

王浆酸冻干粉的安全性毒理学评价

白冰瑶¹, 周茜^{1,2}, 杨光¹, 董小涵¹, 闫晨静¹, 韩雪¹, 蔡东伟¹, 赵文^{1,2}

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001) (2. 河北省农产品加工工程技术中心, 河北保定 071001)

摘要: 研究王浆酸冻干粉的食用安全性, 为促进其合理开发利用提供科学依据。根据《保健食品检验与评价技术规范》对王浆酸冻干粉进行急性经口毒性试验, 遗传毒性试验 (Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验) 和大鼠 30 d 喂养试验对王浆酸冻干粉的食用安全性进行毒理学评价。王浆酸冻干粉对雌、雄小鼠的急性经口 LD₅₀>20 mg/kg-bw; Ames 试验、小鼠骨髓微核试验和小鼠精子畸形试验 3 项遗传毒性试验结果均为阴性; 大鼠 30 d 喂养实验中, 实验动物生长情况良好, 血液学检查结果、生化学检查结果、主要脏器比及组织学检查结果与对照组相比, 均无明显差异 ($p>0.05$)。病理组织学检查未发现王浆酸对大鼠主要脏器产生组织结构的变化。王浆酸冻干粉无毒, 无遗传毒性及亚急性毒性作用, 具有较高的食用安全性。

关键词: 王浆酸; 急性毒性; 遗传毒性; 30 d 喂养实验; 毒理学评价

文章编号: 1673-9078(2017)11-102-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.016

Toxicological Safety Evaluation of Royal Jelly Acid Lyophilized Powder

BAI Bing-yao¹, ZHOU Qian^{1,2}, YANG Guang¹, DONG Xiao-han¹, YAN Chen-jing¹, HAN Xue¹, CAI Dong-wei¹, ZHAO Wen^{1,2}

(1.College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(2.Engineering Technology Research Center for Agricultural Product processing of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The safety of lyophilized powder of royal jelly acid was studied for the reasonable utilization and development of eleutheroside. According to the national standard procedures and methods in food safety and toxicological evaluation, a series of toxicological studies on the ingestion of eleutheroside were conducted, including the acute oral toxicity test in mice, genetic toxicity tests (salmonella typhimurium reverse mutation test (Ames test), mouse bone marrow cell micronucleus test and mouse sperm malformation test) and a 30-day feeding test in rats. Oral acute toxicity test showed that the medium lethal dose (LD₅₀) of the powder was above 20 mg/kg-bw for both male and female mice. The results of Ames test, mouse bone marrow micronucleus test and spermatobnormality test were negative. The 30-day feeding test showed that the physical appearance and indices of hematology, biochemistry, organ coefficients and histological observations of rats had no significant differences as compared with the control group.

Key words: royal jelly acid; toxicology evaluation; acute toxicity test; genotoxicity test; 30-day feeding test

王浆酸, 又名蜂王酸或皇浆酸, 化学名称为 (E) 10-羟基-2-癸烯酸 (简称 10-HAD), 是蜂王浆中重要的脂肪酸, 占总脂肪酸比重的 55% 以上, 并仅存在于蜂王浆与蜂胶中^[1]。10-HAD 作为蜂王浆的标志物及主要活性成分, 具有诸如抗菌消炎^[2,3]、增强免疫力^[4-6]、抗肿瘤^[7]、降血脂^[8]、延缓衰老^[9]和抗氧化^[10,11]等多种功效, 是一种天然的保健品, 王浆酸作为一种十分重要的功能保健品, 拥有着巨大的发展潜力。我国是世界最大的蜂王浆生产国和出口国, 年产约 2500 吨, 国际贸易中的蜂王浆产品有 90% 以上来源于中国,

收稿日期: 2017-05-08

基金项目: 河北省科技计划项目 (17236405D); 河北省食品科学与工程学科“双一流”建设资金项目 (2016SPGCA18)

作者简介: 白冰瑶 (1992-), 女, 硕士, 研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 赵文 (1964-), 女, 教授, 研究方向: 食品营养

主要出口日本、欧洲、美国、东南亚等国家和地区, 近几十年对蜂王浆的研究成为国内外科研人员研究的热点和重点, 目前国内外研究蜂王浆主要可归纳为五个方面, 分别是组成检测、质量评价体系建立、分子生化分析、功能营养学实验探究和产业工艺优化。

王浆酸在蜂王浆中的含量仅为 2% 左右, 传统的物理手段提取率很低, 国内外科研人员通过化学方法人工合成王浆酸来获取大量王浆酸。目前, 王浆酸广泛用于保健食品及饮料中, 需求量大, 如制作软胶囊、硬胶囊、药品和化妆品等^[12], 但面对从天然物提取出的王浆酸供不应求的整体行业情况, 人工合成王浆酸领域得到了研究人员的越来越多的重视, 各种人工合成技术有了长足的发展, 而关于人工合成王浆酸的安全性和营养功能也成为评价王浆酸质量体系的重点环节。不同合成方法, 获得的产品纯度不同, 导致其食

用安全性及功能效果也各有差异。本实验对石家庄维奥生物科技有限公司的王浆酸冻干粉进行急性、遗传和亚急性毒性试验研究,旨在评估其食用安全性,为人工合成的王浆酸及同类产品的食用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验样品

本试验所用样品(王浆酸冻干粉)是由石家庄维奥生物科技有限公司通过自主专利技术进行人工合成的王浆酸,性状为白色粉末,纯度 $\geq 99.9\%$ 。在动物试验灌胃前均用蒸馏水溶解稀释,现用现配。

1.2 实验动物

ICR 小鼠,三级,由北京华阜康生物科技股份有限公司购入,许可证号:SCXK(京)2009-0004;SD 大鼠,二级,购自河北省实验动物中心,许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。

1.3 主要试剂

TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株,北京协和建昊医药技术开发有限责任公司;营养肉汤培养基、营养肉汤琼脂培养基,天津博欧特化工贸易有限公司;四环素、D-生物素、L-组氨酸和氨苄青霉素,北京华迈科生物技术有限公司;小牛血清,北京赛因坦科技有限公司;戊巴比妥钠,北京普博斯生物技术有限公司;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、血糖(Glu)、血清白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、总胆固醇(T-CHO)和甘油三酯(TG) ELISA 试剂盒,南京建成生物技术有限公司。

1.4 主要仪器

SW-CJ-2D 型超净工作台,上海茸研仪器制造有限公司;SPX-250B 型生化培养箱,北京鑫淼腾达仪器设备有限公司;3-18R 型低温(0~4 °C)高速离心机,湖南恒诺仪器有限公司;902-ULTS 型超低温冰箱(-80 °C),美国 Thermo 公司;ECLIPSE E100 型生物显微镜日本 Nikon 公司;1500-823 型酶标仪, Thermo Scientific 公司;雅培 CD3700 全自动血球计数仪,美国雅培公司;Finesse 石蜡切片机, Thermo scientific 公司。

1.5 试验方法

1.5.1 小鼠急性毒性试验

本试验采用最大耐受剂量(MTD)法^[13],取体重

18~22 g 小鼠 20 只,雌雄各半,购买后观察 3~5 d,按体重随机分成 2 组,首次灌胃前停止喂食,但保证正常饮水 12 h,以 20 g/kg·bw 的王浆酸冻干粉进行灌胃,持续观察 14 d,对小鼠生长状况进行统计并记录中毒表现及死亡情况,求得最大耐受剂量。

1.5.2 伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)

选用平板掺入法,设置添加和不含 S9 混合液两套试验^[14]。Ames 实验设 10、2、0.4、0.08 mg/mL 4 个王浆酸冻干粉剂量组,受试物加热灭菌后,各组均加 0.1 mL/皿。另设空白对照、阴性对照(DMSO)和阳性对照组。阳性对照组使用 1,8 二羟基蒽醌 50 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 、2-AF 20 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 、2,4,7-TNFone 0.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 、NaN₃ 2.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 、MMC 1.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$,每组均做 3 个平行皿。37 °C 培养 48 h,计数每皿回变菌落数。当样品培养基中回变菌落数目与空白对照组相比增加 100%以上并有剂量-反应关系者定论为阳性结果。整套试验在相同试验条件下重复一次。

1.5.3 小鼠骨髓细胞微核试验

取体重 18~22 g 小鼠,随机分成 5 组,每组 10 只(雌雄各半),为阴性对照(蒸馏水)、阳性对照(40 mg/kg·环磷酰胺)和 2500、5000、10000 mg/kg·bw 三个剂量组。间隔 24 h 染毒两次,末次灌胃 6 h 后,小鼠脱臼处死,取小鼠胸骨的骨髓液用小牛血清稀释涂片,甲醇固定,Giemsa 染色,用蒸馏水清洗、晾干、标签好后进行镜检。采取双盲的阅片方法,每张玻片用细胞计数器记录 1000 个嗜多染红细胞,微核检出率以千分率表示^[15,16]。

1.5.4 小鼠精子畸形试验

取体重 30~35 g 成年雄性小鼠(6~8 周),随机分为 5 组,每组 5 只,组别和剂量同 1.5.3。每日灌胃 1 次,连续 5 d,首次给受试物后 35 d 采用颈椎脱臼方法处死动物,摘下双侧附睾,甲醇固定,伊红染色。高倍镜下观察,每只动物计数 1000 个精子,记录畸形精子数,计算精子畸变率^[17~19]。

1.5.5 大鼠 30 d 喂养试验

取体重 65~80 g 大鼠(出生后 4 周),随机分成 4 组,每组 20 只(雌雄各半),为阴性对照组(蒸馏水)和 250、500、1000 mg/kg·bw 三个剂量组。单笼饲养,每日一次灌胃染毒,连续 30 d。每周记录体重和食物摄入量,计算每周及整个试验喂养期内的食物利用率。实验结束时,采用腹腔麻醉法处死动物,股动脉取血,收集抗凝血和非抗凝血,抗凝血进行血液学的测定,非抗凝血进行生化学的测定。采血后对大鼠进行大体病理检测,取肝、肾、脾和睾丸等脏器,称量其绝对

重量并计算脏器比值，并对阴性对照组和王浆酸高剂量组的大鼠进行肝、肾、脾、胃、十二指肠、睾丸及卵巢等脏器的病理组织学检验^[20]。

1.6 数据统计分析

所得全部的试验数据结果以平均数值±标准偏差的形式显示， $p < 0.05$ 表示具有显著性差异， $p < 0.01$ 表示具有极显著性差异，用 SPSS 19.0 统计软件进行数据统计。

2 结果与分析

表 1 王浆酸冻干粉 Ames 试验结果

Table 1 Ames test results of royal jelly acid lyophilized powder ($x \pm s$)

| 剂量/(mg/皿) | TA97 | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
|---------------------------|----------|--------|----------|-------|----------|--------|----------|--------|
| | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 |
| 空白对照组 | 143±11 | 154±9 | 34±3 | 37±2 | 163±8 | 151±12 | 286±9 | 275±19 |
| 0.008 | 146±12 | 149±9 | 33±2 | 36±2 | 145±15 | 153±24 | 281±8 | 279±21 |
| 第 0.040 | 134±9 | 145±8 | 32±3 | 35±4 | 143±7 | 149±16 | 281±15 | 279±13 |
| 一 0.200 | 141±11 | 138±12 | 35±4 | 34±1 | 154±13 | 138±13 | 290±20 | 271±19 |
| 次 1.000 | 144±11 | 136±8 | 35±2 | 357±2 | 139±12 | 159±14 | 284±18 | 293±15 |
| 5.000 | 80±19 | 106±12 | 33±2 | 31±0 | 132±19 | 142±10 | 142±37 | 138±32 |
| DMSO | 140±8 | 133±16 | 33±2 | 35±2 | 156±8 | 147±12 | 291±17 | 284±16 |
| 空白对照组 | 144±9 | 134±11 | 33±1 | 34±2 | 149±11 | 145±6 | 288±9 | 286±18 |
| 0.008 | 142±8 | 135±11 | 34±2 | 36±3 | 139±13 | 144±10 | 282±12 | 275±9 |
| 第 0.040 | 147±11 | 137±14 | 34±2 | 34±2 | 137±11 | 142±6 | 279±9 | 294±10 |
| 二 0.200 | 145±11 | 136±8 | 34±2 | 34±2 | 144±8 | 149±8 | 289±10 | 279±16 |
| 次 1.000 | 137±10 | 135±14 | 32±2 | 34±1 | 150±7 | 130±12 | 291±15 | 283±10 |
| 5.000 | 83±14 | 101±18 | 28±5 | 29±4 | 119±18 | 137±13 | 126±23 | 107±14 |
| DMSO | 136±11 | 137±5 | 33±1 | 33±1 | 141±15 | 155±13 | 279±11 | 276±20 |
| 2-AF 20 μg/皿 | 1119±163 | | 1108±236 | | 1495±536 | | | |
| NaN ₃ 2.5 μg/皿 | | | | | 1001±245 | | | |
| 2,4,7-TNFOne 0.5 μg/皿 | 1055±384 | | 1549±333 | | | | | |
| MMC 1.0 μg/皿 | | | | | | | 832±101 | |
| 1,8 二羟基蒽醌 50 μg/皿 | | | | | | | 1309±234 | |

由表 1 可知，Ames 试验表明，王浆酸冻干粉对 TA97、TA98、TA100 和 TA102 四株试验菌株，在有无 S-9 添加的情况下，与空白对照组回变菌落数相比，各试验组回变菌落增长量都没有超出空白对照组的 200%，且均未表现出致突变作用。Ames 实验为阴性结果，王浆酸冻干粉对鼠伤寒沙门氏菌无直接和间接致突变作用。

2.3 小鼠骨髓细胞微核试验

在光学显微镜下对小鼠股骨骨髓中染色后的嗜多染红细胞计数观察，统计结果如下表。

2.1 小鼠急性毒性试验

雌、雄小鼠灌胃后，未出现中毒表现，无死亡。结果表明，王浆酸冻干粉对 ICR 雌、雄小鼠的 MTD > 20 g/kg·bw。因此，参照标准可以判定王浆酸冻干粉急性毒性分级为无毒物。

2.2 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验)

表 2 王浆酸冻干粉对小鼠骨髓细胞微核的影响

Table 2 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the mouse bone marrow cells micronucleus ($x \pm s$)

| 组别 | 动物数/只 | 灌胃量/[mg/(kg·d)] | 微核率/% |
|-------|-------|-----------------|--------------|
| 阴性对照组 | 10 | 0 | 2.50±1.18 |
| 阳性对照组 | 10 | 40 | 18.96±1.25** |
| 低剂量组 | 10 | 2500 | 1.84±1.21 |
| 中剂量组 | 10 | 5000 | 1.92±0.99 |
| 高剂量组 | 10 | 10000 | 2.25±1.29 |

注：与阴性对照组相比，* $p < 0.05$ ，差异显著；** $p < 0.01$ ，差异极显著。

由表 2 可知,与阴性对照组相比,阳性对照组(环磷酰胺)微核率检出明显升高,同时存在极显著差异($p<0.01$),说明造模成功。三个王浆酸冻干粉剂量组的微核率均 $<4\%$,且与阴性对照组相比都不存在显著差异($p>0.05$)。结果表明,王浆酸冻干粉在各剂量条件下未见致突变作用。

2.4 小鼠精子畸形试验

表 3 王浆酸冻干粉对小鼠精子生长状况的影响

Table 3 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the

growth conditions of sperm in mice ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数/ 只 | 剂量 /[mg/(kg·bw)] | 精子畸形 检出率/% |
|-------|-----------|---------------------|---------------|
| 阴性对照组 | 5 | 0 | 2.16±0.78 |
| 阳性对照组 | 5 | 40 | 6.48±0.93** |
| 低剂量组 | 5 | 2500 | 2.34±1.01 |
| 中剂量组 | 5 | 5000 | 2.21±0.97 |
| 高剂量组 | 5 | 10000 | 2.15±0.99 |

注:与阴性对照组比较,** $p<0.01$,差异极显著。

用光学显微镜观察检测王浆酸对小鼠遗传性毒性作用,由表 3 可知,阳性对照组(环磷酰胺)小鼠精

子畸形率明显高于阴性对照试验组,且有极显著差异($p<0.01$),说明造模成功。各受试物组小鼠精子畸形率均小于 3.4%,同时与阴性对照组对比不存在统计学差异($p>0.05$),说明王浆酸冻干粉对小鼠精子未见遗传毒性。

2.5 大鼠 30 d 喂养试验

2.5.1 王浆酸冻干粉对大鼠体重、食物摄入量及食物利用率的影响

由表 4 可知,三个受试物剂量组大鼠其初始、最终体重及增重,与阴性对照组相比不存在明显变化幅度,且均无差异显著($p>0.05$)。由表 5 可知,受试物剂量组动物第一、第二、第三、第四周的食物摄入量与阴性(蒸馏水)对照组比较,摄食量大致相同,均未出现显著变化($p>0.05$);从总食物摄入量统计的数据上看,王浆酸冻干粉剂量组同阴性对照组的总食物摄入量大体相同,没有显著差异($p>0.05$)。由表 6 可知,三个受试物组每周和整个试验期间的食物利用率与阴性对照组相比,没有明显变化,不存在统计学差异($p>0.05$)。

表 4 王浆酸冻干粉对大鼠体重的影响

Table 4 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the body weight in rats ($\bar{x} \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数 | 始重/g | 终重/g | 增重/g |
|----|-----------------|-----|------------|--------------|--------------|
| 雄 | 0 | 10 | 73.10±3.72 | 318.05±24.83 | 227.25±23.37 |
| | 250 | 10 | 72.90±2.23 | 293.40±21.65 | 217.85±27.89 |
| | 500 | 10 | 74.39±2.62 | 298.89±26.52 | 220.56±26.08 |
| | 1000 | 10 | 74.85±2.26 | 310.78±27.88 | 229.80±15.10 |
| 雌 | 0 | 10 | 67.50±2.87 | 221.83±12.11 | 155.90±14.12 |
| | 250 | 10 | 67.70±3.77 | 216.20±9.89 | 150.50±7.72 |
| | 500 | 10 | 69.78±2.14 | 205.50±20.65 | 143.71±21.01 |
| | 1000 | 10 | 69.33±1.83 | 213.89±18.23 | 143.05±19.62 |

表 5 王浆酸冻干粉对大鼠每周食物摄入量及总食物摄入量的影响

Table 5 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the weekly food intake and total food intake in rats ($\bar{x} \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | 第一周/g | 第二周/g | 第三周/g | 第四周/g | 总摄入量/g |
|----|-----------------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 雄 | 0 | 10 | 191.00±20.49 | 226.55±26.43 | 209.05±14.53 | 181.25±21.07 | 807.75±65.99 |
| | 250 | 10 | 187.40±28.58 | 219.95±6.30 | 206.85±32.40 | 170.60±16.45 | 784.80±65.13 |
| | 500 | 10 | 204.45±26.83 | 210.57±7.35 | 203.57±17.64 | 171.25±38.10 | 831.55±93.04 |
| | 1000 | 10 | 170.70±15.16 | 201.65±31.72 | 180.54±37.31 | 157.44±23.29 | 804.28±78.13 |
| 雌 | 0 | 10 | 104.42±19.97 | 148.70±17.20 | 149.78±16.23 | 146.39±29.72 | 541.44±76.88 |
| | 250 | 10 | 126.67±14.14 | 143.29±14.22 | 161.55±9.46 | 126.35±19.96 | 560.50±39.58 |
| | 500 | 10 | 132.30±19.18 | 134.45±21.63 | 127.40±23.18 | 127.36±15.88 | 519.10±84.54 |
| | 1000 | 10 | 110.50±20.90 | 132.56±32.16 | 119.93±15.26 | 121.44±34.85 | 510.17±91.52 |

表6 王浆酸冻干粉对大鼠每周食物利用率及总食物利用率的影响

Table 6 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the weekly food utilization and total food utilization in rats ($x \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | 第一周/% | 第二周/% | 第三周/% | 第四周/% | 总食物利用率/% |
|----|-----------------|-------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 雄 | 0 | 10 | 20.75±3.84 | 20.58±3.08 | 18.68±3.39 | 21.34±4.12 | 20.34±1.15 |
| | 250 | 10 | 17.28±3.50 | 17.75±2.32 | 17.92±3.75 | 22.68±3.52 | 18.91±2.53 |
| | 500 | 10 | 16.96±4.03 | 18.27±2.84 | 18.72±3.23 | 20.08±3.05 | 18.51±1.29 |
| | 1000 | 10 | 20.26±3.58 | 20.03±3.49 | 19.66±3.36 | 21.73±5.21 | 20.42±0.91 |
| 雌 | 0 | 10 | 23.08±1.98 | 18.71±3.21 | 17.49±3.33 | 20.53±4.49 | 19.95±2.43 |
| | 250 | 10 | 21.83±5.09 | 17.58±3.87 | 19.59±4.22 | 21.17±2.70 | 20.04±1.89 |
| | 500 | 10 | 21.85±4.20 | 15.76±2.29 | 17.97±3.44 | 18.72±3.97 | 18.58±2.52 |
| | 1000 | 10 | 21.22±3.67 | 20.32±4.52 | 21.86±2.87 | 19.24±4.33 | 20.66±1.14 |

表7 王浆酸冻干粉对大鼠的血液学指标检测结果

Table 7 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the hematological indices of rats ($x \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | 白细胞 | 红细胞 | 血红蛋白 | 血小板计数 |
|----|-----------------|-------|-------------------------|----------------------------|-------------|-------------------------|
| | | | WBC/($\times 10^9/L$) | RBC/($\times 10^{12}/L$) | HGB/(g/L) | PLT/($\times 10^9/L$) |
| 雄 | 0 | 10 | 7.31±2.10 | 7.88±0.48 | 147.40±9.64 | 633.89±66.97 |
| | 250 | 10 | 6.82±2.30 | 7.60±0.28 | 143.60±5.97 | 673.40±87.92 |
| | 500 | 10 | 9.03±3.48 | 7.55±0.38 | 145.00±5.77 | 762.20±81.68 |
| | 1000 | 10 | 9.11±3.32 | 7.54±0.33 | 143.11±5.99 | 749.33±88.11 |
| 雌 | 0 | 10 | 8.27±1.60 | 7.53±0.26 | 143.11±3.59 | 714.20±50.64 |
| | 250 | 10 | 6.87±2.20 | 7.57±0.42 | 143.50±6.43 | 600.17±79.56 |
| | 500 | 10 | 6.07±2.35 | 7.66±0.25 | 141.64±5.99 | 636.88±98.59 |
| | 1000 | 10 | 6.21±2.74 | 7.27±0.34 | 140.00±5.76 | 641.40±60.75 |

表8 王浆酸冻干粉对大鼠的血液学指标检测结果

Table 8 Effects of Royal jelly acid on the hematological indices of rats ($x \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | 血红蛋白含量 MCH/pg | 血红蛋白浓度 MCHC/(g/L) | 红细胞体积 MCV (fL) |
|----|-----------------|-------|---------------|-------------------|----------------|
| 雄 | 0 | 10 | 18.70±0.58 | 348.10±6.17 | 53.80±1.57 |
| | 250 | 10 | 18.87±0.48 | 351.10±8.65 | 53.75±1.46 |
| | 500 | 10 | 19.21±0.37 | 345.67±6.02 | 55.66±1.54 |
| | 1000 | 10 | 18.99±0.32 | 347.33±5.83 | 54.74±1.57 |
| 雌 | 0 | 10 | 19.03±0.44 | 348.89±9.57 | 54.53±1.21 |
| | 250 | 10 | 18.96±0.70 | 342.20±10.56 | 55.00±2.52 |
| | 500 | 10 | 18.80±0.54 | 350.67±8.69 | 53.65±1.37 |
| | 1000 | 10 | 19.06±0.61 | 346.50±8.96 | 54.94±2.40 |

2.5.2 王浆酸冻干粉对大鼠血液学指标的影响

白细胞是一种重要免疫细胞,广泛存在于生物体血液和淋巴中,当机体在收到外来侵害时会引起白细胞的免疫应激作用,数量会发生变化,是血常规化验的必检项目,红细胞是一种血细胞,运输氧气的载体同时还有转载二氧化碳的作用,正常情况下其数量保持稳定,血红蛋白是红细胞的重要成分,其数量与红细胞数量呈正相关,血小板具有促进凝血作用、减缓器官移植排斥反应强度等多种活性功效。由表7和表8可知,与阴性对照组相比,不同浓度的王浆酸试验组大鼠的白细胞总数、红细胞总数、血红蛋白含量、

血小板计数、均无显著差异($p>0.05$),在动物性别上也没有表现出明显的差别($p>0.05$),说明王浆酸受试物对大鼠血液不存在慢性毒性影响。

2.5.3 王浆酸冻干粉对大鼠血液生化学指标的影响

肾脏功能的评价通常使用BUN和Cr作为判断依据,Cr是蛋白质代谢的终产物,BUN是含氮的有机物,对肾脏健康情况反应极为敏感。Glu是血葡萄糖,表现胰岛素的分泌能力的强弱,呈正相关性,TG、T-CHO和ALB是脂质代谢的重要检测指标,AST和ALT是检测肝功能的两项重要指标。由表9和表10

可知,三组王浆酸冻干粉大鼠的BUN、Glu、Cr、Tp、ALB、T-CHO、TG、AST、ALT与阴性对照组相比,无显著性差异($p>0.05$)。结果表明,王浆酸冻干粉对大鼠血液生化指标无明显影响。

2.5.4 王浆酸冻干粉对大鼠脏器质量的影响

对雌、雄大鼠解剖后的检测脏器进行称重,统计数据见表11和表12。由表11和表12可知,王浆酸受试物组和阴性对照组相比,肝、肾、脾和睾丸的绝对质量和肝/体、肾/体、脾/体、雄鼠睾丸/体相对质量

均无差异显著($p>0.05$)。

2.5.5 病理学检查结果

肉眼观察,各组大鼠心、肝、脾、肺、肾、胃肠、睾丸和卵巢等主要脏器都没有形态结构、色泽和气味的异常情况出现。对阴性对照组和王浆酸高剂量组大鼠的肝、肾、脾脏、胃肠、睾丸和卵巢进行进一步的组织病理学检查,结果表明,各组动物均未见由受试物引起的中毒性病理变化。

表9 王浆酸冻干粉对大鼠血液生化指标的检测结果

Table 9 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the chemical indicators of blood biochemistry in rats ($x \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | BUN/(mmol/L) | Glu/(mmol/L) | Cr/(μ mol/L) | Tp/(g/L) | ALB/(g/L) |
|----|-----------------|-------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|
| 雄 | 0 | 10 | 7.90 \pm 1.04 | 4.23 \pm 0.77 | 42.25 \pm 8.62 | 55.54 \pm 4.53 | 27.91 \pm 3.45 |
| | 250 | 10 | 7.26 \pm 1.04 | 4.04 \pm 1.01 | 40.14 \pm 8.52 | 58.43 \pm 2.47 | 30.85 \pm 1.74 |
| | 500 | 10 | 7.92 \pm 1.08 | 4.00 \pm 0.68 | 49.39 \pm 5.79 | 58.08 \pm 3.24 | 29.27 \pm 2.65 |
| | 1000 | 10 | 6.73 \pm 0.70 | 4.50 \pm 0.56 | 40.42 \pm 8.08 | 58.99 \pm 2.51 | 31.27 \pm 2.10 |
| 雌 | 0 | 10 | 7.64 \pm 0.94 | 3.53 \pm 0.73 | 41.38 \pm 8.91 | 60.89 \pm 3.83 | 33.60 \pm 3.33 |
| | 250 | 10 | 6.20 \pm 0.94 | 3.74 \pm 0.73 | 39.37 \pm 8.6 | 60.76 \pm 3.05 | 36.20 \pm 3.41 |
| | 500 | 10 | 6.95 \pm 0.73 | 3.68 \pm 0.45 | 45.31 \pm 5.50 | 60.94 \pm 5.11 | 36.39 \pm 3.14 |
| | 1000 | 10 | 6.52 \pm 0.74 | 3.88 \pm 0.89 | 45.41 \pm 7.14 | 58.96 \pm 3.51 | 35.57 \pm 2.32 |

表10 王浆酸冻干粉对大鼠血液生化指标的检测结果

Table 10 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the chemical indicators of blood biochemistry in rats ($x \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | T-CHO/(mmol/L) | TG/(mmol/L) | AST/(U/L) | ALT/(U/L) |
|----|-----------------|-------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|
| 雄 | 0 | 10 | 1.64 \pm 0.43 | 0.79 \pm 0.18 | 146.39 \pm 14.73 | 51.46 \pm 5.83 |
| | 250 | 10 | 1.82 \pm 0.39 | 0.69 \pm 0.18 | 151.27 \pm 13.20 | 51.38 \pm 6.04 |
| | 500 | 10 | 1.77 \pm 0.42 | 0.71 \pm 0.24 | 151.14 \pm 15.82 | 49.43 \pm 8.37 |
| | 1000 | 10 | 1.82 \pm 0.26 | 0.76 \pm 0.15 | 146.47 \pm 16.79 | 49.54 \pm 6.89 |
| 雌 | 0 | 10 | 2.01 \pm 0.38 | 0.68 \pm 0.07 | 150.26 \pm 11.40 | 50.43 \pm 4.25 |
| | 250 | 10 | 1.85 \pm 0.20 | 0.64 \pm 0.06 | 151.67 \pm 9.91 | 51.50 \pm 4.83 |
| | 500 | 10 | 2.04 \pm 0.44 | 0.75 \pm 0.22 | 151.63 \pm 14.16 | 52.18 \pm 6.19 |
| | 1000 | 10 | 2.08 \pm 0.36 | 0.81 \pm 0.17 | 147.43 \pm 14.92 | 51.10 \pm 8.28 |

表11 王浆酸冻干粉对大鼠脏器绝对重量的检测结果

Table 11 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the organs absolute weight in rats ($x \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | 肝脏/g | 肾脏/g | 脾脏/g | 睾丸/g |
|----|-----------------|-------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 雄 | 0 | 10 | 10.90 \pm 0.90 | 2.70 \pm 0.16 | 0.70 \pm 0.10 | 3.20 \pm 0.51 |
| | 250 | 10 | 10.77 \pm 1.03 | 2.52 \pm 0.30 | 0.67 \pm 0.12 | 3.35 \pm 0.34 |
| | 500 | 10 | 10.77 \pm 1.36 | 2.56 \pm 0.36 | 0.64 \pm 0.07 | 3.17 \pm 0.27 |
| | 1000 | 10 | 11.56 \pm 1.55 | 2.54 \pm 0.26 | 0.60 \pm 0.05 | 3.22 \pm 0.24 |
| 雌 | 0 | 10 | 7.06 \pm 0.59 | 1.82 \pm 0.20 | 0.53 \pm 0.09 | |
| | 250 | 10 | 7.71 \pm 0.73 | 1.88 \pm 0.18 | 0.53 \pm 0.05 | |
| | 500 | 10 | 7.70 \pm 1.10 | 1.82 \pm 0.21 | 0.49 \pm 0.08 | |
| | 1000 | 10 | 8.04 \pm 1.11 | 1.77 \pm 0.24 | 0.49 \pm 0.08 | |

表 12 王浆酸冻干粉对大鼠脏器相对重量的检测结果

Table 12 Effects of royal jelly acid lyophilized powder on the organ relative weight in rats($\bar{x} \pm s$)

| 性别 | 剂量/[mg/(kg·bw)] | 动物数/只 | 肝体比/% | 肾体比/% | 脾体比/% | 睾体比/% |
|----|-----------------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 雄 | 0 | 10 | 3.44±0.36 | 0.85±0.05 | 0.22±0.03 | 1.01±0.15 |
| | 250 | 10 | 3.68±0.32 | 0.86±0.08 | 0.23±0.02 | 1.14±0.11 |
| | 500 | 10 | 3.62±0.46 | 0.85±0.07 | 0.22±0.03 | 1.07±0.15 |
| | 1000 | 10 | 3.72±0.40 | 0.82±0.02 | 0.21±0.03 | 1.04±0.07 |
| 雌 | 0 | 10 | 3.19±0.28 | 0.82±0.11 | 0.24±0.03 | |
| | 250 | 10 | 3.57±0.34 | 0.87±0.08 | 0.25±0.01 | |
| | 500 | 10 | 3.65±0.47 | 0.89±0.09 | 0.24±0.04 | |
| | 1000 | 10 | 3.66±0.65 | 0.84±0.14 | 0.23±0.04 | |

3 结论

3.1 前期工作中,本课题组研究了王浆酸冻干粉对酒精性肝损伤的保护作用,结果表明王浆酸冻干粉在 66 mg/(kg·bw)剂量下,能够加快酒精分解代谢,缓解肝脏酒精性中毒,起到保护肝脏的效果;并且具有显著辅助调节肝脏细胞因子分泌的作用,能明显提高肝脏抗氧化功能。本研究从毒理学角度出发,以高纯度的王浆酸冻干粉为研究对象,对其进行了急性毒性、遗传毒性和大鼠 30 d 喂养实验,为其作为功能食品开发的安全性提供一定的理论依据^[21-23]。

3.2 急性毒性实验中采用最大耐受剂量法,结果表明:王浆酸冻干粉对 ICR 小鼠 LD₅₀ 大于 20 g/(kg·bw),且动物活动正常,未发现不良症状,说明该受试物属于无毒级物质。

3.3 根据对遗传物质作用终点的差别,并兼顾原核细胞与真核细胞、体内实验与体外实验以及体细胞和生殖细胞相配套原则,进行了 3 项遗传毒性实验,即 Ames 实验、小鼠骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸变实验。实验结果表明 3 项遗传毒性实验结果皆为阴性,未表现出致突变性。

3.4 30 d 喂养实验显示,王浆酸冻干粉在 250 mg/(kg·bw)、500 mg/(kg·bw)和 1000 mg/(kg·bw)三个剂量时,对动物的体质量、脏器比、以及血液学、血液生化指标等均无明显不良影响,说明王浆酸冻干粉对动物的生长发育、造血功能和肝肾等功能均无损害作用,同时研究表明,高剂量组王浆酸冻干粉大鼠的肝、肾、脾脏、胃肠、睾丸和卵巢等器官均未见发生明显病理组织学改变。

综上所述,王浆酸冻干粉在实验剂量范围内无急性毒性,无遗传毒性,并且长期食用对机体无害^[24]。试验结果显示,王浆酸冻干粉符合食品安全相关规定标准和要求,可以作为保健食品进行相关功能研究。

参考文献

- [1] 刘晓华,孙文基.王浆酸的研究进展概况[J].中药品标准,2004,5(1):9-10
LIU Xiao-hua, SUN Wen-ji. Development situation of royal jelly acid research [J]. Drug Standards of China, 2004, 5(1): 9-10
- [2] Sugiyama T, Takahashi K, Tokoro S, et al. Inhibitory effect of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid on LPS-induced IL-6 production via reducing IκB-ζ expression [J]. Innate Immunity, 2012, 18(3): 429-437
- [3] Sugiyama T, Takahashi K, Kuzumaki A, et al. Inhibitory mechanism of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid (royal jelly acid) against lipopolysaccharide-and interferon-β-induced nitric oxide production [J]. Inflammation, 2012, 12(6): 553-556
- [4] 王国燕,林志彬.10-羟基-2-癸烯酸对小鼠 T 淋巴细胞及其亚型和白介素 2 产生的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,1996,10(1):53-55
WANG Guo-yan, LIN Zhi-bin. Effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on T lymphocyte and its subtypes and interleukin 2 production in mice [J]. Chinese Pharmacology and Toxicology Journal, 1996, 10(1): 53-55
- [5] Zheng J, Lai W, Zhu G, et al. 10-hydroxy-2-decenoic acid prevents ultraviolet A-induced damage and matrix metalloproteinases expression in human dermal fibroblasts [J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2013, 27(10): 1267-1277
- [6] Mihajlovic D, Rajkovic I, Chinou I, et al. Dose-dependent immunomodulatory effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on human monocyte-derived dendritic cells [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(2): 838-846
- [7] 王国燕,林志彬.10-羟基-2-癸烯酸对荷瘤小鼠的抑瘤作用

- 及免疫增强作用[J].北京医科大学学报,1996,27(10):45-47
- WANG Guo-yan, LIN Zhi-bin. Antitumor and immunopotentiating effect of 10-hydroxy-2-decenoic acid on Tumor-bearing mice [J]. Journal of Beijing Medical University, 1996, 27(10): 45-47
- [8] 许东晖,梅雪婷,许实波.10-羟基-2-癸烯酸治疗实验性高脂血症大鼠的药理研究[J].中药材,2002,25(5):346-347
- XU Dong-hui, MEI Xue-ting, XU Shi-bo. Pharmacological study on hypolipidemic effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on hypolipidemic rat [J]. Traditional Chinese Medicinal Materials, 2002, 25(5): 346-347
- [9] S Inoue, S Koya-Miyata, S Ushio, et al. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage [J]. Exp. Gerontol., 2003, 38(9): 965-969
- [10] P Jamnik, D Goranovic, P Raspor. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell [J]. Exp. Gerontol., 2007, 42(7): 594-600
- [11] M Corona, K A Hughes, D B Weaver, et al. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity [J]. Mechanisms of Ageing & Development, 2005, 126(11): 1230-1238
- [12] 程晓宇,胡福辰.我国蜂胶保健食品概况[J].中国蜂业,2015,66(4):45-47
- CHENG Xiao-yu, HU Fu-chen. This is an overview of the propolis health food in our country [J]. Apiculture of China, 2015, 66(4): 45-47
- [13] 谭俊峰,林智,李靛.茶氨酸复合制剂安全性毒理学研究[J].食品科学,2011,32(19):262-267
- TAN Jun-feng, LIN Zhi, LI Liang. Toxicological studies on compound theanine preparation [J]. Food Science, 2011, 32(19): 262-267
- [14] 白阳.马氏珠母贝糖胺聚糖软胶囊的研制及其安全毒理学评价[D].湛江:广东海洋大学,2012
- BAI Yang. Preparation and toxicological safety evaluation of soft capsules making of glycosaminoglycan from *pinctada Martensii Dunker* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012
- [15] 杨平,李润国,孟宪军.刺五加苷食用安全性毒理学评价[J].食品科学,2013,34(11):258-262
- YANG Ping, LI Run-guo, MENG Xian-jun. Food safety and toxicological assessment of eleutheroside [J]. Food Science, 2013, 34(11): 258-262
- [16] 昭日格图,娜日苏,韩景芬,等.黄芪多糖的安全性研究[J].食品科学,2009,30(19):309-313
- ZHAORIGETU, NA Ri-su, HAN Jing-fen, et al. Safety evaluation of astragalus polysaccharide [J]. Food Science, 2009, 30(19): 309-313
- [17] 宾捷.金钗石斛胶囊内容物毒理学安全性评价的实验研究[D].长沙:中南大学,2010
- BIN Jie. Experimental study on toxicological safety evaluation of content in dendrobium nobile iindl capsule [D]. Changsha: Central South University, 2010
- [18] 郝彬秀,应剑,孟庆佳,等.螃蟹脚全粉的急性毒性和遗传毒性[J].食品科学,2016,37(21):248-251
- HAO Bin-xiu, YING Jian, MENG Qing-jia, et al. Acute and genetic toxicity of whole powder of *Viscum liquidambaricum* Hayata [J]. Food Science, 2016, 37(21): 248-251
- [19] 于丽华,周力,谢克勤.河豚毒素诱发小鼠骨髓细胞染色体畸变、小鼠骨髓细胞微核及小鼠精子畸变的研究[J].山东医科大学学报,2000,38(1):48-49,56
- YU Li-hua, ZHOU Li, XIE Ke-qin. Study on chromosome aberration and micronucleus in bone marrow cells of mice and sperm abnormality of mice induced by tetrodotoxin [J]. Acta Academiae Medicinae Shandong, 2000, 38(1): 48-49, 56
- [20] 樊柏林,刘春霞,杨文祥,等.复方竹节参胶囊的毒理学试验[J].癌变·畸变·突变,2008,20(6):483-486
- FAN Bo-lin, LIU Chun-xia, YANG Wen-xiang, et al. Toxicological research of panax japonicus C.A Mey complex [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis, Mutagenesis, 2008, 20(6): 483-486
- [21] 付立杰.现代毒理学及其应用[M].上海:上海科学技术出版社,2001
- FU Li-jie. Modern toxicology and its applications [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2001
- [22] 张天亮.急性经口毒性试验替代测试方法进展[J].预防医学论坛,2008,14(12):1225-1226
- ZHANG Tian-liang. An acute oral toxicity test was developed to replace the test method [J]. Preventive Medicine Tribune, 2008, 14(12): 1225-1226
- [23] 许红霞,高晓黎,冯巍,等.阿胶铁口服液毒理学安全性评价[J].现代预防医学,2008,35(18):3602-3604
- XU Hong-xia, GAO Xiao-li, FENG Wei, et al. Toxicology and safety assessment of donkey-hide glue iron oral solution [J]. Modern Preventive Medicine, 2008, 35(18): 3602-3604
- [24] 张鸣镛,赵会燕,刘静波,等.玉米胚芽抗氧化肽的急性毒性和致突变性[J].食品科学,2014,35(13):228-231
- ZHANG Ming-di, ZHAO Hui-yan, LIU Jing-bo, et al. Acute toxicity and mutagenicity of corn germ antioxidant peptide [J]. Food Science, 2014, 35(13): 228-231