

• 研究简报 •

山萸肉水提液的毒性实验

张慧珍¹, 吴逸明^{1,*}, 吴拥军¹, 呼世斌²

(1. 郑州大学医学院公共卫生学院, 河南 郑州 450052; 2. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】背景与目的: 检测山萸肉水提液对脊椎动物胚胎的致畸作用, 确定山萸肉果水提液的急性毒性和蓄积毒性。材料与方
法: 采用国家标准规定的急性毒性试验方法、蓄积毒性试验方法和致畸胎试验方法。结果: 山萸肉水提液的 $LD_{50} > 10$ g/kg, 蓄
积系数 $K > 5$; 山萸肉水提液没有致畸胎作用。结论: 山萸肉水提液没有急性毒性和蓄积毒性; 山萸肉水提液对脊椎动物胚胎无
致畸作用, 为将山萸肉开发为功能性保健食品提供了科学的依据。

【关键词】山萸肉; 水提液; 急性毒性; 蓄积毒性; 胚胎毒性

中图分类号: R994.4; R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)03-0175-03

Study on the Toxicity of the Water Extract from the Pulp of Cornus

ZHANG Hui-zhen, WU Yi-ming, WU Yong-jun, *et al*

(Department of Environmental Health, College of Public Health Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To check the embryo toxicity, acute toxicity, and accumulation toxicity of water
extract from the pulp of cornus. MATERIAL AND METHODS: Acute toxicity test, accumulation toxicity test and terato-
genicity test were used in this study. RESULTS: The test result showed that: $LD_{50} > 10$ g/kg, accumulation coefficient
 $K > 5$. There was no significant difference between the water extract from the pulp of cornus and negative control,
but there was significant difference compared to positive control. CONCLUSION: The water extract has no acute toxicity,
accumulation toxicity on the mice, and no embryotoxicity on the embryo of mice.

【KEY WORDS】pulp of cornus; the matter extracted by water; acute toxicity; accumulative toxicity; embryotoxicity

山萸肉作为我国重要的药用植物资源, 产量丰富, 药用、保健成分独特, 山萸肉果实山萸肉具有提高免疫、延缓衰老、清除体内自由基、抑菌等作用^[1-3]。后魏贾思勰所著的《齐民要术》中, 有“井上宜种茱萸, 茱萸叶落井中, 有此水者无瘟病”的记载, 证明古代人早已意识到山萸肉有防病保健的作用。正是基于这些, 山萸肉饮品开发方兴未艾, 而且还具有非常广阔的开发前景。但是, 山萸肉作为一种中药, 开发为保健品后是否具有潜在的毒性? 为此需要对山萸肉提取物进行全面的、多阶段的安全性评价。本实验从急性毒性、蓄积毒性以及致畸胎等方面进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料 山萸肉果实为陕西省太白县当年产。经去核整理干净后。用水提取, 终浓度为 1 g/ml, 真空抽滤, 除尘备用。实验动物为健康昆明种小白鼠, 体重 25~30 g, 购自第四军医大学实验动物房。

1.2 方法^[4]

1.2.1 急性毒性试验 选择健康昆明种小鼠 30 只, 体重 18~22 g, 随机分为 5 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 设置一个阴性组, 采用蒸馏水, 受试物山萸肉水提液分为 4 个剂量组, 10、5、2.5、1.25 g/kg, 灌胃前各组小鼠均禁食 16 h 左右, 灌胃后至少 13 h 再喂食, 然后饲养观察两周, 分别记录试验动物的中毒症状、死亡情况 (包括死亡时间和死亡个数), 并根据死亡情况确定山萸肉水提液的 LD_{50} 数值, 依 LD_{50} 数值进一步确定水提液的毒性大小。

收稿日期: 2003-12-12; 修订日期: 2004-02-09

作者简介: 张慧珍(1972-), 女, 郑州市人, 讲师, 研究方向: 卫生毒理学。

* 通讯作者: Tel: 0371-6973864, E-mail: wym@zsu.edu.cn

1.2.2 蓄积毒性实验 选用 18~22 g 的小鼠 50 只,雌雄各半,其中 20 只作为对照,30 只作为山萸肉水提液剂量组。各受试物剂量组分别以 1/10 LD₅₀(1 g/kg)的剂量进行灌胃,对照组采用自由饮水方式。灌胃每天一次,连续 50 d,第 51 d 时再增加一个 LD₅₀(10 g/kg),继续观察 7 d,记录死亡状况,并计算蓄积系数 K(K = LD₅₀(n)/LD₅₀(1)),试验结束后,取部分小鼠的肝、肾、睾丸等作徒手观察,检查内脏有无异常现象。

1.2.3 致畸胎实验 健康性成熟的雄性小鼠 24 只,体重 20~25 g,健康未生产的雌性小鼠 48 只,按照雌:雄 = 2:1 的比例合笼交配,每天上午 8:00~9:00,下午 4:00~5:00,晚上 8:00~9:00 分别检查雌鼠阴道栓,见到阴栓认为该鼠交配过,当日作“受孕”零天计算。如果 5 d 未交配,则更换雄鼠,检出的孕鼠随机分到各组,试验分为 3 个组,1 个阴性对照组,1 个阳性对照组,另外 1 个为山萸肉水提液剂量组,每组 16 只孕鼠。在受孕的第 4 d 开始灌用给予受试物。山萸肉水提液以每日 1 g/kg 灌胃,阳性对照阿斯匹林以 0.5 g/kg 的剂量灌胃,阴性对照给予蒸馏水,给药至受孕第 16 d 终止,所有试验动物均自由进食饮水,所有受试孕鼠从受孕 0 d 开始称体重,记录体重变化,以随时调整灌胃量。各组全部妊娠动物的 3/4 在妊娠的第 18 d,用颈椎脱臼法处死,剖腹取出子宫称重,检查记录胚胎的植入数、吸收数、死胎数、活胎数及活胎重等,检查完毕后,取所有胎鼠逐一检查胎仔体重、体长、外观畸形等情况,并作记录。然后将 1/2 的活胎鼠依次放入乙醇中固定,氢氧化钠中透明,茜素红-S 应用液中染色,再透明,制成骨骼标本,然后作骨骼检查,先整体检查,然后逐步检查骨骼,观察骨骼畸形情况。剩余每窝 1/2 的活胎鼠固定后,用刀片徒手作切片,按不同部位的断面观察器官的大小、形状和相对位置,检查胎鼠内脏畸形情况。将全部妊娠动物的 1/4 留下,使其自然分娩,并将幼仔喂养至断奶,检查出生后可能出现的畸形。

1.2.4 统计学方法 用二项分布估计总体率可信区间,数据采用 χ^2 检验、Poisson 分布处理。

2 结果

2.1 山萸肉浸提液急性毒性试验结果 试验结果见表 1,山萸肉水提液分别以 4 个剂量一次性灌胃,经过两周的观察,结果表明,当山萸肉水提液分别在小鼠体内达 1.25,2.5,5,10 g/kg 时,各剂量组均无死亡状况,无明显中毒症状。各剂量组小鼠均运动快速,活泼有力,眼睛鲜红,有精神,被毛有光泽,紧贴体表,与阴性对照组(蒸馏水)小鼠相对比,无明显差别,依据中华人民共和国国标(GB15193.14-1994)规定,当受试物在实验小鼠体内的剂量达到 10 g/kg 时,仍不引起实验动物的死亡,则无须再精确测定其半数致死剂量,确认受试物的半数致死剂量 LD₅₀>10 g/kg。按照我国五级急性毒性分级标准,小鼠一次经口 LD₅₀>10 g/kg,属于微毒物质。因而认为山萸肉水提液属于微毒物质。

表 1 山萸肉水提液急性毒性试验结果

Table 1 Results of acute toxicity of the matter extracted from the pulp of cornus by water

Groups	Dosage g · kg ⁻¹	Numer of mice		Numer of died mice	
		female	male	female	male
Water Extract	1.25	3	3	0	0
	2.5	3	3	0	0
	5	3	3	0	0
	10	3	3	0	0
Negative Control	0	3	3	0	0

2.2 蓄积毒性试验结果 试验结果见表 2。表 2 显示,当以 1/10 LD₅₀(1 g/kg)的剂量给予小鼠山萸肉水提液,累积到 5 LD₅₀时,实验小鼠无明显中毒症状,再增加 1 个 LD₅₀,小鼠无死亡现象。此时,山萸肉水提液蓄积系数 K>5。

表 2 山萸肉水提液的蓄积毒性试验结果

Table 2 Results of cumulative toxicity of the matter Extracted from the pulp of cornus by water

Groups	Dose	Accumulation	Added	Last	Accumulation
	per day (LD ₅₀)	dose (LD ₅₀)	dose (LD ₅₀)	dose (LD ₅₀)	coefficient (K)
Distilled Water	0	0	0	0	0
Water Extract	1/10	5	1	6	6

2.3 致畸胎实验结果 实验结果见表 3。从表 3 中可见山萸肉水提液对妊娠小白鼠的胚胎发育均未表现出不良影响。山萸肉水提液的致死胎率为 1.5(0.15%~5.41%),与阴性对照(3.05%)相对比,差异无显著性(Poisson 分布处理, P=0.4181),而与具有强致畸作用的阳性对照(19.2%)相比,差

表 3 山萸肉水提液对小鼠胚胎发育的影响

Table 3 Effects of the matter extracted from the pulp of cornus by water to embryos of mice

Groups	Preganant mice	Embryos Implantation	Absorbed Embryos		Dies Embryos		Living Embryossum	
			sum	rate(×10 ⁻²)	sum	rate(×10 ⁻²)	sum	rate(×10 ⁻²)
positive	12	125	29	23.30	26	19.20	70	56.00
negative	12	131	6	4.58	4	3.05	121	92.37
water extract	12	133	3	2.26	2	1.50	128	96.24

表4 山萸肉水提液对小鼠胚胎的致畸活性比较

Table 4 Aberrationizing activity of the matter extracted from the pulp of cornus by water to embryos of mice

Groups	Preganant Mice	Living Embryos	Appearance			viscera			bone			sum		
			Number of Embryos checked	terate	Rate of terate	Number of Embryos checked	terate	Rate of terate	Number of Embryos checked	terate	Rate of terate	Number of Embryos checked	terate	Rate of terate
Positive	13	70	23	12	52.0	23	14	60.8	24	13	54.0	70	39	55.7
Negative	13	121	40	5	12.5	40	6	15.0	41	7	17.0	121	18	14.8
Water Extract	13	128	42	5	11.9	43	6	13.9	43	8	18.6	128	19	14.8

异显著 ($\chi^2 = 24.80, P < 0.05$)。吸收胎率看,山萸肉水提液的吸收率为 2.26% (0.45% ~ 6.62%),与阴性对照 (4.58%) 相比,差异无显著性 (Pissoon 分布处理, $P = 0.3366$),与阳性对照 (23.3%) 差异有显著性 ($\chi^2 = 26.02, P > 0.05$)。

山萸肉水提液对小鼠胚胎致畸性比较见表 4。表 4 显示与阴性对照山萸肉水提液,在骨骼畸形上,的致畸率均为 14.8%;前者不同于阳性对照 ($\chi^2 = 36.50, P < 0.005$)。

山萸肉水提液对小鼠胚胎畸形类型分布比较见表 5。表 5 显示山萸肉水提液致小鼠胚胎畸形部位,在骨骼和内脏及外观上均有分布。骨骼畸形、外观畸形,内脏畸形的类型分布上,与阴性对照和阳性对照相比,无明显差异,分布基本一致,只是发生畸形的频率阳性对照高于山萸肉水提液。对分娩后的子代小鼠进行观察,发现生长正常,无外观畸形,解剖部分子代小鼠,未发现内脏异常。

表5 山萸肉水提液致小鼠胚胎畸形类型分布情况

Table 5 Distributing of malformation types of embryos of mice

Groups	Positive	Negative	Extracted matter
Appearance	Rolled ear	4	1
	Showed ear	2	0
	Tail broken	4	2
	Bobtail	1	2
	Ectrolactyly	1	0
	Sum	12 (n = 23)	5 (n = 40)
Bone	Cleft palate	4	1
	Lack of breastbone	3	1
	7 breastbone	4	2
	More rib	3	2
Sum	14 (n = 24)	6 (n = 41)	6 (n = 43)
Viscera	Waterhead	5	2
	Water in kidney	5	3
	Cleft palate	3	2
Sum	13 (n = 23)	7 (n = 40)	8 (n = 43)
Total	39	18	19

Note: 1. n = number of Embryos of mice 2. number of sum include all kinds of malformation of one Embryos of mice

3 讨论

3.1 急性毒性试验主要是测定外来化合物的 LD₅₀,是确认和研究化合物对机体毒效应的第一步,为全

面的毒理学评价打基础。观察时间一般是 2 周,主要是考虑到受试物的迟发性中毒症状和迟发性死亡。本研究中的急性毒性实验也观察了 2 周,这就避免了山萸肉水提液出现迟缓的中毒症状,或出现迟发性死亡。研究山萸肉水提液的急性 LD₅₀,主要是为阐明外来化合物的剂量—效应关系,确定其急性毒性。本试验结果提示我们,山萸肉水提液在两周观察时间内,其 LD₅₀ 大于 10 g/kg,属于实际无毒物质。

3.2 在急性毒性试验得出 LD₅₀ 的情况下,进一步研究山萸肉水提液作为外来化合物进入人体是否具有蓄积性作用是蓄积毒性试验的主要目的。外来化合物对机体蓄积作用的过程主要分为物质蓄积和功能蓄积。物质蓄积主要是指外来物不断进入机体内,其吸收量大于排出量,使其在体内的量逐渐积累增多,这是一种量的蓄积。而功能蓄积是指外来物进入机体后,反复作用于机体,引起机体一定结构或功能的改变,功能改变的累积也必须以物质累积为基础,两者同时存在,互为基础,无法严格加以区别。如果将山萸肉开发为保健功能性食品后,会不会引起在体内的蓄积?本实验采用固定剂量法,反复 50 日接触 1/10 LD₅₀ 的山萸肉水提液,使其在实验动物体内的积累量大于 5 LD₅₀,此时,受试小鼠无死亡,而蓄积系数已经大于 5,按照我国《食品安全性毒理学评价程序》:当 K > 5 时受试物的蓄积毒性为弱蓄积性。徒手解剖各组试验动物,观察部分实验小鼠的肝、胃、睾丸等内脏器官,与阴性对照组对比,无明显差异。因而山萸肉水提液属于弱蓄积性物质。

3.3 有许多外来化合物在一定剂量范围内对母体并不引起损害作用,但对胚胎具有毒性作用,胚胎与致畸物发生接触时,可因胚胎所处的发育阶段不同而呈现不同的敏感性。胚胎在分化前期对药物不敏感,在分化早期却对药物高度敏感。到了性器官形成期,随胚胎胎龄的增长,对药物的敏感性又逐渐降低。一般认为,小鼠胚胎对药物的敏感期大约在妊娠的第 5~14 d,如果在这个时期让妊娠小鼠接触到待测物,即可检测出待测物对妊娠小鼠胚胎是否具有致畸作

产物(chlorinated by-products, CBPs)。CBPs 主要由含氯消毒剂与水中有机物反应生成,能诱导哺乳动物产生肿瘤^[3]。在 Ames 试验中,含氯消毒剂消毒后饮用水对沙门氏菌 TA₁₀₀ 株致突变活性是 TA₉₈ 株的 2~8 倍。且加入大鼠肝微粒体酶时活性降低(-S₉)提示饮用水致突变是以直接碱基置换型为主^[4]。本次试验,并未发现强氯净消毒剂对小鼠骨髓嗜多染红细胞有致突变作用,这可能与含氯消毒剂产生致突变能力的强弱,与水中污染有机物程度(尤其腐植酸)和氯化时间等因素有关^[4];臭氧具有较好的消毒效果,特别是作为空气和水的消毒越来越被广泛应用。但有人报道用臭氧发生器作用 15 min,纯净水中含亚硝酸盐 0.119 1~0.152 0 mg/L,自来水中含亚硝酸盐 0.112 9~0.162 6 mg/L,说明消毒后亚硝酸盐含量严重超标^[5]。本试验未发现高浓度臭氧水对小鼠骨髓嗜

(上接 174 页)

植物细胞中是基本相同的,并进一步说明植物根尖细胞 SCE 与人外周血淋巴细胞 SCE 在检测诱变剂作用本质上的一致性^[8]。Vig BK^[10]也早已发现,植物和动物之间对环境致突变物所引起的染色体畸变等定性反应的一致性可达 99% 以上。因此,推测钐离子对哺乳动物外周血淋巴细胞 SCE 的影响也可能存在与蚕豆根尖 SCE 相似的效应,暗示钐元素对人类可能具有潜在的遗传毒性。

参考文献:

- [1] Perry P and Evans HJ. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange[J]. *Nature*, 1975, 258(13): 121-125.
- [2] Wanjin X, Zili Z. A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens [J]. *Mutat Res*, 1990, 241: 109-113.
- [3] Zhang ZL, Yang J, Zhang Q, et al. Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents [J]. *Mutat Res*, 1991, 261: 69-73.

(上接 177 页)

用。本试验选择小鼠妊娠后第 4~16 d 给药,包括了小鼠胚胎的整个敏感期。结果表明,水提液对妊娠小鼠胚胎无致畸作用。在致畸活性和致畸部位上看,山萸肉水提液与阴性对照是基本一致的,因此认为液对脊椎动物胚胎无致畸作用。

综上所述,山萸肉水提液在本实验条件下对实验小鼠无急性毒性、蓄积毒性和胚胎毒性,为将其开发为新的保健食品资源提供了科学依据。

多染红细胞有致突变作用,今后应进一步探讨;戊二醛作为消毒和灭菌剂被广泛应用于医疗单位,其有较强的刺激性,同时也易引起变态反应,但未见报道有致突变作用;聚维酮碘溶液是一种无毒、无刺激的消毒剂,也未见报道有致突变作用,这与本次试验结果相一致。

参考文献:

- [1] 薛广波. 实用消毒学[M]. 北京:人民军医出版社,1986.
- [2] 卫生部. 消毒技术规范[S]. 2002. 126-143.
- [3] 林辉,刘建平. 氯消毒饮水的毒性及其流行病学研究进展[J]. 中国消毒学杂志,2000,17(2): 89-93.
- [4] 徐丹凤. 氯化饮水致突变性与腐植酸的关系[J]. 国外医学卫生学分册,1992,20(1): 20.
- [5] 魏兰芬,许激,林军明. 水中臭氧杀菌效果及产生亚硝酸盐量的检测[J]. 中国消毒学杂志,2002,19(1): 48-50.
- [4] 嵇庆,朱卫中,徐业义,等. 三种蚕豆品种在微核试验中的敏感性比较[J]. 徐州师范学院(自然科学版),1994,12(2): 50-52.
- [5] 张若桦. 稀土元素化学[M]. 天津:天津科学技术出版社,1987. 112.
- [6] Tempelaar, MJ, de Both MT, Versteegh JE. Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedures for *vicia faba* [J]. *Mutat Res*, 1982, 103(3-6): 321-326.
- [7] 孔志明,吴庆龙,夏恩中,等. 蚕豆 SCE 检测环境诱变剂的方法学研究[J]. 环境科学,1996,17(1): 47-49.
- [8] 邢万金,王宇一. 7 种农药对植物及人外周淋巴细胞 SCE 影响的比较观察[J]. 癌变·畸变·突变,2001,13(3): 172-174.
- [9] Maki-paakkanen J, Hayashi M, Suzuki T, et al. Analysis by fluorescence in situ hybridization with a mouse gamma satellite DNA probe of isolated micronuclei induced in mice by two clastogens and two spindle poisons[J]. *Mutagenesis*, 1995, 10(6): 513-516.
- [10] Vig BK. Somatic mosaicism in plants with special reference to somatic crossing over [J]. *Environ Health Prospect*, 1978, 27: 27-36.

参考文献:

- [1] 赵世萍,付桂香. 山萸萸化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药,1997,28(3): 187-188.
- [2] 刘保林,朱彤妮,禹志领,等. 山萸萸醇提物对实验动物血糖、血脂、血小板聚集的影响[J]. 中国药科大学学报,1992,23(1): 19-21.
- [3] 黄钰铃,呼世斌,刘音. 萸萸果实提取物抑菌作用研究[J]. 食品工业科技,2002,23(10): 31-32.
- [4] GB15193.14-1994.《食品安全性毒理学评价程序》[S].