

灰树花提取物的毒理安全性评价

汤 茜

成都市青羊区中医医院药剂科 四川成都 610000

〔摘要〕目的 对灰树花提取物进行毒理安全性评价。方法 以灰树花提取物灌胃小鼠进行急性毒性试验,三项遗传试验(Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验),并以 0.75、1.5、3.0g/kg.bw 3 个剂量组对大鼠进行 90d 喂养,观察生长发育情况,进行血液学及血液生化指标检测,脏器系数和病理组织学检查。结果 灰树花灌胃给药最大耐受剂量 > 12.5g/kg,属无毒级;三项遗传试验结果均为阴性;90d 喂养试验未见明显毒副作用。结论 灰树花安全无毒,可长期食用。

〔关键词〕灰树花;急性毒性;遗传毒性;长期毒性

〔中图分类号〕R115 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**2095-7165 (2021) 02-068-02

灰树花又名栗蘑、贝叶多孔菌、舞茸,属担子菌纲多孔菌科,是一种药食两用珍稀食用菌。灰树花提取物是从灰树花子实体中分离得到,其主要成分为真菌多糖。近年研究表明灰树花多糖具有增强免疫、抑制肿瘤、抗 HIV、稳定血压等生理活性^[1-3]。但安全性研究较少报道。本试验对灰树花提取物的急性毒性、遗传毒性及 90 天喂养试验进行了观察。

1 材料与与方法

1.1 试验动物

清洁级昆明种健康小鼠,20~22g;Wistar 大鼠,180~220g,购于成都达硕生物科技有限公司(许可证号:SCXK(川)2015-030号)。

1.2 菌株

鼠伤寒沙门菌突变型菌株 TA97、TA98、TA100 和 TA102 购于中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

1.3 受试物及工艺

灰树花提取物:棕褐色粉末,灰树花子实体经水提、浓缩,浓缩液加 95% 乙醇至含醇量 80%,醇沉 24h,过滤,沉淀干燥而得,提取率约 20%。

1.4 方法

1.4.1 急性毒性

灌胃前禁食 16h,不限饮水,以最大耐受剂量 12.5g/kg 灌胃后连续观察 14d,记录动物中毒症状及死亡情况。

1.4.2 遗传毒性

(1)Ames 试验 采用平板掺入法,浓度为 8、40、200、1000、5000 μg/皿 5 个剂量组。(2)小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 小鼠雌雄各半,随机分成 5 组(n=10),即 2.5、5.0、10.0g/kg 剂量组,环磷酰胺阳性对照组(40mg/kg)和阴性对照组。按 20ml/kg.bw 容量间隔 24h 灌胃 2 次,6h 后处死动物,取胸骨髓液、涂片、甲醇固定、Giemsa 染色。镜检 PCE,计算微核率。(3)小鼠精子畸形试验 雄性小鼠随机分成 5 组(n=10),即 2.5、5.0、10.0g/kg 剂量组,阴性对照组和环磷酰胺阳性对照组(40mg/kg)。按 20ml/kg.bw 容量灌胃 5d,继续喂养 1 月,35d 颈椎脱臼处死,每组随机选 5 只取两侧附睾,制成精子悬液,常规涂片,甲醇固定,用体积分数 1% 的伊红染色,10×40 倍显微镜下观察形态,记录畸形精子数,计算精子畸形率。

1.4.3 90d 毒性试验

Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,随机分为 0.75、1.5、3.0g/kg.bw 剂量组(相当于人体推荐量的 25、50、100 倍)和空白对照组,将提取物掺入饲料中喂养,自由饮食,连续喂养 13 周,观察动物的外观行为,记录体重增长、摄食量,计算食物利用率。末期禁食过夜,腹主动脉采血测定生化及血常规指标,解剖动物观察各脏器大体改变,摘取脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、睾丸/卵巢、

附睾/子宫、肾上腺、胸腺测定湿重,计算脏器比;取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑、垂体、甲状腺、胸腺、胃、十二指肠、胰脏、结肠、直肠、膀胱、淋巴结、肾上腺、睾丸、卵巢、子宫进行病理组织学观察,脏器石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色。

2 结果

2.1 急性毒性试验

小鼠灌胃后观察 14d,未见明显中毒症状和死亡。灰树花提取物灌胃给药最大耐受剂量 > 12.5g/kg,无急性毒性作用。

2.2 遗传毒性试验

2.2.1 Ames 试验

对 TA97、TA98、TA100 和 TA102 试验菌株,不同浓度提取物在加和不加 S9 条件下的回变菌落数与阴性对照组无显著差异,而阳性对照组回变菌落数均高于阴性对照组回变菌落数 2 倍以上。灰树花提取物细菌回复突变试验检测结果为阴性,重复试验仍得出相同结果。

2.2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

与阴性对照组比较,受试物各剂量组微核率差异无统计学意义(P > 0.05),环磷酰胺阳性对照组差异有统计学意义(P < 0.01)。

2.2.3 小鼠精子畸形试验

与阴性对照组比较,受试物各剂量组小鼠精子畸形率差异无统计学意义(P > 0.05),环磷酰胺阳性对照组差异有统计学意义(P < 0.01)。

2.3 90 天毒性试验

2.3.1 一般观察

试验期间各剂量组大鼠未见异常症状和体征,无死亡。

2.3.2 大鼠体重增重、总摄食量、总食物利用率

提取物各剂量组雌雄大鼠的增重及食物利用率与对照组比较,差异均无统计学意义(P > 0.05)。见表 1。

表 1: 对大鼠增重、进食量及食物利用率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (g/kg.bw)	增重 (g)	进食量 (g)	食物利用率 (g)
0	261.8±18.6	771.4±38.2	33.5±0.6
0.75	258.7±20.3	778.5±40.5	33.1±1.3
1.5	263.5±21.8	783.9±53.8	33.4±1.4
3.0	262.1±19.4	792.2±39.7	33.2±1.6

2.3.3 血液学及血液生化指标

各剂量组大鼠的血液学及血液生化指标均在正常参考值范围内。见表 2。

2.3.4 大体及病理组织学检查

与阴性对照组比较,各剂量组大鼠脏器重量差异无统计学意义(P > 0.05)。病理切片显微镜检查发现:阴性对照组 2 只雄鼠可见轻度胰腺腺泡间脂肪细胞浸润;高剂量组有 1 只雄鼠可见汇管

区轻度淋巴细胞浸润；阴性对照组 2 只雄鼠可见轻度肾间质淋巴细胞浸润；阴性对照组 1 只雄鼠可见轻度肾小管再生；高剂量组雌、雄大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑、垂体、甲状腺、胸腺、胃、十二指肠、胰脏、结肠、直肠、膀胱、淋巴结、肾上腺、睾丸、卵巢、子宫均未见明显与试验因素有关的病理组织学变化。灰树花提取物对试验大鼠大体解剖、组织学观察未见明显影响。

表 2: 对大鼠血液学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (g/kg, bw)	RBC($\times 10^{12}/L$)	Hb($\rho B/g \cdot L^{-1}$)	PLT($\times 10^9/L$)	WBC($\times 10^9/L$)	LYM (%)	MID (%)	GRA (%)
0	6.88±0.58	143.88±10.18	513.88±80.18	11.14±0.58	77.35±6.58	10.35±2.33	10.15±2.52
0.75	6.87±0.54	141.87±9.84	501.87±92.84	11.57±0.54	76.80±7.32	9.45±2.71	9.85±3.05
1.5	6.92±0.53	142.92±10.53	522.92±96.53	10.82±0.53	78.72±6.90	9.79±3.12	10.12±3.86
3.0	6.90±0.51	146.90±11.51	546.90±111.51	12.30±0.51	79.79±8.24	10.68±4.94	10.58±4.11

表 3: 对大鼠血液生化学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (g/kg, bw)	ALT(u/L)	AST(u/L)	ALP(u/L)	TP (g/L)	CHO (mmol/L)	BUN (mmol/L)	GLu (mmol/L)
0	51.4±6.3	119.4±14.3	67.1±6.3	52.3±1.3	1.3±0.2	9.0±0.8	7.0±0.7
0.75	52.6±4.9	117.6±16.5	66.4±7.9	53.7±1.9	1.2±0.1	8.7±1.1	6.8±0.6
1.5	49.2±7.3	111.3±13.8	69.5±7.2	54.5±3.2	1.4±0.3	8.5±0.5	7.1±0.4
3.0	50.3±5.5	112.8±12.6	65.9±8.4	54.6±2.4	1.2±0.2	8.6±0.6	6.6±0.7

3 小结与讨论

本研究测定灰树花毒性作用,结果表明,灰树花提取物灌胃给药最大耐受剂量>12.5g/kg,无急性毒性作用;三项遗传试验(Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验)结果均为阴性,无遗传毒性;长期毒性试验对血液学、血液生化学及重要组织形态学观察未见病理学改变。灰树花无毒副作用,长期用药安全。

[参考文献]

- [1] 李海花. 灰树花多糖的免疫作用实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(2): 365.
- [2] 肖正中, 郭苏晓. 灰树花多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34): 19310-19311、19313.
- [3] 田君琪, 韩晓伟. 灰树花对免疫系统的影响[J]. 吉林中医药, 2018, 38(10): 1203-1205.

(上接第 65 页)

3 讨论

特异性和非特异性免疫是免疫系统最重要组成部分,其中特异性免疫可分为细胞免疫和体液免疫。在细胞免疫中,T 淋巴细胞受到 ConA 刺激可增殖为成熟 T 淋巴细胞。成熟 T 淋巴细胞可分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ 2 个亚群,其中 CD4⁺T 细胞与相应抗原再次接触后,产生淋巴因子,通过炎症反应发挥效应。此外,IL-2 可通过刺激 T 淋巴细胞生长、增殖、分化来调节细胞免疫。在体液免疫中,B 淋巴细胞通过分泌抗体参与免疫调节。其中,IgM 是抗原诱导的体液免疫中最早合成并分泌的抗体,IgG 是机体再次免疫应答中的主要抗体,而 IL-4 又通过对 IgG 的促进作用间接调节体液免疫。NK 细胞和巨噬细胞则是非特异性免疫中的重要组成部分。

本实验结果显示,试食结束后,试食组受试者与对照组及自身相比,外周血 T 细胞淋巴计数、CD4⁺/CD8⁺、IL-2、IgG、IgM 含量均升高,NK 细胞活性增强,提升机体免疫力,表明灰树花、姬松茸、灵芝、蝙蝠蛾拟青霉菌粉等多种复合真菌具有提升免疫力

作用,且服用安全、无毒副作用,为下一步更多食用真菌的研究提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良等. 中国食用菌名录. 菌物学报[J], 2010, 29(1): 1-21.
- [2] 李月梅等. 食用菌的功能成分与保健功效[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 517、521.
- [3] 贺青提, 张松. 食(药)用菌多糖免疫增强作用机制的研究进展[J]. 食用菌学报, 2004, 11(2): 52-58.
- [4] 李月梅. 食用菌的功能成分与保健功效[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 517-521.
- [5] 李志涛, 赵娟娟, 王敏, 等. 复合食用菌多糖的免疫活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 39-42.
- [6] 隋明, 刘根娣, 杨晨. 红景天化工生产方法及对人体免疫功能的调节作用. 医药化工, 2020, 46(6): 216-217.

(上接第 66 页)

细胞压积、平均血红蛋白量等指标,以筛查有无贫血性疾病,然而血常规检测无法判定是否是地中海贫血,只是一种初次筛查方法。电泳检查是一种电泳分离与检测技术,以血红蛋白为中心,在不同 pH 值缓冲液中,血红蛋白分子分别携带有正极或负极电荷,受到电场作用,产生分离进而产生包含区带的电泳图谱,实施定量分析后,以筛查有无患上地中海贫血,并能够鉴别地中海贫血种类^[3]。

本研究,经 MCV、MCH 产前筛查,180 例孕妇中,表型阳性 37 例,于毛细血管电泳检查, α -地中海贫血拟确诊 21 例, β -地中海贫血拟确诊 10 例, α/β -地中海贫血拟确诊 2 例。经基因检测,

23 例为 α -地中海贫血中,其中静止型 9 例,标准型 14 例。10 例为 β -地中海贫血,数据对比有统计学意义($P < 0.05$)。

总结发现,对孕妇实施产前筛查与基因检测,可以有效预防地中海贫血。

[参考文献]

- [1] 吴碧云. 孕妇地中海贫血筛查与产前诊断分析[J]. 国际感染病学(电子版), 2019, 8(03):1-3.
- [2] 李韩梅. 产前检查中实施地中海贫血筛查的临床意义[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(55):176-177.
- [3] 杨帆, 李康生. 孕妇地中海贫血筛查及基因检测结果分析和临床意义[J]. 辽宁医学杂志, 2018, 32(2):30-32.

(上接第 67 页)

[参考文献]

- [1] 范海波. 全自动生化分析仪同快速血糖仪血糖检测结果对比分析[J]. 中国医疗器械信息, 2019, 25(23):160-161.
- [2] 尹发斌. 快速血糖仪与全自动生化分析仪监测血糖结果的

对比分析[J]. 中国医疗器械信息, 2019, 25(05):162-163.

[3] 张洪瑞, 周青雪, 董世雷, 等. 便携式血糖仪与生化分析仪血糖结果对比研究[J]. 中国现代医生, 2018, 56(25):135-139.

[4] 李贵梅, 陈卫文, 徐应波, 等. POCT 血糖仪与全自动生化分析仪血糖检测结果的对比[J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(08):106-109.