

The Curative Effect of HaierFu Liquid on Alzheimer's Disease by Aluminum Lead Poisoned Mice

Fengzhen Zhao*, Na Wang, Simei Huang, Yanmei Lu, Hai Li, Shuqiu Zhang, Yun Ma, Sheng He#

Heavy Metals and Fluorine and Arsenic Toxicology Research Laboratory of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise Guangxi

Email: #sqzhang224@163.com

Received: Mar. 25th, 2015; accepted: Apr. 15th, 2015; published: Apr. 20th, 2015

Copyright © 2014 by authors 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

Abstract

Objective: To explore the curative effect of HaierFu liquid on Alzheimer's disease by aluminum lead poisoned mice. **Methods:** 48 Kunming white mice were divided into 4 groups: normal group, model group, treated group 1 and treated group 2. There were 12 rats in each group. Mice of the later three groups were fed with $AlCl_3$ and $Al(NO_3)_3$ for three months to make aluminum lead poisoned mice model. After being poisoned two months, mice of treated group 1 and treated group 2 were poured with different dosages of Chinese medicine—HaierFu liquid for one month, and mice of normal group and model group were poured with equal pure water at the same time. Blood Hemoglobin (Hb) was determined before and after experiment, and biochemical indices of serum and brain tissue were determined at the end of experiment. **Result:** The vitality of TchE in brain tissue of model group was obviously lower than that of other groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). However, the content of MDA in brain tissue of model group was obviously higher than that of treated group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and for the clearance rate of oxygen-free radicals, normal group was the highest while model group was the lowest. There was no obvious difference of Hb and Tc in serum, and ALT in serum among each group. **Conclusion:** The vitality of TchE in brain tissue and the clearance rate of oxygen-free radicals in Alzheimer's disease by aluminum lead poisoned mice were obviously decreased; HaierFu liquid have an obvious curative effect on Alzheimer's disease by aluminum lead poisoned mice.

Keywords

Aluminum, Alzheimer's Disease, The Brain Nerve Regeneration, HaierFu Liquid

*第一作者。

#通讯作者。

海尔福治疗对铝造模阿尔茨海默病小鼠大脑神经损害后再生效果的研究

赵凤珍^{*}, 王娜, 黄斯梅, 陆艳梅, 李海, 张树球, 马允, 何胜[#]

右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室, 广西百色

Email: sqzhang224@163.com

收稿日期: 2015年3月25日; 录用日期: 2015年4月15日; 发布日期: 2015年4月20日

摘要

目的: 探讨铝造模阿尔茨海默病小鼠大脑神经损害后, 海尔福口服液对其再生的治疗效果。**方法:** 选用昆明种小白鼠48只, 随机分为4组: 正常组、模型组、治疗1组、治疗2组, 每组12只。后3组用氯化铝和硝酸铝喂养3个月, 复制铝染毒动物模型。染毒2个月后, 治疗1组、治疗2组分别用大、小不同剂量的中药海尔福口服液灌胃治疗1个月, 正常组和模型组用等体积的蒸馏水灌胃对照。测定实验前和试验后的血红蛋白(Hb)。实验结束后, 分别测小鼠血清和脑匀浆的各项生化指标。并取部分大脑用10%甲醛溶液固定后, 作病理检查, 对比分析。**结果:** 模型组脑匀浆乙酰胆碱酯酶(TChE)活性明显低于其他三组, ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而模型组脑匀浆丙二醛(MDA)却显著高于治疗组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 氧自由基清除率正常组最高, 模型组最低。大脑病理检查结果显示, 铝中毒模型组的光镜结构, 大脑皮质分层不清楚, 外颗粒层颗粒和内颗粒细胞数量明显减少, 胞质的尼氏体也减少且体积变小。有较多的神经元萎缩、变性; 治疗组的病理改变得到很好改善, 颗粒细胞数量增多, 神经元胞质尼氏体也数量增多体积增大, 其中治疗2组病理改变得到改善较明显。**结论:** 铝致阿尔茨海默病小鼠脑组织TChE活性和氧自由基清除率明显下降, 大脑神经元受损害, 海尔福口服液治疗后明显好转。

关键词

铝, 阿尔茨海默病, 大脑神经再生, 海尔福口服液

1. 引言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种严重的中枢神经系统退行性疾病, 严重损害患者的认知功能, 造成生活自理能力的障碍和精神行为的异常。阿尔茨海默病已成为严重威胁老年人健康的四大疾病之一, 但目前阿尔茨海默病的病因学和发病机制尚不清楚[1] [2], 提出有多种学说, 而且尚无根治药物, 该领域已成为当今世界研究的热点之一。流行病学调查结果表明, 我国是世界上阿尔茨海默病患者最多的国家[3]。很多学者研究发现, 阿尔茨海默病患者神经原纤维缠结、老年斑、神经元减少等大脑病理改变, 而其他器官极少发现病理改变, 同时发现老年斑中有大量的铝沉积, 从而提出了阿尔茨海默病发病机理中的铝中毒学说, 并用铝制剂来复制阿尔茨海默病的动物模型[4] [5]。虽然如此, 许多学者认为铝与阿尔茨海默病的关系尚缺乏直接的依据。国内有学者用中药试验治疗该病, 取得了一些效果。为进一步探讨该病大脑病理改变及中药治疗对神经损伤后的再生效果, 本实验用氯化铝和硝酸铝来复制小白鼠的阿尔茨海默病模型, 并用中药海尔福口服液进行灌胃治疗, 测定治疗后的生化指标变化及大脑病理改变, 并对比分析。现将实验结果报告如下。

2. 试剂与方法

2.1. 试剂

氯化铝、硝酸铝、氯化钠、高铁氰化钾、氰化钾、磷酸二氢钾、Triton-100、盐酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸羟氨、过硫酸铵、对氨基苯磺酸钠、1-萘胺、正丁醇、乙醇、甲醛,均为国产分析纯。乙酰胆碱酯酶(TchE)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒,分别购自四川成都迈克试剂有限公司和南京建成生物工程研究所。

2.2. 中药

海尔福口服液,用金银花、茯苓、甘草等中药提取制成,由本院海尔福研制中心提供。

2.3. 动物

60只小白鼠,昆明种,健康,鼠龄二个月,雌雄各半,体重25~35g/只。由学院动物室提供,动物实验许可证SYXK桂2011-0010,动物生产许可证号:SCXK桂2012-0003。

2.4. 动物实验

动物分组,将小鼠分成四组:正常组、模型组、治疗1组、治疗2组,每组15只,随机分组,雌雄各半,分开喂养,每笼5只。染毒:后三组用16g/L氯化铝拌饲料喂养,按22mg/只/d剂量,饲料6g/只/d。用0.2g/L硝酸铝,使其自由饮用。连续三个月。染毒2个月后,治疗1组用0.15ml/只海尔福口服液原液,蒸馏水稀释至0.3ml/只灌胃,治疗2组用0.05ml/只海尔福口服液原液,蒸馏水稀释至0.3ml/只灌胃,每日一次,连续一个月。模型组和正常组用等体积蒸馏水灌胃。

2.5. 测定方法

TchE根据乙酰胆碱在TchE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操作参考试剂盒说明书;O₂⁻清除率测定利用比色法,具体操作详见参考文献[6]。

2.6. 统计学处理

数据利用SPSS(13.0版)软件统计处理。方差分析,Q检验。结果用($\bar{x} \pm S$)表示。

2.7. 实验分工

实验由张树球、赵凤珍、何胜负责设计,赵凤珍、王娜、黄斯梅、陆艳梅、张树球参加实验,马允指导实验,李海负责病理检查,赵凤珍负责数据统计处理,实验在右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室进行。

3. 结果

3.1. 实验小鼠60只

全部参加统计。

3.2. 器官病理检查结果

铝中毒实验镜下正常组、铝中毒模型组和治疗组的光镜正常和病理改变的特点:取小鼠大脑中央前回的皮质石蜡包埋切片,HE染色,光镜放大200倍观察。大脑皮质1照片为对照组的光镜结构,可见对照组的大脑皮质的分子层、外颗粒层、外锥体层和内颗粒光镜层分界清楚,颗粒细胞数量较丰富,胞质

的尼氏体数量较多(图 1)。大脑皮质 2 照片为铝中毒模型组的光镜结构, 大脑皮质分层不清楚外颗粒层颗粒和内颗粒细胞数量明显减少, 胞质的尼氏体也减少数量少且体积变小。有较多的神经元萎缩、变性(图 2)。大脑皮质 3、4 照片分别为治疗 1 组和治疗 2 组的大脑皮质照片(图 3、图 4)。从中可见治疗组的病理改变得到很好改善, 颗粒细胞数量增多, 神经元胞质尼氏体也数量增多体积增大, 其中治疗 2 组病理改变得到改善较明显。

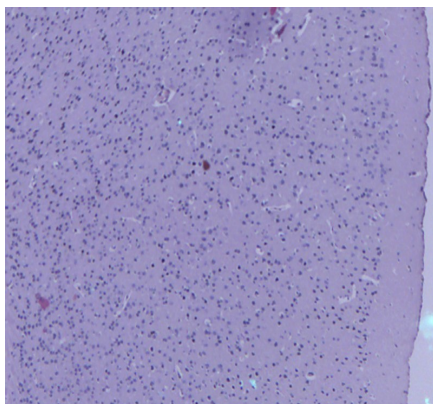


Figure 1. Normal group (×100)
图 1. 正常组(×100)

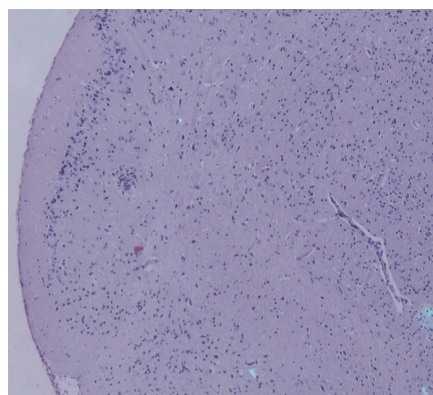


Figure 2. Model group (×100)
图 2. 模型组(×100)

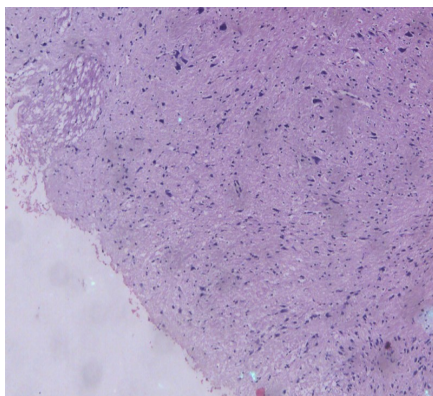


Figure 3. Treated group 1 (×100)
图 3. 治 1 组(×100)

3.3. 脑匀浆乙酰胆碱酯酶 TChE、丙二醛(MDA)含量、O₂⁻清除率测定结果

结果显示, TChE 模型组明显低于其他三组, 差异有统计学意义($\Delta P < 0.05$ 或, $\Delta\Delta P < 0.01$); 丙二醛(MDA)模型组却明显高于治疗组, 差异有统计学意义($\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$), 正常组也较高; O₂⁻清除率, 正常组最高, 模型组最低, 差异有统计学意义($\Delta\Delta P < 0.01$) (见表 1)。

4. 讨论

阿尔茨海默病模型小鼠模型组脑组织乙酰胆碱酯酶(TChE)活性明显降低, 正常组 TChE 活性明显高于模型组($P < 0.01$), 治疗组 TChE 活性也明显高于模型组($P < 0.05$)。正常基底前脑的胆碱能神经元合成大量乙酰胆碱经投射纤维输送至大脑皮质和海马, 乙酰胆碱被认为与学习和记忆有关[1][2], 而海马是学习和记忆的解剖基础。发生阿尔茨海默病时基底前脑区的胆碱能神经元丢失, 造成乙酰胆碱的合成、储存、释放减少, 从而导致以识别和记忆功能障碍为主的多种临床表现[6]。经测定发现, 阿尔茨海默病患者大脑细胞中铝含量是正常者的数倍, 由此推测阿尔茨海默病与铝中毒有密切关系。本实验表明, 铝中毒所致的阿尔茨海默病模型小鼠 TChE 明显下降, 而海尔福治疗后各组 TChE 有明显升高, 与正常组接近。海尔福口服液有促进金属排泄的功能, 其机理可能是中药植物中的有机酸与金属离子络合而加速其排泄, 从而表现出对铝中毒模型阿尔茨海默病的解毒功能。

正常情况下, 人体氧化代谢过程中产生低浓度生理范围的自由基, 但若产生过多或清除能力减弱, 就会对机体造成伤害。铝中毒时脑组织受到损伤, 导致大脑对氧自由基的清除能力下降, 大量自由基在脑内淤积, 损伤生物膜造成细胞内环境紊乱, 导致细胞老化、死亡; 损伤脂类产生过氧化, 过氧化脂类分

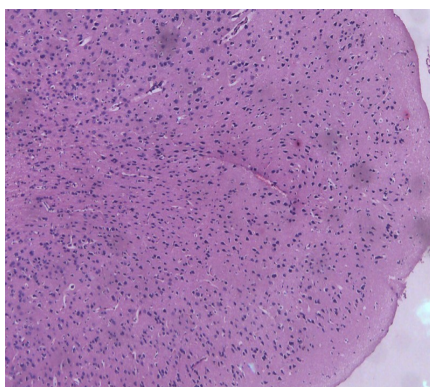


Figure 4. Treated group 2 (×100)
图 4. 治 2 组(×100)

Table 1. Compare the TChE of spinal cord homogenate, MDA content and O₂⁻ clearance rate
表 1. 脑匀浆乙酰胆碱酯酶 TChE, 丙二醛(MDA)含量, O₂⁻氧自由基清除率比较

组别	TChE (U/mg·prot)	MDA (nmol/mg·prot)	O ₂ ⁻ 清除率(%)
正常组	2.00 ± 0.37	1.82 ± 0.26	16.11 ± 2.75
模型组	1.37 ± 0.18 $\Delta\Delta\Delta\star\star$	1.94 ± 0.33	4.90 ± 1.72 $\Delta\Delta\star\star\star\star$
治1组	1.85 ± 0.14	1.26 ± 0.18 $\Delta\Delta\star\star$	10.83 ± 1.46 $\Delta\Delta$
治2组	1.75 ± 0.19	1.49 ± 0.17 $\Delta\star$	8.29 ± 1.51 $\Delta\Delta\star$

方差分析: TChE, 与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与治 1 组比较, $\star P < 0.05$, 与治 2 组比较, $\Delta P < 0.05$; MDA, 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与正常组比较, $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$; O₂⁻清除率, 与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与治 1 组比较, $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$, 与治 2 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

解时可产生丙二醛等醛类，这些醛类与磷酸及蛋白质结合形成脂褐素，沉积于脑导致智力障碍[7]。本实验中，用海尔福治疗后脑组织丙二醛明显低于模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，而氧自由基清除率显著高于模型组($P < 0.01$)，说明治疗后脑组织抗氧化能力明显增强。病理检查显示，铝中毒组(模型组)大脑组织受到损伤，导致大脑乙酰胆碱酯酶(AChE)活性明显降低[8]，对氧自由基的清除能力下降，结构改变导致功能改变，这是符合的，而治疗后这些改变明显减轻，特别是大剂量组更明显，体现了量效关系。

血红蛋白，血清 TC、ALT 含量各组差异无显著性($P > 0.05$)，但血清 TG 治疗组却显著低于模型组($P < 0.01$)，治疗 1 组尿素也有明显的下降($P < 0.05$)。

以上综合分析，海尔福口服液对铝染毒致阿尔茨海默病模型小鼠有较明显的治疗作用。

基金项目

广西自然科学基金课题，桂科自 0991282，桂科自 0499013。

参考文献 (References)

- [1] 张宝第, 郭雄 (2003) 铝致阿尔茨海默病的分子机制. *国外医学地理分册*, **1**, 57-59.
- [2] 常艳, 薛毅珑 (2004) 阿尔茨海默病的发病机制及其研究进展. *中国临床康复*, **4**, 693-695.
- [3] 韩红伟, 李渡华, 张德英, 等 (2004) 中医药治疗老年性痴呆症的研究进展. *浙江中医杂志*, **11**, 498-499.
- [4] 刘如臣 (2000) 铝中毒与 ALZHEIMER 病及其治疗药物. *山东医药工业*, **2**, 22-23.
- [5] 韦小敏, 陆进培, 王清海, 等 (1999) 电解铝作业对工人神经功及微量元素的影响. *广西预防医学*, **5**, 257-259.
- [6] 萧华山, 何文锦, 傅文庆, 等 (1999) 一种用分光光度计检测氧自由基的新方法. *生物化学与生物物理进展*, **2**, 180.
- [7] 马允, 张树球, 梁月秀, 等 (2005) 乌圆补血口服液对拟老年性痴呆症小鼠乙酰胆碱酯酶的影响. *中国临床康复*, **44**, 94-96.
- [8] 何胜, 黄杰林, 李佩蕾, 等 (2014) 中药对老年性痴呆症小鼠干预作用. *中国公共卫生*, **4**, 448-450.