

海参肽与高原药食两用原料复配对雄鼠运动疲劳损伤的影响

徐莉苹¹, 孙绪丁², 冯凤琴³, 郑亚凤¹, 郑宝东^{1*}, 骆贤亮^{1*}

¹福建农林大学食品科学学院, 福州 350002; ²山东益衡元健康科技有限公司, 济南 250000;

³浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310000

摘要:本研究旨在探究海参肽和高原药食两用原料(牦牛鞭、鹿血、玛咖)复配对运动疲劳雄鼠的影响。采用力竭游泳构建运动疲劳雄鼠模型,将疲劳小鼠随机分为模型组、对照组(0.5 mg/g BW 市售人参杜仲片)和两种剂量组合物组(0.25 和 0.5 mg/g BW 组合物),连续干预六周,测定小鼠的脏器系数、交配能力、抗疲劳指标、组织切片、血清激素水平、精子形态及畸形率。两种剂量组合物均可改善力竭运动引起的交配能力下降,且低剂量组效果更佳;组合物可延长小鼠游泳时间,降低血清乳酸含量和肝脏丙二醛水平;低、高剂量的组合物能够有效改善力竭运动导致的血清睾酮和促黄体激素水平不足,并降低精子畸形率;睾酮、乳酸和丙二醛水平均与小鼠交配行为有显著相关性。总之,在力竭游泳训练诱导的疲劳小鼠模型中,海参肽和高原药食两用原料组合物能够改善小鼠疲劳状态和激素分泌失衡,降低生殖系统的氧化损伤。

关键词:海参肽;高原药食两用原料;运动疲劳;激素;疲劳损伤

中图分类号:R283.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)12-2122-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.12.013

Effect of sea cucumber peptide combined with plateau medicinal and edible raw materials on exercise-induced fatigue injury in male mice

XU Li-ping¹, SUN Xu-ding², FENG Feng-qin³, ZHENG Ya-feng¹, ZHENG Bao-dong^{1*}, LUO Xian-liang^{1*}

¹College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

²Shandong Yiheng Yuan Health Technology Co., Ltd., Jinan 250000, China;

³College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China

Abstract: The aim of this study is to investigate the effects of the combination of sea cucumber peptide and plateau medicinal and edible raw materials (yak whip, deer blood, maca) on the reproductive health of male mice with exercise fatigue. The male model of exercise fatigue was established by acute exhaustion swimming, and the mice were randomly divided into blank group, model group, control group (0.5 mg/g BW commercially available Renshen Duzhong tablets) and two-dose composition group (0.25 and 0.5 mg/g BW formula), which were administered continuously for six weeks. The organ coefficient, mating ability, fatigue resistance index, tissue section, serum hormone level, sperm morphology and malformation rate of mice were measured. Both dosage formula improved the decreased mating ability caused by exhaustive exercise, and the low-dose group has better effects. Also, the swimming time of mice was prolonged by formula treatment, while the level of lactic acid in serum and malondialdehyde in liver were reduced. Low and high-dose formula could effectively improve insufficient serum testosterone and luteinizing hormone levels caused by exhaustive exercise, and reduce sperm deformity rates ($P < 0.05$). In addition, testosterone, lactic acid and malondialdehyde levels were significantly correlated with the mating behavior of mice. In the exercise-induced fatigue mouse model, the combination of sea cucumber peptide and plateau medicinal and edible raw materials can improve the fatigue symptom and hormone secretion imbalance of mice, as well as reduce oxidative damage to the reproductive system.

Key words: sea cucumber peptide; plateau medicinal and edible raw materials; exercise fatigue; hormone; fatigue damage

收稿日期:2024-04-29

接受日期:2024-09-10

基金项目:福建省教育厅中青年骨干教师教育科研(科技类)项目(JAT231021);福州市科技重大项目(2021-ZD-287);福建农林大学校企合作科研项目(KH230219A)

*通信作者 Tel:86-013459100507; E-mail:lxlsky008@163.com

生殖系统健康往往与心理健康、心脑血管健康和代谢平衡息息相关^[1]。疲劳是一种复杂的生理和病理现象,长期疲劳会严重影响人体健康。运动疲劳属于机体能量消耗过多从而导致机体能量缺乏,能够诱发男性的生殖功能障碍和精子活力损伤^[2]。机体在高强度运动下会产生大量的氧自由基,活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的大量积累会对性激素、生殖细胞及精子质量产生不良影响,进而导致机体生殖功能下降和损伤^[3]。因此,生殖系统与能量平衡紧密相连,身体活动的变化会改变能量平衡的状态进而影响生殖系统^[4]。鉴于此,开发改善运动疲劳损伤的膳食补充剂尤为重要。

牦牛鞭富含激素、氨基酸及微量元素。有研究发现将牦牛鞭与其他中药成分复配,每日摄入量约为0.7 mg/g BW时,能有效促进睾丸发育和提高小鼠抗缺氧能力^[5]。人工养殖鹿血逐渐得到广泛应用,鹿血含有多种蛋白质、氨基酸、酶和维生素,具有抗疲劳、补血补虚以及加快氧化脂质代谢等功效^[6]。Cui等^[7]研究发现发酵鹿血能显著降低肠道的氧化损伤,增强高强度运动后小鼠的能量储备及抗氧化能力。每日摄入0.3~1.44 mg/g BW鹿血粉还能改善贫血症状^[8]。海参肽由海参蛋白通过酶解加工等手段获得^[9]。课题组前期研究发现,0.2~0.6 mg/g BW剂量的海参肽能够有效提高血清睾酮水平和发挥抗疲劳作用^[10,11]。此外,玛咖作为药食两用高原草本植物,具有抗氧化应激、抗疲劳和改善生殖功能等功效^[12]。研究表明,小鼠每日摄入0.15~0.3 mg/g BW的玛咖,能够改善小鼠疲劳状态^[13],有效抑制生精小管的空泡化和间质细胞的增殖、提高血清睾酮水平等作用^[14]。

海参肽、牦牛鞭、鹿血和玛咖是补肾益精的传统天然药材或食品成分,具有潜在的协同作用,但目前关于这些成分配伍后对运动疲劳损伤的影响尚未有数据支撑。鉴于此,本研究采用力竭游泳构建运动疲劳小鼠模型,并给予模型鼠灌胃不同剂量的海参肽、牦牛鞭、鹿血和玛咖组合物(sea cucumber peptide-plateau medicinal and edible raw materials, SP)。基于前人的研究基础,确定每种组分比例为海参肽:牦牛鞭:鹿血:玛咖粉=34:8:8:50。通过测定脏器系数、血清激素水平、组织形态、精子畸形率、相关性分析等指标,重点探究海参肽与高原药食两用原料(牦牛鞭、鹿血和玛咖)配伍对运动疲劳雄鼠激素水

平和生殖损伤的影响,为改善疲劳损伤相关膳食补充剂的开发提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

海参肽、牦牛鞭粉、鹿血粉和玛咖粉组合物(批号:20230418,山东益衡元健康科技有限公司);人参杜仲片(批号:20230507,聊城澳健生物技术有限公司);乳酸(lactic acid, LA)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号:20230608,南京建成生物工程研究所);睾酮(testosterone, T)、双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定试剂盒(批号:20230704,武汉基因美生物科技有限公司);精子(细胞)形态学快速染色液(Diff-Quik法)(批号:20230701,购于珠海贝索生物技术有限公司);苯甲酸雌二醇(批号:20230513,四川金科药业有限责任公司);孕酮(批号:20230418,四川省精科生化制品有限责任公司)。

HH-2 电热恒温水浴锅(上海舍岩仪器有限公司);KL05R 低速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);Synergy-H1 多功能全自动酶标仪(BioTek公司);Alliance 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters公司);STELLARIS 5 Cryo 冷冻共聚焦光学显微镜(上海徕卡显微系统贸易有限公司)。

1.2 动物

60只ICR雄性小鼠(5~6周龄)和60只ICR雌性小鼠(7~10周龄)由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。动物使用许可证编号:SYXK(浙)2018-0012。所有实验方案与饲养方法均符合动物伦理要求和动物福利规范要求,动物伦理批准编号为:IACUC-20230619-09。

1.3 实验方法

1.3.1 海参肽分子量分布和氨基酸组成测定

分子量检测:本研究以细胞色素C、抑酞酶、杆菌肽、乙烷-乙烷-酪氨酸-精氨酸以及乙烷-乙烷乙烷为标准品制备标准曲线。准确称取0.02 g海参肽于容量瓶中,用流动相定容至10 mL,用0.2 μm微孔过滤膜过滤后进样,利用高效液相色谱测得海参肽分子量分布。采用TSK系列凝胶色谱柱(G2000SWXL);45%乙腈,55%水和0.1%三氟乙酸为流动相;流速、温度和进样量分别设置为0.5

mL/min, 30 °C 和 20 μL。

氨基酸组成检测:精确称取 20 mg 海参肽于消解瓶中,加入 1 mL 的盐酸(6 mol/L)后立即充入氮气并封口,移入 150 °C 恒温箱中消化 1.5 h。加入水解液(6 μL),使用氮气进行吹干,再加入 10 μL 干燥液,吹干后加入衍生溶液(20 μL),混匀并于室温下静置 20 min,加入 B 相(80% 乙腈,50 μL)和 A 相溶液(0.1 mol/L 乙酸钠溶液,450 μL),用乙酸调 pH 至 6.5,涡旋混匀后过膜,通过高效液相色谱进行检测。

1.3.2 实验分组和给药

将雄鼠随机分为空白组(Blank)、模型组(AES)、对照组(AES + GE)、低剂量组(AES + SPL)、高剂量组(AES + SPH),每组 12 只。其中,低剂量组每日灌胃 0.25 mg/g BW 组合物,高剂量组每日灌胃 0.5 mg/g BW 组合物,对照组每日灌胃 0.5 mg/g BW 人参杜仲片,模型组及空白组每日灌胃同体积蒸馏水。以急性疲劳游泳(acute exhausted swimming, AES)进行运动疲劳造模^[10]:于灌胃开始的第 2 周、4 周和 6 周,在小鼠尾巴上绑上铅块(占体重的 5%)。然后,将雄鼠分别放入 25 °C、深 30 cm 的塑料游泳池中进行力竭游泳。当小鼠未能在 5 s 内升至水面呼吸时,记为雄鼠的力竭游泳时间。随后,立即将雄鼠捞起并擦干毛发。空白组小鼠不进行力竭游泳训练。每日按照灌胃量 0.01 mL/g BW 给予小鼠相应剂量的受试物(每日灌胃一次),连续灌胃 6 周,每周测定小鼠体重和摄食量。

1.3.3 交配能力试验

第 6 周力竭游泳训练后,进行小鼠交配能力测试,在每个测试开始时,将雄性小鼠单独置于笼中,使其适应环境 15 min。雌性小鼠于实验前 48 h 皮下注射 5 μg 苯甲酸雌二醇,并于实验前 5 h 皮下注射 5 μg 孕酮诱发发情。实验在 19:00-24:00 进行,将小鼠按雌雄比 1:1 合笼,观察并记录 25 min 内小鼠交配行为。统计各组小鼠的行为参数,包括捕捉次数、骑跨潜伏期、骑跨次数、插入潜伏期、插入次数和射精潜伏期^[11]。

1.3.4 脏器系数

解剖前称取小鼠体重,取血后,通过颈椎脱臼法处死小鼠,收集小鼠肝脏、肾脏、睾丸、精囊腺、阴茎和附睾组织,称重,并计算脏器系数。按公式(脏器系数 = 脏器重量/小鼠体重 × 100%)计算脏器系数。

1.3.5 疲劳指标

在交配实验结束后,给小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(50 mg/kg BW),确保小鼠处于晕迷状态后进行眼球静脉丛取血,室温静置 1 h 后,于 4 °C、3 500 r/min 下离心 15 min,取得血清,置于 -80 °C 冰箱中保存待测。利用生化试剂盒测定血清 LA 和 BUN 含量。此外,称取 100 mg 肝脏组织,以 1:10 (mg:mL)的比例浸入三氯盐酸(0.02 mmol/L)中,匀浆;离心,取上清液加入硫代巴比妥酸,在 532 nm 处测定吸光度,并按照试剂盒说明书计算肝脏组织中的 MDA 含量。

1.3.6 血清激素水平

在实验结束后对小鼠进行眼球静脉丛取血,室温静置 1 h 后,于 4 °C、3 500 r/min 下离心 15 min,取得血清,置于 -80 °C 冰箱中保存待测。按照酶联免疫吸附试验试剂盒说明书操作,检测血清中睾酮、黄体生成素、卵泡刺激素和双氢睾酮的含量。

1.3.7 组织病理学分析

将保存于 4% 多聚甲醛中的睾丸和附睾取出进行组织包埋。连续切割组织使每张厚度均为 4 μm,将切割后的组织进行常规脱蜡水化,再进行苏木精-伊红染色,脱水透明及封固后,通过光学显微镜观察和采集睾丸和附睾形态图像。

1.3.8 精子形态及畸形率

取小鼠一侧附睾,剪切后,放入装有 1 mL 0.9% 生理盐水的离心管中,剪碎组织,将离心管置于 37 °C 恒温水浴锅中孵化 5 min;待精子充分游离后,滴入 8 μL 新鲜精液于清洁载玻片上制成涂片;参考 Diff-Quik 精子形态染色试剂盒说明书对涂片进行染色。将染色后的涂片自然晾干,于光学显微镜下观察并采集图像。采用随机双盲法,通过高倍光学显微镜准确计数 500 个结构完整的精子,按公式(精子畸形率 = 畸形精子数/(畸形精子数 + 正常精子数) × 100%)计算精子畸形率,畸形精子类型包括香蕉形、无钩、胖头、无定形、双头、双尾、尾折叠等。

1.4 统计学处理

数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 Graphpad Prism V10.0 软件进行绘图,通过 One-way ANOVA 进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 海参肽的基本性质

本研究所使用海参肽的分子量分布和氨基酸组

成如图 1 所示。研究表明,海参肽主要集中在分子量 180 ~ 500 Da、500 ~ 1 000 Da 和 1 000 ~ 2 000 Da。分子量小于 1 000 Da 的占比达 73.61%。然而,分子量小于 3 000 Da 的仅有 2.00%,说明本研究的海

参肽为小分子肽。此外,海参肽中主要的氨基酸为甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸、脯氨酸和亮氨酸,其含量分别为 162.78、113.67、86.35、72.42 和 65.25 mg/g。组氨酸和半胱氨酸含量最低,仅有 0.23 和 0.10 mg/g。

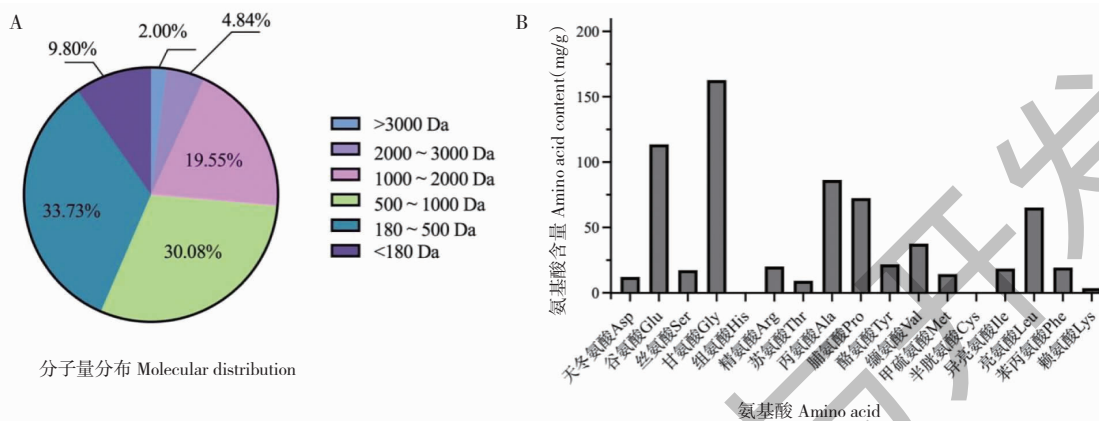


图 1 海参肽的分子量分布与氨基酸组成

Fig. 1 Molecular weight distribution and amino acid composition of sea cucumber peptides

2.2 组合物对小鼠体重的影响

如图 2 所示,各组小鼠的初始体重均在 23.5 g 左右,差异无统计学意义。随着饲养时间的增加,各

组小鼠的体重逐渐增加,但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明组合物的摄入不影响小鼠体重变化。

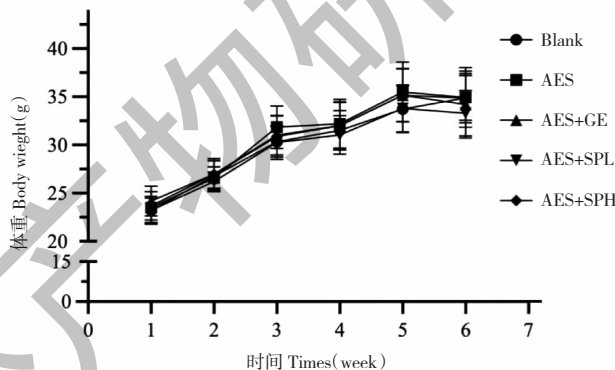


图 2 各实验组小鼠体重 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 2 Body weight of mice in each experimental group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

2.3 组合物对小鼠摄食量的影响

高强度运动会降低机体的能量储备,造成运动后的额外能量摄入显著增加,而膳食补充剂能为机体提供充足的能量来维持机体的能量平衡^[12]。每周记录小鼠的摄食量,结果如图 3 所示。在第二周力竭游泳训练后,模型组的摄食量在第三周较空白组显著增加 ($P < 0.01$),这可能是游泳消耗了大量体能,促使小鼠需要摄入更多能量。有趣的是,模型组的摄食量也显著高于低、高剂量配方组的摄入量,表明试验组在运动后的额外能量摄入更少。在第四

周至第六周,低剂量组合物的摄入量仍然显著小于模型组 ($P < 0.05$)。与对照组比较,低、高剂量组合物的摄食量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 组合物对小鼠脏器系数的影响

根据脏器比差异性的大小能够初步检验动物的脏器是否受到药物的影响。与空白组比较,各干预组未出现行动迟缓、脱毛、精神萎靡等中毒现象。如表 1 所示,与空白组比较,各干预组的脏器系数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。值得注意的是,低、高剂量组的阴茎系数和附睾系数平均值均高于模型

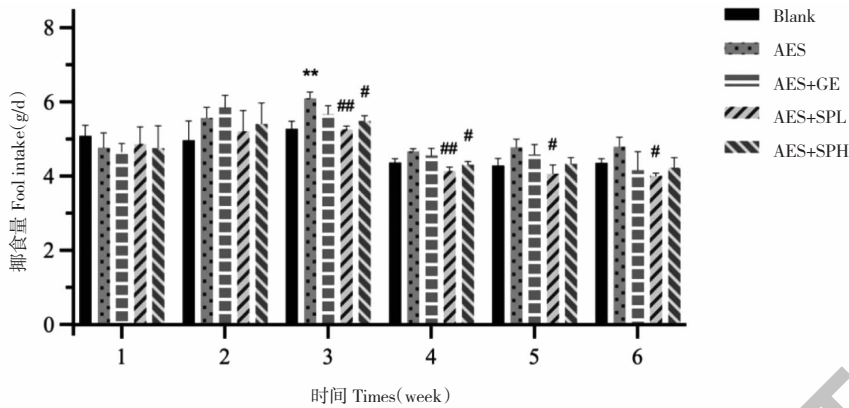


图3 各实验组小鼠摄食量($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Food intake of mice in each experimental group($\bar{x} \pm s, n = 12$)

注:与 Blank 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 AES 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Blank, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with AES, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

表1 各组小鼠脏器系数($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Organ indexes of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	肝脏系数 Liver index (%)	肾脏系数 Kidney index (%)	睾丸系数 Testicular index (%)	精囊腺系数 Seminal vesicle index (%)	阴茎系数 Penile index (%)	附睾系数 Epididymal index (%)
Blank	4.43 ± 0.48	1.58 ± 0.17	0.69 ± 0.05	0.55 ± 0.15	0.14 ± 0.03	0.34 ± 0.09
AES	4.89 ± 0.69	1.70 ± 0.17	0.72 ± 0.08	0.53 ± 0.16	0.14 ± 0.06	0.32 ± 0.10
AES + GE	3.97 ± 0.65	1.47 ± 0.20	0.72 ± 0.15	0.56 ± 0.25	0.13 ± 0.07	0.38 ± 0.20
AES + SPL	4.09 ± 0.54	1.52 ± 0.32	0.72 ± 0.22	0.55 ± 0.11	0.15 ± 0.08	0.34 ± 0.10
AES + SPH	3.95 ± 0.57	1.55 ± 0.14	0.75 ± 0.18	0.53 ± 0.18	0.21 ± 0.12	0.40 ± 0.18

组,表明组合物具有促进雄鼠生殖器官生长的潜在活性。

2.5 组合物对小鼠力竭游泳时间的影响

在极限力竭游泳运动模型中,小鼠游泳时间常作为判断产品抗疲劳功效的指标之一,且产品的抗疲劳效果与小鼠运动延长的时间呈正相关^[15]。图4结果显示,随着饲养时间的延长,小鼠力竭游泳时间整体缩短,这表明造模引起了小鼠一定程度的疲劳损伤。与模型组比较,低剂量组合物在第二周、第四周和第六周的力竭游泳时间均有统计学差异($P < 0.05$),而高剂量组合物在第四周和第六周表现出统计学差异($P < 0.05$)。活性成分的干预持续时间可能会影响其生理活性,Michael 等^[16]研究发现在 60 km 的自行车骑行中,运动员每 5 km 饮用 200 mL 碳水化合物 + 酪蛋白水解物(CHO + ProH)功能饮料,可以改善机体的运动能力,但这种效果出现在功能饮料干预后期。此外,有研究显示,低剂量玛咖多糖(150 mg/(kg · d))对延长小鼠力竭游泳

时间的效果优于高剂量组(600 mg/(kg · d))^[13]。值得注意的是,对照组的力竭游泳时间虽较空白组有所提高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。在第二周和第四周时,两种剂量组合物的效果均有优于对照组。上述结果表明,两种剂量组合物均能有效延长小鼠的运动时间,具有潜在的抗疲劳能力。

2.6 组合物对小鼠交配行为的影响

长时间或高强度运动不仅会大量消耗体内能量,导致代谢产物过度积累,睾酮合成受到抑制,造成身体肌肉疲劳^[17]。同时,疲劳所导致的机体能量不足还可能引起男性生殖功能下降^[18]。本研究进一步观察海参肽与高原药食两用原料配伍对急性力竭游泳后小鼠交配能力的影响。结果表明,与正常组比较,模型组的交配率、捕捉次数、骑跨次数和插入次数明显减少(见图5),表明力竭运动导致小鼠交配能力降低。与模型组比较(33.33%),对照组、低剂量组和高剂量组均明显提高小鼠的交配率,分别为58.33%、75%和58.33%。同时,低剂量组明

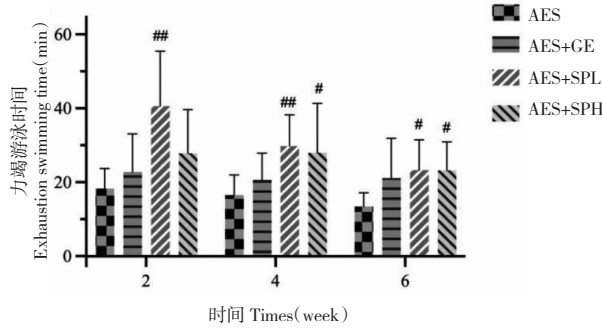


图 4 组合物对小鼠力竭游泳时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 4 Effect of the combination on the exhaustion swimming time of mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

注:与 AES 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with AES, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

显改善力竭游泳后小鼠的交配能力,包括降低射精潜伏期(见图 5C, $P < 0.01$),增加射精次数(见图 5D, $P < 0.01$)、骑跨次数和插入次数(见图 5E, 5F)。高剂量组在一定程度上能够改善小鼠交配能力,但与模型组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在交配能力方面,低剂量组合物的改善效果最佳,且优于对照组。这表明海参肽与高原药食两用原料组合物在 0.25 mg/g BW 的剂量下有更好的恢复疲劳小

鼠的交配能力的作用。在先前的一项研究中,低剂量的海参肽干预(1.5 g/kg 饲料)相比于中剂量的海参肽干预(3.0 g/kg 饲料)具有更好的提高疲劳小鼠血清中葡萄糖水平的功效,这可能有助于海参肽在较低的剂量下产生积极的抗疲劳作用^[19]。此外,研究发现不同剂量(30 mg/kg 饲料和 150 mg/kg 饲料)的发酵鹿血对疲劳小鼠的抗氧化能力、降低乳酸和尿素氮能力、维持肠道屏障完整性和抗肠道

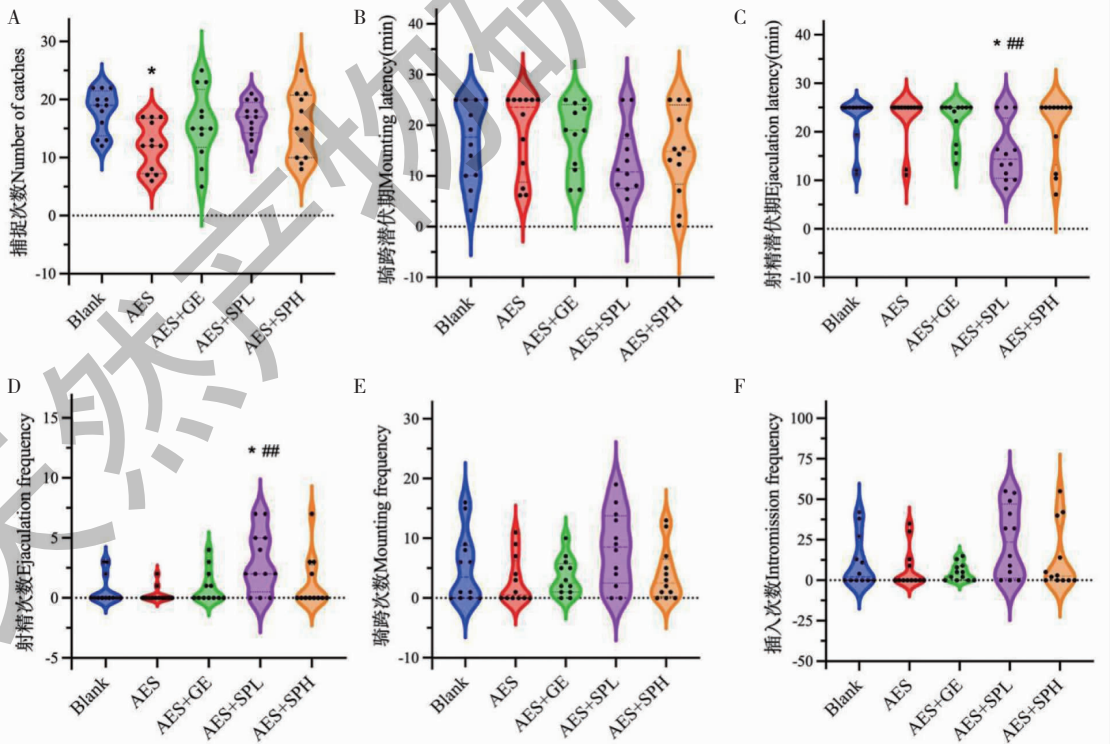


图 5 组合物对小鼠交配行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 5 Effect of composition on mating behavior in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

注:与 Blank 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 AES 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Blank, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with AES, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

炎症等方面无显著差异^[20]。因此,本研究观察到的低剂量组合物在改善交配能力方面有更好效果的现象的分子机制可能是复杂的,还需进一步研究。

2.7 组合物对小鼠乳酸、尿素氮和丙二醛的影响

剧烈运动时,碳水化合物会在无氧条件下发生糖酵解,产生大量乳酸。当糖和脂肪代谢不能给机体提供足够能量时,蛋白质和氨基酸的分解代谢则会增强,从而使机体尿素氮含量增加^[21]。与空白组相比,模型组小鼠的血清 LA 和 BUN 含量显著升高(见图 6A、6B, $P < 0.05$),说明急性力竭游泳消耗了小鼠的大量能量并造成代谢产物堆积。然而,对照组和两种剂量复配物均明显降低 LA 和 BUN 水

平,其中 LA 水平具有统计学差异(见图 6A、6B, $P < 0.05$)。高剂量复配物组的 LA 水平较对照组显著降低($P < 0.05$)。运动时,机体首先消耗体内碳水化合物和脂质作为主要能量来源^[22],而高强度的运动会使机体自由基大量生成,进而攻击细胞膜中的多不饱和脂肪酸从而产生丙二醛,造成不可逆的氧化损伤^[23]。本研究表明急性力竭游泳引起了小鼠肝脏 MDA 含量提高,表明肝脏发生了氧化损伤。与模型组比较,两种剂量复配物均显著降低肝脏 MDA 含量(见图 6C, $P < 0.05$),对肝脏的脂质氧化损伤有一定保护作用。与对照组比较,复配物给药组的 MDA 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

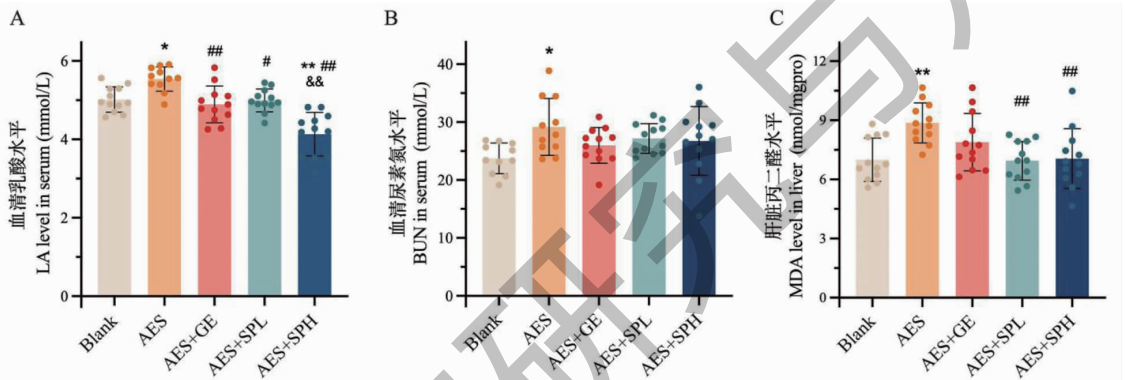


图 6 组合物对小鼠疲劳指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 6 Effect of composition on fatigue indicators in mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

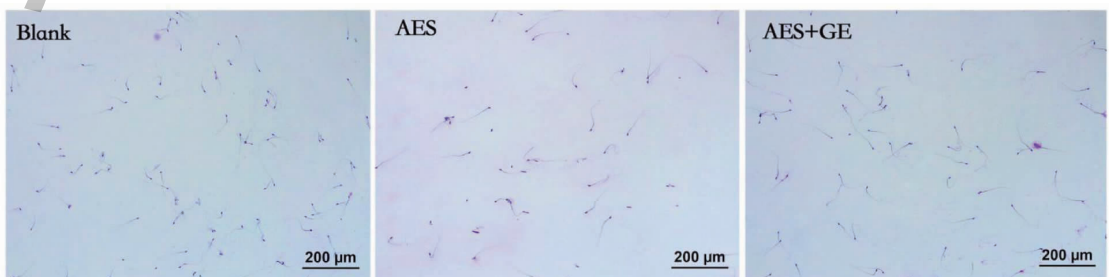
注:与 Blank 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 AES 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 AES + GE 组比较, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Blank, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with AES, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with AES + GE, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

2.8 组合物对小鼠精子形态和畸形率的影响

高强度运动会加快体内自由基的生成,打破机体内自由基稳态,造成细胞及线粒体氧化损伤,从而导致疲劳并损伤机体功能^[24]。在疲劳状态下,氧自由基水平过高还会造成精子的 DNA 损伤,降低精子数量及活力^[25]。如图 7 所示,低剂量组和高剂量组的精子运动活力有所增强,且精子形态较空白组无显著差异。在高倍显微镜下对小鼠精子进行计数统计,与空白组比较,各造模组的精子畸形率显著提高

($P < 0.05$),表明急性力竭游泳运动对精子形态有显著影响,导致精子畸形率上升,这可能是由于高强度运动产生的大量的自由基会损害睾丸及精子,造成精子质量降低。然而,与模型组相比,对照组、低剂量组和高剂量组的精子畸形率均显著降低,且具有统计学差异($P < 0.05$)。此外,两种剂量复配物的精子畸形率与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),且低剂量组与高剂量组之间也无显著性差异($P > 0.05$)。



续图 7(Continued Fig.7)

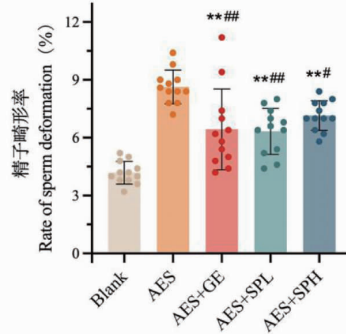
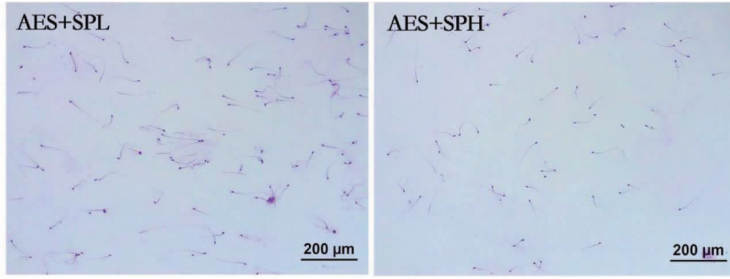


图7 各组分对小鼠精子畸形率的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

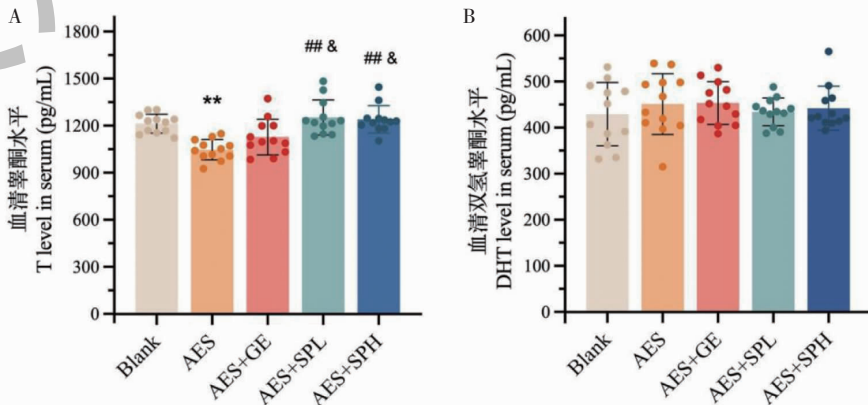
Fig. 7 Effects of each component on sperm deformity rate in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

注:与 Blank 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 AES 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Blank, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with AES, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.9 组合物对小鼠血清激素水平的影响

在下丘脑-垂体-睾丸轴中,促性腺激素与雄激素形成正负反馈调节机制,使机体激素处于平衡状态^[26]。然而,高强度或长时间的运动能够影响机体内分泌系统的调节功能^[27],导致激素分泌紊乱。与空白组相比,模型组小鼠的血清 T 和 LH 水平均明显下降(见图 8A、8D, $P < 0.05$),说明力竭游泳运动可能造成性激素合成不足。低睾酮水平可能导致精子数量和质量减少,影响生育能力^[28]。而促黄体生成素水平下降则可能导致睾丸功能减退,影响正常的睾酮生成,进而影响到整个生殖系统的正常功

能^[29]。与模型组比较,低、高剂量组合物均明显提高了 T 和 LH,其中 T 具有显著性差异($P < 0.05$)。值得注意的是,两种剂量复配物组的 T 水平均显著高于对照组($P < 0.05$)。此外,由垂体分泌的促卵泡激素则作用于睾丸细胞,促进精子的生成和发育,睾酮代谢产物双氢睾酮可促进精子在附睾中的成熟。然而,DHT 和 FSH 水平较模型组差异无统计学意义(见图 8B、8C, $P > 0.05$)。上述结果表明,在运动疲劳模型雄鼠中,海参肽与高原药食两用原料组合物主要改善 T 和 LH。



续图 8(Continued Fig.8)

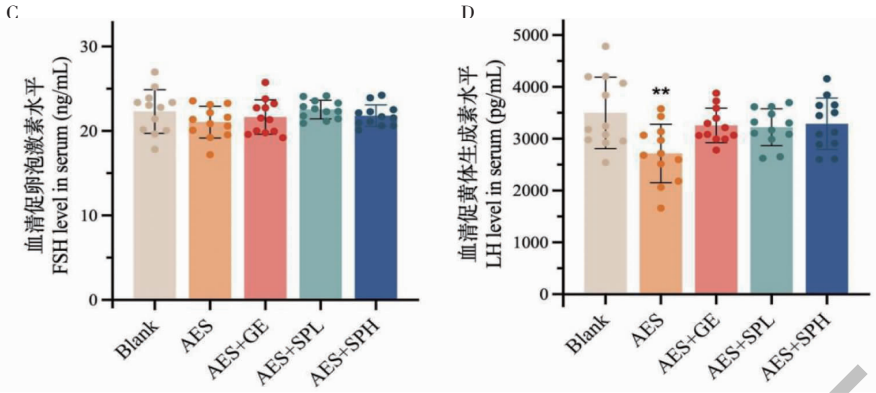


图8 组合物对小鼠血清激素水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 8 Effect of the combination on serum hormone levels in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

注:与 Blank 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 AES 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与 AES + GE 组比较, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Blank, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with AES, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;
Compared with AES + GE, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

2.10 组合物对小鼠睾丸和附睾组织形态的影响

氧化应激是导致睾丸功能障碍的主要因素,而随着氧自由基的不断产生,氧化应激也会随之增加,导致睾丸形态被破坏^[30]。如图 9A、9B 所示,各处理组小鼠的睾丸组织结构完整,曲细精管排列规整有序,各级生精细胞均由内向外紧密排列。结果表

明,急性力竭运动未造成小鼠睾丸组织明显的病理损伤,但能够引起部分生精细胞脱落和精子储存减少,这可能是由于 DNA 的氧化损伤及睾丸的氧化应激所引起的。然而,两种剂量组合物干预均有效缓解这种现象,且对照组、低剂量组和高剂量组的附睾中精子储备量增多(见图 9C、9D)。

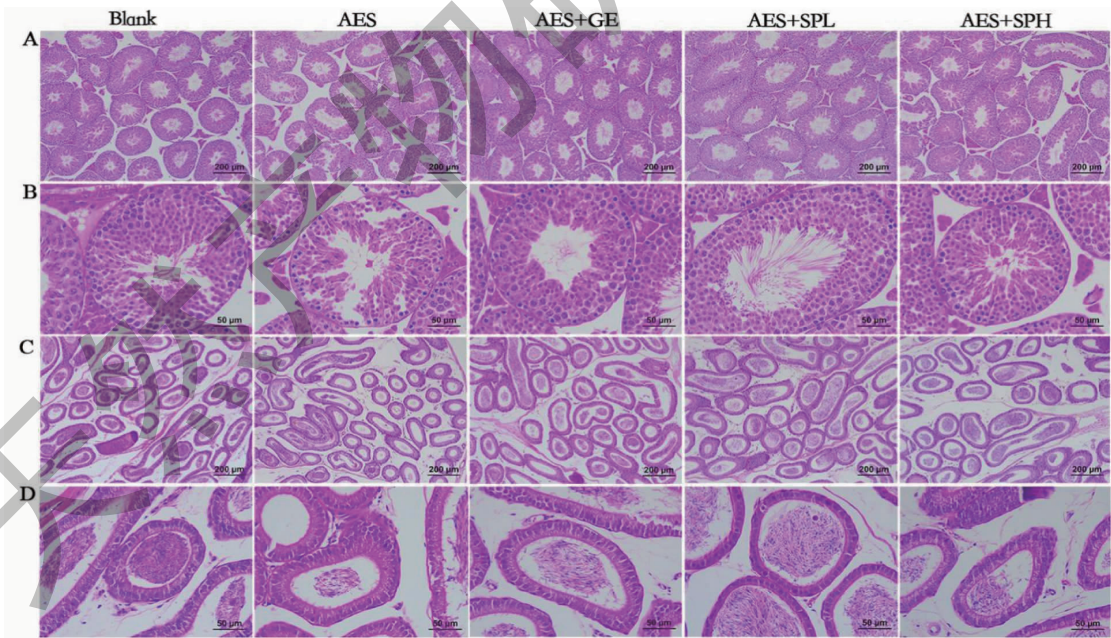


图9 各组小鼠睾丸(A、B)和附睾(C、D)的组织切片

Fig. 9 Tissue slices of testes(A, B) and epididymis(C, D) in each group of mice

2.11 生化指标与生殖功能指标的相关性分析

前文研究表明力竭游泳引起小鼠多项指标变化,但疲劳引起的生化指标变化是否与生殖功能相

关指标具有相关性仍值得进一步探究。如图 10 所示,通过斯皮尔曼(Spearman)相关性分析发现,血清睾酮和促黄体激素水平均与小鼠精子畸形率呈显著

负相关($P < 0.05$)。同时,血清 T 与小鼠的射精次数、骑跨次数和插入次数均有明显的正相关关系。从疲劳指标上看,乳酸水平与小鼠骑跨潜伏期显著正相关($P < 0.05$),表明 LA 的堆积会影响小鼠的交配兴趣。此外,肝脏 MDA 含量与骑跨潜伏期显著

正相关($P < 0.05$),且与射精次数、骑跨次数和插入次数均显著负相关($P < 0.05$),说明疲劳引起的 MDA 水平升高显著影响小鼠的交配行为。因此,监测和维持适当的 T 水平和疲劳指标对于保护力竭运动后雄鼠的生殖健康具有重要意义。

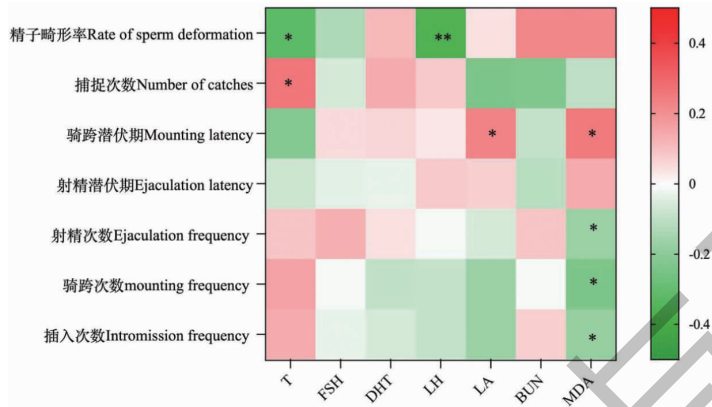


图 10 生化指标与生殖能力指标的相关性分析

Fig. 10 Correlation analysis between biochemical indicators and reproductive ability indicators

注: * 显著相关($P < 0.05$); ** 极显著相关($P < 0.01$)。Note: * Significant correlation ($P < 0.05$); ** Highly significant correlation ($P < 0.01$)。)

3 讨论与结论

长时间或高强度运动不仅会大量消耗体内能量,还可能产生一系列损伤。本实验采用力竭游泳构建运动疲劳模型,探究海参肽、牦牛鞭、鹿血和玛咖组合物对运动疲劳损伤的影响。海参肽是一种潜在的膳食营养补充剂^[9],本研究的海参肽分子量主要集中在 180~500 Da 和 500~1 000 Da,是典型的小分子肽,这一特性可能有助于机体对海参肽的高效吸收利用。在力竭游泳运动模型中,低、高剂量组合物在第四周和第六周的力竭游泳时间均显著长于模型组,这表明组合物具有良好的抗疲劳功效。此外,疲劳是一种复杂的生理和病理现象,疲劳的产生往往会伴随着氧化损伤^[2]。Yu 等^[19]研究发现,海参肽显著降低小鼠血清 LA 和 BUN 水平,同时增加小鼠肝糖原含量。相似地,本研究两种剂量组合物均显著降低血清 LA 和肝脏 MDA 含量,对肝脏的脂质氧化损伤有一定保护作用。这一功效可能与组合物中牦牛鞭、鹿血和海参肽中的功能性成分有关^[5-9]。疲劳产生的氧化应激会导致精子 DNA 的完整性被破坏,长期的疲劳状态可能导致生殖功能障碍和精子活力损伤^[25]。同时,低水平的 T、LH 会抑制精子的产生。海参肽与高原药食两用原料组合物显著提高小鼠的血清睾酮水平,并显著逆转了运动疲劳导致的小鼠精子畸形率的上升,减少睾丸组织生精细胞脱落。组合物中的玛咖和海参肽可能在其

改善生殖功能和氧化损伤中扮演重要角色^[9,14]。值得注意的是,本研究 Spearman 相关性分析表明,小鼠交配能力与睾酮显著正相关,与 LA 和 MDA 水平显著负相关。这进一步揭示了疲劳与生殖健康之间的复杂困扰,疲劳相关代谢物、基因以及酶等是改善生殖功能的潜在靶点。

综上,本研究发现海参肽与高原药食同源物复配能够显著改善运动疲劳损伤,其可能通过改善睾酮水平和抑制脂质氧化等途径缓解疲劳并改善生殖功能。此外,睾酮水平和疲劳指标(LA、MDA)与雄鼠生殖功能息息相关。然而,海参肽与高原药食同源物复配改善运动疲劳损伤的作用机制仍有待进一步挖掘。本研究结果将有助于更好地了解力竭运动对于生殖系统的影响,并为海参肽和高原药食同源物的开发与科学应用提供理论依据。

参考文献

- 1 Steptoe A, Deaton A, Stone AA. Subjective wellbeing, health, and ageing[J]. Lancet, 2015, 385: 640-648.
- 2 Zhang J, Zhang C, Liu A, et al. Synthesis of *Icariin-Zinc* and its protective effect on exercise fatigue and reproductive system related glands in male rats[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 611722.
- 3 Plessis SSD, Kashou A, Vaamonde D, et al. Is there a link between exercise and male factor infertility? [J]. The Open Reprod Sci J, 2011, 3: 105-113.

- 4 Lanfranco F, Minetto MA. The male reproductive system, exercise, and training: endocrine adaptations [M]//Constantini N, Hackney AC. *Endocrinology of Physical Activity and Sport: Second Edition*. New York: Springer Science + Business Media, 2013: 121-132.
- 5 Li P, Wang Y. Effects of traditional Chinese compound prescription Zhuangyao San on testis development and anti-hypoxia ability in mice [J]. *J Tradit Chin Vet Med (中兽医医药杂志)*, 2012, 31: 22-24.
- 6 Li JM, Pan YC, Xia XY, et al. Immunoregulating effects of deer blood crystal on macrophages [J]. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)*, 2020, 36: 810-814.
- 7 Cui J, Shi C, Xia P, et al. Fermented deer blood ameliorates intense exercise-induced fatigue via modulating small intestine microbiota and metabolites in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13: 1543.
- 8 Qi XY, Zhao HP, Shang YD, et al. Deer blood effectively improved clinical signs of anaemia in a rodent model [J]. *Anim Prod Sci*, 2020, 60: 1351-1356.
- 9 Ni ML, Huang HC. Research progress on the biological activity and application of sea cucumber peptides [J]. *Light Ind Sci Technol (轻工科技)*, 2020, 36: 16-20.
- 10 Lou XL, Liu WX, Zheng BD, et al. Sea cucumber peptides positively regulate sexual hormones in male mice with acute exhaustive swimming: possibly through the Ca²⁺/PKA signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2023, 14: 10188-10203.
- 11 Luo X L, Liu WX, Wang J, et al. Effects of the combination of sea cucumber peptide and *Cistanche deserticola* on hormone regulation and testicular anti-oxidative damage in acute-exercising mice [J]. *J Zhejiang Univ: Agric Life Sci (浙江大学学报: 农业与生命科学版)*, 2023, 49: 105-116.
- 12 Kim JH, Cho HD, Won YS, et al. Anti-fatigue effect of prunus mume vinegar in high-intensity exercised rats [J]. *Nutrients*, 2020, 12: 1205.
- 13 Li YJ, Xin YZ, Xu FX, et al. Maca polysaccharides: Extraction optimization, structural features and anti-fatigue activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 115: 618-624.
- 14 Zhou B, Chen Y, Luo H, et al. Effect of Maca (*Lepidium meyenii*) extract on non-obstructive azoospermia in male mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116228.
- 15 Lamou B, Taiwe GS, Hamadou A, et al. Antioxidant and anti-fatigue properties of the aqueous extract of *Moringa oleifera* in rats subjected to forced swimming endurance test [J]. *Oxid Med Cell Longevity*, 2016, 2016: 3517824.
- 16 Michael JS, Rebecca WM, Arie KK, et al. Carbohydrate and protein hydrolysate coingestion's improvement of late-exercise time-trial performance [J]. *Int J Sport Nutr Exe*, 2009, 19: 136-149.
- 17 Pasiakos SM, Berryman CE, Karl JP, et al. Effects of testosterone supplementation on body composition and lower-body muscle function during severe exercise-and diet-induced energy deficit: a proof-of-concept, single centre, randomised, double-blind, controlled trial [J]. *EBioMedicine*, 2019, 46: 411-422.
- 18 Trumble C, Brindle E, Kupsik M, et al. Responsiveness of the reproductive axis to a single missed evening meal in young adult males [J]. *Am J Hum Biol*, 2010, 22: 775-781.
- 19 Yu YH, Wu GQ, Jiang YG, et al. Sea cucumber peptides improved the mitochondrial capacity of mice: a potential mechanism to enhance gluconeogenesis and fat catabolism during exercise for improved antifatigue property [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4604387.
- 20 Cui J, Shi C, Xia P, et al. Fermented deer blood ameliorates intense exercise-induced fatigue via modulating small intestine microbiota and metabolites in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13: 1543.
- 21 Deng X, Chou M, Huang HZ, et al. Effect of decocting time on chemical composition and anti-fatigue effect of *Triphala* decoction [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2023, 35: 1212.
- 22 Gonzalez JT, Fuchs CJ, Betts JA, et al. Liver glycogen metabolism during and after prolonged endurance-type exercise [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 311: E543-E553.
- 23 Zhu J, Yi J, Kang Q, et al. Anti-fatigue activity of hemp leaves water extract and the related biochemical changes in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 150: 112054.
- 24 Meng JX, Hou JP. Influence of trace elements on the health of athletes [J]. *J Food Saf Qual (食品安全质量检测学报)*, 2020, 11: 358-362.
- 25 Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, 10: 49.
- 26 Corradi PF, Corradi RB, Greene LW. Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male [J]. *Urologic Clinics*, 2016, 43: 151-162.
- 27 Chen CY, Yuen HM, Liao YH, et al. Anti-fatigue effects of sante premium silver perch essence on exhaustive swimming exercise performance in rats [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 651972.
- 28 Grande G, Barrachina F, Soler VA, et al. The role of testosterone in spermatogenesis: lessons from proteome profiling of human spermatozoa in testosterone deficiency [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 852661.
- 29 Nida A, Mohd S, Rajesh K, et al. Abnormalities in sex hormones and sexual dysfunction in males with diabetes mellitus: a mechanistic insight [J]. *Acta Histochem*, 2023, 125: 151974.
- 30 Yang J, Wang J, Guo W, et al. Toxic effects and possible mechanisms of deoxynivalenol exposure on sperm and testicular damage in BALB/c mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 2289-2295.