

· 实验研究 ·

驱铅灵对铅暴露大鼠学习和记忆损害的拮抗作用

周萍¹ 杨新华¹ 李勇辉²

(湖南省科技厅资助项目, 课题编号: 29040234; 1 湖南师范大学教育科学学院心理学,
湖南省长沙市麓山路 36 号, 410081; 2 中国科学院心理研究所)

摘要 目的: 观察中药复方驱铅灵浸膏粉对铅暴露动物学习和记忆损害的拮抗作用。方法: 将 48 只 SD 大鼠随机分成 6 组, 除正常对照组和中药对照组大鼠外, 其余各组大鼠均连续饮用 28 天 0.05% 的醋酸铅水溶液, 铅暴露组大鼠每日予生理盐水灌胃。低、中、高剂量驱铅灵组每日分别以 3.46g/kg、6.93g/kg、13.86g/kg 剂量的驱铅灵浸膏粉灌胃。采用 Morris 水迷宫学习和记忆等行为指标, 观察慢性低水平铅暴露对成年大鼠学习和记忆的影响及驱铅灵的治疗效果。结果: 慢性低水平铅暴露可引起大鼠空间参考记忆和空间工作记忆的损害, 中药复方驱铅灵浸膏粉可明显拮抗这种毒性作用, 并可显著提高铅暴露动物在 Morris 水迷宫中的学习记忆成绩。结论: 中药复方驱铅灵浸膏粉对慢性低水平铅暴露引起的学习和记忆损害有明显的拮抗作用。

关键词 铅暴露/中医药疗法; @ 驱铅灵

Antagonistic Effect of Quqianling on Rat's Learning and Memory Impairment Caused by Exposure to Lead

Zhou Ping¹, Yang Xinhua¹, Li Yonghui²

(1 Psychological Department, Faculty of Education Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract Objectives: To observe antagonistic effect of a Chinese materia medica prescription-Quqianling powdered extract on learning and memory impairment caused by exposure to lead. **Methods:** 48 SD rats were randomly divided into six groups, and were fed with 0.05% lead acetate solution consecutively for 28 days except for those of normal control group and Chinese medicine control group. Rats of lead-exposure group were given Sodium Chloride daily by intragastric administration. Rats were given Quqianling powdered extract by intragastric administration in Quqianling treated groups of three kinds of dosage, which was 3.46g/kg, 6.93g/kg, 13.86 g/kg respectively. By using behavioral indexes such as learning and memory in Morris water maze, influence caused by chronic exposure to low-dose lead and curative effect of Quqianling were observed on rats. **Results:** chronic exposure to low-dose lead could injury spatial reference memory and spatial working memory, but Quqianling powdered extract could apparently antagonize the toxicity, significantly improve rat's behavior in Morris water maze test. **Conclusion:** Quqianling powdered extract has significant antagonistic effect on rat's learning and memory impairment caused by exposure to lead.

Key Words Exposure to lead/Chinese Medical Therapy; @ Quqianling

低水平铅暴露是一个严重的公共卫生问题^[1,2,3]。对人和动物大量的前瞻性研究证实, 出生前铅暴露引起婴儿期、幼儿期、儿童期、成年期持续性的认知功能和行为改变^[4,5,6,7]。流行病学的研究证明, 即使铅暴露的水平不造成任何明显的毒性反应, 也可损害儿童的认知功能, 其中最主要的是对学习和记忆的影响^[8,9,10], 主要表现为铅暴露对学习和记忆能力的损害是不可逆的、长期的, 且无浓度下限^[11]。我们的前期实验发现, 中药复方驱铅灵煎剂能降低染铅大鼠的血铅水平, 改善铅中毒引起的学习记忆障碍^[12,13,14]。为了进一步了解该复方改变剂型后对慢性低水平铅暴露引起的学习和记忆损害是否有拮抗作用, 本次试验将该复方制成浸膏粉, 采用 Morris 水迷宫学习和记忆行为模型来观察慢性低水平铅暴露对成年大鼠学习和记忆的影响, 观察驱铅灵浸膏粉对低水平铅暴露引起的学习

和记忆损害是否有保护作用, 以进一步阐明驱铅灵拮抗铅暴露对学习和记忆损害的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只, 起始体重 405~500g (由北京维通利华实验动物技术有限公司提供)。实验室温度控制在 20~22℃, 相对湿度为 40% 左右。

1.2 药物和试剂: 99% 醋酸铅(湘中精细化学品厂), 驱铅灵浸膏粉, 每克相当于原材料 77g, 按 15ml/kg 灌胃, 每只动物 6ml/天, 上午 10:00 和晚上 22:00 两次给药, 每次 3ml。低、中、高剂量驱铅灵按 1:2:4 的比例配制, 每日给药量分别为 3.46g/kg、6.93g/kg、13.86g/kg。

1.3 动物处理: 实验动物随机分为 6 组, 每组 8 只, 铅暴露组每天饮 0.05% 含铅水溶液并灌胃生理盐水



6ml; 正常对照组饮蒸馏水并灌胃 6ml 生理盐水; 低、中、高剂量驱铅灵组饮 0.05% 含铅水溶液并分别灌胃低、中、高剂量驱铅灵; 中药对照组饮蒸馏水并灌胃中剂量驱铅灵。实验期间每周测动物体重; 第 29 天开始行为测试; 实验结束后麻醉动物, 断头取血 2ml 测定血铅水平。

1.4 Morris 水迷宫训练程序: 整个行为程序分为位置导航任务、探索任务、工作记忆任务和提示导航任务。具体的程序和方法参考文献^[15]。

1.5 血铅浓度的测定: 参考文献^[16], 用石墨炉原子吸收分光光度计(美国 PE 公司)进行测定。

2 结果

2.1 学习与记忆成绩的比较: 由表 1 可知, 各组位置导航任务逃避潜伏期(多因素重复测量方差分析)之间成绩差异不显著($P > 0.05$), 铅暴露组和低、中、高剂量驱铅灵组, 正常对照组, 中药对照组的逃避潜伏期在 4 天的训练后皆都能达到 15 秒左右。在探索任务中, 记录动物第 1 次到达原站台位置的时间(见表 1), 单因素方差分析主效应不显著($P > 0.05$), 但 LSD 平均数多重比较表明, 铅暴露组比正常对照组的潜伏期显著延长($P < 0.05$), 中剂量驱铅灵组和铅暴露组之间有显著差异($P < 0.05$), 而低剂量和高剂量驱铅灵组和铅暴露组之间并无显著差异($P > 0.05$), 这说明铅暴露影响大鼠空间参考记忆, 而中剂量驱铅灵可以显著拮抗铅暴露对学习和记忆的伤害。虽然中药对照组和铅暴露组之间有极显著差异($P < 0.01$), 但中药对照组和正常对照组之间无显著差异($P > 0.05$)。单因素方差分析各组的游泳速度间无显著差异($P >$

0.05), 这表明铅暴露未影响动物的运动能力和运动协调能力, 说明铅暴露对参考记忆探索任务的影响并非是因为损害了动物的运动能力造成的。各组动物都能在短时间内(15 秒左右)找到站台, 单因素方差分析表明: 各组提示导航任务之间无显著差异($P > 0.05$), 表明铅暴露并没有影响动物的非空间认知能力如感知运动能力、动机和运动协调能力。工作记忆任务的结果: 各组之间的主效应不显著($P > 0.05$), 但可见明显的交互作用, 在第 4 天铅暴露组和正常对照组、中药对照组之间差异极显著($P < 0.01$), 而与低、中、高剂量驱铅灵组和中药对照组差异不显著。但各剂量驱铅灵组的成绩都在铅暴露组曲线以下, 这说明铅暴露损害动物的工作记忆, 而中药驱铅灵可以减缓铅暴露的这种影响。进一步分析第 4 天铅暴露组和正常对照组动物在各象限停留的时间, 铅暴露组动物在第 4 个任务(session)中的站台象限(象限 1)停留的时间显著或极显著长于其他 3 个象限(与象限 2、3、4 比较, 依次为 $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$)。正常对照组动物在象限 1 的停留时间明显短于其他 3 个象限($P < 0.01$)。说明铅暴露组动物在原站台象限寻找站台, 而正常对照组动物却集中在其他 3 个象限寻找站台。

2.2 体重的比较: 各组动物的体重见表 2, 各组动物在实验期间体重(g)增加, 但多因素重复测量方差分析(组别 × 时间)表明组间没有差异($P > 0.05$), 说明并没有因为铅暴露而造成营养不良。

2.3 血铅的比较: 0.05% 水平的铅暴露 28 天可导致成年动物血铅水平显著的升高。铅暴露组、正常对照组、低、中、高剂量驱铅灵组和中药对照组的血铅值分

表 1 每组动物在各个任务的平均成绩($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	位置导航任务 逃避潜伏期	探索任务		提示导航任务 逃避潜伏期(s)	工作记忆任务	
			潜伏期(s)	游泳速度(cm/s)		逃避潜伏期(s)	原象限停留时间(%)
铅暴露组	8	14.32 ± 11.08	34.63 ± 16.63	30.45 ± 4.63	9.63 ± 4.45	16.39 ± 13.96	34.17 ± 6.10
正常对照组	8	13.26 ± 13.11	19.00 ± 9.60*	29.11 ± 5.10	10.16 ± 5.83	14.31 ± 13.17	17.08 ± 3.87**
低剂量驱铅灵组	7 ^a	14.97 ± 14.24	23.71 ± 9.67	31.86 ± 3.02	14.68 ± 7.58	18.25 ± 14.02	27.35 ± 7.36
中剂量驱铅灵组	6 ^b	15.21 ± 13.60	17.17 ± 7.44*	29.43 ± 4.93	11.50 ± 5.68	17.34 ± 12.36	26.37 ± 9.87
高剂量驱铅灵组	7 ^c	12.27 ± 8.12	23.50 ± 14.00	28.62 ± 3.50	13.04 ± 7.89	15.69 ± 13.43	28.35 ± 9.33
中药对照组	8	11.10 ± 12.21	14.00 ± 6.00**	30.25 ± 3.25	14.69 ± 7.84	16.47 ± 14.21	21.00 ± 8.91**

注: a 第 15 天 1 只动物死亡, b 第 7、10 天死亡动物 2 只, c 第 19 天 1 只动物死亡。与铅暴露组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各组动物每周体重($\bar{x} \pm s$)

组别	初体重	第 1 星期	第 2 星期	第 3 星期	第 4 星期
铅暴露组	432.14 ± 13.11	441.57 ± 14.28	462.14 ± 15.66	468.57 ± 15.46	504.00 ± 17.85
正常对照组	455.75 ± 7.00	465.75 ± 8.85	486.38 ± 9.42	495.88 ± 9.22	513.75 ± 8.45
低剂量驱铅灵组	436.37 ± 10.21	444.75 ± 11.78	462.75 ± 13.13	470.00 ± 13.77	488.38 ± 14.58
中剂量驱铅灵组	451.71 ± 15.79	460.43 ± 17.26	476.00 ± 16.53	481.71 ± 16.41	512.00 ± 14.19
高剂量驱铅灵组	432.51 ± 10.51	446.33 ± 12.12	467.51 ± 13.28	472.33 ± 12.6	508.67 ± 14.19
中药对照组	448.50 ± 8.41	463.63 ± 7.95	479.95 ± 13.90	480.51 ± 14.01	515.88 ± 11.95

别是: $(29.72 \pm 15.19) \text{ ng/ml}$, $(5.86 \pm 2.06) \text{ ng/ml}$, $(12.82 \pm 4.53) \text{ ng/ml}$, $(7.23 \pm 5.10) \text{ ng/ml}$, $(9.11 \pm 3.78) \text{ ng/ml}$, $(6.56 \pm 5.39) \text{ ng/ml}$ ($\bar{x} \pm s$)。单因素方差分析表明各组之间差异显著 ($P < 0.01$), LSD 多重比较表明铅暴露组和其他各组之间差异极显著 ($P < 0.01$), 低、中、高剂量驱铅灵组和正常对照组及中药对照组之间无显著差异 ($P > 0.05$), 低、中、高剂量驱铅灵组间差异不显著, 即 3 个剂量的驱铅灵都对铅有拮抗作用。

3 讨论

本实验发现低水平铅暴露 28 天可使动物血铅浓度显著增高, Morris 水迷宫各项行为结果表明慢性低水平铅暴露对大鼠空间参考记忆和空间工作记忆有一定损害, 但对空间学习 (反应动物认知策略的位置导航任务) 无影响, 这和我们前期实验结果不完全一致。我们前期实验是用 2% 的醋酸铅溶液灌胃, 造成急性铅中毒 (14 天), 动物体内很快就能达到稳定的高血铅和高脑铅水平, 机体来不及对铅毒性造成的损害进行代偿, 因而出现记忆与学习的多重损害。而本次实验通过饮用水慢性 (28 天) 低水平 (0.05%) 铅暴露, 缓慢的铅接触可以引发体内的补偿机制^[17], 因此损害程度较轻, 而体重变化各组无区别, 说明各项学习记忆任务并未受到躯体因素 (体重) 的影响。

本次实验观察到中药复方驱铅灵浸膏粉能有效排铅, 对铅暴露导致的学习与记忆损害有显著的拮抗作用 (其中中剂量的驱铅灵效果较好), 这和我们前期的实验结果是吻合的^[12, 13, 14]。驱铅灵中的土茯苓、当归、甘草、枳实、党参含阿魏酸、甘草酸、琥珀酸、酒石酸、果胶酸、党参酸等多种有机酸, 有机酸具有络合功能, 起到排铅的作用^[18]; 当归含有丰富的精氨酸促进 NO 的合成^[19]; 枳实、甘草具升压作用, 使血压和肾血管阻力明显升高, 从而增高滤过压, 有利于被络合的铅滤过, 并明显增加尿量, 便于排铅^[20], 同时对免疫功能处于抑制状态的机体有调节和恢复作用; 其中甘草能改善神经功能, 提高线粒体 ATP 酶活性, 改善能量代谢, 促进脑功能的恢复^[21]。因此, 该方抗铅毒性的机制可能是与进入体内的铅直接结合, 使铅排出体外; 或是对铅作用的神经元有保护作用, 并能增加 NO 的生成; 同时还可能与其增加脑部细胞供氧、改善细胞受损后的缺氧状况, 从而促进组织修复有关。总之, 驱铅灵的药物作用特点是综合性的, 它不仅可拮抗铅的毒性, 也对机体进行了整体的调节。

参考文献

1 Finkclstein Y, Markowitz M E, Rosen J F. Low-level lead-induced

neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects Brain Res Brain Res Rev, 1998, 27: 168~ 176

2 Dykeman R, Aguilar-Madriz G, Smith Hernandez-Avila M. Lead exposure in Mexican radiator repair workers Am. J Ind Med, 2002, 41: 179~ 187.

3 Gasana J, Chamorro A. Environmental lead contamination in miami inner-city area J Expo Anal Environ Epidemiol, 2002, 12: 265~ 272

4 Cory-Slechta D A, Weiss B, Cos C. Performance and exposure indices of rats exposed to low concentrations of lead Toxicol Appl Pharmacol, 1985, 78: 291~ 299

5 Cory-Slechta D A, Pokora M J, Widzowski D V. Postnatal lead exposure induces supersensitivity to the stimulus properties of a D2-D3 agonist Brain Res, 1992, 598: 162~ 172

6 Lilienthal H, Winneke G, Brockhaus A, et al Prenatal and postnatal lead exposure in monkeys: effects on activity and learning set formation Neurobehav Toxicol Teratol, 1986, 8: 265~ 272

7 Needleman H L, Schell A, et al The long term effects of exposure to low doses of lead in childhood: A 11-year follow up report N Engl J Med, 1990, 322: 83~ 88

8 Bellinger D J, Sloman A, Leviton B, et al Low-level lead exposure and children's cognitive function in the preschool years Pediatrics, 1997, 87: 219~ 227.

9 Bellinger D, Stiles J, Needleman H L. Low-level lead exposure, intelligence, and academic achievement: A long-term follow-up study. Pediatrics, 1992, 90: 855~ 861.

10 Dietrich K, Berger W O, Succop P A, et al The developmental consequences of low to moderate prenatal and postnatal lead exposure: Intellectual attainment in the Cincinnati lead study cohort following school entry. Neurotoxicol Teratol, 1993, 15: 37~ 44

11 Morgan R. E, Levitsky D A, Strupp B J. Effects of chronic lead exposure on learning and reaction time in a visual discrimination task Neurotoxicology and Teratology, 2000, 22: 337~ 345

12 周萍, 李勇辉, 朱建国 驱铅灵对铅染毒大鼠血铅含量的影响 湖南中医学院学报, 2003, 23(3): 16~ 17.

13 周萍, 李勇辉 中药复方对铅染毒大鼠海马 NOS 表达影响的观察 中国临床康复杂志, 2005, 6: 104~ 105

14 周萍, 李勇辉, 马建军, 等 中药复方对铅染毒大鼠学习记忆障碍的改善作用 心理科学, 2005, 5: 1490~ 1492

15 Nera L, Ramirez A, Omsby CE, et al Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning Neurobiol Learn Mem, 1996, 66: 44~ 50

16 Hernandez A, Romieu L Rios C, et al Lead-glazed ceramics as major determinants of blood lead levels in Mexican women Environ Health Perspect, 1991, 94: 117~ 120

17 Guadalupe Gare'la-Arenas, Victor Ram'irez-Amaya, Isabela Balderas, et al Cognitive deficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS Behavioural Brain Research, 149(2004): 49~ 59

18 孙爱贞, 郭瑞新, 王惠芳 从中药驱铅的实验研究看中医的“祛邪安正” 职业医学, 1992, 19(2): 98~ 100

19 张银柱, 郭书文 中药驱铅的研究 黑龙江中医药, 1996, 23(2): 64~ 65

20 赵英环, 刘剑虹 中药驱铅 110 例临床疗效观察 职业医学, 1992, 19(1): 21~ 22

21 左立云, 于慧敏 中医药治疗铅中毒的研究进展 中国中医药信息杂志, 2002, 9(4): 87~ 88

(2006- 11- 14 收稿)