

## 大黄不同萃取物对大鼠体质量及下丘脑、垂体组织结构的影响

赵盼盼<sup>1</sup>, 佟继铭<sup>1</sup>, 马淑月<sup>2</sup>, 高飞<sup>1</sup>, 董雅洁<sup>1</sup>, 张树峰<sup>1\*</sup>

1. 河北省中药研究与开发重点实验室/承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000
2. 华北理工大学, 河北 唐山 063000

**摘要:** **目的** 比较大黄不同萃取物对成年雌性大鼠体质量及下丘脑、垂体结构的影响, 进而筛选大黄生殖毒性主要萃取物。**方法** 采用极性梯度萃取法制备大黄水提物、氯仿萃取物、醋酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水溶物, 雌性成年大鼠随机分为对照组、大黄水提物组和各萃取物组, 各组给药剂量均相当于大黄生药 4.00 g/kg, 连续 ig 给药 60 d; 计算大鼠给药前后体质量增长率; 光镜下观察大鼠下丘脑弓状核神经元和垂体促性腺细胞病理学变化。**结果** 大黄水提物组大鼠体质量增长率低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其余各萃取物组明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 大黄水提物组大鼠下丘脑弓状核神经元出现染色质边缘化, 核膜界限不清, 胞浆尼氏体溶解, 也可见鬼影细胞, 腺垂体细胞整体数目减少, 细胞排列欠规则, 细胞间窦状毛细血管增多, 其余各萃取物组下丘脑弓状核和腺垂体未见明显病变。**结论** 长期大剂量 ig 大黄水提物可使大鼠体质量增长率降低, 导致下丘脑弓状核和腺垂体发生形态学病理变化; 其余各萃取物却使大鼠体质量增长率明显升高, 且对下丘脑弓状核和腺垂体的组织结构影响不大。

**关键词:** 大黄; 萃取物; 生殖毒性; 体质量; 下丘脑; 垂体

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)02-0215-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.02.014

## Effect of different extracts from *Rheum palmatum* on weight and tissue structure of hypothalamus and pituitary of rats

ZHAO Pan-pan<sup>1</sup>, TONG Ji-ming<sup>1</sup>, MA Shu-yue<sup>2</sup>, GAO Fei<sup>1</sup>, DONG Ya-jie<sup>1</sup>, ZHANG Shu-feng<sup>1</sup>

1. Key Laboratory for Research and Development of Traditional Chinese Medicine in Hebei Province, Institute of Traditional Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China
2. North China University of science and Technology, Tangshan 063000, China

**Abstract:** **Objective** To compare the effects of different extracts of *Rheum palmatum* on weight and tissue structure of hypothalamus and pituitary of adult female rats, and screen the main reproductive toxicity extract. **Methods** The water, chloroform, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts and water-soluble substance of *R. palmatum* were prepared by polarity gradient extraction method. Female adult rats were randomly divided into blank control group, rhubarb water extract group, and different extracts groups. The dosage of all the groups was equivalent to 4.00 g/kg crude rhubarb. Rats were administered with extracts by gavage for 60 d. Body mass growth rate of rats were calculated before and after administration. The pathological changes of hypothalamic arcuate nucleus neurons and pituitary gonadal cell were observed with light microscope. **Results** Compared with the blank control group, the body mass growth rate of rhubarb water extract group was decreased ( $P < 0.05$ ), while those in the different extracts groups were increased ( $P < 0.01$ ); The hypothalamic arcuate nucleus neurons of rhubarb water extract group showed chromatin marginalization, nissl substance dissolving, fuzzy boundary of nuclear membrane, as well as hell cells, and the total number of adenohypophysis cells reduced and the cells arranged in irregular. However, there were no apparent pathologic changes in different extracts groups. **Conclusion** Rhubarb water extract administration by long-term dose can reduce weight growth rate and result in pathologic changes of hypothalamic arcuate nucleus and adenohypophysis, while the different extracts can increase weight growth rate significantly and have little effects on the organizational structure of hypothalamic arcuate

收稿日期: 2016-10-28

基金项目: 河北省教育厅重大项目 (2009301)

作者简介: 赵盼盼 (1989-), 女, 河南许昌, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。Tel: 15632452519 E-mail: 1192516144@qq.com

\*通信作者 张树峰 (1955-), 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药理与毒理学研究工作。

nucleus and adenohipophysis.

**key words:** *Rheum palmatum* L.; extract; reproductive toxicity; weight; hypothalamus; pituitary

大黄始载于《神农本草经》，具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经的功效<sup>[1]</sup>，几千年来在多种疾病的治疗过程中发挥着重要作用。但随着研究的逐渐深入，发现大黄具有肝、肾、胃肠、三致作用等多方面毒性，而蒽醌类成分是其主要毒性物质<sup>[2]</sup>。本课题组前期研究发现，除上述毒性外，大黄同时具有生殖毒性，长期 ig 大黄水提物可引起雌性周期紊乱，易造成早期吸收胎<sup>[3]</sup>，大鼠血清性激素水平下降，下丘脑-垂体-性腺轴功能紊乱<sup>[4-5]</sup>，卵巢各级卵泡数减少、闭锁卵泡增多，睾丸间质细胞凋亡，生殖器官萎缩<sup>[6-7]</sup>，下丘脑弓状核神经元和垂体促性腺细胞出现明显损害<sup>[8]</sup>，其毒性程度与给药时间和给药剂量呈明显的依赖关系<sup>[6-8]</sup>。但导致大黄生殖毒性的物质基础目前尚不清楚，本研究采用不同极性的有机溶剂萃取大黄水煎液，通过比较大黄不同萃取物对成年雌性大鼠体质量及下丘脑弓状核神经元、腺垂体组织结构的影响，筛选导致大黄生殖毒性的主要萃取物，为下一步主要毒性成分的研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 药物及主要试剂

大黄，产地甘肃，购自安国市长安中药材有限公司，批号 20090902，经承德医学院中药研究所刘翠哲研究员鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根茎。

大黄水提物的制备：大黄饮片，粉碎，加 10 倍水浸泡 2 h，煎煮 10 min，8 层纱布滤过；滤渣加 8 倍水煎煮 10 min，过滤，合并滤液，50 °C 减压浓缩为 0.4 g/mL（生药）提取液，4 °C 保存，备用。

大黄水提物不同萃取物的制备：依前法制备大黄水提物，滤液于 50 °C 减压浓缩成 0.5 g/mL（生药）提取液，用氯仿、醋酸乙酯、正丁醇依次萃取，萃取液旋蒸浓缩后，冷冻干燥成粉末，得氯仿萃取物、醋酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水溶物（梯度萃取之后所剩余的水溶性部分），得率分别为 0.111%、1.024%、1.987%、20.893%，保存备用。临用时用 1% 羧甲基纤维素钠（CMC）溶液混悬。

氯仿、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠（天津市福晨化学试剂厂，批号分别为 20150115、20120214、20120822）；醋酸乙酯（天津市风船化学试剂科技有

限公司，批号 20130314）；正丁醇（天津市康科德科技有限公司，批号 140109）；羧甲基纤维素钠（天津市佳兴化工玻璃仪器工贸有限公司，批号 20090324）；水合氯醛（天津市科密欧化学试剂开发中心，批号 20080614）；多聚甲醛（天津市光复精细化工研究所，批号 20151119）。

### 1.2 动物

SPF 级 8 周龄 SD 雌性大鼠，体质量 180~220 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2012-0001。

### 1.3 主要仪器

BH-2 型 OLYM-PUS 显微镜及摄像装置，日本 Olympus 公司；Excelsior TMES 自动组织脱水机，美国 Thermo Scientific 公司；Leica RM2235 石蜡切片机，德国 Leica 仪器公司；EYELA 旋转蒸发仪 N-1100 系列，日本东京理化器械株式会社。

## 2 方法

### 2.1 分组及给药

SD 雌性大鼠 60 只，随机分为 6 组：对照组、大黄水提取物组（生药 4.00 g/kg）、氯仿萃取物组（4.44 mg/kg）、醋酸乙酯萃取物组（40.96 mg/kg）、正丁醇萃取物组（79.43 mg/kg）和水溶物组（835.72 mg/kg），各萃取物组剂量均相当于大黄生药 4.00 g/kg，剂量设置依据预实验及参考文献<sup>[3]</sup>，以成人体质量 60 kg 计算，约为临床常用剂量的 4 倍。5 mL/kg 连续 ig 60 d，每天 1 次，对照组给予等体积 1% CMC。

### 2.2 一般状况观察

给药过程中进行大鼠毛色、排便、死亡等一般状况观察。

### 2.3 大鼠体质量增长率检测

于给药初始及终末分别称取大鼠体质量，计算大鼠体质量增长率。

体质量增长率 = (终末体质量 - 初始体质量) / 终末体质量

### 2.4 HE 染色

各组大鼠均于末次给药后 24 h 水合氯醛麻醉，开胸，暴露心脏，自左心室升主动脉灌注约 250 mL 生理盐水，待流出液为无色；继以灌注 4% 多聚甲醛约 300 mL 至大鼠全身变硬。灌注结束后，取脑、垂体，放入 4% 多聚甲醛进行后固定，常规脱水，

石蜡包埋，4 μm 切片，HE 染色，光学显微镜下观察下丘脑、垂体形态学变化。

### 2.5 统计学分析

实验数据计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析，计量资料组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验。

## 3 结果

### 3.1 一般状况

对照组大鼠皮毛光滑，毛色正常，大便正常，对外界反应情况正常；大黄水提物组大鼠毛色暗淡、无光泽，尾巴及局部被毛呈红色，随给药时间延长，红染逐渐加重；氯仿萃取物组、醋酸乙酯萃取物组、

正丁醇萃取物组、水溶物组红染现象不明显。大黄水提物组大鼠于给药初期出现稀、软便，约 10 d 后逐渐恢复正常，但氯仿萃取物组大鼠便质干燥，醋酸乙酯萃取物组、正丁醇萃取物组及水溶物组大便基本正常。给药过程中，对照组、醋酸乙酯萃取物组、水溶物组各有一只大鼠出现死亡，经解剖观察，均因 ig 不当所致。

### 3.2 体质量增长率

各组大鼠体质量总体呈增长趋势，其中大黄水提物组大鼠体质量增长率显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )；而其余各组大鼠体质量增长率均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

表 1 各组大鼠体质量增长率比较

Table 1 Comparison on weight growth rate of rats

组别	n/只	初始体质量/g	终末体质量/g	体质量增长率/%
对照	9	202.60 ± 8.80	257.67 ± 15.62	27.19 ± 6.33
大黄水提物	10	206.20 ± 8.90	248.30 ± 16.83	20.57 ± 9.10*
氯仿萃取物	10	198.40 ± 11.34	283.30 ± 19.27	42.82 ± 6.33**
醋酸乙酯萃取物	9	197.50 ± 9.87	270.00 ± 10.27	36.75 ± 8.57**
正丁醇萃取物	10	196.80 ± 8.82	273.20 ± 7.30	39.05 ± 6.70**
水溶物	9	196.90 ± 8.58	273.56 ± 9.67	38.67 ± 4.74**

与对照组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs blank control group

### 3.3 对下丘脑弓状核神经元和腺垂体细胞结构的影响

3.3.1 对下丘脑弓状核神经元的影响 如图 1 所示，对照组下丘脑弓状核神经元分布均匀，密度较

大，胞浆染色较深，胞核清楚；与对照组比较，水溶物组、正丁醇萃取物组、醋酸乙酯萃取物组和氯仿萃取物组大鼠弓状核神经元无明显病变；大黄水提物组神经元细胞数量减少，可见染色质边缘化，

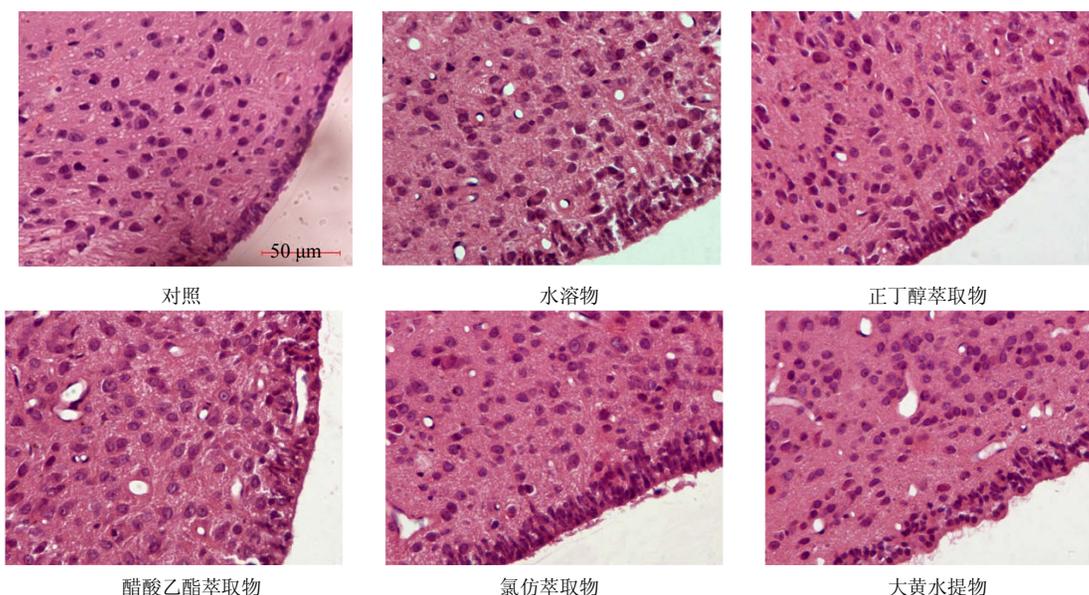


图1 各组大鼠下丘脑弓状核神经元结构比较

Fig. 1 Comparison on tissue structure of hypothalamic arcuate nucleus neurons in rats

核膜界限不清,胞浆尼氏体溶解,也可见鬼影细胞。

### 3.3.2 对腺垂体细胞结构的影响

对照组腺垂体细胞整体数目多,细胞排列规则,细胞间有丰富的窦状毛细血管;与对照组比

较,水溶物组、正丁醇萃取物组、醋酸乙酯萃取物组和氯仿萃取物组腺垂体细胞无明显变化;大黄水提物组腺垂体细胞整体数目有所减少,细胞排列欠规则,细胞间窦状毛细血管增多。结果见图2。

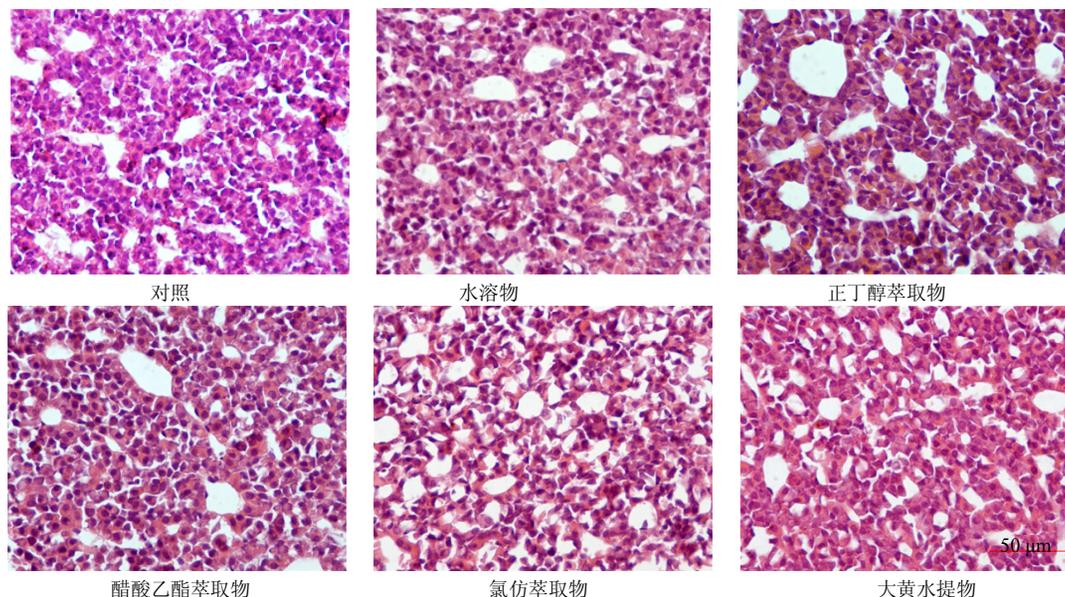


图2 各组大鼠腺垂体细胞结构比较

Fig. 2 Comparison on tissue structure of adenohypophysis in rats

## 4 讨论

大黄作为传统中药,具有多种治疗作用,一直被广泛应用于临床。近年来,大黄被越来越多地应用到各种降脂减肥、排毒养颜类中成药中,由于药物滥用和用药疗程过长,其不良反应逐渐凸显。本课题组前期研究证实,大黄水提物长期ig给药可致生殖毒性<sup>[3]</sup>,但究竟是大黄中的哪一部位或哪一种成分导致的毒性作用还不清楚,本实验在前期工作基础上,比较相当于同等剂量生药的大黄不同萃取物和水提取物对受试大鼠体质量及下丘脑、垂体组织结构的影响,分析大黄生殖毒性物质主要存在于哪种萃取物中,以便进一步从该种萃取物中筛选分析生殖毒性的部位及成分。

中药大黄通常以攻下药为人们所熟知,目前也有很多人通过服用大黄进行减肥,但实际上中药的疗效与其剂量有很大关系,文昌凡等<sup>[9]</sup>认为大黄常用量可泻下通便,小用量反能止泻,甚至有健胃之功。《大黄的药学与临床研究》中认为:“大黄对胃肠具有保护作用,小剂量大黄可促进胃酸分泌,使小鼠离体胃运动亢进,大黄对应激型、结扎幽门型、纯酒精引起的胃溃疡有明显的保护作用”<sup>[10]</sup>。本实验中各萃取物对体质量的影响与水提物不同,大黄

水提物组大鼠体质量增长率较对照组显著降低( $P < 0.05$ ),但其他各萃取物组均较对照组体质量增长率明显升高( $P < 0.01$ ),推测大黄的功效可能与其内所含各成分之间的相互作用有关,其内各成分综合作用时具有泻下之力,使体质量减轻,但单独作用时则可能具有健脾胃作用,使体质量增加。

下丘脑-垂体-卵巢轴(HPOA)是一个完整的神经内分泌轴,3个部分相互协调,共同维持女性生长发育、月经周期及性功能。本实验结果显示,大黄水提物组大鼠下丘脑弓状核神经元出现细胞核形状不规则,染色质边缘化,核膜界限不清,胞浆尼氏体溶解,也可见鬼影细胞;腺垂体细胞整体数目有所减少,细胞排列欠规则,细胞间窦状毛细血管增多,说明长期ig大黄水提物可导致大鼠下丘脑弓状核和腺垂体组织结构发生病理改变。但其余各萃取物组下丘脑弓状核和腺垂体与对照组比较未发现明显病变。而本课题同期实验已证明大黄氯仿和醋酸乙酯萃取物可致大鼠子宫、卵巢产生一定的病理变化(另文发表),但同一实验条件下却未发现其对下丘脑、垂体的病理改变。针对此实验结果,可从以下两个方面进行探讨:

一方面,大黄为植物性中药材,煎煮和用药过

程中作用成分复杂,其对下丘脑弓状核神经元和垂体促性腺细胞的毒理作用是其内多组分共同作用的结果,但各组分单独作用时便不会产生这种毒性作用。另外,只有当有害因素的浓度(强度)和作用时间超过一定限度或功能性改变发展到一定程度时才出现器质性病变,大黄萃取过程中可能或多或少会导致某些有效成分的损耗,致使各萃取物组受试药物剂量相对较低,尚不足以导致大鼠下丘脑、腺垂体组织结构发生明显的形态学改变,但其是否已导致大鼠HPOA神经内分泌系统发生功能性的变化尚未可知,接下来应对HPOA相关功能性指标进行检测。也可能是组织形态学病变较微小,光镜下难以识别,故接下来可采用透射电镜技术观察各组大鼠下丘脑弓状核神经元和垂体促性腺细胞超微病理变化。

另一方面,同一实验条件下,氯仿和醋酸乙酯萃取物可导致大鼠子宫、卵巢发生明显的病理变化,但下丘脑、腺垂体却未见明显病变,推测除了上述相关因素外,还可能因为大黄对下丘脑、腺垂体的毒性作用是通过HPOA正负反馈系统间接发生的,只有当其对子宫、卵巢等靶器官的毒性作用达到一定程度时,才有可能作用于上游中枢神经系统的下丘脑和腺垂体,导致其病理改变,而本实验可能各萃取物组受试药物剂量较低或给药时间较短,尚不足以使下丘脑垂体发生病变。

综上所述,大黄水提物可致大鼠下丘脑弓状核和腺垂体发生形态学病理变化,并使大鼠体质

量增长率降低;其余各萃取物组大鼠下丘脑弓状核和腺垂体却未见明显形态学病变,且可使大鼠体质量增长率明显升高,而关于大黄对下丘脑、垂体产生毒性作用的主要物质基础,尚有待进一步探讨。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 郭鹏,张铁军,朱雪瑜,等. 大黄毒性的现代研究与减毒对策 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1671-1674.
- [3] 闫丽伟,佟继铭,张树峰,等. 大黄对大鼠胚胎发育影响的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 603-605.
- [4] 卢宁. 大黄对雌性大鼠生殖毒性与用药剂量及时间关系的研究 [D]. 承德: 承德医学院, 2014.
- [5] 刘梦杰,佟继铭,宋素英,等. 大黄对雌性幼年大鼠血清 GnRH、LH、FSH、P、E2 水平的影响 [J]. 承德医学院学报, 2015, 32(2): 102-104.
- [6] 胡晓丞. 大黄对雄性大鼠的生殖毒性研究 [D]. 承德: 承德医学院, 2012.
- [7] 郭建恩,胡晓丞,佟继铭,等. 大黄提取物对雄性未成年大鼠生殖毒性的实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(12): 82-86.
- [8] 佟继铭,刘梦杰,万慧杰,等. 大黄对幼年雌性大鼠下丘脑、垂体结构及激素水平的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 116-119.
- [9] 文昌凡,何忠莲. 中药用法与功效的关系 [J]. 成都中医药大学学报, 1998, 21(4): 7-9.
- [10] 邱颂平. 大黄的药学与临床研究 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.