

## 淫羊藿苷和淫羊藿素对乳腺癌 T47D 细胞增殖的影响

王洁<sup>1,2</sup>, 陈花<sup>2</sup>, 买迪娜<sup>2</sup>, 马海蓉<sup>2\*</sup>, 王振华<sup>1\*</sup>, 李一<sup>1</sup>

1. 石河子大学药学院 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002

2. 中国科学院新疆理化技术研究所 干旱地区植物资源化学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

**摘要:** **目的** 研究淫羊藿苷及淫羊藿素对乳腺癌 T47D 细胞增殖的影响, 探讨雌激素受体 (ER) 与其作用机制的关系。**方法** 用不同浓度的淫羊藿苷和淫羊藿素处理雌激素受体呈阳性的乳腺癌 T47D 细胞系后, MTT 法检测 T47D 细胞增殖, 流式细胞术检测 T47D 细胞周期的变化, Western blotting 法检测 T47D 细胞 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  蛋白表达。**结果** 淫羊藿苷和淫羊藿素浓度为  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L, 能显著促进 T47D 细胞增殖, 且该作用可被雌激素受体拮抗剂 ICI 182.780 ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 所拮抗。与对照组相比, 淫羊藿苷和淫羊藿素  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 使 S 期 T47D 细胞比例明显增加, 增殖指数显著升高, 但该作用可被 ICI 182.780 抑制。淫羊藿苷和淫羊藿素  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 还可显著增加 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。**结论** 淫羊藿苷和淫羊藿素均可显著促进 T47D 细胞增殖, 该作用可能是通过上调胞内 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  蛋白表达介导的。

**关键词:** 淫羊藿苷; 淫羊藿素; 乳腺癌 T47D 细胞; 细胞增殖; 雌激素受体

**中图分类号:** R282.710.5; R979.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)11-1470-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.021

## Effects of icariin and icaritin on proliferation of breast cancer T47D cells

WANG Jie<sup>1,2</sup>, CHEN Hua<sup>2</sup>, MAI Di-na<sup>2</sup>, MA Hai-rong<sup>2</sup>, WANG Zhen-hua<sup>1</sup>, LI Yi<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry of Arid Zone, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of icariin (Ica) and icaritin (Ict) on the proliferation of breast cancer T47D cells *in vitro* and to explore the relationship between estrogen receptor (ER) and the mechanisms. **Methods** The ER positive T47D cells were treated with Ica and Ict at different concentration. The proliferation of T47D cells was measured by MTT method, and the cell cycle changes during the proliferation were further evaluated using flow cytometric assay. The effects of Ica and Ict on the expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in T47D cells were analyzed by Western blotting. **Results** Ica and Ict ( $10^{-9} \sim 10^{-6}$  mol/L) stimulated the proliferation of T47D cells, and the proliferation was inhibited by the estrogen antagonist ICI 182.780 ( $10^{-6}$  mol/L). Compared with the control group, Ica and Ict ( $10^{-7}$  mol/L) could increase the amount of T47D cells arrested in S phase, and the stimulation was inhibited by ICI 182.780. As well Ica and Ict ( $10^{-7}$  mol/L) could up-regulate the expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  proteins ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Ica and Ict stimulate the proliferation of T47D cells, and the effect may be performed through up-regulating the expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  proteins.

**Key words:** icariin; icaritin; breast cancer T47D cell; cell proliferation; estrogen receptor

淫羊藿是我国传统补益中药材, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效, 适用于阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛等病症的治疗, 淫羊藿苷 (icariin, Ica) 和淫羊藿素 (icaritin, Ict) 是淫羊藿

的主要活性成分。淫羊藿苷和淫羊藿素对骨细胞增殖、分化有促进作用<sup>[1-4]</sup>。Wang 等<sup>[5]</sup>发现淫羊藿素能够促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 而淫羊藿苷未见有此作用。叶海涌等<sup>[6]</sup>的研究结果表明淫羊藿素对

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102890, 11175222); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-10-0967)

作者简介: 王洁 (1987—), 女, 山东潍坊人, 硕士生, 研究方向为分子与肿瘤药理学。E-mail: 403319609@qq.com

\*通信作者 马海蓉 E-mail: mhersj@163.com

王振华 E-mail: zhenhuawang@tom.com

MCF-7、T47D 细胞有显著的促增殖作用,且该作用可被雌激素受体(ER)拮抗剂 ICI 182.780 完全抑制,因此提示淫羊藿素通过与 ER 结合而发挥促增殖作用。由于淫羊藿苷与淫羊藿素的化学结构极其相似,本实验进一步考察淫羊藿苷和淫羊藿素对雌激素受体表达呈阳性的乳腺癌 T47D 细胞增殖的影响及 ER 受体在其作用机制中的作用,为淫羊藿中植物雌激素产品的开发提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

淫羊藿苷(批号 110737-200415),质量分数 99.9%,中国药品生物制品检定所;淫羊藿素(批号 12031523),质量分数 98%,上海 TAUTO 公司。雌二醇、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO),美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基、高糖无酚红 DMEM 培养基、胎牛血清,美国 Hyclone 公司;活性炭-葡聚糖苷处理胎牛血清(CDT-FBS),北京元亨金马公司;ICI 182.780 拮抗剂,美国 Cayman 公司;NC 膜、蛋白酶抑制剂(PMSF)、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、羊抗兔 IgG,武汉博士德公司;预染蛋白 Marker、化学发光试剂盒,美国 Thermo 公司;兔抗 ER $\alpha$  抗体、兔抗 ER $\beta$  抗体,北京博奥森公司。

### 1.2 细胞

人乳腺癌 T47D 细胞购自中国科学院细胞库。

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱,德国 Binder 公司;SpectraMax M5 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;倒置相差显微镜,德国 Leica 公司;超纯水机,美国 Millipore 公司;恒流恒压电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;流式细胞仪 Epics Altra,美国 Beckman Coulter 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

T47D 细胞置于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 相对饱和湿度下培养 2 d。实验开始前 3 d 将细胞用 PBS 洗涤 2 次后改换无酚红高糖 DMEM(含 5% CDT-FBS),继续培养至耗尽细胞内储存的雌激素。

### 2.2 MTT 法检测细胞增殖

实验分成 4 组:淫羊藿苷组、淫羊藿素组和 2 化合物分别加 ICI 182.780 组。取淫羊藿苷和淫羊藿素用少量 DMSO 溶解至储藏浓度  $1 \times 10^{-2}$  mol/L,使用时用培养基配成所需浓度,各组 DMSO 质量分

数均小于 0.1%。T47D 细胞经无酚红高糖 DMEM(含 5% CDT-FBS)培养 3 d 后,选取对数生长期细胞,用 PBS(pH 7.4)洗 2 次后用 0.25%胰蛋白酶消化,加入无酚红高糖 DMEM(含 5% CDT-FBS)吹打均匀,以 3 000/孔接种于 96 孔板,培养 24 h 待细胞贴壁后,各组加入相应药物(淫羊藿苷或淫羊藿素给药浓度为  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$  mol/L,ICI 182.780 给药浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L),每个浓度设 4 个复孔,培养 48 h 后每孔加入 MTT(5 mg/mL)20  $\mu$ L,继续培养 4 h,吸去培养基,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L,震荡 5~10 min,使结晶物完全溶解,多功能酶标仪测定各孔 570 nm 吸光度(A),计算细胞增殖率(PR)。

$$PR = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}$$

### 2.3 流式细胞术检测细胞周期

实验分成 8 组:对照组、ICI 182.780 组、雌二醇组、雌二醇+ICI 182.780 组、淫羊藿苷组、淫羊藿素组、淫羊藿苷和淫羊藿素分别加 ICI 182.780 组。取经无酚红 DMEM(含 5% CDT-FBS)培养基培养 3 d 的 T47D 细胞,以  $5 \times 10^5$ /皿接种于 6 cm 培养皿中,24 h 细胞贴壁后,换为含 0.5% CDT-FBS 的无酚红 DMEM 完全培养基,培养 3 d,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期,之后换为含药物(淫羊藿苷、淫羊藿素和 ICI 182.780 给药浓度同“2.2”项,雌二醇给药浓度为  $1 \times 10^{-8}$  mol/L)的无酚红 DMEM 培养液(5% CDT-FBS)继续培养 48 h(对照组更换含 0.1% DMSO 的培养液),平行测试 3 组。收获细胞后用预冷的 70%乙醇缓慢加入到细胞沉淀中混匀,4 °C 固定细胞过夜,用含 0.03 mg/mL 的碘化丙啶、0.3 mg/mL 的 RNase 的 PBS 染色,室温避光 0.5 h 后用 300 目的尼龙筛滤过,用流式细胞仪检测细胞周期分布,并计算细胞增殖指数(PI)。

$$PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M)$$

### 2.4 Western blotting 法检测 ER $\alpha$ 和 ER $\beta$ 蛋白表达

实验分组同“2.2”项。取经无酚红 DMEM(含 5% CDT-FBS)培养 3 d 的 T47D 细胞,以  $1 \times 10^6$ /皿接种于 6 cm 培养皿中,24 h 细胞贴壁后各组更换含相应药物(ICI 182.780 为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L,淫羊藿苷、淫羊藿素均为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L,雌二醇  $1 \times 10^{-8}$  mol/L)的无酚红培养基继续培养 48 h,吸弃培养液,4 °C 预冷的 PBS(pH 7.4)漂洗 2 遍后加入 200  $\mu$ L RIPA 细胞裂解液,冰上充分裂解,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清,用 BCA 法对总蛋白定量。

蛋白经煮沸处理后各组取 30 μg 蛋白样品, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 蛋白转移至 NC 膜上, 加入一抗 (兔抗 ERα 抗体, 1:200; 兔抗 ERβ 抗体, 1:100; 抗 β-actin 抗体, 1:1 000), 4 °C 过夜, 次日以 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入二抗 (羊抗兔 IgG-HRP, 1:3 000), 室温孵育 1 h; 以 TBST 摇床洗膜 3 次, 每次 10 min, 用化学发光法检测目的蛋白, 显影定影结束胶片扫描后用 Image J 软件测定其光密度值, 并计算各组的相对光密度值。平行测试 3 组。

### 2.5 统计学处理

用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计学分析, 采用析因设计、单因素分析方法进行组间差异比较, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

### 3.1 对 T47D 细胞增殖的影响

淫羊藿苷  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L、淫羊藿素  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$  mol/L 均能显著促进 T47D 细胞增殖, 且与浓度相关。淫羊藿苷在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 时作用最强, 细胞增殖率为 215%; 淫羊藿素在  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 时作用最强, 细胞增殖率为 209%; 这 2 种药物在  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 时, 细胞增殖率一致, 因此选择该浓度进行以下实验。当淫羊藿素和淫羊藿苷组均加入浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 ICI 182.780 时, 细胞增殖率明显降低。结果见图 1。

### 3.2 对 T47D 细胞周期的影响

淫羊藿苷与淫羊藿素浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 时, 使 T47D 细胞 PI 显著增大, 增加 S 期和 G<sub>2</sub>/M 细胞的比例, 促进细胞增殖, 淫羊藿苷的作用强度约是

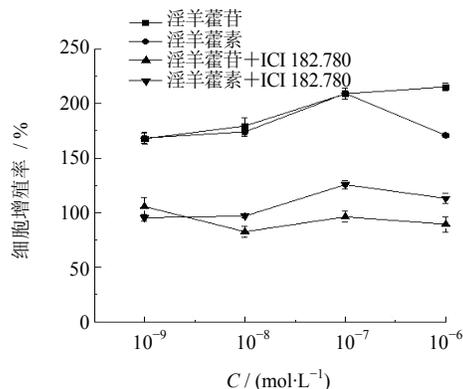


图 1 淫羊藿苷和淫羊藿素对 T47D 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 1 Effects of Ica and Ict on proliferation of T47D cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

对照组的 3.3 倍, 但弱于雌二醇组, 而淫羊藿素作用强度约是对照组 3.5 倍, 作用强于雌二醇组。当加入 ER 阻滞药 ICI 182.780 ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 后, PI 明显下降。结果见表 1、图 2。

### 3.3 对 ERα 和 ERβ 蛋白表达的影响

与对照组相比, 淫羊藿苷和淫羊藿素  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 给药后 48 h, 显著上调 ERα 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), 表达量分别增加 2.8、2.7 倍; 而加入 ER 抑制剂 ICI 182.780 后, 淫羊藿苷和淫羊藿素组 ERα 蛋白表达量明显下降。结果见图 3。

与对照组相比, 淫羊藿苷和淫羊藿素给药后 48 h, 可显著上调 ERβ 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 使表达量分别增加 1.8、1.2 倍; 而加入 ER 抑制剂 ICI 182.780 后, 淫羊藿苷和淫羊藿素组 ERβ 蛋白的表达量明显下降。结果见图 4。

表 1 淫羊藿苷和淫羊藿素对 T47D 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effects of Ica and Ict on cell cycle of T47D cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	C / ( $\times 10^{-6}$ mol·L <sup>-1</sup> )	细胞周期分布 / %			PI / %
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期	
对照	—	76.3 ± 3.8	0	23.7 ± 1.2	23.7
雌二醇	0.01	31.8 ± 1.5**	29.1 ± 1.4**	39.1 ± 1.9*	68.2**
淫羊藿苷	0.10	39.3 ± 1.9**	20.5 ± 1.0**	40.2 ± 2.0**	60.7**
淫羊藿素	0.10	30.9 ± 1.5**	39.6 ± 1.8**	29.5 ± 1.5	69.1***
ICI 182.780	1.00	79.4 ± 3.9	7.4 ± 0.3	13.2 ± 0.6	20.6
雌二醇+ICI 182.780	0.01+0.10	63.4 ± 3.2 <sup>▲</sup>	0	36.6 ± 1.8 <sup>▲▲</sup>	36.6 <sup>▲</sup>
淫羊藿苷+ICI 182.780	0.10+0.10	77.5 ± 3.9	0	22.5 ± 1.1 <sup>▲</sup>	22.5
淫羊藿素+ICI 182.780	0.10+0.10	76.3 ± 3.8	0	23.7 ± 1.19 <sup>▲</sup>	23.7

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与 ICI 182.780 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$   
<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs ICI 182.780 group

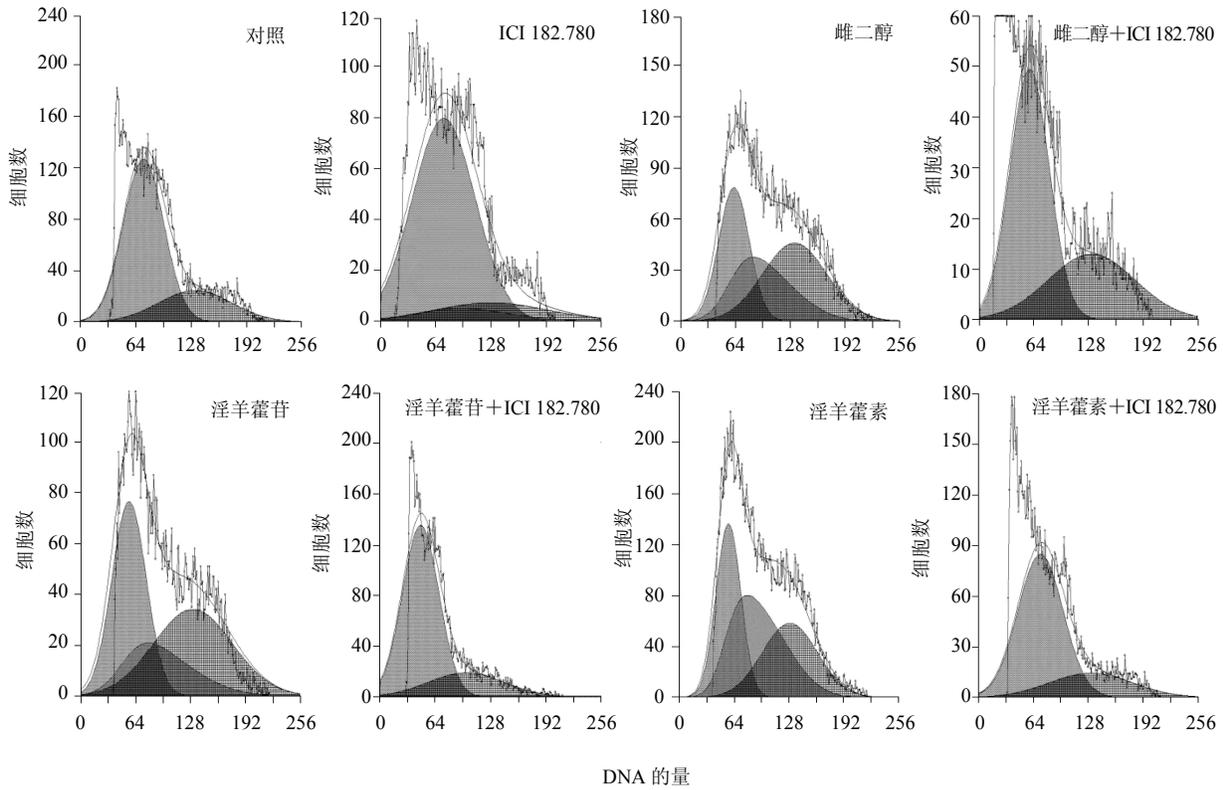
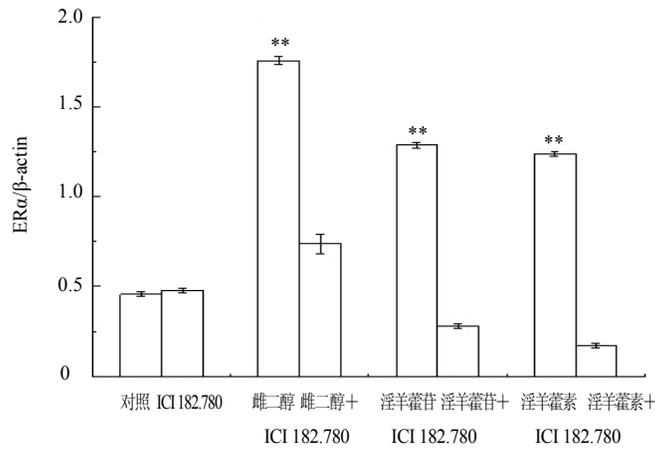
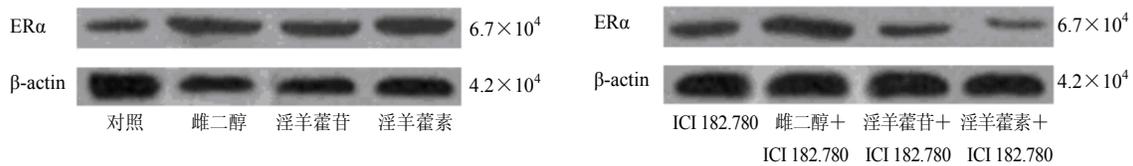


图2 雌二醇、淫羊藿苷及淫羊藿素对细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effects of estradiol, Ica, and Ict on cell cycle ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group

图3 淫羊藿苷及淫羊藿素对ERα蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effects of Ica and Ict on expression of ERα protein ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

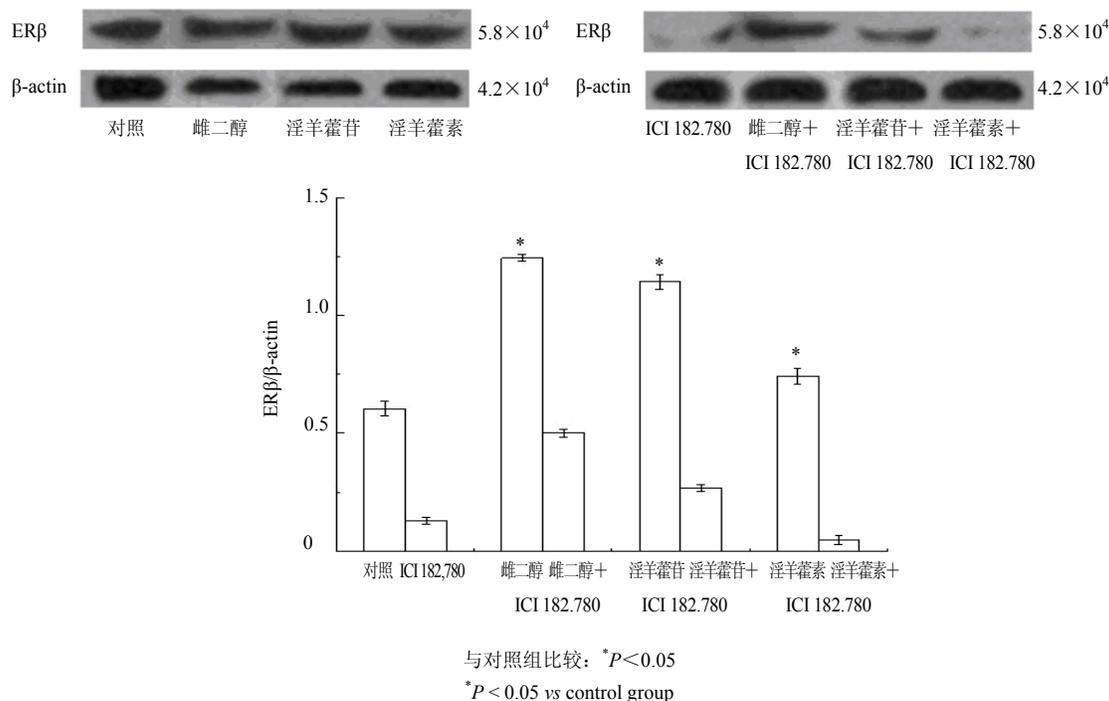


图 4 淫羊藿苷和淫羊藿素对 ERβ 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 4 Effects of Ica and Ict on expression of ERβ protein ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

大量研究表明, 淫羊藿苷和淫羊藿素具有促进成骨细胞增殖、预防骨质疏松、促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、提高细胞分裂和增殖指数等作用<sup>[4-10]</sup>。但有研究者认为淫羊藿苷并不具备显著的雌激素样作用, 原因是淫羊藿苷结构中的 3、7 碳位糖苷键使其不具有生物学活性, 而淫羊藿素作为淫羊藿苷体内代谢产物之一, 糖苷键被羟基取代, 生物活性更强<sup>[6,11]</sup>。也有人认为, 天然黄酮类化合物糖苷化后对其抗氧化活性并无不利影响, 且能够提高其水溶性及生物利用度<sup>[12-13]</sup>。本实验结果表明, 淫羊藿苷和淫羊藿素在  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L 时, 对乳腺癌 T47D 细胞增殖均具有显著促进作用, 且能够增加 S 期和 G<sub>2</sub>/M 细胞比例, 因此推测淫羊藿苷结构中 3、7 碳位糖基取代并不影响其活性, 5 碳位羟基化可能为淫羊藿苷和淫羊藿素发挥生物活性的重要位点。淫羊藿苷与淫羊藿素雌激素样活性的差异是否与各自的结构有关, 将在后续实验中进一步探讨。

ERα 和 ERβ 在不同组织和细胞中的表达不同: ERα 在女性生殖系统中高表达, 如下丘脑、乳腺、子宫和阴道; ERβ 在中枢神经系统、心血管系统、免疫系统、泌尿系统、消化系统等中表达<sup>[14-16]</sup>。淫羊藿总黄酮可使卵巢切除的雌性大鼠下丘脑和海马

中 ERα、ERβ mRNA 表达明显上调<sup>[17]</sup>。本实验结果显示, 在淫羊藿苷和淫羊藿素给药同时加入 ER 拮抗剂 ICI 182.780, 淫羊藿苷和淫羊藿素对 T47D 细胞的促增殖作用明显减弱, 细胞大部分停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, PI 明显降低, 提示淫羊藿苷对 T47D 细胞的促增殖作用可能主要通过 ER 介导的。Western blotting 法检测显示, 淫羊藿苷和淫羊藿素不同程度地上调 ERα 和 ERβ 的蛋白表达, 且该作用能够被 ICI 182.780 所拮抗, 进一步证明这 2 个有效成分通过上调 ERα 和 ERβ 的表达产生促细胞增殖作用。

综上所述, 淫羊藿苷与淫羊藿素均具有较显著促 T47D 细胞增殖的作用, 该作用通过其与 ERα 和 ERβ 相结合、上调 ERα 和 ERβ 蛋白表达产生。淫羊藿苷在淫羊藿总黄酮中的量远远高于淫羊藿素, 且提取方法简单, 价格便宜, 更具有开发潜力。

#### 参考文献

- [1] 朱晓峰, 张荣华, 孙升云, 等. 淫羊藿苷通过雌激素受体和 p38MAPK 信号诱导 MC3T3-E1Subclone14 细胞的分化 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(5): 957-960.
- [2] 朱晓峰. 淫羊藿素对 MC3T3-E1Subclone14 细胞分化及相关信号通路的影响 [D]. 广州: 暨南大学, 2009.
- [3] Ming L G, Chen K M, Xian C J. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in

- regulating bone remodelling [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 228(3): 513-521.
- [4] 朱晓峰, 张荣华, 孙升云, 等. 淫羊藿素通过雌激素受体和骨形态发生蛋白信号诱导 MC3T3-E1 subclone 14 细胞分化 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 27(12): 2351-2356.
- [5] Wang Z Q, Lou Y J. Proliferation-stimulating effects of icaritin and desmethylcaritin in MCF-7 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 504(3): 147-153.
- [6] 叶海涌, 刘健, 楼宜嘉. 淫羊藿苷衍生物的制备及其雌激素样作用研究 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2005, 34(2): 131-136.
- [7] 蒋凌云, 刘光明, 陈可欣. 淫羊藿苷的提取、分离和抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 353-358.
- [8] Wang Z, Lou Y. Proliferation-stimulating effects of icaritin and desmethylcaritin in MCF-7 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 504(3): 147-153.
- [9] 胡蕾蕾, 段小群, 卢曦, 等. 淫羊藿素对雌激素依赖性乳腺癌 MCF-7 细胞作用的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 155-158.
- [10] 王大伟, 邓秀兰, 牛建昭, 等. 淫羊藿素和脱水淫羊藿素对人类乳腺癌细胞 T47D 增殖和细胞周期的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 28(8): 637-640.
- [11] 朱瑞清, 李志忠, 周建, 等. 淫羊藿苷及其拟代谢物的雌激素样作用研究 [J]. 中医学报, 2012, 40(3): 15-20.
- [12] 郑翠, 李琳, 庞浩, 等. 天然产物活性组分的糖基化修饰研究进展 [J]. 纤维素科学与技术, 2012, 20(1): 62-71.
- [13] 刘蓉, 曹树稳, 余燕影, 等. 染料木素及其乳糖苷清除自由基能力的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(9): 111-114.
- [14] Mueller S O, Simon S, Chae K, *et al.* Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$  in human cells [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 80(1): 14-25.
- [15] 张远强, 王红. 雌激素受体 $\beta$ 亚型在大鼠睾丸发育过程中的表达和定位 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(4): 296-298.
- [16] 王瑞安, 郑平菊, 张远强. 雌激素受体在小鼠睾丸表达的免疫组织化学研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1999, 8(4): 385-388.
- [17] 武密山, 赵素芝, 任立中. 淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠下丘脑和海马雌激素受体  $\alpha$  及  $\beta$  mRNA 表达的影响 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 36(1): 15-20.