

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.002
View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.002>

绿茶提取物 EGCG 对乙醇诱导原代海马神经元损伤的保护作用及其机制

杨海玉¹, 刘勇², 胡建新³, 戴艳枝²

(江西省人民医院 1. 临床医学研究所; 2. 病理科; 3. 药剂科, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 探讨绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)对乙醇诱导原代海马神经元损伤的作用及机制。方法: 以原代培养的海马神经元为实验对象, 设对照组、乙醇组、EGCG+乙醇组和EGCG组, 采用MTT比色法检测细胞存活率以及Annexin-V APC/7-AAD双染法观察细胞凋亡状况, 采用荧光实时定量PCR检测凋亡因子BCL2, BAX表达并进行氧化应激检测。结果: EGCG(100 μmol/L)可明显提高海马神经元存活率及抑制乙醇诱导的细胞凋亡($P<0.001$); 另外, EGCG可促进海马神经元凋亡因子BCL2表达增高、BAX表达降低($P<0.001$), 同时使抗氧化酶T-SOD和GSH-Px的酶活力明显增高($P<0.001$)。结论: EGCG对乙醇诱导的原代海马神经元损伤具有一定的保护作用, 其机制与抑制海马神经元凋亡及抗氧化应激损伤有关。

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯; 乙醇性痴呆; 海马神经元; 凋亡; 氧化应激

Protective effect of green tea compound epigallocatechin-3-gallate on alcohol-induced primary-cultured hippocampal neuron injury and its mechanism

YANG Haiyu¹, LIU Yong², HU Jianxin³, DAI Yanzhi²

(1. Institute of Clinical Medicinal Sciences; 2. Department of Pathology; 3. Department of Pharmacy,
Jiangxi Province People's Hospital, Nanchang 330006, China)

Abstract **Objective:** To observe the protective effect of green tea compound epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on alcohol-induced primary-cultured hippocampal neuron injury and discuss its mechanism. **Methods:** Hippocampal neurons were primary-cultured for 7 days and identified with immunofluorescence staining, divided into 4 groups: control group, ethanol group, EGCG + ethanol group and EGCG group. The cell viability was analyzed with MTT assay and the staining with Annexin-V APC/7-AAD was used to observe cell apoptosis. The expression of apoptosis factors including BCL2 and BAX was detected by Real-time fluorescent quantitative PCR, the activity

收稿日期 (Date of reception): 2017-12-10

通信作者 (Corresponding author): 刘勇, Email: jxpathology@126.com

基金项目 (Foundation item): 江西省卫生厅中医药科研基金重点项目 (2013Z005); 江西省杰出青年人才资助计划 (20162BCB23056)。This work was supported by the Traditional Chinese Medicine Key Project Foundation of Jiangxi Provincial Health Department (2013Z005) and Jiangxi Provincial Outstanding Youth Talents Scheme (20162BCB23056), China.

of antioxidant enzymes such as T-SOD and GSH-Px in hippocampal neurons was also studied. **Results:** For primary-cultured hippocampal neurons, the cell viability was significantly increased and alcohol-induced cell apoptosis was apparently inhibited by treatment of EGCG (100 $\mu\text{mol/L}$) ($P<0.001$). Moreover, the result showed that anti-apoptotic factor BCL2 was significantly up-expressed and pro-apoptotic factor BAX was down-expressed, the enzyme activity of T-SOD and GSH-Px in hippocampal neurons was also obviously increased after EGCG treatment. **Conclusion:** The alcohol-induced injury of hippocampal neuron could be prevented by EGCG treatment, which is closely associated with its inhibition effects on alcohol-induced cell apoptosis and oxidative stress.

Keywords epigallocatechin-3-gallate; alcohol-associated dementia; hippocampal neuron; apoptosis; oxidative stress

大脑是乙醇诱导损伤的最常见靶器官之一，长期大量饮酒可引起脑器质性损害，并逐渐发展至痴呆状态，称之为乙醇性痴呆(alcohol-associated dementia, AAD)，临床主要特征表现为学习记忆功能损害，严重者甚至日常生活不能自理^[1]。研究^[2-4]证实海马是调控学习记忆功能的重要脑区，乙醇可通过诱导神经炎性反应、氧化应激等途径导致神经细胞发生凋亡，致使海马区功能性神经细胞数目减少，从而导致学习记忆功能障碍。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是从绿茶中提取的儿茶素类单体，也是绿茶的主要活性成份。目前研究^[5-8]证实EGCG具有很强的抗氧化活性，可抑制各种诱因导致的神经元凋亡，对中枢神经系统具有一定的保护作用。在前期工作基础上，本研究以原代培养的海马神经元为实验对象，进一步探讨EGCG对乙醇诱导神经元损伤的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

EGCG购自成都曼思特生物科技有限公司。培养原代海马神经元所需的DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养基及胎牛血清购于美国Gibco公司；兔抗神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)单克隆抗体和兔抗神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)单克隆抗体购于武汉博士德生物公司；四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自美国Sigma公司；胰蛋白酶、Annexin V-APC/7-AAD细胞凋亡及氧化应激检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司；荧光实时定量PCR相关试剂购自美国Thermo Fisher公司。

1.2 原代海马神经元培养和鉴定^[9]

取胎龄为15~18 d的SD胚胎大鼠(购自江西中医药大学实验动物部)，于体视显微镜下分离海马组织，采用体积分数为0.25%胰蛋白酶消化，加入DMEM培养基吹打细胞悬液，调整细胞密度为 2×10^5 接种于6孔板，孔内预先放置包被多聚-L-赖氨酸的盖玻片。每3 d换液1次。细胞培养第7 d取盖玻片，PBS轻洗3次，用体积分数为4%多聚甲醛室温固定30 min。之后用体积分数为0.1% Triton X-100处理15 min，分别滴加一抗兔抗鼠NSE(1:100)和GFAP(1:100)4 °C过夜。PBS洗3次后，分别滴加FITC标记和TRITC标记羊抗兔二抗(1:300)，室温避光孵育1 h。之后甘油缓冲液封片，荧光显微镜观察结果。

1.3 原代海马神经元 MTT 检测

将密度为 2×10^5 的海马神经元细胞悬液接种于预先包被多聚-L-赖氨酸的96孔板，置培养箱内培养6 d，每3 d换液1次。第7天所有细胞均更换无血清的DMEM培养基进行后续实验。乙醇组细胞加入含300 mol/L浓度乙醇的培养基，EGCG+乙醇组同时加入不同浓度的EGCG(1~100 $\mu\text{mol/L}$)及300 mol/L乙醇，对照组细胞加入不含乙醇及EGCG的培养基，各组细胞置培养箱中37 °C培养24 h。之后每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL)，37 °C培养4 h。弃去所有溶液后加入150 μL DMSO溶液，振荡10 min，采用酶标仪490 nm波长检测光密度(optical density, OD)值，并根据各组OD值计算细胞存活率。

1.4 原代海马神经元凋亡检测

实验设对照组、乙醇组(300 mol/L)、EGCG(100 $\mu\text{mol/L}$)+乙醇组及EGCG组(100 $\mu\text{mol/L}$)。各组细胞经上述处理后，弃去培养基，用PBS洗3次，

每孔滴加5 μL Annexin V-APC混匀，再加入5 μL 7-AAD混匀，避光染色10 min，PBS洗3次后采用流式细胞仪(美国Becton-Dickinson FACS Calibur)检测细胞凋亡。

1.5 原代海马神经元 PCR 检测

本研究采用荧光实时定量PCR技术检测凋亡因子BCL2, BAX在原代海马神经元中的表达变化。实验分组同凋亡检测。引物序列设计如下，BCL2：上游引物5'-GTACCTGAACCGGCATCTG-3'，下游引物5'-GGGCCATATAGTCCACAA-3'；BAX：上游引物5'-GTGAGCGGCTGCTTGTCT-3'，下游引物5'-GTGGGGTCCCAGTAG-3'；内参GAPDH：上游引物5'-GGCCTTCCGTGTTCTACC-3'，下游引物5'-CGCCTGCTTCACCACCTTC-3'。RNA提取后按试剂盒说明书进行反转录反应，之后采用荧光定量PCR仪(美国ABI Step one plus Real time-PCR system)进行PCR反应，反应步骤为：95 °C变性15 s，60 °C退火20 s，72 °C延伸40 s，共40个循环；实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的统计学方法处理。

1.6 原代海马神经元氧化应激检测

实验分组同凋亡检测。实验方法按总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒说明书进行。采用紫外分光光度计分别检测T-SOD及GSH-Px反应液(450 nm)的OD值。

1.7 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行分析，数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示；多组间均数比较采用单因

素方差分析，两两比较选择Bonferroni检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代海马神经元形态学观察结果

采用免疫荧光染色法对分离培养的细胞进行鉴定，细胞呈神经元特异标志物(NSE)高表达，几乎不表达神经胶质细胞特异标志物(GFAP)，提示培养的原代海马神经元纯度较高。从图1可见，与对照组(A)及EGCG组(D)相比，乙醇组(B)细胞数量明显减少，并可见较多的呈核固缩的凋亡细胞；与乙醇组(B)相比，EGCG+乙醇组(C)细胞数量明显增多、凋亡细胞减少。

2.2 原代海马神经元 MTT 检测结果

实验结果显示：给予乙醇(300 mol/L)作用24 h后，与对照组相比，乙醇组细胞存活受到明显抑制($F=410.277$, $P<0.001$)；然而，与乙醇组相比，给予EGCG(10~100 μmol/L, 24 h)共培养后，海马神经元存活率明显增高，并且呈剂量依赖性($P<0.001$ ，图2)。

2.3 原代海马神经元凋亡检测结果

流式检测结果证实乙醇组细胞凋亡率[($5.393\pm0.38\%$)]明显高于对照组[($2.71\pm0.25\%$)]及EGCG组[($3.07\pm0.29\%$)]，其差异具有统计学意义($F=9192.625$, $P<0.001$)；EGCG+乙醇组的细胞凋亡率[($27.41\pm0.70\%$)]明显低于乙醇组，结果具有统计学意义($P<0.001$)；对照组与EGCG组之间的细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$ ，图3)。

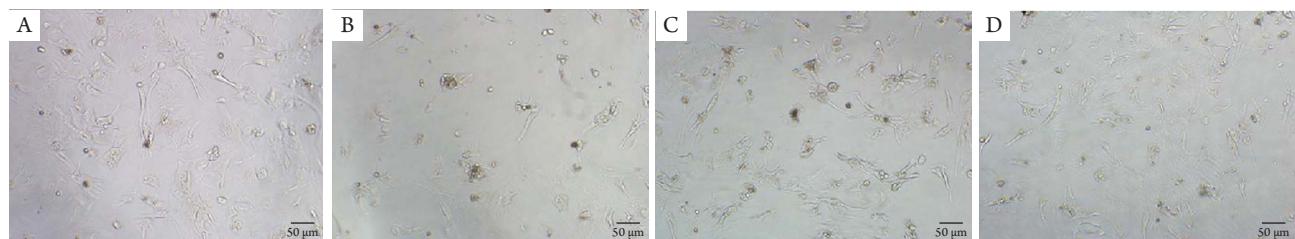


图1 原代海马神经元形态学观察结果($\times 200$)

Figure 1 Morphological observation of primary-cultured hippocampal neurons ($\times 200$)

(A)对照组；(B)乙醇组；(C)EGCG+乙醇组；(D)EGCG组。

(A) Control group; (B) Ethanol group; (C) EGCG + ethanol group; (D) EGCG group.

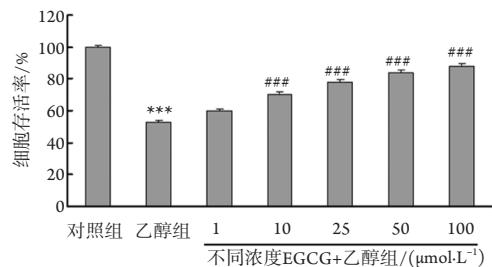


图2 不同浓度EGCG对乙醇诱导原代海马神经元损伤的作用

Figure 2 Effect of different doses of EGCG on alcohol-induced hippocampal neuron injury

与对照组相比, ***P<0.001; 与乙醇组相比, #P<0.001。
Compared with the control group, ***P<0.001; Compared with the ethanol group, #P<0.001.

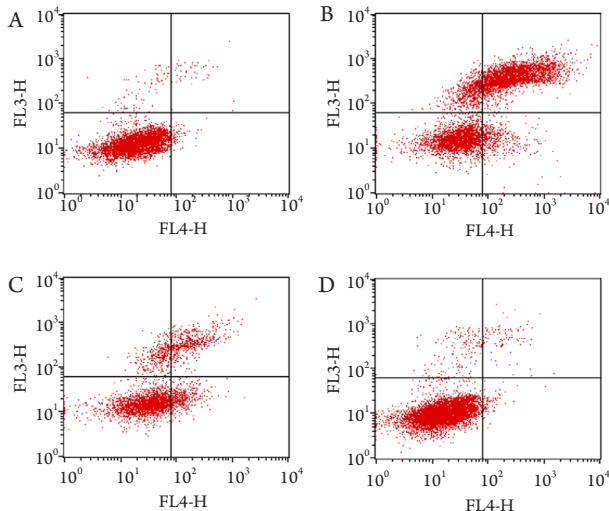


图3 流式检测原代海马神经元凋亡结果

Figure 3 Result of primary-cultured hippocampal neuron apoptosis by flow cytometry

(A)对照组; (B)乙醇组; (C)EGCG+乙醇组; (D)EGCG组。
(A) Control group; (B) Ethanol group; (C) EGCG + ethanol group;
(D) EGCG group.

2.4 原代海马神经元PCR检测结果

与对照组相比, 乙醇组细胞中抗凋亡因子BCL2表达明显降低, 而促凋亡因子BAX明显增高, 差异具有统计学意义(P<0.001); 当给予EGCG 100 μmol/L时, 与乙醇组相比, BCL2表达明显提高而BAX表达明显下降(P<0.001); 对照组和EGCG组中BCL2, BAX的表达差异无统计学意义(P>0.05, 表1)。

表1 原代海马神经元凋亡因子表达PCR检测结果

Table 1 Expression of apoptotic factors in original hippocampal neurons by PCR

组别	细胞凋亡因子	
	BCL2	BAX
对照组	1.000 ± 0.038	1.001 ± 0.062
乙醇组	0.246 ± 0.003*	2.749 ± 0.211*
乙醇+EGCG组	0.804 ± 0.011 [#]	1.877 ± 0.035 [#]
EGCG组	1.050 ± 0.071	0.978 ± 0.036

与对照组相比, *P<0.001; 与乙醇组相比, #P<0.001。

Compared with the control group, *P<0.001; Compared with the ethanol group, #P<0.001.

2.5 原代海马神经元氧化应激检测结果

与对照组相比, 细胞给予乙醇(100 mol/L)作用24 h后, 其抗氧化酶SOD和GSH-Px的酶活力均明显抑制, 结果具有统计学差异(P<0.001); 而给予EGCG可显著逆转乙醇诱导的SOD和GSH-Px酶活力下降(P<0.001)。对照组和EGCG组中SOD和GSH-Px的酶活力差异无统计学意义(P>0.05, 图4)。

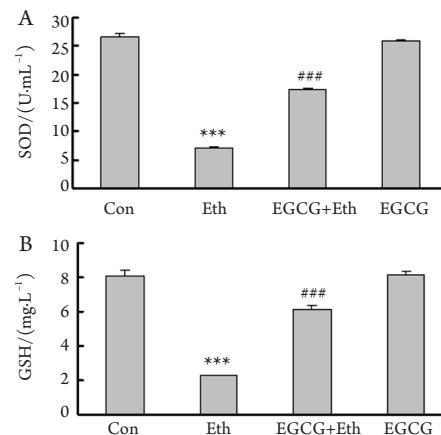


图4 原代海马神经元氧化应激检测结果

Figure 4 Observation of oxidative stress in primary-cultured hippocampal neurons

(A)SOD; (B)GSH。与对照组相比, ***P<0.001; 与乙醇组相比, #P<0.001。Con, 对照组; Eth, 乙醇组; EGCG+Eth, EGCG+乙醇组; EGCG, EGCG组。

(A)SOD; (B)GSH. Compared with the control group, ***P<0.001; Compared with the ethanol group, #P<0.001. Con, control group; Eth, ethanol group; EGCG + Eth, EGCG + ethanol group; EGCG, EGCG group.

3 讨论

AAD是慢性乙醇中毒引起脑器质性损害的结果，主要临床表现为记忆力缺损伴其他认知功能障碍。海马是神经元高度集中的部位，具有与周围脑组织界限明确、易于分离等特点，是神经科学领域常用的体外研究对象。研究^[1,4]认为海马是调控学习记忆功能的关键脑区，在短时记忆转为长时记忆以及空间航行定位功能中具有重要作用。另外，研究^[3-4]证实长期慢性饮酒可促使海马体积减小及海马区大量神经细胞凋亡。在前期工作中，研究^[2]证实28 d乙醇灌胃可导致大鼠学习记忆功能损害并诱导海马神经细胞发生显著凋亡，同时观察到大鼠血清中抗氧化酶SOD和GSH-Px的酶活力明显抑制。本研究通过体外实验进一步证实，乙醇可明显抑制海马神经元存活并诱导其发生显著凋亡，而且同样可抑制其抗氧化酶的活性。以上结果提示乙醇促进海马神经元凋亡是导致学习记忆功能损伤的重要机制，并且与诱导氧化应激损伤有关。

然而，目前临幊上治疗慢性乙醇中毒导致的学习记忆功能障碍尚无有效的方法。本研究以原代海马神经元为实验对象，探讨绿茶提取物EGCG对乙醇诱导神经元损伤的作用及机制。EGCG是绿茶的主要活性成份，具有较强的抗氧化活性，不仅对中枢神经系统损伤具有一定的保护作用，而且可明显改善动物学习认知功能^[5-7]。更为重要的是，有研究^[10-12]证实EGCG对成年动物海马神经干细胞增殖和神经元存活具有促进作用，并且可促使神经干细胞向损伤区域迁移。EGCG可明显促进乙醇作用条件下海马神经元细胞存活以及明显抑制乙醇诱导的海马神经元凋亡发生，一方面可提高抗凋亡因子BCL2表达而抑制促凋亡因子BAX表达，另一方面可显著提高细胞内抗氧化酶SOD和GSH-Px的活性。

综上所述，EGCG对乙醇诱导的原代海马神经元损伤具有一定的保护作用，其机制与抑制海马神经元凋亡及抗氧化应激有关，由此认为EGCG对于AAD可能具有潜在的临幊治疗价值。

参考文献

- 李舜伟. 认知功能障碍的诊断与治疗[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2006, 32(2): 189-191.
- LI Shunwei. The diagnosis and treatment of cognitive dysfunction[J].

- Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases, 2006, 32(2): 189-191.
- 杨海玉, 吴晓牧, 刘勇, 等. 酒精性痴呆大鼠海马神经细胞凋亡与氧化应激的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(11): 968-970.
- YANG Haiyu, WU Xiaomu, LIU Yong, et al. The research of neuronal apoptosis and oxidative stress in the hippocampus of alcohol-associated dementia rat model[J]. Journal of Apoplex and Nervous Diseases, 2013, 30(11): 968-970.
- Oliveira-da-Silva A, Manhães AC, Cristina-Rodrigues F, et al. Hippocampal increased cell death and decreased cell density elicited by nicotine and/or ethanol during adolescence are reversed during drug withdrawal[J]. Neuroscience, 2010, 167(1): 163-173.
- Chin VS, Van Skike CE, Matthews DB. Effects of ethanol on hippocampal function during adolescence: a look at the past and thoughts on the future[J]. Alcohol, 2010, 44(1): 3-14.
- Biasibetti R, Tramontina AC, Costa AP, et al. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia[J]. Behav Brain Res, 2013, 236(1): 186-193.
- Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Chronic epigallocatechin-3-gallate ameliorates learning and memory deficits in diabetic rats via modulation of nitric oxide and oxidative stress[J]. Behav Brain Res, 2011, 224(2): 305-310.
- Ahmed NA, Radwan NM, Aboul Ezz HS, et al. The antioxidant effect of Green Tea Mega EGCG against electromagnetic radiation-induced oxidative stress in the hippocampus and striatum of rats[J]. Electromagn Biol Med, 2017, 36(1): 63-73.
- 杨海玉, 刘勇, 胡建新, 等. 绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯对酒精诱导SH-SY5Y细胞损伤的作用研究[J]. 临幊与病理杂志, 2016, 36(12): 1900-1904.
- YANG Haiyu, LIU Yong, HU Jianxin, et al. Effect of green tea compound epigallocatechin-3-gallate on alcohol-induced SH-SY5Y cell injury[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(12): 1900-1904.
- 刘勇, 曾玉娥, 杨海玉. 采用海马原代神经元和离体脑片建立乙醇性痴呆体外模型的比较[J]. 中华神经医学杂志, 2014, 13(1): 41-44.
- LIU Yong, ZENG Yu'e, YANG Haiyu. Setting up alcohol-associated dementia in vitro models with primary-cultured hippocampal neuron and brain slice[J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2014, 13(1): 41-44.
- Wang Y, Li M, Xu X, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) promotes neural progenitor cell proliferation and sonic hedgehog pathway activation during adult hippocampal neurogenesis[J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(8): 1292-1303.
- Itoh T, Imano M, Nishida S, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate

- increases the number of neural stem cells around the damaged area after rat traumatic brain injury[J]. J Neural Transm (Vienna), 2012, 119(8): 877-890.
12. Ortiz-López L, Márquez-Valadez B, Gómez-Sánchez A, et al. Green tea compound epigallo-catechin-3-gallate (EGCG) increases neuronal survival in adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro[J]. Neuroscience, 2016, 322: 208-220.

本文引用: 杨海玉, 刘勇, 胡建新, 戴艳枝. 绿茶提取物EGCG对乙醇诱导原代海马神经元损伤的保护作用及其机制[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(4): 694-699. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.002

Cite this article as: YANG Haiyu, LIU Yong, HU Jianxin, DAI Yanzhi. Protective effect of green tea compound epigallocatechin-3-gallate on alcohol-induced primary-cultured hippocampal neuron injury and its mechanism[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(4): 694-699. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.002