DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.015
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)14-1261-04

论著

雌激素样作用中药复方对卵巢切除大鼠雌激素受体和β-内啡肽的影响

刘兆平,李文仙,于 波,卢承前,陈君石 (中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

提 要:目的 探讨以补骨脂和小茴香为主的雌激素样作用中药复方(CHF)对卵巢切除大鼠雌激素受体(ERs)和β-内啡肽(β-EP)的影响。方法 体质量260~280 g雌性Wistar大鼠,卵巢切除(OVX)后4周,每天分别灌胃给予5、10、20 g/kg的CHF提取物,同时设卵巢切除对照、雌激素对照(OVX,0.1 g/kg 17β-雌二醇)和假手术对照(SHAM)。测定血清雌二醇(E_2)、黄体生成素(LH)、下丘脑视前区(HPO)和血浆的β-EP浓度以及HPO的ERs含量。结果 5、10、20 g/kg的CHF提取物均可显著升高卵巢切除大鼠的E_2浓度并降低LH浓度,显著增加HPO的ERs含量($P<0.05$);而CHF提取物可降低HPO的β-EP含量,并呈剂量反应关系;但20 g/kg的CHF提取物可显著升高血浆β-EP浓度($P<0.05$)。结论 CHF提取物与17β-雌二醇相似,可改善由卵巢切除造成的ERs异常和β-EP紊乱。

关键词:补骨脂;小茴香;雌激素;雌激素受体;β-内啡肽
中图法分类号:R282.71;R339.22;R977.12 文献标识码:A

Effects of estrogen-like herb extracts on estrogen receptors and β-endorphin in ovariectomized rats

LIU Zhao-ping, LI Wen-xian, YU Bo, LU Cheng-qian, CHEN Jun-shi (Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To examine the effects of estrogen-like herb extracts mainly containing *Fructus Foeniculi and Fructus Psoraleae* (CHF) on estrogen receptors (ERs) and β-endorphin (β-EP) in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Female Wistar rats weighing 260—280 g were bilaterally ovariectomized under anesthesia. After 4-week recovery, CHF at the doses of 5, 10, and 20 g/kg was administered by gavage for 12 weeks. The positive group (17β-estradiol, 0.1 g·kg·d^{-1}), sham group and OVX control group were also included simultaneously in present study. Serum estradiol (E2) concentrations were determined at 5, 8, 12, and 16 weeks. ERs contents in hypothalamus preoptic area (HPO) and β-EP concentrations in HPO and plasma were also measured at week 16. **Results** OVX rats in groups treated with CHF at the doses of 5, 10, and 20 g·kg·d^{-1} had significantly higher E_2 and lower LH concentrations and HPO ERs contents than animals in OVX control group ($P<0.05$). CHF decreased β-EP in HPO in a dose-dependent manner. Rats treated with CHF at the dose of 20.0 g·kg·d^{-1} increased β-EP content as compared with animals in OVX control group ($P<0.05$). **Conclusion** Similar to 17β-estradiol, CHF could prevent against the disturbance of ERs and β-EP induced by estrogen deficiency in OVX rat models.

Key words: *Fructus Foeniculi*; *Fructus Psoraleae*; estrogen receptor; β-endorphin

女性更年期综合征涉及到神经-内分泌-免疫网络的紊乱[1,2]。除了雌激素水平首先下降以及卵泡刺激素和黄体生成素代偿性增加之外,包括β-内啡肽(β-endorphin,β-EP)在内的神经肽亦会发生明显变化[3]。这些内分泌系统的改变与更年期症状及其程度密切相关,如β-EP参与垂体促性腺激素的释放、体温调节以及情绪反应。近期观点认为,该神经肽的合成与释放紊乱是诱发更年期潮热发生的主要机制之一[3,4]。雌激素受体(estrogen receptors,ERs)存在于人体大多数的组织器官中,是内源性雌激素发挥生理学作用的物质基础[5]。研究显示,绝经女性下丘脑乳突状神经核的ERs含量下降[6],ERs的异常改变可直接影响内源性雌激素的生物学效应。

前期研究表明,以补骨脂和小茴香为主要原料的中药复方(CHF)提取物具有雌激素样作用,主要是因为这种提取物中含有补骨脂素、染料木苷元、茴香醚和杯苋甾酮等已被证明具有雌激素样作用的天然成分。本实验以卵巢切除大鼠为动物模型,研究CHF提取物对下丘脑视前区(hypothalmus preoptic area,HPO)ERs

作者简介:刘兆平(1971—),男,江苏省邳州市人,博士,助理研究员,主要从事植物雌激素的健康效应方面的研究。电话:(010)83132553

收稿日期:2004-03-12;修回日期:2004-05-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和β-EP 含量的影响，旨在为 CHF 应用于更年期综合征的防治提供可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

3 月龄雌性 Wistar 大鼠 78 只，体质量 260～280 g，购自军事医学科学院实验动物中心，合格证号：京动许字 99001 号。

1.2 主要试剂

补骨脂和小茴香等植物药原料购自北京同仁堂药店，17β-雌二醇(17β-E_2，SIGMA)，血清雌二醇(E_2)和黄体生成素(LH)放射免疫测试盒(中科院原子能研究所)，β-EP 放射免疫测试盒(上海第二军医大学神经生理教研室)，[2，4，6，7-^{3}H] 标记 17β-E_2(^{3}H-E_2，Amesham)，己烯雌酚(DES，SIGMA)，二硫苏糖醇(DTT，上海丽珠东风生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

RE52-A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器设备厂)，AE100-S 电子天平(METTLER)，1162 多孔 γ-计数仪(LKB)，WALLAC1410 液体闪烁记数仪(Pharmacia)，UV120-02 分光光度计(岛津)。

1.4 实验方法

1.4.1 CHF 提取液制备 CHF 复方原料以 5∶1(V/W)的 70%乙醇浸泡过夜，回流 4 h，浓缩至 3.0 g/ml(以生药计，下同)，冷藏备用。

1.4.2 动物分组与处理 大鼠按体质量分为 6 组，每组 13 只。腹腔注射 30 mg/kg 的戊巴比妥钠麻醉，行双侧卵巢切除术(OVX)，其中假手术组(SHAM)仅切除 2 g 左右的脂肪。术后恢复 3 周，期间去卵巢大鼠进行阴道涂片，观察其动情周期，持续 1 周，剔除出现动情期的大鼠。剩余去卵巢大鼠按体质量进行 2 次分组，每组 13 只。第 5 周后，各组处理如下：SHAM 组：蒸馏水，i.g.；OVX-0 组：蒸馏水，i.g；OVX-5 组：5.0 g/kg 的 CHF，i.g.；OVX-10 组：10.0 g/kg 的 CHF，i.g.；OVX-20 组：20.0 g/kg 的 CHF，i.g.；OVX-E_2 组：0.1 mg /kg 的 17β-E_2，s.c.。于 5、8、12、16 周时取尾血测定血清雌二醇(E_2)浓度；16 周后，大鼠经戊巴比妥麻醉后腹主动脉取血，肝素抗凝，分离血浆；小心剥离下丘脑视前区(HPO)，取其中 6 个样本直接置于液氮中保存，待测 ERs；另取 6 个样本称量后在生理盐水中煮沸 4～5 min，液氮保存，测定β-EP。

1.4.3 血清 E_2 和 LH 测定 放射免疫法，按试剂盒说明进行。

1.4.4 ERs 测定 将 HPO 称量后剪碎，按 1∶10(W/V)比例加入 ERs 缓冲液，冰浴中匀浆，20 000× g 离心 15 min(4 ℃)，吸取上层胞浆液，用单点饱和法[7]分别测定 HPO 和子宫组织的 ERs 含量。

1.4.5 β-EP 测定 将各组 HPO 置于 5.0 ml 玻璃匀浆管中，加入 1.0 ml 1 mol/L 的 HAC(或 HCl)，充分匀浆后倒入一次性塑料试管中，室温放置 100 min；加入 1 ml 1 mol/L 的 NaOH，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液。按试剂盒说明进行β-EP 测定。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 软件中的单因素或单因变量多因素方差分析。

2 结果

2.1 CHF 对体质量的影响

手术前(0 周)各组动物体质量无明显差异。从术后 4 周(给药第 0 周)开始，SHAM 组大鼠体质量均显著低于其它各 OVX 组($P<0.01$)。第 7 周时，OVX-E_2 组大鼠体质量显著低于 OVX-0 组($P<0.05$)，至第 13 周时，OVX-10 和 OVX-20 组动物体质量显著低于 OVX-0 组($P<0.05$)，在实验期间，OVX-5 组大鼠体质量与 OVX-0 组无显著性差异($P>0.05$)，见图 1。

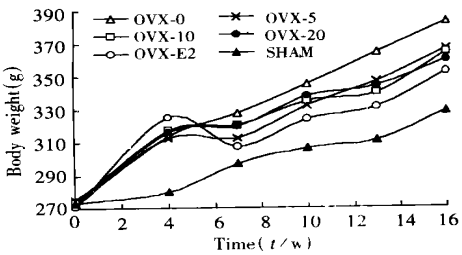


图 1 CHF 提取物对卵巢切除大鼠体质量的影响

Fig 1 Effects of CHF extracts on body weight of ovariectomized rats

2.2 CHF 对血清 E_2 浓度的影响

经单因变量多因素方差分析发现，大鼠血清 E_2 浓度存在显著性差异($F=9.8$，$P<0.01$)。对不同剂量组的同期 E_2 浓度进行比较，各剂量组间存在显著差异($F=11.5$，$P<0.01$)。5 周(给药前)时，SHAM 组大鼠血清 E_2 浓度明显高于其它各卵巢切除组($P<0.05$)。给药期间，SHAM 组和 OVX-0 组血清 E_2 浓度无显著变化，而 OVX-5、OVX-10 和 OVX-20 组 E_2 浓度显著高于处理前和同期 OVX-0 组的 E_2 浓度($P<0.05$)，见表 1。

表 1 CHF 提取物对卵巢切除大鼠血清 E_2 浓度的影响($\bar{x}\pm s$，pg/ml)

Tab 1 Effects of CHF extracts on serum estradiol in ovariectomized rats ($\bar{x}\pm s$，pg/ml)

Group	Week 5	Week 8	Week 12	Week 16
OVX-0	56.98±10.99	65.01±36.71	52.32±18.29	35.07±10.67
OVX-5	45.65±17.86	86.28±43.98	90.49±40.87 *	57.32±24.31
OVX-10	46.23±3.92	88.66±37.66 *	100.40±44.06 *	70.54±36.57 *
OVX-20	47.43±15.57	73.60±21.65 *	109.38±56.70 *	71.51±29.35 *
OVX-E_2	45.21±22.04	461.87±210.66 **	491.25±196.14 **	226.49±105.30 *
SHAM	75.95±28.00 *	84.88±27.47 *	96.33±36.71 *	70.59±39.12 *

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* OVX-0

2.3 CHF 对血清 LH 浓度的影响

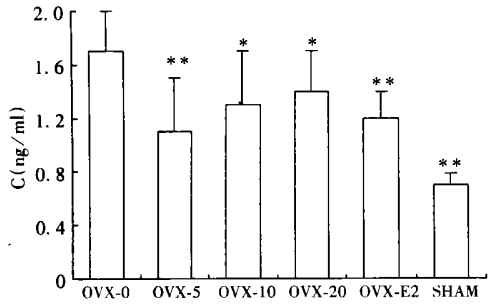
SHAM 组大鼠血清 LH 浓度显著低于其它各卵巢切除组($P<0.01$)，而 OVX-5 组、OVX-10 组、OVX-20 组和 OVX-E_2 组的血清 LH 浓度均低于 OVX-0 组($P<0.05$)，见图 2。

2.4 CHF 对 ERs 含量的影响

OVX-0 组 HPO 的 ERs 含量显著低于 SHAM 组($P<0.01$)，而 OVX-5 组、OVX-10 组、OVX-20 组和 OVX-E_2 组 HPO 的 ERs 含

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

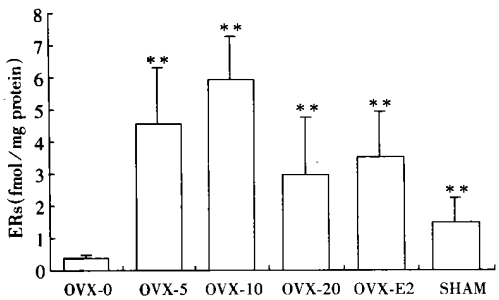
量显著高于OVX-0 组（$P<0.01$），见图 3。



*：$P<0.05$，　**：$P<0.01$，*vs* group OVX-0

图 2　CHF 提取物对卵巢切除大鼠 LH 浓度的影响

Fig 2　Effects of CHF extracts on LH concentrations in ovariectomized rats



**：$P<0.01$，*vs* group OVX-0

图 3　CHF 提取物对卵巢切除大鼠下丘脑视前区 ERs 含量的影响（$n=6$）

Fig 3　Effects of CHF extracts on estrogen receptors in HPO in ovariectomized rats（$n=6$）

2.5　CHF 对β-EP 水平的影响

OVX-0 组大鼠HPO 的β-EP 含量高于 SHAM 组，但血浆中β-EP 浓度则显著降低（$P<0.05$）。OVX-20 组和 OVX-E_2 组 HPO 的β-EP 含量显著低于 OVX-0 组（$P<0.05$）；OVX-10 组、OVX-20 组和 OVX-E_2 组的血浆β-EP 浓度则显著高于 OVX-0 组（$P<0.05$，$P<0.01$）（表 2）。

表 2　CHF 提取物对去卵巢大鼠 HPO 和血浆β-EP 含量的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Effects of CHF extracts onβ-endorphin in HPO and plasma in ovariectomized rats（$\bar{x}\pm s$）

Group	CHF（g/kg）	HPO（$n=6$，pg/mg）	Plasma（$n=10$，pg/mL）
OVX-0	0.0	35.58±12.90	31.86±9.66
OVX-5	5.0	25.18±11.19	44.45±17.92
OVX-10	10.0	23.87±5.26	68.55±19.40**
OVX-20	20.0	10.56±9.54*	56.91±17.29*
OVX-E_2	—	11.46±5.25*	70.18±20.94**
SHAM	0.0	19.74±7.35	52.55±16.67*

*：$P<0.05$，　**：$P<0.01$，*vs* group OVX-0

3　讨论

本研究显示，去卵巢大鼠血清 E_2 浓度显著低于假手术大鼠，表明成功造成雌激素低下模型。由于体内雌激素水平是调节 LH 分泌的因素之一，因此雌激素水平下降会反馈性促进垂体分泌 LH。去卵巢大鼠血清LH 浓度显著高于假手术大鼠，从另一侧面证明了卵巢切除造成了大鼠雌激素水平低下。当给以 CHF 提取物处理后 4 周，各组血清 E_2 浓度达到假手术组水平，表明该复方可明显升高卵巢切除大鼠的 E_2 水平，而各 CHF 提取物组 LH 显著下降可能是由其升高 E_2 水平而间接引起的。大鼠卵巢切除 1 个月后，体质量明显增加，在整个实验期间，假手术大鼠体质量始终低于同期的卵巢切除大鼠，而大鼠经 17β-E_2 处理 3 周后，体质量显著降低。这种卵巢切除引起体质量增加以及雌激素的拮抗作用可能与雌激素参与体内脂肪代谢有关。本次研究结果表明，CHF 提取物也可以降低由卵巢切除引起的体质量增加，这种作用可能与 CHF 提取物升高体内 E_2 水平有关。

卵巢切除和雌激素补充对 ERs 水平或 ERmRNA 表达的影响与组织器官、动物年龄以及处理时间等因素有关。例如，Carley 等[8] 发现，卵巢切除和雌激素补充对小鼠泌尿生殖道 ERmRNA 表达的影响具有组织特异性，其中卵巢和子宫最为敏感。国内学者则发现，卵巢切除可以使小鼠前脑 ERβ 表达下降，并于 20 d 后恢复至正常水平[9]。本研究显示，卵巢切除可明显降低下丘脑 HPO 的 ERs 水平，这可能与卵巢切除造成激素缺乏进而无法调节 ERs 的生物合成有关。研究表明，某些卵巢源性物质（如孕激素）和神经递质（如多巴胺、神经肽 Y 和 5-HT）可影响啮齿类动物大脑 ERs 的生物合成[10,11]，而这些物质又受到雌激素的调节。因此，卵巢切除引起这些物质的改变可能是造成下丘脑 ERs 含量低下的原因之一。而给予雌激素后，下丘脑 ERs 含量明显增加，这是因为雌激素一方面可以直接调控 ERs 的基因表达及生物合成，另一方面可通过调节孕激素和某些神经递质来间接升高组织的 ERs 水平。给予CHF 提取物后，下丘脑 HPO 的 ERs 含量明显增加，其作用与雌激素相似，可能与 CHF 升高血清 E_2 水平的作用有关。因此，本研究结果表明，CHF 提取物可以通过升高 E_2 水平以及上调下丘脑 ERs 表达，来增加卵巢切除大鼠的内源性雌激素效应。

β-EP 是一种由下丘脑弓状核分泌的内源性鸦片肽，其合成释放受性激素调节。本研究显示，卵巢切除可使大鼠下丘脑 HPO 的β-EP 含量升高，血浆β-EP 浓度降低，这与以前的文献[3] 报道相一致，这种作用主要是由雌激素快速撤退导致下丘脑β-EP 向外周释放减少而造成的。17β-E_2 则可有效逆转因卵巢切除而引

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

起的β-EP变化，这与雌激素调节β-EP合成释放的作用有关。不同剂量的CHF提取物均可降低下丘脑HPO的β-EP含量，并呈剂量-效应关系；并可升高血浆β-EP水平，其作用与17β-E_2相似，提示该提取物能促进下丘脑合成的β-EP向外周释放。这种作用可能是通过影响E_2水平而间接发挥的。另外，下丘脑弓状核的β-EP神经元内有ERs存在，是雌激素在下丘脑的靶细胞之一，CHF提取物也可能通过增加下丘脑ERs表达水平，来恢复大鼠因卵巢切除而引起的β-EP紊乱。由于β-EP可直接或间接作用于体温调节中枢，与更年期潮热与情感活动密切相关；另外，LH也被认为可能与更年期潮热有关，因此，CHF提取物对β-EP紊乱的改善作用以及对LH的降低作用可能会有利于更年期综合征的防治。

参考文献：

[1] 叶雪清. 更年期综合征-神经-内分泌-免疫网络的变化[M]. 西安：陕西科学技术出版社，1996. 88－176.

[2] Wilson M M. Menopause[J]. Clin Geriatr Med, 2003, 19(3): 483－506.

[3] Brzezinski A, Benshushan A. Neuropeptides, neurotransmitters, body weight, and menopause[J]. Menopause, 2000, 7(3): 137－139.

[4] Zurate A, Fonseca E, Ochoa R, *et al*. Low-dose conjugated equine estrogens elevate circulating neurotransmitters and improve the psychological well-being of menopausal women[J]. Fertil Steril, 2002, 77(5): 952－955.

[5] 余学文. 雌激素受体的作用[J]. 国外医学妇幼保健分册，2002，13(2)：69－71.

[6] Ishunina T A, Kamphorst W, Swaab D F. Changes in metabolic activity and estrogen receptors in the human medial mamillary nucleus: relation to sex, aging and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(6): 817－828.

[7] 王乃功. 雌激素受体测定[A]. 见：张均田 主编. 现代药理学实验方法[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1998. 566－577.

[8] Carley M E, Rickard D J, Gebhart J B, *et al*. Distribution of estrogen receptors alpha and beta mRNA in mouse urogenital tissues and their expression after oophorectomy and estrogen replacement[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2003, 14(2): 141－145.

[9] 张吉强，姚 青，蔡文琴. 卵巢切除对小鼠基底前脑内雌激素β受体表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(3)：260－262.

[10] Kato J, Onouchi T. Ovarian steroid hormone receptors in developing rat brain and progesterone modulation of estrogen receptors in the hypothalamus[A]. In: Saxena B B, Catt K J, Birnbaumer L, *et al*. eds. Hormone receptors in growth and reproduction[M]. New York: Raven Press, 1984. 279－289.

[11] Blaustein J D, Brown T J, Swearengen E S. Dopamine-B-hydroxylase inhibitors modulate the concentration of functional estrogen receptors in female rat hypothalamus and pituitary[J]. Neuroendocrinology, 1986, 43(1): 143－149.

（编辑 汪勤俭）

（上接1260页）

组的严重后遗症发生率统计学处理，用Microsoft Excel进行χ^2检验。

2 结果

试验组和对照组严重后遗症发生率有显著性差异（$\chi^2=53.15$，$P=0.000$），见表1。

表1 冰袋护脑佐治小儿病毒性脑炎的疗效

分组	例数	严重后遗症者	无或轻微后遗症者	严重后遗症发生率(%)
实验组	141	58	84	40.85
对照组	254	196	57	77.47

3 讨论

小儿病毒性脑炎系有多种病毒引起的脑实质炎症，全年均可发生，病毒感染中枢神经系统途进主要为血行传播，当病毒有消化道或呼吸道侵入机体后，首先在局部增殖，然后进入血液引起病毒血症，再通过血脑屏障进入神经细胞内增殖并破坏脑组织引起脑炎，其次病毒也可经其他周围神经直接播散至脑组织，其主要病理改变为脑组织水肿、坏死和软化。目前国内外认为，即使浅低温亦有脑保护作用，例如，鼠大脑半球缺血实验时，在36 ℃时缺血20 min后，鼠脑海马损伤100%，34 ℃时，损伤减少到20%，33 ℃时0%。低温明显的保护作用不仅由代谢抑制单一因素所致，其机制包括：抑制谷氨酸释放，削弱NO产生，减少钙内流，和增加缺血时GABA释放[1]。

上面一系列统计数据也说明，在综合治疗的情况下，冰袋护脑可以大大减轻小儿病毒性脑炎的后遗症。临床观察早期运用冰袋护脑效果更好，所谓早期冰袋护脑是指患儿进入医院后，一旦怀疑病毒性脑炎就可以用冰袋护脑，越早越好，不一定非要等到腰穿报告回来才使用，或者患儿昏迷很长时间或抽搐很多次后才使用。由于“早期”在医学上还是模糊的时间概念，所以暂时还无法用统计的方法进行分析。

由于患儿频繁抽搐，往往造成大脑缺血、缺氧，而缺血缺氧往往造成血液动力学改变，代谢异常，自由基损伤和神经介质异常，造成大脑细胞的损伤，而造成脑细胞的不可逆转，而用冰袋护脑因为整个大脑处于一种低温状态（35 ℃以下），从而可以大大降低脑细胞的基础代谢，从而降低氧耗量，达到改善缺血缺氧的目的，减少大脑细胞的损伤，为下一步大脑细胞的恢复治疗奠定坚实基础。如果在这一阶段仅仅考虑到抢救患儿生命，而未考虑到抢救完患儿生命后的后期恢复治疗而进行的早期保护性治疗，那么会产生严重的后果。

关键词：冰袋护脑；病毒性脑炎

中图法分类号：R725.123 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王慕逖. 儿科学[M]. 第5版. 北京：人民卫生出版社，2002. 113－114.

（编辑 刘洪娥）

1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net