

桉叶油对环磷酰胺致大鼠胚胎毒性的保护作用

余永莉, 冯国纹, 唐于川, 兰美兵, 张宏, 赵晟珣, 李啸红(遵义医学院珠海校区人体解剖与组织胚胎教研室, 广东 珠海 519041)

摘要: 目的 探讨桉叶油对环磷酰胺致大鼠胚胎毒性的保护作用。方法 取孕鼠 25 只, 随机分成 5 组, 3 个实验组(桉叶油低、中、高剂量组), 溶剂对照组(花生油组), 阳性对照组(环磷酰胺组)。大鼠妊娠第 10 天开始, 实验组分别用 100, 200, 300 mg·kg⁻¹ 桉叶油灌胃, 溶剂对照组每只用 2 mL 花生油灌胃, 每天 1 次, 连续 5 d。阳性对照组于孕第 13 天腹腔注射 12.5 mg·kg⁻¹ 环磷酰胺 1 次。各组孕鼠于孕第 19 天处死取胚胎, 记录孕鼠的体重、子宫重、卵巢重、胎盘重。计胚胎植入的总数、吸收胎数、活胎数、死胎数。观察胚胎外形, 并测量胎鼠体重、身长、尾长。另取孕鼠 25 只, 动物分组同前。实验组和溶剂对照组于孕第 10 天分别用桉叶油和花生油开始灌胃, 用药剂量同前, 连续灌胃 8 d。各组于第 13 天注射 12.5 mg·kg⁻¹ 环磷酰胺 1 次, 孕第 19 天处死取胚胎, 记录观察指标同前。结果 ①桉叶油灌胃孕鼠后, 孕鼠的体重增重、子宫重、卵巢重、胎盘重与溶剂对照组比较均无显著性差异($P>0.05$)。胚胎植入总数、吸收胎率、活胎率、死胎率与溶剂对照组相比均无显著性差异($P>0.05$)。桉叶油各组活胎鼠平均体重、身长、尾长均较溶剂对照组高, 但只有桉叶油高剂量组胎鼠平均体重与溶剂组比有显著性差异($P<0.05$)。其余组的指标与溶剂对照组比无显著性差异($P>0.05$)。阳性对照组胎鼠平均体重、尾长明显低于溶剂组, 有显著性差异($P<0.05$)。阳性对照组胎鼠平均身长低于溶剂组, 但无显著性差异($P>0.05$)。②100, 200, 300 mg·kg⁻¹ 桉叶油灌胃孕鼠 8 d 后, 环磷酰胺诱发的胚胎畸胎率、死胎率明显低于未灌胃桉叶油的阳性对照组, 有显著性差异($P<0.05$)。实验组胎鼠平均体重、尾长均高于未灌胃桉叶油的阳性对照组, 有显著性差异($P<0.05$)。结论 本实验条件下, 桉叶油对孕鼠胚胎无胚胎发育毒性, 同时具有拮抗环磷酰胺诱发胚胎畸形的作用。

关键词: 桉叶油; 胚胎毒性; 环磷酰胺; 保护作用

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)03-0189-05

Protection Effects of Eucalyptus on Embryonic Developmental Toxicity in Rats Treated by Cyclophosphamide

YU Yongli, FENG Guowen, TANG Yuchuan, LAN Meibing, ZHANG Hong, ZHAO Shengxun, LI Xiaohong(Department of Anatomy and Histology and Embryology, Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protection effects of eucalyptus on embryonic developmental toxicity in rats treated by cyclophosphamide. **METHODS** ①Twenty-five pregnant rats were randomly divided into 5 groups: three experiment groups (high, medium, low doses of eucalyptus group), negative control group (peanut oil group), positive control group (cyclophosphamide group). Three experiment groups and negative control group were administrated from the 10th to 14th day of gestation with eucalyptus in 100, 200, 300 mg·kg⁻¹·d⁻¹ and peanut oil 2 mL per animal per day respectively, while positive control group was ip with 12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ cyclophosphamide at the 13th day of gestation. All pregnant rats were sacrificed at the 19th day. The body, uterus, ovary and placenta weights of the pregnant rats were measured respectively. The numbers of absorbed, live and dead fetus were counted, respectively. The length for fetus body and tail as well as body weights were measured. Another 25 pregnant rats were randomly divided into 5 groups like ①. Three experiment groups and negative control group pregnant rats were administrated from the 10th to 17th day of gestation with eucalyptus in doses like ①. All groups was ip with 12.5 mg·kg⁻¹ cyclophosphamide on the 13th day of gestation and sacrificed on the 19th day. Observed and noted target like ①. **RESULTS** ①After administration of eucalyptus (100, 200, 300 mg·kg⁻¹) for 5 days. The body, uterus, ovary and placenta weights of pregnant rats showed no significant difference compared with negative control group ($P>0.05$). The numbers for absorbed, live and dead fetus also showed no significant difference compared with negative control group ($P>0.05$). All of the fetus body weights, body length and tail length were larger in the treated groups than those in the negative control group. But only high doses of eucalyptus group's fetus weight of body showed difference compared with negative control group ($P<0.05$), others had no significant difference ($P>0.05$). The fetus body weight, tail length in the positive control group were lower than those in the negative control group ($P<0.05$), but the fetus body length showed no significant difference compared with negative control group ($P>0.05$). ②Eucalyptus administration 8 days could dramatically decrease the rate of abnormal embryo and dead fetus induced by cyclophosphamide compared with the group without administration

基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2008]2193)

作者简介: 余永莉, 女, 硕士, 副教授 Tel: (0756)7623354

E-mail: yuyongli5088@sina.com

($P<0.05$). **CONCLUSION** Under the experimental condition, eucalyptus showed no embryonic developmental toxicity, and it can restrain embryonic developmental toxicity in rats induced by cyclophosphamide.

KEY WORDS: eucalyptus; embryonic developmental toxicity; cyclophosphamide; protection

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是临床上常用的氮芥类的抗肿瘤药物,进入人体后在肝脏或血液中经活化生成烷基化的代谢产物,进而发挥抗肿瘤的作用,其主要的不良反应是严重损伤骨髓细胞的造血功能,引起白细胞减少^[1],导致感染等严重后果,影响治疗效果。同时其也是一种诱变剂,可明显诱发骨髓细胞微核和姐妹染色单体互换导致染色体畸变,具有一定的遗传毒性。动物实验中其常为研究遗传毒性和生殖毒性实验阳性对照组模型的造模剂^[2]。因此,寻找对 CP 所致损伤具有防护作用的物质,为减轻临床上使用 CP 所致不良反应具有重要意义,对于保护职业性接触这种化学物质的人群也有一定意义。

桉树在我国西南部和南部种植广泛,桉叶无论是在中国还是在其他种植地区都是民间常用的草药。桉叶可提取桉叶油(eucalyptus),主要化学成分是萜类,萜醇、醚、酮和酯等含氧化合物,具有挥发性,是医药、香料和化学工业的重要原料,也是常用的食品添加剂。其药理作用有抗菌、抗氧化、抗炎、促渗、杀虫驱蚊及防腐^[3-9]。本研究用桉叶油灌胃大鼠,研究桉叶油的胚胎毒性及其对 CP 所致大鼠的胚胎毒性是否有保护作用,为其作为食品添加剂、香料或药品提供一些实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 大鼠,♀♂兼用,普通级,广东省医学实验动物中心,合格证号:SCXK(粤)2008-0004,饲养条件:室温为 24~27℃,通风,相对湿度为 68%~80%,每日光照 12 h,自由摄食饮水。

1.2 药品及试剂

桉叶油(桉叶素99.5%)购自德信行(珠海)香精香料有限公司,批号:H071126,用花生油配制成实验用药剂量。环磷酰胺粉剂购自山西普德药业有限公司,批号:08061521。

1.3 桉叶油对大鼠胚胎的影响

1.3.1 动物分组及用药 选择体重为230~250 g的大鼠50只,♀;体重为250~300 g的大鼠25只,♂,♀:♂按2:1合笼,次日早晨查见阴栓者定为孕第0天。取孕鼠25只,随机分为5组,每组5只。3个实验组(桉叶油低、中、高剂量组),溶剂对照组(花生

油组),阳性对照组(CP组)。大鼠妊娠第10天开始,实验组分别用100, 200, 300 mg·kg⁻¹桉叶油灌胃,溶剂对照组每只用2 mL花生油灌胃,每天1次,连续灌胃5 d。阳性对照组在怀孕第13天腹腔注射12.5 mg·kg⁻¹CP 1次^[10]。

1.3.2 孕鼠的观察 观察孕鼠的一般状态、毛发、活动、摄食情况,各组孕鼠于孕第19天,称重,深麻醉后,解剖腹部,记录子宫重、卵巢重、胎盘重。

1.3.3 胚胎植入、致畸与发育情况观察 各组孕鼠于孕第19天,称重,深麻醉后,解剖腹部,暴露子宫,剥离、取出胚胎。记录活胎、死胎、吸收胎数及植入胚胎总数,计算出吸收胎率与死胎率(吸收胎率=吸收胎数/植入胚胎总数,死胎率=死胎数/植入胚胎总数)^[11]。观察判定胚胎畸形,记录畸胎数并计算畸胎率(畸胎率=畸胎数/活胎总数)^[11]。记录每个活胎体重、身长、尾长。

1.4 桉叶油对CP致大鼠胚胎毒性的保护作用

1.4.1 动物分组及用药 选择体重230~250 g的大鼠50只,♀;体重250~300 g的大鼠25只,♂,♀:♂按2:1合笼,次日早晨查见阴栓者定为孕第0天。取孕鼠25只,随机分为5组,每组5只。3个实验组(桉叶油低、中、高剂量+CP组),溶剂对照组(花生油+CP组),阳性对照组(CP组)。大鼠妊娠第10天开始,实验组分别用100, 200, 300 mg·kg⁻¹桉叶油灌胃,溶剂对照组每只用2 mL花生油灌胃,连续灌胃8 d,每天1次。各组在怀孕的第13天腹腔注射12.5 mg·kg⁻¹CP 1次。

1.4.2 胚胎植入、致畸与发育情况 观察项目同“1.3.3”项下内容。

1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,两组比较,SPSS11.0 软件进行统计处理。

2 结果

2.1 桉叶油对大鼠胚胎的影响

2.1.1 桉叶油对孕鼠的影响 各组孕鼠未见明显的外观异常,被毛有光泽,活动佳,摄食正常,大便正常。各组孕鼠从用药到处死期间体重增重、子宫重、卵巢重、活胎胎盘重无显著性差异($P>0.05$)。结果见表1。

表 1 桉叶油对孕鼠的影响($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effect of eucalyptus on the pregnant rats($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	孕鼠 10~19 d 增重/g	子宫重/g	卵巢重/g	活胎胎盘重/g
溶剂对照组	45.86±22.77	3.50±1.212	0.16±0.029	0.59±0.254
桉叶油低剂量组	42.82±17.09	3.94±1.106	0.13±0.023	0.43±0.034
桉叶油中剂量组	43.04±8.25	4.06±0.137	0.14±0.021	0.43±0.029
桉叶油高剂量组	27.60±9.06	3.54±1.088	0.13±0.023	0.47±0.059
阳性对照组	36.28±14.06	2.31±0.768	0.29±0.046	0.29±0.089

表 2 桉叶油对大鼠胚胎植入的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The effect of eucalyptus on rat embryo implantation($\bar{x} \pm s$)

组别	溶剂对照组	桉叶油低剂量组	桉叶油中剂量组	桉叶油高剂量组	阳性对照组
孕鼠数/只	5	5	5	5	5
植入胚胎总数/个	61	59	55	45	47
平均植入数/个	12.2±4.43	11.8±2.19	11.0±2.34	9.0±2.24	9.4±0.89
活胎总数/个	51	58	51	41	30
每窝活胎均数/个	10.2±50.6	11.6±2.04	10.2±1.78	8.2±2.68	6.0±2.00 ¹⁾
活胎率/%	79.5±29.77	93.1±4.06	73.8±10.02	90.7±10.36	65.3±25.26 ¹⁾
吸收胎总数/个	10	1	4	4	13
每窝吸收胎均数/个	2.0±2.34	0.2±0.44	0.8±1.30	0.8±0.83	2.6±2.30
吸收胎率/%	20.5±29.75	1.8±4.06	6.1±10.02	9.3±10.36	26.2±22.83
畸形总数/个	0	0	0	0	23
每窝畸形胎均数/个	0	0	0	0	4.6±1.51 ¹⁾
畸形率/%	0	0	0	0	80.7±23.64 ¹⁾
死胎总数/个	0	0	0	0	4
每窝死胎均数/个	0	0	0	0	0.8±0.83 ¹⁾
死胎率/%	0	0	0	0	8.5±8.58 ¹⁾

注：与溶剂对照组比较，¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with solvent control group, ¹⁾ $P<0.05$

2.1.3 桉叶油对大鼠胚胎生长发育的影响 用高、中、低剂量的桉叶油灌胃孕鼠 5 d 后，各组活胎鼠平均体重均较溶剂组高，桉叶油高剂量组胎鼠平均体重与溶剂对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。阳性对照组胎鼠平均体重和尾长明显低于溶剂对照组，具有显著性差异($P<0.05$)，结果见表 3。说明桉叶油对大鼠胚胎的发育有积极的影响。CP 对大鼠胚胎的发育有不良影响，有胚胎毒性。

表 3 桉叶油对大鼠胚胎生长发育主要指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The effect of eucalyptus on growth and development of rat embryo($\bar{x} \pm s$)

组别	活胎数/n	胎鼠体重/g	胎鼠身长/mm	胎鼠尾长/mm
溶剂对照组	51	1.462±0.397	24.06±2.960	10.05±1.337
桉叶油低剂量组	58	1.940±0.462	27.37±2.797	10.85±1.738
桉叶油中剂量组	51	1.602±0.274	25.27±1.840	10.32±1.383
桉叶油高剂量组	41	2.318±0.606 ¹⁾	28.29±3.710	10.97±0.973
阳性对照组	30	0.980±0.096 ¹⁾	22.10±2.107	7.25±1.741 ¹⁾

注：与溶剂对照组比较，¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with solvent control group, ¹⁾ $P<0.05$

2.1.2 桉叶油对大鼠胚胎植入、外观畸形的影响 桉叶油各组活胎数与溶剂对照组比较无显著性差异，活胎体形完好，肤色红润，刺激运动反应良好；植入胚胎中没有死胎和畸形胎。阳性对照组活胎体形总体较桉叶油各组溶剂对照组小，肤色也不够红润，偏暗红色，可见脑膜膨出，短肢，短尾，并趾等畸形胎和死胎。其死胎率和畸形胎率明显高于溶剂对照组，具有显著性差异($P<0.05$)，结果见表 2。说明桉叶油对大鼠胚胎植入和胚胎外形无明显的影响；CP 具有干扰大鼠胚胎植入和致胚胎畸形的不良影响。

2.2 桉叶油对 CP 致大鼠胚胎毒性的保护作用

2.2.1 桉叶油对 CP 作用过孕鼠的影响 各组孕鼠未见明显的外观异常，被毛有光泽，活动佳，摄食正常，大便正常。桉叶油高剂量+CP 组孕鼠体重增量明显高于阳性对照组，具有显著性差异($P<0.05$)，结果见表 4。

表 4 桉叶油对 CP 作用过孕鼠的影响($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of eucalyptus on the pregnant rats induced by cyclophosphamide($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	孕鼠 10~19 d 增重/g	子宫重/g	卵巢重/g	活胎胎盘重/g
阳性对照组	36.28±14.064	2.31±0.768	0.29±0.046	0.29±0.089
溶剂对照组	53.47±9.513	2.34±0.438	0.12±0.046	0.30±0.068
桉叶油低剂量+CP 组	43.34±14.418	3.23±0.519	0.13±0.019	0.33±0.049
桉叶油中剂量+CP 组	39.43±8.801	2.24±0.469	0.09±0.021	0.26±0.014
桉叶油高剂量+CP 组	66.96±7.841 ¹⁾	2.82±0.469	0.13±0.089	0.41±0.032

注：与阳性对照组比较，¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with positive control group, ¹⁾ $P<0.05$

2.2.2 桉叶油对 CP 干扰大鼠胚胎植入、诱发胚胎外观畸形的影响 桉叶油高剂量+CP 组活胎体形完好, 肤色红润, 刺激运动反应良好, 没有发现脑膜膨出, 短肢, 短尾, 并趾等畸形胎和死胎, 其他各组可见不同数量死胎和畸形胚胎。但

实验组活胎数明显高于阳性对照组, 具有显著性差异($P<0.05$)。实验组死胎率和畸胎率均明显低于 CP 组, 具有显著性差异($P<0.05$), 结果见表 5。说明桉叶油具有拮抗 CP 对胚胎的植入干扰和致畸作用。

表 5 桉叶油对 CP 干扰大鼠胚胎植入的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 The effect of eucalyptus on embryo implantation induced by cyclophosphamide in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	阳性对照组	溶剂对照组	桉叶油低剂量+CP组	桉叶油中剂量+CP组	桉叶油高剂量+CP组
孕鼠数/只	5	5	5	5	5
植入胚胎总数/个	47	49	55	56	60
平均植入数/个	9.4±0.89	9.8±3.49	11.0±1.87	11.2±1.92	12.0±2.45 ¹⁾
活胎总数/个	30	39	52	50	50
每窝活胎均数/个	6.0±2.00	7.8±1.10	10.4±2.30 ¹⁾	10.0±2.00 ¹⁾	10.0±2.24 ¹⁾
活胎率/%	65.3±25.26	85.0±22.36 ¹⁾	94.2±8.9 ¹⁾	92.9±5.00 ¹⁾	84.1±14.85 ¹⁾
吸收胎总数/个	13	6	2	5	10
每窝吸收胎均数/个	2.6±2.30	1.2±1.79	0.4±0.55	1.0±0.71	2.0±2.00
吸收胎率/%	26.2±22.83	12.5±21.65	19.1±3.82	7.1±5.00	15.9±14.85
畸胎总数/个	23	36	19	27	0
每窝畸胎均数/个	4.6±1.52	7.2±1.64	3.8±2.68	5.4±0.89	0 ¹⁾
畸胎率/%	80.7±23.64	92.5±16.77	35.3±19.96 ¹⁾	52.9±14.15 ¹⁾	0 ¹⁾
死胎总数/个	4	6	1	0	0
每窝死胎均数/个	0.8±0.84	1.2±2.68	0.2±0.45 ¹⁾	0 ¹⁾	0 ¹⁾
死胎率/%	8.5±8.59	7.5±16.77	2.0±4.47 ¹⁾	0 ¹⁾	0 ¹⁾

注: 与阳性对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with positive control group, ¹⁾ $P<0.05$

2.2.3 桉叶油对 CP 作用后大鼠胚胎生长发育的影响 桉叶油高剂量+CP 组活胎鼠平均体重和尾长与阳性对照组比较有显著性差异($P<0.05$), 结果见表 6。说明桉叶油对 CP 的胚胎毒性有一定的拮抗作用。

表 6 桉叶油对 CP 作用后大鼠胚胎生长发育主要指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 6 The effect of eucalyptus on growth and development of rat embryo induced by cyclophosphamide($\bar{x} \pm s$)

组别	活胎数/n	胎鼠体重/g	胎鼠身长/mm	胎鼠尾长/mm
阳性对照组	30	0.98±0.096	22.10±2.107	7.25±1.741
溶剂对照组	39	1.05±0.055	21.33±0.932	7.66±0.767
桉叶油低剂量+CP组	52	1.11±0.073	22.73±0.947	8.59±0.305
桉叶油中剂量+CP组	50	1.05±0.039	22.39±1.075	8.22±0.482
桉叶油高剂量+CP组	50	1.40±0.086 ¹⁾	23.83±0.735	9.88±0.028 ¹⁾

注: 与阳性对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with positive control group, ¹⁾ $P<0.05$

3 讨论

在预实验中, 300 mg·kg⁻¹ 桉叶油灌胃孕鼠 2 周, 胚胎生长发育各项指标与溶剂对照组比较无显著性差异, 但与阳性对照组比较有显著性差异($P<0.05$), 提示桉叶油对大鼠无胚胎毒性, CP 对大鼠有胚胎毒性。同时发现桉叶油高剂量组胎鼠平均体重与溶剂对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。推

测此现象可能是因为摄取过多的花生油对孕鼠的胚胎植入和胎鼠的生长发育产生了不良影响, 桉叶油对此不良影响可能有一定的拮抗作用。基于这种推测, 本研究设计用桉叶油灌胃胚胎毒性强的 CP 作用过的孕鼠, 观察桉叶油对 CP 致畸作用的影响。实验表明桉叶油对 CP 致大鼠胚胎毒性有一定的拮抗作用。至于桉叶油拮抗 CP 致大鼠胚胎毒性的作用机制, 还有待深入研究。

REFERENCES

- [1] WANG X Y, LIANG Q J. Recent progress in research on toxicological mechanism of cyclophosphamide and the improving measures [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2006, 30(10): 252-256.
- [2] JIA Q J, LIU T P, GUO K L, et al. Effect on testicular germ cell after exposure to cyclophosphamide in mice [J]. J Bethune Mil Med Coll(白求恩军医学院学报), 2006, 4(2): 70-71.
- [3] RAMEZANI H, SINGH H P, BATISH D R, et al. Antifungal activity of the volatile oil of eucalyptus citriodora [J]. Fitoterapia, 2002, 73(3): 261-262.
- [4] BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 94(3): 223-253.
- [5] CIMANGA K, KAMBU K, TONA L, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo [J]. J Ethnopharmacol, 2002, 79(2): 213-220.

- [6] GRASSMANN J, HIPPELI S, DORNISCH K. Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects [J]. *Arzneimittelforsch*, 2000, 50(2): 135-139.
- [7] SILVA J, ABEBE W, SOUSA S M, et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus* E [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 89(2/3): 277-283.
- [8] EL-GHORAB A H, EL-MASSRY K F, MARX F, et al. Antioxidant activity of Egyptian *eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf extracts [J]. *Nahrung*, 2003, 47(1): 41-45.
- [9] DESSÍ M A, DEIANA M, ROSA A, et al. Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia [J]. *Phytother Res*, 2001, 15(6): 511-518.
- [10] ZHAO H Y, XIAO R, YANG Y, et al. Experimental study on rats' neural tube defects caused by cyclophosphamide and its mechanism [J]. *China J Public Health*(中国公共卫生学报), 2002, 18(11): 1302-1304.
- [11] LI Y, ZHANG T B. *Developmental Toxicology Research Methods and Experimental Techniques* (发育毒理学研究方法和实验技术) [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2000: 145.

收稿日期: 2010-06-04