

论著

牛初乳对子代雌鼠子宫结构及雌激素受体表达的影响

徐丽¹, 张兰威¹, 张玉梅², 刘钊燕², 吕艳丽²

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150081;

2. 北京大学医学部公共卫生学院, 北京 100191)

摘要:目的 研究妊娠期和哺乳期通过SD母鼠暴露于牛初乳及断乳后继续食用牛初乳对成年子代雌鼠子宫发育及雌激素受体(ER α 和ER β)表达的影响。方法 将母鼠随机分成2组,牛初乳组和空白对照组。牛初乳组母鼠在交配前期、妊娠期和哺乳期食用含有牛初乳的饲料,仔鼠3周断乳后食用对应于母鼠的饲料至成年。空白组母鼠和仔鼠食用普通饲料。仔鼠成年后处死,取其血液,剥离子宫和卵巢称重,检测血清激素,子宫病理学检查;利用免疫组化法检测子鼠子宫内雌激素受体(ER α 和ER β)的表达。结果 牛初乳组子代雌鼠体重、卵巢和子宫脏体比与空白组相比差异无统计学意义($P>0.05$),血清中催乳素(PRL)含量显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),其余激素含量两组间差异无统计学意义($P>0.05$),子宫组织结构无异常表现,子宫内雌激素受体ER α 表达量高于空白组,ER β 表达量与空白组相近,但与空白组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 妊娠期和哺乳期暴露于子代的牛初乳不会对子代雌鼠子宫发育和雌激素受体表达产生不利影响。

关键词:牛初乳; 雌性仔鼠; 生殖和发育; 子宫; 雌激素受体; 内分泌

中图分类号:R151.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)01-0020-04

Effects of bovine colostrum on the structure of uteri and the expression of estrogen receptor in rat's adult female offsprings

Xu Li, Zhang Lanwei, Zhang Yumei, Liu Zhaoyan, Lv Yanli

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Heilongjiang Harbin 150081, China)

Abstract: Objective To study the effects of gestational and lactational exposure to bovine colostrum on the structure of uterus and the expression of estrogen receptor (ER α , ER β) of the female offspring of Sprague-Dawley rats. **Methods** SD rats were randomly divided into bovine colostrum and control group and fed before mating and during gestation and lactation with bovine colostrum diet and normal diet. Female offsprings were sacrificed after maturity and uteri and ovaries were removed for weighing. The hormone levels in serum were determined and the uteri were used for pathological examination. Expressions of estrogen receptor α (ER α) and estrogen β (ER β) in uterus were examined using immunohistochemical method. **Results** There was no significant difference in the female offsprings' body weight and ratio of uterus and ovary weight to body weight between bovine colostrum diet and control diet ($P>0.05$). Bovine colostrum diet significantly increased the level of prolactin (PRL) in serum ($P<0.05$). Additionally, the development of uterus was normal and the expression of ER α and ER β had no significant difference between bovine colostrum group and control group ($P>0.05$). **Conclusion** The gestational and lactational exposure to bovine colostrum did not cause significant influence on the development of uterus and expressions of ER α and ER β .

Key words: Bovine colostrum; female litter rat; reproduction and development; uterus; estrogen acceptor; endocrine

牛初乳因含有多种生物活性物质,对人体胃肠道和免疫系统发挥重要作用而成为膳食补充剂。同时牛初乳也被用作母乳初乳的首选替代品,能提

高新生儿免疫力,增强抗病能力^[1-2]。但牛初乳中含有较高含量的雌激素,对新生儿生殖发育的影响倍受关注。妊娠和哺乳阶段是对雌激素物质特别敏感的时期,激素环境微小的变化都会对子代生殖系统的发育产生不利影响^[3]。本课题组前期研究发现牛初乳能够干扰亲代雌鼠的内分泌激素水平平衡,但对生殖能力无显著影响,且子代雌鼠也未表现出表观上的性早熟或推迟的现象^[4],但还有必

收稿日期:2012-09-07

作者简介:徐丽 女 博士生 研究方向为食品科学

E-mail: xuli0411@163.com

通信作者:张兰威 男 教授 研究方向为益生菌和乳品

E-mail: lanweizhang111@yahoo.com.cn

要进一步研究子代雌鼠成年后的生殖器官的微观结构变化。子宫是雌性哺乳动物或人类重要的生殖器官,雌激素样物质可干扰生物体内分泌激素水平的平衡而影响生殖器官发育或通过雌激素受体直接影响生殖器官发育。本研究重点分析妊娠期和哺乳期接受牛初乳后,成年子代雌鼠内分泌激素水平、子宫组织结构及雌激素受体表达的变化,进一步揭示子代生命早期接受实际膳食剂量的牛初乳对成年后雌性生殖发育的影响。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

苏木精染液、酸酒精、伊红染液,均购于北京益利化学品有限公司;促黄体生成素(LH)测定试剂盒、促卵泡激素(FSH)测定试剂盒、孕酮(P)测定试剂盒、雌二醇(E2)测定试剂盒,均购于北京科美生物技术有限公司;ER α 和ER β 抗体、SP二抗试剂盒、DAB试剂盒,均购于镇江厚普生物科技有限公司。DFM-96型放射免疫计数器;CMOS光学显微镜。

1.2 试验方法

1.2.1 试验动物和喂养

SPF级4周龄SD大鼠雌雄各20只,体重为60~80g,购于北京大学医学部试验动物科学部[动物合格证号:SCXK(京)2006-008],饲养于北京大学医学部SPF级动物房[合格证号:SYXK(京)2007-0008],室温为(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度50% \pm 5%,通风良好。食物和水自由摄取。SD大鼠适应环境1周后随机分为牛初乳组和空白对照组,每组雌雄各10只,利用牛初乳饲料和空白对照组饲料喂养雌雄鼠,饲喂到11周时,同组雌雄鼠交配,雌鼠受孕生育得到子代鼠^[4],各组雌鼠妊娠期和哺乳期持续食用对应组饲料。子鼠出生4d后每窝挑选仔鼠8只(雌雄各半),不足8只的窝被剔除。牛初乳饲料组和空白饲料组10窝均达要求。雌性仔鼠为本实验动物,雄性仔鼠用于其他研究。子代雌鼠3周断乳后继续食用对应于母鼠的饲料至出生后80d。本试验获得北京大学生物医学伦理委员会批准。牛初乳饲料和空白对照饲料采用王洋等人^[4]的实验饲料配方。牛初乳组饲料是在空白对照饲料的基础上加入10%牛初乳粉,调整饲料中其他成分比例,使牛初乳饲料中蛋白质、碳水化合物、能量接近于空白组饲料。利用GB/T21981—2008方法检测牛初乳饲料中雌二醇含量为9.71 μ g/kg,雌酮为21.08 μ g/kg。空白饲料不含雌激素。

1.2.2 子代雌鼠血清激素检测

80d子代雌鼠12h禁食后记录体重。之后取

雌鼠股动脉血,拉直大鼠下肢,使静脉充盈,将注射器刺入血管取血。得到的血液转移到Ap管内,4000rpm离心10min,分离血清和血浆,之后将血清置于1.5mlAp管中,-40 $^{\circ}$ C冰箱保存。采用放射性免疫吸附法检测雌鼠血清中促黄体生成激素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(Estradio-17 β)、孕酮(Progesterone)、催乳素(Prolactin)水平。

1.2.3 子代雌鼠组织器官重量和脏体比

取血后的雌鼠处死,摘取卵巢和子宫并称重,与处死前禁食12h后的体重相比,得到脏体比。并取一部分子宫组织固定于4%甲醛溶液中待用。

1.2.4 子宫形态学分析

4%甲醛固定后的子宫组织经常规脱水、透明、包埋后制成厚度5 μ m的组织切片附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上,60 $^{\circ}$ C过夜。HE染色,在光学显微镜下观察子宫组织。

1.2.5 免疫组织化学法检测子宫内雌激素受体ER α 和ER β 表达

①免疫组织化:5 μ m厚的切片常规脱蜡入水,3% H_2O_2 溶液孵育5~10min以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗,浸泡5min,微波修复抗原。滴加山羊血清封闭液,室温孵育15min,倾去。滴加1:100稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C过夜。0.1mol/LPBS冲洗(5min \times 3次),以PBS代替一抗为阴性对照。滴加生物素化羊抗兔IgG二抗工作液,37 $^{\circ}$ C孵育15min,0.1mol/LPBS冲洗(5min \times 3次),滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37 $^{\circ}$ C孵育15min,0.1mol/LPBS冲洗(5min \times 3次),DAB(3,3-二氨基联苯胺)显色,然后按常规脱水、透明、中性树脂封片,光镜下进行400 \times 的显微照相。②免疫组化评分(immunohistochemical scores, HIS)^[5]:结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面评分。阳性细胞计数:每张切片随机选取5个高倍视野,每个视野计数100个细胞,计数阳性细胞数,无阳性细胞=0分,阳性细胞占1%~10%=1分,11%~50%=2分,51%~80%=3分,81%~100%=4分。阳性细胞染色强分为,阴性=0分,弱阳性=1分,中度阳性=2分,强阳性=3分。阳性细胞数与染色强度两项乘积即为该组织的IHS。理论上,HIS分值在0~12之间,9~12代表相当强的免疫反应,5~8代表中等强度的免疫反应,1~4代表弱的免疫反应,0代表阴性。

1.3 统计方法

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据利用SPSS 13.0统计软件包进行统计处理。两组间均数的比

较用独立 t 检验, 设定检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 子代雌鼠体重和脏体比

表1 子代雌鼠体重及脏体比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Body weight and organ weight of offspring female($\bar{x} \pm s$)

分类	空白组($n=10$ 窝)		牛初乳组($n=10$ 窝)	
	重量(g)	脏体比(%)	重量(g)	脏体比(%)
体重	433.84 ± 64.37	/	441.44 ± 44.05	/
右卵巢	0.08 ± 0.02	0.19 ± 0.06	0.07 ± 0.03	0.17 ± 0.07
左卵巢	0.09 ± 0.03	0.22 ± 0.07	0.08 ± 0.04	0.19 ± 0.09
子宫	0.61 ± 0.16	1.45 ± 0.48	0.56 ± 0.17	1.30 ± 0.45

2.2 子代雌鼠血清激素水平分析

子代雌鼠血清激素水平如表2所示, 牛初乳组雌鼠血清中催乳素含量与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。其余激素水平两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 子代雌鼠血清激素水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Offspring female serum hormone concentration($\bar{x} \pm s$)

激素	空白组($n=10$ 窝)	牛初乳组($n=10$ 窝)
LH(mIU/ml)	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.07
FSH(mIU/ml)	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.04
PRL(ng/ml)	43.16 ± 21.25	57.57 ± 38.62*
P(ng/ml)	496.14 ± 312.09	507.22 ± 409.29
E2(pg/ml)	9.10 ± 4.30	9.31 ± 3.33

注:与空白组的差异有统计学意义 * $P < 0.05$ 。

2.3 子代雌鼠子宫病理学检查

牛初乳组和空白组子宫组织内膜和腺体无明显异常, 子宫内膜发育充分, 腺体发育明显, 增殖期腺体呈圆形管状, 腺上皮细胞增殖活跃, 细胞质嗜酸性较分泌期强; 分泌期腺体发育充分, 腺体迂曲扩张, 腺上皮细胞变大, 胞浆透亮, 细胞核染色质变浅, 腺腔内无或有少许分泌物。

2.4 免疫组织化学检测子代雌鼠子宫组织 ER α 和 ER β 的表达

ER α 和 ER β 在子代雌鼠子宫内呈阳性表达, 如表3所示。牛初乳组 ER α 阳性表达率和 HIS 评分高于空白组, 但两组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 均为中等强度表达。牛初乳组 ER β 的表达与空白组相近, 同样两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表3 雌激素受体在子代雌鼠子宫内阳性细胞数表达

Table 3 Positive cell staining of ER α and ER β in uterine of offspring female($\bar{x} \pm s$)

组别	ER α		ER β	
	阳性表达率(%)	IHS 评分	阳性表达率(%)	IHS 评分
空白组	32.17 ± 16.99	5.20 ± 1.10	24.33 ± 5.24	5.00 ± 1.03
牛初乳组	41.83 ± 15.66	6.33 ± 2.58	21.17 ± 3.25	5.00 ± 1.10

子代雌鼠处死前体重及脏体比如表1所示, 牛初乳组雌鼠体重与空白组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 两组间卵巢与体重比和子宫与体重比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

关于内分泌干扰物的研究发现, 新生儿期是人类及动物生殖系统发育的关键时期, 激素环境的微小变化都会对后代生殖系统的发育产生不利影响。故本研究在前期对亲代大鼠生殖发育影响的研究基础上, 进一步探讨新生雌性子鼠通过母鼠胎盘和乳汁暴露于含有雌激素的牛初乳后, 子宫发育和子宫内雌激素受体表达是否受到干扰。结果发现, 除子鼠血清中催乳素含量与空白组相比表现异常外, 子鼠体重、脏体比、子宫结构及子宫内雌激素受体(ER α 和 ER β)的表达均表现正常。体重和器官重量是常规毒性研究中分析潜在毒性的敏感指示^[6-7]。子鼠在接触牛初乳后体重和各器官重量与空白组相比差异无统计学意义, 表明母鼠在妊娠期、哺乳期及断乳后食用牛初乳没有对子鼠产生毒性影响。血清中激素水平受大脑神经内分泌系统的调节, 神经系统中垂体腺管分泌前垂体激素, 如催乳素、LH、FSH等, 这些激素负责调节外围腺管和组织^[8]。本研究通过对子鼠血清激素水平分析发现, 牛初乳组血清中 LH 和 FSH 水平正常, 但催乳素含量显著高于空白组, 可能是仔鼠大脑垂体腺管受到影响。

雌激素受体 ER α 和 ER β 的分布与表达具有组织特异性, 子宫内以 ER α 为主^[9]。本研究通过对子宫内雌激素受体免疫组织化学表达分析证实了这一点, 空白组和牛初乳组子宫中 ER α 的表达相对高于 ER β 。先前催乳素对雌激素受体表达调节作用的研究发现, 催乳素可增强雌激素受体表达^[10]。本研究牛初乳组与空白组相比子宫雌激素受体 ER α 和 ER β 表达量虽差异无统计学意义, 但牛初乳组 ER α 免疫表达略高于空白组, 可能是血清中高含量催乳素影响了子宫内雌激素 ER α 的表达, 具体机制有待进一步研究。

(志谢:蒙牛集团提供研究经费, 哈尔滨康普生物科技有限公司提供试验所用的牛初乳。)

参考文献

- [1] Davidson G P, Whyte P B, Danieis E, et al. Passive immunisation of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus [J]. Lancet, 1989, 2: 709-712.
- [2] Greenberg P D, Cello J P. Treatment of severe diarrhea caused by Cryptosporidium parvum with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS [J]. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996, 13, 348-354.
- [3] 陈以偿,郝卫东,尚兰琴,等.围生期双酚 A 暴露对大鼠雌性子代生殖系统及雌激素受体表达的影响[J].癌变·畸变·突变,2010,22(3):194-201.
- [4] 王洋,薛勇,刘钊燕,等.大鼠繁殖试验评价牛初乳对生殖发育的影响[J].中国食品卫生杂志,2012,24(3):200-204.
- [5] Robert A S, Andrew J D, Demaretta R. COX-2 Is Expressed in Human Pulmonary, Colonic, and Mammary Tumors [J]. Cancer, 2000, 89, 2637-2645.
- [6] Andersen H, Larsen S, Spliid H, et al. Multivariate statistical analysis of organ weights in toxicity studies [J]. Toxicology, 1999,136, 67-77.
- [7] Kim HY, Lee SB, Lim KT, et al. Subchronic inhalation toxicity study of 1,3-dichloro-2-propanol in rats [J]. Ann Occup Hyg, 2007, 51, 633-643.
- [8] Kalantabidou S N, Zoumakis E, Makrigiannakis A, et al. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: An update [J]. J Reprod Immunol, 2010, 85, 33-39.
- [9] Paolo A, Alessio B, Maria M. Structure function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health [J]. Mol Aspects Med, 2006, 27 (4): 299-302.
- [10] Frasor J, Gibori G. Prolactin regulation of estrogen receptor expression [J]. Trends Endocrin Met, 2003, 14:118-123.

食品安全检测新技术集中亮相第六届食品安全大会

为了进一步加强食品安全学科建设和科技人才培养,加大食品安全重点检测项目的技术攻关力度,让食品质检专业人员充分了解新的检测方法和标准,尽早熟悉新的检测步骤和仪器设备,提升检测技术水平,由北京食品学会和北京食品协会联合主办,太平洋国际展览有限公司承办的“第六届中国北京国际食品安全高峰论坛”将于2013年4月1日-2日在国家会议中心(CNCC)隆重举办。

目前,国内外诸多食品安全检测技术著名厂商均已报名参加本次大会,如安捷伦、赛默飞世尔、默克密里博、布鲁克、AB SCIEX、BD 诊断、德国莱驰、QIAGEN、IKA、培安、梅特勒-托利多、赛多利斯、西格玛奥德里奇、艾万拓化工、博纳艾杰尔、欧普图斯、迪马科技、莱伯泰科、勤邦生物、北京陆桥、智云达科技等,聚集了众多食品安全检测技术领先企业,将集中展示其新技术和新产品,发表技术演讲报告和应用解决方案。

大会主要讨论议题:

01. 食品安全-色谱分析技 02. 食品安全-质谱分析技术 03. 食品安全-快速检测技术 04. 食品安全-质量控制技术 05. 食品安全-样品前处理技术 06. 食品安全-辐照加工技术 07. 食品安全-监控和信息技术 08. 食品安全-新产品与新技术 09. 农兽药残留分析 10. 重金属元素分析 11. 食源性致病菌分析 12. 生物毒素分析 13. 塑化剂筛查与分析检测 14. 地沟油筛查与分析检测 15. 牛奶及乳制品的质量安全 16. 动物源性食品的质量控制 17. 营养与保健食品的质量安全 18. 食品添加剂的管理与安全应用 19. 食品安全的风险分析与评估 20. 食品供应链的管理与过程控制

如您有兴趣在第六届食品安全大会上进行产品展览或发表技术讲座,请尽快报名,展位数量和演讲时间段有限,先到先得,订完为止。

大会组委会联系方式:

联系人:王凡老师 手机:15910886126 电话:010-63815398 63854275

传真:010-63851905 电子邮箱:wf_bj@hotmail.com 大会网址:www.cbifs.net