

· 毒理 ·

## 莪术对正常和血瘀证孕大鼠子代学习记忆能力损伤的差异

邹宇, 刘玉章, 张春, 樊丽, 周丽, 牛英才\*

(齐齐哈尔医学院医药科学研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** **目的:**观察并比较莪术对正常和血瘀证孕大鼠子代学习记忆能力影响的差异。**方法:**Wistar 雌性大鼠随机平均分为正常组和血瘀证模型组,采用 0.1 mg/只 sc 盐酸肾上腺素与冰水浴相结合的方法制备大鼠血瘀证模型。造模结束后,按 2:1 雌雄合笼,受孕后正常组和血瘀证组孕鼠分别随机分为 1.4, 2.8, 5.6 g·kg<sup>-1</sup>莪术组和对照组,共 8 个亚组。孕鼠于妊娠第 6 d~19 d 连续 ig 给予不同剂量的莪术水煎液,共给药 14 d,于仔鼠生后 28 d 进行 Morris 水迷宫测试。**结果:**正常大鼠和血瘀证大鼠给予莪术暴露后两者仔鼠学习记忆能力存在差异。在莪术高剂量组,第 2,3,4 天正常大鼠组仔鼠逃避潜伏期(44.87 ± 10.99)s, (33.95 ± 4.29)s, (23.29 ± 3.56)s 较血瘀组(38.11 ± 5.40)s, (29.11 ± 5.40)s, (19.59 ± 2.58)s 明显延长,过台次数(6.30 ± 1.71)次, (5.15 ± 1.18)次,明显减少(均  $P < 0.05$ ),而血瘀证模型大鼠组仔鼠的逃避潜伏期和过台次数与对照组比较均无显著性差异。**结论:**莪术对正常大鼠和血瘀证模型大鼠的仔鼠学习记忆能力损伤的影响具有差异,对正常大鼠的毒性效应更明显。

**[关键词]** 莪术; 学习记忆; 血瘀证; Morris 水迷宫

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0278-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013120278

## Ability of Learning and Memory of Offspring Affected by Exposure of Normal and Blood-stasis Pregnant Rats to Curcumae Rhizoma

ZOU Yu, LIU Yu-zhang, ZHANG Chun, FAN Li, ZHOU Li, NIU Ying-cai\*

(Institute of Medicine, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** In order to evaluate the differences in ability of learning and memory of offspring between normal and blood-stasis pregnant rats treated with Curcumae Rhizoma. **Method:** One hundred female Wistar rats were randomized into normal group and blood-stasis model group. A model of blood stasis model in rats by injecting adrenalin and simultaneously being immersed in ice water was used. The rats were mated and pregnant rats of two groups were randomized into the low, medium and large dose (1.4, 2.8, 5.6 g·kg<sup>-1</sup>) and control sub-group. Curcumae Rhizoma was orally administered to pregnant rats from gestational day (GD) 6 through 19 at dose levels of 0, 1.4, 2.8, 5.6 g·kg<sup>-1</sup>. The functions of learning and memory of the infant rats from the postnatal day 28 to 32 were determined with Morris water maze. **Result:** There was a difference in ability of learning and memory of offspring between normal and blood-stasis pregnant rats treated with Curcumae Rhizoma. Compared with the blank group, the infant rats in normal pregnant group treated with Curcumae Rhizoma at 5.6 g·kg<sup>-1</sup> had significantly longer escape latency to find the platform on postnatal day 29 to 31, whereas the number of crossings over a platform position was significantly decreased. We could not find any significant changes in that of blood-stasis rats group. **Conclusion:** Ability of learning and memory of offspring of normal pregnant rats was weaker than that of offspring of blood-stasis pregnant rats treated with Curcumae Rhizoma, confirmed the rationality of evaluating the toxicity of Chinese medicines based on traditional Chinese medicine syndrome theory.

**[Key words]** Curcumae Rhizoma; learning and memory; syndrome of blood stasis; Morris water maze

**[收稿日期]** 20121202(010)

**[通讯作者]** \*牛英才, Tel:13766573068, E-mail:myc1968@126.com

中药是一把双刃剑,在认可其疗效可靠的同时也必须兼顾安全合理使用<sup>[1]</sup>。妊娠期中药的应用在世界范围存在一定的普遍性,其主要原因是大多数人认为中药为天然物质,对人体无害<sup>[2]</sup>。虽然中医对妊娠禁忌积累了长期的临床经验,对妊娠禁忌中药的实验研究却不多,而且中药发育毒性研究大多是按照西药研究的思路,脱离了中医药理论的指导<sup>[3]</sup>。对于如何使用妊娠禁忌中药这一问题,大多数医家主张在妊娠期仍然应该辨证用药,对古人妊娠禁忌之说不必过分拘泥<sup>[4]</sup>。《黄帝内经》中“有故无损,亦无损”的思想长期用于指导中医临床的妊娠期用药。建立符合中医自身特点的中药发育毒性评价体系,有助于提高中药治疗水平及扩大应用范围,有助于开发自主知识产权的中药新药<sup>[5]</sup>。本研究采用血瘀证大鼠模型,进行莪术发育毒性(学习记忆)的评价,对中药安全性评价具有重要的启示和借鉴意义。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 Wistar 雌性大鼠,体重(185 ± 5) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号 SCXK(京)2007-0001。

**1.2 药物** 莪术药材购自齐齐哈尔市福顺堂药店,经黑龙江中医药大学中药教研室常惟智副教授鉴定为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥根茎。取蓬莪术,蒸馏水浸泡 30 min 后,加 20 倍量蒸馏水,每次煎煮 1.5 h,共煎煮 2 次,合并两次水煎液后过滤并浓缩至 100%,4 °C 保存备用。盐酸肾上腺素注射液(由上海禾丰制药有限公司生产 10 mg·mL<sup>-1</sup>)。

## 2 方法

**2.1 受试动物分组与模型制备** Wistar 雌性大鼠随机分为空白对照组、血瘀证模型对照组、正常 + 3 剂量莪术组,血瘀证 + 3 个剂量莪术组。参照文献

方法进行血瘀证大鼠模型制备<sup>[6]</sup>,第 1 天每隔 4 h sc 0.1 mg/只盐酸肾上腺素,共 3 次。在每次药物注射间隔期间,将大鼠放入 0 ~ 2 °C 冰水中 4 min 冷浴 2 次。第 2 天间隔 4 h sc 0.1 mg/只盐酸肾上腺素,共 2 次,在两次药物注射间隔期间,将大鼠放入冰水中冷浴 3 min。

**2.2 交配试验** 造模结束后,将各组大鼠按 2:1 雌雄合笼,次日镜检阴道涂片,查出精子的当天确定为孕 0 天(gestational day, GD 0),保证最后每组孕鼠至少为 10 只。

**2.3 莪术宫内暴露** 处理组母鼠于 GD 6 ~ 19 ig 给予不同剂量的莪术,对照组 ig 等体积生理盐水。为保持仔鼠营养的均衡性,进行窝标准化操作(每窝保留 8 只仔鼠,4 雌 4 雄)。

**2.4 观察仔鼠学习记忆能力** 仔鼠出生后第 28 天,从每组(10 窝)的每窝(8 只仔鼠)中随机选取 1 雌 1 雄仔鼠进行 Morris 水迷宫定位航行和空间探索试验。Morris 水迷宫前 4 d 为定位航行试验,每天从东入水点将仔鼠头朝池壁放入水池,使其自由游泳,以寻找平台,记录大鼠逃避潜伏期。实验第 5 天为空间探索试验,撤除平台,测试 1 min 内仔鼠跨越原平台位置的次数。

**2.5 统计学分析** 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间差异的显著性分析采用方差分析,组间两两比较用 SNK 检验。 $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 3 结果

**3.1 定位航行实验** 随着训练天数延长,各组仔鼠逃避潜伏期均呈缩短趋势,表明仔鼠学习能力随着训练次数增加而有所增强,而第 2,3,4 天,5.6 g·kg<sup>-1</sup> 莪术正常组仔鼠的逃避潜伏期明显长于空白对照组( $P < 0.05$ ),表明孕期暴露于莪术使正常组仔鼠的学习能力受损。而血瘀证模型大鼠组仔鼠的逃避潜伏期与对照组比较无显著性差异。见表 1。

表 1 莪术对正常和血瘀证孕大鼠的仔鼠定位航行潜伏期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	潜伏期/s			
		1 d	2 d	3 d	4 d
空白对照	-	52.38 ± 5.96	35.67 ± 5.46	27.79 ± 4.88	18.32 ± 3.79
血瘀证模型	-	51.03 ± 7.98	40.11 ± 8.37	29.45 ± 5.77	20.65 ± 3.69
正常 + 莪术	1.4	51.84 ± 7.84	39.38 ± 11.35	30.52 ± 5.21	20.38 ± 4.50
	2.8	54.71 ± 6.97	40.91 ± 8.99	31.58 ± 3.62	21.66 ± 3.43
	5.6	54.34 ± 6.78	44.87 ± 10.99 <sup>1)</sup>	33.95 ± 4.29 <sup>1)</sup>	23.29 ± 3.56 <sup>1)</sup>
血瘀证 + 莪术	1.4	51.66 ± 7.95	40.16 ± 6.19	30.47 ± 4.35	20.17 ± 3.48
	2.8	50.40 ± 6.97	41.09 ± 7.50	31.91 ± 4.79	20.68 ± 4.12
	5.6	53.88 ± 5.68	38.11 ± 5.40	29.11 ± 5.40	19.59 ± 2.58

注:与同期空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 空间探索实验** 与空白对照组比较, 5.6 g·kg<sup>-1</sup> 莪术正常组仔鼠穿越平台次数明显减少 ( $P < 0.05$ )。表明孕期暴露于莪术使正常组仔鼠的记忆能力受损。而血瘀证模型大鼠组仔鼠的穿越平台次数与对照组比较无显著性差异。见表 2。

表 2 莪术对正常和血瘀证孕大鼠的仔鼠空间探索过台次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	过台次数 /次	游泳速度 /cm·s <sup>-1</sup>
空白对照	-	4.75 ± 1.25	10.93 ± 0.67
血瘀证模型	-	4.75 ± 1.71	11.44 ± 0.62
正常 + 莪术	1.4	5.30 ± 1.52	10.97 ± 0.69
	2.8	6.00 ± 1.33	11.26 ± 0.52
	5.6	6.30 ± 1.71 <sup>1)</sup>	11.26 ± 0.58
血瘀证 + 莪术	1.4	4.95 ± 1.70	11.37 ± 0.51
	2.8	4.70 ± 1.71	11.44 ± 0.60
	5.6	5.15 ± 1.18	11.21 ± 0.63

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

目前,人们对妊娠禁忌中药的发育毒性的认识还不够深入和系统,至今尚没有一套适合于中药的生殖发育毒性研究的方法,致使妊娠禁忌中药的安全性评价还处于起步阶段<sup>[7]</sup>。建立符合中医药自身特点的发育安全性评价技术与方法,才能更好地阐明中医药的妊娠理论而有所创新。

破血祛瘀通经药其性走散动血,药力较峻能堕胎。莪术是传统妊娠禁忌药,用于治疗瘀血经闭、癥瘕痞块病症等。因莪术破血力强,故历代医家均将其列为妊娠禁忌药。据报道,从莪术的醇浸膏中分离出的萜类和倍半萜类化合物,对鼠有明显的抗早孕作用,给药 4 d 即见阴道流血、流产<sup>[8]</sup>。

对于如何使用妊娠禁忌中药这一问题,大多数医家主张在妊娠期仍然应该辨证用药,对古人妊娠禁忌之说不必过分拘泥<sup>[9]</sup>。临床若辨证正确,药用得当,虽“毒”虽“忌”亦可使病去胎安。如妊娠期伤胎腹痛,《外台秘要》用神验胎动方,以川芎、当归活血止痛、养血安胎。活血化瘀药并非绝对为妊娠安胎之禁区,应用的关键在于“有故无殒”,紧扣病机,权衡用之<sup>[10]</sup>。

学习记忆是中枢高级活动的一种方式,是高等动物和人类认知的基础<sup>[11]</sup>。本研究通过水迷宫定向航行试验,观察仔鼠对空间信息的获取效率。结果显示,孕期母鼠给予的莪术剂量达到 5.6 g·kg<sup>-1</sup> 时,正常组仔鼠的逃避潜伏期明显长于空白对照组。但是,此差异在出生后第 28 天(即训练第 1 天)的

训练中未体现出来,这可能与开始阶段需要适应水迷宫的陌生环境有关。出生后第 29,30,31 天,两组差异具有显著性。表明莪术 5.6 g·kg<sup>-1</sup> 正常组仔鼠在空间信息的获取上存在缺陷。空间探索试验结果进一步表明,莪术 5.6 g·kg<sup>-1</sup> 正常组仔鼠穿过原平台所在位置的次数低于对照组。表明正常组孕鼠在妊娠期摄入 5.6 g·kg<sup>-1</sup> 的莪术,可能导致子代大鼠在空间信息获取、保存和再现方面显著损伤。而血瘀证孕鼠组的仔鼠逃避潜伏期和过台次数均与对照组比较,无显著性差异。提示血瘀证(莪术的必效证)具有使莪术发育毒性去敏感化的改变趋势,表明中医“辨证减毒”的重要性。至于莪术损害学习记忆的证候状态差异的机制,则有待于进一步深入研究。但是,由于大鼠与人的组织结构和调节功能不完全相同,本研究结果不能完全类推与人体,临床中莪术在血瘀妊娠期妇女中的应用还需进一步临床研究。

#### [参考文献]

- [1] 边育红,庄朋伟,王丽,等. 药物潜在毒性发现技术及其在中药安全性评价中的应用展望[J]. 中草药, 2011,42(12):2379.
- [2] 冯艺萍,吴钢,严伟凤,等. 广西壮族自治区妊娠期妇女用药情况的调查分析[J]. 中国药房, 2011, 28,2605.
- [3] 谷颖敏,李咏梅,姜昕,等. 朱砂灌胃给药对大鼠生育力与早期胚胎发育毒性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(9):226.
- [4] 张慧珍,张晓芬. 寿胎丸合补中益气汤治疗脾肾两虚型早期先兆流产 38 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(16):329.
- [5] 赵云龙,冯蓓,周宜,等. 红花妊娠毒性选择性表达的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011,38(11):2274.
- [6] 胡小勤,陈利国,屈援. 生化汤对血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子表达的影响[J]. 中成药, 2006, 28(9):1330.
- [7] 韩佳寅,梁爱华. 全胚胎培养技术及其应用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010,35(5):549.
- [8] 何凤琴,王波. 口服莪术油抑制雌性棕色田鼠性行为 and 雌二醇受体在大脑核团中的表达[J]. 兽类学报, 2010,30(2):218.
- [9] 罗辉,杨国彦,刘建平. 应用活血化瘀法治疗复发性流产文献评价[J]. 中医杂志, 2012,53(16):1382.
- [10] 孙谊,于智敏. “有故无殒”发微[J]. 中华中医药杂志, 2009,24(11):1418.
- [11] Mishra D, Tiwari S K, Agarwal S, et al. Prenatal carbofuran exposure inhibits hippocampal neurogenesis and causes learning and memory deficits in offspring[J]. Toxicol Sci, 2012, 127(1):184.

[责任编辑 聂淑琴]