

家蝇蛆粉的临床前致畸性研究

黎运西¹, 朱家勇², 林超群¹, 金小宝², 曾爱华³, 褚夫江² (1. 南方医科大学附属顺德区第一人民医院检验科, 广东佛山 528300; 2. 广东省生物活性物质研究重点实验室, 广州 510006; 3. 广东药学院药科学院, 广州 510006)

【摘要】 目的 探讨家蝇蛆粉对大鼠的致畸性, 以评价其安全性。**方法** 家蝇蛆粉按比例定量添加到普通饲料原料中混匀, 干燥, 做成高、中、低剂量家蝇蛆粉饲料。将性成熟的 98 只 SD 大鼠按雌雄 2 : 1 的比例同笼交配。取 64 只孕鼠平均分为 4 组: 家蝇蛆粉饲料低剂量组; 家蝇蛆粉饲料中剂量组; 家蝇蛆粉饲料高剂量组; 普通饲料对照组。于受孕后称量体重质量增长情况。最后脱颈椎处死孕鼠, 称子宫质量, 并进行胎鼠检查。**结果** 家蝇蛆粉饲料高、中、低剂量组与对照组相比, 雌鼠体质量增长、子宫质量比较差异无统计学意义, 无吸收胎、早死胎、晚死胎; 各組間雄性与雌性胎鼠数比较差异均无统计学意义; 各組間雄性与雌性胎鼠的外观、体质量、体长比较差异均无统计学意义。各組間胎鼠骨骼和胎鼠内脏比较差异均无统计学意义。**结论** 家蝇蛆粉对 SD 大鼠未见致畸性。

【关键词】 家蝇蛆粉; SD 大鼠; 致畸性

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 14. 022 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)14-1709-02

Study on the preclinical teratogenicity of musca domestica larvae powder LI Yun-xi¹, ZHU Jia-yong², LIN Chao-qun¹, JIN Xiao-bao², ZENG Ai-hua³, CHU Fu-jiang² (1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated People's Hospital of Southern Medical University in Shunde District, Foshan, Guangdong 528300, China; 2. Key Laboratory of Biological Activity Material, Guangdong 510006, China; 3. Department of Pharmacy of Pharmacy College, Guangdong 510006, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the teratogenicity on mice of powder extract from *Musca domestica* larvae powder (MDLP) and the safety of it. **Methods** MDLP was added into animal feeds, then we prepared high dose of MDLP animal feeds, middle dose of MDLP animal feeds, and low dose of MDLP animal feeds. In each cage, 2 female eugamic rats and 1 male eugamic rat were put together for mating. 64 pregnant rats were divided into the 4 groups: high dose treated group, middle dose treated group, low dose treated group, and ordinary feedstuff treated group as controls. The growth information of the weight of the above 4 group were analyzed. At last, uterus of pregnant rats were weighed and the fetuses were examined. **Results** The growth information of whole weight and uterus weight of pregnant rats, and the appearance, sex, weight, stem length, bone, internal organs of rat fetus of three different dose treated groups were not significantly different compared with those of the control one. No absorption foetus, earlier died foetus before delivery, later died foetus before delivery was found in three different dose treated groups. **Conclusion** There are no embryonic and teratogenic toxicity teratogenicity for MDLP on SD mice.

【Key words】 musca domestica larvae powder; SD rats; teratogenicity

家蝇蛆粉未见急性毒性效应和遗传毒性^[1], 但由于抗高血脂与动脉粥样硬化药物有可能会用于高血脂或动脉粥样硬化孕妇, 而家蝇蛆粉是否存在胚胎毒性和致畸性, 却尚未明确。母体在孕期应用受试物时, 如果该受试物可通过胎盘屏障, 并影响胚胎的器官分化与发育, 导致结构和功能的缺陷, 就会造成胚胎畸形。因此, 在受孕动物的胚胎着床并已进入细胞和器官分化期时给予受试物, 则可检出该受试物对胎仔的致畸作用。本试验对受孕 SD 大鼠给予不同剂量的家蝇蛆粉饲料, 评价家蝇蛆粉对胚胎的致畸作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 家蝇三龄幼虫(本实验室自行饲养), SD 大鼠 98 只, 无特定病原体 (SPF) 级, 购于广州中医药大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK (粤) 2008-0020, 粤监证字 2008A002, 雌 66 只(未交配过), 雄 32 只, 体质量 190~230 g, 75~85 d。

1.2 家蝇蛆粉的制备

1.2.1 将家蝇三龄幼虫置于冰上 5 min, 然后置于 45 ℃ 水浴 3 min, 重复 3 次。再将幼虫饲养 36 h 后收集, 然后饥饿处理 2 h, 蒸馏水清洗 3 次, 75% 乙醇洗 3 次, 再用蒸馏水清洗 3 次, 后

置于一 70 ℃ 冷冻贮存。室温解冻后与 3 倍质量的磷酸盐缓冲液混匀, 用高速组织匀浆机搅成匀浆。匀浆液用 400 目纱网过滤。

1.2.2 滤液置于 80 ℃ 水浴 10 min, 然后冰浴冷却, 去除上层凝固的脂肪层后超声粉碎 30 s, 反复 6 次, 强度 14 kHz, 800 W。最后置于一 70 ℃ 冰箱过夜。从冰箱取出冷冻滤液, 置于真空冷冻干燥机进行冷冻干燥, 制成干粉。

1.2.3 余下的滤渣每 100 g 加 500 mL 的 2 mol/L 的 HCl 溶液, 搅拌 2 h, 过滤。滤渣用蒸馏水冲洗至中性。然后置于 2% 的 NaOH 溶液中混匀 4 h。过滤后取滤渣再置于 10% 的 NaOH 溶液中混匀, 沸水浴 4 h, 过滤, 洗涤至中性。每 10 g 滤渣加质量百分比为 6% 的 H₂O₂ 溶液 20 mL 浸泡 1.5 h 脱色, 冷冻真空干燥得产品甲壳素。每克甲壳素加 50 mL 40% 的 NaOH 溶液混匀, 沸水浴 3 h, 过滤。滤渣再加上述比例和浓度的 NaOH 溶液, 沸水浴 3 h, 过滤。滤渣水洗至中性。加 50 mL 10% 的醋酸溶液, 混匀 1 h, 过滤。取滤液调其 pH 值至 7.0 时得絮状沉淀。离心分离沉淀, 烘干, 即得壳聚糖。

1.2.4 干粉与壳聚糖按 10 : 1 比例进行组合混匀, 制成黄色粉末状家蝇蛆粉。

1.3 主要试剂 甲醛、冰乙酸、苦味酸、氢氧化钾、甘油、茜素红。

1.4 主要仪器设备 显微镜、游标卡尺、动物手术刀、剪刀、镊子、电子称、电子天平。

1.5 实验方法

1.5.1 主要试剂的配制 茜素红溶液:茜素红 0.1 g,氢氧化钾 10 g,蒸馏水 1 000 mL,混匀。透明液 A:甘油 200 mL,氢氧化钾 10 g,蒸馏水 790 mL,混匀。透明液 B:甘油与蒸馏水按 1:1 的比例混匀。固定液(Bouins 液):苦味酸饱和液 75 份,甲醛 20 份,冰乙酸 5 份,混匀。

1.5.2 家蝇蛆粉饲料的配制 高剂量家蝇蛆粉饲料:家蝇蛆粉含量百分比为 40%;中剂量家蝇蛆粉饲料:家蝇蛆粉含量百分比为 27%;低剂量家蝇蛆粉饲料:家蝇蛆粉含量百分比为 13%。

1.5.3 大鼠的饲养和检查 98 只 SD 大鼠,被笼养于可控制温度的 SPF 级别的动物房中,保持温度在 20~25 ℃,相对湿度为 40%~60%,光线照射时间为白天 12 h。雌雄分笼饲养,雄性大鼠每笼 1 只,雌性大鼠其中 30 笼为每笼 2 只,2 笼为每笼 3 只。每天喂以普通饲料、水煮鸡蛋和生瓜子,适应环境 2 周。待大鼠性成熟后,把 32 笼雌鼠随机分到 32 笼雄鼠中,其中 30 笼的雌雄比例为 2:1,两笼的雌雄比例为 3:1。每天早晨观察阴道栓,并进行阴道涂片,显微镜下查精子。被查出阴道栓或在阴道涂片上找到精子的雌鼠被认为是已交配的,当天记为“受孕”0 d。如果 5 d 内仍有雌鼠未交配,则交换雄鼠,直到交配为止。检出的孕鼠取 64 只,随机分为 4 组,每组 16 只,并编号:高剂量家蝇蛆粉饲料组,中剂量家蝇蛆粉饲料组,低剂量家蝇蛆粉饲料组,普通饲料对照组。将各孕鼠在“受孕”0、3、7、15、22 d 时称量体质量。在受孕的第 7~16 天,高、中、低剂量家蝇蛆粉饲料组和普通饲料对照组每天分别按 82.5 g/kg

体质量喂以高剂量家蝇蛆粉饲料、中剂量家蝇蛆粉饲料、低剂量家蝇蛆粉饲料和普通饲料。

1.5.4 孕鼠的处死和检查 在雌鼠受孕 21 d,脱颈椎处死孕鼠,解剖子宫,称量子宫质量。检查并记录早死胎、晚死胎、吸收胎和活胎数。

1.5.5 活胎鼠一般检查 按文献[2-3]检查胎鼠外观有无异常,各组每胎雄性胎鼠数,雌性胎鼠数,各胎鼠的体质量和体长。

1.5.6 胎鼠骨标本检查 按文献[2]将每窝胎鼠的一半去皮、去内脏和脂肪后,放入茜素红溶液浸泡,当天摇 2~3 次,24 h 后换入透明液 A 中 48 h,再换入透明液 B 中 72 h,最后置甘油中保存。

1.5.7 胎鼠内脏检查 按文献[2-3]每窝胎鼠另一半放入 Bounins 液中固定 2 周,作内脏检查。用自来水冲去固定液,将胎鼠仰放在手术板上,剪掉四肢和尾巴,用手术刀在头部横切 2 刀,纵切 3 刀,观察头部内部;再从腹中线剖开胸腔和腹腔,从不同的角度和切面观察器官的相对位置、形状和大小。先后检查心、肺、横隔膜、肝、胃、肠等脏器的位置和大小,然后将其摘除。再检查肾、输尿管、膀胱、睾丸或子宫位置和发育情况。然后将肾脏剖开,观察肾盂是否积水或扩大。

2 结 果

2.1 致畸试验孕鼠体质量增长情况 家蝇蛆粉高、中、低剂量饲料组和普通饲料对照组孕鼠体质量增长情况,见图 1。经统计分析可知,家蝇蛆粉高、中、低剂量饲料组孕鼠体质量增长与普通饲料对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 致畸试验胚胎发育情况 家蝇蛆粉高、中、低剂量饲料组和普通饲料对照组胎鼠性别、体质量和体长,见表 1。经统计分析可知,家蝇蛆粉高、中、低剂量饲料组胎鼠性别、体质量和体长与普通饲料对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 致畸试验孕鼠子宫质量、胎鼠性别、体质量和体长($\bar{x}\pm s$)

分组	低剂量组	中剂量组	高剂量组	对照组
孕鼠子宫质量(g)	5.043 7±0.960 0	5.825 0±1.359 9	5.832 3±0.494 9	5.999 0±0.308 5
雄性胎鼠数(只)	5.600 0±2.7	7.200 0±1.9	7.400 0±3.4	7.000 0±1.6
雌性胎鼠数(只)	6.600 0±1.1	6.000 0±1.6	6.200 0±3.1	7.800 0±1.9
雄性胎鼠体质量(g)	6.690 4±0.221 3	6.381 6±0.268 4	6.027 6±0.429 7	7.084 0±0.483 4
雌性胎鼠体质量(g)	6.126 1±0.542 2	6.361 8±0.388 1	5.755 2±0.344 9	6.682 3±0.731 7
雄性胎鼠体长(mm)	49.620 0±1.99	51.180 0±1.47	47.180 0±1.47	48.330 0±4.10
雌性胎鼠体长(mm)	49.670 0±2.37	49.580 0±0.83	48.500 0±0.50	50.030 0±0.99

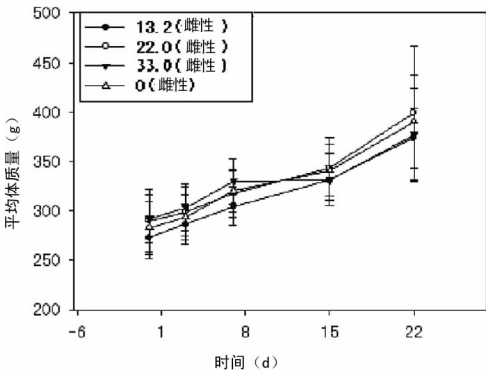


图 1 家蝇蛆粉饲料致畸试验孕鼠体质量增长情况

2.3 致畸试验胎鼠外观体格检查 家蝇蛆粉高、中、低剂量饲料组胎鼠外观均未见异常,与普通饲料对照组相比差异无统计学意义。

2.4 致畸试验胎鼠骨骼检查 家蝇蛆粉高、中、低剂量饲料组胎鼠骨骼检查未见异常,与普通饲料对照组相比,差异无统计学意义。

2.5 致畸试验胎鼠内脏检查 与对照组相比,家蝇蛆粉高、中、低剂量饲料组胎鼠内脏检查差异无统计学意义。

3 讨 论

在家蝇蛆粉抗高血脂与动脉粥样硬化的药效学研究中,每天 10 g/kg 体质量的 SD 大鼠的剂量为最佳治疗剂量。而根据杨海峰等[2]的报道,SD 大鼠的用量约为成人临床使用剂量的 60 倍。因此,60 kg 成人的用药剂量为 10 g/d,相当于 0.17 g/kg 体质量。在本试验的给药剂量设计上,以 33.0 g/kg 体质量作为最大用药剂量,相当于人的用药剂量的 194 倍,比杨海峰等[2]报道的临床使用剂量的 30 倍还要高。而据毒理学标准[4],将大鼠毒性试验外推到人时,鉴于种属和个体差异,安全系数通常为 100。据报道,致畸性研究的受试物的最高剂量为推荐摄入量的 100 倍而未观察到明显的母(下转第 1712 页)

个严重并发症,直接关系到患者的预后,故其早期诊断和干预治疗,对延缓肾病的发生与发展具有重要价值^[1]。现对糖尿病肾病早期检测的指标较多,有尿微量蛋白、尿 α_1 微球蛋白、尿 β_2 微球蛋白、TRF、NAG、尿视黄醇结合蛋白和血 Cys C 等。本研究对联合检测尿 TRF、NAG 及血 Cys C 在糖尿病肾病的早期诊断具有一定的临床意义。

TRF 为单链糖蛋白,相对分子质量为 76.5×10^3 ,大小为 4.0 nm,半衰期为 7~10 d。其主要功能是转运铁离子、带负电荷。正常情况下,肾小球滤过膜存在电荷选择性屏障,在静电作用下,绝大部分不能通过滤过膜。但在糖尿病肾病早期,肾小球滤过膜负电荷减少,通透性增加,导致其易通过肾小球滤过膜^[2]。NAG 是一种溶酶体酶,相对分子质量大,不能通过肾小球滤过膜,尿中增高反映肾小管结构损伤^[3]。本研究中,B 组中尿液的 TRF 和 NAG 分别为 (10.66 ± 3.50) mg/L 和 (4.30 ± 1.74) U/mmol,显著高于 A 组的 (3.12 ± 0.45) mg/L 和 (2.26 ± 0.97) U/mmol,A 组中 TRF 和 NAG 水平也显著高于对照组($P < 0.05$),说明尿 TRF 和 NAG 对糖尿病肾病早期诊断有一定的检测价值。

Cys C 是一种相对分子质量低、碱性非糖化蛋白质,相对分子质量为 13×10^3 ,由 120 个氨基酸残基组成,是一种分泌性蛋白质,Cys C 产生率相当恒定,Cys C 能反映肾小球滤过膜通透性的早期变化^[4]。国内有研究表明,当糖尿病早期肾损伤时,血清 Cys C 及尿 RBP 已经升高,且与血清肌酐、尿素氮呈高度正相关,表明血清 Cys C 浓度可反映肾小球滤过及肾小管重吸收功能^[5]。本研究结果与其相似,B 组中血清 Cys C 浓度显著高于 A 组中的浓度,A 组中的浓度显著高于对照组。

(上接第 1710 页)

体毒性、胚胎毒性和致畸性,则可认为该受试物无致畸毒性作用^[5]。在高、中、低 3 个剂量的家蝇蛆粉的致畸试验中,均未发现胚胎毒性或致畸作用。因此,本试验的剂量设计对家蝇蛆粉的致畸性评价是有意义的。

在实验动物选择方面,有文献报道用 SD 大鼠和新西兰兔作为试验动物^[6]。根据药物毒理学安全性评价的要求,大鼠为最常用的试验动物。本研究选择了 SD 大鼠作为家蝇蛆粉致畸试验的动物,具有代表性。

本研究中,家蝇蛆粉高、中、低剂量组孕鼠体质量增长与对照组相比,差异无统计学意义,表明家蝇蛆粉对孕鼠无显著毒性作用,对子宫和胚胎发育无显著影响。由于家蝇蛆粉高、中、低剂量组孕鼠的胎鼠中,各剂量组的平均雄性胎鼠数与雌性胎鼠数差异无统计学意义,表明家蝇蛆粉对雌鼠受孕能力无显著影响。由胎鼠体表各检查项目,胎鼠骨骼检查和内脏检查的结果可见,家蝇蛆粉对胎鼠各组织结构、器官发育无显著致畸毒性作用。有文献报道,致畸药物引起的胚胎体质量减轻和胚胎畸形通过上调细胞色素 P-450 基因表达而起作用^[7]。但据 Albert 等^[8]的观点,用基因表达的方法替代动物试验进行药物安全性评价还未完善,目前还是以动物试验作为致畸试验的金标准。但是,随着人类基因组学和后基因组学研究的进展^[9],用基因表达和蛋白表达的方法进行药物致畸毒性研究是有很大的发展前景。

参考文献

- [1] 黎运西,朱家勇,金小宝,等.家蝇蛆粉对小鼠急性毒性及突变性作用[J].中国公共卫生,2010,26(11):1416-1417.

表 2 表明,单独检测一个指标,敏感性最高为 64.0%,特异性最高为 86.7%,准确性最高为 72.5%;二联检测,敏感性最高为 78.0%,特异性最高为 96.7%,准确性最高为 85.0%;三联检测,敏感性为 84.0%,特异性为 96.7%,准确性为 88.8%。

因此,尿 TRF、NAG 及血 Cys C 单独检测,敏感性、特异性和准确性较低,二联、三联检测则能提高敏感性、特异性和准确性。

参考文献

- [1] 邱晓萍,朱东辉,王燕萍,等.尿液转铁蛋白、微清蛋白检测在糖尿病肾病早期诊断中的临床意义[J].福建医科大学学报,2008,42(5):436-437.
- [2] 王国萍,李华,王国君,等.尿转铁蛋白对糖尿病早期肾病检测的评价[J].中国临床医学,2008,15(4):561-562.
- [3] 张秀岩,李庆禄,池洪治,等.尿液联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J].标记免疫分析与临床,2009,16(4):254-255.
- [4] 喻长法,张仙森,王丽君,等.尿微量蛋白及血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的检测对糖尿病肾病的早期诊断价值[J].检验医学,2009,24(6):478-479.
- [5] 吴卫国.血清 Cys C 和尿 RBP 联合检测对诊断糖尿病早期肾损害的临床意义[J].齐齐哈尔医学院学报,2009,30(24):3046-3047.

(收稿日期:2011-02-15)

- [2] 杨海峰,万荣峰,张玲玲,等.壳聚糖对大鼠的致畸胎试验[J].癌变·畸变·突变,2007,19(1):64-66.
- [3] 吴惠岭,郑云燕,傅剑云,等.六月霜的安全性评价[J].现代预防医学,2008,35(10):1919-1926.
- [4] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范(2003 版)[S].北京:中华人民共和国卫生部,2003:225-228.
- [5] 夏勇,郑云燕,宋燕华.某妊娠期保健食品的致畸性和致突变性研究[J].海峡预防医学杂志,2005,11(5):52-53.
- [6] Bernard BK, Watanabe E, Kodama T, et al. Studies of the toxicological potential of capsinoids. IX. Teratology studies of dihydrocapsiate in rats and rabbits[J]. Int J toxicol, 2008,27(Suppl 3):119-136.
- [7] Park D, Kim S, Kang H. Preventive effect of piperonyl butoxide on cyclophosphamide-induced teratogenesis in rats[J]. Birth Defects Res, 2009,86(5):402-408.
- [8] Mbaya AW, Nwosu CO, Onyeyili PA. Toxicity and anti-trypanosomal effects of ethanolic extract of Butyrospermum paradoxum (Sapotaceae) stem bark in rats infected with Trypanosoma brucei and Trypanosoma congolense[J]. J Ethnopharmacol, 2007,111(3):526-530.
- [9] 黎运西,朱家勇,金小宝,等.组织器官特异性基因差异表达在毒理学中的应用[J].现代预防医学,2010,37(23):4526-4528.

(收稿日期:2011-04-19)