

可乐与无糖可乐对雄性小鼠青春期发育提前的影响

穆春光, 辛永娟

郑州大学公共卫生学院儿少卫生学教研室, 河南郑州 450001

摘要: **背景** 在世界范围内, 儿童青少年的青春期启动有提前的趋势, 不良膳食如含糖饮料过量摄入可能是导致这一现象的诱因。**目的** 探讨生命早期可乐和无糖可乐暴露对雄性小鼠青春期启动的影响。**方法** 雌性 C57BL/6J 小鼠在检出阴道栓当天开始接受可乐和无糖可乐暴露, 暴露一直持续至子代雄性小鼠青春期启动指标出现。其间子代小鼠定期称重, 监测子代小鼠每日饮水和摄食量, 在青春期启动指标出现当天处死小鼠, 收集血清、睾丸、下丘脑组织, 检测激素水平和调控青春期启动的关键基因表达水平。**结果** 与对照组比较, 可乐组和无糖可乐组小鼠体质量均增加, 饮水量增加, 摄食量减少, 并且无糖可乐组小鼠的饮水增加量和摄食减少量均低于可乐组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 可乐组 ($P < 0.01$) 和无糖可乐组 ($P < 0.01$) 阴茎剥离时间均提前, 可乐组睾丸器官系数升高 ($P < 0.01$), 生精上皮厚度增加 ($P < 0.01$), 无糖可乐组睾丸器官系数无统计学差异 ($P > 0.05$), 生精上皮厚度增加 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 可乐组和无糖可乐组血清激素促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) ($P < 0.05$)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) ($P < 0.05$) 和促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) ($P < 0.01$) 水平均提高。机制方面, 与对照组比较, 可乐组和无糖可乐组小鼠下丘脑下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG 轴) 中青春期启动相关基因 *TTF-1*、*KISS-1*、*GPR54*、*GnRH* 的 mRNA 表达水平均增加 ($P < 0.05$), 能量代谢相关基因 *POMC* 的 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.01$); 睾丸组织中 *Cyp11b1* 的 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.05$), *Cyp19a1* 无显著变化 ($P > 0.05$)。**结论** 生命早期可乐和无糖可乐暴露可能通过调节雄性小鼠 HPG 轴上游基因 *TTF-1*, 影响 HPG 轴中 *KISS-1*、*GPR54* 和 *GnRH* 基因的表达以促进 GnRH、LH 和 FSH 激素的分泌, 进而调控睾丸中 *Cyp11b1* 基因的表达, 导致青春期启动提前。

关键词: 生命早期; 可乐; 无糖可乐; 下丘脑; HPG 轴; 青春期启动

中图分类号: R179; R335

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)05-0485-07

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.24121802

引用本文: 穆春光, 辛永娟. 可乐与无糖可乐对雄性小鼠青春期发育提前的影响 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (5): 485-491.

Comparative effects of cola and diet cola on accelerated pubertal development in male mice

MU Chunguang, XIN Yongjuan

Department of Child and Adolescent Health, School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Corresponding author: XIN Yongjuan. Email: yjxin@zzu.edu.cn

Abstract: Background There is a tendency for early onset of puberty in children and adolescents worldwide. And excessive consumption of unhealthy diets such as sugary drinks may be a contributing factor. **Objective** To investigate the effects of cola and diet cola exposure on the initiation of puberty in male mice. **Methods** Female C57BL/6J mice were exposed to cola and diet cola starting from the day when vaginal plugs were detected, with the exposure continuing until the onset of puberty indicators in male offspring. During this period, male offspring were regularly weighed, and their daily water intake and food consumption were monitored. On the day when puberty onset indicators were observed, mice were euthanized, and serum, testicular, and hypothalamic tissues were collected to analyze hormone levels and measure the expression of key genes regulating puberty initiation. **Results** Compared with the control group, mice in the cola group and the diet cola group had a significant increase in body weight, an increase in water intake, and a decrease in food intake, and both the increase in water intake and the decrease in food intake of mice in the diet cola group were lower than those in the cola group, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the time of penile peeling was significantly earlier in the cola group ($P < 0.01$) and the diet cola group ($P < 0.01$). The testicular organ coefficient was significantly higher ($P < 0.01$), and spermatogenic tubule epithelial thickness was significantly increased ($P < 0.01$) in the cola group, while there was no significant difference in testicular organ coefficient ($P > 0.05$), and spermatogenic tubule epithelial thickness was significantly increased ($P < 0.05$) in the diet cola group. Sera hormone levels of GnRH ($P < 0.05$), LH ($P < 0.05$), and FSH ($P < 0.01$) were significantly higher in the cola and diet cola groups compared to the control group. For mechanisms, mRNA expression levels of HPG axis-related genes *TTF-1*, *KISS-1*, *GPR54*,

收稿日期: 2024-12-18

第一作者: 穆春光, 学士。Email: 15738221749@163.com

通信作者: 辛永娟, 博士, 讲师。Email: yjxin@zzu.edu.cn

and *GnRH* were significantly upregulated in the hypothalamic tissues of mice in the cola group and the diet cola group ($P < 0.05$), and the mRNA expression levels of energy metabolism-related genes *POMC* were significantly downregulated ($P < 0.01$). In testicular tissues, *Cyp11b1* mRNA expression was significantly decreased ($P < 0.05$), whereas no significant changes were observed for *Cyp19a1* ($P > 0.05$). **Conclusion** Early-life exposure to cola and diet cola may promote precocious puberty onset in male mice by modulating the upstream HPG axis gene *TTF-1*, thereby influencing the expression of *KISS-1*, *GPR54*, and *GnRH* genes within the HPG axis. This process enhances the secretion of hormones such as GnRH, LH, and FSH, subsequently regulating the expression of the *Cyp11b1* gene in the testes.

Keywords: early life; cola; diet cola; hypothalamus; hpg axis; puberty initiation

Cited as: Mu CHG, Xin YJ. Comparative effects of cola and diet cola on accelerated pubertal development in male mice[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(5): 485-491.

近年来,含糖饮料的消费量逐年增加,可乐和无糖可乐作为饮料市场上的两大热门产品,消费量十分庞大。调查显示,2024年可口可乐和无糖可口可乐在全球的销量分别增加了2%和6%^[1],2021年可口可乐在全球软饮料市场份额中占比居首位^[2],接近61.5%的中国网民消费过无糖可口可乐^[3]。含糖饮料的大量摄入给人体健康带来了巨大的潜在风险,如大量摄入糖而导致的肥胖,极易造成机体出现心血管疾病、2型糖尿病、癌症等^[4]。同时,含糖饮料的过量摄入会导致儿童更高的体质量指数和体质量,含糖饮料消费与体质量增长呈现正线性的剂量-反应关系^[5]。为了规避含糖饮料带来的诸多健康隐患,人们开始倾向于饮用添加阿斯巴甜、安赛蜜等^[6]人造甜味剂的无糖饮料,但有研究发现妇女怀孕期间食用含人造甜味剂的饮料与后代7岁时超重/肥胖风险存在正相关^[7]。同时,越来越多的研究发现,儿童青春期启动时间有逐渐提前的趋势。1997—2013年,全球女童乳腺发育的平均年龄每10年提前了近3个月^[8]。1998—2017年,丹麦男孩和女孩患中枢性性早熟的年发病率显著上升^[9]。我国儿童青少年的相关调查研究中也发现了类似的现象^[10-11]。流行病学调查数据显示,与正常儿童相比,肥胖儿童的青春期开始较早^[12],并且肥胖与青春期启动提前呈现一定的正相关关系,具体机制尚不清楚^[13]。含糖饮料的过量摄入是导致儿童青少年肥胖的重要原因之一,儿童青少年肥胖是其青春期启动提前的关键诱因之一,但含糖饮料对青春期启动的直接效应还不明确。基于以上背景,本研究通过构建生命早期可乐和无糖可乐暴露模型,探讨可乐和无糖可乐暴露对子代雄性小鼠青春期启动的影响,并寻找其可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

于北京维通利华实验动物有限公司购入8周龄

SPF级雌性C57BL/6J小鼠,在温度22~25℃、湿度40%~60%的环境下适应性喂1周后进行合笼,妊娠前小鼠体质量18~20g。所有实验均按照郑州大学实验动物伦理学委员会的标准执行(伦理编号:ZZUIRB G2R2021-0128)。

1.2 主要试剂

可乐及无糖可乐为市面常见饮料(郑州太古可口可乐饮料有限公司);促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH; E-20506)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH; E-20342)和促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH; E-20418)酶联免疫吸附实验试剂盒由广东省安迪基因生物科技有限公司提供;苏木精-伊红染色试剂盒(60524ES60)、总RNA提取试剂(19201ES60)、反转录试剂(11123ES10)、SYBR(11190ES08)由翌圣生物科技股份有限公司提供;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 模型构建及分组

每天下午将雄性小鼠与雌性小鼠进行合笼,次日清晨检查雌性小鼠阴道,若发现阴栓则将其标记为妊娠母鼠。共选取12只妊娠母鼠,随机均分为对照组母鼠、可乐组母鼠和无糖可乐组母鼠,每组4只。可乐组和无糖可乐组的妊娠母鼠分别以可乐和无糖可乐替代对照组的饮用水,且小鼠的饮用量不加限制。三组子代小鼠出生数量基本一致(对照组子代n=31,可乐组子代n=31,无糖可乐组子代n=34),待小鼠断奶按性别分笼,将每组子代雄性小鼠分成3笼饲养(对照组雄性子代n=16,可乐组雄性子代n=17,无糖可乐组雄性子代n=14),整个暴露过程持续至子代雄性小鼠青春期启动的指标显现为止。青春期的性发育通过经典的Tanner分期来评估,阴茎剥离通常发生在Tanner 3期或4期,将雄性小鼠的阴茎包皮分离这一指标作为青春期启动的标志^[14]。在子代雄性小鼠哺乳期结束1周后,每日固定时间用镊子轻拨小鼠阴茎处

皮肤,发现阴茎剥离且无阻力时认为小鼠青春期启动出现。

1.4 血清激素水平测定

按照 GnRH、LH 和 FSH 酶联免疫吸附实验试剂盒说明书要求,将标准品及待检测血清样品稀释后加入孔板中,37°C温育 30 min,洗涤 5 次后每孔加入 50 μ L 酶标试剂,再次 37°C温育 30 min,洗涤 5 次后加入显色剂,在避光 37°C 条件下显色 15 min,最后加入反应终止液,以空白孔调零,450 nm 波长测量各孔吸光度。根据标准品吸光度计算出标准曲线后将检测样本吸光度代入标准曲线,计算出具体激素含量。

1.5 睾丸器官系数及苏木精-伊红染色

睾丸组织器官系数=(睾丸湿重/小鼠体质量) \times 100%;子代雄性小鼠睾丸组织取下后,用 0.9% 氯化钠注射液冲洗干净,放入 4% 多聚甲醛溶液中固定。石蜡包埋后切成厚度为 4 μ m 的切片,脱蜡后进行 HE 染色,脱水封片后在显微镜下进行观察并拍照保存。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测子代雄性小鼠下丘脑中青春期启动基因 *TTF-1*、*KISS-1*、*GPR54*、*GnRH*、下丘脑中能量代谢基因 *POMC* 以及睾丸中青春期启动基因 *Cyp11b1*、*Cyp19a1* 的 mRNA 表达

提取子代雄性小鼠下丘脑和睾丸组织总 RNA,反转录为 cDNA,使用实时荧光定量 PCR 法检测小鼠下丘脑组织中 *TTF-1*、*KISS-1*、*GPR54*、*GnRH*、*POMC* 以及小鼠睾丸组织中 *Cyp11b1* 和 *Cyp19a1* 基因的 mRNA 表达水平,使用 *Gapdh* 归一化的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算各基因表达量,本实验用于扩增每个基因的引物序列见表 1。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 26.0 进行统计学分析,Image J 软件统计 HE 染色结果,GraphPad Prism 9.0 进行绘图,组间比较采用单因素方差分析(两两比较采用

Bonferroni 法),结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 可乐和无糖可乐暴露对子代雄性小鼠出生数量、体质量、饮水量和摄食量的影响

在本实验中 3 组子代小鼠出生数量和出生体质量基本一致,提示不存在胎盘的吸收差异,妊娠母鼠及子代小鼠数量见表 2。子代雄性小鼠出生当天记为出生后第 1 天(postnatal day 1, P1),在子代雄性小鼠出生后第 3、7、14、21、28 天时分别称量了 3 组小鼠的体质量(图 1A),结果发现,与对照组比较,可乐组小鼠体质量在 P3 和 P7 无显著变化,在 P14($P<0.01$),P21($P<0.01$)和 P28($P<0.05$)时升高;无糖可乐组小鼠体质量在 P3 时无显著变化,在 P7($P<0.05$),P14($P<0.01$),P21($P<0.01$)和 P28($P<0.01$)时升高。与可乐组比较,无糖可乐组小鼠体质量在 P28($P<0.01$)时升高。由上可知,生命早期可乐和无糖可乐暴露均会增加子代雄性小鼠的体质量。

本研究记录了从小鼠哺乳期结束当天(P21)至青春期启动之间,10 d 内小鼠每日的饮水量(图 1B)和摄食量(图 1C)。从 3 组子代小鼠摄食量和饮水量监测数据来看,对照组饮水量最低,摄食量最高。同时,与对照组相比,10 d 内可乐组饮水量增加($P<0.05$),摄食量减少($P<0.01$)。无糖可乐组饮水量在 P21($P<0.01$)和 P22($P<0.01$)时增加,其余时间无统计学差异,摄食量在 10 d 内减少($P<0.01$)。与可乐组比较,无糖可乐组小鼠饮水量仅在 P24 时无统计学差异,其余时间均降低($P<0.05$),摄食量在 P21($P<0.05$)、P22($P<0.05$)、P25($P<0.05$)和 P30($P<0.05$)时增加,其余时间无统计学差异。从总体趋势上看,可乐和无糖可乐暴露均会增加子代饮水量,减少摄食量,

表 1 实时定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers used for real-time PCR

基因	正向引物	反向引物
<i>TTF-1</i>	CACACGACTCCGTTCTCAGTG	CATGCAGGCAAAGCAGTCA
<i>KISS-1</i>	TGCTGCTTCTCCTCTGT	GGAAAAGGAATCGCGGT
<i>GPR54</i>	GCCACAGACGTCACCTTTCCTAC	CGGGAACACAGTTCACATACCA
<i>GnRH</i>	GAAAGAGAAACACTGAACACTTGGT	TCCTCTTCAATCAGACTTTCCAGAG
<i>POMC</i>	CTCCTGCTTCAGACCTCCAT	CAGTCAGGGGCTGTTCATCT
<i>Cyp11b1</i>	AGCCAGGACACCCCTTCC	CCTGAACATCCGGGTATCTG
<i>Cyp19a1</i>	CTGCAGACACTACTACTACA	ATCCGAGTCACTGCTCTCAG
<i>Gapdh</i>	AGAGTGTTCCTCGTCCCCTAGACA	CGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGTC

并且无糖可乐组饮水增加量和摄食减少量要低于可乐组。

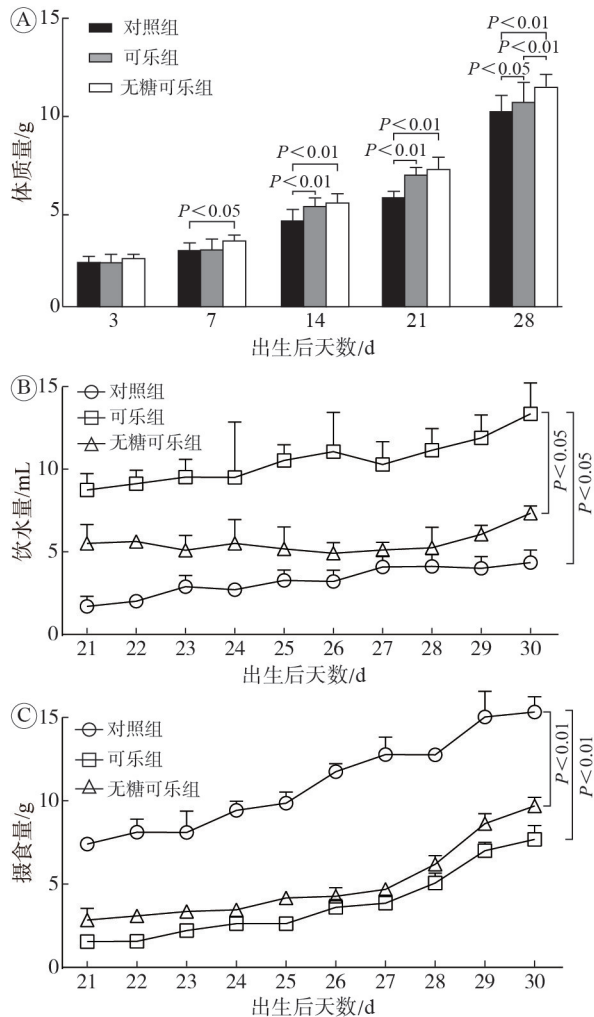


图1 子代雄性小鼠体质量(A)、每日饮水量(B)和摄食量(C)(对照组n=16, 可乐组n=17, 无糖可乐组n=14)

Fig. 1 Body weight (A), daily water intake (B) and food intake (C) of offspring male mice (control group: 16 cases, cola group: 17 cases, diet cola group: 14 cases)

表2 妊娠母鼠及子代小鼠数量

Tab. 2 Number of pregnant mothers and offspring mice

分组	妊娠母鼠数量/只	分娩仔鼠数量/只	雄性子代数量/只	最终纳入数量/只
对照组	4	31	16	16
可乐组	4	31	17	17
无糖可乐组	4	34	14	14

2.2 可乐和无糖可乐暴露对子代雄性小鼠青春期启动的影响

为了确定生命早期可乐和无糖可乐暴露对雄性小鼠青春期启动的影响, 检测了小鼠的阴茎剥离情况(图2)。结果发现, 在P33时, 对照组仅有1只小鼠阴茎剥离(1/16), 而可乐组有10只小鼠阴

茎剥离(10/17), 无糖可乐组有12只小鼠阴茎剥离(12/14)(图2A)。统计分析结果发现, 与对照组比较, 可乐组($P<0.01$)和无糖可乐组($P<0.01$)小鼠的阴茎剥离时间提前。与可乐组比较, 无糖可乐组小鼠的阴茎剥离时间提前($P<0.05$)(图2B)。这表明可乐和无糖可乐暴露均会导致雄性小鼠青春期启动提前, 并且无糖可乐暴露导致的青春期启动提前现象较可乐组更为显著。

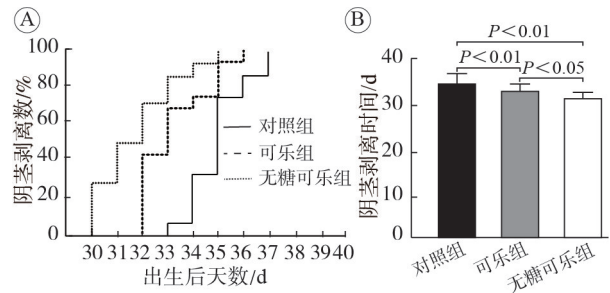


图2 子代雄性小鼠阴茎剥离百分比(A)及天数(B)(对照组n=16, 可乐组n=17, 无糖可乐组n=14)

Fig. 2 Percentage of preputial separation (A) and days to preputial separation (B) in male offspring mice (control group: 16 cases, cola group: 17 cases, diet cola group: 14 cases)

2.3 可乐和无糖可乐暴露对下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)关键激素水平的影响

可乐和无糖可乐暴露会导致子代雄性小鼠青春期启动提前, HPG轴激活在青春期启动过程中扮演着关键角色, 本研究检测了HPG轴关键激素GnRH(图3A)、LH(图3B)和FSH(图3C)水平的变化。结果发现, 与对照组比较, 可乐组和无糖可乐组小鼠血清GnRH($P<0.05$)、LH($P<0.05$)、FSH($P<0.01$)水平均增加。与可乐组比较, 无糖可乐组小鼠血清GnRH、LH、FSH无统计学差异。这表明可乐和无糖可乐暴露可能通过影响雄性小鼠HPG轴中的关键激素水平来影响青春期启动。

2.4 可乐和无糖可乐暴露对小鼠睾丸器官系数和组织形态的影响

为了确定生命早期可乐和无糖可乐暴露对子代雄性小鼠的生殖系统是否存在影响, 本研究检测了睾丸组织的器官系数(图4B)并对睾丸组织进行HE染色(图4A), 使用生精上皮厚度(图4C)和生精小管直径(图4D)这两个指标来评价睾丸的发育情况。结果发现, 与对照组比较, 可乐组小鼠睾丸器官系数($P<0.01$)和生精上皮厚度($P<0.01$)增加, 无糖可乐组小鼠睾丸器官系数无统计学差异, 生精上皮厚度增加($P<0.05$); 两组的生精小管直

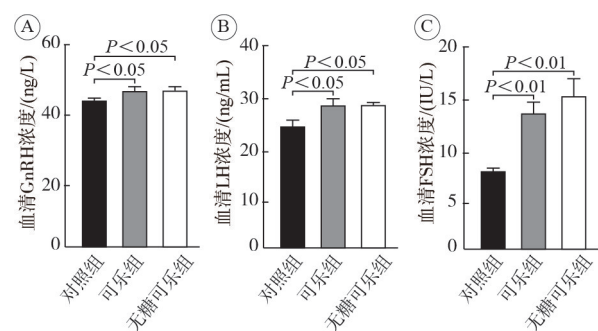


图3 子代雄性小鼠血清激素GnRH(A)、LH(B)、FSH(C)水平(对照组n=6, 可乐组n=7, 无糖可乐组n=5)

Fig. 3 Sera levels of hormones GnRH (A), LH (B) and FSH (C) in offspring male mice (control group: 6 cases, cola group: 7 cases, diet cola group: 5 cases)

径无统计学差异,但两组的生精小管管腔大小不均匀,发育不完善。与可乐组比较,无糖可乐组小鼠睾丸器官系数降低($P<0.01$),生精小管直径无统计学差异。这表明可乐和无糖可乐暴露均会导致睾丸组织的异常发育。

2.5 可乐和无糖可乐暴露对子代雄性小鼠下丘脑青春期相关基因的影响

为了进一步探讨可乐和无糖可乐暴露导致子代雄性小鼠青春期启动提前的机制,本研究检测了小鼠下丘脑组织中与青春期启动相关基因 *TTF-1*、*KISS-1*、*GPR54*、*GnRH* 以及睾丸组织中 *Cyp11b1*、*Cyp19a1* 的 mRNA 水平,同时检测了下丘脑组织中与能量代谢相关基因 *POMC* 的 mRNA 水平。结果如图5所示,与对照组比较,可乐组和无糖可乐组基因 *TTF-1* ($P<0.01$)、*KISS-1* ($P<0.05$)、*GPR54* ($P<0.01$)、*GnRH* ($P<0.01$) 的 mRNA 表达水平升高,基因 *Cyp11b1* ($P<0.05$) 和 *POMC* ($P<0.01$) 的 mRNA 表达水平降低,基因 *Cyp19a1* 的 mRNA 表达水平无统计学差异。此外,上述基因在可乐组与无糖可乐组中的表达水平无统计学差异。这表明可乐和无糖可乐暴露可能通过相同的机制,调节下丘脑中基因 *TTF-1*, 以及 HPG 轴中

关键基因 *KISS-1*、*GPR54*、*GnRH* 的表达,影响睾丸中基因 *Cyp11b1* 的表达,进而影响小鼠的青春期启动。

3 讨论

本研究发现生命早期可乐和无糖可乐暴露均会导致子代雄性小鼠体质量增加,这与已有的研究结果一致,本研究中所用可乐的含糖量为10.6%,无糖可乐中的人造甜味剂主要为安赛蜜和阿斯巴甜。已有研究表明,在儿童和成人中大量摄入含糖饮料会导致体质量增加^[5]。8周龄雄性小鼠在接受为期4周的安赛蜜灌胃后会体质量升高^[15]。7周龄雄性小鼠接受阿斯巴甜溶液暴露7周也会导致体质量增加,并且小鼠的体质量增加与阿斯巴甜的摄入量呈正相关^[16]。

除体质量变化之外,子代雄性小鼠还呈现饮水量和摄食量的变化。下丘脑中的 POMC 神经元具有抑制食欲、调节能量消耗以及降低体质量的功能。本实验中可乐组和无糖可乐组小鼠的下丘脑基因 *POMC* 表达均降低,尽管两组小鼠的摄食量没有增加,但饮料摄入量却增加,最终贡献于体质量的增加。究其原因,本课题组认为可乐组小鼠长期接受甜味刺激促使其摄入更多的可乐,因此降低了摄食量。而无糖可乐组小鼠体质量增加,摄食量减少,并且饮料内不含糖,可能的原因是无糖可乐中含有除糖以外的其他物质影响了能量代谢,详细的机制还需要进一步的研究验证。也有研究发现6周龄雄性小鼠接受可乐暴露3个月会导致小鼠体质量降低,下丘脑中 *POMC* 表达升高^[17],这与本研究的结果相反,造成这种差异的原因可能是由于可乐的暴露时长不同。在本研究中,可乐暴露时间为孕期、哺乳期和青春期启动前,而在周兵勇等^[17]的研究中,可乐暴露时间为小鼠6周龄性成熟以后,这表明生命早期这一特殊

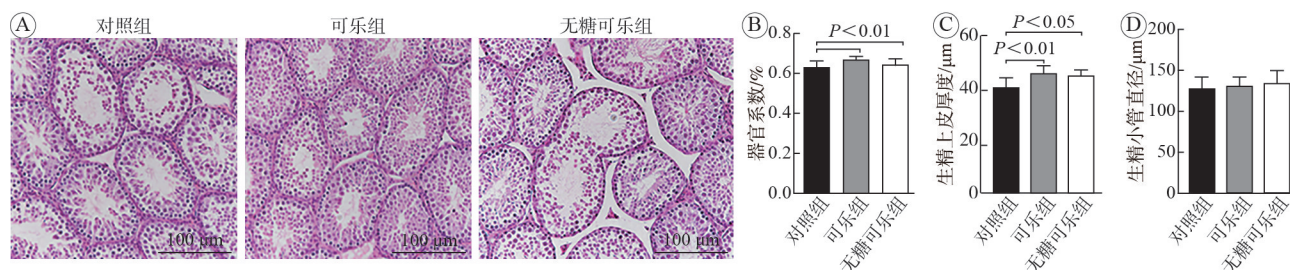


图4 子代雄性小鼠睾丸HE染色(A, 200×)、器官系数(B)、生精上皮厚度(C)及生精小管直径(D)(对照组n=5, 可乐组n=5, 无糖可乐组n=5)

Fig. 4 HE staining (A, 200×), organ coefficient (B), thickness of spermatogenic epithelium (C) and diameter of spermatogenic tubules (D) in testes of offspring mice (control group: 5 cases, cola group: 5 cases, diet cola group: 5 cases)

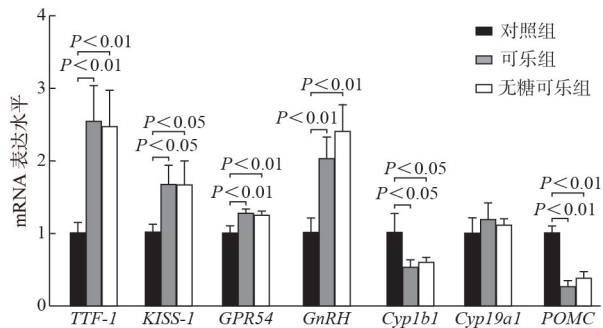


图5 Real-time PCR检测子代雄性小鼠青春期启动及能量代谢相关基因(对照组n=5, 可乐组n=5, 无糖可乐组n=4)

Fig. 5 Real-time PCR detection of genes related to puberty initiation and energy metabolism in offspring male mice (control group: 5 cases, cola group: 5 cases, diet cola group: 4 cases)

时期以及母婴代际效应可能对脂肪代谢有一定影响, 最终导致体质量变化的差异, 更详细的调控机制还有待后续的研究进一步明确。

本实验观察到母鼠暴露于可乐和无糖可乐会导致子代雄性小鼠青春期启动提前, 并出现睾丸组织病理变化, 这与之前的研究相对应。人群数据显示含糖饮料过度消费与男孩较早时间断声^[18]、女孩月经初潮提前有关^[19]。在动物实验中, 母鼠摄入阿斯巴甜会导致后代雌性大鼠青春期启动延迟^[20], 而摄入安赛蜜会导致后代雌性大鼠青春期启动提前^[21]。本实验所用无糖可乐主要含有安赛蜜和阿斯巴甜两种人造甜味剂, 实验结果更倾向于支持安赛蜜在青春期启动中的作用大于阿斯巴甜, 但二者在体内的生理功能和交互作用尚不明确, 还需要进一步的研究来深入阐明不同人造甜味剂在青春期启动中的具体作用。已有研究同时证实摄入过多的糖或人造甜味剂会对生殖健康产生不良影响。青春期雄性大鼠接受20%的果糖暴露会导致睾丸生精小管异常增长, 并伴有异常未成熟的精子细胞^[22]。阿斯巴甜暴露可使睾丸组织形态发生变化, 生精小管内生殖细胞数量大幅减少^[23]。而安赛蜜暴露会影响睾酮的水平, 导致性腺脂肪细胞肥大等^[24]。在本研究中, 可乐组和无糖可乐组小鼠的睾丸组织中生精上皮厚度均增加, 生精小管管腔大小不均匀, 发育不完善, 这与以往的研究结果类似。与对照组比较, 可乐组小鼠的睾丸器官系数增加, 青春期启动提前。而无糖可乐组小鼠的睾丸器官系数较可乐组降低, 但其青春期启动同样提前, 这提示无糖可乐在生殖系统发育和青春期启动机制上可能存在不依赖于糖的其他机制。无糖可乐暴露可能通过更复杂的机

制干扰小鼠生殖系统的正常发育, 这一问题有待后续实验进一步探究。

青春期启动的机制一直悬而未决, 其可能的机制包括关键基因对HPG轴及其上游的调控。在本研究中, 可乐组和无糖可乐组下丘脑组织中*KISS-1*、*GPR54*、*GnRH*基因的mRNA表达水平增加, 这表明可乐和无糖可乐能够激活HPG轴。*TTF-1*基因通过作用于下丘脑弓状核中的*KISS-1*神经元来发挥作用^[25], 其表达升高提示可乐和无糖可乐可能通过激活HPG轴上游*TTF-1*的表达进而调控HPG轴的活性。在生殖系统中, *Cyp11b1*是雌激素代谢过程中的关键基因, 携带*Cyp11b1**2杂合等位基因的女性月经初潮年龄较晚^[26]。而基因*Cyp19a1*编码的酶负责将雄激素转化为雌激素, 现有研究认为, *Cyp19a1*的突变会导致女性无法正常发展第二性征, 但对男性正常的青春期成熟并无影响^[27]。在本研究中, 睾丸组织中*Cyp11b1*基因的mRNA表达水平降低, 同时两组小鼠的血清GnRH、LH、FSH激素水平均高于对照组, 这一结果与青春期启动提前的表型相吻合。

本研究存在一些局限性。首先, 本研究只观察了短时间的动物暴露结局, 未进行长期跟踪观察, 短期实验结果可能无法全面反映长期影响。其次, 实验中使用的暴露饮料为市售常见饮品, 其成分不够明确, 并且采用无限制饮用方式, 难以确定明确的剂量依赖关系。再次, 本研究关注可乐和无糖可乐导致青春期启动提前的相同效应, 但糖和代糖对生殖系统和能量代谢中的不同作用机制和剂量反应关系还有待进一步研究。最后, 本研究主要聚焦于子代雄性小鼠青春期指标的变化, 源于子代雌性小鼠在青春期启动及相关健康效应上未表现出明显差异, 提示可乐和无糖可乐暴露可能存在性别差异, 具体的机制还有待以后的研究进一步解析。在今后的实验中, 可以开展长期跟踪观察, 如将出生队列研究纳入儿童青少年膳食摄入的长期观察, 大规模人群应用研究以及单一成分的随访追踪研究等, 以明确含糖饮料和无糖饮料的健康效应。

综上所述, 本研究的实验结果表明, 生命早期可乐和无糖可乐暴露会导致子代雄性小鼠体质量增加, 生殖系统受损, 青春期启动提前。其潜在机制可能是可乐和无糖可乐暴露通过调节雄性小鼠HPG轴上游基因*TTF-1*, 影响HPG轴中*KISS-1*、*GPR54*和*GnRH*基因的表达来促进GnRH、LH

和FSH激素的分泌,进而调控睾丸中*Cyp11b1*基因的表达,导致青春期启动提前发生。因此,孕妇、儿童青少年等特殊人群,应注意控制各种含糖饮料和无糖饮料的摄入量,避免因过量摄入导致机体出现一系列的发育性健康问题。

作者贡献 穆春光:进行实验,数据分析,撰写初稿;辛永娟:总体设计,实验指导,审阅和修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: yjxin@zzu.edu.cn。

参考文献

- 1 可口可乐公司2024 Q2财报:全球销量增长2% 亚太销量增长3% [EB/OL]. <https://www.coca-cola.com/cn/zh/media-center/q2-2024-financial-report>.
- 2 2023年全球软饮料行业市场规模及竞争格局分析 可口可乐全球市场份额接近15% [EB/OL]. <https://bg.qianzhan.com/report/detail/300/230129-c6c644bd.html>.
- 3 无糖饮料市场数据分析:61.5%中国网民消费过无糖可口可乐 [EB/OL]. <https://www.iimedia.cn/c1061/83229.html>.
- 4 Malik VS, Hu FB. The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18 (4): 205-218.
- 5 Nguyen M, Jarvis SE, Tinajero MG, et al. Sugar-sweetened beverage consumption and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies and randomized controlled trials [J]. *Am J Clin Nutr*, 2023, 117 (1): 160-174.
- 6 Zani F, Blagih J, Gruber T, et al. The dietary sweetener sucralose is a negative modulator of T cell-mediated responses [J]. *Nature*, 2023, 615 (7953): 705-711.
- 7 Zhu YY, Olsen SF, Mendola P, et al. Maternal consumption of artificially sweetened beverages during pregnancy, and offspring growth through 7 years of age: a prospective cohort study [J]. *Int J Epidemiol*, 2017, 46 (5): 1499-1508.
- 8 Eckert-Lind C, Busch AS, Petersen JH, et al. Worldwide secular trends in age at pubertal onset assessed by breast development among girls: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Pediatr*, 2020, 174 (4): e195881.
- 9 Bräuner EV, Busch AS, Eckert-Lind C, et al. Trends in the incidence of central precocious puberty and normal variant puberty among children in Denmark, 1998 to 2017 [J]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3 (10): e2015665.
- 10 王立, 苏喆, 王强, 等. 深圳市6~16岁儿童青春性发育现况调查 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2020, 28 (4): 456-459.
- 11 杨田, 宋逸, 董彦会, 等. 内蒙古城乡中小学生月经初潮或首次遗精年龄与肥胖相关性 [J]. *中国学校卫生*, 2024, 45 (5): 719-722.
- 12 Zhang Y, Yuan X, Yang XH, et al. Associations of obesity with growth and puberty in children: a cross-sectional study in Fuzhou, China [J]. *Int J Public Health*, 2023, 68: 1605433.
- 13 马涛, 李艳辉, 陈曼曼, 等. 青春期启动提前与儿童肥胖类型的关联研究: 基于横断面调查和队列调查 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2022, 54 (5): 961-970.
- 14 Shen W, Chen J, Yin J, et al. Selenium protects reproductive system and foetus development in a rat model of gestational lead exposure [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20 (4): 773-780.
- 15 Bian XM, Chi L, Gao B, et al. The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (6): e0178426.
- 16 Ragi ME, El-Haber R, El-Masri F, et al. The effect of aspartame and sucralose intake on body weight measures and blood metabolites: role of their form (solid and/or liquid) of ingestion [J]. *Br J Nutr*, 2022, 128 (2): 352-360.
- 17 周兵勇, 黄鑫, 徐珂, 等. 可乐代替饮用水对小鼠健康的影响 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42 (6): 988-996.
- 18 Tsai MC, Lee YL, Chen YC. Association of the consumption of common drinks with early puberty in both sexes [J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 854477.
- 19 Carwile JL, Willett WC, Spiegelman D, et al. Sugar-sweetened beverage consumption and age at menarche in a prospective study of US girls [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30 (3): 675-683.
- 20 Lin CY, Nguyen NN, Tsai WL, et al. Aspartame intake delayed puberty onset in female offspring rats and girls [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2024, 68 (5): e2300270.
- 21 Wu HT, Chiang CC, Wang CT, et al. Consumption of the nonnutritive sweetener acesulfame potassium increases central precocious puberty risk [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 461: 132529.
- 22 Medaglia DSA, Vieira HR, Silveira SDS, et al. High-fructose diet during puberty alters the sperm parameters, testosterone concentration, and histopathology of testes and epididymis in adult Wistar rats [J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2022, 13 (1): 20-27.
- 23 Anbara H, Sheibani MT, Razi M. Long-term effect of aspartame on male reproductive system: evidence for testicular histomorphometrics, Hsp70-2 protein expression and biochemical status [J]. *Int J Fertil Steril*, 2020, 14 (2): 91-101.
- 24 Bridge-Comer PE, Vickers MH, Morton-Jones J, et al. Impact of maternal intake of artificial sweetener, acesulfame-K, on metabolic and reproductive health outcomes in male and female mouse offspring [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 745203.
- 25 Zang SL, Yin XQ, Li P. Downregulation of TTF1 in the rat hypothalamic ARC or AVPV nucleus inhibits Kiss1 and GnRH expression, leading to puberty delay [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19 (1): 30.
- 26 Mitchell ES, Farin FM, Stapleton PL, et al. Association of estrogen-related polymorphisms with age at menarche, age at final menstrual period, and stages of the menopausal transition [J]. *Menopause*, 2008, 15 (1): 105-111.
- 27 Bulun SE. Aromatase and estrogen receptor α deficiency [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101 (2): 323-329.

(责任编辑:孟晓彤)