

植物甾醇的类雌激素功能及其对动物生殖发育的影响

张永辉, 李春梅*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 植物甾醇是一种新型饲料添加剂, 具有多种生物学功能, 如类雌激素功能、影响胆固醇代谢、抗氧化作用、抗癌作用、免疫调节功能、抗炎作用以及调节生长作用等, 近年来随着植物甾醇在动物生产中的应用, 其类雌激素功能及其对动物生长发育的调节作用引起了人们的广泛关注, 本文简述了植物甾醇的性质和来源, 对植物甾醇的类雌激素功能及其对动物生殖发育影响进行综述。

关键词: 植物甾醇; 类雌激素作用; 生殖发育

中图分类号: S816.79 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-5130(2011)05-0099-05

植物甾醇 (phytosterol) 是一种存在于植物中类似于环状醇结构的天然活性物质, 是植物细胞膜的重要组成部分, 同时也是多种激素、维生素 D 及甾体化合物合成的前体。所有植物性食物中都含有一定量的植物甾醇, 其中植物油、种子、坚果、谷物以及豆类中植物甾醇含量尤为丰富, 它是植物代谢的终产物之一, 并以游离型、脂肪酸酯和糖苷等形式广泛存在于植物的根、茎、叶、果实和种子中。天然植物甾醇种类繁多, 一般有 4 种分子结构: β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和菜籽甾醇。人类及动物日常摄入的植物甾醇主要为 β -谷甾醇 (β -sitosterol)、菜油甾醇 (campesterol) 和豆甾醇 (stigmasterol)。近年来随着科学研究特别是生命科学、油脂科学与工程技术的迅猛发展, 植物甾醇在医药、食品、化工、饲料、植物基因工程等领域被高度重视与关注。著名粮油企业益海嘉里正式对外宣布: 推出国内市场上第一款植物甾醇玉米油——金龙鱼新一代玉米油。植物甾醇玉米油因对心血管健康有着重要膳食调理作用而被业内视为一种新型健康油脂。植物甾醇的研究已有百年历史, 大量流行病学资料和实验室研究显示, 摄入较多植物甾醇与许多慢性病较低的发生率相关。2000 年 9 月, 美国 FDA 通过了对植物甾醇的健康声称, 并批准添加植物甾醇和烷醇酯的食品可以使用“有益健康”的标签, 2007 年植物甾醇获我国农业部颁发的饲料添加剂新产品证书。近年来随着植物甾醇在动物生产中的应用, 其类雌激素功能及对动物生长发育的调节作

用引起了人们的广泛关注, 本文将对植物甾醇的生理作用、类雌激素功能及其对动物生殖发育的影响进行综述。

1 植物甾醇的生理作用

植物甾醇具有降血脂、降低患心脑血管疾病风险、抗炎、抗氧化、提高免疫力、抗癌、调节生长和类雌激素功能等多种作用, 其中植物甾醇抑制胆固醇吸收、降低血浆总胆固醇水平和患心脑血管疾病风险方面的研究比较深入, 但是游离甾醇在水和油中溶解度小的特点而限制了它的应用^[1-3]。植物甾醇的 C-3 位羟基是重要的活性基团, 可与羧酸化合形成植物甾醇酯, 其相对于甾醇有更好的脂溶性和生物活性^[4-5]。有研究表明, 动物对植物甾醇的吸收率极低, 与胆固醇超过 40% 的吸收率相比, 人和其他哺乳动物对植物甾醇的吸收率很低 (0.4% ~ 3.5%), 植物甾醇的吸收更低 (0.02% ~ 0.3%)^[6]。在动物试验中, 一般肝脏、肾上腺、卵巢、睾丸等脏器中植物甾醇含量很高^[7]。这些发现暗示植物甾醇和合成甾类的组织有高度亲和性, 植物甾醇可能被用作甾类激素的前体。

近年来植物甾醇的抗癌作用引起了学术界的广泛关注, 研究表明, 植物甾醇对前列腺癌、乳腺癌和结肠癌细胞的生长都具有明显的抑制作用^[8], Atif B. Awad 等^[9]给大鼠饲喂含植物甾醇 (2% 植物甾醇和 0.2% 胆酸) 的饲料, 研究其对大鼠组织中睾酮新陈代谢的影响; 连续饲喂 22 d, 结果发现, 试验组与对照组 (只含 0.2% 胆酸) 相比, 血清中睾酮下降了 33%, 前列腺中 5 α -还原酶降低了 33% 而芳香化酶的活性降低了 55%, 试验组大鼠睾丸与对照组没有差异, 这些结果说明植物甾醇可能通过降低睾酮新陈代谢酶的活性而降低患前列腺癌的风险。但植物甾醇抗

收稿日期: 2010-07-20

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (KYJ200910)。

作者简介: 张永辉 (1987-), 男, 硕士研究生。

* 通讯作者: 李春梅, 教授, 博士生导师, 主要从事动物环境生理学方面的研究, E-mail: chunmeili@njau.edu.cn。

酶作用的机理仍不明确，或许与其类激素样作用有关。

2 植物甾醇的类雌激素作用

植物甾醇的类激素功能国外已有诸多试验研究，而国内鲜有报道，且一直存在争议。植物甾醇属于甾体化合物，在结构上类似于类固醇（甾体）激素，因而可能具有类激素活性，在机体内表现出一定的激素活性，与靶细胞受体结合，激发 DNA 的转录活动，生成新的 mRNA，诱导蛋白质合成，从而达到调节生长及相应的生物效应。

植物甾醇的类激素功能主要表现为类雌激素样作用。Ling 等^[10]给大鼠皮下注射高剂量（每天 0.5 ~ 5 mg/kg）的 β-谷甾醇，发现其在体内转化为类雌激素物质，可能会对生殖系统产生一定的影响。Malini 等^[11]比较了 β-谷甾醇、17-β-雌二醇和黄体酮对卵巢切除后成年大鼠子宫某些生化指标的影响，发现 β-谷甾醇、雌激素或两者联用可引起子宫细胞内糖原浓度显著增加，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、磷酸己糖异构酶及总乳酸脱氢酶的活性也显著增加，但黄体酮与 β-谷甾醇联用可部分消除 β-谷甾醇诱导的子宫糖原浓度和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性增加的效应，证明了 β-谷甾醇对子宫内物质代谢有类似于雌激素的作用。Christianson-Heiska 等^[12]分别用 10 μg/L 和 100 μg/L 的植物甾醇（80% 的 β-谷甾醇，少量 β-二氢谷甾醇和油菜甾醇）和氧化的植物甾醇连续处理斑马鱼 3 个月，结果表明，植物甾醇可以诱导雄性个体卵黄蛋白原的产生，说明植物甾醇在雄性个体内具有微弱的雌激素样作用；而氧化的植物甾醇可以增加血浆中的性激素水平，加速雄性个体精子发生以及增强雌性个体卵泡闭锁，说明氧化的植物甾醇具有类雄激素的作用。Tremblay 等^[13]利用虹鳟鱼模型研究 β-谷甾醇对生殖和内分泌功能的影响，其中受体结合测定结果显示，β-谷甾醇对肝脏雌激素受体具有亲和力，但较雌二醇低；肝细胞试验测定结果表明，β-谷甾醇可以诱导卵黄蛋白原的产生，而动物试验测定证明了 β-谷甾醇具有雌激素活性，不仅能够诱导雌雄两性未成年虹鳟鱼卵黄蛋白原的产生，还可以降低血浆睾酮、孕烯醇酮和总胆固醇水平，但雌二醇不具有同样功能，说明这些效应并不依赖于 β-谷甾醇的雌激素样活性，这 3 种测定均证明了 β-谷甾醇具有雌激素样作用。而 Rainie L. Sharpe 等^[14]利用金鱼检测 β-谷甾醇对 StAR 蛋白合成的影响，腹膜内埋植 β-谷甾醇（200 μg/g）和雌二醇（10 μg/g）21 d 或 5 个月，发现 β-谷甾醇长期处理的雄性金鱼血浆睾酮水平显著降低，长期 β-谷甾醇处理的雄性以及雌二醇

处理的雌性 StAR 转录水平降低而短期处理对其无影响，并最终认为 β-谷甾醇没有雌激素作用，但证明了 β-谷甾醇可以改变性腺 StAR 转录水平，提供了一种解释其影响生殖内分泌终端的机理。

植物甾醇的类雌激素样作用在动物试验中已得到初步证明，目前，虽然尚无其在人体中类雌激素样作用的试验报道，但是 Gutendorf 等^[15]利用人类转基因 MVLN 细胞（从 MCF-7 细胞中获得）和 HGELN 细胞（从 HeLa 细胞中获得）做荧光素酶报告基因测定、用人类雌激素受体 α 和 β 重组做竞争性结合测定以及用 MCF-7 细胞做增殖测定，测定 β-谷甾醇等 11 种化合物的雌激素样或抗雌激素样作用的潜力，结果表明，β-谷甾醇具有雌激素样作用，并且倾向于与雌激素受体 β 结合。

研究发现，植物甾醇经机体吸收转化，可以影响机体部分生化指标，如激素水平、酶活性、糖原含量和器官重量等。植物甾醇对雌鲮血浆中雌二醇和促黄体素有不同程度的提高作用^[16]，对雌鳊鱼血浆中的雌二醇有提高作用^[17]。Gilman 等^[18]通过硅橡胶在金鱼腹膜内埋植植物甾醇混合物（72% β-谷甾醇）解释植物甾醇对类固醇抑制作用的机理，结果表明，处理组的鱼体内低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯分别降低了 43% 和 50%，但是，从金鱼线粒体中分离到的转化胆固醇到孕烯醇酮的限速酶之一 P450_{scc} 的活性并未受到影响。MacLatchy 等^[19]给金鱼腹膜内注射 β-谷甾醇，发现其可以显著降低雄性血浆中睾酮含量和雌性血浆中睾酮以及雌二醇水平，睾丸组织中睾酮和孕烯醇酮含量也降低，但排卵前卵泡产生的睾酮不变而孕烯醇酮的生成减少，说明注射 β-谷甾醇可以显著降低血浆中生殖类固醇激素的水平，这种影响可以归因于性腺类固醇激素生物合成能力的降低。体外试验还发现，注射过 β-谷甾醇的金鱼睾丸对人绒毛膜促性腺激素的敏感性下降。提示 β-谷甾醇可能通过影响胆甾醇的生物利用率或一些酶来降低性腺组织合成类固醇激素的能力。植物甾醇还可以改善动物繁殖性能，如增加受孕机率等。Nieminen 等^[20]在饲料中长期添加 β-谷甾醇，研究其对美国水貂生殖的影响，以每天 50 mg/kg 的剂量连续饲喂 10 个月，结果发现，与对照组相比，饲喂组不孕雌性水貂减少，而成功再生的雌性显著增加，证明 β-谷甾醇可以用来增强哺乳动物的再生性能。Nieminen 等^[21]利用冻原田鼠模型研究植物甾醇（每天 5 mg/kg）对其生殖和内分泌参数以及酶活性的影响，结果发现，与对照组 60% 的配种率相比，植物甾醇饲喂组的配种率为 85%，并且成年雄性鼠血浆和睾丸中的睾酮浓度降低，但其后代雄性个体睾丸中睾酮浓度却升高，证明

长期饲喂植物甾醇可以提高物种的繁殖力,并且对后代成熟过程中性类固醇激素水平有潜在影响。

研究证明,植物甾醇不同的给予方式会影响其在机体中作用的发挥。Baker等^[22]利用体内和体外两种途径测定植物甾醇的类雌激素活性,用植物甾醇灌喂22~23 d的大鼠,连续3 d,第4天称量实验鼠的绝对子宫重量,发现试验组大鼠子宫重与对照组大鼠子宫重并无明显区别,表明植物甾醇并无直接的类雌激素样作用,可能需代谢成一种具有激素样作用的代谢产物才具有类雌激素样作用。植物甾醇的总摄入量也会影响其在机体中的生理作用,不同剂量的植物甾醇对机体可能会表现出不同的效应。Rosenblum等^[23]研究指出,间歇性低剂量给予植物甾醇对去势大鼠有微弱的雌激素样作用,高剂量时此作用消失。这与王国栋等^[24]报道相一致,植物甾醇使去势大鼠子宫重量有小幅度增加,且每日一次性给予植物甾醇不能升高空腹雌激素水平,提示植物甾醇具有较弱的雌激素作用,对血脂和体重的影响可能更多地与胆固醇的生物利用率有关。研究表明,不同种类的植物甾醇在机体内的作用也不尽相同。Mellanen等^[25]发现,木源性 β -谷甾醇对MCF-7或T-47D乳腺癌细胞均表现出雌激素样作用。对鱼可表现出雌激素样作用,可诱导幼鱼和甲基睾丸素处理的虹鲟鱼的肝脏促卵黄素基因表达,但胆固醇、谷甾醇和其他相似化合物无此作用。在动物生长发育的不同时期给予植物甾醇处理,所表现出的效应也有差异。Mattsson等^[26]利用鲑鱼模型,用10~30 $\mu\text{g/L}$ 的植物甾醇处理雌性鲑鱼从卵子发生一直到分娩的整个过程,结果表明,植物甾醇影响幼虫的胚胎发育,并影响亲本体内循环的性激素水平。

对植物甾醇类激素功能的报道不完全一致并且几乎都集中在啮齿类动物和鱼虾上,在家禽上报道较少,王龙昌等^[27]用添加植物甾醇的饲料饲喂后期蛋鸡,根据激素含量测定未表现出显著的类激素功能,这说明植物甾醇的类激素功能可能存在种间差异性。Ayehs等^[28]的研究也证明了这一点,成年男性和女性摄食8.6 g/d植物甾醇对机体雌激素水平亦没有影响。

综上所述,植物甾醇在机体内表现出一定的激素活性,其类雌激素活性功能可能会对人和动物的激素代谢和生殖生长功能存在一定影响,并且这种影响呈现植物甾醇种类、剂量、给予方式以及动物发育时期和物种相关性。

3 植物甾醇对动物生殖发育安全性的影响

人们对植物甾醇各种生物学功能研究的同时对植

物甾醇的安全性也进行了大量研究,虽然尚未有植物甾醇对人体或其他动物有毒副作用的报道,但是一些研究表明植物甾醇对动物生殖器官的发育及新生代性别比例有一定的影响,甚至产生致命危害。Nakari等^[29]使雌雄混合的斑马鱼连续三代分别暴露于木材和大豆中分离的均含有 β -谷甾醇的植物甾醇,以卵黄蛋白原水平和性别比例的改变作为生殖障碍的指标,结果显示,两种植物甾醇都诱导卵黄蛋白原的产生,木材中的植物甾醇可以改变后代的性别比例,F1代雄性占主要优势而F2代以雌性为主;10 $\mu\text{g/L}$ 的大豆植物甾醇对斑马鱼的F1代是致命的,这表明,含有 β -谷甾醇的植物甾醇通过改变性别比例和诱导卵黄蛋白原的生成来扰乱斑马鱼的生殖系统。Lehtinen等^[30]用10 $\mu\text{g/L}$ 和20 $\mu\text{g/L}$ 的植物甾醇(主要是 β -谷甾醇)处理产卵前雌性和雄性北美灰鲟鱼四个半月,并对其卵的孵化过程和后代的生长情况进行观察记录,结果表明,随着剂量增高,鱼卵的死亡率、小卵的数量以及卵黄囊阶段幼虫的低平均体重显著增加;畸形以及患病幼虫的几率增加,尤其是高剂量处理后,这些影响的关键时期一般是在亲代成熟过程的最后阶段,并且呈现性别相关性,植物甾醇进一步处理幼虫不会增加其死亡率;亲代部分生理参数的变化,如较高的血浆雌二醇,表明雌性个体成熟过程变慢而雄性个体成熟过程却加速。

Czech等^[31]用雌雄同体的椎实螺属腹足类动物检测内分泌调节物质对生殖参数的影响,分别以1, 10和100 ng/L的 β -谷甾醇处理刚成年的椎实螺属,发现壳高、壳重、成年小螺的死亡率和卵的产量以及卵的孵化率都没有受到影响,但胚乳腺出现明显的萎缩;而由 β -谷甾醇引起的胚乳腺退化并未对成年螺以及F1代的生殖力和生育力产生不利影响,但这并不能预测长期高剂量处理是否会对其产生影响。

关于植物甾醇的生殖毒性报道大多集中在鱼类和低等动物,在哺乳动物中除了一定程度地影响激素水平及部分器官发育和体重,尚未证实也有类似危害。Nieminen等^[32]利用美国水貂模型研究植物甾醇对生殖安全性的影响,分别以每天5 mg/kg、10 mg/kg和50 mg/kg植物甾醇量经口服连续饲喂雌性和雄性美国水貂10个月,无论雄性还是雌性生殖性能与对照组相比均无差异,表明植物甾醇对哺乳动物的生育力没有显著危害。

Ryokkynen等^[33]连续5代(F0-F4)给小鼠饲喂植物甾醇(每天5 mg/kg,其中主要是 β -谷甾醇),研究其对小鼠生殖的慢性作用,结果发现,植物甾醇可以增加F2和F4代幼仔血浆中睾酮浓度,而降低相对子宫重量;F3代雌性幼仔的血浆雌二醇水平增加,

而 F2 代雄性幼仔睾丸中睾酮的水平升高；除了这些暂时的改变，并没有发现植物甾醇对小鼠的生殖产生持久性有害作用。Ryokkynen 等^[34]利用水貂模型研究 β -谷甾醇（每天 50 mg/kg）对生殖的影响，亲代连续饲喂 9 个月，后代通过妊娠期和哺乳期接受 β -谷甾醇的处理，在后代出生后 21 d 采集亲代及后代样本，通过测定性激素水平、精子质量、器官重量和后代的发育情况发现，在幼仔出生后 1 d，试验组雌性体重大于对照组，相反从出生后 1~21 d，对照组幼仔体重大于试验组；虽然 β -谷甾醇没有影响成年水貂器官重量，但是试验组幼仔的睾丸相对重量比对照组高；与此同时，试验组幼仔的前列腺相对重量升高而子宫相对重量却降低；试验说明，围产期 β -谷甾醇处理水貂可以改变幼仔生殖器官的重量。Malini 等^[35]利用雄性大鼠模型研究 β -谷甾醇的抗生育效应，大鼠皮下注射 β -谷甾醇（每天 0.5 mg/kg 和 5 mg/kg，分别连续注射 16、32 和 48 d），结果发现，只有在高剂量时 β -谷甾醇的抗生育效应才明显，并且高剂量处理组大鼠的精子浓度以及睾丸和附属性组织的重量呈现一种时间相关性降低，但长期低剂量注射的实验大鼠的睾丸重量以及精子密度显著降低，并且除了附睾头，低剂量 β -谷甾醇处理大鼠的所有附属性组织的重量都增加，所有这些影响只有附属性组织在 30 d 后恢复到接近正常水平。

4 展望

大量科学研究已经证实，骨质疏松症的发生与雌激素水平不足有关^[36-38]，雌性动物随年龄增长，卵巢功能出现下降，卵巢滤泡大量减少，雌激素分泌降低，老年妇女的雌激素水平尚不及男性，血液中的雌二醇平均水平只有青年期的 1%。绝经后血中雌激素水平显著下降，不但加速衰老，还引起不同程度的骨质疏松症^[39]。另外，我国目前至少有 1 亿只宠物，有些宠物主人只是将其纯粹作为宠物饲养，他们会考虑将宠物透过阉割手术而变为中性，从而避免宠物因生理表现所带来的麻烦，调查显示，雌性宠物绝育手术日趋增加。卵巢切除使机体雌激素分泌不足，从而增加动物骨质疏松症的发病几率。研究表明，激素替代疗法可以降低骨质疏松症的发生^[40-42]，植物雌激素用来治疗及预防绝经期后和卵巢切除女性及雌性动物骨质疏松症已有相关报道，并取得一定效果^[43-44]。植物甾醇具有类雌激素功能，但目前还没有它对骨质疏松症的预防及治疗的相关研究报道。植物甾醇以其较低的毒副作用，作为一种新型功能性饲料添加剂，在预防和改善动物骨质疏松症方面具有广阔的发展前景。

万方数据

参考文献：

- [1] 韩军花, 冯妹元, 王国栋, 等. 常见谷豆类食物中植物甾醇含量分析 [J]. 营养学报, 2006, 28(5): 375-378.
- [2] 万建春, 张维农. 天然植物甾醇的分离纯化 [J]. 武汉工业学院学报, 2006, 25(4): 12-16.
- [3] Villeneuve P, Turon F, Caro Y, et al. Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37: 150-155.
- [4] 刘军海, 裘爱冰, 张海晖. 植物甾醇酯和植物甾醇醇酯的制取和应用研究进展 [J]. 中国油脂, 2004, 29(2): 43-46.
- [5] 王明霞, 黄沁洁, 李江涛, 等. 植物甾醇脂肪酸酯酶法合成及热力学特性研究进展 [J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(2): 22-226.
- [6] Ostlund R E, McGill J B, Zeng C, et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy-5-phytosterols and phytostanols in humans [J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2002, 282: 911-916.
- [7] Ikeda I, Nakagiri H, Sugano M, et al. Mechanisms of phytosterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive and WKY rats [J]. Metabolism, 2001, 50: 1361-1368.
- [8] Peter G Bradford, Atif B Awad. Phytosterols as anticancer compounds [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2007, 51: 161-170.
- [9] Atif B Awad, Maria Sri Hartati, Carol S Fink. Phytosterol feeding induces alteration in testosterone metabolism in rat tissues [J]. Nutrition Biochemistry, 1998, 9: 712-717.
- [10] Ling W H, Jones P J H. Minireview dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects [J]. Life Science, 1995, 57(3): 195-206.
- [11] Malini T, Vanithakumari G. Comparative Study of the Effects of β -Sitosterol, Estradiol and Progesterone on Selected Biochemical Parameters of the Uterus of Ovariectomised Rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1992, 36(1): 51-55.
- [12] Inga Christianson-Heiska, Pia Smeds, Nina Granholm, et al. Endocrine modulating actions of a phytosterol mixture and its oxidation products in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2007, Part C 145: 518-527.
- [13] Louis Tremblay, Glen Van Der Kraak. Use of a series of homologous in vitro and in vivo assays to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout [J]. Aquatic Toxicology, 1998, 43: 149-162.
- [14] Rainie L Sharpe, Amanda Woodhouse, Thomas W Moon, et al. β -Sitosterol and 17 β -estradiol alter gonadal steroidogenic acute regulatory protein (STAR) expression in goldfish, *Carassius auratus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 151: 34-41.
- [15] Brigitte Gutendorf, Johannes Westendorf. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens [J]. Toxicology, 2001, 166: 79-89.
- [16] Ciccone N A, Sharp P J, Wilson P W, et al. Changes in reproductive neuroendocrine mRNAs with decreasing ovarian function in ageing hens [J]. General and Comparative Endocrinology, 2005,

- 144: 20-27.
- [17] Lehtinen K J, Mattsson K, Tana J, et al. Effects of Wood-Related Sterols on the Reproduction, Egg Survival and Offspring of Brown Trout [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999, 42: 40-49.
- [18] Christine I Gilman, Frederic D L Leusch, W Carl Breckenridge, Deborah L MacLatchya. Effects of a phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450_{sc} activity [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 130: 172-184.
- [19] Deborah L Maclatchy, Glen J Van Der Kraak. The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995, 134: 305-312.
- [20] Petteri Nieminena, Ilpo Pölnönen, Anne-Mari Mustonen. Increased reproductive success in the white American mink (*Neovison vison*) with chronic dietary β -sitosterol supplement [J]. *Animal Reproduction Science*, 2010, 119: 287-292.
- [21] Nieminen P, Mustonen A-M, Paivalainen P, et al. Reproduction of the tundra vole (*Microtus oeconomus*) with dietary phytosterol supplement [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42: 945-950.
- [22] Baker V A, Hepburn P A, Kennedy S J, et al. Safety evaluation of phytosterol esters. Part1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1999, 37: 13-22.
- [23] Rosenblum E R, Stauber R E, van Thiel D H, et al. Assessment of the estrogenic activity of phytoestrogens isolated from bourbon and beer [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1993, 17(6): 1207-1209.
- [24] 王国栋, 王竹, 韩军花, 等. 植物甾醇酯对实验大鼠血脂水平的影响 [J]. *卫生研究*, 2006, 35(5): 581-583.
- [25] Mellanen P, Petanen T, Lehtimäki J, et al. Wood-derived estrogens; studies in vitro with breast cancer cell and in vivo in trout [J]. *Toxicology applied pharmacology*, 1996, 136: 381-388.
- [26] Kaj Mattsson, Jukka Tana, Christina Engstrom, et al. Effects of wood-related sterols on the offspring of the viviparous blenny, *zoarces viviparus* L [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 49, 122-130.
- [27] 王龙昌, 顾尧婷, 王恬, 等. 植物甾醇对蛋鸡产蛋后期生产性能、鸡蛋胆固醇含量及血清生殖激素水平的影响 [J]. *中国粮油学报*, 2008, 23(6): 166-171.
- [28] Ayesh R, Weststarte J A, Drewitt N P, et al. Saefyevaluation of Phytosteorl esters. Part5. Faecal Short - chain fatty acid and microflora content, faecal bacterial enzyme activity and serum female sex Hormones in healthy normoli Pidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without A Phytosterol ester-enriched margarine [J]. *Food Chem. Tox*, 1999, 37: 1127-1138.
- [29] Tarja Nakari, Kirsti Erkkoma. Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in multigeneration test [J]. *Environmental Pollution*, 2003, 123: 267-273.
- [30] Karl-Johan Lehtinen, Kaj Mattsson, Jukka Tana, et al. Effects of wood-related sterols on the reproduction, egg survival and offspring of brown trout (*salmo trutta lacustris* L.) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999, 42: 40-49.
- [31] Czech P, Weber K, Dietrich D R. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 53: 103-114.
- [32] Petteri Nieminen, Ilpo Polonen, Katja Ikonen, et al. Evaluation of reproductive safety of β -sitosterol on the American mink (*Neovison vison*) [J]. *Chemosphere*, 2008, 71: 493-499.
- [33] Ari Ryokkynen, Ulla-Riitta Kayhko, Anne-Mari Mustonen, et al. Multigenerational exposure to phytosterols in the mouse [J]. *Reproductive Toxicology*, 2005, 19: 535-540.
- [34] Ari Ryokkynena, Petteri Nieminena, Anne-Mari Mustonena, et al. Phytoestrogens alter the reproductive organ development in the mink (*Mustela vison*) [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 202: 132-139.
- [35] Malini T, Vanithakumari G. Antifertility effects of β -sitosterol in male albino rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1991, 3(2): 149-153.
- [36] Nguyen T V, Jones G, Sambrook P N, et al. Effects of estrogen exposure and reproductive factors on bone mineral density and osteoporotic fractures [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(9): 2709-2714.
- [37] Manolagas S C, Jilka R L. Bone marrow, cytokines, and bone remodelling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(5): 305-311.
- [38] Riggs B L, Khosla S, Melton L J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(3): 279-302.
- [39] 赵永强, 陈凤苞, 李甲振. 雌激素对实验性骨质疏松症骨折愈合的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(1): 56-60.
- [40] Michaelsson K, Baron J A, Johnell O, et al. Variation in the efficacy of hormone replacement therapy in the prevention of hip fracture [J]. *Osteoporos Int*, 1998, 8(6): 540-546.
- [41] Beral V, MillionWomen Study Collaborators. Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study [J]. *Lancet*, 2003, 362(9382): 419-427.
- [42] Jolly E E, Bjarnason N H, Neven P, et al. Prevention of osteoporosis and uterine effects in postmenopausal women taking raloxifene for 5 years [J]. *Menopause*, 2003, 10(4): 337-344.
- [43] Zhang G, Qin L, Shi Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22: 1072-1079.
- [44] Zhang G, Qin L, Hung W Y, et al. Flavonoids derived from herbal *Epimedium brevicornum Maxim* prevent OVX-induced osteoporosis in rats independent of its enhancement in intestinal calcium absorption [J]. *Bone*, 2006, 38: 818-825.