

# 阿胶对染铅大鼠海马损害的拮抗作用

李茂进<sup>1</sup>, 冷为忠<sup>2</sup>

(1. 山东省劳动卫生职业病防治研究所, 山东 济南 250062; 2. 日照市东港区人民医院后村分院, 山东 日照 267800)

**摘要:** 目的 观察和探讨阿胶对铅所致大鼠学习记忆损害的拮抗作用。方法 选用 36 只 Wistar 雄性大鼠随机分为对照组、铅组、阿胶铅组, 每组 12 只。大鼠经口染铅并给予阿胶灌胃。每月用 Y 型迷宫试验测试学习记忆 1 次。3 个月后处死大鼠, 分别测定海马组织一氧化氮 (NO) 和总抗氧化能力 (TAOC) 并做病理检查。结果 (1) 在 Y 型迷宫试验中, 铅组大鼠学习记忆达标前所受电击次数 (错误次数) 显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 阿胶铅组大鼠所受电击次数显著低于铅组 ( $P < 0.05$ ; 2、3 月  $P < 0.01$ )。 (2) 铅组大鼠海马 NO 和 TAOC 显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 阿胶铅组大鼠海马 NO 和 TAOC 显著高于铅组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。 (3) 病理检查, 铅组大鼠海马显著萎缩, 细胞形态不规则、排列紊乱, 细胞变性、脱失显著, 轴突溶解、消失; 阿胶铅组海马病理变化不明显。结论 铅可损害海马细胞结构和功能, 降低海马组织 NO 和 TAOC 水平, 降低学习记忆能力; 阿胶对铅所致海马损害和学习记忆障碍具有拮抗作用。

**关键词:** 铅; 阿胶; 一氧化氮; 总抗氧化能力; 学习记忆

中图分类号: R135.1; R12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)05-0262-03

## The antagonism of Donkey-hide gelatin against the damage of hippocampus induced by lead in rats

LI Mao-jin<sup>1</sup>, LENG Wei-zhong<sup>2</sup>

(1. Shandong Institute of Occupational Health, Jinan 250062, China; 2. Houcun Branch of People's Hospital in District of Donggang, Rizhao 276800, China)

**Abstract:** **Objective** To observe and explore the antagonism of Donkey-hide gelatin (DHG) against the impairment of learning and memory induced by lead in rats. **Methods** 36 male Wistar rats were chosen and divided into 3 groups at random, 12 rats in every group: (1) control group: water, (2) lead group: lead [0.1g/(kg·d)], (3) lead-DHG group: lead [0.1g/(kg·d)] + DHG [1.0g/(kg·d)]. Wistar rats were given DHG orally after being given lead every day for three months. The ability of learning and memory of each group was measured by Y-maze test. Eventually, the rats were decapitated and nitric oxide (NO) as well as total antioxidative capacity (TAOC) in hippocampus were measured immediately, in the same time, pathological examination was also made. **Results** (1) In Y-maze test, the number of electric shocks of lead group was significantly increased in comparison with the control ( $P < 0.01$ ); the number of electric shocks of lead-DHG group significantly decreased in comparison with lead group (in the first month  $P < 0.05$ , the second and third month  $P < 0.01$ ). (2) The NO and TAOC in hippocampus of lead group were significantly decreased in comparison with the control ( $P < 0.01$ ), the NO and TAOC in hippocampus of lead-DHG group were significantly increased in comparison with the lead group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). (3) Pathological examination showed an appearance of atrophy, denaturation and necrosis of cells with their neurofibers dissolving and obliteration in hippocampus of lead group rats but no obviously impaired was shown in rats of lead-DHG group. **Conclusion** The results showed that lead significantly damaged the function and structure of hippocampal cells, decreased NO and TAOC in hippocampus and impaired the ability of learning and memory; DHG significantly decreased the impairment or damage induced by lead.

**Key words:** Lead; Donkey-hide gelatin (DHG); Nitric oxide (NO); Total antioxidative capacity (TAOC); Learning and memory

铅的慢性毒性以损害神经功能为主, 接触铅早期阶段即可影响学习记忆功能<sup>[1]</sup>, 使患者认知和辨别能力降低, 并伴有情绪不稳定、反应迟钝、神经衰弱、精神异常甚至痴呆等。阿胶具有促进骨髓造血、改

善微循环、提高机体免疫力、调节植物神经功能等作用, 近年研究发现还具有抗脂质过氧化和延缓衰老等作用<sup>[2,3]</sup>。海马是学习记忆的关键部位, 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 在学习记忆过程中是重要的逆行信使, 对于海马长时程增强效应 (long-term potentiation, LTP) 的诱导和维持是必不可少的信息物质<sup>[4]</sup>。本文通过 Y 型迷宫试验、大鼠海马一氧化氮和总抗氧化

收稿日期: 2002-02-27; 修回日期: 2002-09-02

基金项目: 山东省科委博士基金 (413774)

作者简介: 李茂进 (1969-), 男, 硕士, 研究方向: 工业毒理。

能力 (total antioxidative capacity, TAOC) 测定以及病理检查, 探讨阿胶对铅所致学习记忆损害的拮抗作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Wistar 雄性大鼠, 体重 (110±18) g, 由山东大学实验动物中心提供; 阿胶由山东东阿阿胶有限公司提供; 醋酸铅由上海化学试剂四厂生产; NO、TAOC 和蛋白质试剂盒均由南京建成生物工程技术有限公司提供。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 选用 36 只 1 月龄健康大鼠, 随机分为 3 组, 每组 12 只, 分别为: (1) 对照组: 给予蒸馏水; (2) 铅组: 醋酸铅; (3) 阿胶铅组: 给予醋酸铅后 6 h 给阿胶灌胃。醋酸铅浓度为 0.025 g/ml (W/V), 按 0.1 g/(kg·d) 灌胃。阿胶加蒸馏水加热溶解配成质量浓度为 0.5 g/ml 的溶液, 按 1.0 g/(kg·d) 灌胃。3 个月后处死大鼠, 测定海马组织 NO 和 TAOC。

1.2.2 血铅测定 每月用石墨炉原子吸收光谱法测定 1 次。

1.2.3 测试学习记忆 每月用 Y 型迷宫测试 1 次, 于晚上安静环境中进行。大鼠先在箱内适应环境 3 min, 然后放入起步区, 灯亮 5 s 后电击, 致其逃避到安全区后灯再亮 15 s, 熄灯休息 45 s, 再进行下一次试验。大鼠由起步区直接跑到安全区为正确, 其余均为错误反应。记录学习记忆能力达标前 (连续 10 次中有 9 次正确) 所受电击次数 (错误次数), 并以此作为各组大鼠的学习记忆能力。

1.2.4 病理切片 病理切片由山东大学病理室承做, 大鼠断头处死, 迅速剥离取出海马固定, HE 染色, 倒置显微镜观察。

1.2.5 NO 和 TAOC 测定 大鼠断头处死, 迅速剥离取出海马, 在冰块上制成 10% 的组织匀浆; 按试剂盒的要求, 取上清液分别测定 NO、TAOC 和蛋白质。测定结果用 SPSS 软件统计分析。

## 2 结果

### 2.1 大鼠体重变化

铅组大鼠体重显著低于对照组 ( $P<0.01$ ); 阿胶铅组大鼠体重显著高于铅组 ( $P<0.01$ )。随染毒时间的延长, 铅组大鼠体重增加缓慢, 阿胶铅组大鼠与铅组比较增长较快 ( $P<0.01$ )。

### 2.2 血铅测定

见表 1。阿胶铅组大鼠血铅浓度与铅组比较差异不显著 ( $P>0.05$ ), 二者与对照组比较差异皆非常显著 ( $P<0.01$ )。随染毒时间的延长, 铅组与阿胶铅组大鼠血铅浓度都有显著增加 ( $P<0.01$ )。

表 1 大鼠血铅浓度测定结果 ( $\bar{x}\pm s$ )  $\mu\text{mol/L}$

分组	<i>n</i>	1 个月	2 个月	3 个月
对照组	10	0.14±0.04	0.14±0.03	0.14±0.04
铅组	10	0.66±0.08**	1.29±0.16**	2.18±0.29**
阿胶铅组	10	0.60±0.09**	1.18±0.18**	2.09±0.14**

与对照组比较 \*\*  $P<0.01$ 。

### 2.3 测试学习记忆

由表 2 可见, 在 Y 型迷宫试验中, 铅组、阿胶铅组大鼠学习达标前所受电击次数显著高于对照组 ( $P<0.01$ ), 阿胶铅组大鼠所受电击次数显著低于铅组 (1 个月  $P<0.05$ ; 2、3 个月  $P<0.01$ )。

表 2 阿胶对染铅大鼠所受电击次数的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	<i>n</i>	1 个月	2 个月	3 个月
对照组	10	8.2±1.03	7.5±0.85	7.0±1.05
铅组	10	12.6±0.79**	16.0±1.49**	18.9±1.66**
阿胶铅组	10	11.5±1.08**△	13.9±1.20**△△	15.6±0.97**△△

与对照组比较 \*\*  $P<0.01$ ; 与铅组比较 △ $P<0.05$

△△ $P<0.01$ ; 下表同。

### 2.4 大鼠海马 NO 和 TAOC 测定

铅组大鼠海马 NO、TAOC 显著低于对照组 ( $P<0.01$ ), 阿胶铅组大鼠海马 NO、TAOC 显著高于铅组 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表 3。

表 3 阿胶对染铅大鼠海马 NO 和 TAOC 的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	<i>n</i>	NO ( $\mu\text{mol/g}$ )	TAOC (U/mg)
对照组	10	0.839±0.0145	1.120±0.0078
铅组	10	0.733±0.0148**	0.945±0.0170**
阿胶铅组	10	0.761±0.0280**△	0.972±0.0170**△△

### 2.5 病理检查

铅组大鼠海马明显萎缩, 组织疏松呈海棉状, 细胞变性固缩呈菱形、棒形、长椭圆形或不规则块状, 排列紊乱, 坏死脱失显著; 轴突溶解、消失。阿胶铅组大鼠海马萎缩不明显, 细胞形态基本正常, 脱失不明显; 轴突存在。对照组大鼠海马组织结构和细胞形态正常, 轴突无溶解、消失。

### 3 讨论

海马是学习记忆的关键部位,尤其在空间学习、辨别学习以及记忆形成的早期阶段起重要作用,其长时程增强效应(LTP)是学习记忆的始动环节。大量研究证明,铅可选择性进入海马组织,破坏其结构和功能。当血铅大于  $2.72 \mu\text{mol/L}$  时,运动协调功能和记忆力明显减退,且呈现剂量依赖性<sup>[5]</sup>;在海马背部注射醋酸铅可直接引起学习和认知功能障碍<sup>[9]</sup>。铅可抑制海马一氧化氮合酶(nitric oxide synthetase, NOS),使 NO 合成显著减少<sup>[7]</sup>,如铅浓度达  $17 \text{ nmol/L}$  时, NOS 活性降低 50%;铅浓度达  $80 \text{ nmol/L}$  时, NOS 完全被抑制<sup>[8]</sup>。NO 在学习记忆过程中是重要的逆行信使,NO 减少可直接影响 LTP 的形成和维持,从而降低突触可塑性,损害学习记忆。血铅浓度为  $5 \mu\text{mol/L}$  时, LTP 降低 75%;血铅浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  时, LTP 可完全被抑制,这是铅引起儿童认知功能和神经行为缺陷的重要原因<sup>[9]</sup>。用 Morris 水迷宫实验发现,大鼠在训练前给 NOS 抑制剂 L-硝基-精氨酸甲酯(L-NAME),可明显延长大鼠到达平台时间,如同时给 L-精氨酸则可对抗上述作用;训练后给 NOS 抑制剂,不影响获得行为,表明 NO 主要影响学习的获得和早期记忆阶段<sup>[10]</sup>。铅作业工人血中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性显著降低,染铅大鼠血清丙二醛含量显著增高,而血中还原型谷胱甘肽和 SOD 含量显著降低<sup>[11]</sup>,提示铅可引起脂质过氧化增强、自由基增加。脂质过氧化增强和自由基增加可直接损伤各种酶类、载体、受体、通道等功能蛋白质,还可损伤遗传物质 DNA 和 RNA 以及各种生物膜等,导致细胞结构破坏、功能异常、机体衰老并发生各种疾病甚至发生肿瘤,同时影响学习记忆功能。

试验结果表明铅可降低大鼠海马 TAOC 和学习记忆能力并使体重明显下降,这与以前报道一致;同时发现铅还可降低大鼠海马 NO 含量。染铅大鼠给予阿胶后海马 NO 和 TAOC 下降明显延缓,学习记忆能力也得到了明显改善。病理切片显示铅组大鼠海马萎缩、组织疏松,细胞坏死脱失明显,轴突溶解、消失;阿胶铅组大鼠海马病理损害明显减轻。这提示铅可破坏海马结构,并通过多种途径损害学习记忆功能,而阿胶能明显降低铅对大鼠海马的毒害作用,改善染铅大鼠的学习记忆能力。但也可看到阿胶铅组与对照组比较仍有明显差异,提示阿胶未能完全消除铅

对大鼠海马病理及学习记忆的损害作用。血铅测定结果显示阿胶对于降低血铅浓度作用不大,提示阿胶可能不是通过排铅作用而是通过其他机制改善了染铅大鼠的学习记忆能力。阿胶含有多种微量元素和氨基酸,对细胞功能具有支持和保护作用,近年关于阿胶作用机理的研究又提出了“聚负离子基”结构学说<sup>[12]</sup>,从而为阿胶改善学习记忆能力、刺激骨髓造血、提高机体免疫力以及改善微循环等作用提供了理论基础。这说明阿胶对机体不仅具有营养作用,还具有其他功能和效应,有待进一步研究和探讨。推测阿胶对铅所致海马 TAOC 和 NO 降低及海马病理损害的拮抗作用可能是其改善铅染毒大鼠学习记忆能力的神经机制之一。

### 参考文献:

- [1] Jett DA, Kuhlmann AC, Famer SJ, et al. Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, 57 (1-2): 271-279.
- [2] 王京娥, 杨福安. 阿胶作用机理的研究 [J]. *中医学报*, 1991, 1: 43-46.
- [3] 王永实, 范治全. 阿胶复脉汤对大鼠内毒素血症血小板血液凝固性与脂质过氧化变化的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 1993, 14 (1): 55-57.
- [4] Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation [J]. *Science*, 1991, 254: 1503-1506.
- [5] 杨红光, 梁友信, 唐海旺, 等. 铅接触对神经行为影响的研究 [J]. *中华预防医学杂志*, 1994, 28 (1): 9-12.
- [6] Guikate TR, Jett DA, Kuhlmann AC. Intrahippocampal administration of lead (Pb) impairs performance of rats in the Morris water maze [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, 57 (1-2): 263-269.
- [7] Blazka ME, Harry GJ, Luster MI. Effect of lead acetate on nitrite production by murine brain endothelial cell culture [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 126 (1): 191-194.
- [8] Quinn MR, Harris CL. Lead inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated nitric oxide synthase activity from rat cerebellum [J]. *Neurosci Lett*, 1995, 18, 196 (1-2): 65-68.
- [9] Hori N, Busselberg D, Matthews MR, et al. Lead blocks LTP by an action not at NMDA receptors [J]. *Exp Neurol*, 1993, 119 (2): 192-197.
- [10] Chapman PF, Atkins CM, Allen MT, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis two different forms of learning [J]. *Neuro Report*, 1992, 3 (7): 567-570.
- [11] 姜厚波, 刘秋芳, 蔡原, 等. 铅对大鼠血清丙二醛含量和红细胞抗氧化酶活性影响的研究 [J]. *中国公共卫生学报*, 1996, 15: 108-109.
- [12] 郭成浩, 金毅, 张辉, 等. 阿胶药理作用的结构学说 [J]. *中国中药杂志*, 1999, 24 (1): 54-56.