

秦皮水煎剂对SD大鼠胚胎/胎儿发育的影响*

□张 旻** 刘晓萌 宋 捷 胡燕萍 王秀文 李 波

(中国药品生物制品检定所国家药物安全评价监测中心 北京 100175)

摘 要:目的:观察秦皮水煎剂对SD大鼠胚胎/胎儿发育的影响。方法:采用SD孕鼠,分为溶媒对照组、秦皮组,每组20只交配成功动物,于妊娠第6日开始至妊娠第17日经口灌胃给予秦皮水煎剂 $27.3\text{g}(\text{生药})\cdot\text{kg}^{-1}$,每天1次,于妊娠第20天解剖。观察母体动物的临床症状、体重变化、摄食量、母体动物的黄体数、着床数、胚胎生存死亡情况、生存胎仔的性别、体重、外观、骨骼及内脏检查等指标;结果:秦皮组于妊娠第6~12d引起SD妊娠大鼠摄食量显著降低,停药后,摄食量显著增加,雄性与雌性胎儿体重较对照组明显增高,其余母体及胚胎/胎儿发育各项指标未见明显影响。结论:在本实验条件下,秦皮水煎剂未见明显的母体毒性与胚胎/胎儿发育毒性。

关键词:秦皮 发育毒性

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.05.022

中药已有几千年的使用历史,但在发达国家一直未能作为药品合法销售和使用。自1999年开始,中国国家食品药品监督管理局(SFDA)与法国健康产品卫生安全管理局(AFSSAPS)开展了政府间的中法植物药合作项目,旨在促使中国的中药材被法国药典或欧洲药典收载,促进中药及中药材产品(成品和/或专利)进入法国及欧盟,保证日后可能在法国销售的中草药或中成药的质量和安全性,进而扩大中药在世界范围的影响。

中药秦皮为木犀科植物的干燥枝皮或干皮,具有清热燥湿、收涩、明目功效,用于热痢、泄泻、赤白带下、目赤肿痛、目生翳膜^[1]。现代药理学研究表明,秦皮有抗病原微生物、抗炎镇痛及抗肿瘤等作用^[2]。但秦皮的安全性资料较少,尤其关于胚胎/胎儿发育

毒性研究未见报道。我们受中法植物药工作组的委托,按照OECD414的指导原则^[3],采用SD大鼠,对秦皮的胚胎/胎儿发育毒性进行初步研究。

一、材料与方 法

1. 秦皮水煎剂

秦皮原药材由中国药品生物制品检定所标本馆张继采集,并鉴定为秦皮Cortex Fraxini。水煎剂由北京同仁堂科技发展股份有限公司制备,浓度为 $2.73\text{g}(\text{生药})\cdot\text{mL}^{-1}$;溶媒对照采用动物饮用水。

2. 实验动物

SD大鼠,清洁级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号为SCXK(京)2007-0001,雄性为310~380g,雌性为210~260g;钴60放射灭菌鼠全价颗粒饲料喂养,自由饮水。动物饲养室温度 $20^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$,相对湿度36%~66%,12h光照/12h黑暗周期。

收稿日期:2010-05-06

修回日期:2010-07-21

* 科学技术部国际科技合作项目(2006DFB31690):促进中药材在法国的注册和进入,负责人:林瑞超。

** 联系人:张旻,副主任药师,主要研究方向:生殖毒理,Tel:010-67872233-8201,E-mail:zhangmin@nicpbp.org.cn。

换气次数为 10~20 次/h。

3. 交配方法

将雌鼠以 1:1 比例与雄鼠同笼,次日早上进行阴栓与阴道涂片检查,发现精子与阴栓同时存在者,判为交配成立,当日记为妊娠 0 日(GD0)。

4. 分组与给药

根据法方建议,采用秦皮的最大技术给药量,秦皮原液为 $2.73\text{g(生药)}\cdot\text{mL}^{-1}$,故设定发育毒性研究的剂量为 $27.3\text{g(生药)}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。2005 版中国药典推荐秦皮的人用量为 $6\sim 12\text{g}^{[1]}$,以人体重 60kg 计算,相当于 $0.1\sim 0.2\text{g(生药)}\cdot\text{kg}^{-1}$,所选剂量 $27.3\text{g(生药)}\cdot\text{kg}^{-1}$ 相当于人临床最大用量的 137 倍。

交配成功大鼠,随机分为对照组、秦皮组,每组 20 只,秦皮组经口灌胃给予秦皮水煎剂 $2.73\text{g(生药)}\cdot\text{mL}^{-1}$,溶媒对照组给予动物饮用水,给药体积为 $10\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重。于妊娠第 6d 开始至妊娠第 17d 连续给药,每日 1 次。

5. 观察指标

(1) 妊娠动物的观察指标。

对于妊娠动物进行临床症状观察、体重与摄食量测定,并于妊娠第 20d 进行剖腹产,确认是否妊娠。摘出妊娠动物的卵巢及子宫,计数黄体数、着床数。同时确认有无胎盘异常并称重。

(2) 生存胎儿的观察指标。

进行外表观察、胎儿体重测定、性别判断。将 50% 的生存胎儿用于进行内脏检查,胎儿头部采用 Wilson 粗大切片法^[4]、胸部及腹部根据显微解剖法^[5],检查内脏有无畸形、变异。其余的生存胎儿经 70% 的酒精液固定,根据 Dawson 法制作茜素红 S 染色透明骨骼标本^[6],观查有无骨骼畸形、变异,检查胸骨、掌骨、跖骨、骶尾椎骨的各骨化数。

6. 统计方法

应用 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。

二、结 果

1. 妊娠动物临床症状观察、体重及摄食量测定

各组动物临床症状观察均未见明显异常。

于妊娠第 0、3、6、9、12、15、18 和 20d 测定的动物体重,结果显示,秦皮组妊娠动物的体重及体重增长与对照组比较无统计学差异($P>0.05$),摄食量于妊娠第 6~12d 显著低于对照组,于妊娠第 18~20d 显

著高于对照组($P<0.01$)(见表 1~2)。表明,经口灌胃给予秦皮水煎剂对 SD 妊娠大鼠的体重及体重增长没有明显影响,但可暂时性的引起摄食量降低,停药后摄食量增加。

2. 剖检观察

秦皮组妊娠末期剖检中黄体数、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性差异(见表 3),表明经口灌胃秦皮水煎剂对母体生育机能无明显影响。大体观察未见胎盘异常。

妊娠末期剖检中活胎数、死胎数、雄雌胎儿数、平均胎盘重、性别比对照组比较均无显著性差异,雄性 & 雌性胎儿体重与对照组比较增高,有统计学差异($P<0.01$, $P<0.05$)(见表 3),分别较对照组增加了 7.2% 与 6.4%。

3. 骨骼检查

与对照组比较,秦皮组的骨骼畸形率无明显差异($P>0.05$);各项变异率均无显著性差异(见表 4);与对照组比较,秦皮组的掌骨骨化数、跖骨骨化数、

表 1 秦皮水煎剂对 SD 妊娠大鼠体重的影响

时间	体重(g)	
	对照组	秦皮组
妊娠动物数	19	18
GD0	253.8±26.2	256.5±14.7
GD3	279.7±33.5	276.5±22.7
GD6	289.5±29.7	287.4±13.5
GD9	300.9±30.6	297.3±14.9
GD12	319.9±30.5	314.9±16.8
GD15	336.2±29.5	328.8±24.7
GD18	365.1±38.3	363.7±23.0
GD20	391.6±40.1	390.1±28.5

表 2 秦皮水煎剂对 SD 妊娠大鼠摄食量与体重增长的影响

时间	摄食量(g)		体重增长(g)	
	对照组	秦皮组	对照组	秦皮组
妊娠动物数	19	18	19	18
GD0~3	26.7±6.3	25.7±5.2	24.3±11.6	20.0±10.6
GD3~6	24.2±4.7	24.0±3.9	11.3±20.0	10.8±13.9
GD6~9	25.3±4.9	18.2±3.7**	11.4±12.0	9.9±8.1
GD9~12	26.1±4.4	21.6±3.6**	19.0±7.8	17.6±5.0
GD12~15	28.6±4.0	25.8±3.2	16.3±5.4	13.9±11.3
GD15~18	26.8±3.5	27.1±2.9	28.9±14.5	34.9±10.8
GD18~20	25.2±3.6	29.7±2.9**	26.6±11.5	26.4±8.1

注: ** $P<0.01$ 。

骶尾椎骨化数及各胸骨骨化率均无明显差异 ($P > 0.05$) (见表 5)。表明经口灌胃秦皮水煎剂对 SD 大鼠胚胎/胎儿骨骼发育及骨化过程未见明显影响。

4. 内脏观察

秦皮组未见畸形胎儿, 各项内脏变异率与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$) (见表 6)。表明经口灌胃秦皮水煎剂对 SD 大鼠胚胎/胎儿内脏发育未见有明显影响。

三、讨 论

本研究系中法植物药合作项目的一部分, 对秦皮水煎剂的 SD 大鼠发育毒性进行了研究。实验结果显示, 与对照组比较, 秦皮组临床症状观察未见明显异常, 体重及体重增重均与对照组比较无显著差异; 妊娠第 6~12d, 秦皮组摄食量显著低于对照组, 停药后, 摄食量增加, 有统计学差异, 考虑可能是由于秦皮性味苦寒, 刺激消化道, 引起动物摄食减少, 但由于动物体重及体重增长并未受明显影响, 临床症状观察未见异常, 且胎儿各项发育指标未见明显影响, 因此认为短期的摄食量降低无毒理学意义。

对于母体生殖机能检查, 秦皮组的黄体数、着床数、着床前丢失率及着床后丢失率与对照组比较均无明显差异, 未见秦皮水煎剂对于母体生殖机能有显著影响; 胚胎/胎儿发育的检查中, 秦皮组的活胎数、吸收胎数、雄雌胎儿数、平均胎盘重、性别比与对照组比较均无显著性差异, 雄性与雌性胎儿体重均明显高于对照组, 考虑可能是停药后 (妊娠第 18~20d) 秦皮组的摄食量明显增加引起, 且由于胎儿在妊娠后期生长较快, 所以导致胎儿体重增加, 因此认为不具有毒理学意义; 秦皮组的骨骼异常率及骨化程度均无明显改变, 内脏畸形与变异率均无明显改变。故认为在本实验条件下, 秦皮水煎剂未见明显的母体毒性及胚胎/胎儿发育毒性。

秦皮在中国具有悠久的历史, 但其安全性资料报道较少, 尚未见有关秦皮生殖毒性方面的研究报道。胡隐恒等^[7]的急性毒性研究表明, 小鼠口服秦皮素的 LD_{50} 为 $2.39g \cdot kg^{-1}$, 秦皮苷 $11.5g \cdot kg^{-1}$ 可引起 30% 动物死亡; 亚急性毒性结果显示, 小鼠口服秦皮素 $1g \cdot kg^{-1}$, 连续 2 周末观察到毒性反应; 杨天鸣等^[8]的结果, 腹腔注射秦皮水煎液 ($1g \cdot mL^{-1}$), 小鼠的半数致死量 LD_{50} 为 $14.60g \cdot kg^{-1}$ 。王晓东等^[9]的研究未发现秦皮总香豆素有致突变作用。本课题组采用水煎剂进行

表 3 妊娠末期剖检观察结果

		对照组	秦皮组
妊娠动物数		19	18
黄体数		17.4±4.3	15.1±2.7
着床数		13.9±4.3	13.1±3.5
活胎数		12.7±4.1	12.6±3.6
吸收胎数		1.2±1.0	0.4±0.5
着床前丢失率 (%)		18.9±24.2	14.1±19.7
着床后丢失率 (%)		8.4±7.5	3.8±4.7
胎仔数	雄	6.8±3.0	6.1±2.8
	雌	5.9±2.3	6.6±2.9
胎仔重量 (g)	雄	3.524±0.241	3.776±0.242**
	雌	3.283±0.231	3.493±0.170*
性别比 (%)		52.0±12.7	47.6±17.1
胎盘重量 (g)		0.484±0.049	0.513±0.082

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

表 4 秦皮水煎剂对胎仔骨骼发育的影响

	对照组	秦皮组
妊娠动物数	19	18
骨骼畸形		
总畸形胎仔数	13	6
十三肋短小 (%)	0.00±0.00	1.85±7.86
十三肋缺失 (%)	0.00±0.00	1.85±7.86
舌骨缺失 (%)	3.29±14.34	0.00±0.00
后头骨形态异常 (%)	1.32±5.74	0.00±0.00
腰椎缺失 (%)	0.00±0.00	1.85±7.86
腰椎过剩 (%)	0.00±0.00	0.79±3.37
耻骨缺失 (%)	3.95±17.21	0.00±0.00
耻骨短小 (%)	0.66±2.87	0.00±0.00
坐骨短小 (%)	3.95±17.21	0.00±0.00
胸骨愈合 (%)	0.00±0.00	0.79±3.37
椎体分离 (%)	4.98±9.52	4.13±6.91
骨骼变异		
总变异胎仔数	32	19
十四肋	8.63±14.10	4.10±13.81
椎体亚铃型	1.99±4.76	5.09±11.03
椎体不对称亚铃型	0.75±3.28	0.00±0.00
颈肋骨	0.00±0.00	2.78±8.57
胸骨二分骨化	0.00±0.00	0.79±3.37
舌骨未骨化	6.86±13.51	4.40±15.02
顶骨骨化不全	2.63±11.47	0.00±0.00
间顶骨骨化不全	4.61±20.07	0.00±0.00
后头骨骨化不全	1.32±5.74	0.00±0.00
耻骨未骨化	2.51±8.15	0.00±0.00
耻骨骨化不全	1.50±6.55	1.91±5.63

表 5 秦皮水煎剂对胎仔骨化程度的影响

	对照组	秦皮组
妊娠动物数	19	18
掌骨骨化数	6.9±0.7	7.3±0.8
跖骨骨化数	7.9±0.1	8.0±0.1
骶尾椎骨化数	7.5±0.8	7.7±0.4
第Ⅰ胸骨骨化率(%)	100.0±0.0	100.0±0.0
第Ⅱ胸骨骨化率(%)	98.7±5.7	100.0±0.0
第Ⅲ胸骨骨化率(%)	100.0±0.0	100.0±0.0
第Ⅳ胸骨骨化率(%)	97.9±6.4	100.0±0.0
第Ⅴ胸骨骨化率(%)	73.0±23.8	72.4±22.1
第Ⅵ胸骨骨化率(%)	58.9±33.5	72.0±28.2

表 6 秦皮水煎剂对胎仔内脏的影响

	对照组	秦皮组
妊娠动物数	19	18
内脏畸形		
总畸形胎仔数	1	0
心脏形态异常(%)	1.32±5.74	0.00±0.00
心房小(%)	1.32±5.74	0.00±0.00
内脏变异		
总变异胎仔数	60	72
胸腺残留(%)	27.27±30.88	29.82±25.65
肾盂扩张(%)	8.29±15.46	4.37±9.25
尿管蛇形(%)	1.50±6.55	3.94±8.75
尿管扩张(%)	4.41±7.96	2.50±5.94
甲状腺愈合(%)	26.07±21.52	40.52±34.80
锁骨下动脉起始异常(%)	0.00±0.00	0.79±3.37
颈动脉起始异常(%)	0.00±0.00	0.79±3.37
无名动脉缺失(%)	0.00±0.00	0.79±3.37
脐动脉左行(%)	1.54±4.65	0.00±0.00

的遗传毒性研究发现, 体外 MLA 实验有潜在的遗传毒性, 但无体内遗传毒性^[10]; 本研究在本实验条件下, 也未发现秦皮水煎剂有发育毒性。秦皮的成分复杂, 有效成分包括秦皮甲素、秦皮乙素及秦皮苷等多种活性物质, 各种成分在水煎剂中的含量及其对于生殖毒性的影响还有待进一步探讨。此外, 秦皮提取方法有多种, 包括煎提、醇提等, 在临床多用于复方制剂。因此, 秦皮其它方式的提取物及其制剂形式是否具有生殖毒性还需进一步的深入研究。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005 年版 1 部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 44~45.
- 2 方莲花, 吕扬, 杜冠华. 秦皮的药理作用研究进展. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2732~2736.
- 3 Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for testing of chemicals 414: Prenatal Developmental Toxicity Study, 2001.
- 4 Wilson, J.G. Methods for Administering Agents and Detecting Malformations in Experimental Animals. In Teratology Principles and Techniques, University of Chicago Press, 1965: 262~277.
- 5 Stuckhardt JL, Poppe SM. Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 1984, 4(2): 181~188.
- 6 Dawson AB. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol, 1926, 1 (1): 123~124.
- 7 胡隐恒, 汪曼影. 秦皮所含的秦皮素和秦皮甙的主要药理作用. 新医药学杂志, 1975, 8: 41~42.
- 8 杨天鸣, 葛欣, 王晓妮. 秦皮抗菌作用研究. 西北国防医学杂志, 2003, 24(5): 387~388.
- 9 王晓东, 邓治文, 彭晓华, 等. 秦皮总香豆素致突变作用研究. 药品评价, 2004, 1(3): 194~196.
- 10 胡燕平, 宋捷, 王欣, 等. 秦皮水煎剂的遗传毒性研究. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 2228~2231.

Effects of Cortex Fraxini Decoction on Embryo-Fetal Development in Rats

Zhang Min, Liu Xiaomeng, Song Jie, Hu Yanping, Wang Xiuwen, Li Bo

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, National Center for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China)

Abstract: The potential for Cortex Fraxini decoction to induce developmental toxicity was investigated in SD rats. Timed-pregnant SD rats (20 rats/group) were given Cortex Fraxini decoction (27.3g (herbal raw material)/kg/day) or vehicles (distilled water) by gavage on gestation days 6 through 17. Maternal clinical sign, abortions, premature deliveries, and body weight were monitored throughout gestation. At termination (gestation days 20) pregnant females were evaluated for clinical status and gestational outcome; live fetuses were examined for gender, external, visceral

and skeletal malformation and variations. No deaths, premature deliveries or dose-related clinical signs were attributed to Cortex Fraxini decoction. Maternal body weight and body weight gain were not affected. Food consumption was significantly decreased from GD6 to GD12 and increased from GD18 to GD 20. Fetal weights were statistically increased. There were no effects observed on fetus viability, incidences of fetal malformation and variation. These results demonstrate that Cortex Fraxini decoction has no detectable adverse effects on either the treated F0 female rats or the fetuses.

Keywords: Cortex fraxini decoction, Developmental toxicity

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立崑)