

# 番茄红素的安全性评价及对小鼠免疫功能的影响

孙杰, 胡奇, 李世芬, 钟义红, 环飞, 王玉邦\*

(南京医科大学公共卫生学院, 江苏省医药农药兽药安全性评价与研究中心, 江苏 南京 210029)

**摘要:**目的: 研究番茄红素的食品安全性及其对小鼠免疫功能的影响。方法: 进行大鼠30 d喂养实验, 小鼠急性毒性实验, 测定小鼠细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能及NK细胞活性。结果: 雌、雄小鼠的番茄红素急性经口毒性 $>2\ 666.64\ \text{mg/kg}$ , 属实际无毒级; 番茄红素200、433.33、666.67  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 剂量(以体质量计, 下同)在30 d喂养实验中没有对大鼠的血液常规和血清生化指标产生影响, 且Ames实验、小鼠骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸形实验结果呈阴性; 以33.33、66.67、200  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  3个剂量进行小鼠免疫功能实验, 200  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 剂量组的鸡红细胞吞噬指数、自然杀伤(natural killer, NK)细胞活性高于阴性对照组, 且差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: 番茄红素食品安全性良好, 高剂量番茄红素作为食品添加剂在小型啮齿类动物实验中具有增强免疫力的功能。

**关键词:** 番茄红素; 免疫功能; 食品安全

## Safety Evaluation and Immunoregulatory Effect in Mice of Lycopene

SUN Jie, HU Qi, LI Shifen, ZHONG Yihong, HUAN Fei, WANG Yubang\*

(Safety Assessment and Research Center for Drug, Pesticide and Veterinary Drug of Jiangsu Province, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** Objective: To evaluate the safety of lycopene as a food supplement in mice and its effect on immune functions. Methods: A 30-day feeding test was carried out on rats, and mice were employed for acute toxicity test and measured for cellular and humoral immune functions, mononuclear macrophage phagocytosis and natural killer (NK) cell viability. Lycopene at three doses namely 33.33, 66.67 and 200  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  was administered per os to the mice for up to 30 days. Results: In the acute oral toxicity test, the maximal tolerance dose (MTD) of lycopene for both male and female mice was higher than 2 666.64  $\text{mg/kg}$  suggesting that it is actually non-toxic. During the 30-day feeding period, no effects of lycopene at the 200、433.33、666.67  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  doses were observed on haematological or blood biochemical indexes, and Ames, marrow cell micronucleus and sperm abnormality tests showed negative results. The macrophage phagocytosis index of chicken erythrocytes and NK cell viability in the high-dose group were higher than those in the negative control group with statistical significance ( $P<0.05$ ). Conclusions: Lycopene is safe as a food supplement. High-dose lycopene supplementation can boost immunity in mice.

**Key words:** lycopene; immune function; food safety

中图分类号: TS255.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 09-0170-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201509031

氧化应激损伤是指机体在遭受有害刺激时, 体内活性氧自由基和活性氮自由基产生过多, 或清除氧化自由基的酶系统功能减弱而导致的组织损伤<sup>[1-3]</sup>。氧化应激损伤是导致人类皮肤衰老的重要因素, 其对细胞组织造成伤害, 可以导致机体功能蜕化, 也是造成心脑血管疾病中神经损伤的主要因素<sup>[4-5]</sup>。适当地补充抗氧化剂可以缓解机体的氧化应激损伤, 因此, 天然抗氧化剂一直是冠

心病<sup>[6-7]</sup>、高血脂、糖尿病<sup>[8-9]</sup>、神经退行性病变等多种中老年慢性疾病预防药物与美容行业的研究热点。

类胡萝卜素具有很好的抗氧化与抗自由基活性, 番茄红素(lycopene)属于类胡萝卜素类脂溶性色素, 广泛存在于番茄、西柚等水果中。现代研究证实, 番茄红素可以改善成纤维细胞中自由基清除酶活力, 提高成纤维细胞对紫外损伤的抗氧化能力<sup>[10]</sup>, 对抗脂质

收稿日期: 2014-06-08

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目

作者简介: 孙杰(1981—), 女, 讲师, 博士, 主要从事药理学研究。E-mail: yssjmm@126.com

\*通信作者: 王玉邦(1965—), 男, 副教授, 博士, 主要从事保健食品安全性与功效研究。E-mail: wyb@njmu.edu.cn

过氧化对心脑血管内皮产生的损伤,减轻动脉粥样硬化形成<sup>[11-12]</sup>,通过增加*Beclin1*基因与LC3蛋白表达抑制心肌细胞肥大<sup>[13]</sup>,对急性心肌梗死及高血糖所导致的内皮祖细胞功能障碍具有保护作用<sup>[14-15]</sup>。番茄红素体外实验证明其可以显著抑制胃癌细胞SGC-7901以及MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-468这3种乳腺癌细胞生长<sup>[16-17]</sup>,并且对顺铂导致的大鼠急性肝肾损伤具有保护作用<sup>[18]</sup>。人体实验证明,中等剂量的番茄红素胶囊可以提高人体的抗氧化能力,降低急性高强度运动后人体血清脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde, MDA)增高幅度并减少氧化酶的消耗<sup>[19-20]</sup>。此外,番茄红素摄入量不足的人群前列腺上皮内瘤与前列腺癌发病率较高,适当地补充番茄红素可以降低前列腺癌组织中血管增生等级<sup>[21-22]</sup>。番茄红素正快速成为抗衰老、预防老年病心脑血管病变及神经退行性病变的保健食品<sup>[23-24]</sup>,作为类胡萝卜素,关于番茄红素的安全性研究罕见报道。因此,本实验采用急性毒性实验、30 d喂养实验、Ames实验、小鼠骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸形实验等对番茄红素的安全性进行评价,并采用国标方法对番茄红素增强小鼠免疫功能进行研究,以期对番茄红素的口服安全性及增强免疫活性提供基础数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、动物与试剂

番茄红素由新疆瑞琦生物科技有限公司提供(纯度≥5%,批号:20120710),所得番茄红素粉样品编号为XH20120512A,按照GB 28316—2012《食品安全国家标准食品添加剂 番茄红》方法检测番茄红素含量为5.26%。

增强免疫力与30 d喂养研究分别选用SPF级BI/F1代健康雌性小鼠(2008001628344)、SPF级Sprague-Dawley (SD)健康离乳大鼠(2008001628343),由上海西普尔-必凯实验动物有限公司繁育,生产许可证号为SCXK(沪)2008-0016;小鼠急性毒性实验(0010028)、微核实验(0016140)、精子畸形实验(0015410)选用清洁级ICR健康小鼠,由扬州大学比较医学中心提供,生产许可证号SCXK(苏)2012-0004。基础饲料,苏州双狮实验动物饲料科技有限公司制备提供。

鼠伤寒沙门氏菌突变菌株TA97、TA98、TA100、TA102以及S-9来源于复旦大学公共卫生学院。S-9蛋白质含量为36.24 mg/mL,每100 mL S-9混合液中加入10 mL S-9;羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC)、豚鼠血清、鸡红细胞为实验室自采制备;YAC-1细胞 上海派通生物科技有限公司;2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB) 医药集团(上海)化学试剂公司;印度墨汁 北京笃信精细制剂厂;伴刀豆球蛋白A(concanavalin A, Con A) 华美生物

工程公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 韩国Biosharp公司。

### 1.2 仪器与设备

JJ-100电子天平 常熟市双杰测试厂;DNP-9162BS电热培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;SX-700高压灭菌器 日本Tomy公司;KYC-100C型恒温摇床 上海福玛实验设备有限公司;Spectra Max M2e多功能酶标仪 美国Molecular Devices公司;二氧化碳培养箱 美国Thermo Forma公司;7100型全自动生化分析仪 日立高新技术(上海)国际贸易有限公司;ADVIA 2120i血液分析仪 德国Siemens公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 小鼠急性经口毒性实验

采用最大耐受量(maximum tolerated dose, MTD)法进行小鼠急性毒性实验,选用清洁级ICR健康成年小鼠20只(雌雄各半),体质量为18.6~21.5 g,实验前禁食16 h。配制最大质量浓度为含番茄红素133.32 mg/mL样品,按最大灌胃量20 mL/kg(以体质量计,下同)一次性给药,受试物番茄红素的给药剂量为2 666.64 mg/kg。连续观察14 d,记录小鼠中毒表现及死亡情况。

#### 1.3.2 Ames实验

分别在加与不加S-9混合液的情况下,以1 111.11、222.22、44.44、8.89、1.76 μg/皿的剂量进行实验,每个剂量组做3个平行皿。活化系统为多氯联苯诱导的大鼠肝匀浆制备的S-9混合液。阳性组:不加S-9者为敌克松(TA97、TA98、TA102)、叠氮钠(TA100),加S-9者为2-氨基芴(TA97、TA98、TA100)、1,8-二羟基蒽醌(TA102);同时设阴性对照组(自发回变组和二甲基亚砷组);样品用二甲基亚砷配制成11.11、2.22、0.44、0.09、0.02 mg/mL剂量组,加样量0.1 mL/皿。在2 mL顶层琼脂中加入0.1 mL实验菌株增菌液、0.1 mL受试样品溶液和0.5 mL S-9混合液,混匀后倒入底层培养基平板上,37℃培养48 h,计数每皿回变菌落数。如果受试样品组的回变菌落数是阴性对照组回变菌落数的2倍以上,并具有剂量-反应关系则为阳性。

#### 1.3.3 小鼠骨髓细胞微核实验

选用体质量25~30 g的ICR清洁级小鼠50只,按体质量随机分为5个组,每组10只,雌雄各半。以环磷酰胺(40 mg/kg)为阳性对照组,受试样品按照人体推荐剂量的480、240、120倍设高、中、低剂量组,分别含受试样品质量浓度为111.11、55.56、27.78 mg/mL,以20 mL/kg剂量灌胃,采用30 h给受试物法。两次给受试样品间隔24 h,第二次给受试样品后6 h处死小鼠,取胸骨常规制片、镜检。每只小鼠计数1 000个骨髓嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE),观察含微核的嗜多染红细胞数并计算微核发生率,以千分率计,结

果采用Poisson分布 $U$ 检验进行统计处理。每只小鼠计数200个嗜多染红细胞时所观察到的成熟红细胞(red blood cell, RBC)数,并计算嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/RBC)。

### 1.3.4 小鼠精子畸形实验

选用体质量25~35 g的ICR清洁级性成熟雄性小鼠25只,按体质量随机分为5组。取质量浓度为111.11、55.56、27.78 mg/mL的样品以20 mL/(kg·d)剂量灌胃小鼠,连续5 d。于首次给受试样品后的第35天处死小鼠,取两侧附睾精子滤液按常规方法制片、镜检。每只小鼠计数1 000个结构完整的精子,计算精子畸形发生率(以百分率计),结果采用秩和检验进行统计分析。

### 1.3.5 30 d喂养实验

选用SPF级SD健康离乳大鼠80只,按体质量随机分为4组,雌雄各半。受试样品掺入基础饲料中饲喂大鼠,对照组饲喂基础饲料,按人体推荐剂量的30、65、100倍,设200、433.33、666.67 mg/(kg·d)低、中、高3个剂量组,受试样品掺入基础饲料的质量分数分别为0.20%、0.43%、0.67%,连续喂养30 d,测定各剂量组大鼠血液红细胞计数、血红蛋白水平、白细胞计数及其分类等血液常规指标,以及血清生化指标。

### 1.3.6 Con A诱导小鼠淋巴细胞转化及自然杀伤(natural killer, NK)细胞活性测定

按照《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)<sup>[25]</sup>相关规定,以相当于受试样品人体推荐摄入量的5、10、30倍,设33.33、66.67、200 mg/(kg·d)这3个剂量组,以不加样品的溶剂为阴性对照组,每日1次经口给予小鼠,灌胃量0.1 mL/10 g,连续灌胃30 d。颈椎脱臼法处死小鼠,无菌取脾脏并研磨为单细胞悬液,过200目筛,以无菌Hank's液洗涤两次,1 000 r/min离心10 min收集细胞。

脾细胞使用RPMI-1640完全培养液重悬为浓度 $3 \times 10^6$ 个/mL的单细胞悬液,1 mL/孔接种于24孔培养板中,加入75  $\mu$ L 100  $\mu$ g/mL的Con A溶液,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养72 h,不加Con A溶液孔为对照。培养结束前4 h,每孔移除0.7 mL完全细胞培养液,加入0.7 mL不含小牛血清的RPMI-1640培养液与50  $\mu$ L 5 mg/mL的MTT,继续培养4 h。培养结束后,每孔加入1 mL酸性异丙醇终止反应,吹打混匀后移入96孔培养板中,每孔3个平行对照,酶标仪于570 nm波长处测定各样品光密度(OD<sub>570 nm</sub>)值,按照公式(1)计算淋巴细胞增殖能力。

$$\text{淋巴细胞增殖能力} = \text{加Con A的OD}_{570 \text{ nm}} - \text{不加Con A的OD}_{570 \text{ nm}} \quad (1)$$

无菌脾单细胞悬液加入0.5 mL无菌水裂解红细胞20 s, Hank's液洗涤两次后,使用RPMI-1640完全培养液调整细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 个/mL。取 $4 \times 10^5$ 个/mL浓度

的YAC-1靶细胞与脾细胞各100  $\mu$ L接种于96孔细胞培养板,以YAC-1细胞100  $\mu$ L+培养液100  $\mu$ L为YAC-1细胞自然释放孔,以YAC-1细胞100  $\mu$ L+2.5% Triton 100  $\mu$ L为YAC-1细胞最大释放孔,每个检测样品设3个平行孔,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养4 h。1 500 r/min离心96孔培养板5 min,每孔吸取100  $\mu$ L上清液,加入乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)基质液100  $\mu$ L反应10 min,每孔加入1 mol/L HCl 30  $\mu$ L,于酶标仪490 nm波长处测定光密度(OD<sub>490 nm</sub>)值,按照公式(2)计算NK细胞活性。

$$\text{NK细胞活性}/\% = \frac{\text{反应孔OD}_{490 \text{ nm}} - \text{自然释放孔OD}_{490 \text{ nm}}}{\text{最大释放孔OD}_{490 \text{ nm}} - \text{自然释放孔OD}_{490 \text{ nm}}} \times 100 \quad (2)$$

### 1.3.7 DNFB诱导小鼠迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)

各剂量组番茄红素连续灌胃30 d后,剃除小鼠腹部3 cm×3 cm鼠毛,均匀涂抹50  $\mu$ L 10 mg/mL DNFB溶液致敏。5 d后,以10  $\mu$ L 10 mg/mL DNFB溶液均匀涂抹于小鼠右耳两面进行攻击,24 h后颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳,以打孔器取下8 mm耳片称质量,按照公式(3)计算DTH程度。

$$\text{DTH程度}/\text{mg} = \text{右耳质量}/\text{mg} - \text{左耳质量}/\text{mg} \quad (3)$$

### 1.3.8 抗体生成细胞检测及血清溶血素水平测定

连续灌胃30 d后,每鼠腹腔注射体积分数2%的SRBC悬液0.2 mL进行免疫,4 d后颈椎脱臼处死小鼠,无菌取脾脏制备 $5 \times 10^6$ 个/mL脾细胞悬液。将表层培养基与2×Hank's液1:1(V/V)混匀分装为0.5 mL每管,加入50  $\mu$ L以乙酸钠缓冲液(sodium acetate buffer, SA)缓冲液配制的体积分数10% SRBC悬液、20  $\mu$ L新鲜制备的脾细胞悬液,混匀倾倒入已刷琼脂糖薄层的玻片上,每个样品做两个平行片,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养1.5 h,将新鲜豚鼠血清补体1:8(V/V)稀释后加入玻片架凹槽内,继续孵育1.5 h后,计数溶血空斑数。

小鼠腹腔注射SRBC悬液免疫4 d后,摘眼球法取血,全血静置1 h,2 000 r/min离心10 min收集血清。血清200倍稀释后,加入体积分数5%鸡红细胞悬液0.5 mL、补体0.5 mL,37  $^{\circ}$ C温育30 min,2 000 r/min离心10 min取上清液1 mL加入3 mL都氏试剂中,静置10 min后于540 nm波长处测定样品管及SRBC半数溶血时的光密度(OD<sub>540 nm</sub>)值,溶血素的量以半数溶血值(HC<sub>50</sub>)表示,按照公式(4)计算HC<sub>50</sub>。

$$\text{HC}_{50} = \frac{\text{样品OD}_{540 \text{ nm}}}{\text{SRBC半数溶血时的OD}_{540 \text{ nm}}} \times \text{稀释倍数} \quad (4)$$

### 1.3.9 小鼠碳廓清实验

小鼠连续灌胃30 d后,每鼠按0.1 mL/10 g尾静脉注射4倍稀释的印度墨汁,墨汁注入后立即计时。注射墨汁



后2 min及10 min时分别从眼内眦静脉丛取血20 μL, 加入2 mL 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液中, 用酶标仪测定600 nm波长处的光密度值, 按照公式(5)、(6)计算吞噬指数(α)。

$$\alpha = \frac{\text{体质量} \times K^{1/3}}{\text{肝质量} + \text{脾质量}} \quad (5)$$

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1} \quad (6)$$

式中: K为廓清指数; OD<sub>1</sub>为t<sub>1</sub>时的光密度值; OD<sub>2</sub>为t<sub>2</sub>时的光密度值; t<sub>1</sub>为2 min, t<sub>2</sub>为10 min。

1.3.10 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

小鼠连续灌胃30 d后, 每鼠腹腔注射1 mL体积分数20%鸡红细胞悬液, 30 min后颈椎脱臼法处死小鼠, 腹腔注入2 mL生理盐水润洗1 min, 吸出腹腔洗液于37 ℃恒温培养箱孵育30 min, 于生理盐水中漂洗晾干, 丙酮-甲醇溶液1:1 (V/V) 固定, 体积分数4%的Giemsa-磷酸盐缓冲液染色3 min, 蒸馏水漂洗晾干封片, 光镜下进行观察并计数, 按照公式(7)、(8)计算HC<sub>50</sub>。

$$\text{吞噬百分率}/\% = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \quad (8)$$

1.4 数据分析

各组实验原始数据使用SPSS 10.0软件进行分析, 满足方差齐性的数据使用单因素方差分析中多个实验组与一个对照组间均数的两两比较方法进行统计分析; 对非正态或方差不齐性的数据资料进行适当的变量转换, 满足方差齐性要求后进行单因素方差分析, P<0.05为差异显著。骨髓细胞微核实验结果采用Poisson分布U检验进行统计分析, 小鼠精子畸形实验结果采用秩和检验进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性毒性实验结果

表1 番茄红素小鼠急性经口毒性实验结果 (x̄±s)  
Table 1 Acute oral toxicity of lycopene in mice (x̄±s)

性别	剂量/(mg/kg)	小鼠只数	初始体质量/g	终体质量/g	死亡只数	MTD/(mg/kg)
雌性	2 666.64	10	19.8±0.7	30.6±2.7	0	>2 666.64
雄性	2 666.64	10	20.0±0.7	36.3±2.8	0	>2 666.64

由表1可知, 实验期间番茄红素对小鼠体质量无影响, 各组小鼠饮食和活动正常, 生长良好, 未见中毒表现, 无死亡小鼠, 雌、雄小鼠的番茄红素经口MTD>2 666.64 mg/kg, 属实际无毒级。

2.2 Ames实验结果

表2 番茄红素Ames实验回变菌落数 (x̄±s)  
Table 2 Colony variation number per vessel after administration of lycopene in Ames test (x̄±s)

组别	剂量/(μg/mL)	回变菌落数							
		加S-9				不加S-9			
		TA97菌株	TA98菌株	TA100菌株	TA102菌株	TA97菌株	TA98菌株	TA100菌株	TA102菌株
1	1 111.11	112±12	35±4	152±10	276±22	118±12	36±4	177±17	258±22
2	222.22	121±18	35±3	167±19	292±11	113±13	39±6	173±17	279±16
3	44.44	129±8	37±5	157±11	290±15	107±12	34±6	169±12	274±19
4	8.89	117±10	37±4	161±24	255±20	108±9	38±5	174±13	270±13
5	1.76	118±16	35±4	173±20	263±20	112±8	40±5	163±21	272±15
自发回变组	0	130±10	37±7	169±24	278±13	116±14	39±5	178±21	265±23
二甲基亚砷组	0.1 mL	114±13	36±2	163±10	269±11	127±12	33±5	160±18	272±19
2-氨基蒽组	10	1 188±195**	3 515±176**	2 834±288**					
1,8-二羟基蒽组	50				1 082±185**				
戊烷组	50					2 014±124**	1 159±154**		9 62±193**
叠氮钠组	1.5							2 006±111**	

注: \*\*. 超过阴性对照组(自发回变组、二甲基亚砷组)回变菌落数2倍以上。

参照文献[25]方法, Ames实验结果(表2)表明, 番茄红素各剂量组回变菌落数均未超过阴性对照组回变菌落数的2倍, 亦无剂量-反应关系。即番茄红素对鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98、TA100、TA102这4株实验菌株在加与不加S-9时, 均未见有致基因突变作用。

2.3 小鼠骨髓细胞微核实验结果

表3 番茄红素对小鼠骨髓细胞微核发生率及PCE/RBC值的影响  
Table 3 Effect of lycopene on bone marrow cell micronucleus and PCE/RBC ratio in mice

性别	剂量/(mg/kg)	PCE数	含微核的PCE数	微核率/%	PCE/RBC
雌性	2 222.22	5 000	7	1.4±105	1.09±0.07
	1 111.11	5 000	6	1.2±0.8	1.10±0.04
	555.56	5 000	8	1.6±0.9	1.12±0.08
	0	5 000	7	1.4±1.3	1.10±0.06
	40 (环磷酰胺)	5 000	119	23.8±3.1**	0.93±0.03
雄性	2 222.22	5 000	5	1.0±0.7	1.10±0.03
	1 111.11	5 000	7	1.4±0.5	1.11±0.07
	555.56	5 000	8	1.6±1.5	1.06±0.04
	0	5 000	9	1.8±1.3	1.09±0.04
	40 (环磷酰胺)	5 000	131	26.2±3.9**	0.91±0.04

注: \*\*. 与阴性对照组(剂量为0)比较, 差异极显著(P<0.01)。表4、6、8同。

由表3可知, 番茄红素各剂量组微核率与阴性对照组相比无显著性差异(P>0.05), 而阳性对照组(环磷酰胺)则极显著高于阴性对照组(P<0.01)。未见番茄红素对小鼠嗜多染红细胞微核形成及PCE/RBC比值产生影响。

2.4 小鼠精子畸形实验结果

表4 番茄红素对小鼠精子畸形率的影响 (x̄±s, n=5)  
Table 4 Effect of lycopene on teratospermia ratio in mice (x̄±s, n=5)

剂量/(mg/(kg·d))	受检精子数	总畸形数	畸形率/%
2 222.22	5 000	108	2.2±0.4
1 111.11	5 000	96	1.9±0.2
555.56	5 000	109	2.2±0.3
0	5 000	111	2.2±0.3
40 (环磷酰胺)	5 000	461	9.2±0.8**

表5 番茄红素对小鼠精子畸形类型及比例的影响

Table 5 Effect of lycopen on sperm malformation type and ratio in mice

剂量/ (mg/ (kg·d))	无钩 比例/%	无定形 比例/%	胖头 比例/%	香蕉形 比例/%	双头 比例/%	双尾 比例/%	尾折叠 比例/%	总畸形 数/只
2 222.22	13.9 (15)	78.7 (85)	4.6 (5)	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.9 (2)	108
1 111.11	18.8 (18)	74.0 (71)	3.1 (3)	2.1 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	2.1 (2)	96
555.56	16.5 (18)	77.1 (84)	3.7 (4)	1.8 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	109
0	18.0 (20)	76.6 (85)	2.7 (3)	1.8 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	111
40 (环磷酰胺)	22.8 (105)	63.3 (292)	4.1 (19)	2.6 (12)	2.0 (9)	1.5 (7)	3.7 (17)	461

注：括号中的数据为小鼠数量n。

由表4、5可知，番茄红素各剂量组精子畸形率与阴性对照组（剂量为0）比较，无显著性差异（ $P>0.05$ ），而阳性对照组（环磷酰胺）小鼠精子畸形率与阴性对照组比较有极显著提高（ $P<0.01$ ）。因此，番茄红素对小鼠精子畸形率未产生影响。

2.5 番茄红素对大鼠血液常规指标的影响

表6 番茄红素对大鼠血液常规指标的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

Table 6 Effect of lycopen on haematological indexes in rats（ $\bar{x} \pm s$ ）

性别	剂量/ (mg/ (kg·d))	白细胞计数/ ( $10^9/L$ )	红细胞计数/ ( $10^{12}/L$ )	血红蛋白 含量/(g/L)	淋巴细胞 比例/%	中性细胞 比例/%	单核细胞 比例/%	嗜酸性细胞 比例/%	嗜碱性细胞 比例/%
雄性	0	6.3±1.4	7.2±0.3	140±6	82.6±3.7	13.3±2.5	2.9±1.1	0.5±0.2	0.1±0.1
	200	7.0±1.8	7.4±0.4	144±6	80.2±2.8	15.6±3.1	3.0±0.8	0.7±0.1	0.2±0.1
	433.33	5.5±0.9	7.5±0.4	143±7	81.2±3.2	14.5±3.2	3.0±0.6	0.7±0.2	0.1±0.1
	666.67	6.5±1.3	7.5±0.2	143±4	80.9±2.0	15.2±1.9	2.7±0.8	0.7±0.2	0.1±0.1
雌性	0	5.9±0.9	7.2±0.2	138±4	84.7±3.0	11.7±3.1	2.5±0.4	0.5±0.2	0.1±0.1
	200	5.1±1.6	7.4±0.4	141±5	81.6±4.4	13.7±4.4	3.2±1.3	0.8±0.2	0.1±0.1
	433.33	5.1±1.7	7.4±0.3	141±5	82.9±3.8	13.4±3.5	2.4±0.6	0.8±0.3	0.1±0.1
	666.67	4.9±1.9	7.3±0.3	141±5	81.7±3.1	14.2±3.1	2.7±0.6	0.9±0.5	0.1±0.1

由表6可知，番茄红素各剂量组大鼠的各项血液常规指标与阴性对照组（剂量为0）比较，差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

2.6 番茄红素对大鼠血清生化指标的影响

经口给予大鼠不同剂量的番茄红素30 d，测定各组大鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶活力和总蛋白、白蛋白、总胆固醇、甘油三酯、尿素氮、肌酐及血糖的水平。如表7所示，番茄红素各剂量组各项血液生化指标与阴性对照组（剂量为0）比较，差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表7 番茄红素对大鼠部分血清生化指标的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

Table 7 Effect of lycopen on blood biochemical parameters in rats（ $\bar{x} \pm s$ ）

性别	剂量/ (kg·d)	谷丙转氨酶 活力/(U/L)	谷草转氨酶 活力/(U/L)	总蛋白含量/ (g/L)	白蛋白含量/ (g/L)	尿素氮含量/ (mmol/L)	肌酐含量/ (μmol/L)	总胆固醇含量/ (mmol/L)	甘油三酯含量/ (mmol/L)	血糖含量/ (mmol/L)
雄性	0	43±7	147±23	50.0±1.5	30.7±0.8	5.39±0.78	30±4	1.46±0.20	0.39±0.04	8.26±1.14
	200	42±7	129±36	49.7±2.1	31.2±1.8	6.02±1.04	28±4	1.54±0.22	0.47±0.14	8.62±0.93
	433.33	40±5	136±30	48.9±1.1	31.5±1.5	6.42±0.94	29±5	1.51±0.22	0.42±0.07	8.53±0.62
	666.67	41±7	149±28	48.9±1.1	31.3±1.5	6.22±1.04	32±5	1.44±0.26	0.42±0.09	8.70±0.86
雌性	0	33±7	118±19	54.6±2.0	33.9±1.7	6.51±1.09	32±3	2.03±0.42	0.35±0.08	7.78±0.70
	200	34±5	112±10	53.0±1.4	35.3±1.1	5.97±1.33	31±6	1.93±0.33	0.38±0.06	7.93±0.90
	433.33	31±6	118±16	53.5±2.0	33.4±1.1	6.47±1.51	31±5	2.12±0.24	0.36±0.05	8.11±0.86
	666.67	33±5	123±15	53.0±1.9	33.2±1.2	6.35±1.25	31±4	2.04±0.45	0.34±0.05	8.43±0.87

2.7 番茄红素对小鼠免疫功能的影响

小鼠经口给予不同剂量番茄红素30 d后，33.33、66.67、200 mg/（kg·d）剂量组小鼠平均终末体质量、体质量增长值、胸腺与脾脏的脏/体比与阴性对照组（剂量为0）相比，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。MTT法进行Con A诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验，结果不满足方差齐性要求，采用秩和检验进行统计处理。结果（表8）表明，番茄红素各剂量组淋巴细胞增殖能力与阴性对照组相比，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表8 番茄红素对小鼠免疫功能的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

Table 8 Effect of lycopen on immune functions in mice（ $\bar{x} \pm s$ ）

剂量/ (kg·d)	胸腺质量/ 体质量比/%	脾脏质量/ 体质量比/%	淋巴细胞 增殖能力	NK细胞 活性/%	DTH 程度/mm	溶血空斑数/ ( $10^3$ 个脾细胞)	HC <sub>50</sub>	吞噬 指数(α)	吞噬百 分率/%	吞噬指数
0	0.182±0.046	0.466±0.059	0.010±0.004	26.4±5.4	16.5±3.3	52±27	72±20	5.28±0.52	22.6±5.4	0.30±0.07
33.33	0.212±0.022	0.481±0.045	0.010±0.003	22.8±7.5	14.8±2.9	51±24	85±26	4.95±0.44	22.7±3.7	0.30±0.03
66.67	0.185±0.026	0.461±0.025	0.011±0.005	27.6±13.1	16.3±3.1	55±23	90±25	5.06±0.77	23.1±3.6	0.34±0.05
200	0.202±0.037	0.466±0.040	0.012±0.008	38.4±11.4*	17.4±3.5	86±37*	99±12**	5.61±0.36	26.2±4.8	0.36±0.05*

注：\*、与阴性对照组（剂量为0）比较，差异显著（ $P<0.05$ ）。

采用乳酸脱氢酶法进行小鼠NK细胞活性测定，将NK细胞经 $\sin^{-1}$ （ $P^{1/2}$ ）（ $P$ 为NK细胞活性）转化后进行组间 $t$ 检验比较，结果（表8）表明，200 mg/（kg·d）剂量组NK细胞活性高于阴性对照组（剂量为0），差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），而使用耳肿胀法进行DNFB诱导小鼠DTH实验及小鼠碳廓清实验结果证实，番茄红素各剂量组DTH程度及小鼠吞噬指数（α）与阴性对照组比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

采用Jerne改良玻片法进行小鼠抗体生成细胞实验，计算溶血空斑数，发现200 mg/（kg·d）剂量组溶血空斑数高于阴性对照组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。采用半数溶血值法测定小鼠血清半数溶血值（HC<sub>50</sub>），结果发现200 mg/（kg·d）剂量组血清半数溶血值（HC<sub>50</sub>）高于阴性对照组，差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）。此外，用半体内法进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验，计算吞噬指数及吞噬百分率，并将吞噬百分率经 $\sin^{-1}$ （ $P^{1/2}$ ）（ $P$ 为吞噬百分率）转化后进行组间 $t$ 检验比较，结果表明200 mg/（kg·d）剂量组小鼠吞噬指数高于阴性对照组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

3 结论

食品安全性评价结果显示，ICR小鼠对番茄红素最大可耐受灌胃剂量高于人体推荐食用量100倍，属于实际无毒级。200、433.33、666.67 mg/（kg·d）番茄红素连续30 d给药没有对大鼠的血液生化指标产生影响，Ames实验、小鼠精子畸形实验、骨髓细胞染色结果阴性，未见致畸变作用。此外，番茄红素以33.33、66.67、200 mg/（kg·d）连续给药30 d，没有对小鼠的摄食、体质量增量、主要免疫器官的脏/体比产生影响。

免疫功能研究结果显示,在Con A诱导的小鼠淋巴细胞转化实验中,33.33、66.67、200 mg/(kg·d)剂量组淋巴细胞增殖能力与阴性对照组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ );DNFB诱导的小鼠DTH实验中,33.33、66.67、200 mg/(kg·d)剂量组DTH程度与阴性对照组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ );在体液免疫功能方面,抗体生成细胞检测实验中,200 mg/(kg·d)剂量组溶血空斑数高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );小鼠血清半数溶血值实验中,200 mg/(kg·d)剂量组血清半数溶血值高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ );而在单核-巨噬细胞功能实验、碳廓清实验中,番茄红素各剂量组吞噬指数 $\alpha$ 与阴性对照组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),200 mg/(kg·d)剂量组鸡红细胞吞噬指数高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );NK细胞活性实验中,200 mg/(kg·d)剂量组NK细胞活性高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。综上所述,番茄红素可以增强小鼠的细胞与体液免疫功能。

#### 参考文献:

- [1] SAHIN K, ONDERCI M, SAHIN N, et al. Effects of dietary combination of chromium and biotin on egg production, serum metabolites and egg yolk mineral and cholesterol concentration in heat-distressed laying quails[J]. *Biological Trace Element Research*, 2004, 101(2): 181-192.
- [2] NONG Qingqing, KOMATSU M, IZUMO K, et al. Involvement of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced cytogenotoxicity[J]. *Free Radical Research*, 2007, 41(12): 1326-1337.
- [3] JURANEK I, BEZEK S. Controversy of free radical hypothesis reactive oxygen species: cause or consequence of tissue injury?[J]. *General Physiology Biophysics*, 2005, 24(3): 263-278.
- [4] WEI Y H. Mitochondrial DNA alterations as aging-associated molecular events[J]. *Mutation Research*, 1992, 275(3/6): 145-155.
- [5] ZALATA A A, AHMED A H, ALLAMANENI S S, et al. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2004, 6(4): 313-318.
- [6] 徐盟. 心肌缺血再灌注损伤的主要机制与相关药物治疗的研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2014(8): 1052-1056.
- [7] 沈云峰, 胡远贵, 张洪波, 等. 冠心病患者血清胱抑素C、一氧化氮、超氧化物歧化酶及超敏C反应蛋白水平变化及与冠脉狭窄程度的相关性[J]. *微循环杂志*, 2014(3): 28-31.
- [8] 罗祖明, 董佑忠, 彭国光. 脑血管疾病治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 455-462.
- [9] MANZANERO S, SANTRO T, ARUMUGAM T V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury[J]. *Neurochemistry International*, 2013, 62(5): 712-718.
- [10] 杨娜, 李明, 胡家栋, 等. 番茄红素对UVA氧化损伤皮肤成纤维细胞的保护作用[J]. *生物技术通报*, 2013(11): 142-147.
- [11] 唐湘宇, 孙文清, 王蕾, 等. 番茄红素对高脂血症脂质过氧化损伤的影响及机制探讨[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2006, 11(2): 158-163.
- [12] 胡敏予, 李毅琳, 刘昭前, 等. 番茄红素对家兔动脉粥样硬化形成的保护作用[J]. *营养学报*, 2007, 29(5): 498-502.
- [13] 汪海宁, 李吉林, 姚怀齐, 等. 心肌细胞肥大中番茄红素对自噬的作用[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(33): 11-14.
- [14] 杨艳晖, 王海霞, 荣胜忠, 等. 番茄红素对大鼠急性心肌梗死所致心肌损伤的保护作用[J]. *营养学报*, 2013, 35(5): 471-474.
- [15] 曾瑶池, 穆桂萍, 黄淑芬, 等. 番茄红素对高糖所致内皮祖细胞功能障碍的保护作用及机制初探[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(1): 19-23.
- [16] 张卫国, 谢国建, 刘先军, 等. 番茄红素对胃癌细胞SGC-7901生长的抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(3): 292-295.
- [17] TAKESHIMA M, ONO M, HIGUCHI T, et al. Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines[J]. *Cancer Science*, 2014, 105(3): 252-257.
- [18] ERMAN F, TUZCU M, ORHAN C, et al. Effect of lycopene against cisplatin-induced acute renal injury in rats: organic anion and cation transporters evaluation[J]. *Biological Trace Element Research*, 2014, 158(1): 90-95.
- [19] 刘秀萍. 番茄红素对人体高强度耐力运动后氧自由基代谢的影响[J]. *北京体育大学学报*, 2006, 29(9): 1025-1027.
- [20] 吴丽君, 郭新明, 张俊峰. 番茄红素及运动对人体血清自由基代谢的影响[J]. *体育科学*, 2008, 28(2): 47-53.
- [21] ZU Ke, MUCCI L, ROSNER B A, et al. Dietary lycopene, angiogenesis, and prostate cancer: a prospective study in the prostate-specific antigen era[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2014: djt430. doi: 10.1093/jnci/djt430.
- [22] MARIANI S, LIONETTO L, CAVALLARI M, et al. Low prostate concentration of lycopene is associated with development of prostate cancer in patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(1): 1433-1440.
- [23] 范远景, 黄璐. 番茄红素吸收与体内抗氧化的机理研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 545-548.
- [24] 尚德军, 王军. 番茄红素研究现状与展望[J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(2): 59-61.
- [25] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[EB/OL]. (2006-01-08)[2014-04-07]. <http://www.sdfda.gov.cn/filedown/admin/12671467264375794242367161.pdf>.