

茯苓和首乌龙眼口服液对老年痴呆症(AD)小鼠模型治疗效果的实验研究

杨娟¹, 陈源嘉¹, 林秋霞¹, 梅金钰², 何胜¹, 陈菊芳³, 张树球², 杨梅春⁴, 龙奇军^{5*}

¹右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室, 广西 百色

²广西百色清醒科技有限公司, 广西 百色

³百色市人民医院神经科, 广西 百色

⁴右江民族医学院附属医院, 广西 百色

⁵右江民族医学院, 广西 百色

Email: *longqijun248@163.com

收稿日期: 2020年11月5日; 录用日期: 2021年1月5日; 发布日期: 2021年1月14日

摘要

目的: 研究中药茯苓水提液对老年痴呆症(AD)小鼠模型治疗效果并与复方何首乌口服液对比较。方法: 首先建立AD模型。用17.78%氯化铝 + 1.2% D-半乳糖 + 0.9%亚硝酸钠混合给小鼠腹腔注射造模二个月, 然后用两种中药分别灌胃治疗二个实验组, 20天结束。测定实验前、中、后的血红蛋白, 用水迷宫试验测定小鼠记忆力前、中、后的变化。结束, 取血测定血清生化指标, 处死小鼠, 取大脑, 用生理盐水制成10%脑匀浆, 测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、胆碱酯酶(AchE)、胆碱乙酰基转移酶(chAT)等。结果: 正常对照组、模型对照组、实验(治疗1, 茯苓组)1组、实验(治疗2, 桂元复方组)2组依次排列, 脑自由基(\bar{O}_2), $19.12 \pm 3.03^{▲▲}$, 5.48 ± 5.36 , $16.64 \pm 2.65^{▲▲}$, $14.95 \pm 1.87^{▲▲★}$ (清除率%), $F = 17.750$, $P = 0.000$, 差异有显著性意义; (GSH-px); 脑(GSH-px), $45.20 \pm 4.42^{▲▲★}$ 、 $43.56 \pm 8.73^{▲▲★}$ 、 51.61 ± 3.46 、 54.14 ± 4.51 (活力/ml) $F = 6.065$, $P = 0.004$, 差异有显著性意义; 脑(chAT)活力, $53.94 \pm 24.09^{★▲▲}$ 、 $15.15 \pm 5.91^{▲▲}$ 、 $62.15 \pm 29.94^{★▲▲}$ 、 $94.85 \pm 33.12^{★★}$ (U/g组织湿重), $F = 9.544$, $P = 0.000$, $★P < 0.05$, $★★P < 0.01$, 差异有显著性意义; 脑(AchE)活力为 1.00 ± 0.21 、 1.12 ± 0.19 、 1.17 ± 0.28 、 1.06 ± 0.29 (U/mg·prot), $P > 0.05$, 差异无显著性意义; 水迷宫试验游水时间比较, 正常对照组前、中、后差异无统计学意义; 其余三组, 造模后均明显延长, 治疗后, 模型对照组延长, 实验1组、实验2组有一定程度缩短; 血红蛋白(Hb)含量, 正常对照组、模型对照组无明显变化, 治疗两组均有升高。治疗后血清甘油三酯、尿素氮、总蛋白、(ALT/GPT)酶活力, 各组间均有一定程度变化。结论: 造模各组记忆力均明显下降, 治疗后明显升高, 疗效显著。

关键词

老年痴呆症, 中药茯苓口服液, 抗氧化能力, 乙酰胆碱转移酶(chAT)

*通讯作者。

Experimental Study on the Effect of Tuckahoe and Shouwulongyan Oral Liquid on Alzheimer's Disease (AD) Mouse Model

Juan Yang¹, Yuanjia Chen¹, Qiuxia Lin¹, Jinyu Mei², Sheng He¹, Jufang Chen³, Shuqiu Zhang², Meichun Yang⁴, Qijun Long^{5*}

¹Heavy Metal and Arsenic Fluoride Research Laboratory, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise Guangxi

²Guangxi Baise Sober Technology Co., LTD., Baise Guangxi

³Department of Neurology, People's Hospital of Baise, Baise Guangxi

⁴Youjiang Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise Guangxi

⁵Youjiang Medical University for Nationalities, Baise Guangxi

Email: *longqijun248@163.com

Received: Nov. 5th, 2020; accepted: Jan. 5th, 2021; published: Jan. 14th, 2021

Abstract

Objective: To study the therapeutic effect of traditional Chinese medicine Fuling water extract on Alzheimer's disease (AD) mouse model and compare it with compound *Polygonum multiflorum* oral liquid. **Methods:** AD model was first established. The mice were intraperitoneally injected with 17.78% aluminum chloride + 1.2% D-galactose + 0.9% sodium nitrite for two months, and then the two experimental groups were treated by gavage with two kinds of traditional Chinese medicine respectively, ending with 20 days. Hemoglobin levels were measured before, during, and after the experiment, and memory changes were measured before, during, and after the water maze test. In the end, blood was taken to measure serum biochemical indexes, mice were sacrificed, brains were taken, 10% brain homogenate was prepared with normal saline; glutathione peroxidase (GSH-PX), cholinesterase (AChE), choline acetyltransferase (chAT) and so on were measured. **Results:** Normal control group, model control group, experimental group (treatment 1, *Poria cocos* group) 1, experimental group (treatment 2, Guiyuan compound group) 2 were arranged in order; brain free radical (\bar{O}_2), $19.12 \pm 3.03^{\Delta\Delta}$, 5.48 ± 5.36 , $16.64 \pm 2.65^{\Delta\Delta}$, $14.95 \pm 1.87^{\Delta\Delta\star}$ (clearance rate %), $F = 17.750$, $P = 0.000$, the difference was significant; (gsh-px); brain (GSH-PX), $45.20 \pm 4.42^{\Delta\Delta\star}$, $43.56 \pm 8.73^{\Delta\Delta\star}$, 51.61 ± 3.46 , 54.14 ± 4.51 (vitality/mL) $F = 6.065$, $P = 0.004$. Brain (chAT), $53.94 \pm 24.09^{\Delta\Delta\star}$, $15.15 \pm 5.91^{\Delta\Delta}$, $62.15 \pm 29.94^{\Delta\Delta\star}$, $94.85 \pm 33.12^{\Delta\Delta\star}$ (U/g tissue wet weight), $F = 9.544$, $P = 0.000$, $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$, there was significant difference; AChE activity of brain (AChE) was 1.00 ± 0.21 , 1.12 ± 0.19 , 1.17 ± 0.28 , 1.06 ± 0.29 (U/mm²-prot), $P > 0.05$, with no significant difference. Compared with the water maze test, there was no statistically significant difference between the control group before, during and after the test. In the other three groups, it was significantly prolonged after modeling. After treatment, it was prolonged in the model control group and shortened to a certain extent in experimental group 1 and experimental group 2. The hemoglobin (Hb) content in the normal control group and the model control group showed no significant changes, and it increased in both treatment groups. After treatment, serum triglyceride, urea nitrogen, total protein and enzyme activity (ALT/GPT) were changed to

some extent between each group. Conclusion: Memory decreased significantly in each group, and increased significantly after treatment.

Keywords

Alzheimer's Disease, Oral Liquid of Traditional Chinese Medicine *Poria cocos*, Antioxidant Capacity, Acetylcholine Transferase (chAT)

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

老年性痴呆症即阿尔茨海默病(AD) [1], 是德国医生阿尔茨海默首先描述的一个疑难疾病, 它是大脑与记忆功能有关的神经系统退行性变化引起的认知能力迅速减退的病症, 其发病原因还没有完全研究清楚, 发病过程相当复杂, 提出有多个学说, 如遗传学说、神经衰老学说、胆碱能学说、 β -淀粉样蛋白沉淀学说、铝中毒学说等, 尚处在学说阶段, 因而尚无根治药物。本病在老年人中发病率较高, 现在进入老龄化社会, 本病尤为突出, 给国家和个人都造成极大的负担, 也给老年人生活带来诸多的不方便, 因而引起各国政府的高度关注。本课题组曾用铝或 D-半乳糖 + 亚硝酸钠建立小鼠模型, 并用中药治疗, 虽获得较好的效果, 但有些指标并非十分满意, 机理也还不清楚, 因此还需继续深入研究。现将铝 + D-半乳糖 + 亚硝酸钠, 混合腹腔注射[2], 用两种不同配方的中药口服液治疗, 对比治疗效果。现将结果报道如下。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 中药

桂圆、首乌、薏米、茯苓、白木耳等干品。由广西百色清醒科技有限公司研究中心实验室分别研制。中药经水提醇沉, 浓缩, 乙醇沉淀, 过滤去沉淀物, 去乙醇, 定容, 等精制步骤, 装瓶, 灭菌, 待用。配制成茯苓抗痴呆 1 号口服液, 由茯苓、薏米、白木耳等组成抗痴呆 1 号(专利号 201210339742.8) (供治疗 1 组用); 桂圆首乌抗痴呆 2 号(专利申请号: 201210015422.7)口服液, 桂圆首乌中药组成(供治疗 2 组用)。

2.1.2. 药品

各种测试盒, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、胆碱乙酰基转移酶(chAT)、胆碱酯酶(AchE)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、尿素氮、丙氨酸氨基转移酶等试剂盒, 购自成都迈克试剂公司和南京建成生物工程研究所有限责任公司。硝酸铝、三氯化铝、硝酸钠、半乳糖、过硫酸铵、氯化钾、氯化羟胺、对氨基苯甲酸、1-萘胺、氯化氢(HCL)、磷酸氢二钾、铁氰化钾、氰化钾、四甲基乙二胺(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、均为国产分析纯。

2.2. 方法

1) 实验动物, 由湖南省长沙市天勤生物技术有限公司提供小白鼠, 昆明种(SPF 级), 健康, 雌雄各半, 鼠龄 55 天, 体重 25~35 克, 共 60 只。物生产许可证号: SCXK(湘)209-0014。质量检测单位, 湖南

省动检二站, 动物实验单位: 使用许可证号 SYXK 桂 2011-0010。右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室, 放小白鼠饲养内空气净化鼠架装置上, 温度 25℃~30℃, 湿度 45%~65%, 分笼喂养, 每笼 6 只, 雌雄分开, 由学院动物室提供用标准饲料喂养, 自由饮用自来水。

2) 动物模型的建立及分组 先用三氯化铝 + D-半乳糖 + 亚硝酸钠混合后腹腔注射造模[3]。D-半乳糖用生理盐水溶解, 配成 1.2g%浓度; 亚硝酸钠用蒸馏水配成 0.9%, 氯化铝用蒸馏水配成 17.78%, 滤膜过滤除菌。放 4℃冰箱保存待用。D-半乳糖按每天 100 mg/kg 体重剂量[3], 0.9%亚硝酸钠按 45 mg/kg 体重剂量, 三氯化铝按 $Al_3 + 2$ mg/kg 体重剂量, 三溶液混合后给小鼠作腹腔注射, 每日 1 次, 连续二个月结束。染毒结束后, 将小鼠分成模型对照组 12 只、实验(治疗 1, 茯苓组) 1 组 18 只、实验(治疗 2, 桂元复方组) 2 组 18 只, 另设正常对照组 12 只。

3) 动物治疗实验 1 组(茯苓组)用茯苓口服液、实验 2 组(桂元复方组)用桂元首乌复方口服液分别灌胃, 以成人(50 kg 体重)剂量折算, 每次每只小鼠(40~45 g 体重/只)用原液 0.15 ML + 蒸馏水稀释成 0.3 ML, 灌胃, 每日一次, 治疗 20 天, 模型对照组, 正常对照组用等量蒸馏水代替灌胃直至实验结束。

4) 记忆力变化的判断, 实验过程中, 做水迷宫试验, 测定实验前、中、后的记忆力变化; 用 Y 型水迷宫试验。实验开始小鼠预先学习 8~10 天(d)游泳, 使每只小鼠形成到达上岸终点记忆, 熟识线路, 逃避危险。然后测试(S, 游水时间): 每鼠连续游泳 3 次, 记录自下水至到达上岸终点的时间(S, 游水时间)和错误次数, 连续测定 3 天。统计时设定标准, 错误率%, 超过 10 秒/次为超时(计算超时率%), 超过 40 秒/次, 为失败(计算失败率%)。实验过程中, 测定实验前、中、后三次, 作对比记忆力分析。测试方法按参考文献[4]。

5) 测定实验前、中、后血红蛋白 Hb 含量, 判断对造血功能的影响。用铁氰化钾(HiCN 法)测定血红蛋白。用温水浸小鼠尾巴 1 分钟, 使充血, 刺破尾巴后让血滴到白瓷板上, 取 10 μ l 测定血红蛋白, 具体操作参考文献[3]。

6) 实验结束, 从眼球后取全血, 分离血清, 放 4℃冰箱保持待用。处死小鼠, 取大脑组织, 用生理盐水洗去多余的血液, 滤纸吸干, 称重, 匀浆器研磨 5 分钟, 用生理盐水制成 10%脑匀浆, 放 4℃冰箱保存待用。生化指标测定方法: 血清测尿素、胆固醇、三酯酰甘油、谷丙转氨酶等; 大脑匀浆测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活力、自由基($\cdot O_2^-$)清除率%、胆碱乙酰基转移酶(chAT)、胆碱酯酶(AchE)等; 血清尿素氮用脲酶波氏法测定; TC 测定, 依据血清中脂化的胆固醇经胆固醇酯酶水解成游离胆固醇, 再被氧化酶氧化生成过氧化氢, 经过氧化物酶催化, 将 4-氨基安替比林和酚氧化为红色醌型化合物, 在 510 nm 波长比色测定, 计算其含量; TG 用测定, 甘油三酯在脂肪酶催化下水解生成甘油, 然后甘油在甘油激酶, 3-磷酸甘油氧化酶等催化下生成过氧化氢, 再经过氧化物酶催化, 将 4-氨基安替比林和酚氧化为红色醌型化合物, 在 510 nm 波长比色测定计算其含量; 谷丙转氨酶活力用 2,4-二硝基苯肼测定; 大脑匀浆谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活力测定: GSH-px 促进过氧化氢与 GSH 反应生成水及氧化型谷胱甘肽(GSSG), GSH-px 活力可以其催化 GSH 的反应速度来表示, 测定此反应中还原型谷胱甘肽(GSH)的消耗量, 可求出酶的活力。GSH 和二硫代二硝基苯甲酸作用生成 5-硫代二硝基苯甲酸呈黄色, 在 412 nm 波长比色, 参考文献[4]。胆碱乙酰基转移酶(ChAT)活力测定, 是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物, 在 ChAT 催化下, 反应生成物与显色剂结合, 在 324 nm 处比色测定吸光度, 计算转移酶活力; 乙酰胆碱酯酶(AchE)活力测定, 乙酰胆碱酯酶水解乙酰胆碱生成胆碱及乙酸, 胆碱可以与巯基显色剂反应生成 TNB 对称-三硝基苯黄色化合物, 412 nm 比色测定, 水解产物胆碱的数量可反映胆碱酯酶的活力; 具体操作按试剂盒说明书。 $(\cdot O_2^-)$ 清除率%测定利用比色法[5], 利用过硫酸铵与 Tris, TEMED 混合反应生成 $(\cdot O_2^-)$, 经与氯化羟胺, 对氨基苯甲酸, α -萘胺一系列反应, 生成黄色终产物, 比色测定, 可计算浓度和清除率[5]。

2.3. 数据收集及统计学处理

数据均来自原始记录。按照原始记录要求,从实验一开始,根据实验设计方案,就做好原始记录,有专用实验记录本,封面,标明实验名称,课题负责人,课题成员,质量负责人,实验起止时间。内面第一页,记录实验方案,所需动物品种,数量,分组,体重等。实验每天均有原始记录,记录作到及时、准确、真实、完整;记录必需在本子上,不得记在一张纸上,过后转抄,记录必需是原始的,作到可塑性;不得错记漏记,写错不得撕页,只能打叉,保留原样清晰可见,并在旁边签名,后面补写正确的,以保证记录的真实性;每天实验结束,实验者和记录者需签名确认,质控者签名,时间。实验室负责人或指导老师需经常检查。记录本不外借,不得带出实验室。课题实验结束,记录本上交统一归档保管,包括实验动物器官经甲醛处理上交归档保管,必要时作病理研究。本实验室(右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室,广西高校重点实验室,研究方向:中草药的开发与利用)自上世纪八十年代创立以来,所有的研究课题记录、动物标本,均完整保存。除本课题人员可借阅外,非本课题人员不借。根据以上记录的数据,在电脑上打开 SPSS-13 软件,分组输入,按设计的操作程序,统计,结果自动生成。记录显示 F 值、P 值,各组比较,方差分析和 Q 检验结果。结果用($\bar{x} \pm s$)表示。

3. 结果

模型对照组 12 只、实验(治疗 1, 茯苓组) 1 组 18 只、实验(治疗 2, 桂元复方组) 2 组 18 只,另设正常对照组 12 只。

1) 各组造模前、后和治疗后血红蛋白(Hb)含量测定结果。结果显示,实验前,各组比较差异无显著性;治疗前,各组比较,差异有显著性,治疗后,各组比较,差异有显著性;组内前中后比较:各组前中后差异有显著性;见表 1。

Table 1. Comparison of Hb changes before and after modeling and after treatment ($\bar{x} \pm s$, g/L)

表 1. 造模前后及治疗后 Hb 变化比较($\bar{x} \pm s$, g/L)

组别	实验前	治疗前	治疗后
正常对照组	153.59 ± 21.40	161.68 ± 29.28 ^{▲▲}	159.59 ± 21.90
模型对照组	147.06 ± 13.65	137.15 ± 10.29 ^{★▲▲^c}	137.14 ± 20.11 ^{▲^c}
茯苓组	159.48 ± 19.61	126.63 ± 26.39 ^{★▲▲^c}	139.52 ± 22.56 ^{▲^c}
桂元复方组	156.42 ± 13.84 ^c	101.83 ± 16.00 ^{★★}	155.51 ± 18.95 ^c

方差分析:

组间比较:造模前, $F = 1.323$, $P = 0.276$, $P > 0.05$, 无显著性差异;治疗前, $F = 16.390$, $P = 0.000$, 与正常对照组比较, $★P < 0.05$, $★★P < 0.01$, 有显著性差异,与桂元复方组比较, $▲▲P < 0.01$;有显著性差异;治疗后, $F = 2.912$, $P = 0.046$, 与正常对照组比较, $▲P < 0.05$, 有显著性差异。

组内比较:正常对照组前中后比较,无显著性差异;模型对照组, $F = 13.777$, $P = 0.000$, 与实验前比较, $°P < 0.01$, 有显著性差异;茯苓组, $F = 18.574$, $P = 0.000$, 与实验前比较, $°P < 0.01$, 有显著性差异;桂元复方组, $F = 23.444$, $P = 0.000$, 与治疗前比较 $°P < 0.01$, 有显著性差异。

2) 各组实验前、后和治疗后水迷宫试验测定结果。结果显示,组间比较:实验前,各组比较,正常对照组与桂元复方组比较,有显著性差异, $P < 0.05$, 桂元复方组游的较快;治疗前,各组比较,有显著性差异;治疗后,各组比较,有显著性差异;组内比较:除正常对照组前、中、后比较,无显著性差异外;其余各组前、中、后比较,均有显著性差异。见表 2、表 3、表 4。

Table 2. Comparison of water maze time before and after modeling and after treatment ($\bar{x} \pm s$, second time)**表 2.** 建模前后和治疗后水迷宫时间比较($\bar{x} \pm s$, 二进宫)

组别	实验前	治疗前	治疗后
正常对照组	3.54 ± 0.55	3.34 ± 0.45	3.57 ± 0.60
模型对照组	3.35 ± 0.52	4.17 ± 1.39	4.45 ± 0.75 ^{▲a}
茯苓组	3.28 ± 0.34	4.30 ± 0.93 ^{★b}	4.14 ± 0.65 ^b
桂元复方组	3.17 ± 0.43 [▲]	4.51 ± 1.09 ^{★★c}	4.32 ± 1.13 ^{▲c}

方差分析:

组间比较: 实验前, $F = 1.556$, $P = 0.211$, 与正常对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, 有显著性差异; 治疗前, $F = 3.151$, $P = 0.033$, 与正常对照组比较, $^{\star}P < 0.05$, $^{\star\star}P < 0.01$, 有显著性差异; 治疗后, $F = 2.437$, $P = 0.076$, 与正常对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, 有显著性差异。

组内比较: 正常对照组前、中、后比较, $F = 0.608$, $P = 0.551$, $P > 0.05$, 无显著性差异; 模型对照组前、中、后比较, $F = 3.927$, $P = 0.031$, 与实验前比较, $^aP < 0.05$, 有显著性差异; 茯苓组前、中、后比较, $F = 11.256$, $P = 0.000$, 与实验前比较, $^bP < 0.01$, 有显著性差异; 桂元复方组前、中、后比较, $F = 9.762$, $P = 0.000$, 与实验前比较, $^cP < 0.01$, 有显著性差异。

Table 3. Comparison of error rate and timeout rate of water maze before and after modeling and after treatment**表 3.** 水迷宫建模前后和治疗后的错误率和超时率比较

组别	造模前		造模后		治疗后	
	错误率%	超时率%	错误率%	超时率%	错误率%	超时率%
正常对照组	0	0	1.01	0	2.02	0
模型对照组	0	0	14.44	13.33	6.17	8.64
茯苓组	0	0	16.05	11.11	6.17	7.40
桂元复方组	0	0	15.97	15.28	11.85	12.59

分析: 实验前, 各组均无错误, 也无超时; 失败率为 0; 造模后, 各组均有错误, 正常对照组错误率%最低; 超时率%为 0; 治疗后正常对照组错误率%也是最低; 超时率%为 0。

Table 4. Comparison of looped rate and failure rate of water maze before and after modeling and after treatment**表 4.** 水迷宫建模前后和治疗后的打圈率和失败率比较

组别	造模前		造模后		治疗后	
	打圈率%	失败率%	打圈率%	失败率%	打圈率%	失败率%
正常对照组	0	0	0	0	11.11	0
模型对照组	0	0	0	1.11	11.11	0
茯苓组	0	0	7.40	0	9.88	0
桂元复方组	0	0	5.56	0	11.85	0

分析: 实验前, 各组打圈率%、失败率%均 0; 造模后, 正常对照组打圈率%、失败率%均为 0, 模型对照组失败率为 1.11%, 打圈率%为 0, 治 1、2 组, 有打圈, 无失败; 治疗后, 各组均有打圈, 但打圈率%接近, 无明显差别, 但均无失败。

3) 10%大脑匀浆 胆碱酯酶(AChE)活力、胆碱乙酰基转移酶(ChAT)活力及血清胆碱酯酶(AChE)活力测定结果。结果显示, 10%大脑匀浆(AChE)活力, 各组间无明显差异; 胆碱乙酰基转移酶活力, 模型对照组明显低于其他组, 桂元复方组活力最高, 茯苓组其次; 血清胆碱酯酶活力, 茯苓组和桂元复方组也

明显高于正常对照组和模型对照组，模型对照组最低。见表 5。

Table 5. Activities of brain (AChE) and (ChAT), and serum (AChE) ($\bar{x} \pm s$)

表 5. 脑(AChE)活力、脑(ChAT)活力和血清(AChE)活力($\bar{x} \pm s$)

组别	脑(AChE)活力(U/mg-prot)	脑(ChAT)活力(U/g 组织湿重)	血清(AChE)活力(U/ml)
正常对照组	1.00 ± 0.21	53.94 ± 24.09 ^{***}	33.62 ± 1.99
模型对照组	1.12 ± 0.19	15.15 ± 5.91 ^{▲▲}	32.58 ± 0.51
茯苓组	1.17 ± 0.28	62.15 ± 29.94 ^{***}	36.26 ± 1.06 ^{▲▲▲*}
桂元复方组	1.06 ± 0.29	94.85 ± 33.12 ^{**}	35.69 ± 0.50 ^{▲▲▲*}

方差分析：组间比较，脑胆碱酯酶活力：0.757， $P = 0.526$ ， $P > 0.05$ ，无显著性差异；脑匀浆(AChE)活力： $F = 9.544$ ， $P = 0.000$ ，与模型对照组比较， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ，有显著性差异，与桂元复方组比较， $▲P < 0.05$ ， $▲▲P < 0.01$ ，有显著性差异；血清(AChE)活力： $F = 20.144$ ， $P = 0.000$ ，与正常对照组比较， $▲▲P < 0.01$ ，有显著性差异；与模型对照组比较， $**P < 0.01$ ，有显著性差异。

4) 10%大脑匀浆自由基(O_2^-)清除率%，谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活力，血清谷丙转氨酶(ALT/GPT)酶活力测定结果。结果显示，自由基清除率%，模型对照组明显低于其他组；谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活力，模型对照组和正常对照组明显低于茯苓组和桂元复方组。模型对照组活力最低；血清谷丙转氨酶活力，正常组低于其他各组。见表 6。

Table 6. Clearance rate of (O_2^-), activity of GSH-px and ALT/GPT ($\bar{x} \pm s$)

表 6. 清除率(O_2^-)、GSH-px 和 ALT/GPT 活性($\bar{x} \pm s$)

组别	自由基(O_2^-) (清除率%)	(GSH-px) (活力/ml)	(ALT/GPT)酶活力(U/L)
正常对照组	19.12 ± 3.03 ^{▲▲}	45.20 ± 4.42 ^{▲▲*}	8.91 ± 2.84
模型对照组	5.48 ± 5.36	43.56 ± 8.73 ^{▲▲*}	10.44 ± 3.91
茯苓组	16.64 ± 2.65 ^{▲▲}	51.61 ± 3.46	13.17 ± 4.60 [*]
桂元复方组	14.95 ± 1.87 ^{▲▲*}	54.14 ± 4.51	12.33 ± 4.53 [*]

方差分析：组间比较，自由基(O_2^-)： $F = 17.750$ ， $P = 0.000$ ，与模型对照组比较， $▲▲P < 0.01$ ，与正常对照组比较， $*P < 0.05$ ，有显著性差异；谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)： $F = 6.065$ ， $P = 0.004$ ，与桂元复方组比较， $▲▲P < 0.01$ ，与茯苓组比较， $*P < 0.05$ ，有显著性差异；(ALT/GPT)酶活力，治疗后，各组比较， $F = 2.764$ ， $P = 0.052$ ，与正常对照组比较， $*P < 0.05$ ，有显著性差异。

5) 各组治疗后血清甘油三酯，尿素氮，总胆固醇，总蛋白含量测定结果。结果显示，茯苓组甘油三酯较高，正常对照组最低；正常对照组尿素明显高于其他各组；总胆固醇各组无显著性意义；正常对照组血清总蛋白明显低于其他各组。见表 7。

Table 7. Comparison of Serum concentrations of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and urea nitrogen, total protein after treatment ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

表 7. 治疗后血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、尿素氮、总蛋白浓度的比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	甘油三酯	尿素氮	总胆固醇	血清总蛋白(g/L)
正常对照组	1.37 ± 0.22 ^{▲▲}	13.16 ± 1.63 ^{**}	8.23 ± 0.46	58.21 ± 4.91
模型对照组	1.44 ± 0.38 ^{▲▲*}	9.51 ± 2.59 ^{▲▲}	7.08 ± 0.89	64.31 ± 7.31 [*]
茯苓组	2.00 ± 0.51	11.51 ± 1.94 ^{▲*}	7.64 ± 1.26	63.84 ± 7.11 [*]
桂元复方组	1.44 ± 0.29 ^{▲▲}	10.52 ± 1.15 ^{▲▲}	7.75 ± 1.45	63.08 ± 4.94

甘油三酯, $F = 8.203$, $P = 0.00$, 与茯苓组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与正常对照组比较, $*P < 0.05$, 有显著性差异; 尿素氮, $F = 7.647$, $P = 0.00$, 与正常对照组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与模型对照组比较, $*P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 有显著性差异; 总胆固醇 $F = 1.395$, $P = 0.258$, 各组无显著性差异; 血清总蛋白, $F = 2.127$, $P = 0.110$, 与正常对照组比较, $*P < 0.05$, 有显著性差异。

6) 一般情况 实验从 2019 年 10 月 12 日开始到 2020 年 1 月 10 日结束, 共 88 天, 小白鼠 60 只, 分组, 正常对照组 12 只, 模型对照组 12 只, 茯苓组 18 只, 桂元复方组 18 只, 后三组为造模组。实验结束, 正常对照组死亡 1 只, 死亡率为 8.33%; 模型对照组死亡 3 只, 死亡率为 25.0%; 茯苓组死亡 0 只, 死亡率为 0%; 桂元复方组死亡 3 只, 死亡率为 16.67%。模型对照组死亡率最高, 茯苓组死亡率最低。各组体重变化见表 8。

Table 8. Comparison of weight changes before and after modeling and after treatment ($\bar{x} \pm s$, g/only)

表 8. 建模前后及治疗后体重变化比较($\bar{x} \pm s$, 克/只)

组别	造模前	造模后	模后增加	治疗后	治后增加	总增加
正常对照组	27.88 ± 3.02	46.42 ± 3.91	18.54	50.02 ± 3.86	3.60	22.14
模型对照组	31.44 ± 3.88	47.25 ± 7.31	15.81	50.10 ± 10.58	2.85	18.66
茯苓组	28.99 ± 1.93	46.62 ± 7.59	17.63	48.14 ± 5.84	1.52	19.15
桂元复方组	30.07 ± 4.35	42.25 ± 7.26	12.18	45.57 ± 7.49	3.32	15.50

方差分析: 组间比较, 造模前, 各组比较 2.392, $P = 0.078$, 无显著性差异, 与正常对照组比较, $\Delta P < 0.05$, 有显著性差异; 造模后(治疗前), $F = 1.631$, $P = 0.194$, 无显著性差异; 治疗后, $F = 1.159$, $P = 0.335$, 无显著性差异; 各组体重均有增加, 无论是治疗前和治疗后, 正常对照组体重增加最多。

4. 讨论

4.1. 一般情况

实验结束, 正常组死亡率为 8.33%; 模型组死亡率为 25.0%; 治 1 组死亡率为 0%; 治 2 组死亡率为 16.67%; 模型组死亡率高于其他各组。各组体重均有增加, 无论是治疗前或治疗后, 正常组体重增加最多, 平均体重从实验开始 27.88 g 到结束为 50.02 g, 增加了 22.14 g; 而模型组从 31.44 g 到 50.10 g, 增加了 18.66 g, 其他二组增加较小, 说明造模对体重和死亡有一定影响。

4.2. 大脑胆碱乙酰基转移酶活力

实验结果显示, 模型组活力明显低于其他三组, 乙酰胆碱转移酶催化乙酰胆碱合成, 酶活性降低, 乙酰胆碱合成减少, 乙酰胆碱减少, 会影响到大脑记忆功能。血清中胆碱酯酶活力测定结果, 模型组明显低于其他三组, 治疗组最高, 特别是治疗 2 组, 表明两组中药均能明显提高胆碱乙酰转移酶和胆碱酯酶活力。目前研究表明, 胆碱乙酰基转移酶和胆碱酯酶是公认的大脑中与记忆功能密切相关的关键酶。

4.3. 大脑自由基(O_2^-)清除率%, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活力

模型组明显低于其他三组。说明模型组抗氧化能力降低, 自由基在大脑中增加, 会影响大脑的功能, 超氧阴离子自由基(O_2^-)具有强的氧化能力, 在线粒体呼吸链电子传递过程中漏出的电子与 O_2 结合可产生超氧阴离子自由基(O_2^-), 是体内(O_2^-)的主要来源, 胞质中的需氧脱氢酶也可催化产生自由基(O_2^-), 感染、缺氧、药物等外源因素, 也可使自由基产生增加。但体内自由基(O_2^-)可迅速在超氧化物歧化酶 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、过氧化氢酶等催化下转化为 H_2O_2 , H_2O_2 再转化为无毒的 H_2O 而迅速消

除, 只有在某些病理情况下, 使自由基产生增加或清除减少, 对机体产生损伤。超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)是体内主要的自由基, 它与 H_2O_2 、羟自由基 $\cdot OH$, 统称活性氧, 或反应氧族, 它们化学性质活泼, 羟自由基 $\cdot OH$ 活性最强, 可引起蛋白质、DNA 等各种生物大分子氧化损伤, 破坏细胞的结构与功能, 如可使磷脂分子中的不饱和脂肪酸氧化成过氧化脂质, 破坏生物膜。同时, 过氧化脂质与蛋白质结合成复合物, 累积成棕褐色的色素颗粒, 称脂褐素, 与组织老化有关[6], 这是老年痴呆的自由基学说。本实验结果表明, 模型组自由基($O_2^{\cdot-}$)清除率%低于其他三组, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活力也低于其他三组, 而且(GSH-px)活力, 治疗 1、2 组高于正常组, 说明治疗效果显著。

4.4. 水迷宫试验

结果表明, 造模前, 各组比较, 正常对照组与桂元复方组比较, 有显著性差异, $P < 0.05$, 桂元复方组游得较快; 造模后(治疗前), 茯苓组、桂元复方组与正常组比较, 分别是 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 造模后茯苓组、桂元复方组游水时间明显延长, 速度明显减慢; 模型组时间也延长但还不太明显; 治疗后, 模型对照组、桂元复方组与正常对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, 游水时间明显延长, 而且模型对照组比造模后(治疗前)时间还继续延长, 速度继续减慢, 但茯苓组、桂元复方组比治疗前游水时间有一定缩短, 速度有加快; 正常组前、中、后速度几乎不变, 无显著差别, 而且只出现很低的错误率, 没有超时和失败; 说明其记忆力前、中、后均无变化; 而模型组、茯苓组、桂元复方组前、中、后速度发生明显改变, 造模后变慢; 治疗后, 茯苓组、桂元复方组速度加快, 模型对照组速度继续变慢, 说明出现治疗效果。

4.5. 其他

造模对血红蛋白(Hb)有一定影响, 造模前各组间无显著性差异, 且均在正常范围内; 造模后, 除正常对照组(Hb)没有下降外, 其他三组均有不同程度的下降, 其中治疗组降低最多; 治疗后, 正常组没有明显变化, 治疗组上升恢复, 桂元复方组基本恢复到原有水平, 模型对照组维持在治疗前水平。血清总胆固醇(TC), 各组间无显著性差异; 但血清甘油三酯、尿素氮、谷丙转氨酶、总蛋白, 各组间比较均有显著性差异[7], 各组间由于实验对照条件不同, 实验组注射造模药物, 治疗组灌服二种不同中药复方, 可能会对某些器官(如肝、肾), 或某些代谢产生影响, 这些影响不一定是不良影响, 也有良性作用, 如本次实验组尿素氮低过正常组, 血清总蛋白又高过正常组, 而谷丙转氨酶治疗组却高过正常组, 是误差造成? 或其他原因? 其原因、生理意义、与本病间的关系有待进一步探讨[8]。

参考文献

- [1] 张玲, 潘宝龙, 古俊伟, 等. 慢性铝暴露对小鼠认知能力影响及 β -APP 关系[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(4): 461-462.
- [2] 刘燕, 黄照河, 张树球, 等. 海尔福对铝中毒小鼠心肌细胞损害的防治研究[J]. 中华临床医师杂志, 2016, 10(12): 1753-1755.
- [3] 杨海龙, 梁伟江, 吴艳, 等. 中药海尔福对铝中毒小鼠模型大脑的乙酰胆碱转移酶活性的影响[J]. 环境卫生学杂志, 2014, 12(4): 509-513.
- [4] 唐焕文, 韦小敏, 庄志雄, 等. 铝致大鼠中枢神经系统病理形态学改变的研究[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(8): 902-904.
- [5] 萧华山, 何文锦, 傅文庆, 曹红云, 范子南. 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, 1999(02): 3-5.
- [6] 查锡良, 主编. 生物化学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 176.
- [7] 龙奇军, 邓钰莹, 谭川铃, 等. 阿尔茨海默病模型小鼠脑乙酰胆碱转移酶(chAT)和乙酰胆碱酯酶(AChE)活力的实验研究[J]. 临床医学进展, 2019, 9(6): 807-814.
- [8] 何胜, 玉莹, 陈菊芳, 等. D-半乳糖加亚硝酸钠建立痴呆小鼠模型和中药治疗效果[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(2): 422-424.