

薏苡仁油致突变性实验研究

黄样增¹, 张 昆¹, 陈言视¹, 吴长辉¹, 姚渭溪¹, 陈冠敏², 李 晔¹

(1. 福建仙芝楼生物科技有限公司 药用菌栽培与深加工国家地方联合工程研究中心, 福州 350002;

2. 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001)

摘要:按照《保健食品检验与评价技术规范》, 采用 Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验研究薏苡仁油的致突变性。结果表明: Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验结果均为阴性。因此, 在本试验条件下, 薏苡仁油未显示有致突变性。

关键词:薏苡仁油; Ames 试验; 骨髓细胞微核试验; 精子畸形试验; 致突变性

中图分类号: TS225; TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)06-0069-04

Mutagenicity of coix seed oil

HUANG Yangzeng¹, ZHANG Kun¹, CHEN Yanjian¹, WU Changhui¹,
YAO Weixi¹, CHEN Guanmin², LI Ye¹

(1. Research Center of Medicinal Mushroom Cultivation and Deep Processing of Local and

National United Engineering, Fujian Xianzhilou Biological Science and Technology Co., Ltd.,

Fuzhou 350002, China; 2. Fujian Center of Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

Abstract: The mutagenicity of coix seed oil was studied by three mutagenicity tests including Ames test, bone marrow micronucleus test and sperm malformation test in mice in accordance with the terms from *Technical Standards for Test & Assessment of Health Food*. The results showed that in all three mutagenicity tests, no mutagenic effect was observed in any coix seed oil treated group. Therefore, coix seed oil had no mutagenic effect under the experimental conditions.

Key words: coix seed oil; Ames test; bone marrow micronucleus test; sperm malformation test; mutagenicity

薏苡仁油是从禾本科植物薏苡(*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuan* (Roman.) Stapf)的干燥成熟种仁^[1]中提取的, 薏苡仁含有2%~8%的薏苡仁油。张栋霞^[2]、谢春英^[3]等发现薏苡仁油中的主要成分有薏苡内酯(又称薏苡素)、脂肪酸甘油酯、甾醇、角鲨烯及维生素E等, 具有增强免疫力^[4]和抗肿瘤^[5]等作用, 其应用前景十分广阔。但是, 目前对于薏苡仁油的遗传毒性报道较少, 缺乏相关研究数据。遗传毒性研究是非临床安全性评价的重要内容, 包括致突变性、致癌性、致畸性。本试验按照

《保健食品检验与评价技术规范》, 通过对鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames试验)、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验对薏苡仁油的致突变性进行评价, 以期对薏苡仁油的开发利用以及安全食用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品

薏苡仁油软胶囊, 薏苡仁按照《中国药典》检测合格后, 采用图1生产工艺流程制备薏苡仁油(密度为0.87 g/L), 直接经压丸后制得。药理取薏苡仁油软胶囊内容物, 即薏苡仁油。

1.1.2 试验动物及饲养环境

选用上海斯莱克实验动物有限责任公司提供的清洁级健康ICR小鼠200只, 体重25~30 g; 清洁级

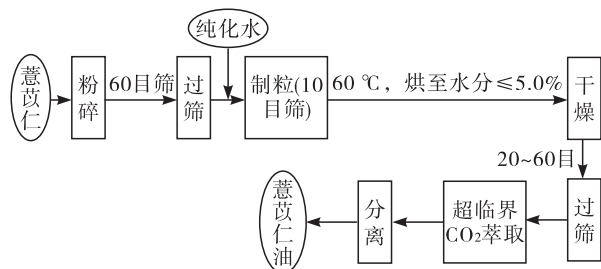
收稿日期: 2019-08-14; 修回日期: 2020-01-16

基金项目: 福州市科技计划项目(2018-G-81)

作者简介: 黄样增(1981), 男, 硕士, 研究方向为食药用菌和农产品活性物质的提取(E-mail) huangyangzeng@163.com。

通信作者: 李 晔, 高级工程师(E-mail) lee@xianzhilou.com。

SD大鼠80只,体重67~85 g,雌雄各半。许可证号为SCXK(沪)2012-0002。小鼠、大鼠饲养于福建省疾病预防控制中心SPF级动物实验室,许可证号为SYXK(闽)2012-0008。



注:超临界CO₂萃取条件为萃取压力25 MPa、萃取温度60℃、分离压力6.5 MPa、分离温度45℃、CO₂流量100 L/h、萃取时间4 h。

图1 薏苡仁油生产工艺流程

1.1.3 菌株

鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型菌株TA98、TA97、TA102和TA100,由福建省疾病预防控制中心赠送(购于复旦大学公共卫生学院),经鉴定符合要求后再进行试验。

1.1.4 仪器与试剂

电子天平,BSC-1360 II A2生物安全柜,SHP-250生化培养箱,DK-S28电热恒温水温箱,SS-325型自动高压灭菌器,自动菌落计数仪,Olympus CH显微镜。

丝裂霉素C(MMC),2,4,7-三硝基苄酮(2,4,7-TNFone),2-氨基苄(2-AF),1,8-二羟基蒽醌,三氯化钠(Na₃),二甲基亚砷(0.055 MPa,20 min灭菌),环磷酰胺(40 mg/kg),大豆油。

1.2 试验方法

1.2.1 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames试验)

采用多氯联苯诱导的大鼠肝匀浆作为体外代谢活化系统。称取样品5.0 g加二甲基亚砷至100 mL作为高剂量受试物,量取高剂量受试物20 mL加二甲基亚砷至100 mL搅拌均匀作为次高剂量受试物,以下3个剂量如此类推配制,由高到低配成5 000、1 000、200、40、8 μg/皿5个剂量,经0.103 MPa,20 min灭菌,同时设自发回变组、阳性对照组和溶剂(二甲基亚砷)对照组,每个剂量设3个平皿。在顶层琼脂中加入0.1 mL受试物溶液、0.1 mL测试菌株增菌液和0.5 mL S-9混合液(当需要代谢活化时),混匀后倒入底层培养基平板上,于37℃培养48 h,计数每皿回变菌落数,试验重复1次。如果样品的回变菌落数是溶剂对照组回变菌落数2倍以上,并具有剂量反应关系则定为试验结果阳性。

1.2.2 小鼠骨髓细胞微核试验

选取50只体重25~30 g健康小鼠,雌雄各半,各性别小鼠随机按体重分成5组,每组5只。鉴于动物、人的种属和个体之间的生物学差异,安全系数通常为100,因此试验设3个剂量组为4.35、8.70、17.40 g/kg,相当于成人推荐量的130、261、522倍,另设阳性(环磷酰胺)对照组、溶剂(大豆油)对照组。分别称取样品2.5、5.0、10.0 mL各加大豆油至20 mL配成3个浓度,各组动物分别按体重0.02 mL/g间隔24 h灌胃给予不同浓度的受试物及对照物2次,末次灌胃6 h后脱颈椎处死动物,取胸骨骨髓用小牛血清稀释涂片,经甲醇固定,Giemsa染色。在光学显微镜下观察,每只动物计数1 000个嗜多染红细胞(PCE),微核发生率以含微核PCE率计,按 χ^2 检验进行统计分析。同时计数200个PCE,求出PCE(嗜多染红细胞)/NCE(正染红细胞)值。

1.2.3 小鼠精子畸形试验

选用体重25~30 g雄性性成熟小鼠25只,随机按体重分成5组,每组5只,试验设3个剂量组为4.35、8.70、17.40 g/kg,相当于成人推荐量的130、261、522倍,另设溶剂对照组和阳性对照组。分别称取样品2.5、5.0、10.0 mL各加大豆油至20 mL配成3个浓度,各组动物分别按0.02 mL/g灌胃给予不同浓度的受试物及对照物,连续5 d。于首次灌胃后35 d,处死动物,取双侧附睾尾按标准程序制片、染色,显微镜下每只动物观察1 000个完整精子,记录各类畸形精子数,计算精子畸形率,按 χ^2 检验进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames试验)(见表1、表2)

由表1、表2可见,阳性对照组菌株的回变菌落数均超过自发回变组和溶剂(二甲基亚砷)对照组2倍以上,而该样品受试物各剂量组的回变菌落数均未超过溶剂对照组回变菌落数的2倍。说明Ames试验结果为阴性。

2.2 小鼠骨髓细胞微核试验(见表3)

由表3可见,该样品各剂量组PCE(嗜多染红细胞)/NCE(正染红细胞)未少于溶剂对照组的20%,提示骨髓红细胞系统的增殖并无明显抑制,对嗜多染红细胞微核的观察无明显影响。阳性(环磷酰胺)对照组微核发生率明显高于溶剂对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而样品各剂量组与溶剂对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明该样品未表现出使小鼠骨髓PCE微核率上升的致突变效应。

表1 样品 Ames 试验结果(第一次) ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
受试物	5 000	120 \pm 19	129 \pm 12	31 \pm 2	31 \pm 1	134 \pm 12	137 \pm 11	267 \pm 12	279 \pm 14
	1 000	122 \pm 19	133 \pm 11	33 \pm 1	34 \pm 1	136 \pm 12	139 \pm 16	273 \pm 14	276 \pm 21
	200	130 \pm 11	130 \pm 11	32 \pm 2	32 \pm 2	135 \pm 11	142 \pm 16	266 \pm 21	281 \pm 15
	40	127 \pm 10	134 \pm 14	32 \pm 1	33 \pm 3	132 \pm 12	140 \pm 16	270 \pm 18	282 \pm 13
	8	123 \pm 16	134 \pm 11	32 \pm 2	31 \pm 1	138 \pm 11	143 \pm 16	276 \pm 15	280 \pm 20
自发回变		117 \pm 15	128 \pm 15	33 \pm 2	32 \pm 2	131 \pm 13	139 \pm 17	269 \pm 17	277 \pm 12
溶剂对照		120 \pm 14	131 \pm 15	32 \pm 1	33 \pm 2	136 \pm 12	144 \pm 14	264 \pm 18	277 \pm 19
阳性对照									
2,4,7-TNFone	0.2	1 147 \pm 65		1 180 \pm 77					
NaN ₃	1.5					1 106 \pm 49			
MMC	2.5							1 144 \pm 77	
2-AF	10.0		1 127 \pm 41		1 140 \pm 75		1 116 \pm 25		
1,8-二羟基蒽醌	50.0								1 190 \pm 52

表2 样品 Ames 试验结果(第二次) ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
受试物	5 000	109 \pm 11	118 \pm 13	31 \pm 1	33 \pm 1	128 \pm 11	139 \pm 14	271 \pm 17	280 \pm 15
	1 000	116 \pm 12	126 \pm 11	33 \pm 2	31 \pm 2	132 \pm 14	144 \pm 12	268 \pm 18	276 \pm 16
	200	115 \pm 12	125 \pm 12	33 \pm 1	33 \pm 2	135 \pm 13	140 \pm 15	273 \pm 15	276 \pm 21
	40	117 \pm 11	123 \pm 18	32 \pm 2	33 \pm 1	136 \pm 13	143 \pm 13	273 \pm 16	278 \pm 14
	8	121 \pm 15	122 \pm 15	32 \pm 3	32 \pm 2	137 \pm 13	145 \pm 15	277 \pm 16	278 \pm 18
自发回变		117 \pm 13	131 \pm 12	33 \pm 3	31 \pm 1	137 \pm 17	145 \pm 13	269 \pm 18	278 \pm 14
溶剂对照		121 \pm 16	134 \pm 11	33 \pm 2	34 \pm 1	134 \pm 13	149 \pm 14	267 \pm 10	278 \pm 16
阳性对照									
2,4,7-TNFone	0.2	1 106 \pm 45		1 100 \pm 55					
NaN ₃	1.5					1 169 \pm 37			
MMC	2.5							1 147 \pm 80	
2-AF	10.0		1 148 \pm 100		1 134 \pm 72		1 112 \pm 64		
1,8-二羟基蒽醌	50.0								1 169 \pm 92

表3 样品小鼠骨髓细胞微核试验结果($\bar{x} \pm s$)

性别	组别	剂量/ (g/kg)	动物数 (只)	PCE/NCE			含微核 PCE 率		
				观察 PCE 数(个)	观察 NCE 数(个)	PCE/NCE	观察 PCE 数(个)	含微核的 PCE 数(个)	含微核 PCE 率/%
雄	溶剂对照		5	1 000	1 097	0.91 \pm 0.08	5 000	6	0.12 \pm 0.08
		4.35	5	1 000	1 003	1.00 \pm 0.04	5 000	4	0.08 \pm 0.08
	受试物	8.70	5	1 000	1 061	0.94 \pm 0.05	5 000	3	0.06 \pm 0.05
		17.40	5	1 000	1 074	0.93 \pm 0.05	5 000	4	0.08 \pm 0.13
	阳性对照		5	1 000	1 124	0.89 \pm 0.09	5 000	111*	2.22 \pm 0.22
雌	溶剂对照		5	1 000	1 135	0.88 \pm 0.06	5 000	6	0.12 \pm 0.11
		4.35	5	1 000	1 077	0.93 \pm 0.06	5 000	5	0.10 \pm 0.10
	受试物	8.70	5	1 000	1 045	0.96 \pm 0.07	5 000	4	0.08 \pm 0.04
		17.40	5	1 000	1 052	0.95 \pm 0.05	5 000	3	0.06 \pm 0.05
	阳性对照		5	1 000	1 076	0.94 \pm 0.09	5 000	110*	2.20 \pm 0.16

注:*表示与溶剂对照组相比 $P < 0.01$ 。下同。

(下转第81页)

参考文献:

- [1] 王树杞. 大扁杏——甜杏仁栽培与利用[M]. 北京:中国林业出版社,1993:5-20.
- [2] 王筠默. 中药药理学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983:87.
- [3] 杨海涛. 甜杏仁油的提取研究与应用[J]. 中国油脂,2008,33(4):20-21.
- [4] 李志东,张洪林,邱峰. 杏仁油的提取研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(17):4389-4390.
- [5] 丁洁,李博生. 微胶囊技术及其在食品工业中的应用[J]. 中国食物与营养,2010(3):29-31.
- [6] 王宝琴,徐泽平. 微胶囊化粉末油脂制品的技术研究[J]. 粮油加工,2010(7):8-11.
- [7] 钱列生,芮汉明. 食品微胶囊技术[J]. 中山大学学报论丛,2007(9):201-205.
- [8] 姚辉,于才渊. 喷雾干燥制备微胶囊技术在食品工业中的应用[J]. 干燥技术与设备,2004(1):8-11.
- [9] DRUSCH S, SCHWARZ K. Microencapsulation properties of two different types of *n*-octenylsuccinate-derivatised starch[J]. Eur Food Res Technol,2006,222(1/2):155-164.
- [10] 孙兰萍,马龙,张斌,等. 杏仁油微胶囊制备工艺的优化[J]. 农业工程学报,2008(9):253-257.
- [11] 刘凡. 油脂微胶囊壁材主要成分相互作用研究及微观结构分析[D]. 南昌:南昌大学,2013.

- [12] 戴燕红. 《现代干燥技术》(第2版)编写工作会议纪要[J]. 干燥技术与设备,2004(4):9.
- [13] GHARSALLAOUI A, ROUDAUT G, CHAMBIN O, et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview[J]. Food Res Int, 2007, 40(9):1107-1121.
- [14] 薛焕焕,张海生,赵鑫帅,等. 不同提取方法对大扁杏仁油品质的影响[J]. 江苏农业学报,2018,34(2):439-446.
- [15] 张莉,杨有林,张靖,等. 扁杏仁油微胶囊的制备及质量评价[J]. 食品工业科技,2012,24(9):246-249.
- [16] 王梦泽,薛少平,王佳,等. 草莓浑油汁维生素C降解动力学模型[J]. 农业工程学报,2010,26(3):353-357.
- [17] 吴晓霞,李建科,张研宇. 蚕蛹油超声波辅助萃取及其抗氧化稳定性[J]. 中国农业科学,2010,43(8):1677-1687.
- [18] QUISPE-CONDORI S, SALDAÑA M D A, TEMELL F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying[J]. LWT - Food Sci Technol, 2011, 44(9):1880-1887.
- [19] DENIZ B, BOYACI I H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology[J]. J Food Eng, 2007,78(3):836-845.
- [20] 孔令明,李芳,陈士利,等. 杏仁油微胶囊的制备[J]. 农产品加工,2012(1):74-75,78.

(上接第71页)

3.3 小鼠精子畸形试验(见表4)

由表4可见,阳性(环磷酰胺)对照组与溶剂(大豆油)对照组比较,差异有统计学意义($P <$

0.01),而样品各剂量组与溶剂对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),可见样品对小鼠精子畸形率未产生明显改变,提示该样品对小鼠精子不产生畸变作用。

表4 样品小鼠精子畸形试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g/kg)	动物数 (只)	观察精子 数(个)	畸形数(个)							畸形 率/%	
				无定型	无钩	香蕉	胖头	双尾	双头	尾折叠		总量
溶剂对照	5	5	5 000	63	13	7	3	0	0	0	86	1.72 ± 0.22
	4.35	5	5 000	61	10	6	3	0	0	0	80	1.60 ± 0.19
受试物	8.70	5	5 000	67	14	6	3	0	0	0	90	1.80 ± 0.23
	17.40	5	5 000	65	11	6	4	0	0	0	86	1.72 ± 0.18
阳性对照	5	5	5 000	197	150	69	14	4	2	1	437 *	8.74 ± 0.65

3 结论

采用反映基因突变的 Ames 试验、反映染色体损害的小鼠骨髓细胞微核试验和反映生殖细胞突变的小鼠精子畸形试验研究薏苡仁油的致突变性。结果发现,薏苡仁油对小鼠骨髓细胞微核无明显增多作用,对雄性小鼠生殖细胞无遗传损伤作用,也不具有基因致突变作用。因此,在本试验条件下,薏苡仁油未显示有致突变性。试验表明薏苡仁油对人体无致突变作用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:376-377.
- [2] 张栋霞,张涛. GC/MSD 分析薏苡仁油组份[J]. 粮食与油脂,2001(1):42-43.
- [3] 谢春英,林乐维. 超临界 CO₂ 流体萃取薏苡仁油的 GC-MS 分析[J]. 中药材,2011,34(8):1234-1236.
- [4] 周岩飞,金凌云,王琼,等. 薏苡仁油对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 中国油脂,2018,43(8):77-81.
- [5] 张明发,沈雅琴. 薏苡仁油抗消化系统肿瘤的基础和临床研究[J]. 中国执业药师,2011,8(8):19-22.