

综述

染料木黄酮的雌性生殖毒性及其对卵母细胞成熟的影响

张岭,综述;王茵,审校

(浙江省医学科学院,浙江 杭州 310013)

摘要:染料木黄酮(GEN)是一种植物雌激素,属大豆异黄酮,由染料木苷经肠道细菌和肠细胞酶代谢活化而形成,具有内分泌干扰作用。其生殖毒性引起国内外学者的广泛关注,过量摄入 GEN 可引起动物(包括雌性与雄性)生殖系统结构与功能异常,但 GEN 的雌性生殖毒性作用机制尚不清楚。卵母细胞是维持正常雌性生殖的生理基础,是外源性化学毒性作用的潜在靶点。有研究表明,染料木黄酮可干扰哺乳动物卵母细胞的成熟过程,这可能是染料木黄酮生殖毒性的作用机制之一。不过,目前 GEN 影响卵母细胞成熟的机制尚不明确,有待进一步阐明。

关键词:染料木黄酮;植物雌激素;生殖毒性;卵母细胞;作用机制

中图分类号:R15;Q492 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)03-0285-04

Reproductive toxicity of genistein and Its effect on oocyte maturation

Zhang Ling, Wang Yin

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang Hangzhou 310013, China)

Abstract: The reproductive toxicity of genistein has attracted a certain attention from researchers worldwide in recent years. Excessive intake of genistein may result in abnormal structure and function of reproductive system in animals (including male and female). However, the mechanism on which genistein impact on female reproductive system remains inexplicit. Oocyte, the physiological foundation to the normal reproductive function, has been considered as a potent target for exogenous chemicals. It is shown that genistein can interfere with the maturation process of mammalian oocytes, which may be one of the mechanisms of genistein's reproductive toxicity.

Key words: Genistein; phytoestrogen; reproductive toxicity; oocyte maturation; mechanism of action

生殖系统结构和功能的完整健全直接关系到种群的生存和繁衍。环境内分泌干扰物可通过不同方式/途径干扰体内性激素的合成、分泌和作用,对动物和人体的生殖功能造成较严重损害,故研究内分泌干扰物对生殖系统结构和功能的影响有着重要意义。植物雌激素作为一种来自天然食物的内分泌干扰物,由于人们认识较晚,其很多毒性尚不太清楚。

1 染料木黄酮及其生殖毒性

1.1 染料木黄酮

染料木黄酮(GEN)是人们接触较多的一种植

物雌激素,属大豆异黄酮,由染料木苷经肠道细菌和肠细胞酶代谢活化而成。GEN 化学名为 4,5,7-三羟基异黄酮,由于其结构与雌激素相似,能与雌激素受体结合,产生雌激素样效应,故又归类于植物雌激素。GEN 在体内主要以硫酸盐和葡萄糖醛酸盐形式存在,并可通过血胎屏障进入胚胎中。GEN 是大豆异黄酮中活性最高的功能成分,具有多种生理功能,可抑制肿瘤生长、降低动脉粥样硬化危险性、预防骨质疏松、抗氧化损伤^[1-5]。大豆及其制品是膳食 GEN 的主要来源,1 g 大豆所含 GEN 超过 500 μg 。因此,习惯食用大豆及其制品的亚洲人群 GEN 摄入量较高,每天可达 1 mg/kg。大豆蛋白婴儿配方奶粉则可使 GEN 的摄入水平达到每天 6 ~ 11 mg/kg^[6]。

1.2 GEN 的雌性生殖毒性

有研究表明,GEN 除了具有保健功效外,还具有促癌、致突变性及免疫损伤等负面效应^[7-9]。另有研究表明,GEN 可对哺乳动物的雌性生殖功能产生不良影响^[9-11]。GEN 可影响染毒动物的卵巢分化,导致卵巢和子宫的病理学异常,干扰卵巢功能和动情周期,导致动物生育力降低甚至

收稿日期:2013-03-12

基金项目:国家自然科学基金(81001260);浙江省自然科学基金(Y2100794);浙江省医药卫生平台重点资助计划(2011ZDA001);浙江省科技计划厅项目(2009R50028、2011F20038、2011R09028-09);浙江省 151 人才培养项目;浙江省营养学医学支撑学科建设(11-ZC03)。

作者简介:张岭 副研究员 研究方向为植物化学物与人体健康研究
E-mail:zhangling8107@126.com

通信作者:王茵 研究员 研究方向为植物化学的生物活性研究
E-mail:wy3333@163.com

不孕^[9-11]。

由于新生儿期是 GEN 高暴露期,有关 GEN 雌性生殖毒性的研究大多关注新生儿期给药对雌性生殖系统的干扰作用。新生小鼠(出生后 1~4 d)暴露生理剂量(5 mg/kg BW)的 GEN 会干扰卵巢分化和卵泡生成,卵巢中会形成大量多卵卵泡(MOF);进一步研究显示,GEN 对卵泡生成及细胞分化的干扰作用是通过雌激素受体途径来实现的。在 ER α 基因敲除小鼠中,GEN 诱导的 MOF 仍存在,而在 ER β 基因敲除小鼠中,MOF 现象消失,提示 GEN 诱导的 MOF 现象是由 ER β 信号介导的^[10]。同时,新生儿期染毒的动物在成年后会伴有生育力降低甚至完全丧失,这可能与 MOF 中卵母细胞质量相对于正常卵泡明显降低有关^[11]。此外,研究还表明,小鼠在新生儿期接触高剂量的 GEN 后,直到 6 个月后才能出现首次动情周期^[12];新生儿期 GEN 暴露还可干扰性成熟小鼠的动情周期,明显延长周期长度^[13]。

目前,针对成年动物的研究较少,有限的研究表明,成熟动物在 GEN 染毒后,生育力显著降低^[14]。来自人体的报道也表明,GEN 可能会损害女性的生育能力^[15]。此外,小鼠暴露 GEN 会导致子宫重量降低^[16]。

总之,GEN 具有比较明确的雌性生殖毒性,遗憾的是迄今为止,由于生殖与发育这一复杂的生理过程是受严密的遗传调控的,还没哪种生殖/发育毒物的作用机制是完全明了的。

2 GEN 对卵母细胞成熟的影响及可能的作用机制

2.1 GEN 对卵母细胞成熟的影响

健康卵子(成熟卵母细胞)是维持正常受精、胚胎形成和发育的物质基础。卵母细胞功能或结构异常可能导致两种后果:①细胞不能受精,或受精后无法着床,导致不孕;②异常传给子代,导致流产、畸形、生长发育迟缓等。卵母细胞的数量在出生前即已确定,以后会逐年减少;另外,成熟卵子形成是一个极其漫长过程,一般要数年甚至数十年。这就决定卵母细胞对外界因素的敏感性较高。机体所处环境中的多种因素均可干扰健康卵子的形成,尤其是环境内分泌干扰物,如 2,4-二氯苯氧乙酸、双酚 A、甲氧氯、林丹、镉等^[17]。由此可见,卵母细胞是外源性化学物引起生殖毒性的一个重要靶点。正常情况下,哺乳动物卵母细胞会停滞于第一次减数分裂前期,即生发泡(GV)期。在黄体生成素(LH)生理峰的刺激下,部分细胞可恢复减数分裂,生发泡破裂(GVBD),染色质凝集,并形成第一

次减数分裂中期相(M I 期)纺锤体,然后细胞发生不对称分裂,形成次级卵母细胞并释放第一极体(PB1),而后细胞迅速进入第二次减数分裂,最终停滞在第二次减数分裂中期(M II 期)。从卵母细胞恢复减数分裂至 M II 期阻滞形成这一过程称为成熟过程^[18]。

有研究表明,GEN 可干扰卵母细胞的生成和成熟过程^[19-20]。GEN 可干扰小鼠卵巢分化功能,抑制卵原细胞巢的破裂,促进多卵卵泡的形成^[21]。GEN 可抑制小鼠卵母细胞的体外成熟启动;若在 GVBD 后进行染毒,GEN 可抑制 PB1 排出和 M II 期细胞的皮质颗粒释放^[20]。GEN 对卵母细胞成熟抑制作用与卵母细胞成熟生理抑制剂次黄嘌呤(IBMx)的作用相似。研究还表明^[20],用 GEN 对小鼠进行染毒后,体外培养成熟的卵母细胞的受精率也明显降低。此外,该研究中 GEN 的最高剂量不超过每天 1.0 mg/kg^[20]。不过,以上研究的成熟过程均是在体外条件下进行的,无法真实反映体内成熟过程;且纺锤体、染色体、皮质颗粒以及重要调节分子是否也受 GEN 的影响,尚未见报道。

2.2 GEN 对卵母细胞成熟影响可能的作用机制

卵泡生理学研究结果表明,雌激素及其受体是卵母细胞成熟的一个生理抑制信号^[22]。目前,已有研究表明人工合成的雌激素类物质可影响卵母细胞的成熟,可干扰成熟过程中纺锤体、染色体等亚细胞器的定位^[17,23],提示雌激素样活性或雌激素受体可能介导外源性化学物对卵母细胞成熟的影响。雌激素是由卵巢颗粒细胞分泌的甾体类激素,可分布于血液和卵泡中。GEN 可能干扰体内雌激素水平。有研究表明,生理剂量(0.5~50 mg/kg BW) GEN 处理新生小鼠后,青春期前后小鼠的血浆雌激素水平未见变化^[6]。但体外卵泡培养发现,低剂量(10^{-7} mol/L)的 GEN 可降低卵泡内雌激素水平,而高剂量(10^{-6} mol/L)的 GEN 则可升高雌激素水平^[24]。此外,人体在摄入 GEN 后,血浆中 GEN 的绝对水平远高于雌激素,故 GEN 在体内的雌激素样活性也不容忽视。

雌激素受体(ER)是一种核受体,可分 α 和 β 两种亚型,其中 ER α 广泛表达于机体组织中,而 ER β 只特异性地表达于乳腺、卵巢等组织中。在卵泡中,ER α 较多表达于卵母细胞中,而 ER β 较多表达于颗粒细胞中^[25]。体外研究表明,GEN 与两种 ER 亚型均有一定的亲合力^[26]。与 ER α 相比,GEN 与 ER β 的结合力相对较强。有研究发现,GEN 与精子细胞的 ER 结合后,可调节多种基因的表

达^[27]。有研究表明,用 GEN 处理小鼠后,卵泡膜细胞中的 ER α 表达明显升高,而将 ER β 基因敲除可防止 GEN 诱导的多卵卵泡形成^[10],提示两种 ER 在 GEN 影响卵母细胞发育中有重要作用,ER 的改变可能对卵母细胞成熟产生影响。通过上面分析可见,GEN 可干扰卵泡内雌激素稳态,影响 ER 的表达,这可能是 GEN 抑制卵母细胞成熟的机制之一。不过,这点尚需要我们在未来的研究中作进一步验证。

综上所述,GEN 具有明确的雌性生殖毒性,可降低雌性动物的生育力。其中,抑制卵母细胞成熟,可能是 GEN 发挥雌性生殖毒性的途径之一,不过,目前 GEN 影响卵母细胞成熟的机制尚不明确,有待进一步阐明。

参考文献

- [1] Dang Z C. Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action [J]. *Obes Rev*, 2009, 10 (3): 342-349.
- [2] SI H, LIU D. Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14 (24): 2581-2589.
- [3] Yamaguchi M. Nutritional factors and bone homeostasis: synergistic effect with zinc and genistein in osteogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 366 (1-2): 201-221.
- [4] Sugiura K, SU Y Q, LI Q, et al. Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15 [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24 (12): 2303-2314.
- [5] 何玲玲,封锦芳,肖荣,等.染料木黄酮对 β 淀粉样肽 25-35 介导的 PC12 细胞凋亡过程相关基因表达的影响 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23 (2): 100-104.
- [6] Jefferson W N, Williams C J. Circulating levels of genistein in the neonate, apart from dose and route, predict future adverse female reproductive outcomes [J]. *Reprod Toxicol*, 2011, 31 (3): 272-279.
- [7] Klein C B, King A A. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224 (1): 1-11.
- [8] Yellayi S, Naaz A, Szczykowski M A, et al. The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (11): 7616-7621.
- [9] Jefferson W N, Padilla-Banks E, Newbold R R. Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein [J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 23 (3): 308-316.
- [10] Jefferson W N, Couse J F, Padilla-Banks E, et al. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67 (4): 1285-1296.
- [11] Jefferson W N, Padilla-Banks E, Newbold R R. Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: genistein as an example [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51 (7): 832-844.
- [12] Jefferson W N, Doerge D, Padilla-Banks E, et al. Oral exposure to genistein, the glycosylated form of genistein, during neonatal life adversely affects the female reproductive system [J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117 (12): 1883-1889.
- [13] 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 (2): 140-145.
- [14] Seppen J. A diet containing the soy phytoestrogen genistein causes infertility in female rats partially deficient in UDP glucuronyltransferase [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264 (3): 335-342.
- [15] Chandraredy A, Muneyirci-Delale O, McFarlane S I, et al. Adverse effects of phytoestrogens on reproductive health: a report of three cases [J]. *Complement Ther Clin Pract*, 2008, 14 (2): 132-135.
- [16] Power K A, Ward W E, Chen J M, et al. Genistein alone and in combination with the mammalian lignans enterolactone and enterodiol induce estrogenic effects on bone and uterus in a postmenopausal breast cancer mouse model [J]. *Bone*, 2006, 39 (1): 117-124.
- [17] 张岭,夏蕾,吴坤.外源性化学物在卵母细胞成熟中的作用 [J]. *疾病控制杂志*, 2006, 10 (6): 597-599.
- [18] Schatten H, Sun Q Y. Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78 (10-11): 757-768.
- [19] Jung T, Fulka J, Lee C, et al. Effects of the protein phosphorylation inhibitor genistein on maturation of pig oocytes in vitro [J]. *J Reprod Fertil*, 1993, 98 (2): 529-535.
- [20] Chan W H. Impact of genistein on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development [J]. *Reprod Toxicol*, 2009, 28 (1): 52-58.
- [21] Jefferson W N, Padilla-Banks E, Goulding E H, et al. Neonatal exposure to genistein disrupts ability of female mouse reproductive tract to support preimplantation embryo development and implantation [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80 (3): 425-431.
- [22] Tyler J P P, Collins W P. The effect of progesterone and estradiol on gonadotropin-induced oocyte maturation in isolated ovarian follicles from mice [J]. *Gamete Research*, 1980, 3 (1): 59-66.
- [23] Eichenlaub-Ritter U, Winterscheidt U, Vogt E, et al. 2-methoxyestradiol induces spindle aberrations, chromosome congression failure, and nondisjunction in mouse oocytes [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76 (5): 784-793.
- [24] 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 Appl Pharmacol*, 2005, 204 (1): 69-80.
- [25] XU B Z, LIN S L, LI M, et al. Changes in estrogen receptor-alpha variant (ER-alpha36) expression during mouse ovary development and oocyte meiotic maturation [J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 131 (3): 347-354.