

王东升,张世栋,苗小楼,等. 藿苈灌注射液局部刺激性试验[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):303-305.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.086

藿苈灌注射液局部刺激性试验

王东升,张世栋,苗小楼,董书伟,魏立琴,邝晓娇,那立冬,闫宝琪,严作廷

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽用药物创制重点实验室/甘肃省中兽药工程技术研究中心/

甘肃省新兽药工程重点实验室,甘肃兰州 730050)

摘要:为了评价藿苈灌注射液的刺激性,为临床安全用药提供依据,采用眼睛刺激性和阴道黏膜刺激性试验进行局部刺激性研究。眼睛刺激性试验选择家兔 5 只,以左眼为对照结膜囊内滴入生理盐水 0.1 mL,右眼结膜囊内滴入藿苈灌注射液 0.1 mL,给药后观察 7 d,考察藿苈灌注射液对家兔眼睛的刺激性。阴道黏膜刺激性试验选择家兔 10 只,随机分为试验组和对照组,试验组家兔阴道灌注藿苈灌注射液 2 mL,对照组家兔阴道灌注生理盐水 2 mL,给药后 24 h 处死家兔,对家兔阴道进行病理组织学检查,评价其对家兔阴道黏膜的刺激性。结果表明,藿苈灌注射液对家兔眼睛和阴道黏膜无刺激性,说明藿苈灌注射液无刺激性。

关键词:藿苈灌注射液;刺激性;阴道;眼睛;家兔

中图分类号: S858.237.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2016)04-0303-02

不孕症是奶牛常见的四大疾病之一,由卵巢疾病引起的不孕症占 35%~55%^[1],有些地区高达 78.5%,而且 57.3% 为持久黄体 and 卵巢静止^[2]。近年来,奶牛不孕症尤其是由卵巢疾病引起的不孕症的发病率呈上升趋势^[3-4]。奶牛卵巢疾病常引起奶牛受胎率下降,造成的经济损失巨大^[5]。目前,治疗奶牛卵巢疾病引起的不孕症主要以激素为主,中药具有疗效确切、无残留、毒副作用小等优点,对卵巢性不孕症的疗效好,值得开发利用^[6],虽然我国学者已研制出许多中药制剂,但广泛用于兽医临床的却甚少^[7-9]。藿苈灌注射液,别称催情助孕液,是由淫羊藿、阳起石、丹参等中药组成的子宫灌注剂,临床上主要用于治疗奶牛卵巢静止和持久黄体。研究表明,该制剂工艺稳定^[10],能提高雌性小鼠机体雌激素水平和雌孕激素受体基因的表达量,能增强动物发情调节作用^[11]。为了研究制剂的局部刺激性,进行藿苈灌注射液的家兔眼睛和阴道黏膜刺激性试验,为该制剂在临床上的安全应用奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验动物

健康新西兰家兔,15 只,无任何眼部疾病,体质量 1.7~2.3 kg,由中牧实业股份有限公司兰州生物制药厂提供。

1.2 试验药品

藿苈灌注射液,北京中农劲腾生物技术有限公司生产的中试产品,规格为 1 mL 相当于原生药 1 g,批号为 20121001。

收稿日期:2015-03-23

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD12B03);中国农业科学院科技创新工程。

作者简介:王东升(1979—),男,甘肃临洮人,硕士,助理研究员,主要从事中药药理与奶牛繁殖疾病的研究。E-mail: lzmyswds@126.com.

通信作者:严作廷,博士,研究员。E-mail: yanzuoting@caas.cn。

1.3 试验方法

1.3.1 眼睛刺激性试验 选取眼睛无异常的家兔 5 只,右眼结膜囊内滴入 0.1 mL 藿苈灌注射液,左眼结膜囊内滴入 0.1 mL 生理盐水作为对照,轻轻拉动下眼睑,使药液与眼球充分接触 8~10 s,于滴眼前和滴眼后 30、60、90、120 min,24、48 h 和第 7 天,观察记录双眼的局部反应情况,主要观察家兔双眼角膜是否混浊,虹膜有无充血、出血和肿胀,瞳孔对光有无反应,结膜有无充血、水肿和流分泌物等。按眼刺激反应评分标准对角膜、虹膜及结膜分别进行评分,总和作为综合评分,计算平均值,对家兔的左右眼评分进行比较,按眼刺激性评价标准作出判定。即 0~3.9 分为无刺激性,4~8.9 分为轻度刺激性,9~12.9 分为中度刺激性,13~16 分为强度刺激性^[12](表 1)。

表 1 家兔眼刺激性反应综合评分

阶段	时间		眼刺激反应分值					平均 分值	眼刺激 性评价
			1 号	2 号	3 号	4 号	5 号		
点眼前	0 h	左	0	0	0	0	0	0	正常
		右	0	0	0	0	0	0	正常
点药后	30 min	左	0	1	0	1	0	0.4	无刺激性
		右	1	1	0	1	0	0.6	无刺激性
	60 min	左	0	0	0	1	0	0.2	无刺激性
		右	0	1	0	1	0	0.4	无刺激性
	90 min	左	0	0	0	0	0	0	无刺激性
		右	0	1	0	0	0	0.2	无刺激性
	120 min	左	0	0	0	0	0	0	无刺激性
		右	0	0	0	0	0	0	无刺激性
	24 h	左	0	0	0	0	0	0	无刺激性
		右	0	0	0	0	0	0	无刺激性
	48 h	左	0	0	0	0	0	0	无刺激性
		右	0	0	0	0	0	0	无刺激性
	7 d	左	0	0	0	0	0	0	无刺激性
		右	0	0	0	0	0	0	无刺激性

1.3.2 阴道黏膜刺激性试验 参照文献[13]方法。试验前先检查家兔阴道口有无充血、水肿、炎症、分泌物或其他损伤,选取阴道无异常雌性家兔 10 只,随机分为 2 组,每组 5 只。试验组将 2 mL 藿苈灌注液轻轻注入家兔阴道内,保持家兔倒立 5 min,使药液与阴道黏膜充分接触;对照组同法灌注生理盐水。24 h 后处死家兔,取出阴道组织,观察黏膜有无充血、出血、红肿等现象,将阴道组织在 10% 福尔马林中固定,做石蜡切片,HE 染色,进行病理组织学检查。

2 结果与分析

2.1 眼睛刺激性试验

从表 1 可见,给药后 30、60、90 min 家兔眼刺激性反应得分右眼分别为 0.6、0.4、0.2,左眼分别为 0.4、0.2、0,左、右眼分别在 60、90 min 内结膜有轻微充血现象,120 min 内恢复正常,按眼刺激性评价标准,藿苈灌注液对家兔眼睛无刺激性。

2.2 阴道黏膜刺激性试验

24 h 后处死家兔,取出阴道组织观察,结果黏膜无充血、出血、红肿等现象。阴道组织病理学检查,黏膜上皮完整,黏膜层、肌层结构清晰,上皮细胞形态正常,无炎症细胞浸润,血管无充血和水肿,表明藿苈灌注液对家兔阴道黏膜无刺激性(图 1 至图 4)。

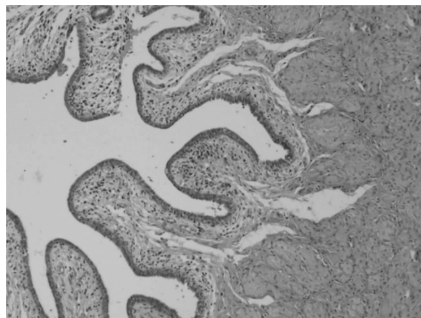


图1 对照组阴道组织(10×10)

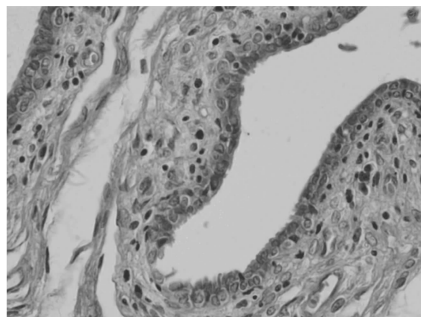


图2 对照组阴道组织(10×40)

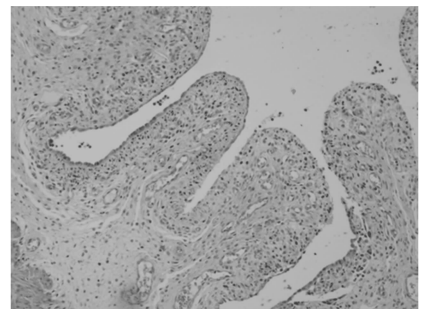


图3 药物组阴道组织(10×10)

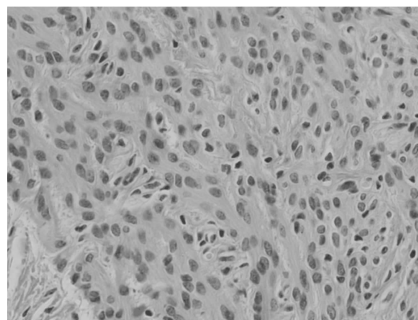


图4 药物组阴道组织(10×40)

3 结论与讨论

藿苈灌注液对家兔眼睛刺激性和阴道黏膜刺激性试验表明,藿苈灌注液无刺激性。刺激性是非口服给药制剂对给药部位产生的炎症反应或组织损伤。局部刺激性试验是考察动物的血管、肌肉、皮肤、黏膜等部位接触受试物后是否引起红肿、充血、渗出、变性或坏死等局部反应。目前,国际上最常用的家兔眼刺激性试验为 Draize 眼部刺激试验法,常以此为基础进行单次、多次和持续性刺激试验,以便全面研究滴眼剂等制剂的刺激性^[14]。为此,本试验先进行了家兔的眼刺激性试验,通过对试验家兔 7 d 的观察和综合评分表明,藿苈灌注液对家兔眼睛无刺激性。阴道黏膜既是一道抵御病菌感染的天然屏障,又是长期与细菌、病毒等接触而成为多种致病因素进入体内的部位,通过阴道刺激性试验,对与阴道黏膜接触的物品进行安全性检验极其重要^[15]。家兔阴道对刺激的敏感性高,符合安全性评价的试验目的,也是美国食品药品监督管理局确定的阴道刺激性试验的试验动物,而且操作相对简便、经济。试验中应以组织病理学检查结果为主要诊断依据进行综合判断。藿苈灌注液的给药方式是子宫灌注,子宫内膜是由黏膜组织构成的。因此,本试验在对家兔眼睛刺激性试验研究的基础上,利用阴道黏膜刺激性试验进一步评价藿苈灌注液的刺激性,考察阴道黏膜接触藿苈灌注液后黏膜的充血、炎症反应等情况,结果藿苈灌注液对家兔阴道黏膜无刺激性,这为该制剂的临床安全应用提供了依据。

参考文献:

- [1] 张俊秀. 奶牛的繁殖障碍及对策[J]. 北方牧业: 奶牛, 2007(9): 42-43.
- [2] 罗瑞卿, 谷新利. 促孕散治疗奶牛卵巢疾病性不孕症的研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2009, 27(4): 455-457.
- [3] Walsh S W, Williams E J, Evans A C O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows [J]. Animal Reproduction Science, 2011, 123(3/4): 127-138.
- [4] Lucy M C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle; where will it end? [J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(6): 1277-1293.
- [5] López-Gatius F. Is fertility declining in dairy cattle? a retrospective study in northeastern Spain [J]. Theriogenology, 2003, 60(1): 89-99.
- [6] 梁光华, 邓敏, 刘贤侠, 等. 促孕散对持久黄体 and 卵巢静止奶牛血清生殖激素的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(15): 3182-3188.
- [7] 罗瑞卿, 谷新利. 中药治疗奶牛不孕症[J]. 中国奶牛, 2008

何 蕾,王 璐,惠秀娟,等. 盐酸小檗碱对小鼠肝、脾、肾细胞 DNA 损伤的比较研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):305-307.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.087

盐酸小檗碱对小鼠肝、脾、肾细胞 DNA 损伤的比较研究

何 蕾¹,王 璐¹,惠秀娟¹,刘 宛²,宋 婕¹,徐成斌¹,王鹤潼²

(1. 辽宁大学环境学院,辽宁沈阳 110036; 2. 污染生态与环境工程重点实验室/中国科学院沈阳应用生态研究所,辽宁沈阳 110016)

摘要:通过彗星试验比较研究了盐酸小檗碱对小鼠肝、脾、肾细胞的 DNA 损伤。设置 6 个不同剂量组(阴性对照组、7.5、15、30、60、120 mg/kg 组)对小鼠进行 30 h 灌胃方式染毒,末次染毒 6 h 后小鼠颈椎脱臼处死。检测小鼠肝、脾、肾细胞的彗星细胞率、彗星尾长及尾矩。结果表明:(1)盐酸小檗碱可引起上述 3 种受试器官的 DNA 损伤,且随剂量增加,DNA 损伤增加($P < 0.05$),呈显著的剂量-效应关系。(2)比较同剂量组不同器官之间的彗星细胞率、彗星尾长及彗星尾矩,3 个剂量组均为肾细胞 > 脾细胞 > 肝细胞,并存在器官间显著差异($P < 0.05$)。一定剂量盐酸小檗碱对小鼠肝、脾、肾细胞造成了 DNA 损伤,具有一定的遗传毒性,比较研究发现肾细胞对盐酸小檗碱致 DNA 损伤最为敏感。

关键词:盐酸小檗碱;DNA 损伤;彗星试验;小鼠

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0305-03

盐酸小檗碱又称黄连素,是苯并异喹啉类铵型生物碱^[1],以清热解毒和抗菌等疗效著称,在临床上作为广谱抗菌类药物已使用多年。盐酸小檗碱还具有降血糖、抗心律失常、抗肿瘤、免疫调节等多种药理活性^[2-3]。盐酸小檗碱也表现出一定的毒副作用,研究表明大鼠脑中遗传物质的合成、细胞内细胞呼吸链相关酶的正常运转、大脑皮质神经元死亡、小脑颗粒神经元死亡,这些都受到侵入细胞内的盐酸小檗碱的影响^[4]。盐酸小檗碱还被大剂量地添加在动物饲料中,由于过量使用不能被完全吸收代谢,大部分仍会以原药或次级代谢产物的形式随动物粪便排泄出体外,污染地下水及环境,对于人类以及整个环境都造成巨大的危害。

单细胞凝胶电泳技术(SCGE),又称彗星试验,SCGE 在 1984 年首次由 Ostling 等^[5]提出,是一种在细胞层面上准确检测 DNA 损伤的方法,应用于很多领域^[6]。Guengerich 等^[7]应用彗星试验探究了常见和不常见的细胞色素 P450 代谢和毒性的相关化学反应;Knut 等^[8]通过彗星试验检测了紫外线引

起的 DNA 损伤,近几年,Kliemann 等^[9],Djelic 等^[10]应用 SCGE 技术探究了人类和动物细胞的 DNA 损伤。但目前为止,利用彗星试验比较盐酸小檗碱对不同器官 DNA 损伤差异的研究尚未见报道。因此,为了研究大剂量盐酸小檗碱的遗传毒性及其潜在的环境影响,本研究从细胞和分子水平上,探究盐酸小檗碱对于小鼠不同器官的遗传毒性。通过彗星试验检测盐酸小檗碱诱发小鼠不同器官彗星细胞率、彗星尾长及彗星尾矩的变化情况,为进一步探究盐酸小檗碱的遗传毒性、毒性机理等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

采用 ICR 雄性小鼠(沈阳医学院实验动物中心)36 只,体重 25~30 g,使用 SAS 随机程序将实验动物分为 6 组:阴性对照组、7.5、15、30、60、120 mg/kg 组。灌胃方式采用 30 h 灌胃法,末次染毒 6 h 后小鼠颈椎脱臼处死。所有处理均重复 6 次。

1.2 主要试验试剂

盐酸小檗碱(分析纯)、溴化乙锭(EB)、过氧化氢(H₂O₂)均购自国药集团化学试剂沈阳有限公司;正常熔点琼脂糖(NMA)、低熔点琼脂糖(LMA)、二甲亚砜(DM-SO)、及硫代巴比妥酸等购自美国 Sigma 公司,试剂均为优级纯。

1.3 试验步骤

参照 Singh 等改进和建立的单细胞凝胶电泳技术^[11],并

收稿日期:2015-05-04

基金项目:辽宁省科学技术计划(编号:2011230009);辽宁大学环境学院重点学科资助项目。

作者简介:何 蕾(1989—),女,辽宁沈阳人,硕士研究生,主要从事环境污染物遗传毒性研究。E-mail:137962846@qq.com。

通信作者:惠秀娟,硕士,教授,主要从事环境污染物遗传毒理与安全评价研究。E-mail:jennyhuixj@hotmail.com。

(10):67-69.

[8]杨炳杰,张盼峰,苏惠龙,等. 奶牛卵泡囊肿病因及诊疗研究进展[J]. 动物医学进展,2008,29(10):90-93.

[9]王东升,严作廷,李世宏,等. 治疗奶牛卵巢疾病性不孕症中药制剂研究进展[J]. 中国奶牛,2011(22):35-38.

[10]王东升,张世栋,李世宏,等. 正交试验法优化催情助孕液制备工艺[J]. 中国农学通报,2012,28(29):75-78.

[11]张世栋,王旭荣,杨 峰,等. 催情助孕液对小鼠雌、孕激素水平及其受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国兽医学报,2013,33(7):

1127-1131.

[12]中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南[M]. 北京:中华人民共和国卫生部,1994.

[13]吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京:化学工业出版社,2007.

[14]刘 洋,李 志,郭新红,等. 阿奇霉素滴眼剂的制备及质量控制[J]. 中国药房,2014,25(33):3131-3133.

[15]金 毅,王 平,王晓炜,等. 阴道刺激性试验的动物实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报,2012,46(3):235-237.