

· 实验研究 ·

更年期上调老年雌性大鼠下丘脑雌激素受体 mRNA 表达对 P 物质和 β -内啡肽的影响*

步世忠¹ 孙梅¹ 张沅² 张永莲² 俞瑾¹

内容提要 目的:探讨中药复方更年期上调老年雌性大鼠下丘脑雌激素受体(ER)和 ER 信使核糖核酸(mRNA)对 P 物质(SP)和 β -内啡肽(β -EP)的影响。方法:建立自然衰老的雌性大鼠模型,用放射配体结合分析法检测 ER,用 Northern blot 分析 ERmRNA 的改变,用放射免疫分析法检测 SP 和 β -EP 含量。结果:老年雌性大鼠性减退期下丘脑 ER 和 ERmRNA 水平随血清 E_2 水平的下降较性成熟期显著下降,而更年期则使下降了的 ER 和 ERmRNA 水平明显提高,并通过上调下丘脑 ERmRNA 使 SP 明显下降,而 β -EP 则显著提高,与提高体内雌激素水平具有同样的效果。结论:更年期可增加 ER 在下丘脑的表达以增强雌激素的生物学效应,同时降低下丘脑 SP 水平而提高 β -EP 的含量。

关键词 更年期 下丘脑 雌激素受体 信使核糖核酸 P 物质 β -内啡肽

Effect of Gengnianjian on Up Regulated Estrogen Receptor mRNA to Substance P and β -Endorphin in Hypothalamus of Aging Female Rats Bu Shizhong, Sun Mei, Zhang Yuan, et al *Obstetric and Gynecology Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200011)*

Objective: To investigate the effect of Chinese herbal formula Gengnianjian on estrogen receptor (ER), ERmRNA substance P (SP) and β -endorphin (β -EP) in the hypothalamus of aging female rats. **Methods:** ER proteins were determined by radioligand binding assay, ER mRNA was analyzed by Northern blot analysis and the levels of β -EP and SP were detected by immunohistochemistry. **Results:** In aging rats, lowered ER and ER mRNA in the hypothalamus were still up-regulated by low serum E_2 level, but not in rats of after the age of 21 months; Gengnianjian significantly increased ER protein level and ER mRNA expression, decreased SP and increased the level of β -EP in the hypothalamus in aging female rats before 21 months of age, without changing of serum E_2 level. In EB group, serum E_2 and β -EP levels increased and SP level decreased but ER expression suppressed in the hypothalamus except after 21 months. **Conclusion:** Enhance estrogen bioactivity can decrease the level of SP and increase the level of β -EP in hypothalamus of aging female rats. Herbal formula Gengnianjian increase-EP level and decrease SP level by raising the level of ER and ER mRNA.

Key words Gengnianjian, hypothalamus, estrogen receptor, mRNA, substance P, β -endorphin

更年期综合征患者有严重的神经内分泌功能紊乱,中枢神经递质 P 物质(SP)明显升高,而 β -内啡肽(β -EP)则显著下降⁽¹⁾,西医治疗更年期综合征通常用雌激素替代或辅以孕激素联合用药,其疗效肯定,但中远期致乳癌、子宫内膜癌和卵巢癌的副作用却无法排

除⁽²⁾,中药治疗更年期综合征临床已开展多年,并取得良好的临床效果,且无副作用。中药复方更年期健在治疗更年期综合征的临床应用中疗效显著,且用药后患者血清 E_2 水平无明显变化⁽³⁾,其药理作用机理尚不清楚。本研究应用分子生物学方法研究更年期健对老年雌性大鼠下丘脑雌激素受体(ER)信使核糖核酸(mRNA)表达的调节作用以及这种调节作用对下丘脑 SP 和 β -EP 的影响,以阐明该药的作用机理。

* 国家中医药管理局基金资助项目(No. 9221A5)

1. 上海医科大学妇产科医院(上海 200011); 2. 中国科学院上海生化所分子生物学国家重点实验室

材料和方法

1 材料

1.1 实验动物 雌性 SD 大鼠由上海医科大学实验动物部提供,按清洁级标准饲养。

1.2 更年健由生地、白芍、枸杞子、菟丝子等组成,由本校药学院制成口服液,每毫升含生药 1g。

1.3 主要试剂 大鼠雌二醇(E₂)放免药盒:由世界卫生组织提供;异硫氰酸胍;Sigma 公司产品;非标记己烯雌酚和苯甲酸雌二醇(EB):上海第九制药厂生产;³H 标记 E₂;α-³²PdATP;Amershem 公司产品;SP 放免药盒:中国协和医科大学生理教研室提供;β-EP 放免药盒:第二军医大学神经生物教研室提供。

2 方法

2.1 动物分组和给药 取 3 月龄和 12 月龄大鼠各设一空白对照组,取 15、18 和 21 月龄大鼠按给药情况分为 3 组:更年健组、雌二醇组和空白对照组,每组 6 只,分笼饲养,至各月龄时,更年健组每鼠每天灌更年健 2ml(相当于临床成人每公斤体重剂量的 20 倍)。雌二醇组每鼠隔天肌肉注射 EB 0.05μg/10g 体重⁽⁴⁾,空白组不作任何处理。各年龄段大鼠给药 20 天后处死,迅速取血和下丘脑置于 -70℃ 保存。

2.2 测定方法

2.2.1 总 RNA 抽提和 Northern 印迹法测定 ERmRNA 各组织标本 RNA 按照 Chomczynski⁽⁵⁾;硫

氰酸胍-苯酚-氯仿一步法抽提,经 DABA 法⁽⁶⁾测知其中 DNA 含量小于 1%,紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ >1.8,通过电泳转移交联于尼龙膜上,与 α-³²PdATP 标记的小鼠 ERcDNA(编码 DNA 结合区)和 β-Actin cDNA(比活为 5 × 10⁸cpm/μg)于 65℃ 杂交过夜。杂交信号经 -70℃ 放射自显影后,用岛津 C3-930 双波长扫描仪扫描定量。湿润的尼龙膜用 10mol/L Tris·HCl(pH 8.0),1mmol/L 乙二醇四乙醇,0.1% (w/v)十二烷基硫酸钠于 95℃ 洗 20min,可除去杂交信号,用于下一次杂交。

2.2.2 ER 分析 按照 Clark⁽⁷⁾单点饱和法测各组组织细胞胞浆 ER 含量。DNA 测定按 Buton 方法⁽⁸⁾进行。

2.2.3 血清 E₂ 测定 由上海市内分泌研究所提供药盒,按放免常规方法测定。

2.2.4 下丘脑 SP 和 β-EP 测定 按放免常规方法测定。

结 果

1 更年健对血清 E₂ 的影响 见表 1。空白组大鼠血清 E₂ 的水平在 12 月龄时较 3 月龄时明显下降,18 月龄出现再下降;雌二醇组 15、18 和 21 月龄血清 E₂ 水平则明显上升(P < 0.01),更年健组各月龄段血清 E₂ 与空白组同月龄段相比无明显差异。

2 更年健对 ERmRNA(6.5kb)的 Northern 分析,

表 1 3 组大鼠不同月龄段血清 E₂ 比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

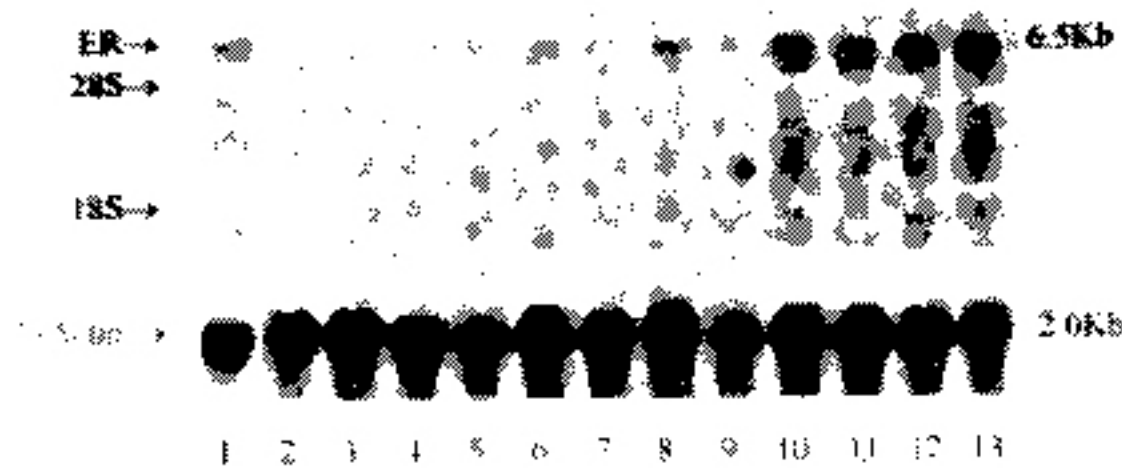
组别	鼠数	3 月	12 月	15 月	18 月	21 月
空白	6	52.65 ± 6.15	26.68 ± 7.11*	26.33 ± 6.52*	19.83 ± 4.12*	21.01 ± 3.82*
更年健	6	—	—	26.40 ± 5.05	24.44 ± 6.46	23.32 ± 4.89
雌二醇	6	—	—	153.40 ± 9.78 [△]	123.50 ± 12.41 [△]	154.58 ± 32.42 [△]

注:与本组 3 月龄比较,*P < 0.01;与空白组同月龄比较,[△]P < 0.01

见附图。实验中采用了多项指标来确保 RNA 的质量、数量和操作过程的可重复性。电泳后总 RNA 的 28s

和 18s 条带和作为管家基因 β-Actin mRNA(2.0kb)均表明每泳道 40μg 总 RNA 的上样量和质量是稳定的。限于电泳槽的尺寸,大量样品只能分别在多张膜上杂交,故我们在每张膜上都点有一个等量的标准样品来保证所有结果的可比性。结果雌二醇组 ERmRNA 表达极微,明显被 E₂ 抑制,更年健组 ERmRNA 则表达增加。

3 更年健对大鼠下丘脑 ERmRNA 和 ER 的影响 见表 2、3。空白组大鼠自 12 月龄开始,下丘脑 ERmRNA 水平逐渐下降(P < 0.01),21 月龄时则降为 0;雌二醇组 15 月龄开始给药后,各月龄段下丘脑 ERmRNA 水平较空白组明显下降(P < 0.01);更年健组 15 和 18 月龄时下丘脑 ERmRNA 较空白组同时间



附图 18 个月大鼠下丘脑 ERmRNA Northern blot 分析 1 为阳性对照,2~5 为雌二醇组,6~9 为空白组,10~13 为更年健组

表 2 3 组大鼠不同月龄段 ERmRNA 测定值比较 (Du/40 μ g RNA, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 月	12 月	15 月	18 月	21 月
空白	6	22975 $\pm$ 6496	16962 $\pm$ 4189 *	15563 $\pm$ 5527 *	8738 $\pm$ 4185 *	0
更年期健	6	—	—	37844 $\pm$ 8063 Δ	54883 $\pm$ 14699 Δ	0
雌二醇	6	—	—	2652 $\pm$ 172 Δ	1570 $\pm$ 637 Δ	0

注:与本组 3 月龄比较, * $P < 0.01$;与空白组同月龄比较, $\Delta P < 0.01$

表 3 3 组大鼠不同月龄段 ER 测定值比较 (fmol/mg pro, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 月	12 月	15 月	18 月	21 月
空白	6	36.48 $\pm$ 8.23	18.75 $\pm$ 4.17 *	15.67 $\pm$ 4.25 *	0	0
更年期健	6	—	—	15.17 $\pm$ 4.96	8.15 $\pm$ 2.91 Δ	0
雌二醇	6	—	—	1.05 $\pm$ 4.16 Δ	0	0

注:与本组 3 月龄比较, * $P < 0.01$;与空白组同月龄比较, $\Delta P < 0.01$

段明显升高($P < 0.01$);21 月龄时,3 组 ERmRNA 均为 0。各组下丘脑 ER 的变化与 ERmRNA 呈相同趋势,所不同的是更年期健组在 15 月龄时与空白组无明显变化。

4 更年期健对大鼠下丘脑 SP 的影响 见表 4。空白组 18 和 21 月龄时下丘脑 SP 含量较 15 月龄时升高($P < 0.05$),但 18 与 21 月龄间无显著性差异。雌二醇组和更年期健组 15 和 18 月龄时下丘脑 SP 含量较同月龄空白组显著下降($P < 0.05$)。

相关分析表明,更年期健组下丘脑 SP 含量与下丘脑 ERmRNA 呈负相关($r = -0.5942$, $P < 0.05$);与血清 E_2 水平无相关性($r = 0.03$, $P > 0.05$);雌二醇组下丘脑 SP 含量与血清 E_2 呈负相关($r = -0.5431$, $P < 0.05$)。

表 4 3 组大鼠不同月龄段下丘脑 SP 测定值比较 (ng/mg pro, $\bar{x} \pm s$)

组别	15 月	18 月	21 月
空白	181.8 $\pm$ 32.7	209.5 $\pm$ 45.2 *	197.5 $\pm$ 19.8 *
更年期健	136.6 $\pm$ 33.5 Δ	166.1 $\pm$ 27.8 Δ	201.1 $\pm$ 20.9
雌二醇	166.4 $\pm$ 28.7 Δ	186.3 $\pm$ 26.2 Δ	194.3 $\pm$ 32.9

注:与本组 15 月龄比较, * $P < 0.05$;与空白组同月龄比较, $\Delta P < 0.05$;每组均为 6 只鼠

5 更年期健对 β -EP 的影响 见表 5。空白组 18 和 21 月龄下丘脑 β -EP 含量较 15 月龄下降($P < 0.05$),而 18 月龄与 21 月龄间无显著差异。雌二醇组和更年期健组 15 和 18 月龄下丘脑 β -EP 含量较同月龄空白组显著下降($P < 0.05$)。

相关分析表明,更年期健组下丘脑 β -EP 含量与下丘脑 ERmRNA 呈正相关($r = 0.5526$, $P < 0.05$);和血清 E_2 水平无相关性($r = 0.04$, $P > 0.05$)。雌二醇组下丘脑含量与血清 E_2 呈正相关($r = 0.6571$, $P < 0.05$)。

表 5 3 组大鼠不同月龄下丘脑 β -EP 含量比较 (pg/mg pro, $\bar{x} \pm s$)

组别	15 月	18 月	21 月
空白	20.0 $\pm$ 4.3	16.8 $\pm$ 4.4 *	15.1 $\pm$ 4.6 *
更年期健	51.4 $\pm$ 9.1 Δ	38.6 $\pm$ 7.9 Δ	25.4 $\pm$ 5.8
雌二醇	82.6 $\pm$ 12.8 Δ	97.5 $\pm$ 14.4 Δ	29.5 $\pm$ 5.3

注:与本组 15 月龄比较, * $P < 0.05$;与空白组同月龄比较, $\Delta P < 0.05$;每组均为 6 只鼠

讨 论

更年期综合征患者有不同程度的神经内分泌功能紊乱,雌激素分泌减少,中枢 SP 升高, β -EP 下降等⁽⁹⁾。雌激素的生理作用是由 ER 介导的⁽¹⁰⁾,因此雌激素的生物学效应取决于雌激素水平和 ER 含量。中药复方更年期健按中医七七肾气衰,清水涵木,肝阳上亢,心肾不交,心火上炎的理论,取补肾清汗泻心法则治疗更年期综合征,临床疗效在 92%~100% 之间;对激素治疗无效者,服本方后绝大多数有效⁽¹¹⁾。本研究中,大鼠性减退时血清 E_2 水平和下丘脑 ER 和 ERmRNA 水平明显下降,灌服更年期健后下丘脑组织内 ER 和 ERmRNA 水平有明显升高,而此时血清 E_2 水平无明显变化,表明更年期健的作用可能在提高 ERmRNA 转录水平,使 ER 合成增加,在 E_2 含量不变的情况下提高 E-ER 生物效应,而 21 月龄时下丘脑 ER 未测出,说明更年期健的作用有一定的范围。推测更年期健可能是通过下丘脑 ERmRNA 含量增加,而不是提高血清 E_2 水平,21 月龄时下丘脑内已无 ER 表达,故纵然有血清 E_2 水平升高,局部 SP 水平仍无变化。中枢 β -EP 参与神经内分泌的调节,下丘脑弓状核 β -EP 神经元内有 ER 存在,成为雌激素在下丘脑的靶细胞之一,以致在雌激素对 GnRH 进行反馈调节中, β -EP 起主要作用⁽¹²⁾。以

往研究表明,更年期妇女和卵巢切除后患者其血和脑脊液 β -EP 水平明显降低,给 E_2 替代治疗和补肾药治疗后 β -EP 升高。本研究结果表明血清 E_2 升高或下丘脑 ERmRNA 水平增加均可使下丘脑 β -EP 含量增加,提示雌激素生物学效应增加是 β -EP 含量提高的原因。我们认为,更年期健在临床上治疗更年期综合症的机理与雌激素替代疗法不同。该药不改变血清 E_2 水平,而提高组织 ERmRNA 和 ER 含量,从而增强雌激素的生物学效应,使 SP 神经元代偿性作用减弱,SP 含量下降,同时也使 β -EP 水平提高。

参 考 文 献

1. Ranceh NE, Young S. Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P Messenger rionucleic acids in the hypothalamus of postmenopausal women. *Endocrinology* 1991;128:2239—2247.
2. Schneider HP, Donsimoni R. Dose HRT modify risk of gynecological cancer? *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995;40 (Suppl 1):40.
3. 毛秋之,俞 瑾,李超荆.“更年期健”对更年期综合症生殖内分泌的影响. *上海中医药杂志* 1993;1:1—3.
4. Genazzani AR, Petralia F, Mercui N. Effect of steroid hormones and antihormones on hypothalamic beta-endorphin concentration intact and castrated female rats. *J Endocrinol Invert* 1990;13:91—96.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemist* 1987;162:156—159.
6. Thomas PS, Leranch C, Wirkin JW, et al. Specific measurement of DNA in nuclei and nucleic acids using diaminobenzoic acid. *Anal Bilo* 1978;89:35—39.
7. Clark JH, Kalra SP. 激素作用与分子内分泌的实验方法手册. 北京:科学出版社,1988:1—32.
8. Burton K, Faccinetti F, Martignoni E. Determination of DNA concentration with dyphenylamine. *Biochem J* 1956;62:315—312.
9. Brown ER, Harlan RE, Krause LE. Gonadal steroid regulation of acids in the rat anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology* 1990;126:330—340.
10. Kassis JA, Walent JH, Gorshi JF. Estrogen receptors in cultured rat uterine cells;induction of progesterone receptor in the absence of estrogen receptor processing. *Endocrinology* 1992;118:603—608.
11. 李人金,李超荆.中药复方对更年期综合症妇女生殖内分泌-免疫功能调节. *上海免疫学杂志* 1995;15(5):30—33.
12. Grucnewald DA, Matsumoto AM. Age-regulated decrease in proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the arcuate nucleus (RAC) of the female rat. *Proc Soc Neurosci Mtg*1993;15:343—351.

(收稿:1997-05-23 修回:1997-08-28)

《中国中西医结合杂志》第五届编委会名单

名誉总编辑 季钟朴

总 编 辑 陈可冀

副 总 编 辑 沈自尹 侯 灿 陈维养(常务)

顾 问 吴咸中 周金黄 辛育龄 关幼波 邓铁涛 祝谌予 耿鉴庭 傅世垣

编辑委员 马必生 王玉良 王今达 王 佩 王建华 王宝恩 王雪苔 尹光耀 史兆歧

叶舜宾 刘干中 刘猷枋 危北海 庄国康 许自诚 匡调元 吕维柏 孙弼纲

李 恩 李乃卿 李连达 李廷谦 李国贤 李鸣真 李顺成 李恩宽 李祥国

李超荆 杨任民 时振声 时毓民 邱佳信 陈士奎 陈文为 陈文绮 陈克忠

陈贵廷 张大钊 张之南 张国玺 张亭栋 张家庆 张梓荆 林求诚 郁仁存

尚天裕 郑显理 周文泉 周霭祥 金益强 赵伟康 姜廷良 贺瑞麟 高寿征

唐由之 郭赛珊 徐治鸿 徐理纳 黄晓愚 梁子钧 葛秦生 谢宗万 谢竹藩

楼之岑 蔡松年 蔡定芳 裴正学 廖家楨 谭家兴