

· 实验研究 ·

大豆异黄酮对丙烯酰胺致大鼠小脑损伤的保护作用

The protective effect of soybean isoflavone on cerebellar damage induced by acrylamide in rats

赵红, 江城梅, 赵文红, 申玲, 陈丽丽

ZHAO Hong JIANG Chengmei ZHAO Wenhong SHEN Ling CHEN Lili

(蚌埠医学院预防医学系, 安徽 蚌埠 233030)

摘要: 选用清洁级 Wistar 大鼠 40 只, 雌雄各半, 分为 4 组, 以 25 mg/(kg·d) 丙烯酰胺 (acrylamide, ACR) 为染毒组, 大豆异黄酮 (soybean isoflavone, SI) 高、低剂量组在大鼠染毒的同时灌胃大豆异黄酮 50、25 mg/(kg·d), 正常对照组以等量蒸馏水灌胃, 连续灌胃 4 周后, 颈椎脱臼处死大鼠立即取小脑组织, 进行过氧化物指标检测和形态学观察。结果染毒组和正常对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对照组与大豆异黄酮高剂量组则差别不大 ($P > 0.05$)。ACR 能够引起大鼠小脑的损伤, 而 SI 可能对 ACR 的神经毒作用有一定的拮抗作用。

关键词: 丙烯酰胺; 大豆异黄酮; 小脑损伤

中图分类号: O623.626 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2009)01-0040-02

丙烯酰胺作为一种化学品早已被广泛应用于各种技术领域。而在食品中首次检出高含量的丙烯酰胺, 是由瑞典食品科学家在 2002 年 4 月在富含淀粉的食物经高温油炸或烧烤中发现的^[1], 立即引起全球有关机构的关注。有研究表明丙烯酰胺对人体有一定的神经毒作用, 中毒者主要表现为锥体外系和小脑病变的临床征象^[2]。本实验通过观察丙烯酰胺染毒大鼠及加用大豆异黄酮拮抗后对其小脑组织形态学和过氧化物指标的影响, 探讨大豆异黄酮对丙烯酰胺诱导脑损伤的可能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及染毒

清洁级 Wistar 大鼠 40 只, 体重 (200 ± 20) g, 雌雄各半, 分开喂养, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号 SCXK (沪) 2003-0003 适应性喂养一周后, 按体重随机分成 4 组, 正常对照组 (蒸馏水灌胃), 染毒组: ACR 剂量为 25 mg/(kg·d), 大豆异黄酮高、低剂量组在 ACR 25 mg/(kg·d) 染毒同时灌胃大豆异黄酮 50、25 mg/(kg·d)。连续灌胃 4 周, 每日灌胃 1 次, 每周 5 次, 同时观察行为及体重变化, 各组均正常饲养 4 周后, 颈椎脱臼处死立即取小脑组织检测。

1.2 主要试剂

丙烯酰胺由 Sigma 公司生产, 纯度 > 99%。大豆异黄酮由上海嘉辰化工有限公司生产, 含量 > 99%。超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力以及丙二醛 (MDA) 含量测定的试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 观察指标

按试剂盒说明检测脑组织匀浆中的 SOD、GSH-Px 活力以及 MDA 含量, 同时检测脑组织蛋白的含量。形态学观察: 电镜观察神经元细胞的变化, 于给丙烯酰胺及大豆异黄酮的第 4 周从各实验组及对照组中分别随机选取大鼠, 经解剖立即取 1 mm² 小脑皮质, 1% 锇酸固定后经处理后电镜观察。

1.4 统计学分析

结果采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析及 LSD 多重比较。

2 结果

2.1 生长发育及行为改变

染毒组大鼠自灌胃 1 周后就出现体重减轻、躁动, 继而出现后肢无力等症状, 并随染毒时间延长而进行性加重, 大豆异黄酮组尤以 S 高剂量组症状较轻。

2.2 小脑组织匀浆中过氧化物指标测定

染毒组的 SOD 和 GSH-Px 活力明显下降, MDA 含量升高, 与正常对照组和高剂量的 SI 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠小脑组织过氧化物指标测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (U/mg Prot)	GSH-Px ($\mu\text{mol}/\text{mg Prot}$)	MDA (nmol/mg Prot)
对照组	10	395.78 ± 25.72	68.51 ± 5.53 Δ	10.71 ± 0.86 Δ
染毒组	10	189.53 ± 20.03* $\#$	51.72 ± 3.91* $\#$	19.15 ± 1.34* $\#$
大豆异黄酮低剂量组	10	271.71 ± 21.49* $\Delta\#$	61.00 ± 3.26	16.24 ± 1.14*
大豆异黄酮高剂量组	10	351.71 ± 46.71 Δ	65.95 ± 3.41 Δ	13.61 ± 0.96 Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与染毒组比较, Δ $P < 0.05$; 与大豆异黄酮高剂量组比较, $\#$ $P < 0.05$

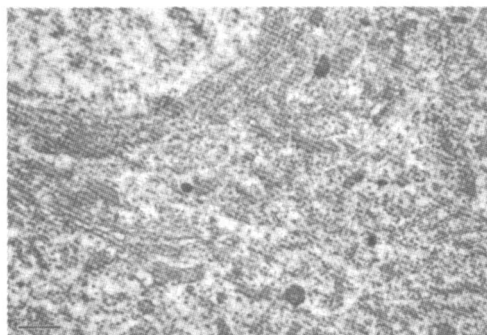
2.3 电镜观察

各组大鼠小脑皮质神经元超微结构的改变见图 1。

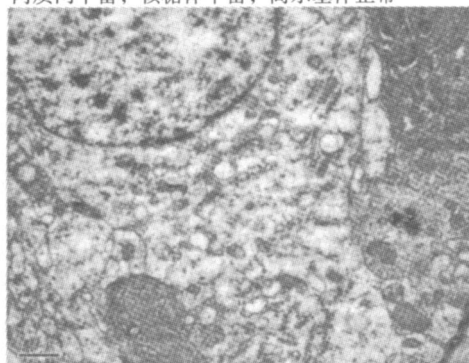
收稿日期: 2008-04-15 修回日期: 2008-06-19

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目 (2006KB45B)

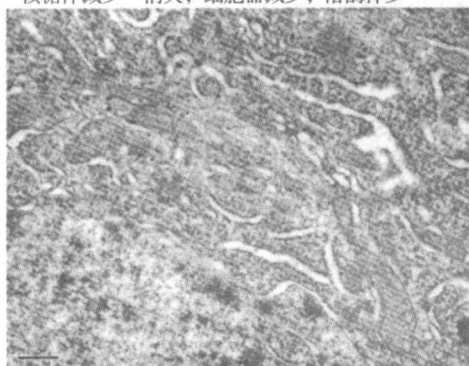
作者简介: 赵红 (1967-), 女, 实验师, 主要从事预防实验教学及科研工作。



正常对照组: 线粒体无肿胀, 脊突无破坏, 粗面内质网丰富, 核糖体丰富, 高尔基体正常



染毒组: 神经元细胞水肿, 线粒体空泡样改变, 核糖体减少—消失, 细胞器减少, 溶酶体少



大豆异黄酮高剂量组: 神经元细胞水肿不明显, 线粒体大部分完好, 少数粗面内质网扩张, 核膜清楚, 核糖体丰富, 溶酶体、高尔基体可见

图 1 各组大鼠小脑皮质神经元超微结构

3 讨论

丙烯酸 (ACR) 是中等毒性的亲神经毒物, 水剪性强, 很容易被生物体的消化道、皮肤、肌肉或其他途径吸收, 引起急性中毒, 主要表现为神经系统的损害, 出现感觉运动周围神经和中枢神经病变^[3]。有研究者以同位素标记的丙烯酸酰胺腹腔注射, 发现其在小脑组织浓度最高^[4]。因此, 本实验采用灌胃 ACR 诱导大鼠小脑中毒, 通过检测小脑组织匀浆 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量观察大鼠小脑损伤, 因为脑组织是机体氧化代谢最活跃的器官, 同时脑组织又含有大量极易过氧化的多不饱和脂肪酸, 其防御氧自由基损害的能力较差^[5]。但在一些化学毒物 (如 ACR) 损伤情况下, 无法清除

自由基而产生氧化损伤。MDA 是机体组织脂质过氧化的最终产物, 其含量高低反映了机体受自由基攻击的程度, 从而了解机体组织受损的程度。大豆异黄酮 (SI) 是一种植物雌激素, 具有明显的抗氧化作用, 能够增强抗氧化酶作用^[6]。SI 含有酚羟基, 酚羟基作为供氧体能与自由基反应使之生成相应的离子或分子, 熄灭自由基, 终止自由基的连锁反应。本实验在灌胃 ACR 同时再灌胃不同剂量的 SI 来探讨 SI 对 ACR 致大鼠脑组织损伤的保护作用。实验结果表明, 灌胃后的第一周, 染毒组大鼠即出现体重减轻、躁动, 继而出现后肢无力及行走摇摆等症状, 并随染毒时间延长而进行性加重, 而 SI 组的症状较轻, 尤以高剂量的 SI 组症状较轻。过氧化物指标检测表明, 染毒组的 SOD、GSH-Px 活力明显降低, MDA 含量增加, 与正常对照组和高剂量 SI 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对照组和高剂量 SI 组之间则差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

线粒体是机体的重要细胞器, 也是自由基产生的重要场所。有些学者认为, 线粒体是细胞内自由基的源泉, 它们是决定细胞衰老的生物钟^[7]。许多研究证实, 小脑神经细胞线粒体是丙烯酸酰胺毒性的敏感部位^[8]。因此我们在电镜下观察到, 对照组神经元细胞线粒体无肿胀, 脊突无破坏, 粗面内质网和核糖体丰富, 高尔基体正常; 染毒组细胞变化较大, 有细胞水肿, 线粒体空泡样改变, 核糖体减少或消失, 溶酶体减少; 高剂量 SI 组细胞变化和对照组差别不大, 神经元细胞水肿不明显, 线粒体大部分完好, 少数粗面内质网扩张, 核膜清楚, 核糖体丰富, 溶酶体、高尔基体可见, 提示 SI 可能对减轻细胞形态结构的损伤有一定作用。

综上所述, ACR 的毒性可能与大鼠体内氧自由基增加密切相关, 而大豆异黄酮具有明显的抗氧化作用, 通过清除体内自由基降低脂质过氧化物的产生, 在一定程度上能够拮抗 ACR 的毒性, 对大鼠脑组织可能有保护作用。

参考文献:

- [1] WHO (World Health Organization) (2002) Health implications of acrylamide in food—report of a joint FAO/WHO consultation. Geneva, Switzerland [Z].
- [2] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科技文献出版社, 1991: 264
- [3] 秦菲, 陈文, 金宗濂, 等. 丙烯酸酰胺毒性研究进展 [J]. 北京联合大学学报, 2006, 20 (3): 32-35.
- [4] Kohrigama K, Matsuo K, S, B, I, H, et al. Effects of acrylamide and acrylic acid creatine kinase activity of the rat brain [J]. Arch of Toxicol 1994, 68-69.
- [5] 贾松, 吕立夏, 杨翠香, 等. 丙烯酸酰胺对小鼠小脑 SOD 基因表达影响 [J]. 同济大学学报, 2003, 24 (1): 28-30
- [6] 庄颖, 姚荣英. 大豆异黄酮对动脉粥样硬化所致血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 蚌埠医学院学报, 2005, 30 (1): 90-92
- [7] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000, 211-222
- [8] Masuoka M, Igisu H, Lin J, et al. Effects of acrylamide and N-N-methylmaleimide on creatine kinase activity [J]. Brain Research 1990, 507, 351-353.