论著

文章编号:1000-5404(2012)17-1750-04

异黄酮改构化合物F11雌激素效应初步研究

陈 诚[1],王 琳[1],艾国平[2],常 青[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院妇产科[1],军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 初步研究异黄改构化合物F11的雌激素效应。**方法** 构建去双卵巢大鼠动物模型,经腹腔注射F11[15、50、150 mg/(kg·d)3个剂量组(F11-15组、F11-50组、F11-150组)]共10周,同时设置阴性对照组,阳性对照组(E_2)和假手术组,统计分析各组大鼠子宫湿质量/体质量情况,HE染色观察用药前后阴道涂片和子宫内膜变化情况;Western blot检测子宫内膜组织ERα和ERβ的表达情况。**结果** F11-50及F11-150组大鼠子宫湿质量/体质量显著高于阴性对照组($P<0.05$),且F11-150组与E_2和假手术组无显著差别($P>0.05$)。阴性对照组大鼠阴道涂片以炎细胞为主,F11各组以角化上皮细胞为主,与E_2和假手术组相似;F11各组较阴性对照组子宫内膜腺体数目增多,腺腔增大,F11-150组与E_2和假手术组相似。F11各组ERα及ERβ蛋白表达均强于阴性对照组($P<0.05$),其中ERα表达弱于E_2和假手术组($P<0.01$),而F11-150组ERβ的表达强于E_2和假手术组($P<0.05$)。**结论** F11在增加去双卵巢大鼠子宫湿质量、阴道上皮成熟及子宫内膜ER的表达等方面均表现出雌激素效应,该效应主要通过ERβ介导。

[关键词] 异黄酮改构化合物F11;雌激素生物学效应;雌激素受体调节剂

[中图法分类号] R914.5; R962; R977.12 [文献标志码] A

Preliminary study of estrogenic effect of isoflavone derivative F11 *in vivo*

Chen Cheng[1], Wang Lin[1], Ai Guoping[2], Chang Qing[1] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To study the estrogenic effect of isoflavone derivative F11 *in vivo*. Methods The ovariectomized rat models were constructed, and the rats were divided into a negative control group (normal saline), a positive control group [estradiol, 50 μg/(kg·d)], a sham operation group and three F11 groups including a F11-15 group, a F11-50 group and a F11-150 group [intraperitoneal injection of F11 with 15, 50 and 150 mg/(kg·d), respectively]. After the treatment for 10 weeks, the ratio of rat uterus wet weight/body weight was analyzed, and the vaginal smear and endometrium were observed by HE staining. The expression of estrogen receptor (ER) α and ERβ in endometrial tissues was determined by Western blotting. Results The ratio of rat uterus wet weight/body weight in the F11-50 group and F11-150 group was significant higher than that of the negative control group ($P<0.05$), but the ratio of the F11-150 group was not significantly different from that of the positive control group or sham operation group ($P>0.05$). There were mainly inflammatory cells in the vaginal smear of the negative control group and keratinized epithelial cells in the vaginal smear of the F11 groups. The HE staining results showed that the quantity of endometrial glands and the size of gland cave in all the three F11 groups were greater than those of the negative control group, and those of the F11-150 were the same as the positive control group and sham operation group. The expression levels of ERα and ERβ in endometrial tissues in the F11 groups were significantly higher than those in the negative control group ($P<0.05$). The ERα expression level of the F11 groups was significantly lower than that of the positive control group and sham operation group ($P<0.01$), and the ERβ expression level of the F11-150 group was significantly higher than that of the positive control group and sham operation group ($P<0.05$). Conclusion F11 exhibits estrogenic effect on increasing uterus wet weight, promoting vaginal epithelium maturation and upregulating ER expression in endometrium of ovariectomized rats mainly through ERβ.

[**Key words**] isoflavone derivatives F11; estrogen effect; selective estrogen receptor modulator

Corresponding author: Chang Qing, Tel: 86-23-68765399

[通信作者] 常 青,电话:(023)68765399

激素治疗是改善绝经症状的重要治疗策略,但长期单用雌激素治疗可诱发子宫内膜癌的发生。研究发现,异黄酮类化合物结构类似雌二醇(estradiol,E_2),可表达雌激素样活性,该活性可因化合物分子结构的改变而增强,且促细胞增殖作用不显著[1],因此异黄酮类化合物结构改造后具有成为雌激素受体调节剂的可能。基于该思路,四川大学华西药学部对异黄酮进行结构改造(于异黄酮母环结构侧链上添加碱性基团)合成 24 个异黄酮改构化合物,前期实验已经证实异黄酮改构化合物 F11 具有较强的抑制离体子宫内膜(癌)细胞增殖的生物学活性[2]。本实验以去双卵巢大鼠为动物模型,研究 F11 对在体子宫及阴道的生物学效应,期望为研发新型雌激素受体调节剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 月龄 Sprague-Dawley 雌性大鼠,体质量(200 ± 20)g,购自第三军医大学实验动物中心,由第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所动物房于 SPF 环境下饲养。具体环境:温度:(22 ± 2)℃;湿度:50%;12 h 昼夜更替。所有动物自由进食水,喂养食物不含雌激素或植物雌激素成分。

1.2 主要试剂

兔抗鼠细胞雌激素受体 α 抗体(ERα)和 β 抗体(ERβ)均购自美国 Santa Cruz 公司,组织总蛋白提取液购自美国 Pierce 公司,4% ~12% Bis-Tris 预制胶等购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 实验动物模型的建立及分组

1.3.1 去双卵巢大鼠和假手术组大鼠模型的建立 参照徐淑云等《药理实验方法学》[3]构建动物模型。部分大鼠切除卵巢后第 6 天开始连续 5 d 行阴道涂片检查,如涂片见炎细胞而未见或少见角化上皮细胞提示去双卵巢大鼠模型构建成功;部分大鼠仅切除卵巢周围脂肪组织后同前涂片检查,如涂片见大量角化上皮细胞而未见或少见炎细胞,提示假手术组大鼠模型构建成功。

1.3.2 分组及给药方法 去双卵巢大鼠称质量后简单随机分成 5 组,每组 6 只大鼠;假手术组取 6 只大鼠。所有大鼠每日腹腔注射给药,共 10 周。①阴性对照组:生理盐水;②阳性对照组(E_2组):E_2,50 μg/(kg · d);③假手术组:生理盐水;④F11 低剂量组(F11-15 组):F11,15 mg/(kg · d);⑤F11 中剂量组(F11-50 组):F11,50 mg/(kg · d);⑥F11 高剂量组(F11-150 组):F11,150 mg/(kg · d)。

1.4 标本采集及制备

1.4.1 大鼠阴道涂片 实验第 10 周,每日行大鼠阴道涂片观察阴道上皮角化情况。

1.4.2 大鼠处死及提取子宫标本 最后 1 次给药 24 h 后放血处死大鼠,分别称质量后取全子宫标本,将子宫称质量后计算各组大鼠子宫湿质量/体质量情况。取一部分大鼠子宫标本甲醛固定待行 HE 染色,另一部分大鼠子宫标本冻存于液氮待行 Western blot 检测。

1.5 实验方法

1.5.1 大鼠阴道涂片及子宫内膜 HE 染色 大鼠阴道涂片 75% 酒精固定,子宫组织切片,脱蜡及酒精漂洗后,二者均以苏木精 + 伊红染色,系列酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.5.2 Western blot 法检测 ERα、ERβ 蛋白的表达 参照萨姆布鲁克 J 等[4]《分子克隆实验指南》进行。用 RIPA 裂解液法提取子宫内膜组织总蛋白,于 4% ~12% Bis-Tris 预制胶中电泳,常规电转印过夜;加入一抗稀释液(稀释浓度:ERα 为 1∶200,ERβ 为1∶100)及二抗,DAB 工作液显色,Gel Doc2000 凝胶成像分析系统上分析,同一样本重复 3 次。采用 D 值 × 面积半定量分析。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行配对 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠子宫湿质量/体质量比较

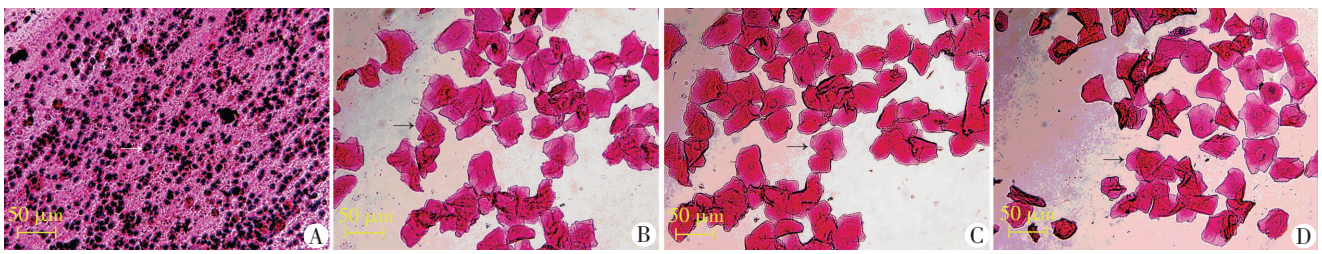
单位以 10^{-5} g 计算。F11 可增加去卵巢大鼠的子宫湿质量/体质量,其中 F11-50 组(50.34 ± 6.80)及 F11-150(131.81 ± 20.27)均显著高于阴性对照组(31.02 ± 3.47,$P < 0.05$),且当 F11 剂量增至 150 mg/(kg · d)时,与 E_2组(139. ± 14.76)及假手术组(179.5 ± 28.21)无显著差别($P > 0.05$)。

2.2 大鼠阴道涂片结果

阴性对照组大鼠阴道涂片以大量炎细胞为主,罕见角化上皮细胞;E_2和假手术组大鼠阴道涂片均以大量角化上皮细胞为主,少见炎细胞;而 F11 各剂量组大鼠阴道涂片中可见上述两种细胞,但角化上皮细胞明显多于炎细胞(图 1)。

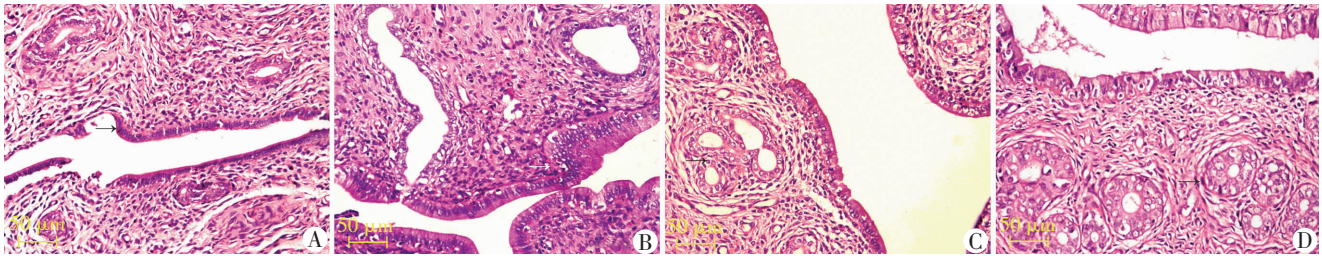
2.3 大鼠子宫内膜组织 HE 染色结果

阴性对照组大鼠子宫腺体数目少,腺体由菲薄的 1 层腺上皮组成;E_2组和假手术组的大鼠子宫腺体数目明显多于阴性对照组,腺腔增大,腺上皮细胞分层生长;而 F11 各组大鼠的子宫腺体数目多于阴性对照组,腺腔增大,腺上皮呈分层生长(图 2)。其中 F11-150 组与 E_2 和假手术组相似。



A:阴性对照组(箭头示炎细胞);B:E_2组;C:假手术组;D:F11-150 组;B、C、D 中箭头示角化的上皮细胞

图 1 各组大鼠阴道涂片 HE 染色观察

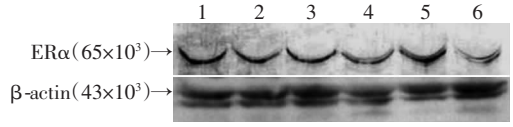


A:阴性对照组(箭头示子宫内膜腺体由单层菲薄腺上皮组成);B:E_2组;C:假手术组;D:F11-150组;B、C、D箭头示腺体由多层腺上皮生长组成

图2 各组大鼠子宫内膜组织HE染色结果

2.4 大鼠子宫内膜组织ERα、ERβ蛋白的表达

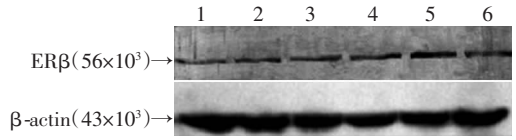
2.4.1 ERα蛋白的表达 E_2组大鼠子宫内膜ERα表达(2 257.0±118.8)最强,阴性对照组(978.8±87.1)表达最弱。F11各组大鼠子宫内膜ERα表达(F11-15组:1 189.2±85.6,F11-50组:1 369.0±61.4,F11-150组:1 457.8±52.9),均显著强于阴性对照组($P<0.05$),但显著弱于E_2和假手术组(1 910.0±96.9,$P<0.01$)。剂量增加,ERα蛋白表达逐渐增强(图3)。



1:假手术组;2:F11-150组;3:F11-50组;4:F11-15组;5:E_2组;6:阴性对照组

图3 各组大鼠子宫内膜组织ERα蛋白的表达

2.4.2 大鼠子宫内膜组织ERβ蛋白的表达 F11-150组大鼠子宫内膜ERβ表达(1 881.7±64.8)最强,与E_2组(1 529.8±48.1)和假手术组(1 695.4±80.4)比较有统计学差异($P<0.01$);阴性对照组(1 229.8±43.7)表达最弱。F11-15组:(1 524.4±34.1)和F11-50组(1 706.7±38.1)显著强于阴性对照组($P<0.01$)。随F11剂量增加,ERβ表达增强。见图4。



1:阴性对照组;2:E_2组;3:F11-15组;4:F11-50组;5:F11-150组;6:假手术组

图4 各组大鼠子宫内膜组织ERβ蛋白的表达

3 讨论

子宫生长实验是经典的检测外源性化合物雌激素活性的生物学方法[3]。子宫富含ER,雌激素与ER结合后,诱导子宫蛋白含量增加,从而刺激子宫生长,因此可根据化合物使用前后子宫湿质量/体质量的变化来评价外源性化合物雌激素活性[3]。本实验中,假手术组代表正常内源性雌激素水平刺激下子宫湿质量/体质量情况,而外源性E_2亦诱导去双卵巢大鼠子宫蛋白的合成。与阴性对照组比较,F11各剂量组均增加大鼠子宫湿质量/体质量,而且高剂量[150 mg/(kg·d)]组与E_2[50 μg/(kg·d)]无显著差别,提示F11表达雌激素样生物学效应。

绝经后缺乏雌激素刺激,阴道上皮萎缩,阴道涂片以大量炎细胞为主,缺乏角化上皮;而子宫内膜亦萎缩,腺体数目减少,腺腔变小,腺上皮菲薄。在外源性雌激素作用下,阴道上皮成熟角化,涂片以大量的角化上皮为主,少见炎细胞;同时子宫内膜上皮细胞增生并分层生长,腺体数目增加,子宫内膜增厚[5]。本实验首先成功构建去双卵巢大鼠模型,阴道涂片以炎症细胞为主,提示大鼠进入绝经期。予大鼠外源性化合物处理后,F11各组与阴性对照组比较,子宫内膜腺体增多,腺腔增大,同时腺上皮数目增加且部分区域可见分层生长;而E_2组、假手术组和F11各组阴道涂片以角化上皮为主,提示大鼠阴道上皮受到雌激素作用。该实验结果提示F11表达雌激素样生物学效应,该效应随剂量增加而加强。

雌激素与特异性ER结合后发挥生物学效应[6]。1986年法国Chambon克隆出雌激素受体亚型ERα,10年后瑞典的Kuiper发现另一种雌激素受体亚型ERβ。ERα和ERβ的组织分布和表达量随年龄的不同有所差别,在子宫中以ERα表达为主,而ERβ表达较弱[7];而绝经后子宫中两种受体亚型的表达均显著下降。雌激素既可与两种受体亚型结合而发挥生物学效应[8],同时又可调节ER的表达[9],据此可初步评判雌激素的生物学活性。本实验Western blot结果显示:阴性对照组ERα和ERβ的表达均显著低于假手术组,而E_2组和F11各组均强于阴性对照组,提示F11与E_2一样显示出雌激素活性。

由于子宫中ERα表达为主,因此加入E_2后,ERα表达显著增强。然而,假手术组ERβ表达却强于E_2组,这是因为绝经后大鼠子宫的ERβ表达明显下调[8],而该下调作用与HT治疗与否无关[10]。而异黄酮作为植物雌激素,可上调ERβ表达的降低[11];F11以异黄酮结构为主体改造而来,理论上可表达甚至增强表达异黄酮的生物学效应,从而解释本实验中F11各组大鼠子宫ERβ表达较强,甚至F11高剂量组表达强于假手术组的原因。研究发现,E_2结合ERα后促进

子宫内膜上皮细胞的增生,诱导子宫内膜癌的产生;而ERβ却可抑制ERα的功能[12],由于异黄酮对ERβ的亲和力或选择性远远高于ERα[13],因此异黄酮不促进子宫内膜上皮细胞的增殖。异黄酮明显区别于E_2的作用机制,决定其发挥雌激素活性的同时不促进子宫内膜组织的增殖,因此,异黄酮改构化合物F11有可能成为新型雌激素受体调节剂应用于临床。

综上,本实验表明:F11在增加去双卵巢大鼠子宫湿质量、阴道上皮成熟及子宫内膜ER的表达等方面均表现出剂量相关的雌激素样活性。由于F11结构类同于异黄酮,其可能主要与ERβ结合后发挥雌激素效应,其对子宫内膜组织促增殖作用弱,因此F11可能成为新型雌激素受体调节剂。

参考文献:

[1] Bitto A, Granese R, Triolo O, *et al*. Genistein aglycone: a new therapeutic approach to reduce endometrial hyperplasia[J]. Phytomedicine, 2010, 17(11): 844-850.
[2] 陈诚, 常青, 张丽龙, 等. 4种异黄酮改构化合物对人离体子宫内膜腺上皮细胞增殖活性的比较[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(16): 1553-1556.
[3] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 368-376.
[4] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 27-99.
[5] Munro M G, Critchley H O, Broder M S, *et al*. FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nongravid women of reproductive age[J]. Int J Gynecol Obstet, 2011, 113(1): 3-13.
[6] Wirakiat W, Udomuksorn W, Vongvatcharanon S, *et al*. Effects of estrogen *via* estrogen receptors on parvalbumin levels in cardiac myocytes of ovariectomized rats[J]. Acta Histochem, 2012, 114(1): 46-54.
[7] Mehasseb M K, Panchal R, Taylor A H, *et al*. Estrogen and progesterone receptor isoform distribution through the menstrual cycle in uteri with and without adenomyosis[J]. Fertil Steril, 2011, 95(7): 2228-2235.
[8] Gibson D A, Saunders P T. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues-a role for estrogen receptors and estrogen related receptors[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 348(2): 361-372.
[9] Neese S L, Korol D L, Katzenellenbogen J A, *et al*. Impact of estrogen receptor alpha and beta agonists on delayed alternation in middle-aged rats[J]. Horm Behav, 2010, 58(5): 878-890.
[10] Song X, Pan Z Z. Estrogen receptor-beta agonist diarylpropionitrile counteracts the estrogenic activity of estrogen receptor-alpha agonist propylpyrazole-triol in the mammary gland of ovariectomized Sprague Dawley rats[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012, 130(1/2): 26-35.
[11] Li W, Liu Y H. Effects of phytoestrogen genistein on genioglossus function and oestrogen receptors expression in ovariectomized rats[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(11): 1029-1034.
[12] Wang H, Li M C, Yang J, *et al*. Estrogenic properties of six compounds derived from Eucommia ulmoides Oliv. and their differing biological activity through estrogen receptors α and β[J]. Food Chem, 2011, 129(2): 408-416.
[13] Cvoro A, Paruthiyil S, Jones J O, *et al*. Selective activation of estrogen receptor-beta transcriptional pathways by an herbal extract[J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 538-547.

(**收稿**:2012-02-21;**修回**:2012-04-10)
(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2012)17-1753-01

个案与短篇

胃大部切除术致糖尿病患者反复低血糖1例

周厚地,童 强,段 炼,陈 卫,郑宏庭 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院内分泌科)

[**关键词**] 胃转流;糖尿病;胃大部切除;低血糖
[**中图法分类号**] R587.1; R656.61 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,女性,68岁,因"发现血糖高10年,控制不佳加重1月"入院。10年前,患者偶然查血糖16.2 mmol/L,无明显"三多一少"症状,于某三甲医院检查确诊为"2型糖尿病",予"二甲双胍"等口服降糖药治疗,患者反复于餐前及夜间发生低血糖,而餐后血糖偏高,5年前因"糖尿病神经病变"换用预混胰岛素降糖,后再次交替使用各种口服降糖药及预混胰岛素(类似物)降糖,血糖始终控制不佳,低血糖频繁发生,最多1晚出现4次低血糖,夜间血糖最低1.6 mmol/L。患者于1年前换为甘精胰岛素9 U,瑞格列奈0.25 mg,2次/d(中晚餐前),阿卡波糖50 mg 3次/d口服,低血糖仍常于餐后6~8 h发生,并持续存在(纠正1次后,低血糖仍可再次发生),后又分别换用"优泌乐50"或甘精胰岛素加口服降糖药(二甲双胍及阿卡波糖)治疗,血糖控制不佳,遂收住入院治疗。其父母及5个兄弟姐妹均有"糖尿病"史,入院查体:Bp 135/78 mmHg,BMI 22.6 kg/m^2,发育正常,心肺腹查未见明显异常,神经系统查体阴性。入院后完善检查,HbA1c 7.2%;馒头餐试验:0 min 3.8 mmol/L,30 min 7.61 mmol/L,60 min 6.42 mmol/L,120 min 6.07 mmol/L,180 min 4.07 mmol/L;胰岛素释放试验:0 min 4.6 μU/ml,30 min 42.00 μU/ml,60 min 18.74 μU/ml,120 min 12.49 μU/ml,180 min 4.47 μU/ml;C肽释放试验:0 min 0.641 ng/ml,30 min 3.54 ng/ml,60 min 3.69 ng/ml,120 min 2.83 ng/ml,180 min 1.32 ng/ml。余肾功电解质、肝功血脂、三大常规等均未见明显异常。询问病史得知,患者曾于46年前和39年前因"胃十二指肠溃疡急性出血"行胃大部切除术(毕罗Ⅰ式)和胃部分切除术(毕罗Ⅱ式)。考虑患者不宜口服降糖药治疗,遂建议患者

(下转1757页)

[**通信作者**] 郑宏庭,电话:(023)68774254,E-mail:fnf7703@hotmail.com