

彝良小草坝天麻急性毒性和诱变毒性作用的研究

刘敏, 秦光和, 赵青剑, 王伟, 冯丽, 胡嘉想, 李姿*

(云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022)

摘要: **目的** 研究彝良小草坝天麻的急性毒性和诱变毒性作用。**方法** 通过小鼠急性经口毒性实验、Ames实验、小鼠骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸形实验, 测定其急性毒性和遗传毒性作用。**结果** 小鼠急性经口毒性实验 $LD_{50} > 10000$ mg/kg·BW。Ames实验中, 各剂量组回复突变菌落数均未见明显增加($P > 0.05$), 亦无剂量-反应关系。小鼠骨髓细胞微核实验中, 各剂量组微核细胞率与阴性对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。小鼠精子畸变实验中, 各剂量组精子畸变率与阴性对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 该彝良小草坝天麻对昆明种小鼠属实际无毒, 在Ames实验中未呈现致突变作用, 未见诱导小鼠骨髓细胞微核形成的能力, 未见致小鼠精子畸变的能力。

关键词: 小草坝天麻; 急性毒性; LD_{50} ; Ames实验; 微核; 精子; 诱变

Study on the acute toxicity and mutagenicity of *Gastrodia elata* in Yiliang Xiaocaoba

LIU Min, QIN Guang-He, ZHAO Qing-Jian, WANG Wei, FENG Li, HU Jia-Xiang, LI Zi*

(Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China)

ABSTRACT: Objective To study the acute toxicity and potential mutagenicity of *Gastrodia elata* in Yiliang Xiaocaoba. **Methods** Acute toxicity and genetic toxicity of mice were determined by mouth toxicity test, Ames test, micronucleus test of mouse bone marrow cell and sperm abnormality test. **Results** In mouse acute oral toxicity test, LD_{50} was higher than 10000 mg/kg·BW. In the Ames test, there was no significant increase in the number of revertant colonies in each dose group ($P > 0.05$), and no dose-response relationship. In the micronucleus test of mouse bone marrow cell, there was no significant difference in micronucleus cell rate between each dose group and the negative control group ($P > 0.05$). In the sperm aberration test of mice, there was no significant difference in sperm aberration rate between each dose group and the negative control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The Yiliang xiaocaoba *Gastrodia elata* is actually non-toxic to Kunming mice, and shows no mutagenesis in Ames test, no ability to induce micronucleus formation of mouse bone marrow cell, and no ability to cause sperm distortion in mice.

KEY WORDS: *Gastrodia elata*; acute toxicity; LD_{50} ; Ames test; micronucleus; sperm; mutagenicity

基金项目: 云南省食品安全与营养研究中心项目

Fund: Supported by Yunnan Food Safety and Nutrition Research Center Project

*通讯作者: 李姿, 主管技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。E-mail: 63248889@qq.com

*Corresponding author: LI Zi, Technician, Safety Evaluation of Food Toxicology, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming, Yunnan 650022, China. E-mail: 63248889@qq.com

1 引言

天麻,为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎,具有息风止痉,平抑肝阳,祛风通络的功效^[1]。在民间一直有天麻炖鸡,天麻鱼头和天麻泡酒等食疗方法,用于治疗眩晕、头痛、肢体麻木、高血压等症状^[2,3]。也有研究报告,天麻具有改善睡眠、益智、改善记忆、安神、治疗老年性痴呆症明显等功效^[4-7]。云南省昭通彝良小草坝天麻含有丰富的人体必需微量营养元素^[8],是云南天麻的代表,素有“云天麻”之称^[9]。

有研究报告,天麻细粉片、天麻微粉均未见明显毒性和致突变作用^[10,11]。但对彝良小草坝天麻的毒性和致突变性研究鲜有报道。

为了进一步研究彝良小草坝天麻的食用安全性,本研究参照相关文献资料^[12,13],对彝良小草坝天麻进行了动物的急性毒性实验、Ames 实验、小鼠骨髓细胞微核实验和小鼠精子畸形实验,以期了解其急性毒性和诱变毒性作用,为彝良小草坝天麻的进一步研究和开发应用提供一定的科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

彝良小草坝天麻,购买于云南省昭通市彝良县小草坝。样品为乳白色固体,实验时,研磨成细粉,过100目筛,以纯水为溶剂配制各剂量受试物。

Ames 菌株和大鼠肝 S9(美国 MOLTOX 公司); Ames 培养基(英国 OXOID 公司); 敌克松、2-氨基苄、叠氮钠、2-氨基蒽、1,8-二羟基蒽醌、环磷酰胺(美国 Sigma 公司); Giemsa 染液、伊红染液(珠海贝索生物技术有限公司)。

DHG-9033BS-III 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); DM1000 型显微镜(德国莱卡公司); BF-240 恒温培养箱(德国 BINDER 公司); MP12001 干烤箱(上海精宏实验设备有限公司)。

2.2 实验动物

昆明种小鼠, SPF 级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号: SCXK-(湘)2016-0003。

2.3 环境条件

温度 20~25 °C,相对湿度 40%~70%,设施证号: SYXK(滇)K2015-0004。

2.4 实验方法

2.4.1 急性毒性实验

实验采用最大耐受量法。剂量为 10000 mg/kg BW 一个剂量组。20 只健康小鼠,雌雄各半,体重 18.0~22.0 g。

灌胃前动物禁食 16 h。以 0.2 mL/10 g·BW 两次经口灌胃,间隔 3 h,连续观察 14 d,记录动物中毒症状及死亡情况^[14]。

2.4.2 Ames 实验

实验菌株为鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100 和 TA102,大鼠肝 S9 混合液作为代谢活化系统。实验分别设 5 个剂量组,各剂量组彝良小草坝天麻浓度分别为每皿 5000、1000、200、40、8 μg,同时设溶剂对照(灭菌纯水)、阳性对照(敌克松、叠氮钠、2-氨基苄、1,4-二羟基蒽醌)及空白对照组。采用平板掺入法,每个菌株每个测试剂量均做 3 个平行皿,37 °C 下培养 48 h 后计数每皿回复突变菌落数^[14]。

2.4.3 小鼠骨髓细胞微核实验

实验采用 30 h 给受试物法。实验设 1250、2500、5000 mg/kg·BW 3 个剂量组、阴性对照组(纯水)及阳性对照组(环磷酰胺 40 mg/kg·BW)。选取体重为 25~30 g 健康昆明种小鼠 50 只,按体重随机分成 5 组,每组 10 只,雌雄各半。阴性对照组和 3 个彝良小草坝天麻剂量组经口灌胃给予受试物,阳性对照组采用腹腔注射。两次给受试物间隔 24 h,第 2 次给予受试物 6 h 后,处死小鼠,取股骨进行骨髓常规制片。Giemsa 染色后,每只小鼠计数 1000 个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)及 PCE 微核发生率。同时计数每 200 个 PCE 所观察到的成熟红细胞(red blood cell, RBC)数^[14]。

2.4.4 小鼠精子畸形实验

高剂量组根据一次最大灌胃剂量进行设计,实验设 1250、2500、5000 mg/kg·BW 3 个剂量组和阴性对照组、阳性对照组(环磷酰胺 40 mg/kg·BW)。选取体重为 28~35 g 健康昆明种雄性小鼠 25 只,按体重随机分成 5 组,每组 5 只。以 0.2 mL/10 g·BW 经口灌胃给予受试物,阳性对照组采用腹腔注射。连续给予受试物 5 d,于第 1 次给予受试物后第 35 d 处死动物,取双侧附睾按常规制片染色镜检。每只动物观察 1000 个精子,记录畸形精子数和畸变类型,计算畸变率^[14]。

2.5 统计学处理

统计学处理用卡方检验和方差分析,采用 SPSS 统计软件处理数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 急性经口毒性实验

受试动物在观察期间,未见异常表现,未出现死亡。所有动物大体解剖未见病理改变。在本实验中,彝良小草坝天麻对昆明种雌、雄性小鼠急性经口毒性 $LD_{50} > 10000$ mg/kg·BW,属实际无毒级物质。

3.2 Ames 实验

进行了 2 次测试, 如表 1、表 2 所示, 2 次实验, 空白对照组各菌株自发回复突变菌落数均在正常范围内; 实验结果显示, 在加与不加 S9 时, 受试样品各剂量组回复突变菌落数均未见明显增加, 未超过自发回复突变菌落数的 2 倍及以上, 亦无剂量-反应关系($P>0.05$)。结果表明, 在本次实验条件下, 彝良小草坝天麻没有诱导 TA97、TA98、TA100 和 TA102 回复突变的能力。

3.3 骨髓细胞微核实验

如表 3 所示, 彝良小草坝天麻各剂量组 PCE/RBC 均在正常值范围内, 未明显少于阴性对照组, 说明实验染毒剂量合适。阳性对照组微核率与阴性对照组及各剂量组比较差异均有统计学意义($P<0.01$); 阴性对照组及各剂量组

微核率均在本实验室以往的正常值范围内(微核率 $<5\%$), 说明实验结果可靠。彝良小草坝天麻 3 个剂量组微核率与阴性对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 结果表明, 在本次实验条件下, 彝良小草坝天麻未使小鼠骨髓 PCE 微核率发生明显改变。

3.4 小鼠精子畸变实验

如表 4 所示, 彝良小草坝天麻各剂量组和阴性对照组的精子畸变率与阳性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$), 且精子畸变率均在本实验室以往的正常值范围内(精子畸变率 0.8~2.4%), 说明实验结果可靠。彝良小草坝天麻 3 个剂量组精子畸变率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 结果表明, 在本次实验条件下, 彝良小草坝天麻未使小鼠精子畸变率发生明显改变。

表 1 Ames 第一次实验结果($n=3$)
Table 1 Results of the first Ames experiment ($n=3$)

剂量	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	131 \pm 14	135 \pm 11	37 \pm 2	41 \pm 5	154 \pm 4	153 \pm 14	277 \pm 19	283 \pm 4
1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	131 \pm 19	132 \pm 23	37 \pm 4	39 \pm 5	151 \pm 25	154 \pm 12	270 \pm 23	285 \pm 9
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	143 \pm 20	138 \pm 19	37 \pm 4	39 \pm 5	145 \pm 16	153 \pm 21	293 \pm 11	260 \pm 9
40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	136 \pm 21	137 \pm 12	38 \pm 5	36 \pm 2	145 \pm 18	154 \pm 12	259 \pm 12	277 \pm 17
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	135 \pm 11	135 \pm 19	37 \pm 4	36 \pm 4	159 \pm 15	168 \pm 14	268 \pm 14	286 \pm 16
空白对照	137 \pm 25	139 \pm 19	38 \pm 2	38 \pm 5	150 \pm 24	151 \pm 14	287 \pm 21	274 \pm 16
溶剂对照	129 \pm 25	126 \pm 33	36 \pm 3	41 \pm 4	158 \pm 15	151 \pm 20	268 \pm 25	273 \pm 15
阳性对照	2643 \pm 84**	1693 \pm 82**	1239 \pm 47**	6075 \pm 206**	2981 \pm 71**	3104 \pm 21**	917 \pm 36**	923 \pm 46**

注: **表示与空白对照组比较, $P<0.01$ 。阳性对照: TA97、TA98、TA102-S9 用敌克松 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; TA100-S9 用叠氮钠 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; TA97、TA98、TA100+S9 用 2-氨基苄 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; TA102+S9 用 1,4-二羟基蒽醌 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

表 2 Ames 第二次实验结果($n=3$)
Table 2 Results of the second Ames experiment ($n=3$)

剂量 $\mu\text{g}/\text{ml}$	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
5000	126 \pm 26	131 \pm 20	38 \pm 3	40 \pm 4	155 \pm 7	148 \pm 15	279 \pm 24	283 \pm 14
1000	129 \pm 17	126 \pm 21	33 \pm 2	41 \pm 3	149 \pm 6	163 \pm 20	273 \pm 19	267 \pm 15
200	134 \pm 16	136 \pm 19	38 \pm 3	37 \pm 4	152 \pm 19	158 \pm 15	273 \pm 19	278 \pm 7
40	131 \pm 20	140 \pm 13	37 \pm 3	40 \pm 4	154 \pm 12	170 \pm 13	274 \pm 24	280 \pm 11
8	142 \pm 26	151 \pm 9	36 \pm 3	37 \pm 4	149 \pm 12	167 \pm 11	274 \pm 6	280 \pm 12
空白对照	124 \pm 18	127 \pm 28	37 \pm 4	41 \pm 2	157 \pm 16	153 \pm 16	273 \pm 24	274 \pm 10
溶剂对照	142 \pm 28	144 \pm 17	37 \pm 2	38 \pm 2	151 \pm 26	155 \pm 20	291 \pm 17	278 \pm 10
阳性对照	2693 \pm 100**	1725 \pm 25**	1180 \pm 48**	6069 \pm 199**	3027 \pm 87**	3061 \pm 36**	885 \pm 36**	908 \pm 27**

注: **表示与空白对照组比较, $P<0.01$ 。阳性对照: TA97、TA98、TA102-S9 用敌克松 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; TA100-S9 用叠氮钠 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; TA97、TA98、TA100+S9 用 2-氨基苄 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; TA102+S9 用 1,4-二羟基蒽醌 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

表 3 彝良小草坝天麻小鼠骨髓细胞微核实验结果
Table 3 Results of mouse bone marrow micronucleus test of microbial flocculant

性别	组别	观察 PCE 数	微核数	微核率 /%	PCE /RBC
雄	1250 mg/kg·BW	5000	7	1.4	1.08
	2500 mg/kg·BW	5000	4	0.8	1.04
	5000 mg/kg·BW	5000	8	1.6	1.08
	阴性对照	5000	8	1.6	1.08
	阳性对照	5000	107	21.4**	1.10
雌	1250 mg/kg·BW	5000	6	1.2	1.07
	2500 mg/kg·BW	5000	7	1.4	1.05
	5000 mg/kg·BW	5000	8	1.6	1.05
	阴性对照	5000	7	1.6	0.98
	阳性对照	5000	101	20.2**	1.05

注: **表示与阴性对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 4 小鼠精子畸变实验结果
Table 4 Results of mice sperm abnormality test

性别	组别	观察精子数 /n	畸变精子数 /n	畸变率 /%
雄	1250 mg/kg·BW	5000	79	1.58
	2500 mg/kg·BW	5000	84	1.68
	5000 mg/kg·BW	5000	97	1.94
	阴性对照	5000	82	1.64
	阳性对照	5000	293	5.86**

注: **表示与阴性对照组比较, $P < 0.01$ 。

4 结 论

云南省昭通市彝良县地处云南省东北部的云、贵、川三省结合部的乌蒙山区, 生态环境敏感脆弱, 经济结构层次低, 经济发展滞后, 但彝良县生物资源较为丰富, 近年来大力发展天麻种植产业, 彝良县已成为全国首个天麻有机产品认证示范县。彝良小草坝天麻天麻素平均含量达 1.13%, 天麻多糖含量 10.4%~21.6%, 均高于其他地区^[15-17]。国家前卫生部已将天麻列入“可用于保健食品的物品名单”, 但是以天麻为原料的保健食品品种单一, 彝良县的天麻产业更是多以粗加工为主, 无法创造出更大的经济效益^[18]。本研究选用急性经口毒性实验、Ames 实验、骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸变实验, 从急性毒性、细菌回复突变和体细胞微核形成等几个不同角度对彝良小草坝天麻进行了急性性和致突变性的评价, 旨在为彝良小草坝天麻的进一步研究和保健食品等新产品的开发提供科学数据。

急性经口毒性实验是检测和评价受试物毒性作用最基本的一项实验, 在短期内观察动物所产生的毒性反应。Ames 实验用于检测有害物质的体外致突变性, 主要检测的遗传学终点为基因内的点突变和移码突变, 具有快速、有效、经济的特点。骨髓细胞微核实验是一种用于检测体内染色体损伤突变和干扰细胞有丝分裂的化学毒物的实验方法^[19]。在本研究中, 该彝良小草坝天麻属实际无毒级物质, 在 Ames 实验中未呈现致突变性, 也未见诱导小鼠骨髓细胞微核形成和精子畸变的能力。

综上所述, 在本实验条件和剂量范围内, 未发现本彝良小草坝天麻受试物的急性毒性和诱变毒性作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2015 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [2] Jang JH, Son Y, Kang SS, et al. Neuropharmacological potential of *Gastrodia elata* blume and its components [J]. Evid-based Compl Alt, 2015, 2015(10): 226-227.
- [3] Hu Y, Li C, Wei S. Gastrodin all eviates memory deficits and reduces neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neuro Pathol, 2014, 34(4): 370-377.
- [4] 齐丽娟, 高珊, 马玲, 等. 天麻改善睡眠功能的实验研究[J]. 首都公共卫生, 2012, 6(2): 66-68.
Qi LJ, Gao S, Ma L, et al. An experimental study of the effect of *Gastrodia elata* on sleeping [J]. Capit J Publ Health, 2012, 6(2): 66-68.
- [5] 李永利, 于滨. 天麻粉片改善睡眠的实验研究[J]. 中国医药导报, 2009, 6(16): 39-41.
Li YL, Yu B. An experimental study of effect of *Gastrodia* tablets on sleep [J]. China Med Herald, 2009, 6(16): 39-41.
- [6] 张乐多, 龚晓健, 胡苗苗, 等. 天麻素抗血管性痴呆作用及其机理[J]. 中国天然药物, 2008, 6(2):130-134.
Zhang LD, Gong XJ, Hu MM, et al. Anti-vascular dementia effect of gastrodin and its mechanism [J]. Chin J Nat Med, 2008, 6(2): 130-134.
- [7] 高冬丽, 潘娅, 李永江, 等. 天麻素对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马 p53 表达的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2009, 34(4): 382-385.
Gao DL, Pan Y, Li YJ, et al. Effects of gastrodin on learning and memory ability and p53 expression in hippocampus of rats with vascular dementia [J]. J Guizhou Med Univ, 2009, 34(4): 382-385.
- [8] 赵晓慧, 徐丹先, 栾杰, 等. 昭通彝良小草坝新鲜天麻营养成分分析评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(10): 3727-3731.
Zhao XH, Xu DX, Luan J, et al. Evaluation and analysis of nutritional components of fresh *Gastrodia elata* in Xiaocaoba, Zhaotong [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(10): 3727-3731.
- [9] 彝良县政府. 云南省彝良县小草坝优质天麻[J]. 云南农业科技, 2004, (1): 10-12.
Yiliang County People's Government. Yiliang county Xiaocaoba quality *Gastrodia elata* [J]. Yunnan Agric Sci Technol, 2004, (1): 10-12.
- [10] 于滨, 左增艳, 孔维佳. 天麻细粉片毒性及安全性的实验研究[J]. 中国当代医药, 2014, 21(21): 6-10.

- Yu B, Zuo ZY, Kong WJ. Experimental studies of the toxicity and safety of *Gastrodia elata* powder tablets [J]. *China Mod Med*, 2014, 21(21): 6–10.
- [11] 田好亮, 李立, 王勇, 等. 天麻微粉的毒理学安全性评价[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, (15): 2161–2164.
Tian HL, Li L, Wang Y, *et al.* Toxicological assessment on safety of superfine rhizoma *Gastrodiae* powder [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, (15): 2161–2164.
- [12] 张爱华, 孙志伟. 毒理学基础[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
Zhang AH, Sun ZW. *Toxicology foundation* [M]. Beijing: Science Press, 2008.
- [13] 孙志伟, 陈雯, 周建伟. 毒理学基础第 7 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
Sun ZW, Cheng W, Zhou JW. *Toxicology foundation(7nd Ed)* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S].
Ministry of Health, PRC. *Technical standards for testing and assessment of health food* [S].
- [15] 肖薇, 尹珉, 庄志宏, 等. 不同产地天麻中天麻素含量的测定[J]. *北京中医药*, 2011, 30(12): 945–946.
Xiao W, Yin M, Zhuang ZH, *et al.* Determination of gastrodin in *Gastrodia elata* from different origins [J]. *Beijing J Trad Chin Med*, 2011, 30(12): 945–946.
- [16] 王韬, 仇全雷, 杜艳仓, 等. 云南昭通天麻多糖含量测定[J]. *西南林业大学学报*, 2011, 31(1): 31–33.
Wang T, Qiu QL, Du YC, *et al.* Determination of polysaccharide content in *Gastrodia elata* in Zhaotong, Yunnan [J]. *J Southwest Forest Univ*, 2011, 31(1): 31–33.
- [17] 黄先敏, 凌敏, 杨正贤, 等. 不同产地天麻多糖含量测定分析[J]. *现代农业科技*, 2017, (6): 259–259.
Huang XM, Lin M, Yang ZX, *et al.* Determination and analysis of polysaccharide content in *Gastrodia elata* from different habitats [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2017, (6): 259–259.
- [18] 李娟娟, 刘志涛, 王晓雯, 等. 天麻的研究现状与展望[J]. *中国民族民间医药*, 2014, 14: 16–17.
Li JJ, Liu ZZ, Wang XX, *et al.* Research status and prospect of *Gastrodia elata* [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2014, 14: 16–17.
- [19] 李寿祺. 毒理学原理与方法第 2 版[M]. 成都: 四川大学出版社, 2003.
Li SQ. *Principles and methods of toxicology (2nd Ed)* [M]. Chengdu: Sichuan University Press, 2003.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘 敏, 副主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。
E-mail: 108616255@qq.com



李 姿, 主管技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。
E-mail: 63248889@qq.com