

改善更年期综合征保健食品功能评价的实验研究

叶于薇 董妙珠 郑卫东 叶秀玲 忻佩君 应贤平

(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:为建立改善更年期综合征保健食品功能评价方法,将保健食品分别经口给予摘除卵巢成熟小鼠、无生育能力的老年小鼠及幼年小鼠,30 d后测定性激素和性器官变化。结果显示高剂量组(30倍人体推荐剂量)的小鼠呈现血清雌二醇浓度和子宫重量及水摄取增加百分率显著提高,阴道雌激素作用增强,上皮角化细胞增多等现象;尤以老年鼠反应比去势鼠及幼年鼠更灵敏。结果表明血清雌二醇含量、子宫重量及水摄取增加百分率、阴道雌激素作用水平及上皮角化细胞数量等观察指标和老年鼠模型可作为评价改善更年期综合征保健食品功能之用。

关键词:营养保健品;更年期;小鼠;动物;实验

Experimental assessment of a health food for improving the climacteric syndrome

Ye Yuwei, et al.

(Shanghai municipal center for disease prevention and control, Shanghai 200336, China)

Abstract: To establish the parameters for the effect of health foods on climacteric syndrome, a health food was administered by oral to ovariectomized, old non-reproductive and young mice for 30 days. Hormone and sexual organ changes were examined. The results showed that the health food at high dose enhanced significantly serum 17 beta-estradiol (E2) level, uterus weight and water uptake, and vagina expressed keratogenous changes, in its epithelium. Old non-reproductive mice were most sensitive. The results suggested that serum 17 beta-estradiol (E2) concentration, uterus weight and water uptake and vagina changes in old non-reproductive mice may be proposed as the evaluation parameters for the effect of health foods to improve climacteric syndrome.

Key Words: Dietary Supplements; Climacteric; Mice; Animals; Laboratory

人的生育能力变化在更年期会带来一些生理改变,这方面女性表现更为突出。通常因绝经、内分泌紊乱造成性机能减退、情绪烦躁等现象称之为更年期综合征。目前临床上治疗常采用性激素补充疗法(HRT),^[1]但存在一些不良反应。^[2,3]我国是一个文明古国,传统医学有许多治疗更年期综合征的秘方和药膳,^[4,5]随着人们生活日趋富裕,以中草药为原料开发的改善更年期综合征保健食品将会不断推出。为适应这一形势,本研究采用现代科学技术方法,建立了更年期综合征动物模型,对去势、老年和幼年动物的性激素、性器官及组织细胞等相关指标进行比较研究,以得到评价保健食品改善更年期综合征的有效方法。

1 材料和方法

1.1 受试物 胶囊,中草药复方制剂,人体推荐剂量为2 g/60 kg BW,由上海某保健食品厂提供。

苯甲酸雌二醇注射液 2 mg/mL,上海第九制药厂生产。

氯化2,3,5-三苯基四唑(TTC) 上海化学试剂公司进口分装。

雌激素测定试剂盒 DSL-4300,美国进口。

-放射免疫计数器 FJ-2008PS,西安核仪器厂生产。

1.2 动物 昆明种小鼠,清洁级,雌性,老年鼠为大于12月龄并经阴道涂片证实无性周期、已失去生育能力者;幼年鼠为出生后14~18 d的;去势鼠为性成熟(70 d左右)但摘除卵巢者。卵巢摘除术:以戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔注射,腹位固定,取背部中线两侧切口,子宫角顶端分别可见一乳白色脂肪团,用

基金项目:卫生部保健食品专项基金课题(BJZ-02-39)

作者简介:叶于薇 女 副主任技师

This work was supported by the Special Funds for Health Food of Ministry of Health, China (BJZ-02-39)

小镊子夹住脂肪团拉出切口外,分离脂肪中包埋的红黄色卵巢,仔细剥离并剪除卵巢。假手术组动物按同法操作,仅摘除部分脂肪。术后,将脂肪团送回腹腔内,缝合切口,(此时可在创面上滴加少许抗菌素,以防感染)。卵巢摘除 5 d 后,对动物逐只进行阴道涂片检查,每天 1 次,连续 5 d。观察结果呈间情期者,即认为摘除手术成功,若呈动情期,即认为摘除不完全,弃去。间情期:阴道涂片主要是大量多核白细胞,少量上皮细胞。动情期:阴道涂片主要是大量角化上皮细胞,形状大而不规则,间有少量上皮细胞。

1.3 实验分组 按一般保健食品要求,实验组按人体推荐剂量的 5、10、30 倍,即 0.17 g/kg BW、0.33 g/kg BW、1.0 g/kg BW 3 个剂量组分别给予去势、老年和幼年组动物,另设阴性对照组(蒸馏水 20 mL/kg BW)和阳性对照组(每鼠皮下注射浓度为 10 μg/mL 的苯甲酸雌二醇 0.1 mL),每组 20 只动物。取胶囊内容物研磨成粉末后,分别称取 0.17、0.33、1.0 g 加蒸馏水至 20 mL,混匀,即得 3 剂量组受试液。除阳性对照在实验结束前 3 d 每天连续皮下注射苯甲酸雌二醇外,其余各组均以 0.4 mL/20 g BW 连续灌胃 30 d。

1.4 血清性激素测定 动物连续给予样品 30 d 后,各组小鼠逐只眼眶取血,离心,分离血清,用放射免疫法^[6]测定血清雌二醇及孕酮含量。

1.5 子宫变化指标^[7] 重量测定 连续给予受试物 30 d 后,逐只处死小鼠,称重,记录,解剖,切取子宫,迅速称重,计算,子宫重量百分率=(子宫湿重/每 100 g 体重)×100%。随后立即放入 100 ℃ 烘箱 24 h,取出,再次称重,计算,水摄取增加百分比率=[(子宫湿重-子宫干重)/子宫干重]×100%。内膜形态观察:取上述子宫置 10% 甲醛溶液中,取材,包埋,制片,镜检,观察子宫内膜腺上皮细胞形态。

1.6 阴道内雌激素活性测定^[7] 连续给予受试物 30 d,阳性对照组于 30 d 一次给予阳性物(皮下注射),24 h 后,每鼠阴道内注射 TTC 水溶液(25 mg/mL) 0.02 mL,30 min 后立即处死动物,剪取阴道,纵行切开,以适量蒸馏水冲洗多余的 TTC 溶液,以滤纸轻吸除残余液体,分别置于小离心管内,加无水乙醇+四氯乙烯混合液(3+1) 2.0 mL,振摇浸泡 2

h,离心 3 min(3 000 r/m),吸取上清液,加 2~3 倍量的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.7)摇匀,在波长 500 nm 处测定 A 值。

1.7 阴道上皮角化细胞观察 连续给予受试物 30 d 后,取小鼠逐只进行阴道涂片:左手背位固定小鼠,右手取一棉签细心插入小鼠阴道内 2~3 mm,转动,抽出,涂在事先已加有 1 滴生理盐水的玻璃片上,苏木素染色,显微镜下进行细胞学检查,计数角化上皮细胞。按角化上皮细胞占细胞总数 50% 分类,大于 50% 为阳性,小于 50% 为阴性。

1.8 统计处理 除阴道内上皮角化细胞计数作²检验分析外,其余采用 t 检验。

2 结果

2.1 去势动物模型研究 性成熟小鼠去势后血清性激素水平变化不大,血清雌二醇水平基本持平。子宫及阴道变化较为明显(见表 1)。病理检查结果证实:手术组动物子宫萎缩,子宫内膜变薄,腺上皮细胞成立方形,单层排列;腺体数量明显减少;腺腔内分泌物消失。实验提示去势小鼠虽无卵巢存在,但反映改善更年期最重要血清性激素变化的指标不明显,因此不能完全反映更年期的实际状况。

2.2 血清性激素 表 2 结果表明正常动物中老年鼠血清雌二醇水平明显低于幼年和去势小鼠,给药后血清雌二醇水平在老年和幼年鼠中有显著提高,老年鼠提高速度快于幼年鼠,高剂量组老年鼠可以提高 222%,而幼年鼠只能提高 43%。给药后血清孕酮水平提高仅在幼年鼠中有显著意义。受试物对去势动物血清雌二醇和孕酮水平提高没有统计学意义。

2.3 子宫变化 子宫是重要生殖器官,去势鼠子宫萎缩比老年鼠明显,前者子宫重量百分率(子宫湿重/每 100 g 体重×100%为 0.74%,而后者子宫重量百分率为 0.235%,给予受试物后动物子宫重量均有不同程度增加,高剂量组增加有统计学上显著意义。子宫水摄取增加百分率与子宫重量百分率结果相似(见表 3)。受试物还可以提高幼年鼠子宫重量及水摄取增加百分率,因此具有普遍作用意义。

2.4 阴道变化

给药后实验小鼠阴道内上皮角化细胞普遍增多,老年鼠、幼年鼠和去势鼠高剂量组均有显著意义

表 1 去势动物的指标测定

动物数 只	雌二醇 ng/mL	孕酮 ng/mL	TTC 法 A 值	子宫重量 %	水摄取增加 %	上皮角化细胞	
						阳性数	阴性数
正常组	30.0 ±12.1	4.20 ±2.7	0.26 ±0.03	0.324 ±0.15	450.7 ±96.5	4	6
假手术	27.8 ±10.7	4.25 ±2.4	0.34 ±0.10	0.421 ±0.13	563.7 ±170.9	4	6
去势组	29.7 ±19.5	1.63 ±1.0	0.11 ±0.05 ⁽¹⁾	0.074 ±0.04 ⁽¹⁾	63.4 ±25.2 ⁽¹⁾	0	10 ⁽¹⁾

注:(1)与正常组相比,P<0.05。



表 2 改善更年期综合征保健食品对老年、幼年及去势小鼠血清雌二醇和孕酮含量的影响

组 别	动物数	老年鼠		幼年鼠		去势鼠	
		雌二醇	孕酮	雌二醇	孕酮	雌二醇	孕酮
阴性对照	10	9.7 ±3.4	14.7 ±7.8	66.7 ±18.9	3.4 ±1.8	29.7 ±19.5	1.6 ±1.0
0.17 g/kg BW	10	15.6 ±3.5	14.8 ±4.9	69.0 ±19.3	6.6 ±4.9	39.3 ±30.5	3.0 ±1.1
0.33 g/kg BW	10	18.2 ±6.9	22.6 ±9.4	80.1 ±17.2	7.8 ±5.8	46.3 ±29.6	4.3 ±4.3
1.0 g/kg BW	10	31.2 ±6.9 ⁽¹⁾	27.1 ±9.4	95.7 ±12.8 ⁽¹⁾	13.8 ±1.7 ⁽¹⁾	34.4 ±11.8	4.6 ±2.3
阳性对照	10	35.1 ±3.5 ⁽¹⁾	28.1 ±10.6	90.3 ±14.4 ⁽¹⁾	14.2 ±7.1 ⁽¹⁾	64.7 ±50.5 ⁽¹⁾	4.1 ±2.8

注：(1)与阴性对照相比， $P<0.05$ 。

表 3 改善更年期综合征保健食品对老年、幼年及去势小鼠子宫重量百分率及子宫水摄取增加百分率的影响

%

组 别	动物数	老年鼠		幼年鼠		去势鼠	
		重量	水增加	重量	水增加	重量	水增加
阴性组	10	0.235 ±0.06	186.5 ±103.7	0.310 ±0.09	314.9 ±68.6	0.074 ±0.04	63.4 ±25.2
0.17 g/kg BW	10	0.336 ±0.09	226.6 ±120.8	0.447 ±0.21	372.4 ±129.6	0.180 ±0.11	300.5 ±140.7
0.33 g/kg BW	10	0.320 ±0.12	246.5 ±69.1	0.431 ±0.13	408.3 ±196.6	0.196 ±0.13	277.7 ±389.3
1.0 g/kg BW	10	0.416 ±0.25 ⁽¹⁾	367.8 ±127.3 ⁽¹⁾	0.527 ±0.15 ⁽¹⁾	607.2 ±367.5 ⁽¹⁾	0.262 ±0.12 ⁽¹⁾	370.2 ±198.3 ⁽¹⁾
阳性组	10	0.463 ±0.35 ⁽¹⁾	391.2 ±158.8 ⁽¹⁾	0.595 ±0.17 ⁽¹⁾	615.9 ±223.3 ⁽¹⁾	0.419 ±0.08 ⁽¹⁾	687.3 ±367.8 ⁽¹⁾

注：(1)与阴性对照相比， $P<0.05$ 。

(结果见表 4)。用 TTC 还原法测定小鼠阴道内雌激素作用活性也表明样品具有增加作用,高剂量组增强效应均超过 100 % (结果见表 5)。

表 4 改善更年期综合征保健食品对小鼠阴道内上皮角化细胞增多作用

组 别	动物数	老年鼠		幼年鼠		去势鼠	
		只	阳性数 阴性数	阳性数 阴性数	阳性数 阴性数	阳性数 阴性数	阳性数 阴性数
阴性对照	10	2	8	2	8	0	10
0.17 g/kg BW	10	3	7	4	6	1	9
0.33 g/kg BW	10	6	4	5	5	2	8
1.0 g/kg BW	10	7	3 ⁽¹⁾	7	3 ⁽¹⁾	4	6 ⁽¹⁾
阳性对照	10	8	2 ⁽¹⁾	9	1 ⁽¹⁾	5	5 ⁽¹⁾

注：(1)与阴性对照相比， $P<0.05$ 。

表 5 改善更年期综合征保健食品对老年、幼年及去势小鼠阴道内雌激素活性(TTC 还原法)的影响

组 别	动物数	A 值 波长 500 nm		
		老年鼠	幼年鼠	去势鼠
阴性对照	10	0.13 ±0.06	0.18 ±0.05	0.11 ±0.05
0.17 g/kg BW	10	0.15 ±0.06	0.25 ±0.07	0.14 ±0.04
0.33 g/kg BW	10	0.18 ±0.07	0.36 ±0.14	0.14 ±0.07
1.0 g/kg BW	10	0.27 ±0.10 ⁽²⁾	0.39 ±0.13 ⁽²⁾	0.26 ±0.07 ⁽²⁾
阳性对照 ⁽¹⁾	10	0.31 ±0.14 ⁽²⁾	0.32 ±0.07 ⁽²⁾	0.29 ±0.18 ⁽²⁾

注：(1)第 30 天一次给于阳性物(皮下注射),24 h 后测定结果。

(2)与阴性对照相比， $P<0.05$ 。

3 讨论

中医药对更年期综合征调理比西医性激素补充治疗更容易被广大中国患者接受,目前已有的一些中药制剂临床效果也比较好。^[8]随着科学知识普及和生活水平的不断提高,对生活质量要求提高的愿望将越来越强,人们将更愿意自主选择保健食品类来调节更年期出现的不适生理反应,故建立改善更年期综合征保健食品评价方法,对开发相关产品具有重要意义。卵巢功能减退是诱发更年期综合征的

主要原因,^[9]实验中采用卵巢切除术诱发小鼠更年期的结果与人卵巢切除后的影响相似,^[10]但与实际随着年龄增长、生育能力受到限制,卵巢萎缩、性激素下降所诱发的更年期综合征有着本质差别。实验中选用老年鼠更符合实际生理变化状况,与去势鼠相比许多指标更灵敏,又可免去手术麻烦,故建议以老年鼠作为改善更年期综合征实验用动物。

参与调节性激素的器官或组织有大脑 - 下丘脑 - 垂体 - 卵巢等,而卵巢是分泌雌激素和孕激素的主要器官,其次为肾上腺。更年期综合征是卵巢萎缩导致雌激素急剧下降、性器官退化而出现的一系列生理不适应变化,而雌二醇是雌激素中活性最高的,因此测定血清雌二醇水平高低具有非常重要意义。推测含有中草药成分的保健食品可能是通过增加性激素分泌,提高血清中雌二醇浓度,而具有改善更年期综合征的能力。

参考文献：

[1] Kornaga E. The effect of hormonal replacement therapy on symptoms of climacteric syndrome and selected metabolic parameters[J]. Ginekol Pol,2001,72(3):113—120.

[2] 程泽能,李焕德. 性激素补充疗法新制剂开发思路[J]. 中国药学杂志,1999,34(10):652—654.

[3] 娄友群,江虹. 激素替代疗法与药物选择[J]. 首都医药,1999,6(8):20—21.

[4] 范红霞,万力生,黎烈荣. 更年安怡片治疗更年期综合症的临床与实验研究[J]. 中医药研究,1999,15(4):45—49.

[5] 毋英杰,刘建璇,宋丽晶,等. 更年欣胶囊治疗更年期综合症的实验研究[J]. 中成药,1999,21(2):82—84.

[6] Coen P, Kulin H, Ballantine T, et al. An aromatase-producing sex cord tumor resulting in prepubertal gynecomastia



- [J]. New Engl J Med ,1991 ,(324) :317 —322.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 雌激素体内活性测定[A]. 见:药理实验方法学[C]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1994,1294,1296,1295.
- [8] 廖柏松,胡燕,鞠躬,等. 二仙汤对18月龄雌性大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴功能的调节[J]. 山东中医学院学报,1996,20(6):396-398.
- [9] Utian WH. Ovarian function,therapy-oriented definition of menopause and climacteric [J]. Exp Gerontol, 1994, 29 (34):245—251.
- [10] 洪颖,胡志沁,许传芬. 卵巢切除与更年期综合症的关系[J]. 中国实用妇科与产科杂志,1996,12(6):350—352.
- [收稿日期:2002-06-15]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)01-0032-04

卫生部文件

卫法监发[2002]218号

卫生部关于不得以熊胆等野生动植物为原料 生产健康相关产品的批复

重庆市卫生局:

你局《关于以熊胆为原料生产健康相关产品的请示》收悉。以野生动植物为原料生产化妆品、消毒产品等健康相关产品,应依照《卫生部关于限制以野生动植物及其产品为原料生产保健食品的通知》(卫法监发[2001]160号)、《卫生部关于限制以甘草、麻黄草、苁蓉和雪莲及其产品为原料生产保健食品的通知》(卫法监发[2001]188号)和《卫生部关于不再审批以熊胆粉和肌酸为原料生产保健食品的通告》(卫法监发[2001]267号)中的有关规定执行。

此复。

中华人民共和国卫生部
二〇〇二年八月二十七日

卫生部文件

卫法监发[2002]222号

卫生部关于撤销 “张博唤牌神乐冲剂”保健食品批准证书的通知

济南博唤实业有限公司:

根据群众举报,深圳市卫生局对你公司生产的“张博唤牌神乐冲剂”进行了监督检查。监督检查中发现,“张博唤牌神乐冲剂”声称的产品功能与卫生部审查批准的不一致。以上事实有其产品说明书等为证。

我部根据《保健食品管理办法》第二十七条的规定,对你公司生产的“张博唤牌神乐冲剂”进行了重新审查。经审查,我部确认,你公司的行为严重违反了《中华人民共和国食品卫生法》第二十三条、《保健食品管理办法》第二十三条的规定。现依据《保健食品管理办法》第二十七条的规定,我部决定撤销你公司“张博唤牌神乐冲剂”的保健食品批准证书(批准文号:卫食健字(1999)第0270号)。

如不服本决定,可以依照有关法律提起行政复议或行政诉讼。

中华人民共和国卫生部
二〇〇二年九月十一日