

论著

大豆异黄酮对新生儿期大鼠子宫发育和雌激素受体表达的影响

刘兆平¹ 李 丽² 张晓鹏¹ 张文众¹ 宋 雁¹ 王 伟¹ 崔文明¹ 贾旭东¹ 李 宁¹ 严卫星¹
(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050; 2. 北京市药品检验所,北京 100035)

摘要:目的 研究母鼠暴露于大豆异黄酮对新生儿期大鼠子宫发育及雌激素受体表达的影响。方法 将母鼠及其仔鼠随机分至 6 组,母鼠的大豆异黄酮暴露剂量分别为 0、10、50、100、150、200 mg/kg BW(i. g.),暴露时间为产后第 5 至 10 天(PND 5~10)。在 PND 11 处死雌性仔鼠,称量子宫重量并进行病理学检查,利用 ELISA 方法测定血清雌二醇(E2)和孕酮(P)浓度,利用 RT-PCR 方法测定子宫中雌激素受体(ER)mRNA 的表达。结果 与对照组比较,大豆异黄酮 150、200 mg/kg BW 剂量组仔鼠的子宫/体重比显著增加,子宫内膜增厚的差异有统计学意义($P < 0.05$);血清 E2 浓度明显高于对照组,SIF 150 组升高幅度最大,但各处理组血清 P 浓度呈下降趋势;100、150、200 mg/kg BW 剂量组仔鼠的子宫 ER mRNA 表达降低的差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 大豆异黄酮经母鼠暴露,可刺激雌性仔鼠的子宫发育,这种雌激素样效应至少与该物质对血液性激素和子宫 ER mRNA 表达的调节作用有关。
关键词:异黄酮类;大鼠;动物;新生;子宫;受体;雌激素

Effects of Lactational Exposure to Soy Isoflavones on Uterine Development and Estrogen Receptor Expression in Neonate Rat

LIU Zhao-ping, LI Li, ZHANG Xiao-peng, ZHANG Wen-zhong, SONG Yan, WANG Wei, CUI Wen-ming, JIA Xu-dong, LI Ning, YAN Wei-xing
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

达的数量和种类随培养时间的变化呈现出连续动态的变化过程,因此 MALDI-TOF-MS 图谱中离子峰的数量及丰度也随之发生改变。形态学研究中真菌培养观察的最佳时间为 7 d,本实验结果显示,模式菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 时质谱图质量最好,由此验证形态学研究结果的可靠性。

红曲霉是我国传统的食品发酵用菌,已有上千年的使用历史,但研究发现几乎所有的红曲霉均有产桔青霉素的能力,且同一菌株在不同实验条件下产桔青霉素毒的能力和水平不一^[4,5],从形态学上尚无法将高产毒株与低产毒株区分开。由于到目前为止尚未筛查到非桔青霉素产毒株,因此本研究所有的红曲菌 MALDI-TOF-MS 质谱图代表的是桔青霉素产毒株,这也是从质谱图上不能区分桔青霉素高产毒株与低产毒株的原因所在。对黄曲霉产毒株与非产毒株质谱结果的对比发现,产毒与非产毒株的离子峰分布不同,既有共有离子峰,也有产毒株特

有的离子峰,但每个离子峰代表的蛋白与产毒素能力的相关关系尚需进一步研究证实,这需要借助相关的实验工具和统计软件,对更多的产毒与非产毒株的 MALDI-TOF-MS 图谱进行综合分析评价。

参考文献

- [1] GB/T 4789.28—2003. 食品微生物学检验 染色法、培养基和试剂[S].
- [2] 李凤琴,吴多加,武淑真,等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测与鉴定食品真菌的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(5): 385-393.
- [3] 李凤琴,许赣荣,李玉伟,等. 食品工业用红曲菌株产桔青霉素能力的研究[J]. 卫生研究, 2003, 32(6): 602-606.
- [4] 顾玉梅,许赣荣,陈蕴. 红曲霉菌 9903 发酵工艺条件对色素及桔霉素产生的影响[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 43-47.
- [5] 许赣荣,卢晨,穆晓青. 部分红曲菌菌株产桔霉素的研究[J]. 无锡轻工业大学学报, 2000, 19(1): 58-61.

[收稿日期:2007-09-02]

中图分类号:R15;Q949.32;R379 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)06-0481-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30400350);十一五国家科技支撑计划重大项目(2006BAK02A07)。

作者简介:刘兆平 男 副研究员



Abstract : Objective To study the effects of lactational exposure to soy isoflavones (SIF) on uterine development and estrogen receptor expression in neonate rats. **Methods** 42 maternal rats were randomly divided into six groups with seven dams in each group so that every maternal rat could breed about 8 to 10 litters, which contained 4 to 6 female litters. After postnatal day 5 to 10 (PND 5 ~ 10), maternal rats were gavaged SIF at the doses of 0, 10, 50, 100, 150, 200 mg/kg BW in different treatment groups, respectively. On PND 11, female litters were killed and their uterine were removed for pathological evaluation after weighing. The concentrations of serum estradiol (E2) and progesterone (P) were detected by ELISA, and the expression of estrogen receptor mRNA (ER mRNA) in uterine were measured by RT-PCR. **Results** The ratios of uterine weight to body weight and heights of endometrium at the doses of 150 and 200 mg/kg BW groups were higher than those of control groups ($P < 0.05$). Serum E2 concentrations in rats treated with SIF were higher than those of untreated rats, while P concentrations in treatment groups were lower than those of control group. At the doses of 100, 150 and 200 mg/kg BW groups, ER mRNA expressions decreased significantly when compared with control groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Lactational exposure to soy isoflavones could induce abnormal development of uterus in neonate rats, which mechanisms could be associated with modification of SIF on serum hormone and ER mRNA expression.

Key word: ISOFLAVONES ; Rats; Animals, Newborn; Uterus; Development; Receptors, Estrogen

大豆异黄酮(Soy isoflavones, SIF)是一类广泛存在于膳食中的植物性雌激素,其结构与内源性雌二醇(E2)相似,可以与内源性E2竞争结合于雌激素受体(estrogen receptors, ER),从而发挥雌激素样作用或抗雌激素样作用。虽然SIF的这种双向调节作用对于更年期女性具有一定的健康促进作用^[1],但随着SIF的广泛应用,这种具有内分泌干扰作用的物质对生命早期的潜在毒性已引起了研究者的密切关注^[2]。新生儿期是大鼠性分化的关键阶段,此时接触具有雌激素活性的物质可能会直接影响大鼠生殖系统的正常发育。研究发现,SIF可影响新生儿期大鼠的大脑性分化和卵巢发育^[3],表明SIF是可以干扰影响子宫发育的关键因素。皮下注射染料木素(一种活性最强的SIF)可促进新生鼠子宫增殖^[4]。虽然SIF可通过乳汁分泌,但母鼠接触SIF是否会影响仔鼠的子宫发育,以及这种作用是否与ER的表达有关目前尚不清楚。本研究通过母鼠暴露SIF,研究该物质对仔鼠子宫发育的影响,并初步探讨其可能的ER介导机制。

1 材料与amp;方法

1.1 主要材料与试剂 大豆异黄酮 纯度为80%,染料木素(GEN) + 大豆黄素(DAI) + 黄豆素(GLY) = 13 + 5 + 2,购自四川某公司;不含大豆异黄酮和紫花苜蓿的大鼠饲料(SAFD)由中科院实验动物中心提供;雌二醇(E2)和孕酮(P) ELISA试剂盒购自ADL公司,美国;- actin 5 - 引物 ATGGATGAC GATATCGCTCGG、- actin 3 - 引物 CTCATATCG TCCAGITGGT、ER 5 - 引物 TGACCAACCTGCCAG ACAGG、ER 3 - 引物 GCCTTTGTACTCATG TGCC^[3]由上海生工生物工程技术有限公司合成;DNA 100 bp marker 购自北京莱博生物实验材料研究所;

RNA提取试剂盒购自Takara公司,日本;焦炭酸二乙酯(DEPC)和Trizol购自Sigma公司。

1.2 主要仪器 低温高速离心机 Beckman公司;紫外分光光度计 Beckman公司;光学显微镜 Nikon; 37 恒温箱 天津泰斯特仪器有限公司;高温烘烤箱 江苏南通实验电器厂;酶标仪 Denley Dragon;电泳仪 北京六一仪器厂;PCR仪 PTC - 200, Alpha Unit Block Assembly for PTC DNA Engine Systems;紫外光凝胶成像系统 VILBER LOURMA。

1.3 动物分组与处理 9周龄SD大鼠,适应性饲养3d后,雌雄大鼠1:1进行交配,每日观察阴栓,查出阴栓为受孕0d。将42只孕鼠按体重随机分至6个实验组,各组仔鼠出生后进行数量标准化,使每个母鼠哺乳8~10只仔鼠,其中含有4~6只雌性仔鼠。母鼠在产后5至10d(PND 5~10)灌胃给予SIF,剂量分别为0、10、50、100、150、200 mg/kg BW(记为对照、SIF 10、SIF 50、SIF 100、SIF 150、SIF 200)。试验期间雌性大鼠在妊娠和哺乳期均以不含大豆异黄酮和紫花苜蓿的饲料(SAFD)喂养^[5]。母鼠染毒结束后次日(PND 11)随机处死10只雌性仔鼠(每只母鼠至少提供1只仔鼠)。

1.4 血清激素测定 雌性仔鼠断头取血,分离血清,根据试剂盒说明书利用ELISA方法测定血清E2和P浓度。

1.5 子宫病理学检查 分离仔鼠子宫,称重后置甲醛液中固定,石蜡切片,HE染色,显微镜下观察病理学改变。测量子宫内膜高度,并计子宫腺体数。

1.6 子宫ER mRNA表达的测定 用Trizol试剂提取子宫总RNA,并利用紫外分光光度计分析总RNA的质量, $A_{260}/A_{280} > 1.6$ 。反转录条件为:30 10 min, 48 30 min, 99 5 min, 5 5 min。将反转录产物加入到PCR反应液中,PCR反应条件为:94 2 min,

94 30 s,58 30 s,72 1 min,72 5 min,共35个循环。取5 μl PCR产物与1 μl 6 ×DNA上样缓冲液的混合液,80 V电泳1 h,紫外光下拍照。图像采用 Geopro-analyser 3.1 分析软件进行分析。

1.7 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件进行分析。

2 结果

2.1 对子宫病理学的影响 染毒前后各组仔鼠体

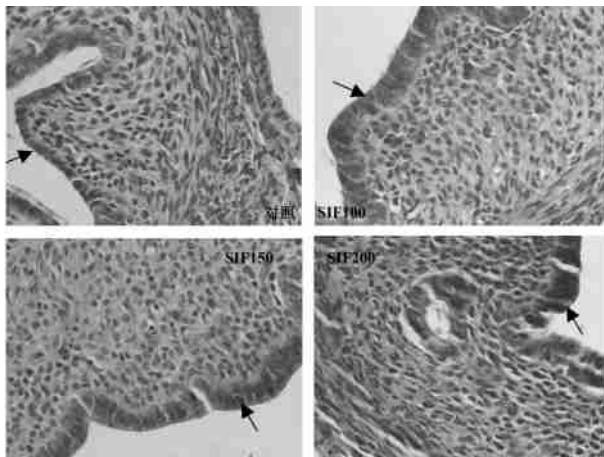
重差异无统计学意义。染毒 6 d 后,SIF 150 和 SIF 200 组的子宫重量以及子宫/体重比显著高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。组织病理学观察发现,对照组及各处理组大鼠的子宫均可见腺管,腺体数 0~4 个,各组无明显差别;间质细胞中等,可见新生血管。但 SIF 100、SIF 150 和 SIF 200 组的子宫内膜明显增厚,呈现异常增生状态(见表 1 和图 1)。

2.2 对血清激素水平的影响 由表 2 可见,SIF 50、SIF 100、SIF 150 和 SIF 200 剂量组的血清 E2 浓度明显

表 1 大豆异黄酮对大鼠子宫指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	PND 4 体重(g)	PND 11 体重(g)	子宫(mg)	子宫/体重($\times 10^{-4}$)	内膜厚度(μm)	腺体数(个)
对照	10	12.13 ±1.08	22.80 ±3.07	7.75 ±0.86	3.40 ±0.51	1.38 ±0.19	1.29 ±1.11
SIF10	10	12.04 ±1.65	23.70 ±1.57	7.50 ±0.69	3.17 ±0.39	1.42 ±0.22	0.57 ±0.79
SIF50	10	12.08 ±1.86	22.85 ±1.60	9.20 ±1.62	4.02 ±0.92	1.35 ±0.21	1.33 ±1.51
SIF100	10	11.30 ±1.66	25.85 ±3.35	10.70 ±1.93	4.14 ±0.89	1.52 ±0.45	1.43 ±1.27
SIF150	10	10.93 ±1.42	25.25 ±6.63	13.10 ±1.56 ^a	5.19 ±0.75 ^a	1.79 ±0.27 ^a	0.88 ±0.64
SIF200	10	12.05 ±1.09	26.30 ±3.51	14.30 ±1.45 ^a	5.44 ±0.67 ^a	1.75 ±0.22 ^a	1.83 ±1.83

注:a:与对照组比较, $P < 0.05$ 。



(HE, ×400, 箭头示子宫内膜)

图 1 各组子宫内膜的代表性病理学改变

高于对照组,其中 SIF 50、SIF 150 和 SIF 200 组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$);但与对照

组比较,各处理组血清 P 浓度呈下降趋势,SIF 100 和 SIF 200 剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 对大鼠子宫 ERmRNA 表达的影响 图 3 为各组子宫组织 β -actin 和 ER 的电泳条带,经灰度分析测定 A 值并进行比值比较,SIF 100、SIF 150、SIF 200 剂量组比值显著低于对照组(表 2)。

表 2 大豆异黄酮对血清激素和子宫 ERmRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	E2 (pg/ml)	P (pg/ml)	A _{ER} /A _{actin}
对照	74.21 ±44.39	6.62 ±1.65	1.12 ±0.24
SIF10	78.69 ±42.40	6.29 ±0.32	1.06 ±0.08
SIF50	285.49 ±146.34 ^b	5.42 ±1.88	0.90 ±0.14
SIF100	179.59 ±10.91	2.98 ±0.71 ^b	0.66 ±0.04 ^b
SIF150	260.53 ±10.56 ^b	5.23 ±0.73	0.78 ±0.14 ^b
SIF200	306.58 ±248.42 ^b	4.71 ±1.18 ^a	0.74 ±0.02 ^b

注:a:与对照组比较, $P < 0.05$;b: $P < 0.01$ 。

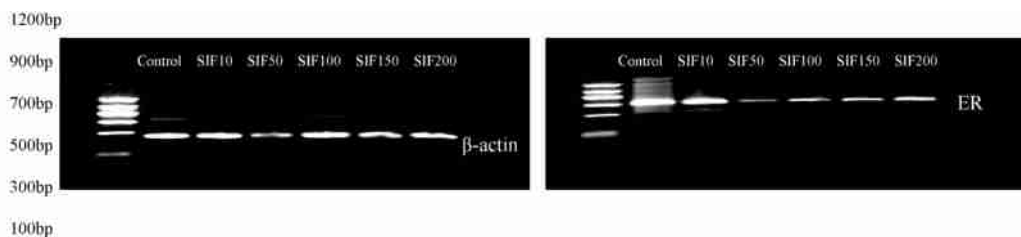


图 2 各剂量组仔鼠子宫 ER mRNA 表达的典型条带

3 讨论

子宫增生是评价外源性物质雌激素效应的重要指标之一。Newbold 等研究发现,在 PND 1~5 时给

小鼠皮下注射 50 mg/kg 的染料木素,可诱导子宫组织增生,表明这种大豆异黄酮在新生鼠体内能表现出雌激素活性^[6]。在 PND 16~20 时给大鼠皮下注

射 500 mg/kg 的染料木素也得出同样的结论^[4]。本研究发现,母鼠在出生后 2~11 d 暴露于高剂量大豆异黄酮(150 和 200 mg/kg BW),其雌性仔鼠的子宫重量亦显著增加,子宫内膜明显增厚。这些结果不仅证实了大豆异黄酮在新生鼠体内的雌激素活性,同时也证实了哺乳期母鼠接触大豆异黄酮,可以导致其雌性仔鼠生殖系统发生异常增生。

大豆异黄酮对整体动物血液中性激素水平的影响目前尚无定论。不同研究者的结论不同主要与受试物暴露时间、期限和剂量有关。本研究结果显示,母鼠暴露大豆异黄酮,其雌性仔鼠的血清 E₂ 水平明显升高,而 P 水平呈下降趋势,该结果与 Lewis 等的研究结果一致^[7]。我们以前的研究证实,大豆异黄酮可促进新生仔鼠卵巢发育^[5],这种作用是否与本研究发现激素调节作用有关,尚需进一步研究证实。另外,大豆异黄酮对性激素的调节还可能与该物质对激素合成酶的调节有关。芳香酶是将孕酮转化成 E₂ 的关键酶,利用大鼠未成熟卵泡进行的体外研究表明大豆异黄酮可增强芳香酶活性,这可能是促进 E₂ 合成进而导致仔鼠血清 E₂ 水平升高的机制之一^[8]。孕酮(P)是由孕烯醇酮转化而来,3-羟类固醇脱氢酶(3-HSD)是其中重要的转化酶。现已发现,大豆异黄酮可抑制卵巢黄体颗粒细胞中孕酮的合成,这种作用与大豆异黄酮对 3-HSD 活性的抑制有关^[9]。本研究中发现的大豆异黄酮组血清 P 水平呈下降趋势,可能与该物质对孕酮合成的抑制作用有关。

雌激素受体(ER)是一类有配体激活的核转录因子,可与相应的激素配体结合并引发一系列激素依赖性生理生化过程。大鼠子宫组织在出生后 4~6 d 时就开始表达 ER。本研究发现,母鼠暴露于大豆异黄酮,其仔鼠子宫 ER mRNA 表达显著降低,表明大豆异黄酮可抑制新生儿期大鼠子宫的 ER 表达。其他研究者利用不同时期的大鼠模型也证实了大豆异黄酮对 ER 表达的抑制作用^[4]。子宫是雌激素的靶器官之一,其生理性和病理性改变与体内激素水平和组织的 ER 表达密切相关,本研究发现高剂量大豆异黄酮暴露可引起仔鼠的子宫增生,其机

制可能涉及两点。第一是该物质直接与子宫组织的 ER 结合,通过发挥雌激素样作用刺激子宫增生。第二是大豆异黄酮通过调节机体的 E₂ 水平和子宫的 ER 表达,间接发挥对子宫增生的促进作用。虽然大豆异黄酮和雌激素对子宫增生的促进作用以及雌激素对 ER mRNA 表达的抑制作用已经明确,但是这三种物质与其他影响或反映子宫增生的指标(如孕激素受体和 pS 2 蛋白)之间的关系还需要进一步地深入研究。

参考文献

- [1] COS P, BRUYNER T D, APERS S, et al. Phytoestrogens: recent developments[J]. *Planta Med*, 2003, 69: 589-599.
- [2] HUMFREY C D N. Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence[J]. *Nat Toxins*, 1998, 6: 51-59.
- [3] KOUKI T, KISHITAKE M, OKAMOTO M, et al. Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis[J]. *Horm Behav*, 2003, 44: 140-145.
- [4] COTRONEO M S, WANG J, ELTOUM I E A, et al. Sex steroid receptor regulation by genistein in the pubertal rat uterus[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 173:135-145.
- [5] 张晓鹏,李丽,张文众,等.大豆异黄酮对不同发育期雌性大鼠生殖系统毒性作用的研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2006, 18(6): 508-514.
- [6] NEWBOLD R R, BANKS E P, BULLOCK B, et al. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 4325-4328.
- [7] LEWIS R W, BROOKS L, MILBURN G M, et al. The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat[J]. *Toxicol Sci*, 2003, 71: 74-83.
- [8] MYLLYMAKI S, HAAVISTO T, VAINIO M, et al. In vitro effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles[J]. *Toxicol and Applied Pharmacol*, 2005, 204: 69-80.
- [9] LE BAIL J C, CHAMPAVIER Y, CHULIA A J, et al. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 β and 17 α hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells[J]. *Life Science*, 2000, 66: 1281-1291.

[收稿日期:2007-06-02]

中图分类号:R15;Q946.885;Q954.592 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)06-0488-04