

·药理·

环磷酰胺致畸性的体外研究

管孝鞠 王治乔 廖明阳 王爱平

(军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

摘要 环磷酰胺是临床上常用的抗肿瘤药物和免疫抑制剂,是化学致畸物研究的代表药,体外致畸试验方法是研究致畸作用及机理的有效方法之一;本文以环磷酰胺为例,从前致畸原体外活化、体外给药方法及试验方法几个方面较系统地介绍了该药体外致畸的研究情况,这对其它化学物质的致畸研究可能有一定参考价值。

关键词 环磷酰胺;致畸性;体外

Studies on teratogenicity of cyclophosphamide in vitro

Guan Xiaojun, Wang Zhiqiao, Liao Mingyang, Wang Aiping

(Institute of Pharmacology and Toxicology, AMMS, Beijing 100850)

ABSTRACT Cyclophosphamide is a commonly used antitumor and immunosuppressive drug as well as an important chemical teratogen after exposure in vivo. Methods and models in vitro were efficient in teratogenicity research. In this review, general considerations about activation of proteratogen, methods of administration and testing in vitro are introduced. Furthermore, it can be useful for other teratogens studies.

KEY WORDS cyclophosphamide, teratogenicity, in vitro

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是一种烷化剂,在体内具有细胞毒和免疫抑制活性,在临床上广泛用于肿瘤化疗,可引起较严重的毒副作用,如骨髓抑制、出血性膀胱炎、脱发和性腺损害等,也有致癌、致突变和致畸作用;特别是其致畸作用,危害更大,限制了其应用范围;故国内外对此进行了大量的研究,本文着重对其体外致畸作用的体外研究方法作一综述。

一、体外活化的研究

环磷酰胺在体内经肝微粒体细胞色素 P450 单加氧酶(monooxygenases)的作用,生成中间产物 4-羟基-环磷酰胺(4-OH-CP),再分解产生活性产物磷酰胺芥(phosphamide mustard, PM)和丙烯醛(acrolein, AC);环磷酰胺体外无致畸活性,其致畸作用

的发挥有赖于生物活化过程,实验表明,不加代谢活化酶系,胚胎对 CP 的耐受剂量可达 800mg/ml,该剂量下胚胎表现形态学正常,而蛋白量减少。孕龄 10d 的大鼠胚胎体外与 [氯乙基³H]环磷酰胺(³H-CP)4mg/ml 一起培养 24h 后,利用放射自显影和生化方法检测标记药物的摄取和结合量。结果表明,加入含代谢活化系统 CP 的胚胎摄入结合的氟约比非活化条件下(CP+不含辅因子的 S-9)多 3 倍,提示活化条件下胚胎对 CP 的摄取和结合量增加。

在培养液中加入肝药酶成分,如细胞色素 P450 单加氧酶、NADPH 等^[1],或加入肝药酶诱导剂,如苯巴比妥、多氯联苯(Aroclor1254)等,可以有效加速 CP 体外代谢活化过程,显著提高其致畸效应。Aroclor 1254 诱导的大

鼠肝微粒体可以用作 FETAX (frog embryo teratogenesis assay, 蛙胚胎致畸试验) 体外代谢活化系统。

影响 CP 活化的因素很多, 其主要影响因素如下:

(1) 氧的浓度 由于 P450 代谢酶系依赖氧的参与, 故氧分压增加, CP 的毒性增强;

(2) 药物接触时间 10d 孕龄大鼠的胚胎体外接触活化的 CP (25mg/ml) 5h, 足以引起生长迟缓、前脑畸形、肢体及尾的畸形。CP 在体内活化需要 15 ~ 30min, 药物可通过孕鼠对胚胎产生毒性或通过作为培养基的大鼠血清对胚胎产生致畸效应;

(3) 酶系的代谢活性 取自不同脏器及不同品系、不同性别动物的 S_9 对环磷酰胺致畸代谢活性存在一定的差异。研究表明, 取自肝的 S_9 (S_9L) 比取自肾的 S_9 (S_9K) A 代谢活性高, CBA 小鼠的 S_9L 比 C57BL 活性高, 体内给予 CP (20mg/kg) 可显著降低 S_9L 、 S_9K 代谢活性, 种间差异消失, CP 对 C57BL 小鼠比对 CBA 的致畸作用、致死性强, 致畸作用的类型也有一些差别。

雄性动物比雌性动物肝药酶诱导作用强。在 Aroclor1254 作用下, 雄性和雌性动物总细胞色素 P-450 有明显增加, 二者无明显差别, 但就 CP 胚胎毒性和诱变性代谢物产生来说, Aroclor1254 对雄性大鼠比妊娠雌性大鼠的诱导作用更强^[2]。

有人尝试用人肝 S_9 成分作为 CP 体外生物活化的酶来源, 以使结果更接近于人的状况, 获得 CP 对人致畸性研究的资料。CP (30 ~ 150 μ g/ml) 加入人 S_9 (50 μ l) 的致畸效应低于 35.5%, 说明人肝 S_9 代谢活性不够高^[3]。

不同的培养系统, 代谢活化方法可以有所不同, 但总的来说是要提高细胞色素 P-450 单加氧酶的活性, 减少酶系自身的毒副作用。

二、体外致畸研究的给药方法

环磷酰胺体外无直接致畸活性, 所以进

行体外试验时首先要考虑代谢活化问题。国外有不少学者直接利用其代谢活性产物或类似物来研究其致畸作用及机理, 也是有效可行的方法; 采用环磷酰胺体外给药的方法主要有以下几种:

(一) 培养液中加入酶、辅助因子和/或诱导因子

CP 直接加入含代谢活化酶系所需的酶、辅助因子的培养液中, 有时可根据研究的需要, 加入酶诱导剂或抑制剂, 以调整酶的活性。

(二) 采用给予 CP 大鼠的血清作为培养基

这种给药方法考虑了 CP 机体代谢的因素, 与体内给予 CP 的致畸作用有良好的一致性, 是体外试验中代谢活化药物值得推荐的给药方法。

取头褶期大鼠胚胎体外培养 48h, 培养基是腹腔注射 CP 后不同时间间隔取得的大鼠血清, 与同步对照大鼠血清比较, 结果表明, 在 CP (180mg/kg) 给药后 4h 所取得的血清中培养, 胚胎存活并出现露脑畸形, 与对照组比较, 蛋白质和 DNA 含量降低。CP 给药剂量增加, 所取得的大鼠血清对体外培养的小鼠胚胎的致突变作用和毒性均增加, 500mg/kg CP 对小鼠胚胎有致死性, 用正常大鼠血清培养的胚胎的存活率为 $79.8 \pm 0.31\%$, 而给予 500mg/kg CP 的大鼠血清培养的小鼠胚胎存活率仅为 $8.4 \pm 0.42\%$, 故可以考虑利用小鼠胚胎畸形发生率及成活率来评价孕鼠血清中的致畸因素。

(三) 与母体肝细胞共培养

啮齿动物植入后胚胎培养技术广泛用于研究外源性化合物的胚胎毒性, 不少研究者将胚胎培养技术与生物活化系统相结合, 除了以上加入制备的 P450 代谢酶系外, 近来还发展了利用妊娠动物的具有代谢活性的肝细胞悬液, 在不改变胚胎发育的最佳实验条件的情况下, 与胚胎一起培养, 结果表明, 肝细

胞或 CP 单独对胚胎发育均无明显影响,肝细胞与 CP 一起加入胚胎培养液中,CP (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)时发现胚胎毒性,加入单加氧酶抑制剂甲吡丙酮,胚胎毒性减轻,可见肝细胞悬液具有生物转化活性,此方法使得前致畸原的研究有利于胚胎培养在最适条件下进行^[4]。小鼠胚胎与其母体肝细胞一起培养,也可以对 CP 进行体外活化^[5]。

(四)卵黄囊内注射

卵黄囊脏层具有代谢活性^[6],通过卵黄囊内注射,可以观察药物对胚胎的直接作用,用于致畸筛选准确率约为 74%^[7]。

三、体外致畸研究的试验方法

致畸研究的体外模型从应用细胞培养方法代替动物试验进行致畸原的筛选,到全胚胎培养系统的运用,都要求与体内试验的结果相一致。目前,应用 CP 体外致畸研究的方法主要有以下几种:

(一)细胞培养

1. 胚胎细胞

用分化的大鼠胚胎肢芽细胞进行体外培养,研究表明,器官形成期的大鼠胚胎细胞具有代谢活性,通过跨胎盘诱导,CP 可以被活化产生有毒活性代谢物。利用处于分化状态的神经嵴(胚)的软骨形成前肢芽间质细胞,进行致畸化合物的筛选试验,结果显示,体内致畸与体外培养的细胞生长分化的改变呈正向相关。

2. 微团培养

取自大鼠胚胎中脑和肢芽的细胞微团培养 5d,分别分化形成神经细胞和软骨细胞,CP (+ S₉)对神经细胞分化的 IC₅₀的平均值为 9.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,存活浓度为 8.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[8]。鸡胚肢芽细胞微团经 5~6d 培养,可分化形成软骨小结。Aroclor 1254 诱导的大鼠肝细胞对 CP 活化作用最强,与鸡胚肢芽细胞一起培养,IC₅₀为 2mg/ml。活化的 CP 对软骨蛋白增殖和蓄积的毒性相近。

多种化合物的体外微团试验表明,对细

胞分化呈选择性抑制的很可能具有致畸性^[9]。

3. 胚胎干细胞

致畸原的微团试验广泛用于生殖毒性的检测,主要缺点在于所用的原始细胞来自大鼠胚胎,而干细胞试验所用的是可以传代的细胞系(株)。在白血病抑制因子(LIF)的作用下,小鼠胚胎干细胞(ESC)保持非分化状态;去除 LIF,细胞分化形成胚内胚层,与 ESC 形态上明显不同。ESC 克隆可以每 d 收集,当洗去 LIF 时,这些细胞可形成分化的细胞群,用于化学物质致畸性的检测,有人对用未分化的 ESC 代替微团试验中的大鼠原代胚胎细胞的条件及其有效性进行了研究,发现干细胞的检测敏感性和特异性与微团试验相近,而所用的细胞可以进行传代,减少动物消耗^[10,11]。

4. MELC(murine erythroleukemic cell)法

此外,还有人利用鼠红白血病细胞(MELC)研究化学物的致畸机理,活性 CP 代谢产物 PN 及 4-OOH-CP 对细胞周期的破坏作用与肢芽核试验观察到的相似,故可采用 MELC 法研究具有 DNA 损伤活性物质的作用机制^[12]。

(二)组织、器官培养

肢芽、腭、尾、唾液腺在组织、器官培养中应用较多,也是 CP 体外致畸作用比较明显的部位。

1. 肢芽

苯巴比妥诱导的大鼠肝细胞色素 P450,经纯化掺入由 NADPH-细胞色素 P450 还原酶, dilauroyl phosphatidyl choline 和胆酸钠重新组成的活化系统,将此系统加至 11d 龄小鼠胚胎肢芽培养液中,加入不含 CP 的 P450 9~30pmol/ml 对肢芽发育无明显影响;当加入 CP(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)时可引起软骨分化损害和明显的异常结构,出现远侧骨和肩胛骨畸形,趾骨骼畸形表现尤为明显。

3~10mg/ml 的丙烯醛对 12d 孕龄小鼠

胚胎的肢芽分化有显著损害作用,对 11d 孕龄的小鼠胚胎肢芽作用浓度要求更低,接触时间 20 ~ 40min 足以引起发育异常,其致畸作用与 4-OOH-CP 明显不同。

2. 胥

为了研究 CP 对胥组织生长和分化的影响,选用仓鼠的胥组织进行了体内和体内试验的比较。胶原和氨基多糖的合成是胥正常发育所必需的,CP 体内给药的胥组织在体外培养中不能融合;无论是体内给予 CP 或体外给予活化的 CP,胥组织均不见融合;CP 能降低顶部胶原和氨基多糖的合成,同时给予维生素 B₁ 和 B₆,CP 的致畸作用不受影响。提示 CP 可能是通过影响 DNA 的合成,损伤处于生长和增殖活跃的细胞,继而抑制氨基多糖和胶原的合成,延迟胥突的接触与闭合,导致胥发育畸形的发生^[13]。

3. 唾液腺

利用胎鼠的唾液腺培养系统研究不同酶系的代谢活化活性。研究表明,与肝细胞共培养的 CP 对唾液腺生长的抑制作用最强,其次是 Aroclor 1254 诱导的 S₉ 活化的 CP^[1]。

(三) 胚胎培养

目前,哺乳动物全胚胎培养系统广泛用于研究正常及异常发育过程,主要的优点在于可以精确控制试验条件,可以获得体内试验无法得到的资料,可在不受母体干扰的情况下研究药物及环境致畸物对胚胎发育的作用及机理;主要的不足在于技术条件的限制和能够进行体外培养的胚胎发育阶段较短。利用全胚胎培养系统进行致畸原的筛选尚存在争议,但是该系统在致畸研究中必将得到越来越多的应用^[14]。

1. 植入前胚胎培养

植入前胚胎培养是将小鼠、大鼠或家兔的受精卵在着床前取出进行体外培养的一种方法,有人利用植入前小鼠胚胎培养就 CP 对发育各阶段的干扰作用、基因突变及其与发生畸形或出生缺陷的关系进行了实验研

究^[15]。

2. 植入后胚胎培养

大鼠全胚胎培养方法最初由 New 提出和发展起来的,孕龄 10d 的大鼠胚胎与卵黄囊脏层及完整的外胎盘圆锥在大鼠血清、37.8℃ 与测试物一起旋转培养 48h,加与不加代谢活化系统(S₉ 混合物)比较,可以研究 CP 的致畸作用及机理。利用这种方法可以对化合物的致畸性进行快速检测^[16]。加入大鼠肝微粒体成分和 NADPH₂ 的培养液中,CP 对植入后大鼠胚胎的致畸作用与对同期体内大鼠胚胎的作用相比较,结果表明,经本系统体外活化的 CP 与 CP 在体内的致畸作用相仿^[17]。

小鼠全胚胎培养是在大鼠全胚胎培养基础上建立和发展起来的,基本方法相似。CP 体外致畸研究除了广泛应用大鼠全胚胎培养方法外,小鼠全胚胎培养方法也是采用较多的工具之一,仓鼠植入后胚胎培养可能对于研究 CP 体外致畸的动物选择性有一定意义。

(四) 移植法

此外,将肢芽切成碎片移到裸鼠体内,移植后第 7 和第 9d 腹腔注射 CP(10 ~ 120mg/kg),观察到移植物生长和组织发生受抑,可见,胚胎组织移植物对 CP 的敏感性与胚胎对 CP 致畸的敏感性相近,故移植法可以作为致畸研究的有效方法之一^[18]。

四、结语

环磷酰胺是研究最多的致畸剂,也是体外研究前致畸原(proteratogen)最常用的工具和阳性药,研究方法较多,对于其他致畸原或前致畸原的研究,以上方法也可能适用;体外途径可作为体内试验的初筛,也是研究化合物致畸作用及机理快速可靠、切实易行的途径之一。随着人们对生命奥秘认识的深入和现代生物学技术的进步,CP 等药物的致畸机理可望得到阐明,从而更好地促进其临床应用。

参考文献

- [1] Lyng RD, Scalf R, Monteith D. Metabolic activation in the fetal mouse salivary gland culture system with rat hepatocytes, rat S-9, and human S-9 Teratog Carcinog Mutagen, 1991; 11(1):31
- [2] Van Aerts LA, Hahne SJ, Oostendorp AG, et al. Sex difference in aroclor 1254 induction of rat hepatocytes; consequences for in vitro embryotoxicity and mutagenicity of cyclophosphamide. Toxicology In Vitro, 1993; 7(6):769
- [3] Zhao J, Krafft N, Terlouw GD, et al. A model combining the whole embryo culture with human liver S-9 fraction for human teratogenic prediction. Toxicology In Vitro, 1993; 7(6):827
- [4] Van Aerts L, Piersma AH, Verhoef A, et al. Bioactivation of cyclophosphamide in an in vitro postimplantation rat-embryo/hepatocytes co-culture, using maternal hepatocytes in suspension. Reprod Toxicol, 1991; 5(3):270
- [5] Ozolins TR, Oglesby LA, Wiley MJ, et al. In vitro murine embryotoxicity of cyclophosphamide in embryos co-cultured with maternal hepatocytes; development and application of a murine embryo-hepatocyte co-culture model. Toxicology, 1995; 102(3):259
- [6] Cumberland PF, Richold M, Parsons JF, et al. Intravitelline injection of cultured rat embryos; an improved method for the identification of cytotoxic and non-cytotoxic teratogens. Toxicology in Vitro, 1992; 6(6):503
- [7] Cumberland PF, Richold M, Parsons J, et al. Intravitelline injection of rodent conceptuses; an improved in vitro developmental toxicity screen. Toxicology In Vitro, 1994; 8(4):731
- [8] Combes RD, Innes D. Preliminary studies on the use of the in vitro rat micromass assay - results with some model teratogens. Toxicologist, 1990; 10(1):125
- [9] Uphill PF, Wilkins SR, Allen JA. In vitro micromass teratogen test; results from a blind trial of 25 compounds. Toxicology In Vitro, 1990; 4(4-5):623
- [10] Newall DR, Beedles KE. The stem-cell test; an in vitro assay for teratogenic potential. Results of a blind trial with 25 compounds. Toxicology In Vitro, 1996; 10(2):229
- [11] Newall DR, Beedles KE. The stem-cell test - a novel in vitro assay for teratogenic potential. Toxicology In Vitro, 1994; 8(4):697
- [12] Elstein KH, Zucker RM, Shuey DL, et al. Utility of the murine erythroleukemic cell (MELC) in assessing mechanisms of action of DNA-active developmental toxicants; application to 5-fluorouracil. Teratology, 1993; 48(1):75
- [13] Shah RM, Izadnegahdar MF, Hehn BM, et al. In vivo/in vitro studies on the effects of cyclophosphamide on growth and differentiation of hamster palate. Anticancer Drugs, 1996; 7(2):204
- [14] New DA. Whole embryo culture, teratogenesis, and the estimation of teratologic risk, Teratology, 1990; 42(6):635
- [15] Kola I. The preimplantation mouse embryo; its use in the study of birth defects. Teratology, 1990; 42(3):326
- [16] Nakaura S, Tanaka S, Usami M, et al. In vitro teratogenicity testing using the rat embryo culture system; (4) Comparative study of embryotoxicity of cyclophosphamide in vitro and in vivo. Teratology, 1990; 42(6):46A
- [17] Piersma AH, Van Aerts L, Verhoef A, et al. Biotransformation in post-implantation rat embryo culture using maternal hepatocytes in suspension coculture. Teratology, 1990; 41(5):585
- [18] Shiota K, Uwabe C, Yamamoto M, et al. Teratogenic drugs inhibit the differentiation of fetal rat limb buds grafted in athymic(nude)mice. Reprod Toxicol, 1990; 4(2):95

HPLC 法测定人血清中氨氯地平浓度

袁荣刚 王晓波 邢山岗 靳姝杰

(解放军第 210 医院临床药理室 大连 116021)

摘要 本文建立了快速、简便测定人血清中氨氯地平的 HPLC 法,分析柱为 ODS-5S(150×4.0mm)不锈钢柱,流动相为甲醇:0.03M 磷酸二氢钾缓冲液(9:1)的混合液。流速为 1.0ml/min,以硝苯地平为内标物,检测波长为 366nm,蛋白沉淀剂选用 15%高氯酸。氨氯地平测定的线性范围为 4~12μg/ml, r=0.9992,最低检测限为 4ng。日内平均相对回收率为 10.24±5.40%,日间平均相对回收率为 99.87±6.23%。本方法专一性好,放置 24h 对含量测定无影响。

关键词 HPLC; 氨氯地平; 血药浓度