

# 海参花水提物对环磷酰胺诱导小鼠生殖系统受损的保护作用

刘坤, 高华, 张婕, 石振艳, 刘占涛, 郭锡春(青岛大学药学院, 山东 青岛 266021)

**摘要:** 目的 探讨海参花水提物对环磷酰胺诱导的小鼠生殖系统受损、卵巢早衰的保护作用。方法 昆明♀小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组(戊酸雌二醇  $0.085 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、海参花水提物低、中、高剂量组(分别为  $150, 300, 600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 除空白组每天注射生理盐水外, 其余各组连续 5 d 腹腔注射环磷酰胺  $28 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 造成小鼠生殖系统紊乱, 建立小鼠卵巢早衰模型, 并同时灌胃给予相应药物。放免法检测血清雌二醇含量( $E_2$ )、孕酮(P)含量, 比较各组小鼠间子宫、卵巢、脾、胸腺等脏器重量, 并进行小鼠卵巢、子宫组织形态学观察。结果 连续用药 4 周后, 与模型组相比, 海参花水提物各剂量组均能显著增加小鼠的子宫、卵巢、胸腺等脏器重量( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 显著提高  $E_2$ 、P 含量( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 增加子宫内膜平均厚度( $P<0.01$ ), 改善卵巢形态。结论 海参花水提物可增加子宫内膜厚度, 对卵巢早衰发挥防治作用, 对雌性小鼠生殖系统有一定的保护作用。

**关键词:** 海参花; 环磷酰胺; 卵巢早衰; 生殖系统

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0802-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.007

## Protective Effect of Water Extracts of Sea Cucumber Ovum on Reproductive System of Premature Ovarian Failure Mice

LIU Kun, GAO Hua, ZHANG Jie, SHI Zhenyan, LIU Zhantao, GUO Xichun(School of Pharmaceutical Science, Qingdao University, Qingdao 266021, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To investigate the protective effects of water extracts of sea cucumber ovum on deficiency of the genital system injured by cyclophosphamide. **METHODS** Female Kunming mice were selected and randomly divided into 6 groups included control group, model group, positive group (estradiol valerate  $0.85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and low-, middle-, high-dose sea cucumber ovum group( $150, 300, 600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) with 10 animals in each group, except the control group injected with normal saline, others were injected with cyclophosphamide( $28 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) daily for successive 5 d to induce reproductive system disorders and premature ovarian failure in mice. Detected the level of estradiol( $E_2$ ) and progesterone(P) by radioimmunoassay, all mice were compared the weight of organs, such as uterus, ovarian, spleen, and thymus, observed for the form of uterus and ovarian. **RESULTS** Sea cucumber ovum could increase the weight of organs, such as uterus, ovarian, and thymus gland of mice obviously( $P<0.05, P<0.01$ ), significantly improved the level of  $E_2$  and P( $P<0.05, P<0.01$ ), increased the thickness of endometrial ( $P<0.01$ ), improved the form of ovarian obviously. **CONCLUSION** Sea cucumber ovum can increase the thickness of endometrial, prevent the premature ovarian failure, promote and protect the reproductive system of female mice.

**KEY WORDS:** sea cucumber ovum; cyclophosphamide; premature ovarian failure; reproductive system

海参(sea cucumbers)属于棘皮动物门海参纲, 营养丰富, 富含多种有益于人体健康的生理活性物质, 素有“海中人参”之称<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 海参中含有海参多糖、海参皂苷、脂肪酸和胶原多肽等多种生物活性物质, 具有抗凝血、抗肿瘤、免疫调节、延缓衰老、降血脂等多种生物学活性<sup>[2-3]</sup>。海参卵俗称海参花, 是海参加工过程中产生的废弃物之一。海参卵不仅与海参体壁含有同样丰富的蛋白质和活性物质, 而且许多珍贵营养成分含量更高, 如多糖、钒、核酸、性腺色素、精氨酸等<sup>[4]</sup>。海参肠卵中钒的含量是海参体壁的 3~4 倍。

钒能维持机体正常的糖代谢作用, 有效的防治糖尿病, 还能刺激机体的造血功能, 促进骨骼的造血能力<sup>[5]</sup>。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是目前临床上最为常用的抗肿瘤药之一, 是一种双功能细胞毒性烷化剂。大量研究表明, CP 可致闭经、卵巢纤维化, 导致卵巢功能早衰<sup>[6-7]</sup>。卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指过早绝经, 发生低雌激素和高促性激素状态, 主要是卵巢功能过早衰退或丧失, 性激素分泌减少, 促性腺激素增加, 从而导致植物神经功能紊乱, 免疫功能随

作者简介: 刘坤, 女, 硕士, 教授, 硕导 Tel: (0532)0299121203

E-mail: kunliu62@126.com

之下降<sup>[8]</sup>。POF 对妇女影响极大, 闭经、不孕或提前进入绝经期, 出现出汗、潮热等绝经期症状。目前临床常用性激素替代疗法治疗卵巢早衰, 这种方法不能恢复卵巢周期性功能, 有一定的不良反应, 对患者的身体会造成伤害。

本实验建立小鼠卵巢早衰模型, 以海参花为原料, 采用水溶液超声辅助提取海参花中生物活性物质, 探索海参花水提物对机体激素水平、免疫系统的影响, 研究其对雌性生殖系统的影响, 初步探讨海参花水提物对 POF 的防治作用, 为海参花的开发利用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

昆明小鼠, ♀, 25~30 g, 清洁级, 由山东省鲁抗医药股份有限公司提供, 合格证号为: 0013475。室温(20±5)℃下饲养, 自由饮水和摄食。

### 1.2 试剂与仪器

CP(江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 12031425); 戊酸雌二醇片(法国 DELPHARM lilleS.A.S, 批号: 234A, 规格: 1 mg·片<sup>-1</sup>); 氯化钠注射液 0.9%(辰欣药业股份有限公司, 批号: 1207215121); 孕酮放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所, 批号: 12092112); 雌二醇放射免疫分析药盒(深圳拉尔文生物工程技术有限公司, 批号: 12081308)。

海参花水提物: 称取一定量海参花, 组织匀浆器打碎, 按质量比 1:3 加入蒸馏水, 采用 30℃ 超声波辅助提取 25 min, 30℃ 水浴搅拌提取 2 h, 并以 4 000 r·min<sup>-1</sup> 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, 过滤, 滤液旋蒸浓缩至 1/3 时, 进行冷冻干燥得到海参花水提物。

DK-98-1 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); SK3200H 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司); AR5120 电子天平(奥豪斯国际贸易上海有限公司); 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); B1 系列生物摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); LD4-2A 低速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及模型制备

昆明小鼠 60 只随机分为空白组、模型组、阳性对照组(戊酸雌二醇 0.085 mg·kg<sup>-1</sup>)、海参花水提

物低、中、高剂量组(分别为 150, 300, 600 mg·kg<sup>-1</sup>)。除空白组每天腹腔注射生理盐水外, 其余各组均每天腹腔注射 CP(28 mg·kg<sup>-1</sup>), 连续 5 d 制备 POF 模型。造模期间各用药组同时灌胃给药, 1 次·d<sup>-1</sup>, 连续 4 周。

### 2.2 观察小鼠生存状态

每天观察小鼠身体状况, 并且所有小鼠每周称重一次。

### 2.3 指标检测

所有小鼠末次给药 24 h 后称体质量, 眼球取血, 采集完毕后立即置于 37℃ 水浴中孵育, 2 h 孵育后 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液, 放免法测定血清中孕酮、雌二醇含量。脱颈椎处死, 剖腹取出卵巢、子宫、脾、胸腺, 迅速置分析天平上精密称重, 分别计算脏器指数[脏器指数=脏器重量(mg)/体质量(100 g)]。子宫分上下 2 段, 靠近左侧卵巢那段经 10% 福尔马林固定后, 做成石蜡切片, 采用 HE 染色, 显微镜下用测微尺测量子宫内膜平均厚度。左侧卵巢置于 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 取最大纵切面, HE 染色, 显微镜下观察卵巢形态。

### 2.4 统计学分析

数据用 SPSS 软件计算指标的平均值与标准差, 均用方差分析比较组间差异。

## 3 结果

### 3.1 小鼠生存状况

实验期间, 每组小鼠有 1~2 只死亡, 试验结束后, 模型组小鼠死亡率为 20%, 海参花水提物低、中剂量组为 10%, 其余实验组均为 0, 每组均选用 8 只进行统计分析。空白组小鼠生长情况良好, 平均体质量 4 周后持续增长; 而其余实验组小鼠在给予一定剂量的 CP 后, 1 周后体质量均有减轻; 随着实验的进行, 各给药组小鼠体质量均有不同程度的增长, 海参花水提物高剂量组和阳性对照组效果最显著, 海参花水提物低、中剂量组相对较弱, 而模型组小鼠体质量持续降低, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结果见表 1。

### 3.2 脏器指数比较

与空白组相比, 模型组小鼠的子宫、卵巢、胸腺、脾等脏器指数均明显偏低( $P<0.01$ )。用药各组小鼠脏器指数与模型组相比, 均有明显改善( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 结果见表 2。

### 3.3 血清激素含量与子宫内膜厚度的测定

与空白组相比,模型组小鼠血清中的雌二醇、孕酮含量及子宫内膜厚度均显著降低( $P<0.01$ );而相对于模型组,各用药组小鼠激素含量均有明显改善( $P<0.01$ ),子宫内膜厚度也明显增加( $P<0.05$ ),且海参花水提物高剂量组优于低剂量组。结果见表3。

### 3.4 卵巢切片形态学观察

由卵巢切片形态可知,与空白组相比,模型组小鼠卵巢体萎缩,发育较差,髓质较多,原始卵泡和生长卵泡均明显减少,未见成熟卵泡,部分被纤维组织所代替,颗粒细胞排列不规整。而相对于模型组,用药各组小鼠卵巢体积较大,发育良好,皮质、髓质层次分明,原始卵泡和生长卵泡数量均有所增多,偶见成熟卵泡,颗粒细胞排列较规整,细胞液较丰富。海参花提取物组中

表2 各组小鼠脏器指数( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The organ coefficient of the mice( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	平均体质量/g			
	第1周	第2周	第3周	第4周
空白组	28.87±4.48	29.34±5.04	30.74±3.63	31.25±4.06
模型组	29.03±4.58	28.06±5.67	27.78±5.23 <sup>2)</sup>	26.67±4.45 <sup>2)</sup>
海参花水提物				
低剂量组	29.54±4.31	28.77±4.98	29.46±3.78 <sup>1)</sup>	30.39±5.99 <sup>1)</sup>
中剂量组	29.13±3.54	28.23±4.80	29.15±5.10 <sup>1)</sup>	30.64±3.48
高剂量组	28.97±4.54	28.32±5.24	29.69±4.22 <sup>1)</sup>	30.93±4.46 <sup>1)</sup>
阳性对照组	29.13±3.46	28.43±4.58	29.78±4.30 <sup>1)</sup>	31.15±4.23 <sup>1)</sup>

以中、高剂量效果较显著,结果见图1。

表1 各组小鼠平均体质量( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The weight of the mice( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	平均体质量/g			
	第1周	第2周	第3周	第4周
空白组	28.87±4.48	29.34±5.04	30.74±3.63	31.25±4.06
模型组	29.03±4.58	28.06±5.67	27.78±5.23 <sup>2)</sup>	26.67±4.45 <sup>2)</sup>
海参花水提物				
低剂量组	29.54±4.31	28.77±4.98	29.46±3.78 <sup>1)</sup>	30.39±5.99 <sup>1)</sup>
中剂量组	29.13±3.54	28.23±4.80	29.15±5.10 <sup>1)</sup>	30.64±3.48
高剂量组	28.97±4.54	28.32±5.24	29.69±4.22 <sup>1)</sup>	30.93±4.46 <sup>1)</sup>
阳性对照组	29.13±3.46	28.43±4.58	29.78±4.30 <sup>1)</sup>	31.15±4.23 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较,<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与空白组比较,<sup>2)</sup> $P<0.01$

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with control group, <sup>2)</sup> $P<0.01$

注:与模型组比较,<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与空白组比较,<sup>3)</sup> $P<0.01$

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with control group, <sup>3)</sup> $P<0.01$

表3 各组小鼠血清中雌二醇、孕酮的含量及子宫内膜厚度( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 The levels of estradiol and progesterone in serum and the endometrial thickness of mice( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	雌二醇/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	孕酮/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	子宫内膜厚度/ $\mu\text{m}$
空白组	3.14±0.25	14.12±3.38	394.33±18.81
模型组	1.18±0.13 <sup>3)</sup>	7.03±2.65 <sup>3)</sup>	290.33±46.46 <sup>2)</sup>
海参花水提物			
低剂量组	2.70±0.38 <sup>2)</sup>	10.71±0.92 <sup>1)</sup>	373.67±10.98 <sup>1)</sup>
中剂量组	2.84±0.50 <sup>2)</sup>	11.89±1.96 <sup>2)</sup>	381.67±13.66 <sup>1)</sup>
高剂量组	2.86±0.51 <sup>2)</sup>	12.96±2.63 <sup>2)</sup>	412.50±20.67 <sup>1)</sup>
阳性对照组	3.09±0.23 <sup>2)</sup>	16.22±3.44 <sup>2)</sup>	406.33±12.98 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较,<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与空白组比较,<sup>3)</sup> $P<0.01$

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with control group, <sup>3)</sup> $P<0.01$

## 4 讨论

卵巢功能减退是诱发机体早衰、围绝经期综合征的主要原因。本实验选用CP诱导雌性小鼠卵巢早衰,CP可加速衰老过程,且能引发子宫、卵巢早衰<sup>[9]</sup>。POF主要体现在体积萎缩,功能衰退,卵巢分泌雌激素和孕酮减少,进而引发一系列内

分泌变化和围绝经期症状,子宫的衰老则与卵巢相并行,同时免疫功能随之下降。为防治这些症状的发生,目前临床常采用性激素替代疗法<sup>[10-11]</sup>,这种方法不能恢复卵巢周期性功能,有一定不良反应,因此如何选用一种安全有效的方法,一直是国内外研究的热点。

免疫学学说认为:机体免疫低下是导致衰老及多种老年性疾病的重要原因之一<sup>[12]</sup>。胸腺为机体重要的中枢免疫器官,是T淋巴细胞分化成熟的场所,其功能与免疫密切相关。脾脏为外周免疫器官,机体的细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫都和脾脏有密切关系。胸腺和脾脏的功能都和其质量呈正相关性,且有增龄性萎缩的变化,模型组胸腺、脾脏的变化与此相符。因此,动态监测胸腺和脾脏的质量可用于机体免疫功能的评价。本实验结果显示:各给药组小鼠上述脏器系数均有明显增加,猜测海参花水提物有一定的免疫增强作用。

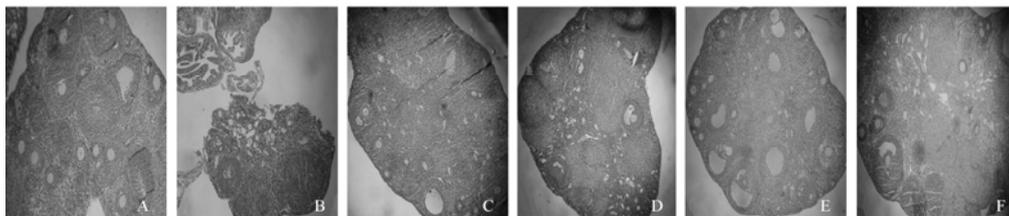


图1 各组小鼠卵巢HE染色切片(HE, 400×)

A-空白组; B-模型组; C-海参花水提取物低剂量组; D-海参花水提取物中剂量组; E-海参花水提取物高剂量组; F-阳性对照组

Fig. 1 Photographs on ovarian by H-E staining (HE, 400×)

A-control group; B-model group; C-low dose of water extract of sea cucumber ovum group; D-middle dose of water extract of sea cucumber ovum group; E-high dose of water extract of sea cucumber ovum group; F-positive drug group

实验结果表明, 海参花水提取物能提高子宫、卵巢脏器指数, 增加子宫内膜厚度, 同时也使卵巢发育良好、卵泡数量增多, 并且在一定程度上提高了血清中雌二醇、孕酮含量。子宫、卵巢脏器指数是评价受试物雌激素效应的常用指标, 均与体内雌激素水平呈正相关。通过卵巢切片发现卵泡发育较模型组明显增强, 提示海参花水提取物对减缓卵巢功能的衰退有一定作用。血清检测显示, 与模型组相比, 海参花提取物能显著提高血清中雌二醇及孕酮含量, 也在一定程度上显示了海参花水提取物的雌激素样作用。

在本次实验中, 发现海参花水提取物能改善雌性小鼠POF、保护小鼠生殖系统, 但是关于海参花的有效组分及其作用机制, 有待于进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] JIANG J, YANG B L, TAI Y. Studies on resources and bioactive substances of sea cucumber [J]. Lett Biotechnol(生物技术通报), 2004, 15(5): 537-540.
- [2] ZHAO Q, WANG J F, XUE R. Comparative study on the components and immune function of three species of sea cucumber [J]. J Fish Sci China(中国水产科学), 2008, 15(1): 154-159.
- [3] ZHOU J Y. Pharmacological research progress of holothurian which was used for the health food materials [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2011, 30(6): 346-348.
- [4] ZHAO H X, ZHOU D Y, QIN L. Optimization of the enzymatic hydrolysis of sea cucumber ovum with response surface method [J]. Food Machin(食品与机械), 2010, 26(5): 114-117.
- [5] JIANG J F, HAO G L. Effect of the vanadium in nutrition [J]. Feed Ind(饲料工业), 2004, 25(6): 29-32.
- [6] LE X Y, XU Z X, SHI L S. Effects of sepia ink polysaccharides on spermatogenesis injured by cyclophosphamide [J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2012, 31(5): 23-26.
- [7] LIU H Z, WANG G, WU J L, et al. Amelioratory effects of sepia ink polysaccharides on partial internal organs injured by cyclophosphamide [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 89-93.
- [8] FANG L, WEI X H, HE Q J. Studies on treatment of menopausal syndrome with angeng capsules [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2006, 41(22): 1741-1744.
- [9] MIAO M S. Experimental Animals and Animal Experimental Techniques(实验动物和动物实验技术) [M]. Beijing: Chinese Medical Press, 1997: 145.
- [10] WANG F, ZHANG Y H, ZUO D Y. Effects of Hongrengui capsules on mouse climacteric syndrome models [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2008, 25(7): 581-585.
- [11] CHEN L, ZHANG T, CHEN J G. Study on the effect of Gengning pills on perimenopausal syndrome in rats [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2012, 32(11): 856-858.
- [12] LI J, LIN L W, XIN Q. Anti-aging effect of green tea polyphenols on D-galactose-induced subacute aging in mice [J]. Food Drug(食品与药品), 2013, 15(2): 106-109.

收稿日期: 2013-11-16