



# 孕驴尿中雌激素类物质的组成及活性

左晓佳,张蓉银,柴婷,高维明

(新疆畜牧科学院 畜牧业质量标准研究所,乌鲁木齐 830000)

**摘要** 旨在获得更多的雌激素类物质作为原料药来源,通过收集怀孕 6 个月的孕驴尿液,用 DH100 大孔吸附树脂提取尿液中的雌激素类物质分析其组成,并用提取物处理小鼠,以阴道开口率、子宫系数及阴道上皮细胞的角质化程度为判定指标进行药效评价试验。结果表明:尿液中存在雌激素类似物马烯雌酮,质量浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;利用提取物处理雌性小鼠,给药组小鼠均出现阴道开口提前和子宫质量增加,阴道上皮细胞角质化现象明显,表明提取物具有较强的活性。

**关键词** 孕驴;尿液;雌激素类似物;活性评价

**中图分类号** S879;S872

**文献标志码** A

**文章编号** 1004-1389(2018)07-0923-06

天然的雌激素类物质最早是从马尿中获得的多种天然结合态雌激素的混合物,可以用于制备雌激素替代疗法的药物,对人体多种因雌激素缺乏而引起的更年期综合症疾病有较好疗效,早在 20 世纪 40 年代,美国惠氏-艾尔斯特制药公司生产的结合雌激素药物倍美力就已经正式上市使用<sup>[1-2]</sup>。而目前该类原料药的来源基本都是孕期马尿,其他动物孕期尿液的研究鲜见报道。

马属动物的消化器官构造和代谢机能基本相同,理论上尿液中也应包括雌激素代谢的所有中间产物,即雌激素结构类似物。据世界粮农组织(FDA)统计,截至 2013 年,全球马的存栏量 5 977 万头,驴 4 353 万头。中国养驴历史悠久,家驴的遗传多态性丰富<sup>[3]</sup>,据国家统计局公布的 2017 年统计年鉴,截至 2016 年,中国马的存栏量达到 550.7 万头,驴 456.9 万头,新疆地区马存栏量达到 89 万头,驴 54.6 万头。因此,驴尿将是获得天然雌激素类药物的又一强势来源,同时也将为农牧民带来极大的经济效益。鉴于此,本研究通过采集怀孕 6 个月孕驴的尿液,提取雌激素类似物,通过动物试验检测其活性,为孕驴尿的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

孕驴尿取自怀孕 6 个月的新疆驴(新疆沙湾

县隆源养殖合作社提供);试验小鼠为 50 只 SPF 级昆明小鼠(新疆医科大学医学试验动物中心提供),雌性,18~19 日龄,个体质量 12~16 g,以阴门未开作为未性成熟标志。按小鼠个体质量随机分为 5 组,饲养在 SPF 级动物房,保持 12 h 照明/12 h 黑暗的光照周期,温度(23±1)℃,湿度(60±10)%,自由饮水进食。

**雌激素标准品:**雌酮硫酸钠标准品、马烯雌酮标准品、17 $\alpha$ -马烯雌酮标准品(美国 USP 公司)、雌二醇、雌三醇(中国食品药品检定研究院);DH100 大孔吸附树脂(郑州勤实科技有限公司);**阳性药物:**红利来结合雌激素片(新疆新姿源生物制药有限责任公司,国药准字 H20090172)。

### 1.2 主要仪器

UPLC 超高效液相色谱仪(Waters 公司,美国);RM 2126 组织切片仪(Leica 公司,德国);LC-MS TQD 三重四极杆液质联用仪(Waters 公司,美国)。

### 1.3 方法

**1.3.1 雌激素类似物提取** 采集到的孕驴尿低温避光静置 6 h,10 000 r/min 离心后,经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤去除不溶物,得到清澈明亮的黄色液体。采用固液萃取方式分离获得雌激素类物质的混合物<sup>[4-5]</sup>,用 DH100 大孔树脂层析,流速 6 mL/min,按填料体积:上样体积=1:10 上样,乙醇洗脱。再使用 UPLC 超高效液相色谱

收稿日期:2018-03-07 修回日期:2018-05-02

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2016D01B002)。

第一作者:左晓佳,女,助理研究员,研究方向为畜禽副产品开发利用。E-mail: 625591197@qq.com

C18 柱分离样品<sup>[6-7]</sup>,流动相为 V(乙腈):V(磷酸二氢钾)=30:70 溶液,流速 0.4 mL/min。在紫外检测器 215 nm 下检测目标产物峰。收集产物峰经质谱定性<sup>[8-9]</sup>。

1.3.2 纯化产物活性检测 参照文献<sup>[10-11]</sup>的方法对小鼠进行处理。处理方式如下:试验小鼠分别用 280、140、70 ng/g 提取物进行灌胃,每天给药 1 次,以常规饲养为阴性对照组,阳性对照组用 280 ng/g 阳性药物处理。

阴道开口时间及开口率:从第 2 天开始观察阴道是否开口,记录时间和数量,以开口 > 2 mm 作为开口标准,最后计算阴道开口率。

子宫质量及子宫系数:最后一次给药 24 h 后用乙醚麻醉处死,解剖后称量小鼠个体质量及子宫质量,计算公式为子宫系数 = 子宫质量/体质量 × 100%。

阴道上皮组织切片:解剖后每组随机选 3 只取阴道上皮组织(5 mm × 5 mm × 2 mm),使用 Bouin 固定液(饱和苦味酸 300 mL + 甲醛 100 mL + 冰醋酸 200 mL)固定 5 h;用 φ=50% 酒精浸洗数次,之后逐级增加酒精体积分数(60% ~ 100%),各体积分数分别浸泡 2 h 至完全脱水;使用 V(纯酒精):V(二甲苯)=1:1 和二甲苯溶液

分别浸泡 30 min 进行透明化处理;然后浸在溶解并保温 55 °C 的石蜡内 1 h,再将组织与石蜡一起包埋入包埋盒中,将组织待观察面平铺向下摆放好,并赶出气泡;冷水中冷却凝固后将蜡块固定在切片机的持腊器上,以厚度 5~7 μm 进行切片;将较好的切片在 40 °C 水浴中铺展,然后固定在载玻片上于烘箱 45 °C 烤干;经 HE 染色(苏木精 5 min,伊红 2 min),同样上述方法脱水和透明化处理,之后用树胶封固,加盖盖玻片,晾干后用显微镜观察阴道上皮细胞的角质化情况。

### 1.4 统计分析

试验数据用 SPSS 22 进行显著性分析和单因素方差分析,对差异显著的数据用 LSD 和 S-N-K 法进行比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取纯化试验中雌激素结构类似物的结构初步鉴定

避光静置 6 h 后,经 0.22 μm 避光微孔滤膜多次过滤,最后用透明橙黄色的液体作为纯化原料最好,超过则会引起雌激素类化合物的降解或析出。从图 1 可以看出,洗脱液在 0.95 min 有一个明显的特征峰与图 2 一致,对照混合标准品(包

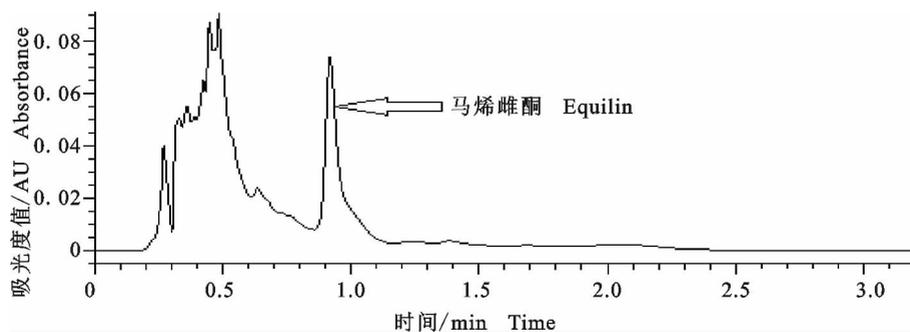


图 1 洗脱液超高效液相色谱图

Fig. 1 UPLC spectrogram of eluent

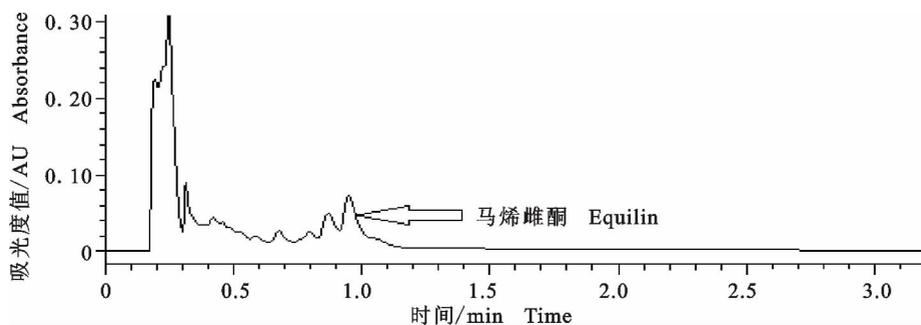


图 2 红利来结合雌激素药物液相色谱图

Fig. 2 UPLC spectrogram of conjugated estrange drug Honglilai

括雌酮硫酸钠、17 $\alpha$ -马烯雌酮、马烯雌酮、雌二醇、雌三醇)液相谱图(图 3)可以发现,该峰有可能是马烯雌酮峰。

鉴于此,分离该峰进行质谱分析,结果如图 4

所示,可以明显看出有一个质核比为 267.31 的物质响应强烈,对比马烯雌酮分子质量可以断定该物质为马烯雌酮的母离子,证实液相对比的分析结果,定量分析其质量浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$ 。

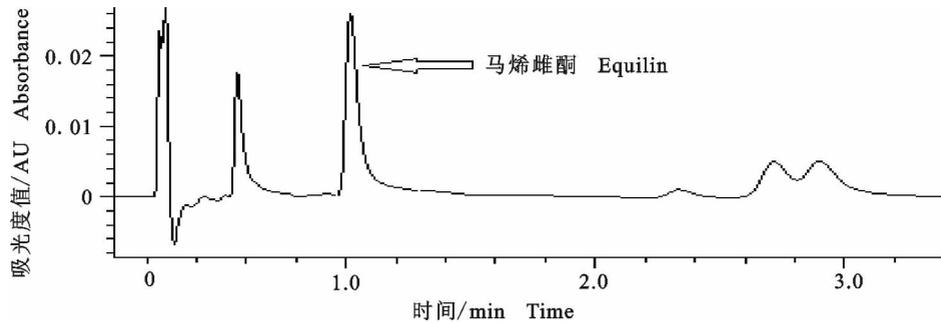


图 3 混标液相谱图

Fig. 3 UPLC spectrogram of mixed standards

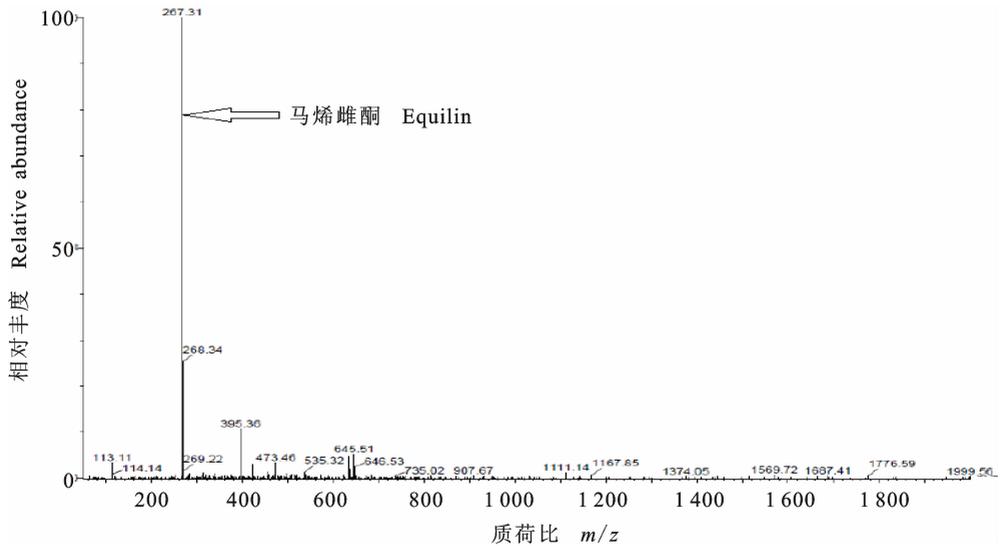


图 4 马烯雌酮质谱图

Fig. 4 Mass spectrogram of equilin

## 2.2 纯化产物活性评价

2.2.1 阴道开口时间及开口率 由表 1 可知,阳性对照组和处理组都从第 3 天给药结束后,开始有阴道开口现象,之后逐天增加,而阴性对照组直到试验结束也未有阴道开口的小鼠出现。所有处理组小鼠无体质量明显减少或死亡等不良现象。

结果表明,在纯化的雌激素结构类似物作用下,小鼠呈明显提前发育状态,并且随质量分数增加,阴道开口的小鼠数量呈明显上升趋势。280 ng/g 组的开口率略低于阳性对照组。

2.2.2 子宫质量及子宫系数 由表 2 可知,2 个指标分析结果一致,4 个给药组与阴性对照组差

异均极显著 ( $P < 0.01$ ),阳性对照组和 70 ng/g 组差异极显著 ( $P < 0.01$ ),与其他处理组差异不显著,280 ng/g 组和 140 ng/g 组与 70 ng/g 组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.2.3 阴道上皮细胞角质化程度 小鼠性成熟后,阴道上皮细胞发生角质化,并随着角质层的增厚出现脱落现象,因此,从小鼠阴道上皮细胞切片图能直观地看出阴道角质化程度。从图 5 可以看出,阴性对照组阴道上皮细胞完整,未见角质化,阳性对照组角质化明显,各处理组均有较明显的角质化,甚至 140 ng/g 组程度比 280 ng/g 组和阳性对照组强烈。

表 1 各组小鼠阴道开口状态  
Table 1 Vaginal opening state of mice in each group

给药时间/d Lasting time of drug treatment	阴性对照组 Negative control	阳性对照组 Positive control	70 ng/g	140 ng/g	280 ng/g
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	3	0	2	2
5	0	7	2	4	5
6	0	9	5	7	8
阴道开口率/% Vaginal opening rate	0	90	50	70	80

表 2 子宫质量及子宫系数显著性分析( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Significance analysis of uterine mass and uterine coefficient

组别 Group	子宫质量/g Uterine mass	子宫系数 Uterine coefficient
阴性对照组 Negative control	0.028 2±0.012 C	1.340±0.52 C
阳性对照组 Positive control	0.143 6±0.043 A	6.294±1.63 A
70 ng/g	0.077 5±0.045 Bb	3.471±1.89 Bb
140 ng/g	0.124 3±0.053 ABa	5.539±2.14 ABa
280 ng/g	0.119 0±0.031 ABa	5.419±1.42 ABa

注:同列数据不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Note: Different lowercase letters in the same columns indicate significant difference ( $P < 0.05$ ), and uppercase letters indicate extremely significant difference ( $P < 0.01$ ).

### 3 讨论

目前,治疗雌激素缺乏症所使用的药物主要是从孕马尿中提取的结合雌激素,是多种天然固醇类结合态雌激素的混合物<sup>[1-2]</sup>。早在 20 世纪 30 年代就围绕其开展多方面的研究。

中国驴种资源丰富,然而随着社会进步和运输业的快速发展,驴在中国大部分地方的役用地位明显降低,主要驴品种种质资源逐步退化,目前驴的饲养主要用于产皮、产肉、产奶,而尿液的利用研究鲜见报道。相较于马,驴饮水量小,食量小,但纤维消化能力强,不易得消化器官疾病,对蛋白质的吸收略低于反刍动物,而高于马、骡子。

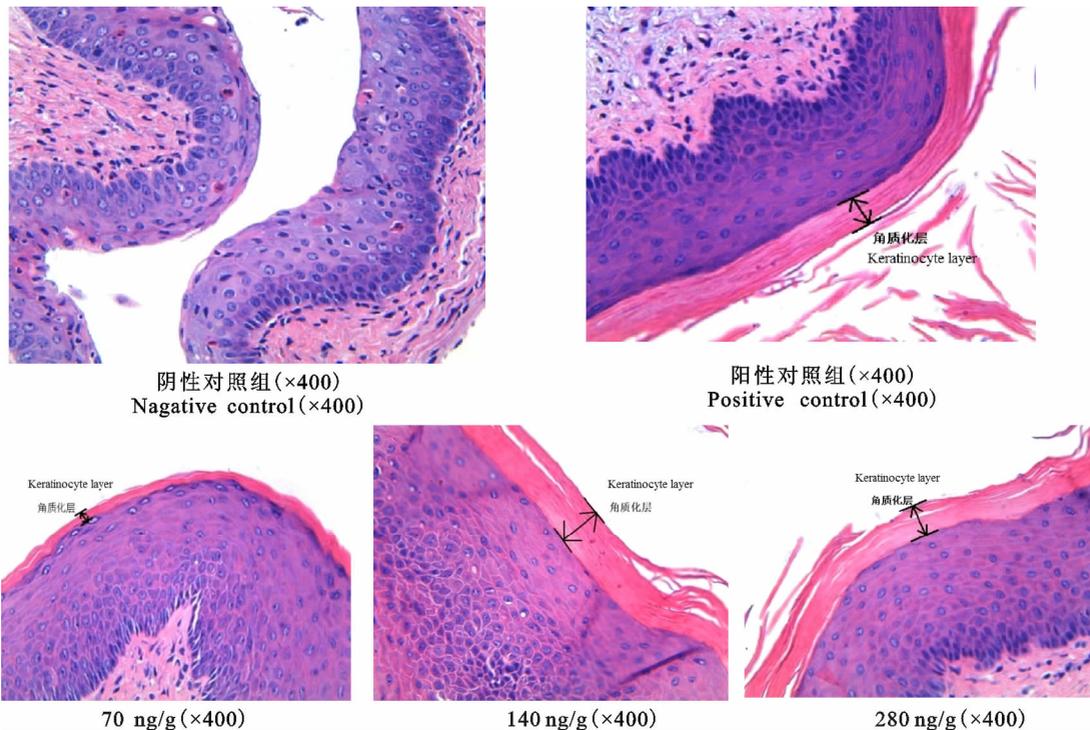


图 5 阴道上皮组织切片图

Fig. 5 Vaginal epithelial tissue slices

并且驴性成熟早,繁殖率比马高,驴体内雌激素的代谢率理论上比孕马高,从其尿液中应该能够提取出更多的雌激素结构类似物。

本研究发现,孕驴尿中的确含有雌激素结构类似物并分离出马烯雌酮,质量浓度约为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,同时发现有少量  $17\alpha$ -马烯雌酮的脱氢化合物和雌二醇的脱水产物,具体结构并不能确定,但已基本证实孕驴尿中同样可以获得雌激素结构类似物的混合物。

本研究中随提取物的质量分数增加,阴道开口率明显呈上升趋势,然而 280  $\text{ng}/\text{g}$  组的药效比 280  $\text{ng}/\text{g}$  的阳性对照组略差,推测可能是由于提取物中除马烯雌酮外,其他雌激素类似物的组成比例不同,协同效应不同。同样可以解释阴道上皮细胞观察到的角质化结果,140  $\text{ng}/\text{g}$  组角质化比阳性对照组更明显。子宫系数也证明 140  $\text{ng}/\text{g}$  和 280  $\text{ng}/\text{g}$  组和阳性对照组均与阴性对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ ),说明孕驴尿中获得的雌激素结构类似物同样具有令小鼠性成熟提前的效果,可以考虑作为替代药物来源。

试验还发现,提取物与阳性药物的药效差异较小,而且 140  $\text{ng}/\text{g}$  组和 280  $\text{ng}/\text{g}$  组药效差异不大,从成本考虑,孕驴尿中提取的雌激素类物质将成为更低廉高效的原料药物。然而从子宫质量数据中也可以看出,提取物的子宫质量低于阳性药物组,从另一方面说明提取物的纯度还有待提高,纯化方法还有待优化,混合物中除马烯雌酮外其他组分的结构还有待进一步确认。

## 4 结 论

发现孕驴尿中存在和孕马尿中相似的成分,尿液原样中含有马烯雌酮 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,此外还检测到其他雌激素结构类似物,具体结构还有待证实。该提取物具使小鼠性成熟明显提高的药效。

### 参考文献 Reference:

- [1] 张兰兰,赵文军,吴雪萍,等. 孕马尿中甾体成分及其活性的研究现状[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(4):354-358. ZHANG L L, ZHAO W J, WU X P, et al. Advance of steroid content analysis of pregnancy mares' s urine[J]. *Natural Product Research and Development*, 2003, 15(4): 354-358.
- [2] 木拉塔力·克力木,高晓黎. 天然雌激素来源-孕马尿研究进展[J]. 西北药学杂志,2009,24(1):76-78. MULATALI · KELIMU, GAO X L. Progress in studies on pregnant mare's urine as the natural sources of estrogens [J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2009, 24(1): 76-78.
- [3] 张云生,王小斌,雷初朝,等. 中国 5 个家驴品种 mtDNA *Cytb* 基因遗传多样性及起源[J]. 西北农业学报,2009,18(6):9-11,38. ZHANG Y SH, WANG X B, LEI CH ZH, et al. MtDNA *Cytb* gene genetic diversity and origin of five donkey breeds in china[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18(6): 9-11, 38.
- [4] 高晓黎,肖建民. 从孕马尿中获取结合雌激素混合物方法及其所用大孔吸附树脂的应用:1803150. A[P],2006-7-19. GAO X L, XIAO J M. The method of obtaining conjugated estrogens from progesterone mare urine applicate macroporous resin:CN,1803150. A[P]. 2006-07-19.
- [5] LOMANS J, LEIVA-PAREDES C. Steroid extraction process from urine sources:US,8349819 [P]. 2013-01-08.
- [6] 姚 军,高晓黎,高 茜,等. 新疆孕马尿中主要结合雌激素定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志,2011,31(8):1471-1474. YAO J, GAO X L, GAO Q, et al. Study on the qualitative and quantitative methods of main conjugated estrogens in pregnant horse urine of Xinjiang[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 31(8): 1471-1474.
- [7] 王 君,周志荣,林少彬. 化妆品中 6 种雌激素的液相色谱串联质谱检测方法研究[J]. 卫生研究,2010,39(3):383-385. WANG J, ZHOU ZH R, LIN SH B. Determination of six kinds of estrogens in cosmetics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2010, 39(3): 383-385.
- [8] ISOBE T, SHIRAIISHI H, YASUDA M, et al. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 984(2): 195-202.
- [9] KERRY M W, ROBERT M B, JOSEPH A H, et al. Mechanism of formation of the major estradiol product ions following collisional activation of the molecular anion in a tandem quadrupole mass spectrometer [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2013, 24(10): 1451-1455.
- [10] 金三九,陈丽萍,楼金芳,等. 复方戊酸雌二醇和炔诺酮对动物雌激素和孕激素活性影响的研究[J]. 中国现代应用药学,2003,20(4):275-276. JIN S J, CHEN L P, LOU J F, et al. Effect of compound estradiol valerate and norethisterone (E-V) on estrogen and progesterone activity in animals [J]. *The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2003, 20(4): 275-276.
- [11] 张丽娟,赵生俊,高晓黎,等. 复方结合雌激素片的动物药效学研究[J]. 新疆医科大学学报,2006,29(5):424-426. ZHANG L J, ZHAO SH J, GAO X L, et al. Study on animal pharmacodynamics of compound conjugated estrogens

## Composition and Activity of Estrogens in Urine of Pregnant Donkey

ZUO Xiaojia, ZHANG Rongyin, CHAI Ting and GAO Weiming

(Institute of Quality Standards for Animal Husbandry, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China)

**Abstract** In order to obtain more estrogens as a source of materials, we collected urine from pregnant donkey with 6 months, extracted estrogens material using DH100 macroporous resin, and analyzed the composition of estrogens, and the extracts were applied to mice, the selected vaginal opening rate, uterus coefficient and keratinization of vagina epithelial tissue were used as parameter to conduct evaluation effect. The results showed that, there were estrogen analogues of equilin in the urine of pregnant donkey with a mass concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The female mice, after treatment with extracts, showed all appeared early vaginal opening, and uterine mass gained significantly, and had obvious keratinization of vaginal epithelial cells, this indicated that the extract had strong activity.

**Key words** Pregnant donkey; Urine; Estrogen analogue; Activity evaluation

**Received** 2018-03-07

**Returned** 2018-05-02

**Foundation item** The Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2016D01B002).

**First author** ZUO Xiaojia, female, research assistant. Research area: development and utilization of livestock by-products. E-mail: 625591197@qq.com

(责任编辑: 顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)