

食叶草粉对SD大鼠的致畸性研究

楼敏涵, 张丽婧, 梅松, 骆华星, 刘臻, 刘冬英, 胡志航, 陈建国,
曲雪峰, 胡文力, 翟兵中, 王茵*

(杭州医学院保健食品研究所, 杭州 330013)

摘要: **目的** 探究食叶草粉对SD大鼠的母体毒性、胚胎毒性和致畸性。**方法** 受孕SD大鼠按体重随机分组, 每组不少于16只, 设溶剂对照组(蒸馏水)和食叶草粉低、中、高剂量组(分别为0.42、0.84、1.67 g/kg BW)。在受孕第6~15 d, 每日以10 mL/kg BW灌胃给予受试物或等量蒸馏水。观察、记录孕鼠临床表现和体重, 于孕期第20 d称重并处死母鼠, 检查孕鼠妊娠情况和胎鼠发育状况, 包括黄体数、死胎数、吸收胎数、活胎数, 胎仔性别、体重、体长、尾长, 观察有无骨骼畸形和内脏畸形。**结果** 将各剂量组的各项指标与溶剂对照组指标进行比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 食叶草粉在本实验条件下对SD大鼠无母体毒性、胚胎毒性和致畸性。

关键词: 食叶草; 致畸性; 胚胎; 母体毒性; 大鼠

Study on the teratogenicity of edible dock powder on SD rats

LOU Min-Han, ZHANG Li-Jing, MEI Song, LUO Hua-Xing, LIU Zhen, LIU Dong-Ying, HU Zhi-Hang,
CHEN Jian-Guo, QU Xue-Feng, HU Wen-Li, ZHAI Bing-Zhong, WANG Yin*

(Health Food Research Institute, Hangzhou Medical College, Hangzhou 330013, China)

ABSTRACT: Objective To explore the maternal toxicity, embryo toxicity and teratogenicity of edible dock powder in SD rats. **Methods** Pregnant SD rats were randomly divided into groups according to body weight, no less than 16 rats in each group. Solvent control group (distilled water) and low, medium and high dose groups of grass meal (0.42, 0.84 and 1.67 g/kg BW, respectively) were set. During the 6th to the 15th day of gestation, the maternal rats were orally given distilled water or edible dock powder at 10 mL/kg BW once daily, respectively. In the course of the study, clinical manifestations and body weights of the pregnant rats were observed and recorded weekly. The pregnant rats were weighted and humanely sacrificed on the 20th day in pregnancy. Pregnancy of rats and fetal development were examined, including the numbers of corpus luteum, died fetuses, absorbed fetuses and living fetuses, the gender, body weight, body length, tail length and deformity of the fetal rats. **Results** There was no significant difference between the indexes of each dose group and those of the solvent control group ($P>0.05$). **Conclusion** Edible dock powder has no maternal toxicity, embryo toxicity and teratogenicity to SD rats under the experimental conditions

基金项目: 浙江省医学支撑学科营养学项目(16-zc03)、浙江省中医药科技计划重点项目(2019ZZ005)、浙江省自然科学基金项目(LQ18H260003)

Fund: Supported by the Zhejiang Medical Support Discipline of Nutrition (16-zc03), Zhejiang TCM Science and Technology Plan Key Project (2019ZZ005), and the Zhejiang Natural Science Foundation (LQ18H260003)

*通信作者: 王茵, 教授, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: wy3333@163.com

*Corresponding author: WANG Yin, Professor, Hangzhou Medical College, No.182, Tianmushan Road, Xihu District, Hangzhou 330013, China. E-mail: wy3333@163.com

KEY WORDS: edible dock; teratogenicity; embryos; maternal toxicity; rat

0 引言

食叶草 (*Rumex patientia* L. × *Rumex tianschanicus* A. LOS), 又名“蛋白草”, 属蓼科酸模属植物, 是以鲁梅克斯 K-1 (*Rumex patientia* L. × *Rumex tianschanicus* cv. *Rumex* K-1) 为母本, 巴天酸模 (*Rumex patientia* L.) 为父本, 经杂交选育而来的植物品种。母本鲁梅克斯 K-1 由乌克兰科研人员杂交育种研发, 并于 20 世纪 90 年代由新疆农业大学引入国内, 具有粗蛋白含量高的特点, 在干旱、盐碱及低温地区能正常生长, 已在国内作为饲草安全使用多年^[1]。赵霖等^[2]以鲁梅克斯 K-1 饲料饲喂 Wistar 大鼠, 发现受试大鼠肝脏中丙二醛的含量较对照组显著降低, 且未观察到其他不良反应, 提示鲁梅克斯 K-1 具有一定的抗氧化功能, 并认为该种酸模植物有望成为可供日常食用的蔬菜。另据《中国植物志》^[3]记载, 父本巴天酸模遍布我国东北、华北、西北、山东、河南、湖南、湖北及川藏地区, 生长区域平均海拔为 20~4000 m, 能适应我国大部分自然环境, 在马其顿地区被用作食物馅料食用^[4]。

食叶草结合其父本与母本的优良性状, 具有营养丰富、适口性好、对环境适应性强等特点。据权威机构检测报告显示, 新鲜食叶草中的蛋白质含量可高达 4.5%, 与《中国食物成分表》^[5]中记录的数据相比, 其蛋白质含量分别是大白菜、苋菜、菠菜、油菜中蛋白质含量的 3.0、1.6、1.73 和 2.5 倍, 与大豆蛋白质含量相当, 不失为一种植物蛋白的新来源; 食叶草富含矿物质钾, 含量可达 2805 mg/100 g, 是菠菜中钾元素含量(311.0 mg/kg) 的 9.02 倍^[6]; 除此之外, 食叶草含有 8 种必需氨基酸和生物活性物质超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 营养价值较高, 具有成为新食品原料的潜力^[7]。食叶草经品种选育, 具有父本和母本耐寒耐旱、抗盐碱的生物特性, 在重度盐碱胁迫条件下, 其种子也能正常萌发^[8], 在盐碱地中快速生根发芽, 适应我国大部分地区的气候及土壤条件, 易于种植和管理。目前, 食叶草已在我国新疆、黑龙江、河北、河南、山东、山西、陕西、甘肃、北京、天津、浙江、江西、江苏、广东、广西、吉林、黑辽宁、内蒙等地种植。

当前, 国内对食叶草的研究主要集中于土壤改良、蛋白肥、饲料和食品研制等^[9-11], 其毒理学及安全性研究尚未涉及。因此, 本研究按照 GB 15193.14—2015《食品安全国家标准 致畸试验》^[12]的规定, 对 SD 孕鼠连续经口给予食叶草粉, 观察该物质对孕鼠是否具有母体毒性、胚胎毒性和致畸毒性, 对其安全性进行毒理学评价, 为其进一步开发为新食品原料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试物

食叶草粉为墨绿色疏松粉末, 由浙江省食叶草农业技术有限公司提供。以新鲜的食叶草(蛋白草)为原料, 经去杂、切段、杀青、沥水、烘干、粉碎等工艺, 制得 120~180 目食叶草粉样品。每 10 g 新鲜食叶草可得食叶草粉 1 g。

1.1.2 实验动物

选用体重为 200~220 g 的 SPF 级健康 SD 大鼠, 雌性大鼠 100 只, 雄性大鼠 30 只。动物饲养于不锈钢饲养笼中, 饲养室环境温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~70%。上述 SD 大鼠由浙江省实验动物中心提供。实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2014-0001, 实验动物使用许可证号为 SYXK(浙)2016-0022。实验用基础饲料由浙江省实验动物中心提供, 执行标准为 GB 14924—2010。在实验过程中小鼠享受良好的动物福利, 本实验项目由浙江省医学科学院动物福利委员会审查批准, 编号为 2018-098。

1.1.3 仪器与试剂

CKX41 型倒置生物显微镜(日本 OLYMPUS 公司); 111-101-10G 型游标卡尺(中国桂林广陆数字测控有限公司, 精度±0.03 mm)。

甲醛(分析纯, 无锡市展望化工试剂有限公司); 氢氧化钾、乙酸、水合氯醛(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司); 丙三醇(分析纯, 南京化学试剂有限公司); 茜红素、无水乙醇(分析纯, 中国上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 2,4,6-三硝基酚(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 氯化钠注射液(国药准字 H51021158, 四川科伦药业股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 剂量设计

参照最大可灌胃剂量设溶剂对照组和食叶草粉剂量组(0.42、0.84、1.67 g/kg·BW)。依据上述剂量要求, 称取食叶草粉 12.5、25.0 和 50.0 g, 分别于 300 mL 蒸馏水中混匀并保存在 4 °C 冰箱, 每周配制。每天按 10 mL/kg·BW 的灌胃剂量将上述样品给予受试动物。溶剂对照组按相同灌胃剂量给予等量蒸馏水。

1.2.2 方法

本实验按照 GB 15193.14—2015^[12]的规定执行。将雌、雄大鼠以 2:1 的比例同笼, 过夜后于次日早晨用棉棒沾取生理盐水对雌性大鼠阴道内分泌物取样后涂片, 在显微镜下观察有精子者即可认定其为受精鼠, 受精当天即为受孕 0 d。将受精鼠编号并称重、记录体重后, 随机分为 4 组, 分

别对应溶剂对照组和低、中、高剂量组(0.42、0.84、1.67 g/kg·BW),且每个剂量水平的孕鼠不少于16只,以保证各组均能获得足够的胎仔用于评价食叶草粉的致畸作用。实验中孕鼠自由进食和饮水,观察记录动物的一般表现、行为,有无中毒体征、流产及死亡等情况;在受孕的6~15 d,每天经口灌胃给予受试物,并记录大鼠在孕期第0、6、9、12、15、20 d的体重。孕期第20 d处死母鼠并剖腹取出子宫及卵巢,检查并记录黄体数、活胎数、吸收胎及死胎数。逐一记录活胎仔的体长、尾长、体重及性别,检查有无外观畸形。完成后,自每窝活胎仔中取1/2浸入95%乙醇中固定3周,取出以流水淋洗并再次浸入2%氢氧化钾溶液中透明2~3 d。取出后置于茜素红应用液中对骨骼进行染色,以头骨染红为宜。经透明后,将标本置于小平皿中,在透射光源下观察骨骼畸形。剩余1/2活胎仔则浸入Bouins液(甲醛、乙酸、2,4,6-三硝基酚)中固定,用以观察内脏畸形。

1.2.3 统计分析

本实验数据均采用SPSS 13.0软件进行统计学处理。计算各个观察指标的平均数、标准差、发生率等,其中计量数据的分析均采用方差分析;计数数据的分析则采用卡方检验。胎鼠相关指标的统计以窝为单位进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 孕鼠一般情况观察结果

研究期间,各食叶草剂量组和溶剂对照组孕鼠日常活动、摄食、饮水等均未见异常,且各组孕鼠体重增重情况良好,未观察到中毒表现和体征,也无孕鼠流产及死亡现象。由表1可见,与溶剂对照组相比,食叶草粉低、中、高剂量组孕鼠在0、6、9、12、15、20 d的体重、增重及净增重,均无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 孕鼠生殖能力观察结果

溶剂对照组和食叶草各剂量组大鼠受孕数、孕鼠黄体数、着床数、吸收胎数、死胎数、活胎数、着床前死亡数及上述各指标的百分率见表2。与对照组相比,各剂量组大鼠受孕率无统计学差异($\chi^2=0.518, P>0.05$);各剂量组孕鼠黄体数、窝平均活胎数均无显著性差异($F=0.138, P>0.05$; $F=0.085, P>0.05$)。剂量组吸收胎数、死胎数及活胎数与对照组相比,差异均无统计学意义($\chi^2=0.812, P>0.05$)。各剂量组着床率、着床前死亡率与溶剂对照组相比,差异无统计学意义($\chi^2=0.145, P>0.05$)。研究期间未观察到食叶草粉对孕鼠生殖功能产生损害性影响。

表1 食叶草粉对孕鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of edible dock powder on the body weights of pregnant rats($\bar{x} \pm s$)

组别	受精鼠(n)	受孕鼠(n)	体重/g						增重/g	净增重/g
			0 d	6 d	9 d	12 d	15 d	20 d		
对照组	19	16	203.5±10.4	242.9±12.6	255.7±11.4	274.8±12.6	297.4±12.7	358.0±24.9	115.1±22.7	46.9±12.5
低剂量组	19	16	203.9±19.9	245.1±20.4	259.6±22.8	275.8±22.7	301.9±24.8	356.9±34.3	111.8±25.3	46.4±13.7
中剂量组	19	16	200.6±19.7	241.5±18.9	261.1±18.1	285.3±17.8	309.3±20.7	362.9±33.9	121.4±25.3	52.5±17.2
高剂量组	19	17	202.7±11.6	241.7±13.0	254.3±14.7	269.1±21.0	294.1±21.6	354.7±22.2	113.0±18.5	46.1±15.9
F值			0.135	0.155	0.566	2.078	1.683	0.232	0.554	0.669
P值			0.939	0.926	0.639	0.112	0.180	0.874	0.647	0.574

表2 食叶草粉对孕鼠生殖功能的影响

Table 2 Effect of edible dock powder on the reproductive function of pregnant rats

组别	受精鼠数(n)	受孕鼠数(%)	黄体数(n)	着床数(%)	吸收胎数(%)	死胎数(%)	活胎数(%)	窝平均活胎数($\bar{x} \pm s$)	着床前死亡数(%)
对照组	19	16(84.2)	243	176(72.4)	4(2.3)	2(1.1)	170(96.6)	10.6±2.9	67(27.6)
低剂量组	19	16(84.2)	236	169(71.6)	4(2.4)	2(1.2)	163(96.4)	10.2±3.5	67(28.4)
中剂量组	19	16(84.2)	244	178(73.0)	5(2.8)	3(1.7)	170(95.5)	10.6±4.2	66(27.0)
高剂量组	19	17(89.5)	251	180(71.7)	4(2.2)	2(1.1)	174(96.7)	10.2±2.5	71(28.3)

2.4.3 内脏畸形

溶剂对照组和各食叶草剂量组均未观察到胎鼠内脏畸形的发生,在本研究条件下,未见食叶草(粉)对胎鼠内脏畸形的发生产生影响,见表6。

表6 食叶草对胎鼠内脏畸形的影响
Table 6 Effect of edible dock powder on the viscera deformity of fetal rats

组别	受检胎鼠数(n)	内脏畸形率/%			
		鼻腔充血	脑室充血	肾脏萎缩	上颌裂
对照组	82	0	0	0	0
低剂量组	78	0	0	0	0
中剂量组	85	0	0	0	0
高剂量组	84	0	0	0	0

3 结论与讨论

据国家统计局数据显示,1983年到2015年期间,我国农村居民蛋白质来源以植物蛋白为主,植物蛋白的摄入量占蛋白质总摄入量的85.67%;2013年后,城镇居民对植物蛋白的需求不断上升,植物来源的蛋白质摄入量增长较大,而粮食依然是我国居民日常膳食中植物蛋白的最主要来源^[13]。食叶草的主要营养成分包括蛋白质、脂肪、碳水化合物、18种氨基酸(尤其是人体必需氨基酸)、维生素、矿物质等,有研究人员将干制食叶草的营养成分与传统粮食(大米、小麦、玉米)对比后发现,食叶草(干)中蛋白质含量约为我国主要粮食的3~4倍,胡萝卜素及矿物质元素钾、钙、镁、锌含量与粮食相比具有明显优势^[14]。因此,将食叶草作为一种可日常食用的蔬菜,既能满足我国居民对植物性蛋白选择多样化的需求,更为拓展植物性食品来源提供了资源。

我国及世界多地均有食用酸模属植物的习惯。《中国植物志》中记载,“酸模又名遏蓝菜,全草供药用,有凉血、解毒之效;嫩茎、叶可做蔬菜及饲料”。《A Modern Herbal》^[15]一书中记载,部分酸模属植物的食用历史最早可追溯至亨利八世时期,酸模植物叶常作为蔬菜或制成沙拉供人们食用。在葡萄牙、西班牙、意大利、斯洛文尼亚、波黑、阿尔巴尼亚、巴勒斯坦以及墨西哥等地中海地区也有将酸模属植物的茎叶制成沙拉、配菜等食用的习惯^[16]。食叶草经杂交选育获得父本及母本的优良性状,蛋白质含量与常用叶类蔬菜相比有较大优势,同时在长期选育过程中改善了酸模属植物普遍具有的酸、涩口感,具有成为新食品原料的潜力。鉴于食叶草可在盐碱、干旱及低温地区生长,产量高,生长周期短,亦可作为蔬菜类经济作物在我国大部分地区推广种植。为验证食叶草的食用安全性,本研究对食叶草粉进行了传统的致畸实验,以期通过观察不同剂量

浓度下食叶草粉对实验动物母体、生殖功能、胚胎发育等方面的影响,从而评价食叶草对人体的致畸作用。

本研究结果表明,在本实验条件下,对各剂量组大鼠经口灌胃给予食叶草粉(0.42、0.84、1.67 g/kg BW)后,未见孕鼠饮食减少及出现中毒体征,也无孕鼠死亡;各组孕鼠生殖功能、胎鼠发育均无显著损害性影响,证明食叶草粉在本实验条件下对SD大鼠无母体毒性、致畸性和胚胎毒性。该结论可为食叶草的安全性评价提供毒理学支持。

参考文献

- [1] 姚焱,张平,章苗萌. 鲁梅克斯 K-1 杂交酸模的品种特性及产业化发展[J]. 中国医学生物技术应用, 2002, (3): 67-70.
YAO Y, ZHANG P, ZHANG ZM. The variety characteristics and industrial development of Rumex K-1 [J]. Chin Acad Med Magaz Org, 2002, (3): 67-70.
- [2] 赵霖,鲍善芬,宋曙辉,等. 蔬菜新资源鲁梅克斯 K-1 杂交酸模营养生理功能的研究[J]. 军医进修学院学报, 2002, 23(3): 206-208.
ZHAO L, BAO SF, SONG SH, et al. Study on the nutritional function of a new kind of vegetables-Rumex K-1 [J]. Acad J Chin PLA Med School, 2002, 23(3): 206-08.
- [3] 吴征镒,洪德元. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
WU ZY, HONG DY. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [4] PIERONI A, REXHEPI B, NEDELICHEVA A, et al. One century later: the folk botanical knowledge of the last remaining Albanians of the upper Reka Valley, Mount Korab, Western Macedonia [J]. J Ethnobiol Ethnomed, 2013, 9: 22.
- [5] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所. 中国食物成分表[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009.
Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Prevention and Control. China food composition [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2009.
- [6] 植石灿,李育军,何潮安,等. 食叶草蔬菜的高产优质种植及加工研究[J]. 长江蔬菜, 2020, (4): 52-56.
ZHI SC, LI YJ, HE CA, et al. Study on the high output, high quality of edible dock planting and processing [J]. J Changjiang Veget, 2020, (4): 52-56.
- [7] 陈伟. 食叶草的营养价值及产品开发生研究进展[J]. 农产品加工, 2018, (7): 63-64, 67.
CHEN W. Study on nutritional value and development of edible leaf weed and research progress on edible leaf weed products [J]. Farm Prod Pros, 2018, (7): 63-64, 67.
- [8] 郑旭,李斌,殷春旭,等. 复合盐碱胁迫对食叶草种子萌发的影响[J]. 新疆农垦科技, 2019, 42(5): 33-38.
ZHENG X, LI B, YIN CX, et al. Effects of combined saline alkali stress on edible dock seed germination [J]. Xinjiang Farm Res Sci Technol, 2019, 42(5): 33-38.
- [9] 张国和,王明泽,李国良. 大庆地区食叶草引种育苗及高产优质种植技术研究[J]. 当代畜牧, 2011, (10): 39-41.
ZHANG GH, WANG MZ, LI GL. Study on the introduction and seedling cultivation of edible dock and its highyield and high-quality planting technology in Daqing area [J]. Contem Anim Husb, 2011, (10): 39-41.
- [10] 柏绿山,杨秀丽,柏英庭. 食叶草植物奶及其制备工艺: 中国,

- CN201610102419.7 [P]. 2016-02-25.
 BAI LS, YANG XL, BAI YT. Edible dock plant milk beverage and its prparation process: China, CN201610102419.7 [P]. 2016-02-25.
- [11] 柏绿山, 杨秀丽. 食叶草氨基酸蛋白肥料的应用与效果分析[J]. 中国果菜, 2018, 38(10): 38-40.
 BAI LS, YANG XL. Effect analysis and application of amino acid fertilizing leaf-eating grass [J]. China Fruit Veget, 2018, 38(10): 38-40.
- [12] GB 5009.14—2015 食品安全国家标准 致畸试验[S].
 GB 15193.14—2015 National food safety standard-Teratogenicity test [S].
- [13] 罗洁霞, 徐克. 我国居民家庭膳食蛋白质和脂肪摄入量比较[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(2): 79-83.
 LUO JX, XU K. Comparative research on protein and fat intake of Chinese residents [J]. Food Nutr China, 2019, 25(2): 79-83.
- [14] 柏绿山, 杨秀丽. 食叶草(蛋白草)拓展粮食新资源战略意义[J]. 农业开发与装备, 2018, (9): 53, 55.
 BAI LS, YANG XL. The strategic significance of edible dock to the expansion of novel food [J]. Agric Dev Equip, 2018, (9): 53, 55.
- [15] GRIEVE M. A morden herbal [M]. New York: Dover Publications, 1971.

- [16] TARD OJ, S NCHEZ-MATA MDC, MORALES R, *et al.* Mediterranean wild edible plants-ethnobotany and food composition tables [M]. New York: Springer New York, 2016.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



楼敏涵, 硕士, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: louminhan@zjams.com.cn



王 茜, 教授, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: wy3333@163.com

“生物毒素研究”专题征稿函

随着社会经济的发展, 人民越来越关注食品的安全问题。在日常生活中, 食物中毒事件时有发生。在食品安全事件中, 生物毒素中毒事件占一定比例。生物毒素是生物体内所产生的有毒代谢产物, 包括微生物毒素、植物毒素、动物毒素和海洋毒素。生物毒素不仅对消费者的健康造成危害, 还会对养殖业、种植业、畜牧水产业等行业造成巨大的经济损失。因此, 关注食品中生物毒素的安全, 是一项具有重大经济意义和科学意义的事情。

鉴于此, 本刊特别策划“生物毒素研究”专题。专题将围绕生物毒素的产生与调控机制、生物毒素的快速检测与筛查技术、生物毒素的脱毒方法与机制、生物毒素的毒理研究与风险评估、生物毒素的标准物质研发、生物毒素型药物的开发研究等问题展开讨论, 计划在 2021 年 3~4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2021 年 1 月 31 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**生物毒素研究**):

网站: www.chinafoodj.com(备注投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题:生物毒素研究”)

邮箱投稿:E-mail: jfoodsq@126.com(备注:生物毒素研究专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部