

牡蛎酶解超滤组分对 TM4 小鼠睾丸支持细胞的氧化损伤保护作用

张雪妍¹, 秦小明^{1,2}, 林海生^{1,2}, 曹文红^{1,2},
郑惠娜^{1,2}, 高加龙^{1,2}, 章超桦^{1,2}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东省水产品加工与安全重点实验室/广东普通高等学校水产品深加工重点实验室/国家贝类加工技术研发分中心(湛江)/南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 湛江 524088)

摘要: 该研究通过雷公藤甲素 (TP) 损伤 TM4 细胞构建生殖细胞损伤模型, 探究了香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 酶解超滤组分对 TP 诱导的 TM4 小鼠 (*Mus musculus*) 睾丸支持细胞氧化损伤的保护作用, 并检测了牡蛎酶解超滤组分的分子量分布与微量金属元素含量, 比较分析了各个超滤组分对 TP 诱导的 TM4 细胞存活率以及还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 和活性氧 (ROS) 水平的影响。结果表明, 牡蛎酶解超滤组分富含铜 (Cu)、锌 (Zn)、锰 (Mn) 和硒 (Se) 等微量金属元素; 经超滤分级, 小分子与大分子物质得到有效分离; 与模型组相比, 各个超滤组分均不同程度地提高了经 TP 诱导的 TM4 细胞存活率, 其中 <3、3~5 和 5~10 ku 超滤组分的细胞存活率高于 >10 ku 超滤组分; 而 <3 ku 超滤组分可有效抵抗 TP 诱导的 TM4 细胞氧化应激损伤, 减少细胞内 ROS 产生和脂质过氧化, 增强 TM4 细胞的抗氧化能力。

关键词: 香港牡蛎; 超滤组分; 睾丸支持细胞; 雷公藤甲素; 氧化损伤

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Protective effect of hydrolyzed ultrafiltration fractions from oyster (*Crassostrea hongkongensis*) on oxidative damage of TM4 Sertoli cells

ZHANG Xueyan¹, QIN Xiaoming^{1,2}, LIN Haisheng^{1,2}, CAO Wenhong^{1,2},
ZHENG Huina^{1,2}, GAO Jialong^{1,2}, ZHANG Chaohua^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety/Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution/National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang)/South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In this study, TM4 Sertoli cells were injured by triptolide (TP) to construct a germ cell injury model, so as to explore the protective effect of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) hydrolyzed ultrafiltration fractions on TP-induced oxidative damage of TM4 Sertoli cells in mice (*Mus musculus*). Besides, the molecular mass distribution and trace metal element content of the oyster hydrolyzed ultrafiltration fractions were detected, and the cell viability, GSH content, MDA content and ROS level of TM4 cells induced by TP by ultrafiltration fractions were compared. The results show that the oyster hydrolyzed ultrafiltration fractions are rich in trace metal elements such as copper, zinc, manganese and selenium; most small molecules and macromolecular substances were separated

收稿日期: 2021-03-04; 修回日期: 2021-03-22

资助项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助

作者简介: 张雪妍 (1992—), 女, 博士研究生, 研究方向为海洋功能活性物质。E-mail: 1162742815@qq.com

通信作者: 秦小明 (1964—), 男, 博士, 教授, 从事水产品精深加工、贝类活性物质研究。E-mail: xiaoming0502@21cn.com

by ultrafiltration; compared with the model group, ultrafiltration fractions improved the cell viability of TM4 cells induced by TP. The cell viability of <3, 3–5 and 5–10 ku ultrafiltration fractions was higher than that of >10 ku ultrafiltration fraction; <3 ku ultrafiltration fraction could prevent TP-induced oxidative stress damage in TM4 cells, reduce the production of intracellular reactive oxygen species and lipid peroxidation, and enhance the antioxidant activity of TM4 cells.

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; Ultrafiltration fraction; Sertoli cells; Triptolide; Oxidative damage

近年来男性不育症的发病率呈逐年升高趋势, 调查显示全球 8%~12% 育龄夫妇患有不育症^[1], 其中归因于男性伴侣的占近 50%^[2]。生殖系统疾病^[3]、环境污染^[4-5]、内分泌失调^[6]和药物^[7]引起的生殖损伤均可导致男性不育。睾丸的生殖激素改变^[6]、细胞凋亡^[8]、氧化损伤^[9]和组织结构异常可能是男性生殖功能障碍的机制。睾丸支持细胞作为睾丸生精的“营养细胞”, 为生殖细胞发育、存活和成熟提供微环境, 其所形成的血睾屏障可有效保护生殖细胞免受有毒物质的破坏。因此, 体外研究睾丸支持细胞对物质的敏感性可能是间接衡量这些物质在精子形成中发挥作用的有效途径。雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 中药制剂在临床上长期用于治疗炎症及免疫系统疾病, 而雷公藤甲素 (TP, C₂₀H₂₄O₆) 作为雷公藤的药理和毒性作用的主要有效成分^[10], 其副作用中发生率最高的是生殖毒性^[11]。TP 摄入过多会导致睾丸萎缩、激素合成代谢紊乱及精子活力下降等^[11-12]。研究表明, TP 可降低 TM4 小鼠睾丸支持细胞存活率、增加细胞活性氧 (ROS) 蓄积并诱导细胞凋亡途径的激活^[13]。因此, TP 的生殖毒性极大限制了其临床应用。

香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*), 俗称生蚝, 因其肉质鲜美, 富含蛋白质、糖原、氨基酸、脂肪酸和无机盐等^[14], 被冠以“海洋牛奶”的美称^[15]。牡蛎已被我国卫生部批准为药食两用材料^[16]。牡蛎肉提取物具有抗氧化^[17]、增强机体免疫^[18]、抗疲劳^[19]、抗皮肤光老化^[20]、降血压^[21]、降血糖^[22]、醒酒护肝^[23]和生殖保健^[24]等多种生物活性。研究表明, 小分子牡蛎多肽可提高小鼠血清性激素水平及其精子质量^[25]。Li 等^[26]发现近江牡蛎 (*Ostrea rivularis*) 多糖可抑制过氧化氢 (H₂O₂) 诱导的 TM4 细胞氧化应激水平, 改善环磷酰胺所致小鼠睾丸组织损伤, 提高精子存活率并减少精子畸形。可见牡蛎肉提取物具有改善雄性生殖功能的潜能, 但其有效成分、作用机理尚不明确。本研究以香港牡蛎为原料, 以 TM4 小鼠 (*Mus musculus*) 睾丸支持细胞株为研究对象, 探究牡蛎酶解超滤组分

对 TP 诱导的 TM4 小鼠睾丸支持细胞氧化损伤的保护作用, 在细胞水平上探讨牡蛎酶解超滤组分对 TP 抗生育作用的减毒效果, 以期为研发以牡蛎为原料的改善男性生殖健康的保健功能食品提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜香港牡蛎购于湛江海鲜批发市场, 动物蛋白酶 (酶活力 3×10^4 U·g⁻¹) 购于广西南宁庞博生物有限公司, DMED/F12 培养基购自 Gibco 公司, 马血清、青/链霉素双抗购自 HyClone 公司, 噻唑兰 (MTT) 购自 Genview 公司, TP (纯度>98%) 购自美伦生物技术有限公司, 还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定试剂盒和丙二醇 (MDA) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, ROS 检测试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物研究所, 小鼠睾丸支持细胞株 (TM4) 购于广州赛库生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

XX42PMINI 超滤装置 (美国 Milipore 公司); Lynx6000 高速落地离心机 (美国 Thermo 公司); R-1005 旋转蒸发仪 (郑州长城科工贸有限公司); 1200 型半制备高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 7500cx 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS, 美国 Agilent 公司); HHT4-LX-C50L 型立式压力蒸汽灭菌器 (北京中西远大科技有限公司); CKX41 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州净化有限公司); Forma 370 型二氧化碳 (CO₂) 恒温箱 Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo 公司); 5810R 型高速台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 牡蛎酶解产物超滤组分的制备 取新鲜牡蛎肉, 经洗净、沥干, 然后按料水质量体积比 1 : 3 (g·mL⁻¹) 加入预冷的蒸馏水, 高速匀浆, 按照酶活和底物 1 000 : 1 (U·g⁻¹) 的比例加入动物蛋

白酶^[27], 酶解液沸水浴灭活 10 min, 冷却至室温, 最后以 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 取上清液, 并对其进行超滤分级, 利用超滤装置及 3、5、10 ku 超滤膜对酶解液进行分级处理, 进口压力控制在 60 psi, 得到 <3、3~5、5~10 和 >10 ku 4 个超滤组分, 收集各个组分, 冷冻干燥备用。

1.3.2 牡蛎酶解产物超滤组分的分子量分布测定 参考 Li 等^[28] 的测定方法, 通过高效凝胶过滤色谱法测定牡蛎酶解超滤组分的分子量分布。使用蛋白分析色谱柱 Waters Protein-pak 60A (WAT085250), 流动相浓度为 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液。将洗脱速度控制在 $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 设置柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 检测波长 214 nm, 每次进样 20 μL 。

1.3.3 牡蛎酶解产物超滤组分的微量金属元素测定 铜 (Cu)、锌 (Zn)、锰 (Mn)、硒 (Se) 微量金属元素按照 GB/T 5009.268—2016, 采用微波消解-电感耦合等离子体质谱法进行测定。

1.3.4 TM4 细胞的培养 TM4 细胞在 D-MEM/F-12 培养基 (体积分数 92.5%) 中培养, 该培养基补充有体积分数 5% 马血清和体积分数 2.5% 优质胎牛血清, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养 [体积分数 5% CO_2 , 湿度 95%]。当细胞融合至 80%~90% 时, 用胰酶消化, 按照 1:3 的比例进行传代培养, 选择对数生长期的细胞进行实验。

1.3.5 牡蛎酶解超滤组分对 TM4 细胞生长的影响

将 TM4 细胞浓度稀释至 $1\times 10^4\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[29], 按每孔 200 μL 接种至 96 孔板, 待细胞生长到融合状态, 小心吸出培养基, 每孔加入 20 μL 含不同质量浓度 (0、50、100、250、500、1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的牡蛎酶解超滤组分 (<3、3~5、5~10 和 >10 ku), 每组设置 6 个平行, 并分别培养 12 和 24 h。培养结束后, 用磷酸缓冲液 PBS 配置 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 噻唑蓝 (MTT) 溶液, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 并将培养板温育 4 h。小心吸走上清液, 向每孔中加入 100 μL DMSO, 然后摇动 10 min。用酶标仪测量上清液的吸光度值 (测定波长 570 nm)。以不加牡蛎酶解超滤组分为空白对照组, 按式 (1) 计算细胞存活率 (%)。

$$R = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为细胞存活率; A_0 为空白对照组上清液的吸光度; A_1 为实验组上清液的吸光度。

1.3.6 TP 对 TM4 细胞生长的影响 同 1.3.5 的方

法, 将牡蛎酶解超滤组分换成不同浓度的 TP (0、125、250、500、1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[13]。以不加 TP 为空白对照, 按式 (1) 计算细胞存活率。

1.3.7 牡蛎酶解超滤组分对 TP 诱导 TM4 细胞毒性的保护作用 将 TM4 细胞浓度稀释至 $1\times 10^4\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按每孔 200 μL 接种至 96 孔板, 待细胞生长至融合状态时, 弃掉旧培养基, 设置空白对照组 (加入同等体积培养液); TP 模型组 ($500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$); 牡蛎酶解超滤组分 + TP 实验组 (加入不同质量浓度的牡蛎酶解超滤组分), 质量浓度分别为 50、100、250、500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 细胞孵育 6 h/12 h 后小心吸出培养液, 除空白对照组外均加入含 TP 的无血清培养液, TP 终浓度为 $500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 孵育培养箱中培养 24 h, 采用 MTT 法测定吸光度值, 计算牡蛎酶解超滤组分对 TP 所致 TM4 细胞存活率的变化量, 每组设定 6 个复孔。

1.3.8 牡蛎酶解超滤组分对 TP 诱导 TM4 细胞的氧化应激损伤的生化检测 将 TM4 细胞浓度稀释至 $1.5\times 10^4\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按每个 5 mL 体积接种至 60 mm 培养皿中, 待细胞生长至融合状态时, 进行分组。实验组加入不同质量浓度的牡蛎酶解超滤组分, 质量浓度分别为 50、100、250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 空白对照组和 TP 模型组加入不含样品的培养基, 细胞孵育 12 h 后小心吸出培养液, 除空白对照组外均加入含 TP 的无血清培养液, TP 终浓度为 $500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 孵育培养箱中培养 24 h。细胞经过不同样品和 TP 处理后, 收集细胞进行各指标的测定^[30]。分别用试剂盒提供的方法测定细胞内 GSH 和 MDA 含量。通过 BCA 蛋白测定试剂盒确定相应的样品蛋白质含量。

1.3.9 活性氧试剂盒检测 ROS 的生成 将 <3 ku 超滤组分在不同浓度下提前与 TM4 细胞培养 6 h 后, TP ($500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 TM4 细胞造模 3 h^[29]。细胞培养达到测定时间, 按试剂盒说明将 DCFH-DA 工作液采用无血清培养基稀释, 使其终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。去除含样品的培养基, 每孔加入 DCFH-DA 稀释液 500 μL , 避光孵育 45 min。采用无血清培养基洗涤细胞 5 次, $2\text{ min}\cdot\text{次}^{-1}$ 。细胞采用倒置荧光显微镜拍照并保存, 同时采用多功能酶标仪检测细胞荧光值。

1.3.10 数据统计分析 采用 Excel 2016、Origin 2018、SPSS 19.0 软件对数据进行分析处理, 用 LSD 多重比较和 t 检验进行差异显著性分析 ($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 牡蛎酶解超滤组分分子量分布

超滤作为一种初步分离手段, 具有操作便利、节省材料、保留样品活性等优点。分子量分布测定可有效评价超滤分级的分离效果。 $>10\text{ ku}$ 超滤组分中 $>10\text{ ku}$ 的成分占 67.96%, $<3\text{ ku}$ 超滤组分中 $<3\text{ ku}$ 的小分子物质占 57.48%, 各个超滤组分中, 随着分子量的降低, $<3\text{ ku}$ 的小分子物质占比不断升高, $>10\text{ ku}$ 的大分子物质占比不断降低 (表 1), 表明通过超滤分级将大分子物质和小分子物质进行了有效分离。而在牡蛎酶解产物中, $3\sim5\text{ ku}$ 和 $5\sim10\text{ ku}$ 2 个分子量区间的物质占比较低, 因此分离难度较大。

表1 超滤膜分级后不同分子量区间的成分占各超滤组分的比值
Table 1 Ratio of different molecular mass ingredients to each ultrafiltration fraction after ultrafiltration membrane classification %

超滤组分 Ultrafiltration fraction/ku	分子量 Molecular mass			
	<3	$3\sim5$	$5\sim10$	>10
>10	25.97	1.44	4.63	67.96
$5\sim10$	36.32	1.29	8.54	53.84
$3\sim5$	46.79	1.26	10.42	41.53
<3	57.48	2.65	9.17	30.72

本研究选取的原料、酶解工艺和超滤分级方法均参照笔者课题组前期研究^[27], 前期研究对牡蛎酶解产物及其超滤组分的基本成分分析发现, 牡蛎酶解粉中蛋白质 (41.26%) 和糖类 (50.07%) 为主要组成成分, 而经过超滤分级, $<3\text{ ku}$ 超滤组分的蛋白质比例达 72.3%^[27], 结合分子量分布结果, 说明 $<3\text{ ku}$ 超滤组分中的主要成分为小分子肽和游离氨基酸。

2.2 牡蛎酶解产物超滤组分的微量金属元素含量

各个牡蛎酶解超滤组分富含 Cu、Zn、Mn、Se 等微量金属元素 (表 2)。其中, Zn 是影响男性生育的重要营养物质, 精浆和前列腺中均具有高浓度的 Zn。精液中适量的 Zn 对精子产生与维持精子正常形态、数量、功能均至关重要^[31]。此外, 睾丸的发育和类固醇生成都离不开 Zn 的参与, 在性腺功能低下、少精症、弱精症和无精子症患者体内常见 Zn 缺乏。牡蛎中 Zn 含量高于其他食物, 质量分数一般为 $61.33\sim616.98\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[32], 而 <3 、

$3\sim5$ 和 $5\sim10\text{ ku}$ 超滤组分中 Zn 质量分数分别高达 $3\,019$ 、 $2\,998$ 和 $3\,128\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。 <3 、 $3\sim5$ 和 $5\sim10\text{ ku}$ 超滤组分中 Cu、Zn、Mn 的质量分数均高于 $>10\text{ ku}$ 超滤组分, 说明小分子物质与金属元素的结合效率更高, 更易富集金属元素。本研究也发现, 牡蛎中的 Zn 可与牡蛎肉中的蛋白质和氨基酸结合, 而牡蛎肉中占比较高的谷氨酸 (Glu)、亮氨酸 (Leu)、精氨酸 (Arg) 和天冬氨酸 (Asp) 表现出很强的金属结合亲和力^[33]。

表2 牡蛎超滤组分微量金属元素质量分数
Table 2 Mass fractions of trace metal elements in oyster ultrafiltration fractions $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

超滤组分 Ultrafiltration fraction/ku	铜 Cu	锌 Zn	锰 Mn	硒 Se
>10	771	2 701	19.7	3.96
$5\sim10$	1 918	3 128	28.3	3.69
$3\sim5$	1 952	2 998	25.4	4.08
<3	1 928	3 019	22.0	3.47

2.3 牡蛎酶解超滤组分对 TM4 细胞生长的影响

为确保本研究中牡蛎酶解超滤组分在质量浓度范围内对 TM4 细胞存活率不存在抑制作用, 将细胞与各质量浓度的牡蛎酶解超滤组分 (<3 、 $3\sim5$ 、 $5\sim10$ 和 $>10\text{ ku}$) 孵育 12 和 24 h, 通过 MTT 法测定细胞存活率。结果显示, 分别作用 12 和 24 h 后, 在 $1\,000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内, 与空白对照组相比, TM4 细胞存活率均有不同程度的增加 ($P<0.05$, 图 1), 说明各牡蛎酶解超滤组分对 TM4 细胞均无细胞毒性作用。

2.4 TP 对 TM4 细胞生长的抑制作用

已有研究表明 TP 具有较强的生殖毒性作用, 而睾丸支持细胞作为维持睾丸微环境、组成血睾屏障的主要功能细胞, 对有毒物质和药物十分敏感^[13]。用不同浓度 (125、250、500 和 $1\,000\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) TP 处理 TM4 细胞 24 h, 随着 TP 浓度增加, TM4 细胞存活率呈剂量依赖性降低, 与空白对照组相比, 各浓度 TP 对 TM4 细胞存活率的影响均差异显著 ($P<0.05$, 图 2)。Wang 等^[13] 研究也表明, TP 以剂量依赖和时间依赖性的方式显著抑制 TM4 细胞的生长, 24 h 的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(669.5\pm269.45)\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据本实验结果及前人^[13,29-30] 的研究方法, 选取 $500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为后续造模损伤浓度。

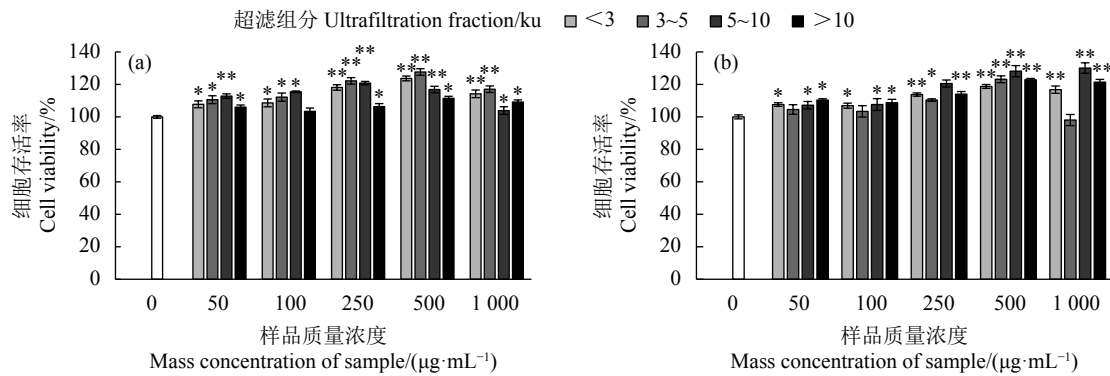


图1 牡蛎酶解超滤组分作用于TM4细胞12 h (a) 和24 h (b) 后的细胞存活率

与空白对照组相比, *. 显著差异 ($P<0.05$); **. 极显著差异 ($P<0.01$).

Figure 1 Cell viability of oyster hydrolyzed ultrafiltration fractions after treatment on TM4 cells for 12 h (a) and 24 h (b) Compared with the control group, *. Significant difference ($P<0.05$); **. Very significant difference ($P<0.01$).

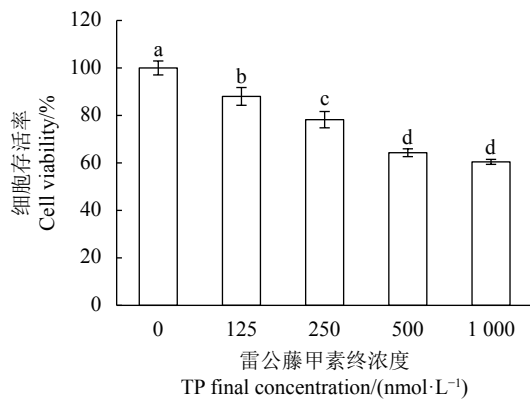


图2 雷公藤甲素对TM4细胞的毒性作用

上标不同字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$); 图3—图5 同此。

Figure 2 Cytotoxic effect of TP on TM4 cells

Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$).

The same case in Figure 3—Figure 5.

2.5 牡蛎酶解超滤组分对 TP 诱导 TM4 细胞毒性的保护作用

牡蛎酶解超滤组分分别预处理 TM4 细胞 6 和 12 h, TP ($500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 TM4 细胞 24 h 进行

毒性损伤, 与 TP 模型组相比, 牡蛎酶解超滤组分各剂量组的细胞存活率均显著提高 ($P<0.05$, 图3), 说明各牡蛎酶解超滤组分对 TP 损伤后 TM4 细胞的活力均具有保护作用, 且呈现较好的剂量依赖性。其中, $<3 \text{ ku}$ 超滤组分在 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内各个剂量组的细胞存活率均具有显著性差异 (图3-b); 在 250 和 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作用下, <3 、 $3\sim 5$ 和 $5\sim 10 \text{ ku}$ 超滤组分的细胞存活率显著高于 $>10 \text{ ku}$ 超滤组分 ($P<0.05$), 且与空白对照组无显著性差异 ($P>0.05$), 说明 <3 、 $3\sim 5$ 和 $5\sim 10 \text{ ku}$ 3 个超滤组分对 TP 损伤 TM4 细胞活力具有很好的保护效果, 且效果优于 $>10 \text{ ku}$ 超滤组分。研究表明小分子物质更容易被机体利用和吸收, 且具有更高的生物利用率和生物活性^[34], 结合本研究结果, 说明小分子物质对 TP 损伤的 TM4 细胞活力具有更好的保护效果。

研究表明 Zn 具有保护睾丸组织毒性损伤的作用, 可抑制镉、乙醇等生殖毒性物质对生殖细胞的影响^[35-36]。本研究中牡蛎酶解超滤组分中富含

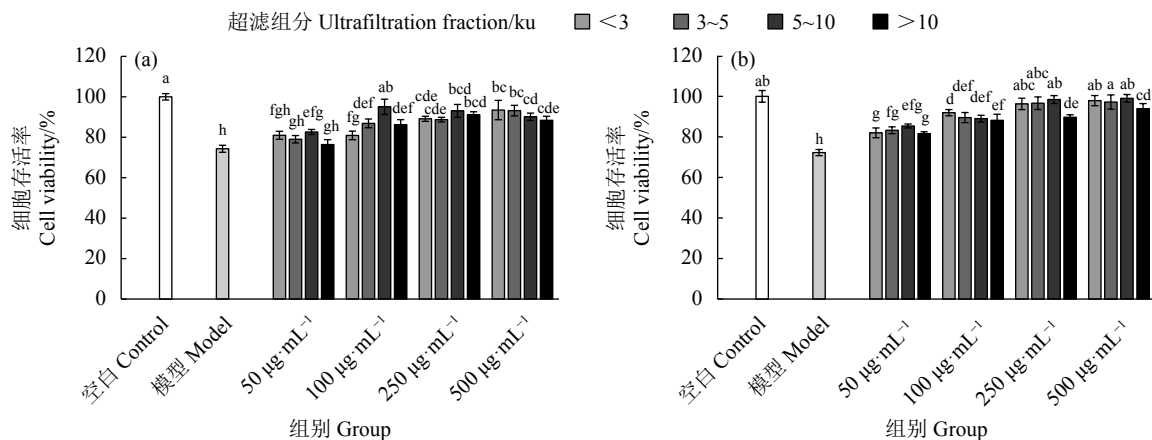


图3 牡蛎超滤组分对雷公藤甲素诱导TM4细胞毒性的保护作用 (预处理时间: a. 6 h; b. 12 h)

Figure 3 Protective effect of oyster ultrafiltration fractions on TP-induced TM4 cytotoxicity (Pretreatment time: a. 6 h; b. 12 h)

Zn, 且<3、3~5 和 5~10 ku 超滤组分的 Zn 含量高于>10 ku 超滤组分, 结合细胞存活率实验结果, 推测牡蛎酶解超滤组分在改善 TP 诱导的 TM4 细胞凋亡过程中 Zn 可能起到了一定的协同作用。

2.6 牡蛎酶解超滤组分对 TP 诱导 TM4 细胞氧化应激损伤的生化检测

GSH 作为一种低分子清除剂, 可有效减少机体的氧化损伤, 是衡量机体抗氧化能力的重要指标。TP 显著降低 TM4 细胞内 GSH 含量, 且具有剂量依赖性 ($P<0.05$, 图 4-a), 说明 TP 作用于 TM4 细胞会降低其细胞内抗氧化能力。

各牡蛎酶解超滤组分对 TM4 细胞的保护效果见图 5。与 TP 模型组相比, 不同质量浓度 (50、100、250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的<3 ku 超滤组分均可显著提高 TM4 细胞内 GSH 含量, 显著抑制 TP 对 TM4 细胞的氧化损伤且呈现剂量依赖性 ($P<0.05$); 此外, <3 ku 超滤组分 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组的 GSH 含量均显著高于其他超滤组分的各个剂量组 ($P<0.05$)。

自由基作用于脂质发生过氧化反应, 生成的终

产物则为 MDA, 其水平反映了机体脂质过氧化的强度和速率, 间接反映了组织过氧化损伤程度, 还可影响细胞线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶活性, 同时加剧细胞膜损伤, 具有细胞毒性。与空白对照组相比, TP 可显著诱导 TM4 细胞中 MDA 含量的升高, 且呈现剂量依赖性 ($P<0.05$, 图 4-b), 说明 TP 作用于 TM4 细胞会显著增加细胞的脂质过氧化程度。

与 TP 模型组相比, 不同质量浓度的各牡蛎超滤组分均不同程度地抑制 TP 对 TM4 细胞的脂质过氧化损伤 (图 5-b)。其中, <3 ku 和 5~10 ku 超滤组分在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用浓度下, 抑制细胞内脂质过氧化效果最显著 ($P<0.05$), 且与空白对照组无显著性差异, 而在 50 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下, <3 ku 超滤组分抑制效果优于 5~10 ku ($P<0.05$)。

综上, <3 ku 超滤组分在各超滤组分中对 TM4 细胞抗氧化损伤的活性最强。刘姝等^[37]和林海生^[38]研究也表明, 牡蛎酶解液中抗氧化活性物质主要集中于<3 ku 的小分子活性肽, 而相关研究也

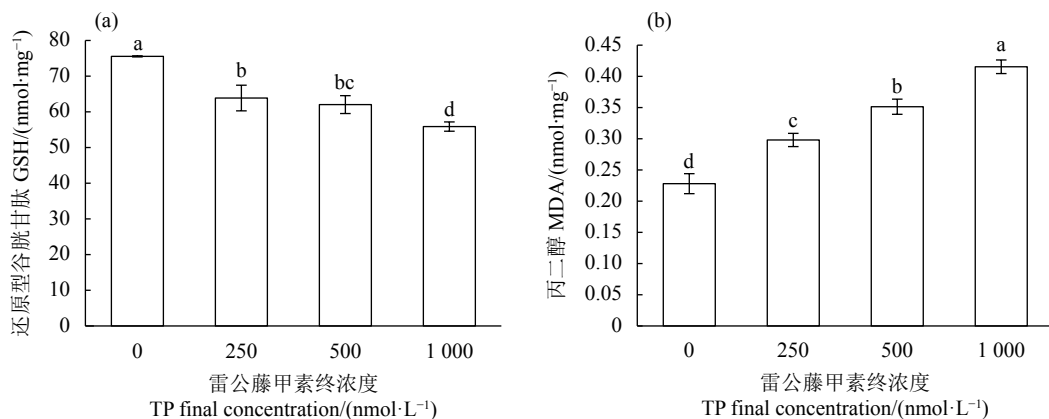


图4 雷公藤甲素对TM4细胞内还原型谷胱甘肽和丙二醇含量的影响

Figure 4 Effect of TP on GSH and MDA content in TM4 cells

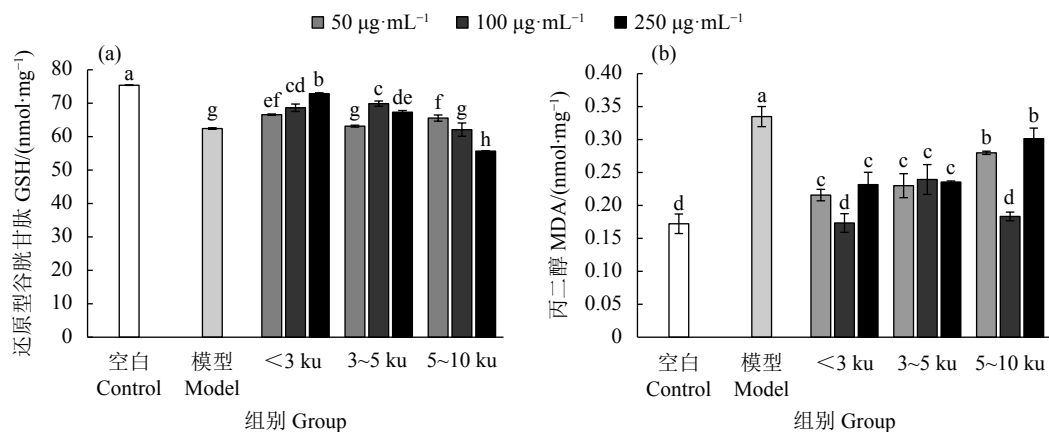


图5 牡蛎超滤组分对雷公藤甲素诱导TM4细胞内还原型谷胱甘肽和丙二醇含量的影响

Figure 5 Effect of oyster ultrafiltration fractions on GSH and MDA content in TM4 cells induced by TP

表明 TP 主要通过诱导 TM4 细胞氧化应激导致细胞凋亡^[29], 因此<3 ku 超滤组分中对 TP 起主要拮抗作用的可能是具有抗氧化活性的小分子活性肽。

2.7 牡蛎酶解超滤组分对 TP 诱导 TM4 细胞内活性氧水平的影响

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 是指化学性质活泼的具有含氧基团的化合物。有研究表明, TP 对睾丸支持细胞的毒性作用机制与 ROS 的过量产生和抗氧化防御系统的失活有关^[30]。ROS 的过度积累或持续存在会导致线粒体功能障碍, 释放细胞色素 C 进入细胞质, 从而导致细胞凋亡。TP 可通过增加氧化应激水平产生毒性作用。活性

氧水平与细胞分化以及精子发生的生理过程密切相关, 而活性氧水平的异常升高会导致生精细胞凋亡, 影响正常的生精过程^[39]。根据细胞内 GSH 和 MDA 含量测定结果, 对<3 ku 超滤组分提前预处理 TM4 细胞 6 h 后, TP (500 nmol·L⁻¹) 作用 TM4 细胞造模 3 h, 如 DCFH-DA 检测所证实, 在 TP 暴露下细胞内 ROS 水平显著增加, 但经<3 ku 超滤组分预处理的各个剂量组, 与 TP 模型组相比, 可显著抑制 TP 诱导的 ROS 积累 (图 6 和图 7)。本实验结果表明, <3 ku 超滤组分可抑制过量 ROS 的生成, 为其减少睾丸组织的氧化损伤提供实验依据。

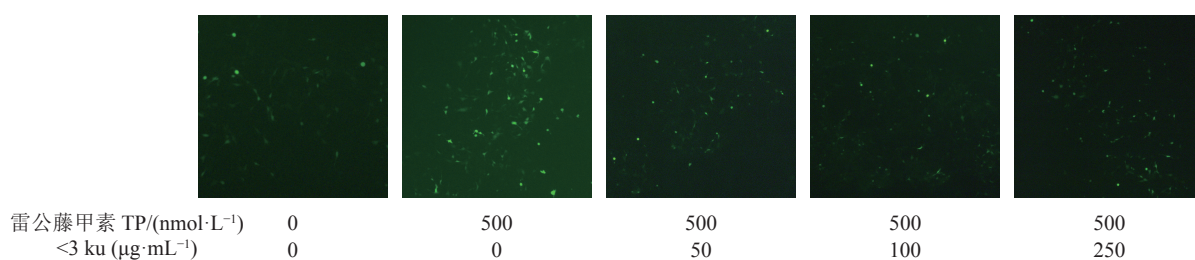


图6 DCFH-DA探针法检测TM4睾丸支持细胞内活性氧 (200×)

Figure 6 Intracellular ROS in TM4 Sertoli cells indicated as green fluorescence by DCFH-DA

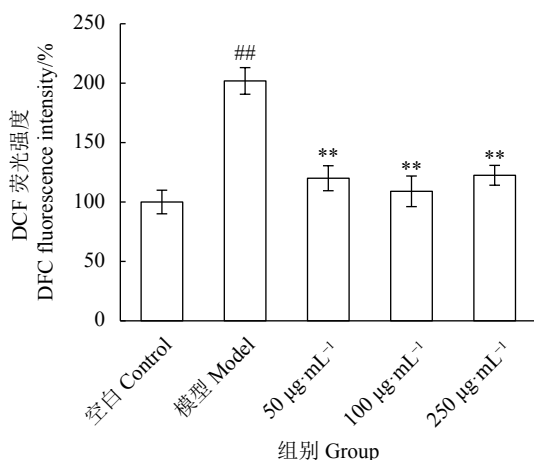


图7 <3 ku牡蛎超滤组分对雷公藤甲素诱导TM4细胞内活性氧水平的影响

与模型组相比, * 显著差异 ($P<0.05$); ** 极显著差异 ($P<0.01$); 与空白对照组相比, # 显著差异 ($P<0.05$); ## 极显著差异 ($P<0.01$).

Figure 7 Effect of <3 ku ultrafiltration fractions from oyster on TP-induced reactive oxygen species in TM4 cells

Compared with the model group, * Significant difference ($P<0.05$); ** Very significant difference ($P<0.01$). Compared with the control group, # Significant difference ($P<0.05$); ## Very significant difference ($P<0.01$).

3 结论

本研究通过 TP 损伤 TM4 细胞构建生殖细胞

损伤模型, 探究了牡蛎酶解超滤组分对 TP 诱导的氧化损伤的保护作用。结果表明, <3 ku 超滤组分可有效抵抗 TP 对 TM4 小鼠睾丸支持细胞的毒性损伤, 提高细胞存活率, 减少细胞内 ROS 的产生和脂质过氧化, 增强 TM4 细胞的抗氧化能力。本研究也提示小分子量的牡蛎酶解产物可用于抗生殖毒性损伤的保健食品利用和开发。在此基础上, 还有待通过动物模型来验证<3 ku 超滤组分对 TP 诱导的生殖损伤的保护作用及相关机制。

参考文献:

- [1] WILLEM O, IAN C, SILKE D, et al. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(6): 605-621.
- [2] JAROW J P, SHARLIP I D, BELKER A M, et al. Best practice policies for male infertility[J]. Fertil Steril, 2002, 77(5): 873-882.
- [3] LEE P A, HOUK C P. Cryptorchidism[J]. Curr Opin Endocrinol, 2013, 20(3): 210-216.
- [4] LI X, YAO Z, YANG D, et al. Cyanidin-3-O-glucoside restores spermatogenic dysfunction in cadmium-exposed pubertal mice via histone ubiquitination and mitigating oxidative damage[J]. J Hazard Mater, 2019, 387: 121706.
- [5] BUDIN S B, KHO J H, LEE J H, et al. Low-dose nicotine exposure induced the oxidative damage of reproductive organs and altered the sperm characteristics of adolescent male rats[J].

- Malays J Med Sci, 2017, 24(6): 50-57.
- [6] NI F D, HAO S L, YANG W X. Molecular insights into hormone regulation via signaling pathways in Sertoli cells: with discussion on infertility and testicular tumor[J]. Gene, 2020, 753: 144812.
- [7] ZHAO Y, ZHANG P, GE W, et al. Alginate oligosaccharides improve germ cell development and testicular microenvironment to rescue busulfan disrupted spermatogenesis[J]. Theranostics, 2020, 10(7): 3308-3324.
- [8] CHEN Y, WANG J, CHEN X, et al. Microcystin-leucine arginine mediates apoptosis and engulfment of Leydig cell by testicular macrophages resulting in reduced serum testosterone levels[J]. Aquat Toxicol, 2018, 199: 116-126.
- [9] BISHT S, FAIQ M, TOLAHUNASE M, et al. Oxidative stress and male infertility[J]. Nat Rev Urol, 2017, 14(8): 470-485.
- [10] WANG B, MA L, TAO X, et al. Triptolide, an active component of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook. f., inhibits production of nitric oxide by decreasing inducible nitric oxide synthase gene transcription[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(9): 2995-3003.
- [11] 徐颖, 樊媛芳, 赵元, 等. 近 40 年雷公藤生殖毒性研究概述 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3406-3414.
- [12] HUYNH P N, HIKIM A P S, WANG C, et al. Long-term effects of triptolide on spermatogenesis, epididymal sperm function, and fertility in male rats[J]. J Androl, 2000, 21(5): 689-699.
- [13] WANG Y, GUO S H, SHANG X J, et al. Triptolide induces Sertoli cell apoptosis in mice via ROS/JNK-dependent activation of the mitochondrial pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2018, 39(2): 311-327.
- [14] 代春美, 廖晓宇, 叶祖光. 海洋中药牡蛎的化学成分、药理活性及开发应用 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(3): 471-474, 437.
- [15] 叶知秋. 海鲜食疗养生法 [M]. 长春: 吉林科学出版社, 2004: 98-100.
- [16] 陈必链, 王绍钊, 吴松刚. 牡蛎水提取氨基酸的研究 [J]. 适用技术市场, 1998(4): 25-26.
- [17] HAO G, CAO W, HAO J, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effects of oyster (*Ostrea plicatula* Gmelin) peptides prepared using neutral proteinase[J]. Food Sci Technol Res, 2013, 19(4): 623-631.
- [18] 李婉, 曹文红, 章超桦, 等. 牡蛎酶解产物的组成特点及其体外免疫活性 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 35-42.
- [19] MIAO J, LIAO W, KANG M, et al. Anti-fatigue and anti-oxidant activities of oyster (*Ostrea rivularis*) hydrolysate prepared by compound protease[J]. Food Funct, 2018, 9(12): 6577-6585.
- [20] 吕佳桐, 林海生, 秦小明, 等. 牡蛎及其酶解产物抗皮肤光老化的初步研究 [J]. 南方水产科学, 2021, 17(1): 91-100.
- [21] 邱娟, 沈建东, 翁凌, 等. 利用牡蛎制备 ACE 抑制肽的工艺优化 [J]. 食品科学, 2017, 38(16): 165-172.
- [22] 邓燕群. 牡蛎活性肽及其复合物降血糖作用的研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2015: 27-30.
- [23] ZHANG C, LI X, JING X, et al. Protective effects of oyster extract against hepatic tissue injury in alcoholic liver diseases[J]. J Ocean Univ China, 2014, 13(2): 262-270.
- [24] 张雪妍, 秦小明, 高加龙, 等. 牡蛎酶解工艺优化及其酶解产物对小鼠睾酮分泌的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(3): 96-102.
- [25] 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.
- [26] LI S, SONG Z, LIU T, et al. Polysaccharide from *Ostrea rivularis* attenuates reproductive oxidative stress damage via activating Keap1-Nrf2/ARE pathway[J]. Carbohydr Polym, 2018: 321-331.
- [27] 黄艳球. 牡蛎肉及其酶解产物对半去势雄性大鼠性功能的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019: 12-24.
- [28] LI W, XU C, ZHANG C, et al. The purification and identification of immunoregulatory peptides from oyster (*Crassostrea hongkongensis*) enzymatic hydrolysate[J]. RSC Adv, 2019, 9(56): 32854-32863.
- [29] MA B, ZHANG J, ZHU Z M, et al. Aucubin, a natural iridoid glucoside, attenuates oxidative stress-induced testis injury by inhibiting JNK and CHOP activation via Nrf2 up-regulation[J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153057.
- [30] MA B, ZHANG J, ZHU Z M, et al. Luteolin ameliorates testis injury and blood-testis barrier disruption through the Nrf2 signaling pathway and by upregulating Cx43[J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(10): e1800843.
- [31] SKORACKA K, EDER P, DOBROWOLSKA A. Diet and nutritional factors in male (in) fertility: underestimated factors[J]. J Clin Med, 2020, 9(5): 1400.
- [32] 林海生, 秦小明, 章超桦, 等. 中国沿海主要牡蛎养殖品种的营养品质和风味特征比较分析 [J]. 南方水产科学, 2019, 15(2): 110-120.
- [33] CHEN D, LIU Z, HUANG W, et al. Purification and characterisation of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate[J]. J Func Food, 2013, 5(2): 689-697.
- [34] ZHOU C, HU J, MA H, et al. Antioxidant peptides from corn gluten meal: orthogonal design evaluation[J]. Food Chem, 2015, 187(15): 270-278.
- [35] SADIK N A H. Effects of diallyl sulfide and zinc on testicular steroidogenesis in cadmium-treated male rats[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2010, 22(5): 345-353.
- [36] POURHASSANALI N, ROSHAN-MILANI S, KHERADMAND F, et al. Zinc attenuates ethanol-induced Sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways[J]. Reprod Toxicol, 2016, 61: 97-103.
- [37] 刘姝, 王淑军, 房耀维, 等. 发酵法制备太平洋牡蛎水解液的功能特性及其抗氧化活性 [J]. 水产科学, 2013, 32(11): 641-645.
- [38] 林海生. 牡蛎蛋白肽的酶法制备及其改善小鼠学习记忆功能的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013: 25-32.
- [39] MORIMOTO H, IWATA K, OGONUKI N, et al. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(6): 774-786.