

网络出版时间:2018-01-26 10:32

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.05.018

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180126.0953.036.html>

绞股蓝籽油食品安全毒理学评价及 抗衰老研究

杜楠^{1,2}, 王璐³, 白鸽³, 张明星^{1,2}, 肖娅萍^{1,2},
张坤³, 王攀³, 王筱冰³, 刘全宏^{1,3}

(1 药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西 西安 710062;

2 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062;

3 陕西师范大学 生命科学院, 陕西 西安 710062)

【摘要】【目的】对绞股蓝籽油(GPSO)进行毒理学分析与评价,为绞股蓝籽油的生物学功能研究及其新资源的开发提供科学依据。【方法】通过小鼠急性经口毒性试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验和小鼠精子畸形试验,对 GPSO 进行食品安全毒理学评估。在小鼠急性经口毒性试验中,于小鼠禁食 16 h 后,各试验组分别经口一次性灌胃 0, 4, 6, 10.0 及 21.5 g/kg GPSO,连续观察 14 d,记录小鼠的饮食、运动、排泄、中毒表现及死亡情况;在小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验中,试验组小鼠以 2.5, 5.0, 10.0 g/kg 的剂量分别灌胃 GPSO,空白对照组以环磷酰胺为阳性药物腹腔注射给药,每天 1 次,持续 5 d,处死后取骨髓制作骨髓细胞涂片,镜下观察并计算微核率;在小鼠精子畸形试验中,以性成熟雄性小鼠为试验动物,其中试验组小鼠以 2.5, 5.0, 10.0 g/kg 的剂量分别灌胃 GPSO,空白对照组以环磷酰胺为阳性药物腹腔注射给药,每天 1 次,持续 5 d,在最后 1 次灌胃 7, 14, 21, 28 和 35 d 后分别处死小鼠,取附睾制作精子涂片,镜检并计算精子畸形率。通过注射 D-半乳糖建立衰老模型,同时以绞股蓝籽油作为抗衰老试验药物,按 2.0, 3.0, 4.0 mL/kg 的剂量进行灌胃给药,60 d 后检测小鼠体质量、各脏器指数及血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)浓度,以及小鼠肝脏、脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量,并观察小鼠肝脏组织的病理变化。【结果】绞股蓝籽油对雌雄小鼠急性经口半数致死剂量 LD₅₀ 值大于 10.0 g/kg,依据急性毒性剂量分级标准属于实际无毒物质;小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验表明,绞股蓝籽油 3 个剂量组中雌雄小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率为 2.0‰~3.8‰,与空白对照组相比无显著差异($P>0.05$),证明绞股蓝籽油不会对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核数造成显著影响;小鼠精子畸形试验表明,绞股蓝籽油低、中、高剂量组与空白对照组之间无显著差异($P>0.05$),表明绞股蓝籽油对小鼠精子无致畸变作用。抗衰老试验表明,与空白对照组相比,衰老模型组小鼠 TC、TG、LDL 浓度均显著升高($P<0.05$),HDL 浓度显著降低($P<0.05$),肝、脑组织中 SOD 活性和 T-AOC 能力降低($P<0.05$),MDA 含量升高($P<0.05$),证实衰老小鼠建模成功;绞股蓝籽油低、中、高剂量组均可缓解因注射 D-半乳糖导致的小鼠饮食量下降、皮毛光泽度变差、行动缓慢、体质量增加缓慢甚至下降等症状;与衰老模型组相比,绞股蓝籽油可以显著降低小鼠血清中的 TC、TG、LDL 浓度($P<0.05$),显著提高血清中的 HDL 浓度($P<0.05$);小鼠肝、脑组织生化指标测定发现,与衰老模型组相比,GPSO 中、低剂量组能极显著增强 SOD 活性($P<0.05$),显著或极显著降低 MDA 含量($P<0.05$),极显著提高 T-AOC 能力($P<0.05$),表明绞股蓝籽油可能通过增强机体的总抗氧化能力从而有效清除多余的自由基,降低机体细胞损伤程度,间接保护正常细胞,从而起到抗衰老作用。【结论】初步判定绞股蓝籽油无明显毒副作用,且有一定的抗衰老活性。

【关键词】 绞股蓝籽油;食品安全性评价;毒理学分析;抗衰老作用;D-半乳糖

【中图分类号】 TS225.1⁺9;TS201.6

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)05-0131-10

【收稿日期】 2017-03-17

【基金项目】 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI06B05)

【作者简介】 杜楠(1995—),女,陕西富平人,在读硕士,主要从事植物抗癌活性成分研究。E-mail:dunan4321@163.com

【通信作者】 刘全宏(1957—),男,陕西白水人,教授,博士,博士生导师,主要从事植物抗癌活性成分研究。

E-mail:lshaof@snnu.edu.cn

Food safety toxicology evaluation and anti-aging analysis of *Gynostemma pentaphyllum* seed oil

DU Nan^{1,2}, WANG Lu³, BAI Ge³, ZHANG Mingxing^{1,2}, XIAO Yaping^{1,2},
ZHANG Kun³, WANG Pan³, WANG Xiaobing³, LIU Quanhong^{1,3}

(1 Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an, Shaanxi 710062, China; 2 National Engineering Laboratory for Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, Xi'an, Shaanxi 710062, China; 3 College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract:【Objective】 This study evaluated the toxicology of *Gynostemma pentaphyllum* seeds oil (GPSO) to provide basis for studying biological function of GPSO and developing new resources. 【Method】 Mice acute oral toxicity test, mouse bone marrow polychromatic erythrocyte micronucleus test, and mouse sperm deformation test were conducted to evaluate the food safety toxicology. For mice acute oral toxicity test, after fasting for 16 h, each group of mice was orally administered with 0, 4.6, 10.0 and 21.5 g/kg of GPSO. Then the mice were continuously observed for 14 d, and the diet, exercise, excretion, poisoning performance and death were recorded. For mouse bone marrow polychromatic erythrocyte micronucleus test, the mice in experimental groups were treated with 2.5, 5.0 and 10.0 g/kg of GPSO while the blank control group was injected intraperitoneally with cyclophosphamide as a positive drug once a day for 5 days. Bone marrow cells were sacrificed, the incidence of micronuclei was observed and calculated under microscope. For mouse sperm deformation test, male mice were selected and treated with 2.5, 5.0 and 10.0 g/kg of GPSO while the blank control group was injected intraperitoneally with cyclophosphamide as a positive drug once per day for 5 days. Mice were sacrificed at the last time after 7, 14, 21, 28 and 35 days, epididymis were taken to produce sperm smears for microscopy observation and calculating sperm deformity rate. The food safety toxicological evaluation of GPSO was carried out by above three tests. D-galactose was injected to establish an aging model while the GPSO was administered as an anti-aging test drug at doses of 2.0, 3.0, and 4.0 mL/kg. After 60 days, mice organ index and levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) in serum were determined. The activities superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), catalase (CAT) activity and malondialdehyde (MDA) in liver and brain tissues of mice were observed and the pathological changes of liver tissues were observed. 【Result】 The acute oral lethal dose LD₅₀ value of GPSO on male and female mice was greater than 10.0 g/kg, and GPSO was actual non-toxic substance according to the acute toxicity dose classification standard. The micronucleus test of mouse bone marrow polychromatic erythrocytes showed that the micronucleus rate of bone marrow polychromatic erythrocytes in male and female mice was between 2.0‰—3.8‰, without significant difference compared with control group ($P>0.05$). It was proved that GPSO did not significantly affect the micronuclei of bone marrow polychromatic erythrocytes in mice. Mice sperm abnormalities test showed that GPSO-L, M, and H dose groups had no significant difference compared with blank control group. Anti-aging study showed that the contents of TC, TG and LDL in aging group were significantly higher ($P<0.05$) and HDL was significantly lower ($P<0.05$) compared with the control. Liver and brain biochemical markers were detected in mice, GPSO could significantly enhance SOD activity ($P<0.05$), reduce MDA content ($P<0.05$), and improve T-AOC capacity ($P<0.05$). It was indicated that GPSO may effectively enhance the total antioxidant capacity to effectively remove excess free radicals, reduce the degree of cell damage, indirectly protect normal cells, and play a role in anti-aging. 【Conclusion】 It is preliminarily confirmed that GPSO showed no significant toxic effect while had certain anti-aging activity.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* seed oil; food safety evaluation; toxic analysis; anti-aging effect; D-galactose

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)为葫芦科(Cucurbitaceae)绞股蓝属多年生草质藤本植物,又名五叶参、七叶参等。绞股蓝是除五加科人参属植物以外唯一含有人参皂苷的植物,且较人参更易栽培,优良品种中人参皂苷的含量甚至高于人参,因此获得了“南方人参”的美誉^[1]。绞股蓝属于雌雄异株,自然条件下结种量较小,在农业生产中,绞股蓝主要依靠根状茎来繁殖。而对于绞股蓝种子,一方面尚未引起人们的充分重视而研究甚少;另一方面其通常只用于有性繁殖,或废弃而未得到充分利用。绞股蓝籽油是从药用植物绞股蓝种子中提取获得的天然植物油脂,其中含有超过 80% 的多不饱和脂肪酸及多种植物甾醇,具有作为食品添加剂、保健食品及药品原料的开发潜力^[2]。Wang 等^[2-3]通过超临界 CO₂ 法萃取绞股蓝籽油,并对绞股蓝籽油的油脂成分进行了分析和抗氧化研究,但绞股蓝籽油要开发为一种新的食品资源,尚必须进行食品安全毒理学评价,而相关研究尚未见报道。

衰老又称老化,是机体退化时期生理紊乱及功能下降的一个不可逆的过程,也是一种自然而复杂的生物学过程。进入 21 世纪后,全球开始跨入一个人口老龄化社会。随着 2025 年人口老龄化高峰期的到来,研究衰老及抗衰老已刻不容缓。D-半乳糖致小鼠衰老模型,主要原理是通过在一定时间内连续注射 D-半乳糖,增高机体细胞的半乳糖浓度,并在醛糖还原酶催化作用下将 D-半乳糖还原成半乳糖醇,由于机体不能正常代谢该物质,于是这一物质便堆积在细胞中使细胞的正常渗透压受到影响,导致细胞肿胀、代谢紊乱和功能障碍,最终导致机体衰老^[4-10]。

本研究以急性经口毒性试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验来评价绞股蓝籽油的安全性,并通过颈背部皮下注射 D-半乳糖建立小鼠衰老模型,检测血清和组织中的生理生化指标,观察小鼠肝组织切片,研究绞股蓝籽油的抗衰老作用,以期对绞股蓝籽油的生物学功能研究及其新资源的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绞股蓝籽油经超临界 CO₂ 萃取制备。试验动

物为健康昆明种小鼠,购买于安徽医科大学动物实验中心。

1.2 试剂与仪器

主要试剂有:注射用环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司;Giemsa 染色液,北京雷根生物技术有限公司;D-半乳糖,美国 Sigma 公司;无水乙醇、石蜡、二甲苯、氯化钠、盐酸、苏木精、伊红、多聚甲醛、中性树胶、抗坏血酸(VC),均购自天津市天力化学试剂有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;总胆固醇(TC)试剂盒、甘油三酯(TG)试剂盒、低密度脂蛋白(LDL)试剂盒、高密度脂蛋白(HDL)试剂盒,均购自吉林长春汇力生物技术有限公司。

主要仪器设备有:可拍照光学显微镜(P95-C MOTIC2506),德国 Zeiss 公司;HH-6B 型数显恒温水浴锅,江苏常州国华电器有限公司;SL202 型药物电子天平,上海明桥精密科学仪器有限公司;H-1 型漩涡混匀器,上海康禾光电仪器有限公司;JB-3 型磁力搅拌器,杭州仪表机电有限公司;TGL-20bR 型高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;KD-1508A 型轮转式切片机,浙江金华仪器有限公司;Nikon E2000 型光学显微镜,Nikon 公司;Epoch 超微量微孔板分光光度计,美国 BioTek 公司;动物手术器械,广东医疗器械厂。

1.3 试验方法

1.3.1 小鼠急性经口毒性试验 选用健康昆明种小鼠 40 只,体质量 18~22 g,适应性喂养 2~3 d 后随机分为空白对照组和高、中、低剂量组,每组 10 只,雌雄各半,在相同条件下分笼饲养。灌胃绞股蓝籽油前禁食 16 h 左右,空白对照组灌胃生理盐水,剂量为 10.0 g/kg;绞股蓝籽油高(GPSO-H)、中(GPSO-M)、低(GPSO-L)剂量组灌胃剂量分别设置为 4.6、10.0 及 21.5 g/kg,经口进行一次性灌胃后,连续观察 14 d,记录小鼠的饮食、运动、排泄、中毒表现及死亡情况。测定经口半数致死剂量(LD₅₀),若剂量超过 10.0 g/kg 仍不能引起动物死亡,初步认定受试样品无毒或低毒。

1.3.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 选用健康昆明种小鼠 50 只,体质量 18~22 g,随机分为空

白对照组、阳性对照组和高、中、低剂量组,每组 10 只,雌雄各半。空白对照组灌胃生理盐水,剂量为 10.0 g/kg;阳性对照组用环磷酰胺(CTX, 40 mg/kg)进行腹腔注射,每天 1 次,连续 5 d;绞股蓝籽油高(GPSO-H)、中(GPSO-M)、低(GPSO-L)剂量组以 2.5、5.0 及 10.0 g/kg 的灌胃剂量连续灌胃绞股蓝籽油 5 d,每天 1 次,最后 1 次灌胃后 24 h 处死小鼠,取股骨骨髓,制作骨髓细胞涂片,甲醇固定 15 min, Giemsa 染色 10~15 min, 双盲法镜检,每只小鼠计数 1 000 个嗜多染红细胞(Polychromatic erythrocyte, PCE)中含微核的 PCE 数,并计数 200 个细胞中 PCE 与正染红细胞(Normochromatic erythrocyte, NCE)的比值,微核发生率以千分率(‰)表示^[11-12]。

1.3.3 小鼠精子畸形试验 选用体质量 30~35 g 的性成熟昆明种雄性小鼠 25 只,随机分为空白对照组、阳性对照组和绞股蓝籽油高、中、低剂量组,每组 5 只,以腹腔注射 40 mg/kg 的环磷酰胺为阳性对照,每天 1 次,连续 5 d,绞股蓝籽油低、中、高组以 2.5、5.0 及 10.0 g/kg 的灌胃剂量连续灌胃绞股蓝籽油 5 d,最后 1 次灌胃 7、14、21、28、35 d 后分别处死小鼠,取两侧附睾剪碎,制备精子涂片,甲醇固定,质量分数 1%伊红染色 10 min,油镜下观察,每只小鼠计数 1000 个结构完整的精子细胞,依据精子畸变分型,统计每 1 000 个结构完整的精子细胞中畸变精子的数量,计算精子畸形率,以千分率(‰)表示^[13]。

1.3.4 抗衰老研究 将雌性昆明小鼠饲养在通风良好、湿度和温度均适宜的环境中,自由摄食和饮水,期间观察小鼠状态,适应性饲养 2~3 d 后进行后续试验。将每只小鼠适应性饲养后称质量,随机分成 6 组,即空白对照组、衰老模型组、阳性对照组和绞股蓝籽油低(GPSO-L)、中(GPSO-M)、(GPSO-H)剂量组,每组 10 只。其中空白对照组每天颈背部皮下注射 400 mg/kg 生理盐水,其余各组每天颈背部皮下注射 D-半乳糖 400 mg/kg。衰老模型组和空白对照组每天灌胃 4 mL/kg 的生理盐水,阳性对照组每天灌胃 100 mg/kg 的抗坏血酸(V_C),绞股蓝籽油低、中、高剂量组分别按 2.0、3.0 和 4.0 mL/kg 剂量每天灌胃绞股蓝籽油,连续给药 60 d。在试验过程中小鼠正常饲养,每 7 d 称量记录体质量 1 次,并观察小鼠状态。在末次给药后,所有小鼠禁食不禁水 12 h 后颈椎脱臼法处死,试剂盒测定血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)浓度及肝、脑组织超

氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量等各项生理生化指标^[9]。

1.3.5 脏器指数 将所有小鼠称质量后处死,取出胸腺、肝脏、脾脏、肾脏以及脑组织分别称质量,计算各脏器指数。计算公式如下:

脏器指数=脏器质量/体质量。

1.3.6 测试样品的制备 (1)血清。各组小鼠末次给药禁食 12 h 后,眼眶取血,将采集的血液在 3 000 r/min 下低温离心 10 min,取上层血清保存于一 20 °C 冰箱中待测。(2)组织匀浆的制备。取出各组小鼠脑和肝组织后,冰浴生理盐水冲洗干净,滤纸吸干,称取 1.0 g 组织置于研钵中,在低温条件下加入冰浴生理盐水 9 mL 研磨成体积分数 10%的组织匀浆液,在 3 000 r/min 下低温离心 10 min,取上清液保存于一 20 °C 冰箱中待测。

1.3.7 肝脏组织病理学石蜡切片的制作 每组随机取 3 块肝脏,在肝小叶部分剪取 5 mm×5 mm 的方块,用于石蜡切片的制作。制作流程如下:固定(体积分数 10%福尔马林)→脱水(体积分数 50%~100%乙醇梯度脱水)→透明(二甲苯)→包埋(软蜡,硬蜡)→切片→脱蜡(二甲苯)→染色(H&E)→封片(中性树脂)→镜检。

(1)透明。取出在福尔林固定液中固定 24 h 的小鼠肝脏组织块,流水冲洗,用体积分数 50%~100%的乙醇梯度洗脱,逐渐脱去组织中的水分,然后用二甲苯逐步透明。以上每步均进行 30 min。

(2)石蜡包埋。将已透明的肝脏组织块,按组别分别转置于盛有已熬好软蜡的蜡杯中,放入 60 °C 保温箱内,待石蜡完全浸入组织块后,用硬蜡进行包埋。

(3)切片。将包埋好组织的蜡块修好后,用切片机连续切片,其厚度为 6 μm,附于用固定液处理好的载玻片上进行贴片,40 °C 恒温烘干。

(4)H&E 染色。二甲苯脱去切片中的石蜡,体积分数 100%~50%乙醇梯度脱水,蒸馏水水洗,以上每步均进行 5 min。然后苏木精染色 4 min,自来水冲洗至泛蓝色,盐酸酒精分色 2~5 s,体积分数 50%~90%乙醇梯度脱水,伊红染色 4 min,二甲苯透明,中性树脂封片成永久切片。

(5)镜检。在光学显微镜下观察各组小鼠肝脏组织病理学变化,拍摄并保存照片。

1.3.8 血清及脑、肝组织生理生化指标的检测 按照试剂盒使用说明书测定血清总胆固醇(TC)、甘油

三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)浓度及肝、脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量等指标。每个样品均重复 3 次,以降低误差确保试验结果的准确性。

1.4 数据分析

采用 SPAA20.0 分析软件对数据进行 *t* 检验方差分析及多重比较,差异显著性用 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性经口毒性试验

急性经口毒性试验结果表明,在空腹灌胃 4.6,

10.0 和 21.5 g/kg 绞股蓝籽油 4 h 后,各剂量组小鼠均未见明显的中毒症状,常规饲养 14 d 内小鼠生长发育正常,毛色光泽良好,饮食、运动、排泄均未见异常现象,无小鼠死亡。试验期间受试动物均未见明显中毒反应且无动物死亡,表明绞股蓝籽油对雌雄小鼠急性经口 LD₅₀ 值均大于 10.0 g/kg,依据急性毒性剂量分级标准属于实际无毒物质,可进入下一阶段毒理学试验。

2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

空白对照组、阳性对照组及绞股蓝籽油低、中、高剂量组小鼠骨髓嗜多染红细胞的统计结果如表 1 所示。

表 1 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果

Table 1 Effect of GPSO on microkernel rate of polychromatic erythrocytes in mice					
性别 Gender	分组 Group	小鼠只数 Number of mice	细胞计数 Cytometry	微核数 Micronucleus number	微核发生率/% Micronucleus rate
雄鼠 Male mice	空白对照组 Control	5	5 000	11	2.2
	阳性对照组 Positive control	5	5 000	197	39.4 * *
	高剂量组 GPSO-H	5	5 000	19	3.8
	中剂量组 GPSO-M	5	5 000	10	2.0
	低剂量组 GPSO-L	5	5 000	13	2.6
雌鼠 Female mice	空白对照组 Control	5	5 000	14	2.8
	阳性对照组 Positive control	5	5 000	156	31.2 * *
	高剂量组 GPSO-H	5	5 000	11	2.2
	中剂量组 GPSO-M	5	5 000	11	2.2
	低剂量组 GPSO-L	5	5 000	12	2.4

注: * * 表示与空白对照组相比差异极显著($P<0.01$)。表 2 同。
Note: * * means highly significant difference compared with control group($P<0.01$). The same for Table 2.

表 1 结果表明,绞股蓝籽油低、中、高 3 个剂量组雌雄小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生率为 2.0%~3.8%,与空白对照组相比均无显著性差异($P>0.05$),亦无剂量依赖效应;但阳性对照组雌、雄小鼠骨髓嗜多染细胞的微核发生率达到 31.2%和 39.4%,与其他组相比均有极显著差异($P<0.01$)。说明在本试验剂量范围内,绞股蓝籽油不会对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核数造成显著影响,即受试样品的微核试验结果为阴性。

2.3 精子畸形试验

绞股蓝籽油对小鼠精子畸形率的影响如表 2 所示。与骨髓细胞微核试验结果相似,阳性药物处理后,小鼠精子的畸形率为 6.52%,极显著高于空白对照组及其他各剂量组($P<0.01$),而绞股蓝籽油低、中、高剂量组小鼠精子畸形率分别为 2.24%,1.82%和 2.02%,与空白对照组相比无显著差异($P>0.05$),表明绞股蓝籽油对小鼠精子无致畸变作用,试验结果为阴性。

表 2 小鼠精子畸形试验结果

Table 2 Effect of GPSO on sperm abnormality rate in mice				
分组 Group	小鼠只数 Number of mice	受检精子数 Number of sperm	精子畸形数 Number of teratospermia	精子畸形率/% Rate of sperm deformation
空白对照组 Control	5	5 000	89	1.78
阳性对照组 Positive control	5	5 000	326	6.52 * *
高剂量组 GPSO-H	5	5 000	112	2.24
中剂量组 GPSO-M	5	5 000	91	1.82
低剂量组 GPSO-L	5	5 000	101	2.02

2.4 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠体质量的影响

绞股蓝籽油对各试验组小鼠体质量的影响如表 3 所示。由表 3 可知,在试验开始后的 49 d 内,各试验组小鼠体质量总体上呈持续增长趋势,但增长幅

度整体较小。总体上看,衰老模型组小鼠体质量增长最为缓慢,在 42 d 后其体质量一直呈下降趋势,试验结束时该组小鼠体质量最低。在 56 d 时,所有小鼠体质量都有所下降,可能是处死之前断食所致。

表 3 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

Table 3 Effect of GPSO on body weight of aging mice($\bar{x}\pm s,n=10$) g

试验时间/d	空白对照组 Control	衰老模型组 Aging-Model	阳性对照组 Positive	低剂量组 GPSO-L	中剂量组 GPSO-M	高剂量组 GPSO-H
7	26.59±0.96	26.41±0.71	26.86±1.73	26.53±0.63	26.85±0.96	26.37±0.71
14	28.94±2.01	27.91±1.57	28.85±0.98	28.97±0.47 [#]	28.45±0.74	28.49±0.84
21	30.44±1.35	28.83±1.13 ^{**}	29.60±1.56	29.91±1.16 [#]	29.19±1.41 [*]	29.83±0.81 [#]
28	31.14±1.58	30.16±0.71	31.08±2.02	31.11±0.86 [#]	30.80±1.01	30.40±0.52
35	31.16±1.18	30.73±1.85	31.69±1.31 [#]	31.27±1.71	31.02±0.81	31.41±1.01
42	31.66±1.42	30.24±1.65 [*]	31.61±0.64 [#]	31.32±1.18	32.50±0.94 [#]	31.36±0.99
49	32.66±0.99	30.03±1.73 ^{**}	32.05±1.68 [#]	32.28±1.63 ^{##}	33.59±0.66 ^{**#}	32.23±1.29 ^{##}
56	31.36±1.43	28.94±1.34 ^{**}	29.53±0.91 ^{##}	31.11±0.85 ^{##}	30.92±1.10 ^{##}	30.06±1.46

注:与空白组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$);与衰老模型组相比,#表示差异显著($P<0.05$),##表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。

Note: * means significant difference compared with control group ($P<0.05$), ** means highly significant difference compared with control group ($P<0.01$); # means significant difference compared with aging model group ($P<0.05$), ## means highly significant difference compared with aging model group ($P<0.01$). The same below.

与空白对照组相比,衰老模型组小鼠在试验第 42 天时体质量显著降低($P<0.05$),在第 21,49,56 天时体质量极显著降低($P<0.01$)。而绞股蓝籽油低、中、高剂量组中,除绞股蓝籽油中剂量组在 21 和 49 d 表现出显著性差异外,其余各组均无明显差异($P>0.05$)。绞股蓝籽油低、中、高剂量组与衰老模型组相比,除高剂量组在 56 d 时无显著差异外,低、中剂量组在 49,56 d 均表现出极显著差异($P<0.01$),并且绞股蓝籽油低剂量组在 14~28 d 时有显著差异,高剂量组在第 21 天有显著差异。与衰老模型组相比,阳性对照组在第 35 天开始呈现显著性

差异,在最后 1 周时呈现极显著差异。

表 3 结果说明,D-半乳糖对小鼠食欲及吸食能力有一定影响,使其体质量增加缓慢,而绞股蓝籽油低、中、高剂量组缓解了这一症状,即绞股蓝籽油可以改善 D-半乳糖致衰老小鼠食欲及吸食能力的不断下降,具有一定的抗衰老活性。

2.5 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠脏器指数的影响

D-半乳糖致衰老小鼠处死后,其肝脏指数、脾脏指数、胸腺指数、肾脏指数的计算结果见表 4。

表 4 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠脏器指数的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

Table 4 Effect of GPSO on spleen index of aging mice($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别 Group	肝脏指数 Liver index	脾脏指数 Spleen index	胸腺指数 Thymus index	肾脏指数 Kidney index
空白对照组 Control	43.46±0.20	3.63±0.61	3.70±0.11	9.57±0.58
衰老模型组 Model	39.14±0.31 ^{**}	3.19±0.36 [*]	3.19±0.13 [*]	10.40±0.15
阳性对照组 Positive	41.81±0.19 [#]	3.88±0.11 [#]	3.33±0.78	10.19±0.14
低剂量组 GPSO-L	42.27±0.31 [#]	3.48±0.79	3.73±0.80	9.68±0.85
中剂量组 GPSO-M	42.78±0.40 [#]	4.33±0.15 [#]	3.36±0.10 [#]	10.54±0.89
高剂量组 GPSO-H	42.90±0.41 [#]	3.66±0.83	3.70±0.56	10.27±0.15

由表 4 可知,与空白对照组相比,衰老模型组小鼠肝脏指数极显著减低($P<0.01$),脾脏指数和胸腺指数均显著降低($P<0.05$);与衰老模型组相比,阳性对照组小鼠肝脏指数和脾脏指数有显著差异($P<0.05$),绞股蓝籽油低、中、高剂量组小鼠的肝脏指数均有显著差异($P<0.05$),中剂量组脾脏指

数和胸腺指数也有显著差异($P<0.05$)。

脏器指数可反映动物的健康状况。对于脾脏指数而言,绞股蓝籽油低、中、高剂量组小鼠与衰老模型组小鼠相比均呈升高趋势,说明灌胃绞股蓝籽油可使小鼠脾脏趋于正常,增强小鼠免疫功能。对于胸腺指数而言,绞股蓝籽油低、中、高剂量组小鼠与

衰老模型组小鼠相比均呈现升高趋势,说明灌胃不同剂量绞股蓝籽油均能提高小鼠胸腺的生理机能,从而达到增强小鼠免疫功能的目的。对于肾脏指数而言,各组小鼠均无明显差异($P>0.05$),说明阳性对照组和灌胃绞股蓝籽油对小鼠肾脏无明显影响。

表 5 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠血清生化指标的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

Table 5 Effect of GPSO on biochemical indexes in serum of aging mice($\bar{x}\pm s,n=10$)					mmol/mL
组别 Group	TC	TG	LDL	HDL	
空白对照组 Control	3.33±1.22	1.42±0.13	2.13±0.14	1.05±0.41	
衰老模型组 Model	5.19±1.07 [*]	1.84±0.21 [*]	3.33±0.26 [*]	0.71±0.13 [*]	
阳性对照组 Positive	3.06±0.88 ^{##}	1.45±0.21 [#]	2.43±0.41	0.98±0.32 [#]	
低剂量组 GPSO-L	3.22±0.61 ^{##}	1.21±0.22 [#]	2.46±0.23 [#]	0.89±0.12 [#]	
中剂量组 GPSO-M	2.80±0.38 ^{##}	0.92±0.13 ^{##}	2.41±0.17 [#]	0.97±0.32 [#]	
高剂量组 GPSO-H	3.22±0.37 ^{##}	0.98±0.08 [#]	2.53±0.43 [#]	0.88±0.15 [#]	

由表 5 所知,与空白对照组相比,衰老模型组小鼠血清 TC、TG 和 LDL 浓度显著升高,HDL 浓度显著降低($P<0.05$)。与衰老模型组相比,绞股蓝籽油低、中、高剂量组小鼠 TC 浓度极显著降低($P<0.01$),但灌胃绞股蓝籽油各剂量组之间差异不明显;与衰老模型组相比,灌胃绞股蓝籽油中剂量组小鼠的 TG 浓度极显著降低($P<0.01$),低、高剂量组小鼠 TG 浓度也有所降低,且差异达显著水平($P<0.05$)。与衰老模型组相比,绞股蓝籽油低、中、高剂

2.6 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠血清生化指标的影响

对 D-半乳糖致衰老小鼠血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)浓度进行测定,其结果见表 5。

量组小鼠 LDL 浓度显著降低,HDL 浓度显著上升,但 3 个剂量组间并无明显差异。

2.7 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脏组织生化指标的影响

对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)等指标进行检测,其结果见表 6。

表 6 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脏组织生化指标的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

Table 6 Effect of GPSO on biochemical indexes in liver of aging mice($\bar{x}\pm s,n=10$)				
组别 Group	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	T-AOC/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
空白对照组 Control	236.22±8.86	4.45±1.22	1.14±0.40	30.99±7.90
衰老模型组 Model	211.52±11.90 ^{**}	6.40±1.13 ^{**}	0.72±0.18 ^{**}	48.28±18.19 ^{**}
阳性对照组 Positive	233.77±12.83 [#]	5.01±0.79 [#]	2.10±2.64 [#]	30.40±6.59 [#]
低剂量组 GPSO-L	231.12±15.39 ^{##}	4.92±1.06 [#]	1.62±0.69 ^{##}	28.28±9.96 ^{##}
中剂量组 GPSO-M	240.65±18.11 ^{##}	5.31±0.96 [#]	1.42±0.59 ^{##}	26.16±15.56 ^{##}
高剂量组 GPSO-H	225.15±15.45	4.94±1.35 [#]	1.09±0.30 [#]	29.76±12.45 [#]

由表 6 可知,与空白对照组相比,衰老模型组小鼠肝脏组织中的 SOD 活性和总抗氧化能力(T-AOC)极显著降低,MDA 含量和 CAT 活性极显著升高,说明衰老模型组小鼠肝脏总抗氧化能力下降,清除自由基的能力减弱,脂质过氧化程度加深,进而导致细胞损伤、机体衰老,说明长期注射 D-半乳糖致小鼠衰老造模成功。

表 6 显示,与衰老模型组相比,阳性对照组和灌胃绞股蓝籽油各剂量组小鼠的 SOD 活性均有所提高,其中阳性对照组小鼠肝脏 SOD 水平的提高具有显著性差异($P<0.05$),低剂量组和中剂量组小鼠 SOD 水平的提高具有极显著差异($P<0.01$)。说明灌胃绞股蓝籽油能在一定程度上增加小鼠肝脏的

SOD 活性。针对 MDA 而言,与衰老模型组相比,灌胃绞股蓝籽油的各剂量小鼠的 MDA 含量均呈显著下降趋势,说明灌胃绞股蓝籽油能降低小鼠肝脏的 MDA 含量。针对总抗氧化能力(T-AOC)而言,与衰老模型组相比,灌胃绞股蓝籽油的各剂量组小鼠的 T-AOC 活性显著或极显著提高,说明灌胃绞股蓝籽油可提高小鼠的总抗氧化能力。就 CAT 而言,与衰老模型组相比,灌胃绞股蓝籽油低、中剂量小鼠的 CAT 活性均极显著降低,高剂量组和阳性对照组显著降低,说明灌胃绞股蓝籽油可降低小鼠的过氧化程度,但是灌胃绞股蓝籽油各剂量组小鼠的抗衰老能力并不会随着剂量的增加而增大,因此绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠抗衰老能力的

提高不构成剂量依赖关系。

2.8 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织生化指标的影响

对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)指标进行测定,其结果见表 7。由表 7 可知,

表 7 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织生化指标的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)
Table 7 Effect of GPSO on biochemical indexes in cerebrum of aging mice($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别 Group	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	T-AOC/(U·mg ⁻¹)
空白对照组 Control	153.81±6.72	13.16±1.92	0.87±0.35
衰老模型组 Model	111.22±10.39**	15.28±1.86**	0.31±0.11**
阳性对照组 Positive	144.31±15.16##	10.84±0.99##	0.99±0.85#
低剂量组 GPSO-L	148.04±11.28##	9.30±0.71##	1.40±0.39##
中剂量组 GPSO-M	146.17±9.65##	10.41±0.80##	1.99±0.79##
高剂量组 GPSO-H	145.94±12.73##	9.67±1.05##	1.83±0.22##

与衰老模型组相比,除阳性对照组小鼠 T-AOC 活性显著升高外($P<0.05$),其余各组 SOD、T-AOC 活性和 MDA 含量均极显著升高或降低($P<0.01$)。说明灌胃绞股蓝籽油可降低小鼠脑组织脂质过氧化程度,提高总抗氧化能力,提高自由基清除能力,但是不同剂量组氧化能力并不会随着剂量的增加而增大,因此绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠不构成剂量依赖关系。

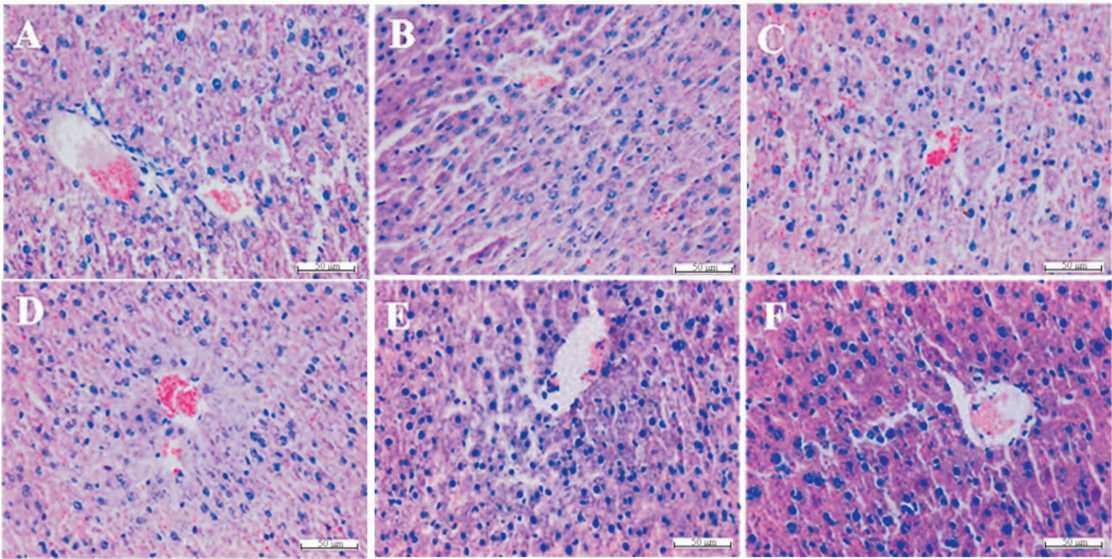
以上结果表明,绞股蓝籽油抗衰老机理之一可

与空白对照组相比,衰老模型组小鼠脑组织中的 SOD 活性和总抗氧化能力(T-AOC)降低,MDA 含量升高,且均达极显著差异水平($P<0.01$),说明衰老模型组小鼠脑组织总抗氧化能力下降,清除自由基能力降低,脂质过氧化程度加深,亦证实了长期注射 D-半乳糖致小鼠衰老造模成功。

能与其具有的抗氧化能力有关,其可以通过增强机体的总抗氧化能力并有效清除自由基,降低机体细胞损伤程度,间接保护正常细胞,从而起到抗衰老的作用。

2.9 绞股蓝籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脏组织病理变化的影响

对空白对照组、衰老模型组及绞股蓝籽油低、中、高剂量组小鼠肝脏组织进行病理学镜检,结果如图 1 所示。



A. 空白对照组;B. 衰老模型组;C. 阳性对照组;D. 绞股蓝籽油低剂量组;E. 绞股蓝籽油中剂量组;F. 绞股蓝籽油高剂量组
A. Control group;B. Aging-model group;C. Positive control group;D. GPSO-L;E. GPSO-M;F. GPSO-H

图 1 各组小鼠肝脏组织 HE 染色病理切片的显微镜检($\times 40$)

Fig. 1 HE staining of mice liver tissues in experimental groups ($\times 40$)

由图 1 可知,空白对照组小鼠肝颜色红润富有弹性,表面光滑有光泽度,光学显微镜检结果显示,肝细胞间连接紧密,核质比大,胞浆丰富,以中央静

脉腔为中心呈辐射状,细胞完整且很规则,细胞结构与间隙清晰,细胞核圆形位于中央,核质分布均匀(图 1-A);衰老模型组小鼠肝脏明显肿大,颜色黄白

有点状灰白色,表面粗糙且质地稍脆无光泽,光学显微镜镜检结果显示细胞间隙扩大,排列紊乱,坏死细胞较多,细胞轮廓模糊,细胞核多皱缩且胞浆疏松、淡染,出现裂解现象,胞质内出现脂滴空泡,并伴随胞质丢失现象(图 1-B);阳性对照组小鼠肝细胞排列较紊乱且间隙大,腔静脉周围都有少部分坏死细胞,细胞界限模糊但病变有所缓解(图 1-C);绞股蓝籽油低剂量组小鼠肝细胞排列较整齐而间隙较大,胞质内有脂滴空泡,胞浆疏松、淡染呈轻度脂肪变性(图 1-D);绞股蓝籽油中剂量组小鼠肝细胞边缘清晰结构完整,少数胞质内有脂滴空泡,病变较小(图 1-E);绞股蓝籽油高剂量组小鼠肝细胞呈辐射状排列且细胞间隙小,核圆清晰完整,几乎无坏死细胞,损伤较轻(图 1-F),说明绞股蓝籽油可以有效缓解衰老小鼠的肝损伤情况。

3 讨 论

在绞股蓝籽油的相关报道中,刘世彪等^[14]对石油醚提取的绞股蓝籽油进行了小鼠急性毒性试验的初步评价,该试验中选用的最大剂量为一次性经口灌胃 65 mL/kg,试验结果表明,14 d 内小鼠活动正常,体质量增加均衡,无明显中毒症状,亦无死亡现象发生;同时对小鼠进行解剖镜检,各主要脏器也未发现可见的异常变化,故按照保健食品检验与评价技术规范急性毒性分级标准,初步认定绞股蓝籽油为无毒级,且富含多不饱和脂肪酸^[2],可作为营养保健植物食用油使用。本试验采用超临界 CO₂ 萃取绞股蓝籽油,避免了溶剂残留的影响,并通过急性经口毒性试验及 2 项遗传毒性试验结合的方法,进一步验证了绞股蓝籽油的食用安全性。但考虑到绞股蓝籽油含有大量 α -桐酸,且油脂的脂肪酸组成结构与桐油极为相似, α -桐酸的含量也几乎相当,而误食桐油发生中毒的事件时有发生^[15-17],普遍的观点认为桐油的毒性来源于 α -桐酸,因此,仅通过急性经口毒性试验及遗传毒性试验检测评价绞股蓝籽油的食用安全性,尚是远远不够的,还需要经过慢性毒性试验等大量检测进行进一步考察。此外,也有文献报道,同样含有大量 α -桐酸的苦瓜籽油和栝楼籽油均可作为食用油脂用于日常饮食,平均寿命最长的日本人也有长期食用苦瓜的习惯^[18-20],这些事例似乎又证明,这些含有大量 α -桐酸的植物油甚至 α -桐酸本身可能都是无毒的。推测桐油的毒性来源一方面为桐油籽中含有的有毒皂素等物质,一方面是以 α -桐酸为主构成的甘油三酯因组成或结构不同而产

生有毒或无毒的植物油脂^[21-22]。此外,桐油的急性中毒也可能与摄入量密切相关,而 α -桐酸具有的抗癌、减肥、降血脂等有益的生理功效,也不会因为桐油的毒性而被掩盖^[23]。因此,在充分验证绞股蓝籽油无毒的基础上,有望将其开发成富含 α -桐酸的可食用天然植物油,以取代桐油成为更加安全的 α -桐酸的天然来源。

本试验以绞股蓝籽油为对象,采用皮下注射 D-半乳糖的方法构建小鼠衰老模型,初步研究其抗衰老作用。随着灌胃和注射时间的延长,小鼠出现饮水量下降,皮毛光泽度变差,行动缓慢,体质量增加缓慢甚至下降的症状,说明长期注射 D-半乳糖会导致小鼠食欲及吸食能力不断下降,而绞股蓝籽油可以缓解这一症状。肝脏指数分析表明,绞股蓝籽油对小鼠肝脏可以起到保护作用。脾脏和胸腺指数是评价机体免疫功能的主要生化指标,灌胃绞股蓝籽油各剂量组小鼠脾脏指数和胸腺指数均较衰老模型线小鼠有所提高,说明绞股蓝籽油可通过提高小鼠脾脏和胸腺的生理机能从而达到增强小鼠免疫功能的目的。本研究显示,供试小鼠的肾脏指数未出现异常,说明绞股蓝籽油对小鼠肾脏功能影响不大。血清生化指标测定结果表明,长期食用绞股蓝籽油不会增加血清中的 TC 和 TG 浓度,反而可明显降低衰老小鼠血清的 LDL 浓度,增加 HDL 浓度,说明绞股蓝籽油可能通过调节血清血脂 TC、TG、LDL、HDL 浓度,改善血脂代谢进而起到抗衰老作用^[24]。肝脏组织和脑组织生化指标的测定结果说明,绞股蓝籽油在一定程度上能显著辅助和增强 SOD 活性,降低 MDA 含量,提高总抗氧化能力,表明绞股蓝籽油抗衰老机理之一可能与其抗氧化能力有关,其可能通过增强机体的总抗氧化能力并有效清除自由基,降低机体细胞损伤程度,间接保护正常细胞,从而起到抗衰老作用^[25-26]。小鼠肝脏组织石蜡切片显示,灌胃不同剂量绞股蓝籽油均可有效缓解衰老小鼠肝脏内脂质过氧化和自由基攻击等造成的氧化损伤,降低肝细胞肿胀甚至坏死的程度,调节细胞恢复生理功能和正常代谢,表明绞股蓝籽油有一定的抗衰老活性。

4 结 论

绞股蓝籽油食品安全性毒理学评价初步认定,绞股蓝籽油属实际无毒物质,小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验和精子畸形试验也表明,绞股蓝籽油不会对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核数造成显著影响,

对小鼠精子无致畸变作用。另外,绞股蓝籽油有一定的抗衰老作用,且其抗衰老机理可能与其所具有的抗氧化能力有关。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2007.
Nanjing University of Chinese Medicine. The dictionary of medicinal plant [M]. Shanghai:Shanghai Science and Technology Publishing House,2007.
- [2] Wang L, Wang X B, Wang P, et al. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction, physicochemical and cytotoxicity properties of *Gynostemma pentaphyllum* seed oil: a potential source of conjugated linolenic acids [J]. Separation Purification Technology, 2016, 159:147-156.
- [3] Wang L, Pang M, Wang X B, et al. Characteristics, composition, and antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino seed oil [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97:2084-2093.
- [4] 曹峻岭, 李祖伦, 陈建武, 等. 火麻仁油对 D-半乳糖致亚急性衰老模型小鼠血清 NO、SOD、GSH-Px、MDA 的影响 [J]. 四川中医, 2005, 23(3):29-30.
Cao J L, Li Z L, Chen J W, et al. The effect of Hemp seed oil on subacute aging model mice serum NO, SOD, GSH-Px, MDA induced by D-galactose [J]. Journal of Sichuan Traditional Chinese Medicine, 2005, 23(3):29-30.
- [5] 雷 鸣, 朱祖健. D-半乳糖致衰老模型小鼠的保护作用 [J]. 解剖科学进展, 2011, 17(1):83-85.
Lei M, Zhu Z J. The research progress of D-galactose-induced aging [J]. Progress of Anatomical Science, 2011, 17(1):83-85.
- [6] 关 萍, 郭 搏, 王 蕙, 等. D-半乳糖促小鼠衰老模型的衰老程度与自然生长鼠龄的比较 [J]. 动物医学进展, 2013, 34(1):71-74.
Guan P, Guo B, Wang H, et al. Analysis on relativity of Aging degree between aging model mice caused by D-galactose and natural growth mice [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(1):71-74.
- [7] 黄玲玲, 魏道智, 吴亚妮, 等. 复方精油对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的保护作用 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 30(6):32-35.
Huang L L, Wei D Z, Wu Y N, et al. The anti-aging effect of Compound essential oil on aging mice induced by D-galactose [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agriculture Science Edition), 2012, 30(6):32-35.
- [8] 莫艳秀, 于美娟, 莫永亮. 林蛙油对 D-半乳糖衰老模型小鼠的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(9):1603-1604.
Mo Y X, Yu M J, Mo Y L. The protection effect of oviductusra-nae on aging model induced by D-galactose [J]. Chinese Journal of Gerontol, 2011, 31(9):1603-1604.
- [9] 秦红兵, 杨朝晖, 范忆江, 等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立与评价 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7):1275-1278.
- [10] Chen J M, Li Y F, Zhu Q Q, et al. Anti-skin-aging effect of *Epigallocatechin gallate* by regulating epidermal growth factor receptor pathway on aging mouse model induced by D-galactose [J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2017, 164:1-7.
- [11] 付少华, 夏 莹, 田 洁. 环磷酰胺给予剂量及方式对小鼠骨髓微核率的影响 [J]. 卫生研究, 2016, 45(6):1018-1019.
Fu S H, Xia Y, Tian J. Effects of dose and model of cyclophosphamide on micronucleus rate of bone marrow in mice [J]. Journal of Hygiene Research, 2016, 45(6):1018-1019.
- [12] Jiang P Z, Ni Z Z, Wang B, et al. Acute toxicity, twenty-eight days repeated dose toxicity and genotoxicity of vanadyl tregalose in Kunming mice [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017, 85:86-97.
- [13] 张希桥, 杨志华. 关于精子畸变分型的参考意见 [J]. 卫生毒理学杂志, 1995, 9(1):46.
Zhang X Q, Yang Z H. Guidance on sperm aberration typing [J]. Journal of Health Toxicology, 1995, 9(1):46.
- [14] 刘世彪, 谭秀梅, 彭小列, 等. 绞股蓝种子油的提取、成分分析和急性毒性实验 [J]. 广西植物, 2014, 34(1):130-134.
Liu S B, Tan X M, Peng X L, et al. Extraction, composition and acute toxicity test of seed oil of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Guihaia, 2014, 34(1):130-134.
- [15] 虞精明, 李志芳, 方胜宇, 等. 一起误食桐油引起食物中毒事件的调查 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(9):2201-2202.
Yu J M, Li Z F, Fang S Y, et al. An investigation case of eating with tung oil cause food poisoning [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(9):2201-2202.
- [16] 冯银矿. 急性桐油中毒 17 例临床分析 [J]. 中国社区医师, 2015, 31(7):109.
Feng Y K. Clinical analysis of 17 cases acute tung oil poisoning [J]. Chinese Community Doctors, 2015, 31(7):109.
- [17] 狄 明, 张春玲, 尹江宁, 等. 一起误食桐油引起食物中毒事件的调查 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(24):3636-3637.
Di M, Zhang C L, Yi J N, et al. Analysis of ingestion of tung oil cause food poisoning [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(24):3636-3637.
- [18] Tsuzuki T, Tokuyama Y, Igarashi M, et al. Tumor growth suppression by alpha-eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(8):1417-1425.
- [19] Kohno H, Yasui Y, Suzuki R, et al. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPARgamma expression and alteration of lipid composition [J]. International Journal of Cancer, 2004, 110(6):896-901.

- sian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) [J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(6): 957-964.
- [20] 秦秀林, 钱江潮, 储 炬, 等. 优化易错 PCR 条件以提高毕赤酵母 GAP 启动子文库突变效率 [J]. 生物技术通报, 2016, 10(6): 211-217.
- Qin X L, Qian J C, Chu J, et al. High-error-rate random mutagenesis of GAP promoter in *pichia pastoris* using an optimized error prone PCR [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 10(6): 211-217.
- [21] 曾家豫, 郑 群, 廖世奇, 等. 大豆过氧化物酶基因随机突变文库的构建 [J]. 大豆科学, 2011, 30(5): 731-737.
- Zeng J Y, Zheng Q, Liao S Q, et al. Construction of soybean peroxidase gene random mutation library [J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 731-737.
- [22] 刘卫晓, 钱世君. 酶分子体外定向进化的研究方法 [J]. 微生物学报, 2004, 31(2): 100-104.
- Liu W X, Qian S J. Methods of the directed molecular evolution of enzyme *in vitro* [J]. Microbiology China, 2004, 31(2): 100-104.
- [23] 宋 萍, 南宫自艳, 张 杰, 等. 苏云金芽胞杆菌 *Cry1Ia32* 基因克隆和原核表达的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2015, 38(5): 48-52.
- Song P, Nangong Z Y, Zhang J, et al. Cloning and expression of *Cry1Ia32* gene from *Bacillus thuringiensis* isolate [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2015, 38(5): 48-52.
- [24] 乔 利, 郑坚武, 成卫宁, 等. 不同饲料配方对亚洲玉米螟生长发育和繁殖的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(5): 109-112.
- Qiao L, Zheng J W, Cheng W N, et al. Impact of 4 different artificial fodders on life span of asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) [J]. Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed), 2008, 36(5): 109-112.
- [25] 岳润清, 铁双贵, 陈小洁, 等. 人工改造基因 *Cry1Abm* 的合成、原核表达及其抗虫鉴定 [J]. 玉米科学, 2013, 21(6): 21-25.
- Yue R Q, Tie S G, Chen X J, et al. Synthesis of the modified *Cry1Abm* gene, expression in *E. coli* and bioassay [J]. Journal of Maize Sciences, 2013, 21(6): 21-25.
- [26] 任 羽, 刘华梅, 宋福平, 等. 苏云金芽胞杆菌 *Cry1Ca7* 蛋白定点突变对甜菜夜蛾杀虫活性的影响 [J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 733-738.
- Ren Y, Liu H M, Song F P, et al. Effect of *Cry1Ca7* protein modified by site-directed mutagenesis on inhibiting *Spodoptera exigua* Hübne [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(6): 733-738.
- [27] Drummond D A, Iverson B L, Georgiou G, et al. Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 350(4): 806-816.
- [28] 黄 瑛, 蔡 勇, 杨江科, 等. 基于易错 PCR 技术的短小芽胞杆菌 YZ02 脂肪酶基因 *BpL* 的定向进化 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(3): 445-451.
- Huang Y, Cai Y, Yang J K, et al. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(3): 445-451.
- [29] 余宗兰, 贺利业. 苏云金芽胞杆菌 *cry1Ie* 新基因的克隆、表达与生物活性测定 [J]. 植物保护学报, 2016, 43(2): 201-206.
- Yu Z L, He L Y. Cloning, expression, and biological activity of a new *cry1Ie* gene from *Bacillus thuringiensis* strain [J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(2): 201-206.

(上接第 140 页)

- [20] Dhar P, Ghosh S, Bhattacharyya D K. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9cis, 11trans, 13trans) levels on blood lipids and nonenzymatic *in vitro* lipid peroxidation in rats [J]. Lipids, 1999, 34(2): 109-114.
- [21] Cahoon E B, Carison T J, Ripp K G, et al. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(22): 12935-12940.
- [22] Van Erp H, Shockey J, Zhang M, et al. Reducing isozyme competition increases target fatty acid accumulation in seed triacylglycerols of transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2015, 168(1): 36-46.
- [23] Yuan G F, Chen X E, Li D. Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review [J]. Food & Function, 2014, 5: 1360-1368.
- [24] 殷 越, 赵雪莹, 李胜志. 二至丸对 D-半乳糖致衰老模型大鼠血脂含量影响的实验研究 [J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 75-77.
- Yin Y, Zhao X Y, Li S Z. Experimental study on the effect of Erzhi Pill on blood lipid content in D-galactose-induced senile rat model [J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2009, 26(1): 75-77.
- [25] 栾增强, 曹文富, 黄和贤, 等. 延衰合剂对 D-半乳糖衰老小鼠血清 SOD, MDA, IL-2 和睾酮的影响 [J]. 中国药房, 2011, 22(7): 589-591.
- Luan Z Q, Cao W F, Huang H X, et al. Effects of Yanshuai mixture on serum SOD, MDA, IL-2 and testosterone of aging mice induced by D-galactose [J]. China Pharmacy, 2011, 22(7): 589-591.
- [26] Zhen Y Z, Lin Y J, Li K J, et al. effects of rhein lysinate on D-galactose-induced aging mice [J]. Exoimmetnal and Therapeutic Medicine, 2016, 11: 303-308.