

槲皮素对幼鼠卵巢发育以及血液中激素水平的影响

舒翔, 胡晓娟, 周圣煜, 许春莲, 邱奇琦, 聂少平*, 谢明勇

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要: 为了探讨槲皮素对 3 周龄小鼠卵巢发育和血浆中激素水平的影响, 本研究使用槲皮素对 3 周龄小鼠进行连续灌胃 (45 、 25 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 50 天, 定期监测发情周期和血液中相关激素水平变化; 处死动物后取出卵巢进行组织形态分析, 观察各级卵泡及其 PCNA 染色细胞的比例。结果显示, 槲皮素组较空白对照组能增加卵巢的器官指数 ($P < 0.05$), 能提高原始卵泡和次级卵泡的比例 ($P < 0.05$) 并降低成熟卵泡、闭锁卵泡和黄体的比例 ($P < 0.05$), 能有效提高各级卵泡中增殖细胞的比例 ($P < 0.05$), 对于小鼠血液中各激素水平有较为明显的影响 ($P < 0.05$), 尤其是卵泡刺激素 (FSH) 和黄体生成素 (LH)。由此可见, 槲皮素在小鼠卵巢发育阶段呈现出一定的类雌激素的性质, 在幼鼠发育阶段长期摄入槲皮素, 将影响其卵巢发育以及体内相关的激素水平。

关键词: 槲皮素; 植物雌激素; 卵泡发育; 卵巢癌

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 09-1051-07

Effect of quercetin exposure during the prepubertal period on ovarian development and reproductive endocrinology of mice

SHU Xiang, HU Xiao-juan, ZHOU Sheng-yu, XU Chun-lian, QIU Qi-qi, NIE Shao-ping*, XIE Ming-yong

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: This study is to explore the effects of quercetin (QUE) on the 3 week-old mice ovarian development and relative hormone levels. The 3 week-old mice were exposed to QUE (45 , 25 , and $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage for 50 days. The estrous cycle during 50 days and the changes of hormone level such as FSH, LH, etc were monitored. Moreover, the ovaries were removed after sacrifice. The organ index was measured, and the ratios of different stages of follicles were analyzed by HE staining. Furthermore, the proportion of PCNA positive cells during all stages was detected by immunohistochemistry. The results showed that QUE could increase body weight of mice and reduce the anogenital distance (AGD) to some extent, and was able to disrupt mice's estrous cycle, but it could not extend or reduce the cycle regularity. It increased ovarian organ index with a dose-dependent manner. The proportion of the primordial follicle and secondary follicles rose obviously, and that of mature follicles', atretic follicles' and corpus luteums' reduced, while primordial follicle had no change. Immunohistochemistry analysis showed that QUE could effectively increase the percentage of proliferating cells in all kinds of follicles. Serum hormone assay showed that there were significant changes of FSH and LH levels. In summary, QUE showed an estrogen-like effect on mice's ovarian development. The weight of ovary, the proportion of all kinds of follicles, the development of ovarian cells and the level of plasma hormone in mice were altered obviously by oral administration of QUE.

Key words: quercetin; phytoestrogen; follicular development; ovarian cancer

收稿日期: 2011-02-23.

基金项目: 科技部国际合作项目 (2010DFA31780).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-791-8304452, E-mail: spnie@ncu.edu.cn

槲皮素及其衍生物是具有多种生物活性的黄酮类化合物, 广泛分布于蔬菜、水果、茶、葡萄酒以及食品添加剂中^[1, 2]。有文献报道, 槲皮素可以有效减少非肿瘤细胞凋亡, 增加其存活率^[3, 4]。槲皮素属于植物雌激素, 是具有类雌激素效应的天然化合物^[5]。目前已有大量的研究表明, 黄酮类植物雌激素对前列腺癌、妇女更年期综合征、骨质疏松和痴呆症等有一定的预防作用^[6, 7], 在动物生产中具有促进动物生长, 调节泌乳, 增强机体免疫力, 调节动物繁殖等生理功能。然而过多摄入此类物质将导致许多生殖系统疾病, 对人类的健康产生严重危害, 也有可能对动物的生殖系统及生长发育造成不利的影响, 甚至促进乳腺癌、卵巢癌等生殖系统肿瘤的发生及生长。有研究指出, 在大鼠的青春前期, 口服染料木素能阻止人工诱导乳腺癌^[8, 9]; 而另一项研究表明, 如果以胚胎为作用对象, 将得到相反的结果, 能够提高诱导乳腺癌的成功率^[10]。由此说明, 雌激素敏感性肿瘤如乳腺癌的发生是受到食源性植物雌激素干扰的, 但具体效应是促进还是抑制, 与作用量、作用对象所处生理状态等诸多因素都有很大的关系, 现在仍存在争议。

目前国内关于槲皮素对生殖系统方面影响的报道甚少, 只有几篇关于大鼠的实验研究^[11], 且实验设计和结果比较简单, 不论是剂量梯度、持续时间抑或是深入程度, 均不能从根本上说明槲皮素对动物生殖系统产生的生物学效应; 而国外的报道也对槲皮素对人体的影响存在正反两面争议。本文首次采用处于卵巢发育敏感阶段的 3 周龄小鼠作为研究对象, 探讨长期口服摄入不同剂量槲皮素后对其各级卵泡比例、卵巢指数和血液激素水平的影响及其互相之间的关系, 并拟对槲皮素在卵巢癌发生发展方面的效应做初步探索, 为今后更深入的研究提供方向和依据。

材料与方法

动物来源及饲养 清洁级 3 周龄雌性昆明种小鼠 90 只, 体重 (10 ± 2.5) g, 购于南昌大学医学院实验动物中心。于人工控制环境下饲养, 室温 (20 ± 1) °C, 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食饮水, 参照 AIN-93 饲料配方配制成小鼠日常饲料, 为了避免大豆异黄酮等植物雌激素对实验结果的干扰, 用玉米油代替其中的大豆油, 基础饲料配方: 20% 酪蛋白, 0.3% *L*-胱氨酸, 39.7% 玉米淀粉, 13.2% 糊精玉米粉, 10% 蔗糖, 5% 纤维, 7% 玉米油, 3.5% 混合矿物盐, 1% 混合维生

素, 0.2% 二酒石酸胆碱, 0.001% 叔丁基氢醌^[12]。

主要试剂 槲皮素 (quercetin, QUE) 和雌二醇 (estradiol, E2) 购于美国 Sigma 公司, 纯度 $\geq 98\%$; 二甲基亚砜 (DMSO) 购于天津市大茂化学试剂厂; 抗体: 一抗兔抗小鼠增殖细胞核抗原 (PCNA) 单克隆抗体和二抗山羊抗兔过氧化物酶标记的链霉卵白素 (streptavidin/peroxidase) 染色试剂盒, 购于北京中杉金桥公司; 小鼠血浆各种激素放射免疫测定试剂盒, 购于北京华英生物技术研究; 瑞氏染液试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

动物分组及处理 将 90 只小鼠随机分成 15 笼 (每笼 6 只), 共 5 组 (每组 3 笼, 共 18 只): 空白对照组 (A 组, DMSO $0.1 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$), 槲皮素 45、25 及 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量组 (B、C、D 组, 溶于 DMSO) 以及阳性对照组 (E 组, E2 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 溶于 DMSO)^[13]; 每天灌胃 1 次, 连续处理 50 天。每 5 天测一次体重 (BW), 以观察小鼠的一般生长发育情况; 待小鼠阴道开张, 确认小鼠性成熟后, 每天以阴道涂片方式, 确认小鼠所处的生殖周期状态; 定期 (每 10 天) 以眼眶取血方式采取小鼠血样 (待小鼠性成熟后, 只取处于发情期小鼠), -80 °C 保存, 检测血浆中各相关激素水平。

50 天后, 陆续处死各组处于发情期的小鼠, 取出卵巢组织, 浸泡在 10% 中性福尔马林中固定保存, 梯度酒精脱水后二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 连续切片 ($5 \mu\text{m}$)。

HE 染色 石蜡切片常规脱蜡, 梯度酒精水化, 苏木素染色 2 min, 1% 盐酸酒精分化 3 s, 稀氨水返蓝 30 s, 伊红染色 20 s, 脱水、透明、中性树胶封片。计算方法: 按照视野清晰、切面完整、染色区别度高等原则每个样本选取 3 张切片, 每张切片取 5 个视野, 计数每张卵巢组织切片上不同阶段卵泡数各占总卵泡数的百分比。

免疫组织化学染色 石蜡切片常规脱蜡入水, PBS (pH 7.4) 洗 5 min, 柠檬酸钠缓冲液高压锅 (放气 2 min) 修复抗原, 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物, PBS (pH 7.4) 洗 2 min (3 次); 封闭用正常山羊血清工作液, 室温 20 min, 甩去多余液体; 滴加一抗工作液, 4 °C 孵育过夜, PBS (pH 7.4) 洗 5 min (3 次); 滴加生物素化二抗工作液, 37 °C 孵育 15 min, PBS (pH 7.4) 洗 3 min (3 次); 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37 °C 孵育 15 min, PBS (pH 7.4) 洗 3 min (3 次); DAB- H_2O_2 室温下显色 5~30 min, 镜下根据显色程度控制反应时间, 蒸馏水洗涤, 苏木素复染, 中性树

胶封片。切片选取方法同 HE 染色, 计数不同阶段卵泡中 PCNA 阳性染色的比例。

血浆激素测定 用放射免疫法测定血浆中卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、孕酮 (P)、睾酮 (T)、雌二醇 (E2) 和泌乳素 (PRL) 等 6 种激素的动态变化, 按照各激素检测试剂盒说明书分别测定, 试剂盒批内测量误差 $CV_w < 10\%$, 批间测量误差 $CV_b < 15\%$ 。

统计学分析 所有统计学处理均采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素 ANOVA 分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Origin7.5 软件作图。

结果

1 一般情况统计结果

一般情况包括体重 (BW)、肛殖距 (AGD) 和发情周期的变化。各组体重平均值结果显示, 阳性对照组增重最多 (14.7 g), 随后依次是槲皮素 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量组 (12.9 g)、 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量组 (12.1 g)、 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量组 (11.4 g) 和空白对照组 (9.9 g), 但各组之间差异并无统计学意义 ($P > 0.05$); 从 AGD 差值统计结果的平均值来看, 雌二醇 ($1.21 \times 10^{-4} \text{ m}$) 和槲皮素 (B: $1.04 \times 10^{-4} \text{ m}$, C: $1.58 \times 10^{-4} \text{ m}$, D: $1.01 \times 10^{-4} \text{ m}$) 较空白对照组 ($0.86 \times 10^{-3} \text{ m}$) 均能缩短 AGD, 但各组之间无明显差异 ($P > 0.05$); 另一方面, 槲皮素和雌二醇均能有效地使小鼠发情周期发生紊乱, 然而并不能规律性地增长或缩短发情周期, 但从日常观察结果显示, E 组小鼠比其他组普遍提早发情 (平均时间 2 周左右),

而 A 组小鼠最晚实现全部发情 (平均时间 3 周左右), 但差异并无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 卵巢器官指数

计算方法: 器官指数 = 卵巢质量 / 小鼠体重。每组的器官指数取其平均值, 见图 1; 从图中可以看出, 由于槲皮素具有类雌激素效应, 使得卵巢呈现剂量依赖性增殖。

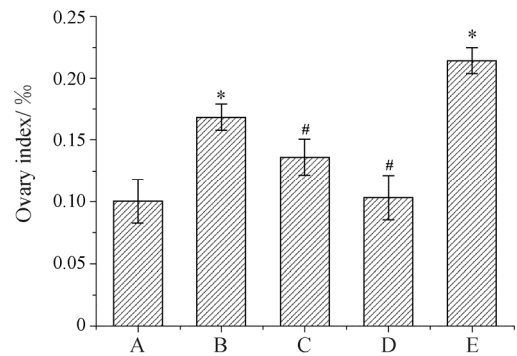


Figure 1 Effect of quercetin (QUE) on the ovary index. A: Blank control group; B: QUE $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; C: QUE $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; D: QUE $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; E: Estradiol $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs group A; # $P < 0.05$ vs group E

3 小鼠卵巢组织免疫组织化学染色结果分析

HE 染色结果显示, 小鼠卵巢主要由原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡、闭锁卵泡以及黄体组成 (图 2); 统计结果 (表 1) 显示, B 组和 E 组的原始卵泡比例明显大于 A 组 ($P < 0.05$), 而 B、C、D 组均与 E 组有显著差异 ($P < 0.05$)。在初级卵泡的比较中, 只有 E 组与 A 组有显著性差异 ($P < 0.05$); B 组和

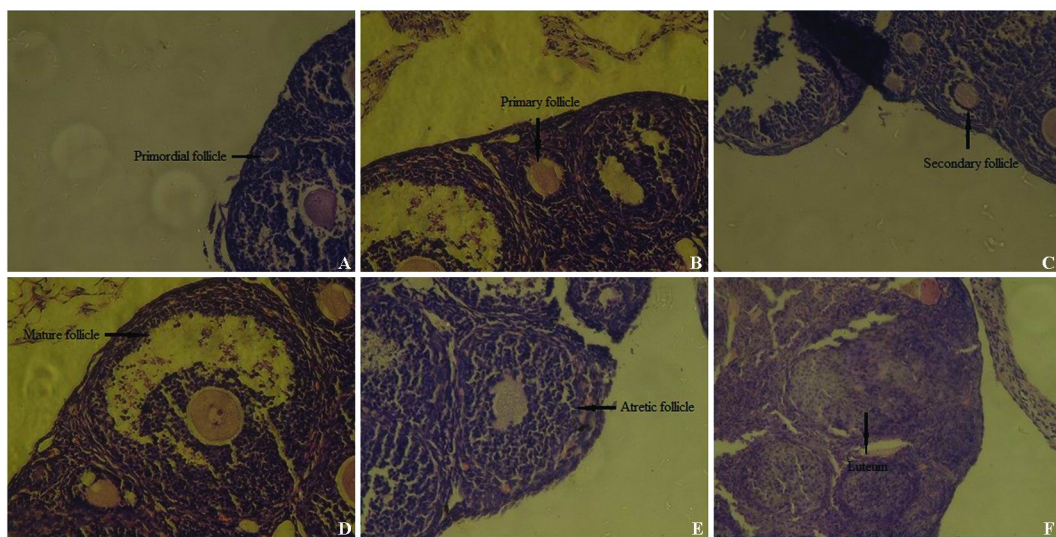


Figure 2 Photomicrograph of follicle labeling for HE ($\times 400$). A: Primordial follicle; B: Primary follicle; C: Secondary follicle; D: Mature follicle; E: Atretic follicle; F: Luteum

Table 1 Effect of quercetin (QUE) on the follicle ratio of every stage (%). The types of follicles were detected by HE staining, and selected five fields for every section. A: Blank control group; B: QUE 45 mg·kg⁻¹ group; C: QUE 25 mg·kg⁻¹ group; D: QUE 5 mg·kg⁻¹ group; E: Estradiol 0.1 mg·kg⁻¹ group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs group A; † $P < 0.05$ vs group E

Group	Primordial	Primary	Secondary	Mature	Atretic	Luteum
A	1.64 ± 1.81	6.91 ± 2.11	5.81 ± 1.34	20.15 ± 5.79	55.13 ± 3.45	10.43 ± 6.77
B	7.12 ± 1.87**	8.43 ± 1.67	9.69 ± 2.33*	17.34 ± 3.45**	44.43 ± 2.89*	12.13 ± 5.41
C	3.44 ± 2.98†	5.49 ± 4.98†	8.17 ± 2.15	19.11 ± 2.57†	58.97 ± 5.14†	5.54 ± 2.47**
D	4.31 ± 2.18†	8.92 ± 3.75	7.60 ± 2.35	18.98 ± 2.44†	53.78 ± 1.99†	5.66 ± 4.18**
E	10.13 ± 3.24*	11.78 ± 2.22*	9.72 ± 1.11*	14.14 ± 1.59*	43.17 ± 1.45*	11.74 ± 5.22

E 组的次级卵泡比例均大于 A 组 ($P < 0.05$); 而 B 组和 E 组的成熟卵泡比例均小于 A 组 ($P < 0.05$), B、C、D 组均大于 E 组 ($P < 0.05$)。非存活卵泡中, B 组和 E 组的闭锁卵泡比例同样小于 A 组 ($P < 0.05$), 而 C 组和 D 组明显大于 E 组 ($P < 0.05$); 在黄体的比较中, C 组和 D 组的黄体比例小于 A 组和 E 组 ($P < 0.05$)。

4 各期卵泡中 PCNA 表达水平分析

从图 3 可以看出, E 组染色的强度和密度均高于其他组, 其次则是 B 组, 从阳性细胞统计结果来看有很大差别。从表 2 可以看出, 除了原始卵泡, 各组均与 E 组有明显差异, 说明雌二醇能有效增加卵泡内 PCNA 的含量 ($P < 0.05$)。原始卵泡中, B、C、D 组与 A 组有明显差异, 均大于 A 组 ($P < 0.05$); 在初级卵泡中, A 组的阳性染色比例明显低于 B、C、D 组 ($P < 0.05$)。次级卵泡中, D 组的阳性染色比例高于 A 组 ($P < 0.05$), 而 E 组高于 A、B、C 组 ($P < 0.05$); 在成熟卵泡中, B 组的阳性染色比例大于 A 组 ($P < 0.05$)。

Table 2 The positive cells ratio of PCNA from kinds of survival follicles in each group (%). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. A: Blank control group; B: QUE 45 mg·kg⁻¹ group; C: QUE 25 mg·kg⁻¹ group; D: QUE 5 mg·kg⁻¹ group; E: Estradiol 0.1 mg·kg⁻¹ group. * $P < 0.05$ vs group A; † $P < 0.05$ vs group E

Group	Primordial	Primary	Secondary	Mature
A	27.41 ± 9.42	37.86 ± 3.81	38.98 ± 6.14	46.37 ± 3.14
B	48.35 ± 6.48*	45.80 ± 6.33**	42.76 ± 3.76†	53.18 ± 6.01**
C	40.61 ± 8.05**	48.99 ± 7.27**	43.44 ± 4.21†	50.32 ± 3.37†
D	53.63 ± 3.68*	47.38 ± 5.99**	49.86 ± 2.31*	46.57 ± 7.29†
E	53.54 ± 7.03*	55.36 ± 5.82*	51.96 ± 5.71*	66.31 ± 5.50*

5 血液中生殖系统相关激素水平检测

按照测定说明书依次检测各组小鼠血浆中 6 种激素的水平, 统计结果如表 3 所示 (由于在第 20~30 天左右小鼠陆续进入性成熟阶段, 致使该时间点符合检测要求的样本数不足, 未获取数据)。通过观察各组小鼠在灌胃期间血浆中各种激素水平的曲线变化, 可以直观地比较随着槲皮素在小鼠体内的不断积累, 血浆各激素相应的升降趋势, 综合评价各激素之间的促进或拮抗效应 (只列出有统计学差异的比较情况)。

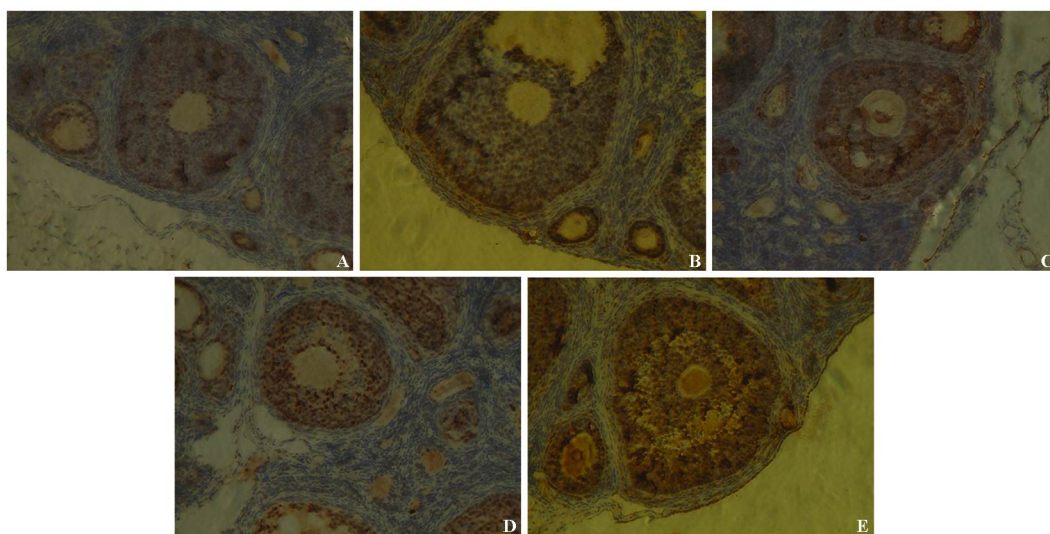


Figure 3 Photomicrograph of follicle labeling for PCNA (×400). A: Blank control group; B: QUE 45 mg·kg⁻¹ group; C: QUE 25 mg·kg⁻¹ group; D: QUE 5 mg·kg⁻¹ group; E: Estradiol 0.1 mg·kg⁻¹ group

Table 3 Hormone level of plasma from different stages in each group ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$). Due to mice went into sexual maturity period successively around the 20th to 30th day; there were not enough samples to constitute significant statistics at the two time points. E2: Estradiol; FSH: Follicle-stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone; P: Progesterone; PRL: Prolactin; T: Testosterone. A: Blank control group; B: QUE 45 mg·kg⁻¹ group; C: QUE 25 mg·kg⁻¹ group; D: QUE 5 mg·kg⁻¹ group; E: Estradiol 0.1 mg·kg⁻¹ group. * $P < 0.05$ vs group A; † $P < 0.05$ vs group E

Time point/d	Group	E2 /pg·mL ⁻¹	FSH /mIU·mL ⁻¹	LH /mIU·mL ⁻¹	P /ng·mL ⁻¹	PRL /ng·mL ⁻¹	T /ng·mL ⁻¹
1	A	94.04 ± 9.35	22.52 ± 3.88	23.12 ± 1.43	13.15 ± 1.19	21.06 ± 3.51	0.20 ± 0.07
	B	90.90 ± 8.01 [†]	19.54 ± 2.74	26.98 ± 4.25*	13.36 ± 1.40	20.84 ± 1.04	0.18 ± 0.06
	C	86.61 ± 11.73 [†]	19.14 ± 2.14*	27.64 ± 4.13*	12.31 ± 0.39	21.09 ± 2.21	0.18 ± 0.04
	D	86.32 ± 4.76 [†]	18.02 ± 1.60*	29.08 ± 2.30*	14.14 ± 2.14	19.59 ± 4.42	0.15 ± 0.04
	E	101.27 ± 6.05	20.98 ± 2.31	23.12 ± 2.05	13.66 ± 1.70	15.13 ± 2.44*	0.14 ± 0.10
10	A	91.45 ± 8.30	20.50 ± 1.78	32.73 ± 2.81	13.13 ± 1.31	21.24 ± 7.76	0.16 ± 0.06
	B	90.32 ± 5.59	15.12 ± 2.63*	34.58 ± 3.03 [†]	16.32 ± 1.25**	21.80 ± 0.25 [†]	0.15 ± 0.03
	C	87.39 ± 11.31	17.12 ± 3.18	26.29 ± 2.74*	11.78 ± 1.53	20.40 ± 4.41	0.14 ± 0.01
	D	87.94 ± 10.26	19.14 ± 1.82	23.42 ± 1.72*	13.93 ± 1.07	21.97 ± 0.14 [†]	0.16 ± 0.06
	E	102.97 ± 3.13	18.52 ± 0.82	24.43 ± 1.87*	11.48 ± 0.51	13.02 ± 1.58	0.19 ± 0.05
40	A	104.68 ± 0.71	26.42 ± 2.14	23.76 ± 1.93	14.79 ± 1.16	23.24 ± 2.73	0.14 ± 0.01
	B	95.85 ± 6.81	17.77 ± 3.01*	32.11 ± 8.43	14.91 ± 2.73	20.73 ± 1.64 [†]	0.14 ± 0.03
	C	98.99 ± 8.12	19.03 ± 1.35*	29.45 ± 3.70	13.69 ± 2.29	19.11 ± 0.35**	0.13 ± 0.02
	D	92.80 ± 0.92	17.20 ± 1.32*	29.45 ± 2.01	18.55 ± 2.59 [†]	20.16 ± 2.32 [†]	0.19 ± 0.03 [†]
	E	104.04 ± 5.99	17.39 ± 0.69*	22.31 ± 1.22	10.29 ± 2.44*	13.21 ± 0.87*	0.12 ± 0.03
50	A	102.46 ± 5.33	19.07 ± 1.16	30.41 ± 1.95	13.96 ± 2.40	22.30 ± 4.63	0.17 ± 0.04
	B	103.22 ± 2.73	18.94 ± 3.69	26.61 ± 3.18*	14.63 ± 1.25 [†]	22.42 ± 5.53 [†]	0.17 ± 0.05
	C	100.14 ± 8.90	19.05 ± 5.67	26.76 ± 2.33**	14.78 ± 1.63 [†]	24.33 ± 2.51 [†]	0.21 ± 0.04
	D	97.93 ± 6.99	17.87 ± 1.95	23.78 ± 3.50*	14.51 ± 2.66 [†]	22.39 ± 1.35 [†]	0.22 ± 0.05
	E	96.98 ± 6.04	18.61 ± 0.87	23.44 ± 1.68*	11.76 ± 1.24	14.21 ± 4.77*	0.14 ± 0.10

5.1 第1天 E2: B、C、D组小于E组 ($P < 0.05$); PRL: 只有E组明显小于A组 ($P < 0.05$); FSH: C、D组小于A组 ($P < 0.05$); LH: B、C、D组均明显大于A组 ($P < 0.05$)。

5.2 第10天 P: B组不仅大于A组 ($P < 0.05$), 且大于C、D组 ($P < 0.05$) 和E组 ($P < 0.05$); PRL: B、D组大于E组 ($P < 0.05$); FSH: B组小于A组 ($P < 0.05$); LH: A组和B组均明显大于C、D组和E组 ($P < 0.05$)。

5.3 第40天 P: D组和A组均大于E组 ($P < 0.05$); PRL: C组小于A组 ($P < 0.05$), B、C、D组均明显大于E组 ($P < 0.05$); T: D组大于C组和E组 ($P < 0.05$); FSH: B、C、D组和E组均明显小于A组 ($P < 0.05$)。

5.4 第50天 P: B、C、D组均大于E组 ($P < 0.05$); PRL: B、C、D组和A组均明显大于E组 ($P < 0.05$); LH: B、C、D组和E组均小于A组 ($P < 0.05$), 其中C组大于E组 ($P < 0.05$)。

讨论

已有文献报道黄酮类植物雌激素可以通过延迟新生鼠卵母细胞巢的破裂、抑制卵母细胞凋亡来达到

抑制卵泡发育的作用^[11]。本实验使用槲皮素作用于即将进入青春期(卵巢发育阶段)的3周龄幼鼠, 探讨槲皮素对卵巢发育的影响。实验结果显示, 槲皮素能在一定程度上促进小鼠体重的增加, 缩短肛殖距, 但对发情周期的影响不明显。在这方面, 其他植物雌激素, 如香豆雌酚, 则能有效促使幼鼠发情期的提前, 且出现“持续发情”^[14]; 此外, 高浓度的槲皮素还能有效增加卵巢的器官指数。

在各阶段卵泡的统计中, 槲皮素能提高原始卵泡和次级卵泡的比例, 降低成熟卵泡、闭锁卵泡和黄体的比例, 对初级卵泡没有明显的作用。由此可以看出, 槲皮素既抑制了原始卵泡和次级卵泡的发育, 又延滞了卵泡闭锁。而由于随着槲皮素浓度的升高, 基始卵泡比例也随之提高, 宏观上表现出的结果是器官指数的增加, 与前面的结果互相印证。

PCNA 即增殖细胞核抗原, 与细胞 DNA 合成关系密切, 在细胞增殖的启动上起重要作用。PCNA 免疫组化的结果显示, 槲皮素能有效提高小鼠卵巢中各级卵泡里增殖细胞的数量。而另一方面, PCNA 作为细胞 DNA 合成所必需的一种蛋白质, 其表达水平可以反映细胞的增殖程度^[15]。肿瘤的基本特征是细

胞的失控性生长,包括细胞的死亡(凋亡)的减少或增殖的增加,由于抑癌基因的丢失或点突变使得正常细胞增殖、分化调控出现阻碍,表现出细胞增殖标记分子的 PCNA 过度表达引起细胞恶性转化并发展为恶性肿瘤,而 PCNA 在卵巢恶性肿瘤中阳性表达率高达 80.8%~91.8%^[16],且与卵巢癌生物学行为及预后不良有一定关系。PCNA 统计结果显示,槲皮素能提高 PCNA 表达的阳性程度,但不表现出明显的剂量依赖性,有研究显示,给新生小鼠皮下注射染料木素 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹后,子宫癌发生率增高,且卵巢出现囊肿、功能衰竭以及黄体消失等现象^[17, 18]。

对动物血液中激素水平的研究发现,FSH 和 LH 是卵巢卵泡发育和分化的外源调控因子,FSH 对雌性动物的主要作用是刺激卵泡的生长和发育,FSH 的分泌受雌激素通过抑制 FSH 分泌而进行的反馈调节,FSH 和 LH 具有协同作用;多卵泡的发育产生高水平的 E2,血浆 E2 水平的高低反映卵泡的分泌功能,E2 水平与双卵巢内的卵泡数量及大小有关,间接反映卵母细胞的质量。雌激素水平的升高,促使垂体释放大量 LH 而引起排卵^[19]。Amiridis 等^[20]在雪维特羊上做实验测定黄体数目与 P 水平的关系,说明血清中 P 水平与黄体数目呈显著的正相关,且受 E2 调节;而过多的 PRL 能抑制 FSH 和 LH 的分泌。相对于雌性动物来说,当出现多囊卵巢综合征的一些症状时,体内的 T 水平会升高,且 LH 分泌增多,而 FSH 水平不变或者降低。

分析本研究的血浆激素水平测定结果,第 1 天和第 10 天两个数据点中,阳性对照组血浆中的 E2 水平明显升高,这表明口服的雌二醇能很快进入到血液循环中并能被检测出来。PRL 的分泌会受到高浓度 E2 的抑制^[21],因此阳性对照组的 PRL 水平也一直明显低于空白对照组。由于槲皮素有类雌激素作用,故 PRL 水平也受到一定抑制,但无明显差异;而 QUE 5 和 25 mg·kg⁻¹剂量组的 FSH 水平明显降低,这可能是因为口服具有类雌激素效应的槲皮素而导致的;同时,由于 FSH 水平降低,为了维持体内卵泡调控因子的平衡,LH 水平相应升高,因此 QUE 5、25 和 45 mg·kg⁻¹剂量组均明显高于空白对照组。从第 10 天开始,QUE 45 mg·kg⁻¹剂量组的 P 水平明显高于其他各组,从前面的各级卵泡比例统计结果来看,QUE 45 mg·kg⁻¹剂量组的黄体比例在各组之中为最高,因此该组的 P 水平也相应升高;而 QUE 45 mg·kg⁻¹剂量组的 FSH 水平低于其他各组,且明显低于空白对照组,

推断可能高浓度的 QUE 刺激卵泡分泌雌激素的能力较强,又由于 QUE 45 mg·kg⁻¹剂量组黄体比例高,能有效抑制 FSH 的分泌,该组的 FSH 水平较低,而相应的 LH 水平明显升高。在第 40 天和第 50 天数据点的比较中,小鼠已全部进入发情期,这两个时间点的血液都是在发情期采集的,因此自身的 E2 水平已经很高,加上长期口服外源性 E2,导致阳性对照组的 P 分泌明显受到抑制,水平低于其他各组,且其 PRL 水平仍然为最低。在 T 水平的比较中,发现 QUE 5 mg·kg⁻¹剂量组小鼠 T 的分泌量明显增多,前面提到,高浓度的 QUE 能促进卵泡增殖,增加卵泡数量,且抑制卵泡排卵,导致了 QUE 5 mg·kg⁻¹剂量组小鼠的 T 含量过高;而最终空白对照组的 LH 水平高于其他各组,且阳性对照组 LH 水平最低,可能的原因是槲皮素和雌二醇会减少黄体的生成数量,即抑制 LH 的分泌。在小鼠长期口服槲皮素和雌二醇的作用下,LH 的分泌受到影响,明显低于空白对照组。

从上面的结果分析看出,血液中激素水平受槲皮素作用改变较为明显且具有规律性的是 FSH 和 LH,这两者与空白对照组相比分别呈下降和上升趋势,具有一定的雌激素样效应,然而都没表现出明显的剂量依赖性。但是需要注意,在小鼠经过长期喂养后,由于自身生殖系统的发育,内源性 E2 已经达到一个较高的水平,作为相关激素的 FSH 水平受内源性 E2 的影响,各组渐渐趋近;所以,在第 50 天的数据中可以看到各组的 FSH 水平依然大致相同。血液激素检测结果显示,槲皮素对于小鼠血液中激素水平的影响部分表现出阳性结果,但随着小鼠不断的发育成长,自身体内的激素水平慢慢升高并渐占主导地位,与各小鼠的体质成长和摄食量密切相关,部分激素检测数据无明显差异性,今后的工作会考虑如何屏蔽小鼠内源性激素的参与调节。

本研究发现,各级卵泡比例和血液激素水平这两者之间呈现出较密切的关联,槲皮素的摄入改变了卵巢内各级卵泡的比例以及卵巢分化,从而影响了相关激素的分泌,激素的水平变化又反馈作用于卵巢以及生殖内分泌系统内其他靶器官,引发了一系列的生物学效应。

References

- [1] van Meeuwen JA, van den Berg M, Sanderson JT, et al. Estrogenic effects of mixtures of phyto- and synthetic chemicals on uterine growth of prepubertal rats [J]. Toxicol Lett, 2007, 170: 165-176.

- [2] Miodini P, Fioravanti L, Di Fronzo G, et al. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80: 1150–1155.
- [3] Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention [J]. *J Nutr Biochem*, 2007, 18: 427–442.
- [4] Ternaux JP, Portalier P. Effect of quercetine on survival and morphological properties of cultured embryonic rat spinal motoneurons [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 332: 33–36.
- [5] Verma AK, Johnson JA, Gould MN, et al. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin [J]. *Cancer Res*, 1988, 48: 5755–5758.
- [6] Yuan HQ, Guo HF, He ML, et al. The roles of c-Jun and CBP in the inhibitory effect of quercetin on prostate cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 819–824.
- [7] Clifton-Bligh PB, Baber RJ, Fulcher GR, et al. The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism [J]. *Menopause*, 2001, 8: 259–265.
- [8] Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, et al. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80: 1682–1688.
- [9] Lamartiniere CA, Zhang JX, Cotroneo MS. Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68: 1400S–1405S.
- [10] Hilakivi-Clarke L, Cho E, Onojafe I, et al. Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring [J]. *Oncol Rep*, 1999, 6: 1089–1095.
- [11] Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, et al. Effects of quercetin on ovarian follicular development and ovarian life span in rats [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res (中国组织工程研究与临床康复)*, 2010, 14: 2727–2730.
- [12] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. *J Nutr*, 1993, 123: 1939–1951.
- [13] Kumar A, Sehgal N, Kumar P, et al. Protective effect of quercetin against ICV colchicine-induced cognitive dysfunctions and oxidative damage in rats [J]. *Phytother Res*, 2008, 22: 1563–1569.
- [14] Whitten PL, Lewis C, Russell E, et al. Potential adverse effect of phytoestrogens [J]. *J Nutr*, 1995, 125: 771s–776s.
- [15] Maffia P, Grassia G, Di Meglio P, et al. Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury [J]. *Circulation*, 2006, 114: 430–437.
- [16] Ghazizadeh M, Sasaki Y, Araki T, et al. Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and Ag NOR analyses [J]. *Am J Clin Pathol*, 1997, 107: 451–455.
- [17] Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, et al. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) alpha expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67: 1285–1296.
- [18] Newbold RR, Banks EP, Bullock B, et al. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 4325–4328.
- [19] Karsch FJ, Moenter SM, Caraty A. The neuroendocrine signal for ovulation [J]. *Anim Repord Sci*, 1992, 28: 329–341.
- [20] Amiridis GS, Rekkas CA, Fthenakis GC, et al. Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes [J]. *Theriogenology*, 2002, 57: 1143–1150.
- [21] Chen XZ, Zhang MM, Yuan SY. Study on the reproduction hormone level of female Wanxi white geese [J]. *China Poult (中国家禽)*, 2005, 9: 24–26.