

碳酸饮料对雄鼠生长发育和睾酮分泌作用的研究

巩转娣¹, 魏锁成^{*2}, 魏黎敏³, 张涛杰², 杨妍梅²,
梁浩勤², 王欢², 赖露菊², 郑秧秧²

(1. 西北民族大学 医学院附属医院, 甘肃 兰州 730030; 2. 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030; 3. 甘肃省人民医院 神经内科, 甘肃 兰州 730099)

摘要: 将 100 只 28 日龄健康雄性小白鼠随机分为 5 组($n=20$), COC-1 和 COC-2 自由饮用 50% 和 100% 可口可乐, PEP-1 和 PEP-2 自由饮用 50% 和 100% 百事可乐, CG 为空白对照, 实验持续 15 d。于第 3、5、7、10、13 和 15 d 随机从每个组抓取 3 只小鼠断颈采血, 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 无菌采集内脏器官, 分别称重; ELISA 法测定血清睾酮含量。结果表明至实验第 7 d, COC-2 和 PEP-2 组小鼠的体重均高于 CG($P<0.01, P<0.05$), 15 d 时, 实验组小鼠体重均大于对照组(CG); 第 10 d 时 COC-1 日增重明显低于 PEP-2 和 CG, 第 15 d 各实验组日增重均略小于对照组; 第 7 d 时, COC-1、COC-2 和 PEP-2 两侧睾丸平均重明显高于 CG($P<0.05$), 到 15 d 实验组睾丸重均大于对照组(CG); PEP-2 胃质量在第 15 d 大于其余 4 组; 第 7 d 时 COC-1、COC-2 和 PEP-2 肾脏质量明显高于 PEP-1($P<0.05$); 在实验期间各组的心、肝、脾和肺脏均无显著差异; 第 10 d 时 PEP-1、PEP-2 血清睾酮含量显著高于 COC-1 和 CG($P<0.05$), 且 COC-2 和 PEP-2 在 15 d 明显高于 CG($P<0.05$)。短时期饮用高浓度可口可乐和百事可乐可以促进小鼠生长, 轻度促进睾丸发育, 增加血清睾酮含量。

关键词: 碳酸饮料; 生长发育; 生殖功能; 睾酮; 小鼠

中图分类号: TS 201.6 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)11—1163—06

Effects of Carbonated Drinks on Growth and Testosterone Secretion of Male Mice

GONG Zhuandi¹, WEI Suocheng^{*2}, WEI Limin³, ZHANG Taojie², YANG Yanmei²,
LIANG Haoqin², WANG Huan², LAI Luju², ZHENG Yangyang²

(1. Affiliated Hospital of Medical College, Northwest University For Nationalities, Lanzhou 730030, China; 2. Life Science and Engineering College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; 3. Neurology Department, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730099, China)

Abstract: One hundred male mice (20.84 ± 2.45 g) were randomly divided into five groups($n=20$), COC-1 and COC-2 groups drank ad libitum 50% and 100% Coca-cola, PEP-1 and PEP-2 mice drank 50% and 100% Pepsi-cola and the control group (CG) drank tap water. Three mice selected

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460684)。

作者简介: 巩转娣(1963—), 女, 甘肃甘谷人, 主任护师, 主要从事生殖生物技术研究。E-mail: yxgzb578@163.com

*通信作者: 魏锁成(1962—), 男, 甘肃甘谷人, 农学博士, 教授, 主要从事生殖生物技术研究。E-mail: weisc668@163.com

randomly from each group were killed by cervical dislocation on the days 3, 5, 7, 10, 13 and 15; the serum was separated by centrifugal at 4000r/min for 10min; all visceral organs (heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach and testis) were harvested aseptically; the concentration of serum testosterone was measured with the ELISA kit. On the 7th day body weights of four test groups were all higher than that of CG, especially for COC-2 ($P < 0.05$); on the 15th day the body weights of COC-2 and PEP-2 groups were higher than that of CG. Testis weights of COC-1, COC-2 and PEP-2 groups were significantly greater than groups CG and PEP-1 on the 7th day ($P < 0.05$); the stomach weight of PEP-2 was higher than other four groups on the 15th day. The concentration of serum testosterone in PEP-2 was significantly higher than those in COC-1 and CG ($P < 0.05$); on the 10th day the concentrations in COC-2 and PEP-2 were dramatically higher than that in CG ($P < 0.05$); on the 15th day the concentration in PEP-2 was remarkably higher than that in CG ($P < 0.05$). Thus, a short period of drinking of relatively high concentrations of Coca-cola and Pepsi-cola could promote the growth of male mice, enhance the testis development and increase the content of serum testosterone with no remarkable effects on visceral organs.

Keywords: carbonated soft drinks, growth and development, reproduction function, testosterone, mice

在各种碳酸饮料中,可口可乐、百事可乐和苏打水消费量最大,使其成为能量摄入的主要方式之一^[1-2]。有报道江苏省中学生每天喝碳酸饮料1~2次、3次及以上的报告率分别为17.4%,3.5%,初中生显著高于高中生,男生显著高于女生^[3]。从20世纪70年代开始,随着含糖饮料消费日益增加,已成为超重、肥胖和2型糖尿病及其相关疾病患病率不断上升的一个重要因素^[4]。已发现饮用碳酸饮料不仅可导致肥胖和代谢综合征,而且牙病、肺病、肾病和心血管疾病均与此密切关联^[4-5]。研究表明大量饮用碳酸软饮料的人群肥胖症和II型糖尿病明显增加^[6-8],但是碳酸饮料摄入与体质量增加是否有关目前也不很清楚^[6]。不过许多报道都是通过问卷调查或临床病例的前瞻性分析或流行病学观察得出的结果,这些流行病学研究的结果相互矛盾,可信的信息也不完整^[9-11],目前为止还没有关于碳酸饮料与生育力相关性的实验研究^[5,12-13]。

总体而言,长期大量饮用软饮料或碳酸饮料会造成公共健康问题,但许多观点和说法尚需实验证实。作者拟在小鼠饮用不同品牌的碳酸饮料(如可口可乐、百事可乐),通过测定分析生长发育指标、内脏指数、血清睾酮等,从发育生物学、生殖生物学和内分泌学角度揭示碳酸饮料对生物有机体的影响,为科学饮用碳酸饮料提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

可口可乐和百事可乐:市售;小鼠用血清睾酮ELISA检测试剂盒(QD30439):上海桥杜生物科技有限公司提供;96孔酶标板:博大泰克公司产品;Rayto-6000型酶标仪:Rayto公司产品。

1.2 实验动物

21日龄健康雄性昆明小鼠:兰州大学实验动物中心提供[使用许可证:SCXK(甘)2005-0007]。随机均分为($n=20$)实验1组(COC-1)、实验2组(COC-2)、实验3组(PEP-1)和实验4组(PEP-2)和对照组(CG)。小鼠在22~24℃和相对湿度40%~60%下分笼饲养,自由饮食。小鼠饲料购于兰州泰华饲料有限公司,适应一周后开始正式实验。动物的饲养和操作严格按照甘肃省实验动物管理办法执行。

1.3 碳酸饮料饮用剂量与采样时间

碳酸饮料饮用剂量和采样时间见表1。

1.4 体质量测定

每天早晨8:00~9:00用电子天平称精确测定体质量。

1.5 样本采集与处理

于3,5,7,10,13和15d分别随机抓取3只小鼠,断颈取血,4000r/min离心分离血清,-20℃保

存。处死后无菌采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和睾丸,分别用电子称精确称重,计算内脏指数。

表1 碳酸饮料饮用剂量和采样时间

Table 1 Doses of carbonated drinks and sampling time

组别	小鼠数量/只	处理方法	称重与采样时间
COC-1	20	50%自来水+50%可口可乐	每天称重;3,5,7,10,13和15 d分别宰杀3只,采集心、肝、脾、肺、肾、胃和睾丸,分别称重。采血分离血清。
COC-2	20	100%可口可乐	
PEP-1	20	50%自来水+50%百事可乐	
PEP-2	20	100%百事可乐	
CG	20	自来水	

注:50%自来水+50%可口可乐(百事可乐)即一半自来水和一半市售可口可乐(百事可乐);100%可口可乐(百事可乐)即单纯饮用可口可乐(百事可乐)。

1.6 血清睾酮测定

严格按照血清睾酮 ELISA 检测试剂盒的使用说明操作,用标准品的浓度和吸光度计算回归方程,以此回归方程计算样本的浓度。

1.7 睾丸组织结构观察

采集睾丸称重后各分为两份,一份用体积分数10%福尔马林固定24 h,石蜡包埋、切片(5 μm)、展片、烘干、H-E染色、封固,Motic显微镜下观察,采集图像,另一份-80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存。

1.8 显微图像数据分析

用Motic images Plus 2.0软件对图像数据进行

表2 小鼠体质量与日增重变化

Table 2 Changes of body weights and daily gains

组别	体质量/g					日增质量/(g/d)		
	0 d	5 d	7 d	10 d	15 d	5 d	10 d	15 d
COC-1	20.3 \pm 3.6	26.6 \pm 2.7	28.0 \pm 2.3	30.6 \pm 2.4	31.7 \pm 1.7	1.18 \pm 0.19	0.79 \pm 0.11 ^{a,b}	0.66 \pm 0.03
COC-2	20.9 \pm 5.2	28.0 \pm 5.3	30.0 \pm 5.3 ^{a,b}	30.7 \pm 5.0	31.9 \pm 2.4	1.15 \pm 0.09	1.03 \pm 0.06	0.56 \pm 0.05
PEP-1	20.5 \pm 4.8	24.7 \pm 4.0	26.3 \pm 3.6 ^a	30.5 \pm 2.1	31.6 \pm 2.0	1.07 \pm 0.07	0.94 \pm 0.06	0.52 \pm 0.05 ^a
PEP-2	20.4 \pm 4.5	27.3 \pm 4.3	28.7 \pm 3.9 ^a	31.5 \pm 3.8	32.0 \pm 0.5	1.28 \pm 0.09	1.06 \pm 0.06 ^a	0.71 \pm 0.03
CG	20.2 \pm 2.4	25.1 \pm 3.3	26.6 \pm 3.0	30.3 \pm 3.0	31.2 \pm 2.1	1.13 \pm 0.08	1.03 \pm 0.12	0.77 \pm 0.04

注:0 d即为开始饮用碳酸饮料前1天。同一列中*表示同一天实验组与对照组(CG)相比差异显著($P<0.05$);**表示当天实验组与对照组(CG)相比差异极显著($P<0.01$)。不同上标字母(如a,b)表示同一天实验组两组间差异显著($P<0.05$)。下图相同。

碳酸饮料可能是引起超重和肥胖的主要原因,这与以前的报道一致^[6,14],因为可乐等碳酸饮料是高糖的,饮用后可以增加热量,很容易令人发胖^[15-20]。

2.2 小鼠睾丸质量变化

第7d时,COC-1、COC-2和PEP-2两侧睾丸平均质量明显高于CG($P<0.05$),而PEP-1却低于CG和其它3个实验组($P<0.05$)(表3)。到第15 d 4个

采集和测量。每个样品选取形态良好、结构清晰的切片4张,每张切片测量5个点,计20个点,每个时间点100个点,分别测定睾丸曲细精管的直径和白膜厚度。

1.9 数据统计分析

使用Spss18.0统计软件包处理数据,用平均值 \pm 标准差(\pm SD)表示,以 χ^2 检验、多因子方差分析(LSD)进行显著性和多重比较检验。 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 分别为差异显著和极显著。

2 结果与讨论

2.1 碳酸饮料对小鼠体质量和日增质量的影响

碳酸饮料对小鼠体质量和日增质量的影响见表2。实验第7 d,COC-2和PEP-2组小鼠的体质量均高于CG($P<0.01,P<0.05$),COC-1同时高于COC-1和PEP-1组($P<0.05$);到第15 d时,4个实验组小鼠体质量均大于对照组(CG),以PEP-2组最大,但无显著的统计学差异。第10 d时COC-1日增重明显低于PEP-2和CG,第15 d各实验组日增质量均略小于对照组,以PEP-1最低。表明饮用100%可口可乐在10 d内可以显著增加小鼠体质量,而饮用100%百事可乐在10 d后能促进小鼠生长,所有小鼠的日增质量随日龄增加而减缓,饮用可口可乐和百事可乐会减少日增质量。

实验组睾丸质量均大于对照组(CG),以PEP-2组最大,但各组间无显著差异,右侧睾丸与左侧呈相同的变化;提示短期饮用可口可乐和百事可乐能够轻度促进睾丸的发育。2010年丹麦进行的一项对2 500多名年轻男性的研究指出,每天喝大约1 L可乐的男性,精子数量比不喝可乐的男性减少约30%,这是因为碳酸饮料中所含的氧化剂直接引起

蛋白质氧化，并导致细胞显著损害所致^[12]。同时，碳酸饮料中的酸性物质、添加剂和咖啡因的共同作用会降低精子活力和性功能，在一定程度上影响男性

生育能力。实验结果表明饮用可口可乐和百事可乐后第7 d，睾丸重明显高于对照组，遗憾的是本实验未能检测精子数量。

表3 小鼠睾丸质量变化

Table 3 Changes of testis weights of mice

组别	质量/g					
	3 d	5 d	7 d	10 d	13 d	15 d
COC-1	0.073±0.015	0.054±0.006	0.090±0.010 ^{ab}	0.077±0.015	0.100±0.013	0.098±0.007
COC-2	0.062±0.011	0.064±0.009	0.089±0.009 ^{ab}	0.089±0.010	0.083±0.015	0.097±0.010
PEP-1	0.080±0.014	0.060±0.012	0.049±0.008 ^a	0.078±0.012	0.080±0.013	0.085±0.006
PEP-2	0.065±0.012	0.061±0.010	0.091±0.015 ^{ab}	0.079±0.011	0.092±0.011	0.099±0.016
CG	0.071±0.011	0.060±0.008	0.066±0.016	0.076±0.014	0.081±0.009	0.086±0.007

注：同一列中，* 表示与对照组比较差异显著($P<0.05$)；** 表示与对照组比较差异极显著($P<0.01$)。下图相同。

2.3 内脏质量和内脏指标

2.3.1 胃质量变化 图1显示整个实验期间 COC-2 和 PEP-2 的胃重量均高于 CG，特别是 7 d 以后 PEP-2 组胃质量明显大于其余 4 组($P<0.05$)，其余时间各组均无明显差异。结果表明饮用高浓度可口可乐和百事可乐可能会增加胃质量，尤其是百事可乐，这或许与肠道微生态环境改变有关^[21-22]。

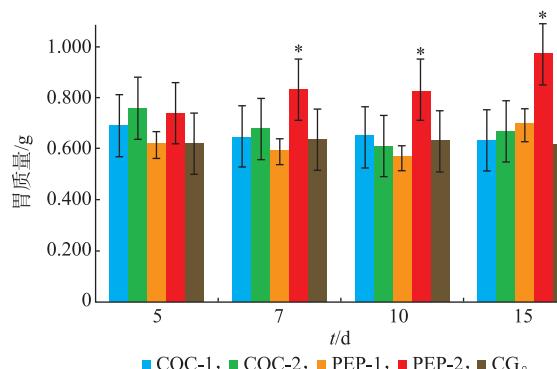


图1 小鼠胃质量变化

Fig. 1 Changes of stomach weight of mice

2.3.2 肾脏、肺脏、心脏、肝脏和脾脏质量变化 图2显示第7 d时，COC-1、COC-2 和 PEP-2 两侧肾脏平均质量明显高于($P<0.05$)PEP-1；15 d时 COC-1 肾脏重大于其余4组，但无统计学差异。肺脏、心脏、肝脏和脾脏质量在实验期间各组间均无显著差异。短时期饮用不同浓度可口可乐和百事可乐对肾脏、肺脏、心脏、肝脏和脾脏生长无明显影响。

2.4 血清睾酮(Testosterone)含量变化(nmol/L)

各个组小鼠血清睾酮含量均不同程度的升高。PEP-2 组血清睾酮高于其它 4 组，第 10 d 和 15 d，PEP-1, PEP-2 血清睾酮含量显著高于 COC-1 和

CG($P<0.05$)，而且 COC-2 和 PEP-2 在 15 d 明显高于 CG($P<0.05$)，也高于 PEP-1 和 COC-1(图3)。表明短时期高浓度饮用百事可乐和可口可乐能够增加睾酮的合成与分泌，尤其以百事可乐的作用更明显。血清睾酮含量升高可能与睾丸质量增加，或者睾丸的发育加快有关。作者实验结果与何丽等的结果一致^[17]，但是由于时间较短，所得结果仍需实验验证，其作用机理有待深入探讨。

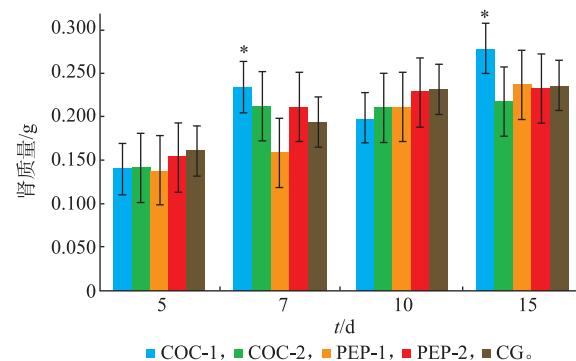


图2 两侧肾脏平均质量变化

Fig. 2 Changes of average weights of bilateral kidney

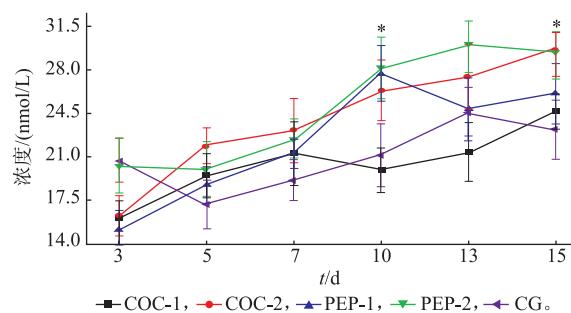


图3 血清睾酮浓度变化

Fig. 3 Changes of serum testosterone concentrations

3 结语

目前碳酸软饮料已成为世界范围内经常大量消费的饮品,许多文献资料报道长期饮用会损害人体健康,然而很多报道都是通过流行病学问卷调查或临床病例的前瞻性分析结果,缺乏实验研究^[4-5,11]。作者通过在发育期小鼠饮用不同浓度可口可乐和

百事可乐,通过分析生长发育指标、内脏指数和血清睾酮等指标,比较性研究了碳酸饮料对生长发育和内分泌的作用,得出短时期饮用高浓度可口可乐和百事可乐可促进小鼠生长,并能轻度促进睾丸发育,增加血清睾酮含量,而对内脏器官的发育无显著影响。

参考文献:

- [1] BOWMAN S A. Beverage choices of young females: changes and impact on nutrient intakes [J]. *Journal of the American Dietetic Association*, 2002, 102(9): 1234-1239.
- [2] FIORITO L M, MARINI M, MITCHELL D C, et al. Girls' early sweetened carbonated beverage intake predicts different patterns of beverage and nutrient intake across childhood and adolescence[J]. *Journal of the American Dietetic Association*, 2010, 110(4): 543-550.
- [3] 潘晓群,史祖民,袁宝君,等.江苏省中学生碳酸饮料饮用频率及其相关因素分析 [J].中国学校卫生,2009,30(12): 1137-1138.
- PAN Xiaoqun, SHI Zumin, YUAN Baojun, et al. Analysis of drinking carbonated beverage frequency and relevant factors in the middle school students in Jiangsu province[J]. *Chinese School Health*, 2009, 30(12): 1137-1138. (in Chinese)
- [4] 杨小娟,刘明亮,高爱民,等.碳酸饮料导致肾损害三例[J].实用药物与临床,2012,15(12):863-864.
YANG Xiaojuan, LIU Mingliang, GAO AIMIN, et al. Three cases reports of kidney damage caused by Carbonated drinks [J]. *Practical Pharmacy And Clinical Remedies*, 2012, 15(12): 863-864. (in Chinese)
- [5] CUOMO R, ANDREOZZI P, ZITO F P. Alcoholic beverages and carbonated soft drinks: consumption and gastrointestinal cancer risks[J]. *Cancer Treat Res*, 2014, 159: 97-120.
- [6] MALIK V S, SCHULZE M B, HU B. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain:a systematic review [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 84: 274-288.
- [7] JOHNSON R, SEGAL M, SAUTIN Y, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 86(4): 899-906.
- [8] AKGUN S, ERTEL N H. The effects of sucrose, fructose, and high-fructose corn syrup meals on plasma glucose and insulin in non-insulin-dependent diabetic subjects[J]. *Diabetes Care*, 1985, 8: 279-83.
- [9] BECH B, NOHR E, VAETH M, et al. Coffee and fetal death:A cohort study with prospective data [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2005, 162(10): 983-990.
- [10] MATIJASEVICH A, SANTOS I, BARROS F. Does caffeine consumption during pregnancy increase the risk of fetal mortality? A literature review[J]. *Cadernos de Saúde Pública*, 2005, 21(6): 1676-1684.
- [11] SIGNORELLO L, MCLAUGHLIN J. Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion:A review of the epidemiologic evidence[J]. *Epidemiology*, 2004, 15(2): 229-239.
- [12] BANERJEE P, PANDA K, NANDI P, BANERJEE S K. Oxidative damage of liver, kidney and serum proteins with apoptosis of above tissues in guinea pigs fed on carboanted soft drink[J]. *Asian Journal of Biochemistry*, 2013, 8(1): 1-13.
- [13] ZENG H, SHU W Q, CHEN J A, et al. Experimental comparison of the reproductive outcomes and early development of the offspring of rats given five common types of drinking water[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108955
- [14] JAMES J, THOMAS P, CAVAN D, et al. Preventing childhood obesity by reducing consumption of carbonated drinks: cluster randomised controlled trial[J]. *British Medical Journal (BMJ)*, 2004, 328: 1237.
- [15] SALDANA T M, BASSO O, DARDEN R, et al. Carbonated beverages and chronic kidney disease [J]. *Epidemiology*, 2007, 18(4): 501-506.
- [16] SINGH S, JINDAL R. Evaluating the buffering capacity of various soft drinks, fruit juices and tea [J]. *J Conserv Dent*, 2010, 13

- (3):129-131.
- [17] 管爽,田艳梅,董芙蓉,等. 儿童青少年饮料摄入对体质指数影响[J]. 中国公共卫生,2013,29(4):557-559.
GUAN Shuang, TIAN Yanmei, DONG Furong, et al. Effect of beverage intake on body mass index (BMI) in children and adolescents[J]. **Chin J Public Health**, 2013, 29(4):557-559. (in Chinese)
- [18] 何丽,牛艳芬. 碳酸饮料对小鼠生长发育的影响[J]. 云南医药,2010,31(1):8-10.
HE Li, NIU Yanfen. Effects of soft drink on the growth and development of mice [J]. **Yunnan Medicine**, 2010, 31 (1):8-10. (in Chinese)
- [19] SYLVIE Stacy. Relaxation drinks and their use in adolescents[J]. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, 2011, 21(6):605-610.
- [20] LALITHAMBIGAI G, RAO Ashwini, RAJESH G, et al. Carbonated beverages and their erosive potential-an in vitro study[J]. **International Journal of Advanced Research**, 2014, 2(4):833-838.
- [21] 王娜,商志伟,赵敏. 微生态制剂对仔猪生长性能及肠道菌群的影响[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(3):255-260.
WANG Na, SHANG Zhiwei, ZHAO Min. Effects of probiotics on growth and intestinal microflora of piglets[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(3):255-260. (in Chinese)
- [22] BOYLE P, KOECHLIN A, AUTIER P. Sweetened carbonated beverage consumption and cancer risk :meta-analysis and review [J]. **European Journal of Cancer Prevention**, 2014, 23(5):481-490.

会议信息

会议名称(中文):2016 上海辰山第二届“药食同源与植物代谢”国际学术研讨会

会议名称(英文):The 2nd International Symposium of Functional Food and Plant Metabolism

所属学科:作物学及林木育种、生物学,农作物、林木果实产品贮藏、保鲜与安全,中医学

开始日期:2016-12-13 结束日期:2016-12-15

所在城市:上海市 黄浦区 具体地点:上海辰山植物园

主办单位:中国植物生理与分子生物学学会

承办单位:上海辰山植物园、上海市植物生理与植物分子生物学学会、上海市资源植物功能基因组重点实验室、加州大学戴维斯分校生物系

联系人:李佳

联系电话:021-37792288-969

E-MAIL:lijia@csnbgsh.cn

会议网站:http://www.cspp.cn/cp9-1_more.asp?id=1585

会议背景介绍:随着科学技术的发展,药用植物的代谢及组学研究以及功能性食品的研发已然成为现下的研究热点,这是与人类的健康有着密切关系的重要课题。为了展示国内外在药食同源与植物代谢方面的最新研究进展与未来的发展方向,探讨新兴生命科学技术对该研究领域的影响,我们定于 2016 年 12 月 13 日至 15 日在上海辰山植物园召开 2016 上海辰山第二届“药食同源与植物代谢”国际学术研讨会,以促进同行间的交流与合作。本次会议由中国植物生理与分子生物学学会、上海市植物生理与植物分子生物学学会、上海辰山植物园上海市资源植物功能基因组重点实验室和加州大学戴维斯分校生物系联合承办。会议将邀请多位国内外相关领域的专家作大会主题报告,交流最新学术成果,诚邀广大同行的积极参加。