

肉苁蓉中松果菊苷和毛蕊花糖苷的植物雌激素活性研究

王琳琳, 李 薇, 宋新波*, 余河水, 苗 琳, 张丽娟, 陶 蕊

天津中医药大学, 天津 300193

摘要:研究肉苁蓉中松果菊苷和毛蕊花糖苷的雌激素活性。采用荧光素酶报告质粒法检测受试药物松果菊苷和毛蕊花糖苷的雌激素活性;利用雌激素受体竞争性结合实验和荧光素酶报告质粒法,检测松果菊苷和毛蕊花糖苷与雌激素的竞争性作用。松果菊苷和毛蕊花糖苷有上调雌激素应答元件(ERE)活性,和雌激素共同作用可以拮抗雌激素对 ERE 的上调作用。松果菊苷和毛蕊花糖苷通过上调 ERE 荧光素酶活性而表现出植物雌激素活性,可作为候选 SERMs。

关键词:松果菊苷;毛蕊花糖苷;植物雌激素;雌激素受体;SERMs

中图分类号:S285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.03.002

文献标识码:A

Study on Estrogenic Effects of Echinacoside and Actoside from Herba Cistanche

WANG Lin-lin, LI Wei, SONG Xin-bo*, YU He-shui, MIAO Lin, ZHANG Li-juan, TAO Rui

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: In this study, the estrogenic effects of echinacoside and actoside of Herba Cistanche was investigated. A luciferase reporter plasmid law was used to detect the estrogenic effects of echinacoside and actoside. The estrogen receptor competition binding experiments were used to detect their competitive effect with estrogen. The results showed that echinacoside and actoside can increase the activity of ERE. When echinacoside or actoside added in estrogenacts, ERE-driven reporter gene activity can be stimulated as an estrogen agonist. Hence, it was concluded that echinacoside and actoside had a phytoestrogens activity through stimulating ERE-increase reporter gene activity. Echinacoside and actoside were potential SERMs.

Key words: echinacoside; actoside; phytoestrogens; estrogen receptor; SERMs

肉苁蓉(Herba Cistanche)是列当科(*Orobanchaceae*)肉苁蓉属(*Cistanche*)植物肉苁蓉干燥带鳞叶的肉质茎,又名地精、金笋、苁蓉、大芸。具有补肾阳,益精血,润肠通便的作用,用于肾阳不足,精血亏虚,阳痿不孕,腰膝酸软,筋骨无力,肠燥便秘^[1,2]。目前从肉苁蓉中分离鉴定的化学成分主要有苯乙醇苷类、环烯醚萜类、木脂素类、黄酮类、多糖、低聚糖、半乳糖醇、挥发性成分、生物碱类^[10]等。其中苯乙醇苷类是肉苁蓉中主要活性成分,也是肉苁蓉质量控制的主要检测指标,并以松果菊苷和毛蕊花糖苷为代表^[9]。现代药理研究表明肉苁蓉具有免疫调节^[3]、抗氧化^[4]、抗衰老^[5]、抗疲劳^[6]、神经保护^[7]、保肝^[8]等作用。一些药理研究还表明肉苁蓉具有促进骨再生^[11-13],抑制妇女绝经后期骨质疏松形

成^[14-16]和植物雌激素作用^[17]。

本实验选择肉苁蓉中的主要质量控制指标成分松果菊苷和毛蕊花糖苷,通过荧光素酶报告质粒法、雌激素受体竞争性结合实验,检测松果菊苷和毛蕊花糖苷的雌激素作用,并探讨松果菊苷和毛蕊花糖苷雌激素作用机理。

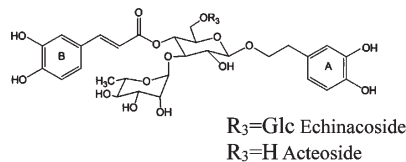


图1 松果菊苷和毛蕊花糖苷的结构式

Fig. 1 Chemical structures of echinacoside and actoside

1 材料与方法

1.1 材料

Hela 细胞(人宫颈癌细胞),购自上海细胞生物

收稿日期:2014-04-08

接受日期:2014-09-30

基金项目:天津市组分中药制剂与分析服务平台建设(12TXGCCX03800)

* 通讯作者 Tel:86-22-27494976; E-mail:songxinbo@tjutcm.edu.cn

研究所;松果菊苷(echinacoside)由本实验室从荒漠肉苁蓉中分离纯化得到,经 HPLC-ELSD 检验,以松果菊苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111670)为对照,测得纯度为 95.1%;毛蕊花糖苷(acteoside)由本实验室从荒漠肉苁蓉中分离纯化得到,经 HPLC-ELSD 检验,以毛蕊花糖苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111530)为对照,测得纯度为 96.4%;质粒 ER α 、ER β 、ERE-luc、Renila(本实验室提取);雌二醇(E₂),Sigma 公司;胎牛血清(FBS),PAA 公司;活性炭处理胎牛血清(CS-FBS),PAA 公司;无酚红 DMEM,Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO),Amresco 公司;LB 培养基,上海生工生物科技公司;Passive Lysis 5X Buffer, Promega 公司;Lipofectamine 2000, Promega 公司;质粒提取试剂盒,TIANGEN 公司;荧光素酶报告基因检测试剂盒为 Promega 公司产品。

1.2 细胞培养

Hela 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中。实验前至少提前一代换为含 1% 活性炭处理的胎牛血清的 DMEM 培养液。

1.3 转染及荧光素酶活性测定

将 Hella 细胞以 70% ~ 80% 密度接种到 24 孔板,待细胞贴壁后,细胞密度为 90% 时,按照 lipofectamine2000 转染试剂说明转染 ER α 、ER β 表达质粒和 ERE、Renila 报告质粒,8 h 后换液并加入不同浓度的受试药物,培养过夜后,用多功能读板机分别检测雌激素应答元件 ERE 荧光素酶的活性,计算药物对荧光素酶活性的相对影响。

1.4 数据处理和统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件,数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)和 Dunnett 多重比较 t 检验对数据进行分析, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 毛蕊花糖苷对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的影响

结果显示,由 ER α 、ER β 介导时与对照组相比,E₂(10 nmol)能显著上调雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性,毛蕊花糖苷在 10、100、1、10、50 μmol 时均能上调雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性,当浓度达到 50 μmol 时对 ERE 荧光素酶活性的上调作用与雌二醇相当,且有剂量依赖性,但是对雌激素受

体 ER α 、ER β 的选择性不明显(图 2)。

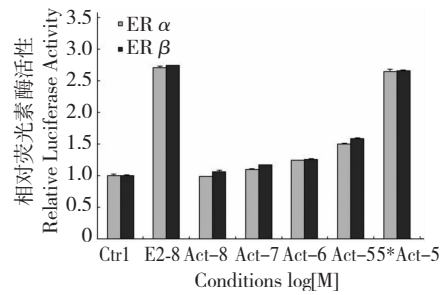


图 2 毛蕊花糖苷以浓度依赖方式对 ERE 荧光素酶活性的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of acteoside on the luciferase activity of ERE

注:与对照组比较, $P < 0.05$;与 E² 组比较, $P < 0.05$; $n = 4$

Note: compared with control group, $P < 0.05$; compared with E² group, $P < 0.05$; $n = 4$

2.2 松果菊苷对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的影响

结果显示,由 ER α 、ER β 介导时与对照组相比,E₂(10 nmol)能显著上调雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性,松果菊苷在 10、100、1、10、50 μmol 时均能上调雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性,当浓度达到 50 μmol 时对 ERE 荧光素酶活性的上调作用略低于雌二醇,且也有剂量依赖性,但是对雌激素受体 ER α 、ER β 有微弱的选择性差异(图 3)。

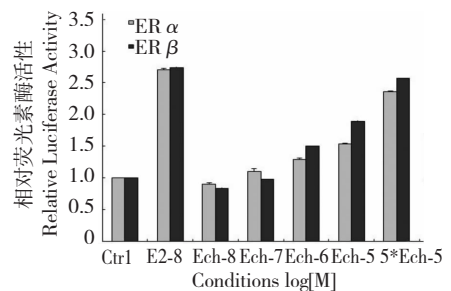


图 3 松果菊苷以浓度依赖方式对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of echinacoside on the luciferase activity of ERE

注:与对照组比较, $P < 0.05$;与 E² 组比较, $P < 0.05$; $n = 4$

Note: compared with control group, $P < 0.05$; compared with E² group, $P < 0.05$; $n = 4$

2.3 毛蕊花糖苷和雌二醇对雌激素受体的竞争性结合作用

结果显示毛蕊花糖苷能与雌二醇竞争性结合雌激素受体,拮抗雌二醇对雌激素应答元件 ERE 荧光

素酶活性的上调作用。与 E_2 (10 nmol) 组相比,毛蕊花糖苷在 1、10、50 μmol 时均能不同程度的下调雌二醇对雌激素应答元件 ERE 的荧光素酶活性,且毛蕊花糖苷表现出剂量依赖性,当浓度达到 50 μmol 时对雌二醇的拮抗作用最明显(图 4)。

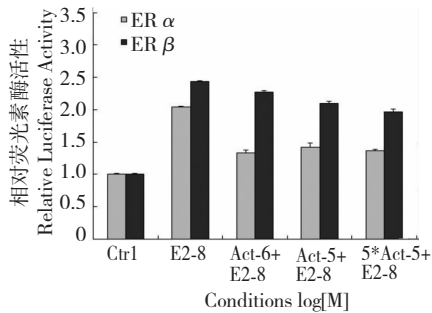


图 4 毛蕊花糖苷以剂量依赖方式拮抗雌二醇对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的影响

Fig. 4 Acteoside can stop estradiol to up regulation the luciferase activity of ERE

注:与对照组比较, $P < 0.05$; 与 E^2 组比较, $P < 0.05$; $n = 4$

Note: compared with control group, $P < 0.05$; compared with E^2 group, $P < 0.05$; $n = 4$

2.4 松果菊苷和雌二醇对雌激素受体的竞争性结合作用

结果显示松果菊苷同样能与雌二醇竞争性结合雌激素受体,拮抗雌二醇对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的上调作用。与 E_2 (10 nmol) 组相比,毛蕊花糖苷在 1、10、50 μmol 时均能不同程度的下调雌二醇对雌激素应答元件 ERE 的荧光素酶活性,且松果菊苷表现出剂量依赖性,当浓度达到 50 μmol 时对雌二醇的拮抗作用最明显(图 5)。

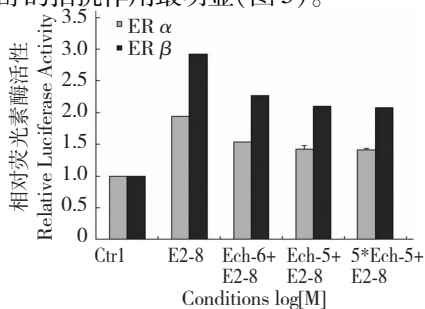


图 5 松果菊苷拮抗雌二醇对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的影响

Fig. 5 Echinacoside can stop estradiol to up regulation the luciferase activity of ERE

注:与对照组比较, $P < 0.05$; 与 E^2 组比较, $P < 0.05$; $n = 4$

Note: compared with control group, $P < 0.05$; compared with E^2 group, $P < 0.05$; $n = 4$

3 讨论

本实验首次通过明确数据显示肉苁蓉中主要有效成分松果菊苷和毛蕊花糖苷能结合雌激素受体 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$, 上调 ERE 的荧光素酶活性而发挥雌激素作用,表现出 SERMs 活性。对上述实验数据进行分析后表明,在 $ER\alpha$ 体系中毛蕊花糖苷在 50 μmol 时对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的上调作用相当于 E_2 (10 nmol) 时的 0.977 倍,在 $ER\beta$ 体系中相当于 0.970 倍;同样,在 $ER\alpha$ 体系中松果菊苷在 50 μmol 时对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的上调作用相当于 E_2 (10 nmol) 时的 0.874 倍,在 $ER\beta$ 体系中相当于 0.937 倍,固毛蕊花糖苷对雌二醇对雌激素应答元件 ERE 荧光素酶活性的上调作用略高于松果菊苷,且对雌激素受体 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 的选择性不明显,而松果菊苷对雌激素受体 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 有微弱的选择性差异,这些差异可能和毛蕊花糖苷和松果菊苷的 R4 位连接的基团不同有关。

雌激素主要通过雌激素受体发挥作用,雌激素受体主要有两种亚型 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$, 雌激素和有雌激素作用的物质和雌激素受体结合形成二聚体,然后二聚体与雌激素应答原件 ERE 结合,进而发挥雌激素效应^[21,22]。植物雌激素和雌激素具有相似的结构和功能^[23],研究表明植物雌激素能调节骨代谢,对于维持骨吸收和骨形成的平衡具有极其重要的作用^[18],对老年性机能减退患者的骨质疏松有一定的临床防治作用^[19]。故推测肉苁蓉促进骨再生、抑制妇女绝经后期骨质疏松形成的作用是通过其植物雌激素作用而发挥疗效的。

本实验还表明松果菊苷和毛蕊花糖苷能与雌二醇竞争性的结合雌激素受体,拮抗雌二醇对 ERE 荧光素酶活性的上调作用,此作用机制和白藜芦醇等已知植物雌激素成分作用相似^[20]。进一步说明松果菊苷和毛蕊花糖通过结合雌激素受体 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 而发挥雌激素作用。

上述对肉苁蓉的植物雌激素活性及其发挥雌激素作用机理的研究,为肉苁蓉可能通过改善机体雌激素水平发挥延缓、抑制妇女绝经后期骨质疏松的形成或者治疗由于机体雌激素水平下降而引起的骨质疏松提出了可能,为扩大肉苁蓉的临床药用范围提供了理论依据。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会).

- Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press, 2010. Vol 1: 126.
- 2 Li SZ(李时珍). Compendium of Materia Medica. Beijing: People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 1977. 727.
 - 3 Zeng LQ(曾群力), Zheng YF(郑一凡), Lv ZL(吕志良). The immunobiological activity and its mechanism of action of cistanches polysaccharides. *J Zhejiang Univ, Med Ed* (浙江大学学报, 医学版), 2002, 31: 284-287.
 - 4 Xiong Q, Kadota S, Tani T, *et al.* Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 1580-1585.
 - 5 Muteliefu G(古力努尔·木特列夫), Lei L(雷丽), Tu PF(屠鹏飞), *et al.* Anti-aging effects mechanism of Echinacoside. *Acta Biophys Sin* (生物物理学报), 2004, 20: 183-187.
 - 6 Pan YR(潘玉荣), Min FY(闵凡印). Effect of ethanol extract of the Cistanche to the kidney and adrenal gland in yang deficiency animal model. *J Prac Med* (实用中医药杂志), 2004, 20: 357-358.
 - 7 Chen H, Jing FC, Li CL, *et al.* Echinacoside pre-vents the striatal extracellular levels of monoamine neurotransmitters from diminution in 6-hydroxydo-pamine lesion rats. *J Ethnopharmacol*, 2007, 114: 285-289.
 - 8 Wu Y, Li L, Wen T, *et al.* Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology*, 2007, 232(1/2): 50-56.
 - 9 Moriya A, Tu PF, Karasawa D, *et al.* Pharmacognostical studies of Cistanche herba (II). *Nat Med*, 1995, 49: 394-396.
 - 10 Lei L(雷丽), Song ZH(宋志宏), Tu PF(屠鹏飞). Advances in research of chemical constituents in plants of cistanche hoffing. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2003, 34: 473-476.
 - 11 Lia TM, Huang HC, Su CM, *et al.* *Cistanche deserticola* extract increases bone formation in osteoblasts. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64: 897-907.
 - 12 Li F, Yang Y, Zhu P, *et al.* Echinacoside promotes bone regeneration by increasing OPG/RANKL ratio in MC3T3-E1 cells. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1443-1450.
 - 13 Dong YL(董亚莉), Li JF(李剑锋). Different concentrations of total glycosides of Cistanche induce rat bone marrow mesenchymal stem cells Differentiation into nerve-like cells. *Chin J Tissue Eng Res* (中国组织工程研究), 2012, 16: 103-106.
 - 14 Liang HD, Yu F, Tong ZH, *et al.* Cistanches Herba aqueous extract affecting serum BGP and TRAP and bone marrow Smad1 mRNA, Smad5 mRNA, TGF- β 1 mRNA and TIEG1 mRNA expression levels in osteoporosis disease. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 757-763.
 - 15 Liang HD, Yu F, Tong ZH. Effect of Cistanches Herba aqueous extract on bone loss in ovariectomized rat. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 5060-5069.
 - 16 Yamaguchi K, Shinohara C, Kojima S, *et al.* (2E, 6R)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenoic acid, a novel anti-osteoporotic monoterpene, isolated from Cistanche salsa. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63: 731-735.
 - 17 Zhao PW(赵丕文), Wang DW(王大伟), Niu JC(牛建昭), *et al.* Study the estrogenic activity of Safflower etc 10 Chinese herbal medicines. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32: 436-438.
 - 18 Zhou ZL(周振雷), Hou JF(侯加法). Estrogen regulative effect on Bone metabolism. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, 8: 2714-2715.
 - 19 Fan GW(樊官伟), Wang H(王虹), Gao XM(高秀梅). Clinical value of plant estrogen. *Foreign Med Sci, Pharm* (国外医学植物药分册), 2008, 23: 127-130.
 - 20 Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, *et al.* Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 2000, 141: 3657-3667.
 - 21 Shanle EK, Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24: 6-19.
 - 22 Leclercq G, de Cremoux P, This P, *et al.* Lack of sufficient information on the specificity and selectivity of commercial phytoestrogens preparations for therapeutic purposes. *Maturitas*, 2011, 68: 56-64.
 - 23 Zhang Y, Li PP. Assessment of shikonin for potential estrogenic activity by dual-luciferase reporter based bioluminescent measurements *in vitro*. *Pharmazie*, 2011, 66: 141-143.