

大豆异黄酮对成年期大鼠卵巢卵泡发育的影响

陈益钦, 管芳圆, 申琪, 郭雨柔, 席煜, 王文祥

福建医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系 / 福建省环境与健康重点实验室, 福建 福州 350108

摘要:

[背景] 大豆异黄酮具有类似内源性雌激素的结构和功能, 在豆类制品中广泛存在。既往研究表明不同发育时期大豆异黄酮暴露对女性生殖系统具有不同的影响, 但关于成年期大豆异黄酮暴露的研究尚未见相关报道。

[目的] 探讨成年期大豆异黄酮暴露对大鼠卵巢卵泡发育的影响, 为成年期大豆异黄酮的合理利用提供科学依据。

[方法] 44只3月龄清洁级雌性Wistar大鼠, 按体重随机分为对照组和低、中、高大豆异黄酮剂量组(25、50、100 mg/kg), 每组11只, 每日灌胃1次, 持续6个月。干预结束后取卵巢称重并计算脏器系数; 观察卵巢组织学变化并计算卵泡构成比; 测定血清抗苗勒氏管激素(AMH)水平; 测定卵巢AMH、雌激素受体 β (ER β)、卵特异性连接组蛋白(H1foo)、干细胞因子(SCF)及其受体(c-Kit)的mRNA表达水平。

[结果] 与对照组相比, 各剂量组体重、卵巢重量及其脏器系数差异均无统计学意义($P>0.05$)。与对照组相比: 低剂量组窦前卵泡构成比升高(12.2% vs 8.6%); 中剂量组有腔卵泡构成比升高(40.7% vs 30.3%), 但黄体构成比降低(7.4% vs 19.1%); 高剂量组窦前卵泡构成比降低(3.4% vs 8.6%), 但闭锁卵泡构成比升高(53.8% vs 42.0%); 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。各剂量组血清AMH水平差异无统计学意义($P>0.05$); 但低、中剂量组AMH mRNA表达水平下降, 高剂量组表达水平上调(对照组和低、中、高剂量组分别为 1.00 ± 0.03 、 0.58 ± 0.03 、 0.53 ± 0.03 、 2.82 ± 0.37 , $P<0.05$)。与对照组(0.92 ± 0.07)相比, 低、中、高剂量组c-Kit mRNA表达水平均上调(分别为 1.19 ± 0.01 、 1.50 ± 0.07 、 1.80 ± 0.15 , $P<0.05$)。同样, 低剂量组SCF mRNA及高剂量组H1foo、ER β mRNA表达水平相较于对照组也上调[分别为(2.08 ± 0.06) vs (1.19 ± 0.29), (1.46 ± 0.03) vs (1.03 ± 0.13), (1.29 ± 0.26) vs (0.92 ± 0.09), $P<0.05$]。

[结论] 成年期大鼠25 mg/kg及以上的大豆异黄酮暴露可通过影响卵巢细胞因子的表达进而影响卵巢卵泡发育。

关键词: Wistar大鼠; 大豆异黄酮; 卵巢; 卵泡; 抗苗勒氏管激素

Effects of soy isoflavone on ovarian follicle development in adult rats CHEN Yi-qin, GUAN Fang-yuan, SHEN Qi, GUO Yu-rou, XI Yi, WANG Wen-xiang (Department of Health Inspection and Quarantine, School of Public Health, Fujian Medical University/Fujian Provincial Key Laboratory of Environment and Health, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract:

[Background] Soy isoflavone has similar structure and function to endogenous estrogen and is widely found in soy products. Previous studies have shown that soy isoflavone exposure at different developmental stages has different effects on female reproductive system, but there are no relevant reports on adult soy isoflavone exposure.

[Objective] This animal experiment explores the effects of adulthood soy isoflavone exposure on ovarian follicle development in rats, aiming to provide a scientific basis for the rational use of soy isoflavone in adulthood.

[Methods] Forty-four three-month-old clean female Wistar rats were randomly divided into control group, and low-, medium-, and high-dose soy isoflavone groups (25, 50, and 100 mg/kg), 11 rats per group, and received intragastric administration once a day for six months. After that, the ovary was weighed and organ coefficient was calculated; the histological changes of ovary were observed and the follicle proportion was calculated; the anti-Muller hormone (AMH) level

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19220

基金项目

福建省自然科学基金(2015J01306)

作者简介

陈益钦(1995—), 女, 硕士生;

E-mail: 13123184166@163.com

通信作者

王文祥, E-mail: 2001wanghappy@sina.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-04-08

录用日期 2019-07-16

文章编号 2095-9982(2019)09-0812-06

中图分类号 R155.5

文献标志码 A

引用

陈益钦, 管芳圆, 申琪, 等. 大豆异黄酮对成年期大鼠卵巢卵泡发育的影响[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(9): 812-817.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19220

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Wen-xiang, E-mail: 2001wanghappy@sina.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-04-08

Accepted 2019-07-16

►To cite

CHEN Yi-qin, GUAN Fang-yuan, SHEN Qi, et al. Effects of soy isoflavone on ovarian follicle development in adult rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(9): 812-817.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19220

in serum was determined; the mRNA expression levels of *AMH*, estrogen receptor β (*ER β*), oocyte-specific linker histone (*H1foo*), stem cell factor (*SCF*), and its receptor (*c-Kit*) in ovary were determined.

[Results] Compared with the control group, there was no significant difference in body weight, ovary weight, and its organ coefficient in the three dose groups ($P>0.05$). Compared with the control group, the proportion of pre-antral follicles in the low-dose group was increased (12.2% vs 8.6%); the proportion of antral follicles was increased (40.7% vs 30.3%), but the proportion of corpus luteum was decreased (7.4% vs 19.1%) in the middle-dose group; the proportion of pre-antral follicles was decreased (3.4% vs 8.6%), while the proportion of atresia follicles was increased (53.8% vs 42.0%) in the high-dose group; all the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in serum AMH levels ($P>0.05$) across all groups, but the expression levels of *AMH* mRNA were decreased in the low- and medium-dose groups and increased in the high-dose group (control: 1.00 ± 0.03 ; low-dose: 0.58 ± 0.03 ; medium-dose: 0.53 ± 0.03 ; high-dose: 2.82 ± 0.37 ; $P<0.05$). Compared with the control group (0.92 ± 0.07), the expression levels of *c-Kit* mRNA were up-regulated in the low-, medium-, and high-dose groups (1.19 ± 0.01 , 1.50 ± 0.07 , and 1.80 ± 0.15 , respectively, $P<0.05$), and the level of *SCF* mRNA in the low-dose group and the levels of *H1foo* and *ER β* mRNA in the high-dose group were also up-regulated [(2.08 ± 0.06) vs (1.19 ± 0.29) , (1.46 ± 0.03) vs (1.03 ± 0.13) , and (1.29 ± 0.26) vs (0.92 ± 0.09) , respectively, $P<0.05$].

[Conclusion] Exposure to soy isoflavone at 25 mg/kg and above in adult rats could affect ovarian follicle development through affecting the expression of ovarian cytokines.

Keywords: Wistar rat; soy isoflavone; ovary; follicle; anti-Muller hormone

大豆异黄酮来源于豆科类植物, 具有抗氧化^[1]、抗肿瘤^[2]及降胆固醇^[3]等生物学功能, 因其结构和功能与内源性雌激素类似而一直为人们所关注, 尤其在对于女性生殖系统的影响方面。大豆异黄酮是一种环境内分泌干扰物, 孕期大豆异黄酮暴露可使后代雌性小鼠动情期推迟, 血清雌激素降低^[4]; 在断乳至性成熟期, 大豆异黄酮可通过诱导颗粒细胞凋亡, 进而影响卵巢卵泡发育^[5]; 对于青年期^[6]和围绝经期^[7], 则可通过调控凋亡相关基因的表达从而延缓卵巢衰老, 延长生育年限。这一系列研究主要集中于大豆异黄酮对性成熟前卵巢卵泡发育的影响或成年期后对卵巢衰老的影响, 而缺乏大豆异黄酮对性成熟后的成年期卵巢卵泡发育过程影响的研究。此外, 既往研究主要关注的是大豆异黄酮调控卵巢类固醇激素合成从而影响卵泡发育方面^[5, 8], 但卵巢卵泡发育不仅受类固醇激素调控, 卵巢中部分分泌因子如干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 及其配体 (*c-Kit*)、抗苗勒氏管激素 (anti-Muller hormone, AMH)、卵特异性连接组蛋白 (oocyte-specific linker histone, H1foo) 等以及雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β) 也参与卵泡发育过程, 然而关于大豆异黄酮对于这一方面的研究甚少。基于以上研究现状, 本研究拟通过观察成年期大豆异黄酮暴露对大鼠卵巢卵泡生长发育及其相关分泌因子表达的影响, 以期对成年期大豆异黄酮暴露的卵巢毒性研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

44 只 3 月龄清洁级雌性 Wistar 大鼠, 体重 ($220\pm$

16) g, 来自福建医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。实验经福建医科大学动物管理委员会批准, 实验程序按照实验动物管理指南^[9]进行。

1.2 主要试剂与仪器

试剂: 大豆异黄酮 (福州吴氏实验动物贸易有限公司, 中国), 苏木素染液 (飞净生物技术有限公司, 中国), 伊红染液 (上海碧云天, 中国), 目的基因引物 (上海生工生物工程, 中国), mRNA 逆转录试剂、荧光定量 PCR 试剂 (大连 TaKaRa, 中国), ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特, 中国)。主要仪器: RM2245 半自动石蜡切片机 (LEICA, 德国), BM-V III 生物组织包埋机 (孝感市宏业医用仪器有限公司, 中国), OLYSIA-BioReport 图像拍摄系统 (Olympus, 日本), 5430R 台式高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), 酶联免疫检测仪 (Thermo Labsystems, 芬兰), 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国)。

1.3 动物分组与实验方法

1.3.1 实验动物与处理 44 只雌性 Wistar 大鼠适应性喂养一周后, 按体重随机分为对照组和低、中、高剂量组, 每组 11 只; 各剂量组与对照组均每日灌胃 1 次, 连续 6 个月。实验期间, 动物自由饮水进食, 每隔 3 d 称一次体重。

1.3.2 剂量设置依据 保健食品功能性评价中, 动物实验剂量设计经常以人体摄入量的 10 倍为依据。根据中国居民膳食营养素参考摄入量 (2013 版), 大豆异黄酮可耐受最高摄入量为 120 mg/d, 即体重为 50 kg 的成人大豆异黄酮可以每日 2.4 mg/kg 剂量暴露, 其 10 倍为 24 mg/kg (约为 25 mg/kg), 且本课题组前期研

究发现大鼠 100 mg/kg 和 200 mg/kg 大豆异黄酮暴露均可对卵巢产生不利影响^[10]。基于此,本研究选择以 100 mg/kg 为高暴露剂量,以 25 mg/kg 为低剂量,并以 50 mg/kg 为中剂量设置大豆异黄酮剂量组(用蒸馏水配制),以蒸馏水为对照组。

1.3.3 测定脏器系数与组织处理 干预结束后监测大鼠的动情周期,当动物处于动情期时摘眼球取血,而后采用颈椎脱臼法处死,取卵巢称重并计算脏器系数;每个剂量组取 3 个卵巢用 4% 甲醛溶液固定,而后脱水包埋,常规苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。光学显微镜下观察卵巢卵泡发育情况并计算卵泡构成比(各级卵泡数/总卵泡数,%)。各级卵泡判断标准如下:窦前卵泡,包括原始卵泡和初级卵泡,原始卵泡为单层扁平颗粒细胞包围的卵泡结构,卵母细胞细胞核大而圆,位于中央或稍偏;初级卵泡为单层立方或复层颗粒细胞包围的卵泡结构,出现透明带,无卵泡腔。有腔卵泡,多层颗粒细胞包围的卵泡结构,出现卵泡腔、放射冠。黄体,卵泡排卵后形成的体积巨大、富含血管的内分泌细胞团。闭锁卵泡,卵母细胞细胞核极度偏位,核固缩,核膜扭曲或溶解消失,或透明带扭曲、肿胀,或颗粒细胞脱落卵泡腔,或卵泡膜细胞体积增大,形成间质腺等。

1.3.4 ELISA 方法检测血清 AMH 水平 摘眼球取血静置 1 h 后,以 3 000×g 于 4℃ 离心 15 min 并收集血清,后采用 ELISA 试剂盒测定血清 AMH 含量。

1.3.5 荧光定量 PCR 测定卵泡发育相关基因表达水平 卵巢组织用 1 mL RNAiso Plus 碾磨制成匀浆并按总 RNA 提取说明书操作提取总 RNA;随后按照 PrimeScript RT Reagent 试剂说明书将其逆转录为 cDNA;最后采用 SYBR Green I 荧光染料试剂和 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR。反应条件为:95℃ 预变性 30 s→95℃ 预变性 5 s→60℃ 退火并延伸 34 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行 mRNA 表达量计算。内参和大鼠卵巢卵泡发育相关基因 mRNA 引物序列如下。

β -actin:正向,5'-GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG-3',反向,5'-GGAGATTA CTGCCCTGGCTCCTA-3';

ER β :正向,5'-TCTGGGTGATTGCGAAGAG-3',反向,5'-TGCCCTTGTTACTGAT GTGC-3';

H1foo:正向,5'-CAGTTGTTCAGGGGGCTA A-3',反向,5'-CTCGGGGGTCTTT GTCTTC-3';

AMH:正向,5'-AAGGGGA CAGGGACAGATG-3',

反向,5'-GGCAGTTGTTGGCT TGGTAG-3';

c-Kit:正向,5'-AGACTTGCTGGGATGCTGAT-3',反向,5'-TCTCTGGGTTGGGGT TACAG -3';

SCF:正向,5'-AATAGGAAAGCCGCAAAGTCC-3',反向,5'-GCTCCAAAAGCAAA GCCAAT-3'。

1.4 统计学分析

所有数据采用 IBM SPSS 20.0 软件进行统计分析。卵泡构成比比较采用 χ^2 检验;其余各指标数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并采用单因素方差分析比较组间差异;进一步分析时,若方差齐则采用 LSD-t 法进行两两比较,方差不齐则采用 Dunnett's t 检验进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$,所有数据均采用双侧检验。

2 结果

2.1 成年期大鼠脏器重量及脏器系数

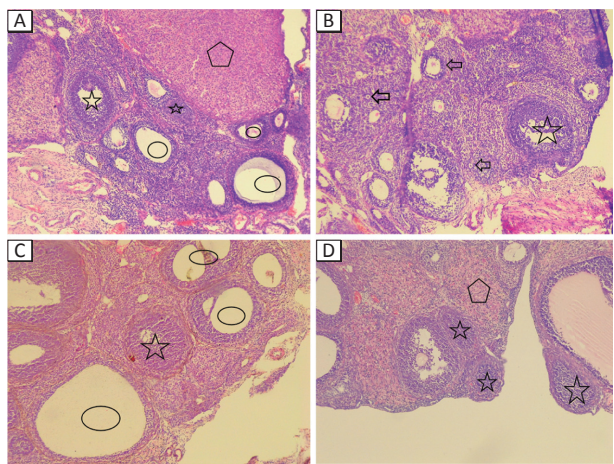
如表 1 所示,与对照组相比,各剂量暴露组终体重、卵巢重量及其脏器系数差异均无统计学意义(相应 F 值分别为:F=0.41, F=1.78, F=1.12;均 $P>0.05$)。

表 1 大豆异黄酮对成年期大鼠卵巢重量及其脏器系数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=11$)

组别 Group	初始体重 (g) Initial body weight	终体重 (g) Final body weight	卵巢重量 (mg) Ovarian weight	脏器系数 (mg/g) Organ coefficient
对照组 Control group	220.00±11.76	339.75±36.73	89.83±30.15	0.27±0.01
低剂量组 Low-dose group	219.36±17.51	335.91±35.48	89.33±24.23	0.27±0.07
中剂量组 Medium-dose group	220.15±18.17	328.00±44.09	75.84±30.09	0.23±0.09
高剂量组 High-dose group	220.00±18.50	325.08±27.66	67.79±25.64	0.21±0.09
F	0.01	0.41	1.78	1.12
P	0.999	0.744	0.166	0.350

2.2 成年期大鼠卵巢卵泡构成比

卵巢 HE 染色及卵泡构成比如图 1、表 2 所示。对照组可见较多的窦前卵泡,有腔卵泡和一定量的黄体,闭锁卵泡比例较少。而各剂量大豆异黄酮暴露组卵泡构成比发生明显改变($\chi^2=144.46$, $P<0.001$)。与对照组相比:低剂量组窦前卵泡构成比升高;中剂量组有腔卵泡构成比升高,但黄体构成比降低;高剂量组窦前卵泡构成比降低,但闭锁卵泡构成比升高;差异均具有统计学意义($P<0.05$)。



[注] ↖表示窦前卵泡, ○表示有腔卵泡, ☆表示闭锁卵泡, ⬠表示黄体。A: 对照组, 皮质区可见明显闭锁卵泡和有腔卵泡; B: 低剂量组, 可见窦前卵泡和黄体; C: 中剂量组, 可见较多有腔卵泡; D: 高剂量组, 可见大量闭锁卵泡。

[Note] ↖indicates pre-antral follicles; ○indicates antral follicles; ☆indicates atresia follicles; ⬠indicates corpus luteum. A: In the control group, there are obvious atresia follicles and antral follicles in the cortical area; B: In the low-dose group, pre-antral follicles and corpus luteum are seen; C: In the medium-dose group, more antral follicles are observed; D: In the high-dose group, a large number of atresia follicles are found.

图1 大豆异黄酮对成年期大鼠卵巢卵泡构成比的影响 (HE染色, ×100)

Figure 1 Effects of soy isoflavone on the proportion of ovarian follicles in adult rats (HE staining, ×100)

表2 大豆异黄酮对成年期大鼠卵巢卵泡构成比的影响 (%)
Table 2 Effects of soy isoflavone on the proportion of ovarian follicles in adult rats

组别 Group	窦前卵泡 Pre-antral follicle	有腔卵泡 Antral follicle	闭锁卵泡 Atresia follicle	黄体 Corpus luteum	合计 Total
对照组 Control group	8.6	30.3	42.0	19.1	100.0
低剂量组 Low-dose group	12.2*	34.6	37.6	15.6	100.0
中剂量组 Medium-dose group	9.2	40.7*	42.7	7.4*	100.0
高剂量组 High-dose group	3.4*	27.4	53.8*	15.4	100.0

[注] *: 与对照组相比, $P<0.05$ 。
[Note] *: Compared with the control group, $P<0.05$ 。

2.3 成年期大鼠血清AMH水平及卵巢AMH mRNA的表达

如表3所示, 各剂量组血清AMH水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 但组间mRNA表达水平不同 ($F=179.43$, $P<0.001$)。与对照组相比, 低、中剂量组AMH mRNA表达水平下降, 而高剂量组AMH mRNA表达水平上调, 差异均具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

表3 大豆异黄酮对成年期大鼠血清AMH及卵巢AMH mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=11$)

Table 3 Effects of soy isoflavones on serum AMH and its mRNA expression in ovary in adult rats

组别 Group	AMH质量浓度 (μg/L) AMH concentration	AMH mRNA
对照组 (Control group)	10.36±1.81	1.00±0.03
低剂量组 (Low-dose group)	10.30±1.61	0.58±0.03*
中剂量组 (Medium-dose group)	9.04±1.09	0.53±0.03*
高剂量组 (High-dose group)	9.51±1.48	2.82±0.37*
F	1.97	179.43
P	0.134	0.000

[注] *: 与对照组相比, $P<0.05$ 。
[Note] *: Compared with the control group, $P<0.05$ 。

2.4 成年期大鼠卵巢SCF、c-Kit、H1foo及ERβ mRNA的表达

卵巢SCF、c-Kit、H1foo及ERβ mRNA表达水平检测结果见表4。经单因素方差分析发现, 各剂量组SCF、c-Kit、H1foo及ERβ mRNA表达水平差异均有统计学意义 ($P<0.001$ 或 $P<0.05$); 与对照组相比, 低剂量组SCF mRNA表达水平, 低、中、高剂量组的c-Kit mRNA表达水平及高剂量组H1foo、ERβ mRNA表达水平也上调 ($P<0.05$)。

表4 大豆异黄酮对大鼠卵巢SCF、c-Kit、H1foo及ERβ mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=11$)

Table 4 Effects of soy isoflavone on SCF, c-Kit, H1foo, and ERβ mRNA expressions in ovary in adult rats

组别 Group	SCF mRNA	c-Kit mRNA	H1foo mRNA	ERβ mRNA
对照组 Control group	1.19±0.29	0.92±0.07	1.03±0.13	0.92±0.09
低剂量组 Low-dose group	2.08±0.06*	1.19±0.01*	1.04±0.05	0.88±0.20
中剂量组 Medium-dose group	1.31±0.03	1.50±0.07*	1.09±0.05	1.23±0.43
高剂量组 High-dose group	1.46±0.06	1.80±0.15*	1.46±0.03*	1.29±0.26*
F	26.49	62.50	43.39	3.25
P	0.000	0.000	0.000	0.046

[注] *: 与对照组相比, $P<0.05$ 。
[Note] *: Compared with the control group, $P<0.05$ 。

3 讨论

卵巢是女性重要的生殖器官, 卵巢重量及其脏器系数可客观反映其生长发育状况。在本研究中, 各剂量干预组体重、卵巢重量及其脏器系数未见不同, 提示在大豆异黄酮作用下, 卵巢无或仅有轻微病理损伤。鉴于各级卵泡构成比在一定程度上可以反映外源

物质对卵巢功能的影响,本研究进一步计算卵泡构成比后发现低剂量组窦前卵泡构成比高于对照组,表明低剂量大豆异黄酮可减少卵巢原始卵泡消耗,进而延缓卵巢功能衰竭;中剂量组有腔卵泡构成升高,黄体构成降低,而高剂量组窦前卵泡降低,闭锁卵泡构成比明显升高,提示中剂量组优势卵泡发育受阻,导致最终成功释放卵子的概率下降,而高剂量组会促窦前卵泡的丢失,减少卵巢寿命。

卵巢中部分分泌因子可参与卵泡发育过程。其中,SCF主要由卵巢颗粒细胞合成,可辅助优势卵泡生长^[11],通过SCF/c-Kit信号通路可以调控卵巢原始卵泡的生长、激活和早期发育^[12];H1foo特异性表达于早期卵母细胞中,李建^[13]发现在小鼠卵母细胞超表达H1foo会促进卵母细胞成熟,与Yun等^[14]的研究相一致,提示H1foo在卵母细胞成熟过程中发挥着重要的作用。本研究发现,低剂量组SCF、c-Kit mRNA表达均高于对照组,表明低剂量大豆异黄酮可促进优势卵泡发育,抑制闭锁卵泡形成,同时减少窦前卵泡的消耗;中剂量组c-Kit mRNA表达水平高于对照组,但是其SCF mRNA表达水平未发生明显变化,推测中剂量组可促进卵泡发育,使有腔卵泡增多,但因未增强优势卵泡的发育,所以会使黄体形成减少;高剂量组c-Kit及H1foo表达水平均明显高于对照组,而c-Kit和H1foo基因与原始卵泡及卵母细胞发育启动有密切关联^[12-13],因此高剂量组可能会促进原始卵泡的启动,导致窦前卵泡构成比的下降。

AMH是转化因子 β 超家族中的成员,可通过抑制早期卵泡发育或降低卵泡对卵泡刺激素的敏感性^[15],从而对卵泡发育过程进行调控。研究表明,多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞AMH启动子活性异常增高,导致其转录水平提高,进而使得血清AMH升高,从而降低生长卵泡对卵泡刺激素的敏感性,抑制对优势卵泡的选择,最终使卵泡停止发育^[16-17]。在本研究中,高剂量组卵巢AMH mRNA异常高表达,本应有与多囊卵巢综合征患者类似的表现,即血清AMH水平上升,但实验表明血清中AMH水平无明显变化;此外,低、中剂量组AMH mRNA表达降低,但其血清水平也无明显变化。因此猜测,大豆异黄酮对AMH表达的影响可能存在转录后的调控机制,如甲基化、microRNA调控等,此机制尚需进一步研究。

雌激素受体有 α 和 β 亚型,ER β 主要表达于颗粒细胞,对卵泡生长发育具有重要作用,其表达水平随

卵泡发育逐渐减低^[18],大豆异黄酮可与其竞争性结合而对生殖系统发挥作用^[19]。本研究通过观察ER β mRNA表达水平变化情况来探讨ER是否介导大豆异黄酮对卵巢卵泡发育的作用过程。结果表明,仅高剂量组ER β mRNA表达水平高于对照组,提示高剂量大豆异黄酮可通过ER β 途径对卵巢卵泡生长发育发挥效应,而低、中剂量则可能通过非ER β 途径对卵巢卵泡发挥效应。

综上,本研究结果显示,成年期低剂量大豆异黄酮暴露可提高大鼠卵巢卵泡储备,延缓卵巢衰老,而中、高剂量大豆异黄酮对卵巢具有损害作用。先前的研究表明摄入豆类膳食的亚洲成年人血清中大豆异黄酮的平均浓度为276 nmol/L^[20],而根据前期的研究^[21](50 mg/kg组大鼠血清大豆异黄酮浓度为726 nmol/L)可得,与人体平均血清大豆异黄酮浓度等效的大鼠剂量为19 mg/kg。尽管本研究的低剂量略高于人体实际平均水平,但该剂量仍显示出对卵巢的有益效应,所以大豆异黄酮对大多数育龄女性是有益的,应提倡多摄入。但是,由于中高剂量大豆异黄酮对卵巢具有损害作用,而对于少数女性素食主义者而言,其大豆异黄酮暴露仍可能达到该剂量水平,所以这部分人群应当避免大豆异黄酮的过多摄入,尤其是大豆异黄酮的补充剂摄入。同时,本研究也存在一些不足。首先,在本研究中大鼠饲料摄入量的相关数据并未收集,并不能完全排除大豆异黄酮的作用是因饲料摄入量不同而间接影响卵巢卵泡的发育。其次,最低剂量略高于人体实际平均摄入量,实验效应与实际效应可能有所差异。此外,本实验周期较长,仅测定了实验末卵巢的变化情况,无法保证在整个实验周期内大豆异黄酮对卵巢的作用效果是一致的。然而本实验结果依然可以表明大豆异黄酮可以对成年期大鼠卵巢造成影响,其具体的作用机制有待今后进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 许永杰, 卢志顺, 罗洁. 大豆异黄酮减轻大鼠非酒精性脂肪肝病的作用研究[J]. 现代医药卫生, 2019, 35 (2): 188-191.
- [2] CHANG YJ, HOU YC, CHEN LJ, et al. Is vegetarian diet associated with a lower risk of breast cancer in Taiwanese women? [J]. BMC Public Health, 2017, 17 (1): 800.
- [3] HAN A, WON SB, KWON YH. Different effects of maternal

- low-Isoflavone soy protein and Genistein consumption on hepatic lipid metabolism of 21-day-old male rat offspring [J]. *Nutrients*, 2017, 9 (9) : 1039.
- [4] 尹艳云, 刘京威, 鲍文玉, 等. 饲喂雌鼠大豆异黄酮对后代雌性生殖性状的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17 (4) : 299-302.
- [5] 王文祥. 断乳至性成熟期持续暴露大豆异黄酮对卵泡发育的影响及其代谢组学研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2013.
- [6] 迟晓星, 张涛, 钱丽丽, 等. 大豆异黄酮对青年雌性大鼠卵巢、子宫组织中 *Bcl-2* mRNA 和 *Bax* mRNA 表达的影响 [J]. *食品科学*, 2010, 31 (11) : 231-233.
- [7] 孟毅, 庞海燕, 刘国艺, 等. 大豆异黄酮对围绝经期大鼠卵巢组织形态学变化及 *SPARC* mRNA 表达的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2012, 19 (1) : 32-34.
- [8] 范觉鑫. 大豆异黄酮对巴马香猪初情启动及卵泡发育的影响及其机制 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [9] National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals [M]. 8th ed. Washington, DC : National Academies Press, 2011 : 11-103.
- [10] WANG W, SUN Y, GUO Y, et al. Continuous soy isoflavones exposure from weaning to maturity induces downregulation of ovarian steroidogenic factor 1 gene expression and corresponding changes in DNA methylation pattern [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 281 : 175-183.
- [11] 温肖依. 多囊卵巢综合征患者卵泡发育不良与 SCF、BMP-15 以及 GDF-9 表达水平的相关性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [12] 李昱辰, 陈钦辉, 刘瑾, 等. 2, 5- 己二酮抑制大鼠卵巢颗粒细胞干细胞因子的表达 [J]. *中国预防医学杂志*, 2018, 19 (4) : 272-275.
- [13] 李建. *H1foo* 基因在小鼠卵母细胞中的表达及 *H1foo* 基因四环素诱导表达载体的构建 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [14] YUN Y, AN P, NING J, et al. H1foo is essential for *in vitro* meiotic maturation of bovine oocytes [J]. *Zygote*, 2015, 23 (3) : 416-425.
- [15] 田勇, 赖志文, 石良艳, 等. AMH 蛋白在性成熟小鼠卵泡发育不同阶段及自然衰老过程卵巢组织中的表达变化 [J]. *现代妇产科进展*, 2012, 21 (12) : 936-940.
- [16] 杨硕, 尤昭玲, 孙晓峰, 等. 抗苗勒氏管激素与多囊卵巢综合征卵泡发育相关性的研究进展 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35 (9) : 65-69.
- [17] 席稳燕. 血 AMH 与 PCOS 妇女辅助生殖技术结局的关系以及 *AMH* mRNA 在不同卵巢储备妇女颗粒细胞中的差异表达 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [18] 丘彦, 贺雪辉, 王炼炼. 性成熟小鼠卵巢和性未成熟小鼠体外培养卵泡的雌激素受体 α 、 β 亚型表达的研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32 (5) : 480-483, 527.
- [19] 吕斌, 张娟丽, 李振国, 等. 大豆异黄酮对大鼠子宫雌激素受体的影响 [J]. *现代预防医学*, 2009, 36 (8) : 1440-1441.
- [20] SETCHELL K D, ZIMMER-MECHEMIAS L, CAI J, et al. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula [J]. *Lancet*, 1996, 350 (9070) , 23-27.
- [21] WANG W, SUN Y, LIU J, et al. Soy isoflavones administered to rats from weaning until sexual maturity affect ovarian follicle development by inducing apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72 : 51-60.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 汪源)