

猪蹄甲和穿山甲抑制乳腺增生作用的比较研究

王辉*, 崔瑛, 侯士良

(河南中医学院药学院临床中药学科, 河南 郑州 450008)

[摘要] 目的: 比较猪蹄甲和穿山甲抑制乳腺增生的作用。方法: 取 Wistar 雌性大鼠 60 只, 随机分成正常对照组, 模型对照组, 穿山甲组(3.33 g·kg⁻¹·d⁻¹), 猪蹄甲高、中、低剂量组(分别灌服猪蹄甲水煎液 6.66, 3.33, 1.67 g·kg⁻¹·d⁻¹) 等 6 组, 每组 10 只, 正常对照组、模型对照组灌服等体积的生理盐水。造模方法: 大鼠肌肉注射苯甲酸雌二醇 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 25 d, 继而改用肌肉注射黄体酮 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 5 d, 形成乳腺增生模型。对照组每只肌注生理盐水 0.2 mL·d⁻¹, 共 30 d。从造模的第 1 天起, 各组分别以上述选定的量灌胃, 每日 1 次, 连续 45 d。第 45 d 腹主动脉取血分别测血清中雌二醇(E₂)、泌乳素(PRL)、促黄体生成激素(LH)、孕酮(P)的含量并观察各组乳腺病理形态改变。结果: 与模型对照组比较, 猪蹄甲高剂量、中剂量与穿山甲均能显著降低血清中的 E₂ 水平(P < 0.05), 其中猪蹄甲高剂量组更明显(P < 0.01), 猪蹄甲低剂量有降低血清 E₂ 水平的趋势, 但无统计学意义; 猪蹄甲高剂量、中剂量、低剂量与穿山甲均能显著升高血清中 PRL 水平(P < 0.05), 其中以猪蹄甲高剂量更明显(P < 0.01)。各组病理组织检查显示猪蹄甲水煎液不同剂量与穿山甲水煎液均能不同程度地改善实验大鼠乳腺增生病理组织形态。结论: 穿山甲与猪蹄甲在抑制乳腺增生作用方面, 作用相近, 二者具有可替代性。

[关键词] 猪蹄甲; 穿山甲; 乳腺增生

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)07-0051-03

穿山甲为国家二级保护动物(*Manis pentadactyla* Linnaeus)的鳞甲, 是临床常用中药。积极地寻找穿山甲的药用替代品, 对于保护生态环境解决其药用供需矛盾和开发新药源都具有重要意义。猪蹄甲为猪科动物(*Sus scrofa domestica* Brisson)的蹄甲, 是畜牧业的副产品, 其资源丰富。我们用现代药理学方法对猪蹄甲和穿山甲的抗乳腺增生作用从药效学角度进行了对比实验研究, 为寻找穿山甲的替代品奠定基础。

1 材料

1.1 药物 穿山甲水煎液: 穿山甲由河南省药材公司提供, 按药典方法^[1]砂烫醋淬炮制后, 经干燥粉碎成粗颗粒。称取穿山甲粉 500 g, 浸泡 1 h, 加水至 4 000 mL, 煮沸 60 min, 双层纱布过滤。二煎加水 2 500 mL, 煮沸 60 min, 双层纱布过滤。合并滤液, 浓缩至 5 00 mL(相当于每 1 mL 含生药 1 g), 置冰箱 4 °C 冷藏备用。

猪蹄甲水煎液: 猪蹄用购自郑州市食品公司, 洗净, 晒干后, 炮制方法同穿山甲, 取猪蹄甲粉 800 g,

煎煮方法同穿山甲, 滤液浓缩至 800 mL, 置冰箱 4 °C 冷藏备用。临用时按 1: 2: 4 比例稀释为 3 种浓度进行实验。

生理盐水: 郑州化学药业有限公司生产(批号: 0003052)。

苯甲酸雌二醇: 上海第九制药厂生产(批号: 009004)。黄体酮注射液: 广州明兴制药厂生产(批号: 941202-5)。

1.2 动物 Wistar 雌性未孕大鼠 60 只, 普通级, 体重(180~ 220)g, 由郑州大学实验动物中心提供动物合格证号: 99010。

1.3 试剂 雌二醇(E₂), 泌乳素(PRL), 孕酮(P), 促黄体生成激素(LH)放射免疫试剂盒均由深圳拉尔文生物工程有限公司提供, 批号: 0106)。

1.4 仪器 光学显微镜 JXJ- II 离心沉淀机 SN-682 型放射免疫 r 计数器。

2 方法

2.1 乳腺增生模型的复制 参照文献[2], 给实验大鼠肌肉注射苯甲酸雌二醇 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 25 d, 继而改用肌肉注射黄体酮 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 5 d, 形成乳腺增生模型。对照组每只肌注生理盐水 0.2 mL·d⁻¹, 共 30 d。

2.2 动物分组和给药方法 动物分组: 取 Wistar 雌

[收稿日期] 2007-01-22

[通讯作者] * 王辉, Tel: (0371) 65962546; E-mail: whui3697@

126.com

性大鼠 60 只,称重;随机分成 6 组。正常对照组,模型对照组,穿山甲组,猪蹄甲高、中、低剂量 3 组,每组 10 只。给药方法:各组分别给予标准饲料,药物灌胃量的选定参考《中药八百种详解》^[1],穿山甲临床用量为 10 g,大鼠每千克 1 日灌服生药量为 10/60 × 20(倍) ≈ 3.33 g·kg⁻¹·d⁻¹。猪蹄甲设高、中、低 3 个剂量,分别灌服猪蹄甲水煎液 6.66, 3.33, 1.67 g·kg⁻¹·d⁻¹,正常对照组、模型对照组灌服相同体积生理盐水。从造模的第 1 天起,各组分别以上述选定的量灌胃,每日 1 次,连续 45 d。

2.3 取材方法

末次给药 1 h 后,所有大鼠用戊巴比妥钠(30 mg·kg⁻¹)麻醉,腹主动脉取血(3~6) mL,离心,制备血清,-20℃保存待测。动物处死后,立即取下大鼠第二对或第三对乳房组织,制作组织切片。

2.4 指标观测

2.4.1 血清指标测定方法 血清中雌二醇(E₂),泌乳素(PRL),促黄体生成激素(LH),孕酮(P)等指标

均以放射免疫法进行测定。标本经处理后,3 400 r/min离心 20 min 后弃去上清,用 γ 计数器测定沉淀物的放射强度,经换算得实验结果。

2.4.2 乳房组织光镜观察 所取乳房组织用 10% 甲醛溶液固定,72 h 后,切取厚度为 2 mm 组织,按常规脱水,透明,石蜡包埋切片,HE 染色,作光学显微镜观察。

2.5 统计学处理 实验数据采用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对血清 E₂、PRL、P、LH 水平的影响 结果见表 1。与模型对照组比较,猪蹄甲高剂量、中剂量与穿山甲能显著降低血清中的 E₂ 水平(P < 0.05),其中猪蹄甲高剂量组更明显(P < 0.01);猪蹄甲低剂量有降低血清 E₂ 水平的趋势,但无统计学意义;猪蹄甲高剂量、中剂量、低剂量均能显著升高血清中 PRL 水平(P < 0.05),其中以猪蹄甲高剂量更明显(P < 0.01)。

表 1 各组大鼠血清 E₂, PRL, P, LH 水平的变化(x ± s)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	n	E ₂ (pg/mL)	PRL(ng/mL)	P(ng/mL)	LH(mIU/mL)
正常对照组	生理盐水(等体积)	9	53.8 ± 1.65	3.81 ± 0.96	23.28 ± 5.52	23.68 ± 0.91
模型对照组	生理盐水(等体积)	7	12.65 ± 0.58	3.66 ± 0.38	18.47 ± 3.52	3.63 ± 1.21
穿山甲组	3.33	8	11.31 ± 0.94 ¹⁾	4.90 ± 0.92 ¹⁾	20.68 ± 2.55	2.89 ± 0.82
猪蹄甲高剂量组	6.66	8	11.00 ± 1.08 ²⁾	4.95 ± 0.87 ²⁾	20.25 ± 2.18	3.89 ± 0.66
猪蹄甲中剂量组	3.33	8	11.34 ± 1.58 ¹⁾	4.87 ± 1.18 ¹⁾	19.31 ± 1.77	4.08 ± 1.79
猪蹄甲低剂量组	1.67	9	11.87 ± 0.62	4.84 ± 0.90 ¹⁾	21.06 ± 1.98	3.77 ± 1.39

注:与模型对照组比较,¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01。

3.2 大鼠乳腺病理学检查 正常:大鼠乳腺由无数小叶组成,每叶由富有脂肪组织的结缔组织分隔,每腺叶又被结缔组织隔成小叶,小叶的腺泡较少,被结缔组织包围着,乳腺的腺泡相对窄小,小腺泡及小导管的表皮细胞均为单层低柱状、核圆形,位于基底部,腺泡腔内有较多分泌物。(见图 1)。

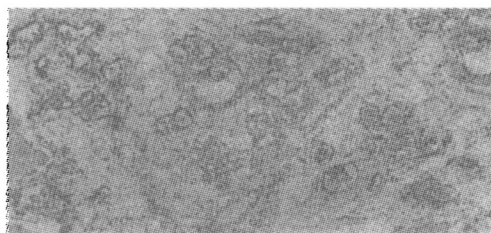


图 1 正常对照组大鼠乳腺切片 × 100

模型组:大鼠乳腺形态结构发生了很大的变化,每叶腺泡明显增生,被结缔组织和脂肪组织包

围,腺泡上皮细胞高度增生,致使腺泡与腺泡之间无结缔组织和脂肪组织分隔,腺泡上皮呈高柱状,层次增加,有些腺泡上皮向腔内呈乳头状突出。(见图 2)。

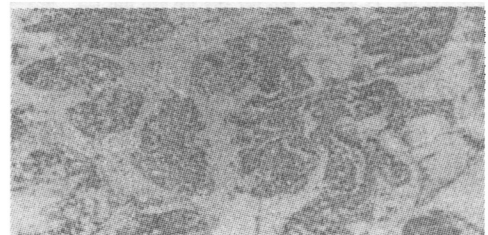


图 2 模型组大鼠乳腺切片 × 100

穿山甲组:大鼠乳腺每叶腺泡轻度增生,结缔组织和脂肪组织也略增多;乳腺上皮细胞多为高柱状,层次轻度增加,核圆形,腺泡上皮细胞轻度增生,向内腔呈乳头状突出不明显。(见图 3)。

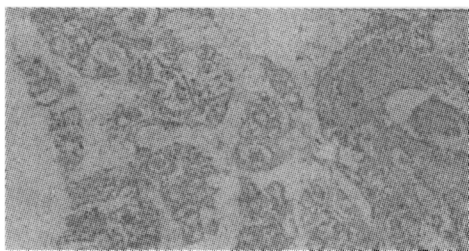


图3 穿山甲 3.33 g·kg⁻¹组大鼠乳腺切片 × 100

猪蹄甲高剂量组:大鼠乳腺形态结构有明显的改善,与穿山甲组(阳性对照组)相似。(见图4)。

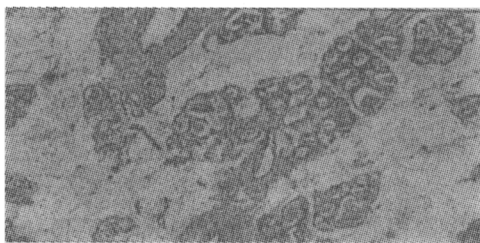


图4 猪蹄甲 6.66 g·kg⁻¹组大鼠乳腺切片 × 100

猪蹄甲中剂量组:大鼠乳腺腺泡上皮细胞呈中度增生,呈高柱状,层次增加,少数腺泡上皮细胞向腺腔呈乳头状突出。(见图5)。

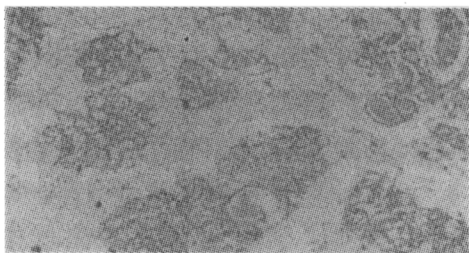


图5 猪蹄甲 3.33 g·kg⁻¹组大鼠乳腺切片 × 100

猪蹄甲低剂量组:大鼠乳腺每叶腺泡增生,有些腺腔密集,腺泡上皮细胞增生,层次略增加,有些增生向腺腔内呈乳头状突出。(见图6)。

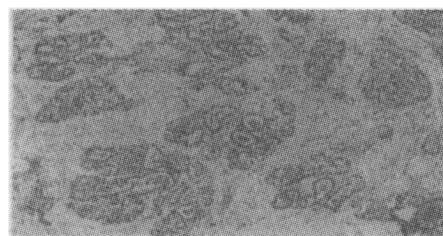


图6 猪蹄甲 1.67 g·kg⁻¹组大鼠乳腺切片 × 100

4 讨论

乳腺增生病是一种好发于中青年妇女的常见病,其发病率居乳腺疾病的首位。本实验采用长期应用大量的雌二醇配合小量的黄体酮成功地复制了乳腺增生模型,并选择 E₂、PRL、P、LH 为观测指标,通过大鼠乳腺病理学检查观察猪蹄甲与穿山甲对乳腺增生的抑制作用并初步探讨其作用机理。

实验结果显示,猪蹄甲中剂量、高剂量和穿山甲均能降低血清中雌二醇水平($P < 0.05$),同时对血清泌乳素水平均有升高作用($P < 0.05$),且作用强度与穿山甲相似。

通过对各组病理组织观察,我们发现猪蹄甲水煎液不同剂量与穿山甲水煎液均能不同程度地改善实验性大鼠乳腺增生病理组织形态,以穿山甲与猪蹄甲高剂量作用明显,表明在抑制乳腺增生作用方面,猪蹄甲高剂量与穿山甲作用相近,二者具有可替代性。二者抑制乳腺增生的机理可能与降低血清中雌二醇水平,调整内分泌及降低血液黏稠度,改善循环等途径有关,有待进一步研究探讨。

[参考文献]

- [1] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 200.
- [2] 饶金才, 李兰珍. 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.
- [3] 侯士良. 中药八百味详解[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1998. 622-624.