

## · 基础研究 ·

## 葛根素与雌二醇对去卵巢大鼠子宫的影响\*

黄海玲<sup>1</sup>, 谭慧欢<sup>2</sup>, 赵琼芝<sup>1</sup>, 李海<sup>1</sup>, 方晓燕<sup>1</sup>

(1. 右江民族医学院组织胚胎学教研室, 广西百色 533000; 2. 百色市人民医院耳鼻喉科, 广西百色 533000)

**摘要:**目的 观察长期联合使用葛根素、雌二醇对去卵巢大鼠子宫组织结构的影响。方法 将 40 只健康雌性 5 月龄 SD 大鼠随机分为 5 组( $n=8$ ):假手术组、去卵巢模型组、葛根素组、雌二醇组、葛根素-雌二醇组。假手术组大鼠只切除其卵巢旁的一小块脂肪垫;其余 4 组建立去卵巢大鼠骨质疏松症模型。1 周后,葛根素组大鼠皮下注射葛根素 50 mg/kg,1 次/d;雌二醇组大鼠皮下注射雌二醇 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,2 次/周;葛根素-雌二醇组大鼠皮下注射葛根素(25 mg/kg,1 次/d)的同时还皮下注射雌二醇(100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,2 次/周)。药物干预 20 周后取各组大鼠血清和子宫组织,观察血清雌二醇水平和子宫组织的形态学表现。结果 雌二醇组大鼠血清雌二醇水平、子宫管径、子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积明显高于去卵巢模型组、葛根素组及葛根素-雌二醇组( $P<0.05$ )。葛根素-雌二醇组与葛根素组比较,前者大鼠血清雌二醇水平、子宫管径、子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积有增加趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 小剂量雌二醇与葛根素联合或较大剂量葛根素对子宫的促增生作用较弱。

**关键词:**雌二醇;子宫;大鼠;葛根素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.012

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)01-0037-03

## Effects of puerarin and estradiol on uterus of ovariectomized rats\*

Huang Hailing<sup>1</sup>, Tan Huihuan<sup>2</sup>, Zhao Qiongzhi<sup>1</sup>, Li Hai<sup>1</sup>, Fang Xiaoyan<sup>1</sup>

(1. Department of Histology and Embryology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 2. Department of Otolaryngology, Baise People's Hospital, Baise, Guangxi 533000, China)

**Abstract:** Objective To observe the effect of long-term combination therapy with puerarin and estradiol on uterine structure of ovariectomized rat. Methods Forty healthy 5-month-old female rats were randomly divided into 5 groups( $n=8$ ): sham-operated, ovariectomized, puerarin, estradiol and puerarin-estradiol group. Rats in sham-operated group were subjected to removal of ovarian fat pads only, and ovariectomized-induced osteoporosis rats model were established in the rest 4 groups. One week after modeling, rats in the puerarin group were subcutaneously injected with 50 mg/kg puerarin once daily, and rats in the estradiol group with 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  estradiol twice weekly, and rats in puerarin-estradiol group with puerarin(25 mg/kg, once daily) and estradiol(100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , twice weekly) simultaneously. After 20 weeks of drug intervention, serums and uterine tissues of rats in each group were collected, and the level of serum estradiol and morphological structure of uterus were observed. Results Serum estradiol level, uterine diameter, endometrium area, myometrium area and uterine gland area of rats in estradiol group were significantly higher than those in ovariectomized, puerarin and puerarin-estradiol group( $P<0.05$ ). Compared with puerarin-estradiol group and puerarin group, rats in the former showed a increasing trend of serum estradiol level, uterine diameter, endometrium area, myometrium area and uterine gland area, with no statistically significant( $P>0.05$ ). Conclusion Both low dose of estradiol and puerarin combination and relatively high dose of puerarin possess small effect on uterine proliferation.

**Key words:** estradiol; uterus; rats; puerarin

在绝经后 5~10 年,约有 1/3 的妇女会发生绝经后骨质疏松症(即 I 型骨质疏松症),其所导致的疼痛、骨折等症状严重影响中、老年妇女的身体和生活质量<sup>[1-2]</sup>。I 型骨质疏松症采用雌激素替代治疗,虽效果明显,但不良反应大,导致子宫内膜癌、乳腺癌等雌激素依赖性肿瘤的发病率明显上升<sup>[3-4]</sup>。在前期的实验中,作者发现小剂量的雌二醇与葛根素联合治疗去卵巢大鼠的 I 型骨质疏松症与分别单独使用较大剂量的葛根素或雌二醇相比,治疗效果相近。葛根素与雌激素的联合应用可减少雌激素剂量<sup>[5-6]</sup>。本实验旨在观察长期使用葛根素、雌二醇对去卵巢大鼠血清雌二醇和子宫组织结构的影响,为葛根素与雌激素联合治疗 I 型骨质疏松症提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物与药物** 5 月龄健康雌性无特定病原(specific pathogen free, SPF)级 SD(Sprague Dawley)大鼠 40 只,体质量

(280.36±20.52)g;由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号为 SCXK 桂 2009-002;均在室温,12 h 交替光照,相对湿度为 58%的环境下全价颗粒饲料喂养。实验过程符合中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》要求。葛根素注射液(100 mg/支,批号为 0905053)由成都天台制药厂生产,主要成分为葛根素;苯甲酸雌二醇(100  $\mu\text{g}/\text{支}$ ,批号为 0908072)由浙江仙居制药厂生产。

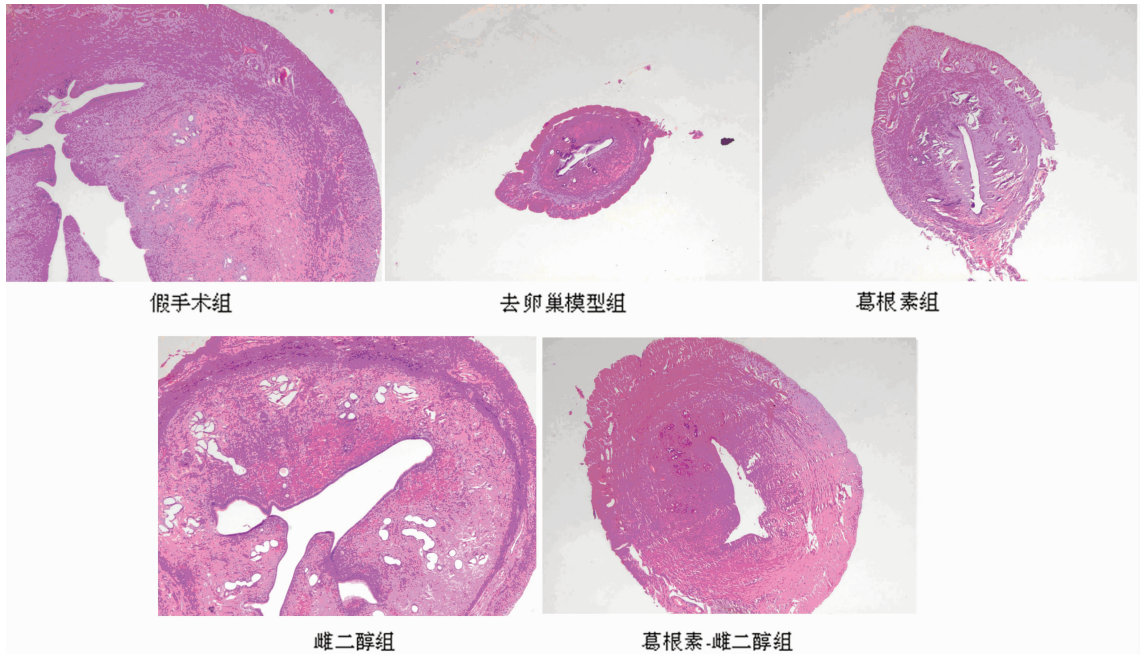
**1.2 动物分组** SD 大鼠按体质量大小顺序编号,将其随机分为 5 组:假手术组、去卵巢模型组、葛根素组、雌二醇组、葛根素-雌二醇组,每组 8 只。所有大鼠均分笼标准饲料,自由饮水。各组大鼠照明、通风、温度及湿度等饲养条件相同。

**1.3 假手术及去卵巢大鼠 I 型骨质疏松症模型的建立** 假手术组大鼠只切除其卵巢旁的一小块脂肪垫。其余 4 组 SD 大鼠用 10 g/L 戊巴比妥钠溶液(3.0 mg/kg)腹腔麻醉,无菌条件下

表 1 大鼠血清雌二醇水平、子宫管径、子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积的检测结果( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	雌二醇(ng/L)	子宫管径(mm)	子宫内膜(mm <sup>2</sup> )	子宫肌层(mm <sup>2</sup> )	子宫腺(mm <sup>2</sup> )
假手术组	46.25±7.15	3.53±0.46	6.28±1.38	3.04±1.05	0.97±0.10
去卵巢模型组大鼠	19.56±6.32a	0.86±0.11 <sup>a</sup>	0.33±0.05 <sup>a</sup>	0.21±0.08 <sup>a</sup>	0.08±0.03 <sup>a</sup>
葛根素组	36.43±9.67 <sup>c</sup>	1.64±0.29 <sup>c</sup>	1.26±0.426 <sup>c</sup>	0.86±0.10 <sup>c</sup>	0.36±0.10 <sup>c</sup>
雌二醇组	86.34±14.56 <sup>b</sup>	3.05±0.52 <sup>b</sup>	5.46±1.63 <sup>b</sup>	2.84±0.96 <sup>b</sup>	1.15±0.12 <sup>b</sup>
葛根素-雌二醇组	42.85±8.75	1.96±0.35	1.66±0.75 <sup>b</sup>	0.97±0.173	0.43±0.11

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与假手术组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与去卵巢模型组比较; <sup>c</sup>:  $P>0.05$ , 与葛根素-雌二醇组比较。

图 1 干预 20 周后大鼠子宫组织的形态学表现(苏木精-伊红染色  $\times 40$ )

经腰、背部双侧切口进入腹腔,切除双侧卵巢,切口分层缝合,术后肌内注射庆大霉素(3 mg/kg, 1 次/d)3 d,防止伤口感染。1 周后,葛根素组、雌二醇组及葛根素-雌二醇组大鼠开始用药。

**1.4 药物干预** 葛根素组大鼠皮下注射葛根素 50 mg/kg, 1 次/d;雌二醇组大鼠皮下注射雌二醇 200  $\mu$ g/kg, 2 次/周;葛根素-雌二醇组大鼠皮下注射葛根素(25 mg/kg, 1 次/d)的同时皮下注射雌二醇(100  $\mu$ g/kg, 2 次/周)。药物干预 20 周后取材。

**1.5 大鼠子宫的组织学形态观察** 去卵巢的 4 个实验组大鼠于第 20 周行腹腔麻醉,方法同 1.3,左心室取血 4 mL,并完全放血致大鼠死亡,取其子宫中段组织备用,然后处死大鼠。假手术组大鼠进行阴道脱落细胞观察,于动情间期取其血清和子宫中段组织,取材方法同去卵巢 4 组。子宫组织经固定、脱钙、脱水、石蜡包埋、切片(切片厚 5  $\mu$ m)、苏木精-伊红染色,封片。日本 Olympus 光学显微镜观察子宫管径、子宫内膜和肌层的变化并进行测量。

**1.6 大鼠血清雌二醇水平的检测** 将大鼠血液离心后取血清,美国贝克曼库尔特全自动化学发光免疫分析仪(DXI 800)检测其雌二醇水平。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物的数量分析** 纳入大鼠 40 只,无死亡,均进入结果分析。

**2.2 大鼠子宫组织的形态学表现** 假手术组大鼠子宫壁结构

正常,上皮为单层柱状上皮;固有层分布有子宫腺;肌层为多层平滑肌,肌纤维排列紧密。去卵巢模型组大鼠子宫管径显著变小,子宫内膜和肌层明显变薄,固有层子宫腺减少,肌纤维细小。分别与去卵巢模型组、葛根素组、葛根素-雌二醇组比较,雌二醇组大鼠子宫管径明显增加,子宫内膜和肌层明显增厚,子宫腺数量增多,内膜、肌层和子宫腺面积增加。雌二醇组与假手术组比较,大鼠子宫管径大小、子宫内膜面积和肌层面积均无明显差异,但前者子宫腺面积增加。与葛根素组比较,葛根素-雌二醇组大鼠中有 4 例子宫管径、内膜面积、肌层面积和子宫腺面积稍增加,另外 4 例的差异不明显。见图 1。

**2.3 大鼠血清雌二醇水平、子宫管径、子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积的检测结果** 去卵巢模型组大鼠血清雌二醇水平、子宫管径、子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积明显低于其他各组( $P<0.05$ )。雌二醇组大鼠血清雌二醇水平、子宫管径及子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积明显高于去卵巢模型组、葛根素组及葛根素-雌二醇组( $P<0.05$ )。葛根素-雌二醇组与葛根素组比较,前者大鼠血清雌二醇水平、子宫管径、子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积有增加趋势,但差异无统计意义( $P>0.05$ )。雌二醇组与假手术组比较,前者大鼠血清雌二醇水平、子宫腺面积明显增加( $P<0.05$ ),但二者子宫管径、子宫内膜面积和肌层面积的差异无统计意义( $P>0.05$ )。见表 1。

## 3 讨论

在寻找疗效好、不良反应小的药物治疗绝经后 I 型骨质疏松症的研究中,科学工作者发现从豆科植物野葛或甘葛藤根提

炼出的葛根异黄酮结构与雌激素相似<sup>[7-8]</sup>,具有植物样雌激素作用<sup>[9-11]</sup>。在动物试验中,葛根素单独或与雌二醇联合使用对去卵巢大鼠骨质疏松症具有较好的治疗效果<sup>[5-6]</sup>。但葛根素是否具有“类雌激素”不良反应和并发症的研究目前鲜见报道;同时,中药也具有不良反应,葛根素注射液所致的溶血和过敏反应等时有报道<sup>[12-14]</sup>;另外,虽然西药雌二醇治疗骨质疏松症的不良反应大、并发症多,却具有较好的治疗效果<sup>[15-16]</sup>。

在为数不多的葛根素对子宫影响的报道中,研究结果不一。薛晓鸥等<sup>[17]</sup>认为葛根提取物高剂量组(按葛根异黄酮量计算,灌胃 300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,持续 6 周)能显著提高去卵巢大鼠阴道和子宫质量,改善子宫萎缩状况,增加去卵巢大鼠血清雌二醇含量。郑高利等<sup>[18]</sup>报道,去卵巢大鼠、幼年小鼠、成年小鼠和雌激素化小鼠采用葛根素和葛根总异黄酮灌胃 5 d 后,葛根素和葛根总异黄酮能明显增加去卵巢大鼠阴道涂片中角化细胞数量,部分恢复去卵巢大鼠的性周期,明显增加去卵巢大鼠和幼年小鼠的子宫质量,且呈明显的剂量依赖性,而对正常成年小鼠的子宫生长无明显影响;在联合雌二醇后,葛根素和葛根总异黄酮可使雌二醇的促子宫生长作用明显减弱。Tanaka 等<sup>[19]</sup>给予小鼠野葛提取物 8 周后,未观察到子宫肥大的表现。

骨质疏松症的治疗是一个长期过程。上述研究中,实验时间较短且研究结果不一。为此,作者采用长期(20 周)单一较大剂量雌二醇、葛根素或较小剂量雌二醇-葛根素联合处理去卵巢大鼠骨质疏松症模型,在各组均获得较好骨质疏松症疗效的情况下<sup>[5-6]</sup>,观察各组用药对去卵巢大鼠血清雌二醇和子宫管径、内膜、肌层及子宫腺的影响,对葛根素是否具有“类雌激素”不良反应和并发症作进一步研究,旨在为中、西药结合治疗骨质疏松症提供实验依据。

实验结果显示,假手术组大鼠子宫壁结构正常。去卵巢模型组大鼠子宫管径显著变小,子宫内膜和肌层明显变薄,固有层子宫腺减少。分别与去卵巢模型组、葛根素组、葛根素-雌二醇组比较,雌二醇组大鼠子宫管径明显增加,子宫内膜和肌层明显增厚,子宫腺数量明显增多,内膜面积、肌层面积和子宫腺面积增加。与葛根素组比较,葛根素-雌二醇组大鼠血清雌二醇水平、子宫管径、子宫内膜面积、肌层面积和子宫腺面积有增加趋势,但无统计意义( $P>0.05$ )。雌二醇组与假手术组比较,前者大鼠血清雌二醇水平、子宫腺面积明显增加( $P<0.05$ ),但二者子宫管径、子宫内膜面积和肌层面积的差异无统计意义( $P>0.05$ )。

本研究中,较大剂量雌二醇显示了明显的促去卵巢大鼠子宫增生的作用。虽然雌二醇组与假手术组比较,二者在子宫管径、内膜和肌层方面无明显差异,但子宫腺明显增多,这提示大剂量雌二醇将会增加子宫内膜增生症、子宫肿瘤发生的概率。

综上所述,治疗去卵巢大鼠 I 型骨质疏松症实验中,小剂量葛根素-雌二醇联合或较大剂量葛根素促子宫增生的作用较弱,对预防子宫内膜癌的发生优于单一较大剂量的雌二醇,为长期使用葛根素与雌激素联合治疗 I 型骨质疏松症提供了实验依据。

#### 参考文献:

[1] 许洁,赵东宝,刘文斌.老年性骨质疏松症的防治进展

[J].中国全科医学,2010,13(4B):1246-1248.

- [2] 姚远,胡丽娜.绝经后骨质疏松症概述[J].实用妇产科杂志,2006,22(7):385-387.
- [3] 刘建立.应用雌激素防治绝经后骨质疏松症的问题[J].国际内分泌代谢杂志,2006,26(4):230-232.
- [4] Palacios S. Advances in hormone replacement therapy: making the menopause manageable [J]. BMC Women Health,2008,8:22-22.
- [5] 黄海玲,李海,王金花,等.雌激素与葛根素组合治疗去卵巢大鼠骨质的最佳剂量[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(33):6111-6114.
- [6] 黄海玲,李海,王金花,等.雌激素与不同剂量的葛根素联合对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J].中国妇幼保健,2011,26(33):5228-5231.
- [7] Reppert A, Yousef GG, Rogers RB, et al. Isolation of radiolabeled isoflavones from kudzu (Pueraria lobata) root cultures[J]. J Agric Food Chem,2008,56(17):7860-7865.
- [8] Zhang Y, Zeng X, Zhang L, et al. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/Akt pathway in rat calvaria osteoblasts[J]. Planta Med,2007,73(4):341-347.
- [9] 张文瑜,王香桂.葛根素注射液对去卵巢大鼠雌激素样作用的研究[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(8):465-467.
- [10] 黄彤,金邦荃,孙桂菊.葛根素对去卵巢大鼠机体骨代谢影响的观察[J].中国老年学杂志,2009,29(19):2482-2484.
- [11] 刘小艳.大豆异黄酮防治绝经相关疾病研究进展[J].重庆医学,2008,37(3):1490-1492.
- [12] 吴嘉瑞,张冰.中药注射剂药物警戒探析(一)[J].中国执业药师,2011,8(3):48-51.
- [13] 陈琳,邢茂,张恩娟.2008 年某院 245 例药品不良反应报告分析[J].重庆医学,2010,39(9):1110-1112.
- [14] 王波,张俊斌.葛根素的非常规应用及毒副作用[J].数理医药学杂志,2010,23(2):209-210.
- [15] 冯翠屏.早期使用雌激素防治女性原发性骨质疏松[J].中国妇幼保健,2009,24(13):1869-1870.
- [16] Faulkner KG. Bone matters: are density increases necessary to reduce fracture risk[J]. J Bone Miner Res,2000,15(2):183-187.
- [17] 薛晓鸥,金哲,魏育林,等.葛根提取物对去卵巢大鼠阴道子宫及垂体-性轴激素变化的影响[J].北京中医药大学学报,2002,25(6):28-30.
- [18] 郑高利,张信岳,郑经伟,等.葛根素和葛根总异黄酮的雌激素样活性[J].中药材,2002,25(8):566-568.
- [19] Tanaka T, Tang H, Yu F, et al. Kudzu (Pueraria lobata) vine ethanol extracts improve ovariectomy-induced bone loss in female mice[J]. J Agric Food Chem,2011,59(24):13230-13237.

(收稿日期:2012-07-08 修回日期:2012-08-29)