

连翘精油急性毒性及其对环磷酰胺致小鼠精子畸形的影响

赵梓含

杭州师范大学药学院 浙江杭州 311100

摘要: **目的:** 测定连翘精油的LD₅₀, 研究连翘精油对环磷酰胺致小鼠精子畸形的保护作用。**方法:** ①急性毒性试验: 设置1700mg/kg、1750mg/kg、1800mg/kg、1850mg/kg四个剂量组, 以花生油为空白对照组, 每组需小鼠六只, 雌雄各半, 禁食12个小时, 于早晨九点以0.1ml/10g灌胃量灌胃给予小鼠, 观察两周, 测定LD₅₀。②保护作用试验: 25只雄性小鼠分为5组, 每组5只, 三个小组以100mg/kg、200mg/kg、400mg/kg以0.1ml/kg灌胃给予连翘精油连续五天, 第6天起与阳性对照组和花生油对照组一起每天用灌胃针给予40mg/kg的环磷酰胺(cp) 0.1ml/kg, 连续5d, 于35天后脱颈椎处死计算精子畸形率。**结果:** ①急性毒性试验: 连翘精油的急性毒性属于无毒。②保护作用试验: 小鼠灌胃给予连翘精油400, 200和100mg·kg⁻¹35d后, cp诱发小鼠精子畸形率分别为64.4%, 58.6%和60.6%, 与阳性对照cp所致小鼠精子畸形率55.5%无明显差异, 说明连翘精油不具有对环磷酰胺致小鼠精子畸形的保护作用。

关键词: 连翘精油; 精子致畸; 保护作用

连翘在我国古时作为一种中药使用, 连翘气微香, 味苦, 其功效有清热解毒、利尿排石等, 对风热感冒、淋巴结结核等有很好的治疗作用。双黄连口服液和连翘解毒片里面也都含有连翘成分, 在医学上的应用十分广泛, 同时也是我国出口的药材^[1]。尚未有连翘精油毒性及其对环磷酰胺致小鼠精子畸形的保护作用方面的研究, 本研究用连翘精油灌胃给予小鼠, 研究连翘精油的急性毒性及其对环磷酰胺所致小鼠的遗传毒性是否有保护作用, 为其作为药品开发提供一些毒性方面的实验依据。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是氮芥类的抗肿瘤药物, 也是一种诱变剂^[2], 作为抗肿瘤药物, 在抗癌化疗方面的应用广泛, 有很高的药用价值, 这类化疗药物虽可杀死肿瘤细胞但本身也具有细胞毒性作用, 能够损害雄性睾丸的生精能力, 严重的还会引起不育^[3]。因此, 寻找对于CP所致损伤具有防护作用的物质, 对于临床上减轻使用CP进行治疗的患者的不良反应以及对于保护职业性接触这种化学物质的人群也有一定意义。

一、材料与方

1. 材料

(1) 实验动物

未交配的昆明小鼠: 雌性昆明小鼠12只、雄性昆明小鼠37只, 实验前进行三天左右的适应性饲喂。饲

养环境: 室温为20 ~ 27℃, 通风环境下, 相对湿度为47% ~ 65%, 自由摄食饮水。

(2) 连翘果实

连翘果实购自甘肃复兴厚生物医药科技有限公司, 批号: 20200201

(3) 主要仪器及试剂

连翘精油 莱阳鲁花浓香花生油有限公司生产的鲁花5s压榨一级花生油 环磷酰胺 生理盐水 甲醛 2%的曙红水溶液

2. 试验步骤

(1) 连翘精油的提取(依据精油执行标准GB/T29990)

称取连翘果实100g, 磨成粉末, 加入500ml蒸馏水(物料比为1: 5), 浸泡3h后^[4], 水蒸气蒸馏提取4h, 将馏液中的水和连翘精油分离(上层连翘精油, 下层为水), 将取得的连翘精油再用无水硫酸铵除水后盛于PE管内, 锡箔纸包裹避光, 保存备用。

(2) 急性毒性试验

测定连翘精油对小鼠的半数致死量的试验方法: 小鼠30只, 随机分成5组, 每组六只, 雌雄各半, 禁食12小时左右(自由饮水)^[5], 禁食后4个小组小鼠分别用灌胃针给予1700, 1750, 1800, 1850mg/kg浓度梯度的连翘精油0.1ml/10g。1个小组给予与实验组相同量(即0.1ml/10g)花生油, 作为空白对照组, 观察14天。

(3) 连翘精油对小鼠精子畸形影响试验

连翘精油对小鼠精子畸形影响试验方法: 取雄性昆明种小鼠25只, 体重20 ~ 25g, 随机分为5组, 每组5

基金项目: 兰州市人才创新项目(2019-RC-121)

作者简介: 赵梓含, 学生, 主要从事药理与毒理学研究。

只。设置连翘精油 100, 200 和 400mg/kg 的浓度梯度三组, 花生油组 (溶剂对照) 和环磷酰胺 40mg/kg (阳性对照) 组, 连翘精油组及溶剂对照组小鼠每天灌胃 1 次, 灌胃量为 0.1ml/10g, 连续 10d, 第 6 天起与阳性对照组一起每天腹腔注射 40mg/kg 环磷酰胺, 每次注射量为 0.1ml/10g, 连续 5d^[6]。各组小鼠于第一次注射连翘精油 35d 后, 脱颈椎处死, 取小鼠两侧附睾, 观察精子, 并计算精子的畸形率。

精子观察方法及畸形精子统计步骤: 小鼠用脱颈椎法处死, 将小鼠双侧附睾取下, 于平皿中加入 1ml 生理盐水并放入取下附睾将其剪碎, 使精子游离并保持活性, 涂片, 待干燥后用甲醛溶液固定 5min, 再用 2% 曙红染色液染色 1 小时 (现用现配), 用蒸馏水冲洗干净, 用滤纸滤干; 将涂片放置于光学显微镜油镜下观察完整精子, 每只小鼠观察 100 个精子, 并记录各类型畸形精子的数目, 计算精子畸变发生率^[7, 8, 9]。

二、结果与分析

1. 试验结果

(1) 急性毒性试验结果

小鼠 ig 给予连翘精油后, 初始食量和饮水量明显下降, 后逐渐恢复至正常饮水量。体重变化与空白对照组无明显差异 (表 1)。14 天后, 小鼠无死亡情况, 说明连翘精油急性毒性属于无毒。

表 1 连翘精油急性毒性实验对体重的影响及死亡情况

组别	剂量组 (mg/kg)	初重 (g)	末重 (g)	增重 (g)	死亡情况 (只)
雄	溶剂组	29.8	41.7	11.9	0
	1700	31.1	42.1	11.0	0
	1700	32.8	44.1	11.3	0
	1800	32	46.3	14.3	0
	1800	30.8	43.5	12.7	0
雌	溶剂组	21.6	28.9	8.3	0
	1700	21	28.1	8.1	0
	1700	17.6	26.1	8.5	0
	1800	21.6	28.6	8	0
	1800	19.8	28.8	9	0

(2) 连翘精油致小鼠精子畸形影响试验结果

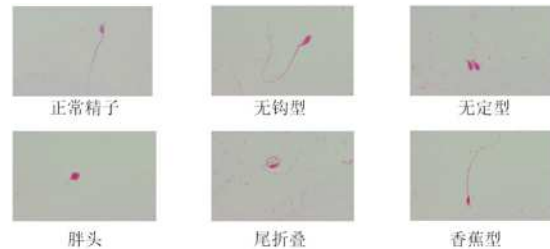
表 2 精子畸形实验组精子畸形类型统计

剂量组	无钩	香蕉形	无定形	胖头	尾折叠	双头	双尾	合计
花生油+CP	19	187	67	1	36	0	0	310
剂量 100+CP	14	156	56	5	72	0	0	303
剂量 200+CP	15	167	34	28	49	0	0	293
剂量 400+CP	12	183	45	29	53	0	0	322
CP	18	133	65	5	56	0	0	277

表 3 精子畸形影响试验组精子数量及畸形率统计

剂量组	畸形精子数	正常精子数	合计	畸形率 (%)
花生油+CP	310	190	500	62
剂量 100+CP	303	197	500	60.6
剂量 200+CP	293	207	500	58.6
剂量 400+CP	322	178	500	64.4
CP	277	223	500	55.4

精子类型



小鼠 ig 给予连翘精油 400, 200 和 100mg·kg⁻¹35d 后, CP 诱发小鼠精子畸形率分别为 64.4%, 58.6% 和 60.6%, 与阳性对照 CP 所致小鼠精子畸形率 55.5% 无明显差异, ig 给予花生油 62% 也明显差异 (表 3)。说明连翘精油不可降低 CP 致小鼠精子畸形率, 花生油也无此作用, 因此连翘精油对小鼠精子畸形无影响。

三、讨论

环磷酰胺作为免疫抑制剂, 可以用来治疗机体一些免疫方面的疾病。虽然环磷酰胺类的药物可以杀死肿瘤细胞, 但是本身也具有一定的细胞毒性作用, 会损害男性睾丸生精能力, 甚至导致不育。

连翘精油是一种天然防腐剂, 具有抗菌保鲜的功效, 并且具有很高的药用价值, 具有抑菌消炎、抑制病毒等功效。连翘的药用部位是其果壳, 而富含精油且占连翘大部分的果实往往被丢弃^[10], 实在是资源的浪费, 如若提取连翘果实中的精油并对其药用食用价值进行相关研究, 不仅有利于促进连翘资源的综合利用, 而且还为其作为药品开发提供一些方面的实验依据。

在本次实验研究中, 急性毒性实验结果显示连翘精油只会引起小鼠饮水摄食量减少, 并不具有毒性, 对环磷酰胺引起的精子畸形率不具有影响作用。关于连翘精油的毒性研究, 还需进一步进行慢性毒性研究, 对于环磷酰胺副作用的拮抗药剂, 还需进行进一步的研究。

参考文献:

[1] 牛群. 连翘的丰产栽培技术及其药用价值分析[J]. 农业与技术. 2016 (12)

- [2]余永莉, 王传铜, 冯国纹, 等. 桉叶油毒性及其对环磷酰胺致小鼠骨髓微核及精子畸形的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24 (06): 525-528.
- [3]丁越, 徐晓宇, 王亚非, 等. 淫羊藿生物碱对环磷酰胺引起的雄鼠生殖系统损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2021
- [4]吴子龙, 赵昕, 叶嘉, 等. 连翘精油的提取及其抗菌保鲜效果的研究[J]. 北方园艺, 2016 (11): 131-134.
- [5]石晓红, 遇艳萍, 王林和, 等. 臭柏精油对小鼠的急性毒性试验[J]. 农产品加工(学刊), 2013 (15): 17-18+20.
- [6]王怡菲, 曹楠, 许丹宁, 等. 不同剂量环磷酰胺对昆明小鼠肝肾组织的损伤作用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48 (02): 695-703.
- [7]朱嘉伟, 王俊, 周欢欢, 等. 甲醛慢性吸入暴露致小鼠精子畸形[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34 (06): 495-497.
- [8]胡怡秀, 刘秀英, 易传祝, 等. 苦瓜水提取物对小鼠的急性经口毒性和遗传毒性实验研究[J]. 中国预防医学杂志, 2008, 9 (2): 101-104]
- [9]林云, 陈润, 赵康涛, 等. 黑果枸杞的遗传毒性研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2021, 27 (01): 58-60.
- [10]袁岸, 赵梦洁, 李燕, 等. 连翘的药理作用综述[J]. 中药与临床, 2015, 6 (05): 56-59.