

大黄水提物对成年大鼠子宫及卵巢的影响

卢宁, 张树峰, 佟继铭*

(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:**观察长期灌胃大黄对雌性大鼠子宫及卵巢的影响。**方法:**8周龄180~220 g雌性Wistar大鼠90只,随机分为正常对照组、大黄水提取物1.0, 2.0 g·kg⁻¹组、各剂量组再分为灌胃30, 40, 50, 60 d组, 每组10只, 计算大鼠子宫、卵巢指数, 观察子宫和卵巢的组织形态学变化。**结果:**大黄水提取物1.0 g·kg⁻¹给药60 d组子宫和卵巢指数分别为(0.21±0.058), (0.07±0.001), 均显著低于正常对照组(0.26±0.038), (0.07±0.007) ($P < 0.05$); 大黄水提取物2.0 g·kg⁻¹给药40, 50, 60 d组子宫指数分别为(0.20±0.045), (0.19±0.054), (0.19±0.041), 显著低于正常对照组(0.26±0.038) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 大黄水提取物2.0 g·kg⁻¹给药30, 40, 50, 60 d组卵巢指数分别为(0.068±0.008), (0.065±0.007), (0.065±0.005), (0.061±0.006), 均显著低于正常对照组(0.07±0.007) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 组织形态学显示, 2.0 g·kg⁻¹ 50, 60 d组大鼠子宫内膜水肿, 腺体减少; 卵巢萎缩, 卵泡数减少, 卵泡内细胞排列不规则。**结论:**长期应用大黄可影响成年雌性大鼠的生殖功能, 并有明显的剂量/时间依赖关系。

[关键词] 大黄水提取物; 子宫; 卵巢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0258-04

[doi] 10.11653/syjf2013210258

Effect of Rhubarb Aqueous Extract on Uterus and Ovary Tissue in Adult Rats

LU Ning, ZHANG Shu-feng, TONG Ji-ming*

(Key Laboratory for Research and Development of Traditional Chinese Medicine in Hebei Province, Institute of Traditional Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the long-term effect of Rhubarb on the uterus and ovary in female rats. **Method:** Ninety 8-week-old female rats (180-220 g) were randomly divided into nine groups: normal control group, and investigation groups ($n = 10$ each, administration of Rhubarb 1.0, 2.0 g·kg⁻¹ for 30, 40, 50, 60 d respectively). Then the index of uterus and ovary were calculated, and the morphological changes in uterus and ovary were observed. **Result:** The indexes of uterus and ovary in Rhubarb 1.0 g·kg⁻¹ 60 d group were lower than that in the control group obviously ($P < 0.05$); the indexes of uterus in 2.0 g·kg⁻¹ groups (40, 50, 60 d) were lower than that in the control group obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). While, the indexes of ovary in 2.0 g·kg⁻¹ groups (30, 40, 50, 60 d) were lower than that in the control group obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pathological examination showed that endometrial edema and glandular reduction, ovary atrophy, follicles reduction, and follicle cells irregular arrangement in 2.0 g·kg⁻¹ groups (50, 60 d). **Conclusion:** The long-term use of Rhubarb shows a certain degree of reproductive toxicity in female rats, and its impact is clear dose/time dependent.

[Key words] Rhubarb aqueous extract; uterus; ovary

[收稿日期] 20130410(010)

[基金项目] 河北省教育厅重大项目(2009301)

[第一作者] 卢宁, 在读硕士生, 从事中药药理与毒理学研究, Tel:18230142686, E-mail:496297368@qq.com

[通讯作者] * 佟继铭 教授, 硕士生导师, 从事中药新药研究与开发, Tel:18031405791, E-mail:tongjiming@163.com

大黄药用历史悠久,始载于《神农本草经》,具泻下攻积、清热泻火、解毒止血、活血化瘀、清利湿热等功效,是在中药组方中应用范围最大、使用频率最高的为数不多的几种重要中药之一,也已作为一种世界性药物载入 19 个国家的药典^[1]。现代研究表明,大黄含有蒽醌类、多糖类、鞣质类等成分,具有泻下、收涩、止血、抗菌、抗病毒、延缓衰老等作用^[2-4]。据统计,约有 800 多种中药制剂中含有大黄,一般认为大黄毒性较低,临床应用比较安全。但大多数降脂减肥、排毒养颜类中成药也含有大黄,以致应用大黄的时间过长,导致大黄相关的不良反应发生率增高^[5-6]。大黄为中医临床常用药,由于近年来的不当使用,不良反应发生率明显增高,有报道显示大黄可致雌性大鼠成熟期明显减缓,子宫卵巢质量减轻,未成年大鼠卵巢萎缩,阴户延期甚至长期不能洞开^[7]。长期应用大黄可损害睾丸的形态结构,以高剂量的损害最为严重^[8]。本实验研究了大黄长期高剂量灌胃给药对雌性大鼠生殖系统功能的影响及其作用机制。以大黄水提取物进行大黄毒性物质基础的探讨,为客观评价大黄的毒性及临床合理用药提供依据。

1 材料

1.1 药品 大黄,安国市长安中药材有限公司提供;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的干燥根茎 (*Rheum palmatum* L)。

1.2 仪器 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)。

1.3 动物 SPF 级,8 周龄 180 ~ 220 g,雌性 Wistar 大鼠 90 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK(京)2009-0008。

2 方法

2.1 大黄水提取物的制备 大黄药材粉碎为粗粉,10 倍水浸泡煎煮 2 次,合并 2 次滤液,40 ℃ 浓缩至含生药 0.4 g·mL⁻¹,备用。

2.2 分组及给药 大鼠 90 只,随机分为正常对照组,大黄水提取物 1.0,2.0 g·kg⁻¹ 组,各剂量组再分为灌胃 30,40,50,60 d 组,每组 10 只。给药容积 5 mL·kg⁻¹。

2.3 一般状态观察 每天观察动物的一般状况、精神状态、反应、行为活动、排便情况、毛色、清洁度、每周称体重和记录死亡数。

2.4 子宫、卵巢指数 末次给药后禁食不禁水 24 h 后处死,取出子宫、卵巢进行观察和称重。冷生理盐水冲洗除去血液,滤纸吸干,计算子宫、卵巢指数。

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器质量}}{\text{体质量}} \times 100\%$$

2.5 子宫、卵巢组织学检查 子宫、卵巢经 10% 甲醛固定 24 h 后常规制片,片厚 4 μm,HE 染色,在光学显微镜下观察子宫内膜、肌层、腺体、肌纤维的形态学变化和卵巢中各级卵泡、黄体、闭锁卵泡及间质腺的变化。

2.6 统计学分析 应用 SPSS 17 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态观察 正常对照组大鼠活动敏捷,步态、行为及对外界反应均正常;大黄 1.0,2.0 g·kg⁻¹ 组大鼠均在给药 3 d 后出现水样便,3 周后水样便缓解;2.0 g·kg⁻¹ 50,60 d 组毛色脏乱,被毛有红染,9 组均无死亡;1.0 g·kg⁻¹ 30,40,50 d 组和 2.0 g·kg⁻¹ 30 d 组大鼠体质量增长率与空白组比较无统计学差异,1.0 g·kg⁻¹ 60 d 组和 2.0 g·kg⁻¹ 40,50,60 d 组体质量增长率均明显低于空白对照组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 1。

表 1 大黄水提取物对成年雌性大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	给药时间 / d	初始体质量 / g	终末体质量 / g	体质量增长率 / %
空白对照	-	-	196.9 ± 8.81	249.6 ± 8.41	0.21 ± 0.02
大黄	1.0	30	195.8 ± 3.33	252.7 ± 12.10	0.22 ± 0.03
		40	196.1 ± 2.69	247.3 ± 11.30	0.21 ± 0.03
		50	195.0 ± 6.05	242.8 ± 9.10	0.20 ± 0.01
		60	195.0 ± 3.83	240.9 ± 4.68 ¹⁾	0.19 ± 0.01 ¹⁾
	2.0	30	196.6 ± 8.10	244.6 ± 13.78	0.19 ± 0.03
		40	194.6 ± 6.10	240.2 ± 7.97 ¹⁾	0.19 ± 0.02 ¹⁾
		50	201.2 ± 7.74	238.6 ± 10.79 ¹⁾	0.16 ± 0.02 ²⁾
		60	196.3 ± 6.7	224.5 ± 9.24 ²⁾	0.12 ± 0.04 ²⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(表 2 ~ 3 同)。

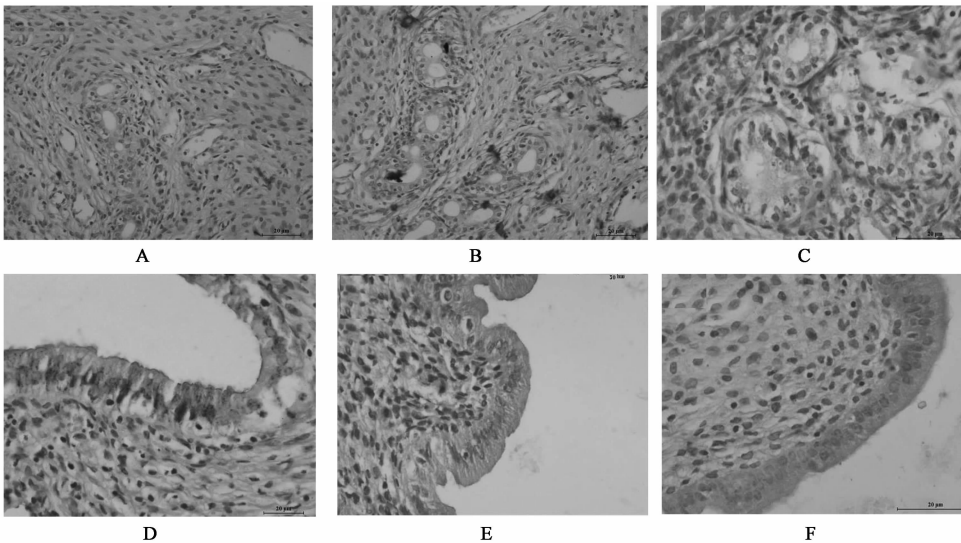
3.2 对大鼠子宫、卵巢指数的影响 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30,40,50 d 组和 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30 d 组大鼠子宫指数与空白对照组比较无统计学差异; $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 d 和 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 40,50,60 d 组大鼠子宫指数明显低于空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30,40,50 d 组卵巢指数与空白对照组无统计学差异; $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 d 和 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组卵巢指数明显低于空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2,3。

表 2 大黄水提取物对大鼠子宫质量及子宫指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药时间 / d	子宫质量 / g	子宫指数 / %
空白对照	-	-	0.64 ± 0.097	0.26 ± 0.038
大黄	1.0	30	0.61 ± 0.065	0.24 ± 0.024
	1.0	40	0.60 ± 0.594	0.24 ± 0.240
	1.0	50	0.57 ± 0.641	0.24 ± 0.010
	1.0	60	$0.51 \pm 0.137^{1)}$	$0.21 \pm 0.058^{1)}$
	2.0	30	0.55 ± 0.177	0.22 ± 0.072
	2.0	40	$0.48 \pm 0.120^{1)}$	$0.20 \pm 0.045^{1)}$
	2.0	50	$0.45 \pm 0.133^{2)}$	$0.19 \pm 0.054^{2)}$
	2.0	60	$0.44 \pm 0.094^{2)}$	$0.19 \pm 0.041^{2)}$

3.3 对大鼠子宫、卵巢的组织形态的影响

3.3.1 子宫的形态学观察 正常组子宫平滑肌层



A. 空白对照组; B. 大黄($2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30 d)组; C. 大黄($2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 40 d)组; D. 大黄($2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 50 d)组; E. 大黄($2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 d)组; F. 大黄($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 d)组(图 2 同)

图 1 大黄水提物对成年大鼠子宫组织形态学的影响 (HE 染色, A, B. $\times 200$; C, D, E, F. $\times 400$) (图 2 同)

3.3.2 卵巢的组织形态学观察 正常组卵巢体积大, 卵泡生长活跃, 可见各级卵泡, 颗粒细胞层次多, 卵泡液含量多, 黄体发育良好, 体积大, 血

表 3 大黄水提取物对成年大鼠卵巢质量及卵巢指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药时间 / d	卵巢质量 / g	卵巢指数 / %
空白对照	-	-	0.18 ± 0.020	0.07 ± 0.007
大黄	1.0	30	0.17 ± 0.005	0.07 ± 0.003
	1.0	40	0.17 ± 0.004	0.07 ± 0.002
	1.0	50	0.16 ± 0.006	0.07 ± 0.002
	1.0	60	$0.16 \pm 0.002^{1)}$	$0.07 \pm 0.001^{1)}$
	2.0	30	$0.16 \pm 0.025^{1)}$	$0.068 \pm 0.008^{1)}$
	2.0	40	$0.16 \pm 0.011^{1)}$	$0.065 \pm 0.007^{1)}$
	2.0	50	$0.16 \pm 0.012^{1)}$	$0.065 \pm 0.005^{1)}$
	2.0	60	$0.14 \pm 0.014^{2)}$	$0.061 \pm 0.006^{2)}$

较薄, 平滑肌细胞细长, 内环外纵, 规则排列, 子宫内
膜厚, 内膜腺体形态规则, 腺腔大, 圆形或椭圆形, 腺
体丰富, 腺体上皮细胞均为单层立方或柱状。 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30,40,50 d 组与空白对照组比较无明显改变, $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30 d 组和 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 d 组子宫内膜均
轻微变薄、腺体轻度减少, 无炎细胞浸润; $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
40,50,60 d 组子宫内膜变薄、腺体减少都比较明显,
腺腔变的不规则, 50,60 d 组最为明显; 子宫内膜有炎
细胞浸润, 有嗜酸性粒细胞存在, 上皮细胞出现水肿,
见图 1。 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 无明显病理改变组图略。

管丰富。 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30,40,50 d 组与空白对照组
比较无明显改变; $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 d 组与高剂量 30 d
组均表现为卵巢略有萎缩, 卵泡数稍有减少, 黄

体数量略少。大黄 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 40,50,60 d 组表现为各级卵泡数均减少,黄体数减少,闭锁卵泡数增多,卵母细胞颗粒层数减少,卵泡内细胞排列出现

紊乱,大黄 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 50,60 d 组卵泡内结构紊乱更加明显, $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组无明显病理改变。见图 2。

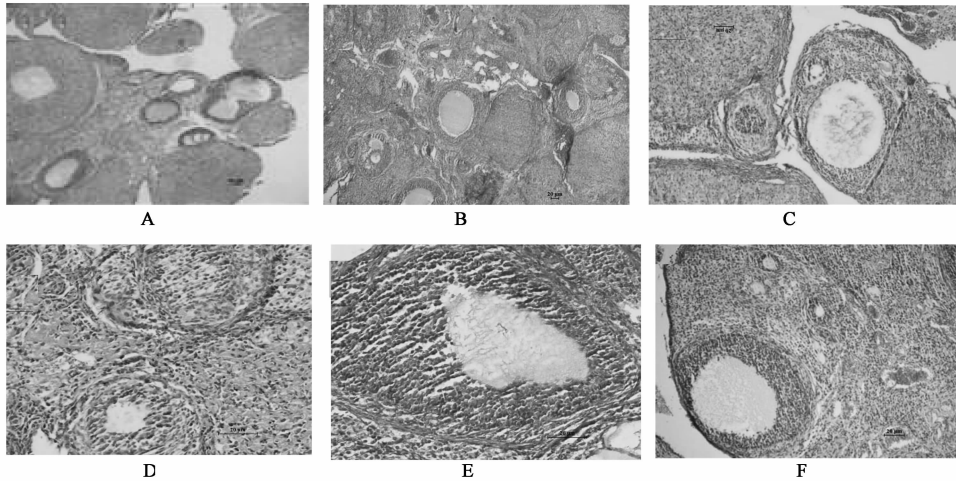


图 2 大黄水提物对成年大鼠卵巢组织形态学的影响

4 讨论

卵巢的功能主要依靠卵泡的血管生成而产生^[8]。卵泡是卵巢功能的物质基础,卵泡数量及结构的改变对卵巢功能影响较大^[9]。卵泡发育受卵巢血流影响,始基卵泡没有单独的血供,由基质血管传递营养物质和激素,故卵巢血流与卵巢反应密切相关^[10]。本实验研究显示,大黄可致雌性大鼠卵巢质量减轻,卵巢指数 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组与对照组比较具有统计学意义。长期大量使用大黄导致卵巢血管减少,组织发生纤维化改变,卵泡颗粒细胞层减少,透明带模糊不清,提示大黄可导致卵母细胞发育环境受到损害,各剂量组小卵泡均明显减少,提示即使低剂量大黄亦可能对卵巢储备造成影响,随着用药剂量增高和用药时间的延长,则中、大卵泡数和黄体数明显减少,提示卵泡的发育与大黄用药剂量和用药时间呈负相关。

大黄高剂量长期灌胃可使大鼠子宫指数降低,子宫内膜水肿,内膜腺体含量减少,肌纤维稀疏,说明大黄对子宫组织结构有一定的损伤,随用药时间延长逐渐加重,高剂量 60 d 时损伤最为明显。推测大黄对子宫的损伤可能是由于卵巢分泌性激素失调影响子宫所致,也不排除其对子宫有直接损伤。本实验结果提示,长期应用大黄可影响成年雌性大鼠的生殖功能,并有明显的剂量及时间依赖关系,本研究为临床上合理用药提供了一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] 庄江能. 大黄的主要成分及其临床药理研究进展[J]. 西南军医, 2009, 11(5): 931.
- [2] 高学敏. 中药学. 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 595.
- [3] 周驰. 大黄中蒽醌类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(4): 111.
- [4] 曹俊岭, 孙玉琦, 肖小河, 等. 对大黄“毒性”的认识与思考[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(2): 112.
- [5] 王心如. 毒理学基础[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 119.
- [6] 苗明三, 王 灿. 中药对生殖系统毒性的研究分析[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 284.
- [7] 胡晓丞, 李亚洲, 高冲, 等. 大黄水提物对雄性小鼠睾丸影响的实验研究[J]. 承德医学院学报, 2012, 29(1): 18.
- [8] 王月飞, 田艳君, 肖晓辉, 等. 中药益坤宁对围绝经期大鼠卵巢血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6): 45.
- [9] Popovic Todorovic B, Loft A, Lindhard A. A prospective IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram[J]. Hum Reprod, 2003, 18(4): 781.
- [10] 马晓玲, 高云荷, 郭红宇, 等. 促性腺激素释放激素类似物预防化疗对大鼠卵巢损伤作用的研究[J]. 生殖与避孕, 2005, 25(3): 137.

[责任编辑 李玉洁]