

茶葉改善腦缺血誘發之大鼠記憶障礙

吳國任 吳啓瑞 蔡汎修 林立偉 呂宗俊 王文信 彭文煌 謝明村

中國醫藥大學 中國藥學研究所

目的 茶葉為山茶科 (Theaceae) 植物 *Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE 之葉，且具抗氧化、抗動脈粥樣硬化作用及減少大鼠腦缺血後神經細胞死亡現象。本研究擬探討茶葉是否對腦缺血後學習記憶損傷具有改善作用。

方法 以大鼠前中腦動脈及兩側頸總動脈結紮為腦缺血模式，並以水迷宮實驗評估茶葉粗抽物對腦缺血大鼠學習操作障礙之改善。

結果 本研究利用大鼠前中腦動脈及兩側頸總動脈結紮所造成之腦缺血模式，可誘發大鼠於水迷宮空間操作、參考記憶、工作記憶再學習與再現等學習操作能力之障礙，結果顯示茶葉粗抽物可改善因腦缺血所誘發之學習操作障礙。

結論 茶葉粗抽物對腦缺血學習記憶損傷具改善作用。(中台灣醫誌 2005;10 Supplement:S9-15)

關鍵詞

腦缺血再灌流，記憶障礙，茶葉，水迷宮

前言

腦血管病變中以腦中風為最常見疾病，其發病原因，有缺血性和出血性兩大類，前者發病率遠高於後者。缺血性腦血管病變其病因係由於腦血管動脈粥樣硬化而使腦血管漸漸狹窄；或因腦血管血栓，而造成腦血管阻塞，進而使阻塞血管所支配之區域缺血，造成缺血區域腦細胞死亡。近年來許多研究證實在腦缺血的病理過程中自由基損害扮演著重要的角色，腦缺血時自由基大量產生，損傷神經細胞膜引發脂質過氧化反應。因此治療缺血性腦血管疾病的藥物有：血栓溶解藥物 rt-PA、抗凝血劑 aspirin、神經保護劑 nifedipine、抗氧化劑 vitamin C 及 vitamin E、腦血流改善劑 pentoxifylline 等，但皆有其副作用。

中風依中醫理論，主因於氣血虧虛，心、肝、腎三臟陰陽失調，加之憂思惱怒，以致氣血運行受阻所導致 [1]。因此，中醫多以補氣活血、祛瘀通絡中藥為主，一般以補陽還五湯等用於治療腦中風。茶葉為山茶科 (Theaceae) 植物 *Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE 之葉，始著錄於唐

《新修本草》，有降火、破熱氣、中風昏憤之功，又茶葉方劑川芎茶調散主治疏風散邪、清熱止痛之效。且茶葉具抗氧化及抗動脈粥樣硬化作用 [2,3]，更有研究報告指出對大鼠腦缺血後神經細胞死亡現象具保護作用 [4]。茶葉是否對腦缺血後學習記憶損傷，未見有現代藥理完整研究。復據研究報告指出大鼠之前中腦動脈及兩側頸總動脈經結紮，會造成大鼠腦部細胞死亡及學習記憶障礙 [5,6]。因此，本研究擬以大鼠前中腦動脈及兩側頸總動脈結紮為腦缺血動物模式，以水迷宮實驗，評估茶葉粗抽物對腦缺血大鼠學習操作障礙之改善作用。

材料與方法

茶葉之抽提製備

本研究所使用材料茶，為山茶科 (Theaceae) 植物 *Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE 之葉，於民國 91 年 10 月由南投縣名間鄉國銘茶園吳聰智先生所提供。

新鮮茶葉 3 kg 使用 85°C 二次水浸泡 12 小時後，濾取濾液，重複此步驟，收集濾液後再經過減壓濃縮機濃縮，並經過烘箱乾燥後即可得到茶葉水抽物，抽取率為 7.23%。在實驗前以二次水溶解，每日新鮮配置。

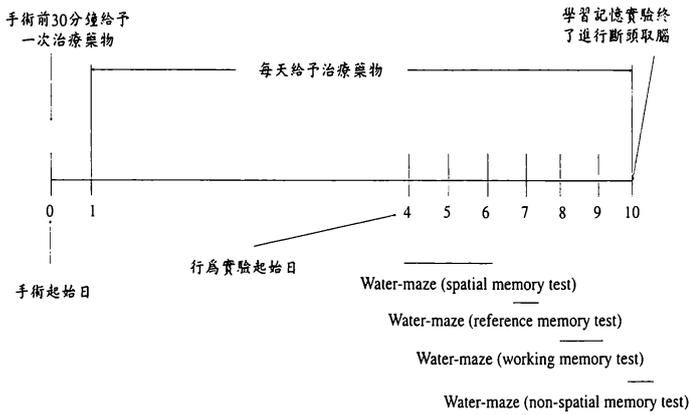
聯絡作者：謝明村

地址：404 台中市北區學士路 91 號

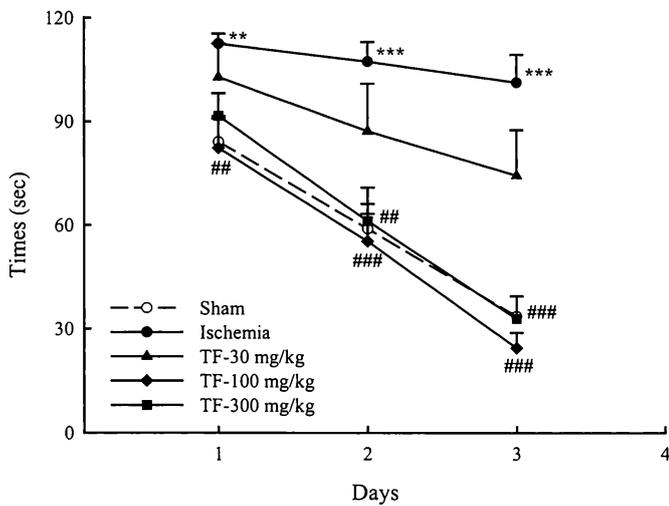
中國醫藥大學 中國藥學研究所

收文日期：2004 年 6 月 11 日 修改日期：2004 年 7 月 9 日

接受日期：2004 年 8 月 13 日



圖一 實驗流程。



圖二 Effects of Theae Folium (TF, 30, 100, 300 mg/kg) on swimming time reaching the hidden platform of water maze in ischemic rats. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (compared with sham group). ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ (compared with ischemia group).

實驗動物

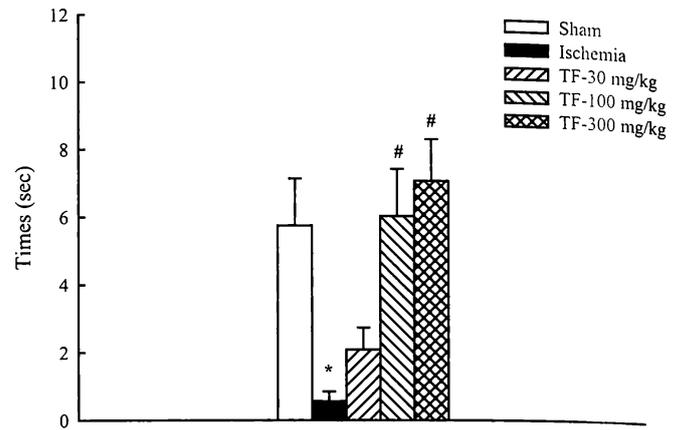
本實驗所採用之動物為中國醫藥大學 動物中心所提供 Sprague-Dawley (SD) 系雄性大鼠，體重 300 至 350 公克，飼養在空調的飼養室，溫度維持在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，燈光控制採 12 小時亮、12 小時暗(08:00 燈亮、20:00 燈暗)，食物與水不予限制。實驗期間，實驗動物之照顧皆遵從行政院農業委員會訂定之「實驗動物管理及使用指南」。

本實驗將老鼠隨機分為三組：1)茶葉粗抽物治療組 30 mg/kg (n = 8)、100 mg/kg (n = 9)、300 mg/kg (n = 10)；2)腦缺血組 (n = 11)；3)空白對照組 (n = 12)。

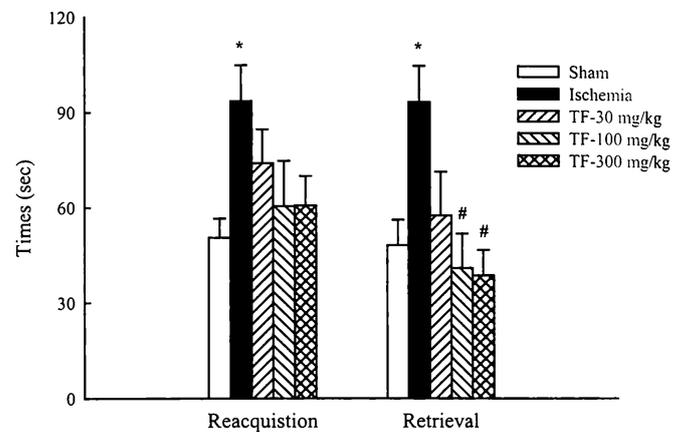
實驗儀器

水迷宮之設備

由一直徑 160 公分、高 50 公分、壁厚 15 公



圖三 Effects of Theae Folium (TF, 30, 100, 300 mg/kg) on swimming time spent on the target ring of water maze in ischemic rats. * $p < 0.05$ (compared with sham group). # $p < 0.05$ (compared with ischemia group).



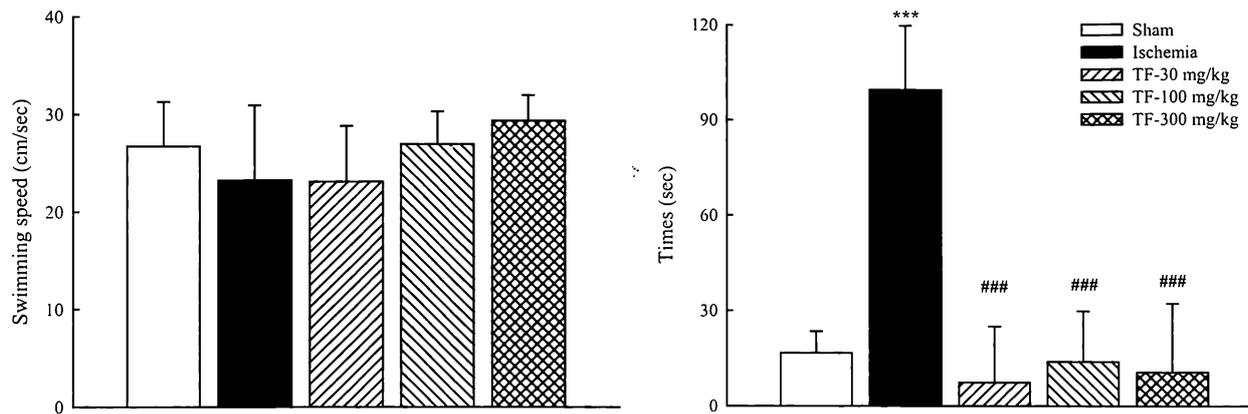
圖四 Effects of Theae Folium (TF, 30, 100, 300 mg/kg) on swimming time reaching the hidden platform during reacquisition and retrieval of water maze in ischemic rats. * $p < 0.05$ (compared with sham group). # $p < 0.05$ (compared with ischemia group).

厘之不銹鋼水池及一個逃逸平台 (直徑 11 公分、高 22 公分，當泳池充滿水時，置於水面下 1 公分處) 所組成，而且水溫需保持在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ [7]。水池由電腦劃分為四個象限 (I、II、III、IV)，A、B、C 三個環 (自圓心往壁緣依序為 A、B、C 環)。水迷宮實驗所使用之紀錄儀器：Columbus Instruments' VIDEOMEX-V video tracking, Video Camera, Video monitor (Columbus Instruments International Corporation)。實驗所使用之軟體為 Columbus Instruments' Water Maze Program。

實驗方法

腦缺血動物模式

以 Nagasawa (1989) 方式改良[5]，做為腦缺血模式。將 SD 大鼠以 sodium pentobarbital (45



圖五 Effects of Theae Folium (TF, 30, 100, 300 mg/kg) on swimming time and speed on the visible platform of water maze in ischemic rats. $***p < 0.001$ (compared with sham group); $####p < 0.001$ (compared with ischemia group).

mg/kg, i.p.) 麻醉，將左右兩側之頸總動脈分離出，之後將大鼠固定於立體定位儀上，以「雷射度普勒」監測腦動脈血流，建立基本動脈血流，而後在眼框及外耳道中間作皮膚切開，拉開顳肌，在顳骨以電動鑽頭打一個小洞，找出前中腦動脈以 10-0 的縫合線將前中腦動脈結紮，同時以顯微動脈夾夾閉兩側頸總動脈，並以「雷射度普勒」監測腦動脈血流，以確定血管結紮完全，同時計時，在 90 分鐘後移除前中腦動脈結紮及兩側頸總動脈之顯微動脈夾，讓血管重新再灌流血液，全部過程將大鼠置於熱墊 ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) 上保溫；假手術組，將血管分離但不結紮。治療藥物在手術前 30 分鐘給予一次，之後每天給予，直到實驗結束；本實驗流程如圖一所示。

水迷宮實驗

本實驗利用 Morris Water Maze 來進行學習記憶測試 [8]，其訓練過程如下：

第一天至第三天將泳池分成四個象限，逃逸平台固定置於第四象限的 B 區，而大鼠依序分別置入四個象限，每天訓練 4 次，每次 2 分鐘；若大鼠於 2 分鐘內即找到逃逸平台，讓大鼠於逃逸平台休息 30 秒鐘後，抓出泳池休息 30 秒鐘，再進行下一次之訓練；但若大鼠於 2 分鐘尚未找到逃逸平台，則將大鼠抓到逃逸平台，休息 30 秒鐘後，抓出泳池休息 30 秒鐘，再進行下一次之訓練；共訓練 3 天，此三天稱之為「空間操作 (spatial performance)」 [9]。

第四天將逃逸平台自水面下取走，再將大鼠置於第三象限，連續測定 60 秒鐘，記錄大鼠於泳池內游泳之軌跡及於原逃逸平台所花之時間及游泳距離，此階段稱之為「參考記憶 (reference memory)」 [10]。

第五天及第六天前段將逃逸平台置於第二象

限，加水使其沈入水面 1 公分，大鼠先置入第一象限，連續測定 120 秒鐘或至大鼠找到逃逸平台，稱之為「再學習 (reacquisition)」 [11]。

前段結束後休息 5 分鐘，再將大鼠先置入第三象限，亦連續測定 120 秒鐘或至大鼠找到逃逸平台，此稱之為「記憶再現 (retrieval)」 [11]。第五天及第六天前段與後段總稱為「工作記憶 (working memory)」。

第七天再將逃逸平台置入第四象限並使其露出於水面 1 公分，訓練四次，稱之為「非空間性操作 (non-spatial performance)」 [9]。所有大鼠游泳之軌跡及實驗資料均由電腦自動記錄。

動物腦部之處理

實驗完成後，將大鼠以 sodium pentobarbital (45 mg/kg) (i.p.) 麻醉，剪開胸腔，自心臟以 4°C normal saline 灌流，斷頭取腦，置於 brain matrices 係做 2 公釐的連續切片，將每一片置於 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC) 中， 37°C 下反應 30 分鐘，移至 5% formaldehyde solution，用電腦及掃描器紀錄。

統計學分析

水迷宮空間操作、參考記憶暨工作記憶等所獲得之數據，以 one-way ANOVA，各組之間以 Dunnett's test 作分析；若 $p < 0.05$ ，則認為具統計意義。

結果

茶葉粗抽物對腦缺血鼠誘發水迷宮空間操作障礙之影響

如圖二所示，腦缺血四天後，造成大鼠於水迷宮空間性學習操作之障礙 ($p < 0.001$)。茶葉粗抽物 100、300 mg/kg 可改善因腦缺血鼠誘發水迷宮學習操作障礙 ($p < 0.001$)。



圖六 TTC-stained brain slices of A: Ischemic rats. B: Normal rats.

茶葉粗抽物對腦缺血鼠誘發水迷宮參考記憶障礙之影響

如圖三所示，腦缺血七天後，造成大鼠於水迷宮參考記憶障礙 ($p < 0.05$)。茶葉粗抽物 100、300 mg/kg 可改善因腦缺血鼠誘發水迷宮參考記憶障礙 ($p < 0.05$)。

茶葉粗抽物對腦缺血鼠誘發水迷宮工作記憶障礙之影響

如圖四所示，腦缺血八天後，造成大鼠於水迷宮工作記憶障礙 ($p < 0.05$)。茶葉粗抽物 100、300 mg/kg 可改善因腦缺血鼠誘發水迷宮工作記憶障礙 ($p < 0.05$)。

茶葉粗抽物對腦缺血鼠在水迷宮非空間性游泳能力之影響

如圖五所示，腦缺血九天後，可造成大鼠於水迷宮尋找可見逃逸平台時間增加 ($p < 0.05$)。茶葉粗抽物 30、100、300 mg/kg 可使游泳時間減少 ($p < 0.05$)，但對游泳速度無任何影響。

大鼠腦組織萎縮現象

如圖六 A 所示，腦缺血後，可造成大鼠腦組織萎縮現象，其梗塞區有增加現象；而如圖六 B 所示，正常大鼠並無此現象。

討論

腦血管疾病是一種常見疾病，且為台灣地區十大死亡原因之一，而以缺血性腦血管病變為主，發病率為 70% 以上。腦缺血造成腦部損傷主要由於腦血流不足與腦部缺氧所引起自由基大量產生，因而造成腦細胞死亡。

Nagasawa 等人於 1989 年提出大鼠前中腦動脈及兩側頸總動脈結紮，會造成大鼠腦部細胞死亡 [5]，其中以海馬迴 CA1 區細胞損傷較為嚴重 [12,13]，而海馬區在腦部主要扮演學習記憶之調

控中樞 [14-16]。因 Davis 及 Kiyota 等人指出，腦缺血後造成大鼠於八臂迷宮參考記憶及工作記憶障礙 [17,18]；另 Hong 等人指出，大鼠腦缺血後會出現水迷宮空間操作障礙 [19]，而上述之學習記憶障礙現象均與海馬迴 CA1 區損傷有關，且可因投入胚胎鼠之海馬迴細胞而修復 [20]。因此，本研究即以大鼠前中腦動脈及兩側頸總動脈結紮形成之腦缺血模式來進行研究，再經由水迷宮實驗評估其學習記憶之能力。研究結果顯示，腦缺血鼠於前中腦動脈及兩側頸總動脈結紮後第四天，即出現水迷宮空間操作障礙，且可造成參考記憶及工作記憶等缺陷，此結果與其他研究學者相符 [17-19]；並且由腦部切片圖顯示，腦缺血鼠於前中腦動脈及兩側頸總動脈結紮後第 10 天，會造成大鼠腦組織萎縮，其梗塞區有增加現象，此結果與其他研究學者相符 [5]。因此，本研究繼續以此腦缺血之動物模式來評估茶葉粗抽物改善學習記憶障礙之作用，結果顯示，茶葉粗抽物 (100、300 mg/kg) 可改善腦缺血造成空間操作、參考記憶及再學習與記憶再現之障礙。

另因大鼠於水迷宮之空間操作受運動活性、探索能力及視覺能力等多種因素所影響。我們進一步以可視安全平台做標的物，來評估茶葉粗抽物對大鼠非空間操作能力之影響，以進一步釐清茶葉改善空間操作障礙之作用。結果顯示，腦缺血鼠會造成水迷宮非空間操作能力 (僅延遲找到安全平台之時間而不影響游泳速度) 障礙；腦缺血鼠之非空間操作障礙部分係因影響大鼠對泳池環境之注意及探索所致。而茶葉粗抽物 (30、100、300 mg/kg) 均可改善腦缺血鼠非空間操作能力障礙之現象，此作用可能因改善腦缺血鼠對泳池環境之注意及探索所致。

由上述結果得知，大鼠前中腦動脈及兩側頸

總動脈結紮所造成之腦缺血模式，會造成水迷宮空間操作、參考記憶、工作記憶再學習與再現等學習操作能力障礙，但並不影響游泳速度，此與其他研究相符 [21,22]；說明腦缺血造成學習記憶障礙不僅與記憶形成有關，亦與影響其對泳池之環境探索有關。本研究發現茶葉粗抽物 (100、300 mg/kg) 對腦缺血鼠於水迷宮空間操作、參考記憶、工作記憶再學習與再現等學習操作能力障礙均有改善作用。因此，茶葉改善腦缺血所致學習記憶障礙之作用，與記憶形成過程之改善有關。

茶葉中含有咖啡因 (caffeine)、茶鹼 (theophylline)、可可鹼 (theobromine) 及多酚類如 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)、theaflavin-3,3'-digallate (TF-3) 等多種成分。Angelucci ME 等人研究指出，咖啡因於低劑量 (0.3 至 10 mg/kg) 可增強大鼠記憶，於高劑量 (30 mg/kg) 可抑制大鼠記憶 [23]；而 EGCG 為抗氧化劑 [24]。因此，茶葉改善腦缺血所致學習記憶障礙之作用，可能與咖啡因及 EGCG 均有關。未來將進一步探討咖啡因及 EGCG 對改善腦缺血所致學習記憶障礙作用之研究。

致謝

本文承蒙國科會專題計畫編號 NSC92-2320-B-039-042，NSC91-2745-P-039-002 及本校 CMU92-CPS-02 之經費補助，謹此致謝。

參考文獻

1. 黃泰康。腦血管疾病的中西醫診斷與治療。北京：中國醫藥科技出版社，1988;83。
2. Zhang G, Miura Y, Yagasaki K. Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumor growth and endogenous hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:711-6.
3. Yang TT, Koo MW. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis* 2000;148:67-73.
4. Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, et al. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull* 2000;53:743-9.
5. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1989;20:1037-43.
6. Ohno M, Watanabe S. Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull* 1996;40:229-36.
7. Yi SM, Harson RE, Zabner J, et al. Lectin binding and endocytosis at the apical surface of human airway epithelia. *Gene Ther* 2001;8:1826-32.
8. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, et al. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986;319:774-6.
9. Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, et al. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res* 1998;800:125-35.
10. Galani R, Weiss I, Cassel JC, et al. Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behav Brain Res* 1998;96:1-12.
11. Rashidy-Pour A, Motamedi F, Motahed-Larijani Z. Effects of reversible inactivations of the medial septal area on reference and working memory versions of the Morris water maze. *Brain Res* 1996;709:131-40.
12. Squire LR, Zola SM. Ischemic brain damage and memory impairment: a commentary. [Review] *Hippocampus* 1996;6:546-52.
13. Bachevalier J, Meunier M. Cerebral ischemia: are the memory deficits associated with hippocampal cell loss? [Review] *Hippocampus* 1996;6:553-60.
14. Mishkin M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 1978;273:297-8.
15. O'Keefe J, Conway DH. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res* 1978;31:573-90.
16. Teyler TJ, DiScenna P. The hippocampal memory indexing theory. *Behav Neurosci* 1986;100:147-54.
17. Davis HP, Tribuna J, Pulsinelli WA, et al. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiol Behav* 1986;37:387-92.
18. Kiyota Y, Miyamoto M, Nagaoka A. Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1991;538:295-302.
19. Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, et al. Involvement of cortical damage in the ischemia/reperfusion-induced memory impairment of Wistar rats. *Arch Pharm Res* 2000;23:413-7.
20. Masada T, Itano T, Fujisawa M, et al. Embryonic transplantation and ischemic memory deficit. *Neurosci Res* 1997;27:249-55.
21. Shinoda M, Matsuo A, Toide K. Pharmacological studies of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, in rats with middle cerebral artery occlusion. *Eur*

- J Pharmacol* 1996;305:31-8.
22. Winter B, Bert B, Fink H, et al. Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. *Stroke* 2004;35:191-5.
23. Angelucci ME, Cesario C, Hiroi RH, et al. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1201-8.
24. Matsuo N, Yamada K, Shoji K, et al. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 1997;52:58-64.

Effects of Theae Folium Extract on Cerebral Ischemia-induced Memory Impairment in Rats

Kuo-Jen Wu, Chi-Rei Wu, Fan-Hsuan Tsai, Li-Wei Lin, Tzong-Chung Leu,
Wen-Hsin Wang, Wen-Huang Peng, Ming-Tsuen Hsieh

Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

Purpose. Theae Folium (*Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE) has been shown to be a natural antioxidant with antiatherosclerotic and neuroprotective effects in rats with ischemia-reperfusion brain injury. The present study investigated the effects of Theae Folium on memory impairment induced by cerebral ischemia.

Methods. We evaluated the protective effects of Theae Folium in rats with ischemia-reperfusion brain injury caused by occlusion of the middle cerebral artery and the two common carotid arteries. Memory function was measured by the water maze test.

Results. Occlusion of the cerebral artery and the two common carotid arteries caused brain dystrophy and impaired spatial performance, and reference and working memory. Theae Folium extract at 100 and 300 mg/kg ameliorated the impaired performance and working memory in cerebral ischemic rats.

Conclusions. Theae Folium improves memory impairment in ischemic rats. (**Mid Taiwan J Med 2005;10 Supplement:S9-15**)

Key words

cerebral ischemia-reperfusion, memory impairment, Theae Folium (*Camellia sinensis*), water maze