

枸杞多糖对锰中毒小鼠神经发生和学习记忆的影响

温 静* 杨伯宁 任 丹

摘要 目的 探讨枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharides, LBP)对锰中毒小鼠神经发生和学习记忆的影响。方法 选择健康成年昆明小鼠随机分5组,分别为对照组,锰中毒组,锰中毒加LBP高、中、低剂量组。LBP和氯化锰分别采用灌胃和腹腔注射方法给药。用Morris水迷宫训练测试其空间学习和记忆能力;用5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记神经发生细胞。结果 锰中毒组平均逃避潜伏期高于对照组($P < 0.05$),穿越平台区次数明显低于对照组($P < 0.05$);锰中毒加LBP各剂量组海马齿状回(DG)内BrdU阳性细胞数目显著高于锰中毒组($P < 0.05$)。结论 LBP可能通过促进海马神经发生,从而影响小鼠的学习记忆能力。

关键词 枸杞多糖; 锰中毒; 学习记忆; 神经发生; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷

Effect of *Lycium barbarum* Polysaccharides on Neurogenesis and Learning & Memory in Manganese Poisoning Mice WEN Jing, YANG Bo-ning, and REN Dan *Department of Human Anatomy, Guangxi Medical University, Nanning (530021)*

ABSTRACT **Objective** To study the effect of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) on neurogenesis and learning & memory of manganese poisoning mice. **Methods** Healthy adult Kunming mice were divided into 5 groups, the control group (A), the manganese poisoning (by manganese chloride peritoneal injection) group (B), the manganese poisoning and treated with gastric perfusion of high, medium, low dosage LBP groups (C, D and E). The spatial learning & memory capacity of mouse was determined by Morris water maze training test. The neurogenetic cells were labelled with bromodeoxyuridine (BrdU) and detected by immunohistochemistry. **Results** The average escape latency was significantly higher and the times of passing through platform lower in group B than those in group A ($P < 0.05$). BrdU positive cells in groups C, D and E were significantly more than those in group B ($P < 0.05$). **Conclusion** LBP could enhance the learning & memory capability of the manganese poisoning mice by promoting neurogenesis in hippocampus.

KEYWORDS *Lycium barbarum* polysaccharides; manganese poisoning; learning & memory; neurogenesis; bromodeoxyuridine

对锰中毒的治疗,早期轻度中毒患者可选用依地酸钙钠(CaNa₂-EDTA)和钠盐(Na₂DMS)进行驱锰治疗^[1];研究表明左旋多巴和金刚烷胺可以逆转一些症状(如齿轮样强直、震颤),但这些抗帕金森药物并不一律有效,尤其是肌张力障碍^[2];亦有采用物理疗法治疗锰中毒的,对肌肉进行按摩,可促进神经系统症状的迅速缓解,但都未取得满意的疗效和进展,具有很大的局限性。中药在锰中毒治疗方面的应用还很少见,中药枸杞子的主要有效成分为枸杞多糖,其具有免疫

调节、抗衰老、护肝、防辐射、抗疲劳、抗肿瘤、抗氧化等功能。本实验重在探讨枸杞多糖(*lycium barbarum* polysaccharides, LBP)对锰中毒是否有干预作用,能否改善锰中毒的学习记忆功能,LBP改善锰中毒学习记忆的机制如何。

材料与方 法

1 动物 8周龄雄性昆明小鼠40只,清洁级,体重25~30g,由广西医科大学实验动物中心提供。随机分为5组,每组8只,即对照组、锰中毒组及锰中毒加LBP高、中、低剂量组。

2 试剂 LBP由上海康舟真菌多糖有限公司提供,LBP含量为31.7%,检验批号为20080110。氯化锰(分析纯)购于汕头化学制品厂。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)及二氨基联苯胺(DAB)

· 基金项目:广西省科学基金资助项目(桂科基 No. 0575058);广西医科大学科研基金资助项目(No. 302052)

作者单位:广西医科大学(南宁 530021)

通信作者:杨伯宁, Tel: 0771 - 5358854, E-mail: yangbn@ gxmu.

net. cn

* 现为广西医科大学硕士研究生

显色剂购自 Sigma 公司。

3 给药方法 氯化锰用无菌生理盐水配置成浓度为 5 mg/mL 的溶液,按 0.1 mL/g 剂量进行腹腔注射;LBP 高剂量浓度为 0.12 g/mL,按 2 g/kg 灌胃;中剂量浓度为 0.06 g/mL,按 1 g/kg 灌胃;低剂量浓度为 0.03 g/mL,按 0.5 g/kg 灌胃;对照组给予等容积的生理盐水;注射总时间控制在 2~3 min,连续 2 周。

4 Morris 水迷宫测试及 BrdU 注射

4.1 Morris 水迷宫测试 腹腔注射和灌胃后 2 周进行水迷宫测试。第 1~5 天,小鼠被连续从 4 个象限放入水中,记录其从入水到找到平台所用的时间,即逃避潜伏期(escape latency)。如 60 s 内未能找到,引导其上平台并休息 60 s。取 4 个象限测试成绩的平均值为当日的学习成绩,并记录 5 天的游泳速度进行比较。第 6 天撤去平台,选任一象限将小鼠放入水中,记录其在 60 s 穿越原平台所在区域的次数(frequency),以此作为空间记忆力的成绩,记录第 6 天的游泳速度进行比较。

4.2 BrdU 注射 从水迷宫测试第 4 天开始,每天在水迷宫测试前 30 min,5 组小鼠腹腔注射 BrdU (40 mg/kg,临用前用含 0.007% NaOH 的生理盐水溶解配制),连续 3 天。

5 组织切片 水迷宫实验结束后使用 4% 多聚甲醛对实验小鼠进行灌注处死。用 0.5% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,然后经左心室插管至升主动脉,快速灌注生理盐水,冲洗血液至液体清亮;即先快后慢地灌注 4% 多聚甲醛约 200 mL。灌注完毕后开颅取脑,将小鼠脑组织置于 4% 多聚甲醛中后固定,4℃ 过夜;然后依次移入含 20%、30% 的蔗糖液中至组织沉底。使用恒冷箱切片机作连续冠状冰冻切片,片厚 40 μm,每隔 4 片取 1 片,各组收集 1 套切片进 BrdU 免疫组化染色。

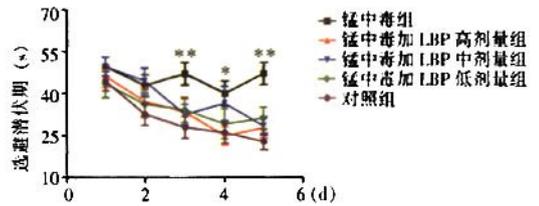
6 BrdU 染色及阳性细胞计数 切片经 0.01 mol/L PBS 漂洗,5 min/次 × 3 次,入 3% H₂O₂ 室温孵育 30 min,以清除内源性过氧化物酶;0.01 mol/L PBS 漂洗,5 min/次 × 3 次,入 50% 甲酰胺溶液(2 × SSC 溶液配制),65℃ 孵育 2 h;2 × SSC 溶液漂洗,5 min/次 × 3 次,入 2 mol/L HCl 溶液 37℃ 变性孵育 30 min;0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.0)漂洗,5 min/次 × 2 次,然后入 0.01 mol/L PBS 再漂洗,5 min/次 × 2 次,正常山羊血清 37℃ 封闭 30 min。加入小鼠抗人 BrdU 单克隆抗体(1:100)室温孵育 2 h,然后 4℃ 过夜;0.01 mol/L PBS 漂洗,5 min/次 × 3 次,加入生物素化的羊抗鼠 IgG 室温下孵育 2 h;0.01 mol/L PBS 漂

洗,5 min/次 × 3 次,加入链霉素抗生物素-过氧化酶室温孵育 2 h;0.01 mol/L PBS 漂洗,5 min/次 × 3 次,0.05% DAB 显色,显色完成后用 0.01 mol/L PBS 漂洗终止反应。切片风干,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。每只动物取含海马齿状回切片 3 张,光镜下分别计算每张切片内含 BrdU 阳性的细胞数目。阴性对照实验除用正常山羊血清代替一抗外,其余步骤与上述相同。结果为阴性。

7 统计学方法 水迷宫测试和细胞计数数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。根据方差齐或否,分别采用 LSD 法或 Games-Howell 法进行两两比较。

结果

1 各组空间学习能力比较(图 1,图 2) 前 2 天各组间平均逃避潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$),第 3、5 天锰中毒组小鼠在 Morris 水迷宫中找到平台的时间均出现滞后现象,学习成绩明显低于对照组($P < 0.01$);其余各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。5 天中各组小鼠的平均游泳速度比较差异无统计学意义($P > 0.05$),且训练过程中平均速度基本平稳。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 1 各组小鼠逃避潜伏期随训练时间变化曲线

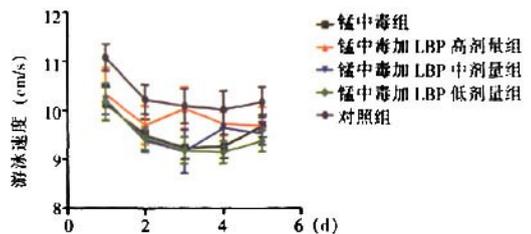
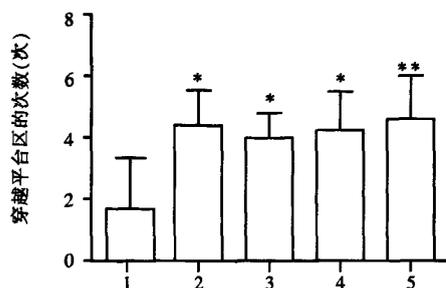


图 2 各组小鼠游泳速度随训练时间变化曲线

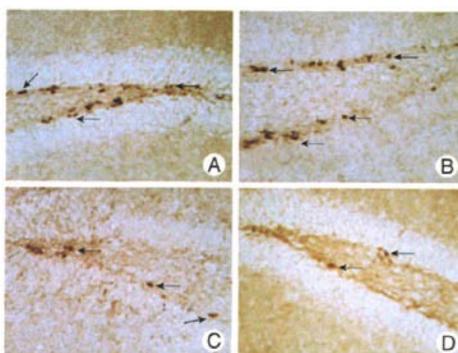
2 各组空间记忆能力比较(图 3) 在空间探索实验中,锰中毒组穿越原平台所在区域的平均次数(1.33 ± 1.21)低于对照组($4.25 \pm 2.76, P < 0.01$);锰中毒加 LBP 高、中、低剂量组分别为 4.44 ± 1.14 、 4.00 ± 0.82 、 4.25 ± 1.26 ,高于锰中毒组($P < 0.05$)。

各组小鼠间的平均游泳速度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



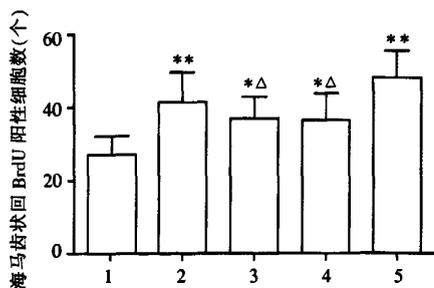
注:1 为锰中毒组;2 为锰中毒加 LBP 高剂量组;3 为锰中毒加 LBP 中剂量组;4 为锰中毒加 LBP 低剂量组;5 为对照组(图 5 同);与锰中毒组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 3 各组小鼠穿越平台的次数比较



注:A 为对照组;B 为锰中毒加 LBP 高剂量组;C 为锰中毒加 LBP 低剂量组;D 为锰中毒组;箭头所指为 BrdU 阳性细胞

图 4 各组小鼠海马齿状回神经干细胞的增殖情况(免疫组化染色, $\times 400$)



注:与锰中毒组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

图 5 各组小鼠海马齿状回 BrdU 阳性细胞计数结果比较

3 BrdU 免疫组织化学染色结果(图 4, 图 5)

BrdU 的免疫反应产物主要位于细胞核内,在切片上呈现有球形、扁椭圆形、梭形及不规则的斑块形状,DAB 显色呈深棕黄色。海马齿状回(DG)内的阳性细胞定位于颗粒细胞下层(SGZ),且多分布于 SGZ 和颗粒细

胞层交界的周边区带,细胞多散在分布,部分切片可见较多聚集。聚集区域多在靠近中线的交角部位;锰中毒组 BrdU 阳性细胞明显少于对照组和锰中毒加 LBP 高、中、低剂量组(图 4A ~ D)。

对各组动物 DG 区 BrdU 阳性细胞数进行统计分析后显示:锰中毒组 BrdU 阳性细胞数明显少于对照组($P < 0.01$),锰中毒加 LBP 各剂量组高于锰中毒组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);锰中毒加 LBP 各剂量组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

1 锰中毒对学习记忆的影响 近年来,锰接触引起的神经行为学改变受到越来越多的重视,其中毒症状不仅是存在锥体外系损伤症状^[3],而且同时出现边缘系统损伤^[4],表现为学习记忆功能明显减退,认知功能明显下降,以及明显情绪改变。张德兴等^[5]发现,锰中毒使雌性成年小鼠的记忆力明显下降,并能通过胎盘屏障对子代小鼠的大脑发育产生影响。Shukakidze 等^[6]发现不论是慢性还是急性染锰都能造成大鼠的行为学障碍。本实验采用锰中毒模型,其中锰中毒组小鼠平均逃避潜伏期和穿环次数明显低于其他各组,实验结果亦显示染锰小鼠学习能力变差,记忆力降低。

2 LBP 对学习记忆的影响 枸杞子是我国传统中药又是食品,具有滋补肝肾、益精明目等功效。LBP 为其主要的生物活性成分,已证明 LBP 有增强机体免疫力、延缓衰老等作用^[7]。目前,LBP 在锰中毒治疗方面的研究还未见报道。本实验采用 Morris 水迷宫对 LBP 治疗的染锰小鼠进行神经行为测试,结果显示,随着治疗时间的延长,LBP 能缩短染锰小鼠的逃避潜伏期,增加穿环次数,说明 LBP 能提高染锰小鼠的学习记忆能力。

3 LBP 对锰中毒的影响 锰中毒机制方面的研究已有很多报道,锰可以抑制超氧化物歧化酶(SOD),使其对超氧阳离子的歧化作用减弱,导致自由基在体内堆积,进而作用于生物膜的不饱和脂肪酸,使其氧化而引起脂质过氧化物生成增加^[8]。LBP 具有抗衰老、抗氧化的功能,可提高 SOD 的活性,降低过氧化脂质(LPO)的含量^[9,10]。因此 LBP 改善染锰小鼠学习记忆能力,可能是由于其可以增加 SOD 活性,降低 LPO 含量而引起的。谭国鹤等^[11]发现锰中毒可以减少小鼠脑内神经发生的数量,从而降低小鼠的学习记忆能力。本实验中 LBP 各治疗组神经发生数量明显高于锰中毒组,因

此 LBP 改善染锰小鼠学习记忆能力,可能是由于其可以增加神经发生数量,从而提高小鼠学习记忆能力。LBP 对锰中毒的治疗机制可能是多方面的。将 LBP 用于临床上锰中毒的治疗,有望更有效地降低锰在神经毒性方面的危害,这将是锰中毒治疗的新切入点。

参 考 文 献

- [1] 朱夏燕,姜岳明,胡万达.对氨基水杨酸钠治疗锰中毒研究近况[J].环境与职业医学,2006,23(6):516-519.
Zhu XY, Jiang YM, Hu WD. A review of studies on manganese intoxication treated with PAS-Na [J]. Environ Occup Med, 2006, 23(6):516-519.
- [2] Barceloux DG. Manganese [J]. Clin Toxicol, 1999, 37(2):293-307.
- [3] Jan Kovic, Joseph MD. Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease[J]. Neurology, 2005, 64(12):2021-2028.
- [4] Barbeau A. Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias) [J]. Neurotoxicology, 1984, 5(1):13-35.
- [5] 张德兴,贺新红,张文光,等.高锰对雌性仔鼠大脑发育的影响[J].卫生研究,1999,28(3):141-144.
Zhang DX, He XH, Zhang WG, et al. Effects of high manganese on cerebral development of the offspring in rats. J Hyg Res, 1999, 28(3):141-144.
- [6] Shukakidze A, Lazriev I, Mitagvariya N. Behavioral impairments in acute and chronic manganese poisoning in white rats [J]. Neurosci Behav Physiol, 2003, 33(3):263-267.
- [7] 李国莉,任彬彬,杨建军.枸杞多糖对小鼠耐力及体内抗氧化酶活性的影响[J].辽宁中医杂志,2002,29(10):634.
Li GL, Ren BB, Yang JJ, et al. The effects of *Lycium barbarum* polysacchride on the endurance of mice and the activity of antioxidant enzymes *in vivo* [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2002, 29(10):634.
- [8] Venkataraman S, Jiang X, Zhang Y, et al. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells [J]. Oncogene, 2005, 24(1):77-89.
- [9] Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, et al. Antioxidant measurements [J]. Physiol Meas, 2007, 28(4):41-55.
- [10] 梁越欣,张伟,李电东,等.枸杞多糖、牛膝多糖对 H₂O₂ 诱导 2BS 细胞衰老的影响[J].中国新药杂志,2004,13(7):599-602.
Liang YX, Zhang W, Li DD, et al. The effects of *Lycium barbarum* polysacchride and *Achyranthes bideniata* polysaccharide on cell senescence of 2BS induced by H₂O₂ [J]. Chin J New Drugs, 2004, 13(7):599-602.
- [11] 谭国鹤,杨伯宁,谭国富,等.锰中毒对小鼠海马神经干细胞增殖的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2007,25(4):282-285.
Tan GH, Yang BN, Tan GF, et al. Effects of manganese on proliferation of neural stem cells in mice's hippocampus [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2007, 25(4):282-285.

(收稿:2009-04-15 修回:2009-12-05)

第五届全国中西医结合围手术期医学研讨会征文通知

为了促进现代外科理论和中西医结合围手术期管理研究的学术交流,推动本领域临床实践和研究的不断深入,中国中西医结合学会围手术期专业委员会定于2010年5~6月在浙江省杭州市举办“第五届全国中西医结合围手术期医学研讨会”,届时将邀请美国、日本等国际知名外科专家及国内本领域的院士和专家做专题报告,介绍21世纪外科围手术期医学的新理论、新思路和新发展,以及中西医结合围手术期管理医学的最新进展,并进行学术交流。现征文如下。

1 征文内容 (1)围手术期管理医学研究的新进展:围手术期管理医学研究的理论探讨;快速康复外科新理念研究的前沿动态;中医、中西医结合方法在术后快速康复中的应用展望。(2)快速康复外科与中医药/中西医结合医学研究:快速康复技术应用的中西医结合临床经验交流;围手术期营养支持研究;微创新技术、新成果研究;相关临床研究、基础研究;其他。

2 征文要求 (1)论文内容真实可靠,具备科学性、先进性、实用性。(2)全文3 000字左右,并附400字左右中文摘要。全文及摘要打印稿各1份(A4纸、加盖公章),或用E-mail传送电子版。(3)请务必注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编和联系电话。(4)论文截稿日期:2010年4月15日。(5)会议具体时间、地点另行通知。

3 联系人 浙江省中医院外科(浙江省杭州市邮电路54号,邮编:310006)张勤(手机:13588887282),周济春(13777361870)。传真:0571-87077785;E-mail:zjc0305@live.cn