研究报告

静脉注射环磷酰胺对新西兰兔胚胎和胎仔的发育毒性研究

龚英菲　曾现欢　赵维俊　左俊涛　朱钟凯　王湛博　刘　伟　王　昀　杨　勇

（中国药科大学新药安全评价研究中心，南京　211198）

摘要：目的　孕兔静脉给予环磷酰胺，以观察其对孕兔胚胎及胎仔的毒性作用及表现，为选择环磷酰胺作为阳性对照提供使用参考。**方法**　将孕兔随机分为对照组［0.9%氯化钠注射液，GD11（GD，妊娠日），i.v］和环磷酰胺组（环磷酰胺 30 mg/kg 体质量，GD11，i.v）。GD28 对孕兔实施安乐死，剖宫取胎仔，检查胎仔外观、内脏和骨骼。**结果**　环磷酰胺组对兔生殖功能及胚胎形成无明显影响，可引起外观、内脏和骨骼畸变。胎仔外观腭裂畸形率为 32.95%；内脏变异率为 10.23%；骨骼畸形率为 23.37%。**结论**　新西兰兔 GD11 静脉给予环磷酰胺 30 $mg \cdot kg^{-1}$ 可引起胎仔畸形，畸形种类和比例适当，可用于生殖试验阳性对照。

关键词：环磷酰胺；生殖毒性；孕兔；阳性对照

中图分类号：R-332　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1006-6179（2019）02-0058-05

DOI：10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.011

生殖毒性试验的目的是通过动物试验反映受试物对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响。胚胎-胎仔发育毒性试验（即Ⅱ段生殖毒性试验）是评价新药生殖毒性的首选方法之一。妊娠动物自胚胎着床至硬腭闭合给药，观察受试物对妊娠动物母体、胚胎和胎仔发育的影响，包括胚胎胎仔的死亡、生长改变和结构变化等，为母体孕期接触新药可能对胎儿造成的影响提供临床前的试验依据[1]。环磷酰胺（Cyclophosphamide）是一种氮芥类烷化剂，对多种肿瘤具有明显的抑制作用，对增殖细胞群的各期均有杀伤作用，具有较强的致畸、致癌和致突变作用。研究表明环磷酰胺可造成精子缺乏、精子畸形、停经等生殖系统毒性，妊娠初期给予可致畸胎。但目前生殖毒性研究主要集中于大鼠和小鼠[2-6]，用于兔生殖毒性研究很少。根据国家食品药品监督管理局 2006 年发布的《药物生殖毒性研究技术指导原则》，兔是胚胎-胎仔发育毒性研究中优先选用的非啮齿类动物，但 II 段生殖毒性试验中关于兔阳性药物的致畸背景资料较少[7]。因此，选用阳性对照物并确定相关的致畸作用对新开展此项试验具有实际指导意义[8]。

1　材料与方法

1.1　药品和试剂

环磷酰胺（批号 P01637）购自阿达玛斯贝塔（上海）化学试剂有限公司，白色结晶或结晶性粉末，临用前用生理盐水配制；茜素红（批号 20110315）购自天津市化学试剂研究所，褐色固体粉末；硫化铵（批号 13071020653）购自南京化学试剂有限公司，白色固体结晶；氢氧化钾（批号 20131230）购自上海凌峰化学试剂有限公司，白色固体粉末；丙三醇（批号 20140118）购自江苏强盛功能化学股份有限公司，无色澄清溶液；乙醇（批号 20140821）购自国药集团化学试剂有限公司，无色澄清溶液。

1.2　动物

新西兰兔购自青岛康大生物科技有限公司，普通级，动物生产许可证 SCXK（鲁）2012-0005，饲养于中国药科大学新药安全评价研究中心，普通级动物房，实验动物使用许可证 SCXK（苏）2013-0013，温度 21～25 ℃，相对湿度 44%～68%，光照 12 h；单

收稿日期：2019-08-21

作者简介：龚英菲（1987—），男，研究实习员，研究方向：药物安全性评价.E-mail：1620144289@cpu.edu.cn

通信作者：杨　勇（1976—），男，博士生导师，教授，研究方向：肿瘤药理和药物安全性评价.E-mail：1020050807@cpu.edu.cn

只饲养于不锈钢笼内。饲料为北京科澳协力饲料有限公司生产的兔生长繁殖饲料,饮用水为 CENTRA-R200 净化系统净化处理的实验动物饮用水,笼具和托盘每日清洁更换。

1.3　仪器

体式显微镜,型号(SZX7),Olympus;正置生物显微镜,型号(BX43),Olympus;电子天平,型号(QUINTIX224-1CN,QUINTIX1102-1CN,PRACTUM2102-1CN);赛多利斯;游标卡尺,型号(BZ),成都成量工具集团有限公司。

1.4　方法

1.4.1　动物分组与给药方案:购买 4~5 月龄的孕兔 40 只,交配成功日计为 GD0,并按照体质量均衡原则随机分为对照组和环磷酰胺组。最终纳入统计对照组(0.9%氯化钠注射液,i.v)16 只,环磷酰胺组(30 mg/kg,i.v.)17 只。

1.4.2　观察和检测:试验期间进行一般临床症状观察,体质量和摄食量的测定。GD28 对孕兔进行过量 CO_2 安乐死,剖宫称取怀孕子宫总质量、子宫、胎盘、卵巢及脑质量。记录黄体数、死胎数、活胎数、吸收胎数、着床腺数,并计算子宫、卵巢脏体、脏脑系数。取出胎仔,存活胎仔自腹腔注射戊巴比妥钠溶液实施安乐死后记录胎仔性别、胎仔质量、顶臀长、尾长及外观。全部胎仔进行内脏和骨骼检查,其中除心脏、脑、肾脏用 4%甲醛溶液固定后检查,其余内脏当即检查,骨骼标本用 95%的乙醇固定和茜素红染色后检查。胎仔外观畸形检查包括头部、四肢、躯干、尾部和肛门。胎仔内脏畸形检查包括有无腭裂、脑水肿、肾积水,眼球是否正常,心、肝、脾、肺、肾和子宫等脏器大小和位置是否异常等。胎仔骨骼畸形检查包括骨化程度、有无胸骨节缺失、骨化不全、胸骨节错位、多肋、少肋、肋骨分叉、肋融合、波状肋等。

1.5　统计方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)来表示,先进行方差齐性检验,如果采用 $P>0.05$ 再进行 t 检验,如果 $P<0.05$ 进行秩和检验;有吸收胎的孕兔百分率、有死胎的孕兔百分率、妊娠率、窝别外观(内脏、骨骼)畸形率和窝别内脏(骨骼)变异率等采用百分率表示,采用 Fisher 确切概率法进行分析。$P<0.05$ 确认为有统计学意义。

2　结果

2.1　对一般临床症状观察、体质量和摄食量的影响

一般临床症状观察未见明显异常。GD14~16 孕兔的体质量增长环磷酰胺组较对照组明显降低($P<0.05$),给药后环磷酰胺组的摄食量较对照组出现一过性的降低(GD11 $P<0.05$)。

2.2　对孕兔生殖功能及胚胎形成的影响

与对照组相比,孕兔终末体质量(GD28)、怀孕子宫质量、胎盘质量、子宫质量、卵巢质量及其脏体和脏脑系数均未见明显差异。

环磷酰胺组较对照组着床后丢失率提高近一倍。黄体数、死胎数、着床腺数、活胎数、吸收胎数、总丢失率无明显异常。详见下表 1:

表 1　环磷酰胺对孕兔生殖功能及胚胎形成的影响

Table 1　The effect of Cyclophosphamide on rabit reproduxtion and embryo-fetal development

指标	对照组 0.9%氯化钠注射液 $n=16$,($\bar{x}\pm s$)	环磷酰胺组 环磷酰胺,30 mg/kg $n=17$,($\bar{x}\pm s$)
终末体质量/kg	4.82 ± 0.42	4.69 ± 0.35
怀孕子宫质量/g	592.63 ±128.77	488.01 ±210.04
胎盘子宫质量/g	166.63 ± 29.49	140.85 ± 52.15
胎盘质量/g	90.52 ± 21.56	74.39 ± 31.99
卵巢质量/g	1.3243± 0.1729	1.3455± 0.3182
子宫质量/g	75.24 ± 16.15	65.50 ± 20.67
脑质量/g	10.71 ± 0.40	10.92 ± 0.52
卵巢脏体系数	0.028 ± 0.004	0.028 ± 0.006
子宫脏体系数	1.56 ± 0.27	1.39 ± 0.41
卵巢脏脑系数	0.124 ± 0.016	0.123 ± 0.028
子宫脏脑系数	7.04 ± 1.60	6.02 ± 1.94
黄体数/个	14.40 ± 4.10	14.70 ± 3.10
着床腺数/个	11.40 ± 3.60	10.60 ± 4.30
吸收胎总数/个	0.80 ± 1.00	0.70 ± 1.30
死胎数/个	0.10 ± 0.30	0.20 ± 0.50
活胎数/个	10.50 ± 3.20	9.80 ± 4.50
着床后丢失率/%	7.38 ± 7.95	15.22 ± 32.83
总丢失率/%	26.86 ± 11.83	37.38 ± 26.32

2.3　对胎仔外观的影响

与对照组相比,胎仔总质量,均质量分别降低 9.62%和 16.47%;胎仔身长、尾长分别减少 8.00%和 17.55%($P<0.05$);腭裂畸形率(32.95%)明显高于对照组,与对照组比差异有统计学意义($P<0.05$),且窝别的腭裂畸形率为 73.33%,与对照组比有统计学差异($P<0.05$)。详见下表 2:

表 2 环磷酰胺对胎仔外观的影响

Table 2 The effect of Cyclophosphamide on appearance of fetal rabits

指标	对照组 0.9%氯化钠注射液 $n=16$,($\bar{x}\pm s$)	环磷酰胺组 环磷酰胺,30 mg/kg $n=15$,($\bar{x}\pm s$)
窝胎仔总数/个	10.50± 3.20	10.50± 3.20
窝胎仔总质量/g	402.02±93.98	363.34±84.04*
窝胎仔均质量/g	39.88± 7.60	33.31± 3.91*
窝胎仔均身长/mm	93.37± 6.47	85.90± 4.67*
窝胎仔均尾长/mm	12.97± 1.04	11.37± 1.34*
窝雄仔比/%	52.97±24.68	50.42±13.28
窝雌仔比/%	47.03±24.68	49.58±13.28
腭裂畸形率/%	0.00± 0.00	32.95±28.66*
少趾畸形率/%	0.00± 0.00	1.89± 3.93
并趾畸形率/%	0.00± 0.00	1.22± 3.24
短尾畸形率/%	0.00± 0.00	0.56± 2.15

注:* 表示与对照组比 $P<0.05$

Note: * Compared with the control group $P<0.05$

2.4 对胎仔内脏的影响

环磷酰胺组:胎仔的窝别内脏变异率为 80.00%,与对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),主要变异类型为左心室偏大;胎仔的窝别内脏畸形率为 73.33%,与对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),主要畸变类型为肾皮质髓质分界不清。详见下表 3:

表 3 环磷酰胺对胎仔内脏检查指标的影响

Table 3 The effect of Cyclophosphamide on fetal organs

指标	对照组 0.9%氯化钠注射液 $n=16$,($\bar{x}\pm s$)	环磷酰胺组 环磷酰胺,30 mg/kg $n=15$,($\bar{x}\pm s$)
窝胎仔受检数/个	10.50±3.20	11.10± 2.80
胎仔内脏变异率/%	2.08±8.33	10.23± 8.10*
球状心/%	0.00±0.00	1.08± 2.88
左心房扩大/%	2.08±8.33	0.00± 0.00
右心房扩大/%	2.08±8.33	0.67± 2.58
心室扩大/%	2.08±8.33	0.00± 0.00
左心室偏大/%	0.00±0.00	4.01± 7.70
右心室偏大/%	0.00±0.00	1.03± 2.73
肾盂扩大/%	0.00±0.00	1.56± 4.52
肾脏充血/%	0.00±0.00	0.56± 2.15
第Ⅲ脑室出血/%	0.00±0.00	1.33± 3.52
胎仔内脏畸形率/%	0.00±0.00	14.65±11.76*
肾皮质髓质分界不清/%	0.00±0.00	13.98±11.72*
心房发育不全/%	0.00±0.00	0.67± 2.58

注:* 表示与对照组比 $P<0.05$

Note: * Compared with the control group $P<0.05$

2.5 对胎仔骨骼的影响

环磷酰胺组:除胸椎、肋骨骨化数与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)外,枕骨骨化程度、其他骨化数及胎仔窝别骨骼变异率差异均无统计学意义。胎仔骨骼畸变率为 86.67%,与对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。详见下表 4:

表 4 环磷酰胺对胎仔骨骼检查指标的影响

Table 4 The effect of Cyclophosphamide on fetal skeleton

指标	对照组 0.9%氯化钠注射液 $n=16$,($\bar{x}\pm s$)	环磷酰胺组 环磷酰胺,30 mg/kg $n=15$,($\bar{x}\pm s$)
窝胎仔受检数/个	10.50± 3.20	11.10± 2.80
颈椎骨化数/个	7.00± 0.00	7.00± 0.00
胸椎骨化数/个	12.40± 0.30	12.70± 0.20*
腰椎骨化数/个	6.70± 0.30	6.40± 0.30
骶椎骨化数/个	4.00± 0.00	4.00± 0.10
胸骨节/个	5.90± 0.10	5.90± 0.10
肋骨/对	12.30± 0.30	12.70± 0.20*
枕骨Ⅰ级/%	0.00± 0.00	0.00± 0.00
枕骨Ⅱ级/%	0.00± 0.00	0.00± 0.00
枕骨Ⅲ级/%	0.00± 0.00	0.00± 0.00
枕骨Ⅳ级/%	0.00± 0.00	0.00± 0.00
变异/%	18.08±14.45	29.47±22.73
胸骨骨化不全/%	3.39± 8.77	5.00±10.37
肋骨发育不全/%	3.00± 6.17	5.79±11.55
短肋/%	11.70±12.05	21.21±14.80
畸形/%	3.69± 9.14	23.37±21.41*
肋骨缺失/%	3.69± 9.14	11.49±14.24*
胸骨弯曲过度/%	0.00± 0.00	0.56± 2.15
胸骨哑铃状/%	0.00± 0.00	3.74± 7.53
胸骨融合/%	0.00± 0.00	3.02± 5.61
肋骨隆突/%	0.00± 0.00	1.51± 4.14
肋骨断裂/%	0.00± 0.00	0.83± 3.23
腰椎畸形/%	0.00± 0.00	2.96±11.47
尾椎畸形/%	0.00± 0.00	1.48± 5.74

注:* 表示与对照组比 $P<0.05$

Note: * Compared with the control group $P<0.05$

3 讨论

本研究中,以环磷酰胺作为阳性药物,采用静脉注射途径、给药剂量 30 mg/kg、给药时间 GD11,观察环磷酰胺对新西兰兔胎仔畸形的影响以确定此方法可行程度。

环磷酰胺作为广谱的抗癌药物,药物的不良反应也较突出,特别是在生殖方面。环磷酰胺能透过血胎屏障和血乳屏障,所以临床上妊娠妇女禁用,哺乳期妇女用药时必须停止哺乳。

不同给药途径的相对吸收率不同,一般依次为静脉注射>经口给药>皮下注射[9]。有报道给兔

GD6~20 连续灌胃给予环磷酰胺 18 mg/kg 畸形比例适当,胎仔生长发育也受到明显的影响[10]。皮下注射环磷酰胺畸形比例较高,胎仔的体格和生长发育会受到明显影响,吸收胎数量较多,导致可供进行检查的胎仔数量略少[8],但本研究前期预实验中,新西兰兔 GD6~20 进行连续经口灌胃给予环磷酰胺 18 mg/kg·d^{-1}会导致孕兔出现流产,亦会导致检查的胎仔数量减少。所以正式试验的过程中选择静脉注射,耳缘静脉注射给药操作较为简单且对动物造成的应激性较小,静脉注射吸收率高从而使用环磷酰胺较少。

本研究中发现给药后环磷酰胺组较对照组体质量和摄食量有一定的降低,说明本试验采用的 30 mg/kg 环磷酰胺在试验过程中对孕兔产生了一定的毒副作用,为一过性的。如果剂量加大或者是给药频次增加,可能会导致毒性太大,对胎仔产生不可逆的影响,致使胎仔出现死亡或者流产,会导致样本缺失,无法分析。从胎仔的外观上来看,环磷酰胺组和对照组窝胎仔总数没有明显差异,但环磷酰胺组胎仔的均质量、身长、尾长均低于对照组,四肢的畸变率明显高于对照组。对胎仔内脏进行检查,环磷酰胺组的变异率和畸形率明显高于对照组。对胎仔的骨骼进行检查,环磷酰胺组骨骼的畸变种类和数目都明显高于对照组。有报道雌性大鼠 GD7~11 静脉注射环磷酰胺 5 mg/kg·d^{-1},GD20 剖取胎仔,发现对中轴骨骼畸形的诱导具有阶段和部位特异性。本研究采取的 GD11 亦处于中轴骨骼发生畸形的敏感期[11]。本研究中环磷酰胺 GD11 给药组骨骼畸形的比例为 86.67%,基本全部集中于中轴骨骼。环磷酰胺作用机理体内被肝脏或肿瘤内存在的过量磷酰胺酶或磷酸酶水解变成活化的磷酰胺氮芥与 DNA 发生交叉联结,抑制 DNA 的合成,特别是 G2 期(DNA 合成后期),干扰 RNA 的功能,从而导致胎仔发育迟缓,外观、内脏、骨骼的畸变。环磷酰胺还会使 T 细胞和 B 细胞的绝对数目减少,从而影响免疫系统的发育[12]。综上所述可知我们采用 30 mg/kg环磷酰胺在 GD11 给予孕兔,对胎仔产生的畸变种类较为合适。选用环磷酰胺作为生殖毒性试验的阳性对照是合适的。

在本实验条件下。30 mg/kg 环磷酰胺对孕兔生殖功能及胚胎形成无明显影响,但可显著影响胎仔发育,可引起胎仔外观畸形、内脏变异、内脏畸变和骨骼畸变。本次实验方法可靠。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] 胡文娟,王玫玫,孙祖越.敌枯双和环磷酰胺对 SD 大鼠胚胎致畸敏感作用比较[J].生殖与避孕,2009,**29**(7):426-431.

[3] Sandor S,Mic A F.Cell death in normo-and teratogenesis Ⅱ Cell death in teratogenesis[J].Rom J Morphol Embryol,1994,**40**(3-4):83-91.

[4] Barton T S,Robaire B,Hales B F.Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure [J].Proc Natl Acad sci USA,2005,**102**(22):7865-7870

[5] 孙昌华,卜文,祝清芬.胚胎-胎仔发育毒性试验中阳性模型的建立[J].实验动物科学,2016,**33**(1):15-19.

[6] 孙昌华,卜文,祝清芬.环磷酰胺对 SD 大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型的建立[J].实验动物科学,2015,**32**(6):8-12.

[7] 胡文娟,周莉,孙祖越.致畸实验阳性对照的选择[J].毒理学杂志,2010,**24**(2):162-165.

[8] 孙祖越,周莉,闫晗,等.如何成功地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.

[9] Gad S C.Drug safety evaluation [M].New York:John Wiley and Sons,Ine.2002:447.

[10] 周莉,姜娟,孙祖越,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.

[11] 管孝鞠.环磷酰胺致畸机理研究进展[J].癌变·畸变·实变,1998,**10**(4):256-264.

[12] 饶子亮,郑佳琳,黄威,等.H22 实体瘤小鼠的免疫功能及环磷酰胺的影响[J].实验动物科学,2013,**30**(3):10-15.

The Embryo-fetal Developmental Toxicity Test of Intravenous Cyclophosphamide on New Zealand Pregnant Rabbits

GONG Yingfei, ZENG Xianhuan, ZHAO Weijun, ZUO Juntao, ZHU Zhongkai, WANG Zhanbo, LIU Wei, WANG Yun, YANG Yong

(*Center for New Drug Safety Evaluation and Research*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198, *China*)

Abstract: Objective To observe the embryo-fetal developmental toxicity of intravenous cyclophosphamide on pregnant rabbits, and provide basis for using cyclophosphamide as a positive control in embryo-fetal developmental toxicity test. **Method** Pregnant New Zealand rabbits were randomly divided into control group (0.9% Sodium chloride injection, GD11, i.v), and cyclophosphamide group (cyclophosphamide 30 mg/kg, GD11, i.v). At termination (GD28), the uterine content was removed by caesarean section. Live fetuses were examined for external, visceral and skeletal malformations and variations. **Result** There were no noticeable changes in the reproductive function and embryogenesis of rabbits by cyclophosphamide. But cyclophosphamide could cause the teratogenic in external, visceral and skeletal malformations. The rate of cleft palate was 32.95%, the rate of visceral variation was 10.23%, and the rate of skeletal malformation was 23.37%. **Conclusion** Inject cyclophosphamide (30 mg/kg) into the New Zealand rabbits can cause fetal malformation. Type and ratio of fetal malformations are proportional. Cyclophosphamide can be used as a positive control for embryo-fetal developmental toxicity test in rabbits.

Key words: Cyclophosphamide; reproductive toxicity; pregnant rabbits; positive control

(上接第 57 页)

A Model of Hemorrhagic Shock in Beagle Dogs

CHEN Jianzhao, CHEN Jiejun, LI Rixu, GUO Qiuping

(*Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute*, *Guangzhou* 510240, *China*)

Abstract: Objective To establish a model of hemorrhagic shock in Beagle dogs for the experimental study of drug evaluation and research. **Method** Fifteen Beagle dogs of common grade were bled until the arterial pressure (SBP) reached 50 mmHg, which was then maintained as best as possible. The criteria of the model were 9 ~ 11 mmol/L of Lac and 12 mmol/L of BE in arterial blood, less than 60% PO_2 in venous blood. When the model was established, the changes of general physiological indexes, blood-gas parameters and blood routine indexes were observed. **Result** Twelve animals survived, the success rate of the model was 80%. The changes of indexes were in accordance with the characteristics of hemorrhagic shock. **Conclusion** The model was able to simulate the clinical characteristics of hemorrhagic shock objectively and accurately, and is suitable for the efficacy evaluation of blood products and blood substitutes.

Key words: Hemorrhagic shock; Beagle dog; animal model