

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240826002

松花粉发酵产物的安全性评价

杨长军¹, 尹雷¹, 任志斌¹, 时梦雷², 陈思思², 林智超², 黄仕新², 何建林^{2*}

(1. 烟台新时代健康产业有限公司, 烟台 264006; 2. 自然资源部第三海洋研究所, 海洋生物资源开发利用工程技术创新中心, 厦门 361005)

摘要: **目的** 研究松花粉发酵产物安全性, 对其进行毒理学评价。**方法** 通过小鼠急性经口毒性试验、细菌回复突变试验、小鼠红细胞微核试验、小鼠精母细胞染色体畸变试验、大鼠 28 d 经口毒性试验系统地研究松花粉发酵产物的安全性。**结果** 松花粉发酵产物急性经口毒性试验雌雄小鼠最大耐受剂量大于 15 g/(kg·BW), 属于实际无毒级别; 细菌回复突变试验、哺乳动物红细胞微核试验及小鼠精母细胞染色体畸变试验等 3 项遗传毒性检测结果均为阴性; 28 d 经口毒性试验中, 0.625、1.250、2.500 g/(kg·BW) 3 个剂量组大鼠的体质量、进食量、血液学、血生化等指标, 无异常变化。**结论** 在本研究条件和剂量下, 松花粉发酵产物无急性毒性、遗传毒性, 其雌、雄大鼠 28 d 经口毒性无可见有害作用剂量值至少为 2.5 g/(kg·BW)。因此, 松花粉发酵产物具有食用安全性。

关键词: 急性毒性; 遗传毒性; 28 d 经口毒性; 精母细胞染色体畸变

Safety evaluation of pine pollen fermentation products

YANG Chang-Jun¹, YIN Lei¹, REN Zhi-Bin¹, SHI Meng-Lei², CHEN Si-Si²,
LIN Zhi-Chao², HUANG Shi-Xin², HE Jian-Lin^{2*}

(1. Yantai New Era Health Industry Co., Ltd., Yantai 264006, China; 2. Technology Innovation Center for Exploitation of Marine Biological Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: Objective To study the safety of pine pollen fermentation products and evaluate their toxicology. **Methods** The safety of pine pollen fermentation products was systematically studied through acute oral toxicity test in mice, bacterial reverse mutation test, red blood cell micronucleus test in mice, spermatocyte chromosomal aberration test in mice, and 28-day oral toxicity test in rats. **Results** The acute oral toxicity test of pine pollen fermentation products in female and male mice showed that the maximum tolerated dose was greater than 15 g/(kg·BW), which was classified as practically non-toxic; the results of 3 genotoxicity tests, including bacterial reverse mutation test, mammalian red blood cell micronucleus test, and mouse spermatocyte chromosomal aberration test, were all negative; in the 28-day oral toxicity test, no abnormal changes were observed in the body weight, food intake, hematology, and blood biochemistry indicators of rats in the 3 dose groups of 0.625, 1.250, and 2.500 g/(kg·BW). **Conclusion** Under the experimental conditions and the dose tested, the pine pollen fermentation product shows no acute toxicity or genotoxicity. The no observed adverse effect level for the 28-day oral toxicity in both male and female rats are at least 2.5 g/(kg·BW). Therefore, the pine pollen fermentation product is considered to be safe for consumption.

*通信作者: 何建林, 博士, 副研究员, 主要研究方向为功能食品研究与开发。E-mail: jlhe@tio.org.cn

*Corresponding author: HE Jian-Lin, Ph.D, Associate Professor, Technology Innovation Center for Exploitation of Marine Biological Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China. E-mail: jlhe@tio.org.cn

KEY WORDS: acute toxicity; genotoxicity; 28-day oral toxicity; spermatocyte chromosomal aberration

0 引言

松花粉来源于马尾松和油松等植物,主要通过人工采集获得,是最早被人类食用的非蜂源纯净花粉^[1]。我国有着悠久的食用松花粉的历史。松花粉最早记载于距今 2000 多年前的《神农本草经》,书中将松黄(松花粉)列为上等滋补品^[2]。此外,松花粉还被《唐本草》《本草纲目》《本草从新》等药学典籍收录,主要记载了其润心肺、益气、除风、止血等功能^[3]。松花粉含有蛋白质、氨基酸、多糖和膳食纤维、脂肪、酚类化合物、矿物质等多种营养成分,被称为“天然微量营养素库”^[4]。可见,松花粉不仅被用作中药材预防和治疗疾病,还因其丰富的营养成分和健康益处被用作食品原料^[5]。近年的研究表明,松花粉具有抗氧化^[6]、抗炎^[7]、增强免疫力^[8]、调节血糖和血脂^[9]、抗菌^[10]、抗病毒^[11]、抗肿瘤^[12]、抗衰老^[13]等功能。因此,松花粉被广泛用于现代功能食品开发。

松花粉细胞壁由纤维素、果胶、孢粉素等物质组成,物理和化学性质稳定,不易被破坏,营养成分不易释放^[14];并且多酚、黄酮等活性物质多以结合态存在,导致松花粉中的营养成分在人体的吸收率不高^[15]。作为一种新资源食品原料^[16],松花粉的营养成分受到加工方式的显著影响^[17-18]。松花粉收获以后,对其进行有效的加工,如干燥、消毒、破壁等,以确保其储存稳定性、理化性质的改善以及主要营养成分的高释放率^[19]。为增加松花粉营养成分的肠道吸收,通常采用超声^[20]、发酵^[21]、酶解^[22]等方法处理松花粉,其中发酵最具前景^[23]。对松花粉进行发酵可以分解大分子物质,增加可吸收的功能性成分,提高生物利用度,并能够改善口感和风味^[24]。因此,对松花粉进行发酵是一种提高其营养价值、改善产品特性和开发新用途的有效手段^[25-26]。松花粉发酵过程中,可能产生一些新的代谢产物,引起生物活性和功能属性的变化^[21]。目前,已有文献报道松花粉^[27]、破壁松花粉^[28]和过热蒸汽灭菌松花粉^[29]的安全性毒理学研究。但未有文献报道发酵对松花粉食用安全性的影响。

鉴于此,本研究通过急性经口毒性、3 项遗传毒性试验和 28 d 经口毒性试验对松花粉的发酵产物进行系统的毒理学研究^[30],为相关产品的开发提供数据支撑和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

松花粉发酵产物(烟台新时代健康产业有限公司,批

号: 20231018),黄棕色固体粉末,保质期为 24 个月,-20℃避光保存。制备步骤:松花粉(来自马尾松 *Pinus massoniana* Lamb.,产地:云南祥云)和葡萄糖适量在水中混匀,经巴氏灭菌作为发酵基质。酵母菌以体积分数 10% 接种量接种,于 30℃、200 r/min 培养,培养 5 d 后灭菌,喷雾干燥即得,得率约为 20%。

SPF 级 ICR 小鼠, Wistar 大鼠均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,生产许可证号 SCXK(沪)2022-0004; 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株(TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535)和 S9 购自美国 Molecular Toxicology 公司。

谷氨酰转氨酶检测试剂盒(货号: TE0141,北京雷根生物技术有限公司);氯离子检测试剂盒(货号: C003-2-1,南京建成生物工程研究所有限公司);钾离子、钠离子检测试剂盒(货号: AKBL004M、AKBL006M,北京盒子生物科技有限公司);环磷酸胺(纯度 97%,上海易恩化学技术有限公司);甲基磺酸甲酯(纯度 98%,美国 Sigma-Aldrich 公司);敌克松(纯度 92%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);1,8-二羟蒽醌(对照品,纯度 98%,中国药品生物制品检定所);2-氨基苄(纯度 97%,上海安谱科学仪器有限公司);叠氮钠(纯度 99%,北京索莱宝科技有限公司);2-氨基蒽(纯度 98%,上海麦克林生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

BS-240VET 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);BC-30VET 全自动血液分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);YZ2 手持裂隙灯(苏州六六视觉科技股份有限公司)。

1.3 试验方法

参照《保健食品及其原料安全性毒理学检验与评价技术指导原则》(2020 年版)^[31]以及 GB 1519.3—2014《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》、GB 1519.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》、GB 1519.5—2014《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》、GB 15193.8—2014《食品安全国家标准 小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验》、GB 15193.22—2014《食品安全国家标准 28 天经口毒性试验》等对松花粉发酵产物进行毒理学安全性评价。

1.3.1 急性经口毒性试验

ICR 小鼠(SPF 级)20 只,雌雄各半,体重 20~30 g。适应性喂养 5 d 后开始实验。禁食 6 h,自由饮水。24 h 内灌胃两次给予受试物,每次间隔 6 h。总剂量为 15 g/(kg·BW)。给药后观察 14 d。

1.3.2 细菌回复突变试验

采用平板掺入法, 在顶层琼脂中加入 0.1 mL 试验菌株增菌液、0.1 mL 受试物溶液和 0.5 mL S9 混合液(当需要代谢活化时), 混匀后倒入底层培养基平板上。试验设 0.5、5.0、50.0、500.0、5000.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个剂量, 每个剂量平行 3 组。同时设未处理对照、溶剂对照[包括水对照和二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)对照]和阳性对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48~72 h, 计数每皿回变菌落数。结果为阴性的整个试验重复做一次, 改变剂量间距(改为 5 倍间距), 其他同上; 结果为阳性的, 随机挑选阳性测试点进行重复, 其他同上。

1.3.3 哺乳动物红细胞微核试验

松花粉发酵产物以蒸馏水溶解, 设 1.25、2.50、5.00 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$ 3 个剂量组, 另加溶剂对照组和阳性对照组[环磷酰胺(灌胃), 40 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$]。每组 10 只 ICR 小鼠, 雌雄各半。采用 2 次给予法, 即: 第一次灌胃给予受试物后 24 h 灌胃给予第二次受试物, 6 h 后脱颈椎处死小鼠, 取股骨骨髓, 小牛血清分散骨髓细胞后涂片, 甲醇固定, Giemsa 染色。每只小鼠在油镜下计数 2000 个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocyte, PCE)中微核细胞数, 由此得出含微核细胞率(%); 并计数 200 个红细胞(red blood cell, RBC)所见 PCE 的比例(PCE/RBC)。

1.3.4 小鼠精母细胞染色体畸变试验

松花粉发酵产物以蒸馏水溶解, 设 3 个剂量组[1.25、2.50、5.00 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$], 另加溶剂对照组和阳性对照组[环磷酰胺, 40 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$]。每组 5 只雄性 ICR 小鼠。各剂量组每天给予 1 次受试物, 连续 5 d。溶剂对照组给予蒸馏水。阳性对照于给药第 1 d 时腹腔注射一次。第 14 d 各组动物腹腔注射给予秋水仙素 5 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$ 。注射 5 h 后处死动物, 分离两侧睾丸, 进行低渗、固定、离心、滴片和染色处理。在显微镜下, 每只小鼠的玻片标本计数 100 个含染色体数为 $1n\pm 1$ 的中期相细胞。分辨各种染色体畸变类型(断片、微小体、裂隙、常染色体单价体、相互易位、X-Y 单价体)。

1.3.5 大鼠 28 d 经口毒性试验

Wistar 大鼠(SPF 级)80 只, 雌雄各半, 体重 50~70 g, 适应环境后, 随机分为 4 组。即 1 个溶剂对照组和剂量分别为 0.625、1.250、2.500 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$ 的低、中、高剂量组。每组 20 只。灌胃量为 10 mL/kg, 溶剂对照组灌胃给予同体积的蒸馏水, 连续给予受试物 28 d, 各组喂饲鼠维持饲料。

实验期间, 每周记录体重和摄食量。停止给予受试物

后, 动物空腹过夜, 称处死前体重, 眼部检查, 采血测各项血液学、生生化指标, 同时进行大体解剖、病理组织学检查。

1.4 数据处理

急性经口毒性试验、哺乳动物红细胞微核试验、大鼠 28 d 经口毒性试验结果以平均值 \pm 标准偏差表示。方差分析进行多个实验组与对照组之间的均数比较。小鼠精母细胞染色体畸变试验采用 χ^2 检验进行统计学分析。 $P<0.05$ 表示有显著性差异(*), $P<0.01$ 表示有极显著性差异(**)。

2 结果与分析

2.1 急性经口毒性试验

结果如表 1 所示, 以 15 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$ 剂量给药的小鼠, 未见小鼠死亡。继续观察 14 d, 动物均健康生存。记录小鼠给药前和给药 14 d 的体重。其外观、行为、活动、精神状态、呼吸、饮食、粪便、分泌物等一般指标均正常, 大体解剖观察未见异常。可见, 松花粉发酵产物急性经口给与的最大耐受剂量大于 15 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$, 属于“实际无毒”级别。市售松花粉的推荐服用量是每天 3 g, 约为 0.05 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$, 15 $\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$ 相当于松花粉推荐量的 300 倍。而松花粉发酵产物的得率是 20%, 换算成松花粉则相当于人推荐量的 1500 倍。

2.2 细菌回复突变试验

表 2 为第 1 次 Ames 试验的回变菌落数, 结果未见松花粉发酵产物具有菌株毒性。细菌背景生长良好, 平板上无沉淀, 对照皿回变菌落数在本实验室历史范围内, 各剂量组回变菌落数均未超过未处理对照皿菌落数 2 倍, 亦无剂量-反应关系。因试验结果为阴性, 改变剂量间距后进行第 2 次试验(表 3), 结果亦为阴性。由此表明, 松花粉发酵产物无致突变作用。

2.3 哺乳动物红细胞微核试验

如表 4 所示, 溶剂对照组的微核细胞率 $\leq 1.50\%$ 。松花粉发酵产物各剂量组的微核细胞率均 $\leq 3.80\%$, 与对照组相比, 无显著性差异, 均在正常动物自发微核率范围内。阳性对照组的微核细胞率 $\geq 16.6\%$, 与溶剂对照组比较, 统计学分析具有极显著性差异($P<0.01$)。并且, 受试物各剂量组 PCE/RBC 比值未少于溶剂对照组的 20%。以上数据表明, 松花粉发酵产物未诱发 ICR 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的明显增高。

表 1 松花粉发酵产物小鼠急性经口毒性试验

Table 1 Acute oral toxicity test of pine pollen fermentation products in mice

性别	剂量/ $\text{g}/(\text{kg})$	动物数/只	初体重/ g	末体重/ g	死亡数/只	最大耐受剂量/ $\text{g}/(\text{kg})$	相当于人推荐量的倍数
雌性	15	10	24.13 \pm 1.17	28.06 \pm 2.11	0	> 15	1500
雄性	15	10	28.69 \pm 1.60	35.88 \pm 3.06	0	> 15	1500

表2 松花粉发酵物 Ames 试验的回变菌落数(第1次)
Table 2 Revertant colony count from the Ames test of pine pollen fermentation product (1st trial)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
受试物	0.5	99 \pm 10	169 \pm 7	25 \pm 3	38 \pm 4	138 \pm 4	165 \pm 7	232 \pm 14	274 \pm 11	65 \pm 6	66 \pm 10
	5.0	109 \pm 6	175 \pm 11	22 \pm 3	31 \pm 5	125 \pm 19	178 \pm 8	229 \pm 31	280 \pm 14	62 \pm 12	71 \pm 5
	50.0	112 \pm 10	192 \pm 18	23 \pm 1	38 \pm 2	143 \pm 10	187 \pm 18	208 \pm 15	283 \pm 11	64 \pm 6	60 \pm 8
	500.0	110 \pm 4	194 \pm 7	22 \pm 2	39 \pm 8	147 \pm 15	180 \pm 12	221 \pm 24	266 \pm 16	68 \pm 4	64 \pm 11
	5000.0	107 \pm 3	215 \pm 22	23 \pm 2	28 \pm 9	141 \pm 8	166 \pm 11	258 \pm 8	265 \pm 16	84 \pm 37	69 \pm 25
未处理对照	0.0	119 \pm 13	176 \pm 11	24 \pm 4	42 \pm 2	167 \pm 8	173 \pm 2	223 \pm 5	283 \pm 16	65 \pm 14	77 \pm 24
水对照	100.0	107 \pm 18	148 \pm 23	29 \pm 1	43 \pm 9	162 \pm 89	155 \pm 15	235 \pm 16	259 \pm 3	44 \pm 4	37 \pm 5
DMSO 对照	100.0	104 \pm 11	173 \pm 12	27 \pm 2	43 \pm 6	166 \pm 20	176 \pm 10	243 \pm 7	287 \pm 11	28 \pm 4	30 \pm 9
2-氨基苄	10.0	/	906 \pm 115	/	1804 \pm 58	/	898 \pm 49	/	/	/	/
甲基磺酸甲酯	1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$	/	/	/	/	585 \pm 92	/	976 \pm 92	/	/	/
敌克松	50.0	301 \pm 37	/	216 \pm 28	/	/	/	/	/	/	/
1,8-二羟基萘醌	60.0	/	/	/	/	/	/	808 \pm 107	/	/	/
叠氮钠	1.5	/	/	/	/	/	/	/	/	556 \pm 12	/
2-氨基蒽	5.0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	267 \pm 15

表3 松花粉发酵物 Ames 试验的回变菌落数(第2次)
Table 3 Revertant colony count from the Ames test of pine pollen fermentation product (2nd trial)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
受试物	8.0	103 \pm 8	182 \pm 4	28 \pm 6	40 \pm 6	142 \pm 11	174 \pm 8	235 \pm 22	296 \pm 8	54 \pm 3	60 \pm 5
	40.0	105 \pm 7	179 \pm 14	27 \pm 2	40 \pm 2	128 \pm 14	172 \pm 11	227 \pm 18	294 \pm 12	50 \pm 7	62 \pm 8
	200.0	108 \pm 12	186 \pm 9	25 \pm 3	37 \pm 6	136 \pm 9	169 \pm 13	215 \pm 9	288 \pm 5	53 \pm 8	58 \pm 11
	1000.0	121 \pm 11	193 \pm 12	27 \pm 5	38 \pm 4	144 \pm 12	182 \pm 7	226 \pm 14	274 \pm 22	51 \pm 10	63 \pm 4
	5000.0	114 \pm 8	204 \pm 17	26 \pm 4	31 \pm 7	146 \pm 20	178 \pm 7	241 \pm 16	265 \pm 35	57 \pm 4	67 \pm 5
未处理对照	0.0	116 \pm 16	184 \pm 14	25 \pm 9	38 \pm 4	158 \pm 18	184 \pm 17	235 \pm 13	287 \pm 43	58 \pm 9	63 \pm 8
水对照	100.0	109 \pm 14	164 \pm 18	28 \pm 2	41 \pm 2	167 \pm 25	164 \pm 10	246 \pm 8	268 \pm 15	51 \pm 2	57 \pm 15
DMSO 对照	100.0	111 \pm 16	178 \pm 16	27 \pm 4	42 \pm 4	159 \pm 15	180 \pm 15	254 \pm 14	276 \pm 10	46 \pm 7	51 \pm 2
2-氨基苄	10.0	/	967 \pm 84	/	1685 \pm 132	/	804 \pm 114	/	/	/	/
甲基磺酸甲酯	1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$	/	/	/	/	605 \pm 47	/	958 \pm 74	/	/	/
敌克松	50.0	342 \pm 28	/	245 \pm 14	/	/	/	/	/	/	/
1,8-二羟基萘醌	60.0	/	/	/	/	/	/	/	887 \pm 53	/	/
叠氮钠	1.5	/	/	/	/	/	/	/	/	489 \pm 58	/
2-氨基蒽	5.0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	275 \pm 21

注: /为无此数值, 表 5~7、11 同。

表4 松花粉发酵产物小鼠红细胞微核试验结果
Table 4 Results of the micronucleus test in mouse red blood cells for pine pollen fermentation products

性别	组别	剂量/(g/kg)	动物数/只	RBC 数/个	PCE 数/个	PCE/RBC/%	PCE 数/个	含微核 PCE 数/个	微核细胞率/%
雌性	溶剂对照	0.00	5	1000	710	71.00 \pm 6.46	10000	14	1.40 \pm 0.55
	阳性对照	0.04	5	1000	606	60.60 \pm 7.87	10000	166	16.60 \pm 8.5**
	低剂量	1.25	5	1000	643	64.30 \pm 10.8	10000	16	1.60 \pm 0.89
	中剂量	2.50	5	1000	655	65.50 \pm 8.34	10000	24	2.40 \pm 0.96
	高剂量	5.00	5	1000	684	68.40 \pm 11.59	10000	19	1.90 \pm 0.89
雄性	溶剂对照	0.00	5	1000	552	55.20 \pm 10.10	10000	15	1.50 \pm 1.00
	阳性对照	0.04	5	1000	550	55.00 \pm 9.81	10000	192	19.20 \pm 5.64**
	低剂量	1.25	5	1000	351	35.10 \pm 22.26	10000	24	2.40 \pm 1.14
	中剂量	2.50	5	1000	465	46.50 \pm 20.82	10000	29	2.90 \pm 1.34
	高剂量	5.00	5	1000	588	58.80 \pm 20.77	10000	38	3.80 \pm 2.05

注: 与溶剂对照组比较, ** $P < 0.01$ 表示具有极显著差异, 表 5、7~9、11 同。

2.4 小鼠精母细胞染色体畸变试验

与溶剂对照组相比, 阳性对照组(环磷酰胺)染色体畸变率和畸变细胞率极显著增高($P < 0.01$); 受试物各剂量组的染色体畸变率和畸变细胞率与溶剂对照组比较, 统计学分析均无显著性差异($P > 0.05$)。详见表 5~7。可见, 松花粉发酵产物对小鼠精母细胞染色体畸变无影响。

2.5 大鼠 28 d 经口毒性试验

实验期间, 每天观察大鼠的一般表现。各剂量组大鼠

健康状态良好, 体重持续增长, 未见中毒反应, 也未有动物死亡。

2.5.1 松花粉发酵产物对大鼠体重、摄食量的影响

由表 8 可见, 松花粉发酵产物对雌性大鼠的总进食量没有影响, 但是低、中和高剂量的总增重以及低和高剂量的总食物利用率与对照组相比均显著升高。考虑到本实验松花粉发酵产物的蛋白含量为 9.8% 左右, 在总进食量无明显变化的情况下, 雌性大鼠体质量总增重和食物利用率的增高, 可能与受试物较高的蛋白质含量有关。

表 5 松花粉发酵产物对小鼠睾丸精母细胞染色体畸变的影响(性染色体单价体)
Table 5 Effects of pine pollen fermentation products on chromosome aberrations in mouse testicular spermatocytes (sex chromosome monosomy)

组别	剂量/(g/kg)	动物数/只	观察细胞/个	性染色体单价体/个	单价体率/%	P
溶剂对照	0.00	5	500	16	3.20	/
阳性对照	0.04	5	500	36	7.20	0.004**
低剂量	1.25	5	500	20	4.00	0.497
中剂量	2.50	5	500	19	3.80	0.606
高剂量	5.00	5	500	20	4.00	0.497

表 6 松花粉发酵产物对小鼠睾丸精母细胞染色体畸变的影响(常染色体单价体)
Table 6 Effects of pine pollen fermentation products on chromosome aberrations in mouse testicular spermatocytes (autosomal monosomy)

组别	剂量/(g/kg)	动物数/只	观察细胞/个	常染色体单价体/个	单价体率/%	P
溶剂对照	0.00	5	500	155	31.00	/
阳性对照	0.04	5	500	158	31.60	0.838
低剂量	1.25	5	500	144	28.80	0.447
中剂量	2.50	5	500	153	30.60	0.891
高剂量	5.00	5	500	147	29.40	0.582

表 7 松花粉发酵产物对小鼠睾丸精母细胞染色体畸变的影响(结构畸变)
Table 7 Effects of pine pollen fermentation products on chromosome aberrations in mouse testicular spermatocytes (structural aberrations)

组别	剂量/(g/kg)	动物数/只	观察细胞/个	染色体畸变/个			染色体畸变个数/个	染色体畸变率/%	P	畸变细胞数/个	畸变细胞率/%	P
				断片	微小体	易位						
溶剂对照	0.00	5	500	8	0	2	10	2.0	/	10	2.0	/
阳性对照	0.04	5	500	48	1	47	96	19.2	0.000**	90	18.0	0.000**
低剂量	1.25	5	500	8	0	1	9	1.8	0.817	9	1.8	0.817
中剂量	2.50	5	500	10	0	3	13	2.6	0.527	13	2.6	0.527
高剂量	5.00	5	500	9	0	6	15	3.0	0.311	15	3.0	0.311

表 8 松花粉发酵产物不同剂量下大鼠的总增重、总进食量和食物总利用率
Table 8 Total body weight gain, total food intake, and overall food utilization rate in rats at different doses of pine pollen fermentation products

性别	组别	剂量/(g/kg)	总增重/g	总进食量/g	总食物利用率/%
雌性	溶剂对照	0.000	76.59±12.67	400.38±34.67	19.11±2.35
	低剂量	0.625	90.13±8.47**	391.12±24.97	23.07±1.95**
	中剂量	1.250	83.58±11.93**	407.00±36.91	20.64±3.18
	高剂量	2.500	91.33±7.04**	403.29±32.81	22.76±2.31**
雄性	溶剂对照	0.000	160.14±13.01	461.42±27.78	34.74±2.53
	低剂量	0.625	162.12±11.85	474.06±28.04	34.22±1.98
	中剂量	1.250	156.28±13.64	456.11±25.05	34.36±3.56
	高剂量	2.500	153.41±8.27	436.05±21.81	35.21±1.70

而与对照组相比,松花粉发酵产物各剂量组对雄性大鼠的总增重、总进食量和总食物利用率均无明显影响。

2.5.2 松花粉发酵产物对大鼠血液学的影响

由表 9 可见,松花粉发酵产物对雌性大鼠的白细胞计数、红细胞计数、红细胞压积、中性粒细胞以及淋巴细胞计数有一定的影响。然而,这些差异均处于 Wistar 大鼠的正常参考范围以内^[32],且无明显的剂量依赖性。结合红细胞微核呈现阴性的结果,判断该变化属于正常生理差异范围。

雄性大鼠的血液学指标未受影响。

2.5.3 松花粉发酵产物对大鼠血生化的影响

由表 10 可见,与对照组相比,除雌性大鼠低剂量组

的谷丙转氨酶显著下降外,雌雄大鼠各剂量组的血生化指标均未发生显著变化。谷丙转氨酶和谷草转氨酶一般被用来指示肝细胞损伤,而以谷丙转氨酶更为敏感^[33]。由表 10 可知,给予松花粉发酵物的雌雄大鼠各剂量组谷丙转氨酶均有下降趋势,提示松花粉发酵物可能对肝脏的损伤有一定的保护作用。

2.5.4 松花粉发酵产物对大鼠脏器比的影响

由表 11 可见,与对照组相比,除雄性大鼠中剂量和高剂量肝脏的脏器比有所下降外,雌雄大鼠其他脏器比均未发生显著变化。但是两剂量组的谷丙转氨酶和谷草转氨酶并未发生显著变化,病理检查也未发现异常。推测为动物个体差异所致。

表 9 松花粉发酵产物对大鼠血液学的影响
Table 9 Effects of pine pollen fermentation products on hematology in rats

性别	组别	白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$)	血红蛋白浓度 (g/L)	红细胞压积 (%)	血小板计数 $\times 10^9/L$	中性粒细胞 (%)	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)
雌性	溶剂对照	5.02±0.75	7.78±0.15	150.60±7.29	45.94±2.18	1001.0±250.2	1.00±0.13	3.73±0.65	0.280±0.068
	低剂量	3.60±0.92*	7.39±0.25	147.30±4.60	43.48±1.50*	1094.0±98.9	0.73±0.18*	2.68±0.78*	0.190±0.052
	中剂量	4.36±1.48	7.40±0.35	148.00±2.87	43.45±2.12*	1052.0±163.7	0.95±0.33	3.18±1.12	0.240±0.096
	高剂量	3.41±0.88*	7.16±0.20**	148.30±4.58	42.26±1.27**	1009.0±193.1	0.76±0.18	2.46±0.70*	0.210±0.078
雄性	溶剂对照	6.23±1.22	7.54±0.27	147.90±4.01	45.78±1.43	1204.0±83.7	1.24±0.18	4.67±1.02	0.320±0.077
	低剂量	6.11±1.26	7.43±0.17	147.90±3.78	44.89±0.90	1222.0±58.1	1.19±0.17	4.62±1.04	0.310±0.110
	中剂量	5.77±1.39	7.31±0.16	147.40±2.51	44.50±1.39	1196.0±38.4	1.19±0.19	4.28±1.12	0.300±0.088
	高剂量	5.66±1.29	7.33±0.24	148.70±3.71	44.45±1.55	1220.0±49.6	1.09±0.22	4.29±1.00	0.290±0.080

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,表 10、11 同。

表 10 松花粉发酵产物对大鼠血生化的影响
Table 10 Effects of pine pollen fermentation products on blood biochemical parameters in rats

性别	组别	谷丙转氨酶 (U/L)	谷草转氨酶 (U/L)	碱性磷酸酶 (U/L)	尿素 (mmol/L)	肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	血糖 (mmol/L)	总蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)	总胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	谷氨酰转氨酶 (U/L)	氯 (mmol/L)	钾 (mmol/L)	钠 (mmol/L)
雌性	溶剂对照	49.15±8.91	196.90±28.25	124.00±37.91	8.36±0.94	43.41±7.09	4.33±0.83	48.71±3.35	28.28±2.02	1.87±0.13	0.36±0.07	1.47±0.37	66.09±2.18	0.58±0.038	6.69±0.73
	低剂量	38.47±5.01*	184.80±22.95	114.30±14.23	8.19±0.84	45.10±8.32	4.79±0.88	49.83±1.92	28.43±0.98	1.86±0.13	0.41±0.10	1.65±0.48	65.65±1.27	0.60±0.07	6.27±0.49
	中剂量	40.97±6.08	172.40±32.45	106.40±19.66	8.66±1.05	55.58±24.47	4.82±1.42	49.74±2.05	28.44±1.35	1.78±0.16	0.37±0.07	1.66±0.50	65.3±0.69	0.65±0.11	6.16±0.28
	高剂量	39.88±4.84	199.10±67.20	100.60±11.41	9.02±1.54	44.96±7.25	4.71±0.85	48.36±1.25	27.76±0.70	1.74±0.15	0.39±0.09	1.82±0.34	65.96±0.79	0.60±0.05	6.78±1.08
雄性	溶剂对照	52.32±7.65	180.20±44.43	218.40±21.88	7.66±1.16	33.07±8.56	6.48±0.86	50.24±5.24	28.07±2.97	1.67±0.24	0.86±0.35	1.43±0.70	63.85±1.35	0.51±0.04	4.21±3.49
	低剂量	50.00±5.85	181.30±28.36	190.80±23.36	7.20±0.84	41.87±14.03	6.41±1.12	51.18±2.03	28.77±0.89	1.58±0.10	0.89±0.26	1.56±0.32	64.57±1.4	0.54±0.05	3.89±2.47
	中剂量	51.49±14.12	181.20±50.26	195.40±18.05	7.67±0.80	34.72±7.30	6.20±1.23	49.66±1.51	27.96±0.77	1.54±0.11	0.91±0.18	1.92±0.64	64.08±2.61	0.54±0.04	5.83±4.03
	高剂量	47.96±4.35	163.00±33.99	197.30±30.68	7.25±0.66	31.62±2.56	7.55±1.79	51.27±1.05	28.72±0.66	1.57±0.10	0.78±0.16	1.68±0.66	63.69±1.77	0.56±0.02	4.82±7.11

表 11 松花粉发酵产物对大鼠的脏器比的影响(%)
Table 11 Effects of pine pollen fermentation products on organ-to-body weight ratio in rats (%)

性别	组别	心脏	胸腺	肾上腺	肝脏	肾脏	脾脏	睾丸
雌性	溶剂对照	0.39±0.06	0.22±0.04	0.025±0.006	3.11±0.17	0.86±0.05	0.23±0.01	/
	低剂量	0.44±0.16	0.21±0.02	0.024±0.007	3.29±0.11	0.86±0.05	0.23±0.01	/
	中剂量	0.40±0.03	0.23±0.02	0.029±0.008	3.33±0.56	0.88±0.04	0.24±0.02	/
	高剂量	0.39±0.03	0.22±0.02	0.024±0.008	3.16±0.25	0.85±0.008	0.24±0.04	/
雄性	溶剂对照	0.36±0.04	0.20±0.02	0.011±0.003	3.44±0.13	0.79±0.05	0.24±0.03	1.30±0.06
	低剂量	0.36±0.02	0.20±0.03	0.012±0.007	3.36±0.09	0.79±0.05	0.23±0.02	1.22±0.12
	中剂量	0.38±0.04	0.20±0.02	0.009±0.007	3.27±0.07*	0.79±0.07	0.23±0.02	1.27±0.07
	高剂量	0.37±0.03	0.19±0.01	0.016±0.008	3.23±0.21**	0.79±0.04	0.23±0.01	1.33±0.05

2.5.5 组织病理学检查

苏木精-伊红染色对大鼠的脑、甲状腺、胸腺、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胃、十二指肠、结肠、胰脏、肠系膜淋巴结、卵巢、睾丸和膀胱进行组织病理学检查,未发现异常。

3 结 论

本研究对松花粉发酵产物进行毒理学研究。受试物对雌、雄 ICR 小鼠急性经口毒性的最大耐受剂量大于 15 g/(kg·BW), 属实际无毒级。3 项遗传毒性实验皆呈阴性, 表明松花粉发酵产物不具有遗传毒性。28 d 经口毒性试验的无可见有害作用剂量(no observed adverse effect level, NOAEL)至少为 2.5 g/(kg·BW), 由于本研究所用松花粉发酵产物的得率为 20%, 因此换算成松花粉的 NOAEL 值至少为 12.5 g/(kg·BW)。

综上, 在本研究剂量范围内, 未发现松花粉发酵产物具有急性毒性、遗传毒性和亚急性毒性。本研究丰富了松花粉的毒理学研究资料, 为松花粉深加工产品的安全性提供了参考。

参考文献

- [1] LEE KH, CHOI EM. Effect of pine pollen extract on experimental chronic arthritis [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(5): 651-657.
- [2] 李荣胜, 付庆帅, 郭俊红, 等. 中药松花粉的化学成分及现代应用研究进展[J/OL]. 沈阳药科大学学报, 1-14. [2024-10-30]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2022.0835>
- [3] LI RS, FU QS, GUO JH, et al. Research progress on the chemical components and modern applications of traditional Chinese medicinal pine pollen [J/OL]. *J Shenyang Pharm Univ*, 1-14. [2024-10-30]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2022.0835>
- [4] 陈一凡, 席榕, 唐爽, 等. 基于古今文献分析的松花粉食疗应用探究与展望[J]. *亚太传统医药*, 2018, 14(6): 122-125.
- [5] CHEN YF, XI R, TANG S, et al. Exploration and prospect of pine pollen as a dietary therapy based on ancient and modern literature analysis [J]. *Asia-Pac Tradit Med*, 2018, 14(6): 122-125.
- [6] 付玉娟, 陈少瑜, 李思广, 等. 云南松花粉中总黄酮和总酚含量的株间差异研究[J]. *西部林业科学*, 2022, 51(4): 62-67.
- [7] FU YP, CHEN SY, LI SG, et al. Inter-plant variation in the content of total flavonoids and total phenols in Yunnan pine pollen [J]. *J West China Forest Sci*, 2022, 51(4): 62-67.
- [8] 贾春伶, 王锦燕, 赵奎君, 等. 《本草纲目》木部药食同源药用植物的记载及其启示[J]. *中国现代中药*, 2021, 23(6): 1094-1102.
- [9] JIA CL, WANG JY, ZHAO KJ, et al. Records and implications of food-medicinal plants in the wood section of *Compendium of materia medica* [J]. *Mod Tradit Chin Med*, 2021, 23(6): 1094-1102.
- [10] 何小平, 戴承恩, 李海龙, 等. 松花粉功能成分及马尾松花粉抗氧化性[J]. *食品工业*, 2022, 43(5): 151-154.
- [11] HE XP, DAI CEN, LI HL, et al. Functional components of pine pollen and antioxidant properties of Masson pine pollen [J]. *Food Ind*, 2022, 43(5): 151-154.
- [12] 王桐, 于建伟, 杨长军, 等. 松花粉提取物抗炎功效及安全性的研究[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(23): 21-24.
- [13] WANG T, YU JW, YANG CJ, et al. Study on anti-inflammatory efficacy and safety of pine pollen extract [J]. *Food Res Dev*, 2014, 35(23): 21-24.
- [14] 尹利端, 王桐, 宋文山, 等. 不同分子量松花粉肽增强小鼠免疫力的功能研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(3): 61-65.
- [15] YIN LD, WANG T, SONG WS, et al. Functional study on the immunoenhancing effects of pine pollen peptides with different molecular weights in mice [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(3): 61-65.
- [16] 赵士博, 吴忠港, 郑淮远, 等. 松黄和野菊花及其联合应用对小鼠血糖及血脂的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(8): 1950-1952.
- [17] ZHAO SB, WU ZG, ZHENG HY, et al. The impact of pine pollen and wild chrysanthemum flower, and their combined application on blood sugar and blood lipids in mice [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(8): 1950-1952.
- [18] GHAFFARI T, KAFIL HS, ASNAASHARI S, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from the aerial parts of *Pinus eldarica* grown in Northwestern Iran [J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3203.
- [19] 梁海燕, 马平川, 朱文凯, 等. 泰山松花粉抗病毒作用的研究进展[J]. *山东化工*, 2019, 48(8): 78-79.
- [20] LIANG HY, MA PC, ZHU WK, et al. Research progress on the antiviral effect of Tai Mountain pine pollen [J]. *Shandong Chem Ind*, 2019, 48(8): 78-79.
- [21] 商红旗. 松花粉多糖对肿瘤细胞生长和转移的影响及机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [22] SHANG HQ. Study on the impact and mechanism of pine pollen polysaccharides on the growth and metastasis of tumor cells [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2022.
- [23] 喻陆, 史春夏. 松花粉对衰老成纤维细胞线粒体 DNA 缺失突变的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(24): 5438-5441.

- YU L, SHI CX. The impact of pine pollen on mitochondrial DNA deletion mutations in aging fibroblasts [J]. *Chin J Gerontol*, 2012, 32(24): 5438–5441.
- [14] 刘其耸, 李菲, 李全宏. 基于冷冻-研磨破壁技术制备松花粉[J]. *粮食与油脂*, 2022, 35(1): 74–77.
- LIU QS, LI F, LI QH. Preparation of pine pollen based on freezing-grinding cell wall rupture technology [J]. *Grain Oil*, 2022, 35(1): 74–77.
- [15] 任志斌, 邓鹏, 尹雷, 等. 酶法破壁提取蜂花粉功能成分的工艺优化及抗氧化活性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(9): 278–286.
- REN ZB, DENG P, YIN L, *et al.* Optimization of enzymatic cell wall breaking extraction process of bee pollen functional components and analysis of antioxidant activity [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(9): 278–286.
- [16] 常智尧, 刘其耸, 李全宏. 松花粉功能作用及其加工利用研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(4): 20–22.
- CHANG ZY, LIU QS, LI QH. Research progress on the functional effects and processing utilization of pine pollen [J]. *Cere Oils*, 2020, 33(4): 20–22.
- [17] 程勇. 前处理对松花粉营养活性成分及贮藏稳定性的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- CHENG Y. Effects of pretreatment on nutrients, bioactive components and storage stability of pine pollen [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [18] SHAN Y, YU JH, LIU QS, *et al.* Lipid oxidation stability of ultra-high-temperature short-time sterilization sporoderm-broken pine pollen (UHT-PP) and 60Co-irradiation sterilization sporoderm-broken pine pollen (60Co-PP) [J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(2): 675–684.
- [19] 王桐, 曲涛, 程勇, 等. 破壁处理对松花粉营养成分和理化性质的影响[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(4): 58–63.
- WANG T, QU T, CHENG Y, *et al.* The influence of cell wall rupture treatment on the nutritional components and physicochemical properties of pine pollen [J]. *Food Res Dev*, 2023, 44(4): 58–63.
- [20] 邵圣娟, 李晓, 卫静莉. 超声波辅助纤维素酶解法提取马尾松花粉中的总黄酮[J]. *中成药*, 2016, 38(1): 204–207.
- SHAO SJ, LI X, WEI JL. Extraction of total flavonoids from masson pine pollen using ultrasonic-assisted cellulase hydrolysis [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2016, 38(1): 204–207.
- [21] 洪佳瑞, 张丽梅, 王思凡, 等. 花粉发酵研究进展[J]. *保鲜与加工*, 2024, 24(7): 117–123.
- HONG JR, ZHANG LM, WANG SF, *et al.* Research progress on pollen fermentation [J]. *Preserv Process*, 2024, 24(7): 117–123.
- [22] 王双毅, 谢玮, 崔少宁, 等. 响应面分析法优化黑松松花粉多糖提取工艺[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(11): 113–116, 120.
- WANG SY, XIE W, CUI SN, *et al.* Optimization of polysaccharide extraction process from black pine pollen using response surface methodology [J]. *Cere Oils*, 2021, 34(11): 113–116, 120.
- [23] CHENG Y, WANG Z, QUAN W, *et al.* Pine pollen: A review of its chemical composition, health effects, processing, and food applications [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2023, 138: 599–614.
- [24] 胡璐曼, 乔强, 杨长军, 等. 不同酵母菌发酵对松花粉抗氧化活性及其酚类组成的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(19): 72–80.
- HU LM, QIAO Q, YANG CJ, *et al.* The impact of different yeast fermentation on the antioxidant activity and phenolic composition of pine pollen [J]. *Food Ferment Ind*, 2024, 50(19): 72–80.
- [25] 王璇. 发酵法提升松花粉的活性成分及降脂功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- WANG X. Study on the enhancement of active components and lipid-lowering function of pine pollen by fermentation method [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
- [26] 王璇, 刘其耸, 高福凯, 等. 米根霉发酵松花粉及对 3T3-L1 细胞分化和脂质代谢的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(12): 1–9.
- WANG X, LIU QS, GAO FK, *et al.* *Rhizopus oryzae* fermentation of pine pollen and its impact on 3T3-L1 cell differentiation and lipid metabolism [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(12): 1–9.
- [27] 陆梅, 严峰, 罗海燕, 等. 松花粉安全性毒理学研究[J]. *药学研究*, 2015, 34(1): 16–19.
- LU M, YAN F, LUO HY, *et al.* Toxicological safety study of pine pollen [J]. *J Pharm Res*, 2015, 34(1): 16–19.
- [28] 樊柏林, 田辉, 王护民, 等. 破壁松花粉的毒理试验[J]. *癌变. 畸变. 突变*, 2005(6): 62–64.
- FAN BL, TIAN H, WANG HM, *et al.* Toxicological experiment of cell wall broken pine pollen [J]. *Carcinogen, Teratogen Mutagen*, 2005(6): 62–64.
- [29] 张惠惠, 崔议方, 宋书祎, 等. 过热蒸汽灭菌松花粉的安全性毒理学评价研究[J]. *药学研究*, 2022, 41(7): 442–446.
- ZHANG HH, CUI YF, SONG SY, *et al.* Safety toxicological evaluation study of overheated steam sterilization pine pollen [J]. *J Pharm Res*, 2022, 41(7): 442–446.
- [30] 楼敏涵, 曲雪峰, 张丽婧, 等. 新食品原料食叶草的安全性评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(10): 3919–3926.
- LOU MH, QU XF, ZHANG LJ, *et al.* Safety evaluation of edible dock as a new food raw material [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(10): 3919–3926.
- [31] 国家市场监督管理总局. 2020 年第 44 号公告[EB/OL]. [2020-10-31]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxxgk/fdzdgknr/tssps/art/2023/art_d0c45ed1dc6d4ff4a7eb6bb9baac0bb1.html [2024-08-30].
- State Administration for Market Regulation of China. Announcement No.44 of 2020 [EB/OL]. [2020-10-31]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxxgk/fdzdgknr/tssps/art/2023/art_d0c45ed1dc6d4ff4a7eb6bb9baac0bb1.html [2024-08-30].
- [32] 钱江, 黎福荣, 唐彬, 等. 不同月龄 SPF 级 Wistar 大鼠血液学及生化学指标正常值范围探讨[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(2): 79–83.
- QIAN J, LI FR, TANG B, *et al.* Discussion on the normal range of hematology and biochemical indicators in SPF grade wistar rats of different ages [J]. *Prog Vet Med*, 2018, 39(2): 79–83.
- [33] 张效敏, 芦瑞萍, 海秀玲, 等. 浅析血清谷丙转氨酶水平与肝脏病理改变的关系[J]. *医药前沿*, 2019, 9(11): 32–34.
- ZHANG XM, LU RP, HAI XL, *et al.* Analysis of the relationship between serum alanine aminotransferase level and liver pathological changes [J]. *J Front Med*, 2019, 9(11): 32–34.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)

作者简介

杨长军, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为功能食品研究与开发。
E-mail: aimam@126.com

何建林, 博士, 副研究员, 主要研究方向为功能食品研究与开发。
E-mail: jlhe@tio.org.cn