·重大新药创制专项巡礼·

槟榔碱对大鼠体外胚胎肢芽发育的影响

朱思睿[1,2],杨艳伟[1],赵曼曼[1],刘鑫磊[1],黄芝瑛[2],周晓冰[1],张河战[1],李　波[1]

(1 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心,药物非临床安全评价研究北京市重点实验室,北京 100176;2 中山大学药学院,广州 510006)

[摘要]　**目的:**研究槟榔碱在体外培养下对大鼠胚胎软骨发育的影响,从而探究槟榔碱的胚胎致畸性。**方法:**取受孕 d 14 大鼠胚胎肢芽,前肢芽利用微团培养技术进行体外培养,根据半数细胞增殖抑制浓度(IC_{50}-P)和半数细胞分化抑制浓度(IC_{50}-D)及其比值判定受试物的致畸性;利用离体器官技术培养后肢芽,随机分为空白对照(0 mg·mL^{-1}槟榔碱)、低剂量(0.1 mg·mL^{-1}槟榔碱)、中剂量(1 mg·mL^{-1}槟榔碱)、高剂量(10 mg·mL^{-1}槟榔碱)、阳性对照(100 ng·mL^{-1} 5-氟尿嘧啶)5 个实验组,分别在体外培养 24,72 和 120 h 后收获,在体视镜下进行形态学评分后,石蜡包埋、切片、HE 染色和甲苯胺蓝染色观察细胞和软骨形态,并通过免疫组化技术研究槟榔碱对在各组软骨细胞骨形态发生蛋白 2(BMP-2)表达的影响。**结果:**在微团模型中根据欧洲替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)预测模型判定槟榔碱为胚胎中晚期发育毒性化学物,为非特异性弱致畸物;在整体肢芽器官模型中,1 mg·mL^{-1}(中剂量)及以上浓度的槟榔碱会对肢芽器官造成发育毒性,10 mg·mL^{-1}(高剂量)从给药 24 h 后便能产生显著毒性,各剂量组在 72 h 培养后发育状况出现了显著的剂量相关性;从病理切片结果可以看出,槟榔碱会进一步影响增殖软骨细胞和肥大软骨细胞的增殖分化,从而影响肢芽指掌与肢臂的发育;在 BMP-2 表达的免疫组化结果中,BMP-2 的表达强度呈现与槟榔碱剂量相关性,槟榔碱的剂量越大,阳性表达程度越低,反映软骨细胞增殖分化放缓。**结论:**大于 1 mg·mL^{-1}的槟榔碱在大鼠胚胎肢芽体外培养中有生长抑制作用,可初步认为槟榔碱对胚胎中后期发育具有弱致畸性,可能是通过影响 BMP-2 的表达来抑制软骨细胞的增殖分化。

[关键词]　槟榔碱;胚胎毒性;致畸;替代实验;微团培养;离体器官培养

[中图分类号]　R965　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003－3734(2021)23－2157－09

Effects of arecoline on the development of rat embryo limb bud cartilage *in vitro*

ZHU Si-rui[1,2], YANG Yan-wei[1], ZHAO Man-man[1], LIU Xin-lei[1], HUANG Zhi-ying[2], ZHOU Xiao-bing[1], ZHANG He-zhan[1], LI Bo[1]

(1 *National Center for Safety Evaluation of Drugs*, *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100176, *China*; 2 *School of Pharmaceutical Sciences*, *Sun Yat-sen University*, *Guangzhou* 510006, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To study the effect of arecoline on rat embryo cartilage development *in vitro*, so as to explore the embryonic teratogenicity of arecoline. **Methods**: The embryonic limb buds of gestation day 14 timed-pregnant (GD14) rats were taken, and the forelimb buds were cultured in micromass (MM). The teratogenicity of arecoline was determined by the half-proliferation inhibitory concentration (IC_{50}-P), the half-differentiation inhibitory concentration (IC_{50}-D) and their ratios. The hindlimb buds were cultured in organ culture and randomly divided into five experimental groups, *i.e.*, blank control (0 mg·mL^{-1} arecoline), low-dose (0.1 mg·mL^{-1} arecoline), middle-dose (1 mg·mL^{-1} arecoline), high-dose (10 mg·mL^{-1} arecoline), and positive control group (10 ng·mL^{-1}

[基金项目]　国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2018ZX09201017-001);国家自然科学基金资助项目(81603210);中检院中青年基金课题(2020C1)

[作者简介]　朱思睿,女,硕士研究生,研究方向:药物安全性评价。E-mail: cielzsr@ foxmail. com。

[通讯作者]　周晓冰,女,研究员,研究方向:药物安全性评价。E-mail: zhxb@ nifdc. org. cn。张河战,男,主任技师,研究方向:质量管理。E-mail: zhanghz@ nifdc. org. cn。

5-fluorouracil). They were cultured *in vitro* for 24, 72, and 120 h, respectively, and then harvested. Morphological scoring was performed under a stereo microscope, and followed by paraffin embedding, sectioning, HE staining and toluidine blue staining to observe the morphology cartilage cells. The effects of arecoline on the expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in each group were studied by immunohistochemistry. **Results**: In MM model, according to the ECVAM prediction model, it was determined that arecoline was a developmental toxic chemical and a non-specific weak teratogen. In the limb bud organ model, 1 mg·mL^{-1} (medium dose) and above concentrations of can cause developmental toxicity arecoline to limb bud organs. Arecoline at 10 mg·mL^{-1} (high dose) can produce significant toxicity after 24 h of administration. The developmental status of each dose group has a significant measurement correlation after 72 h of culture. It can be seen from the pathological section results that arecoline further affected the proliferation and differentiation of proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes, thereby affecting the development of limb buds, palms and limbs. In the immunohistochemical analysis, the expression intensity of BMP-2 was related to the dose of arecoline. The larger the dose of arecoline used, the lower degree of positive expression obtained, reflecting the slowdown of chondrocyte proliferation and differentiation. **Conclusion**: Arecoline at concentration over 1 mg·mL^{-1} inhibited the growth of rat embryonic limb buds and cartilage development *in vitro*. It can be preliminarily believed that arecoline has weak teratogenicity on embryonic development, and arecoline affected the expression of BMP-2 to inhibit the proliferation and differentiation of chondrocytes directly or indirectly.

[**Key words**] arecoline; embryotoxicity; teratogenicity; alternative assay; micromass cultures; organ cultures

槟榔(*Areca catechu* L.)常见于我国南方以及东南亚地区,具有较大的药食两用价值;也是我国四大南药之一,具有杀虫、破积、降气行滞、行水化湿的功效,可以治疗消化不良、孕妇腹痛等。然而,槟榔具有强烈的致瘾性,是仅次于烟草、酒精、咖啡因的成瘾物[1],全世界超过 10% 的人口有嚼食槟榔的嗜好[2],过量食用所带来的安全隐患也受到广泛关注,如极易诱发口腔癌,国际癌症研究中心(IARC)已将槟榔归类为第一类致癌物质。

槟榔碱(arecoline)是槟榔的主要活性成分,《中华人民共和国药典》2020 年版"槟榔"项下要求槟榔碱含量不得低于 0.2%[3]。近年来,人们发现服用过量槟榔碱对身体的毒害作用不仅体现在口腔疾病及相关肿瘤,对人体其他系统器官也有显著危害,包括神经、心血管、内分泌、免疫和泌尿系统[4]。由于槟榔的成瘾性,一些孕妇孕期仍有嚼食槟榔的习惯,槟榔碱的生殖发育毒性近年来也愈受重视,已经发现槟榔碱对生育力和胚胎早期发育有影响,对禽类、小鼠、斑马鱼等有胚胎毒性[5]。受伦理影响,关于槟榔碱对女性生殖系统与妊娠相关的研究较少,主要集中在病例调查和流行病学统计中,这些研究提示槟榔碱会对女性妊娠结局产生不良影响,如新生儿男女比例失调[6]、新生儿质量减轻[7]等,妊娠期每日摄入超过 4 枚槟榔的剂量与其分娩的婴儿死亡率有相关性[8],且槟榔碱为小分子化合物,可以透过血脑屏障和胎盘,有研究报道在新生儿的粪便中检测到槟榔碱[9]。但历年版《中华人民共和国药典》未提及槟榔的毒性以及孕妇禁用等相关提示,槟榔碱的致畸性和胚胎毒性仍有争议,也缺乏其对胚胎中后期发育的毒性剂量、机制等研究。因此,本研究通过结合微团培养法和肢芽器官培养体外预测模型,评价槟榔碱潜在的发育毒性。

材料与方法

1 实验动物及处理

SPF 级雌、雄 Wistar 大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2016-0006。实验动物饲养于屏障环境,温度:20 ℃ ~26 ℃,日温差 <3 ℃,相对湿度:40% ~70%,最小换气次数 15 次·h^{-1},12 h/12 h 明暗周期,自由摄食饮水。于 18:00 将雌、雄 Wistar 大鼠以 1∶1比例同笼,次日 7:00 进行阴栓和阴道涂片检查,镜下可见精子视为受孕成功,并记为受孕 d 0(GD 0)。动物实验方案经国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会审查批准。

2 主要试剂

槟榔碱(曼斯特生物科技有限公司,纯度≥98%);5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)由中国食品药品检定研究院标准物质供应室提供;Ham's F-12 培养基、BGJb 培养基、Hank's 液、胎牛血清、青链霉素、骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2,BMP-2)抗体均购自美国 Thermo 公司 Gibco 系列;胰蛋白酶

(美国 BD 公司,规格:1∶250);盐酸胍、软骨染色液(甲苯胺蓝法)、阿利新蓝醋酸染色液(8GX,0.5%)均购自北京索莱宝公司。

3 仪器

SZX12 型体式显微镜(OLYMPUS 公司);IX71 型倒置显微镜(OLYMPUS 公司);HERACELL 240i 型二氧化碳培养箱(Thermo 公司);Victor X5 型酶标仪(美国 PerkinElmer 公司),NanoZoomer S60 型显微成像设备(日本滨松公司);DRS－2000 型自动染色机(日本樱花公司);TekVIP6 型全封闭组织脱水透明机(日本樱花公司)。

4 微团培养模型

4.1 微团培养过程

GD14 的 Wistar 孕鼠用二氧化碳麻醉后体表酒精消毒,剖腹取出子宫后放入含有 37 ℃预温的无菌 Hank's 液培养皿中并转移至超净台,孕鼠放血处死。在无菌环境下,挑选含 40 ~45 个体节数的正常胚胎,分离胚胎的前肢芽和后肢芽,后肢芽用于微团培养,前肢芽用于肢芽器官培养。将同一窝胚胎的后肢芽用 PBS 清洗 3 次后加入 0.25% 胰酶-0.53 mmol·L^{-1} EDTA 消化为单细胞悬液,200 目网筛过滤后台盼蓝计数,细胞存活率须在 90% 以上,调整细胞浓度为 2×10^7 个·mL^{-1},于 96 孔板每孔中央点种 5 μL 细胞悬液,37 ℃、5% CO_2 培养箱孵育 2 ~3 h,细胞贴壁后每孔补齐 200 mL 含相应浓度受试物的完全培养液,于培养箱中连续培养 5 d。

4.2 剂量考虑与设计

根据欧洲替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods,ECVAM)的验证方法,以 5-FU 作为阳性对照组建立模型,染毒浓度分别为 0,15.623,31.25,62.5,125,250,500 和 1 000 ng·mL^{-1}。槟榔碱的剂量考虑[14]:根据各地文献调查和相关白皮书报告,槟榔碱的含量约为 0.560 7%,干果平均重量为 2.673 g,药典推荐剂量 10 g,市售口嚼槟榔 1 包约 100 g。摄入 7 g 槟榔,为推荐剂量;摄入 70 g 槟榔,为低剂量(轻度成瘾者);摄入 700 g 槟榔,为中剂量(重度成瘾者);摄入 7 kg 槟榔,为高剂量。假设孕妇血液体积约为 4 000 mL,忽略代谢因素,推算出体外低、中、高给药剂量分别为 0.1,1,10 mg·mL^{-1}。在微团模型中槟榔碱的最终浓度为 0,0.01,0.03,0.1,0.3,1,3 和 10 mg·mL^{-1},并将 100 ng·mL^{-1} 5-FU 作为阳性对照。每个浓度设置 6 个复孔。实验平行重复 3 次。

4.3 微团细胞增殖及分化检测

细胞培养 d 5,去除培养液后避光加入 10% CCK-8 检测试剂,37 ℃孵育 2 ~4 h 后,于 450 nm 测定吸光度值以检测其细胞增殖能力。

生理盐水清洗 3 次去除孔内试剂和培养液,加入 1% 阿利新蓝染液常温过夜。生理盐水清洗 3 次后镜下观察,加入 6 mol·L^{-1} 盐酸胍振荡提取 2 h 后,于 620 nm 测定吸光度值以检测肢芽细胞分化为软骨细胞的能力。

4.4 分析与评价方法

根据 CCK-8 测定的吸光度值,计算半数细胞增殖抑制浓度(IC_{50}-P);根据阿利新蓝染色的吸光度值计算和半数细胞分化抑制浓度(IC_{50}-D)。单位均为 ng·mL^{-1}。有 3 种 ECVAM 的微团培养发育毒性预测模型[15]。

4.4.1 Flint 标准　IC_{50}-D < 10 μg·mL^{-1} 为强阳性致畸物,< 50 μg·mL^{-1} 为阳性致畸物。

4.4.2 线性判别分析　计算出化学物的 IC_{50}-D 后,分别代入下列 3 个公式计算:

$6.658\times\lg(IC_{50}\text{-D})-9.49$　　公式(1)

$6.16\times\lg(IC_{50}\text{-D})-8.29$　　公式(2)

$-1.31\times\lg(IC_{50}\text{-D})-1.42$　　公式(3)

代入 3 个公式得出 3 个计算值并比较,如果公式(1)的计算值最大,则该化学物质判定为非致畸物;如果代入公式(2)的计算值最大,则该化学物质判定为弱致畸物;如果代入公式(3)的计算值最大,则该化学物质判定为强致畸物。

4.4.3 "2 倍"法　IC_{50}-P/IC_{50}-D 的值 >2 时说明化学物的致畸作用是特异的,即在非细胞毒性的剂量下发生致畸。

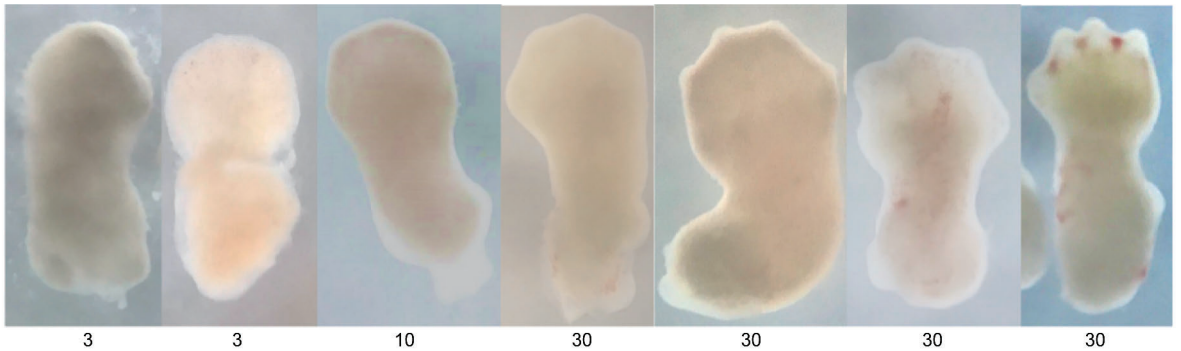
5 肢芽器官培养模型

5.1 肢芽器官培养过程

将分离的前肢芽,分别放入含新的 Hank's 液培养皿,将同一窝(同一孕鼠)的胚胎前肢芽均匀分为 15 组,包含 5 个剂量组(空白对照、低、中、高剂量组及阳性对照组)共 3 个时间点(染毒 24,72 和 120 h),培养密度为 2 个肢芽·$孔^{-1}$,然后清洗更换含药完全培养基于培养箱培养,每日吹悬 3 次,定期收获肢芽,每组分别收获完整 14 只肢芽。

5.2 形态学分析

将收获的肢芽(14 只·$组^{-1}$,共 3 ×5 组)用 PBS 清洗,在体视显微镜下观察肢芽软骨发育并依据评分标准打分形态学评分,评分标准参考 Neubert 300 分(半定量)评分系统[16],见图 1 和表 1。



A:肢臂整体发育得分;B:指掌骨整体发育得分

图 1 半定量得分系统体视镜下打分参考(前肢芽)

表 1 半定量得分系统评分依据(前肢芽)

骨骼种类	得分
肢臂整体发育	
无法辨认或缺失	0
刚能认出	3
已分化、但长度较短	10
分化良好,且明显增长	30
指掌骨整体发育	
无法辨认或缺失	0
刚能认出	1
小、分化差(拳头形状)	3
短和厚(常出现手掌扁平形状)	6
末端融合(边缘处稍有尖锐)	12
掌骨细小,有的伴卷曲变形(边缘处波浪状)	24
掌骨发育好伴小的指骨(边缘处锯齿状)	27
掌骨、指骨均发育好(指突清晰,指蹼完全消失)	30

5.3 组织处理

打分后肢芽用甲醛固定 12 h 以上,酒精脱水、石蜡包埋,制备石蜡切片,随后分别进行常规的 HE、甲苯胺蓝染色,BMP-2 免疫组化、最后中性树胶封片。

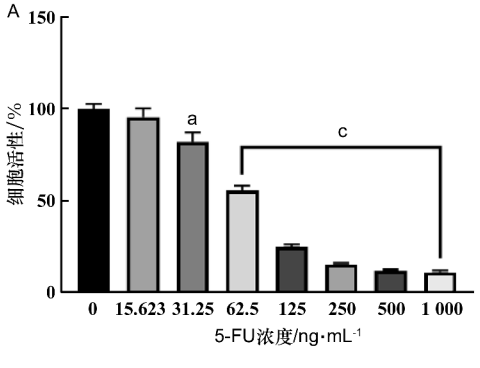
6 数据统计和分析

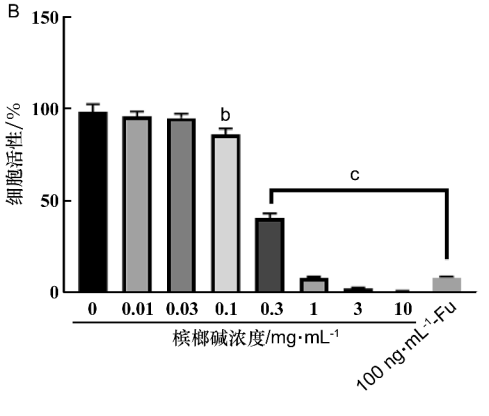
实验各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 25.0 数据统计分析软件对数据进行方差分析,当数据满足正态分布和方差齐性时,各组采用单因素方差分析(one-way ANOVA)并用 LSD 及 Dunnett-t 法进行两两比较。当不满足正态分布或者方差齐性时,采用非参数检验,并用 Dunnett's C 进行多重比较。在微团培养模型中,使用 GraphPad Prism 8 软件拟合计算出各 IC_{50};在肢芽器官培养模型中,形态学评分采用两样本均数比较的秩和检验 Wilcoxon 方法进行统计分析。

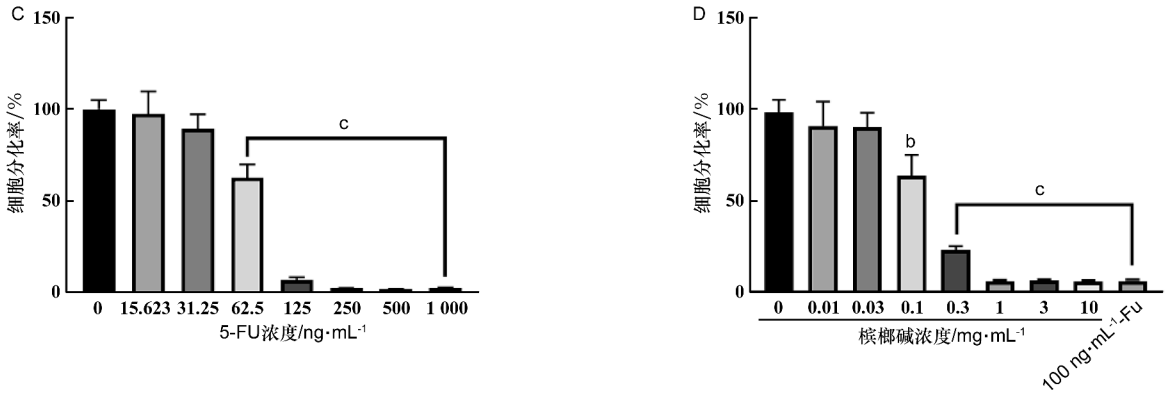
结　果

1 槟榔碱对肢芽软骨细胞增殖和分化的影响

5-FU 对肢芽软骨细胞的增殖和分化均有明显抑制作用,见图 2 和图 3。经 GraphPad Prism 8 软件拟合计算出 5-FU 的 IC_{50}-P 为 62.31 μg·mL^{-1},IC_{50}-D 为 54.51 ng·mL^{-1},代入微团培养模型的发育毒性预测判别式得出:5-FU 为非特异性强发育毒性物质,符合该预测模型的建立标准,证明该模型建立成功。







A:5-FU 对肢芽软骨细胞增殖的影响;B:槟榔碱对肢芽软骨细胞增殖的影响;C:5-FU 对肢芽软骨细胞分化的影响;D:槟榔碱对肢芽软骨细胞分化的影响;与对照组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.001$,c:$P<0.000\ 1$

图 2 5-FU 和槟榔碱对肢芽软骨细胞增殖分化的影响

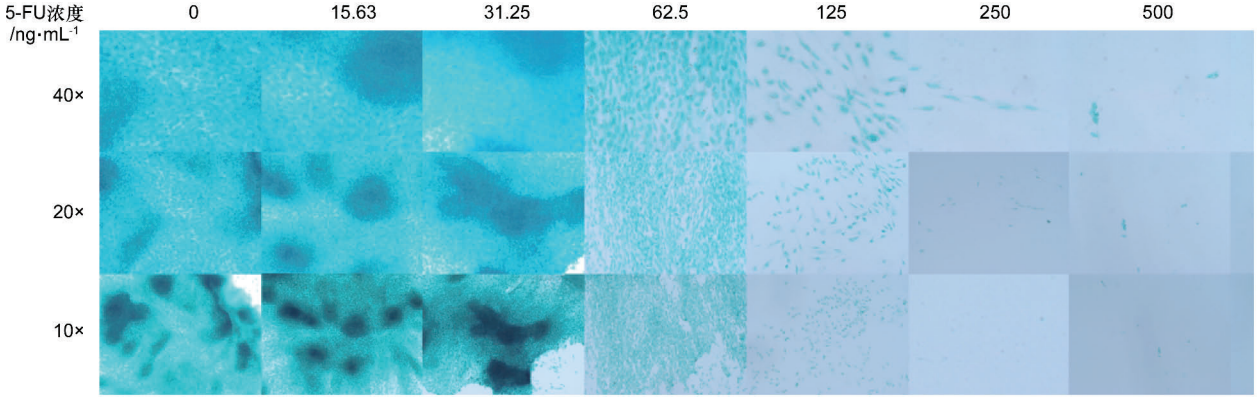


图 3 5-FU 对肢芽软骨细胞微团形成的影响(阿利新蓝染色)

如图 2 所示,0.30 mg·mL^{-1}(300 μg·mL^{-1})及以上浓度的槟榔碱可引起肢芽软骨细胞增殖和分化能力的明显降低,其 IC_{50}-P 为 256.3 μg·mL^{-1},IC_{50}-D 为 145.8 μg·mL^{-1}。如图 4 所示,随着槟榔碱浓度的降低,阿利新蓝对软骨细胞的着色度逐渐上升,从 0.30 mg·mL^{-1}槟榔碱浓度开始,软骨细胞间开始形成纤维状的细胞骨架,并随着给药浓度的降低而更加紧密,直至形成微团。

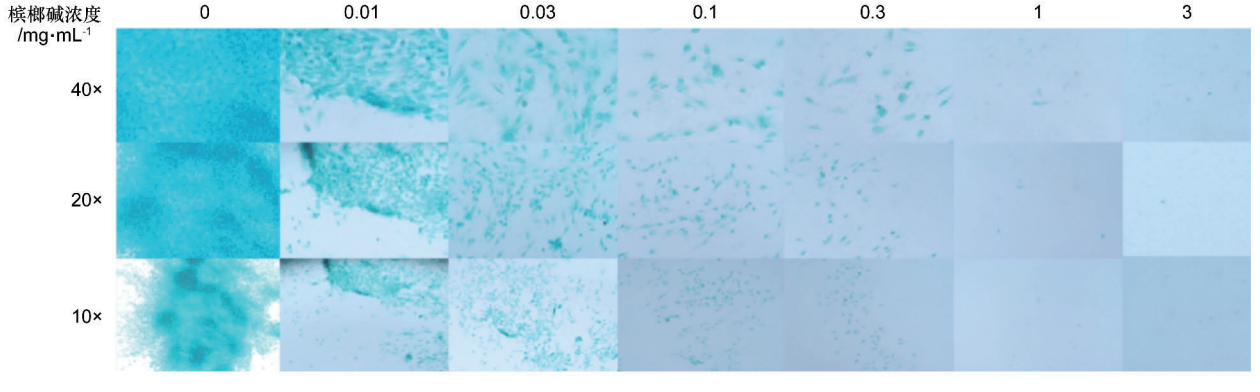


图 4 槟榔碱对肢芽软骨细胞微团形成的影响(阿利新蓝染色)

2 微团培养模型对槟榔碱发育毒性的评价

经 GraphPad Prism 8 软件拟合计算出槟榔碱的 IC_{50}-D 为 145.8 μg·mL^{-1}。代入 Flint 标准法,判断槟榔碱为非阳性致畸物;代入微团培养模型的发育

毒性预测判别式法，显示槟榔碱为弱胚胎发育毒性化学物；代入“2 倍”法，显示槟榔碱的致畸作用是非特异的，即在细胞毒性的剂量下发生致畸。

3 槟榔碱对肢芽整体形态的发育影响

各组胚胎 GD14 的前肢芽在含药培养基分别培养 24，72 和 120 h。未经培养的前肢芽多呈规则的圆弧状，边缘光滑平整，肢臂平直、短。如图 5 所示，经过 24 h 培养后，除高剂量组外，各组指突均匀略显，肢臂微微弯曲隆起；高剂量组肢芽颜色发白，边缘模糊，发育滞后。72 h 后，高剂量边缘平整，透明度较高，其余各组前肢芽指掌增厚，边缘处稍有尖锐，部分出现波浪状，显示掌骨细小，末端融合；空白对照组和低剂量组肢臂微微弯曲增加，长度增加，而中、高剂量组和阳性对照组则短小，发育较缓。120 h 后，空白对照组和低剂量组多数肢芽边缘已呈现出锯齿状，指突清晰，指蹼逐渐消失，肢臂发育良好且变长；高剂量边缘处稍有尖锐，肢臂发育仍不明显；中剂量组和阳性对照组指掌发育良好，肢臂发育较缓。

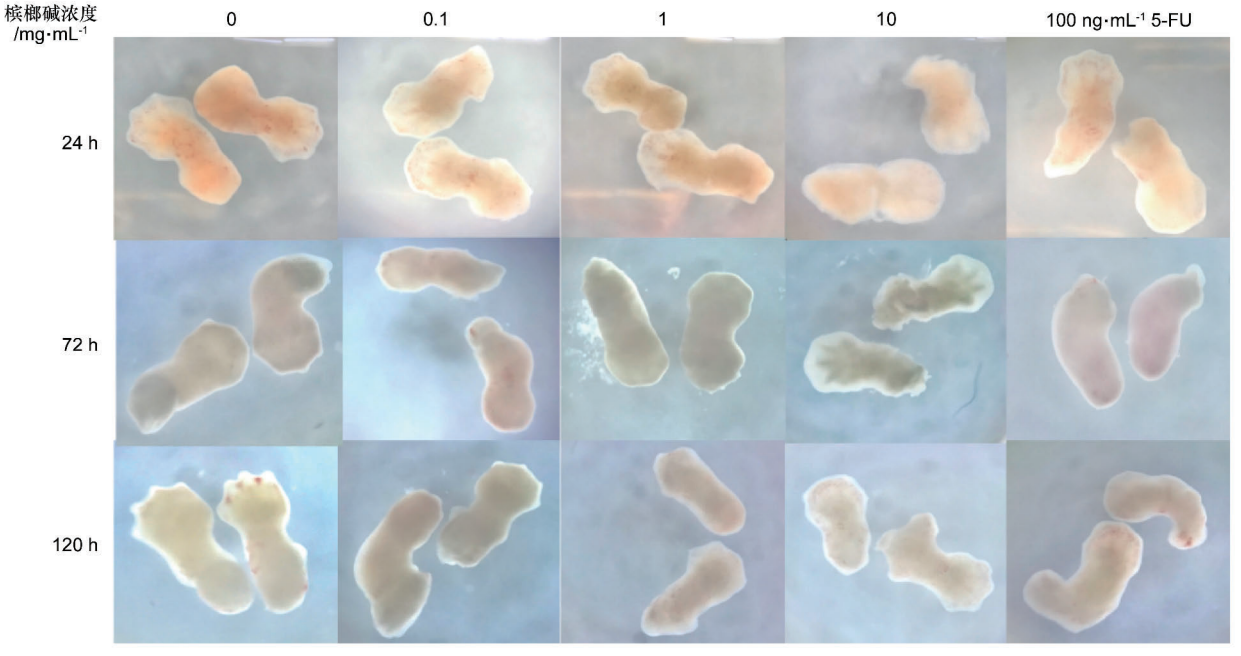


图 5 体视显微镜下观察槟榔碱对肢芽整体器官发育的影响（25 ×）

根据各组肢芽评分结果（见表 2）发现，肢芽的指掌与肢臂的整体发育与给药浓度和时间相关。高剂量组从染毒 24 h 起指掌与肢臂的形态学各评分低于空白对照组，且具有统计学意义；中剂量组各时间点形态学评分均值低于空白对照组，从染毒 72 h 起，肢臂（B）评分以及总评分与空白对照组相比具有显著性差异；低剂量组各时间点发育状况与空白对照组无明显差异；阳性对照组在染毒 24 h 时，肢芽发育状况与空白对照组和低剂量组无显著性差异，在染毒 72 h 起，肢臂（B）评分以及总评分与空白对照组相比具有显著性降低，肢芽整体得分均值位于中、低剂量组之间。

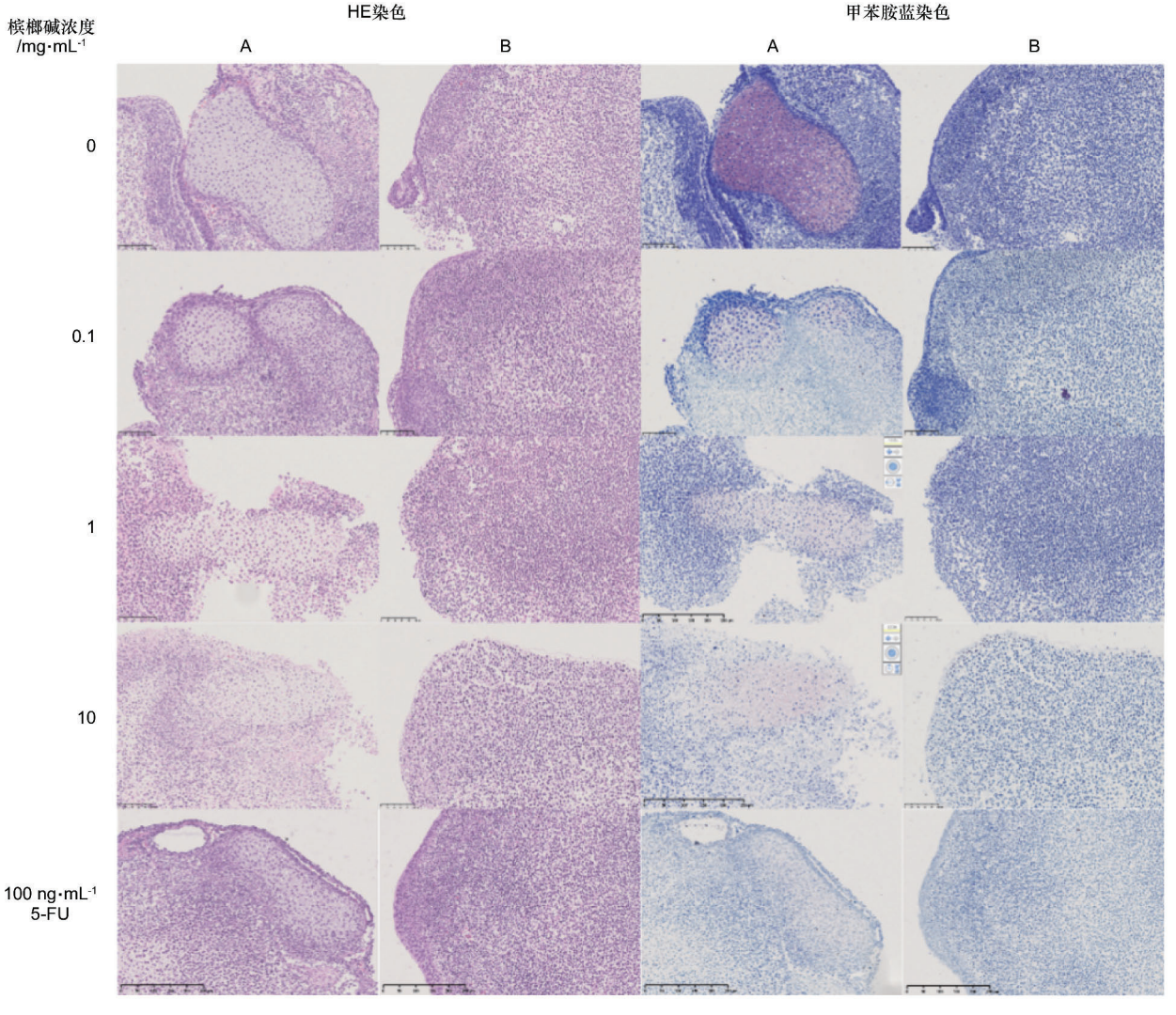
表 2 槟榔碱对大鼠前肢芽软骨发育的影响（形态学总评分 60 分） $\bar{x} \pm s, n = 14$

时间/h	24			72			120		
	A	B	总分	A	B	总分	A	B	总分
空白对照	20.93 ± 11.01	18.00 ± 7.98	38.93 ± 18.43	25.71 ± 8.52	20.36 ± 6.57	46.07 ± 13.89	25.71 ± 8.52	19.93 ± 7.02	45.64 ± 13.63
低剂量组	20.00 ± 10.38	18.21 ± 6.50	38.21 ± 13.15	25.71 ± 8.52	19.86 ± 7.21	45.57 ± 9.29	30.00 ± 0.00	19.57 ± 5.88	50.57 ± 6.86
中剂量组	18.57 ± 10.27	11.79 ± 8.60	30.36 ± 14.85	20.93 ± 11.01	9.21 ± 5.32[a]	30.14 ± 12.29[a]	21.43 ± 10.27	10.07 ± 3.25[a]	31.50 ± 12.04[a]
高剂量组	9.86 ± 9.17[a]	4.71 ± 1.54[a]	14.57 ± 9.95[a]	9.43 ± 6.75[a]	5.79 ± 2.99[a]	15.21 ± 7.99[a]	12.86 ± 7.26[a]	8.79 ± 3.42[a]	21.64 ± 9.18[a]
阳性对照	20.93 ± 11.01	17.36 ± 7.64	38.29 ± 12.18	20.43 ± 11.69	13.50 ± 7.51[a]	33.93 ± 17.98[a]	27.14 ± 7.26	11.14 ± 4.62[a]	38.29 ± 9.34[a]

与空白对照组比较，a：$P < 0.05$；高剂量组：槟榔碱 10.00 mg·mL^{-1}；中剂量组：槟榔碱 1.00 mg·mL^{-1}；低剂量组：槟榔碱 0.10 mg·mL^{-1}；阳性对照：5-FU 100 ng·mL^{-1}

4 槟榔碱对软骨细胞形态的发育影响

结合 HE 和甲苯胺蓝软骨染色结果见图 6,120 h 时间点的空白对照组位于指掌与肢臂的交界处 A(掌骨与长骨的交接处)的肥大软骨细胞(紫红色)密集、染色较深,且 B 处指掌边缘(编织骨)清晰,软骨细胞排列整齐,肢芽远端边缘指突明显,指突部位增值软骨细胞密集,显示这两部分软骨发育旺盛;低剂量组和阳性对照组形态学特征与空白对照组较为一致,但细胞密集度和染色度次之;高剂量组和中剂量组边缘模糊,远端无明显指突且增殖软骨细胞密度相对较少,指掌与肢臂的交界处的肥大软骨细胞染色较浅,显示这 2 个部分软骨发育迟缓。

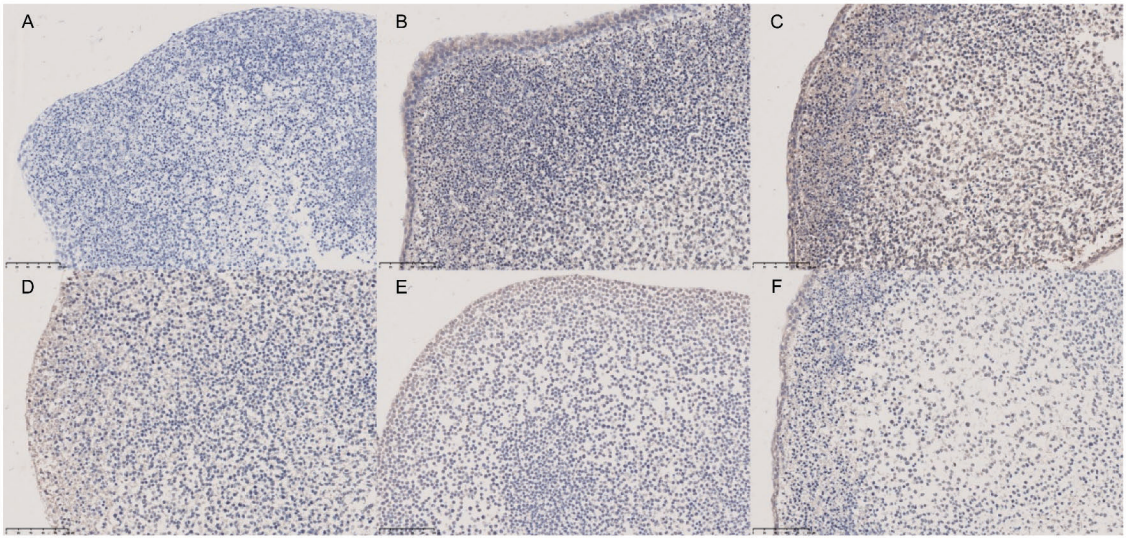


A:指掌与肢臂的交界处(掌骨与长骨的交接处),以评估肢臂发育;B:指掌的指尖处,以评估指掌发育;紫红色:肥大软骨细胞;蓝色:增殖软骨细胞

图 6 120 h 各组前肢芽同位点 HE 与甲苯胺蓝染色结果(200 ×)

5 槟榔碱对肢芽软骨组织内 BMP-2 表达的影响

各组指掌指端处肢芽软骨细胞均出现不同程度的 BMP-2 阳性染色,且主要分布在增生活跃的软骨细胞以及周围的纤维结缔组织(如新生编织骨边缘处),且分散的软骨细胞间具有可见弱阳性染色;如图 7 所示,随着给药剂量的增加,边缘处软骨细胞的 BMP-2 表达逐渐减弱,分散的软骨细胞间 BMP-2 表达几近消失不可见。



A:PBS 对照组;B:空白对照组;C:低剂量组;D: 中剂量组;E:高剂量组;F:阳性对照

图 7 120 h 各组前肢芽 BMP-2 表达结果(200 ×)

讨　论

随着动物福利 3R 原则的推进以及大量新化合物待筛查,出现了各种生殖发育毒性评价的替代方法,最新版人用药品注册技术要求国际协调会(ICH) S5(R3)[10]指导原则也提出推荐使用替代实验。微团培养法是通过 ECVAM 验证的 3 个替代方法之一[11],侧重于评价肢芽细胞向软骨细胞分化的能力,其灵敏度高、预测性强、耗时短、花费少,应用性更强,但其预测模型相对简单,对生殖毒性评价有限,对弱致畸物的预测不佳。另外,随着体外 3D 培养及类器官研究的深入,科学家发现细胞骨架结构改变会对软骨细胞的表型产生影响[12],而肢芽器官培养在一定程度上维持原来组织的三维结构,保留了组织的实质、基质和细胞间相互作用等,更接近机体内的生长状态,能补充软骨整体发育和形态学角度等重要信息。如 BMP-2 是存在于细胞间的一种重要的成骨调节因子,在体内和体外能够诱导干细胞、成骨细胞分化和骨形成[13],整体器官培养能完整地保留它在细胞间的表达情况。最后,肢芽发育的时期也正是胚胎体内其他器官发育的关键期,如果受试物对肢芽的发育有毒性作用,也能提示受试物可能会对其他器官发育有一定的毒性作用,为研究受试物的胚胎发育毒性提供重要参考信息[11]。因此,本研究通过结合微团培养法和肢芽器官培养体外预测模型,评价槟榔碱的潜在发育毒性。

研究表明,在微团模型中,0.1 mg·mL^{-1}及以上浓度的槟榔碱会对大鼠胚胎造成发育毒性,细胞分化较细胞增殖更为敏感,提示较高剂量槟榔碱有可能导致大鼠胚胎肢芽细胞分化为软骨细胞过程受阻。根据 ECVAM 预测模型判定槟榔碱为胚胎中晚期发育毒性化合物,为弱致畸物,但该模型对弱致畸物的预测只有 70% 的准确性[17],不能准确判断弱发育毒性化学物和无发育毒性化学物;另外“2 倍”法判定结果显示槟榔碱的发育毒性可能是由于细胞毒性引起的,不具有特异性。在微团培养过程中也发现,正常软骨细胞之间联系紧密,并且细胞骨架明显,而随着槟榔碱剂量的增大,细胞骨架逐渐减弱。

在整体肢芽器官模型中,1 mg·mL^{-1}及以上浓度的槟榔碱会对肢芽器官造成发育毒性,10 mg·mL^{-1}(高剂量组)从给药 24 h 后便能产生显著毒性,各剂量组在 72 h 培养后发育状况出现了显著的计量相关性,符合历史文献报道[16];阳性对照组毒性在 72 h 毒性作用显现最大,但在 120 h 培养后毒性作用逐渐回落,这可能与 5-FU 的稳定性有关(半衰期短)[16];从病理切片结果可以看出,槟榔碱会进一步影响增殖软骨细胞和肥大软骨细胞的增殖分化,从而影响肢芽指掌与肢臂的发育;在 BMP-2 表达的免疫组化结果中,BMP-2 的表达强度呈现槟榔碱剂量相关性,槟榔碱的剂量越大,阳性表达程度越低,反映软骨细胞增殖分化放缓,提示槟榔碱可能会直接或间接影响 BMP-2 的表达从而抑制软骨细胞的增

殖分化;在培养过程中也发现,肢芽器官表面的血管分布也与槟榔碱的浓度相关,浓度越高,肢芽表面血管减少,整体肢芽颜色发白,有文献报道该时期的胚胎肢芽已有神经、结缔组织的发育[18]以及槟榔碱对心血管发育的影响[4]。

对比 2 个模型的量效关系,微团模型在更低的浓度下就显现出毒性作用,因为三维环境下细胞的化学敏感性更低,耐药性更强[19],如乳腺癌细胞系形成致密的球状体可以在紫杉醇的环境中防止细胞凋亡[20],这是因为在 2D 培养中,化学物能直接作用细胞,而在 3D 培养中,致密结构中的细胞无法受到均一浓度化学物的影响,同时表面坏死细胞能分离介质进而保护内部的活细胞[21]。综上,2 个模型的结果提示槟榔对胚胎软骨发育有弱致畸性;再结合 2 个模型的组织细胞形态,显示槟榔碱会影响 BMP-2 的表达影响软骨细胞的增殖分化。

综上所述,可初步认为槟榔碱对胚胎中后期发育具有弱致畸性,槟榔碱在本实验中的最大无毒性反应剂量为 0.1 mg·mL^{-1},槟榔碱可能会直接或间接影响 BMP-2 的表达从而抑制软骨细胞的增殖分化,提示日摄入超过 700 g 槟榔(换算为体外给药浓度 1.00 mg·mL^{-1})可能会对胎儿发育造成影响。药用推荐剂量未发现毒性,但受槟榔的产地品种以及食用处理方式等影响,槟榔碱的含量不一,槟榔碱在妊娠妇女准确体液分布及蓄积性仍缺少文献报道,因此槟榔碱在人体内准确的发育毒性剂量仍需进一步调查研究。

[参 考 文 献]

[1] NELSON BS, HEISCHOBER B. Betel nut: a common drug used by naturalized citizens from India, Far East Asia, and the South Pacific Islands[J]. *Ann Emerg Med*, 1999, 34(2): 238 - 243.

[2] BOUCHER BJ, MANNAN N. Metabolic effects of the consumption of Areca catechu[J]. *Addict Biol*, 2002, 7(1): 103 - 110.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版, 一部. 北京:中国医药科技出版社, 2020.

[4] LIU YJ, PENG W, HU MB, *et al*. The pharmacology, toxicology and potential applications of arecoline: a review[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(11): 2753 - 2760.

[5] 周思安, 刘斯薇, 金力行, 等. 槟榔碱对生殖与泌尿系统的影响[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2019, 38(5): 413 - 417.

[6] YANG MS, LEE CH, CHANG SJ, *et al*. The effect of maternal betel quid exposure during pregnancy on adverse birth outcomes among aborigines in Taiwan[J]. *Drug Alcohol Dependence*, 2008, 95(1 - 2): 134 - 139.

[7] BERGER KE, MASTERSON J, MASCARDO J, *et al*. The effects of chewing betel nut with tobacco and pre-pregnancy obesity on adverse birth outcomes among Palauan women[J]. *Matern Child Health J*, 2016, 20(8): 1696 - 1703.

[8] DEB AK, DUTTA S, HNICHHO C, *et al*. A case control study investigating factors associated with high infant death in Saiha district of Mizoram, India bordering Myanmar[J]. *BMC Pediatr*, 2017, 17(1): 23.

[9] GARCÍA-ALGAR O, VALL O, ALAMEDA F, *et al*. Prenatal exposure to arecoline (Areca nut alkaloid) and birth outcomes [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2005, 90(3): F276 - F277.

[10] ICH. Harmonised Guideline S5(R3): Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals[EB/OL]. (2020 - 02 - 18). https: //www. ich. org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5_R3/Step4/S5_R3__Guideline. pdf.

[11] SPIELMANN H, GENSCHOW E, BROWN NA, *et al*. Validation of the rat limb bud micromass test in the international EC-VAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests[J]. *Altern Lab Animals*, 2004, 32(3): 245 - 274.

[12] PARK JJ, WELDON BA, HONG S, *et al*. Characterization of 3D embryonic C57BL/6 and A/J mouse midbrain micromass *in vitro* culture systems for developmental neurotoxicity testing[J]. *Toxicol in Vitro*, 2018, 48: 33 - 44.

[13] SALAZAR VS, GAMER LW, ROSEN V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(4): 203 - 221.

[14] LIU ST, YOUNG GC, LEE YC, *et al*. A preliminary report on the toxicity of arecoline on early pregnancy in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(1): 144 - 148.

[15] GENSCHOW E, SPIELMANN H, SCHOLZ G, *et al*. The EC-VAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods[J]. *Altern Lab Anim*, 2002, 30(2): 151 - 176.

[16] HARRIS C, HANSEN JM. Developmental Toxicology: Methods and Protocols[M]. New York: Humana Press, 2012.

[17] BRANNEN KC, CHAPIN RE, JACOBS AC, *et al*. Alternative models of developmental and reproductive toxicity in pharmaceutical risk assessment and the 3Rs[J]. *Ilar J*, 2016, 57(2): 144 - 156.

[18] BIGAEVA E, PARADIS FH, MOQUIN A, *et al*. Assessment of the developmental toxicity of nanoparticles in an ex vivo 3D model, the murine limb bud culture system[J]. *Nanotoxicology*, 2015, 9(6): 780 - 791.

[19] LEE JM, MHAWECH-FAUCEGLIA P, LEE N, *et al*. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells *in vitro*[J]. *Lab Invest*, 2013, 93(5): 528 - 542.

[20] IMAMURA Y, MUKOHARA T, SHIMONO Y, *et al*. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1837 - 1843.

[21] DUVAL K, GROVER H, HAN LH, *et al*. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture[J]. *Physiology* (*Bethesda*), 2017, 32(4): 266 - 277.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 07 - 27