国际分子医学杂志 20: 287-292, 2007

蒲公英提取物 T-1 上调小鼠生殖激素受体的表达研究

XU ZHI，本田谦一，尾崎宏治，三枚卓也，角俊幸，石河修
日本大阪市阿倍野区旭町 1-4-3 大阪市立大学研究生院医学研究科妇产系 545-8585

收稿日期：2007 年 4 月 10 日；接受日期：2007 年 5 月 21 日

摘要 生殖激素通过不同组织中的受体发挥其作用。本研究考察了蒲公英提取物 T-1（Dandelion T-1 extract，DT-1E）口服治疗 6 周后小鼠脂肪组织和生殖器官中雌激素受体（ERα 和 ERβ）、孕激素受体（progesterone receptor，PR）和卵泡刺激素受体（follicle-stimulating hormone receptor，FSHR）的表达情况。实时逆转录聚合酶链反应定量检测显示，与饲喂普通饲料的对照组相比，饲喂含 DT-1E 饲料的小鼠脂肪组织中 ERα和 ERβ mRNA 表达增强。此外，注射促性腺激素后，DT-1E 组子宫中 ERα、ERβ和 PR 以及卵巢中 FSHR mRNA 的表达量均显著高于对照组。免疫组化研究也显示 DT-1E 组的上述受体水平提高。本研究表明，口服 DT-1E 可上调小鼠 ERα、ERβ、PR 和 FSHR 的表达，提示 DT-1E 在临床治疗生殖激素相关障碍方面具有潜在的应用价值。

引言

研究发现，生殖激素，如雌激素、孕激素和卵泡刺激素，与各种生化和生理过程有关，也与妇女的多种失调和疾病有关，如绝经症状、肥胖和几类癌症[1-3]。调节激素水平已被认为是临床治疗激素相关紊乱的常用手段。例如，众所周知，激素替代治疗（hormone replacement therapy，HRT） 可有效缓解绝经症状；然而，它具有剂量相关副作用的风险[4,5]。此外，激素通过相应的受体发挥作用[6,7]，因此，研究受体表达可能有助于阐明激素诱导的病理生理状态，甚至可能有助于以较少的不便或风险替代目前可用的激素疗法。

在这方面，草药产品最近变得越来越受欢迎，它们因其具有前景光明的治疗效果和较少的副作用而被广泛使用。许多源于草药的疗法已被用于治疗女性生殖激素相关障碍[8-10]，但其具体作用机制仍有待阐明。我们假设这些草药产品的疗效可能与影响生殖激素水平或其受体的表达有关。

本研究以市售中药产品之一蒲公英提取物 T-1（Dandelion T-1 extract，DT-1E）为研究对象，研究雌性小鼠摄入含 DT-1E 的饲料 6 周后，血清激素水平的变化及脂肪组织、子宫和卵巢中雌激素受体（ERα和 ERβ）、孕激素受体（progesterone receptor，PR）和卵泡刺激素受体（follicle-stimulating hormone receptor，FSHR）的表达情况及其对排卵的影响。

材料与方法

*动物与饲料。*动物的所有条件和处理均按照《大坂市立大学动物实验指南》进行，本研究获得了我校的机构动物研究委员会的批准。36 只雌性 C3H/HeNCrlCrlj 小鼠（4 周龄）均购自日本 Charles River Laboratories Japan, Inc.（日本横滨）。将小鼠随机分为 4 组（每组 9 只），在 12h 光照：12h 黑暗周期下单笼饲养于恒温（23 ± 1℃）恒湿（55%）的笼子中。小鼠在整个 6 周饲喂期间自由饮食。2 个对照组小鼠予以无植物雌激素的普通饲料（NIH-07PLD；オリエンタル酵母工業株式会社，日本东京），2 个 DT-1E 组小鼠予以含 0.03% (w/w) DT-1E（健康促进研究所，日本大阪）的饲料。DT-1E consists of 87% dandelion extract, 5% adlay, 5% sucrose, and 3% ant extract.

*通讯作者：*本田谦一，日本大阪市阿倍野区旭町 1-4-3 大阪市立大学研究生院医学研究科妇产系 545-8585
电子邮箱：kenhonda@med.osaka-cu.ac.jp

*关键词：*雌激素受体α；雌激素受体β；孕激素受体；卵泡刺激素受体；蒲公英提取物 T-1；小鼠

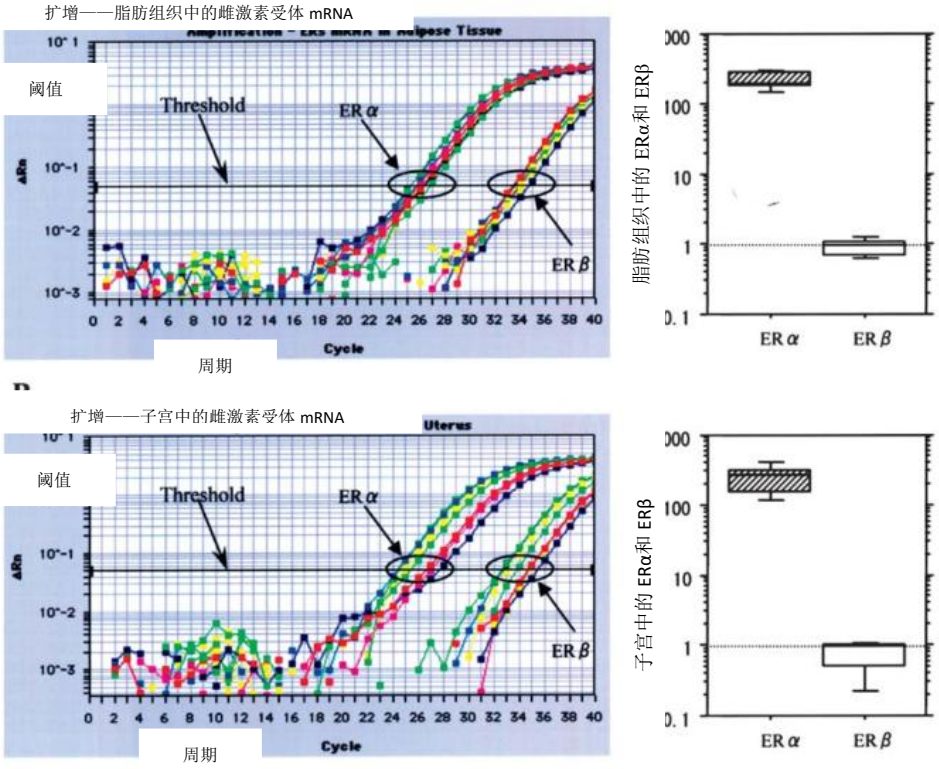


图 1. 未注射促性腺激素的普通饮食小鼠脂肪组织和子宫 ERα和 ERβ mRNA 的定量。实线表示阈值，X 轴表示阈值循环数（C_T）。C_T 为 PCR 产物达到阈值时的扩增循环数。由于 ERα具有较小的 C_T 值，因此在脂肪组织（A）和子宫（B）中，ERα显示的 mRNA 数比 ERß更多。用 $\Delta\Delta C_T$ 法测定的 ERα和 ERβ mRNA 的量在右侧以箱线图表示。

取两个对照组中其中一组小鼠以及其中一组 DT-1E 组小鼠，在 10 周龄时注射促性腺激素。对于促性腺激素注射，每只小鼠单次腹腔注射 5 IU 用 0.1 ml 灭菌生理盐水稀释的孕马血清（pregnant mare's serum，PMS，G4527；西格玛公司，美国密苏里州圣路易斯）。46 h 后，再次单次腹腔注射 5 IU 用 0.1 ml 灭菌水稀释的人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，hCG，C8554；西格玛公司）。注射 hCG 12 h 后，通过乙醚吸入处死所有小鼠，包括未注射促性腺激素的另外两组小鼠，并解剖子宫旁脂肪组织、子宫和卵巢。

血清激素测定。小鼠解剖时，从腹主动脉取血样，采用放射免疫测定法（radioimmunoassay，RIA）测定血清雌二醇水平，试剂盒购自美国诊断试剂公司（美国加利福尼亚州洛杉矶），检测限为 1.4 pg/ml，批内和批间变异系数分别为 1.75 %和 2.58 %。

RNA 提取、逆转录和实时荧光定量 PCR。根据制造商说明，使用 RNeasy Protect mini kit（凯杰公司，美国加利福尼亚州瓦伦西亚）从小鼠的脂肪组织、子宫和卵巢中分离总 RNA。分离的总 RNA 保存于-80℃备用。

采用两步实时定量逆转录聚合酶链反应（real-time reverse transcription polymerase chain reaction， real-time RT-PCR）测定 mRNA 水平。使用 TaqMan 逆转录试剂（美国应用生物系统公司，美国加利福尼亚州福斯特城）将总 RNA 样品反转录成 cDNA。每份总 RNA 样品取 1 μg 加入反转录酶混合液中，按照 TaqMan Gold RT-PCR 程序制备，最终体积为 100 μl。逆转录反应程序：25℃ 10 min，37℃ 60 min，最后 95℃ 10 min。

按照制造商说明，在 ABI PRISM 7700 序列检测系统（美国应用生物系统公司）上对 50 μl 反应混合物进行 TaqMan 实时定量 PCR，使用适当的引物和探针，用 6-羧基荧光素标记的 3'-小沟结合物，用于编码 ERα (Mm00433153 _ m1)、ERß (Mm00599821_m1)、PR (Mm00435628_m1) 和 FSHR (Mm00442819_m1)（美国应用生物系统公司）的 cDNA。寡核苷酸序列不公开，但由制造商验证。

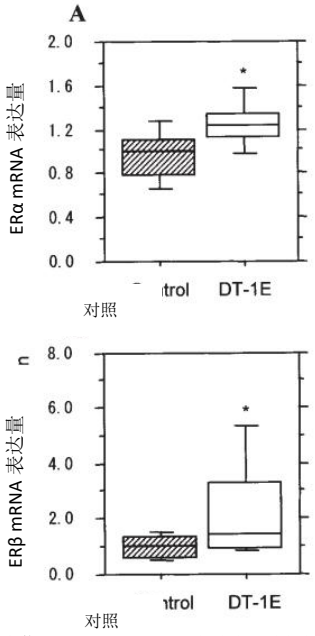


图 2. 未注射促性腺激素的 DT-1E 组和对照组小鼠脂肪组织中 ERα和 ERβ mRNA 的表达情况。TaqMan 实时 RT - PCR 定量检测结果显示，DT-1E 口服 6 周后，小鼠脂肪组织 ERα (A)和 ERβ (B) mRNA 表达量均显著高于对照组（* P < 0.05）。数值表示为与对照组观察到的水平相比的倍数变化。

通过比较 CT (Δ Δ CT) 法对 mRNA 转录本进行定量。以内参 18S rRNA（美国应用生物系统公司）为内标，相对于校准品，通过评估表达式 2- Δ Δ CT [11-13]来确定靶点量，其中 Δ Δ CT = Δ CT,s - Δ CT,cb。CT 是 ABI PRISM 7700 序列检测器软件给出的一个参数数值，与反应体系中 mRNA 的初始量呈负相关； Δ CT 是靶点与内参之间的阈值循环的差异； Δ CT,s 是样品的 Δ CT 值； Δ CT,cb 为校准品（对照组的中位数）的 Δ CT 值。

脂肪组织和生殖器官的免疫组化。为了进行 ERα、ERβ、PR 和 FSHR 的免疫组化检测，将小鼠脂肪组织、子宫和卵巢的石蜡包埋切片（4 μm 厚）脱蜡，并通过将载玻片浸泡在柠檬酸盐缓冲液（pH 6.0）中并在 110℃下高压灭菌加热 15 min 进行抗原修复。用磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）洗涤后，组织切片用含 0.05%吐温-20 的 5%山羊血清 PBS 溶液中封闭 10 min，并将载玻片分别与抗小鼠 ERα（Santa Cruz Biotechnology, Inc.，美国加利福尼亚州圣克鲁兹）、抗小鼠 ERß（AnaSpec 公司，美国加利福尼亚州圣何塞）、抗小鼠 PR（Santa Cruz Biotechnology, Inc.）或抗小鼠 FSHR（Santa Cruz Biotechnology, Inc.）兔多克隆 IgG 在 4℃下孵育过夜。用含 0.05%吐温-20 的 PBS 洗涤后，组织切片与罗丹明标记的驴抗兔 IgG 抗体（Chemicon International, Inc.，美国加利福尼亚州蒂梅丘拉）室温孵育 1 h 进行检测 ERα和 ERβ，与异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记的羊抗兔 IgG 抗体（Southern Biotech，美国阿拉巴马州伯明翰）室温孵育 1 h 进行检测 PR 和 FSHR，再次洗涤，并用含 10% PBS 的甘油溶液封片。免疫荧光图像在荧光显微镜（BX50；奥林巴斯公司，日本东京）下观察，使用 520~550 nm 激发光滤光片和> 580 nm 发射光滤光片用于检测罗丹明的红色，或使用 470~490 nm 激发光滤光片和 520~550 nm 发射光滤光片用于检测 FITC 的绿色。

卵子计数。注射 hCG 后 12 h，从小鼠切除的输卵管中收集卵子，并使用立体显微镜（SZX-ZB12；奥林巴斯公司）计算卵子数量。

统计。通过 StatView 5.0 软件（SAS Institute Inc.，美国北卡罗来纳州凯里）采用非参数 Mann-Whitney U 检验比较组间差异。P < 0.05 被认为具有统计学意义。数据分析结果在图片中以箱线图所示，其中 50%的数据汇总在方框中。各方框内的线代表中位数，各方框外的线代表 90%置信区间。

结果

血清雌二醇浓度。检测小鼠血清雌二醇浓度，无论是否

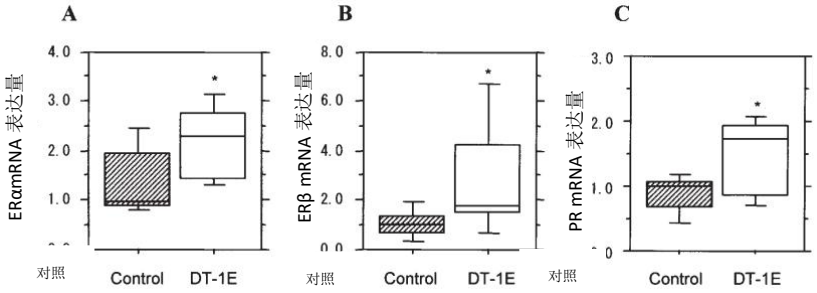


图 3. 促性腺激素注射后子宫 ERα、ERβ和 PR mRNA 的表达情况。通过 TaqMan 实时 RT-PCR 检测，在注射促性腺激素后，DT-1E 组 ERα (A)、ERß (B)和 PR (C) mRNA 的表达量均显著高于对照组（* P < 0.05）。数值表示为与对照组观察到的水平相比的倍数变化。

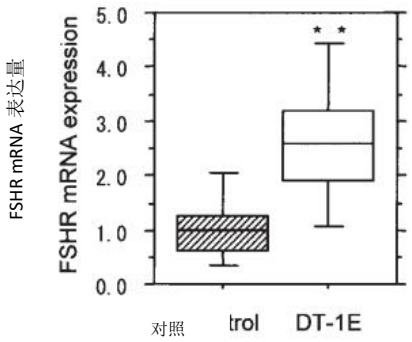


图 4. 促性腺激素注射后卵巢 FSHR mRNA 的表达情况。采用 TaqMan 实时 RT-PCR，发现注射促性腺激素后，DT-1E 组 FSHR mRNA 的表达量显著高于对照组（**P < 0.01）。数值表示为与对照组观察到的水平相比的倍数变化。

注射促性腺激素，DT-1E 组与对照组相比均无显著性差异。对于未注射促性腺激素的小鼠，对照组的雌二醇浓度为 9.3±1.8 pg/ml，DT-1E 组的雌二醇浓度为 10.8±2.5 pg/ml。对于注射促性腺激素的小鼠，对照组的雌二醇浓度为 12.3±6.5 pg/ml，DT-1E 组的雌二醇浓度为 12.4±4.4 pg/ml。

*脂肪组织和子宫 ERα和 ERβ mRNA 表达的定量分析。*采用 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测喂饲普通饮食和未注射促性腺激素小鼠脂肪组织和子宫中 ERα和 ERβ的 mRNA 水平。基于 TaqMan 商业试剂核心的 RT-PCR 效率一致性，结果表明，在小鼠脂肪组织（图 1A）和子宫（图 1B）中，ERα的 mRNA 表达水平远高于 ERα。

*ERα和ERβ在脂肪组织中的表达情况。*实时定量 RT-PCR 结果显示，在未注射促性腺激素的小鼠脂肪组织中，DT-1E 组 ERα mRNA 和 ERβ mRNA 的表达量均显著高于对照组(P < 0.05）P < 0.05。DT-1E 组（图 5B 和 5D）脂肪细胞雌激素受体(ERs)免疫荧光较对照组（图 5A 和 5C）更明显。

*ERα、ERβ和 PR 在子宫中的表达。*DT-1E 组子宫 ERα、ERβ、PR mRNA 表达水平与未注射促性腺激素的对照组相比，差异无统计学意义。然而，在注射促性腺激素的小鼠中，DT-1E 组子宫中 ERα、ERβ和 PR mRNA 表达水平显著高于对照组（P < 0.05）（图 3）。与对照组（图 6A、6C 和 6E）相比，DT-1E 组（图 6B、6D 和 6F）注射促性腺激素小鼠的子宫上皮细胞和基质细胞中 ERα、ERβ和 PR 的免疫荧光更加明显。

*各组卵巢 FSHR 表达情况的比较。*在未注射促性腺激素的小鼠中，DT-1E 组卵巢中 FSHR mRNA 的表达水平与对照

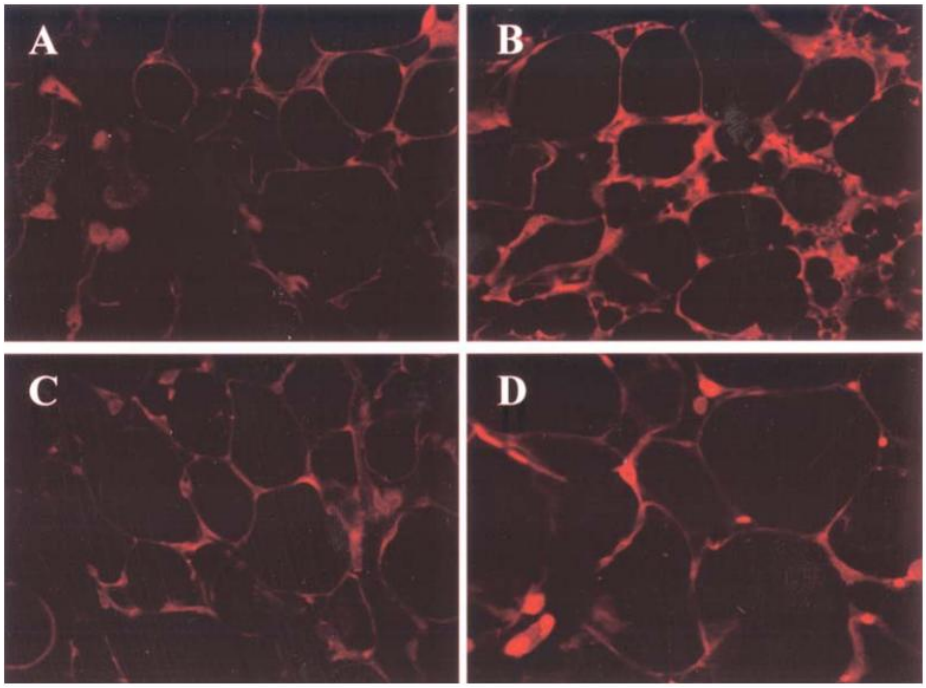


图 5. 脂肪组织 ER 免疫荧光组织化学检测。对照组（A、C）和 DT-1E 组（B、D）的脂肪组织与抗 ERα（A、B）或抗 ERα（C、D）兔 IgG 反应，并用罗丹明标记的抗兔 IgG 抗体染色。DT-1E 组脂肪细胞中 ERα和 ERβ的荧光均比对照组更明显。放大倍数，400 倍。

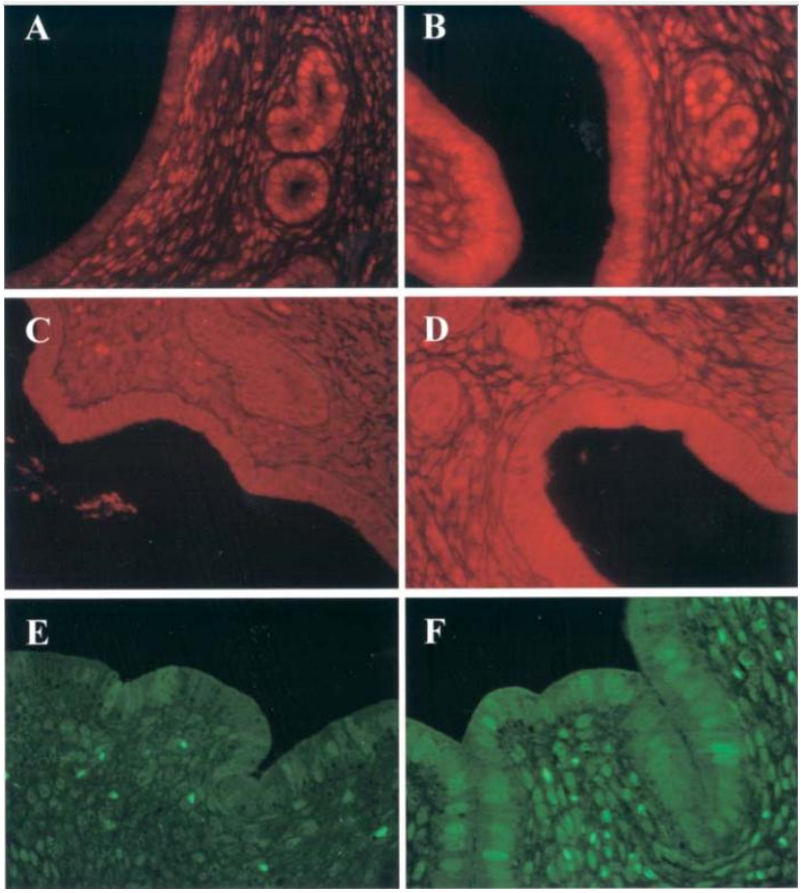


图 6. 子宫 ER 和 PR 免疫荧光组织化学检测。对照组（A、C、E）和 DT-1E 组（B、D、F）的子宫分别与抗 ERα（A、B）、抗 ERβ（C、D）或抗 PR（E、F）兔 IgG 反应，并与罗丹明标记的（ERα和 ERβ）或 FITC 标记的（PR）抗兔 IgG 抗体染色。DT-1E 组 ERα、ERβ和 PR 的荧光强度明显高于对照组。放大倍数，400 倍。

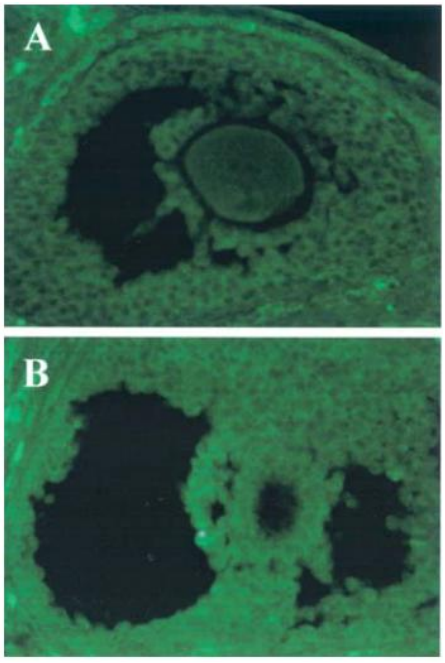


图 7.卵巢 FSHR 免疫荧光组织化学检测。对照组(A)和 DT-1E 组(B)的卵巢与抗 FSHR 兔 IgG 反应，并用 FITC 标记的抗兔 IgG 抗体染色。DT-1E 组颗粒细胞 FSHR 荧光较对照组明显。放大倍数，400 倍。

组相比无显著性差异。然而，在注射促性腺激素的小鼠中，DT-1E 组卵巢中 FSHR mRNA 表达水平显著高于对照组（$P < 0.01$）（图 4）。DT-1E 组（图 7B）卵巢颗粒细胞 FSHR 免疫荧光较对照组（图 7A）明显。

*注射促性腺激素小鼠的卵子数。*注射促性腺激素后，我们在解剖时收集输卵管，并统计卵子数。数据显示，DT-1E 组（中位数= 7）比对照组（中位数= 5）有更多的卵子（$P < 0.05$）。

讨论

我们选择子宫和卵巢作为目标生殖器官，脂肪组织作为表达 ER 的非生殖组织，以研究 DT-1E 对小鼠的影响，包括激素（雌二醇）水平的变化，受体（ERα、ERβ、PR 和 FSHR）的表达情况，以及注射促性腺激素后排卵的生殖功能。

通过 RIA 检测小鼠血清雌二醇浓度，发现即使在注射促性腺激素后，DT-1E 与对照组之间也没有显著性差异，这表明 DT-1E 的作用是不太可能通过改变循环激素水平来介导的。

组间比较，DT-1E 组脂肪组织中 ERα和 ERβ的表达量显著高于对照组。生殖激素，如雌激素，在脂肪组织代谢中发挥重要作用[14]，并且研究已经揭示小鼠的脂肪分解涉及 ERα[15,16]。虽然未发现（数据未显示）各组小鼠的体重和摄食量存在差异，但需要进一步对脂肪组织的代谢情况进行研究。

在未注射促性腺激素的情况下，DT-1E 组子宫 ERα、ERβ和 PR 的表达量与对照组相比无显著性差异。然而，在注射促性腺激素的小鼠中，DT-1E 组的 ERα、ERβ和 PR 的表达量比对照组更高。这些结果表明，虽然口服 DT-1E 并不单单上调子宫的 ER 和 PR mRNA 的表达，但其增强了子宫的反应能力。

除上述发现外，在注射促性腺激素后，我们获得了卵子，并对其数量进行了组间比较。DT-1E 组的卵子比对照组更多，这也提示了 DT-1E 对生殖系统的功能影响，包括其增加 FSHR 表达量的作用。目前关于 FSHR 表达的研究结果也表明，尽管口服 DT-1E 并不像在子宫中那样单独上调 FSHR 的表达，但 DT-1E 可能增强卵巢的反应能力。

迄今为止，许多商业草药产品可用于医疗保健和临床治疗；然而，这类产品能够增加激素受体表达的报道并不多见。本研究强调了 DT-1E 对小鼠脂肪组织、子宫和卵巢中生殖激素受体表达的上调作用，具有较大的临床应用潜力。据我们所知，20 年前引进 HRT 是为了缓解绝经症状[17]；然而，HRT 最近成为一个争论的话题，原因是基于受试者的研究揭示了乳腺癌、子宫内膜癌和冠状动脉疾病的风险[18-20]，建议雌激素剂量应尽可能低[4,19,21]。本研究表明，DT-1E 上调一系列生殖激素受体，可能会增强其对激素的反应性和敏感性，并可能允许低剂量雌激素用于 HRT 以降低这些风险。此外，促性腺激素注射引起的排卵功能升高表明 DT-1E 可能使排卵功能障碍的女性获益。

综上所述，本研究揭示了 DT-1E 在小鼠口服治疗后对 ERα、ERβ、PR 和 FSHR 的表达的上调作用，DT-1E 作为治疗生殖激素相关障碍的替代方法可能具有巨大的潜力。

致谢

我们要感谢健康促进研究所对本研究的支持。我们同时感谢大阪市立大学研究生院医学研究科的工作人员提供的技术支援。

参考文献

1. Buckler H: The menopause transition: endocrine changes and clinical symptoms. J Br Menopause Soc 11: 61-65, 2005.
2. Lovejoy JC: The menopause and obesity. Prim Care 30: 317-325,2003.
3. Henderson BE and Feigelson HS: Hormonal carcinogenesis. Carcinogenesis 21: 427-433, 2000.
4. Jacobs HS: Hormone replacement therapy and breast cancer.Endocr Relat Cancer 7: 53-61, 2000.
5. Gambacciani M and Genazzani AR: Hormone replacement therapy: the benefits in tailoring the regimen and dose. Maturitas 40: 195-201, 2001.
6. Tsai MJ and O'Malley BW: Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily. Annu Rev Biochem 63:451-486, 1994.
7. Gether U: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. Endocr Rev 21: 90-113,2000.
8. Albertazzi P: Alternatives to estrogen to manage hot flushes. Gynecol Endocrinol 20: 13-21, 2005.
9. Newton KM, Reed SD, Grothaus L, Ehrlich K, Guiltinan J, Ludman E and Lacroix AZ: The herbal alternatives for menopause (HALT) study: background and study design.
Maturitas 52: 134-146, 2005.
10. Schutz K, Carle R and Schieber A: Taraxacum - a review on its phytochemical and pharmacological profile. J Ethnopharmacol 107: 313-323, 2006.
11. Yuan JS, Reed A, Chen F and Stewart CN Jr: Statistical Analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics 7: 85, 2006.
12. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantifi- cation in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45, 2001.
13. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods 25: 402-408, 2001.
14. Darimont C, Delansorne R, Paris J, Ailhaud G and Negrel R: mInfluence of estrogenic status on the lipolytic activity of parametrial adipose tissue in vivo: an in situ microdialysis study. Endocrinology 138: 1092-1096, 1997.
15. Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM and Roca P: Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. Am J Physiol Endocrinol Metab 288: E200-E207, 2005.
16. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB and Cooke PS: Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 97: 12729-12734,2000.
17. Nichols KC, Schenkel L and Benson H: 17 beta-estradiol for postmenopausal estrogen replacement therapy. Obstet Gynecol Surv 39: 230-245, 1984.
18. Stevenson JC: Hormone replacement therapy: review, update, and remaining questions after the Women's Health Initiative Study. Curr Osteoporos Rep 2: 12-16, 2004.
19. Emons G, Huschmand-Nia A, Krauss T and Hinney B: Hormone replacement therapy and endometrial cancer. Onkologie 27: 207-210, 2004.
20. Timins JK: Current issues in hormone replacement therapy. N J Med 101: 21-27, 2004.
21. Peeyananjarassri K and Baber R: Effects of low-dose hormone therapy on menopausal symptoms, bone mineral density, endometrium, and the cardiovascular system: a review of randomized clinical trials. Climacteric 8:13-23, 2005