

# 石灰、蓼叶处理槟榔对小鼠生殖毒性及体温的影响

刘书伟<sup>1</sup>, 王 燕<sup>2\*</sup>, 都二霞<sup>3</sup>, 胡劲召<sup>2</sup>

(1. 海南热带海洋学院 热带生物与农学院, 海南 三亚 572022; 2. 海南热带海洋学院 热带生态环境保护学院, 海南 三亚 572022; 3. 美国康涅狄格大学 医学院, 康涅狄格州 法明顿 06032)

**摘要:** 为探索添加蓼叶和石灰对槟榔毒副作用的影响, 设置蓼叶 + 槟榔、石灰 + 槟榔、蓼叶 + 石灰 + 槟榔、槟榔 4 个处理及空白对照(蒸馏水), 分别将不同处理的水提液(蒸馏水)对 SPF 级 KM 小鼠进行灌胃处理, 每天 1 次, 连续灌胃 14 d, 测定小鼠的生精细胞凋亡指数、Bcl-2 与 Bax 蛋白表达量及体温。结果表明, 与空白对照相比, 各处理的睾丸曲细精管中生精细胞凋亡指数均增高且差异显著, 其中槟榔处理的凋亡指数最大, 其次是槟榔 + 石灰, 槟榔 + 蓼叶 + 石灰处理最小, 槟榔处理的凋亡指数是槟榔 + 蓼叶 + 石灰处理的 2.6 倍; 各处理的 Bax 蛋白表达阳性率均增高, Bcl-2 蛋白表达阳性率均降低, 其中槟榔处理变化幅度最大, 槟榔 + 蓼叶 + 石灰槟榔处理最小, 槟榔 + 蓼叶 + 石灰处理的 Bcl-2/Bax 值是槟榔处理的 1.41 倍; 各处理的小鼠体温均呈现下降趋势, 槟榔 + 蓼叶 + 石灰处理体温相对最高且降幅最小, 与槟榔处理相反。可见, 添加蓼叶或石灰能减弱槟榔对小鼠的毒性作用。

**关键词:** 槟榔鲜果; 小鼠; 细胞凋亡; 体温

**中图分类号:** S859.3    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2016)10-0151-04

## Influence of Lime *Piper betle* Processing Betelnut on Mice' Genital Toxicity and Body Temperature

LIU Shuwei<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>2\*</sup>, DU Erxia<sup>3</sup>, HU Jinzhao<sup>2</sup>

(1. College of Tropical Biology and Agronomy, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China;  
2. College of Tropical Ecological Environmental Protection, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China;  
3. Department of Medicine, UConn Health, Farmington, CT 06032, USA)

**Abstract:** To explore the toxic effects of betelnut after *Piper betle* and lime were added, the KM mice of SPF were intragastrically administered with water extract solution from *Piper betle* + betelnut, lime + betelnut, *Piper betle* + lime + betelnut and betelnut once a day and observed for 14 d. Spermatogenic cell index, Bcl-2, Bax and body temperature of mice were measured. The results showed that spermatogenic cell apoptosis index of treatments were increased and had a significant difference with the control, in which the betelnut treatment was the biggest and was 2.6 times of *Piper betle* + lime + betelnut treatment that was the smallest, and lime + betelnut was between them. The positive expression level of Bax protein of the treatments were up regulated, but Bcl-2 protein was down regulated significantly, which betelnut treatment changed was the biggest, and *Piper betle* + lime + betelnut was minimum, but the Bcl-2/Bax of the later

收稿日期: 2016-04-02

基金项目: 海南省中药现代化专项项目(ZY201417); 三亚市院地科技合作项目(2014YD16, 2015YD29); 三亚市功能槟榔研究重点实验室项目(L1411)

作者简介: 刘书伟(1978-), 男, 河南平舆人, 副教授, 硕士, 主要从事中药药理、农产品加工研究及相关教学工作。  
E-mail: hnsw@163.com

\* 通讯作者: 王 燕(1979-), 女, 河南太康人, 副教授, 硕士, 主要从事槟榔研究及相关教学工作。  
E-mail: wysw119@163.com

was 1.41 times of the former. Body temperature of mice in four treatments were lower than CK and showed a trend of decline, 'Piper betle + lime + betelnut treatment' s temperature was relatively higher and the smallest decrease, in contrast with betelnut. In short, adding Piper betle or lime to betelnut could weaken genital toxicity in mice.

**Key words:** betelnut; mice; cell apoptosis; body temperature

槟榔 (*Areca catechu* L.) 是棕榈科槟榔属的热带常绿乔木, 其果实因具有重要的药用价值而位居中国四大南药之首<sup>[1]</sup>。槟榔是许多中药复方的组成成分, 如四磨汤、槟榔四消丸、柴胡舒肝丸等, 其应用较广泛。在兽医临床上, 槟榔主要用于治疗绦虫、蛔虫、钩虫等<sup>[2-4]</sup>, 也可治疗牲畜的食积气滞、腹痛胀满便秘、增加食欲等<sup>[5-7]</sup>, 还可用于抗氧化、抗抑郁、抗镇痛等<sup>[8]</sup>。2003 年, 世界卫生组织国际癌症研究中心 (IARC) 认定槟榔为 I 级致癌物<sup>[9]</sup>。此后, 槟榔的使用安全性越来越受到质疑, 国内外学者对槟榔进行了较多研究, 但之前的研究主要集中在槟榔生物碱的药理及毒性方面, 而对槟榔鲜果添加物的研究较少<sup>[10-12]</sup>。关于槟榔毒性来源一直存在争议, 槟榔咀嚼地区一般把毒性来源归结于添加物上, 但缺乏科学依据。为此, 针对槟榔常用添加物进行毒性评价, 采用鲜果槟榔传统食用的方法对小鼠进行灌胃, 研究小鼠对毒物较敏感的生殖器官的毒性变化情况, 以小鼠睾丸曲细精管中的生精细胞凋亡状况来评价槟榔对小鼠的生殖毒性, 并观察小鼠染毒后体温的变化, 评价槟榔添加物对其毒副作用的影响, 旨在为槟榔在兽药学领域的进一步产品开发和利用提供理论支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试动物

4 周龄 SPF 级 KM 小鼠购于湖南斯莱克实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(湘) 2013-0004。购入后置于海南省三亚市功能槟榔重点实验室动物房养殖, 以江苏省协同医药生物工程有限责任公司生产的 SPF 级小鼠专用维持饲料喂养, 采取自由采食、饮水的喂养方式, 适应 7 d 后, 选取表现无异常、大小均匀的小鼠待用, 体质量为 (18 ± 1) g。实验室室内温度 (22 ± 3) °C, 光照为 12 h/d, 相对湿度 60% ~ 70%。

### 1.2 试验设计

按照食品毒理学实验室操作规范 (中华人民共和国国家标准 GB15193-2014) 进行试验, 选取 45 只 4 周龄、SPF 级、大小均匀的健康 KM 雄鼠, 随机分为 5 个处理, 即槟榔 + 蒺藜 + 石灰处理、槟榔 + 蒺

藜处理、槟榔 + 石灰处理、槟榔处理及空白对照处理 (CK, 蒸馏水)。每个处理 9 只雄鼠。采用 4 个处理的水提液和蒸馏水对小鼠经口灌胃。具体要求为: 小鼠禁食 8 h 后称其体质量后对小鼠灌胃, 每天 1 次, 灌胃剂量标准为 15 mL/kg, 给药后禁食禁水 1 h 后, 自由采食饮水, 连续灌胃 14 d, 小鼠均为单只单笼饲养。

### 1.3 槟榔材料及制备

槟榔鲜果采摘于海南三亚吉阳区的槟榔种植园, 采收的槟榔茎部带宿萼, 切开后有未成熟的种子, 外形椭圆、匀称, 纵向直径为 5 ~ 6 cm, 横向直径为 3 ~ 4 cm, 光泽好、绿色纯正。为防止槟榔水分挥发, 槟榔采用保鲜膜包裹, 冷藏待用。将鲜果槟榔清洗干净后晾干, 切碎待用。用马弗炉烧制贝壳, 制备贝壳粉, 然后把贝壳粉与蒸馏水混合制备成黏稠状石灰待用。取碎槟榔、新鲜蒺藜和黏稠状石灰按照质量比 144:16:9 混合, 取碎槟榔与新鲜蒺藜按照质量比 9:1 混合, 取碎槟榔与黏稠状石灰按照质量比 16:1 混合。分别取各混合物 500 g, 并在各混合物中加入等质量的蒸馏水, 分别用研磨机粉碎研磨 5 min, 静置水提 4 h, 然后用双层纱布过滤, 将滤液分别置于经消毒后的离心管中, 5 000 r/min 离心 10 min, 然后采用 0.22 μm 除菌过滤膜过滤, 滤液即为供试水提液, 水提液现用现制, 2 h 内处理完毕。

### 1.4 测定指标

1.4.1 生精细胞凋亡检测 灌胃处理 14 d 后, 脱颈椎处死小鼠, 迅速摘取小鼠双侧睾丸, 采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (TUNEL) 检测。将睾丸组织切片置于荧光显微镜下观察, 细胞核中具有棕黄色颗粒且背景清晰的细胞视为阳性细胞, 每张切片均选 20 个视野, 计总的生精细胞凋亡数, 通过计算得出生精细胞凋亡指数。

1.4.2 免疫组织化学法检测睾丸组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 参照姜卓等<sup>[13]</sup>的方法进行检测。10% 中性甲醛固定睾丸组织, 铬明矾处理组织切片, 然后进行石蜡包埋、切片、展片、烘片、脱蜡等处理, 采用武汉博士德生物工程有限公司生产的试剂盒按说明书进行操作, 应用 JD-801 形态学显微图像分析系统对结果进行分析。

1.4.3 体温 试验期间,应用北京海创高科科技有限公司生产的 TH-212 生物体温计,从第 2 天开始对小鼠的体温进行测量,每 2 d 测定 1 次,共计测量 7 次。

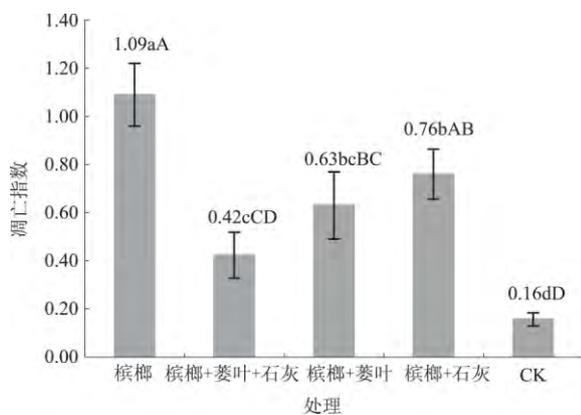
### 1.5 数据处理

差异性统计分析使用 SPSS 19.0 统计软件处理,单因素 ANOVA 分析,数据以平均数 ± 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响

从图 1 可知,与 CK 相比,其他 4 个处理的小鼠睾丸曲细精管中的生精细胞凋亡指数均有不同程度的增高;CK 与槟榔+葵叶、槟榔+石灰及槟榔处理差异极显著,与槟榔+葵叶+石灰处理差异显著。与槟榔处理相比,添加葵叶的 2 个处理生精细胞凋亡指数均极显著降低,说明添加葵叶后能降低槟榔对小鼠生殖器官的损伤。槟榔+葵叶+石灰处理细胞凋亡指数值最小,槟榔处理细胞凋亡指数是其 2.6 倍,说明通过向槟榔里添加葵叶和石灰,能减少槟榔对小鼠的生精细胞的伤害。



不同小、大写字母表示在 0.05、0.01 水平差异显著

图 1 不同处理对小鼠睾丸生精细胞凋亡指数的影响

### 2.2 不同处理对小鼠生精细胞的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Bcl-2 和 Bax 蛋白均参与生精细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。Bcl-2 和 Bax 蛋白在功能上相互对立,Bcl-2 蛋白抗细胞凋亡,Bax 蛋白促细胞凋亡,Bcl-2/Bax 值的大小是决定细胞是否发生凋亡的重要指标。从表 1 可看出,Bcl-2 和 Bax 蛋白在各处理中均有不同程度的表达。在 Bax 蛋白表达阳性率方面,槟榔处理最大,且与 CK 差异显著;其他 3 个处理略高于 CK,但差异均不显著。在 Bcl-2 蛋白表达阳性率方面,4 个具有槟榔成分的处理均小于 CK,其中 CK 与槟榔处理差异极显著,与槟榔+石灰处理差异显著,与

其他 2 个处理差异不显著;槟榔处理与槟榔+葵叶+石灰处理差异极显著。在 Bcl-2/Bax 方面,4 个具有槟榔成分的处理均小于 CK;槟榔+葵叶+石灰处理、槟榔+葵叶处理、槟榔+石灰和 CK 的 Bcl-2/Bax 值分别是槟榔处理的 1.41 倍、1.29 倍、1.19 倍和 1.73 倍。从以上分析可知,在诱导小鼠睾丸生精细胞凋亡方面,与槟榔处理相比,槟榔+葵叶+石灰处理能降低凋亡基因蛋白 Bax 的表达,显著地增强抗凋亡基因蛋白 Bcl-2 的表达,使 Bcl-2/Bax 值增大。说明添加葵叶和石灰能明显减弱槟榔对小鼠睾丸组织的伤害。

表 1 不同处理的小鼠睾丸组织 Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 差异性

处理	Bax 蛋白表达 阳性率/%	Bcl-2 蛋白表达 阳性率/%	Bcl-2/Bax
槟榔	39.59 ± 2.06 <sup>aA</sup>	23.14 ± 1.89 <sup>cB</sup>	0.59 ± 0.07 <sup>dC</sup>
槟榔+葵叶+石灰	35.70 ± 3.09 <sup>abA</sup>	29.49 ± 1.96 <sup>abA</sup>	0.83 ± 0.06 <sup>abAB</sup>
槟榔+葵叶	37.26 ± 2.63 <sup>abA</sup>	28.17 ± 2.60 <sup>abAB</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>bcAB</sup>
槟榔+石灰	38.47 ± 2.40 <sup>abA</sup>	25.52 ± 2.78 <sup>bcAB</sup>	0.66 ± 0.06 <sup>cB</sup>
CK	33.32 ± 1.66 <sup>bA</sup>	34.17 ± 3.17 <sup>aA</sup>	1.02 ± 0.06 <sup>aA</sup>

注:同列数据不同小、大写字母分别表示在 0.05、0.01 水平差异显著。

### 2.3 不同处理对小鼠体温的影响

从图 2 可以看出,整个试验期间,槟榔+葵叶+石灰处理、槟榔+葵叶处理、槟榔+石灰处理、槟榔处理的小鼠体温均低于 CK;随着灌胃天数的增加,4 个具有槟榔成分的处理体温均呈现逐渐降低的趋势,其中槟榔处理组小鼠体温降低最为明显。槟榔+葵叶+石灰处理体温降低幅度较小,且体温均高于槟榔+葵叶处理、槟榔+石灰处理和槟榔处理。

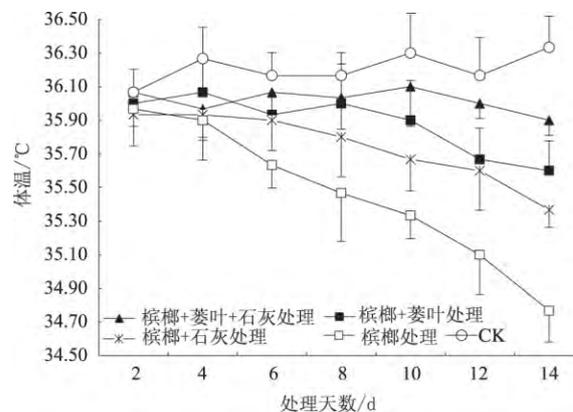


图 2 不同处理对小鼠体温的影响

## 3 结论与讨论

本研究结果表明:(1) 槟榔水提液可诱导小鼠生精细胞凋亡,槟榔+葵叶+石灰处理、槟榔+葵叶

处理、槟榔+石灰处理、槟榔处理的小鼠生精细胞凋亡指数增高,与CK差异均显著。其中,槟榔处理凋亡指数是槟榔+葵叶+石灰处理凋亡指数的2.6倍。此外,槟榔处理Bax蛋白表达阳性率最大,且与CK差异显著,其他3个处理略高于CK,但差异不显著;4个具有槟榔成分的处理的Bcl-2蛋白表达阳性率均小于CK,其中CK与槟榔处理差异极显著,与槟榔+葵叶+石灰处理差异不显著,同时槟榔处理与槟榔+葵叶+石灰处理差异极显著。说明添加葵叶和石灰,能减小槟榔对小鼠的伤害,不添加葵叶或石灰的槟榔使小鼠生精细胞凋亡指数较大,使生精过程发生障碍,从而影响其生殖功能,其详细机制还有待进一步探讨。(2)4个具有槟榔成分的处理的小鼠体温均不同程度低于CK,并均呈现下降趋势。其原因可能是小鼠基础代谢率降低,各器官功能减弱,或者是各处理通过抑制小鼠下丘脑体温调节中枢,而使体温调节功能下降。

胡怡秀等<sup>[16]</sup>曾报道,当槟榔碱水提液超过一定剂量时,会能使小鼠精子数量显著减少、精子活动率明显降低及精子畸形率明显升高,甚至会导致小鼠性功能减低。高文平等<sup>[17]</sup>研究表明,槟榔碱能降低正常男性体外精子运动能力,其毒性与浓度时间成正比。刘书伟等<sup>[18]</sup>也表明,槟榔水提液影响小鼠体质量、存活率及生精细胞凋亡指数,并与槟榔碱含量呈正相关。以上研究与本研究的结果总体一致,说明槟榔果中高剂量的槟榔碱对雄性小鼠的生殖系统可能造成一定的危害,但有待进一步的试验研究。同时本研究发现,向槟榔里添加葵叶和石灰,能减弱槟榔的毒副作用。但若把槟榔添加到饲料中时,同时加入葵叶或石灰是否对牲畜具有积极影响,需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 方瑞征. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 113-114.  
 [2] 田喜凤, 戴建军, 董路, 等. 槟榔南瓜子合剂对猪带绦虫作用的超微结构观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志,

2002, 15(6): 47-48, 84.

- [3] 李献军. 中药对离体猪蛔虫的疗效研究[J]. 现代农业科技, 2011(11): 328-330.  
 [4] 许正敏, 李智山, 温茂兴, 等. 槟榔对犬钩蚴体外作用的实验观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2010(10): 767-768, 805.  
 [5] 王明兴. 槟榔散治疗马属动物不完全阻塞性肠便秘[J]. 中兽医医药杂志, 2000(10): 31.  
 [6] 王平. 槟榔的促胃动力作用及其有效组分的探索[D]. 南京: 南京医科大学, 2012.  
 [7] 杨建省, 王秋菊. 砂仁、槟榔、山楂等6味中草药促进胃肠蠕动作用的研究[J]. 饲料博览, 2013(2): 5-10.  
 [8] 蒋志, 陈其城, 曹立幸, 等. 槟榔及其活性物质的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1684-1687.  
 [9] Gilani A H, Ghayur M N, Saify Z S *et al.* Presence of cholinomimetic and acetylcholinesterase inhibitory constituents in betel nut[J]. Life Sciences, 2004, 75(20): 2377-2389.  
 [10] 刘立云, 符之学, 黄丽云, 等. 海南万宁市槟榔鲜果含硒状况调查与分析[J]. 农学学报, 2014, 4(6): 67-71.  
 [11] 袁列江, 李忠海, 郑锦星. 槟榔提取物对小白鼠体内抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 225-228.  
 [12] 何艾, 李远颂, 张容鸽, 等. 不同储藏条件对贝壳粉处理槟榔品质的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 162-165.  
 [13] 姜卓, 罗光彬, 尹荣焕, 等. 喹乙醇对小鼠生精细胞Bax基因表达的影响[J]. 河南农业科学, 2008(3): 112-114.  
 [14] Saikumar P, Dong Z, Weinberg J M *et al.* Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury[J]. Oncogene, 1998, 17(25): 3341-3349.  
 [15] Yang J, Liu X, Bhalla K *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275: 1129-1132.  
 [16] 胡怡秀, 臧雪冰, 胡余明, 等. 槟榔对雄性小鼠生殖功能的影响[J]. 中华预防医学杂志, 1999, 18(1): 27-28.  
 [17] 高文平, 杨大坚, 胡四琴, 等. 槟榔碱对人体外精子运动能力的影响[J]. 中国药房, 2010, 21(11): 967-969.  
 [18] 刘书伟, 王燕, 胡劲召. 槟榔鲜果对小鼠体质量、生精细胞凋亡及脏器系数的影响[J]. 河南农业科学, 2016, 45(2): 142-145, 160.