

大豆异黄酮对卵巢切除大鼠糖脂代谢和血清瘦素、抵抗素表达的影响

龚华芳, 张亚兴, 王晓东, 曾耀英

(暨南大学 生命科学技术学院组织移植与免疫实验中心, 广东 广州 510632)

摘 要 为探讨大豆异黄酮对卵巢切除大鼠糖脂代谢和血清瘦素、抵抗素表达的影响,将12周SD大鼠分成3组,假手术(Sham)组、卵巢切除(OVX)组和大豆异黄酮(OVX+Gen)组,每组7只,卵巢切除术后10 d,OVX组和Sham组大鼠每天腹腔注射生理盐水0.1 ml/只,OVX+Gen组每天注射大豆异黄酮0.2 mg/只,连续注射30 d后处死取血,检测子宫病理改变、血糖血脂和胰岛素水平、血清瘦素和抵抗素含量。结果发现卵巢切除后大鼠总胆固醇、HDL和LDL均增加($P < 0.05$),但胰岛素、血糖、甘油三酯、血清瘦素和抵抗素水平变化不明显($P > 0.05$);卵巢切除后补充大豆异黄酮,可促进子宫内膜上皮部分增生,但胰岛素、血糖、总胆固醇、甘油三酯、LDL和HDL、血清瘦素和抵抗素水平均无明显变化(与OVX组相比, $P > 0.05$),结果提示大豆异黄酮对卵巢切除大鼠糖脂代谢参数和血清瘦素、抵抗素水平影响不大。

关键词 卵巢切除; 大豆异黄酮; 血糖; 血脂; 瘦素; 抵抗素

中图分类号 Q95; R3 **文献标志码** A **文章编号** 1000-9965(2011)03-0324-04

Effects of genistein on glucose and lipid metabolism and the expression of serum leptin and resistin in ovariectomized SD rats

GONG Hua-fang, ZHANG Ya-xing, WANG xiao-dong, ZENG Yao-ying

(Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] To delineate the effects of ovariectomy (OVX) and genistein treatment on the levels of glucose, insulin, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, serum leptin and resistin, female SD rats (12-week old) were divided into three groups, control (Sham), OVX and OVX treated with genistein (OVX + Gen) ($n = 7$, each group). After operation for 10 days, rats were treated with genistein (ip, 0.2 mg per day) (OVX + Gen) and vehicle (Sham and OVX rats) for 30 days. The pathological conditions of the uterus, and the levels of glucose, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, serum leptin and resistin were analyzed. The results indicated that OVX upregulated the levels of total cholesterol, LDL and HDL, but showed no effect on the levels of insulin, blood glucose, triglyceride, serum leptin and resistin. Although the treatment with genistein did not change the levels of insulin, blood glucose, total cholesterol, triglyceride, LDL, HDL, serum leptin and resistin, it stimulated the proliferation of endometrial epithelial cells. The results suggest that genistein could promote the proliferation of endometrial epithelial cells, but show no effects of on the glucose and lipid metabolism, and the levels of serum leptin and resistin in ovariectomized female rats.

[Key words] ovariectomy; genistein; glucose; lipid; leptin; resistin

收稿日期 2011-04-01

基金项目 “973”国家重点基础研究项目(2006CB504201; 2004CB720100)

作者简介 龚华芳(1971-),女,博士研究生,研究方向:妇产科病理

通讯作者: 曾耀英,男,研究员,博士生导师, Tel: 020-85226219. Email: tzengyy@jnu.edu.cn.

肥胖是发生糖尿病、心血管疾病、高血压、血脂代谢异常的重要危险因素,是目前威胁人类健康的主要问题。绝经后,因为雌激素缺乏,女性肥胖的发生率增高。大豆异黄酮是与内源性雌激素有相似结构的植物雌激素,可与雌激素受体 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 结合^[1],发挥雌激素和抗雌激素作用。肥胖目前认为是脂肪组织一种慢性炎症,大豆异黄酮能调节淋巴细胞的免疫反应^[2],另外,大豆异黄酮还可通过提高细胞膜表面 LDL-R 的活性和数量、抑制 HMG-CoA 还原酶的活性、促进胆汁酸的分泌^[3]、抑制胰岛 β 细胞凋亡、干扰小肠对糖的吸收、调节与糖代谢有关的酶的释放及其活性^[4]来调节脂代谢和糖代谢,从而抑制肥胖的发生。

瘦素(Leptin, LP)和抵抗素(resistin)是由脂肪细胞分泌的细胞因子,与糖脂代谢相关,参与机体能量代谢的调节^[5]。绝经后补充大豆异黄酮是否影响机体糖脂代谢和血清瘦素、抵抗素水平,对评估大豆异黄酮的预防和治疗肥胖作用具有一定意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

12周 Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠,南方医科大学动物中心提供,合格证号:0067868。Genistein注射液配制:称取一定量 genistein 粉末,先用无水乙醇溶解,后加入食用油稀释成 1 mg/mL ,并使乙醇体积分数低于1%,过滤除菌,分装 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。全自动生化分析仪,美国 BECKMAN LX20;全自动化学发光免疫分析仪,美国 Beckman 公司;胰岛素放射免疫分析药盒,大鼠瘦素、抵抗素 ELISA 试剂盒,上海江莱生物科技有限公司。

1.2 方法

(1)动物分组和模型 术前禁食禁水8h,称量。随机将大鼠分为3组,假手术(Sham)组、卵巢切除(OVX)组和大豆异黄酮(OVX+Gen)组。卵巢切除手术,质量分数3.5%水合氯醛($1\text{ mL}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)腹腔麻醉后,固定于特制手术板上。下腹正中切口,开腹后找到“Y”型子宫,沿其末端找到双侧卵巢,分别结扎后将其完整切除,切除组织进行病理检查。确定切除断端无出血后放回腹腔。假手术在找到双侧卵巢后不切除放回腹腔。术后10d,选取伤口I期愈合大鼠,Sham组和OVX组大鼠每天腹腔注射生

理盐水 0.1 mL/只 ,OVX+Gen组每天注射 genistein 0.2 mg/只 ,连续注射30d后处死取血,离心后取血清分装,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

(2)子宫病理切片 取大鼠右侧子宫角同一部位组织于多聚甲醛溶液中固定,常规方法制作石蜡切片,HE染色,显微镜观察子宫病理切片。

(3)血糖血脂检测 取(1)节中的血清,利用全自动生化分析仪检测血清中血糖血脂含量。

(4)血清雌激素水平和空腹胰岛素水平的检测

取(1)节中的血清,化学发光免疫分析系统检测血清雌激素水平;放射免疫分析法检测血清空腹胰岛素水平

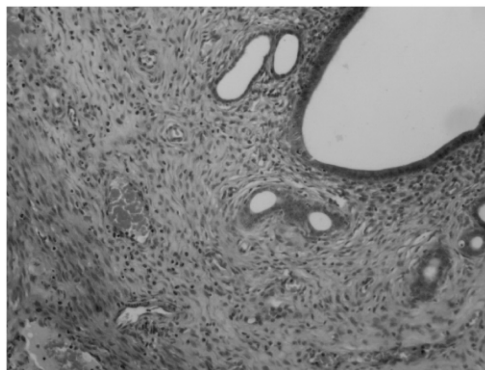
(5)血浆瘦素、抵抗素水平的检测 取(1)节中的血清,按ELISA试剂盒要求处理样品,并设不同浓度的标准品,酶标仪检测血浆瘦素、抵抗素水平。根据标准品分析数据作出标准曲线,并根据标准曲线计算每个样品中血浆瘦素、抵抗素水平的含量。

1.3 统计学分析

数据结果应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理,各变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 one-way ANOVA 方差分析和秩和检验。

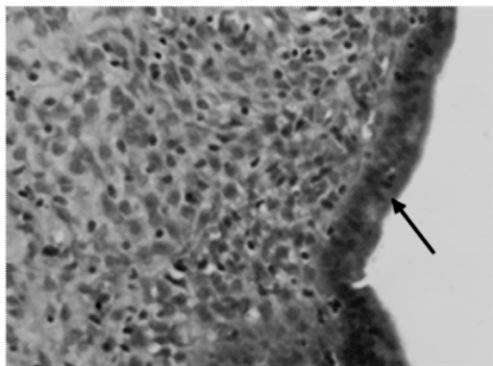
2 结果

(1)子宫内膜病理改变 正常子宫内膜被覆单层柱状上皮,固有层疏松,腺体丰富(图1~2),卵巢切除后,子宫萎缩,子宫内膜呈低柱状(图3),补充大豆异黄酮,子宫内膜上皮部分增生,呈假复层样(图4~5)。



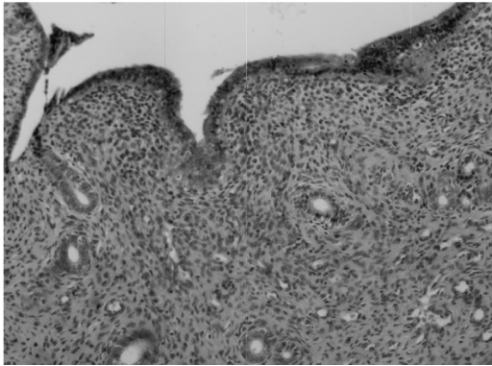
子宫内膜被复单层柱状上皮,固有层有子宫腺体、血管和淋巴管(HE, $\times 100$)。

图1 Sham组(正常)子宫内膜



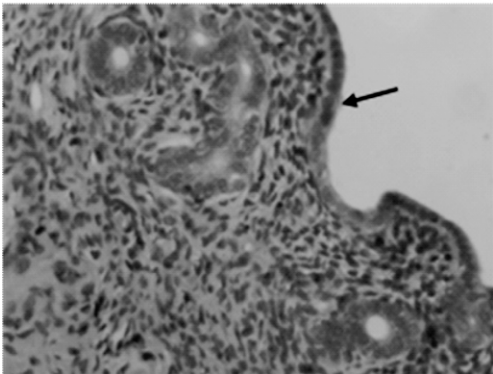
子宫内层呈单层柱状上皮(↑ 示) (HE, ×200) .

图 2 Sham 组子宫内层



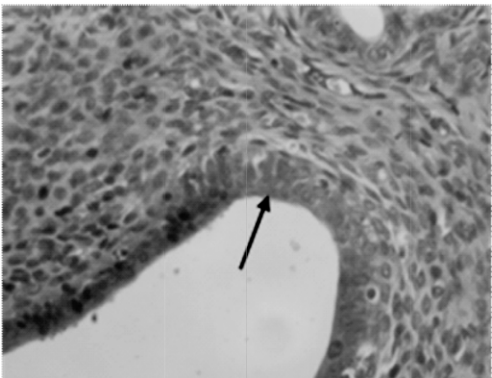
子宫内层被覆单层低柱状上皮,部分上皮柱状有假复层现象,固有层稍致密(HE, ×100) .

图 4 OVX + Gen 组子宫内层



卵巢切除后,子宫内层单层低柱状,腺体萎缩,固有层致密,子宫壁变薄(HE, ×100) 图 3: OVX 组子宫内层子宫内层上皮呈单层低柱状(↑ 示) (HE, ×200) .

图 3 OVX 组子宫内层上皮



子宫内层被覆柱状上皮,部分呈低柱状,部分柱状(↑ 示) (HE, ×200) .

图 5 OVX + Gen 组子宫内层上皮

(2) 大豆异黄酮对卵巢切除大鼠血清胰岛素水平的影响 卵巢切除后,血清雌激素水平下降($P < 0.05$),胰岛素水平无明显变化($P > 0.05$);补充大豆异黄酮后(OVX + Gen 组),与 OVX 组比,血清雌激素和胰岛素水平无明显变化($P > 0.05$) (表 1) .

(3) 大豆异黄酮对卵巢切除大鼠血糖血脂的影响 卵巢切除后大鼠总胆固醇、HDL、LDL 均升高,且有显著性差异($P < 0.05$),甘油三酯和血糖变化不明显($P > 0.05$);补充大豆异黄酮后,与 OVX 组比,

表 1 血清中雌激素和胰岛素水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	雌激素/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	胰岛素/($\text{mIU} \cdot \text{L}^{-1}$)
Sham	7	57.857 ± 11.562	19.32 ± 6.192
OVX	7	35.439 ± 3.309 ¹⁾	14.02 ± 5.202
OVX + Gen	7	35.571 ± 5.192	14.17 ± 10.354

1) 与 Sham 组相比较, $P < 0.05$.

血清中血糖、甘油三酯、TC、HDL 和 LDL 水平均无明显变化($P > 0.05$) (表 2) .

表 2 大鼠血清中血糖、血脂变化($\bar{x} \pm s$)

						$\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$
组别	<i>n</i>	血糖	甘油三酯	TC	HDL	LDL
Sham	7	4.534 ± 1.499	0.714 ± 0.107	1.64 ± 0.203	1.07 ± 0.084	0.267 ± 0.043
OVX	7	4.359 ± 0.516	0.666 ± 0.072	2.343 ± 0.131 ¹⁾	1.337 ± 0.299 ¹⁾	0.416 ± 0.03 ¹⁾
OVX + Gen	7	4.987 ± 0.29	0.749 ± 0.087	2.107 ± 0.302	1.303 ± 0.212	0.363 ± 0.04

与 Sham 组相比较, 1) $P < 0.05$.

(4) 大豆异黄酮对卵巢切除大鼠血清瘦素、抵抗素表达的影响 假手术(Sham) 组、卵巢切除

(VOX) 组、补充大豆异黄酮(OVX + Gen) 组,血清瘦素和抵抗素水平无明显变化($P > 0.05$) (表 3) .

表3 血清瘦素、抵抗素水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	瘦素/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抵抗素/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Sham	7	274.66 $\pm$ 26.31	4.51 $\pm$ 0.937
OVX	7	273.84 $\pm$ 29.2	4.28 $\pm$ 0.518
OVX + Gen	7	289.13 $\pm$ 20.9	4.61 $\pm$ 0.386

3 讨论

绝经后,由于卵巢激素缺乏,出现肥胖和糖脂代谢的变化,可能与胰岛素抵抗和糖尿病的发生有关。而雌激素替代治疗可以改善这种状况,但心血管疾病发生风险增高,因此人们转向寻求安全的、天然的具有雌激素作用的植物雌激素。

大豆异黄酮可与雌激素受体结合,发挥弱雌激素作用。子宫是雌激素靶器官,大豆异黄酮能引起子宫内膜增生,作用强度与剂量有关^[4]。我们观察到,卵巢切除后补充大豆异黄酮可以引起子宫内膜部分增生,具有雌激素样作用。

流行病学研究发现,在东京的日本人比在西雅图的日籍美国人发生2型糖尿病的概率低,可能与高豆类饮食和大豆异黄酮有关^[7-9]。多项研究报道,大豆异黄酮可改善糖脂代谢参数。给予大豆异黄酮,能降低体重、BMI,降低血总胆固醇和LDL^[9-14],增加HDL^[14],降低空腹血糖和胰岛素水平^[11-12]。大豆异黄酮对绝经后女性的正面效应也受到其他实验的反驳。相当多的研究显示,大豆异黄酮对经典的代谢参数如体重指数、血脂、血糖和胰岛素无影响^[13-14],这和我们观察到的结果是一致的。研究认为绝经后虽然出现肥胖,但仍属于健康状态,大豆异黄酮对血脂代谢参数改善并不明显。

瘦素、抵抗素是脂肪细胞分泌的细胞因子,可通过调节食物摄取,抑制脂肪形成,抑制胰岛素作用,参与机体能量代谢。体外实验,大豆异黄酮能抑制脂肪细胞分泌瘦素^[15-16],而在体内实验,结果存在差异。有研究发现^[17]补充大豆类物质可降低血清瘦素水平,但也有不同的研究结果,大豆异黄酮对绝经后妇女血清瘦素、抵抗素表达没影响^[13,18],这与我们的结果一致。Charles等^[13]发现,补充大豆异黄酮虽没影响血清瘦素水平,但能引起脂肪细胞因子脂联素升高。

本研究发现,卵巢切除大鼠,补充大豆异黄酮,能引起子宫内膜变化,但对糖脂代谢参数和血清瘦素、抵抗素没有影响,可能与我们使用药物剂量和作用时间有关,也可能大豆异黄酮不是大豆对糖脂代谢和体重减轻发挥有益作用的主要因素,大豆异黄

酮的作用还需进一步研究探讨。

参考文献

- [1] KUIPER G G, LEMMEN J G, CARLSSON B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta [J]. *Endocrinology*, 1998, 139 (10): 4252-4263.
- [2] 叶雪仪,曾耀英,肇静娴,等.染料木黄酮与环孢菌素A联合用药对小鼠淋巴细胞体外免疫应答的影响[J].暨南大学学报:自然科学版,2007,28(3):321-326.
- [3] PEDERSON S B. The effect of estrogen on glucose tolerance and insulin [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 85 (10): 13-19.
- [4] 廖苇萍,石元刚.黄芪多糖和大豆异黄酮对糖尿病大鼠糖代谢的影响[J].第三军医大学学报,2007,29(5):416-418.
- [5] BUDAK E, SANCHEZ M F, BELLVER J, et al. Interactions of hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(6): 1563-1581.
- [6] 赵更力,江元慧,张小松,等.不同剂量大豆异黄酮对去势大鼠子宫内膜的影响[J].中国预防医学杂志,2005,6(3):193-195.
- [7] FUJIMOTO W Y, LEONETTI D L, KINYOUN J L, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance among second-generation Japanese-American men [J]. *Diabetes*, 1987, 36(6): 721-729.
- [8] FUJIMOTO W Y, LEONETTI D L, BERGSTROM R W, et al. Glucose intolerance and diabetic complications among Japanese-American women [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1991, 13(1-2): 119-129.
- [9] ALLISON D B, GADBURY G, SCHWARTZ L G, et al. A novel soy-based meal replacement formula for weight loss among obese individuals: a randomized controlled clinical trial [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2003, 57(4): 514-522.
- [10] GOODMAN-GRUEN D, KRITZ-SILVERSTEIN D. Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women [J]. *Menopause*, 2003, 10(5): 427-432.
- [11] CHENG S Y, SHAW N S, TSAI K S, et al. The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women [J]. *J Women Health (Larchmt)*, 2004, 13 (10): 1080-1086.
- [12] NOGOWSKI L, NOWICKA E, SZKUDELSKI T, et al. The effect of genistein on some hormones and metabolic parameters in the immature, female rats [J]. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2007, 16: 275-286.

(下转第338页)

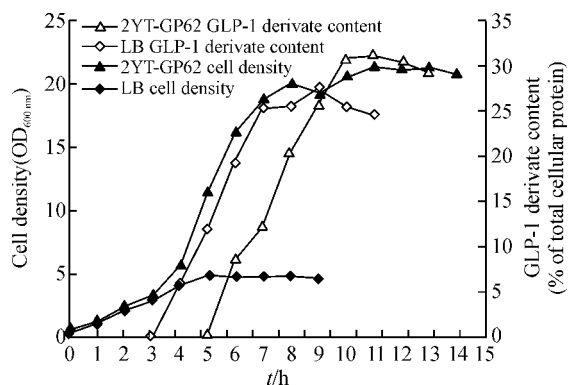


Fig. 5 Cell density and GLP-1 derivative (GP62) expression with 2YT-GP62 and LB medium

[References]

- [1] WHITE J W, SAUNDERS G F. Structure of the human glucagon gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14(12): 4719 - 4730.
- [2] RACHMAN J, BARROW B A, LEVY J C, et al. Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in subjects with NIDDM [J]. *Diabetologia*, 1997, 40(2): 205 - 211.
- [3] DAVID R J. Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 297(1/2): 137 - 140.
- [4] LI HONGJIAN, MA YI, CHEN YING, et al. A protease-based strategy for the controlled release of therapeutic peptides [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(29): 4930 - 4933.
- [5] LI HONGJIAN, ZHOU CINDY X, SU JAMES Z. Chemical ligation and cleavage on solid support facilitate recombinant peptide purification [J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 50(2): 238 - 246.
- [6] SU Z, A VINOGRADOVA, A KOUTYCHENKO, et al. Rational design and selection of bivalent peptide ligands of thrombin incorporating P4 - P1 tetrapeptide sequences: from good substrates to potent inhibitors [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2004, 17(8): 647 - 657.
- [7] J SAMBROOK, D W RUSSELL. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* [M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] SHIN C S, HONG M S, BAE C S, et al. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21 (DE3) [pET-3aT2M2] [J]. *Biotechnol Prog*, 1997, 13(3): 249 - 257.
- [9] LEE C, SUN W J, BURGESS B W, et al. Process optimization for large-scale production of TGF- α -PE40 in recombinant *Escherichia coli*: effect of medium composition and induction timing on protein expression [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, 18(4): 260 - 266.
- [10] NIWA T, YOKOYAMA S, ITO T, et al. Reduction of leptin secretion by soy isoflavonoids in murine adipocytes in vitro [J]. *Phytochemistry Letters*, 2010, 3: 122 - 125.
- [11] LLANEZA P, GONZÁLEZ C, FERNÁNDEZ-ÑARREA J, et al. Soy isoflavones, diet and physical exercise modify serum cytokines in healthy obese postmenopausal women [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(4): 245 - 250.
- [12] MASKARINEC G, STEUDE JS, FRANKE AA, et al. Inflammatory markers in a 2-year soy intervention among premenopausal women [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2009, 6: 9.

责任编辑: 黄建军

责任编辑: 黄建军

(上接第 327 页)

- [13] CHARLES C, YUSKAVAGE J, CARLSON O, et al. Effects of high-dose isoflavones on metabolic and inflammatory markers in healthy postmenopausal women [J]. *Menopause*, 2009, 16(2): 395 - 400.
- [14] RICCI E, CIPRIANI S, CHIAFFARINO F, et al. Effects of soy isoflavones and genistein on glucose metabolism in perimenopausal and postmenopausal non-Asian women: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Menopause*, 2010, 17(5): 1080 - 1086.
- [15] PHRAKONKHAM P, VIENGCHAREUN S, BELLOIR C, et al. Canivenc-Lavier, Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 110(1-2): 95 - 103.