

# 芦丁对哺乳大鼠乳腺发育及相关激素水平与受体表达量关系的影响

郭旭东<sup>1</sup> 刁其玉<sup>1\*</sup> 王月影<sup>2</sup> 屠焰<sup>1</sup> 闫贵龙<sup>3</sup> 汪新建<sup>2</sup> 李军涛<sup>2</sup> 邓东晓<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院 饲料研究所/农业部饲料生物技术重点实验室,北京 100081;

2. 河南农业大学 农业部动物生长发育调控重点开放实验,郑州 450002;

3. 河北北方学院 动物科技学院,河北 张家口 075000)

**摘要** 研究芦丁对哺乳母鼠乳腺发育、泌乳相关激素水平及其受体表达量的影响。试验选择 18 只 Wistar 哺乳母鼠,随机分为 3 组,分别为对照组(Lac-Con 组)每日每只灌喂生理盐水(2 mL)1 次;芦丁组(Lac-Rut 组)每日每只灌服芦丁(60 mg/kg, BW)1 次;雌二醇组(Lac-Est 组)每周每只肌注(60  $\mu$ g/kg, BW)1 次;从哺乳第 4 天开始连续给药 2 周,基础日粮相同。检测哺乳母鼠血浆与乳腺组织中雌激素(雌二醇,  $E_2$ )、孕激素(P)、催乳素(PRL)和生长激素(GH)的含量,乳腺组织中雌激素受体(雌激素  $\alpha$  受体,  $ER\alpha$ )、孕激素受体(PR)、催乳素受体(PRLR)和生长激素受体(GHR)的表达量,并进行乳腺组织切片组织形态学观察。试验显示:  $E_2$ 、PRL 和 GH 在血浆与乳腺组织里的含量都表现为 Lac-Est 组 > Lac-Rut 组 > Lac-Con 组 ( $P < 0.05$ ); P 含量组间差异不显著 ( $P > 0.05$ );  $ER$ 、PR、PRLR 和 GHR 在乳腺组织中的表达量均为 Lac-Est 组 > Lac-Rut 组 > Lac-Con 组 ( $P < 0.05$ ); 乳腺腺泡/管腔直径统计显示 Lac-Est 组和 Lac-Rut 组高于 Lac-Con 组 ( $P < 0.05$ ), Lac-Est 组与 Lac-Rut 组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。试验结果表明,芦丁能够提高哺乳母鼠体内  $E_2$  水平,促进 PRL 和 GH 分泌,诱导  $ER$ 、PR、PRLR 和 GHR 的表达,具有弱雌激素样作用功效。

**关键词** 芦丁; 大鼠; 激素; 受体

中图分类号 Q 492.7

文章编号 1007-4333(2011)05-0088-08

文献标志码 A

## Effect of dietary rutin on mammary gland development and the level and receptors of estrogen in lactation rats

GUO Xu-dong<sup>1</sup>, DIAO Qi-yu<sup>1\*</sup>, WANG Yue-ying<sup>2</sup>, TU Yan<sup>1</sup>, YAN Gui-long<sup>3</sup>,  
WANG Xin-jian<sup>2</sup>, LI Jun-tao<sup>2</sup>, DENG Dong-xiao<sup>2</sup>

(1. Feed Research Institute/Key Laboratory of Feed Biotechnology of Ministry of Agriculture,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Key Laboratory of Animal Growth and Development, Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

3. College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract** The objective of this study was to observe effects of a natural plant extract rutin in mammary gland development, endocrine hormone levels and receptor expression were measured for lactation rats. Eighteen Wistar rats were randomly assigned to three treatments; control (Lac-Con) group was treated with gastric infusion of 2 mL normal saline per mouse per day; Rutin (Lac-Rut) treatment group was treated with gastric infusion of rutin 60 mg/kg BW per day; and Estradiol (Lac-Est) group was treated with intramuscular injection of estradiol 60  $\mu$ g/kg BW weekly started from the fourth lactation day and continue for two weeks with the same basal diet as control group. The level of estrogen ( $E_2$ ), progesterone (P), prolactin (PRL) and growth hormone (GH) in plasma and gland tissues were detected; and the expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), prolactin receptor (PRLR) and growth hormone

收稿日期: 2011-03-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD12B04-04)

第一作者: 郭旭东, 博士研究生, E-mail: gxd.168@163.com

通讯作者: 刁其玉, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物生理与营养研究, E-mail: diaoqiuyu@mail.caas.net.cn

receptor (GHR) in gland tissues were measured. Histomorphology of development about mammary gland were observed. (Results) The results showed that, the relationship among the level of  $E_2$ , PRL and GH in plasma and gland tissues was Lac-Est>Lac-Rut>Lac-Con ( $P<0.05$ ), the level of P in plasma and gland tissues was not significant among groups ( $P>0.05$ ). The expression of ER, PR, PRLR and GHR in gland tissues was Lac-Est>Lac-Rut>Lac-Con ( $P<0.05$ ). The diameter of mammary gland alveolus showed that Lac-Est and Lac-Rut were higher than Lac-Con ( $P<0.05$ ), there was not significant between Lac-Est and Lac-Rut ( $P>0.05$ ). The test indicated that rutin could improve the level of  $E_2$  in lactation rats, increase PRL and GH release, up-regulated the expression level of ER, PR, PRLR and GHR. And finally rutin had weakly estrogen-like effect.

**Key words** rutin; rat; hormone; receptor

动物泌乳功能的发挥依赖于泌乳器官乳腺,而乳腺的发育与泌乳功能受许多激素与生长因子的调控,其中非常重要的一个激素就是雌激素( $E_2$ )<sup>[1]</sup>,即使是在分娩之后,泌乳已经启动后,乳腺的发育要延续到哺乳早期<sup>[2]</sup>。现有试验证实  $E_2$  促进乳腺的发育和泌乳的效果非常显著<sup>[3]</sup>。

芦丁(Rutin),又名芸香苷,化学名称为 5,7,3',4'-四羟基-3-芸香糖黄酮,分子式为  $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ ,相对分子质量为 610.5<sup>[4]</sup>,结构如图 1 所示。芦丁广泛存在于自然界中,是一种从植物中提取的黄酮类化合物,具有多方面的生物活性,价廉易得<sup>[5]</sup>,有广阔的开发前景<sup>[6]</sup>,既可以作为治疗药物,又可以作为保健品<sup>[7]</sup>。芦丁在结构上由槲皮素 C3

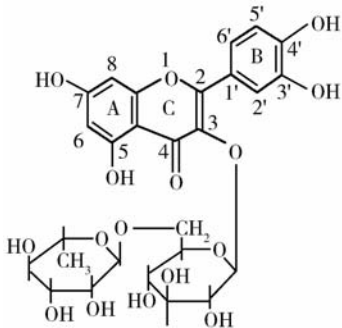


图 1 芦丁的结构

Fig. 1 Structure of rutin

位上的羟基和芸香糖结合而形成的双糖苷,该结构与内源性雌激素 17- $\beta$ -雌二醇( $E_2$ )具有很相似的平面双苯环结构,通常认为,这种结构,可以通过结合于  $E_2$  所占据的 ERs 的相同位点而发挥弱雌激素样作用<sup>[8]</sup>。因此开展芦丁对泌乳神经内分泌的影响,是否具有类植物雌激素作用的研究,具有重要的意义。现有的研究表明芦丁具有维生素 P 样作用<sup>[7]</sup>、抗自由基作用、抗脂质过氧化作用、血管舒张作用、抗病毒作用、拮抗血小板活化因子作用、抗急性胰腺炎作用、对胃溃疡的保护作用等等<sup>[6]</sup>。与芦丁结构

相似的大豆黄酮、葛根、黄芪、芒丙花素和淫羊藿等都已证明具有植物雌激素样作用<sup>[9-10]</sup>,能够对动物机体的内分泌产生影响。但是,有关芦丁的类雌激素样作用功效的研究还比较少,其特殊的结构,是否能在机体内起到一定的雌激素样作用功效亟需探讨。

本试验以 Wistar 哺乳母鼠为对象,研究芦丁对哺乳母鼠血浆与乳腺组织中  $E_2$ 、P、PRL 和 GH 含量,乳腺组织中  $ER_{\alpha}$ 、PR、PRLR 和 GHR 表达量的影响,乳腺组织发育情况等,探讨芦丁的类雌激素样作用功效,旨在为利用芦丁促进乳腺发育和泌乳提供数据参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间及地点

试验于 2009-12—2010-02,在河南农业大学农业部动物生长发育调控重点开放实验室进行。

### 1.2 试验动物

Wistar 大鼠,购自河南省实验动物中心,其中雌鼠 30 只,体重 200~250 g;雄鼠 15 只,体重 250~300 g,实验动物许可证号 SCXK(豫)2005-0001。在 12 h 光照和 12 h 黑暗的条件下进行喂养,环境温度为 15~20  $^{\circ}C$ ,相对湿度 50%~70%,自由采食和饮水。大鼠饲料配方见表 1。

### 1.3 药品

芦丁,从槐花米中提取,购自山西云鹏制药有限公司,批号 B090102。

雌二醇,苯甲酸雌二醇注射液,购自上海通用药业有限公司,批号 08090902。

### 1.4 试验设计

30 只雌性和 15 只雄性 Wistar 大鼠按照雌雄 2:1 的比例进行配种,分娩后选择分娩时间接近的 18 窝(即 18 只母鼠)进行试验,分为对照(Lac-Con)组、芦丁(Lac-Rut)组和雌二醇(Lac-Est)组,每组 6 窝,每窝 1 只哺乳母鼠配 6 只仔鼠,样品采自哺乳母

表1 基础日粮的组成及营养成分质量分数  
(风干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of  
the basal diet(air dry basis)

日粮组成	$\omega/\%$	营养成分	$\omega/\%$
面粉	19.0	水份	9.5
玉米粉	23.0	粗蛋白	22.5
高粱粉	6.0	粗脂肪	4.2
麦麸	10.0	粗纤维	4.1
大豆粕	15.0	粗灰分	7.2
植物油	2.0	钙	1.6
鱼肝油	1.0	磷	0.8
鱼粉	10.0		
骨粉	1.0		
啤酒酵母	1.0		
食盐	1.0		
淀粉	6.6		
甘氨酸	3.4		
蛋氨酸	0.5		
碳酸钙	0.5		
合计	100.0		

鼠,以分娩当日为第0天,为减少分娩对大鼠造成的应激和体质下降的因素对试验结果的影响<sup>[11]</sup>,试验从第4天开始,试验期2周。

对照组(Lac-Con组),每日每头哺乳母鼠灌服2 mL生理盐水1次;

芦丁组(Lac-Rut组),每日每头哺乳母鼠灌服芦丁1次(60 mg/kg,BW);

雌二醇组(Lac-Est组),每周每头哺乳母鼠肌注雌二醇1次(60  $\mu$ g/kg,BW)。

## 1.5 样品采集与处理

### 1.5.1 血浆样品的采集与处理

试验结束时,哺乳母鼠按照3.5 mL/kg(BW)的剂量腹腔注射10 mg/mL的水合氯醛麻醉,然后心脏取血5 mL左右,于加有抗凝剂的真空采血管中,离心(4 000 r/min,15 min)取血浆,分别装于2支有盖离心管中后于-20 °C冰箱中保存,待测。

### 1.5.2 乳腺组织的采集与处理

哺乳母鼠取血后处死,迅速取腹部近尾端3对

乳腺中右侧的乳腺组织于液氮中速冻,然后置于-80 °C冰箱保存,待测。取蹊部乳腺组织用10% (体积分数)中性甲醛固定用于组织切片制作。

### 1.5.3 乳腺组织匀浆液的制备

取大小适宜的已冷冻的哺乳母鼠乳腺组织,在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸擦干,称重,放入5~10 mL烧杯里面,用移液管量取预冷的匀浆介质(生理盐水),体积总量是组织块重量的9倍,用组织捣碎机上下研磨制成10 mg/mL的组织匀浆液,将制备好的10%的匀浆液4 °C、2 000 r/min离心15 min,取上清液于-20 °C的冰箱中保存,待测。

## 1.6 测定指标及方法

### 1.6.1 组织匀浆液蛋白含量的测定

用美国Thermo公司微量分光光度计测定乳腺组织匀浆液的蛋白含量,用于计算组织蛋白中激素的含量。

### 1.6.2 激素含量

哺乳母鼠血浆与乳腺组织中 $E_2$ 、P、PRL和GH的测定,采用放射性免疫方法检测。试剂盒均为北京科美东雅生物技术有限公司生产,按试剂盒说明书要求操作。用 $\gamma$ -计数器测定沉淀cpm数,通过标准曲线换算血浆和乳腺组织匀浆液中激素的含量,根据乳腺匀浆液中蛋白质浓度及放射免疫所测乳腺组织匀浆液中激素含量,将样品中激素的量换算成单位组织蛋白质中各激素的含量。

### 1.6.3 激素受体的检测

1)PCR引物的设计与合成。根据GenBank中公布的大鼠雌激素 $\alpha$ 受体(ER $\alpha$ )、PR、GHR、PRL和 $\beta$ -actin(内参考)的cDNA序列,利用Primer5.0引物设计软件设计PCR引物。引物序列见表2,由TaKaRa公司合成。

2)大鼠乳腺组织总RNA的提取。采样TaKaRa公司“Total RNA”提取试剂盒,按操试剂盒作步骤提取哺乳母鼠乳腺组织总RNA。

3)RNA质量鉴定。将RNA样品稀释后,用微量分光光度计测定OD<sub>260</sub>和OD<sub>280</sub>,检测RNA的纯度及含量。

4)RT-PCR反应。

①RT反应。总RNA 2  $\mu$ L;5 $\times$  Buffer 4  $\mu$ L; dNTP(10 mmol/L) 4  $\mu$ L; RNase Inhibitor(40 U/

表2 PCR反应的引物

Table 2 Primers used in PCR amplification reactions

基因名称	引物	在基因的位置	目的片段大小/bp
ER $\alpha$	F:5'-GCGGCATACGGAAAGACC-3'	952-969	430
	R:5'-ATGGAGCGCCAGACGAGA-3'	1364-1381	
PR	F:5'-AACTGGTTCCGCCACTCA-3'	2015-2032	368
	R:5'-CCACATGGTAAGGCACAGC-3'	2358-2376	
GHR	F:5'-GTTGAATAGTGCAACTGATC-3'	622-641	263
	R:5'-CTCACACGCACTTCGTGCTC-3'	863-882	
PRLR	F:5'-CTTACATCGTTGAGCCAGAG-3'	546-565	418
	R:5'-TAGCCCTTCAAAGCCACT-3'	946-963	
$\beta$ -actin	F:5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	950-970	227
	R:5'-GGACTCATCGTACTCTGCT-3'	1157-1176	

$\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ; Olig dT18 (14 nmol), 1  $\mu\text{L}$ ; M-MLV (promega) 1  $\mu\text{L}$ ; DEPC-H<sub>2</sub>O 7.5  $\mu\text{L}$ 。混合后, 室温静置 10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$ , 60 min, 70  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min, 即得 cDNA 模板, 置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

② PCR 反应。采用 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系。10 $\times$  PCR Buffer (无 Mg<sup>2+</sup>), 5  $\mu\text{L}$ ; dNTP Mix (Mixture (10 mmol/L) TaKaRa) 6  $\mu\text{L}$ ; (25 mmol/L) MgCl<sub>2</sub> 6  $\mu\text{L}$ ; Premix Ex Taq 0.5  $\mu\text{L}$ ; 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ; cDNA 模板 4  $\mu\text{L}$ ; ddH<sub>2</sub>O 26.5  $\mu\text{L}$ 。

$\beta$ -actin 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s; 53  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s; 共 25 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

ER $\alpha$ 、PR、GHR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s; 53  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s; 共 28 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

PRLR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s; 52  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s; 共 28 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

5) RT-PCR 扩增产物的检测。分别取 PCR 产物各 5  $\mu\text{L}$ , 用 1.5 mg/mL 琼脂糖凝胶, 100 V、电泳 30 min。凝胶成像系统照像, 并检测 PCR 产物积分光密度 (IOD) 值, 用各基因与  $\beta$ -actin 的比值相对定量转录水平。

#### 1.6.4 乳腺组织切片制作

将 1.6.2 取自哺乳母鼠蹊部放于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10% 中性 (pH 7.4) 甲醛磷酸缓冲液固定液中固定保持的乳腺组织, 按照人体及动物组织 H. E 染色石蜡切片方

法制作乳腺组织切片。在光镜下观察、记录乳腺组织学改变并测量每张切片中 3 个最大腺泡腔直径数据<sup>[12]</sup>。

#### 1.7 主要仪器

SN-659 型智能放免  $\gamma$  测量仪 (上海应用物理所日环光电仪器有限公司); 高速组织匀浆机 (德国 IKA); 微量分光光度计 (美国 Thermo); Sigma 3k30 高速冷冻离心机 (美国 Sigma); -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱; -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱; 电子天平等。

#### 1.8 数据统计分析

试验数据采用 SAS 8.2 统计软件 ANOVA 进程进行分析, 差异显著则采用 DUNCAN 法进行多重比较, 显著水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 哺乳母鼠血浆和乳腺组织中 E<sub>2</sub>、P、PRL 和 GH 的水平

哺乳母鼠血浆与乳腺组织中, E<sub>2</sub>、P、PRL 和 GH 激素水平见表 3。由表 3 可见, E<sub>2</sub> 在血浆里的含量 Lac-Est 组高于 Lac-Rut 组高于 Lac-Con 组 ( $P < 0.05$ ), 在乳腺组织中表现同一规律。P 含量血浆与乳腺组织都为 Lac-Est 组大于 Lac-Rut 组大于 Lac-Con 组 ( $P > 0.05$ )。血浆中 PRL 水平 Lac-Con 组小于 Lac-Rut 组小于 Lac-Est 组 ( $P < 0.05$ ), 乳腺组织中趋势一样。GH 在血浆与乳腺组织里的含量也表现为 Lac-Con 组低于 Lac-Rut 组低于 Lac-Est 组 ( $P < 0.05$ )。

表3 母鼠血浆与乳腺组织中 E<sub>2</sub>、P、PRL 和 GH 的水平Table 3 Levels of E<sub>2</sub>, P, PRL and GH in plasma and mammary gland tissues (n=6)

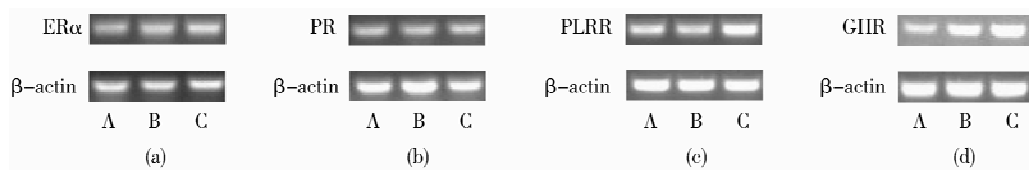
指标		Lac-Con 组	Lac-Rut 组	Lac-Est 组
雌激素(E <sub>2</sub> )	血浆/(pg/mL)	10.06±1.31 c	14.87±0.54 b	18.81±1.45 a
	乳腺组织/(pg/mg)	1.68±0.67 c	4.80±0.84 b	7.79±1.21 a
孕激素(P)	血浆/(ng/mL)	0.54±0.22	0.64±0.18	0.84±0.14
	乳腺组织/(ng/mg)	1.94±0.57	2.42±0.40	2.68±0.36
催乳素(PRL)	血浆/(ng/mL)	7.27±0.73 c	9.98±0.28 b	13.03±0.88 a
	乳腺组织/(ng/mg)	4.07±0.23 c	6.18±0.35 b	8.96±0.65 a
生长激素(GH)	血浆/(ng/mL)	2.35±0.30 c	3.75±0.50 b	5.11±0.30 a
	乳腺组织/(ng/mg)	10.92±1.14 c	14.73±1.07 b	18.41±1.34 a

注:数据为平均值±标准误;同一行数据不同字母者表示差异显著(P<0.05),下表同。

## 2.2 哺乳母鼠乳腺组织中 ER<sub>α</sub>、PR、PRLR 和 GHR mRNA 的转录水平分析

从哺乳母鼠乳腺组织中提取的总 RNA 经 RT-PCR 后,核酸电泳分析在约 430、368、418 和 263 bp 处有预期大小的特异性扩增条带(图 2),大鼠乳腺

组织中 ER<sub>α</sub> mRNA、PR mRNA、PRLR mRNA 和 GH mRNA 转录水平的相对定量结果(各基因与 β-actin 的比值)见表 4,由表可知,ER<sub>α</sub> mRNA、PR mRNA、PRLR mRNA 和 GH mRNA 在大鼠乳腺组织中的转录水平都表现为 Lac-Est 组高于 Lac-



A 为 Lac-Con;B 为 Lac-Rut;C 为 Lac-Est。

图2 乳腺组织中 ER<sub>α</sub> mRNA(a)、PR mRNA(b)、PRLR mRNA(c)和 GHR mRNA(d)的 RT-PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis analysis of ER<sub>α</sub> (a), PR(b), PRLR(c) and GHR(d) cDNA RT-PCR product

表4 哺乳母鼠乳腺组织激素受体电泳条带定量分析结果

Table 4 Electrophoresis analysis of ER<sub>α</sub>/β-actin, PR/β-actin, PRLR/β-actin, GHR/β-actin of mammary gland in lactation rats

处理	ER <sub>α</sub> /β-actin	PR/β-actin	PRLR/β-actin	GHR/β-actin
Lac-Con 组	0.54±0.01 c	0.62±0.02 c	0.73±0.03 c	0.73±0.03 c
Lac-Rut 组	0.66±0.02 b	0.76±0.02 b	0.85±0.02 b	0.82±0.02 b
Lac-Est 组	0.78±0.04 a	0.86±0.01 a	0.94±0.01 a	0.95±0.01 a

Con 组高于 Lac-Rut 组(P<0.05)。

## 2.3 大鼠乳腺组织形态学观察

大鼠乳腺由结缔组织、腺泡和导管组成。图 3 反映了试验组哺乳母鼠乳腺组织形态学观察结果,由图可见,哺乳期乳腺发育达到顶峰,腺泡间结缔组

织很少,主要都是分化完全的成熟腺泡,腺体的大部分都是充盈的腺泡腔,腺泡内蓄积不少乳蛋白颗粒、脂肪滴等分泌物。乳腺处于全面活跃期,结缔组织和脂肪组织大量退化,被新发育的腺泡代替,腺泡呈圆形或椭圆形,大小很不一致。

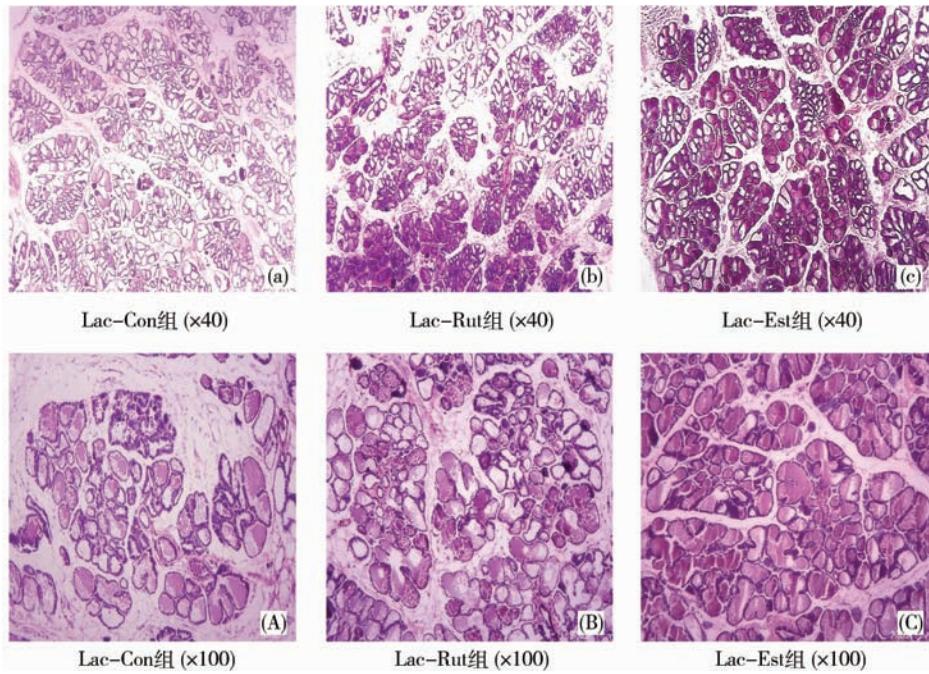


图 3 哺乳母鼠乳腺组织切片(H, E 染色)

Fig. 3 Mammary gland sections of lactation rats (H, E)

从切片图可见, Lac-Est 组和 Lac-Rut 组, 乳腺腺体数量多, 腺体呈小叶分布, 仅有少量结缔组织包绕在腺泡周围和小叶间, 腺泡呈扩张状, 腔内分泌物较多, 腺泡上皮细胞为低立方状, 单层排列, 胞浆空亮, 部分为空泡状, 核圆形, 位于细胞中部。Lac-Con 组腺体间成熟的脂肪组织。

哺乳母鼠乳腺组织切片中, 选取 3 个最大腺泡测量管腔直径, 数据统计结果见表 4, 由表可见, 腺泡腔直径 Lac-Est 组和 Lac-Rut 组大于 Lac-Con 组 ( $P < 0.05$ )。

表 4 乳腺腺泡管腔直径

Table 4 Diameter of mammary acinar  $\mu\text{m}$

指标	直径
Lac-Con 组	408.93 ± 5.61 b
Lac-Rut 组	969.94 ± 41.52 a
Lac-Est 组	1046.47 ± 25.99 a

### 3 讨论

#### 3.1 芦丁对哺乳母鼠泌乳相关激素与受体的影响

乳腺的发育是泌乳生理过程的首要环节, 主要受下丘脑-垂体神经内分泌系统的调控<sup>[1,13]</sup>。乳腺作为性激素作用的靶器官, 其发育的最主要动力来

自于内分泌激素<sup>[14]</sup>, 参与乳腺发育调控的激素主要有: E、P、GH、PRL 和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 等等, 其中最重要的是 E<sup>[1]</sup>。E 是乳腺细胞进行有丝分裂的有效分裂源<sup>[15]</sup>, 能够刺激乳腺导管生长, 尤其是性成熟阶段, 乳腺导管的生成有赖于雌激素的刺激<sup>[1]</sup>。现有的研究表明, 在动物分娩之后, 泌乳已经启动, 而乳腺的发育一直要延续到哺乳的早期, 因此在哺乳期内, 母体的雌激素水平与动物的乳腺的发育状况和泌乳能力密切相关<sup>[2,5]</sup>, 已有试验证实 E 促进乳腺的发育和泌乳的效果都是显著的<sup>[3,7]</sup>。

本试验研究结果显示, 哺乳母鼠血浆与乳腺组织中  $E_2$  含量都表现为 Lac-Con 组低于 Lac-Rut 组低于 Lac-Est 组 ( $P < 0.05$ ), 表明芦丁能够提高哺乳母鼠体内  $E_2$  的水平, 这与同芦丁结构类似的亚麻籽木脂<sup>[13]</sup>、红车轴草异黄酮<sup>[16]</sup>、葛根素<sup>[17]</sup>、虎杖提取物<sup>[18]</sup> 和大豆异黄酮<sup>[19]</sup> 能够显著提高大鼠  $E_2$  水平的研究结果相似。

现在的研究认为, 雌激素在乳腺中的作用部分由雌激素受体介导,  $ER_{\alpha}$  可能参与了乳腺细胞的发育和凋亡<sup>[1]</sup>。本试验结果显示, 乳腺组织  $ER_{\alpha}$  表达量 Lac-Est 组高于 Lac-Rut 组高于 Lac-Con 组 ( $P < 0.05$ ), 表明芦丁可以上调大鼠乳腺组织中  $ER_{\alpha}$  的

表达,这与大豆黄酮能够提高处女大鼠、妊娠大鼠乳腺 ER 的数目的研究结果一致<sup>[9]</sup>。ER<sub>α</sub> 表达量的提高对于芦丁促进乳腺发育具有重要的积极意义。

雌激素受体(ER)属于甾体激素受体大家族的一种核受体,位于胞浆内,介导 E 实现其功能<sup>[20]</sup>。当脂溶性的雌激素(E)进入细胞内后与胞内 ER 的激素结合区结合,引起 ER 发生空间构象改变形成二聚体,并转移进细胞核内,与靶基因调节区的雌激素受体反应元件(ERE)结合,启动靶基因转录<sup>[21]</sup>。植物雌激素由于与天然的雌激素结果相似,因而可以和 ER 结合,表现雌激素样作用。

现在已知,植物雌激素的双环结构及每个芳香环上至少有一个羟基对雌激素活性至关重要,虽然 A 环和 B 环的中间结构有较大差别,但母核上 4' 和 7 位羟基对维持雌激素的活性不可缺少,5 位羟基可增强该活性,A 环上的羟基位置有一定的灵活性,羟基处于 5、6、7 位都有较强的雌激素活性,B 环上 4'-羟基直接与受体结合,具有较高的结构特异性,它直接影响与受体结合的亲和力大小<sup>[22]</sup>。芦丁(结构见图 1)及其苷元槲皮素的结构符合植物雌激素的结构特点。研究表明,芦丁及其代谢产物苷元槲皮素在肠道,经位于细胞顶膜的多抗药性相关蛋白 2(MRP2)的载体作用,通过肠上皮细胞进入动物机体内<sup>[23]</sup>。进入机体内的芦丁及其苷元,由于其结构的特点,能够与雌激素受体结合,进而产生类雌激素样作用,促进乳腺发育和泌乳等,其作用机制可能同前面讨论有关。

本试验显示哺乳母鼠血浆与乳腺组织中,P 的含量都表现为 Lac-Est 组高于 Lac-Rut 组高于 Lac-Con 组( $P>0.05$ ),表明芦丁对哺乳期大鼠的 P 水平影响不显著。但芦丁在哺乳母鼠乳腺组织中 PR 的表达水平 Lac-Est 组高于 Lac-Rut 组高于 Lac-Con 组( $P<0.05$ ),这可能是由于 E<sub>2</sub> 水平上升所致的缘故。已有的研究结果证实 E 能够显著诱导在体或离体乳腺细胞的 PR 数目增加<sup>[1]</sup>。同时许多研究认为,P 对乳腺腺泡发育的促进功能是通过其与乳腺 PR 的特异性结合来实现的<sup>[24]</sup>。

在本试验中,经检查哺乳母鼠血浆与乳腺组织中 PRL 的含量都呈现 Lac-Con 组低于 Lac-Rut 组低于 Lac-Est 组( $P<0.05$ )的同样规律,乳腺组织中 PRLR 表达量检测结果也显示 Lac-Con 组低于 Lac-Rut 组低于 Lac-Est 组( $P<0.05$ ),表明补充芦丁后能够促进 PRL 的分泌,上调乳腺 PRLR 的表达。

有研究显示,植物雌激素大豆黄酮能够显著提高大鼠外周血中 GH、PRL 浓度,能够显著提高母猪血清中 GH、PRL 水平<sup>[25]</sup>,能够显著提高奶牛血清中 GH 和 PRL 含量<sup>[26]</sup>,葛根、黄芪能够显著提高大鼠外周血 GH、PRL 水平的<sup>[9-10]</sup>。研究还证实,E 能够促进 PRLR 基因的转录<sup>[27]</sup>。本试验结果与这些研究结果类似。PRL 是垂体前叶分泌的一种多肽类激素,位于靶细胞的细胞膜上,当 PRL 与 PRLR 结合后,激活细胞内酪氨酸激酶(JAK),JAK 的底物是信号转导与转录激活因子(STAT),STAT 被激活后到达细胞核内与特定的基因结合,调节基因的表达,从而发挥生物学效应<sup>[27]</sup>。PRL 以及 PRLR 的上升有助于促进泌乳。

同时,本试验研究中发现,芦丁能够调节 GH 在血浆与乳腺组织中的水平,Lac-Est 组高于 Lac-Rut 组高于 Lac-Con 组( $P<0.05$ ),同时发现芦丁能够上调 GHR 在乳腺组织中的表达量,Lac-Est 组高于 Lac-Rut 组高于 Lac-Con 组( $P<0.05$ )。这与植物雌激素大豆黄酮能够显著提高山羊血清中 GH 和 E<sub>2</sub> 水平<sup>[28]</sup>的结果一致。GH 是一种生物大分子,不能够直接透过细胞膜,必须经过与靶细胞表面的 GHR 结合,由 GHR 介导通过不同的途径将信号传到细胞内,进而产生一系列生理效应,发挥 GH 的生理作用。由于添加芦丁引起机体 GH 和 GHR 是提高与上调,对于泌乳意义重大。

以上本试验的研究结果说明,芦丁能够提高大鼠机体 E<sub>2</sub> 水平,增加内源性 GH 和 PRL 水平,上调 ER<sub>α</sub>、PR、PRLR 和 GHR 在乳腺组织中的表达,促进乳腺大发育与泌乳,其作用机制可能同以上讨论的作用有关。

本试验数据结果还显示,在哺乳母鼠血浆与乳腺组织中 E<sub>2</sub>、PRL 和 GH 水平以及乳腺组织里 ER<sub>α</sub>、PR、PRLR 和 GHR 的表达量等,Lac-Rut 组都低于 Lac-Est 组( $P<0.05$ ),表明芦丁的作用效果弱于直接增加雌二醇的刺激效果,提示芦丁的雌激素样作用缓和,即具有弱雌激素样作用功效。

### 3.2 芦丁对哺乳母鼠乳腺组织形态的影响

乳腺由实质和间质组成。实质具有合成、分泌和排乳的功能,包括腺泡和乳管两部分,其基本结构单位是乳腺叶,乳腺叶的基本单位是乳腺小叶,每个小叶都含有大量的腺泡。间质主要包括脂肪垫、脂肪组织、纤维结缔组织、血管、淋巴管和神经等组织,起保护和支持腺体组织的作用。乳腺发育始于胚胎



期<sup>[29]</sup>,从出生至青春期乳腺发育很平稳,称为等速生长。青春期后,乳腺发育速度快于机体的生长速度,进入异速生长时期,但乳腺的发育一直延续到哺乳的早期<sup>[2]</sup>,到此时,乳腺才成为分化与发育完全的成体器官。从本试验研究中乳腺组织切片可见,哺乳期大鼠乳腺组织内布满大量的腺泡,腺泡的密度 Lac-Est 组大于 Lac-Rut 组大于 Lac-Con 组,乳腺腺泡管腔直径数据统计显示 Lac-Est 组和 Lac-Rut 组大于 Lac-Con 组( $P < 0.05$ ),Lac-Est 组和 Lac-Rut 组间差异不显著。表明 Lac-Est 组和 Lac-Rut 组的乳腺发育好于 Lac-Con 组,提示在哺乳期补充芦丁和雌二醇,对乳腺发育最后高峰期有促进作用,芦丁效果接近雌二醇组。

## 4 结 论

芦丁能够提高哺乳母鼠体内雌激素水平,促进垂体生长激素、催乳素的合成与分泌,诱导乳腺组织中雌激素受体、孕激素受体、催乳素受体、生长激素受体的表达,其作用效果弱于外源性雌激素,具有弱雌激素样作用功效。

## 参 考 文 献

[1] 王月影,王艳玲,李和平,等. 动物乳腺发育的调控[J]. 畜牧与兽医,2002,34(7):36-37

[2] 郝振荣,朱志宁,郭玉琴,等. 大豆黄酮对产奶量和牛奶品质的影响[J]. 北京农学院学报,2009,24(4):26-27

[3] 冯仰廉. 雌激素对于乳腺发育和泌乳的作用[J]. 中国畜牧兽医,1962(5):13-14

[4] 何铭清. 中草药有效成分理化与药理特性[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1979:2031

[5] 龙全江,杨韬. 芦丁的研究概况及展望[J]. 中国中医药信息杂志,2002,9(4):39-42

[6] 臧志和,曹丽萍,钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报,2007,26(7):758-760

[7] 孟祥颖,郭良,李玉新,等. 芦丁的来源、用途及提取纯化方法[J]. 长春中医学院学报,2003,19(2):61-64

[8] Tham D M, Gardner C D, Haskel W L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence[J]. J Clin Endocrinol Metab,1998(83):2223-2235

[9] 张荣庆,韩正康,陈杰,等. 大豆黄酮促进妊娠大鼠乳腺发育和泌乳的实验研究[J]. 动物学报,1995,41(4):414-419

[10] 梁英,韩鲁佳. 黄芩中黄酮类化合物药理学作用研究进展[J]. 中国农业大学学报,2003,8(6):9-14

[11] 巴音吉日嘎拉,巴雅尔,石荷叶. 中草药葛根素对小白鼠乳腺组织形态学结果的影响[J]. 畜牧与饲料科学,2007(1):30-31

[12] 霍继明,孙国志,赵伟,等. 乳腺康口服液的药效研究[J]. 中国实验动物学杂志,2002,12(5):297-299

[13] 姜晶晶,王国杰,韩正康. 亚麻籽木脂素对青春期雌性大鼠乳腺发育及相关内分泌的影响[J]. 畜牧与兽医,2009,41(1):79-82

[14] 巴音吉日嘎拉,松元光春,西中川骏,等. 穿山甲、王不留行对卵巢摘除小白鼠乳腺实质发育的影响研究[J]. 中兽医医药杂志,2007(1):7-9

[15] Russo J, Daniel M, Hu Y F, et al. Breast differentiation and its implication in cancer prevention[J]. Clin Cancer Res,2005,11:931-936

[16] 曾伶,曾劲,薛存宽,等. 红车轴草异黄酮雌激素样作用的研究[J]. 医药导报,2007,26(11):1258-1260

[17] 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

[18] 宋静荣. 虎杖提取物对去势大鼠雌激素的影响[J]. 中国妇幼保健,2008,23(28):4029-4031

[19] 徐霞,贡沁燕,鲁映青,等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨密度和雌激素活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2002,21(6):321-325

[20] 赵晓民,徐小明. 雌激素受体及其作用机制[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(12):154-158

[21] 谈智,王庭魁. 雌激素作用分子机制研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2003,19(10):1422-1426

[22] Lamartiniere C A, Holland M. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer[J]. Proc Soc Exp Biol Med,1995,208(1):44-50

[23] 王海玲,刘宁,刘志强,等. 利用 Caco-2 细胞模型模拟拟脂素和芦丁在小肠的吸收[J]. 吉林大学学报:医学版,2007,33(1):33-36

[24] Conneely O M, Jericevic B M, Lydon J P. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia,2003,8:205-214

[25] 张荣庆,韩正康,陈杰,等. 大豆黄酮对母猪免疫功能和血清及初乳中 GH、PRL、SS 水平的影响[J]. 动物学报,1995,41(2):201-206

[26] 杨建英,王艳玲,郭永国,等. 大豆黄酮对奶牛免疫功能和血清及乳中激素水平的影响[J]. 中国畜牧杂志,2006,42(7):15-17

[27] Leondires M P, Hu Z Z, Dong J, et al. Estadiol stimulates expression of tow human prolactin receptor isoforms with alternative exons-1 in T47D breast cancer cell[J]. J Steroid Biochem Mol Biol,2002,82(2/3):263-268

[28] 聂芙蓉,王老七,王艳玲. 大豆黄酮对山羊血液中几种内源性激素水平的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(21):6442,6530

[29] Fernandez V, Mukherjee R, Mulac-Jericevic A, et al. Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: Insights from the mouse[J]. Sem Reproduct Med,2005,23(1):22-37