

备等也会不断地涌现,阻碍中药缓控释制剂发展的这些问题最终会得以解决,在广大医学、药学等多学科研究工作者们的共同努力下,相信中药缓控释制剂的明天会更加美好!

#### 参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 二部. 2005.
- [2] 阳长明. 浅谈中药缓控释制剂的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(4): 282-283.
- [3] 陈立兵, 葛卫红, 张继稳. 我国中药缓控释制剂的研究状态分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9(5): 83-90.
- [4] 任天颖, 郑大恒. 浅谈中药现代化的发展现状与对策[J]. 绍兴文理学院学报, 2007, 27(10): 63-67.
- [5] 郭立玮. 中药药代动力学方法与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [6] 吴伟康, 奉建芳. 中药缓释制剂研究之管见[J]. 中成药, 2001, 23(6): 459.
- [7] 李俊松, 冯 怡, 徐德生. 中药缓、控释制剂研究现状及思考[J]. 中成药, 2007, 29(4): 563-567.
- [8] 姜思通, 殷秀贞. 我院缓控释片剂 3 年用药分析[J]. 中国新

- 药杂志, 1999, 8(3): 213-214.
- [9] 贺玉琢. 日本汉方药“血清药理学”、“血清药化学”的研究概况[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1998, 20(5): 3-7.
- [10] 袁 莹, 冯 怡, 徐德生. 大川芎方效应组分物质基础研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2008.
- [11] 王喜军. 中药及中药复方血清药物化学研究[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 4(2): 1-5.
- [12] 邱明丰, 彭 腾, 罗海燕, 等. 以血清药理学方法研究复方丹参缓释片的缓释作用[J]. 中草药, 2008, 39(3): 411-413.
- [13] 冯 怡, 徐德生, 张 宁, 等. 中药提取物表面物理改性技术探索[J]. 中成药, 2007, 29(5): 744-745.
- [14] 钱一鑫, 唐景玲, 孙 进, 等. 口服自乳化释药系统及其在中药制剂中的应用[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1441-1446.
- [15] 杨 明, 冯 怡, 徐德生, 等. 现代中药复方释药系统的构建[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2006, 8(5): 10-15.
- [16] 张继稳, 陈立兵, 顾景凯, 等. 多组分中药化合物组释放/溶出动力学理论研究[J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 49-52.
- [17] 陈立兵, 张继稳, 顾景凯, 等. 中药制剂及给药系统的物质组释放/溶出动力学原理[J]. 中草药, 2008, 39(5): 641-644.

## 中药植物雌激素受体调节剂筛选研究中的问题与对策

王大伟, 牛建昭, 王继峰\*, 孙丽萍\*

(北京中医药大学基础医学院 细胞生物化学实验室, 北京 100029)

**摘 要:** 中药植物雌激素是近年来研究的一个热点, 但目前的研究中还存在着很多的问题, 如中药含有植物雌激素成分的判断标准值得商榷、具体作用的受体需明确、药物血清实验方法尚需改进、植物雌激素具体作用机制有待阐明等。针对这些问题, 可以从以下研究方向展开植物雌激素筛选的研究, 从结构上寻找中药的活性成分、能影响雌激素受体表达、揭示雌激素受体之间的关系, 以及明确植物雌激素的作用靶点。

**关键词:** 植物雌激素; 中药; 雌激素受体

**中图分类号:** R285. 51

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2009)05-0825-03

## Problems and countermeasure of screening studies on estrogen receptor modulators in Chinese materia medica

WANG Da-wei, NIU Jian-zhao, WANG Ji-feng, SUN Li-ping

(Laboratory of Cell Biochemistry, College of Basic Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Key words:** phytoestrogen; Chinese materia medica (CMM); estrogen receptor

雌激素(estrin)是女性关键性的调节激素, 女性进入绝经期后, 体内雌激素水平显著下降, 出现与之相关的绝经期综合征, 以及心血管疾病如冠心病、动脉粥样硬化和骨质疏松等, 临床上一般采用人工合成的雌激素替代疗法缓解妇女绝经期综合征症状。然而, 近年来的研究发现, 人工合成的雌激素具有一系列严重的副作用, 特别是致癌作用。

植物雌激素是近年来的一个研究热点, 起初研究者注意到亚洲人群骨质疏松症、心血管病、更年期综合征及某些癌症发病率较低, 与其摄取豆类食物较多有密切关系。自 20

世纪 90 年代以来, 植物雌激素研究急剧增加<sup>[1]</sup>。此外, 植物雌激素还具有良好的心血管系统保护作用<sup>[2]</sup>、抗骨质疏松作用<sup>[3]</sup>、抗辐射作用<sup>[4]</sup>等。

### 1 中药与植物雌激素

植物雌激素是一类非甾族的天然存在于植物中的活性物质, 可以与哺乳类动物的雌激素受体相结合并将其激活的一类化合物。其结构与内源性雌激素相似, 能结合并激活哺乳类动物雌激素受体, 从而具有雌激素样和/或抗雌激素双向活性的植物成分。

\* 收稿日期: 2008-11-24

基金项目: 国家自然科学基金(30772849); 高等学校创新引智计划(B07007)

作者简介: 王大伟(1977-), 男, 山东威海人, 在读博士, 北京中医药大学基础医学院中西医结合基础专业(生物化学), 研究方向为中药植物雌激素。 Tel: (010) 64510291 E-mail: doctorwdw @163.com

\* 通讯作者 王继峰 E-mail: wangjifeng @126.com

我国植物资源丰富,祖国医学经历了长期的临床实践,积累了应用植物药防治疾病的丰富经验。根据临床实践中从中药中筛选可能含有植物雌激素的药物,使整个筛选过程更具方向性,也缩小了筛选的范围,最终找出具有雌激素样作用的单体化合物,作为人工合成雌激素的代用品成为可能。

## 2 研究中存在的问题

植物雌激素研究的开展时间比较短,研究中还存在着很多问题。

2.1 中药含有植物雌激素成分的判断标准值得商榷:具有雌激素样作用的中药很多,但这并不能说明该中药就一定含有植物雌激素。植物雌激素具有雌激素样的作用,重要的是能与雌激素受体结合。而中药并不一定是通过与雌激素受体结合而发挥的雌激素样作用的,其作用机制可能是通过影响内源性雌激素分泌及代谢、作用于下丘脑垂体性腺轴、调节免疫系统、神经递质和其他相关因子而实现的<sup>[5]</sup>。此外,中药进入体内以后,部分药物成分经肠道细菌的转化会发生代谢,也有可能是这些代谢产物产生了雌激素样作用。

所以一些中药具有类雌激素样的作用,不能说该中药中一定含有植物雌激素,这是一个概念性的错误。器官水平的粗略研究,只是为雌激素的筛选提供了一个范围。

2.2 具体作用的受体需明确:雌激素受体(ER)是通过配体结合激活的一类核受体超家族成员,有 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  两种雌激素受体。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  在结构上有高度的同源性,但在编码基因、组织分布和在各组织中的表达有明显不同,特别是在与配体结合后产生的生物学效应也有所差异。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  在体内分布广泛,在许多组织和细胞中都有分布。雌激素受体调节剂是在不同组织、不同生理条件下通过与 ER $\alpha$  和/或 ER $\beta$  结合而发挥作用。雌激素发挥作用的过程是一个复杂的信号转导和转录调控过程。

因此,ER 亚型组织分布的差异直接影响其对雌激素或植物雌激素的应答,也造成了其在功能上的明显不同。总的来看,多数细胞内 ER $\beta$  的转录活性均低于 ER $\alpha$ ;在无雌激素状态或在 1 $\beta$ -雌二醇(1 $\beta$ -E<sub>2</sub>)作用下,人 ER $\alpha$  mRNA 的基础转录活性均高于人 ER $\beta$  mRNA,且 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的活性均呈 1 $\beta$ -E<sub>2</sub> 剂量依赖性增长<sup>[6]</sup>。Fabio 等<sup>[7]</sup>在利用稳定转染 ER $\alpha$  或 ER $\beta$  的 U2OS 骨肉瘤细胞进行的实验中发现,在所检测的 12 000 个基因中,有约 100 个受 E<sub>2</sub> 调控的基因通过 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  介导有相同的效应。而多数基因对 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  具有选择性;在这些基因当中,又有 75 %是 ER $\alpha$  选择性基因。

所有这些效应的发挥都是植物雌激素与相应 ER 结合后经过一系列胞内因子的参与而完成的,且首先决定于植物雌激素所结合 ER 的类型、比例及其在不同组织或细胞内的分布,这一机制的阐明将为中药雌激素受体调节剂的开发提供新的途径和手段。

2.3 血清药理学实验方法尚需改进:由于中药成分复杂,开展体外药理实验难度较大,血清药理学应运而生,即从血清中研究药物活性成分的方法,血清药理学在研究中得到了广

泛的应用。但血清药理学方法还存在一些问题。首先,给药剂量问题。剂量大小不同,对实验动物可能起到不同的作用,量效关系只是在一定的范围内,可能会随着剂量的增加起到相反的作用。其次,药理血清的灭活问题。由于新制备的药理血清中含有一定量的补体,而补体可协同、补充和放大机体的特异性体液免疫系统,在抗原抗体反应中参与免疫反应,因此,常需灭活补体。而灭活通常在 56 °C 的温度下进行,以减弱部分抗体对培养细胞的非药物性影响。但在灭活补体的同时,并不能保证血清中的活性成分在这个温度条件下不发生变化,如果成分发生了变化,血清药理学的实验将失去了研究的意义。

因此,血清药理学实验应确定实验动物的给药剂量。比较血清灭活前后的实验结果,以减小研究中的误差。此外,该方法还存在着给药时间和采血时间的问题。实验除参考常用的标准外,还应根据药物的特点,通过一系列的实验摸索而得到合适的实验方法。

2.4 植物雌激素具体作用机制有待阐明:目前多认为,植物雌激素对机体具有双重作用,即雌激素活性和抗雌激素活性<sup>[8]</sup>。一方面在体内雌激素水平较低时,可与 ER 结合发挥雌激素样作用,对防治更年期综合征、乳腺癌、骨质疏松症和心血管疾病等有积极的效果。另一方面,在体内雌激素水平较高时,植物雌激素可通过竞争性抑制靶细胞 ER 而产生抗雌激素作用,可有效地减弱靶细胞对雌激素的应答。植物雌激素对机体的双重调节作用,以及具体作用机制还不十分明确。

植物雌激素的最终效应不仅与靶组织内 ER 亚型的种类、分布、比例密切相关,也与靶细胞内同 ER 效应基因表达过程相关的调控因子的种类和作用相关,因此要了解植物雌激素的最终效应,必须明确其作用机制,这些问题都有待于从基因水平阐明。

## 3 植物雌激素的研究方向

3.1 从结构上寻找中药活性成分:植物雌激素被证实存在于多种植物中,但在不同植物中其种类和量差别很大。已知的植物雌激素包括黄酮、异黄酮、二氢黄酮、黄酮醇、香豆素、木脂素等。其共性是具有双酚环(diphenolic)的结构,与动物雌激素非常近似。正是由于结构上的相似性,才使其具备这种特点。所以从结构上寻找活性成分成为一种可能的简便途径。

明确中药中具体何种成分发挥了雌激素样作用,对其化学结构、理化性质、生物活性也应清楚;观察发挥雌激素样作用的成分是否符合植物雌激素的结构类别;筛选的中药活性成分也首先要能与雌激素受体结合。

3.2 能影响雌激素受体表达:低剂量金雀黄素能提高子宫内膜癌细胞(ER $\alpha$ 、ER $\beta$  表达阳性细胞) ER $\alpha$  mRNA 表达,降低 ER $\beta$  mRNA 的表达;高剂量金雀黄素能下调子宫内膜癌细胞 ER $\alpha$  mRNA 和 ER $\beta$  mRNA 表达。金雀黄素对子宫内膜癌细胞 ER $\alpha$  mRNA 和 ER $\beta$  mRNA 的表达有双重作用,而且与其剂量有一定关系<sup>[9]</sup>。

植物雌激素通过与受体结合,对细胞增殖产生促进或抑制作用。在药物筛选范围内,选择对雌激素受体的表达有调节作用的中药,将对防治各种雌激素依赖性癌症提供一定的有效途径。

3.3 揭示两种雌激素受体之间的关系:因植物雌激素受体调节剂组成、结构和特征的不同以及 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  自身组成和构象的差异,植物雌激素与 ER $\alpha$  或 ER $\beta$  的亲合力往往也有较大差异,研究发现多数植物雌激素对 ER $\beta$  的亲合力大于 ER $\alpha$ <sup>[10,11]</sup>;少数植物雌激素与 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的亲合力基本相同,或对 ER $\alpha$  的亲合力较强。Bowers 等<sup>[12]</sup>通过实验观察到白藜芦醇对 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  有相似的亲合力。染料木素 ER $\beta$  的结合力远远低于 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>,即使在此浓度下,染料木素所诱发的 ER $\beta$  构象改变可能仍与 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 引起的构象改变有所差异,表现在其继续与后面的共激活因子结合的能力可能仍不及 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>,因此最终诱导相应基因表达的水平低于 17 $\beta$ -E<sub>2</sub><sup>[13]</sup>。在诱导转录活性方面,研究发现 ER $\alpha$  比 ER $\beta$  在激活基因转录上作用显著,而 ER $\beta$  在抑制基因转录上比 ER $\alpha$  作用强<sup>[14]</sup>。植物雌激素对细胞增殖的促进或抑制作用也与诱导其发挥作用的受体类型相关。研究发现芹菜素对 MCF7 和 T47D 细胞增殖的促进作用与其激活 ER $\alpha$  有关;而其在低浓度下对乳腺癌细胞增殖的抑制作用是经过 ER $\beta$  介导的<sup>[15,16]</sup>。因此,推测 ER $\alpha$  主要作为基因转录的激动剂,而 ER $\beta$  主要作为基因转录的抑制剂。ER $\beta$  的作用还随 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 的浓度而异,低浓度时 ER $\alpha$  的活性随 ER $\beta$  表达增加而减少,而在饱和浓度下 ER $\beta$  表达的增加,对 ER $\alpha$  的转录活性无任何影响。

雌激素两种受体除了上述关系外,二者关系的进一步揭示,对于今后植物雌激素的筛选有着非常重要的意义。可以利用转染实验,将表达 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  受体的质粒转入特定细胞中,通过不同植物雌激素的干预作用,观察细胞内 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  受体表达的变化,评价其转录效应,进一步明确二者之间的关系。

3.4 明确植物雌激素的作用靶点:与 E<sub>2</sub> 相比,植物雌激素与雌激素受体结合的部位、方式有所差异。植物雌激素通过与不同靶细胞内的雌激素受体结合,启动细胞内不同的信号转导途径,从而发挥其生物学效应。所以对植物雌激素与雌激素受体的具体结合位点,其启动的信号转导途径,最终的具体基因的调节等环节需要进一步的揭示。采用先进的分子生物学技术,如基因芯片、染色质免疫沉淀(ChIP)技术等,可以从基因水平上寻找药物筛选的靶标,观察药物处理后细胞基因表达谱的变化,使研究者对药物的毒性和代谢特点、药物所影响的反式因子的体内结合位点和在基因表达调控中的作用,药物对染色体蛋白分布的影响以及组蛋白修饰情况有所了解。

#### 4 结语

祖国医学经历了长期的临床实践,积累了丰富的应用植物药防治生殖系统的功能障碍疾病的经验。近代药理研究也

证实中药对机体内分泌系统的机能有显著调节作用,特别是一些中药的药效成分在研究中被发现具有类雌激素样作用。

中药所含有效成分是中药用于防治疾病的物质基础,植物雌激素作为中药中具有生物活性的组分,对中药药效的发挥有重要的意义。但目前植物雌激素的研究只停留在个别零散的实验基础上,没有进行系统筛选和比较,且研究水平和深度还不够,没有进一步提出其有效成分并阐明其作用机制。而且在有效成分的测定、纯化、体内代谢过程、有效剂量、不良反应等方面有待进一步的研究。因此,应用现代科学技术系统研究中药中植物雌激素的分布、种类、化学结构、理化性质、生物活性等,将有助于进一步阐明中药的作用机制,从而加速中药基础研究和开发应用的现代化进程。

#### 参考文献:

- [1] Takeshi U S U I. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens [J]. *Endocr J*, 2006, 53(1): 7-20.
- [2] Glazier M G, Bowman M A. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy [J]. *Archiv Int Med*, 2001, 161(9): 1161-1175.
- [3] Pereboom D, Gilaberte Y, Sinues B, et al. Antioxidant intracellular activity of geistein and equol [J]. *Med Food*, 1999, 2(3-4): 253-256.
- [4] 金宏. 大豆异黄酮抗辐射作用的实验研究 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2004, 26(3): 23-27.
- [5] 王大伟,王继峰,牛建昭. 中医药治疗更年期综合征的作用机理探讨. [J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(3): 213-216.
- [6] 李宏,张文昌. 雌激素受体 $\alpha$ 与 $\beta$ 的比较 [J]. *福建医科大学学报*, 2005, 39: 5-8.
- [7] Stossi F, Barnett D H, Frasor J, et al. Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER)  $\alpha$  or ER $\beta$  in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(7): 3473-3486.
- [8] Schmitt K, Hirose T, Kinjo J, et al. Interaction of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues [J]. *Toxicol In Vitro*, 2002, 15: 433-439.
- [9] 薛晓鸥,魏丽惠. 金雀黄素对子宫内腺癌细胞 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  mRNA 水平的调节 [J]. *北京大学学报:医学版*, 2005, 37(3): 278-280.
- [10] Gutendorf B, Wectendorf J. Comparison of an assay of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens [J]. *Toxicology*, 2001, 166(1-2): 79-89.
- [11] Chrzan B G, Bradford P G. Phytoestrogen activate estrogen receptor beta and estrogenic responses in human breast and bone cancer cell lines [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(2): 171-177.
- [12] Bowers J L, Tyulmenkov V V, Jernigan S C. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(10): 3657-3667.
- [13] Morito K, Hirose T, Kinjo J, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(4): 351-356.
- [14] An J, Ribeiro R C, Webb P, et al. Estradiol repression of tumor necrosis factor-alpha transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 15161-15166.
- [15] Seo H S, Denardo D G, Jacquot Y, et al. Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 99(12): 121-134.
- [16] Mak P, Leung Y K, Tang W Y, et al. Apigenin suppresses cancer cell growth through ER $\beta$  [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(11): 896-904.