

# 新型降血糖化合物G004的遗传毒性与生殖毒性研究<sup>△</sup>

蔡 鸣<sup>1\*</sup>, 侯 艳<sup>1</sup>, 乔红群<sup>2</sup>, 刘 晶<sup>1</sup>(1.江苏省药物研究所, 南京 210009; 2.南京工业大学药学院, 南京 211816)

中图分类号 Q355 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3078-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.12

**摘要** 目的:研究新型降血糖化合物G004的遗传毒性与生殖毒性。方法:分别采用Ames试验(鼠伤寒沙门氏菌突变株回复突变试验)、CHL细胞(中国仓鼠肺成纤维细胞)染色体畸变试验、小鼠骨髓微核实验考察G004的遗传毒性;采用大鼠胚胎-胎仔发育毒性实验,在大鼠妊娠第6~15天连续灌胃给药G004(剂量分别为100、300、900 mg/kg),考察其对孕鼠体质量和摄食量、胚胎形成以及胎鼠生长发育等的影响,评价其生殖毒性。结果:遗传毒性方面,G004的Ames试验、CHL细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓微核实验结果均为阴性;生殖毒性方面,G004各剂量组孕鼠均无明显毒性反应,100、300 mg/kg剂量组胎鼠生长发育正常,仅900 mg/kg剂量组出现吸收胎数增加及胎鼠骨骼发育迟缓。结论:G004无明显遗传毒性;剂量≤900 mg/kg时对怀孕大鼠母体无毒性作用,剂量≤300 mg/kg时对大鼠子代无致畸作用。

**关键词** 降血糖药;G004;遗传毒性;生殖毒性;胚胎;发育

## Study on Genotoxicity and Reproductive Toxicity of New Hypoglycemic Compound G004

CAI Ming<sup>1</sup>, HOU Yan<sup>1</sup>, QIAO Hongqun<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>1</sup> (1. Jiangsu Institute of Materia Medica, Nanjing 210009, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the genotoxicity and reproductive toxicity of new hypoglycemic compound G004. METHODS: The genotoxicity of G004 was investigated by Ames trial (reverse mutation test of *Salmonella typhimurium* mutant), CHL cell (Chinese hamster lung fibroblasts) chromosomal aberration test and mice bone marrow micronucleus test. In embryo-fetal

- phylla fruit extract on compound 48/80-induced anaphylactic reactions[J]. *Am J Chin Med*, 2001, 29(2):293-302.
- [3] 钟恒亮,王荔萍,陈力.益智仁口服液镇静催眠作用实验研究[J].贵阳医学院学报,2002,27(2):132-134.
- [4] 黄凌,朱毅,邝少轶.益智仁挥发油抗帕金森模型小鼠黑质神经元凋亡的作用研究[J].中国药房,2011,22(47):4430-4433.
- [5] MITIĆ-CULAFIĆ D, ZEGURA B, NIKOLIĆ B, et al. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cell[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(1):260-266.
- [6] 李生茂,彭璐,夏青,等.益智盐炙前后挥发油化学成分及抗氧化活性的比较研究[J].中医药信息,2015,32(6):23-27.
- [7] 杨久山,孙秀萍,王忆杭,等.连翘酯苷对东莨菪碱模型小鼠学习记忆的影响及其机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(8):177-181.
- [8] 王红利,薛莉君,万东,等.梓醇改善东莨菪碱诱导的学习记忆障碍及机制研究[J].中国药理学通报,2011,27(9):1271-1275.
- [9] JAIN NK, PATIL CS, KULKARNI SK, et al. Modulatory role of cyclooxygenase inhibitors in aging- and scopolamine or lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction in mice[J]. *Behav Brain Res*, 2002, 133(2):369-376.
- [10] WEINBERBERGER NM, MIASNIKOV AA, CHEN JC. Sensory memory consolidation observed: increased specificity of detail over days[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2009, 91(3):273-286.
- [11] 王爱梅,耿若君,李戈,等.早莲草对老年痴呆模型大鼠学习记忆及海马神经递质的影响[J].中国中医基础医学杂志,2016,22(3):332-335.
- [12] MARKESBERY WR, LOVELL MA. Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment[J]. *Arch Neurol*, 2007, 64(7):954-956.
- [13] FAN Y, HU J, LI J, et al. Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 374(3):222-226.
- [14] GOVERDHAN P, SRAVANTHI A, MAMATHA T. Neuroprotective effects of meloxicam and selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2012. DOI: 10.1155/2012/974013.
- [15] DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain[J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 62(6):649-671.
- [16] HALL ED, ANDRUS PK. Measurement of oxygen radicals and lipid peroxidation in neural tissues[M]. 2009. DOI:10.1002/0471142301.ns0717s48.

△ 基金项目:江苏省科技厅政策引导类计划(产学研合作)项目(No.BY2016005-10)

\* 副研究员。研究方向:毒理学、药物安全性评价。电话:025-83587711。E-mail:cmjssyy@sina.com

(收稿日期:2018-05-17 修回日期:2018-09-26)

(编辑:段思怡)

development toxicity test, pregnant rats were given medicine intragastrically during 6-15 days of pregnancy (G004 dose of 100, 300, 900 mg/kg). The effects of G004 on body weight and food intake of pregnant rats, embryo formation and fetal rat growth and development were investigated to evaluate reproductive toxicity of G004. RESULTS: The negative genotoxicity results were obtained in Ames trial, CHL cell chromosomal aberration test and mice bone marrow micronucleus test. In respect of reproductive toxicity, there was no obvious toxic reaction in pregnant rats of G004 different dose groups, and rat embryos developed normally in G004 100, 300 mg/kg groups. Only resorption number increased and rat embryos developed slowly in 900 mg/kg group. CONCLUSIONS: G004 shows no obvious genotoxicity. When the doses are not more than 900 mg/kg, G004 has no toxic effect on rat; when the doses are not more than 300 mg/kg, G004 has no teratogenic effect on rat offspring.

**KEYWORDS** Hypoglycemic agent; G004; Genotoxicity; Reproductive toxicity; Embryo; Development

G004 化学名为 1-[4-[2-(4-溴苯磺酰胺基)乙基]苯磺酰]-3-(反-4-甲基环己基)脲, 其是以格列美脲降血糖活性结构部分为母体, 引入抗血栓活性基因而合成的新型降血糖化合物<sup>[1]</sup>。据报道, G004 具有抗实验性血栓和保护血管内皮细胞的作用, 能显著促进糖代谢, 促进大鼠胰岛原代分离培养细胞分泌胰岛素, 并可显著改善胰岛素抵抗的 HepG2 细胞的糖代谢功能<sup>[2-7]</sup>。从新药的临床前安全性评价角度出发, 笔者采用遗传毒性评价的标准试/实验组合方法 (Ames 试验、CHL 细胞染色体畸变试验、小鼠骨髓微核实验) 研究 G004 的遗传毒性; 同时, 采用大鼠胚胎-胎仔发育毒性实验, 研究 G004 的生殖毒性, 旨在为其临床前毒性研究以及临床研究的安全性评价提供基础研究依据, 以期为妊娠期糖尿病孕妇的安全用药提供更多、更好的选择。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BB16UV 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (德国 Heraeus 公司); BX45 型相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 87191 型倒置显微镜 (上海光学仪器厂); F3JN7743 型超纯水机 (美国 Millipore 公司)。

### 1.2 药品与试剂

G004 原料药 (中国药科大学新药研究中心提供, 批号: 20100705-01, 纯度: 99.0%; 使用前以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成混悬液); 哺乳动物肝脏微粒体酶 (简称“S9”, 上海西唐生物科技有限公司); 4-硝基邻苯二胺 (NPD)、2-氨基苄 (2-AF)、2-氨基蒽 (2-AA) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 柔红霉素 (美国 Pharmacia 公司); 叠氮钠 (东阳市凯明特种试剂有限公司); 甲基磺酸甲酯 (MMS, 比利时 Acros Organics 公司); 1,8-二羟基蒽醌 (中国医药集团上海化学试剂公司); 丝裂霉素 (浙江海正药业股份有限公司); 环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司); RPMI Medium 1640 培养液 (日本日水制药株式会社); 其余试剂均为分析纯, 水为自制纯化水。

### 1.3 动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠 50 只, 体质量 22~24 g; SPF 级 SD 大鼠 225 只, 雌鼠体质量为 210~269 g, 雄鼠体质量在 300 g 以上。动物均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK (沪) 2007-0005。动物均在温度为 20~26 °C、相对湿度为 40%~70% 的屏

障环境中进行饲养。

## 1.4 菌株和细胞

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型突变株 (TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535)、中国仓鼠肺成纤维细胞 (CHL 细胞) 均来自江苏省食品药品检验所。

## 2 方法

### 2.1 Ames 试验

Ames 试验 (鼠伤寒沙门氏菌突变株回复突变试验) 采用平板掺入法<sup>[8]</sup>。根据预试验结果 (G004 浓度高于 1 250 μg/皿时会析出固体), 本试验设置 5 个 G004 剂量组 (终浓度分别 62.5、125、250、500、1 000 μg/皿), 同时设空白对照组 (自发回复突变)、溶媒对照组和阳性对照组。每组设置 3 个平行皿。试验在加或不加代谢活化系统即哺乳动物肝脏微粒体酶 (简称为“±S9”) 的条件下平行进行。-S9 条件下, TA97 菌株的阳性对照为 NPD (20 μg/皿), TA98 菌株的阳性对照为柔红霉素 (10 μg/皿), TA100、TA1535 菌株的阳性对照为叠氮钠 (1.5 μg/皿), TA102 菌株的阳性对照为 MMS (2 μL/皿); +S9 条件下, TA97、TA98、TA100 菌株的阳性对照为 2-AF (20 μg/皿), TA102 菌株的阳性对照为 1,8-二羟基蒽醌 (50 μg/皿), TA1535 菌株的阳性对照为 2-AA (5 μg/皿)。试管中依次加入 S9 混合液 (+S9 条件下) 或 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (-S9 条件下) 0.5 mL, G004 各剂量组分别加入不同浓度的 G004 混悬液 0.1 mL, 空白对照组不加样, 溶媒对照组加入相应溶媒 0.1 mL, 阳性对照组分别加入相应阳性对照溶液 0.1 mL, 最后分别加入预先振荡培养的 5 种菌株培养液 (密度为 1×10<sup>9</sup>~2×10<sup>9</sup> 个/mL) 0.1 mL。随后加入融化并保温在 45 °C 的上层培养基 2 mL, 在振荡器上混匀后倒入含底层培养基的平皿中, 轻轻旋转平皿使上层培养基及内含物均匀分布在底层培养基表面后, 置暗处于室温下放置 45 min, 再翻转放入 37 °C 恒温培养箱中培养 72 h。菌落计数前先观察背景菌苔, 选择背景菌苔正常的平皿计数各平板的菌落数。

### 2.2 CHL 细胞染色体畸变试验

根据预试验结果 [G004 对细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) = 4 099.8 μg/mL], 并按照《药物遗传毒性研究技术指导原则》<sup>[8]</sup> 要求, 本试验设置 3 个 G004 剂量组 (终质量浓度分别为 250、500、1 000 μg/mL), 另设空白对照组、溶媒对照组和阳性对照组。-S9 条件下阳性对照为丝

裂霉素(0.4 μg/mL),+S9条件下阳性对照为环磷酰胺(20 μg/mL)。将CHL细胞制成细胞悬液(5×10<sup>4</sup>个/mL),在细胞瓶中按1 mL/瓶接种,在1640培养液中培养72 h后,G004各剂量组分别加入不同质量浓度的G004混悬液100 μL,空白对照组不加样,溶媒对照组加入相应溶媒100 μL,阳性对照组分别加入相应阳性对照溶液100 μL。-S9条件下,各组细胞在37℃分别培养24、48 h后收获细胞;+S9条件下,各组细胞另加S9混合液0.5 mL,37℃培养6 h后,更换新鲜1640培养液再继续培养18 h后收获细胞。在收获细胞前4 h加入秋水仙碱(0.2 μg/mL),按常规方法制备染色体标本,Giemsa染色。显微镜下观察各组100个中期分裂相细胞,记录细胞染色体的数目或结构异常情况,计算细胞畸变率。

### 2.3 小鼠骨髓微核实验

取雄性ICR小鼠50只,随机分为5组,每组10只。根据预实验结果[小鼠灌胃给予G004的半数致死量(LD<sub>50</sub>)大于5 000 mg/kg],并按照《药物遗传毒性研究技术指导原则》<sup>[9]</sup>要求,本试验设置3个G004剂量组(625、1 250、2 500 mg/kg),并设溶媒对照组(0.5%羧甲基纤维素溶液)和阳性对照组(环磷酰胺,40 mg/kg)。G004各剂量组与溶媒对照组小鼠均灌胃给药,阳性对照组小鼠腹腔注射给药,给药体积均为20 mL/kg,连续给药3 d。在给药期间及给药结束后观察各组小鼠外观和行为活动等一般情况。末次给药后24 h采集小鼠骨髓,常规制片,在显微镜油镜下观察2 000个嗜多染红细胞(PCE),记录含微核细胞数,计算PCE微核率;在观察PCE的同时记录相同视野下的正染红细胞(NCE)数,当PCE计数达到200个时,计算PCE占总红细胞的比例[PCE个数/(NCE个数+PCE个数)]。

### 2.4 大鼠胚胎-胎仔发育毒性实验

参照文献[9-10]方法,将大鼠按雌性/雄性2:1的比例合笼,每天早上对雌鼠进行阴道涂片检查,显微镜下查见精子视为交配成功,并将当天定为妊娠第0天。取交配成功的雌性大鼠100只按体质量分层随机分为5组,每组20只。根据预实验结果(G004单次灌胃5 000 mg/kg后未引起大鼠死亡),并按照《药物生殖毒性研究

技术指导原则》<sup>[11]</sup>要求,本实验设置G004低、中、高剂量组(100、300、900 mg/kg),另设溶媒对照组(0.5%羧甲基纤维素钠溶液)和阳性对照组(环磷酰胺,3.5 mg/kg)。各组大鼠均灌胃给药,给药体积均为10 mL/kg,连续给药10 d(妊娠第6~15天)。给药期间观察孕鼠外观和行为活动等一般情况。于妊娠第0、3、6、10、13、16、20天时称定大鼠体质量,并称定前一日加食量与当日剩食量以计算当日摄食量。于妊娠第20天时处死孕鼠,剖取胎鼠,记录黄体数、着床数、死胎数、活胎数、体质量、性别、外观异常情况等。取约半数胎鼠固定于Bouin氏液中进行内脏检查,另外的胎鼠固定于75%乙醇中制作骨骼标本后进行骨骼畸形检查。

### 2.5 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行各组间方差齐性检验,若方差齐则进行单因素方差分析,如有统计学差异则进行Tukey检验;若方差不齐则进行非参数检验(Kruskal-Wallis检验),如有统计学差异则各剂量组与对照组间比较采用Mann-Whitney *U*检验。计数资料采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 G004对鼠伤寒沙门氏菌突变株回复突变菌落数的影响

与溶媒对照组比较,阳性对照组回复突变菌落数显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。G004各剂量组平板背景菌均正常;与溶媒对照组比较,在±S9条件下,G004各剂量组的TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535菌株的回复突变菌落数均未显著增加,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。G004的Ames试验结果为阴性,即G004对鼠伤寒沙门氏菌突变株回复突变试验无明显影响。G004对鼠伤寒沙门氏菌突变株回复突变菌落数的影响见表1。

### 3.2 G004对CHL细胞染色体畸变的影响

与溶媒对照组比较,阳性对照组CHL细胞染色体畸变率显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在±S9条件下,G004各剂量组CHL细胞在药物作用不同时间后,

表1 G004对鼠伤寒沙门氏菌突变株回复突变菌落数的影响( $\bar{x} \pm s$ ,个)

Tab 1 Effects of G004 on the number of reverse mutation bacterial colony of *Bacillus breislaviensis* ( $\bar{x} \pm s$ , number)

组别	菌株回复突变菌落数									
	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
G004组(62.5 μg/皿)	148.7±18.4	159.3±20.8	32.3±9.0	38.7±3.8	159.3±21.4	188.0±28.8	271.7±35.4	295.7±25.0	19.7±3.1	22.7±7.2
G004组(125 μg/皿)	150.0±17.1	185.3±16.8	34.0±2.6	38.3±6.1	158.7±15.8	164.0±8.0	251.0±77.4	298.7±49.2	14.3±2.1	20.0±6.1
G004组(250 μg/皿)	129.7±28.4	157.3±13.3	40.0±11.1	43.3±7.5	156.0±20.0	171.3±4.0	249.7±57.4	271.0±38.6	15.7±1.5	22.7±4.2
G004组(500 μg/皿)	143.3±9.1	152.7±29.7	34.0±2.6	42.0±3.6	152.7±14.0	177.0±10.6	242.3±35.1	289.7±50.1	19.3±4.0	22.7±5.5
G004组(1 000 μg/皿)	161.3±11.9	145.7±19.3	36.3±7.8	39.3±10.7	165.0±22.5	165.7±26.3	259.7±27.7	280.0±18.7	14.7±2.1	15.7±1.5
空白对照组	121.7±11.1	176.3±36.9	37.0±6.9	46.3±5.9	155.3±18.6	195.7±27.0	285.0±43.9	308.3±17.8	12.3±2.1	23.0±7.8
溶媒对照组	144.7±11.5	166.3±19.5	32.7±4.2	37.0±12.0	155.3±27.2	200.7±43.1	274.7±62.2	268.7±8.1	11.7±0.6	22.3±4.7
阳性对照组	840.0±115.1*	1 666.7±476.7*	374.7±30.9*	514.0±129.3*	1 286.3±337.1*	2 047.7±190.9*	2 237.7±324.6*	2 605.0±439.5*	285.3±16.5*	330.0±40.0*

注:与溶媒对照组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. solvent control group, \* $P < 0.05$



其染色体畸变率均未显著升高,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。G004的CHL细胞染色体畸变试验结果为阴性,即G004对CHL细胞染色体畸变试验无明显影响。

### 3.3 G004对小鼠骨髓微核的影响

给药期间及给药结束后,G004各剂量组、溶媒对照组和阳性对照组小鼠的外观和行为活动均未出现异常。骨髓涂片结果显示,与溶媒对照组比较,阳性对照组小鼠骨髓PCE微核率显著升高,PCE占总红细胞的比例显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );G004各剂量组小鼠骨髓PCE微核率、PCE占总红细胞的比例差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。G004的小鼠骨髓微核试验结果为阴性,即G004对小鼠骨髓微核试验无明显影响。G004对小鼠骨髓微核的影响见表2。

### 3.4 G004对大鼠胚胎-胎仔发育的影响

3.4.1 G004对孕鼠的影响 给药期间,各组孕鼠外观和行为活动均未见异常,均未表现出明显毒性症状。与

表2 G004对小鼠骨髓微核的影响( $n=10$ )

Tab 2 Effects of G004 on bone marrow micronucleus in mice( $n=10$ )

组别	PCE微核率( $\bar{x}\pm s$ ),%	PCE占总红细胞的比例
G004组(625 mg/kg)	0.40±0.31	0.43
G004组(1 250 mg/kg)	0.60±0.39	0.44
G004组(2 500 mg/kg)	0.75±0.42	0.43
溶媒对照组	0.40±0.39	0.44
阳性对照组	15.55±4.19**	0.19*

注:与溶媒对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. solvent control group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

溶媒对照组比较,G004各剂量组、阳性对照组孕鼠的摄食量差异无统计学意义( $P>0.05$ );阳性对照组孕鼠实验后期体质量增加明显减缓,从妊娠第10天起体质量均显著较低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );G004各剂量组孕鼠体质量差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。这表明G004对孕鼠摄食量和体质量均无明显影响。G004对孕鼠体质量的影响见表3。

表3 G004对孕鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 3 Effects of G004 on body weight of pregnant rats( $\bar{x}\pm s$ )

组别	实际怀孕大鼠数,只	体质量,g							总体质量增加值
		妊娠第0天	妊娠第3天	妊娠第6天	妊娠第10天	妊娠第13天	妊娠第16天	妊娠第20天	
G004低剂量组	18	234.1±15.1	254.9±17.2	276.1±17.4	300.4±19.5	325.6±20.4	349.1±21.0	416.9±22.9	182.8±16.0
G004中剂量组	17	233.2±16.6	250.4±16.9	271.7±18.8	294.0±18.4	319.1±18.6	348.1±17.8	406.5±19.1	173.3±10.3
G004高剂量组	17	233.4±14.7	250.9±15.4	270.1±16.9	294.8±18.0	319.4±19.2	347.6±16.8	401.8±16.7	168.4±7.7
溶媒对照组	18	235.0±17.0	256.7±16.1	279.6±16.3	302.8±16.1	326.4±17.1	356.6±17.1	414.1±20.2	179.1±15.9
阳性对照组	17	235.5±11.4	251.8±10.4	272.4±12.0	292.4±12.0*	313.9±13.0**	338.7±14.3**	391.4±17.8**	155.9±10.6**

注:与溶媒对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. solvent control group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

3.4.2 G004对大鼠妊娠结局的影响 与溶媒对照组比较,阳性对照组大鼠活胎数显著减少,吸收胎数显著增加,子宫总质量、胎盘总质量均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );G004高剂量组的吸收胎数显著增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),该组其他各项指标及G004低、中剂量组各项指标差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。这表明G004剂量为900 mg/kg时可对大鼠妊娠结局产生一定的影响。G004对大鼠妊娠结局的影响见表4。

表4 G004对大鼠妊娠结局的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 4 Effects of G004 on pregnancy outcome of rats ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	实际怀孕大鼠数,只	活胎数,个	死胎数,个	吸收胎数,个	着床数,个	黄体数,个	子宫总质量,g	胎盘总质量,g
G004低剂量组	18	14.1±2.7	0	0.4±0.6	14.5±2.7	14.6±2.6	94.7±13.1	10.1±1.3
G004中剂量组	17	13.9±2.1	0	0.8±1.0	14.8±1.9	14.8±1.9	92.9±10.2	10.1±1.2
G004高剂量组	17	13.4±2.5	0	1.5±1.3*	14.8±2.5	14.8±2.5	91.4±9.5	9.9±1.6
溶媒对照组	18	14.0±2.0	0	0.4±0.5	14.4±2.1	14.6±2.0	94.9±9.8	10.4±1.4
阳性对照组	17	11.4±3.0*	0.1±0.5	2.7±2.1*	14.2±3.5	14.6±2.8	62.8±16.7**	5.9±1.8**

注:与溶媒对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. solvent control group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

3.4.3 G004对胎鼠生长发育的影响 与溶媒对照组比较,阳性对照组胎鼠体质量、顶臀长均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );G004各剂量组上述指标差异

均无统计学意义( $P>0.05$ )。这表明G004对胎鼠生长发育无明显影响。G004对胎鼠生长发育的影响见表5。

表5 G004对胎鼠生长发育的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 5 Effects of G004 on the growth and development of fetal rats( $\bar{x}\pm s$ )

组别	胎鼠样本数,例	性别比(雌/雄)	体质量,g	顶臀长,cm
G004低剂量组	254	1.07±0.71	4.06±0.22	3.85±0.14
G004中剂量组	237	1.15±0.39	4.02±0.25	3.83±0.21
G004高剂量组	227	1.08±0.49	4.01±0.30	3.82±0.20
溶媒对照组	252	1.05±0.44	4.09±0.2	3.85±0.16
阳性对照组	194	0.94±0.36	3.27±0.46*	3.56±0.29*

注:与溶媒对照组比较,\* $P<0.05$

Note: vs. solvent control group,\* $P<0.05$

3.4.4 G004对胎鼠外观、内脏和骨骼的影响 G004各剂量组和溶媒对照组胎鼠外观均未见畸形;G004高剂量组胎鼠的内脏检查亦未见畸形,中、低剂量组未作检查并保留标本;阳性对照组除1例胎鼠样本出现肾积水外,其他样本的外观、内脏等指标亦未见明显异常。

与溶媒对照组比较,阳性对照组102例胎鼠样本中有枕骨骨化不全30例(其中I级骨化不全19例、II级骨化不全9例、III级骨化不全2例)、胸骨畸形42例,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );另有肋骨畸形2例(1例第13肋短小,1例第7肋变长)、尾骨缺失1例,差异均无统计

学意义( $P>0.05$ )。与溶媒对照组比较,G004高剂量组118例胎鼠样本中有枕骨骨化不全21例(其中I级骨化不全13例、II级骨化不全7例、III级骨化不全1例),差异有统计学意义( $P<0.01$ ),而该组其余指标及G004低、中剂量组各项指标差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。这表明G004剂量为900 mg/kg时可对大鼠子代的骨骼发育产生明显影响。G004对胎鼠骨骼发育的影响见表6。

表6 G004对胎鼠骨骼发育的影响(例)

Tab 6 Effects of G004 on skeletal development of fetal rats(case)

组别	胎鼠样本数	骨骼发育畸形			
		头颈骨	胸骨	肋骨	尾骨
G004低剂量组	130	7	20	0	0
G004中剂量组	122	10	25	0	0
G004高剂量组	118	21**	35	3	1
溶媒对照组	131	5	18	0	0
阳性对照组	102	30**	42**	2	1

注:与溶媒对照组比较,\*\* $P<0.01$

Note:vs. solvent control group,\*\* $P<0.01$

#### 4 讨论

虽然多数妊娠期糖尿病患者可通过控制饮食来调节血糖水平,但仍有部分患者需要通过药物治疗来控制血糖。过去临床上认为,胰岛素为治疗妊娠期糖尿病的唯一选择,因为其他口服降糖药有可能会透过胎盘导致胎儿畸形。但近年来研制的第二代磺脲类药物及阿卡波糖等口服降糖药在临床上未发现有致畸作用<sup>[12]</sup>。第一代磺脲类药物的胎盘通透性较大,可自由透过胎盘,由此可能造成死胎或胎儿畸形;而第二代磺脲类药物的胎盘通透性小,即便在母体血药浓度很高时,胎儿的血药浓度仍不超过母体的2%<sup>[13]</sup>。

G004是由中国药科大学新药研究中心研发的新型降血糖化合物,以具有降糖活性的磺酰脲结构为母核连接具有抗血小板聚集活性的化学基团设计而成,除有显著的降血糖作用外,尚可对抗糖尿病患者的血管内皮细胞损伤、血小板聚集、凝血及纤溶功能异常等,有利于糖尿病血管并发症的防治<sup>[2-7,14]</sup>。G004的相对分子量大、血浆蛋白结合率高、半衰期较短,与其他第二代磺脲类药物有相似的药动学特性<sup>[15]</sup>,因此推测其遗传毒性和生殖毒性较传统口服降糖药明显降低。本文首次报道了G004的遗传毒性和生殖毒性。G004的遗传毒性3项试验(Ames试验、CHL细胞染色体畸变试验、小鼠骨髓微核实验)结果均为阴性,表明在本试验条件和用药剂量下,G004无致基因突变或染色体畸变作用,即无明显致突变性。大鼠胚胎-胎仔发育毒性实验结果显示,G004剂量 $\leq 900$  mg/kg时对怀孕大鼠母体无毒性作用,剂量 $\leq 300$  mg/kg时对大鼠子代无致畸作用,表明G004在一定剂量下无明显生殖毒性。

综上所述,G004无明显遗传毒性,在一定剂量下也无明显生殖毒性,总体安全性较好。但此结论仍有待于

后续深入开展G004毒动学研究进行证实。

#### 参考文献

- [1] TONG X, MA H, AMADI SW, et al. Reno-protection of G004, a novel anti-diabetic sulfonylurea in db/db mice[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015, 388(8): 831-841.
- [2] QIAN L, MA L, WU G, et al. G004, a synthetic sulfonylurea compound, exerts anti-atherosclerosis effects by targeting SIRT1 in ApoE -/- mice[J]. *Vascul Pharmacol*, 2017, 89: 49-57.
- [3] HU L, AGBOKPONTO JE, LI X, et al. In vivo and in vitro evidence of the sex-dependent pharmacokinetics and disposition of G004, a potential hypoglycemic agent, in rats[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2015, 40(2): 187-202.
- [4] WU GZ, HONG G, ZHANG WP, et al. Effect of 1-[4-[2-(4-bromobenzenesulfonamino) ethyl]phenylsulfonyl]-3-(trans-4-methylcyclohexyl) urea (I4), a new synthetic sulfonylurea compound, on glucose metabolism in vivo and in vitro[J]. *Arzneimittelforschung*, 2009, 59(11): 550-556.
- [5] 尚利娜, 皋聪, 巫冠中, 等. 新型降血糖化合物G004对kay小鼠糖脂代谢的作用[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(21): 2057-2062.
- [6] 刘晓倩, 巫冠中, 皋聪, 等. 磺酰脲类化合物G004体内外糖代谢的实验研究[J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(19): 1581-1584.
- [7] 张文平, 巫冠中, 刘国卿. G004抗实验性血栓形成作用及机制[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(2): 162-167.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 药物遗传毒性研究技术指导原则[S]. 2007.
- [9] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 300-321.
- [10] 周莉, 孙祖越. 实验用兔和大鼠常见畸形图谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2015: 139-286.
- [11] 国家食品药品监督管理局. 药物生殖毒性研究技术指导原则[S]. 2006.
- [12] 张文杰, 张戎华, 崔艳萍. 口服降糖药在妊娠期糖尿病的应用进展[J]. *中国妇幼卫生杂志*, 2011, 2(4): 188-190.
- [13] KOREN G. Glyburide and fetal safety: transplacental pharmacokinetic considerations[J]. *Reprod Toxicol*, 2001, 15(3): 227-229.
- [14] 巫冠中, 张文平, 吕正兵, 等. 新型磺酰脲类化合物G004对血管内皮细胞的保护作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(10): 1156-1161.
- [15] 李晓宇, 王广基, 巫冠中, 等. 化合物G004在大鼠体内的绝对生物利用度研究[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(6): 698-701.

(收稿日期:2018-05-30 修回日期:2018-10-05)

(编辑:段思怡)