

Effect of L-theanine on Improving Memory Impairment of APP/PS1 Transgenic Mice

Yuwei Chen Jieying Wang Xiaofeng Shi Xiaoqing Zhang

Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease with abnormal structure of nerve tissue and cognitive dysfunction caused by degeneration of nerve tissue. The main pathological features of AD are the appearance of senile plaques formed by amyloid accumulation outside brain nerve cells, intracellular neurofibrillary tangles, and accompanied by synaptic damage, massive loss of neurons, and apoptosis. L-theanine can pass through the blood-brain barrier, is non-neurotoxic, and has good antioxidant properties. In this study, APP/PS1 transgenic mice were used to study the effect of theanine on memory damage caused by Alzheimer's disease through animal behavior experiments, and molecular biology methods were used to analyze the effects of theanine on brain inflammation in mice.

Keywords

Alzheimer's disease; theanine; cognitive impairment

茶氨酸对 APP/PS1 转基因小鼠记忆损伤改善作用研究

陈钰玮 汪洁英 史小峰 张小庆

西安医学院, 中国·陕西 西安 710021

摘要

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是由神经组织变性引起的神经组织结构异常与认知功能障碍的神经退行性疾病, 是威胁老年人健康的重要因素。AD 的主要病理特征为脑神经细胞外出现淀粉样蛋白聚集形成的老年斑, 细胞内神经纤维缠结, 并伴随有突触损伤、神经元大量丢失、细胞凋亡等现象。茶氨酸 (L-theanine) 能够通过血脑屏障, 无神经毒性, 具备良好的抗氧化性。在本研究中, 使用 APP/PS1 转基因小鼠, 通过动物行为学实验研究茶氨酸对阿尔茨海默症引起的记忆损伤缓解作用, 利用分子生物学手段分析茶氨酸对小鼠脑内炎症反应的影响, 阐释茶氨酸干预阿尔茨海默症潜在作用机制。

关键词

阿尔茨海默症; 茶氨酸; 认知障碍

1 引言

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 如今已经成为全人类需要面对的世界公共卫生健康问题。AD 是由神经组织变性引起的神经组织结构异常与认知功能障碍的神经退行性疾病^[1], 主要病理特征为脑神经细胞外出现 β 淀粉样蛋白聚集, 并伴随突触损伤、神经元大量丢失、细胞凋亡等现

象^[2]。AD 发病原因尚不明确, 现有的方法仅能起到延缓作用, 并且传统的药物治疗副作用较大, 因此从天然产物中寻求安全有效的治疗 AD 的方法意义重大。

茶氨酸 (L-theanine) 具有安神、抗抑郁等生理作用, 可以通过血脑屏障, 与谷氨酸受体竞争性结合抑制谷氨酸毒性, 并且茶氨酸在体内和体外实验中均未体现神经毒性, 具有一定神经保护作用^[3,4]。然而, 茶氨酸对阿尔兹海默症引起的记忆损伤研究却少有报道。本课题采用 3 月龄 APP/PS1 转基因小鼠作为 AD 动物模型, 将茶氨酸溶于水 (0.24mg/mL) 给药 3 个月进行建模, 通过水迷宫行为学实验测试茶氨酸对阿尔兹海默症模型实验动物的学习记忆能力及认知功能的影响, 研究茶氨酸对 AD 引起的记忆损伤缓解作用, 并探究茶氨酸发挥作用的关键机制, 为天然产物茶氨酸干预阿尔兹海默症提供研究依据。

【基金项目】 本课题研究受到陕西省教育厅自然科学专项项目 (项目编号: 19JK0754); 陕西省脑疾病防治重点实验室开放基金 (项目编号: 18NBZD05), 西安医学院青年科研基金 (2018QN04) 资助。

【作者简介】 陈钰玮 (1991-), 研究生学历, 现任职西安医学院讲师, 从事天然食品功能因子对阿尔兹海默症的作用研究。

2 实验材料及方法

2.1 建立与处理动物模型

表 1 动物模型建立与处理

小鼠种类	月龄	个数(只)
C57BL/6 (SPF 级) 雄性	3 月龄	10
APP/PS1 (SPF 级) 转基因雄性	3 月龄	20

如表 1 所示, 饲养在标准条件动物房中, 控制光暗周期 (12/12), 温度 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 湿度 ($50 \pm 15\%$), 饮水和取食不进行限制。试验前进行适应性喂养 1 周。实验分组为: Control 组为 C57BL/6 雄性小鼠 $n=10$ / 组, AD 组为 APP/PS1 转基因雄性小鼠 $n=10$ / 组、茶氨酸干预组为 APP/PS1+L-theanine= 10 / 组。将茶氨酸溶于生理盐水中 (0.24mg/mL) 饲喂小鼠从 6 月龄至 9 月龄。

2.2 水迷宫实验

在适应性训练过程中, 将 Morris 水迷宫圆形游泳池 (直径: 100cm , 高度: 35cm) 均匀划分为 4 个等面积象限, 每一象限侧壁具有特性性可视标志, 将水池充满无毒未染色水, 并保持温度在 $23\sim 25^\circ\text{C}$, 在高于水面 1.5cm 的四象限之一区域内设施可视平台 (直径 4.5cm , 高 14.5cm)^[5,6], 将小鼠从四象限任意位置随机放入水中, 记录找到平台的时间, 若超过 60s 则用引导棍引导小鼠找到平台并停留 30s, 四个象限各训练一次。在注射 L-theanine 的第 4~8 天进行定位巡航实验, 将水池中水用无毒白色染料染色, 并将平台置于水面下 $0.5\sim 1\text{cm}$ 位置, 利用视频监测软件系统记录小鼠的游泳路径及找到平台的时间 (逃避潜伏期 s)。如小鼠在 60s 内未找到平台, 用引导棍引导找到平台并停留 30s, 逃避潜伏期则记为 60s。在第 9 天进行空间探索实验, 将平台撤去, 记录 60s 内小鼠的运动轨迹、穿越平台的次数以及停留在目标象限的时间^[7]。

2.3 自主活动能力测试

实验动物建模分组后, 将实验动物随机放入 ($25 \times 25 \times 25\text{cm}$) 的运动监测笼中, 通过装置顶端的光电传感器测量实验动物 5min 内在笼中的水平运动总距离, 并使用视频跟踪系统进行分析。

2.4 Y 迷宫

在自主活动能力测试结束后进行 Y 迷宫实验, 考察实验动物的工作记忆能力。Y 迷宫有 3 个臂, 各个臂夹角 120° , 每一臂尺寸 $35\text{cm} \times 5\text{cm} \times 15\text{cm}$ (长 \times 宽 \times 高)。实验开始

时, 将小鼠放在 Y 迷宫中间处, 允许自由探索迷宫 8min, 视频分析系统记录总进臂次数和连续进入三个不同臂的次数, 并按如下公式计算交替百分比:

$$\text{交替百分比} = (\text{连续进入三次不同臂次数} / \text{总进臂次数} - 2) * 100\%$$

2.5 血浆中炎症因子的检测

小鼠禁食但不禁水放置一夜, 在处死前对其称重, 并腹腔内注射 400mg/kg 的水合氯醛对小鼠进行麻醉。从小鼠眼球进行取血, 标记, 离心 (3000r/min , 15min), 取上清液并储存在 -80°C 进行测试将保存在 -80°C 的小鼠血清通过低温解冻, 以 3000r/min 的速度离心 10 分钟, 收集上清液。用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的含量。

3 实验结果

3.1 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验是在行为学中常用的用来考察实验动物学习与记忆能力的检测方法。如图 1 所示, 从小鼠的运动轨迹图上可以直观的看出在定位巡航实验中, APP/PS1 组与 Control 组相比的运动轨迹呈现出明显的无序性与复杂性, 而茶氨酸组则有效地逆转了这一趋势。在撤去平台的空间探索实验中, Control 组小鼠穿越平台的次数, 停留在目标象限的路程比例显著低于 APP.PS1 组, 而茶氨酸处理组能够显著优于 Control 组。

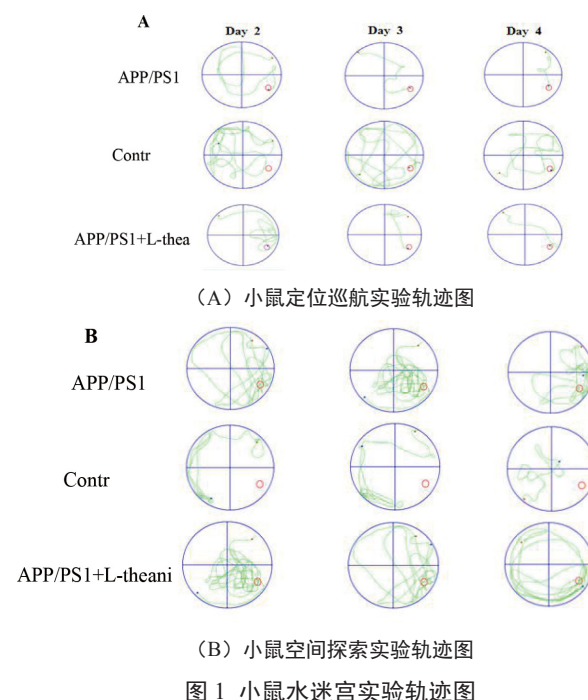


图 1 小鼠水迷宫实验轨迹图

对水迷宫实验结果进行定量分析,从图2可以看出,在前5天的定位巡航实验中,APP/PS1组与Control组相比显著提高的小鼠的逃避潜伏期即小鼠找到平台的时间,而茶氨酸处理组与AD模型组相比小鼠的逃避潜伏期有了较为明显的缩短。同样,对于逃避潜伏的总距离这一项,AD组与Control组相比小鼠找到平台的总距离明显增加,茶氨酸处理组显著缩短小鼠找到平台的游泳总距离。说明了茶氨酸可以显著改善AD模型小鼠的空间学习认知能力的下降。

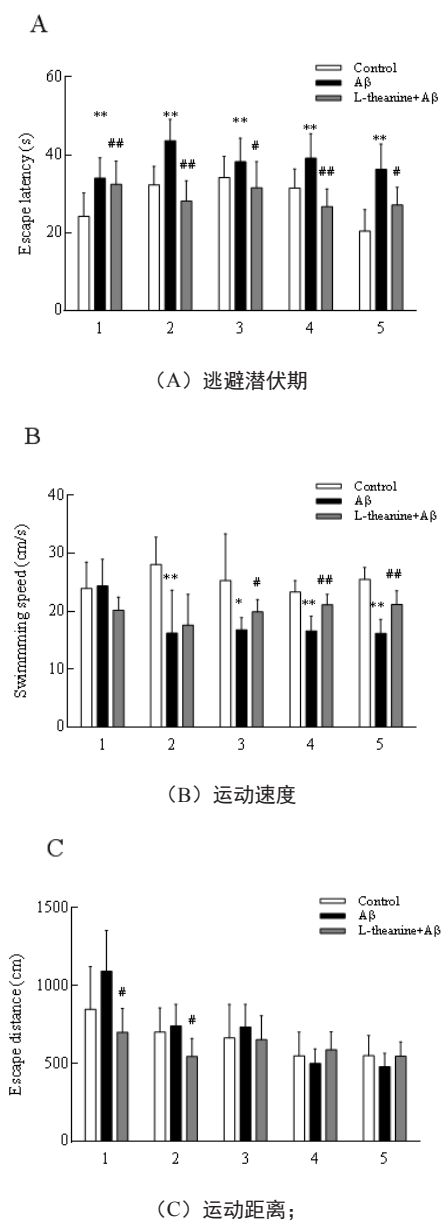


图2 小鼠水迷宫实验对比图

其中,结果表示为平均值±标准误差(n=10);与空白组相比,**p<0.01;与APP/PS1组相比,*#p<0.05,**p<0.01。

3.2 自主活动能力测试及Y迷宫实验

由图3A自主能力活动测试结果可以看出,Control组、AD组、L-theanine+APP/PS1组的自主活动能力(探索总距离cm)之间没有显著性差异,表明AD组小鼠或茶氨酸并不会改变小鼠的自发活动能力。图3B显示Y迷宫实验结果显示,AD模型组、L-theanine+APP/PS1处理组、Control组相比总进臂次数不存在显著性差异,这也与自主能力活动测试结果一致,说明AD小鼠与茶氨酸并不会影响小鼠自发活动能力。如图3C所示,与Control组相比,AD组小鼠连续进入不同三个臂的比例显著降低,表明其工作记忆能力显著下降,而茶氨酸与AD组相比可以显著提高这一比例,缓解AD造成的工作记忆损伤。

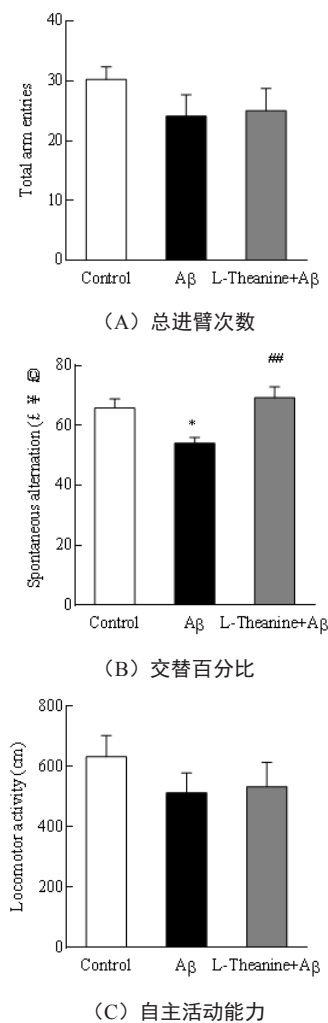


图3 小鼠自主活动能力测试与Y迷宫实验

其中,结果表示为平均值±标准误差(n=10);与空白组相比,*p<0.05;与Aβ诱导组相比,*p<0.05。行为学检测结果表明,AD模型小鼠与膳食补充茶氨酸

不会造成小鼠自主活动能力差异。而通过膳食补充茶氨酸则可以显著抑制系统性炎症诱导的小鼠工作记忆能力、空间学习认知能力与记忆能力的下降。

3.3 茶氨酸抑制 APP/PS1 小鼠血清中炎症因子的表达

如图 4 所示, 在 APP/PS1 组中, TNF- α 和 IL-1 β 的表达与对照组相比显著增加, 而茶氨酸处理组与 APP/PS1 组相比, 血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达得到了明显的抑制。所以说明茶氨酸可以抑制 APP/PS1 小鼠血清中炎症因子的表达。

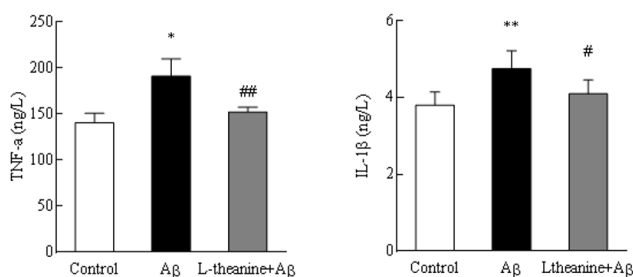


图 4 茶氨酸对小鼠血浆炎症因子水平的影响

结果表示为平均值 \pm 标准误差 ($n \geq 5$) ; 与空白组相比, $**p < 0.01$; 与 AD 模型组相比, $##p < 0.01$

4 结论

水迷宫和 Y 迷宫的实验结果显示, APP/PS1 小鼠与对照组小鼠相比学习记忆能力与认知能力显著下降, 而膳食补充茶氨酸则可以显著提高 APP/PS1 小鼠的工作记忆能力、空间学习认知能力与记忆能力的下降, 并且膳食补充茶氨酸不会

造成小鼠自主活动能力差异, 说明茶氨酸具有一定神经保护作用, 能够干预阿尔茨海默症引起的认知损伤。

除此之外, 论文还进一步探讨了茶氨酸可能发挥神经保护作用的机制, 研究表明, 炎症反应在 AD 中扮演重要角色。茶氨酸可能通过抑制小鼠脑内炎症反应, 抑制炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达进而干预阿尔茨海默症。

参考文献

- [1] Guoqi Zhu, Sanjuan Yang, Zhongwen Xie, Xiaochun Wan. Synaptic modification by L-theanine, a natural constituent in green tea, rescues the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in AD mice[J]. *Neuropharmacology*, 2018(08):138.
- [2] 唐丽娜, 许小明, 李艳红. 炎症因子与阿尔茨海默病的相关性研究进展 [J]. *中国老年学*, 2016(17):4378-4380.
- [3] 刘婉如. 茶氨酸的生理活性及药理作用研究进展 [C]// 中国高科技产业化研究会特膳食品研究开发及法规标准交流研讨会, 2014.
- [4] 阳衡, 罗源, 刘仲华, 等. 茶氨酸的体内代谢与功效机制 [J]. *茶叶通讯*, 2017(01):56-57.
- [5] 周海东, 陈益君, 朱浩. 平台颜色对大鼠 Morris 水迷宫训练成绩的影响 [J]. *中国现代医生*, 2018, 56(13):25-27+169.
- [6] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris 水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24):6274-6277.
- [7] Yan Zhao, Baolu Zhao. The neuroprotective effect of L-Theanine and its inhibition on nicotine dependence[J]. *Science Bulletin*, 2014, 59(31):4014.