

香菇多糖联合依地酸钙钠对铅中毒小鼠学习记忆功能及胆碱能神经功能的影响

刘会芳^{1*}, 问慧娟², 李玉巧², 刘新霞², 刘中成¹, 马焕云², 王晓晖²
(1. 河北大学药学院, 河北省药物质量研究重点实验室, 河北保定 071000;
2. 河北大学基础医学院, 河北保定 071000)

[摘要] **目的:**研究香菇多糖联合依地酸钙钠对铅中毒小鼠学习记忆功能的影响,并初步探讨其作用机制。**方法:**将 50 只昆明种小鼠随机分为 5 组,即正常对照组、模型对照组、阳性对照依地酸钙钠组、香菇多糖低剂量联合依地酸钙钠组、香菇多糖高剂量联合依地酸钙钠组。正常对照组 ip 等量生理盐水,每日 1 次,其他组 ip 质量分数为 2% 的 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 溶液 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日 1 次,连续给药 8 d,复制铅中毒模型。然后正常对照组、模型对照组 ip 等量生理盐水,共 7 d,其他组 ip 依地酸钙钠 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,共 3 d。同时香菇多糖低剂量联合依地酸钙钠组、香菇多糖高剂量联合依地酸钙钠组分别 ip 依地酸钙钠和香菇多糖 1.5, 3.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,共 7 d。采用小鼠跳台法、Morris 水迷宫法检测小鼠学习记忆功能,用生物化学法检测小鼠大脑组织中乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 及乙酰胆碱酯酶 (TChE) 的活力,HE 染色观察海马组织形态学改变。**结果:**香菇多糖高剂量联合依地酸钙钠组能显著改善铅中毒所致的学习记忆障碍。与模型对照组相比,香菇多糖高剂量联合依地酸钙钠组逃离潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$),停留潜伏期明显延长 ($P < 0.01$),错误数减少 ($P < 0.01$),TChE 活力显著降低 ($P < 0.01$),ChAT 活力显著增高 ($P < 0.01$),并显著改善了海马神经元的变性、脱落。与依地酸钙钠 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组相比,香菇多糖高剂量联合依地酸钙钠组逃离潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$),停留潜伏期明显延长 ($P < 0.01$),错误数减少 ($P < 0.01$),TChE 活力显著降低 ($P < 0.01$),ChAT 活力显著增高 ($P < 0.01$),且优于香菇多糖低剂量联合依地酸钙钠组。**结论:**香菇多糖联合依地酸钙钠能改善铅中毒小鼠的学习记忆功能,其作用机制可能与降低 TChE 活力、提高 ChAT 活力,增强中枢胆碱能神经系统功能有关。

[关键词] 香菇多糖; 依地酸钙钠; 铅中毒; 学习记忆; 乙酰胆碱转移酶; 乙酰胆碱酯酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0211-04

The Influence of Combined Application of Lentinan and Calcium Disodium Edetate on Learning, Memory Ability and the Function of the Central Cholinergic System in Lead Poisoning Mice

LIU Hui-fang^{1*}, WEN Hui-juan², LI Yu-qiao², LIU Xin-xia²,
LIU Zhong-cheng¹, MA Huan-yun², WANG Xiao-hui²

(1. School of Pharmaceutical Sciences Hebei University, Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Baoding 071000, China;
2. School of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding 071000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of learning and memory ability on lead poisoning mice treated by lentinan and calcium disodium edetate, and to explore the mechanism preliminarily. **Method:** Fifty mice were randomly divided into five groups, control group, model group, positive control group, lentinan low dose group and high dose group. The mice in the control group were given intraperitoneal injection of saline at the same dosage, and the mice in other groups were given intraperitoneal injection of 2% $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ solution ($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 8 days. Then the mice in the control group and model group were given intraperitoneal injection of saline at the same

[收稿日期] 20110905(001)

[基金项目] 河北省科学技术研究与发计划项目(10276428);河北省中医药管理局科研计划(2011035)

[通讯作者] 刘会芳,副教授,从事天然药物药理学以及体内药物分析研究, Tel:0312-5971107, E-mail:liu-huifang@163.com

dosage for seven days, and the mice in other groups were given intraperitoneal injection of calcium disodium edetate ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for three days, at the same time the mice in lentinan low dose group and high dose group were given intraperitoneal injection of lentinan ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for seven days. Step-down test and Morris water maze were used to monitor the learning and memory ability. In the mean time, the activity of choline acetyltransferase (ChAT) and true choline esterase (TChE) was measured by biochemical methods. And the alterations in hippocampus slices morphology were assessed using microscope. **Result:** The learning and memory ability of lead poisoning mice could be markedly improved by lentinan high dose group. Compared with model group, the escape latency of mice in lentinan high dose group was markedly shortened ($P < 0.01$), and the retention latency of mice was markedly lengthened ($P < 0.01$), and the fault numbers were markedly reduced ($P < 0.01$). The activity of ChAT was markedly decreased ($P < 0.01$) and TChE was markedly increased ($P < 0.01$). The degenerative changes of neuron in hippocampus slices were improved. Compared with positive control group, the escape latency of mice in lentinan high dose group was shortened ($P < 0.05$), and the retention latency of mice was markedly lengthened ($P < 0.01$), and the fault numbers were markedly reduced ($P < 0.01$). The activity of ChAT was markedly decreased ($P < 0.01$) and TChE was markedly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The combined application of lentinan and calcium disodium edetate could improve the learning and memory ability in lead poisoning mice. The mechanism may be related to increasing the activity of ChAT and decreasing the activity of TChE and the improvement of the function of the central cholinergic system.

[Key words] lentinan; calcium disodium edetate; lead poisoning; learning and memory; choline acetyltransferase; true choline esterase

随着城市工业化进程,铅对环境污染日益严重,使铅中毒成为最常见的职业病之一。铅在神经系统蓄积后,可干扰脑细胞活动、破坏神经元结构、影响神经系统的多种功能,特别是对学习和记忆功能有抑制作用^[1]。目前临床上主要采用依地酸钙钠等金属络合剂治疗铅中毒,但这些药物不良反应较多,而且对低剂量的铅接触无效^[2]。香菇多糖为药食同源的植物香菇中提取的多糖,其具有提高内源性超氧化物歧化酶(SOD)活性、抑制自由基产生并清除氧自由基、免疫调节、抗菌、增强机体排毒能力等多种生物学作用^[3]。但香菇多糖用于铅中毒的治疗未见报道,故本实验对香菇多糖联合依地酸钙钠在改善铅中毒小鼠学习记忆功能及机制方面进行研究。

1 材料

1.1 药物和试剂 依地酸钙钠(CaEDTA)注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号1002261),注射用香菇多糖(山西振东泰盛制药有限公司,批号1011291),醋酸铅(分析纯,北京市红星化工厂批号000718-1),乙酰胆碱转移酶(ChAT)测试盒(批号20100812)及乙酰胆碱酯酶(TChE)测试盒(批号20100818)(南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器 BI-2000 小鼠水迷宫(成都泰盟科技有限公司),小鼠跳台条件反射仪(河北大学医学实验

中心自制),TEC2800 组织包埋机(徕克医疗仪器有限公司),RM2135 石蜡切片机(Leica 公司),CKX41 倒置生物显微镜(日本 Olympus),ELX-800 型自动酶标仪(美国宝特公司),Allgra X-15R 型低温低速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司),BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司)。

1.3 动物 清洁级昆明种小鼠,体重(20 ± 2)g,雌雄各半,由河北医科大学实验动物中心提供(动物合格证编号1003088)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 小鼠称重后,随机分为5组,正常对照组 ip 等量生理盐水,每日1次。其他组 ip 质量分数为2%的 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 溶液 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日1次,连续给药8d,复制铅中毒模型。模型复制完成后恢复3d,称重,具体分组给药如下:①正常对照组(NS):等量生理盐水,共7d;②模型对照组 $[\text{Pb}(\text{Ac})_2]$:等量生理盐水,共7d;③阳性对照组(CaEDTA):CaEDTA $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,共3d,第4日开始 ip 等量生理盐水,共4d;④香菇多糖低剂量联合 CaEDTA 组(LNT_低):ip CaEDTA $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 持续3d,同时 ip 香菇多糖 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,共7d;⑤香菇多糖高剂量联合 CaEDTA 组(LNT_高):ip CaEDTA $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 持续3d,同时 ip 香菇多糖 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,共7d。

2.2 小鼠跳台实验^[4] 给药结束后 1 h,对小鼠进行跳台训练,通过小鼠跳台实验检测小鼠学习记忆功能。记录小鼠在铜栅上受电击而跳回至平台上的时间为逃离潜伏期,此与回避反应的获得有关;记录小鼠在平台上停留直至跳回至铜栅上的时间为停留潜伏期,此与记忆保持有关;小鼠跳回至铜栅的次数(5 min 内)记为错误数。动物每隔 1 d 测试 1 次,每次 5 min,共 3 次,记录最后 1 次小鼠的逃离潜伏期、停留潜伏期和错误数。

2.3 Morris 水迷宫定向航行实验^[4] 小鼠跳台实验结束后进行定向航行实验。Morris 水迷宫的直径 100 cm,水深 30 cm,水面高于站台 1 cm,水温保持(26 ± 1) °C。定向航行实验(place navigation)测量小鼠对水迷宫学习和记忆的能力。水池上方安置带有显示系统的摄像机,同步记录小鼠运动轨迹,将其运动轨迹输入计算机并通过软件分析得到实验数据。实验共进行 7 d,每天训练 2 次,分上、下午两段进行,训练时随机选择一个入水点,将小鼠面向池壁放入水中,观察并记录小鼠寻找并爬上平台所需时间(即逃避潜伏期)。每次训练分别从不同的入水点入水,如果小鼠在 60 s 内未找到平台,将其引至平台稳定 10 s。这时其潜伏期记录为 60 s。

2.4 小鼠脑组织中 ChAT 及 TChE 活力的测定^[5] Morris 水迷宫测试结束后,断头取大脑,用预冷生理盐水冲洗表面血液,滤纸拭干,取一半脑组织,以质量/体积比 1:9 加入 4 °C 生理盐水,制成 10% 的匀

浆,4 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 15 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定大脑组织 ChAT 及 TChE 活性。

2.5 小鼠脏器系数的测定及计算 断头处死小鼠后,取其脑、肝脏,脾脏,肾脏。取小鼠完整股骨,将软组织剔除干净,用滤纸吸干,称重。按以下公式计算各脏器系数。

$$\text{脏器系数} = \text{脏器质量(g)} / \text{小鼠体重(g)}$$

2.6 组织学检查 小鼠取脑后,冠状切取前脑 2~5 mm 脑组织块,10% 多聚甲醛固定;48 h 后 0.01 mol·L⁻¹ PBS 冲洗 3 次,70% 至 100% 乙醇常规浓度梯度脱水,二甲苯中透明 2 次,入石蜡内进行包埋,将修好的蜡块固定于石蜡切片机上连续切片,厚度为 7 μm,常规 HE 染色。在显微镜下观察海马 CA3 区神经元损伤情况。

2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组以上资料采用 One-way ANOVA 分析、组间 Newman-Student-Keuls 检验进行统计学处理;两组资料采用 *t* 检验。*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠跳台实验 与 Pb(Ac)₂ 组相比,NS 组逃离潜伏期缩短、停留潜伏期延长和错误数减少 (*P* < 0.01),这表明铅中毒模型复制成功。与 CaEDTA 组相比,LNT_高 组逃离潜伏期时间缩短 (*P* < 0.05),停留潜伏期延长和错误数减少 (*P* < 0.01)。说明高剂量的香菇多糖对依地酸钙钠治疗铅中毒的增效作用更加明显(表 1)。

表 1 香菇多糖(LNT)联合依地酸钙钠(CaEDTA)对铅中毒小鼠跳台实验逃离潜伏期、停留潜伏期、错误数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	逃离潜伏期/s	停留潜伏期/s	错误数/次
NS	-	5.94 ± 2.24 ^{2,4)}	201.51 ± 26.25 ^{2,4)}	2.30 ± 1.25 ^{2,4)}
Pb(Ac) ₂	-	16.14 ± 3.80	71.61 ± 11.46 ³⁾	6.70 ± 1.58 ³⁾
CaEDTA	80	11.04 ± 2.20 ²⁾	94.87 ± 14.23 ^{1,4)}	5.20 ± 1.32 ¹⁾
LNT + CaEDTA ⁵⁾	1.5	8.77 ± 1.66 ²⁾	141.59 ± 25.18 ^{2,4)}	4.00 ± 1.05 ^{2,3)}
	3.0	8.15 ± 2.68 ^{2,3)}	160.28 ± 20.84 ^{2,4)}	3.10 ± 1.37 ^{2,4)}

注:与 Pb(Ac)₂ 组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与 CaEDTA 组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01; ⁵⁾ CaEDTA 为 80 mg·kg⁻¹ (表 2~3 同)。

3.2 Morris 水迷宫定向导航实验 与 CaEDTA 组比较,LNT_低 组逃避潜伏期缩短 (*P* < 0.05),LNT_高 组逃避潜伏期明显缩短 (*P* < 0.01),表明香菇多糖能增强依地酸钙钠对铅中毒小鼠记忆力的改善作用(表 2)。

3.3 对铅中毒小鼠脑组织中 ChAT, TChE 活力的影响 与 CaEDTA 组比较,LNT_高, LNT_低 组均降低铅中毒小鼠脑组织 TChE 活力 (*P* < 0.01),提高 ChAT 的活力 (*P* < 0.01),以 LNT_高 组效果最佳(表 3)。

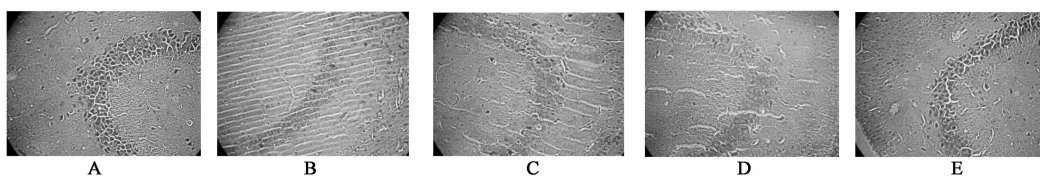
表 2 香菇多糖(LNT)联合 CaEDTA 对铅中毒小鼠逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s
NS	-	25.11 ± 9.88 ^{2,4)}
Pb(Ac) ₂	-	73.28 ± 15.00 ⁴⁾
CaEDTA	80	55.39 ± 10.18 ²⁾
LNT + CaEDTA ⁵⁾	1.5	44.36 ± 9.45 ^{2,3)}
	3.0	36.77 ± 10.47 ^{2,4)}

表 3 香菇多糖(LNT)联合 CaEDTA 对铅中毒小鼠脑组织中 ChAT 及 TChE 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ChAT 活力 /U·g ⁻¹	TChE 活力 /U·mg ⁻¹
NS	-	215.05 ± 16.87 ^{2,4)}	194.63 ± 16.35 ^{2,4)}
Pb(Ac) ₂	-	167.51 ± 10.38	318.53 ± 17.42 ⁴⁾
CaEDTA	80	176.39 ± 10.46	275.56 ± 13.63 ²⁾
LNT + CaEDTA ⁵⁾	1.5	190.83 ± 10.33 ^{2,3)}	238.02 ± 14.57 ^{2,4)}
	3.0	205.87 ± 15.44 ^{2,4)}	231.82 ± 10.41 ^{2,4)}

3.4 各组小鼠脏器系数的变化 研究表明,与



A. NS; B. Pb(Ac)₂; C. CaEDTA 80 mg·kg⁻¹; D. LNT 1.5 mg·kg⁻¹ + CaEDTA 80 mg·kg⁻¹;
E. LNT 3.0 mg·kg⁻¹ + CaEDTA 80 mg·kg⁻¹

图 1 香菇多糖对铅中毒小鼠海马组织 CA3 区神经元细胞形态的影响 (HE 染色, ×400)

4 讨论

香菇多糖 (lentinan, LNT) 具有提高 SOD 活性, 抑制 MDA 生成, 抗脂质氧化, 清除氧自由基、免疫调节、抗菌、增强机体排毒能力等多种生物学作用, 其糖链上丰富的游离-OH 和-COOH 可与铅络合形成难以吸收的凝胶, 阻止铅在胃肠道的吸收, 理论上可以起到治疗铅中毒的作用。同时香菇还含有大量的矿物质及微量元素^[6], 如果与传统的驱铅药物金属络合剂合用可以减轻微量元素的代谢失调。本实验结果表明香菇多糖联合依地酸钙钠能改善铅中毒小鼠的学习记忆功能。

学习记忆过程受神经和神经肽调节, 学习记忆与中枢胆碱能神经系统有着密切的关系, 中枢胆碱能神经系统可通过隔区-海马-边缘叶和大脑皮质两条通路特异性地调节第一级记忆转入第二级记忆的过程^[5]。乙酰胆碱 (Ach) 是促进学习记忆的重要递质^[7], 由 ChAT 催化合成, TChE 催化分解。TChE 与 ChAT 是中枢胆碱代谢的一对特异性酶, 两者的活性直接影响脑内神经递质 Ach 的含量。研究表明, 模型对照组小鼠脑组织中 ChAT 活力显著降低, TChE 活力显著升高, 而 LNT_高 组显著升高了 ChAT 活力, 并降低了 TChE 活力。从而提高了胆碱

Pb(Ac)₂ 组相比, 各组脏器系数比较均无统计学意义。与 CaEDTA 组相比, 各组也均无统计学意义。

3.5 对小鼠海马 CA3 区细胞形态的影响 NS 组小鼠海马结构正常, 有 3~4 层锥体细胞, 排列整齐紧密, 细胞胞质丰富, 核圆形, 无固缩或溶解, 核仁清晰可见。与 NS 组比较, Pb(Ac)₂ 组海马 CA3 区神经细胞变性坏死, 表现为轴突消失, 空泡样变, 核固缩, 胞膜核膜界限不清。LNT_低 组、LNT_高 组不同程度改善了 CA3 区神经细胞病理改变, 以 LNT_高 组最显著 (图 1)。

神经系统功能。这可能是香菇多糖改善铅中毒小鼠学习记忆功能的机制之一。

[参考文献]

- [1] 任振华, 李光武. 铅对小鼠学习记忆及自主活动的影响[J]. 环境与健康杂志, 2006, 23(3): 237.
- [2] 郭碧花, 张星海. 抗氧化剂对铅毒防治的作用及机制探讨[J]. 中国工业医学杂志, 2004, 17(2): 100.
- [3] 陈传红, 金卫根, 李荣同, 等. 真菌多糖药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 933.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 1020.
- [5] 赵燕燕, 刘新霞, 陈春生, 等. 高良姜提取物对小鼠学习记忆能力及胆碱能神经系统功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2): 49.
- [6] 刘威, 刘立强. 浅谈香菇营养及药用保健价值[J]. 农业与技术, 2009, 29(5): 131.
- [7] Wang X B, Zeng Y M, Duan S M, et al. M-1 and M-2 muscarinic receptors in the hippocampus and fear activated memory and the content of glutamate in amygdala[J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(2): 244.

[责任编辑 聂淑琴]