

研究报告

香露兜粉对大鼠致畸性研究

冯丁山,黄业宇,苏林梁,吴爱琴,张晓昕,王湛,林卫华

(海南省疾病预防控制中心,海南海口 570203)

摘要:目的 评价食用香露兜粉对人体的母体毒性、胚胎毒性和致畸性。方法 采用 GB 15193.14—2015《食品安全国家标准 致畸试验》中的方法,将已受孕的 SD 大鼠随机分为溶媒对照组、阳性对照组以及香露兜粉样品高剂量组、中剂量组、低剂量组(分别为 2.50、1.25 和 0.60 g/kg BW),每组 16 只。于受孕第 6 天~第 15 天,采用灌胃方式经口给予受试物,溶媒对照组用等量纯水,阳性对照组腹腔注射环磷酰胺 15 mg/kg。受孕第 20 天处死孕鼠,检查、解剖并记录胎鼠的畸形情况。**结果** 香露兜粉各剂量组均未见母体毒性、胚胎毒性和致畸作用,各项指标与溶媒对照组比较,均未发现明显异常,整体分析不具有剂量-反应关系趋势。阳性对照组大鼠有明显的胚胎毒性和致畸毒性。致畸作用的未观察到有害作用剂量(NOEL)为 2.50 g/kg BW。**结论** 在本研究条件下,未见香露兜粉样品具有母体毒性、胚胎毒性和致畸作用。

关键词:香露兜粉;大鼠;母体毒性;胚胎毒性;致畸性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)02-0130-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.02.004

Study on teratogenicity of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder in rats

FENG Dingshan, HUANG Yeyu, SU Linliang, WU Aiqin, ZHANG Xiaoxin,
WANG Zhan, LIN Weihua

(Hainan Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Hainan Haikou 570203, China)

Abstract: Objective To evaluate whether the *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder had reproductive toxicity to the SD rat and whether it was teratogenic to the embryo, perform toxicological evaluation of its safety, and provide the basis of the toxicology safety for the development of food additive. **Methods** Pregnant rats were randomly divided into negative control group, positive control group, *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder sample high-dose group, middle dose group and low-dose group (2.50, 1.25 and 0.60 g/kg BW respectively), using the teratogenic test method in GB 15193.14-2015. The test substance was orally administered on the 6th to 15th day of conception, and was administered by intragastric administration. The vehicle control group was intragastrically administered with the same amount of pure water; the positive control group was intraperitoneally injected with cyclophosphamide 15 mg/kg. The pregnant rats were sacrificed on the 20th day of pregnancy, and the abnormalities of the fetal rats were examined, dissected and recorded. **Results** The groups intervened with *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder showed no produce maternal toxicity, embryonic toxicity nor teratogenicity, compared with the negative control group. No significant abnormality was found in the indicators, and the overall analysis did not have a dose-response relationship. The positive control group showed obvious embryonic toxicity and teratogenicity. The no observed adverse effect level (NOEL) was 2.50 g/kg BW. **Conclusion** In the dose range of this experimental study, there was no teratogenic effect in the sample of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder.

Key words: *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder; rat; maternal toxicity; embryo toxicity; teratogenicity

香露兜(*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)为露兜树科露兜树属常绿草本植物,又名板兰香、甲抛叶、香兰叶、香林投、七叶兰、碧血树,原产地为印度尼西亚马鲁古群岛^[1],在东南亚国家和我国人群中也有多年食用的历史,主要用于制作菜肴和食物香

料。我国于 20 世纪 50 年代从国外引进,已经在海南省万宁市、儋州市、琼海市以及云南省南部地区普遍种植,形成了一定的种植规模。

目前国内关于香露兜叶的研究主要集中于其化学成分及功效方面,对食用的毒理学研究鲜见报道。为更系统地了解香露兜粉作为食品添加剂的食用安全性,开展包括急性毒性、遗传毒性、亚慢性毒性和致畸性研究在内的系统的毒理学安全性评

价势在必行。本研究将在前期毒理学评价基础上,依照 GB 15193.14—2015《食品安全国家标准 致畸试验》^[2]的要求,评价香露兜粉的母体、胚胎和致畸毒性,为其进一步的开发利用提供基础毒理学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物

香露兜粉为绿色粉末状,由新鲜香露兜叶洗净、晾干,采用真空冷冻法干燥后粉碎,过 200 目筛后制成。1 g 香露兜干粉相当于 7 g 新鲜香露兜叶,以干粉作为受试样品进行配制(实际使用时按体质量调整配制量)。

1.1.2 主要仪器与试剂

电子天平,显微镜,游标卡尺。

环磷酰胺(5 g/瓶,美国 Aladdin Industrial Corporation)。取 200 mg 环磷酰胺加灭菌生理盐水 8.0 ml,溶解后,取 1.8 ml 加灭菌生理盐水至 3.0 ml,即为 15 mg/ml,按需配置。

1.1.3 实验动物及饲养条件

选无特定病原体(SPF级)11周龄雌性SD大鼠120只,同龄雄性大鼠40只,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(湘)2014-0011,质量合格证号:43006700016607。饲料由长沙市天勤生物技术有限公司提供,质量合格证号:43000200003731。实验动物使用单位为海南省疾病预防控制中心,使用许可证号:SYXK(琼)2015-0021,动物实验室环境:温度为20~26℃,相对湿度为40%~70%。

1.2 方法

1.2.1 剂量分组

本研究根据急性经口毒性所得到的最大耐受剂量(MTD)大于10.00 g/kg BW,采用最大溶解浓度和最大灌胃容量的原则,分别称取受试样品0.60、1.25、2.50 g,加蒸馏水至20.0 ml,搅拌混匀,设为低、中、高三个剂量组,即0.60、1.25、2.50 g/kg BW。根据GB 15193.14—2015^[2]并结合本实验室以往数据,另设溶媒对照组(蒸馏水)和阳性对照组(环磷

酰胺 15 mg/kg BW)。

1.2.2 实验动物分组及处理

选健康、性成熟未交配过的SD雌性大鼠与雄性大鼠,按1:1数量同笼后,每日早晨观察阴栓,查出阴栓日作为“受孕”0天。孕鼠随机分配到各组,称体质量并编号,每个剂量组、溶媒对照组和阳性对照组的孕鼠均为16只。受试物各剂量组和溶媒对照组孕鼠在受孕的第6天~第15天每天灌胃一次,灌胃容量为20 ml/kg BW,并在受孕第0天、第6天、第9天、第12天、第15天、第20天称量体质量,根据体质量调整灌胃量。阳性对照组孕鼠在受孕第12天腹腔注射给予环磷酰胺(1 ml/kg BW)。

1.2.3 观察指标

受孕第20天,用二氧化碳麻醉方式处死孕鼠,剖腹后取出子宫连胎称重,检查并记录着床数、黄体数、吸收胎数、早死胎数、晚死胎数和活胎数,识别胎鼠性别并记录;称胎仔体质量及胎盘重量,测量胎仔体长及尾长;逐一检查胎鼠外观有无异常,将每窝1/2的活胎鼠固定,检查骨骼发育情况,另每窝1/2的活胎鼠用Bouins液固定,检查内脏。

1.3 统计学分析

全部数据采用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理。率的统计用卡方检验;孕鼠增重用方差分析,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;胎鼠身长、体质量、窝平均活胎数、子宫连胎重、黄体数用t检验;以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察结果

试验期间,各组孕鼠行动灵活,反应敏捷,被毛整洁,目光有神,眼鼻口无分泌物,摄食、饮水未见异常,体质量增长良好,均未见流产及其他明显中毒反应,无死亡。由表1可见,各剂量组孕鼠体质量、子宫连胎重量、体质量增长量与溶媒对照组比较,差异均无统计学意义(P>0.05);阳性对照组孕鼠第20天体质量、子宫连胎重量、体质量增长量与溶媒对照组比较,差异均有统计学意义(F=7.324, P<0.01; F=55.082, P<0.01; F=12.661, P<0.01)。

表1 香露兜粉对孕鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=16, g$)

Table 1 Effect of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder on body weight of pregnant rats

分组	孕鼠体质量					子宫连胎重量	孕鼠体质量增长量	
	第0天	第6天	第9天	第12天	第15天			第20天
低剂量组	278.8±15.8	330.7±19.2	340.0±22.5	357.6±23.1	376.5±21.2	453.0±31.4	82.55±27.18	122.9±22.5
中剂量组	280.7±18.2	331.7±33.8	339.7±36.8	361.5±38.8	388.9±36.6	464.4±46.8	87.18±26.86	132.7±44.2
高剂量组	281.7±18.4	331.5±23.8	332.3±32.6	341.4±30.5	359.0±31.7	438.8±38.4	81.02±15.06	107.3±23.7
溶媒对照组	276.3±15.2	326.5±18.6	338.6±22.5	353.9±23.8	366.6±25.6	447.8±34.8	88.17±12.82	121.2±22.4
阳性对照组	284.2±18.9	326.9±25.3	348.6±25.5	375.9±34.6	379.7±27.8	415.2±33.2 [#]	40.90±22.02 [#]	88.3±29.5 [#]

注:[#]表示与溶媒对照组比较P<0.01

2.2 对胎鼠的影响

2.2.1 对胎鼠生长发育的影响

由表2可见,低剂量组黄体数与溶媒对照组比较,差异有统计学意义($t = 2.666, P < 0.05$);其他各剂量组黄体数与溶媒对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。低、中剂量组胎盘重量与溶媒对照

组比较,差异均有统计学意义($t = 2.336, P < 0.05$; $t = 2.457, P < 0.05$),高各剂量组胎鼠各项指标与溶媒对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。阳性对照组胎鼠体质量、胎盘重量、胎鼠体长及胎鼠尾长与溶媒对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表2 香露兜粉对胎鼠生长发育的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder on growth and development of fetal rats

分组	孕鼠数 /只	受检胎鼠 数/只	胎鼠体质量 /g	胎盘重量 /g	胎鼠体长 /mm	胎鼠尾长 /mm	着床数 /个	黄体数 /个
低剂量组	16	224	3.91±0.67	0.57±0.09*	38.35±2.30	13.70±0.45	16.56±2.83	14.38±4.66*
中剂量组	16	233	3.98±0.73	0.58±0.09*	38.65±2.06	13.93±0.88	18.81±2.79	15.00±4.21
高剂量组	16	232	3.72±0.42	0.52±0.05	37.98±1.38	13.95±0.66	18.63±3.63	15.56±1.97
溶媒对照组	16	256	3.69±0.72	0.51±0.06	37.59±2.17	13.54±0.55	19.13±2.60	16.38±2.85
阳性对照组	16	182	2.03±0.84#	0.25±0.09#	27.23±4.69#	9.70±2.47#	18.00±4.23	15.38±3.26

注:*表示与溶媒对照组比较 $P < 0.05$;#表示与溶媒对照组比较 $P < 0.01$

2.2.2 对胚胎形成的影响

由表3可见,各剂量组活胎率、吸收胎率、死胎率与溶媒对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

阳性对照组活胎率、吸收胎率及死胎率与溶媒对照组比较,差异均有统计学意义($\chi^2 = 60.115, P < 0.01$; $\chi^2 = 53.893, P < 0.01$; $\chi^2 = 8.282, P < 0.01$)。

表3 香露兜粉对胚胎形成的影响

Table 3 Effect of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder on embryo formation

分组	胎鼠总数/只	活胎鼠数/只	活胎率/%	吸收胎数/只	吸收胎率/%	死胎数/只	死胎率/%
低剂量组	230	224	97.4	6	2.6	0	0.0
中剂量组	240	233	97.1	7	2.9	0	0.0
高剂量组	243	232	95.5	10	4.1	1	0.4
溶媒对照组	262	256	97.7	6	2.3	0	0.0
阳性对照组	246	182	74.0#	58	23.6#	6	2.4#

注:#表示与溶媒对照组比较 $P < 0.01$

2.2.3 对胎鼠外观和内脏的影响

由表4可见,各剂量组外观畸形率与溶媒对照组比较,差异均无统计学意义($\chi^2 = 2.694, P > 0.05$);阳性对照组外观畸形率与溶媒对照组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 316.963, P < 0.01$)。胎鼠内脏畸形检查均未见畸形,外观畸形类型主要为脑膨出和水肿。

(少于6块)的胎鼠数量与溶媒对照组比较,差异均有统计学意义($\chi^2 = 7.900, P < 0.05$; $\chi^2 = 25.794, P < 0.05$),但无实际意义。各剂量组肋骨畸形(少于13对)的胎鼠数量与溶媒对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);阳性对照组肋骨畸形(少于13对)、头骨畸形、胸骨畸形(少于6块)的胎鼠数量与溶媒对照组比较,差异均有统计学意义($\chi^2 = 13.643, P < 0.01$; $\chi^2 = 149.951, P < 0.01$; $\chi^2 = 17.030, P < 0.01$)。胎鼠骨骼染色图见图1。

表4 香露兜粉对胎鼠外观和内脏的影响

Table 4 Effect of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder on fetal rat's appearance and viscera

分组	外观畸形			内脏畸形		
	受检胎鼠数 /只	畸形胎鼠数 /只	畸形率 /%	受检胎鼠数 /只	畸形胎鼠数 /只	畸形率 /%
低剂量组	224	0	0.0	108	0	0.0
中剂量组	233	0	0.0	112	0	0.0
高剂量组	232	0	0.0	111	0	0.0
溶媒对照组	255	1	0.0	125	0	0.0
阳性对照组	182	159	87.4#	87	0	0.0

注:#表示与溶媒对照组比较 $P < 0.01$

2.2.4 对胎鼠骨骼发育的影响

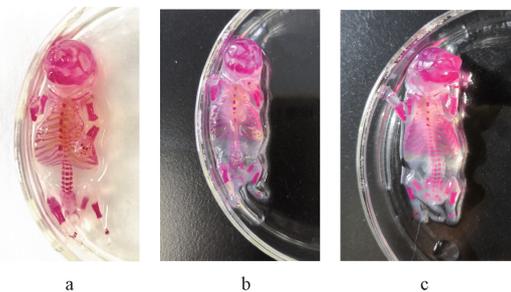
由表5可见,各剂量组头骨畸形和胸骨畸形

表5 香露兜粉对胎鼠骨骼发育的影响(只)

Table 5 Effect of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. powder on fetal rat bone development

分组	受检胎鼠数	肋骨少于13对	头骨骨化不全	四肢发育异常	胸骨少于6块
低剂量组	116	1	0*	0	66*
中剂量组	121	0	0*	0	60*
高剂量组	121	0	1*	0	73*
溶媒对照组	130	1	4	0	103
阳性对照组	95	84#	87#	0	93#

注:*表示与溶媒对照组比较 $P < 0.05$;#表示与溶媒对照组比较 $P < 0.01$



注:a 为高剂量组,正常胸骨;b 为溶媒对照组,正常胸骨;
c 为阳性对照组,缺第 5、6 块胸骨

图 1 胎鼠骨骼染色图

Figure 1 Fetal bone chromatogram

3 讨论

致畸作用是指环境污染物通过人或动物母体影响胚胎发育和器官分化,干扰胚胎的正常发育,使子代出现先天性畸形的作用。畸形是发育毒性的一种主要表现,通过致畸试验观察外来化合物对母体子宫内的胚胎或胎儿产生的毒作用及引起的致畸可能性,可评价受试物对人体是否存在致畸性,是衡量外来化合物发育毒性的重要指标,对食品添加剂的安全性评价具有重要意义。本实验室依据前期的毒理试验结果,按 GB 15193.14—2015^[2]进行设计和试验。前期毒理试验显示香露兜粉的小鼠经口 MTD 大于 10.0 g/kg BW,急性毒性分级属实际无毒级。本研究结果显示,在设计的剂量范围内各组小鼠一般状况正常,未见明显中毒反应,无一死亡,各剂量组孕鼠解剖未见异常,观察指标与溶媒对照组比较,未发现明显异常,整体分析未发现具有剂量-反应关系的异常改变。经对试验数据分析表明,香露兜粉在本研究中无母体毒性、胚胎毒性和致畸性,致畸作用和发育毒性的未观察到有害作用剂量(NOAEL)为 2.50 g/kg BW。

香露兜是露兜树种中唯一叶片带有芳香气味的植物,是东南亚国家常用的食物香料,能让食物增添清新、鲜甜的味道^[3],香露兜鲜叶散发香味的物质有多种,其中 2-乙酰-1-吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline)是香味的主要贡献物^[4]。近年来的多篇文献中提到香露兜叶的挥发油中含有大量的角鲨烯、叶绿醇、甾醇、不饱和脂肪酸、醛、酯以及炔类等多种有效成分,其中叶绿醇相对含量最高,占总挥

发油量的 42.15%,相对含量较高的还有角鲨烯(16.81%)^[5]。叶绿醇是合成维生素 K 及维生素 E 的原料^[6-7]。角鲨烯同深海鱼油中的二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)一样,具有渗透、扩散、杀菌作用,有较强的输送氧的能力,可增强细胞的活力及免疫力,加强细胞新陈代谢,消除疲劳,抑制癌细胞生成及防止癌细胞扩散等作用,还有较好的养颜、润肤等功效^[8-9]。利用超声波萃取技术对香露兜叶进行萃取,得到的香露兜叶提取物具有较好的抗氧化能力和抗辐射能力^[10]。香露兜叶乙醇提取物以及石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水相组分也均表现出抗氧化和自由基清除活性。香露兜超临界提取的挥发油在医用产品及化妆品方面有着较好的应用价值和发展前景,作为保健食品和新资源食品也有较大的应用潜质。本研究为香露兜粉的食用安全评估提供了毒理学参考依据,为今后作为普通食品、保健食品和新资源食品原料进一步开发利用夯实基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1992:23.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 致畸试验:GB 15193.14—2015[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [3] 尹桂豪,王明月,曾会才.香露兜叶挥发油的超临界萃取及气相色谱-质谱联用分析[J].时珍国医国药,2010,21(1):159-160.
- [4] WAKTE K V, NADAF A B, THENGANE R J, et al. *Pandanus amaryllifolius* Roxb. cultivated as aspic in coastal regions of India [J]. Genet Resour Crop Evol, 2009, 56(3): 735-740.
- [5] 陈小凯,马晋芳,葛发欢,等. HPLC 法测定香露兜叶超临界 CO₂ 萃取物中角鲨烯的含量[J]. 中药材, 2017, 40(12): 2899-2901.
- [6] 任竹君,王道平,罗亚男,等. 香兰叶挥发性成分分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(36): 22307-22308.
- [7] 陈小凯,葛发欢. 香露兜叶挥发油化学成分研究[J]. 中药材, 2014, 37(4): 616-620.
- [8] 赵振东,孙震. 生物活性物质角鲨烯的资源及其应用研究进展[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(3): 107-112.
- [9] 许瑞波,刘玮炜,王明艳,等. 角鲨烯的制备及应用进展[J]. 山东医药, 2005, 45(35): 69-70.
- [10] 陈新蕾,阮萍. 香露兜叶提取物抗氧化与辐射效应影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(10): 4533-4539.