

大黄酚对铅中毒小鼠学习记忆能力的影响

张季*, 严春临, 侯勇, 张力, 张丹参, 王金

(河北北方学院基础医学院药理学教研室, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:**研究大黄酚对铅中毒小鼠学习记忆能力及组织内铅水平的改善作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:**采用连续 8 d ip 7 mg·kg⁻¹ 醋酸铅造成铅中毒小鼠模型,采用跳台实验,观察 ip 大黄酚(10.0, 1.0, 0.1 mg·kg⁻¹)对铅中毒模型小鼠记忆能力的改善作用,并于大黄酚治疗 14 d 后测定小鼠心、肝、脾、肾内铅水平,同时测定小鼠肝、肾组织内丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力。**结果:**连续 8 d ip 7 mg·kg⁻¹ 醋酸铅造成铅中毒小鼠模型学习记忆障碍,使小鼠心、肝、脾、肾内铅水平显著升高,小鼠肝、肾内 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低,使 MDA 含量增加;而连续 ip 大黄酚 14 d 治疗后,可不同程度提高小鼠铅中毒后学习记忆能力,与模型组相比大黄酚治疗组均可显著降低心、肝、脾、肾铅含量($P < 0.01$);与模型组相比大黄酚 10.0, 1.0 mg·kg⁻¹ 治疗组可显著升高肝、肾内 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低 MDA 含量($P < 0.01$),而大黄酚 0.1 mg·kg⁻¹ 治疗组可显著升高肾内 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低 MDA 含量($P < 0.01$),对肝内 SOD, GSH-Px 的活性及 MDA 含量无显著影响。**结论:**大黄酚可显著改善铅中毒小鼠学习记忆能力,降低铅中毒小鼠各组织的铅水平,提高小鼠肝、肾组织内抗氧化酶的活性,改善铅中毒造成的脂质过氧化。

[关键词] 大黄酚; 铅中毒; 学习记忆; 氧化损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0187-04

Effect of Chrysophanol on Learning and Memory Impairment Induced by Lead in Mice

ZHANG Ji*, YAN Chun-lin, HOU Yong, ZHANG Li, ZHANG Dan-shen, WANG Jin

(Department of Pharmacology, School of Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of chrysophanol (Chry) on learning and memory impairment and lead level in lead poisoning mice. **Method:** Mice except control group were administered 7 mg·kg⁻¹ lead acetate by peritoneal injection every day for 8 days to establish the mice lead poisoning model. Chry was ip injected for 14 days. Learning memory was examined by step-down test. The lead level of heart, spleen, liver and kidney was measured by hydride generated-atomic absorption spectrographic method. Antioxidant enzyme levels glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxidation products (malondialdehydel MDA) in liver and kidney were determined. **Result:** Lead acetate could (induce the disorder of learning and memory of mice, lead acetate also could significantly increase the lead level of heart, spleen, liver and kidney in lead poisoning mice. Lead acetate could decrease the activities of SOD and GSH-Px of mice liver and kidney. Compared with model group, the lead levels of mice heart, spleen, liver and kidney were markedly decreased after treated with Chry (10.0, 1.0, 0.1 mg·kg⁻¹) for 14 days ($P < 0.01$). Chry (10.0, 1.0 mg·kg⁻¹) could significantly increase the SOD and GSH-Px activity and could decrease the content of MDA in mice liver and kidney ($P < 0.01$). Chry (0.1 mg·kg⁻¹) could increase the SOD and GSH-Px activity and could decrease the content of MDA in mice kidney ($P < 0.01$), but Chry (0.1 mg·kg⁻¹) had no significantly

[收稿日期] 20110829(007)

[基金项目] 河北省卫生厅医学科学研究重点课题项目(20100144);张家口市科技项目指导计划项目(1021098);河北北方学院校级课题(Q2010020)

[通讯作者] *张季, 硕士, 讲师, 从事中药药理学与药剂学研究, Tel: 18931316003, E-mail: zhangjizhji@126.com

influence on the SOD and GSH-Px activity and the content of MDA in mice liver ($P < 0.01$). **Conclusion:** Chry could obviously improve the learning and memory ability in mice with lead poisoning, and reduce lead levels in mice tissues with lead poisoning, Chry also could increase the activity of antioxidant enzyme and decrease the lipid peroxidation caused by lead poisoning mice.

[**Key words**] chrysophanol; lead poisoning; learning and memory; oxidative damage

大黄酚(chrysophanol, Chry)是大黄中提取的蒽醌类化合物之一,具有改善学习记忆障碍、抗衰老的作用,近期研究表明大黄酚具有改善阿尔茨海默病(AD)小鼠学习记忆和认知功能、提高抗缺氧能力和耐力,同时通过清除自由基减少过氧化脂质的生成和增强抗氧化酶的活性,抑制乙酰胆碱酯酶(AchE)活性、提高脑血氧水平、降低脑组织一氧化氮(NO)含量及一氧化氮合酶(NOS)等作用^[1]。铅是广泛存在于自然界中的一种有毒重金属,铅暴露能使细胞活性氧增加,破坏机体氧化/抗氧化动态平衡,改变抗氧化酶活性及脂质过氧化水平,从而导致细胞氧化损伤^[2]。研究表明铅中毒与AD具有相同的靶部位,在铅中毒的动物和人脑可观察到AD样的老年斑(senile plaques, SPs)和神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)^[3]。大黄酚是否能够改善铅中毒所造成的伤害目前尚未见报道,本实验就大黄酚对铅中毒小鼠学习记忆的影响及作用机制做进一步研究。

1 材料

1.1 动物 健康、昆明种雄性小鼠,体重(20 ± 2)g,由中国医学科学院实验动物中心提供。动物在实验室适应性饲养3d后用于实验,分笼饲养,自由饮食和饮水。室温(20 ± 2)℃。

1.2 药品与试剂 大黄酚(中国生物制品检定所提供,批号0796-200310,含量99.4%),实验前用N,N-二甲基甲酰胺溶解,氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(吐温80)助溶,再加入生理盐水混匀,N,N-二甲基甲酰胺:吐温80:生理盐水=1:1:8;实验前用生理盐水稀释至所需浓度;醋酸铅(天津化学试剂六厂);硝酸、高氯酸(天津耀华化学试剂有限责任公司);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号20110314)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号20110123)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号20110305)及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(批号20110311),均购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 DT-200 跳台仪(中国医学科学院药物研究所,紫外-可见分光光度计(LabTech公司),

ME235P型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司),80-2B离心机(上海安亭科学仪器厂),Sigma-3K30高速冷冻离心机(德国),AA-6800原子吸收分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 50只小鼠随机为5组,每组10只,分别为溶媒组;铅中毒组(模型组);大黄酚治疗组(高、中、低剂量分别为10.0,1.0,0.1 mg·kg⁻¹)。铅中毒组和大黄酚各剂量组每天ip醋酸铅溶液7 mg·kg⁻¹,溶媒组每天ip等量的生理盐水,连续注射8d,然后停止注射3d;染毒后4d开始给药,大黄酚治疗组ip相应剂量的大黄酚(10 mL·kg⁻¹);溶媒组与模型组ip 10 mL·kg⁻¹溶剂(N,N-二甲基甲酰胺:吐温80:生理盐水=1:1:8),1次/d,共14 d^[4-5]。

2.2 跳台实验 各组给药第12天进行跳台实验训练,实验时将小鼠放入跳台实验仪中,训练小鼠受到电击跳上平台躲避伤害性刺激,记录小鼠第1次跳下平台的时间即潜伏期,3 min内从平台跳下的次数为学习的错误次数及触电时间;24 h后重新测试,记录潜伏期和记忆错误次数及触电时间,比较不同组间小鼠记忆成绩的差异,测试时若小鼠停留在平台上超过3 min,其潜伏期以180 s计^[6]。

2.3 小鼠心、肝、脾、肾中铅含量的测定 跳台实验完成后快速将小鼠断头处死,取心、肝、脾、肾,分别用生理盐水洗净,用滤纸吸干水分称重,于-80℃保存备用;将取下的心、脾、部分肝、右肾分别用10%硝酸消化定容,石墨炉原子吸收分光光度法测定其铅含量。

2.4 小鼠肝、肾过氧化指标的测定 取部分肝及左肾,按试剂盒说明制备组织匀浆、离心,取上清液适量,按照试剂盒说明书分别测定MDA含量及SOD, GSH-Px活力,采用考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量。

2.5 统计学方法 采用SPSS 11.0统计软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示方法,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对铅中毒小鼠学习记忆的影响 连续ip 7 mg·kg⁻¹醋酸铅8d,可以导致小鼠学习能力及记忆能

力显著下降,学习训练实验中,模型组与溶媒组比较,小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期明显降低($P < 0.05$),错误次数及触电时间显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,大黄酚 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可显著增加小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期($P < 0.05$),降低错误次数及触电时间($P < 0.05$)。记忆测试实验中,模型组与溶媒组比较,小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期明显降低($P < 0.01$),错误次数及触电时间显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,大黄酚 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可显著增加小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期($P < 0.05$),降低错误次数及触电时间($P < 0.05$),而大黄酚 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 显著增加小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期($P < 0.01$),同时显著降低错误次数及触电时间($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 跳台实验中大黄酚对铅中毒小鼠学习记忆的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	学习训练实验			记忆测试实验		
		触电潜伏期/s	错误数/次	触电时间/s	触电潜伏期/s	错误数/次	触电时间/s
溶媒	-	86.23 ± 32.33	2.34 ± 1.17	42.33 ± 21.41	118.35 ± 21.13	0.88 ± 0.76	29.45 ± 16.22
模型	-	57.35 ± 23.21 ¹⁾	3.68 ± 1.51 ¹⁾	68.22 ± 24.17 ¹⁾	69.11 ± 17.88 ²⁾	2.33 ± 1.23 ²⁾	64.12 ± 19.08 ²⁾
大黄酚	0.1	68.34 ± 20.32	2.48 ± 1.25	62.71 ± 23.91	85.26 ± 17.34	1.57 ± 0.75	53.86 ± 19.88
	1.0	78.14 ± 22.91	2.37 ± 1.19 ³⁾	54.32 ± 19.88 ³⁾	90.44 ± 19.17 ³⁾	1.29 ± 0.67 ³⁾	42.76 ± 17.41 ³⁾
	10.0	80.22 ± 23.11 ³⁾	2.41 ± 1.07 ³⁾	46.77 ± 19.34 ³⁾	95.54 ± 18.55 ⁴⁾	1.03 ± 0.68 ⁴⁾	32.25 ± 16.54 ⁴⁾

注:与溶媒组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 大黄酚对铅中毒小鼠心、肝、脾、肾组织内铅水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$			
		心	脾	肝	肾
溶媒	-	4.71 ± 0.69	1.47 ± 0.12	0.83 ± 0.08	1.08 ± 0.17
模型	-	19.12 ± 2.38 ²⁾	12.33 ± 1.33 ²⁾	8.47 ± 0.62 ²⁾	4.96 ± 0.52 ²⁾
大黄酚	0.1	15.35 ± 1.15 ⁴⁾	7.41 ± 1.17 ⁴⁾	5.34 ± 0.39 ⁴⁾	2.04 ± 0.21 ⁴⁾
	1.0	12.33 ± 1.32 ⁴⁾	4.21 ± 0.88 ⁴⁾	4.62 ± 0.35 ⁴⁾	1.78 ± 0.24 ⁴⁾
	10.0	10.02 ± 1.24 ⁴⁾	2.51 ± 0.69 ⁴⁾	3.56 ± 0.29 ⁴⁾	1.27 ± 0.15 ⁴⁾

表 3 大黄酚对铅中毒小鼠肝、肾内 MDA 含量及 SOD, GSH-Px 活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝内氧化指标			肾内氧化指标		
		MDA	SOD	GSH-Px	MDA	SOD	GSH-Px
		/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
溶媒	-	1.86 ± 0.12	322.41 ± 13.45	93.03 ± 5.78	1.57 ± 0.12	148.17 ± 8.77	110.38 ± 4.19
模型	-	2.91 ± 0.13 ²⁾	275.12 ± 12.45 ²⁾	59.44 ± 4.73 ²⁾	2.56 ± 0.23 ²⁾	91.37 ± 9.86 ²⁾	67.11 ± 3.77 ²⁾
大黄酚	0.1	2.82 ± 0.19	287.81 ± 21.36	61.58 ± 6.01	2.18 ± 0.19 ⁴⁾	114.22 ± 8.42 ⁴⁾	84.34 ± 5.33 ⁴⁾
	1.0	2.28 ± 0.17 ⁴⁾	312.73 ± 15.68 ⁴⁾	68.23 ± 6.35 ⁴⁾	1.96 ± 0.17 ⁴⁾	127.23 ± 8.11 ⁴⁾	95.81 ± 4.92 ⁴⁾
	10.0	1.92 ± 0.18 ⁴⁾	314.77 ± 15.64 ⁴⁾	82.04 ± 5.36 ⁴⁾	1.71 ± 0.15 ⁴⁾	146.11 ± 8.36 ⁴⁾	101.33 ± 5.19 ⁴⁾

4 讨论

铅具有极强的神经毒性,长期铅暴露对儿童智

3.2 对铅中毒小鼠心、肝、脾、肾组织内铅水平的影响 模型组与溶媒组相比,心、肝、脾、肾内铅含量显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,大黄酚治疗组均可显著降低心、肝、脾、肾铅含量($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 小鼠肝、肾过氧化指标的影响 连续 ip $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 醋酸铅 8 d, 可以导致小鼠肝、肾内 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低,使 MDA 含量增加,模型组与溶媒组相比各项指标均具有显著性($P < 0.01$);而连续 ip 大黄酚 14 d 后,与模型组相比大黄酚 $10.0, 1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组可显著升高肝、肾内 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量($P < 0.01$),而大黄酚 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组可显著升高肾内 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低 MDA 含量($P < 0.01$),对肝内 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量无显著影响。见表 3。

力发育和学习行为的影响已引起人们的广泛关注。本实验采用小鼠连续 ip $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 醋酸铅 8 d 制备

铅中毒模型,具有操作简便、剂量准确的优点。本实验通过跳台法行为学检测指标检测大黄酚对铅中毒小鼠学习能力及记忆能力的影响。

以往对铅中毒机制研究发现,一方面,铅可诱发氧自由基的产生,其在血、肝、脑等组织中发生脂质过氧化反应的终产物在体内堆积,导致膜、蛋白质及 DNA 发生不可逆损伤,即氧化损伤。另一方面,铅与巯基有较强的亲和力,而机体的抗氧化系统的一些重要酶类多为含巯基酶,铅与之结合,使抗氧化能力下降,因此增强了脂质过氧化作用的有害效应^[7-8]。本实验研究发现连续 ip $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 醋酸铅 8 d 可以导致小鼠各器官铅水平显著升高,小鼠肝、肾内 MDA 含量显著升高, SOD, GSH-Px 活力显著下降,这与文献报道相一致,而 ip 大黄酚 14 d 后,可显著降低小鼠各组织内铅水平,小鼠肝、肾内 MDA 含量显著降低而 SOD, GSH-Px 活力显著升高,进一步证实铅通过损伤抗氧化系统而发挥毒性作用说法,大黄酚则通过提高动物体内各种脂质过氧化酶的活性,达到解除铅对抗氧化系统损伤的作用,从而达到拮抗铅毒性作用。预防铅中毒与 AD 的预防与治疗是否具有-致性,大黄酚改善铅中毒是否还具有其他方面的机制均有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李淑娟,李春更,侯勇,等. 大黄酚抗衰老作用研究进展[J]. 河北北方学院学报:医学版,2009,26(1):70.
- [2] 梁冰,李晓兵,张伟,等. 铅的污染危害及天然产物防治铅中毒[J]. 四川环境,2000,9(2):17.
- [3] 韦东禄,傅雪,姜岳明. 铅暴露与阿尔茨海默病[J]. 工业卫生与职业病,2006,32(6):379.
- [4] 张梅,刘梅,陈文. 番茄纤维对铅中毒小鼠重要脏器的促排铅作用研究[J]. 现代预防医学,2009,36(16):3104.
- [5] 卫培峰,吴艳艳,焦晨莉. 制何首乌及大黄酚对小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):172.
- [6] 谢寒芳,颜崇淮. 铅影响学习记忆的分子神经生物学机制研究进展[J]. 国外医学:儿科学分册,2005,32(4):240.
- [7] 张喜莲,马融,刘璇. 疏肝利胆法对染铅大鼠驱铅效应及拮抗海马损害的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):122.
- [8] 陆新华,刘卓宝. 自由基与铅中毒机制的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,1998,16(3):189.

[责任编辑 聂淑琴]