

# 肉苁蓉尿囊素提取物安全性毒理学评价

谯明<sup>1</sup>, 朱毅<sup>2</sup>, 杨建华<sup>2</sup>, 胡君萍<sup>1\*</sup>

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** **目的:**研究肉苁蓉尿囊素提取物的食用安全性,为其后续开发利用提供科学依据。**方法:**根据《保健食品检验与评价技术规范》,对肉苁蓉尿囊素提取物进行细菌回复突变(Ames)实验、小鼠骨髓微核实验、小鼠精子畸变实验、大鼠30 d喂养实验。**结果:**Ames实验中,尿囊素提取物剂量分别40,200,1 000,5 000  $\mu\text{g}/\text{皿}$ ,无论加或不加哺乳动物肝脏微粒体酶( $S_9$ ),各剂量组的回复突变菌落数均未出现剂量依赖性的增加,结果为阴性;小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验中,与正常组比较,尿囊素提取物各剂量组中的微核率均无显著性差异;小鼠精子畸变实验中,尿囊素提取物各剂量组小鼠精子畸变率与正常组比较无显著性差异,结果为阴性。3项遗传毒性实验结果均为阴性,表明尿囊素提取物无遗传毒性。大鼠30 d喂养实验结果显示,采用不同浓度尿囊素提取物(1.100,0.550,0.275  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )分别对大鼠连续喂养30 d,大鼠未见中毒症状和死亡,各剂量组大鼠体质量、摄食量、增重、周食物利用率、总食物利用率、脏器比、血常规指标及生化指标与正常组均无显著性差异,脏器病理组织学检查也未发现病理改变。**结论:**肉苁蓉尿囊素提取物属无毒级物质,未见遗传毒性,具有较高的食用安全性,为其安全性提供了科学实验依据。

**[关键词]** 肉苁蓉;尿囊素;急性毒性;遗传毒性;亚急性毒性

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5;R93 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0095-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190923

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190116.1931.012.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-17 17:52

## Safety and Toxicological Assessment of Allantoin Extract from Cistanches Herba

QIAO Ming<sup>1</sup>, ZHU Yi<sup>2</sup>, YANG Jian-hua<sup>2</sup>, HU Jun-ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the safety of allantoin extract from Cistanches Herba, so as to provide scientific support for subsequent utilization and development of allantoin extract from Cistanches Herba. **Method:** According to the national standard procedures and methods in food safety and toxicological evaluation, a series of toxicological studies on allantoin extract from Cistanches Herba were conducted, including genetic toxicity and subacute toxicity tests. **Result:** In the Ames test, with or without mammalian liver microsomal enzymes ( $S_9$ ), allantoin extract from Cistanches Herba in 40, 200, 1 000, 5 000  $\mu\text{g}\cdot\text{dish}^{-1}$  dose range for four bacteria showed no dose-dependent increase. In the micronucleus test, there was no statistically significant difference among each dose group and the negative control group. In the test of mouse sperm aberration, there was no significant difference in the sperm aberration rate among the allantoin extract group and the negative control group. The results of three genotoxicity tests were all negative, indicating no genotoxicity in allantoin extract. The results of 30 days test showed no death and abnormal clinical sign in rats of control group and each dose group (1.100, 0.550, 0.275  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The body

**[收稿日期]** 20190102(005)

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区科技计划项目(201417105)

**[第一作者]** 谯明,在读博士,从事天然产物研究与开发研究,E-mail:1532527694@qq.com

**[通信作者]** \*胡君萍,博士,教授,从事新疆特色药用资源的开发与利用研究,E-mail:89229613@qq.com

weight, food intake, weekly and total food utilization, weight increment, organ/body ratios, blood biochemical indexes and blood routine indexes had no significant difference among the control group and dose groups. There was no abnormal pathological change in heart, liver, spleen, lung, kidney and testicle of rats in treatment group. **Conclusion:** Allantoin extract from *Cistanches Herba* is a non-toxic substance without any genetic toxicity but with a high edible safety. This study provides scientific experimental basis for its safety.

[**Key words**] *Cistanches Herba*; allantoin; acute toxicity; genetic toxicity; sub-acute toxicity

肉苁蓉又名地精、苁蓉、大芸,素有“沙漠人参”之美誉<sup>[1]</sup>。肉苁蓉味甘、咸,性温,主治男子肾虚、女子不孕、慢性便秘等<sup>[2]</sup>,在我国已有 2 000 多年的使用历史,在补肾壮阳方面仅次于人参。肉苁蓉原植物全世界约 20 种,我国有 6 种及 1 变种,分别为肉苁蓉 *Cistanche deserticola*,盐生肉苁蓉 *C. salsa*,管花肉苁蓉 *C. tubulosa*,沙苁蓉 *C. sinensis*,兰州肉苁蓉 *C. lanzhouensis*,迷肉苁蓉 *C. ambigua* 和变种白花盐苁蓉 *C. salsavar*<sup>[3]</sup>。肉苁蓉主要生于盐碱地、沙地、沙漠环境中,在我国主要分布于内蒙古、陕西、甘肃、宁夏及新疆等 5 个省区,此外,青海亦有少量分布<sup>[4]</sup>。肉苁蓉中含有多种活性成分,主要包括苯乙醇苷类、多糖、挥发性成分、环烯醚萜类、木脂素类、黄酮类、生物碱<sup>[5-6]</sup>等,其中苯乙醇苷类对缺血心肌具有保护作用<sup>[7-8]</sup>;半乳糖醇具有润肠通便功效<sup>[9]</sup>;多糖对细胞免疫功能具有显著调节作用<sup>[10]</sup>;除此之外,肉苁蓉还有降压、保肝、补肾壮阳、抗氧化<sup>[11-12]</sup>等功效。

尿囊素是肉苁蓉中一种酰胺类化合物,化学名称为 1-脲基间二氮杂茂烷-2,4-二酮或 5-脲基海因,属于咪唑类杂环化合物,分子式  $C_4H_6N_4O_3$ ,相对分子质量 158.12,生物碱反应呈阳性<sup>[13-15]</sup>,具有促进皮肤细胞生长,清理坏死组织,促使伤口组织愈合<sup>[16-18]</sup>,刺激新的健康组织生长等生理活性,临床上主要用于皮肤干燥皲裂、手部皮炎、胃及十二指肠溃疡等治疗<sup>[19]</sup>;杨建华等<sup>[20]</sup>采用酵母双杂交技术对肉苁蓉中 5 种化学成分的降血脂活性进行了筛选,结果显示尿囊素具有一定的体外降血脂活性;本课题组研究显示盐生肉苁蓉 *C. salsa* 中尿囊素含量最高<sup>[21]</sup>。课题组前期对肉苁蓉尿囊素提取物进行了急性毒性研究,结果显示其最大给药量对小鼠心、肝、脾、肺、肾等重要脏器的生长和体质量增加无影响,但目前还没有肉苁蓉尿囊素提取物的系统毒性研究报道,为进一步全面考察其食用安全性,促进其资源的合理开发利用,本研究按照《保健食品检验与评价技术规范》<sup>[22]</sup>对其进行 Ames 实验、小鼠骨髓微核实验、小鼠精子畸变实验、大鼠 30 d 喂养

实验等毒理安全性研究,旨在为肉苁蓉尿囊素提取物后续开发利用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠和昆明种小鼠由新疆医科大学医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(新)2016-0004,SD 大鼠体质量为 95 ~ 105 g,昆明种小鼠体质量为 25 ~ 35 g,实验前均在实验室预饲养 1 周,自由进食和饮水,动物实验室为 SPF 级,室温 (22 ± 2)℃,相对湿度 50% ~ 70%。本实验研究经过新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(编号 2016-087),符合中国伦理委员会指导原则。

**1.2 药物与试剂** 肉苁蓉(2013 年 5 月采自新疆吉木萨尔沙漠地区),由新疆医科大学杨建华教授鉴定为列当科植物盐生肉苁蓉 *C. salsa* 的肉质茎,凭证标本保存在新疆医科大学生药学教研室。胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号 20150707);Giemsa 染液,多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20160928,20150730);环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司,批号 15100925);伊红(天津市天新精细化工开发中心,批号 20140228);琼脂粉,氯化钠,2-氨基苄,甲基磺酸甲酯,敌克松,  $S_0$  反应液,  $S_9$  混合物,底层培养基 GS,底层培养基 VS,HB 溶液,1,8-二羟基蒽醌,TA97 菌株,TA98 菌株,TA100 菌株,TA102 菌株(北京汇智泰康生物技术有限公司,批号分别为 20161104,20160908,20161126,20160815,20161126,20161104,20161110,20161104,20161107,20160819,20160715,20161121/N,20160818/N,20160913/N,20161115/O)。

**1.3 仪器** mindray BS-120 型全自动生化仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);Sysmex XT-2000i 型全自动血液细胞分析仪(日本东亚医用电子仪器有限公司);Ctr 4000 型显微镜,RM 2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 肉苁蓉尿囊素提取物的制备** 肉苁蓉药材粉碎,过 30 目筛。取肉苁蓉粉末,分别以 10,8 倍量

水加热, 80 ℃ 条件下提取 2 次, 合并提取液并减压浓缩<sup>[23]</sup>。水提液通过 AB-8 型大孔吸附树脂柱, 以 4 倍柱体积水洗脱, 再用 1 倍柱体积无水乙醇洗脱, 收集醇洗脱液, 减压浓缩至稠膏, 再经冷冻干燥得尿囊素提取物粉末, 得率为 6.14%, 尿囊素质量分数为 20.01%。

**2.2 细菌回复突变 (Ames) 实验** 采用鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97, TA98, TA100, TA102 4 株菌株进行实验。实验采用平板掺入法。分别设尿囊素提取物组 (40, 200, 1 000, 5 000 μg/皿), 2-氨基苄组, 甲基磺酸甲酯组, 敌克松组, 1, 8-二羟基蒽醌组, 自发回变组和溶剂组。在加 S<sub>0</sub> 和 不加 S<sub>0</sub> 情况下, 每种菌每个测试浓度设 3 皿平行, 计数各组平均回变菌落数<sup>[24]</sup>。4 株菌株在加 S<sub>0</sub> 或未加 S<sub>0</sub> 条件下, 受试物组回变菌落数是溶剂组的 2 倍以内, 结果判定为阴性; 任一菌株在加 S<sub>0</sub> 或未加 S<sub>0</sub> 条件受试物组回变菌落数是溶剂组的 2 倍或 2 倍以上, 结果判定为阳性。

**2.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验** 采用 30 h 给受试物法进行实验。取体质量为 25 ~ 30 g SPF 级昆明种小鼠 50 只, 适应性喂养 5 d 后, 按体质量随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。环磷酰胺 (0.04 g·kg<sup>-1</sup>) 为环磷酰胺组, 无菌生理盐水为正常组, 尿囊素临床日用量的 25 倍, 50 倍, 100 倍<sup>[22]</sup> 分别作为尿囊素提取物高、中、低剂量组 (1.100, 0.550, 0.275 g·kg<sup>-1</sup>) 给小鼠灌胃 (0.02 L·kg<sup>-1</sup>)。第 2 次给受试物后 6 h, 颈椎脱臼处死小鼠, 取股骨, 用止血钳挤出骨髓液与玻片一端的胎牛血清混匀, 常规涂片, 待涂片自然干燥, 放入甲醇中固定 5 ~ 10 min, 将固定好的涂片放入 Giemsa 应用液中, 染色 30 min。立即用蒸馏水冲洗, 晾干。选择细胞完整、分散均匀, 着色适当的区域, 在光学显微镜下观察<sup>[25]</sup>。每只动物计数 200 个嗜多染红细胞, 计算嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值 (PCE/NCE)。计数 1 000 个嗜多染红细胞 (PCE), 观察含有微核的嗜多染红细胞数, 微核率以千分率表示。

**2.4 小鼠精子畸形实验** 昆明种雄性小鼠 (25 g ~ 35 g) 30 只, 适应性喂养 5 d 后, 按体质量随机分为 5 组, 每组 6 只。以 0.06 g·kg<sup>-1</sup> 环磷酰胺为环磷酰胺组, 灭菌生理盐水为正常组。尿囊素提取物 3 个剂量为 1.100, 0.550, 0.275 g·kg<sup>-1</sup>, 每日给小鼠灌胃灌胃 1 次, 连续 5 d, 于首次灌胃给药后的第 35 天, 用颈椎脱臼法处死小鼠, 取出两侧副睾, 放入盛有 2 mL 生理盐水的平皿中。用

眼科剪将副睾纵向剪 1 ~ 2 刀, 静置 5 min, 轻轻摇动。用 4 层擦镜纸过滤, 吸滤液涂片, 空气干燥后, 用甲醇固定 5 min 以上干燥, 用 2% 伊红染色 1 h, 用水轻冲, 干燥<sup>[26]</sup>。每只动物计数 1 000 个结构完整的精子, 计算精子畸形率。精子畸形率 = 精子畸形总数/检查精子总数 × 100%。

**2.5 大鼠 30 d 喂养实验** 取 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 雄鼠体质量为 (107.3 ± 10.48) g, 雌鼠体质量 (100.6 ± 6.45) g。适应性喂养 5 d 后, 按体质量随机分为 4 组, 即正常组及 3 个剂量组, 每组 20 只, 雌雄各半。尿囊素提取物高、中、低剂量组分别 1.100, 0.550, 0.275 g·kg<sup>-1</sup>, 相当于人体推荐剂量的 100, 50, 25 倍。每日灌胃 1 次, 灌胃体积为 0.01 L·kg<sup>-1</sup>, 连续灌胃 30 d。每天观察并记录动物的行为、表现。每周称 1 次体质量和 2 次食物摄入量, 计算每周及总的食物利用率。给药 30 d 后禁食 16 h, 腹主动脉采血, 用全自动血液分析仪测定血红蛋白 (HGB), 红细胞压积 (HCT), 红细胞总数 (RBC), 白细胞计数 (WBC), 血小板 (PLT) 计数, 嗜酸性粒细胞 (EO), 单核细胞 (MO), 中性粒细胞 (NEUT), 淋巴细胞 (LYM); 非抗凝血分离血清, 用全自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 尿素 (Urea), 肌酐 (Cr), 血糖 (Glu), 血清白蛋白 (ALB), 总蛋白 (TP), 总胆固醇 (TCH) 和甘油三酯 (TG)。采血后, 对所有动物进行解剖, 称量肝、肾、脾、睾丸质量并计算各脏器比, 取肝、肾、脾、胃、十二指肠、睾丸/卵巢作病理切片检查。

**2.6 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件统计分析数据, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对细菌回变菌落数的影响** 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97, TA98, TA100, TA102 4 株菌株, 在加及不加 S<sub>0</sub> 时, 尿囊素提取物各剂量组回变菌落数均未超过溶剂组菌落数的 2 倍, 亦无量效关系, 无致突变作用, 表明该受试物诱变实验结果为阴性, 见表 1。

**3.2 对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生率的影响** 尿囊素提取物 3 个剂量组雌、雄小鼠骨髓含微核嗜多染红细胞 (PCE) 率与正常组比较无统计学差异; 与提取物各剂量组、正常组微核率比较, 环磷酰胺组微核率显著升高 (*P* < 0.01)。提取物同一剂量组内雌、雄小鼠之间的微核无明显的性别差异。

表 1 尿囊素提取物对 4 株鼠伤寒沙门氏菌回变菌落数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of allantoin extract on bacterial count of four types of salmonella typhimurium ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ μg/皿	TA97		TA98		TA100		TA102	
		+ S <sub>9</sub>	- S <sub>9</sub>	+ S <sub>9</sub>	- S <sub>9</sub>	+ S <sub>9</sub>	- S <sub>9</sub>	+ S <sub>9</sub>	- S <sub>9</sub>
自发回变	-	115 ± 18	118 ± 12	39 ± 4	32 ± 6	134 ± 17	137 ± 13	297 ± 24	289 ± 37
溶剂	-	119 ± 11	113 ± 16	40 ± 3	37 ± 4	141 ± 11	138 ± 18	283 ± 27	291 ± 21
尿囊素提取物	40	115 ± 16	111 ± 17	37 ± 2	36 ± 5	136 ± 15	138 ± 12	296 ± 19	284 ± 20
	200	113 ± 15	114 ± 11	39 ± 3	39 ± 6	139 ± 16	134 ± 15	282 ± 19	293 ± 17
	1 000	118 ± 13	119 ± 18	36 ± 5	37 ± 3	133 ± 17	135 ± 17	293 ± 25	284 ± 17
	5 000	115 ± 17	120 ± 16	38 ± 4	40 ± 2	137 ± 13	139 ± 14	289 ± 26	294 ± 22
2-氨基苄	100	1 153 ± 129 <sup>1)</sup>	-	2 021 ± 297 <sup>1)</sup>	-	2 547 ± 164 <sup>1)</sup>	-	-	-
甲基磺酸甲酯	100	-	-	-	-	-	2 630 ± 121 <sup>1)</sup>	-	2 375 ± 137 <sup>1)</sup>
敌克松	100	-	1 254 ± 152 <sup>1)</sup>	-	1 845 ± 102 <sup>1)</sup>	-	-	-	-
1,8-二羟基蒽醌	50	-	-	-	-	-	-	2 264 ± 154 <sup>1)</sup>	-

注:与溶剂组比较<sup>1)</sup>P < 0.01。阳性剂, + S<sub>9</sub>, TA97, TA98, TA100 为 2-氨基苄(100 μg/皿); TA102 为 1, 8-二羟基蒽醌(50 μg/皿); - S<sub>9</sub>, TA100, TA102 为甲基磺酸甲酯, TA97, TA98 为敌克松(100 μg/皿)。

表明尿囊素提取物未显示使小鼠骨髓 PCE 微核率 上升的致突变效应。见表 2。

表 2 尿囊素提取物对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of allantoin extract on bone marrow cell micronucleus rate in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

性别	组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PCE 数 <sup>2)</sup> /个	微核数/个	微核率/‰	PCE 数 <sup>3)</sup> /个	NCE 数/个	PCE/NCE
雄	正常	-	5 000	6	1.20 ± 0.35	1 000	1 002	0.99 ± 0.051
	环磷酰胺	0.040	5 000	127	25.40 ± 1.74 <sup>1)</sup>	1 000	1 054	0.95 ± 0.042
	尿囊素提取物	0.275	5 000	4	0.80 ± 0.43	1 000	895	1.12 ± 0.062
		0.550	5 000	4	0.80 ± 0.46	1 000	953	1.05 ± 0.041
		1.100	5 000	5	1.00 ± 0.52	1 000	955	1.05 ± 0.037
雌	正常	-	5 000	7	1.40 ± 0.28	1 000	1 023	0.98 ± 0.062
	环磷酰胺	0.040	5 000	154	30.80 ± 1.27 <sup>1)</sup>	1 000	1 025	0.98 ± 0.049
	尿囊素提取物	0.275	5 000	3	0.60 ± 0.42	1 000	964	1.04 ± 0.036
		0.550	5 000	5	1.00 ± 0.55	1 000	865	1.16 ± 0.055
		1.100	5 000	5	1.00 ± 0.21	1 000	943	1.06 ± 0.068

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.01(表 3 同);<sup>2)</sup>每只小鼠计数 1 000 个嗜多染红细胞,5 只/组,共 5 000 个 PCE,微核率 = 微核数/5 000 个 PCE;  
<sup>3)</sup>每只小鼠计数 200 个嗜多染红细胞,5 只/组,共 1 000 个 PCE,PCE/NCE = 此处的 PCE 数除以 NCE 数。

**3.3 对小鼠精子畸形发生率的影响** 与正常组小鼠的精子畸形率相比,环磷酰胺组的精子畸形率显著升高(P < 0.01);而肉苁蓉尿囊素提取物高、中、低剂量组精子畸形率分别为 1.41%, 1.15%, 1.20%,与正常组比较无统计学差异。提示尿囊素提取物对小鼠精子不产生畸变作用。见表 3。

**3.4 对大鼠 30 d 喂养的影响** 30 d 喂养期间各尿囊素提取物动物生长发育良好,行为正常。对 80 只大鼠解剖观察发现,各器官均未见异常。对高剂量组大鼠做镜检发现,肝脏、肾脏、胃肠、脾脏及睾丸

表 3 尿囊素提取物对小鼠精子畸形发生率的影响

Table 3 Effect of allantoin extract on sperm deformity rate in mice

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	畸形精子数/个	精子畸形率 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )/%
正常	-	79	1.32 ± 0.85
环磷酰胺	0.060	401	6.68 ± 0.61 <sup>1)</sup>
尿囊素提取物	1.100	85	1.41 ± 0.13
	0.550	69	1.15 ± 0.32
	0.275	72	1.20 ± 0.15

注:受检精子数 6 000 个。

(卵巢)未见明显的组织病理学变化(图 1)。结果表明,各剂量组大鼠的进食量、体质量、周食物利用率、总食物利用率与正常组比较无统计学差异(表 4,5);各剂量组雌雄大鼠的血常规指标和生化指标与正常组比较无统计学差异(表 6,7)。各剂量组大鼠体质量、肝、肾、脾、睾丸质量及其脏体比与正常组比较无统计学差异(表 8)。

#### 4 讨论

肉苁蓉是名贵药材,属国家二级保护植物,化学成分多样,药用价值极高。现代药理学研究表明,肉苁蓉具有提高性功能,调节神经内分泌,提高机体免疫功能,抗氧化,促进物质代谢,抗阿尔茨海默症,抗帕金森病、抗高原肺水肿和脑水肿、补肾壮阳、保肝护肝、润肠通便等多种功效<sup>[27-31]</sup>。随着我国人口老龄化和人们对健康需求的增加,肉苁蓉作为名贵的补益类中药材具有较高的药用价值,无论在药品还是保健食品的开发利用方面都有广阔的前景和意义。近年来,随着对肉苁蓉应用的不断扩展,较大量摄入肉苁蓉提取物的安全性也受到了研究者的关注。

本实验结合前期的急性毒性研究,对肉苁蓉尿囊素提取物进行了系统性毒性研究。第一阶段的急性毒性实验无法测出尿囊素提取物的 LD<sub>50</sub>,采用最大给药量实验对其进行急性毒性研究,结果得出

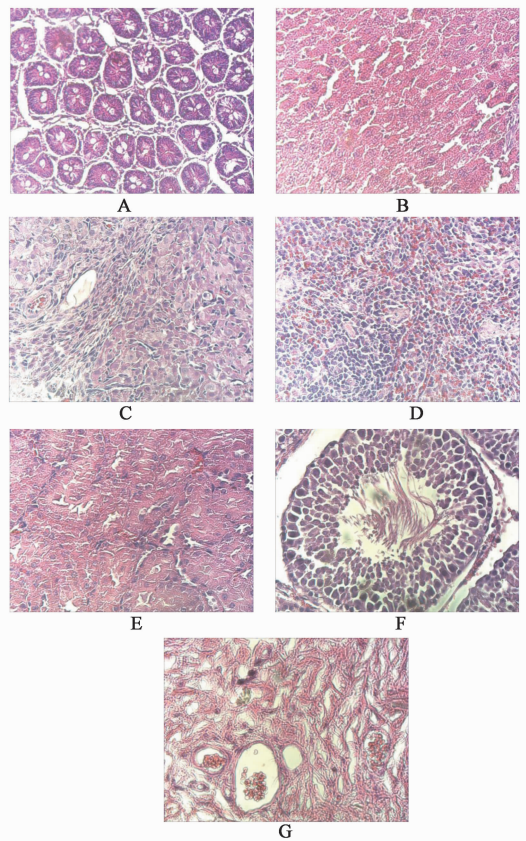
表 4 尿囊素提取物对大鼠体质量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of allantoin extract on weight of rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

性别	组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	始重	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
雄	正常	-	102.9 ± 9.2	149.6 ± 10.8	237.9 ± 11.6	299.8 ± 8.1	364.7 ± 6.1
	尿囊素提取物	0.275	102.2 ± 7.1	146.1 ± 10.4	238.3 ± 9.9	301.7 ± 8.3	364.3 ± 5.7
		0.550	104.3 ± 9.4	148.6 ± 9.8	238.7 ± 10.0	298.6 ± 10.7	365.3 ± 8.9
		1.100	101.3 ± 8.5	150.4 ± 9.1	240.1 ± 7.7	302.3 ± 8.7	367.8 ± 6.6
雌	正常	-	99.6 ± 5.9	134.5 ± 5.3	196.9 ± 4.4	217.2 ± 5.8	242.8 ± 4.8
	尿囊素提取物	0.275	101.1 ± 8.1	136.5 ± 6.1	193.2 ± 3.7	218.8 ± 6.8	243.4 ± 7.1
		0.550	100.1 ± 5.7	136.8 ± 5.8	193.7 ± 5.8	217.5 ± 3.8	242.7 ± 5.7
		1.100	101.7 ± 6.9	137.9 ± 6.9	195.4 ± 6.2	219.4 ± 7.2	241.7 ± 5.8

尿囊素提取物最大给药量为生药 290.88 g·kg<sup>-1</sup>,相当于人临床尿囊素日用量 0.495 g·(60 kg)<sup>-1</sup>的 580 倍,尿囊素临床日用量为,且对小鼠心、肝、脾、肺、肾等重要脏器的生长和体质量量增加无影响,说明肉苁蓉尿囊素提取物较为安全<sup>[32]</sup>。

第二阶段毒性实验中参考前期急性毒性实验结果,进行肉苁蓉尿囊素提取物的遗传毒性实验和



A. 十二指肠;B. 肝脏;C. 卵巢;D. 脾;E. 肾;F. 睾丸;G. 胃

图 1 尿囊素提取物高剂量组对大鼠组织结构的影响(HE, ×400)  
Fig. 1 Effect of allantoin extract on tissue of rats of allantoin extract (HE, ×400)

30 d 喂养实验,遗传毒性实验兼顾原核细胞和真核细胞、生殖细胞和体细胞,体内、体外实验相结合的原则,选用 Ames 实验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验 3 项实验,实验结果均为阴性,表明肉苁蓉尿囊素提取物无致突变作用。通过给大鼠连续 30 d 灌胃不同剂量的肉苁蓉尿囊素提取物,实验期间各剂量组及空白组大鼠的生长发育

表 5 尿囊素提取物对大鼠食物利用率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of allantoin extract on food utilization rate of rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

性别	组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	体质量总增重 /g	总进食量 /g	总食物利用率 /%	周食物利用率/%			
						第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
雄	正常	-	254.7 ± 6.4	525.4 ± 5.6	24.5 ± 3.5	20.1 ± 4.7	33.6 ± 3.6	21.0 ± 4.7	23.4 ± 6.7
	尿囊素提取物	0.275	252.1 ± 7.1	530.5 ± 7.7	25.2 ± 2.9	19.5 ± 4.5	35.1 ± 2.1	22.6 ± 2.7	26.6 ± 4.3
		0.550	250.9 ± 8.9	540.5 ± 6.7	24.6 ± 3.3	20.1 ± 5.1	33.6 ± 3.9	20.6 ± 7.9	24.4 ± 4.9
		1.100	255.4 ± 7.3	532.3 ± 9.3	24.8 ± 4.9	20.5 ± 3.6	34.8 ± 4.6	20.0 ± 4.7	24.0 ± 7.1
雌	正常	-	143.2 ± 9.2	522.3 ± 3.9	15.7 ± 3.6	19.5 ± 4.8	25.2 ± 4.8	9.9 ± 7.8	8.4 ± 5.8
	尿囊素提取物	0.275	142.3 ± 10.6	498.7 ± 6.7	16.1 ± 4.8	20.2 ± 1.1	26.5 ± 1.5	9.1 ± 1.9	8.6 ± 4.9
		0.550	142.6 ± 9.4	516.4 ± 4.5	15.9 ± 4.1	19.7 ± 6.4	23.6 ± 5.4	8.9 ± 2.3	8.7 ± 4.6
		1.100	139.9 ± 9.3	527.9 ± 7.8	15.4 ± 4.3	19.6 ± 5.7	23.6 ± 6.6	9.1 ± 1.3	8.9 ± 5.5

表 6 尿囊素提取物对大鼠血常规指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 6 Effect of allantoin extract on blood routine index of rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

性别	组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	HGB	RBC	HCT	PLT	WBC	LYM	NEUT	MO	EO
			/g·L <sup>-1</sup>	/10 <sup>12</sup> 个/L	/%	/10 <sup>9</sup> 个/L	/10 <sup>9</sup> 个/L	/%	/%	/%	/%
雄	正常	-	147.20 ± 5.73	7.87 ± 0.54	39.74 ± 7.19	949.50 ± 34.21	8.40 ± 2.35	78.92 ± 3.28	11.11 ± 3.06	5.17 ± 3.22	2.23 ± 0.42
	尿囊素提取物	0.275	146.30 ± 3.16	7.86 ± 0.53	39.54 ± 7.01	914.22 ± 33.96	9.03 ± 3.53	76.59 ± 6.39	11.29 ± 3.25	4.53 ± 2.35	1.95 ± 0.31
		0.550	146.80 ± 4.73	7.92 ± 0.60	39.80 ± 7.43	895.68 ± 33.59	9.21 ± 2.39	73.63 ± 7.41	10.95 ± 3.42	5.01 ± 2.06	2.25 ± 0.28
		1.100	146.80 ± 4.74	8.09 ± 0.66	40.87 ± 7.64	899.68 ± 34.17	9.08 ± 2.06	73.82 ± 8.40	11.23 ± 2.45	4.73 ± 2.66	2.14 ± 0.50
雌	正常	-	142.20 ± 4.69	7.68 ± 0.34	38.43 ± 7.16	917.68 ± 33.31	9.82 ± 1.57	74.32 ± 8.32	11.10 ± 2.61	4.93 ± 2.69	2.04 ± 0.41
	尿囊素提取物	0.275	146.20 ± 5.19	7.79 ± 0.54	39.31 ± 7.22	957.50 ± 33.87	8.96 ± 2.49	78.88 ± 5.06	10.80 ± 2.58	4.83 ± 2.41	1.91 ± 0.32
		0.550	147.05 ± 3.11	7.85 ± 0.45	38.27 ± 6.76	895.50 ± 33.14	9.39 ± 1.69	76.17 ± 7.92	11.09 ± 2.28	4.25 ± 2.57	2.07 ± 0.17
		1.100	147.30 ± 6.61	7.75 ± 0.42	39.80 ± 6.01	908.41 ± 33.72	9.50 ± 1.54	77.35 ± 7.61	11.36 ± 2.35	4.34 ± 2.06	1.99 ± 0.41

表 7 尿囊素提取物对大鼠血清生化指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 7 Effect of allantoin extract on serum biochemical indicators of rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

性别	组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ALT	AST	TP	ALB	TC	TG	Urea	Cr	Glu
			/U·L <sup>-1</sup>	/U·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/mmol·L <sup>-1</sup>	/mmol·L <sup>-1</sup>	/mmol·L <sup>-1</sup>	/mmol·L <sup>-1</sup>	/mmol·L <sup>-1</sup>
雄	正常	-	47.79 ± 17.21	105.95 ± 27.84	61.35 ± 13.38	36.58 ± 6.70	1.82 ± 0.51	0.66 ± 0.13	7.96 ± 2.10	100.09 ± 10.29	9.85 ± 2.10
	尿囊素提取物	0.275	45.26 ± 12.86	107.52 ± 24.92	60.79 ± 16.56	33.35 ± 6.64	1.80 ± 0.45	0.61 ± 0.36	7.98 ± 2.57	102.37 ± 9.95	9.72 ± 2.34
		0.550	41.79 ± 14.88	108.25 ± 29.13	61.36 ± 17.58	35.20 ± 6.18	1.84 ± 0.59	0.65 ± 0.26	7.53 ± 2.46	106.38 ± 14.56	9.92 ± 2.26
		1.100	40.58 ± 12.47	104.92 ± 23.49	61.36 ± 17.85	34.38 ± 6.09	1.98 ± 0.40	0.63 ± 0.21	7.97 ± 2.31	101.27 ± 12.91	10.00 ± 2.51
雌	正常	-	44.68 ± 18.65	104.08 ± 22.50	60.92 ± 18.76	35.01 ± 9.04	2.07 ± 0.27	0.64 ± 0.27	7.87 ± 1.34	101.11 ± 10.61	9.79 ± 2.20
	尿囊素提取物	0.275	40.00 ± 15.48	101.41 ± 24.41	58.79 ± 13.91	35.02 ± 6.51	2.02 ± 0.51	0.65 ± 0.37	7.58 ± 2.04	106.20 ± 10.59	10.23 ± 2.45
		0.550	45.05 ± 15.96	100.77 ± 26.07	62.62 ± 18.73	35.04 ± 8.12	1.90 ± 0.55	0.67 ± 0.34	7.59 ± 2.27	102.06 ± 8.57	10.14 ± 1.17
		1.100	43.81 ± 16.95	106.93 ± 27.51	61.77 ± 17.82	33.78 ± 5.11	1.95 ± 0.49	0.63 ± 0.29	7.81 ± 2.26	105.82 ± 11.71	10.26 ± 1.38

状况良好,无死亡现象。结果显示尿囊素提取物对大鼠的平均进食量、大鼠体质量、周食物利用率、总食物利用率等无不良影响,表明尿囊素提取物对

大鼠的正常生长发育和食物的吸收代谢等无影响。尿囊素提取物各剂量组的生化指标、血常规指标与正常组相比均无统计学差异。尿囊素提取物各剂量组

表 8 尿囊素提取物对大鼠各脏器质量与脏器比的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 8 Effect of allantoin extract on weight of organs and index of rat organs( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

性别	组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	肝重 /g	肾重 /g	脾重 /g	睾丸重 /g	肝 /体系数 /%	肾 /体系数 /%	脾 /体系数 /%	睾丸 /体系数 /%
雄	正常	-	10.70 ± 0.31	3.53 ± 0.15	0.70 ± 0.10	3.64 ± 0.23	2.93 ± 0.22	0.97 ± 0.07	0.20 ± 0.02	1.00 ± 0.08
	尿囊素提取物	0.275	10.43 ± 0.80	3.30 ± 0.22	0.69 ± 0.09	3.64 ± 0.24	2.86 ± 0.22	0.91 ± 0.05	0.19 ± 0.04	1.00 ± 0.03
		0.550	10.61 ± 0.71	3.64 ± 0.32	0.71 ± 0.02	3.65 ± 0.20	2.90 ± 0.18	0.95 ± 0.04	0.19 ± 0.02	1.00 ± 0.06
		1.100	10.77 ± 0.85	3.57 ± 0.34	0.68 ± 0.03	3.64 ± 0.19	2.93 ± 0.23	0.97 ± 0.02	0.18 ± 0.05	0.99 ± 0.07
雌	正常	-	7.24 ± 0.56	2.73 ± 0.38	0.52 ± 0.05	-	2.98 ± 0.15	1.10 ± 0.03	0.21 ± 0.01	-
	尿囊素提取物	0.275	7.39 ± 0.42	2.68 ± 0.39	0.49 ± 0.02	-	3.03 ± 0.24	1.10 ± 0.02	0.20 ± 0.03	-
		0.550	7.36 ± 0.34	2.72 ± 0.33	0.49 ± 0.04	-	3.03 ± 0.23	1.10 ± 0.03	0.20 ± 0.03	-
		1.100	7.27 ± 0.33	2.62 ± 0.40	0.51 ± 0.06	-	3.00 ± 0.11	1.08 ± 0.04	0.21 ± 0.01	-

大鼠各脏器质量与脏器比均在正常值范围之内,且与正常组相比均无统计学差异,对脏器病理组织学检查也未发现病理改变。因此,本实验结果表明肉苁蓉尿囊素提取物在实验剂量范围内无急性毒性,无遗传毒性,具有较高的食用安全性,为其后续开发利用提供科学依据。

[参考文献]

[1] YANG J H, HU J P. Studies on chemical constituents of cultivated *Cistanche salva* [J]. J Chin Med Mater, 2008, 31(11):1663-1665.

[2] 罗德梅, 龙梅, 杜文静, 等. 新疆肉苁蓉提取液对 M-KOOPG 小鼠抗骨质疏松的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10):138-142.

[3] 尹刚, 龚道恺, 刘帮会, 等. 肉苁蓉多糖对阿尔茨海默病大鼠学习记忆及脑组织胆碱能系统的影响 [J]. 神经损伤与功能重建, 2014, 9(5):426-427, 446.

[4] Hiromi K, Toshio M. Studies on the constituents *Cistanche Herba* [J]. Chem Pharm Bull, 2014, 21(10):3009-3014.

[5] 陶义存, 李建英, 许永华, 等. 肉苁蓉苯乙醇苷对大鼠高原肺水肿的防治作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15):134-138.

[6] LI L, YONG J, PENG T, et al. New glycosides from *Cistanche salsa* [J]. Helv Chim Acta, 2015, 90(1):79-85.

[7] 胡琼, 由淑萍, 刘涛, 等. 肉苁蓉苯乙醇总苷抗肝癌作用的实验研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(3):194-199.

[8] 赵东海, 张磊, 张艳, 等. 肉苁蓉苯乙醇苷对环磷酰胺致小鼠生精障碍的治疗作用及其机制 [J]. 吉林大学学报:医学版, 2014, 40(3):612-615.

[9] 马慧, 尹若熙, 郭敏, 等. 肉苁蓉多糖对 D-半乳糖致衰老模型小鼠 CREB 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20):137-141.

[10] Jeon H J, An J. Anti-proliferation effects of *Cistanche salsa* on the progression of benign prostatic hyperplasia [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(1):104-111.

[11] 陈延纯. 肉苁蓉药理作用的研究新进展 [J]. 医药探究, 2018, 2(14):78-79.

[12] HU G S, HU Y J. Effects of 2-aminoindan-2-phosphonic acid treatment oil the accumulation of salidroside and four phenylethanoid glycosides in suspension cell culture of *Cistanche deserticola* [J]. Plant Cell Rep, 2016, 30(4):665-674.

[13] 朱群英, 张亚锋, 苏超男, 等. HILIC-HPLC 双波长法测定山药中尿囊素和腺苷的含量 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33(3):334-336.

[14] 杨陆艳, 张亚杰, 阮杰, 等. 肉苁蓉颗粒剂对帕金森病大鼠模型黑质纹状体多巴胺能神经元的保护作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12):2927-2931.

[15] 范亚楠, 黄玉秋, 贾天柱, 等. 肉苁蓉炮制前后对便秘大鼠的通便作用 [J]. 中成药, 2016, 38(12):2684-2687.

[16] 李楠, 白宏英, 姜季宇, 等. 肉苁蓉制剂对阿尔茨海默病患者的脑保护作用 [J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(20):115-116.

[17] CHENG X Y, GUO B. Study advances of *Herba Cistanche* [J]. Nat Prod Res Dev, 2016, 17(2):235-241.

[18] 由淑萍, 赵军, 马龙, 等. 肉苁蓉乙醇提取物抗大鼠免疫性肝纤维化的作用及其机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(5):504-510.

[19] 孟胜喜, 霍清萍. 肉苁蓉有效成分对神经系统作用

- 研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(10):123-126.
- [20] 杨建华, 胡君萍, 热娜·卡斯木, 等. 基于酵母双杂交技术筛选肉苁蓉降血脂活性成分[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3):252-255.
- [21] 杨建华, 胡君萍, 热娜·卡斯木, 等. HPLC 测定肉苁蓉中的尿囊素[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(2):175-176.
- [22] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范实施手册[M]. 北京:卫生部卫生法制与监督司, 2003:223-224.
- [23] 堵年生, 杨建华, 热娜·卡斯木. 从肉苁蓉中制备尿囊素和尿囊素提取物以及它们的应用[P], 专利号:ZL2005100725492.
- [24] 国家质量监督检验检疫总局. GB 15193.4-2003 食品安全性毒理学评价程序和方法:伤寒沙门氏菌哺乳动物微粒体酶试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003:35-43.
- [25] 国家质量监督检验检疫总局. GB 15193.5-2003 食品安全性毒理学评价程序和方法:骨髓细胞微核试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003:47-48.
- [26] 国家质量监督检验检疫总局. GB 15193.7-2003 食品安全性毒理学评价程序和方法:小鼠精子畸形试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003:57-58.
- [27] 靳春丽, 毛新民, 李琳琳, 等. 肉苁蓉苯乙醇苷对高原肺动脉高压大鼠肺血流动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12):197-200.
- [28] 周海涛, 曹建民, 林强. 肉苁蓉对大鼠力竭游泳能力和心肌线粒体抗氧化能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):229-233.
- [29] 薛海燕, 焦婵媛, 姚军. 肉苁蓉总苷药理作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(4):486-488.
- [30] 王丽超, 刘丹, 姜勇, 等. 基于分子亲和和色谱技术的肉苁蓉低分子糖巨噬细胞激活作用靶点群鉴定与机制分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19):3666-3671.
- [31] 王启新, 陈则华, 罗晓捷, 等. 肉苁蓉不同提取部位改善肾阳虚大鼠性功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22):95-101.
- [32] 谯明, 杨建华, 朱毅, 等. 肉苁蓉尿囊素提取物的急性毒性研究[J]. 中医药导报, 2016, 22(16):47-49.

[责任编辑 张丰丰]