

的遗传毒性作用。Ace对DNA的损伤主要在细胞毒水平发生<sup>(11)</sup>。本研究表明Ace对CNPB无显著影响时,已有染色体损伤作用。

Giavini等<sup>(7)</sup>曾报道,药源性着床前胚泡异常对胎仔发育的影响并不呈“全或无”模式,本文结果与此相符。本实验还发现,畸胎率显著提高的剂量组均相应出现CNPB减少,FB-MA,FM及MI升高,提示药源性着床前胚泡异常与着床后畸胎发生可能有内在联系。

Asp 0.25 g·kg<sup>-1</sup>未见对胚泡有明显影响,而使得着床后胚胎毒和胎仔异常率增加,因此,就Asp而言。在细胞学水平观察药物对胚泡的影响尚不够深入。本实验还不能排除因药物引起母体毒性,而导致着床前,后胚胎丢失及畸胎发生的可能性。

**ACKNOWLEDGMENTS** 实验设计和论文撰写中,承方瑞英和章元沛两位教授的指导。

**REFERENCES**

- 1 Austin CR. Embryo transfer and sensitivity to teratogenesis. *Nature* 1973; **244** : 333-4.
- 2 Nagao T, Murita Y, Ishizuka Y, Wada A, Mizutani M. Induction of fetal malformations after treatment of mouse embryos with methylnitrosourea at the preimplantation stages. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1991; **11** : 1-10.

- 3 Takeuchi IK. Teratogenic effects of methylnitrosourea on pregnant mice before implantation. *Experientia* 1984; **40** : 879-81.
- 4 Giavini E, Lomonica IP, Lou Y, Broccia ML, Prati M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: cyclophosphamide, cis-platinum, adriamycin. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1990; **10** : 417-26.
- 5 Abraham M, Rudolph MD. Effects of aspirin and acetaminophen in pregnancy and in the newborn. *Arch Intern Med* 1981; **141** : 358-63.
- 6 Weeks BS, Gamache P, Klein NW, Hinson JA, Bruno M, Khairallah E. Acetaminophen toxicity to cultured rat embryos. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1990; **10** : 361-71.
- 7 Giavini E, Bonanomi L, Ornaghi F. Developmental toxicity during the preimplantation period: embryotoxicity and clastogenic effects of chlorambucil in the rat. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1984; **4** : 341-8.
- 8 Wilson JG. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson JG, Warkany J, editors *Teratology: principles and techniques*. Chicago: Univ of Chicago Press, 1965; 262-77.
- 9 Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red-S method for fetal bone. *Stain Technol* 1964; **35** : 61-3.
- 10 Ornaghi F, Giavini E. Induction of micronuclei in preimplantation rat embryos *in vivo*. *Mutat Res* 1989; **225** : 71-4.
- 11 Dybing E, Holme JA, Gordon WP, Soderlund EJ, Dahlin DC, Nelson SD. Genotoxicity studies with paracetamol. *Mutat Res* 1984; **138** : 21-32.

372-375

125

**可乐定对大鼠动情期、雌二醇、促性腺激素、格雷夫氏卵泡和黄体的影响<sup>1</sup>**

张 声, 陈达光 (福建医学院高血压研究室, 福州350005, 中国)

R 96512

**Effects of clonidine on estrus, estradiol, gonadotropin, Graafian follicle, and corpus luteum in rats**

ZHANG Sheng, CHEN Da-Guang  
(Hypertension Division, First Affiliated Hospital of Fujian Medical College, Fuzhou 350005, China)

Received 1991-04-09 Accepted 1992-12-01  
<sup>1</sup> Project supported by National Key Project 75-60-02-65

**ABSTRACT** Effects of clonidine (Clo) on ♀ reproductive system were studied in rats. Blood FSH, LH, progesterone, testosterone, and estradiol were mea-

sured by radioimmunoassay and the development of secondary follicles and corpus luteum in ovary were investigated by morphometry. After Clo *po* 0.3 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> × 14 d, the estrus of rats was prolonged; FSH, LH, and progesterone increased significantly; while estradiol reduced. The development of secondary follicles in ovary was blocked at the stage of prematuration and the numerical density of corpus luteum decreased. After clonidine *po* 28 d, FSH and LH sustained at high levels, but the estrous cycle, estradiol and progesterone recovered.

**KEY WORDS** clonidine; estrus; FSH; LH; estradiol; progesterone; testosterone; Graafian follicle; corpus luteum

**摘要** 放射法测定 FSH, LH, 黄体酮, 睾丸酮和雌二醇。体视学计量 Graafian 卵泡数密度。可乐定 *po* 0.3 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> × 14 d 后, 动情周期延长, 血 FSH, LH 显著升高, 雌二醇降低, Graafian 卵泡的发育被阻断在成熟前阶段。服药 28 d 后, 血 FSH, LH 仍持续在较高水平, 而动情周期, Graafian 卵泡数密度及雌二醇恢复至对照组水平。

**关键词** 可乐定; 动情期; 促卵泡激素; 促黄体素; 雌二醇; 黄体酮; 睾丸酮; 格雷夫氏卵泡; 黄体

中枢神经肾上腺素 α<sub>2</sub> 受体能调节部分脑核团和垂体促性腺激素及卵巢甾体激素的分泌<sup>(1-4)</sup>。通过兴奋 α<sub>2</sub> 受体, 去甲肾上腺素 (NE) 能兴奋动情前期和动情间期雌鼠促黄体素 (LH) 的分泌, 服用甾体激素的去卵巢大鼠也有类似现象<sup>(5,6)</sup>。中枢肾上腺素能激活引起的 NE 释放能抑制 LH 分泌和排卵<sup>(7)</sup>。既往探讨可乐定 (clonidine, Clo) 对生殖系统的影响多局限于其对垂体的作用。如脑室内灌注 Clo 后 LH 先短暂升高, 随后降低, 而 FSH 表现为迟缓性降低<sup>(2)</sup>。健康女性注射 Clo 后显著降低月经周期中黄体期的血中 LH 水平<sup>(3)</sup>。本文探讨中枢 α<sub>2</sub> 受体激动剂 Clo 对♀鼠动情周期, 雌二醇 (E<sub>2</sub>); 黄体酮 (progesterone), 睾丸酮 (T), 促卵泡激素 (FSH) 和 LH 及 Graafian 卵泡和黄体的影响。

## MATERIALS AND METHODS

Wistar ♀鼠, 体重 255 ± 28 g, 恒温 22 ± 2 °C, 湿度 55% ± 5%, 人工光照 7:00—19:00 饲养, 自由取食和饮水 (种鼠合格证号: 上海医学实验动物管理委员会 1108 号; 动物饲养设施合格证号: 闽医动条准 5 号); 每天 08:00 阴道涂片和阴道测温判断动情周期。

**实验分组** 选动情周期规则的♀鼠随机分成: 对照组 (n=16) 和服药组; 在服药 14 d (n=17) 和 28 d (n=17) 选动情间期鼠处死, 子宫切片 HE 染色作为动情间期监测, 如发现子宫内膜变化不属动情间期者均予以排除。

**药物** 盐酸可乐定片 (Clo, 江苏丹阳制药厂, 批号 870626), 0.3 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 以 5 g 奶粉为载体, 每天 07:30 让大鼠自由 *po* 摄入。

**激素测定** FSH 和 LH 药盒购自卫生部上海生物制品研究所; E<sub>2</sub> 和 T 药盒购自上海内分泌研究所; progesterone 药盒购自中美合营天津利科生物科技有限公司, 操作按说明书进行。FJ-2008 型全自动放射免疫 γ 计数仪 (西安 262 厂); 液体闪烁计数仪 (Beckman Packard, 2000 CA)。FSH, LH, E<sub>2</sub>, T 和 progesterone 测定的变异系数见 Tab 1。

Tab 1. Coefficients of variation in radioimmunoassay of FSH, LH, E<sub>2</sub>, T, and progesterone in rats.

CV%	Intra-batch (n=10)	Inter-batch (n=12)
FSH	8.7	11.7
LH	7.3	8.9
E <sub>2</sub>	8.4	11.3
T	8.3	12.4
Progesterone	8.9	10.7

**卵巢切片** 卵巢组织连续切片, HE 染色。根据 Weibel 体视学原理<sup>(8)</sup>, 使用点阵测试系统, 计算单位卵巢切片面积内卵泡或黄体的数目  $N_a$  (number of profiles per unit test area) =  $N_x \cdot A_s^{-1}$ , (其中  $N_x$  代表测试系统内卵泡或黄体的数目,  $A_s$  为测试系统内卵泡或黄体所占的面积), 然后依据公式  $N_v = K \cdot \beta^{-1} (N_a \cdot V_s^{-1})^{1/2}$  计算单位体积卵巢中卵泡或黄体的数目, 即数密度  $N_v$  (number of particles per unit volume),  $K$  和  $\beta$  为大小分布系数和形状系数, 分别为 1.05 和 1.38<sup>(9)</sup>。

用显微测微尺测定卵泡直径, 并分为三组: 30-200  $\mu\text{m}$ , 201-400  $\mu\text{m}$ , 401-650  $\mu\text{m}$  分别进行计算.

统计分析 各组数据用 ANOVA 分析检验测定组间差别的显著性.

**RESULTS**

**动情周期** Clo *po* 0.3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\times 14$  d 时♀鼠的动情周期显著延长, 对照组为  $5.0 \pm s 1.2$  d, Clo *po* 14 d 时为  $12.9 \pm s 1.5$  d ( $P < 0.01$ ), Clo *po* 28 d 时为  $6.0 \pm s 1.2$  d, 与对照组比差异不显著 ( $P > 0.05$ ).

**卵巢切片** 体视学观察发现给药14 d 时♀鼠卵巢 Graafian 卵泡的生长被阻抑在直径为 201  $\mu\text{m}$ -400  $\mu\text{m}$  水平以下, 而较大的 Graafian 卵泡无明显影响, 但黄体密度显著下降. 给药 28 d 时基本恢复至对照组水平 (Tab 2, Fig 1, Plate 3).

**激素水平** Clo *po* 14 d 时 FSH, LH 和 progesterone 显著升高,  $E_2$  下降. 给药 28 d 时, FSH, LH 仍持续增高, 而  $E_2$  和 progesterone

基本恢复至对照组水平 ( $P > 0.05$ ), T 在整个给药时期内未受明显影响 ( $P > 0.05$ ) (Tab 3).

**DISCUSSION**

我们的结果与文献的结果<sup>(2,3)</sup>不同. 我们首次发现给雌鼠 Clo *po* 14 d 时, 动情周期显著延长, 反映对垂体影响的 FSH, LH 显著增高, 而反映卵巢靶器官的激素  $E_2$  却显著下降, 但 progesterone 升高, T 无明显变化. 与  $E_2$  下降一致, Graafian 卵泡的发育被阻抑在直径为 201-400  $\mu\text{m}$  水平以下, 黄体数降低. 这种垂体与靶器官脱节的现象不能用传统的性激素与卵巢卵泡关系的学说解释. 推测可能系 Clo 对垂体-性腺轴不同水平的作用不同. 在外周, Clo 兴奋  $\alpha_2$  受体, 使去甲肾上腺素促进卵泡颗粒细胞分泌  $E_2$  的作用<sup>(10)</sup>被阻抑, 导致  $E_2$  调节卵泡发育的作用<sup>(11)</sup>被阻断在近成熟阶段, 而使排卵受抑制<sup>(12)</sup>. 黄体数降低, 但在 Clo 影响下,

Tab 2. Effect of clonidine *po* 0.3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  on numerical densities of secondary follicles and corpus luteum in rats.  $n=16$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs 0 ( $\text{cm}^{-3}$ ).

Numerical density of	Clonidine medication			
	0	14 d	28 d	
Secondary follicles	30-200 $\mu\text{m}$	13.1 $\pm$ 5.8	21.1 $\pm$ 8.4**	13.8 $\pm$ 9.4*
	201-400 $\mu\text{m}$	5.2 $\pm$ 4.4	12.4 $\pm$ 8.6***	6.3 $\pm$ 4.1*
	401-650 $\mu\text{m}$	2.6 $\pm$ 2.4	2.4 $\pm$ 2.2*	2.9 $\pm$ 3.2*
Corpus luteum		15.6 $\pm$ 7.0	10.8 $\pm$ 2.4***	14.1 $\pm$ 5.0*

Tab 3. Effects of clonidine *po* 0.3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  on levels of gonadotropin and steroid hormones in rats. \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs control.

	Controls		Clonidine 14 d		Clonidine 28 d	
	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$
FSH/IU $\cdot\text{L}^{-1}$	14	1.68 $\pm$ 0.10	16	2.09 $\pm$ 0.12***	15	2.19 $\pm$ 0.13***
LH/IU $\cdot\text{L}^{-1}$	15	1.8 $\pm$ 0.3	17	2.8 $\pm$ 0.3***	17	2.61 $\pm$ 0.17***
Estradiol/pmol $\cdot\text{L}^{-1}$	9	284 $\pm$ 77	10	177 $\pm$ 36***	8	255 $\pm$ 90*
Testosterone/nmol $\cdot\text{L}^{-1}$	9	3.9 $\pm$ 1.0	10	4.5 $\pm$ 0.8*	10	3.7 $\pm$ 0.8*
Progesterone/nmol $\cdot\text{L}^{-1}$	9	201 $\pm$ 120	9	379 $\pm$ 136**	10	208 $\pm$ 119*

progesterone 与黄体 and 卵泡发育脱节的现象尚无法解释。而在中枢, Clo 可能通过视丘下部的  $\alpha_2$  受体, 解除 NE 对 LH 释放的抑制<sup>(7)</sup>, FSH, LH 释放增加, 并促进 progesterone 的分泌。

我们还首次发现小鼠 *po* Clo 0.3 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> × 28 d 时, 动情周期, 甾体激素, Graafian 泡及黄体数基本恢复至对照组水平, 但促性腺激素仍保持较高水平。这种中枢促性腺激素与外周性腺靶器官脱节的现象无法用传统学说解释。推测可能是外周  $\alpha_2$  受体下调, 儿茶酚胺释放正常, 使甾体激素的释放和受甾体激素调控的卵泡与黄体的发育恢复正常, 但中枢端可能仍维持上述提到的作用, 维持 FSH, LH 较高水平的释放。

本文应用体视学方法观察连续切片的卵巢组织, 获得卵泡和黄体的定量数据, 避免了定性描述的主观性, 使得结果稳定可靠。

短期服用治疗高血压的中枢  $\alpha_2$  受体激动剂 Clo 后能抑制卵泡的发育, 延长动情周期, 抑制排卵, 影响血促性腺激素和甾体激素水平。提示青春期和育龄期女性高血压慎用 Clo 治疗。

#### REFERENCES

- Osterburg HH, Telford NA, Morgan DG, Cohen-Becker I, Wise PM, Finch CE. Hypothalamic monoamines and their catabolites in relation to the estradiol-induced luteinizing hormone surge. *Brain Res* 1987; 409 : 31-40.
- Condon TP, Sawyer CH, Whitmoyer DI. Episodic patterns of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release; differential secretory dynamics and adrenergic control in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1986; 118 : 2525-33.
- Baranowska B. The effect of clonidine on pituitary hormone secretion in physiological and pathological states. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 10 Suppl 12 : S235-S9.
- Chotesangasa R, Kamiyoshi M, Tanaka K, Tomogaae H, Yokoyama A. Enhancement of the response of hen granulosa cells to LH with norepinephrine *in vitro*. *Comp Biochem Physiol* 1988; 90C : 225-9.
- Gallo RV, Drouva SV. Effect of intraventricular infusion of catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized, steroid-primed rats. *Neuroendocrinology* 1979; 29 : 149-62.
- Terasawa E, Bridson WE, Davenport JW, Goy RW. Role of brain monoamines in release of gonadotropin before proestrus in the cyclic rat. *Neuroendocrinology* 1975; 18 : 345-58.
- Dotti C, Taleisnik S. Inhibition of the release of LH and ovulation by activation of the noradrenergic system, effect of interrupting the ascending pathways. *Brain Res* 1982; 249 : 281-90.
- Weibel ER, Gomez DM. A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* 1962; 17 : 343-48.
- Hans E, Dallar MH, Editors. A guide to practical stereology. New York; Karger, 1983 : 34-6.
- Barnea ER, Perlman R, Fakih H, Bick T, Kol S, Hochberg Z. The role of catecholamines in estradiol and progesterone secretion by cultured explants and cells of human term placentae. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 121 : 767-72.
- Tonetta SA, diZerega GS. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev* 1989; 10 : 205-9.
- Al-Hamood MH, Gilmore DP, Wilson CA. Evidence for a stimulatory  $\beta$ -adrenergic component in the release of the ovulatory LH surge in pro-ovulatory rats. *J Endocrinol* 1985; 106 : 143-51.