

牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配 促进睾丸间质细胞生成雄性激素

方磊, 王雨辰, 马永庆, 张海欣, 陆路, 王憬, 谷瑞增, 魏颖

(中国食品发酵工业研究院, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

摘要: 分析牡蛎肽、大豆肽、胶原肽和紫苏籽肽的氨基酸组成, 并研究牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽以不同比例复配作用于小鼠睾丸间质细胞(TM3)分泌睾酮、二氢睾酮等雄性激素的影响, 筛选适合改善性功能的低聚肽组合。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法测定牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对TM3细胞存活率的影响, 酶联免疫吸附法检测睾酮、二氢睾酮、环磷鸟苷(cGMP)的含量, 硝酸盐还原酶法检测一氧化氮(NO)的含量, WST-8法检测超氧化物歧化酶(SOD)活力、硫代巴比妥酸法检测丙二醛(MDA)浓度。结果表明, 四种低聚肽富含精氨酸, 尤其紫苏籽肽的精氨酸含量最高为10.02%; 较对照组, 牡蛎肽和紫苏籽肽(浓度均为400 μg/mL, 体积2:1)复配效果最好, 对雄性激素睾酮、二氢睾酮、cGMP的促进作用分别是50.64%、143.69%、88.44%; 此外也能提高TM3细胞NO浓度和SOD酶活, 降低TM3细胞MDA浓度, 维持细胞内稳定的氧化环境, 表明牡蛎肽和紫苏籽肽复配促进TM3细胞生成雄性激素, 具有改善男性性功能的作用。

关键词: 牡蛎肽; 睾丸间质细胞; 雄性激素

文章编号: 1673-9078(2021)06-28-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.1074

The Combination of Oyster Peptides, Soybean Peptides, Collagen Peptides, and Perilla Seed Peptides Promotes the Production of Male Hormones in Testicular Stromal Cells

FANG Lei, WANG Yu-chen, MA Yong-qing, ZHANG Hai-xin, LU Lu, WANG Jing, GU Rui-zeng, WEI Ying

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing Engineering Research Center of Protein & Functional Peptides, Beijing 100015, China)

Abstract: The amino acid composition of oyster peptides, soy peptides, collagen peptides and perilla peptides were analyzed. Oyster peptide, soy peptide, collagen peptide, and perilla seed peptide are compounded in different proportions to affect the secretion of testosterone, dihydrotestosterone and other male hormones in mouse leydig cells (TM3) and the oligopeptide combinations were screened for improving sexual function. Tetramethylazolol blue (MTT) colorimetric method was used to determine the effect of oyster peptides, soy peptides, collagen peptides, and perilla peptides on the survival rate of TM3 cells. ELISA was used to detect testosterone, dihydrotestosterone, cyclic GMP (cGMP) content, nitrate reductase method was studied to detect nitric oxide (NO) content, WST-8 method and thiobarbituric acid method were used to detect superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and malondialdehyde (MDA) concentration, respectively. The results showed that the four

引文格式:

方磊,王雨辰,马永庆,等.牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配促进睾丸间质细胞生成雄性激素[J].现代食品科技,2021,37(6): 28-34,+81

FANG Lei, WANG Yu-chen, MA Yong-qing, et al. The combination of oyster peptides, soybean peptides, collagen peptides, and perilla seed peptides promotes the production of male hormones in testicular stromal cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 28-34, +81

收稿日期: 2020-11-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400604)

作者简介: 方磊(1993-), 男, 助理工程师, 研究方向: 功能食品; 共同第一作者: 王雨辰(1990-), 男, 工程师, 研究方向: 食源低聚肽产业化

通讯作者: 魏颖(1981-), 博士, 高级工程师, 研究方向: 功能食品

oligopeptides were rich in arginine, especially the perilla peptide, which had the highest arginine content 10.02%. Compared with the control group, oyster peptide and perilla seed peptide (both at a concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$, volume 2:1) had the best combined effect, and the promotion effects on testosterone, dihydrotestosterone, and cGMP were 50.64%, 143.69%, and 88.44%, respectively. In addition, they can also increase the NO concentration and SOD activity of TM3 cells, and reduce the concentration of TM3 cells; maintain a stable oxidizing environment in the cells. In summary, it is shown that the combination of oyster peptide and perilla seed peptide promotes the production of male hormones by TM3 cells and has the effect of improving male sexual function.

Key words: oyster peptide; testicular mesenchymal cells; androgen

勃起功能障碍(ED)是一个阴茎能否勃起以及能否保持阴茎硬度以达到满意性交的问题,越来越多的男性患有ED,且患病率逐年升高^[1]。阴茎勃起是一个复杂的心理生理过程,本质是一系列神经-血管活动,受到性刺激后,非胆碱能、非肾上腺素能神经末梢会释放神经递质,刺激神经型一氧化氮合酶(nNOS)和海绵体血管内皮细胞上的内皮型一氧化氮合酶(eNOS)催化产生NO,并经过NO/cGMP信号通路的传导,使阴茎海绵体平滑肌松弛,血管扩张充血,促进并维持阴茎勃起^[2,3]。睾酮是机体内主要的循环雄激素,对男性的性别分化和发育、第二性征、生殖道功能和性功能均有重要作用。精子是在睾丸细胞内产生的,生精过程中睾丸内的生精细胞所处的氧化环境与精子的发育和分化密切相关^[4]。目前,临床上有多种治疗ED的方法,如5型磷酸二酯酶抑制剂、手术治疗、真空负压吸引和阴茎假体植入术等多种治疗手段,但这些治疗手段因有较严重的不良反应并不为多数患者所接受^[5-7]。因此,开发针对ED的口服新药物是当前临床治疗的迫切需求,也具有广阔的市场前景。

男性的雄激素主要由睾丸间质细胞分泌,而睾酮作为最主要的雄激素,可以通过剂量依赖的方式促进精子的产生,并改善肌肉质量和增强体力,在维持男性健康方面发挥着重要作用。生物活性肽是由蛋白质经酶解消化制备,一般含有3~20个氨基酸残基,具有不同的生物活性,其活性取决于它们的氨基酸组成及其排列顺序;低聚肽是位于氨基酸和蛋白质之间的片段,由于其分子量较小可不经消化直接被胃吸收,且比游离氨基酸消化更快更多,具有更高的生物效价和营养价值。张亭等研究发现牡蛎低聚肽配伍核桃低聚肽和山药多糖通过增加雄性小鼠附性器官指数,提高NO、睾酮和cGMP含量并降低PDE5水平增强雄性小鼠的性功能^[8];刘瑜等通过实验进一步证明补充牡蛎低聚肽能够通过改善下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)有效防止环磷酰胺(CTX)引起的中老年男性雄激素部分缺乏综合征(PADAM)的形成,显著改善性功能和生殖功能^[9];精氨酸可以合成信号分子NO以及参与某些多胺类物质的合成,而NO和多胺对于

男性勃起功能和精子生成至关重要,补充精氨酸或富含精氨酸的蛋白质可以提高男性的性功能;紫苏籽肽可以有效改善环磷酰胺造成的大鼠生殖损伤状况从而达到改善性功能的作用以及提高大鼠血清中IL-2、IFN- γ 、IgG水平和免疫器官脏器指数可能与紫苏籽肽富含精氨酸有关^[10];此外,据报道鹿角多肽、大豆多肽等具有提高血清睾酮含量和改善运动性低血睾酮的作用^[11]。牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽是经现代酶解技术制备的小分子低聚肽,本文以牡蛎肽为主,然后复配大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽,研究其对睾丸间质细胞雄激素生成的研究,开发具有改善男性性功能的食源低聚肽组合,为低聚肽改善男性性功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽,实验室自制;小鼠睾丸间质细胞(TM3细胞),上海冠导生物工程有限公司;DMEM/F12(1:1)培养基、胎牛血清,美国Gibco公司;胰蛋白酶、缓冲液PBS、青霉素链霉素溶液,碧云天生物技术研究;NO测定试剂盒、SOD测定试剂盒、睾酮测定试剂盒、二氢睾酮测定试剂盒、cGMP测定试剂盒,北京百智生物科技有限公司;西地那非,美国Sigma公司;DMSO,西陇化工股份有限公司。

1.2 仪器与设备

BX53型倒置显微镜,日本奥林巴斯公司;细胞培养箱,美国Thermo公司;SpectraMax® iD5型多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司;Accuri C6型流式细胞仪,美国BD生物科学仪器及软件公司;ESCO AC2-6S1生物安全柜,新加坡艺思高科技有限公司;3K-15型冷冻离心机,德国Sigma公司。

1.3 试验方法

1.3.1 食源性肽的制备

牡蛎肉→水洗→匀浆→加入风味蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解 4 h→灭酶→离心取上清→陶瓷膜过滤→浓缩→活性炭脱色→过滤→灭菌→喷雾干燥→牡蛎肽

大豆分离蛋白→加水混匀→调节 pH 至 8.5 加入碱性蛋白酶酶解 2 h→调 pH 至 7.0 加入中性蛋白酶酶解 2 h→灭酶→离心取上清液→超滤膜超滤→浓缩→灭菌→喷雾干燥→大豆肽

鳕鱼鱼皮→洗净→润涨→绞碎匀浆→调节温度至 55 °C, pH 至 8.5, 加入碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解 3 h→灭酶→离心取上清液→陶瓷膜过滤→浓缩→灭菌→喷雾干燥→胶原肽

将紫苏籽蛋白粉→匀浆→调 pH 至 5.5~6.0→加热至 45~55 °C→加入酸性蛋白酶、中性蛋白酶及木瓜蛋白酶酶解 4 h→灭酶→离心取上清液→陶瓷膜过滤→减压浓缩→硅藻土过滤→灭菌→喷雾干→紫苏籽肽

1.3.2 氨基酸组成分析

依据 GB/T 5009.124 方法, 采用 L-8900 日立全自动氨基酸分析仪对牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽的氨基酸组成进行测定。

1.3.3 分子量分布测定

将样品用流动相溶解后并经孔径 0.2 μm 聚四氟乙烯过滤膜过滤, 然后通过高效液相色谱仪进行凝胶过滤, 根据标准曲线得到样品的分子量分布。

1.3.4 TM3 细胞培养

使用含有 5% HS、2.5% FBS 的 DMEM/F12 (1:1) 培养基, 在 37 °C, 5% CO₂ 及充分饱和湿度的培养箱中培养。根据细胞的实际情况, 2~3 d 换一次液, 待细胞融合至培养皿的 80% 左右时, 弃掉培养瓶中旧培养基, 用 PBS 缓冲液冲洗细胞 2~3 次, 加入适量室温复温的 0.05% 胰酶消化液, 按照 1:3 传代培养。3 次传代后取处于对数期、生长状态良好的细胞用于实验。

1.3.5 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对 TM3 细胞存活的影响

将处于对数生长期的细胞消化后, 用 DMEM/F12 完全培养基 (含 10% FBS 和 1% 青霉素链霉素溶液) 调整细胞密度为 10⁵ 个/mL, 接于 96 孔板, 每孔 100 μL 细胞悬液。于 CO₂ 培养箱中培养 24 h, 细胞单层贴壁后更换 DMEM/F12 不完全培养基, 加入相应浓度复配样品溶液 (牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽浓度均为 400 μg/mL, 分别以体积 1:1、2:1、4:1、8:1 复配, 组别简称为牡大 (1:1)、牡大 (2:1)、牡大 (4:1)、牡大 (8:1)、牡胶 (1:1)、牡胶 (2:1)、牡胶 (4:1)、牡胶 (8:1)、牡紫 (1:1)、牡紫 (2:1)、牡紫 (4:1)、

牡紫 (8:1) 继续培养 24 h, 然后用 MTT 法检测细胞存活率, 计算公式为:

$$\text{存活率}/\% = \frac{OD_{\text{样品}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.3.6 检测指标与方法

分别检测细胞培养上清中 NO (硝酸还原酶法)、睾酮 (竞争 ELISA 法)、二氢睾酮 (竞争 ELISA 法)、及胞内 SOD (WST-8 法)、MDA (硫代巴比妥酸法)、cGMP (竞争 ELISA 法) 产生量, 并用各孔的蛋白总量 (BCA 法) 进行校正, 评价牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽的复配调节 TM3 细胞雄激素生成作用。

1.3.7 统计学处理

实验数据采用 Origin 9.0 软件进行统计学处理, 采用单因素方差分析, 若 t 检验, $p < 0.05$, 则证明数据差异具有显著性。

2 结果

2.1 牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽的氨基酸组成和分子量分布

牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽的氨基酸总量分别为 57.74%、83.81%、85.91%、79.42%, 四种低聚肽都含有较高的精氨酸, 尤其紫苏籽肽中的精氨酸含量最高为 10.02%, 精氨酸对于男性精子的生成具有非常重要的作用, 精氨酸通过精氨酸酶途径和 NO 合成途径参与免疫调控以及精子生成^[12,13]; 有研究报道, 肽的抗氧化活性与其氨基酸组成有关。许多氨基酸具有抗氧化活性^[14,15], 如赖氨酸、亮氨酸、精氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸等; 由表 1 可知, 牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽均含有较高的亮氨酸、丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸等, 可改善细胞内的氧化环境, 睾丸间质细胞的氧化环境对睾酮、二氢睾酮等雄性激素的生成至关重要; 脯氨酸通过其代谢产物 5-吡咯啉羧酸调控细胞增殖和 DNA 合成以及影响促进精子生成的多胺类物质的合成; 牡蛎肽、大豆肽、胶原肽和紫苏籽肽分子量分布如表 2 所示, 4 种肽的分子量 < 1000 u 以下占比分别为 88.54%、92.53%、88.53% 和 91.38%, 有研究显示分子量小于 1000 u 的蛋白水解物更易被人体吸收从而发挥功能活性^[16,17]。

表 1 牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of oyster peptide, soybean peptide, collagen peptide and perill peptide

氨基酸名称	牡蛎肽/%	大豆肽/%	胶原肽/%	紫苏籽肽/%
天冬氨酸(Asp) ¹	6.13	9.74	5.34	7.83
苏氨酸(Thr)	2.56	3.02	2.70	3.00
丝氨酸(Ser)	2.94	4.564	3.25	3.77
谷氨酸(Glu) ²	9.52	18.78	8.94	14.21
甘氨酸(Gly)	4.48	3.20	20.38	3.96
丙氨酸(Ala)	4.40	3.78	8.49	3.95
缬氨酸(Val)	2.58	3.45	1.81	3.81
胱氨酸(Cys)	0.46	1.99	0.72	1.92
甲硫氨酸(Met)	1.49	1.13	1.54	2.21
异亮氨酸(Ile)	2.40	3.26	1.19	2.96
亮氨酸(Leu)	4.13	5.76	2.48	5.46
酪氨酸(Tyr)	2.23	2.79	0.89	3.31
苯丙氨酸(Phe)	1.98	3.98	1.98	4.16
组氨酸(His)	1.32	1.85	1.04	2.44
赖氨酸(Lys)	4.00	5.32	4.66	3.19
精氨酸(Arg)	5.24	6.11	6.94	10.02
脯氨酸(Pro)	1.88	5.09	13.56	3.22

注: 1 天冬氨酸+天冬酰胺; 2 谷氨酸+谷氨酰胺。

表 2 牡蛎肽、大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽的分子量分布

Table 2 Molecular weight distribution of oyster peptide, soybean peptide, collagen peptide, and perilla peptide

肽种类	<140 u/%	140 u~1000 u/%	>1000 u/%	平均分子量/u
牡蛎肽	10.68	77.86	11.39	526.5
大豆肽	7.96	84.57	7.42	460.3
胶原肽	5.60	82.93	11.45	550.2
紫苏籽肽	5.65	85.73	8.59	486.4

2.2 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配

对 TM3 细胞存活率的影响

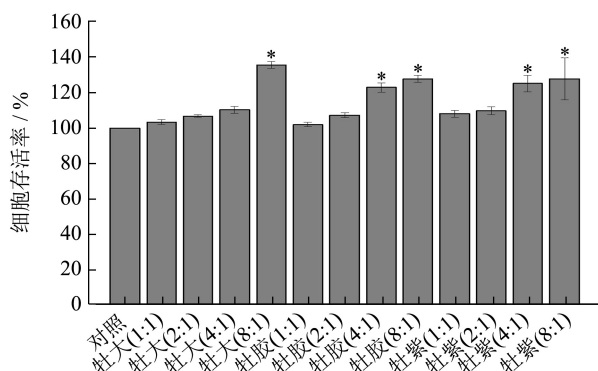


图 1 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对细胞存活的影响

Fig.1 Effect of oyster peptide, soybean peptide, collagen peptide, and perillin on cell survival

从图 1 可以看出, 牡蛎肽+大豆肽 (8:1), 牡蛎肽+紫苏籽肽 (4:1)、(8:1), 牡蛎肽+胶原肽 (4:1)、(8:1) 时能显著促进 TM3 细胞的存活, 对细胞有显著影响 ($p<0.05$), 其存活率在 120%~135%之间, 其余组别均无显著影响, 对细胞无毒性; 所以为保证后续实验的正常进行, 选择配比为: 牡蛎肽+大豆肽 (1:1)、(2:1); 牡蛎肽+紫苏籽肽 (1:1)、(2:1); 牡蛎肽+胶原肽 (1:1)、(2:1) 进行后续实验。

2.3 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配

对 TM3 细胞睾酮和 NO 的影响

TM3 细胞在促黄体生成激素的调节下合成和分泌睾酮, 睾酮合成后, 一方面可以释放到淋巴液, 并转运到曲细精管及附睾, 促进精子发生、成熟; 另一方面, 睾酮进入血流, 周流全身而发挥作用^[18]。此外, 血清中的睾酮可以调节基因, 抑制 PDE5 酶合成, 促

进 NOs 酶、精氨酸酶的产生；NO 是一种非肾上腺非胆碱的神经递质，是引起阴茎平滑肌松弛和血液进入海绵体使之充盈勃起的关键物质^[19,20]；NO 是由一氧化氮合酶（NOS）催化产生的，而 NOS 的底物为左旋精氨酸（L-Arg）；在阴茎组织中，它成为海绵体舒张的重要信使，阴茎勃起的诱导和维持的过程起着决定性作用^[21]。

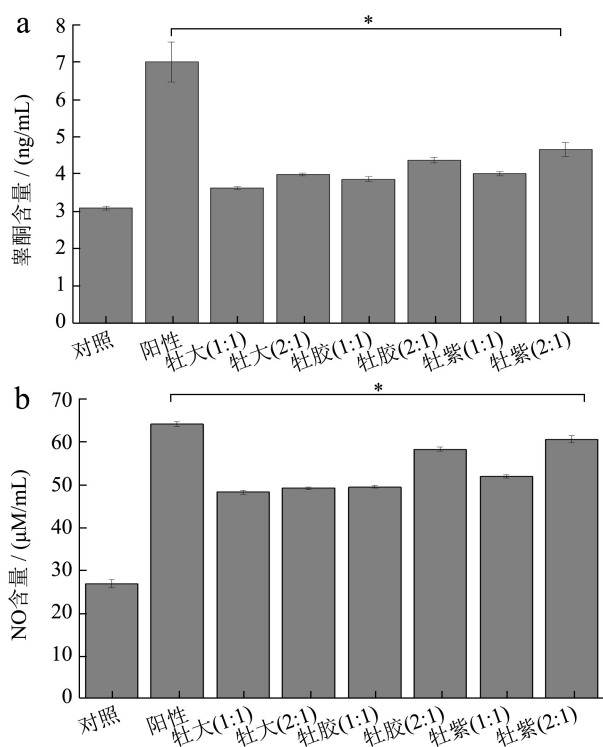


图2 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对 TM3 细胞睾酮 (a) 和 NO (b) 的影响

Fig.2 Effect of oyster peptides, soybean peptides, collagen peptides, and perillin pairs on testosterone (a) and NO (b) in TM3 cells

注：* $p < 0.05$ 与对照组比较，下同。

由图 2 可知，阳性对照西地那非和牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配均能提高 TM3 细胞睾酮的分泌量、增加 TM3 细胞培养上清的 NO 浓度，但其提高 TM3 细胞分泌睾酮和 NO 作用要低于西地那非；与空白对照组相比，牡蛎肽与紫苏籽肽（2:1）复配对睾酮和 NO 促进作用最好，分别提高了 50.64%、125.61%；不同复配组升高睾酮和 NO 水平效果大小排序为：牡蛎肽+紫苏籽肽>牡蛎肽+胶原肽>牡蛎肽+大豆肽。有研究报道，雄性小鼠服用玛咖后血清 NO 浓度提高，阴茎勃起能力加强，勃起时间延长，说明 NO 能刺激阴茎勃起^[19]，对改善性功能有重要作用；曹东等研究表明丽江玛咖正丁醇/水提取物具有提高雄性小鼠性行为的作用，对雄性小鼠睾酮和雌二醇含量无明显影响，说明牡蛎肽与紫苏籽肽复配对睾酮雄

性激素的调节要优于丽江玛咖提取物^[22]。

2.4 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配

对 TM3 细胞二氢睾酮的影响

二氢睾酮是由睾丸间质细胞分泌的一种类固醇激素，是人体内主要的雄激素，与男性第二性征的发育有关。睾酮作为一种激素原，在芳香化酶的作用下可转变为 17β-雌二醇，广泛分布于全身血液中，能够与生精细胞的雄激素受体结合，促进精子的生成；主要作用是维持生精、正常的性欲以及刺激生殖器官的发育，是男性重要的雄性激素。男性未成年时期二氢睾酮分泌不足，就会导致男性第二性征发育不明显，产生小阴茎，小阴囊等病理现象。

由图 3 可知，阳性对照西地那非和牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配均能提高 TM3 细胞二氢睾酮的分泌量，但复配组的促进作用要低于西地那非；复配组升高二氢睾酮水平效果大小排序为：牡蛎肽+紫苏籽肽>牡蛎肽+胶原肽>牡蛎肽+大豆肽，该结果与促进 TM3 细胞分泌睾酮趋势相一致；表明牡蛎肽和紫苏籽肽复配可显著提高血清中睾酮和二氢睾酮雄激素水平，这可能与酪氨酸、丝氨酸、谷氨酸和精氨酸以及支链氨基酸的促睾酮、二氢睾酮分泌活性有关^[10]。

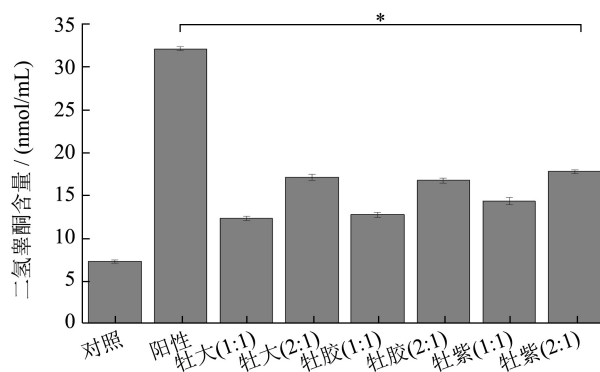


图3 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对 TM3 细胞二氢睾酮的影响

Fig.3 Effect of oyster peptides, soybean peptides, collagen peptides, and perillin pairs on dihydrotestosterone in TM3 cells

2.5 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配

对 TM3 细胞抗氧化活性的影响

精子是在睾丸细胞内产生的，生精过程中睾丸内的生精细胞所处的氧化环境与精子的发育和分化密切相关^[3]。睾丸细胞内良好的氧化环境有利于精子及雄性激素的生成。SOD 酶活力和 MDA 含量是评价机体

抗氧化性常用的两个指标, SOD 是机体内重要的抗氧化酶, 能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质, 如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$, 减少细胞膜受到的损伤。睾丸细胞内的 SOD 酶能够维持细胞正常的氧化环境并调控生精细胞的精子生成。

由表 3 可知, 阳性对照西地那非和牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配均能提高 TM3 细胞的 SOD 酶活力, 相比于对照组, 西地那非组和牡蛎肽与大豆肽 (2:1)、胶原肽 (1:1)、紫苏籽肽 (2:1) 复配分别提升了 165.87%、34.56%、17.83%、87.17%, 增强 TM3 细胞 SOD 酶活效果的顺序为: 牡蛎肽+紫苏籽肽>牡蛎肽+大豆肽>牡蛎肽+胶原肽; 此外, 与对照组相比, 阳性对照西地那非和牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏

籽肽复配均能显著降低 TM3 细胞内的 MDA 浓度, 其中牡蛎肽与紫苏籽肽 (2:1) 降低效果最好, 相比对照组降低了 61.60%, 与西地那非的降低效果 61.99%相近, 说明牡蛎肽与紫苏籽肽复配更有利于稳定 TM3 细胞内的氧化环境; 综上牡蛎肽和紫苏籽肽复配能显著提高 TM3 细胞的 SOD 活力, 增强细胞内的抗氧化能力, 可能与精氨酸对 SOD 活性的激活作用有关; 牡蛎肽和紫苏籽肽复配能减轻脂质过氧化程度, 与牡蛎肽和紫苏籽肽含有的半胱氨酸、精氨酸、亮氨酸等参与自由基消除反应和谷氨酸、精氨酸等通过侧链的螯合作用抑制自由基氧化反应可能有关; 机体内稳定的氧化环境可减轻细胞损伤及线粒体功能障碍, 减少损伤精子膜和 DNA, 有利于维持精子的稳定。

表 3 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对 TM3 细胞中 SOD 酶活、MDA 含量的影响

Table 3 Effects of oyster peptides, soybean peptides, collagen peptides, and perilla peptides on SOD enzyme activity and MDA content in TM3 cells

分组	SOD 酶活性/(U/mg pro)	MDA 浓度/(mmol/mg pro)
对照	4.60±0.15	43.49±1.32
西地那非	12.23±0.28*	16.53±0.48*
牡蛎肽+大豆肽 (1:1)	5.69±0.16*	29.16±1.05*
牡蛎肽+大豆肽 (2:1)	6.19±0.12*	24.20±0.52*
牡蛎肽+胶原肽 (1:1)	5.42±0.11*	25.46±0.56*
牡蛎肽+胶原肽 (2:1)	5.32±0.11*	19.98±0.97*
牡蛎肽+紫苏籽肽 (1:1)	7.32±0.13*	17.99±0.07*
牡蛎肽+紫苏籽肽 (2:1)	8.61±0.20*	16.70±0.84*

注: * $p < 0.05$ 与对照组比较。

2.6 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对 TM3 细胞 cGMP 的影响

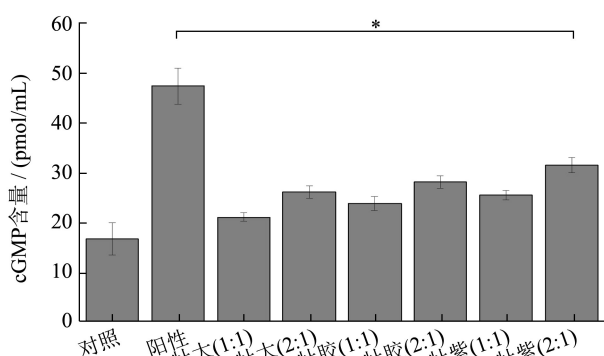


图 4 牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配对 TM3 细胞 cGMP 的影响

Fig.4 Effect of oyster peptide, soybean peptide, collagen peptide, and perillin on cGMP of TM3 cells

阴茎勃起是指由于受到性刺激阴茎海绵体快速充血, 阴茎迅速充血变硬并延伸的现象。副交感神经

中枢通过释放可溶性神经递质 NO 来激活可溶性腺苷酸环化酶, 细胞内的 GTP 转化成 cGMP, cGMP 作为细胞内的第二信使, 可以使细胞内的 Ca^{2+} 浓度降低, 导致细胞内 Ca^{2+} 减少, 海绵体平滑肌舒张, 海绵体内压增加, 同时, 白膜下小静脉被动受压闭塞, 产生勃起^[21]。

由图 4 可知, 阳性对照西地那非和牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配均能促进 TM3 细胞内的 cGMP 含量, 但阳性对照西地那非作用最强; 增强 TM3 细胞 cGMP 含量的顺序为: 牡蛎肽+紫苏籽肽>牡蛎肽+大豆肽>牡蛎肽+胶原肽; 此外, 牡蛎肽与紫苏籽肽 (2:1) 复配提高 TM3 细胞分泌 cGMP 效果最好, 与对照组相比, 提高了近 88.44%, 但促进效果仍低于阳性对照西地那非。

3 结论

本文对牡蛎肽、大豆肽、胶原肽和紫苏籽肽的氨基酸组成进行了分析, 结果表明四种低聚肽都富含精氨酸、尤其紫苏籽肽的精氨酸含量最高为 10.02%; 然

后将牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽(浓度均为400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别以体积1:1、2:1、4:1、8:1)复配作用于小鼠睾丸间质细胞(TM3), 并以西地那非作为阳性对照, 结果发现西地那非和牡蛎肽与大豆肽、胶原肽、紫苏籽肽复配均能刺激 TM3 细胞分泌睾酮和二氢睾酮等雄性激素、提高了 TM3 细胞内的 NO 和 cGMP 含量, 增强了 TM3 细胞内的 SOD 酶活, 显著降低细胞内的 MDA 浓度, 维持了细胞内正常的氧化环境, 有利于雄性激素和精子的生成; 牡蛎肽和紫苏籽肽复配的促进效果最好, 可能与牡蛎肽、紫苏籽肽富含精氨酸有关, 具有改善男性性功能的作用, 为牡蛎肽和紫苏籽肽应用于保健功能食品奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Najari B B, Kashanian J A. Erectile dysfunction [J]. *Jama*, 2016, 316(17): 1838
- [2] 庞磊.高尿酸对雄性小鼠勃起功能和精子的影响[D].青岛: 青岛大学,2018
PANG Lei. The effect of hyperuricemia on erectile function and the sperm of male mice [D]. Qingdao: Qingdao University, 2018
- [3] 徐辉,马光,迟强.尼古丁对大鼠阴茎勃起功能及阴茎海绵体内源性一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)含量的影响[J].中国男科学杂志,2012,26(9):11-16
XU Hui, MA Guang, CHI Qiang. Effects of nicotine on the rat erectile function and penis endogenous nitric oxide (NO) and carbonic oxide (CO) content [J]. *Chinese Journal of Andrology*, 2012, 26(9): 11-16
- [4] Aitken R J, Vernet P. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis [J]. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)*, 1997, 53: 109-118
- [5] Phé V, Roupret M. Erectile dysfunction and diabetes: a review of the current evidence-based medicine and a synthesis of the main available therapie [J]. *Diabetes Metab*, 2012, 38(1): 1-13
- [6] 郝慧瑶,左宏业,张硕,等.五味子醇甲对糖尿病ED大鼠勃起功能的影响[J].河北医科大学学报,2018,39(4):396-400
HAO Hui-yao, ZUO Hong-ye, ZANG Shuo, et al. Effect of schisandrin on the erectile function of diabetic ED rats [J]. *Journal of Hebei Medical University*, 2018, 39(4): 396-400
- [7] Kim H K, Bak Y O, Choi B R, et al. The role of the lignan constituents in the effect of *Schisandra chinensis* fruit extract on penile erection [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(12): 1776-1778
- [8] 张亭,李迪,乌兰,等.牡蛎低聚肽配伍核桃低聚肽和山药多糖对雄性小鼠性功能的影响[J].现代预防医,2018,45(12): 2141-2145
ZHANG Ting, LI Di, WU Lan, et al. Effect of compatibilities of oyster oligopeptides, walnut oligopeptides and yam polysaccharide on sexual function in male mice [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2018, 45(12): 2141-2145
- [9] 刘瑜,张海欣,盛卓娴,等.牡蛎低聚肽对 CTX 诱导的 PADAM 大鼠性功能及生殖功能的干预作用[J].食品工业科技,2020,41(17):302-306
LIU Yu, ZHANG Hai-xin, SHENG Zhuo-xian, et al. Intervention of oyster oligopeptides on sexual and reproductive funtions in PADAM rats induced by CTX [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(17): 302-306
- [10] 李明亮,姜盛,郭颖,等.紫苏籽肽对环磷酰胺致性功能损伤大鼠的改善作用[J].食品科学,2021,42(5):177-186
LI Ming-liang, JIANG Sheng, GUO Ying, et al. Improving effects of perilla seed peptide on cyclophosphamide induced sexual functional impairment in rats [J]. *Food Science*, 2021, 42(5): 177-186
- [11] 陈悦,李路,闫朝阳,等.小分子牡蛎多肽对雄性小鼠性功能的影响[J].基因组学与应用生物学,2019,38(1):109-116
CHEN Yue, LI Lu, YAN Chao-yang, et al. Effects of small molecule polypeptide of oyster on sexual function in male mice [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(1): 109-116
- [12] 王蜀金,陈惠娜,方思敏,等.功能性氨基酸在动物机体内的代谢利用与生理功能[J].家畜生态学报,2014,35(8):6-12
WANG Shu-jin, CHEN Hui-na, FANG Si-min, et al. Metbolism and physiological functional of amino acids in animals [J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2014, 35(8): 6-12
- [13] 汤国祥.氨基酸对动物免疫功能的影响及调节机制研究进展[J].饲养饲料,2016,11(8):65-68
TANG Guo-xiang. Research progress of amino acids' effects on animal immune function and regulation mechanism [J]. *Husbandry and Forage*, 2016, 11(8): 65-68
- [14] Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein [J]. *J Nutr Biochem*, 2000, 11: 128-131

(下转第 81 页)