

華中師範大學

茶多酚对小鼠神经毒性的影响

# 目 录

1 文献综述.....	2
1.1 茶多酚的神经保护作用.....	2
1.1.1 血脑屏障的突破.....	2
1.1.2 抗氧化性.....	2
1.1.3 对金属离子的络合能力.....	3
1.2 甲醛的神经毒性.....	4
1.2.1 甲醛的理化性质.....	4
1.2.2 甲醛进入人体的主要途径.....	4
1.2.3 甲醛引发神经损伤的毒理学机制.....	5
1.3 锌离子的神经毒性.....	5
1.3.1 影响淀粉状前体蛋白的表达.....	5
1.3.2 影响氧化应激反应.....	6
1.4 一种神经行为学研究方法——Morris 水迷宫测试.....	6
1.5 实验设计与思路.....	7
2 材料和方法.....	9
2.1 实验动物.....	9
2.2 实验仪器与药品.....	9
2.3 实验方案.....	9
2.4 水迷宫实验.....	10
2.5 脑组织样品制备.....	11
2.6 氧化应激指标检测.....	11
2.7 DNA 损伤水平检测.....	11
2.8 统计分析.....	12
3 实验结果.....	13
3.1 染毒期间小鼠体重变化.....	13
3.2 Morris 水迷宫结果.....	14
3.2.1 定位航行实验结果.....	14
3.2.2 空间探索实验结果.....	15

3.3 氧化应激指标结果.....	17
3.4 DNA 损伤水平检测结果.....	18
4 讨 论.....	19
5 结论与展望.....	21
5.1 结论.....	21
5.2 展望.....	21
参考文献.....	22

**内容摘要：** 表没食子儿茶素没食子酸酯是茶多酚中含量最高、活性最强的物质。系列毒理学报告证明，气态甲醛与锌离子具备较显著的神经毒性。本实验采用气态甲醛（ $3\text{mg}/\text{m}^3$ ，8h/day）与氯化锌（ $50\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ ）作为染毒剂，0.2%EGCG 作为拮抗剂，从行为学实验（Morris 水迷宫）、氧化应激程度（活性氧簇含量测定）、DNA 损伤程度（8-OHdG）三个角度出发，研究短期内上述三种物质间的互相拮抗作用。实验结果表明， $\text{ZnCl}_2$ 与甲醛均能不同程度地对小鼠脑组织造成氧化损伤，而 EGCG 能极显著地与  $\text{ZnCl}_2$ 发生拮抗反应，减弱其神经毒性。于此同时，在本实验中，我们还观察到了 EGCG 同时存在的抗氧化性与促氧化性两种特点。

**关键词：** 神经毒性 氧化应激 锌 甲醛 EGCG

**Title:** Effects of tea polyphenols on neurotoxicity in mice

**Abstract:** Epigallocatechin-3-gallate, EGCG, is the most abundant and active substance among tea polyphenols. Series of toxicity research has showed that gaseous formaldehyde and zinc ion are significantly neurovirulent. In this research, gaseous formaldehyde ( $3\text{mg}/\text{m}^3$ ，8h/day) and zinc chloride ( $50\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ ) are used as toxicants and 0.2% EGCG is used as antagonist. Behavioral experiment (Morris Maze), oxidative stress (ROS) and DNA injury degree (8-OHdG) are applied to evaluate these three substances. The experiment results show that  $\text{ZnCl}_2$  and formaldehyde can cause oxidative damage in mice brain tissues while EGCG can antagonize zinc ion significantly. Furthermore, we found EGCG is both prooxidant and antioxidant.

**Key words:** Neurotoxicity; Oxidative stress; Zinc; EGCG

# 1 文献综述

## 1.1 茶多酚的神经保护作用

在我国，茶叶的栽种和饮用的历史长达千年，其相关的文化更是享誉世界。随着当代物质的日益丰富，人们生活水准的不断提高，饮茶正在重新成为一种新的健康生活方式。目前已经证实，茶叶干重中有约 30%的成分是茶多酚，茶多酚作为一种重要的有益成分，非常值得我们研究<sup>[1]</sup>。

茶多酚 (tea polyphenol, TP) 是一类从天然茶叶中抽提出来的以儿茶素类为主的多酚类衍生物混合体。这类儿茶素的单体通常有四种：表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG)、表没食子儿茶素 ((-)-epigallocatechin, EGC)、表儿茶素没食子酸酯 ((-)-Epicatechin gallate, ECG)、表儿茶素 (Epicatechin, EC)。其中 EGCG 含量最丰富，活性最高<sup>[2][3]</sup>。

一般认为，茶多酚中的 EGCG 起到了较为主要的神经保护作用。而 EGCG 保护作用的产生主要基于三个原因：一是它能够较好地突破血脑屏障<sup>[4]</sup>；二是它对于氧化损伤具有保护作用；三是它能够络合金属离子<sup>[3]</sup>。

### 1.1.1 血脑屏障的突破

为了进行复杂的神经信号传递，大脑需要相当严格地把控其内环境的稳定，因此，能够将大脑与血液区隔开的血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 就显得尤其重要。而若希望缓解由氧化损伤造成的神经退行性疾病，抗氧化物需进入到大脑中行使功能，亦即必须具备能够突破血脑屏障的能力。事实上，存在较多的还原性物质，尽管其有很好的抗氧化能力，但因其无法突破血脑屏障，很难起到缓解神经损伤的效果<sup>[5]</sup>。

而 EGCG 具备突破血脑屏障的能力。研究者使用被标记的 [3H]EGCG 给 CD-1 小鼠灌胃，给药后 24 小时，其脑中 EGCG 含量最高可达 0.22 $\mu$ mol/L，且单次给药 6 小时后再度以同剂量给药，脑中放射性强度可为单次给药的 6 倍<sup>[4]</sup>。

### 1.1.2 抗氧化性

机体中通常存在着氧化性物质与还原性物质的平衡。而当这种平衡被打破，氧化性物质增多，并可能造成一定程度损伤的状况，我们将其称之为“氧化应激”。机体内的氧化物质通常来自于正常的有氧代谢，但若机体处于病理状态时，相应的氧化性物质会加速合成。而对这些氧化性物质的拮抗作用通常来自一些酶，如过氧化氢酶、

超氧化物歧化酶等, 进行一系列酶促反应降低机体氧化性; 或是一些具备还原性的物质, 如维生素 E、谷胱甘肽等, 直接利用其还原性进行反应。这两种方式彼此结合, 构成了机体抗氧化的主要途径<sup>[6]</sup>。

氧化损伤是指, 上述的氧化应激过程进一步加剧, 产生了大量的具有毒性的活性氧簇物质, 这些物质会继而攻击机体造成了一定的损伤。氧化损伤与诸多神经退行性疾病联系紧密<sup>[7]</sup>。以帕金森症 (Parkinson's disease, PD) 为例, 细胞氧化-还原平衡的破坏会进一步引发呼吸电子传递链受阻, 造成细胞能量耗竭, 导致多巴胺能神经元的缺失, 最终产生 PD 的临床症状<sup>[1]</sup>。

如图所示, 虚线方框内的部分通常被认为是该物质起到抗氧化性作用, 消除自由基的关键位置<sup>[8]</sup>。

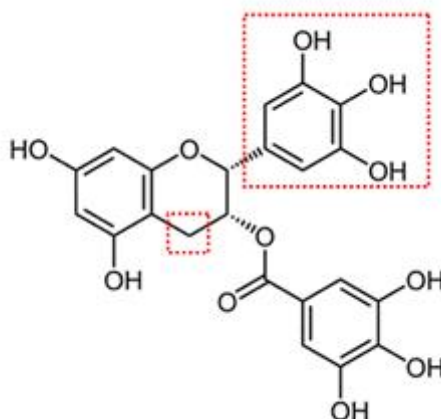


图 1.1 EGCG 分子结构式

### 1.1.3 对金属离子的络合能力

金属离子常常会深度参与一些神经退行性疾病的发生, 我们以阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 为例加以说明。淀粉样蛋白级联 (amyloid cascade of events) 是一种有关 AD 发生方式的假说: 淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 能够转换成 $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -peptide,  $A\beta$ ), 而  $A\beta$  蛋白能在二价金属离子 (如  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) 的存在下发生自富集, 并在新皮质中成为具有神经毒性的淀粉样纤丝 (amyloid fibrils)<sup>[9]</sup>。研究表明, 茶多酚 EC 能够阻止淀粉样纤丝的形成, 而茶多酚 EGCG 能够调控 APP 的转换<sup>[3]</sup>。

百草枯具有较强的神经毒性, 能够帮助建立帕金森症模型, 并能够造成氧化损伤。Weinreb 等在综述中指出, EGCG 在上述模型中能够减轻细胞膜脂质过氧化程度, 也是依赖于其结构的这两种特质。实验发现, 当  $FeSO_4$  加入后, EGCG 的保护作用消失。这就

意味着, EGCG 能够通过与金属离子 (如  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  等) 发生络合反应的途径减弱细胞膜脂过氧化程度<sup>[10]</sup>。

## 1.2 甲醛的神经毒性

### 1.2.1 甲醛的理化性质

甲醛 (formaldehyde, FA), 分子式  $\text{CH}_2\text{O}$ , 是一种天然存在的有机物。常温下为气体, 无色, 有特殊刺激性气味, 极易溶于水, 易溶于醇、醚等溶剂, 其 40% 的水溶液俗称福尔马林。作为许多复杂化工产品的前体, 甲醛用途极广, 产量极大, 1996 年其估计年产量就已为 870 万吨<sup>[11]</sup>。

甲醛存在的毒害作用涉及包括呼吸道炎症、细胞毒性、遗传毒性、致癌性等在内的诸多方面<sup>[12]</sup>。1981 年, 甲醛被美国国家毒理学计划 (US National Toxicology Program) 列为可能人类致癌物; 2011 年, 随着关于人群实验证据的补充, 甲醛被列为已知人类致癌物。

### 1.2.2 甲醛进入人体的主要途径

外源性甲醛主要通过呼吸、摄入、接触三种途径进入人体。

甲醛的吸入一般发生在工厂 (如化学工业、木材行业、纺织和制鞋行业等) 和一般居室中。据统计, 1985 年-2006 年间, 我国各地工厂、医院、医学院甲醛水平普遍高于卫生部于 2007 年发布的职业性甲醛标准 ( $0.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ ), 部分地区甚至超过卫生部在 1979 年发布的标准 ( $3 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) 类似的, 2004 年前后, 各大城市新装修居室内甲醛含量严重超出《室内空气质量标准》(GB/T 18883-2002) 中规定的  $0.1 \text{ mg}/\text{m}^3$ , 超标率在 60%-90%<sup>[13]</sup>。

海产品或经甲醛处理的水产品以及罐头等的食用是甲醛经摄入这种途径进入人体的重要原因。其中, 海洋生物本身含有的用以调节渗透压的氧化三甲胺能在氧化三甲胺酶的作用下转化成甲醛; 同时, 由于不法分子的不当牟利, 一些水产品 in 加工过程中也会被利用甲醛保鲜。因此, 水产品成为了人体摄入甲醛的一种重要来源<sup>[14][15]</sup>。上述两种方式进入人体的甲醛都能容易地被人体吸收, 并在鼻黏膜、肝脏、活组织的红细胞中被代谢成蚁酸, 最终以尿液、粪便的形式排出体外, 或是以二氧化碳的形式呼出体外<sup>[16]</sup>。

纺织品中的甲醛能通过与皮肤接触的方式进入人体。维纶 (聚乙烯醇缩甲醛纤

维)、固色剂(氰氨-甲醛缩聚物)、脱色剂(次硫酸氢钠甲醛)等纺织工业常见品均含有不同含量的甲醛,其附着在衣物上,溶于汗液,通过皮肤接触浸入人体,可能引发瘙痒、皮炎等炎症反应<sup>[17]</sup>。

### 1.2.3 甲醛引发神经损伤的毒理学机制

许多研究已经证明,长期暴露在甲醛环境中,可能会引发神经衰弱,具体症状为头痛头晕、睡眠失调、记忆力下降等。暴露在甲醛中,头痛眩晕的可能性将是正常情况的1.3-1.6倍<sup>[13]</sup>。甲醛引发神经损伤的机制至少包括以下两方面。

一方面,甲醛能够通过一系列的生化反应抑制硫化氢的合成。 $H_2S$ 因其抗氧化的特性,是一种重要的能够保护神经细胞的物质。在哺乳动物中,甲醛降解酶(formaldehyde dehydrogenase, FDH)是一氧化氮合成酶(S-nitrosogluthathione reductase, GSNOR)的同系物。在中枢神经系统中,甲醛的进入刺激机体过量产生一氧化氮,抑制 $H_2S$ 合成酶的主要前体胱硫醚 $\beta$ 合成酶(cystathionine  $\beta$  synthase, CBS)的活性,从而抑制 $H_2S$ 的合成。当机体发生氧化应激反应时, $H_2S$ 的缺失使机体难以维持原有的氧化还原平衡,从而进一步引发神经损伤<sup>[18][19]</sup>。

另一方面,机体内部存在动态的氧化还原平衡。外源甲醛的进入能够破坏机体内的这种平衡,诱发活性氧簇的生成与聚集,进一步攻击破坏线粒体功能,引发神经细胞损伤凋亡<sup>[20]</sup>。一项实验证明,以10mg/kg的剂量给成年大鼠通过腹腔注射甲醛10天后,其额皮质与海马体中的丙二醛含量与蛋白质羰基化程度显著上升(这都是发生氧化损伤的典型指标),而超氧化物歧化酶与过氧化氢酶含量则显著降低,这说明甲醛使脑组织中发生了较为严重的氧化损伤<sup>[16]</sup>。

## 1.3 锌离子的神经毒性

锌是一种普遍存在的微量元素,在脑中的分布尤其广泛。锌大量参与细胞内各式生理活动,包括影响神经传递、酶的活性、基因调控、保持蛋白质结构稳定等等<sup>[21]</sup>。我们已经知道,人类基因组中有约10%的基因能编码存在锌离子结合的蛋白<sup>[22]</sup>。由此,脑中锌的浓度与脑组织的功能存在关联。目前来讲,过量的锌离子至少有两种方式展现其神经毒性。

### 1.3.1 影响淀粉样前体蛋白的表达

前文已经提到,APP蛋白与一系列的神经退行性疾病紧密相关。APP的表达受到



转录因子 NF- $\kappa$ B 与 Sp1 的影响，而这两种转录因子都含有锌离子。其中，APP 启动子含有两个 NF- $\kappa$ B/Rel 结合位点，一旦启动，能够增强 APP 基因的转录；而 Sp1 也被发现能够结合到 APP 启动子的正调控位点上<sup>[23]</sup>。于此同时，锌还能够抑制 APP 蛋白的降解，并促进其转化后的产物 A $\beta$ 蛋白自富集的发生<sup>[9]</sup>。

### 1.3.2 影响氧化应激反应

脑中的锌离子绝大多数（80%~90%）结合在蛋白上，剩下的则被包裹在兴奋性神经元亚群的突触泡中。当神经元遭遇氧化应激时，细胞内结合的锌离子会被释放进细胞质，而游离的锌离子会触发一系列有害的信号通路，生成更多的活性氧簇，形成有害的循环<sup>[21][24]</sup>。由此我们得知，氧化应激会提升细胞质中游离的锌离子含量，过量游离的锌离子会触发氧化应激。

## 1.4 一种神经行为学研究方法——Morris 水迷宫测试

Morris 水迷宫是神经生物学家 Morris 于上世纪 80 年代初提出的由定位航行实验和空间探索实验两部分组成的一项行为学实验研究方法。该方法旨在通过对小鼠的空间认知能力的比较，判断其学习与记忆能力的强弱。实验器材为一个带有逃逸平台的水池，将水注入合适水位后，平台恰好被隐入水下，小鼠可在平台上站稳，但无法通过观察得知平台具体位置。通过对小鼠的短期训练，小鼠将记住平台具体位置，径直游向该平台。

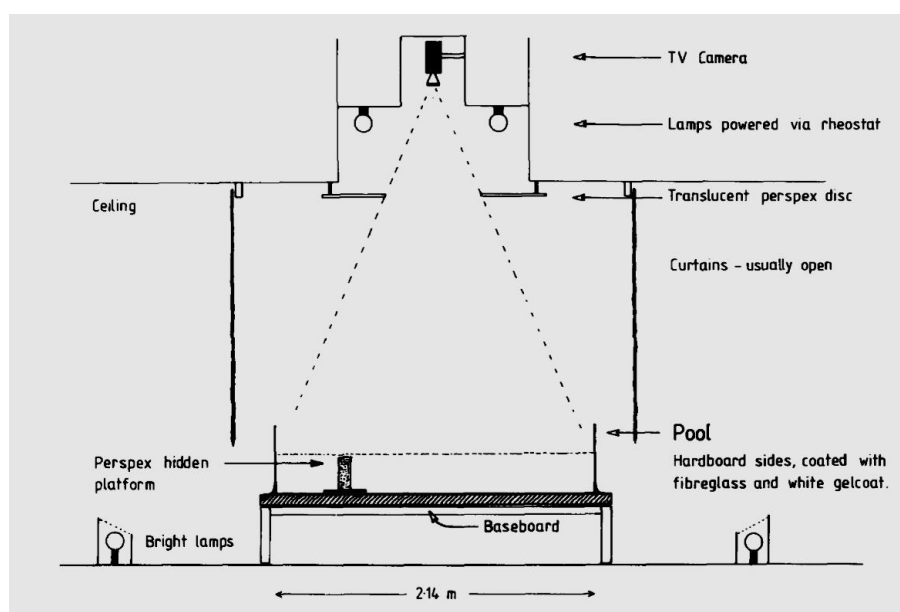


图 1.2 Morris 水迷宫示意图 (Morris 绘制) (Morris R 1984)

定位航行实验主要观察小鼠的学习能力，通过记录分析其找寻平台的时间、路径变化，判断其学习能力强弱；空间探索实验主要观察小鼠的记忆能力，经过短期的训练，撤掉平台后，记录小鼠的运动轨迹与在原平台所在象限的停留时间，判断其记忆能力的强弱<sup>[25]</sup>。

## 1.5 实验设计与思路

气态甲醛，由于其在室内装修、工业生产等领域的广泛应用，是一种常见的空气污染物。长期暴露在甲醛环境中，可能会头痛头晕、睡眠失调、记忆力下降，并进一步引发神经衰弱等症状<sup>[13]</sup>。系列研究已经证明，甲醛能够通过间接或直接造成氧化损伤的方式对神经系统造成损害<sup>[20]</sup>。鉴于通过鼻腔呼吸进入体内是甲醛侵入人体的一种重要的途径，本实验采用甲醛暴露仓进行吸入式染毒。

二价金属离子，能够诱导与 AD 相关的 $\beta$ -淀粉样蛋白沉积，并在新皮质中成为具有神经毒性的淀粉样纤维<sup>[9]</sup>。而在具备类似性质的二价金属离子中，锌离子诱导 $\beta$ -淀粉样蛋白沉积效果最明显<sup>[26]</sup>。本实验采用  $\text{ZnCl}_2$  提供锌离子以灌胃形式染毒，探究其具体机制。

我们已经能够知道，EGCG 作为一种神经系统的保护剂，拥有较好的抗氧化性与络合金属离子能力。本实验采用甲醛吸入式染毒、将 EGCG 加入到饮用水中的方式，充分模拟生活中的真实情景，研究甲醛、氯化锌的神经毒性与 EGCG 的拮抗作用。我们通过文献研究初步得知，EGCG 的抗氧化性主要由其大量的酚羟基提供。然而，关于其络合金属离子的能力与抗氧化性是否来源于相同的功能基团这一点，尚鲜有文献报告。本实验通过设置甲醛与氯化锌单独/联合暴露组，初步探究 EGCG 的这两种神经保护能力是否来源于相同功能基团。

本研究以昆明小鼠为实验对象，采用 Morris 水迷宫实验，活性氧簇（Reactive Oxidative Species, ROS）含量测定、8-羟基脱氧鸟苷（8-hydroxy-deoxyguanosine, 8-OHdG）含量测定等方式，从行为学、氧化损伤水平和 DNA 损伤水平三个角度，讨论脑神经损伤情况。实验设计思路如下图所示：

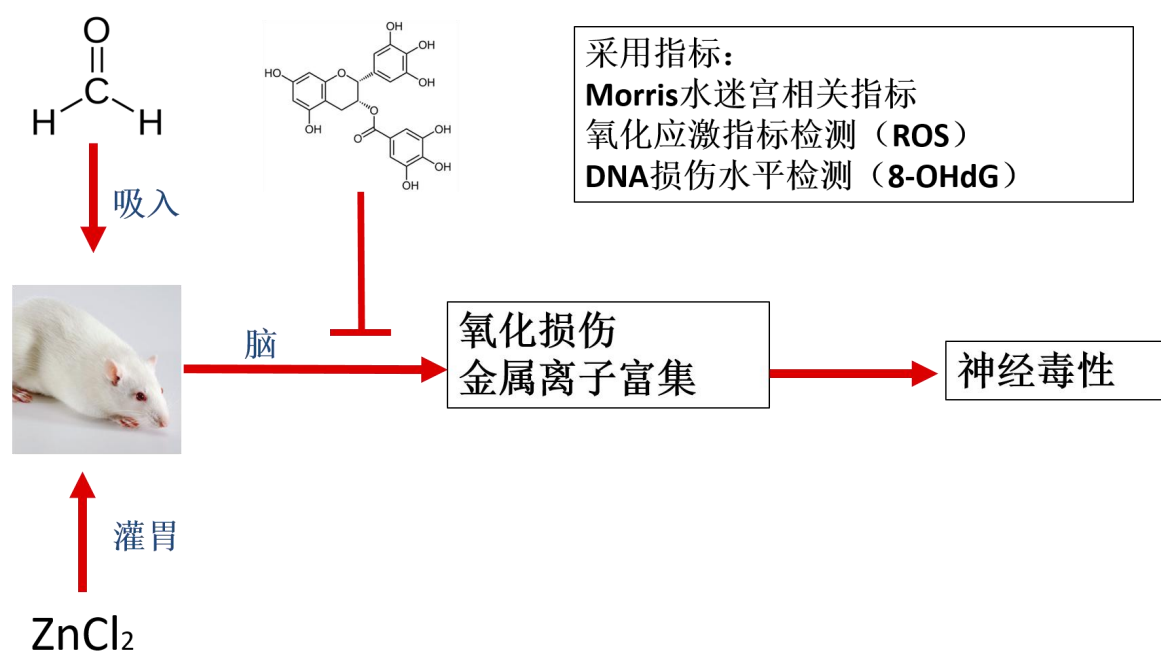


图 1.3 实验设计思路示意图

## 2 材料和方法

### 2.1 实验动物

49 只 SPF (specific pathogen free) 级昆明小鼠, 按标准环境饲养两周后, 体重在 25-28 克左右开始实验。实验流程华中师范大学科研动物处批准的《实验动物使用和关爱标准》(CCNU-IACUC-2012-011) 规定。

### 2.2 实验仪器与药品

仪器/药品	生产厂家
水迷宫	武汉 Yi-Hong 科技
甲醛测定仪 (Interscan 4160)	Chatsworth
涡旋仪	北京京辉凯业
低温冷冻离心机 (5415R)	Eppendorf
全波长酶标仪 (DNM-9602)	北京普朗新技术
荧光酶标仪 (FLx 800)	Biotech
-20℃ 冰箱	广东科龙
磷酸盐缓冲液 (PBS)	上海国药
甲醛 (质量分数 4%)	Sigma
表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)	Sigma
2', 7' -二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA)	Sigma
8 羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) ELISA 试剂盒	上海国药

### 2.3 实验方案

49 只小鼠随机分成 7 组, 每组 7 只。分别为:

- (1) 对照组 (Con): 饮用自来水, 不进行甲醛仓暴露染毒;
- (2) 气态甲醛暴露组 (FA): 饮用自来水, 3mg/m<sup>3</sup> 甲醛仓暴露染毒 8 小时/天;
- (3) 气态甲醛暴露及 EGCG 饲养组 (FA+EGCG): 饮用水为 0.2% EGCG, 3mg/m<sup>3</sup> 甲醛仓暴露染毒 8 小时/天;
- (4) ZnCl<sub>2</sub> 灌胃组 (ZnCl<sub>2</sub>): 饮用自来水, 不进行甲醛仓暴露染毒, 50mg/kg ZnCl<sub>2</sub>

灌胃；

- (5)  $\text{ZnCl}_2$  灌胃及 EGCG 饲养组 ( $\text{ZnCl}_2$ +EGCG): 饮用水为 0.2% EGCG, 不进行甲醛仓暴露染毒, 50mg/kg  $\text{ZnCl}_2$  灌胃;
- (6) 甲醛仓暴露、 $\text{ZnCl}_2$  灌胃及 EGCG 饲养组 (FA+  $\text{ZnCl}_2$ +EGCG): 饮用水为 0.2% EGCG, 3mg/m<sup>3</sup> 甲醛仓暴露染毒 8 小时/天, 50mg/kg  $\text{ZnCl}_2$  灌胃;
- (7) EGCG 饲养组 (EGCG): 饮用水为 0.2% EGCG, 不进行甲醛仓暴露染毒。

## 2.4 水迷宫实验

每天十点开始水迷宫实验, 一般于十五点左右结束。水迷宫实验分为两个阶段: 第一阶段为定位航行实验, 每日一次, 进行 7 天; 第二阶段为空间探索实验, 在完成第一阶段实验后间隔一天进行, 实验进行一次。

实验场地为黑色内壁不反光的圆形水池, 直径 1m, 水深约 40cm, 温度恒定在 23℃ 左右。环境安静, 光线合理。水池被假想均分成四个象限, 每个象限池壁正中贴有大小相同形状不一的图案, 以便小鼠记忆。逃逸平台在 0.5cm 的水下, 被置于第四象限正中间。小鼠的运动轨迹、运动速度、逃逸时间等数据均由正上方的摄像机记录, 相关数据导入计算机。

具体实验步骤如下:

- (1) 抓住小鼠尾巴, 悬空, 使其面对池壁, 从图形所在位置将小鼠轻放入水中, 摄像机于此刻开始追踪;
- (2) 每只小鼠按一、二、三象限的顺序依次训练, 每次训练时长为 60s。若小鼠于 60s 内站上逃逸平台并停留 3s 以上, 则所用时间记为逃逸潜伏期, 将小鼠捞出; 若小鼠未在 60s 内找到逃逸平台, 则人工将小鼠放置于平台, 并使其在平台上停留学习 30s 以上后捞出;
- (3) 以上实验为定位航行实验, 重复 7 天后, 第 8 天为遗忘期, 不进行任何水迷宫实验;
- (4) 第 9 天进行空间探索实验, 撤下平台, 将小鼠如上述方式置于水池中, 每次记录时间为 60s;
- (5) 以上数据由摄像机记录, 并由 Smart 3.0 水迷宫数据分析软件进行处理。

## 2.5 脑组织样品制备

行为学实验完成后,对小鼠行脱颈处死,完整并迅速地取出脑组织,使用电子天平称重并记录后,按质量体积比 1: 9 的比例,于匀浆器中用 PBS 配制浓度为 10% 的脑组织匀浆。将上述匀浆于 4℃, 5000r/min 下离心 10 分钟后,收集上清液,于-20℃ 冰箱保存。

## 2.6 氧化应激指标检测

细胞内活性氧簇 (ROS) 含量能够反映氧化应激程度。采用 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 法测定 ROS 含量。DCFH-DA 可自由扩散进入细胞,并被胞内酯酶水解为 DCFH。DCFH 本身无荧光,但可被胞内活性氧簇氧化成带有荧光的 DCF。通过荧光分度计检测 DCF 的荧光强度可得知 ROS 含量。具体步骤如下:

- (1) 将匀浆上清液使用 PBS (pH=7.5) 稀释 10 倍;
- (2) 取 10  $\mu$ L 加入 96 孔酶标板中;
- (3) 取 10  $\mu$ mol/L 的 DCFH-DA 加入酶标板中,每孔 100  $\mu$ L, 37℃ 避光反应 30 分钟;
- (4) 在 485nm 激发光、525nm 发射光下用荧光酶标仪测定荧光强度。

## 2.7 DNA 损伤水平检测

8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 是一种敏感的 DNA 损伤标志物,由氧化应激所产生的羟自由基诱导氧化造成 DNA 的损伤。8-OHdG 的含量能够较准确地反映氧化应激对 DNA 的损伤程度。本实验采用 ELISA 试剂盒检测其含量。反应终产物呈黄色,其在 450nm 波长下的吸光度与样品中 8-OHdG 含量正相关。具体步骤如下:

- (1) 依次设待测样孔、标准孔、空白孔。空白孔加样品稀释液、标准孔加标准品、待测样孔加待测样各 100 $\mu$ L, 37℃ 反应 120 分钟;
- (2) 弃去液体,甩干,每孔加生物素标记抗体工作液 100 $\mu$ L, 37℃ 反应 1 小时;
- (3) 弃去上述液体,洗板 3 次后,甩干;
- (4) 每孔加入辣根过氧化物酶标记的亲和素工作液 100 $\mu$ L, 37℃ 反应 1 小时;
- (5) 弃去上述液体,洗板 5 次后,甩干;
- (6) 依序每孔加底物溶液 90 $\mu$ L,于 37℃ 下避光显色至标准品前 3 到 4 孔由明显的

蓝色梯度即终止;

(7) 依序每孔加终止液 50 $\mu$ L;

(8) 在波长 450nm 下用酶标仪测定光强度。

## 2.8 统计分析

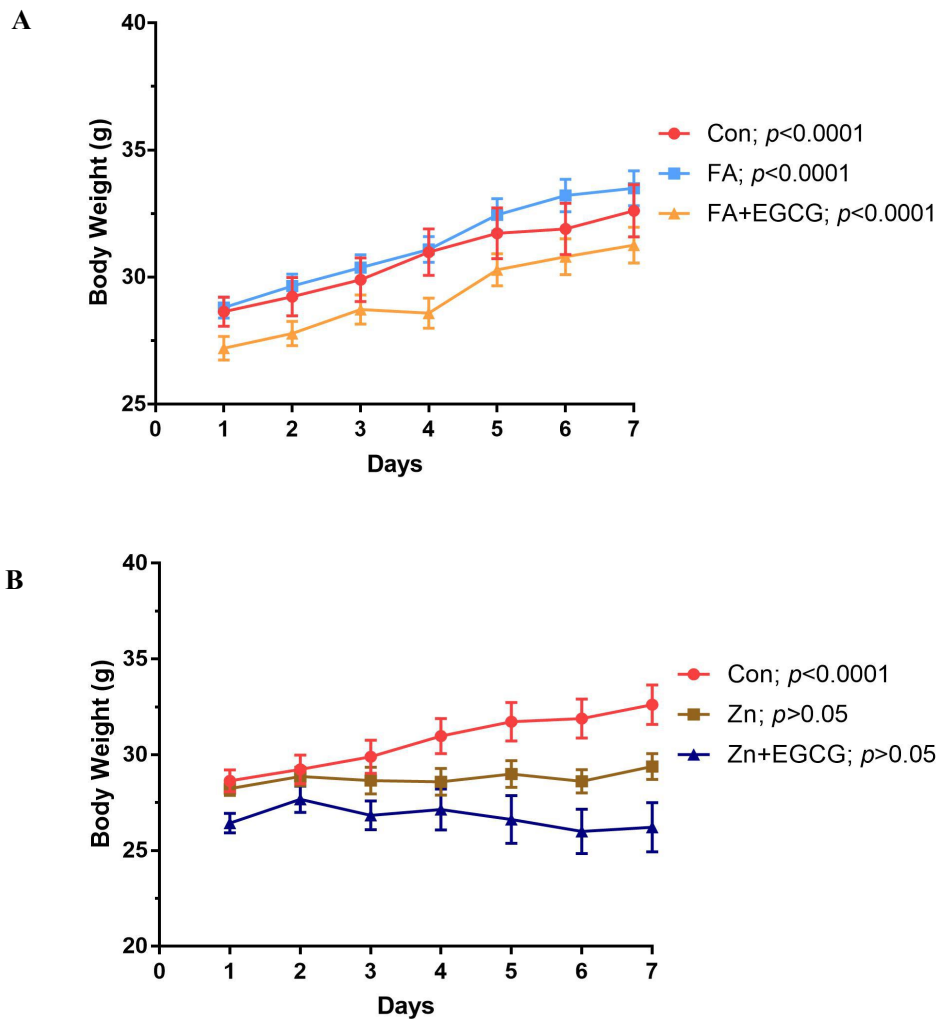
采用 GraphPad Prism 6.07 作图与统计分析。小鼠体重数据采用线性回归分析 (linear regression)。Morris 水迷宫实验数据采用线性回归分析与单因素方差分析 (one-way ANOVA), 后采用 Tukey's 检验研究各组间差异是否显著。其他指标采用单因素方差分析后采用 Tukey's 检验研究各组间差异。数据以 Mean  $\pm$  SEM 表示。“\*”表示两组之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); “\*\*”表示两组之间具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ); “\*\*\*”表示  $P < 0.001$ , “\*\*\*\*”表示  $P < 0.0001$ 。

### 3 实验结果

#### 3.1 染毒期间小鼠体重变化

图 3.1 展示了一到七天小鼠体重变化，A、B、C 三张图分别显示了甲醛、锌离子与二者联合暴露对小鼠体重的影响。对照组结果表明，短期内小鼠的体重呈极显著的上升趋势 ( $P<0.0001$ )。类似的，我们也在单独吸入甲醛组、甲醛与 EGCG 联合组、EGCG 单独服用组中观察到了一致的趋势 ( $P<0.0001$ )。然而我们发现，但凡摄入了锌离子的实验组小鼠体重，均未有显著的上升趋势 ( $P>0.05$ )。

小鼠的体重变化表明，短期的气态甲醛暴露并不会对小鼠体重产生显著的影响，而短期高浓度锌离子的摄入缺失会使小鼠的体重增长减缓，并且我们未能观察到在此过程中 EGCG 可能存在的拮抗作用 ( $P>0.05$ )。





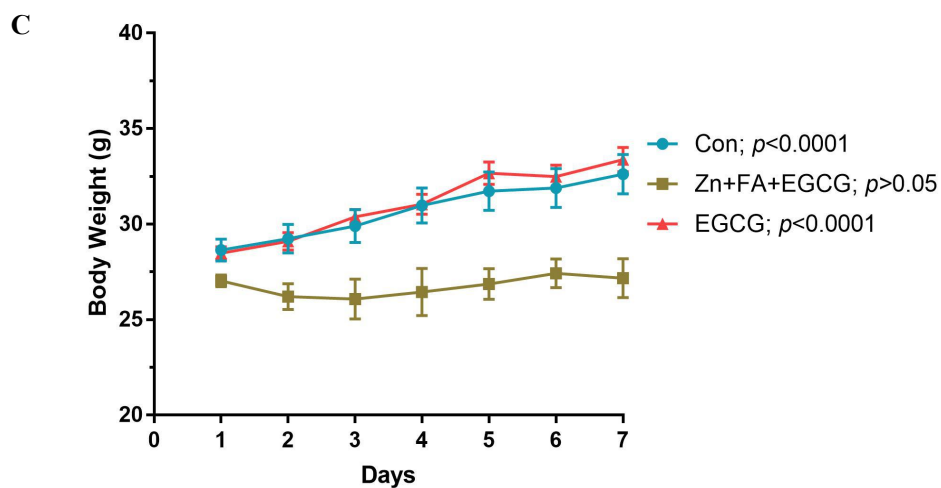
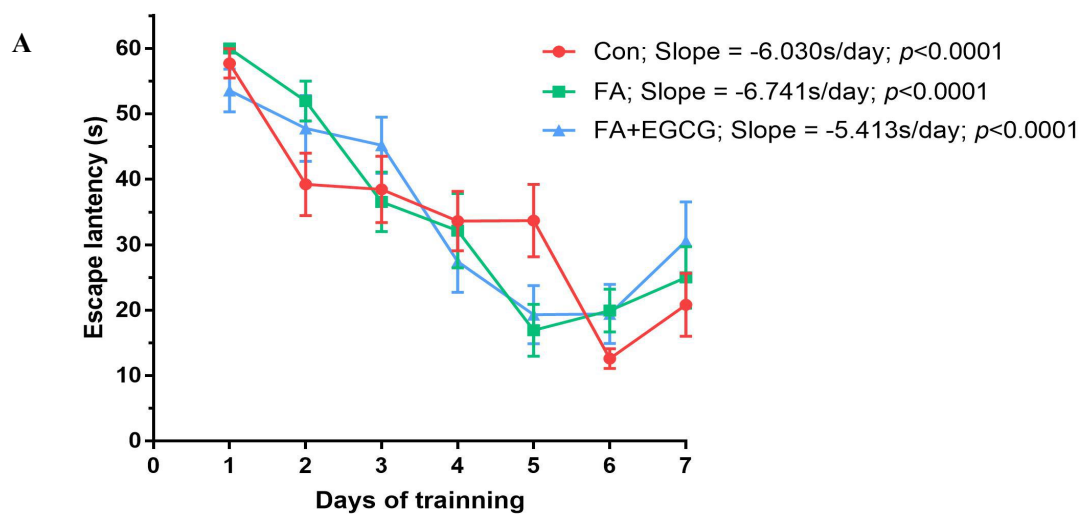


图 3.1 染毒过程中小鼠体重变化

## 3.2 Morris 水迷宫结果

### 3.2.1 定位航行实验结果

图 3.2 展示了定位航行实验中，每组小鼠逃逸潜伏期的变化情况。7 天的定位航行实验结果显示，各组小鼠的逃逸潜伏时间均在逐渐缩短 ( $P < 0.0001$ )，这说明各组小鼠都存在学习的过程。其中，EGCG 组的小鼠逃逸潜伏期平均缩短的最快；而  $ZnCl_2$  组的小鼠平均缩短的最慢。



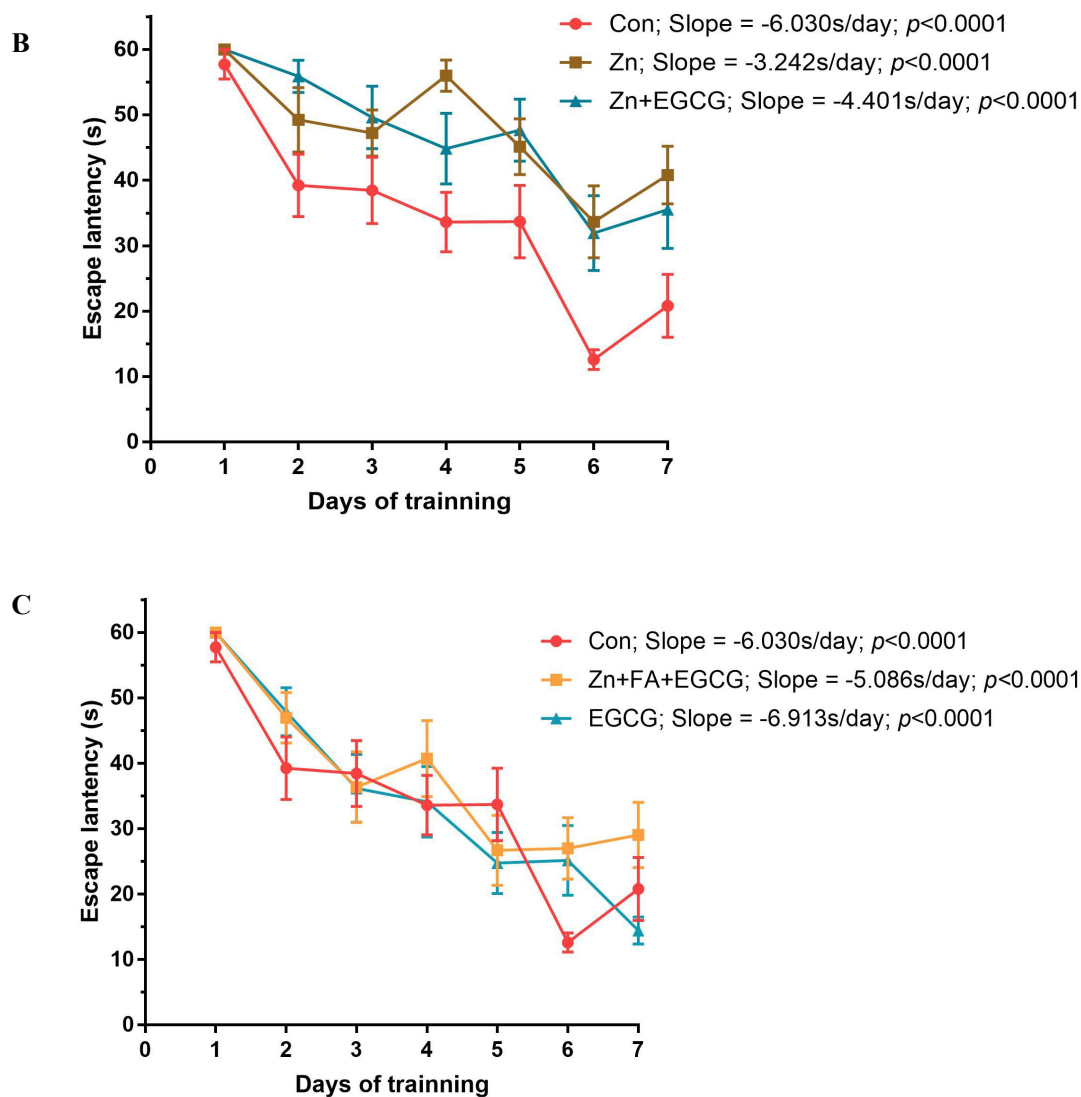


图 3.2 定位航行实验中各组小鼠逃逸潜伏期的变化情况

### 3.2.2 空间探索实验结果

经过第八天的遗忘，第九天进行空间探索实验，图 3.3-3.5 展示了实验结果。图 3.3 展示的是小鼠进入目标象限的次数，A 图中的结果表明，EGCG 可能能够对于由吸入甲醛而造成的记忆下降产生一定的拮抗作用 ( $P < 0.01$ )，但是由于单纯吸入甲醛组与对照组之间并没有显著差别 ( $P > 0.05$ )，我们无法依此下一个确定的结论；B 图结果显示短期服用锌离子可能造成极显著地神经毒性 ( $P < 0.01$ )。

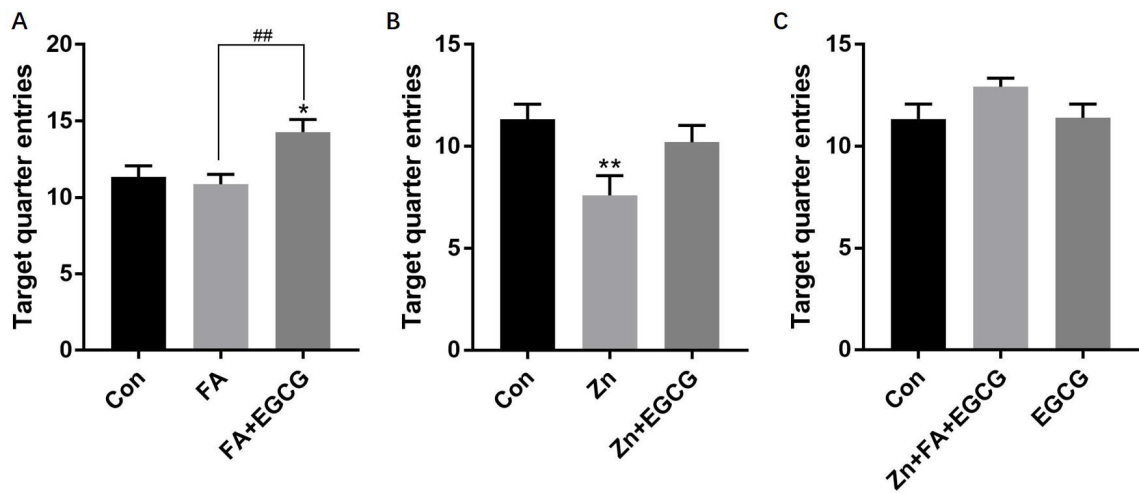


图 3.3 空间探索实验中各组小鼠进入目标象限的次数

图 3.4 展示的是小鼠在目标象限中的停留时间。B 图显示，短期服用锌离子实验组小鼠的记忆能力极显著地有别于对照组小鼠 ( $P<0.001$ )，而 EGCG 能够显著地拮抗锌离子的影响 ( $P<0.05$ )。

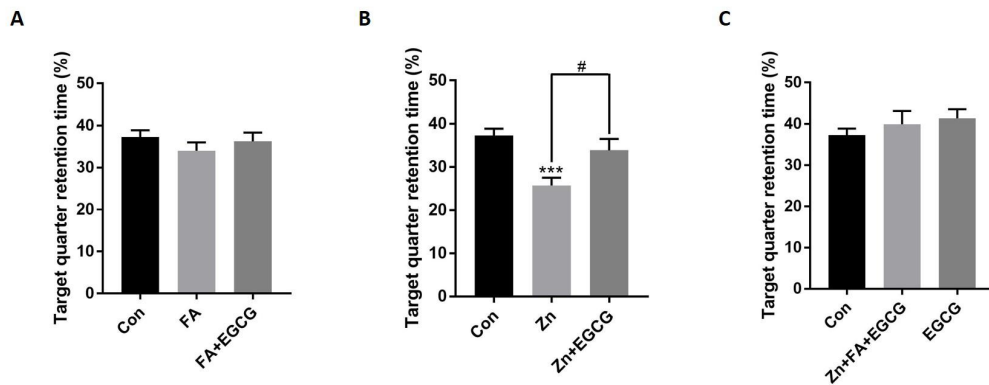


图 3.4 空间探索实验中小鼠在目标象限中的停留时长

图 3.5 展示的是具有代表性的小鼠在定位航行实验中的轨迹图。A 图表示的是对照组小鼠的运动情况，轨迹图显示，在 60s 内，小鼠多次试图通过曾经平台的位置，表现出了较好的记忆能力。而从 B、C 图（单纯吸入甲醛、吸入甲醛并服用 EGCG 两组）中，我们并不能观察到类似的情况。相比之下，B 图的轨迹比 C 图更散乱。D、E 两图分别为单纯服用锌离子组与混合服用锌离子、EGCG 组，我们可以明确地观察到，D 图较为散乱，而 E 图轨迹主要集中在目标象限附近，这与小鼠在目标象限中的

停留时长的结论一致。F 图（FA+Zn+EGCG）轨迹较为散乱，而 G 图的轨迹则集中在目标象限中，而且，越接近曾经平台的位置，轨迹越密集，说明短期单纯服用 EGCG 可能能提高小鼠短期的记忆能力。

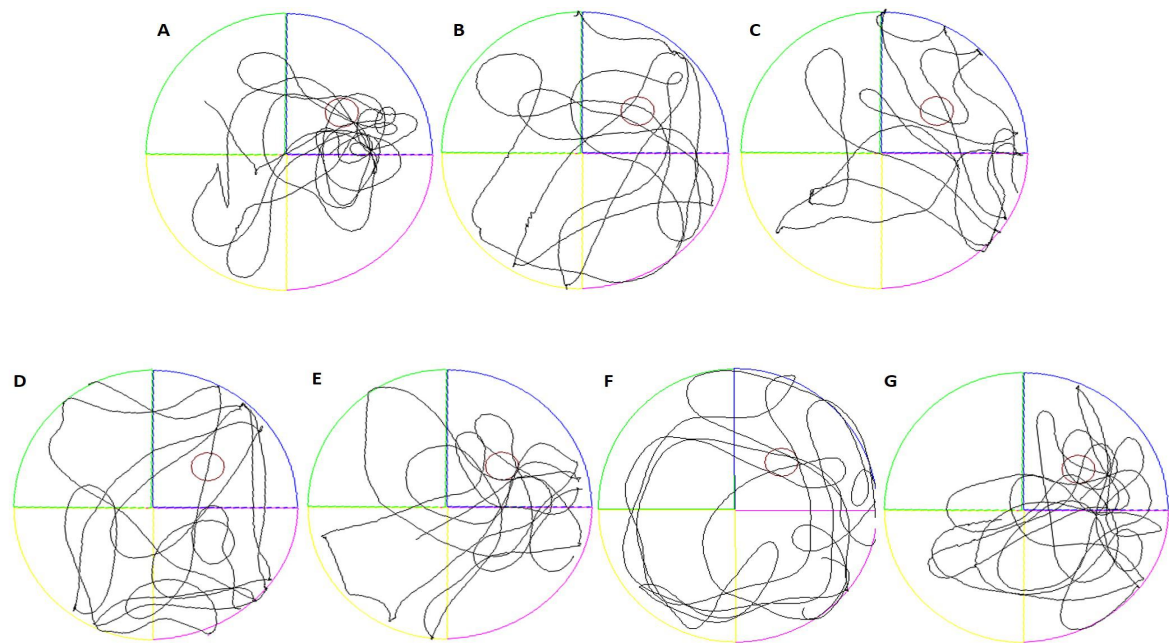


图 3.5 空间探索实验中小鼠的运动轨迹

### 3.3 氧化应激指标结果

图3.6展现了脑组织中活性氧簇的状况。ROS 结果指示了组织内活性氧簇的含量。实验结果表明，与对照组相比，单纯吸入甲醛能造成极显著的氧化损伤（ $P<0.001$ ），并且，EGCG 极显著地拮抗了由吸入式甲醛带来的氧化损伤（ $P<0.001$ ）。于此同时，我们观察到，锌离子、甲醛、EGCG 的联合染毒与对照组相比，存在极显著的氧化损伤（ $P<0.01$ ）。

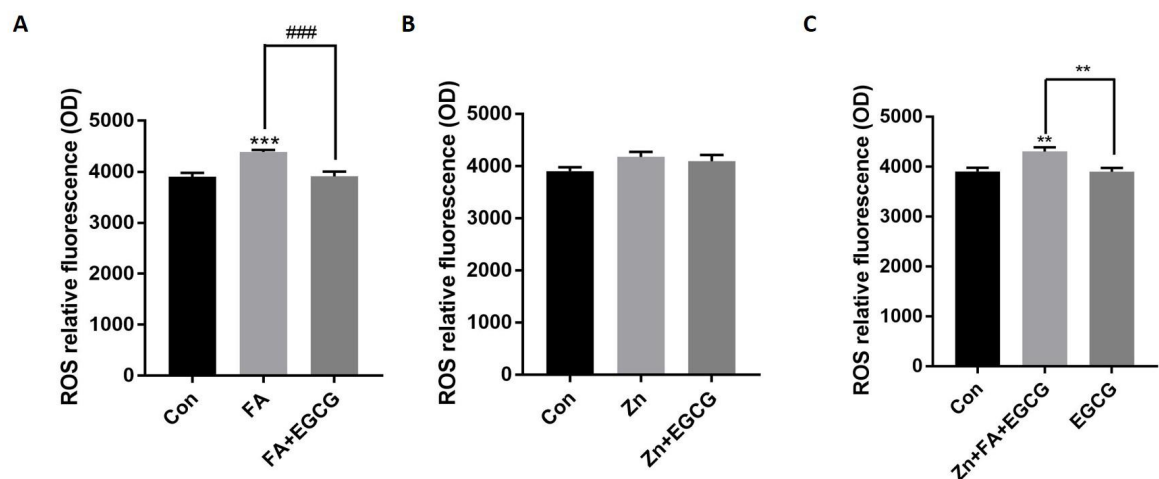


图 3.6 ROS 测定结果

### 3.4 DNA 损伤水平检测结果

8-OHdG 是敏感的 DNA 损伤标志物,其含量越高,标志着由羟自由基诱导的 DNA 损伤越严重,即由氧化损伤导致的 DNA 损伤越严重。图 3.7 为 8-OHdG 的结果示意图。可以发现,甲醛与  $\text{ZnCl}_2$  均造成了极显著的脑组织 DNA 损伤( $P<0.001$ ,  $P<0.0001$ ),其中, EGCG 有效地抑制了由  $\text{ZnCl}_2$  造成的伤害 ( $P<0.0001$ ),而未见其对吸入式甲醛的显著拮抗作用 ( $P>0.05$ )。值得一提的是,单独摄入 EGCG 组表现出了极显著的 DNA 损伤水平 ( $P<0.0001$ ),并与 Zn+FA+EGCG 组都有极显著的差异 ( $P<0.01$ )。

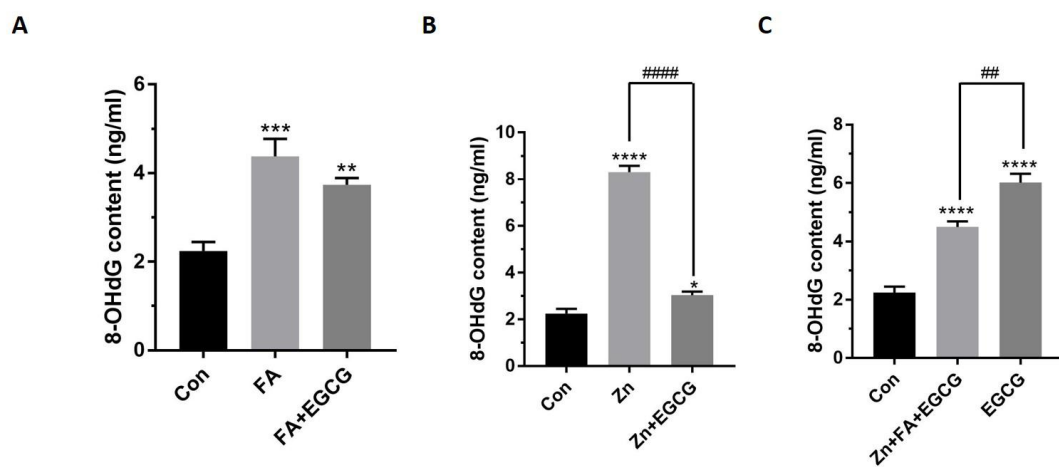


图 3.7 8-OHdG 含量结果图

## 4 讨 论

随着社会经济水平的不断提高，饮茶正在重新成为一种健康的生活方式，同时，以茶多酚为主要成分的保健品也层出不穷。表没食子儿茶素没食子酸酯（EGCG）作为茶多酚中含量最丰富，活性最高的成分，被广泛讨论。本实验就是以 EGCG 为主要研究对象，讨论其在脑组织方面与锌离子和甲醛的拮抗作用。

锌离子至少有两种展现神经毒性的方式。其一是影响淀粉状前体蛋白（amyloid precursor protein, APP）的表达。其二是锌也能够通过影响氧化应激的方式，产生活性氧簇，从而损伤脑组织<sup>[21]</sup>。本实验单纯进行 50mg/kg ZnCl<sub>2</sub> 灌胃的小鼠，被发现在行为学与 DNA 损伤程度等方面，显著甚至极显著地表现出了神经毒性。

目前已经证明，吸入式甲醛具备神经毒性。行为学研究显示，吸入式甲醛能够使小鼠认知能力显著性下降<sup>[27]</sup>。尽管有诸多文献支持，遗憾的是，我们未能观测到吸入式甲醛对小鼠认知能力的伤害。我们已经知道，甲醛能够通过使脑组织氧化还原平衡失调的方式发挥其神经毒性<sup>[20]</sup>。在本实验中，活性氧簇检测结果（ROS）与 DNA 损伤水平（8-OHdG）的检测结果显示也均极显著地（ $P < 0.001$ ）反映了这一规律。

一般认为，EGCG 能够通过螯合金属离子与发生抗氧化作用的方式拮抗上述神经毒性。事实上，在空间探索实验测定小鼠进入指定象限次数这一指标上，我们观测到了饮用 EGCG 并暴露于气态甲醛的实验组进入次数极显著高于单纯暴露于气态甲醛的实验组（ $P < 0.01$ ）；ROS 的检测结果显示也发现了 EGCG 对由吸入式甲醛诱导的氧化损伤具有极显著地拮抗作用（ $P < 0.001$ ）；但我们并未在 8-OHdG 这一指标上观察到 EGCG 对甲醛神经毒性的拮抗作用。

在空间探索实验中的小鼠在目标象限内的停留时间这一指标上，我们观察到了 EGCG 对由锌离子诱发的神经毒性显著地拮抗作用（ $P < 0.05$ ）；虽然氧化应激指标并未证明这种拮抗作用，但在 8-OHdG 这一指标上，我们观察到 EGCG 与 Zn 发生了极显著的拮抗。（ $P < 0.0001$ ）。因此，我们可以判断，EGCG 极有可能以上述两种提到的方式与 Zn 和甲醛发生反应。综合上述结果，我们认为 EGCG 是一种较好的对甲醛和锌离子诱导产生神经毒性的拮抗剂。

此外，我们在 8-OHdG 指标上，观察到了 Zn+FA+EGCG 组极显著高于 Zn+EGCG 组（ $P < 0.001$ ），然而与 FA+EGCG 组无显著性差异（ $P > 0.05$ ），存在一种可能：EGCG 用来螯合金属离子的功能基均可起到还原的作用，而其所有起还原作用的功能基并不一

定能够螯合金属离子。这只是一种推测，鉴于实验中存在众多不稳定因素，还需要更多更精确的实验对其加以验证。

在本实验中，8-OHdG 检测结果展现出了因单独服用 EGCG 而产生的促氧化作用 ( $P < 0.0001$ )。尽管针对 EGCG 的研究主要集中在其抗氧化性方面，但目前已经证实，EGCG 能够在细胞内发生促氧化作用。这样的促氧化作用一般被认为能够产生活性氧簇作用于肿瘤细胞细胞器或膜结构，引发肿瘤细胞的损伤。而对于正常细胞，温和的氧化应激环境能够提高细胞的抗氧化酶活力，从而开启细胞的抗氧化机制<sup>[28]</sup>。但是我们尚未得知，过高浓度的 EGCG 是否有可能将温和的氧化应激环境转化成氧化损伤，对正常细胞造成不可逆的伤害。EGCG 至少有两种方式发生促氧化作用。其一，是直接发生自氧化产生  $H_2O_2$ <sup>[29]</sup>，而  $H_2O_2$  能够诱导细胞产生氧化应激，甚至造成氧化损伤；其二，EGCG 能够依靠其本身的还原性，破坏细胞内氧化还原平衡，使  $Fe^{3+}$  向  $Fe^{2+}$  转化，从而开启 Fenton 反应。Fenton 反应显示， $H_2O_2$  与  $Fe^{2+}$  的混合液具备强氧化性，原理为： $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot$ <sup>[30]</sup>。同时，我们还知道，一些常见的抗氧化剂，如维生素 C，在适当的剂量下表现出抗氧化剂，但在高剂量下表现出促氧化性<sup>[31]</sup>。基于此，我们推测，EGCG 表现出抗氧化或促氧化的特性，可能取决于细胞内部氧化还原平衡的状况与 EGCG 自身的浓度。上述较多的研究都集中在针对癌细胞的研究方面，针对脑神经系统的相关研究较少，故而具体的剂量与毒性的数据缺乏参考价值。本实验采用的将 EGCG 溶于饮用水的方式给药，浓度为 0.2%，结合小鼠饮用情况，约为 400mg/kg/day。已有文献表明，在类似的给药量（500mg/kg/day）与给药方法下，并未观察到小鼠在基因毒性<sup>[32]</sup>、皮肤毒性<sup>[33]</sup>有所表现。然而，通过皮下注射的方式，在 200mg/kg/day 给药组就出现了明显的毒性，500mg/kg/day 给药组在第一次注射后，就有 6 只（共 8 只）死亡<sup>[34]</sup>。

通过本实验的一系列结果，我们推测，EGCG、 $ZnCl_2$ 、FA 均能够产生氧化应激，并对脑组织造成损伤。然而由于其化学性质的差异，EGCG 与  $ZnCl_2$ 、FA 存在拮抗作用，一同施加于小鼠时毒性减弱。具体的作用机制与毒性减弱程度还有待进一步的研究。

## 5 结论与展望

### 5.1 结论

- (1) 行为学、氧化应激指标与 DNA 损伤水平检测均表明，短时间  $\text{ZnCl}_2$  灌胃（50mg/kg/day）与甲醛吸入式染毒（3mg/m<sup>3</sup>, 8h/day）能不同程度地对小鼠脑组织造成氧化损伤；
- (2) EGCG 对由吸入式甲醛、锌离子摄入造成的氧化损伤均具备较好的保护作用；
- (3) EGCG 可能兼具抗氧化性和促氧化性的特点。

### 5.2 展望

- (1) 目前已经有较多关于 EGCG 对神经系统损伤的修复作用的研究，但是鲜见关于其促氧化作用在神经系统中发挥作用的相关机制研究；
- (2) EGCG 作为一种常见保健品，兼具抗氧化性与促氧化性，但是在何种情景下展现何种特性，以及摄入何等剂量时效果最佳，还有待进一步的探索；
- (3) 与 EGCG 促氧化性的研究主要集中在其诱导细胞发生氧化应激从而起到抗癌作用这一层面，而对于过量服用茶多酚类保健品对神经系统的影响鲜有研究，因此，过量抗氧化剂对神经系统的影响还有待进一步讨论；
- (4) 本实验涉及的是短期暴露，但由于人服用 EGCG 作为保健品或治疗作用将是一种长期行为，那么，关于长期服用 EGCG 对神经系统的影响还有待进一步的探索。



## 参考文献:

- [1] 赵保路. 茶多酚保护脑神经防止帕金森病损伤作用及其分子机理[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(7): 735-743.
- [2] 王志鑫, 张伟, 檀建新. 植物多酚提取物防治阿尔茨海默氏病研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(9): 118-122.
- [3] Weinreb O, Mandel S, Amit T, et al. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2004, 15(9): 506-516.
- [4] Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, et al. Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue[J]. Carcinogenesis, 1998, 19(10): 1771-1776.
- [5] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier[J]. Neuropharmacology, 2001, 40(8): 959-975.
- [6] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants[J]. Experimental physiology, 1997, 82(2): 291-295.
- [7] Barnham K J, Masters C L, Bush A I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. Nature reviews Drug discovery, 2004, 3(3): 205-214.
- [8] Nanjo F, Goto K, Seto R, et al. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1996, 21(6): 895-902.
- [9] Bush A I. The metallobiology of Alzheimer's disease[J]. Trends in neurosciences, 2003, 26(4): 207-214.
- [10] Higuchi A, Yonemitsu K, Koreeda A, et al. Inhibitory activity of epigallocatechin gallate (EGCg) in paraquat-induced microsomal lipid peroxidation—a mechanism of protective effects of EGCg against paraquat toxicity[J]. Toxicology, 2003, 183(1): 143-149.
- [11] Reuss G, Disteldorf W, Gamer A O, et al. Formaldehyde[J]. Ullmann's

Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000.

- [12] Usanmaz S E, Akarsu E S, Vural N. Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2002, 11(2): 93-100.
- [13] Tang X, Bai Y, Duong A, et al. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects[J]. Environment international, 2009, 35(8): 1210-1224.
- [14] 孙亮, 陈娜, 沈向红, 等. 龙头鱼甲醛本底含量及其影响因素的研究 [J]. 中国卫生监督杂志, 2009, 16(3): 254-257.
- [15] 安利华, 孙群, 郑万源. 东海地区常见水产品甲醛本底值调查及含量分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(6): 524-527.
- [16] Songur A, Ozen O A, Sarsilmaz M. The toxic effects of formaldehyde on the nervous system[M]//Reviews of environmental contamination and toxicology. Springer New York, 2010: 105-118.
- [17] 童金柱. 纺织工业中的甲醛问题[J]. 纺织导报, 2003 (3): 94-96.
- [18] Hou Q, Jiang H, Zhang X, et al. Nitric oxide metabolism controlled by formaldehyde dehydrogenase (fdh, homolog of mammalian GSNOR) plays a crucial role in visual pattern memory in Drosophila[J]. Nitric Oxide, 2011, 24(1): 17-24.
- [19] Tang X Q, Fang H R, Zhou C F, et al. A novel mechanism of formaldehyde neurotoxicity: inhibition of hydrogen sulfide generation by promoting overproduction of nitric oxide[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54829.
- [20] Zararsiz I, Kus I, Ogeturk M, et al. Melatonin prevents formaldehyde - induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rats: an immunohistochemical and biochemical study[J]. Cell biochemistry and function, 2007, 25(4): 413-418.
- [21] McCord M C, Aizenman E. The role of intracellular zinc release in aging, oxidative stress, and Alzheimer' s disease[J]. Frontiers in aging neuroscience, 2014, 6.
- [22] Andreini C, Banci L, Bertini I, et al. Counting the zinc-proteins encoded

- in the human genome[J]. *Journal of proteome research*, 2006, 5(1): 196–201.
- [23] Cuajungco M P, Lees G J. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders[J]. *Neurobiology of disease*, 1997, 4(3): 137–169.
- [24] Aizenman E, Stout A K, Hartnett K A, et al. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation[J]. *Journal of neurochemistry*, 2000, 75(5): 1878–1888.
- [25] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *Journal of neuroscience methods*, 1984, 11(1): 47–60.
- [26] Lovell M A, Robertson J D, Teesdale W J, et al. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques[J]. *Journal of the neurological sciences*, 1998, 158(1): 47–52.
- [27] Malek F A, Möritz K U, Fanghänel J. A study on the effect of inhalative formaldehyde exposure on water labyrinth test performance in rats[J]. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2003, 185(3): 277–285.
- [28] 陈怡君, 熊立瑰, 黄建安, 等. EGCG 对细胞的促氧化作用研究进展[J]. *茶叶科学*, 2015, 35(2): 130–136.
- [29] Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2008, 476(2): 107–112.
- [30] Kim H S, Quon M J, Kim J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate[J]. *Redox biology*, 2014, 2: 187–195.
- [31] 陈伟, 林映才, 马现永, 等. 一些抗氧化剂的抗/促氧化作用及其机制[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(4): 595–605.
- [32] Isbrucker R A, Bausch J, Edwards J A, et al. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(5): 626–635.
- [33] Isbrucker R A, Edwards J A, Wolz E, et al. Safety studies on

epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(5): 636-650.

- [34] Isbrucker R A, Edwards J A, Wolz E, et al. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 3: teratogenicity and reproductive toxicity studies in rats[J]. Food and chemical toxicology, 2006, 44(5): 651-661.