

论著

# 大豆异黄酮对大鼠内分泌干扰作用研究

张文众 王伟 张晓鹏 宋雁 刘兆平 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 探索大豆异黄酮(SIF)经口摄入后,在体内的抗雄激素作用机制和剂量-反应关系。方法 选用4~5周雄性SD大鼠做HERSHBERGER试验,分别经灌胃给与0.2、0.5、1.5和4.5 g/kg BW的SIF,以3.0 mg/kg BW的氟他胺为阳性对照,0.4 mg/kg 睾酮对照(TP组)和空白对照组,除空白对照其余各组均给予睾酮,所有剂量组连续灌胃10天。试验结束称量腹侧前列腺、精囊和凝结腺、肛提肌加球海绵体肌、阴茎头和尿道球腺重量,并测定促黄体激素和睾酮。结果 和TP组比较,大豆异黄酮0.50、1.50和4.5 g/kg BW剂量组的体重和增重明显降低( $P < 0.05$ ),1.50和4.5 g/kg BW剂量组的阴茎头/肾脏和尿道球腺/肾脏的比值降低( $P < 0.05$ ),4.5 g/kg BW剂量组的肛提肌/肾脏比值降低( $P < 0.05$ ),1.5 g/kg BW组的LH/T比值升高( $P < 0.05$ )。结论 大剂量(1.5 g/kg BW和更高)的大豆异黄酮经口摄入产生抗雄激素作用,这种抗雄激素作用可能是一种间接效应。

**关键词:**异黄酮类;激素拮抗药;内分泌干扰物

## Study on Endocrine Disruptor Effects in the rat of Soy Isoflavones

ZHANG Wen-zhong, WANG Wei, ZHANG Xiao-peng, SONG Yan, LIU Zhao-ping, LI Ning  
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the androgen antagonists mechanisms in the rat of soy isoflavones *in vivo*, and also to study the relationship of dose-response. **Method** HERSHBERGER assay was carried out in immature male SD rats at the age of 4-5 weeks old, 0.2, 0.5, 1.5 and 4.5 g/kg soy isoflavones, and 3.0 mg/kg flutamide as positive control, 0.4 mg/kg Testosterone Propionate (TP), which was given to every groups, as negative control, vehicle as blank control, all groups were administered orally for 10 consecutive day. In the end of test, animals were anesthetized, weight of ventral Prostate, seminal vesicles together with coagulating gland, levator ani bulbocavernous muscles, glans penis, bulbourethral glands were measured, testosterone (T) and luteinizing hormone (LH) levels were measured. **Results** In compariton with TP control, body weight decreased in the groups of 0.50, 1.50 and 4.5 g/kg of soy isoflavones. The weights of glans penis and bulbourethral glands weights were found to be significantly decreased in the groups of 1.50 and 4.5 g/kg soy isoflavones ( $P < 0.05$ ). The weights of levator ani muscles decreased in the group of 4.5 g/kg soy isoflavones ( $P < 0.05$ ); LH and ratio of LH/T increase in the group of 1.5 g/kg soy isoflavones ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** At the level of high dose soy isoflavones had androgen antagonist effects *in vivo*, and the effect may be caused indirectly.

**Key words:** Soy Isoflavones; Hormones Antagonists; Endocrine Disruptor

[6] 张帆,王建华,刘立恒,等. 菊粉寡糖促进嗜酸乳杆菌生长的研究[M]. 食品与发酵工业,2004,30(4):49-51.

[7] LIU P, PIAO X S, KIM S W, et al. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs [J]. J Anim Sci, 2008, 86(10): 2609-2618.

[8] 阎春玲,刘兵,刘万顺. 壳寡糖及其衍生物对糖尿病大鼠糖耐量及肠道微生态平衡的影响[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(11):1202-1207.

[9] 曹维强,王静,张英春,等. 壳寡糖对酸乳后酸化抑制效果的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(8):115-118.

[收稿日期:2009-01-24]

中图分类号:R15;R117;Q935;Q939.117 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)03-0225-04

基金项目:国家“十五”科技攻关重大项目(2006BAK02A07)

作者简介:张文众 男 助理研究员

大豆异黄酮(soyisoflavones, SIF)在食品工业(尤其是保健食品)中的广泛应用,作为暴露量最大的植物雌激素,其内分泌干扰毒性受到了广泛关注。

已有研究提示 SIF 可能具有抗雄激素活性<sup>[1-3]</sup>。本研究采用抗雄激素模型通过敏感的观察终点,探讨 SIF 作为雌激素活性物质是否具有抗雄激素活性,以及其机制和剂量-反应关系。为 SIF 的食用安全以及相关的机制探索提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

Sprague Dawley (SD)大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司(清洁级,合格证号:SCXK(京)2002-0003)。饲养地点:首都医科大学附属北京口腔医院动物中心(许可证号:SYXK(京)2005-0031)。饲料为不含大豆成分的饲料(SAFC),购自中国医学科学院实验动物研究所繁育场(许可证号:SCXK(京)2001-0003)。

### 1.2 主要仪器和试剂

大豆异黄酮由广汉市生化制品有限公司生产,该产品总异黄酮占 84%,其中大豆黄素(daidzein, DAI)占 25.6%、染料木素(genistein, GEN)占 50.0%;丙酸睾酮(testosterone propionate, TP)购自上海中盛化工有限公司,纯度为 98%;氟他胺(flutamide, Flu)购自北京科昊达生物技术有限公司;玉米油(食用)由北京绿宝油脂有限公司生产。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组

健康的 4 周龄未成年雄性 SD 大鼠,体重 140~210 g,适应 1 周,每日观察,排除疾病和行动异常的大鼠,确认动物已经性成熟后进行去势手术(摘除双侧睾丸),术后适应 1 周开始给予 SIF。本研究所用方法通过本单位动物伦理委员会的批准,并严格按照相关规定操作。

#### 1.3.2 试剂配制方法和剂量设计

试验设 7 个组,3 个对照组:空白对照、TP 对照和阳性对照组以及 SIF 4 个剂量组。空白对照组皮下注射蒸馏水,其余各组都皮下注射 TP 0.4 mg/kg BW)。空白对照组和 TP 对照组灌胃给予蒸馏水,阳性对照组给予 Flu(TP+0Flu) 3 mg/kg BW)。SIF 4 个组剂量分别为:0.2、0.5、1.5 和 4.5 g/kg BW。Flu 和溶剂(水)经口灌胃给予。每组 6 只动物,每组两笼,每笼 3 只。试验周期为 10 天,动物自由饮水和进食,间隔 24 小时每日根据体重调整并记录灌胃剂量。外周促黄体激素(luteinizing hormone, LH)和睾酮(testosterone, T)测定均采用 ELISA 方法,试剂盒购自

中美科技生物技术有限公司(湖北武汉),按照说明书要求操作。

#### 1.3.3 性器官称重和组织病理学检查

最后一次给予受试物 24 h 后处死,解剖后去除脂肪组织,不吸附液体,直接称量以下组织器官:腹侧前列腺(VP)、精囊和尿道球腺(SV 和 CG)、肛提肌加球海绵体肌(LABC)、阴茎头(GP)、尿道球腺(CG)、肾上腺和肾脏的湿重。称量精确度为 0.1 mg。称重后把腹侧前列腺在中性 10%福尔马林溶液中固定 24 小时,再次称重前列腺。

#### 1.4 数据统计和分析

数据录入 Excel,数据用 SPSS 10.0 计算均数和标准差,经方差齐性检验后,方差齐时用 LSD 统计分析,方差不齐时用 Games-Howell 法统计分析。

## 2 结果

### 2.1 体重和性激素依赖组织器官变化

去势后恢复 7 d,各组动物活动、生长正常,被毛浓密有光泽。连续给予 SIF 10 天后动物终体重出现差异,0.5、1.5 和 4.5 g/kg BW 三个 SIF 剂量组动物的体重和增重均低于 TP 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),并有剂量-反应关系,见表 1。

表 1 HERSHBERGER 试验中 SIF 对体重的影响

剂量 (g/kg BW)	动物数 (只)	初重	终重	增重
空白对照	6	147.2 ±8.3	215.2 ±9.4	68.0 ±11.7
TP	6	144.2 ±7.6	217.3 ±11.2	73.2 ±14.5
TP + Flu	6	148.2 ±11.5	220.3 ±9.9	72.2 ±16.6
0.2 + TP	6	148.0 ±7.6	212.3 ±8.9	64.3 ±7.1
0.5 + TP	6	144.2 ±7.1	203.2 ±12.7 <sup>a</sup>	59.0 ±8.3 <sup>a</sup>
1.5 + TP	6	143.8 ±8.2	199.5 ±10.3 <sup>a</sup>	55.7 ±13.4 <sup>a</sup>
4.5 + TP	6	140.7 ±12.0	190.8 ±10.6 <sup>a</sup>	50.2 ±4.5 <sup>a</sup>

注:1. 表中 TP 为丙酸睾酮,Flu 为氟他胺,SIF 为大豆异黄酮;各剂量 SIF 和 Flu 灌胃给予,TP 皮下注射,下同;2. a 表示与 TP 组相比  $P < 0.05$ 。

与空白对照组相比,TP 组的前列腺鲜重/肾脏,前列腺固定重/肾脏,精囊和凝集腺/肾脏,球海绵体肌/肾脏,阴茎头/肾脏,尿道球腺/肾脏,肛提肌/肾脏,肾上腺/肾脏均显著升高( $P < 0.05$ );与 TP 组相比,1.5 和 4.5 g/kg BW 剂量组的阴茎头/肾脏,尿道球腺/肾脏以及 4.5 g/kg BW 剂量组肛提肌/肾脏均明显降低( $P < 0.05$ );与 TP 组相比,Flu 组的前列腺鲜重/肾脏,前列腺固定重/肾脏,精囊和凝集腺/肾脏,球海绵体肌/肾脏,阴茎头/肾脏,尿道球腺/肾脏,肛提肌/肾脏,肾上腺/肾脏均显著降低( $P < 0.05$ ),见表 2 和表 3。

2.2 性激素水平的变化  
和 TP 组相比, 1.5 g/kg BW 和 Flu 组的 LH 和 LH/

T 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 其余各剂量组虽略有升高, 但未达到统计学显著性水平, 见表 4。

表 2 HERSHBERGER 试验中 SIF 对性器官/肾脏系数的影响 (%)

剂量 (g/kg BW)	动物数	肾脏重量	前列腺鲜重/肾脏	前列腺固定重/肾脏	精囊和凝集腺/肾脏	球海绵体肌/肾脏
空白对照	6	1.7760 ± 0.1365	0.0228 ± 0.0078	0.0050 ± 0.0009	0.0255 ± 0.0090	0.0136 ± 0.0063
TP	6	1.8139 ± 0.1464	0.1064 ± 0.0336 <sup>a</sup>	0.1549 ± 0.0521 <sup>a</sup>	0.2460 ± 0.0700 <sup>a</sup>	0.0487 ± 0.0132 <sup>a</sup>
TP + Flu	6	1.8752 ± 0.1868	0.0667 ± 0.0237 <sup>b</sup>	0.0948 ± 0.0345 <sup>b</sup>	0.1473 ± 0.0375 <sup>b</sup>	0.0296 ± 0.0077 <sup>b</sup>
TP + 0.2	6	1.7925 ± 0.1426	0.0921 ± 0.0277	0.1597 ± 0.0672	0.2128 ± 0.0737	0.0386 ± 0.0158
TP + 0.5	6	1.7756 ± 0.1564	0.0961 ± 0.0244	0.1412 ± 0.0198	0.1891 ± 0.0349	0.0409 ± 0.0085
TP + 1.5	6	1.7886 ± 0.1473	0.1044 ± 0.0215	0.1425 ± 0.0283	0.2138 ± 0.0355	0.0519 ± 0.0141
TP + 4.5	6	1.7923 ± 0.1445	0.1042 ± 0.0260	0.1418 ± 0.0269	0.2058 ± 0.0397	0.0609 ± 0.0132

注: a 表示与空白对照组相比  $P < 0.05$ ; bb 表示与 TP 组相比  $P < 0.05$

表 3 HERSHBERGER 试验中 SIF 对性器官/肾脏系数的影响

剂量 (g/kg BW)	动物数	阴茎头/肾脏	尿道球腺/肾脏	肛提肌/肾脏	肾上腺/肾脏
空白对照	6	0.0163 ± 0.0047	0.0154 ± 0.0052	0.0256 ± 0.0111	0.0262 ± 0.0079
TP	6	0.0484 ± 0.0210 <sup>a</sup>	0.0474 ± 0.0072 <sup>a</sup>	0.0662 ± 0.0156 <sup>a</sup>	0.0238 ± 0.0091 <sup>a</sup>
TP + Flu	6	0.0281 ± 0.00877 <sup>b</sup>	0.0302 ± 0.0057 <sup>b</sup>	0.0396 ± 0.0625 <sup>b</sup>	0.0141 ± 0.00396 <sup>b</sup>
TP + 0.2	6	0.0341 ± 0.0105	0.0412 ± 0.0044	0.0663 ± 0.0255	0.0335 ± 0.0269
TP + 0.5	6	0.0438 ± 0.0103	0.0354 ± 0.0187	0.0561 ± 0.0146	0.0256 ± 0.0045
TP + 1.5	6	0.0280 ± 0.0125 <sup>b</sup>	0.0276 ± 0.0121 <sup>b</sup>	0.0516 ± 0.0189	0.0278 ± 0.0062
TP + 4.5	6	0.0322 ± 0.0112 <sup>b</sup>	0.0322 ± 0.0091 <sup>b</sup>	0.0462 ± 0.0124 <sup>b</sup>	0.0274 ± 0.0063

注: a 表示与空白对照组相比  $P < 0.05$ ; b 表示与 TP 组相比  $P < 0.05$

表 4 HERSHBERGER 试验中 SIF 对血清中 LH 和 T 的影响

剂量 (g/kg BW)	动物数	LH (mIU/ml)	T (ng/ml)	LH/T
TP	6	0.44486 ± 0.08660	3.01265 ± 0.64123	0.151413 ± 0.032805
TP + Flu	6	0.70510 ± 0.144779 <sup>a</sup>	2.234152 ± 0.17026	0.317446 ± 0.069863 <sup>a</sup>
TP + 0.2	6	0.46456 ± 0.04887	2.27586 ± 0.34860	0.20758 ± 0.035568
TP + 0.5	6	0.69931 ± 0.30934	1.97002 ± 0.20431	0.237702 ± 0.128684
TP + 1.5	6	0.66783 ± 0.23533 <sup>a</sup>	2.22025 ± 0.25300	0.299869 ± 0.091598 <sup>a</sup>
TP + 4.5	6	0.51879 ± 0.14329	2.88753 ± 0.84405	0.265773 ± 0.172078

注: a 表示与 TP 组相比  $P < 0.05$

3 讨论

HERSHBERGER 试验通常对雄激素采用皮下注射, 使其吸收完全、迅速, 而对于受试物往往采用经口灌胃途径, 使其与人类接触环境化学物的途径相似。抗雄激素阳性物质氟他胺 (Flu) 在 HERSHBERGER 试验中运用广泛。本研究表明 Flu 组的性器官发育严重滞后, 激素水平 LH 和 LH/T 升高, 抗雄激素作用明显, 表明去势手术和造模成功。

Delclos<sup>[4]</sup> 在研究中发现妊娠期母鼠和断乳至出生后 50 天喂饲 GEN (每 kg 饲料中含 1 250 mg), 可致雄性大鼠的前列腺重量降低, 动物生精延迟或缺失, 可引起雌雄大鼠的垂体/体重比增加。本研究也显示 SIF 影响去势大鼠的体重, 阴茎头、尿道球腺和肛提肌的发育受到影响。推测 SIF 可能不直接与雄激

素受体结合产生抗雄激素效应, 而是通过间接的作用产生抗雄激素作用。SIF 影响雄性激素相关受体表达和激素代谢相关酶的活性。如体外研究表明 GEN 抑制前列腺癌细胞系雄激素受体的表达<sup>[5]</sup>。SIF 和 GEN 抑制酪氨酸激酶和类固醇合成酶超家族, 对类固醇激素的代谢产生影响。对中年雄性大鼠皮下注射 30 mg/kg BW, 可以促进肾上腺皮质酮的释放, 抑制肾上腺皮质素和醛固酮的分泌<sup>[6]</sup>。上述研究提示 SIF 可能是通过干扰内分泌系统对去势大鼠的生长发育产生影响。

GEN 对促黄体素受体具有干扰作用, 通过受体干扰最终会影响到依赖睾丸间质细胞 (leydig) 雄性酮的合成<sup>[7]</sup>。本研究中去势大鼠 1.5 g/kg BW 组 LH 和 LH/T 显著升高。提示 SIF 影响去势大鼠的促黄体素水平。

本研究显示 SIF 影响去势大鼠阴茎头、尿道球腺和肛提肌的发育,会直接导致性功能下降。有研究显示 GEN 抑制精子活性和精子顶体反应<sup>[8]</sup>。每组 5 只雄性 SD 大鼠分别给予 2、20 和 100 mg/kg BW 大豆黄素,连续给予 90 天,结果发现 20 mg/kg BW 的大豆黄素即可导致阴茎的平滑肌细胞和弹性纤维数量明显减少,勃起功能障碍<sup>[9]</sup>。另外有研究表明 GEN 对雄性大鼠的生殖系统造成不可逆性的改变。例如,成年大鼠通过饲料暴露于 GEN(每 kg 饲料中含 900 mg),6 周后大鼠睾丸和附睾明显变小、乳腺显著增生;给成年大鼠灌胃 480 mg/kg BW 的 GEN,持续 2 个月,可使大鼠精子活度下降<sup>[10]</sup>。3-大豆苷元磺酸钠(DSS)是利用磺化反应对大豆苷元进行结构修饰和改性后,新合成的强水溶性的大豆苷元磺化物。DSS 对丙酸睾酮所致小鼠良性前列腺增生具有明显的抑制作用,减轻了前列腺湿重。形态学检查显示,连续 12 天给予小鼠 40 mg/kg BW DSS 能明显抑制前列腺增生,而且其腺体结构已接近正常对照组,血清睾酮、雌二醇水平和 T/E2 的比值明显降低<sup>[11]</sup>。而上述生物学效应均提示 SIF 具有抗雄激素作用。

同时也有研究未发现 GEN 的毒性效应。如最高剂量为 1 000 mg/kg BW GEN 的雄性大鼠 4 周喂养试验中,未影响血清中的激素水平、生殖器官的重量和组织病理学、精子的活性,即 NOAEL 为 1 000 mg/kg BW<sup>[12]</sup>。以 GEN 为受试物为期两年的喂养试验中,50 mg/kg BW GEN 可对生殖系统产生可逆的功能性影响,500 mg/kg BW GEN 对肝脏具有轻微的毒性,表现为胆管增生和谷氨酰转移酶活性增加<sup>[13]</sup>。结果表明 SIF 对未成年去势大鼠的 LOAEL 为 0.5 g/kg BW,0.2 g/kg BW 的剂量未见显著影响。提示只有高剂量的 SIF(1.5 g/kg BW 及以上)才能导致身体发育和性器官及其附属组织发育滞后,干扰 LH 水平等抗雄激素作用。同时 SIF 并非对所有的雄激素依赖的组织器官产生影响,说明 SIF 并未直接结合雄激素受体,因此推测 SIF 可能直接干扰神经-内分泌系统,这种干扰效应间接的产生了抗雄激素作用。

## 参考文献

- [1] THUILLIER R, WANG Y, Culty M. Prenatal exposure to estrogenic compounds alters the expression pattern of platelet-derived growth factor receptors alpha and beta in neonatal rat testis: identification of gonocytes as targets of estrogen exposure[J]. Biol Reprod. 2003 Mar; 68(3):867-80.
- [2] CASANOVA M, YOU L, GAIDO K, et al. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro[J]. Toxicol Sci. 1999 Oct;51(2):236-44.
- [3] NCTR. 1. Genistein: Evaluation of reproductive effects over multiple generations [Volume ] and the chronic effects [Volume ] of exposure during various life states. Jefferson AR[M]: National Center for Toxicological Research; 2005.
- [4] DELCLOS K, BUCCI T, LOMAX L, et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats[J]. Reprod Toxicol. 2001 Nov-Dec;15(6):647-63.
- [5] BASAK S, POOKOT D, NOONAN E, et al. Genistein downregulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function [J]. Mol Cancer Ther. 2008 Oct;7(10):3195-202.
- [6] AJDZANOVIC V, SOSIC B, FILIPOVIC B, et al. Genistein-induced histomorphometric and hormone secreting changes in the adrenal cortex in middle-aged rats[J]. Exp Biol Med (Maywood). 2008 Dec 8.
- [7] HANCOCK K, COLEMAN E, TAO Y, et al. Genistein decreases androgen biosynthesis in rat Leydig cells by interference with luteinizing hormone-dependent signaling[J]. Toxicol Lett. 2008 Nov 18.
- [8] TAO J, ZHANG Y, LI S, et al. Tyrosine kinase-independent inhibition by genistein on spermatogenic T-type calcium channels attenuates mouse sperm motility and acrosome reaction[J]. Cell Calcium. 2008 Sep 11.
- [9] HUANG Y, PAN L, XIA X, et al. Long-term effects of phytoestrogen daidzein on penile cavernosal structures in adult rats [J]. Urology. 2008 Jul;72(1):220-4.
- [10] 李丽,刘兆平,严卫星. 大豆异黄酮毒性作用研究进展[J]. 国外医学卫生学分册,2005,32(6):338-342.
- [11] HUANG Y, ZENG J, HUANG Y, et al. Antagonistic effect of 3'-daidzein sulfonate sodium on prostatic hyperplasia in mice [J]. Zhonghua Nan Ke Xue. 2007 May;13(5):387-90.
- [12] OKAZAKI K, OKAZAKI S, NAKAMURA H, et al. A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals[J]. Arch Toxicol 2002,76:553-9.
- [13] MICHAEL M, ERICH W, ALBERTO D, et al. Edwards, Jochen Bausch. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats[J]. Food and Chemical Toxicology. 2006,44:56-80.

[收稿日期:2009-02-25]

中图分类号:R15;Q579.11;Q946.885;Q95-3;S565.1;TS214.2 文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2009)03-0228-04