

# 猪脑内微量注射大豆黄酮对血浆 LH 水平的影响

王根林<sup>1</sup>, 陈杰<sup>2</sup>, 陈伟华<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 南京农业大学动物科技学院;<sup>2</sup> 南京农业大学农业部动物生理生化重点实验室, 南京 210095)

摘要: 在去势格丁根小公猪(n=9)下丘脑 MBH 和 VM 部位注射大豆黄酮(10 $\mu$ l/头, 8pg/ $\mu$ l), 注射后血浆 LH 浓度变化呈上升趋势: 在 MBH 部位, 注射后 0.5~2h 有 4 例(4/5) LH 水平较注射前升高, 1 例(1/5) 变化不明显( $P \leq 0.05$ ), 注射 2.5h 后与注射前比较无明显变化; 在 VM 部位, 注射后 3 例(3/4) 升高, 1 例变化不明显。对照组除 1 例外, 其他在处理前后 LH 水平的变化不明显。结果说明, 大豆黄酮可在下丘脑水平上增加去势公猪 LH 的分泌。

关键词: 大豆黄酮; 下丘脑; 微量注射; LH; 猪

## Effect of Daidzein with Intra-cerebral Micro-injection on Plasma LH of the Pigs

WANG Gen-lin<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>2</sup>, CHEN Wei-hua<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology; <sup>2</sup> Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Daidzein (DA) was micro-injected into mediobasal hypothalamus (MBH) and nucleus ventromedialis thalami (VM) of castrated male Goettingen Mini pigs (n=9, 10 $\mu$ l/animal, 8pgDA/ $\mu$ l) and plasma LH levels were compared prior and posterior to the treatment. The result showed that LH levels after cerebral administration (ad) tended to increase compared to the levels before ad. In MBH, LH level rose in 4 cases (4/5) and did not change in 1 case 0.5~2 h after ad compared to those before ad. There were no significant changes 2.5 h after ad. When injected in VM, LH level rose in 3 cases (3/4) and showed no change in 1 case after ad compared to those before ad. In the control, there were no changes of plasma LH level prior and posterior to the treatment except for 1 case in MBH. The results suggest that DA could up-regulate LH secretion through hypothalamus level.

Key words: Daidzein; Hypothalamus; Microinjection; LH; Pig

植物雌激素对动物生殖内分泌的影响已有许多观察试验。利用不同剂量的香豆雌酚处理去卵巢大鼠,可以在不同程度上改变 GnRH 诱导的 LH 分泌动力模型<sup>[1]</sup>。长期采食植物雌激素的绵羊, LH 分泌特征改变, 表现为与雌激素处理相类似的效应<sup>[2]</sup>。用大豆黄酮处理去卵巢猪, 导致其血浆 LH 浓度下降。体外条件下, 大豆黄酮也可以影响猪垂体前叶组织的 LH 释放特征<sup>[3,4]</sup>。本试验通过在脑组织内注射大豆黄酮, 以便了解大豆黄酮对高级神经中枢影响的直接证据, 进一步探讨大豆黄酮的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及脑内导管埋植手术

用 4~6 月龄、体重 18~26kg 德国格丁根小公猪 5 头, 人工控制光照(600~1900h) 和室温(20~24 $^{\circ}$ C), 自由采食, 分栏饲养。在试验栏饲养 1 周后, 施行睾丸阉割术, 去势 3 周后安装颈静脉血管导管, 导管安装 1 周后施行脑内导管埋植手术, 埋植方法按 Ellendorff 法进行<sup>[5]</sup>。导管在脑顶骨联合十字线的相对位置为: 十字线纵向向前 20mm, 十字线横向

收稿日期: 2000-12-05

作者简介: 王根林(1957-), 男, 江苏靖江人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理、生殖调控和养牛学等领域的教学和研究工作。

Tel: 025-4395381; Fax: 025-4395314; E-mail: glwang@public1.ptt.js.cn

两侧 2.5 mm;导管插入深度为 28.5 ~ 32 mm。脑内导管插入后,用医用牙科凝胶固定。

### 1.2 脑内注射

待脑内埋植手术部位愈合后(手术后第 3 周)施行脑内注射。注射时将动物随机分成 2 组,3 头作注射试验,2 头作注射对照。所有动物注射前以 10 min 间隔,通过血管导管采血 1 h 以作空白对照。然后试验组每侧注射 5 $\mu$ l 大豆黄酮溶液(两侧共 10 $\mu$ l,8 pg/ $\mu$ l);对照组注入相同体积不含大豆黄酮的助溶剂(乙二醇)生理盐水溶液。注射后以相同时间间隔采样 3 h。相隔 3 d 时间,交叉重复试验 3 次。

试验完全结束时,通过脑内导管每侧注入 5 $\mu$ l 台盼蓝(Trypanblau)溶液。宰杀猪并取出脑组织,于 37%福尔马林溶液固定,经脑组织冷冻切片,根据着色点的位置,对照格丁根猪脑组织图谱,确定脑内注射部位。结果表明,3 头猪脑内注射部位在下丘脑基底部(MBH),另 2 头脑内注射部位在丘脑腹侧正中核(VM,见图 1)。

### 1.3 LH 含量分析

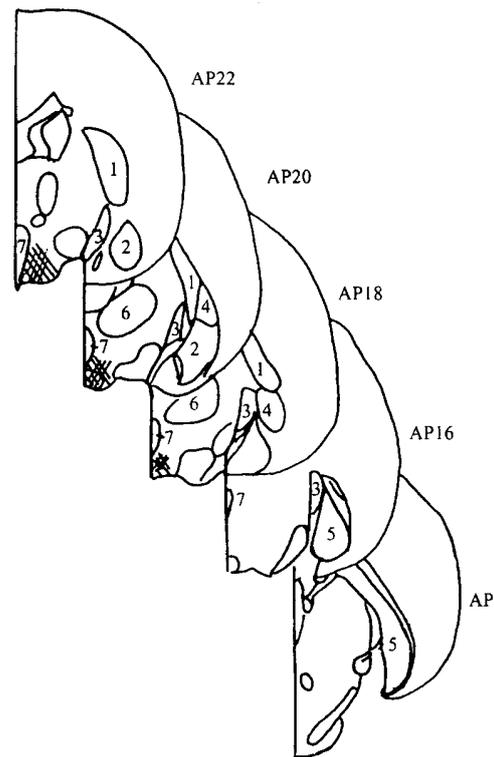
按放免双抗法测定<sup>[6]</sup>,猪 LH 标准品和第一抗体由比利时 UCB bio products 公司生产,第二抗体由德国动物科学与动物行为研究所(FAL)提供。测定的批内变异系数为 4.5%,批间变异系数为 7.2%。

### 1.4 统计分析

以注射处理前后各 0.5 h 所采集样本,统计分析(平均数 $\pm$ SD)及差异的显著性,统计程序为 Student-Newman-Keuls-test, ANOVA in Sig mastat, Jandel Scientific。

## 2 结果与分析

试验组注射大豆黄酮后,LH 水平呈上升趋势:4 例注入部位为 MBH 的动物,处理后 0.5 ~ 2 h 血浆 LH 水平较注射前上升( $P < 0.05$  和  $P < 0.058$ ),1 例变化不明显,注射 2.5 h 后各例 LH 水平与注射前比较无显著差异;注射部位为 VM 的 4 例中,3 例处理后 LH 水平上升,1 例变化不明显。对照组注射前后 LH 水平除 1 例外,其他无明显变化(表)。大豆黄酮脑内注射后,血清 LH 分泌峰和频率的变化:注射在 MBH 部位,处理后 LH 分泌峰幅显著增高的有 4 例,其中有 2 例分泌峰值增高超过基础值的 3 ~ 4 倍,但 LH 峰频无明显改变;注射在 VM 部位,处理后有 1 例 LH 分泌峰幅比基础水平增高 1.5 倍以上,2 例峰幅增高 0.5 倍左右,其他未出现峰幅



网格代表注入部位在下丘脑基底部(MBH 部位, AP 22, AP20, AP18);AP—脑纵向切面;1 = 豆状核,2 = 杏仁核,3 = 视神经束,4 = 尾状核,5 = 海马腹侧核,6 = 丘脑腹侧正中核,7 = 第三脑室  
# indicates the areas of injection in the mediobasal hypothalamus (MBH, AP22, AP20, AP18). AP = anterior-posterior plane; 1 = putamen; 2 = amygdala; 3 = tractus opticus; 4 = nucleus caudatus; 5 = nucleus ventralis hippocampi; 6 = nucleus ventromedialis thalami; 7 = third ventricle

图 1 导管脑内埋植部位示意图

Fig. 1 Schematic representation of sites of implants

变化,处理前后 LH 峰频也未发生改变。图 2 和图 3 为大豆黄酮处理后 LH 分泌的典型变化曲线。

## 3 讨论与结论

动物下丘脑-垂体-性腺轴分泌受到相互制约调节。下丘脑是 GnRH 的重要分泌部位,体内条件下,性腺激素可与下丘脑受体结合,通过改变 GnRH 释放特征而影响垂体 LH 分泌<sup>[7-9]</sup>。大豆黄酮是具有多种生物活性的物质,具有雌激素或抗雌激素活性。作者的研究证实,体内状态下,大豆黄酮也可改变猪下丘脑 GnRH 的分泌,并调节垂体 GnRH 受体水平<sup>[10]</sup>。本试验表明,在阉割雄性公猪下丘脑部位(无论是在 MBH 部位或 VM 部位)注射大豆黄酮后,血浆 LH 水平趋于上升,进一步说明大豆黄酮可以通过下丘脑途径影响猪的促性腺激素分泌,这为大豆黄酮通过高级神经中枢调节动物生殖内分泌功

表 大豆黄酮脑内注射阉割公猪血浆 LH 浓度变化

Table Plasma LH levels in castrated male pigs with intracerebral microinjection of daidzein

组别 Group	序号 No.	部位 Site	LH 含量 LH content (ng/ml plasma, mean ±SD)						变化趋势 Changes			
			- 1h	- 0.5h	0.5h	1h	1.5h	2h	2.5h	上升 Rise	下降 Decline	不变 Stable
试验 Exp.	1		1.33 ±0.13	1.37 ±0.15	1.43 ±0.22	1.97 ±0.31*	1.77 ±0.25	1.57 ±0.07	1.43 ±0.13			
	2		1.33 ±0.22	1.30 ±0.20	1.13 ±0.16	1.03 ±0.10	1.67 ±0.26	2.23 ±0.24*	1.40 ±0.22			
	3	MBH	1.40 ±0.14	1.10 ±0.08	1.27 ±0.14	1.73 ±0.08	1.43 ±0.11	1.93 ±0.27*	1.43 ±0.21			
	4		2.33 ±0.45	2.67 ±0.38	2.33 ±0.29	2.13 ±0.41	1.83 ±0.52	2.03 ±0.36	1.99 ±0.27	4	0	1
对照 CK	5		1.77 ±0.25	1.70 ±0.21	1.57 ±0.21	1.80 ±0.25	2.73 ±0.35*	2.50 ±0.22*	1.90 ±0.24			
	1		1.30 ±0.23	1.60 ±0.19	1.60 ±0.18	1.98 ±0.08*	1.41 ±0.19	2.57 ±0.33*	1.73 ±0.18			
	2	VM	2.30 ±0.42	2.27 ±0.29	2.80 ±0.35*	1.73 ±0.21	2.96 ±0.29*	2.00 ±0.16	1.83 ±0.12	3	0	1
	3		1.67 ±0.35	1.80 ±0.18	1.93 ±0.23	1.43 ±0.17	1.87 ±0.28	1.67 ±0.24	1.60 ±0.20			
	4		2.02 ±0.23	1.98 ±0.28	2.33 ±0.21	3.00 ±0.31*	2.73 ±0.27*	2.43 ±0.22	2.10 ±0.24			
	1		1.90 ±0.44	1.87 ±0.33	1.13 ±0.17#	1.40 ±0.26	1.50 ±0.13	1.80 ±0.25	1.38 ±0.09			
	2	MBH	1.47 ±0.23	1.20 ±0.16	1.33 ±0.14	1.63 ±0.23	1.14 ±0.11	1.50 ±0.19	1.14 ±0.10	0	1	3
	3		1.83 ±0.34	1.77 ±0.27	1.97 ±0.27	1.53 ±0.22	1.63 ±0.20	1.57 ±0.32	1.53 ±0.12			
	4		1.86 ±0.31	1.67 ±0.25	1.50 ±0.22	1.60 ±0.00	2.03 ±0.21	2.18 ±0.35	1.90 ±0.23			
	1	VM	1.70 ±0.24	1.33 ±0.21	1.63 ±0.25	1.43 ±0.11	1.76 ±0.09	1.83 ±0.23	1.50 ±0.22	0	0	2
	2		1.26 ±0.23	1.26 ±0.15	1.08 ±0.16	1.10 ±0.11	1.43 ±0.14	1.30 ±0.07	1.32 ±0.04			

\* 高于注射前 0.5h 或 1h 分泌水平 (P ≤ 0.05); # 低于注射前 0.5h 或 1h 分泌水平 (P ≤ 0.05)  
 \* indicates LH level higher than that for 0.5 or 1 hour prior to the treatment (P ≤ 0.05); # indicates LH level lower than that for 0.5 or 1 h prior to the treatment (P ≤ 0.05)

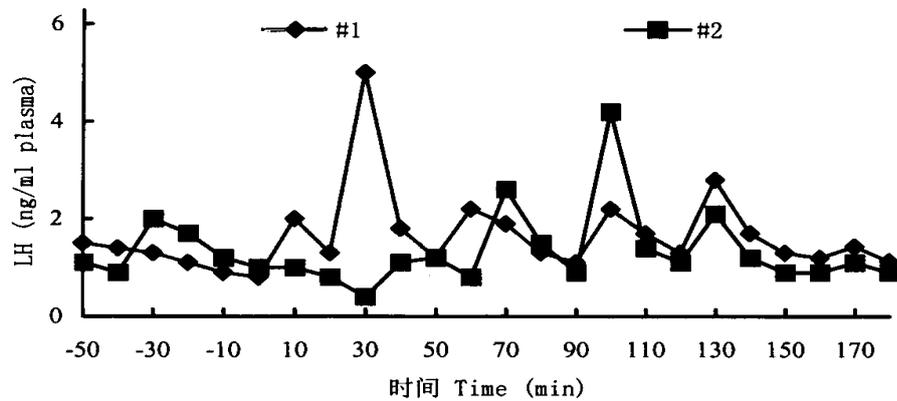


图 2 大豆黄酮微量注射猪 MBH 部位对血浆 LH 水平的影响

Fig. 2 Effect of daidzein with intracerebral microinjection into MBH on plasma LH levels of the pigs

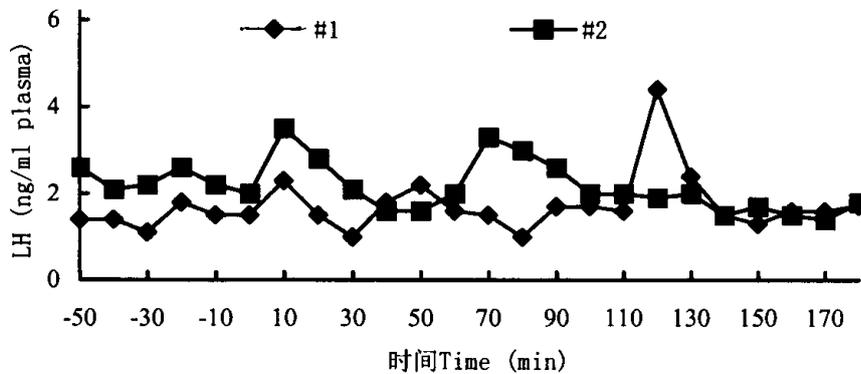


图 3 大豆黄酮微量注射猪 VM 部位对血浆 LH 水平的影响

Fig. 3 Effect of daidzein with intracerebral microinjection into VM on plasma LH levels of the pigs

能提供了直接的试验证据。

体内外试验表明,动物对植物雌激素的反应存在性别差异。用大豆黄酮静脉内一次注射去卵巢猪,可降低猪血浆 LH 水平,长期用大豆黄酮埋植同一样性别的猪,可加强雌二醇诱导的对 LH 分泌的负反馈抑制,推测大豆黄酮对母猪垂体 LH 分泌的影响受到下丘脑释放激素的调节<sup>[9]</sup>。体外条件下,大豆黄酮和雌二醇均表现为对小母猪垂体体外 LH 释放的抑制作用,而对小公猪垂体体外 LH 释放无明显抑制<sup>[11]</sup>,在 GnRH 诱导下可不同程度地加强垂体 LH 释放,说明大豆黄酮对雌、雄动物下丘脑和垂体具有不同的生理影响,与雌激素在不同性别的反应相类似<sup>[12]</sup>。大豆黄酮在下丘脑水平上诱导垂体 LH 分泌峰幅的增高,进一步证明了大豆黄酮对公猪垂体内、外 LH 分泌功能具有增强作用。

本试验大豆黄酮作用的途径与性激素相似,说明大豆黄酮的受体可能就是雌激素受体,但仍没有 MBH 和 VM 部位大豆黄酮或雌激素受体分布的直接资料。另外,动物对大豆黄酮具有剂量依赖性反应<sup>[13]</sup>。本试验因条件所限,只进行了一个剂量的处理,其他剂量范围的大豆黄酮对下丘脑的直接效应亦有待进一步研究。

#### References :

- [ 1 ] Hughes C L Jr. Effects of phytoestrogens on GnRH-induced luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Reprod. Toxicol.* 1988, 1(3) :179 - 181 .
- [ 2 ] Nwannenna A I, et al. Clinical changes in ovariectomized ewes exposed to phytoestrogens and 17 beta-estradiol implants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995, 208(1) :92 - 97 .
- [ 3 ] Wang G L, et al. Effect of daidzein on LH secretion in ovariectomized sows. *J. Chinese Appl. Physiol.* 1998, 14(1) : 70 - 73 . (in Chinese)
- 王根林,等.大豆黄酮对去卵巢猪 LH 分泌的影响. *中国应用生理学杂志*, 1998, 14(1) : 70 - 73 .
- [ 4 ] Wang G L, et al. Effect of daidzein on LH release from the pituitaries in a perfusion system. *J. Nanjing Agri. Univ.* 1997, 20(4) : 48 - 53 . (in Chinese)
- 王根林,等.大豆黄酮对体外灌流垂体前叶组织促黄体素分泌的影响. *南京农业大学学报*, 1997, 20(4) : 48 - 53 .
- [ 5 ] Ellendorff F, et al. The miniature pig as an animal model in endocrine and neuroendocrine studies of reproduction. *Lab. Anim. Sci.* 1977, 27 : 822 - 830 .
- [ 6 ] Ponzilius K H, et al. Ontogeny of secretory pattern of LH release and effects of gonadectomy in the chronically catheterized pig fetus and neonate. *Biol. Reprod.* 1986, 34 : 602 - 612 .
- [ 7 ] Kato J. Basic and clinical studies on sex hormone receptors. *J. Jap. Soc. Gynaecol. (Nippon Sanka Fujunka Gakkai Zasshi)*, 1994, 46 : 647 - 658 .
- [ 8 ] Britt J H, et al. Roles of estradiol and gonadotropin-releasing hormone in controlling negative and positive feedback associated with luteinizing hormone surge in ovariectomized pigs. *Biol. Reprod.* 1991, 45 : 478 - 485 .
- [ 9 ] Wang G L, et al. Effect of daidzein on secretion of GnRH, LH and inhibin in gilts. *Jiangsu J. Agri. Sci.* 1999, 15(1) : 26 - 29 .
- [ 10 ] Wang G L, et al. Effect of intro muscular injection of daidzein on level of GnRH receptor in pituitary in piglets. *J. Jiangsu Agri.* 2000, 16(4) : 233 - 236 . (in Chinese)
- 王根林,等.大豆黄酮肌注仔猪对垂体 GnRH 受体水平的影响. *江苏农业学报*, 2000, 16(4) : 233 - 236 .
- [ 11 ] Wang G L, et al. Effects of daidzein and estradiol on GnRH-induced LH *in vitro* release from the pituitaries of male pigs in the perfusion system. *J. Nanjing Agri. Univ.* 1999, 22(1) : 65 - 68 . (in Chinese)
- 王根林,等.大豆黄酮和雌二醇体外灌流公猪垂体组织对 GnRH 诱导下 LH 分泌的影响. *南京农业大学学报*, 1999, 22(1) : 65 - 68 .
- [ 12 ] Elsaesser F, et al. Ontogeny of pituitary gonadotrophin secretion in the fetal and post-natal pig in response to LHRH *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 1988, 82 : 71 - 80 .
- [ 13 ] Levy J R, et al. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995, 208(1) : 60 - 66 .