

· 论 著 ·

铁皮石斛花对孕鼠母体和仔鼠出生前毒性的研究

傅剑云, 夏勇, 郑云燕, 蔡德雷, 何佳维, 宋燕华

浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 研究铁皮石斛花对孕鼠母体和仔鼠出生前毒性, 为评价铁皮石斛花安全性提供毒理学依据。**方法** 设低、中、高3个剂量组和对照组, 每组雌鼠20只, 雄鼠10只。各剂量组喂饲受试物饲料, 受试物的量分别为2.0、4.0、6.4 g/kgbw; 对照组喂饲基础饲料。繁殖二代(F1、F2), F1a和F2a喂饲基础饲料, F1b和F2b喂饲含受试物饲料。测定并比较大鼠体重、总增重、受孕率、妊娠率、仔鼠出生体重和存活率。**结果** 4组P、F1b孕鼠第一次和第二次妊娠的体重、总增重、受孕率和妊娠率差异均无统计学意义($P>0.05$)。各剂量组F1、F2仔鼠出生存活率和出生仔数与对照组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 未发现铁皮石斛花对P、F1孕鼠母体和F1、F2仔鼠出生前有明显不良影响。

关键词: 铁皮石斛花; 大鼠; 母体毒性; 出生前毒性

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2020) 10-1000-04

Toxicity of *Dendrobium officinale* flowers to pregnant rats and offspring rats before birth

FU Jianyun, XIA Yong, ZHENG Yunyan, CAI Delei, HE Jiawei, SONG Yanhua

Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: **Objective** To learn the toxicity of *Dendrobium officinale* flowers to pregnant rats (P, F1) and offspring rats (F1, F2) before birth, so as to provide toxicological evidence for the safety assessment. **Methods** The rats were divided into four groups with 20 female rats and 10 male each. The rats in three dose groups were fed with *Dendrobium officinale* flowers at the dose of 2.0, 4.0, 6.4g/kgbw. After two generation, the F1a and F2a rats were fed with basal diet; F1b and F2b rats were fed with *Dendrobium officinale* flowers. The body weights and total weight gains during the gestation, the conception rates, the pregnancy rates, the birth weights and survival rates of offspring rats were examined. **Results** There were no statistically significant differences in the body weights and total weight gains during the gestation, the conception rates, and the pregnancy rates in pregnant rats (P, F1) among the four groups ($P>0.05$). There were also no statistically significant differences in the survival rates and live birth rates in offspring rats (F1, F2) between the dose groups and the control group ($P>0.05$). **Conclusion** *Dendrobium officinale* flowers did not show obviously adverse effects on pregnant rats (P, F1) and offspring rats (F1, F2) before birth.

Keywords: *Dendrobium officinale* flowers; rat; maternal toxicity; toxicity before birth

铁皮石斛含多糖、黄酮、氨基酸、金属元素、酚及木质素类、生物碱和挥发油等, 具有增强免疫、抗肿瘤活性、抗血小板聚集、降血糖、抗衰老、抗氧化和抗诱变等作用^[1-3]。铁皮石斛通常是指铁皮石斛干燥的茎, 铁皮石斛叶、花和根非食用部位, 毒理学安全性研究评价很少^[4-5]。本文采用动物发育毒性试验研究铁皮石斛花对孕鼠母体和仔鼠出生前毒性, 为评

价铁皮石斛花安全性提供毒理学依据。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 受试物 新鲜铁皮石斛花晒干粉碎后粗粉, 80目过筛, 黄棕色, 铁皮石斛花纯度 $>98\%$, 批号为110323, 阴凉干燥处保存。

1.2 实验动物 实验用SD大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪) 2007-0005, 清洁级, 体重80~100 g,

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2020.10.007

作者简介: 傅剑云, 硕士, 主任医师, 主要从事卫生毒理学工作

通信作者: 宋燕华, E-mail: yhsong@cdc.zj.cn

实验动物饲料由浙江实验动物中心提供,执行标准依据 GB 14924.3—2001《实验动物 小鼠大鼠配合饲料》^[6]。实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2008-0106。饲养环境:屏障环境,温度范围 20~25℃,相对湿度范围 40%~70%。实验动物在动物房环境中适应 5 d 后进行试验。

1.3 实验方法 设低、中、高 3 个剂量组和对照组。各剂量组受试物分别为 2.0、4.0、6.4 g/kgbw,按大鼠体重的 8% 折算,均匀拌入基础饲料(加入酪蛋白调整饲料蛋白质比例)喂饲;对照组仅喂饲基础饲料。SD 大鼠雌性 80 只,雄性 40 只,随机分为 4 组,每组雌性 20 只,雄性 10 只,单笼饲养,自由进食、饮水。亲代大鼠(P)连续给受试物 3 个月,于同一剂量组随机选择雌雄大鼠 1:1 交配 2 周,所产仔鼠(F1a)于出生后第 4 d 标准化,每窝调整为 10 只,尽量使雌雄数量相等。F1a 断乳后仅喂饲基础饲料。10 d 后将 P 再次交配,所产仔鼠(F1b)继续繁殖。F1b 断乳后喂含受试物饲料 3 个月,进行交配,所产仔鼠(F2a)处理同 F1a。F2a 断乳后 10 d,将 F1b 再次交配,所产仔鼠(F2b)部分检查畸胎,部分断乳后喂含受试物饲料。实验参照 GB 15193.15—2015《食品安全国家标准 生殖毒性试验》^[7]。

1.4 观察指标 (1)测量 P 和 F1b 孕鼠体重和总增

重;(2)计算受孕率和妊娠率,受孕率(%)=(怀孕鼠数/交配雌鼠数)×100%,妊娠率(%)=(分娩活体的孕鼠数/孕鼠总数)×100%;(3)记录并计算子代仔鼠出生体重和存活率,出生活仔率(%)=(出生活仔鼠数/出生仔鼠总数)×100%,出生存活率(%)=(产后 4 d 仔鼠存活数/出生活仔鼠数)×100%,性别比=仔鼠成熟时雄鼠数/雌鼠数。

1.5 统计分析 采用 SPSS 15.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,孕鼠体重比较采用重复测量资料的方差分析,总增重比较采用协方差分析,仔鼠出生体重采用线性混合效应模型分析(窝别作为随机效应变量,组别作为固定效应变量)。定性资料采用相对数描述,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,进一步两两比较采用 Bonferroni 法。检验水准 $\alpha=0.05$,校正后检验水准 $\alpha'=0.008$ 。

2 结果

2.1 4 组 P 和 F1b 孕鼠体重和总增重比较 两次妊娠,4 组 P 和 F1b 孕鼠体重均随时间延长而增加($P<0.05$);组间体重差异均无统计学意义($P>0.05$);组间和时间的交互效应对体重的影响均无统计学意义($P>0.05$)。4 组 P 和 F1b 孕鼠两次妊娠总增重差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1 和表 2。

表 1 4 组 P 和 F1b 孕鼠体重比较

组别	第一次妊娠					第二次妊娠				
	受孕鼠 (只)	0 d	7 d	14 d	21 d	受孕鼠 (只)	0 d	7 d	14 d	21 d
P										
对照组	18	323.07±20.61	352.17±22.65	379.36±33.16	444.78±49.92	16	355.73±29.86	371.73±30.49	405.57±31.60	495.75±63.02
低剂量组	19	323.18±17.16	345.46±18.77	382.99±21.82	471.72±63.26	18	365.04±18.38	389.55±21.70	423.14±31.35	516.28±53.75
中剂量组	19	323.43±23.34	351.09±20.74	381.94±31.31	468.91±63.09	19	365.69±33.24	391.38±30.10	419.48±34.29	497.21±61.60
高剂量组	19	333.72±34.76	353.55±28.52	383.33±33.15	474.88±46.64	16	372.78±31.53	399.16±27.70	432.90±28.25	535.29±52.12
$F_{时间}$ 值/ P 值			344.864/<0.001					341.121/<0.001		
$F_{组间}$ 值/ P 值			0.477/0.699					2.225/0.094		
$F_{时间*组间}$ 值/ P 值			1.080/0.370					0.863/0.481		
F1b										
对照组	24	316.74±25.83	342.75±28.45	376.13±31.02	471.01±38.71	23	361.19±28.58	383.17±31.29	414.03±34.15	517.54±59.19
低剂量组	22	326.88±25.82	355.29±29.28	386.36±32.53	464.53±54.81	22	360.59±20.28	376.66±19.55	410.50±22.22	504.09±44.74
中剂量组	22	334.61±25.02	361.90±25.80	387.53±27.65	474.93±49.47	22	369.44±21.59	384.76±19.82	418.06±29.35	513.33±60.81
高剂量组	23	337.08±34.73	364.93±35.12	391.10±39.54	467.24±69.78	22	373.90±32.73	397.24±31.28	423.55±35.59	505.97±82.10
$F_{时间}$ 值/ P 值			663.244/<0.001					416.475/<0.001		
$F_{组间}$ 值/ P 值			0.817/0.488					0.537/0.658		
$F_{时间*组间}$ 值/ P 值			1.233/0.302					0.503/0.698		

注:0、7、14、21 d 体重采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,单位为 g。

表2 4组P和F1b孕鼠总增重比较 ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	第一次妊娠	第二次妊娠
P		
对照组	121.71±58.83	140.01±47.35
低剂量组	148.54±53.34	151.25±51.32
中剂量组	145.47±60.30	131.52±66.58
高剂量组	141.16±45.29	162.51±59.76
F值	0.846	1.181
P值	0.474	0.325
F1b		
对照组	154.27±26.72	156.35±36.87
低剂量组	137.65±48.34	143.50±42.22
中剂量组	140.32±40.85	143.89±51.97
高剂量组	130.16±58.72	132.07±77.25
F值	1.143	0.472
P值	0.337	0.703

2.2 4组P和F1b孕鼠受孕率和妊娠率比较 4组P和F1b孕鼠两次妊娠受孕率和妊娠率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表3。

2.3 4组F1和F2仔鼠存活情况和出生体重比较 4组F1a、F2a、F1b和F2b仔鼠出生活仔率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。4组F1b和F2a仔鼠出生存活率差异均有统计学意义 ($P<0.05$)；但低、中、高剂量组F1b和F2a仔鼠出生存活率分别与对照组比较，差异均无统计学意义 ($P>0.008$)。F1a和F2b仔鼠出生存活率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。低剂量组F1a仔鼠出生体重低于对照组 ($t=-2.746$, $P=0.008$)，中剂量组F2b仔鼠出生体重低于对照组 ($t=-2.248$, $P=0.030$)。4组F1a、F2a、F1b和F2b活仔鼠性别比差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表4。

表3 4组P和F1b孕鼠受孕率和妊娠率比较

组别	第一次妊娠				第二次妊娠			
	受孕鼠 (只)	受孕率 (%)	妊娠鼠 (只)	妊娠率 (%)	受孕鼠 (只)	受孕率 (%)	妊娠鼠 (只)	妊娠率 (%)
P								
对照组	16	88.89	13	81.25	15	93.75	10	90.91
低剂量组	17	89.47	15	88.24	17	94.44	10	90.91
中剂量组	18	94.74	15	83.33	17	89.47	10	83.33
高剂量组	17	89.47	16	94.12	15	93.75	10	90.91
χ^2 值		0.503		1.441		0.428		0.511
P值		0.918		0.696		0.934		0.916
F1b								
对照组	22	91.67	22	100.00	21	91.30	21	100.00
低剂量组	21	95.45	21	100.00	21	95.45	19	90.48
中剂量组	21	95.45	19	90.48	20	90.91	18	90.00
高剂量组	22	95.65	18	81.82	21	95.45	17	80.95
χ^2 值		0.507		7.691		0.670		4.378
P值		0.917		0.053		0.880		0.223

3 讨论

研究结果显示，在两次妊娠过程中，4组P和F1b孕鼠体重变化均不明显，P和F1b孕鼠受孕率和妊娠率差异均无统计学意义，提示铁皮石斛花对P和F1b孕鼠母体未见明显不良影响。各剂量组F1和F2仔鼠出生活仔率、性别比、出生存活率与对照组比较，差异均无统计学意义；但低剂量组F1a仔鼠出生体重低于对照组，中剂量组F2b仔鼠出生体重低于对照组，可能与这两组出生活仔鼠总数明显多于对照组有关。实验结果表明喂饲铁皮石斛花对P、

F1b孕鼠母体毒性和F1、F2仔鼠出生前毒性未见明显不良影响。

目前的动物发育毒性试验方案主要有三段生殖毒性试验和一代或多代生殖毒性试验^[8]。三段生殖毒性试验包括生育力和早期胚胎发育毒性试验、胚体胎体毒性试验和出生前后发育毒性试验。一代或多代生殖毒性试验研究受试物对亲代、子代发育与生殖的影响，主要用于评价人类可能长期或多代接触的化学物质如农药、食品添加剂、食品和饮水污染物等。多代生殖毒性试验设计的主要特点是亲代雌雄都喂饲受试物，子代在断乳后喂饲受试物，实质上是多代连续接

表4 4组F1和F2仔鼠存活情况和出生体重比较

组别	窝数	出生活仔鼠 (只)	出生体重 (g)	出生活仔率 (%)	出生存活率 (%)	性别比
F1a						
对照组	13	113	7.27±1.03	98.26	92.04	1.05 : 1
低剂量组	15	209	6.54±0.62	95.87	88.04	1.04 : 1
中剂量组	15	200	6.75±0.53	99.01	92.00	0.98 : 1
高剂量组	16	176	6.81±0.60	96.70	93.75	1.00 : 1
χ^2 值				4.670	4.311	0.071
P值				0.198	0.230	0.995
F2a						
对照组	22	285	6.67±0.59	99.30	92.63	1.02 : 1
低剂量组	21	258	6.59±0.80	100.00	93.02	0.92 : 1
中剂量组	19	266	6.44±0.75	98.88	88.72	0.91 : 1
高剂量组	18	217	6.88±0.82	99.54	97.24	0.97 : 1
χ^2 值				2.958	12.841	0.333
P值				0.398	0.005	0.954
F1b						
对照组	10	133	7.19±0.85	97.79	92.48	1.11 : 1
低剂量组	10	162	7.04±0.51	100.00	96.91	1.00 : 1
中剂量组	10	140	7.03±0.87	100.00	97.86	0.98 : 1
高剂量组	10	179	7.09±0.43	99.44	98.32	0.98 : 1
χ^2 值				7.129	9.158	0.173
P值				0.068	0.027	0.982
F2b						
对照组	11	125	7.23±1.00	100.00	96.00	0.81 : 1
低剂量组	11	143	7.21±0.92	100.00	99.30	1.08 : 1
中剂量组	11	161	6.54±0.34	98.17	95.65	0.82 : 1
高剂量组	11	169	6.86±0.44	98.83	97.63	1.05 : 1
χ^2 值				4.476	4.444	1.373
P值				0.214	0.217	0.712

触受试物,子代通过乳汁摄入受试物,观察指标包括母体、胎儿和新生仔。本研究中采用受试物多代连续给予正是基于铁皮石斛花作为新资源食品的考虑。

人工种植生产和开发利用石斛其他部位(花、叶、根)是保护野生药用石斛种质资源的2个重要措施。有报道显示,铁皮石斛花可降血压、滋阴和改善甲亢型阴虚小鼠阴虚症状^[9-13],铁皮石斛茎、叶、花中黄酮类成分具有较高抗氧化活性,尤其铁皮石斛花黄酮^[14-17],为开发利用铁皮石斛花代替茎入药提供了可能性。本次实验结果显示铁皮石斛花对孕鼠母

体和仔鼠出生前未见明显不良影响,为其安全性评价提供了毒理学资料。应进一步结合铁皮石斛花致突变性、亚慢性毒性和致畸性等毒理学研究结果和流行病学资料,综合、全面地评价其安全性。

参考文献

- [1] 张宇,高飞,王向军,等.铁皮石斛主要化学成分及生物活性研究进展[J].药物生物技术,2015,22(6):557-561.
- [2] 张诗航.铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J].当代医药论丛,2018,16(20):26-27.
- [3] 汤志远,周晓宇,冯健,等.铁皮石斛多糖降血糖作用研究[J].南京中医药大学学报,2016,32(6):566-570.
- [4] 刘泳廷,刘佳,高敏,等.贵州鲜铁皮石斛粉小鼠经口毒性和骨髓红细胞微核试验研究[J].中国卫生工程学,2019,18(2):182-184.
- [5] 戴晓丰.铁皮石斛片安全性和功能学评价研究[D].南京:南京农业大学,2015.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.实验动物 小鼠大鼠配合饲料:GB 14924.3—2001[S].北京:中国标准出版社,2001.
- [7] 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 生殖毒性试验:GB 15193.15—2015[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [8] 孙志伟,陈雯,周建伟,等.毒理学基础[M].7版.北京:人民卫生出版社,2017.
- [9] 何晓艳,吴人照,杨兵勋,等.铁皮石斛花对自发性高血压大鼠降压作用研究[J].浙江中医杂志,2016,51(2):152-154.
- [10] 梁凯伦,方萍,施秋秋,等.铁皮石斛花对高糖高脂饮酒致高血压大鼠的降压作用及机制研究[J].中国中药杂志,2018,43(1):147-153.
- [11] 何晓艳,吴人照,龙华晴,等.铁皮石斛花对自发性高血压大鼠的降压作用及机制研究[J].中华中医药杂志,2017,32(4):1836-1840.
- [12] 雷珊珊,吕圭源,金泽武,等.铁皮石斛花提取物对甲亢型阴虚小鼠的影响[J].中国中药杂志,2015,40(9):1793-1797.
- [13] 王楠楠,戴明珠,徐俞悦,等.铁皮石斛花对肾上腺皮质激素致肾阴虚模型小鼠的影响[J].中药药理与临床,2017,33(1):116-119.
- [14] 唐静月,颜美秋,齐芳芳,等.铁皮石斛花总黄酮提取工艺优化及体外抗氧化活性研究[J].浙江中医药大学学报,2017,41(3):235-242.
- [15] 李芳,魏云,陈艳杰.铁皮石斛茎、叶、花中黄酮含量及其体外抗氧化活性研究[J].中医学报,2019,34(5):1020-1023.
- [16] 宋燕华,蔡德雷,傅剑云,等.铁皮石斛叶对二代繁殖雌性大鼠免疫水平影响的研究[J].浙江预防医学,2016,28(2):109-112.
- [17] 傅剑云,宋燕华,何佳维,等.铁皮石斛叶对亲代和子代雄性大鼠生殖系统的影响[J].预防医学,2017,29(8):782-785,789.

收稿日期:2019-12-02 修回日期:2020-01-09 本文编辑:田田