

当归挥发油改善阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆机制初探

王虎平^{1,2*}

¹甘肃中医药大学; ²甘肃省方药挖掘与创新转化重点实验室, 兰州 730000

摘要:本实验旨在从 $\text{A}\beta$ 代谢角度探讨当归挥发油对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠学习记忆的改善作用及其机制。大鼠分为假手术组、模型组、阳性组及当归挥发油低、中、高剂量组等6组。采用脑立体定位注射 $\text{A}\beta_{25-35}$ 复制 AD 大鼠模型, 并予以灌胃给药。Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力, ELISA 法检测血清乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)活性及海马 β 淀粉样蛋白前体(β -amyloid precursor protein, APP)、 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein 1-42, $\text{A}\beta_{1-42}$)含量, 比色法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)水平。结果显示, 当归挥发油可改善 AD 模型大鼠学习记忆能力, 提升血清 ACh、ChAT、SOD 活性($P < 0.05$), 降低血清 AChE、MDA 水平及海马 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量($P < 0.05$)。研究结果表明, 当归挥发油能有效改善 AD 模型大鼠学习记忆能力, 对 AD 具有一定的防治作用, 其可能与调节胆碱能神经递质、自由基氧化等介导的 $\text{A}\beta$ 代谢有关。

关键词:当归挥发油; 阿尔茨海默病; 学习记忆; 机制研究

中图分类号:R741.05

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)5-0836-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.5.012

Mechanism of improving learning and memory in Alzheimer's disease model rats by *Angelica* volatile oil

WANG Hu-ping^{1,2*}

¹Gansu University of Chinese Medicine; ²Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs Discovery and Innovation and Transformation in Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Abstract: This study aims to explore the effect and mechanism of *Angelica* volatile oil on learning and memory in Alzheimer's disease (AD) model rats. The rats were divided into 6 groups: sham operation group, model group, positive group and low, medium and high dose groups of *Angelica* volatile oil. Brain stereotactic injection of $\text{A}\beta_{25-35}$ was used to establish AD rat model and the drugs were administered by gavage. The learning and memory ability of rats was examined by Morris water maze. Serum acetylcholine (ACh), activity of choline acetyltransferase (ChAT) and β -amyloid precursor protein (APP), amyloid β -protein 1-42 ($\text{A}\beta_{1-42}$) in hippocampus were detected by ELISA. The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and acetylcholinesterase (AChE) were measured by colorimetry. The results showed that *Angelica* volatile oil could improve the learning and memory ability of AD model rats, increase the activities of Ach, chat and SOD ($P < 0.05$), and reduce serum AChE, the level of MDA and content of hippocampus APP and $\text{A}\beta_{1-42}$ ($P < 0.05$). The results show that *Angelica* volatile oil can effectively improve the learning and memory ability of AD model rats and has preventive and therapeutic effect on AD, which may be related to the regulation of cholinergic neurotransmitter, free radical oxidation and $\text{A}\beta$ metabolism.

Key words: *Angelica* volatile oil; Alzheimer's disease; learning and memory of ability; mechanism research

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)作为一种以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的神经系统退行性疾病,由多种因素(包括生物和社会

心理因素)共同作用诱发。其中神经递质改变、氧化应激及 β 淀粉样蛋白沉积等已成为明确诱因,且形成相互影响的级联恶化反应,进一步促进、激发了 AD 的发生发展。

当归作为“十大陇药”、甘肃道地药材,课题组在前期研究中已初步探明了其防治 AD 的作用^[1,2]。

收稿日期:2021-10-11 接受日期:2022-03-08

基金项目:国家自然科学基金(81960828);甘肃省自然科学基金(1212RJZA075)

*通信作者 Tel:86-931-5162454; E-mail:whp@gszy.edu.cn

为了推进当归防治 AD 的有效组部位、组分的细化研究,课题组将遴选当归的明确部位(组分)多糖、挥发油及阿魏酸进行有效组分及组分配伍研究,进一步优选防治 AD 的当归核心部位或组分。本实验基于神经递质改变、氧化应激及 β 淀粉样蛋白沉积等发病学说,研究当归主要活性部位当归挥发油防治 AD 的作用及其初步机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 70 只,雌雄各半,3 月龄,体重 200 ± 20 g,由中国农业科学院兰州畜医研究所实验动物场提供,许可证号:SCXK(甘)2015-0001-62000600000198。

1.2 试剂与仪器

当归挥发油(水蒸气蒸馏法提取,藁本内酯含量 40%)由甘肃省轻工业科学研究所友情提供; $A\beta_{25-35}$ 购于(上海强耀生物科技有限公司,批号:20160509); Rat APP ELISA KIT(上海酶联生物科技有限公司,批号:1069820); Rat $A\beta_{1-42}$ ELISA KIT(上海酶联生物科技有限公司,批号:1069821); Rat Ach ELISA KIT(上海酶联生物科技有限公司,批号:1069818); Rat ChAT ELISA KIT(上海酶联生物科技有限公司,批号:1069819); AChE 试剂盒(南京建成生物化学试剂有限公司,批号:20161218); MDA 试剂盒(南京建成生物化学试剂有限公司,批号:20161221); SOD 试剂盒(南京建成生物化学试剂有限公司,批号:20161221); 考马斯亮蓝蛋白测试盒(南京建成生物化学试剂有限公司,批号:20161220); 盐酸多奈哌齐(安理申)(卫材(中国)药业有限公司,批号:1604043)购于甘肃中医药大学附属医院;青霉素 160 万单位(华北制药股份有限公司,批号:F6057301)购于甘肃中医药大学附属医院。

Morris 水迷宫视频跟踪系统(成都泰盟科技有限公司,型号:WMT-100); 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司,型号:DNM-9602); 紫外分光光度计(日本岛津,型号:UV-120-02); 数字恒温水浴锅(江苏正基仪器有限公司,型号:HH-S2); 台式高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备有限公司,型号:CT14RD); HANGPING 电子秤(上海精科公司天平仪器厂,型号:JY4001)。大鼠脑立体定位仪(成都泰盟科技有限公司,型号:WT-200); 牙科钻(韩国世新公司,型号:STRONG-90); 微量进样器(上海安亭微量进样器厂)。

1.3 造模与给药

实验大鼠在 SPF 级实验室适应性饲养 3 天后进行学习记忆能力筛选,剔除不合格大鼠。将合格的大鼠随机选取 10 只(雌雄各半)为假手术组,其余大鼠全部以 10% 水合氯醛(350 mg/kg)行腹腔注射麻醉,参考《大鼠脑立体定位图谱》^[3] 在海马 CA1 区注射已孵化好的 $A\beta_{25-35}$ 溶液(假手术组大鼠等位点注射同剂量生理盐水)2 μ L 复制模型。假手术组及所有造模动物在手术后,皆用碘伏擦拭伤口并涂青霉素粉末 100 000 U。30 °C 恒温室内单笼留置至苏醒后放回大笼,并每天肌肉注射青霉素 100 000 U/只,连续 7 天。造模大鼠 7 天后进行水迷宫学习记忆能力测试,筛选造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、阳性(安理申)组、当归挥发油低、中、高剂量组等 5 组,每组 10 只。

精密量取当归挥发油适量,以吐温-80 为乳化剂,分散于生理盐水中,采用研磨法制成 O/W 型乳剂,作为供试药物,其中当归挥发油浓度分别为低剂量组 0.002 2 mL/mL, 中剂量组 0.004 4 mL/mL, 高剂量组 0.008 8 mL/mL。精密称取安理申在研钵中研为粉末,充分溶解于生理盐水中,制成 0.045 mg/mL 的溶液,作为阳性药物。精密量取生理盐水,加入同比例吐温-80 乳化剂,制成生理盐水混悬液,作为空白对照给药。

造模第 7 天筛选分组后开始给药。模型组与假手术组大鼠灌胃生理盐水(吐温-80)混悬液 2 mL/100 g · d⁻¹, 当归挥发油低(浓度 0.002 2 mL/mL)、中(浓度 0.004 4 mL/mL)、高剂量组(浓度 0.008 8 mL/mL)及阳性组(浓度 0.045 mg/mL)大鼠分别灌胃各组对应药液 2 mL/100 g · d⁻¹, 连续 28 天。

1.4 Morris 水迷宫行为学测试

1.4.1 定位航行实验

Morris 水迷宫水池按方位分为四个象限,将逃生平台放置在固定象限。测试时将大鼠面向池壁从四个象限各自的固定入水点放入水中,记录其入水后寻找到平台的时间,即为逃避潜伏期。如果大鼠在 2 min 内没有找到平台,则记为 120 s。共历时 4 天,每日更换入水象限进行测试。

1.4.2 空间探索实验

Morris 水迷宫实验第 5 天撤走水下逃生平台,任选 1 个象限入水点将大鼠放入水池,让大鼠在无平台情况下凭记忆寻找平台位置。记录大鼠入水后首次经过原平台位置的潜伏期及 120 s 内跨越原平台位置的次数及在原平台象限的游泳时间百分比。

1.5 血清 ACh、ChAT、AChE、SOD、MDA 及海马组织 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 测定

空间探索实验结束后,各组大鼠自由饮水、禁食12 h,然后腹主动脉取血,4 ℃、10 000 r/min 离心3 min,取血清以 ELISA 法测定乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)含量及胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)活性、比色法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平,然后处死动物,迅速取出脑组织,分离海马,加生理盐水制成10%的匀浆,4 ℃、10 000 r/min 离心5 min,吸取上清液以 ELISA 法测定 β 淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)、 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein 1-42, $\text{A}\beta_{1-42}$)含量。

1.6 统计学方法

用SPSS20.0统计软件进行数据分析处理,数据以Mean \pm SD表示后,代入Graphpad Prism8.0软件进行组间数据对比,采用独立样本t检验,制做图形表现结果间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; $P < 0.01$ 为差异显著。

2 结果

2.1 动物死亡情况

由于手术造模创伤较大,且每只动物每天灌胃给药,实验周期较长,各组出现了不同程度的动物死亡。其中模型组、假手术组各死亡2只,当归挥发油低、中剂量组各死亡1只,阳性组死亡3只。

2.2 Morris 水迷宫试验测定学习记忆能力结果

2.2.1 对AD模型大鼠定位航行能力的影响

模型组大鼠逃避潜伏期明显延长,目标象限滞留时间较少,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);干预治疗后当归挥发油各组大鼠逃避潜伏期均有不同程度缩短,目标象限滞留时间均有不同程度增多,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图1、2)。

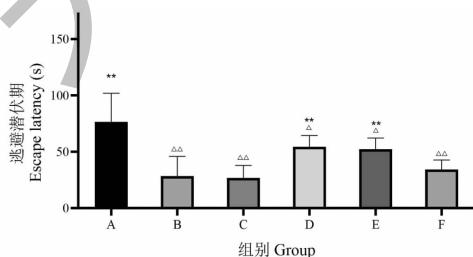


图1 各组大鼠逃避潜伏期

Fig. 1 Escape latency of rats in each group

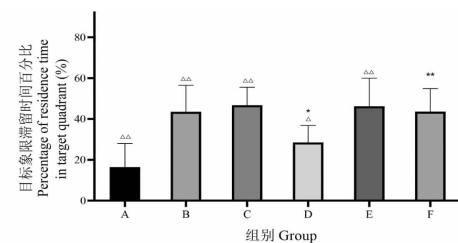


图2 各组大鼠目标象限滞留时间百分比

Fig. 2 Percentage of retention time in target quadrant of rats in each group

注:A为模型组;B为假手术组;C为阳性组;D为当归挥发油低剂量组;E为当归挥发油中剂量组;F为当归挥发油高剂量组。与模型组相比, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$;与高剂量组相比, $*$ $P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$,下同。Note: A is model; B is sham operation group; C is Positive drug group; D is Angelica volatile oil low dose group; E is Angelica volatile oil middle dose group; F is Angelica volatile oil high dose group. Compared with the model group, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$; Compared with high dose group, $*$ $P < 0.05$,

$^{**}P < 0.01$, the same below.

2.2.2 对AD模型大鼠空间探索能力的影响

模型组大鼠首次到达原逃生平台位置的潜伏时间明显延长,穿越原平台位置的次数、在目标象限滞留时间较少,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);干预治疗后当归挥发油各剂量组大鼠首次到达原平台位置的潜伏期明显缩短,穿越原平台位置的次数均有不同程度提升,在目标象限滞留时间均有不同程度增多,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图3、4、5)。

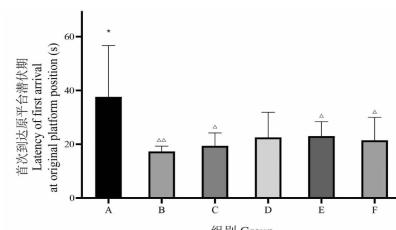


图3 各组大鼠首次到达原平台位置潜伏期

Fig. 3 Latency of rats in each group reaching the original platform for the first time

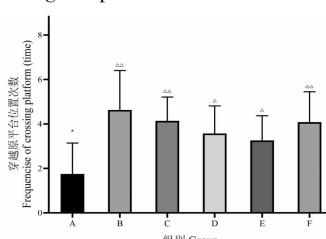


图4 各组大鼠穿越原平台位置次数

Fig. 4 Times of rats crossing the original platform in each group

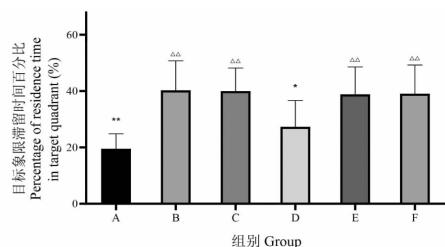


图 5 各组大鼠目标象限滞留时间百分比

Fig. 5 Percentage of retention time in target quadrant of rats in each group

2.3 对 AD 模型大鼠血清 ACh 含量与 ChAT、AChE 活性的影响

模型组大鼠血清 ACh 含量与 ChAT 活力明显降低, AChE 活力明显增强, 与假手术组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) ; 干预治疗后当归挥发油各剂量组大鼠血清 ACh 含量提高, ChAT 活力增强, AChE 活力减弱, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$) (见图 6~8)。

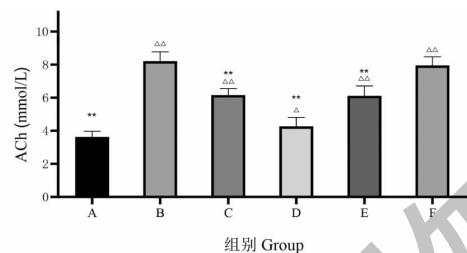


图 6 各组大鼠血清 ACh 水平

Fig. 6 Serum ACh level of rats in each group

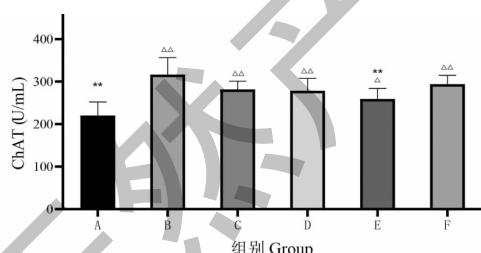


图 7 各组大鼠血清 ChAT 水平

Fig. 7 Serum ChAT level of rats in each group

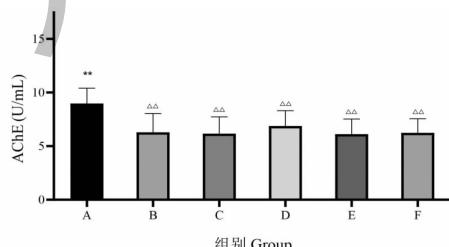


图 8 各组大鼠血清 AChE 水平

Fig. 8 Serum AChE levels of rats in each group

2.4 对 AD 模型大鼠血清 SOD 活性、MDA 水平的影响

模型组大鼠血清 SOD 活力显著降低, MDA 水平明显增高, 与假手术组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) ; 干预治疗后当归挥发油各剂量组大鼠血清 SOD 活力显著增强, 高剂量组大鼠 MDA 水平明显降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$) (见图 9、10)。

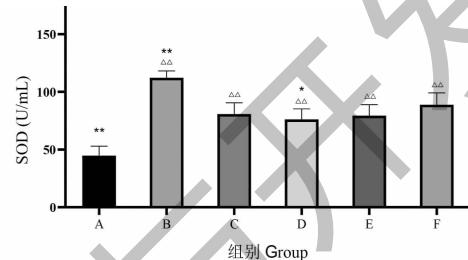


图 9 各组大鼠血清 SOD 活性

Fig. 9 Serum SOD activity of rats in each group

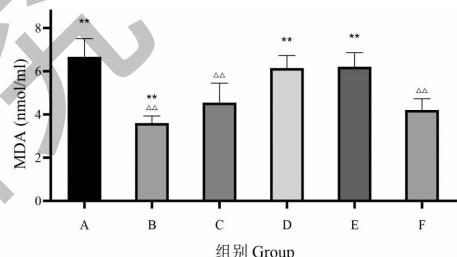


图 10 各组大鼠血清 MDA 水平

Fig. 10 Serum MDA level of rats in each group

2.5 对 AD 模型大鼠海马 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量的影响

模型组大鼠海马组织 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量明显增高, 与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ; 干预治疗后当归挥发油各组大鼠海马组织 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量明显降低, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$) (见图 11)。

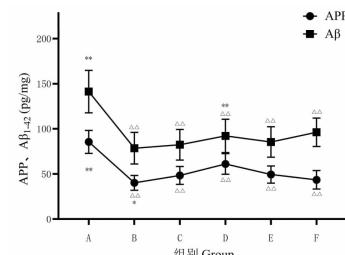
图 11 各组大鼠 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白含量

Fig. 11 Mice in each group APP and $\text{A}\beta_{1-42}$ protein content

3 讨论与结论

AD 作为神经系统常见的一种退行性疾病, 已

跃居全球十大死因之列。中医药防治 AD 历史久远,文献记录丰富,且现代研究表明中医药治疗 AD 具有明显的疗效和安全性。当归甘补辛散而性情温和,不仅能补血、活血,还可疏达肝气、调畅气机。如《景岳全书·本草正》指出:“当归,其味甘而重,故专能补血;其气轻而辛,故又能行血。补中有动,行中有补,诚血中之气药,亦血中之圣药也。……大约佐之以补则补,故能养营养血,补气生精,安五脏,强形体,益神志,凡有形虚损之病,无所不宜。”《药鉴》云:“当归气温,味辛甘,气味俱轻,可升可降,阳也。多用,大益于血家,诸血证皆用之。但流通而无定,由其味带辛甘而气畅也,随所引导而各至焉。入手少阴,以其心主血也;入足太阴,以其脾藏血也;入足厥阴,以其肝藏血也。”可见,当归气血同调,补虚通滞,是补血活血、调肝导滞之要药,符合 AD “痰瘀虚”三大病机。现代研究亦表明,当归具有抗自由基氧化、抗衰老作用^[4],可缓解脑缺血后细胞的凋亡^[5],减轻痴呆小鼠记忆缺失^[1],显示出对 AD 的潜在防治作用。当归挥发油是其重要的药效部位,含有苯酞类、酚类、萜烯类等化合物。已证实多类化合物具有保护神经、改善学习记忆的能力,如对苯酞类化合物中常见的藁本内酯的研究显示,藁本内酯可通过促进清除 A β 沉积的途径保护神经元^[6]。Liu 等^[7]预测当归挥发油质量标志物,认为当归挥发油的核心靶点位于海马、大脑皮层、基底节等区,且与神经保护、免疫调节相关。由于当归挥发油中部分化合物不稳定,易发生异构化和降解反应^[8],为尽可能保证当归挥发油的稳定性,极大程度还原其对脑神经的作用,本次实验采用当归挥发油灌胃的方式探究其对 AD 大鼠的作用。

本研究以海马 CA1 区注射 A β_{25-35} 溶液复制 AD 模型,从神经递质改变、氧化应激及 β 淀粉样蛋白沉积等角度探讨了当归挥发油对 AD 大鼠学习记忆的影响。结果显示,当归挥发油可显著缩短模型大鼠逃避潜伏期,延长目标象限滞留时间,缩短首次到达原逃生平台位置潜伏时间,增多跨原平台次数,并可显著提升血清 ACh 含量与 ChAT、SOD 活性,降低血清 AChE 活性、MDA 水平及海马 APP、A β_{1-42} 含量,较好地改善了模型大鼠的学习记忆能力,表明其对 AD 具有一定的防治作用。

众多研究表明,老年斑(senile plaques, SP)是 AD 的核心病理表现,由 APP 裂解为 A β 后进一步聚合而成。A β_{1-42} 与 A β_{1-40} 是 APP 的裂解产物,其中

A β_{1-42} 更容易聚集,具有较强的细胞毒性。当脑内 A β_{1-42} 产生与清除机制的平衡遭到破坏,导致 A β_{1-42} 在脑内过多堆积,呈现出弥散型斑块即 SP; A β_{1-42} 的聚积还可促使氧化应激、破坏机体胆碱能系统等进一步诱发或加速 AD 的发生发展。由于 APP、A β 尤其是 A β_{1-42} 的大量堆砌将会激发多种机制、通过多种途径促成 AD 的发生,因此 APP、A β 的含量测定成为衡量 AD 病情的指标之一。本研究表明当归挥发油可降低 APP、A β_{1-42} 含量,其中当归挥发油与 APP 含量存在量效关系,当归挥发油中剂量对 A β_{1-42} 的抑制最强。当归挥发油高剂量降低 APP 含量效果最佳,但此时 A β_{1-42} 含量却高于当归挥发油低、中剂量组,在今后的研究中可进一步探索当归挥发油抑制 APP、A β_{1-42} 含量的最佳浓度、高剂量当归挥发油是否在抑制 APP 表达的同时激活其他促进 A β_{1-42} 产生的通路,以及降低 APP 含量是否存在有效范围。

机体在自然衰老的过程中神经元会产生大量自由基^[9],自由基作用于脂质发生过氧化反应,形成具有细胞毒性的终极产物 MAD,引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,亦能促进 A β 的毒性和聚集,促使 AD 老年斑的形成^[10]。而胆碱能神经系统与大脑记忆的形成、贮存亦密切相关,直接影响着学习、记忆的能力^[11]。其中乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是促进学习记忆的重要神经递质,广泛分布于脑组织,由胆碱、乙酰辅酶 A 在 ChAT 的催化下合成,在 AChE 的切割下分解。可见,ChAT 和 AchE 的活性反映了 ACh 在脑中合成与代谢的速率,是维持 Ach 含量动态平衡的矛盾二体^[12]。因此,ChAT 催化活性的降低和 AChE 裂解活性的增强会引发乙酰胆碱的减少甚至缺失,必将导致机体认知功能下降,记忆能力丧失。本研究表明,当归挥发油可显著提升血清 ACh 含量与 ChAT,降低血清 AChE 活性,其中中剂量当归挥发油对 ChAT 的作用弱于低、高剂量组,但当归挥发油与 Ach 水平存在量效关系。高剂量当归挥发油提升 SOD 活性,降低 MDA 水平效果最佳。现从胆碱能神经递质与氧化角度证实当归挥发油对 AD 的作用,与此前用当归水煎液干预 AD 模型小鼠的结果一致^[1],因此当归挥发油可能是起效的主要成分之一。本实验仅探讨了当归挥发油对 AD 的治疗作用,其在体内外的吸收代谢规律及改善胆碱能神经递质及提升抗自由基氧化能力等机制还需进一步探究。

综上所述,当归挥发油可有效改善AD模型大鼠学习记忆能力,其机制可能与促进A β 的代谢、改善胆碱能神经递质及提升抗自由基氧化能力等多通路及相互间级联作用相关。

参考文献

- 1 Wu HY, Li HL, Wang HP, et al. The effects of *Angelica* with high dose on the learning and memory, AchE activity and ChAT activity of mice model of senile dementia induced by scopolamine [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2013, 24:552-554.
- 2 Yang ZY, Wu HY, Li HL, et al. Protective effect of *Angelica*-containing serum against neurotoxicity of Alzheimer's disease cell model [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2014, 41(1):164-167.
- 3 Xinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. San Diego: Academic Press, 1998.
- 4 Qi XL, Xu XF, Wei XD. Effect of *Angelica* in the anti-oxidation system in D-galactose-induced mice aging model [J]. *Heilongjiang Med Pharm*(黑龙江医药科学), 2003, 26(1): 223.
- 5 Yang JW, Liao WJ. Effects of *Angelica* to Apoptosis and Map-2 on focal cerebral ischemia injury of rat brain. [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2001, 28:505-506.
- 6 Zhang SJ, Xu TT, Wang Q. Effect of ligustilide on A β trans-
- port and clearance via regulating GLUT1 in the brain microvascular endothelial cells of animal models with Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropharm*(神经药理学报), 2019, 9(4):52.
- 7 Liu XL, Huang XY, Zhang XF, et al. Q-Marker prediction of volatile oil of *Angelicae Sinensis Radix* based on GC-MS analysis combined with network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2021, 52:2696-2706.
- 8 Zhu H, Liu SL, Xiong L, et al. Constituents of *angelica* oil and their neuroprotective effects [J]. *Nat Prod Res*(天然产物研究与开发), 2020, 32:1477-1483.
- 9 Zeng WY, Dong KL. Overview of etiological mechanism of AD [J]. *Hunan J Tradit Chin Med*(湖南中医药杂志), 2006, 22(1):77-80.
- 10 Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, et al. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54:533-539.
- 11 Deng HC. The risk factors analysis of Alzheimer's disease [J]. *Chin J Clin Rat Drug Use*(临床合理用药杂志), 2015, 8(19):1-2.
- 12 Cheng SZ, Wang XM, Liu H, et al. Experiment study on the pathogenesis of AD model rats induced by aluminum [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*(中风与神经疾病杂志), 2012, 29(1): 41-43.