

温经消瘀颗粒性激素调节作用的研究

陈超^{1,2}, 窦永起^{1*}, 滕鸣健¹

(1. 解放军总医院 中医院, 北京 100853; 2. 75180 部队医院, 广西 桂林 541005)

[摘要] **目的:**利用动物实验研究温经消瘀颗粒在性激素调节方面的作用机制。**方法:**SD大鼠40只,随机分为正常组,丹参酮组(0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹),温经消瘀颗粒低、中、高剂量组(5.1, 10.2, 20.4 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组8只。温经消瘀颗粒低、中、高剂量组及丹参酮组分别给予相应浓度温经消瘀颗粒溶液和丹参酮溶液 ig, 正常组予蒸馏水 ig, 连续7 d。ig 7 d后,腹主动脉取血,剪下子宫称质量,计算子宫系数、观察子宫病理,免疫组化法测子宫雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α),雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)表达,ELISA法检测大鼠血清中雌二醇(estradiol, E₂)与睾酮(testosterone, T)的含量。**结果:**各用药组子宫系数增加,以温经消瘀颗粒中、高剂量组最为明显($P < 0.01$)。各用药组子宫内膜组织增生明显,上皮由单层变成了复层,厚度明显增加。E₂含量,各组较正常组均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),以高剂量组最高;T含量,温经消瘀颗粒高剂量组最低($P < 0.01$)。大鼠子宫组织 ER α , ER β 的表达,各用药组均较正常组明显升高($P < 0.01$),温经消瘀颗粒各剂量组表达随剂量增加而增多。**结论:**温经消瘀颗粒具有促进雌激素、抑制雄激素分泌、增加雌激素受体表达的作用,且作用效果随剂量增加而增强。

[关键词] 温经消瘀颗粒; 雌激素受体; 睾酮; 雌二醇

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0119-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016040119

Regulatory Effect of Wenjing Xiaocuo Granules on Sex Hormone

CHEN Chao^{1,2}, DOU Yong-qi^{1*}, TENG Ming-jian¹

(1. General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. 75180 Military Hospital, Guilin 541005, China)

[Abstract] **Objective:** To study the regulatory mechanism of Wenjing Xiaocuo granules on sex hormone in an animal experiment. **Method:** Totally 40 SD rats were randomly divided into blank group, tanshinone group (0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹), Wenjing Xiaocuo granules of low, medium and high dose groups (0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹), with 8 rats in each group. Wenjing Xiaocuo granules low, medium and high dose groups and tanshinone group were gavaged corresponding Wenjing Xiaocuo granules solution and tanshinone solution, blank group was gavaged distilled water for 7 days. Seven days later, efforts were made to take blood from the abdominal aorta, and cut off the uterus and weigh it, then calculate the coefficient of uterus and observe uterine pathology. IHC was used to detect the changes of estrogen receptor α (ER α) and estrogen receptor β (ER β), ELISA was used to detect the content of estradiol (E₂) and testosterone (T) in the rats. **Result:** In all of treatment groups, uterus coefficient increased, particularly the Wenjing Xiaocuo granules medium and high dose group ($P < 0.01$). In all of treatment groups, uterine tissue hyperplasia was obvious, epithelial monolayer became stratified, the epithelial thickness also increased significantly. With respect to E₂ level, compared with the blank group, all other groups were significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$), particularly Wenjing Xiaocuo granules high dose group. The content of T in high dose group was the lowest ($P < 0.01$). Compared with blank group, the expressions of ER α and ER β of all other groups were significantly increased ($P < 0.01$), and the expressions of all Wenjing Xiaocuo granules groups

[收稿日期] 20150515(173)

[基金项目] 解放军总医院临床科研扶持基金项目(2012FC-ZHCG-1003)

[第一作者] 陈超, 硕士, 医师, 从事中西医结合临床工作, Tel: 010-66939456, E-mail: chenchao618@163.com

[通讯作者] * 窦永起, 硕士, 教授, 博士生导师, 主任医师, 从事中西医结合临床工作, Tel: 010-66939456, E-mail: dyqi_301@yeah.net

increased with the rise in dose. **Conclusion:** Wenjing Xiaocuo granules can promote the secretion of estrogen, suppress the secretion of androgen, and increase the expression of estrogen receptor, with the effect enhancing with the increasing dose.

[**Key words**] Wenjing Xiaocuo granules; estrogen receptor; testosterone; estradiol

痤疮是一种主要发生于颜面、胸背部的皮肤病,患病率高,且容易复发,如果治疗不得当,易遗留瘢痕,不仅影响容貌美观,也给患者造成一定的心理负担,影响生活质量。痤疮发病机制比较复杂,性激素的失调是其发生的一个重要原因。内分泌的紊乱是痤疮发生的另一个重要原因。自 1940 年 Hamilton 提出“男性激素样物质”参与痤疮的发病以来,痤疮与雄性激素之间的关系便一直备受学者们的关注,至今已有大量的临床及实验研究报道,但所得出的结论各不相同^[3]。温经消痤颗粒是根据临床经验方温经消痤汤制成,该方寒热并用,通补兼施,活血与祛瘀同用,使经脉畅通,寒去而热解,同时具有清热解毒等功效,临床上应用于治疗女性痤疮合并月经病疗效显著。为进一步探讨其作用机理,本实验从性激素调节的角度,观察了温经消痤颗粒对大鼠血清雌二醇(estradiol, E_2),睾酮(testosterone, T)及子宫雌激素受体 α (estrogen receptor α , $ER\alpha$),雌激素受体 β (estrogen receptor β , $ER\beta$)表达的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌性,体重 60 ~ 90 g(刚断乳),动物合格证号 SCXK(军)2012-0004,由军事医学科学院实验动物中心提供。动物饲养于光、暗各 12 h 恒温、恒湿的安静饲养室内。

1.2 仪器 BX60 型电子显微镜(日本 Olympus 公司),EG 1140H 型石蜡包埋机和 H1220 型切片机(德国 LEICA 公司),VICTOR X5 型多标记微孔板检测仪(PerkinElmer 公司)。

1.3 药物及试剂 温经消痤颗粒:由桂枝、川芎、吴茱萸、当归、牡丹皮、赤芍、黄柏组成(每克颗粒剂相当于生药 1.76 g,由解放军 302 医院中药制剂室提供);丹参酮胶囊(河北兴隆希力药业,批号 20140407),Rat E_2 ELISA 试剂盒(美国 Andygene 公司,批号 HTCH012),Rat 睾酮 ELISA 试剂盒(美国 Andygene 公司,批号 HTCH006),Rabbit Anti- $ER\alpha$ (博奥森公司,批号 bs-0122R),Rabbit Anti- $ER\beta$ (博奥森公司,批号 bs-0116R),免疫组化染色试剂盒(博奥森公司,批号 sp-0023)。

2 方法

2.1 动物分组 SD 大鼠 40 只随机分为正常组、丹

参酮组、温经消痤颗粒低剂量组、温经消痤颗粒中剂量组及温经消痤颗粒高剂量组,每组各 8 只。

2.2 给药 大鼠温经消痤颗粒低、中、高剂量组分别按 5.1, 10.2, 20.4 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ (分别相当于 1, 2, 4 倍临床等效剂量^[1-2])给予温经消痤颗粒溶液 ig ,阳性药组给予丹参酮 0.4 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ (相当于 1 倍临床等效剂量)溶液 ig ,正常组灌服同体积蒸馏水,每日 1 次,连续 7 d。

2.3 观察、取材与检测 所有大鼠于最后一次给药 2 h 后称取体重,1% 戊巴比妥钠溶液 5 $mL \cdot kg^{-1}$ 腹腔麻醉后,剖开腹腔,腹主动脉取血,迅速将子宫与周围组织分离后剪下子宫,称质量,放入 10% 甲醛溶液中固定。

2.3.1 大鼠子宫增重实验 取血后迅速分离并剪下子宫称重,计算子宫系数。

$$\text{子宫系数} = \frac{\text{子宫湿重 } g}{\text{体重 } g} \times 100\%$$

2.3.2 大鼠子宫组织 HE 染色 取各组大鼠子宫组织用生理盐水冲洗后,10% 甲醛溶液固定 24 ~ 48 h,经常规脱水、透明、浸蜡、包埋后制成蜡块,5 μm 切片,采用 HE 染色法染色。

2.3.3 免疫组化法检测大鼠子宫组织中 $ER\alpha$, $ER\beta$ 的表达 大鼠子宫经固定、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋切片后,采用免疫组化 SP 法检测大鼠子宫组织中 $ER\alpha$ 及 $ER\beta$ 的表达。

2.3.4 大鼠血清 E_2 , T 的检测 取血 1 ~ 2 mL,滴入试管内不抗凝,经离心取上清液备用。采用双抗体夹心 ELISA 法检测大鼠血清 E_2 , T 的含量。具体操作按照试剂盒说明,采用检测仪 450 nm 波长下测量吸光度 A ,通过标准曲线计算大鼠血清 E_2 , T 浓度。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,大鼠血清、子宫系数、 $ER\beta$ 经正态性及方差齐性检验后采用单因素方差分析,组间比较用 SNK 法; $ER\alpha$ 因方差不齐或非正态分布采用 Kruskal-Wallis 法秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠子宫系数的影响 大鼠子宫系数,与正常组比较,虽然各用药组子宫系数增加,但仅以温经

消瘦颗粒中剂量与高剂量组增长较为明显 ($P < 0.01$); 与丹参酮组比较, 温经消瘦颗粒各组统计学

差异不显著, 见表 1。

3.2 对大鼠子宫组织病理学变化的影响 光镜下

表 1 温经消瘦颗粒对大鼠子宫系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重/g	子宫湿重/g	子宫系数/%
正常	-	124.375 ± 9.219	0.068 ± 0.012	0.055 ± 0.009
丹参酮	0.4	129.500 ± 11.596	0.090 ± 0.029	0.068 ± 0.017
温经消瘦颗粒	5.1	126.362 ± 5.648	0.075 ± 0.012	0.060 ± 0.009
	10.2	126.862 ± 7.301	0.101 ± 0.015	0.079 ± 0.011 ¹⁾
	20.4	127.175 ± 8.710	0.104 ± 0.019	0.082 ± 0.013 ¹⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

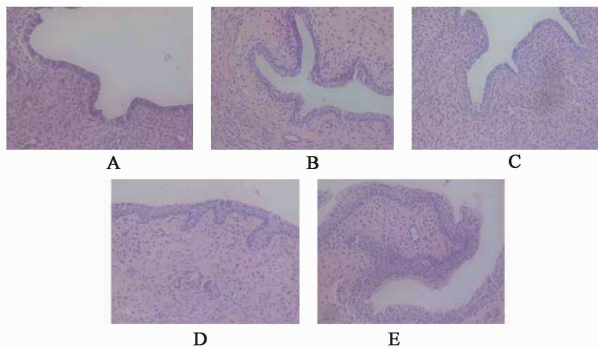
观察可见, 正常组子宫上皮细胞呈单层柱状排列, 丹参酮组及温经消瘦颗粒低剂量组子宫组织局部增生明显, 上皮由单层变成了复层, 上皮高度亦明显增加, 而温经消瘦低、中、高剂量组子宫内膜上皮则变成多层, 厚度增加明显。各用药组与正常组比较差异明显。见图 1。

表 2 温经消瘦颗粒对大鼠子宫 ER α , ER β 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Wenjing Xiaocuo granules on expression of rat uterus ER α , ER β ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ER α	ER β
正常	-	0.059 ± 0.011	0.082 ± 0.005
丹参酮	0.4	0.102 ± 0.010 ¹⁾	0.107 ± 0.008 ¹⁾
温经消瘦颗粒	5.1	0.099 ± 0.006 ¹⁾	0.122 ± 0.006 ^{1,2)}
	10.2	0.126 ± 0.012 ^{1,2)}	0.138 ± 0.011 ^{1,2)}
	20.4	0.137 ± 0.009 ^{1,2)}	0.147 ± 0.008 ^{1,2)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与丹参酮组比较²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组; B. 丹参酮组; C. 温经消瘦颗粒 5.1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 温经消瘦颗粒 10.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 温经消瘦颗粒 20.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (图 2 ~ 3 同)

图 1 温经消瘦颗粒对大鼠子宫组织病理变化的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effects of Wenjing Xiaocuo granules on rat uterus tissues of pathological structures (HE, $\times 400$)

3.3 对大鼠子宫组织 ER α , ER β 表达的影响 ER α

胞质、胞核均有表达, 主要在子宫平滑肌细胞、间质细胞及腔上皮、腺上皮细胞。与正常组比较, 各用药组 ER α 表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与丹参酮组比较, 温经消瘦颗粒中高剂量组平均光密度值明显较高, 以高剂量组为最高, 低剂量组与丹参酮组相当, 差异无统计学意义。见表 2, 图 2。ER β 主要表达于胞核中, 主要分布于大鼠子宫内膜腔上皮和腺上皮, 内膜间质细胞及子宫平滑肌细胞亦有表达。与正常组比较, 其余组 ER β 平均光密度值均升高明显 ($P < 0.01$); 与丹参酮组比较, 温经消瘦颗粒各剂量组表达均较多 ($P < 0.01$), 且表达随剂量增加而增多。见表 2, 图 3。

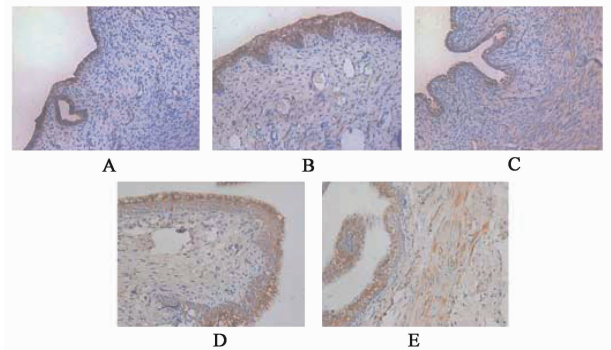


图 2 温经消瘦颗粒对大鼠子宫 ER α 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effects of Wenjing Xiaocuo granules on expression of rat uterus ER α (IHC, $\times 400$)

3.4 对大鼠血清 E₂, T 激素水平的影响 E₂ 含量,

各组较正常组均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与丹参酮组比较, 温经消瘦颗粒各剂量组均升高, 以高剂量组 E₂ 含量最高。T 含量比较, 与正常组比较, 各组含量均不同程度降低, 以温经消瘦高剂量组降低最明显 ($P < 0.01$); 与丹参酮组比较, 温经消瘦颗粒各剂量组均较低, 以高剂量组 T 含量最低 ($P < 0.01$)。见表 3。

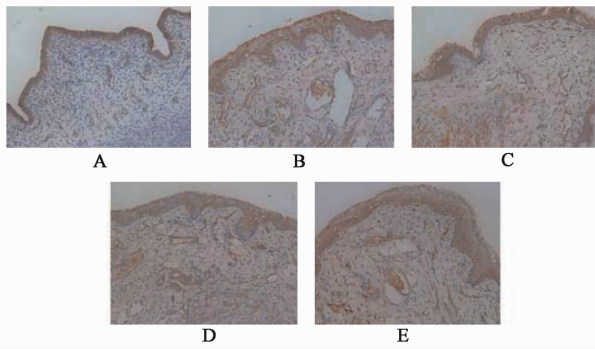


图 3 温经消瘰颗粒对大鼠子宫 ERβ 表达的影响 (免疫组化, × 400)

Fig. 3 Effects of Wenjing Xiaocuo granules on expression of rat uterus ERβ (IHC, × 400)

表 3 温经消瘰颗粒对大鼠血清 E₂, T 的影响 (x̄ ± s, n = 8)

Table 3 Effects of Wenjing Xiaocuo granules on rat serum E₂, T (x̄ ± s, n = 8)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹	T/nmol·L ⁻¹
正常	-	15.577 ± 1.852	91.490 ± 3.831
丹参酮	0.4	17.438 ± 0.748 ¹⁾	90.019 ± 5.483
温经消瘰颗粒	5.1	17.986 ± 1.527 ²⁾	86.492 ± 4.491
	10.2	18.532 ± 1.158 ²⁾	86.604 ± 10.332
	20.4	18.797 ± 1.449 ²⁾	78.259 ± 4.754 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与丹参酮组比较³⁾ P < 0.01。

4 讨论

一般认为,女性各个年龄阶段的痤疮患者都存在一定程度的内分泌紊乱,其主要表现为雄性激素的相对或绝对增多以及雌、孕激素的相对或绝对不足。骆伟雄^[4]通过检测临床痤疮患者血清中的雌二醇、睾酮等性激素水平,并以健康人激素水平测定为对照,认为血清中游离睾酮水平的升高可能是痤疮发病中的一个关键环节;于中蛟等^[5]对女性痤疮患者血清六项性激素水平进行检测,认为青春期女性痤疮患者发病的主要原因可能是由于雌激素分泌不足,使血清内睾酮水平相对增多所致。张景龙等^[6]检测患者血清促卵泡激素(FSH),促黄体激素(LH),催乳素(PRL),孕酮(P), E₂ 和 T 水平,显示青春期女性痤疮患者促卵泡素、促黄体素升高,雌激素水平下降,雄激素和雌激素比值明显升高,青春后期女性雌激素降低,睾酮和雌二醇比值升高。

雌激素能够通过与其子宫组织中所含有的雌激素受体相结合,而引起细胞内基因、蛋白的表达增多,促进细胞的生长,导致子宫内膜的增生变厚、子宫质量增加,子宫增重实验就是利用这一原理^[7],笔者

选用性未成熟的雌性大鼠,给予受试药物,观察子宫的增重、子宫病理及子宫雌激素受体的情况,同时测定血清激素,并以丹参酮为对照物,来评价其活性的大小。阳性药丹参酮胶囊的主要有效成分为隐丹参酮,具有抗菌作用及温和的雌激素样活性、抗雄性激素作用和抗皮脂腺分泌作用,为临床治疗痤疮较为理想的药物^[8-9]。实验结果显示,温经消瘰颗粒各剂量组均能显著增加大鼠子宫质量,尤以高剂量组明显,子宫组织病理则显示温经消瘰颗粒能使大鼠子宫内膜明显增厚,上皮组织由单层变为复层甚至多层;而子宫雌激素受体 α, β 免疫组化结果表明,温经消瘰颗粒各剂量组能诱导蛋白表达使受体的表达增加;血清学检测中 E₂ 含量结果表明,温经消瘰颗粒组随剂量增加血清 E₂ 含量增加,表明温经消瘰颗粒具有促进雌激素分泌、提高子宫雌激素受体表达的作用。T 含量测定结果显示温经消瘰高剂量组睾酮含量降低,表明温经消瘰颗粒同时还具有抑制雄激素分泌的作用。

综上所述,温经消瘰颗粒能促进雌激素、抑制雄激素分泌,增加雌激素受体的表达的作用,其作用效果随着剂量的增加而作用增强。

[参考文献]

[1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:33-34.

[2] 王北婴,李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001:38-39.

[3] 于中蛟. 痤疮与雄激素关系的研究进展[J]. 承德医学院学报,2005,22(4):348-350.

[4] 骆伟雄. 痤疮患者血清性激素水平分析[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2010,17(5):357-359.

[5] 于中蛟,段昕所,陆洁,等. 青春期痤疮患者血清六项性激素水平的测定[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊,2005,4(4):215-217.

[6] 张景龙,杨惠敏,白雪,等. 女性痤疮患者黄体期性激素水平与中医证型关系研究[J]. 中国皮肤性病学期刊,2009,23(10):672-673.

[7] 赵丕文,王大伟,王玲巧,等. 用小鼠子宫增重法筛选淫羊藿等10种中药雌激素样作用的实验研究[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(10):686-689.

[8] 石乃玉,董华民,黄海金. 丹参酮药理及临床应用[J]. 中国医师杂志,2001,3(2):150-151.

[9] 林岷格,韩平,戴永江,等. 丹参酮对寻常性痤疮患者血清睾酮、雌二醇的影响[J]. 山东医药,2009,49(48):58-59.

[责任编辑 周冰冰]