

大黄总蒽醌对雌性大鼠下丘脑、垂体功能和结构的影响及可逆性

宋素英¹, 孟欣¹, 佟继铭², 吴金洋¹, 张树峰^{2*}

(1. 华北理工大学 中医学院, 河北 唐山 063000;

2. 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)

[摘要] **目的:**观察大黄总蒽醌对雌性大鼠下丘脑和垂体功能及结构的影响及其可逆性。**方法:**SD 雌性大鼠 40 只, 随机取 10 只作为正常组, 其余 30 只灌胃大黄总蒽醌 $73 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续 60 d。于末次给药后 24 h, 停药 30, 60 d 分别处死 1/3 动物。酶联免疫(ELISA)法检测大鼠血清促性腺激素释放激素(GnRH), 黄体生成素(LH), 卵泡刺激素(FSH)水平; 记录性周期; 取垂体称重, 计算脏器指数; HE 染色观察下丘脑、垂体形态学变化。**结果:**给药 60 d 和停药 30 d LH, FSH 水平高于正常组, GnRH 水平低于正常组($P < 0.05$)。停药 60 d LH, FSH 水平低于给药 60 d, GnRH 水平高于给药 60 d($P < 0.05$)。给药 30, 60 d 大鼠性周期紊乱率、动情间期天数高于正常组($P < 0.05$); 停药 30 d 性周期紊乱率高于正常组($P < 0.05$)。停药 60 d 大鼠性周期紊乱率、动情间期天数高于给药 30 d ($P < 0.05$)。垂体指数: 给药 60 d 高于正常组 ($P < 0.05$); 停药 30, 60 d 低于给药 60 d ($P < 0.05$)。组织形态学检测, 给药 60 d, 下丘脑神经元减少, 有红色神经元、鬼影细胞、染色质边集; 垂体细胞减少, 排列不规整, 血窦扩张, 嗜酸性细胞适应性增生。停药 30 d, 下丘脑神经元增加, 鬼影细胞、染色质边集减少; 垂体细胞增加, 血窦扩张减轻, 嗜酸性细胞增生减少。停药 60 d, 下丘脑和垂体的上述病理改变进一步恢复。**结论:**灌胃 60 d 大黄总蒽醌对雌性大鼠性激素水平、性周期和下丘脑、垂体组织结构均有毒性, 但这种损害是可逆的, 停药 60 d 基本恢复。

[关键词] 大黄总蒽醌; 下丘脑; 垂体; 可逆性; 性周期

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0169-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010169

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1452.018.html>

[网络出版时间] 2016-10-27 14:52

Effect of Rhubarb Total Anthraquinone on Function and Structure of Hypothalamus and Pituitary of Female Rats

SONG Su-ying¹, MENG Xin¹, TONG Ji-ming², WU Jin-yang¹, ZHANG Shu-feng^{2*}

(1. College of Chinese Medicine of North China University of Science and

Technology, Tangshan 063000, China;

2. Hebei Provincial Key Laboratory of Research and Development on Chinese Materia Medica, Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of rhubarb total anthraquinone on function and structure of hypothalamus, pituitary and its reversibility in female rats. **Method:** Forty female SD rats were selected, in which 10 rats were randomly selected as normal control group, and the remaining 30 rats were administered orally with $73 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhubarb total anthraquinone for 60 days. At 24 h, 30 d and 60 d after the last administration, 1/3

[收稿日期] 20160805(009)

[基金项目] 河北省教育厅科研计划项目(2009301)

[第一作者] 宋素英, 教授, 硕士生导师, 主任医师, 从事中医血证的研究, Tel: 0314-2290076, E-mail: plmmssy@163.com

[通讯作者] * 张树峰, 教授, 博士生导师, 从事中药药理学毒理研究, Tel: 0314-2290076, 18031405791, E-mail: cdyxyzsf@163.com, tongjiming@163.com

rats were put to death. ELISA was used to detect the gonadotropin-releasing hormone (GnRH), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating (FSH) levels in serum. Their estrous cycle was recorded. The pituitary was collected and weighed to calculate the index of pituitary. The morphological changes in hypothalamus and pituitary were observed by HE staining. **Result:** The LH and FSH levels of the model group at 60 d after administration and 30 d after drug discontinuance were higher than that in the normal control group, and GnRH level was lower than that in normal control group ($P < 0.05$). The LH and FSH level of the model group at 60 d after drug discontinuance were lower than that at 60 d after administration, GnRH level was higher than that at 60 d after administration ($P < 0.05$). The rate of the estrous cycle disordered and the number of diestrus days of the model at 30 d and 60 d after administration were higher than that in normal control group ($P < 0.05$). The rate of the estrous cycle disordered and the number of diestrus days of the model group at 60 d after administration were higher than that at 30 d after administration ($P < 0.05$). The rate of disordered estrous cycle of the model group at 30 d after drug discontinuance was higher than that in normal control group ($P < 0.05$). The indexes of pituitary of the model group at 60 d after administration was higher than normal control group ($P < 0.05$); and that at 30 d and 60 d after drug discontinuance was lower than at 60 d after administration ($P < 0.05$). Pathological examination showed that the hypothalamus neurons of the model group at 60 d after administration reduced, red neurons, ghost cells and chromatin side pole appeared; pituitary cells decreased and became irregular, blood sinus was expanded, adaptability of eosinophilic cell was proliferated. The hypothalamus neurons of the model group at 30 d after drug discontinuance increased, red neurons decreased, ghost cells and chromatin side pole reduced; pituitary cells increased, blood sinus expansion was reduced, adaptability of eosinophilic cell hyperplasia was reduced. Pathological changes of the hypothalamus and pituitary were further recovered in the model group at 60 d after drug discontinuance. **Conclusion:** Estrogen level, estrous cycle and structure of hypothalamus and pituitary in female rats were affected by 60 d oral administration with rhubarb total anthraquinone, which however is reversible at 60 d after drug discontinuance.

[**Key words**] rhubarb total anthraquinone; hypothalamus; pituitary; reversibility; estrous cycle

大黄为蓼科植物,是我国传统常用中草药,具有泻下通便、利湿退黄、破积滞、行瘀血等功效^[1],因此历代本草均有记载,称其为“将军”。大黄的有效成分主要为蒽醌类化合物,包括大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚、没食子酸以及大黄多糖等^[2]。一般认为传统中药“纯天然、无毒副作用”,即使长期服用对人体也是健康的,这种片面的观点导致大黄在保健、减肥等领域中应用日益广泛,常作为水煎服或代茶饮的保健类食品应用,使大黄的不良反应事件增多。大黄虽然已被列为影响世界的传统药物之一,但同时也一直备受争议。女性作为减肥用药的主体,大黄的生殖毒性自然成为关注的焦点。

本课题组前期研究探讨^[3-5],给雌性大鼠长期灌胃大黄,可对其造成严重的生殖毒性。雌性大鼠子宫内膜变薄,上皮细胞水肿,腺体减少,腺腔不规则;卵巢萎缩,卵泡数减少,黄体数减少,卵泡内细胞排列不规则,血清雌二醇(E_2),促性腺激素释放激素(GnRH),孕酮(P)降低,黄体生成素(LH),卵

泡刺激素(FSH)升高。且毒性反应均与剂量和时间呈依赖关系。本研究进一步探讨长期给药大黄总蒽醌,对雌性大鼠的下丘脑、垂体,血清促性腺激素释放激素(GnRH),黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)水平及性周期的影响及其可逆性,为客观评价大黄的毒性及临床合理用药提供依据。

1 材料

STP120 型自动组织处理机,171 型组织自动包埋机(美国 Thermo Electron Corporation);Tk218 型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司);NIKON Eclipse 80i-型尼康生物显微镜(上海江文信息技术有限公司)。大鼠 GnRH, LH, FSH 酶联免疫(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 ml003038, ml002860, ml002872)。Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Electron 公司)。

大黄总蒽醌,纯度为 54.7% (以大黄素为指标,南京泽朗医药公司,批号 ZL140906582,经承德医学院中药制剂研究室 HPLC 检测)。

SPF 级 SD 大鼠 40 只,8 周龄,体重 180 ~ 200 g,

购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004。

2 方法

2.1 分组及给药 实验组前期证明^[3-4],大黄水提物质量分数为 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按生药计),为有效剂量;本实验在前期基础,换算等量大黄总蒽醌,即(用提取率 2%) \times (生药质量分数 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)/纯度 54.7%,得出 $0.073 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,即 $73 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

选取有规律动情周期的 SD 雌性大鼠 40 只,8 周龄,体重 180 ~ 200 g,随机取 10 只作为正常组,其余 30 只灌胃大黄总蒽醌 $73 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,NC 组给予等体积蒸馏水。连续给药 60 d,分别于末次给药后 24 h,停药 30,60 d 处死大鼠总量的 1/3。

2.2 血清中 GnRH, LH 和 FSH 测定 腹主动脉采血, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取血清, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,应用 ELISA 法检测大鼠血清 GnRH, LH 和 FSH 的水平。

2.3 阴道涂片样本采集 动物从一次动情开始至下次开始动情,或者从一次动情结束到下次动情结束所需要的时间,称为动情周期。采用四分法将其分为:动情前期(P),动情期(E),动情后期(M),动情间期(D),大鼠动情周期为 4 ~ 5 d。在灌胃期间的 20 ~ 30,50 ~ 60 d,停药期的 1 ~ 60 d,每天清晨 8 点做阴道脱落细胞涂片,固定大鼠背部,暴露阴道后,观察大鼠一般情况,精神状态,阴道口是否有感染、流液及流血。将在生理盐水中浸湿的消毒棉签轻柔地放入大鼠阴道侧壁上 1/3 处,顺时针方向旋转 1 周,取出棉签沿相同方向薄而均匀地涂抹于做好标记的载玻片上,晾干后苏木-伊红(HE)染色,依据性周期各期阴道上皮细胞

判定标准^[6]判断性周期。

2.4 取材及检测 大鼠用 4% 水合氯醛腹腔麻醉,开胸,暴露心脏,将钝性针头从左心尖插入左心室,剪开右心耳。先以生理盐水 250 mL 快速冲洗,待流出液体无色后继以 4% 多聚甲醛约 300 mL 灌注固定。灌注结束后,取出大鼠脑、垂体。下丘脑的摘取参照文献[7]方法,沿上颌从颈椎处剪下头部,破坏颅底骨,将下丘脑作为一团块取出,前面限制在视交叉前 2 mm,后而至乳头体,侧面从下丘脑纹裂至离其底面 3 mm 的组织。

2.4.1 垂体指数计算 快速取出垂体,观察并称重,计算垂体指数。

$$\text{垂体指数} = \text{垂体质量}(\text{mg}) / \text{体重}(100 \text{ g})^{[8]}$$

2.4.2 下丘脑、垂体组织病理学检查 下丘脑、垂体放入 4% 多聚甲醛固定,48 h 后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,切片,厚约 $4 \mu\text{m}$,HE 染色。光学显微镜下根据脑定位图谱准确定位下丘脑、根据组织学彩色图谱定位腺垂体后,观察下丘脑、垂体形态学变化,摄片。

2.5 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件包进行数据统计,实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析,计数资料采用卡方检验分析,用率(%)表示,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

3 结果

3.1 对血清性激素水平的影响 给药 60 d 和停药 30 d LH 和 FSH 水平高于正常组,GnRH 水平低于正常组($P < 0.05$);停药 60 d LH,FSH 和 GnRH 水平与正常组比较没有统计学意义。停药 30 d LH,FSH 和 GnRH 水平与给药 60 d 比较无统计学意义;停药 60 d LH 和 FSH 的水平低于给药 60 d,GnRH 水平高于给药 60 d($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 大黄总蒽醌对雌性大鼠血清 GnRH, LH 和 FSH 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of rhubarb total anthraquinone on levels of GnRH, LH and FSH in serum of female rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	时间/d	GnRH/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	LH/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	FSH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	-	51.83 ± 4.054	40.54 ± 3.347	20.08 ± 1.552
大黄总蒽醌	73	给药 60	$42.30 \pm 5.569^{1)}$	$48.52 \pm 3.833^{1)}$	$22.97 \pm 2.545^{1)}$
		停药 30	$46.13 \pm 5.736^{1)}$	$45.92 \pm 3.375^{1)}$	$21.93 \pm 2.679^{1)}$
		停药 60	$50.16 \pm 4.849^{2)}$	$43.47 \pm 2.814^{2)}$	$20.89 \pm 1.624^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与给药 60 d 比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对大鼠性周期影响 观察大鼠阴道脱落细胞涂片,正常组大鼠动情周期紊乱率为 0%,给药 30,60 d 大鼠的动情周期紊乱率为 58.6%,82.8%。给药 30,60 d 动情周期紊乱率明显高于正常组($P <$

0.05)。给药 60 d 紊乱率明显高于给药 30 d($P < 0.05$)。停药 30,60 d 大鼠动情周期紊乱率分别为 60%,0%。停药 30 d 大鼠动情周期紊乱率明显高于正常组($P < 0.05$)。停药 60 d 性周期紊乱率与

正常组比较无统计学意义。停药 30, 60 d 大鼠的性周期均在随着时间的延长逐渐恢复正常, 停药 60 d 时, 大鼠的性周期已经完全恢复正常。见表 2。

分析比较动情间期天数, 给药 30, 60 d 高于正常组 ($P < 0.05$), 可见大鼠的间期天数明显延长。给药 60 d 明显高于 30 d ($P < 0.05$), 可见随着给药时间的增加, 间期明显延长。停药 30 d 动情间期天

数与正常组比较无统计学意义。随着时间延长动情间期天数逐渐下降, 恢复正常。见表 2。

3.3 对大鼠垂体指数的影响 给药 60 d 垂体指数明显高于正常组 ($P < 0.05$); 停药 30 d 垂体指数高于正常组, 但差异无统计学意义。停药 30, 60 d 垂体指数明显低于给药 60 d ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 大黄总蒽醌对大鼠动情周期和垂体指数影响

Table 2 Effect of rhubarb total anthraquinone on estrous cycle and pituitary coefficient of female rats

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	时间 /d	n	紊乱大鼠数 /只	动情周期紊乱率 /%	间期 /d	垂体指数 /mg·g ⁻¹
正常	-		12	0	0	3.500 ± 1.000	0.046 ± 0.008 4
大黄总蒽醌	73	给药 30	29	17	58 ¹⁾	5.310 ± 1.606 ^{1,2)}	-
		给药 60	29	24	82 ^{1,2)}	6.276 ± 1.850 ¹⁾	0.064 ± 0.007 7 ¹⁾
		停药 30	10	6	60 ¹⁾	3.700 ± 1.160	0.050 ± 0.008 2 ³⁾
		停药 60	10	0	0	3.400 ± 1.174	0.050 ± 0.008 2 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与给药 30 d 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与给药 60 d 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 大鼠下丘脑、垂体组织病理学观察

3.4.1 对下丘脑的组织结构的影响 正常组大鼠下丘脑细胞结构清晰, 神经元细胞数目多, 细胞排列规整, 细胞核完整。给药 60 d 组大鼠下丘脑神经元减少, 有红色神经元, 出现大量鬼影细胞及染色质边集现象。停药 30 d 下丘脑神经元数量有所增加, 红色神经元数量也比给药组减少, 鬼影细胞及染色质边集现象减轻。停药 60 d 下丘脑红色神经元数量进一步增加, 红色神经元数量极少, 有少量的鬼影细胞及染色质边集现象。见图 1。

不规整, 血窦严重扩张, 嗜酸性细胞适应性增生, 嗜碱性细胞减少。停药 30 d 垂体细胞数量有所增加, 细胞排列不规整, 血窦中度扩张, 嗜酸性细胞适应性增生减少, 嗜碱性细胞增加。停药 60 d 大鼠垂体细胞数量进一步增加, 细胞排列不规整, 血窦轻微扩张, 嗜酸性细胞适应性增生极少, 嗜碱性细胞数量基本恢复。见图 2。

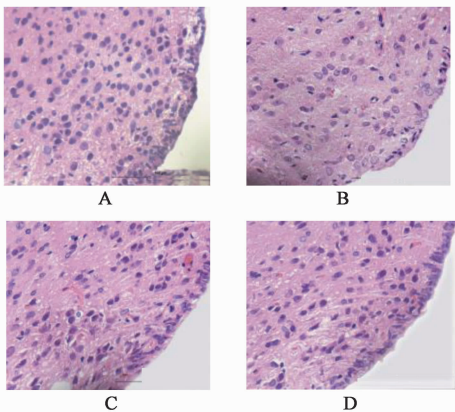


图 1 大黄总蒽醌对大鼠下丘脑组织结构的影响 (HE, ×400)
Fig.1 Comparison of structure of hypothalamus (HE, ×400)

3.4.2 对垂体的组织结构的影响 正常组大鼠垂体细胞排列整齐, 嗜酸性细胞和嗜碱性细胞分布均匀。给药 60 d 组大鼠垂体细胞数量减少, 细胞排列

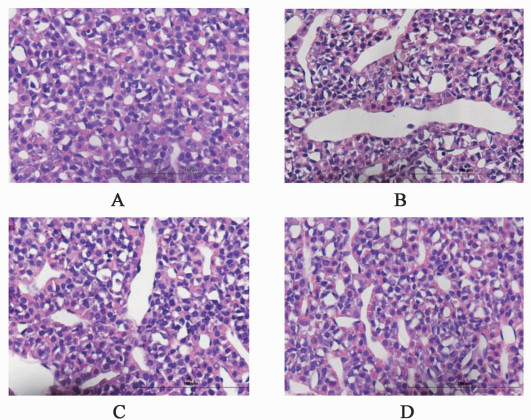


图 2 大黄总蒽醌对大鼠垂体组织结构的影响 (HE, ×400)
Fig.2 Comparison of structure of pituitary (HE, ×400)

4 讨论

下丘脑-垂体-卵巢性腺轴在动物的生殖活动中, 发挥着重要的作用。下丘脑分泌 GnRH 经垂体门脉系统脉冲性释放进入垂体, 促进垂体前叶 LH 和促卵泡素 FSH 的合成和分泌, LH 和 FSH 通过调控性激素的合成及配子发生, 从而实现动物的

生殖功能和性行为。反过来,性腺通过产生性激素反馈作用于下丘脑、垂体影响下丘脑 GnRH 及垂体促性腺激素的合成和分泌,维持生殖内分泌系统的稳定。从而使下丘脑-垂体-性腺轴水平保持平稳。在下丘脑-垂体-卵巢性腺轴的调节作用下,大鼠卵巢内卵泡的生长、发育、排卵、黄体生成的过程周而复始,体内的雌孕激素也呈现出周期性变化,即性周期。大鼠阴道表层细胞随雌孕激素周期性变化而变化,因此通过观察大鼠阴道脱落细胞就可以了解卵巢功能及激素水平的状况^[9]。

本研究发现,给药 60 d 与正常组比较,垂体指数明显升高,说明大黄总蒽醌能导致垂体指数的升高,可见,对垂体造成一定的损害。与给药 60 d 比较,停药 30,60 d 垂体指数有显著下降趋势,说明随着时间的延长,垂体的损害能够逐渐恢复。长期灌胃大黄总蒽醌,下丘脑神经元减少,有红色神经元,出现大量鬼影细胞及染色质边集现象;垂体细胞数量减少,细胞排列不规整,血窦严重扩张,嗜酸性细胞适应性增生,嗜碱性细胞减少。而停止给药后,随着时间的延长,损害逐渐减轻,提示其自身停药后有一定的恢复功能。

长期使用大黄可使雌性大鼠血清 LH,FSH 水平升高,GnRH 水平下降,与正常组比较差异具有统计学意义。停药后随着时间的延长 GnRH 水平逐渐升高,LH,FSH 水平逐渐降低。可见,GnRH,LH,FSH 水平的改变与大鼠下丘脑、垂体、卵巢损伤具有一定的联系。下丘脑发生损伤,分泌的 GnRH 减少,进而刺激垂体分泌更多的 LH,FSH。当停止给药进入恢复期后,大鼠的卵巢可能逐渐恢复,分泌的雌激素逐渐增多,负反馈减弱,从而使 LH,FSH 水平下降。

阴道脱落细胞涂片方法是本课题的重要方法之一,灌胃大黄总蒽醌后大鼠的动情周期明显紊乱,动情间期比率明显升高,且给药 30 d 比给药 60 d 的紊乱率和间期比率升高。停药后大鼠的动情周期逐渐恢复正常,与时间有一定的依赖关系。可见,动情周期的紊乱与卵巢损伤和激素水平的改变有一定的关系,因为阴道上皮细胞直接受到卵巢内分泌功能的

影响,对雌激素反应敏感,尤以表皮细胞最显著,因此检验阴道脱落细胞涂片是生物测定雌激素效能的一种常用方法,同时阴道涂片还可反映阴道黏膜的变化,是动情周期中各阶段的简便指标。

本研究说明大黄总蒽醌可对大鼠下丘脑、垂体、血清 GnRH,LH,FSH 的水平 and 性周期有明显影响。从本实验的结果来看,给药 60 d 大鼠的垂体指数显著增大,垂体发生肥大,提示在大黄的作用下可能导致了给药大鼠垂体发生代偿性增大,功能出现失调。随着恢复时间的延长,大鼠下丘脑、垂体,激素水平和性周期都有一定的恢复,恢复程度与时间呈正比。因此,本实验为大黄在临床上的安全使用提供相应的可靠数据。长期应用大黄对雌性大鼠的生殖内分泌有一定影响,但是这种损害能够在停药后逐渐消失。但是具体多久能够完全恢复,还需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] 吕继红. 中药炮制中大黄不同炮制品的疗效研究[J]. 中国卫生产业,2011,22(4):123-124.
- [2] 徐翔, 郇柏平, 张慧芬, 等. 大黄的研究进展[J]. 上海中医药杂志,2003,37(4):57-59.
- [3] 卢宁, 张树峰, 佟继铭, 等. 大黄水提物对成年大鼠子宫及卵巢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):258-261.
- [4] 卢宁, 佟继铭, 张树峰, 等. 大黄水提物对雌性大鼠血清 E₂, LH 和 FSH 水平的影响[J]. 承德医学院学报,2013,130(5):374-376.
- [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] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:424-426.
- [7] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1994:2561.
- [8] 盛华刚. 鹿衔草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志,2011,27(4):383-384.
- [9] 马灵芝, 金季玲, 夏天. 补肾调冲方对半乳糖致卵巢衰老大鼠卵巢功能的影响[J]. 江苏中医药,2011,43(6):91-92.

[责任编辑 邹晓翠]