

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.05.004

绿茶多酚对东莨菪碱及 D-乳糖所致小鼠学习记忆障碍的影响

李 军 辛 勤 林 丽 文

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘要 目的 研究绿茶多酚 (green tea polyphenols, GTPs) 对记忆障碍模型小鼠学习记忆功能的影响。**方法** 以东莨菪碱和 D-半乳糖复制记忆障碍小鼠模型, 以跳台和水迷宫为学习记忆指标, 观察不同剂量的 GTPs 对小鼠学习记忆的影响。**结果** 在东莨菪碱和 D-半乳糖记忆障碍小鼠模型中, 与模型组比较, GTPs 能减少小鼠在跳台实验中的错误次数 ($P < 0.05$), 延长跳台潜伏期 ($P < 0.01$), GTPs 可缩短小鼠在水迷宫实验中的潜伏期 ($P < 0.05$), 减少错误次数 ($P < 0.05$)。**结论** GTPs 对东莨菪碱及 D-半乳糖造成的两种学习记忆获得障碍小鼠的学习记忆能力均有明显的改善作用。

关键词 绿茶多酚; 学习记忆障碍; 东莨菪碱; D-半乳糖

中图分类号: R285.5 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)10-316-04

Effects of Green tea polyphenols on scopolamine and D-galactose-induced learning and memory impairment in mice

LI Jun, XIN Qin, LIN Li-wen

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the improvement of Green tea polyphenols in the memory acquisition impairment of mice. **Methods** Memory acquisition impairment model in mice with the method of scopolamine intraperitoneal injection was made. D-galactose of 140mg/kg was intraperitoneally injected into mice to establish learning behaviour obstructed mice model. The step-down and water maze were used as evaluation indexes, and the effects of different dosages Green tea polyphenols on mouse learning dysmnesia were observed. **Results** Among scopolamine and D-galactose-induced mouse dysmnesia models, Green tea polyphenols could decrease the number of errors in the step down test ($P < 0.05$), and prolonged the latency significantly ($P < 0.01$). In the water maze test, Green tea polyphenols could decrease the mistaken reaction times ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and shorten the incubation period. **Conclusion** Green tea polyphenols have the improvement in the memory acquisition impairment of mice induced by scopolamine, and D-galactose.

Key words: Green tea polyphenols; Learning and memory impairment; Scopolamine; D-galactose

老年性痴呆, 即阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 多发在老年, 以近期记忆障碍为主要临床症状, 以神经元纤维缠结、大量记忆性神经元丢失以及 β -淀粉样蛋白沉积为主要病理改变的进行性神经变性疾病, 目前仍无良好的防治药物^[1-2]。绿茶是一种非发酵茶, 其主要活性成分是绿茶多酚 (green tea polyphenols, GTPs)^[3]。GTPs 是绿茶中酚类物质的总称, 其中儿茶素类含量最多, 近年研究发现 GTPs 具有抗氧化、减轻自由基损伤、抗衰老、抗炎、抗菌、抗癌等多种药理作用^[4]。本实验以东莨菪碱和 D-半乳糖建立记忆障碍小鼠模型,

观察 GTPs 对小鼠学习记忆功能的影响, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 昆明种小鼠, 雄性, 体重 (20 \pm 2.0)g, 由山东鲁抗医药股份有限公司实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 GTPs (郑州荔诺生物科技有限公司, 批号: CDF20120302); 吡拉西坦 (吉林双药药业集团有限公司, 批号: 20111001); 氢溴酸东莨

苕碱(上海禾丰制药有限公司,批号:110402);生理盐水(石家庄四药有限公司,批号:110824405);D-半乳糖(上海源聚生物科技有限公司,批号:101201)。

1.1.3 主要仪器设备 小鼠自主活动测试仪(成都泰盟科技有限公司,ZZ-6 型);小鼠跳台测试仪(成都泰盟科技有限公司,DT-200 型);程控水迷宫(中国医学科学院药物研究所,SMG-2 型)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与给药 首先将小鼠在实验室饲养 7d 以适应环境,然后进行预选,即将小鼠放入跳台装置,加以 24V 电压,将过度敏感(通电立刻出现电惊厥)小鼠和极不敏感(不表现逃避电击反应)小鼠淘汰,筛选出 60 只合格小鼠。随机分为 6 组(每组 10 只):1)正常对照组;2)模型组;3)阳性对照组(吡拉西坦);4)GTPs 低剂量组;5)GTPs 中剂量组;6)GTPs 高剂量组。各组均按 0.1ml/10g 体重灌胃给药,每日 1 次。1)、2)组灌胃 0.9%生理盐水;3)组灌胃吡拉西坦 600mg/kg;4)组灌胃 GTPs 100mg/kg;5)组灌胃 GTPs 250mg/kg;6)组灌胃 GTPs 625mg/kg^[5]。

1.2.2 东莨菪碱致小鼠记忆获得障碍实验 按上述方法分组并连续给药 14d,末次灌胃给药后 2h,除 1)组灌胃等容积的生理盐水外,2)~6)组分别按 2mg/kg 腹腔注射东莨菪碱(造模),注射后 30min,进行跳台实验训练,24h 后进行测试。第 17 天开始进行水迷宫行为实验,第 17 至第 19 天训练,第 20 天测试且数据作为记忆成绩。

1.2.3 D-半乳糖致小鼠学习记忆障碍实验 按上述方法分组,除 1)组外;2)~6)组每日颈背部皮下注射 140mg/kg·d D-半乳糖,连续 6 周,造成学习记忆障碍的模型小鼠。同时,1)组和 2)组灌胃等体积生理盐水,其余 4 组灌胃相应药物,给药体积均为 0.1ml/10g,连续 42d。末次给药后 1h 进行跳台训练,第 43 天进行测试且数据作为记忆成绩。第 45 至第 47 天进行水迷宫训练,第 48 天测试且数据作为记忆成绩。

1.2.4 跳台实验(step-down test)^[6] 实验时先将小鼠放入跳台箱中适应环境 3min,随后将其放在安全平台上并通以 24V 交流电,如小鼠跳下平台,正常反应是跳回平台以躲避伤害性刺激。但多数动物可能再次或多次跳下平台,受到电击后又跳回平台。以小鼠跳下平台双足接触铜栅记为错误次数,如此训练 5min。24h 后进行测试,直接将小鼠

放在安全平台上并通电,记录 5min 内小鼠首次跳下平台的时间(即潜伏期)和跳下平台受电击的次数(即错误次数),作为记忆成绩。测试时若小鼠停留在平台上超过 5min,则其潜伏期记为 300s。

1.2.5 水迷宫实验(water maze test)^[7] 实验开始后将小鼠头朝迷宫壁放在起点,记录小鼠从起点游至终点的时间(潜伏期)及进入迷宫盲端的错误次数,3min 内游不出者潜伏期记为 180s。若小鼠在规定时间内不能游至台阶,则将其引导至台阶,并使其在终点停留 20s。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 东莨菪碱致获得记忆障碍小鼠跳台实验

与正常对照组相比,模型组小鼠在跳台试验中的错误次数增多($P < 0.05$),潜伏期明显缩短($P < 0.01$)。与模型组相比,GTPs 中、高剂量组对东莨菪碱所致小鼠记忆获得障碍有明显改善作用,表现为 5min 内错误次数减少($P < 0.05$),潜伏期明显延长($P < 0.01$),而且与吡拉西坦组比较无差异。结果见表 1

表 1 GTPs 对东莨菪碱致记忆获得障碍小鼠跳台成绩的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量 (mg/kg)	潜伏期(s)	错误次数(次)
正常对照组	10		247.1±28.5	0.3±0.68
模型组	10		81.2±19.4 [#]	3.1±1.33 [#]
GTPs 低剂量组	10	100	155.6±35.5 [*]	0.4±0.70
GTPs 中剂量组	10	250	178.9±22.8 ^{**}	0.3±0.48 [*]
GTPs 高剂量组	10	625	178.6±18.5 ^{**}	0.2±0.42 [*]
吡拉西坦组	10	600	249.0±24.5 ^{**}	0±0 [*]
F 值			7.487	6.289
P			0.000	0.000

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

2.2 东莨菪碱致获得记忆障碍小鼠水迷宫实验

与正常对照组相比,模型组小鼠进入盲端次数(即错误次数)明显增多($P < 0.01$),到达终点的时间(潜伏期)明显延长($P < 0.01$)。绿茶多酚低、中、高剂量组均使小鼠的错误次数减少($P < 0.05$),潜伏期缩短($P < 0.05$)。而且绿茶多酚各剂量组与吡拉西坦组之间无差异。结果见表 2。

表2 GTPs对东莨菪碱造成记忆获得障碍小鼠水迷宫实验的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量 (mg/kg)	潜伏期(s)	错误次数(次)
正常对照组	10		82.3±14.4	4.8±1.4
模型组	10		159.0±26.2 [#]	9.4±2.7 [#]
GTPs低剂量组	10	100	112.1±11.9 [*]	6.2±1.4 [*]
GTPs中剂量组	10	250	106.4±18.0 [*]	6.2±1.9 [*]
GTPs高剂量组	10	625	83.2±18.2 ^{**}	5.6±1.4 [*]
吡拉西坦组	10	600	100.2±22.9 ^{**}	4.8±1.6 ^{**}
F值			6.592	2.414
P			0.000	0.044

注:与正常对照组比较, # $P<0.05$, # # $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.3 D-半乳糖致学习记忆障碍小鼠跳台实验

与正常对照组相比,模型组小鼠首次错误的潜伏期明显缩短($P<0.01$),错误次数增加($P<0.05$)。GTPs低、中、高剂量组小鼠的错误次数较模型组减少($P<0.05$),潜伏期较模型组明显延长($P<0.01$)。而且与吡拉西坦组比较无差异。结果见表3。

表3 GTPs对D-半乳糖致记忆获得障碍小鼠跳台实验成绩的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量 (mg/kg)	潜伏期(s)	错误次数(次)
正常对照组	10		232.3±66.8	0.17±0.38
模型组	10		96.9±12.6 [#]	0.64±0.50 [#]
GTPs低剂量组	10	100	208.6±36.9 ^{**}	0.18±0.60 [*]
GTPs中剂量组	10	250	236.5±33.5 ^{**}	0.18±0.40 [*]
GTPs高剂量组	10	625	200.6±28.1 ^{**}	0.27±0.47 [*]
吡拉西坦组	10	600	215.7±27.2 ^{**}	0.33±0.65 [*]
F值			9.707	8.106
P			0.000	0.000

注:与正常对照组比较, # $P<0.05$, # # $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.4 D-半乳糖致学习记忆障碍小鼠水迷宫实验

与正常对照组相比,模型组小鼠进入迷宫首端的错误次数增多($P<0.05$),到达终点的潜伏期明显延长($P<0.01$)。GTPs低、中、高剂量组小鼠的错误次数较模型组减少($P<0.05$),潜伏期较模型组明显缩短($P<0.01$)。而且与吡拉西坦组比较无差异。结果见表4。

表4 GTPs对D-半乳糖致记忆获得障碍小鼠水迷宫实验的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量 (mg/kg)	潜伏期(s)	错误次数(次)
正常对照组	10		62.2±12.9	4.9±1.1
模型组	10		152.3±27.3 [#]	13.0±2.3 [#]
GTPs低剂量组	10	100	91.8±14.1 ^{**}	4.8±1.9 [*]
GTPs中剂量组	10	250	55.4±12.0 ^{**}	2.4±0.6 ^{**}
GTPs高剂量组	10	625	53.4±17.2 ^{**}	3.5±0.8 ^{**}
吡拉西坦组	10	600	70.9±11.8 ^{**}	3.2±0.6 ^{**}
F值			14.525	6.761
P			0.000	0.000

注:与正常对照组比较, # $P<0.05$, # # $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

学习、记忆和思维是大脑的高级活动,记忆障碍AD的重要症状。现代研究认为,中枢胆碱能神经系统与学习记忆密切相关,乙酰胆碱(Ach)为脑内促进学习记忆的重要神经递质,东莨菪碱是中枢M型胆碱受体拮抗剂,能特异性阻滞信息由第一级记忆向第二级记忆的转移过程,干扰获得近期记忆的能力,从而造成记忆获得障碍。现已广泛用于动物实验中建立认知功能损伤的动物模型。本研究给小鼠一次腹腔注射东莨菪碱2mg/kg,造成小鼠记忆获得障碍。

本研究还采用了长期颈部皮下注射D-半乳糖的方法建立具有记忆功能障碍的小鼠模型。在一定时间内连续给小鼠注射D-半乳糖,机体细胞内半乳糖浓度逐渐升高,在醛糖还原酶催化下还原成半乳糖醇,半乳糖醇这种代谢终产物不能进一步代谢而堆积在细胞内,导致细胞肿胀、功能障碍及全身代谢紊乱,最终导致机体衰老,这一过程与机体的自然衰老过程相似^[8],同时大量的D-半乳糖在半乳糖氧化酶的作用可产生过量的超氧阴离子自由基(O_2^-),与核酸、蛋白质、脂质等生物大分子反应,损坏机体的功能,加重对细胞的损伤,短期内可引起小鼠衰老甚至死亡^[9]。D-半乳糖致小鼠衰老模型是目前国内应用最多的衰老模型。

药物对学习记忆的影响,主要是通过行为学的方法来观察,本文采用了2种不同的行为学测定实验来反映衰老过程中小鼠学习记忆能力的变化,其中跳台法反映小鼠的被动回避能力,水迷宫法反映小鼠的空间学习记忆能力;这2个行为学指标均可客观地反映出各组小鼠的学习记忆能力情况。

本文结果表明,腹腔注射东莨菪碱的小鼠出现了明显的记忆障碍,GTPs 中、高剂量能明显改善小鼠在跳台实验中的记忆再现缺失,使小鼠的跳台错误次数减少,潜伏期明显延长;GTPs 各剂量组能拮抗小鼠在水迷宫实验中的空间定向学习记忆障碍,表现为从起点到达终点平台的潜伏期缩短,进入盲端的错误次数减少,明显提高学习的记忆能力。本文结果还表明,D-半乳糖模型组小鼠也出现了明显的记忆障碍,GTPs 各剂量组可明显改善 D-半乳糖引起的小鼠记忆减退,且具有一定的剂量依赖性。

综上所述,本文采用 2 种比较成熟的实验动物模型,采用 2 种行为学实验方法,证明 GTPs 能较好改善记忆获得障碍模型小鼠的记忆功能。GTPs 对学习记忆障碍的改善作用可能与其抗氧化、增强对自由基的清除、保护脑神经细胞免受自由基的损害作用有关,其具体作用机理正在研究中。

参考文献:

[1] 黄忠仕,黄仁彬,李江,等. 龙眼参多糖对不同模型拟痴呆小

(上接第 315 页)因子(NGF),后者通过作用于邻近细胞的旁分泌方式促进神经发生^[6-9]。在体外 EPO 促进源于胚胎脑皮质的 NSCs 分化,推测可能原因:一方面,源于大鼠胚胎脑皮质的 NSCs 有与促红细胞生成素相结合的受体,体外培养基中加入 EPO,EPO 便与脑皮质 NSCs 上的 EPO-R 结合启动了信号传导通路而促进 NSCs 向神经元方向的分化,另一方面可能刺激了源于胚胎脑皮质的 NSCs 分泌神经生长因子,此因子作用于邻近神经干细胞,从而促进了 NSCs 向神经元方向的分化。NSCs 向神经元方向分化的具体调控机制目前尚不清楚,受自身基因和外来信号等方面共同调节,下一步将继续深入探讨胚胎 NSCs 向神经元定向诱导分化的影响因素及其分化机制,为 NSCs 移植治疗中枢神经系统损伤及神经变性疾病提供理论基础。

参考文献:

[1] Burger D,Lei M,Geoghegan-Morphet N,et al. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase[J]. Cardiovasc Res, 2006, 72(1):51-59.
 [2] 袁丽丽,姜海燕,杜红梅,等. EPO 对鼠胚脑皮质神经干细胞

鼠的益智作用[J]. 右江民族医学院学报,2004,26(4):463-465.
 [2] 杜怡峰,闫鹏,韩晓娟. Alzheimer 病胰岛素信号通路的研究[J]. 济宁医学院学报,2012,35(2):84-92.
 [3] Cabrera C,Artacho R,Giménez R. Beneficial effects of green tea-a review[J]. J Am Coll Nutr,2006,25(2):79-99.
 [4] Thielecke F,Boschmann M. The potential role of green teacatechins in the prevention of the metabolic syndrome-a review[J]. Phytochemistry,2009,70(1):11-24.
 [5] 杨文豪,吕俊华. 绿茶多酚对学习记忆障碍小鼠的改善作用及其机制[J]. 华西药学杂志,2008,23(3):277-279.
 [6] 徐叔云,卞如廉,陈修. 药理实验方法学 3 版[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:826-827.
 [7] 辛勤,刘善庭,葛顺,等. 替米沙坦对脑缺血再灌注小鼠记忆障碍的改善作用[J]. 中国新药与临床杂志,2006,25(9):696-699.
 [8] 刘显明,李月芬,李国平. 茶氨酸对 D-半乳糖衰老模型小鼠抗衰老作用的实验研究[J]. 创伤外科杂志,2007,10(3):257-259.
 [9] 白雪,杨杰,刘昌福. 延胡索总生物碱对 D-半乳糖所致衰老模型小鼠相关指标的影响[J]. 贵州医药,2008,32(5):399-401.

(收稿日期 2014-07-21)

抗凋亡作用的研究[J]. 济宁医学院学报,2011,34(2):77-80.
 [3] 袁丽丽,马登殿,杜红梅,等. 促红细胞生成素促进体外鼠胚脑皮质神经干细胞增殖[J]. 解剖科学进展,2010,16(6):550-553.
 [4] Yu X,Shacka JJ,Eells JB,et al. Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development[J]. Development,2002,129:505-516.
 [5] Wallach I,Zhang J,Hartmann A,et al. Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells[J]. Pediatr Res,2009,65:619-624.
 [6] Sargin D,El-Kordi A,Agarwal A,et al. Expression of constitutively active erythropoietin receptor in pyramidal neurons of cortex and hippocampus boosts higher cognitive functions in mice[J]. BMC Biol,2011,9:27.
 [7] Hirabayashi Y,Itoh Y,Tabata H,et al. The Wnt/{beta}-catenin in pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells[J]. Development,2004,131:2791-2801.
 [8] Wang L,Zhang Z,Wang Y,et al. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats[J]. Stroke,2004,35:1732-1737.
 [9] 胡宝洋. 干细胞神经定向分化研究与医学转化[J]. 济宁医学院学报,2012,35(5):316-321.

(收稿日期 2014-07-10)