

Relationship between Alzheimer's Disease (AD) and Aluminum Poisoning and the Treatment of Aluminum Extraction from *Poria Chinensis*

Sanyan Wang¹, Tianliang Long², Wanjun Bi², Yuling Li², Minmin Zhang², Jieying Wei², Shuqiu Zhang³, Kuochuan Chou⁴

¹Department of Neurology, Pingle County People's Hospital of Guangxi, Guilin Guangxi

²Research Laboratory of Heavy Metals and Fluoroarsenic Toxicants, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise Guangxi

³Guangxi Baise High-Tech Zone Technology Enterprise Incubation Base R & D Center, Baise Guangxi

⁴Department of Environmental Science Toxicology, Michigan State University, Michigan, USA

Email: 247913895@qq.com

Received: Dec. 10th, 2019; accepted: Dec. 24th, 2019; published: Dec. 31st, 2019

Abstract

Objective: To evaluate the association between aluminum poisoning and Alzheimer's disease (AD) and observe the therapeutic effect of *Smilax glabra*. **Methods:** 53 mice were divided into four groups: control group, model group, treated group 1, treated group 2. Except control group, the rest of groups were made Alzheimer's disease models by IP injection with D-galactose and AlCl₃ mixed solution for 60 days. Mice of treated group 1 and treated group 2 were given different doses of traditional Chinese medicine, containing *Poria Chinensis*, in different doses by gavage after 1 month of aluminum poisoning. The modeled group and the control group were gavaged with the same volume of distilled water until the end of the experiment. The water maze swimming test was made respectively before, during and after the experiment, and the hemoglobin was measured. After the experiment, the blood was taken, the serum was separated, and the serum biochemical indexes were measured. The mice were killed, and the brain homogenate was made. The contents of AchE, scavenging rate of superoxide anion radicals, glutathione and other related biochemical indexes in the brain were determined. The other part of the brain was treated with formaldehyde for pathological examination. **Results:** The Al³⁺ content of the brain was 2.17 ± 0.06 , 2.41 ± 0.07 , 1.40 ± 0.49 , 1.14 ± 0.02 ($\mu\text{mol/L}$) in the control group, the model group, the treated group 1, and the treated group 2 respectively ($p < 0.01$); and the Al³⁺ content of the serum was 1.81 ± 0.13 , 2.89 ± 0.26 , 2.62 ± 0.08 , 2.41 ± 0.30 ($\mu\text{mol/L}$) ($p < 0.01$) respectively. The difference was statistically significant. The serum Al³⁺ content of the control group was significantly lower than that of other 3 groups, and that of the model group and the treated group 1 were significantly higher than other 2 groups. The activities of AchE among the control group, the model group, the treated group 1 and the treated group 2 were 2.22 ± 0.74 , 1.18 ± 0.35 , 1.64 ± 0.40 , and 1.76 ± 0.42 (U/mg-prot); the activity in the modeled group was significantly reduced, with statistical significance, $p < 0.05$. The activities of chAT were: 59.67 ± 9.73 , 32.84 ± 13.12 , 28.23 ± 5.63 , and 25.07 ± 4.89 (U/g tissue wet weight); the activity in the control group was significantly higher than other

groups, $p < 0.01$. The content of hemoglobin, before, during and after modeling, compared before the experiment, showed no significant difference between groups. After the modeling and the treatment, the modeled group and the two treated groups were significantly different from the normal group, $p < 0.01$. The comparison between the groups of superoxide anion radicals was statistically significant, $p < 0.01$. These differences were statistically significant, compared between groups of glutathione, compared with the normal group, treatment group 1 $p < 0.05$; compared with the model group, $p < 0.05$ in the treatment group 2 and $p < 0.01$ in the treatment group 1. Comparing serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and urea nitrogen between groups, $p < 0.05$, the difference was statistically significant. In the water maze test, there was no significant difference in the latency time to find the platform before and after the modeling (before the treatment), but the modeled group and the treatment group 1 had a prolonged trend. Nonetheless, there were some differences between each group after the treatments. In addition, there were significant differences in the error rate and failure rate between all groups, before experiment, after modeling, and after treatments. Conclusion: Aluminum can induce atrophy, degeneration and apoptosis of neurons in the brain, resulting in a decrease in AchE activity and a decrease in antioxidative capacity. The extract prepared from traditional Chinese medicine ameliorated the effects on chAT, Ach, AchE, and oxidative capacity in the Alzheimer's model induced by Al poisoning.

Keywords

Aluminum Poisoning, Alzheimer's Disease, AchE, Antioxidant

阿尔茨海默病(AD)与铝中毒的关系及土茯苓排铝治疗的探讨

王三艳¹, 龙田梁², 闭万俊², 李玉玲², 张敏敏², 韦婕莹², 张树球³, 周国荃⁴

¹广西平乐县人民医院神经内科, 广西 桂林

²右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室, 广西 百色

³广西百色高新区科技企业孵化基地研发中心, 广西 百色

⁴美国密西根州立大学环境科学毒理学教研室, 密西根, 美国

Email: 247913895@qq.com

收稿日期: 2019年12月10日; 录用日期: 2019年12月24日; 发布日期: 2019年12月31日

摘要

目的: 探讨阿尔茨海默病(AD)与铝中毒的关系及土茯苓治疗的效果的观察。方法: 将53只小鼠分为正常组、模型组、治疗1组和治疗2组, 除正常组外, 造模组用D-半乳糖 + $AlCl_3$ 混合水溶液腹腔注射60天, 建立拟老年痴呆症(阿尔茨海默病)模型。治疗1、2组在铝染毒1个月后同时分别给予中药复方制剂不同剂量灌胃, 模型组和正常组用等量体积蒸馏水灌胃, 直至实验结束。在实验前、中、后分别进行水迷宫游水试验, 并测定血红蛋白; 实验结束后取血, 分离血清, 测定血清生化指标; 处死小鼠取脑, 制成10%脑匀浆, 分别测定脑中乙酰胆碱酯酶(AchE)、乙酰胆碱转移酶(chAT)活力、超氧阴离子自由基(O_2^-)清除率、谷胱甘肽等相关生化指标含量; 另一部分脑用甲醛处理后作病理检查。结果: 正常组、模型组、治1组、治2组依次为, 脑铝 Al^{3+} 含量 2.17 ± 0.06 、 2.41 ± 0.07 、 1.40 ± 0.49 、 1.14 ± 0.02 ($\mu\text{mol/L}$), 各組间比较, $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 血清 Al^{3+} 含量, 1.81 ± 0.13 、 2.89 ± 0.26 、 2.62 ± 0.08 、 2.41

± 0.30 ($\mu\text{mol/L}$), 各组间比较, $p < 0.01$, 差异有统计学意义, 正常组小鼠血清铝Al³⁺含量明显低于其他3组, 模型组, 治1组明显高于其他二组; 脑乙酰胆碱酯酶(AchE)活力: 2.22 ± 0.74 、 1.18 ± 0.35 、 1.64 ± 0.40 、 1.76 ± 0.42 (U/mg-prot), $p < 0.05$, 差异有统计学意义; 模型组明显降低; 脑乙酰胆碱转移酶(chAT)活力依次为, 59.67 ± 9.73 、 32.84 ± 13.12 、 28.23 ± 5.63 、 25.07 ± 4.89 (U/g组织湿重), 正常组明显高于其他各组, $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 造模前、中、后Hb含量, 组间比较, 实验前: 各组无显著性差异; 造模后和治疗后, 与正常组比较, $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 超氧阴离子自由基(O_2^-)组间比较, $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 谷胱甘肽, 组间比较, 与正常组比较, 治疗1组 $p < 0.05$, 与模型组比较, 治疗2组 $p < 0.05$, 治疗1组 $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、尿素氮各组间比较, $p < 0.05$, 差异有统计学意义; 血清谷丙转氨酶(ALP)、脑丙二醛(MDA)浓度(nmol/mg, prot)治疗1组、治疗2组明显低于正常组、模型组; 在水迷宫试验中, 造模前、造模后(治疗前)水迷宫时间, 各组间无明显差异, 但模型组、治1组已有延长趋势, 治疗后各组间已有明显差异, 且前、中、后的水迷宫错误率和失败率都有明显的差异。结论: 高铝抑制了(chAT)活性, 使乙酰胆碱(Ach)合成减少, 导致AchE活性下降, 抗氧化能力降低及记忆功能障碍; 且本中药复方制剂通过排铝、提高抗氧化能力治疗后对老年认知功能障碍有明显疗效。

关键词

铝中毒, 阿尔茨海默病(AD), 乙酰胆碱酯酶, 抗氧化能力

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

铝是地球上含量最多的金属元素之一, 与人类的生产生活关系非常密切。过去一直认为铝是无毒元素, 而近年来研究发现铝也有一定的毒性, 虽毒性较低, 且体内积蓄量较少, 但如长期积蓄在大脑, 特别是颞叶皮层、海马结构中, 与神经元纤维变性、缠结、神经元细胞减少有关, 研究发现老年认知功能障碍(痴呆症)患者大脑神经组织中铝含量是正常人的 1.5~30 倍, 因此有学者认为铝与老年认知功能障碍(AD)发病有密切关系[1] [2], 而且有研究发现, 小鼠中 D-半乳糖和铝联合应用是一个有效的非转基因阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型, 可用于 AD 病理研究和相关治疗药物的评价[3]。近来甚至有德国学者提出通过药物促进铝的排泄来治疗老年痴呆症(AD)的策略, 因而寻找排铝药物又成为医学界的重要课题, 而用铝染毒常作为建立老年认知功能障碍动物模型的一种方法。为探讨两者间的关系, 本文用氯化铝染毒小白鼠建立动物模型实验, 从大脑、血清生化变化结合大脑形态学变化进行深入研究, 作对比分析, 并探讨具有排重金属作用的中药抗痴呆口服液通过排铝等的治疗效果。现将结果报告如下。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 试剂

氯化铝、硝酸铝、D-半乳糖、亚硝酸钠、氯化钠, 氰化钾、高铁氰化钾、无水磷酸二氢钾、过硫酸铵、1-奈胺、盐酸羟胺、对氨基苯磺酸、盐酸(HCL)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)均为国产分析纯。各种试剂盒, 乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒、乙酰胆碱转移酶(chAT)试剂盒、谷胱甘肽

(GSH)测试盒、丙二醛测试盒、尿素氮测试盒、甘油三酯(TG)测试盒、总胆固醇(TC)测试盒、谷丙转氨酶测试盒, 购自南京建成生物工程研究所和四川省迈克科技有限责任公司。

2.1.2. 中药

土茯苓干品, 购自市中药店, 自提: 称取中药→放锅内→加自来水 20 倍→加热煮沸 40 分钟→过滤→加热浓缩→冷却→加 3 倍量 v/v 95%乙醇沉淀过夜→过滤弃沉淀→回收乙醇→药液定容→装瓶→105℃高压消毒 30 分钟→放冰箱保存待用。中药复方制剂(中药复方抗痴呆制剂, 商品名: 植物饮液, 专利号: ZL201210339742.8)由广西百色高新区科技企业孵化基地研发中心提供, 由绿豆、金银花、茯苓、甘草等组成。

2.2. 方法

2.2.1. 动物

小白鼠 53 只, 标准清洁级, 健康, 雌雄各半, 鼠龄 2~3 个月。由学院动物室提供(动物使用许可证号: SYXK 桂 2011-0010。动物生产许可证号: SCXK 桂 2012-0003), 该实验项目为经申报批准下文件资助的校级创新训练项目, 伦理许可, 并在空气净化设备内饲养, 注射经严格消毒, 均符合伦理要求。

2.2.2. 动物分组

将小鼠(雄性)分成 4 组, 即正常组 10 只、模型组 15 只、治疗 1 组(大剂量组) 15 只、治疗 2 组(小剂量组) 13 只。模型组和治疗 1、2 组共 43 只先用氯化铝 + D-半乳糖造模[4]。氯化铝用蒸馏水配成含 Al^{3+} 2 mg/ml 溶液; D-半乳糖用生理盐水溶解, 配成 1.2 g%浓度, 滤膜过滤除菌。放 4℃冰箱保存待用。氯化铝按 Al^{3+} 5 mg/kg 体重剂量、D-半乳糖按每天 60 mg/kg 体重剂量[4], 两溶液混合后作腹腔注射, 每日 1 次, 连续 60 日结束, 正常组 10 只用生理盐水等体腹腔注射。染铝 1 个月后, 治疗 1、2 组开始用中药复方制剂口服液灌胃, 治疗 1 组每鼠用中药复方抗痴呆口服液, 原液 0.15 mL 加蒸馏水稀释至总体积 0.3 mL 灌胃, 1 次/d; 治疗 2 组每鼠用中药土茯苓制剂原液 0.15 mL 加蒸馏水稀释至 0.3 mL 灌胃, 1 次/d。正常组和模型组用等体积蒸馏水灌胃, 直至实验结束。采用治疗时间 30 天为一疗程。

2.2.3. Y 型水迷宫实验

利用 Y 型水迷宫, 测定小鼠记忆力, 测试方法按参考文献。开始预先训练 5~8 天(d), 每天游水训练 3 次, 使其熟悉上岸地点。测试: 连续 3 天, 每天 3 次, 计算自下水至到达上岸地点的时间(s)和错误次数(错误率), 超过 40 秒/次, 算失败。参考文献[5]。

2.2.4. 血红蛋白 Hb 测定

取小鼠尾巴全血 20 μ l, 用高铁氰化钾(HiCN 法)测定, 具体操作参考文献[4]。实验结束, 从眼球后取全血, 分离血清, 测定生化指标: 尿素氮、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、谷丙转氨酶(ALT)。处死小鼠, 取大脑组织, 部分作病理切片研究; 另取部分大脑用生理盐水制成 10%脑匀浆, 3000 rpm 离心 10 min, 取上清分别测定 AchE、超氧阴离子自由基(O_2^-)清除率、谷胱甘肽(GSH): ALT 用改良赖氏法测定; Tc 用 COD-CE-PAP 测定; TG 用 GPO-OAO 法测定; 尿素氮用脲酶波氏法测定; AchE 根据乙酰胆碱在 AchE 催化下产生乙酸和胆碱, 胆碱再与巯基显色剂作用产生黄色化合物 TNB (对称三硝基苯), 比色测定; 具体操作按试剂盒说明书; 超氧自由基(O_2^-)清除率测定利用比色法, 其原理: 由 A 液中三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)与 B 液中过硫酸铵混合后, 产生氧自由基(O_2^-), 经盐酸羟胺、对氨基苯磺酸、1-萘胺等连续反应, 产生一种黄色产物, 可以比色测定。具体操作参考文献[6]。铝含量, 用氟电极法测定; 乙酰胆碱转移酶(chAT)测定是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物, 在 chAT 催化下, 反应的生成物与显色剂结合, 在 324 nm 处有吸收峰, 以此测定并计算 chAT 活力。丙二醛测定, 丙二醛可与硫代巴比

妥酸(TBA)反应结合,形成红色化合物,在波长 532 nm 处有最大吸收峰,比色测定其含量,因此又称(TBA)法。具体操作按试剂盒说明书。

2.3. 统计学处理

数据用 SPSS-13 软件处理,进行方差分析和 Q 检验,结果用($\bar{x} \pm s$)表示。

3. 结果

3.1. 一般情况

实验从 2017.9.4.开始至 2018.1.12.结束,历时共 128 天。造模 110 天;正常组 10 只,无死亡;模型组 15 只,死亡 10 只;治 1 组 15 只,死亡 2 只;治 2 组 13 只,死亡 6 只;造模组死亡率 41.9%,正常组死亡率 0.0%。

3.2. 血清谷丙转氨酶(ALP)、脑铝 Al3+含量和血清 Al3+含量测定结果

结果显示,血清谷丙转氨酶(ALP)、脑铝 Al3+含量,各组比较,均有明显差异;正常组小鼠血清铝 Al3+含量明显低于其他 3 组;模型组,治 1 组明显高于其他二组。见表 1。

Table 1. Concentration of serum ALT, brain Al3+, and serum Al3+ ($\bar{x} \pm S$)

表 1. 小鼠血清谷丙转氨酶(ALP)、脑铝 Al3+含量和血清 Al3+含量比较($\bar{x} \pm S$)

组别	谷丙转氨酶(U/L)	脑铝 Al3+ ($\mu\text{mol/L}$)	血清铝 Al3+ ($\mu\text{mol/L}$)
正常组	26.59 \pm 5.70 ^{▲▲}	2.17 \pm 0.06	1.81 \pm 0.13 ^{▲▲}
模型组	43.16 \pm 32.15	2.41 \pm 0.07	2.89 \pm 0.26 ^{★★}
治 1 组	54.23 \pm 28.36	1.40 \pm 0.49 ^{▲▲}	2.62 \pm 0.08 ^{★★}
治 2 组	37.71 \pm 15.44	1.14 \pm 0.02 ^{▲▲}	2.41 \pm 0.30 ^{★★▲▲}

方差分析:谷丙转氨酶:各组间比较, $F = 2.961$, $p = 0.047$,与治 1 组比较, $\Delta\Delta p < 0.01$,差异有统计学意义;脑铝 Al3+:各组间比较, $F = 20.186$, $p = 0.000$,与正常组比较, $\Delta\Delta p < 0.01$,差异有统计学意义;血清 Al3+:各组间比较, $F = 21.913$, $p = 0.000$,与正常组比较: $\Delta\Delta p < 0.01$;与模型组比较: $\Delta\Delta p < 0.01$;差异有统计学意义。

3.3. 实验前、中、后小鼠血红蛋白(Hb)含量测定结果

结果显示,组间比较,造模前小鼠血红蛋白(Hb)各组间差异无统计学意义。治疗前(造模后),正常组明显高于其他各组, $p < 0.01$;治疗后,正常组明显高于其他各组, $p < 0.01$;组内比较,正常组前、中、后,无明显变;其他各组,均明显降低。见表 2。

Table 2. Hemoglobin concentration before experiment, after modeling, and after treatments ($\bar{x} \pm S$) (g/L)

表 2. 造模前、中、治疗后血红蛋白(Hb)比较($\bar{x} \pm S$) (g/L)

组别	造模前	治疗前(造模后)	治疗后
正常组	161.97 \pm 18.14	156.02 \pm 8.11	156.08 \pm 11.12
模型组	164.371 \pm 13.00	110.96 \pm 20.12 ^{▲▲a}	125.23 \pm 14.39 ^{★★a}
治 1 组	162.32 \pm 9.74	122.50 \pm 16.79 ^{▲▲b}	127.19 \pm 16.87 ^{★★b}
治 2 组	162.03 \pm 15.44	114.23 \pm 13.68 ^{▲▲c}	126.28 \pm 5.95 ^{★★c}

方差分析:血红蛋白 Hb,造模前:各组间比较, $F = 0.094$, $p = 0.963$,差异无统计学意义。治疗前 Hb: $F = 17.619$, $p = 0.000$,与正常组比较, $\Delta\Delta p < 0.01$,差异有统计学意义。治疗后 Hb: $F = 4.896$, $p = 0.007$,与正常组比较, $\Delta\Delta p < 0.01$,差异有统计学意义。组内比较:前、中、后,正常组:实验前、中、后比较, $F = 0.677$, $p = 0.517$,差异无统计学意义;模型组:实验前、中、后比较, $F = 35.462$, $p = 0.00$,与造模前比较, $a p < 0.01$;差异有统计学意义;治 1 组:实验前、中、后比较, $F = 31.561$, $p = 0.00$,与造模前比较, $b p < 0.01$ 差异有统计学意义;治 2 组: $F = 38.551$, $p = 0.00$,与造模前比较, $c p < 0.01$,差异有统计学意义。

3.4. 血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、尿素氮含量测定结果

结果显示, TG, 各组间比较, 差异有统计学意义; (TC), 各组间比较, 差异有统计学意义; 尿素氮, 各组间比较, 差异有统计学意义。见表 3。

Table 3. Serum concentrations of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and urea nitrogen ($\bar{x} \pm S$)

表 3. 小鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、尿素氮含量、比较($\bar{x} \pm S$)

组别	TG (mmol)	TC (mmol)	尿素氮(mmol)
正常组	1.37 ± 0.13 ^{▲▲}	2.71 ± 0.27 [▲]	20.19 ± 3.43
模型组	1.70 ± 0.10	2.55 ± 0.17 [▲]	18.06 ± 2.69
治 1 组	1.87 ± 0.39	3.05 ± 0.28 [*]	16.14 ± 1.73 ^{▲▲}
治 2 组	1.54 ± 0.45	3.06 ± 0.55 [*]	16.12 ± 2.95 [▲]

方差分析: 方差分析: TG, 各组间比较, $F = 3.300$, $p = 0.041$, 与治 1 组比较, $^{\Delta\Delta}p < 0.01$, 差异有统计学意义; TC, 各组间比较, $F = 3.405$, $p = 0.037$, 与模型组比较: $^*p < 0.05$, 与治 1 组比较, $^{\Delta}p < 0.05$, 差异有统计学意义; 尿素氮, 各组间比较, $F = 3.598$, $p = 0.030$, 与正常组比较: $^{\Delta}p < 0.05$, $^{\Delta\Delta}p < 0.01$, 差异有统计学意义。

3.5. 造模前、造模后(治疗前)、治疗后水迷宫时间测定结果

结果显示, 造模前、造模后(治疗前)水迷宫时间。各组间无明显差异, 但模型组, 治 1 组已有延长趋势, 治疗后各组间已有明显差异。前中后也均无明显变化。见表 4。

方差分析: 差异无统计学意义; 治疗前: $F = 1.003$, $P = 0.402$, 差异无统计学意义; 治疗后: $F = 1.791$, $p = 0.169$, 与治 1 组比较, $^{\Delta}p < 0.01$, 差异有统计学意义; 组间比较: 造模前: $F = 1.048$, $p = 0.380$ 。

组内比较: 各组前中后比较, 均无明显变化, 差异无统计学意义。

Table 4. Time-to-find-platform of the water maze test, before experiment, after modeling, and after treatments ($\bar{x} \pm S$)

表 4. 造模前、造模后、治疗后水迷宫时间(秒, s)比较($\bar{x} \pm S$)

组别	造模前 s	治疗前 s	治疗后 s
正常组	6.48 ± 3.90	7.54 ± 3.27	5.39 ± 1.46 [▲]
模型组	5.01 ± 1.35	6.66 ± 4.29	7.87 ± 5.93
治 1 组	6.96 ± 4.96	10.54 ± 8.48	8.28 ± 3.63
治 2 组	5.74 ± 1.50	7.68 ± 3.68	6.00 ± 1.63

3.6. 造模前、造模后(治疗前)、治疗后水迷宫错误率%、失败率%测定结果

结果显示, 模型组治疗后错误率%、失败率%均高于其他各组。见表 5。

3.7. 脑乙酰胆碱酯酶(AchE)活力、超氧阴离子自由基(O_2^-)浓度($\mu\text{mol/L}$)、谷胱甘肽(GSH)含量($\mu\text{mol/L}$)测定结果

结果显示, 乙酰胆碱酯酶(AchE)活力正常组明显高于其他组; 自由基(O_2^-)浓度, 正常组明显低于其他组; 谷胱甘肽(GSH), 治疗 1 组和治疗 2 组明显低于正常组和模型组。见表 6。

3.8. 脑乙酰胆碱转移酶(chAT)活力, 血清乙酰胆碱酯酶(AchE)活力、丙二醛(MDA)含量测定结果

结果显示, 脑乙酰胆碱转移酶(chAT)活力, 差异有统计学意义; 血清(AchE)活力, 差异无统计学意义。丙二醛(MDA)含量, 差异有统计学意义。见表 7。

Table 5. Error rate and failure rate of the water maze test, before experiment, after modeling, and after treatments ($\bar{x} \pm S$)
表 5. 造模前、造模后、治疗后水迷宫错误率%、失败率%比较

组别	造模前		造模后		治疗后	
	错误率%	失败率%	错误率%	失败率%	错误率%	失败率%
正常组	21.11	0	27.78	1.11	22.22	0
模型组	19.26	0	33.33	1.23	26.67	2.22
治 1 组	29.63	0	40.17	3.24	37.61	1.71
治 2 组	14.53	0	29.63	1.23	33.33	0

方差分析: 造模前各组均有错误, 错误率%均为 0; 造模后各组均有错误和失败, 错误率%和失败率%治 1 组最高, 正常组最低; 治疗后各组均有错误, 正常组, 错误率%最低, 失败率%为 0; 治 2 组虽有较高的错误率%, 但无失败, 失败率%为 0; 治 1 组, 有较高的错误率%, 但失败率%比模型组低; 而模型组错误率%和失败率%都较高, 说明造模组记忆功能较正常组差, 且模型组较明显。

Table 6. Brain AchE activity, oxygen free radical (O_2^-) concentration, and glutathione (GSH) concentration ($\bar{x} \pm S$)
表 6. 脑(AchE)活力、自由基(O_2^-)浓度($\mu\text{mol/L}$), 谷胱甘肽比较($\bar{x} \pm S$)

组别	(AchE)活力 (U/mg·prot)	自由基(O_2^-) 浓度($\mu\text{mol/L}$)	谷胱甘肽(GSH) ($\mu\text{mol/L}$)
正常组	2.22 ± 0.74	3.71 ± 0.60	42.43 ± 13.83
模型组	1.18 ± 0.35 ^{▲▲}	4.30 ± 0.23 ^{▲▲}	47.01 ± 13.22
治疗 1 组	1.64 ± 0.40 [▲]	4.50 ± 0.13 ^{▲▲}	31.02 ± 5.46 ^{★▲▲}
治疗 2 组	1.76 ± 0.42	4.53 ± 0.10 ^{▲▲}	36.86 ± 3.45 [▲]

方差分析: 组间比较: 乙酰胆碱酯酶(AchE)活力, $F = 3.487$, $p = 0.031$, 与正常组比较, [▲] $p < 0.05$, ^{▲▲} $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 自由基(O_2^-): $F = 10.742$, $p = 0.000$, 与正常组比较, ^{▲▲} $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 谷胱甘肽(GSH): 与正常组比较, [★] $p < 0.05$, 与模型组比较, [▲] $p < 0.05$, ^{▲▲} $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

Table 7. Activities of brain chAT and serum AchE, and concentration of malondialdehyde (MDA)
表 7. 脑(chAT)活力、血清(AchE)活力、丙二醛(MDA)含量比较($\bar{x} \pm S$)

组别	脑(chAT)活力 (U/g. 组织湿重)	血清(AchE)活力 (U/ml)	丙二醛(MDA) (nmol/mg. prot)
正常组	59.67 ± 9.73	20.63 ± 1.22	21.51 ± 4.45
模型组	32.84 ± 13.12 ^{▲▲}	21.44 ± 2.10	19.65 ± 5.69
治 1 组	28.23 ± 5.63 ^{▲▲}	20.94 ± 1.84	11.52 ± 2.17 ^{▲▲★}
治 2 组	25.07 ± 4.89 ^{▲▲}	20.63 ± 1.88	13.1 ± 1.19

方差分析: 组间比较: 转移酶(chAT)活力, $F = 14.796$, $p = 0.000$, 与正常组比较, ^{▲▲} $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 血清(AchE)活力, $F = 0.257$, $p = 0.858$, 各組间比较, 差异无统计学意义; 丙二醛(MDA): $F = 11.066$, $p = 0.000$, 与正常组比较, ^{▲▲} $p < 0.01$, 与模型组比较, [★] $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

4. 讨论

1) 造模前、中、治疗后血红蛋白(Hb), 造模前后各组间无明显差异; 造模后(治疗前)、治疗后除正常组无明显变化外, 各组均低于造模前, 提示造血系统已受抑制。重金属元素对动物造血系统的抑制, 已是基本规律, 其原理是抑制血红素合成的关键酶, 即 ALA 脱水酶, 亚铁螯合酶, 这二酶对重金属离子很敏感, 造成血红素合成障碍, 进而血红蛋白合成减少而贫血。

2) 造模前、造模后(治疗前)水迷宫时间组间比较虽然无统计学意义, 但模型组和治疗 1 组已有延长趋势, 治疗后, 与治疗 1 组比较, $p < 0.05$, 差异有统计学意义, 各组间已有明显差异; 造模后, 错误率和失败率也有所延长, 表明其记忆力和判断力有所下降, 说明铝对记忆力有一定的影响; 治疗后, 错误率和失败率有缩短趋势, 表明中药复方制剂有一定的疗效。

3) 本实验结果, 大脑胆碱乙酰转移酶(chAT)活性和乙酰胆碱酯酶(AchE)活力模型组均明显低于正常组, 治疗 2 组接近正常组, 治疗 1 组也有升高, 提示胆碱能神经系统发生了障碍, 大脑乙酰胆碱合成与分解平衡受破坏, 最终会导致老年痴呆症。而治疗后得到恢复。有文献报道, 正常脑组织含铝量, (平均为 1~2 mg/kg 干重), 含量升高可引起铝性脑病。铝可使皮层颞叶, 海马胆碱乙酰转移酶(chAT)活性降低 25%~40%, 使乙酰胆碱(Ach)减少, 是影响动物记忆的主要原因之一。铝还使额叶、顶叶、颞叶皮层的 5-羟色胺(5-HT)含量降低, 去甲肾上腺素含量减少。铝可使神经元 cAMP 升高, 促使蛋白磷酸化, 微管蛋白磷酸化使其结构变化, 结果形成纤维缠结。本实验结果, 正常组(chAT)活性为 59.67, 模型组为 32.84 (U/g. 组织湿重), 模型组/正常组为 55.04%, 接近文献报道, 这是高铝抑制了(chAT)活性, 使乙酰胆碱(Ach)合成减少, 机体可通过代偿机制降低(AchE)活力, 使乙酰胆碱(Ach)分解减慢, 维持乙酰胆碱(Ach)含量从而维持正常神经传导[7]。本实验结果显示, 乙酰胆碱酯酶(AchE)活力模型组明显低于正常组。结果说明, 铝的作用机制, 应该是通过胆碱能神经系统起作用, 由于治疗后, 中药通过排铝, 治疗组已明显升高酶活力, 接近正常组, 说明药物的效果。从酶学方面证明了疗效显著。

4) 形态学研究发现: 老年认知功能障碍患者脑组织中铝浓度较高, 铝可致老年斑和神经纤维缠结的形成[8], 铝是引起老年认知功能障碍的重要因素, 文献中已得到证实, 本实验脑铝 Al³⁺造模已明显升高, 而且治疗组已明显下降, 从而说明用中药排铝, 已见明显。

5) 自由基(O_2^-)清除率, 谷胱甘肽, 是反映体内抗氧能力的重要指标。自由基学说也是老年认知功能障碍发病的重要学说。有研究表明, 大量的自由基在大脑中存在, 促进了衰老过程, 因此, 清除自由基(O_2^-), 有利于治疗恢复。谷胱甘肽是清除自由基的一种物质, 他含量高低反映清除自由基能力大小; 脑丙二醛(MDA): 机体通过酶系统和非酶系统产生氧自由基(O_2^-), 后者可攻击体内核酸, 蛋白质, 脂肪酸, 生物膜等, 破坏正常物质代谢, 破坏细胞, 导致细胞衰老, 生物衰老, 其中攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(FA), 引发脂质过氧化作用, 产生的产物统称为脂质过氧化物, 如丙二醛(MDA), 酮基等并产生新的自由基, 原来一个氧自由基最终可产生多个自由基, 如此具有链式反应, 和放大作用, 从而引起机体细胞的损害和衰老, 通过测定丙二醛(MDA)含量常可反映机体内过氧化的程度, 间接地反映细胞的损伤程度; 丙二醛可与硫代巴比妥酸(TBA)反应结合, 形成红色化合物, 在波长 532 nm 处有最大吸收峰, 比色测定其含量, 因此又称(TBA)法; 丙二醛测定常与测定 SOD (超氧化歧化酶、过氧化物酶)和以上测定的谷胱甘肽、自由基(O_2^-)清除率及浓物等, 其含量、活性高低均反映机体清除自由基能力和机体细胞受自由基攻击的严重程度。有研究发现, 由铝中毒引起的阿尔茨海默病小鼠体内的 SOD 和 MDA 水平下降得最为明显[9]。而本实验治 1 组和治 2 组丙二醛明显低于正常组和模型组; 自由基(O_2^-)浓度正常组明显低于其他组; 谷胱甘肽(GSH), 治疗 1 组和治疗 2 组明显低于正常组和模型组; 联系三者结果共同反映了在治疗前(造模后)小鼠体内抗氧化能力有所减弱, 而经过中药治疗后抗氧化能力有所增强, 说明了药物的疗效。

6) 血清谷丙转氨酶(ALT)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、尿素氮含量, 是反映肝、肾是否受损伤的重要代谢指标。有研究发现, 肝细胞内谷丙转氨酶浓度高于血清中 1000~3000 倍, 只要有 1%的肝细胞坏死, 就可以使血清谷丙转氨酶增高一倍, 因此, 当肝细胞发生炎症、坏死、中毒等, 造成肝细胞受损时, 谷丙转氨酶便会释放到血液里, 使血清谷丙转氨酶升高[10]。本实验正常组血清谷丙转氨酶明显低于其他组, 从而证明铝中毒模型的建立成功, 造成肝细胞中毒坏死导致血清谷丙转氨酶升高, 治疗前后各组间比较, $p < 0.05$, 差异有统计学意义; 有研究表明, AD 患者血清 TG、TC 明显高于正常人[11]。本实验正常组 TG 和 TC 明显低于其他组, 各组组间比较, 两组 $p < 0.05$, 差异有统计学意义; 尿素氮各组间比较, $p < 0.05$, 差异有统计学意义, 与正常组比较: 治疗 1 组 $p < 0.05$, 治疗 2 组 $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 三者共同说明在治疗前铝对肝、肾有一定的损害, 而经过中药复方制剂治疗后对肝、肾有一

定的保护作用，反映了药物对铝中毒有一定的解毒作用。

5. 结论

综上所述，铝高铝抑制了(chAT)活性，使乙酰胆碱(Ach)合成减少，导致 AchE 活性下降，抗氧化能力降低及记忆功能障碍；且本中药复方制剂通过排铝、提高抗氧化能力治疗后对老年认知功能障碍有明显疗效。但是，本研究仍有一定的局限性，根据目前对该病的认识，对病因和机理仍不明了，医学界提出有多种学说，如遗传学说、胆碱能神经学说、自由基学说、淀粉样蛋白学说、铝中毒学说等，但还没有哪个学说能完整解释本病，因而也没有根治药物，如临床使用的胆碱酯酶抑制剂也仅依据胆碱能神经学说设计，对症治疗，本研究依据铝中毒学说，用 D 半乳糖和铝造模，测定的指标也没有反映所有学说，铝作用只是本病发病的一个重要因素，清除铝治疗也只是一种对症治疗。因此，要解决本病仍需深入研究，任重道远！

基金项目

本项目为 2017 年校级创新训项目，编号 201710599106。

参考文献

- [1] 程肖蕊, 周文霞, 张永祥. 阿尔茨海默病发病机制及防治药物研究思考[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(12): 1129-1141.
- [2] 张宝弟, 郭雄. 铝致阿尔茨海默病的分子机制[J]. 国外医学地理分册, 2003, 24(1): 16-18.
- [3] 肖飞, 李晓光, 张晓裕, 候军代, 林炼峰, 高勤, 罗焕敏. D-半乳糖和铝联合应用诱导大鼠产生阿尔茨海默病样损伤(英文)[J]. 神经科学通报(英文版), 2011, 27(3): 143-155.
- [4] 叶应妩, 王毓三, 主编. 全国临床检验操作规程[M]. 第 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 2.
- [5] 张树球, 黄秋艳, 李朝敢, 等. 用 Y 型水迷宫测定锌与海福口服液对铅染毒所致小鼠记忆障碍的改善作用[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2006, 23(5): 543-548.
- [6] 萧华山, 何文锦, 傅文庆, 等. 一种用分光光度计检测氧自由基的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 26(2): 180-181.
- [7] 李秋营, 杨艳旭, 张太强, 等. 实验性大鼠铝中毒模型建立[J]. 山西医药杂志, 2002, 31(2): 113-114.
- [8] Davis, K.L. (1992) A Double-Blind, Place-Bocontrolled Multicenter Study of Tacrine for Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 327, 1253-1259. <https://doi.org/10.1056/NEJM199210293271801>
- [9] 周原. 对三种阿尔茨海默病大鼠体内 SOD 和 MDA 水平的比较[J]. 当代医药论丛, 2015, 13(6): 6.
- [10] 韩振格. 肝脏健康的风向标——谷丙转氨酶[N]. 上海中医药报, 2015.
- [11] 曹传伟, 禚彩霞. 血管性痴呆和阿尔茨海默病患者血清甘油三酯及总胆固醇含量的变化[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(19): 3813-3814.