



# 兔胚胎-胎仔发育毒性试验中环磷酰胺给药方式的探讨

孔菲菲, 张彤, 龚夏实, 张航

(湖北省医药工业研究院有限公司/湖北省药物安全性评价中心, 武汉 430061)

**【摘要】** **目的** 探讨环磷酰胺不同给药途径、给药剂量对妊娠家兔胚胎及胎仔的影响, 以确定诱导胎兔畸形最佳的给药方式。**方法** 孕兔分为生理盐水对照C组、静脉注射Y1组(15 mg/kg)、皮下注射低剂量Y2组(20 mg/kg)和皮下注射高剂量Y3组(30 mg/kg), 各组均在GD10~13(受孕当天为GD0)分别按相应途径给药。GD28解剖, 检查黄体数、着床数、连胎子宫重、吸收胎率; 取胎仔, 检查胎仔性别、身长、尾长、活胎数、死胎数, 并按要求进行外观畸形、内脏畸形和骨骼畸形的检查。**结果** 环磷酰胺静脉注射组及皮下注射低剂量组孕兔胎仔均出现了畸形, 两组外观畸形率分别为30.77%和95.65%, 骨骼畸形率分别为7.69%和73.91%, 内脏畸形率分别为20.51%和47.83%。皮下注射高剂量组吸收胎发生率为100%。**结论** 孕兔在GD10~13皮下注射环磷酰胺20 mg/kg可用作家兔胚胎-胎仔发育毒性发育试验的阳性给药方法。该方法给药周期短, 操作方便, 吸收胎少, 胎仔畸形率高, 可为同行选择合适的兔胚胎-胎仔发育毒性阳性模型提供依据。

**【关键词】** 胚胎-胎仔发育; 胚胎畸形; 环磷酰胺; 兔

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0093-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.017

## Administration mode of cyclophosphamide for the embryo-fetal developmental toxicity test in rabbits

KONG Fei-fei, ZHANG Tong, GONG Xia-shi, ZHANG Hang

(Hubei Institute Co., Ltd of Pharmaceutical Industry, Hubei Center for Drug Safety Evaluation, Wuhan 430061, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects of cyclophosphamide administered by different routes or in different doses on the embryo-fetal development in pregnant rabbits, and to determine the optimal mode of cyclophosphamide administration to induce fetal malformation. **Methods** Pregnant rabbits were divided into control group C (saline), group Y1 (intravenous injection of 15 mg/kg cyclophosphamide), group Y2 (subcutaneous injection of low dose cyclophosphamide, 20 mg/kg), and group Y3 (subcutaneous injection of high dose cyclophosphamide, 30 mg/kg). Each rat was administrated according to the corresponding mode once daily on GD10~13. The day of conception was designated as GD0. The pregnant rabbits were sacrificed and dissected on GD28. Then, the number of corpora lutea and implantation, the weight of uterus with contained fetus, and fetal resorption rate were detected, the fetuses were removed and the fetal sex, body length, tail length, the number of live births and stillbirths were recorded, and the appearance of deformities, visceral deformities and skeletal malformations were detected. **Results** Pregnant rabbit fetuses in the cyclophosphamide intravenous injection group and subcutaneous injection of low dose cyclophosphamide group showed deformities. The appearance malformation rates in the two groups were 30.77% and 95.65%, the skeletal deformity rates were 7.69% and

73.91%, and the visceral abnormality rates were 20.51% and 47.83%, respectively. The fetal resorption rate in the high dose cyclophosphamide subcutaneous injection group was 100%. **Conclusions** Subcutaneous injection of 20 mg/kg cyclophosphamide to pregnant rabbits at GD10 ~ 13 can be used as a positive administration method for rabbit embryo-fetal developmental toxicity test. This method has the advantages of short administration period, easy operation, few fetus resorption, and high rate of fetal malformation, thus, providing the evidence for selection of appropriate model of rabbit embryo-fetal developmental toxicity.

**【Key words】** Embryo fetal development; Fetal malformation; Cyclophosphamide; Rabbits

生殖毒性研究是药物非临床研究的重要内容,是药物进入临床研究及上市的重要环节。生殖 II 段,即胚胎-胎仔发育毒性试验,研究胚胎从着床到硬腭闭合期间给药,受试药物是否具有胚胎毒性或致畸性。胚胎-胎仔发育毒性试验需选用两种哺乳动物,一般非啮齿类选择家兔<sup>[1]</sup>。国内外关于家兔胚胎-胎仔发育毒性试验中阳性药物选择的文献较少,国内已有研究表明<sup>[2]</sup>,环磷酰胺可诱导家兔胎仔产生畸形,但其最佳给药途径和给药剂量还有待于进一步研究。本研究拟以环磷酰胺为受试药,研究不同给药途径和给药剂量下,家兔胚胎及胎仔的发育状况,确定最佳的给药方式。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药物及试剂

注射用环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司生产),75%乙醇(武汉市一轻江南公司竹叶酒精分装部生产),氯化钠注射液(武汉滨湖双鹤药业有限责任公司生产),苦味酸(西陇化工股份有限公司生产),茜素红(上海化学试剂采购供应站经销),甲醛溶液(广东光华科技股份有限公司生产),氢氧化钾(国药集团化学试剂有限公司生产),冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司生产),丙三醇(国药集团化学试剂有限公司生产)。

#### 1.1.2 实验动物

日本大耳兔,普通级,体重 2.5 ~ 3.5 kg,购自武汉生物制品研究所【SCXK(鄂)2012-0003】。兔受孕后运回,饲养在湖北省药物安全性评价中心【SYXK(鄂)2014-0023】,饲养温度 16 ~ 26℃,相对湿度为 35% ~ 85%,光照为 12 h 明暗交替。

#### 1.1.3 主要仪器

奥豪斯 CAV2101 天平(美国奥豪斯仪器有限公司制造),Nikon SMZ-800 体视显微镜(日本尼康公司制造)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及给药<sup>[2,3]</sup>

35 只孕兔经适应性喂养后选取 32 只采用计算机随机分为 4 组,每组 8 只,即生理盐水对照组(C 组);GD10 ~ 13 耳缘静脉注射生理盐水,3 mL/kg;静脉注射组(Y1 组);GD10 ~ 13 耳缘静脉注射环磷酰胺,15 mg/kg;皮下注射低剂量组(Y2 组);GD10 ~ 13 皮下注射环磷酰胺,20 mg/kg;皮下注射高剂量组(Y3 组);GD10 ~ 13 皮下注射环磷酰胺,30 mg/kg。

### 1.2.2 观察指标<sup>[4,5]</sup>

#### (1) 一般情况观察

试验期间检查孕兔体征和活动情况,并作详细记录,若动物有死亡,对死亡孕兔应称重并进行尸检。

#### (2) 体重

孕兔于运回当日称重,并记录 GD6、GD10、GD11、GD12、GD13、GD15、GD18 及 GD21、GD24、GD28 体重。

#### (3) 摄食量测定

每周测一次摄食量,计算孕兔的摄食量。

### 1.2.3 剖检

GD28 空气栓处死孕兔,取出子宫,称连胎子宫重后剖宫取出胎兔。记录黄体数、植入数、吸收胎数、活胎数、死胎数。胎兔逐一检查外观、性别、体重,并测量身长和尾长。所有胎兔将双肾、心脏放入 Bouin 氏液固定后检查,其他内脏于解剖当日进行新鲜检查。检查完成后将偶数号胎仔头部从颈部切下,放入 Bouin 氏液固定,后期徒手切片观察;奇数号胎仔连同去掉头部的偶数号胎仔一起放入 75%乙醇中,制成骨骼透明标本进行骨骼检查。

## 1.3 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,孕兔体重、摄食量采用方差分析,胎兔体重、身长、尾长采用嵌套设计方差分析,活胎率、畸形率等采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

### 2.1 环磷酰胺对孕兔一般状况的影响

给药期间各组孕兔生长状况良好,孕兔毛被光泽,活动正常,大小便也未出现异常,各组孕兔均存活到 GD28,均未观察到流产、早产等症状。GD12,皮下

注射高剂量组孕兔摄食量较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ),可见给予高剂量的环磷酰胺后,对母体产生了一定的毒性。给药结束后,各给药组孕兔摄食量与对照组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。在整个给药和观察期间,孕兔的体重和对照组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),体重和摄食量变化见表 1、表 2。

表 1 环磷酰胺对孕兔体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8, \text{kg}$ )

Tab. 1 Effect of cyclophosphamide on body weight of the pregnant rabbits

| 妊娠时间<br>Gestation day | C 组<br>Group C | Y1 组<br>Group Y1 | Y2 组<br>Group Y2 | Y3 组<br>Group Y3 |
|-----------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| GD6                   | 3.22 ± 0.45    | 3.23 ± 0.49      | 3.19 ± 0.51      | 3.19 ± 0.40      |
| GD10                  | 3.23 ± 0.45    | 3.29 ± 0.48      | 3.27 ± 0.49      | 3.25 ± 0.38      |
| GD11                  | 3.22 ± 0.43    | 3.23 ± 0.46      | 3.20 ± 0.52      | 3.13 ± 0.37      |
| GD12                  | 3.27 ± 0.39    | 3.27 ± 0.50      | 3.22 ± 0.47      | 3.16 ± 0.36      |
| GD13                  | 3.28 ± 0.43    | 3.29 ± 0.48      | 3.22 ± 0.48      | 3.14 ± 0.32      |
| GD15                  | 3.26 ± 0.42    | 3.33 ± 0.49      | 3.27 ± 0.44      | 3.15 ± 0.32      |
| GD18                  | 3.31 ± 0.48    | 3.36 ± 0.52      | 3.31 ± 0.42      | 3.11 ± 0.29      |
| GD21                  | 3.26 ± 0.41    | 3.42 ± 0.53      | 3.34 ± 0.44      | 3.16 ± 0.34      |
| GD24                  | 3.40 ± 0.49    | 3.47 ± 0.51      | 3.38 ± 0.44      | 3.20 ± 0.31      |
| GD28                  | 3.46 ± 0.51    | 3.50 ± 0.52      | 3.41 ± 0.45      | 3.20 ± 0.34      |

注:与生理盐水对照组比差异有显著性 \*  $P < 0.05$ , 差异有显著性 \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the saline control group.

表 2 环磷酰胺对孕兔摄食量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8, \text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ )

Tab. 2 Effect of cyclophosphamide on food intake of the pregnant rabbits

| 妊娠时间<br>Gestation day | C 组<br>Group C | Y1 组<br>Group Y1 | Y2 组<br>Group Y2 | Y3 组<br>Group Y3 |
|-----------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| GD6                   | 57.73 ± 7.01   | 57.10 ± 13.12    | 60.73 ± 6.59     | 41.54 ± 20.34    |
| GD12                  | 41.25 ± 7.31   | 48.60 ± 17.77    | 44.00 ± 7.85     | 20.80 ± 17.11*   |
| GD18                  | 46.85 ± 4.12   | 51.20 ± 10.45    | 56.40 ± 5.35     | 40.98 ± 22.57    |
| GD24                  | 47.98 ± 1.03   | 49.38 ± 11.30    | 48.08 ± 8.70     | 55.12 ± 8.60     |

注:与生理盐水对照组比差异有显著性 \*  $P < 0.05$ , 差异有显著性 \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the saline control group.

表 3 环磷酰胺对兔妊娠结局的影响

Tab. 3 Effects of cyclophosphamide on pregnancy outcome in the rabbits

|  | C 组<br>Group C  | Y1 组<br>Group Y1 | Y2 组<br>Group Y2 | Y3 组<br>Group Y3 |
|--|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 连胎子宫重(g)<br>Weight of uterus combined with embryos | 448.18 ± 148.71 | 280.33 ± 90.26   | 417.26 ± 157.64  | 12.10 ± 3.10**   |
| 总黄体数<br>Number of corpora lutea                    | 39              | 45               | 26               | 31               |
| 总着床数<br>Number of implantation                     | 34              | 41               | 23               | 27               |
| 活胎数(率)<br>Number (rate) of live fetuses            | 34(100%)        | 39(95.12%)       | 23(100%)         | 0**              |
| 吸收胎数(率)<br>Number (rate) of resorbed fetuses       | 0               | 1(2.44%)         | 0                | 27(100%)**       |
| 死胎数(率)<br>Number (rate) of stillbirth              | 0               | 1(2.44%)         | 0                | 0                |

注:与生理盐水对照组比差异有显著性 \*  $P < 0.05$ , 差异有显著性 \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the saline control group.

### 2.2 环磷酰胺对兔妊娠结局的影响<sup>[6]</sup>

GD28 解剖各组孕兔,大体解剖均未见母体有

异常。由于皮下注射高剂量组 100% 为吸收胎,故与对照组相比,环磷酰胺皮下注射高剂量组连胎子

宫重、活胎数(率)、吸收胎数(率)均有极显著性差异。环磷酰胺静脉注射组、皮下注射低剂量组与对照组相比,孕兔妊娠结局均没有显著影响( $P > 0.05$ ),见表 3。

### 2.3 环磷酰胺对胎仔体重、身长、尾长的影响

GD28 解剖孕兔后,取出胎兔,测量胎兔体重、身长、尾长(见表 4)。结果表明,环磷酰胺静脉注射组体重、身长,皮下注射低剂量组胎兔的体重、身长、尾长与对照组相比均差异有显著性( $P < 0.01$ )。

### 2.4 环磷酰胺对兔胎仔外观、骨骼、内脏的影响

家兔解剖后观察胎仔外观畸形,胎仔骨骼及内脏经处理及染色后检查,见表 5。结果表明,静脉注射组内脏畸形数与对照组相比差异有显著性( $P < 0.05$ ),皮下注射低剂量组与对照组相比,骨骼畸形数(率)及内脏畸形数(率)均差异有显著性( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

阳性对照组在药物生殖毒性研究中有重要意义,可以验证实验动物、实验人员、实验条件、实验

环境等方面的稳定性和可靠性。在家兔 II 段生殖毒性研究中,阳性药的选择一直是研究的难点,它要求药物能使兔胎仔产生尽可能多的畸形种类,但不能对母体产生较大的毒性。环磷酰胺是临床上常用的一种抗肿瘤药物和免疫抑制剂<sup>[7]</sup>,是研究最多的化学致畸剂之一,背景资料较多,经常用于致畸、致突变研究,本研究亦采用环磷酰胺进行试验<sup>[8]</sup>。

实验室前期研究中,采用环磷酰胺分别于妊娠 GD6、GD8、GD10 按 20 mg/kg 耳静脉推注给药,兔胎仔外观及骨骼、内脏畸形均不明显。可见选择恰当的给药时间和给药方式是研究的重难点。本次研究设计了两种给药方式,即静脉注射和皮下注射,分别于 GD10 ~ 13 给予不同剂量的环磷酰胺,观察兔胎仔外观、内脏、骨骼畸形。结果表明,静脉注射组外观畸形率、内脏畸形率与对照组相比均有显著性差异;皮下注射低剂量组外观畸形率、骨骼畸形率、内脏畸形率与对照组相比均有极显著性差异,且外观畸形出现的种类较多;皮下注射高剂量组 100% 为吸收胎,可见该剂量不适宜制备家兔 II 段生殖毒性阳性对照。

表 4 环磷酰胺对兔胎仔体重、身长、尾长的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Effects of cyclophosphamide on body weight, body length and tail length of the rabbit litter

|                    | C 组( $n=34$ )<br>Group C | Y1 组( $n=39$ )<br>Group Y1 | Y2( $n=23$ )<br>Group Y2 |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 体重(g) Body Weight  | 37.36 ± 2.11             | 34.59 ± 2.72 **            | 28.14 ± 4.36 **          |
| 身长(mm) Body length | 88.14 ± 4.84             | 83.65 ± 0.73 **            | 80.50 ± 1.96 **          |
| 尾长(mm) Tail length | 11.26 ± 0.97             | 11.25 ± 1.11               | 9.62 ± 2.77 **           |

注:与生理盐水对照组比差异有显著性 \*  $P < 0.05$ , 差异有显著性 \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the saline control group.

表 5 环磷酰胺对兔胎仔外观、骨骼、内脏的影响

Tab. 5 Effects of cyclophosphamide on the appearance, skeleton and viscera of the rabbit litter

|   | C 组<br>Group C | Y1 组<br>Group Y1 | Y2 组<br>Group Y2 |
|---|----------------|------------------|------------------|
| 外观检查数<br>Checked number of appearance                       | 34             | 39               | 23               |
| 外观畸形数(率)<br>Number (incidence) of appearance deformity      | 0              | 12(30.77%) **    | 22(95.65%) **    |
| 骨骼检查数<br>Checked number of bones                            | 34             | 39               | 23               |
| 骨骼畸形数(率)<br>Number (incidence) of bones deformity           | 1(2.94%)       | 3(7.69%)         | 17(73.91%) **    |
| 内脏检查数<br>Checked number of internal organs                  | 34             | 39               | 23               |
| 内脏畸形数(率)<br>Number (incidence) of internal organs deformity | 1(2.94%)       | 8(20.51%) *      | 11(47.83%) **    |

注:与生理盐水对照组比差异有显著性 \*  $P < 0.05$ , 差异有显著性 \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the saline control group.

本研究还对淘汰的三只孕兔于 GD12 单次静脉给予环磷酰胺 30 mg/kg, GD28 解剖发现, 该剂量下未产生母体毒性, 胎仔 100% 产生外观畸形, 内脏畸形率为 36.36%, 骨骼畸形率为 54.54%。但由于样本量较少, 该阳性对照组模型的制备方法还有待于进一步研究验证。

综上所述, 采用静脉注射和皮下注射给药, 均使孕兔产生了不同程度的畸形, 说明环磷酰胺用作兔胚胎-胎仔发育毒性试验阳性对照药物是可行的, 且 GD10 ~ 13 皮下注射环磷酰胺 20 mg/kg 给药周期短, 操作方便, 吸收胎少, 胎仔畸形率高, 畸形种类多, 对母体毒性小, 可视为较理想的阳性给药方法。

#### 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: 1-28.

- [2] 周莉, 姜娟, 王永, 等. 环磷酰胺对新西兰兔胚胎-胎仔发育的毒性作用研究 [J]. 药物不良反应杂志, 2013, 15(2): 87-92.
- [3] 汤连升, 张森, 贾庆文. 静脉注射注射用环磷酰胺对新西兰兔胚胎-胎仔发育的影响 [A]. 2015 年(第五届)药物毒理学年会[C], 2015: 138-139.
- [4] 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.
- [5] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京化学工业出版社, 2007.
- [6] 周莉, 孙祖越. 实验用兔和大鼠常见畸形图谱 [M]. 上海科学技术出版社, 2015.
- [7] 管孝鞠, 王治桥, 廖明阳, 等. 环磷酰胺致畸机理研究进展 [J]. 癌变畸变突变, 1998, 10(4): 256-264.
- [8] 王聪, 王一腾, 魏鑫. 环磷酰胺的临床应用现状 [J]. 临床和实用医学杂志, 2008, 7(8): 179.

[修回日期]2016-11-18

#### ·专家问答·

#### 问: 常见分子影像设备的应用情况简介

答: 分子影像的应用主要包括三方面: 结构性影像、功能性信息、细胞与组织代谢。对于结构性影像来说, 在临床、临床前多用 CT 或 MR 影像系统, MR 还可以看功能性信息和少量代谢信息; 对于细胞与组织代谢来说, 在临床、临床前最具代表性的还是 PET 或 SPECT 影像系统, 但由于这些系统需要使用核素, 所以多在医院使用, 在实验室使用不太方便, 在高校活体光学应用得最广。当然, 每个设备、每个影像平台都有其优势和不足。在分子影像平台方面, 活体光学在使用上还有一些限制, 解决这些限制的一个办法就是多模态方式的整合, 比如活体光学与 CT/MR 的组合, PET 与 CT/MR 的组合等类似的概念和逻辑。

(感谢第四军医大学实验动物中心 师长宏 教授、冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 王志宇先生 的解答)