

芒果核仁的化学成分及体外对弱精症大鼠精子质量的影响

余昕¹, 邓家刚², 欧贤红¹, 袁叶飞^{1*}

1. 四川医科大学, 四川 泸州 646000

2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001

摘要: **目的** 研究芒果 *Mangifera indica* 核仁的化学成分及体外对弱精症大鼠精子质量的影响。**方法** 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和重结晶等分离纯化手段, 分离纯化芒果核仁化学成分, 进一步以 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和质谱等有机波谱学方法鉴定各单体化合物的结构; 采用雷公藤多苷 ig 大鼠建立弱精症大鼠模型, 以此评价化合物体外对弱精症大鼠的精子活力和精子存活率的影响。**结果** 从芒果核仁中得到 9 个化合物, 分别鉴定为维生素 E (1)、没食子酸甲酯 (2)、山柰酚 (3)、槲皮素 (4)、3,4-*O*-异丙基莽草酸 (5)、5-羟基-4-氧代吡喃-2-羧酸 (6)、阿魏酸 (7)、异槲皮苷 (8)、1,2,3,4,6-五-*O*-没食子酰葡萄糖 (9); 化合物 1、7、9 在体外能使弱精症大鼠的精子活力和精子存活率增加。**结论** 化合物 1、3~6、8 为首次从芒果核仁中分离得到, 化合物 1、7、9 体外能够改善弱精症大鼠的精子质量。

关键词: 芒果核仁; 弱精症; 精子质量; 阿魏酸; 1,2,3,4,6-五-*O*-没食子酰葡萄糖

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)24-3643-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.005

Chemical constituents from *Mangifera indica* seed kernel and their effects on sperm quality of asthenospermia rats *in vitro*

YU Xin¹, DENG Jia-gang², OU Xian-hong¹, YUAN Ye-fei¹

1. Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of mango (*Mangifera indica*) seed kernel and their effects on sperm quality of asthenospermia rats *in vitro*. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and recrystallization. Their structures were elucidated by spectral analyses such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and MS. The rats were treated with a single ig administration tripterygium glycosides to induce asthenospermia rat model, so that the effects of the compounds could be evaluated on the sperm motility and sperm survival rate of asthenospermia rats *in vitro*. **Results** Nine compounds were isolated and purified from mango seed kernel, whose structures were elucidated as vitamin E (1), methyl gallate (2), kaempferol (3), quercetin (4), 3,4-*O*-isopropylidene shikimic acid (5), 5-hydroxy-4-oxopyran-2-carboxylic acid (6), ferulic acid (7), isoquercitrin (8), and 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloylglucose (9). Compounds 1, 7, and 9 could increase the sperm motility and sperm survival rate of asthenospermia rats *in vitro*. **Conclusion** Compounds 1, 3-6 and 8 are obtained from mango seed kernel for the first time; Compounds 1, 7, and 9 could improve the sperm quality of asthenospermia rats *in vitro*.

Key words: mango seed kernel; asthenospermia; sperm quality; ferulic acid; 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloylglucose

芒果 *Mangifera indica* L. (俗称芒果) 为漆树科 (Aceraceae) 芒果属 *Mangifera* L. 热带常绿大乔木, 其分布广泛, 世界有 70 多个国家生产芒果, 年产量近 2.0×10^7 t, 其中我国年产量 1.0×10^6 t。芒果鲜食或加工后产生大量的果核, 果核中的核仁约占芒

果总质量的 20% 左右^[1-2], 但芒果核仁常被废弃, 未得到有效利用。芒果核仁具有补肾、祛肾寒的功效, 用于肾虚、肾寒、腰腿痛、疝气和睾丸炎等症^[3]。近年来研究表明, 芒果核仁具有抑菌止泻^[4]、抗氧化^[2]、抗炎^[5]等药理作用。基于芒果核仁具有补肾、祛肾

收稿日期: 2015-08-17

基金项目: 广西中药药效研究重点实验室开放基金 (13-051-06-K5); 四川省科技支撑计划 (14ZC0043); 广西中医药大学校级课题 (K378)

作者简介: 余昕 (1982—), 女, 硕士, 实验师, 从事药理学研究。Tel: (0830)3162291 E-mail: 153361232@qq.com

*通信作者 袁叶飞, 男, 博士, 教授, 从事中药化学成分研究。Tel: (0830)3162291 E-mail: yuan_yefei@163.com

寒功效, 而肾阳虚与弱精症密切相关, 且临床上常用补肾阳中药治疗弱精症, 前笔者通过实验证实了杧果核仁具有治疗弱精症的作用^[6]。为进一步明确其活性成分, 本实验从杧果核仁 95%乙醇提取物的二氯甲烷萃取物和正丁醇萃取物中分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为维生素 E (vitamin E, **1**)、没食子酸甲酯 (methyl gallate, **2**)、山柰酚 (kaempferol, **3**)、槲皮素 (quercetin, **4**)、3,4-*O*-异丙基莽草酸 (3,4-*O*-isopropylidene shikimic acid, **5**)、5-羟基-4-氧代吡喃-2-羧酸 (5-hydroxy-4-oxopyran-2-carboxylic acid, **6**)、阿魏酸 (ferulic acid, **7**)、异槲皮苷 (isoquercitrin, **8**)、1,2,3,4,6-五-*O*-没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-penta-*O*-galloylglucose, **9**)。其中化合物 **1**、**3**~**6**、**8** 为首次从杧果核仁中分离得到, 化合物 **1**、**7**、**9** 在体外能增加弱精症大鼠的精子活力和精子存活率。

1 仪器与材料

Yanaco MP-S3 显微熔点测定仪 (日本 Yanaco 公司), Bruker AM-400 MHz 型核磁共振光谱仪 (瑞士 Bruker 公司), QTRAP 型串联四极杆线性离子阱质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司), CMIS 型精子质量分析系统 (上海北昂医疗技术有限公司)。

柱色谱用硅胶 (100~200 目, 青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 型凝胶 (Amersham Pharmacia Biotech AB), 化学试剂均为分析纯。雷公藤多苷片 (批号 20120501, 黄石飞云制药有限公司), 五子衍宗丸 (批号 130155, 云南腾药制药股份有限公司)。

“台式”培养液: 以 NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、CaCl₂ 0.2 g、NaHCO₃ 1.0 g、MgCl₂ 0.1 g、NaH₂PO₄ 0.05 g 和葡萄糖 1.0 g, 加重蒸馏水至 1 000 mL 配制。杧果核仁各单体化合物, 均分别以“台式”培养液配制成 40 和 80 μmol/L 的浓度; 五子衍宗丸以“台式”培养液配制成 40 μmol/L 的浓度。

药材采自广西百色市 (2012 年 7 月), 经四川医科大学庄元春副教授鉴定为杧果 *Mangifera indica* L. 的干燥核仁。标本 (20120709) 保存于四川医科大学药用植物标本库。

Wistar 大鼠, 体质量 (200±20) g, 雄性, 由四川医科大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号 SYXK (川) 2013-065。

2 提取与分离

取杧果核仁 10.4 kg, 加 95%乙醇回流提取, 每次 2 h, 提取 4 次, 收集提取液, 浓缩至无乙醇味,

得乙醇浸膏 2.58 kg。取 1.5 kg 乙醇浸膏, 加适量水混悬, 混悬液依次以石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 回收溶剂, 得到石油醚萃取物 47.6 g、二氯甲烷萃取物 58.9 g、醋酸乙酯萃取物 285.3 g、正丁醇萃取物 53.5 g。取二氯甲烷萃取物 50.0 g, 先用石油醚-丙酮 (50:1→2:1) 梯度洗脱, 合并相同组分, 得 3 个流分 Fr. 1~3; 再以氯仿-甲醇 (20:1→1:1) 梯度洗脱, 合并相同组分, 得 3 个流分 Fr. 4~6。Fr. 1 (5.0 g) 进行硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (30:1→10:1) 梯度洗脱, 经反复硅胶柱色谱及重结晶得到化合物 **1** (50 mg)、**2** (20 mg)。Fr. 2 (7.0 g) 进行硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (20:1→5:1) 梯度洗脱, 再经反复硅胶柱色谱及重结晶, 得到化合物 **3** (50 mg)、**4** (30 mg)。Fr. 4 (5.0 g) 进行硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇 (10:1→3:1) 梯度洗脱, 经反复硅胶柱色谱及重结晶, 得到化合物 **5** (30 mg)、**6** (20 mg)、**7** (20 mg)。

正丁醇萃取物 50.0 g 经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇 (20:1→3:2) 梯度洗脱, 相同部分合并, 得 5 个流分 Fr. 7~11。Fr. 9 (2.0 g) 进行硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇 (6:1→2:1) 梯度洗脱, 其中氯仿-甲醇 (3:1) 部分再经 Sephadex-LH 20 凝胶柱色谱得化合物 **8** (30 mg) 和 **9** (30 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色油状物, mp 2~4 °C, 分子式为 C₂₉H₅₀O₂。ESI-MS *m/z*: 430 [M]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.28 (1H, s, -OH), 2.60 (2H, t, *J*=6.7 Hz, H-4), 2.20 (3H, s, H-7a), 2.10 (6H, s, H-5a, 8a), 1.81 (2H, m, H-3), 1.26 (3H, s, H-2a); ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) 及 DEPT δ: 148.5 (C-9, C), 144.9 (C-6, C), 122.0 (C-8, C), 121.1 (C-7, C), 115.9 (C-5, C), 115.2 (C-10, C), 74.9 (C-2, C), 39.9 (C-1', -CH₂), 39.5 (C-11', -CH₂), 37.9 (C-3', 7', -CH₂), 37.3 (C-5', 9', -CH₂), 32.8 (C-4', -CH), 32.7 (C-8', -CH), 31.6 (C-3, -CH₂), 27.9 (C-12', -CH), 24.8 (C-2', -CH₂), 24.4 (C-10', -CH₂), 23.8 (C-2a, -CH₃), 22.5 (C-12'a, -CH₃), 22.4 (C-12'b, -CH₃), 21.1 (C-6', -CH₂), 20.8 (C-4, -CH₂), 19.8 (C-4'a, -CH₃), 19.7 (C-8'a, -CH₃), 12.2 (C-7a, -CH₃), 11.8 (C-5a, -CH₃), 11.3 (C-8a, -CH₃)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为维生素 E。

化合物 **2**: 白色粉末 (甲醇), mp 201~203 °C, 分子式为 C₈H₈O₅。ESI-MS *m/z*: 183 [M-H]⁻, 367

[2M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 3.71 (3H, s, -OCH₃), 6.92 (2H, s, H-2, 6); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 166.9 (-C=O), 145.8 (C-3, 5), 138.8 (C-4), 119.7 (C-1), 108.9 (C-2, 6), 51.7 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为没食子酸甲酯。

化合物 **3**: 黄色无定形粉末 (甲醇), mp 274~276 °C, 分子式为 C₁₅H₁₀O₆。ESI-MS *m/z*: 285 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.47 (1H, s, 5-OH), 8.02 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175.9 (C-4), 163.9 (C-7), 160.7 (C-9), 159.2 (C-4'), 156.2 (C-5), 146.8 (C-2), 135.7 (C-3), 129.6 (C-2', 6'), 121.7 (C-1'), 115.5 (C-3', 5'), 103.1 (C-10), 98.2 (C-6), 93.5 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为山柰酚。

化合物 **4**: 黄色粉末 (甲醇), mp 314~316 °C, 分子式为 C₁₅H₁₀O₇。ESI-MS *m/z*: 325 [M+Na]⁺, 303 [2M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 12.47 (1H, s, 5-OH), 7.65 (1H, s, H-2'), 7.51 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, s, H-8), 6.17 (1H, s, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 156.2 (C-2), 147.73 (C-5), 146.9 (C-2), 135.7 (C-3), 175.9 (C-4), 160.8 (C-5), 98.3 (C-6), 163.9 (C-7), 93.4 (C-8), 160.7 (C-9), 103.1 (C-10), 122.0 (C-1'), 115.1 (C-2'), 145.1 (C-3'), 147.7 (C-4'), 115.7 (C-5'), 120.1 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为槲皮素。

化合物 **5**: 片状结晶 (石油醚-丙酮), mp 174~176 °C, 分子式为 C₁₀H₁₄O₅。ESI-MS *m/z*: 213 [M-H]⁻, 427 [2M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ: 7.35 (1H, t, *J* = 1.7 Hz, H-2), 5.02 (1H, m, H-3), 4.51 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-4), 4.42 (1H, td, *J* = 4.4, 6.8 Hz, H-5), 3.20 (1H, dd, *J* = 4.4, 17.4 Hz, H-6a), 2.84 (1H, dd, *J* = 6.9, 17.4 Hz, H-6b), 1.49 (3H, s, -CH₃), 1.44 (3H, s, -CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ: 169.4 (-COOH), 132.3 (C-1), 134.2 (C-2), 109.3 (C-8), 78.7 (C-4), 73.2 (C-3), 68.3 (C-5), 30.8 (C-6), 28.4 (10-CH₃), 26.2 (9-CH₃)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为 3,4-*O*-异亚丙基莽草酸。

化合物 **6**: 无色片状结晶 (甲醇), mp 210~212 °C, 分子式为 C₆H₄O₅。ESI-MS *m/z*: 157 [2M+H]⁺, 179 [M+Na]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ:

6.91 (1H, s, H-3), 8.17 (1H, s, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 116.1 (C-3), 140.4 (C-6), 147.6 (C-5), 152.4 (C-2), 173.8 (C-4), 160.8 (-COOH)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为 5-羟基-4-氧代吡喃-2-羧酸。

化合物 **7**: 白色针状结晶 (甲醇), mp 170~172 °C, 分子式为 C₁₀H₁₀O₄。ESI-MS *m/z*: 195 [2M+H]⁺, 177 [M-OH]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.46 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-3'), 6.34 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-2'), 7.26 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, H-6), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 3.79 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) 及 DEPT δ: 167.9 (C-1', -COOH), 149.1 (C-3, C), 147.9 (C-4, C), 144.4 (C-3', -CH), 125.8 (C-1, C), 122.7 (C-6, -CH), 115.7 (C-2', -CH), 115.6 (C-5, -CH), 110.3 (C-2, -CH), 55.7 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **7** 为阿魏酸。

化合物 **8**: 黄色粉末 (甲醇), mp 223~225 °C, 分子式为 C₂₁H₂₀O₁₂。ESI-MS *m/z*: 464 [M]⁺, 463 [M-H]⁻, 927 [2M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 12.6 (1H, s, 5-OH), 9.26 (1H, s, 7-OH), 7.57 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2'), 7.56 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-5'), 6.83 (1H, dd, *J* = 6.0, 2.5 Hz, H-6'), 6.39 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.46 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 156.3 (C-2), 133.3 (C-3), 177.5 (C-4), 161.3 (C-5), 98.7 (C-6), 164.1 (C-7), 93.5 (C-8), 156.2 (C-9), 104.0 (C-10), 121.6 (C-1'), 121.2 (C-2'), 144.8 (C-3'), 148.5 (C-4'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-6'), 100.8 (C-1''), 74.1 (C-2''), 76.5 (C-3''), 69.9 (C-4''), 77.6 (C-5''), 60.9 (C-6'')。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **8** 为异槲皮苷。

化合物 **9**: 浅棕色粉末 (甲醇), mp 256~258 °C, 分子式为 C₄₁H₃₂O₂₆。ESI-MS *m/z*: 939 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ: 6.33 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, Glc-H-1), 5.92 (1H, t, *J* = 9.6 Hz, Glc-H-3), 5.46 (1H, t, *J* = 9.6 Hz, Glc-H-4), 5.43 (1H, t, *J* = 9.6 Hz, Glc-H-2), 4.43 (1H, m, Glc-H-5), 4.30 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Glc-H-6), 6.77, 6.82, 6.85, 6.92, 6.97 (各 2H, s, galloyl-H-2, 6); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃COCD₃) 及 DEPT δ: 92.3 (Glc-C-1, -CH), 71.1 (Glc-C-2, -CH), 72.6 (Glc-C-3, -CH), 68.2 (Glc-C-4, -CH), 72.8 (Glc-C-5, -CH), 61.9 (Glc-C-6, -CH₂), 164.5, 164.7,

165.0, 165.5, 166.0 (各 1C, galloyl-C-7, -COO), 118.0, 118.3, 118.7, 119.2, 119.6 (各 1C, galloyl-C-1, C), 109.3, 109.5, 109.6, 109.8, 110.2 (各 2C, galloyl-C-2, 6, -CH), 145.6, 145.7, 145.8, 146.0, 146.4 (各 2C, galloyl-C-3, 5, C), 139.0, 139.2, 139.4, 140.0, 140.3 (各 1C, galloyl-C-4, C)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 9 为 1,2,3,4,6-五-O-没食子酰葡萄糖。

4 成分活性研究

4.1 方法

4.1.1 弱精症动物模型的建立 40 只雄性 Wistar 大鼠, 在同一环境室温下, 自由进食饮水。随机分为正常对照组 20 只和模型组 20 只。模型组均每日 ig 20 mg/kg 雷公藤多苷片, 对照组 ig 等体积生理盐水 (0.02 mL/g), 连续 30 d。30 d 后, 模型组和正常对照组各随机抽取 10 只大鼠, 立即处死, 摘除左侧睾丸和附睾。睾丸用 4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察睾丸组织病理改变。附睾剪碎于 2.0 mL “台式” 培养液中, 在 30 °C 恒温水浴中保温 10 min, 待精子充分游离后, 血球计数板计数, 用 “台式” 培养液将精液稀释至 2×10^7 个/mL。移取 10 μ L 在 CMIS 型精子质量分析系统检测精子密度、精子存活率、精子活力和精子畸形率。

4.1.2 活性成分筛选 弱精症大鼠模型建立后, 立即处死模型组和对对照组各剩余的 10 只大鼠, 分别摘取附睾, 附睾按 “4.1.1” 项方法处理后, 以 “台式” 培养液稀释至 2×10^7 个/mL。正常大鼠每例精子悬液 1 份 (30 μ L/份), 弱精症大鼠每例精子悬液 20 份 (30 μ L/份), 分别移入 21 只离心管中。实验设正常对照组、模型组、阳性对照组及实验组。①正常对照组 (1 份): 30 μ L “台式” 培养液与 30 μ L 正常大鼠精子悬液混匀; ②模型组 (1 份): 30 μ L “台式” 培养液与 30 μ L 弱精症大鼠精子悬液混匀; ③阳性对照组 (1 份): 30 μ L 浓度为 40 μ mol/L 的五子衍宗丸与 30 μ L 弱精症大鼠精子悬液混匀; ④实验组 (总计 18 份): 实验组为杠果核仁单体化合物(1~9), 各单体化合物均设 2 个不同浓度组(40

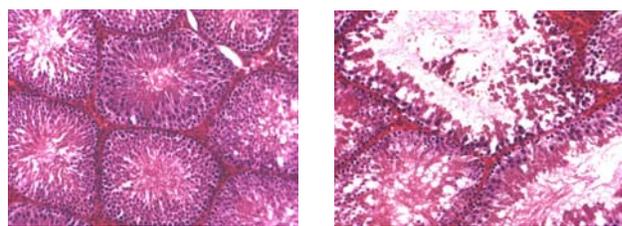
和 80 μ mol/L), 各取 30 μ L 分别与 30 μ L 弱精症大鼠精子悬液混匀。各离心管置于 37 °C 恒温水浴箱培养孵育 0、1、2 h, 移取 10 μ L, 用 CMIS 型精子质量分析系统检测精子活力和精子存活率。

4.1.3 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验数据应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理。采用单因素方差分析进行统计学分析, 组间比较采用 Dunnett's *t* 检验。

4.2 结果

4.2.1 雷公藤多苷造模效果评价 睾丸病理切片显示对照组睾丸细胞学无异常改变, 曲细精管内精子发生完全, 各级生精细胞排列规整; 模型组生精上皮变薄, 睾丸曲细精管管腔变大, 多数管腔内可见空泡变性的生精细胞或巨核细胞, 各级生精细胞和精子数量明显减少, 部分管腔生精细胞全部破坏, 偶见残存的支持细胞, 间质内可见水肿或结缔组织增生 (图 1)。附睾中的精子显示: 与正常对照组相比, 模型组的精子密度、精子存活率、精子活力都较低, 精子畸形率较高, 均有显著差异 ($P < 0.01$, 表 1)。睾丸病理切片及附睾精子质量表明, ig 大鼠雷公藤多苷, 可造成大鼠睾丸受损, 精子发生、成熟障碍以及附睾精子质量降低, 可成功建立弱精症大鼠模型。

4.2.2 杠果核仁单体化合物对弱精症大鼠体外精子质量的影响 与正常对照组比较, 模型组的精子活力和精子存活率在 0、1、2 h 都较低, 并有极显著性差异 ($P < 0.01$)。模型组、正常对照组、阳性对照



正常对照组 模型组

图 1 睾丸组织比较 (HE 染色, $\times 200$)

Fig. 1 Comparison on testicular tissue (HE dyeing, $\times 200$)

表 1 精子质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison on sperm quality ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	精子密度/ $(\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1})$	精子存活率/%	精子活力/%	精子畸形率/%
正常对照	26.50 \pm 3.89	46.80 \pm 4.05	38.80 \pm 3.21	22.00 \pm 2.23
模型	15.20 \pm 3.25**	32.10 \pm 3.16**	25.60 \pm 2.58**	30.80 \pm 4.36**

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group

组及各实验组的精子活力、存活率均随时间延长而减弱。在 0 h, 实验组各化合物和模型组比较, 精子活力和存活率均没有差异 ($P>0.05$)。在 1、2 h, 40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 1 (维生素 E)、7 (阿魏酸) 及 9 (1,2,3,4,6-五-O-没食子酰葡萄糖) 与模型组比较, 精子活力和存活率均增加, 并有显著差异 ($P<0.05$ 、 0.01), 并随浓度增加, 精子活力和精子存活率增加。其他化合物在 1 和 2 h, 与模型组比较, 精子活力和存活率均无差异 ($P>0.05$)。结果见表 2 和 3。

5 讨论

从杧果核仁中分离得到 9 个化合物, 化合物 1、3~6、8 为首次从杧果核仁中分离得到。

弱精症是导致男性不育的主要原因, 其发病机制为睾丸及附睾受损造成的精子发生、成熟障碍^[16]。雷公藤多苷作用于精子细胞的变态期, 抑制晚期精子细胞精核蛋白转化和精子在附睾中的成熟, 损伤睾丸生精细胞, 导致精子生成发生障碍, 并影响精子的活力, 因此常采用雷公藤多苷建立弱精症动物模型^[17-18]。本实验睾丸病理切片及附睾精子质量分

表 2 化合物对弱精症大鼠体外精子活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of compounds on sperm motility of asthenospermia rats *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

化合物	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	精子活力/%			化合物	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	精子活力/%		
		0 h	1 h	2 h			0 h	1 h	2 h
正常对照		38.5±4.32	25.2±5.01	15.30±4.36	5	40	23.5±5.04	14.8±3.56	6.88±2.10
模型		24.9±5.05 ^{##}	16.0±3.50 ^{##}	7.60±2.51 ^{##}	80	80	24.0±4.95	15.2±3.69	6.68±2.36
阳性对照		26.1±4.89	20.2±4.31 ^{**}	13.80±3.05 ^{**}	6	40	24.9±6.01	15.0±4.12	7.02±2.36
1	40	25.2±4.12	19.2±3.19 [*]	10.60±2.18 [*]	80	80	25.2±3.98	14.6±3.98	7.23±2.91
	80	25.4±3.85	20.8±4.02 ^{**}	12.50±2.31 ^{**}	7	40	24.7±3.99	18.9±3.26 [*]	10.20±2.85 [*]
2	40	25.8±6.02	15.1±5.12	7.35±2.36	80	80	25.1±5.21	19.6±4.31 [*]	10.80±2.68 [*]
	80	25.6±6.21	15.5±4.96	7.21±2.45	8	40	24.7±5.02	14.6±4.21	6.88±3.10
3	40	23.6±5.17	14.5±4.03	7.08±2.69	80	80	24.9±4.89	14.8±4.18	7.21±2.65
	80	24.2±4.12	14.8±3.98	7.23±2.56	9	40	26.2±6.75	18.8±4.01 [*]	10.10±3.12 [*]
4	40	26.1±7.02	15.6±4.85	7.23±2.34	80	80	25.9±7.02	20.9±4.29 ^{**}	11.50±3.24 ^{**}
	80	25.4±6.08	15.3±4.32	7.31±2.56					

与正常对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型对照组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下同
[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs normal group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below

表 3 化合物对弱精症大鼠体外精子存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of compounds on sperm survival rate of asthenospermia rats *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

化合物	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	精子存活率/%			化合物	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	精子存活率/%		
		0 h	1 h	2 h			0 h	1 h	2 h
正常对照		46.1±4.23	28.6±4.96	21.90±3.85	5	40	32.9±7.69	17.9±4.12	10.50±2.98
模型		33.5±6.86 ^{##}	18.5±5.02 ^{##}	10.60±3.42 ^{##}	80	80	33.1±7.89	18.1±5.23	10.60±2.69
阳性对照		33.8±7.02	24.8±4.96 [*]	18.90±4.31 ^{**}	6	40	32.2±6.98	18.3±5.02	11.10±3.55
1	40	33.9±7.25	23.2±5.05 [*]	14.20±3.35 [*]	80	80	33.9±7.38	18.6±4.64	10.70±2.88
	80	33.8±7.96	24.3±4.80 [*]	16.50±4.69 ^{**}	7	40	32.8±6.25	23.3±4.25 [*]	13.90±2.85 [*]
2	40	34.0±8.01	17.9±3.68	11.20±3.85	80	80	33.7±7.56	23.9±5.51 [*]	17.20±3.97 ^{**}
	80	34.9±7.85	18.2±4.21	10.60±3.02	8	40	32.9±6.68	19.5±5.12	9.89±2.99
3	40	32.3±7.96	18.3±4.21	10.70±2.94	80	80	33.1±6.57	18.2±3.65	10.60±3.31
	80	33.0±8.10	18.5±4.65	9.95±2.65	9	40	32.1±7.23	23.1±5.21 [*]	13.70±3.02 [*]
4	40	32.8±8.03	18.5±4.11	10.70±3.19	80	80	33.6±8.01	24.5±4.68 [*]	18.10±4.51 ^{**}
	80	33.1±8.92	17.6±5.05	10.50±3.01					

析表明,连续30 d给予大鼠每日ig 20 mg/kg 雷公藤多苷,不仅可造成大鼠睾丸、附睾功能损伤,而且可造成大鼠附睾中的精子密度、精子存活率和精子活力降低,精子畸形率升高,揭示了本实验通过ig大鼠雷公藤多苷,成功建立了雄性大鼠弱精症模型。实验结果还表明,化合物1、7和9在体外能使弱精症大鼠的精子活力和精子存活率增加,为芒果核仁临床治疗弱精症提供了科学依据。

参考文献

- [1] Abdalla A E M, Darwish S M, Ayad E H E, *et al.* Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel [J]. *Food Chem*, 2007, 103(4): 1134-1140.
- [2] Maisuthisakul P, Gordon M H. Antioxidant and tyrosinase activity of mango seed kernel by product [J]. *Food Chem*, 2009, 117(2): 332-341.
- [3] 内蒙古蒙药材标准 [S]. 1987.
- [4] Kaur J, Rathinam X, Kasi M, *et al.* Preliminary investigation on the antibacterial activity of mango (*Mangifera indica* L: Anacardiaceae) seed kernel [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2010, 3(9): 707-710.
- [5] Das P C, Das A, Mandal S, *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial activities of the seed Kernel of *M. indica* [J]. *Fitoterapia*, 1989, 60(3): 235-240.
- [6] 袁叶飞. 农作物废弃物芒果核仁的化学成分及药理作用研究 [D]. 百色: 广西百色国家农业科技园区, 2013.
- [7] 张茂娟, 刘冰, 安彦峰, 等. 白钩藤的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 175-180.
- [8] 周荣光, 杨兆祥, 王金, 等. 扁桃叶的化学成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(9): 1217-1219.
- [9] 周兴栋, 程森, 余绍福, 等. 锡叶藤的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(2): 185-188.
- [10] 宁德生, 闫晓旭, 黄思思, 等. 壮药鸡尾木的化学成分及其细胞毒活性 [J]. *中国药学杂志*, 2015, 40(4): 686-690.
- [11] 谢春锋, 李子静, 曲建博, 等. 毛地钱和多形带叶苔化学成分研究 [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(22): 1706-1708.
- [12] Kingsbury C A, Clifton M, Looker J H, *et al.* Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of kojic acid and other 4-pyrone derivatives [J]. *J Org Chem*, 1976, 41(16): 2777-2780.
- [13] 靳鑫, 时圣明, 张东方, 等. 穿心莲化学成分的研究 (II) [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 164-169.
- [14] 周艳林, 赵旭, 华娟, 等. 金沙藤化学成分及其抗氧化活性评价研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5): 1392-1396.
- [15] 刘春丽, 关小丽, 李典鹏, 等. 龙眼壳中化学成分的研究 (I) [J]. *广西植物*, 2014, 34(2): 167-169.
- [16] Anca B, Razvan S, Demetra S, *et al.* Methylation pattern of methylene tetrahydrofolate reductase and small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N promoters in oligoasthenospermia: a case-control study [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(2): 225-231.
- [17] Wang T S, Huang J L, Wu D L, *et al.* Effect of Wuziyanzong Pill on sperm quality and calcium ion content in oligoasthenospermia rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(4): 631-635.
- [18] 王秋萍, 王桐生, 龙子江, 等. 五子衍宗丸对少弱精症模型大鼠精子质量及睾丸组织的影响 [J]. *中成药*, 2011, 33(10): 1796-1797.