

番茄红素对氟染毒小鼠氧化应激及行为影响*

刘重斌^{1,2}, 陈格格¹, 叶翎¹, 陈露¹, 王瑞¹

摘要:目的 探讨番茄红素对饮水性氟染毒小鼠氧化应激损伤与神经行为影响及可能机制。方法 成年雄性 C57BL/6 小鼠 60 只, 随机分为对照组、染氟组、番茄红素组、番茄红素低、中、高剂量干预组, 每组 10 只; 连续处理 6 个月后, 氟离子选择电极法测定尿氟、血氟和脑氟含量; 化学比色法检测血液和海马组织中丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和过氧化氢酶 (CAT) 活力; 水迷路实验分析小鼠神经行为学改变。结果 与对照组比较, 染氟组小鼠体重下降, 尿氟、血氟和脑氟含量 [分别为 (3.76 ± 1.60)、(19.26 ± 0.62)、(1.19 ± 0.12) mg/kg] 升高 ($P < 0.05$), 血液和海马组织中 MDA 含量显著增加, SOD、GSH-Px 和 CAT 酶活力下降 ($P < 0.05$); 与染氟组比较, 番茄红素高剂量干预组尿氟、血氟和脑氟含量 [分别为 (2.06 ± 0.47)、(13.40 ± 0.35)、(0.52 ± 0.21) mg/kg] 明显下降 ($P < 0.05$), 血液和海马组织中 MDA 含量降低, SOD、GSH-Px 和 CAT 酶活力升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 染氟组小鼠平均逃逸时间和靶象限活动时间 [分别为 (20.84 ± 0.72)、(16.11 ± 0.77) s] 延长 ($P < 0.05$); 与染氟组比较, 番茄红素高剂量干预组小鼠平均逃逸时间和靶象限活动时间 [分别为 (14.01 ± 0.82)、(7.38 ± 0.37) s] 下降 ($P < 0.05$)。结论 番茄红素能有效降低饮水性氟染毒小鼠氧化应激损伤及提高小鼠学习记忆能力, 对饮水性氟中毒具有一定保护作用。

关键词: 番茄红素; 氟染毒; 氧化性应激; 神经行为; 小鼠
中图分类号: R 151.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)00-0000-03 DOI: 10.11847/zgggws2013-29-00-00

Effects of lycopene on oxidative stress and neurobehavior in mouse exposed to drinking water fluorosis

LIU Chong-bin*, CHEN Ge-ge, YE Ling, et al (* Department of Physiology, Basic Medical Science Building, Huzhou Normal College Huzhou, Zhejiang Province 313000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between lycopene exposure and neurobehavior and its mechanism in mouse exposed to drinking water fluorosis. **Methods** Sixty adult mice were randomly divided into six groups (ten animals in each group): control group, lycopene group, sodium fluoride (NaF) group, NaF + low, medium, high dose lycopene groups. After 6 months treatment, the fluoride ion selective electrode method was used to determine the fluoride concentrations of urine, blood and hippocampus. The spectrophotometry was used to determine the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), catalase (CAT), and the contents of malondialdehyde (MDA) in serum and hippocampus. We also examined neurobehavioral abnormalities with WT-200 water maze. **Results**

Compared with the control group, NaF administration induced a decrease in body weight markedly ($P < 0.05$), the fluoride concentrations of urine, blood, and hippocampus were 2.06 ± 0.47, 13.40 ± 0.35, and 0.52 ± 0.21 mg/kg and increased markedly ($P < 0.05$). At the same time, NaF administration induced oxidative stress as evidenced by elevated levels of lipid peroxidation measured as MDA in serum and brain tissues ($P < 0.05$). Moreover, significantly decreased activities of SOD, GSH-PX, CAT were observed in the examined tissues ($P < 0.05$). Compared with NaF group, the fluoride concentrations of urine, blood, and hippocampus were 2.06 ± 0.47, 13.40 ± 0.35, and 0.52 ± 0.21 mg/kg in NaF + high dose lycopene group ($P < 0.05$). The induced oxidative stress and the alterations in antioxidant system were normalized by the oral administration of medium and high dose lycopene treatment ($P < 0.05$). Compared with the control group, the escape time and activity time were 20.84 ± 0.72 and 16.11 ± 0.77 s ($P < 0.05$) in NaF group. Compared with NaF group, the escape time and activity time were 14.01 ± 0.82 and 7.38 ± 0.37 s in high dose lycopene group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Lycopene administration could minimize the toxic effects of fluoride indicating its free radical scavenging and powerful antioxidant activities.

Key words: lycopene; chronic fluorosis; oxidative stress; neurobehavior; mouse

慢性氟中毒 (chronic fluorosis) 是一种慢性全身性疾病, 临床表现为氟牙症、氟骨症, 以及神经系统、骨骼肌和肾脏等非骨相损害^[1-2]。目前, 中国约有

2.6 亿人暴露于高氟环境中, 其中又以饮水型氟中毒影响最为广泛。由于地下水的相互渗透作用, 个别病区水含氟量增高, 成为严重影响居民健康的重大公共卫生问题之一^[3]。自由基损伤学说被公认为氟中毒发病机制之一。番茄红素 (lycopene, Ly) 是天然胡萝卜素中最有效的、具有生物学活性的单线态氧自由基捕获剂, 其淬灭单线态氧的能力比 β -胡萝卜素强 2 倍, 是 α -生育酚的 100 倍^[4]。并

* 基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y2110388); 浙江省科技厅公益性应用研究项目 (Y2011C37091)

作者单位: 1. 湖州师范学院医学院生理与药理学教研室, 浙江湖州 313000; 2. 温州医学院基础医学院

作者简介: 刘重斌 (1972 -), 男, 江西吉安人, 副教授, 博士, 研究方向: 营养生理。

且,番茄红素可由膳食摄入透过血脑屏障进入脑组织,促进自由基的清除,抑制小神经胶质细胞的活化,减少氧化应激损伤引起的神经退行性疾病的发生^[5]。本研究通过观察番茄红素对饮水型氟染毒小鼠氧化应激及神经行为的保护作用,为饮水型慢性氟中毒的早期预防和治疗提供实验依据,结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

氟化钠(NaF,株洲市广成化工有限公司),番茄红素(美国Sigma公司),丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase,CAT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),Varioskan Flash酶标仪(北京柏莱斯特科技发展有限公司),WMT-200水迷路视频分析系统(成都泰盟科技有限公司),奥立龙氟离子选择电极(美国Orion公司),电动玻璃匀浆器(宁波新芝生物科技股份有限公司),低温高速离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 分组与处理

清洁级成年雄性C57BL/6小鼠60只,体重(18.12±0.31)g,由中科院上海实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0357,动物使用许可证号:浙22-005234。实验室温度21~25℃,相对湿度40%~60%。昼夜照明12h/12h。小鼠适应性饲养5d后,按体重随机分为6组,每组10只;对照组(饮用自来水,水氟含量<0.5mg/L)、染氟组(饮水含NaF50mg/L)、番茄红素组(饮用自来水,同时灌胃番茄红素10mg/kg)、番茄红素低、中、高剂量干预组(饮水含NaF50mg/L+番茄红素5、10、15mg/kg),动物分笼饲养,每天观察动物一般性状和表现,每月称量动物体重,连续6个月。染毒结束后,动物经戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血,置于含有肝素离心管中,3000r/min离心。同时尽快取出海马组织用冰冻生理盐水冲洗,除去血迹,用滤纸拭干,准确称取1g组织块制成10%匀浆,匀浆经3000r/min4℃离心10min,取上清于-20℃保存,待测。

1.3 指标与方法

1.3.1 生化指标测定

血液和海马组织中MDA含量测定采用硫代巴比妥酸荧光法、SOD活性测定采用亚硝酸盐法、GSH-Px活性测定采用二硫代双硝基苯甲酸直接法、CAT活性测定按试剂盒说明书进行。采用氟离子选择电极法测定各组小鼠尿氟、

血氟和脑氟浓度(海马组织先用生理盐水研磨成匀浆,放置过夜后,3000r/min4℃离心10min,取上清测定)。

1.3.2 小鼠神经行为学检测

采用WMT-200水迷路视频分析系统计算机视觉相关算法,实时跟踪动物的行为状态,并分析和记录动物入水后搜索目标所需时间、采取的策略和游泳轨迹,给药后每个月测定1次。(1)定位航行实验:实验前将小鼠置于站台上适应20s,随后将小鼠随机从不同象限面壁置入池内,小鼠登上站台5s后终止记录,最长记录时间为30s(若30s内不能上台,引导小鼠登上站台适应10s,最后将小鼠擦干放入鼠笼)。如此将小鼠置入游泳池,3次为1组,分别测量6组小鼠平均逃逸时间,以评价其空间学习能力;(2)空间探索实验:定位航行1d后撤除水面下站台,将小鼠随机从不同象限内壁置入池内5次。每次记录小鼠在30s内的游泳轨迹,并测量小鼠在靶象限的活动时间,以评判小鼠的空间记忆能力。

1.4 统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件进行处理,计量资料符合正态分布,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析,两两比较选用最小显著差法,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 番茄红素对氟染毒小鼠生长发育影响

对照组和番茄红素组小鼠毛发光滑亮泽,生长发育状况良好;氟染毒组小鼠毛发无光泽,烦躁不安;番茄红素干预组小鼠生长发育状况尚好。染毒结束时,对照组、番茄红素组、染氟组小鼠体重分别为(39.38±0.78)、(39.18±0.65)、(32.46±0.81)g,番茄红素低、中、高剂量干预组小鼠体重分别为(35.25±0.68)、(36.32±0.55)、(36.27±0.84)g;与对照组比较,染氟组小鼠体重明显减轻($P < 0.05$),番茄红素干预各组小鼠体重无明显变化。

2.2 番茄红素对染氟小鼠尿氟、血氟和脑氟含量影响(表1)

与对照组比较,染氟组小鼠尿氟、血氟和脑氟含量明显升高($P < 0.05$);与染氟组比较,番茄红素中、高剂量干预组小鼠尿氟、血氟和脑氟含量明显降低($P < 0.05$)。

2.3 番茄红素对染氟小鼠血清中氧化应激指标影响(表2)

与对照组比较,染氟组小鼠血清MDA含量升高、GSH-Px、SOD、CAT酶活力降低($P < 0.05$);与染氟组比较,番茄红素中、高剂量干预组小鼠血清MDA含量降低、GSH-Px、SOD、CAT酶活力升高($P < 0.05$)。

表1 各组小鼠尿氟、血氟和脑氟含量变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	尿氟(mg/L)	血氟(mg/L)	脑氟(mg/kg)
对照组	1.25 ± 0.06	12.16 ± 0.75	0.43 ± 0.04
番茄红素组	1.34 ± 0.07	11.32 ± 0.85	0.46 ± 0.07
染氟组	3.76 ± 1.60 ^a	19.26 ± 0.62 ^a	1.19 ± 0.12 ^a
番茄红素干预组 5	2.95 ± 1.71	17.14 ± 0.65	0.82 ± 0.29
10	2.08 ± 0.82 ^b	14.28 ± 0.86 ^b	0.64 ± 0.18 ^b
15	2.06 ± 0.47 ^b	13.40 ± 0.35 ^b	0.52 ± 0.21 ^b

注:与对照组比较, a $P < 0.05$; 与染氟组比较, b $P < 0.05$ 。

表2 各组小鼠血清氧化应激指标变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	MDA(mmol/L)	GSH - Px(U/mL)	SOD(U/mL)	CAT(U/mL)
对照组	1.15 ± 0.14	1.52 ± 0.87	1.73 ± 0.24	2.19 ± 0.63
番茄红素组	1.24 ± 0.17	1.75 ± 0.20	1.62 ± 0.51	2.42 ± 0.48
染氟组	3.06 ± 0.62 ^a	0.53 ± 0.12 ^a	0.85 ± 0.11 ^a	0.87 ± 0.60 ^a
番茄红素干预组 5	2.85 ± 0.56	0.89 ± 0.65	1.12 ± 0.29	0.92 ± 0.27
10	1.94 ± 0.35 ^b	1.97 ± 0.83 ^b	1.48 ± 0.36 ^b	1.92 ± 0.33 ^b
15	1.73 ± 0.29 ^b	1.76 ± 0.55 ^b	1.52 ± 0.19 ^b	2.06 ± 0.11 ^b

注:与对照组比较, a $P < 0.05$; 与染氟组比较, b $P < 0.05$ 。

2.4 番茄红素对染氟小鼠海马组织氧化应激指标影响(表3) 与对照组比较,染氟组小鼠海马组织中MDA含量升高、GSH - Px、SOD、CAT酶活力降

低($P < 0.05$);与染氟组比较,番茄红素中、高剂量干预组小鼠血清MDA含量降低、GSH - Px、SOD、CAT酶活力升高($P < 0.05$)。

表3 各组小鼠海马组织氧化应激指标变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	MDA(nmol/mg)	GSH - Px(U/mg)	SOD(U/mg)	CAT(U/mg)
对照组	3.08 ± 0.14	26.51 ± 1.87	1.86 ± 0.25	3.77 ± 0.68
番茄红素组	3.14 ± 0.57	25.81 ± 2.24	1.92 ± 0.52	3.62 ± 0.44
染氟组	5.72 ± 1.48 ^a	17.53 ± 3.88 ^a	0.82 ± 0.14 ^a	1.66 ± 0.65 ^a
番茄红素干预组 5	4.68 ± 1.72	19.27 ± 1.59	1.15 ± 0.27	1.98 ± 0.25
10	3.66 ± 1.53 ^b	23.42 ± 2.06 ^b	1.58 ± 0.36 ^b	2.92 ± 0.61 ^b
15	3.70 ± 1.35 ^b	22.30 ± 1.69 ^b	1.62 ± 0.78 ^b	2.65 ± 0.71 ^b

注:与对照组比较, a $P < 0.05$; 与染氟组比较, b $P < 0.05$ 。

2.5 番茄红素对染氟小鼠神经行为影响 与对照组比较,染氟组小鼠平均逃逸时间明显延长($P < 0.05$);与染氟组比较,番茄红素中、高剂量干预组小鼠在给药后第1、2、3、4个月时平均逃逸时间均明

显缩短($P < 0.05$)。与对照组比较,染氟组小鼠在靶象限活动时间明显延长($P < 0.05$);与染氟组比较,番茄红素中、高剂量干预组小鼠靶象限活动时间明显缩短($P < 0.05$)。

表1 各组小鼠平均逃逸时间变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	干预后时间(月)					
	1	2	3	4	5	6
对照组	11.21 ± 0.71	11.33 ± 0.56	10.07 ± 0.81	10.88 ± 0.47	11.89 ± 0.65	12.01 ± 0.83
番茄红素组	12.45 ± 0.51	10.94 ± 0.29	11.71 ± 0.70	11.21 ± 0.39	12.22 ± 0.49	11.55 ± 0.58
染氟组	18.33 ± 0.67 ^a	19.85 ± 0.92 ^b	20.11 ± 1.02 ^b	20.84 ± 0.72 ^b	18.85 ± 0.85 ^a	19.28 ± 0.90 ^a
番茄红素干预组 5	17.22 ± 0.32	17.11 ± 0.85	17.72 ± 0.77	18.38 ± 0.64	17.15 ± 0.58	17.32 ± 1.10
10	14.11 ± 0.67 ^c	15.86 ± 0.55 ^c	14.44 ± 0.87 ^c	14.66 ± 1.02 ^c	16.70 ± 0.49	15.86 ± 0.81
15	14.67 ± 0.44 ^c	15.17 ± 0.76 ^c	14.01 ± 0.82 ^c	14.38 ± 0.50 ^c	14.69 ± 0.47	14.92 ± 0.52

注:与对照组比较, a $P < 0.05$, b $P < 0.01$; 与染氟组比较, c $P < 0.05$ 。

3 讨论

氟是一种化学性质极为活泼的必需微量元素,机体摄入过量氟可直接攻击氧,干扰氧代谢,导致氧自由基增多。同时,氟化物进入机体后,也可消耗体内的抗氧化物质(如 GSH)和自由基清除酶类(如 SOD、GSH-Px),导致抗氧化防御机制与自由基之间失去平衡,使机体处于氧化应激状态,造成细胞损伤^[6]。本研究采用含氟水饲喂小鼠 6 个月后,染氟组小鼠体重明显降低,尿氟、血氟和脑氟含量均高于对照组,表明慢性氟中毒小鼠模型复制成功。本研究结果显示,染氟组小鼠血清和海马组织 MDA 含量升高,同时, SOD、GSH-Px 和 CAT 酶活性下降,表明小鼠抗氧化能力明显削弱;与染氟组比较,番茄红素中、高剂量干预组小鼠 MDA 含量降低, SOD、GSH-Px、CAT 酶活性升高。提示一定剂量的番茄红素可阻止超氧阴离子攻击机体多不饱和脂肪酸,防止脂质过氧化,保护机体免受超氧阴离子损害。番茄红素可能通过提高细胞内 GSH 含量,发挥其较强的抗氧化作用^[7]。

慢性氟中毒引起神经系统的损伤表现为代谢、受体、递质、形态及行为的变化^[8-9]。氟在脑组织中蓄积的主要部位在海马,海马是学习记忆的重要部位。水迷路行为分析结果显示,染氟组小鼠平均逃逸时间和靶象限活动时间长于对照组,这与很多动物实验的结果相符^[8-10]。提示饮用高浓度氟化钠溶液能降低小鼠学习能力。本研究结果表明,给予

番茄红素中、高剂量干预后,与染氟组比较,小鼠平均逃逸时间和靶象限活动时间明显缩短。提示番茄红素对海马神经细胞氧化应激损伤有一定的保护作用,但其具体作用机制有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Mandinic Z, Curcie M, Antonijevic B, et al. Relations between fluoride intake in Serbian children living in two areas with different natural levels of fluorides and occurrence of dental fluorosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 1080 - 1084.
- [2] 张憬, 祝文静, 章子贵. 慢性氟中毒与脑损伤关系研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(2): 251 - 252.
- [3] 周金水, 楼晓明, 朱文明, 等. 2011 年浙江省饮水型氟中毒病区健康教育效果评价 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2012, 27: 383 - 384.
- [4] Sharma N, Goswami UC. Function of lycopene in mammalian system; a review [J]. *Proc Zool Soc*, 2011, 64: 1 - 7.
- [5] Kaur H, Chauhan S, Sandhir R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36: 1435 - 1443.
- [6] 杨蜀莹, 张蕾, 章子贵. 硒对氟中毒致大鼠肾脏损伤的干预作用 [J]. *营养学报*, 2012, 24: 26 - 40.
- [7] Mansour HH, Tawfik SS. Efficacy of lycopene against fluoride toxicity in rats [J]. *Pharm Biol*, 2011, 12: 1577 - 1586.
- [8] 高勤, 官志忠. 慢性氟中毒与神经系统的损伤 [J]. *国外医学: 医学地理分册*, 2010, 31: 130 - 135.
- [9] 高勤, 刘艳洁, 吴昌学, 等. 慢性氟中毒大鼠脑组织氧化应激水平及学习记忆功能的变化 [J]. *中国地方病学杂志*, 2008, 27: 371 - 373.
- [10] Gao Q, Liu YJ, Guan ZZ. Decreased learning and memory ability in rats with fluorosis; increased oxidative stress and reduced cholinesterase activity in the brain [J]. *Fluoride*, 2009, 42: 277 - 285.

收稿日期: 2013-06-18

(解学魁编辑 校对)