

阿司匹林丁香酚酯的一代繁殖毒性研究

赵晓乐,孔晓军,杨亚军,刘希望,李世宏,秦哲,焦增华,李剑勇*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽用药物创制重点实验室/甘肃省新兽药工程重点实验室,兰州 730050)

[收稿日期] 2016-09-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0054-05 [中图分类号] S859.81

[摘要] 为了初步评价阿司匹林丁香酚酯(AEE)对亲代大鼠的生殖功能和子代早期发育的影响,将360只Wistar大鼠随机分成6组,分别为受试药物AEE高、中、低剂量组(剂量分别为498.0、124.5和31.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹),阿司匹林组(剂量为68.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹),丁香酚组(剂量为246.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹),空白对照组(给予常规维持饲料)。各实验组均按设定剂量连续给药10周后,测定亲代大鼠主要的脏器系数、繁殖指数和生产指标以及子代(F₁)仔鼠的出生指标和生长指标。结果显示,与空白对照组相比,高剂量的AEE影响胎鼠的生长($P < 0.05$),并且高剂量AEE组大鼠的妊娠率、窝产仔数、出生活仔率和出生存活率都偏低,其中雄性仔鼠比例偏高;阿司匹林组妊娠大鼠和哺乳期胎鼠生长缓慢($P < 0.05$);高剂量组AEE亲代大鼠的睾丸和附睾系数偏高($P < 0.05$),阿司匹林和丁香酚组子代大鼠的附睾系数偏高($P < 0.05$)。结果表明,在本试验条件下,AEE对大鼠繁殖毒性的最大无损害作用剂量为31.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,对大鼠的最小有损害作用剂量为124.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

[关键词] 阿司匹林丁香酚酯;生殖毒性;发育毒性;繁殖指标

Reproductive Toxicity in Parental Generation of Aspirin Eugenol Ester on Rats

ZHAO Xiao-le, KONG Xiao-jun, YANG Ya-jun, LIU Xi-wang, LI Shi-hong,

QIN Zhe, JIAO Zeng-hua, LI Jian-yong*

(Key Lab of New Animal Drug Project, Gansu Province; Key Lab of Veterinary Pharmaceutical Development, Ministry of Agriculture; Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The reproductive and developmental toxicity of aspirin eugenol ester (AEE) in rats were investigated. Parental generation were exposed to AEE at doses of 498.0, 124.5 and 31.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹ and aspirin at dose of 68.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹ and eugenol at dose of 246.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 10 weeks before breeding. The weights of main organs and breeding indexes were observed in P and first filial generation (F₁). Results showed that the body weights of P and F₁ were decreased ($P < 0.05$), and pregnancy rate, litter size, live birth index and viability index on day 4 in high AEE dose group were also lower than those of control group. In addition, high male proportion in sex ratio of F₁ was very abnormal. Pregnant rats and weaning index in aspirin group grew slowly

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572573)

作者简介: 赵晓乐, 硕士研究生, 从事药物繁殖毒性研究。

通讯作者: 李剑勇。E-mail: lijy1971@163.com

($P < 0.05$)。Compared to control group, testis and epididymis indexes of P rats in high dose AEE group were high ($P < 0.05$), and epididymis indexes of F₁ rats in aspirin and eugenol groups were also high ($P < 0.05$)。Under the experimental condition, AEE had reproductive toxicity in rats. No observed adverse effect level was $31.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。Low observed adverse effect level was $124.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

Key words: aspirin eugenol ester; reproductive toxicity; developmental toxicity; reproductive indexes

阿司匹林丁香酚酯 (Aspirin eugenol ester, AEE) 由阿司匹林 (Aspirin) 与丁香酚 (Eugenol) 经过酰氯反应合成的一种新型的无色透明药用化合物。前期研究表明 AEE 一方面可降低 Aspirin 对胃肠道的刺激性, 另一方面又可增强 Eugenol 的稳定性, 同时临床作用的结构部位不会发生改变^[1]。药理学研究表明, 等剂量的 AEE 对二甲苯致大鼠耳廓肿胀模型的抗炎效果与 Aspirin 相当, 在酵母菌致大鼠发热模型中, AEE 的解热效果与等剂量的 Aspirin 无显著差异, 但 AEE 的药效更持久。此外, AEE 还具有镇痛、抗氧化、抑制血小板聚集、降低血脂等生物活性^[2-4]。药代动力学研究发现, AEE 在体内首先分解代谢为水杨酸和 Eugenol, 进而水杨酸和 Eugenol 均进行二相代谢转化生成水杨酸的葡萄糖醛酸结合物、水杨酸的甘氨酸结合产物和 Eugenol 的葡萄糖醛酸结合物和 Eugenol 的硫酸结合产物, 并且这些代谢产物在血浆和尿液中都可以检测到^[5]。毒理学研究表明, AEE 对小鼠经口急性毒性的半数致死量 (LD₅₀) 为 10.39 mg/kg , 大鼠经口急性毒性的 LD₅₀ 是 5.98 mg/kg , 而前药 Aspirin 和 Eugenol 的大鼠急性经口毒性分别为 1.93 mg/kg 和 1.5 mg/kg ^[6], 说明 AEE 相比前体药物毒性更低。由于合成 AEE 的前药 Aspirin 是研究药物致畸作用的阳性对照药物, 而 AEE 在体内分解为 Aspirin 和 Eugenol, 因此, AEE 是否具有繁殖毒性值得研究。目前未见 AEE 的繁殖毒性研究报道, 因此本实验就 AEE 对妊娠大鼠、胚胎及子代发育是否有影响进行了研究。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 AEE (纯度 > 99%, HPLC 方法检测), 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所制备; Aspirin, 武汉合中化工制造有限公司, 纯度

> 99.9%; Eugenol, 江西汇通药用香料油有限公司, 纯度 > 99%; 吐温 - 80, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验动物 6 周龄、未经产的 Wistar 大鼠 360 只, 体重 $200 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$, 随机分为 6 组, 每组 60 只, 雌雄各半。饲养温度为 $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[7], 相对湿度 $60\% \pm 10\%$, 光暗周期 12 h。

1.3 实验方法 将 AEE 设为低、中、高三个剂量组 (剂量分别为 31.1 、 124.5 和 498.0 mg/kg), 即 L (AEE)、M (AEE) 和 H (AEE)。Eugenol 组的给药剂量为 246.0 mg/kg , 与 H (AEE) 组的剂量等摩尔。Aspirin 给药组的剂量为 68.4 mg/kg , 与 M (AEE) 组的剂量等摩尔。AEE 和 Aspirin 研磨后过 100 目筛, 按剂量比例将其加入到饲料中 (福贝世亨生物医药 (上海) 有限公司成) 饲喂大鼠。Eugenol 与吐温 - 80 按 1:2 质量比配制成混悬液, 以饮水方式给予大鼠。

亲代大鼠饲喂 10 周后, 雌雄比按 1:1 进行同笼交配。计算繁殖指数: 受孕率 (受孕率 = 怀孕大鼠数 / 交配雌性大鼠数 $\times 100\%$)、妊娠率 (妊娠率 = 分娩有活体幼仔的大鼠数 / 怀孕大鼠数 $\times 100\%$)、出生活仔率 (出生活仔率 = 出生时活的仔鼠数 / 出生时仔鼠总数 $\times 100\%$)、出生存活率 (出生存活率 = 产后 4 d 仔鼠存活数 / 出生时活仔数 $\times 100\%$)、哺乳存活率 (哺乳存活率 = 21 d 断乳时仔鼠存活数 / 出生 4 d 后仔鼠存活数 $\times 100\%$)、性别比 (性别比 = 仔鼠成熟时雄鼠数 / 雌鼠数)。

测定生产指标: 每窝产仔数, 仔鼠出生后第 0、4、7 和 21 天的生长变化。实验结束时解剖实验动物, 测定亲代和子代大鼠睾丸和附睾 (或子宫和卵巢) 的脏器系数^[8-10]。

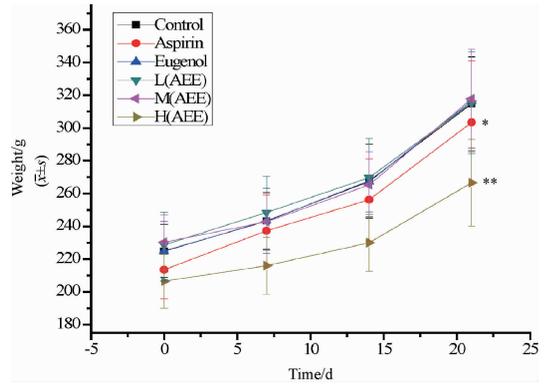
脏器系数 = 脏器重量 / 体重 $\times 1000$

1.4 统计方法 实验数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,结果均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。各组间差异比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床表现 除 H(AEE) 和 Aspirin 组大鼠的活动和进食略减,被毛疏松外,其余亲代和 F₁ 代对照组大鼠在整个试验期间精神状态良好,活动正常,进食、饮水和皮毛均无明显的异常变化。

2.2 妊娠大鼠体重变化 与空白对照组比较, Eugenol 组、M(AEE) 组和 L(AEE) 组的孕鼠体重增长无差别($P > 0.05$); H(AEE) 组和 Aspirin 组的孕鼠体重增长缓慢,有统计学意义($P < 0.05$),结果见图 1。



与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 各剂量组妊娠大鼠体重增长曲线

2.3 繁殖指数 如表 1 所示, Eugenol 组大鼠的受孕率偏低, H(AEE) 组大鼠的妊娠率、出生活仔率和出生存活率偏低,其中性别比例很异常,雄性仔鼠比例偏高。

表 1 各剂量组大鼠的繁殖指标

组别	受孕率/%	妊娠率/%	出生活仔率/%	出生存活率/%	哺乳存活率/%	性别比/%
Control	96.7	89.7	99.6	98.7	98.3	0.84
Aspirin	90	81.5	95.4	97.1	98	0.94
Eugenol	86.7*	96.2	98.8	95.4	97	0.9
L(AEE)	96.7	89.7	99.2	96.2	96.9	0.98
M(AEE)	93.3	85.7	97.9	97.5	96.1	1.15
H(AEE)	93.8	56.7*	78.2*	75.0*	87.2	1.53*

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 差异显著

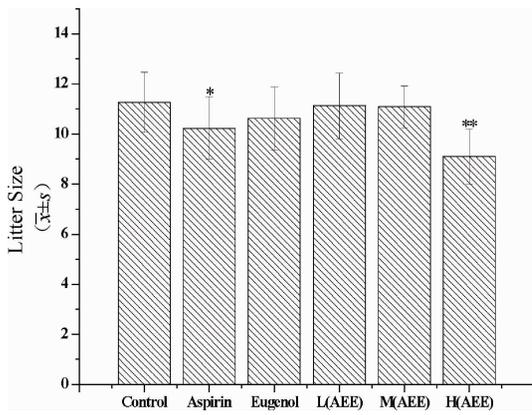
2.4 生长指标 各剂量组的窝产仔数和死亡数如图 2 所示。窝产仔数是大鼠分娩后第一天平均窝产仔鼠,可见 H(AEE) 组和 Aspirin 组大鼠的窝产仔鼠明显偏低($P < 0.05$)。F₁ 代哺乳期时体重生长见图 3,与对照组对比, H(AEE)、M(AEE) 和 Aspirin 组子代大鼠生长缓慢,具有统计学意义($P < 0.05$)。H(AEE) 组子代体重增长最为缓慢,但 M(AEE) 组子代生长状况明显好于 Aspirin 组。

2.5 脏器系数 F₁ 代断乳 20 d 后,亲代大鼠用戊巴比妥钠麻醉,心脏采血后脱臼处死,雌性大鼠分离子宫和卵巢,雄性大鼠分离睾丸和附睾,分别进行称重计算脏器指数,结果见表 2。与空白对照组相比, H(AEE) 组亲代大鼠的附睾和睾丸的脏器系数偏高($P < 0.05$)。F₁ 代断乳后给空白饲料饲喂

三个月后, Aspirin 和 Eugenol 处理组大鼠的子代附睾的系数偏高($P < 0.05$)。

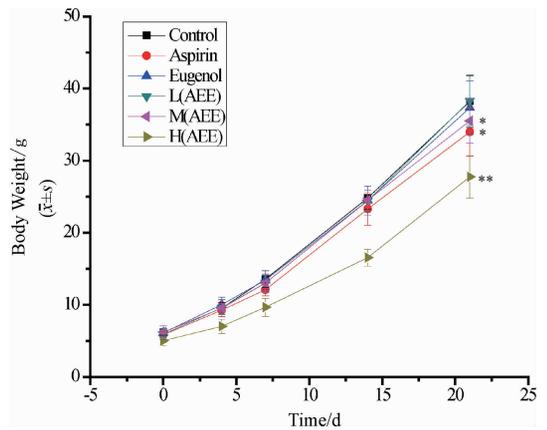
3 讨论与小结

AEE 的剂型研究还正在进行当中,本试验中将 AEE 作为原料药直接添加到大鼠饲料中,通过饲喂的方式给予大鼠。各剂量组妊娠大鼠体重增长与空白对照组比较, H(AEE) 组和 Aspirin 组妊娠大鼠的体重增长缓慢,与溶剂对照组相比差异显著($P < 0.05$)。这表明高剂量的 AEE 和 Aspirin 对胎鼠生长发育有一定影响,这与 AEE 在体内分解为水杨酸和丁香酚有关。与 Aspirin 组等摩尔的 M(AEE) 组与空白对照组相比差异不显著,表明 AEE 对妊娠大鼠产生的毒性比 Aspirin 小。



与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 各剂量组亲代大鼠的每窝产仔数



与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 各剂量组 F_1 代大鼠哺乳期的体重增长

表2 各剂量组亲代和 F_1 代大鼠的主要生殖脏器系数

组别	亲代大鼠				F_1 代大鼠			
	睾丸	附睾	子宫	卵巢	睾丸	附睾	子宫	卵巢
Control	8.01 ± 0.60	3.31 ± 0.37	1.83 ± 0.18	0.63 ± 0.09	9.31 ± 0.85	3.84 ± 0.34	1.85 ± 0.18	0.58 ± 0.054
Aspirin	7.64 ± 0.85	3.37 ± 0.33	1.71 ± 0.18	0.59 ± 0.07	10.13 ± 0.58	4.38 ± 0.50*	1.89 ± 0.15	0.59 ± 0.028
Eugenol	8.43 ± 0.48	3.37 ± 0.38	1.73 ± 0.27	0.52 ± 0.03	9.66 ± 0.93	4.34 ± 0.17*	1.86 ± 0.16	0.54 ± 0.068
L(AEE)	7.82 ± 0.64	3.47 ± 0.21	1.96 ± 0.23	0.62 ± 0.03	9.91 ± 0.83	3.93 ± 0.57	1.85 ± 0.19	0.56 ± 0.060
M(AEE)	8.06 ± 1.01	3.41 ± 0.17	2.02 ± 0.24	0.61 ± 0.08	9.88 ± 0.79	3.87 ± 0.21	1.87 ± 0.25	0.55 ± 0.075
H(AEE)	8.90 ± 1.03*	3.85 ± 0.34*	1.90 ± 0.23	0.56 ± 0.07	9.37 ± 0.77	3.90 ± 0.28	1.91 ± 0.22	0.54 ± 0.065

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 差异显著

各受试药物组大鼠的妊娠率、窝产数、出生活仔率、出生存活率、哺乳存活率、性别比、仔鼠的哺乳期生长等指标与空白对照组比较, 结果得出: 与溶剂对照组相比, H(AEE) 组大鼠妊娠率、窝产数、出生存活率、出生存活率、哺乳存活率和哺乳期仔鼠的体重增长都偏低, 而雄/雌性别比偏高, 这表明当 AEE 为 498.0 mg/kg 时, 会对大鼠的生殖和发育产生影响, 导致大鼠的繁殖能力和哺乳能力较弱。Eugenol 的剂量为 246.0 mg/kg 时会降低大鼠的受孕率, 说明 Eugenol 可能影响合子形成或着床^[11]。M(AEE) 组和 L(AEE) 组的繁殖指标与空白对照组相比差异不明显。

试验结束时, 对雌性大鼠子宫和卵巢, 雄性大鼠睾丸和附睾的脏器指数进行统计分析, H(AEE) 组亲代大鼠的睾丸和附睾脏器系数偏高, 与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 可见长期接触高剂量的

AEE, 会对大鼠的睾丸和附睾产生影响^[12]。 F_1 代大鼠饲喂空白饲料三个月后, 对其睾丸、附睾、子宫和卵巢进行统计学分析, 只有 Aspirin 组和 Eugenol 组 F_1 代大鼠的附睾的脏器指数偏高 ($P < 0.05$), 说明 Aspirin 和 Eugenol 可能会对子代雄性大鼠的生殖系统产生不良影响, 这需要进一步探讨。

以上分析结果表明, 498.0 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 剂量的 AEE 会造成大鼠繁殖指数异常, 影响胚胎的发生及胎儿的发育, 导致自然流产和胎儿发育迟缓。因此, 在本实验的条件下, AEE 对大鼠繁殖毒性的最大无损害作用剂量为 31.1 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 对大鼠的最小有损害作用剂量为 124.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 并且 Aspirin 繁殖毒性最大, AEE 次之, Eugenol 的繁殖毒性最小。此外 Aspirin 和 Eugenol 有可能影响后代的生殖系统。

参考文献:

- [1] 李剑勇. 阿司匹林丁香酚酯药用化合物制剂及其制备方法 [P]. 中国专利: 200810017950. X, 2008-10-01.
- [2] 于远光. 阿司匹林丁香酚酯药理学与毒理学研究及其栓剂的研制 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- [3] Ma N, Liu X W, Yang Y J, *et al.* Preventive effect of aspirin eugenol ester on thrombosis in κ -carrageenan-induced rat tail thrombosis model [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): 1-14.
- [4] Karam I, Ma N, Liu X, *et al.* Regulation effect of aspirin eugenol ester on blood lipids in Wistar rats with hyperlipidemia [J]. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 217.
- [5] Li J Y, Yu Y G, Yang Y J, *et al.* A 15-day oral dose toxicity study of aspirin eugenol ester in Wistar rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(6): 1980-1985.
- [6] Shen Y M, Liu X W, Yang Y J, *et al.* *In vivo* and *in vitro* metabolism of aspirin eugenol ester in dog by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Biomedical Chromatography*, 2015, 29: 129-137.
- [7] *Herbicide Risk Assessment: Clove Oil (Eugenol)* [M]. Marin; Municipal Water District Vegetation Management Plan, 2008.
- [8] 何桂林, 孙周莉, 闫 晗, 等. 如何成功开展药物非临床生殖毒性试验 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(22): 2195-2204.
- [9] 冯忠武. 兽药研究技术指导原则汇编 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 119-122.
- [10] Mesfin Yimam, Y-C L, Eu-Jin Hyun, *et al.* reproductive and developmental toxicity of orally administered botanical composition, UP446-part II: effects on prenatal and postnatal development, including maternal function in Sprague-Dawley rats [J]. *Birth Defects Research*, 2015, 104: 153-165.
- [11] 董竞武, 杨 隽, 洪新宇, 等. 三唑磷原药的大鼠两代繁殖毒性研究 [J]. *癌变畸变突变*, 2012, 24(6): 448-451.
- [12] 孙祖越, 周 莉, 闫 晗, 等. 药物非临床生殖发育毒性试验中逐案原则的建议 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(8): 836-843.
- [13] 董延生, 尹纪业, 陈 长, 等. SD 大鼠脏器重量及脏器系数正常参考值的确立与应用 [J]. *军事医学*, 2012, 36(5): 351-353.

(编辑: 李文平)