

## 柴芍乳癖颗粒对乳腺增生兔模型 B 超声像及组织形态学的影响

杨春萍<sup>1</sup>, 刘丽芳<sup>2\*</sup>, 杨涛<sup>1</sup>, 聂佳欣<sup>1</sup>, 高双双<sup>1</sup>, 胡文文<sup>3</sup>

(1.湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007;  
3.湖南省第二人民医院, 湖南长沙 410007)

**【摘要】目的** 观察柴芍乳癖颗粒对乳腺增生病兔模型乳腺组织 B 超声像及组织形态学的影响。**方法** 56 只健康未孕新西兰雌兔, 随机挑出 10 只为正常对照组, 肌注生理盐水; 46 只为模型制备组, 序贯肌注雌孕激素造模。2 组均随机处死 1 只雌兔, 观察病理切片确定造模成功后, 将模型制备组剩下的 45 只兔再随机分为 5 组: 模型对照组、乳癖散结颗粒组、柴芍乳癖颗粒低、中、高剂量组。6 组兔每天分别予以生理盐水、乳癖散结颗粒 (0.56 g/kg)、柴芍乳癖颗粒 (0.47、0.94、1.88 g/kg) 水溶液灌胃 1 次, 连续 3 月。末次灌胃 24 h 后麻醉, 用 B 超机采集第 2 对乳房的声像图, 处死后取第 2 对乳腺组织, HE 染色观察组织形态学表现, 计数乳腺小叶腺泡数、导管上皮细胞层数、腺泡腔直径。**结果** 柴芍乳癖颗粒能使模型兔乳腺组织低回声区缩小, 内部回声强度减低, 其中高剂量组最明显; 与模型组相比, 柴芍乳癖颗粒低、中、高剂量跟乳癖散结颗粒均可明显缩小腺泡腔直径 ( $P < 0.01$ ), 中、高剂量可以减少乳腺导管上皮细胞层数, 低剂量还可减少乳腺小叶腺泡数 ( $P < 0.05$ )。**结论** 柴芍乳癖颗粒可以改善乳腺增生兔模型 B 超声像, 减轻雌兔乳腺增生程度, 治疗乳腺增生效果明显。

**【关键词】** 乳腺增生; 柴芍乳癖颗粒; B 超声像; 组织形态学; 柴胡

**【中图分类号】**R285.5

**【文献标识码】**A

**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.09.007

### Effects of Chaishao Rupi Granules on B Type Ultrasound Images and Histomorphology of Rabbit Models with Breast Hyperplasia

YANG Chunping<sup>1</sup>, LIU Lifang<sup>2\*</sup>, YANG Tao<sup>1</sup>, NIE Jiaxin<sup>1</sup>, GAO Shuangshuang<sup>1</sup>, HU Wenwen<sup>3</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Second People's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China)

**【Abstract】Objective** To observe the effect of Chaishao Rupi Granules on B type ultrasound images and histomorphology of rabbit models with breast hyperplasia. **Methods** 10 rabbits were randomly selected from 56 healthy unfertilized female New Zealand rabbits as the normal control group, which were given muscle injection with normal saline, 46 rabbits as model preparation group, which were taken female progestogen sequential muscle injection. Randomly killing female rats in the two groups, determine the model is successful or not by observing the pathological section. The remaining 45 rabbits in model preparation group were divided into 5 groups: model control group, Rupi Sanjie granule group, and low dose, middle dose, high dose of Chaishao Rupi granules groups. The six groups were administrated normal saline, 0.56 g/kg Rupi Sanjie granules, and 0.47 g/kg, 0.94 g/kg, 1.88 g/kg Chaishao Rupi granules, respectively, once a day, continuous for 3 months. At 24 h after the last lavage, we implemented the anesthesia to all of the rabbits and collected the second pair of breasts' B ultrasound images. We cut the second pair of breast tissue out. The histomorphology after HE staining was observed. The numbers of lobular acini, duct epithelial layer and acinus cavity diameter were counted. **Results** Chaishao Rupi granules can shrink the rabbit model's breast tissue keyed acoustic area, decrease internal echo intensity, the effect of high dose group is the most obvious. Compared with model group, three doses of Chaihu Rupi granules and Rupi Sanjie granules can narrow the acinus cavity diameter significantly ( $P < 0.01$ ). The middle dose and high dose can reduce the mammary ductal epithelial cell layers ( $P < 0.05$ ), low dose can also reduce lobular acini number ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Chaishao Rupi granules can improve B ultrasonic

**【收稿日期】**2015-12-06

**【作者简介】**杨春萍,女,硕士,研究方向:中医外治法。

**【通讯作者】**\* 刘丽芳,女,教授,主任医师,博士研究生导师, E-mail:liuliff@126.com。

image of mammary gland hyperplasia rabbit models, can reduce the degree of female rabbits' hyperplasia of mammary glands. The effect on hyperplasia of mammary glands is obvious.

[**Keywords**] hyperplasia of mammary glands; Chaishao Rupī granules; B type ultrasound images; histomorphology

乳腺增生病 (hyperplasia of mammary glands, HMG) 是乳腺组织的一种既非炎症也非肿瘤性病变。据调查,70%~80%的女性都有不同程度的乳腺增生<sup>[1]</sup>。HMG是最常见的乳房疾病<sup>[2]</sup>,且有癌变可能。终末导管小叶单位→普通增生→非典型增生→原位癌→浸润性癌→转移癌是连续演变的,但在出现“原位癌”之前上述进程是可逆的。积极治疗乳腺增生,既能解除广大患者的痛苦,又能避免发展为乳腺癌。

导师刘丽芳教授根据多年临床经验创制出柴芍乳癖汤,已经在临床上采用中药配方颗粒的形式运用多年。经前期临床观察表明:柴芍乳癖汤能在一定程度上控制乳腺增生症状<sup>[3]</sup>。但目前尚无柴芍乳癖颗粒对乳腺组织产生影响的直观证据。本次动物实验通过创建兔 HMG 模型,观察兔乳腺组织的 B 超声像及组织形态学表现,以期直观验证柴芍乳癖颗粒对 HMG 的疗效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 动物 健康未孕雌性新西兰白兔 56 只,体质量 1.7~2.5 kg,由湖南中医药大学动物实验中心提供,使用许可证编号:SYXK(湘)2013-0005。

1.1.2 药物 柴芍乳癖颗粒(简称 CSRPKL):柴胡、白芍、当归、青皮、郁金、瓜蒌皮、浙贝母、莪术、橘核、牡蛎、夏枯草、王不留行、白术、茯苓(一方中药配方颗粒),由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供;乳癖散结颗粒(简称 RPSJKL):陕西白鹿制药股份有限公司,4 g/袋,批号 150503。

1.1.3 主要试剂 苯甲酸雌二醇注射液(宁波第二激素厂,批号 140910)、黄体酮注射液(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 140706)、0.9%氯化钠注射液(湖南科伦制药有限公司,批号 G141201F)、8%硫化钠水溶液、10%甲醛溶液、巴比妥钠等分析纯试剂。

1.1.4 主要仪器 尼康 CI-1 研究型正置荧光显微镜;Motic BA410 研究型显微镜(加拿大麦克奥迪);Motic 6.0 数码医学图像分析系统(加拿大麦克奥迪);M5 迈瑞便携式彩色 B 超机(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);莱卡 RM2235 轮转石蜡切片机;金迪 YD-A 生物组织摊片机;DNP-9162 电热

恒温培养箱(上海一恒)。

### 1.2 方 法

1.2.1 HMG 模型兔的创建 56 只兔编号 1-56,抓阉法随机挑出 10 只为正常对照组编号 Z1-Z10、剩余 46 只为模型制备组,编号 M1-M46,参考文献[4]造模方法,正常对照组双大腿内外侧肌肉丰厚处交替肌注生理盐水,1 次/d,连续 30 d;模型制备组肌注(兽用)苯甲酸雌二醇 0.5 mg/kg,1 次/d,连续 25 d,随后肌注(人用)黄体酮 1 mg/kg,隔天 1 次,共 3 次。末次肌注 24 h 后将兔腹部脱毛观察乳房大体变化情况,两组均随机挑出 1 只兔处死,取第 2 对乳房做病理切片,显微镜下观察乳腺组织形态,确认造模成功。

1.2.2 分组与给药 将造模后的 45 只雌兔,按体质量由低到高编号 1-45,用随机数字表法随机编入模型对照组、RPSJKL 组和 CSRPKL 低、中、高剂量组 5 个组,加上正常对照组,共 6 个组,每组 9 只。采用灌胃给药,1 次/d,连续 3 月。按照徐叔云<sup>[5]</sup>《药理实验方法学》体表面积法换算,CSRPKL 中剂量组和 RPSJKL 组换算为临床日用量等效剂量,低、中、高剂量组按 1:2:4 的比例用药。每只兔每日灌胃药量分别为 RPSJKL 组 0.56 g/kg、CSRPKL 低剂量组 0.47 g/kg、中剂量组 0.94 g/kg、高剂量组 1.88 g/kg。正常对照组、模型对照组兔灌同体积的生理盐水。

1.2.3 B 超声像采集及病理取材 造模后及末次灌胃后 24 h,用 5%巴比妥钠 200 mg/kg 腹腔注射麻醉,仰面固定在解剖台上,先剪短腹部(锁骨→腹股沟)被毛,再均匀涂抹 8%硫化钠水溶液,几分钟后待被毛变成黄色粘稠液态物质,抹布蘸温水擦净,观察乳房大体变化,标号拍照。末次灌胃标号拍照后,用便携式彩超机采集第 2 对乳房的 B 超声像图,然后空气栓塞致死,剪取第 2 对乳房。

1.2.4 病理切片的制作与染色 (1)固定:将离体组织标本在 10%甲醛溶液中浸泡 24 h 以上;(2)脱水、透明、石蜡包埋;(3)切片:蜡块连续切片,厚约 4 μm;(4)HE 染色:①二甲苯连续脱蜡 2 次,10 min/次;②梯度酒精复水,2~5 min/次;③苏木素染色,5~10 min;④水洗 时间随机;⑤蓝化 时间随机;⑥伊红液染色,1~3 min;⑦梯度酒精脱水,2~5 min/次;⑧二甲苯两步透明;(5)中性树脂封片,标

号及标示左右。

1.2.5 组织形态学观测 用 Motic BA410 研究型显微镜在 10×10 倍光镜下观察经 HE 染色后的病理切片,用 Motic 6.0 数码医学图像分析系统采集图像,每只兔观测左、右二张切片,每张切片观测 4 个视野,计数每个视野中乳腺小叶腺泡数、腺泡腔直径和导管上皮细胞层数,取 4 个视野的平均值作为该切片的数值,取左、右二张切片的平均值作为该只兔的最终值。

### 1.3 统计学处理

实验数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表达,用 SPSS 17.0 统计软件统计数据,采用单因素方差分析 LSD 法、Dunnett's T3 法进行数据分析, $P < 0.05$  时差异有统计学意义, $P < 0.01$  时差异有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 造模后乳房大体变化

末次肌注激素 24 h 后将兔腹部脱毛,观察见:两组雌兔各乳头均充血增大,其中第 2 对最明显(正常对照组见图 1A,模型制备组见图 1B)。



A.正常对照组 B.模型制备组

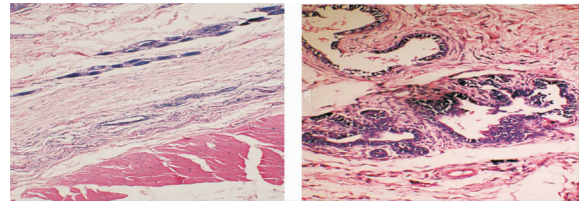
图 1 兔腹部 4 对乳房大体照片

### 2.2 HMG 兔模型的评价

显微镜下观察处死的正常对照组和模型制备组雌兔的乳腺组织病理切片,可见正常乳腺组织(图 2A)小叶腺泡数较少,导管上皮细胞排列整齐,导管腔基本无扩张。模型制备组(图 2B)乳腺小叶腺泡数增加,导管上皮细胞层数增加、结构紊乱,腺泡腔明显扩张,腔内可见脱落的上皮细胞及分泌物,参考文献<sup>[9]</sup>标准,可以判定造模成功。

### 2.3 干预后乳房 B 超声像表现

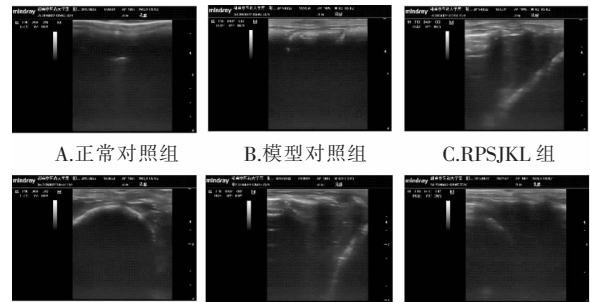
正常对照组(图 3A)乳腺腺体层不增厚,模型对照组(图 3B)乳腺腺体增厚,回声强弱不一,内部光点增粗,回声区形状近似介于椭圆形和梭形之间,药物干预后,RPSJKL 组(图 3C)和 CSRPKL 低剂量组(图 3D)乳腺组织稍厚,低回声区呈长条形,其中 RPSJKL 组的面积小于低剂量组;中剂量组(图 3E)乳腺组织类似半椭圆形,中央回声稍高;高剂量组(图 3F)乳腺



A.正常对照组 B.模型制备组

图 2 兔第 2 对乳腺组织病理切片光镜图(HE×100)

组织低回声区比 RPSJKL 组和低剂量组窄、厚,边界较模糊,形态略不规整。

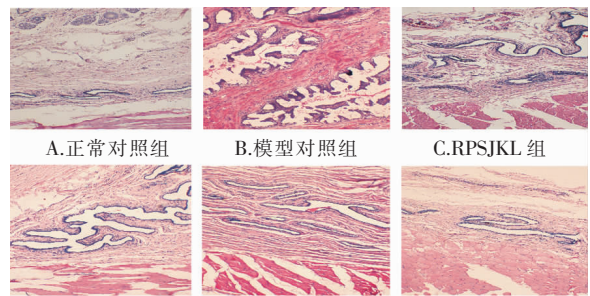


D.CSRPKL 低剂量组 E.CSRPKL 中剂量组 F.CSRPKL 高剂量组

图 3 兔乳房 B 超声图像

### 2.4 干预后兔乳腺组织病理形态学情况

由于实验正值梅雨季及酷夏,动物饲养环境一般,加之实验人员操作不熟练、动物不配合等原因,灌胃 3 月后仅剩 44 只雌兔。其中,模型对照组 1 只兔因奋力反抗肌注、灌胃等操作而双下肢瘫痪,1 只被野鼠咬伤感染而亡;CSRPKL 低剂量组因药液灌至肺内死亡 2 只,腹泻死亡 1 只;中剂量组死亡 2 只,高剂量组死亡 3 只,解剖见肺内有药液残留、胸腔大量炎性积液。6 组雌兔第 2 对乳腺组织病理切片详见图 4。



D.CSRPKL 低剂量组 E.CSRPKL 中剂量组 F.CSRPKL 高剂量组

图 4 兔乳腺组织病理切片光镜图(HE×100)

与正常对照组相比,模型对照组乳腺小叶腺泡数、导管上皮细胞层数增多( $P < 0.05$ ),腺泡腔直径显著扩张( $P < 0.01$ ),造模效果好。干预后,与模型组相比,CSRPKL 低剂量组乳腺小叶腺泡数减少( $P < 0.05$ ),



CSRPKL 中、高剂量组导管上皮细胞层数减少 ( $P < 0.05$ ), RPSJKL 组及 CSRPKL 低、中、高剂量组腺泡腔直径均明显缩小 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

表 1 各组乳腺小叶腺泡数、导管上皮细胞层数、腺泡腔直径比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	腺泡腔直径比较 ( $\bar{x} \pm s$ )		
		乳腺小叶腺泡数(个)	导管上皮细胞层数(层)	腺泡腔直径( $\mu\text{m}$ )
正常对照组	9	4.58±3.65	1.07±0.65	56.73±12.80
模型对照组	7	10.42±4.27 <sup>●</sup>	2.25±0.45 <sup>●</sup>	108.85±24.88 <sup>●●</sup>
RPSJKL 对照组	9	6.90±2.50	1.83±0.39	79.04±23.04 <sup>▲▲</sup>
CSRPKL 低剂量组	6	4.75±2.26 <sup>▲</sup>	1.65±0.45	73.81±19.78 <sup>▲▲</sup>
CSRPKL 中剂量组	7	6.92±3.37	1.43±0.49 <sup>▲</sup>	67.48±13.50 <sup>▲▲</sup>
CSRPKL 高剂量组	6	5.83±2.76	1.43±0.49 <sup>▲</sup>	73.07±16.74 <sup>▲▲</sup>

注:与正常对照组相比,● $P < 0.05$ ,●● $P < 0.01$ ;与模型对照组相比,▲ $P < 0.05$ ,▲▲ $P < 0.01$ 。

### 3 分析与讨论

HMG 主要病因为内分泌失调,属慢性疾病。目前,诊断 HMG 的首选检查方法是 B 超<sup>[7]</sup>,无创、可反复使用;确诊 HMG 的方法是病理检查,但有创,患者不易接受。常用治疗 HMG 的西药有激素类、维生素类、碘制剂、利尿消肿药和止痛剂。激素类药物会加重机体内分泌失调,停药后乳房疼痛加重,出现子宫内膜增厚甚至癌变、月经不调等副反应;碘制剂有导致甲状腺功能障碍的风险;维生素类没有直接抗增生作用,疗效不确切;利尿消肿药和止痛剂也是“治标不治本”。而据统计,中医药治疗 HMG 的平均有效率为(93.50±6.45)%<sup>[8]</sup>,能有效控制 HMG 的临床症状,副反应也较少。因此,对临床疗效显著的柴芍乳癖颗粒开展相关研究具有较高价值和重要意义。

HMG 以乳房疼痛和肿块为主要临床表现,属中医学“乳癖”范畴,由郁怒伤肝、思虑伤脾、气滞血瘀、痰凝成核,气、血、痰三者夹杂同时致病<sup>[9]</sup>。柴芍乳癖颗粒由 14 味中药组成,针对乳癖的病因病机,方中君药柴胡疏肝解郁,白芍养血敛阴、柔肝止痛;臣药青皮疏肝破气、消积化滞,郁金活血止痛、行气解郁,白术和茯苓益气健脾、利水渗湿,当归活血补血,佐药瓜蒌皮、浙贝母和橘核清热化痰、理气宽胸、散结止痛,使药川楝子行气止痛,王不留行活血通经,莪术破血行气、消积止痛,丹参活血祛瘀止痛,牡蛎软坚散结,夏枯草清肝泻火、散结消肿。诸药合用,共奏疏肝理气、健脾益气、除湿化痰、活血化瘀、散结止痛之功。

本研究通过创建模拟人类 HMG 的兔模型,进行长期药物干预实验,既能减轻患者的痛苦,又能减少患者依从性不高对实验结果的影响。通过研究发现:在 B 超声像方面,柴芍乳癖颗粒能缩小增生乳腺组织回声区范围,降低乳腺组织内部回声强度。在乳腺组织病理形态学方面,柴芍乳癖颗粒减轻增生的作用是值得肯定的,低剂量组能减少乳腺小叶腺泡数,中、高剂量组可以减少导管上皮细胞层数,低、中、高剂量组均能明显缩小腺泡腔直径。但与正常对照组相比,各用药组均未恢复至乳腺无增生状态,可能与中药起效慢有关。另外,从乳房大体照片上可以看出:实验中正常对照组雌兔乳头亦充血增大,可能与兔龄增长自然发育有关,属正常生理现象,病理切片显示兔乳头充血增大与乳腺组织增生无必然联系。

目前,中医药治疗 HMG 的动物实验多采用小鼠、大鼠造模,采用兔的很少,而且已查阅到的文献内建立 HMG 动物模型的部分激素已经停产。因此,本实验参考前人研究成果,创新性采用兽用激素注射液进行造模,并在激素使用剂量和次数上进行探索。实验发现:肌注(兽用)苯甲酸雌二醇注射液 0.5 mg/kg,1 次/d,连续 25 d,随后肌注(人用)黄体酮注射液 1 mg/kg,隔天 1 次,共 3 次,可创建出 HMG 兔模型。病理观测造模效果好,希望对后续研究者起到一定的参考作用。本文的造模方法前期仅进行过 1 次预实验,模型的重复性和稳定性有待后续研究者进一步实验后评判。

### 参考文献:

- [1] 张保宁.乳腺肿瘤学[M].北京:人民卫生出版社,2013:453.
- [2] 徐春红.乳腺增生病的流行病学综述[J].北方药学,2013,12:92-93.
- [3] 王月,刘丽芳.柴芍乳癖汤治疗乳腺增生疗效观察[J].广西中医药,2012,1:14-15.
- [4] 陈晰,秦优优,张建国,等.消乳散结胶囊治疗兔乳腺增生的实验研究[J].现代生物医学进展,2012,12(32):6249-6252,6281.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1861.
- [6] 陈静,李渤文,孟宪波,等.消癖颗粒对家兔乳腺增生模型的影响[J].齐鲁药事,2007,26(7):427-428.
- [7] 李晓曦.乳腺增生症的诊断[J].临床外科杂志,2007,15(6):374-375.
- [8] 刘晓雁,刘鹏熙,李广曦.乳腺增生症的中医辨证用药规律分析[J].江苏中医药,2007,39(6):53.
- [9] 刘靖,靳小磊,耿刚.乳腺增生病发病因素的分析[J].内蒙古中医学,2010,29(5):121-123.

(本文编辑 杨 璞)