



· 药理 ·

应用全胚胎培养方法研究野百合碱对小鼠胚胎发育的影响

韩佳寅^{1,2}, 梁爱华^{1,2*}, 易艳², 高双荣², Odd Georg Nilsen³

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

3. 挪威科技大学 医学院, 挪威 特隆赫姆 7006)

[摘要] 目的:探讨野百合碱的胚胎发育毒性。方法:采用小鼠全胚胎培养模型,将8.5 d小鼠胚胎在含有野百合碱的即刻离心血清中培养48 h(野百合碱的终浓度分别为100,50,25,12.5 mg·L⁻¹),观察野百合碱对胚胎生长发育(卵黄囊直径、颅臀长、头长、体节数)和组织器官形态分化(卵黄囊循环、尿囊、翻转、心、脑、尾神经管、视听嗅系统、腮弓、颌突、肢芽)的影响。结果:随野百合碱浓度的增加,胚胎的生长发育和组织器官形态分化受到的影响越来越严重,其中以视听系统、颌突、肢芽等项的影响最为明显。结论:野百合碱对体外培养的小鼠胚胎有明显的毒性作用,提示妊娠期暴露于该化合物对胎儿具有潜在的毒性。

[关键词] 野百合碱;全胚胎培养;生殖毒性

野百合碱(monocrotaline, MCT)是一种分布范围很广的吡咯里西啶生物碱,目前已知其毒性主要集中在肝毒性^[1]、诱导肺动脉高血压^[2]和造成心脏衰竭^[3]等方面。除此以外野百合碱还具有遗传毒性,能造成DNA损伤,影响细胞生长^[4-5]。关于野百合碱在妊娠期间的暴露对胎儿的危害目前研究很少,但目前已知与其结构相似的千里光碱可以扩散通过胎盘屏障,产生胚胎毒性作用^[6]。本实验拟采用体外植入后全胚胎培养模型研究野百合碱对小鼠胚胎生长发育的影响,为其合理用药提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 健康未生育ICR小鼠,体重20~30 g,雌30只,雄14只。健康成年雄性SD大鼠,体重300 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2006-0009,饲养于中国中医科学院实验动物中心。饲养环境控制在温度

20~25℃,相对湿度55%±15%,全新风换气,人工控制照明,昼夜交替时间为12 h/12 h。

1.2 试剂 野百合碱,纯度99%,购于金测分析技术(天津)有限公司,批号200903(用50 μL DMSO助溶将5 mg野百合碱溶于5 mL ICS中,配制成1 g·L⁻¹野百合碱母液);丝裂霉素C,购于Roche公司,批号107409。

2 方法

2.1 培养基(即刻离心血清,immediately centrifuged serum, ICS)的制备 成年健康SD大鼠用乙醚麻醉后,用乙醇进行常规腹部消毒,剖腹,分离腹主动脉快速抽血。即刻3 500 r·min⁻¹离心5 min,用长柄镊子挤压上层纤维凝块,释放血清,3 500 r·min⁻¹离心15 min,此时获得的血清即为ICS。将ICS开盖56℃水浴35 min灭活补体并使其中的乙醚挥发。将获得的血清用0.22 μm滤菌膜滤菌,分装,-80℃保存。临用时加入终浓度为100 U·mL⁻¹的青链霉素。

2.2 小鼠交配 雌雄鼠于每日16:00时按3:2合笼,次日晨9:00左右检查阴栓,查见阴栓即为交配成功,定为妊娠第0天,妊娠第8天12:00时定为第8.5 d。

2.3 胚胎移植 脱颈处死孕8.5 d小鼠,常规消毒

[稿件编号] 20100802010

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873434);国家科技部重大专项(2009ZX09301-005);中国中医科学院自选课题(2007)

[通信作者] *梁爱华, Tel: (010)64288601, E-mail: liangaihua@ sina.com



腹部后,打开腹腔,取出蜕膜组织包裹的胚胎置于无菌 D-Hanks 液中。于解剖显微镜下剥离蜕膜组织和 Reichert's 膜,分离出带有完整脏层卵黄囊 (visceral yolk sac, VYS) 和羊膜的胚胎,选取体节数为 2~5 的胚胎,随机分配到各组含有 3 mL 培养基的培养管中,每支培养管中放入 2~3 只胚胎。实验分 7 组:空白对照组(培养基为纯 ICS),溶媒对照组(培养基为含有 0.1% DMSO 的 ICS),阳性对照组(培养基为含丝裂霉素 C $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ICS),给药 4 组(培养基分别为含野百合碱 100, 50, 25, $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ICS)。各组培养基 pH 均调为 7.5。

2.4 体外培养 将培养管水平插入旋转培养装置中,在 $(37.5 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内旋转培养 48 h,转速控制在 $30 \sim 40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别于培养开始时、16~18 h 和 23~25 h 向培养管内充入无菌混合气体 2.5 min,在以上各时间段充入混合气体的比例分别为 ($\text{O}_2\text{-CO}_2\text{-N}_2$) 5:5:90, 20:5:75, 40:5:55。培养 48 h 后收获胚胎。

2.5 生物学终点观察 胚胎生长发育:将培养 48 h 后的胚胎于倒置显微镜下测量胚胎脏层卵黄囊 (visceral yolk sac, VYS) 直径,颅臀长,头长,体节数。胚胎形态分化:根据 Van 胚胎形态学评分系统对卵黄囊、尿囊、心、脑、视听嗅系统、神经系统、肢芽等进行评分,评价胚胎组织器官形态分化终点^[7]。

2.6 统计学处理 胚胎生长发育指标和胚胎形态分化总分应用方差分析进行统计分析,胚胎形态分化各项指标应用等级资料秩和检验进行统计分析。各用药组与溶媒组进行比较,分析显著性差异。

3 结果

3.1 野百合碱对胚胎生长发育的影响 随着野百合碱浓度的增加,VYS 直径、颅臀长、头长、体节数等胚胎生长发育指标值均较溶媒对照组降低,并且呈一定的量效关系。表明野百合碱对胚胎具有毒性作用,其中以对代表胚胎大小的颅臀长影响最为严重,在低剂量时已出现影响;对 VYS 直径影响最小,仅在高剂量才产生影响(表 1)。

表 1 野百合碱对体外培养小鼠全胚胎生长发育的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	胚胎数	卵黄囊直径 / mm	颅臀长 / mm	头长 / mm	体节数 /对
空白对照	-	9	4.45 ± 0.45	3.56 ± 0.38	1.80 ± 0.26	27.89 ± 1.83
溶媒对照	0	10	4.78 ± 0.48	3.80 ± 0.24	1.89 ± 0.28	28.30 ± 1.77
丝裂霉素 C	2	10	$2.71 \pm 0.89^{2)}$	$1.63 \pm 0.77^{2)}$	$0.84 \pm 0.48^{2)}$	$0.00 \pm 0.00^{2)}$
野百合碱	12.5	12	4.60 ± 0.42	$3.30 \pm 0.39^{1)}$	1.66 ± 0.18	26.25 ± 2.26
	25	12	4.16 ± 0.74	$3.06 \pm 0.51^{2)}$	$1.50 \pm 0.34^{2)}$	24.83 ± 3.61
	50	12	4.00 ± 0.82	$3.15 \pm 0.54^{1)}$	$1.53 \pm 0.32^{1)}$	$24.08 \pm 2.71^{2)}$
	100	10	$3.24 \pm 0.87^{2)}$	$2.45 \pm 0.76^{2)}$	$1.19 \pm 0.45^{2)}$	$12.50 \pm 11.41^{1)}$

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 野百合碱对胚胎组织器官形态分化的影响 野百合碱对胚胎组织器官形态分化有比较明显的影响,并呈一定的量效关系(表 2)。低浓度野百合碱 ($12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 仅对胚胎的视听系统、下颌突和前后肢芽有影响,对其他组织器官形态分化的影响与对照组比较无显著性差异。随着用药剂量的增加 ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),野百合碱对胚胎组织器官形态分化的影响逐渐增加,对心、尾部神经管、后脑等也产生了影响。到达 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时胚胎的组织形态分化除翻转一项外,其他各项与对照组比较均有影响。达到最高剂量时 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),野百合碱对胚胎组织分化具有全面的影响,其中对视听系统、颌突、肢芽等项的影

响最为明显,其评分不足对照组的 1/3。

4 讨论

本研究将处于器官形成期的胚胎 (8.5 d) 移植到体外进行全胚胎培养,既保持了胚胎的完整性,又精确地控制试验条件,排除了母体代谢等复杂因素的影响,能观察药物本身对胚胎的直接影响,从而分析其是否具有潜在的致畸性。

在本试验中,空白对照组胚胎的生长发育和组织器官形态分化各项指标均得到较高的评分,说明胚胎能基本达到在体内子宫内的发育状态;已知的致畸物丝裂霉素 C 在终浓度 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平对胚胎有明显的致畸效果,表明本试验系统具有较好的可



表2 野百合碱对体外培养小鼠全胚胎组织器官形态分化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg · L ⁻¹	胚胎数	卵黄囊循环	尿囊	翻转	心	尾部神经管	后脑
空白对照	-	9	4.78 ± 0.44	4.00 ± 0.00	4.89 ± 0.33	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
溶媒对照	0	10	4.70 ± 0.48	3.80 ± 0.42	4.60 ± 0.52	4.90 ± 0.32	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
丝裂霉素 C	2	10	1.50 ± 0.71 ²⁾	1.30 ± 0.48 ²⁾	1.50 ± 1.27 ²⁾	1.00 ± 0.94 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.20 ± 0.63 ²⁾
野百合碱	12.5	12	4.50 ± 0.90	3.83 ± 0.39	4.67 ± 0.65	4.75 ± 0.45	4.83 ± 0.39	5.00 ± 0.00
	25	12	3.83 ± 0.94 ¹⁾	3.25 ± 0.75	3.92 ± 1.08	3.83 ± 0.72 ²⁾	3.83 ± 0.84 ²⁾	4.08 ± 1.16 ¹⁾
	50	12	3.25 ± 1.06 ²⁾	2.50 ± 0.67 ²⁾	4.67 ± 0.49	3.67 ± 1.23 ²⁾	3.42 ± 0.79 ²⁾	3.75 ± 0.97 ²⁾
	100	10	2.00 ± 0.82 ²⁾	1.70 ± 0.68 ²⁾	2.30 ± 1.89 ¹⁾	2.10 ± 1.37 ²⁾	1.70 ± 1.64 ²⁾	2.80 ± 1.23 ²⁾

组别	剂量/mg · L ⁻¹	胚胎数	中脑	前脑	听系统	视系统	嗅系统	腮弓
空白对照	-	9	4.56 ± 0.63	5.56 ± 0.63	5.44 ± 0.53	5.89 ± 0.33	2.67 ± 0.50	3.22 ± 0.44
溶媒对照	0	10	4.50 ± 0.53	5.50 ± 0.53	5.00 ± 0.67	5.80 ± 0.42	2.50 ± 0.53	3.10 ± 0.32
丝裂霉素 C	2	10	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.50 ± 0.53 ²⁾	0.10 ± 0.32 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾
野百合碱	12.5	12	4.33 ± 0.65	5.33 ± 0.49	4.08 ± 1.00 ¹⁾	5.00 ± 0.85 ¹⁾	2.08 ± 0.52	2.75 ± 0.87
	25	12	3.83 ± 0.84	4.75 ± 0.45	3.42 ± 1.31 ²⁾	3.67 ± 1.83 ²⁾	1.58 ± 0.67 ²⁾	1.83 ± 0.94 ²⁾
	50	12	3.33 ± 0.65 ²⁾	4.08 ± 1.08 ²⁾	2.42 ± 1.78 ²⁾	4.00 ± 1.21 ²⁾	1.25 ± 0.62 ²⁾	1.75 ± 0.62 ²⁾
	100	10	1.90 ± 1.45 ²⁾	2.70 ± 1.49 ²⁾	0.80 ± 1.14 ²⁾	1.60 ± 1.26 ²⁾	0.70 ± 0.48 ²⁾	0.70 ± 0.48 ²⁾

组别	剂量/mg · L ⁻¹	胚胎数	上颌突	下颌突	前肢芽	后肢芽	体节	形态分化总评分
空白对照	-	9	2.56 ± 0.53	2.33 ± 0.50	2.33 ± 0.50	2.22 ± 0.67	5.00 ± 0.00	70.44 ± 3.50
溶媒对照	0	10	2.50 ± 0.53	2.20 ± 0.42	2.20 ± 0.42	1.80 ± 0.42	5.00 ± 0.00	67.70 ± 4.32
丝裂霉素 C	2	10	0.20 ± 0.42 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	6.30 ± 2.31 ²⁾
野百合碱	12.5	12	2.17 ± 0.58	1.58 ± 0.52 ¹⁾	1.42 ± 0.52 ²⁾	1.08 ± 0.29 ²⁾	4.75 ± 0.45	62.17 ± 5.46
	25	12	1.50 ± 0.67 ²⁾	1.08 ± 0.52 ²⁾	0.92 ± 0.67 ²⁾	1.00 ± 0.60 ²⁾	4.42 ± 0.67 ¹⁾	50.75 ± 11.03 ²⁾
	50	12	1.25 ± 0.75 ²⁾	1.08 ± 0.29 ²⁾	0.75 ± 0.45 ²⁾	0.75 ± 0.45 ²⁾	4.42 ± 0.67 ¹⁾	46.33 ± 8.12 ²⁾
	100	10	0.60 ± 0.84 ²⁾	0.70 ± 0.48 ²⁾	0.30 ± 0.48 ²⁾	0.30 ± 0.48 ²⁾	2.20 ± 2.10 ²⁾	25.10 ± 14.09 ²⁾

靠性和敏感性。

野百合碱不溶于 ICS, 需用助溶剂进行助溶。有文献报道在低于 0.04% 的剂量时 DMSO 有胚胎毒性^[8], 但本试验中使用 0.1% DMSO 作为助溶剂^[9], 实验结果证明, 溶媒对照组与空白对照组在胚胎生长发育和组织器官形态分化各方面均无显著性差异, 因此在全胚胎培养过程中可以使用 ≤ 0.1% DMSO 作为助溶剂。

野百合碱属于吡咯里西啶生物碱, 是一种在猪屎豆属较为常见的成分, 常用于治疗癌症的农吉利中就含有此类成分^[10]。文献报道, 吡咯里西啶类生物碱具有致畸、堕胎的作用^[11], 体外实验证明, 野百合碱还有明显的致突变毒性^[12]。关于野百合碱生殖毒性的报道较少, 且结论不一: Medeiros 等在大鼠怀孕期间给予其含 0.02% 野百合碱的饲料, 结果导致了胎儿发育迟缓^[13]; Blanco 等在测试半胱氨酸对野百合碱生殖毒性防护作用的试验中也证明了野百合碱生殖毒性的存在^[14]。然而, Ricci 等在大鼠怀孕期间给予 1.0, 3.5, 7.0 mg · kg⁻¹ 不同剂量的野百合碱, 发现除胎儿数量减少外, 胎儿生长发育的各项指标均未受到影响^[15]。

本试验通过全胚胎培养模型来测试野百合碱的毒性, 实验结果证明野百合碱对体外胚胎的生长发育具有明显影响, 且其毒性呈明显的剂量-效应关系, 表明其可造成胚胎发育迟缓。此外, 野百合碱可能造成胚胎畸形, 其对卵黄囊循环、尿囊等发育均有显著性影响, 其中对视听系统、颌突、肢芽等项的影响最为明显, 质量浓度为 12.5 mg · L⁻¹ 时就已经出现影响。

本试验结果提示, 妊娠期应避免使用含有野百合碱的中草药。另外, 有些含有野百合碱的植物种子可能污染谷物而造成误服, 这也可能造成孕妇的潜在暴露, 故农作物的采收也应防止含野百合碱的植物种子污染。

在本试验系统中未加入外源性代谢活化系统, 早期胚胎本身也缺乏代谢活性, 因此, 本试验的结果反映了野百合碱对胚胎的直接致畸作用, 表明野百合碱可能作为一种直接致畸物而对胚胎产生毒性作用, 其代谢后对胚胎的毒性是增强或减弱有待继续研究。

[参考文献]

[1] 王希海, 黄光照. 药用植物引起中毒性肝病时的病理变化



- [J]. 中西医结合肝病杂志,1996,6(4):48.
- [2] 林伟,王毅,吴昊. 野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的建立及尾加压素-II在肺动脉高压中的表达[J]. 浙江实用医学,2010,15(2):96.
- [3] 张国伟,于洋,祁家驹. 野百合碱注射复制大鼠右心衰竭模型[J]. 心肺血管病杂志,2009,28(6):423.
- [4] Barreto R A, Sousa C S, Silva V D A, et al. Monocrotaline pyrrol is cytotoxic and alters the patterns of GFAP expression on astrocyte primary cultures[J]. Toxic in Vitro, 2008, 22 :1191.
- [5] Silva-Neto J P, Barreto R A, Pitanga B P S, et al. Genotoxicity and morphological changes induced by the alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, in a model of glial cells[J]. Toxicol,2010,55:105.
- [6] Sundareson A E. An experimental study on placental permeability to cirrhogenic poisons[J]. J Pathol,1942,54(3):289.
- [7] Van M F G, Delhaise F, Picard J J. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos[J]. Toxic in Vitro, 4(2):149.
- [8] Augustine-Rauch K A, Zhang Q, Kleinman M, et al. A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds[J]. Reprod Toxicol, 2004, 18:391.
- [9] 曾怀才,陈锋,龙鼎新,等. 氯化三丁基锡对外培养小鼠胚胎毒性研究[J]. 中国职业医学,2005,32(6):11.
- [10] 葛宝林,朱文苑. 农吉利甲素(野百合碱)抗癌机理研究 II 农吉利甲素对 3H-胸腺嘧啶核苷掺入人体肝癌细胞 DNA 的影响[J]. 青岛医学院学报,1983(1):1.
- [11] Prakash A S, Pereira T N, Reilly P E B, et al. Pyrrolizidine alkaloids in human diet[J]. Mutat Res,1999,443:53.
- [12] 王军,王长虹,王峥涛. 吡咯里西啶生物碱的细胞毒性及致毒机制研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2007,34(4):246.
- [13] Medeiros R M T, Gorniak S L, Guerra J L. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats[J]. J Ethnopharmacol, 2000, 69:181.
- [14] Blanco B S, Medeiros R M T, Guerra J L, et al. Lack of protective action of cysteine against the fetotoxic effect of monocrotaline [J]. Food Chem Toxicol,2001,39:635.
- [15] Ricci E L, Telloli C S, Dalmolin D P, et al. Developmental toxicology of monocrotaline: physical and neurobehavioral evaluation in rat offspring[J]. Toxicol Lett, 2010, 196: S183.

Toxicity of monocrotaline on *in vitro* cultured mouse embryos

HAN Jiayin^{1,2}, LIANG Aihua^{1,2*}, YI Yan², GAO Shuangrong², Odd Georg Nilsen³

(1. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Faculty of Medicine, Norwegian University of Science and Technology, 7006 Trondheim, Norway)

[Abstract] **Objective:** To investigate the fetotoxicity of monocrotaline. **Method:** Mouse whole embryo culture (WEC) was applied. Post-implantation (8.5 d) mouse embryos were isolated from their mothers and put into the medium of immediately centrifuged serum (ICS) prepared from rats. Different concentrations of monocrotaline (100,50,25,12.5 mg · L⁻¹) were added into the WEC. Development (yolk sac diameter, crown-rump length, head length, somite number) and organic morphodifferentiation (yolk sac circulation, allantois, embryonic flexion, heart, brain, optic-otic-olfactory organ, branchial arch, maxillary, mandible, bud) of embryos were observed at 48 h after treatment. **Result:** Obvious fetotoxicity could be observed in various monocrotaline treatment groups in a dose-dependent manner. Development of embryos was delayed significantly at dose 12.5-100 mg · L⁻¹. Malformations were shown in all organic morphodifferentiation indice, especially in opti-otic organ, mandible and bud. **Conclusion:** Monocrotaline had obvious fetotoxicity *in vitro* WEC, indicating that exposure of pregnant mice to monocrotaline may have potential risk on fetus.

[Key words] monocrotaline; whole embryo culture; fetotoxicity

doi:10.4268/cjcm20110424

[责任编辑 张宁宁]