

苦瓜提取物 30 天喂养对 BALB /c 小鼠的毒性研究

方瑾, 梁春来, 李永宁, 王伟, 贾旭东, 李宁

卫生部食品安全风险评估重点实验室, 国家食品安全风险评估中心, 北京, 100021

摘要: **目的** 初步探究苦瓜提取物 30 天喂养对 BALB /c 小鼠的毒性作用。 **方法** 80 只雌性 BALB /c 小鼠, 以体重分层随机分为 2 个大组, 每大组 40 只; 每大组再按体重随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为对照组, 苦瓜提取物低、中、高剂量组, 其中受试物试验剂量设为 0、1.11、3.33、10.00g/kg BW, 灌胃给予 30d, 每周称重以调整灌胃量, 实验结束后采血测各项血液学和临床生化指标, 进行脏器称重、脾细胞计数以及病理组织学检查。 **结果** 受试物各剂量组小鼠体重及主要脏器系数与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 血常规检测结果显示受试物中剂量组血红蛋白含量较对照组显著降低 ($P<0.05$), 高剂量组淋巴细胞百分比较对照组显著降低 ($P<0.05$), 中性粒细胞百分比较对照组显著升高 ($P<0.05$); 受试物其他各剂量组白细胞计数及分类、红细胞计数、血红蛋白含量、红细胞压积、平均红细胞体积、平均血红蛋白含量与对照组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 血生化检测结果显示受试物高剂量组血糖值较对照组显著升高 ($P<0.05$), 受试物高剂量组肌酐较对照组显著降低 ($P<0.05$); 上述血常规及血生化检测指标的改变均在本实验室历史参考值范围内, 故无生物学意义。受试物其他各剂量组: 血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、尿素、肌酐、总胆固醇、甘油三酯、血糖、总蛋白、白蛋白测定值与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 各剂量组小鼠的肝、肾、胃、脾的病理指标也未显示出有受试物引起的异常改变。 **结论** 苦瓜提取物喂养 30 天对正常 BALB /c 小鼠未见明显毒性作用。

关键词: 苦瓜提取物; 30 天喂养, 毒性研究, BALB/c 小鼠

A 30-day toxicity study on Momordica charantia extract in BALB /c mice

Fang Jin, Liang Chunlai, Li Yongning, Wang Wei, Jia Xudong, Li Ning

Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing, 100021

Abstract: **Objective** To preliminary investigate the 30-day toxicity of Momordica charantia extract (MCE) in BALB/c mice. **Method** A total of 80 female mice weighing 18-22 g were randomly divided into two clusters based on body weight, and each weight-based cluster included four groups (10 mice per group): negative control, low, intermediate, and high dose MCE groups. Then mice were administered intragastrically with MCE at dosage of 0, 1.11, 3.33 and 10.00g/kg BW respectively for 30 days, and body weights were measured once every week to adjust the gavage volume. By the end of study, blood samples were collected for blood routine test and biochemical indexes, organ weighting and the spleen cell counting, histopathologic examinations were performed on all animals euthanized for necropsy. **Results** The weight gain of mice in all treated groups was similar to that in non-treated group. liver/body, kidney/body, spleen/body and thymus/body coefficients of mice in all treated groups were similar to those in non-treated group ($P>0.05$). Hematology results showed that the level of hemoglobin in middle dosage group of MCE were significantly lower than those in the negative control group ($P<0.05$), the percentage of lymphocyte in high dosage group of MCE were significantly lower than those in the negative control group ($P<0.05$), and the percentage of monocyte in high dosage group of MCE were significantly higher than those in the negative control group ($P<0.05$). White blood cell count and differential count, red blood cell count,

基金项目: 食品化学污染物与新资源危害识别关键技术研究 (2012BAK01B04)

作者简介: 方瑾 女 助理研究员 研究方向为食品毒理 E-mail:fangjin99168@163.com

通讯作者: 贾旭东 男 研究员, 李宁 女 研究员 研究方向为食品毒理

hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volumem and mean corpuscular hemoglobin concentration of mice in all treated groups were normal($P>0.05$); Clinical biochemical parameters showed the level of glucose in the high dosage group of MCE was significantly higher than the negative control group ($P<0.05$), the level of creatinine in the high dosage group of MCE was significantly lower than the negative control group($P<0.05$). however, all the changes in detected index of blood routine and blood biochemical were within the scope of this historical reference in our lab, so there were no biological significance. Aspartate transaminase, alanine aminotransferase, blood urea nitrogen, creatinine, cholesterol, triglyceride, glucose, albumin and serum total protein of mice in all treated groups were normal($P>0.05$). No pathological changes in liver, Kidney, spleen, thymus, lymph node, and bone marrow of mice in all treated groups were observed under microscope. **Conclusion** No obvious toxicity effects was observed in mice fed with MCE for 30 days.

Key words: Momordica charantia extract ; 30-day feeding: toxicity study ; BALB/c mice

随着科学技术的快速发展和生活水平的提高,消费者对食品的要求也逐步提高,药食两用物质由于其具有提高机体免疫力和特殊的营养功效,受到各国食品行业的青睐。然而药食两用物质虽然具有较高的开发和利用价值,但是由于其成分的复杂性,如果大量服用,也可引发潜在危害甚至死亡,因此对药食两用物质需要进行安全性评价,也需要关注其神经毒性、免疫毒性、内分泌干扰作用等特殊毒性,从而为该类物质作为新药开发或者保健型食品的开发提供科学依据。

苦瓜(*Momordica charantia* L.), 别名癞葡萄和锦荔枝,在我国已有数百年的食用历史,也是近年来备受关注的药食两用物质之一^[1-2],目前国内外主要关注于苦瓜及其提取物的功效研究,如增强免疫力,降血糖,抗病毒,抗肿瘤等等^[3-4];然而对其食用安全性的资料并不多,本研究以苦瓜水提物为受试物,以BALB/c小鼠为研究对象,对小鼠的主要器官、血常规、血生化以及病理等观察指标,初步探讨了苦瓜提取物对正常BALB/c小鼠的毒性作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料及试剂

受试物 苦瓜水提物 (购自南京泽朗医药科技有限公司)为棕色、有典型气味的细粉末,易溶于水,其中苦瓜皂甙含量为 20.18%,其它主要成分为苦瓜多糖及甾类物质。

1.2 动物与分组

BALB/c 小鼠,雌性,6~8 周龄,体重 18~22 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 [SPF 级,动物合格证号:SCXK(京)2009-0007]。颗粒饲料由中国医学科学院实验动物研究所提供 [许可证号:SYXK(京)2009-0008]。饲养地点为中国疾病预防控制中心动物房 [SPF 级,合格证号:SCXK(京)2009-0032], 室温(22 ± 2) °C,湿度 60% ~ 80%。

80 只雌性 BALB/c 小鼠,以体重分层随机分为 2 个大组,每大组 40 只;每大组再按体重随机分为 4 组,每组 10 只,分别为阴性对照组、苦瓜提取物低、中、高剂量组(根据苦瓜提取物的

“动物最大给予量”设定出的高、中、低剂量分别为 10.00、3.33 和 1.11 g/kg BW)。各试验剂量组均用纯净水配制成所需浓度，灌胃给样，对照组给予纯净水，灌胃容积为 0.3 ml/10 g。每周根据体重调整给样量，连续给样 30 d。

1.3 主要仪器与试剂

日立 7080 型自动生化仪；BECKMAN COULTER Ac.T diff2™ 血液分析仪。

电子分析天平(Sartorius 公司)、生物显微镜(NIKON 公司)、CO₂ 恒温培养箱(SHEL-LAB 公司)、低温高速离心机(BECKMAN GS-15R)。血生化检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司。

1.4 各组小鼠的处理及检测指标

(1) 第一组：喂养期间每周称重，喂养结束时眼眶内眦静脉采血处死动物，取肝脏、肾脏、脾脏、胸腺、骨髓、淋巴结，计算主要脏器系数；并进行病理组织学检查以及血常规检测。

(2) 第二组：喂养结束时眼眶内眦静脉采血处死动物后，分离血清测定血生化指标，取脾脏并进行脾细胞计数。

1.5 脾细胞数

无菌取脾，置于盛有 Hank's 液的平皿中，用 4 层纱布将脾磨碎，制成单细胞悬液，移入带盖的无菌试管中，用 Hank's 液洗 2 次，每次 1000 r/min 离心 10 min，然后将细胞悬浮于 1 ml 完全培养液，计数脾细胞数。

1.6 数据分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。计量资料采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。方差齐时用 LSD 法进行组间数据比较，方差不齐时用 Dunnett's T3 法进行组间数据比较，检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 对动物体重增长与脏器系数的影响

试验期间，动物的生长状况良好，3 个实验组与对照组无明显区别；连续给予受试物 30d 后，各剂量组小鼠每周体重及其增重，肝脏、肾脏、脾脏、胸腺以及脏器系数与对照组比较，差异均无统计学意义($p > 0.05$)，见表 1、表 2。

表 1 苦瓜提取物对小鼠每周的体重影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照组	20.2±0.7	19.4±0.8	20.0±0.8	20.1±0.8	20.1±0.8
低剂量组	20.9±1.1	20.3±1.1	20.2±1.0	20.4±1.0	19.9±1.0
中剂量组	20.0±1.7	20.1±1.3	20.5±1.5	20.7±1.4	20.2±1.2
高剂量组	20.7±1.1	19.7±1.2	19.2±1.2	20.2±1.6	19.8±1.3
F值	1.613	1.360	1.966	1.362	2.537
P值	0.187	0.263	0.116	0.262	0.053

表 2 苦瓜提取物对小鼠主要器官重量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	肝脏		肾脏		脾脏		胸腺	
	绝对重量	脏器系数	绝对重量	脏器系数	相对重量	脏器系数	绝对重量	脏器系数
	(g)	(%)	(g)	(g)	(%)	(%)	(g)	(%)
对照组	0.968±0.070	4.850±0.445	0.244±0.018	1.220±0.103	0.092±0.008	0.450±0.053	0.049±0.006	0.240±0.052
低剂量组	1.000±0.160	4.973±1.061	0.239±0.031	1.188±0.219	0.099±0.026	0.494±0.158	0.049±0.006	0.237±0.032
中剂量组	0.934±0.075	4.612±0.169	0.248±0.017	1.229±0.086	0.100±0.009	0.497±0.046	0.048±0.010	0.235±0.045
高剂量组	1.019±0.149	5.139±0.562	0.253±0.022	1.280±0.072	0.095±0.012	0.475±0.062	0.044±0.017	0.222±0.082
F值	0.970	1.234	0.678	0.799	0.934	0.619	0.404	0.238
P值	0.418	0.312	0.571	0.502	0.434	0.607	0.751	0.869

2.2 对血常规的影响

连续给药 30d 后，受试物中剂量组血红蛋白含量较对照组显著降低（ $P < 0.05$ ），受试物高剂量组淋巴细胞百分比较对照组显著降低（ $P < 0.05$ ），受试物高剂量组中性粒细胞较对照组显著升高（ $P < 0.05$ ），这些指标均在本实验室历史参考值范围内，故无生物学意义。受试物其他各剂量组白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白含量、平均红细胞体积、平均血红蛋白含量与对照组比较差异均无统计学意义（ $p > 0.05$ ）见表 3。

2.3对血生化指标的影响

连续给药30d后，受试物高剂量组血糖值较对照组显著升高（ $P < 0.05$ ），受试物高剂量组肌酐较对照组显著降低（ $P < 0.05$ ），这些指标均在本实验室历史参考值范围内，故无生物学意义。受试物其他各剂量组小鼠的血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总蛋白、白蛋白、血糖、尿素、肌酐、总胆固醇、甘油三酯与对照组比较差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）见表4。

2.4 对小鼠脾细胞数的影响

由表 5 可见，苦瓜提取物各剂量组小鼠的脾细胞数与对照组比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

表 5 苦瓜提取物对小鼠脾细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	小鼠脾细胞数 (10^7 个/g脾)
对照组	4.63±0.91
低剂量组	3.34±1.64
中剂量组	3.98±1.40
高剂量组	4.67±1.58
F值	1.324
P值	0.292

2.5 对脏器病理学的影响

各组小鼠肝、肾、脾脏、胸腺、骨髓、淋巴结肉眼观察未发现明显病变，组织病理学检查结果：肝小叶结构清晰，索窦比例正常，汇管区未见纤维组织增生及炎细胞浸润；肾脏组织皮、髓质分界清晰，肾小球、肾小管、集合管、间质及肾盂粘膜均未见明显异常；脾脏组织结构清晰，红髓、白髓及边缘区清晰，未见明显异常；胸腺：胸腺组织皮、髓质分界清晰，胸腺结构完整；淋巴结皮质、髓质结构清晰，淋巴结内淋巴滤泡可见，髓质内淋巴窦及髓索结构完整，淋巴滤泡未见明显增生；骨髓组织未见明显病理改变。故受试物各组动物肝、肾、脾脏、胸腺、骨髓、淋巴结组织病理学检查未见明显病理性损伤。

表 3 血常规检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$)	血红蛋白 (g/L)	红细胞压积 (%)	平均红细 胞体积 (fL)	平均血红 细胞含量 (pg)	淋巴细胞 (%)	单核细胞 (%)	中性粒细胞 (%)	嗜酸性粒细 胞 (%)	嗜碱性粒细 胞 (%)
对照组	5.82±1.74	10.48±0.33	159.4±3.5	48.0±1.3	45.7±0.7	15.2±0.4	75.27±5.07	3.12±2.32	17.98±5.36	3.60±0.28	0.00±0.00
低剂量组	5.28±1.95	10.29±0.25	153.7±4.6	46.6±1.0	45.3±0.5	14.9±0.2	63.07±10.44	3.99±2.13	28.24±11.00	4.69±1.72	0.00±0.00
中剂量组	4.52±1.12	10.16±0.15	152.1±2.5 ^a	46.7±0.7	46.0±0.5	15.0±0.2	68.82±4.13	5.56±1.48 ^a	22.54±5.22	3.08±1.26	0.00±0.00
高剂量组	4.07±0.99	10.47±0.61	156.3±9.7	47.6±2.7	45.5±0.7	14.9±0.2	62.44±4.26 ^a	3.69±1.40	30.19±4.46 ^a	3.69±2.15	0.00±0.00
F值	2.583	1.704	2.860	1.727	2.007	2.369	5.645	2.805	4.928	1.724	1.582
P值	0.069	0.184	0.051	0.179	0.131	0.087	0.004	0.057	0.013	0.184	0.215

注：a 表示与对照组比较，P<0.05

表 4 血生化指标检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	谷丙转氨酶 (U/L)	谷草转氨酶 (U/L)	总蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)	血糖 (mmol/L)	尿素 (mmol/L)	肌酐 (μ mol/L)	总胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)
对照组	41.0±14.3	149.3±19.2	69.72±10.75	38.66±8.28	3.65±0.95	10.48±1.69	58.63±11.41	2.55±0.33	1.55±0.52
低剂量组	32.1±9.1	151.4±42.3	63.47±5.87	32.97±2.89	3.72±1.00	10.73±2.08	56.20±10.58	2.71±0.27	1.57±0.34
中剂量组	35.4±10.9	144.0±35.5	65.81±9.73	32.76±3.54	4.58±0.87	10.16±1.23	55.41±9.84	2.65±0.23	1.65±0.39
高剂量组	31.6±8.8	140.2±23.8	69.04±9.47	34.55±6.41	4.76±1.29 ^a	9.14±1.38	48.44±2.63 ^a	2.81±0.55	1.25±0.37
F值	1.541	0.266	1.013	2.294	3.082	1.843	2.213	0.834	1.865
P值	0.221	0.849	0.398	0.094	0.039	0.157	0.103	0.484	0.153

注：a 表示与对照组比较，P<0.05

3 讨论

已有研究表明以1.25 g/(kg bw)、2.50/(kg bw)、5.00 g/(kg bw)剂量(分别相当于人体推荐量的25、50、100倍)的苦瓜水提取物给大鼠灌胃30 d, 各剂量对大鼠体重增长、总进食量、食物利用率差异无统计学意义($P>0.05$)^[5]。在本实验研究中, 以1.11、3.33、10.00g/kg BW剂量的苦瓜提取物灌胃给予小鼠30d, 受试物各剂量组动物的体重, 主要器官重量及脏器系数与对照组比较无显著性差异; 在组织病理学检测中各主要器官未见明显异常; 该结果与其他利用大鼠进行的苦瓜提取物长期毒性的研究结果较一致^[6]。

血液中红细胞和白细胞在参与机体免疫功能的过程中发挥重要作用^[7], 其中红细胞有许多与免疫相关的物质, 如补体受体CR1、CR3、NK细胞增强因子、过氧化物歧化酶(SOD)等, 能够识别、粘附、杀伤抗原, 清除免疫复合物, 并参与机体免疫调控的作用^[8-10]; 白细胞包括淋巴细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞, 这些不同细胞之间的比例变化可作为免疫细胞显微分化的评价指标。本研究中血常规结果显示, 苦瓜提取物中剂量组血红蛋白含量较对照组显著降低($P<0.05$), 苦瓜提取物高剂量组淋巴细胞百分比比较对照组显著降低($P<0.05$), 苦瓜提取物高剂量组中性粒细胞较对照组显著升高($P<0.05$), 虽然结果均在本实验室历史参考值范围内, 但是受试物高剂量组中的淋巴细胞百分比和中性粒细胞百分比均出现明显的改变, 这提示苦瓜提取物可能在一定剂量范围内对白细胞分类有一定的影响, 今后应进一步进行免疫功能学检测。

综上所述, 在本研究剂量范围内, 苦瓜提取物对正常BALB/c小鼠无明显毒副作用。

参考文献:

- [1] 袁涌, 贺吉川, 李妍. 苦瓜的药理作用之浅谈[J]. 中华临床医药, 2004.5: 108-109.
- [2] 查青, 董英, 徐斌. 药食两用植物(II) - 苦瓜的药理作用研究概况[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 33- 36.
- [3] 胡怡秀, 刘秀英, 马征, 尹进. 苦瓜水提取物降血糖作用动物实验研究[J]. 实用预防医学, 2010, 1(17):30-32.
- [4] Agrawal RC, Beohar T. Chemopreventive and anticarcinogenic effects of Momordica charantia extract[J]. Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11(2):371-5.
- [5] 胡怡秀, 刘秀英, 马征等. 苦瓜水提取物对大鼠毒副作用的实验研究[J]. 中国自然医学杂志, 2007, 4(9):83-87.
- [6] 吴春霞, 张明辉. 苦瓜提取物大鼠长期毒性试验[J]. 现代中医药, 2005, 25(5) : 71- 721
- [7] 王彩虹. 红细胞免疫调控研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(2):28-31
- [8] 赵卫红, 寿好长, 闫福岭. 细胞凋亡. 郑州: 河南医科大学出版社, 1997.
- [9] Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat M, Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity[J]. Biomed Pharmacol, 1998, 52(6):252-8.
- [10] 齐丽娟, 宋雁, 王伟等. 环磷酰胺对小鼠免疫抑制动物模型的建立[J]. 卫生研究, 2010, 39(3): 313-316.