

金贝乳康片对乳腺癌癌前病变肝郁肾虚模型大鼠的干预作用

邓卫芳¹ 裴晓华^{2*} 樊英怡² 胡克菲³

(1. 北京中医药大学 2010 级博士研究生, 北京市北三环东路 11 号, 100029;

2. 北京中医药大学第三附属医院; 3. 华中科技大学同济医学院)

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(7102093); 北京中医药大学校级课题(2009-X-63)

* 通讯作者: pxh_127@163.com, (010)52075253

[摘要] 目的 研究金贝乳康片对乳腺癌癌前病变肝郁肾虚模型大鼠的干预作用。方法 将 70 只 SD 大鼠随机分为正常组(15 只)、对照组(15 只)、模型组(20 只)、金贝乳康片组(20 只)。用二甲基苯蒽(DMBA)联合慢性轻度不可预计应激及冷水刺激应激制备乳腺癌癌前病变肝郁肾虚模型。金贝乳康片组给予金贝乳康片水溶液灌胃 1.5g/kg, 其余各组予生理盐水。30 天后腹腔取血并采集乳腺组织, HE 染色观察病理学变化, ELLISA 法检测血清皮质酮(CORT)、雌二醇(E₂)及孕激素(P)水平。结果 与正常组相比, 模型组大鼠出现一系列生物表征变化, 且 CORT 水平明显升高($P < 0.05$)。金贝乳康片组大鼠肉眼可见肿瘤发生率较模型组明显减少($P < 0.05$); 病理以一般增生为主, 较模型组明显减轻; 血清 CORT、E₂ 水平较模型组明显降低($P < 0.05$), P 水平略有升高($P < 0.05$)。结论 金贝乳康片可降低肝郁肾虚证模型组大鼠肉眼可见肿瘤发生率, 逆转乳腺癌癌前病变病理变化向一般增生转变, 调节大鼠激素水平。

[关键词] 温阳解郁法; 肝郁肾虚模型; 金贝乳康片; 乳腺癌癌前病变

Intervention with Jinbei Rukang Tablet on the Liver Qi Stagnation and Kidney Deficiency Model of Precancerous Breast Lesions

DENG Weifang¹, PEI Xiaohua², FAN Yingyi², HU Kefei³

(1. Doctorate Student of year 2010, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine; 3. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

ABSTRACT Objective To explore the effect of Jinbei Rukang Tablet (Tablet for breast diseases) on the liver qi stagnation and kidney deficiency model of precancerous breast lesion. **Methods** The 70 SD rats were randomized into blank group ($n=15$), control group ($n=15$), model group ($n=20$), and Jinbei Rukang Tablet group ($n=20$). The liver qi stagnation and kidney deficiency model was prepared with DMBA jointed with multi-composite stress and cold water stress. Jinbei Rukang Tablet was given to the Jinbei Rukang Tablet group, while the other groups were given normal saline. Thirty days later, blood collected from abdominal cavity and the breast tissue collected for pathological examination. HE staining was adopted for observing the pathological changes and ELLISA method adopted for detecting the level of corticosterone (CORT), estradiol (E₂), and progesterone (P). **Results** Comparing with the control group, there appeared a series of biological changes in the model group, and the level of CORT was significantly increased ($P < 0.05$). The incidence of visible tumors in the Jinbei Rukang Tablet group was significantly less than that of the model group ($P < 0.05$), the pathological changes characterized by proliferation were significantly relieved, and the levels of CORT and E₂ were significantly decreased ($P < 0.05$) and the level of P was slightly increased ($P < 0.05$) than those of the model group. **Conclusion** Jinbei Rukang Tablet can reduce the incidence of visible tumors of the rats of liver qi stagnation and kidney deficiency model group of precancerous breast lesions, promote the pathological changes of precancerous lesions changing to hyperplasia, and adjust hormone levels to inhibit progression of disease.

Keywords Wenyang Jieyu (warming yang to relieve the stagnation); liver qi stagnation and kidney deficiency model; Jinbei Rukang Tablet (Tablet for breast diseases); precancerous breast lesions

临床实践发现, 长期处于空调等人工环境中且工作压力大的乳腺增生病和乳腺癌癌前疾病的患者, 临床多辨证为“肝郁肾虚”证。为了研究中

药对此类型患者的治疗作用, 本课题采用慢性轻度不可预计应激及冷水刺激应激模型, 模拟该类患者在日常工作生活及环境中所受到的负性应激, 将其

与乳腺癌前病变模型相结合, 建立肝郁肾虚模型; 并以温阳解郁的金贝乳康片作为干预因素, 从病理及激素水平变化等方面探讨金贝乳康片对乳腺癌前病变大鼠的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠 70 只, 体重 160~180g, 实验动物许可证: SCKX (京) 2006-0009, 雌性, SPF 级。购自北京维通利华实验动物中心, 中国中医科学院中药研究所动物实验中心饲养。饲养条件为光照 8:00-20:00, 室温 25℃~28℃, 相对湿度 45%~50%, 半屏蔽环境, 饲料及饮水均严格消毒。

1.2 试剂与药物

血清皮质酮 (CORT) 试剂盒、雌二醇 (E_2) 试剂盒、孕激素 (P) 试剂盒均由北京优博奥生物技术有限公司提供。二甲基苯蒽 (DMBA) 试剂盒购自美国 Sigma 公司; 金贝乳康片由北京因科瑞斯医药科技有限公司惠赠, 批号 20100712。

1.3 分组模型制备与给药

常规饲养 1 周后, 按体重分层随机分组法分为正常组 15 只, 对照组 15 只, 模型组 20 只, 金贝乳康片组 20 只。

除正常组外, 其余实验大鼠给予溶有 DMBA 的芝麻油 0.1g/kg 灌胃, 然后开始进行常规饲养 9 周^[1-2]。实验第 7 周开始, 模型组及金贝乳康片组大鼠给予慢性轻度不可预计应激及冷水刺激应激。整套多相性应激模型包括: 禁食 (每次持续 48h)、禁水 (每次持续 48h)、拥挤 (每次持续 2h)、热刺激 (60℃ 恒温电吹风机刺激大鼠, 每次持续 15min)、4℃ 冰水游泳 (每次持续 5min) 等 5 种方式。5 种造模方法随机安排在 21d 完成, 连续进行, 每天 1 种次。造模结束时, 模型组大鼠死亡 1 只, 金贝乳康片组大鼠死亡 4 只。

于第 10 周开始, 金贝乳康片组给予金贝乳康片水溶剂 1.5g/kg 连续灌胃 1 个月, 其余组给予蒸馏水 10ml/kg 连续灌胃 1 个月。

1.4 取材

实验结束, 腹腔注射麻醉后, 大鼠于上午 8:00 到 10:00 间腹腔取血, 取上清 -70℃ 保存备用; 无菌条件下取大鼠胸部第 2 对乳腺及其周围皮肤、皮下组织, 标本用 4% 的多聚甲醛固定液固定备用。

1.5 观察指标与方法

末次应激后 24h 内, 观察各组大鼠毛色、直立

攀笼次数、情绪反应、对刺激敏感程度、活动度、饮食饮水量等的变化情况。

实验第 7 周开始, 每周观察 1 次大鼠肉眼可见肿瘤发生情况, 详细记录每组肉眼可见肿瘤大鼠数, 并记录单发、多发肿瘤数目。实验结束, 计算各组肉眼可见肿瘤发生率。

酶联免疫吸附测定 (ELLISA) 法检测血清 CORT、 E_2 、P 等水平, 按照相关试剂盒说明书进行操作。HE 染色观察乳腺组织病理变化。乳腺病理诊断标准参考《WHO 肿瘤分类》^[4], 见表 1。

表 1 三级非典型增生与单纯性增生及原位癌的鉴别要点

增生形式	单纯性增生	非典型增生			原位癌
		I	II	III	
	一般或搭桥	实性筛状乳头腺样	实性筛状乳头腺样	实性筛状乳头腺样	实性筛状乳头腺样
腺管直径扩大	±	+	+++	++	++~+++
细胞异型性	±	+	++	++~+++	++~+++
细胞极性	+++	+	+	±	-
双层细胞结构	++	+	+	±	-
中心坏死	-	-	-	-	+
核分裂象	-	-	-	±	+
两种特殊细胞	-	+	++	+++	+++

1.6 统计学方法

用 SAS 9.0 统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。正态分布和方差齐的计量资料采用多样本 ANOVA 方差分析、LSD 检验, 非正态分布和方差不齐的资料采用 Welch 近似检验。计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠生物表征比较

造模结束后模型组及金贝乳康片组大鼠出现较为明显的异常生物表征: 皮毛松弛, 暗淡无光、蜷缩少动, 扎堆眯眼, 倦怠淡漠, 对刺激敏感度降低, 反应迟缓, 饮食水量减少, 舌有瘀斑等。正常组及对照组大鼠生物表征未见异常变化。

2.2 各组大鼠肉眼可见肿瘤发生情况比较

表 2 示, 各组大鼠肉眼可见肿瘤发生率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与正常组相比, 对

表 2 各组大鼠肉眼可见肿瘤发生情况比较

组别	鼠数	出现肿瘤大鼠数 (只)			
		单发	多发	合计	百分比 (%)
正常组	15	0	0	0	0
对照组	15	1	6	7	46.7*
模型组	19	8	2	10	52.6*
金贝乳康片组	16	1	1	2	12.5

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$

照组、模型组肉眼可见肿瘤发生率差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 金贝乳康片组与正常组相比无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠乳腺病理学比较

正常组全部为正常腺体; 对照组及模型组均以Ⅱ~Ⅲ型非典型增生为主, 同时伴有乳腺癌; 金贝乳康片组非典型增生发病率较模型组低, 以一般增生为主, 伴有Ⅰ型非典型增生。

2.4 各组大鼠激素水平比较

由于腹腔采血失败, 金贝乳康片组损失1份血标本。表3示, 各组大鼠CORT水平比较差异有统计学意义 ($F = 5.235, P < 0.05$)。模型组与正常组、金贝乳康片组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组 E_2 水平比较差异有统计学意义 ($F = 9.799, P < 0.05$)。对照组、模型组与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 金贝乳康片组与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组P水平比较差异有统计学意义 ($F = 21.896, P < 0.05$)。金贝乳康片组与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 金贝乳康片组与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠激素水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CORT	E_2	P
正常组	15	182.85 ± 27.79	19.82 ± 2.17	785.54 ± 87.57
对照组	15	192.85 ± 29.65	27.38 ± 3.56*	674.92 ± 101.57*
模型组	19	202.51 ± 12.77*	23.97 ± 4.05*	601.70 ± 62.92*
金贝乳康片组	15	172.48 ± 22.24 [△]	21.99 ± 4.35	781.82 ± 64.31 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

近年来, 乳腺癌发病率已居我国女性肿瘤的首位, 是女性第一大常见恶性肿瘤和第三大恶性肿瘤死因^[5], 发病趋势也日趋年轻化, 对于乳腺癌癌前状态的治疗成为预防乳腺癌发病的重要手段。心理社会因素引起乳腺癌癌前病变向乳腺癌转化的关系也已引起广泛关注^[6-7]。长期精神心理因素, 如应激性负性生活事件等可引起机体内分泌功能紊乱导致乳腺疾病的发生发展^[8-9]。不仅如此, 长期处于空调办公环境中的女性患者在辨证中不仅肝郁证明显, 而且还出现一系列肾虚证的临床表现, 故早期多辨证为肝郁肾虚证。若得不到及时控制, 日久则形成“毒瘀互结”之证^[10], 导致乳腺癌的发生。由此可见, 对乳腺癌癌前病变肝郁肾虚证的研究成

为逆转乳腺癌癌前病变向乳腺癌发展的有效途径。

目前关于乳腺癌癌前病变的造模方式很难将心理社会因素及环境因素考虑进来, 更难对模型进行辨证。因此, 寻找适合中医药研究的乳腺癌癌前病变肝郁肾虚模型, 对模型进行辨证、验证模型是否成功成为亟待解决的问题。

付艳丽等^[11]从中医角度阐述了心理社会应激引起疾病发生发展的机理, 并通过动物实验观察慢性心理应激引起大鼠生物表征的变化, 对这些变化进行辨证分析, 这一方法使对造模大鼠生物表征进行辨证成为可能。研究表明, 慢性心理应激使大鼠引起免疫系统功能变化而释放的各种细胞因子可激活下丘脑—垂体—肾上腺皮质 (hypothalamic-pituitary-adrenocortical, HPA) 轴, 释放CORT, 进而引起下丘脑—垂体—卵巢性腺轴分泌紊乱, 进而引起一系列免疫系统变化, 最终导致乳腺癌的发生^[3]。这是一个复杂的过程, 但是引起乳腺疾病发生的最初的关键环节是CORT的分泌, 进而导致性腺轴的分泌紊乱。因此对CORT水平的测定是验证心理、社会应激模型是否成功的关键之一。

本实验将DMBA诱导乳腺癌癌前病变模型^[1-2]与慢性轻度不可预计应激^[3]及冷水刺激模型相结合建立病证结合模型, 同时对模型的评价方法进行了初步总结: 从生物表征变化^[11]、肿瘤发生率等方面变化对模型进行辨证分析, 病理变化及激素水平变化等客观指标两大方面对模型进行验证。结果发现: 模型组肉眼可见肿瘤数及病理变化与对照组无明显差异, 因此乳腺癌癌前病变仍属于疾病发展的早期, 但模型组大鼠出现皮毛松弛, 暗淡无光, 皮温低, 蜷缩少动, 扎堆眯眼, 倦怠淡漠, 对刺激敏感度降低, 饮食饮水减少, 大便成形量多半湿, 小便量多色淡, 舌尖有瘀点, 苔湿润等一系列肝郁肾虚证的生物表征变化; 且模型组大鼠CORT水平较其他组明显升高, 证明造模成功。

该模型中采用的慢性轻度不可预计应激模型, 与夹尾^[12]等造模方式相比, 一定程度上避免了大鼠因身体伤害而非心理伤害造成的应激, 而且能高度模仿人在社会环境中所受到的各种负性生活事件。

我们临床研究发现, 乳腺癌癌前病变大多是在冲任失调的基础上肝气郁结、痰凝血瘀而发病, 病变初期辨证以“肝郁肾虚”为主, 故治疗应温阳解郁, 软坚散结。金贝乳康片以淫羊藿、鹿角片为君

药以温补肝肾, 益精养血, 调摄冲任; 瓜蒌、郁金、浙贝母等行气解郁, 化痰软坚散结, 共为臣药; 佐以(醋)延胡索、莪术行气活血, 破血止痛。全方共奏调摄冲任, 软坚散结, 理气止痛之效, 可用于乳腺癌癌前病变的治疗。

本研究结果表明, 金贝乳康片能明显降低大鼠肉眼可见肿瘤发生率, 使金贝乳康片组乳腺癌癌前病变向一般增生转化, 而且可以调节紊乱的激素水平至正常状态。其逆转作用主要是通过调节机体CORT、 E_2 、P激素水平来实现的。其逆转乳腺癌癌前病变的作用机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1]魏玺, 黄焰. DMBA 诱导大鼠乳腺癌模型及乳腺癌化学预防实验研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(3): 454 - 456.
- [2]王峰, 马忠兵, 方允治, 等. 乳腺癌癌前病变大鼠模型的建立[J]. 中国现代普通外科进展, 2009, 12(5): 387 - 390.
- [3]王文竹, 杨忠华, 徐志伟, 等. 逍遥散抗慢性心理应激海马神经元凋亡的机理研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 295 - 298.
- [4]Tavassoli FA, Devilee P. WHO classification of tumors. Pathology & genetics tumors of the breast and female

genital organs[M]. Lyon: IARC Press, 2003: 129.

- [5]沈镇宙, 邵志敏. 乳腺肿瘤学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 14.
- [6]潘芳, 毛雪琴, 江虹, 等. 乳腺癌患者应激事件、社会支持与婚姻质量的研究[J]. 山东大学学报, 2003, 14(1): 65 - 69.
- [7]惠起源, 魏晓萍, 高枫. 社会心理因素与癌症[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(12): 1875 - 1876.
- [8]邓国兴, 赵立峰, 李春香, 等. 心理应激、情志与从肝论治乳腺增生病相关性的探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(12): 934 - 935.
- [9]贾树华, 姜潮, 赵耀, 等. 教育程度与婚姻对乳腺癌妇女精神障碍影响的多元 Logistic 分析[J]. 健康心理学杂志, 2003, 11(4): 286 - 290.
- [10]裴晓华, 邓卫芳. 乳腺癌癌前病变“毒瘀互结”证的认识[J]. 中医学报, 2010, 25(2): 200 - 201.
- [11]付艳丽, 阿地里江·阿不力米提, 哈木拉提·吾甫尔. 从中医角度看慢性应激对小鼠生物表征的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(12): 708 - 710.
- [12]宋爱莉, 梁栋, 殷玉琨, 等. 大鼠乳腺癌癌前病变肝郁证造模的研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 5 - 7.

(收稿日期: 2011-06-08; 修回日期: 2011-09-02)

[编辑: 行之]

(上接第 323 页)

核心证候要素, 能在保持较高质量分类能力的基础上, 尽量消除信息系统(决策表)中不必要的知识, 得到最小的约简属性, 即核心证候要素, 由此所构建的模型也较简练, 是一种中医证候数据处理的可行性方法, 可以得到对证型有较好的分类能力的较小属性集合。

参考文献

- [1]胡镜清, 刘保延, 王永炎. 中医临床个体化诊疗信息特征与数据挖掘技术应用分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2004, 6(1): 14 - 16.
- [2]陈淑慧, 陈耀龙, 梁伟雄. 中医药数据挖掘中属性约简方法的应用探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(2): 1 - 2.
- [3]American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Forth Edition, Text Revision [M]. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994: 597 - 609.
- [4]American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep Disorders[M]. 2nd. 2005: 58 - 65.
- [5]中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则

(第一辑)[M]. 1993: 186 - 189.

- [6]国家技术监督局. 中医临床诊疗术语[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 31.
- [7]Skowron A, Rauszer C. The Discernibility Matrix and Functions In Information Systems, In Intelligent Decision Support — Handbook of Applications and Advances of the Rough Set Theory[M]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1992: 331 - 362.
- [8]Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction (Second Edition) [M]. New York: Springer, 2008: 219 - 257.
- [9]王钰, 王任, 苗夺谦, 等. 基于 Rough Set 理论的“数据浓缩”[J]. 计算机学报, 1998, 21(5): 393 - 400.
- [10]Vladimir N, Vapnik. The Nature of Statistical Learning Theory[M]. New York: Springer, 1995: 126.
- [11]Dietterich TG. Machine learning research: four current directions[J]. AI Magazine, 1997, 18(4): 97 - 136.

(收稿日期: 2010-10-26; 修回日期: 2011-01-30)

[编辑: 崔京艳]