

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.003

文章编号: 1005-8982(2017)13-0014-05

岩鹿乳康胶囊对乳腺增生大鼠乳腺组织及雌孕激素受体表达的影响*

郭宇飞¹, 吕娟², 王书勤²

(1.河南省中医院,河南 郑州 450002;2.河南中医药大学,河南 郑州 450046)

摘要:目的 观察岩鹿乳康胶囊对乳腺增生大鼠乳腺组织及雌孕激素受体表达的影响,探讨其治疗乳腺增生的作用机制。**方法** 用肌内注射外源性苯甲酸雌二醇及黄体酮的方法复制大鼠乳腺增生模型,观察各组大鼠乳腺组织变化,用免疫组织化学法检测雌激素受体亚型($ER\alpha$ 、 $ER\beta$)和孕激素受体(PR)的表达水平。**结果** 岩鹿乳康胶囊能减少实验大鼠乳腺导管上皮细胞层数和腺泡数,同时降低乳腺组织 $ER\alpha$ 、PR 的表达,提高 $ER\beta$ 的表达,抑制乳腺组织增生。**结论** 岩鹿乳康胶囊对大鼠乳腺增生具有抑制作用,其治疗机制可能与上调 $ER\beta$,下调 $ER\alpha$ 、PR 的表达有关。

关键词: 岩鹿乳康胶囊;乳腺增生;雌激素受体亚型;孕激素受体

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of Yanlurukang Capsules on breast tissue and expressions of ER and PR in rats with hyperplasia of mammary glands*

Yu-fei Guo¹, Juan Lyu², Shu-qin Wang²

(1. Henan Province Hospital of TCM, Zhengzhou, Henan 450002; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450046)

Abstract: Objective To observe the effect of Yanlurukang Capsules on the breast tissue and expressions of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in rats with hyperplasia of mammary glands (HMG), and to discuss the mechanism. **Methods** Breast hyperplasia rat model was established by intramuscular injection of estradiol benzoate and progesterone. The changes of breast tissue were observed in rats of each group. The expressions of $ER\alpha$, $ER\beta$ and PR in breast tissues were detected using immunohistochemical staining. **Results** Yanlurukang Capsules significantly reduced the layers of mammary ductal epithelial cells and the number of acini in the experimental rats, down-regulated the expressions of $ER\alpha$ and PR, and enhanced the expression of $ER\beta$. **Conclusions** Yanlurukang Capsules can inhibit HMG in rats, the mechanism may be related to up-regulation of $ER\beta$ expression and down-regulation of $ER\alpha$ and PR expressions.

Keywords: Yanlurukang Capsules; hyperplasia of mammary glands; ER; PR

乳腺增生是妇女的一种常见病和多发病,以周期性乳房疼痛为主要特征的一种既非炎症又非肿瘤的乳腺疾病,是乳腺实质的良性增生,属中医学“乳癖”范畴。岩鹿乳康胶囊是彝医药,由岩陀、鹿衔草、鹿角霜三味药组成,具有益肾、活血,软坚散结之功

效,在治疗乳腺增生上具有良好临床疗效。本研究通过复制乳腺增生大鼠模型,观察各组大鼠乳腺组织病理变化,测定乳腺组织中雌激素受体(estrogen receptor, ER)亚型($ER\alpha$ 、 $ER\beta$)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)水平,探索岩鹿乳康胶囊

收稿日期:2016-12-21

* 基金项目:河南省中医药科学研究专项课题普通项目(No:2013ZY02036);河南省教育厅科学技术研究重点项目(No:13A360610)

抑制乳腺增生的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年未孕 Wistar 雌性大鼠 60 只(北京维通利华有限公司提供),鼠龄 7~8 周,体重 180~200 g,合格证号:11400700094092。

1.2 实验用药及试剂

岩鹿乳康胶囊(云南龙海天然植物药业有限公司,批号:z20025379),枸橼酸他莫西芬片(三苯氧胺,扬子江药业集团有限公司,批号:08062501),乳癖消颗粒(哈尔滨太华药业有限公司,批号:z19990028),苯甲酸雌二醇注射液(苏州苏牧动物药业有限公司,批号:100862511),黄体酮注射液(天津金耀药业有限公司,批号:h12020533)。SA1022 兔 IgG- 免疫组织化学试剂盒 SABC 即用型,DAB 显色试剂盒(批号:AR1022)均购自武汉博士德生物工程有限公司。ER α 抗体(批号:21244-1-AP),ER β 抗体(批号:14007-1-AP)均购自美国 Proteintech 公司,PR 抗体(批号:bs-0183R)购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 分组、复制模型及给药 将 Wistar 雌性大鼠 60 只随机分为空白组、疾病模型组、去卵巢组、三苯氧胺组、乳癖消颗粒组和岩鹿乳康胶囊组,每组 10 只。除空白组外,其余各组大鼠大腿内侧肌内注射苯甲酸雌二醇 0.5 mg/(kg·d),使用 25 d 后改为肌内注射黄体酮 4 mg/(kg·d),连续 5 d,复制乳腺增生模型^[1]。空白组、疾病模型组及去卵巢组蒸馏水灌胃 0.2 ml/d,三苯氧胺组 2.07 mg/(kg·d),乳癖消颗粒组 2.52 g/(kg·d),岩鹿乳康胶囊组 630 mg/(kg·d),各组分别灌胃给药 4 周,末次给药后 24 h 处死动物取材。

1.3.2 组织形态学观察 取大鼠第 3 对乳腺,用 10%甲醛溶液固定、石蜡包埋、连续切片、染色,光镜下计数导管上皮层数和腺泡数。

1.3.3 ER α 、ER β 、PR 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学 SABC 法,按试剂盒说明书步骤进行,高倍镜下观察,拍片。用 Image-Pro Plus 6 分析软件对各组照片进行平均光密度测算,定量分析。细胞胞浆或细胞核呈黄色或棕黄色着色为阳性表达,平均光密度值[mean density=(IOD SUM)/area]反映了这张照片上免疫反应物的表达强度。ER α 、ER β 、PR 阳性表达的水平与平均光密度值呈正相关。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件处理数据,用完全随机设计的单因素方法(one-way ANOVA),实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠乳腺形态

空白组大鼠乳腺组织可见乳腺小叶体积小、形态规则,乳腺导管上皮细胞排列整齐,腺泡数量少,未发现有乳腺增生的症状(见图 1~3)。与空白组比较,疾病模型组大鼠乳腺组织导管上皮细胞层数及腺泡数目增多($P<0.05$),腺泡和导管增生、扩张,细胞排列紊乱,有典型的乳腺增生症状。与疾病模型组比较,各治疗组(三苯氧胺组、乳癖消颗粒组及岩鹿乳康胶囊组)导管上皮细胞层数、腺泡数减少($P<0.05$),导管扩张减轻,乳腺增生程度均有不同程度的改善。去卵巢组导管上皮层数与腺泡数低于空白组,病理表现相近。见表 1。

2.2 岩鹿乳康胶囊对乳腺增生大鼠乳腺组织 ER α 、ER β 、PR 表达的影响

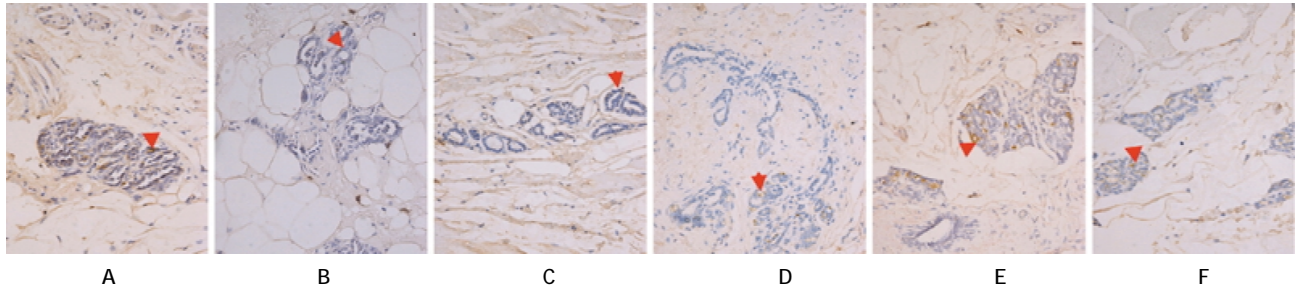
2.2.1 各组大鼠乳腺组织 ER α 的表达 与空白组比较,疾病模型组平均光密度值升高,阳性细胞表达增多($P<0.05$)。与疾病模型组比较,各治疗组平均光密度值降低($P<0.05$),阳性细胞表达减少。表明当大鼠乳腺组织形态表现为明显增生时,乳腺组织内的 ER α 表达水平随之升高,而各治疗组均可下调 ER α 表达,有益于抑制增生。岩鹿乳康胶囊组与三苯氧胺组比较差异无统计学意义,在数值上接近三苯氧胺组。见图 1、表 2。

2.2.2 各组大鼠乳腺组织 ER β 的表达 与空白组比较,疾病模型组、去卵巢组的平均光密度值下降,阳性细胞表达减少。与疾病模型组比较,三苯氧胺组、岩鹿乳康胶囊组及乳癖消颗粒组的平均光密度值均升高,阳性细胞表达增多,且岩鹿乳康胶囊组及乳癖消颗粒组与疾病模型组比较有统计学意义($P<0.05$),表明岩鹿乳康胶囊组及乳癖消颗粒组可上调 ER β 表达,以岩鹿乳康胶囊组最为明显。见图 2、表 2。

2.2.3 各组大鼠乳腺组织 PR 的表达 与空白组比较,疾病模型组平均光密度值升高,阳性细胞表达增多($P<0.05$)。与疾病模型组比较,去卵巢组、三苯氧胺组、岩鹿乳康胶囊组及乳癖消颗粒组平均光密度

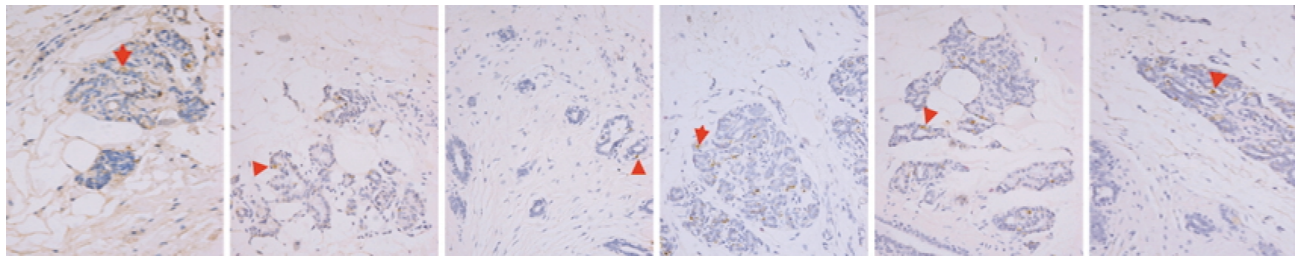
降低 ($P < 0.05$), 阳性细胞表达减少, 表明乳腺增生模型大鼠的 PR 表达水平升高, 三苯氧胺组、岩鹿乳康胶囊组及乳癖消颗粒组药物的应用能降低大鼠乳腺组织 PR 含量。见图 3、表 2。

实验结果表明, 疾病模型组大鼠乳腺组织明显增生时, 乳腺内 ER α 和 PR 表达水平随之升高, ER β 表达下降。空白组的正常乳腺组织中 ER α 的表达率低于 ER β 的表达。推测 ER β 对正常乳腺



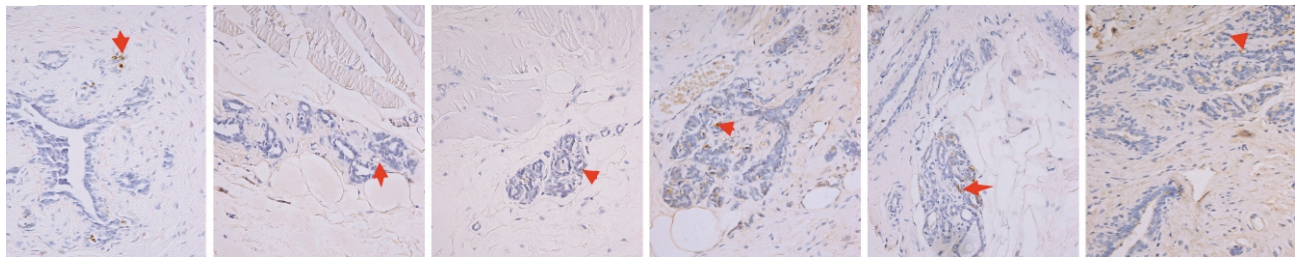
A: 疾病模型组; B: 空白组; C: 去卵巢组; D: 乳癖消颗粒组; E: 三苯氧胺组; F: 岩鹿乳康胶囊组; 箭头所示棕黄色为 ER α 阳性表达

图 1 ER α 免疫组织化学染色结果 (10 \times 40)



A: 疾病模型组; B: 空白组; C: 去卵巢组; D: 乳癖消颗粒组; E: 三苯氧胺组; F: 岩鹿乳康胶囊组; 箭头所示棕黄色为 ER β 阳性表达

图 2 ER β 免疫组织化学染色结果 (10 \times 40)



A: 疾病模型组; B: 空白组; C: 去卵巢组; D: 乳癖消颗粒组; E: 三苯氧胺组; F: 岩鹿乳康胶囊组; 箭头所示棕黄色为 PR 阳性表达

图 3 PR 免疫组织化学染色结果 (10 \times 40)

有保护作用。去卵巢组的 ER α 、ER β 、PR 的表达均低于空白组, 这可能与大鼠去卵巢后内源性雌孕激素的缺乏导致雌孕激素受体的表达减弱有关。三苯氧胺组在 ER α 、PR 表达上与疾病模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但在 ER β 表达上与疾病模型组比较差异无统计学意义, 提示 ER α 和 ER β 对抗雌激素物质三苯氧胺来说, 有不同的亲和力。ER α 在多种细胞中可介导三苯氧胺的激动作用而 ER β 则不能^[2]。岩鹿乳康胶囊组在调节 ER α 、PR 表达方面趋向三苯氧胺组, 优于乳癖消颗粒组, 在上调 ER β 表达上优于这两组。

表 1 各组大鼠乳腺导管上皮层数、腺泡数比较

($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	导管上皮细胞层数	腺泡数
空白组	2.167 \pm 0.753 ¹⁾	3.667 \pm 1.033 ¹⁾
疾病模型组	4.667 \pm 1.211 ²⁾³⁾	13.333 \pm 2.160 ²⁾³⁾
去卵巢组	1.833 \pm 0.753 ¹⁾	2.833 \pm 0.753 ³⁾
三苯氧胺组	2.667 \pm 0.816 ¹⁾	4.667 \pm 1.033 ¹⁾
乳癖消颗粒组	3.333 \pm 1.033 ¹⁾²⁾	7.667 \pm 1.633 ¹⁾²⁾³⁾
岩鹿乳康胶囊组	3.167 \pm 0.753 ¹⁾	5.500 \pm 1.049 ¹⁾²⁾

注: 1) 与疾病模型组比较, $P < 0.05$; 2) 与空白组比较, $P < 0.05$; 3) 与三苯氧胺组比较, $P < 0.05$

表 2 各组大鼠乳腺组织 ER α 、ER β 、PR 平均光密度值比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ER α	ER β	PR
空白组	0.382 \pm 0.086 ¹⁾²⁾	0.475 \pm 0.084	0.309 \pm 0.037 ¹⁾²⁾
疾病模型组	1.403 \pm 0.143 ³⁾	0.419 \pm 0.098	0.704 \pm 0.085 ²⁾³⁾
去卵巢组	0.280 \pm 0.069 ¹⁾²⁾³⁾	0.366 \pm 0.062 ²⁾³⁾	0.256 \pm 0.045 ¹⁾²⁾
三苯氧胺组	0.406 \pm 0.062 ¹⁾	0.443 \pm 0.054	0.379 \pm 0.057 ¹⁾³⁾
乳癖消颗粒组	0.486 \pm 0.119 ¹⁾²⁾	0.491 \pm 0.044 ¹⁾	0.501 \pm 0.042 ¹⁾²⁾³⁾
岩鹿乳康胶囊组	0.438 \pm 0.075 ¹⁾	0.524 \pm 0.067 ¹⁾²⁾	0.408 \pm 0.054 ¹⁾³⁾

注:1)与疾病模型组比较, $P<0.05$;2)与三苯氧胺组比较, $P<0.05$;3)与空白组比较, $P<0.05$

3 讨论

乳房是多种内分泌激素的靶器官,乳腺增生的病因除了过高的 E2 直接刺激或 P 值降低不能保护乳腺组织,使乳腺实质增生过度 and 复旧不全外^[3],还与局部乳腺组织 ER、PR 含量相关,ER、PR 的表达量可提示乳房组织对性激素的敏感性。目前国内外的研究认为 ER 的功能主要是在 ER 信号通路中起重要作用,具体表现在激素相关的靶器官如乳腺组织、骨骼组织和脂肪组织^[4]。ER 是一类由配体激活的转录因子,是核受体超家族的成员,2 种亚型 ER α 、ER β 介导雌激素而使其产生作用。ER α 和 ER β 在雌激素的靶组织分布不同调节机制也不同,两者有不同的生物学作用^[5],且在人类的乳腺中 ER β 比 ER α 的分布更为广泛^[6]。研究者^[7]证实几乎 100% 的导管上皮不典型增生都高表达 ER α ,约 75% 的导管原位癌、大于 90% 的小叶原位癌,约 70% 的浸润性乳腺癌病灶中可检测到增高的 ER α 。约 85% 的正常乳腺导管上皮中有表达 ER β ,其表达强度在正常导管上皮、导管位癌、浸润性导管癌依次减少。有研究^[8]显示 ER α 与 ER β 在 45 例正常乳腺组织中均有表达,且在表达量上,ER β 高于 ER α ,提示 ER β 可能是正常乳腺的优势雌激素受体,ER β 的表达可能在正常乳腺细胞中发挥更重要的作用。KOEHLER 等^[9]在动物实验中发现 ER β 对正常乳腺具保护作用。在正常乳腺中 ER β 表达比 ER α 更为丰富,活化的 ER α 促进乳腺及其他组织细胞的增殖,已被推荐作为区分激素依赖和非激素依赖的乳腺癌的标志物;近期研究也表明活化的 ER β 可拮抗乳腺及其他组织的增殖,高浓度的 ER β 可以下调 ER α 的表达^[10]。雌激素也能调节和

控制 PR 的表达,PR 依赖于 ER 存在并受雌激素的调节和控制,因而 PR 表达状态能够显示雌激素调节系统的功能状况。当孕酮含量升高时经 PR 的介导,通过完整的 PR 系统,使 PR 合成进一步增加,对 PR 的依赖敏感性同步增加,引起乳腺上皮细胞的增生和细胞功能活跃^[11]。ER 和 PR 过度表达与乳腺增生病的发生有较大相关性。

祖国医学称乳腺增生为“乳癖”,多因情志内伤,肝气郁结,乳络阻滞或肾阳不足以致冲任不调,气滞痰凝所致。治法则以疏肝理气,温补肾阳,活血化瘀,软坚散结,消肿止痛等为主。岩鹿乳康胶囊是彝医药,由岩陀、鹿衔草和鹿角霜三味药组成,岩陀,苦、涩、凉,有活血化瘀、理气祛痰、消肿止痛之功;鹿衔草味甘苦,性温,能补虚,益肾,活血调经,调理冲任;鹿角霜味咸,归肝肾经,能温阳寒,软坚散结。现代药理证明,岩陀主要化学成分为岩白菜素,具有抗炎、抗 HIV、抑制微生物、镇咳、抗氧化、镇痛、增强免疫等作用^[12]。鹿角霜能对抗戊酸雌二醇性小鼠乳腺增生,大剂量能抑制 MA-737 小鼠乳腺癌的生长^[13],且有类似内分泌激素的作用^[14]。已经有相关研究证明鹿衔草通过植物雌激素样作用,提升血清雌激素水平^[15]。因为结构上的相似性,植物性雌激素可通过 ER 的结合,从而表现出雌激素活性和抗雌激素活性 2 种重要的生物学活性^[16],由此可见,岩鹿乳康胶囊治疗乳腺增生与其改善机体内分泌功能有关,可能是通过调节激素分泌水平,减弱异常的雌、孕激素对乳腺的生物学效应。

综上所述,①岩鹿乳康胶囊组治疗大鼠乳腺增生,在对乳腺导管上皮层数和腺泡数等抑制作用方面优于乳癖消颗粒组,接近三苯氧胺组的抑制效果。②疾病模型组 ER α 和 PR 表达水平升高,ER β 表达下降。岩鹿乳康胶囊组可上调 ER β ,下调 ER α 和 PR 的表达,提示岩鹿乳康胶囊治疗乳腺增生的机制可能与调节了 ER α 、ER β 、PR 的表达相关,且 ER β 的表达与乳腺保护作用密切相关。③三苯氧胺可下调 ER α 和 PR 的表达,对 ER β 上调不明显,提示岩鹿乳康胶囊治疗乳腺增生的机制与雌激素受体拮抗剂三苯氧胺存在差异。岩鹿乳康胶囊组在抑制大鼠乳腺组织增生的同时,乳腺 ER α 、PR 表达水平随之降低,同时 ER β 表达上调。因而推测岩鹿乳康胶囊一方面下调大鼠乳腺组织 ER α 和 PR 的表达,使乳腺组织对雌激素的敏感性下降,从而减少受体与激素结合形成的复合物对基因的活化和对

靶细胞的调节作用,起到抑制乳腺增生的作用,另一方面上调 ER β 表达,对乳腺组织起到保护作用。岩鹿乳康胶囊抑制与保护兼具,且能调理体质,体现了中医药在治疗乳腺增生的优越性。但其具体作用机制及是否有预防乳腺癌的作用,有待于今后进一步研究阐明。

参 考 文 献:

- [1] 向骏马,张蓉,邢茂,等. 中药治疗乳腺增生物模型评价指标的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 4: 550-552.
- [2] 李宏,张文昌. 雌激素受体 α 与 β 的比较 [J]. 福建医科大学学报, 2005, 增刊: 5-7.
- [3] 吴在德. 外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 307.
- [4] PAPP B, PLATH K. Pluripotency re-centered around Esrrb[J]. EMBO J, 2012, 22(31) : 4255-4257.
- [5] 柯江维,段荣. 雌激素受体 α (ER α)与 β (ER β)表达的研究和检测技术新进展及其在疾病预后判断中的应用 [J]. 实验与检验医学, 2009, 3(27): 291-294.
- [6] MEHTA R G , HAWEHOME M , METHA R R, et al. Differential roles of ER α and ER β in normal and neoplastic development in the mouse mammary gland[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e13175.
- [7] 朱信信,杨红鹰. 雌激素受体亚型 α 和 β 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2014, 6: 766-768.
- [8] 胡凤娣,邹天宁,邓明佳,等. 雌激素受体亚型 α 、 β 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2013, 2: 130-132.
- [9] KOEHLER K F, HELGUERO L A, HALDOSEN L A, et al. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta[J]. Endocr Rev 2005, 26(3): 465-478.
- [10] SPEIRS V, SKLIRIS G P, BURDALL S E, et al. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(5): 371-374.
- [11] 柏青杨,王显艳,胡南,等. ER、PR 在乳腺增生病中的定量表达及其临床意义[J]. 医学研究杂志, 2007, 7: 112-113.
- [12] 刘斌,谭成玉,池晓会,等. 岩白菜素的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2015, 5: 660-662.
- [13] 李增战,陈捷,苗文红,等. 鹿仙散结汤治疗晚期乳腺癌 30 例[J]. 陕西中医, 2007, 5: 526-527.
- [14] 徐国兵,王峥涛. 鹿角对大鼠乳腺增生模型的治疗作用[J]. 中国药科大学学报, 2006, 4: 349-352.
- [15] 林丽琼. 鹿衔草对去卵巢大鼠钙调节激素的影响[D].福州: 福建中医药大学, 2012.
- [16] 宋丽华. 植物性雌激素的研究进展[J]. 国外医学(药学分册), 2003, 1: 25-29.

(张蕾 编辑)