

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.18.005

## 菠菜和芫荽对雄性大鼠性功能的影响与植物雌激素样作用研究\*

潘晓南 斯依提·阿木提 刘文娟 阿地力江·伊明<sup>△</sup> 童卓云 侯鹏程 努尔比亚·阿力甫

(新疆医科大学基础医学院 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要 目的:**研究菠菜、芫荽对雄性大鼠性功能的影响,探讨植物雌激素样作用机制。**方法:**60只正常雄性SD大鼠,随机分为正常组(N组)、大豆对照组(A组)、菠菜组(B组)、芫荽组(C组)和菠菜+芫荽组(D组),每组12只,不同饲料干预20周后,进行性行为学试验并取材。采用放免法检测各组外周血清中T、E<sub>2</sub>、LH、FSH和PRL等性腺轴激素含量,HE染色观察睾丸组织形态学变化,IHC和western blot法检测大鼠睾丸中ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 蛋白表达。**结果:**(1)性行为学检测结果:C和D组插入、射精潜伏期较N组显著延长( $P<0.05$ ),爬背、插入、射精次数较N组显著减少( $P<0.05$ );D组插入潜伏期较A组显著延长( $P<0.05$ )(2)性激素水平检测结果:D组T水平较N组显著降低( $P<0.05$ );C组E<sub>2</sub>水平较A组显著升高( $P<0.05$ ),D组E<sub>2</sub>水平较N、A组显著升高( $P<0.05$ );C和D组LH水平较N组显著降低( $P<0.05$ ),同时C组LH水平亦较A组显著降低( $P<0.05$ );FSH水平在各组之间无显著差异( $P>0.05$ );D组PRL水平较N组显著降低( $P<0.05$ )。(3)睾丸HE染色结果:光镜下N组睾丸组织结构完整,B、C和D组睾丸组织结构发生明显变化,生精小管间连接疏松,间质细胞减少,生精细胞减少。(4)ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 的表达结果:ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 分别在睾丸中精原细胞和间质细胞中表达,其中ER $\alpha$ 在B、C和D组表达较N组显著增多( $P<0.05$ ),ER $\beta$ 在各组间无显著差异( $P>0.05$ )。**结论:**芫荽及菠菜和芫荽联合干预可延长大鼠爬背、插入、射精潜伏期和减少其爬背、插入和射精次数,导致大鼠性功能障碍;具体机制可能与发挥雌激素样作用,升高血清中E<sub>2</sub>水平,使ER $\alpha$ 在睾丸间质中的表达增多,进而降低T水平有关。芫荽与大豆相比具有更强的雌激素样作用,而菠菜与大豆雌激素样作用接近,菠菜和芫荽联合干预出现累加效应。

**关键词:**菠菜;芫荽;植物雌激素;性功能;雌激素受体

**中图分类号:**R-33;R579.1;R698.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)18-3424-06

## Effects of Spinach and Coriander on Sexual Function of Male Rats and Their Estrogen-like Effects\*

PAN Xiao-nan, SIYITI·Amuti, LIU Wen-juan, ADILJIANG·Yiming<sup>△</sup>, TONG Zhuo-yun, HOU Peng-cheng, NUERBIYA·Alifu

(College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effects of spinach and coriander on sexual function in male rats and explore their estrogen-like effects. **Methods:** Sixty normal male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group (N group), soy control group (A group), spinach group (B group), coriander group (C group) and spinach + coriander group (D group), 12 rats in each group. Collect samples after being conducted sexual behavior tests. The levels of T, E<sub>2</sub>, LH, FSH and PRL in the peripheral blood of each group were detected by radioimmunoassay. Observe morphology of testicular tissue by HE staining. The expressions of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in rat testis were detected by IHC and western blot. **Results:** (1) Sexual behavior test results: the incubation periods of insertion and ejaculation of rats in groups C and D were significantly increased compared with group N ( $P<0.05$ ), the frequency of straddle, insertion and ejaculation were significantly decreased compared with group N ( $P<0.05$ ). The incubation periods of insertion in group D were significantly increased compared with group A ( $P<0.05$ ). (2) Results of sex hormone levels: The level of T in group D was significantly lower compared with group N ( $P<0.05$ ). The level of E<sub>2</sub> in group C was significantly higher compared with group A ( $P<0.05$ ). The level of E<sub>2</sub> in group D was significantly higher compared with groups N and A. The levels of LH in groups C and D were significantly lower compared with group N ( $P<0.05$ ), and LH level in group C was significantly lower compared with group A ( $P<0.05$ ). The levels of FSH were not significantly different among groups ( $P>0.05$ ). The PRL level in group D was significantly lower compared with group N ( $P<0.05$ ). (3) HE staining results: The testicular tissue structure in group N was completed under light microscope. In groups B, C, and D, the morphological structure of testicular tissue significantly changed, the number of leydig cells and spermatogenic cells in testicular tissue reduced, and the arrangement of seminiferous tubules were loosely. (4) The results of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression: ER $\alpha$  and ER $\beta$  were expressed in spermatogonia and stromal cells respectively in testis. The expression of ER $\alpha$  in groups B, C and D were significantly increased compared with group N ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the expression level of ER $\beta$  among groups ( $P>0.05$ ).

\* 基金项目:新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2016B03044-6)

作者简介:潘晓南(1991-),女,硕士,主要研究方向:勃起功能障碍的基础研究,E-mail:398153816@qq.com

<sup>△</sup> 通讯作者:阿地力江·伊明,男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向:男性生殖疾病的基础研究与转化,E-mail:adljym@126.com

(收稿日期:2020-02-28 接受日期:2020-04-15)

**Conclusions:** Coriander and spinach combined with coriander could cause sexual dysfunction in rats by prolonging the incubation periods of straddle, insertion and ejaculation and reducing the frequency of straddle, insertion and ejaculation. The specific mechanism may be related to decreased T level through exerting estrogen-like effects, increasing serum  $E_2$  level and increasing the expression of  $ER\alpha$  in Leydig cells. Coriander has a stronger estrogen-like effects than soy. Spinach and soy have similar estrogen-like effects. The combined feed of spinach and coriander has a cumulative effect.

**Key words:** Spinach; Coriander; Phytoestrogens; Sexual function; Estrogen receptor

**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R579.1; R698.1 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2020)18-3424-06

## 前言

男性的性功能随着人们的饮食习惯及生活方式的改变等因素日益受到威胁,男性生殖功能障碍患者逐渐增多<sup>[1]</sup>。近年来的研究发现<sup>[2,3]</sup>,多种食物及部分中草药中存在一些膳食化合物,具有雌激素样作用,被称为植物雌激素(Phytoestrogens, PEs)。大豆异黄酮是最常见的 PEs<sup>[4]</sup>,研究发现若大鼠长期摄入高剂量的大豆异黄酮,可导致性功能减退,但是有关 PEs 与雄性功能的关系研究较少。我们在前期研究中<sup>[5,6]</sup>,发现通过冷环境和植物雌激素样饲养的复合刺激可导致大鼠性功能减退和勃起功能障碍(Erectile dysfunction, ED)。本研究在此基础上,以菠菜和芫荽两种植物单独和联合饲养,观察其对大鼠性功能的影响,通过对外周血清中性激素水平的变化及睾丸雌激素受体的改变进行研究,探讨这两种植物发挥雌激素样作用,及损伤雄性大鼠性功能的可能机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 正常雄性(Sprag-Dawley, SD)大鼠 60 只,SPF 级,体重质量(200±10)g,20 只性成熟雌性大鼠,用于交配实验,均购自新疆医科大学实验动物中心。动物模型的制备遵守动物伦理规章制度,该研究通过新疆医科大学实验动物中心伦理委员会批准。

**1.1.2 主要仪器与试剂** LT3002E 型电子天平(北京赛多科斯特平有限公司),ACCESS 全自动微粒子化学发光免疫分析仪(美国贝克曼和 PASTURE 公司联合生产),5810R 型高速冷冻离心机(德国 eppendorf 公司),电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);黄体酮(批号:180301,上海全宇生物科技动物药业有限公司);苯甲酸雌二醇(批号:B181103,宁波三生生物科技有限公司);大鼠睾酮(T)放免试剂盒、雌二醇( $E_2$ )放免试剂盒、黄体生成素(LH)放免试剂盒、卵泡刺激素(FSH)放免试剂盒和催乳素(PRL)放免试剂盒均购自北京北方生物技术研究所;兔多克隆  $ER\alpha$ 、 $ER\beta$  抗体(北京博奥森生物技术有限公司);山羊抗兔二抗试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司);超敏 ECL 化学发光试剂盒(新赛美生物科技有限公司);免疫组化检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 菠菜和芫荽饲料的制备** (1)大豆饲料:70%正常饲料加入 30%大豆粉;(2)菠菜饲料:70%正常饲料加入 30%菠菜籽粉;(3)芫荽饲料:70%正常饲料加入 30%芫荽籽粉;(4)菠菜+芫荽饲料:70%正常饲料加入 15%菠菜籽粉、15%芫荽籽

粉;饲料由新疆医科大学实验动物中心制备。

**1.2.2 发情雌鼠的制备** 根据文献<sup>[7]</sup>,进行制备发情的雌鼠。

**1.2.3 大鼠的饲养与干预** 60 只具有正常性功能的雄性 SD 大鼠(与发情雌鼠做交配实验),经一周适应性饲养后,随机分为正常对照组(N 组)、大豆组(A 组)、菠菜组(B 组)、芫荽组(C 组)和菠菜+芫荽组(D 组),每组 12 只。饲养环境为温度(20±2)℃,湿度 55±5%,每日喂食 300 g 普通饲料,自由饮水,动态观测生物学体征与行为模式改变,并观测交配能力的改变。

**1.2.4 交配实验** 参照文献<sup>[7]</sup>,选择一个安静实验室,光线调暗,将雄性大鼠放入玻璃笼里面,环境适应 10 min 后,放入雌鼠,观察雄鼠爬背、插入和射精潜伏期及次数并记录。

**1.2.5 血清性激素指标检测** 在新疆医科大学第一附属医院核医学放免实验室,检测大鼠血清中 T、 $E_2$ 、LH、FSH 和 PRL 的表达水平。

**1.2.6 HE 染色观察睾丸组织形态学变化** 睾丸组织标本由 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片厚约 4  $\mu$ m,正常操作苏木素-伊红染色,中性树胶封片,光镜下观察睾丸组织形态变化,并采集图像。

**1.2.7 免疫组化检测** 取睾丸石蜡切片,常规脱蜡至水,抗原修复。加入一抗  $ER\alpha$ (1:500)、 $ER\beta$ (1:500)4℃过夜。二抗 37℃孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水,透明,封片。显微镜观察并采集图像,在 40 倍物镜下随机采取 5 个视野,使用 Image 分析平均灰度值。

**1.2.8 Western blot 检测睾丸 ER 蛋白的表达** 睾丸组织研碎加入 RIPA 裂解液,离心取上清,BCA 法蛋白定量计算各蛋白浓度,加入 4×蛋白上样缓冲液沸水煮使蛋白变性。根据蛋白分子量配制 12%分离胶、5%浓缩胶,上样进行电泳,将蛋白转印至 PVDF 膜上,4℃恒流转膜 2 h,5%脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗  $ER\alpha$  (1:500)、 $ER\beta$  (1:500)、GAPDH (1:500),4℃孵育过夜。TBST 清洗 4 次,室温二抗孵育 2 h 后,TBST 清洗 4 次,目的条带滴加 ECL 化学显影液,在化学发光凝胶成像系统发光检测蛋白的表达。将获得的图像在 ImageJ 分析软件计算灰度值。

### 1.3 统计学分析

实验结果采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料用( $\bar{x}\pm s$ )进行统计描述,多组数据做正态检验和方差齐性检验,满足条件,采用单因素方差分析(ANOVA),如不满足,求出秩次进行方差分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$  表示有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 大鼠性行为学试验结果

结果显示(如表 1),干预 20 周后,A 和 B 组爬背、插入、射

精潜伏期较 N 组明显延长,但无统计学差异( $P>0.05$ ),爬背、插入、射精次数均显著减少( $P<0.05$ );与 A 组相比,D 组插入、射精次数有明显降低,但无显著差异( $P>0.05$ );与 N 组相比,C 和 D 组插入、射精潜伏期均显著延长( $P<0.05$ ),爬背、

表 1 大鼠性行为学试验结果

Table 1 Results of sexual behavior test in rats

Groups	Straddle latency(s)	Straddle frequency (n)	Insertion latency(s)	Insertion frequency (n)	Ejaculation latency(s)	Ejaculation frequency(n)
N	522.44±192.80	16.78±3.22	549.33±186.22	16.00±3.02	549.33±186.22	15.00±2.80
A	551.00±146.25	12.73±3.44	609.55±153.88	10.82±3.09	659.09±154.72	10.09±2.93
B	661.18±224.05	9.78±3.07	832.78±244.80	8.78±3.01	910.63±262.47	8.30±2.68
C	1065.22±188.08	5.30±1.31*	1151.25±203.94*	5.20±1.44*	1151.25±203.94*	4.90±1.42*
D	933.63±250.58	6.78±1.92*	1159.30±182.48**	4.90±1.71*	1181.40±187.46*	4.80±1.69*

Note: compared with group N, \* $P<0.05$ ; compared with group A, # $P<0.05$ .

### 2.2 大鼠外周血清性激素水平检测结果

检测结果显示(如表 2),与 N 组相比,T 水平在各组中均降低,其中,C 组( $P=0.071$ )较 N 组降低,D 组较 N 组显著降低( $P<0.05$ )。C 组  $E_2$  水平较 N 组升高( $P=0.058$ ),而较 A 组显著升高( $P<0.05$ );D 组  $E_2$  水平较 N 和 A 组显著升高( $P<0.05$ )。C

和 D 组 LH 水平较 N 组显著降低( $P<0.05$ ),同时 C 组 LH 水平亦较 A 组显著降低 ( $P<0.05$ );FSH 水平在各组之间无统计学差异 ( $P>0.05$ );D 组 PRL 水平与 N 组相比显著降低 ( $P<0.05$ )。

表 2 放免检测大鼠外周血清激素水平

Table 2 Peripheral serum hormone levels in rats detected by radioimmunoassay

Groups	T(ng/mL)	$E_2$ (pg/mL)	LH(mlu/mL)	FSH(mlu/mL)	PRL( $\mu$ lu/mL)
N	1.83±0.37	6.22±1.12	3.03±0.88	1.44±0.33	91.92±16.10
A	1.40±0.28	4.74±0.56	2.43±0.73	1.67±0.30	64.32±14.70
B	1.25±0.33	7.30±1.85	1.42±0.76	1.84±0.25	57.62±9.93
C	1.11±0.18	12.74±3.71#	0.46±0.25**	1.79±0.28	81.36±16.19
D	0.79±0.20*	13.02±2.75**	0.93±0.52*	2.14±0.28	54.12±5.55*

Note: compared with group N, \* $P<0.05$ ; compared with group A, # $P<0.05$ .

### 2.3 大鼠睾丸组织 HE 染色结果

结果如(图 1)所示,光镜下可见,N 组睾丸组织形态结构完整,间质细胞丰富,各级生精细胞排列整齐。A 组睾丸组织生精小管间连接疏松,出现水肿。B 组睾丸组织生精小管间连接

疏松,间质细胞减少。C 组睾丸组织形态紊乱,间质细胞水肿,间质细胞减少。D 组睾丸组织生精小管严重萎缩变形,间质细胞明显减少,生精细胞减少甚至缺失。

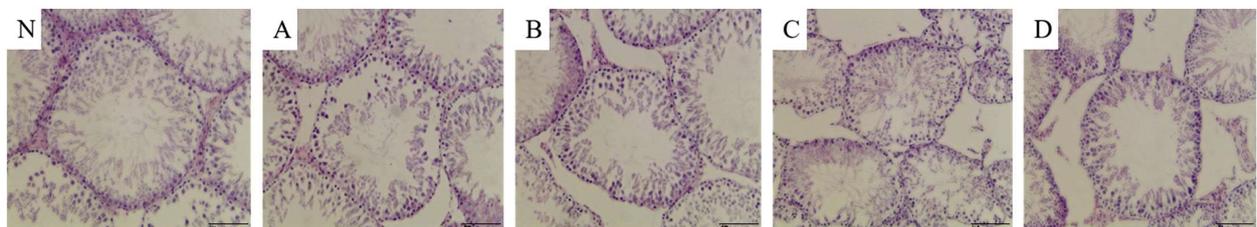


图 1 各组大鼠睾丸 HE 染色结果(200×)

Fig. 1 Results of HE staining of rat testis in each group(200×)

注: N: 正常组, A: 大豆对照组, B: 菠菜组, C: 芫荽组, D: 菠菜 + 芫荽组

Note: N: normal group, A: soy control group, B: spinach group, C: coriander group, D: spinach + coriander group

### 2.4 大鼠睾丸 ER $\alpha$ 和 ER $\beta$ 免疫组化结果

结果如(图 2、表 3)所示,光镜下可见,ER $\alpha$ 、ER $\beta$  受体均在生精小管之间的睾丸间质细胞(Leydig cell, LCs)及精原细胞表

达。与 N 组相比,B、C 和 D 组 ER $\alpha$  蛋白表达水平均显著升高 ( $P<0.05$ ),与 A 组相比,C 和 D 组 ER $\alpha$  蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。各组 ER $\beta$  蛋白表达无显著差异( $P>0.05$ )。

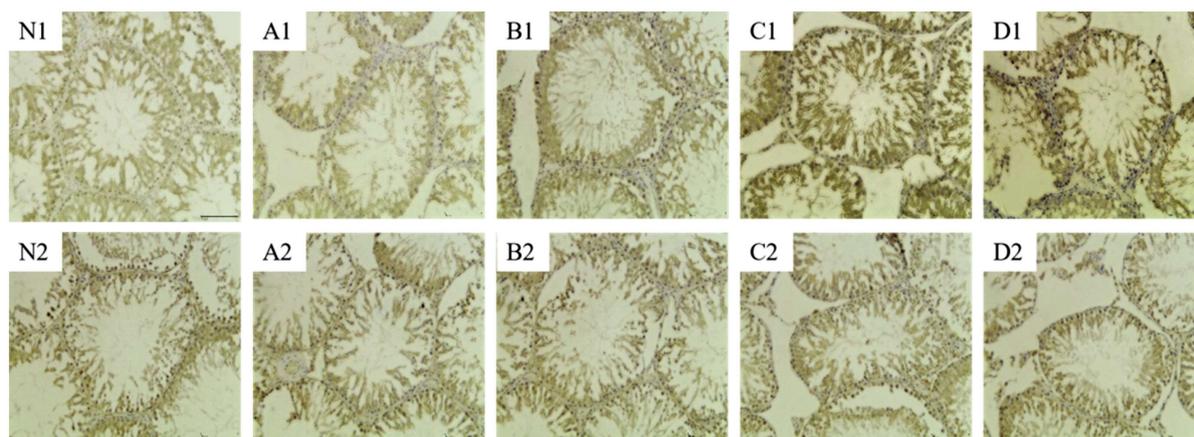


图2 免疫组化检测大鼠睾丸 ERα 和 ERβ 的表达(200×)

Fig. 2 ERα and ERβ expression in testis detected by immunohistochemical(200×)

注:N1-D1: 各组大鼠睾丸 ERα 的表达,N2-D2: 各组大鼠睾丸 ERβ 的表达。

Note: N1-D1: Comparison of ERα in rat testis among different groups N2-D2: Comparison of ERβ in rat testis among different groups.

表3 免疫组化检测大鼠睾丸 ERα 和 ERβ 的表达

Table 3 ERα and ERβ expression in testis detected by immunohistochemical

	N	A	B	C	D
ERα	14.37±0.36	14.93±0.70	16.01±0.40*	17.19±0.67**	17.22±0.32**
ERβ	16.45±0.62	15.08±0.59	15.04±0.50	15.34±0.66	15.13±1.04

Note: compared with group N, \* $P < 0.05$ ; compared with group A, # $P < 0.05$ ; compared with group B, \* $P < 0.05$ .

### 2.5 大鼠睾丸 ERα 和 ERβ Western-blot 检测结果

结果如(图3),与N组相比,A组 ERα 表达未出现显著差异 ( $P > 0.05$ ),B、C、D组 ERα 蛋白表达水平显著升高 ( $P <$

0.05); 与A组相比,C和D组 ERα 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )。ERβ 蛋白表达在各组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

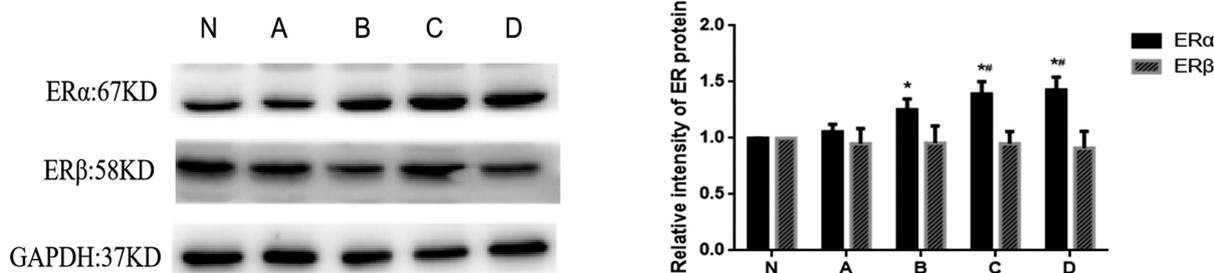


图3 Western-blot 检测大鼠睾丸 ERα 和 ERβ 的表达

Fig. 3 ERα and ERβ expression in testis detected by Western-blot analysis compared with group N, \* $P < 0.05$ ; compared with group A, # $P < 0.05$

注:N: 正常组,A: 大豆对照组,B: 菠菜组,C: 芫荽组,D: 菠菜 + 芫荽组。

Note: N: normal group, A: soy control group, B: spinach group, C: coriander group, D: spinach + coriander group.

## 3 讨论

近年来,随着环境污染的加重及生活习惯的变化,男性的生殖功能障碍呈上升趋势,其病因复杂,影响因素繁多<sup>[8]</sup>;其中,PEs对男性生殖系统的影响已成为人们新兴关注的焦点。而ED是一种常见的性功能障碍疾病<sup>[9]</sup>。据估计<sup>[10]</sup>,到2025年,世界范围内的ED患病率将达到3.22亿例。PEs是存在于植物中的膳食化合物,属于环境雌激素中的一种,与体内雌激素受体结合干扰生殖内分泌系统<sup>[11]</sup>。

大豆是东方饲养中常见的蛋白质来源,在我国居民的饲养

结构中占比较大。大豆富含异黄酮,是我们生活中最常见也最易接触到的PEs<sup>[12,13]</sup>,国内外多项研究已经证实大豆或者大豆异黄酮均能损伤男性性功能,而一项临床回顾性分析研究发现长时间摄入富含豆类食品男性患ED的概率为不摄入豆类食物男性的3.46倍<sup>[14]</sup>。菠菜是我们生活中常见的绿色蔬菜,对其提取物的研究分析发现其富含植物雌激素黄酮类物质如异黄酮<sup>[15]</sup>、槲皮素<sup>[16]</sup>等。芫荽俗称香菜,广泛应用于生活的各领域,研究发现<sup>[17]</sup>,芫荽中含有含有雌二醇、雌三醇、黄酮类化合物<sup>[18]</sup>及香豆素类<sup>[19]</sup>,常用于调整女性激素水平,及排卵障碍所致不孕症。徐悦<sup>[20]</sup>等发现,含有芫荽籽精油的培养基对线虫有抑

制作用,包括繁殖能力减退,体内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)增多,产生氧化损伤。而关于菠菜或茺菘对雄性性功能的影响均无文献报道,随着菠菜和茺菘在生活中的广泛应用,相关的研究显得尤为紧迫。故本研究,选用菠菜和茺菘,制备不同饲料干预大鼠,以同等比例大豆作为阳性对照组,研究大豆、菠菜和茺菘对雄性性功能的影响,并探讨其可能的内在机制。

本研究的性行为学试验结果发现,A组大鼠较N组爬背、插入、射精潜伏期有延长的趋势;爬背、插入、射精次数亦有减少的趋势,但经统计学处理,无显著差异( $P>0.05$ );B组大鼠爬背、插入、射精次数亦有减少,但较N组或A组均无显著差异;C和D大鼠爬背、插入、射精潜伏期较N组显著延长,爬背、插入、射精次数较N组显著减少,同时D组插入潜伏期较A组显著延长( $P<0.05$ ),插入和射精次数明显减少。C组和D组大鼠出现显著的性功能减退。Pan L等<sup>[21]</sup>研究发现,植物雌激素大豆异黄酮对雄性大鼠性功能的损害呈剂量相关性,本研究结果显示A组大鼠性功能与N组相比有所减退,但未出现显著变化,表明30%的大豆饲养不会显著影响雄性性功能,可能和大豆比例成分及浓度有关;而在同等比例下,B组大鼠性行为与N组相比稍有减退,但与A组大鼠性功能水平持平;而C组和D组大鼠的性功能较N组和A组出现明显的减退,且D组性功能减退更为显著,提示菠菜饲养对性功能的影响与大豆类似,而茺菘及菠菜和茺菘联合饲养对大鼠性功能的损伤,显著强于大豆,并且菠菜和茺菘联合饲养的损伤要大于菠菜或茺菘单一饲养干预。

阴茎勃起需要神经、血管、内分泌、心理等许多因素协同作用的复杂生理活动,其中任一因素异常均可导致ED<sup>[22]</sup>。其中内分泌因素T水平降低是ED发生的独立危险因素,雄激素可诱导性欲及阴茎的自发勃起,调控勃起状态<sup>[23]</sup>。T的合成和分泌主要受下丘脑-垂体-性腺轴(HPG)的调节,垂体释放LH,LH与LCs细胞膜上的LH受体特异性结合,促进T的生成<sup>[24]</sup>。血清高水平 $E_2$ 可负反馈抑制LH的生成,此外血清中高水平的 $E_2$ 可通过与睾丸间质细胞的雌激素受体结合,抑制T的产生,诱导ED的产生<sup>[25]</sup>。文献报道<sup>[26]</sup>,低水平的T和高水平 $E_2$ 的可导致ED的患病率升高。本研究结果显示,A组血清激素水平与N组无显著差异;C组( $P=0.071$ )T水平与N组未出现显著差异,可能与样本量不足有关;D组T水平均显著降低( $P<0.05$ )。各组 $E_2$ 水平明显升高,且C组 $E_2$ 水平较A组显著升高,而D组 $E_2$ 水平较N、A组显著升高;C和D组LH水平较N组显著降低,同时C组LH水平较A组显著降低。提示茺菘及菠菜和茺菘联合干预可能通过升高血清 $E_2$ 水平,降低LH水平进而降低T的分泌,从而导致雄性大鼠内分泌系统激素紊乱,使雄性大鼠性功能减退。

睾丸间质细胞表达雌激素受体, $E_2$ 是体内生物效能最强的雌激素,雌激素必须先和雌激素受体结合,激活雌激素受体形成复合物,才能作用于靶器官<sup>[27,28]</sup>。Gould M L等<sup>[29]</sup>研究发现,小鼠敲除ER $\alpha$ 导致睾酮分泌增多,而敲除ER $\beta$ 没有影响。A Lehraiki等<sup>[30]</sup>的研究也表明,敲除ER $\alpha$ ,可能通过提高类固醇激素生成酶的活性,使睾酮分泌增多。因此,雌激素通过ER $\alpha$ 抑

制小鼠间质细胞合成和分泌睾酮。本研究IHC和western-blot结果显示,A组ER $\alpha$ 在睾丸间质细胞的表达无变化,而B、C和D组ER $\alpha$ 在睾丸间质细胞的表达较N组显著增多,C组和D组ER $\alpha$ 在睾丸间质细胞的表达较A组显著升高。ER $\beta$ 的表达量在各组之间则无显著差异( $P>0.05$ ),与文献报道一致<sup>[31]</sup>。提示,茺菘及菠菜和茺菘联合干预对雄性大鼠性功能的影响可能是通过提高 $E_2$ 水平,使睾丸间质细胞ER $\alpha$ 的表达升高,进一步降低T的分泌所导致的。而A组经过干预后T和LH虽有降低的趋势,但 $E_2$ 和FSH水平则无显著变化,同时ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 亦无显著变化,说明30%大豆饲养并不能显著影响大鼠性腺轴激素及其功能,可能与大豆比例较低有关;C组和D组睾丸ER $\alpha$ 表达量较N组和A组均有显著升高,结合性行为学实验及血清激素结果,可得出茺菘具有比大豆更强的雌激素样作用,且菠菜和茺菘的雌激素样作用具有累加效应。

综上所述,30%大豆和菠菜单一饲料干预不会显著损伤大鼠性功能,同比例茺菘及菠菜和茺菘联合干预均可显著损伤雄性大鼠性功能,而以菠菜和茺菘联合饲料干预最为显著;其直接原因是血清睾酮降低,而其具体机制可能是通过提高血清中 $E_2$ 含量促进睾丸ER $\alpha$ 的表达,从而发挥雌激素样作用,直接抑制T的分泌;同时可能通过高水平 $E_2$ 抑制LH的生成,进而使T水平降低,最终损伤大鼠性功能。大豆对大鼠性功能的影响可能呈剂量依赖性,具体机制还需增加样本量进行更一步的研究。同等比例下,茺菘具有比大豆更强的雌激素样作用,且菠菜和茺菘联合饲养具有累加效应,其具体的分子机制需要进一步的深入研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Rehman H, Jahan S, Ullah I, et al. Effects of endocrine disruptor furan on reproductive physiology of Sprague Dawley rats: An F1 Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study (EOGRTS) [J]. Hum Exp Toxicol, 2020 [Epub ahead of print]
- [2] Rietjens IMCM, Lousse J, Beekmann K. The potential health effects of dietary phytoestrogens [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174 (11): 1263-1280
- [3] Andrew R, Izzo AA. Principles of pharmacological research of nutraceuticals[J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(11): 1177
- [4] Huang Y, Pan L, Xia X, et al. Long-term effects of phytoestrogen daidzein on penile cavernosal structures in adult rats. [J].Urology, 2008, 72(1): 220-224
- [5] 刘凤霞,李华强,斯依提·阿木提,等.一种环境激素联合冷应激大鼠模型阴茎组织中Sprouty 2、ERK1/2表达的研究[J].现代生物医学进展,2018,18(18): 3431-3434
- [6] 刘凤霞,斯依提·阿木提,阿卜杜热伊木江·如则,等.环境激素联合冷应激建立勃起功能障碍大鼠模型的实验研究[J].中国男科学杂志,2018(5): 9-13
- [7] 张盼盼,王丽,阿地力江·伊明,等.雌性大鼠交配实验模型的建立[J].中国男科学杂志,2014(6): 6-9
- [8] Luan Y, Cui K, Tang Z, et al. Human Tissue Kallikrein 1 Improves Erectile Dysfunction of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by Inhibition of Excessive Oxidative Stress and Activation of the PI3K/AKT/eNOS Pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020. [Epub ahead of print]

- [9] Osasona SO, Ehimigbai M. Sexual dysfunction: prevalence and associated factors in patients with mental illness receiving psychotropic medication in Nigeria [J]. *Afr Health Sci*, 2019, 19(4): 2973-2984
- [10] Esposito K, Maiorino MG. Bellastella Lifestyle modifications and erectile dysfunction: what can be expected?[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(1): 5-10
- [11] Griffiths K, Wilson DW, Singh RB, et al. Effect of dietary phytoestrogens on human growth regulation: imprinting in health & disease[J]. *Indian J Med Res*, 2014, 140(7): 82-90
- [12] Patisaul HB. Endocrine disruption by dietary phyto-oestrogens: impact on dimorphic sexual systems and behaviours [J]. *Proc Nutr Soc*, 2017, 76(2): 130-144
- [13] Zhou T, Meng C, He P. Soy Isoflavones and their Effects on Xenobiotic Metabolism[J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(1): 46-53
- [14] 潘连军, 张爱霞, 黄宇烽, 等. 饮食中的异黄酮类植物雌激素与勃起功能障碍关系的初步调查[J]. *中华男科学*, 2009, 15(6): 561-564
- [15] 吴开莉, 吕华伟, 颜继忠. 菠菜中化学成分及药理活性研究进展[J]. *食品与药品*, 2016, 18(3): 222-227
- [16] 穆易君, 陈洋, 孙晶, 等. 纤维素酶-超声联合提取菠菜中总黄酮及其成分分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(19): 187-193
- [17] 李小梅, 张丽茁, 张景涛. 苜蓿营养与药理作用研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2010(3): 127-129
- [18] 杨洋, 朱晓华, 李煜彬. 苜蓿中黄酮类化合物的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2015(06): 114-119
- [19] 王婷, 王凤杰, 苗明三. 苜蓿化学、药理及临床应用特点分析[J]. *中医学报*, 2016, 31(12): 1954-1956
- [20] 徐悦, 束成杰, 聂韡, 等. 苜蓿籽精油成分解析及其对秀丽隐杆线虫寿命和运动的影响[J]. *江苏农业科学*, 2019(14): 111-115
- [21] Pan L, Xia X, Feng Y, et al. Exposure of Juvenile Rats to the Phytoestrogen Daidzein Impairs Erectile Function in a Dose-Related Manner in Adulthood[J]. *J Androl*, 2008, 29(1): 55-62
- [22] Yunching H, Dongru H, Jianhui L, et al. Dietary Modification Is Associated with Normalization of Penile Hemodynamics in Rats Fed a High-Fat Diet[J]. *J Sex Med*, 2019, 16(6): 791-802
- [23] Podlasek CA, Mulhall J, Davies K, et al. Translational perspective on the role of testosterone in sexual function and dysfunction [J]. *J Sex Med*, 2016, 13(8): 1183-1198
- [24] Jinwoo L, Tiegang T, Haichuan D, et al. Regulation of StAR by the N-terminal Domain and Coinduction of SIK1 and TIS11b/Znf361l in Single Cells[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 7(107): 1-17
- [25] Vignozzi L, Filippi S, Comeglio P, et al. Estrogen Mediates Metabolic Syndrome-Induced Erectile Dysfunction: A Study in the Rabbit[J]. *J Sex Med*, 2014, 11(12): 2890-2902
- [26] Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function[J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(3): 435
- [27] Combarnous Y, Nguyen TMD. Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds[J]. *Toxics*, 2019, 7(1): 5
- [28] Ruihua Z, Shuwu X, Guoting L, et al. Hormone-like activities of Kuntai capsule in the uteri of ovariectomized rats and immature rabbits[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38(6): 853-861
- [29] Gould M, Hurst P, Nicholson H. The effects of oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  on testicular cell number and steroidogenesis in mice [J]. *Reproduction*, 2007, 134(2): 271-279
- [30] Lehraiki A, Chamailard C, Krust A, et al. Genistein impairs early testosterone production in fetal mouse testis via estrogen receptor  $\alpha$ [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(8): 1542-1547
- [31] 李炜, 牛建昭, 王继峰, 等. 槲皮素的植物雌激素作用及其受体机制研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(2): 91-95