

16 亚甲基-17 α -乙酰氧基-19-失碳黄体酮的无致畸性和无诱变性

屠曾宏、王美瑛、祁晓东、许卫兵、许东辉 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国) R 968

Lack of mutagenicity and teratogenicity of 16-methylene-17 α -acetoxy-19-norprogesterone

TU Zeng-Hong, WANG Mei-Ying, QI Xiao-Dong, XU Wei-Bing, XU Dong-Hui (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT 16-Methylene-17 α -acetoxy-19-norprogesterone (ST-1435) is a new antifertility agent. ST-1435 silastic capsule was implanted sc in the nuchal region of rats on d 6 of gestation at 75, 300, and 600 mg · kg⁻¹. The rats were killed on d 20. In comparison with the control, the treated groups showed no significant differences in maternal body weights, number of corpora lutea, and the development of embryos and fetuses. The number of dead fetuses decreased and live fetuses increased slightly. ST-1435 did not affect the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes, nor induce chromosomal aberrations in cultured CHL cells, or increase the revertants of *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, and TA102 in Ames test. The results suggested that ST-1435 had neither teratogenicity nor mutagenicity.

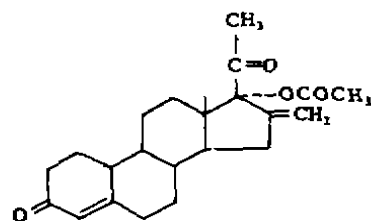
KEY WORDS norprogesterones; chromosome aberrations; micronucleus tests; mutagenicity tests

摘要 皮下埋植抗生育药 16 亚甲基-17 α -乙酰氧基-19-失碳黄体酮(ST-1435)剂量高达 600 mg · kg⁻¹ 时, 对孕大鼠的体重增加, 胚胎的形成和胎鼠的生长发育均无影响。而死胎数有所减少, 活胎数略有增加, 似有保胎作用。ST-1435 不诱发小鼠骨髓微核的形成和培养 CHL 细胞染色体畸变。Ames 实验亦呈阴性, 这些结果表明 ST-1435 无致畸性亦无致突变性。

关键词 去甲黄体酮类; 染色体畸变; 微核试验; 致突变试验

我国 1965 年在上海市化工学会年会上(见

年会论文摘要“有机化学”1-2 页)首先报道了 16 亚甲基-17 α -乙酰氧基-19-失碳黄体酮(ST-1435)的化学合成。因口服筛选无抗排卵作用而未深入研究, 后查明是因肝脏将之代谢为无活性产物之故。巴西 1976 年报道 ST-1435 埋植剂皮下埋植有明显的效果⁽¹⁾, 又引起对此药的兴趣。我所避孕药研究实验室在动物试验中肯定了 ST-1435 埋植剂良好的、长效的抗生育作用⁽⁶⁾。在此基础上我们测试了它的致畸, 致突变作用, 为评价该药的安全性提供必要的资料。



MATERIALS AND METHODS

ST-1435 结晶由中国药科大学廖清江教授提供, ST-1435 硅胶管由上海橡胶制品研究所李佐邦工程师研制。动物由中科院上海实验动物饲养中心供应。

致畸试验 Sprague-Dawley 大鼠, ♀ 230 ± s · 12 g, ♂ 280 ± 22 g, 按 1♂, 2♀ 合笼, 次日晨作阴道涂片, 查到精子日为 d 0, 于 d 6 在颈背部埋植 ST-1435 硅胶管一直保留至 d 20 剖腹产, 以临床试用剂量⁽¹⁾200 倍 (600 mg · kg⁻¹) 选为实验的高剂量组, 再设 75 和 300 mg · kg⁻¹ 两个剂量组。另以生理盐水作阴性对照组, 敌枯双(polyglycolic acid)为阳性对照组, 孕鼠于 d 6, d 15, d 20 称重,

Received 1991 Mar 21

Accepted 1991 Jul 8

并于 d 20 解剖, 记录每窝胎仔数, 身长, 体重, 活胎数, 死胎数, 吸收胎数及外观畸形。半数胎仔固定在 95% 乙醇中经茜素红染色, 检查骨骼发育情况, 另半数胎仔固定于 Bouins' 液中, 作徒手切片检查内脏。

致突变实验 中国仓鼠肺成纤维细胞 (CHL) 用来测试 ST-1435 诱发染色体畸变作用⁽³⁾, 并按 Ishidate 标准判断实验结果⁽⁴⁾, 小鼠骨髓微核试验及 Ames 试验按文献^(3,5)。

RESULTS

1 致畸试验

1.1 对孕鼠体重的影响 埋植 ST-1435 后, 三个剂量组孕鼠于 d 6, d 15, d 20 体重增加情况均与对照组相似, 结果列于 Tab 1。阳性药物敌枯双组体重增加明显低于对照组, 胎儿发育迟缓, 瘦小, 而且出现较多的吸收胎。

1.2 对胚胎形成的影响 由 Tab 1, 2 可见, 三个剂量组孕鼠的黄体数, 着床点均与对照组相似, 而死胎、吸收胎数略低于对照组, 活胎数较对照组略有增加, 敌枯双组则显示了明显的胚胎毒性。

1.3 对胎鼠生长发育的影响 所有 ST-1435 给药组胎儿的平均体重、身长均与对照组相仿 (Tab 2)。外形畸胎检查对照组发现 2 例短尾 (2/227, 约为 0.88%), 其它主要损伤为皮下出血点, 各给药组与对照组都在

1-2% 之间, 敌枯双组则呈现明显的致畸作用, 有脑外露, 内脏外露, 短尾, 脊椎裂隙, 脚内 (外) 翻, 皮下出血等。骨骼和内脏检查在 ST-1435 给药组与对照组都有少数胎鼠缺少胸骨第 5 和部份脊椎骨, 头骨不完全骨化, 数量相似, 而敌枯双组则引起明显的骨骼畸形和内脏异常。

2 致突变作用

2.1 CHL 细胞染色体畸变试验 测得 ST-1435 对 CHL 细胞半数生长抑制剂量 Ig_{50} 为 $279.7 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 依此为基础设 280, 140, $70 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 三个剂量组, 实验分非活化组 (-S₀) 测药物的直接作用和代谢活化组 (+S₀) 测药物经代谢后的诱变作用, 结果三个剂量组均不诱发染色体畸变, 而阳性药物丝裂霉素 C 和环磷酰胺却显示明显的诱变作用 (Tab 3)。

2.2 小鼠骨髓微核试验和 Ames 实验 ICR 小鼠 sc ST-1435 于 12, 18, 36, 48, 72 h 各时间点取样涂片镜检, 微核率均低于 3%, 与对照组相似, 说明尽管多时间点取样在 72 h 内仍无任何阳性迹象, 再根据代谢和毒性资料在 24 h 时间点上测 500, 1000, 2000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (sc) 剂量-效应关系, 每组 ICR 小鼠 10 只, 雌雄各半, 结果微核率均在 3% 以下与对照组相似 ($P > 0.05$), 而环磷酰胺则为 $48 \pm 15\%$, 骨髓中嗜多染红细胞与正常红细胞之比亦属正常, 表明 ST-1435 对骨髓无抑制作用。

Tab 1. Body weight of pregnant rats and formation of embryos after sc implantation of silastic capsules containing ST-1435 on d 6 of gestation. Plug day = d 0. Dams were killed on d 20. $n = 20$, $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control, silastic capsules only.

ST-1435/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Body weight of dams / g				Corpora lutea	Implantation sites
	d 0	d 6	d 15	d 20		
Control	261 ± 13	276 ± 14	319 ± 17	374 ± 20	14.4 ± 2.7	13.4 ± 3.7
75	$256 \pm 17^*$	$271 \pm 23^*$	$318 \pm 22^*$	$381 \pm 27^*$	$14.7 \pm 2.1^*$	$14.0 \pm 1.8^*$
300	$252 \pm 18^*$	$271 \pm 14^*$	$318 \pm 17^*$	$374 \pm 24^*$	$14.3 \pm 3.6^*$	$13.4 \pm 3.2^*$
600	$256 \pm 17^*$	$273 \pm 22^*$	$316 \pm 28^*$	$376 \pm 29^*$	$14.2 \pm 2.0^*$	$13.6 \pm 1.9^*$
Polyglycolic acid	$256 \pm 21^*$	$270 \pm 15^*$	$278 \pm 29^{**}$	$289 \pm 28^{***}$	$13.9 \pm 2.6^*$	$12.2 \pm 2.1^*$

Tab 2. Effects of sc silastic capsules containing ST-1435 on fetuses of rats. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control, silastic capsules only. @ Some were sex-indistinct because of deformation.

ST-1435/ mg · kg ⁻¹	Dams (Live fetuses)	Number	Live fetuses			Resorbed	Dead
			♂ / ♀	weight / g	Length / cm		
Control	20 / (227)	11.4 ± 4.2	114 / 113	3.2 ± 0.6	3.30 ± 0.19	1.5 ± 3.2	0.2 ± 0.7
75	20 / (269)	13.4 ± 2.4*	129 / 140	3.5 ± 0.5*	3.37 ± 0.21*	0.6 ± 1.1*	-
300	20 / (249)	12.4 ± 3.4*	129 / 120	3.4 ± 0.7*	3.37 ± 0.24*	0.9 ± 1.2*	-
600	20 / (266)	13.3 ± 1.9*	130 / 136	3.4 ± 0.4*	3.37 ± 0.21*	0.2 ± 0.4*	-
Polyglycolic acid	28 / (83)	2.9 ± 0.6*	@	1.0 ± 0.2***	3.10 ± 0.40**	8.0 ± 5.0***	1.3 ± 0.4**

Tab 3. Chromosome aberration test of Chinese hamster lung cell line for ST-1435, mitomycin C (MMC), cyclophosphamide (CPA). 100 metaphases were scored from each group. b: break, f: fragmentation, p: polyploid, r: ring, t: translocation, o: other aberrations.

Expt system	Drug	Concn / μg · ml ⁻¹	Time / h	Chromosome aberrations		
				Type	%	Score*
-S ₀	Solvent**	0.1 ml	24	o	0	-
			48	b	2	-
	MMC	0.2	24	bfoprt	42	++
			48	bfoprt	51	+++
	ST-1435	280	24	bp	3	-
			48	bp	4	-
			24	br	2	-
			48	b	2	-
			24	b	1	-
			48	p	2	-
+S ₀	Solvent**	0.1 ml	24	o	0	-
	CPA	20	24	boprt	76	+++
	ST-1435	280	24	P	1	-
			24	bp	4	-
			24	b	1	-

* -, negative (< 4.9%); ±, suspicious (5.0-9.9%); +, positive (10.0-19.9%); ++, (20.0-49.9%); +++, (> 50%)⁽⁴⁾.
**N-dimethyl formamide.

在 Ames 实验中, ST-1435 从 5-5000 μg/皿 浓度对 TA97, TA98, TA100, TA102 四个菌株, 无论是 -S₀ 或 +S₀ 实验系统中, 均不增加各菌株的回变数 ($P > 0.05$).

DISCUSSION

大鼠致畸实验中, sc 剂量高达 600 mg · kg⁻¹ 已为临床剂量⁽¹⁾200 倍时, 孕鼠、胎鼠各项指标检查正常, 无任何胎鼠发育异常发现。

提示 ST-1435 无致畸性, 而且是足够安全的。实验中发现给药组与对照组相比死胎数减少, 胎儿总数增加, 但统计差别不显著, 似有保胎作用。这可能是孕激素作用的一个表现。

ST-1435 无论是在无 S₀ 代谢系统或经 S₀ 代谢系统的两套体外致突变试验中, 对 CHL 细胞染色体畸变和鼠沙门氏菌回变实验均为阴性。即无诱发染色体畸变作用, 也无诱发细菌基因突变作用。在整体动物实验中, ST-1435

也不增加小鼠骨髓微核率,综合这些结果表明 ST-1435 不是诱变剂,可望成为一个很好的抗生育药.

REFERENCES

1 Coutinho EM, da Silva AR, Kraft H-G. Fertility control with sub-dermal silastic capsules containing a new progestin (ST-1435). *Int J Fertil* 1976; 21 : 103-8.

2 Manson JM, Zenick H, Costlow RD. Teratology test methods for laboratory animals. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press, 1982; 141-84.

3 Tu ZH, Wang MY, Xiao WQ, Qi XD, Tang WD. Effects of 10-hydroxycamptothecin on m-

duced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells and micronuclei in mouse bone marrow and fetal liver. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 378-81.

4 Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro - a screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48 : 337-354.

5 Tu ZH, Wang MY. Mutagenicity and comutagenicity of three nootropils: huperzin A, amiracetam and piracetam. *N Drugs Clin Remedy* 1990; 9 : 65-8.

6 Chu ZW, Wang WC, Wang YE, You GD, Gu ZP. Antifertility effect of the implant containing 16-methylene-17 α -acetoxy-19-norprogesterone (ST-1435). *Acta Pharmacol Sin* 1991; 12 : 285-8.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Mar; 13 (2) : 186-188

86-188

桑素素的光敏作用对腹水型肝癌细胞 DNA 合成的抑制

周秀芳, 郑荣梁, 黄明 (兰州大学生物系, 兰州 730000, 中国)

Inhibition of photosensitization of morin on DNA synthesis of ascites hepatoma cells

ZHOU Xiu-Fang, ZHENG Rong-Liang, HUANG Ming (Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT Morin (0.012, 0.12, 1.2, 12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) significantly inhibited the DNA synthesis of ascitic hepatoma (AH) cells. The inhibition of DNA synthesis and cell mortality was dependent on its concentrations as well as the illumination time. Photosensitization of morin was not due to $^1\text{O}_2$ and O_2^- , but closely related to OH and H_2O_2 . The mechanism of the inhibition may be attributed to the damage of DNA replication template.

KEY WORDS morin; phototherapy; free radical scavengers; neoplasm DNA; experimental liver neoplasms

提要 桑素素(morin)对腹水型肝癌细胞(AH)具有光敏杀伤作用,对AH细胞的DNA合成具有很明显的抑制作用,抑制作用随着桑素素浓度的增加,照光时间的延长而加强.在避光条件下,桑素素也具有杀伤癌细胞的能力,但远比照光组杀伤力低,桑素素对AH细胞的杀伤具有永久性,光敏作用的产生与 $^1\text{O}_2$ 和 O_2^- 无关,而与OH和 H_2O_2 密切相关.

关键词 桑素素; 光疗法; 自由基清除剂; 肿瘤脱氧核糖核酸; 实验的肝肿瘤 DNA

桑素素(morin)是从桑科植物的树皮和茎中提出的一种黄酮类物质(2',3,4',5,7-五羟基黄酮),它是一种光敏剂,有较强的抗金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、痢疾菌株、斑疹伤寒芽孢杆菌的作用⁽¹⁾,能抑制体外培养的小鼠NK/Ly淋巴瘤腹水细胞的生长⁽²⁾,对TPA(佛波酯)诱导的皮肤癌也有显著的抑制作用⁽³⁾.近年来,利用光敏反应来诊断和治疗癌症已成为热门,本文就桑素素的光敏反应及其

Received 1990 Feb 1

Accepted 1991 Sep 3