

# 疏肝利胆法对染铅大鼠驱铅效应及拮抗海马损害的研究

张喜莲, 马融\*, 刘璇

(天津中医药大学第一附属医院儿科, 天津 300193)

[摘要] 目的: 探讨疏肝利胆法对染铅大鼠驱铅效应及拮抗海马损害的机制。方法: 以醋酸铅灌胃制作铅中毒模型, 实验大鼠随机分为疏肝利胆颗粒高、中、低剂量组, 智杞颗粒组, 依地酸钙钠组, 模型对照组, 空白对照组。采用等离子原子发射光谱法(ICP)测定各组大鼠治疗前后血中铅、钙、锌的浓度; 电镜观察海马结构损伤; 紫外分光光度法测定治后各组大鼠海马中一氧化氮(NO)和总抗氧化能力(TAOC)。结果: 疏肝利胆颗粒、智杞颗粒及依地酸钙钠 3 组治后血铅含量均明显降低, 组间无显著差异; 疏肝利胆颗粒中、高剂量对血钙的降低与智杞颗粒相当, 明显低于依地酸钙钠, 而对血锌的降低, 显著低于智杞颗粒及依地酸钙钠。染铅大鼠海马结构明显损伤, 各治疗组中疏肝利胆组海马结构损伤最轻, 其次是智杞颗粒、依地酸钙钠组。染铅大鼠海马中 NO 及 TAOC 含量显著降低, 疏肝利胆颗粒高剂量组海马中 NO, TAOC 含量明显增高, 较其他治疗组有显著差异。结论: 疏肝利胆法可降低血铅含量, 避免必需微量元素钙、锌的流失; 同时能拮抗铅所致海马损伤, 提高 NO 及 TAOC 含量, 改善学习记忆能力。

[关键词] 疏肝利胆法; 铅; 必需微量元素; 海马

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0122-05

## Shugan Lidan Therapy for Discharging Lead and Antagonizing Damage of Hippocampus in Lead-poisoned Rat

ZHANG Xi-lian, MA Rong\*, LIU Xuan

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the effect of Shugan Lidan (SGLD) therapy for discharging lead and antagonizing the damage of hippocampus. **Method:** Lead poisoned model of rat was established by giving lead acetate ig for 5 weeks. All rats were randomly divided into seven groups: SGLD high-does group, SGLD middle-does group, SGLD low-does group, Zhiqi Granule group, EDTA-CaNa<sub>2</sub> group, plumbum dyed model group and normal control group. We measured the concentrations of lead, calcium, zinc in blood by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP); observed morphological changes in hippocampus by electronic microscope; and measured the concentrations of NO, TAOC in the hippocampus cortex by UV spectrophotometry. **Result:** The treatments with SGLD, Zhiqi and EDTA-CaNa<sub>2</sub> lowered the level of blood lead significantly, without significant differences among the three groups. Meanwhile the treatments caused the level of calcium and zinc in blood to drop, among the groups medium dose and high dose of SGLD dropped the level of calcium as much as Zhiqi, and the effect was lower than that of EDTA-CaNa<sub>2</sub>. However, blood zinc was observably dropped less by SGLD than that of

[收稿日期] 20100203(003)

[基金项目] 天津市社会发展计划应用基础研究(05YFJMJC07900)

[第一作者] 张喜莲, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事小儿癫痫、多动症、抽动症、儿童铅中毒等疾病研究, Tel: 15900384609, E-mail: zhangxilian1952@ yahoo. com. cn

[通讯作者] \* 马融, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要研究小儿癫痫、多动症、抽动症、儿童铅中毒等疾病, Tel: 022-27432012  
E-mail: marong1974@ yahoo. com. cn

Zhiqi and EDTA-CaNa<sub>2</sub>. The hippocampus of lead-poisoned rat was injured obviously, but the damage in SGLD groups was the lightest. NO, TAOC in hippocampus of rat was explicitly lack in plumbum dyed model group. The high dose of SGLD could significantly increase the NO, TAOC in hippocampus. And It is better than those in the middle and low doses of SGLD, Zhiqi and EDTA-CaNa<sub>2</sub>. **Conclusion:** Shugan Lidan therapy can accelerate the elimination of lead, avoid loss of the endogenous essential elements calcium, zinc, meanwhile antagonize the damage of hippocampus, increase the level of NO, TAOC, and improve learning and memory ability.

**[Key words]** Shugan Lidan; lead; endogenous essential elements; hippocampus

铅是一种造成人体多系统、多器官损伤的重金属元素。由于儿童自身生长发育特点,在同一环境相同接触水平下,儿童对铅接触途径多,易感性强,吸收率比成人高 6 倍<sup>[1]</sup>,排泄率相对较低,因此铅对儿童的危害更为明显。由于铅是强烈的嗜神经毒物,小儿神经系统发育不完善,铅对儿童的危害以神经毒性最为突出、最先表现,常见的有学习、记忆、认知等能力下降。目前常用的驱铅药物为西药螯合剂,通过与铅结合成水溶性络合物从肾脏由尿排出,但排铅的同时非特异性地排泄内源性的必需微量元素及维生素,干扰机体正常生理和生化功能。中医治疗本病多从虚、瘀、毒、湿立论,采用滋补肝肾、化瘀解毒、健脾渗湿法治疗,取得了一定的疗效。

我们根据铅在体内的代谢特点、小儿“肝常有余”的生理特点及肝的疏泄功能在铅中毒疾病过程中的关键作用,并结合临床体会,提出“疏肝利胆”为主的新治法,研制了疏肝利胆颗粒。本实验在探讨其驱铅效应的同时,进一步研究其对必需微量元素及铅所致海马损伤的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级健康雄性 SD 大鼠 56 只,体重(45 ± 5) g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物许可证号 SCXK-(军)2002-001。

**1.2 药品** 醋酸铅(分析纯,天津市瑞金特化学品有限公司提供)用去离子水配成含铅质量浓度为 4 g·L<sup>-1</sup>的溶液。

疏肝利胆颗粒:由柴胡、黄芩、郁金、生大黄、枳壳等组成,江阴天江药业有限公司提供。按照高、中、低给药剂量用去离子水配成,生药含量分别为 2.025, 1.35, 0.675 g·mL<sup>-1</sup>的溶液。

智杞颗粒:湖北广仁药业有限责任公司提供,生产批号 B20030001,用去离子水配成质量浓度为 0.1 g·mL<sup>-1</sup>的溶液。

依地酸钙钠:天津鑫耀氨基酸有限公司提供,生

产批号 H12020890,用 0.9% 生理盐水配成质量浓度为 0.02 g·mL<sup>-1</sup>的溶液。

**1.3 器材及检测设备** 聚四氟乙烯消化罐(成都科林分析技术有限公司);IRIS Advantage 等离子发射光谱仪(美国热电公司);紫外分光光度计(日本岛津公司);JY92—型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);高速低温台式离心机(美国贝克曼库尔特公司);光学显微镜(OLYMPUS);透射电镜(JEM1230);超薄切片仪(LEICA UCT);包埋机(Epon812)。

**1.4 试剂及耗材** 1 000 μg·mL<sup>-1</sup> 铅标准溶液(GBW08619)、1 000 μg·mL<sup>-1</sup> 钙标准溶液[GBW(E)080118]、1 000 mg·L<sup>-1</sup> 锌标准溶液(GBW08620)均购自国家标准物质研究中心;一氧化氮(NO)、总抗氧化能力(TAOC)试剂盒购于南京建成生物工程研究所,批号 20040203。

## 2 方法

**2.1 模型制作** 将 56 只大鼠在天津中医药大学第一附属医院的洁净动物实验室饲养,自由饮食,控制室温在 25 左右,湿度 55% 左右。适应性喂养 7 d 后随机选出 8 只作为空白对照组,用去离子水按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 体重剂量 ig,每天 1 次,持续 5 周。其余大鼠用配制好的醋酸铅溶液按 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig 染铅,每天 1 次,持续 5 周。

染铅结束后用毛细玻璃管取大鼠目内眦静脉血。将血放入经去离子水处理过的盛有肝素钠的炮弹管中,微波消化,测定血铅浓度。若血铅浓度 > 100 μg·L<sup>-1</sup>,证明铅中毒造模成功。

**2.2 动物分组** 将铅中毒大鼠随机分为 6 组,每组 8 只。组:疏肝利胆颗粒高剂量组。组:疏肝利胆颗粒中剂量组。组:疏肝利胆颗粒低剂量组。组:智杞颗粒组。组:依地酸钙钠组。组:模型对照组。组:另设空白对照组(8 只),不染铅为正常动物。

**2.3 给药方法** 造模结束后, 进行药物治疗。  
组: 疏肝利胆颗粒水溶液按照 20.25, 13.5, 6.75 g·kg<sup>-1</sup> 剂量 ig, 每日 1 次, 持续 5 周。组: 智杞颗粒水溶液按照 0.75 g·kg<sup>-1</sup> 剂量 ig, 每日 1 次, 持续 5 周。组: 依地酸钙钠按照 0.05 g·kg<sup>-1</sup> 剂量 ip, 每周连续 4 d, 停 3 d, 持续 5 周。组: 去离子水按照 10 mL·kg<sup>-1</sup> 剂量 ig, 每日 1 次, 持续 5 周。组: 空白对照组, 干预方法同 组。

**2.4 血中铅及钙、锌的测定**

**2.4.1 全血的采集** 分别于造模后及治疗后, 用 10% 水合氯醛 ip, 待大鼠麻醉后, 用毛细玻璃管取大鼠目内眦静脉血, 将血放入经去离子水处理过的盛有肝素钠的 Eppendorf 管中, 置于 4℃ 冰箱中保存。

**2.4.2 样本检测的前处理** 本实验中血样的前处理均采用微波消解法<sup>[2]</sup>。精确量取全血 1 mL 放入聚四氟乙烯消化罐中, 再加入 2 mL 浓硝酸, 旋紧消化罐盖, 在微波高火下消解 10 min。取出消化罐, 冷却至室温, 用去离子水定容于 5 mL 量瓶中。注意各转移过程要用去离子水多次冲洗容器, 尽量避免铅在转移过程中的丢失。同时做试剂空白。

**2.4.3 指标的测定方法** 血铅及钙、锌的浓度测定均采用等离子原子发射光谱法(ICP)<sup>[2]</sup>。

**2.5 海马结构病理观察** 治疗结束取血后, 以 10% 水合氯醛 300 mg·kg<sup>-1</sup> ip, 麻醉动物后, 仰卧固定; 剪开腹部皮肤、肌肉, 暴露肝脏、膈肌; 剪开膈肌、肋骨、心包, 暴露心脏。用改良的 12 号注射针头刺入左心室到升主动脉, 切开右心耳; 将 250 mL 生理盐水快速滴注, 直至肝脏变为土黄色, 右心耳流出无色透明液体; 滴注 3% 冷戊二醛磷酸缓冲液约 400 mL 进行内固定, 直至肝脏、四肢、尾巴变硬; 剖取海马后置于 4℃ 3% 戊二醛磷酸缓冲液固定 24 h, 切片后入 1% 锇酸后固定, 丙酮脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 铀铅染色, 透射电镜下观察。

**2.6 海马中 NO 含量和 TAOC 的测定** 大鼠断头

后, 快速置于冰盘上分离出海马, 将其称重, 按照重量体积比 1:9 加入 0.9% 生理盐水, 用超声粉碎仪进行粉碎, 5 s/次, 间隔 10 s, 连续 3 次, 制备成 10% 的海马匀浆。将上述匀浆液用低温离心机 3 000 r/min, 离心 20 min, 取上清液待测。根据试剂盒要求分别进行测定。

**2.7 统计学分析** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 进行统计处理。根据实验数据的性质, 组间比较用单因素方差分析或秩和检验; 治疗前后比较用配对 *t* 检验或秩和检验。

**3 结果**

**3.1 治疗前后血铅浓度** 结果见表 1。统计结果显示: 造模后, 各染铅组大鼠血铅质量浓度均大于 100 μg·L<sup>-1</sup>, 证实造模成功。治疗后, 各治疗组大鼠血铅浓度均比治疗前显著降低, 疏肝利胆颗粒各剂量与智杞组、依地酸钙钠作用相当。

表 1 治疗前后各组大鼠血铅质量浓度比较( $\bar{x} \pm s$ ) μg·L<sup>-1</sup>

组别	剂量 / g·kg <sup>-1</sup>	n	造模后	治疗后
疏肝利胆	20.25	7	259.5 ±127.1	42.2 ±45.0 <sup>1)</sup>
	13.5	8	213.2 ±77.3	53.2 ±57.9 <sup>1)</sup>
	6.75	7	244.8 ±94.6	88.4 ±79.7
智杞颗粒	0.75	8	300.8 ±83.3	72.4 ±48.2 <sup>1,3)</sup>
依地酸钙钠	0.05	7	270.2 ±193.9	16.3 ±18.6 <sup>1)</sup>
模型对照	-	8	290.3 ±91.7	167.7 ±57.3
空白对照	-	7	36.3 ±34.5 <sup>2)</sup>	15.1 ±26.0 <sup>2)</sup>

注: 与模型对照组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01, 与依地酸钙钠组比较<sup>3)</sup> *P* < 0.05。

**3.2 治疗前后血钙浓度** 结果见表 2。包括空白对照组、模型对照组在内各组治疗后均较治前血钙明显降低, 可能与其饮食、环境等因素有关, 故以 Ca 值来做分析。模型对照组治疗后血钙较治前明显降低, 可能与染铅后, 铅与钙竞争肠道吸收过程中所需的转运蛋白, 降低了钙在肠道的吸收有关。

表 2 治疗前后各组大鼠血钙质量浓度比较( $\bar{x} \pm s$ )

mg·L<sup>-1</sup>

组别	剂量 / g·kg <sup>-1</sup>	n	造模后 Ca	治疗后 Ca	Ca
疏肝利胆	20.25	7	103.2 ±4.8	46.0 ±3.9	57.1 ±6.0
	13.5	8	103.2 ±4.2	45.6 ±3.0	57.6 ±5.6
	6.75	7	120.7 ±9.2	48.8 ±3.6	71.9 ±9.3 <sup>1)</sup>
智杞颗粒	0.75	8	113.5 ±16.3	48.7 ±3.7	64.8 ±19.0
依地酸钙钠	0.05	7	115.4 ±10.1	49.8 ±10.2	65.6 ±12.3 <sup>1)</sup>
模型对照	-	8	116.0 ±9.4	53.3 ±3.4	62.8 ±8.1 <sup>1)</sup>
空白对照	-	7	110.0 ±8.8	60.2 ±11.9	49.8 ±13.2

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05。

统计结果显示: 各组治疗前后血钙浓度的变化比较, 疏肝利胆颗粒中高剂量、智杞颗粒与空白组变化无显著差异; 依地酸钙钠与模型组显著增高 ( $P < 0.05$ )。说明疏肝利胆颗粒驱铅同时不会造成血钙的大量丢失。

表 3 治疗前后各组大鼠血锌质量浓度比较 (  $\bar{x} \pm s$  )

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	造模后 Zn	治疗后 Zn	Zn
疏肝利胆	20.25	7	4.1 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.5 <sup>1,2)</sup>
	13.5	8	4.1 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.6 <sup>1,2)</sup>
	6.75	7	4.5 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.7
智杞颗粒	0.75	8	5.9 $\pm$ 1.1	3.4 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 1.3
依地酸钙钠	0.05	7	7.7 $\pm$ 5.4	3.5 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 1.1
模型对照	-	8	5.6 $\pm$ 1.7	4.2 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 1.6
空白对照	-	7	6.8 $\pm$ 3.5	3.9 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 3.4

注: 与智杞组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与依地酸钙钠组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.4 各组大鼠海马结构变化** 电镜下, 正常对照组细胞核较大, 核膜明显, 胞质中有大量密集的粗面内质网与其间一些多聚核糖体和单个核糖体形成尼氏体, 线粒体数量较多, 嵴排列整齐, 高尔基复合体较发达且结构正常。模型对照组组织明显损伤, 神经元高度肿胀, 线粒体嵴大部分溶解、断裂及较大空泡形成, 粗面内质网及高尔基复合体中度扩张, 胞浆内细胞器明显减少。依地酸钙钠组神经元中线粒体中度肿胀, 部分线粒体结构正常, 粗面内质网及高尔基复合体轻度扩张。智杞组神经元中线粒体结构基本正常, 个别线粒体轻度肿胀, 粗面内质网及高尔基复合体轻度扩张。疏肝利胆组神经元中个别线粒体中度肿胀, 空泡变性, 嵴断裂, 粗面内质网及高尔基复合体轻度扩张。

**3.5 各组大鼠海马中 NO 及 TAOC 含量** 结果见表 4。统计结果表明: 模型大鼠海马 NO 含量及

表 4 各组大鼠海马中 NO 及 TAOC 含量比较 (  $\bar{x} \pm s$  )

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	NO / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TAOC / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
疏肝利胆	20.25	7	14.3 $\pm$ 4.6 <sup>1,2,3,4)</sup>	15.9 $\pm$ 1.3 <sup>2,3,4)</sup>
	13.5	8	14.2 $\pm$ 7.9 <sup>1,2,3)</sup>	15.9 $\pm$ 2.9 <sup>2)</sup>
	6.75	7	9.0 $\pm$ 1.6 <sup>1,2)</sup>	11.0 $\pm$ 1.0 <sup>1,3,4)</sup>
智杞颗粒	0.75	8	5.9 $\pm$ 5.1 <sup>2)</sup>	14.0 $\pm$ 1.1 <sup>1,2)</sup>
依地酸钙钠	0.05	7	7.1 $\pm$ 2.9 <sup>2)</sup>	13.5 $\pm$ 1.8 <sup>1)</sup>
模型对照	-	8	1.0 $\pm$ 1.4 <sup>1)</sup>	11.6 $\pm$ 1.7 <sup>1)</sup>
空白对照	-	7	4.2 $\pm$ 2.8	18.1 $\pm$ 4.1

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型对照组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与智杞组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ; 与依地酸钙钠组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.3 治疗前后血锌浓度** 结果见表 3。统计结果显示: 疏肝利胆颗粒中、高剂量组大鼠治疗前后血锌浓度的变化明显低于智杞颗粒组、依地酸钙钠组 ( $P < 0.05$ ), 说明疏肝利胆颗粒在驱铅同时不会造成血锌的大量流失。

TAOC 明显低于正常鼠 ( $P < 0.05$ )。疏肝利胆颗粒高剂量组海马 NO 含量及 TAOC 明显升高, 优于智杞颗粒及依地酸钙钠组 ( $P < 0.05$ )。说明疏肝利胆颗粒拮抗海马损害的作用优于智杞颗粒及依地酸钙钠。

#### 4 讨论

中医治疗儿童铅中毒多从解毒、化痰、利湿论治, 我们认为其病机关键在肝胆郁滞、气机被遏。因肝主疏泄、调畅气机, 铅邪郁滞于内, 致肝失疏泄, 气机紊乱, 变生痰、瘀、湿邪, 使郁滞加重, 产生各种病理表现。从西医学角度, 铅的排泄途径近 2/3 由肾脏经尿道排出, 近 1/3 通过胆汁分泌由肠道排出<sup>[3]</sup>; 肝细胞可主动从血浆中摄取铅排入胆汁, 胆汁中的铅浓度是血中的 40 - 100 倍。因此肝失疏泄, 排胆不利, 直接影响肠道排铅的效果; 并可致肾的气化及膀胱主水道功能失常, 影响尿道排铅的效果。据此确立了疏肝利胆大法, 研制出疏肝利胆颗粒, 方中柴胡、郁金疏肝理气解郁; 茵陈、金钱草清热利湿, 土茯苓利湿解毒, 郁金、当归活血化瘀, 尤配以生大黄清热泻下、解毒化痰, 使邪毒由肠腑而下。诸药合用, 共奏疏肝利胆, 达郁解毒之功。本次研究结果证实, 疏肝利胆颗粒能明显降低病模大鼠血铅含量, 其作用与依地酸钙钠、智杞颗粒相当。且在排铅同时不会造成钙、锌的大量流失, 避免了西药排铅时的副作用, 具有突出的优势。

铅对儿童的神经毒性损害最突出, 以往研究表明, 铅可通过降低内源性一氧化氮 (NO) 含量及总抗

氧化能力(TAOC),影响海马长时程增强效应(LTP)的形成和维持,损害学习记忆能力<sup>[4-5]</sup>。本次研究结果发现,染铅模型大鼠海马结构明显损伤,NO及TAOC含量显著降低,与文献报道相符。而疏肝利胆颗粒能明显拮抗海马病理损害,提高NO及TAOC含量,效果优于智杞颗粒、依地酸钙钠。表明疏肝利胆颗粒在驱铅的同时,具有拮抗铅所致海马损害、改善学习记忆能力的突出优势。

#### [参考文献]

[1] 章丽娟. 中国儿童铅中毒现状及其原因[J]. 中国学校卫生, 2004, 25(6): 771.

- [2] 冯福建,王兰,虞江萍. 铅染毒对大鼠体内钙、锌、铁元素的影响研究[J]. 广东微量元素科学, 2001, 8(4): 23.
- [3] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 2448.
- [4] 李淑华,袁宏伟,谷红梅,等. 发育期慢性染铅大鼠组织中NO, SOD, MDA的变化及其相互关系的研究[J]. 中国全科医学杂志, 2003, 11(6): 898.
- [5] 李茂进,胡俊峰,张春玲,等. 天麻和阿胶联合应用对染铅大鼠海马总抗氧化能力和学习记忆的影响[J]. 预防医学文献信息, 2001, 7(5): 485.

[责任编辑 聂淑琴]

## 更正

2010年8月第9期166页,醒胰降糖灵对试验性糖尿病大鼠NO与ET-1的影响(作者贾育新,杨中高)一文中,表2中六味地黄汤组空腹血糖值 $6.99 \pm 1.95$ ,改为 $8.41 \pm 1.55$ ;醒胰降糖灵组的血糖值 $6.91 \pm 1.522$ 改为 $6.91 \pm 1.52$ ;表注中删去“<sup>(6)</sup>  $P < 0.01$ ”。正文中参考文献[9]应为[8], [10]应为[9], [11]应为[10], [12]应为[11], [13]应为[12]。