

## 二仙汤及其组方中药对幼年大鼠子宫作用的研究

陶仕英, 牛建昭<sup>\*</sup>, 赵丕文, 王继峰, 杨美娟  
(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 通过对二仙汤及其组方中药对幼年大鼠子宫作用的定量分析, 探讨其对子宫功能的影响机制。方法: 幼年 SD 大鼠 54 只, 分为正常对照、己烯雌酚、二仙汤、淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏和知母 9 组, 各组给药 6 d 后麻醉大鼠, 取血清测量雌二醇( $E_2$ )的含量, 分离摘取双侧子宫, 称重后常规石蜡包埋切片, 行 HE 染色和免疫组织化学染色。结果: 己烯雌酚组、二仙汤组、淫羊藿组和仙茅组子宫系数与正常组对比增加明显, 有统计学意义( $P < 0.05$ )。仅己烯雌酚组  $E_2$  增高。HE 染色发现己烯雌酚组子宫内膜厚度和上皮细胞高度明显增加( $P < 0.01$ )。免疫组织化学染色发现己烯雌酚可明显下调雌激素受体 ( $ER$ ) 和雌激素受体 ( $ER$ ) 在大鼠子宫中的表达, 而二仙汤及方中君药淫羊藿和仙茅则上调  $ER$  和  $ER$  的表达( $P < 0.01$ )。结论: 二仙汤及其方中温肾药(淫羊藿、仙茅)通过调节雌激素受体  $ER$  和  $ER$  在子宫中的表达而发挥植物雌激素的功能。

[关键词] 二仙汤; 子宫; 雌激素受体; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0118-04

## Effects of Er-xian Decoction and its Compositions on Uterus in Immature Rat

TAO Shi-ying, NIU Jian-zhao<sup>\*</sup>, ZHAO Pi-wen, WANG Ji-feng, YANG Mei-juan  
(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible functional mechanism for effect of Er-xian Decoction on uterus through quantity analysis of effect of Er-xian Decoction and its compositions on uterus in immature rat. **Method:** Fifty-four immature female SD rats were randomly divided into nine groups: normal control group (A), diethylstilbestrol (DES) group (B), Er-xian Decoction group (C), Herba Epimedii group (D), Rhizoma Curculiginis group (E), Radix Morindae Officinalis group (F), Radix Angelicae Sinensis group (G), Cortex Phellodendri group (H), Rhizoma Anemarrhenae group (I). After the rats were administrated for six days, serum were got to measure Estradiol ( $E_2$ ). After bilateral uterus was removed and weighed, paraffin sections, HE staining and immunohistochemical staining were made. **Result:** The uterus coefficient was increased significantly in Group B, C, D and E ( $P < 0.05$ ). The level of  $E_2$  in Group B only was increased. It was found diethylstilbestrol (DES) could induce increasing in the height of endometrium epidemic cells and the height of endometrium sroma cells. Immunohistochemical staining showed that DES caused a decrease in the expression of  $ER$  and  $ER$  in the uterus of immature rats, but Er-xian Decoction and its kidney-warming composition (Herba Epimedii, Rhizoma Curculiginis) could up-regulate the  $ER$  and  $ER$  expression. **Conclusion:** Er-xian Decoction and its kidney-warming composition (Herba Epimedii, Rhizoma Curculiginis) could act as the phytoestrogen by upregulating the expression of  $ER$  and  $ER$  in the uterus of immature rats.

[Key words] Er-xian Decoction; uterus; estrogen receptor; rat

[收稿日期] 20100515(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772849); 高等学校创新引智计划项目(B07007); 北京中医药大学科研基金(0100013)

[第一作者] 陶仕英, Tel: 010-64287538

[通讯作者] <sup>?</sup> 牛建昭, Tel: 010-64286716, E-mail: niujianzhao@126.com

近年来,随着人们生活水平的提高,绝经期妇女的健康状况愈来愈受到医学界的广泛关注。既往绝经期妇女多采用补充外源性雌激素的方法,即雌激素替代疗法(estrogen replacement treatment, ERT)来改善绝经期症状,但同时又增加雌激素相关疾病如乳腺癌、子宫内膜癌的发病风险。植物雌激素(phytoestrogen, PE)是天然植物中提取的一种结构与人体内源性刺激素相似,目前在临床围绝经期综合征的保健和治疗作用日益受到人们的关注。本文通过对二仙汤及其组方中药对幼年大鼠子宫作用的定量分析研究,旨在探讨二仙汤及其组方中药的植物雌激素样作用,对临床用于围绝经期妇女的治疗提供一定的理论指导。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 雌性未成年正常大鼠 54 只,出生后 21 d(刚断乳),体重 50 ~60 g 购自北京维通利华实验动物中心。合格证号:SCXK(京)2007-0001。

**1.2 药物** (淫羊藿、仙茅、巴戟天) (当归、黄柏、知母) 6 味中药为免煎颗粒剂,首创大地药业有限公司生产。蒸馏水溶解,6 味中药分别配制成生药含量为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液;二仙汤按(淫羊藿、仙茅、巴戟天) (当归、黄柏、知母) 为 3:2 配制成生药含量  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液;己烯雌酚(批号 20080104),  $0.5 \text{ mg} \times 100$  片/瓶,合肥久联制药有限公司生产,以上药物均购自北京东直门医院。

**1.3 试剂** 一抗:ER (HC-20,批号 H2108) 和 ER (H-150,批号 2709) 为 Santa Cruz 公司产品;过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒(SP-9001,批号 K87712B) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;血清激素检测试剂盒购自北京华英生物技术研究所。

## 2 方法

**2.1 分组** 实验期间饲养在二级动物室,温度 ( $25 \pm 1$ )。将动物按体重均衡和随机的原则分为 9 组:正常对照组、己烯雌酚组、二仙汤组以及 6 个单味药组。动物到达后适应性饲养 3 d,开始实验。正常对照组给予蒸馏水。不同药物剂量参考徐叔云《药理实验方法学》<sup>[1]</sup>,依据临床用量进行等效换算,己烯雌酚组按  $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  给予阳性药物己烯雌酚;二仙汤组按  $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  给药;淫羊藿、仙茅、巴戟天均按  $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  给药;当归、黄柏和知母均按  $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  给药。灌胃分早、晚 2 次进行,给药均持续 6 d。

**2.2 动物取材与血清提取** 给药 6 d,处死前晚禁食 12 h。用 10% 水合氯醛按  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射麻醉,沿大鼠腹正中线打开腹腔,自腹主动脉取血,经室温静置 2 h 后,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取其血清分别保存于 EP 管中,  $-20$  保存备用。将子宫与周围组织完全剥离后取出,称重,用 10% 福尔马林固定后制成石蜡切片。

**2.3 血清中激素  $E_2$  的测定** 具体步骤参考所购试剂盒说明书。

**2.4 子宫组织定量测量** 石蜡切片脱蜡至水,常规 HE 染色,分别在低倍镜和高倍镜下观察摄片,在 MiE 显微图像处理软件下,每组取 6 张切片,每张切片在低倍镜 ( $10 \times 10$ ) 和高倍镜 ( $40 \times 10$ ) 下观察摄片,测量子宫内膜最大厚度和上皮细胞高度。根据 Jefferson WN<sup>[2]</sup> 等的测量方法测量子宫上皮细胞的高度,每只子宫的两侧子宫角上分别于 3, 6, 9, 12 点方位各测 4 个位点,所得的平均值为该子宫上皮细胞的平均高度。测量子宫内膜最大厚度,每只子宫测量 8 个位点,(所选位点均为子宫内膜厚度最大处),其平均值为该子宫内膜的最大厚度。

**2.5 免疫组织化学染色及定量分析** 石蜡切片脱蜡至水,微波修复抗原 10 min;入 3% 过氧化氢室温孵育 30 min;正常山羊血清封闭液室温孵育 20 min,倾去,分别用兔抗大鼠 ER $\alpha$  或 ER 抗体 ( $1:150$ , Santa Cruz) 孵育切片 (4 h, 过夜);羊抗兔二抗 37 孵育 30 min,辣根酶标记链霉卵白素工作液 37 孵育 30 min, DAB 染色。每步骤间用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 充分洗涤,常规脱水,透明,封片,光镜下观察,摄片。细胞核被染成棕黄色者为阳性。阴性对照采用 PBS 代替一抗孵育切片。采用通用医学图像分析仪,光镜下观察各组染色结果,用 NIS-Elements Basic Research 数据分析软件分析相应抗体的表达量,每组取 6 张切片,每张切片取 5 个视野,计算每视野平均吸光度值 (A)。

**2.6 统计学方法** 所有统计资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计学处理采用 SPSS11.5 软件,单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 二仙汤及其组方中药对子宫系数和血清激素水平的影响** 以大鼠子宫湿重与大鼠体重之比计算大鼠子宫系数。己烯雌酚组、二仙汤组、淫羊藿组、仙茅组和当归组子宫系数明显增加 ( $P < 0.05$ ), 其

余各组子宫系数虽对比正常对照组有所增加, 但无统计学意义。血清雌激素水平除己烯雌酚组  $E_2$  明显升高, 其余各组血清激素水平与正常对照组比较均无统计学意义(表 1)。

表 1 不同药物对大鼠子宫系数和血清  $E_2$  含量的影响(  $\bar{x} \pm s, n = 6$  )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	子宫系数 /g·g <sup>-1</sup>	$E_2$ /pg·L <sup>-1</sup>
正常对照	-	0.046 ±0.014	500.15 ±69.47
己烯雌酚	0.000 18	0.255 ±0.039 <sup>2)</sup>	610.89 ±87.80 <sup>2)</sup>
二仙汤	7.5	0.101 ±0.025 <sup>2)</sup>	559.25 ±39.39
淫羊藿	1.5	0.098 ±0.023 <sup>2)</sup>	558.04 ±67.82
仙茅组	1.5	0.094 ±0.021 <sup>2)</sup>	507.73 ±28.31
巴戟天	1.5	0.073 ±0.032	565.80 ±54.64
当归	1.0	0.089 ±0.022 <sup>2)</sup>	569.35 ±72.53
黄柏	1.0	0.057 ±0.014	559.24 ±83.93
知母	1.0	0.058 ±0.016	556.03 ±42.92

注:与正常对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 ~3 同)。

**3.2 HE 染色形态学观察及形态计量学分析** 低倍镜下观察发现己烯雌酚组子宫内膜明显增厚, 明显大于正常对照组( $P < 0.01$ )。上皮细胞呈高柱状排列, 其高度亦明显增加, 与正常对照组比较差异显著( $P < 0.01$ )。二仙汤及组方药物对子宫内膜无刺激增生作用(表 2)。

表 2 不同药物对大鼠子宫内膜厚度和上皮细胞高度的影响(  $\bar{x} \pm s, n = 6$  )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	子宫内膜厚度 / $\mu\text{m}$	上皮细胞高度 / $\mu\text{m}$
正常对照	-	56.58 ±9.13	6.46 ±0.90
己烯雌酚	0.000 18	83.24 ±4.25 <sup>2)</sup>	16.15 ±2.30 <sup>2)</sup>
二仙汤	7.5	67.90 ±6.56	7.64 ±1.51
淫羊藿	1.5	59.54 ±5.95	7.61 ±2.36
仙茅组	1.5	58.87 ±7.69	5.10 ±0.96
巴戟天	1.5	48.82 ±4.26	6.73 ±1.57
当归	1.0	54.96 ±6.12	8.43 ±1.71
黄柏	1.0	55.90 ±8.15	7.14 ±1.60
知母	1.0	48.27 ±9.78	6.97 ±2.44

**3.3 免疫组织化学法检测不同药物对大鼠子宫 ER, ER 表达的影响** ER 在各组大鼠子宫内腔上皮、腺上皮、内膜间质细胞和平滑肌细胞均有表达, 以核表达为显著。己烯雌酚组 ER 平均 A 低于正常对照组( $P < 0.05$ )。而二仙汤组、淫羊藿组和仙茅组的 A 均高于正常对照组, 统计学具有明显差异( $P < 0.01$ )。其余各组与正常对照组比较均无统计学意义。

ER 主要表达于细胞核中, 主要分布于内腔上皮和腺上皮, 部分表达于内膜间质细胞和子宫平滑肌细胞。己烯雌酚组大鼠 ER 染色阳性率低于正常对照组( $P < 0.05$ ), 而二仙汤组、淫羊藿组和仙茅组的 A 均高于正常对照组, 统计学具有明显差异( $P < 0.01$ )。其余各组与正常对照组比较均无统计学意义(见表 3)。

表 3 ER, ER 在各组大鼠子宫中的表达(  $\bar{x} \pm s, n = 6$  )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	A	
		ER	ER
正常对照	-	0.856 ±0.010	0.637 ±0.004
己烯雌酚	0.000 18	0.795 ±0.025 <sup>1)</sup>	0.634 ±0.001 <sup>1)</sup>
二仙汤	7.5	0.970 ±0.005 <sup>2)</sup>	0.644 ±0.002 <sup>2)</sup>
淫羊藿	1.5	0.957 ±0.036 <sup>2)</sup>	0.644 ±0.003 <sup>2)</sup>
仙茅组	1.5	0.921 ±0.055 <sup>2)</sup>	0.644 ±0.003 <sup>2)</sup>
巴戟天	1.5	0.855 ±0.006	0.635 ±0.002
当归	1.0	0.851 ±0.006	0.637 ±0.002
黄柏	1.0	0.851 ±0.005	0.637 ±0.003
知母	1.0	0.840 ±0.043	0.637 ±0.002

#### 4 讨论

二仙汤是张伯讷教授于 20 世纪 50 年代创制的、临床常用的妇科方剂, 治疗更年期综合征是临床应用最广泛之处。既往研究<sup>[3]</sup>表明二仙汤可通过改善老龄大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴功能, 延缓下丘脑衰老, 治疗更年期综合征。在我们的实验中亦发现二仙汤及其房中君药淫羊藿、仙茅, 使药当归均可使幼年大鼠子宫系数增加, 但对血清  $E_2$  的影响虽然有不同的升高, 而无统计学意义, 因此我们考虑二仙汤及其方中药物是否通过激素作用的靶器官-子宫, 直接发挥雌激素受体调节剂的作用。

子宫增重实验是筛选药物雌激素活性的一种常用方法<sup>[4]</sup>, 子宫组织含有大量的雌激素受体(ER), 具有雌激素活性的物质, 如本实验中二仙汤、淫羊藿、仙茅、当归在大鼠体内经代谢产生活性物质与 ERs 结合, 激活雌激素受体应答元件(ERE), 诱发细胞内反应, 增加靶蛋白的表达而使子宫重量增加。

己烯雌酚也使子宫系数增加, 并且幅度比二仙汤及其组方中药大很多, 我们考虑二者机制可能不同。从子宫形态学观察, 我们发现己烯雌酚作用下子宫内膜厚度明显增加, 上皮细胞呈高柱状排列, 高度亦明显增加。免疫组织化学染色发现, 己烯雌酚可明显下调 ER 和 ER 在子宫组织中的表达, 这与

Kangjs<sup>[5-6]</sup>等的研究结果一致,也与 Wilder J 等<sup>[7]</sup>研究显示的雌激素诱发子宫内膜癌可能与其下调 ER 基因转录有关相一致。而二仙汤、淫羊藿、仙茅可明显上调 ER 和 ER 在子宫组织中的表达。由此,我们推测二仙汤对大鼠生殖器官的影响不同于己烯雌酚,在子宫形态上则表现为子宫内膜厚度和上皮细胞的高度无明显改变,提示二仙汤对子宫内膜组织无雌激素样促增殖作用。

综上所述,二仙汤可以通过雌激素受体直接作用于雌激素的靶器官—子宫,发挥植物雌激素样作用,为临床用于治疗与雌激素水平相关的疾病提供一定的理论指导。但详细理解其与雌激素受体之间是如何相互影响还有待进一步阐明。

#### [参考文献]

- [1] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1994: 178.
- [2] Jefferson W N, Elizabeth P B, Clark G, et al. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse utero-trophic responses [J]. *Chromatography B*, 2002, 777: 179.

- [3] 廖柏松,胡燕,鞠躬,等. 二仙汤对 18 月龄雌性大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴功能的调节[J]. *山东中医学院学报*, 1996, 20(6): 396.
- [4] Shelby M D, Newbold R R, Tully D B, et al. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104(12): 1296.
- [5] Kang J S, Lee B J, Ahn B, Kim D J, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the uterus and vagina of immature rats treated with 17-ethinyl estradiol [J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65(12): 1293.
- [6] Kang J S, Jung N J, Kim S, et al. Down regulation of estrogen receptor alpha and beta expression in carcinogen-induced mammary gland tumors of rats [J]. *Eksp Onkol*, 2004, 26(1): 31.
- [7] Wilder J L, Shajahan S, Khattar N H, et al. Tamoxifen-associated malignant endometrial tumors: pathologic features and expression of hormone receptors estrogen and progesterone; a case controlled study [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(2): 553.

[责任编辑 聂淑琴]

#### (上接第 117 页)

- [3] 郭青龙,郭殿武,陈真. 茵栀黄注射液保肝作用的实验研究[J]. *中国药科大学学报*, 2001, 32(6): 440.
- [4] 李瑞芬,范玉明,王希海. 茵栀黄注射液对大鼠实验性肝损伤的治疗作用[J]. *中药药理与临床*, 2001, 17(2): 23.
- [5] 任永申,张萍,杜晓曦,等. 基于 HPLC 指纹图谱的茵栀黄注射液质量一致性和稳定性研究[J]. *中草药*, 2008, 39(6): 837.
- [6] 陈辉扬,陈军,温平康. 茵栀黄注射液的药理作用与临床应用评价[J]. *药品评价*, 2005, 2(2): 122.

- [7] 王有良. 茵栀黄注射液佐治新生儿病理性黄疸 42 例临床观察[J]. *儿科药学杂志*, 2009, 15(5): 28.
- [8] 张奕梅,黎燕玲,黄翎. 茵栀黄注射液联合微生态调节剂佐治新生儿高胆红素血症 128 例疗效观察[J]. *中国医药导报*, 2009, 6(3): 63, 67.
- [9] 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,2001: 581.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991: 458.

[责任编辑 聂淑琴]