

二至丸对未成熟小鼠雌激素样作用分析

郑红霞^{1,2}, 赵元², 徐颖^{2*}, 林娜^{2*}

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**观察二至丸对未成熟小鼠子宫系数、血清中雌二醇(estrodiol, E₂), 子宫阴道形态学变化及雌激素受体(estrogen receptor, ER) α 和ER β 表达的影响, 探讨其发挥雌激素样作用机制。**方法:**取健康, 出生21 d的昆明种雌性小鼠40只, 随机分成4组, 分别为空白组, 阳性药戊酸雌二醇(EV)组(0.154 mg·kg⁻¹), 二至丸1.365, 2.73 g·kg⁻¹组, 每组10只, 连续给药7 d后观察小鼠子宫系数; 分别采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中E₂的水平; 苏木素-伊红(HE)染色法观察未成熟小鼠子宫阴道形态改变; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测子宫、阴道ER α 和ER β 的蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较, 二至丸1.365 g·kg⁻¹组能使未成熟小鼠子宫系数显著增加($P < 0.05$), 血清中E₂含量明显升高($P < 0.05$), 能明显促进靶器官子宫、阴道的生长发育, 还能显著上调阴道ER α 和ER β 表达($P < 0.05$), 与EV作用相似。**结论:**二至丸通过上调血中雌二醇含量和靶器官雌激素受体表达发挥雌激素样作用。

[关键词] 二至丸; 未成熟小鼠; 雌激素样作用; 子宫系数; 雌激素受体

[中图分类号] R285.5; R271.9; R228 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0103-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040103

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171127.0916.030.html>

[网络出版时间] 2017-11-27 9:16

Estrogenic Effect of Erzhiwan on Immature Mice

ZHENG Hong-xia^{1,2}, ZHAO Yuan², XU Ying^{2*}, LIN Na^{2*}

(1. Chengde College of Medicine, Chengde 067000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Erzhiwan on uterus coefficient, estradiol (E₂) in serum, pathological changes in tissues of uterus and vagina, and expressions of estrogen receptors (ER α and ER β) of immature mice, in order to investigate the estrogen-like mechanism, and provide experimental evidence for the clinical application of Erzhiwan in the treatment of perimenopausal syndrome. **Method:** Forty female Kunming mice were randomly divided into 4 groups: normal group, estrogen receptor agonist group (EV, 0.154 mg·kg⁻¹) and Erzhiwan (1.365, 2.73 g·kg⁻¹) groups. Seven days later, the serum level of E₂ was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes in immature mouse tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expressions of ER α and ER β were detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, Erzhiwan groups showed a significant increase in the uterus coefficient ($P < 0.05$) and a decrease in the level of E₂ ($P < 0.05$), and the growth and development of uterus and vagina, and increase of the expressions of ER α and ER β in vagina of immature mice, with a similar effect with EV. **Conclusion:** Erzhiwan plays an estrogen-like effect by up-regulating the expression of estradiol in blood and the expressions of estrogen receptors in target organ.

[收稿日期] 20170920(005)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573632, 81774203, ZXKT17015)

[第一作者] 郑红霞, 在读硕士, 从事中药药性理论和中药药理学研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: 991062185@qq.com

[通信作者] *林娜, 博士, 研究员, 从事中药药性理论和中药药理学研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: nlin@icmm.ac.cn;

*徐颖, 博士, 副研究员, 从事中药植物雌激素防治围绝经期综合征及妇科肿瘤研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: yxu@icmm.ac.cn

[Key words] Erzhiwan; immature mice; estrogen; uterus coefficient; estrogen receptor

围绝经期综合征又称更年期综合征,见于中医古籍的“脏躁”、“郁证”、“崩漏”、“月经不调”等病证中,属于中医“绝经前后诸证”、“脏躁”等范畴。临床表现为烘热汗出、烦躁易怒、头晕目眩、耳鸣心悸、失眠健忘、腰膝酸痛、五心烦热、精神倦怠、月经紊乱等阴阳失调的症状^[1]。卵巢功能逐渐衰退,雌激素水平下降是引起更年期各种症状的主要原因,应用雌激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT)治疗虽疗效显著,但其也同时增加子宫内膜癌和乳腺癌的患病率^[2],美国国立卫生研究院已宣布终止HRT研究计划。鉴于传统HRT潜在的危险性,植物雌激素成为研究的热点,经典名方是植物雌激素的重要来源之一。二至丸出自清代江昂《医方集解》^[3],由旱莲草和女贞子2味药组成。女贞子冬至日采,墨旱莲夏至日采,所以称二至丸,是经典的补肾方剂。有体外研究发现二至丸具有雌激素活性^[4],但其对体内雌二醇(E_2)水平及生殖靶器官雌激素受体的影响未见报道。本研究以未成熟小鼠为模型,观察二至丸对循环中 E_2 含量、生殖靶器官形态学及雌激素受体(estrogen receptor, ER) α 和ER β 表达的影响,阐述其雌激素样作用机制以期为其治疗围绝经期综合征提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种雌性小鼠40只,体质量9~12 g,均购自军事医学科学院,SPF级,动物合格证号SCXK(军)2012-0004。动物标准饲养,自由摄食饮水,实验前12 h禁食,不禁水。本研究获得中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准[中药科服字(2013) D12]。

1.2 药物及试剂 二至丸(江西仁丰药业有限公司,批号170306)。二至丸低、高(质量分数1.365, 2.73 g·kg⁻¹)剂量溶液的制备:将二至丸成药研磨成细粉,过100目筛,分别精确称取2.73, 5.46 g粉末,溶于20 mL蒸馏水,即得。戊酸雌二醇(EV,法国拜耳公司生产,拜耳医药保健有限公司广州分公司分装,批号J20130009),EV水溶液的制备:先用二甲基亚砜(DMSO)助溶,再用蒸馏水稀释至0.0154 g·L⁻¹。甲醛(国药集团化学试剂有限公司,批号1507012);二甲苯(北京化工厂,批号20160516);伊红染料,苏木素染料,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为15111828, 20161101, 08H04A02);

血清中雌二醇(E_2)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(北京鑫方程生物有限公司,批号201707);ER α 抗体[圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司,批号sc-8002];兔抗鼠ER β 抗体,兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab-3577, ab-181602)。

1.3 仪器 BX50型正置显微镜(日本Olympus公司);SFG-02.400型电热恒温鼓风干燥箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司);3K15型低温离心机(美国Sigma公司);BMJ-1型生物组织包埋机,QPJ-C型轮转式切片机, KPJ-1A型烤片机, ZPJ-1A型展片机(天津天利航空机电有限公司);KA-1000型漩涡混合器(北京金北德工贸有限公司);PowerpacTM Basic型电泳仪, Mini Trans-Blot Cell型转移电泳槽(美国Bio-Rad公司);Fusion FX5型凝胶成像仪(法国Vilber公司);WD-9405B型摇床(上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 分组及给药 取小鼠40只,适应性饲养2 d,按体重随机分为空白组, EV组(0.154 mg·kg⁻¹), 二至丸低、高剂量组(1.365, 2.73 g·kg⁻¹),高剂量组即为临床等效剂量组,每组10只,除了空白组给予等体积的蒸馏水,其余组各每天灌胃(ig)1次,连续给药7 d。处死取材前禁食12 h,不禁水。

2.2 阴道涂片 灌胃第4~7天于给药后2 h制作小鼠阴道分泌液涂片,亚甲基蓝(美蓝)染色观察以确定其所处动情动情阶段。

2.3 取材 小鼠末次给药后24 h,称重,摘眼球取血, 3 000 r·min⁻¹离心15 min,分离血清, ELISA试剂盒检测血清中雌二醇(E_2)。小鼠脱颈处死,迅速剖腹摘取子宫和阴道,称重后计算子宫系数,并分取左侧子宫角和宫颈近端阴道部分放入4%的多聚甲醛溶液中固定待作病理形态学观察,右侧子宫角和宫颈近端阴道部分置于-80℃冷藏,以供蛋白免疫印迹法(Western blot)实验检测。

2.4 观察指标及测定方法

2.4.1 动情周期的评判 用适宜大小的移液器吸取适量生理盐水于小鼠阴道内反复抽吸。将抽吸得到的液体滴载玻片上,自然晾干。将干燥的载玻片置于95%乙醇中固定10 min,再置于配置好的美蓝染液中染色10 min,小心冲洗涂片边缘的美蓝染液,晾干后于镜下观察细胞学变化。评判

标准见表 1。

表 1 小鼠动情周期评判标准^[5]

Table 1 Evaluation criteria of estrous cycle in immature mice

动情周期	细胞特点
动情前期	大部分为有核上皮细胞,偶有少量大而角化的无核上皮细胞
动情期	全部是大而角化的无核上皮细胞,或间有少量有核上皮细胞
动情后期	白细胞、角化无核上皮细胞、有核上皮细胞都存在
动情间期	大量的白细胞及少量有核上皮细胞

2.4.2 子宫系数计算 剥离子宫所带的脂肪,并用千分之一分析天平称重,计算子宫系数,子宫系数 = 子宫湿重/小鼠体重 × 100%。

2.4.3 性激素水平测定 参照北京鑫方程生物有限公司血清中 E₂ ELISA 试剂盒测定小鼠血清中 E₂ 的水平。

2.4.4 苏木素-伊红(HE)染色^[6]检测组织形态学变化 组织置于 4% 的多聚甲醛中固定 2 d 后流水冲洗 60 min;脱水、石蜡包埋和切片,进行 HE 常规染色,中性树胶封片,镜下观察。

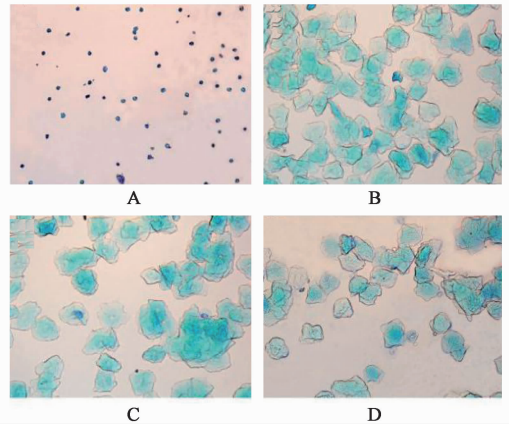
2.4.5 Western blot^[7]检测 ER α 和 ER β 蛋白的表达 将子宫、阴道尽量剪碎研磨,提取总蛋白,湿法电泳转移至 PVDF 膜,用脱脂奶粉封闭,加入 ER α (1:200), ER β (1:1 000) 和 GAPDH (1:40 000) 一抗,后加入相应二抗 (1:5 000),用多色荧光及活体成像系统显影,采用多色荧光及活体成像系统成像并分析蛋白条带灰度值,最终以目的蛋白与 GAPDH 的比值来评价蛋白表达水平的强弱。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 版统计软件对数据进行分析处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐时采用单因素方差分析进行检验,方差不齐时采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,应用 Microsoft office 2010 版软件和 Adobe Photoshop CS5 版软件进行图片整理。

3 结果

3.1 对未成熟小鼠阴道细胞角化的影响 观察未成熟小鼠给药 7 d 后的阴道涂片,空白组阴道上皮几乎全为白细胞,处于动情间期;EV 阳性药组阴道上皮呈多边形的角化细胞,处于动情期;二至丸方 1.365, 2.73 g·kg⁻¹ 组阴道上皮多为角化的细胞,处于动情期,提示二至丸可使未成熟小鼠提前进入动情期,具有雌激素样作用。见图 1。

3.2 对未成熟小鼠子宫系数的影响 与空白组比



A. 空白组; B. EV 0.154 mg·kg⁻¹ 组; C. 二至丸 1.365 g·kg⁻¹ 组; D. 二至丸 2.73 g·kg⁻¹ 组 (图 2, 3 同)

图 1 二至丸对未成熟小鼠阴道细胞角化的影响 (亚甲基蓝, ×400)
Fig. 1 Effect of Erzhiwan on estrous cycle in immature mice (Methylene blue, ×400)

较, EV 组子宫系数显著增加 ($P < 0.01$), 二至丸方 1.365, 2.73 g·kg⁻¹ 组均明显增加子宫系数 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 二至丸对未成熟小鼠子宫系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of incompatibility of Erzhiwan on immature mice uterus index ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	子宫系数/%
空白	-	0.11 ± 0.04
EV	0.154 × 10 ⁻³	0.44 ± 0.18 ²⁾
二至丸	1.365	0.21 ± 0.10 ²⁾
	2.73	0.16 ± 0.08 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3, 图 3 同)。

3.3 对未成熟小鼠血清中 E₂ 水平的影响 与空白组比较, EV 组血中 E₂ 水平显著上升 ($P < 0.05$); 二至丸 1.365 g·kg⁻¹ 组的血清中 E₂ 含量也明显升高 ($P < 0.05$), 与 EV 作用相似; 2.73 g·kg⁻¹ 组仅有上调血中 E₂ 水平的趋势。见表 3。

表 3 二至丸对未成熟小鼠性激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of incompatibility of Erzhiwan on immature mice sex hormone level ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹
空白	-	73.74 ± 10.54
EV	0.154 × 10 ⁻³	86.32 ± 13.93 ¹⁾
二至丸	1.365	87.80 ± 8.00 ¹⁾
	2.73	86.15 ± 13.30

3.4 对未成熟小鼠靶器官子宫和阴道形态学的影

响 病理切片结果显示,空白组子宫体积小,宫腔窄,腺体少而小,子宫内膜薄,内膜上皮为紧密排列的单细胞层;EV 组子宫体积变大,宫腔变宽,腺体丰富,腺腔宽,子宫内膜增厚,内膜上皮为低柱状细胞,固有层疏松;二至丸 1.365, 2.73 g·kg⁻¹ 组子宫体积变大,腔体变宽,腺体增多,子宫内膜增厚,内膜上皮见透亮细胞,基层增厚,其中 1.365 g·kg⁻¹ 组较

2.73 g·kg⁻¹ 组子宫体积更大,宫腔更宽。

空白组阴道上皮细胞小而排列紧密,阴道壁较薄;EV 组阴道上皮细胞明显角化,并出现增生和多层鳞状细胞,阴道壁增厚;二至丸 1.365, 2.73 g·kg⁻¹ 组阴道上皮增厚,鳞状上皮细胞及角化上皮细胞增厚,其中 1.365 g·kg⁻¹ 组阴道上皮出现多层泡状细胞层,角化程度较大。见图 2。

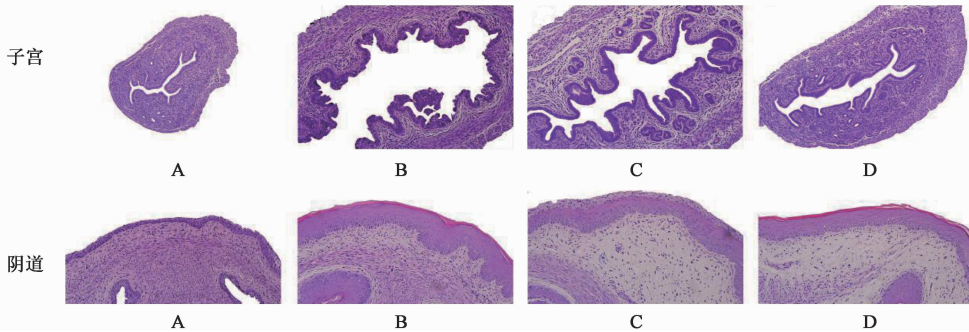


图 2 二至丸对未成熟小鼠子宫、阴道的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of incompatibility of Erzhiwan on immature mice uterus and vagina(HE, ×200)

3.5 对未成熟小鼠靶器官 ER 亚型表达的影响

与空白组比较, EV 组能显著提高子宫组织的 ER α , ER β 表达($P < 0.01$), 二至丸方对子宫组织的 ER α , ER β 表达无显著影响; EV 组作用于阴道同样能够显著提高其雌激素受体 ER α , ER β 表达($P < 0.01$), 二至丸 1.365 g·kg⁻¹ 组对阴道组织的 ER α , ER β 蛋白表达显著上升($P < 0.01$), 作用与 EV 相似略弱, 2.73 g·kg⁻¹ 组对蛋白表达无显著影响。见图 3。

4 讨论

围绝经期综合征目前多采用雌激素替代疗法治疗, 该法虽疗效显著, 但也同时增加子宫内膜癌和乳腺癌的患病率^[2]。中医药在治疗围绝经期综合征方面的优势越来越得到认可, 以经典名方为来源的植物雌激素近年来已成为该领域的研究热点。

二至丸药味少而平和, 补而不膩, 古书记载其具有“补腰膝, 壮筋骨, 强阴肾, 乌髭发”的功效^[3]。现代药理研究表明, 二至丸具有抗骨质疏松、抗衰老、乌发、调节免疫系统机能等功效^[8]。二至丸中的女贞子和墨旱莲中均含有萜类、黄酮类和香豆草醚类化合物等物质, 其结构与雌激素激动剂雌二醇相似^[9-11], 且具有雌激素样作用^[11]; XU 等^[4]发现二至丸可显著诱导转染 ERE-荧光素酶报告基因的表达, 证实了二至丸体外具有雌激素样作用。雌激素是一种类固醇激素, 主要由卵巢、滤泡、黄体及妊娠胎盘分泌产生, 能促进阴道、子宫、输卵管和卵巢本身的发育, 同时子宫内膜增生。本实验结果显示, 与

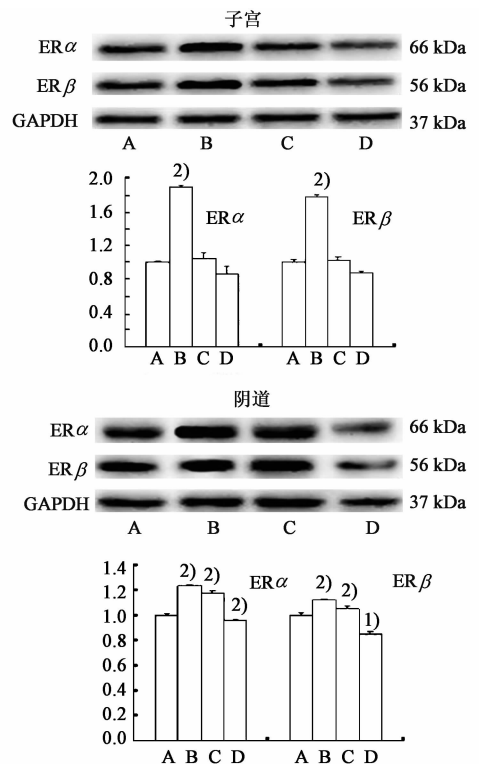


图 3 二至丸对未成熟小鼠子宫、阴道雌激素受体 ER α 和 ER β 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Erzhiwan on protein and gene expression of estrogen receptor ER α and ER β in uterus and vagina of immature mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

空白组比较, 未成熟小鼠给予二至丸后, 子宫系数显著增加, 且子宫体积变大, 子宫内膜增厚, 腔体变大, 基层增厚, 腺体数目增多, 阴道上皮基底细胞出现

了明显角化,阴道上皮增厚,鳞状上皮细胞及角化上皮细胞增厚,与阳性对照药EV的作用趋势一致。提示二至丸在体内对未成熟小鼠具有雌激素样作用。

雌激素效应不仅与雌激素含量有关,还和靶器官上雌激素受体(ERs)的数目、亚型及分布密切相关,也与靶细胞内同ERs效应基因表达过程相关的调控因子的种类和作用有关。

ER α 和ER β 是经典的雌激素核受体,介导雌激素的基因型效应,即通过调节特异性靶基因的转录而发挥“基因型”调节效应。本研究的Western blot实验结果显示,与空白组比较,EV组能够显著提高未成熟小鼠生殖靶器官子宫、阴道ER α 和ER β 的蛋白表达水平,二至丸1.365 g·kg⁻¹组同样显著提高了阴道组织ER α 和ER β 的蛋白表达水平,但对子宫的雌激素受体亚型的蛋白表达未见显著影响,提示二至丸可能对生殖系统不同靶组织具有选择性,也可能存在实验模型上的差异。ELISA结果显示,与空白组比较,EV组显著提升了血中E₂的水平,二至丸1.365 g·kg⁻¹组血中E₂水平显著增加。提示二至丸通过上调循环中E₂含量发挥雌激素样作用。目前有研究表明二至丸、女贞子以及女贞子和墨旱莲所含单体化合物均具有抗骨质疏松活性^[11-16],而骨骼是雌激素的靶组织,雌激素可对骨组织产生直接作用,为二至丸对未成熟小鼠雌激素样作用提供了间接证据。

二至丸低剂量组同高剂量组比较,在对未成熟小鼠阴道细胞角化、血中E₂水平及子宫系数等均显示出了较好的药效趋势,雌激素对生殖系统的效应呈倒钟形量效曲线关系,二至丸高剂量组可能分布在倒钟形曲线的右侧,即随着剂量的增加,效应逐渐减弱。笔者课题组前期观察七宝美髯方^[6]和青娥方^[7]对未成熟小鼠及去卵巢小鼠生殖系统雌激素效应亦呈倒钟形量效曲线关系,该结果均提示植物雌激素不会引起生殖系统的过度增殖,较合成雌激素具有一定的安全性。

本实验证明了补肾方剂二至丸具有雌激素样作用,并发现该作用可能与上调血中雌二醇含量和靶器官雌激素受体表达有关。相关结论为二至丸治疗围绝经期综合征的临床应用提供一定的实验依据。

[2] 李京京. 激素治疗围绝经期综合征的疗效探讨[J]. 当代医学, 2012, 11 (36):73-74.

[3] 项长生. 汪昂医学全书[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999:162.

[4] XU H, SU Z R, HUANG W, et al. Er Zhi Wan, an ancient herbal decoction for woman menopausal syndrome, activates the estrogenic response in cultured MCF-7 cells; an evaluation of compatibility in defining the optimized preparation method [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(1):109-115.

[5] 丁玉龙, 孙莉, 李丽亚. 小鼠阴道涂片三种染色方法比较[J]. 实验动物科学, 2010, 27 (1):67-69.

[6] XU Y, MA X, AN J N, et al. Short-time QiBaoMeiRan formula treatment exerts estrogenic activities without side effects on reproductive tissues in immature mice[J]. Sci Rep, 2015, doi: 10.1038/srep17436.

[7] XU Y, ZHANG Z J, GENG F, et al. Treatment with Qing'E, a kidney-invigorating Chinese herbal formula, antagonizes the estrogen decline in ovariectomized mice [J]. Rejuvenation Res, 2010, 13(4):479-488.

[8] 蔡秀江, 黄美艳, 丁安伟, 等. 二至丸考源及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (23):272-275.

[9] 刘亭亭, 王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (14): 228-234.

[10] 汪玲玉. 中药墨旱莲化学成分研究[D]. 合肥:安徽大学, 2013.

[11] 林雄浩, 吴锦忠. 中药复方二至丸的化学成分及抗骨质疏松研究进展[J]. 解放军药学报, 2009, 25 (5):421-424.

[12] 程敏. 二至丸及其组方药物防治骨质疏松与作用机制研究[D]. 西安:西北大学, 2012.

[13] 程敏, 王庆伟, 刘雪英. 二至丸含药血清对成骨细胞增殖分化及矿化的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24 (7):1555-1557.

[14] CHENG M, WANG Q, FAN Y, et al. A traditional Chinese herbal preparation, Er-Zhi-Wan, prevent ovariectomy-induced osteoporosis in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(2):279-285.

[15] 张明发, 沈雅琴. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松症的研究进展[J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 566-571.

[16] CHEN Q, YANG L, ZHANG G, et al. Bioactivity-guided isolation of antiosteoporotic compounds from *Ligustrum lucidum*[J]. Phytother Res, 2013, 27(7): 973-983.

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997: 3-4.

[责任编辑 邹晓翠]