

· 博士之窗 ·

补肾活血中药对乳腺萎缩、增生雌性大鼠乳腺形态结构的影响

李培英^{1△} 欧阳惠卿²

内容提要 目的 探讨补肾活血中药对乳腺萎缩、增生雌性大鼠乳腺组织形态结构的影响及对受体水平的影响机理。方法 分别用去势和长期大量肌肉注射己烯雌酚的方法建立成年大鼠乳腺萎缩和乳腺增生模型 探讨补肾活血中药对乳腺重量指数、乳腺组织结构及乳腺雌、孕激素受体的影响。结果 (1) 补肾活血中药能使萎缩的乳腺组织结构得到明显改善,重量指数显著增加($P < 0.01$),乳腺组织胞浆和胞核雌、孕激素受体的数量明显升高($P < 0.01, P < 0.05$),并使核/浆雌、孕激素受体比值趋于正常。(2) 补肾活血中药能够使增生乳腺的重量指数及乳腺结构得到恢复或改善,使雌、孕激素核/浆受体比值均趋于正常。结论 (1) 补肾活血中药能够预防与改善性激素水平低下导致的成年大鼠乳腺萎缩,并促进大鼠乳腺发育。(2) 补肾活血中药与雌激素制剂虽然都具有促进乳房发育的作用,但作用途径不同。补肾活血中药治疗乳房发育不良具有应用开发前景。

关键词 补肾 活血 中药 乳腺发育 雌二醇受体 孕酮受体

Effects of Kidney Reinforcing and Blood Circulation Activating Chinese Medicine on Morphological Structure of Mammary Glands in Models of Mammary Atrophy and Hyperplasia in Female Rats LI Pei-ying, OUYANG Hui-qing *The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou (510405)*

Objective : To study the effects and mechanism of Kidney reinforcing and blood circulation activating Chinese medicine (K&B) on morphologic structure of mammary glands in female rat models of mammary atrophy and mammary hyperplasia. **Methods :** The models of mammary gland atrophy and hyperplasia were established respectively by ovariectomy and diethylstilbestrol injection to observe the changes of gland's weight index, structure, estradiol receptor (ER) and progesterone receptor (PR) after treated by K&B. **Results :** (1) K&B could ameliorate the atrophied structure of mammary gland with significant increase of weight index ($P < 0.01$), raise the number of ER and PR in mammary tissue and nuclei ($P < 0.01, P < 0.05$), normalize the ratios of ER and PR in plasma and those in nucleus (EnR/EcR and PnR/PcR). (2) K&B could also improve or restore the proliferated structure of mammary gland and its weight index as well as the EnR/EcR and PnR/PcR ratios. **Conclusion :** K&B has the effects in preventing and improving the mammary gland atrophy induced by hyposecretion of sexual hormone and promoting the development of mammary gland in adult rats. Although both K&B and estrogen can improve the development of mammary gland, their mechanisms are different. There is a bright future of K&B in treating underdevelopment of mammary gland.

Key words Kidney reinforcing, blood circulation activating, Chinese herbal medicine, mammary gland development, estradiol receptor, progesterone receptor

乳房是性激素作用的靶器官,雌、孕激素既是青春期推动乳房发育的主要动力,也是整个性成熟期维持乳房正常的丰满挺拔形成的主要因素,雌、孕激素的缺

乏将引起第二性征的减退包括乳房的萎缩。此外,乳房也是容易发生病变的器官,雌、孕激素分泌失调,雌激素水平相对过高是导致乳腺病理性增生乃至癌变的重要原因。在研究了补肾活血中药对幼龄大鼠乳腺发育的作用之后,本研究进一步探讨补肾活血中药对体内不同性激素水平的成年大鼠乳腺形态结构的影响,

1. 广州中医药大学妇科(广州 510405);2. 广州中医药大学第一

旨在了解补肾活血中药对成年大鼠乳腺萎缩的预防改善作用以及在高雌激素环境下对乳腺结构的保护作用。

材料和方法

1 动物 全部动物为雌性清洁级处女 Wistar 大鼠,由中山医科大学清洁级动物中心提供,80 日龄体重 260g 左右,经连续阴道脱落细胞涂片 3 周期检查,选择动情周期规律者进行实验。

2 药物 补肾活血中药由熟地、枸杞子、仙茅、肉苁蓉、丹参等按中医方剂配伍原则组成,中药饮片由广州中医药大学附属医院药房提供,水煎浓缩至每毫升相当于含生药 5.5g;己烯雌酚片剂由广州中外合资彼迪药业有限公司提供,批号 970801。研细,加少量淀粉与蒸馏水,于每日使用前配制己烯雌酚悬浊液,摇匀后灌胃。己烯雌酚注射液,广州明兴制药厂生产,批号 990302。

3 乳腺萎缩大鼠模型的建立及分组实验 戊巴比妥常规麻醉,俯卧位固定,行双侧卵巢摘除术(去势)。术后 30 天,取腹部近尾端三对乳腺行病理切片检查,显示:乳腺萎缩,腺泡很少,腺管萎缩狭窄或完全闭塞,上皮细胞扁平或仅剩残留的上皮。周围反应性间质明显减少,胶原增多,出现纤维化现象。乳腺萎缩模型造模成功。

大鼠 48 只,随机分为 4 组。正常组 12 只,蒸馏水灌胃,每只 2ml/d;模型组 12 只,上述方法造模并蒸馏水灌胃,每只 2ml/d;己烯雌酚组:12 只,造模并用己烯雌酚悬浊液摇匀后灌胃,每只 2ml/d(内含己烯雌酚 0.05mg)相当于成人常规剂量的 10 倍;中药组:12 只,造模并用补肾活血中药浓缩液灌胃,2ml/d(含生药 11g),为成人常规剂量的 10 倍。各组大鼠连续给药 30 天,停药 1 周后,模型组大鼠称量体重,处死,冰浴下迅速取下腹与鼠蹊部乳腺;其余 3 组大鼠于动情间期处理同模型组。每组随机抽取 7 只大鼠乳腺,称重, -70℃ 液氮冻存,待测雌二醇(E₂)、孕酮受体(P);每组剩余的 5 个乳腺标本,10% 中性福尔马林固定,常规石蜡切片,HE 染色,行病理检查(采用 Olympus 光学显微镜)。

4 大鼠乳腺病理性增生模型的建立及分组实验 参照安丽、曾希志等的造模方法^[1,2]略加修改。己烯雌酚注射液后肢外侧肌肉注射,每次 0.2mg,每天 1 次,共 30 天,总剂量为每只 6mg。检查乳房外观及乳腺病理改变。见造模大鼠乳头直径、长度显著增加。取腹部近尾端 3 对乳腺进行病理切片检查,见乳腺导管腔

扩大,管腔中充满分泌物。乳腺腺泡数目明显增多。上皮细胞增生,呈复层或假复层状排列。证明造模成功。

大鼠 36 只,随机分为 3 组,处理如下:正常组 12 只,蒸馏水灌胃,每只 2ml/d;模型组 12 只,造模同时每天蒸馏水灌胃 1 次,每次 2ml;模型加中药组 12 只,乳腺增生造模同时加用补肾活血中药浓缩液灌胃,每天 1 次,每次 2ml(含生药 11g),相当于成人用量的 10 倍。各组大鼠连续灌药 30 天,停药 1 周后,于动情间期每组随机抽取 7 只大鼠乳腺, -70℃ 液氮冻存,待测雌二醇受体(ER)、孕酮受体(PR);每组剩余 5 个乳腺标本,10% 中性福尔马林固定,常规石蜡切片,HE 染色,行病理检查(采用 Olympus 光学显微镜)。

5 雌、孕激素受体测定 采用放射配基结合分析法,参见文献^[3],³H-E₂ 和³H-Pg 为上海原子能研究所产品。用 Lowry 法测定样本蛋白浓度,受体含量以 fmol/mg 蛋白质表示。

6 统计学处理 采用 student's *t* 检验。

结果

1 补肾活血中药对乳腺萎缩模型大鼠乳腺组织的影响

1.1 补肾活血中药对乳腺萎缩模型大鼠乳腺重量指数的影响及比较 对每组随机抽取的 7 对乳腺进行重量指数(mg/100g 体重)比较,正常组为 18.87 ± 1.53,模型组为 14.12 ± 4.36,显著低于正常组($P < 0.05$);己烯雌酚组为 21.37 ± 2.65,与正常组比较差异无显著性,但显著高于模型组($P < 0.01$);中药组为 21.83 ± 1.53,明显高于正常组及模型组,差异均有显著性($P < 0.01$)。

1.2 补肾活血中药对乳腺萎缩模型大鼠乳腺结构的影响及比较 正常成年处女雌性大鼠乳腺组织腺泡少,结缔组织与脂肪组织多,腺泡腔较狭小。去势后,模型组全部 5 个乳腺标本都呈明显的萎缩状态,腺泡更小、更少,腺管萎缩狭窄甚至完全闭塞,上皮细胞扁平或仅剩残留的上皮。周围反应性间质减少,胶原增多,有纤维化现象。补肾活血中药组 5 个大鼠乳腺组织标本均有腺泡、导管数量较模型组增多的变化,无管腔闭塞现象,导管中出现较多染成红色的分泌颗粒,周围结缔组织较去势组染色浅,呈疏松状。己烯雌酚组腺泡、腺管数量接近正常大鼠,但有 2 例局部有轻度增生现象。

1.3 补肾活血中药对乳腺萎缩模型大鼠的乳腺雌、孕激素受体的影响 见表 1、表 2。去势后,模型组

大鼠乳腺胞浆雌二醇受体数量(用 EcR B_{max} 表示)极显著增加,胞核雌二醇受体数量(用 EnR B_{max} 表示)无明显改变,但胞核雌二醇-受体亲和力(用 EnR K_d 表示,K_d 值越小,亲和力越高)明显增强,受体呈现“超敏”的改变,但胞核/胞浆雌激素受体比值(EnR B_{max}/EcR B_{max})显示进入胞核的雌激素受体数量显著低于正常组。

补肾活血中药组大鼠乳腺 EcR B_{max}、EnR B_{max} 均有明显升高,不仅高于模型组,而且也显著高于正常组(P<0.01)。而已烯雌酚组 EcR B_{max}、EnR B_{max} 改变并不明显。己烯雌酚与补肾活血中药都能使 EnR B_{max}/EcR B_{max} 比值显著高于模型组,与正常组该比值接近。

孕激素受体是雌激素受体产生的同时诱导出的另一种产物,是雌激素受体功能完整的表现。模型组、己烯雌酚组和中药组胞浆孕酮受体数量(用 PcR B_{max} 表示)、胞核孕酮受体数量(用 PnR B_{max} 表示)、胞浆孕酮-受体亲和力(用 PnR K_d 表示,K_d 值越小,亲和力越高)及胞核孕酮-受体亲和力(用 PnR K_d 表示,K_d 值越小,亲和力越高)变化的趋势与各组雌激素受体的变化基本一致,但补肾活血中药能调整 PnR B_{max}/PcR B_{max} 比值与正常组接近,而已烯雌酚组该比值却极显著高于正常组,呈现明显的偏离。

2 补肾活血中药对乳腺增生模型大鼠乳腺组织的影响

2.1 补肾活血中药对乳腺增生模型大鼠乳腺重量指数的影响

给成年大鼠较长期大剂量肌肉注射(肌注)己烯雌酚造成大鼠乳腺组织增生的模型,对每组随机抽取的 7 对乳腺进行重量指数(mg/100g 体重)比较,结果模型组大鼠乳腺重量指数为 23.02±2.52,较正常组(18.87±1.53)明显升高(P<0.01)。在肌

注己烯雌酚同时喂饲补肾活血中药一组大鼠的乳腺重量指数(18.50±4.93)与正常组比较,差异无显著性。

2.2 补肾活血中药对乳腺组织增生模型大鼠乳腺组织结构的影响

与正常大鼠乳腺组织比较,模型组全部 5 只大鼠乳腺标本都有腺泡数量明显增加,上皮增生呈假复层现象,严重者甚至堵塞导管;导管扩张,内含大量分泌物;周围反应性间质明显减少,染色变深,胶原增生,失去疏松状态。中药组腺泡有增生,但程度明显轻于模型组。5 个乳腺标本上皮基本都呈单层,排列较整齐,无堵塞导管现象。周围结缔组织较正常乳腺组织减少,但反应性间质成分较模型组多,有 3 个呈现较疏松的状态。

2.3 补肾活血中药对乳腺增生模型大鼠乳腺雌、孕激素受体的影响

见表 3、4。与正常组相比,模型组 EcR B_{max} 显著增加,但 EnR B_{max} 无明显改变,EnR B_{max}/EcR B_{max} 比值显著低于正常组。造模同时灌饲补肾活血中药的大鼠与正常组比较,其 EcR B_{max}、EnR B_{max} 均有显著升高,胞浆和胞核雌激素-受体亲和力也显著增加(EcR K_d、EnR K_d 降低),其 EnR B_{max}/EcR B_{max} 比值明显高于模型组,与正常组该比值接近。

模型组 PnR B_{max}、PcR B_{max} 与正常组相比虽然无明显变化,但孕激素-受体的亲和力均显著下降(PcR K_d、PnR K_d 升高)。与前述乳腺萎缩实验中己烯雌酚组 PnR B_{max}/PcR B_{max} 比值偏离正常的情况相似,大量应用己烯雌酚的模型组该比值也显著高于正常组。而造模同时灌服补肾活血中药组大鼠的胞浆、胞核孕酮-受体亲和力较模型组均有明显升高(PcR K_d、PnR K_d 降低),其 EnR B_{max}、EcR B_{max}、PcR K_d 和 PnR K_d 与正常组差异无显著性,PnR B_{max}/PcR B_{max} 比值也降至正常组水平。

表 1 补肾活血中药对乳腺组织萎缩模型大鼠的乳腺雌激素受体的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	B _{max} (fmol/mg)		EnR/EcR	K _d (nmol/L)	
		EcR	EnR		EcR	EnR
正常	7	25.91±1.60	53.02±7.16	2.22±0.45	0.58±0.04	2.07±0.29
模型	7	29.77±1.39**	54.16±4.43	1.83±0.05*	0.53±0.06	1.26±0.20**
己烯雌酚	7	24.91±6.85	55.30±17.72	2.20±0.12 [△]	0.54±0.10	1.39±0.10**
中药	7	38.39±2.16** [△]	77.86±12.16** [△]	2.12±0.08 [△]	0.57±0.05	1.35±0.28**

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.01

表 2 补肾活血中药对乳腺组织萎缩模型大鼠的乳腺孕激素受体的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	B _{max} (fmol/mg)		PnR/PcR	K _d (nmol/L)	
		PcR	PnR		PcR	PnR
正常	7	15.51±2.99	35.99±13.58	2.26±0.43	0.80±0.05	1.66±0.03
模型	7	18.58±1.97*	41.91±3.65	2.26±0.19	0.81±0.09	1.72±0.05*
己烯雌酚	7	16.72±1.18	40.25±8.71	2.97±0.10** ^{△△}	0.71±0.12	1.94±0.70
中药	7	22.64±2.84** ^{△△}	50.44±9.57* [△]	2.31±0.07	0.81±0.04	1.95±0.44

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.05,^{△△}P<0.01

表 3 补肾活血中药对乳腺增生模型大鼠乳腺雌激素受体的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bmax(fmol/mg)		EnR/EcR	Kd(nmol/L)	
		EcR	EnR		EcR	EnR
正常	7	25.91 ± 1.60	53.02 ± 7.16	2.22 ± 0.45	0.58 ± 0.04	2.07 ± 0.29
模型	7	36.82 ± 3.68**	56.93 ± 6.43	1.55 ± 0.13**	0.64 ± 0.10	1.94 ± 0.27
模型加中药	7	37.38 ± 3.44**	66.69 ± 5.08**△△	1.79 ± 0.09*△△	0.48 ± 0.07**△△	1.16 ± 0.17**△△

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型对照组比较,△P<0.05,△△P<0.01

表 4 补肾活血中药对乳腺增生模型大鼠乳腺孕激素受体的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bmax(fmol/mg)		PnR/PcR	Kd(nmol/L)	
		PcR	PnR		PcR	PnR
正常	7	15.51 ± 2.99	35.99 ± 13.58	2.26 ± 0.43	0.80 ± 0.05	1.66 ± 0.03
模型	7	13.00 ± 1.78	35.50 ± 4.77	2.75 ± 0.37*	1.12 ± 0.21**	2.05 ± 0.25**
模型加中药	7	17.81 ± 7.19	37.21 ± 8.66	2.24 ± 0.64	0.75 ± 0.11△△	1.76 ± 0.15△

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,△P<0.05,△△P<0.01

讨 论

因疾病、体质、生活所伤等原因导致下丘脑-垂体功能异常或卵巢功能过早衰退,雌、孕激素分泌水平低下或不能形成正常幅度的峰谷状起伏,达不到对乳腺组织有效刺激所需的阈值,日久将引起乳腺的萎缩。结合既往对幼龄大鼠乳腺发育作用的研究结果,本实验提示补肾活血中药促进乳腺发育的作用不仅限于幼年动物,也体现于成年动物。

对雌、孕激素受体的检测既证实了己烯雌酚、补肾活血中药对乳腺萎缩的改善作用与受体有关,也从细胞分子水平说明雌激素制剂与补肾活血中药作用机制的不同。由于去势后内源性激素的严重缺乏,机体自身调节使乳腺雌、孕激素受体数量增多、亲和力增强的类似“超敏”的改变,但胞核受体数量明显低于正常的现象反映了机体应激调节能力的不足。补肾活血中药能够使雌、孕激素核/浆受体比值均接近正常,说明补肾活血中药的作用是对机体平衡自稳调节系统功能的进一步增强。

己烯雌酚对雌、孕激素受体的调节显然与机体自稳调节没有明显关联。虽然己烯雌酚的作用能使雌激素核/浆受体比值趋于正常,但孕激素核/浆受体比值却与正常值显著偏离,这可能正是雌激素制剂的单因素干预作用方式在细胞分子水平的反映,也可能是雌激素制剂导致靶器官结构不良的细胞分子病理学基础之一。与己烯雌酚相比,补肾活血中药显然不是简单的雌激素替代或干预,而是对机体平衡自稳调节能力的补充,体现了补肾活血中药在内分泌调节领域自然、安全的作用特点与优势。

乳腺增生模型实验反映了在高雌激素环境下补肾活血中药对乳腺组织的保护作用。按照受体调节的一般原则,生理条件下雌激素能对雌、孕激素受体产生正

向调节,使其数量增多、亲和力增强;但在血中激素浓度激烈波动时,机体自我调节使受体向激素改变相反的方向变化^[4]。长期大量应用己烯雌酚启动了应激系统对雌激素不良刺激的抵抗,阻止雌激素进入细胞核与靶基因结合产生生物效应,因此出现了雌二醇受体核/浆结合容量比值显著低于正常组的结果。而应用己烯雌酚同时灌饲补肾活血中药的大鼠乳腺相反却出现了正常雌激素刺激时才有的雌二醇受体数量和亲和力显著增加的增敏现象,说明补肾活血中药减弱了大量雌激素造成的不良刺激,维护了机体的平衡稳定。

孕激素可以对抗雌激素刺激引起的靶组织异常增生,对靶器官的结构具有保护作用。模型组孕酮-受体亲和力明显降低说明大量雌激素的不良刺激影响孕激素生物效应的发挥,因此乳腺组织出现病理性增生的异常改变。补肾活血中药对乳腺结构的保护作用与促进孕酮功能的正常发挥密切相关。

模型组大鼠大量应用己烯雌酚后,PnR/Bmax/PcR/Bmax 比值显著高于正常组,此变化趋势与乳腺萎缩模型实验中己烯雌酚组该比值的变化趋势一致,说明己烯雌酚的刺激是导致孕酮核/浆受体结合容量比值偏离正常的原因,无论是大剂量还是小剂量长期应用雌激素制剂,都能导致该比值的异常。此结果一方面再次验证了补肾活血中药与己烯雌酚作用机制的不同,一方面说明核/浆受体最大结合容量比值的异常在内分泌研究中可能是指示内分泌状态正常与否的敏感指标,其或高、或低都标志着内分泌系统平衡的失调。

以上实验说明补肾活血中药既能促进乳房发育,又具有对乳腺结构保护的双向调节作用,其作用方式是通过对内分泌激素、受体系统的平衡调节实现的。补肾活血中药在促进乳房发育以及内分泌调节中具有雌激素制剂无法比拟的优势,体现了美容与保健合二

为一的治疗思想,有着光明的临床应用前景。

参 考 文 献

1. 安 丽,袁 硕,毛肖三,等. 乳腺增生的中药治疗及实验研究. 新中医 1997;29(4):13—15.
2. 曾希志,姚樑祥. 三苯氧胺阻断外源性雌激素致乳癌的实验

研究. 中华外科杂志 1996;34(3):177—179.

3. 刘以训. 人乳腺肿瘤组织雌激素和孕激素受体量的测定. 肿瘤防治研究 1980;1:11.
4. 徐仁宝主编. 受体的基础与临床. 上海:上海科学技术出版社,1992:138.

(收稿 2000-07-03 修回 2000-11-15)