基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1029-03

青蒿水提物对雄性小鼠一般生殖毒性的实验研究

竹 梅[1],张会军[2],王莎莉[3]

(1. 四川泸州医学院生理教研室,泸州 646000; 2. 西安市胸科医院外科,西安 710061; 3. 重庆医科大学神经科学研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察青蒿水提物对雄性小鼠生殖能力的影响。方法:采用一般生殖毒性实验,80 只雄性昆明小鼠随机分为生理盐水组、青蒿水提物低剂量组(20 mg/kg)、中剂量(100 mg/kg)和高剂量组(500 mg/kg)。雄鼠连续腹腔给药 60 d,然后按雌雄比例 2:1 合笼喂养交配、处死,检测青蒿水提物对各组雄鼠的交配率、睾丸、精子数量、活动精子百分率和畸形率的影响以及睾丸组织病理学变化。结果:500 mg/kg 青蒿水提物对前述所检测的生育指标无明显影响。结论:青蒿水提物对雄鼠的生殖功能无明显毒性作用。

【关键词】青蒿水提物;雄性小鼠;生殖毒性

【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-27

Toxic effects of artemisia aqueous extract on general reproduction in male mice

ZHU Mei, et al

(*Department of Physiology, Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To observe the toxic effects of artemisia aqueous extract on the ability of reproduction in male mice. *Methods*: Mice were randomly divided into 0, 20, 100 and 500 mg/kg dose groups and administered intraperitoneally for 60 days then mated and exeduted. The coefficient of testicle and epididymis, fertility index, sperm, the percentage of motile sperm, deformity of sperm and histopathological changes of testicle were detected. *Results*: The concentrations of artemisia aqueous extract used in this study have no significant influence on the aforementioned parameters. *Conclusion*: Reproductive functions of male mice does not obviously impaired by artemisia aqueous extract.

【Key words】Artemisia aqueous extract; Male mice; Reproductive toxicity

中药是我国的国粹,青蒿是其中最具代表性的一种,是我国自主创新的成果,它改写了只有生物碱成分抗疟的历史,为世界抗疟疾作出了巨大贡献,其研究也处于国际领先水平。但是青蒿的成分众多,药理作用非常广泛,研究发现,青蒿素及其衍生物还有明显的抗肿瘤、抗炎、抗心率失常等作用[1~4],有巨大的发掘潜力。特别是今年 1 月 15 日的《科学》杂志报道说,英国科学家[5]已经破解了青蒿的遗传密码,绘制出了青蒿的基因组图谱,并找到了产生药性的特别基因和其标记物。这使得青蒿及其衍生物的研究仍然是当今研究的热点,青蒿巨大的药用潜力将进一步被发掘。

课题组从青蒿中提取出了高水溶性的青蒿素衍生物即青蒿水提物,该药克服了其它青蒿素类药物难溶于水,对热不稳定,不易吸收等影响等缺点,具有一定的抗癌作用[6]。为了评价青蒿水提物的安全性,本实验按照一类新药生殖毒性的评价要求[7,8],对青蒿水提物的一般生殖毒性进行了研究,为临床安全用药提供实验依据。

作者介绍:竹 梅(1981-),女,硕士,研究方向:神经生理。

通讯作者:王莎莉,女,教授,E-mail:YPWang@public.cta.cq.cn。

基金项目:重庆市科委攻关项目(编号:渝科发计字(2005)50 号文)。

1 材料与方法

1.1 药品

青蒿水提物,由重庆医科大学基础研究所提供。

1.2 实验动物

清洁级雄性昆明小鼠,未孕,无生育史,体质量(17 ± 2) g,常规喂养。购于重庆医科大学动物实验中心。

1.3 实验方法

80 只雄性昆明小鼠,随机分为 4 组,每组 20 只。实验剂量参考青蒿琥酯的 LD50, 分别设青蒿水提物低剂量组(20 mg/kg)、中剂量组(100 mg/kg)、高剂量组(500 mg/kg)和生理盐水对照组,按 1 次/d,0.01 ml/g 体质量腹腔给药。雄鼠连续腹腔给药 60 d,然后按雌雄比例 2:1 合笼喂养,第 2 d 早晨 8:00 根据雌鼠阴道有阴栓为阳性,计算交配率。脱颈椎处死

实验雄鼠，分别摘取睾丸和附睾，称重，计算脏器系数，测精子数、活动精子百分率、畸形率。4%多聚甲醛固定睾丸，组织病理学检测。

1.4 观察指标[1]

1.4.1 一般健康情况 观察给药期间实验小鼠的活动、步态、行为等一般健康情况；每周体质量；死亡数。

1.4.2 睾丸、附睾脏器系数 睾丸脏器系数(g)= 双侧睾丸质量(g)/体重(g) × 100；附睾脏器系数 = 双侧附睾质量(g)/ 体重(g) × 100。

1.4.3 交配率 交配率 = 阴栓阳性鼠数/交配鼠数 × 100%。

1.4.4 精子数量、活动精子百分率及畸形率的检测 取一侧附睾称重，将其置于 1 ml 生理盐水中，制成精子悬液，过滤，计算精子数和活动精子百分率。取滤液推片甲醛固定 5 min，1%伊红溶液染色 15 min，高倍镜计数 1 000 个完整精子，记录畸形精子数，计算精子畸形率。

1.4.5 睾丸组织病理学检测 睾丸经 4%多聚甲醛溶液固定，常规石蜡包埋，HE 染色，光镜下观察形态学变化。

1.5 统计学分析

实验数据计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，计数资料用率(%)表示，使用 SPSS11.5 软件包进行数据统计，计量资料组间比较采用单因素方差分析，计数资料采用卡方检验分析，以 $P<0.05$ 为显著性差异，有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况

实验期间，各剂量组小鼠活动敏捷，步态、行为及对外界反应情况均正常，未见死亡。各剂量组体重稳步增长，与对照组比较无显著性差异，$P>0.05$(表 1)。

2.2 青蒿水提物对小鼠睾丸、附睾重量、脏器系数的影响

与对照组比较，各剂量组之间小鼠睾丸与附睾质量以及睾丸(附睾)系数，均无显著性差异，$P>0.05$(表 2)。

2.3 青蒿水提物对小鼠精子计数、活动精子百分率与精子畸形率的影响

各剂量组间小鼠精子计数、活动精子百分率与精子畸形率比较无显著性差异，$P>0.05$(表 3)。

2.4 青蒿水提物对小鼠交配率的影响

与对照组比较，各剂量组之间小鼠交配率均无显著性差异，$\chi^2 \approx 1.38$，$P>0.05$(表 4)。

2.5 小鼠睾丸的组织病理学观察

各组动物睾丸组织结构正常，精细小管排列规整，精细小管内从管壁到管腔依次排列这精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞，并可见精子。生精上皮未见退变及坏死等毒性病理反应，睾丸间质(包括间质细胞)也未见明显的异常改变(图 1)。

表 1 各剂量组对小鼠体重的影响(g, n=80, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 周	4 周	8 周
对照组	20	19.63 ± 0.91	24.8 ± 3.6	35.3 ± 4.7
低剂量组	20	19.5 ± 1.91	26.4 ± 2.3	35.4 ± 2.6
中剂量组	20	18.9 ± 2.21	25.7 ± 3.2	35.5 ± 3.1
高剂量组	20	20.38 ± 1.70	27.2 ± 2.6	35.7 ± 2.8
F		2.448	2.360	0.056
P		0.070	0.078	0.983

表 2 青蒿水提物对睾丸及附睾质量(系数)的影响($\bar{x} \pm s$)

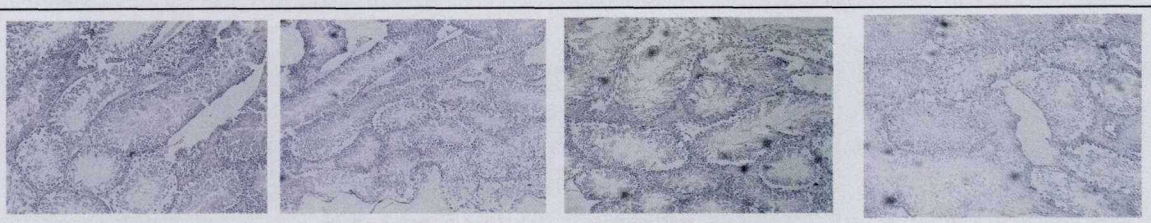
组别	n	睾丸质量(g)	附睾质量(g)	睾丸系数	附睾系数
对照组	20	0.26 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.70 ± 0.10	0.26 ± 0.05
低剂量组	20	0.25 ± 0.02	0.11 ± 0.08	0.71 ± 0.08	0.33 ± 0.25
中剂量组	20	0.24 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.68 ± 0.14	0.29 ± 0.03
高剂量组	20	0.24 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.69 ± 0.07	0.31 ± 0.13
F		1.607	2.057	1.240	1.330
P		0.195	0.113	0.301	0.271

表 3 青蒿水提物对小鼠交配率的影响(%)

组别	阴栓		合计	交配率
	阳性	阴性		
对照组	19(17.75)	1(2.25)	20	95
低剂量组	17(17.75)	3(2.25)	20	85
中剂量组	17(17.75)	3(2.25)	20	85
高剂量组	18(17.75)	2(2.25)	20	90
合计	71	9	80	88.75

表 4 青蒿水提物对小鼠精子计数、活动精子百分率与精子畸形率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	精子数($\times 10^8$ 个/ml 附睾)	活动精子百分率(%)	精子畸形率(%)
对照组	20	6.954 ± 1.200	86.56 ± 12.35	5.96 ± 0.921
低剂量组	20	6.798 ± 1.150	85.37 ± 10.58	6.23 ± 0.878
中剂量组	20	6.821 ± 1.340	85.88 ± 11.41	6.38 ± 0.994
高剂量组	20	6.545 ± 1.120	83.73 ± 10.96	6.25 ± 0.862
F		0.402	0.227	0.768
P		0.752	0.878	0.515



对照组(HE × 200) 低剂量组(HE × 200) 中剂量组(HE × 200) 高剂量组(HE × 200)

图 1 青蒿水提物处理后小鼠睾丸组织病理学变化

3 讨 论

青蒿水提物是课题组从青蒿中分离提取的一种水溶性较好的青蒿素衍生物,我们和其他学者研究证实,它在体内外具有明显的抗白血病[6]和肺癌[9-11]作用,这与 Sun WC 等[2]许多作者研究发现的青蒿及其衍生物对鼠白血病细胞株 P388,人类肝癌细胞系 SMMC-7721,人类胃癌细胞株 SGC-7901 有明显的抑制作用结果相似。本实验主要研究青蒿水提物对雄性小鼠的一般生殖毒性反应,对青蒿衍生物的应用潜力进行客观的评价。

体重是反映动物生长发育的客观指标[12]。青蒿水提物作用 60 d 后,各剂量组体重稳步增长,与对照组比较无显著性差异,同时各剂量组小鼠活动敏捷,步态、行为及对外界反应情况均正常,未见死亡。说明一定剂量的青蒿水提物对小鼠的体重及一般情况影响不大。

在雄性小鼠血睾屏障形成后连续给药 60 d,使药物作用于生殖细胞的增殖期、生长成熟期和变形期,同时也作用于睾丸支持细胞、间质细胞和其它类型细胞,以观察青蒿水提物对雄性小鼠生殖能力的影响。睾丸和附睾的发育可反映生殖机能的发育状况,精子的密度及活力更是反映其生精功能的重要指标。实验证实:一定剂量的青蒿水提物进入体内后,没有引起睾丸和附睾的重量以及它们的系数发生显著的变化,组织学观察也未见明显的病理学改变,精子的密度和活动精子百分率与对照组相比也无显著的差异。这些结果提示:当青蒿水提物的浓度在 500 mg/kg 剂量范围内时,对小鼠睾丸间质细胞分泌睾酮参与生精功能的调节可能无显著影响,这些也与其他学者的研究结果基本一致[3,4,12]。精子的形态是由多基因遗传调控的,Y 性连锁基因控制畸形精子的数量,常染色体基因控制精子的畸形类型[13],实验中观察到虽然青蒿水提物在小鼠体内浓度变化很大,但其精子的数量、活动精子百分率、畸形率与交配率都没有显著变化。我们推测:一定浓度的青蒿水提物使小鼠精子染色体发生明显畸变的可能性较小,因此对其子代发育的影响较小。但在我们进一步的实验中观察到小鼠胚胎的死亡率增加等现象,提示青蒿水提物可能可以通过胎盘屏障而影响到胚胎发育的过程。

参 考 文 献

[1] Firestone G L,Sundar S N. Anticancer activities of artemisinin and its bioactive derivatives[J]. Expert Rev Mol Med,2009,30(11):e32.

[2] Sun W C,Han J X,Yang W Y,et al. Antitumor activities of 4 derivatives of artemisic acid and artemisinin B in vitro[J].Zhongguo Yao Li Xue Bao,1992,13(6):541-543.

[3] 张 季,严春临. 青蒿素类药物的药理和毒理学研究[J].河北北方学院学报,2005,22(6):75-77.

[4] 谭 涛,秦宗会,谭 蓉.青蒿素类药物的药理作用研究进展[J].中国药业,2009,18(3):63.

[5] Graham I A,Besser K,Blumer S,et al.The genetic map of artemisia annua L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin [J].Science,2010,327(5963):328-331.

[6] 周生伟,王莎莉,王亚平.青蒿酸对人红白血病 K562 细胞增殖抑制的体外研究[J].重庆医科大学学报,2006,31(2):159-162.

[7] 王心如,周宗灿,张 桥,等. 毒理学实验方法与技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2003.

[8] 袁伯俊,王治乔. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京:军事医学科学出版社.1997.177.

[9] 张会军,王莎莉. 青蒿水提物对兔 VX2 肺癌的体内效果[J].第四军医大学报,2008,29(16):1455-1457.

[10] 陈卫强,戚好文,吴昌归,等.双氢青蒿素抗人肺腺癌 A549 细胞生长的实验研究[J].中国肺癌杂志,2005,8(2):85-88.

[11] Zhou H J,Zhang J L,Li A,et al. Dihydroartemisinin improves the efficiency of chemotherapeutics in lung carcinomas in vivo and inhibits murine Lewis lung carcinoma cell line growth in vitro[J].Cancer Chemother Pharmacol,2010,66(1):21-29.

[12] 楚宁宁,薛青光,孙旺吾,等.P450 芳香化酶活性调控对小鼠睾丸和附睾发育及精子发生的影响[J].安徽农业科学,2009,37(29):14204-14206.

[13] 张 桥.卫生毒理学基础[M].北京:人民卫生出版社,2000.249-251.

(责任编辑:关蕴良)