

浓缩归脾丸对苯中毒并抑郁小鼠应激能力的影响

王晶, 刘立, 刘艳杰

甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 观察浓缩归脾丸对苯中毒并抑郁小鼠的定时游泳总里程、行为学及缺氧存活时间等应激能力的影响。方法: 将 72 只小鼠随机分成 6 组, 即正常组、模型组、归脾丸高、中、低各剂量组和西药组, 每组 12 只。除正常组外, 其余组均采用熏苯 14 天, 并随机刺激 14 天建立苯中毒并应激抑郁小鼠模型, 在造模成功后第 1 天开始给药。正常组、模型组均给予生理盐水 0.2 mL/只灌胃; 归脾丸高、中、低剂量组分别按 8、4、2 mg/(kg·d) 灌胃; 西药组给予利血生 1.5 mg/(kg·d), 鲨肝醇 5 mg/(kg·d), 配制成混悬液灌胃; 每天 1 次, 连续 3 周。检测小鼠 3 min 定时游泳总里程、行为学及缺氧存活时间等指标。结果: 与模型组比较, 正常组 3 min 定时游泳总里程和小鼠的行为得分显著较高, 缺氧存活时间显著较长, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 归脾丸各剂量组及西药组 3 min 定时游泳总里程显著延长, 归脾丸各剂量组的垂直得分和水平得分明显升高, 归脾丸各剂量组及西药组均能延长苯中毒小鼠的缺氧存活时间, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与西药组比较, 归脾丸各剂量组 3 min 定时游泳总里程、垂直和水平得分升高的更明显, 归脾丸中、低剂量组小鼠的缺氧存活时间更长, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 归脾丸可提高苯中毒并抑郁小鼠的应激能力并减轻其抑郁的程度。

[关键词] 浓缩归脾丸; 苯中毒; 抑郁; 应激反应; 缺氧存活时间; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 01-0012-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.01.004

Concentrate Guipi Pills on Stress Ability of Mice with Benzene Poisoning Merged Depression

WANG Jing, LIU Li, LIU Yanjie

Abstract: Objective: To observe the effect of Concentrate Guipi Pills (CGP) on stress ability, including time swimming total mileage, ethology and anoxia survival time of mice with benzene poisoning merged depression. Methods: Divided 72 mice into normal group, model group, CGP groups with high, moderate and low dose, and western medicine group randomly, 12 in each. Except normal group, other groups were given fumigating benzene and random stimulation for 2 weeks to build models. Medicines were taken after the first day of successful modeling. Normal group and model group were given normal saline (NS) with the dose of 0.2 mL per mouse by gavage. CGP groups with high-, moderate- and low dose were given 8, 4, 2 mg/(kg·d), respectively. Suspension of 1.5 mg/(kg·d) leucogen and 5 mg/(kg·d) batyl alcohol were given to western medicine group by gavage. Once a day, lasting for 3 weeks. Detected index of 3 minutes swimming total mileage, ethology, and anoxia survival time. Results: Compared with model group, scores of 3 minutes swimming total mileage and behavior were higher, and anoxia survival time were longer in normal group. CGP groups with different dose and western medicine group could prolong the 3 minutes swimming total mileage and anoxia survival time in mice with benzene poisoning ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with western medicine group, the 3 minutes swimming total mileage, vertical and horizontal scores were higher in CGP groups with three different dose, anoxia survival time were longer in CGP groups with moderate and low dose ($P < 0.05$). Conclusion: CGP may improve stress ability of mice with benzene poisoning merged depression and relieve its depression degree.

Keywords: Concentrate Guipi Pills; Benzene poisoning; Depression; Stress response; Anoxia survival time; Animal experiment; Mice

[收稿日期] 2016-07-12

[项目基金] 甘肃省 2009 年重大中医药科研项目 (GZK2009-08)

[作者简介] 王晶 (1991-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合神经内科。

[通讯作者] 刘立, E-mail: liulizyxx@sina.com。

近年,苯及苯系物越来越多的应用于工业生产和人们生活中,苯中毒的患者正在逐年增加。苯中毒引起机体的改变,主要表现在初期时齿龈和鼻黏膜处有类似坏血病的出血症,并出现神经衰弱样症状^[1],严重时可使骨髓造血机能发生障碍,导致再生障碍性贫血^[2]。诸多劳动卫生学资料报道:长期接触苯系混合物的工人中再生障碍性贫血罹患率较高,这时病人的心理异常更加突出,表现为抑郁、恐惧、悲哀等。本实验从游泳时间、行为学、缺氧存活时间方面入手,研究浓缩归脾丸对苯中毒并抑郁小鼠的应激能力及应激后抑郁行为的影响,初步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物的选取与分组 选取72只昆明小鼠,8~12周龄,雌雄各半,体质量(20±2)g,由甘肃中医学院动物实验中心提供(国家级重点实验室),批号:SCXK(甘)2004-2006。动物实验通过了本校动物伦理委员会的审批。编号后,按随机数字表法随机分成正常组、模型组、归脾丸高、中、低各剂量组和西药组6组,每组12只。

1.2 药物、试剂与仪器 选用浓缩归脾丸,兰州佛慈制药厂,批号:200937,每8粒相当于原生药3g。二甲苯(分析纯),广州化学试剂生产,批号:0307012;利血生,江苏吉贝尔药业有限公司生产,批号:20091104;鲨肝醇片,广东康奇力药业有限公司生产,批号20080511。BS110S电子称,北京塞多利斯有限公司。

1.3 慢性苯中毒并应激抑郁模型小鼠的建立 除正常组外,其余组均采用熏苯14天,并随机刺激14天造模。熏苯方法:小鼠置于人工模拟的高苯浓度(苯浓度为2000 mg/m³)环境吸入式染毒,每天8h,连续14天。根据《职业性苯中毒诊断标准(GBZ68-2002)》,造模结束后小鼠断尾采血,检测外周血白细胞计数低于4.5×10⁹/L(4000/mm³),证实苯中毒造模成功。随机刺激包括:冰水游泳(4℃,5 min)、热应激(45℃,5 min)、禁水(24 h)、禁食(48 h)、夹尾(1 min)、电击足底(36 V交流电,每隔1 min刺激1次,持续10秒,共30次)、制动(分别为5 h、6 h)、频闪照明(120次/min)和昼夜颠倒等刺激。造模结束后测定行为学和脑组织单胺类神经递质,以确定苯中毒并应激抑郁造模成功。

1.4 给药方法 在造模成功后第1天开始给药。正常组、模型组均给予生理盐水0.2 mL/只灌胃;归脾丸高、中、低剂量组分别给予归脾丸按8、4、2 mg/(kg·d)灌胃,相当于临床成人用量的20倍、10倍、5倍;西药组给予利血生1.5 mg/(kg·d),鲨肝醇5 mg/(kg·d),配制成混悬液灌胃;每天1次,连续3周。给药期间,除正常组外其余5组小鼠持续高苯环境喂养以防小鼠自愈。

1.5 统计学方法 应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析及LSD进行组间比较。

2 检测指标

2.1 3 min 定时游泳总里程测定 于实验第35天,末次给药

1 h后,各组小鼠分别使用MORRIS游泳测试软件记录3 min定时游泳总里程。水温25℃,水深20 cm。

2.2 敞箱实验 敞箱为立柱体,高为40 cm,长宽各为80 cm,周壁为黑色,底面由面积相等的25块(每块面积为16 cm×16 cm)组成。以动物穿越地面块数为水平活动得分,动物穿越1格为1分,如动物沿线行走,以每10 cm为1分。以动物双前足离开地面次数为垂直活动得分,即动物双前足离开地面为标志,无论动物站立多长时间,直至放下双前足为1次活动。每只动物进行1次,每次时间为5 min。观测各组大鼠水平积分和垂直积分。

2.3 缺氧存活时间 采用耐缺氧实验。小鼠于末次给药后2 h,单个放入装有碱石灰(30 g)的500 mL广口瓶中,瓶盖周围涂以凡士林,记录每只小鼠存活时间。

3 结果

3.1 各组小鼠3 min 定时游泳总里程结果比较 见表1。与模型组比较,正常组3 min 定时游泳总里程显著较高;归脾丸各剂量组及西药组3 min 定时游泳总里程显著延长,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与西药组比较,归脾丸各剂量组3 min 定时游泳总里程升高的更明显,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 各组小鼠3 min 定时游泳总里程结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 min 定时游泳总里程/cm
正常组	12	802.61±175.20 ^②
模型组	12	387.14±125.53
归脾丸高剂量组	12	778.46±95.89 ^③
归脾丸中剂量组	12	694.41±104.72 ^③
归脾丸低剂量组	12	624.06±151.46 ^{①②③}
西药组	12	494.11±139.75 ^①

与模型组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与西药组比较,③ $P < 0.01$

3.2 各组小鼠敞箱实验结果比较 见表2。经苯染毒14天后,与正常组比较,各染毒组小鼠的行为得分降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。药物干预21天,即实验第35天,与模型组比较,归脾丸各剂量组的垂直得分和水平得分明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与西药组比较,归脾丸各剂量组垂直和水平得分升高的更明显,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.3 各组苯中毒小鼠缺氧存活时间结果比较 见表3。与模型组比较,正常组缺氧存活时间显著较长,归脾丸各剂量组及西药组均能延长苯中毒小鼠缺氧的存活时间,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与西药组比较,归脾丸中、低剂量组小鼠的缺氧存活时间更长,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

4 讨论

苯是一种化学物质,在常温下是一种呈透明的液态物质,

表2 各组小鼠敞箱实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第14天		第35天	
		垂直得分	水平得分	垂直得分	水平得分
正常组	12	8.9±5.4	134.6±15.7	9.4±2.5 ^{②④}	139.8±24.4 ^{②④}
模型组	12	4.8±2.3 ^①	65.8±13.5 ^①	4.2±2.0	73.3±23.7
归脾丸高剂量组	12	4.6±3.2 ^①	71.5±20.0 ^①	9.2±3.1 ^{②④}	115.0±34.8 ^{②④}
归脾丸中剂量组	12	5.1±2.7 ^①	73.7±24.8 ^①	6.7±4.3 ^{②③}	123.1±32.2 ^{②③}
归脾丸低剂量组	12	6.1±3.9 ^①	69.6±14.3 ^①	7.8±4.7 ^{②③}	95.4±27.3 ^{②③}
西药组	12	5.3±1.4 ^①	77.1±23.1 ^①	4.8±3.3	81.3±47.4

与正常组比较, ① $P < 0.01$; 与模型组比较, ② $P < 0.01$; 与西药组比较, ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$

表3 各组苯中毒小鼠缺氧存活时间结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	存活时间(s)
正常组	12	35.82±12.52 ^①
模型组	12	26.30±3.59
归脾丸高剂量组	12	33.82±5.02 ^①
归脾丸中剂量组	12	34.40±5.08 ^{①②}
归脾丸低剂量组	12	34.70±5.70 ^{①②}
西药组	12	33.50±8.20 ^①

与模型组比较, ① $P < 0.05$; 与西药组比较, ② $P < 0.05$

气味芳香, 易燃, 经由皮肤表层以及呼吸系统入侵到人体内部^[3]。现今社会, 苯类物质在工业生产和日常生活中被广泛应用, 大多数企业工作场所的苯浓度都控制在国家规定的职业接触苯的接触限值内^[4], 很少发生苯的急性中毒事件, 苯的职业危害主要是慢性苯中毒, 其发病率正在逐年增加。苯的急性毒作用主要是损伤神经系统, 慢性毒作用的靶器官主要是造血系统。

归脾汤是严用和根据《内经》“二阳之病发心脾”理论创建的。本方由当归、人参、龙眼肉、白术、酸枣仁、茯神、远志和甘草组成, 共奏益气补血、健脾养心、宁神益智之功^[5]。现代药理研究显示, 人参内所含的人参皂苷对应激性和中枢神经系统有一定的影响^[6]; 当归中挥发油成分非常丰富, 其中蒿苯内酯和正丁烯基苯等含量较高, 蒿苯内酯可以通过减轻氧化应激和抗细胞凋亡, 从而保护缺血心肌^[7]; 龙眼肉对小鼠遭受缺氧刺激有明显的保护作用^[8]。因此, 从现代药理研究角度也可证明归脾丸对苯中毒小鼠的应激反应及抑郁行为的改善作用。

动物组织含氧量不足或组织利用氧发生障碍时, 组织器官的机能代谢甚至形态结构将发生异常变化, 严重时可导致机体死亡, 这种病理过程称为缺氧^[9]。中枢对缺氧的耐受性是决定动物存活时间的主要限制因素, 所以增强神经元对缺氧的耐受性是延长动物缺氧存活时间的关键环节。归脾汤中人参的成分皂苷类能减轻海马组织和培养的海马神经元的缺血低氧性损伤作用^[10], 故归脾汤对动物缺氧的应激能力具有明显的改善作

用, 本次实验中小鼠缺氧存活时间测定结果可证明这一点。并且3 min 定时游泳总里程测定结果显示, 归脾汤各给药组小鼠3 min 定时游泳里程明显延长, 与模型组、西药组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 这也说明归脾丸能提高苯中毒并抑郁小鼠的应激能力。

目前普遍认为五羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)等神经递质含量下降或是活性下降会引起抑郁, 反之会引起狂躁。本研究前期实验发现苯吸入会造成小鼠的抑郁性行为, 并且会降低小鼠的中枢神经系统的5-HT、DA等单胺类神经递质^[11]。此次研究通过敞箱实验的测试评分评价苯中毒并抑郁小鼠在新环境中的行为学改变, 即表示活动能力的水平运动及表示对新环境的探究程度的垂直运动。结果表明, 经14天熏苯染毒后, 各组小鼠的行为得分与正常组比较均有降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 此表现与抑郁症患者的兴趣丧失、情绪消沉、意志活动减退等症状十分相似。给予药物干预21天后, 发现归脾丸高、中剂量组的行为学得分均与正常组接近, 归脾丸各剂量组得分均高于西药组, 可见归脾丸可减轻苯中毒并抑郁小鼠的应激抑郁程度, 改善其抑郁性行为, 提高其活动能力。

【参考文献】

- 成东艳. 室内空气中苯系物污染的危害及防治[J]. 环境保护与循环经济, 2008, 28(1): 40-41.
- 汤丽霞, 姚永成. 低浓度苯系物对作业工人健康的影响[J]. 河南预防医学杂志, 2000, 11(2): 102-103.
- 谭冰. 苯类物质的特点及应用[J]. 中国科技信息, 2015(3): 13-14.
- 陈金茹, 钟海盛, 赵转地. 长期低浓度苯系物接触的早期职业健康损害[J]. 职业与健康, 2010, 26(1): 24-26.
- 邓敏贞, 黎同明. 归脾汤对失眠小鼠镇静催眠及记忆巩固性障碍的影响[J]. 中医学报, 2012, 27(4): 438-440.
- 杨武韬. 人参的化学成分和药理研究进展[J]. 中国医药指南, 2014, 12(3): 33-34.
- 徐广侠. 当归有效成分及其药理作用的分析[J]. 中国卫生产业, 2014(33): 29-30.
- 盛康美, 王宏洁. 龙眼肉的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 236-238.
- 邢树文. 小鼠缺氧耐受性影响因素的研究[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(4): 314-317.
- 咸云淑, 熊文, 程刚. 人参皂甙对兴奋毒损伤的保护作用研究[J]. 中国实验诊断学, 2003, 7(2): 132-134.
- 刘立, 王祖华, 孙少伯, 等. 归脾丸对苯中毒小鼠行为学及中枢5-HT、NE、5-HIAA的影响[J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(3): 12-14.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)