

# MT 生物饮品的毒性研究

周宇红 严卫星

刘海波

卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

**摘 要** 为了更好地开发利用金属硫蛋白,对其进行了急性毒性、致突变性及亚慢性毒性研究。结果显示:MT 生物饮品无急性毒性和亚慢性毒性,无致突变作用,说明长期饮用 MT 生物饮品是安全的。

**关键词** 金属硫蛋白 毒性试验

金属硫蛋白(Metallothionein 简称 MT)是低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白。1957 年 Margoshes 等首次从马肾中分离出该物质<sup>(1)</sup>,此后 30 余年越来越受到国内外学者的重视,已成为当今生物化学、分子生物学以及医学热门课题之一。现已发现 MT 广泛存在于动、植物组织和真核微生物中,是一种具有天然生物活性的物质,具有广泛的生理学和生物学功能。<sup>(2)</sup>其主要作用是:参与微量元素的储存、运输和代谢,拮抗电离辐射,清除羟基自由基,重金属解毒,增强机体的各种应激反应,参与 DNA 的复制、转录和能量代谢的调节过程。<sup>(3)</sup>故 MT 对人体的健康具有重要意义,将其作为保健食品具有广阔的应用前景。为保障人体长期食用 MT 的安全,和为其开发利用提供可靠的毒理学依据,我们对其进行了急性毒性、致突变性及亚慢性毒性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**样品** MT 生物饮品(由广东某生物工程公司提供)25 倍浓缩液,含 MT 25 mg/L。

**动物** 健康昆明种小鼠、Wistar 大鼠由中国医学科学院实验动物中心提供。

### 1.2 方法<sup>(4)</sup>

#### 1.2.1 小鼠急性毒性试验

用体重 18~22 g 小鼠 20 只,雌雄各半,以 20 mL/kg BW 的剂量一次性灌胃,连续观察 2 周。记录中毒表现及死亡情况。

#### 1.2.2 Ames 试验

采用经鉴定符合要求的沙门氏鼠伤寒组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 4 个菌株按平板掺入法进行试验。采用多氯联苯(PCB)诱导的大鼠肝匀浆作为体外代谢活化系统。受试物用 G6 滤器除菌。根据毒性测定结果,试验设 10%、25%、50%、

100% 4 个浓度,同时设自发回变,阳性突变剂和无菌对照,37℃ 培养 48 h,计数每皿回变菌落数,受试物的回变菌落数的增加超过自发回变率的 2 倍以上,并具有剂量—反应关系者定为阳性。

#### 1.2.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

用体重 25~30 g 小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半。三个剂量组分别为 2.5、5、10 mL/kg BW,阳性对照组为 50 mg/kg BW 剂量的环磷酰胺,阴性对照为蒸馏水。采用间隔 24 h,2 次经口灌胃法进行试验,末次给受试物后 6 h 脱颈椎处死动物,取胸骨骨髓制片、固定、Giemsa 染色、镜检,每只动物观察 1000 个嗜多染红细胞(PRC),计算微核发生率(‰),按 Poisson 分布求 95% 可信限,最后进行  $u$  检验。

#### 1.2.4 小鼠精子畸变试验

用体重 30~35 g 性成熟雄性小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只。3 个剂量组分别为 2.5、5、10 mL/kg BW,阳性对照物组为 40 mg/kg BW 剂量的环磷酰胺,阴性对照组为蒸馏水,每日灌胃一次,连续 5 d,末次灌胃后 30 天处死动物,取附睾制片,伊红染色,镜检。每只动物计数 1000 个结构完整的精子,计算畸变精子发生率(%)。

#### 1.2.5 大鼠 90 d 喂养试验

用体重 40~60 g 断乳大鼠 80 只,随机分为 4 组,每组 20 只,雌雄各半。3 个剂量组(低、中、高)分别为 1、3、10 mL/kg BW,用自来水配至所需浓度,按 1 mL/100g 体重灌胃,连续灌胃 90 d,对照组灌同体积自来水,试验期间,动物单笼喂养,自由饮食,每周称重 2 次,观察动物生长发育及摄食量,计算食物利用率。试验结束,动物禁食 12 h 后断头取血测血常规及生化指标,同时进行大体解剖,取心、肝、肾、脾、胃、十二指肠、睾丸(卵巢)称重,10% 甲醛固定,石蜡切片,HE 染色镜检,观察病理变化。

2 结果

2.1 急性毒性试验

经 14d 观察,两种性别小鼠均未出现任何中毒症状,无死亡。LD<sub>50</sub>均大于 10 g/kg BW,根据急性毒性分级,MT 生物饮品属实际无毒物。

2.2 致突变试验

2.2.1 Ames 试验

由表 1 可见,MT 生物饮品各剂量组对 TA97、TA98、TA100、TA102 4 株试验菌株,无论直接作用还是代谢活化作用,回变菌落数均未超过自发回变菌落数 2 倍,亦无剂量—反应关系,表明 MT 生物饮品对测试菌株无诱变性。

表 1 MT 生物饮品 Ames 试验结果

| 剂量 % | 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> |
| 10   | 151              | 125              | 20               | 21               | 157              | 119              | 260              | 276              |
| 25   | 135              | 141              | 18               | 19               | 125              | 118              | 249              | 286              |
| 50   | 123              | 143              | 18               | 35               | 141              | 140              | 258              | 279              |
| 100  | 145              | 185              | 18               | 24               | 152              | 117              | 277              | 260              |
| 自发回变 | 128              | 152              | 20               | 19               | 130              | 130              | 283              | 288              |
| 阳性对照 | (a)              | (d)              | (a)              | (d)              | (b)              | (d)              | (c)              | (e)              |
|      | 1165             | 1439             | 1516             | 1165             | 954              | 1367             | 1218             | 1690             |

(a)9- 苊酮 0.2 μg/皿; (b)NaN<sub>3</sub> 2.5μg/皿; (c)MMS 1.0μg/皿; (d)2- AF 10μg/皿; (e)2,8- 二羟蒽醌 50μg/皿。

表 2 MT 生物饮品对小鼠骨髓微核发生率影响

| 性别 | 剂量 mL/kg BW | 动物数 | 检查细胞数 | 微核数 | 微核率‰                |
|----|-------------|-----|-------|-----|---------------------|
| 雄  | 0.0         | 5   | 5000  | 7   | 1.4                 |
|    | 2.5         | 5   | 5000  | 9   | 1.8                 |
|    | 5.0         | 5   | 5000  | 9   | 1.8                 |
|    | 10.0        | 5   | 5000  | 11  | 2.2                 |
|    | 阳性对照        | 5   | 5000  | 169 | 33.8 <sup>(1)</sup> |
| 雌  | 0.0         | 5   | 5000  | 8   | 1.6                 |
|    | 2.5         | 5   | 5000  | 8   | 1.6                 |
|    | 5.0         | 5   | 5000  | 7   | 1.4                 |
|    | 10.0        | 5   | 5000  | 9   | 1.8                 |
|    | 阳性对照        | 5   | 5000  | 144 | 28.8 <sup>(1)</sup> |

阳性对照为 50 mg/kg BW 环磷酰胺 (1)P<0.01

2.2.2 微核及精子畸形试验

由表 2、3 可见,微核发生率和精子畸变率,MT 生物饮品各剂量组与阴性对照组比较差异无显著性,阳性对照组与阴性对照组比较差异有极显著性(P<0.01)。表明 MT 生物饮品对小鼠骨髓细胞染色体无明显断裂效应,对小鼠精子形态无影响。

2.3 90 d 喂养试验

2.3.1 生长发育

经 13 周观察,动物健康状况良好,未见异常体征,MT 生物饮品各剂量组的食物利用率与对照组相比,差异无显著性。各组动物随喂养时间延长,体重逐渐上升,曲线接近,差异无显著性。

2.3.2 血常规及生化检验

表 4、5 表明,各组动物血液及其生化指标(血红蛋白、红细胞总数、白细胞计数、血清谷-丙转氨酶、血清总蛋白、血清白蛋白、尿素氮、总胆固醇、甘油三

脂、血糖)均在正常值范围内波动。

表 3 MT 生物饮品对小鼠精子畸形发生率的影响

2.3.3 病理组织学检查

解剖时大体观察未见异常;脏器系数各剂量组与阴性对照组比较差异无显著性(见表 6)。镜下观察对照组和各剂量组动物的肝、脾、肾、胃、十二指肠、睾丸或卵巢,均未见有意义的病理改变。

3 讨论

MT 生物饮品经第一、二阶段毒性试验没有发现任何毒性和致突变作用。

| 剂量<br>mL/kg BW | 动物<br>数 | 受检<br>精子数 | 精子<br>畸形数 | 畸变率<br>%            |
|----------------|---------|-----------|-----------|---------------------|
| 0.00           | 5       | 5000      | 85        | 1.70                |
| 1.25           | 5       | 5000      | 91        | 1.82                |
| 2.50           | 5       | 5000      | 84        | 1.68                |
| 5.00           | 5       | 5000      | 88        | 1.76                |
| 阳性对照           | 5       | 5000      | 257       | 5.14 <sup>(1)</sup> |

阳性对照为 40 mg/kg BW 环磷酰胺

(1) $P<0.01$

表 4 MT 生物饮品 90 d 喂养试验生化检验结果

mg/dL

| 指标                          | 雄 mL/kg BW |       |       |       | 雌 mL/kg BW |       |       |       |
|-----------------------------|------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|
|                             | 0          | 1     | 3     | 10    | 0          | 1     | 3     | 10    |
| 血糖                          | 34.6       | 41.6  | 61.9  | 57.9  | 51.1       | 47.1  | 55.6  | 59.6  |
|                             | ±17.1      | ±11.6 | ±11.9 | ±12.3 | ±18.6      | ±15.3 | ±18.5 | ±17.4 |
| 血清谷-丙转氨酶<br>(赖氏法)(单位)       | 34.6       | 41.4  | 14.2  | 14.9  | 31.7       | 31.0  | 12.6  | 9.0   |
|                             | ±7.8       | ±16.8 | ±6.8  | ±15.8 | ±14.2      | ±19.4 | ±19.4 | ±7.4  |
| 尿素氮                         | 14.2       | 14.5  | 17.9  | 13.6  | 16.5       | 18.3  | 17.7  | 17.7  |
|                             | ±2.2       | ±1.8  | ±2.0  | ±2.1  | ±2.9       | ±3.0  | ±3.2  | ±3.3  |
| 总胆固醇                        | 43.8       | 53.9  | 51.6  | 59.3  | 55.9       | 71.9  | 65.4  | 70.5  |
|                             | ±11.7      | ±13.3 | ±5.4  | ±9.2  | ±12.3      | ±23.4 | ±13.5 | ±14.2 |
| 甘油三酯                        | 119.7      | 96.0  | 168.0 | 118.9 | 104.4      | 95.6  | 88.7  | 98.9  |
|                             | ±54.2      | ±99.8 | ±58.3 | ±46.3 | ±76.4      | ±58.6 | ±38.5 | ±58.2 |
| 血清总蛋白<br>g/dL               | 9.0        | 9.0   | 8.6   | 8.2   | 9.9        | 10.0  | 7.9   | 9.5   |
|                             | ±0.7       | ±1.2  | ±1.2  | ±0.9  | ±1.8       | ±1.0  | ±1.2  | ±2.2  |
| 血清白蛋白                       | 5.7        | 5.5   | 6.4   | 6.3   | 5.8        | 6.0   | 6.0   | 6.2   |
|                             |            |       |       |       |            |       |       |       |
| 指标                          | 0          | 1     | 3     | 10    | 0          | 1     | 3     | 10    |
|                             |            |       |       |       |            |       |       |       |
| 血红蛋白<br>g/dL                | 11.7       | 11.8  | 11.8  | 11.7  | 11.9       | 11.6  | 11.9  | 11.6  |
|                             | ±0.5       | ±0.5  | ±0.4  | ±0.4  | ±0.5       | ±0.6  | ±0.5  | ±0.5  |
| 红细胞计数<br>$10^6/\text{mm}^3$ | 7.6        | 7.7   | 7.5   | 7.5   | 7.4        | 7.6   | 7.5   | 7.4   |
|                             | +1.0       | +0.8  | +0.9  | +0.6  | +0.5       | +0.9  | +0.5  | +0.6  |

90 d 喂养试验, 各组雌雄大鼠生长发育良好, 体重、食物利用率、血常规、血生化、脏器系数及病理组织学检查等各项指标与对照组比较差异均无显著性, 这表明 MT 生物饮品没有产生抑制大鼠体重增长, 食物利用及损害肝、肾功能的毒性。高剂量组 10

mL/kg BW 对大鼠未出现明显的毒性作用。可以认为该产品最大无作用剂量为 10 mL/kg BW (为人实际摄入量的 1 000 倍), 因此人体长期食用 MT 生物饮品是安全的。

表 6 MT 生物饮品对大鼠脏器系数的影响 %

| 性别 | 剂量 mL/kg BW | 肝/体  | 脾/体  | 肾/体  | 睾丸/体 |
|----|-------------|------|------|------|------|
| 雄  | 0           | 2.62 | 0.13 | 0.53 | 0.72 |
|    | 1           | 2.57 | 0.12 | 0.55 | 0.68 |
|    | 3           | 2.99 | 0.13 | 0.59 | 0.70 |
|    | 10          | 2.63 | 0.12 | 0.60 | 0.74 |
| 雌  | 0           | 2.55 | 0.14 | 0.70 |      |
|    | 1           | 2.62 | 0.14 | 0.74 |      |
|    | 3           | 2.40 | 0.14 | 0.67 |      |
|    | 10          | 2.46 | 0.12 | 0.76 |      |

4 参考文献

1 Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. J Am Chem Soc, 1957, 79: 4813

2 茹炳根, 等. 金属硫蛋白. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(4): 254~289

3 Foulkes EC. Biological roles of metallothionein, Elsevier/North-Holland, 1981, New York

4 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价程序和方法, GB 15193.1~15193.19, 1994-08-10

(上接第 8 页)

表 3 可见, 螺旋藻 3 个剂量组的精子畸形率与阴性对照组相比, 均无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 说明螺旋藻不引起小鼠精子畸形。

3 参考文献

1 程双奇, 等. 螺旋藻营养评价. 营养学报, 1990, 12: 415

2 方昭希, 张爱琴. 螺旋藻几种成分的初步分析. 营养学报, 1989, 11: 146

3 李定梅. 螺旋藻. 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 3

4 丁纯孝, 于静宜编译. 实用食品加工新技术(4). 北京: 中国食品出版社, 1989, 26

5 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价程序和检验方法, 1994-08-10

《食品卫生培训教材》征订通知

《食品卫生培训教材》是培训各类食品生产、销售及管理人员的实用教材, 由中国医药科技出版社出版。全面介绍了食品生产管理、消毒、饮食、食品加工、冷饮冷食、副食品卫生的知识, 最后一章还对企业检验室的条件和要求作了叙述。每节后附有问答题供考核时使用。全书共 9 章 20 万字, 定价: 8.50 元, 按 70% 收费每本收费 5.95 元(含运费)。来电来函后可先寄样书。

联系单位: 北京市昌平区卫生防疫站 邮编: 102200  
联系电话: (010)69745043 寻呼机: (010)68368800 呼 23851  
联系人: 贾树队