

中图分类号: R151 文献标识码: A 文章编号: 1002-3127(2012)01-0028-03

• 实验研究 •

人参皂苷 Rg1 对染铅幼鼠学习记忆的影响

王敏, 田丹, 谭伟, 吴俊, 李程, 王穆, 让蔚清

(南华大学环境医学与放射卫生研究所, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 目的 初步探讨人参皂苷 Rg1 对幼鼠染铅所致学习记忆障碍的影响。方法 选取 21 d 龄 SD 大鼠, 随机分为 5 组: 对照组、模型组、人参皂苷 Rg1 低、中和高剂量组。采用腹腔注射方式给幼鼠染毒和药物干预。通过 Morris 水迷宫试验, 观察人参皂苷 Rg1 对染铅幼鼠定位航行能力和空间搜索能力的影响。石墨炉原子吸收光谱法测定血铅含量。结果 模型组幼鼠与其他组相比寻找平台时间明显增加 ($P < 0.05$)。人参皂苷 Rg1 可降低染铅幼鼠血铅含量 ($P < 0.05$)。45 mg/kg 剂量人参皂苷 Rg1 可明显改善铅中毒大鼠的学习记忆。结论 幼鼠轻度铅中毒即能导致学习记忆功能障碍。人参皂苷 Rg1 对铅致神经毒性起保护作用, 能改善铅中毒幼鼠的空间学习记忆功能障碍。

【关键词】 铅; 幼鼠; 人参皂苷 Rg1; 学习记忆

铅是一种古老的神经毒物, 能损害人体的多个系统和组织器官, 而且对发育中的神经系统尤为敏感, 严重时能造成不可逆的损伤, 导致儿童各种行为缺陷和认知障碍^[1]。儿童因生活习惯和自身发育、代谢特点, 使其成为铅中毒的高发人群^[2]。临床上目前用于治疗铅中毒的依地酸钠钙、二巯基丁二酸等金属螯合剂, 这类药绝大多数不能螯合脑内铅, 对于以大脑损伤为主的儿童铅损伤达不到满意的疗效, 迄今为止也未筛选出针对儿童的特异性强、副作用小的铅中毒治疗药物^[3]。人参是传统的补益中药, 具有大补元气、安神益智等功效。人参皂苷是人参的主要活性成分, 在现代药理学研究中显示它对中枢神经系统具有一定的调节作用, 可影响大脑皮层的兴奋和抑制过程, 易化学习记忆的获得、巩固和再现等^[4]。它对神经系统有如此强大的保护作用能否应用于铅致神经系统功能的损害, 为此本实验采用 Morris 水迷宫实验检测幼鼠学习记忆能力, 并检测幼鼠血中铅含量, 以明确人参皂苷 Rg1 对铅暴露引起的幼鼠学习记忆障碍的影响, 为儿童铅中毒防治提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器 醋酸铅, 分析纯, 纯度 99.5%, 北

京红星化工厂生产; 人参皂苷 Rg1, 纯度 98%, 南京泽朗医药科技有限公司生产; 铅标准储备液由北京恒元启天化工技术研究院提供; 其余试剂均为市售国产分析纯。AA700 型原子吸收仪, 美国 Perkin Elmer 公司生产; HI-3 型恒温磁力搅拌器; 微量取液器等。参考相关文献自制 Morris 水迷宫装置, 该装置由不锈钢圆柱形水池和可移动位置的圆柱形透明有机玻璃站台组成^[5]。水池直径 180 cm, 高 60 cm, 站台直径 12 cm, 高 30 cm。水池上方通过高清摄像头与计算机相连, 利用软件对动物的活动轨迹进行全程跟踪, 记录游泳轨迹、找到平台所需的时间即潜伏期、穿越平台次数及在目标象限停留时间。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型制备: 健康 21 d 龄雄性 SD 大鼠 53 只, 清洁级, 合格证号为 SCXK2010-0004, 体重 (86.65 ± 18.10) g, 由南华大学动物部供给, 于清洁级环境中饲养; 随机分为 5 组, 即对照组 13 只, 模型组 10 只, 低、中、高剂量人参皂苷 Rg1 组各 10 只。醋酸铅溶于生理盐水中按 30 mg/kg 体重腹腔注射模型组, 人参皂苷 Rg1 低、中、高剂量组, 隔日 1 次, 共注射 7 次。各组染铅后第 2 天腹腔注射人参皂苷 Rg1。对照组腹腔注射相应量的生理盐水。

1.2.2 药物制备与给药方法: 用生理盐水配制低、中、高剂量人参皂苷 Rg1 溶液, 按照 5、15 和 45 mg/kg 体重每日 1 次腹腔注射, 连续 2 周。对照组腹腔注射相应量的生理盐水。

1.2.3 Morris 水迷宫实验: 水池水深 32 cm, 比平台高 2 cm, 水温 (23 ± 2) °C, 倒入适量墨汁。水池边缘等距设东、南、西、北 4 个标记点, 将水池等分为 4 个象限, 平台

基金项目: 湖南省卫生厅科研项目 (2010-203); 湖南省教育厅科研项目 (10C1173); 湖南省衡阳市社会基金资助项目 (2011KF4); 全国教育科学“十一五”规划 2010 年度教育部重点课题 (GLA102077)

作者简介: 王敏, 硕士在读, 研究方向: 食物药物毒理及安全评价。

通讯作者: 让蔚清, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 心血管药理与食物药物毒理研究。

置于第三象限,每只动物每天训练 4 次,每次采用不同的入水点,每次训练 2 min。训练时将动物面朝池壁轻轻放入水中,同时开始记录。动物找到并爬上平台后,让其停留 10~20 s,若动物入水后 2 min 内未能找到平台,则将其引导至平台上停留 10~20 s。一次训练结束后,将动物从平台上取下休息 1 min,再进行下一次训练。连续训练 6 d,第 7 天撤去平台,动物由第一象限入水,每只动物测试 1 min。结果以动物寻找平台的潜伏期、穿越平台次数及目标象限停留时间比例表示。

1.2.4 血铅测定:实验结束后第 2 天取动物右股动脉血,采用石墨炉原子吸收光谱法测定全血血铅含量^[6]。

1.3 统计学方法 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 stata 11.0 统计软件进行单因素方差分析,多组间样本均数的比较采用 Scheffe 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对染铅幼鼠血铅含量及体重的影响 与对照组相比,模型组血铅含量明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,人参皂苷 Rg1 低、中、高剂量组的血铅含量均明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,各组体重增量均有增高,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ,表 1。

表 1 各组血铅浓度及体重变化($\bar{x} \pm s$)

组别	血铅($\mu\text{g/L}$)	干预后体重差(g)
对照组	12.31 \pm 7.83 [#]	64.72 \pm 13.13
模型组	122.69 \pm 15.86 [*]	52.62 \pm 15.42
Rg1 低剂量组	62.58 \pm 13.22 ^{*#}	101.11 \pm 11.61
Rg1 中剂量组	48.94 \pm 13.48 ^{*#}	75.22 \pm 10.96
Rg1 高剂量组	47.71 \pm 12.72 ^{*#}	101.60 \pm 23.31

注:与对照组相比, ^{*} $P < 0.05$;与模型组相比, [#] $P < 0.05$ 。

2.2 对染铅幼鼠 Morris 水迷宫实验的影响

2.2.1 潜伏期:随着训练天数的增加,各实验组潜伏期均有缩短,结果如图 1 所示。训练前 3 d 各组间潜伏期差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。训练第 4 天,与对照组 (60.45 \pm 15.03) s 相比,模型组潜伏期 (109.39 \pm 12.57) s 明显增加 ($P < 0.05$);与模型组相比,人参皂苷 Rg1 中剂量组 (61.19 \pm 33.19) s、高剂量组 (46.77 \pm 12.17) s 潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)。训练第 6 天,对照组、模型组、人参皂苷 Rg1 低、中、高剂量组潜伏期分别为 (45.85 \pm 10.46) s、(102.55 \pm 12.61) s、(51.32 \pm 24.48) s、(36.96 \pm 17.74) s 和 (30.88 \pm

10.42) s;与对照组相比,模型组明显增加 ($P < 0.01$);与模型组相比,各组潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$)。

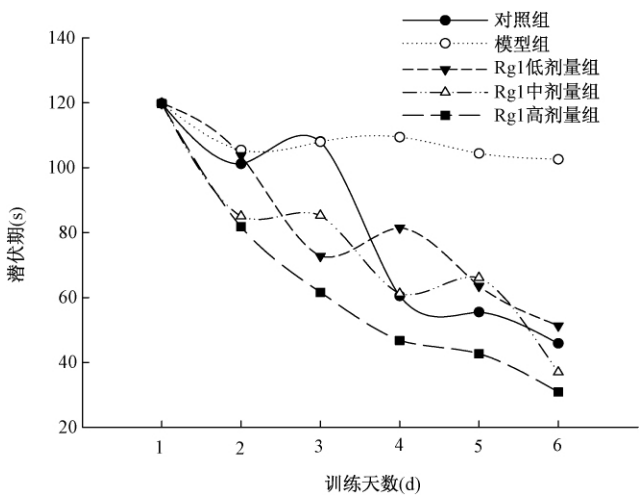


图 1 各组水迷宫定位航行能力潜伏期结果

2.2.2 穿越平台次数:实验第 7 天撤去平台,与对照组相比,模型组穿越平台次数明显减少 ($P < 0.01$)。与模型组相比,人参皂苷 Rg1 低、中、高剂量组,穿越平台次数明显增多 ($P < 0.01$) ,表 2。

表 2 各组水迷宫空间搜索能力($\bar{x} \pm s$)

组别	穿越平台次数	目标象限停留时长(%)
对照组	6.16 \pm 1.16 ^{##}	0.36 \pm 0.08 ^{##}
模型组	0.33 \pm 0.11 ^{**}	0.04 \pm 0.01 ^{**}
Rg1 低剂量组	5.00 \pm 2.53 ^{##}	0.33 \pm 0.13 ^{##}
Rg1 中剂量组	5.50 \pm 1.97 ^{##}	0.34 \pm 0.07 ^{##}
Rg1 高剂量组	8.00 \pm 1.67 ^{##}	0.41 \pm 0.08 ^{##}

注:与对照组相比, ^{**} $P < 0.01$;与模型组相比, ^{##} $P < 0.01$ 。

2.2.3 目标象限停留时长比:与对照组相比,模型组在第三象限停留时间占总游泳时间的比例均明显减少 ($P < 0.01$)。与模型组相比,人参皂苷 Rg1 低、中、高剂量组在第三象限停留时间比例明显增加 ($P < 0.01$) ,表 2。

血铅浓度及 Morris 水迷宫实验结果表明,染铅可影响幼鼠的空间学习记忆能力,人参皂苷 Rg1 不仅能影响血铅浓度,而且还能扭转铅所致的幼鼠空间学习记忆障碍。

3 讨论

本实验以腹腔注射醋酸铅染毒,构建幼鼠铅中毒模型,结果显示血铅水平明显增高,已达到轻度铅中毒水平,出现体重增加减缓等现象,表明铅中毒模型构建成功。运用目前测试动物智力状况较好的实验方法——Morris 水迷宫实验,可综合评价动物的神经行

为、运动协调性和耐力。在进行药物干预后,发现人参皂苷 Rg1 3 个剂量组较模型组血铅含量均有明显下降 ($P < 0.05$)。行为学实验结果显示,模型组到达平台的时间最长,对照组和人参皂苷 Rg1 低、中、高剂量组动物不同时段到达平台的时间均较模型组缩短,其中人参皂苷 Rg1 45 mg/kg 剂量组最先也最明显缩短动物到达平台的时间 ($P < 0.01$)。提示轻度铅中毒即能损害幼鼠的学习记忆功能,而人参皂苷 Rg1 能改善这一损伤,可推测其改善记忆的作用与人参皂苷 Rg1 降低血铅含量有关。值得注意的是,人参皂苷 Rg1 不仅能影响血铅含量,甚至可以逆转神经系统的损害。

铅进入人体后的代谢缓慢,长期蓄积可对人体健康造成危害。对于婴幼儿期的神经系统,铅暴露的远期损害似乎没有下限浓度。到目前为止尚无证据表明在血铅水平与儿童认知功能之间存在安全界限^[7]。它可通过调控神经递质、调质和激素的合成与释放,改变受体亲和力或受体密度,影响神经营养因子的生成和表达,改变酶的活性,影响海马神经突触可塑性,上调或下调某些相关基因及蛋白的表达等,最终影响学习记忆功能^[8-13]。

人参皂苷 Rg1 作为人参促智的主要成分之一,具有改善学习记忆的功效,而且能影响记忆的全过程^[14]。有研究报道 Rg1 有提高啮齿动物海马神经干细胞(NSCs)的增殖能力,NSCs 细胞与 Rg1 共培育能够显著提高巢蛋白、5-溴脱氧尿苷阳性细胞球及波形蛋白阳性细胞的数目^[15]。提示人参皂苷 Rg1 有增加海马神经发生的作用。除此之外,Rg1 还有上调大鼠皮层和海马中脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白表达的功能。而 BDNF 可逆转铅暴露后大鼠认知功能的下降^[16]。在本研究中,经 Rg1 干扰后染铅幼鼠的学习记忆功能有不同程度的改善,其对神经系统的保护作用是否通过增加神经营养因子表达或是促进神经发生来实现,还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 杨晓燕. 少数民族地区儿童铅中毒与环境因素的探讨[J]. 中外妇儿健康, 2011, 19(2): 63.
- [2] 黄爱芳. 1273 例儿童血铅水平及相关因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(21): 3351-3352.
- [3] 韦云秋, 林玲. 国内驱铅治疗及护理现状[J]. 中国现代医药杂志, 2007, 9(12): 139-140.

- [4] 刘娟, 袁莹, 何晶, 等. 人参皂苷 Rb1 和 Rg1 对海马神经元的影响[J]. 同济大学学报(医学版), 2011, 32(3): 1-10.
- [5] 张均田, 石成璋. “水迷宫”自动控制仪的研制及在神经药理研究中的应用[J]. 药物分析杂志, 1991, 11(1): 23-26.
- [6] 卫生部卫生监督司. WS/T20-1996 血中铅的石墨炉原子吸收光谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [7] Rothenberg SJ, Rothenberg JC. Testing the dose-responses pecification in epidemiology: Publichealth and policy consequences for lead[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(9): 1190-1195.
- [8] 祝高春, 伍风云, 叶薇薇, 等. 铅暴露对 N2a 细胞 SV2C 表达的影响[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(1): 41-43.
- [9] 徐健, 颜崇淮, 邹向宇, 等. 胚胎期和哺乳期铅暴露对仔鼠海马代谢型谷氨酸受体 5 表达的影响[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(1): 65-72.
- [10] 王洋, 天琪, 陈杰, 等. 发育期铅暴露对大鼠海马 GDNF 蛋白表达影响[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(12): 1528-1529.
- [11] Toscano CD, O' Callaghan JP, Guilarte TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity and expression are altered in the hippocampus of Pb²⁺-exposed rats[J]. Brain Res, 2005, 1044(1): 51-58.
- [12] 余加其. 神经节苷脂对铅引起的大鼠海马突触可塑性损伤的修复和保护作用[D]. 安徽: 中国科学技术大学, 2009.
- [13] 孟金萍, 杨旭, 王艳蓉, 等. 铅暴露 U251 细胞差异表达基因分析[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(4): 505-512.
- [14] ZHAO Hai-feng, LI Qiong, LI Yong. Long-term ginsenoside administration prevents memory loss in aged female C57BL/6J mice by modulating the redox status and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus. 北京市营养学会第四届会员代表大会暨膳食与健康研讨会论文集[C]. 北京, 2010: 36-53.
- [15] 张建平, 司银楚, 朱培纯. 人参皂苷 Rg1 诱导大鼠海马神经干细胞分化的实验研究[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(3): 335-338.
- [16] April N, Kirstie HS. Lead exposure during synaptogenesis alters vesicular proteins and impairs vesicular release: potential role of NMDA receptor-dependent BDNF signaling[J]. Toxicological Sciences, 2010, 116(1): 249-263.

(收稿日期: 2011-09-21)