

坤泰胶囊对大鼠胚胎和胎仔的发育毒性研究

龚立, 刘昆, 张云, 龚华云, 王玮*

四川抗菌素工业研究所 中国医药集团安全性评价研究中心, 四川 成都 610052

摘要: 目的 评价 SD 孕鼠在致畸敏感期(怀孕第 6~15 天) ig 给予坤泰胶囊溶液对 SD 大鼠的母体毒性、胚胎-胎仔毒性和致畸性。方法 雌性 SD 大鼠低、中、高剂量组在怀孕第 6~15 天内分别 ig 给予 2.5、5、10 g/(kg·d) 坤泰胶囊成品粉溶液, 对照组给予双蒸水。试验期内每天观察动物的一般情况和临床毒性表现; 记录孕鼠的体质量; 在怀孕第 20 天进行剖腹检查, 摘取卵巢和子宫, 观察黄体数、着床数、胚胎生存及死亡情况、生存胎仔的外观、性别、体质量、骨骼及脏器发育等指标。结果 孕鼠及胚胎、胎仔发育的上述各观察指标未见明显异常, 与对照组比较无显著差异。结论 在本实验条件下, 坤泰胶囊成品粉未见明显的母体毒性与胚胎和胎仔发育毒性。

关键词: 坤泰胶囊成品粉; SD 大鼠; 胚胎-胎仔毒性; 致畸性

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)05-0337-06

Development toxicity of Kuntai Capsule powder on embryo and fetus of rats

GONG Li, LIU Kun, ZHANG Yun, GONG Hua-yun, WANG Wei

Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Sinopharm Center for Safety Evaluation, Chengdu 610052, China

Abstract: Objective To evaluate the matrix toxicity, embryo-fetal toxicity, and teratogenicity of ig administration with Kuntai Capsule powder on SD rats in sensitive period to teratogenic agent (day 6—15 of pregnancy). **Methods** Female rats were administrated with Kuntai Capsule powder solution [2.5, 5, 10 g/(kg·d)] at day 6—15 of pregnancy, while the rats in control group were given double distilled water. In the trial period, general conditions and clinical toxicity performance of the animals were observed daily, and body weight of rats was recorded. SD rats were sacrificed at day 20 after pregnancy. The luteal number, nidation sites, embryo survival and death, the appearance, sex, weight, bone and organ development indicators of survival fetus were observed. **Results** There were no statistical significance between Kuntai Capsule group and control group in above indexes. **Conclusion** Kuntai Capsule does not have obvious toxicity on embryo and fetus of rats under the conditions in this paper.

Key words: Kuntai Capsule powder; SD rats; embryo and fetal toxicity; teratogenicity

坤泰胶囊由熟地黄、黄连、白芍、黄芩、阿胶、茯苓组成, 临床广泛用于治疗围绝经期综合征、卵巢储备功能不足相关的不孕、卵巢早衰等病症, 但本药对胚胎和胎仔发育毒性研究未见报道。本研究采用 SD 大鼠, 对坤泰胶囊成品粉的胚胎和胎仔发育毒性进行初步探讨。

1 材料和方法^[1]

1.1 供试品及试剂

坤泰胶囊成品粉浸膏, 批号 100702, 由贵阳新天药业股份有限公司提供。用双蒸水溶解至所需浓度。0.9%氯化钠注射液。

1.2 动物及分组

SD 大鼠由上海斯莱克实验动物有限公司提供,

许可证号 SCXK(沪)2007-0005。鼠全价颗粒饲料由上海斯莱克实验动物有限公司生产, 许可证号为沪饲审(2008)-04002。动物饲养室温度 20~25℃, 相对湿度 40%~70%, 12 h 光照/12 h 黑暗周期。换气次数为 10~15 次/h。

新购入 SD 大鼠适应环境一周以上并确定为健康动物后开始试验。大鼠交配: 将大鼠按雌雄为 2:1 的比例合笼, 每日早晨检查阴栓及阴道涂片检查精子, 以发现阴栓、精子的当天作为怀孕第 0 天。坤泰胶囊低、中、高剂量组分别给药 2.5、5.0、10.0 g/(kg·d)。将受精大鼠按体质量由大到小编号, 按照高剂量组-中剂量组-低剂量组-对照组-对照组-低剂量组-中剂量组-高剂量组的顺序, 分配到各组。

收稿日期: 2012-06-29

*通讯作者 王玮, 研究方向为药理毒理。E-mail: wangwei_ww@163.com

在非给药期, 每天观察一次; 在给药期间 (怀孕第 6~15 天), 每天给药前和给药后观察是否死亡、濒死、活动状况、外观及被毛、有无外伤、粪便情况等。

1.3 摄食量测定

每周记录 2 次大鼠 24 h 摄食量。所用仪器为 TE2101—L 型电子天平。测定方法: 第一次测定每一笼给料量, 第二次大致相同的时间测定剩余饲料量, 以二者的差值除以间隔天数, 计算每一只动物的 24 h 摄食量。

1.4 F₀ 母鼠体质量测定

记录怀孕第 0、3 天, 给药期间 (怀孕第 6、9、12、15、18 天) 及怀孕第 20 天 (解剖当天) 雌鼠体质量。

1.5 F₀ 母鼠大体解剖检查

在雌鼠怀孕第 20 天, 将雌鼠处死, 进行大体尸解检查。各组肉眼观察发现异常的器官、组织与对照组一同进行固定保存, 必要时进行组织病理学检查。

1.5.1 雌鼠剖腹产检查 观察生殖力: 记录黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数和死胎数, 妊娠子宫质量和胎盘总质量, 活胎的性别。

1.5.2 F₁ 胎仔外观检查 观察胎仔头、颈、躯干及四肢有无畸形, 并测量每一胎仔体质量。记录于胎仔外观检查表。

1.5.3 F₁ 胎仔脏器检查 每窝取双号位胎仔用 Bouin's 液固定, 胎仔的头部采用 Wilson 粗大切片法^[2]、胸部及腹部根据显微解剖法^[3]检查内脏有无畸形与变异, 进行内脏检查时进一步核对性别。

1.5.4 F₁ 胎仔骨骼检查 每窝取单号位胎仔, 经 95% 酒精固定后, 采用 Staples 等的方法制作茜系红 S 染色透明骨骼标本, 显微镜下观察骨骼畸形、骨骼变异及骨化程度, 依次检查高、中、低剂量组,

取出胎仔内脏时核对性别。

1.6 统计处理

采用 SPSS 软件进行统计分析, 计量资料采用 *t* 检验分析, 计数资料采用秩和检验。各组怀孕期雌鼠体质量及体质量增长量、胎仔体质量、胎盘均质量, 黄体数、着床数、活胎数和胎仔骨化点数的均数比较用单因素方差分析。如果均数间存在显著差异, 且方差齐, 采用 Dunnett's 检验; 如果均数间存在显著差异, 但方差不齐, 采用 Dunnett's T3 检验。死胎数、吸收胎数 (早期、晚期和总吸收数) 用非参数统计的 Kruskal-Wallis 秩和检验。流产率、早产率、母体死亡率及胎仔外观、内脏和骨骼畸形发生率数据用 Fisher 精确概率法检验组间的差异性。

2 结果

2.1 临床表现和大体解剖检查

试验期间, 坤泰胶囊成品粉各剂量组和对照组雌鼠外观状态良好, 行为活动基本正常, 未出现与药物毒性相关的动物死亡。大体解剖检查, 未发现与给药有关的雌鼠脏器病变。

2.2 雌鼠体质量

F₀ 代动物组平均体质量和体质量改变量见表 1。与对照组相比, 坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组雌鼠第 3、6、9、12、15、18、20 天体质量、怀孕第 6~20 天体质量增量、校正增量无显著差异。坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组试验中未出现与给药有关的雌鼠体质量、怀孕第 6~20 天增量和校正增量的改变。

2.3 摄食量

雌鼠摄食量见表 2。与对照组相比, 坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组雌鼠摄食量无显著差异。坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组试验中未出现与给药有关的雌鼠摄食量的改变。

表 1 怀孕雌鼠平均体质量及体质量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Average weight and weight change of pregnant female rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	n	体质量/g								体质量增量/g	
			第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天	第 18 天	第 20 天	第 6~20 天	校正增量 [#]
对照	—	22	245.9±18.9	270.7±17.2	280.8±19.6	294.2±20.9	318.7±22.0	339.0±22.6	384.6±28.8	416.7±30.2	135.9±20.4	48.4±13.2
坤泰胶囊	2.5	23	240.9±19.3	263.9±19.8	278.9±21.6	289.4±24.3	312.8±28.1	332.8±28.2	369.0±37.8	394.7±53.2	115.8±42.8	45.2±29.9
	5.0	23	242.7±17.7	261.5±18.6	277.5±19.7	294.8±18.1	317.2±18.9	331.0±20.0	373.9±27.2	400.6±30.6	123.2±29.8	49.2±10.7
	10.0	24	250.2±24.8	271.4±23.8	285.4±22.2	303.3±19.5	321.9±18.7	341.5±23.5	381.9±32.3	405.2±45.6	120.8±39.3	48.6±20.6

[#]校正增量: 6~20 d 增量减去怀孕子宫质量。

[#]Correction: increment during 6—20 d minus quality of pregnant uterus

表2 坤泰胶囊大鼠生殖毒性试验雌鼠摄食量 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Food consumption of female rats treated with Kuntai Capsule in genotoxicity tests ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	n	摄食量/g						
			第0天	第3天	第6天	第9天	第12天	第15天	第18天
对照	—	22	20.6±2.5	21.0±4.0	25.7±2.9	25.4±2.7	23.1±4.2	25.8±4.7	25.3±4.6
坤泰胶囊	2.5	23	22.5±5.5	21.7±2.5	22.8±3.4	23.8±4.4	23.7±5.2	24.3±5.7	26.0±9.4
	5.0	23	22.2±2.5	23.8±4.4	21.3±6.3	24.6±1.7	25.2±6.9	23.9±4.8	27.1±4.0
	10.0	24	22.7±3.4	21.8±4.1	22.5±4.3	25.2±3.8	23.8±4.1	24.2±5.4	27.3±5.3

2.4 雌鼠剖腹检查

雌鼠剖腹检查结果见表3。与对照组相比,坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组的流产率、早产率、平均黄体数、平均着床数、平均活胎仔数、死胎数、平均吸收胎数、平均浸软胎数、胎盘均质量、有活胎的雌鼠数、有吸收胎的雌鼠数百分率无显著差异。与

对照组相比,坤泰胶囊中、高剂量组胎仔体质量无显著差异。与对照组相比,坤泰胶囊成品粉低剂量组胎仔体质量减轻,有显著差异,但胎仔体质量减轻没有剂量反应关系,故无生物学意义。

结果可见坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组未出现与给药有关的雌鼠剖腹检查数据的改变。

表3 坤泰胶囊大鼠生殖毒性试验雌鼠及子代剖腹产数据总结

Table 3 Generation data of female rats and F1

观测指标	对照组	坤泰胶囊/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)		
		2.5	5.0	10.0
怀孕雌鼠数	22	23	23	24
流产数	0	0	0	0
早产数	0	0	0	0
雌鼠死亡数	0	0	0	0
剖腹产时怀孕雌鼠数	22	23	23	24
有活胎仔雌鼠数	22	23	23	24
全部吸收胎雌鼠数	0	0	0	0
有吸收胎雌鼠数	5	6	7	7
有死胎的雌鼠数	0	0	1	2
黄体数	394	355	353	346
每只动物的平均黄体数	18±3	15±5	15±5	15±6
着床数	321	281	284	289
每只动物的平均着床数	15±3	12±5	12±5	12±6
死胎数	0	0	1	2
胎仔死亡率	0	0	0.4	0.7
总吸收胎数	5	10	12	10
每只动物的平均吸收胎数	0.2±0.4	0.4±0.8	0.5±0.9	0.4±0.9
浸软胎数	0	2	0	0
每只动物平均浸软胎数	0	0.1±0.4	0	0
活胎数	317	269	271	279
每只动物的平均活胎数	14±3	12±5	12±5	12±5
雄性胎仔数	167	146	139	153
雌性胎仔数	130	123	132	126
活胎仔平均体质量 / g	3.940±0.335	3.823±0.446**	3.998±0.527	3.914±0.409
胎盘平均质量 / g	8.705±1.488	7.577±3.132	8.572±7.306	7.570±3.418

与对照组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

2.5 F1 胎仔外观检查

胎仔外观检查结果见表 4。外观检查各组出现皮下淤血, 未见其他外观异常。与对照组相比坤泰胶囊成品粉各剂量组皮下淤血胎仔数无显著差异。

结果可见坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组试验中未出现与给药有关的胎仔外观改变。

2.6 F1 胎仔内脏检查

胎仔内脏检查结果见表 5 至表 7。与对照组相比, 坤泰胶囊成品粉各剂量组的各项胎仔内脏变异胎仔数和窝发生率无显著差异。

表 4 胎仔外观检查 (皮肤)

Table 4 Appearance examination of F1 generation (skin)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	检查胎仔数/ 窝数	皮肤检查	
			瘀血胎仔数/ 窝数	胎仔/窝发生率
对照	—	317/22	2/2	0.63/ 9.09%
坤泰胶囊	2.5	269/23	6/3	2.23/13.04%
	5.0	271/23	4/3	1.47/13.04%
	10.0	279/24	1/1	0.36/ 4.17%

表 5 胎仔脏器检查 (胸腺和肾)

Table 5 Organ examination of F1 generation (thymus and kidney)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	检查胎仔数 /窝数	胸腺检查		肾检查	
			胸腺残留胎仔数/窝数	胎仔/窝发生率	肾盂扩张胎仔数/窝数	胎仔/窝发生率
对照	—	317/22	1/1	0.34/ 4.55%	7/6	2.21/27.27%
坤泰胶囊	2.5	269/22	4/4	1.49/18.18%	0/0	0.00/ 0.00%
	5.0	271/23	0/0	0.00/ 0.00%	3/3	1.11/13.04%
	10.0	279/22	5/5	1.79/22.73%	3/3	1.08/13.64%

表 6 胎仔脏器检查 (泌尿器官和脐动脉)

Table 6 Organ examination of F1 generation (urinary organs and Umbilical artery)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	检查胎仔数 (只)/窝数	泌尿器官检查		脐动脉检查	
			输尿管蛇行胎仔数/窝数	胎仔/窝发生率	脐动脉左行胎仔数/窝数	胎仔/窝发生率
对照	—	317/22	13/7	4.10/31.82%	0/0	0/0%
坤泰胶囊	2.5	269/22	7/6	2.60/27.27%	1/1	0.37/4.55%
	5.0	271/23	13/10	4.79/43.48%	1/1	0.37/4.35%
	10.0	279/22	13/10	4.66/45.45%	3/2	1.08/9.09%

表 7 胎仔脏器变异数据总结

Table 7 Summary of organ variation data of F1 generation

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	检查胎仔数/窝数	发生变异窝 数/发生率	变异胎仔数/ 发生率
对照	—	317/22	9/40.91%	21/6.62%
坤泰 胶囊	2.5	269/22	12/54.55%	13/4.83%
	5.0	271/23	10/43.48%	16/5.90%
	10.0	279/22	12/38.10%	23/8.24%

2.7 F1 胎仔骨骼检查

骨化部位的平均骨化点数见表 8。胎仔骨骼畸形和变异数据见表 9。与对照组相比, 坤泰胶囊成品粉低剂量组胎仔掌骨、指骨骨化点数量有显著差异; 中剂量组胎仔跖骨骨化点数量有显著差异; 高剂量组胎仔尾椎骨骨化点数量有显著差异。但胎仔

骨化点数量出现差异无剂量反应关系, 故认为骨化点数量差异无生物学意义。

与对照组相比, 坤泰胶囊成品粉中剂量组胎仔上后头骨骨化不全的胎仔数有显著差异。其余组骨骼变异的胎仔数和窝发生率均无显著差异。因为上后头骨骨化不全差异仅在中剂量组出现, 无剂量反应效应, 且上后头骨骨化不全窝发生率无显著差异, 故认为该差异无生物学意义。

3 讨论

坤泰胶囊成分为熟地黄、黄连、白芍、黄芩、阿胶、茯苓, 临床广泛用于治疗围绝经期综合征、卵巢储备功能不足相关的不孕、卵巢早衰等病症。为检查坤泰胶囊成品粉对 SD 大鼠的母体毒和胚胎-胎仔毒性, 为怀孕女性临床应用坤泰胶囊提供客观的安全性证据, 进行本次实验。根据能通过 16 号灌

表8 胎仔骨化点数目 ($\bar{x} \pm s$)
Table 8 Ossification points of F1 generation ($\bar{x} \pm s$)

观测项目	对照组	坤泰胶囊/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)		
		2.5	5.0	10.0
颈椎	7.000±0.000	7.000±0.000	7.000±0.000	7.000±0.000
胸椎	13.000±0.000	13.000±0.000	13.000±0.000	13.000±0.000
腰椎	6.000±0.000	6.000±0.000	6.000±0.000	6.000±0.000
骶椎	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000
尾椎	3.952±0.545	3.841±0.583	3.965±0.540	3.800±0.548*
肋骨	13.000±0.000	13.000±0.000	13.007±0.084	13.000±0.000
胸骨柄	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
中心(胸骨节)	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000
剑突	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
掌骨	左	3.827±0.379	3.613±0.489**	3.823±0.383
	右	3.827±0.379	3.630±0.484**	3.808±0.396
指骨	左	4.911±0.978	4.628±0.916**	4.946±1.022
	右	4.982±0.957	4.652±0.949**	5.031±1.034
跗骨	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
跖骨	左	4.000±0.000	3.993±0.085	4.000±0.000
	右	4.000±0.000 21	4.000±0.000	3.957±0.203**
趾	左	4.341±0.774	4.304±0.700	4.315±0.807
	右	4.210±0.930	4.254±0.726	4.062±0.971

表9 胎仔骨骼变异数据总结
Table 9 Summary of bone variation data of F1 generation

观测项目	对照组	坤泰胶囊/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)		
		2.5	5.0	10.0
进行骨骼检查的胎仔窝数	22	23	23	24
进行骨骼检查的胎仔数	317	269	271	279
骨骼变异胎仔数/窝数	25/13	26/9	20/8	23/8
前头骨骨化不全胎仔发生数/窝发生数	0/0	1/1	0/0	0/0
上后头骨骨化不全胎仔发生数/窝发生数	2/2	7/5	8*/5	3/3
14 肋胎仔发生数/窝发生数	0/0	0/0	1/1	0/0
胸骨柄骨化不全胎仔发生数/窝发生数	1/1	0/0	1/1	0/0
第一胸骨节骨化不全胎仔发生数/窝发生数	1/1	0/0	0/0	2/1
第二胸骨节骨化不全胎仔发生数/窝发生数	2/2	0/0	0/0	1/1
剑突骨化不全胎仔发生数/窝发生数	19/12	18/8	15/6	17/8

胃针的药物的最大浓度, 设定最高质量浓度 0.5 g/mL, 最高剂量 10 g/(kg·d)。

坤泰胶囊由熟地黄、阿胶、白芍、茯苓、黄芩和黄连 6 味中药组成。其中熟地黄为君药, 生精益髓、滋阴补肾、养血。黄连、白芍、阿胶为臣药,

黄连清虚火、清心除烦, 与熟地黄配伍, 滋阴降火、交通心肾, 治疗阴虚火旺发热汗出, 心烦不眠; 白芍、阿胶补血养阴, 补而不滞, 养阴不腻, 且能收敛精气, 固摄元气, 两者与熟地黄配伍, 增强熟地黄滋阴养血的作用。黄芩、茯苓为佐药, 黄芩清热

泻火, 加强黄连清虚火的作用; 茯苓既健脾益气, 为补肾精提供源泉, 又能安神, 治疗疲乏、失眠、心中烦热。以上6味中药合用, 起到滋阴养血, 补精益髓, 安神除烦, 交通心肾, 调节阴阳平衡的作用。

临床研究结果显示, 坤泰胶囊连续服用一年不会引起子宫内膜厚度的增加, 非计划性阴道出血率显著低于小剂量雌激素, 对乳腺无明显刺激作用。研究中血常规、尿常规、肝肾功能、血脂等均也未见明显不良影响^[4]。

本试验研究结果显示, 与对照组相比, 坤泰胶囊成品粉低、中、高剂量组未出现与给药有关的雌鼠体质量增长量、体质量校正增量及摄食量改变。坤泰胶囊成品粉组孕鼠的黄体数、胚胎着床数、着床前丢失率及着床后丢失率与对照组比较, 均无显著差异, 说明坤泰胶囊成品粉对于母体生殖机能无明显的影响; 坤泰胶囊成品粉组孕鼠的活胎数、死胎数、雄雌胎儿数、胎仔体体质量、平均胎盘质量、性别比与对照组比较均无显著差异; 各剂量组胎仔的骨骼异常率及骨化程度均无明显改变, 脏器畸形与变异率均无明显改变。因此认为本试验条件下, 坤泰胶囊成品粉中剂量对SD大鼠无明显的母体毒

和胚胎-胎仔毒性, 无致畸作用, 对胎仔发育无不良反应。

动物的生殖功能受到神经内分泌系统的调控, 性周期的形成, 生殖细胞的生成、发育、成熟, 胚胎的发育都和性激素相关。因此, 生殖毒性的检测, 不仅应该考虑药物对生殖系统的直接毒性, 也应考虑药物通过神经内分泌等其他途径影响生殖功能的可能性。坤泰胶囊能影响激素分泌, 今后的试验中可进一步考虑测定怀孕动物和胎仔血液内的血清激素水平, 对可能导致药物生殖毒性的多个方面进行研究, 保证临床用药的安全。

参考文献

- [1] 药物生殖毒性研究技术指导原则 [M]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2006.
- [2] Wilson J G, Warkany J. Teratology principles and techniques [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1965.
- [3] Sluckhardt J L, Poppe S M. Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing [J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1984, 4(2): 181-188.
- [4] 王绍海, 林守清, 桂启芳, 等. 低剂量性激素治疗及中药治疗引起的非计划性阴道出血 [J]. 中国医学科学院学报, 2006, 28(2): 256-261.