

研究报告

紫皮石斛花水提物对SD大鼠的生殖毒性研究

邵乃敏¹, 李能波², 孙宇立¹, 杨隽¹, 徐菁¹, 丁瑜¹, 赵菊润², 洪新宇¹, 沈定才²

(1. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2. 龙陵县石斛研究所, 云南保山 678300)

摘要:目的 对紫皮石斛花水提物进行生殖毒性评价。方法 依照 GB 15193.15—2015《食品安全国家标准 生殖毒性试验》中一代生殖毒性评价方法, 将 240 只 9 周龄 SD 大鼠(雌、雄各 120 只)按体质量随机分为 0.0、2.5、5.0 和 15.0 g/kg·BW 组。实验中受试物经口灌胃给予。检测亲代(F0)大鼠在灌胃 1~10 周中的体质量、摄食、生殖脏器质量和系数; F0 雄鼠精子参数以及 F0 雌鼠的动情周期、繁殖指数(受孕率和妊娠率)、胚胎毒性(子宫连胎质量、着床数、黄体数、活胎数、吸收胎数/率、死胎数/率); F1 大鼠的哺乳期内存活率、哺乳期内体质量、肛殖距、每窝仔鼠平均数、仔鼠性别比; F1 大鼠的青春期启动(睾丸下降、包皮分开、阴道开放)、体质量变化(3~12 周龄)、生殖脏器质量和系数、精子参数; F0 和 F1 大鼠所得脏器(包括子宫、卵巢、睾丸、附睾)进行组织病理学检查。结果 3 个剂量组的 F0 及 F1 大鼠的各生殖毒性指标与阴性对照组比较, 均无显著性差异($P>0.05$); 组织病理学检查也没有发现显著变化。结论 在本次实验条件下, 紫皮石斛花水提物生殖毒性未观察到有害作用剂量(NOEL)为 15.0 g/kg·BW。

关键词:紫皮石斛花水提物; SD 大鼠; 生殖毒性

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2023)02-0190-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.02.007

Reproductive toxicity study on water extract of flower of *Dendrobium Devonianum* Paxt. 's flower in SD rats

SHAO Naimin¹, LI Nengbo², SUN Yuli¹, YANG Jun¹, XU Jing¹, DING Yu¹, ZHAO Jurun²,
HONG Xinyu¹, SHEN Dingcai²

(1. Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200336, China;

2. Longling Institute of Dendrobium, Yunnan Baoshan 678300, China)

Abstract: Objective To evaluate the reproductive toxicity of water extract of flower of *Dendrobium devonianum* Paxt. **Methods** According to the reproductive toxicity evaluation from National Standard of the People's Republic of China 'Reproductive Toxicity Study' (GB 15193.15—2015), 240 nine-week-old SD rats (120 male and 120 female) were randomly grouped by body weight at a dose of 0.0, 2.5, 5.0 and 15.0 g/kg·BW, respectively. SD rats were administrated by gavage. The detection included the body weight and and ingestion variations from 1st to 10th week, reproductive organ weights and coefficients of F0 rats; the sperm parameters of F0 male rats, and estrous cycles, fertility index (conception and pregnancy rate), teratogenicity index (uterus weight, implantation number, corpus luteum number, living embryo number, resorption embryo number/rate and dead embryo number/rate) of F0 female rats; the survival rate and body weight variation during lactation period, anogenital distance, average litter size, sex ratio of F1 rats; the puberty onset (testis descending, foreskin separation, vaginal opening), body weight variation, reproductive organ weights and coefficients, and sperm parameters of F1 rats; the pathological examination on harvested organs of F0 and F1 rats including testis, epididymis, uterus and ovaries. **Results** Compared with control group, no significant difference in reproductive toxicity to F0 and F1 rats was observed in three dose groups ($P>0.05$). And no significant change was observed via histopathological examination. **Conclusion** In this reproductive test, the no observed adverse effect level

收稿日期: 2021-12-29

作者简介: 邵乃敏 男 主管技师 研究方向为毒理检验 E-mail: shaonaimin@scdc.sh.cn

李能波 男 林业工程师 研究方向为石斛化学成分 E-mail: 1594435869@qq.com

邵乃敏和李能波为并列第一作者

通信作者: 洪新宇 女 主任医师 研究方向为毒理检验 E-mail: hongxinyu@scdc.sh.cn

沈定才 男 高级农艺师 研究方向为石斛栽培技术 E-mail: shendingcai@126.com

洪新宇和沈定才为共同通信作者

(NOAEL) of water extract of the flower of *Dendrobium devonianum* Paxt. is 15.0 g/kg·BW.

Key words: Flower of *Dendrobium devonianum* Paxt.; SD rats; reproductive toxicity

紫皮石斛花为兰科植物紫皮石斛(齿瓣石斛, *Dendrobium devoninum* PaxtonPaxt.)的干燥花。紫皮石斛花不同于入药部位的茎,属于紫皮石斛植株上传统的食用部位,其营养成分丰富,含有蛋白质、氨基酸、多糖以及维生素、黄酮类等多种活性成分,还含有铁、钙、锌、镁、硒等微量元素^[1-5]。在紫皮石斛种植地区,一直有将紫皮石斛花作为日常食材的传统,可作为榨汁、煲汤、制饼等其他特色烹饪的食材,能够清新解郁、疏通肝脾,常作为保健茶饮用。

目前,对于食用紫皮石斛花食用安全性的基础性数据较少,相关的研究和文献报道较少。为进一步完善紫皮石斛花使用和推广所需的系统性、安全性数据,本研究在已有急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性研究的基础上,依据生殖毒性试验方法,进一步对紫皮石斛花的生殖毒性进行评价,积累并丰富相关的安全性资料。

1 材料与方法

1.1 紫皮石斛花提取液的制备

考虑到紫皮石斛花常用于袋泡茶饮及榨汁、煲汤用,采用《食品安全国家标准受试物试验》前处理方法(GB 15193.21—2014)中的袋泡茶类受试物的处理流程。本研究中将紫皮石斛花的水提物作为研究对象(每日推荐食用量为 3.0 g/60 kg·BW)。样品紫皮石斛花由龙陵县石斛研究所提供。将 6 kg 样品放入 30 L 蒸馏水,按此比例,常压、温度 80 °C~90 °C 下,浸泡 30 min 后将提取液过滤收集;再加入 30 L 蒸馏水,同样条件浸泡时间 30 min,再将提取液过滤收集;将上述两次提取液合并浓缩;最终将 60 kg 样品制得 40 L 紫皮石斛花浓缩提取液,浓度为 1.5 g/mL。

在前期的第一、二阶段毒理学评价试验和亚慢性经口毒性试验中,均未发现紫皮石斛花具有急性毒性(LD₅₀>15.0 g/kg·BW)、遗传毒性和亚慢性毒性[未观察到有害作用物质计量(No observed adverse effect level,NOAEL)值为 15.0 g/kg·BW]。

1.2 主要仪器

电子天平 Bp 3100 s(0.01 g),电子秤 ACS-3 型(1 g),制片系统(包埋机、脱水机、染色机)(Thermo),切片机 HM340E(Thermo),显微镜 eclipse 80i(Nikon)。

1.3 实验动物与饲养

SPF 级 SD 大鼠 240 只,9 周龄,雌、雄各半,由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(浙)

2019-0001]。实验动物质量合格证编号:20200820 Aaaz0619000440、20200921Aazz0619000393、20200921Aazz0619000153。实验动物隔离检疫 5 d[SYXK(沪)2018-0031]。屏障环境温度:20 °C~26 °C,相对湿度:40%~70%。饲料由苏州双狮实验动物饲料科技有限公司提供[苏饲证(2017)05005];动物自由摄食饮水。

1.4 实验方法

1.4.1 剂量设计与动物分组

根据先期试验结果,以亚慢性毒性试验的 NOAEL 值为本研究的最高灌胃剂量,设低、中、高剂量组,剂量分别为 2.5、5.0、15.0 g/kg·BW。另设一个蒸馏水对照组。动物按体质量随机分组,每组雌、雄大鼠各 30 只。灌胃容量按每日每次 10 mL/kg·BW 计。

1.4.2 亲代(F0)动物给予受试物

整体实验流程如图 1 所示。实验期间,每天在同一时间段给予受试物,每周 7 d。雄性 F0 大鼠灌胃至交配期结束,在实验第 13 周麻醉后,进行腹主动脉采血和解剖。雌性 F0 大鼠则持续灌胃至子代(F1)动物断乳,在实验的 17 周麻醉后,进行腹主动脉采血和解剖。只有在分娩当日(Postnatal day 0, PND 0),不对雌鼠进行灌胃,以免干扰分娩过程。

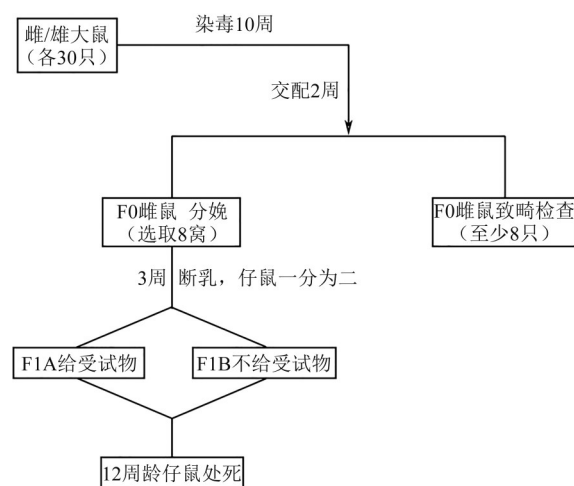


图1 生殖毒性试验流程图

Figure 1 The scheme of one-generation reproductive toxicity study

1.4.3 交配与致畸检查

在实验第 11 周,将 F0 雌、雄大鼠按照 1:1 比例进行合笼交配,将交配成功的雌鼠单笼饲养,当天记为受孕 0 d。交配期为 2 周。每个剂量组取至少 8 只孕鼠在孕期第 20 天脱臼处死后,进行致畸解剖。

1.4.4 分娩与窝的调整

记录母鼠生理情况与新生仔鼠的出生数、活仔数、窝质量以及外观异常与畸形。在 PND 4 根据仔鼠肛殖距判断性别,每窝随机留取雌、雄仔鼠各 4 只,多余幼仔处死。

1.4.5 F1 动物断乳及饲养

F1 动物于 PND 22 断乳,每个剂量组随机选取 8 窝仔鼠继续饲养。仔鼠按剂量组和性别随机编入 F1A 组与 F1B 组,其中 F1A 组动物灌胃给予受试物,F1B 组动物给予蒸馏水,直到 12 周龄麻醉后,进行腹主动脉采血和解剖。饲养期间观察青春期启动指标。

1.4.6 观察和记录

实验期间,每天观察并记录动物的一般状态、中毒体征等情况。每周记录饲料消耗量和体质量。在实验的第 5~6 周用阴道涂片法对雌鼠进行动情周期的检查。动物处死前禁食 24 h,称质量后大体解剖,观察有无明显病变。所取脏器称质量后用福尔马林固定,用于组织病理学检查。未产仔的 F0 雌鼠的子宫,用 2% 浓度的硫化铵进行染色,检查子宫着床点。

精子参数检查:取雄鼠的左侧附睾检测精子参数(包括存活率、精子形态和畸形率)。附睾称质量后,于 4 mL 37 °C 预温的 1640 培养液中钝性分离,恒温扩散 10 min 后获得精子悬液。取 4 滴精子悬液于显微镜下观察活动精子的比例(%)。利用血球计数板于显微镜下计数精子数量,以精子数/g 附睾表示。于载玻片上甲醇固定精子悬液,1% 伊红染色 1 h 后进行精子形态学观察,计算畸形率(‰)。

1.4.7 检测及计算指标

检测 F0 大鼠在灌胃 1~10 周中的体质量、摄食、生殖脏器质量和系数;F0 雄鼠精子参数以及 F0 雌鼠的动情周期、繁殖指数(受孕率和妊娠率)、胚胎毒性(子宫连胎质量、着床数、黄体数、活胎数、吸收胎数/率、死胎数/率);F1 大鼠的哺乳期内存活率、哺乳期内体质量、肛殖距、每窝仔鼠平均数、仔鼠性别比;F1 大鼠的青春期启动(睾丸下降、包皮分开、阴道开放)、体质量变化(3~12 周龄)、生殖脏器质量和系数、精子参数;F0 和 F1 大鼠所得脏器(包括子宫、卵巢、睾丸、附睾)进行组织病理学检查。

受孕率(%)=(产仔+致畸+仅有着床点)/交配母鼠数×100%

妊娠率(%)=产仔/(产仔+仅有着床点)母鼠数×100%

出生活仔率(%)=PND 0(活仔数/总仔数)×100%

出生存活率(%)=(PND 4/PND 0)活仔数×100%

哺乳存活率(%)=(PND 21/PND 4 调整后)活仔数×100%

1.4.8 动物伦理

本研究所有流程符合动物试验伦理要求,并于试验前通过实验动物伦理审核。

1.5 统计学分析

用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,其中的正态资料以平均数±标准差($\bar{X}\pm SD$)表示,采用单因素方差分析对结果进行统计学处理,采用秩和检验、 χ^2 /Fisher 精确 χ^2 检验进行数据处理。

2 结果

2.1 对 F0 大鼠生长与摄食的影响

与对照组相比,各剂量组大鼠在实验 1~10 周内,体质量变化无显著性差异($P>0.05$),见图 2;在第 10 周结束时,各剂量组大鼠的总体质量增加、总摄食量与总食物利用率与对照组相比无显著性差异($P>0.05$,表 1)。各剂量组 F0 动物的禁食末体质量、生殖脏器质量与系数,与对照组比较无显著性差异($P>0.05$,表 2)。

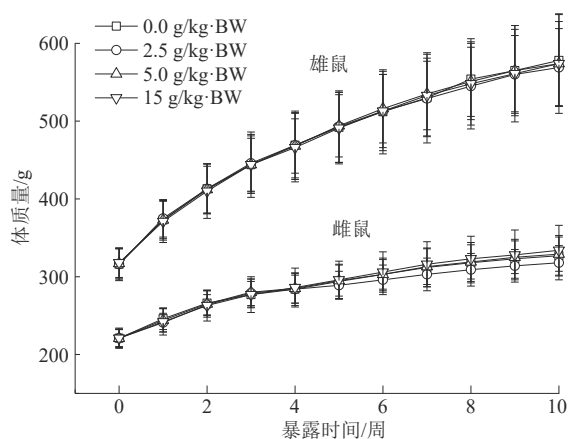


图 2 F0 雌、雄大鼠灌胃 1~10 周内的体质量变化($n=30$)
Figure 2 The body weight variation of F0 rats from 1st to 10th week of study ($n=30$)

表 1 第 10 周时 F0 大鼠总摄食量、总体质量增加与总食物利用率($n=30$)

性别	灌胃剂量/(g/kg·BW)	总摄食量/g	总体质量增加/g	总食物利用率/%
雄	0.0	1 998±135	257.6±72.6	12.8±3.5
	2.5	1 982±99	256.4±43.4	12.9±2.1
	5.0	1 971±129	255.9±44.4	13.0±2.0
	15.0	1 952±161	242.0±56.8	12.3±2.5
雌	0.0	1 398±77	110.6±27.8	7.9±1.8
	2.5	1 345±79	95.8±20.7	7.1±1.2
	5.0	1 391±85	107.3±19.4	7.7±1.4
	15.0	1 379±99	120.6±31.5	8.7±1.8

表2 F0大鼠生殖脏器质量与系数(n=30)

Table 2 The reproductive organ weights and coefficients of F0 rats (n=30)

性别	剂量/ (g/kg·BW)	动物数/只	禁食末 体质量/g	睾丸/g	附睾/g	睾丸/体/%	附睾/体/%
				子宫/g	卵巢/g	子宫/体/%	卵巢/体/%
雄	0.0	30	566±64	3.41±0.45	1.69±0.33	0.61±0.08	0.30±0.06
	2.5	30	554±56	3.52±0.33	1.77±0.42	0.64±0.07	0.32±0.06
	5.0	30	567±60	3.34±0.55	1.83±0.42	0.59±0.09	0.32±0.06
	15.0	30	566±63	3.44±0.35	1.60±0.24	0.61±0.08	0.28±0.05
雌 [#]	0.0	22	321±28	0.82±0.26	0.24±0.07	0.26±0.08	0.07±0.02
	2.5	21	311±17	0.85±0.21	0.27±0.06	0.28±0.07	0.09±0.02
	5.0	20	327±28	0.85±0.18	0.25±0.06	0.26±0.06	0.08±0.01
	15.0	22	321±32	0.80±0.23	0.26±0.07	0.25±0.08	0.08±0.02

注：[#]雌鼠数量是扣除了产前检查畸胎的动物数

2.2 对F0雄鼠生殖毒性的影响

与对照组相比,15.0 g/kg·BW 组雄鼠的各类精

子畸形数与总畸形率、精子活率和精子密度差异无

统计学意义(P>0.05,表3)。

表3 F0雄鼠的精子参数检测与统计(n=30)

Table 3 The effect of exposure on the sperm parameters of F0 male rats (n=30)

剂量/ (g/kg·BW)	精子畸形			总畸形率/%	精子活率/%	精子密度/ (10 ⁷ 个/g附睾)
	双倍体	折叠	头部不定型			
0.0	0	155	121	9.20	72.1±12.1	3.57±1.46
15.0	5	175	147	10.90	71.1±16.0	3.65±1.21

2.3 对F0雌鼠生殖毒性的影响

在2周的动情周期检测期内,各剂量组至少经历过1个完整动情周期的母鼠数,与对照组比较无显著性差异(P>0.05,表4)。结合未产仔雌鼠子宫的硫化铵染色结果,对F0雌鼠的受孕率与妊娠率进行统计,发现各剂量组繁殖指数与对照组相比,差异无统计学意义(P>0.05,表5)。经致畸解剖,发现各剂量组的子宫连胎质量、黄体数、着床数、活胎

表4 F0雌鼠动情周期发生情况

Table 4 The effect of exposure on estrous cycles of F0 female rats

剂量/ (g/kg·BW)	动物数/ 只	经历完整动情 周期母鼠数/只	未经历完整动情 周期母鼠数/只
0.0	30	22	8
2.5	30	23	7
5.0	30	21	9
15.0	30	22	8

数、吸收胎数/率、死胎数/率等指标,与对照组比较无显著性差异(P>0.05,表6)。

表5 F0雌鼠受孕情况统计

Table 5 The exposure effect on fertility index of F0 female rats

剂量/ (g/kg·BW)	雌鼠数 [#] /只	产仔母鼠数/只	致畸母鼠数量 /只	仅有着床点母鼠数/只	未孕母鼠数/只	受孕率/%	妊娠率/%
0.0	30	17	8	0	5	83.3	100.0
2.5	30	13	8	0	9	70.0	100.0
5.0	30	14	8	0	8	73.3	100.0
15.0	30	13	8	0	9	70.0	100.0

注：[#]雌鼠数量是扣除了产前检查畸胎的动物数

表6 胚胎毒性指标(n=8)

Table 6 The embryo toxicity index of F0 female rats (n=8)

剂量/ (g/kg·BW)	子宫连胎质量/g	黄体数/个	着床数/个	活胎数/个	吸收胎数/个	吸收胎率/%	死胎数/个	死胎率/%
0.0	71.90±19.54	19.25±5.65	14.50±2.51	12.88±3.27	13	11.2	0	0.0
2.5	79.93±7.35	16.50±2.20	15.00±2.20	14.25±1.58	6	5.0	0	0.0
5.0	75.38±22.49	19.13±2.80	15.25±3.96	14.38±4.44	7	5.7	0	0.0
15.0	79.35±25.83	18.38±2.77	15.75±4.80	14.88±5.28	7	5.6	0	0.0

2.4 对F1大鼠哺乳期内生长和存活率的影响

每个剂量组取8窝仔鼠进行统计,见表7。在哺乳期(PND 0~21)内,与对照组相比,5.0 g/kg·BW 组在PND 4时窝质量有显著性差异(P<0.05),但

未见剂量反应关系,且从PND 7开始,窝质量无显著性差异(P>0.05),因此认为此差异无统计学意义。其余各剂量组仔鼠窝质量与对照组比较无显著性差异(P>0.05)。PND 4时各剂量组雌、雄仔鼠

表7 F1大鼠哺乳期内窝质量变化和肛殖距统计

Table 7 The litter weight variation and anogenital distance of F1 rats during lactation period

剂量/ (g/kg·BW)	窝数	PND 4/g	PND 7/g	PND 14/g	PND 21/g	PND 4肛殖距/mm	
						雄	雌
0.0	8	87±9	141±15	304±34	512±47	6.69±0.59	4.01±0.36
2.5	8	82±7	136±12	291±21	478±29	6.53±0.45	3.95±0.29
5.0	8	99±24*	158±36	328±51	549±83	6.87±0.51	4.11±0.44
15.0	8	89±23	138±34	287±64	480±84	6.75±0.45	4.07±0.42

注：*与对照组比较， $P<0.05$

的肛殖距，与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。反应关系，且经 χ^2 检验差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较，各剂量组F1动物存活率无剂量

表8 F1大鼠哺乳期内存活情况

Table 8 The exposure effect on the survival rate of F1 rats during lactation period

剂量/ (g/kg·BW)	窝数	PND 0	PND 0	PND 4	PND 4调整后	PND 21	出生	出生	哺乳
		总仔数/只	活仔数/只	活仔数/只	活仔数/只	活仔数/只	活仔率/%	存活率/%	存活率/%
0.0	8	123	123	120	64	64	100.0	97.6	100.0
2.5	8	128	127	125	64	64	99.2	98.4	100.0
5.0	8	114	113	112	64	64	99.1	99.1	100.0
15.0	8	106	105	103	64	64	99.1	98.1	100.0

2.5 对F1大鼠(PND 4)每窝仔鼠平均数与性别比的影响

如表9, F1大鼠在PND 4时, 各剂量组每窝仔鼠平均数与对照组比较, 无显著性差异($P>0.05$); 各剂量组的仔鼠性别比与对照组比较, 无剂量反应关系, 经 χ^2 检验差异无统计学意义($P>0.05$)。

表9 每窝仔鼠平均数与仔鼠性别比

Table 9 The exposure effect on average litter size and sex ratio of F1 rats

剂量/ (g/kg·BW)	窝数	平均仔鼠数/ (只/窝)	仔鼠性别比			
			雄/只	雌/只	雄/雌	总数/只
0.0	8	15.0±1.7	65	55	1.18	120
2.5	8	15.6±1.5	66	59	1.12	125
5.0	8	14.0±1.2	55	57	0.96	112
15.0	8	12.9±2.9	53	50	1.06	103

2.6 对F1大鼠青春期启动的影响

如表10, 与各自的对照组比较, 睾丸下降、包皮分开和阴道开放均无显著性差异($P>0.05$); 并且F1A与F1B的同剂量组之间比较无显著性差异($P>0.05$)。

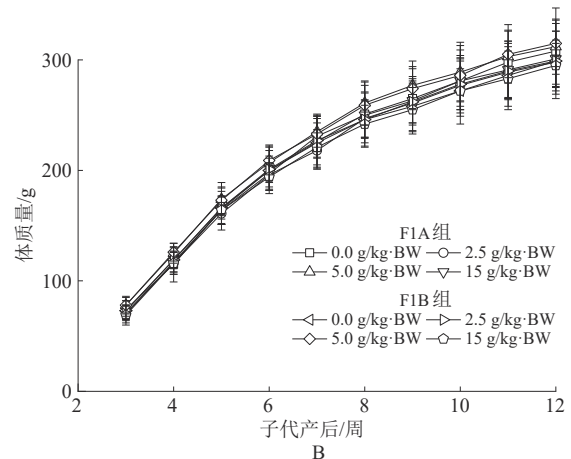
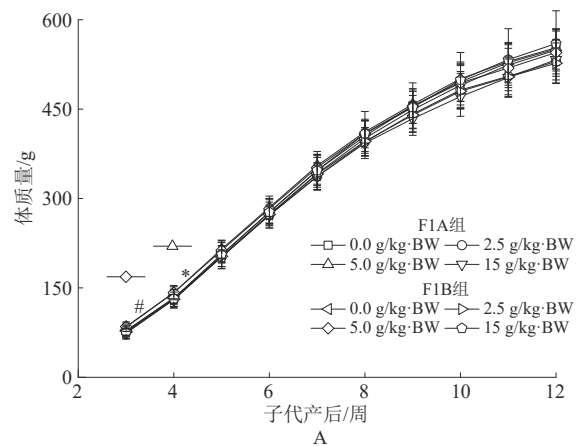
表10 F1大鼠青春期启动情况($n=16$)

Table 10 The exposure effect on the puberty onset of F1 rats ($n=16$)

子代	剂量/ (g/kg·BW)	睾丸下降 (PND)	包皮分开 (PND)	阴道开放 (PND)
F1A	0.0	23.4±1.0	30.6±1.3	31.9±1.5
	2.5	23.6±0.7	30.2±1.6	31.9±1.3
	5.0	23.1±0.8	30.4±1.3	31.8±1.9
	15.0	23.5±1.1	30.3±1.5	31.1±1.3
F1B	0.0	23.4±1.0	30.2±1.1	31.1±0.9
	2.5	23.3±0.6	30.0±1.5	31.6±1.4
	5.0	23.2±0.9	30.4±1.5	31.7±0.9
	15.0	23.3±0.8	30.6±1.5	31.6±1.6

2.7 对F1大鼠断乳后生长的影响

如图3, F1A组的5.0 g/kg·BW组雄鼠在4周



注：*和#分别代表F1A组和F1B组相对于各自对照组的显著性差异($P<0.05$)

图3 F1雄性(A)和雌性(B)大鼠出生后3~12周龄的体质量变化($n=16$)

Figure 3 The body weight variation of F1 of male (A) and female (B) rats between 3 and 12 weeks old ($n=16$)

龄时体质量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 以及 F1B 组的 5.0 g/kg·BW 组雄鼠在 3 周龄时体质量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但均无剂量反应关系; 其余各组动物在各个时间点的体质量与对照组比较, 无显著性差异 ($P > 0.05$); 同性别且同剂量组的 F1A 与 F1B 大鼠相比较, 体质量差异无统计学意

义 ($P > 0.05$)。

F1 大鼠在 12 周龄处死解剖, 得到的生殖脏器质量、系数与各自对照比较, 无显著性差异 ($P > 0.05$); 同性别且同剂量的 F1A 组与 F1B 组大鼠相比较, 脏器质量与系数也无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 11)。

表 11 F1 大鼠生殖脏器质量 ($n=16$)

Table 11 The reproductive organ weights and coefficients of F1 rats ($n=16$)

子代	性别	剂量/(g/kg·BW)	睾丸/g	附睾/g	睾丸/体/%	附睾/体/%
			子宫/g	卵巢/g	子宫/体/%	卵巢/体/%
F1A	雄	0.0	3.58±0.29	1.48±0.18	0.69±0.06	0.28±0.03
		2.5	3.60±0.23	1.48±0.26	0.72±0.07	0.30±0.06
		5.0	3.50±0.32	1.50±0.18	0.67±0.08	0.29±0.04
		15.0	3.33±0.50	1.34±0.22	0.66±0.10	0.27±0.04
F1B	雄	0.0	3.32±0.70	1.56±0.15	0.64±0.14	0.30±0.04
		2.5	3.61±0.33	1.68±0.34	0.72±0.07	0.34±0.07
		5.0	3.58±0.30	1.57±0.35	0.70±0.08	0.31±0.08
		15.0	3.38±0.38	1.48±0.20	0.64±0.07	0.28±0.03
F1A	雌	0.0	0.68±0.15	0.25±0.10	0.23±0.07	0.08±0.03
		2.5	0.69±0.20	0.23±0.05	0.24±0.08	0.08±0.02
		5.0	0.77±0.25	0.25±0.09	0.25±0.08	0.08±0.03
		15.0	0.66±0.14	0.25±0.06	0.22±0.05	0.08±0.02
F1B	雌	0.0	0.70±0.17	0.21±0.07	0.25±0.07	0.07±0.02
		2.5	0.73±0.24	0.23±0.05	0.25±0.10	0.08±0.02
		5.0	0.63±0.14	0.23±0.07	0.21±0.05	0.08±0.02
		15.0	0.76±0.21	0.23±0.07	0.26±0.08	0.08±0.02

2.8 对 F1 雄鼠精子参数的影响

如表 12, F1A 与 F1B 的 15.0 g/kg·BW 组雄鼠的各类精子畸形数、总畸形率、精子活率、精子密度

与各自对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 同剂量的 F1A 与 F1B 组雄鼠互相比较, 差异也无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 12 F1 雄鼠的精子参数检测与统计 ($n=16$)

Table 12 The effect of exposure on the sperm parameters of F1 male rats ($n=16$)

子代	灌胃剂量/ (g/kg·BW)	精子畸形				精子活率/%	精子密度/(10^7 个/g 附睾)
		双倍体	折叠	头部不定型	总畸形率/% _{co}		
F1A	0.0	2	155	108	16.56	68.8±17.7	3.23±0.75
	15.0	4	165	114	17.69	70.0±17.8	3.45±1.29
F1B	0.0	1	153	100	15.88	72.7±19.1	3.01±1.59
	15.0	2	172	114	18.00	62.5±20.5	3.60±1.40

2.9 组织病理学检查

15.0 g/kg·BW 组 F0 和 F1 动物的肝、肾、脾、脑、睾丸/卵巢、附睾/子宫等脏器, 与对照组比较未见明显差异 ($P > 0.05$)。脏器色泽、大小、形态结构无明显异常, 镜检未发现明显的组织病理学变化。

3 讨论

紫皮石斛花水提取物对 F0 和 F1 代 SD 大鼠均未发现具有明显的生殖毒性。因此, 紫皮石斛花水提取物的生殖毒性实验的 NOAEL 为 15.0 g/kg·BW。

生殖毒性实验是食品安全性评价的重要组成部分, 主要评估受试物对动物生殖功能和胚胎发育过程的影响, 判断其可能对亲代生殖功能和子代生长发育产生干扰, 包括精卵形成、交配、着床、胎仔的吸收和死亡、宫内活胎发育、子代生长发育等。

紫皮石斛花的生殖毒性取决于其所含的活性成分。经化学分析, 紫皮石斛花中富含多酚、多糖、游离氨基酸、可溶性糖等天然化合物, 具有抗氧化、抗菌和免疫调节等活性^[6-10]。现有的文献报道以及本研究组前期对于紫皮石斛花提取液的第一、二阶段毒性试验中(包括致畸试验), 均未发现紫皮石斛花具有明显毒性^[11-14]。为进一步完善紫皮石斛花使用和推广所需的系统性安全性数据, 在本研究中通过观察和统计一般毒性、母体毒性、生殖毒性、发育毒性等各项参数, 来评价紫皮石斛花的生殖毒性。

一般毒性主要包括动物体质量、总体脂量增加、总摄食量、总食物利用率以及主要脏器的组织病理学检查。这些指标的变化能够说明暴露期间受试物对动物维持正常生长与生理功能的影响。实验结果表明紫皮石斛花提取液对 F0 大鼠不具有明

显的一般毒性,并且在 F0 雌鼠受孕期间,各剂量组未观察到体质量减轻、生理功能异常,以及其他与毒性有关的临床症状,表明受试物对亲代雌鼠无明显母体毒性。

雄性动物的生殖毒性主要取决于精子的发生、分化、成熟,该过程主要受到由脑—垂体—性腺轴系统调节的性激素分泌和睾丸/附睾功能的影响,表现为精子参数(畸形数/率、活率、密度)和睾丸/附睾组织病理学的变化。任何能够影响该过程的物质,都有可能干扰雄性动物的生殖功能。本实验中,各剂量组 F0 雄鼠睾丸和附睾的质量/系数,以及各精子参数与对照组比较无显著性差异($P>0.05$),表明受试物对 F0 雄鼠无明显生殖毒性。

雌性动物的生殖行为是一个非常复杂的过程,生殖毒性可以体现在多个方面:脑—垂体—性腺轴系统调节的性激素分泌;卵巢功能的维持,如卵泡的发育与卵母细胞的发育、成熟和排卵;繁殖指数与胚胎毒性,如受孕率、着床率、胎吸收率、妊娠率、产仔数等。由实验结果可知,各剂量组 F0 雌鼠子宫和卵巢的质量/系数、动情周期发生情况、繁殖指数(受孕率、妊娠率)、胚胎毒性指标(子宫连胎质量、黄体数、着床数、活胎数、吸收胎数/率、死胎数/率)、平均窝仔数、性别比与对照组比较均无显著性差异($P>0.05$),表明受试物对 F0 雌鼠无明显生殖毒性。

子代在哺乳期内和断乳后的发育情况也能反映受试物在整个生殖过程中对子代动物的潜在发育毒性。由实验结果可见,各剂量组 F1 大鼠在哺乳期内的窝质量变化、肛殖距、存活情况(出生活仔率、出生存活率、哺乳存活率)、青春期启动情况(睾丸下降、包皮分开、阴道开放),以及断乳后至 12 周龄解剖时体质量与对照组比较无显著性差异($P>0.05$),各主要脏器未发现显著病理学变化,表明受试物对 F1 大鼠无明显发育毒性。并且,也未发现受试物对 F1 雄鼠具有明显的生殖毒性。

由脑—垂体—性腺轴系统调节分泌的性激素对于动物维持正常生殖功能至关重要。在本研究中,考虑到试验结果表明受试物未具有明显的生殖、发育等毒性,因此并未进一步对动物的血清性激素进行检测。若实验过程中发现雄性大鼠出现明显的精子生成障碍、精子活率低、畸形率高,雌性大鼠动情周期紊乱,以及受孕率较对照组降低的情况,则非常有必要对血清性激素进行检测,有利于对最后的实验结果进行理解和解释。

本研究采用食品安全国家标准 2015 版中的生殖毒性试验标准,在 2020 版的食品安全国家标准

中,该标准已发展为扩展一代生殖毒性试验(GB 15193.29—2020)。相比于 2015 版,新版本中主要作了 4 方面的变化:将动物交配前受试物暴露时间缩短为 2 周,该时间足够使受试物产生对雌、雄动物生精与动情周期的影响;取消了 2015 版中致畸检查部分的内容,改为直接观察出生仔鼠的健康状况;增加了对仔鼠神经发育毒性和发育免疫毒性检测的内容;简化了子代仔鼠断乳后暴露流程,改为对全部仔鼠继续暴露和观察。新标准精准符合经济合作与发展组织相关标准,对生殖毒性试验设计具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] BI Z M, WANG Z T, XU L S. Chemical constituents of *Dendrobium moniliforme* [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(1): 124-126.
- [2] YANG L, WANG Z T, XU L S. Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene, and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1104(1-2): 230-237.
- [3] 李燕,王春兰,王芳菲,等. 铁皮石斛中的酚酸类及二氢黄酮类成分[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(13): 975-979.
LI Y, WANG C L, WANG F F, et al. Phenolic components and flavanones from *Dendrobium candidum* [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2010, 45(13): 975-979.
- [4] 金鹏程,丁永丽,赵艳丽,等. 齿瓣石斛中微量元素含量及浸出特性[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 292-293.
JIN P C, DING Y L, ZHAO Y L, et al. Concentrations and dissolution characteristics of trace elements in *Dendrobium devonianum* Paxt. [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(4): 292-293.
- [5] 郑志新,李昆,张昌顺,等. 云南龙陵齿瓣石斛化学成分分析测定及栽培方式选择[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1426-1427.
ZHENG Z X, LI K, ZHANG C S, et al. Analysis and determination of chemical ingredients in *Dendrobium devonianum* in Longling county of Yunnan province and selection of its cultivation modes [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(4): 1426-1427.
- [6] 宋美芳,李光,陈曦,等. 两种石斛多糖提高小鼠免疫活性的初步研究[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(6): 428-431.
SONG M F, LI G, CHEN X, et al. Primary study of *Dendrobium* polysaccharides improving immunity activity on mouse [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013, 48(6): 428-431.
- [7] 李光,宋美芳,李宜航,等. 不同种类石斛多糖成分对小鼠脾脏免疫功能的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(10): 1108-1111.
LI G, SONG M F, LI Y H, et al. Influence of polysaccharide from different *Dendrobium* on mice spleen immune functions [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2012, 17(10): 1108-1111.

- [8] 张爱莲, 于敏, 徐宏化, 等. 齿瓣石斛的化学成分及其抗氧化活性[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 844-847.
ZHANG A L, YU M, XU H H, et al. Constituents of *Dendrobium devonianum* and their antioxidant activity[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(6): 844-847.
- [9] 王琳, 王涛, 杨敏, 等. 齿瓣石斛提取物体外抗菌作用初步研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(17): 9338-9339.
WANG L, WANG T, YANG M, et al. Preliminary study on the antibacterial effect of *Dendrobium devonianum* paxt. extracts *in vitro* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(17): 9338-9339.
- [10] 李崇萍, 刘倩葶, 刘琨毅, 等. 四种石斛花化学成分及抗氧化活性[J]. 科学技术与工程, 2021, 21(9): 3708-3715.
LI C P, LIU Q T, LIU K Y, et al. Chemical compounds and antioxidant activities in four kinds of *Dendrobium's* flower[J]. Science Technology and Engineering, 2021, 21(9): 3708-3715.
- [11] 吴月国, 王茵, 梅松, 等. 齿瓣石斛提取物的急性毒性和遗传毒性[J]. 中成药, 2017, 39(6): 1281-1284.
WU Y G, WANG Y, MEI S, et al. The acute toxicity and genotoxicity of *Dendrobium devonianum* Paxt. extract[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2017, 39(6): 1281-1284.
- [12] 董寿堂, 杨娇, 张旭强, 等. 紫皮石斛浸膏对小鼠急性毒性实验的研究[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(5): 257-259.
DONG S T, YANG J, ZHANG X Q, et al. Experimental study on acute toxicity of *Dendrobium devonianum* extract in mice[J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2019, 16(5): 257-259.
- [13] 吴月国, 刘臻, 王茵, 等. 齿瓣石斛对大鼠的亚慢性毒性[J]. 中成药, 2018, 40(11): 2551-2553.
WU Y G, LIU Z, WANG Y, et al. The subchronic toxicity of *Dendrobium devonianum* Paxt. in rats [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(11): 2551-2553.
- [14] 梅松, 陈建国, 刘冬英, 等. 齿瓣石斛提取物对SD大鼠的致畸作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 3793-3797.
MEI S, CHEN J G, LIU D Y, et al. Teratogenic effects of *Dendrobium devonianum* Paxt. extract on SD rats[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(12): 3793-3797.