

中药复方驱铅制剂对铅染毒大鼠脑海马齿状回及 CA1 区和 CA3 区一氧化氮合酶的影响^{*☆}

周萍¹, 李勇辉²¹ 湖南师范大学教科院心理系, 湖南省长沙市 410081; ² 中国科学院心理研究所, 北京市 100101通讯作者: 周萍[☆], 女, 1964年生, 湖南省岳阳市人, 汉族, 1997年湖南中医学院毕业, 博士, 副教授, 主要从事医学心理学研究。
angie@public.cs.hn.cn

湖南省科技厅资助项目(99ssy-2002-8)*

中图分类号: R749.05 文献标识码: A 文章编号: 1671-5926(2005)24-0104-02
收稿日期: 2005-01-06 修回日期: 2005-03-09 (14/XX/YQ)**Effects of Chinese compound Quqianling decoction on nitric oxide synthase of brain hippocampal dentate gyrus, CA1 area and CA3 area in lead-exposed rats** Zhou Ping¹, Li Yonghui², ¹Department of Psychology, College of Education, Hunan Normal University, Changsha 410001, Hunan Province, China; ²Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China**Correspondence to:** Zhou Ping[☆], Doctor, Associate professor, Department of Psychology, College of Education, Hunan Normal University, Changsha 410001, Hunan Province, China
angie@public.cs.hn.cn

Received: 2005-01-06 Accepted: 2005-03-09

Abstract

AIM: To observe the effects of traditional Chinese medicine compound (Quqianling decoction) on amelioration of memory in lead-exposed rats, and use antallin as controlled standard.**METHODS:** The experiment was done in Animal Laboratory of College of Life Science of Hunan Normal University. Sixty healthy SD rats were selected and divided randomly into 6 groups with 10 in each group. Negative controlled group, positive controlled group, Quqianling group 3.3 g/kg per day (composed of tangshen 15 g, suberect spatholobus stem 15g, etc.), Quqianling group 6.6 g/kg per day, Quqianling group 13.2 g/kg per day and antallin group. Positive controlled group, antallin group and Quqianling group were treated with gastric perfusion of 20 g/L lead acetate solutions at the dosage of 10 μ L/g body mass with once a day and at the 11th day stopped for one day totally for three weeks. At the second day after stopping using narcotics, the rats in Quqianling group were treated with gastric perfusion of the corresponding type solution at the dosage of 10 μ L/g Chinese compound Quqianling with once a day and at the 11th day stopped for one day totally for 3 weeks. Rats in antallin group were injected in abdominal cavity with 5 g/L antallin solutions at the dosage of 10 μ L/g (50 mg/kg) body mass and four days per week, stopped for three days, totally three weeks. Negative group and positive group was treated with gastric perfusion of distilled water, once a day, the 11th stopped for one day, totally three weeks. Effect of Quqianling on the amelioration of brain hippocampi tissue structure in lead-exposed rats was observed. Evaluation was conducted by the number of positive cells of nitric oxide synthase and average absorbance of product of positive cells. Morphology injury of hippocampal formation in rats was expressed by absorbance of positive product of nitric oxide synthase.**RESULTS:** Totally 60 rats were involved in results analysis without deletion. Absorbance of brain dentate gyrus positive product in lead-exposed rats: Absorbance of Quqianling group 3.3 g/kg per day, Quqianling group 6.6 g/kg per day, Quqianling group 13.2 g/kg per day and antallin group was higher significantly than that of positive controlled group (0.069 2 \pm 0.004 3)(0.070 7 \pm 0.002 2)(0.064 5 \pm 0.002 7)(0.072 0 \pm 0.003 7), (0.053 8 \pm 0.006 8) A (F=12.383 P<0.01). Changes of absorbance of positive product in brain CA1 area in lead-exposed rats: Absorbance of Quqianling group 3.3g/kg per day, Quqianling group 6.6g/kg per day, Quqianling group 13.2g/kg per day and antallin group was higher significantly than that of positive controlled group (0.063 8 \pm 0.003 3)(0.064 8 \pm 0.00 27)(0.061 3 \pm 0.002 9)(0.065 5 \pm 0.003 7)(0.060 5 \pm 0.002 6) (F=10.585, P<0.01). Changes of absorbance of positive product in brain CA3 area in lead-exposed rats: Absorbance of Quqianling group 3.3 g/kg per day, Quqianling group 6.6 g/kg per day, Quqianling group 13.2 g/kg per day and antallin group was higher significantly than that of positive controlled group (0.068 2 \pm 0.004 4)(0.070 2 \pm 0.004 7)(0.063 0 \pm 0.004 4), (0.073 3 \pm 0.005 1)(0.054 5 \pm 0.002 7) (F=18.867, P<0.01).**CONCLUSION:** Chinese compound Quqianling decoction no matter low, middle or high dosage can improve morphology impairment of brain hippocampal formation in lead-exposed rats and the injury of learning memory induced by lead. Its effect is similar with antallin. Effects of different dosage of Quqianling decoction are insignificantly.Zhou P, Li YH. Effects of Chinese compound Quqianling decoction on nitric oxide synthase of brain hippocampal dentate gyrus, CA1 area and CA3 area in lead-exposed rats. *Zhongguo Linchuang Kangfu* 2005;9(24):104-5(China)
周萍, 李勇辉. 中药复方驱铅制剂对铅染毒大鼠脑海马齿状回及 CA1 区和 CA3 区一氧化氮合酶的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(24):104-5
(www.zgckf.com)

摘要

目的: 观察中药复方驱铅制剂对铅染毒大鼠记忆改善的影响, 并以依地酸钙钠做标准对照。

方法: 实验于 2001-11/12 在湖南师范大学生命科学院动物实验室完成。

选用健康 SD 大鼠 60 只, 随机分成 6 组, 每组 10 只。阴性对照组、阳性对照组、驱铅灵(由党参 15 g、鸡血藤 15 g 等组成 3.3 g/(kg·d)组、驱铅灵 6.6 g/(kg·d)组、驱铅灵 13.2 g/(kg·d)组、依地酸钙钠组。阳性对照组、依地酸钙钠组、驱铅灵各组均用 20 g/L 的醋酸铅溶液以 10 μ L/g 体质量的剂量灌胃, 1 次/d, 第 11 天停染 1 d, 共 3 周。停止染毒后第 2 天, 驱铅灵各组分别用相应剂型的中药复方驱铅灵 10 μ L/g 体质量灌胃, 1 次/d, 第 11 天停 1 d, 共 3 周。依地酸钙钠组用 5 g/L 依地酸钙钠溶液以 10 μ L/g 体质量的剂量(50 mg/kg)腹腔注射, 1 周注射 4 d, 停 3 d, 共 3 周。阴性对照组、阳性对照组用蒸馏水灌胃, 1 次/d, 第 11 天停染 1 d, 共 3 周。观察驱铅灵制剂对铅染毒大鼠脑海马组织结构的改善以一氧化氮合酶阳性细胞数目的多少及阳性细胞产物平均吸光度的大小作为评价指标, 对大鼠海马结构形态学损伤以一氧化氮合酶阳性产物吸光度表示。结果纳入 60 只, 均进入结果分析, 无缺失值。铅染毒大鼠齿状回阳性产物吸光度情况: 驱铅灵 3.3 g/kg、6.6 g/kg、13.2 g/(kg·d)组与依地酸钙钠组显著大于阳性对照组 [(0.069 2 \pm 0.004 3)(0.070 7 \pm 0.002 2)(0.064 5 \pm 0.002 7), (0.072 0 \pm 0.003 7)(0.053 8 \pm 0.006 8) A (F=12.383 P<0.01)]。铅染毒大鼠脑 CA1 区阳性产物吸光度变化: 驱铅灵 3.3 g/kg、6.6 g/kg、13.2 g/(kg·d)组与依地酸钙钠组的阳性产物吸光度显著大于阳性对照组 [(0.063 8 \pm 0.003 3), (0.064 8 \pm 0.002 7)(0.061 3 \pm 0.002 9)(0.065 5 \pm 0.003 7)(0.060 5 \pm 0.002 6) (F=10.585 P<0.01)]。铅染毒大鼠脑 CA3 区阳性产物吸光度变化: 驱铅灵 3.3 g/kg、6.6 g/kg、13.2 g/(kg·d)组与依地酸钙钠组在脑 CA3 区显著大于阳性对照组 [(0.068 2 \pm 0.004 4)(0.070 2 \pm 0.004 7)(0.063 0 \pm 0.004 4), (0.073 3 \pm 0.005 1)(0.054 5 \pm 0.002 7) (F=18.867 P<0.01)]。

结论: 中药复方驱铅制剂低、中、高各剂量组均能改善铅染毒大鼠脑海马结构的形态学损伤, 改善铅致学习记忆的损害, 其效果与依地酸钙钠相似, 不同剂量的驱铅制剂作用效果比较无显著差别。

主题词: 复方; 铅; 学习; 记忆; 一氧化氮合酶

0 引言

近年来, 铅对神经心理及行为功能的损害越来越引起人们的关注。对铅影响学习、记忆机制的研究取得了较大进展, 其中发现铅对海马一氧化氮合酶的表达有影响^[1]。本文观察中药复方驱铅制剂对大鼠海马结构的改善, 并与常用驱铅西药依地酸钙钠比较效果。

1 材料和方法

设计: 随机分组, 空白对照与标准对照。

单位: 湖南师范大学教科院心理系及中国科学院心理研究所。

材料: 实验于 2001-11/12 在湖南师范大学生命科学院动物实验室完成。选择健康 SD 大鼠 60 只(购自中南大学湘雅医学院实验动物中心), 体质量 100~130 g, 雌雄各半, 剪耳编号。在温度 18~22 $^{\circ}$ C、空气流通、自然光照的实验室内适应性饲养 7 d 后, 随机分成 6 组, 每组 10 只, 雌雄分笼饲养。阴性对照组、阳性对照组、驱

铅灵 3.3 g/(kg·d)组、驱铅灵 6.6 g/(kg·d)组、驱铅灵 13.2 g/(kg·d)组,并以依地酸钙钠组为标准对照。主要药品与试剂:醋酸铅(分析纯、广东汕头西陇化学试剂厂);依地酸钙钠(天津市氨基酸公司人民制药厂生产);驱铅灵(由党参 15 g、鸡血藤 15 g 等组成,药材购自湖南省医药公司)。低剂量中药以一剂生药加水 500 mL 煎至 250 mL 制成,中、高剂量中药的浓度依次倍增。

干预措施:铅中毒模型的建立及给药治疗方法:模型建立:阳性对照组、依地酸钙钠组、驱铅灵各组均用 20 g/L 的醋酸铅溶液以 10 μL/g 体质量的剂量灌胃。灌胃前空腹,灌胃后 2 h 禁饮。1 次/d,第 11 天停染 1 d,共 3 周。阴性对照组以相同方法用蒸馏水灌胃。给药方法:停止染毒后第 2 天,驱铅灵组分别用相应剂型的中药复方 10 μL/g 体质量灌胃,1 次/d,第 11 天停 1 d,给药 3 周。依地酸钙钠组用 5 g/L 依地酸钙钠溶液以 10 μL/g 体质量的剂量(50 mg/kg)腹腔注射,1 周注射 4 d,停 3 d,共 3 周。阴性对照组、阳性对照组用蒸馏水灌胃,1 次/d,第 11 天停 1 d,共 3 周。

海马结构组织学检查:组织切片制备:染毒结束后每组随机取 2 只,治疗结束后每组随机取 3 只,用 20 g/L 的戊巴比妥钠(40 mg/kg 体质量)腹腔注射麻醉,开胸经左心室升主动脉快速灌注 100~200 mL 生理盐水,然后用含 40 g/L 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.4)先快后慢灌注 500 mL 固定。开颅取脑,将修整好的脑标本移入含 300 g/L 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中浸泡直至标本下沉。取出后恒冷箱-18℃冰冻连续冠状切片,片厚 30 μm,取含海马的脑片,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液接片、漂洗。还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸组织化学染色示海马结构一氧化氮合酶阳性细胞:将漂洗好的切片移入含 1 mmol/L 还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸、1.2 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝、3 g/L TritonX-100 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中,37℃恒温孵育 1 h。然后移入 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液中终止反应。漂洗后用明胶裱片,干燥。梯度乙醇脱水;二甲苯脱脂,透明;中性树胶封固。

主要观察指标:光学显微镜下观察海马齿状回、CA1、CA3 区一氧化氮合酶阳性神经细胞形态及数目变化。并用 HPIAS-100 型彩色图象分析系统对阳性神经细胞进行吸光度分析。

统计学分析:统计学处理由作者本人在 SPSS 10.0 上进行统计学处理。采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入 60 只,分为 6 组,每组 10 只进入结果分析,无缺失值。

2.2 统计推断 单因素方差分析表明,各组大鼠齿状回、CA1、CA3 区一氧化氮合酶阳性产物吸光度差异极显著($F=12.383, 10.585, 18.867, P<0.01$),见表 1。

表 1 治疗后各组大鼠海马不同区域一氧化氮合酶阳性产物吸光度($\bar{x}\pm s, n=10$)

组 别	齿状回	CA1 区	CA3 区
阳性对照组	0.053 8±0.006 8	0.060 5±0.002 6	0.054 5±0.002 7
驱铅灵 3.3g/(kg·d)组	0.069 2±0.004 3 ^b	0.063 8±0.003 3	0.068 2±0.004 4 ^b
驱铅灵 6.6g/(kg·d)组	0.070 7±0.002 2 ^b	0.064 8±0.002 7 ^a	0.070 2±0.004 7 ^b
驱铅灵 13.2g/(kg·d)组	0.064 5±0.002 7 ^b	0.061 3±0.002 9	0.063 0±0.004 4 ^b
依地酸钙钠组	0.072 0±0.003 7 ^b	0.065 5±0.003 7 ^a	0.073 3±0.005 1 ^b
阴性对照组	0.084 3±0.011 9	0.075 3±0.004 9	0.083 8±0.004 8

与阳性对照组比较:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

3 讨论

现有研究表明,海马在学习和记忆上具有极其重要的作用,是学习、记忆最关键的部位之一,而长时程增强效应是海马记忆形成过程中的可能机制^[2,3]。一氧化氮在长时程增强效应的产生、维持中起重要作用。在海马脑片上施加 NMDA 受体或强直刺激其传入纤维产生长时程增强效应时有一氧化氮生成;施加一氧化氮合酶抑制剂 L-硝基-精氨酸可阻断长时程增强效应的产生,这一效应可被 L-精氨酸逆转,而一氧化氮供体硝普钠能促进长时程增强效应产生。基因敲除研究表明,神经型一氧化氮合酶和内皮型一氧化氮合酶双敲除的小鼠上发现长时程增强效应降低。以上研究有力证明了一氧化氮参与长时程增强效应^[4]。进一步研究发现,在海马锥体细胞培养的突触标本中,采用向突触前神经元或突触后神经元注射一氧化氮清除剂或一氧化氮合酶抑制剂的方法,结果表明只有清除突触前神经元内的一氧化氮抑制突触后神经元内的一氧化氮合酶才能阻断长时程增强效应,直接证明一氧化氮是在突触后神经元合成,扩散到突触前神经元起作用的^[5]。但一氧化氮不易直接检测,因而通常以一氧化氮合酶阳性细胞数目的多少及阳性细胞产物平均光密度的大小来反映一氧化氮的量。本文显示,染毒组大鼠海马齿状回、CA1、CA3 区一氧化氮合酶阳性细胞数目减少,阳性细胞吸光度显著低于阴性对照组($P<0.05$),说明海马结构有形态学改变,一氧化氮合成量减少,证明铅致大鼠空间学习记忆障碍至少部分是于损害海马一氧化氮合酶神经元导致一氧化氮生成减少所致。实验证明,驱铅灵有与依地酸钙钠功效相当的排铅作用^[6],给药治疗 2 周后,驱铅灵 3.3、6.6、13.2 g/(kg·d)组、依地酸钙钠组大鼠海马齿状回一氧化氮合酶阳性细胞数目多于阳性对照组,其海马齿状回、CA1、CA3 区阳性细胞光密度显著大于对阳性对照组,说明驱铅灵可通过排铅而改善铅致学习记忆损害。至于该中药复方对记忆作用是否还存在其他机制,将有待于日后更进一步研究。

致谢:本实验得到了中南大学湘雅医学院第一附属医院病理教研室的教师们的大力支持,在此表示谢意!

4 参考文献

- 岳晓雯.铅影响学习记忆的机制[J].武警医学院学报,2002,11(3):206-9
- 穆军山,杨渤生,林航.神经营养因子对大鼠学习记忆及海马一氧化氮合酶阳性神经元数目的影响[J].中国临床康复,2004,8(25):5402-3
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361(6407):31-9
- 李积胜, 闫蓓.铅对大鼠齿状回神经型一氧化氮合酶阳性神经元的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2002,11(3):253-6
- 韩济生.神经科学原理[M].北京:北京医科大学出版社,1999
- 周萍,李勇辉.中药复方驱铅灵降低血铅含量的观察[J].湖南中医学院学报,2003,23(3):16-7