汤中药,如当归、白芍、白术等药物均与PI3K/Akt信号通路的响应关系密切<sup>[31-33]</sup>。

本研究成功复制乳腺增生大鼠模型,通过一般生存状况评价大鼠肝郁脾虚模型,通过观察乳头形态及乳腺厚度评价乳腺增生大鼠模型,结果表明与正常组比较,模型组大鼠暴躁易激惹,扎堆蜷卧,乳头肿胀明显,乳腺厚度明显增加;与模型组比较,各给药组大鼠一般生存状态、乳头肿胀程度不同程度缓解,乳腺组织厚度不同程度变薄。分子生物学实验表明乳腺组织中Bcl-2含量明显升高、Bax含量明显降低,乳腺组织中PTEN基因和蛋白表达水平显著降低、PI3K、Akt基因和蛋白表达水平明显升高;乳腺组织中Bcl-2含量明显降低、Bax含量明显升高,乳腺组织中PTEN基因和蛋白表达水平明显升高、PI3K、Akt基因和蛋白表达水平明显降低,其中尤以归芍运脾汤高剂量组显著。这与既往的研究基本一致。

本研究揭示了归芍运脾汤对乳腺增生大鼠的有效防治作用,其具体机制可能与归芍运脾汤有效调控PTEN/PI3K/Ak信号通路在乳腺组织中的响应而实现。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] MA W, JIN Z N, WANG X, et al. Clinical practice guideline for diagnosis and treatment of hyperplasia of the mammary glands: Chinese Society of Breast Surgery (CSBrS) practice guideline 2021 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(16): 1891-1893.

[2] WANG L, ZHAO D, DI L, et al. The anti-hyperplasia of mammary gland effect of *Thladiantha dubia* root ethanol extract in rats reduced by estrogen and progestogen [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(1):

136-140.

[3] 张朴,张卫华. 国医大师郭诚杰应用药对治疗乳腺增生经验[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(9): 132-134.

[4] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗乳腺增生症临床应用指南(2021年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(5): 517-524.

[5] 赵乐,张董晓,裴晓华,等. 基于情绪轴及性腺轴探讨疏肝补肾法治疗乳腺增生症的机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 150-154.

[6] LI X, XIN P, WANG C, et al. Mechanisms of traditional Chinese medicine in the treatment of mammary gland hyperplasia [J]. Am J Chin Med, 2017, 45(3): 443-458.

[7] 于淼,马凯,张婉悦,等. 乳腺增生中药复方授权专利用药规律分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(4): 1575-1585.

[8] 艾艳珂,王鑫,白文静,等. 中医药治疗乳腺增生症随机对照临床试验设计质量评价[J]. 中医杂志, 2015, 56(10): 847-850.

[9] 乔楠,倪毓生,屈卫龙,等. 内消乳核冲剂治疗肝郁气滞型乳腺增生症患者的临床疗效及对情志改善的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4391-4394.

[10] 王煜. 全国名中医王自立临床经验集[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社, 2020: 188-189.

[11] 钟森杰,李静,李琳,等. 病证结合动物模型研究思路述评[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 141-144.

[12] 中华中医药学会,中药实验药理专业委员会. 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.

[13] 涂文玲,黄妙安,洪银洁,等. 基于Hedgehog信号通路探讨柴芍六君汤对肝郁脾虚型CAG大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 1-8.

[14] 郜洁,谢蓝,巫海旺,等. 中医妇科病证结合动物模型研究思路[J]. 中医杂志, 2016, 57(4): 299-301.

[15] 张碧涛,辛泰然,李媛媛,等. 逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚大鼠孤束核 Ghrelin、GHS-R 及 Ob-R 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4692-4697.

[16] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006.

[17] 何清湖. 全国中医药行业高等教育“十四五”规划教材中西医结合外科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2021: 638-641.

[18] 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.

[19] 朱智耀,李宁,李可敬. 逍遥散临床应用经验及验案

- 举隅[J]. 中医临床研究, 2019, 11(22): 121-123.
- [20] JIN L, GUO Y, MAO W, et al. Total glucosides of paeony inhibit breast cancer growth by inhibiting TAMs infiltration through NF- $\kappa$ B/CCL2 signaling[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154307.
- [21] LEE H, LEE S, BAEK J Y, et al. Estrogenic activity of ethyl gallate and its potential use in hormone replacement therapy[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 40: 127919.
- [22] JIN Q, LU J, GAO R, et al. Systematically deciphering the pharmacological mechanism of fructus aurantii via network pharmacology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6236135.
- [23] LI X, SHI G. Therapeutic effects and mechanism of ferulic acid and icariin in mammary gland hyperplasia model rats via regulation of the ERK pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 666.
- [24] 巩子星, 徐墨, 刘远, 等. 三七总皂苷调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对乳腺增生大鼠乳腺组织细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 29(2): 98-103.
- [25] 张继红, 石孟琼, 陈茂华, 等. 基于 PTEN/PI3K/Akt 和线粒体凋亡信号通路探讨乳癖散结汤治疗乳腺增生大鼠作用机制[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 46-53.
- [26] COTRIM C Z, FABRIS V, DORIA M L, et al. Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2013, 32(19): 2390-2402.
- [27] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [28] HADDADI N, LIN Y, TRAVIS G, et al. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 37.
- [29] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [30] LI X, XIN P, WANG C, et al. Mechanisms of traditional Chinese medicine in the treatment of mammary gland hyperplasia [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(3): 443-458.
- [31] YUAN H, WU X, WANG X, et al. Chinese herbal decoction astragalus and angelica exerts its therapeutic effect on renal interstitial fibrosis through the inhibition of MAPK, PI3K-Akt and TNF signaling pathways[J]. *Genes Dis*, 2020, 9(2): 510-521.
- [32] ZHOU Z, WANG S, SONG C, et al. Paeoniflorin prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells [J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 9: 2511-2518.
- [33] GUO Y, XIAO Y, ZHU H, et al. Inhibition of proliferation-linked signaling cascades with atractylenolide I reduces myofibroblastic phenotype and renal fibrosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 183: 114344.

[责任编辑 周冰冰]