

莲房原花青素对极低频电磁场致雄性小鼠生殖损伤的影响

张海晖, 樊蓉, 程燕翔, 何远清, 段玉清

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 本文研究了莲房原花青素(LSPCs)对极低频电磁场(ELF-EMF)致雄性小鼠生殖系统损伤的预防作用。选用50只雄性ICR小鼠,随机分为对照组,ELF-EMF组和ELF-EMF+30、60、90 mg/kg LSPCs预处理组。LSPCs连续灌胃75 d,灌胃15 d后开始连续辐射60 d。ELF-EMF辐射处理后将小鼠处死,取出附睾、睾丸并称重,求睾体比,检测附睾中精子活率和精子畸形率,测定睾丸组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,观察睾丸组织形态学变化。结果表明ELF-EMF辐射处理后小鼠睾丸组织形态发生严重改变,睾体比、精子活率及睾丸组织SOD活性显著降低,精子畸形率和睾丸组织MDA水平显著增高。经LSPCs预处理后辐射损伤得到改善,其中60、90 mg/kg LSPCs预处理组各项指标与ELF-EMF组相比均达到极显著差异($P < 0.01$)。由此提示LSPCs对ELF-EMF导致的雄性小鼠生殖损伤有明显的预防作用。

关键词: 极低频电磁场; 生殖损伤; 莲房原花青素; 预防作用

文章编号: 1673-9078(2015)6-13-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.003

Effects of Lotus Seedpod Procyanidins on Extremely Low-frequency Electromagnetic Field-induced Reproductive Injury in Male Mice

ZHANG Hai-hui, FAN Rong, CHENG Yan-xiang, HE Yuan-qing, DUAN Yu-qing

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The protective effects of lotus seedpod procyanidins (LSPCs) on injury to the reproductive system in male mice, induced by extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF). A total of 50 male, ICR mice were randomly divided into five groups: control group, ELF-EMF group, and ELF-EMF+30, 60, and 90 mg/kg LSPC groups. LSPC was administered intragastrically to the mice daily for 75 consecutive days. ELF-EMF exposure was initiated 15 days after LSPC administration began and continued for 60 days. After ELF-EMF exposure, the mice were sacrificed, and their epididymis and testes were obtained to determine the weight. Parameters such as testicle to body weight ratio, sperm motility, and malformation rates, superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) content were measured as well as testicular pathological changes were noted. Administration of LSPCs (especially 60 and 90 mg/kg) for 75 days effectively alleviated testicular morphological damage, significantly improved testicle to body weight ratio, sperm motility, SOD activity in the testes, reduced sperm malformation rate, and testicle MDA content. The results suggest that treatment with LSPCs could significantly alleviate reproductive injury induced by ELF-EMF in male mice.

Key words: extremely low-frequency electromagnetic field; reproductive injury; lotus seedpod procyanidins; preventive effect

极低频电磁场(extremely low frequency electromagnetic fields, ELF-EMF)是频谱在0~300 Hz

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(31201456, 31371734); 江苏省“六大人才高峰”项目(SWYY-022); 江苏省“青蓝工程”项目; 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 张海晖(1975-), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事农副产品活性因子及其机制研究

通讯作者: 段玉清(1973-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事药食同源植物活性成分及其机制研究

的电磁波发出的以非热效应为主的非电离辐射^[1], 主要由电源设备, 输电线路及各种家用电器产生, 由于其存在的地区十分广泛导致与其接触的公众人群众多, 由此引发的影响人体健康等相关问题日益突出, 主要包括对心血管系统的损害, 中枢神经系统的损害, 以及对生殖系统的损害等, 作为环境电磁辐射的主要来源之一, ELF-EMF的诱病性已引起国内外学者的广泛关注。生殖系统属于遗传系统, 遗传损害是电磁辐射对人体健康影响的一个重要方面。众多流行病学和动物实验研究表明极低频电磁场可造成人及动物生殖

损伤。Fracki 等通过对 2376 名男性职业电脑操作员的流行病学调查,发现其精子数和精子活率均有所下降^[2]。Salama 等研究表明长期暴露于 60 Hz、1 mT 磁场强度中会导致大鼠睾丸组织发育迟缓^[3]。上述研究均表明雄性生殖系统对 ELF-EMF 非常敏感。

原花青素是一类有特殊分子结构的生物类黄酮,广泛存在于水果、蔬菜、种子、花、树皮等中^[4-5],由于其优良的抗氧化能力和广泛的安全性,在营养、医药和健康领域受到越来越多的关注。近年来,研究人员在莲房中发现了高含量的原花青素,并证明莲房原花青素(Lotus Seedpod Procyanidins, LSPCs)是聚多酚类混合物,包含单体、二聚体和四聚体,其中二聚体的含量最大,儿茶素和表儿茶素是其基本单位^[6]。我们先前的研究表明 LSPCs 具有很强的生物效应,包括抗氧化^[7]、抗癌^[8]、提高学习和记忆^[9]、无线电防护^[10]等。而 LSPCs 对 ELF-EMF 致生殖系统损伤有无影响尚无文献报道。本研究在辐射损伤模型的基础上给予小鼠不同剂量 LSPCs 灌胃,探讨 LSPCs 对 ELF-EMF 致雄性小鼠生殖损伤的保护作用,为其在食品和保健品行业的深入应用提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验动物:雄性 ICR 小鼠(20±2 g),由江苏大学实验动物中心提供(动物生产许可证号:SCIK(苏)2007-0001)。

原料:莲房采自洪湖瞿家湾种植区,品种名称为武植 2 号。将莲房(去籽)清洗干净,待用。采用本实验室已建立的方法提取制备,莲房原花青素纯度>95%^[6]。

试剂:伊红染液,上海恒远生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司;SOD 和 MDA 试剂盒,南京建成生物工程研究所;冰乙酸;甲醛。

1.2 仪器与设备

电子精密天平,MP502B,上海精密科学仪器有限公司;GL-21B 型高速冷冻离心机,上海安亭化学仪器厂;漩涡震荡仪(上海亚荣分析仪器公司);HH-S₄ 数显恒温水浴锅,金坛市医疗仪器厂;Multiskan Spectrum 型全波长酶标仪,美国热电公司;Leica DC300F 倒置荧光显微镜,德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 辐射装置

实验采用极低频电磁场发生器,该仪器由两个圆形亥姆霍兹(Helmholtz)线圈和调压器构成,线圈外径为 36 cm,内径 32 cm,匝数为 500。两线圈通以同方向 50 Hz 的交流电,中心区域可产生交变电磁场。经特斯拉计测量,该电磁场均匀度良好。对实验小鼠进行辐射时,将盛放小鼠的通风良好的透明有机玻璃盒置于两圆形线圈之间,通过调节电压控制磁场强度^[9]。

1.3.2 实验动物分组与辐射

将 50 只雄性 ICR 小鼠,随机分为正常对照组、ELF-EMF 组和 ELF-EMF+30 mg/kg LSPCs(ELF-EMF+LSPCs30),ELF-EMF+60 mg/kg LSPCs(ELF-EMF+LSPCs60),ELF-EMF+90 mg/kg LSPCs(ELF-EMF+LSPCs90)预处理组。LSPCs 用生理盐水配制,连续灌胃 75 d,灌胃 15 d 后各组在 50 Hz,8 mT 磁场条件下 4 h/d 连续辐射 60 d,其中正常对照组只进行相同条件的伪辐射。

1.3.3 组织准备

连续 60 天的 ELF-EMF 辐射结束后,脱颈椎法处死实验小鼠。取出两侧睾丸及附睾,用生理盐水冲洗,并剥离睾丸上的脂肪组织,称取睾丸重量,做好记录,并计算睾丸和体重的比值(睾体比),以 mg/10g 体重表示。一侧睾丸冻存于-80℃冰箱中用于生化指标测定,另一侧睾丸固定在 10%福尔马林溶液中用于组织病理分析。

1.3.4 小鼠精子活率

将一侧附睾放入盛 37℃生理盐水的小烧杯中,剪碎,使精子溢出,制成精子悬液,用吸管取一滴精子悬液与等量的 1%伊红混匀后滴于玻片上,1 min 左右推成薄片,空气中自然干燥,显微镜下观察。显微镜下显现红粉色的为死精,不被着色的则为活精,每只动物检查完整不重叠的精子 1000 条,计算精子活率。

1.3.5 小鼠精子畸形率

取另一侧附睾,放入盛有 2 mL 生理盐水的小平皿中。用眼科剪将附睾纵向剪 1~2 刀,静置 3~5 min,轻轻振动。用四层擦镜纸过滤,吸滤液涂片。于空气中干燥后,用甲醇固定 5 min 以上,干燥。用 1%伊红染色 10 min,用水轻冲,干燥。在低倍镜下找到背景清晰、精子重叠较少的部位,用高倍镜顺序检查精子形态,计数结构完整的精子。精子有头无尾(轮廓不清)或头部与其他精子或碎片重叠,或明显是人为剪碎者,均不计算,每只动物检查 1000 个精子。

1.3.6 睾丸组织 SOD、MDA 测定

取一侧睾丸,称睾丸重量,剪碎置于匀浆器中,加入9倍预冷的生理盐水,置于冰水混合物中充分研磨,然后以2000 r/min离心10 min,制成10%组织匀浆。按照测定试剂盒操作流程测定睾丸组织中SOD活性和MDA含量。

1.3.7 睾丸组织形态学观察

快速取一侧睾丸,用滤纸吸干。用10%福尔马林固定24 h以上。常规石蜡包埋,然后切片(厚4.0 μm),作HE(苏木精-伊红)染色,显微镜下观察。

1.4 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,组间数据 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 LSPCs 对小鼠睾丸比的影响

脏器比的变化可以直观反映组织器官是否受损。由表1可见,与正常对照组相比,经ELF-EMF辐射后小鼠睾丸比显著降低 ($P < 0.01$)。而经不同浓度LSPCs预处理后,脏器比明显上升,其中ELF-EMF+LSPCs60和ELF-EMF+LSPCs90组与ELF-EMF组相比均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

表1 LSPCs 对小鼠睾丸比的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of LSPCs on testicle to body weight ratio in mice

分组	n	睾丸比/(mg/10g)
正常对照	10	37.90±0.40
ELF-EMF	10	20.47±2.76 ^{##}
ELF-EMF+LSPCs30	10	24.57±1.53*
ELF-EMF+LSPCs60	10	31.80±1.56**
ELF-EMF+LSPCs90	10	36.70±2.01**

注: ^{##}与正常对照组相比有极显著性差异($P < 0.01$); *与ELF-EMF组相比有显著性差异($P < 0.05$); **与ELF-EMF组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

2.2 LSPCs 对小鼠精子活率的影响

由表2可以看出,ELF-EMF辐射显著降低了小鼠精子活率 ($P < 0.01$),而灌胃LSPCs使得精子活率有所提升,虽然未达到正常对照组水平,但LSPCs(30、60、90 mg/kg)各组与ELF-EMF组相比,均具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。

2.3 LSPCs 对小鼠精子畸形的影响

由表2可见,各组小鼠精子均有畸形发生,而

ELF-EMF组精子畸形率与正常对照组相比明显增高 ($P < 0.01$),灌胃LSPCs(30、60、90 mg/kg)明显降低了ELF-EMF辐射导致的精子畸形率 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。

表2 LSPCs 对小鼠精子活率和精子畸形率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of LSPCs on sperm motility and malformation rates in mice

分组	n	精子总数	精子活率/%	精子畸形率/%
正常对照	10	1000	67.33±2.06	31.56±1.95
ELF-EMF	10	1000	43.53±1.96 ^{##}	51.88±1.58 ^{##}
ELF-EMF+LSPCs30	10	1000	47.90±1.57*	48.86±0.57*
ELF-EMF+LSPCs60	10	1000	56.80±1.40**	44.04±1.91**
ELF-EMF+LSPCs90	10	1000	62.03±1.70**	39.20±1.17**

2.4 LSPCs 对睾丸SOD活力的影响

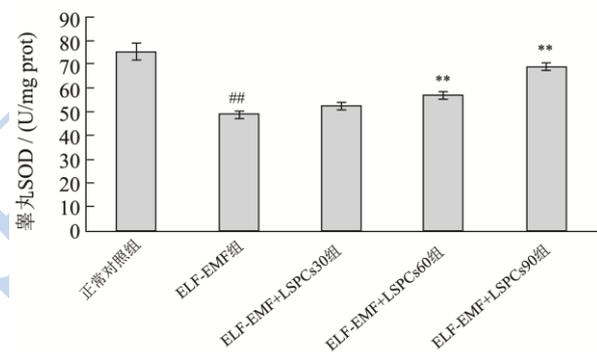


图1 LSPCs 对睾丸SOD活力的影响

Fig.1 Effect of LSPCs on SOD activity in the testis

从图1可以看出,与正常对照组相比,ELF-EMF组睾丸SOD活力明显降低 ($P < 0.01$)。与ELF-EMF组相比LSPCs(60、90 mg/kg)预处理组SOD活力显著升高 ($P < 0.01$),但ELF-EMF+LSPCs30组SOD活力没有明显变化。

2.5 LSPCs 对睾丸MDA含量的影响

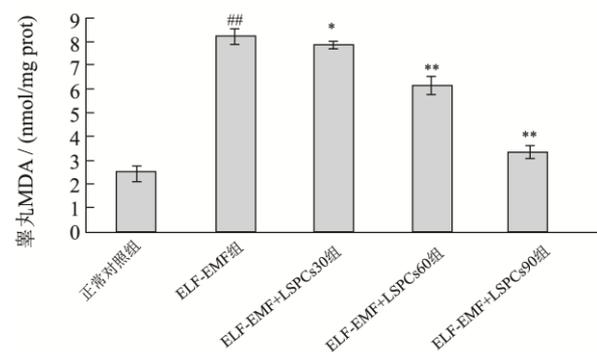


图2 LSPCs 对睾丸MDA含量的影响

Fig.2 Effect of LSPCs on testicle MDA content

由图2可见,ELF-EMF组睾丸MDA含量与正常

对照组相比显著增高 ($P<0.01$), 说明辐射产生了严重的脂质过氧化。经过 LSPCs (30、60、90 mg/kg) 的预处理, 与 ELF-EMF 组相比, MDA 含量明显降低, 且存在统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)。

2.6 LSPCs 对睾丸组织病理形态的影响

睾丸组织形态是检测影响精子产生最敏感和可靠的方法。由图 3 (A) 可以看出, 正常对照组睾丸间质中的间质细胞排列整齐有序, 曲细精管充实饱满, 外壁光滑无褶皱, 各级生精细胞排列整齐有序, 管腔中可见到大量成熟精子。由图 3 (B) 可以看出, ELF-EMF 组睾丸间质水肿与曲细精管分离, 曲细精管部分管壁脱落缺失, 各级生精细胞排列紊乱疏松, 生

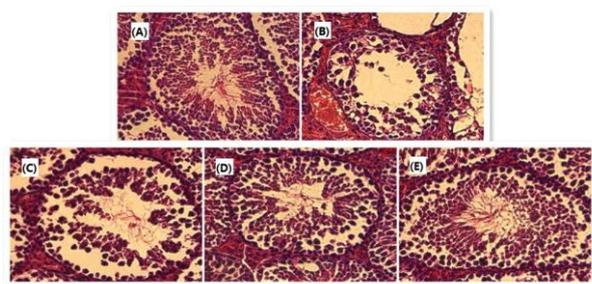


图 3 LSPCs 对睾丸组织病理形态的影响 (HE, $\times 400$)

Fig.3 Effect of LSPCs on histopathological changes in the testis (HE, $\times 400$)

注: (A) 正常对照; (B) ELF-EMF; (C) ELF-EMF+LSPCs30; (D) ELF-EMF+LSPCs60; (E) ELF-EMF+LSPCs90。

精上皮脱落至管腔, 管腔变窄, 腔内少见成熟精子。经过 LSPCs 预处理, 睾丸组织形态较 ELF-EMF 组有所改善, 且随着 LSPCs 剂量的加大改善越明显。由图 3 (D) 和 (E) 可以看出睾丸组织形态损伤得到明显缓解, 曲细精管上皮细胞层次趋向正常, 各级生精细胞数量有所增加, 排列有序, 管腔内成熟精子数量大大增多。

2.7 讨论

ELF-EMF 对机体的氧化损伤是其生物学效应机制之一。许多研究数据表明, 电磁辐射会导致机体细胞和器官产生自由基而造成氧化应激^[9,11-12], 长期暴露在 ELF-EMF 下, 可造成中枢神经系统、心血管系统、免疫系统和生殖系统等功能障碍^[2-3,11-12]。研究认为, ELF-EMF 主要通过影响活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 代谢使其在体内过量积累, 引起生物大分子如糖类、脂质、蛋白质和核酸等发生不同程度的氧化、变性、交联和断裂等, 进而导致细胞、

组织和器官的病变, 甚至癌变^[12]。

氧化应激可导致生殖损伤^[13]。在正常的生殖系统中, ROS 的产生与清除处于一种动态平衡, 适当的 ROS 有助于精子获能和顶体反应, 而当过量的 ROS 超过了生殖系统的清除能力时, 则会引起氧化损伤, 导致精子 DNA 双链断裂、产生单链^[12]。SOD 是体内抗氧化酶系的重要成员之一, 具有清除自由基和抑制脂质过氧化的作用, MDA 是机体内氧自由基代谢中产生的脂质过氧化产物, 它可以反映体系中脂质过氧化自由基产生的程度。本实验通过测定睾丸组织 SOD 活性和 MDA 含量, 发现 ELF-EMF 辐射后睾丸组织 SOD 活性显著降低而 MDA 含量显著升高, 说明 ELF-EMF 辐射明显抑制了睾丸抗氧化酶活性, 造成睾丸组织自由基和脂质过氧化物大量堆积。ELF-EMF 辐射后睾丸间质水肿与曲细精管分离, 曲细精管部分管壁脱落缺失, 各级生精细胞排列紊乱疏松, 生精上皮脱落至管腔, 管腔变窄, 腔内几乎未见成熟精子。睾丸组织形态发生这种变化的原因可能是 ELF-EMF 辐射使机体产生大量自由基而不能及时清除, 破坏精子质膜的流动性, 引起睾丸损伤造成精子生成过程障碍和精子细胞的破坏, 从而导致精子畸形率的升高和精子活率的降低。而辐射后小鼠睾体比下降, 其原因可能正是由于体内自由基和脂质过氧化物堆积, 机体正常的代谢活动受到干扰, 引起生殖功能障碍造成的。

业已证实, 莲房原花青素 LSPCs 在体内外均具有极强的清除自由基能力和抗氧化活性^[6-7]。在本实验中, 经过 LSPCs 预处理后, 睾丸组织 SOD 活性显著升高, MDA 含量明显降低, 说明 LSPCs 具有很好的激活体内抗氧化酶和清除自由基的能力。同时, 加入 LSPCs 保护后睾丸组织形态得到明显改善, 睾体比和精子活率有明显的上升趋势, 精子畸形率也显著降低, 表明 LSPCs 具有预防氧化损伤及由于氧化应激造成的生殖损伤的作用。由此提示: LSPCs 能有效地预防和修护 ELF-EMF 致雄性生殖损伤, 其作用机制可能与清除自由基, 提高机体抗氧化系统中的抗氧化成分有关。

目前有关 ELF-EMF 的研究主要集中于健康风险的评估, 缺少评估后防护措施的研究报道。鉴于 ELF-EMF 对生殖系统的极大威胁, 必须采取多渠道措施加以预防。本文研究结果表明, 在日常饮食中添加 LSPCs 可能是预防 ELF-EMF 所致危害的一种有效方法。我国莲资源丰富, 莲房作为莲子加工的副产物, 除少量用作传统医药外, 大多被当作垃圾扔掉, 造成资源的极大浪费, 如能将其充分利用, 对于提高莲资

源的附加值和国民健康水平具有重要的意义。

3 结论

3.1 ELF-EMF 辐射处理后小鼠睾丸组织形态发生严重改变, 辜体比、精子活率及辜丸组织 SOD 活性显著降低, 精子畸形率和辜丸组织 MDA 水平显著增高。

3.2 经 LSPCs 预处理后辐射损伤得到改善, 其中 60、90 mg/kg LSPCs 预处理组各项指标与 ELF-EMF 组相比均达到极显著差异 ($P < 0.01$)。

3.3 LSPCs 对 ELF-EMF 导致的雄性小鼠生殖损伤有明显的预防作用。

参考文献

- [1] Calvente I, Fernandez MF, Villalba J, et al. Exposure to electromagnetic fields (non-ionizing radiation) and its relationship with childhood leukemia: a systematic review [J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 408, 16: 3062-3069
- [2] Fracki S, Bablok L, Mézyński J. Fertility disturbances in males working as professional computer operators [J]. *Ginekologia Polska*, 1994, 65(1): 41-44
- [3] Salama N, Kishimoto T, Kanayama H. Retracted: Effects of exposure to a mobile phone on testicular function and structure in adult rabbit [J]. *International Journal of Andrology*, 2010, 33(1): 88-94
- [4] 李瑞丽,马润宇.从葡萄籽中提取原花青素的工艺研究[J].现代食品科技,2008,24(1):61-63
Rui-li, MA Run-yu. Study of Extraction of Procyanidins from Grape Seeds [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(1): 61-63
- [5] 吴骏,夏道宗,吴晓敏,等.紫薯原花青素复合功能饮料的研制[J].现代食品科技,2012,28(12):1739-1742
WU Jun, XIA Dao-zong, WU Xiao-min, et al. The development of compound functional beverage with proanthocyanidins in purple sweet potato [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(12): 1739-1742
- [6] Ling Z Q, Xie B J, Yang, E L. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera Gaertn* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(7): 2441-2445
- [7] Duan Y Q, Xie B J. The effect of lotus seedpod procyanidins on antioxidation in vivo in rats [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2003, 3: 026
- [8] Duan Y Q, Zhang H H, Xu F F, et al. Inhibition effect of procyanidins from lotus seedpod on mouse B16 melanoma in vivo and in vitro [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 84-91
- [9] Duan Y Q, Wang Z G, Zhang H H, et al. The preventive effect of lotus seedpod procyanidins on cognitive impairment and oxidative damage induced by extremely low frequency electromagnetic field exposure [J]. *Food & Function*, 2013, 4 (8):1252-1262
- [10] Duan Y Q, Zhang H H, Xie B J, et al. Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera Gaertn* [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(12): 3374-3384
- [11] Duan Y Q, Wang Z G, Zhang H H, et al. Extremely low frequency electromagnetic field causes cognitive impairment associated with alteration of MAPKs pathway activation and decreased CREB phosphorylation in the hippocampus: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod [J]. *Food & Function*, 2014, 5: 2289-229
- [12] Focker F, Schuermann D, Kuster et al. DNA fragmentation in human fibroblast under extremely low frequency electromagnetic field exposure [J]. *Mutation Research*, 2011, 683: 74-83
- [13] Richburg J H. The relevance of spontaneous and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology [J]. *Toxicology Letters*, 2000, 112: 79-86