

海尔福对铝暴露大鼠血浆 NOS, T-SOD 及 MDA 的干预效应^①

李根亮, 李韬, 许苡饶, 谢孟林, 王红丽, 叶芳, 许文婷, 唐媛媛,
唐秀芬, 梁宇, 卢舒雨, 胡红柳^②, 张树球

(右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: ligenliang@163.com)

摘要: **目的** 探讨海尔福对铝致痴呆的可能干预效果及其可能干预机制。**方法** 通过对大鼠饲喂氯化铝构建老年痴呆症(AD)大鼠模型, 并采用中药提取液海尔福干预饲养铝暴露大鼠, 分析比较各组大鼠(正常对照组、铝暴露组和海尔福干预组)在水迷宫中的行为特征及血浆中一氧化氮合酶(NOS)活性、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的变化。**结果** 与正常对照组相比, 铝暴露大鼠出现了AD特征, 如在目的象限的活动时间缩短($P < 0.01$), 血浆中NOS和T-SOD的活性分别升高($P < 0.01$)和下降($P < 0.01$), MDA的含量升高($P < 0.01$)。海尔福干预则能有效改善铝暴露大鼠的以上各项指标。**结论** 铝暴露能引起大鼠的学习障碍, 而海尔福则通过降低NOS的活性、提高T-SOD的活性和降低MDA的含量, 防止大鼠学习能力障碍的产生, 从而预防铝致老年痴呆症的发生。

关键词: 海尔福口服液; 铝暴露; 大鼠; 血浆; 干预效应

中图分类号: R745.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)03-0183-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.03.006

Intervention effects of Haierfu on plasma NOS, T-SOD, and MDA in rats exposed to aluminum

Li Genliang, Li Tao, Xu Yijiao, Xie Menglin, Wang Hongli, Ye Fang, Xu Wenting,
Tang Yuanyuan, Tang Xiufen, Liang Yu, Lu Shuyu, Hu Hongliu, Zhang Shuqiu

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China
E-mail: ligenliang@163.com)

Abstract: **Objective** To investigate the possible intervention effects of Haierfu on aluminum induced dementia and its possible intervention mechanism. **Methods** The rats were randomly divided into three groups: control group, aluminum-exposed group, and Haierfu intervention group. The rat models of Alzheimer's disease (AD) were established by feeding the rats with aluminum chloride. The rats exposed to aluminum were fed with Haierfu for analyzing the abnormal behavioral characteristics in the Morris water maze and the alterations of plasma nitric oxide synthase (NOS) activity, plasma total superoxide dismutase (T-SOD) activity and plasma malondialdehyde (MDA) content by comparison those indexes in rats of three groups mentioned above.

Results Compared to the normal control group, there were obvious AD characteristics in rats exposed to aluminum, such as the activity time of the rats in the target quadrant shortened ($P < 0.01$), the activity of plasma NOS increased ($P < 0.01$), the activity of plasma total SOD decreased ($P < 0.01$), and the content of plasma MDA increased ($P < 0.01$). Haierfu intervention can effectively improve the indicators mentioned above in aluminum-exposed rats. **Conclusion** The aluminum exposure can cause learning disabilities in rats, but Haierfu can prevent the occurrence of learning disabilities and by increasing the activity of plasma total SOD, decreasing the activity of plasma NOS, and reducing the content of plasma MDA in rats, and aluminum-induced elderly AD was also prevented by the treatment with Haierfu.

Key words: Haierfu; aluminum exposure; rats; plasma; intervention effects

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)俗称老年痴呆症, 是一种常见的老年性脑组织病变性综合

征^[1-3]。铝是一种广泛存在于自然界和日常生活中的金属, 市场上的大量食品如油条等都可能含铝, 甚至是

① 基金项目: 广西自然科学基金(2014GXNSFAA118255)

② 通信作者, E-mail: 2521762992@qq.com

铝超标^[4-5]。大量实验研究表明,铝能够引起海马组织的结构性损伤及记忆力的显著下降,导致AD的发生^[6-8]。但目前尚不清楚铝致痴呆的确切机制,也无有效防治铝中毒的方法。本研究通过对大鼠饲喂氯化铝构建AD大鼠模型,比较铝暴露组、海尔福干预组及正常对照组大鼠在水迷宫中的行为特征及血浆中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化,判断海尔福对铝致痴呆的可能干预效果,探讨其可能的干预机制。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器 健康清洁级雄性SD大鼠15只,鼠龄10个月,体重240~260g,由右江民族医学院实验动物中心提供。 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 购自广东西陇化工有限公司, NOS、SOD、MDA试剂盒购自南京建成生物工程研究所。海尔福口服液由本课题组提取,材料为金银花、茯苓、甘草、杨桃果等中药经加水煮沸提取^[9]。Morris水迷宫测试系统(RB-100A)购自北京新天地科技有限责任公司,紫外可见分光光度计(TU-1810S)购自北京普析通用仪器有限责任公司,离心机(1-15PK)购自德国Sigma Laborzentrifugen公司。

1.2 动物分组及处理 将大鼠随机分为3组:正常对照组、铝暴露组、海尔福干预组,每组5只大鼠。各组大鼠每天正常饲喂普通饲料。正常对照组给予不加 AlCl_3 的水。铝暴露组隔日交替给予不加 AlCl_3 的水和加 AlCl_3 的水,根据每日大鼠需水量决定水中 AlCl_3 的浓度,控制 AlCl_3 剂量为280 mg/(kg·d)左右。海尔福干预组给水与铝暴露组同,即隔日交替给予不加 AlCl_3 的水和加 AlCl_3 的水,只是在加 AlCl_3 的水中加海尔福口服液,根据每日大鼠需水量决定水中海尔福口服液的浓度,控制海尔福口服液剂量为0.8 ml/(kg·d)左右。大鼠饲喂时间为6个月。

1.3 大鼠空间学习记忆功能的行为学检测 大鼠饲喂6个月后,利用Morris水迷宫实验检测大鼠的学习记忆能力。连续进行5d实验训练,每天训练1次,训练每只大鼠入水后寻找水下隐蔽平台的能力。在最后一次训练结束后,撤去平台,从与训练时的相同入水点将其放入水中,仪器自动记录和摄像,采集其穿越目标象限(原平台所在象限)的时间及120s内穿越原平台的次数。

1.4 大鼠血浆生化指标检测 行为学检测试验结束后,腹腔注射10%水合氯醛(3 ml·kg⁻¹)麻醉大鼠进行解剖,腹主动脉取血,2000 r/min离心取血浆待测。取适量制备好的血浆,按照各试剂盒使用说明书,检测和计算各血浆样本中NOS活性、SOD活性和MDA

含量。

1.5 统计学方法 实验数据用SPSS 19.0软件进行分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较用方差分析,多重比较用最小显著差数法进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的学习记忆能力 Morris水迷宫实验显示,铝暴露组大鼠穿越原平台的次数有减少的趋势,而海尔福干预组穿越原平台次数则比铝暴露组有改善的趋势,但各组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。与穿越原平台的次数不同,方差分析显示,各组大鼠在目的象限的活动时间上存在极显著差异($P < 0.01$);多重比较表明,铝暴露组与正常对照组及海尔福干预组之间都存在统计学差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(见图1)。实验结果表明,铝暴露组大鼠出现了学习能力障碍,海尔福的干预则有效防止了铝暴露大鼠学习能力障碍的产生,说明海尔福有预防铝致老年痴呆症的作用。穿越原平台次数之间不存在显著差异可能与训练次数较少有关。

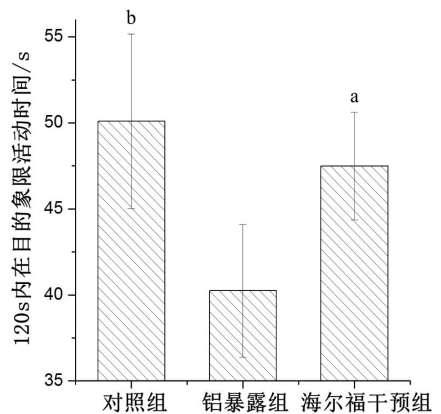


图1 各组大鼠在目的象限的活动时间($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

注:与铝暴露组相比,a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

2.2 各组大鼠血浆中NOS的活性、T-SOD的活性及MDA的含量 血浆检测结果表明,与正常对照相比,铝暴露使大鼠血浆中NOS的活性显著升高($P < 0.01$),MDA含量极显著增加($P < 0.01$),T-SOD活性显著下降($P < 0.01$),而海尔福干预大鼠血浆中各项指标则与正常对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),而与铝暴露组之间存在统计学差异($P < 0.01$)(见图2、图3、图4)。研究结果说明,铝暴露会导致大鼠血浆中NOS的活性升高、T-SOD的活性降低、MDA的含量增加,而海尔福则能有效使铝暴露大鼠血浆中NOS的活性降低、T-SOD的活性升高和MDA的含量减少。

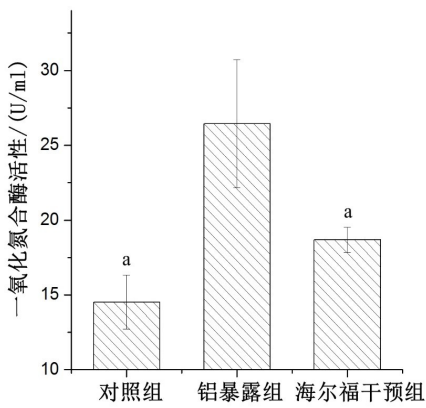


图2 各组大鼠血浆中 NOS 的活性($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与铝暴露组相比,a: $P < 0.01$

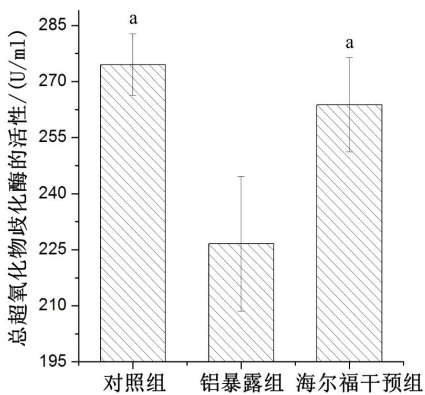


图3 各组大鼠血浆中 T-SOD 的活性($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与铝暴露组相比,a: $P < 0.01$

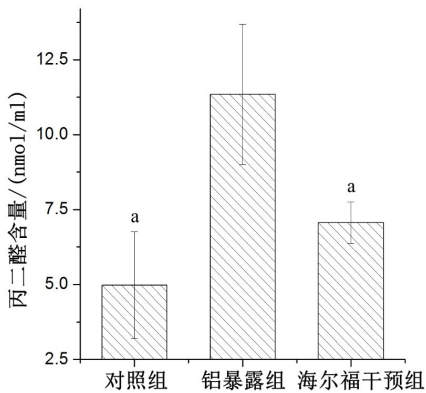


图4 各组大鼠血浆中 MDA 的含量($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与铝暴露组相比,a: $P < 0.01$

3 讨论

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种重要的信号分子和活性物质,健康状态下,机体内的 NO 维持着一定的浓度。对神经系统来说,这种正常生理浓度的 NO 有保护神经组织的作用。但当某些因素导致组织损伤后,便会激活诱导型 NOS(iNOS)的大量表达,合

成大量的 NO 产生神经毒性作用。因为 NO 是一种活性自由基,能与氧自由基作用生成 NO_2 、 NO_3 等过氧亚硝酸盐自由基,后者活性极强,会损伤机体组织,影响脑等器官组织的功能。因此,NO 的表达水平可以反映脑等组织的受损程度及作为 AD 是否发生的一项指标^[10-12]。由于 NO 半衰期短,直接检测困难,而 NO 合成的关键酶之一是 NOS,因此研究中通常通过检测 NOS 活性来分析 NO 的含量。与 NO 的作用相反, SOD 是一种能清除机体内氧自由基的抗氧化酶,在减少氧自由基对机体组织造成的损伤、抗疲劳、预防机体衰老和 AD 发生及脑功能识别障碍中发挥着重要的作用。因此, SOD 在机体内活性的降低可以作为衰老和 AD 的指标^[13]。氧自由基对细胞膜上的不饱和脂肪酸的过氧化反应,产生多种代谢产物,MDA 就是其中的一种。MDA 具有细胞毒性,并能引起蛋白质和核酸的交联聚合。因此,MDA 含量的异常增加程度也反映了机体组织脂质过氧化损伤的程度及 AD 发生的程度^[12,14]。

我们的建模结果显示,铝暴露组大鼠穿越原平台的次数有减少的趋势($P > 0.05$),其在目的象限的活动时间极显著缩短($P < 0.01$),这表明铝暴露组大鼠出现了学习能力障碍。血浆检测结果则进一步显示,与正常对照组相比,铝暴露使大鼠血浆 NOS 的活性极显著升高($P < 0.01$),T-SOD 活性极显著下降($P < 0.01$),MDA 含量极显著增加($P < 0.01$)。这些结果表明,铝暴露大鼠具有了 AD 的一些特征,我们的 AD 大鼠建模可以满足本研究对这几项检测指标进行分析的需要。

海尔福干预的实验结果则显示,与正常对照组相比,干预组大鼠的各项检测指标差异均无统计学意义($P > 0.05$),而与铝暴露组相比,则在目的象限的活动时间显著增加($P < 0.05$),血浆中 NOS 的活性极显著降低($P < 0.01$),T-SOD 活性极显著升高($P < 0.01$),MDA 含量极显著减少($P < 0.01$)。这些结果表明,海尔福有预防铝致 AD 的作用。海尔福能通过降低 NOS 的活性、提高 T-SOD 的活性和降低 MDA 的含量,防止大鼠学习能力障碍的产生。日常生活中我们食用的一些食品中含有铝,甚至有铝超标现象,这些铝都可能对我们的记忆力及脑组织造成一定的伤害。而海尔福口服液则对这些铝造成的伤害具有一定的预防作用。

(致谢:感谢刘付兴,周东健,劳世梅,江宏秋,张壮壮,黄雪莲,黄超康,黄祖广,申国玲等同学参与了大鼠水迷宫实验和取血过程。)

(下转第 189 页)

- [2] Liu P, Yao Y, Liu MY, et al. Epidemiology of spinal trauma in Mainland China from 2001 to 2007: an epidemiological study based on a nationwide database [J]. *Spine*, 2012, 37(15): 1310-1315.
- [3] 李少春, 马丽娜, 李峰杰, 等. 不同浓度水合氯醛对大鼠的麻醉作用比较[J]. *中国药业*, 2014, 23(19): 22-23.
- [4] 卢旻鹏, 权正学, 刘渤, 等. 小鼠脊髓损伤标准化重物打击模型的制备及评价[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(8): 933-938.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244-256.
- [6] 蒙文丹, 解继胜. 骨质疏松动物模型建立的知识图谱分析[J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(6): 821-823.
- [7] 王兵, 秦军, 俞渊, 等. 慢性肝损伤发胆石症动物模型的建设[J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(2): 171-174.
- [8] Basso DM, Fisher LC. The Basso mouse scale for locomotion (BMS) is a more sensitive indicator of recovery than the BBB scale in mice with spinal cord injury [J]. *J Rehab Res Dev*, 2003, 40(S3): 12-26.
- [9] 王玉珏, 梁华平, 刘晓奇, 等. 建立 BALB/c 小鼠脊髓钳夹伤后的运动学评价方法[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2011, 45(3): 229-233.
- [10] Hyun SJ, Rhim SC. Combined motor and somatosensory evoked potential monitoring for intramedullary spinal cord tumor surgery: correlation of clinical and neurophysiological data in 17 consecutive procedures [J]. *Br J Neurosurg*, 2009, 23(4): 393-400.
- [11] DiCindio S, Theroux M, Shah S, et al. Multimodality monitoring of transcranial electric motor and somatosensory-evoked potentials during surgical correction of spinal deformity in patients with cerebral palsy and other neuromuscular disorders [J]. *Spine*, 2003, 28(16): 1851-1855.
- [12] 赵军, 权正学, 刘渤, 等. 小鼠 Allen's 脊髓损伤模型的建立及评价[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(11): 1296-1300.

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-06-12

(上接第 185 页)

参考文献:

- [1] 何建军, 罗玥倩, 张俊, 等. 老年痴呆症的病因及发病机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(20): 5924-5926.
- [2] 沈阳, 陈宇, 傅洁瑜, 等. 老年痴呆症的分子机制[J]. *生命科学*, 2014, 26(6): 550-559.
- [3] 范红波. 氧自由基在老年痴呆发病机制中的作用[J]. *中国现代医药杂志*, 2012, 14(4): 130-132.
- [4] 李国星, 麻顺广, 杨翠平, 等. 2012-2015 年濮阳市油条、油饼中铝含量结果分析[J]. *河南预防医学杂志*, 2016, 27(5): 385-387.
- [5] 陆日贵, 李必斌, 孙琦. 南宁市市面制食品油条、馒头中铝含量的调查分析[J]. *实用预防医学*, 2014, 21(3): 334-335.
- [6] 李海, 吴琪俊. 铝暴露的神经毒性及其作用机制的研究进展[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(6): 616-618.
- [7] 漆光紫, 周敏, 庞广福, 等. 职业性铝暴露与认知功能障碍的关系研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(1): 20-21, 29.
- [8] 胡红柳, 宾慧婷, 蓝贤英, 等. 慢性铝暴露 AD 大鼠学习记忆功能障碍及绿茶多酚的干预作用研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(3): 262-264.
- [9] 杨海龙, 梁伟江, 吴艳, 等. 中药海狗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, 4(6): 509-513.
- [10] 刘祥琴, 刘小琦, 晏宁. 老年性痴呆患者血浆 NO 和 H₂S 的变化及意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(1): 19-21, 24.
- [11] 雷蕾, 彭军, 姜丹. 血清内皮素-1、一氧化氮水平与血管性痴呆患者认知功能的相关性研究[J]. *现代医院*, 2016, 16(11): 1572-1574.
- [12] Mokhtari Z, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, et al. Riluzole ameliorates learning and memory deficits in A β 25-35-induced rat model of Alzheimer's disease and is independent of cholinergic activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 135-144.
- [13] Yen K, Patel HB, Lublin AL, et al. SOD isoforms play no role in lifespan in ad lib or dietary restricted conditions, but mutational inactivation of SOD-1 reduces life extension by cold[J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(3): 173-178.
- [14] Arjmand Abbasi Y, Mohammadi MT, Sarami Foroshani M, et al. Captopril and Valsartan May Improve Cognitive Function Through Potentiation of the Brain Antioxidant Defense System and Attenuation of Oxidative/Nitrosative Damage in STZ-Induced Dementia in Rat [J]. *Adv Pharm Bull*, 2016, 6(4): 531-539.

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-05-10