论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1018-03

异黄酮改构化合物 F11 对去势大鼠乳腺的影响

尹姝心[1],艾国平[2],粟永萍[2],张丽龙[2],杨 伟[1],陈 诚[1],常 青[1] (第三军医大学:[1]西南医院妇产科,[2]预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨异黄酮改构化合物 F11 对去势大鼠乳腺的生物学效应。方法 选用雌性 Wistar 大鼠,制作去势模型分为生理盐水组、雌二醇组、F11 组、假手术组,腹腔给药每日 1 次,连续给药 12 周,每 4 周测血清中雌二醇含量,12 周后处死大鼠取乳腺组织观察乳腺组织形态学变化,免疫组化及 Western blot 检测 PCNA、ERα、ERβ 表达情况。结果 F11 早期可使血清 E_2 升高;减缓去势大鼠乳腺组织的萎缩;可上调 ERβ 及 PCNA 在去势大鼠乳腺组织中的表达。结论 F11 有类似雌激素样作用,能有效缓解去势大鼠乳腺的萎缩,可能是通过上调 ERβ 实现的。

关键词:异黄酮改构化合物 F11,去势大鼠,大鼠乳腺
中图法分类号:R-332;R322.66;R977.12 文献标识码:A

Effects of a reconstructed isoflavone F11 on the breast in ovariectomized rats

YIN Shu-xin[1], AI Guo-ping[2], SU Yong-ping[2], ZHANG Li-long[2], YANG Wei[1], CHEN Cheng[1], CHANG Qing[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of a reconstructed isoflavone F11 on the breast in ovariectomized rats. Methods The ovariectomized rat model was established in female Wistar rats. F11 was injected intraperitoneally once daily for 12 weeks, while normal saline or estrogen (E_2) were given in the controls. The serum level of E_2 was detected every 4 weeks. Twelve weeks later, all rats were sacrificed by blood letting from femoral artery. The breast tissues were collected and observed histomorphologically. PCNA, ERα and ERβ in rat breast tissues were examined by immunofluorescence and Western blot. Results In the ovariectomized rats, F11 increased the serum level of E_2 in the early period (4 weeks after administration), ameliorated breast atrophy, and upregulated the expressions of ERβ and PCNA, but not the expression of ERα in the breast tissues. Conclusion The reconstructed isoflavone F11 presents estrogen activity and ameliorates effectively breast atrophy in ovariectomized rats, which may be related to the increased expression of ERβ.

Key words: reconstructed isoflavone F11; ovariectomized rat; rat brest

雌激素替代治疗可减轻围绝经期症状不利影响[1],但长期应用雌激素后易产生高血凝状态、高血压、水肿等副反应,增加乳腺癌[2]的发病危险性。植物雌激素中的异黄酮结构类似雌激素,但雌激素活性弱,因此对其结构进行改造,保留其选择性雌激素调节作用,提高其活性已成为国内外研究的焦点。我们前期研究显示以三羟基异黄酮为母体进行化学改构形成的化合物 F11 具有抑制肿瘤细胞增殖的能力[3],对改善去势大鼠的子宫萎缩、骨质疏松等有较好的作用,本研究在前期研究的基础上进一步观察 F11 对去势大鼠乳腺的生物学效应,以期明确 F11 能否成为理想的雌激素替代品,为开发新的有效的缓解围绝经期症状的药物提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物

雌二醇,美国 Sigma 公司生产;异黄酮改构化合物 F11:华西药学院提供。抗体购自美国 Santa 公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉公司。

1.2 实验动物、分组及模型的建立

1.2.1 动物 Wistar 大鼠 40 只,3~4 月龄,雌性,体质量(220±20)g,购自第三军医大学实验动物中心,由第三军医大学国家创伤、烧伤及复合伤重点实验室动物房于 SPF 环境下饲养。

基金项目:重庆市攻关课题(CSTC2004BB5034)
Supported by the Sci & Tech Research Project of Chongqing (CSTC 2004BB5034)
作者简介:尹姝心,女,河北省唐山市人,硕士研究生,医师,主要从事妇科内分泌方面的研究。电话:(023)68772003
通信作者:常 青,电话:(023)68765399,E-mail:CQLi99@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-07;修回日期:2008-03-24

1.2.2　**分组**　　随机分为 4 组，每组 10 只，分为生理盐水组（NS 组），雌二醇组（E_2 组），F11 组，假手术组（sham 组）。

1.2.3　**去势（去卵巢）大鼠模型**　　大鼠于动物房适应性喂养 1 周后构建去势模型。1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉后，腹卧位固定，剪去躯干下 1/3 处毛发，消毒后沿脊柱正中纵形切开 1 cm 皮肤，分离肌肉层后，可见淡黄色脂肪团，以小弯镊拉出脂肪团，可见脂肪中一团细线状深红色组织即为卵巢，于卵巢下端穿一丝线结扎，剪去卵巢，将脂肪组织放回腹腔，逐层缝合切口，消毒。假手术（sham）组仅切除卵巢周围的少量脂肪组织。

1.2.4　**给药方法**　　手术后各组大鼠正常饮食 1 周，第 2 周后每日腹腔注射给药，NS 组和 sham 组每日给予生理盐水 2 ml，E_2 组给予雌二醇 50 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，F11 组给予 F11 50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，共 12 周。

1.3　检测指标及方法

1.3.1　**血清学检测雌二醇（E_2）**　　采用全自动电化学发光免疫分析仪检测。

1.3.2　**各组乳腺组织切片**　　HE 染色，观察大鼠乳腺组织形态学变化。

1.3.3　**免疫组化检测各组大鼠乳腺组织 PCNA 表达情况**　　切片、脱蜡及梯度酒精漂洗，大量清水冲洗后浸泡于蒸馏水中 10 min，再将切片置于枸橼酸盐缓冲液中，90 ℃热修复 20 min，待其自然冷却；3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min，滴加封闭用正常山羊血清室温孵育 15 min，倾去，滴加稀释一抗（PCNA：1∶100），4 ℃湿盒过夜，PBS 冲洗，5 min×3 次，滴加相应生物素化二抗 IgG，37 ℃孵育 15 min，PBS 冲洗，5 min×3 次；滴加辣根过氧化物酶标记的链白卵素 37 ℃孵育 15 min；PBS 冲洗，5 min×3 次；DAB 显色。苏木精复染，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

1.3.4　**Western blot 法检测大鼠乳腺组织 ERα、ERβ、PCNA 蛋白的表达情况**　　提取各组乳腺组织总蛋白后，12% SDS-PAGE 凝胶电泳后，将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜上，将 PVDF 膜与 5% 脱脂奶粉一起 4℃封闭过夜，取 PVDF 膜与稀释的一抗（ERα 1∶200，ERβ 1∶100，PCNA 1∶400，GAPDH 1∶1 000 为内参，5% 脱脂奶粉稀释）一起 4 ℃过夜，PBS-T 洗膜 3 次，每次 5 min，放入含辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 及羊抗兔 IgG 二抗抗体的封闭，37 ℃孵育 1 h，PBS-T 洗膜，5 min×3 次，DAB 显色。

1.4　统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用 SPSS12.0 统计软件行秩和检验。

2　结果

2.1　血清中雌二醇含量的检测

F11 早期可使血清 E_2 显著升高，与 NS 组比较有统计学差异（$P<0.05$），后逐渐下降，至用药 12 周后血清 E_2 水平与 NS 组比较无统计学差异（$P>0.05$），见表 1。

2.2　大鼠乳腺组织 HE 染色结果显示

NS 组大鼠乳腺腺体数目减少，腺腔变小；雌二醇组和假手术组大鼠乳腺腺体均较发达，腺体数目较多，腺腔增大，腺上皮增生明显（图 1）；F11 组大鼠乳腺腺体也较发达，腺腔增大，腺上皮细胞增生活跃。提示 F11 能去势改善大鼠乳腺腺体的萎缩。

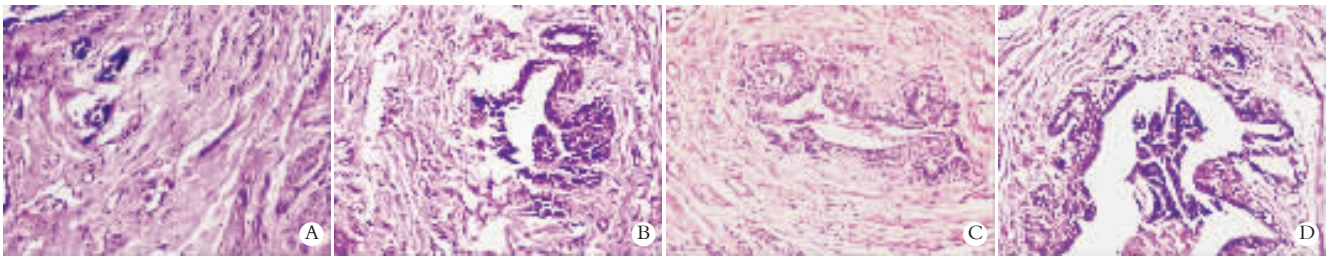
2.3　PCNA 在各组大鼠乳腺组织的表达情况

PCNA 主要是反映细胞增殖情况，免疫组化染色显示其在细胞核分布，呈棕色颗粒状。生理盐水组 PCNA 表达明显减弱（图 2A），E_2 组腺体组织中 PCNA 表达明显增强、增多（图 2B），sham 组表达也较明显（图 2D），F11 组表达也增加，但弱于雌二醇组（图 2C）。

表 1　不同处理组去势大鼠血清 E_2 水平（pg/ml，$n=40$）

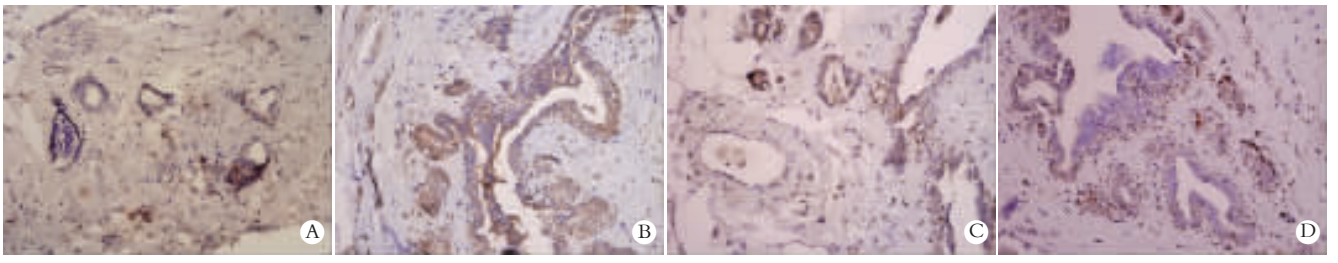
组别	用药 4 周	用药 8 周	用药 12 周
NS 组	3.33 ± 1.15	2.00 ± 0.82	1.25 ± 0.46
E_2 组	55.00 ± 37.87[a]	277.00 ± 86.31[ab]	32.33 ± 25.84[ab]
F11 组	91.20 ± 89.04[a]	6.75 ± 9.50	1.50 ± 0.53
sham 组	72.40 ± 86.16	17.75 ± 12.07	6.20 ± 11.62

a：$P<0.05$，与 sham 组比较；b：$P<0.05$，与 NS 组比较



A：NS 组；B：E_2 组；C：F11 组；D：sham 组

图 1　各组大鼠乳腺组织病理学观察　（HE×400）

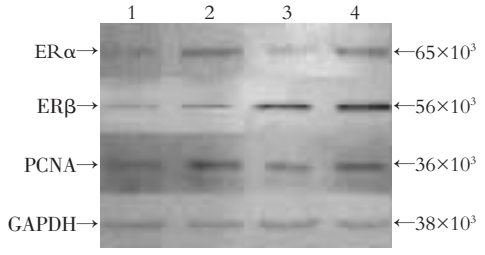


A：NS 组；B：E_2 组；C：F11 组；D：sham 组

图 2　各组大鼠乳腺组织 PCNA 的表达　（×400）

2.4 Western blot 法检测 ERα,ERβ,PCNA 在大鼠乳腺组织中的表达

雌激素受体 α(ERα)在 E_2 组及 sham 组大鼠乳腺组织表达增强,生理盐水对照组和 F11 组表达较弱;而雌激素受体 β(ERβ)在 F11 组及 sham 组大鼠乳腺组织表达较强,E_2 组表达较弱,生理盐水组表达最弱。PCNA 在 E_2 组大鼠乳腺表达最强,NS 组表达最弱,F11 组 PCNA 表达弱于 sham 组。GAPDH 为引入的内参照(图3)。



1:NS 组 2:E_2 组 3:F11 组 4:sham 组

图3 Western blot 检测 ERα,ERβ PCNA 在乳腺组织的表达情况

3 讨论

雌激素发挥雌激素的作用主要是通过其特异性的雌激素受体介导,包括 ERα 和 ERβ 两种受体亚型,两种受体亚型均可与配体结合发挥各自的生物学效应。两种受体亚型在体内的分布不一致,两者与不同配体的亲和力也各有高低,大多数动物源性雌激素与 ERα 的亲和力高于 ERβ,而多数植物源性雌激素与 ERβ 的亲和力高于 ERα[4]。这些发现提示,根据二种 ER 亚型的不同组织学分布,选择亲和力合适的一定配体,有可能实现雌激素替代治疗的组织选择性作用。

大豆异黄酮(soybean isoflavone)是一组多酚类的混合物,主要包括金雀异黄酮、大豆黄素和黄豆黄素等,它能与雌激素受体结合,具有弱雌激素样作用,故称之为植物雌激素。我们前期研究工作发现以三羟基异黄酮为母体进行化学改构形成的化合物 F11 具有抑制肿瘤细胞增殖的能力,对改善去势大鼠子宫的萎缩、骨质疏松等有较好的作用[5-7]。本实验结果显示在给去势大鼠腹腔注射 F11 四周后血清中雌二醇的水平较高,随着用药时间的增加在第 8、12 周时血清中雌二醇的含量明显降低,而雌二醇组的血清中雌二醇的含量一直持续在较高的水平,提示 F11 具有一定的类似雌激素的作用,在早期有促进体内合成分泌雌二醇的功能,但并不随着用药时间的延长,合成分泌雌二醇的能力增加,这也可能是异黄酮改构化合物 F11 无致肿瘤作用的可能机理,张丽龙等[8]研究证实了化合物 F11 对 Hela 细胞建立的荷瘤裸鼠模型的肿瘤有较强的抑制作用;大鼠乳腺形态学观察也提示去势大鼠用 F11 后,乳腺腺体增生,腺体数目增加,能改善去势大鼠乳腺的萎缩。PCNA 能较好反映细胞增殖能力,乳腺的免疫组化显示雌二醇组和假手术组的乳腺上皮细胞增生活跃,尽管 F11 组的乳腺腺体增生较为明显,但 PCNA 在乳腺组织的表达未见明显的增强,提示 F11 具有改善乳腺萎缩的作用,但对乳腺上皮的增生无明显的促进作用;进一步研究显示雌二醇主要通过 ERα 受体发挥作用,而 F11 主要通过 ERβ 发挥作用。

异黄酮改构化合物 F11 表达出较强的雌激素活性,改善了去势大鼠乳腺的萎缩,但对乳腺上皮细胞促增殖作用的能力却明显弱于雌激素,推测由于其可能主要与 ERβ 结合发挥相应生物学效应相关。提示植物雌激素改构物 F11 可作为新型的雌激素替代品改善绝经期后子宫、乳腺的萎缩、骨质疏松等症状,对子宫、乳腺上皮的促增殖作用明显弱于天然雌激素,具有进一步研发的价值。

参考文献:

[1] Prelevic G M, Kocjan T, Markou A. Hormone replacement therapy in postmenopausal women[J]. Minerva Endocrinol, 2005, 30(1):27-36.

[2] Rippy L, Marsden J. Is HRT justified for symptom management in women at higher risk of developing breast cancer? [J]. Climacteric, 2006, 9(6):404-415.

[3] 张丽龙,粟永萍,刘晓宏,等. 新型异黄酮及甾体类化合物体外抗癌细胞增殖活性的初步筛选[J]. 第三军医大学学报,2006,28(13):1393-1396.

[4] D'Haeseleer M, Cornillie P, Simoens P, *et al*. Localization of oestrogen receptors within various bovine ovarian cell types at different stages of the oestrous cycle[J]. Anat Histol Embryol, 2006, 35(5):334-342.

[5] 彭俊华,糜漫天,朱俊东,等. 辛基酚和三羟异黄酮对二甲基苯蒽诱发大鼠乳腺肿瘤的影响[J]. 第三军医大学学报,2005,27(23):2317-2320.

[6] 张 红,朱俊东,糜漫天,等. 三羟异黄酮与化疗药物联合作用对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 增殖的影响[J]. 第三军医大学学报,2006,28(7):710-713.

[7] 廖苇萍,石元刚. 黄芪多糖和大豆异黄酮对糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 第三军医大学学报,2007,29(5):416-418.

[8] 张丽龙,艾国平,粟永萍,等. 异黄酮类化合物 F11 抗癌活性的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2007,29(12):1155-1157.

(编辑 邓强庭)