

牛膝正丁醇萃取物对小鼠繁殖性能的影响^{*}

卜书海^a, 李青旺^b, 郑雪莉^a, 胡建宏^b, 屈宁宁^c

(西北农林科技大学 a 林学院, b 动物科技学院, c 校医院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 用不同剂量(0.5, 2.0, 4.0 g/kg)牛膝正丁醇萃取物给配对前的成年小鼠连续灌喂 15 d, 检测部分雄鼠精液品质、睾丸发育情况和内脏器官; 同时在雌、雄小鼠合笼后观察小鼠妊娠及胚胎发育情况, 以探讨牛膝正丁醇萃取物对成年小鼠繁殖性能的影响。结果表明, 牛膝正丁醇萃取物不能明显干扰小鼠的繁殖性能, 小鼠可以正常发情、妊娠, 且胎儿发育正常, 仅 4.0 g/kg 剂量处理组母鼠的胎仔数与其他各组相比差异显著($P < 0.05$)。2 和 4 g/kg 灌喂剂量可引起小鼠脾脏、肝脏、肾脏出现急性炎症反应。

[关键词] 牛膝正丁醇萃取物; 小鼠; 繁殖性能; 内脏病变

[中图分类号] S814.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0031-04

牛膝(*Achyranthes bidentata* Blume)为苋科牛膝属多年生草本药用植物, 其味苦、酸, 性平偏凉, 走下焦入肝肾。因其具有下行之性, 常用于活血通经、补肝肾、强筋骨, 可治疗难产、胞衣不下等病症及堕胎^[1]。许宏亮等^[2]、王晓娟等^[3]、惠永正等^[4]研究认为, 牛膝的活性物质主要为聚糖类、皂甙类和蜕皮激素类。王晓娟等^[3]、孟大利等^[5]研究表明, 牛膝通过正丁醇萃取后可以获得多种皂苷类成分, 如 3-O-[α -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 3)- β D-吡喃葡萄糖醛酸]-齐墩果酸-28-O-(β D-吡喃葡萄糖)、3-O-(β D-吡喃葡萄糖醛酸)-齐墩果酸-28-O-(β D-吡喃葡萄糖)、竹节参皂甙-1 等, 这些皂甙均为五环三萜皂甙, 其皂苷元为齐墩果酸。牛膝皂甙具有重要的药理活性, 如抗炎、抗菌和镇痛作用^[6], 以及对肿瘤细胞的抑制作用^[7]和对雌性动物的抗生育作用^[8-11]。但是, 目前国内关于牛膝皂甙类抗生育作用的研究只是侧重于对小鼠等实验动物抗孕卵着床和抗早孕方面^[8-11], 而对动物其他生理阶段生殖机能的作用研究报道较少, 尤其对配对前期动物繁殖性能影响的研究几乎未见报道。为此, 本研究根据常规繁殖毒理研究方法, 探讨了牛膝正丁醇萃取物对动物配对前期繁殖性能和生殖器官的影响, 以为牛膝的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 选用健康、繁殖性能正常、体重为 25~30 g 的二级 ICR 小白鼠 120 只。

1.1.2 牛膝正丁醇的萃取 按照文献[3]的提取方法, 取怀牛膝根(购自河南沁阳)5 kg, 洗净, 60℃干燥后粉碎, 然后依次用体积分数为 95%, 70% 和 50% 的乙醇浸提 3 d, 合并滤液并减压浓缩后, 分别用乙醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 即可获得牛膝正丁醇萃取物 174 g, 使用前用 0.9% 生理盐水稀释。

1.2 试验方法

将 120 只小白鼠按雌、雄分开, 根据性别和体重随机分为 6 个处理组和 2 个对照组, 每组 15 只, 所有小白鼠的日粮和营养标准以及饲养管理均相同。对照组小白鼠灌喂 0.9% 生理盐水溶液, 处理组小白鼠按照 0.5, 2.0 和 4.0 g/kg 的设计剂量每日灌喂 1 次, 连续灌服 15 d。在末次给药 48 h 后每组随机处死 5 只小白鼠进行剖检, 称量肝脏、肾脏、脾脏、卵巢和睾丸重量, 然后制片, 并用 HE 染色后镜检观察。对雄性小白鼠, 取其输精管精子, 利用常规检查方法评定精液品质。

将每组剩余小鼠在末次给药后 48 h 按雌、雄数量 2:1 的比例与未处理小鼠合笼, 翌日上午对雌鼠进行阴道栓检查。在合笼 20 d 解剖雌鼠, 统计死、活

^{*} [收稿日期] 2005-12-26

[基金项目] 西北农林科技大学青年科研专项(04zm023)

[作者简介] 卜书海(1974-), 男, 黑龙江佳木斯人, 讲师, 主要从事动物保护研究。

[通讯作者] 李青旺(1956-), 男, 陕西西乡人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

E-mail: liqingwangysu@yahoo.com.cn

胚胎数(含着床点),分析胎儿发育情况及母鼠的妊娠率。

1.3 数据统计与分析

在试验期间,每天观察并记录各组小鼠的临床表现,试验数据利用 Excel 软件进行统计处理。

2 结果与分析

2.1 牛膝正丁醇萃取物对小白鼠妊娠率的影响

不同给药剂量的牛膝正丁醇萃取物对母鼠妊娠的影响情况见表 1。从表 1 可知,3 个处理组母鼠的

妊娠率均为 100%,但胚胎在着床后的发育过程中都不同程度地被子宫吸收,且吸收胚胎随用药剂量的增加而上升,特别是处理 I 组中的 1 只雌鼠,其 10 个胚胎在怀孕早期全部终断发育而被子宫吸收,其子宫特征几乎呈未孕鼠的子宫状态,其胎仔数与其他各组相比差异显著($P < 0.05$)。但是,不同处理组母鼠的妊娠率、胚胎着床点数与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。从雄鼠处理组可知,3 个雄鼠组配偶母鼠的妊娠率均为 100%,胎仔数与对照组亦无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 牛膝正丁醇萃取物对小鼠妊娠的影响

Table 1 Effects of n-butanol extract from achyranthes bidentata on pregnancy of mice

组别 Group	性别 Sex	剂量/ (g · kg ⁻¹ · d ⁻¹) Dose	妊娠率/% Pregnant ratio	终止妊娠鼠数 Termination of pregnancy	着床点数 No. of embryo implantation	胎仔数 Viable fetuses per pregnant mouse
I	♀	4.0	100	1	9.91 ± 1.34	6.50 ± 2.00 a
II	♀	2.0	100	0	10.58 ± 1.01	10.08 ± 1.10 b
III	♀	0.5	100	0	11.29 ± 3.82	10.87 ± 2.37 b
CK I	♀	-	100	0	10.42 ± 2.41	10.16 ± 3.75 b
IV	♂	4.0	100	-	-	11.08 ± 5.10
V	♂	2.0	100	-	-	9.50 ± 1.43
VI	♂	0.5	100	-	-	9.20 ± 2.20
CK II	♂	-	100	-	-	10.01 ± 3.75

注:同列数据后标不同字母者表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Data with different letters in the same row differ significantly at $P < 0.05$

2.2 牛膝正丁醇萃取物对小鼠性行为 and 胚胎发育的影响

对小鼠灌服牛膝正丁醇萃取物后,在整个试验期间,各组小鼠均未见异常行为表现,3 个雄鼠处理组小鼠均能够正常交配;3 个雌鼠处理组小鼠均在合笼 3 d (2~ 5 d) 内进入动情期,与对照组的 2 d (1~ 4 d) 相比,其交配时间无明显差异,说明牛膝正丁醇萃取物对小鼠的性行为没有明显影响。

3 个雌鼠处理组母鼠怀孕后子宫发育良好,子宫径粗直,呈大的结节状,淡红色。除极个别胚胎被明显吸收萎缩外,其余胚胎均正常发育。子宫呈密集的串珠状,妊娠 17~ 18 d 的胎儿均呈鲜红色。初生幼仔体重均在 1.8 g 左右,发育正常。

2.3 牛膝正丁醇萃取物对雄鼠精液品质和睾丸质量的影响

不同剂量的牛膝正丁醇萃取物对雄鼠精液品质和睾丸质量及大小的影响见表 2 和表 3。由表 2 可见,V,VI 组小鼠精液中平均精子密度比对照组高,不同处理组之间精子密度虽略有差异,但不显著($P > 0.05$);处理组精子活率、畸形率与对照组相比也没有显著差异($P > 0.05$)。

从表 3 可以看出,不同剂量牛膝正丁醇萃取物对小鼠睾丸的质量和形态无明显影响($P > 0.05$),处理组和对照组小鼠睾丸与体重比值接近,形态正常。

表 2 牛膝正丁醇萃取物对雄鼠精液品质的影响

Table 2 Effects of n-butanol extract of achyranthes bidentata on sperm quality

组别 Group	数量 No. of mice	精子密度/($\times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) Sperm density	精子活率/% Sperm mobility	精子畸形率/% Percentage of sperm abnormality
IV	5	4.71 ± 1.35	75.93 ± 4.68	13.02 ± 2.17
V	5	5.10 ± 0.88	77.41 ± 4.51	10.73 ± 2.33
VI	5	5.32 ± 0.92	76.09 ± 5.18	11.48 ± 3.59
CK II	5	4.93 ± 1.06	77.23 ± 5.32	11.22 ± 2.65

表3 牛膝正丁醇萃取物对雄鼠睾丸发育的影响

Table 3 Effects of n-butanol extract of achyranthes bidentata on testis of male mice

组别 Group	数量 No. of mice	睾丸湿重/mg Weight	睾丸长径/mm Length of testis	睾丸短径/mm Diameter of testis	睾丸与体重比值 Weight ratio of testis to body
IV	5	206.5 ± 12.3	7.25 ± 0.25	4.90 ± 0.05	6.90 × 10 ⁻³
V	5	185.6 ± 31.8	6.51 ± 0.19	4.18 ± 0.03	6.89 × 10 ⁻³
VI	5	173.7 ± 22.6	7.56 ± 0.32	4.63 ± 0.18	6.58 × 10 ⁻³
CK II	5	201.0 ± 21.3	7.73 ± 0.43	5.14 ± 0.38	7.15 × 10 ⁻³

2.4 牛膝正丁醇萃取物对小鼠内脏器官的影响

对停药后的雌、雄鼠内脏进行镜检观察发现,牛膝正丁醇萃取物主要对 I、II、IV、V 组小鼠的肾脏、肝脏、脾脏有影响,出现了病理变化,表现出以下特征:肾脏肾小球毛细血管内皮细胞增生,充满整个肾小球囊,肾小管上皮细胞胞浆内充满大量红染颗粒,导致细胞肿大,肾小管管腔闭塞,有散在的点状出血;肝脏的肝细胞胞浆内也出现红染颗粒,肝细胞索紊乱,而中央静脉、叶间静脉、胆小管变化不大;脾脏皮质淋巴小结扩张,细胞数目增多,皮质窦、小梁窦有少量浆液及大量红细胞,被膜略有增厚。表明较高剂量(2.0, 4.0 g/kg)的牛膝正丁醇萃取物灌喂可引起小鼠内脏器官发生病变,而低剂量(0.5 g/kg)灌喂时对小鼠内脏器官的作用不明显。

牛膝正丁醇萃取物对所有处理组全部小鼠睾丸、卵巢的作用不明显,雄鼠睾丸形态正常,切片观察可见睾丸上存在精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞以及精细胞;母鼠卵巢内可见大量初级卵泡、已排卵卵泡腔,只有个别小鼠卵巢未见次级卵泡,其他正常。

3 结论与讨论

中草药是我国独特的资源之一,目前已越来越多地应用于畜牧业生产以及家畜繁殖中,并且副作用很小。牛膝作为下行之中药,在复方中应用比较广泛。从本研究看,牛膝正丁醇萃取物口服对小鼠生殖系统的影响作用较小,即使用较大剂量的牛膝正丁醇萃取物处理未配对小鼠,雌、雄小鼠也均能正常发情、排卵,参与繁殖过程,其性行为、存活胚胎均表现正常,母鼠妊娠率均达到 100%,但大剂量处理组妊娠母鼠的胎仔数比其他剂量处理组显著减少。

牛膝正丁醇萃取物中的主要成分是酸性三萜皂苷,皂苷元为齐墩果酸;其次还含有微量的蜕皮甾酮。研究表明^[8-11],牛膝中对动物发挥抗早期妊娠作用和催产功效的活性成分是牛膝中的皂甙。王世祥等^[9]研究认为,牛膝总皂甙抗早孕作用可被外源性黄体酮、人绒毛膜促性腺激素和泰必利部分拮抗;牛膝总皂甙灌喂可显著抑制假孕小鼠和去卵巢小鼠的子宫蜕膜细胞反应,表明其不仅能改变形成和维持蜕膜细胞反应所需的激素环境,而且对蜕膜组织有一定的直接作用,这可能是牛膝总皂甙抗着床、抗早孕机制中的重要因素。本研究也提示,牛膝皂甙作用的靶器官可能是子宫,但是由于未孕子宫的微环境不同于妊娠子宫,因而对未孕子宫的干扰作用较小。

动物发情主要依靠雌激素的作用,一定量的雌激素作用于母畜生殖道使之产生一系列变化,并将信息作用于大脑皮层,使雌性动物产生性欲,同时出现允许雄性动物爬跨、交配等外部行为的变化。从本试验结果来看,牛膝正丁醇萃取物发挥作用的持续时间较短,不产生依赖性,雌鼠停止灌药后不影响其发情、交配及胚胎着床,这表明牛膝皂甙无抗雌激素样作用,这与王世祥等^[9]的研究结论一致。

牛膝正丁醇萃取物对小鼠精液品质影响的研究表明,短期内灌服时其作用不很明显,对雄鼠睾丸曲细精管没有明显的损伤作用,不能抑制精子的发生,并且对精子密度、活率等无不良影响。同时,牛膝皂甙也不能抑制母鼠卵巢上卵泡的生长发育,母鼠可以正常发情、排卵和妊娠。但从组织切片观察可知,2.0 和 4.0 g/kg 处理组能引起小鼠肝脏、脾脏、肾脏出现急性炎症反应,尤其是雌鼠肾脏炎症反应的程度明显高于雄鼠。关于长期灌服牛膝皂甙对小鼠睾丸和子宫的影响还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 418-419.
- [2] 许宏亮, 陆善森. 长叶牛膝与怀牛膝中蜕皮激素的分离和鉴定[J]. 中成药研究, 1981(1): 35-37.

- [3] 王晓娟, 朱玲珍. 牛膝皂甙的化学成分研究[J]. 第四军医大学学报, 1996, 17(6): 427-430.
- [4] 惠永正, 邹卫, 田庚元. 牛膝根中一活性寡糖(ABS)的分离和结构研究[J]. 化学学报, 1989, 47(6): 621-622.
- [5] 孟大利, 李铄. 中药牛膝中化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(1): 27-30.
- [6] 高昌琨, 高建, 马如龙. 牛膝总皂苷抗炎、镇痛和活血作用研究[J]. 安徽医药, 2003, 7(4): 248-249.
- [7] 王一飞, 王庆端, 刘晨江, 等. 怀牛膝总皂苷对肿瘤细胞的抑制作用[J]. 河南医科大学学报, 1997, 32(4): 4-6.
- [8] 朱和, 车锡平. 牛膝总皂甙对动物子宫平滑肌的作用[J]. 中草药, 1985, 18(4): 17-21.
- [9] 王世祥, 井文寅. 怀牛膝总皂甙抗生育作用及其机理[J]. 西北药学杂志, 1997, 12(5): 209-211.
- [10] 朱和, 车锡平. 怀牛膝总皂苷(ABS)对大小白鼠抗生育作用的研究[J]. 西安医科大学学报, 1987, 8(3): 246-248.
- [11] 袁毅君, 秦晓民, 徐敬东, 等. 怀牛膝对未孕大鼠子宫平滑肌峰电活动的影响[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2002, 38(3): 82-86.

Effects of n-Butanol extract from *Achyranthes bidentata* on reproductive performance of mice

BU Shu-ha^a, LI Qin-wang^b, ZHENG Xue-li^a, HU Jian-hong^b, QU Ning-ni^c

(a College of Forestry, b College of Animal Science and Technology, c Hospital, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to study the reproductive effects of n-butanol extract from *Achyranthes bidentata* on premarital mice, the research observed testis, sperm quality and viscera of male mice, as well as Pregnancy and fetuses of female mice after n-butanol extract from *A. bidentata* (0.5, 2.0, 4.0 g/kg) for 15 d in premarital mice. The results showed that it had no significant antifertility action in females and males, except that viable fetuses per pregnant mouse in group I (4.0 g/kg) was significantly different from that of the control mice ($P < 0.05$). Meanwhile, significant pathological changes were found in the liver, spleen and kidney in the n-butanol extract of *Achyranthes bidentata* supplementation when the dosage was 2.0 g/kg and 4.0 g/kg.

Key words: n-butanol extract from *Achyranthes bidentata*; mice; reproductive performance; viscera