

海参精囊两种提取物对环磷酰胺诱导的小鼠睾丸氧化损伤的保护作用

郭锡春^{1*}, 高华^{2#}, 刘坤², 刘占涛², 张婕², 高文³, 刘春宝⁴, 吴岩强⁴(1.潍坊医学院附属医院药剂科, 山东潍坊 261031; 2.青岛大学药学院, 山东青岛 266021; 3.青岛大学临床医学院, 山东青岛 266021; 4.大连棒槌岛海产股份有限公司, 辽宁大连 116100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0497-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.21

摘要 目的:研究海参精囊两种提取物对环磷酰胺(CP)所致小鼠睾丸组织氧化损伤的保护作用。方法:将108只雄性昆明种小鼠,随机分为9组,即空白组,模型组,海参精囊水提取物低、中、高剂量[150、300、600 mg(生药)/kg]组,海参精囊醇提取物低、中、高剂量[150、300、600 mg(生药)/kg]组和甲睾酮溶液(1.5 mg/kg)药物组,除空白组用0.9%氯化钠溶液外其他各组均腹腔注射CP(28 mg/kg),连续5 d,复制生殖系统受损、雄激素部分缺乏模型;同时海参精囊水提取物组、海参精囊醇提取物组每天灌胃给药1次,连续4周。末次给药24 h后,观察睾丸、附睾脏器指数变化,测定睾丸组织总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性和丙二醛(MDA)水平。结果:与模型组相比,给药各组小鼠的睾丸、附睾脏器指数均有显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);睾丸组织T-SOD活性及GSH-PX活性明显升高,MDA水平明显下降,差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:海参精囊两种提取物对CP诱导的小鼠睾丸氧化损伤有保护作用。

关键词 海参精囊;环磷酰胺;生殖功能;抗氧化

Protection of Two Kinds of Holothurian Spermatophore Extracts on Cyclophosphamide-induced Oxidative Damage in Testis of Mice

GUO Xi-chun¹, GAO Hua², LIU Kun², LIU Zhan-tao², ZHANG Jie², GAO Wen³, LIU Chun-bao⁴, WU Yan-qiang⁴
(1.Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Shandong Weifang 261031, China; 2.School of Pharmaceutical Science, Qingdao University, Shandong Qingdao 266021, China; 3.School of Clinical Medicine, Qingdao University, Shandong Qingdao 266021, China; 4.Dalian Bangchui Island Seafood Co., Ltd, Liaoning Dalian 116100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the protective effects of holothurian spermatophore extracts on the damage in testis of mice injured by cyclophosphamide (CP). METHODS: 108 male Kunming mice were equally allotted to 9 groups, i.e. blank group, model group, holothurian spermatophore water extract low-dose, medium-dose and high-dose groups [150, 300, 600 mg(medicinal material)/kg], holothurian spermatophore ethanol extract low-dose, medium-dose and high-dose groups [150, 300, 600 mg(medicinal material)/kg] and methyltestosterone solution group (1.5 mg/kg). They were intraperitoneally injected with CP [28 mg/(kg·d)] for 5 d to construct injured genital system and partial androgen deficiency model except for blank group with 0.9% sodium chloride solution. Holothurian spermatophore water extract and ethanol extract groups were given relevant medicine intragastrically once a day for 4 weeks. The testis and epididymis organ coefficient was observed; the total superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) and malondialdehyde (MDA) of testicle were detected 24 h after last administration. RESULTS: Compared with model group, significant difference of the testis and epididymis organ coefficient among the treatment group was found ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); the T-SOD and GSH-PX activity was significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the MDA level was significantly decreased ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Two kinds of holothurian spermatophore extracts have a protective effect on CP-induced oxidative damage in testis of mice.

KEYWORDS Holothurian spermatophore; Cyclophosphamide; Reproductive function; Anti-oxidation

近年来,有关自由基在各种疾病发病机制中的作用日益受到重视。研究表明,自由基损伤机制与环磷酰胺(Cyclo-

* 硕士研究生。研究方向:天然活性物提取及功能评价。电话:0536-3081557。E-mail:gxch3803@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然活性物提取及功能评价。电话:0532-82991203。E-mail:gaohuaqy@126.com

phosphamide, CP)引起的生精功能障碍有密切关系^[1]。含氧自由基及其产物会利用机体的脂质过氧化作用影响细胞的正常生理功能,甚至引起细胞死亡^[2]。

海参作为人们熟知的海中珍品,具有较高的营养价值,其含有的多种活性成分已被证实具有抗肿瘤、抗凝血、抗氧化、提高免疫力及延缓衰老的药理作用^[3-4]。海参精囊为海参的生

殖器官,也具有较高的营养价值。因此本实验通过建立衰老的动物模型,利用不同剂量的海参精囊提取物饲养小鼠,检测提取物对小鼠睾丸的总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性和丙二醛(MDA)水平的影响,同时观察睾丸和附睾的脏器指数变化,以探讨海参精囊提取物对CP诱导的小鼠睾丸氧化损伤的保护作用。

1 材料

1.1 仪器

AR5120型电子天平(奥豪斯国际贸易上海有限公司);DK-98-1型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);SK3200H型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);LD4-2A型低速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司,离心半径:5 cm);723N型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药材

海参精囊由大连棒槌岛海产股份有限公司提供,所用海参为刺参(*Stichopus japonicus*),由中国科学院海洋研究所段德麟研究员鉴定。

1.3 药品与试剂

0.9%氯化钠(NaCl)溶液(辰欣药业股份有限公司,批号:1207215121);甲睾酮片(上海信谊康捷药业有限公司,批号:110802,规格:5 mg/片);注射用CP(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:12031425,规格:0.2 g/瓶);总蛋白定量试剂盒、T-SOD试剂盒、GSH-PX试剂盒、MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20130604、20130603、20130525、20130605)。

1.4 动物

SPF级健康昆明种小鼠,♂,体质量(30±5)g,购于青岛派特福德白鼠养殖专业合作社,实验动物使用许可证号:SCXK(鲁)20080002。

2 方法

2.1 提取物的制备

2.1.1 海参精囊水提物 称取一定量海参精囊,用组织匀浆器打碎,按质量比1:3加入蒸馏水,采用超声波辅助提取,超声温度30℃,超声时间25 min,然后水浴30℃条件下搅拌提取2 h,并以4 000 r/min离心5 min,取上清液;沉淀物按质量比1:2加入蒸馏水,重复上述操作,合并上清液,通过快速定性滤纸滤过,滤液旋蒸浓缩至1/3时,进行冷冻干燥得到粗提物。

2.1.2 海参精囊醇提物 将预冻好的海参精囊进行冷冻干燥,然后称取一定量,粉碎,按质量比1:10加入无水乙醇,30℃条件下搅拌提取3 h,滤过后取滤液;残渣按质量比1:5加入无水乙醇,重复上述操作,合并滤液,采用旋转蒸发仪进行浓缩并回收乙醇,浓缩液进行真空干燥得到浸膏。

2.2 动物模型制备及分组、给药

108只小鼠随机分成9组,每组12只,空白组腹腔注射0.9%氯化钠溶液,其他各组均腹腔注射CP(28 mg/kg),连续5 d以复制动物雄激素部分缺乏、生殖系统受损模型;同时灌胃给予相应的药物:海参精囊水提物和醇提物各组分别给予海参精囊水提物[150、300、600 mg(生药)/kg]、海参精囊醇提物

[150、300、600 mg(生药)/kg],阳性对照组灌胃甲睾酮溶液(1.5 mg/kg),空白组和模型组灌胃同体积的蒸馏水,连续4周。

2.3 指标的测定

在小鼠饲养过程中,每组会有1~2只死亡。为方便进行统计学描述,故统一测定10只小鼠的指标。末次给药24 h后,颈椎脱臼处死小鼠,立即去双侧睾丸和附睾称质量,观察睾丸、附睾脏器指数的变化(睾丸、附睾与体质量的比值)。另取右侧睾丸组织,按质量(g):体积(ml)=1:9的比例加入9倍体积的0.9%氯化钠溶液,冰水浴条件下匀浆,制备成10%的匀浆液,2 500~3 000 r/min离心10 min,取上清液严格按照试剂盒说明书方法检测。睾丸组织总蛋白含量用考马斯亮蓝法测定,T-SOD活性采用羟胺法测定,GSH-PX活性采用比色法测定,MDA含量采用硫代巴比妥酸法测定。

2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理试验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单组间比较先用单因素分析其正态分布,后行One-way ANOVA检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 海参精囊提取物对小鼠脏器指数的影响

与空白组比较,模型组小鼠的睾丸及附睾的脏器指数明显减小,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,给药各组小鼠的脏器指数均明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);其中,附睾质量和附睾指数呈现出量效关系,结果见表1。

表1 海参精囊提取物对小鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 1 Effects of holothurian spermatophore extracts on viscera indexes of mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	睾丸质量,mg	睾丸指数,mg/g	附睾质量,mg	附睾指数,mg/g
空白组	312.25±15.09	8.096 7±0.460 7	46.60±3.05	0.925 6±0.065 6
模型组	273.78±10.50**	5.868 3±0.733 4**	33.50±1.94**	0.761 2±0.069 5*
水提物低剂量组	292.56±11.36***	7.561 0±0.721 2**	37.58±2.46***	0.901 5±0.124 2*
水提物中剂量组	294.42±10.62***	7.695 0±0.613 6**	39.98±4.46***	0.937 1±0.191 9*
水提物高剂量组	293.72±13.67***	7.275 0±0.853 4***	44.82±2.92**	1.172 5±0.153 3***
醇提物低剂量组	292.38±12.16***	7.261 8±0.810 9***	43.25±2.85**	1.163 5±0.142 8***
醇提物中剂量组	290.27±13.15***	7.150 0±0.419 5***	46.77±4.36**	1.213 9±0.079 5***
醇提物高剂量组	297.87±11.39***	7.338 3±0.508 7***	50.88±2.01**	1.287 7±0.140 4***
阳性药物组	304.23±12.18**	7.450 0±0.551 2***	53.30±7.28***	1.460 4±0.175 6***

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 相关氧化指标的检测

3.2.1 睾丸组织蛋白浓度的检测结果 模型组小鼠经CP处理后,睾丸组织中蛋白浓度明显降低,与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,给药各组小鼠的睾丸组织蛋白浓度均升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果见表2。

3.2.2 T-SOD的检测结果 连续应用5 d CP,导致小鼠睾丸组织中T-SOD含量显著降低;而海参精囊两种提取物均逆转了T-SOD的下降,使组织内T-SOD含量显著回升,均接近或超过空白组水平,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P <$

0.05),结果见表2。

表2 海参精囊提取物对小鼠睾丸组织抗氧化能力的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Effects of holothurian spermatophore extracts on anti-oxidative capacity of testis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	10%蛋白浓度, g/L	T-SOD, U/mg prot	GSH-PX, nmol/mg prot	MDA, nmol/mg prot
空白组	6.55±0.91	46.38±6.30	23.10±4.12	1.18±0.10
模型组	5.30±0.23**	38.59±4.73**	17.29±3.02*	2.39±0.25**
水提物低剂量组	6.08±0.65**	44.12±2.78*	20.06±2.35*	1.45±0.20**
水提物中剂量组	6.20±0.67**	45.12±2.67**	23.68±4.26**	1.23±0.13**
水提物高剂量组	6.49±0.73**	60.03±6.00***	22.88±1.81*	0.77±0.11***
醇提物低剂量组	6.35±0.36*	48.35±4.08**	24.16±2.01**	1.05±0.19**
醇提物中剂量组	6.41±0.28**	51.66±3.84***	26.72±3.27**	0.84±0.14***
醇提物高剂量组	6.54±0.54**	53.99±4.55***	25.87±3.86**	1.08±0.23**
阳性药物组	7.12±0.61**	46.53±2.07**	28.47±1.84*	1.17±0.13**

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.2.3 GSH-PX的检测结果 经检测,连续5 d注射CP,使睾丸组织中GSH-PX显著下降,模型组与空白组比较差异有统计学意义($P<0.05$);海参精囊两种提取物的使用显著提高了组织中GSH-PX的水平,与模型组相比差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),结果见表2。

3.2.4 MDA的检测结果 CP处理后,模型组小鼠睾丸组织中MDA含量显著上升,其变化趋势与T-SOD和GSH-PX相反,与空白组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。海参精囊两种提取物均显著降低睾丸组织中MDA含量,与模型组相比差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),结果见表2。

4 讨论

“自由基”学说是国内外研究的衰老理论的一种,最早是由Denham Harman于1955年提出的:氧自由基在机体的氧化代谢过程中不断产生,然后与核酸蛋白质和脂肪等物质反应,生成相应的氧化物和过氧化物^[6-9]。在正常生理条件下,机体的氧化和抗氧化系统维持在动态平衡条件下,生物体内的自由基不断产生,也不断被抗氧化系统清除^[7]。机体的抗氧化系统主要包括酶促和非酶促两个体系,其中酶促防御系统是通过体内的各种抗氧化酶来抑制不同自由基和活性氧的产生,包括SOD、GSH-PX和过氧化氢酶(CAT)。SOD是歧化超氧阴离子(O_2^-)的专一性酶,由于 O_2^- 是活性氧生成过程中的初始产物,并对GSH-PX、CAT将 H_2O_2 转化为 H_2O 的反应具有催化作用,因此,SOD被称作活性氧防御的第一线。GSH-PX和CAT主要起到后背支持的作用,其活性高低均反映出机体内抗氧化水平。另外,MDA是氧自由基引起的脂质过氧化反应产生的主要最终代谢产物,可以用来作为衡量氧化应激程度的指标^[8-9]。

随着年龄增加,机体清除自由基的能力降低,打破了氧化抗氧化系统的平衡,主要表现为氧化作用增强、抗氧化能力减弱、自由基过量而产生过氧化脂肪,从而引起机体的损伤^[10]。

本实验发现,模型组小鼠睾丸组织T-SOD、GSH-PX活性和睾丸、附睾指数显著降低,MDA水平显著升高,提示CP可以导致睾丸组织细胞中氧自由基生成增多。T-SOD和GSH-PX被大量消耗,不能使过量生成的自由基得以清除,从而加重了脂质过氧化程度,使氧化和抗氧化系统失衡、生殖细胞损伤及代谢障碍,进而损伤生殖系统,使小鼠的睾丸和附睾萎缩。与模型组比较,给药各组小鼠睾丸组织T-SOD、GSH-PX活性和睾丸、附睾指数显著增高,MDA水平明显降低,说明海参精囊提取物能很好地降低睾丸组织MDA水平,防止氧自由基损伤,提高睾丸组织T-SOD活性和GSH-PX活性,提高组织细胞抗氧化和清除自由基的能力,从而维持细胞内氧化抗氧化系统的平衡,减轻机体受自由基损伤的程度,对抗衰老小鼠睾丸和附睾的萎缩。

本研究发现,CP可以使睾丸组织脂质过氧化水平上升、超氧化反应加强,这可能是造成睾丸损害的途径之一,但也无法排除与非酶促防御系统存在失衡有关。海参精囊两种提取物对CP诱导的小鼠睾丸氧化损伤有保护作用。

参考文献

- [1] 靳镛,陈守真.冬虫夏草对抗环磷酸胺致小鼠睾丸氧化损伤的作用[J].中国妇幼保健,2008,23(13):1 858.
- [2] 寇素茹,谢雪兰,段斐,等.锌对小鼠睾丸组织NO的含量及抗氧化作用的影响[J].现代预防医学,2008,35(19):3 855.
- [3] 黄日明,王宾,刘永宏,等.海参的化学成分及其生物活性的研究概况[J].中成药,2009,31(8):1 263.
- [4] 周靖宇.海参用于保健食品功能原料的药理研究进展[J].齐鲁药事,2011,30(6):346.
- [5] 陈霞.衰老机制的中西医研究进展及延缓衰老的途径[D].南京:南京中医药大学,2011.
- [6] 张娜,张耀恒,张轶,等.精液处理前后精子的DNA损伤与活性氧之间的关系研究[J].中国男科学杂志,2012,26(6):7.
- [7] 江少波,孙洁,蒋远春,等.补肾填精方对电磁辐射所致小鼠睾丸组织SOD活性和MDA含量的研究[J].中国中西医结合外科杂志,2010,16(5):554.
- [8] Serra JA, Marschoff ER, Dominguez RO, et al. Comparison of the determination of superoxide dismutase and antioxidant capacity in neurological patients using two different procedures[J]. Clin Chim Acta, 2000, 301(1/2):87.
- [9] 蔡威黔,缪建春,骆佑娣,等.丹参、川芎嗪复方制剂对老年性痴呆模型大鼠红细胞及脑组织SOD、MDA的影响研究[J].中国药房,2008,19(21):1 608.
- [10] 朱玉昌.橙汁抗氧化活性成分及总抗氧化能力的研究[D].重庆:西南大学,2006.

(收稿日期:2014-02-05 修回日期:2014-04-13)

(编辑:张 静)