

唐古特白刺红色素毒理学安全性评价

赵晓辉, 王萍, 陶燕铎, 邵贇, 梅丽娟*

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

摘要:目的 对唐古特白刺红色素毒理学安全性进行评价。方法 清洁级昆明种小鼠、SD 大鼠以唐古特白刺红色素各按最大耐受量(MTD)等体积灌胃,记录中毒表现及死亡情况;采用平板掺入法;分加与不加 S-9 混合液两种;选清洁级昆明种小鼠,取胸骨骨髓制片;检查骨髓嗜多染红细胞微核发生率;选雄性小鼠;取附睾制片;查小鼠精子畸形率;90 d 喂养实验,观察生长发育、食物利用率、血液学检查、生化检查和组织病理检测。结果 雌雄性小、大鼠均未见明显的中毒症状及死亡;在加与不加 S-9 的情况下,均未呈现致突变作用;小鼠微核实验、小鼠精子畸形实验均呈阴性;90 d 喂养大鼠,全部存活,且发育良好,选定各指标均未见异常。结论 唐古特白刺红色素对两种性别的大、小鼠的 MTD 均大于 30 000 mg/(kg·bw),说明该产品属实际无毒物;三项致突变实验结果阴性;大鼠 90d 喂养实验各项指标均无明显异常。

关键词: 唐古特白刺红色素; 安全性评价

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.10.047

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2011)10-2426-02

Safety Assessment of *Nitraria tangutorum* Bobr. Pigment

ZHAO Xiao-hui, WANG Ping, TAO Yan-duo, SHAO Yun, MEI Li-juan*

(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract: Objective To assess the safety of *Nitraria tangutorum* Bobr. pigment. **Methods** The experimental animals were Kunming mice and SD rats. Mice and rats were gastrically infused with the same volume of *Mitrarica tangutirum* Bobr. pigment MTD. Toxicity and death status were recorded. Flat plate incorporating method was used with 2 kinds of mixture solutions which were added S-9 or not. The sternal bone marrow of clean Kunming mice was isolated and fixed and the living rate of mouse bone marrow polychromatic erythrocyte micronucleus test was checked. The epididymis of the double sides in female clean Kunming mice was cut into slices and the rate of sperm teratogenicity was observed. The growth and development, food utilization rate, the changes of blood and biochemistry were observed after the animals were fed for 30 days. **Results** No obvious poisoned symptom and death were observed. Without adding S-9 condition, the mutation effect of all the animals didn't appear. The micronucleus test and the sperm teratogenicity test in mice were negative. All rats survived after feeding for 90 days. Animal growth in each group was good, and no abnormal phenomenon was observed. **Conclusion** The MTD of *Nitraria tangutorum* Bobr. pigment mice and rats is greater than 30 000 mg/(kg·bw). It is concluded that the product has no toxicity. The result of mutagenic test is negative and no abnormal phenomenon is observed after feeding for 90 days.

Key words: *Nitraria tangutorum* Bobr. pigment; Safety assessment

唐古特白刺 *Nitraria tangutorum* Bobr. 为蒺藜科(Zygophyllaceae)白刺属(Nitraria)灌木,在青海柴达木盆地有大量的分布。其抗逆性强,耐盐碱,能适应严酷恶劣的生境,是荒漠地区重要的建群植物。除了生态作用外,还有广谱的医疗和保健作用^[1-2]。唐古特白刺具有健胃补脾、滋阴润肺、解表安神、活血消食、催乳等功效,对身体虚弱、月经不调、脾胃虚寒、消化不良也有一定的疗效^[3]。

当前,食品工业及药剂所用的色素多为合成色素,这类色素具有色泽鲜艳、着色力强、稳定性好、成本低廉等优点。而近年来人们不断发现,很多合成色素都具有不同程度慢性毒性、致癌、致

畸性^[4]。天然食用色素安全可靠、色泽自然,不少品种兼有营养和药理作用。随着人们生活水平和认识水平的提高,它们更加受到人们的青睐。因此,寻求和开发利用天然色素资源已成为人们日益关注的问题,对保护人们的健康及食品工业的发展具有重要意义^[5]。为充分开发唐古特白刺这一新的野生植物资源,我们对该色素毒理学安全性进行了初步研究,旨在为该色素的开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 样品 唐古特白刺鲜果经 70% 乙醇浸提,提取液浓缩经大孔树脂分离得到唐古特白刺红色素提取物,主要成分为花色苷类物质。置阴凉干爽通风处保存。人口服推荐用量为每人(成人)每日 200 mg,成人体重按 60kg 计算,折合剂量为 3.33 mg/(kg·bw)。

1.2 动物及环境 清洁级健康昆明种小鼠,由广西医科大学医学实验动物中心繁殖,实验动物质量合格证号: 0001129; SPF 级 SD 种大鼠,由广东省医学实验动物中心繁殖,实验动物质量合格证号: 0046674。实验动物使用许可证号: SYXK 桂 2007-0003。实验动物室温度: 22~25℃,相对湿度: 55%~70%。

1.3 菌株 鼠伤寒沙门菌突变型菌株 TA97a、TA98、TA100 和 TA102 由上海劳动卫生职业病研究所提供。

收稿日期: 2010-09-18; 修订日期: 2011-05-24

基金项目: 科技部国家科技支撑计划(No. 2007BAI45B00)

作者简介: 赵晓辉(1979-),男(汉族),陕西宝鸡人,现任中国科学院西北高原生物研究所助理研究员,硕士学位,主要从事天然产物研究与开发工作。

* 通讯作者简介: 梅丽娟(1963-),女(汉族),青海西宁人,现任中国科学院西北高原生物所副研究员,学士学位,主要从事天然药物化学研究工作。

2 方法

实验方法均按照(GB 15193-2003)《食品安全性毒理学评价程序和方法》要求进行。

2.1 小鼠急性经口毒性实验 采用最大给药量实验法,选大、小鼠各 20 只,雌、雄性各 10 只。实验前动物禁食 16 h,不限饮水。称取样品,配成 500 mg/ml 的混悬液,然后给动物灌胃 3 次(每次间隔 5 h),每次灌胃量为 0.2 ml/10g·BW,合计剂量为 30 000 mg/kg·BW。灌胃后观察、记录动物的中毒表现。每周称体质量 1 次,观察两周时间,实验结束解剖动物进行大体观察。按毒性分级标准评价受试物的急性毒性强弱。

2.2 Ames 实验 采用“1.1.3”项中 4 种菌株进行实验。在无菌操作条件下,用 0.1 mg/ml 的柠檬酸溶液将样品分别配成 50, 10, 2.0, 0.4, 0.08 mg/ml 5 个浓度作为受试溶液,经高压灭菌(0.103 Mpa 20 min)处理。以多氯联苯诱导的大鼠肝微粒体酶(S-9)作为体外代谢活化系统。采用平板掺入法,在保温的顶层培养基中依次加入 0.1 ml 实验菌株增菌液、0.1 ml 受试物溶液和 0.5 ml S-9 混合液(当需要代谢活化时),混匀后倒入底层培养基平板上。5 个实验剂量分别为 5 000, 1 000, 200, 40, 8 μg/皿,同时设自发回变对照、溶剂对照和阳性突变剂对照(2-氨基苄;采用柔毛霉素;采用敌克松;采用叠氮钠;1,8-二羟基蒽醌)。每个剂量组的各种菌株均做 3 个平行皿。在 37℃ 下培养 48 h,计数每皿的菌落数。整套实验在相同条件下重复两次。如果受试物的回变菌落数增加超过自发回变菌落数的 2 倍以上,并具有剂量-反应关系者,即为诱变实验阳性。

2.3 小鼠骨髓细胞微核实验 采用间隔 24 h 两次经口灌胃法进行实验。选体质量为 25~30 g 的昆明种小鼠 50 只,随机分成 5 组,每组 10 只,雌雄各半。实验组 3 个剂量分别设 5 000, 2 500, 1 250 mg/(kg·BW),以 0.1 mg/ml 的柠檬酸溶液为阴性对照,40 mg/(kg·BW)剂量的环磷酰胺(cp)作阳性对照。第二次给药后 6 h 颈椎脱臼处死动物,取胸骨骨髓用小牛血清稀释涂片,甲醇固定,Giemsa 染色。在光学显微镜下,每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞(PCE),微核率以含微核的 PCE 千分率计,同时计数 200 个嗜多染红细胞,计算嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/NCE)。采用泊松分布均数比较法统计处理。如实验组的微核率比阴性对照组增高,并有明显的剂量-反应关系和统计学意义,即为阳性结果。

2.4 小鼠精子畸形实验 选体质量为 25~30 g 的昆明种雄性小鼠 50 只,随机分成 5 组,每组 10 只。实验组 3 个剂量分别设 10 000, 5000, 2 500 mg/(kg·BW),以 0.1 mg/ml 的柠檬酸溶液为阴性对照,40 mg/(kg·BW)剂量的环磷酰胺(cp)作阳性对照。每天灌胃一次,连续 5 d。末次给药后第 30 天处死动物,取副辜的精子涂片,甲醇固定,伊红染色。在光学显微镜下,每只动物计数完整精子 1 000 个,计算精子畸形率,采用 χ^2 检验统计处理。如实验组的精子畸形率比阴性对照组增高,并有明显的剂量-反应关系和统计学意义,即为阳性结果。

2.5 大鼠 90 d 喂养实验 选 SD 种大鼠 80 只,雌雄各半,雄鼠体质量(78.2±4.3)g,雌鼠体质量(72.5±4.1)g。将动物随机分为 4 组,即阴性对照组和 3 个实验组,每组 20 只,雌雄各半。3 个实验组剂量分别设为 1 000, 667, 333 mg/(kg·BW)。按 1.0 ml/100 g·BW 的体积给相应剂量组动物灌胃,阴性对照组灌给等体积的 0.1 mg/ml 的柠檬酸溶液,每天灌胃一次,连续灌胃 90 d。实验期间所有动物给予普通饲料,单笼饲养,自由摄食饮水。每天观察动物的活动和生长情况,每周加食 2 次,记录给食量和剩食量,每周称一次体质量,计算每周进食量和食物利用率。实验中期从大鼠的眼静脉丛采血,抗凝处理后用血球计数仪检测 Hb、RBC、WBC 及其分类、PLT 等。第 90 天动物禁食过夜,第 91 天称动物空腹称重,然后处死大鼠,采 2 份血样,一份血抗凝用血球计

数仪检测血常规指标(项目同上);另一份血不抗凝分离血清,用试剂盒和半自动生化分析仪检测血清 AST、ALT、BUN、Cr、TC、TG、Glu、TP、Alb 等项目。采血后解剖动物,进行大体观察,取肝脏、肾脏、脾脏和睾丸等脏器进行称重,计算脏/体比值,取肝脏、肾脏、脾脏、胃、十二指肠、睾丸和卵巢等脏器进行病理组织学检查。在对各剂量组动物作大体检查未发现明显病变和生化指标改变时,只进行高剂量组和对照组动物的主要脏器的组织病理学检查,如发现病变则对较中、剂量组相应器官及组织进行检查。

2.6 实验数据统计 应用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。在统计分析时,先对数据进行方差齐性检验,若方差齐,采用单因素方差分析进行总体比较,发现差异再用 Dunnett 检验进行多个剂量组与对照组均数间的两两比较。若方差不齐则对数据进行适当的变量转换,满足方差齐性检验后,用转换后的数据进行统计;若转换数据仍未达到方差齐要求,改用秩和检验进行统计分析。

3 结果

3.1 急性经口毒性实验 以最大给药量[剂量为 30 000 mg/(kg·BW)]的样品给予小鼠灌胃后,动物生长良好,未见体质量受到影响。受试小鼠均未见有中毒症状,观察 14 d 无动物死亡。实验结束解剖动物,大体观察,肝、肾、脾、心、肺、胃、肠等主要脏器均未见明显异常改变,根据《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)中的急性毒性分级标准,该样品的急性经口毒性属无毒级。

3.2 Ames 实验 对 TA97a、TA98、TA100、TA102 四种实验菌株,无论是否加入 S-9,样品各剂量组的回变菌落数均未超过自发回变菌落数的两倍,亦无剂量-反应关系,表明该受试物诱变实验结果为阴性。

3.3 小鼠骨髓微核实验 样品各剂量组的微核率与阴性对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),而环磷酰胺阳性对照组与阴性对照组比较差异有极显著性($P < 0.01$)。未见该样品对小鼠的骨髓细胞有损伤作用。

3.4 小鼠精子畸形实验 样品对小鼠精子畸形发生率未产生明显改变,样品各剂量组的精子畸形率与阴性对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),而环磷酰胺阳性对照组与阴性对照组比较差异有极显著性($P < 0.01$)。未见该样品对小鼠精子产生畸变作用。

3.5 大鼠 90 d 喂养实验

3.5.1 动物一般表现 实验期间,各组动物生长发育良好,未见动物有异常行为和中毒表现,各组动物均无死亡。

3.5.2 样品对大鼠体重及食物利用率的影响 唐古特白刺红色素给大鼠灌胃 90 d,实验期间,样品各剂量组雌雄鼠每周的体质量、增重量、每周进食量及总进食量、每周及总食物利用率与对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的体质量增长和食物利用率无明显影响。

3.5.3 样品对大鼠血常规指标的影响 唐古特白刺红色素给大鼠灌胃 90 d,实验中期和实验结束样品各剂量组雌、雄性大鼠的血红蛋白、红细胞总数、白细胞总数及其分类、血小板数与对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的血常规指标无明显影响。

3.5.4 样品对大鼠血液生化指标的影响 唐古特白刺红色素给大鼠灌胃 90 d,样品各剂量组雌、雄性大鼠的血清草转氨酶、谷丙转氨酶、尿素氮、肌酐、胆固醇、甘油三酯、总蛋白、白蛋白、血糖与对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的血液生化指标无明显影响。

3.5.5 样品对大鼠脏器重量及脏器/体质量比值的影响 唐古特白刺红色素给大鼠灌胃 90 d,样品各剂量组大鼠的肝、肾、脾、雄鼠睾丸重量和肝/体质量、肾/质量、脾/质量、雄鼠辜/体比值与对

照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的脏器重量及脏器/体质量比值无明显影响。

3.5.6 解剖大体观察及组织学检查结果 大体解剖各组大鼠各脏器未见异常。病理组织学检查各组大鼠的肝小叶结构正常,肝细胞无变化、坏死,小叶间无炎细胞浸润和纤维组织增生;肾小球、肾小管结构正常,肾小管肾上皮细胞无变性、坏死,管腔内无异常物质,间质无炎细胞浸润、出血和纤维组织增生;胃壁及十二指肠肠壁结构清晰完整,无出血、炎细胞浸润,胃上皮细胞及肠黏膜上皮细胞无变性、坏死、缺损。未见唐古特白刺红色素对受试物组动物肝、肾、胃及肠产生特异性的病理改变。

4 讨论

我们对唐古特白刺红色素进行了急性毒性实验、Ames 实验、小鼠骨髓 PCE 微核实验、小鼠精子畸形实验和 90 d 喂养实验。结果急性毒性实验中动物无明显中毒反应,无死亡,雌雄大、小鼠经口 LD_{50} 均大于 30.0 g/kg,根据急性毒性分级标准,判定其属实际无毒物;3 项遗传毒性实验中,通过 Ames 实验可推断样品是否为致突变物,通过微核实验可检测样品对染色体的损伤情况,通

过精子畸形实验可评价样品在体内对生殖细胞的遗传毒性作用,该色素此 3 项遗传毒性实验结果均为阴性,提示该样品对哺乳类动物体细胞染色体及生殖细胞无损伤作用;90 d 喂养实验结果表明唐古特白刺红色素对动物未产生明显毒性作用,病理组织学检查发现个别大鼠肝脏有零星的点状炎细胞浸润灶。表明该色素无毒无害,能够作为食品着色剂使用。

参考文献:

- [1] 蒋福祯,王 舰,张艳萍.柴达木盆地野生白刺资源调查及其综合利用[J].青海科技 2005 1: 15.
- [2] 张凤枰,赵 艳,刘耀敏,等.青藏高原白刺、枸杞和沙棘果粉中水溶性维生素含量比较分析[J].食品科学 2010 31(2): 179.
- [3] 朱利娜,强 伟,史俊友,等.唐古特白刺果粉的抗氧化作用研究[J].中国野生植物资源 2010 29(2): 41.
- [4] 杜 鹃,冯作山.玫瑰花中黄酮类色素的提取工艺研究[J].新疆农业职业技术学院学报 2007 4: 30.
- [5] 孟红梅,韩多红.唐古特白刺果实红色素稳定性研究[J].食品科学,2006 27(8): 72.

四君子汤预处理对急性心肌梗塞大鼠心肌 NO 系统及 Caspase-3 的影响

钱海兵¹,黄勇其¹,王 毅²

(1. 贵阳中医学院,贵州 贵阳 550002; 2. 成都中医药大学,四川 成都 610074)

摘要:目的 探讨四君子汤预处理对大鼠急性心肌梗塞后心肌 NO 系统及 Caspase-3 的影响。方法 在四君子汤预处理基础上,结扎雄性大鼠左冠状动脉,复制心肌梗塞模型,分为四君子汤高、低剂量组,另设阳性对照预处理组、模型组、假手术组。术后 2 d 检测心肌匀浆中的 NO、eNOS、iNOS 水平,并采用 Western blotting 检测大鼠心肌组织 Caspase-3 的表达。结果 模型组心肌组织中 NO、eNOS 水平明显降低,Caspase-3、iNOS 表达明显增加;四君子汤与处理组能降低心肌组织中 iNOS、Caspase-3 的表达,增加心肌组织中 NO、eNOS 的含量。结论 四君子汤预处理可以减轻心肌缺血所造成的心肌 NO 系统的紊乱,抑制进 Caspase-3 的高表达,而减轻缺血所诱导的心肌细胞的凋亡。

关键词: 四君子汤; 心肌梗塞; 一氧化氮合酶; 半胱氨酸蛋白酶-3

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.10.048

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2011)10-2428-02

心肌细胞凋亡是心肌梗塞后,尤其是非梗塞区心肌细胞丢失的主要方式,是引起梗塞后心功能不全的主要因素。近年来,一氧化氮(NO)在细胞凋亡中的作用被广泛研究,而一氧化氮合成酶(NOS)的 3 种同工酶,均已被证实广泛表达于心肌组织的各种细胞中,作为 NOS 的主要产物,NO 在心肌缺血中具有保护和造成组织损伤的双重作用。尤其再灌注早期心肌组织中 NOS 同工酶表达失衡是缺血损伤的重要发病机制之一。而半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族的激活是凋亡机制中的关键环节,其中 caspase-3 是 caspase 家族中重要的凋亡执行者之一,它被合成后通常以非活化的酶原形式存在于细胞质中,在多种凋亡信号刺激下经蛋白水解作用被激活成活化形式,可对多种蛋白底物进行降解,从而在细胞凋亡过程中起关键作用^[1]。四君子汤是中医补气名方,始载于《太平惠民和剂局方》,本课题组前期研究发现,四君子汤预处理对急性心肌梗塞具有保护作用^[2]。本研究将在前期研究的基础上,通过四君子汤对缺血梗塞后心肌组织中 NOS 同工酶和 caspase-3 蛋白表达的影响,探讨其心肌延迟保护效应

的机制。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂 四君子汤(人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g)由贵阳中医学院制剂室制备;地奥心血康胶囊,成都地奥制药集团有限公司生产;NO、NOS、eNOS、iNOS 检测试剂盒:南京建成生物工程研究所。Caspase-3 活化抗体: Santa Cruz 公司;BCA 蛋白定量试剂盒:上海申能博彩生物科技有限公司。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 220~250 g。由成都中医药大学实验动物中心提供。

1.3 仪器 TGL-16G 台式离心机(上海医用分析仪器厂);酶标仪(瑞士 Tecan Systems Inc),台式高速冷冻离心机(美国 Thermo);Western Blot 设备: Bio-Rad;凝胶成像系统:上海复日科技有限公司。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠随机分为假手术组、模型组、四君子汤高、低剂量组和地奥心血康组。

2.2 供试药品制备 人参、白术、茯苓、炙甘草共同浸泡、煎煮、去渣,浓缩至药液浓度为 1 g/ml(含生药),4℃ 保存备用;地奥心血康胶囊,成都地奥制药集团有限公司生产,批号:0408046,每粒含甾体总皂苷 100 mg,临用前取胶囊内容物用蒸馏水配成所需浓度混悬液。

2.3 给药方法 造模前 7 d 连续灌胃给药,四君子汤高(SH 组)、

收稿日期: 2010-10-17; 修订日期: 2011-05-28

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(No. J-[2008]2289)

作者简介: 钱海兵(1977-),男(汉族),河南卫辉人,现任贵阳中医学院副教授,博士学位,主要从事中药及中药复方药效与物质基础研究工作。