

九里香雌激素样作用及其对关节保护作用的初步研究

曾发挥, 刘海清, 李林福, 张蕊, 吴龙火* (赣南医学院药学院, 江西赣州 341000)

摘要 [目的]研究九里香的雌激素样作用及其对关节的影响。[方法]取60只大鼠,随机分成6组,每组10只,分别为假手术组、去卵巢对照组、尼尔雌醇对照组和九里香低、中、高剂量组。以大鼠卵巢去除术为模型,术后假手术组和去卵巢对照组均给予浓度0.8%的CMC-Na,尼尔雌醇对照组给药剂量为0.5 mg/kg,均连续给药8周,末次给药后检测子宫质量和血清中雌二醇水平,并检测血清及关节液中透明质酸的含量。[结果]九里香各剂量组子宫湿重、血清中雌二醇水平和关节液中透明质酸的含量均比尼尔雌醇对照组低,但比去卵巢对照组高,且与九里香剂量呈正相关,均呈显著性差异;而血清中透明质酸的含量与九里香剂量呈负相关,差异显著($P < 0.05$)。[结论]九里香具有雌激素样生物活性,可通过影响透明质酸水平保护关节软骨。

关键词 九里香;雌激素;子宫质量;透明质酸;关节液

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)24-09948-03

Preliminary Research on Estrogen-like Effect of *Murraya exotica* (L.) and the Chondro Protection Activity

ZENG Fa-hui et al (College of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract [Objective] To research on estrogen-like effect of *Murraya exotica* (L.) and the chondro protection activity. [Method] Sixty rats were randomly divided into six groups, ten rats were a group. They were sham operation group, ovariectomized group, nilestriol group, low, middle, and high-dosage *M. exotica* group. Ovariectomized rats were duplicated as a model, 0.8% CMC-Na was administrated in sham operation group and ovariectomized group after operation. 0.5 mg/kg nilestriol was designed as positive control. After eight weeks, the weight of uterus, the contents of estradiol in the serum were determined, the contents of hyaluronic acid in the serum and synovia were also determined. [Result] The weights of uterus, the content of estradiol in the serum, and the hyaluronic acid in the synovia in different dosages of *M. exotica* group were much lower than those in nilestriol group, but higher than those in ovariectomized group. They were positively related to the dosages of *M. exotica* and showed significant difference. Conversely, the hyaluronic acid in the serum exhibited negatively related to those dosages significantly. [Conclusion] *M. exotica* exhibit estrogen-like activity, which protect the chondrocyte in the joints through influence on the expression of hyaluronic acid.

Key words *M. exotica*; Estrogen; Uterus weight; Hyaluronic acid; Synovia

植物性雌激素是一类具有类似雌激素样生物活性的植物性成分,主要成分为异黄酮类、香豆素类、甾醇类及生物碱类等。在临床上,绝经后妇女雌激素替代疗法可有效预防因雌激素水平下降所引起一系列症状,如预防心血管疾病、骨质疏松和骨关节炎等。但大量使用雌激素会引起严重的副作用,如子宫内膜癌和子宫出血等,因而限制了其在临床上的应用^[1]。植物性雌激素可模拟雌激素作用,目前已成为国内外雌激素天然替代品研发的热点。

很多学者认为,年龄增加或雌激素水平下降与骨关节炎或骨质疏松有着密切的关系^[2]。九里香的主要有效成分为黄酮类、香豆素类及生物碱类化合物^[3]。九里香中含有很多化合物,均具有雌激素样生物学活性,如槲皮素^[4]、蛇床子素^[5]和月橘烯^[6]等。研究表明,九里香具有明显抗骨关节炎活性^[6]。但九里香是否具有雌激素样作用,目前鲜有报道。笔者以去卵巢大鼠为试验对象,观察九里香的雌激素样作用,并研究其对关节的影响,以期九里香的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 九里香采自福建省漳州市,经赣南医学院药学院李加林副教授鉴定为九里香。

1.1.2 动物 Wistar 大鼠 60 只,雌性,体重 250 ~ 300 g,均由江西赣州市实验动物中心提供,合格证号:SCXK(赣)2008-0002。

1.1.3 主要试剂 尼尔雌醇片,由上海华联制药有限公司生产;透明质酸放射免疫分析测定盒,购自河南焦作市解放免疫诊断试剂研究所;雌二醇(E2)检测试剂盒(化学发光免疫分析法),购自上海酶联生物科技有限公司;乙醇、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)和浓度75%乙醇等均为国产分析纯,市售。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备 将采摘的九里香自然阴干,机械粉碎过40目筛。以浓度75%的乙醇提取,回收溶剂得浸膏,以浓度0.8%的CMC-Na配成混悬液,浓度分别为200、100和50 mg/kg^[7];

1.2.2 模型建立 将大鼠随机分为6组,每组10只,分别为假手术组、去卵巢对照组、尼尔雌醇对照组和九里香低剂、中、高剂量组。大鼠在无菌条件下以浓度0.3%戊巴比妥腹腔注射麻醉后,取下腹正中切口,切除双侧卵巢,结扎输卵管及伴行血管,冲洗缝合伤口。假手术组不切除卵巢。术后大鼠灌胃给药。假手术组和去卵巢对照组均给予浓度0.8% CMC-Na,每天分别给予2 ml,每天1次;尼尔雌醇对照组给药剂量为0.5 mg/kg,每周给药1次;九里香低、中、高3个剂量组,每天分别给予2 ml,每天1次;均连续给药8周。

1.2.3 子宫质量、血清雌二醇、血清及关节液中透明质酸含量测定 末次给药后,称重大鼠体重,眼球摘抄取血,离心分离血清。颈椎脱臼处死大鼠,迅速剥离其子宫,称取子宫湿

基金项目 江西省教育厅科技项目(GJJ13669);赣南医学院人才引进启动基金(No. 201102);赣南医学院校级课题(YB201012)。
作者简介 曾发挥(1984-),男,江西宁都人,助教,从事中药药理学研究,E-mail:274735255@qq.com。*通讯作者,副教授,从事于天然产物活性成分研究,E-mail:longhw@126.com。
收稿日期 2013-07-23

重。膝关节严格消毒后,行关节穿刺,注入 0.2 ml 生理盐水,屈伸活动膝关节 5 次,反复抽出、注入 3 次,待关节液与生理盐水混匀后,抽出关节冲洗液,置离心机中(3 000 r/min)离心 5 min,取上清液。血清及关节冲洗液标本保存于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。采用化学免疫发光测定试剂盒测定大鼠血清雌二醇含量,并采用透明质酸放射免疫分析测定盒测定大鼠血清及关节炎液中透明质酸含量(关节冲洗液标本在检测前需要稀释 500 倍)。

1.2.4 统计学处理。结果采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。统计数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间数据采用方差分析法。

2 结果与分析

2.1 九里香提取液对大鼠体重和子宫质量的影响 观察可知,术后期间,各组大鼠无意外死亡,手术后伤口愈合情况良好,无感染。由表 1 可见,与假手术组比较,尼尔雌醇对照组大鼠体重降低了 4.6%,呈显著性差异($P < 0.05$)。与去卵巢对照组相比,九里香低、中、高剂量组大鼠体重分别下降了 1.2% ($P < 0.05$)、4.1% ($P < 0.05$)及 6.7% ($P < 0.05$)。与假手术组比较,去卵巢对照组的子宫湿重下降了 65.1%,但无显著性差异($P > 0.05$)。九里香各剂量组子宫湿重均比尼尔雌醇对照组低,但比去卵巢对照组高,均呈显著性差异($P < 0.05$)。

表 1 九里香对去卵巢大鼠体重及子宫质量的影响

组别	组数	体重//g	子宫湿重//g
假手术组	10	423.4 ± 7.3	0.63 ± 0.16
去卵巢对照组	10	452.7 ± 9.2	0.22 ± 0.07
尼尔雌醇对照组	10	403.8 ± 8.6*	0.52 ± 0.14*
九里香低剂量组	10	447.1 ± 9.4 [▲]	0.34 ± 0.11* [▲]
九里香中剂量组	10	434.2 ± 8.7* [▲]	0.38 ± 0.15* [▲]
九里香高剂量组	10	422.5 ± 9.8* [▲]	0.40 ± 0.12* [▲]

注:与假手术组相比,* $P < 0.05$;与去卵巢对照组相比,[▲] $P < 0.05$ 。下同。

2.2 大鼠血清雌二醇含量测定 由图 1 可知,去卵巢大鼠血清中雌二醇的含量与假手术组相比,明显降低($P < 0.05$),是假手术组的 55.4%。给予九里香后,大鼠血清中的雌二醇含量均有所升高。与去卵巢组相比,九里香低、中、高剂量组分别提高 15.0% ($P < 0.05$)、25.1% ($P < 0.05$)及 30.4% ($P < 0.05$),均呈显著性差异。

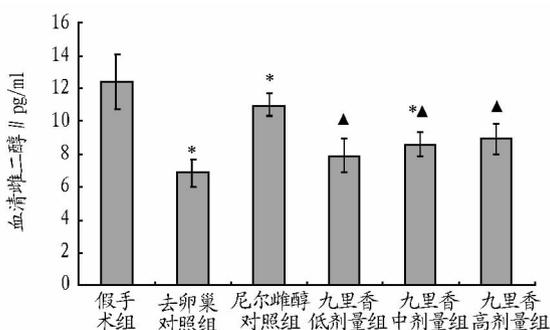


图 1 九里香对去卵巢大鼠血清雌二醇水平的影响

2.3 大鼠血清及关节液中透明质酸含量测定 由表 2 可

知,雌激素水平的变化可以影响关节液和血清透明质酸含量。在关节液中,去卵巢对照组的透明质酸含量是假手术组的 57.73%,而尼尔雌醇对照组则达到 88.27%。随着九里香剂量的升高,关节液中透明质酸的含量也逐渐升高,均呈显著性差异。

在血清中,去卵巢对照组的透明质酸含量是假手术组的 1.78 倍,而尼尔雌醇对照组则为 1.23 倍。九里香高剂量组的血清透明质酸含量为(13.85 ± 1.97) μg/L,而低剂量组则为(16.85 ± 3.54) μg/L。

表 2 九里香对去卵巢大鼠血清及关节液中透明质酸的影响

组别	组数	血清//μg/L	关节液//μg/L
假手术组	10	10.53 ± 2.33	482.34 ± 38.42
去卵巢对照组	10	18.72 ± 2.66	278.46 ± 35.22*
尼尔雌醇对照组	10	12.94 ± 3.22*	425.77 ± 24.12 [▲]
九里香低剂量组	10	16.85 ± 3.54 [▲]	328.41 ± 38.72* [▲]
九里香中剂量组	10	14.54 ± 1.84*	347.46 ± 26.58* [▲]
九里香高剂量组	10	13.85 ± 1.97* [▲]	399.35 ± 27.42*

3 结论与讨论

雌激素或具有雌激素样作用的化合物与雌激素受体结合后可诱导靶细胞增殖与分化,表现为子宫重量增加或子宫内膜柱状上皮增厚腺体增生^[1]。子宫增重试验是最早建立的检测雌激素活性的经典方法,目前仍被广泛应用。通过测定动物子宫重量,可评价药物的雌激素活性及其强度^[8]。试验结果表明,大鼠在去除卵巢后体内雌激素水平明显下降,子宫发育滞后,体重增加。给予尼尔雌醇后,可提高体内雌激素水平,增加子宫的重量。九里香低、中、高剂量组均能一定程度的提高了子宫的重量,说明能改善由于缺乏雌激素导致的症状,呈剂量依赖性。可能是由于九里香中的活性物质小分子具有雌激素样作用,直接与大鼠体内雌激素受体结合而使得血清雌二醇含量增加,但也有可能是通过垂体-肾上腺素提高血清雌激素水平^[9]。月橘烯碱是九里香中重要的双吲哚生物碱类化合物,已由中国医学科学院药物研究所于 1988 年进行化学全合成,研究发现其合成物外消旋体均具有雌激素作用^[10]。同时研究发现,月橘烯碱具有雌激素及抗雌激素的双重活性^[6]。但九里香中的月橘烯碱是通过何种信号途径对生物机体产生作用的,目前还不明确,有待于进一步研究。

关节软骨是性激素敏感组织。关节软骨细胞存在雌激素的特异性受体 E_{α} 和 E_{β} ^[11]。因此,大多数学者认为,雌激素水平与骨关节炎关系密切^[12-13]。雌激素可通过抑制糖蛋白的降解而发挥对骨关节炎的保护作用。关节中蛋白多糖含量下降是所有骨关节炎的主要特征,而透明质酸是构成蛋白多糖的主要成分^[14]。目前已证实,骨关节炎患者关节液中透明质酸的水平、分子质量以及黏滞性会明显低于正常人水平。而低分子量的透明质酸更容易通过淋巴管道进入外周血液循环,使血清透明质酸含量升高^[15]。试验结果发现,在大鼠去除卵巢后,大鼠关节液中透明质酸的含量明显下降。而给予尼尔雌醇后,体内的雌激素水平得到一定的补

偿后,关节液中的透明质酸含量得到提高。九里香具有雌激素样生物活性,呈剂量依赖型的提高关节液中透明质酸。而在血清中,随着九里香剂量升高,血清中的透明质酸的含量则逐渐下降。

九里香作为一种传统中药材,在中国药典中记载具有保护骨关节作用。九里香防治骨关节可通过多条信号途径进行作用。试验已证实九里香具有雌激素样作用及对关节的保护,推测九里香可能是通过雌激素样作用发挥保护软骨的一种作用机制,但仍需要进行进一步的研究确认。

参考文献

- [1] 王寅,张巧艳. 巴戟天雌激素样作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011,22(3):527-528.
- [2] 李海东,蒋雷生,戴力扬. 雌激素在骨关节炎及骨质疏松中的作用研究[J]. 中国矫形外科杂志,2010,18(6):474-478.
- [3] 吴龙火,温慧玲,金奇,等. 九里香指纹图谱与其抗炎活性的灰关联度分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):338-342.
- [4] 杨英,曹阳,张婷婷,等. 槲皮素药理作用在雌激素相关性疾病中的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2011,30(1):69-72.
- [5] 鲍君杰. 蛇床子素防治去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究[D]. 苏州:苏州大学,2005.
- [6] NG P C, HO D D, NG K H, et al. Mixed estrogenic and anti-estrogenic

activities of yuehchukene - a bis-indole alkaloid[J]. European Journal of Pharmacology, 1994,264(1):1-12.

- [7] WU L, WANG X, ZHUANG Z, et al. Evaluation of anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of Murraya[J]. Exotica Pharmaceutical Biology, 2010,48(12):1344-1353.
- [8] 谢金鲜,霍宇,方显明. 经血宁胶囊对药物性流产大鼠子宫出血的止血作用研究[J]. 辽宁中医杂志,2013,40(2):357-359.
- [9] 王洪进. 小鼠和山羊性成熟前卵巢卵泡发育与雌激素受体表达及其调控研究[D]. 泰安:山东农业大学,2012.
- [10] HO D D, LAU C P, NG K H, et al. Anti-implantation activity of S(-) - and R(+)-camphor-yuehchukene in rats[J]. European Journal of Pharmacology, 1991,205:209-212.
- [11] HOEG-ANDERSEN P, TANKO L B, ANDERSEN T L, et al. Ovariectomized rats as a model of post menopausal osteoarthritis: validation and application[J]. Arthritis Res Ther, 2004,6(2):169-180.
- [12] 周小莉,李荣亨. 雌激素与骨关节炎的实验研究进展[J]. 中国老年学杂志,2007,27(4):702-704.
- [13] LINN S, MURTAUGH B, CASEY E. Role of sex hormones in the development of osteoarthritis[J]. The American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation, 2012,4:169-173.
- [14] KIM HARRY K W, SU P H. Development of flattening and apparent fragmentation following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in a piglet model[J]. J Bone Surg, 2002,84(8):1359-1334.
- [15] 包毅敏,包芸,赵建民,等. 补充雌激素对去势雌兔关节液与血清中透明质酸含量的影响[J]. 中国临床康复,2006,48(10):104-106.

(上接第 9937 页)

达的可遗传改变,其来源有远远杂交及此后的多倍体化过程和环境中各种生物和非生物胁迫^[12]。DNA 甲基化是基因组 DNA 的一种重要的表观遗传修饰方式,其基本功能是维持基因组的稳定性,在植物基因组中普遍存在,对植物生长发育及进化起着重要的调节作用,在植物转座子活动、春化作用及开花、杂种优势、转基因植物的基因沉默、亲本印植物组织培养及体细胞无性系变异等研究中具有重要的地位^[3,13]。迄今为止,各种 DNA 甲基转移酶从多种植物中被分离鉴定,包括草本植物和木本植物。但目前的研究多集中于总甲基化水平与植物生长发育的关系上,而对甲基化的机制还缺乏了解。因此对植物甲基化的研究将对植物发育的调控具有启发作用,对其在农业领域中的应用具有实践指导作用。

参考文献

- [1] 张莉,贾峰,张广乐,等. 植物 DNA 甲基化研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012,40(6):3218-3221.
- [2] 南楠,曾凡锁,詹亚光. 植物 DNA 甲基化及其研究策略[J]. 植物学报, 2008,25(1):102-106.
- [3] TEYSSIER E, BERNACCHIA G, MAURY S, et al. Tissue dependent variations of DNA methylation and endoreduplication levels during tomato fruit development and ripening[J]. Planta, 2008,228(3):391-399.
- [4] CAO X, SPRINGER N M, MUSZYNSKI M G, et al. Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97(9):4979-4984.
- [5] RIVAI A, JALIGOT E, BEULE T, et al. Isolation and expression analysis of genes encoding MET, CMT, and DRM methyltransferases in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in relation to the mantled somaclonal variation

[J]. J Exp Bot, 2008,59(12):3271-3281.

- [6] 荆涛,张林玉. 水曲柳的生长规律[J]. 内蒙古农业大学学报, 2004,25(1):36-39.
- [7] BERNACCHIA G, PRIMO A, GIORGETTI L, PITTO L, et al. Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression[J]. Plant J, 1998,13(3):317-329.
- [8] PRADHAN S, CUMMINGS M, ROBERTS R J, et al. Isolation, characterization and baculovirus-mediated expression of the cDNA encoding cytosine DNA methyltransferase from *Pisum sativum*[J]. Nucleic Acids Res, 1998,26(5):1214-1222.
- [9] STEWARD N, KUSANO T, SANO H. Expression of *ZmMET1*, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells[J]. Nucleic Acids Res, 2000,28(17):3250-3259.
- [10] TEERAWANICHPAN P, CHANDRASEKHARAN M B, JIANG Y, et al. Characterization of two rice DNA methyltransferase genes and RNAi-mediated reactivation of a silenced transgene in rice callus[J]. Planta, 2004,218(3):337-349.
- [11] TAO S Q, LI J, GU X G, et al. Quantitative analysis of ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase gene expression in different organs of Tea Plant (*Camellia sinensis*) [J]. American Journal of Plant Sciences, 2012,3:51-59.
- [12] 刘乐承,董德坤,曹家树. 作物杂种优势机理研究进展[J]. 湖北农业科学, 2007,46(4):646-650.
- [13] 陈小强,王春国,李秀兰,等. 植物 DNA 甲基化及其表观遗传作用[J]. 中国细胞生物学杂志, 2007,29(7):519.
- [14] SUN Q, YANG L, SHEN H L, et al. Effects of Treatments with Three Types of Enzyme Solutions and H2O2 on Somatic Embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* Rupr. (Oleaceae) [J]. Agricultural Science & Technology, 2012,13(8):1715-1721.
- [15] 刘合霞,周坚. DNA 甲基化对植物发育调控的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012,40(2):637-639,672.