

## 论著

## 染料木黄酮对小鼠卵母细胞成熟的抑制作用

张岭<sup>1</sup>,张丽婧<sup>2</sup>,胡文敏<sup>2</sup>,刘臻<sup>2</sup>,刘冬英<sup>2</sup>,舒静<sup>1</sup>,徐维海<sup>1</sup>,王茵<sup>2</sup>

(1. 浙江省人民医院杭州医学院附属人民医院生殖内分泌科,浙江 杭州 310014;

2. 浙江省医学科学院保健食品研究所,浙江 杭州 310013)

**摘要:**目的 探讨染料木黄酮(GEN)对小鼠卵母细胞成熟的影响。方法 以小鼠为实验动物,随机分为4组,分别给予不同剂量(0、0.5、5.0、50.0 mg/kg BW)的GEN处理7 d,观察GEN对小鼠促排卵和生殖激素水平[雌二醇(E<sub>2</sub>)、黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)]的影响;同时,进行体外培养试验,用不同浓度的GEN处理体外培养卵丘-卵母细胞复合物(COCs)和裸卵(DOs),观察GEN是否抑制卵母细胞的减数分裂成熟过程。结果 GEN处理可降低小鼠促排卵数,但对机体生殖激素(包括E<sub>2</sub>、FSH和LH)水平无影响;体外培养过程中,GEN可抑制COCs中卵细胞的减数分裂成熟过程,但对DOs的成熟过程无明显影响。结论 GEN可干扰小鼠卵母细胞的成熟过程,其作用机制可能是发生在卵巢中。

**关键词:**染料木黄酮;植物雌激素;卵母细胞;减数分裂;生殖毒性;内分泌干扰;小鼠;毒性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2018)04-0353-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.04.003

### Inhibitory role of genistein on the maturation process of mouse oocytes

ZHANG Ling<sup>1</sup>, ZHANG Li-jing<sup>2</sup>, HU Wen-min<sup>2</sup>, LIU Zhen<sup>2</sup>, LIU Dong-ying<sup>2</sup>,SHU Jing<sup>1</sup>, XU Wei-hai<sup>1</sup>, WANG Yin<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Provincial People's Hospital People's Hospital of Hangzhou Medical College, Zhejiang Hangzhou 310014, China; 2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang Hangzhou 310013, China)

**Abstract: Objective** To investigate the toxicity of genistein (GEN) on oocyte maturation in mice. **Methods** In vivo test, mice were randomly divided into 4 groups and administrated with genistein (0, 0.5, 5.0 and 50.0 mg/kg BW) for 7 days. After superovulation, the ovulated oocytes picked up from oviduct ampulla were counted, and the estradiol (E<sub>2</sub>), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in serum were detected. During in vitro test, cumulus-oocyte complex (COCs) and denuded oocytes (DOs) were collected from super-ovulated mice and cultured by different concentrations of GEN to evaluate the influence of GEN on oocyte meiotic maturation. **Results** The number of superovulated oocytes in animals was significantly decreased by GEN treatment, while sex hormone remained unchanged. GEN produced an evident impact on the meiotic process of in vitro cultured COCs but DOs. **Conclusion** Our result confirmed the influence of GEN on oocyte maturation of mice, with its potential mechanism in ovary.

**Key words:** Genistein; phytoestrogen; oocyte; meiosis; reproductive toxicity; endocrine disruption; mice; poisonousness

染料木黄酮(genistein, 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,其生殖毒性已引起国内外学者的广泛关注<sup>[1]</sup>。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完全清楚。成熟的卵母细胞是维持正常雌性生殖的生理基础,卵母细胞成熟过程也是外源性化学毒性作用的潜在靶点<sup>[2]</sup>。关于GEN影响卵母细胞成熟的研究已有若干报道,但结论不尽一致<sup>[3-4]</sup>。本研究将探讨生理水平GEN是否干扰小鼠卵母细胞的成熟过程。

收稿日期:2018-05-15

基金项目:浙江省自然科学基金(LY15H260004, LY17H040014);浙江省医药卫生科研计划项目(2014ZDA004);浙江省医学支撑学科营养学(11-zc03);国家自然科学基金(81001260);浙江省151人才培养

作者简介:张岭 男 副研究员 研究方向为营养与生殖健康关系  
E-mail:zhangling8107@126.com

通信作者:王茵 女 研究员 研究方向为营养与人体健康关系  
E-mail:wy3333@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

雌性 ICR 小鼠, SPF 级, 4 周龄, 购买并饲养于浙江省医学科学院实验动物中心 [生产许可证号: SCXK(浙) 2008-0033, 使用合格证号: SYXK(浙) 2011-0166]。饲养环境: 温度 ( $23 \pm 2$ ) °C, 湿度 40% ~ 70%, 并保证 12 h 明暗循环的条件。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

GEN、M<sub>2</sub> 培养基、 $\alpha$ -最低必需培养基 ( $\alpha$ -MEM)、胰岛素-转铁因子-硒补充剂 (ITS, 5  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml 和 5 ng/ml)、Hoechst 33258 均购自美国 Sigma, 雌二醇 (E<sub>2</sub>)、黄体生成素 (LH) 和卵泡刺激素 (FSH) 酶联免疫吸附 (ELISA) 检测试剂盒均购自美国 Cayman Chemical。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 整体动物试验

给药: 实验动物按体重随机分成 4 组, 每组 10 只。其中, 设 3 个试验组 (低剂量、中剂量和高剂量组), 经口 (灌胃体积 0.2 ml/kg BW, 每日 1 次) 给予 GEN, 每天剂量分别为 0.5、5.0 和 50.0 mg/kg BW (剂量选择依据: 亚洲人群 GEN 摄入量约为 0.5 ~ 1.0 mg/kg d。食用大豆蛋白配方奶粉的婴儿可达 10 mg/kg d<sup>[5]</sup>); 另设 1 组对照组, 给予溶剂对照 (0.5% 羧甲基纤维素钠), 给药时间为 7 d。

卵母细胞的收集及排卵情况的判定: 在连续染毒 7 d 后, 经腹腔注射孕马血清 (PMSG, 10 IU/只) 刺激 48 h, 再注射人类绒毛膜促性腺激素 (hCG, 10 IU/只) 促排卵, 14 h 后麻醉动物, 处死。取出输卵管置于 M<sub>2</sub> 培养液中, 在体视显微镜下从输卵管壶腹部取出卵母细胞, 并计数, 最后计算各组中平均每只小鼠的超排卵数, 间接反映卵母细胞体内成熟情况。

血清中激素水平的测定: 连续染毒 7 d 后, 麻醉动物, 经股动脉取血, 离心后取血清于 -20 °C 冰箱保存; 小鼠血清中 FSH、E<sub>2</sub> 和 LH 的检测采用 ELISA 检测试剂盒。

#### 1.2.2 体外培养试验

培养方法: 雌性小鼠经腹腔注射 PMSG (10 IU/只) 促进卵泡发育, 48 h 后颈脱臼处死, 取出卵巢, 置于 M<sub>2</sub> 培养基中, 在体视显微镜下, 用 1 ml 注射器针头轻轻撕碎卵巢组织, 刺破卵泡, 使卵泡中的卵丘-卵母细胞复合物 (COCs) 游离出来。为了获得裸卵 (DOs), 用自制细口剥卵针反复吹吸 COCs, 以去除颗粒细胞。最后将获得的 COCs 和 DOs 置于含有 5% 胎牛血清和 ITS (5  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml 和 5 ng/ml)

的  $\alpha$ -MEM 培养液进行培养, 并给予 GEN 进行处理。根据预试验中测得的 GEN 内暴露水平为 2 ~ 4  $\mu$ mol/L, 选择 GEN 给药剂量为 0.4、2、10  $\mu$ mol/L。培养条件: 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度。为排除个体差异对试验结果的影响, 每次试验至少使用 3 只动物。

指标观察: 在培养 4 h 时, 观察生发泡破裂 (GVBD) 情况 (标志细胞启动减数分裂进程, 进入中期相); 在培养 16 h 时, 观察第一极体 (PB1) 排出情况 (标志细胞完成第一次减数分裂, 并进入第二次减数分裂中期)。同时, 在 4 和 16 h 时收集细胞, 用 4% 多聚甲醛固定 1 h, 用 10 ng/ml 的 Hoescht 33258 进行染色后, 荧光显微镜下观察细胞内染色质 (体) 状态, 对肉眼观察结果进行验证。最终结果以 GVBD 率和 PB1 率表示, 其中 GVBD 率 = GVBD 卵子数 (4 h) / 总卵子数  $\times$  100%; PB1 率 = PB1 排出卵子数 / GVBD 卵子数 (16 h)  $\times$  100%。

#### 1.3 统计学分析

本研究数据用 SPSS 17.0 软件统计并分析, 计量资料数据结果均采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异做两样本均数比较的 *t* 检验, 计数资料统计用卡方检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GEN 对小鼠体内成熟卵数量的影响

从表 1 可以看出, 对照组、低剂量组 (0.5 mg/kg)、中剂量组 (5.0 mg/kg) 和高剂量组 (50.0 mg/kg) 平均排卵量分别为  $27 \pm 3$ 、 $26 \pm 4$ 、 $20 \pm 6$  和  $9 \pm 5$  个, 各处理组与对照组比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 随着给药剂量的增加, 排卵数呈明显的下降趋势, 有剂量-效应关系。

表 1 GEN 对小鼠排卵数量的影响

Table 1 Effect of GEN on number of superovulated oocytes

in mice			
组别	动物数目/只	总卵数/个	$\bar{x} \pm s$
对照组	10	269	$27 \pm 3$
低剂量组	10	260	$26 \pm 4$
中剂量组	10	199	$20 \pm 6^*$
高剂量组	10	93	$9 \pm 5^*$

注: \* 为与对照组比较 *P* < 0.05

### 2.2 GEN 对小鼠体内 FSH、E<sub>2</sub> 和 LH 水平的影响

给予不同剂量的 GEN 灌胃处理后, 血清中 FSH、E<sub>2</sub> 和 LH 等激素水平未发现变化, 与对照组比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见图 1。

### 2.3 体外培养试验

将从卵巢中取出的处于 GV 期的卵母细胞, 置于含有不同浓度 GEN 的培养基中培养, 分别于培养 4 和 16 h 时观察卵细胞 GVBD 和 PB1 排出情况 (见

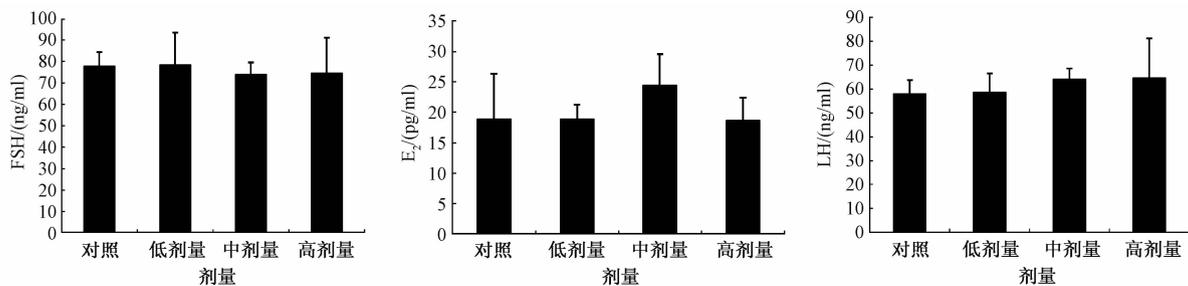
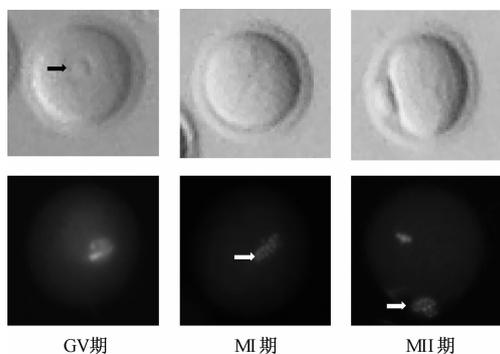
图1 GEN处理对小鼠血清FSH、E<sub>2</sub>和LH水平的影响Figure 1 Effect of GEN on serum FSH, E<sub>2</sub> and LH in mice

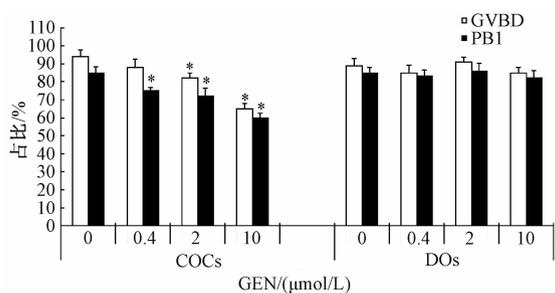
图2)。结果表明,GEN可降低COCs中卵母细胞的成熟,抑制GVBD和PB1排出的发生,具有剂量-反应趋势;但GEN对裸卵的成熟影响差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图3。



注:GV:生发泡,肉眼和荧光下可观察到完整的生发泡(黑色箭头所示);MI:第一次减数分裂中期相,肉眼下表现为生发泡消失,即发生GVBD,荧光下可见排列于赤道板的凝集染色体(白色箭头所示);MII:第二次减数分裂中期相,可见排出的第一极体(白色箭头所示)

图2 不同成熟阶段卵母细胞

Figure 2 Oocytes at different maturation stages



注: \* 为与对照组比较  $P < 0.05$

图3 GEN对小鼠体外卵母细胞成熟的影响

Figure 3 Effect of GEN on in vitro maturation of mice oocyte

### 3 讨论

哺乳动物卵母细胞在成熟前会停滞于第一次减数分裂前期,即GV期。在LH生理峰的刺激下,卵母细胞可恢复减数分裂,表现为GVBD,染色质凝集,并形成第一次减数分裂中期相(MI期)纺锤体,

然后细胞发生不对称分裂,迅速进入第二次减数分裂并释放(PB1),最终停滞在第二次减数分裂中期(MII期)。从卵母细胞恢复减数分裂至MII期阻滞形成这一过程称为成熟过程<sup>[6]</sup>。

有研究<sup>[3,7]</sup>表明,GEN可干扰卵母细胞的生成和成熟过程。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MII期细胞的皮质颗粒释放<sup>[3]</sup>。该研究中使用的GEN最高剂量每天不超过1.0 mg/kg<sup>[3]</sup>。不过,上面研究中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。YOSHIDA等<sup>[4]</sup>的研究却得到不同的结果,即生理剂量的GEN对小鼠卵母细胞成熟无明显影响。本研究结果表明,生理剂量的GEN可抑制体外培养的小鼠COCs的卵母细胞成熟过程,但对DOs的成熟无明显影响;此外,GEN还可干扰超促排小鼠的卵子排出数量,提示卵母细胞体内成熟过程也受GEN干扰。本课题组的结果合理解释了以往研究结果之间的矛盾,在以包含颗粒细胞的COCs为试验模型时,GEN可抑制小鼠卵母细胞的成熟,这与CHAN等<sup>[3]</sup>的研究结果相一致;但在无颗粒细胞存在的DOs中并未发现GEN的成熟抑制作用,这与YOSHIDA的结果相同。哺乳动物卵母细胞外周包裹大量的颗粒细胞,颗粒细胞与卵细胞以及颗粒细胞之间通过缝隙连接传递信号、营养物质和代谢产物<sup>[8]</sup>。在生理条件下,卵母细胞的减数分裂成熟过程必须接受来自颗粒细胞的信号调节<sup>[9]</sup>。所以,合理的方法是选择COCs或卵母体外培养来进行研究;若以去除外周颗粒细胞的DOs作为研究模型来评价外源化学物的毒性,所得出的研究结果可能存在偏差。本研究体外试验存在缺陷是未在GVBD后进行染毒,研究结果只能初步提示GEN可能抑制PB1排出,因此后续研究应在培养4 h时给药,直接观察GEN对PB1排出的影响。

早期有研究<sup>[10]</sup>认为,GEN有拟雌激素活性,可作用于下丘脑雌激素受体,负反馈调节下丘脑-垂

体-卵巢轴,从而干扰体内生殖激素的分泌,抑制生理性 LH 峰的形成。据此,有学者推测 GEN 抑制卵母细胞成熟,可能是通过抑制 LH 水平,从而导致卵母细胞减数分裂成熟过程无法启动。但以上假设仍然缺乏人群调查与实验室证据。尽管有体外卵泡培养发现,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<sup>[11]</sup>,但整体动物试验中,生理剂量(0.5~50 mg/kg BW) GEN 处理并未改变小鼠的血浆雌激素水平<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,生理剂量的 GEN 对小鼠体内生殖激素(包括 E<sub>2</sub>、FSH 和 LH)水平均无影响,提示 GEN 可能是作用于卵泡内,直接干扰卵母细胞的成熟信号。

综上所述,生理剂量的 GEN 确定抑制小鼠卵母细胞的成熟过程,且其作用的潜在靶点是卵泡内部的成熟调节信号,本研究结果将为进一步研究 GEN 对哺乳动物卵母细胞干扰机制提供初步线索。

## 参考文献

- [ 1 ] 张岭,王茵.染料木黄酮的雌性生殖毒性及其对卵母细胞成熟的影响[J].中国食品卫生杂志,2013,25(3):285-288.
- [ 2 ] 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):597-600.
- [ 3 ] CHAN W H. Impact of genistein on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development[J]. Reprod Toxicol,2009,28(1):52-58.
- [ 4 ] YOSHIDA N, MIZUNO K. Effect of physiological levels of phytoestrogens on mouse oocyte maturation in vitro [J]. Cytotechnology,2012,64(3):241-247.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] SCHATTE 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.
- [ 7 ] JUNG T, JR F 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.
- [ 8 ] CECCONI S, CICCARELLI C, BARBERI M, et al. Granulosa cell-oocyte interactions [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2004,115(Suppl 1):S19-22.
- [ 9 ] ZHANG M, SU Y Q, SUGIURA K, et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes[J]. Science,2010,330(6002):366-369.
- [ 10 ] CASSIDY A, BINGHAM S, SETCHELL K. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products [J]. The British Journal of Nutrition,1995,74(4):587-601.
- [ 11 ] 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.

## · 公告 ·

# 市场监管总局关于发布《土豆及其制品中 $\alpha$ -茄碱和 $\alpha$ -卡茄碱的测定》等 2 项食品补充检验方法的公告

[2018 年第 17 号]

按照《食品补充检验方法工作规定》有关规定,《土豆及其制品中  $\alpha$ -茄碱和  $\alpha$ -卡茄碱的测定》《肉制品中刚果红的测定》2 项食品补充检验方法已经国家市场监督管理总局批准,现予发布。

特此公告。

附件:1. 土豆及其制品中  $\alpha$ -茄碱和  $\alpha$ -卡茄碱的测定(BJS 201806)

2. 肉制品中刚果红的测定(BJS 201807)

市场监管总局

二〇一八年七月九日

(相关链接:[http://samr.saic.gov.cn/gg/201807/t20180718\\_275105.html](http://samr.saic.gov.cn/gg/201807/t20180718_275105.html))