

乙双吗啉对小鼠和兔的生殖毒性

陈丽娟、王美瑛、刘明章 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

Reproductive toxicity of bimolane in mice and rabbits

CHEN Li-Juan, WANG Mei-Ying, LIU Ming-Zhang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT Bimolane (AT-1727), 1,2-bis (4-morpholinomethyl-3,5-dioxopiperazinyl)-ethane, is a new antitumor drug, synthesized first in our institute. When the mice were injected ip bimolane 3.7 or 37.2 mg/kg on d 6-15 after mated, 23 or 100% of the embryos were resorbed, while the surviving fetuses remained normal. After ip bimolane 7.4 or 14.9 mg/kg, the weights of living fetuses were all less than that of the control group ($P < 0.01$). After ig bimolane 140 mg/kg to the mice on d 6-15 after mated, 43% of the fetuses developed subcutaneous edema, but no other abnormalities were seen. When the rabbits were given ip bimolane 30 mg/kg on d 7-18 after mated, all the embryos were resorbed. On d 10 after mated ip a single dose of bimolane 74.4 mg/kg to the mice caused nanomelia (34%) and subcutaneous hematoma (55%). Therefore, teratogenicity of bimolane was observed in mice.

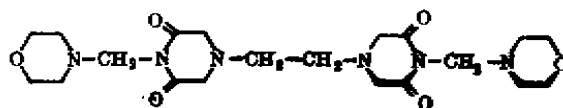
KEY WORDS bimolane; teratogens; drug-induced abnormalities; embryo resorption

摘要 小鼠受精后 d 6-15 连续 ip 乙双吗啉 3.7-37.2 mg/kg ($0.01-0.1 \times LD_{50}$) 及兔受精后 d 7-18 ip 30 mg/kg 均有随着剂量增大而明显增多的吸收胎, 甚至达 100%, 但均未见畸胎。小鼠受精后 d 10 单次 ip 乙双吗啉 74.4 mg/kg, 34% 胎鼠后肢短、55% 皮下血肿。可见乙双吗啉在小鼠和兔的器官形成期连续给药, 对其胚胎有明显毒性, 而 d 10 单次 ip 37.2-74.4 mg/kg 有轻度致畸作用。

Received 1988 Jan 29 Accepted 1989 Apr 20

关键词 乙双吗啉; 致畸胎物; 药物引致畸形; 胚胎吸收

乙双吗啉(bimolane)是由中国科学院上海药物研究所合成的一种新药⁽¹⁾。它对小鼠肉瘤 S₃₇, S₁₃₀ 等有显著抗肿瘤作用⁽²⁾, 临床用它治疗银屑病有较好的疗效⁽³⁾。为了观察其对妊娠生殖的影响, 我们进行了生殖毒性的研究。



Bimolane

MATERIALS AND METHODS

乙双吗啉, 杭州民生制药厂生产, 为白色粉末, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC) 配成混悬液。鱼肝油滴剂 (每克含维生素 A 50 000 和 D 5000 IU), 上海东海制药厂产品。昆明种远交系小鼠, 兔均由中国科学院上海实验动物中心供给。

小鼠体重 $28.0 \pm SD 2.5$ g, 按 1♂ 2♀ 合笼交配, 次日晨查到小鼠有阴栓的当天为 d 0。兔配对交配, 交配成功的当天为 d 0。小鼠受精后 d 6-15 兔 d 7-18 (器官形成期) 连续 ip 或 ig。小鼠还进行了受精后 d 8, 9, 10 大剂量 (37.2 mg/kg ip) 和 d 11 (280 mg/kg ig) 单次给药观察。鱼肝油滴剂按 10 ml/kg 于受精后 d 8-10 连续 ig 作阳性对照。小鼠和兔分别于

受精后 d 18 及 29 解剖, 记录每窝胎仔数、身长、体重、性别、活胎数、死胎数、吸收胎数及外观畸形。将半数胎仔固定在 95% 乙醇中, 经茜素红(alizarin red)染色, 检查骨骼发育情况, 另半数胎仔固定于 Bouins 液中, 检查内脏^(4,5)畸形。

RESULTS

乙双吗啉对小鼠和兔的胎仔发育的影响

每组小鼠 25 只, 获孕鼠数为 10-21 只 (Tab 1)。在小鼠受精后 d 6-15 ip 乙双吗啉 3.7-37.2 mg/kg 各组吸收胎较对照组显著增多 ($P < 0.01$); 37.2 mg/kg 组全部胚胎被吸收, 7.4-14.9 mg/kg 组胎鼠体重明显减轻 ($P < 0.01$), 但均未见畸胎。于受精后 d 8, 9, 10 分别一次 p 37.2 mg/kg ($0.1 \times LD_{50}$) 各组胎鼠体重较对照组为轻 ($P < 0.01$), 而当剂量增大到 74.4 mg/kg ($0.2 \times LD_{50}$) 身长和体重均较对照组值

低 ($P < 0.05$), 吸收胎数与对照组差异非常显著 ($P < 0.01$, Tab 1)。当 d 10 单次 ip 37.2 和 74.4 mg/kg 分别有 14/182 和 13/38 胎鼠后肢短, 头顶部或爪趾间有芝麻大到米粒大的紫色血肿(病理切片证明), 分别为 5/182 和 21/38 例。37.2 mg/kg 重复实验与第一次实验结果相似。于受精后 d 6-15 ig 乙双吗啉 14-140 mg/kg 仅在 140 mg/kg ($0.1 \times LD_{50}$) 在 7/21 孕鼠于受精后 d 5-17 中毒死亡的情况下, 有 6/38 胎鼠出现皮肤水肿, 吸收胎数增多 ($P < 0.01$)。d 10 单次 ig 140 和 280 mg/kg ($0.2 \times LD_{50}$) 组胎鼠身长和体重明显较对照组低 ($P < 0.01$), 后一组吸收胎数也明显增多 ($P < 0.01$) 有 1/71 胎鼠后肢短, 6/71 胎鼠局部皮下有点状血肿。阳性对照鱼肝油滴剂有多种外观畸形 (Tab 2)。

兔于受孕后 d 7-18 连续 ip 乙双吗啉 12 mg/kg, 54% 胎兔被吸收, 活胎兔数明显较

Tab 1. Effect of bimolane on fetuses of mice. $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs 0.5% CMC 10 ml. CLO = cod-liver oil.

Gestation (d)	Bimolane (mg/kg qd)	Route	Pregnant mice (fetuses)	Live fetuses per mouse			Dead fetuses	Resorbed fetuses
				Number	Weight (g)	Length (cm)		
6-15	CMC 10 ml	ip	12(109)	9.1±3.4	1.4±0.2	2.3±0.2	0	0.2±0.4
6-15	3.7	ip	12(94)	7.6±3.2**	1.3±0.1*	2.2±0.2*	0	2.4±4.3***
6-15	7.4	ip	11(103)	9.4±2.3*	1.2±0.2***	2.2±0.1*	0	2.5±3.8***
6-15	14.9	ip	16(153)	8.5±3.3*	1.0±0.1***	2.1±0.2*	0	1.7±2.5***
6-15	37.2	ip	17(0)	0	—	—	0	8.5±2.4***
6	37.2	ip	16(104)	6.5±2.6**	1.1±0.2***	2.2±0.1*	0.3±0.6	1.1±1.4*
9	37.2	ip	16(124)	6.9±3.5**	1.1±0.2***	2.2±0.2*	0.2±0.4	0.8±2.4*
10	37.2	ip	18(162)	10.1±2.4*	1.2±0.2***	2.3±0.2*	0	0.2±0.6*
10	37.2	ip	21(179)	8.5±2.7*	0.9±0.2***	2.0±0.2*	0.4±0.6	1.6±2.9*
10	74.4	ip	14(36)	2.7±3.9***	0.8±0.2***	1.8±0.1***	0.4±0.7	5.5±3.8***
15	74.4	ip	19(152)	8.0±3.0*	1.1±0.2***	2.1±0.2*	0.2±0.4	0.1±0.5*
6-15	CMC 10 ml	ig	15(119)	7.9±3.7	1.0±0.2	2.0±0.3	0.6±0.9	0.8±2.1
8-10	CLO 10 ml	ig	14(90)	6.4±2.6***	1.4±0.3*	2.3±0.1*	0.7±1.2	2.9±3.2***
8-15	14	ig	12(127)	10.6±1.6*	0.9±0.1*	1.8±0.2**	0.3±0.5	0.1±0.3*
6-15	28	ig	10(88)	8.8±4.3*	1.0±0.2*	2.1±0.2*	0.3±0.7	0.4±0.7*
6-15	56	ig	10(79)	7.9±3.1*	1.0±0.2*	2.0±0.2*	0.3±0.7	0.2±0.4*
6-15	140	ig	14(38)	2.7±4.6***	0.9±0.2*	1.9±0.2*	0.1±0.3	7.5±3.9***
10	140	ig	10(109)	10.9±1.8*	0.6±0.1***	1.8±0.1**	0.3±0.7	0
10	280	ig	14(71)	5.1±4.2***	0.7±0.2***	1.6±0.1**	0.7±1.3	3.6±4.6***
11	280	ig	15(120)	8.0±3.0*	1.2±0.1*	2.2±0.1*	0.2±0.6	0.6±1.2*

Tab 2. Effect of bimolane on fetal development in mice. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs 0.5% CMC. % in parentheses, CLO = cod liver oil.

Route Gestation Dose (mg/kg qd)	Intraperitoneal injection				Intragastric gavage			
	d 6-15		d 10		d 6-15		d 10	d 8-10 CLO 10 ml
External abnormalities								
Fetuses examined	109	153	182	38	119	38	71	90
Subcutaneous edema	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	6(16)***	0(0)	0(0)
Subcutaneous hematoma	0(0)	0(0)	5(3)*	21(55)***	0(0)	0(0)	6(8)***	0(0)
Hind nanomelia	0(0)	0(0)	14(8)***	13(34)***	0(0)	0(0)	1(1.4)*	61(67)***
Talipes varus	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	25(28)***
Fetuses open eyes	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	10(11)***
Tail-less	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	67(74)***
Skeletal abnormalities								
Fetuses examined	55	76	91	15	59	20	35	40
Parietal incompletely ossified	2(4)	7(9)*	2(2)*	1(6)*	0(0)	1(5)**	0(0)	4(10)***
Occipital bone absent	0(0)	6(8)***	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)**	0(0)	0(0)
Occipital bone incompletely ossified	3(5)	9(11)*	0(0)	3(20)***	1(1.7)*	0(0)	0(0)	9(23)***
Femur absent	0(0)	3(4)**	1(1)*	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Femur short	0(0)	0(0)	1(1)*	2(13)***	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Sternebrae № 5 absent	3(5)	10(13)*	2(2)*	3(20)***	0(0)	0(0)	0(0)	7(18)***
Tibia or fibula short	0(0)	0(0)	2(2)*	5(33)***	0(0)	0(0)	0(0)	14(35)***
Visceral abnormalities								
Fetuses examined	54	77	91	15	60	18	36	40
Cleft palate	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	38(95)***

Tab 3. Effect of bimolane ip to rabbits on d 7-18 after mated. $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs 0.5% CMC 2 ml.

Bimolane (mg/kg qd)	Pregnant rabbits (fetuses)	Live fetuses per rabbit			Dead fetuses	Resorbed fetuses
		Number	Weight (g)	Length (cm)		
CMC	5(33)	6.6 ± 2.1	34.0 ± 9.0	8.4 ± 1.1	2.0 ± 1.6	0.2 ± 0.4
0.75	4(24)	6.0 ± 4.0*	34.9 ± 5.8*	8.3 ± 1.2*	2.3 ± 2.1*	2.0 ± 4.0*
1.5	4(16)	4.0 ± 3.0*	48.5 ± 8.2*	9.0 ± 1.0*	0	2.8 ± 3.4*
3	3(12)	4.0 ± 4.0*	44.0 ± 1.3*	9.7 ± 0.3*	0	0.3 ± 0.6*
12	6(19)	3.2 ± 4.1**	40.6 ± 11.7*	8.4 ± 6.3*	0.2 ± 0.4***	3.7 ± 3.9***
30	3(0)	0	—	—	0	5.3 ± 4.2***

对照组减少($P < 0.05$), 当剂量增加到 30 mg/kg, 100% 胎兔被吸收。乙双吗啉各剂量组的胎兔及其对照组胎兔外观均无异常(Tab 3)。

对内脏发育的影响 除了鱼肝油滴剂对胎仔引起 95% 腭裂外, 其他各组胎鼠内脏均未见异常(Tab 2)。

给兔 ip 乙双吗啉 1.5 mg/kg (0.0125 × LD_{50}) 组, 4 只孕兔中的 1 只孕兔怀 2 仔, 其中

1 只胎兔的肝脏约 3/4 在横膈之上胸腔内, 1/4 肝脏在横膈之下腹腔内。另只胎兔及其他各组胎兔均未发现异常。

对骨骼发育的影响 在小鼠器官形成期连续 ip 组, 骨骼异常以 14.9 mg/kg 组为突出, 76 只胎鼠中有 7 只头颅骨的顶骨骨化不全, 6 只无枕骨, 9 只枕骨骨化不全, 3 只无股骨, 10 只无第五胸骨节(Tab 2)。在 d 10 单次给

药剂量 74.4 mg/kg 组, 15 只胎鼠中有 3 只枕骨骨化不全, 2 只股骨短, 3 只无第五胸骨节, 5 只胫骨或腓骨短, 与对照组比有显著差异 ($P < 0.01$)。阳性对照鱼肝油滴剂组 40 只胎鼠中有 9 只枕骨骨化不全, 4 只顶骨骨化不全, 7 只无第五胸骨节, 14 只胫骨或腓骨短, 与对照组有显著差异 ($P < 0.01$), 其他各组未见异常 (Tab 2)。

各组胎兔骨骼发育未见异常。

DISCUSSION

乙双吗啉在小鼠器官形成期连续 ip 不论低剂量或高剂量均有比对照组明显增多的吸收胎, 高剂量 (37.2 mg/kg) 可达 100% 吸收胎, 兔的结果与小鼠相似。表明乙双吗啉胚胎毒的剂量范围是很宽的。吸收胎的数量随剂量增大而增多, 并且在同窝内除被吸收的胚胎外还有幸存的胎鼠, 均属正常, 这也支持胚胎是由于中毒死亡后胚胎被吸收⁽⁶⁾。小鼠受精后于器官形成期连续给药共 104 只孕鼠的 648 只胎鼠及 20 只孕兔的 71 只胎兔中均未见畸胎, 可见本实验中在小鼠和兔的器官形成期连续给药无致畸作用, 主要是以死亡(吸收胎)为主的胚胎毒。在单次给药中小鼠于受精后 d 10 ip 37.2 及 74.4 mg/kg 有一定的致畸作用 (Tab 2), 比同样剂量 37.2 mg/kg 连续给药的致畸作用为敏感, 与文献^(7,8)报道的地米同 (demeton) 和硝酸铅对小鼠或大鼠的致畸作用的特点甚为相似。同样剂量在小鼠受精后 d 8, 9, ip 给药的 34 只孕鼠的 226 只胎鼠中未见畸形。提示乙双吗啉对小鼠有一定致畸作用, 是在受精后的专门给药时间(受精后 d 10) 和途径(ip) 及一定的剂量 (37.2 和 74.4 mg/kg) 才表现出致畸作

用。而 d 10 ig 280 mg/kg 在孕鼠已有中毒死亡情况下, 有 1/71 胎鼠后肢短, 显然比单次 ip 为安全。药物的给药途径不同表现出的毒性可有不同⁽⁹⁾。兔的胎兔有 1 例内脏畸形, 由于例数少, 是否属于自然发生率有待研究。

REFERENCES

- 1 任云峰、舒汉丽、张覃沐, 等。抗癌新药乙双吗啉 (AT-1727) 的研究。科学通报 1980, 25 : 189
- 2 Zhang TM, Chen ZY, Lin C. Pharmacological studies on bimolane (AT-1727), a new anti-neoplastic agent. *Acta Pharm Sin* 1980, 15 : 577
- 3 王慧英、周茂恒、凌桂魏、刘承煌、陶玲娣。乙双吗啉 (AT-1727) 治疗银屑病的研究(附 100 例报告)。临床皮肤科杂志 1984, 13(1 Suppl) : 8
- 4 张庆浩、梁友信。化学物质致畸性的检测方法。见:《工业毒理学实验方法》编写组, 编。工业毒理学实验方法。上海: 上海科技出版社, 1979 : 245-55
- 5 上海第一医学院、中国医学科学院卫生研究所。致畸试验。见: 上海第一医学院、中国医学科学院卫生研究所, 主编。食品毒理。北京: 人民卫生出版社, 1978 : 23-7
- 6 Chen LJ, Wang MY, Sun WK, Liu MZ. Embryotoxicity and teratogenicity studies on artemether in mice, rats and rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 1984, 5 : 118
- 7 Budreau CH, Singh RP. Teratogenicity and embryotoxicity of demeton and fenthion in CF#1 mouse embryos. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973, 24 : 324
- 8 McClain RM, Becker BA. Teratogenicity, fetal toxicity and placental transfer of lead nitrate in rats. *Ibid* 1975, 31 : 72
- 9 Kimmel CA. Effect of route of administration on the toxicity and teratogenicity of EDTA in the rat. *Ibid* 1977, 40 : 299