

新橙皮苷对大鼠胚胎-胎仔发育的毒性研究

邵燕飞¹, 林春琴², 钱仁云², 沈晓飞², 袁晨星², 王丹丹², 戴洁露², 翁勤洁^{2*} (1.浙江省人民医院, 杭州医学院附属人民医院, 杭州 310014; 2.浙江大学药物安全评价研究中心, 杭州 310058)

摘要: 目的 评价新橙皮苷对大鼠胚胎-胎仔发育的毒性。方法 妊娠大鼠根据妊娠第0天(gestation day 0, GD0)和体重采用分层随机法分成5组: 对照(0.5%羧甲基纤维素钠)组, 环磷酰胺(12 mg·kg⁻¹)组, 新橙皮苷低、中、高(0.45, 0.9, 1.8 g·kg⁻¹)3个剂量组。妊娠鼠于GD6开始给药至GD15。实验期间, 每周至少测定2次体重和1次摄食量。GD20处死妊娠鼠, 对黄体、着床腺、胎仔、胎盘等情况进行检查。结果 试验期间, 各组动物临床症状观察均未见明显异常。与对照组相比, 新橙皮苷各剂量组动物体重未见明显改变, 环磷酰胺组动物增重减缓; 新橙皮苷各剂量组黄体、着床、活胎、吸收胎、死胎计数均未见明显改变, 环磷酰胺组子宫重量下降; 新橙皮苷高剂量组胎仔身长降低, 环磷酰胺组身长、尾长、重量及胎盘重均降低; 新橙皮苷各剂量组胎仔外观检查未见给药相关改变, 环磷酰胺组主要可见全身浮肿、头、耳、面、肢、指趾等改变。胎仔内脏检查中, 新橙皮苷各剂量组分别可见1例脑室改变, 中、高剂量组分别可见2例和1例食管扩张; 环磷酰胺组可见膈、脑室、食管、睾丸附睾等改变。骨骼检查中, 新橙皮苷可延缓顶骨、胸骨的骨化, 可能影响下颌骨、颈椎、腰椎、耻骨、枕骨和肋骨的骨化。环磷酰胺12 mg·kg⁻¹对颅骨、脊椎骨、肋骨、胸骨、掌骨等的骨化均有所影响。结论 新橙皮苷给药后, 对母体未产生明显毒性反应, 未观察到临床不良反应的剂量水平(NOAE)为1.8 g·kg⁻¹; 对胚胎-胎仔的发育毒性主要表现为延缓骨骼如顶骨、胸骨等的骨化外, 还可能影响脑部和食管的发育, NOAE<0.45 g·kg⁻¹。

关键词: 新橙皮苷; 发育毒性; 胚胎-胎仔发育

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2018)12-1782-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.12.006

引用本文: 邵燕飞, 林春琴, 钱仁云, 等. 新橙皮苷对大鼠胚胎-胎仔发育的毒性研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(12): 1782-1785.

Embryo and Fetal Developmental Toxicity Study of Neohesperidin in Rats

SHAO Yanfei¹, LIN Chunqin², QIAN Renyun², SHEN Xiaofei², YUAN Chenxing², WANG Dandan², DAI Jielu², WENG Qinjie^{2*} (1.Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China; 2.Center for Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate embryo and fetal developmental toxicity of neohesperidin in rats. **METHODS** According to gestation day 0(GD0) and bodyweight, dams were stratified randomly assigned to 5 groups, as control group(0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution), cyclophosphamide group(12 mg·kg⁻¹), neohesperidin low, middle and high dose group(0.45, 0.9, 1.8 g·kg⁻¹). Dams were administrated from GD6 to GD15. Bodyweight and food consumption were gained twice and once per week, respectively. At GD20, dams were killed for examination of corpus luteum, implantation, fetal, placenta and so on. **RESULTS** During study, no abnormal behavior was observed for each group. Compared with the control group, no significant difference was found on bodyweight in each neohesperidin groups, but it decreased in cyclophosphamide group on bodyweight gain. No significant difference was found between control group and 3 neohesperidin groups on corpora luteum, implantation, fetals, placenta and thouse correlative percentage. Uterus weight in cyclophosphamide group decreased. Compared with the control group, body length in neohesperidin high dose group group reduced, body length, tail length, bodyweight and placenta weight decreased in cyclophosphamide group. For examination of external alterations, no change relative to administration in each neohesperidin groups. Changes on anasarca, head, ear, face, limb and digit was found in cyclophosphamide group. For examination of soft tissue alterations, each 1 case ventricle disease was found in neohesperidin groups, 2 cases and 1 case esophagectasia were noted in medium and high dose group, respectively. In cyclophosphamide group, there were changes such as palate, ventricles disease, esophagus, testis and epididymis and so on. For examination of skeletal, the ossification of parietal and sternebra were delayed by neohesperidin as well as ossification might be affected on mandible, cervical and lumbar vertebra, pubis, occipital bone and rib. Cyclophosphamide 12 mg·kg⁻¹ affected the ossification of skull, vertebra, rib, sternebra and metacarpal. **CONCLUSION** No toxicity of neohesperidin was found on dams, and no observed adverse effect level(NOAE) was 1.8 g·kg⁻¹. Main toxicity of neohesperidin on embryo and fetal developmental was the delay of ossification such as parietal and sternebra, it also might affect development of brain and esophageal, NOAE was lower than 0.45 g·kg⁻¹.

KEYWORDS: neohesperidin; developmental toxicity; embryo and fetal developmental

作者简介: 邵燕飞, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)85893117 E-mail: shaoyanfei3@sina.com
Tel: (0571)88208076 E-mail: wengqinjie@zju.edu.cn

*通信作者: 翁勤洁, 男, 博士, 副教授

新橙皮苷是一种天然黄酮类化合物,主要存在于芸香科和茜草科植物中。现有研究发现,新橙皮苷具有广泛的药理活性,包括骨质疏松抑制^[1]、降糖降脂^[2-4]、促进胃部消化、保护心血管^[5-6]、抗氧化^[7]和自由基介导抑制、抗过敏^[8]、抗菌^[9]和抗肿瘤等。本试验旨在研究新橙皮苷对大鼠胚胎-胎仔发育的毒性影响,为新橙皮苷进一步安全性评价和临床研究提供理论基础和实验依据^[10-12]。

1 仪器与试剂

Pb1501-L/AL104/XS205 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO); DM1000 显微镜、MZ95/S8APO 解剖显微镜(德国 Leica); Option S7 纯水仪(英国 ELGA)。

新橙皮苷(南京泽朗医药科技有限公司,批号:ZL20130315YY;含量 98.47%,配制方法:取新橙皮苷粉末,研磨后加入 0.5%的 CMC-Na 配制成浓度为 0.18, 0.09, 0.045 g·mL⁻¹ 的混悬液);注射用环磷酰胺(CP,江苏恒瑞制药有限公司,批号:13041125);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号:F20110211);0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业有限公司);水为超纯水。

2 动物与饲养

SPF 级 SD 大鼠,♂(17~19 周)55 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001,动物合格证编号:11400700017339;♀(9~11 周)110 只,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(沪)2008-0016,动物合格证编号:2008001634226。实验期间,饲养室温度 20~26℃,湿度 40~70%,光照为 12 h 明暗交替(8:00~20:00)。饲料为经钴 60 辐照灭菌的 SPF 大小鼠生长繁殖饲料,由北京科澳协力饲料有限公司提供;原木垫料由北京科澳协力饲料有限公司提供,经高温高压消毒灭菌后使用;动物饮用水为城市居民饮用水,由杭州祥符水厂提供,经高温高压消毒灭菌后使用。

3 方法

3.1 分组与给药

动物入室饲养 7 d,♂和♀按 1:1 或 1:2 进行交配,交配期每天进行阴道涂片检查,发现阴道有精子或阴栓的当天为妊娠第 0 天(gestation day 0, GD0)。

妊娠动物根据交配成功日期和体质量采用分层随机法分为对照组、新橙皮苷 1.8, 0.9, 0.45 g·kg⁻¹ 组和环磷酰胺 12 mg·kg⁻¹ 组,每组至少

20 只。对照组和新橙皮苷给药组于 GD6~15 每天灌胃给予 0.5% CMC-Na 和不同浓度的新橙皮苷混悬液,容量为 10 mL·kg⁻¹;环磷酰胺组动物于 GD12 皮下注射 2 mL·kg⁻¹ 的环磷酰胺。

3.2 临床症状观察与体质量摄取

每天记录动物活动等行为状态和死亡情况。妊娠动物分别于 GD0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 20 称重。每周测定 1 次 72 h 摄食量。

3.3 大体解剖观察

妊娠动物于 GD20 处死,进行大体解剖观察,并计数黄体 and 检查子宫内容物。从左侧子宫角上方至子宫颈,右侧子宫角上方至子宫颈,按顺序剖开子宫,取出胎仔胎盘,对子宫内着床腺、活胎、吸收胎、死胎进行计数。

分离胎仔与胎盘进行称重和外观检查,并确定胎仔的性别、身长、尾长。每窝约 1/2 活胎进行内脏检查,约 1/2 活胎用于骨骼检查。

3.4 统计学分析

着床前丢失率、着床后丢失率、吸收胎率、畸形率等百分率用 χ^2 检验。体质量、摄食量等计量资料作方差齐性检验,若方差齐($P>0.05$),则做单因素方差分析,后检验方法为 Dunnett-t;若方差不齐($P<0.05$),则进行非参数检验(Kruskal-Wallis H 检验),若有统计学差异($P<0.05$),则各剂量组与对照组间做 Mann-Whitney U 检验。

4 结果

4.1 临床症状观察与体质量摄取

实验期间,各组动物被毛光滑,反应灵敏,呼吸平稳,饮食及活动正常,均未见明显异常。与对照组相比,新橙皮苷各剂量组动物体质量及区段增重均正常,未见显著性差异($P>0.05$);环磷酰胺 12 mg·kg⁻¹ 组妊娠鼠 GD20 体质量、GD15~18、GD18~20、GD0~20 的区间增重明显降低($P<0.01$)。各组别动物摄食量未见明显改变。

4.2 动物解剖

与对照组相比,新橙皮苷给药组黄体数、着床数、活胎数、吸收胎数、早期死胎数、晚期死胎数、吸收胎率、活胎率、活雄胎率、着床前丢失率和着床后丢失率均未见明显差异;环磷酰胺 12 mg·kg⁻¹ 组妊娠鼠的子宫重明显下降($P<0.01$)。

与对照组相比,除新橙皮苷 1.8 g·kg⁻¹ 组胎仔身长显著性降低($P<0.05$)外,新橙皮苷给药组胎仔身长、尾长、体质量和胎盘重均未见明显改变;环磷酰胺 12 mg·kg⁻¹ 组胎仔身长、尾长、重量以

及胎盘重均明显降低($P<0.01$)。

4.3 胎仔外观检查

对照组和新橙皮苷 $0.45, 0.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组均可见血肿, 与对照组相比, 新橙皮苷给药组血肿的胎仔发生率和窝发生率均未见统计学差异。环磷酰胺 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组血肿的胎仔发生率和窝发生率分别为 16.7% 和 71.4% , 显著高于对照组的 0.8% 和 5.0% ($P<0.001$), 其余异常如露脑、脑膨出、脑膜膨出、耳廓形态异常、突舌、唇裂、肢弯曲异常、缺指趾、并指趾、多指趾、指趾过短、爪尖过小、全身浮肿、颅裂等仅见于该组。

4.4 胎仔内脏检查

肾盂扩张于 5 个组别内均可见, 且组间未见统计学差异。新橙皮苷 $0.45 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见 1 例脑室扩张, $0.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见 1 例脑室扩张和 2 例食管扩张, $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见 1 例脑积液和 1 例食管扩张, 不排除与新橙皮苷给药相关。环磷酰胺 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔可见腭裂、脑室扩张、脑积液、脑形态异常、食管扩张、小型肺、睾丸附睾异位, 其中脑室扩张、脑积液、脑形态异常的发生率明显高于对照组($P<0.01$)。

4.5 胎仔骨骼检查

新橙皮苷给药组顶骨的骨化不全率呈剂量相关性升高, $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组的窝发生率为 33.3% , 显著高于对照组窝发生率 5.0% ($P<0.05$); 顶间骨、枕骨、第二胸骨、第五胸骨、第六胸骨的骨化不全率未见明显剂量关系; 下颌骨骨化不全仅见 $0.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 第一胸骨的骨化不全仅见 $0.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 颈椎、腰椎、耻骨、第四胸骨骨化不全仅见 $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 这些变化不排除与新橙皮苷给药相关。环磷酰胺 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔可见骨化不全的骨骼有下颌骨、颧骨、鼻骨、额骨、顶骨、顶间骨、枕骨、颈椎、胸椎、腰椎、耻骨、肋骨、第一胸骨、第二胸骨、第三胸骨、第四胸骨、第五胸骨、第六胸骨, 除第五胸骨, 其余骨骼骨化不全的胎仔发生率与窝发生率均显著高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 1。

新橙皮苷给药组第二胸骨、第五胸骨的未骨化发生率未见明显剂量关系; $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组第六胸骨未骨化的胎仔发生率和窝发生率均明显高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 第三胸骨、第四胸骨未骨化于 0.45 和 $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组各见 1 例, 枕骨未骨化于 $0.45 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组见 1 例, 不排除与新橙皮苷给药相关。环磷酰胺 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔可见未骨化的

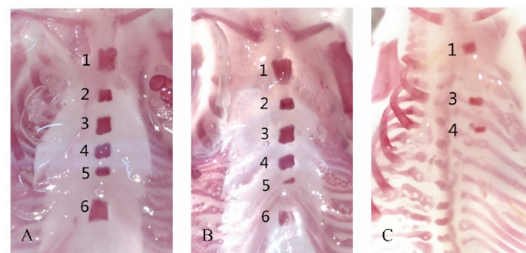


图 1 胸骨骨化不全和未骨化

A—新橙皮苷 $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 孕鼠号-胎仔号为 F53-10, 正常胸骨; B—新橙皮苷 $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 孕鼠号-胎仔号为 F53-6, 第五胸骨和第六胸骨骨化不全; C—环磷酰胺 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 孕鼠号-胎仔号为 F24-13, 第一、三、四胸骨骨化不全, 第二、五、六胸骨未骨化。

Fig. 1 Unossified and incomplete ossification of sternbra
A—Neohesperidin $1.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group, Dam order-fetal order was F53-10, normal sternum; B—Neohesperidin $1.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group, Dam order-fetal order was F53-6, incomplete ossification of 5th and 6th sternbra; C—cyclophosphamide $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group, Dam order-fetal order was F24-13, incomplete ossification of 1st, 3rd and 4th sternbra, unossified of 2nd, 5th and 6th sternbra.

骨骼有额骨、顶骨、顶间骨、枕外骨、枕骨、胸椎、肋骨、第一胸骨、第二胸骨、第三胸骨、第四胸骨、第五胸骨、第六胸骨, 胎仔发生率与窝发生率均高于对照组。

新橙皮苷 $0.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见 2 例波浪状肋、2 例肋骨增粗和 1 例骨化点, $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见 1 例骨化点, 不排除与新橙皮苷给药相关。环磷酰胺 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔可见畸形或变异的类型有肋骨短小、肋骨增粗、类分叉、配列异常、椎体融合、椎弓小型、椎弓过长、骨化点, 且胎仔发生率和窝发生率均高于对照组。

与对照组相比, 新橙皮苷给药组胸骨和中掌骨的计数变化未见明显剂量关系。环磷酰胺 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组骶尾椎、左侧肋骨、右侧肋骨、胸骨、左中掌骨、右中掌骨计数均明显下降($P<0.01$)。结果见表 1。

5 讨论

GD12 皮下注射 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量环磷酰胺, 妊娠动物于 GD15 开始的体质量减轻, 该变化与子宫重、胎仔重、胎仔大小相关指标变化一致; 同时, 胎仔的外观检查、内脏检查和骨骼检查中均可见明显毒性反应。本实验条件下, 阳性对照环磷酰胺于 $12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下可见明显的胚胎-胎仔发育毒性, 确保了本实验系统的有效性^[13]。

妊娠动物于 GD6~15 给予 $0.45, 0.9, 1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 新橙皮苷, 于妊娠动物体质量、摄食、临床症状观察未见明显影响。子宫内容物中, 新橙皮苷 $1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胎仔身长虽降低, 但数据偏差在 1% 内, 推测无毒理学意义。胎仔检查中, 新橙皮苷

表 1 骨骼计数检查

Tab. 1 Examination of skeletal count

组别	胎仔/窝	颈椎	胸椎	腰椎	骶尾椎	左侧肋骨	右侧肋骨
对照组	120/20	7.00±0.00	13.00±0.00	6.00±0.00	7.83±0.58	13.00±0.00	13.00±0.00
环磷酰胺 12 mg·kg ⁻¹ 组	120/20	6.94±0.64	12.89±1.19	5.98±0.58	7.18±1.12 ³⁾	12.80±0.86 ³⁾	12.76±1.00 ³⁾
新橙皮苷 0.45 g·kg ⁻¹ 组	111/20	7.00±0.00	13.00±0.00	6.00±0.00	7.85±0.73	13.00±0.00	13.00±0.00
新橙皮苷 0.9 g·kg ⁻¹ 组	126/21	7.00±0.00	13.00±0.00	6.00±0.00	7.91±0.61	13.00±0.00	13.00±0.00
新橙皮苷 1.8 g·kg ⁻¹ 组	104/18	7.00±0.00	13.01±0.10	6.00±0.00	7.80±0.74	13.01±0.10	13.01±0.10

组别	胎仔/窝	胸骨	左中掌骨	右中掌骨	左中足骨	右中足骨
对照组	120/20	5.69±0.61	3.34±0.48	3.34±0.48	4.00±0.00	4.00±0.00
环磷酰胺 12 mg·kg ⁻¹ 组	120/20	4.72±1.27 ³⁾	2.73±0.82 ³⁾	2.80±0.76 ³⁾	4.03±0.16	4.02±0.18
新橙皮苷 0.45 g·kg ⁻¹ 组	111/20	5.52±0.88	3.46±0.50	3.47±0.50	4.00±0.00	4.00±0.00
新橙皮苷 0.9 g·kg ⁻¹ 组	126/21	5.74±0.55	3.52±0.50 ²⁾	3.53±0.50 ¹⁾	4.00±0.00	4.00±0.00
新橙皮苷 1.8 g·kg ⁻¹ 组	104/18	5.44±0.87 ¹⁾	3.33±0.49	3.33±0.53	3.99±0.10	3.99±0.10

注：与对照组比较，¹⁾P<0.05，²⁾P<0.01，³⁾P<0.001。

Note: compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001.

给药组外观检查未见供试品相关改变，内脏检查可见脑部和食管发育变化；骨骼检查中，新橙皮苷可延缓顶骨和胸骨骨化，对下颌骨、颈椎、腰椎、耻骨、枕骨和肋骨的骨化也可能产生影响。综上所述，本试验条件下，妊娠大鼠于 GD6~15 灌胃给予新橙皮苷后，未见明显的母体毒性反应，未观察到临床不良反应的剂量水平(NOEL)为 1.8 g·kg⁻¹；对胚胎-胎仔的主要毒性影响为延缓骨骼如顶骨、胸骨等的骨化外，还可能影响脑部和食管发育，NOEL<0.45 g·kg⁻¹。

胎仔骨化的延缓推测与新橙皮苷的药理活性相关。一方面，新橙皮苷通过增加 HepG2 细胞葡萄糖消耗，降低血糖、血脂等对糖脂代谢进行调节^[2]，该作用可能导致胎仔营养供应不足；另一方面，新橙皮苷与雌激素相当的骨质疏松抑制作用^[1]，可能促进了母体成骨细胞的增殖分化，提高母体钙盐沉积、骨钙素等的表达^[14]，从而与胎仔骨化形成竞争。新橙皮苷导致胎仔骨化延缓的潜在机制有待进一步的研究验证。

新橙皮苷对高脂饮食诱导肥胖模型小鼠的降糖和降脂作用试验有效剂量为 100 mg·kg⁻¹，折算成大鼠剂量约为 0.05 g·kg⁻¹；最大给药量试验和 1 个月大鼠重复给药毒性试验中，SD 大鼠分别灌胃给予 5，1.8 g·kg⁻¹ 剂量新橙皮苷后，未见明显毒性作用；生育力与早期胚胎发育毒性试验灌胃给予 1.8，0.90，0.45 g·kg⁻¹ 剂量后未见明显毒性反应。本试验设置的高、中、低剂量分别为 1.8，0.90，0.45 g·kg⁻¹，约为有效剂量约 36，18，9 倍。对于胚胎-胎仔发育，实验动物 NOEL 暴露与最大推荐人用剂量暴露量的比值<10，临床使用过程中发育毒性风险较高^[15]，建议孕妇和可能妊娠的妇女避免给药，育龄妇女需要被告知采取避孕措施。

REFERENCES

[1] 谭桢. 新橙皮苷对 RANKL 诱导的破骨细胞分化和去卵巢小鼠骨质疏松的影响[D]. 广西: 广西医科大学, 2015.

[2] 阎优优. 新橙皮苷的体内外糖脂代谢调节作用及其机制研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2014.

[3] 吴昊妹, 杨波, 何俏军, 等. 新橙皮苷在制备防治糖尿病药物中的应用: 中国, 201210199606 [P]. 2012-11-14.

[4] ZENG L J, CHEN D, ZHENG L, et al. Studies on pharmacokinetics features of characteristic active ingredients of daidai flavones extract in different physiological status [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(2): 309-315.

[5] WANG C, ZHANG Y F, ZHAO X P. Study on screening cardioprotective components from Zhishi Xiabai Guizhi Tang [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(10): 1601-1605.

[6] LUO R, WU X, LI J Y, et al. Effects on icam-1 expression and releasing of Huvec Induced by ox-ldl of aurantii fructus immaturus extract and its active components [J]. Prog Mod Biomed(现代生物学进展), 2012, 12(32): 6228-6233.

[7] LI Y, ZHOU Z Q, XI W P, et al. Composition and antioxidant activities of different polar fractions of ethanol extraction from the peel of citrus reticulata 'Ponkan' [J]. South Chin Fruits(中国南方果树), 2014, 43(6): 5-8.

[8] FENG B M, JIANG G, JIA J M, et al. Study on the anti-allergy of Naringin and neohesperidin [J]. J Dalian Univ(大连学报), 2005, 26(4): 68-69.

[9] MANDALARI G, BENNETT R N, BISIGNANO G, et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (citrus bergamia risso) peel, a byproduct of the essential oil industry [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103(6): 2056-2064.

[10] 《药物生殖毒性研究技术指导原则》课题组. 药物生殖毒性研究技术指导原则[S]. 2006.

[11] SUN Z Y, ZHOU L, YAN H, et al. How to successfully carry out nonclinical reproductive toxicity study on new drugs [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2011, 20(22): 2195-2204.

[12] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.

[13] YANG R F, GUO H D, XIA Q Y, et al. Cyclophosphamide as a positive control in teratogenicity test of rats [J]. Carcinog Tertog Mutag(癌变·畸变·突变), 2013, 25(3): 222-226.

[14] MEI H. Osteogenic and adipogenic differentiation mechanisms of Human mesenchymal stem cells induced by 17β -estrogen [D]. Jilin: Jilin University, 2008.

[15] ICH S5(R3) Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals [S]. 2017(7): 25.

收稿日期: 2018-03-16

(本文责编: 曹粤锋)