

马齿苋多糖抗雄性大鼠生殖氧化损伤作用的研究

杨翠军¹, 孙全文², 葛剑³, 白雪梅¹, 王爱华³

(1. 河北北方学院生命科学研究中心, 河北张家口 075000) (2. 河北北方学院实验动物中心, 河北张家口 075000)

(3. 河北北方学院动物科技学院, 河北张家口 075131)

摘要: 研究马齿苋多糖 (POP) 对环境雌激素引起的生殖氧化损伤的影响, 为其功能性食品开发提供参考。炔雌醇 (EE₂) 处理组, 按 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、5 mg/kg 大鼠腹腔注射 EE₂, POP 对比组同时注射 10% POP, 测定大鼠睾丸相对质量、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA) 和过氧化氢酶 (CAT) 水平, 光镜观察睾丸组织结构。EE₂ 处理组, 注射 1 mg/kg EE₂ 后, 睾丸组织结构紊乱, 睾丸萎缩, 相对质量下降 (P<0.05); 且 EE₂ 处理组, 随 EE₂ 剂量增加和作用时间延长, T-AOC、CAT、SOD 和 GSH-Px 水平降低 (P<0.05), MDA 水平升高 (P<0.05)。POP 对比组, 组织结构未发生明显变化, T-AOC、CAT、SOD 和 GSH-Px 水平稳定 (P>0.05), 个别组升高显著 (P<0.05), MDA 水平稳定 (P>0.05)。提示炔雌醇具有生殖毒性, 造成脂质过氧化, 与 ROS 密切相关, POP 具有抗生殖氧化损伤作用, 维持 ROS 和抗氧化酶防御系统之间的平衡。

关键词: 马齿苋多糖; 活性氧簇; 氧化损伤; 抗氧化酶

文章编号: 1673-9078(2014)2-6-11

Anti-oxidative Damage of *Portulaca oleracea* Polysaccharide on Reproductive System in Male Rats

YANG Cui-jun¹, SUN Quan-wen², GE Jian³, BAI Xue-mei¹, WANG Ai-hua³

(1. Life Science Research Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

(2. Laboratory Animal Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

(3. College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, China)

Abstract: The protection mechanism of *Portulaca Oleracea* polysaccharide (POP) on reproductive toxicity and oxidative damage induced by EEs in male rats was studied to provide the experimental basis for development and application of POP. The male rats were established as fertility problems model by intraperitoneal injecting ethinylloestradiol (EE₂), with the injecting dose of 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg and 5 mg/kg, and meanwhile intraperitoneal injection of 10% POP as the comparative group. Absolute and relative testicular weights were measured. Morphological changes of testicular were observed in the light microscope. The contents of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) in testicular tissue and plasma were detected. In EE₂ processed groups, testicular weight decreased significantly (P<0.05) and led to shrink when injection of 1mg/kg EE₂. The antioxidant enzymes including SOD, GSH-Px, CAT and T-AOC in testicular tissue all decreased (P<0.05) which resulted in the increase of MDA (P<0.05) with the increase of EE₂ dosage. On the contrary, SOD, GSH-Px, CAT, T-AOC and MAD were unchanged (P>0.05) in POP group. EE₂ decreased antioxidant activity and closely related to the content of reactive oxygen species (ROS). And POP had the effect of anti-oxidative damage, protected the balance of ROS and the defense system of antioxidant enzyme.

Key words: *Portulaca oleracea* polysaccharide; reactive oxygen species; antioxidant; oxidative damage

马齿苋在我国资源丰富, 无污染, 它不但可以入药, 而且具有较好的营养保健价值, 是一种药食两用的绿色野生植物。目前, 随着整个社会经济的发展,

收稿日期: 2013-10-07

基金项目: 2012年河北省高等学校科学研究计划项目 (Z2012162); 河北省科技支撑计划 (10230418)

作者简介: 杨翠军 (1979-), 女, 在读博士, 讲师, 研究方向生物科学

人们生活水平的提高, 人们的保健意识逐步增强, 越来越要求食品向绿色型、环保型发展。因此, 关于马齿苋系列食品的开发和利用也正逐步开展, 已被加工为速冻菜、蔬菜粉、保健冰激凌、保健饮料、咀嚼片等多种食品^[1]。研究表明, 马齿苋多糖能活化巨噬细胞, 增强机体免疫功能^[2]; 并且马齿苋具有很好的抗肿瘤作用^[3], 对油脂具有较强的抗氧化能力^[4-5]。马齿

苋及其有效成分作为具有保健作用的功能性食品,备受人们的青睐,马齿苋的开发利用具有巨大潜力,为我们提出了许多新课题。受现代生活垃圾和生活方式的影响,以及高脂肪、高蛋白物质的自由摄入导致的肥胖,环境释放物等的作用下,导致人体内水平活性氧簇(ROS)大量产生,并在体内进行堆积,造成ROS和抗氧化防御系统之间的平衡被破坏,发生脂肪过氧化反应,产生过氧化脂质及其他代谢物,从而诱发多种慢性病的发生。环境雌激素(Environmental Estrogens, EEs)为众多影响因素中的一种,广泛存在于各类环境中,进入人和动物体内后能干扰体内自然激素的合成、分泌、转运、结合作用和消除等过程,是环境内分泌干扰物中最为重要的一类,能够引起各种类型的雄性生殖障碍等^[6]。因而环境雌激素对生殖健康的影响备受关注,同时开发预防和治疗环境雌激素造成的生殖损伤的健康食品也逐渐得到人们的关注。本研究首先提纯马齿苋多糖(POP),以炔雌醇(E₂)作为环境雌激素的模型药物,诱导成年雄性大鼠生殖氧化损伤,通过观察睾丸组织形态学结构,和测定大鼠睾丸和附睾组织及血浆中抗氧化酶水平,研究POP对生殖氧化损伤的缓解作用及其对细胞内抗氧化系统的保护作用,为马齿苋的深加工及开发具有保健作用的功能性食品提供参考。

1 材料和仪器

1.1 材料和实验动物

本试验选取96只雄性青年大鼠,清洁级,体重在200~220 g,购自河北北方学院实验动物中心[许可证编号:scxk~(军)2007-004]。马齿苋采自河北省张家口,由河北北方学院中医学院鉴定。

1.2 试剂

E₂购自sigma公司,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT),购自南京建成生物工程研究所,其余试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

组织切片机为Leica公司生产,Nikon多功能显微镜,美国Stat Fax 2100型酶标仪,中药粉碎机(FW-177型),电热恒温真空干燥箱(DZ-1BC),真空冷冻干燥机(SNL216),电子分析天平(GR202)。

1.4 试验方法

1.4.1 POP的提取

根据参考文献^[7]提取POP,采集新鲜马齿苋,去根,50℃烘干,将其粉碎,过40目筛,石油醚将其完全浸没,回流脱脂2次;然后滤渣用约其5倍体积95%乙醇,回流脱脂2次,过滤,滤渣与37℃真空干燥箱烘干,备用。称取上述处理过的马齿苋,以料水比1:12加入ddH₂O,充分浸泡后,置于60℃超声仪超声20 min(130 W),然后90℃水浴回流2 h,重复1次,合并滤液,用旋转蒸发器将滤液浓缩到适当体积。滤液浓缩后,12000 r/min,离心20 min,取上清,加入4倍体积的无水乙醇充分混匀,静置过夜,抽滤、沉淀后,按照以下方式清洗,无水乙醇3次、丙酮3次、石油醚3次,然后将其放入真空干燥箱内,37℃,干燥,得到粗POP。

1.4.2 POP的纯化

本研究采用木瓜蛋白酶+Sevage法,去除粗POP中蛋白质。大孔吸附树脂XDA-5对去除蛋白后的POP进行脱色。最后采用直径为2~3 nm的透析袋,脱去POP中的小分子杂质,得到纯化的POP,备用。

1.4.3 POP对E₂处理后大鼠的影响指标的测定

1.4.3.1 试验分组

选取96只雄性的青年大鼠随机分为9组,每组12只,分别为空白组、E₂处理组(1组、2组、3组、4组)、POP对比组(5组、6组、7组、8组),空白组腹腔注射100 μL生理盐水,其余试验各组分别注射等体积的0.1 mg/kg E₂、0.5 mg/kg E₂、1 mg/kg E₂、5 mg/kg E₂、0.1 mg/kg E₂+10%POP、0.5 mg/kg E₂+10%POP、1 mg/kg E₂+10%POP、5 mg/kg E₂+10%POP,每隔2 d注射一次,连续注射5次后,继续饲喂一周后,取材。

1.4.3.2 试验取材

分别于试验第1、8、15和21 d称重并无菌采血,肝素抗凝,5000 r/min离心10 min,取血浆于-80℃冰箱保存备用。试验结束后处理动物,分别剥离大鼠睾丸和附睾组织,称取睾丸质量,计算睾丸相对质量=睾丸重量(g)/体重(g)×100。一部分睾丸组织进行HE染色和形态结构观察。剩余睾丸-附睾制备组织匀浆,液氮冷冻后,保存于-80℃备用。

1.4.3.3 抗氧化能力测定

睾丸组织和血浆中抗氧化酶,如T-AOC、MDA、CAT、SOD和GSH-Px的检测使用相应试剂盒,方法及步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 数据统计

试验数据均采用 spss 13.0 进行统计分析, 结果以平均值±标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异为显著水平。

2 结果与分析

2.1 睾丸相对质量及形态学观察

各组大鼠的平均体重差异不显著 ($P > 0.05$), 说明 EE_2 并未影响其基本代谢。空白组、1 组、2 组、3 组、4 组睾丸相对质量分别为 0.51 ± 0.01 、 0.52 ± 0.02 、 0.33 ± 0.02 、 0.26 ± 0.02 、 0.21 ± 0.02 , 对各组进行 t 检验, 除空白组与 1 组差异不显著 ($P > 0.05$), 其余各组间差异显著 ($P < 0.05$)。5 组、6 组、7 组、8 组的睾丸相对质量分别为 0.52 ± 0.03 、 0.54 ± 0.01 、 0.51 ± 0.03 、 0.44 ± 0.01 。5 组、6 组、7 组睾丸相对质量与空白组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 8 组与空白组相比差异显著 ($P < 0.05$)。观察睾丸组织形态结构, EE_2 处理后大鼠生精上皮变薄, 精小管在不同程度上间隙增大, 细胞变得稀松和紊乱, 管腔内精子细胞数目减少, 说明睾丸组织受损导致生殖能力下降; 应用 POP 处理后, 睾丸组织的损伤得到了不同程度修复, 以低剂量 ($0.1 \text{ mg/kg } EE_2 + 10\% \text{ POP}$) 组最明显, 这在本课题组以前

的试验也得到过证实^[8]。

2.2 雄性大鼠生殖氧化损伤及 POP 抗生殖氧化损伤结果与分析

2.2.1 POP 对 CAT 水平的影响

本研究以不同剂量的 EE_2 建立雄性大鼠生殖损伤模型, 测定血浆和睾丸-附睾中 CAT 含量 (详见表 1)。 EE_2 处理组, 随 EE_2 剂量增加和作用时间延长, 大鼠血浆中 CAT 水平显著下降 ($P < 0.05$), 睾丸-附睾组织 CAT 水平随 EE_2 剂量增加而显著降低 ($P < 0.05$)。POP 对比组, 大鼠血浆和睾丸-附睾组织在 EE_2 中、低剂量组 CAT 水平变化不显著 ($P > 0.05$), 高剂量组其水平显著降低 ($P < 0.05$)。水平氧一般不在体内积累, 而在受到外界胁迫后, 水平氧逐步积累, 随着作用时间和 EE_2 剂量的增加, CAT 因清除体内的水平氧而大量消耗和 CAT 水平受到抑制逐渐降低, 可能造成生殖系统 H_2O_2 含量增加, 对雄性生殖器官具有毒性作用。而 EE_2 和 POP 作用后的大鼠, 其 CAT 含量变化不明显, 说明 POP 可能通过提高 CAT 水平和促进 H_2O_2 分解的作用, 抑制 H_2O_2 对细胞的过氧化作用。

表 1 大鼠血浆及睾丸 CAT 含量变化

Table 1 The different level of CAT in plasma and testicular of Rats

组别	大鼠数量/只	药物处理	第 1 d 血浆 CAT/(U/mg)	第 8 d 血浆 CAT/(U/mg)	第 15 d 血浆 CAT/(U/mg)	第 21 d 血浆 CAT/(U/mg)	21 d 睾丸-附睾 CAT/(U/mg)
空白组	12	生理盐水	5.84 ± 0.62^{Aa}	5.74 ± 0.16^{Aa}	5.54 ± 0.64^{Aa}	5.66 ± 0.65^{Aa}	1.32 ± 0.21^A
1 组	12	$0.1EE_2$	5.72 ± 1.36^{Aa}	5.62 ± 1.31^{Aa}	5.47 ± 0.72^{Aa}	5.81 ± 0.77^{Aa}	1.15 ± 0.14^B
EE_2 处理组	2 组	$0.5EE_2$	5.68 ± 1.03^{Aa}	5.38 ± 1.60^{Ab}	5.35 ± 1.11^{Aa}	5.35 ± 1.31^{Ba}	0.90 ± 0.21^C
	3 组	$1EE_2$	5.81 ± 0.78^{Aa}	5.34 ± 0.89^{Bb}	5.27 ± 0.54^{Ba}	5.02 ± 0.45^{Cb}	0.82 ± 0.13^D
	4 组	$5EE_2$	5.79 ± 1.01^{Aa}	5.15 ± 1.62^{Bb}	4.81 ± 0.72^{Bb}	4.89 ± 1.09^{Cb}	0.71 ± 0.18^E
POP 对比组	5 组	$0.1EE_2 + 10\% \text{ POP}$	5.77 ± 0.75^{Aa}	5.64 ± 0.55^{Aa}	5.68 ± 0.86^{Aa}	5.58 ± 0.54^{Aa}	1.35 ± 0.23^A
	6 组	$0.5EE_2 + 10\% \text{ POP}$	5.67 ± 0.98^{Aa}	5.66 ± 0.14^{Aa}	5.69 ± 1.11^{Aa}	5.57 ± 0.62^{Aa}	1.29 ± 0.17^A
	7 组	$1EE_2 + 10\% \text{ POP}$	5.59 ± 1.32^{Aa}	5.87 ± 0.67^{Aa}	5.71 ± 1.02^{Aa}	5.55 ± 1.10^{Aa}	1.40 ± 0.18^A
8 组	$5EE_2 + 10\% \text{ POP}$	5.97 ± 0.85^{Aa}	5.61 ± 0.48^{Aa}	5.91 ± 0.71^{Aa}	5.57 ± 0.75^{Aa}	1.01 ± 0.16^{FBC}	

注: EE_2 单位为 mg/kg , POP 浓度为 10%。同列肩标不同大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.2 POP 对 GSH-Px 水平的影响

由表 2 可知, EE_2 处理组, 大鼠血浆中 GSH-Px 水平随着 EE_2 剂量增加呈降低趋势 ($P < 0.05$), 睾丸-附睾组织 GSH-Px 水平显著降低 ($P < 0.05$); POP 对比组, 中、低剂量 EE_2 处理的大鼠血浆 GSH-Px 水平增加 ($P < 0.05$), 高剂量 EE_2 处理的大鼠血浆中 GSH-Px 水平变化不显著 ($P > 0.05$), 大鼠睾丸-附睾组织的 GSH-Px 水平除高剂量 EE_2 组显著降低外 ($P < 0.05$), 其余各组变化不显著 ($P > 0.05$)。这说明 EE_2 能够逐渐

消耗 GSH-Px 和增加 H_2O_2 含量, 降低 GSH-Px 水平, 降低其清除 H_2O_2 的能力, 使 ROS 与抗氧化防御系统之间的平衡破坏, 产生生殖毒性, 造成睾丸和附睾组织损伤。 $EE_2 + \text{POP}$ 作用后的大鼠体内 GSH-Px 含量变化, 说明 POP 可能通过两种方式提高 GSH-Px 水平, 其一直接提高 GSH-Px 水平, 其二 POP 促进 H_2O_2 分解的作用, 抑制 H_2O_2 对细胞的氧化。POP 不但使受损伤的生殖器官 GSH-Px 水平上升, 且能使全血 GSH-Px 的水平明显提高, 提高机体抗氧化能力。

表 2 大鼠血浆及睾丸 GSH-Px 含量变化

Table 2 The different level of GSH-Px in plasma and testicular of Rats

组别	大鼠数量/只	药物处理	第 1 d 血浆 GSH-Px(U/mL)	第 8 d 血浆 GSH-Px(U/mL)	第 15 d 血浆 GSH-Px(U/mL)	第 21 d 血浆 GSH-Px(U/mL)	21 d 睾丸-附睾 GSH-Px(U/mg)
空白组	12	生理盐水	5.88±0.13 ^{Aa}	5.92±0.12 ^{Aa}	5.96±0.18 ^{Aa}	5.86±0.17 ^A	40.41±2.70 ^A
EE ₂ 处理组	1 组	0.1EE ₂	5.92±0.12 ^{Aa}	5.74±0.10 ^{Aa}	5.32±0.13 ^{Bb}	4.68±0.21 ^B	36.82±1.92 ^B
	2 组	0.5EE ₂	6.12±0.17 ^{Aa}	5.78±0.24 ^{Ba}	5.18±0.21 ^{Bb}	4.64±0.19 ^C	33.22±2.39 ^{BC}
	3 组	1EE ₂	5.94±0.18 ^{Aa}	5.38±0.17 ^{Ba}	5.02±0.20 ^{Bb}	3.92±0.17 ^C	29.81±1.92 ^C
	4 组	5EE ₂	5.92±0.16 ^{Aa}	5.64±0.10 ^{Aa}	4.96±0.15 ^{Bb}	3.84±0.36 ^C	21.81±2.59 ^D
POP 对比组	5 组	0.1EE ₂ +10%POP	6.05±0.13 ^{Aa}	6.01±0.32 ^{Aa}	6.26±0.26 ^{Cb}	6.83±0.21 ^{Dc}	43.21±1.98 ^A
	6 组	0.5EE ₂ +10%POP	5.91±0.13 ^{Aa}	6.10±0.45 ^{Aa}	5.98±0.75 ^{Aa}	6.18±0.43 ^{A_{Ea}}	40.88±2.11 ^A
	7 组	1EE ₂ +10%POP	5.89±0.67 ^{Aa}	5.98±0.56 ^{Aa}	6.04±0.43 ^{Aa}	6.23±0.45 ^{Bb}	39.26±3.14 ^A
	8 组	5EE ₂ +10%POP	5.94±0.76 ^{Aa}	5.89±0.81 ^{Aa}	5.85±0.17 ^{Aa}	5.95±0.27 ^{Aa}	34.58±3.10 ^{FBC}

注: EE₂ 单位为 mg/kg, POP 浓度为 10%。同列肩标不同大写字母表示差异显著 (P<0.05); 同行肩标不同小写字母表示差异显著 (P<0.05), 相同字母表示差异不显著 (P>0.05)。

2.2.3 POP 对 SOD 水平的影响

试验结果显示 (详见表 3), EE₂ 处理组, 大鼠血浆中 SOD 水平随着作用时间和 EE₂ 剂量的增加而降低 (P<0.05), 睾丸-附睾组织的 SOD 水平显著降低 (P<0.05); 在 POP 对比组, 除高剂量的 EE₂ 处理大鼠睾丸-附睾组织 SOD 水平显著降低外 (P<0.05), 其余各组大鼠血浆及睾丸-附睾组织 SOD 水平变化不显著 (P>0.05)。SOD 是机体抗氧化系统中重要的金属酶类, 能清除超氧阴离子自由基 (O₂⁻), 防止 O₂ 产生细胞毒性使细胞脂质过氧化, 是抗氧化防御系统的关键酶。随着 EE₂ 作用时间和剂量的逐渐增加, SOD 水

平逐渐降低, 清除 O₂ 的能力逐渐下降, O₂ 的毒性作用使细胞内脂质发生过氧化反应, 对睾丸和附睾组织的细胞造成氧化损伤, 同时血浆中 SOD 水平变化, 亦进一步说明 EE₂ 对机体的氧化损伤作用。经 POP 处理的睾丸及附睾组织 SOD 水平变化不明显, 说明 POP 对 EE₂ 造成的大鼠生殖氧化损伤具有一定的保护作用, 一方面可能通过保持体内 SOD 水平, 清除 O₂; 另一方面可能 POP 通过清除 O₂ 保持 SOD 水平, 来保护生殖系统抗氧化防御体系, 防止 EE₂ 对细胞产生氧化损伤。

表 3 大鼠在血浆及睾丸 SOD 水平变化

Table 3 The different level of SOD in plasma and testicular of Rats

组别	大鼠数量/只	药物处理	第 1 d 血浆 SOD/(U/mL)	第 8 d 血浆 SOD/(U/mL)	第 15 d 血浆 SOD/(U/mL)	第 21 d 血浆 SOD/(U/mL)	21 d 睾丸-附睾 SOD/(U/mg)
空白组	12	生理盐水	112.40±1.85 ^{Aa}	114.00±1.44 ^{Aa}	112.00±0.65 ^{Aa}	112.4±1.02 ^{Aa}	134.21±8.83 ^A
EE ₂ 处理组	1 组	0.1EE ₂	114.00±1.41 ^{Aa}	108.20±1.72 ^{Bb}	97.2±1.60 ^{Ac}	94.8±1.72 ^{Bd}	115.67±5.76 ^B
	2 组	0.5EE ₂	114.6±3.38 ^{Aa}	104.20±2.23 ^{B_{Cb}}	91.8±2.14 ^{Bc}	88.2±3.31 ^{Cc}	91.56±2.83 ^C
	3 组	1EE ₂	112.80±1.72 ^{Aa}	100.6±2.58 ^{Bb}	89.2±3.05 ^{B_{Cb}}	81.8±2.13 ^{Dd}	82.99±5.01 ^D
	4 组	5EE ₂	113.00±0.89 ^{Aa}	98.2±1.72 ^{Bb}	90.8±2.13 ^{B_{Dc}}	80.2±2.31 ^{Ed}	59.24±4.89 ^E
POP 对比组	5 组	0.1EE ₂ +10%POP	116.21±0.26 ^{Aa}	103.23±4.76 ^{Bb}	108.21±5.74 ^{Ac}	112.23±4.51 ^{Aa}	140.28±5.42 ^A
	6 组	0.5EE ₂ +10%POP	114.3±2.85 ^{Aa}	114.98±3.82 ^{Aa}	107.54±4.61 ^{Ab}	108.43±5.55 ^{Ab}	134.78±3.56 ^A
	7 组	1EE ₂ +10%POP	113.86±3.21 ^{Aa}	107.16±1.87 ^{Bb}	108.16±3.21 ^{Ab}	114.83±6.61 ^{Aa}	136.12±8.44 ^A
	8 组	5EE ₂ +10%POP	111.78±4.51 ^{Aa}	112.56±2.23 ^{Aa}	110.31±2.21 ^{Aa}	115.12±3.12 ^{Aa}	115.21±6.55 ^F

注: EE₂ 单位为 mg/kg, POP 浓度为 10%。同列肩标不同大写字母表示差异显著 (P<0.05); 同行肩标不同小写字母表示差异显著 (P<0.05), 相同字母表示差异不显著 (P>0.05)。

2.2.4 POP 对 MDA 水平的影响

通过以上结果, CAT、GSH-Px 和 SOD 三种抗氧化酶水平的变化, 说明 EE₂ 可对生殖系统造成氧化损伤, POP 具有缓解生殖氧化损伤的作用。本研究在此

基础上, 进一步测定 MDA 水平变化, 验证 POP 抗氧化损伤的作用。结果显示 (见表 4), EE₂ 处理组, MDA 水平随着大鼠注射 EE₂ 的剂量增加, 血浆和睾丸-附睾组织中 MDA 水平增加 (P<0.05); POP 对比组中, 大

鼠血浆 MDA 水平变化不大 ($P>0.05$); 睾丸-附睾组织 MDA 水平随 EE_2 剂量增加呈现不同程度提高。MDA 水平可反映机体产生自由基的产生的程度, 血浆和生殖系统 MDA 水平显著增加, MDA 是脂质过氧化的最终产物之一, 说明 EE_2 确实造成了生殖器官的氧化损伤, 可造成雄性小鼠生殖毒性, 精子存活率、

数目降低、睾丸组织存在不同程度损伤。POP 和 EE_2 同时处理的各组大鼠, MDA 水平未发生较大变化, 说明 POP 对高剂量和低剂量的 EE_2 造成的氧化损伤, 均具有显著的预防和缓解作用, 同时说明 POP 对脂质过氧化具有抑制和缓解作用, 对生殖系统和机体具有保护作用。

表 4 大鼠血浆和睾丸 MDA 水平变化

Table 4 The different level of MDA in plasma and testicular of Rats

组别	大鼠数量/只	药物处理	第 1 d 血浆 MDA / (nmol/mL)	第 8 d 血浆 MDA / (nmol/mL)	第 15 d 血浆 MDA / (nmol/mL)	第 21 d 血浆 MDA / (nmol/mL)	21 d 睾丸-附睾 MDA/(nmol/mg)
空白组	12	生理盐水	4.65±0.41 ^{Aa}	4.58±0.52 ^{Aa}	4.68±0.54 ^{Aa}	4.56±0.61 ^{Aa}	2.58±0.55 ^A
1 组	12	0.1 EE_2	4.66±0.35 ^{Aa}	4.91±0.29 ^{Bab}	5.01±0.28 ^{Bb}	5.11±0.32 ^{Bb}	2.89±0.56 ^A
EE_2 处 2 组	12	0.5 EE_2	4.65±0.45 ^{Aa}	4.88±0.51 ^{Ba}	5.31±1.09 ^{Bb}	5.48±0.28 ^{Bb}	3.40±0.88 ^B
理组 3 组	12	1 EE_2	4.66±0.34 ^{Aa}	4.81±0.23 ^{Ba}	5.88±1.21 ^{BCb}	5.81±0.39 ^{Cb}	3.56±0.26 ^B
4 组	12	5 EE_2	4.68±0.61 ^{Aa}	4.82±0.38 ^{Ba}	5.97±0.26 ^{CDb}	5.98±0.25 ^{Db}	3.46±0.46 ^B
5 组	12	0.1 EE_2 +10%POP	4.67±0.26 ^{Aa}	4.72±0.25 ^{Aa}	4.48±0.51 ^{Aa}	4.35±0.51 ^{Aab}	1.65±0.78 ^C
POP 6 组	12	0.5 EE_2 +10%POP	4.71±0.19 ^{Aa}	4.65±1.21 ^{Aa}	4.91±0.56 ^{Ba}	4.68±0.18 ^{Aa}	1.98±0.34 ^D
对比组 7 组	12	1 EE_2 +10%POP	4.80±1.13 ^{Aa}	4.81±0.39 ^{Ba}	4.85±0.6A ^{Ba}	4.71±0.24 ^{Aa}	2.65±0.23 ^A
8 组	12	5 EE_2 +10%POP	4.91±1.09 ^{ABa}	4.88±0.28 ^{Ba}	4.82±0.61A ^{Ba}	5.01±0.38 ^{Ba}	2.68±0.55 ^A

注: EE_2 单位为 mg/kg, POP 浓度为 10%。同列肩标不同大写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.2.5 POP 对 TAC 的影响

大鼠血浆及睾丸-附睾组织中 TAC 含量变化结果见表 5。 EE_2 处理组, 血浆和睾丸-附睾组织中 TAC 水平随其剂量和作用时间的增加, 逐渐降低 ($P<0.05$)。POP 对比组, 大鼠血浆中除个别 TAC 水平显著增加外 ($P<0.05$), TAC 水平基本不变 ($P>0.05$); 睾丸-附睾组织, 除高剂量 EE_2 组 TAC 水平显著降低外 ($P<0.05$), 其余各组 TAC 水平变化不显著 ($P>0.05$)。

TAC 为机体内总抗氧化能力之和, 为体内酶类和非酶类抗氧化物的总体水平。各抗氧化物之间有着相互联系、协同保护作用, TAC 是反映机体抗氧化作用的重要指标。本研究结果显示 EE_2 能够对生殖系统和机体造成氧化损伤, 并具有时间和剂量的依赖性, 而 POP 能够通过一定程度上提高 TAC 水平, 和清除睾丸、附睾组织, 甚至整个机体中 ROS, 防止 H_2O_2 、 O_2^- 、 OH 等过量积蓄造成的氧化损伤。

表 5 大鼠在不同处理时期和不同给药剂量血浆中 T-AOC 水平变化

Table 5 The different level of T-AOC in plasma and testicular of Rats

组别	大鼠数量/只	药物处理	第 1 d 血浆 TAC/(U/mL)	第 8 d 血浆 TAC (U/mL)	第 15 d 血浆 TAC/(U/ mL)	第 21 d 血浆 TAC/(U/mL)	21d 睾丸-附睾 TAC/(U/mg)
空白组	12	生理盐水	15.71±1.31 ^{Aa}	15.82±1.23 ^{Aa}	15.61±1.43 ^{Aa}	15.58±1.28 ^{Aa}	28.30±3.21 ^A
1 组	12	0.1 EE_2	15.68±1.38 ^{Aa}	15.74±3.13 ^{Aa}	15.55±1.32 ^{Aa}	15.54±1.45 ^{Aa}	25.32±2.23 ^B
EE_2 处 2 组	12	0.5 EE_2	15.35±1.43 ^{Aa}	15.15±1.48 ^{Ab}	15.21±1.76 ^{Ab}	15.20±1.11 ^{Aa}	21.34±1.78 ^C
理组 3 组	12	1 EE_2	15.65±1.65 ^{Aa}	15.09±1.56 ^{Bb}	14.89±1.83 ^{Bb}	14.78±1.98 ^{Bb}	15.65±1.56 ^D
4 组	12	5 EE_2	15.88±1.32 ^{Aa}	15.23±1.23 ^{Bb}	14.74±5.63 ^{Cb}	14.67±1.45 ^{Cb}	10.58±1.43 ^E
5 组	12	0.1 EE_2 +10%POP	15.43±1.40 ^{Aa}	15.78±1.39 ^{Aa}	16.41±1.20 ^{Db}	17.61±1.21 ^{Dc}	29.13±4.33 ^A
POP 对 6 组	12	0.5 EE_2 +10%POP	15.56±1.29 ^{Aa}	15.85±1.45 ^{Aa}	16.52±1.21 ^{Db}	17.37±1.87 ^{Dc}	27.62±1.89 ^A
比组 7 组	12	1 EE_2 +10%POP	15.67±1.09 ^{Aa}	15.67±1.61 ^{Aa}	15.78±1.19 ^{Aa}	16.56±1.56 ^{Eb}	28.05±3.69 ^A
8 组	12	5 EE_2 +10%POP	15.71±0.98 ^{Aa}	15.18±1.42 ^{Aa}	15.80±0.99 ^{Aa}	15.81±1.34 ^{Aa}	24.13±2.99 ^{FB}

注: EE_2 单位为 mg/kg, POP 浓度为 10%。同列肩标不同大写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。

3 结论

本研究以 EE₂ 作为环境雌激素的模型药物, 成功建立了雄性大鼠生殖氧化损伤模型, 而同时注射 POP 和 EE₂ 处理的大鼠, ROS 和抗氧化酶防御系统之间的平衡未遭到破坏。首先, 从不同角度证实了 EE₂ 能够从时间和剂量上逐渐影响各种抗氧化酶和 ROS 在体内含量的变化, 造成生殖氧化损伤。其次, POP 能够通过提高抗氧化酶的水平 and 清除 ROS, 保护机体, 使机体免受环境雌激素引起的生殖氧化损伤。

参考文献

- [1] 谢晓凤,童莲花,马泽鑫,等. 马齿苋咀嚼片制备技术研究[J]. 食品工业,2013,34(1):33-35
Xie Xiao-feng, Tong Lian-hua, Ma Ze-xin, et al. Preparation technology of *portulaca oleracea L.* chewable tablets [J]. The food industry, 2013, 34(1): 33-35
- [2] Chen YouGuo, Shen ZongJi, Chen XiaoPing. Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45(5):448-52
- [3] Shen H, Tang G, Zeng G, et al. Purification and characterization of an antitumor polysaccharide from *Portulaca oleracea L.* [J]. Carbohydr Polym, 2013, 93(2): 395-400
- [4] 葛剑,杨翠军,孙茂红.马齿苋多糖对雏鸡生长性能、血液代谢激素和血脂的影响[J].中国粮油学报,2013, 28(2): 87-92
Ge Jian, Yang Cuijun, Sun Maohong. Effects of *portulaca oleracea* polysaccharide on growth performance, blood hormones secretion and serum lipid of chicken [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(2): 87-92
- [5] Bendong Chen, Haining Zhou, Wenchao Zhao, et al. Effects of aqueous extract of *Portulaca oleracea L.* on oxidative stress and liver, spleen leptin, PARα and FAS mRNA expression in high-fat diet induced mice [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(8):7981-7988
- [6] Chighizola C, Meroni PL. The role of environmental estrogens and autoimmunity [J]. Autoimmunity Reviews, 2012, 11(6-7): 493-501
- [7] 吴光杰,李玉萍,皮小芳,等.响应曲面法优化马齿苋多糖提取工艺[J].食品与机械,2010,26(3):129-133
WU Guang-jie, LI Yu-ping, PI Xiao-fang, et al. Optimization of polysaccharides extraction process from *Portulaca oleracea L.* by response surface methodology [J]. Food and machinery, 2010, 26(3): 129-133
- [8] 杨翠军,崔文典,刘芳,等.马齿苋多糖对炔雌醇诱导小鼠睾丸损伤的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2013,4(上):121-123
Yang Cui-jun, Cui Wen-dain, Liu Fang, et al. Effects of *portulaca oleracea* polysaccharide on testicle injuries were induced by ethinylestradiol in mice [J]. Heilongjiang Animal Science And veterinary Medicine, 2013, 4 (the first volume): 121-123