

健脾生血颗粒对大鼠生育力与早期胚胎发育毒性的影响

屈文¹ 金志春² 赵刚³ 余启枝¹ 郑艳华¹ 刘巍崎¹ 黄志军³

摘要 **目的** 评价健脾生血颗粒对大鼠生殖能力及早期胚胎发育的影响。**方法** 将 176 只 SD 大鼠按性别分层,采用随机数字表法分为对照组及健脾生血颗粒低、中、高剂量组,分别以健脾生血颗粒 0、1.16、3.48、5.80 g/(kg·d) 给予雌鼠 2 周及雄鼠 4 周连续灌胃给药后,雌雄大鼠以 1:1 合笼,雌鼠持续给药至妊娠第 7 天,雄鼠持续给药至剖检前,雄鼠整个给药周期为 59~63 天。剖检所有亲代动物,观察亲代动物体征形态,检查组织病理情况进行一般毒性检测;称重睾丸、附睾,计数附睾尾精子数并行精子活力检查检测生殖力毒性;计数黄体、活胎、死胎、吸收胎并计算着床数以观察早期胚胎发育毒性。**结果** (1)一般毒性:健脾生血颗粒高剂量组雄鼠体重增长减缓。中低剂量组则无异常;(2)生育力毒性:健脾生血颗粒各剂量对雄鼠睾丸、附睾及附睾尾精子数量均无明显影响;(3)早期胚胎发育毒性:健脾生血颗粒各剂量组对早期胚胎形成未见明显影响。**结论** 健脾生血颗粒一般毒性方面可能存在一定的胃肠毒性作用,未见毒性反应剂量为 3.48 g/(kg·d)。健脾生血颗粒各剂量组均未见明显生育力及早期胚胎发育毒性反应。

关键词 健脾生血颗粒;一般毒性;生育力毒性;早期胚胎;发育毒性

Effect of Jianpi Shengxue Granule on Fertility and Early Embryo Development Toxicity of Rats
QU Wen¹, JIN Zhi-chun², ZHAO Gang³, YU Qi-zhi¹, ZHENG Yan-hua¹, LIU Qin-qi¹, and HUANG Zhi-jun³
1 Center for Food and Drug Safety Evaluation in Hubei Province, Wuhan (430073); 2 Department of TCM, Hubei Maternal and Children's Health Hospital, Wuhan (430070); 3 Academy of Pediatric Drugs, Jianmin Pharmaceutical Group Co. Ltd., Wuhan (430052)

ABSTRACT **Objective** To assess the effects of Jianpi Shengxue Granule (JSG) on the fertility and early embryo development in rats. **Methods** Totally 176 SD rats were stratified by sex, and divided into 4 groups, i.e., the control group, low, medium, high dose JSG treatment groups. Rats in the 3 JSG treatment groups were administered with JSG at 0, 1.16, 3.48, 5.80 g/kg per day by gastrogavage, respectively. After 2 weeks of administration for females and 4 weeks of administration for males, males and females were caged in the ratio of 1:1. Females were administered to the gestation day 7. Males were administered for 59–63 days until the day before anatomy. All parental generations were anatomized to observe signs and morphologies. Pathological examination was performed. General toxicity was detected. The testis and epididymis were weighed. Spermatozoa number was counted from epididymis, and reproduction toxicity of sperm motility was checked. The numbers of corpus luteum, live fetus, dead fetus, and absorbed fetus were counted. The implantation number was calculated to observe early embryo development toxicity. **Results** (1) General toxicity: The body weight growth slowed down in male rats of the high dose JSG treatment group. No abnormality was found in low and medium dose JSG treatment groups. (2) Fertility toxicity: There was no obvious toxic effect on testis, epididymis, and spermatozoa number from epididymis sperm in all JSG treatment groups. (3) Early embryo development toxicity: No significant effect on the formation of early embryos was found in all JSG treatment groups. **Conclusions**

基金项目:武汉市科技攻关计划项目(No. 2013070204020053)

作者单位:1.湖北省食品药品安全评价中心(武汉 430073); 2.湖北省妇女儿童医院中医科(武汉 430070); 3.健民药业集团股份有限公司儿童药物研究院(武汉 430052)

通讯作者:黄志军, Tel: 027-84520229, E-mail: 452354589@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.03.0356

Certain gastrointestinal toxicity of JSG might exist to some extent. The dose for non-adverse effect of JSG on fertility and early embryo development was 3.38 g/kg per day. No obvious fertility or early embryo development toxicity occurred in each JSG treatment group.

KEYWORDS Jianpi Shengxue Granule; general toxicity; fertility toxicity; early embryo; development toxicity

健脾生血颗粒和健脾生血片为健民药业集团股份有限公司生产的中西复方制剂,二者仅为剂型不同,处方一致,主要成分为党参、茯苓、黄芪、山药、鸡内金、龟甲、大枣、白术、甘草、麦冬、南五味子、龙骨、牡蛎及硫酸亚铁,具有健脾和胃,养血安神功效,临床用于小儿脾胃虚弱、心脾两虚型缺铁性贫血及成人气血两虚型缺铁性贫血的治疗。

妊娠期妇女缺铁性贫血发生率较高,可造成妊娠不良结局的发生^[1,2]。为配合国家相关政策,本课题组对缺铁性贫血治疗药物健脾生血颗粒进行上市后安全性再评价工作,尤其针对妊娠期妇女应用该产品的安全性进行观察。

临床数据显示,健脾生血颗粒在妇产科应用非常广泛^[3-6]。因妊娠期妇女需要大量的铁来保证胎儿的健康发育与生长,而饮食上铁的摄入又相对不足,从而导致部分妊娠期妇女出现不同程度的缺铁性贫血症状。为在补充铁剂的同时,改善脾虚症状,增进孕妇食欲,部分临床医师应用健脾生血颗粒或健脾生血片进行治疗^[7,8]。治疗后大部分患者症状改善,血红蛋白含量恢复正常。为进一步探讨妊娠期妇女在妊娠过程中使用该药的安全性,本研究对健脾生血颗粒大鼠生育力与早期胚胎发育毒性进行分析,以期对备孕和妊娠期妇女及胎儿的毒性作用提供科学依据。

材料与方法

1 动物 176 只 SD 大鼠,8~10 周龄,SPF 级,购于湖北省实验动物研究中心,生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0005,实验动物质量合格证号:42000600002944。在动物接收时,兽医对所有动物进行检疫。饲养环境相对湿度 39%~55%,温度范围 20.1~23.7℃。光照 10 h 明/14 h 暗循环交替至实验结束。所有动物适应性饲养 1 周,饲料由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供。饮用水为经高压灭菌消毒的瓶装水。

2 药物 健脾生血颗粒浸膏由健民药业集团股份有限公司提供(批号:140111-18),每克浸膏相当于生药材 3.3 g,含 7 水硫酸亚铁 0.154 g。

3 分组与给药 SD 大鼠按性别分层采用随机

数字表法分为 4 组,每组 44 只,分别为对照组(灌服纯净水)、健脾生血颗粒低、中、高剂量组[灌服健脾生血颗粒浸膏 1.16,3.48,5.80 g/(kg·d),分别相当于临床用量的 3、9、15 倍]。将健脾生血颗粒浸膏以纯净水分别稀释至上述不同浓度,以 10 mL/kg 的灌胃体积进行给药。雄性大鼠从交配前 4 周开始给药至处死前 1 天,雄性大鼠首次给药当天定义为 Day 1,不同雄鼠给药持续时间为 59~63 天。雌性动物从交配前 2 周(即 Day 15)开始给药,给药持续至妊娠第 7 天。雄性动物给药 4 周后,雌性动物给药 2 周后,按雌雄比例为 1:1 进行合笼。合笼后次日晨阴道涂片确定是否交配,如未交配则继续合笼,如证实交配则分笼饲养,整个合笼周期长为 3 周,前两周为同一雌雄配对持续合笼,在第 3 周的合笼期中,将剩余的未查出精子的雌性大鼠与已经发生过交配行为的雄性大鼠合笼。

4 观察指标

4.1 一般情况观察 从动物到达至动物解剖当日,每天进行 2 次存活性观察及笼边观察,观察动物存活情况、体征变化、行为等。体重称量从试验前即开始,每 3 天称重一次。摄食量每周测定一次。从测量加食开始,加食 7 天后,在相同时间(± 2 h)收集动物剩余的饲料,计算方法为:一周摄食量=饲料加食量-饲料剩余量。

4.2 终点检查 剖检前,采用 2% 戊巴比妥钠麻醉实施安乐死,所有动物均对体表、天然孔道和脑外表面进行检查。孕鼠于妊娠第 15 天处死。观察胎盘,称取卵巢、子宫及所有附着的胎仔总重,计数黄体数、活胎、死胎、吸收胎并计算着床数。雄鼠剖检后,取睾丸和附睾进行检查,包括组织学检查、精子计数、活力及形态学检查等。

4.3 生育力指标 生育力指标按以下公式进行计算^[9]:雄性交配指数=(交配成功的雄鼠数/用于交配的雄鼠数) $\times 100\%$;雄性生育力指数=(使雌鼠成功受孕的雄鼠数/用于交配的雄鼠数) $\times 100\%$;雌性交配指数=(交配成功的雌鼠数/用于交配的雌鼠数) $\times 100\%$;雌性生育力指数=(成功受孕的雌鼠数/用于交配的雌鼠数) $\times 100\%$;雌性

受孕率指数 = (成功受孕的雌鼠数/确认交配的雌鼠数) × 100%。

5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 健脾生血颗粒对大鼠的一般毒性 大鼠经灌胃给予健脾生血颗粒后,动物各项体征、行为与对照组比较,未见明显差异。剖检后,雄鼠有部分消化道改变,1 只腺胃黏膜呈红色,但镜下观察未见异常;1 只腺胃区少量散在小红点,且镜下观察未见异常;健脾生血颗粒高剂量组有 2 只腺胃散在条块状红色斑块,镜下观察胃黏膜固有层血管轻度充血。临床表现主要为软便、黑便,这可能与产品中所含硫酸亚铁有关。此外,所有雌鼠未见胃肠道变化。健脾生血颗粒各剂量组大鼠摄食量与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

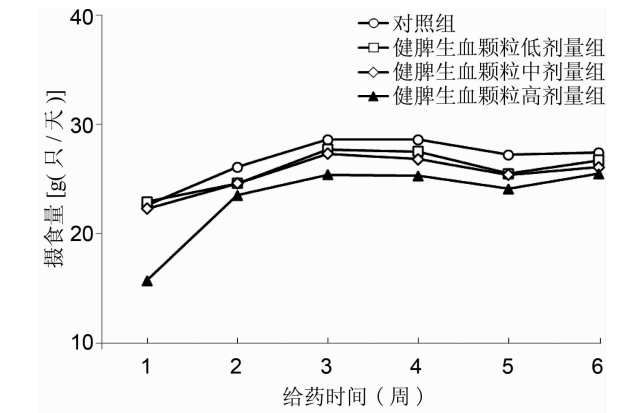


图 1 各组大鼠摄食量比较

2 各组雄性大鼠睾丸、附睾重量、精子数量及活力比较(表 1) 各组雄鼠睾丸、附睾重量及精子活力均未见差异。健脾生血颗粒各剂量组附睾尾精子数量未见明显改变。每只雄鼠观察 500 个精子形态,未见精子畸形率的改变。

3 各组大鼠生育力指数比较(图 2) 健脾生血颗粒各剂量组交配指数、生育力指数及受孕指数与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

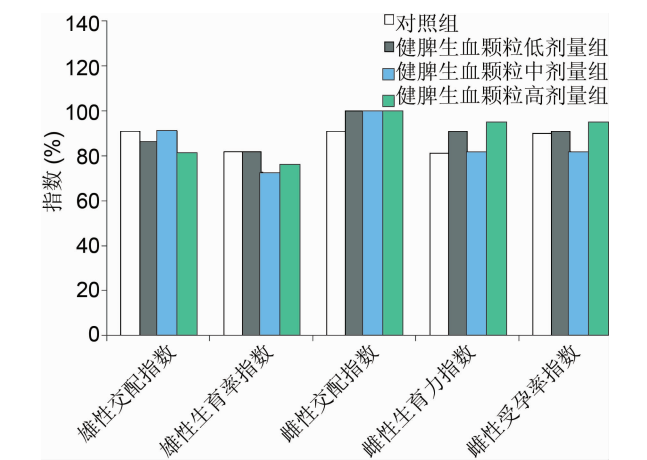


图 2 各组大鼠生育力指数比较

4 各组孕鼠胚胎形成情况比较(表 2) 因部分雌鼠未检出精子,但剖检中发现已受孕,且受孕天数不详,故未参与统计。与对照组比较。健脾生血颗粒中、高剂量组着床数、活胎数及着床率显著升高,且呈剂量依赖性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。健脾生血颗粒各剂量组黄体数、死胎/吸收胎及死胎率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

缺铁性贫血是临床的常见病、多发病,妊娠期妇女

表 1 各组雄鼠睾丸、附睾重量、精子数量及活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	睾丸(g)	附睾(g)	精子活力百分比(%)	附睾尾精子计数($\times 10^8$)	精子畸形率(%)
对照	22	3.11 $\pm$ 0.44	1.34 $\pm$ 0.09	75.2 $\pm$ 4.13	3.8 $\pm$ 0.6	0.24 $\pm$ 0.28
健脾生血颗粒低剂量	22	2.93 $\pm$ 0.20	1.31 $\pm$ 0.13	77.7 $\pm$ 6.06	4.0 $\pm$ 0.6	0.25 $\pm$ 0.24
中剂量	22	3.02 $\pm$ 0.24	1.30 $\pm$ 0.12	75.0 $\pm$ 6.52	3.9 $\pm$ 0.6	0.32 $\pm$ 0.29
高剂量	22	2.93 $\pm$ 0.50	1.24 $\pm$ 0.23	78.2 $\pm$ 6.20	4.0 $\pm$ 1.1	0.30 $\pm$ 0.33

表 2 各组孕鼠胚胎形成情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	黄体数(个)	着床数(个)	着床率(%)	活胎数(个)	吸收胎/死胎(个)	死胎率(%)
对照	18	14.6 $\pm$ 3.2	8.6 $\pm$ 4.3	59.2	7.3 $\pm$ 4.5	22/1	14.8
健脾生血颗粒低剂量	20	14.7 $\pm$ 2.3	10.8 $\pm$ 4.0	73.5**	10.2 $\pm$ 4.5	11/1	5.6
中剂量	18	15.3 $\pm$ 3.0	12.0 $\pm$ 2.7*	78.5**	11.4 $\pm$ 2.8*	7/4	5.1
高剂量	21	13.6 $\pm$ 3.4	12.5 $\pm$ 3.8**	92.3**	11.5 $\pm$ 4.3**	20/2	8.4

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

缺铁性贫血发病率远高于普通人。临床报道显示,妊娠期妇女铁缺乏的发生率为 40%~90%^[10],甚至可达到 95%^[11],平均为 58.6%^[12]。近年来,随着人们健康意识的提高及对孕期保健的重视,药学工作者对缺铁性贫血治疗药物的研究逐步深入,妊娠期缺铁性贫血已逐渐得到有效控制。因此,探明妊娠期妇女所使用的缺铁性贫血治疗药物的生殖毒性作用具有重要意义。

健脾生血颗粒为中西复方制剂。研究报道,健脾生血颗粒对血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、肝脏过氧化氢酶(CAT)活性等方面的作用均强于富马酸亚铁^[13],提示健脾生血颗粒在提高 SOD、CAT 活力、降低血清 MDA 含量、清除自由基方面具有明显优势。

本课题研究严格按照药品非临床研究质量管理规范(GLP)对健脾生血颗粒的大鼠生殖力及早期胚胎发育毒性进行评价。试验结果显示,低、中、高剂量健脾生血颗粒对大鼠生殖力和早期胚胎的发育未见明显毒性作用,提示供试品在临床应用过程中对备孕和已孕妇女以及胎儿的生殖毒性作用可能较小。然而,各组大鼠摄食量比较结果提示,供试品剂量越大,大鼠摄食量越少,说明供试品可能会导致胃肠不适,影响大鼠食欲。这与供试品“健脾和胃”的功效并不相符,原因可能是本实验大鼠给药量过大,大剂量的硫酸亚铁刺激胃肠道所致。其中,高剂量组大鼠灌胃量相当于临床等效剂量的 15 倍。

此外,该供试品对雄性成年大鼠有一定的一般毒性作用,主要为胃肠道轻微不良反应,表现为腺胃黏膜呈红色或少量散在小红点,但镜下观察均未见异常。高剂量组有镜下异常表现(胃黏膜固有层血管轻度充血),中、低剂量组则未见异常。故该供试品一般毒性靶器官可能为胃肠道,未见毒性反应剂量为中剂量[3.48 g(kg·d)]。健脾生血颗粒是由多味中药和硫酸亚铁组成的复方制剂,通过查阅文献,中药部分并无毒性药材,故分析该供试品中硫酸亚铁成分可能在产品产生胃肠道不良反应中占主导角色。关于硫酸亚铁的不良反应已有相关报道^[13],但健脾生血颗粒的中药成分和维生素 C 均可降低硫酸亚铁所引发的不良反应发生率和程度。因此健脾生血颗粒相对于纯亚铁制剂不良反应发生率明显要低^[14]。在治疗缺铁性贫血疗效方面也明显优于纯亚铁制剂^[15]。

综上所述,供试品对亲代大鼠可能存在一定的胃肠毒性作用,但其对生殖力(包括对睾丸、附睾重量,精子数量、活力等)和子代胚胎的发育(包括对黄体、着床、活胎等)未见毒性作用。

参 考 文 献

- [1] McClure EM, Goldenberg RL, Dent AE, et al. A systematic review of the impact of malaria prevention in pregnancy on low birth weight and maternal anemia[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2013, 121(2): 103-109.
- [2] 杨昕雷. 1 285 例孕妇贫血状况分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2010, 21(4): 246-247.
- [3] 赵刚, 夏莹, 黄志军, 等. 健脾生血颗粒对大鼠胚胎-胎仔发育毒性研究[J]. *世界中医药*, 2015, 10(10): 1582-1585.
- [4] 白婧. 妊娠合并贫血 64 例临床诊治分析[J]. *中国实用医药*, 2014, 9(2): 137-138.
- [5] 何群双. 健脾生血颗粒治疗孕妇缺铁性贫血的疗效观察[J]. *湖北中医杂志*, 2006, 28(8): 14-15.
- [6] 黄逸玲. 健脾生血颗粒治疗妊娠合并贫血 48 例观察[J]. *实用中医药杂志*, 2006, 22(2): 103.
- [7] 马薇, 侯丽, 陈信义. “健脾生血”治疗缺铁性贫血的理论依据和临床实践[A]. 中华中医药学会第二届岐黄论坛——血液病中医药防治分论坛论文集[C]. 北京: 2014.
- [8] 潘琳莉, 张学勇, 吴杰. 健脾生血颗粒治疗缺铁性贫血 60 例疗效观察[J]. *国际中医中药杂志*, 2010, 32(2): 158-159.
- [9] 《药物生殖毒性研究技术指导原则》课题研究组. 药物生殖毒性研究技术指导原则[OL]. <http://www.sda.gov.cn/SWOL/CL1616183445.html>.
- [10] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 154-155.
- [11] 胡美霞, 李承华, 康一娟, 等. 妊娠期贫血筛查与治疗结果分析[J]. *中国妇幼保健杂志*, 2010, 25(24): 3401-3402.
- [12] Ma AG, Schouten E, Wang Y, et al. Anemia prevalence among pregnant women and birth weight in five areas in China[J]. *Med Princ Pract*, 2009, 18(5): 368-372.
- [13] 刘达平. 两种铁补充剂的药理研究[J]. *今日药学*, 2009, 19(1): 19-20.
- [14] 张颖, 骆志炎. 不同剂量复方硫酸亚铁叶酸片对贫血孕妇的疗效及影响[J]. *实用预防医学*, 2015, 22(10): 1252-1253.
- [15] 陈春宝, 王敏, 卢伟. 健脾生血颗粒治疗儿童缺铁性贫血疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(2): 191-192.

(收稿: 2016-04-28 修回: 2016-11-11)