

葛根素对去卵巢大鼠下丘脑 ER β 、GnRH 阳性神经元表达的影响

梁若笏 王香桂 蒋 军 宋俏蔚 叶 平

摘 要 **目的** 观察葛根素是否对去卵巢大鼠血雌二醇(E₂)水平改变及对下丘脑弓状核(Arc)ER、GnRH 阳性神经元表达具有雌激素样作用。**方法** 通过不同剂量葛根素液、倍美力溶液、灌胃去卵巢大鼠 7 周,观察大鼠血雌二醇(E₂)水平变化,并用 ABC 免疫组化法观察大鼠下丘脑弓状核 ER β 、GnRH 阳性神经元表达的光密度值(AOD)变化。**结果** 葛根素高低剂量组较倍美力组血清 E₂ 水平和 ER β 、GnRH 阳性神经元表达虽有减少,但无显著差异($P>0.05$);较造模组有显著上升($P<0.01$);两组间无显著差异($P>0.05$)。**结论** 葛根素能上调血 E₂ 水平和下丘脑弓状核内 ER β 、GnRH 阳性神经元表达,以此调节内分泌水平,进一步发挥药理作用。

关键词 葛根素 异黄酮类 卵巢切除术 神经内分泌学

Effects of Puerarin on ER β and GnRH Positive Neurons in Arc and on Endocrine Regulation of Ovariectomized Rats. Liang Ruojia, Wang Xianggui, Jiang Jun, Song qiaowei, Ye Ping. Zhejiang Province Chinese Medical Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To investigate the effects of Puerarin on the level of E₂, ER β and GnRH positive neurons in Arc of ovariectomized rats, providing information of the mechanism of Puerarin on the endocrine system. **Methods** Radio-immunity and immunohistochemistry were used to test the contents of serum E₂, the number of ER β and GnRH positive neurons in Arc. **Results** Compared with ovariectomized group, the level of E₂, the expression of ER β and GnRH positive neurons of the other four groups increased significantly($P<0.01$). The above indicators in Puerarin groups with high and low dosages were less than estrogen treated and non-ovariectomized groups, but there was no significant difference between them ($P>0.05$). **Conclusion** The present study suggests that Puerarin can obviously increase the level of E₂ and the expression of ER β and GnRH positive neurons in Arc, regulate the endocrine system, so as to improve the endocrine system of ovariectomized rats.

Key words Puerarin; Isoflavones; Ovariectomized; Neuroendocrinology

近年来,国内外学者较多关注利用植物雌激素如大豆等的雌激素样作用治疗和预防雌激素缺乏相关疾病,以取代激素替代疗法从而减少其不良反应。葛根在泰国被作为传统草药治疗更年期症状,临床试验证实其能增加骨更新率,改善阴道环境;动物研究表明能预防骨质疏松症,乳腺癌及雌激素替代治疗(ERT)^[1~3]。葛根素由豆科葛属植物中提取,成分为 4,7-二羟基-8- β -D-葡萄糖基异黄酮,其空间结构与天然雌激素非常相似,故具有弱雌激素样作用及与雌激素受体结合的特性^[1]。但大豆中异黄酮的含量仅 0.1% 左右,而葛根素占葛根异黄酮 50% 左右。因此葛根的研究与开发越来越受到关注,国内外

动物实验证实对于低雌激素水平者,葛根素表现为弱雌激素样作用,对于高雌激素水平者则表现为雌激素拮抗作用,已证实其对雌激素受体 ER α 和 ER β 有不同的结合能力^[1,3~5]。本实验验证葛根素是否具有雌激素样作用的同时,观察其对下丘脑的影响进而探讨其可能的机制,为其成为 ERT 的理想药物提供实验依据。

材料与方法

1. 实验动物:清洁级的同窝 SD 大鼠,雌性,体重 300 $\pm$ 15g,18 月龄(相当于生育期),共 50 只,由中国科学院上海实验动物中心提供,SCXK:(沪)2003-0003。

2. 实验药物:葛根素注射液购自浙江康恩贝制药股份有限公司(每 2ml 约含葛根素 100mg);倍美力片剂:美国惠氏-艾尔斯特公司艾尔斯特大药厂制造,由苏州立达制药有限公司包装(每片含有 E₂0.625mg)。

3. 主要实验试剂:ER β 试剂盒:由英国 ABR 公司生产;GnRH 试剂盒:由英国 Abcam 公司生产;生物素化的山羊抗兔

基金项目:浙江省中医药管理局基金资助课题(2003C049)

作者单位:310006 杭州,浙江省中医院妇科(梁若笏、王香桂、蒋军、叶平);315000 浙江省宁波市中医院(宋俏蔚)

通讯作者:叶平,副教授,副主任中医师,电子信箱: sqjyp@mail.hz.zj.cn

血清试剂盒:由武汉博士德公司生产;链霉素和素抗生物素-辣根过氧化物酶复合体:由武汉博士德公司生产;E₂ 试剂盒:由美国 MARKET 公司生产。

4. 主要仪器、设备:Leica CM 1900 恒冷切片机:德国 Leica 公司制造。OLYMPUS BCH20 光学显微镜:日本 OLYMPUS 公司制造;NIKON 光学显微镜:日本 NIKON 公司制造;图像分析处理软件:为 NIKON 公司 ACT-1 ver2.63 版本和 OPTIMAS 6.5 软件。

5. 实验方法:(1)去卵巢大鼠模型建立:施行经背双侧卵巢摘除术。用药各组大鼠用 1% 戊巴比妥钠(32mg/kg)腹腔注射麻醉,打开腹膜,切除双侧卵巢。假手术组只切除卵巢周围少量脂肪^[6]。阴道图片染色法及 ELISA 法测定血 E₂ 确定造模成功。本方法的最小检测量小于 10pg/ml。(2)实验分组:随机分为:假手术组、去势造模组、葛根素高、低剂量组和阳性对照倍美力组,每组各 10 只,共 5 组。全价饲料(不包含大豆粉)及自由饮水喂养。(3)实验用药:每天分别用葛根素注射液稀释液 120mg/kg、30mg/kg,倍美力水溶液 0.07mg/kg 体重灌胃;假手术组及造模组用生理盐水每只 2ml 灌胃,共 48 天(相当于 12 个动情期)。(4)标本制备及检测指标:眼底毛细血管静脉丛取血,常规分离血清备血,ELISA 法测定血 E₂。3% 的戊巴比妥钠(40mg/kg,腹腔注射)麻醉大鼠,开胸暴露心脏,用生理盐水 200ml 快速冲洗大鼠体循环的血液,继以 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)配制的 4% 多聚甲醛 200ml 灌注固定 2h,断头取出全脑。以 4% 多聚甲醛后固定 24h 后,移入 30% 的蔗糖溶液脱水,取出内侧基底下丘脑区(含 ARC 及腹内侧核),放于-20℃ 的冰箱保存。切片前组织块先用 OCT 包埋,再在恒冷切片机下将组织块切成 30μm 厚的冠

状切片,隔 3 取 2。SABC 法染色程序如下^[7]:切片首先用抗体稀释液孵育切片(4℃,24h),再分别用兔抗大鼠的 ER 血清(1:100,ABR 公司)和兔抗大鼠的 GnRH 血清(1:100,abcam 公司)各自孵育切片(4℃,72h),再用生物素化的山羊抗兔血清(1:100,武汉博士德公司,4℃,48h)和链霉素和素抗生物素-辣根过氧化物酶复合体(Streptavidin-Peroxidase,1:100,武汉博士德公司,37℃,24h)孵育,DAB 呈色。每步骤间用 0.1mol 的 PBS 充分洗涤。常规梯度乙醇脱水、透明、封片,光学显微镜下用 NIKON 公司 ACT-1 ver2.63 图像分析处理系统观察、摄片,脑核团的定位参照大鼠脑立体定位图谱^[8]。用 OPTIMAS 6.5 图像分析系统测定下丘脑弓状核阳性神经元光密度值。阳性对照组用 0.01mol PBS 代替一抗,按上述 SABC 法进行反应,实验结果为阴性。

6. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 for Windows 软件包进行统计学处理。根据大鼠 Paxinos-Waston 图谱,每个大鼠选取标准弓状核切片各 2 张,用 OPTIMAS 6.5 进行光密度值测定。计量资料得出的数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较用 *F* 检验中的单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较如果方差齐性用最小显著性差异检验(LSD-*t*)检验,如果方差不齐用 Tamhane's *T*² 检验,以 *P* < 0.05 为差异显著。

结 果

1. 病死率为 0%。造模 7 天后大鼠血中 E₂ 含量水平的改变,见表 1。造模后,葛根素低剂量组、葛根素高剂量组、阳性对照倍美力组、造模组中血 E₂ 含量均低于假手术组,且有显著性差异(*P* < 0.01)。

表 1 E₂ 及神经元积分光密度值

组别	E ₂ (pg/ml)		积分光密度值	
	7 天后	7 周后	ERβ 阳性神经元	GnRH 阳性神经元
倍美力组	8.33 ± 2.66 **	40.57 ± 8.76 *	53.39 ± 5.17 **	24.80 ± 3.58 **
葛低组	8.36 ± 2.26 **	21.37 ± 7.23 *	56.85 ± 3.08 **	27.89 ± 2.44 **
葛高组	7.95 ± 1.85 **	18.37 ± 5.29 *	51.72 ± 6.40 **	24.69 ± 2.42 **
造模组	8.16 ± 2.38 **	3.72 ± 1.30	19.67 ± 4.46	11.39 ± 2.23
假手术组	17.74 ± 2.81	15.15 ± 4.28 *	51.82 ± 1.47 **	25.30 ± 2.80 **

与假手术组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2. 用药后大鼠血中 E₂ 含量水平的改变,见表 1。外源性 E₂ 补充 7 周后大鼠血 E₂ 水平明显上升,葛根素低剂量组、葛根素高剂量组、阳性对照倍美力组、假手术组的血 E₂ 与造模组比较有显著差异(*P* < 0.01),而葛根素低剂量组、高剂量组、阳性对照组、假手术组 4 组间对比均无显著性差异(*P* > 0.05)。

3. 不同药物对去卵巢大鼠下丘脑 ERβ 阳性神经元表达的影响,见表 1。葛根素低剂量组、葛根素高剂量组、阳性对照倍美力组、假手术组中大鼠下丘脑

弓状核(ARC)的 ER 阳性神经元光密度值与造模组比较差异显著(*P* < 0.01),低剂量组、高剂量组与阳性对照倍美力组、假手术组比较无显著差异(*P* > 0.05)。

4. 不同药物对去卵巢大鼠下丘脑 GnRH 阳性神经元表达的影响,见表 1。葛根素低剂量组、葛根素高剂量组、阳性对照倍美力组、假手术组中大鼠下丘脑弓状核(ARC)的 GnRH 阳性神经元光密度值与造模组比较差异显著(*P* < 0.01),低剂量组、高剂量组与阳性对照组比较无显著差异(*P* > 0.05)。

5. 不同药物对去卵巢大鼠下丘脑 ARC 核团 ER β 、GnRH 阳性神经元表达的影响,见图 1。阳性神

经元为浓密的胞核着色,胞核呈圆形或椭圆形,胞质和突起微着色或不着色。

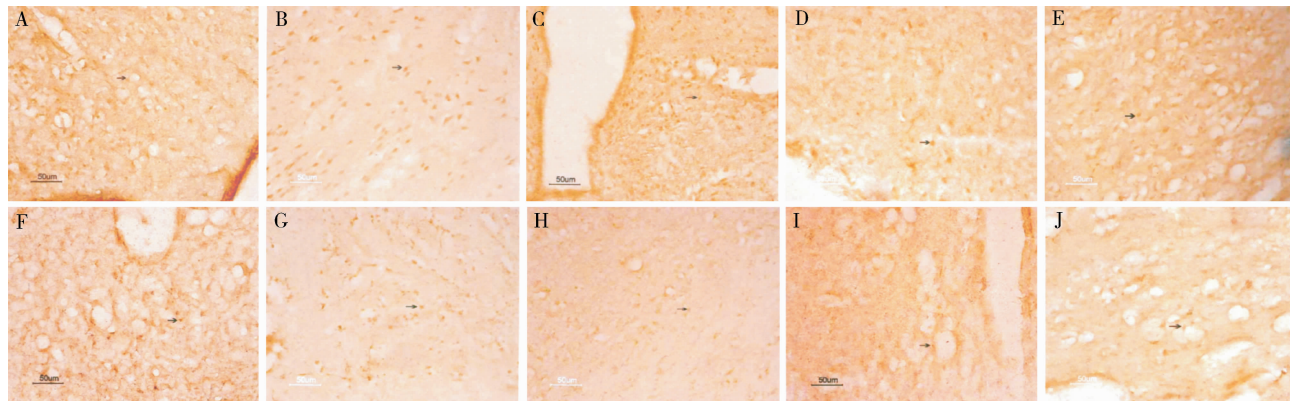


图 1 大鼠下丘脑 ARC 核团切片 ($\times 200$)

A. 倍美力组 ER β 阳性反应(箭头示);B. 葛低组 ER β 阳性反应(箭头示);C. 造模组 ER β 阳性反应(箭头示);D. 葛高组 ER β 阳性反应(箭头示);E. 假手术组 ER β 阳性反应(箭头示);F. 倍美力组 GnRH 阳性反应(箭头示);G. 葛高组 GnRH 阳性反应(箭头示);H. 葛低组 GnRH 阳性反应(箭头示);I. 假手术组 GnRH 阳性反应(箭头示);J. 造模组 GnRH 阳性反应(箭头示)

讨 论

生殖内分泌调节是一个十分复杂的过程,涉及到下丘脑-垂体-性腺 3 个水平所组成的反馈系统。雌激素尤其是 E_2 在整个生命过程中一直影响雌性丘脑下部的活动,对性分化、丘脑下部的发育和成熟均有影响,并为丘脑下部和垂体提供排卵的信号,还对心血管、骨骼起着重要的保护作用。下丘脑是性腺轴和神经内分泌网络的高级中枢,分泌多种神经递质,因其富含 ER 又是雌激素作用的重要靶组织之一。研究表明,雌激素是通过与靶器官神经细胞上的 ER 结合而发挥生物学效应^[4]。ER β 在大鼠大脑神经系统单独分布区域为:ARC、嗅球、视上核、室旁核(PV)、视交叉、灰结节、腹侧大脑脚、小脑浦肯纤维、脊髓的 III~V、VIII、IX 神经节和松果体腺。体外实验已证实植物源性雌激素与 ER β 的亲合力较高,但尚未对神经细胞有报道,本实验通过观察下丘脑 ARC ER β 、GnRH 阳性神经元表达的影响,探讨葛根素对去卵巢大鼠的作用^[1,3]。

本实验观察到去卵巢后大鼠体内雌激素水平降低,大脑认知区域中 ER 表达也随着下降;用药后,血 E_2 及脑内 ER 表达明显增加,呈正向调节,这种作用在本实验中所选择的动物源性雌激素和葛根素两个不同剂量的植物雌激素无明显不同,提示补充外源性雌激素对去势雌性大鼠下丘脑 ER 的表达有促进作用,本文结果支持生理剂量的雌激素对 ER 为正向调节这一学说。这结果与文献报道的外源性雌激素

对脑内 ER 表达有上调的作用一致^[4]。根据实验结果,单纯从受体调节机制推测:体内 E_2 缺乏的状态下靶器官中 ER 表达水平低,外源性雌激素将优先与亲和力和较高的受体结合,由于植物源性雌激素与动物源性雌激素一样均能上调靶器官 ER 表达,但体现出较少的不良反应,因此这类制剂可能是绝经后妇女 ERT 更理想的药物。

GnRH 神经元是中枢生殖调控体系的最终共同通路,其必须与垂体促性腺细胞表面的相应受体结合后才能引起相关的信号转导系统的启动^[9,10]。任何影响 GnRH 受体基因表达及蛋白含量的因素均可影响 GnRH 的作用,从而影响下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPGA)的功能^[10,11]。ARC 及腹内侧核(VMH)作为 GnRH 的紧张性分泌中心,其功能活动与维持 GnRH 的基础分泌水平有关。性激素可能通过影响 ARC 神经元突触联系的功能来反馈调节 GnRH 释放。 E_2 促进 GnRH 的作用部位是下丘脑中缝基底 ARC-VMH,通过调控转录和翻译后修饰过程,促进 GnRH mRNA 的合成^[9,11]。本实验观察到,去卵巢后动物体内雌激素水平降低,下丘脑 GnRH 表达也随着下降;用药后,脑内 GnRH 表达明显增加,呈正向调节,这种作用在本实验中所选择的动物源性雌激素和葛根素两个不同剂量中无明显不同。提示补充外源性雌激素对老年雌性大鼠下丘脑 GnRH 的表达有促进作用。当予以外源性雌激素时,从理论上通过负反馈调节机制分析,下丘脑的 GnRH 水平应相应下降,但本实验结果

表现为 GnRH 受体蛋白合成增多,使其介导的 GnRH 的作用增强,HPGA 功能相对活跃。说明外源性雌激素可通过改变垂体 GnRH 受体的基因表达和蛋白水平调节 HPGA 的功能活动。这显示了不同于经典 GnRH 的调节机制,其中可能涉及多种信息分子(神经递质/调质)构成“cross-talk”的神经元回路和网络,以递质共存、共释放、共作用、相互作用的方式发挥对 GnRH 的促进、抑制、兴奋/抑制双向调节的 3 种作用这一理论研究来解释,可能还与卵巢等内在自身调节及反馈机制有关^[10]。本实验为进一步深入研究葛根素对 GnRH 的生理作用提供了有意义的资料。

结合本实验的结果,我们认为葛根素可提高去卵巢大鼠血中 E_2 水平,有雌激素样作用,显示的都是葛根素对去卵巢大鼠大脑内相应核团中 $ER\beta$ 、GnRH 阳性神经元的上调作用,这可能与葛根素具有雌激素效应有关。至于它是否能够代替雌激素作为治疗绝经期综合征的药物,使用的剂量和效应还有待于今后进一步研究。

参考文献

- Boonchird C, Mahapanichkul T, Cherdshewasart W. Differential binding with $ER\alpha$ and $ER\beta$ of the phytoestrogen-rich plant *Pueraria mirifica* [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43(2):195-200
- Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S, Malaivijitnond S. Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant [J]. *Maturitas*, 2008, 61(4):350-357
- 郑忠志,李宏伟,龚海英,等.葛根素对小鼠子宫 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 蛋白表达的影响[J]. *武警医学院学报*, 2008, 17(11):947-949
- Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary $ER\alpha$ and $ER\beta$ [J]. *Maturitas*, 2007, 58(2):174-181
- 郑高利,张信岳,郑经伟,等.葛根素和葛根总异黄酮的雌激素样活性[J]. *中药材*, 2002, 25(8):566-568
- Aydin M, Yilmaz B, Alcin E, *et al.* Effects of letrozole on hippocampal and cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats [J]. *Neuroscience*, 2008, 151(1):186-194
- 宋俏蔚,叶平,王香桂,等.葛根素对去卵巢大鼠下丘脑正中隆起 nNOS 阳性神经元表达的影响[J]. *中国中医药科技*, 2007, 14(6):421-422
- Paul H, Lewis T. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. Elsevier Academic Press, 2006:36-51
- Brenner RM, Carlisle KS, *et al.* Morphology of the oviducta and endometria of cynomolgus macaques during the menstrual cycle [J]. *Biol Reprod*, 1983, 29(5):1289-1312
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4):963-972
- Crawford JL, Heath DA, Haydon LJ, *et al.* Gene expression and secretion of LH and FSH in relation to gene expression of GnRH receptors in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) demonstrates highly conserved mechanisms [J]. *Reproduction*, 2009, 137(1):129-140

(收稿:2011-06-16)

(修回:2011-06-29)

膀胱癌尿沉渣 RUNX3 基因启动子区域 CpG 岛甲基化状况及意义

魏任雄 廖于峰 熊彬 马建波 贾广成

摘要 **目的** 探讨膀胱癌患者尿沉渣细胞中 RUNX3 基因启动子 CpG 岛的甲基化状况及其临床意义。**方法** 收集临床病理确诊 39 例膀胱癌,采用甲基化特异 PCR(MSP)的方法,检测膀胱癌肿瘤组织和配对的尿沉渣 RUNX3 基因启动子 CpG 岛的甲基化异常频率,同时以 45 例非肿瘤性泌尿系疾病患者及 14 例健康志愿者作为对照。**结果** 膀胱癌肿瘤组织和配对的尿沉渣 RUNX3 基因启动子甲基化阳性率分别为 64.1% (25/39) 和 56.4% (22/39),二者密切相关 ($r=0.420$, $P=0.008$)。膀胱癌尿沉渣 RUNX3 基因启动子甲基化阳性率 (64.1%, 25/39) 显著高于非肿瘤组 (6.7%, 3/45) ($\chi^2=31.015$, $P=0.000$),非肿瘤组与志愿组间 (阳性率为 0) 并无明显差异 ($P>0.05$);尿沉渣 RUNX3 基因甲基化对膀胱癌诊断的敏感性为 64.1% (25/39),特异性为 94.9% (56/59)。浸润性 ($\geq pT2$) 和表浅性 ($\leq pT1$) 膀胱癌 RUNX3 基因甲基化阳性率之间的差异有统计学意义 ($\chi^2=10.363$, $P=0.001$)。性别、年龄、病理分级与 RUNX3 基因甲基化均无明显相关性 (均 $P>0.05$)。**结论** RUNX3 基因启动子异常甲基化

基金项目:宁波市医学科技计划资助项目(2007010)

作者单位:315010 宁波市第二医院检验中心(魏任雄、廖于峰、熊彬、马建波);宁波市第二医院泌尿外科(贾广成)