

棘豆属植物及其有毒成分的中毒病理学研究

张洁¹ 刘绪川² 张国伟² 孟聚诚²

(1 华南农业大学动物医学系,广州,510642; 2 中国农业科学院中兽医研究所)

摘要 对棘豆属 (*Oxytropis*)植物中的生物碱提取、分离和鉴定后,证实生物碱中含有苦马豆素。通过对两组小白鼠分别饲喂添加棘豆属植物粉和生物碱的中毒实验,发现两组小白鼠都发生中毒,其临床症状、剖检变化、病理组织变化基本相同,表明生物碱是棘豆属植物中主要毒性成分。实验除采用常规 H.E 染色外,还应用组织化学和透射电镜等检测手段,较细致地观察了小白鼠棘豆中毒后的病理变化。

关键词 小白鼠;棘豆属植物;生物碱;中毒;病理变化

中图分类号 S 852.3

棘豆属 (*Oxytropis*)植物有 120 多种,已报导可引起家畜中毒的十几种,在我国西北地区,主要以黄花棘豆 (*Oxytropis ochrocephala* Bunge)和甘肃棘豆 (*Oxytropis kansuensis* Bunge)为主,每年可造成大批家畜中毒和死亡,给畜牧业生产造成很大的经济损失。棘豆属植物的毒性成分一直是研究和争论的焦点,国内外都有不少研究报道(曹光荣等,1989; Molyneux et al, 1982; Tulsiani et al, 1984)。本研究从棘豆属植物中提取出生物碱后,经薄层层析分离,气相色谱和质谱鉴定,证实生物碱中含有苦马豆素,通过对两组小白鼠分别饲喂添加棘豆属植物粉和生物碱的饲料后,从临床症状、剖检变化、病理组织变化等方面进行比较观察,以求进一步探究棘豆属植物的毒性成分。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康的昆明系小白鼠 60 只,体重 18~22 g,由卫生部兰州生物制品研究所提供。

1.1.2 棘豆属 (*Oxytropis*)植物 甘肃棘豆 (*O. kansuensis*)与黄花棘豆 (*O. ochrocephala*)混合,晾干,从甘肃省天祝县采购。

1.2 方法

1.2.1 总生物碱的提取 按 Colegate(1979)方法将棘豆属植物粉碎,用热酯酸乙酯萃取 48 h,萃取液在减压条件下使酯酸乙酯蒸发,其绿色残渣以水提取、酸化,将提取液通过层析柱、水洗,再以 0.5% 氨水洗后以氯仿萃取。

1.2.2 单体生物碱的分离 薄层层析法的分离采用展开剂,甲醇:氯仿:氨水:水 (49:49:1:1),5 cm×15 cm 硅胶板,以 10% 无水乙醇醋酸酐和 Enrich's 试液显色,样品与标准品比较,观察斑点位置和颜色,计算其 R_f 值,以 R_f 值为中点,上下各 0.5 cm 刮取硅胶,多次重复,刮取物中回入氯仿,回流 1 h,过滤备用。

1.2.3 单体生物碱的鉴定 红外吸收光谱的测定用 KBr 压片法; 气相色谱-质谱的测定用气相色谱-质谱联用仪。

1.2.4 毒性试验 设立两个试验组和一个对照组, 在试验组一的饲料中添加 20% 棘豆属植物粉, 在试验组二的饲料中添加相当于 20% 棘豆属植物粉中提取的生物碱和 20% 苜蓿草, 在对照组饲料中添加 20% 苜蓿草。小白鼠经健康观察, 随机分组, 每组 20 只, 雌雄各半, 试验期 30 d, 小白鼠可自由采食和饮水, 试验期间观察小白鼠临床症状并定期称重。

1.2.5 石蜡切片的制作和染色 对试验期间死亡的小白鼠及试验结束后剖杀的小白鼠大体检查后, 切取心、肝、肾、脾、大脑、小脑、睾丸和附睾等脏器, 以 10% 福尔马林固定, 石蜡切片, H E 染色; 肝脏糖原染色 (用 Mcmanus 法); 肝脏、脾脏网状纤维染色 (用 Dio Rio- Horteaga 氏法); 脾脏淀粉样变鉴别染色 (甲基紫法)。

1.2.6 冰冻切片的制作和酶染 将 3 组小鼠肝、肾冰冻切片后, 进行碱性磷酸酶 (钙钴法) 和酸性磷酸酶 (Gomori 铅沉淀法) 染色。

1.2.7 电镜样品的制作和观察 将两实验组小鼠肝脏、肾脏、小脑用锐刀切成 $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 小块, 以 2.5% 戊二醛 4°C 作前固定, 以 1% 锇酸作后固定, 丙酮逐级脱水, EPon 612 包埋, 超薄切片, 电镜观察。

2 结果

2.1 单体生物碱的提取、分离和鉴定

经硅胶板层析, 样品和标准品的斑点位置、颜色完全一致时其 Rf 值为 0.502; 红外吸收光谱出现有 $3\,500\sim 3\,300\text{ cm}^{-1}$ (S broad- OH), $2\,850\sim 2\,750\text{ cm}^{-1}$ (S trans CH- N) 谱峰, 表明样品中可能有苦马豆素; 按气相色谱-质谱联用仪条件测得样品的气相色谱图, 其中保留时间 13.20 min 出现 794 峰与苦马豆素标准品一致。根据 GC-MS 系统分析得到的质谱图与标准品质谱图核对也完全一致, 故表明棘豆属植物中含有苦马豆素。

2.2 毒性试验

2.2.1 临床症状 棘豆属植物组和生物碱组小白鼠表现的症状基本相同。主要表现为精神沉郁、被毛逆立、食欲下降、生长迟缓、消瘦, 一些小鼠眼睑红肿, 眼分泌物多, 睁眼困难。但棘豆属植物组小鼠症状出现早且表现严重, 从试验第 3 d 开始死亡, 而生物碱组小鼠至第 7 d 才有死亡, 至试验结束后, 棘豆属植物组死亡 12/20 只 (60%), 生物碱组死亡 10/20 只 (50%)。

实验期间, 3 组小白鼠体重变化情况见图 1。由图可见, 3 组小白鼠体重增长由高到低依次为: 对照组 > 生物碱组 > 毒草组。

2.2.2 剖检变化 两试验组小鼠剖杀后, 可见肝、肾、脾脏呈土黄色, 稍肿大, 一些小鼠肝脏上有针尖大小白点, 脾脏上有米粒大小白点, 多数小鼠肠壁上有出血点。棘豆属植物组的小鼠脑膜充血, 出血较严重, 而生物碱组的小鼠脑膜以肉眼辨别无明显变化。

2.2.3 病理组织变化 肝脏: 肝细胞肿大, 呈颗粒和空泡变性, 窦状隙变窄, 有淋巴细胞和红细胞浸润, 中央静脉扩张显著。肾脏: 皮

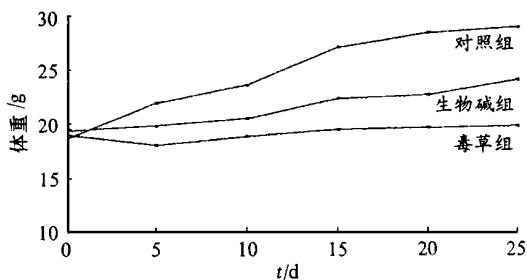


图 1 小白鼠体重变化

质部肾小管上皮细胞颗粒变性或空泡变性,严重的出现坏死,细胞核溶解或碎裂。部分上皮细胞脱落入管腔,形成管型,间质中有红细胞浸润。睾丸:曲精管有的扩张,有的萎缩。管内的精原细胞、初级和次级精母细胞数量减少,呈空泡变性。部分曲精管膜破裂,管内精子生成减少或无精子生成。附睾:附睾管有的扩张,有的萎缩,管内无精子或有少量精子,上皮细胞空泡变性,间质有成纤维细胞增生。脾脏:脾小体变小,淋巴细胞数量减少,出现大片淡红色物质沉着区,呈淀粉样变,该区域边缘淋巴细胞崩解碎裂,巨噬细胞数量明显增多。脑:棘豆属植物组小鼠脑膜血管扩张、充血,脑膜上皮细胞肿胀。此外,还可见少数神经细胞空泡变性。心肌:心肌纤维肿胀,颗粒变性,横纹不清。有红细胞浸润。

酶染色结果,酸性磷酸酶活性无明显变化,碱性磷酸酶活性明显升高,与对照组相比,其黑色颗粒多而大。

肝细胞糖原染色结果,两试验组肝细胞内糖原颗粒明显减少。

肝脏、脾脏网状纤维染色,可见试验组肝、脾组织网状纤维在变性和坏死部位断裂和消失。透射电镜观察:中毒小鼠肝细胞、肾小管上皮细胞、睾丸曲精管生精细胞的空泡多有一层单位膜包裹,内有多泡样小体,部分空泡内尚有不完整的嵴,说明是线粒体肿胀所致,但多数空泡是溶酶体的肿胀所致。见图2、3、4、5。

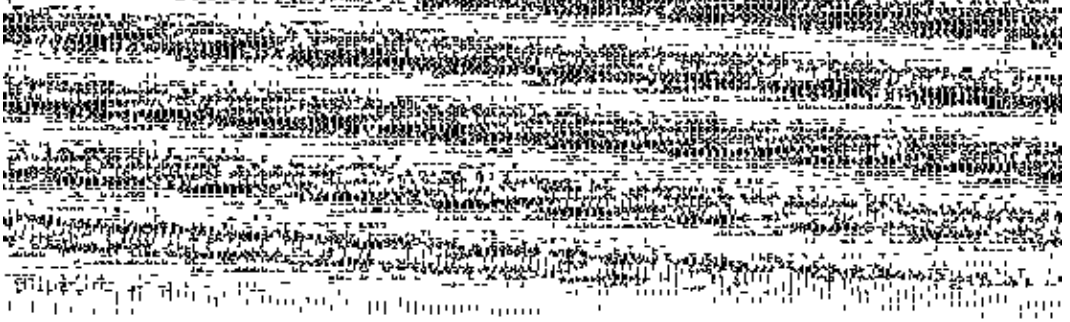


图2 中毒小鼠睾丸生精细胞内大小不等的空泡($\times 60$)

图3 中毒小鼠肝细胞内大小不等的空泡($\times 60$)



图4 中毒小鼠肾小管上皮细胞内大小不等的空泡($\times 60$) 图5 中毒小鼠肝细胞内正空泡化的溶酶体($\times 83$)

3 讨论

3.1 生物碱提取、分离、鉴定结果

从棘豆属植物中提出生物碱,经薄层层析分离后,样品红外光谱图说明存在 trans-CH=N 。

的吸收和 broad-OH 的吸收 CH-N 的吸收与苦马豆素吡啶兹定环的吸收光谱相符, $-\text{OH}$ 的吸收说明环上有 $-\text{OH}$ 结构, 红外光谱测试结果表明该样品可能含有苦马豆素。样品经气相色谱、质谱分析, 证明含有苦马豆素。

3.2 棘豆属植物毒性成分问题

通过中毒试验可以看出, 两组小鼠的临床症状、剖检变化和病理组织变化基本相同, 说明有毒生物碱是造成动物病理损害, 形成细胞胞浆空泡变性的主要毒性成分, 这与国内外许多报道一致 (曹光荣等, 1989; James et al, 1970; Tulsiani, 1984)。试验提出总生物碱中含有苦马豆素, 但含量很低, 尚不能直接用作动物实验。

试验中, 毒草组小白鼠比生物碱组小白鼠生长迟缓, 症状出现早且表现严重, 死亡率高, 剖检时, 脑膜充血、出血, 可能还与棘豆属植物中除生物碱外的其它毒性成分有关。

80年代初, 喻梅辉等 (1985) 从小花棘豆中分离出一种溶血毒素 (毒蛋白, 相对分子质量 27 000) 之后, 高努 (1989) 从黄花棘豆中分离出另一种溶血毒素 (相对分子质量 60 000 的蛋白质)。路英华等 (1993) 对黄花棘豆溶血毒素的毒性进行了部分测定。此外, 孙荣奇等 (1987; 1989), 程东亮等 (1986) 从黄花棘豆和甘肃棘豆中分离鉴定出一系列黄酮、黄酮甙或皂甙类化合物, 但未做动物毒性试验。

3.3 空泡变性形成原因

空泡变性是棘豆中毒最典型的病变。电镜下证实空泡变性是溶酶体和线粒体肿胀所致。

线粒体肿胀可能是由于毒草在破坏了细胞内的线粒体氧化酶系统后, 使三羧酸循环不能顺利进行, ATP 生成减少, 能量供应不足, 导致中间代谢产物如脂肪酸、乳酸及各种氨基酸等在细胞内积蓄, 胞浆嗜水性加强, 从而, 线粒体吸水肿胀形成空泡。

Dorling (1980) 认为溶酶体肿胀是由于生物碱苦马豆素抑制了溶酶体中的水解酶 α -甘露糖苷酶, 使该酶不能将富含甘露糖的低聚糖水解为低分子单糖, 导致溶酶体内积聚多量低聚糖而形成空泡。

3.4 棘豆毒素对雄性小白鼠生殖力的影响

棘豆中毒雄鼠的睾丸受到损害, 使血睾屏障遭到破坏, 从而毒素进入管腔影响精子生成。附睾是精子的贮存和发育成熟之处, 棘豆中毒后, 附睾管纤毛上皮空泡变性, 坏死, 改变了附睾管内环境, 影响精子的成熟。此外, 据 Tulsiani 等 (1982) 报道, 附睾中精子表面的高尔基糖蛋白对精子成熟、精子与卵子的结合有重要作用, 附睾合成和分泌的激素也与高尔基糖蛋白有关, Dualat 等 (1990) 的研究表明, 苦马豆素可抑制高尔基甘露糖苷酶 II 的活性, 从而影响高尔基蛋白的形成和分解, 破坏了公鼠的生殖力。

参 考 文 献

- 孙荣奇, 程东亮, 等. 1987. 黄花棘豆化学成分的研究 (II). 化学学报, (45): 145
孙荣奇, 贾忠建, 程东亮, 等. 1989. 黄花棘豆化学成分的研究 (III). 高等学校化学学报, 10(9): 901
高 努. 1989. 黄花棘豆溶血毒素的提取及性质研究: [学位论文]. 兰州: 兰州大学图书馆
曹光荣, 李绍君, 段得贤, 等. 1989. 黄花棘豆有毒成分的分离与鉴定. 西北农业大学学报, 17(3): 1~ 7
程东亮, 孙荣奇, 李小瑞, 等. 1986. 黄花棘豆中黄酮甙及黄酮甙的分离与鉴定. 植物学报, 28(4): 404
喻梅辉, 奚 强, 胡 冰, 等. 1985. 小花棘豆溶血毒素的分离纯化及其性质的研究. 生物化学与生物物理学报, 17(4): 495
路英华, 钟淑梅, 高 努, 等. 1993. 黄花棘豆种子有毒成分分析. 生物化学与生物物理学报, 25(6): 603

~ 609

- Colegate S M, Dorling P R, Huxtable C R. 1979. A spectroscopic investigation Swainsonine an α -mannosidase inhibitor isolated from Swainsonia Canescens. Aust J Chem, 22 2257~ 2264
- Dorling P R. 1980. Inhibition of lysosomal α -mannosidase by Swainsonine a indolizidine alkaloid isolated from Swainsonia canescens. Biochem J, 191 649~ 651
- Dualat R P, Tulsiani M D. 1990. Swainsonine induced the production hybrid glycoproteins and accumulation of oligosaccharides in male reproductive tissue of the rat. Biol Repro, 43 130~ 136
- James L F, Van Kampen K R, Hartley W. 1970. Comparative pathology of locoweed and Swainsonia poisoning in sheep. Path Vet, 7 116~ 125
- Molyneux R J, James L F. 1982. Loco intoxication Indolizidine alkaloid of spotted locoweed. Science, 216(6): 190~ 191
- Tulsian D R, Harris T M, Touster O. 1982. Swain inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. J Biochem, 257 7936~ 7939
- Tulsiani D R. 1984. The similar effects of Swainsonine and locoweed on tissue glycosidase and oligosaccharides of the pig. Arch Biochem Biophys, 232(1): 76~ 85

STUDIES ON THE TOXICOPATHOLOGY OF *Oxytropis* AND ITS TOXIN

Zhang Jie¹ Liu Xuchuan² Zhang Guowei² Meng Jucheng²
(1 Dept. of Vet. Med., South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642;
2 Chinese Traditional Med. Vet. Res. Inst., Chinese Academy of Agr. Sci.)

Abstract

Alkaloid in *Oxytropis* was extracted, separated and appraised, Swainsonine was found in the alkaloid extract. Rats were fed forage mixed with oxytropis or alkaloid, two group rats became poisoned and showed similar clinical symptoms, autopsy and histopathologic changes, which indicated that the alkaloid was the principal toxin. Not only conventional H. E. staining, but also histochemical technology and transmission electron microscopy were used to observe the histopathologic changes in the poisoned rats.

Key words rat; *Oxytropis*; alkaloid; poisoning; pathologic change