

昆明山海棠提取物对新西兰兔的胚胎-胎仔发育毒性研究[△]

施汀兰*,张莉,黄鹤,梅小利,涂如霞,吴思澜,兰波,李恒华[#](重庆市中药研究院/重庆市药物安全评价中心,重庆 400065)

中图分类号 R285.5;R994.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)14-1710-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.14.09

摘要 目的:研究昆明山海棠提取物对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响。方法:取交配成功的新西兰雌兔,按体质量随机区组法分为溶剂对照组、阳性对照组(环磷酰胺,20 mg/kg)和昆明山海棠提取物高、中、低剂量组(15.0、7.50、3.75 g/kg,以生药量计),每组均至少18只。溶剂对照组和昆明山海棠提取物各剂量组雌兔在妊娠第6~18天灌胃水或相应昆明山海棠提取物药液,5 mL/kg,每天1次;阳性对照组雌兔在妊娠第10~13天于颈部皮下注射环磷酰胺,1 mL/kg,每天1次。依据《药物生殖毒性研究技术指导原则》相关要求,在实验期间观察并记录雌兔的一般情况、体质量和摄食量,并于妊娠第28天时对其实施安乐死,解剖后观察并记录其主要脏器、带胎子宫、胎盘子宫、胎盘、卵巢以及着床腺、吸收胎、死胎、活胎、黄体等相关指标,并对胎仔进行体质量、外观形态、内脏和骨骼发育等相关指标的检查。结果:与溶剂对照组比较,昆明山海棠提取物各剂量组孕兔的体质量、体质量增长、摄食量、主要脏器,孕兔妊娠、生殖功能以及胚胎形成和胎仔的生长发育、外观形态、内脏和骨骼发育等相关指标均未见明显异常改变($P>0.05$);阳性对照组上述指标均有显著变化($P<0.05$),表现出明显的孕兔母体毒性以及胚胎和胎仔发育毒性。结论:昆明山海棠提取物在剂量为3.75~15.00 g/kg(以生药量计)时对新西兰兔无明显母体毒性、胚胎或胎仔发育毒性。

关键词 昆明山海棠;提取物;新西兰兔;胚胎;胎仔;生殖毒性

Study on Toxic Effect of the Extract from *Tripterygium hypoglaucum* on Embryo-fetal Development of New Zealand Rabbits

SHI Tinglan, ZHANG Li, HUANG He, MEI Xiaoli, TU Ruxia, WU Silan, LAN Bo, LI Henghua (Chongqing Academy of Chinese Material Medica/Chongqing Center for Safety Evaluation of Drugs, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the toxic effect of the extract from *Tripterygium hypoglaucum* on pregnant animal and embryo-fetal development. METHODS: Successfully mated New Zealand female rabbits were randomly divided into solvent control group, positive control group (cyclophosphamide, 20 mg/kg) and *T. hypoglaucum* extract high-dose, medium-dose and low-dose groups (15.0, 7.50, 3.75 g/kg, by the amount of crude drug) according to their body weight, with 18 rabbits in each group at least. The female rabbits in solvent control group and *T. hypoglaucum* extract groups were given water or the corresponding *T. hypoglaucum* extract solution from 6th to 18th day of pregnancy, 5 mL/kg, once a day. Positive control group was given cyclophosphamide subcutaneously into the neck from 10th to 13th day of pregnancy, 1 mL/kg, once a day. According to the related requirements of *Technical Guidelines for the Study of Drug Reproductive Toxicity*, the general situation, body weight, body weight increase and food intake of female rabbits were observed and recorded during the experiment, and euthanasia was carried out on 28th day of pregnancy; the relative indexes of main organs, fetal uterus, placenta uterus, placenta, ovary, implantation gland, absorption fetus, stillbirth, live fetus and corpus luteum were observed and recorded after anatomy; the relative indexes of body weight, appearance, visceral and skeletal alterations of the fetus were detected. RESULTS: Compared with solvent control group, the body weight, body weight increase, food intake, main organs, pregnancy of pregnant rabbits, as well as reproductive function, embryo formation, fetal growth and development, appearance, visceral and skeletal development indexes in *T.*

及其性质考察[J].宁夏医科大学学报,2014,36(8):872-

△ 基金项目:国家科技重大专项(No.2017ZX09101002-002-004);重庆市基本科研业务费项目(No.cstc2019jxjl-jbky10005, No.cstc2019-jxjl-jbky120004)

* 助理研究员,硕士。研究方向:中药药理与毒理。电话:023-89029135。E-mail:289643518@qq.com

通信作者:工程师,硕士。研究方向:中药药理与毒理。电话:023-89029135。E-mail:lh8010_2002@163.com

875.

[22] 王思玲,李玉娟,张景海,等.电泳光散射法测定异丙酚微乳剂的动电电位[J].沈阳药科大学学报,2002,19(5):313-315,331.

[23] 马涛.全合一混合液(all in one admixture)的稳定性[J].中国药房,2000,11(2):40-42.

(收稿日期:2020-02-06 修回日期:2020-06-14)

(编辑:陈宏)

hypoglaucum extract groups had no significant abnormal changes ($P>0.05$); above indexes in the positive control group had significant changes ($P<0.05$), and significant maternal toxicity and embryotoxicity were found. CONCLUSIONS: *T. hypoglaucum* extract 15.00-3.75 g/kg (by the amount of crude drug) have no significant maternal toxicity, embryotoxicity or fetal development toxicity to New Zealand rabbits.

KEYWORDS *Tripterygium hypoglaucum*; Extract; New Zealand rabbits; Embryo; Fetal; Reproductive toxicity

昆明山海棠 [*Tripterygium hypoglaucum* (Lévl.) Hutch.] 是卫矛科雷公藤属植物, 又名火把花、粉背雷公藤, 一般以其根部入药, 具有抗炎、调节免疫、抗生育、抗肿瘤、镇痛等多种药理活性^[1-2]; 其在临床多用作免疫抑制剂, 用于治疗类风湿关节炎、红斑狼疮、血管炎、银屑病等症^[1-3], 副作用包括引起女子月经不调、闭经以及导致男子精子减少、精子活动率降低等^[4]。本课题组前期研究发现, 昆明山海棠根的水提物(以下简称“昆明山海棠提取物”) 对雄性大鼠具有明显的生殖毒性, 能导致其睾丸和附睾萎缩并降低睾酮水平^[5-6]。但目前有关其对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响鲜有报道。基于此, 本研究通过胚胎-胎仔发育毒性试验对昆明山海棠提取物的生殖毒性进行考察, 为该药材的进一步研究开发及临床安全应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BS224S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); R2000-15 型电子计重计数秤[奥豪斯仪器(常州)有限公司]; YXQ-LS-50G 型立式高温高压灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 1384A2 型生物安全柜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ZSA302 型体视显微镜(重庆光电仪器有限公司); SZ61 型解剖镜(日本 Olympus 公司); CLW-1020 型纯水机(重庆乾崮仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

昆明山海棠提取物(重庆市中药研究院药化所制备; 药材产地为四川德昌, 采用水提工艺, 每 15 g 生药制得 1 g 提取物); 注射用环磷酰胺(阳性对照, 通化茂祥制药有限公司, 批号: 171201, 规格: 0.2 g/瓶); 戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司, 批号: 922L034); 氯化钠注射液(湖北天圣康迪制药有限公司, 批号: 20180816, 规格: 10 mL: 90 mg); 茜素红、氯化镁(成都市科龙化工试剂厂, 批号分别为 20180403、2018040101); 95% 乙醇、丙三醇、氢氧化钾(重庆川东化工集团有限公司, 批号分别为 20181101、20180501、20180101); 水为纯化水。

1.3 动物

普通级健康新西兰兔, 雌性 100 只, 5~8 月龄, 体质量 3.2~4.4 kg; 雄性 20 只, 5~8 月龄, 体质量 3.3~4.3 kg。动物由重庆市中药研究院实验动物研究所提供, 生产许可证号: SCXK(渝)2017-0006。

2 方法

2.1 溶液配制

取昆明山海棠提取物适量, 用水配制成质量浓度为 3.00、1.50、0.75 g/mL(以生药量计)的溶液, 分别作为高、中、低剂量组药液; 注射用环磷酰胺用氯化钠注射液配制成质量浓度为 20 mg/mL 的药液。

2.2 动物交配与分组 给药

雌雄兔按 1:1 比例合笼交配。以雄兔在笼内追逐雌兔、雌兔接受爬跨交配动作后确认交配成功, 并将成功交配当日定为该雌兔妊娠第 0 日(简称为“GD0”, 以下类推)。交配成功的雌兔根据体质量按随机区组法分为溶剂对照组、阳性对照组和昆明山海棠提取物高、中、低剂量组(各组均至少 18 只)。阳性对照组雌兔于颈部皮下注射环磷酰胺(20 mg/kg, 剂量和给药途径参照相关文献^[7]及本研究预实验结果设置), 注射体积为 1 mL/kg, 在 GD10~GD13 时给药, 每天 1 次; 昆明山海棠提取物高、中、低剂量组雌兔灌胃昆明山海棠提取物溶液(15.00、7.50、3.75 g/kg, 按生药量计; 剂量参照本课题组前期雄性大鼠体内实验结果设置), 灌胃体积为 5 mL/kg, 在 GD6~GD18 时给药, 每天 1 次; 溶剂对照组雌兔灌胃等容水, 给药频次同昆明山海棠提取物各剂量组。

2.3 指标观察及测定

依据《药物生殖毒性研究技术指导原则》相关要求^[8], 解剖观察和记录雌兔妊娠相关指标, 并对胎仔进行相关指标检查以及内脏、骨骼标本制作。

2.3.1 亲代雌兔 于实验期间观察亲代雌兔的一般情况, 测定并记录其体质量、摄食量。在 GD28 时称定雌兔体质量并采用吸入 CO₂ 的方式实施安乐死后, 对其主要脏器(心、肝、脾、肺、肾等)进行大体解剖观察。沿接近卵巢部位的左子宫角到阴道剪开子宫肌层, 将胎仔剥离胎盘, 记录胎盘肉眼观察结果; 称定带胎子宫总质量以及胎盘子宫、胎盘、卵巢的质量, 记录黄体数、着床数、着床腺数、吸收胎数、死胎数、活胎数, 并计算子宫质量(子宫质量=胎盘子宫质量-胎盘质量)。计算子宫、卵巢脏体系数; 子宫和卵巢用 10% 中性福尔马林溶液固定, 必要时进行组织病理学检查; 其他组织器官, 若肉眼观察可见病变, 则同法固定后进行组织病理学检查, 同时取相应的对照组亲代雌兔器官行对比检查。有吸收胎孕兔率、有死胎孕兔率、妊娠率、着床后丢失率、总丢失率等相关指标参照文献方法^[9]计算。

2.3.2 胎仔 观察胎仔外观,测量并记录胎兔体质量、身长。所有存活胎兔以2.5%戊巴比妥钠溶液腹腔注射实施安乐死后进行内脏和骨骼检查。胎兔的心脏、脑、肾脏用10%氯化镁溶液+10%中性福尔马林溶液固定后,以显微解剖法进行检查;其余内脏均以新鲜器官组织行显微解剖法检查;骨骼标本用95%乙醇固定和茜素红染色后检查。窝雌/雄仔比、四肢/尾/头/躯干畸形率、骨骼畸形/变异率等相关指标参照文献方法^[9]计算。

2.4 统计学方法

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。胎仔以窝别为单位统计。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较;计数资料以只数或率表示,采用 χ^2 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 亲代雌兔一般情况

各组雌兔均未出现死亡,行为活动正常,精神状态良好,被毛清洁、无竖毛,未见阴道出血及流产,也未见其他毒性症状出现。与溶剂对照组比较,阳性对照组雌兔体质量在GD18、GD21、GD25、GD28时均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),体质量增长在GD9~GD12、GD15~GD18、GD6~GD28期间均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其余各给药组亲代雌兔体质量及体质量增长与溶剂对照组比较,各组亲代雌兔的摄食量组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。昆明山海棠提取物对亲代雌兔体质量、体质量增长、摄食量的影响见表1~表3(注:表中数据已剔除假孕雌兔的相关指标结果,下同)。

表1 昆明山海棠提取物对亲代雌兔体质量的影响($\bar{x} \pm s, \text{kg}$)

Tab 1 Effects of *T. hypoglaucum* extract on body weight of female parent rabbits($\bar{x} \pm s, \text{kg}$)

时间点	溶剂对照组 (n=17)	昆明山海棠提 取物高剂量组 (n=16)	昆明山海棠提 取物中剂量组 (n=17)	昆明山海棠提 取物低剂量组 (n=17)	阳性对照组 (n=17)
GD0	3.80±0.20	3.86±0.23	3.84±0.22	3.86±0.21	3.78±0.23
GD3	3.88±0.21	3.99±0.23	3.91±0.23	3.90±0.19	3.87±0.23
GD6	3.97±0.24	4.05±0.25	3.96±0.22	3.98±0.22	3.93±0.22
GD9	4.01±0.22	4.10±0.25	4.01±0.23	4.01±0.20	3.99±0.22
GD12	4.08±0.19	4.12±0.24	4.07±0.22	4.06±0.20	3.99±0.25
GD15	4.20±0.20	4.20±0.25	4.16±0.25	4.13±0.19	4.05±0.27
GD18	4.31±0.24	4.25±0.24	4.22±0.24	4.20±0.19	4.08±0.29*
GD21	4.37±0.28	4.32±0.25	4.28±0.25	4.27±0.20	4.13±0.28*
GD25	4.46±0.27	4.43±0.25	4.38±0.28	4.38±0.24	4.21±0.27*
GD28	4.56±0.33	4.54±0.26	4.45±0.27	4.47±0.22	4.26±0.28**

注:与溶剂对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

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

3.2 亲代雌兔解剖检查相关指标检测结果

各组亲代雌兔主要脏器解剖检查均未见异常。与溶剂对照组比较,阳性对照组孕兔的终末体质量和带胎子宫、胎盘子宫、子宫的质量均显著降低($P < 0.01$);子

表2 昆明山海棠提取物对亲代雌兔体质量增长的影响($\bar{x} \pm s, \text{g}$)

Tab 2 Effects of *T. hypoglaucum* extract on body weight increase of female parent rabbits($\bar{x} \pm s, \text{g}$)

时间段	溶剂对照组 (n=17)	昆明山海棠提 取物高剂量组 (n=16)	昆明山海棠提 取物中剂量组 (n=17)	昆明山海棠提 取物低剂量组 (n=17)	阳性对照组 (n=17)
GD0~GD6	170.02±124.43	187.94±98.53	123.62±82.90	117.72±123.12	146.63±98.42
GD6~GD9	41.60±79.51	46.82±78.40	51.72±68.03	37.13±66.83	62.71±47.60
GD9~GD12	69.52±91.31	28.91±70.82	56.31±68.22	45.90±58.02	-3.43±65.61*
GD12~GD15	115.04±91.92	79.63±66.02	90.03±59.81	68.51±43.92	57.82±53.83
GD15~GD18	111.13±79.50	49.84±47.02	62.02±67.11	73.14±56.83	36.11±97.02*
GD18~GD28	258.02±158.52	281.23±129.71	226.64±112.23	267.23±93.32	174.73±106.82
GD6~GD28	595.23±213.54	486.22±179.41	486.62±183.02	491.90±150.91	327.89±194.56**

注:与溶剂对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

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

表3 昆明山海棠提取物对亲代雌兔摄食量的影响($\bar{x} \pm s, \text{g/d}$)

Tab 3 Effects of *T. hypoglaucum* extract on food intake of female parent rabbits($\bar{x} \pm s, \text{g/d}$)

时间点	溶剂对照组 (n=17)	昆明山海棠提 取物高剂量组 (n=16)	昆明山海棠提 取物中剂量组 (n=17)	昆明山海棠提 取物低剂量组 (n=17)	阳性对照组 (n=17)
GD0	173.71±16.23	173.21±15.30	171.12±14.82	168.72±18.81	174.52±15.22
GD6	177.22±12.90	177.42±10.03	177.03±10.61	171.43±18.02	175.41±14.11
GD12	171.61±13.24	172.61±13.03	180.89±9.42	171.89±16.71	169.82±13.60
GD20	179.10±10.32	179.12±7.63	177.52±13.21	180.20±11.12	183.33±8.82
GD27	205.12±5.62	201.82±10.41	204.02±9.13	206.11±7.23	197.62±15.80

宫脏体系数显著升高($P < 0.01$);活胎数显著减少,总丢失率显著升高($P < 0.05$)。与溶剂对照组比较,昆明山海棠提取物各剂量组的未孕兔数、孕兔数、有吸收胎孕兔数、有死胎孕兔数、有活胎孕兔数、有吸收胎孕兔率、有死胎兔率、妊娠率等指标差异均无统计学意义($P > 0.05$);孕兔终末体质量和带胎子宫、胎盘子宫、胎盘、子宫、卵巢的质量差异均无统计学意义($P > 0.05$);孕兔子宫脏体系数、卵巢脏体系数、黄体数、着床数、着床腺数、吸收胎数、死胎数、活胎数、着床后丢失率、总丢失率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。昆明山海棠提取物对亲代雌兔相关指标的影响见表4~表5。

3.3 胎仔生长发育指标检测结果

与溶剂对照组比较,阳性对照组的窝胎仔总质量、窝胎仔均质量、窝胎仔均身长均显著降低,四肢畸形率(主要表现为并趾、少趾、足内翻、前肢屈曲过度、前肢活动受限)、尾畸形率(主要表现为短尾、卷尾)、头畸形率(主要表现为腭裂、露舌、唇裂、眼球突出)和窝别外观畸形率均显著升高($P < 0.05$);胎仔内脏畸形率和窝别内脏畸形率均显著升高($P < 0.05$),主要表现为肾脏小,其余脏器检查未见明显异常;胎仔颅骨变异率、腰椎骨化数、骶尾椎畸形和变异率、胸骨节变异率、前肢畸形和变异率、后肢畸形率、骨骼窝变异和畸形率均显著增加或

表4 昆明山海棠提取物对亲代雌兔妊娠结局指标的影响

Tab 4 Effects of *T. hypoglaucum* extract on pregnant outcome indexes of female parent rabbits

检测指标	溶剂对照组	昆明山海棠提取物高剂量组	昆明山海棠提取物中剂量组	昆明山海棠提取物低剂量组	阳性对照组
交配成功雌兔数,只	18	18	18	18	18
内脏异常雌兔数,只	0	0	0	0	0
未孕兔数,只	1	2	1	1	1
孕兔数,只	17	16	17	17	17
有吸收胎孕兔数,只	5	2	4	2	6
有死胎孕兔数,只	6	3	2	4	8
有活胎孕兔数,只	17	15	17	17	15
有吸收胎孕兔率,%	29.4	12.5	23.5	11.8	35.3
有死胎孕兔率,%	35.3	18.8	11.8	23.5	47.1
妊娠率,%	100	93.8	100	100	88.2

表5 昆明山海棠提取物对亲代雌兔生殖功能及胚胎形成指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Effects of *T. hypoglaucum* extract on the reproductive function and embryo formation indexes of female parent rabbits($\bar{x} \pm s$)

检测指标	溶剂对照组 (n=17)	昆明山海棠提取物高剂量组 (n=16)	昆明山海棠提取物中剂量组 (n=17)	昆明山海棠提取物低剂量组 (n=17)	阳性对照组 (n=17)
终末体质量,kg	4.56±0.33	4.54±0.26	4.45±0.27	4.47±0.22	4.26±0.28**
带胎子宫质量,g	579.43±114.21	520.11±155.02	511.51±130.72	490.78±143.02	304.03±145.21**
胎盘子宫质量,g	129.52±24.73	112.89±32.82	112.31±30.23	108.42±30.33	83.20±32.53**
胎盘质量,g	6.08±1.14	5.63±0.97	5.56±1.16	5.73±1.21	5.33±1.35
子宫质量,g	65.87±11.63	59.88±16.30	58.96±16.95	58.42±17.66	46.39±13.91**
卵巢质量,g	1.10±0.29	1.09±0.20	1.06±0.26	1.04±0.31	1.01±0.24
子宫脏体系数,g/100 g	1.44±0.23	1.32±0.37	1.33±0.38	1.30±0.36	1.08±0.30**
卵巢脏体系数,g/100 g	0.024±0.005	0.024±0.004	0.024±0.006	0.023±0.006	0.024±0.005
黄体数,个	12.2±2.2	11.9±1.4	12.1±2.2	11.8±2.0	11.5±3.1
着床数,个	11.3±2.2	10.1±3.0	10.4±3.1	9.8±2.9	9.9±2.9
着床腺数,个	0.0±0.0	0.1±0.3	0.0±0.0	0.1±0.5	0.7±2.3
吸收胎数,个	0.3±0.5	0.1±0.3	0.4±0.7	0.1±0.3	0.9±1.7
死胎数,个	0.5±0.8	0.4±1.3	0.1±0.3	0.5±1.3	1.1±1.6
活胎数,个	10.5±2.1	9.4±3.2	9.9±2.9	9.1±2.7	7.3±4.1†
着床后丢失率,%	6.7±7.8	5.0±11.5	4.1±6.6	5.5±9.3	19.7±21.6
总丢失率,%	13.0±12.8	20.3±23.3	18.6±20.7	20.8±21.6	30.2±20.6†

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

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

升高,胸椎骨化数、骶尾椎骨化数、肋骨骨化数、前肢骨化数、后肢骨化数均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与溶剂对照组比较,昆明山海棠提取物各剂量组的窝胎仔总数、窝胎仔均数、窝雌仔比、窝雄仔比,四肢、尾、头和躯干的畸形率以及窝别外观畸形率等指标差异均无统计学意义($P>0.05$);昆明山海棠提取物高剂量组胎仔内脏、骨骼指标以及窝变异和畸形率等指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。昆明山海棠提取物对胎仔生长发育指标的影响见表6~表9。

4 讨论

根据国家食品药品监督管理局(SFDA)颁布的《药物生殖毒性研究技术指导原则》,药物生殖发育毒性非

表6 昆明山海棠提取物对胎仔外观指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 6 Effects of *T. hypoglaucum* extract on fetal appearance indexes($\bar{x} \pm s$)

检测指标	溶剂对照组 (n=17)	昆明山海棠提取物高剂量组 (n=15)	昆明山海棠提取物中剂量组 (n=17)	昆明山海棠提取物低剂量组 (n=17)	阳性对照组 (n=15)
窝胎仔总数,个	179	151	168	154	124
窝胎仔均数,个	10.5±2.1	10.1±2.0	9.9±2.9	9.1±2.7	8.3±3.3
窝胎仔总质量,g	396.21±75.52	383.41±71.03	356.78±94.22	329.43±84.82	210.01±80.63**
窝胎仔均质量,g	37.81±3.18	38.37±3.47	36.95±4.68	37.52±6.04	25.82±4.39**
窝胎仔均身长,cm	93.79±2.75	94.62±2.21	93.13±3.83	93.51±5.60	79.39±7.27**
窝雌仔比,%	54.8±14.8	46.9±22.3	54.6±19.3	46.8±17.4	47.3±20.1
窝雄仔比,%	45.2±14.8	53.1±22.3	45.4±19.3	53.2±17.4	52.7±20.1
四肢畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	83.7±31.4**
尾畸率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	29.0±38.1**
头畸率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	99.0±3.7**
躯干畸率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	6.7±25.8
窝别外观畸形率,%	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0**

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

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

表7 昆明山海棠提取物对胎仔内脏指标的影响

Tab 7 Effects of *T. hypoglaucum* extract on fetal viscera indexes

检测指标	溶剂对照组	昆明山海棠提取物高剂量组	阳性对照组
窝胎兔数/窝数	179/17	151/15	124/15
肾脏畸形数	0/179	0/151	12/124
肾脏畸形窝数	0/17	0/15	6/15
内脏畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	11.5±21.5*
窝别内脏畸形率,%	0.0	0.0	40.0*

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$

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

临床研究的方法主要包括生育力与早期胚胎发育毒性试验、胚胎-胎仔发育毒性试验和围产期毒性试验等^[8]。其中,胚胎-胎仔发育毒性试验的给药时限是从胚胎着床到硬腭闭合阶段,可用于评价药物对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响^[7-8]。

根据昆明山海棠片对雄性大鼠的生殖毒性及作用机制的前期研究结果,以5.0、10.0、20.0 g/kg(以生药量计)等3个剂量连续90 d灌胃给药后,与正常对照组(即溶剂对照)比较,10.0 g/kg剂量组大鼠的睾酮水平显著降低,各剂量组大鼠睾丸和附睾出现萎缩,两者的脏器质量和指数均显著降低;停止给药30 d后,大鼠生殖系统组织形态未见完全恢复^[5-6]。本课题组前期通过SD大鼠I阶段生殖毒性实验发现,昆明山海棠提取物按2.5、5.0、10.0 g/kg(以生药量计)等3个剂量灌胃给药对雄性大鼠具有明显的生殖毒性。本研究预实验结果显示,对雌兔按15.0、7.5 g/kg(以生药量计)的剂量灌胃昆明山海棠提取物后,15.0 g/kg剂量组孕兔出现流产、活胎数减少、早期吸收胎数增加等现象,而7.5 g/kg剂量组孕兔未见供试药物相关的毒性反应或异常改变。根据《药物生殖毒性研究技术指导原则》^[8]及相关文献^[10-13],结合本课题组前期研究结果,本研究将昆明山海棠提取物的高、

中、低剂量分别设定为 15.00、7.50、3.75 g/kg(以生药量计)。

表 8 昆明山海棠提取物对胎仔骨骼指标的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 8 Effects of *T. hypoglauca* extract on fetal bone indexes($\bar{x} \pm s$)

检测指标	溶剂对照组(n=17)	昆明山海棠提取物高剂量组(n=15)	阳性对照组(n=15)
窝胎仔受检数,个	10.5±2.1	10.1±2.0	8.3±3.3
枕骨发育V级率,%	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
颅骨畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	9.5±20.7
颅骨变异率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	70.0±44.6**
颈椎骨化数,个	7.0±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0
颈椎畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	9.0±22.9
颈椎变异率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±2.6
胸椎骨化数,个	12.6±0.3	12.6±0.3	12.3±0.3*
胸椎畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	4.4±11.7
胸椎变异率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	2.7±10.3
腰椎骨化数,个	6.4±0.3	6.4±0.3	6.7±0.3*
腰椎畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
腰椎变异率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	5.5±12.2
骶尾椎骨化数,个	20.0±0.4	19.8±1.0	18.0±1.7**
骶尾椎畸形率,%	1.1±3.2	2.8±8.7	56.1±31.8**
骶尾椎变异率,%	0.0±0.0	3.5±11.5	36.0±37.0**
胸骨节骨化数,个	5.9±0.1	5.9±0.1	5.7±0.3
胸骨节畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	4.2±14.1
胸骨节变异率,%	6.8±10.8	10.6±9.8	24.5±22.8*
肋骨骨化数,个	12.6±0.3	12.6±0.3	12.3±0.3**
肋骨畸形率,%	0.0±0.0	1.4±3.7	0.6±2.3
肋骨变异率,%	21.8±21.0	19.5±15.1	22.4±24.1
前肢骨化数,个	19.0±0.0	19.0±0.0	12.4±4.0**
前肢畸形率,%	0.7±3.0	0.0±0.0	90.0±19.7**
前肢变异率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	33.4±36.7**
后肢骨化数,个	16.0±0.0	16.0±0.0	13.9±2.5**
后肢畸形率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	50.1±37.6**
后肢变异率,%	0.0±0.0	0.0±0.0	3.1±9.6

注:与溶剂对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

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

表 9 昆明山海棠提取物对胎仔窝别骨骼变异和畸形指标的影响

Tab 9 Effects of *T. hypoglauca* extract on fetal skeletal variation and deformity indexes

指标	溶剂对照组	昆明山海棠提取物高剂量组	阳性对照组
受检窝数	17	15	15
变异窝数	14	14	15
窝变异率,%	82.4	93.3	100**
畸形窝数	1	3	15
窝畸形率,%	5.9	20.0	100**

注:与溶剂对照组比较,** $P < 0.01$

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

在本实验条件下,新西兰兔在GD6~GD18时灌胃高、中、低剂量昆明山海棠提取物后均未见明显母体毒性或胚胎及胎仔发育毒性。而阳性对照组在给予环磷酰胺 20 mg/kg 剂量条件下,可见明显的母体毒性和胚胎及胎仔发育毒性:母体毒性主要表现为孕兔体质量和体质量增长均显著降低,带胎子宫、胎盘子宫、子宫的质量以及子宫脏体系数均显著降低,活胎数显著减少,总丢失率显著升高;胚胎毒性主要表现为胎仔的窝胎仔总质

量、窝胎仔均质量、窝胎仔均身长均显著降低,四肢、尾、头畸形率以及窝别外观畸形率均显著升高,内脏畸形率以及骨骼畸形和变异率均显著升高。这与以往研究报道^[14-15]的结果类似。

综上,昆明山海棠提取物在剂量为 3.75~15.00 g/kg(以生药量计)时对新西兰兔无明显母体毒性、胚胎或胎仔发育毒性。本研究可为昆明山海棠提取物进一步研究开发及临床应用提供实验依据,下一步有必要进行该药材提取物对妊娠/哺乳期雌鼠以及其胚胎和子代发育影响的研究,以期更全面地评价该药材的生殖毒性。

参考文献

- [1] 谢晨琼,周萍,李祥,等.昆明山海棠化学成分及药理作用和临床应用研究进展[J].中草药,2015,46(13):1996-2010.
- [2] 李贤光,何黎.昆明山海棠与雷公藤药理学对照研究[J].昆明医学院学报,2006,27(2):107-110.
- [3] 张莹,方勇飞,王勇.昆明山海棠药理作用及临床应用研究进展[J].人民军医,2008,51(7):463-464.
- [4] 王钺,隆长锋.中药昆明山海棠的研究进展[J].医学综述,2006,12(11):691-692.
- [5] 黄思行,刘剑毅,黄文涛,等.昆明山海棠片所致大鼠睾丸损伤的病理学研究[J].生殖与避孕,2011,31(8):514-519.
- [6] 刘剑毅,罗先钦,黄思行,等.昆明山海棠对大鼠睾丸功能相关酶活性的影响[J].毒理学杂志,2011,25(4):290-292.
- [7] 孔菲菲,张彤,龚夏实,等.兔胚胎-胎仔发育毒性试验中环磷酰胺给药方式的探讨[J].中国比较医学杂志,2017,27(7):93-97.
- [8] 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].2006-11.
- [9] 袁伯俊,廖明阳,李波.药物毒理学实验方法学与技术[M].北京:化学工业出版社,2007:345-365.
- [10] 孙祖越,周莉.药物生殖与发育毒理学[M].上海:上海科学技术出版社,2015:305-310.
- [11] 孙祖越,周莉,闫晗,等.如何成功地开展药物临床前生殖毒性试验[J].中国新药杂志,2011,20(22):2195-2204.
- [12] 孙祖越,周莉,闫晗,等.生育调节药物非临床安全性评价的特殊性[J].中国药理学通报,2012,28(4):445-450.
- [13] 孙祖越,周莉,闫晗,等.药物非临床生殖发育毒性试验中逐案原则的建议[J].中国新药杂志,2012,21(8):836-843.
- [14] 周莉,姜娟,陈颖,等.环磷酰胺不同给药方式对孕兔胎仔致畸作用的比较[J].中国新药杂志,2013,22(13):1505-1509.
- [15] 周莉,姜娟,王永,等.环磷酰胺对新西兰兔胚胎-胎仔发育的毒性作用研究[J].药物不良反应杂志,2013,15(2):87-92.

(收稿日期:2020-02-06 修回日期:2020-05-31)

(编辑:段思怡)