

乳安凝胶膏剂对大鼠乳腺增生作用机制研究

傅静娟¹ 罗会盛¹ 卞勇² 朱子寒³ 欧宁³

(1 南京中医药大学附属医院; 2 南京中医药大学; 3 江苏省人民医院, 南京, 210029)

摘要 目的:研究乳安凝胶膏剂对大鼠乳腺增生组织中血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)与增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)表达的影响。方法:56只雌性大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、赋形剂对照组、乳增宁组、乳安凝胶膏4.16 g/kg、2.08 g/kg、1.04 g/kg剂量组,共7组,采用注射苯甲酸雌二醇、黄体酮造模,给药30 d。免疫组化法测定各组大鼠乳腺组织PCNA和VEGF的表达。结果:乳安凝胶膏剂4.16 g/kg、2.08 g/kg组能降低大鼠乳腺PCNA和VEGF的表达,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05, 0.01$)。结论:乳安凝胶膏剂可通过抑制其乳腺血管内皮生长因子和增殖细胞核抗原的表达活性,达到对抗大鼠乳腺增生的目的。

关键词 乳安凝胶膏剂;乳腺增生;PCNA;VEGF

Mechanism of Ru'an Ningjiao Ointment on Hyperplasia of Mammary Gland Rats

Fu Jingjuan¹, Luo Shenghui¹, Bian Yong², Zhu Zihan³, Ou Ning³

(1 Affiliated Hospital to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3 Renmin Hospital of Jiangsu, Nanjing 210029, China)

Abstract Objective: To observe the mechanism of Ru'an Ningjiao ointment on tissue of rat vascular endothelial growth factor (PCNA) and the influence of PCNA (VEGF) expression in rats with hyperplasia of mammary gland. **Methods:** A total of 56 female unpregnant rats were randomly divided into 7 groups: normal control group, model group, excipient control group, Ruzengning group, Ru'an Ningjiao ointment 4.16 g/kg, 2.08 g/kg, 1.04 g/kg dose groups. Models were produced by injecting estradiol benzoate and progesterone for 30 days. Use immunohistochemical method to determine the expression of PCNA and VEGF in rats with breast hyperplasia. **Results:** Ru'an Ningjiao ointment 4.16 g/kg, 2.08 g/kg group can reduce the expression of PCNA and VEGF, and compared with model group, the difference had statistical significance ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion:** Ru'an Ningjiao ointment can inhibit the mammary gland vascular endothelial growth factor and the expression of cell activity, and thus to control hyperplasia of mammary gland.

Key Words Ru'an Ningjiao ointment; Hyperplasia of mammary glands; PCNA; VEGF

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.12.026

乳安凝胶膏剂是由临床上使用多年、疗效确切的江苏省中医院验方改制而成,主要用于乳腺增生病的治疗。本文主要通过观察乳安凝胶膏剂对乳腺增生大鼠乳腺组织中的PCNA与VEGF表达的影响,探讨其治疗乳腺增生病的作用机制,为临床应用提供依据^[1]。

1 材料与方法

1.1 实验动物 56只SD大鼠,雌性,健康未孕,体重(220±20)g,北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 受试药物 乳安凝胶膏由南京中医药大学第一附属医院药学部制备,药物组成:淫羊藿、延胡索、丁香、肉桂;药物制备:淫羊藿水提,延胡索醇提,丁香肉桂提取挥发油,将上述提取物与氮酮加入空白

凝胶膏料中搅匀,用层压法将膏药与保护层(聚乙烯薄膜)复合制成乳安凝胶膏,晾干备用。

1.3 试剂 苯甲酸雌二醇,天津金耀氨基酸有限公司,批号:H20150510;黄体酮,天津金耀氨基酸有限公司,批号:H201505632;抗体,购自北京博奥森生物技术有限公司;SP免疫组化检测试剂盒,购自北京博奥森生物技术有限公司;PBS缓冲液:自行配制,每升中含8 g NaCl,0.2 g KCl,1.44 g Na₂HPO₄,0.24 g KH₂PO₄,pH调至7.4。

1.4 仪器 Leica ASP300S全自动真空组织脱水机;Shandon包埋机;Shandon手动切片机;Shandon全自动染色机;OLYMPUS显微镜。

2 方法^[2-7]

2.1 分组及模型建立 将大鼠随机分为正常对照

组、赋形剂对照组、乳腺增生模型组、乳增宁组、乳安凝胶膏剂大剂量组、中剂量组、小剂量组。正常组不给予任何药物,肌内注射等体积生理盐水,1次/d,连续25d。其余各组大鼠肌内注射苯甲酸雌二醇0.5 mg/kg,1次/d,连续20d,继而改用黄体酮5 mg/kg,1次/d,连续5d。

2.2 给药 造模成功后,乳安凝胶膏剂大、中、小剂量组及赋形剂组每天进行乳安凝胶膏剂外贴,选取造模后大鼠最肿大的第三对乳房用药物外贴(大剂量组给予4.16 g/kg、中剂量组2.08 g/kg、小剂量组1.04 g/kg,每24 h换药1次,连续30d。乳增宁组每日上午空腹按剂量定时灌胃给药一次(给予乳增宁,0.9 g/kg,连续30d)。

2.3 检测指标 实验结束时,取大鼠第三对乳头,称重后,用10%甲醛溶液固定,经脱水浸蜡后,进行石蜡包埋、切片。步骤:1)石蜡切片常规脱蜡至水;2)PBS洗二遍,每遍5 min;3)用蒸馏水或PBS配置新鲜的3% H₂O₂室温封闭10 min,蒸馏水洗1次;4)抗原修复;5)PBS洗5 min;6)滴加正常山羊血清封闭液,室温10 min;7)甩去多余液体滴加一抗4℃过夜(过夜后在37℃复温45 min);8)PBS洗2次各5 min;9)滴加生物素化二抗,37℃孵育30 min;10)PBS洗2次各5 min;11)滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉菌抗生物素溶液,37℃孵育20 min;12)PBS洗2次各5 min;13)DAB显色3~10 min在显

微镜下掌握染色程度;14)蒸馏水洗终止染色,苏木素复染;15)脱水,透明,封片,镜检。每张切片取5个高倍视野,用Image Pro Plus 5.0.2图像分析软件测定各组光密度值。

2.4 统计学方法 所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用SPSS 17.0 for windows统计软件进行统计处理,采用单因素方差分析法对实验结果进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 乳安凝胶膏剂对大鼠乳腺增生组织 VEGF 表达的影响 见表1。模型组大鼠乳腺组织中 VEGF 阳性表达增加,与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),乳增宁组大鼠乳腺组织 VEGF 表达减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);乳安凝胶膏剂大剂量组大鼠乳腺组织中 VEGF 表达明显减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.2 乳安凝胶膏剂对大鼠乳腺增生组织 PCNA 表达的影响 见表2。模型组大鼠乳腺组织中 PCNA 的阳性表达明显增加,与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),乳增宁组乳腺组织中 PCNA 阳性表达减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);乳安凝胶膏剂大、中剂量组乳腺组织中 PCNA 阳性表达明显减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01, 0.05$)。

表1 乳安凝胶膏剂对大鼠乳腺增生组织 VEGF 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	VEGF	
			Area	IOD
正常对照组	8		68174 ± 27559	6339 ± 1043
模型组	8		202889 ± 64643 **	27057 ± 6467 **
赋形剂对照组	8		245710 ± 33564	25213 ± 1920
乳增宁组	8	0.90	115825 ± 28148 [#]	16691 ± 3919 [#]
乳安凝胶膏剂大剂量组	8	4.16	91041 ± 27712 [#]	15405 ± 6851 [#]
乳安凝胶膏剂中剂量组	8	2.08	104776 ± 29895 [#]	15365 ± 8579
乳安凝胶膏剂小剂量组	8	1.04	127167 ± 76021	24699 ± 16409

注:与正常对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与模型组比较[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$ 。

表2 乳安凝胶膏剂对大鼠乳腺增生组织 PCNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	PCNA	
			Area	IOD
正常对照组	8		2682 ± 735	596 ± 103
模型组	8		53050 ± 21186 **	7683 ± 2370 **
赋形剂对照组	8		53751 ± 15580	6034 ± 1318
乳增宁组	8	0.90	12032 ± 6994 [#]	1852 ± 564 ^{###}
乳安凝胶膏剂大剂量组	8	4.16	10021 ± 3589 ^{###}	3863 ± 1466 [#]
乳安凝胶膏剂中剂量组	8	2.08	24207 ± 1367 [#]	5097 ± 1742
乳安凝胶膏剂小剂量组	8	1.04	29044 ± 5754.12	5359 ± 1142

注:与正常对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与模型组比较[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$ 。

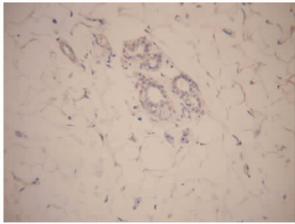


图1 正常对照组 VEGF 表达



图2 模型对照组 VEGF 表达

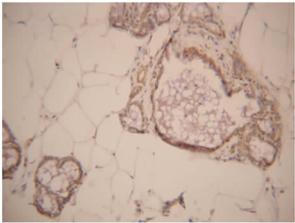


图3 赋形剂对照组 VEGF 表达

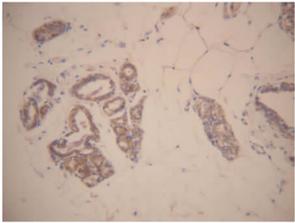


图4 乳增宁组 VEGF 表达

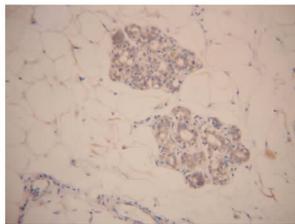


图5 乳安凝胶膏剂大剂量组 VEGF 表达

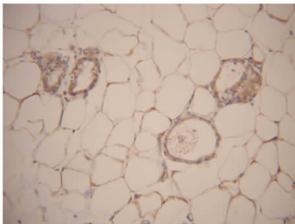


图6 乳安凝胶膏剂中剂量组 VEGF 表达

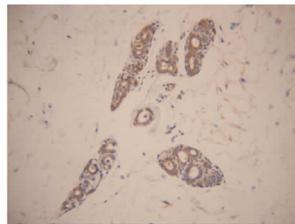


图7 乳安凝胶膏剂小剂量组 VEGF 表达



图8 正常对照组 PCNA 表达

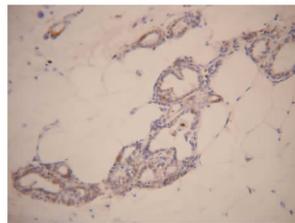


图9 模型对照组 PCNA 表达

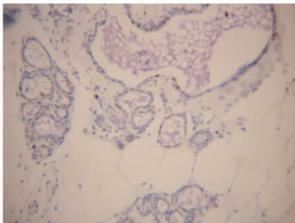


图10 赋形剂对照组 PCNA 表达

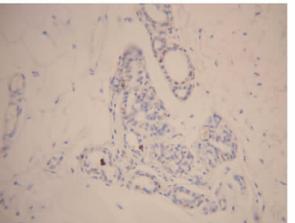


图11 乳增宁组 PCNA 表达

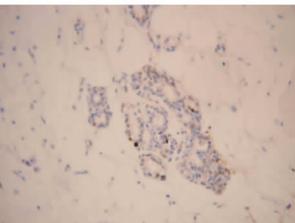


图12 乳安凝胶膏剂大剂量组 PCNA 表达

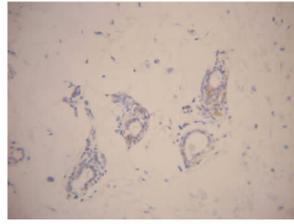


图13 乳安凝胶膏剂中剂量组 PCNA 表达

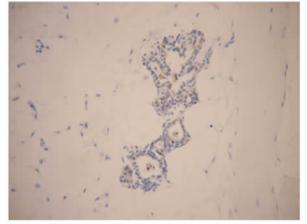


图14 乳安凝胶膏剂小剂量组 PCNA 表达

4 讨论

VEGF 最初是 Senger 等在肿瘤细胞分泌物中发现的,具有高度的血管渗透性,是重要的血管渗透性因子,它可增加毛细血管和小静脉等微小血管对大分子的通透性,微血管通透性的增加可引起血浆蛋白(主要是纤维蛋白原)外渗,外漏的纤维蛋白原凝固成纤维蛋白而沉积,并通过诱导间质产生而促进体内新生血管生成^[8-10]。近年来,较多学者研究发现血管生成与乳腺增生病的发生密切相关。宋爱莉^[11]等对 140 例乳腺增生病患者进行乳房肿块活检,观察病变组织的病理分型类型、分级及 VEGF、bFGF 的表达情况,免疫组化结果显示,不同病理分级的 VEGF、bFGF 表达存在差异,从一般增生到非典型增生,VEGF、bFGF 的表达逐渐增强 ($P < 0.05$)。表明随乳腺增生程度的增加,组织血管生成因子的表达增强,两者存在相关性。段彦苍^[12]等通过制作乳腺增生的大鼠模型,采用酶联免疫法测定血清 VEGF 和 bFGF 含量及其在乳腺组织中的表达,发现与正常组相比,模型组大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 含量明显升高,在乳腺组织中表达增强。表明模型组大鼠体内存在的某些血管因子被激活后,直接或间接促进了局部乳腺组织血管的增生。

PCNA 由 Miyachi 等于 1978 年首次发现并命名,一种分子量为 36KD 的酸性蛋白质,以后的研究发现 PCNA 与表达与细胞周期有关,故又称为周期蛋白,在细胞增殖的启动上起重要作用^[13],是反映细胞增殖状态的良好指标。PCNA 的表达程度和含量是评价细胞增殖状态的客观指标,已证实 PCNA 的合成和表达与细胞的增殖状态有关^[14]。

本实验中,模型组大鼠乳腺组织中 VEGF、PCNA 阳性表达增加,与正常组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),可见在造模的过程中,随着乳腺组织 VEGF、PCNA 表达增加,血管内皮细胞增殖增多,乳腺导管上皮的增殖活性加强,同时血管渗透性增加,引起血管中的蛋白质外渗,乳腺组织发生一系列病理性变化。乳增宁组大鼠乳腺组织 VEGF、PCNA 表达减少,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P <$

0.05); 乳安凝胶膏剂大剂量组大鼠乳腺组织中 VEGF、PCNA 表达明显减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。表明外敷乳安凝胶膏剂后,乳腺增生大鼠乳腺组织中 VEGF、PCNA 表达减少,差异有统计学意义。提示乳安凝胶膏剂可以通过降低 VEGF 的活性,抑制乳腺上皮细胞的增值,对乳腺增生起到一定的抑制作用。

参考文献

- [1] 傅静娟, 欧宁, 李永刚. 乳安凝胶膏剂对大鼠乳腺增生及内分泌激素的影响[J]. 安徽医药, 2012, 16(4): 439-441.
- [2] Zhang QQ, LIU P, Yu SM, et al. Effect of Xiang hua hurugels on mammary hyperplasia rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2014, 31(6): 647-650.
- [3] 楼炜, 周洁, 岳素荣. 散结止痛凝胶膏对乳腺增生模型大鼠的影响[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 657-657.
- [4] Duan HG, Wei Y H, Li BX, et al. The rapeutic effect of different extract of Shuru Xiaokuai decoction on hyperplasia of mammary glands in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2013, 30(10): 1058-1062.
- [5] 李伟泽, 刘世泽, 崔竹玲, 等. 乳腺康凝胶膏剂治疗乳腺增生临床研究[J]. 中医学报, 2015, 30(8): 1218-1220.
- [6] 王玉杰. 桂枝茯苓胶囊治疗乳腺囊性增生的疗效观察[J]. 中国

处方药, 2015, 13(7): 41.

- [7] 王林丽, 杨巧虹, 李卓恒, 等. 乳宁口服液治疗乳腺增生大鼠的药效学研究[J]. 中国药业, 2015, 24(13): 16-17.
- [8] 李泉. 激素与 VEGF、bFGF 水平在乳腺增生病辨证分型中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2250-2253.
- [9] 祁明, 郑亚宁. 血管内皮生长因子的研究进展[J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 2010, 28(4): 61-66.
- [10] 王春艳. EGFR 和 VEGF 联合检测对评估乳腺癌淋巴结转移的意义[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(3): 440-442.
- [11] 宋爱莉, 李静蔚, 刘晓菲, 等. 乳腺增生病与血管生成因子表达关系的临床研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(4): 277-280.
- [12] 段彦苍, 杜惠兰, 靳亚慈. 乳腺增生大鼠模型血清和乳腺 VEGF、bFGF 的变化[J]. 陕西医学杂志, 2010, 39(3): 277-279.
- [13] 宋楠萌, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展[J]. 自然科学进展, 2006, 16(10): 1201-1209.
- [14] 肖秀娣, 邹士林, 陆莉. P53 PCNA C-erbB-2 和 nm23 在乳腺增生症中的表达及其临床意义[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2004, 14(1): 47-48.

(2015-07-23 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第 1921 页)

囊治疗风湿性关节炎的效果及病理机制, 结果表明, 风湿祛痛胶囊能使大鼠佐剂性关节炎的关节肿胀程度, 显著抑制腹腔巨噬细胞的活化, 降低红细胞压积及血沉, 显著降低关节渗出液中 PGE₂ 含量, 能够使血清中 MDA、NO、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 含量显著降低, 显著升高血清 SOD 活性。

本试验证明, 风湿祛痛胶囊具有良好的抗风湿性关节炎的作用, 该作用机制主要与其能够抑制巨噬细胞活化, 降低血清中的炎性因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等的含量, 提高机体清除氧自由基的能力以及改善机体血液流变学性质等因素有关。

参考文献

- [1] 张冠英, 董瑞娟, 廉莲. 川黄柏、关黄柏化学成分及药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(10): 812-821.
- [2] 付红梅, 朱东海, 方婧, 等. 苍术的化学、分子生物学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2669-2672.
- [3] 章蕴毅, 张宏伟, 李佩芬, 等. 威仙灵的解痉抗炎镇痛作用[J]. 中成药, 2001, 23(11): 808-811.
- [4] 符影, 程悦, 陈建萍, 等. 鸡血藤化学成分及药理作用研究[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1229-1234.
- [5] 冯芳, 丁志建, 刘俊. 佐剂性关节炎大鼠模型的实验研究[J]. 天

津药学, 2004, 16(2): 1-4.

- [6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 749-751.
- [7] 李培培, 解国雄, 宋珊珊, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(5): 453-457.
- [8] 曾阳, 马继雄, 鲍敏, 等. 藏药翁布总苷对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(12): 1321-1325.
- [9] 高俊, 丁真奇. 细胞因子在类风湿性关节炎中作用的研究现状[J]. 医学综述, 2006, 12(5): 289-291.
- [10] 付雯雯. 乌头注射液对类风湿性关节炎的治疗作用及其机制[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [11] Lingling Shen, Pingtao Wang, Junhao Guo, et al. Anti-arthritis activity of ethanol extract of Fagopyrum cymosum with adjuvant-induced arthritis in rats[J]. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(6): 783-789.
- [12] Xin-xin Zhang, Yoichiro Ito, Jin-ru Liang, et al. Therapeutic effects of total steroid saponin extracts from the rhizome of Dioscorea zingiberensis C. H. Wright in Freund's complete adjuvant induced arthritis in rats[J]. International Immunopharmacology, 2014(23): 407-416.
- [13] Ke Pan, Xiao Xia, Wen-Hua Guo, et al. Suppressive effects of total alkaloids of Lycopodium casuarinoides on adjuvant-induced arthritis in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015(195): 17-22.

(2015-08-31 收稿 责任编辑: 王明)