

· 专题交流 ·

牛磺酸锌对慢性染汞大鼠学习记忆和皮层 NADPH-d 阳性神经元的影响

赵文涛¹, 李积胜², 朱建忠¹, 王衍¹, 刘建辉¹, 王国明¹, 刘冀¹, 许楹², 王忠¹, 陈树君¹

(1. 沧州医学高等专科学校解剖组胚教研室, 河北 沧州 061001; 2. 武警医学院军事预防医学研究所, 天津 300162)

摘要: 目的 探讨牛磺酸锌 (TZC) 拮抗汞对神经系统的损害作用。方法 选用健康 Wistar 大鼠 64 只随机分为 4 组, 对照组、染汞组、汞+低 TZC 组、汞+高 TZC 组, 采用 Y 迷宫和 NADPH-黄递酶 (NADPH-d) 组化, 观察了饮用 4.3 mg/(kg·d) 氯化汞 (HgCl₂) 水溶液和不同浓度 (0.23、0.46 g/L) TZC 的大鼠学习记忆能力和皮层一氧化氮合酶 (NOS) 活性的变化。结果 汞可导致大鼠学习记忆能力下降和皮层 NADPH 阳性神经元增加 ($P < 0.05$), 不同浓度的 TZC 均可缓解汞致大鼠学习记忆能力下降和皮层 NADPH 阳性神经元增加 ($P < 0.05$), 其中汞+高 TZC 组的保护作用最显著。结论 TZC 在一定程度上能拮抗汞对神经系统毒性作用。

关键词: 牛磺酸锌; 汞; 皮层; 一氧化氮合酶; 神经元; 学习记忆

中图分类号: O614.24 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)05-0284-03

Effect of taurine-zinc compounds on learning memory and cortex NADPH-d positive neurons in chronically mercury-exposed rats

ZHAO Wen-tao¹, LI Ji-sheng², ZHU Jian-zhong¹, WANG Yan¹, LIU Jian-hui¹, WANG Guo-ming¹, LIU Ji¹, XU Yun², WANG Zhong¹, CHEN Shu-jun¹

(1. Department of Anatomy and Histology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, China; 2. Military Preventive Medicine Institute, Chinese People's Armed Police Force Medical College, Tianjin 300162, China)

Abstract Objective To study the effect of taurine-zinc compounds (TZC) on resisting the impairment of cerebral cortex caused by mercury (Hg). **Method** Sixty four Wistar healthy rats were divided into 4 groups: control group, Hg group, Hg+low TZC (0.23 g/L) and Hg+high TZC (0.46 g/L). The learning memory ability was examined with Y maze test, the NOS activity in cerebral cortex was measured with NADPH-diaphorase (NADPH-d) histochemistry method. **Result** It was shown that mercury might induce learning memory ability reducing and cortex NADPH-d positive neurons increasing and the supplement of zinc could mitigate the damage of learning memory ability and reducing NOS activity induced by mercury, especially the higher dose of TZC. **Conclusion** TZC might resist some toxic effect of mercury on nervous system in rats.

Key words: Taurine-zinc (TZC); Mercury; Cerebral cortex; Nitric oxide synthase (NOS); Neuron; Learning memory

汞 (Mercury, Hg) 是一种可引发机体不可逆性损伤的高毒性重金属元素。大量研究结果显示, 汞可影响到脑组织的生长发育、生殖细胞的损伤、细胞的凋亡、生物膜的损伤以及神经递质的改变等。本实验利用行为学和组织化学实验方法研究 Hg 对大鼠学习记忆和皮层 NADPH-d 阳性神经元数量的影响, 以及牛磺酸锌对汞染毒的保护作用, 为揭示 Hg 对中枢神经系统的损害机制及其防治提供一定的实验依据, 为开发合理有效的防汞药物提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用刚断乳健康 Wistar 大鼠 64 只, 雄性, 由天津市实验动物中心提供。随机分为 4 组, 每组 16 只, 分别饲养在 16 个鼠箱中。称量每只大鼠体重, 根据每个染汞鼠箱中大鼠总体重按照以下要求给予不同剂量氯化汞饮水, 单蒸水和 TZC 溶液不限量自由

饮水, 即对照组[饮用单蒸水, 普通饲料]、染汞组[饮用 4.3 mg/(kg·d)氯化汞水溶液, 不足饮水由单蒸水补充, 普通饲料]、汞+低 TZC 组[饮用 4.3 mg/(kg·d)氯化汞水溶液后再饮用含 0.23 g/L TZC 水溶液, 普通饲料]、汞+高 TZC 组[饮用 4.3 mg/(kg·d)氯化汞水溶液后再饮用含 0.46 g/L TZC 水溶液, 普通饲料], 第 20 天同时进行行为学实验和 NADPH-d 组化实验。

含汞饮用水由氯化汞 (分析纯, 姜堰市环球试剂厂) 及生理盐水配制而成, 浓度 0.08 g/L; TZC 由南开大学有机化学所提供; 多聚甲醛 (上海溶剂厂); NADPH-11 (Sigma 公司); 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) (Sigma 公司); 普通饲料由天津市军粮城动物饲料加工厂加工制成。

1.2 方法

1.2.1 行为学测试 随机从每组各取大鼠 8 只, 进行行为学测试。根据大鼠既怕光刺激又怕电刺激的本性, 采用 MG3 型 Y 型迷宫 (购自张家港市生物医学仪器厂), 迷宫分为 3 臂, 臂与臂之间角度为 120°。在每只臂内, 有光刺激时无电刺激, 无光刺激时有电刺激, 迷宫实验时, 3 臂中 2 臂有电刺激而无光刺激, 1 臂有光刺激而无电刺激。将动物放入迷宫的 1 臂

收稿日期: 2005-10-17; 修回日期: 2005-11-30

基金项目: 天津市自然科学基金重点资助项目 (003804411)

作者简介: 赵文涛 (1980-), 男, 助教, 研究方向: 微量元素

(有光、无电)适应 60 s 后切换光源(无光源的两臂及三臂连接处有电),待动物进入有光无电处后开始记时,30 s 时切换光源。如此进行切换 20 次。每次切换光源都使动物学习 1 次,每天每只动物最多学习 20 次,第 20 次切换后待动物进入有光无电处后适应 30 s 将动物取出。每只动物连续 9 次从无光有电处直接进入有光无电处为学会,第 1 天学不会者第 2 天继续学习,直至学会。按学会前训练次数表示学习功能。

利用绘制散点图的方法将学会次数过大及过小值舍去后进行统计学分析。数据中存在的变异值用绘制散点图的方法将其舍去,保留剩余数据输入 SPSS11.0 统计软件,进行单因素方差分析($P=0.05$ 为检验水准)。

1.2.2 NADPH-d 组化实验 剩余大鼠 0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,剪开胸腔,暴露心脏,从心尖插入灌注针至左心室,并剪开右心耳形成灌注液排除通道,从左心室快速灌注生理盐水 100~150 mL,接着灌入 4℃ 的 4% 多聚甲醛 500 mL,于 30~40 min 灌毕,迅速取脑置 4℃ 的 4% 多聚甲醛固定液中后固定 6~9 h,移入 10%、20%、30% 蔗糖溶液各 3~4 h。将右侧皮层置恒冷箱冰冻切片机内切片(片厚约 50 μ m),pH 7.4 的 0.01 mol/L PBS 接片,切片进行 NADPH-d 组化反应。

染色切片移入 NADPH-d 反应液,37℃ 孵育 1 h。反应液成分为 NADPH II 5 mg, NBT 2.5 mg,体积分数为 0.3% 的 Triton-TBS 5 mL。终止反应后裱片、脱水、透明、封片。

1.3 结果观察及统计处理

每组选取 NADPH-d 组化染色对应断面的皮层脑片 15 张,分别计数大脑皮层所有染色阳性神经元。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学方法采用单因素方差分析(ANOVA)及两两比较 q 检验,SPSS11.0 统计软件处理数据。

2 结果

染毒期间,各实验组与对照组大鼠的摄食量、进水量无明显差异。汞染毒组染毒 15 d 后,实验大鼠开始出现活动和攻击性增加,尚未见其他明显表现。

与对照组相比各染汞组的动物在迷宫实验中的学会次数都明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与单纯氯化汞组相比补 TZC 组动物在迷宫实验中的学会次数都明显减少,其中, $\text{HgCl}_2 + 0.46 \text{ g/L TZC}$ 组的减少有统计学意义($P<0.05$)。

在大鼠皮层,与对照组相比单纯染汞组 NADPH-d 阳性细胞数显著增多($P<0.05$);与单纯染汞组相比各补 TZC 组均能使 NADPH-d 阳性细胞数有所降低,其中汞+高 TZC 组 NADPH-d 阳性细胞数显著减少($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠迷宫实验及皮层 NADPH-d 阳性细胞数测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	学会次数	脑片例数	阳性细胞计数
对照组	8	63.4 \pm 13.7	15	50.4 \pm 4.3 Δ
染汞组	8	96.1 \pm 7.6*	15	60.0 \pm 5.5*
汞+低 TZC 组	8	92.0 \pm 13.2*	15	55.9 \pm 5.1* Δ
汞+高 TZC 组	8	78.8 \pm 19.0* Δ	15	51.4 \pm 5.9* Δ

与对照组比较, * $P<0.05$; 与染汞组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨论

大量研究表明,汞暴露后可产生明显的行为改变,包括神经反射、发育、游泳能力、自发活动、旷场实验、迷宫学习、回避反应、程序控制行为、睡眠-觉醒节律等^[1]。由于中枢神经系统的复杂性和功能的多样性,行为功能易受其他因素的影响。采用行为测试方法可早期、灵敏地检测到环境有害因素对机体的损伤。迷宫实验就是一种较好的测量学习记忆的方法。与对照组相比染汞组的动物在迷宫实验中的学会次数都明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 4.3 mg/(kg·d) 氯化汞可以对大鼠的学习记忆能力产生明显的损害作用。

研究表明,NO 可能参与了学习记忆的过程。Yamada^[2] 等曾报道小鼠的空间工作记忆与 NO 通路有关,NO 一般是通过与可溶性鸟苷酸环化酶中的血红素组分起反应而发挥其生物学作用。但在 NO 过量等条件下,NO 又通过与其他化学分子发生不可逆的化学反应生成一些衍生物,此时 NO 与其衍生物常具有神经毒性作用。机体常通过内在的各种抗氧化机制来清除这些有毒物质。但这种保护作用总是有限的,当体内合成这些毒性产物的量超过了机体所能清除的限度,就会对机体的特定组织和器官如脑组织造成损伤^[3]。NOS 是体内催化 L-Arg 生成 NO 的惟一酶类。可以通过测量 NOS 的水平来反映机体 NO 表达的多少。中枢神经系统的 NADPH-d 组织化学反应强度是 NOS 活力的标志,NADPH-d 阳性细胞即为 NOS 阳性神经元,因而一般认为用 NADPH-d 组化方法所显示的神经元即反映了 NOS 阳性结构的存在^[4]。因此,本实验通过 NADPH-d 阳性细胞数来反映汞暴露大鼠皮层 NOS 的活力,与对照组相比单纯染汞组 NADPH-d 阳性细胞数显著增多($P<0.05$),提示汞对皮层有明显的损害作用,神经元的损伤可引起大脑皮质中 NOS 表达的增加^[5]。

牛磺酸是一种条件氨基酸,作为抗氧化剂和细胞调节因子参与保护神经元,阻止氧自由基过氧化过程,保护神经元细胞膜的完整性^[6]。锌的生物学功能非常广泛,锌是 CuZn-SOD 重要的活性离子,CuZn-SOD 是体内重要自由基 O_2^- 清除剂,汞在体内产生的超氧化物阴离子自由基 O_2^- 可被 CuZn-SOD 歧化为氧化氢和氧。清除自由基,减少对细胞膜损伤,拮抗汞的毒性效应^[7]。实验结果表明一定程度的 TZC 能减轻汞对大脑皮层的毒性作用。无机锌的生物学效应要取决于其转化成有生物活性的有机锌的能力。有机锌更接近于其在体内的作用形式,生物学效价要高于无机锌,且毒副作用小^[8]。在迷宫实验中,与单纯氯化汞组相比,补 TZC 组动物在迷宫实验中的学会次数都明显减少,其中, $\text{HgCl}_2 + \text{高 TZC}$ 组的减少有统计学意义($P<0.05$)。在大鼠皮层,与单纯染汞组相比各补 TZC 组均能使 NADPH-d 阳性细胞数有所降低,其中汞+高 TZC 组 NADPH-d 阳性细胞数显著减少($P<0.05$)。说明高浓度的 TZC 对汞染毒大鼠有明显的保护作用。

本实验通过 NADPH-d 组织化学染色对大鼠皮层 NOS 活性的测定,研究汞对皮层神经元的损害。实验表明,汞对大鼠皮层 NOS 活性表达会产生明显损害。而 TZC 可以对汞染毒大鼠皮层神经细胞产生明显的保护作用。从实验结果中可以看出,在一定范围内,随着 TZC 剂量的加大,其保护作用也加强。

参考文献:

- [1] Yoshida M, Watanabe L, Horie K, et al. Neurobehavioral changes in metallothionein-nullmice prenatally exposed to mercury vapor [J]. Toxicol Lett, 2005, 155 (3): 361-368.
- [2] Yamada K, Sasaki Y, Masuda K, et al. Role of nitric oxide in learning and memory processes [J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 1998, 111 (2): 87-96.
- [3] Mittal CK, Harrell WB, Mehta CS, et al. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase [J]. Mol Cell Biochem, 1995, 149-150: 263-265.
- [4] Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (17): 7797-7801.
- [5] 李国君, 吴德生. 中枢神经系统中一氧化氮和一氧化氮合酶研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 1999, 26 (2): 65-68.
- [6] Keys SA, Zmeman WF. Antioxidant activity of retinal glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes [J]. Exp Eye Res, 1999, 68: 693-702.
- [7] 杨兴斌, 赵燕, 海春旭, 等. 硒、锌对索曼神经毒剂诱导大鼠过氧化损伤的保护机制 [J]. 中国临床康复, 2004, 9 (8): 1792-1793.
- [8] 刘亚华, 李积胜, 闫蓓. 牛磺酸锌对染铅大鼠海马 NOS 活性和 nNOS 蛋白及基因表达的影响 [J]. 营养学报, 2004, 26 (5): 337-340.

铅和乙醇对雄性大鼠生殖系统的联合毒作用

谭成森, 靳翠红, 刘秋芳, 赵剑, 蔡原*

(中国医科大学公共卫生学院毒理教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 采用整体动物实验方法, 观察铅和乙醇对大鼠精子数量和质量, 以及血中性激素水平的联合作用。结果显示, 精子计数联合组比铅和乙醇单独作用组显著减少; 精子活动度分析联合组与其他各组比较显著下降。铅和乙醇单独作用均可使雄性大鼠血清睾酮 (T) 升高, 促黄体生成激素 (LH) 下降, 联合作用使 T 降低, LH 较单独作用组升高。提示铅和乙醇联合染毒对雄性大鼠生殖毒性影响可能具有增毒作用。

关键词: 铅; 乙醇; 精子; 性激素

中图分类号: R994.6; R114

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2006)05-0286-02

Study of collaborating effect of lead and ethanol on reproductive function in male rats

TAN Cheng-sen, JIN Cui-hong, LIU Qiu-fang, ZHAO Jian, CAI Yuan*

(Department of Toxicology, College of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Rats were used to observe the effect of lead and ethanol on the quantity and quality of sperms and the levels of sex hormones in the study. The results showed that sperm counts in lead or ethanol administrated group were all decreased compared with control rats. The sperm count in lead-ethanol collaborating exposure group was much lower than that of lead or ethanol group. The motility of sperm in collaborating exposure group was also obviously decreased compared with lead or ethanol group. Additionally, the sex hormones determination also revealed that lead or ethanol might induce a marked decline of serum testosterone (T) level and a definite increase of serum luteinizing hormone (LH) level, whereas collaborating exposure of lead and ethanol showed some adverse effect on serum T and LH levels. It is suggested that the combining exposure of lead and ethanol might produce some additive effect in reproduction toxicity in male rats.

Key words: Lead; Ethanol; Sperm; Sex hormone

铅对生殖系统的损伤, 已由流行病学调查和动物实验广泛证实^[1,2]。乙醇对雄性生殖系统的损害近年来已引起人们的关注。本研究采用整体动物实验方法, 观察铅和乙醇联合作用对大鼠精子数量和质量以及血中性激素水平的影响, 初步探讨铅和乙醇对雄性生殖系统的联合毒作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年 Wistar 雄性大鼠 32 只, 体重 180~200 g, 由中国医科大学实验动物部提供, 饲养 1 周后分组。动物室温度 18~23℃, 相对湿度 40%~70%, 动物自由饮水、摄食。

1.2 主要试剂与仪器

醋酸铅 (分析纯, 沈阳试剂一厂), 乙醇 (分析纯, 沈阳市富康消毒药剂公司), 睾酮 (testosterone, T) 放射免疫分析试剂盒 (天津九鼎医学生物工程有限公司), 促黄体生成激素 (luteinizing hormone, LH) 放射免疫分析试剂盒 (天津九鼎医学生物工程有限公司); 显微镜 (日本, OLYMPUS), 恒温水浴箱 (HH-42 型, 常州国华电器公司), 放射性免疫测定仪 (FJ2003/50G 型, 西安)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及染毒 将 32 只大鼠按体重随机分为 4 组: 对照组、醋酸铅组、乙醇组、联合组。乙醇组大鼠按 2.16 g/kg 给予 26% 乙醇, 经口灌胃染毒, 连续 8 周, 每周 5 d, 每天 1 次; 醋酸铅组大鼠自由饮水摄入 5% 醋酸铅, 连续 8 周, 每周 5 d, 联合组大鼠乙醇和醋酸铅染毒剂量、方式、时

收稿日期: 2005-12-09; 修回日期: 2006-03-20

作者简介: 谭成森 (1977-), 男, 硕士, 研究方向: 生殖毒理。

通讯作者: 教授, 博士生导师。Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net