

EGCG-Zn对血管性痴呆大鼠学习记忆及抗氧化能力的影响

郭亚娟^{1*}, 曾 坤¹, 郭换营¹, 张校晨¹, 张 昀^{1#}, 刘绣华^{2,3} (1. 河南大学药学院, 河南 开封 475001; 2. 河南大学天然产物与免疫工程重点实验室, 河南 开封 475001; 3. 河南大学化学化工学院, 河南 开封 475001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2642-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.14

摘要 目的: 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与锌离子螯合得到的EGCG-Zn对血管性痴呆(VD)大鼠的学习记忆及抗氧化能力的影响。方法: 将大鼠随机分为假手术组、模型组、葡萄糖酸锌组(阳性对照, 70 mg/kg)、EGCG组(5 mg/kg)和EGCG-Zn低、中、高剂量组(2、5、10 mg/kg), 每组10只。采用大脑中动脉闭塞法制备VD模型, 造模7 d后每天ig相应药物1次, 连续28 d。采用Morris水迷宫实验评价各组大鼠的空间学习和记忆能力, 分光光度比色法检测各组大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期延长, 平台象限游泳距离百分比(dP/dT)降低($P < 0.01$); 脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性降低, MDA含量增加($P < 0.01$)。与模型组比较, EGCG组和EGCG-Zn各剂量组大鼠记录第4天的逃避潜伏期明显缩短, dP/dT明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性增强, MDA含量减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。与EGCG组和葡萄糖酸锌组比较, EGCG-Zn各剂量组大鼠逃避潜伏期缩短, dP/dT升高; 脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性增强, MDA含量减少, 以高、中剂量组效果较明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: EGCG-Zn可以提高VD大鼠的学习记忆能力和抗氧化能力, 且效果优于EGCG。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯; 锌离子; 血管性痴呆; 大鼠; 水迷宫; 抗氧化; 学习记忆

Effect of EGCG-Zn on the Learning, Memory and Antioxidant Abilities in Vascular Dementia Rats

GUO Yajuan¹, ZENG Kun¹, GUO Huanying¹, ZHANG Xiaochen¹, ZHANG Yun¹, LIU Xiuhua^{2,3} (1. College of Pharmacy, Henan University, Henan Kaifeng 475001, China; 2. Key Lab. of Natural Medicine and Immune-engineering, Henan University, Henan Kaifeng 475001, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University, Henan Kaifeng 475001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of EGCG-Zn chelated by epigallocatechin gallate (EGCG) and Zn ion on learning, memory and antioxidant abilities in vascular dementia (VD) rats. METHODS: Rats were randomly divided into sham group, model group, zinc gluconate group (positive control, 70 mg/kg), EGCG group (5 mg/kg), and EGCG-Zn low-dose, middle-dose, high-dose groups (2, 5, 10 mg/kg), 10 in each group. The VD models were induced by middle cerebral artery occlusion. The rats were intragastrically given relevant medicines after 7 d of modeling, once a day, for 28 d. Morris water maze were used to evaluate learning and memory abilities of rats. Spectrophotometric method was adopted to detect the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and malondialdehyde (MDA) content in brain tissue of rats. RESULTS: Compared with sham group, escape latency was extended in model group, percentage of platform quadrant swimming distance (dP/dT) was reduced ($P < 0.01$); SOD, CAT, GSH-Px activities in brain tissue were reduced, and MDA content was increased ($P < 0.01$). Compared with model group, escape latency on 4th d of recording was obviously shortened in EGCG group and EGCG-Zn dose groups, dP/dT was obviously increased and dose-dependent ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); SOD, CAT, GSH-Px activities in brain tissue were increased, MDA content was decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and dose-dependent. Compared with EGCG group and zinc gluconate group, escape latency was obviously shortened in EGCG-Zn dose groups, dP/dT was increased; SOD, CAT, GSH-Px activities in brain tissue were increased, MDA content was decreased; and the effects in high-dose, medium-dose groups were more obvious ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: EGCG-Zn can improve the learning, memory and antioxidant abilities in VD rats, and the effect is superior to EGCG.

KEYWORDS Epigallocatechin gallate; Zn ion; Cascular dementia; Rats; Morris water maze; Antioxidant; Learning and memory

血管性痴呆(Vascular dementia, VD)是脑血管疾病的常见并发症,是由一系列脑血管因素导致脑组织损害

引起的以认知功能障碍为特征的痴呆综合征。患者多表现为慢性、进行性、持续性智能障碍综合征,临床表现为记忆及认知等功能障碍^[1]。近年来,自由基损伤与VD之间的关系逐渐成为人们研究的热点问题。

茶叶中所含茶多酚具有明显的抗氧化和清除氧自由基的作用。研究显示,茶多酚可通过抗氧化作用来减

* 本科生。研究方向:天然药物。电话:0371-23880680。
E-mail:913279213@qq.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:天然药物。电话:0371-23880680。E-mail:zhangyun@henu.edu.cn

轻大鼠脑缺血再灌注损伤^[2]。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶叶中多酚类物质的主要成分,其能够明显改善VD模型动物的学习记忆能力^[3-4]。笔者利用EGCG上的酚羟基与锌离子螯合得到EGCG-Zn,研究表明,其体外清除自由基和抗氧化活性均优于EGCG^[5]。本文主要研究EGCG-Zn对VD大鼠学习记忆及抗氧化能力的影响,为EGCG-Zn的进一步研发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Morris水迷宫视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司);全波长酶标仪(美国Thermo公司)。

1.2 药品与试剂

EGCG-Zn(河南大学天然药物与免疫重点实验室提供,批号:20141001,纯度:≥95%);EGCG(南京春秋生物工程有限公司,批号:12050929,纯度:≥98%);葡萄糖酸锌片(海南制药厂有限公司,批号:130102,规格:每片含锌10 mg);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

清洁级SD大鼠,♂,体质量220~250 g,由郑州大学河南省实验动物中心提供,使用合格证号为SCXK(豫)2015-0004。

1.4 其他

中动脉阻塞(MCAO)线栓(北京西浓科技有限公司,线直径:0.26 mm,线头直径:0.34 mm)。

2 方法

2.1 建模

按文献[6]方法,以MCAO模拟VD模型。对大鼠ip10%水合氯醛(0.5 mL/100 g)麻醉后,仰位固定,分离右颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),结扎ECA与CCA,迅速于ECA与ICA分叉处作一切口,从切口处插入线栓,遇阻力时停止进线,实现MCAO,缝合切口,外留1 cm线栓。假手术组大鼠仅结扎ECA与ICA即可。2 h后,观察大鼠的行为状态,若出现左侧前肢蜷曲、行走转圈或行走向左侧倾倒的体征,则入选;未出现此体征或仍未清醒的大鼠弃用。将入选大鼠固定,提拉外留线头直至产生阻力,实现大脑中动脉再灌注,剪去多余线栓,正常饲养。

2.2 分组与给药

将大鼠随机分为假手术组、模型组、葡萄糖酸锌组(阳性对照,70 mg/kg)、EGCG组(5 mg/kg)和EGCG-Zn低、中、高剂量组(2.5、10 mg/kg,给药剂量按预实验设置)。按“2.1”项下方法,假手术组大鼠建立假手术模型,其余各组大鼠建立VD模型,始终保持每组10只大鼠。建模7 d后,各组大鼠ig相应药物,假手术组和模型组大鼠ig生理盐水,每天1次,每次10 mL/kg,连续给药28 d。

2.3 空间学习与记忆能力测试

从给药第22天开始,进行空间学习及记忆能力测试。采用Morris水迷宫进行实验,具体参考文献[7]方法操作。Morris水迷宫直径200 cm、高50 cm、水深30 cm,实验时水温为(26±1)℃。将水池等分为4个象限,任选其一的正中放置平台,水迷宫上方装有摄像机,大鼠的行程可全程记录下来。测试包括:(1)定位巡航实验。即将大鼠面向池壁放入水中,记录其在2 min内寻找到平台的时间(逃避潜伏期)。若在2 min内未找到平台,逃避潜伏期记为120 s。每天测2次,计算结果均值。给药第22天开始,训练2 d,第24天开始进行记录,连续记录4 d。(2)空间探索实验,即给药第28天撤除平台,在迷宫边缘任选一点将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠2 min内的游泳轨迹,分析平台所在象限游泳路径(dP)与总路径(dT)之比,即dP/dT。分别以逃避潜伏期和dP/dT评价各组小鼠的空间学习和记忆能力。

2.4 脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性及MDA含量检测

Morris水迷宫实验后,将大鼠断头取脑,制备脑组织匀浆,按照测定试剂盒说明书操作,采用分光光度比色法测定各组大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性及MDA含量。

2.5 统计学方法

采用SPSS 11.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 水迷宫实验结果

随着时间的延长,各组大鼠的逃避潜伏期均有缩短趋势。与假手术组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期延长,dP/dT降低($P < 0.01$)。与模型组比较,EGCG组和EGCG-Zn低、中、高剂量组大鼠记录第3、4天的逃避潜伏期缩短,dP/dT升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与EGCG组和葡萄糖酸锌组比较,EGCG-Zn中剂量组大鼠记录第4天的逃避潜伏期缩短,dP/dT升高($P < 0.05$);EGCG-Zn高剂量组大鼠记录第3、4天的逃避潜伏期缩短,dP/dT升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表1。

3.2 脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性及MDA含量测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性降低($P < 0.01$),MDA含量增加($P < 0.01$)。与模型组比较,EGCG组和EGCG-Zn各剂量组大鼠脑组织中SOD、CAT和GSH-Px活性增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA含量降低($P < 0.01$)。与EGCG组比较,EGCG-Zn中、高剂量组大鼠脑组织中SOD活性增强($P < 0.05$)。与葡萄糖酸锌组比较,EGCG-Zn各剂量组大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA含量降低($P < 0.05$),结果见表2。

4 讨论

表1 各组大鼠水迷宫实验逃避潜伏期及dP/dT的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Determination results of escape latency and dP/dT in water maze test of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	逃避潜伏期,s				dP/dT,%
	第1天	第2天	第3天	第4天	
假手术组	61.8±20.12	44.8±16.45	34.2±7.74	26.4±5.04	43.56±5.11
模型组	102.5±14.07**	93.4±12.47**	86.1±12.26**	78.1±8.77**	27.96±8.28**
EGCG组	94.1±18.17	87.2±14.76	75.6±9.43 [#]	64.7±12.65 ^{##}	34.56±7.05 [#]
葡萄糖酸锌组	97.1±16.02	89.1±18.25	80.2±16.30	69.8±15.50	29.93±8.12
EGCG-Zn低剂量组	94.1±14.53	86.3±18.75	75.5±14.28 [#]	60.1±11.01 ^{##}	34.68±7.44 [#]
EGCG-Zn中剂量组	92.9±19.72	83.3±14.34	72.9±10.45 ^{##}	54.5±12.73 ^{###}	39.81±5.77 ^{###}
EGCG-Zn高剂量组	93.0±15.16	79.5±12.63 [#]	66.8±11.06 ^{##}	49.8±13.06 ^{###}	41.37±8.17 ^{###}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与EGCG组比较,^Δ $P<0.05$;与葡萄糖酸锌组比较,[◇] $P<0.05$,^{◇◇} $P<0.01$

Note: vs. sham group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. EGCG group, ^Δ $P<0.05$; vs. Zinc gluconate group, [◇] $P<0.05$, ^{◇◇} $P<0.01$

表2 各组大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性和MDA含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Determination results of SOD, CAT, GSH-Px activities and MDA content in brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD,U/mg prot	CAT,U/mg prot	GSH-Px,U/mg prot	MDA,nmol/mg prot
假手术组	157.78±15.22	2.51±0.79	30.80±6.08	3.02±0.76
模型组	130.69±15.32**	1.53±0.45**	24.31±5.35**	4.77±0.82**
EGCG组	142.29±13.38 [#]	1.96±0.60 [#]	28.10±5.69 [◇]	3.87±0.81 [#]
葡萄糖酸锌组	134.36±10.50	1.54±0.43	23.57±5.45	4.31±0.74
EGCG-Zn低剂量组	145.29±10.82 [◇]	1.98±0.56 ^{◇◇}	28.55±5.47 ^{◇◇}	3.70±0.82 ^{##}
EGCG-Zn中剂量组	152.23±11.03 ^{###}	2.04±0.76 ^{◇◇}	28.75±6.03 ^{◇◇}	3.62±0.99 ^{##}
EGCG-Zn高剂量组	154.17±12.19 ^{###}	2.23±0.70 ^{###}	29.62±5.33 [◇]	3.59±0.67 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与EGCG组比较,^Δ $P<0.05$;与葡萄糖酸锌组比较,[◇] $P<0.05$,^{◇◇} $P<0.01$

Note: vs. sham group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. EGCG group, ^Δ $P<0.05$; vs. Zinc gluconate group, [◇] $P<0.05$, ^{◇◇} $P<0.01$

VD早期,患者的学习记忆功能会出现明显的减退。Morris水迷宫常用来评价动物的学习记忆能力,经典的Morris水迷宫实验包括定位巡航实验和空间探索实验。本研究中,采用MCAO法制备VD大鼠模型,给药28 d后,用Morris水迷宫实验考察大鼠行为学变化。结果表明,EGCG-Zn能够明显改善VD大鼠的学习记忆功能,且改善程度与药物存在一定的量效关系。

VD的病因较复杂,但反复脑缺血所致多部位损害是其主要病因之一,目前较多的学者认为脑缺血后自由基对神经细胞的损害作用是VD的重要发病机制之一。研究表明,脑缺血时体内产生大量自由基,自由基及其代谢产物作用于多价不饱和脂肪酸,发生氧化反应,诱导DNA、RNA、蛋白质的交联和氧化反应,促使多糖分子聚合,从而损伤脑组织,导致结构及功能的改变^[8-9]。

MDA是脂质过氧化反应的最终产物,随着氧自由基的过量堆积,机体会生成过量的MDA。因此,检测VD大鼠脑组织中MDA的含量可以间接反映大鼠脑组织中脂质过氧化反应的程度,从而了解细胞受自由基攻击的损伤程度。SOD、CAT、GSH-Px是一类抗氧化酶,是自由基的清除剂,能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,具有抗脂质过氧化损伤的作用,对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要的作用^[10]。因此,检测VD大鼠脑组织中SOD、CAT以及GSH-Px的活性,可反映机体的抗氧化能力。

EGCG具有较强的抗氧化和对抗氧自由基的作用,可上调脑组织中SOD、CAT以及GSH-Px活性,降低脑组织中MDA含量。EGCG-Zn作为其螯合物,结合金属离子后,EGCG分子中电子云发生变化,特征活性基团酚羟基被激活,其抗氧化活性进一步增强。本研究结果显示,VD大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px活性降低,MDA含量增加;经过EGCG-Zn作用后,大鼠脑组织中SOD、GSH-Px、CAT活性增强,MDA含量减少,表明EGCG-Zn可提高VD大鼠的学习记忆能力和抗氧化能力,效果优于EGCG。

参考文献

[1] Bomebroke M, Breteler NM. Epidemiology of non-AD dementias[J]. *Clin Neurosci Res*, 2004, 3(6): 349-361.

[2] Chen YZ, Tian Y, Zhang ZL, *et al*. Effects of tea polyphenol on oligodendrocyte in cerebral ischemic rats[J]. *J Clin Neurol*, 2007, 20(3): 211-213.

[3] 孟令慧,陈福军,商秀丽. EGCG对血管性痴呆Wistar大鼠学习记忆功能及Bax、Bcl-2蛋白表达的影响[J]. *解剖科学进展*, 2011, 17(4): 325-330.

[4] 付正丰,李晶,岳秀永,等. EGCG抑制野百合碱诱导的大鼠右心室肥厚的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(13): 126-129.

[5] 王彦兵,张迪,刘秀华,等. 茶多酚-锌(Ⅱ)配合物的合成及抗氧化活性[J]. *河南大学学报*, 2012, 42(4): 378-383.

[6] 尹军祥,田金洲,黄启福,等. MCAO拟血管性痴呆大鼠模型的建立[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(8): 1144-1147.

[7] 叶翠飞,张丽,艾厚喜,等. 两种水迷宫实验对拟痴呆模型学习记忆功能测试的比较[J]. *中国行为医学科学杂志*, 2004, 13(3): 256-261.

[8] Ferris DC, Kume-Kick J, Russo-Menna I, *et al*. Gender differences in cerebral ascorbate levels and ascorbate loss in ischemia[J]. *Neuroreport*, 1995, 6(11): 1485-1489.

[9] Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription[J]. *FASEB J*, 1996, 10(7): 709-720.

[10] Valdez LB, Arnaiz SL, Bustamante J, *et al*. Free radical chemistry in biological systems[J]. *Biol Res*, 2000, 33(2): 65-70.

(收稿日期:2016-10-28 修回日期:2017-02-06)

(编辑:邹丽娟)