

银杏内酯B注射液对大鼠生育力及早期胚胎发育毒性研究

黄凤娇¹, 李 燕², 李继洪²

1. 湖北省药品监督检验研究院, 湖北 武汉 430054

2. 湖北省医药工业研究院有限公司, 湖北 武汉 430064

摘要: 目的 观察银杏内酯B (GGB) 注射液对SD大鼠生育力及早期胚胎发育毒性。方法 SD大鼠随机分为GGB注射液低、中、高剂量(30、60、120 mg/kg, 分别相当于临床等效剂量的52、105、210倍)组及溶媒对照组(生理盐水), 每组雌雄各25只。每天尾静脉推注给药1次, 雄鼠连续给药4周, 雌鼠连续给药2周, 以1:1合笼交配, 雄鼠继续给药至交配成功, 雌鼠继续给药至妊娠第7天。在确定雌鼠受精后处死同笼的雄鼠, 解剖检查睾丸和附睾等生殖器官及精子的数量、活力和形态。雌鼠妊娠第14天处死, 解剖检查卵巢、子宫和胚胎的情况。**结果** 雄性大鼠GGB注射液高剂量组给药2.5、3.0、3.5、4.0周体质量与溶媒对照组比较显著增高($P<0.05$), 雄性大鼠给药第2周中、高剂量组摄食量与溶媒对照组比较显著增高($P<0.05$ 、 0.01), 给药第3周高剂量组摄食量与溶媒对照组比较亦显著增高($P<0.01$), 摄食量的增高与体质量的显著性增长呈现出较好的一致性, 说明供试品对体质量的影响跟饲料的摄入有关。GGB注射液对雄性大鼠的睾丸、附睾的质量及脏器系数、精子数量、精子活力、精子形态没有显著影响; 对雌鼠的体质量、摄食、孕鼠的黄体、活胎、死胎、吸收胎、着床数、交配率、受孕率、着床前丢失率和着床后丢失率没有显著影响。**结论** 在本试验条件下, 未见GGB注射液对大鼠的生育力及早期胚胎的发育有毒性作用。

关键词: 银杏内酯B注射液; 生殖毒性; 发育; 大鼠; 药物安全性评价

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2019) 04-0653-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.009

Toxicity effects of Ginkgolide B Injection on fertility and early embryo development in rats

HUANG Fengjiao¹, LI Yan², LI Jihong²

1. HuBei Institute for Drug Control, Wuhan 430054, China

2. Hubei Provincial Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Wuhan 430064, China

Abstract: Objective To study the toxicity effect of Ginkgolide B (GGB) Injection on fertility and early embryonic development in rats. **Methods** A total of 100 male and 100 female SD rats were randomly divided into four groups: low, medium and high dosage groups of GGB Injection (30, 60 and 120 mg/kg, 52, 105 and 210 times of clinical equivalent dose, respectively) and solvent control group (normal sodium). There were 25 male and 25 female rats in each group. The rats were given by caudal vein injection (1 mL/100 g) once daily; The male rats were received successive administration for 28 days before mating and the successive administration of 14 days before mating to 7 days after pregnancy for female rats. When the female rats were confirmed to be pregnant, the male rats were executed and their testicle, epididymis and sperm were examined. The female rats were executed on the fourteenth day of pregnancy, and The ovary, uterus and embryo of the female rats were studied. **Results** To male rats, there was a significant increasing difference for the treatment group (120 mg/kg) compared with the control group in body weight gain of male rats in 2.5, 3, 3.5, and 4 week ($P<0.05$), and the food intake of male rats in medium and high dose group was significantly higher than that in solvent control group at the second week ($P<0.05$, 0.01), and the food intake of high dose group was also significantly higher than that in solvent control group at the third week ($P<0.01$). The body weight gain may caused by food intake. There were no significant differences in mass and organ coefficients of testis and epididymis, sperm count, sperm viability, and sperm form. To female rats, there were no significant differences in the body weight, food intake, pregnancy rate, the number of corpus luteum, live embryo, dead embryo and absorbed embryo, implantation, mating rate, and the rate of lost oosperm before and after implantation. **Conclusion** Within the

收稿日期: 2018-05-03

第一作者: 黄凤娇, 女, 副主任药师, 研究方向为药理毒理学。E-mail: 2449582827@qq.com

range of experiment doses, there is no significant toxic effect of GGB Injection on the fecundity and the early development of embryo.

Key words: Ginkgolide B Injection; reproductive toxicity; fertility; rats; drug safety evaluation

银杏是一种在地球上存在了2亿多年的植物,是银杏科银杏属中唯一的生存种,被誉为“活化石”。银杏的化学成分复杂,其中银杏内酯B(ginkgolide B, GGB)是迄今发现的最强的血小板活化因子受体天然拮抗剂^[1], GGB主要用于心血管疾病、脑缺血、脑老化、阿尔茨海默病及哮喘病的治疗^[2]。目前关于GGB的化学成分、药理作用等方面都有许多深入的研究,但对于其生殖毒性方面鲜有报导,本研究对GGB注射液进行了一般生殖毒性研究,旨在探讨其对大鼠的生育力及早期胚胎发育的影响,为其进一步开发利用提供安全性评价依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级SD大鼠,雌雄各100只,体质量250~300 g, 9周龄,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2016-0002。

1.2 供试品与试剂

GGB注射液,批号110601,规格30 mg/mL,由广州博济医药生物技术有限公司提供。甲醛,批号20100613,广东光华化学厂有限公司;冰醋酸,批号T20090910;曙红Y,批号20080415,均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

全自动精子毒性分析仪, Tox Ivos, Hamilton Thorne Inc. 生产;光学显微镜,由宁波宇捷光学仪器有限公司生产。

2 方法^[3-5]

2.1 分组、给药及交配方法

SPF级SD大鼠随机分为GGB注射液低、中、高剂量(30、60、120 mg/kg, 分别相当于临床等效剂量的52、105、210倍)组及溶媒对照组(生理盐水),每组雌雄各25只。每天尾静脉推注已配制好的药液或溶媒,每天1次,给药体积为10 mL/kg,雄鼠连续

给药4周,雌鼠连续给药2周^[6]。给药结束后将雄鼠和雌鼠以1:1合笼^[7-8],合笼期间继续给药,并每日进行阴栓或阴道涂片检查,查到阴栓或精子日定为妊娠d0,雌鼠继续给药至妊娠d7^[9]。雄鼠交配成功后停药处死,2周内未交配上的雌雄大鼠停药处死。

2.2 观察指标^[10-11]

试验期间:每日观察动物体征和死亡情况,每周称量2次体质量及1次摄食量,妊娠大鼠于妊娠d0、d3、d5、d7、d10和d14称质量;雄鼠交配成功后停药处死,称睾丸、附睾质量,计算脏器系数,计数精子数、检查精子活力及精子形态;雌鼠妊娠d14处死计数黄体数、活胎、死胎、吸收胎,计算着床数、交配率、受孕率等。

2.3 数据统计处理方法

实验数据用SPSS 17.0统计软件进行处理,交配率、受孕率用 χ^2 检验,其余指标用方差分析。

3 结果

3.1 一般反应情况

给药期间每日观察动物的外观体征、行为活动等,各剂量组动物无毒性反应,与溶媒对照组比较没有差异,无动物死亡情况。妊娠动物妊娠期间每日观察没有阴道出血的现象发生。

3.2 对动物体质量及摄食量的影响

GGB注射液对雌性大鼠的体质量没有明显影响,结果见表1;对雄性大鼠体质量的影响结果见表2;对妊娠大鼠体质量的影响见表3;对雌雄大鼠的摄食情况见表4。

雄性大鼠高剂量组给药2.5、3.0、3.5、4.0周体质量与溶媒对照组比较显著增高。雄性大鼠给药第2周中、高剂量组摄食量与溶媒对照组比较显著增高($P<0.05$ 、 0.01),给药第3周高剂量组摄食量与溶媒对照组比较亦显著增高($P<0.01$),给药第4周低、中剂量组摄食量与溶媒对照组比较显著降低($P<0.01$ 、 0.05)。

表1 GGB注射液不同时间对雌性大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=25$)

Table 1 Effects of GGB Injection on body mass of female rats at different time ($\bar{x} \pm s$, $n=25$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g				
		给药0周	给药0.5周	给药1.0周	给药1.5周	给药2.0周
溶媒对照	—	217.2±8.7	253.3±15.2	258.4±13.1	263.9±14.3	265.6±14.1
GGB注射液	30	216.8±9.4	252.7±13.5	256.8±13.7	260.4±13.8	260.9±14.8
	60	216.8±9.0	256.2±12.2	260.1±15.6	264.3±13.8	266.6±13.4
	120	217.2±9.0	255.1±13.7	259.0±14.4	264.5±15.3	264.8±16.3

表2 GGB注射液对雄性大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 25$)Table 2 Effects of GGB Injection on body mass of male rats at different time ($\bar{x} \pm s, n = 25$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	体质量/g								
		给药0周	给药0.5周	给药1.0周	给药1.5周	给药2.0周	给药2.5周	给药3.0周	给药3.5周	给药4.0周
溶媒对照	—	288.7±9.5	323.3±12.6	344.0±15.3	369.7±16.3	384.2±18.6	402.0±19.6	412.6±19.7	431.6±21.5	441.4±22.4
GGB注	30	288.4±9.1	324.9±11.0	348.7±11.2	369.4±12.4	388.2±15.2	406.3±17.8	418.8±18.1	436.0±19.4	447.2±21.5
射液	60	288.4±9.9	326.4±10.8	346.2±13.2	373.2±14.9	390.6±16.2	411.5±16.4	423.8±19.1	440.0±21.4	455.1±21.7
	120	288.8±9.2	323.8±12.2	350.1±14.1	374.8±16.4	395.1±19.6	415.4±22.4*	427.0±25.2*	448.1±27.7*	458.2±27.6*

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs solvent control group表3 GGB注射液对妊娠大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of GGB Injection on body mass of pregnant rats at different time ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n/例	体质量/g					
			妊娠 d0	妊娠 d3	妊娠 d5	妊娠 d7	妊娠 d10	妊娠 d14
溶媒对照	—	22	269.2±15.4	292.2±17.6	301.8±20.3	309.1±21.7	324.3±23.3	343.9±26.6
GGB注射液	30	22	262.5±15.1	283.3±17.0	287.2±20.5*	296.9±18.4	313.0±21.4	326.8±26.8
	60	19	269.3±17.2	289.7±14.7	298.3±13.7	303.1±12.6	320.3±12.3	347.7±15.4
	120	21	268.5±16.1	291.3±17.1	298.4±16.1	305.6±19.2	322.4±21.8	345.8±23.4

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs solvent control group表4 GGB注射液对雌雄大鼠摄食量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 4 Effects of GGB Injection on food intake of male and female rats at different time ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	雌鼠摄食量/g		雄鼠摄食量/g			
		给药1周	给药2周	给药1周	给药2周	给药3周	给药4周
溶媒对照	—	6.6±0.5	6.8±0.4	8.4±0.4	7.0±0.3	6.2±0.2	6.4±0.3
GGB注射液	30	6.4±0.5	5.8±0.4**	8.3±0.3	7.0±0.3	6.3±0.1	6.0±0.2*
	60	6.6±0.2	6.2±0.6	8.2±0.8	7.4±0.3*	6.6±0.4	6.0±0.2**
	120	7.0±0.4	6.5±0.7	8.8±0.5	7.5±0.2**	6.8±0.2**	6.3±0.2

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group

妊娠大鼠 d5 低剂量组体质量与溶媒对照组比较显著降低($P < 0.05$), 但无量效及时效关系。

3.3 对雄性大鼠生殖器官及精子的检查结果

结果见表5~7, 各给药组睾丸、附睾质量及脏器系数、精子数量、精子活动度、精子形态与溶媒对

照组比较均无显著性差异。

3.4 对生育指标的影响结果

各给药组黄体数、吸收胎数、活胎数、死胎数、着床前丢失率及着床后丢失率与溶媒对照组比较无显著性差异, 低剂量组着床数与溶媒对照组比较显著降低($P < 0.05$)。结果见表8。

表5 GGB注射液对雄性动物睾丸、附睾脏器质量及系数的影响($\bar{x} \pm s$)Table 5 Effects of GGB Injection on mass and organ coefficients of testis and epididymis of male rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	解剖前动物体质量/g	睾丸质量/g	附睾质量/g	睾丸脏器系数/%	附睾脏器系数/%
溶媒对照	—	448.6±28.5	3.78±0.35	1.08±0.11	0.85±0.10	0.24±0.03
GGB注射液	30	451.2±23.7	3.76±0.31	1.04±0.11	0.83±0.07	0.23±0.02
	60	465.4±25.8	3.71±0.27	1.04±0.12	0.80±0.08	0.22±0.03
	120	457.5±29.9	3.77±0.20	1.03±0.10	0.83±0.06	0.23±0.02

表6 GGB注射液对雄性动物精子数量及精子活动度检查结果($\bar{x} \pm s$)Table 6 Effects of GGB Injection on sperm amount and viability of male rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	精子数量($\times 10^7$)	精子活动度/%			
			快速运动	中速运动	慢速运动	不运动
溶媒对照	—	4.2±1.9	18±10	1±1	13±8	69±14
GGB注射液	30	4.1±2.2	19±10	0±1	9±6	71±15
	60	3.8±1.5	19±8	0±1	13±10	68±16
	120	4.3±2.5	18±8	1±1	13±11	68±16

表7 GGB注射液对雄性动物精子形态的检查结果($\bar{x} \pm s$)Table 7 Effects of GGB Injection on sperm morphology of male rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	无定形	无钩	香蕉形	胖头	双头	尾折形	双尾
溶媒对照	—	2±2	2±2	0±1	0±0	0±0	2±1	0±0
GGB注射液	30	2±2	2±2	0±1	0±0	0±0	2±2	0±0
	60	2±2	1±2	0±1	0±0	0±0	3±2	0±0
	120	2±2	1±1	1±1	0±0	0±0	2±2	0±0

表8 GGB注射液对妊娠大鼠生育指标的检查结果($\bar{x} \pm s$)Table 8 Effects of GGB Injection on fertility index of pregnant rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/例	黄体数	着床数	吸收胎数	活胎数	死胎数	着床前丢失率/%	着床后丢失率/%
溶媒对照	—	22	19±4	16±2	2±3	14±4	0±0	15.0±11.1	13.4±19.3
GGB注射液	30	22	18±3	14±4*	1±1	12±4	0±0	24.5±21.8	12.2±20.8
	60	19	19±4	15±2	1±1	14±2	0±0	18.7±13.2	6.0±4.7
	120	21	18±3	15±4	1±1	14±4	0±0	20.3±20.1	7.6±6.7

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs solvent control group

3.5 对大鼠交配率和生育率的检查结果

各给药组大鼠的交配率和受孕率与溶媒对照组比较无显著差异,结果见表9。

表9 GGB注射液对雌雄动物交配率、受孕率的影响($\bar{x} \pm s$)Table 9 Effects of GGB Injection on mating rate and conception rate of male and female rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	合笼雌/雄动物数	雌鼠	
			交配率	受孕率
溶媒对照	—	25/25	23/25	20/23
GGB注射液	30	25/25	25/25	24/25
	60	25/25	23/25	23/23
	120	25/25	23/25	22/23

4 讨论

动物生殖毒性试验是药物非临床安全性评价的重要内容,是药物从药学研究进入临床试验的重要环节,在药物开发的过程中,生殖毒性试验的目

的是通过动物试验表征受试物对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响,预测其可能产生的对动物的精卵形成、交配、排卵、射精、合子形成、着床、妊娠、分娩和哺乳过程的毒理学作用;即从生殖细胞分化到整个细胞发育,从胚胎细胞发育到个体器官形成,以及对子代胚胎-胎儿发育、出生后发育的不良影响^[12]。生殖毒性试验在限定临床研究受试者范围、降低临床试验受试者和药品上市后使用人群的用药风险方面发挥重要作用。

本研究对雌雄动物由交配前到交配期直至胚胎着床给药,以评价受试物对动物生殖的毒性或干扰作用。本研究中,体质量及摄食量方面:GGB注射液对雌性大鼠的体质量没有明显影响;雄性大鼠高剂量组给药2.5、3.0、3.5、4.0周体质量与溶媒对照组比较有显著性增高,雄性大鼠给药第2周中、高剂量组摄食量与溶媒对照组比较有显著性增高,给药第3周高剂量组摄食量与溶媒对照组比较亦显著增

高,给药第4周低、中剂量组摄食量与溶媒对照组比较显著降低,但无量效关系,故无生物学意义。供试品高剂量组在给药2.5、3、3.5、4周有对雄性大鼠体质量有增高的影响,在给药2、3周有对雄性大鼠摄食量增高的影响,摄食量的增高与体质量的显著性增长呈现出较好的一致性,并未发现其它相关指标有异常,说明供试品对体质量增高的影响与饲料的摄入有关,并非药物的毒性反应。妊娠大鼠d5低剂量组体质量与溶媒对照组比较显著降低,但无量效及时效关系,且其它各天各剂量组妊娠大鼠体质量与溶媒对照组比较无显著性差异,故供试品对妊娠大鼠体质量的影响无生物学意义。

GGB注射液低剂量组着床数与溶媒对照组比较有显著性降低($P<0.05$),但无量效关系,且低剂量组其它相关指标并未发现有显著性差异,故供试品对妊娠大鼠着床数的影响无生物学意义。

各给药组各检测指标与溶媒对照组比较无显著性差异,说明GGB注射液对配子的成熟度、交配行为、生育力、胚胎着床前和着床没有影响;对雌性动物的动情周期、受精卵输卵管转运、着床及胚胎前发育没有影响;对雄性动物的精子数量、精子活动力、精子形态、交配能力等没有影响。

本试验条件下,未见GGB注射液对大鼠的生育力及早期胚胎的发育有毒性作用。

参考文献

- [1] 马丽娜,陈北冬,赵艳阳,等. 银杏内酯B对内皮细胞的保护作用及分子机制研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 189-193.
- [2] 黄晓舞,梅世昌,李 外. 银杏内酯B注射液对Beagle犬的长期毒性研究[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2338-2341.
- [3] 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.
- [4] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学、药理学、毒理学)[S]. 1993.
- [5] 袁伯俊,王治乔. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997.
- [6] 叶向锋,王灵芝,王爱平. SJX对SD大鼠生育力与早期胚胎发育的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 610.
- [7] 张 彤,汪 晶,龚夏实,等. 中药DMY对大鼠I段生殖毒性作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 592-593.
- [8] 邓 沁,吴 忠,彭 维,等. 一类新药尖吻蝮蛇凝血酶对SD大鼠生育力和早期胚胎发育的影响[J]. 中南药学, 2017, 15(8): 1032-1036.
- [9] 龚华云,李宗河,范小艳,等. 新型PPAR- δ 激动剂对SD大鼠生育力与早期胚胎发育毒性研究[J]. 国外医药(抗生素分册), 2015, 36(5): 216-222.
- [10] 谷颖敏,李咏梅,姜 昕,等. 朱砂灌胃给药对大鼠生育力与早期胚胎发育毒性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 226-231.
- [11] 岳 鹏,沈 姣,蔡 鸣,等. 赤芍脉通注射液对大鼠生育力和早期胚胎发育的毒性研究[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(2): 162-164.
- [12] 孙祖越,周 莉,闫 晗,等. 如何成功开展药物非临床生殖毒性试验[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(22): 2195-2204.