

黄花棘豆生物碱对体外大鼠卵黄囊 胎盘结构及功能的影响*

吴永魁, 常国权

(解放军军需大学 军事兽医研究所, 长春 130062)

[摘要] 结合电镜技术, 应用体外全胚胎培养(WEC)方法, 观察了黄花棘豆生物碱对大鼠卵黄囊(YS)胎盘及胚胎的影响。结果表明, 黄花棘豆生物碱质量浓度在 50 $\mu\text{g/mL}$ 以上时, YS 血管分化程度明显减低, 对胚胎器官形态学分化的影响有剂量反应关系; 质量浓度在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, YS 直径和畸胎数与对照组有显著差异。电镜观察发现, 剂量在 50 $\mu\text{g/mL}$ 以上时, YS 上皮细胞微绒毛稀疏变短, 胞质中贮液泡减少, 线粒体、内质网等内膜系统发生多种细胞病理学改变, 细胞间隙增宽, 连接复合体破坏。表明 YS 血管分化及其超微结构对棘豆生物碱反应敏感, 其分化程度与对胚胎发育程度的影响一致, 可以认为 YS 结构与功能受损是黄花棘豆生物碱导致胚胎发育毒性所致。

[关键词] 黄花棘豆; 生物碱; 卵黄囊胎盘; 全胚胎培养

[中图分类号] S865.1⁺20.3; S859.83

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2003)01-0117-04

棘豆属(*Oxytropis*)植物在我国西北牧区草场广泛分布, 是危害最严重的毒草, 其不但能引起多种家畜中毒死亡, 而且还能使家畜繁殖性能下降, 因此, 已成为牧区草地畜牧业发展的一大障碍。生物碱是棘豆的主要有毒成分^[1,2], 其在抗肿瘤等方面的药用价值已引起人们的关注^[3]。毒理学研究表明, 生物碱对体外培养大鼠胚胎有直接发育毒性^[4]。卵黄囊(Yolk Sac, YS)胎盘是啮齿类动物早期器官形成期胚胎与母体进行物质交换的主要场所^[5], YS 结构与功能受损, 必然影响胚胎的生长发育。本试验采用研究 YS 功能的模型之一——体外全胚胎培养(Whole Embryo Culture, WEC)法, 结合电镜技术, 探讨了黄花棘豆(*O. ochrocephala*)生物碱对 YS 结构及功能的影响。

1 材料和方法

黄花棘豆生物碱 黄花棘豆于花期至结荚期采集于甘肃, 自然阴干后粉碎。生物碱提取采用醇类溶剂提取法^[6], 经生物碱沉淀反应和薄板层析鉴定, 至少有 4 种生物碱成分。

动物 Wistar 大鼠(雄鼠体重 > 280 g, 雌鼠体重 > 250 g)由吉林大学实验动物中心提供。雌雄按 1:1 于 18:00 合笼, 次日晨阴道涂片, 发现精子定为妊娠 0 d。

培养基 采取大鼠血液, 立即分离血清, 经 56

, 30 min 灭活, 并加入 30 mg/L 青霉素和 50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, -20℃ 冰箱保存。

胚胎分离与培养 取妊娠 9.5 d 大鼠处死, 在超净工作台上分离胚胎, 用自制旋转培养装置培养胚胎 48 h, 培养期间分 4 次充入含有不同比例 O_2 , CO_2 和 N_2 的混合气体^[4]。

试验分组 试验共分 6 组。体外对照组: 9.5 d 大鼠胚胎体外培养 48 h; 溶剂对照组: 培养基中加入体积分数 0.1% 的 DM SO; 黄花棘豆生物碱 1~4 组: 质量浓度分别为 25, 50, 100 和 200 $\mu\text{g/mL}$, 开始培养时直接加入培养基, 并补足 DM SO 与溶剂对照组浓度相同。

观测指标 培养 48 h 后, 在解剖显微镜下用目镜测微尺测 YS 直径。按 Brown 形态学记分方法对 YS 血管分化程度和胚胎器官形态学发育状况评分^[7]。并将剥下的 YS 用体积分数 2.5% 戊二醛固定, 经冲洗、再固定、脱水、包埋、制片和染色后, 透射电镜下观察其超微结构的变化。

数据处理 应用 SAS 统计软件对数据进行 t 检测、 χ^2 检验和相关性分析, 确定差异显著性。

2 结果与分析

2.1 黄花棘豆生物碱对 YS 及胚胎发育的影响

培养 48 h 后, 溶剂对照组与体外对照组胚胎的各项指标近似(表 1)。由表 1 可见, 棘豆生物碱在剂

* [收稿日期] 2002-01-24

[作者简介] 吴永魁(1963-), 男, 河北正定人, 助理研究员, 硕士, 主要从事兽医药理毒理及新药安全性评价研究。

量 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时,YS 血管分化程度低于对照组 ($P < 0.01$),胚胎器官分化总记分也低于对照组 ($P < 0.01$),而 YS 直径在剂量 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时才低于对

照组 ($P < 0.01$),胚胎总记分和畸形率与剂量之间具有直线相关关系。

表 1 黄花棘豆生物碱对大鼠 YS 及胚胎发育的影响

Table 1 Effects of *Oxytropis ochrocephala* alkaloid on YS and embryo development

组别 Groups	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Dose	胚胎数 Embryo numbers	YS 直径/mm YS diameter	YS 血管分化记分 YS blood vessel differentiation score	畸形数 Malformed embryo numbers	畸形率/% Malformed embryo ratio	Brown 总分 Brown total score
体外对照 <i>In vitro</i> control		19	4.35 $\pm$ 0.27	3.00 $\pm$ 0.00	0	0	48.89 $\pm$ 1.91
溶剂对照 Solvent control	1.00	18	4.39 $\pm$ 0.44	3.00 $\pm$ 0.00	3	16.7	48.67 $\pm$ 2.28
黄花棘豆生物碱 <i>Oxytropis ochrocephala</i> alkaloid	25	11	4.27 $\pm$ 0.21	3.00 $\pm$ 0.00	2	18.2	47.27 $\pm$ 1.74
	50	16	4.40 $\pm$ 0.76	2.44 $\pm$ 0.51**	4	25.0	43.94 $\pm$ 3.15**
	100	16	4.13 $\pm$ 0.26	2.56 $\pm$ 0.63**	7	43.8	38.75 $\pm$ 6.17**
	200	15	3.95 $\pm$ 0.43**	1.87 $\pm$ 0.74**	11	73.3**	33.47 $\pm$ 6.76**

注: ** 示与溶剂对照组比较, $P < 0.01$ 。
Note: ** Comparison with solvent control group, $P < 0.01$.

2.2 黄花棘豆生物碱对 YS 超微结构的影响

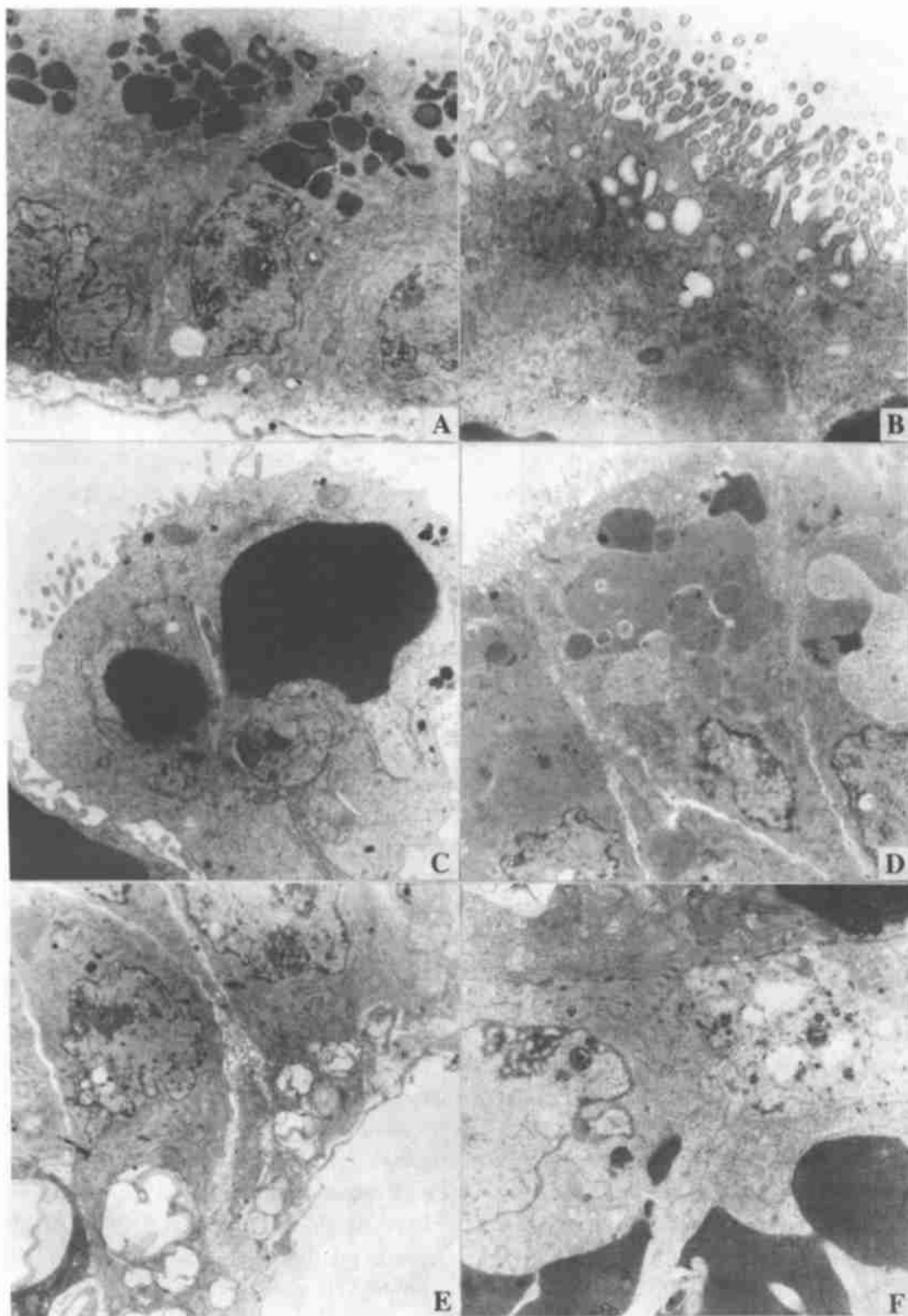
透射电镜观察表明,正常体外培养 11.5 d, 胚胎 YS 内胚层上皮细胞顶部有大量微绒毛, 胞质顶部有饮泡和大量贮液泡, 各种细胞器正常, 基底部膜正常, 细胞间连接紧密(图版 A, 图版 B)。棘豆生物碱在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时, 可使培养胚胎 YS 内胚层上皮细胞表面微绒毛稀疏、变短、脱落, 有的发生肿胀(图版 C); 胞质顶部饮泡和贮液泡减少, 并出现电子密度较低的更大的液泡, 其中分布有次级溶酶体和过氧化酶体(图版 D); 胞质内尤其基底部有大量空泡, 有的空泡内有均质性物质, 有的有髓样结构(图版 E); 局部胞质溶解, 细胞器坏死、消失, 出现溶解斑; 线粒体肿胀, 嵴排列紊乱, 减少或消失成空泡; 粗面内质网数量减少; 高尔基器减少, 细胞核形态不规则, 有的出现电子密度高的圆形类包涵物(图版 F); 上皮细胞间隙增大, 连接复合体破坏; 基底膜断裂, 局部变厚(图版 D, 图版 E); 间质层毛细血管数量减少。并且随剂量增加, 细胞病理学损害加重。

3 讨论

啮齿类动物胚胎在绒毛膜尿囊胎盘循环建立之前, 即在早期器官形成期, 主要依赖 YS 胎盘与母体进行物质交换, YS 是胚胎发育的第一个功能胎盘。YS 由上皮细胞、间质层和间皮层构成。柱状上皮细胞顶端微绒毛有很高内吞活性, 具有对小分子的转运和对来自母体大分子的内吞作用, 以及随后在溶酶体内的消化与代谢, 使其具有组织营养功能。另

外, YS 还对维生素 B₁₂、钙、其他离子、糖和氨基酸的转运系统有旺盛的合成作用, 并分泌大量蛋白质。YS 中的血岛是胚胎最早的造血器官, 也是哺乳动物免疫系统的发生器官。任何对 YS 结构和功能的损害均可影响胚胎的生长发育, 并导致胚胎发育毒性^[5]。黄花棘豆生物碱在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时, 对 YS 血管分化有明显抑制作用, 进而影响了 YS 血液循环, 并在该剂量条件下导致胚胎器官形态学分化程度减低, 二者有明显相关性。而 YS 直径在剂量增加到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时才小于对照组。因此, YS 血管分化程度较 YS 直径更能反映棘豆生物碱对胚胎形态学分化的影响。随剂量增加, 在对胚胎形态学分化影响加重的同时, 胚胎畸形也随之增加, 但在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时才显现统计学意义, 这与影响 YS 直径的剂量是一致的。因此, 产生胚胎致畸效应所需剂量比影响 YS 和胚胎发育所需剂量要大。这一方面说明 YS 血管分化对有害物质反应敏感, 并与影响胚胎发育程度一致, 另一方面说明 YS 或胚胎本身对致畸可能有一定保护作用。

形态学改变是功能改变的重要特征之一^[7], 黄花棘豆生物碱对 YS 形态学的影响, 如血管分化程度减低、超微结构的改变等, 均可影响其功能。YS 上皮细胞微绒毛以及胞内饮泡和贮液泡的减少, 说明其内吞功能减弱, 摄取营养物质减少; 内质网数量减少使蛋白质合成和转运能力以及脂类、糖类代谢能力降低; 线粒体损害使细胞内氧化磷酸化作用减弱, 产生 ATP 减少; 高尔基器减少可影响糖蛋白的



图版 黄花棘豆生物碱对 YS 超微结构的影响

A. 正常培养 11.5 d 的胚胎 YS 内胚层上皮细胞 $\times 5\ 000$; B. 正常培养 11.5 d 胚胎 YS 内胚层上皮细胞 $\times 16\ 000$;
C. 200 $\mu\text{g/mL}$ 处理 $\times 8\ 000$; D. 50 $\mu\text{g/mL}$ 处理 $\times 6\ 000$; E. 50 $\mu\text{g/mL}$ 处理 $\times 5\ 000$; F. 200 $\mu\text{g/mL}$ 处理 $\times 8\ 000$

Plate Effects of *Oxytropis ochrocephala* alkaloid on YS supemicrostructure

A. 11.5 Day YS endodermal epithelium cell of normal culture embryo $\times 5\ 000$; B. 11.5 Day YS endodermal epithelium cell of normal culture embryo $\times 16\ 000$; C. Dispose 200 $\mu\text{g/mL}$ $\times 8\ 000$; D. Dispose 50 $\mu\text{g/mL}$ $\times 6\ 000$; E. Dispose 50 $\mu\text{g/mL}$ $\times 5\ 000$;

F. Dispose 200 $\mu\text{g/mL}$ $\times 8\ 000$

合成、加工、分泌及膜的转变;细胞间隙增大使细胞之间联系出现障碍,细胞间通讯及相互作用失调;基膜受损也使细胞内环境改变。由结构损害所致YS功能出现障碍,特别是内吞作用减弱,使处于易感期快速增殖和分化的胚胎细胞营养紊乱,功能失调,最终导致胚胎发育异常。而棘豆生物碱引起YS血管分化程度减低,YS超微结构改变及胚胎发育障碍的剂量均为 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。因此,YS胎盘结构与功能

受损是黄花棘豆生物碱导致胚胎发育毒性的重要机制。胎儿生长和发育的不同阶段,YS有不同功能,而且YS上皮不同区域的超微结构几乎没有差异^[5]。将YS作为一个重要的靶组织,从研究其结构和功能入手,应用研究YS功能的不同技术方法,将进一步阐明有害物质对YS胎盘及胚胎发育的影响。

[参考文献]

- [1] 史志诚 动物毒物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001 249- 255
- [2] James L F, Panter K E, Nielsen D B, et al The Effect of natural toxins on reproduction in livestock[J]. J Anim Sci, 1992, 70: 1573- 1579
- [3] 史志诚 中国草地重要有毒植物[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997 64
- [4] 吴永魁, 田慧英, 淡 伦, 等 黄花棘豆生物碱对体外大鼠胚胎的发育毒性[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(1): 55- 60
- [5] Beckman D A, Koszalka T R, Jensen M A, et al Experiment manipulation of the rodent visceral yolk sac[J]. Teratology, 1990, 41: 395- 404
- [6] 李仪奎 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991 43- 44
- [7] Hunter III E S, Sadler T W. The Role of the visceral yolk sac in hyperglycemia-induced embryopathies in mouse embryos *in vitro*[J]. Teratology, 1992, 45: 195- 203

Effects of *Oxytropis ochrocephala* alkaloid on structure and function of rat yolk sac placenta *in vitro*

WU Yong-kui, CHANG Guo-quan

(Military Veterinary Institute, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: The effects of *Oxytropis ochrocephala* alkaloid on rat yolk sac (YS) placenta and embryo development *in vitro* were investigated by using the whole embryo culture (WEC) method and electron microscopy. The results showed that the alkaloid caused remarkable retardation of YS blood vessel differentiation and embryo development at dose of over $50\text{ }\mu\text{g/mL}$. Dose-dependent relationship was noticed. At concentration of $200\text{ }\mu\text{g/mL}$, YS diameter was lower than that of control group, and malformation embryo numbers were larger than that of control group. Many pathological changes of the YS ultrastructure were observed at dose of over $50\text{ }\mu\text{g/mL}$. The major changes include sparse and short and loose microvilli of endodermal epithelium cells, a reduction in apical microvesicles and subapical storage vacuoles, swelling of the mitochondria and a reduction or disappear in its crista, a decrease in rough endoplasmic reticulum, abnormality in pattern and structure of nucleus, an increased vacuolation in cells, an extend in the interval of adjacent cells. The results indicated that blood vessel differentiation and ultrastructure of YS were sensitive to the alkaloid. Damage of YS had a high bearing on retardation of embryo development. The injuries of structure and barrier to function of YS placenta was an important mechanism of the alkaloid that caused embryo developmental toxicity.

Key words: *Oxytropis ochrocephala*; alkaloid; yolk sac placenta; whole embryo culture