

奈普替尼对雄性大鼠睾丸形态结构和附睾精子质量的影响

俞斌斌¹, 刘妍^{2,3}, 唐桂毅^{2,3}, 温和^{2,3}, 任萌^{2,3}, 申秀萍^{2,3}, 陈飞虎^{1*}, 张宗鹏^{2,3*}

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

3. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: **目的** 探究奈普替尼对雄性大鼠睾丸形态结构及附睾精子质量的影响。**方法** 将30只雄性SD大鼠随机分为30和70 d两组, 每组又分为对照组和奈普替尼低、高剂量组(0.75、3.00 mg/kg), ig给药, 每天给药1次, 给药体积10 mL/kg。每天进行1次症状观察, 每周称量一次体质量, 大鼠分别于给药35和70 d后次日处死, 肉眼检查各脏器有无异常, 检测双侧睾丸质量和横径、附睾尾精子数量和活力, 睾丸固定进行组织病理学检查。**结果** 奈普替尼高剂量组动物均从给药第14天开始, 出现腹泻、脱毛、口鼻眼处有红色分泌物, 随着给药天数的增加, 症状加重; 给药70 d组其中1只动物于给药60 d开始出现血尿症状。给药35 d组大鼠从给药21 d开始, 给药70 d组从14 d开始, 高剂量大鼠体质量明显低于同期对照组($P < 0.01$)。与对照组比较, 给药组雄鼠的双侧睾丸绝对质量和脏器指数、睾丸横径、附睾尾精子数量和活力及睾丸组织病理学检查并未随给药剂量的增加和给药时间的延长而出现明显变化。**结论** 奈普替尼对雄性大鼠的睾丸组织及精子质量无明显影响。

关键词: 奈普替尼; 大鼠; 睾丸; 精子; 非小细胞肺癌; 生殖毒性

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)05-0805-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.015

Effects of neptinib on testicular morphosis and epididymal sperm quality in male rats

YU Binbin¹, LIU Yan^{2,3}, TANG Guiyi^{2,3}, WEN He^{2,3}, REN Meng^{2,3}, Shen Xiuping^{2,3}, CHEN Feihu¹, ZHANG Zongpeng^{2,3}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

3. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of neptinib on testicular morphosis and epididymal sperm quality of male rats. **Methods** A total of 30 male SD rats were assigned to blank control group (0 mg/kg), low dose group (0.75 mg/kg), and high dose group (3 mg/kg) in a random manner. The test substance was administered by gavage, and the administration volume was 10 mL/kg. The frequency of administration was once daily. All rats were made general clinical observation once daily, and weighed once a week. All rats were sacrificed on the next day after 35 d and 70 d of dosing, and all organs were examined macroscopically for any structural abnormalities with the naked eyes. Both testes were weighed and calculated relative weights. Transverse diameter of both testes was measured. Sperm numbers and motility were assessed in the cauda epididymis. The testes were fixed for histopathological examination. **Results** From the 14th d of administration, the rats in the high dose group of neptinib had diarrhea, hair removal, and red secretions in the mouth and nose, and the symptoms increased with the increase of the number of dosing days. In the 70 d of dosing group, one animal began to appear hematuria at 60 d. Body weight of the high-dose rats in the 35 d group starting from the 21st d of administration, and in the 70 d group starting from the 14th d were both significantly lower than that of control group ($P < 0.01$). Compared with the blank control group, there were no dose- or duration-related obvious changes in the absolute weight and

收稿日期: 2017-09-05

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

第一作者: 俞斌斌, 男(1992—), 主要从事生殖毒理学研究。Tel: (022) 84845264 E-mail: yubinbin1992@qq.com

*通信作者: 陈飞虎, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: cfhchina@sohu.com

张宗鹏, 男, 研究员, 硕士生导师。Email: zhangzp166@163.com

visceral index of tests, the transverse diameter of testes, the number and motility of sperm, and testicular histopathology in treatment groups. **Conclusion** Neptinib has no obvious toxic effects on testicular morphosis and sperm quality in male rats.

Key word: Neptinib; rats; testis; sperm; reproduction toxicity

奈普替尼是新一代的表皮生长因子受体-酪氨酸激酶不可逆抑制剂,临床用于治疗非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)。该药通过抑制表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)胞内区酪氨酸激酶活性,阻断EGFR介导的细胞内信号通路,从而抑制肿瘤细胞生长、转移和血管生成,并促进肿瘤细胞凋亡^[1]。动物研究表明,奈普替尼对外显子19碱基缺失(Ex19 del)型NSCLC荷瘤小鼠具有显著的抑瘤作用,同时其安全性优于同类药物,显示出良好的临床应用前景。

虽然抗肿瘤药物对生殖功能的影响不是药物毒性关注的重点,但随着抗肿瘤药物的不断优化,肿瘤患者的预期寿命会不断延长,一些年轻患者可能会有生育要求。奈普替尼对生殖系统的影响尚未见相关报道,为了了解奈普替尼对雄性生殖功能的影响,本研究使用大鼠为研究对象,研究奈普替尼对雄性生殖器官及精子质量的影响,评价其安全性,为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级健康雄性6~7周龄SD大鼠33只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。动物饲养于室温20~26℃,湿度40%~70%的SPF级动物房内,光照条件12h明/12h暗,食物饮水自由。适应1周后,选择体质量225~272g的30只大鼠进入实验。

1.2 药品与主要试剂

奈普替尼(深圳海王药业有限公司,批号2014001);M199培养基(Gbico公司,批号1802640);牛血清白蛋白(Sigma公司,批号1205B051)。

1.3 主要仪器及设备

Olympus BH-2普通光学显微镜、BX51普通光学显微镜,日本Olympus公司;PH-2电热恒温培养箱,天津市泰斯特;TOX IVOS精子分析仪,Hamilton Thorne Inc;DY89-1电动玻璃匀浆机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Leica EG-1150H+C组织石蜡包埋机,德国Leica公司;VIP5J-F2全封

闭组织脱水机、TEC5EMJ-2组织石蜡包埋机、DRS-2000J-D2自动染色装置、Glas-J2自动封片机,日本樱花检验仪器株式会社;IVS-410型推拉式切片机,日本大和光机工业株式会社。

2 方法

2.1 大鼠分组及给药频率

将30只大鼠随机分为给药35和70d两组,每组均包含对照、奈普替尼低、高剂量(0.75、3.00mg/kg)3个亚组,每组5只,每天ig给药1次,给药体积均为10mL/kg。

2.2 一般状态观察和体质量检查

每天进行1次大鼠一般状态观察,观察内容包括呼吸系统、运动系统、循环系统、神经系统、眼科检查、唾液分泌、皮毛、尿便、饮水、营养外观等。每周记录1次动物体质量。

2.3 解剖检查和脏器称质量

动物安乐死后,取仰卧位,沿腹中线从外生殖器至下颌切开皮肤,随后打开腹腔和胸腔,暴露内脏,仔细观察内脏色泽、形状和大小等有无异常,特别是生殖器官有无器质性病变。肉眼检查完毕,摘除双侧睾丸和附睾,剔除多余脂肪称量双侧睾丸和右侧附睾尾质量,测量双侧睾丸横径。

2.4 精子计数

右侧附睾尾称质量后,放入电动匀浆机加5mL生理盐水匀浆。匀浆完成后,取0.1mL精子原液,加入20倍的生理盐水稀释混匀,使用血球计数板,在普通光学显微镜100倍视野下计数四大方格内的精子数,按照公式计算出“精子数/个附睾尾”,并根据附睾尾质量计算出“精子数/g附睾尾”。

$$\text{精子数/个附睾尾} = \text{四大格精子总数} / 4 \times 10\,000 \times 5$$

2.5 精子活力检测

将左侧附睾尾放入37℃预热的培养皿中,滴几滴精子培养液(加有牛血清白蛋白的M199培养基),用剪刀在附睾尾上剪2~3个小口使精子游出,静置几分钟后,再加入适量精子培养液加以稀释后,转入玻片内,用精子分析仪检测:活力、向前活动、经线速率(VAP)、前向活动速率(VSL)、轨迹速度(VCL)、精子头侧向移位(ALH)、鞭打频率(BCF)、前向性(STR)和直线性(LIN)。

2.6 睾丸组织病理学检查

取各组的大鼠左侧睾丸,剔除多余脂肪放入改良 Davidson 固定液中固定 48 h 以上,转至 12% 酸性甲醛固定液中,经脱水,包埋和 HE 染色,制备组织病理学切片,普通光学显微镜下进行组织病理学检查。

2.7 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件分析,主要统计指标有体质量、体质量增长、睾丸绝对质量及相对质量、双侧睾丸横径、附睾尾精子数量和活力。

数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有的指标均先经方差齐性检验,方差齐时,采用单因素方差分析进行多组间比较,如比较有差异,则采用 Dunnett 检验进行给药组和对照组之间的比较;方差不齐时,采用 Kruskal-Wallis 进行多组间比较,如比较有差异,采用

Mann-Whitney 检验进行给药组和对照组之间的比较。

3 结果

3.1 一般观察

奈普替尼高剂量组动物均从给药第 14 天开始,出现腹泻、脱毛、口鼻眼处有红色分泌物,随着给药天数的增加,症状加重;给药 70 d 组其中 1 只动物于给药 60 d 开始出现血尿症状;低剂量组个别动物在给药 28 d 出现轻微腹泻症状;对照组未出现任何异常症状。

3.2 体质量

给药 35 d 组大鼠从给药 21 d 开始,给药 70 d 组大鼠从给药 14 d 开始,高剂量大鼠体质量明显低于同期对照组 ($P < 0.01$);低剂量大鼠体质量与对照组比较未见明显增长减慢;给药 70 d 组高剂量大鼠在给药后期体质量呈负增长。结果见图 1。

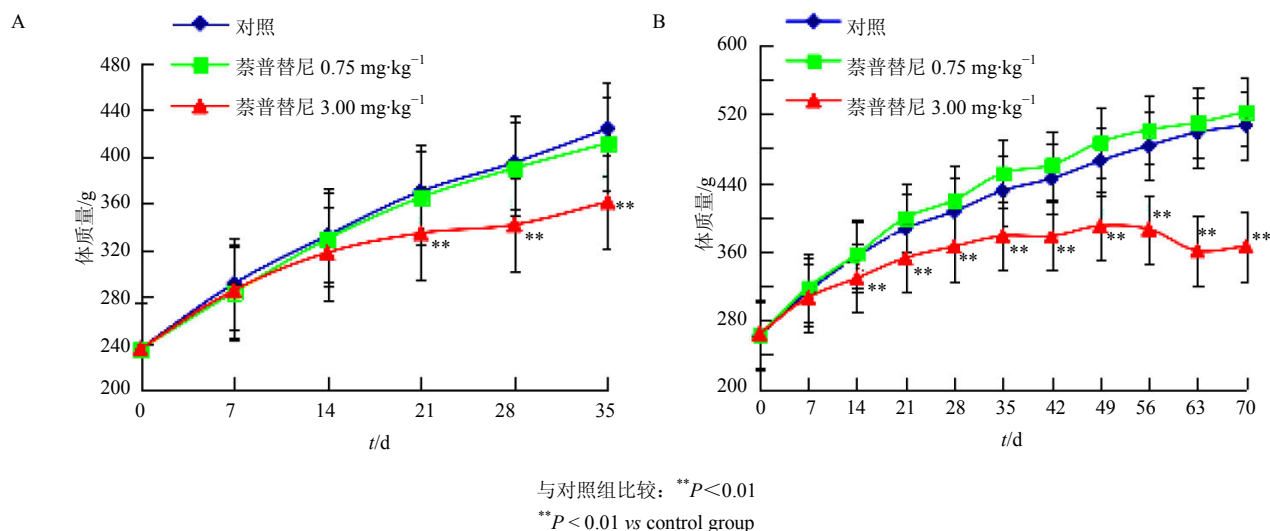


图 1 给药 35 d (A)、70 d (B) 奈普替尼对雄性大鼠体质量的影响

Fig. 1 Effects of neptinib on body weight of male rats after administration for 35 (A) and 75 d (B)

3.3 解剖检查和脏器称量

各给药组和对照组雄性大鼠的解剖检查中,胸腔和腹腔浆膜光滑,无积液和积血。各动物心、肺、胸腺、肝、肾、脾、胃、肠、肾上腺、胰腺、睾丸、附睾、精囊、前列腺及膀胱等脏器色泽、形态、质地和位置均正常,未见明显肉眼可见病理改变。

不同给药周期的低、高剂量组动物睾丸的绝对质量和左右侧睾丸横径与对照组比较均无明显差异,高剂量组睾丸脏器指数高于对照组,统计学差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01),分析认为该差异与雄鼠体质量明显偏低有关,而与受试药物无关。结果见表 1。

3.4 精子计数和活力检测

不同给药周期的给药组动物的精子数量和活力与对照组比较均无明显差异,结果见表 2。

3.5 组织病理学检查

大鼠睾丸组织染色后,普通光学显微镜观察,给药 35 和 70 d 组中对照组大鼠睾丸组织中生精上皮基膜完整,生精小管中各级生精细胞发育正常,排列整齐,小管中央存在大量精子, Sertoli 细胞之间连接紧密,睾丸间质细胞排列均匀没有出现病理学改变。不同给药周期的给药组大鼠睾丸组织与同期对照组相比并未见明显组织病理学改变。

表1 萘普替尼对雄鼠生殖器官的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 1 Effects of Neptinib on reproductive organs of male rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

给药时间/d	组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	睾丸			
			绝对质量/g	脏器指数/($\text{g} \cdot 10^{-2} \cdot \text{g}^{-1}$)	左侧横径/cm	右侧横径/cm
35	对照	—	3.27±0.38	0.83±0.10	1.22±0.05	1.25±0.05
	萘普替尼	0.75	2.97±0.25	0.78±0.10	1.20±0.04	1.22±0.05
		3.00	3.26±0.22	0.98±0.09*	1.28±0.06	1.27±0.06
70	对照	—	3.36±0.21	0.70±0.08	1.25±0.05	1.28±0.05
	萘普替尼	0.75	3.49±0.24	0.71±0.09	1.25±0.04	1.27±0.05
		3.00	3.19±0.14	0.94±0.05**	1.22±0.04	1.23±0.05

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group表2 萘普替尼对雄鼠精子参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Effects of neptinib on sperm parameters of male rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

给药时间/d	组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	每附睾尾精子数/ $\times 10^6$	精子数/ $10^6 \cdot \text{g}^{-1}$	活力/%	向前活动/%	VAP/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
35	对照	—	130.35±26.97	462.33±70.68	74.40±0.89	25.00±1.87	257.80±17.75
	萘普替尼	0.75	118.45±22.14	490.39±53.34	75.20±1.92	24.20±4.09	253.74±22.25
		3.00	115.05±16.30	455.50±92.28	73.60±2.07	24.60±2.30	253.86±27.60
70	对照	—	113.95±20.47	363.05±84.41	69.00±10.22	23.20±4.44	215.98±30.63
	萘普替尼	0.75	103.80±21.46	314.40±33.36	66.00±16.58	22.60±5.73	203.34±38.98
		3.00	99.25±12.38	421.74±71.73	73.20±3.70	24.00±1.58	231.88±30.14

给药时间/d	组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	VSL/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	VCL/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	ALH/ μm	BCF/Hz	STR/%
35	对照	—	179.82±16.04	467.32±26.15	18.96±1.12	20.02±1.33	66.00±1.00
	萘普替尼	0.75	173.32±20.44	464.20±33.98	18.24±1.41	20.36±1.71	64.40±2.19
		3.00	175.36±22.51	468.58±40.92	19.14±1.13	20.56±3.41	63.60±3.21
70	对照	—	147.12±21.71	380.08±55.80	16.12±1.38	21.38±2.61	65.40±2.30
	萘普替尼	0.75	141.16±26.45	356.26±63.57	15.36±1.66	21.42±3.07	67.00±1.41
		3.00	157.78±20.61	413.48±56.93	16.90±1.80	20.94±1.30	64.80±0.45

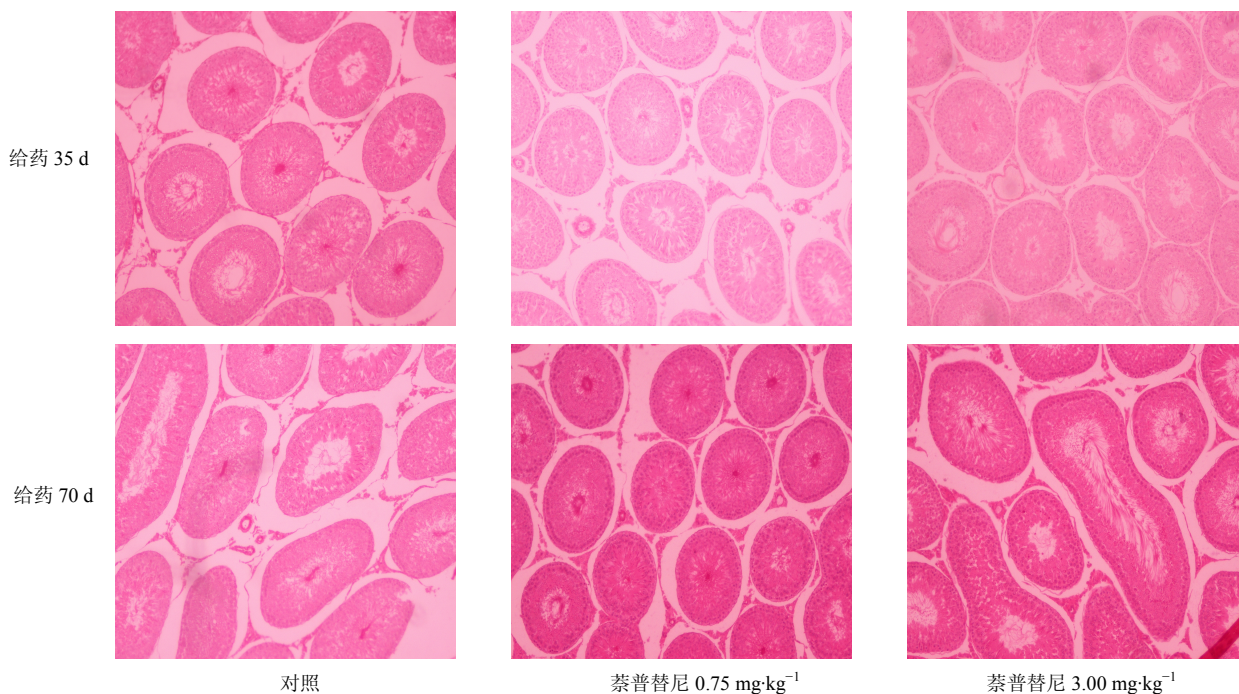


图3 萘普替尼对雄性大鼠睾丸组织的影响 (100×)

Fig. 3 Effects of neptinib on testicular tissue in male rats (100×)

4 讨论

肺癌在全球范围内呈现出高发的趋势,已经成为当今人类最为致命的恶性肿瘤疾病之一,其中NSCLC约占所有肺癌的80%。NSCLC主要包括鳞状细胞癌(鳞癌)、腺癌和大细胞癌^[2],与小细胞癌相比其癌细胞生长分裂较慢,扩散转移相对较晚。

有研究表明,10%~15%的NSCLC白种人患者和40%的NSCLC亚洲患者存在EGFR的基因突变,主要表现在EGFR外显子19缺失或外显子21置换^[3-5]。目前,以EGFR为治疗靶点的药物主要有两类:一类是阻断EGFR结合位点的单克隆抗体类药物;另一类是以抑制EGFR的酪氨酸激酶活性为途径的表皮生长因子受体——酪氨酸激酶抑制剂(Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)。蔡普替尼是新一代的EGFR-TKI,与2013年获FDA批准上市的NSCLC一线治疗药物阿法替尼^[6]结构类似。在本实验室进行的蔡普替尼非临床研究中显示,该药在HCC827(Ex19 del) NSCLC异体移植裸小鼠模型的抑瘤试验中,0.6 mg/kg即有抑瘤作用;在大鼠给药4周的长期毒性试验中,1.5 mg/kg剂量(相当于大鼠药效学等效剂量的5倍)未出现严重的不可逆的毒性反应,初步表明蔡普替尼具有良好的治疗作用,且较阿法替尼有更宽的安全范围。

随着EGFR-TKI类药物的不断优化,加上精准治疗手段的介入,会使肿瘤患者可以获得越来越长的无进展生存期及总生存期。如果这类药物不影响生殖功能,可能会给年轻有生育要求的肿瘤患者带来福音。

本研究采用连续给予蔡普替尼35和70 d后进行睾丸组织病理学检查和附睾尾精子数量和活力检测,评价其对雄性生殖功能的影响。研究结果显示,3 mg/kg剂量组大鼠给药后出现腹泻、脱毛、消瘦和口鼻眼处有红色分泌物,1只动物从给药60 d起出现血尿症状;动物体质量增长缓慢,甚至随着给药时间的延长出现负增长。0.75 mg/kg剂量组个别动物出现轻微腹泻症状,体质量未见明显异常。0.75和3 mg/kg剂量组雄鼠精子数量和活力正

常,未出现如阿法替尼有关文献报道的精子数量减少的情况^[7],睾丸质量、横径和组织病理学检查均未随着给药剂量的增加和给药天数的延长而出现明显异常。

蔡普替尼对雄性大鼠睾丸组织及精子质量并未表现出明显的毒性作用。更全面的评价该药对生殖功能的影响,可通过进行大鼠生育力和早期胚胎发育毒性研究、大鼠和家兔胚胎-胎仔发育毒性研究和大鼠围产期毒性研究,进一步系统的探讨蔡普替尼的生殖毒性作用。

参考文献

- [1] 赵亚力,李琦,韩为东. 肺癌的表皮生长因子受体分子靶向治疗与基因突变 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(6): 1007-1009.
- [2] Travis W D, Brambilla E, Nicholson A G, et al. The 2015 world health organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(9): 1243-1260.
- [3] Marquez-Medina D, Popat S. Afatinib: a second-generation EGF receptor and ErbB tyrosine kinase inhibitor for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer [J]. Future Oncol, 2015, 11(18): 2525-2540.
- [4] Hirsch F R, Varella-Garcia M, Bunn Jr P A, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(20): 3798-3807.
- [5] Yoshida T, Ishii G, Goto K, et al. Solid predominant histology predicts EGFR tyrosine kinase inhibitor response in patients with EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(10):1691-1700.
- [6] 刘丹,栾天,袁莹,等. 多靶点酪氨酸激酶抑制剂阿法替尼及其类似物的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(24): 2145-2149.
- [7] Food and Drug Administration (USA). Center for drug evaluation and research [EB/OL]. http://www.accessdata.fda.gov/drug_satfda_docs/nda/2013/201292Orig1s000PharmR.pdf, 2013-04-30.

替芬泰大鼠胚胎-胎仔发育毒性研究

温 和, 刘 妍, 高绪聪, 申秀萍*, 黄正明, 梁光益

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300193

摘要: **目的** 对妊娠动物从胚胎着床至硬腭闭合期 ig 给予替芬泰, 评价其对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响。 **方法** 将交配成功后的 SD 大鼠于妊娠 6~15 d 连续 ig 给予替芬泰, 剂量为 50、175 和 620 mg/kg, 溶媒对照组给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。试验期间定期记录孕鼠体重及 24 h 摄食量, 于妊娠 21 d 解剖孕鼠进行大体检查, 称量子宫质量, 计数黄体数, 植入数, 吸收胎、死胎和活胎数。胎仔经称质量、性别鉴定、顶臀长和尾长测定及外观检查后, 各留取 50% 胎仔制作标本进行骨骼和内脏的检查。 **结果** 给药期间, 与溶媒对照组比较, 替芬泰 175 (个别天数) 和 620 mg/kg 剂量组孕鼠 24 h 摄食量明显减少、体质量明显降低及体质量增长明显缓慢 ($P < 0.05$ 、 0.01); 3 个剂量的受试物对孕鼠的生育能力无影响; 620 mg/kg 剂量组胎仔体质量偏低; 在胎仔外观、内脏和骨骼检查中, 给药组和溶媒对照组均出现一些发育异常, 其中与溶媒对照组比较, 620 mg/kg 剂量组胎仔体质量显著降低、波状肋发生率明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其他指标均差异不显著。 **结论** 本试验条件下, ig 给予 175 和 620 mg/kg 剂量的替芬泰, 妊娠大鼠出现一定的系统毒性, 50 mg/kg (临床拟用剂量的 30 倍) 为妊娠大鼠的无毒性反应剂量; ig 给予 620 mg/kg 替芬泰, 对胚胎发育有一定毒性, 175 mg/kg 剂量为大鼠胚胎发育的无毒性反应剂量。

关键词: 替芬泰; 胚胎-胎仔发育毒性; 大鼠

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 05- 0810 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.016

Studies on embryos-fetus developmental toxicity of Tyrophentide

WEN He, LIU Yan, GAO Xucong, SHEN Xiuping, HUANG Zhengming, LIANG Guangyi

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effects on the pregnant female, and development of the embryo and fetus consequent to expose Tyrophentide to the female from implantation to closure of the hard palate. **Methods** Three dose of Tyrophentide (50, 175, or 620 mg/kg) were administered by ig method to mated SD female rats over days 6 – 15 of gestation. Control animals received 0.5% CMC-Na solution by gavage. Body weight and food consumption data in dams were collected during the study. On day 21 of gestation, the dams were euthanized and examined grossly. The uterus was removed and weighed. The numbers of corpora lutea, implantations, absorbed fetuses, dead fetuses, and live fetuses were counted. After the fetuses subsequently weighed, sexed, measured crown-rump length, and examined for external, approximately one half of the fetuses respectively in each litter were examined visceral and skeletal abnormalities. **Results** During the administration period, compared with dissolvent control group, there were significant decreased in maternal food consumption, mean body weight, and body weight gain in the 175 and 620 mg/kg groups ($P < 0.05$ and 0.01). There was no reproductive toxicity noted in dams in all groups. Compared with dissolvent control group, at the 620 mg/kg dose, there were significant changes seen including a decreased fetal body weight and an increased incidence of wavy ribs. **Conclusion** Under the experimental conditions, by gavaging to Tyrophentide, the nontoxic reaction dose was 50 mg/kg (30 times the dose for clinical use) in dams based on a general toxicity at 175 and 620 mg/kg dose. The Nontoxic reaction dose for embryo-fetal development was 175 mg/kg based on teratogenicity and embryofeto-toxicity at 620 mg/kg dose.

Key words: tyrophentide; embryo-fetal developmental toxicity; rat

收稿日期: 2018-01-16

第一作者: 温 和 (1988—), 女, 研究实习生, 主要研究方向: 生殖毒理。Tel: (022)84845264 E-mail: wenh@tjipr.com

*通信作者: 申秀萍, 女, 研究员, 研究方向为药物临床前毒理学及药效学。Tel: (022)84845266 E-mail: shenxp@tjipr.com

乙型病毒性肝炎是由乙肝病毒(HBV)引起的、以肝脏炎性病变为主,并可引起多器官损害的一种疾病。乙肝广泛流行于世界各国,主要侵犯儿童及青壮年,少数患者可转化为肝硬化或肝癌。乙肝已成为严重威胁人类健康的世界性疾病,也是我国当前流行最为广泛、危害性最严重的一种疾病,因此,寻找和开发新型抗HBV药物具有重要意义。

苗族药马蹄金为旋花科、马蹄金属植物,为苗族民间常用的一种治疗肝炎的草药,主入肺经和胃经,有清热解毒、利水、活血、接骨续筋等功效,主治黄疸型肝炎、胆囊炎、痢疾、泌尿系感染及结石、疮痈肿毒、跌打损伤等^[1-2]。替芬泰是从马蹄金 *Dichondra repens* Forst. 中分离所得的苯丙氨酸二肽衍生物,临床前研究显示,替芬泰主要通过抑制共价闭合环状脱氧核糖核酸(cccDNA)达到抗HBV作用^[3],对核苷类似物耐药株具有较强抑制作用,且停药后无明显反弹,此外,还具有较强的护肝效用^[4-5]。为了了解替芬泰有无潜在的致畸作用,本试验对其进行了大鼠胚胎-胎仔发育毒性研究,以期为人孕期合理和安全的应用提供实验学依据。

1 材料

1.1 实验动物

雌性SPF级SD大鼠140只,雄性90只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产单位许可证号SCXK(京)2016-0009;对全部动物进行检疫称质量,并进行5d适应性观察。

1.2 药物及主要试剂

替芬泰,苯丙氨酸二肽衍生物,由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提供,批号20101108,临用前用0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制成5.0、17.5、62.0 mg/mL的混悬液;羧甲基纤维素钠对照品(由国药集团化学试剂有限公司生产,批号F20081015)。

氢氧化钾,批号20071030,天津市天河化学试剂厂生产。茜素红,天津市南开化工厂生产。丙三醇,批号20090930、20101126、20100915、20110309、20110302;冰醋酸,批号20091124、20100918;无水乙醇,批号20110301;均购自天津市凯信化学工业有限公司。饱和苦味酸,批号20101208、20110216,南京建成生物工程研究所生产。甲醛溶液,批号20100807、20110228,天津市风船化学试剂科技有限公司生产。硫化铵,批号0305151,天津市光复精细化工研究所。

1.3 主要仪器

BT224S 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);PL203 电子天平(梅特勒托利多仪器(上海)有限公司);G&G T2000 电子天平(美国双杰兄弟(集团)有限公司);SZ-ST 实体显微镜、JM 实体显微镜(日本 Olympus 公司);游标卡尺(陕西航空硬质合金工具公司)。

2 方法

2.1 实验步骤与观测指标

大鼠适应性饲养5d后,将全部雄鼠和体质量范围在237~272 g的雌鼠按照雌雄比例1:1进行合笼,将每日发现阴栓(交配成功)的大鼠根据随机区组方法分至各组:溶媒对照(0.5%羧甲基纤维素钠溶液)和替芬泰低、中、高剂量(50、175、620 mg/kg, 50 mg/kg 是临床拟用剂量的30倍)组,发现阴栓当日为妊娠0d,共连续交配5d,使每组交配成功动物数均达到25只。各组均于妊娠6~15d(从胚胎着床至硬腭闭合期)连续ig给予0.5%羧甲基纤维素钠溶液及替芬泰,每天1次。实验期间每天进行给药前后的一般观察;并于妊娠的0、3、5~16和21d称体质量;妊娠后每周称量1次24h摄食量;妊娠21d,孕鼠解剖进行大体检查,称量子宫质量,计数黄体数、胚胎植入数、吸收胎、死胎和活胎数;胎仔经称质量、性别鉴定、顶臀长和尾长测定及外观检查;留取50%胎仔固定于Bouin氏固定液,做内脏检查;另50%胎仔去除皮肤和内脏,放入茜素红溶液中染色,待骨骼完全着色后,更换为丙三醇溶液,最后用于骨骼形态检查。

2.2 统计学分析

应用SPSS 11.0软件对数据进行统计分析。母体主要统计指标有受孕率、母体平均体质量、孕期增质量、体质量净增长、24h摄食量、子宫质量、平均妊娠黄体数、平均胚胎植入数、植入前(后)丢失率、活胎数、吸收胎(窝)发生率、死胎(窝)发生率。其中,母体平均体质量、孕期增质量、24h摄食量、子宫质量、平均妊娠黄体数、平均植入数和活胎数采用组间 t 或 t' 检验进行统计分析;植入前(后)丢失、吸收胎和死胎的窝数采用 χ^2 检验进行统计分析;每窝植入前(后)丢失率、吸收胎和死胎发生率采用Kruskal-Wallis检验进行统计分析。指标计算公式如下:

$$\text{受孕率} = (\text{妊娠动物数} / \text{交配成功动物数})$$

$$\text{体质量净增长} = \text{体质量增长}(\text{妊娠}0\sim21\text{d}) - \text{子宫总}$$

质量

植入前丢失率 = (平均黄体数 - 平均植入数) / 平均黄体数

植入后丢失率 = (平均植入数 - 活胎数) / 平均植入数

胎仔主要统计指标有活胎体质量、每窝平均胎仔顶臀长和尾长、胎仔性别比例、尾椎数、掌骨数、跖骨数、指(趾)骨数、外观、内脏和骨骼检查的畸形或变异胎仔发生率和发生窝数。其中,活胎体质量、每窝平均胎仔顶臀长和尾长、尾骨数采用组间 t 或 t' 检验进行统计分析;胎仔性别比例及发生外观、内脏和骨骼异常胎仔窝发生率采用 χ^2 检验进行统计分析;掌骨数、跖骨数、指(趾)骨数、每窝外观、内脏和骨骼异常胎仔发生率采用 Mann-

Whitney 检验(两组间)进行统计分析。

3 结果

3.1 对孕鼠的影响

3.1.1 对孕鼠体质量的影响 与溶媒对照组比较,替芬泰 175 mg/kg 剂量组给药期间个别天数体质量明显下降,给药期体质量增长明显缓慢 ($P < 0.01$),停药后体质量增长加快,到妊娠 21 d 时体质量净增长与溶媒对照组无明显差别。替芬泰 620 mg/kg 剂量组孕鼠给药期体质量和体质量增长明显低于溶媒对照组 ($P < 0.01$),停药后体质量增长加快,但由于给药期体质量增长过少,因此虽停药但体质量与溶媒对照组相比仍偏低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 替芬泰对孕鼠体质量和体质量增长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Tyrophentide on body weight and weight gain of pregnant rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	受孕 动物	体质量/g						
			妊娠 0 d	妊娠 3 d	妊娠 5 d	妊娠 6 d	妊娠 7 d	妊娠 8 d	妊娠 9 d
溶媒对照	—	20	254.8±13.74	276.0±13.61	288.3±16.12	292.9±17.86	296.0±17.57	299.6±19.72	305.1±19.39
替芬泰	50	24	255.0±12.19	274.1±14.31	285.3±14.75	288.2±14.75	289.1±17.67	292.8±18.43	297.9±18.75
	175	22	253.0±12.13	272.5±12.77	285.1±12.10	288.6±12.76	289.1±12.82	289.6±14.13	294.9±12.01
	620	25	255.0±11.15	275.3±11.82	286.4±12.90	291.8±13.18	281.1±14.02**	282.0±13.50**	286.5±15.81**
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	受孕 动物	体质量/g						
			妊娠 10 d	妊娠 11 d	妊娠 12 d	妊娠 13 d	妊娠 14 d	妊娠 15 d	妊娠 16 d
溶媒对照	—	20	311.1±20.43	316.4±21.32	323.2±19.91	329.4±21.05	335.2±21.72	340.7±21.47	351.0±23.20
替芬泰	50	24	304.1±18.14	311.0±19.67	316.3±19.80	322.5±20.44	327.3±20.61	334.3±21.44	343.9±22.49
	175	22	299.9±13.61*	305.7±13.95	312.9±14.20	317.6±15.63*	322.8±15.76*	329.4±17.01	338.6±16.87
	620	25	291.2±15.29**	295.4±14.85**	298.7±15.17**	305.0±15.86**	309.6±16.73**	315.0±16.24**	324.4±16.86**
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	受孕 动物	体质量/g	体质量增长/g			体质量净增长/g		
			妊娠 21 d	妊娠 0~6 d	妊娠 6~16 d	妊娠 16~21 d	妊娠 0~21 d	妊娠 0~21 d	妊娠 0~21 d
溶媒对照	—	20	428.0±32.41	38.2±11.50	58.1±9.78	77.0±16.85	173.2±24.97	76.8±23.65	
替芬泰	50	24	423.3±35.81	33.2±6.77	55.8±12.81	79.4±18.60	168.3±31.52	69.7±16.75	
	175	22	422.6±26.91	35.6±6.75	50.0±9.32**	84.0±18.20	169.6±22.87	71.2±17.37	
	620	25	407.6±26.19*	36.8±7.23	32.6±11.09**	83.2±12.79	152.6±21.10**	57.0±13.20**	

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group

3.1.2 对孕鼠摄食量的影响 给药期间,替芬泰 175 mg/kg 剂量组孕鼠在给药初期摄食量较溶媒对照组显著减少 ($P < 0.01$); 620 mg/kg 剂量组孕鼠给药期摄食量明显低于溶媒对照组 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.1.3 对孕鼠生育能力的影响 替芬泰 50、175 和 620 mg/kg 3 个剂量组孕鼠的受孕率、平均黄体数、平均植入数、植入前丢失率、植入后丢失率、吸收胎数、有吸收胎窝数和活胎数与溶媒对照组比较均无统计学差异。结果见表 3。

表2 替芬泰对孕鼠24 h摄食量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of Tyrophentide on food consumption of pregnant rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	受孕动物	24 h 摄食量/g			
			妊娠 0~1 d	妊娠 7~8 d	妊娠 14~15 d	妊娠 20~21 d
溶媒对照	—	20	22.2±2.85	24.2±3.02	26.5±4.35	27.4±4.28
替芬泰	50	24	21.5±2.80	23.7±3.17	26.0±3.42	28.3±4.90
	175	22	20.6±3.87	21.0±2.85**	25.1±3.27	29.1±4.33
	620	25	21.9±3.00	19.0±4.20**	23.4±3.30**	29.0±3.35

与溶媒对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group

表3 替芬泰对孕鼠生育能力的影响

Table 3 Effect of Tyrophentide on fertility of pregnant rats

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	受孕 动物数	受孕 率/%	平均 黄体数	平均 植入数	活胎 数	死胎 数	吸收胎 数 (%) ^a	有吸收胎 窝数 (%)	植入前丢 失率/%	植入后 丢失率/%
溶媒对照	0	21/20 ^a	84	15.6±2.24	14.2±2.81	13.2±3.73	0	20 (7.1)	12 (60.0)	9.0	7.1
替芬泰	50	24	96	17.3±4.09	14.3±2.44	13.6±3.21	0	17 (4.9)	10 (41.7)	17.1	4.9
	175	22	88	15.8±2.09	14.3±1.75	13.5±2.13	0	17 (5.4)	9 (40.9)	9.5	5.4
	620	25	100	16.8±2.20	14.3±2.66	13.5±2.65	0	20 (5.6)	14 (56.0)	14.8	5.6

^a: “(%)” 中为发生率^a: “(%)” is the rate of occurrence

3.2 对胎儿的影响

3.2.1 对胎儿生长发育的影响 替芬泰 620 mg/kg 剂量组孕鼠除所产胎儿体质量明显低于溶媒对照组外 ($P < 0.01$), 其他指标 (即胎儿顶臀长、尾长及性别比例) 与溶媒对照组比较均无统计学差异。见表 4。

3.2.2 对胎儿大体外观的影响 在对胎儿的外观检

查中, 替芬泰 50、175 和 620 mg/kg 3 个剂量组与溶媒对照组的胎儿外观均未见明显异常。

3.2.3 对胎儿内脏发育的影响 溶媒对照组、替芬泰 175、620 mg/kg 剂量组中均出现部分胎儿肾盂扩张, 但给药组与溶媒对照组相比并无明显差别。结果见表 5。

表4 替芬泰对胎儿生长发育的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of Tyrophentide on growth and development of fetal ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	评价胎仔数	评价胎仔窝数	胎仔体质量/g	胎仔顶臀长/cm	胎仔尾长/cm	雄/雌性别比
溶媒对照	0	263	20	5.52±0.335	4.11±0.096	1.50±0.039	111/152
替芬泰	50	327	24	5.46±0.510	4.13±0.164	1.52±0.055	154/173
	175	297	22	5.44±0.361	4.11±0.111	1.51±0.047	135/162
	620	338	25	5.23±0.371**	4.06±0.091	1.48±0.055	156/180

与溶媒对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group

表5 替芬泰对胎儿内脏发育的影响

Table 5 Effect of Tyrophentide on visceral development of fetal

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	评价胎仔数	评价胎仔窝数	肾盂扩张	
				胎仔数 (%)	窝数 (%)
溶媒对照	0	131	20	3 (2.3)	3 (15.0)
替芬泰	50	163	24	0 (0)	0 (0)
	175	151	22	1 (0.7)	1 (4.5)
	620	172	25	2 (1.2)	2 (8.0)

3.2.4 对胎仔骨骼发育的影响 在替芬泰 175、620 mg/kg 剂量组中部分胎仔出现波状肋,且 620 mg/kg 剂量组出现波状肋的胎仔数和窝数与溶媒对照组比

较有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。各给药组与溶媒对照组胎仔的尾椎和前后爪的发育无明显差别。结果见表 6。

表 6 替芬泰对胎仔骨骼发育的影响

Table 6 Effect of Tyrophenide on skeletal development of fetal

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	评价胎 仔窝数	评价胎 仔窝数	额骨骨化不全		顶骨骨化不全		顶间骨骨化不全		上枕骨骨化不全 I 级	
				胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)
溶媒对照	—	132	20	1(0.8)	1(5.0)	7(5.3)	6(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(2.3)	3(15.0)
替芬泰	50	164	24	1(0.6)	1(4.2)	1(0.6)	1(4.2)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.2)	2(8.3)
	175	146	22	0(0.0)	0(0.0)	11(7.5)	4(18.2)	3(2.1)	2(9.1)	6(4.1)	4(18.2)
	620	166	25	0(0.0)	0(0.0)	12(7.2)	7(28.0)	1(0.6)	1(4.0)	5(3.0)	4(16.0)
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	评价胎 仔窝数	评价胎 仔窝数	上枕骨骨化不全 II 级		胸骨骨化不全		胸骨未骨化		胸骨二分裂	
				胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)
溶媒对照	—	132	20	0(0.0)	0(0.0)	82(62.1)	20(100.0)	1(0.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0)
替芬泰	50	164	24	0(0.0)	0(0.0)	95(57.9)	22(91.7)	1(0.6)	1(4.2)	1(0.6)	1(4.2)
	175	146	22	1(0.7)	1(4.5)	92(63.0)	22(100.0)	1(0.7)	1(4.5)	0(0.0)	0(0.0)
	620	166	25	0(0.0)	0(0.0)	127(76.5)	25(100.0)	4(2.4)	3(12.0)	0(0.0)	0(0.0)
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	评价胎 仔窝数	评价胎 仔窝数	短小多余肋 (第 7 颈椎)		短肋		多余肋		捏手状肋	
				胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)
溶媒对照	—	132	20	6(4.5)	5(25.0)	0(0.0)	0(0.0)	7(5.3)	3(15.0)	1(0.8)	1(5.0)
替芬泰	50	164	24	3(1.8)	3(12.5)	4(2.4)	3(12.5)	16(9.8)	12(50.0)	0(0.0)	0(0.0)
	175	146	22	1(0.7)	1(4.5)	4(2.7)	3(13.6)	10(6.8)	7(31.8)	0(0.0)	0(0.0)
	620	166	25	3(1.8)	3(12.0)	2(1.2)	2(8.0)	12(7.2)	10(40.0)	2(1.2)	2(8.0)
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	评价胎 仔窝数	评价胎 仔窝数	波状肋		肋骨骨化不全		掌骨数		近端指骨数	
				胎仔数 (%)	窝数 (%)	胎仔数 (%)	窝数 (%)	左侧	右侧	左侧	右侧
溶媒对照	—	132	20	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4.0±0.03	4.0±0.03	2.5±1.09	2.7±0.96
替芬泰	50	164	24	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4.0±0.00	4.0±0.00	2.7±0.95	2.9±0.92
	175	146	22	1(0.7)	1(4.5)	0(0.0)	0(0.0)	4.0±0.00	4.0±0.03	2.9±0.87	3.1±0.85
	620	166	25	6(3.6)*	5(20.0)*	1(0.6)	1(4.0)	4.0±0.00	4.0±0.00	2.6±1.19	2.8±1.10
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	评价胎 仔窝数	评价胎 仔窝数	远端指骨数		跖骨数		近端趾骨数		远端趾骨数	
				左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧
溶媒对照	—	132	20	3.7±1.43	3.9±1.22	4.8±0.21	4.8±0.23	0.7±0.97	0.6±0.84	0.7±0.97	0.6±0.84
替芬泰	50	164	24	4.1±0.99	4.4±0.85	4.8±0.31	4.7±0.31	0.8±1.20	0.9±0.15	0.8±1.20	0.9±0.15
	175	146	22	4.0±1.11	4.1±1.04	4.8±0.31	4.7±0.33	0.7±0.82	0.6±0.78	0.7±0.82	0.6±0.78
	620	166	25	4.3±0.81	4.6±0.65	4.7±0.34	4.6±0.36	0.7±1.00	0.7±0.89	0.7±1.00	0.7±0.89

4 讨论

全球乙肝患者人数众多,乙型肝炎病毒进入肝细胞后产生超螺旋 DNA,导致病毒产生耐药性,同时长期药物治疗也可能产生乙肝病毒突变株,因

此至今还未发现能够根除该病的药物^[6]。目前该疾病主要是以抗病毒治疗和保肝治疗为主,患者在治疗期间需长期服药以抑制病毒复制,故对药物的选择需考虑各种药物的优越性和安全性。

临床上治疗乙肝的药物少之又少,研制疗效更好且毒副作用小的抗乙肝新药成为治疗乙肝患者的迫切需求,此时替芬泰应运而生。首先,替芬泰可多靶点抗乙肝病毒,研究人员已对其进行了全面的抗病毒研究,证实该药物可以很好的抑制乙肝病毒,作用稳定,停药后症状反弹现象弱,故不需长期持续用药。其次,替芬泰还具有保肝护肝的作用,实验结果显示,其对 CCl_4 、 α -萘异硫氰酸酯所致肝损伤有明显的保护作用,替芬泰可通过增强机体抗氧化能力,加速自由基的清除,修复受损的肝细胞,使肝功能得到改善^[4-5]。再次,就目前的已完成的毒理试验结果发现替芬泰的不良反应少。由此可见,替芬泰的研发前景非常乐观,成为肝病患者的福音。

据文献报道90%的妇女妊娠期间会服用至少一种药品,用药孕妇使用中药及中成药比例最高,其次是维生素和微量元素类药,再次是抗微生物类药,但有近一半的妊娠妇女并未认识到中药(包括成药和草药)会对胎儿及母体造成不良影响^[7-8]。不论西药或中药的生殖毒性非临床安全评价均应引起重视,生殖毒性评价可以帮助医生临床指导妊娠用药。故而替芬泰即便是从中药中提取,也应进行生殖毒性评价研究。

本研究旨在评价ig给予替芬泰对妊娠母鼠、胚胎、胎仔发育的影响。研究结果显示,ig给予175和620 mg/kg剂量的替芬泰,妊娠大鼠出现一定的系统毒性,主要表现为摄食量减少、体质量及体质量增长缓慢;ig给予620 mg/kg的替芬泰,对大鼠的胚胎发育有毒性,主要表现为胎仔体质量降低,波状肋的发生概率明显增加,分析原因可能由于母鼠体质量偏低,摄食少导致的胎仔变化。综上所述,50 mg/kg剂量为妊娠大鼠的无毒性反应剂量,该剂量相当于临床拟用剂量(50~100 mg/人/天,按体质量60 kg计算)的30倍;大鼠胚胎发育的无毒性反应剂量为175 mg/kg,该剂量相当于临床拟用剂

量的105倍。

另在试验过程中发现,ig给予替芬泰,50、175和620 mg/kg剂量组大鼠给药后几分钟出现流涎现象,有流涎的动物随给药剂量的增加而增多。从持续时间来看,50 mg/kg剂量组动物均于给药后10 min内症状消失;175和620 mg/kg剂量组大部分动物于给药后30 min内消失。该现象的发生可能是由于受试药物有特殊味道刺激食道和胃等消化道粘膜而引起的反射性唾液分泌增加,非药物毒性反应,建议考虑通过后期的剂型改造以减少药物对消化系统的刺激。

参考文献

- [1] 曲莉莎,曾万玲,梁光义. 民族药马蹄金提取物对小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(4): 197-199.
- [2] 曲莉莎,曾万玲,梁光义. 民族药马蹄金提取物对D-GlaN、TAA、ANIT所致小鼠化学性肝损伤的药理作用研究 [J]. 中国医药学报, 2003, 18(3): 84-86.
- [3] 刘青川,王晨吟,何书桃,等. 苯丙氨酸二肽类化合物Y101对DHBV-DNA的影响 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(10): 1389-1393.
- [4] 于珊,徐雪钰,李昆峰,等. 苯丙氨酸二肽类化合物Y101对 α -萘基异硫氰酸酯致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 解放军医学学报, 2011, 27(2): 118-121.
- [5] 马俊,徐颖,黄正明,等. 苯丙氨酸二肽类化合物190对小鼠 CCl_4 肝损伤的保护作用 [J]. 解放军药学报, 2009, 25(5): 384-386.
- [6] 徐巍,苏乐群,李宏建. 乙肝治疗药物的研究进展及临床评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(9): 737-739.
- [7] 郭惠娟,刘建安,刘莉莉,等. 孕妇用药现状、需求及药学服务效果分析 [J]. 中国药房, 2010, 21(26): 2490-2492.
- [8] 刘滔滔,钟小斌,陈龙英,等. 妊娠妇女安全用药知识、态度、行为的调查 [J]. 药物警戒, 2006, 3(1): 26-29.