

# 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<sup>①</sup>

胡红柳<sup>1</sup>, 宾慧婷<sup>2</sup>, 蓝贤英<sup>2</sup>, 卢舒雨<sup>3</sup>, 漆光紫<sup>1</sup>, 庞雅琴<sup>1</sup>, 李根亮<sup>1②</sup>

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院 2014 级中药专科班, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院 2014 级护本 3 班, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 研究绿茶多酚(TP)对慢性铝暴露痴呆大鼠记忆功能的保护作用及其机制。方法 采用六水氯化铝喂食的方法构建记忆功能障碍 AD 大鼠模型, 用 Morris 水迷宫实验检测大鼠空间学习记忆能力, 并通过对血清和海马组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的测定, 研究慢性铝暴露导致大鼠记忆功能损害及 TP 的干预机制。结果 与正常对照组相比, 铝暴露组大鼠学习记忆能力降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 血清和海马组织 SOD 活性显著降低( $P < 0.01$ ), 而 MDA 水平有增加趋势( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与慢性铝暴露模型组相比, TP 能提高大鼠血清和海马组织中 SOD 活性( $P < 0.01$ ), 对 MDA 具有降低作用( $P < 0.05$ ), TP 改善了铝致 AD 大鼠学习记忆功能障碍( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论 TP 可改善慢性铝暴露对大鼠记忆功能的损伤, 其机制可能与增加体内抗氧化酶的活性, 降低慢性铝暴露导致的神经脂质过氧化反应有关。

**关键词:** 绿茶多酚; 铝暴露; 学习记忆; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 大鼠

**中图分类号:** R285

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-5817(2016)03-0262-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.03.006

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)是一种老年人群常见的发病率高、危害大的中枢神经系统退变性疾病, 其在临床上表现为近期记忆力降低, 继而出现持续性智能衰退、失语、判断推理能力丧失及运动功能障碍等。目前 AD 的发病机制尚未完全清楚, 但研究显示多种因素与 AD 的发生存在一定的相关性, 如长期铝暴露。铝与多种神经退行性疾病如 AD、帕金森氏病、透析性脑病等有关<sup>[1]</sup>。铝可以影响中枢神经系统的多种功能, 尤其是学习和记忆功能。研究发现多种中草药可改善 AD 的症状, 有效延缓疾病进展, 比如银杏内酯、芍药苷、雷公藤及茶多酚等。绿茶多酚(TP)在绿茶中含量丰富, 可减少  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )的生成、清除自由基、提高抗氧化酶活性, 有效改善记忆功能障碍。本实验采用六水氯化铝灌胃建立慢性铝中毒大鼠模型并给予 TP 进行干预, 通过水迷宫实验, 结合测定血清和脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量, 从行为学和生物化学两方面来研究探讨 TP 对铝染毒大鼠神经系统的保护作用。

## 1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器 健康清洁级雌性 SD 大鼠 24

只, 鼠龄 10 个月, 体重 180~220 g(由右江民族医学院实验动物中心提供)。AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(由广东西陇化工有限公司提供), SOD、MDA 试剂盒(由南京建成生物工程研究所提供), TP(陕西森弗天然制品有限公司)。Morris 水迷宫测试系统(RB-100A, 由北京新天地科技有限公司提供), 722 型分光光度计。

1.2 动物分组及模型的制备 将大鼠按体重随机分为 4 组: 正常对照组、铝暴露组、TP 低剂量组(L 组)、TP 高剂量组(H 组), 每组 6 只大鼠。正常对照组大鼠每天自由摄食普通饲料, 其余大鼠每日摄取的鼠粮为普通饲料中加入结晶氯化铝, 剂量为 280 mg/(kg·d), 染毒时间 4 周。第 5 周开始, 对 L 组、H 组大鼠灌胃 TP 进行解毒治疗, 给予剂量分别为 0.1 g/(kg·d)、0.6 g/(kg·d), 灌胃容量为 10 ml/kg, 对照组和铝暴露组用生理盐水代替, 解毒时间为 12 周。

1.3 大鼠空间学习记忆功能的行为学检测 药物干预结束后, 利用 Morris 水迷宫实验检测大鼠的学习记忆能力。实验训练阶段 5 d 连续进行, 每天训练 2 次, 记录每只大鼠从入水到找到水下隐蔽平台并站立于其上所需时间, 称作逃避潜伏期。①定位航行试验, 检测

① 基金项目: 右江民族医学院 2014 年度校级科研课题(右医科字[2014]2 号); 右江民族医学院 2015 年度广西高校重点实验室开放课题(右医科字[2015]2 号); 国家自然科学基金(81360438, 81360423)

② 通讯作者, E-mail: 2521762992@qq.com

大鼠对水迷宫的学习记忆获取能力。摄像系统自动采集大鼠 60 s 内寻找并爬上平台的路线图及所需时间,即记录其潜伏期。②空间搜索试验,定位航行试验结束后,撤去平台,从同一入水点将其放入水中,采集其第一次到达原平台位置的时间、60 s 内穿越原平台的次数。

1.4 大鼠海马组织与血清生化指标检测 行为学检测试验结束后,腹腔注射 10%水合氯醛(3 ml·kg<sup>-1</sup>)麻醉大鼠进行解剖,腹腔主动脉取血,离心后取血清待测。取血后冰上迅速取大脑海马组织,生理盐水冲洗除血,称重,按 1:9 体积比例加预冷生理盐水,制成 10%匀浆,4℃下离心取上清液。取适量制备好的血清及组织匀浆液,严格按照 SOD 试剂盒、MDA 试剂盒说明书操作,检测血清及海马组织液的 SOD 活性和 MDA 含量。

表 1 定位航行试验大鼠逃避潜伏期的比较 ( $\bar{x}\pm s,s,n=6$ )

| 组别   | 剂量<br>g/(kg·d) | 第 1 d      | 第 2 d                   | 第 3 d                   | 第 4 d                    | 第 5 d                    |
|------|----------------|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组  | —              | 58.22±0.15 | 40.06±2.92              | 27.81±3.25              | 23.31±0.88               | 18.11±13.07              |
| 铝暴露组 | —              | 59.85±1.29 | 50.76±4.20 <sup>a</sup> | 44.60±9.80 <sup>b</sup> | 39.58±4.21 <sup>b</sup>  | 34.52±8.79 <sup>b</sup>  |
| L 组  | 0.1            | 59.20±2.15 | 46.11±0.31              | 36.69±7.22 <sup>c</sup> | 30.41±12.76 <sup>c</sup> | 21.44±10.09 <sup>d</sup> |
| H 组  | 0.6            | 59.18±0.07 | 42.46±1.19 <sup>d</sup> | 32.09±4.65 <sup>c</sup> | 25.74±10.92 <sup>d</sup> | 19.25±0.45 <sup>d</sup>  |

注:与对照组比较,a: $P<0.05$ ,b: $P<0.01$ ;与铝暴露组比较,c: $P<0.05$ ,d: $P<0.01$

2.1.2 空间探索试验 铝暴露组大鼠在目的象限的活动时间较对照组明显缩短,穿越原平台位置的次数相比之下较也有所减少,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。H 组与铝暴露组相比,大鼠在目的象限的游泳时间显著延长,穿越原平台位置的次数明显增加,结果比对差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。而 L 组与铝暴露组相比,目的象限活动时间延长显著( $P<0.05$ ),穿越平台次数增加不明显,差异无统计学意义,结果见表 2。

2.2 TP 对各组大鼠血清及海马组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响 铝暴露 16 w 以后,大鼠血清及脑组织的 SOD 活性显著降低( $P<0.01$ ),MDA 水平明显升高( $P<0.01$ ),差异具有统计学意义。通过不同

1.5 统计学方法 所得实验数据用 SPSS13.0 软件处理,数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,多个样本均数比较用方差分析,组间两两比较用  $q$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆能力变化

2.1.1 定位航行试验 铝暴露组较正常对照组其逃避潜伏期明显延长( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),表明 AD 模型构建成功,染铝大鼠出现学习能力障碍。通过 TP 治疗改善,大鼠逃避潜伏期较铝暴露组有所降低,一定程度上表现出剂量依赖性。其中 H 组第 2~5 d 潜伏期较铝暴露组降低,结果差异具有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。L 组相较之下第 3~5 d 其潜伏期有所下降,其结果具有统计学意义。结果见表 1。

表 2 TP 对大鼠空间学习记忆能力的影响 ( $\bar{x}\pm s,n=6$ )

| 组别   | 剂量<br>g/(kg·d) | 大鼠目的象限<br>活动时间(s)        | 大鼠穿越原<br>平台次数         |
|------|----------------|--------------------------|-----------------------|
| 对照组  | —              | 42.11±6.98               | 9.5±3.63              |
| 铝暴露组 | —              | 20.67±10.32 <sup>a</sup> | 4.0±7.22 <sup>a</sup> |
| L 组  | 0.1            | 28.13±2.31 <sup>b</sup>  | 6.1±4.53              |
| H 组  | 0.6            | 36.49±3.84 <sup>c</sup>  | 8.2±9.46 <sup>c</sup> |

注:与对照组比较,a: $P<0.01$ ;与铝暴露组比较,b: $P<0.05$ ,c: $P<0.01$

浓度 TP 干预治疗,SOD 与 MDA 均有所变化,L 组的变化不明显,而 H 组相对于铝暴露组其 SOD 活性显著上调( $P<0.01$ ),MDA 水平明显下降( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ),这可能与 TP 的剂量有关,见表 3。

表 3 TP 干预对大鼠血清及海马组织 SOD 和 MDA 酶活性的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别   | 剂量<br>g/(kg·d) | SOD                     |                         | MDA                     |                        |
|------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
|      |                | 血清(u/ml)                | 海马组织(u/mg)              | 血清(nmol/ml)             | 海马组织(nmol/mg)          |
| 对照组  | —              | 120.5±18.0              | 663.7±92.0              | 6.12±0.88               | 1.98±0.35              |
| 铝暴露组 | —              | 78.1±10.4 <sup>b</sup>  | 364.8±89.6 <sup>b</sup> | 10.05±1.20 <sup>b</sup> | 2.62±0.11 <sup>a</sup> |
| L 组  | 0.1            | 85.6±20.3               | 421±73.5                | 9.11±1.43               | 2.51±0.16              |
| H 组  | 0.6            | 109.4±22.6 <sup>d</sup> | 532±101.3 <sup>d</sup>  | 7.25±1.54 <sup>d</sup>  | 2.38±0.26 <sup>c</sup> |

注:与对照组比较,a: $P<0.05$ ,b: $P<0.01$ ;与铝暴露组比较,c: $P<0.05$ ,d: $P<0.01$

### 3 讨论

阿尔茨海默病国际协会 (Alzheimer's Disease International, ADI) 的调查报告《全球阿尔茨海默病报告》显示,截止 2015 年,全球约有 4 680 万人患老年痴呆症,并以每 20 年翻一番的速度在增长,预计到 2050 年,全球痴呆患者人数将达到 1.315 亿,其中约一半为 AD 患者<sup>[2]</sup>。AD 存在抗氧化系统能力下降、氧化应激损伤等特点,中枢神经系统脂质过氧化产生大量的自由基,及过氧化产物 MDA,均可导致中枢神经系统的损伤<sup>[3]</sup>,临床症状表现为学习记忆能力障碍。MDA 引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,具有细胞毒性,破坏海马神经元的结构<sup>[4]</sup>,而 SOD 可以减轻海马的过氧化损伤,提高机体抗氧化能力。

铝容易通过血脑屏障,沉积在脑组织细胞的溶酶体、胞核、神经缠结及老年斑淀粉样蛋白核心内,影响神经系统的多种功能,尤其是学习与记忆功能,与 AD 的发生密切相关。它可引起脂质过氧化、自由基增多,对载体、受体、通道和蛋白造成直接损伤<sup>[5]</sup>,同时降低神经元兴奋性,使神经递质受损,使学习和记忆能力受到影响。调查发现<sup>[6]</sup>,随着铝暴露的增加,从事铝焊接工作的工人在学习能力与记忆力方面呈现弱化趋势。

近年来,有关茶多酚对于神经保护作用的研究越来越多,尤其在衰老和脑老化的潜在治疗作用中备受关注。TP 在绿茶中含量丰富,经常饮用绿茶可降低很多患病风险,如癌症、心血管疾病和糖尿病等。TP 具有的抗淀粉样变的能力,不仅能够保护神经元免受 A $\beta$  的神经毒,还可通过调节 APP 的剪切途径,减少 A $\beta$  的生成。可见,TP 对于研究 AD 及其他神经退行性疾病的治疗有潜在价值。

从实验结果可以看出,经过慢性铝暴露之后大鼠的学习记忆能力下降,逃避潜伏期明显延长,对平台的空间搜索时间增加,证明高铝因素下 AD 模型构建成功。经过不同剂量 TP 治疗干预后,其学习记忆障碍有所改善,其中高浓度的 TP 治疗效果较为明显,证明 TP 可以缓解 AD 引起的行为记忆障碍。铝中毒大鼠的 SOD 活性显著降低,MDA 含量升高,表明大鼠体内的抗氧化能力减弱,氧化产物增加,处于氧化应激状

态。TP 作用 12 w 后,两种指标出现变化,SOD 活性大大提高,抗氧化能力增强,而氧化产物 MDA 含量降低,氧化应激损伤有所减轻。数据表明 TP 对铝引起的 AD 具有一定的疗效,其作用机制可能与提高抗氧化能力,改善氧化应激损伤有关,从而起到神经保护的作用。

百色地区铝矿资源丰富,环境中铝元素对周围居民影响更为直接,严重威胁着本地区居民的健康<sup>[7]</sup>。TP 有抗氧化、保护神经元、改善学习记忆等功能,且绿茶在日常生活中普遍饮用,价格便宜,大量的人体和动物实验表明,即使是长期饮用绿茶也十分安全,并无致突变作用。根据现有文献资料及我们的实验结果,推测可以通过绿茶改善铝暴露引起的学习记忆功能障碍,对老年痴呆有一定的预防作用。

### 参考文献:

- [1] 雷曦,王健辉,程肖蕊,等. 防治阿尔茨海默病多靶点药物研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2016,43(2):205-213.
- [2] Prince M. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia,2015[R/OL]. <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>.
- [3] Victor J, Johson, Sang H, et al. Aluminum-Maltolate Induces Apoptosis and Necrosis in Neuro-2a Cell: Potential Role for p53 Signaling[J]. Toxicol Sci, 2005, 83(2): 329-339.
- [4] Choi YT, Jung CH, Lee SR, et al. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons[J]. Life Sci, 2001, 70: 603-614.
- [5] 郭卫力,张勤丽,吉秀亮,等. 三氯化铝侧脑室注射对小鼠认知能力的影响[J]. 环境与职业医学, 2008, 6: 579-581.
- [6] Hanninen H, Matikainen E, Kovala T, et al. Internal load of aluminum and the central Nervous system function of aluminum welders [J]. Scandinavian journal of work, environment & health, 1994, 20(4): 279-285.
- [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.

收稿日期: 2016-05-11; 修回日期: 2016-05-31