

乌贼墨多糖对环磷酰胺致小鼠部分脏器损伤的缓解效应

刘华忠^a, 王光^b, 吴金龙^b, 师莉莎^b, 钟杰平^c, 潘江球^{b*} (广东海洋大学, a.生物化学中心; b.食品科技学院; c.理学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 目的 探讨乌贼墨多糖(SIPS)对环磷酰胺(CP)致小鼠肝脏、肾脏、心脏和肺毒性损伤的缓解效果。方法 BALB/c小鼠连续口服给药 SIPS(180 mg·kg⁻¹)2周(每天1次),于第6、7天2次腹腔注射 CP(100 mg·kg⁻¹)。分别检测肝脏、肾脏、心脏和肺的器官指数和抗氧化能力及肝脏和肾脏的功能参数。结果 SIPS 不仅弱化 CP 所导致的肝脏器官指数的增加($P<0.01$),降低 CP 所致肝脏谷丙转氨酶($P<0.01$)与谷草转氨酶($P<0.01$)的活力升高,升高 CP 所致血清中尿素含量的降低($P<0.01$),同时不同程度地保护了肝脏($P<0.01$)和心脏($P<0.05$)的抗氧化能力。结论 上述结果表明, SIPS 对 CP 所导致的4种器官毒性损伤具有一定的缓解作用。

关键词: 乌贼墨多糖; 环磷酰胺; 内脏器官; 小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0089-05

Amelioratory Effects of Sepia Ink Polysaccharides on Partial Internal Organs Injured by Cyclophosphamide

LIU Huazhong^a, WANG Guang^b, WU Jinlong^b, SHI Lisha^b, ZHONG Jieping^c, PAN Jiangqiu^{b*} (Guangdong Ocean University, a.Modern Biochemistry Center; b.School of Food Science & Technology; c.School of Science, Zhanjiang 524088, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the ameliorative effects of sepia ink polysaccharides (SIPS) on liver, kidney, heart and lung injured by cyclophosphamide. **METHODS** BALB/c mice were orally administered with SIPS (180 mg·kg⁻¹) for two weeks, once a day, and given intraperitoneal injection of cyclophosphamide (100 mg·kg⁻¹) on the 6th and 7th day during experimental of 14 days. Organ indexes and antioxidant abilities of liver, kidney, lung and heart, as well as functions of liver and kidney were detected. **RESULTS** SIPS not only significantly impaired the increase of liver index ($P<0.01$), GPT and GOT activities ($P<0.01$) and decrease of serum BUN ($P<0.01$), also obviously protected antioxidant ability of liver ($P<0.01$) and heart ($P<0.05$). **CONCLUSION** The data indicates SIPS alleviate toxicity of CP on the four organs induced by cyclophosphamide.

KEY WORDS: sepia ink polysaccharides; cyclophosphamide; internal organs; mice

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是临床上常用的氮芥类抗肿瘤药物,目前主要作为抗肿瘤药物和免疫抑制剂。CP 由于在肝脏内被转化为细胞毒性的代谢产物,因此 CP 首先对肝细胞存在一定程度的损伤,主要表现为谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和血清总胆红素(TBIL)的显著升高,即标志着急性肝损伤^[1-2]。同时,CP 代谢后的产物主要通过肾脏排泄,并在大剂量时可导致尿路上皮损伤,发生出血性膀胱炎。因此,在临床上给予 CP 注射的同时,要通过保证水分供应和给予碱化尿液的药物来预防或减少出血性膀胱炎的发生。CP 的心肌毒性研究表明,该化疗药物可导致急性、剂量依赖性心肌损伤,进一步发展为坏疽,

出血,甚至纤维化,并且其不良反应强度与用药剂量相关^[3]。

乌贼是中国四大海产之一,储量极为丰富,但拘于目前深加工技术所限,在我国,乌贼墨一直作为废弃物,造成资源浪费和环境污染。我国医药对乌贼墨的认识与应用历史悠久,最早见于明代的《本草纲目》,现代研究证实,乌贼墨具有广泛的生物学作用。笔者近年来的系列研究结果表明,乌贼墨能大范围地保护机体正常组织,弱化化疗药物的毒性损伤^[4-8]。背景研究表明,乌贼墨中含有黑色素、多糖、蛋白质、脂类和微量元素等成分^[9],究竟哪些物质发挥了化疗保护的药理学效能尚未清楚。为了明确该活性物质,笔者对

基金项目: 国家自然科学基金(31171667); 广东省科技计划项目(2008B021100014)

作者简介: 刘华忠,男,博士,副教授 前二位作者对本文具有同等贡献 Tel: (0759)2383477 E-mail: 90203@sina.com *通讯作者: 潘江球,女,硕士,副教授 Tel: (0759)2383477 E-mail: zj902030@163.com

其中有效成分进行了筛选,初步发现乌贼墨多糖(sepia ink polysaccharides, SIPS)能减弱化疗药物对小鼠造血功能的抑制作用,因而,推测多糖可能是其中发挥化疗保护作用的主要成分之一。鉴于此,为了探讨乌贼墨多糖的化疗保护功能,本实验以小鼠为模型,以小鼠的肝脏、肾脏、心和肺为靶标,综合评估乌贼墨多糖对小鼠主要内脏器官的化疗保护效应。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

BALB/c 小鼠,♀♂各半,体质量(20±2)g,购自广东医学院实验动物中心,实验动物合格证号:2006A029;鲜活乌贼(湛江市水产品市场);检测试剂盒均来源于南京建成生物工程研究所;CF16RX 冷冻高速离心机(日本 HITACHI)。

1.2 SIPS 的制备

参照 Chen 等^[10]报道的方法制备。取新鲜乌贼墨,用 0.1 mol·L⁻¹的 HCl 调 pH 值至 4~5,4 °C 放置 24 h;8 500 r·min⁻¹离心 1 h,上清液中加入 2 倍体积含 1%木瓜蛋白酶的 Tris-HCl 缓冲溶液(50 mmol·L⁻¹,pH 6.8,含 5 mmol·L⁻¹ Cys 和 5 mmol·L⁻¹ EDTA),60 °C 作用 24 h,酶解重复 2 次;加入 4 倍体积的无水乙醇,取沉淀溶解,先后用 Sephacryl S-300 和 DEAE 纯化即获乌贼墨多糖。

1.3 试验程序设计

40 只 BALB/c 小鼠适应性饲养 5 d 后随机分为 4 组(♀♂各半):空白对照组(A)、模型组(B)、多糖组(C)和治疗组(D)。第 6、7 天,B 组和 D 组连续 2 天腹腔注射 CP(100 mg·kg⁻¹),A 组和 C 组腹腔注射生理盐水。整个试验周期 14 d 内灌胃 SIPS(180 mg·kg⁻¹,C 组和 D 组)或生理盐水(A 组和 B 组)。第 15 天摘眼球取血。注射用 CP 溶液用生理盐水配置。

1.4 指标测定

1.4.1 肝、肾、肺、心脏指数的测定 小鼠称重后脱颈椎处死,迅速剥离肝脏、肾脏、肺、心肌组织,用冰冷的生理盐水冲洗后,用滤纸擦干称重,器官指数=器官重/体重。

1.4.2 肝功能的测定 GPT 和 GOT 的测定采用赖氏法;TBIL 测定采用苯甲酸钠-咖啡因比色法;白蛋白含量测定采用溴甲酚绿比色法。

1.4.3 肾功能的测定 尿素氮(BUN)、尿素、β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)的测定均严格按照试剂盒说明书操作。

1.4.4 肝、肾、肺、心肌组织中抗氧化能力的测定 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定采用黄嘌呤氧化酶法;丙二醛(MDA)含量的测定采用硫代巴比妥酸法(TBA 法);均严格按照试剂盒说明书操作;过氧化氢酶(CAT)测定采用钼酸铵法。

2 结果

2.1 肝、肾、肺、心脏指数变化

4 种脏器指数的变化结果见表 1。与空白对照组比较,CP 能显著地升高正常小鼠肝系数、肺系数和心肌系数($P<0.01$ 或 $P<0.05$),而对肾脏系数的升高作用不明显($P>0.05$)。乌贼墨多糖能够明显抑制由 CP 所致的肝系数升高($P<0.01$),而对肾脏系数、肺系数和心肌系数的改善作用不明显($P>0.05$);乌贼墨多糖对正常小鼠 4 种器官指数没有显著性影响($P>0.05$)。

2.2 肝功能的改变

肝功能的改变结果见表 2。CP 能显著地升高正常小鼠肝组织中 GPT 和 GOT 活力($P<0.01$)及血液中 TBIL 含量($P<0.05$),并显著性降低血液中白蛋白含量($P<0.05$)。乌贼墨多糖组小鼠与空白对照组小鼠体内上述指标变化没有明显差异,但乌贼墨多糖却能大幅度下调由 CP 所致的肝组织内 GPT、GOT 的升高($P<0.01$),而对血液中白蛋白和 TBIL 变化无明显影响($P>0.05$)。

表 1 SIPS 对小鼠肝、肾、肺和心脏指数的影响

Tab 1 Effects of SIPS on organ indexes of liver, kidney, lung and heart in mice

组别	肝指数	肾指数	肺指数	心脏指数
对照组	0.050 7±0.002 2	0.015 3±0.000 3	0.005 4±0.000 2	0.005 3±0.000 3
模型组	0.057 3±0.003 2 ¹⁾	0.015 7±0.000 3	0.007 6±0.000 5 ²⁾	0.006 0±0.000 6 ¹⁾
多糖组	0.048 5±0.003 0	0.015 2±0.000 3	0.005 2±0.000 4	0.005 4±0.000 3
治疗组	0.049 9±0.002 7 ³⁾	0.015 6±0.000 3	0.007 2±0.000 3	0.005 5±0.000 4

注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较,³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$; compared with model group,³⁾ $P<0.01$

表 2 SIPS 对小鼠肝功能的影响

Tab 2 Effects of SIPS on liver function of mice

组别	GPT 活力/U·L ⁻¹	GOT 活力/U·L ⁻¹	血清白蛋白/g·L ⁻¹	血清总胆红素/μmol·L ⁻¹
对照组	62.23±1.558	45.16±14.20	34.71±2.492	2.565±0.431 6
模型组	94.44±3.882 ²⁾	83.08±6.871 ²⁾	27.69±0.257 7 ²⁾	3.760±0.161 2 ¹⁾
多糖组	62.39±7.176	41.90±10.71	39.49±2.015	3.006±0.756 2
治疗组	66.14±12.10 ³⁾	43.56±10.09 ³⁾	27.00±3.318	3.496±0.585 1

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与模型组比较, ³⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with model group, ³⁾P<0.01

2.3 肾功能的变化

肾功能的检测指标变化结果见表 3。与对照组比较, 模型组小鼠血清中 BUN 含量显著降低(P<0.01), NAG 活力下降明显(P<0.05), 尿素和肌酐含量没有明显变化(P>0.05), 乌贼墨多糖对正常小鼠体内的上述指标影响不大(P>0.05), 却能大幅度缓解 CP 所致的 BUN 下降(P<0.01), 而对 NAG、尿酸、肌酐的改善作用不明显。

2.4 肝、肾、肺、心肌组织中抗氧化能力变化

肝脏抗氧化能力的变化结果见表 4。CP 使肝组织中 SOD, CAT 活力均降低(P<0.05), MDA 含量降低, 但不明显。乌贼墨多糖也能升高由 CP 所致的

SOD 活力降低(P<0.01), 但对 CAT 活力和 MDA 含量变化的影响没有统计学差异(P>0.05)。肾组织中抗氧化能力的变化结果见表 5。CP 能降低肾组织中 SOD 活力和 MDA 含量(P<0.01), 乌贼墨多糖对肾组织中上述指标变化的改善作用不明显(P>0.05), 4 组小鼠肾组织中 CAT 活力变化差异均无统计学意义(P>0.05)。肺和心肌组织抗氧化能力的变化结果见表 6, 4 组小鼠肺组织中 SOD 活力和 MDA 含量变化差异不大(P>0.05)。另外, 4 组小鼠心肌组织中 SOD 活力变化差异同样无统计学意义, 但 CP 能降低心肌组织中 MDA 含量(P<0.05), 而乌贼墨多糖却能够明显地改善由 CP 所致的 MDA 含量降低。

表 3 SIPS 对小鼠肾功能的影响

Tab 3 Effects of SIPS on kidney function of mice

组别	血清尿素/nmol·L ⁻¹	血清 NAG 活力/U·L ⁻¹	血清尿酸/μmol·L ⁻¹	血清肌酐/μmol·L ⁻¹
对照组	8.073±0.533 7	89.72±3.241	140.2±21.57	55.47±4.826
模型组	6.114±0.447 9 ²⁾	52.38±10.56 ¹⁾	132.5±27.17	51.06±5.407
多糖组	8.314±0.719 4	81.21±12.59	137.1±24.46	49.69±6.469
治疗组	7.175±0.391 6 ³⁾	59.79±9.124	143.7±20.51	50.41±1.088

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与模型组比较, ³⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with model group, ³⁾P<0.01

表 4 SIPS 对小鼠肝脏抗氧化能力的影响

Tab 4 Effects of SIPS on liver antioxidant ability in mice

组别	SOD 活力/U·mgprot ⁻¹	MDA 含量/nmol·mgprot ⁻¹	CAT 活力/U·mgprot ⁻¹
对照组	63.68±4.161	4.222±0.896 0	223.4±23.53
模型组	33.73±11.18 ¹⁾	2.864±0.955 9	190.3±35.09 ¹⁾
多糖组	70.05±10.55	4.163±0.682 3	204.7±26.05
治疗组	68.04±11.86 ²⁾	3.045±0.766 3	184.5±11.31

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05; 与模型组比较, ²⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with model group, ²⁾P<0.01

表 5 SIPS 对小鼠肾脏抗氧化能力的影响

Tab 5 Effects of SIPS on kidney antioxidant ability in mice

组别	SOD 活力/U·mgprot ⁻¹	MDA 含量/nmol·mgprot ⁻¹	CAT 活力/U·mgprot ⁻¹
对照组	379.9±28.96	64.76±3.131	278.7±37.83
模型组	246.3±42.47 ¹⁾	19.37±7.537 ¹⁾	214.2±37.81
多糖组	323.8±51.68	52.22±11.63	255.7±38.22
治疗组	256.2±65.96	19.94±6.720	223.7±35.67

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01

表 6 SIPS 对小鼠肺和心肌组织抗氧化能力的影响

Tab 6 Effects of SIPS on lung and heart antioxidant ability in mice

组别	肺 SOD 活力/U·mgprot ⁻¹	肺 MDA 含量/nmol·mgprot ⁻¹	心脏 SOD 活力/U·mgprot ⁻¹	心脏 MDA 含量/nmol·mgprot ⁻¹
对照组	253.1±30.97	6.750±1.317	292.9±15.71	17.03±1.972
模型组	238.8±40.63	5.087±0.358 6	296.2±36.85	11.77±2.008 ¹⁾
多糖组	306.8±42.42	7.195±1.223	333.0±43.19	16.49±2.838
治疗组	248.5±32.17	5.153±1.259	342.8±53.03	17.00±3.332 ²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05; 与模型组比较, ²⁾P<0.05

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with model group, ²⁾P<0.05

3 讨论

各种急、慢性肝病的发病过程通常与细胞免疫直接导致的炎症坏死有关, 还与各种原因引起的肝细胞异常凋亡关系密切^[11-12]。临床研究表明, CP 可引起部分患者肝功能损害, 胆汁分泌异常, 出现黄疸。本试验结果表明, CP 能够显著升高 GPT 和 GOT, 表明急性肝损伤或慢性肝炎的开始。结合白蛋白和 TBIT 含量数据, 说明 CP 致使正常小鼠肝功能严重损伤, 而乌贼墨多糖能够在一定程度上抑制上述指标的异常变化, 有效缓解 CP 的毒性作用, 并且对正常小鼠体内上述指标无明显影响。肾脏是人体重要器官之一。同时也是毒物直接作用的靶器官之一, 在本试验过程中, 注射 CP 后, 模型组和治疗组小鼠均存在不同程度的尿血现象, 表明 CP 引起老鼠出血性膀胱炎, 与文献报道相符^[13-16], 通过尿酸和肌酐含量的观察未见异常现象, 但是 BUN 和 NAG 活力均有所降低。BUN 是含氮的有机物代谢的终末产物, 其含量降低见于蛋白质摄入过少, 可能是由于 CP 引起的食欲不振、摄食减少而引起的蛋白质摄入不足, 或是 CP 导致的严重肝、肾功能不全。NAG 活力降低也预示着肾功能严重不全。对肺组织和心肌组织的器官指数测定表明, CP 对心肌组织和肺组织也产生了一定程度的影响。本研究同时考察了 4 种脏器组织抗氧化能力的变化, 发现 CP 对它们均产生了不同程度的氧化性损伤, 有报道表明^[17], CP 经肝细胞微粒体 P-450 酶系代谢可生成有毒的亲电子物质, 如丙烯醛等, 这些亲电子中间产物可与蛋白质、核酸和脂质等分子结合, 导致重要的功能酶活性改变, 使细胞内外环境的稳态受破坏, 即导致应激性损伤。CP 诱导的氧化应激过程, 使得胞内产生具有极强氧化能力的各种自由基, 并通过氧化反应来攻击细胞膜、线粒体膜, 与膜中不饱和脂肪酸反应造成脂质过氧化而引起组织线粒体、蛋白质、DNA、RNA 等广泛损伤。这些氧

化性损伤介导的炎症反应, 常常成为各种组织进一步发展成为各种疾病的启动因子。许多免疫及非免疫性的实验研究已证实了氧自由基在急慢性肾脏损伤中的重要作用, 它作为一种致病介质参与急性肾炎、新月体肾炎及各种原因导致的急性肾功能衰竭的发病过程^[18-20], 同时通过自由基的产生, 诱发细胞发生脂质过氧化和 DNA 解链等^[21], 启动肝、肺纤维化前的炎症反应。另外, 氧自由基还可激活、上调细胞核因子 NF-κB, 进一步促进组织的纤维化进程^[22]。此外, 心肌缺氧-复氧损伤(也叫缺血再灌注损伤)也与氧自由基的作用密切相关^[23-24]。本研究结果表明, 乌贼墨多糖对上述脏器组织中 CP 引起的抗氧化能力降低存在一定程度的抑制作用。

REFERENCES

- [1] YU H S, WU L, WANG Z M, et al. Effects of low-dose radiation on liver function injured by cyclophosphamide [J]. J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 2007, 28(6): 574-575.
- [2] SUBRAMANIAN S, THIRUVENGADAM D, BHAKTHAVATCHALAM M M, et al. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity [J]. Clin Chim A, 2006, 364(1/2): 335-342.
- [3] KENSUKE K, MASAHICO I. Three clinicopathological subtypes of autoimmune pancreatitis stratified by the duodenal papillary findings and the serum IgG4 [J]. Gastroin En, 2008, 67(5): 1608-1619.
- [4] WANG G, LIU H Z, WU J L, et al. Study of sepia ink extract on protection from oxidative damage of cardiac muscle and brain tissue in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(2): 95-99.
- [5] WANG G, PAN J Q, ZHONG J P, et al. Protective effect of sepia ink extract against cyclophosphamide-induced oxidative damage in mice spleen [J]. Food Sci(食品科学), 2009, 30(11): 219-222.
- [6] WANG G, GUO Y Z, GUAN S B, et al. Protective effect of sepia ink extract on cyclophosphamine-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2009, 28(1): 36-40.
- [7] ZHONG J P, WANG G, SHANG J H, et al. Protective effects of squid ink extract towards hemopoietic injuries induced by cyclophosphamide [J]. Mar Drugs, 2009, 7(1): 9-18.

- [8] LIU H Z, WANG G, GUO Y Z, et al. Antagonistic effects of squid ink extract towards cyclophosphamide-induced antioxidant injury in kidney from mice [J]. Chin J Nephro(中华肾脏病杂志), 2009, 25(10): 804-805.
- [9] JIANG Y Y, YE G M, FAN G R. Primary active components in sepia: a qualitative and quantitative analysis [J]. Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报), 2006, 28(1): 105-107.
- [10] CHEN S G, XU J, XUE C G, et al. Sequence determination of a non-sulfated glycosaminoglycan-like polysaccharides from melanin-free ink of the squid *Ommastrephes bartrami* by negative-ion electrospray tandem mass spectrometry and NMR spectroscopy [J]. Glycoconi J, 2008, 25(5): 481-492.
- [11] OGASAWARA J, WATANABE-FUKUNAGA R, ADACHI M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice [J]. Nature, 1993, 364(6440): 806-809.
- [12] RYO K, KAMOGAWA Y, IKEDA J, et al. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure [J]. Am J Gastroenterol, 2000, 9(5): 2047-2058.
- [13] NICOL D. Cyclophosphamide and the urinary tract [J]. Intern Med J, 2002, 32(5/6): 199-201.
- [14] MATAR P, ROZADOS V R, GONZALEZ A D, et al. Mechanism of anti-metastatic immuno-potentiation by low-dose cyclophosphamide [J]. Eur J Cancer, 2000, 36(8): 1060-1066.
- [15] ALFIERI A B, CUBEDDU L X. Nitric oxide and NK1-tachykinin receptors in cyclophosphamide-induced cystitis in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 295(2): 824-829.
- [16] PARK Y S, FUJIWARA N, KOH Y H, et al. Induction of thioredoxin reductase gene expression by peroxynitrite in human umbilical vein endothelial cells [J]. Biol Chem, 2002, 383(3/4): 683-691.
- [17] SELVAKUMAR E, PRAHALATHAN C, MYTHILI Y, et al. Beneficial effects of DL- α -lipoic acid on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mitochondrial fractions of rat testis [J]. Chem Biol Interact, 2005, 152(1): 59-66.
- [18] ZHANG B, QIN G H, MENG Z Q, et al. Oxidative damage effect on kidney of mice induced by sulfur dioxide inhalation [J]. Ind Health & Occup Dis(工业卫生与职业病), 2004, 30(1): 29-31.
- [19] NOIRI E, NAKAO A, UCHIDA K, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 281(5): 948-957.
- [20] DUBEY N K, YADAV P, DUTTA A K, et al. Free oxygen radicals in acute renal failure [J]. Indian Pediatr, 2000, 37(2): 153-158.
- [21] YUAN X H, HUANG X. Mechanism of pulmonary fibrosis and development of Chinese medicine [J]. Guide Chin Med J(中国医药指南), 2007, 5(17): 112-114.
- [22] CHANDRAKASAN G, BHATNAGAR R S. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by superoxide [J]. Cell Mol Biol, 1991, 37(7): 751-755.
- [23] MURATA M, SUZUKIT T, MIDORIKAWA K, et al. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 37(6): 793-802.
- [24] DAS U B, MALLICK M, DEBNATH J M, et al. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats [J]. Asian J Androl, 2002, 4(3): 201-207.