

黄心河, 张亚峰, 伍钢, 等. 植物雌激素大豆黄酮对断奶期小鼠乳腺退化的减缓作用研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 41-48.

HUANG X H, ZHANG Y F, WU G, et al. Alleviating effect of phytoestrogen Daizein on mammary gland involution in weaned mice [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 41-48.

植物雌激素大豆黄酮对断奶期小鼠乳腺退化的减缓作用研究

黄心河, 张亚峰, 伍钢, 陈雨涛, 周潇, 张源淑*, 韩正康

(南京农业大学动物医学院/农业农村部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在研究植物雌激素大豆黄酮 (DZ) 对断奶期小鼠乳腺退化的影响。选取 48 只孕鼠, 随机分为对照组 (CON 组), 腹腔注射无菌 PBS; 大豆黄酮组 (DZ 组), 每天每 kg 体重腹腔注射 DZ 100 mg, 连续处理 1 周。孕鼠正常分娩后, 在哺乳期第 10 天强制断奶。各组分别在断奶第 1、3、7 天选取 8 只小鼠取血后处死, 取所有乳腺组织, 称重计算乳腺指数; ELISA 法测定血液中雌二醇 (E2)、催乳素 (PRL)、胰岛素样生长因子 (IGF-I) 的浓度; 常规法制作乳腺组织切片, 进行 HE 染色; Western blot 及荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析乳腺组织内促凋亡因子 Bax 和抗凋亡因子 Bcl-2 的蛋白与基因表达水平。结果: 与 CON 组相比, DZ 组增加了断奶 1 d 母鼠的乳腺指数, 但降低断奶 3 d、7 d 的乳腺指数; 与 CON 组相比, 断奶 1 d 时, DZ 组极显著提高母鼠血清中 PRL 和 IGF-I 浓度 ($P < 0.01$), 断奶 3 d 时 DZ 组极显著提高了 PRL 和 E2 浓度 ($P < 0.01$), 显著提高断奶 7 d 母鼠血清中 E2 浓度 ($P < 0.05$); HE 染色结果显示, 与 CON 组相比, DZ 组显著降低断奶母鼠乳腺组织中脂肪细胞面积比 ($P < 0.05$), 提高腺泡的面积比 ($P > 0.05$); 与 CON 组相比, DZ 组极显著上调断奶期乳腺组织 Bcl-2 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$), 极显著下调断奶 1 d Bax 基因的表达水平 ($P < 0.01$), 断奶 3 d 时极显著下调 Bax 蛋白与基因的表达水平 ($P < 0.01$), 断奶 7 d 时极显著上调乳腺中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$), 在断奶 1 d 和 3 d, Bcl-2/Bax 比值均极显著升高 ($P < 0.01$)。本研究表明, DZ 处理可升高断奶母鼠血清中 IGF-I、PRL 及 E2 浓度, 上调乳腺中 Bcl-2/Bax 比值, 抑制细胞凋亡, 降低脂肪细胞所占面积比, 提示 DZ 可能通过抑制母鼠乳腺细胞凋亡, 延缓乳腺早期退化。

关键词: 植物雌激素; 大豆黄酮; 断奶期; 乳腺退化; 小鼠

中图分类号: S852.2 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)04-0041-08

Alleviating effect of phytoestrogen Daizein on mammary gland involution in weaned mice

HUANG Xinhe, ZHANG Yafeng, WU Gang, CHEN Yutao,

ZHOU Xiao, ZHANG Yuanshu*, HAN Zhengkang

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/
College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To investigate the effects of Daidzein (DZ) on mammary gland involution in weaned mice, 48 pregnant mice were used and randomly divided into a control group (treated with sterile PBS) and a DZ group (intraperitoneal injection of 100 mg/kg), once daily, for 7 days. After normal delivery, the mice were forced to wean on the 10th day of lactation. Then, the rodents were euthanized on 1, 3 and 7 days after weaning, respectively, and their blood and mammary tissues were sampled for analysis. All the mammary tissues were weighed to calculate the mammary index. The enzyme-linked immunosorbent kit (ELISA) was used to detect serum estradiol (E2), prolactin (PRL) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels in the mice. The morphological changes of mammary tissue were analyzed with HE staining. Western blotting was used to detect Bax and Bcl-2 protein expression in the breast tissue. The results showed that compared with the control group, the mammary index was increased in the DZ group on one-day weaned mice, while the index was lower than that of the control group on 3 and 7 days of weaning. Compared with the control group, on 1 day after weaning, the levels of serum PRL ($P < 0.01$) and IGF-I ($P < 0.01$) were significantly increased in the DZ group. Three days after weaning, the serum PRL and E2 concentrations in the DZ group were significantly increased ($P < 0.01$). The HE staining results showed that, compared with the control group, the adipocyte area ratio in the

收稿日期: 2023-05-23; 修回日期: 2024-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972640)

第一作者: 黄心河, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 张源淑, 教授, 研究方向为动物机能生物化学, E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn.

breast tissue of the weaned female mice in the DZ group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the acinar area ratio was increased ($P > 0.05$). Compared with the control group, the expression of Bcl-2 was significantly up-regulated by DZ ($P < 0.01$), while Bax expression was significantly decreased on 3 days after weaning ($P < 0.01$), and the expression of Bax and Bcl-2 proteins was significantly increased on 7 days after weaning ($P < 0.01$). The ratio of Bcl-2/Bax was significantly increased on 1 day and 3 days after weaning ($P < 0.01$) in the DZ group, but decreased on 7 days of weaning ($P > 0.05$). These results indicated that DZ affected the serum IGF- I, PRL and E2 levels in the weaned female mice, and increased the ratio of Bcl-2/Bax expression to inhibit the process of apoptosis and decrease the area ratio of adipose cells, which suggested that DZ might delay the early involution of mammary gland by inhibiting the apoptosis of mammary gland cells in female mice.

Keywords: phytoestrogen; Daidzein; weaning period; mammary gland involution; mice

乳腺是哺乳动物特有的器官,负责乳汁的合成与分泌,良好的发育是乳腺充分发挥泌乳功能的前提,对畜牧业生产及动物子代的生长发育具有重要影响。乳腺发育先后历经胚胎期、青春期、妊娠期、泌乳期和退化期5个阶段^[1],其中退化期是乳腺发育过程中的一个重要阶段。缩短乳腺的退化时间,延缓乳腺的退化,延长泌乳期可以发挥出奶牛、奶山羊等乳用动物的最大经济价值,对畜牧业生产提质增效具有重要意义。

乳腺退化始于腺体内的乳汁郁积^[2],乳腺上皮细胞分泌活动停止,细胞体积逐渐减小并开始凋亡,同时腺体重塑恢复至孕前状态^[3]。动物机体通过多种内分泌激素和细胞因子对退化期的乳腺凋亡严密调控,维护乳腺的内分泌平衡,确保乳腺周期性的泌乳性能正常^[4]。研究表明,雌激素(E)是乳腺重塑和功能调节的重要驱动因子^[5],催乳素(PRL)^[6]、生长激素(GH)^[7]、胰岛素样生长因子 I (IGF-I)^[7-8]和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[8-9]对乳腺上皮细胞凋亡的调节均具有重要作用。

植物雌激素是天然存在的一类非甾体酚类植物化合物,大豆黄酮(DZ)属于异黄酮类植物雌激素之一,化学结构与17- β -雌二醇(E2)相似,能与雌激素受体(ER)结合,从而表现出雌激素活性和抗雌激素活性^[10]。研究表明,DZ可促进乳腺上皮细胞的增殖和乳腺发育^[11],表现出雌激素激动剂的促进作用,与多种激素协同促进乳腺发育及泌乳^[12],同时影响凋亡相关蛋白的表达^[13],显示了DZ在调控乳腺发育方面的开发潜力。DZ对乳腺的发育以及泌乳等方面的影响已有研究,但如何影响乳腺的退化尚未见详细报道。

本试验使用DZ处理妊娠中期小鼠,于断奶的不同时期采样检测,通过测定血清中相关激素和细胞因子含量、观察乳腺的组织学变化及检测凋亡相关蛋白的表达量等,初步探讨DZ对断奶期乳腺退化的影响,为植物雌激素DZ在乳用动物生产中利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 DZ 和试剂

DZ由南京农业大学韩正康教授赠送(纯度>98%);鼠源E2、PRL、IGF-I ELISA检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;组织/细胞裂解液RIPA、蛋白酶抑制剂PMSF及兔 β -tubulin抗体均购自南京巴傲得生物科技有限公司;兔Bax和兔Bcl-2抗体购自Cell Signaling Technology公司;羊抗兔IgG购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;PVDF膜购自美国密理博公司;ECL显色液购自翌圣生物科技有限公司;反转录试剂盒购自艾科瑞公司;TRIzol试剂、qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒购自Vazyme Biotech公司;异丙醇购自上海试四赫维化工有限公司;DEPC水购自南京生兴有限公司等。

1.2 仪器与设备

POWER-PAC 300电泳仪和POWER-PACHC转印仪均购自BIO-RAD公司(美国);全自动化学发光图像分析仪购自天能公司(中国上海);RT-qPCR仪(罗氏LightCycler96);BioPhotometer-D30核酸蛋白测定仪(德国);酶标仪购自Tecan公司(瑞士);组织研磨仪购自赛维尔公司(中国武汉)等。

1.3 实验动物

SPF级ICR小鼠,7周龄,雌性48只,雄性24只,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,动物许可证号:SCXK(浙)2019-0002。饲养于南京农业大学实验动物中心,饲养环境为温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度50%~60%,12h光照和12h黑暗条件下,自由饮食和饮水。统一饲喂生长繁殖饲料,饲料配方包括东北玉米、小麦、西班牙苜蓿草、秘鲁鱼粉、美国鸡肉粉、植物油、氨基酸、维生素、矿物质等。饲料由本实验室提供。

1.4 试验分组及处理

适应性饲养1周后,将雌雄小鼠以2:1的比例混笼饲养,通过观察阴道栓判断雌鼠是否受精,有阴道栓出现的记为怀孕0.5d。将孕鼠随机分为对照组(CON组)、大豆黄酮组(DZ组),每组24只。在母

鼠怀孕 14 d 开始, 每日下午 15: 00, DZ 组按照每 kg 体重 100 mg 的剂量腹腔注射 DZ, CON 组注射等量的无菌 PBS 处理, 连续 7 d。试验期间观察发现小鼠精神状况良好, 饮水饮食及活动均正常, 怀孕和分娩过程中无异常情况发生, 符合试验条件。试验在南京农业大学实验动物中心进行, 经南京农业大学实验动物中心动物伦理委员会批准。

1.5 样品采集

孕鼠正常分娩后, 于哺乳期第 10 天强制断奶。在断奶 1、3 及 7 d 这 3 个时间每组各取 8 只小鼠, 禁食 12 h 后称重。采集血液后颈椎脱臼处死小鼠, 剥离皮肤采集小鼠全部乳腺组织并称重。收集的血液经 3 000 r/min 离心 15 min, 获得血清于 -20 °C 保存。取第 4 对乳腺组织用于 4% 多聚甲醛固定, 剩余乳腺组织置于 -80 °C 冻存。

1.6 指标测定

1.6.1 乳腺指数的测定

将小鼠解剖后取出的所有乳腺称重并记录, 计算乳腺指数 (乳腺湿重/小鼠体重×100%)。

1.6.2 血清 E2、PRL 及 IGF-I 浓度的测定

用酶联免疫检测试剂盒测定血清中 E2、PRL 及

IGF-I 浓度, 按照试剂盒说明书要求操作测定。

1.6.3 小鼠乳腺组织切片 HE 染色及乳腺退化情况的量化计算

组织切片由南京农业大学病理组制作。苏木精-伊红 (HE) 染色: 将固定好的乳腺组织脱水、透明, 之后石蜡包埋, 常规法制作组织切片。光学显微镜下观察乳腺组织的变化。

参照 Chapman^[14] 方法, 以脂肪细胞占据的腺体面积以及腺泡所占据的腺体面积作为指标, 对发生的乳腺退化情况量化处理。各时期每组分别选取 10 个 100 倍放大的视野, 利用 Image J 软件计算每个视野中脂肪细胞的面积以及腺泡的面积, 得出两者面积分别占视野总面积的百分比, 以直方图形式表示。

1.6.4 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测乳腺组织中凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 的表达

TRIzol 一步法提取乳腺组织总 RNA, 测定 RNA 浓度, 按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板 RT-qPCR 检测。使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物序列 (表 1), 引物由北京擎科生物股份有限公司合成。

表 1 RT-qPCR 相关基因引物序列

| 基因 | 基因序列号 | 引物序列 (5'→3') | 产物大小/bp |
|----------------|-------------|---|---------|
| β -actin | NM_007393.5 | F: CGATATCGTGTGGCTGCTGCTC R: AGGTGTGTGGCCAGATCTTC | 260 |
| Bax | NM_007527.3 | F: TGCAGAGGATGATTGCTGAC R: GATCAGCTCGGGCACTTTAG | 140 |
| Bcl-2 | NM_009741.5 | F: ATGCCTTTGTGGAACATATATGCC R: GGTATGCACCCAGAGTGATGC | 92 |

1.6.5 Western blot 检测乳腺组织中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达

称取约 35 mg 的乳腺组织, 加入预冷的裂解液 RIPA (含 PMSF) 匀浆后, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 BCA 法测定蛋白浓度, 统一蛋白浓度为 5 μ g/ μ L, 加上样缓冲液, 100 °C 变性 10 min 制样。每孔上样 50 μ g, 进行 SDS-PAGE, 然后湿转法将目的蛋白转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后加入一抗 Bax (1: 1 000)、Bcl-2 (1: 1 000)、 β -tubulin (1: 10 000), 4 °C 孵育过夜。次日 TBST 漂洗, 加入辣根过氧化物酶标记的 1: 10 000 羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 2 h。洗涤后加入 ECL 发光液, 全自动化学发光分析仪中检测, Image J 软件分析各条带灰度值。以 β -tubulin 为内参, 比较目的条带相对灰度值。

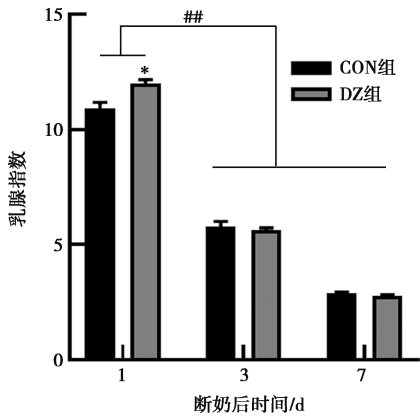
1.7 数据统计和分析

数据采用 IBM SPSS 21.0 软件进行方差分析, GraphPad Prism 8.0 软件作图, 试验结果均以“平均值±标准误”表示, 其中 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 DZ 处理对断奶期小鼠乳腺指数的影响

结果如图 1 所示。与 CON 组相比, 断奶 1 d 时 DZ 组乳腺指数显著增加 ($P < 0.05$); 断奶 3 d 和 7 d 时 DZ 组乳腺指数有所降低, 变化不明显。但与断奶 1 d 相比, 断奶 3 d 和 7 d 时 CON 组及 DZ 处理组乳腺指数均极显著降低 ($P < 0.01$)。



注：同一时间点与对照组相比，*表示差异显著 ($P < 0.05$)；与断奶 1 d 时相比，##表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

图 1 断奶小鼠乳腺指数 ($n = 8$)

2.2 DZ 处理对断奶期小鼠血清中 E2、PRL 及 IGF-I 浓度的影响

如表 2 所示，断奶 1 d 时，与 CON 组相比，DZ 处理降低了母鼠血清中 E2 浓度，显著提高了血清中

表 2 不同断奶期小鼠血清中 E2、PRL、IGF-I 浓度 ($n = 8$)

| 断奶时间/d | CON 组 | | | DZ 组 | | |
|--------|--|---|---|--|---|---|
| | E2/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) | PRL/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) | IGF-I/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) | E2/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) | PRL/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) | IGF-I/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
| 1 | 54.48±0.78 | 14.67±0.49 | 7.32±0.09 | 48.91±2.10 | 21.27±0.59* | 11.2±0.54** |
| 3 | 35.38±1.48 | 15.62±0.06 | 7.33±0.26 | 46.89±1.47** | 19.33±0.28** | 7.52±0.30 |
| 7 | 41.79±1.62 | 16.64±0.06 | 7.43±0.20 | 48.64±1.61* | 16.65±0.05 | 8.01±0.10 |

注：同一指标相同断奶时间与对照组相比，*表示差异显著 ($P < 0.05$)，**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

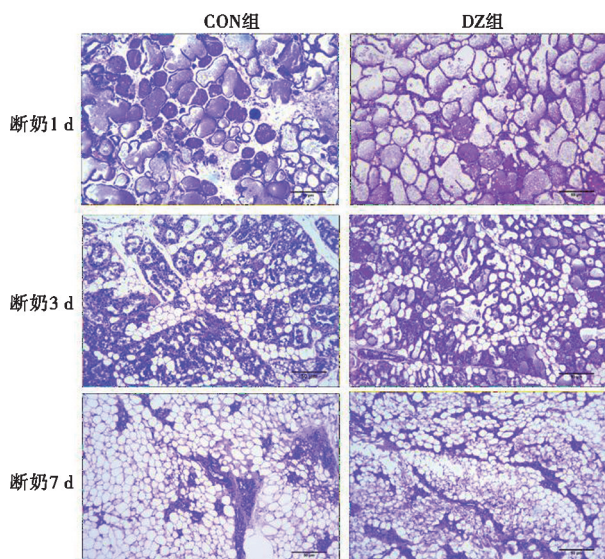


图 2 DZ 处理对乳腺组织形态的影响 (HE, 比例尺 = 50 μm)

为了量化已经发生的退化量，测量了脂肪细胞占

PRL ($P < 0.05$) 及 IGF-I 浓度 ($P < 0.01$)。断奶 3 d 时，与 CON 组相比，DZ 处理极显著提高了血清中 E2 ($P < 0.01$) 和 PRL 浓度 ($P < 0.01$)，IGF-I 含量无显著变化。断奶 7 d 时，与 CON 组相比，DZ 处理提高了血清中 E2 浓度 ($P < 0.05$)，血清中 IGF-I 和 PRL 浓度无显著变化。

2.3 断奶期母鼠乳腺组织形态学变化

如图 2 所示，CON 组在断奶 1 d 时乳腺组织被腺泡充斥，且腺泡结构完整内充满乳汁及其他分泌物。随着断奶时间延长，乳腺组织内腺泡缩小且脂肪组织重新出现，到断奶 7 d 时乳腺组织已全部被脂肪组织及结缔组织所占据。DZ 处理组乳腺组织中变化与 CON 组较一致，但相比于 CON 组，DZ 组腺泡更大且结构较为完整。断奶 3 d 时，DZ 处理组减少了脂肪细胞的增多，且缓解了腺泡大范围缩小及数量减少的情况；断奶 7 d 时，相对于 CON 组乳腺组织被丰富的脂肪组织和结缔组织包围的情况，DZ 组还存在极少量完整的导管及腺泡。提示：DZ 处理有减缓乳腺退化作用，但在断奶早期阶段效果更优。

据的腺体面积，以及腺泡占据的腺体面积。如图 3 所示，与 CON 组相比，DZ 处理组在断奶 1 d、3 d 和 7 d 三个时间点母鼠的腺泡面积比均有所增加，其中断奶 3 d 时，DZ 处理组较 CON 组差异显著 ($P < 0.05$)；同时与 CON 组相比，DZ 处理组乳腺组织中脂肪细胞面积比均显著降低 ($P < 0.05$)，且随断奶时间的延长，腺泡比例的下降与脂肪细胞占比增加呈正相关。

2.4 DZ 对断奶期小鼠乳腺组织中 Bax 和 Bcl-2 基因表达的影响

与 CON 组相比，断奶 1 d 时 (图 4A)，DZ 组极显著下调了凋亡基因 Bax ($P < 0.01$) 的表达，同时极显著增加了 Bcl-2/Bax 表达的比值 ($P < 0.01$)；断奶 3 d 时 (图 4B)，DZ 组极显著下调了 Bax 的表达水平 ($P < 0.01$)，同时极显著上调了 Bcl-2 基因的表达水平 ($P < 0.01$)，且 DZ 处理后极显著增加两者的比值 ($P < 0.01$)；断奶 7 d 时 (图 4C)，DZ 处理后均极显著下调了 Bax 和 Bcl-2 基因的表达水平 ($P <$

0.01), DZ 组显著增加 Bcl-2 与 Bax 表达的比值 ($P < 0.05$)。

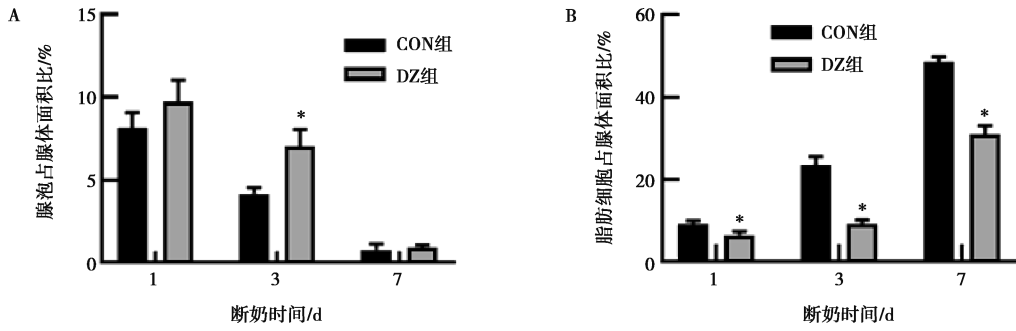
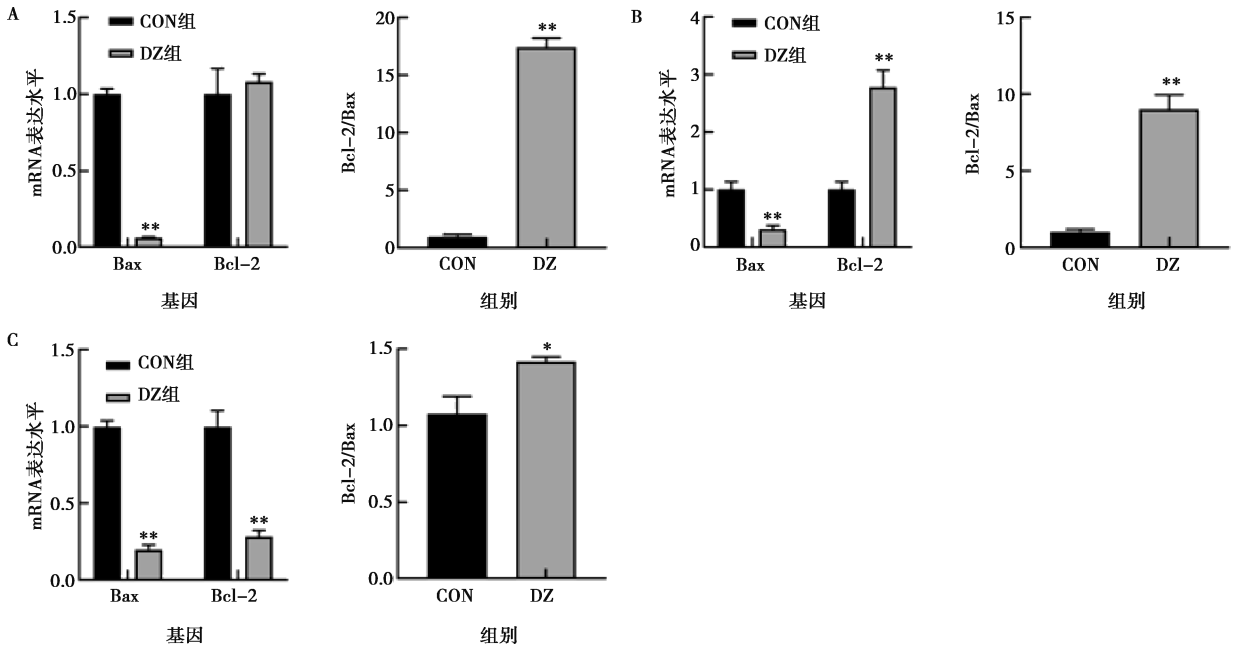


图3 DZ对断奶期小鼠乳腺退化的影响



注: 同一指标与对照组比较, *表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

图4 DZ对断奶1 d (A)、断奶3 d (B)和断奶7 d (C)小鼠乳腺组织 Bax、Bcl-2 基因 mRNA 表达水平的影响

2.5 DZ对断奶期小鼠乳腺组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

与 CON 组相比, 断奶 1 d 时 (图 5), DZ 组极显著上调了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平 ($P < 0.01$), 上调了凋亡蛋白 Bax 的表达水平 ($P > 0.05$), 同时极显著增加了 Bcl-2/Bax 比值 ($P < 0.01$); 断奶 3 d 时

(图 6), DZ 组极显著降低了 Bax 的表达水平 ($P < 0.01$), 且极显著提高了 Bcl-2 的表达水平 ($P < 0.01$), 同时也极显著增加了 Bcl-2/Bax 比值 ($P < 0.01$); 断奶 7 d 时 (图 7), DZ 组极显著极提高了 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$)。

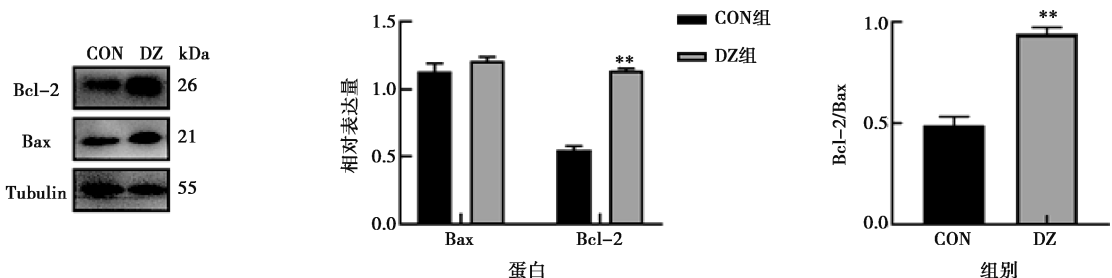


图5 DZ对断奶1 d小鼠乳腺组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平的影响

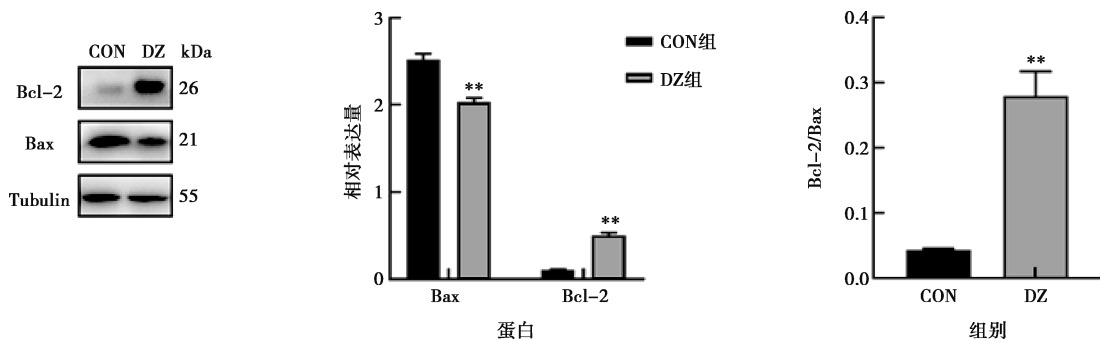


图6 DZ对断奶3 d小鼠乳腺组织Bax、Bcl-2蛋白表达水平的影响

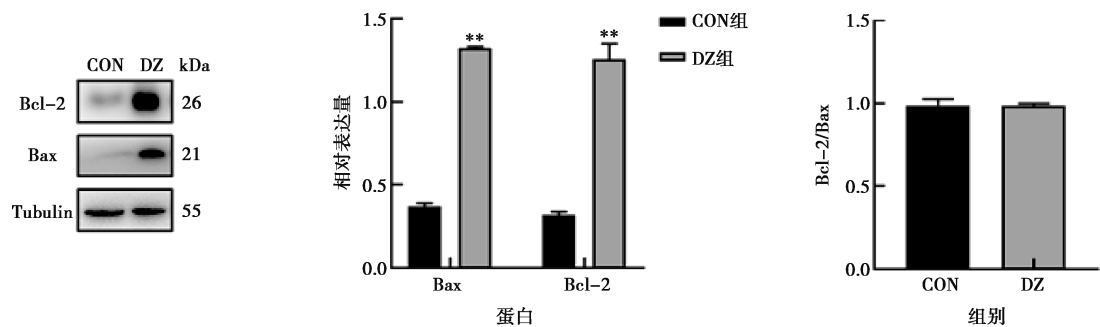


图7 DZ对断奶7 d小鼠乳腺组织Bax、Bcl-2蛋白表达水平的影响

3 讨论

乳腺组织结构大体可分为具有泌乳功能的实质(腺泡和导管系统)和起支持作用的间质(主要是结缔组织和脂肪组织)^[15]。腺泡作为泌乳的基本单位,其数目决定泌乳能力^[16]。幼畜断奶后,乳头失去了吮吸刺激,腺泡腔内乳汁无法正常排出,乳腺分泌活动停止同时其结构发生变化,乳腺组织及导管退化并被增殖的结缔组织和脂肪组织所取代^[17]。Bennetts等于1946年首次发现大豆异黄酮可以引起空怀山羊的乳头增长,甚至出现泌乳现象,提示异黄酮植物雌激素可以影响乳腺的发育和泌乳。刘春龙等^[11]研究发现,一定浓度范围的DZ能促进奶牛乳腺上皮细胞的增殖。本研究结果显示,随断奶时间延长乳腺腺泡面积比不断下降,脂肪细胞占比不断增加,这与李健等^[18]的研究结果一致。与CON组相比,DZ处理后提高了断奶期小鼠乳腺中腺泡的面积比,降低了脂肪组织的面积比;同时乳腺指数结果显示,在断奶1 d时,DZ组的乳腺指数增加,各组乳腺指数随着断奶时间延长乳腺指数不断减小,断奶3 d、7 d时DZ处理降低了母鼠的乳腺指数。提示DZ可能是通过增加腺泡比例,减缓脂肪细胞在乳腺组织中分化增殖的进程,从而影响乳腺的退化过程。

卵巢分泌的雌激素在哺乳动物乳腺生长发育的过程中扮演者重要的角色,它可通过与雌激素ER结合

来影响乳腺发育,同时协同其他激素促进腺泡发育及乳汁生成^[4],但大剂量的E2在体内易残留且有毒害作用,会引起发育、生殖、行为等方面的异常变化。DZ是来自大自然的纯天然药物,与E2相比具有不良反应小且安全的优势。研究发现DZ能与ER结合,表现出雌激素和抗雌激素活性^[19]。同时本研究结果显示,断奶1 d时DZ组的血清E2含量低于CON组,DZ可能是通过与内源性雌激素竞争ER,占据受体结合部位,发挥抗雌激素作用降低E2含量;而随断奶时间的延长,DZ通过发挥其雌激素样作用使得血清中的E2含量提高,发挥雌激素样作用,从而影响着乳腺的发育情况。PRL是一种由垂体泌乳素合成和分泌的肽激素,IGF-I是乳腺生长发育的旁分泌因子之一。乳腺退化过程中受诱导凋亡和抑制增殖双重因素的影响,乳腺上皮细胞数目不断下降^[4]。研究发现,PRL可对退化期的细胞死亡进行调控^[7],维持乳腺细胞的数量^[1]。韩正康^[20]研究发现,异黄酮类植物雌激素可与动物乳腺、垂体、下丘脑的ER竞争性结合,诱发血中PRL水平升高。另有研究证实DZ可通过PRL间接发挥作用^[21]。本研究结果显示,DZ处理后提高了断奶期内母鼠血清中的PRL含量,将血清中PRL含量在断奶7 d内维持在较高水平,当再次恢复泌乳时,高水平的PRL利于泌乳同时保持乳腺细胞数量,从而减少细胞凋亡,影响乳腺的退化。IGF-I在乳腺退化过程中参与乳腺组织的重建,

其作用由胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) 来调节。乳腺细胞的生长与凋亡取决于乳腺中 IGFBP-5 与 IGF-I 之间的相对平衡^[22]。IGFBP-5 可通过高亲和力与 IGF-I 结合, 阻止 IGF-I 与其受体 IGF-IR 的相互作用, 从而抑制 IGF-I 介导的细胞生存, 调控乳腺退化^[23]。研究发现在妊娠母猪日粮中补充 DZ 能提高血清 IGF-I 中含量^[24]。本研究结果也显示, DZ 处理后提高了断奶期内血清 IGF-I 含量。据报道由 E2 激活的核受体刺激 IGF-I 的局部合成^[25], DZ 处理后可能通过提高血清 E2 浓度, 从而上调 IGF-I 的表达, 增加 IGF-I 与其受体的亲和力, 抑制 IGFBP-5 表达, 提高乳腺上皮细胞的存活率, 更好发挥 IGF-I 作为细胞生存因子促进有丝分裂抑制乳腺凋亡的作用, 详细机理有待进一步研究。

乳腺的退化分为 2 个阶段: 第一阶段是由乳停滞引发溶酶体介导的细胞死亡, 发生在断奶 48 h 内, 导致乳腺上皮细胞发生广泛的程序性细胞死亡, 引起上皮细胞数量减少, 此阶段乳腺在哺乳刺激下可重新泌乳^[2]; 第二阶段发生在断奶 2~7 d, 主要是由线粒体介导的细胞凋亡来进行^[3], 引发腺泡塌陷、细胞外基质重塑、脂肪细胞的分化及细胞凋亡^[2]。Bcl-2 相关蛋白是影响乳腺上皮细胞凋亡的细胞内信号引导者, 在调节乳腺退化中发挥关键作用。抗凋亡 Bcl-2 基因缺乏会加速乳腺细胞凋亡, 其过表达可抑制乳腺第二阶段的退化, 促凋亡 Bax 基因缺失会延缓乳腺的退化^[26]。Kuma 等^[13]研究发现, DZ 可通过介导细胞凋亡的内在途径影响 Bax 与 Bcl-2 蛋白的比值。在细胞内 Bcl-2 和 Bax 蛋白之间的相互作用是拮抗性的, 细胞凋亡由 Bcl-2/Bax 比值的变化调节^[27]。因此, Bcl-2/Bax 比值通常用于检测细胞凋亡效应。本研究结果显示, DZ 处理可能通过提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达, 增加 Bcl-2/Bax 的比值, 使乳腺抗凋亡的过程处于优势, 抑制细胞的凋亡。但在断奶 7 d 时, DZ 抑制凋亡的作用不明显, DZ 可能通过抑制细胞的凋亡进程来延缓乳腺的早期退化过程。

综上, 本研究显示植物雌激素 DZ 可通过间接提高断奶母鼠血清中 IGF-I、PRL 含量发挥其促生存作用, 上调 Bcl-2 蛋白的表达, 增加 Bcl-2/Bax 比值, 抑制细胞凋亡进程, 减少乳腺上皮细胞的凋亡, 同时降低脂肪细胞所占面积比, 减缓脂肪细胞在乳腺组织中分化增殖的进程, 延缓乳腺的早期退化过程。

参考文献:

[1] 狄和双, 阎晓东, 王根林. 退化期的乳腺凋亡及其调节机理

[J]. 畜牧与兽医, 2007 (3): 54-57.

- [2] JENA M K, JASWAL S, KUMAR S, et al. Molecular mechanism of mammary gland involution: an update [J]. *Dev Biol*, 2019, 445 (2): 145-155.
- [3] MACIAS H, HINCK L. Mammary gland development [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012, 1 (4): 533-557.
- [4] 李庆章. 乳腺发育与泌乳生物学 [J]. 北京: 科学出版社, 2009: 38-40.
- [5] ITOU J, TAKAHASHI R, SASANUMA H, et al. Estrogen induces mammary ductal dysplasia via the upregulation of Myc expression in a DNA-repair-deficient condition [J]. *iScience*, 2020, 23 (2): 100821.
- [6] BAILEY J P, NIEPORT K M, HERBST M P, et al. Prolactin and transforming growth factor-beta signaling exert opposing effects on mammary gland morphogenesis, involution, and the Akt-forkhead pathway [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18 (5): 1171-1184.
- [7] ACCORSI P A, PACIONI B, PEZZI C, et al. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor I in mammary gland involution in the dairy cow [J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85 (3): 507-513.
- [8] COHICK W S. Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation [J]. *J Dairy Sci*, 1998, 81 (6): 1769-1777.
- [9] 杨彩霞, 杨敏, 王根林, 等. TNF- α 诱导小鼠乳腺上皮细胞凋亡和程序性坏死研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45 (1): 147-155.
- [10] ALSHEHRI M M, SHARIFI-RAD J, HERRERA-BRAVO J, et al. Therapeutic potential of isoflavones with an emphasis on daidzein [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2021, 2021: 6331630.
- [11] 刘春龙, 李忠秋, 张帆, 等. 大豆黄酮和染料木素对体外培养奶牛乳腺上皮细胞增殖及抗氧化水平的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008 (11): 1517-1522.
- [12] TSUGAMI Y, SUZUKI N, SUZUKI T, et al. Regulatory effects of soy isoflavones and their metabolites in milk production via different ways in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68 (21): 5847-5853.
- [13] KUMAR V, CHAUHAN S S. Daidzein induces intrinsic pathway of apoptosis along with ER α/β ratio alteration and ROS production [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2021, 22 (2): 603-610.
- [14] CHAPMAN R S, LOURENCO P C, TONNER E, et al. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3 [J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (19): 2604-2616.
- [15] HANNAN F M, ELAJNAF T, VANDENBERG L N, et al. Hormonal regulation of mammary gland development and lactation [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2023, 19 (1): 46-61.
- [16] NAYLOR M J, OAKES S R, GARDINER-GARDEN M, et al. Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development [J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19 (7): 1868-1883.
- [17] FENDRICK J L, RAAFAT A M, HASLAM S Z. Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998, 3 (1): 7-22.
- [18] 李健, 李庆章. 小鼠乳腺发育、泌乳和退化的组织形态学

- (I): 一般组织形态学变化 [J]. 东北农业大学学报, 2007 (2): 196-201.
- [19] KIM I S. Current perspectives on the beneficial effects of soybean isoflavones and their metabolites for humans [J]. *Antioxidants* (Basel), 2021, 10 (7): 1064.
- [20] 韩正康. 异黄酮植物雌激素调控动物神经内分泌及生产性能的研究 [J]. 中国农业科技导报, 1999 (1): 61-66.
- [21] 杨建英, 王艳玲, 郭永国, 等. 大豆黄酮对奶牛免疫功能和血清及乳中激素水平的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2006 (7): 15-17.
- [22] BARTELL E, FUJIMOTO M, KHOURY J C, et al. Protein QTL analysis of IGF-I and its binding proteins provides insights into growth biology [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29 (15): 2625-2636.
- [23] TONNER E, BARBER M C, ALLAN G J, et al. Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) induces premature cell death in the mammary glands of transgenic mice [J]. *Development*, 2002, 129 (19): 4547-4557.
- [24] LI Y, HE G, CHEN D, et al. Supplementing daidzein in diets improves the reproductive performance, endocrine hormones and antioxidant capacity of multiparous sows [J]. *Anim Nutr*, 2021, 7 (4): 1052-1060.
- [25] KLOTZ D M, HEWITT S C, CIANA P, et al. Requirement of estrogen receptor- α in insulin-like growth factor-1 (IGF-1) -induced uterine responses and *in vivo* evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (10): 8531-8537.
- [26] METCALFE A D, GILMORE A, KLINOWSKA T, et al. Developmental regulation of Bcl-2 family protein expression in the involuting mammary gland [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112 (11): 1771-1783.
- [27] ZHU C, WANG L, ZHU J, et al. OGR1 negatively regulates β -casein and triglyceride synthesis and cell proliferation via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in goat mammary epithelial cells [J]. *Anim Biotechnol*, 2021, 32 (5): 627-636.