

3'-大豆苷元磺酸钠对性激素及前列腺增生组织中 雌激素受体表达的影响

曾靖^{1*}, 胡蓉², 江丽霞², 黄志华¹, 李良东¹

(1. 赣南医学院, 江西 赣州 341000; 2. 赣南医学院第一附属医院, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的: 研究3'-大豆苷元磺酸钠对性激素水平及前列腺增生组织中雌激素 α 受体的影响。方法: 取32只昆明小鼠, 乙醚浅麻醉, 常规消毒, 摘除双侧睾丸, 缝合创口。术后第3天, 各组大鼠每天皮下注射丙酸睾酮 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续12 d, 制造小鼠前列腺增生模型。32只小鼠随机分为4组, 正常对照组, 前列腺增生模型组, $20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 3'-大豆苷元磺酸钠组, 观察各种处理12 d后小鼠前列腺湿重、前列腺指数、前列腺组织形态学变化、性激素水平及前列腺组织中雌激素 α 受体表达的影响。结果: 与模型组比较, $20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 3'-大豆苷元磺酸钠能显著抑制丙酸睾酮所致小鼠前列腺增生 (121.6 ± 11.8), (111.3 ± 14.6) mg, $P < 0.05$, $P < 0.01$; 明显降低小鼠血清睾酮(T) (4.42 ± 0.56), (3.57 ± 0.42) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 和雌二醇(E_2) (30.23 ± 4.41), (26.76 ± 3.28) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含量, 及 T/E_2 0.146 ± 0.02 , 0.133 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$, $P < 0.01$; 同时可以明显抑制前列腺增生组织中雌激素受体的表达。结论: 3'-大豆苷元磺酸钠对丙酸睾酮所致小鼠前列腺增生具有显著的拮抗作用; 其作用机制可能一定程度上与降低小鼠血清T, E_2 , T/E_2 及抑制雌激素 α 受体的表达有关。

[关键词] 3'-大豆苷元磺酸钠; 前列腺增生; 睾酮; 雌激素; 雌激素受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0170-05

[doi] 10.11653/syfy2013100170

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1043.007.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:43

Effects of 3'-daidzein Sulfonate Sodium on Sex Hormone and Estrogen Receptor in Prostatic Hyperplasia

ZENG Jing^{1*}, HU Rong², JIANG Li-xia², HUANG Zhi-hua¹, LI Lian-dong¹

(1. Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

2. The First Affiliated Hospital, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of 3'-daidzein sulfonate sodium adjusting sex hormone and estrogen receptor- α (ER- α) in prostatic hyperplasia tissue. **Method:** Thirty-two benign prostatic hyperplasia mice were modeled by subcutaneous injecting testosterone propionate for 12 consecutive days, and randomly grouped in four, including: the normal control group, the model group of prostatic hyperplasia, treatment groups with 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of 3'-daidzein sulfonate sodium. After sacrificed the animal, prostate glandular wet weights, and its proportion of total body weight, morphological changes of prostate gland, sex hormone including serum testosterone (T), estradiol (E_2) contents, ER- α expression were measured. **Result:** 3'-daidzein sulfonate sodium could significantly inhibit testosterone propionate induced mouse benign prostatic hyperplasia, reduce the serum testosterone, estradiol contents and the ratio of T/E_2 , and inhibit the expression of ER- α . **Conclusion:** 3'-daidzein sulfonate sodium has significant antagonistic effect on experimentally induced mouse benign prostatic hyperplasia by testosterone propionate, the mechanism which may related to the regulative impact on the balance of

[收稿日期] 20121122(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160399)

[通讯作者] * 曾靖, 教授, 硕士生导师, 从事心脑血管药理、中药药理研究, Tel: 13879769873, E-mail: zengjing61@hotmail.com

sex hormone and the expression of ER- α .

[Key words] 3'-daidzein sulfonate sodium; prostatic hyperplasia; testosterone; estradiol; estrogen receptor

良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)是一种老年病,其病因迄今为止并不完全清楚,近年研究显示性激素代谢失衡可能与BPH的发病有密切关系,雌激素在其发病中的作用机制越来越受到重视^[1]。Scuzuki等人的研究发现,40岁后男性出现了雌/雄激素增加的现象^[2],雌激素通过与雄激素的协同作用,在BPH的发病机制中可能起主要作用。葛根是一种治疗绝经期症状的中国传统的中草药,可用于某些绝经期妇女的症状,如骨质疏松症、冠心病及某些激素依赖性肿瘤等^[3]。大豆苷元、葛根素为其主要药效成分。大豆苷元为一种植物雌激素,其结构与雌二醇有着相似性^[4-5],与雌激素不同的是,植物雌激素同时具有雌激素和抗雌激素的作用,对雌激素受体有着独特的作用,与选择性雌激素受体调节剂有着类似的效果^[6]。但由于大豆苷元不溶于水,在临床中存在着生物利用度低、服用量大和显效慢等缺点。3'-大豆苷元磺酸钠(3'-daidzein sulfonate sodium, DSS)是大豆苷元进行结构修饰和改性新合成的强水溶性物质新化合物。目前有关3'-大豆苷元磺酸钠的药理作用只有本课题组报道^[7-12],但其对前列腺增生影响的效能强度及机制尚不清。本研究3'-大豆苷元磺酸钠对性激素水平及前列腺增生组织中雌激素受体(ER)表达水平的影响。

1 材料

1.1 药品 3'-大豆苷元磺酸钠($C_{15}H_9O_7SNa$, 类白色结晶粉末,由沈阳药科大学植化教研室提供,纯度>99%),实验前用生理盐水稀释至所需浓度,用 $NaHCO_3$ 调pH至7.0备用。丙酸睾酮注射液(上海通用药业股份有限公司,批号030519)。

1.2 试剂 橄榄油(Hojiblanca公司,西班牙,用作丙酸睾酮稀释剂),睾酮(T)放射免疫试剂盒、雌二醇(E_2)放射免疫试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司,批号001108033,001105012),单克隆兔抗ER抗体(北京中杉试剂公司,批号00120101),即用型SABC免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号00120202)。

1.3 动物 昆明种小鼠,雄性,普通级,体重(20 ± 2)g,由赣南医学院实验动物中心提供,许可证号SYXK(赣)2007-002。

1.4 仪器 MK3酶标仪(美国,热电公司),TS100-F生物倒置显微镜(日本,尼康公司),XB100KS制冰机(宁波格兰特制冷设备制造),VC-1300净化工作台(苏州), CO_2 培养箱(美国,Thermo Forma公司);J2-21M离心机(美国,Beckman公司)。

2 方法

2.1 良性前列腺增生模型的制备 模型制备参照文献[13-15]进行,取32只小鼠,乙醚浅麻醉,常规消毒,摘除双侧睾丸,缝合创口。术后第3天,将小鼠随机分为3组,每组8只,前列腺增生模型组,3'-大豆苷元磺酸钠低、高剂量组,另设正常对照组。对照组每天给予橄榄油0.1 mL/只,其余各组每天均皮下注射丙酸睾酮 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,同时3'-大豆苷元磺酸钠组 $ig 20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot d^{-1}$ 3'-大豆苷元磺酸钠,连续12 d。

2.2 前列腺指数(PI)的测定 连续给药12 d后,断食12 h,空腹小鼠测量体重后用颈椎脱臼法处死,仔细分离各叶前列腺,剥离干净后立即用电子天平称重,计算湿重指数($PI = \text{前列腺湿重}/\text{体重}$)。

2.3 标本处理 小鼠处死后,取前列腺腹叶组织于10%中性福尔马林中固定过夜,乙醇梯度脱水和二甲苯透明,常规石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察前列腺组织形态变化。

2.4 血清 T, E_2 水平的测定 小鼠颈椎脱臼处死后,经颈总动脉取血于洁净玻璃试管,静置过夜,次日取血清,按 T, E_2 放射免疫试剂盒操作说明,于赣南医学院第一附属医院检验科检测。

2.5 前列腺组织中 $ER\alpha$ 表达水平的检测 石蜡切片常规脱蜡入水,柠檬酸钠缓冲液微波至沸修复抗原,3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 PBS洗3次 $\times 2 \text{ min}$;小牛血清封闭;滴加一抗, 37°C 孵育2 h, PBS洗3次 $\times 5 \text{ min}$;滴加二抗, 37°C 孵育40 min, PBS洗4次 $\times 5 \text{ min}$; DAB- H_2O_2 显色,苏木素复染,中性树胶封片。以PBS代替一抗作阴性对照。采取ISH法对免疫组化结果进行评分:①阳性细胞染色强弱(记为a):阴性或可疑阳性为0分,弱阳性为1分,阳性为2分,强阳性为3分;②阳性细胞率(记为b):1%~10%为1分,11%~50%为2分,51%~80%为3分,81%~100%为4分;③ $a \times b$ 乘积为IHS评分:0为-,1~4分为+,5

~8 分为 ++, 9~12 分为卅。每个标本观察 3 张切片, 取平均值。

2.6 数据处理 所有数据运用 SPSS 14.0 统计软件包进行单因素方差分析, 各测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠前列腺湿重和前列腺指数的影响 与模型组相比, 3'-大豆苷元磺酸钠 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组小鼠前列腺湿重和前列腺指数均有下降 ($P < 0.05$; $P < 0.01$), 且这种下降与药物浓度呈量效关系。见表 1。

3.2 对小鼠血清性激素水平变化的影响 与模型组

表 1 3'-大豆苷元磺酸钠对小鼠前列腺湿重和前列腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	前列腺湿重 $/\text{mg}$	前列腺指数 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常对照	-	102.5 ± 12.5	2.59 ± 0.18
模型组	-	141.0 ± 16.3	3.66 ± 0.22
DSS	20	121.6 ± 11.8 ¹⁾	3.12 ± 0.17 ¹⁾
	40	111.3 ± 14.6 ²⁾	2.59 ± 0.13 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

相比, 3'-大豆苷元磺酸钠 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组小鼠血清中的 E_2 , T 的含量均有下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 T/E_2 亦下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其作用与药物浓度呈量效关系。见表 2。

表 2 3'-大豆苷元磺酸钠对小鼠血清性激素水平变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

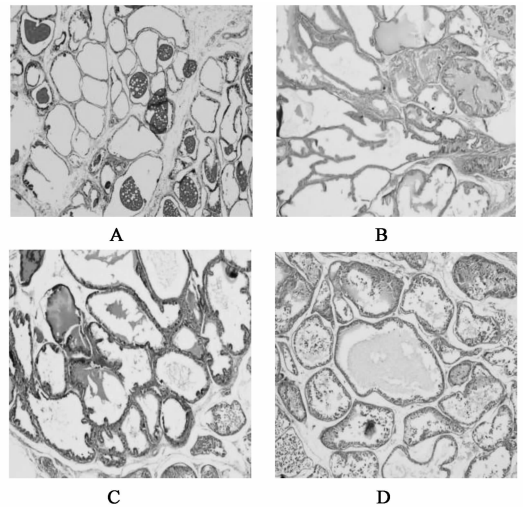
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	$E_2/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	$T/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	T/E_2
正常对照	-	17.42 ± 2.32	2.38 ± 0.42	0.137 ± 0.02
模型组	-	48.65 ± 4.26	7.80 ± 0.82	0.160 ± 0.02
DSS	20	30.23 ± 4.41 ¹⁾	4.42 ± 0.56 ¹⁾	0.146 ± 0.02 ¹⁾
	40	26.76 ± 3.28 ²⁾	3.57 ± 0.42 ²⁾	0.133 ± 0.02 ²⁾

3.3 对小鼠前列腺组织形态的影响 正常对照组小鼠前列腺上皮为单层柱状或单层立方上皮构成, 腺腔规则; 腔内有少量的酸性分泌物; 腺上皮细胞胞核圆形, 位于基底部。模型组小鼠前列腺明显呈结节状增生, 锯齿样扩张明显, 大部分腺体呈乳头状向腔内突出; 腺上皮部分呈高柱状, 细胞层次增加, 细胞体积增大, 细胞质较稀少, 胞核增大, 呈圆或卵圆形, 可见核仁。腔内淡红色均质的酸性分泌物增多。20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3'-大豆苷元磺酸钠组前列腺部分腺体腺上皮增生, 呈乳头状向腔内突出; 上皮为单层柱状或高柱状, 分泌物减少; 腺上皮细胞胞浆透明, 核圆居中。40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3'-大豆苷元磺酸钠组小鼠前列腺腺体少量增生, 大小比较一致, 排列整齐, 接近正常腺体 (图 1)。

3.4 对小鼠前列腺组织 $ER\alpha$ 表达的影响 $ER\alpha$ 在小鼠前列腺内主要分布前列腺的间质细胞, 正常对照组少量表达, 而模型组表达明显增多, 低、高剂量 3'-大豆苷元磺酸钠组表达均有下降, 呈量效关系 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 2~3)。

4 讨论

良性前列腺增生是影响老年男性健康的常见疾病, 发病率占老年男性疾病首位。主要以药物和手术治疗为主, 但目前药物治疗的疗效不佳, 不良反应较多, 且费用较高, 手术治疗有一定风险及并发症。因此, 寻找更有效的预防和治疗良性前列腺增生的



A. 正常对照组; B. 模型组; C. DSS 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; D. DSS 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组 (图 2~3 同)

图 1 3'-大豆苷元磺酸钠对各组小鼠前列腺组织形态变化的影响 (HE, $\times 200$)

药物具有重要意义。研究表明, 植物雌激素可通过抑制酪氨酸蛋白激酶受体表达, 阻滞细胞周期, 抑制 DNA 拓扑异构酶 II 等多种途径抑制前列腺细胞的增殖^[16], 提示植物雌激素对良性前列腺增生有抑制作用。葛根是一味传统的中药, 其主要成分大豆苷元为一种植物雌激素, 其结构与雌二醇有着相似性, 有研究显示大豆苷元也具有抑制前列腺细胞增殖的作用^[17]。3'-大豆苷元磺酸钠是大豆苷元进行结构修饰和改性新合成的强水溶性物质新化合物。本实

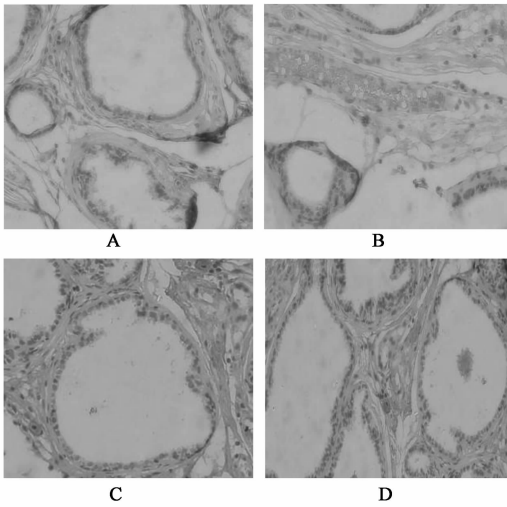
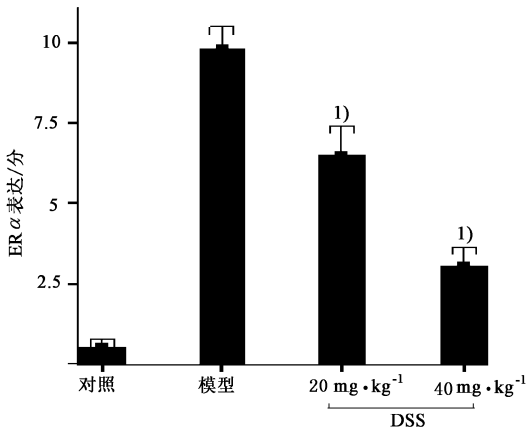


图2 3'-大豆苷元磺酸钠对各组小鼠前列腺组织形态变化的影响(DAB, ×400)



与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$

图3 3'-大豆苷元磺酸钠对ERα免疫组化染色评分的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

验研究结果表明:3'-大豆苷元磺酸钠对丙酸睾酮所致小鼠前列腺增生具有明显的抑制作用,3'-大豆苷元磺酸钠明显降低前列腺湿重和前列腺指数,形态学检查显示,给予40.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 3'-大豆苷元磺酸钠,连续12天小鼠前列腺腺体增生少量,前列腺形态大小比较一致,排列整齐,接近正常腺体。同时3'-大豆苷元磺酸钠还明显降低小鼠血清T, E₂, T/E₂的含量,能明显降低前列腺组织中雌激素受体的表达。提示3'-大豆苷元磺酸钠抑制小鼠前列腺增生的作用机制可能与降低T, E₂的水平,抑制雌激素受体表达有关。

[参考文献]

[1] 顾方六. 现代前列腺病学[M]. 北京:人民军医出版社,2002;9.
 [2] Suzuki K. Endocrine environment of benign prostate

relationship of sex steroid hormone levels with age and the hyperplasia size of the prostate [J]. Nippon Hinyokiki Gakkai Zasshi,1992,83:664.
 [3] Jean W, Edith L, Suzanne C, et al. Comparison of Pueraria lobata with hormone replacement therapy in treating the adverse health consequences of menopause [J]. Menopause,2003,10(4):352.
 [4] Anderson J J B, Anthony M, Cline J M, et al. Health potential of soy isoflavones for menopausal women [J]. Public Health Nutr,1999,2(4):489.
 [5] Fitzpatrick L A. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens; new therapies for the postmenopausal women [J]. Mayo Clin Proc,1999,74:601.
 [6] 董社英,郑建斌,高鸿,等. 3'-大豆苷元磺酸钠的 electrophoretic behavior and application research [J]. 化学学报,2003,61(4):487.
 [7] 曾靖,黄志华,邱峰,等. 3'-大豆苷元磺酸钠抗心律失常作用的研究 [J]. 中药药理与临床,2006,22(1):37.
 [8] 曾靖,曾昭毅,肖海,等. 3'-大豆苷元磺酸钠对小鼠前列腺增生模型的实验研究 [J]. 赣南医学院学报,2005,25(6):1.
 [9] 曾靖,李良东,黄志华,等. 3'-大豆苷元磺酸钠对豚鼠离体右心房自律性及收缩特性的影响 [J]. 时珍国医国药,2007,18(7):1553.
 [10] 曾靖,黄志华,李良东,等. 3'-大豆苷元磺酸钠对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护与抗氧化作用的影响 [J]. 辽宁中医杂志,2009,36(12):2179.
 [11] 曾靖,黄志华,黄真,等. DSS对大鼠脑缺血再灌注损伤后视网膜膜作用的影响 [J]. 辽宁中医杂志,2010,37(5):782.
 [12] 李良东,黄志华,曾靖,等. DSS对脑缺血再灌注损伤的保护与抗氧化作用的关系 [J]. 中风与神经疾病杂志,2009,30(4):407.
 [13] 孙自学,陈建设,王德军,等. 前列安对良性前列腺增生症大鼠模型前列腺组织碱性成纤维生长因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):101.
 [14] 刘绍龔,佐艇,白明,等. 乌鸡白凤丸对小鼠前列腺增生模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):180.
 [15] 刘绍龔,白明,纪晓宁,等. 益母草总碱对小鼠前列腺增生模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):177.
 [16] Wang J, Eltoun I E, Lamartiniere C A. Genistein alters growth factor signaling in transgenic prostate model (TRAMP) [J]. Mol Cell Endocrinol,2004,219(1/2):171.
 [17] Snyder R D, Gillies P J. Reduction of genistein clastogenicity in Chinese hamster V79 cells by daidzein and other flavonoids [J]. Food Chem Toxicol,2003,41(10):1291.

[责任编辑 聂淑琴]

清脑益智方含药脑脊液对缺氧复氧皮层 神经元细胞重塑相关指标的影响

秦秀德¹, 刘玉¹, 张玉莲¹, 王硕², 朱金墙², 康立源^{2*}

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:探究清脑益智方通过促神经元突触重塑治疗血管性痴呆的机制。方法:原代培养皮层神经元,将神经元细胞按照 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔细胞培养板,将细胞分为正常组、缺氧复氧组、正常脑脊液组(正常 CSF 10% 的元血清培养液)、清脑益智方 $15.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药,连续 3 d 制备的含药脑脊液高剂量组(清脑益智方-CSF 10% 的元血清培养液)、清脑益智方含药脑脊液低剂量组(清脑益智方-CSF 5% 的元血清培养液)、恩必普组含 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 3 d 制备的脑脊液 5% 的元血清培养液。除正常细胞组外,其余各组均在添加相应干预措施后进行缺氧 24 h 复氧 24 h 处理。采用 ELISA 法检测细胞上清液中突触素(synapsin, SYN)、生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)、微管相关蛋白 2(microtubule associated protein 2, MAP-2)等突触重塑标志物的表达。结果:清脑益智方含药脑脊液能够促进缺氧复氧皮层神经元突触重塑相关指标 SYN, GAP-43, MAP-2 的表达,并且清脑益智方含药脑脊液高剂量组与低剂量组的上述 3 个指标表达水平均明显高于缺氧复氧组,且具有显著的统计学差异($P < 0.01$)。结论:清脑益智方可通过 SYN, MAP-2, GAP-43 等突触重塑标志物的表达而促进神经元重塑。

[关键词] 清脑益智方; 皮层神经元; 突触重塑

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0174-04

[doi] 10.11653/syfy2013100174

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1040.004.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:40

Effect of Qingnao Yizhi Decoction on Synaptic Remodeling Related Indexes

QIN Xiu-de¹, LIU Yu¹, ZHANG Yu-lian¹, WANG Shuo², ZHU Jin-qiang², KANG Li-yuan^{2*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China; 2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible mechanism of Qingnao Yizhi (QNYZ) decoction on vascular dementia (VD) through testing the effect of cerebrospinal fluid which contained Qingnao Yizhi decoction on synaptic remodeling so as to provide more scientific evidence for the clinical medication on VD patients. **Method:** The primary cultured rat cortical neurons were vaccinated in 96-well cell culture plates and the vaccination concentration was $1 \times 10^6/\text{mL}$. And the cells were divided into control group, H/R group, cerebrospinal fluid (CSF) group, high dose CSF containing QNYZ group (QNYZ-H), low dose CSF containing QNYZ group (QNYZ-L) and CSF containing butylphthalide (NBP) group (except the control group, the other groups were firstly dealt with hypoxia for 24 hours and then received reoxygenation for 24 hours). The concentration of synaptic remodeling markers such as synapsin, microtubule associated protein 2 and growth associated protein-43

[收稿日期] 20121121(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202653);全国优秀博士学位论文作者专项资金项目(201082);中国博士后科学基金一等资助项目(20110490080)

[第一作者] 秦秀德, 博士, 博士后, 主治医师, 从事中医药防治脑病的临床与基础研究, E-mail: qinxiude@foxmail.com

[通讯作者] * 康立源, 博士, 研究员, 从事中医药防治心脑血管疾病和中药新药研究, E-mail: klyzm@163.com