

重组人酸性成纤维细胞生长因子的生殖毒性

姚成灿, 许 华, 郑 青, 赵 文, 吴晓萍, 黄亚东, 李校[✉]*

(暨南大学药学院, 广州 510632)

【摘要】 目的: 研究重组人酸性成纤维细胞生长因子(rhAFGF)在破损皮肤表面给药时的生殖毒性。方法: 从SD大鼠怀孕第6天起对破损皮肤连续给药10 d, 剂量分别为 $3\ 600\ \text{U}/\text{cm}^2$, $1\ 800\ \text{U}/\text{cm}^2$, $900\ \text{U}/\text{cm}^2$, 观察rhAFGF对大鼠的生育能力、胎鼠的生长发育及骨骼发育的影响。结果: 大鼠破损皮肤外用相当于有效剂量60、30和15倍的rhAFGF对母体的毒性、胚胎毒性和致畸作用均无明显的影响。结论: 在相当于有效剂量60倍的剂量下使用rhAFGF对母体和胎儿是安全的。

【关键词】 重组人酸性成纤维细胞生长因子; 生殖毒性; 皮肤用药

【中图分类号】 R965.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2005)05-0461-03

人酸性成纤维细胞生长因子(human acidic fibroblast growth factor, haFGF)是一类对中胚层和神经外胚层来源的细胞具有广泛生物学活性的细胞生长因子, 该因子可促进血管生成、创伤愈合、骨骼修复、溃疡愈合、眼晶状体再生、神经组织的修复、神经突起的生长以及胚胎的发育与分化, 具有较大的临床应用前景^[1-5]。由于haFGF是人体内源性微量活性物质, 难以从体液或组织中提取, 而通过重组DNA技术构建重组haFGF(recombinant haFGF, rhAFGF)基因工程菌生产, 产量大且成本低, 易形成规模生产能力, 使之能够广泛应用于临床, 具有显著的社会效益和经济效益^[6]。rhAFGF经破损皮肤给药, 可有少量吸收, 后迅速被分解破坏, 无毒性反应^[7]。即使在大于其有效剂量15倍的用药情况下, 对破损皮肤长时间连续给药均未产生不良反应^[8]。rhAFGF在外用于破损皮肤修复时是否会引起生殖毒性反应, 迄今未见国内外报道。本实验应用传统致畸试验方法, 研究了rhAFGF对妊娠期SD母鼠的毒性(包括对母体的毒性、胚胎毒性和致畸作用)。

1 材料和方法

1.1 受试药物

重组人酸性成纤维细胞生长因子(rhAFGF,

$11.75 \times 10^5\ \text{U}/\text{mL}$, 暨南大学药学院医药生物技术研究开发中心, 批号: 20010602), 临用时用注射用生理盐水稀释, 制成不同剂量的应用液。

1.2 实验动物

SD大鼠, 由广东省医学动物中心提供, 合格证号为: 2001A046。体重: 雄性为220~250 g, 雌性为250~270 g。

1.3 实验方法

根据rhAFGF的药效学试验结果^[4,5], 本研究设3个剂量组, 即 $3\ 600\ \text{U}/\text{cm}^2$, $1\ 800\ \text{U}/\text{cm}^2$, $900\ \text{U}/\text{cm}^2$ (分别相当于有效剂量的60、30、15倍), 另设溶剂对照组(生理盐水)。

采用传统致畸实验方法, 于前一天下午5时将雌雄大鼠按1:1同笼交配, 次日8时检查雌鼠有无阴道栓以确定交配与否, 检出日为孕期第0天, 将已交配的雌鼠按体重随机分组, 每组15只。于第0, 7, 9, 11, 13, 15, 16和20天称孕鼠体重。于第5天, 在每只动物的背部剪毛, 剪毛面积为 $40\ \text{cm}^2$, 并用消毒过的16号注射针头在去毛的皮肤上进行划痕, 划痕间距约为0.3 cm, 以渗出血为止, 此后每5天进行一次。第6~15天给药, 每日各组动物均以 $0.06\ \text{mL}/\text{cm}^2$ 的剂量皮肤涂抹给药。第20天颈椎脱臼处死孕鼠, 记录孕鼠体重、黄体数、着床数、活胎数、吸收胎数、死胎数, 并称取活胎体重和胎盘重量,

*【收稿日期】 2005-02-09 【*通讯作者】 Tel: 020-85220850 Fax: 020-85224766 E-mail: xiaokunli@163.net

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(“八六三”计划)资助项目(No. 2002AA2Z3318, 2004AA2Z3C60); 广州市科技计划资助项目(No. 2005J1-C0151)

测量其身长及尾长,然后作外观、性别、内脏和骨骼等检查。共检查孕鼠 60 只(15 只/组),胎鼠 727 只。将 1/3 胎鼠于 Bouin 液固定两周后作内脏检查,其余经固定、透明和染色后,作骨骼检查。

1.4 数据处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差分析统计各组之间的差异显著性,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

Tab. 1 Effects of rhaFGF on pregnant rats and embryos

Exam item	Control	Dose (U/ cm ²)		
		900	1 800	3 600
Number of pregnant rats	15	15	15	15
Increase weight of pregnant rats (g)	32.06	25.66	27.40	30.86
Live fetal rats/ pregnant rats	12.73	11.27	12.73	11.73
Number of yellow body	13.60	13.53	14.13	13.60
Number of nidation	13.53	11.80	12.86	12.26
Rate of nidation (%)	99.50	87.19	90.61	90.26
Number of live fetus	191	169	191	176
Rate of live fetus (%)	94.09	95.48	98.96	95.65
Number of absorption fetus	22	12	7	15
Rate of absorption fetus (%)	0.11	0.07	0.04	0.08
Number of dead fetus	2	0	0	0
Rate of dead fetus (%)	0.01	0	0	0

2.2 rhaFGF 对胎鼠生长发育的影响

从表 2 可见,和生理盐水对照组相比,rhaFGF

2 结果与讨论

2.1 rhaFGF 对大鼠生育能力的影响

从表 1 可见,rhaFGF 各剂量组未见母体毒性而导致其活胎率降低或死胎率增高。且各组均未检出胎鼠外观畸形和内脏畸形。各项观察指标与生理盐水对照组比较均无显著差异($P > 0.05$)。

各剂量组对鼠胎数、活胎体重、胎盘重、活胎身长、活胎尾长均无明显影响($P > 0.05$)。

Tab. 2 Effects of rhaFGF on development and growth of fetal rats

Exam item	Control (n=191)	Dose (U/ cm ²)		
		900(n=169)	1 800(n=191)	3 600(n=176)
Weight of live fetus (g)	3.69±0.37	3.71±0.40	3.74±0.37	3.92±0.58
Weight of placenta (g)	0.75±0.11	0.76±0.13	0.77±0.13	0.78±0.12
Length of live fetus (cm)	3.55±0.29	3.54±0.22	3.50±0.23	3.56±0.28
Tail length of live fetus (cm)	1.27±0.17	1.27±0.23	1.24±0.13	1.29±0.10

2.3 rhaFGF 对胎鼠骨骼发育的影响

从表 3 可见,rhaFGF 各剂量组的骨骼发育水平

与对照组比较均无显著差异($P > 0.05$)。

Tab. 3 Effects of rhaFGF on the skeleton development of fetal rats

Number of bones	Control (n=128)	Dose (U/ cm ²)		
		900(n=113)	1 800(n=129)	3 600(n=119)
Neck vertebra	7±0	7±0	7±0	7±0
Thoratic vertebra	13±0	13±0	13±0	13±0
Lumbar vertebra	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
Coccygeal vertebra	4.27±0.45	4.26±0.44	4.26±0.44	4.25±0.44
Sacral vertebra	4.02±0.18	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00
Rib	13.00±0.00	13.00±0.00	13.00±0.00	13.00±0.00
Stemum	5.97±0.17	5.98±0.13	5.97±0.21	5.80±0.60
Metacarpal	7.97±0.25	7.36±1.30	8.00±0.00	7.98±0.18
Proximal phalanx	3.52±0.86	3.59±0.81	3.57±0.83	3.60±0.81
Far phalanx	9.48±0.54	9.81±0.60	9.69±0.73	9.48±0.88
Phalanx	7.95±0.30	7.65±1.29	8.00±0.00	7.93±0.36
Proximal metatarsal	3.52±0.86	3.54±0.85	3.61±0.79	3.51±0.86
Far metatarsal	9.77±0.65	9.70±0.72	9.77±0.64	9.45±0.90

本实验结果表明, 大鼠破损皮肤外用相当于有效剂量 60、30 和 15 倍的 rhaFGF 与生理盐水对照组相比, 对母体的毒性、胚胎毒性和致畸作用均无明显差异, rhaFGF 在 MTD 剂量时对妊娠期 SD 母鼠无毒性, 对大鼠胚胎无致畸作用, 也无胚胎毒性。这表明在相当于有效剂量 60 倍下使用 rhaFGF 对母体和胎儿是安全的。

【参考文献】

- [1] Mellin TN, Mennie RJ, Cashen DE, *et al.* Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing[J]. *Growth Factors*, 1992, 7(1): 1—14.
- [2] Cheng H, Liao KK, Liao SF, *et al.* Spinal cord repair with acidic fibroblast growth factor as a treatment for a patient with chronic paraplegia[J]. *Spine* 2004, 29(14): E284—E288.
- [3] Hershey JC, Corcoran HA, Baskin EP, *et al.* Enhanced hindlimb col-lateralization induced by acidic fibroblast growth factor is dependent

upon femoral artery extraction[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59(4): 997—1 005.

- [4] 李校 (Li XK), 许 华(Xu H), 付小兵(Fu XB), 等. 重组人酸性成纤维细胞生长因子促进创伤愈合的研究[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2002, 33(4): 312—315.
- [5] 许 华(Xu H), 郑 青(Zheng Q), 姚成灿(Yao CC), 等. 重组人酸性成纤维细胞生长因子促进大鼠烫伤愈合的研究[J]. 暨南大学学报(*J Ji'nan Univ*), 2003, 24(2): 7—11.
- [6] 李校 (Li XK), 吴晓萍(Wu XP), 郑 青(Zheng Q), 等. 人酸性成纤维细胞生长因子的高效表达[J]. 华南理工大学学报(自然科学版)[*J South China Univ Technol (Natural Science Edition)*], 2001, 29(12): 61—64.
- [7] 李校 (Li XK), 许 华(Xu H), 赵 文(Zhao W), 等. 重组人酸性成纤维细胞生长因子皮肤用药的药代动力学[J]. 药学报(*Acta Pharm Sin*), 2002, 37(6): 424—427.
- [8] 许 华(Xu H), 李校 (Li XK), 郑 青(Zheng Q), 等. 重组人酸性成纤维细胞生长因子皮肤用药的长期毒性研究[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2003, 34(1): 46—50.

Toxicity of Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor on Reproduction System

YAO Cheng-Can, XU Hua, ZHENG Qing, ZHAO Wen, WU Xiao-Ping, HUANG Ya-Dong, LI Xiao-Kun
(School of Pharmacy, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

【ABSTRACT】 AIM: To investigate the toxicity of recombinant human acidic fibroblast growth factor (rhaFGF) on reproduction system in rats. **METHODS:** The damaged skin on rats was treated with rhaFGF at the dose of 3 600 U/cm², 1 800 U/cm² and 900 U/cm² respectively, once a day for 10 days successively. The fertile activity of mother rats and growing development of embryo was observed. **RESULTS:** No significant differences in the toxicity of mother rats, or embryo teratogenesis were found between each of group even when treated with rhaFGF at 60-fold effective doses. **CONCLUSION:** The safety on pregnant rats and the fetus upon treatment on topical damage skin with rhaFGF of doses up to 60-fold effective dose was confirmed.

【KEY WORDS】 Recombinant human acidic fibroblast growth factor; Toxicity on reproduction system; Transdermal

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China(863 Program) (No. 2002AA2Z3318, 2004AA2Z3C60); Guangzhou Technology Project(No. 2005J1-C0151)