

# 癖速消与他莫昔芬联合应用对大鼠乳腺增生的干预作用

傅蔓华<sup>1\*</sup>, 徐敏<sup>2</sup>, 吉庆明<sup>3</sup>

(1. 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2. 河南省中医学学院, 郑州 450000;  
3. 河南省胸科医院, 郑州 450003)

**[摘要]** 目的:观察癖速消与他莫昔芬联合应用对大鼠乳腺增生的干预作用。方法:随机将大鼠分为正常对照组,模型组,癖速消+他莫昔芬高、中、低(3.0,1.5,0.75 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组,他莫昔芬组 1.67 mg·kg<sup>-1</sup>,癖速消组 2.5 g·kg<sup>-1</sup>,大鼠肌注苯甲酸雌二醇 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>和黄体酮 4 mg·kg<sup>-1</sup>建立大鼠乳腺增生模型,灌胃给药 45 d 镜下观察大鼠乳腺小叶、腺泡上皮细胞增生和导管扩张等情况;放免法测定血清中雌二醇(E<sub>2</sub>)和孕酮(P)的含量;免疫组化法检测雌激素受体(ER)及孕激素受体(PR)的表达情况。**结果:**与模型组比较,癖速消+他莫昔芬能使乳腺增生大鼠乳腺导管及小叶、腺泡上皮细胞增生明显减轻,有显著的统计学差异(P<0.01, P<0.05);能有效的降低大鼠血清中E<sub>2</sub>,P的含量(P<0.01);可显著抑制乳腺组织ER,PR的表达(P<0.01, P<0.05)。**结论:**癖速消+他莫昔芬对大鼠乳腺增生病理组织学改变有明显的干预作用。

**[关键词]** 乳腺增生; 癖速消; 他莫昔芬; 雌二醇; 孕酮; 雌激素受体; 孕激素受体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0242-04

## Protective Effect of Tamoxifen Combined with Pisuxiao in Rats of Mammary Gland Hyperplasia

FU Man-hua<sup>1\*</sup>, XU Min<sup>2</sup>, JI Qing-ming<sup>3</sup>

(1. Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China;  
2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;  
3. Henan Chest Hospital, Zhengzhou 450004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To carry out a morphological study on the protective effect of Tamoxifen combined with Pisuxiao in rats of mammary gland hyperplasia. **Method:** Rat were randomized into 7 groups: nomal, model,

**[收稿日期]** 20120108(001)

**[基金项目]** 河南省科技攻关项目(978307)

**[通讯作者]** \* 傅蔓华, 研究员, 从事心、脑血管及中药药理研究, Tel:0371-66331558, E-mail: zzfmh1234@yahoo.com.cn

[6] 钟毅, 赵自明, 陆英杰, 等. 胃肠舒对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦平滑肌细胞病变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 71.

[7] 秦颖琦. 探析糖尿病胃轻瘫中医病理机制[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(5): 829.

[8] 李莉芬. 温胆汤加味治疗糖尿病胃轻瘫 59 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 69.

[9] 李元翰. 健脾和胃理气中药治疗糖尿病胃轻瘫[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 12: 226.

[10] Kalia N, Bardhan K D. Of blood and guts: association between Helicobacter Pylori and the gastric microcirculation[J]. J Gastroenterol He Patol, 2003, 18(9): 1010.

[11] De Aguilar-Nascimento J E. The role of macronutrients in gastrointestinal blood flow[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005, 8(5): 552.

[12] 倪再玉, 陈超. 胃溃疡与胃黏膜血流[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1274.

[13] 李雄杰, 刘树志, 张路野, 等. CNP 对糖尿病大鼠胃窦环形肌自发性收缩的影响[J]. 山东医药, 2009, 49(33): 32.

[14] 刘晓霓, 金秀冬, 李月珍, 等. 半夏泻心汤对食管炎大鼠食管平滑肌收缩调控蛋白基因和细胞内游离钙的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11): 60.

[责任编辑 何伟]

Tamoxifen (Tam) with Pisuxiao (PSX, 3.0, 1.5, 0.75 g · kg<sup>-1</sup>) and Tamoxifen (1.67 mg · kg<sup>-1</sup>), Pisuxiao (2.5 g · kg<sup>-1</sup>), and ig for 45 days. Rat models of mammary glands hyperplasia were established by intramuscular injection of estradiol benzoate (E<sub>2</sub>) and progesterone (P). Pathologic histopathology of the breast tissue was checked up under the microscope. The estradiol and progesterone contents were determined. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) were evaluated by immunohistochemical technique. **Result:** In compare with model groups, the estradiol level of Tam with PSX group was evidently lower than that in the model group, Tamoxifen with Pisuxiao could inhibit the ductal and lobular hyperplasia and induce hyperplasia ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), reduce the content of E<sub>2</sub> and P in serum ( $P < 0.01$ ). At the same time ER and PR expression were obviously inhibited ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Tamoxifen combined with Pisuxiao is protective in rats with experimental mammary glands hyperplasia.

**[Key words]** breast hyperplasia; Pisuxiao; tamoxifen; estradiol benzoate; progesterone; estrogen receptor; progesterone receptor

癖速消是用当归、柴胡、白术、香附、瓜蒌等多味中草药经科学提取制成的复方中药制剂;该药具有疏肝健脾、理气化痰、消瘀散结、调和冲任等功效。他莫昔芬为雌激素受体拮抗剂,临床用于乳腺增生病及内分泌治疗。本研究探讨癖速消+他莫昔芬对大鼠乳腺增生病理改变的干预作用,为临床用药提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 癖速消:由当归、柴胡、白术、香附、瓜蒌等多味中药组成的复方中药制剂,由河南省中医药研究院制剂室生产,批号 010601;他莫昔芬,上海华联制药有限公司,批号 011003。苯甲酸雌二醇注射液,上海第九制药厂,批号 010615;黄体酮注射液,上海第九制药厂生产,011110;乌拉坦,上海化学试剂公司,批号 000418;E<sub>2</sub> 试剂盒,天津德普生物技术和医学产品有限公司,批号 210057;P 试剂盒,天津德普生物技术和医学产品有限公司,批号 210057;抗 ER 试剂盒,深圳晶美试剂公司,批号 210612;抗 EP 试剂盒,深圳晶美试剂公司,批号 210612。

**1.2 动物** Wistar 大白鼠(普通级),(200 ± 20) g,雌性,由河南省实验动物中心提供,动物合格证号医动字第 410103。

**1.3 仪器** L-160 型-1/万天平(日本岛津);UV-265 型-紫外-可见分光光度仪(日本岛津);SN-695 型-放射免疫 γ-计数器(上海原子核研究所);显微镜(日本 Olympus)。

## 2 方法

**2.1 大鼠乳腺增生模型制作**<sup>[1-2]</sup> Wistar 大鼠 70 只,随机分成 7 组:正常对照组,模型组,癖速消+他莫昔芬(3.0, 1.5, 0.75 g · kg<sup>-1</sup>) 剂量组,他莫昔芬(1.67 mg · kg)组,癖速消 2.5 g · kg<sup>-1</sup> 组。各实验组

肌肉注射苯甲酸雌二醇(E<sub>2</sub>)注射液 0.5 mg · kg<sup>-1</sup>, 1 次/d,连续 25 d;继而改用肌注黄体酮注射液 4 mg · kg<sup>-1</sup>, 1 次/d,连续 5 d。正常对照组肌注生理盐水 0.2 mL/只,1 次/d,共 30 d。自造模之日起,各组大鼠均同时灌胃给药,共 45 d。

**2.2 血清 E<sub>2</sub>, P 含量测定** 在末次给药 1 h 后,用乌拉坦(4 mL · kg<sup>-1</sup>)麻醉大鼠,腹主动脉取血。按试剂盒说明书操作步骤放免法测定血清 E<sub>2</sub>, P 含量。

**2.3 病理学检测** 剖取每只大鼠的第 2, 3 对乳腺组织,10% 甲醛常规固定,进行病理组织学检查。乳腺增生病理组织学分级标准<sup>[3-4]</sup>:(I) 乳腺小叶明显增生,数量增加,腺泡或导管极度扩张,腺管上皮增生,层次增多,腺泡及导管内有分泌物存在。(II) 乳腺小叶部分增生,腺泡及导管扩张明显,腺泡及导管内分泌物有所减少。(III) 乳腺小叶增生受到明显抑制,个别腺泡及导管轻度扩张,腺泡及导管内有少量分泌物。(IV) 未见有乳腺小叶增生,导管紧缩,有少量腺泡,无腺泡扩张,属非增生乳腺。

**2.4 大鼠乳腺组织 ER 和 PR 表达** 免疫组化法检测大鼠乳腺组织 ER 和 PR 的表达情况,细胞浆和(或)核内有棕黄色细胞粒者为受体阳性细胞<sup>[5]</sup>。受体阳性细胞评定标准:阳性细胞率不足 20% 者为(-),计 1 分;阳性细胞率不足 20% 者,但局部区域有少量较强着色的阳性细胞者为(±),计 2 分;阳性细胞率超过 20%,按阳性细胞数由少至多、着色由浅至深评为(+),(++),(+++),(++++),分别计为 3 分、4 分、5 分、和 6 分。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计软件和 Excel 进行统计分析,量反应资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组

均数比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。等级资料采用 Ridit 法检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 癍速消 + 他莫昔芬对乳腺增生模型大鼠血清  $E_2$ , P 含量的影响** 癍速消 + 他莫昔芬能显著降低大鼠血清  $E_2$ , P 含量。3.0, 1.5  $g \cdot kg^{-1}$  癍速消 + 他莫昔芬各组与模型对照组血清  $E_2$  含量比较, 有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ ); 1.25  $g \cdot kg^{-1}$  癍速消 + 他莫昔芬各组与模型对照组血清  $E_2$  含量比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。3.0, 1.5, 0.75  $g \cdot kg^{-1}$  癍速消 + 他莫昔芬对照组血清 P 含量比较, 均有较显著的统计学差异 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 癍速消 + 他莫昔芬对血清乳腺增生模型大鼠  $E_2$ , P 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  $nmol \cdot L^{-1}$

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	$E_2$	P
对照	-	0.06 ± 0.01 <sup>2)</sup>	43.38 ± 28.30 <sup>2)</sup>
模型	-	0.09 ± 0.02	102.33 ± 15.13
癍速消 + 他莫昔芬	3.0	0.06 ± 0.01 <sup>2)</sup>	41.23 ± 19.38 <sup>2)</sup>
	1.5	0.05 ± 0.01 <sup>2)</sup>	38.59 ± 8.88 <sup>2)</sup>
	0.75	0.06 ± 0.03 <sup>1)</sup>	49.77 ± 13.76 <sup>2)</sup>
他莫昔芬	1.67 × 10 <sup>-3</sup>	0.08 ± 0.03	83.38 ± 28.24
癍速消	2.5	0.07 ± 0.02	86.40 ± 25.83

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

**3.2 癍速消 + 他莫昔芬对乳腺增生模型大鼠 ER, PR 表达的影响** 模型组 ER, PR 表达呈强阳性。3.0, 1.5, 0.75  $g \cdot kg^{-1}$  癍速消 + 他莫昔芬各组 ER, PR 表达明显降低, 与模型组比较 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 癍速消 + 他莫昔芬对乳腺增生模型大鼠 ER, PR 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) 分

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	ER	PR
对照	-	2.3 ± 0.67 <sup>2)</sup>	2.2 ± 0.63 <sup>2)</sup>
模型	-	4.6 ± 0.97	4.8 ± 0.78
癍速消 + 他莫昔芬	3.0	2.3 ± 0.82 <sup>2)</sup>	2.5 ± 0.97 <sup>2)</sup>
	1.5	3.0 ± 0.67 <sup>2)</sup>	2.7 ± 0.82 <sup>2)</sup>
	0.75	3.3 ± 0.95 <sup>2)</sup>	2.9 ± 0.74 <sup>2)</sup>
他莫昔芬	1.67 × 10 <sup>-3</sup>	2.5 ± 0.53 <sup>2)</sup>	2.8 ± 0.79 <sup>2)</sup>
癍速消	2.5	3.4 ± 0.97 <sup>2)</sup>	3.8 ± 0.95 <sup>2)</sup>

**3.3 癍速消 + 他莫昔芬对乳腺增生模型大鼠乳腺**

组织病理学的影响 对照组乳腺小叶无异常增生, 腺上皮细胞呈立方状。模型组乳腺小叶明显增生, 导管及腺泡扩张, 腺泡腔中有大量分泌物, 腺上皮细胞呈高柱状, 可见腺细胞核上空泡。癍速消 + 他莫昔芬各组与模型对照组比较, 乳腺小叶增生受到明显抑制, 腺泡及导管扩张明显减轻, 腺泡及导管内分泌物明显减少。3.0, 1.5  $g \cdot kg^{-1}$  癍速消 + 他莫昔芬与模型对照组比较 ( $P < 0.01$ )。见表 3 及图 1。

表 3 癍速消 + 他莫昔芬对乳腺增生模型大鼠病理组织学分级的影响 ( $n = 10$ )

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	乳腺增生病理分级			
		I	II	III	IV
对照	-	0	0	0	10 <sup>2)</sup>
模型	-	7	3	0	0
癍速消 + 他莫昔芬	3.0	0	2	3	5 <sup>2)</sup>
	1.5	1	3	4	2 <sup>2)</sup>
	0.75	2	2	3	3 <sup>1)</sup>
他莫昔芬	1.67 × 10 <sup>-3</sup>	2	5	2	1 <sup>1)</sup>
癍速消	2.5	5	2	2	1 <sup>1)</sup>

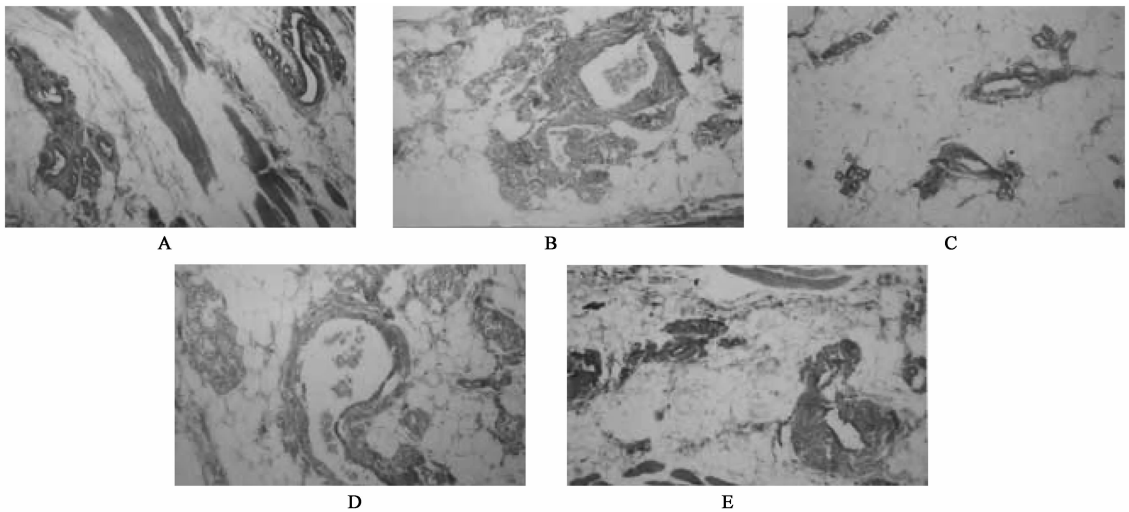
### 4 讨论

**4.1 乳腺是下丘脑-垂体-卵巢轴重要的靶器官**, 乳腺的增生和发育又直接受体内雌激素水平的影响; 雌激素水平增高和活性增强, 雌激素与孕激素比例失调是引起内分泌紊乱, 造成乳腺异常增生的重要原因之一。

**4.2 有研究表明中医治疗乳腺增生病的机制**主要是通过降低患者血浆雌二醇含量<sup>[6]</sup>。中药乳康片能调整乳腺增生症患者性激素达平衡状态, 使其周期性节律趋于正常<sup>[7]</sup>; 中药通过疏肝理气作用可调整肝脏对性激素的灭活功能<sup>[7]</sup>。本实验结果证实, 癍速消 + 他莫昔芬联合应用可明显降低造模后大鼠血清  $E_2$  及 P 活性, 提示, 癍速消 + 他莫昔芬对雌、孕激素比例失调引起的内分泌紊乱有明显的调节作用。

**4.3 据报道 ER, PR 阳性的乳腺增生病患者**, 其内分泌治疗有效率在 50% ~ 60%<sup>[8]</sup>。随着体内血清雌二醇和孕酮水平的异常升高, 乳腺组织 ER, PR 的表达也随之增强。本实验结果显示, 与模型组相比, 癍速消 + 他莫昔芬联合治疗后的各组均能使 ER, PR 表达受到了有效的抑制。提示癍速消 + 他莫昔芬联合应用加强了与雌激素受体结合的竞争性作用, 从而使乳腺组织局部对雌二醇和孕酮的敏感性下降, 有效的抑制了乳腺的异常增生。

**4.4 采用大鼠肌注苯甲酸雌二醇和黄体酮造成大**



A. 对照组;B. 模型组;C. 癖速消 + 他莫昔芬组;D. 他莫昔芬组;E. 癖速消组

图1 各组乳腺组织切片(HE染色, ×100)

鼠乳腺增生病理模型,类似于临床乳腺增生病病理改变过程。病理组织学结果证实,与模型组相比癖速消 + 他莫昔芬使乳腺增生模型大鼠乳腺小叶、腺泡上皮细胞增生及导管扩张明显减轻,管腔内分泌物明显减少。提示,癖速消 + 他莫昔芬对大鼠乳腺增生病理组织学改变有明显的干预作用。

**4.5** 本研究结果显示,癖速消 + 他莫昔芬治疗乳腺增生是通过降低血清  $E_2$  及 P 活性;抑制雌激素受体 ER, PR 的过度表达;从而改变和干预乳腺组织异常增生的病理过程。本研究充分证实了中药癖速消祛瘀散结、疏肝理气、健脾化痰、调摄冲任及对机体内分泌的整体调节作用与他莫昔芬合理应用,有效保护了大鼠的乳腺组织。

#### [参考文献]

[1] 饶金才,李兰珍,陈云生,等. 乳腺增生病动物模型的复制及病理类型[J]. 中国病理生理杂志, 1992, 8(6):671.  
[2] 黄月玲,文瑞成,韦永芳,等. 大鼠乳腺增生模型的建立[J]. 广东医学, 2002, 23(4):362.

[3] 黄霖,潘朝明,罗崇谦,等. 健乳灵治疗乳腺增生病临床与实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(6):329.  
[4] 薛秀安,秦海林,吴健鸿,等. 乳复康片治疗乳腺增生的实验研究[J]. 中成药, 1998, 20(12):28.  
[5] 龚东方,陆智华,幸华,等. 针刺和中药对乳腺增生的抑制作用研究[J]. 广州中医药大学学报, 2003, 20(3):216.  
[6] 马丁,中西医治疗乳腺增生症进展与研究[J]. 陕西中医, 1992, 13(2):89.  
[7] 沃兴德,楼丽华,李万里,等. 乳复康片治疗乳腺增生病患者垂体——性激素周期节律的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(10):600.  
[8] Katzenellengogen B S. Estrogen receptors: ligand discrimination and anti- $E_2$  estrogen action [J]. Breast Cancer Res Treat, 1993, 27(17):16.  
[9] 吴承东,杨焕杰. 消癖合剂对大鼠乳腺增生的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):223.  
[10] 罗伦才,季小平,黄兰亚,等. 均匀设计法用于乳腺增生动物模型的复制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):204.

[责任编辑 何伟]