

论著

白藜芦醇的雌激素作用研究

张文众¹ 李 宁¹ 李 蓉²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050;
2. 中国疾病预防控制中心全国 12320 管理中心,北京 100050)

摘要:目的 探索反式白藜芦醇经口摄入后,在体内的雌激素作用和剂量 - 反应关系。方法 选用 19 日龄未成年大鼠做子宫增重试验,分别经灌胃给予 0.1、0.3、0.6 和 1.0 g/kg BW 的白藜芦醇,以 3.0 μg/kg BW 的雌二醇为阳性对照,并设立水和油的阴性对照组,所有剂量组连续灌胃 3 d。实验结束称量子宫的湿重和干重,对卵巢、子宫和阴道进行组织病理学检查,并测量子宫内膜上皮细胞高度。结果 和对照组比较,白藜芦醇对子宫重量无影响;组织病理学结果显示,1.0 g/kg BW 白藜芦醇剂量组的子宫轻度增生,0.3、0.6 和 1.0 g/kg BW 白藜芦醇剂量组的阴道轻度增生,无剂量 - 反应关系;受试物组子宫内膜上皮细胞高度无明显变化。结论 白藜芦醇经口摄入时雌激素作用较弱,且无剂量 - 反应关系。

关键词:子宫增重试验;藜芦属;醇类;反式白藜芦醇;雌激素类

Study on Estrogenic Effect of Resveratrol

ZHANG Wen-zhong, LI Ning, LI Rong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To investigate the estrogenic effect of *trans*-resveratrol *in vivo*, and study the relationship of dose-response via oral administration. **Method** Uterotrophic assay was carried out in immature SD rats aged 19 days. 0.1, 0.3, 0.6 and 1.0 g/kg BW *trans*-resveratrol, 3.0 μg/kg BW estradiol as positive control, water and oil as negative control, all groups were administered orally for 3 consecutive days. In the end of test, uterine wet and blotted weight, histopathologies of ovary, uterus and vaginal, and the epithelial sizes of uterus were measured. **Results** Compared with control groups, *trans*-resveratrol didn't affect weights of uterus. Uterine histopathologies showed that 1.0 g/kg BW *trans*-resveratrol induce slight proliferation; 0.3, 0.6 and 1.0 g/kg BW *trans*-resveratrol induce slight vagina proliferation without dose-response relationship. There was no significant difference in epithelial sizes. **Conclusion** Via oral administration, *trans*-resveratrol had slight estrogenic effect *in vivo*, and there were no dose-response relationship.

Key word: Uterotrophic; Veratrum; ALCOHOLS; *Trans*-Resveratrol; Estrogens

白藜芦醇 (Resveratrol, *Trans*-resveratrol, R) 是一类植物性多酚。反式白藜芦醇是白藜芦醇的主要活性成分,反式白藜芦醇苷分子式为 C₂₀H₂₂O₈, 化学名为反式-3,4,5-三羟基芪-3-*d*-葡萄糖苷。目前已经在 21 个科、31 个属的 72 种植物中发现了白藜芦醇,常见的有葡萄科的葡萄属、豆科、姚金娘科、百合科、伞形科、莎草科、棕榈科、买麻藤科等。其中,葡萄、虎杖和花生中白藜芦醇含量较高^[1]。体外研究表明,白藜芦醇能与 17 - 雌二醇 (17 - Estradiol, 17 - E2) 竞争结合于雌激素受体并激活雌激素应答基因的转录,即在体外具有雌激素样作用^[2]。刘兆平等^[3] 研究表明,经口给予或皮下注射

2.0 mg/kg BW 白藜芦醇可明显促进阴道开口和阴道上皮角化,显著增加未成熟小鼠子宫重量和系数,使子宫内膜柱状上皮增厚或腺体增生。但经口灌胃给予 10.0 mg/kg BW 的白藜芦醇对小鼠子宫重量并没有影响。Turner 等^[4] 研究亦表明,经口给予白藜芦醇对未成熟大鼠子宫重量没有影响。

本研究选择比较成熟的试验模型,采用多种观察终点,设计更大的剂量范围深入研究,以确定白藜芦醇经口是否可以产生雌激素效应,以及其剂量 - 效应关系和经口摄入体内作用的特点。

1 材料和方法

1.1 实验动物及饲养条件

未成熟 SD 雌性大鼠,16 d 龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (清洁级,合格证号: SCXK(京)2002 - 0003)。饲养地点:首都医科大学附

基金项目:国家“十五”科技攻关重大项目食品安全关键技术研究 (2006BAK02A07)

作者简介:张文众 男 博士生

通讯作者:李蓉 女 研究员 博士生导师

属北京口腔医院动物中心(许可证号:SYXK(京)2005-0031)。饲料为不含大豆成分的SAFC饲料,购自中国医学科学院实验动物研究所繁殖场(许可证号:SCXK(京)2001-0003)。

1.2 主要仪器和试剂

万分之一电子天平(Sartorius,德国)、VIP-E150F全自动脱水机(日本樱花)、TEK-CC/TEK-EC全自动包埋机(日本樱花)、E0106半自动石蜡切片机(英国珊瑚)、ST5010全自动染色机(德国徕卡)、SCA-5600全自动封片机(日本樱花)、TE2000显微镜、DS-5M-U1 CCD、Image Pro-Plus 7200图像分析软件(日本NIKON)。

苯甲酸雌二醇注射液(Estradiol Benzoate, E2),浓度为2 mg/ml,由上海通用药业股份有限公司生产;玉米油(食用)由北京绿宝油脂有限公司生产;白藜芦醇由上海纳贝生物有限公司生产,纯度为98%。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 50只16日龄动物适应环境3 d,于19日龄按体重随机分组,每组6只动物,共分为7个组别。

1.3.2 试剂配制方法和剂量设计 试验设置3.0 μg/kg BW的雌二醇(以油为溶剂)为阳性对照组,两个阴性对照组分别给予水和油。反式白藜芦醇以蒸馏水为溶剂,4个组的剂量分别为0.1、0.3、0.6和1.0 g/kg BW,所有物质均灌胃给予,灌胃量均为10 ml/kg BW,连续给予受试物3 d。

1.3.3 病理学检查和子宫称重 末次给予受试物

24 h,即动物22日龄时,颈椎脱臼处死动物,解剖分离子宫、卵巢和阴道。子宫分离后直接称重为子宫湿重,用滤纸吸取子宫内液再次称重为子宫干重。

把子宫、卵巢和阴道放入10%甲醛溶液中固定做病理学检查。相同脏器均在同一部位选取组织做组织学检查,若有肉眼病变再取病变部位组织,组织经常规脱水、石蜡包埋,切5 μm薄片,做HE染色,显微镜观察。卵巢观察和成像倍数为:10×物镜,0.45×C Mount;子宫观察和成像倍数为:20×物镜,0.45×C Mount;阴道观察和成像倍数为:20×物镜,0.45×C Mount;用图像分析系统进行子宫内膜上皮厚度的测量和图像采集,每只动物标本选择3个不同视野子宫内膜上皮做上皮高度的测定。

1.4 数据统计和分析

数据录入Excel,并计算子宫的湿重系数(子宫湿重/动物体重)和干重系数(子宫干重/动物体重),最后数据用SPSS10.0计算均数和标准差。做方差齐性检验,方差齐时用Dunnett统计分析,方差不齐时用Games-Howell法统计分析。油对照组只与水对照和阳性对照组比较。

2 结果

2.1 子宫增重情况

和对照组相比,雌二醇组子宫干、湿重及其系数显著升高。白藜芦醇0.3 g/kg BW剂量组子宫干重增加,而干重系数无明显变化,可能由体重高导致,因此无生物学意义,其它无明显改变。

表1 白藜芦醇对子宫重量和子宫系数的影响

组别	剂量	n	宰杀体重(g)	子宫湿重(mg)	湿重系数(%)	子宫干重(mg)	干重系数(%)
水	水对照	6	50.33 ±4.59	21.77 ±3.65	0.43 ±0.06	19.47 ±3.30	0.39 ±0.05
油	油对照	6	46.30 ±3.29	19.73 ±2.53	0.43 ±0.06	17.57 ±2.35	0.38 ±0.05
E2	3.0 μg/kg	6	49.70 ±5.95	147.13 ±75.25 ^a	2.94 ±1.43 ^a	101.52 ±16.00 ^a	2.06 ±0.36 ^a
白藜芦醇	1.0 g/kg	6	49.57 ±3.78	21.02 ±5.17	0.43 ±0.12	19.20 ±5.19	0.39 ±0.12
	0.6 g/kg	6	53.30 ±2.18	28.80 ±5.98	0.54 ±0.10	26.80 ±5.57	0.50 ±0.10
	0.3 g/kg	6	55.53 ±3.93	31.67 ±8.83	0.58 ±0.18	29.65 ±7.57 ^b	0.54 ±0.16
	0.1 g/kg	6	52.52 ±4.13	25.22 ±8.38	0.48 ±0.17	21.78 ±8.99	0.41 ±0.18

注:a表示与油对照组相比 $P < 0.05$;b表示与水对照组相比 $P < 0.05$;n表示动物只数。

2.2 子宫病理学检查情况

和对照组相比,E2组病理学显示子宫内膜上皮明显增生,呈高柱状,细胞浆疏松,子宫内膜增厚,子宫腺增多,为显著增生,上皮细胞高度也明显增加,与对照组相比。差异有统计学意义($P < 0.05$)。白藜芦醇仅有1.0 g/kg BW剂量组子宫内膜上皮呈柱状、内膜轻度增厚,少数子宫腺,呈现轻度增生改变,其子宫上皮高度和对照组差异无统计学意义,见图1、表2。

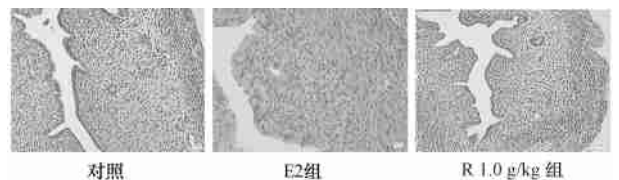


图1 子宫的病理学图片

2.3 阴道病理学检查情况

和对照组相比,E2组病理学显示阴道鳞状上皮

表2 白藜芦醇对子宫内膜上皮细胞的影响

组别	剂量	n	上皮细胞高度(μm)
水	水对照	6	8.49 ±1.45
油	油对照	6	8.39 ±0.87
E2	3.0 μg/kg	6	37.65 ±5.28 ^a
白藜芦醇	1.0 g/kg	6	9.23 ±2.53
	0.6 g/kg	6	8.83 ±1.60
	0.3 g/kg	6	8.83 ±1.48
	0.1 g/kg	6	8.71 ±2.12

注:a表示与对照组相比 $P < 0.05$; n表示动物只数。



图2 阴道的病理学图片

明显增生、增厚并出现角化,阴道壁增厚、皱襞增多,阴道为显著增生,白藜芦醇的0.3、0.6和1.0 g/kg BW剂量组阴道上皮轻度增厚,为轻度增生,无剂量-反应关系,见图2。

2.4 卵巢病理学检查情况

卵巢组织结构清楚,多数为原始卵泡、初级生长卵泡和次级卵泡,生长卵泡增多,无黄体形成。与对照组相比,除阳性对照组生长卵泡增多外,其余各组无差异。

3 讨论

Wang等^[5]对沙鼠模型研究表明,白藜芦醇进入血液循环后首先经过肝脏代谢,与糖苷相结合,在体内半衰期约为4 h。白藜芦醇经肠道吸收后经肝代谢后进入各种组织发挥生物学效应。本研究表明,白藜芦醇只在较高剂量水平(1.0 g/kg BW)才能促进子宫的轻度增生,和雌二醇产生的雌激素效应有很大差异,因此认为白藜芦醇经口摄入可以在未成年大鼠产生较弱的雌激素效应。Turner等^[4]研究表明经口摄入白藜芦醇,即使1.0 g/kg BW的剂量也未影响子宫重量和子宫上皮高度。这和我们的子宫重量研究结果一致,由于Turner等^[4]未对子宫和阴道进行组织病理学检查所以无法和他们比较。Freyberger等^[6]研究采用未成年大鼠皮下注射研究白藜芦醇的生物学效应,结果显示子宫重量并未增加,反而导致

子宫上皮细胞核雌激素受体 mRNA 表达水平下降,仅表现出抗雌激素效应。刘兆平等^[3]用皮下注射白藜芦醇的方法在小鼠试验中得出的结论相反。

白藜芦醇是有效的植物雌激素,也是雌激素受体(ER)的拮抗剂^[7]。Bhat等^[8]利用子宫内膜癌细胞系进行体外实验发现,白藜芦醇可对子宫内膜癌细胞发挥很好的生长抑制作用,能最大限度地抑制雌二醇(浓度为 10^{-9} mol/L)介导的ER阳性乳腺癌MCF-7细胞生长刺激效应。我们的研究也显示,尽管白藜芦醇有3个剂量组阴道产生了雌激素效应,但是并无剂量-反应关系。所以我们推测白藜芦醇在未成年大鼠阴道表现出了弱的雌激素效应和雌激素受体拮抗剂的双重效应。

大量的研究显示白藜芦醇在体内的雌激素效应比较复杂,推测白藜芦醇的给予途径会影响其代谢,最终影响到其生物学效应。而且不同品系、不同年龄阶段的实验动物对白藜芦醇的反应也存在差异。因此对白藜芦醇的雌激素和/或抗雌激素作用需要更多研究。

参考文献

- [1] JANG M, CAIL, UDEANI G, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275: 200-218.
- [2] GEHM B, MCANDREWS J, CIEN P, et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 14138-14143.
- [3] 刘兆平,于波,李文仙. 白藜芦醇的雌激素样作用研究[J]. 卫生研究, 2002, 31(3): 188-190.
- [4] TURNER R, EVANS G, ZHANG M, et al. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats[J]. Endocrinology, 1999, 140: 50-54.
- [5] WANG Z, HUANG Y, ZOU J, et al. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro[J]. Int J Mol Med, 2002, 9(1): 77-79.
- [6] FREYBERGER A, HARTMANN E, HILDEBRAND H, et al. Differential response of immature rat uterine tissue to ethinylestradiol and the red wine constituent resveratrol[J]. Arch Toxicol. 2001, 74(11): 709-715.
- [7] SERRERO G, LU R. Effect of resveratrol on the expression of autocrine growth modulators in human breast cancer cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2001, 3(6): 969-979.
- [8] BHAT K, PEZZUTO J. Cancer chemopreventive activity of resveratrol[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 957: 210-229.

[收稿日期:2007-12-15]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2008)03-0214-03