

六味地黄丸对去势高脂雌鼠 雌激素受体 α 、 β mRNA 表达的影响*

□梁瑞宁 陈明人 邱丽瑛 黄 烨 付向春 姜玉婵

(江西中医学院附属医院 南昌 330006)

摘 要:目的 探讨六味地黄丸对去势高脂雌鼠 ER(α , β)mRNA 表达的影响。方法 将 24 只 8 周龄去势雌性大鼠随机分为地黄组、雌二醇组、对照组共 3 组,每组 8 只,分别给予六味地黄丸(2.4g/d/只)、苯甲酸雌二醇注射液(0.2mg/3d/只)、生理盐水,观察 6 周。应用全自动生化仪测血脂、放免法测 FSH, E_2 , 硝酸还原酶法测 NO, RT-PCR 法分析 ER α , ER β mRNA 表达。结果 与对照组比较,地黄组能明显降低 TC, TG, 有显著性差异($P < 0.01$), 升高 HDL-C($P < 0.05$), E_2 上升($P < 0.05$), NO 明显上升($P < 0.01$), ER α , ER β mRNA 表达均明显高于对照组($P < 0.01$)。结论 六味地黄丸具有改善血脂作用,并可调高去势高脂大鼠主动脉 ER α , ER β mRNA 的表达及升高血清 NO 的作用,该作用为其在绝经女性防治动脉粥样硬化和冠心病等应用提供了依据。

关键词:六味地黄丸 一氧化氮 血脂 雌激素受体 基因表达

六味地黄丸是中医滋补肾阴的传统代表方剂,现广泛应用于更年期综合征、高血压、冠心病等数十种疾病的治疗,其疗效的显著性及可靠性在长期的医疗实践中被充分证实^[1]。更年期综合征及与之相关的绝经后女性心血管防护等均与雌激素受体(ER)相关,为此,本研究通过建立去势高脂模型,进一步探讨六味地黄丸对其主动脉 ER (α , β)、mRNA 表达的影响。

一、材料与方法

1. 动物

8 周龄雌性 Wistar 大鼠 26 只,清洁级,体重(250±27)g,购自江西医学院动物实验中心。

2. 药物

浓缩六味地黄丸,河南省宛西制药有限公司生产,批号 034011。苯甲酸雌二醇由上海第九制药厂生产,批号 970435。

3. 试剂及仪器

RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒均由上海生工提供;ER α 、ER β 特异引物由上海生工设计合成;FSH、 E_2 放免测定药盒为天津九鼎医学生物工程有限公司提供;总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定药盒由温州东欧生物

组稿日期:2006-01-08

* 中华中医药学会和北京同仁堂科技发展股份有限公司主持的“六味地黄丸临床应用学术研讨会”(2004.8)论文 2 等奖;联系人:简秀枝,北京同仁堂科技发展股份有限公司总经理助理,E-mail:jingying1@tongrentangkj.com。

{World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica} 105

工程有限公司提供;PCR Express (HYBAID LIMITED UNITED KINGDOM); 计算机图像分析系统 (采用 FR-200 紫外与可见分析装置,由上海复日科技有限公司生产);DYY-Ⅲ12 型电脑三恒多用电泳仪 (北京市六一仪器厂);全自动生化分析仪 (杜邦-RXL, 美国); γ 放射免疫计数仪 (GC-911 中国合肥·科大)。

4. 实验方法

(1)经 1%硫贲妥钠按 0.4ml/100g 注射麻醉后,摘除卵巢;术后第 3d 开始,连续 5d 阴道涂片,证明去势彻底。26 只,2 只术后未能苏醒。

(2)将 24 只模型大鼠随机分为 3 组:去势+六味地黄丸组(地黄丸);去势+苯甲酸雌二醇组(雌二醇组);去势+生理盐水组(对照组)。每组 8 只,3 组间动物体重无差异($P>0.05$)。术后一周开始实验,均给予高脂饲料(87%普通饲料、3%胆固醇、10%猪油、0.2%乙基硫氧嘧啶);地黄丸组每 d 早晚两次灌胃六味地黄丸,每次 2ml/只 (每 ml 相当于含六味地黄丸 0.6g);雌二醇组,皮下注射苯甲酸雌二醇注射液 0.2mg,每 3d 1 次,共 12 次;对照组予等体积生理盐水,早晚各 1 次灌胃。实验第 6 周后断头取血,留置血清于 -20°C 冰箱,备用测定。

(3)观察指标与检测方法血清 E_2 、一氧化氮(NO)、血脂测定、血清 E_2 测定采用放免法,严格按试剂盒说明操作。NO 的测定采用硝酸还原酶法,测定 NO 的稳定代谢产物 $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ 含量,应用 751 分光光度计在 550nm 处测吸光度。血脂测定采用全自动生化仪(ALCYON300)测定,测定胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)。ER α 、ER β 、RT-PCR 分析:总 RNA 提取按上海生工提供 RNA 提取试剂盒说明进行。用 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 鉴定纯度,1%琼脂糖电泳鉴定完整性。逆转录按上海生工试剂盒说明,ER α 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6min。30 循环。ER β 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6min。30 循环。PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察照相,扫描其密度分析结果:

β -actin 上游 5'GM WO CGC CCC AGG CAC CM'

(540bp) 下游 5'CTT CCr TAA TGT CAC BCA CGA TTT C3,

ER α 上游 5'AAT TCT GAC AAT CGA CGA CGC CAG3'

(344bp) 下游 5' GTG CTT CAA CAT TCP CCC TCC TO,

ER β 上游 5'AAC AAG GGC ATG GAA CAT CTG CT3'

(204bp) 下游 5' TCC GCC TCA GGC CM GCC ATC A3'

5. 统计学处理:数据($\bar{X} \pm S$)表示,采用 t 检验。

二、结 果

1. 3 组大鼠 NO、 E_2 测定结果比较(见表 1)

与对照组比较,地黄组及雌二醇组 NO 分别增长 113.6%及 120%;地黄组与雌二醇组比较,差异无显著性 ($P>0.05$)。与对照组比较,雌二醇组 E_2 上升 54.48%,雌二醇组 E_2 上升 252.99%,雌二醇组与地黄组 E_2 比较,差异亦有显著性($P<0.01$)。

2. 3 组大鼠血脂测定结果比较(见表 2)

与对照组相比较,地黄组 TC、TG 均下降,差异有显著性($P<0.01$),约分别下降 27.8%、37.8%。HDL-C

表 1 3 组大鼠 NO、 E_2 测定结果($\bar{x} \pm S$)

组别	n	NO(nmol/L)	E_2 (pmol/L)
对照	8	27.5 $\pm$ 8.7	19.57 $\pm$ 6.33
地黄	8	58.75 $\pm$ 27.81**	30.14 $\pm$ 5.99*
雌二醇	8	60.50 $\pm$ 28.86**	68.87 $\pm$ 26.27 Δ **

注:与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P>0.01$;与地黄组比较 $\Delta 0.01$ 。

表 2 3 组大鼠血脂测定结果比较($\bar{x} \pm S$)

组别	n	TC	TTG(mmol/L)	HDL-C
对照	8	8.96 $\pm$ 1.37	0.54 $\pm$ 0.17	1.39 $\pm$ 0.24
地黄	8	6.49 $\pm$ 1.09**	0.33 $\pm$ 0.10**	1.68 $\pm$ 0.28*
雌二醇	8	7.36 $\pm$ 1.10*	0.71 $\pm$ 0.15*	1.73 $\pm$ 0.18**

注:与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P>0.01$ 。

上升,差异有显著性($P<0.05$),约升高 20.9%;雌二醇组,TC 下降,差异有显著性($P<0.05$),约下降 17.9%,TG、HDL-C 值均上升,约分别升高 31.5%,24.5%,差异均有显著性($P<0.01$)。

3. 3 组对 ER α 、ER β 表达的影响

见图 1,表 3。

三、讨 论

自从人们发现雌激素具有保护女性心血管系统,预防动脉粥样硬化(AS)和冠心病的作用以来,由于脂质代谢紊乱是 AS 形成的重要危险因素,有关雌激素作用机制的基础和临床研究一般把注意力集中于雌激素与血脂代谢关系上。随着研究深入进行,单用血脂的变化不能圆满解释雌激素的抗 AS 作用。心血管中 ER 的存在为解释雌激素在心血管中的非脂质作用机制及研究冠心病的两性差异提供了分子水平的物质基础,为进一步从分子水平阐述雌激素对心血管的直接作用机制以及某些病理变化提供了一

种新途径,使该问题的研究进入一个新的领域。雌激素可通过改善内皮细胞功能,抑制血管平滑肌细胞(VSMC)增殖、迁移的直接效应以及调节脂代谢、改善血流动力学参数及凝血纤溶系统的功能和抗氧化作用的间接效应,改善血管功能,减弱有害的细胞反应。其中以 ER 介导的直接效应为主要因素^[2]。ER 分为 ER α 、ER β 两个亚型,是一类由配基激活的转录因子,介导大部分已知的雌激素效应。ER 分布于许多组织中,包括中枢神经系统、心血管系统,免疫系统。雌激素发挥其心血管防护作用的重要因素是其介导的内皮细胞生成 NO。NO 可通过对血管内皮及血管平滑肌细胞的作用,调节血管张力,舒张血管,抑制血小板的粘附,并使已聚集的血小板解聚^[3];可抑制血管平滑肌细胞增殖、诱导平滑肌细胞凋亡,促使硬化斑块消退^[4]。

有研究表明,ER α 具有非雌激素依赖的促进一氧化氮合酶(eNOS)基因表达作用。过度表达 ER α 可明显增加雌激素的效应。研究还表明,功能性的 ER α 以非基因方式,通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)依赖的途径快速激活 eNOS,介导了雌激素对血管壁的快速短时效应^[5]。ER β 也可以介导雌激素对血管壁的快速效应,并主要是细胞膜上的 ER β 参与介导了雌激素对血管内皮细胞的快速 NO 释放效应^[6]。由于 ER β 在 VSMC 分布上占优势^[7],因而雌激素对 VSMC 的抑制效应主要是通过 ER β 起作用的。也有学者提出 ER α 与 ER β 中任何一种受体对于介导雌激素这种保护效应都是足够的^[8]。因此,通过雌激素受体介导的 NO 分泌,是雌激素保护心血管的重要机制。

本研究证实六味地黄丸能提高去势高脂雌鼠血清 NO 水平,并证明六味地黄丸能提高其主动脉 ER α 、ER β mRNA 表达水平。与雌激素组相比,ER α 、ER β mRNA 水平均高于雌激素组,但无统计学意义,从雌激素组其 E₂ 水平明显高于其他各组,而 NO 水平却并未明显高于其他各组,此点支持 ER α 具有非雌激素依赖的促进 eNOS 基因表达作用。从降脂方面看,雌激素具有降低 TC 提高 HDL-C 作用,但同时提高了 TG 水平,而地黄丸具降低 TC、TG 及提高 HDL-

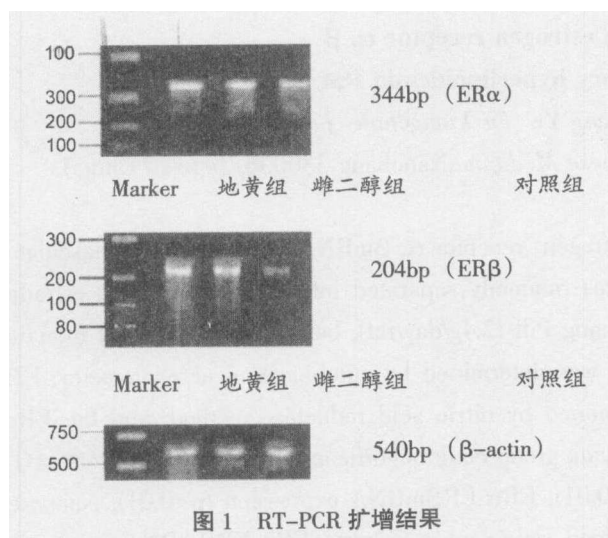


图 1 RT-PCR 扩增结果

表 3 各组大鼠主动脉 ER α 、 β 的表达量($\bar{x}\pm S$)

组别	n	ER α	ER β mRNA
对照	5	0.297 $\pm$ 0.153	0.255 $\pm$ 0.112
地黄	5	1.527 $\pm$ 0.258*	1.993 $\pm$ 0.351*
雌二醇	5	1.491 $\pm$ 0.364*	1.689 $\pm$ 0.426*

注:与对照组比较: * $P<0.01$ 。

C 作用,显示其降脂作用优于雌激素。

本研究证实六味地黄丸能提高去势高脂雌鼠血清 NO 水平,并证明六味地黄丸能提高其主动脉 ER α 、ER β mRNA 表达水平。与雌激素组相比,ER α 、ER β mRNA 水平均高于雌激素组,但无统计学意义,从雌激素组其 E₂ 水平明显高于其他各组,而 NO 水平却并未明显高于其他各组,此点支持 ER α 具有非雌激素依赖的促进 eNOS 基因表达作用。从降脂方面看,雌激素具有降低 TC 提高 HDL-C 作用,但同时提高了 TG 水平,而地黄丸具降低 TC、TG 及提高 HDL-C 作用,显示其降脂作用优于雌激素。

本研究证明了六味地黄丸能提高去势高脂雌鼠主动脉 ER α 、ER β mRNA 表达水平,为其在绝经女性心血管防护的应用从基因水平提供了支持。

参考文献

- 1 聂伟,张永祥.六味地黄方的现代药理学研究进展.中药药理与临床,1998,14(5):41-44.
- 2 Mendelsohn ME, Karas R H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. N Engl J Med 1999, 340:1801-181.
- 3 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991, 43:109-142.
- 4 Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 1989, 82:1774-1777.
- 5 Chen Z, Yuhanna I S, Galcheva-Gargova Z, et al. Estrogen receptor mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. J Clin Invest 1999, 103:40-406.
- 6 Razandi M, Pedram A, Greene G L, et al. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: Studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. Mol Endocrinol 1999, 13:307-319.
- 7 Hondges Y K, Isring L, Yan X D, et al. Estrogen receptor α and β : Prevalence of estrogen receptor P mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. Circulation 2000, 101:1792-1798.
- 8 Karas RH, Hodgins J B, Kwoun M, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor β -deficient female mice. PNAS 1999, 96:15133-15136.

Effect of Liuwei Dihuang Pill on estrogen receptor α , β mRNA expression on emasculatory hyperlipidemia Rat

Liang Ruining Chen Mingren Qiu Liying Huang Ye Fu Xiangchun Jiang Yuchan

(Affiliated Hospital of College of Jiang Xi Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi, China)

Objective Study the influence of Liuwei Dihuang Pill on estrogen receptor α , β mRNA expression on emasculatory hyperlipidemia Rat. **Methods** 24 male rats of 8 week age was randomly separated into Di Huang group, estradiol group and control group, with eight rats each, given Liuwei Dihuang Pill (2.4g/day/rat), benzoic acid estradiol injection (0.2mg/3 days/rat) and salin, observed for 6 weeks. Blood lipid was determined by autobiochemical photometer; FSH and E₂ was measured by radioimmunity method; NO was determined by nitric acid reductase method, and the ER α , ER β mRNA expression was analyzed by PT-PCR. **Results** Di Huang group could significantly reduce the content of TC and TG ($p < 0.01$), increased HDL-C ($p < 0.05$), E₂ ($p < 0.05$), NO ($p < 0.01$), ER α , ER β mRNA expression ($p < 0.01$), compared with control. **Conclusion** Liuwei Dihuang Pill could improve blood lipid, enhance aorta ER α , ER β mRNA expression and increase serum NO of emasculatory hyperlipidemia Rat. These provide evidence for application of the drug in prevention of atherosclerotic and coronary heart disease in menopause women.

Keywords: Liuwei Dihuang Pill, NO, Blood lipid, Estrogen receptor, Gene expression

(责任编辑:李成卫,责任编辑:张志华,责任译审:田 泽)