

二苯乙烯苷对人乳腺癌 T-47D 细胞增殖及其雌激素受体表达的影响^Δ

朱 璨*, 王 嫣, 李尧锋, 付云燕, 唐文超, 杨长福#, 王和生(贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)19-2315-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.19.03

摘要 目的:研究二苯乙烯苷(TSG)对人乳腺癌T-47D细胞增殖及其雌激素受体(ER)表达的影响,探讨其雌激素样作用及可能机制。方法:以ER阳性人乳腺癌T-47细胞为对象,以 β -雌二醇(β -E₂, 1×10^{-8} mol/L)为阳性对照,采用CKK-8法检测不同浓度TSG(1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L)作用24、48、72 h后的细胞增殖情况,并计算增殖率;分别采用Western blotting法和逆转录-聚合酶链式反应法检测低、中、高浓度TSG(1×10^{-8} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-4} mol/L)作用48 h后细胞中ER- α 、ER- β 蛋白及其mRNA的表达情况。结果:经不同浓度TSG作用24、48、72 h后,各给药组各时间点(除 β -E₂组48 h外)的细胞增殖率均较空白组显著升高,且TSG 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L组显著高于 β -E₂组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。经低、中、高浓度TSG作用48 h后,各给药组细胞中ER- α 、ER- β 蛋白及其mRNA的表达量均较空白组显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且TSG低浓度组ER- β 蛋白的表达量,各浓度组细胞中ER- α mRNA以及低、高浓度组ER- β mRNA的表达量均显著高于 β -E₂组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:TSG可诱导T-47D细胞的体外增殖,并可通过促进ER- α 、ER- β 蛋白及其mRNA的表达来发挥雌激素样作用;这种作用在一定浓度下强于 β -E₂。**关键词** 二苯乙烯苷;植物雌激素;人乳腺癌T-47D细胞;细胞增殖;雌激素受体

Effects of Stilbene Glucoside on the Proliferation and Estrogen Receptor Expression of Human Breast Cancer T-47D Cells

ZHU Can, WANG Yan, LI Yaofeng, FU Yunyan, TANG Wenchao, YANG Changfu, WANG Hesheng (College of Basic Medicine, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China)

- mquist法的中国建筑业生产效率分析[J].广州大学学报(自然科学版),2015,14(1):82-89.
- [8] YU XB, CHEN H, LI L. Evaluate typhoon disasters in 21st Century Maritime Silk Road by super-efficiency DEA[J]. *Int J Environ Res*, 2019. DOI: 10.3390/ijerph-16091614.
- [9] COSTA CK, BALBINOTTO NG, SAMPAIO LM. Efficiency of Brazilian States and the federal district in the public kidney transplant system based on DEA (data envelopment analysis) and the Malmquist index[J]. *Cad Saude Publica*, 2014, 30(8):1667-1679.
- [10] 赵银银,李丽清.基于DEA-Malmquist指数模型的政府医疗卫生投入绩效分析研究[J].中国卫生经济,2019,38(12):26-29.
- [11] 蔡万青,孙利华,高勇博.我国药品安全监管效率的实证研究[J].现代商贸工业,2018,39(19):14-17.
- [12] 万广珠.我国食品安全监管效率研究[D].上海:上海海洋大学,2018.
- [13] 广东省药品监督管理局.广东省药品监管统计年度报告:2018[R]. 2019-05-31.
- [14] 胡颖廉.平衡监管和产业:“十三五”药品安全治理的理念和路径[J].行政管理改革,2017(8):29-32.
- [15] 刘沛.贯彻“四个最严”严守药品安全:新修订《中华人民共和国药品管理法》宣贯[J].中国药业,2019,28(24):1-3.
- [16] 程志舫,王广平,江滨.药品安全监管资源配置与医药经济发展的相关性分析[J].中国新药杂志,2013,22(23):2725-2729,2744.
- [17] 李峰,何辉.新形势下药品监管科学的内涵与发展[J].中国新药杂志,2019,28(16):1921-1925.
- [18] 武小赞,王金华,曾昕,等.基于大数据技术的药品生产流通全环节实时动态智慧监管启示[J].中国药事,2019,33(12):1377-1382.
- [19] 周丽金,尚如霞,詹长春.社会共治视阈下药品安全监管体系优化研究[J].卫生经济研究,2019,36(6):54-57.
- (收稿日期:2020-04-13 修回日期:2020-08-14)
(编辑:刘明伟)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of stilbene glucoside (TSG) on the proliferation and estrogen receptor (ER) of human breast cancer T-47D cells, and to explore its estrogen-like effect and potential mechanism. METHODS: Taking ER positive human breast cancer T-47D cells as subjects, using β -estradiol (β -E₂, 1×10^{-8} mol/L) as positive control, CCK-8 assay was used to detect the cell proliferation after treated with different concentrations of TSG (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} mol/L) for 24, 48, 72 h; the cell proliferation rate was calculated. Western blotting assay and RT-PCR methods were adopted to detect the protein and mRNA expression of ER- α and ER- β in cells after treated with low, medium and high concentrations of TSG (1×10^{-8} , 1×10^{-6} , 1×10^{-4} mol/L) for 48 h. RESULTS: After treated with different concentrations of TSG for 24, 48, 72 h, the cell proliferation rate of each administration group at each time point (except for β -E₂ group at 48 h) increased significantly, compared with blank group; those of TSG groups (1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol/L) were significantly higher than β -E₂ group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treated with low, medium and high concentrations of TSG for 48 h, protein and mRNA expression of ER- α and ER- β in cells were increased significantly, compared with blank group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); protein expression of ER- β in TSG low concentration group, mRNA expression of ER- α in TSG groups as well as mRNA expression of ER- β in TSG low and high concentration groups were significantly higher than β -E₂ group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: TSG can induce the *in vitro* proliferation of T-47D cells and exert estrogen-like effects by promoting protein and mRNA expression of ER- α and ER- β , which is stronger than that of β -E₂ at a certain concentration.

KEYWORDS Stilbene glucoside; Phytoestrogen; Human breast cancer T-47D cells; Cell proliferation; Estrogen receptor

二苯乙烯苷化学名为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside,以下简称“TSG”),易溶于水,是中药制首乌的主要活性成分,且其含量是制首乌质量控制的专属性指标^[1]。制首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.干燥块根的炮制加工品,具有补肝肾、益精血、壮筋骨、乌须发之效^[1]。现代药理研究表明,制首乌及其活性成分TSG具有抗衰老、防治骨质疏松、改善血管性痴呆等作用^[2-3]。本课题组前期发现,制首乌具有植物雌激素样作用,其水煎剂可调节去卵巢大鼠的生殖轴,亦能抑制雷公藤多苷对大鼠生殖功能的破坏,且制首乌含药血清可促进人乳腺癌T-47D细胞的增殖^[4-6];且前期体内实验还发现,TSG能增加性未成熟小鼠的子宫系数,调节性激素水平,增强子宫雌激素受体(ER- α 、ER- β)的表达,亦提示TSG具有雌激素样活性^[7]。基于此,本课题组拟研究TSG对雌激素受体阳性[ER(+)]人乳腺癌T-47D细胞增殖及其ER表达的影响,以进一步探讨TSG的雌激素样作用及分子机制,为制首乌植物雌激素样作用的物质基础研究和临床应用提供实验依据,为雌激素依赖性肿瘤(如乳腺癌、子宫内膜癌)患者的治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Eclipse TS100型倒置显微镜(日本Nikon公司); Synergy 2型荧光/吸收光酶标仪(美国BioTek公司); BB15型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司); Mini-PROTEAN Tetra型电泳槽、ChemicDoc Touch型超高灵敏化学发光成像系统、C1000 Touch Thermal Cycler型聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司); Nano-Photometer型微量分光光度计(德国Implen公司); Microfuge 20R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司)。

1.2 药品与试剂

TSG对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:

J1708Z45941,纯度:99.9%); β -雌二醇对照品(β -E₂,阳性对照,北京索莱宝科技有限公司,批号:521C022,纯度: $\geq 98.0\%$);DMEM高糖培养液、无酚红DMEM高糖培养液、胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为8118240、2003881、1967534);胎牛血清(FBS)、活性炭-葡聚糖处理的胎牛血清(CDT-FBS,以色列Biological Industries公司,批号分别为1829596、1742900);兔源 β -肌动蛋白(β -actin)、ER- α 抗体(美国CST公司,批号分别为4、6);兔源ER- β 抗体(美国Abcam公司,批号:GR3211677-6);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(H+L)二抗(美国Jackson Immuno Research公司,批号:139799);青-链霉素双抗、CCK-8试剂盒、细胞裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL化学发光试剂盒、快速封闭液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为091818180923、013018181008、082018180910、081518180916、103018181030、0710181-80906、110818181108);TRNzol Universal总RNA提取试剂、FastKing一步法逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为R6917、Q6214];PCR引物(序列及扩增片段长度见表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成;二甲基亚砜(DMSO)等试剂均为分析纯,水为双蒸水。

表1 PCR引物序列及扩增片段长度

Tab 1 PCR primer sequence and amplified segment length

基因	引物序列	扩增片段长度, bp
ER- α	上游:5'-GACATGAGAGCTGCCAACCT-3'	421
	下游:5'-AGATCTCCACCATGCCCTCT-3'	
ER- β	上游:5'-AGCTGGGCCAAGAAGATTCC-3'	501
	下游:5'-GAGCAGATGTTCCATGCCCT-3'	
β -actin	上游:5'-GTGCTATCCCTGTACGCCTC-3'	530
	下游:5'-TTCTGCATCCTGTCGGCAAT-3'	

1.3 细胞

ER(+)人乳腺癌 T-47D 细胞株由上海复祥生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 细胞培养及预处理

将 T-47D 细胞置于含 10% FBS、1% 青-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养液中,于 37 °C、5% CO₂、相对饱和湿度的条件下培养(培养条件下同)。于试验开始前 3 d,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)清洗 2 次后,替换为含 5% CDT-FBS、1% 青-链霉素双抗的无酚红 DMEM 高糖培养液继续培养,以进一步增加细胞对雌激素样物质的敏感性^[8]。

2.2 细胞增殖情况检测

采用 CCK-8 法检测。取“2.1”项下经培养且处于对数生长期的细胞适量,用 PBS 清洗 2 次,经 0.25% 胰蛋白酶消化后,以不含血清的 DMEM 高糖培养液调整细胞密度,并按 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,每孔总体积为 150 μ L。培养 24 h 待细胞贴壁后,将其随机分为空白组、 β -E₂组 [1×10^{-8} mol/L, 以含 DMSO、5% CDT-FBS、1% 青链霉素、双抗的无酚红 DMEM 高糖培养基稀释(DMSO 最终体积分数为 0.000 3%),浓度参考文献方法^[9]和本课题组前期预试验结果设置;下同]和 TSG 不同浓度组 (1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} mol/L, 浓度参考本课题组前期预试验结果设置),每组设 6 个复孔。吸弃上清液,空白组加入含 5% CDT-FBS、1% 青-链霉素双抗的无酚红 DMEM 高糖培养液 150 μ L,各给药组加入含相应药物以及 5% CDT-FBS、1% 青-链霉素双抗的无酚红 DMEM 高糖培养液 150 μ L。分别于培养 24、48、72 h 时,各孔加入 CCK-8 试剂 15 μ L,于 37 °C 孵育 2 h,使用荧光/吸收光酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的吸光度(A),计算细胞增殖率:增殖率(%)=(试验组平均 A 值/空白组平均 A 值)×100%。上述试验重复 3 次。

2.3 细胞中 ER- α 、ER- β 蛋白表达情况检测

采用 Western blotting 法检测。取“2.1”项下经培养且处于对数生长期的细胞适量,用 PBS 清洗 2 次,经 0.25% 胰蛋白酶消化后,以不含血清的 DMEM 高糖培养液调整细胞密度,并按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,每孔总体积为 2 mL。培养 24 h 待细胞贴壁后,将其随机分为空白组、 β -E₂组 (1×10^{-8} mol/L) 和 TSG 低、中、高浓度组(浓度参考“2.2”项下试验结果设置),每组设 4 个复孔。吸弃上清液,空白组加入含 5% CDT-FBS、1% 青-链霉素双抗的无酚红 DMEM 高糖培养液 2 mL,各给药组加入含相应药物以及 5% CDT-FBS、1% 青-链霉素双抗的无酚红 DMEM 高糖培养液 2 mL。培养 48 h 后,收集细胞,经细胞裂解液裂解后,以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液按 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白于 100 °C 变性 5 min 后,取 20 μ g 行 SDS-PAGE。电泳后转移至 PVDF 膜上,室温封闭 15 min,加入 ER- α 、ER- β 和 β -actin 一抗(稀

释度均为 1:1 000),4 °C 孵育过夜;用三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液清洗 10 min×3 次,加入二抗(稀释度为 1:10 000),室温孵育 1 h;用 TBST 溶液清洗 10 min×3 次,经 ECL 显色后,于超高灵敏化学发光成像系统上成像。使用 Image-Pro Express 5.1 软件分析,以相应蛋白与内参 β -actin 条带的灰度值比值作为目标蛋白的表达量。上述试验重复 3 次。

2.4 细胞中 ER- α 、ER- β mRNA 表达情况检测

采用 RT-PCR 法检测。取“2.1”项下经培养且处于对数生长期的细胞,按“2.3”项下方法培养、分组、给药,每组设 3 个复孔。培养 48 h 后,收集细胞,参照 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂说明书方法提取总 RNA,使用超微量分光光度计测定其纯度(即 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 值,若该值为 1.8~2.0 即表明其纯度符合试验要求^[10])。参照 FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒说明书方法进行 RT-PCR。反应体系(50 μ L):总 RNA 2 μ L,2×FastKing One Step RT-PCR Master Mix 25 μ L,25×RT-PCR Enzyme Mix 2 μ L,上/下游引物各 1.25 μ L、无 RNA 酶的 ddH₂O 18.5 μ L。反应条件:40 °C 逆转录 30 min;95 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共循环 35 次;72 °C 再延伸 5 min。扩增产物行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,于超高灵敏化学发光成像系统上成像。使用 Image Lab 5.2.1 软件分析,以相应基因与内参 β -actin 条带的灰度值比值作为目标基因 mRNA 的表达量。上述试验重复 3 次。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TSG 对 T-47D 细胞增殖的影响

与空白组比较, β -E₂组和 TSG 各浓度组各时间点(除 β -E₂组 48 h 外)的细胞增殖率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且用药 72 h 时 TSG 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L 组的细胞增殖率均显著高于 β -E₂组($P < 0.05$),详见表 2。根据上述结果,本研究以 1×10^{-8} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-4} mol/L 作为 TSG 的低、中、高浓度进行后续试验。

3.2 TSG 对 T-47D 细胞中 ER- α 、ER- β 蛋白表达的影响

与空白组比较,各给药组细胞中 ER- α 、ER- β 蛋白的表达量均显著升高,且 TSG 低浓度组 ER- β 蛋白的表达量显著高于 β -E₂组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中, β -E₂组细胞中 ER- α 、ER- β 蛋白的表达量分别增加了 56%、29%,TSG 低、中、高浓度组细胞中上述蛋白的表达量分别增加了 61%、69%、30%(ER- α)和 83%、28%、34%(ER- β),详见图 1、表 3。

3.3 TSG 对 T-47D 细胞中 ER- α 、ER- β mRNA 表达的影响

与空白组比较,各给药组细胞中 ER- α 、ER- β mRNA

表2 TSG对T-47D细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of TSG on proliferation of T-47D cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	增殖率, %		
	24 h	48 h	72 h
空白组	100	100	100
β -E ₂ 组	118.99 ± 7.03**	138.95 ± 22.41	132.07 ± 1.20**
TSG 1 × 10 ⁻⁸ mol/L组	112.46 ± 6.01**	145.86 ± 29.29*	137.24 ± 3.35**
TSG 1 × 10 ⁻⁷ mol/L组	109.23 ± 4.68*	148.27 ± 33.71*	147.26 ± 9.41***
TSG 1 × 10 ⁻⁶ mol/L组	115.38 ± 3.43**	147.29 ± 22.99*	151.13 ± 12.61***
TSG 1 × 10 ⁻⁵ mol/L组	113.35 ± 0.88**	146.01 ± 23.75*	148.49 ± 8.55**
TSG 1 × 10 ⁻⁴ mol/L组	112.65 ± 2.79**	142.05 ± 6.33*	136.39 ± 7.18**

注:与空白组比较, *P<0.05, **P<0.01;与 β -E₂组比较, #P<0.05

Note: vs. blank group, *P<0.05, **P<0.01; vs. β -E₂ group, #P<

0.05

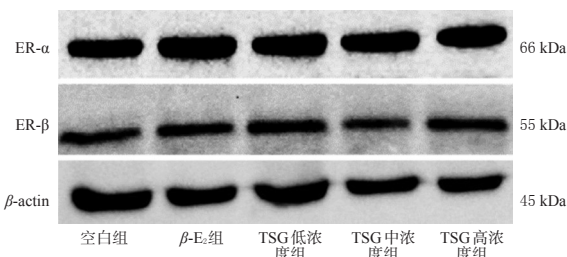


图1 TSG对T-47D细胞中ER- α 、ER- β 蛋白表达影响的电泳图

Fig 1 Electrophorograms of the effects of TSG on protein expression of ER- α and ER- β in T-47D cells

表3 TSG对T-47D细胞中ER- α 、ER- β 蛋白及其mRNA表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of TSG on protein and mRNA expression of ER- α and ER- β in T-47D cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	蛋白		mRNA	
	ER- α	ER- β	ER- α	ER- β
空白组	0.858 ± 0.062	0.550 ± 0.028	1.680 ± 0.022	0.392 ± 0.014
β -E ₂ 组	1.340 ± 0.102*	0.710 ± 0.166*	2.057 ± 0.034*	0.496 ± 0.017*
TSG低浓度组	1.378 ± 0.051*	1.006 ± 0.022***	2.546 ± 0.018**	0.765 ± 0.035***
TSG中浓度组	1.453 ± 0.090*	0.705 ± 0.034*	3.815 ± 0.078***	0.492 ± 0.027*
TSG高浓度组	1.113 ± 0.017*	0.739 ± 0.043*	2.371 ± 0.029**	0.905 ± 0.026***

注:与空白组比较, *P<0.05, **P<0.01;与 β -E₂组比较, #P<0.05, ##P<0.01

Note: vs. blank group, *P<0.05, **P<0.01; vs. β -E₂ group, #P<0.05, ##P<0.01

的表达量均显著升高,且TSG各浓度组ER- α mRNA以及TSG低、高浓度组ER- β mRNA的表达量均显著高于 β -E₂组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其中, β -E₂组细胞中ER- α 、ER- β mRNA的表达量分别增加了22%、27%,TSG低、中、高浓度组细胞中上述mRNA的表达量分别增加了52%、127%、41%(ER- α)和95%、26%、131%(ER- β),详见图2、表3。

4 讨论

雌激素是女性体内重要的性激素,不仅能促进女性

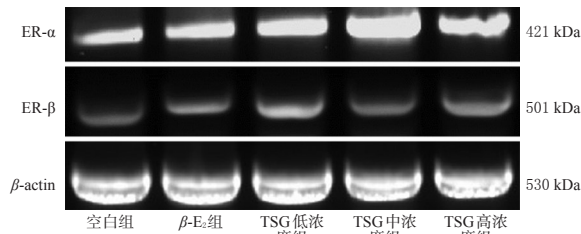


图2 TSG对T-47D细胞中ER- α 、ER- β mRNA表达影响的电泳图

Fig 2 Electrophorograms of the effects of TSG on mRNA expression of ER- α and ER- β in T-47D cells

生殖器官发育、维持第二性征,而且在骨代谢、心血管活动和神经功能中也具有重要作用^[1]。雌激素水平低下可引发一系列疾病,如骨质疏松、更年期综合征、心血管疾病等,严重影响了女性的正常生活;同时,长期应用雌激素替代疗法的副作用较多,且可增加雌激素依赖性肿瘤(如乳腺癌、子宫内膜癌等)发生的风险^[1]。因此,不良反应少的植物雌激素逐渐受到学者的关注,现已成为相关研究的热点之一^[12]。

植物雌激素可与ER结合而发挥雌激素样作用,在调节ER表达水平的同时,亦可用于治疗骨质疏松、围绝经期综合征、心血管疾病、肥胖等症^[12-13]。ER主要包括ER- α 和ER- β ,其中ER- α 的亲合力及总体活性更高^[14]。TSG是中药制首乌的主要活性成分,前期研究表明其在体内具有一定的植物雌激素作用。为进一步探讨该化合物雌激素样活性及作用机制,本课题组以ER(+)T47-D细胞(该细胞含有丰富的ER,易受雌激素或雌激素样物质诱导而增殖,是用于检测化合物雌激素样活性的常用细胞株^[15])为对象,以 β -E₂为阳性对照,通过体外试验初步考察了不同浓度TSG对细胞增殖和ER表达影响。

CCK-8试验结果显示,各给药组各时间点(除 β -E₂组48 h外)的细胞增殖率均较空白组显著升高,且用药72 h时TSG 1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L组的细胞增殖率均显著高于 β -E₂组。这提示阳性对照药和TSG均具有促进T-47D细胞增殖的作用,且TSG(1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L)的作用持续时间可能较阳性对照药更长。在本研究过程中发现,TSG各浓度组细胞的增殖率均有先升高后降低的趋势,且在浓度为1 × 10⁻⁶ mol/L(24、72 h)时达到峰值;同时,TSG在1 × 10⁻⁸~1 × 10⁻⁴ mol/L的浓度范围内均可显著促进T-47D细胞的增殖,故本研究最终选择了1 × 10⁻⁸、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁴ mol/L作为TSG后续试验中的低、中、高浓度。

本研究进一步采用Western blotting法和RT-PCR法分别测定了各组细胞中ER- α 蛋白及其mRNA的表达情况。结果显示,各给药组细胞中ER- α 蛋白及其mRNA的表达量均较空白组显著升高,且TSG各浓度组ER- α

mRNA 的表达量均显著高于 β -E₂组。这提示阳性对照药和TSG均可不同程度地上调ER- α 蛋白及其mRNA的表达。值得注意的是,TSG各浓度组细胞ER- α 蛋白表达量与 β -E₂组无明显差异,但其mRNA的表达量却显著升高,这可能与设计ER- α mRNA扩增引物时未包含变异片段,而 β -E₂可诱导引物外某些序列片段转录有关^[16]。此外笔者还发现,在TSG $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L的浓度作用范围内,细胞中ER- α 蛋白及其mRNA的表达呈先上升后下降的趋势,在TSG 1×10^{-6} mol/L(中剂量)时其增强上述指标表达的效果最明显,这可能与PE的双重调节作用有关,即低浓度协同、高浓度拮抗的拟/抗雌激素作用^[17]。

本研究同法测定了各组细胞中ER- β 蛋白及其mRNA的表达情况。结果显示,各给药组细胞中ER- β 蛋白及其mRNA的表达量均较空白组显著升高,且TSG低浓度组ER- β 蛋白表达量以及TSG低、高浓度组ER- β mRNA的表达量均显著高于 β -E₂组。这提示阳性对照药和TSG均可不同程度地上调ER- β 蛋白及其mRNA的表达,且TSG低浓度的诱导作用普遍强于阳性对照药。值得注意的是,虽然高浓度TSG也可显著上调ER- β mRNA的表达,但其对蛋白的上调作用相对较弱,这可能是由于蛋白表达除受mRNA降解的影响外,可能还受蛋白自组装的影响,从而导致mRNA转录水平和蛋白翻译水平不同步^[18-19]。此外笔者还发现,在TSG $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L的作用浓度范围内,细胞中ER- β 蛋白呈先下降后升高的趋势,在TSG 1×10^{-8} mol/L(低剂量)时其增强上述指标表达的效果最明显。ER- β 与ER- α 变化趋势不同,这可能与两种亚型活性不同、应答不同有关^[12]。

有文献指出,植物雌激素的活性较雌激素弱^[12],且本课题组前期研究也得出了类似结论^[9]。但本研究结果却提示,TSG的雌激素样活性与 β -E₂无明显差异,甚至在某些浓度下还强于 β -E₂。笔者分析其原因,认为:其一, β -E₂多以DMSO为溶剂,若DMSO体积分数超过0.2%则会产生细胞毒性^[20];其二,受试物TSG是单一化学成分,而本课题组前期研究以制首乌为对象,成分复杂,故作用强弱有所差异。

综上所述,制首乌活性成分TSG可诱导T-47D细胞的体外增殖,并可通过促进ER蛋白及mRNA的表达来发挥雌激素样作用。本课题组将在此研究的基础上,进一步探讨TSG对雌激素依赖性肿瘤细胞的影响,挖掘其雌激素样作用的具体机制,以期对制首乌药材及其活性成分的雌激素样作用的物质基础研究以及临床应用提供更多的实验依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版,北京:中国医药科技出版社,2015:176-177.
[2] 王浩,杨健,周良云,等.何首乌化学成分与药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(13):192-205.

[3] 王宏杨,迟继铭,姜雪,等.何首乌提取物二苯乙烯苷药理及临床研究进展[J].中华中医药学刊,2019,37(10):2464-2469.
[4] 朱璨,李尧锋,杨长福,等.制首乌对去卵巢大鼠子宫指数和性激素水平的影响研究[J].中国民族民间医药,2017,26(10):25-27.
[5] 朱璨,李尧锋,彭芳,等.制首乌对大鼠卵巢功能减退的影响研究[J].医学研究生学报,2018,31(6):602-607.
[6] 朱璨,王嫣,李尧锋,等.制首乌含药血清对人乳腺癌T-47D细胞增殖及ER表达的影响[J].中国药房,2019,30(22):3062-3067.
[7] 朱璨,李尧锋,彭芳,等.二苯乙烯苷的雌激素样作用及其对性未成熟小鼠ER表达的影响研究[J].中国药房,2019,30(8):1031-1036.
[8] JEONG SY, CHANG M, CHOI SH, et al. Estrogenic effects of phytoestrogens derived from *Flemingia strobilifera* in MCF-7 cells and immature rats[J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(5):519-529.
[9] 赵丕文. 10种中药植物雌激素样作用及其机制的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007.
[10] WU ZG, JIANG W, MANTRI N, et al. Transcriptome analysis reveals flavonoid biosynthesis regulation and simple sequence repeats in yam (*Dioscorea alata* L.) tubers[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):346.
[11] STINSON CP, BELLINGER L, PURI J, et al. Estrogenic effects on temporomandibular disorder and pain[J]. *J Appl Biobehav Res*, 2019. DOI: 10.1111/jabr.12164.
[12] 王永森. 红茶和石斛的植物雌激素样作用研究[D]. 长春:吉林大学,2018.
[13] ABDI F, ALIMORADI Z, HAQI P, et al. Effects of phytoestrogens on bone mineral density during the menopause transition: a systematic review of randomized, controlled trials[J]. *Climacteric*, 2016, 19(6):535-545.
[14] PONS DG, VILANOVA-LLOMPART J, GAYA-BOVER A, et al. The phytoestrogen genistein affects inflammatory-related genes expression depending on the ER α /ER β ratio in breast cancer cells[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2019, 70(8):941-949.
[15] GONZALEZ TL, MOOS RK, GERSCH CL, et al. Metabolites of n-butylparaben and iso-butylparaben exhibit estrogenic properties in MCF-7 and T47D human breast cancer cell lines[J]. *Toxicol Sci*, 2018, 164(1):50-59.
[16] SZREDER T, ZELAZOWSKA B, OPRZADEK J, et al. Expression in promoter variant of the ER α gene in bos taurus liver[J]. *Mol Biol Rep*, 2008, 35(1):65-71.
[17] VALÉRA M, FONTAINE C, DUPUIS M, et al. Towards optimization of estrogen receptor modulation in medicine[J]. *Pharmacol Ther*, 2018. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.002.
[18] KASTRATI I, CANESTRARI E, FRASOR J. PHLDA1 expression is controlled by an estrogen receptor-NF κ B-

“汗渍法”炮制对了哥王中芫花素含量及其抗氧化能力的影响^Δ

周志容^{1*}, 冯 果^{1,2#}, 李 玮^{1,2}, 郑传奇¹, 许 琴¹, 任晨晨¹, 彭礼珍¹, 黄侨宗¹, 肖晓燕¹(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R283.1; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)19-2320-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.19.04

摘要 目的: 比较“汗渍法”炮制前后了哥王乙醇提取物中活性/毒性成分芫花素的含量变化, 以及炮制对其抗氧化能力的影响。方法: 采用高效液相色谱法测定“汗渍法”炮制前后了哥王药材中芫花素的含量。色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为 0.2% 磷酸水溶液-甲醇(梯度洗脱), 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 346 nm, 进样量为 20 μL。将 SD 大鼠随机分为空白组、了哥王生品乙醇提取物组(317.52 mg/kg, 简称“生品组”)和了哥王炮制品乙醇提取物组(317.52 mg/kg, 简称“炮制品组”), 每组 6 只。空白组大鼠灌胃等体积 1.0% 羧甲基纤维素钠溶液, 各给药组灌胃相应药物混悬液, 灌胃体积均为 20 mL/kg, 每日 1 次, 连续 14 d。采用酶联免疫吸附测定法检测各组大鼠血清氧化应激指标[丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)]的含量。结果: 芫花素进样检测量的线性范围为 0.147~27.360 μg($r=0.9999$); 精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 3%; 平均加样回收率为 98.64%~98.92% (RSD<1%, $n=3$)。“汗渍法”炮制前后, 了哥王药材中芫花素的平均含量分别为 0.377 6、0.234 0 mg/g。与空白组比较, 生品组大鼠血清中 SOD 含量显著升高, CAT 含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 炮制品组大鼠血清中 MDA 含量显著降低, SOD 含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 且炮制品组 MDA 含量显著低于生品组, SOD 含量显著高于生品组($P<0.05$)。结论: 经“汗渍法”炮制后, 了哥王药材中芫花素的含量有所降低, 且抗氧化活性增强; “汗渍法”具有一定的“减毒增效”效果。

关键词 了哥王; 汗渍法; 芫花素; 含量; 抗氧化能力; 减毒增效

Effects of “Sweat Soaking Method” on the Content of Genkwanin in *Wikstroemia indica* and Its Anti-oxidation Ability

ZHOU Zhirong¹, FENG Guo^{1,2}, LI Wei^{1,2}, ZHENG Chuanqi¹, XU Qin¹, REN Chenchen¹, PENG Lizhen¹, HUANG Qiaozong¹, XIAO Xiaoyan¹(1. College of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. National Engineering and Technology Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the content changes of active/toxic ingredient genkwanin in ethanol extract from *Wikstroemia indica* before and after processing with “sweat soaking method” and the effects of processing method on its anti-oxidation ability. METHODS: HPLC method was adopted to determine the content of genkwanin in *W. indica* before and after processing with “sweat soaking method”. The separation was performed on Diamonsil C₁₈ column with 0.2% phosphoric acid solution-methanol as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 30 ℃ and detection wavelength was set at 346 nm. The sample size was 20 μL. SD rats were randomly divided into blank group, *W. indica* raw product ethanol extract group (317.52 mg/kg, called “raw-product group” as short) and *W. indica* processed product ethanol extract group (317.52 mg/kg, called “processed-product group” as short), with 6 rats in each group. Blank group was given constant volume of 1.0% CMC-Na solution intragastrically, and administration groups were given relevant medicine suspension intragastrically; all of them were given 20 mL/kg, once a day, for consecutive 14 days. The contents of serum oxidant stress

miR-181 regulatory loop and is essential for formation of

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81760766); 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地建设项目(No. 国中医科技中药便函[2015]132号); 全国中医药创新骨干人才培养项目(No. 国中医药人教函[2019]128号); 贵州省科技计划项目(No. 黔科合基础[2017]1007); 贵州省高层次创新型人才项目(No. 黔人领发[2020]4号); 贵州中医药大学博士启动基金项目(No. 贵中医博士基金[2017]1号)

* 硕士研究生。研究方向: 中药新制剂新技术。E-mail: 1301244344@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药新制剂新技术、药动学。E-mail: 453989352@qq.com

ER+ mammospheres[J]. *Oncogene*, 2015, 34(18): 2309-2316.

[19] LEVIN ER. Membrane estrogen receptors signal to determine transcription factor function[J]. *Steroids*, 2018. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.10.014.

[20] 杨敏, 张凯, 李建喜, 等. DMSO 与 DMF 对 H9C2 心肌细胞毒性及 STAT3 信号通路的影响[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(9): 1446-1452.

(收稿日期: 2020-02-11 修回日期: 2020-05-20)

(编辑: 张元媛)