

二苯乙烯苷的雌激素样作用及其对性未成熟小鼠子宫ER表达的影响[△]

朱 璨^{1*},李尧锋¹,彭 芳¹,陈天琪¹,陆 海²,刘 成²,杨长福^{1#},王和生¹(1.贵阳中医学院基础医学院,贵阳 550025;2.贵阳中医学院药学院,贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1031-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.05

摘要 目的:探讨二苯乙烯苷(TSG)的雌激素样作用,以及其对性未成熟小鼠子宫雌激素受体(ER)表达的影响。方法:将60只性未成熟雌性昆明种小鼠随机分为正常组,阳性对照组(戊酸雌二醇,0.18 mg/kg),TSG低、高剂量组(50、150 mg/kg),TSG低、高剂量+戊酸雌二醇组(剂量同单用组)。正常组小鼠灌胃等体积水,各给药组小鼠灌胃相应药物溶液0.2 mL/10 g,早晚各1次,连续5 d。末次给药次日,测定并计算各组小鼠子宫指数和体质量增幅;采用酶联免疫吸附测定法检测其血清雌激素[雌二醇(E₂)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)]含量;采用苏木精-伊红染色法观察其子宫组织形态学特征,并检测子宫管径和子宫内膜厚度;采用免疫组织化学染色法检测其子宫组织中ER(ER- α 、ER- β)的表达水平。结果:正常组小鼠子宫肌层排列平行、紧密,子宫上皮呈单层柱状,ER- α 、ER- β 表达较少;各给药组小鼠子宫管径、内膜及上皮均不同程度地增大、增厚或增生,ER- α 、ER- β 表达有所变化。与正常组比较,各给药组小鼠子宫指数(阳性对照组、TSG高剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组)、体质量增幅(阳性对照组、TSG高剂量组、TSG低剂量+戊酸雌二醇组)、子宫管径及内膜厚度(阳性对照组、TSG低剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组)、ER- α 的表达量(阳性对照组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组)、ER- β 的表达量(阳性对照组、TSG高剂量组+戊酸雌二醇联用组)均显著升高,血清LH(阳性对照组、TSG高剂量组)、FSH(TSG低剂量+戊酸雌二醇组)水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫指数、子宫管径及内膜厚度、ER- α 及ER- β 的表达量以及TSG低剂量+戊酸雌二醇组小鼠体质量增幅、血清E₂含量均显著高于TSG同剂量单用组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TSG各剂量组小鼠子宫指数、子宫管径及内膜厚度、ER- α 及ER- β 的表达量,TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫管径、ER- β 的表达量以及TSG低剂量组小鼠体质量增幅均显著低于阳性对照组,而TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠血清LH水平均显著高于阳性对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:TSG可一定程度地增加性未成熟小鼠的子宫指数和体质量,并调节其体内雌激素水平,增加子宫管径及内膜厚度,上调子宫组织中ER的表达,具有一定的雌激素样作用。但这种作用弱于戊酸雌二醇,且两者联合使用可能会拮抗戊酸雌二醇的作用。

关键词 二苯乙烯苷;性未成熟小鼠;雌激素受体;雌激素样作用;戊酸雌二醇

Estrogen-like Effect of Tetrahydroxy Stilbene Glucoside and Its Effects on the Expression of ER in Uterus of Sexually Immature Mice

ZHU Can¹, LI Yaofeng¹, PENG Fang¹, CHEN Tianqi¹, LU Hai², LIU Cheng², YANG Changfu¹, WANG Hesheng¹
(1. School of Basic Medicine, Guiyang College of TCM, Guiyang 550025, China; 2. School of Pharmacy, Guiyang College of TCM, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate estrogen-like effect of tetrahydroxy stilbene glucoside (TSG) and its effects on the expression of estrogen receptor (ER) in uterus of sexually immature mice. METHODS: Totally 60 sexually immature Kunming mice were randomly divided into normal group, positive control group (estradiol valerate, 0.18 mg/kg), TSG low-dose and high-dose groups (50, 150 mg/kg), TSG low-dose and high-dose groups+estradiol valerate groups (same dose as medication alone group). Normal group was given constant volume of water intragastrically, and administration groups were given relevant medicine 0.2 mL/10 g, once morning and night, for consecutive 5 d. The uterus index and body weight increase of mice in each group were determined and calculated the next day after the last administration. The contents of serum estrogen (E₂, LH, FSH) were determined by ELISA. HE staining was used to observe the morphology characteristics of uterus, and uterine tube diameter and endometrial thickness were detected. The expression of ER (ER- α and ER- β) in uterus was detected by immunohistochemical staining. RESULTS: The myometrium of the mice in normal group was parallel and compact, the epithelium of the uterus was columnar, and the expression of ER- α and ER- β was low. The uterine tube diameter, endometrium and epithelium of mice in each administration group increased, thickened or proliferated in varying degrees,

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460670);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(No.黔教合KY字[2017]181);贵州省中西医结合基础省级重点培育学科(No.黔学学位合字ZDXK[2016]25号);贵阳中医学院科研项目(No.贵中医科院内[2016]33号)

* 助教,硕士。研究方向:中医药防治生殖系统疾病。电话:0851-88308013。E-mail:992204746@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药及天然药物防治疾病的生物化学机制。电话:0851-88308013。E-mail:zfy435140961@qq.com

and the expression of ER- α and ER- β changed. Compared with normal group, uterus indexes (positive control group, TSG high-dose group, TSG+estradiol valerate groups), the increase of body weight (positive control group, TSG high-dose groups, TSG low-dose+estradiol valerate group), uterine tube diameter and endometrial thickness (positive control group, TSG low-dose group, TSG+estradiol valerate groups), the expression of ER- α (positive control group, TSG+estradiol valerate groups) and the expression of ER- β (positive control group, TSG high-dose+estradiol valerate group) were increased significantly, while serum contents of LH (positive control group, TSG high-dose group) and FSH (TSG low-dose+estradiol valerate group) were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The uterus index, uterine tube diameter, endometrial thickness and the expression in ER- α and ER- β of TSG+estradiol valerate groups, the increase of body weight and serum content of E_2 in TSG low-dose+estradiol valerate group were significantly higher than same TSG dose alone groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). The uterus index, uterine tube diameter, endometrial thickness and the expression of ER- α and ER- β in TSG groups, uterine tube diameter and the expression of ER- β in TSG+estradiol valerate groups, body weight increase of mice in TSG low-dose group were significantly lower than positive control group, while serum content of LH in TSG+estradiol valerate groups were significantly higher than positive control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: TSG can increase uterus indexes and body weight of sexually immature mice to certain extent, regulate estrogen level, increase the diameter of uterine tube and endometrial thickness and up-regulate the expression of ER in the uterus, showing certain estrogen-like effect, which is weaker than that of estradiol valerate. Combined use of them may antagonize the effect of estradiol valerate.

KEYWORDS Estradiol valerate; Sexually immature mice; Estrogen receptor; Estrogen-like effect; Estradiol valerate

长期以来,雌激素水平低下引发的更年期综合征、心血管疾病、骨质疏松等疾病严重影响着女性生活质量。雌激素替代疗法虽疗效显著,但如高血压、水肿、痴呆等副作用较多,且会增加雌激素依赖性肿瘤的发生风险^[1]。因此,天然的、具有雌激素样活性且不良反应相对较少的植物雌激素(PE)逐渐成为业界研究的热点。有研究发现,PE可用于治疗围绝经期综合征、骨质疏松、心血管疾病、肥胖、代谢综合征等疾病,疗效确切^[2]。

制首乌为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)干燥块根的炮制加工品。现代研究表明,制首乌具有雌激素样作用,可改善衰老模型大鼠血清性激素水平,预防和延缓其颗粒细胞凋亡^[3-4]。本课题组前期亦发现,制首乌水煎液可调节去卵巢大鼠的生殖轴,亦能抑制雷公藤多苷对大鼠生殖功能的破坏作用^[5-6]。制首乌的主要活性成分为二苯乙烯苷(TSG),易溶于水,其含量是制首乌药材质量控制的专属性指标^[7]。有研究指出,TSG能抗衰老、防治骨质疏松、改善血管性痴呆^[8-12]。鉴于此,本研究以刚断乳且性未成熟的雌性小鼠为对象,通过检测其经TSG处理后的血清性激素水平、子宫组织形态和雌激素受体(ER,分为ER- α 、ER- β 亚型)表达情况,评价TSG的雌激素样作用,以期为制首乌雌激素样作用的物质基础研究以及临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

TG20-WS型高速离心机(湖南湘立科学仪器有限公司);Varioskan Flash型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);BX53F型生物显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

TSG对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:J1708Z45941,纯度: $\geq 98\%$);戊酸雌二醇片(阳性对照,德国Jenapharm GmbH & Co. KG,注册证号:国药准字J20171038,规格:1 mg);兔ER- α 多克隆抗体(美国Abcam公司,批号:GR3203259-1);兔ER- β 多克隆抗体(美国Affinity Biologicals公司,批号:66v5464);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L)二抗、二氨基联苯胺(DAB)辣根过氧化物酶显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为01151818022、112117180301);雌二醇(E_2)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为T1U811PA、A8Z7SYMP、MX6L1XTQ);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级雌性昆明种小鼠60只,出生21 d(刚断乳、性未成熟),体质量8~11 g,由重庆医科大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(渝)2017-0001]。所有小鼠均分笼饲养,每笼5只,人工控制室温为(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度为42%~62%,昼夜节律12 h。小鼠均自由饮水、进食,适应性饲养4 d。

2 方法

2.1 分组与给药

将小鼠随机分为6组,即正常组,阳性对照组,TSG低、高剂量组,TSG低、高剂量+戊酸雌二醇组,每组10只。分组后称定并记录小鼠体质量。正常组小鼠灌胃等体积水,各给药组小鼠均灌胃相应药物溶液(均以水为溶剂制备)0.2 mL/10 g,早晚各1次,连续5 d。其中,阳性对照组小鼠给予戊酸雌二醇(0.18 mg/kg,根据临床

成人等效剂量换算而得), TSG 低、高剂量组小鼠给予 TSG(50、150 mg/kg, 剂量根据文献[13]及前期预实验结果设置), TSG 低、高剂量+戊酸雌二醇组小鼠同时给予 TSG 和戊酸雌二醇(剂量同单用组)。

2.2 小鼠子宫指数和体质量增幅测定

末次给药次日, 采用眼球摘除法取血。血样室温静置 2 h 后, 以 1 000×g 离心 20 min, 取上层血清, 于 -20 °C 保存, 备用。断颈处死小鼠后, 迅速剖取子宫, 剔除多余组织, 称定子宫质量, 计算小鼠子宫指数(子宫指数=子宫湿质量/体质量×100%)。分别于给药前以及末次给药次日称定各组小鼠体质量, 并计算体质量增幅[体质量增幅=(给药后体质量-给药前体质量)/给药前体质量×100%]。

2.3 小鼠血清 E₂、LH、FSH 含量检测

取“2.2”项下血清样品适量, 采用 ELISA 法以酶标仪于 450 nm 波长下检测血清 E₂、LH、FSH 含量, 严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.4 小鼠子宫组织形态学观察及子宫管径、内膜厚度检测

称定小鼠子宫质量后, 立即用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 下同)清洗, 于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 经乙醇梯度脱水、透明、石蜡包埋后, 切片(厚度约 5 μm), 常规苏木精-伊红(HE)染色, 封片。每组选取 6 张切片, 置于生物显微镜下观察其子宫组织形态学特征, 并采用 CellSens Stantard 1.0 软件定量检测其子宫管径和内膜厚度。

2.5 小鼠子宫组织 ER 表达情况检测

采用免疫组织化学染色法(IHC)检测。取“2.4”项下石蜡切片, 经常规脱蜡、水化后, 微波修复, 以 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 用 PBS 清洗后, 滴加相应一抗(1:100), 于 4 °C 孵育过夜; 次日用 PBS 清洗后, 滴加相应二抗(1:50), 室温孵育 30 min, 用 PBS 清洗后, 以 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒显色, 用水清洗, 以苏木精复染, 脱水、透明、封片后, 置于生物显微镜下观察, 细胞核被染为棕黄色者为 ER-α、ER-β 表达阳性。采用 Image-Pro Express 5.1 图像处理软件分析阳性区域的灰度值, 用以表示 ER-α、ER-β 的表达量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TSG 对性未成熟小鼠子宫指数和体质量增幅的影响

与正常组比较, 阳性对照组、TSG 高剂量组、TSG 各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫指数均显著升高, 且 TSG 各剂量+戊酸雌二醇组均显著高于 TSG 同剂量单用组,

而 TSG 各剂量组显著低于阳性对照组, 差异均有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。与正常组比较, 阳性对照组、TSG 高剂量组、TSG 低剂量+戊酸雌二醇组小鼠体质量增幅均显著升高, 且 TSG 低剂量+戊酸雌二醇组显著高于 TSG 低剂量组, 而 TSG 低剂量组显著低于阳性对照组, 差异均有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01), 详见表 1。

表 1 TSG 对性未成熟小鼠子宫指数、体质量增幅的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Effects of TSG on uterus index and body weight increase in sexually immature mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	子宫指数, %	体质量增幅, %
正常组	0.059±0.008	39.942±6.553
阳性对照组	0.711±0.421 [*]	59.811±6.992 ^{**}
TSG 低剂量组	0.051±0.004 [#]	43.893±8.256 [#]
TSG 高剂量组	0.119±0.018 ^{**#}	55.960±9.631 [*]
TSG 低剂量+戊酸雌二醇组	0.368±0.154 ^{**Δ}	57.110±5.489 ^{**Δ}
TSG 高剂量+戊酸雌二醇组	0.467±0.135 ^{**Δ}	51.136±13.001

注: 与正常组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与 TSG 同剂量单用组比较, ΔP<0.05, ΔΔP<0.01; 与阳性对照组比较, #P<0.05

Note: vs. normal group, *P<0.05, **P<0.01; vs. same TSG dose alone group, ΔP<0.05, ΔΔP<0.01; vs. positive control group, #P<0.05

3.2 TSG 对性未成熟小鼠血清 E₂、LH、FSH 含量的影响

与正常组比较, 阳性对照组、TSG 高剂量组小鼠 LH 含量以及 TSG 低剂量+戊酸雌二醇组小鼠血清 FSH 含量均显著降低, 而 TSG 低剂量+戊酸雌二醇组小鼠血清 E₂ 水平显著高于 TSG 低剂量组, TSG 各剂量+戊酸雌二醇组小鼠血清 LH 含量均显著高于阳性对照组, 差异均有统计学意义(P<0.05); 而其余各组上述指标组间比较, 差异均无统计学意义(P>0.05), 详见表 2。

表 2 TSG 对性未成熟小鼠血清 E₂、LH、FSH 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Effects of TSG on serum contents of E₂, LH and FSH in sexually immature mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	E ₂ , pg/mL	LH, ng/mL	FSH, ng/mL
正常组	2.368±0.034	0.430±0.008	0.484±0.010
阳性对照组	2.373±0.003	0.378±0.004 [#]	0.477±0.017
TSG 低剂量组	2.325±0.006	0.395±0.012	0.421±0.002
TSG 高剂量组	2.397±0.086	0.388±0.001 [#]	0.469±0.024
TSG 低剂量+戊酸雌二醇组	2.359±0.003 ^Δ	0.403±0.002 [#]	0.414±0.012 [#]
TSG 高剂量+戊酸雌二醇组	2.498±0.095	0.432±0.007 [#]	0.451±0.059

注: 与正常组比较, *P<0.05; 与 TSG 同剂量单用组比较, ΔP<0.05; 与阳性对照组比较, #P<0.05

Note: vs. normal group, *P<0.05; vs. same TSG dose alone group, ΔP<0.05; vs. positive control group, #P<0.05

3.3 TSG 对性未成熟小鼠子宫管径、内膜厚度的影响

正常组小鼠子宫肌层排列平行、紧密, 子宫腺散在分布于固有层, 子宫上皮呈单层柱状。各给药组小鼠子

宫管径增大,子宫内膜增厚,腺体数量增多,其中阳性对照组、TSG低剂量+戊酸雌二醇组子宫上皮增生为复层,详见图1。

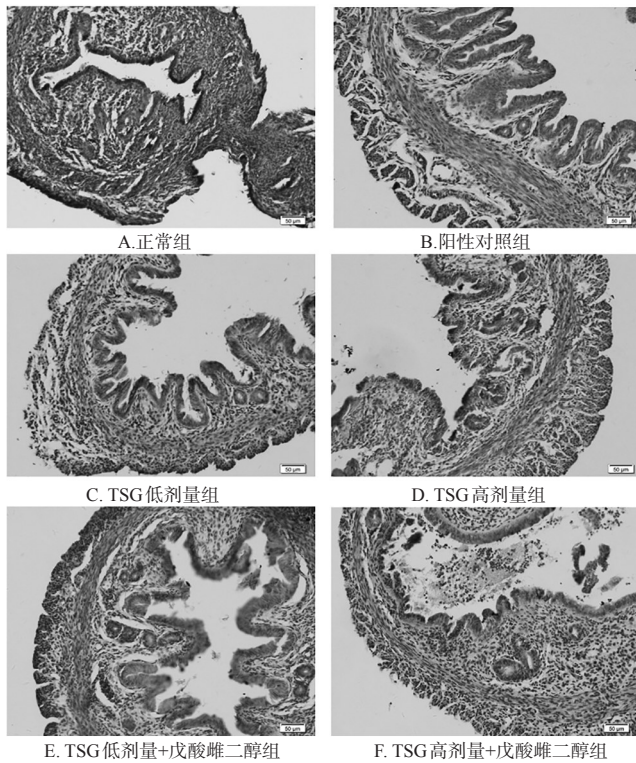


图1 各组小鼠子宫组织形态学显微图(HE染色,×200)
Fig 1 Morphological micrographs of uterine tissue section of mice in each group (HE staining, ×200)

与正常组比较,阳性对照组、TSG低剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫管径显著增大、子宫内膜显著增厚,且TSG各剂量组+戊酸雌二醇组小鼠上述指标均显著高于TSG同剂量单用组,而TSG各剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫管径以及TSG各剂量组小鼠子宫内膜厚度均显著低于阳性对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表3。

表3 TSG对性未成熟小鼠子宫管径、内膜厚度以及ER表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Effects of TSG on uterine tube diameter, endometrial thickness and the expression of ER in sexually immature mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	子宫管径, μm	子宫内膜厚度, μm	ER- α	ER- β
正常组	533.68 ± 57.74	10.92 ± 0.39	109.926 ± 2.029	104.856 ± 1.222
阳性对照组	921.98 ± 14.62**	20.97 ± 4.01**	119.928 ± 0.113*	113.677 ± 1.249**
TSG低剂量组	651.85 ± 80.88***	13.97 ± 2.10**	113.817 ± 0.262**	100.797 ± 0.247**
TSG高剂量组	546.43 ± 48.64**	11.79 ± 0.99**	113.958 ± 0.125**	101.756 ± 1.406**
TSG低剂量+戊酸雌二醇组	725.53 ± 21.65* ^Δ	18.61 ± 2.41** ^Δ	118.904 ± 0.128* ^Δ	105.027 ± 0.965 ^Δ **
TSG高剂量+戊酸雌二醇组	686.33 ± 45.34* ^Δ	16.00 ± 2.08* ^Δ	117.659 ± 0.627* ^Δ	108.326 ± 1.036* ^Δ **

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与TSG同剂量单用组比较,^Δ $P<0.01$;与阳性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. same TSG dose alone group, ^Δ $P<0.01$; vs. positive control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.4 TSG对性未成熟小鼠子宫组织ER表达的影响

由DAB染色结果可见,ER- α 、ER- β 在小鼠子宫黏膜层、肌层、浆膜层均有表达。正常组小鼠子宫组织ER- α 、ER- β 的表达均较少。与正常组比较,各给药组小鼠子宫组织ER- α 、ER- β 的表达均有所变化,其中阳性对照组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫组织ER- α 的表达量以及阳性对照组、TSG高剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫组织ER- β 的表达量均显著提高,且TSG各剂量组+戊酸雌二醇组ER- α 、ER- β 的表达量均显著高于TSG同剂量单用组,而TSG各剂量组ER- α 表达量以及TSG各剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组ER- β 表达量均显著低于阳性对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图2、图3、表3。

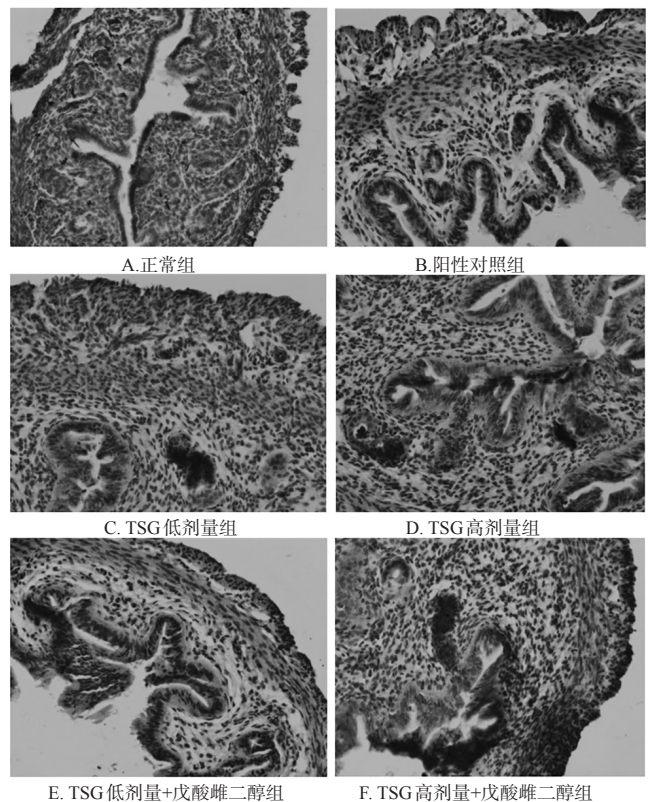


图2 各组小鼠子宫组织ER- α 表达的显微图(DAB染色,×200)

Fig 2 Micrographs of the expression of ER- α in uterine of mice in each group (DAB staining, ×200)

4 讨论

PE与雌激素结构类似,可与体内ER结合并发挥雌激素样作用;同时,PE也可导致靶组织中ER表达水平发生相应变化^[2]。ER包括ER- α 和ER- β 两种亚型,前者的总体活性更高^[14]。有研究表明,PE对机体具有双重调节作用:一方面,当体内雌激素水平较低时,PE可与ER结合发挥雌激素样作用,以防治绝经后雌激素水平过低所引发的健康问题^[15-19];另一方面,当体内雌激素水平较高时,PE可通过竞争性结合靶细胞ER而产生抗雌激素

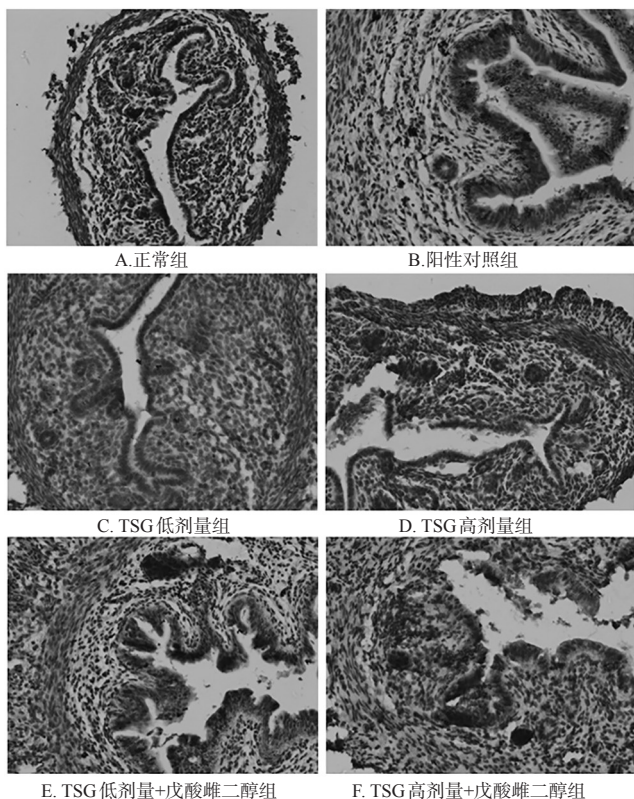


图3 各组小鼠子宫组织ER-β表达的显微图(DAB染色, ×200)

Fig 3 Micrographs of the expression of ER-β in uterine of mice in each group (DAB staining, ×200)

作用,从而抑制雌激素依赖性肿瘤细胞的增殖,并诱导其凋亡^[20-23]。

小鼠子宫增重实验常用来评价药物的雌激素样作用^[24]。因子宫组织富含ER,当PE与ER结合后,可诱导子宫靶蛋白(IPs)含量增加,从而刺激子宫增重。为尽量减少内源性雌激素对实验的干扰,本研究选用断乳、性未成熟的雌性小鼠,测定其给药后的子宫指数。结果发现,与正常组比较,阳性对照组、TSG高剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫指数均显著升高,且TSG各剂量+戊酸雌二醇组均显著高于TSG同剂量单用组,而TSG各剂量组显著低于阳性对照组;阳性对照组、TSG高剂量组、TSG低剂量+戊酸雌二醇组小鼠体质量增幅均显著升高,且TSG低剂量+戊酸雌二醇组显著高于TSG低剂量组,而TSG低剂量组显著低于阳性对照组。这表明TSG对性未成熟小鼠子宫的生长发育具有一定的促进作用,但这种雌激素样作用弱于阳性对照药物及两者联用。

在正常的生理状态下,LH、FSH共同调控机体生殖系统内分泌功能:当血清E₂含量升高时,在生殖轴负反馈调节作用下,腺垂体FSH和LH的分泌量将会降低^[25]。本研究考察并比较了各组小鼠的血清性激素含量。结果显示,与正常组比较,阳性对照组、TSG高剂量组小鼠

LH含量以及TSG低剂量+戊酸雌二醇组小鼠血清FSH含量均显著降低,而TSG低剂量+戊酸雌二醇组小鼠血清E₂水平显著低于TSG低剂量组,TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠血清LH含量均显著高于阳性对照组。这提示TSG具有一定的雌激素样作用,可一定程度地调节小鼠血清雌激素含量,但这种作用普遍弱于阳性对照药物。

小鼠子宫组织HE染色结果显示,正常组小鼠子宫肌层排列平行、紧密,子宫腺散在分布于固有层,子宫上皮为单层柱状上皮;各给药组小鼠子宫管径增大,子宫内膜增厚,腺体数量增多。与正常组比较,阳性对照组、TSG低剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫管径显著增大、子宫内膜显著增厚,且TSG各剂量组+戊酸雌二醇组小鼠上述指标显著高于TSG同剂量单用组,而TSG各剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇联用组小鼠子宫管径以及TSG各剂量组小鼠子宫内膜厚度均显著低于阳性对照组。经DAB染色可见,ER在小鼠子宫黏膜层、肌层、浆膜层均有表达。与正常组比较,各给药组小鼠子宫组织ER的表达均有所变化,其中阳性对照组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫组织ER-α的表达量以及阳性对照组、TSG高剂量+戊酸雌二醇组小鼠子宫组织ER-β的表达量均显著提高,且TSG各剂量+戊酸雌二醇组ER-α表达量显著高于TSG同剂量单用组,而TSG各剂量组ER-α表达量以及TSG各剂量组、TSG各剂量+戊酸雌二醇组ER-β表达量均显著低于阳性对照组。两种染色结果均表明,TSG具有一定的雌激素样作用,但这种作用弱于阳性对照药物;当两者联合使用时,其作用强度强于TSG单用,但弱于阳性对照药物,与前文结果基本一致。笔者认为,两药联合可能会导致拮抗效应的出现,即TSG会削弱阳性对照药物的雌激素样效应:当体内雌激素水平较高时,TSG竞争性结合ER(包括ER-α、ER-β),而两者结合后的效应又弱于雌激素与ER结合后的效应,故表现出更弱的雌激素样作用^[26]。

综上所述,制首乌主要活性成分TSG可一定程度地增加性未成熟小鼠的子宫指数和体质量,并调节其体内雌激素水平,增加子宫管径及内膜厚度,上调子宫组织中ER的表达,具有一定的雌激素样作用。但这种作用弱于戊酸雌二醇,且两者联合使用可能会拮抗戊酸雌二醇的作用。本课题组将在本研究的基础上,进一步分析和探讨TSG发挥雌激素样作用的分子机制以及对雌激素依赖性肿瘤细胞的影响,以期为临床用药提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] 中华医学会妇产科分会.绝经过渡期和绝经后期激素补充治疗临床应用指南:2009版[J].中华妇产科杂志,2010,45(8):635-638.

- [2] 赵元,郑红霞,徐颖,等.中药植物雌激素的研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(18):3474-3483.
- [3] 李亚丽,张娜,郭文潮,等.衰老大鼠性激素与其受体的变化以及何首乌饮对其影响的研究[J].中国妇幼保健,2011,26(1):106-109.
- [4] 杨利娟,黄君梅,王飞.何首乌、骨碎补和淫羊藿的植物雌激素作用研究[J].中药与临床,2012,3(3):37-40.
- [5] 朱璨,李尧锋,杨长福,等.制首乌对去卵巢大鼠子宫指数和性激素水平的影响研究[J].中国民族民间医药,2017,26(10):25-27.
- [6] 朱璨,李尧锋,彭芳,等.制首乌对大鼠卵巢功能减退的影响研究[J].医学研究生学报,2018,31(6):602-607.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:176-177.
- [8] HUANG C, WANG YZ, WANG J, et al. TSG (2, 3, 4', 5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside) suppresses induction of pro-inflammatory factors by attenuating the binding activity of nuclear factor- κ B in microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2013. DOI:10.1186/1742-2094-10-129.
- [9] YANG XP, LIU TY, QIN XY, et al. Potential protection of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside against staurosporine-induced toxicity on cultured rat hippocampus neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2014. DOI:10.1016/j.neulet.2014.05.045.
- [10] ZHOU XX, YANG Q, XIE YH, et al. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against D-galactose induced aging process in mice[J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6(3):372-378.
- [11] 张金康.二苯乙烯苷防治骨质疏松的作用及相关机制研究[D].西安:第四军医大学,2013.
- [12] 马海涵,邵志成,陈力学,等.二苯乙烯苷对血管性痴呆大鼠室管膜细胞增殖的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(8):1162-1163.
- [13] 金波,黄晶晶,朱学鑫,等.制首乌二苯乙烯苷预防急性酒精性肝损伤作用及其机制[J].中华中医药杂志,2016,31(8):3333-3336.
- [14] 赵丕文.十种中药植物雌激素样作用及其机制的研究[D].北京:北京中医药大学,2007.
- [15] LAGARI VS, LEVIS S. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014. DOI:10.1016/j.jsbms.2012.12.002.
- [16] ABDI F, ALIMORADI Z, HAQI P, et al. Effects of phytoestrogens on bone mineral density during the menopause transition: a systematic review of randomized, controlled trials[J]. *Climacteric*, 2016, 19(6):535-545.
- [17] EDEN JA. Phytoestrogens for menopausal symptoms: a review[J]. *Maturitas*, 2012, 72(2):157-159.
- [18] TANTIKANLAYAPORN D, ROBINSON LJ, SUKSAMRARN A, et al. A diarylheptanoid phytoestrogen from *Curcuma comosa*, 1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-ol, accelerates human osteoblast proliferation and differentiation[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(8/9):676-682.
- [19] 祝强,王婧,董隽,等.雌激素受体 α 真核表达载体的构建及在大鼠骨髓基质干细胞中的表达[J].医学研究生学报,2014,27(1):34-37.
- [20] 张百红,岳红云.植物雌激素的激素样作用机制研究进展[J].现代肿瘤医学,2018,26(9):1444-1446.
- [21] CHEN J, HOU R, ZHANG X, et al. Calycosin suppresses breast cancer cell growth via ER β -dependent regulation of IGF-1R, p38 MAPK and PI3K/Akt pathways[J]. *PLoS One*, 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0142287.
- [22] CHEN J, LIU L, HOU R, et al. Calycosin promotes proliferation of estrogen receptor-positive cells via estrogen receptors and ERK1/2 activation in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2011, 308(2):144-151.
- [23] 孙素红,黄琴,曾峰.雌激素受体不同表达对局部晚期乳腺癌TC化疗方案的敏感性观察[J].中国药房,2009,20(20):1558-1559.
- [24] SHELBY MD, NEWBOLD RR, TULLY DB, et al. Assessing environmental chemicals forestro-genicity using a combination of in vitro and in vivo assays[J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104(12):1296-1300.
- [25] ORVIETO R, MELTCER S, LIBERTY G, et al. Does day-3 LH/FSH ratio influence in vitro fertilization outcome in PCOS patients under going controlled ovarian hyperstimulation with different GnRH-analogue? [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(6):422-424.
- [26] ARNAL JF, FONTAINE C, ABOT A, et al. Lessons from the dissection of the activation functions (AF-1 and AF-2) of the estrogen receptor alpha in vivo[J]. *Steroids*, 2013, 78(6):576-582.

(收稿日期:2018-07-07 修回日期:2018-12-29)

(编辑:张元媛)