

## 紫杉醇对器官形成期早期小鼠胚胎生长发育的影响

张清林 王爱平 沈伽弟 王治乔

军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

**摘要** 紫杉醇(Paclitaxel)剂量设54、18和6mg/kg三个实验组,同时设溶剂对照组、生理盐水对照组和环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP)6mg/kg为阳性对照组。小鼠于孕期d6皮下注射给药,连续给药5d,每d一次。于孕期d11.5处死母鼠,结果表明,紫杉醇各剂量组小鼠早期胚胎的生长发育和形态发育指标与溶剂对照和生理水对照相比均有非常明显的差别。与给药剂量有关,剂量增加影响更明显。对胚胎组织匀浆生化分析发现54mg/kg组ST和LDH升高,ALP和TP明显下降。18mg/kg组ALP和TP下降,LDH升高。6mg/kg组ALP下降LDH升高,与溶剂对照组相比均有统计学差异。

**关键词** 紫杉醇;小鼠;胚胎;毒性作用

## EFFECTS OF PACLITAXEL ON THE DEVELOPMENT OF MICE EMBRYOS IN EARLY ORGANOGENESIS PERIOD

为DNA氧化损伤参与肝癌的发生尤其在早期癌变阶段提供了佐证。

### 参考文献

1. Siegers CP, Bumann D, Baretton G, et al. Dietary iron enhances the tumor rate in dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*, 1988;41:251.
2. Siegers CP, Bumann D, Trepkau HD, et al. Influence of dietary iron overload on cell proliferation and intestinal tumorigenesis in mice. *Cancer Lett*, 1992;65:245.
3. Thompson HJ, Kennedy K, Witt M, et al. Effect of dietary iron deficiency or excess on the induction of mammary carcinogenesis by 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 1991;12:1111.
4. Yoshiji H, Nakae D, Mizumoto Y, et al. Inhibitory effect of dietary iron deficiency on inductions of putative preneoplastic lesions as well as 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and lipid peroxidation in the livers of rats caused by exposure to a choline-deficient L-amino acid defined diet. *Carcinogenesis*, 1992;13:1227.
5. Rutenberg AM, Kim H, Fischbein J, et al. Histochemical and ultrastructural demonstration of r-glutamyltranspeptidase activity. *J Histochem Cytochem*, 1968;17:517.
6. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res*, 1984;44:4217.
7. Pitot CH, Barsness L, Goldsworthy T, et al. Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature*, 1978;271:456.
8. Weinberg ED. Iron in neoplastic disease. *Nutri Cancer*, 1983;4:223.
9. Fischer SM, Floyd RA, Copeland ES, et al. Working report from the division of research grants. *Cancer Res*, 1988;48:3882.
10. Folyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1990;11:1447.
11. Li JL, Okada S, Hamazaki S, et al. Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Cancer Res*, 1987;47:1867.
12. Umemura T, Sai K, Takagi A, et al. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Carcinogenesis*, 1990;11:345.

**Abstract** Paclitaxel 54, 18 and 6mg/kg were given subcutaneous injection on gestation mice from 6th day to 11th day. 0.9% solution of sodium chloride and polyoxyethylated castor oil, cremphor were used as control and cyclophosphamide was used as a positive control. The mice were sacrificed at 11.5-day of gestation and uterine horns were removed, Implantation sites were counted. embryos were taken off from uterine and examined for malformations and state of development. The results showed that mice embryo growth and development have significant difference compared with control at the 3 dose groups of paclitaxel. Farther experiment showed that in embryo homogenate: AST, LDH increased and ALP, TP significantly decreased at 54mg/kg. ALP, TP decreased and LDH increased at 18mg/kg. ALP decreased and LDH increased at 6mg/kg.

**Key words** paclitaxel; mice; embryo; toxicity

紫杉醇 (Paclitaxel) 是从紫杉树皮中分离提纯而得的天然抗肿瘤药物。有文献报道该药对动物有明显的胚胎毒性作用<sup>(1,2)</sup>。为了解该药对早期胚胎生长发育和形态发育的影响,我们用妊娠母鼠体内给药,观察在自然生长发育状态下,紫杉醇对着床后 d11.5 胚胎的生长发育及形态学发育指标的影响,并测定了胚胎组织匀浆丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和总蛋白 (TP) 等几项生化指标,为探索致畸性的敏感指标积累资料,现将实验结果报告如下。

## 材料和方法

### 1 实验材料

1.1 药物 紫杉醇由本所制剂室提供,批号 NO.1,纯度 >98%,为白色结晶粉末。

1.2 配制与贮存 称取紫杉醇 4g,使用本药指定的无水酒精与聚氧乙基代蓖麻油 (Polyoxyethylated castor oil, cremphor EL) 1:1 等量混合液加至 100ml。配制成 4% 紫杉醇原液 (40mg/ml)。于 4℃ 冰箱避光保存,临用前用生理盐水稀释成所需浓度。

1.3 对照组 环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CP) 沈阳药科大学制药厂生产,批号 902143-8 号,作为阳性对照,每瓶含 200mg 无水 CP,临用前用生理盐水配制。同时还设

生理盐水和等体积无水酒精-聚氧乙基代蓖麻油混合液和等量生理盐水对照组。

1.4 给药剂量 紫杉醇分为 6、18 和 54mg/kg (按 60kg 体重人体表面积折算分别相当于 217.9, 653.7 和 1961.1mg/m<sup>2</sup>), 三个实验组。环磷酰胺给 6mg/kg 体重。

### 2 实验方法

2.1 动物与交配 由军事医学科学院实验动物中心提供上海种小鼠,合格证号 9025MO3。在实验室检疫 1wk。鼠龄为 100d 左右,雄鼠体重 30 - 35g,雌鼠体重 25 - 30g,雌雄鼠于下午 5:00 以 2:1 同笼过夜交配,每 d 早晨检查雌鼠阴道有无阴栓,发现阴栓之日中午 12 点定为妊娠 0.5 天。受精鼠饲养在标准塑料饲养盒内,每盒 5 只。本院动物中心制作的块料喂养,塑料水瓶自由饮水。笼具定期消毒与更换垫料,动物房定期通风,室温 22 - 25℃,湿度 30 - 70%。受精鼠随机分组,每组受精鼠 5 只。

2.2 给药时间 雌鼠于妊娠 d6 - 11 连续给药 5d,每天一次皮下注射,各实验组与对照组给药体积均为 0.15ml/10g 体重。给药期间母鼠每隔两天称一次体重,根据体重变化,调整给药体积。每天上午 8:00 - 10:00 为给药时间。

2.3 母鼠处死时间及胚胎评价指标 孕鼠于 11.5d 处死,打开腹腔,取出子宫,计数着

床数,将子宫放入平皿内,用眼科剪剪开子宫,分离出胚泡,在解剖显微镜下用钟表镊除去脱膜和 Reicherst 膜,分离胚胎,留下脏层卵黄囊和完整的外胎盘圆锥。每个剂量组取子宫中段的胚胎进行观察和评价,根据 Brown 和 Fabro<sup>(3)</sup>首先提出的胚胎形态学计分方法,并结合 Van Maele - Fabry 等小鼠胚胎分化计分法<sup>(4)</sup>,对小鼠胚胎卵黄囊血液循环、尿囊、胚胎翻转、心脏、尾部神经管、后脑、中脑、前脑,听系统、视系统、嗅系统、鳃弓、上颌突、下颌突、前肢芽,后肢芽等形态发育指标逐项进行评分,同时测量卵黄囊直径和横

径,胚胎头长和颅臀长。

2.4 生化指标检测和仪器 用 Vatalab Micro 半自动生化分析仪(荷兰 Vital scientific 公司生产)测定了妊娠 d15 胎鼠组织匀浆 ALT(动力学法,30 ℃,以乳酸锂为基质)。TP(Coomassie 亮蓝 G—250 法)测定用岛津 160A 紫外可见分光光度计。

2.5 实验资料的统计 计量资料用 *t* 检验。

## 结 果

1 紫杉醇对小鼠早期胚胎的生长发育及早期胚胎形态发育的影响见表 1—3。

表 1 紫杉醇对小鼠早期胚胎生长发育的影响( $\bar{x} \pm s$ )

剂量 (mg/kg)	胚胎 数(只)	卵黄囊直径(mm)	卵黄囊横径(mm)	头长(mm)	颅臀长(mm)	体节	鳃弓	总分
54	18	5.4 ± 0.6 ***+	4.6 ± 0.4 ***+	0.2 ± 0.7 ***+	0.0 ± 0.0 ***+	0.1 ± 0.5 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	3.1 ± 4.7 ***+
18	20	7.2 ± 0.7 **	6.5 ± 0.5 **	3.8 ± 0.3 **	6.7 ± 0.5 **	4.1 ± 0.4 **	4.0 ± 0.2 **	66.4 ± 4.9 ***+
6	18	6.6 ± 0.6 ***+	5.9 ± 0.5 ***+	2.9 ± 0.4 ***+	5.4 ± 0.7 ***+	4.2 ± 0.4 **	4.7 ± 0.5	75.6 ± 6.8 +
溶剂对照	18	8.5 ± 0.6 **	6.3 ± 0.4 **	4.2 ± 0.3 **	7.8 ± 0.6 **	4.3 ± 0.6 **	4.0 ± 0.0 **	74.0 ± 0.9 **
生理盐水对照	18	7.5 ± 0.6	7.0 ± 0.5	3.8 ± 0.1	6.7 ± 0.3	5.1 ± 0.2	4.4 ± 0.6	80.0 ± 5.7
环磷酰胺 6	23	5.6 ± 0.4 ***+	5.1 ± 0.4 ***+	0.0 ± 0.0 ***+	0.0 ± 0.0 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	12.3 ± 13.4 ***+

注: +与溶剂对照相比  $P < 0.005$ , \*\*  $P < 0.01$ ; \*与生理盐水对照相比  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

表 2 紫杉醇对小鼠早期胚胎形态发育的影响形态学计分( $\bar{x} \pm s$ )

剂量 (mg/kg)	胚胎 数(只)	卵黄囊循环	尿囊	翻转	尾部神经管	后脑	中脑	前脑
54	18	2.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.5 ***+	0.1 ± 0.5 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+
18	20	4.0 ± 0.3 ***+	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.5 ***+	4.0 ± 0.5 ***+	4.0 ± 0.3 ***+	4.0 ± 0.3 ***+	4.3 ± 0.6 ***+
6	18	4.7 ± 0.5 ***+	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5 **	4.7 ± 0.5 ***+	4.7 ± 0.5 ***+	4.7 ± 0.5 ***+	4.7 ± 0.5 ***+
溶剂对照	18	5.0 ± 0.0 *	3.9 ± 0.2 **	4.9 ± 0.2 **	5.0 ± 0.0 *	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.1 ± 0.2 **
生理盐水对照	18	5.2 ± 0.4	4.4 ± 0.6	5.2 ± 0.4	5.2 ± 0.4	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.9 ± 0.2
环磷酰胺 6	23	2.2 ± 0.4 ***+	1.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+

注: +与溶剂对照相比  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; \*与生理盐水对照相比  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

表 3 紫杉醇对早期胚胎形态发育的影响形态学计分( $\bar{x} \pm s$ )

剂量 (mg/kg)	胚胎 数(只)	听系统	视系统	嗅系统	上颌突	下颌突	前肢芽	后肢芽	心脏
54	18	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.2 ***+	0.1 ± 0.5 ***+
18	20	4.0 ± 0.3 ***+	4.0 ± 0.3 ***+	3.5 ± 0.5 **	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.4 ± 0.6 ***+	3.0 ± 0.2	4.0 ± 0.3 ***+
6	18	4.7 ± 0.5 ***+	4.7 ± 0.5 **	4.7 ± 0.5 **	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5	2.9 ± 0.2 ***+	2.9 ± 0.2 **	4.7 ± 0.5
溶剂对照	18	5.0 ± 0.0 *	5.0 ± 0.0	3.1 ± 0.2 **	3.4 ± 0.5	3.6 ± 0.5 **	3.9 ± 0.2 **	2.9 ± 0.2 **	5.0 ± 0.0
生理盐水对照	18	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	4.2 ± 0.9	4.4 ± 0.6	4.3 ± 0.5	3.2 ± 0.4	5.2 ± 0.4
环磷酰胺 6	23	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+	0.6 ± 0.8 ***+

注: +与溶剂对照相比  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; \*与生理盐水对照相比  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

紫杉醇母鼠给药后,各剂量组对小鼠早期胚胎的卵黄囊直径、卵黄囊横径、头长、颅臀长、体节、鳃弓、总计分等指标与生理盐水

对照组和溶剂对照组相比均有非常显著性差别。环磷酰胺阳性对照组与生理盐水对照和溶剂对照组相比也有非常显著性差别。溶剂

对照组与生理盐水对照组相比亦有非常显著性差别,说明胚胎生长发育这几项指标是非常敏感的。

紫杉醇对小鼠早期胚胎的卵黄囊循环、尿囊、胚胎翻转、尾部神经管、后脑、中脑和前脑的形态发育,各剂量组与生理盐水对照组和溶剂对照组相比均有非常显著性差别。环磷酰胺阳性对照组与生理盐水对照组和溶剂对照组相比也有非常明显的差别。

紫杉醇对早期胚胎视系统、嗅系统、上颌

突、下颌突、前肢芽、后肢芽和心脏形态发育各剂量组与生理盐水对照组和溶剂对照组相比有非常显著性差别,说明紫杉醇对早期胚胎的形态发育有明显的影晌。环磷酰胺阳性对照组与生理盐水对照组和溶剂对照组相比也有非常显著性差别。

2. 紫杉醇对胚胎组织匀浆 ALT、AST、ALP、LDH 和 TP 等生化指标的影响结果见表 4。

表 4 紫杉醇对胎鼠匀浆五项生化指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

测试指标	紫杉醇 (mg/kg)			溶剂对照	生理盐水对照	环磷酰胺对照 6 mg/kg
	54	18	6			
ALT (U/g)	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.08	0.4 ± 0.05	0.3 ± 0.05 * * *
AST (U/g)	4.3 ± 1.8 +	2.7 ± 0.3	2.4 ± 0.3	1.6 ± 1.5	3.1 ± 0.9	4.7 ± 0.9 * *
ALP (U/g)	1.3 ± 0.7 * * * +	2.1 ± 0.6 +	2.1 ± 0.5 +	3.1 ± 0.5	2.2 ± 0.8	0.9 ± 0.5 * * * +
LDH (U/g)	14.9 ± 1.7 + +	13.4 ± 1.3 * *	11.9 ± 0.9 + +	9.2 ± 1.5	11.9 ± 2.4	19.7 ± 7.8 +
TP (mg/g)	5.72 ± 76.5 * * *	208.7 ± 21.1 + 189.0 ± 26.7		154.2 ± 22.4	211.9 ± 68.6	242.5 ± 34.1 + +

注: 表示每克湿重组织中酶或蛋白的含量; + 与溶剂对照相比  $P < 0.05$ , + +  $P < 0.01$ ; \* 与生理盐水对照相比  $P < 0.05$ , \* \*

\*  $P < 0.01$ ; n = 5

54mg/kg 组胚胎 AST、ALP、LDH 和 TP 与生理盐水对照组相比有明显的差别。18mg/kg 组 ALP、LDH 和 TP 与生理盐水对照组相比有明显差别。6mg/kg ALP 和 LDH 与生理盐水对照组相比有明显差别。环磷酰胺阳性对照组 ALT、AST、ALP、LDH 和 TP 与对照组相比均有明显的差别。上述五项生化指标溶剂对照组与生理盐水对照组相比无明显差别。

## 讨论

紫杉醇是近年来研制的一种新的抗癌药物,它的药理作用为一种阻止微管蛋白解聚的微管稳定剂。已作为癌症化疗药物用于临床,有文献报道紫杉醇对小鼠和大鼠有胚胎毒性作用<sup>(1,2)</sup>。为了解该药对器官形成期早期胚胎生长发育的影响,我们于母鼠妊娠 d6 器官形成期给药,连续给药 5 d,在自然生长情况下观察药物对早期胚胎生长发育和形态

发育的影响。结果表明溶剂对胚胎生长发育有一定毒性作用,在溶剂浓度固定情况下紫杉醇对胚胎的生长发育和形态发育均有明显的影响,且随剂量增加胚胎毒性作用增强。本实验与传统的致畸胎实验的结论基本上是一致的<sup>(1)</sup>,紫杉醇 54mg/kg 组卵黄囊直径和横径都明显下降,卵黄囊血液循环较差,影响胚胎正常翻转,生化测试结果表明总蛋白含量明显下降,这些指标说明紫杉醇能够影响胚胎正常生长发育,是引起胚胎早期死亡的重要原因。

本方法是采用母鼠整体给药,减少了胚胎培养的中间环节,比体外胚胎培养更接近实际。本方法的优点是简便、快速、无需特殊的仪器设备,一般实验室都能进行,与传统的致畸胎实验相比明显的缩短了时间,我们认为本方法如果作为快速筛查致畸物的短期实验方法,还有待于进一步的积累资料。

本实验所选用胚胎组织匀浆五项生化指

## 避孕药醋酸诺酮肟对果蝇的致畸性和致突变性的研究

王 瑶<sup>1</sup> 计雪文<sup>2</sup> 纪贤文<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 福州总医院全军医学检验中心 福州 350001 <sup>2</sup> 第三军医大学遗传学教研室 重庆 630038

**摘要** 采用果蝇致畸试验,果蝇伴性隐性致死试验和果蝇非整倍体试验对避孕药醋酸诺酮肟进行致畸和致突变性研究。结果表明当醋酸诺酮肟在浓度分别为 5mg/ml 和 50mg/ml 时,不引起果蝇致畸率和伴性隐性致死率升高。但在 50mg/ml 浓度时可引起果蝇非整倍体频率上升,并具有统计学意义。

**关键词** 醋酸诺酮肟;果蝇致畸试验;果蝇伴性隐性致死试验;果蝇非整倍体试验。

## TERATOGENICITY AND MUTAGENICITY OF CONTRACEPTIVE DRUG NORETHISTERONE ACETATE-3-OXIME IN DROSOPHILA MELANOGASTER

Wang Yao<sup>1</sup>, Ji Xuewen<sup>2</sup>, Ji Xianwen<sup>2</sup>

*The laboratory center of Fuzhou general hospital, Fuzhou, Fujian, 350001*

**Abstract** Norethisterone acetate-3-oxime is a new contraceptive drug whose teratogenicity and mutagenicity is unclear. In this Paper, in order to investigate safety of norethisterone acetate-3-oxime, we studied the teratogenicity and mutagenicity of norethisterone acetate-3-oxime using *Drosophila melanogaster* teratogenicity test, sex-linked recessive lethal test and aneuploid test. The results showed that norethisterone acetate-3-oxime didn't induce to increase of teratogenic rate and lethal rate in *Drosophila melanogaster* at concentration 5mg/ml

标评价胚胎的生长发育,结果表明 ALT、AST 这两项指标小鼠胚胎不敏感,这可能是由于胚胎太小,某些脏器发育不完全有关。而 ALP、LDH 和 TP 均有明显的改变,是否与影响胚胎的正常生长发育有关,还有待于进一步的研究。

### 参考文献

1. shuichi KAI, Hisashi KOHMURA, Eiko HIRAIWA, et al, Reproductive and developmental toxicity studies of paclitaxel

- (11): Intravenous administration to rats during the total organogenesis. *J Toxicol Sci*, 1994;19(Suppl. 1):69.
2. Scialli AR, Desesso JM, Goeringer GC. Taxol (paclitaxel) toxicity in the developing chick. *Teratology society abstracts*, 1994;49(5):404.
3. Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology*, 1981, 24:65.
4. Van Maele - Fabry G, Delhaise F, Picard J. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *Toxic in vitro*, 1990;4(2):149.