

大豆异黄酮对雄性子代大鼠 *P450scc*、*MIS*、*ERβ* 基因表达的影响

孙合涛^{1,2}, 纪海续³, 周远忠¹, 范奇元^{1*}

摘要: [目的] 探讨孕期大鼠暴露大豆异黄酮对子代雄性生殖系统发育的影响。[方法] SD 大鼠按雌:雄=2:1 的比例同笼交配获取 40 只孕鼠。将孕鼠随机分为 5 组: 对照组(0 mg/kg); 大豆异黄酮 25、50、150、450 mg/kg 组。在孕期第 13~19 天将大豆异黄酮以花生油为溶剂灌胃染毒。将雄性子代于出生后第 18 天处死取其睾丸组织用荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测胆固醇侧链裂解酶(*P450scc*)、苗勒管抑制物(*MIS*)和 β-雌激素受体(*ERβ*)基因的表达水平。[结果] 大豆异黄酮可以明显降低 *ERβ* 基因的表达 ($P<0.05$); *P450scc* 基因表达的降低不明显; 在 150 mg/kg 和 450 mg/kg 剂量时可以增加 *MIS* 基因的表达 ($P<0.01$)。[结论] 孕期暴露大豆异黄酮后可以改变雄性子鼠睾丸的基因表达水平, 从而对子鼠的雄性生殖系统发育造成影响。

关键词: 异黄酮; 大鼠; 胆固醇侧链裂解酶; 苗勒管抑制物; β-雌激素受体

Effects of Soy Isoflavone on Gene Expression of *P450scc*, *MIS* and *ERβ* in Male Offspring Rats SUN He-tao^{1,2}, JI Hai-xu³, ZHOU Yuan-zhong¹, FAN Qi-yuan^{1*} (1. Department of Preventive Medicine, Zuiyi Medical College, Zuiyi, Guizhou 563003, China; 2. Tengzhou worker's Hospital, Tengzhou, Shandong 277500 China; 3. Zhengzhou Huaxin College, Zhengzhou, He'nan 451150 China). *Address correspondence to FAN Qi-yuan; E-mail: qiyuan_fan@yahoo.com.cn

Abstract: [Objective] To explore the effects of soy isoflavone (SIF) on offspring male rats reproductive system after pregnancy exposure. [Methods] 40 pregnant rats were divided into five groups randomly. Soy isoflavone was delivered to the pregnant rats by gavage (peanut oil worked as solution, was delivered to control group) during the period of E13~E19, with the doses of 0 (control group), 25, 50, 150, 450 mg/kg. On postnatal day 18, F1 male rats were sacrificed, testicular tissues were obtained, the expression of *P450scc*, *MIS*, *ERβ* mRNA in testis were measured by real-time PCR. [Results] Compared with the control group, the expressions of *ERβ* ($P<0.01$) and *P450scc* ($P>0.05$) were decreased by exposed to different doses of SIF, but *MIS* expression increased (150, 450 mg/kg SIF, $P<0.01$). [Conclusion] SIF could alter reproductive-related gene expressions in the offspring male rat testes, which could lead to certain adverse effects.

Key Words: isoflavane; rats; *P450scc*; *MIS*; *Erβ*

大豆异黄酮 (soybean isoflavone, SIF) 主要包括染料木黄酮 (genistein, GEN)、大豆苷原 (daidzein, DAI)、大豆黄素 (glycitein) 3 种游离态苷原和 9 种葡萄糖结合态苷类成分组成。它是一类天然植物雌激素, 在动物体内发挥雌激素活性约为雌二醇的 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$, 具有双向雌激素样活性, 在低剂量时与雌激素竞争结合雌激素受体 (estrogen receptors, ER) 表现为抗雌激素作用, 中剂量时产生一定的雌激素活性, 高剂量时可活化因雌激素不足未能活化的 ER, 产生雌激素增强效应; SIF 与 β-雌激素受体 (estrogen receptors beta, *ERβ*) 的亲合力比 α-雌激素受体 (estrogen receptors alpha, *ERα*) 高; 所以异黄酮发

挥的效应因其所作用组织器官雌激素受体水平、局部浓度、内源性雌激素水平等不同而不同^[1-3]。近年来随着大豆深加工产业的发展, 出现了大量大豆浓缩制品以及大豆异黄酮制剂等提纯产品, 许多食品中都添加有大豆浓缩制品, 如婴幼儿配方奶粉等。人们对大豆异黄酮的接触也超过了传统意义上的膳食接触水平。大豆异黄酮潜在的毒性作用也越来越受到人们重视。现有研究中, 对大豆异黄酮可能引起生殖毒性的最小剂量尚无确切定论, 不同研究所得结果也不尽相同, 特别是孕期暴露后, 对雄性子代可能造成生殖毒性的剂量及不良后果缺乏相关性的研究。本实验即通过大鼠孕期子代生殖系统发育的最敏感期暴露大豆异黄酮, 从基因水平研究探讨大豆异黄酮对其子一代 (F₁) 雄性大鼠睾丸组织中相关基因表达的影响及产生影响的可能机制。

[基金项目] 遵义医学院院资金 (编号: F-214)

[作者简介] 孙合涛 (1979-), 男, 硕士生; 研究方向: 环境毒理学;

E-mail: sunhetao2007@163.com

[*通信作者] 范奇元教授; E-mail: qiyuan_fan@yahoo.com.cn

[作者单位] 1. 贵州省遵义医学院预防医学教研室, 贵州 遵义 5630032;

2. 滕州工人医院, 山东 滕州 277500; 3. 郑州华信学院,

河南 郑州 451150

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

动物: 清洁级 SD 大鼠 (第三军医大学野战外科研究所动

物室), 动物合格证号: SCXK-(军)2007-017。大豆异黄酮(陕西森弗生物技术有限公司生产, SIF 含量为 98%); 实时荧光定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]; Trizol(美国 Invitrogen 公司); 苗勒管抑制物(mullerian-inhibiting substance, MIS)、胆固醇侧链裂解酶(P450 side-chain cleavage, *P450scc*)、*ERβ* 引物[宝生物工程(大连)有限公司]; Tu-1810 紫外分光光度计(北京普析通用分析仪器厂); icyclerPCR 仪(美国 BIO-RAD)。

1.2 试验动物分组与处理

SD 大鼠雄性 20 只, 体重(230±20)g; 雌性 40 只, 体重(200±20)g, 适应性喂养一周后按雌:雄=2:1 的比例合笼交配, 次日晨雌鼠阴道涂片镜检, 发现精子当日为受孕第 0 天。共获取 40 只孕鼠, 将其随机分成 5 组, 每组 8 只: 分别为对照组(0mg/kg 大豆异黄酮组), 大豆异黄酮 25、50、150、450mg/kg 组。各组在母鼠孕期第 13~19 天用花生油为溶剂进行大豆异黄酮灌胃染毒。孕鼠产后第 3 天对各组子鼠进行数量调整, 使每只母鼠哺乳 6 只子鼠, 子鼠雌:雄=1:1, 喂至子鼠第 18 天时, 每组随机抽取 6 只雄鼠处死取睾丸组织约 100mg, 剪碎后加入 1mL Trizol 试剂于 -80℃ 冰箱保存。

1.3 实时荧光定量测定睾丸组织的 *P450scc*、*MIS* 和 *ERβ* 基因表达水平

检测包括三个步骤: 第一步, 按 Trizol 说明书方法提取睾丸组织的总 RNA, 紫外分光光度计测定 OD 值分析提取 RNA 的纯度, OD 值在 1.8~2.0 之间说明纯度较好。第二步, 将总 RNA 逆转录成 cDNA, 先将 RNA 配成 50×10⁻⁶mg/L 的浓度, 按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书配制逆转录反应体系: RNA 6μL, 5×primeScript™ Buffer 2μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5μL, Oligo dT Prime(50μmol/L) 0.5μL, Random 6 mers(100μmol/L) 0.5μL, 加 RNase freed H₂O 至 10μL。逆转录反应条件: 37℃ 15min, 85℃ 5s。第三步, 进行实时荧光定量 PCR 反应: 按 PCR 试剂盒说明书配制 PCR 反应体系 20μL, 目的基因均由大连宝生物公司设计合成, 内参 *β-action* 由大连宝生物公司提供, 待测基因扩增条件: 95℃ 8min30s; 95℃ 10s, 60℃ 1min, 40 循环; 95℃ 1min, 55℃ 1min, 55℃ 10s。扩增后根据 Ct 值依次计算各基因的相对表达量。表 1 为本研究所用的 Real-time PCR 的引物。图 1 为实验中部分样品的扩增曲线图。

表 1 用于 Real-time PCR 的引物
Table 1 Primer used in Real-Time PCR

基因名称	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
<i>ERβ</i>	AGCGACCCATTGCCAATCA	CTGGCACAAGTCTCCCACTAA
<i>P450scc</i>	TCTTACACAGACGCATCAAGCA	CAAAGGCAAAAGCGGAATAGG
<i>MIS</i>	GCTGCTGCTAGCGACTATG	AGATCTAGGCTAGCAACTG
<i>3β-HSD</i>	AGGGCATCTCTGTGTGTCATCCAC	GGCCTCCAACAGATTCTGGGTA
<i>β-actin</i>	GCCAACACAGTGTCTCT	AGGAGCAATGATCTTGATCTT

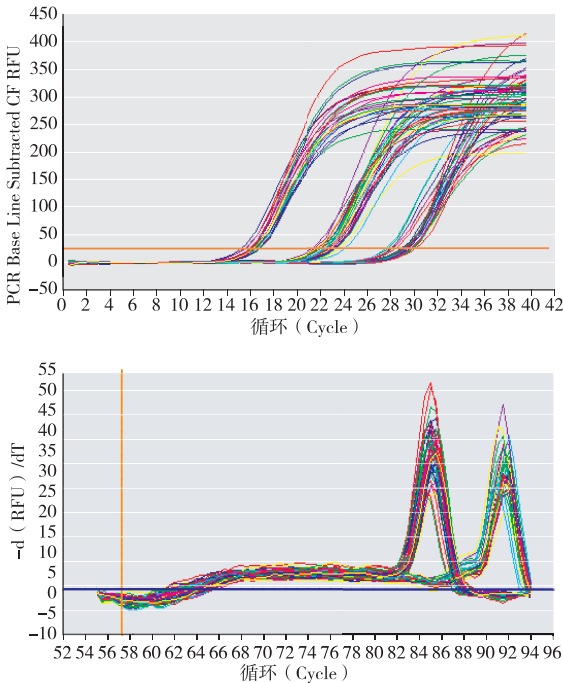


图 1 部分样本的扩增和溶解曲线

Figure 1 Amplification and melt curve of selected samples

1.4 统计分析

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 正态检验显示各组数据均为正态分布, 采用单因素方差分析进行各组间的比较, 先进性方差齐性检验, 各组方差检验结果显示方差齐($P_{ERβ}=0.078$, $P_{P450scc}=0.123$, $P_{MIS}=0.082$), 采用 LSD 法进行分析。

2 结果

从表 2 中可以看出 SIF 对 F₁ 雄鼠出生后第 18 天睾丸组织中 *ERβ*、*P450scc*、*MIS* 基因的 mRNA 表达影响不同。与对照组比较, 各 SIF 组可以明显降低 *ERβ* 的基因表达($P<0.05$); 各 SIF 组 *P450scc* 基因表达未见明显的降低($P>0.05$); 随着 SIF 剂量增高 *MIS* 基因的 mRNA 表达增加, 在 150mg/kg 与 450mg/kg 剂量时增加明显($P<0.01$)。

表 2 孕期暴露于 SIF F₁ 雄鼠出生后 18 天 *ERβ*、*P450scc* 和 *MIS* 的 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 mRNA levels of *ERβ*, *P450scc* and *MIS* of F₁ male on postnatal day 18

组别 (mg/kg)	<i>ERβ</i>	<i>P450scc</i>	<i>MIS</i>
0	1.018 ± 0.205	1.025 ± 2.574	1.010 ± 0.135
25	0.688 ± 0.217*	0.928 ± 0.094	1.002 ± 0.569
50	0.597 ± 0.116**	0.875 ± 0.314	1.163 ± 0.183
150	0.558 ± 0.312**	0.820 ± 0.263	3.677 ± 1.589**
450	0.567 ± 0.126**	0.817 ± 0.345	2.715 ± 0.982**
<i>F</i>	5.164	0.624	11.561
<i>P</i>	0.04	0.650	<0.001

[注]*: 与对照组比较(Compared with the control group), $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

3 讨论

在胚胎发育期, 睾丸的支持细胞和间质细胞产生的苗勒管抑制物(MIS)和睾酮促进雄性性腺的分化形成, MIS促使苗勒管退化, 使泌尿生殖系统向雄性发展; 睾酮使中肾管进一步分化为附睾、输精管、精囊。因此, 在雄性性腺的形成以及睾丸的正常下降移行过程中, 这两种激素起着决定性的作用。缺少睾酮作用, 将使中肾管退化, 导致雄性性器官发育障碍; 缺少MIS将使副中肾管分化为子宫、输卵管和阴道上部^[45]。胆固醇侧链裂解酶是睾酮合成过程中关键酶之一, 该酶的作用将直接影响睾酮的合成。在机体中, 雌激素需要与相应的受体结合后再发挥作用。有研究表明^[6], 在睾丸组织中, 睾丸间质细胞膜上存在着大量雌激素受体, 因此雌激素可通过这些受体作用于睾丸间质细胞对其功能和发育等产生影响。所以, 在雄性生殖系统发育敏感期, 如果外界因素影响到了MIS、P450_{scc}和 β -雌激素受体(ER β)等的基因表达与分泌, 将会使大鼠生殖系统的正常发育和功能受到影响。

本实验结果显示, 母鼠暴露于大豆异黄酮后, 子鼠睾丸组织中ER β 基因的mRNA表达显著降低, 说明大豆异黄酮可以作用于睾丸间质细胞从而影响大鼠睾丸的发育和功能(我们暂时将这种综合效应称为“雌激素效应”), 这与刘兆平等^[7]的研究结果相似。由于雌激素是通过作用于雌激素受体来发挥其作用的, 所以当体内“雌激素效应”过强时, 机体将通过调节降低雌激素受体的水平来降低雌激素效应, 同时也间接反映了在本实验剂量范围内SIF在子鼠体内表现为较强的雌激素样作用。作为睾酮合成过程中的关键限速酶之一的P450_{scc}, 在本实验剂量条件下与对照组比较其mRNA表达有所降低, 但无明显差异($P>0.05$)。MIS是由睾丸支持细胞分泌, 作为哺乳动物胚胎期性腺分化形成早期的关键基因, 可以促进苗勒管的退化并促进雄性生殖系统的形成, 但其过高表达时可以造成Wolffian管发育受损, 睾丸间质细胞的发育延迟或发育不全^[8]。因此, MIS在雄性生殖系统的表达通常是在子鼠出生后不久即出现明显降低, 但本实验发现MIS基因表达在异黄酮高于150mg/kg时明显增高(与对照组比较 $P<0.01$), 推测可能的原因是孕期接触异黄酮所导致睾丸功能细胞发育滞后, 睾丸支持细胞尚处在较为幼稚阶段所致。MIS基因表达的高水平极有可能会干扰到睾丸间质细胞的正常功能和发育。

综上所述, 母鼠孕期接触大豆异黄酮可能通过影响MIS和ER β 基因的改变对雄性生殖发育产生影响。并且各基因受大豆异黄酮影响的敏感度不同, 如当大豆异黄酮剂量为25mg/kg时, ER β 基因的mRNA表达水平已有明显降低; MIS则要在大豆异黄酮剂量达到150mg/kg以上时才有明显差异; 而P450_{scc}在本实验剂量内无明显改变。由此我们推测在本研究所使用的大豆异黄酮剂量范围内, 孕期暴露后可以通过大豆异黄酮所具有的雌激素活性影响雄性子鼠生殖系统发育相关基因的表达, 对雄性子鼠生殖系统发育和功能造成不良影响。

参考文献:

- [1] RIMOLDI G, CHRISTOFFEL J, SEIDLOVA-WUTTKE D, et al. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(Suppl): 62-68.
- [2] 孔令娜, 左萍萍. 植物雌激素研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2003, 12(1): 46-53.
- [3] 崔洪斌, 迟晓星, 李百祥, 等. 大豆异黄酮对雄性大鼠生殖系统的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(3): 164-166.
- [4] 徐伟珏, 朱铨达, 许恩, 等. 小儿血清苗勒抑制物质水平变化及其临床意义[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(3): 246-247.
- [5] 许恩, 徐伟珏, 龚代贤, 等. 血清苗勒抑制物浓度测定在隐睾症和两性畸形临床诊断中的应用[J]. 诊断学理论与实践, 2004, 3(4): 298-300.
- [6] ABNEY TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review[J]. Steroids, 1999, 64(9): 610-617.
- [7] 刘兆平, 李丽, 张晓鹏, 等. 大豆异黄酮对新生儿期大鼠子宫发育和雌激素受体表达的影响[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(6): 488-491.
- [8] JTEIXEIRA J, MAHESWARAN S, DONAHOE P K. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications[J]. Endocr Rev, 2001, 22(5): 657-674.

(收稿日期: 2009-11-20)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 洪琪; 校对: 徐新春)

(上接第31页)

- [11] DENT EW, KALIL K. Axon branching requires interactions between dynamic microtubule and actin filaments[J]. J Neurosci, 2001, 21(24): 9757-9769.
- [12] ASANUMA M, MIYAZAKI I. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease: possible involvement of quinine formation[J]. Expert Rev Neurother, 2006, 6(9): 1313-1325.

- [13] KUHN HG, DICKINSON-ANSON H, GAGE FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation[J]. J Neurosci, 1996, 16(6): 2027-2033.

(收稿日期: 2010-05-05)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 洪琪; 校对: 徐新春)