

论著

雌激素低下动物模型研究

张晓鹏 刘兆平 向 钱 王 伟 张 馨 李 宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 研究雌激素低下大鼠模型对更年期综合征的模拟程度,为建立我国“辅助改善更年期综合征的功能学评价方法”提供依据。方法 以雌二醇(0.2 mg/kg)为阳性物,用大鼠建立雌激素低下模型,测定大鼠尾温和血清雌二醇、卵泡刺激素、黄体生成素、 β -内啡肽的浓度,观察这些指标对更年期综合征相应指标的模拟程度,并用不同剂量的大豆异黄酮(50、100、200 mg/kg)对该模型进行验证。结果 试验期间雌激素低下模型组大鼠尾温显著升高,雌二醇和不同剂量大豆异黄酮均不同程度地降低大鼠尾温。试验结束时,雌激素低下模型组大鼠雌激素水平显著低于对照组、雌二醇组和各剂量大豆异黄酮组;雌激素低下模型组大鼠黄体生成素水平显著升高,雌二醇组和高剂量大豆异黄酮显著降低血清黄体生成素水平;雌激素低下模型组血清卵泡刺激素的水平显著高于其他各组,而 β -内啡肽的水平显著低于其他各组。结论 雌激素低下大鼠模型能够较好地模拟更年期综合征,大豆异黄酮能够一定程度地改善该模型造成的更年期综合征。

关键词:大豆异黄酮;去卵巢;雌激素低下模型;雌二醇;卵泡刺激素;黄体生成素; β -内啡肽;更年期综合征
中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)02-0097-04

Ovariectomized Rats Model for Climacteric Syndrome

ZHANG Xiao-peng, LIU Zhao-ping, XIANG Qian, WANG Wei, ZHANG Xin, LI Ning

(National Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To investigate the modelling of ovariectomized rats for climacteric syndrome, in order to provide scientific basis for the functional assessment of products by which assist in improving climacteric syndrome. **Method** Seventy two rats were randomly divided into six groups of 12 rats each. The sham-operated (SH) control group was given water (ig), another five ovariectomized groups were dosed with water (ig) (OVX group), 0.2 mg/kg estradiol (ip) and 50, 100, 200 mg/kg soybean isoflavones (ig) respectively. All rats were fed with soy-free chow. Tail temperature and blood E_2 , FSH, LH and β -EP of all rats were measured. **Results** The tail temperature of OVX group was significantly higher than SH group. The tail temperature of estradiol group and isoflavones groups was lower than SH group. Blood estradiol of OVX group were significantly lower than other groups. LH of OVX group was significantly higher than SH group and LH of estradiol group and 200 mg/kg soybean isoflavones was lower than SH group. FSH and β -EP of OVX group was significantly higher and lower than other groups respectively. **Conclusion** Ovariectomized rat model can be used as a simulator for climacteric syndrome, and the signs of climacteric syndrome in this model can be improved by soybean isoflavones.

Key words: Soybean Isoflavones; Ovariectomized; Ovariectomized Rats Model; E_2 ; FSH; β -EP; Climacteric Syndrome

更年期综合征(climacteric syndrome, CS)是指在妇女绝经前后一段时间内发生的涉及到神经内分泌、心血管、泌尿生殖及体内代谢的一系列症状和体征。流行病学调查显示,在绝经女性中有1/2以上患有不同程度的更年期症状,其中有近一半的患者

因症状严重需就诊治疗。更年期症状或疾病严重影响了更年期女性的身心健康和生活质量,还给家庭和社会带来沉重的经济负担。寻找有效的措施来预防和与治疗与更年期有关的症状或疾病,改善更年期女性的健康,已成为需要迫切解决的问题。尽管雌激素替代疗法能够较大程度地缓解更年期综合征症状^[1],但由于雌激素替代治疗可能与乳腺癌和子宫内膜癌的发生风险升高有关^[2,3],因此有必要寻找能改善更年期症状的其他有效途径,如保健食品。由于我国此前一直未制定和建立改善更年期综合征保健食品的功能学评价方法,因此研究能够良好模

收稿日期:2010-01-06

基金项目:国家“十一五”科技攻关重大项目(2006BAK02A07)

作者简介:张晓鹏 女 硕士 助理研究员 研究方向为食品毒理

E-mail: xiaopengbird@yahoo.com

通信作者:李 宁 女 研究员 博士生导师 研究方向为食品毒理

E-mail: lining65@yahoo.com

拟更年期综合征的动物模型,对于筛选此类保健食品具有重要意义。本研究前期工作发现,雌激素低下模型良好地模拟了更年期潮热症状^[4],现进行更深入的研究——选择不同剂量的大豆异黄酮并通过更多的指标对模型进行验证,为建立我国“辅助改善更年期综合征的功能学评价方法”提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂 大豆异黄酮(广汉市生化制品有限公司),苯甲酸雌二醇注射液(上海通用药业),戊巴比妥钠(美国 MERCK),ELISA 试剂盒(德国 R-Biopharm)。

1.1.2 仪器 温度记录仪(北京京师新雅 SNDC),低温离心机(德国 BECKMAN GS15R),酶标仪(美国 Bio-Tek Synergy™ HT)

1.2 动物和处理

1.2.1 试验动物 72 只健康成年雌性 SD 大鼠(SPF 级)购于北京维通利华实验动物技术有限公司,体重 300 g 左右,动物生产合格证号为 SCXK(京)2002-2003;饲养于首都医科大学附属北京口腔医院 SPF 级动物房,动物使用合格证号为 SYXK(京)2005-0031,本试验经中国疾病预防控制中心营养与食品安全所医学伦理委员会批准。温度 20~25℃,湿度 40%~70%,12 h 明暗交替,换气次数为 10~20 次/小时。

1.2.2 剂量和分组 大鼠按体重随机分为 6 组,分别为假手术对照组、手术对照组、雌二醇组和大豆异黄酮低、中、高剂量组,每组 12 只。两个对照组灌胃给予蒸馏水,雌二醇组皮下注射 0.2 mg/kg 雌二醇,3 个大豆异黄酮组分别灌胃给予 50、100、200 mg/kg 的大豆异黄酮。假手术对照组大鼠行卵巢摘除

术^[5]但不切除卵巢,仅摘取 2~3g 卵巢周围脂肪,其他各组行卵巢摘除术并摘除卵巢。各组大鼠从术后第 4 天开始给予相应的受试物,持续 13 周。试验期间所有大鼠给予不含大豆异黄酮和紫花苜蓿的大鼠饲料^[6]。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 尾部皮肤温度 将大鼠固定于大鼠固定器内,用胶带将温度记录仪的探头固定在大鼠尾尖距根部约 1 cm 的位置。尾部皮肤温度(尾温)通过温度记录仪的显示屏显示并记录于存储器上^[7]。实施手术前随机抽取 10 只大鼠测定尾温作为基线温度,术后每周测定各组尾温一次,每次持续时间为 45 min。

1.3.2 血清雌二醇(estradiol, E₂)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和 β-内啡肽(β-endorphin, β-EP)浓度测定 分别于试验 0、5、9 周取各组大鼠血清测定雌二醇和黄体生成素的浓度。实验结束后,取各组大鼠血清测定雌二醇、卵泡刺激素、黄体生成素和 β-内啡肽浓度。

1.4 统计方法

用 Excel 计算各组大鼠不同时间点尾温对基础体温的变化,其他试验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,用 PEMS 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 雌激素低下模型相关各组大鼠尾部温度变化

由图 1 可见,各组大鼠术后尾温都随着时间的延长逐渐升高,到术后 3 周达到最高。其中对照组大鼠尾温升高幅度最大,其次为大豆异黄酮组,雌二醇组最低。从术后 4 周开始各组大鼠尾温均逐渐下降,从第 6 周开始趋于平稳。第 3 周雌二醇组和大豆异黄酮组大

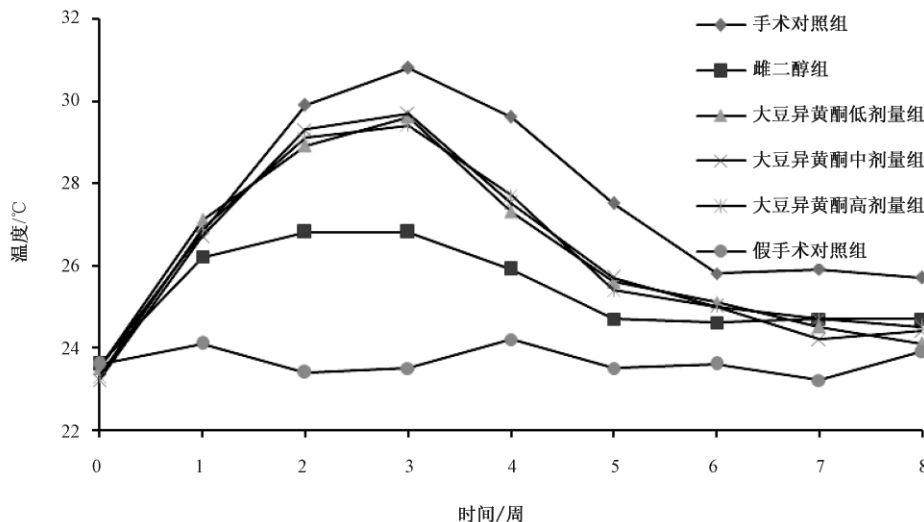


图 1 雌激素低下模型相关各组大鼠尾部温度变化

鼠尾温的升高幅度低于对照组,差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠不同时间段血清雌二醇浓度的变化

由表1可见,试验第5周各组的血清雌二醇水平开始出现变化,第5周手术对照组和大豆异黄酮的中、低剂量组的血清雌二醇浓度低于假手术组,差异有显著性($P < 0.05$),雌二醇组和大豆异黄酮高剂量组的雌二醇浓度高于手术对照组,但未见显著性差异。试验第9周和第13周除手术对照组血清雌二醇水平低于其他各组,差异有显著性外($P <$

0.05),其他各组之间差异没有显著性,但假手术对照组的水平略高于雌二醇组和大豆异黄酮高、中、低组。

2.3 各组大鼠不同时间段血清黄体生成素浓度的变化

由表2可见,试验第13周各组大鼠的血清黄体生成素水平出现差异,假手术组、雌二醇组和大豆异黄酮高剂量组的血清黄体生成素水平显著低于手术对照组,差异有显著性($P < 0.05$),其他各组之间均差异没有显著性。

表1 各组大鼠不同时间段血清雌二醇浓度的变化(pg/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0周	5周	9周	13周
假手术对照组	12	126.6 ± 18.7	139.7 ± 19.3	167.1 ± 30.1 ^b	172.4 ± 25.8 ^b
手术对照组	12	124.5 ± 19.4	108.6 ± 26.4 ^a	121.7 ± 18.2	109.2 ± 18.6
雌二醇组	12	131.5 ± 18.4	122.0 ± 21.1	157.4 ± 19.2 ^b	146.9 ± 18.2 ^b
大豆异黄酮低剂量组	12	125.0 ± 26.5	102.1 ± 19.0 ^a	160.5 ± 21.4 ^b	147.2 ± 22.8 ^b
大豆异黄酮中剂量组	12	130.2 ± 32.2	109.8 ± 21.1 ^a	152.2 ± 32.4 ^b	143.4 ± 18.5 ^b
大豆异黄酮高剂量组	12	121.2 ± 26.2	125.8 ± 19.7	153.8 ± 27.6 ^b	159.7 ± 22.9 ^b

注:^a与假手术组比较 $P < 0.05$, ^b与手术对照组比较 $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠不同时间段血清黄体生成素浓度的变化(ng/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0周	5周	9周	13周
假手术组	12	10.7 ± 3.5	12.5 ± 1.9	10.6 ± 2.9	12.8 ± 2.0 ^a
手术对照组	12	13.6 ± 2.4	11.4 ± 1.2	13.4 ± 3.7	15.3 ± 2.1
雌二醇组	12	10.1 ± 3.2	11.7 ± 2.0	11.4 ± 3.4	10.9 ± 1.7 ^a
大豆异黄酮低剂量组	12	11.8 ± 1.8	12.6 ± 1.7	12.6 ± 4.6	12.5 ± 3.3
大豆异黄酮中剂量组	12	12.9 ± 3.6	11.8 ± 4.0	13.2 ± 3.6	12.3 ± 2.4
大豆异黄酮高剂量组	12	12.0 ± 4.5	10.1 ± 1.5	10.2 ± 3.9	11.3 ± 1.8 ^a

注:^a与手术对照组比较 $P < 0.05$ 。

2.4 试验末期各组大鼠血清卵泡刺激素和 β -内啡肽浓度

由表3可见,试验末期手术对照组血清卵泡刺激素的水平高于其他各组,而 β -内啡肽的水平低于其他各组,差异有显著性($P < 0.05$)。

表3 试验末期各组大鼠血清卵泡刺激素和 β -内啡肽浓度(ng/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	卵泡刺激素	β -内啡肽
假手术组	12	7.4 ± 1.3 ^a	22.4 ± 7.0 ^a
手术对照组	12	9.8 ± 1.3	15.0 ± 2.0
雌二醇组	12	7.0 ± 1.9 ^a	23.1 ± 4.3 ^a
大豆异黄酮低剂量组	12	7.8 ± 2.0 ^a	19.4 ± 3.2 ^a
大豆异黄酮中剂量组	12	7.7 ± 2.1 ^a	20.8 ± 2.4 ^a
大豆异黄酮高剂量组	12	7.6 ± 1.4 ^a	20.0 ± 2.0 ^a

注:^a与手术对照组比较 $P < 0.05$ 。

3 讨论

本课题的前期研究(通过检测雌激素低下模型去卵巢前后尾温的变化,以及这种温度变化能够被雌激素和大豆异黄酮改善的程度)表明,雌激素低下模型很好地模拟了妇女更年期综合征后的潮热症

状;本课题除了温度指标外,还从神经内分泌角度进一步研究雌激素低下模型对更年期综合征的模拟程度。女性进入更年期后,卵巢功能开始减退,通过机体复杂的反馈和负反馈调节,引起下丘脑-垂体-性腺轴机能发生改变^[8],该轴分泌的涉及神经-内分泌-免疫整个网络的许多具有重要生理活性的激素和神经递质、细胞因子都会发生不同程度的紊乱^[9,10]。本研究除了温度指标外,选择比较具有代表性的 E_2 、FSH、LH 和 β -EP 作为观察终点。

潮热是与绝经关系最密切、发生率最高、对绝经女性生活质量影响最大的症状。本课题在前期的潮热模型筛选研究中发现雌激素低下模型较好地模拟了更年期的潮热症状。本实验用不同剂量的大豆异黄酮对该模型进行验证时发现,各剂量(50、100、200 mg/kg)的大豆异黄酮均在一定程度上缓解了大鼠尾温的升高。

E_2 是由女性卵巢成熟滤泡分泌的一种雌激素,绝经后卵泡数目减少,功能衰退,雌激素水平下降^[8]。本研究中,手术对照组大鼠切除卵巢后第5周,血清 E_2 水平显著低于假手术对照组,而且在整

个实验期中都维持较低的水平,而皮下注射的外源性 E₂ 在第 5 周已经能够缓解内源性雌激素的不足,并在整个实验期持续维持血清 E₂ 的较高水平。这个结果表明,雌激素低下模型很好地模拟了临床妇女更年期的特征并验证了雌激素替代作用的疗效。第 5 周时,大豆异黄酮高剂量组的血清 E₂ 水平与假手术组和 E₂ 对照组相当,第 9 周和第 13 周大豆异黄酮各剂量组的血清 E₂ 水平均高于手术对照组,但都没有剂量-反应关系,表明在该模型下一定剂量(50、100、200 mg/kg)的大豆异黄酮能够升高雌二醇的水平。

作为绝经后卵巢功能衰退、雌激素水平下降的一种代偿,促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)的分泌增加^[11],进而引起 FSH 和 LH 的分泌增加,其中首先发生变化的是 FSH,而 LH 一开始并无明显变化,但绝经后 2~3 年, LH 水平明显上升。有的学者认为,FSH 上升和雌激素的下降可作为早期卵巢功能衰退的早期指标^[12]。绝经后下丘脑-垂体-性腺轴结构和功能的改变还导致下丘脑某些神经肽及其基因表达发生变化^[13]。在所有的神经肽中,β-EP 被认为与更年期症状尤其是潮热的关系最密切。该物质由下丘脑和垂体合成,具有抑制垂体促性腺激素释放、调节体温等作用^[14]。Abel 等^[15]根据大量研究结果推测,女性绝经后下丘脑 β-EP 神经元活性下降。本研究中第 13 周手术对照组的 FSH 和 LH 水平均显著高于其他各组,β-EP 水平显著低于其他各组,但其他各组之间差异没有显著性。该结果表明雌激素低下模型能够较好地模拟绝经后这两种激素和神经肽的分泌状态,也表明在该模型下一定剂量(50、100、200 mg/kg)的大豆异黄酮能够改善 FSH、LH 和 β-EP 的水平。

综上所述,在本试验条件下雌激素模型较好地模拟了更年期综合征,大豆异黄酮能够在一定程度上改善此模型的更年期综合征,本试验条件下的功效剂量为 50 mg/kg。但一个成熟模型的建立需要反复的验证,尤其是要把这个模型列入我国保健食品功能学评价和检验方法时,应该采用不同的物质并在不同的试验环境中进行验证,因此该模型的最终确立还需要进行很多的后续工作。

参考文献

[1] BAERUG U, WINGE T, NORDLAND G, et al. Do combinations of 1mg estradiol and low doses of NETA effectively control menopausal symptoms? [J]. *Climacteric*, 1998, 1: 219-228.

[2] GRADY D, GEBRETSADIK T, KERLIKOWSKE K, et al. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a metaanalysis [J]. *Obstet Gynecol*, 1995, 85:304-313.

[3] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer [J]. *Lancet*, 1997, 350:1047-1059.

[4] 张晓鹏,刘兆平,向钱,等. 两种更年期妇女潮热动物模型的对比研究[J]. *卫生研究*, 2010, 39(1): 110-111.

[5] 洪志勇,刘爱平. 大鼠骨质疏松模型建立 II. 卵巢切除术法[J]. *中国实验动物学杂志*, 1994, 4(2): 95-96.

[6] 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): 536-541.

[7] PAN Yuan-long, ANTHONY M, BINNS M, et al. A comparison of oral micronized estradiol with soy phytoestrogen effects on tail temperatures of ovariectomized rats [J]. *Menopause*, 2001, 8(3): 171-174.

[8] GENAZZANI A, SPINETTI A, GALLO R, et al. Menopause and the central nervous system: intervention options [J]. *Maturitas*, 1999, 31(2): 103-110.

[9] OVERLIE I, MOEN M, MORKRID L, et al. The endocrine transition around menopause—a five years prospective study with profiles of gonadotropines, estrogens, androgens and SHBG among healthy women [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1999, 78(7): 642-647.

[10] 叶雪清. 更年期综合征——神经-内分泌-免疫网络的变化[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1996.

[11] 林守清. 绝经过渡期和绝经后疾病[M]//史铁鑫. 协和内分泌和代谢学, 北京: 科学出版社, 1999: 981-1003.

[12] BURGER H. The endocrinology of the menopause [J]. *Maturitas*, 1996, 23(2): 129-136.

[13] RANCE N, USWANDI S. Gonadotropin-releasing hormone gene expression is increased in the medial hypothalamus of postmenopausal women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 3540-3546.

[14] 吕肖峰. 更年期潮热与内源性鸦片肽[J]. *国外医学妇产科分册*, 1992(2): 65-68.

[15] ABEL T, RANCE N. Proopiomelanocortin gene expression is decreased in the infundibular nucleus of postmenopausal women [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 69(2): 202-208.