

牡蛎肽对帕罗西汀致雄性小鼠性功能障碍的作用效果及潜在机制

黄倩倩^{1,2}, 吴海英^{1,2}, 秦小明^{1,2}

1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088

2. 国家贝类加工技术研发分中心(湛江)/广东省水产品加工与安全重点实验室/广东省亚热带果蔬加工科技创新中心, 广东 湛江 524088

摘要: 牡蛎肽 (Oyster peptide, OP) 具有多种生物活性, 然而, 其对男性性功能障碍的作用效果仍知之甚少。以牡蛎肽为研究对象, 探讨其对男性性功能障碍的作用效果及其潜在机制。每天灌胃帕罗西汀 (Paroxetine, PRX) 构建雄性小鼠性功能障碍模型, 同时灌胃牡蛎肽 (500 mg·kg⁻¹), 持续 28 d。结果表明: 与模型 (PRX) 组小鼠相比, 牡蛎肽可显著提高雄性小鼠的性能力 ($P<0.05$), 恢复血清性激素水平 ($P<0.01$), 提高阴茎组织一氧化氮 (NO) 含量 ($P<0.01$)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 含量 ($P<0.05$) 和一氧化氮合酶 (NOS) 活性 ($P<0.05$), 并降低磷酸二酯酶-5 (PDE-5) 活性 ($P<0.01$); 同时, 牡蛎肽可增强睾丸标志性酶活性 ($P<0.05$) 和抗氧化能力 ($P<0.01$), 改善精子质量。此外, HE 染色结果显示: 牡蛎肽可恢复小鼠睾丸生精小管内生精细胞的数量与形态, 减少生精小管空泡化现象。综上所述, 牡蛎肽可有效减缓 PRX 导致的雄性小鼠性功能障碍, 推测其对男性性功能障碍具有潜在的保护作用。

关键词: 牡蛎肽; 帕罗西汀; 性功能障碍; 勃起障碍; 性行为

中图分类号: TS 254.1

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effects and potential mechanism of oyster peptide on paroxetine-induced sexual dysfunction in male mice

HUANG Qianqian^{1,2}, WU Haiying^{1,2}, QIN Xiaoming^{1,2}

1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

2. National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang)/Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety/Guangdong Provincial Science and Technology Innovation Center for Subtropical Fruit and Vegetable Processing, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Oyster peptide (OP) has various biological activities. However, its effects on male sexual dysfunction is still poorly understood. In this study, we explored its effects and potential mechanism on male sexual dysfunction. Besides, we established a paroxetine (PRX)-induced sexual dysfunction model by gavaging OP (500 mg·kg⁻¹) in mice for 28 d. The results show that compared with the model (PRX) group, OP could improve the sexual performance of male mice ($P<0.05$), restored serum sex hormone levels ($P<0.01$), increased penile tissue nitric oxide (NO) content ($P<0.01$), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) content ($P<0.05$) and nitric oxide synthase (NOS) activity ($P<0.05$), and decreased phosphodiesterase-5 (PDE-5) activity ($P<0.01$). Meanwhile, OP enhanced testicular marker enzymes activities ($P<0.05$) and antioxidant capacity ($P<0.01$), and im-

收稿日期: 2023-08-08; 修回日期: 2023-09-14

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-49)

作者简介: 黄倩倩 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类活性物质。E-mail: 953025724@qq.com

通信作者: 秦小明 (1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为贝类产品加工以及水产品保活运输等。E-mail: qinxm@gdou.edu.cn

proved sperm quality. In addition, HE staining results show that OP could restore the number and morphology of spermatogenic cells in seminiferous tubules of mice, and reduced the vacuolization of seminiferous tubules. In conclusion, OP can alleviate PRX-induced sexual dysfunction effectively in male mice and has a potential protective effect on male sexual dysfunction.

Keywords: Oyster peptide; Paroxetine; Sexual dysfunction; Erectile dysfunction; Sexual behavior

男性性行为是一个复杂的生理过程,包括性唤起、阴茎勃起、阴茎进入阴道、射精几个环节,其中任何一个环节出现障碍都称之为性功能障碍;而环境因素、生活习惯、心理因素、药物副作用等均有可能导致男性性功能障碍^[1]。而这其中,药物副作用导致的男性性功能障碍需要引起关注。近年来,抑郁症患者比例逐年增加,而抗抑郁药,尤其是5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs),如帕罗西汀(PRX)的临床使用,已被证实会对男性性功能产生不良影响,包括勃起障碍、射精障碍以及性欲异常等,这无疑加大了对抑郁症患者的伤害^[2-3]。虽然磷酸二酯酶-5抑制剂类药物如西地那非(SDF),已被证明可用于治疗勃起功能障碍(Erectile dysfunction, ED),但该药物会给患者带来其他副作用^[4]。因此,亟需寻求一些无毒副作用的天然活性物质替代药物治疗男性性功能障碍。

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、荸荠(*Eleocharis dulcis*)、淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)、洋葱(*Allium cepa* L.)等的植物提取物因富含皂苷、类黄酮、三萜类化合物等生物活性物质,已被广泛应用于治疗男性性功能障碍^[5-9]。近年来,海洋环境中的动植物同样为药物的发现提供了天然化合物库。郑环宇等^[10]研究发现,华贵栉孔扇贝(*Mimachlamys nobilis*)肉及其酶解产物可改善半去势大鼠的生殖能力。Qiong等^[11]研究发现,海带(*Laminaria japonica*)多糖对电离辐射损伤的雄性大鼠生殖系统及性能力均具有良好的恢复效果。此外,红海藻(*Rhodophyta* sp.)对动物的睾丸功能也有增强作用^[12]。海马(*Hippocampus* sp.)活性肽与单环刺缢(*Urechis unicinctus*)活性肽同样被证实可增强男性性功能^[13-14]。由此可见,开发海洋动植物新产品以改善男性性功能障碍具有较大的应用前景与潜力。

牡蛎又称海蛎子、蚝,肉质鲜美,富含蛋白质、氨基酸、多糖、微量元素等营养物质,被冠以“海洋牛奶”的美誉^[15],是我国第一批纳入药食同源的食品之一^[16]。牡蛎肉及其提取物具有改善学习记忆^[17]、抗皮肤光老化^[18]、抗氧化^[19]、改善

睡眠^[20]等生物活性。此外,牡蛎肽(Oyster peptide, OP)还可以促进小鼠睾丸间质细胞睾酮与一氧化氮(NO)的产生^[21],增强疲劳游泳后雄性小鼠的性行为^[22]。本课题组前期研究也发现,牡蛎肉及其酶解产物可以提高半去势大鼠的性能力^[23],促进小鼠睾丸间质细胞的睾酮分泌^[15],且牡蛎水解产物对雷公藤甲素诱导的雄性小鼠睾丸损伤具有潜在的保护作用^[24]。由此可见,牡蛎肽在改善男性性功能活性方面具有较大潜力。但其改善男性性功能障碍的作用效果及机制依然不明确,缺乏足够的理论支持,且关于牡蛎肽对PRX诱导的性功能障碍的作用效果的相关研究尚未见报道。因此,本研究以牡蛎肽为研究对象,以PRX口腔灌胃构建雄性小鼠性功能障碍模型,探讨牡蛎肽对雄性小鼠性功能障碍的作用效果及其可能机制;以期为研发出相关的牡蛎产品提供理论依据,并为抗抑郁药的临床使用提供新方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验原料:牡蛎肽(生产许可证号:SC10616302300695;执行标准:Q/SMN0012S-2021;保质期36个月;产品批号:20220712B),购自海南盛美诺生物技术有限公司澄迈分公司。

实验动物:64只健康的SPF级ICR小鼠[(26±2)g],雌雄各半,购自广州市研成生物科技有限公司。动物许可证号SCXK(京)2019-0010,动物饲养处于无菌环境,温度为22~26℃,湿度为50%~60%,明暗交替12h,自由进食(C60辐照实验鼠维持饲料)和饮水。整个动物实验过程严格按照广东海洋大学动物实验伦理委员会有关规定执行。

实验药品与试剂:盐酸帕罗西汀片(H10950043)购自中美天津史克制药有限公司;枸橼酸西地那非片(H20020527)购自辉瑞制药有限公司;苯甲酸雌二醇注射液(兽药字163232511)、黄体酮注射液(兽药字163231439)均购自上海全宇生物科技(驻马店)动物药业有限公司;小鼠睾酮(Testosterone, T) ELISA试剂盒、小鼠促黄体生成素(Luteinizing

hormone, LH) ELISA 试剂盒、小鼠促卵泡生成素 (Follicle stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒、小鼠雌二醇 (Estradiol, E2) ELISA 试剂盒、小鼠环磷酸鸟苷 (cGMP) ELISA 试剂盒、小鼠磷酸二酯酶 5 (PDE5) ELISA 试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司; NO、一氧化氮合酶 (NOS)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) 购自上海碧云天生物技术有限公司。分子量所用标品: 细胞色素 C (分子量 12384)、抑肽酶 (分子量 6500)、杆菌肽 (分子量 1422)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (分子量 451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (分子量 189), 纯度均 $\geq 95\%$, 均购自 Sigma 公司。17 种氨基酸标准品均购自 Sigma 公司。

仪器与设备: Varioskan Flash 全自动酶标仪 (美国 Thermo 公司); Waters 2695 高效液相色谱仪 (配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站 GPC 软件, 美国 Waters 公司); CKX41 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 正置光学显微镜, 日本尼康; JOYN-SXT-06B 脂肪测定仪 (上海乔跃电子科技有限公司); HX204 水分测定仪 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); KjeltacTM8200kai 凯氏定氮仪 [福斯华 (北京) 科贸有限公司]; 3-550PD 马弗炉 (美国 Neytech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 基本成分测定

按 GB 5009.5—2016 凯氏定氮法测定样品粗蛋白含量; 按 GB 5009.6—2016 索氏抽提法测定粗脂肪含量; 按 GB 5009.3—2016 常压干燥法测定样品水分含量; 按 GB 5009.4—2016 高温灼烧法测定灰分含量; 按 GB/T 9695.31—2008 苯酚-硫酸法测定样品总糖含量。

1.2.2 分子量测定

色谱柱: TSKgel 2000 SWXL 300 mm \times 7.8 mm; 流动相: 乙腈/水/三氟乙酸, 40/60/0.1 (体积比); 检测: UV 220 nm; 流速: 0.5 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

1.2.3 游离氨基酸测定

参照 GB/T 22729—2008《海洋鱼低聚肽粉》测定牡蛎肽游离氨基酸含量。

1.2.4 动物实验

ICR 雄性小鼠适应性喂养 7 d 后随机分为 4 组

($n=8$): 空白组 (CN, 等体积蒸馏水); 模型组 (帕罗西汀, 14 mg \cdot kg⁻¹ PRX); 阳性组 (14 mg \cdot kg⁻¹ PRX+7 mg \cdot kg⁻¹ SDF); 牡蛎肽组 (14 mg \cdot kg⁻¹ PRX+500 mg \cdot kg⁻¹ OP), 对所有实验组小鼠连续口腔灌胃 28 d。帕罗西汀与西地那非的给药剂量参考 Ademosun 等^[25] 的研究。笔者课题组前期研究发现牡蛎酶解产物在 250、500 和 1 000 mg \cdot kg⁻¹ 3 个剂量组中, 中剂量组 (500 mg \cdot kg⁻¹) 对雄性小鼠生殖障碍的保护作用效果最佳^[26]。因此, 参考上述研究结果, 本研究仅选用 500 mg \cdot kg⁻¹ 剂量组, 探讨牡蛎肽在 PRX 导致的性功能障碍中的作用效果。

交配行为实验于末次口腔灌胃结束 60 min 后进行。正式交配前 48 h, 对雌性小鼠肌内注射 0.2 mg \cdot 只⁻¹ 的苯甲酸雌二醇注射液, 于前 4 h 注射 1 mg \cdot kg⁻¹ 的黄体酮注射液, 使雌性小鼠处于动情期^[27]。实验安排在安静、暗红灯光下的房间里, 于晚上 20:00—24:00 进行, 雄性小鼠先置于 30 cm \times 15 cm \times 15 cm 规格的笼中适应 15 min, 随后采用高清摄像头记录, 从雌性小鼠放进笼子起开始记录, 观察并记录前 30 min 的交配行为参数, 包括骑跨潜伏期 (Mount latency, ML, 雌鼠进入笼子至雄鼠第一次出现骑跨行为的时间间隔)、骑跨频率 (Mount frequency, MF, 雄鼠发生骑跨行为的次数)、插入潜伏期 (Intromission latency, IL, 雄鼠首次插入雌鼠阴道的的时间)、插入频率 (Intromission frequency, IF, 从雌鼠进入到实验结束时雄鼠总的插入次数)、射精潜伏期 (Ejaculation latency, EL, 雄性小鼠首次插入至射精的时间间隔)、射精后间隔期 (Post ejaculation interval, PEL, 雄性小鼠射精后至再次插入的时间间隔)^[28]。

实验小鼠末次口腔灌胃结束后禁食不禁水 12 h, 称量并记录各组实验小鼠体质量后摘去眼球取血, 随后分别取出小鼠阴茎、精囊腺、睾丸、心脏、胸腔、脾、肝脏、肾脏、肺并用电子天平精确称量, 计算脏器系数:

$$\text{脏器系数} = \frac{\text{器官质量}}{\text{小鼠体质量}} \times 100\% \quad (1)$$

血清激素水平测定: 取血后, 血液于室温下自然凝固 15 min, 4 $^{\circ}$ C 下 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 取血清; 按照 ELISA 试剂盒说明测定血清中睾酮 (T)、促黄体生成激素 (LH)、促卵泡生成激素 (FSH) 和雌二醇 (E2) 含量。

阴茎组织指标测定：按照试剂盒说明书制备阴茎组织匀浆液，并测定匀浆中蛋白质含量、NO含量、NOS活性、cGMP含量与PDE5活性。

睾丸组织指标测定：按照试剂盒说明书制备右侧睾丸组织匀浆液，并测定匀浆中蛋白质含量、ACP、ALP、LDH、SOD活性以及MDA含量。

睾丸组织病理切片：将小鼠左侧睾丸分别用甲醛固定液固定、包埋、切片、HE染色及采集图像。

精子质量：取小鼠左右附睾于装有生理盐水的EP管中剪碎，摇匀，37℃水浴孵育15min；取一滴稀释液于血球计数板上，在光学显微镜下计数5个方格中的精子数量，每毫升精子数量等于N×稀释倍数×5×10⁴。另取1滴稀释液涂片，观察200个精子，并计数其中有活动能力的精子数以计算精子活率。此外，根据精子快速染色试剂盒说明书对精子进行染色，并使用倒置显微镜观察与捕获染色后的精子图像，并对精子形态进行分析。

$$\text{精子活率} = \frac{\text{活动精子数}}{200} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 数据统计分析

所有数据采用SPSS 27、Excel 2021、GraphPad 9.3软件进行统计分析及绘图，通过单因素方差分析(One-way ANOVA)分析数据， $P < 0.05$ 表示差异显著， $P < 0.01$ 表示差异非常显著， $P < 0.001$ 表示差异极显著，三者均具有统计学意义，所有实验结果均用“平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)”表示。

2 结果

2.1 牡蛎肽基本成分分析

按照国标方法对牡蛎肽基本成分含量进行测定($n=3$)，以干基计，牡蛎肽中粗蛋白质量分数最高(70.61%)，其次是总糖(25.75%)，粗脂肪质量分数仅为6.17%，灰分和水分质量分数分别为5.06%和6.65%，说明牡蛎肽是一种高蛋白低脂肪的物质，具有较高的营养价值。

2.2 相对分子质量分布与游离氨基酸分析

牡蛎肽的相对分子质量分布情况如图1所示，主要集中在<1 000 D，含量高达95.66%，其中<500 D占83.41%，表明该牡蛎肽主要为小分子肽段，具有吸收效率高、能量消耗低的特点^[29]；因此，可以推断该小分子牡蛎肽具有较好的生物利用率。此外，牡蛎肽游离氨基酸中含人体所需的

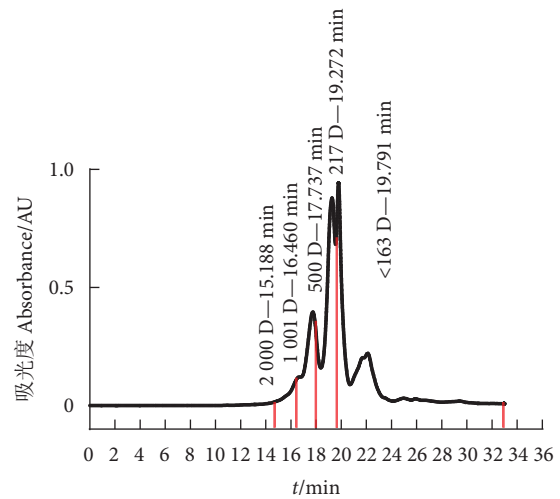


图1 牡蛎肽相对分子质量分布色谱图

Fig. 1 Chromatogram of relative molecular mass distribution of oyster peptides

7种必需氨基酸(表1)，且必需氨基酸在游离氨基酸总量中占比为49.29%，支链氨基酸占比为21.35%，疏水性氨基酸占比为40.71%。适量补充必需氨基酸可在一定程度上促进机体新陈代谢并增强生育能力^[30]，补充支链氨基酸可以提高机体的运动能力、减缓疲劳^[31]。而疏水性氨基酸则具有较强的抗氧化能力^[32]。牡蛎肽游离氨基酸含量及构成说明其具有较高的营养价值。

2.3 牡蛎肽对小鼠交配行为的影响

雄性小鼠交配行为实验结果如图2所示。与CN组相比，PRX组小鼠显著延长了ML、IL、EL与PEL($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)；而经牡蛎肽与SDF干预后，与PRX组相比，雄性小鼠ML、IL与PEL得到了有效缩短($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)，但EL无统计学意义($P > 0.05$)。此外，与CN组相比，PRX组小鼠MF和IF分别显著减少了43.68%和41.54%($P < 0.01$)；而与PRX组相比，PRX+OP组分别使小鼠MF和IF显著提高了57.14%和50.00%($P < 0.01$, $P < 0.05$)，SDF作为阳性药物，同样显著提高了MF和IF($P < 0.05$)。

2.4 牡蛎肽对小鼠脏器系数的影响

由表2可知，与CN组相比，PRX、PRX+SDF与PRX+OP组的内脏系数及阴茎系数均无显著性差异($P > 0.05$)，而PRX+SDF与PRX+OP组的睾丸系数与精囊腺系数，相比PRX组均显著增大($P < 0.01$, $P < 0.05$)。附性腺器官的质量往往与雄性动物的雄激素活性及性能力相关，雄激素对附性腺器官细胞具有增殖增大的作用，即附性腺器官系数的

表 1 牡蛎肽游离氨基酸含量分析
Table 1 Analysis of free amino acid content of oyster peptid

序号 No.	游离氨基酸 Free amino acid	质量分数或含量 Mass fraction or content/%
1	天门冬氨酸 Asp	0.39±0.032
2	苏氨酸 Thr ^①	0.41±0.031
3	丝氨酸 Ser	0.30±0.021
4	谷氨酸 Glu	0.86±0.052
5	脯氨酸 Pro ^②	0.07±0.015
6	甘氨酸 Pro	0.31±0.033
7	丙氨酸 Ala ^②	1.26±0.065
8	胱氨酸 Cys	0.04±0.000
9	缬氨酸 Val ^{①②③}	0.57±0.145
10	蛋氨酸 Met ^{②③}	0.26±0.036
11	异亮氨酸 Ile ^{①②③}	0.76±0.111
12	亮氨酸 Leu ^{①②③}	1.68±0.166
13	酪氨酸 Tyr	0.96±0.030
14	苯丙氨酸 Phe ^{①②}	1.13±0.267
15	赖氨酸 Lys ^①	2.14±0.248
16	组氨酸 His	0.29±0.019
17	精氨酸 Arg	2.68±0.142
	氨基酸总量 Total amino acid, TAA	14.10
	疏水性氨基酸 Hydrophobic amino acid, HAA	5.74
	必需氨基酸 Essential amino acid, EAA	6.95
	支链氨基酸 Branched-chain amino acids, BCAA	3.01
	EAA/TAA (%)	49.29
	BCAA/TAA (%)	21.35
	HAA/TAA (%)	40.71

注: $n=3$; ① 必需氨基酸; ② 疏水性氨基酸; ③ 支链氨基酸。

Note: $n=3$; ① Essential amino acid; ② Hydrophobic amino acid; ③ A branched-chain amino acid.

增大可初步判断样品具有雄激素效应^[33]。本研究发现牡蛎肽在一定程度上增大了睾丸系数与精囊腺系数, 表明牡蛎肽具有雄激素作用, 可通过作用附性腺器官细胞的增殖增大而达到提高雄性小鼠性能力的效果。

2.5 牡蛎肽对小鼠血清性激素的影响

血清性激素水平是评价性能力强弱的关键指标, 如图 3 所示。与 CN 组相比, PRX 组 T、LH、FSH、E2 浓度显著降低 ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.01$,

$P<0.001$), 显然, PRX 的给药干扰了雄性小鼠的性激素水平。而与 PRX 组相比, 牡蛎肽与 SDF 的给药使雄性小鼠的 T、LH 与 FSH 浓度恢复至接近 CN 组水平 ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$)。此外, 与 PRX 组相比, PRX+OP 组可使小鼠 E2 浓度显著升高 ($P<0.01$), 而 PRX+SDF 组 E2 浓度则无统计学意义 ($P>0.05$), 可能是牡蛎肽使雄性动物体内芳香化酶活性增强, 从而使 T 芳香化为 E2, 而 SDF 则无此作用^[34]。

2.6 牡蛎肽对小鼠阴茎组织勃起参数的影响

阴茎组织中的 NO 与 cGMP 含量, 及 NOS 与 PDE-5 活性是雄性阴茎勃起生理过程中的关键因素。由图 4 可知, 与 CN 组相比, PRX 组 NO 含量、cGMP 含量与 NOS 活性显著降低 ($P<0.001$), PDE5 活性显著升高 ($P<0.001$); 由此可见, PRX 的给药导致雄性小鼠阴茎勃起障碍。而与 PRX 组相比, PRX+SDF 与 PRX+OP 组可提高小鼠阴茎组织 NO ($P<0.01$) 与 cGMP 含量 ($P<0.05$), 恢复 NOS 活性 ($P<0.05$), 降低 PDE-5 活性 ($P<0.01$)。说明牡蛎肽可以在 NO/cGMP 信号通路上发挥作用, 从而改善 PRX 导致的勃起功能障碍。

2.7 牡蛎肽对小鼠睾丸组织酶活性及 MDA 含量的影响

ACP、ALP 与 LDH 是睾丸标志酶, 被认为是精子发生及睾丸发育的功能性指标^[24]。当睾丸标志酶活性发生变化时, 睾丸功能及精子发生功能会受到相应影响。由图 5 可知, 与 CN 组相比, PRX 组 ACP、ALP 与 LDH 活性显著降低 ($P<0.01$), 可见 PRX 可导致小鼠睾丸标志酶活性下降。而与 PRX 组相比, 牡蛎肽与 SDF 处理可显著提高 ACP 与 LDH 的活性 ($P<0.01$, $P<0.05$), 但牡蛎肽对 ALP 活性的影响则无统计学意义 ($P>0.05$)。

氧化应激是导致睾丸损伤及雄性动物性能力低下的重要原因, 在 PRX 诱导的雄性小鼠性功能障碍模型中也发现了这一现象。由图 6 可知, PRX 引起脂质过氧化物 MDA 含量显著高于 CN 组 ($P<0.01$), SOD 活性显著低于 CN 组 ($P<0.01$), 可见 PRX 可通过破坏小鼠睾丸组织的抗氧化系统而降低其抗氧化能力。经牡蛎肽处理后, 与 PRX 组相比, MDA 含量显著低于 PRX 组 ($P<0.01$), SOD 活性也得到了显著提高 ($P<0.01$)。说明牡蛎肽可减缓 PRX 引起的睾丸氧化应激损伤。

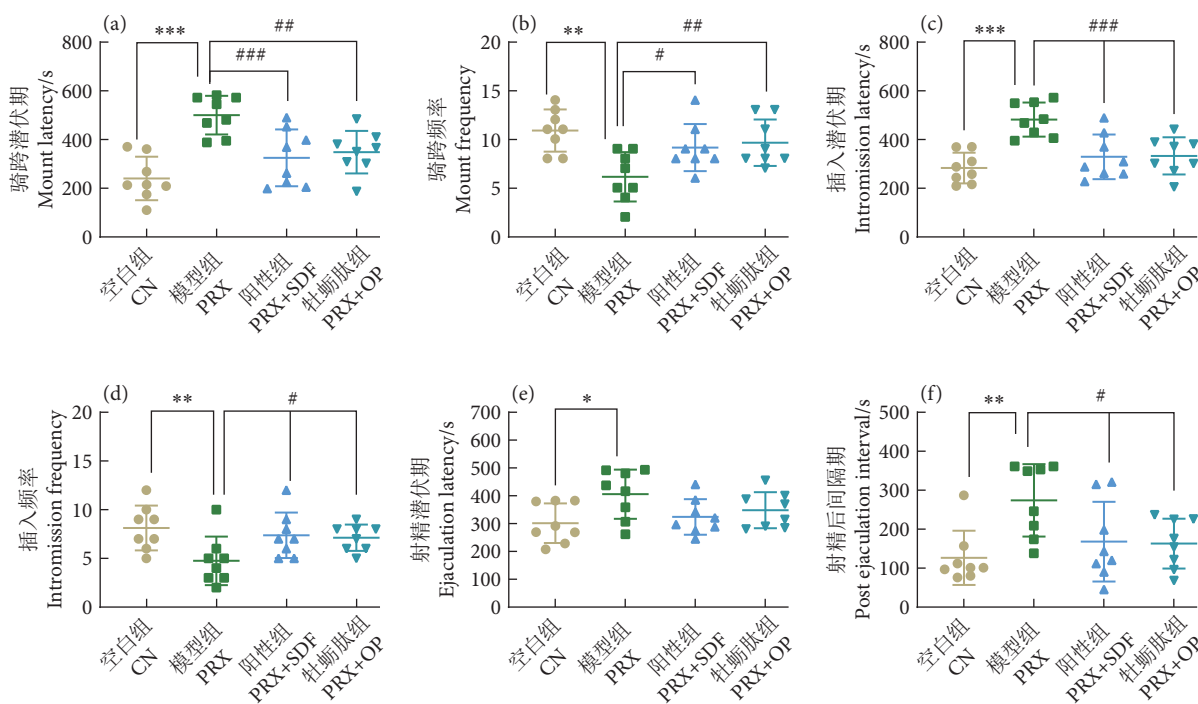


图2 牡蛎肽对小鼠交配行为的影响

注：与空白组相比，*，差异显著 ($P<0.05$)，**，差异非常显著 ($P<0.01$)，***，差异极显著 ($P<0.001$)；与模型组相比，#，差异显著 ($P<0.05$)；##，差异非常显著 ($P<0.01$)，###，差异极其显著 ($P<0.001$)，下同。

Fig. 2 Effect of oyster peptide on sexual behavior in mice

Note: Compared with the blank group, *, Significant difference ($P<0.05$); **, Very significant difference ($P<0.01$); ***, Extremely significant difference ($P<0.001$). Compared with the model group, #, Significant difference ($P<0.05$); ##, Very significant difference ($P<0.01$); ###, Extremely significant difference ($P<0.001$). The same case in the following figures.

表2 牡蛎肽对脏器系数的影响

Table 2 Effect of oyster peptide on organ coefficient

%

项目 Item	空白组 CN	模型组 PRX	阳性组 PRX+SDF	牡蛎肽组 PRX+OP
心脏 Heart	0.599±0.067	0.581±0.072	0.597±0.082	0.622±0.079
胸腺 Thymus	0.11±0.029	0.104±0.021	0.116±0.46	0.113±0.022
脾 Lien	0.328±0.023	0.305±0.026	0.335±0.042	0.309±0.041
肝脏 Liver	5.106±0.586	4.798±0.351	5.004±0.581	5.018±0.306
肾脏 Ren	1.682±0.117	1.629±0.094	1.638±0.151	1.669±0.069
肺 Lung	0.657±0.061	0.637±0.048	0.641±0.034	0.652±0.039
阴茎 Penis	0.120±0.019	0.109±0.026	0.119±0.017	0.119±0.012
睾丸 Testis	0.759±0.083	0.629±0.061***	0.699±0.069#	0.685±0.037#
精囊腺 Seminal vesicle	0.839±0.108	0.574±0.097***	0.687±0.084#	0.731±0.061***

2.8 牡蛎肽对睾丸组织结构及精子质量的影响

由图 7 可知，睾丸组织 HE 染色切片结果表明，CN 组小鼠睾丸组织内生精小管排列整齐有序，生精细胞数量丰富、形态规则良好；而 PRX 组小鼠睾丸组织生精小管内生精细胞排列稀松紊乱，细胞数量锐减，管腔内空泡化严重。而经牡蛎

肽处理后，生精小管内细胞排列规整、分布均匀，细胞数量明显增加，形态也明显改善。由此可见，牡蛎肽可以减缓 PRX 导致的睾丸组织结构损伤。

精子质量可由精子数量、活率和形态反映出来。如图 8 所示，PRX 组小鼠精子数量与活率较 CN 组显著下降 ($P<0.001$)；而与 PRX 组相比，PRX+

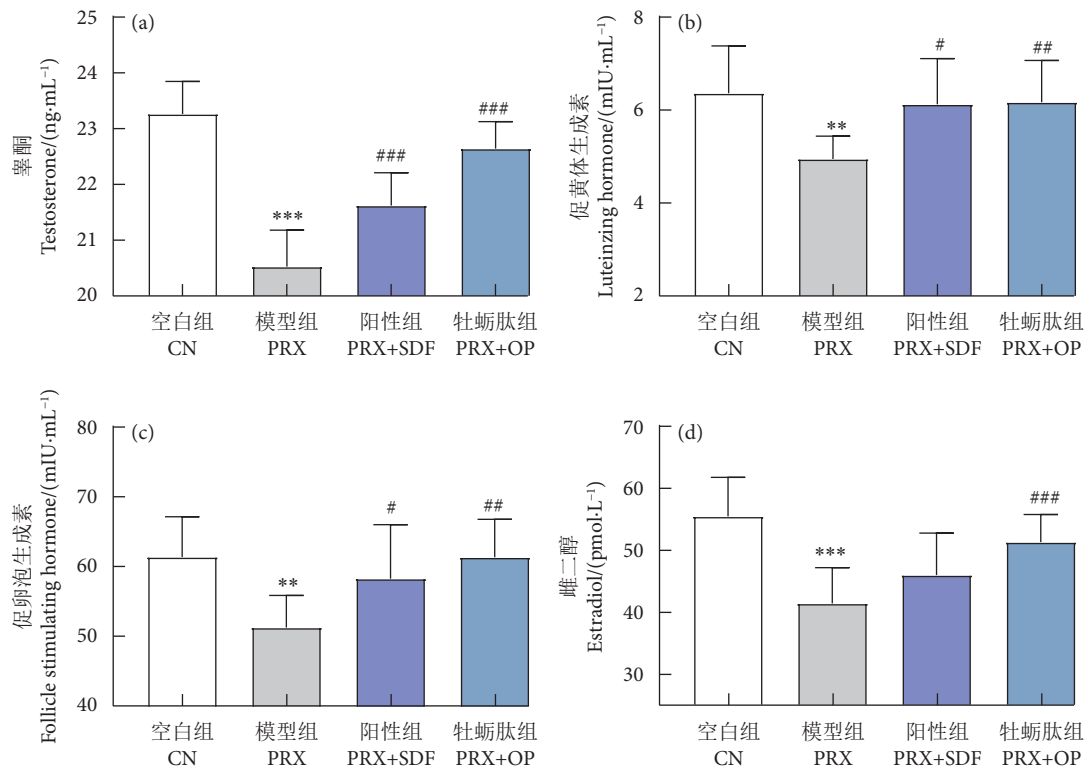


图3 牡蛎肽对血清性激素的影响

Fig. 3 Effect of oyster peptide on serum sex hormones

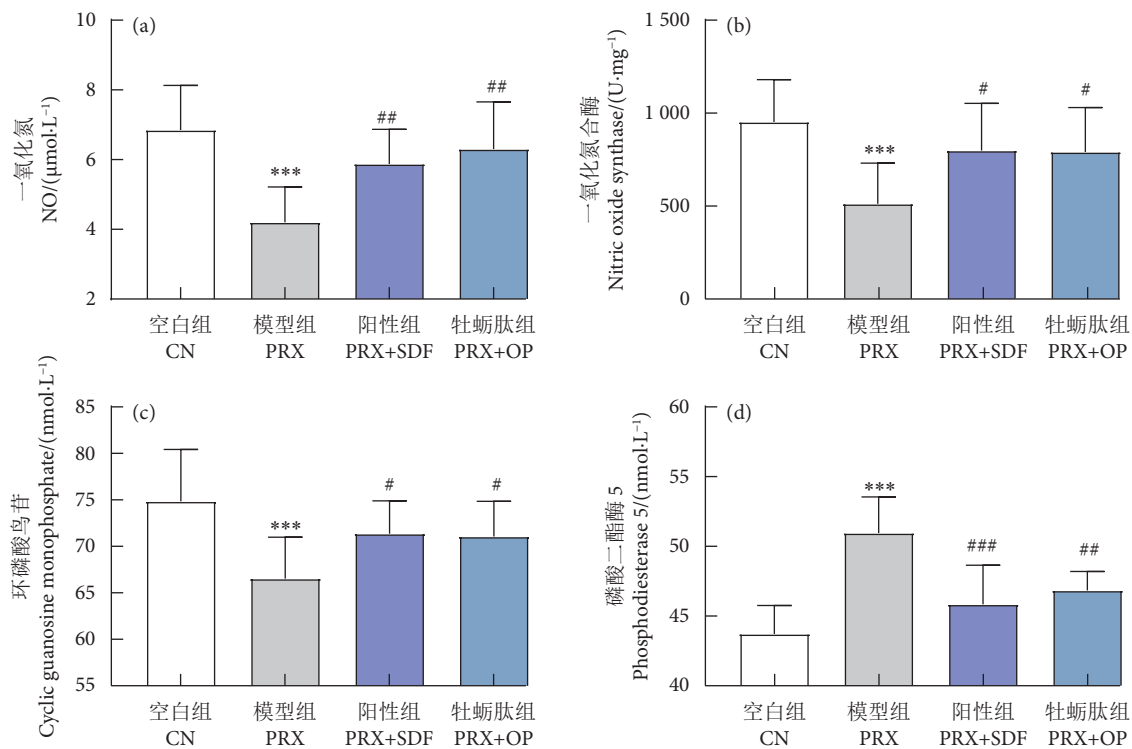


图4 牡蛎肽对阴茎组织一氧化氮、一氧化氮合酶、环磷酸鸟苷、磷酸二酯酶-5 含量或活性的影响

Fig. 4 Effect of OP on content or activity of NO, NOS, cGMP and PDE5 in penile tissue

SDF 与 PRX+OP 组可有效改善精子数量与活率 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。此外, 由图 9 可知, PRX 组小鼠出现大量盘绕尾巴、弯曲尾巴、环颈、无头、无

尾等畸形精子; 而牡蛎肽处理后, 可有效降低精子发生异常。结果表明, PRX 对雄性小鼠精子质量也产生了不利影响, 与 2.7 所述影响精子发生的几

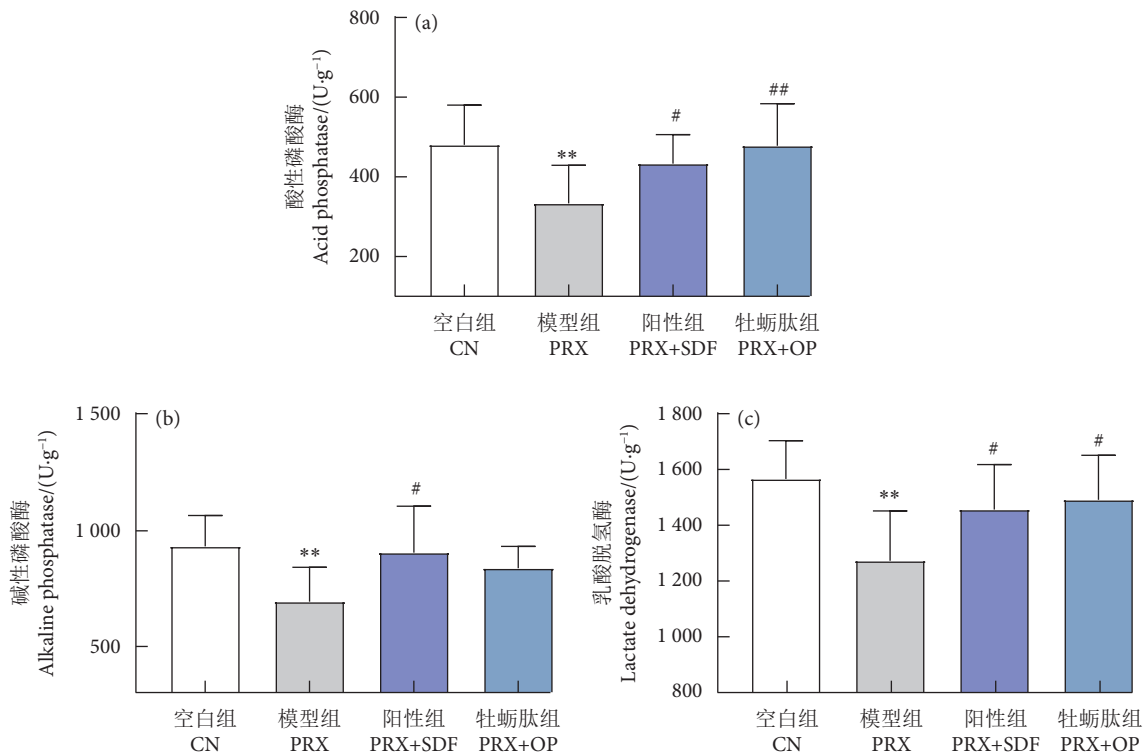


图5 牡蛎肽对睾丸组织标志酶的影响

Fig. 5 Effect of oyster peptide on marker enzymes of testis tissue

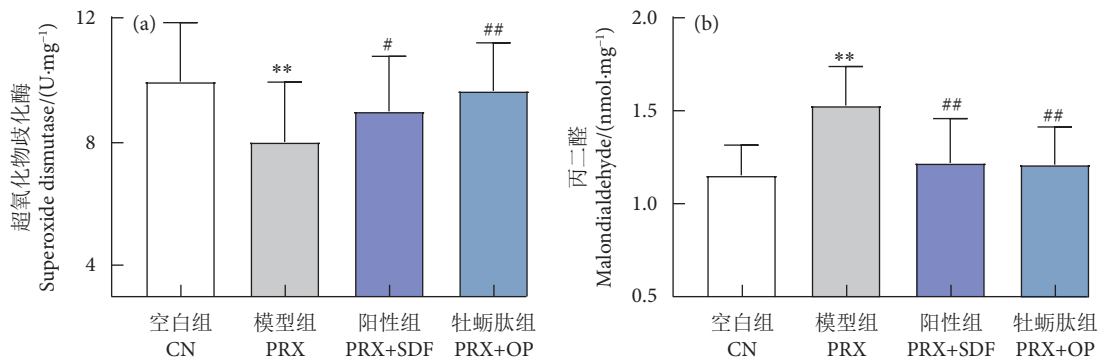


图6 牡蛎肽对睾丸组织抗氧化能力的影响

Fig. 6 Effect of oyster peptide on antioxidant capacity of testis tissue

种睾丸标志酶活性下降的结果及睾丸组织 HE 染色切片结果一致；本研究发现也与 Saikia 等^[35] 的结果相似。

3 讨论

大量研究表明，持续服用抗抑郁药 PRX 后会导导致雄性动物的性能力下降，包括 ML、IL、EL、PEL 的延长，以及 MF 与 IF 的下降^[2]，而这些性行为指标是反映雄性动物性能力强弱最直观的指标。在本研究中，雄性小鼠经口腔灌胃 PRX 28 d 后，性能力明显下降，而经牡蛎肽干预后，其性能力得到明显改善，与 Luo 等^[22] 研究发现牡蛎肽可以提

高疲劳雄性小鼠性能力的结果相似。

性激素具有促进性腺器官生长发育、促进性成熟、刺激性欲等作用，在维持男性性健康中发挥着关键作用^[26]。雄性小鼠在服用 PRX 后，血清性激素水平显著低于 CN 组，可能是 PRX 作用后对性腺轴产生了直接的毒性作用，亦或是 PRX 对下丘脑或垂体的毒性作用而间接影响了性激素的合成与释放^[36]。本研究中 PRX 导致的性激素水平下降与已有研究结果^[36-38] 一致，即持续服用 PRX 会导致雄性动物性激素水平紊乱，继而诱发雄性动物性功能障碍。然而经牡蛎肽处理后，雄性小鼠性激素水平可恢复至接近正常水平，说明牡蛎肽可能通过介

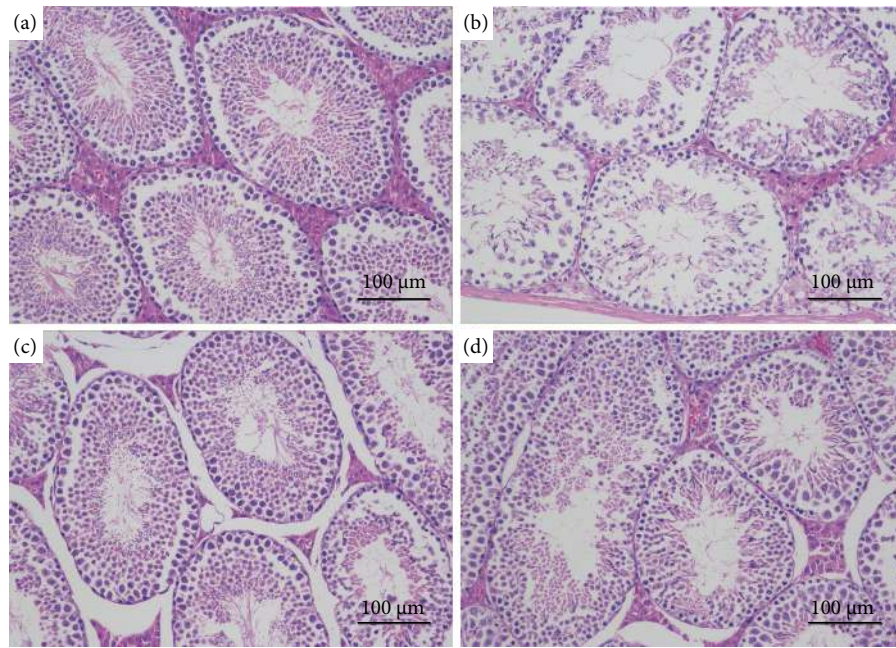


图7 睾丸组织病理分析

注: a. 空白组; b. 模型组; c. 阳性组; d. 牡蛎肽组。

Fig. 7 Pathological analysis of testicular tissue

Note: a. Control group; b. PRX group; c. PRX+SDF group; d. PRX+OP group.

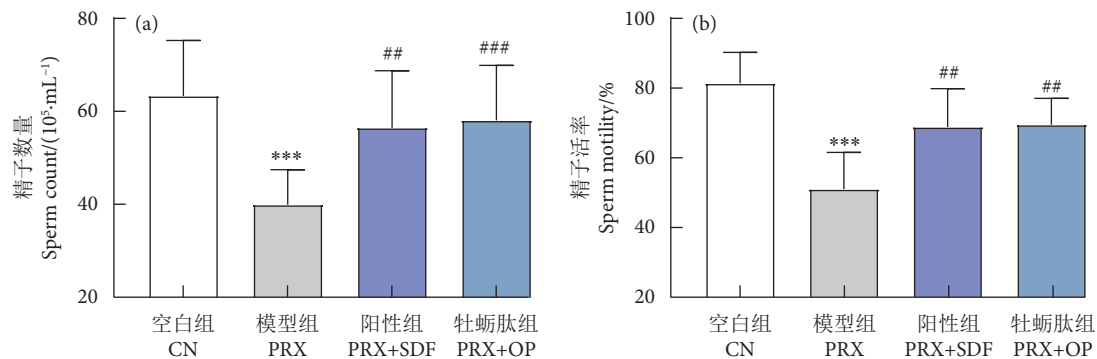


图8 精子数量与活率

Fig. 8 Sperm count and motility

导“下丘脑-垂体-性腺轴”而调节 PRX 导致的雄性小鼠性激素水平紊乱。

此外,本研究通过测定牡蛎肽游离氨基酸含量发现,其精氨酸含量在所有游离氨基酸中占比最高。研究发现,L-精氨酸除可以维持精子功能、改善精子质量,提高血清睾酮浓度外,其亦是 NO 的合成前体,在 NOS 的作用下参与 NO/cGMP 信号通路;当 NO 进入到阴茎平滑肌细胞后,可使鸟苷酸环化酶 (Guanylate cyclase, GC) 激活,从而升高平滑肌细胞内的 cGMP 浓度,进而降低钙离子 (Ca²⁺) 浓度使平滑肌松弛,最终引起阴茎勃起^[39-40]。而 PDE-5 则是 NO/cGMP 勃起通路中的破坏者,可降解 cGMP,导致平滑肌细胞内的 cGMP 浓度下

降,使阴茎难以勃起^[41]。在本研究中,PRX 组中 NO 浓度的下降,可能是由于 PRX 的作用使得精氨酸酶活性增强,从而使 L-精氨酸发生了降解^[25];抑或是因为 PRX 导致的氧化应激,使得超氧化物与 NO 作用形成了过氧亚硝酸盐^[42]。而经牡蛎肽处理后,雄性小鼠 NO、cGMP 含量与 NOS 活性较 PRX 组显著提高,PDE-5 活性显著降低,可见牡蛎肽可能作为前体物质提高平滑肌细胞内 NO 与 cGMP 浓度,亦可能作为精氨酸酶与 PDE-5 的抑制剂而抑制精氨酸酶与 PDE-5 的活性,以达到维持 NO 与 cGMP 浓度的目的。

精子的发生功能与睾丸标志性酶 ACP、ALP 和 LDH 的活性密切相关,ACP 主要负责睾丸生殖

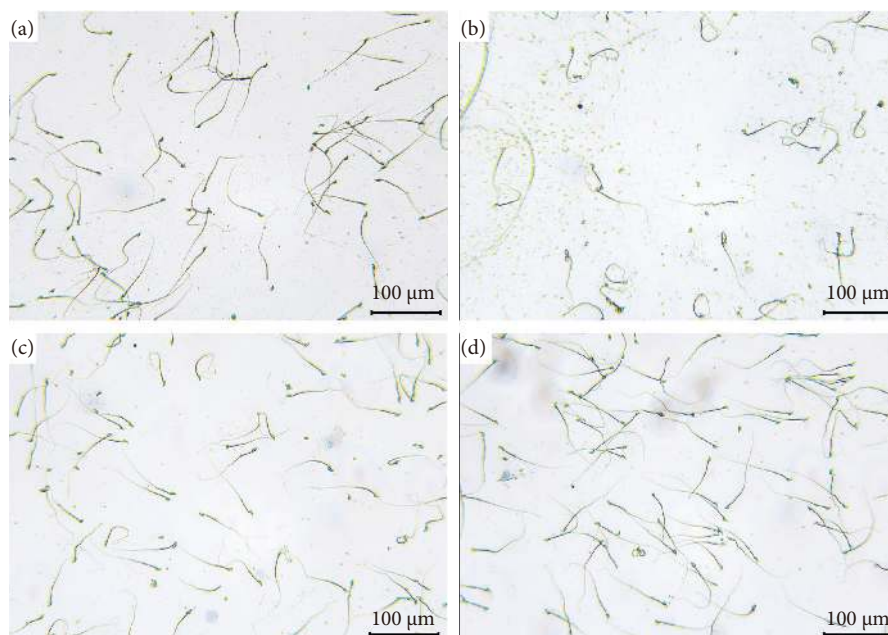


图9 精子形态分析

注: a. 空白组; b. 模型组; c. 阳性组; d. 牡蛎肽组。

Fig. 9 Sperm morphology analysis

Note: a. Control group; b. PRX group; c. PRX+SDF group; d. PRX+OP peptide group.

细胞之间的物质交换, 促进精母细胞的发育; ALP 主要负责管腔液与精子膜之间的物质交换, 以及雄激素在精管周间质与曲细精管之间的转移; 而 LDH 主要影响精子发生过程中的能量代谢与生物利用度^[43]。本研究中 PRX 作用后, 睾丸磷酸酶与 LDH 活性均显著低于正常水平, 影响了睾丸的生物功能与代谢活性, 导致雄激素与精子细胞能量的生物利用度均降低。然而, 在使用牡蛎肽干预后, 睾丸标志性酶活性明显增强, 说明牡蛎肽具有较强的雄激素效应, 在维持睾丸功能与精子发生功能方面发挥着关键作用。

氧化应激是导致男性 ED 与生殖障碍的重要原因。Ogunro 和 Yakubu^[44] 发现, PRX 作用后, 睾丸组织的抗氧化防御系统遭到严重破坏; Adefegha 等^[45] 也发现, PRX 会引起睾丸脂质过氧化物 MDA 含量与非蛋白硫醇含量升高。由此可见, PRX 的作用会诱导雄性动物产生氧化应激, 进而影响男性性功能, 这一现象在本研究中 PRX 组小鼠睾丸组织 SOD 活性较 CN 组显著下降, MDA 含量显著升高的结果中也得到了验证。而牡蛎肽作用后, 有效减缓了 PRX 导致的氧化应激损伤, 说明牡蛎肽具有较强的抗氧化能力, 这在本课题组前期的大量研究中有类似发现^[24,26]。

综上, 牡蛎肽对 PRX 导致的雄性小鼠性功能

障碍具有潜在保护作用, 其作用机制可能与介导“下丘脑-垂体-性腺轴”调节性激素水平、作用 NO/cGMP 勃起信号通路、减缓氧化应激损伤有关。本研究为今后研发相关的牡蛎产品提供了理论依据, 也为药物 PRX 导致的性功能障碍的作用机制研究及 PRX 的临床使用提供了新的研究方案。

参考文献:

- [1] CHEN L, SHI G R, HUANG D D, et al. Male sexual dysfunction: a review of literature on its pathological mechanisms, potential risk factors, and herbal drug intervention[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108585.
- [2] RAHMAN A U, ALAM F, REHMAN Z U, et al. Effects of *Mirabilis jalapa* L. root extract and sildenafil on paroxetine-induced sexual dysfunction in male rats and characterization of its phytoconstituents by UPLC-MS[J]. *S Afr J Bot*, 2023, 152: 240-246.
- [3] ERDEMIR F, ATILGAN D, FIRAT F, et al. The effect of sertraline, paroxetine, fluoxetine and escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rats[J]. *Int Braz J Urol*, 2014, 40: 100-108.
- [4] NAJAFABADI B T, FARSINEJAD M, SHOKRAEE K, et al. Possible effects of saffron (*Crocus sativus*) in the treatment of erectile dysfunction: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *J Herb Med*, 2022, 32: 100551.
- [5] FARNIA V, ALIKHANI M, EBRAHIMI A, et al. Ginseng treatment improves the sexual side effects of methadone maintenance treatment[J]. *Psychiat Res*, 2019, 276: 142-150.

- [6] KOLOKO B L, BUSHRA I, WANKEU-NYA M, et al. *In vivo* effects of *Rauvolfia vomitoria* (Apocynaceae) ethanolic extract on sexual performance and reproductive activity in male rats[J]. *Andrologia*, 2020, 52(1): e13414.
- [7] LI L, CHEN B B, AN T, et al. BaZiBuShen alleviates altered testicular morphology and spermatogenesis and modulates Sirt6/P53 and Sirt6/NF- κ B pathways in aging mice induced by D-galactose and NaNO₂[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113810.
- [8] ALLOUH M Z, DARADKA H M, BARBARAWI M M A, et al. Fresh onion juice enhanced copulatory behavior in male rats with and without paroxetine-induced sexual dysfunction[J]. *Exp Biol Med*, 2014, 239(2): 177-182.
- [9] TEIXEIRA T M, BOEFF D D, de OLIVEIRA CARVALHO L, et al. The traditional use of native Brazilian plants for male sexual dysfunction: evidence from ethnomedicinal applications, animal models, and possible mechanisms of action[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023: 116876.
- [10] 郑环宇, 高加龙, 章超桦, 等. 华贵栉孔扇贝肉及其酶解产物对半去势雄性大鼠生殖能力的影响[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(3): 94-101.
- [11] QIONG L, JUN L, JUN Y, et al. The effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on the recovery of the male rat reproductive system and mating function damaged by multiple mini-doses of ionizing radiations[J]. *Environ Toxicol Phar*, 2011, 31(2): 286-294.
- [12] IBRAHIM N M, IBRAHIM S R, ASHOUR O H, et al. The effect of red seaweed (*Chondrus crispus*) on the fertility of male albino rats[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(7): 3864-3869.
- [13] JE J G, KIM H S, LEE H G, et al. Low-molecular weight peptides isolated from seahorse (*Hippocampus abdominalis*) improve vasodilation via inhibition of angiotensin-converting enzyme *in vivo* and *in vitro*[J]. *Process Biochem*, 2020, 95: 30-35.
- [14] RYU B M, KIM M J, HIMAYA S W A, et al. Statistical optimization of high temperature/pressure and ultra-wave assisted lysis of *Urechis unicinctus* for the isolation of active peptide which enhance the erectile function *in vitro*[J]. *Process Biochem*, 2014, 49(1): 148-153.
- [15] 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.
- [16] 章超桦. 牡蛎营养特性及功能活性研究进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(5): 719-731.
- [17] 朱国萍, 章超桦, 曹文红, 等. 牡蛎酶解产物对小鼠学习记忆的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2021, 41(4): 84-92.
- [18] ZHANG C, LV J T, QIN X M, et al. Novel antioxidant peptides from *Crassostrea hongkongensis* improve photo-oxidation in UV-induced HaCaT Cells[J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(2): 100.
- [19] ZHANG Z R, SU G W, ZHOU F B, et al. Alcalase-hydrolyzed oyster (*Crassostrea rivularis*) meat enhances antioxidant and aphrodisiac activities in normal male mice[J]. *Food Res Int*, 2019, 120: 178-187.
- [20] 张婷, 秦小明, 章超桦, 等. 牡蛎酶解产物改善睡眠作用效果研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(3): 430-436.
- [21] ZHANG W W, WEI Y F, CAO X X, et al. Enzymatic preparation of *Crassostrea* oyster peptides and their promoting effect on male hormone production[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113382.
- [22] LUO X L, LIU W X, ZHONG H, et al. Synergistic effect of combined oyster peptide and ginseng extracts on anti-exercise-fatigue and promotion of sexual interest activity in male ICR mice[J]. *J Funct Foods*, 2021, 86: 104700.
- [23] 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: 12-19.
- [24] ZHANG X Y, PENG Z L, ZHENG H N, et al. The potential protective effect and possible mechanism of peptides from oyster (*Crassostrea hongkongensis*) hydrolysate on triptolide-induced testis injury in male mice[J]. *Mar Drugs*, 2021, 19(10): 566.
- [25] ADEMOSUN A O, ADEBAYO A A, OBOH G. *Anogeissus leiocarpus* attenuates paroxetine-induced erectile dysfunction in male rats via enhanced sexual behavior, nitric oxide level and antioxidant status[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 1029-1035.
- [26] 张锴佳, 张雪妍, 秦小明, 等. 香港牡蛎酶解产物对雷公藤甲素诱导雄性小鼠生精障碍的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(6): 941-948.
- [27] KHALID M, ALQARNI M H, WAHAB S, et al. Ameliorative sexual behavior and phosphodiesterase-5 inhibitory effects of *Spondias mangifera* fruit extract in rodents: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* study[J]. *J Clin Sleep Med*, 2022, 11(13): 3732.
- [28] CANPOLAT S, ULKER N, YARDIMCI A, et al. Irisin ameliorates male sexual dysfunction in paroxetine-treated male rats[J]. *Psychoneuroendocrino*, 2022, 136: 105597.
- [29] 方磊, 张瑞雪, 陈亮, 等. 牡蛎肽对 TM3 细胞性功能的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 140-147.
- [30] HOU Y Q, WU G Y. Nutritionally essential amino acids[J]. *Adv Nutr*, 2018, 9(6): 849-851.
- [31] 陈义明, 孙瑞坤, 张帅, 等. 圆舵鲣暗色肉酶解物 5 ku 组分的抗氧化活性与抗疲劳作用[J]. *广东海洋大学学报*, 2017, 37(4): 92-97.
- [32] 葛晓鸣, 顾伟, 徐永健. 海马水解蛋白的氨基酸组成与抗氧化能力的关系[J]. *核农学报*, 2019, 33(2): 322-329.
- [33] 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.
- [34] SCHULSTER M, BERNIE A M, RAMASAMY R. The role of estradiol in male reproductive function[J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(3): 435.
- [35] SAIKIA Q, HAZARIKA A, KALITA J C. Isoliquiritigenin ameliorates paroxetine-induced sexual dysfunction in male albino mice[J]. *Reprod Toxicol*, 2023: 108341.
- [36] EL-GAAFARAWI I, HASSAN M, FOUAD G, et al. Toxic effects of paroxetine on sexual and reproductive functions of rats[J]. *Egypt J Hosp Med*, 2005, 21(1): 16-32.
- [37] YAKUBU M T, JIMOH R O. *Carpolobia lutea* roots restore sexual

- arousal and performance in paroxetine-induced sexually impaired male rats[J]. *Rev Int Androl*, 2014, 12(3): 90-99.
- [38] AJIBOYE T O, NURUDEEN Q O, YAKUBU M T. Aphrodisiac effect of aqueous root extract of *Lecaniodiscus cupanioides* in sexually impaired rats[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2014, 25(2): 241-248.
- [39] ZHANG Y F, YANG J Y, MENG X P, et al. L-arginine protects against T-2 toxin-induced male reproductive impairments in mice[J]. *Theriogenology*, 2019, 126: 249-253.
- [40] BOLNICK J M, KILBURN B A, BOLNICK A D, et al. Sildenafil stimulates human trophoblast invasion through nitric oxide and guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate signaling[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(6): 1587-1595.e2.
- [41] DEGIONI A, CAMPOLO F, STEFANINI L, et al. The NO/cGMP/PKG pathway in platelets: the therapeutic potential of PDE5 inhibitors in platelet disorders[J]. *J Thromb Haemost*, 2022, 20(11): 2465-2474.
- [42] PACHER P, BECKMAN J S, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 315-424.
- [43] YAKUBU M T, JIMOH R O. Aqueous extract of *Carpolobia lutea* root ameliorates paroxetine-induced anti-androgenic activity in male rats[J]. *Middle East Fertil S*, 2015, 20(3): 192-197.
- [44] OGUNRO O B, YAKUBU M T. *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex hiern) stem extract restores selected biomolecules of erectile dysfunction in the testicular and penile tissues of paroxetine-treated wistar rats[J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(2): 690-700.
- [45] ADEFEGHA S A, OYELEYE S I, DADA F A, et al. Modulatory effect of quercetin and its glycosylated form on key enzymes and antioxidant status in rats penile tissue of paroxetine-induced erectile dysfunction[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1473-1479.