

家兔萱草根素中毒的病理学观察*

赵兴华, 刘志滨, 何欣, 余永涛, 王建华

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 给家兔灌服低剂量(6 mg/kg)、中剂量(12 mg/kg)和高剂量(24 mg/kg)的萱草根素, 研究其对家兔的毒性作用。结果显示, 家兔均发生以中枢神经系统紊乱为特征的中毒症状, 且存在明显的量-效关系; 中毒家兔大脑、小脑和脊髓的白质呈丝瓜络样, 结构异常疏松, 肾小管上皮细胞肿胀、破裂, 视网膜节细胞萎缩, 肝细胞肿胀, 颗粒变性, 脾脏、肺脏严重充血。表明萱草根素能引起家兔以中枢神经系统病变为主的全身性病理变化。

[关键词] 家兔; 萱草根素; 中毒; 病理学

[中图分类号] S856.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0017-03

Pathology of hemerocallin poisoning in rabbits

ZHAO Xing-hua, LI Zhi-bin, HE Xin, YU Yong-tao, WANG Jian-hua

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Rabbit were infused with hemerocallin with low dosage (6 mg/kg), middle dosage (12 mg/kg), and high dosage (24 mg/kg), to study its poisonine. All the rabbits showed toxic signs of CNS disorder, and obvious amount-effect relationship. Histopathological changes demonstrated the following symptoms such as: the loose structure of white matters of brain and spinal cord like vegetable sponge, swollen and broken epithelia of nephric tubule, atrophy retinal ganglion cells, swelled hepatic cells, denatured granular, spleen and lung were hyperaemic etc. The result indicated that the hemerocallin could cause pathological change of central nervous system and other general pathological changes in rabbits.

Key words: rabbit; hemerocallin; poisoning; pathology

萱草根素(Hemerocallin)是百合科(Liliaceae)萱草属(*Hemerocallis* L.)有毒种根中的主要有毒成分,有毒种包括北萱草(*H. esculenta* Koidz)、北黄花菜(*H. lilio-asphodelu* L. emend Hyland)、小黄花菜(*H. minor* Mill)、野黄花菜(*H. altissima* Stout)和童氏萱草(*H. thunbergii* Baker)。羊萱草根素中毒在我国已有 100 多年的历史,并且只在我国发生,国外未见报道,在陕西、甘肃等地区常年流行,危害当地畜牧业^[1-5]。近年来,在甘肃陇东地区又发生牛采食萱草根中毒的病例,造成严重经济损失^[6-7]。此外,萱草根素还会引起人中毒死亡^[8]。萱草根素中毒的流行

病学已经调查清楚^[9],但中毒机理还不很清楚,还没有有效的解毒药物。为此,本研究复制家兔萱草根素中毒模型,并对其进行病理学观察,以为萱草根素中毒机理研究奠定基础。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 北黄花菜根 2005-04 采于陕西长安县南五台,植物样本由西北农林科技大学动物科技学院王建华教授鉴定为北黄花菜。将样本用自来水洗去泥土,60℃ 烘干至恒重,粉碎过 830 μm × 830 μm 筛

* [收稿日期] 2006-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571315)

[作者简介] 赵兴华(1979-),男,河北遵化人,在读博士,主要从事动物中毒性疾病研究。

[通讯作者] 王建华(1948-),男,河南南阳人,教授,博士生导师,主要从事家畜中毒性疾病和营养代谢性疾病研究。

E-mail: jhwang1948@sina.com

备用。

1.1.2 试验动物 大耳白兔 12 只,雌雄不限,质量 1.5~2.0 kg,购于杨凌诚信兔场。

1.1.3 主要试剂及仪器 氯仿、丙酮和乙醚,天津化学试剂六厂,分析纯;多聚甲醛,天津市博迪化工有限公司,分析纯;层析用氧化铝,上海五四化学试剂有限公司;FD 8505 型低温冷冻干燥机,美国 S M 公司;UV 1102 型紫外-可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;820 型旋转切片机,美国。

1.2 萱草根素的提取与鉴定

1.2.1 萱草根素的提取 取 1 kg 干燥萱草根粉,平均分装于 5 只 1 000 mL 烧瓶中,分别加入 700 mL 氯仿,在 50~60 ℃ 水浴条件下进行热回流提取,共进行 3 次,每次 2 h。合并各次提取液,浓缩成浸膏。依次用乙醚和丙酮洗涤此浸膏,得棕黄色不溶性沉淀。用碱性丙酮溶液溶解该沉淀,通过氧化铝柱层析,用碱性丙酮洗脱,收集黄色洗脱液。洗脱液减压浓缩至 5 mL,加 0.6 mol/L HCl 5 mL 酸化产生不溶性桔黄色沉淀,用双蒸水洗涤沉淀,冷冻干燥,得金黄色粉末,疑为萱草根素。

1.2.2 萱草根素的鉴定 对提取的金黄色粉末进行薄层层析法和紫外光谱扫描法鉴定。薄层层析法吸附剂采用硅胶 GF,展开剂 I 为 V (无水乙醇) V (丙酮) = 63 : 37 混合液,展开剂 II 为 V (甲醇) V (乙酸乙酯) = 1 : 1 混合液,倾斜上行展开,显色剂为 20 g/L 三氯化铁无水乙醇溶液。紫外光谱扫描法用甲醇和 0.1 g/L NaOH 作溶剂,进行全波段扫描。萱草根素标准品由西北农林科技大学动物科技学院王建华教授提供。

1.3 家兔中毒模型的建立及组织采取

家兔试验前观察 7 d,饮食精神均正常。第 8 天,将 12 只家兔随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 3 只。萱草根素用 10 g/L 淀粉水溶液配成 12 g/L 的悬浮液,低、中和高剂量组分别经胃管灌服萱草根素 6、12 和 24 mg/kg,一次给药后观察,对照组灌服等量的蒸馏水。濒死家兔麻醉后,心脏灌注 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,剖检采集大脑、小脑、脊髓、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等组织,对照组及未死家兔观察 7 d 后,同法采集上述组织。

1.4 家兔萱草根中毒的病理学观察

将采集的组织在 40 g/L 多聚甲醛中进行后固定,石蜡包埋,常规方法制作切片,HE 染色,显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 萱草根素的鉴定结果

试验所得桔黄色粉末用展开剂 I 和 II 展开后, Rf 值分别为 0.82 和 0.79,所绘制的紫外光谱图也与文献[9-10]报道一致,说明所得金黄色粉末为萱草根素。

2.2 家兔萱草根中毒的主要症状

高剂量组家兔精神沉郁,目光呆滞,频频闭眼,眼睛角膜反射迟钝,对眼前晃动物体不敏感,不思饮食,四肢无力,趴卧于笼底,不能站立,强迫运动时,四肢呈游泳状划动,呼吸浅表而急促,有时有磨牙声,排尿停止,体温下降,后期极度衰竭。中剂量和低剂量组家兔也出现上述症状,但时间较晚,且症状较轻。对照组家兔无变化。

2.3 家兔萱草根中毒的剖检变化

高剂量组家兔肠系膜血管、肠管壁血管、胃壁血管及肺脏血管极度扩张,充满鲜红色血液;胆囊体积增大,充满胆汁;脾脏暗红色与淡粉红交替出现;肝脏、肾脏轻度肿大,肾脏表面有出血点;膀胱极度扩张,充满黄色或桔黄色尿液,膀胱壁血管充血,有散在出血点;脑脊膜血管充血,有出血点。中剂量和低剂量组家兔剖检也可见上述病变。对照组家兔剖检无病变。

2.4 家兔萱草根中毒的病理组织学变化

2.4.1 大脑、小脑、脊髓病理变化 家兔大脑、小脑、脊髓白质神经纤维变性,异常疏松,充满空洞,呈丝瓜络样,有的空洞已经深入到大脑皮质部,髓壳变薄,结构不完整;大脑神经细胞肿大,胞核淡染,部分细胞核溶解或消失,呈现空泡状,细胞浆中存在均质红染颗粒;胶质细胞增多,有明显嗜神经现象或卫星化现象,脊髓神经细胞肿大,胞核淡染(图 1A)。

2.4.2 肾脏病理变化 肾小球毛细血管网充血,肾小球周围淋巴细胞浸润;肾小管上皮细胞肿胀,界限不清,有的上皮细胞胞膜破裂,胞质脱落,少数上皮细胞胞核溶解,消失;肾小管管腔狭小,内充淡粉红色物质(图 1B)。

2.4.3 视网膜病理变化 部分视网膜节细胞核溶解,消失,节细胞大小不一,有的发生萎缩。视网膜内网织层出现形态较小、染色深的细胞(图 1C)。

2.4.4 肝脏病理变化 肝细胞肿胀,胞浆中有均质红染颗粒,细胞界限不清楚,窦状隙狭窄,部分窦状隙中有红细胞,有的窦状隙中充有很多嗜中性粒细胞,中央静脉扩张(图 1D)。

2.4.5 脾脏病理变化 脾脏红髓重度充血, 并含有较多的淋巴细胞、浆细胞和巨嗜细胞(图 1 E)。

2.4.6 肺脏病理变化 肺泡壁毛细血管扩张、充

血, 在肺泡腔可见浆液、大量红细胞和中性粒细胞(图 1 F)。

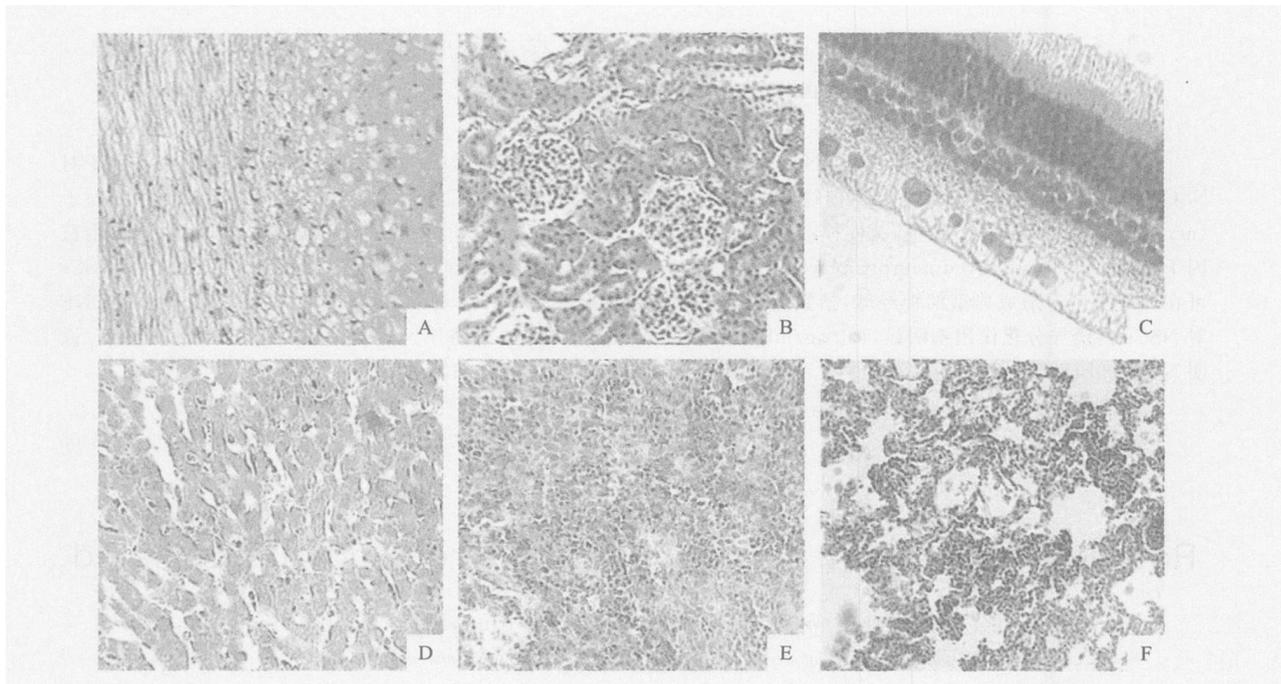


图 1 家兔萱草根素中毒的病理组织学变化(HE 染色)

A. 大脑白质神经纤维($\times 200$); B. 肾小管上皮细胞($\times 200$); C. 视网膜节细胞($\times 400$); D. 肝脏($\times 200$); E. 脾脏红髓($\times 200$); F. 肺脏($\times 200$)

Fig 1 Pathologic change of hemerocallin poisoned rabbit (HE stain)

A. Nerve fibers of white matter denature ($\times 200$); B. epithelia of nephric tubule ($\times 200$); C. retinal ganglion cells ($\times 400$); D. hepatic cells ($\times 200$); E. spleen ($\times 200$); F. lung ($\times 200$)

3 讨论

本研究结果表明, 家兔萱草根素中毒的主要临床症状为失明、后肢或四肢瘫痪, 排尿停止。病理组织学病变主要以大脑、小脑, 脊髓白质异常疏松, 呈现大量空洞。这与萱草根对山羊的毒性作用基本一致^[2,5,10-11], 表明本研究很好地复制出了家兔萱草根素中毒模型。

本研究剖检结果显示, 萱草根素引起家兔内脏血管广泛扩张, 内充满鲜红血液; 肝脏、肾脏、肺脏、脾脏充血, 肝脏、肾脏细胞肿胀, 胞膜破裂, 细胞发生颗粒变性。表明萱草根素对家兔是全身性毒性作用, 能引起广泛的器官和组织损伤。

本试验病理组织学结果表明, 萱草根素主要损害家兔的神经系统, 引起有髓神经纤维结构异常疏松, 呈现大量空洞, 并使神经细胞肿大, 胞核溶解, 这可能与萱草根素的结构有关。萱草根素为多羟基联萘类化合物^[12], 具有多种生理活性, 可能与髓鞘的磷脂发生结合, 使髓鞘磷脂聚积, 致使有髓神经纤维

结构异常疏松, 这一点尚待证实。

萱草根素引起视神经纤维部分或全部断裂、崩解或坏死, 纤维束中出现大量不规则空洞。本试验观察到家兔视网膜节细胞肿胀, 胞核溶解、消失, 部分节细胞发生萎缩, 染色较深。这可能是视神经变性后, 失去与节细胞的联系, 不能发挥营养及调节作用, 致使节细胞坏死或萎缩, 这也可能是家兔失明的原因之一。

【参考文献】

- [1] 孟庆波 陕西淳化县卜家公社城前头第三生产队羊瞎眼病调查和黄花菜根中毒试验初步报告[J]. 甘肃农业大学学报, 1977 (1): 1-4
- [2] 邹康南, 张科仁, 严吉红 绵羊小萱草根中毒的研究[J]. 畜牧科技资料, 1979(4): 1-10
- [3] 武 宁 羊群萱草根中毒的诊疗初探[J]. 中国兽医杂志, 1989, 15(5): 25

(下转第 24 页)

神经元的发育成熟^[9-10],并对交感、感觉及中枢胆碱能神经元具有营养作用。本试验发现,NGF 主要促进神经干细胞向神经元方向分化。BDNF 对神经干细胞的分化有促进作用,可使神经干细胞分化为 GABA 能神经元的比例达 70%^[11],加入 BDNF、IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) 主要诱导神经干细胞向神经元方向分化,其机理可能是通过上调干细胞后代中转录因子 Bm-4 而起作用^[6]。GDNF 是 Lin 等首次从大鼠细胞来源的 B49 细胞株的条件培养基中分离纯化得到的^[12],目前对其诱导分化作用结果报道不一。有研究表明,GDNF 对多巴胺能神经元有特异性营养作用,能促进体内外多巴胺能神经元分化,使神经元胞体增大、轴突延长^[13-14]。但也有文献报道,GDNF 主要诱导 NSCs 向神经胶质细胞和少突胶质细胞分化^[15]。本试验发现,高浓度的 GDNF 可诱导神经干细胞向神经胶质细胞方向分化。

目前,对 NSCs 的定向分化及干细胞可塑性研究还处于探索阶段,NSCs 在不同体内外微环境中的增殖和定向分化还不能完全控制,还有待于进一步研究其增殖和分化的信号激活途径等,进而实现对 NSCs 的调控。

[参考文献]

- [1] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. *Science*, 1992, 255: 1707-1710
- [2] Brannen C L, Sugaya S O. *In vitro* differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium [J]. *Neuroreport*, 2000, 11(5): 1123-1128
- [3] Meltzer H, Hatton J D, Sang U H. Cell type-specific development of rodent central nervous system progenitor cells in culture [J]. *J NeuroSurg*, 1998, 88(1): 93-98
- [4] 曹锐峰. 神经干细胞修复中枢神经系统损伤研究进展 [J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 2003, 30(2): 189-192
- [5] Takahashi T, Palmer T D, Gage F H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult derived neural stem cell cultures [J]. *J Neurobiol*, 1999, 38(1): 65-81.
- [6] Levi M R. The nerve growth factor thirty five years later [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1987, 23: 227-238
- [7] Reilly J O, Karavanova I D, Williams K P, et al. Cooperative effect of Sonic Hedgehog and NGF on basal forebrain cholinergic neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 19: 88-96
- [8] Hayashi M, Yamashita A, Shimizu K. Expression of the gene for nerve growth factor (NGF) in the monkey central nervous system [J]. *Brain Res*, 1993, 618: 142-148
- [9] 刘佳梅, 陈东, 孟晓婷. 神经生长因子诱导神经干细胞向胆碱能神经元的分化 [J]. *神经解剖学杂志*, 2005, 21(6): 603-606
- [10] Biciari-Abejón C, Collin C, Tsoulfas P, et al. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(2): 677-688
- [11] Lin L F, Doherty D H, Lile J D, et al. GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, 260(511): 1130-1132
- [12] 纪家武, 王玮. 神经干细胞诱导分化的研究进展 [J]. *解剖与临床*, 2004, 9(4): 286-288
- [13] Milbrandt J, Desauvage F J, Fahrner T J, et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin [J]. *Neuron*, 1998, 20: 245-263
- [14] Baloh R H, Tansae M G, Lampe P A, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFR α 3RET receptor complex [J]. *Neuron*, 1998, 21: 1291-1302
- [15] Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders [J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 537-544

(上接第 19 页)

- [4] 朱邦武. 渭源县南部“羊瞎眼病”调查 [J]. *甘肃畜牧兽医*, 1992, 22(2): 14
- [5] 陈宗繁, 索兴峰, 尹凤琴, 等. 绒山羊萱草根中毒的调查 [J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(1): 65-66
- [6] 金锋. 耕牛萱草根中毒病例报告 [J]. *中国兽医杂志*, 1992, 18(7): 33
- [7] 杨禄明, 卢旺银, 李世恩, 等. 甘肃省庆阳市犊牛瞎眼病的调查与预防 [J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(9): 26-28
- [8] 赵英, 赵娟. 超大剂量服用萱草根致双目失明死亡案 [J]. *山东中医杂志*, 2000, 19(9): 564
- [9] 王建华. 萱草根素的定性检验-薄层层析法 [J]. *西北农学院学报*, 1983, 11(3): 110-117
- [10] 王建华. 不同种萱草根的毒性研究 [D]. 陕西杨陵: 西北农学院, 1981.
- [11] 王建华. 萱草属不同种植物根的研究 [J]. *西北农学院学报*, 1982, 10(2): 89-103
- [12] 王建华, Barlow R M. 萱草根素的毒性及结构再鉴定 [J]. *动物毒物学*, 1991, 6(2): 9-12