

虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠认知功能障碍的改善作用及机制研究

张景正¹, 许晨新¹, 陈 娴^{2*}

(1. 江苏卫生健康职业学院, 南京 211800; 2. 江苏省老年病医院, 南京 211800)

摘要: **目的** 探究虾青素改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠认知功能的作用及作用机制。**方法** 采用随机数表法将小鼠分为正常组、模型组、虾青素低剂量组、虾青素中剂量组、虾青素高剂量组。除正常组外, 其余各组均给予腹腔连续注射 *D*-半乳糖, 采用腹腔注射 *D*-半乳糖构建衰老小鼠模型。通过水迷宫实验观察各组小鼠学习记忆能力的变化情况; 采用分光光度法测定小鼠脑组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性; 通过酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测小鼠血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达水平; 通过免疫印记法检测小鼠脑中突触素(synaptophysin, SYN)、突触后致密物-95 (postsynaptic density-95, PSD-95)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)和磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase, p-p38)的表达水平。**结果** 行为学实验结果显示, 虾青素各剂量组对于 *D*-半乳糖致衰老小鼠认知功能障碍均有改善作用, 并且存在剂量依赖性。生物学检测结果显示, 虾青素可以降低衰老小鼠脑组织中 MDA 的含量, 升高 GSH 的含量, 并且提高 SOD 的活性; 降低小鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 的表达水平, 提示虾青素可以通过抗氧化和抗炎, 改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠引起的认知功能障碍。此外, 蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)结果显示, 给予虾青素干预后, 衰老小鼠脑中突触相关蛋白 SYN 和 PSD-95 的表达水平显著提升, p-p38 蛋白的表达水平显著降低, 提示虾青素可以通过抑制 p38MAPK 信号通路的过度激活, 改善突触可塑性。**结论** 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠认知功能障碍具有改善作用, 其作用机制可能与抑制 p38MAPK 信号通路过度激活, 抗氧化、抗炎和改善突触可塑性有关。

关键词: 虾青素; 认知功能; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 衰老

Ameliorating effects and mechanism of astaxanthin on *D*-galactose-induced cognitive dysfunction in aging mice

ZHANG Jing-Zheng¹, XU Chen-Xin¹, CHEN Xian^{2*}

(1. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China; 2. Jiangsu Geriatrics Hospital, Nanjing 211800, China)

基金项目: 江苏省大学生创新创业计划项目(202014255002Y)、2021 年江苏卫生健康职业学院院级重点课题项目(JKB2021005)、2020 年江苏卫生健康职业学院院级重点课题项目(JKB202005)

Fund: Supported by the Jiangsu College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (202014255002Y), the Key Project of Jiangsu Health Vocational College in 2021 (JKB2021005), and the Key Project of Jiangsu Health Vocational College in 2020 (JKB202005)

*通信作者: 陈娴, 护师, 主要研究方向为老年病及慢性病。E-mail: 836031675@qq.com

*Corresponding author: CHEN Xian, Nurse, Jiangsu Geriatrics Hospital No.65, Jiangsu Road, Nanjing 211800, China. E-mail: 836031675@qq.com

ABSTRACT: Objective To explore the improvement effect and mechanism of astaxanthin on *D*-galactose-induced cognitive dysfunction in aging mice. **Methods** The mice were divided into normal group, model group, low-dose astaxanthin group, middle-dose astaxanthin group, and high-dose astaxanthin group by random number table method. Except for the normal group, the other groups were given continuous intraperitoneal injection of *D*-galactose, and the aging mouse model was established by intraperitoneal injection of *D*-galactose. The changes of learning and memory ability of mice in each group were detected by water maze test. The content of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in mouse brain tissues were detected by spectrophotometry. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum of mice were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expression levels of synaptophysin (SYN), postsynaptic density-95 (PSD-95), p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38) in mouse brains were detected by immunoblotting. **Results** The results of behavioral experiments showed that all dose groups of astaxanthin could improve the cognitive dysfunction of aging mice induced by *D*-galactose in a dose-dependent manner. The biological test results showed that astaxanthin could reduce the content of MDA, increase the content of GSH and increase the activity of SOD in the brain tissues of aging mice; reduce the levels of IL-6 and TNF- α in serum of mice, suggesting that astaxanthin could improve the cognitive dysfunction caused by *D*-galactose-induced aging mice through antioxidant and anti-inflammatory. In addition, Western Blot (WB) results showed that astaxanthin could significantly increase the levels of synapse-related proteins SYN and PSD-95 in the brain of aging mice and reduce the expression level of p-p38 protein, suggesting that astaxanthin could improve synaptic plasticity by inhibiting the over activation of p38MAPK signal pathway. **Conclusion** Astaxanthin can improve cognitive dysfunction in aging mice induced by *D*-galactose, and its mechanism of action may be related to inhibiting excessive activation of p38MAPK signaling pathway, anti-oxidation, anti-inflammatory and improving synaptic plasticity.

KEY WORDS: astaxanthin; cognitive function; p38 mitogen-activated protein kinase; aging

0 引言

衰老即随着年龄的增长, 机体生理功能发生不可逆转的衰退过程。大脑作为人体最重要的器官之一, 其功能也在衰老过程中不断的衰退, 主要表现为感知、记忆和思维障碍, 故又称之为认知功能障碍^[1-3]。认知功能障碍不仅给老年人的生活带来了诸多不便, 也给家庭带来了沉重的精神压力和经济负担。因而, 寻找一种可以改善老年人认知功能的药物, 提升老年人的生活质量, 实现健康衰老尤为重要。

虾青素(astaxanthin, ATX)是一种来源广泛的类胡萝卜素, 多存在于虾、蟹和牡蛎等海洋生物体内^[4-5]。其结构含有多个不饱和键和羟基, 因而具有强大的抗氧化活性, 此外由于其结构的特殊性, 虾青素本身的脂溶性较大, 易于通过血脑屏障, 更有利于发挥对中枢神经系统疾病的治疗作用。大量研究显示, 虾青素具有较好的神经保护和改善认知功能的作用。如有研究表明, 虾青素可以通过抗炎作用改善糖尿病导致的认知功能障碍^[6], 另有研究发现, 虾青素可以通过抑制氧化应激改善血管性痴呆以及阿尔兹海默病导致的认知功能障碍^[7-8]。此外大量的研究证实, 疾病

状态下炎症的发生与氧化应激的失衡都与 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 信号通路的异常激活密切相关^[9-10], 而衰老状态下常伴随着 p38MAPK 信号通路的异常激活^[11]。虾蟹等食品当中含有丰富的虾青素, 作为一种优良的抗炎和抗氧化剂, 其是否可以通过介导 p38MAPK 信号通路改善衰老导致的认知功能障碍目前尚不明确。

本研究通过构建 *D*-半乳糖(*D*-galactose, *D*-gal)致小鼠脑衰老模型, 并给予不同剂量的虾青素进行干预, 通过行为学检测、氧化应激、炎症相关指标及突触可塑性的变化, 并基于 p38MAPK 信号通路探究虾青素对于衰老小鼠认知功能障碍的改善作用及作用机制, 从而为开发新型的抗衰老药物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

虾青素(CAS: 472-61-7, 纯度 \geq 98%, 陕西康盛生物技术有限公司); 橄榄油(化学纯, 上海国药集团化学试剂有限公司); 丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号 20200709)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(批

号 20200712)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(批号 20200802)(南京建成生物工程研究所); 白细胞介素-6 (interleukin-6 enzyme linked immunosorbent assay, IL-6 ELISA)酶联免疫测定试剂盒(批号 022820 200618)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫测定试剂盒(批号 012820200720)(南京碧云天生物技术有限公司); 兔抗小鼠 SYN(批号 2312S)、兔抗小鼠 PSD-95(批号 3409S)、兔抗小鼠 p38(批号 8690)、兔抗小鼠 p-p38 抗体(批号 4511S)(美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.2 仪器与设备

5417R 台式高速低温离心机(艾本德 Eppendorf 中国有限公司); Forma 88000 -80°C 冰箱(美国 Forma Therapeutics 公司); Bio-Rad 1658001 电泳仪、Mini Trans-Blot 转印槽(美国 Bio-Rad 公司); 天能 Tanon2500/R 凝胶图像处理系统(上海 Tanon 公司); Rt-6100 酶标仪(美国 Rayto 公司); ACT-200A 水迷宫跟踪分析系统(美国 Coulbourn 公司)。

1.3 实验动物

实验采用昆明小鼠, 体重 18~22 g, 由徐州医学院实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(苏)2010-0011, 实验动物室温度: 22~25°C, 相对湿度: 55%~70%, 12 h 照明, 12 h 黑暗交替, 动物自由摄食和饮水。本研究所用老鼠及相关实验操作均经过徐州医学院动物伦理委员会准许。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组及干预

将 40 只雄性昆明小鼠适应性养殖 1 周, 随机分成 5 组, 每组 8 只, 分别为正常组、模型组、虾青素低剂量组(50 mg/kg)、虾青素中剂量组(100 mg/kg)和虾青素高剂量组(200 mg/kg), 模型组和虾青素低、中、高剂量组每日腹腔注射 *D*-半乳糖 150 mg/kg, 虾青素低、中、高剂量组每日灌胃虾青素植物油溶液(50、100、200 mg/kg), 正常组和模型组每日灌胃相同体积的植物油, 连续灌胃 5 周^[7]。

1.4.2 各组小鼠一般状态观察

观察小鼠的日常状态, 包括运动能力、摄食、毛发, 并进行组间比较, 每周称量一次体重, 观察各组小鼠体重的变化。

1.4.3 Morris 水迷宫实验

采用水迷宫观察各组小鼠的学习记忆能力。水迷宫为一圆形水池, 直径为 120 cm, 高 60 cm, 注水深度为 15.5 cm, 将一直径为 10 cm, 高 14 cm 的圆形平台放置于第一象限中, 其与池壁距离为 25 cm, 平台位于水面下 1.5 cm 处, 水温保持在(25±2)°C, 实验前水池中加入墨汁。前 4 d, 小鼠进行目标寻找训练, 每个象限各一次, 记录小鼠在不同象限从入水到找到平台所消耗的时间, 即潜伏期, 4 次潜伏期的平均值作为当日最终成绩进入最后统计。在寻找平台过程中, 如果小鼠在 90 s 内未能找到目标, 应训练小鼠记忆

平台方位, 此种情况下潜伏期记为 90 s, 小鼠每天的游泳速度也要记录下来。第 5 d 撤掉平台, 进行目标探索测试, 观察小鼠 90 s 内的活动轨迹, 记录小鼠到达平台的潜伏期、在目标象限停留时间百分比以及穿越平台的次数^[12]。

1.4.4 分光光度法检测小鼠脑中氧化应激相关指标

实验结束后, 摘眼取血, 分离血清。断头取脑, 匀浆, 取上清。采用分光光度法测定小鼠脑中 GSH 和 MDA 的含量以及 SOD 的活性。

1.4.5 ELISA 法检测小鼠血清中炎症因子相关指标

根据南京碧云天生物技术有限公司购买的 ELISA 检测试剂盒说明书, 分别测定各组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的含量, 每组设 3 个复孔并且每个样本测 3 个重复值。

1.4.6 Western Blot 检测脑中 SYN、PSD-95、p38、p-p38 蛋白的相对含量

按照裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA): 蛋白酶抑制剂(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF):磷酸酯酶抑制剂:氯化钠=100:1:1:2 的体积比配制匀浆液, 匀浆液(mL):组织重量(g)=7.5:1, 操作过程在冰浴中进行, 制备好的匀浆液于 4°C 和 12000 r/min 的条件下离心 10 min, 移液枪吸取取上清, 采用 BCA 蛋白定量测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit)确定蛋白浓度。

配制 10%的分离胶和 5%的浓缩胶, 凝胶后, 用微量进样器吸取样品 10 μ L, 缓慢注入各个样品孔中, 每更换一个样品前, 需要对进样器进行清洗, 以免交叉污染。上样时尽量选取中间的上样孔, 避免边缘效应。上样结束后, 开始电泳(看到电泳液中有上行的气泡说明电泳正常), 恒压 100 V, 100 min; 转膜: 半干转的转膜槽内倒入适量转膜液, 保持滤纸湿润。半干转恒压转膜 10 V, 30 min, 抗体稀释采用抗体体积:一抗稀释液体积进行配制, 比例如下 [SYN (1:1000)、PSD-95 (1:1000)、p38 (1:1000)、p-p38 (1:1000)], 转膜后一定要保持膜的湿润, 避免膜干燥; 封闭, 一抗孵育, 二抗孵育, 显色, 扫描。采用 image-J 1.8.0 版本软件分析目的条带灰度值, 使用目的条带和与内参蛋白条带的比值进行数据分析。

1.5 数据处理

数据统计学分析采用 SPSS 18.0 软件进行, 以平均数±标准偏差表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。方差齐两两比较采用最小显著差数(least significant difference, LSD)法, 方差不齐采用新复极差法检验(Duncan's new multiple range test, Dunnett T3)法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 一般状态结果观察

对小鼠日常状态进行观察, 结果如表 1 所示。结果显示, 与正常组相比, 模型组小鼠在给予 *D*-半乳糖连续注射

后出现了摄食量减少、毛发粗糙不顺滑、状态不活跃的现象,说明连续注射 *D*-半乳糖使小鼠产生了一系列衰老的症状。与正常组相比,虾青素低剂量组小鼠也出现了摄食量减少、毛发粗糙不顺滑、状态相对不活跃的现象,虾青素中、高剂量组在摄食、毛发和运动状态方面有所改善,说明低剂量的虾青素抗衰老作用一般,中、高剂量组虾青素的抗衰老作用较好,药物效果具有一定的剂量依赖性。

表 1 各组小鼠一般状态表($n=8$)Table 1 General status of mice in each group ($n=8$)

组别	摄食情况	毛发情况	运动情况
正常组	正常	毛发顺滑	活跃
模型组	较少	毛发不顺滑,粗糙	不活跃
虾青素低剂量组	较少	毛发不顺滑,粗糙	不活跃
虾青素中剂量组	正常	毛发较顺滑	活跃
虾青素高剂量组	正常	毛发顺滑	活跃

2.2 各组小鼠体重的变化情况

实验过程中小鼠的体重变化如表 2 所示,在实验过程中模型组小鼠的体重呈现出先升高后降低的状态,最终的体重(第 3、4、5 周)与正常组相比极显著降低($P<0.01$),说明连续注射 *D*-半乳糖影响到了小鼠体重的生长。与模型组相比,虾青素低、中、高剂量组小鼠的最终体重(第 4、5 周)极显著升高($P<0.01$),说明虾青素可以明显改善衰老小鼠体重降低的症状。

表 2 各组小鼠 5 周内体重变化表($g, n=8$)Table 2 Body weight change table of mice in each group within 5 weeks ($g, n=8$)

组别	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
正常组	19.38±1.10	25.37±1.64	28.17±1.32	30.30±2.96	31.90±2.96	32.98±3.30
模型组	19.34±0.97	24.66±1.72	24.83±1.52 [#]	24.77±1.41 ^{##}	23.92±1.71 ^{###}	23.75±1.69 ^{###}
虾青素低剂量组	19.00±1.06	24.61±2.29	24.88±2.39	25.86±2.37	27.21±2.87 ^{**}	29.27±1.78 ^{**}
虾青素中剂量组	19.09±0.91	24.53±0.89	25.42±1.31	26.42±1.31	28.95±1.26 ^{**}	30.20±1.33 ^{**}
虾青素高剂量组	19.22±0.71	24.96±1.43	25.62±2.04	26.62±2.05	28.86±2.58 ^{**}	30.72±2.50 ^{**}

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{**} $P<0.01$ 。

表 3 各组小鼠水迷宫实验潜伏期的结果($n=8$)Table 3 Results of the latency period of mice in the water maze experiment in each group ($n=8$)

组别	潜伏期/s				
	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d
正常组	64.84±2.86	44.36±4.32	30.32±3.26	26.82±2.24	16.53±2.35
模型组	71.47±3.75	69.65±4.43 ^{##}	63.86±4.06 ^{##}	54.32±3.43 ^{##}	37.22±3.35 ^{##}
虾青素低剂量组	71.99±5.45	65.69±3.66	54.79±4.31 [*]	47.63±3.05 ^{**}	27.66±3.34 ^{**}
虾青素中剂量组	67.41±3.63	62.49±5.63	48.97±4.02 ^{**}	35.61±3.30 ^{**}	21.62±2.45 ^{**}
虾青素高剂量组	65.26±4.52	52.57±4.27 ^{**}	42.71±3.39 ^{**}	30.26±3.17 ^{**}	19.20±2.62 ^{**}

注:与正常组相比,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;表 4~7 同。

2.3 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响

Morris 水迷宫实验结果如表 3 所示,从第 2 d 开始,与正常组相比,模型组小鼠的潜伏期极显著升高($P<0.01$),与模型组相比,虾青素高剂量组小鼠潜伏期极显著降低($P<0.01$),虾青素低、中剂量组无显著差异($P>0.05$);从第 3 d 开始,与模型组相比,虾青素中、高剂量组潜伏期极显著降低($P<0.01$),虾青素低剂量组也出现了明显差异($P<0.05$);第 5 d,与模型组相比,虾青素低(50 mg/kg)、中(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量干预的各组小鼠潜伏期均极显著降低($P<0.01$),研究结果显示,*D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力明显降低,与前期大量报道^[13-14]结果一致,通过给予虾青素干预后,衰老小鼠的学习记忆能力得到了明显的提升,结果说明虾青素可以明显改善衰老小鼠的学习记忆能力。

在第 5 d,撤掉平台的探索实验中,与正常组相比,模型组小鼠在原平台所在的象限中所待的时间百分比(表 4)极显著降低($P<0.01$),90 s 内穿越平台的次数(表 4)也极显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,虾青素低(50 mg/kg)剂量干预的小鼠在目标象限的百分比显著升高($P<0.05$),穿越平台次数也显著升高($P<0.05$),虾青素中(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量干预的小鼠在目标象限的百分比极显著升高($P<0.01$),穿越平台次数极显著升高($P<0.01$)。说明衰老小鼠的学习记忆能力较正常组极显著降低($P<0.01$),而分别给予虾青素治疗后,小鼠的学习记忆能力得到明显改善。在实验过程中各组小鼠的游泳速度(表 5)无显著性的差异($P>0.05$),说明各组小鼠的运动性并没有对实验的结果产生影响。

表 4 各组小鼠水迷宫实验目标象限停留时间百分比及穿越平台数($n=8$)Table 4 Percentage of stay time in target quadrant and number of crossing platforms of mice in water maze experiment in each group ($n=8$)

组别	目标象限停留时间百分比/%	穿越平台数
正常组	40.32±6.27	6.63±1.27
模型组	13.54±1.65 ^{###}	0.87±0.23 ^{###}
虾青素低剂量组	28.32±3.68 [*]	3.23±0.42 [*]
虾青素中剂量组	33.53±4.46 ^{**}	4.35±0.63 ^{**}
虾青素高剂量组	36.23±5.32 ^{**}	4.80±0.21 ^{**}

2.4 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠氧化应激能力的影响

衰老是一个非常复杂的生命过程, 因此导致衰老的作用机制也多种多样, 其中自由基氧化学说提出最早也最被人们广泛认可的一种机制。当机体衰老时, 体内的自由基增多, 而能够清除自由基的物质减少, 致使自由基在体内过量堆积, 造成细胞损伤、组织器官发生紊乱, 从而导致衰老^[15], 大脑作为人体中最复杂的器官极易受到自由基的攻击^[16]。因此本研究测定了小鼠脑中氧化应激相关指标, 结果如表 6 所示, 与正常组相比, *D*-半乳糖致衰老模型组小鼠脑中测出的 MDA 的含量极显著升高($P<0.01$), GSH 含量极显著降低($P<0.01$), SOD 活性极显著降低($P<0.01$), 而给予虾青素低(50 mg/kg)剂量干预后的小鼠脑中 MDA 含量显著降低($P<0.05$)、GSH 含量显著升高($P<0.05$)、SOD 活性

显著升高($P<0.05$), 给予虾青素中(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量干预后的小鼠脑中 MDA 含量极显著降低($P<0.01$), GSH 含量极显著升高($P<0.01$), SOD 活性极显著升高($P<0.01$)。本研究结果说明长期腹腔注射 *D*-半乳糖导致小鼠脑中产生大量的 MDA, 同时抗氧化物质 GSH 含量降低, 并且抗氧化酶 SOD 活性明显降低, 给予虾青素干预后, 虾青素低、中、高剂量组小鼠脑中的 MDA 水平显著降低, GSH 水平和 SOD 活性明显升高, 由此提示虾青素可以明显减轻 *D*-半乳糖导致的氧化应激损伤。

2.5 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠抗炎能力的影响

有研究报道, 不同因素导致的认知功能的降低均与炎症反应密切相关。如阿尔茨海默病患者及抑郁症患者认知功能的降低均伴随着炎症因子的过度释放^[17-18]。因此本研究测定了小鼠血清当中的炎症因子表达水平。结果如表 7 所示, 与正常组相比, *D*-半乳糖致衰老模型组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的含量极显著升高($P<0.01$), 而给予虾青素低(50 mg/kg)剂量干预后的小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的含量均显著降低($P<0.05$), 给予虾青素中(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量干预后的小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的含量极显著降低($P<0.01$)。本研究结果显示, 长期腹腔注射 *D*-半乳糖导致小鼠血清中产生大量的 TNF- α 和 IL-6, 而给予虾青素干预后, 炎症因子的水平明显降低, 由此说明虾青素可以通过减少炎症因子的释放, 改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠引起的认知功能障碍。

表 5 各组小鼠水迷宫实验游泳速度的结果($n=8$)Table 5 Results of swimming speed of mice in water maze experiment in each group ($n=8$)

组别	游泳速度/(cm/s)				
	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d
正常组	23.26±2.68	25.49±3.34	24.06±2.32	21.13±2.03	22.45±3.24
模型组	26.33±2.32	26.06±2.35	25.45±2.34	22.47±2.52	27.32±1.61
虾青素低剂量组	24.32±1.43	23.31±1.68	22.32±2.26	21.25±1.45	25.28±2.43
虾青素中剂量组	26.47±2.59	24.13±1.62	27.15±1.42	25.42±2.37	26.31±1.66
虾青素高剂量组	27.62±4.31	22.41±0.51	22.36±1.49	22.46±1.22	24.82±4.25

表 6 各组小鼠脑中 SOD 活性及 MDA、GSH 含量的影响($n=8$)Table 6 Effects of SOD activities and MDA and GSH content in the brain of mice in each group ($n=8$)

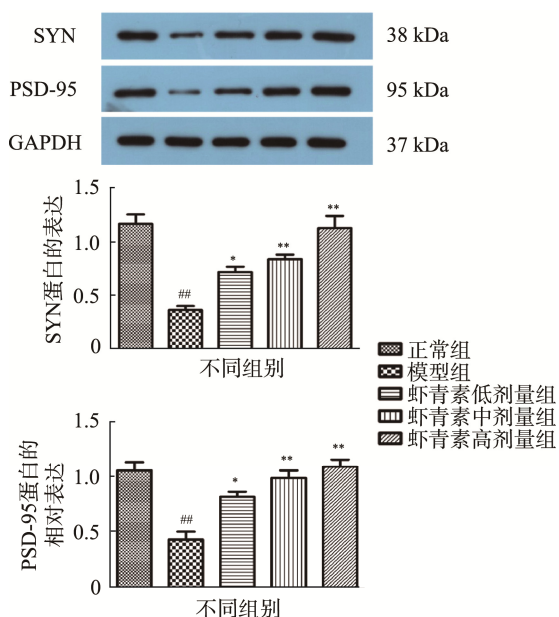
组别	SOD 活性/(U/mgprot)	MDA 含量/(nmol/mgprot)	GSH 含量/(mg/gprot)
正常组	66.26±5.64	24.20±3.31	21.21±2.41
模型组	54.65±6.28 ^{###}	35.28±5.74 ^{###}	14.22±2.14 ^{###}
虾青素低剂量组	60.34±6.10 [*]	30.34±3.24 [*]	16.35±3.72 [*]
虾青素中剂量组	64.72±5.43 ^{**}	27.42±3.87 ^{**}	18.25±1.43 ^{**}
虾青素高剂量组	65.42±5.31 ^{**}	26.19±3.65 ^{**}	20.67±1.46 ^{**}

表 7 各组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的含量($n=8$)
Table 7 Content of TNF- α and IL-6 in serum of mice in each group ($n=8$)

组别	TNF- α 含量/(pg/mL)	IL-6 含量/(pg/mL)
正常组	279.58 \pm 16.86	191.13 \pm 9.84
模型组	439.89 \pm 25.63 ^{###}	264.64 \pm 12.27 ^{##}
虾青素低剂量组	370.48 \pm 15.77*	225.68 \pm 14.05*
虾青素中剂量组	368.96 \pm 26.43**	193.25 \pm 7.39**
虾青素高剂量组	275.30 \pm 17.52**	188.43 \pm 10.66**

2.6 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑中 SYN 和 PSD-95 蛋白表达水平的影响

影响认知功能的因素多种多样,其中突触可塑性是学习和记忆的神经化学基础之一^[19]。突触相关蛋白在突触重塑过程中发挥着重要的作用,当突触相关蛋白表达异常时,个体往往会呈现出抑郁、焦虑以及学习认知功能的障碍^[20]。SYN 是一种神经元特有的与突触结构和功能密切相关的囊泡吸附蛋白,其表达多少可以准确地反映出突触的功能状态^[21-22]。PSD-95 是在谷氨酸能神经元的突触后致密物质中发现的一种特殊蛋白质,其本身并无蛋白酶活性,主要在突触信号转导和整合过程中发挥中介作用。因此本研究测定了小鼠脑中突触相关蛋白的表达,如图 1 所示,与正常组相比,*D*-半乳糖致衰老模型组小鼠脑中 SYN 和 PSD-95 蛋白表达极显著降低($P<0.01$),而给予虾青素低(50 mg/kg)剂



注:与正常组相比,### $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;图 2 同。

图 1 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑中 SYN 和 PSD-95 蛋白表达的影响($n=3$)

Fig.1 Effects of astaxanthin on the expression levels of SYN and PSD-95 proteins in the brain of *D*-galactose-induced aging mice ($n=3$)

量干预后的小鼠脑中的 SYN 和 PSD-95 显著升高($P<0.05$),给予虾青素中(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量干预后的小鼠脑中的 SYN 和 PSD-95 蛋白表达极显著升高($P<0.01$)。本研究结果显示,*D*-半乳糖导致衰老小鼠脑中突触相关蛋白表达明显减少,表明小鼠大脑突触可塑性受到了影响,在 Morris 水迷宫实验当中,衰老小鼠的学习记忆能力明显降低,而给予虾青素进行干预之后,*D*-半乳糖导致衰老小鼠脑中突触相关蛋白的表达明显升高,衰老小鼠的学习记忆能力也明显提升。结果表明,虾青素可以通过改善衰老小鼠突触可塑性,从而改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠引起的认知功能障碍。

2.7 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑中 p38 和 p-p38 蛋白表达水平的影响

p38MAPK 信号通路是中枢神经系统中参与细胞凋亡、炎症反应、氧化应激等调控的重要信号通路^[23-24]。大量研究显示,缺血再灌注导致的神经功能损害与 p38MAPK 信号通路的过度激活有关^[25]。此外,抑制 p38MAPK 信号通路的过度激活可以明显改善癫痫动物模型的神经功能^[26]。因而本研究提出假设,虾青素是否是通过影响 p38MAPK 信号通路,进而调节一系列的生化指标发挥改善认知功能的作用。如图 2 所示,与正常组相比,*D*-半乳糖致衰老模型组小鼠脑中 p-p38 蛋白表达极显著升高($P<0.01$),与模型组相比,给予虾青素低(50 mg/kg)剂量干预后的小鼠脑中的 p-p38 蛋白表达显著降低($P<0.05$),给予虾青素中(100 mg/kg)、高(200 mg kg)剂量干预后的小鼠脑

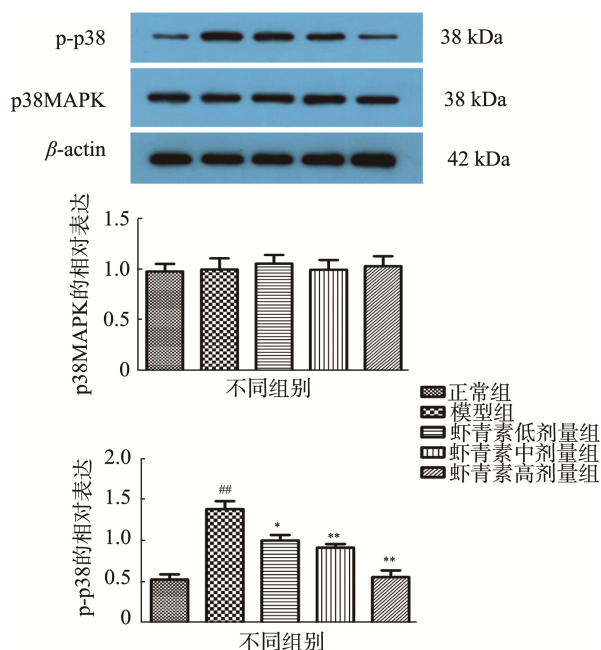


图 2 虾青素对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑中 p38MAPK 和 p-p38 蛋白表达的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of astaxanthin on the expression of p38MAPK and p-p38 proteins in the brain of *D*-galactose-induced aging mice ($n=3$)

中的 p-p38 蛋白表达极显著降低($P < 0.01$), 而各组小鼠脑中 p38 总蛋白的表达与内参相比无明显变化($P > 0.05$)。本研究结果显示, *D*-半乳糖导致衰老小鼠脑中 p-p38 蛋白水平明显升高, 表明 p38MAPK 信号通路出现了过度激活的状况, 给予虾青素进行干预之后, 衰老小鼠脑中 p-p38 蛋白水平明显降低, p38MAPK 信号通路得到了抑制。说明虾青素可以通过抑制 p38MAPK 信号通路, 从而改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠引起的认知功能障碍。

3 讨论与结论

虾青素广泛存在于鱼、虾、螃蟹等日常食物当中, 呈现出较好的抗炎、抗氧化及神经保护作用, 具有潜在的抗衰老应用价值^[27-31]。本研究通过连续腹腔注射 *D*-半乳糖来构建衰老小鼠模型模拟人体正常衰老过程, 采用每日灌胃虾青素进行干预, 结果显示 *D*-半乳糖致衰老小鼠的认知功能明显降低, 主要表现在水迷宫实验当中的潜伏期明显升高, 小鼠脑中氧化应激和血清中炎症指标异常, 与前期文献^[32-33]报道的结果一致。此外本研究结果还发现衰老小鼠脑中突触相关蛋白 SYN 和 PSD-95 表达明显降低, p38MAPK 信号通路发生异常激活, 而给予虾青素进行干预后, 衰老小鼠的潜伏期明显降低, 小鼠脑中氧化应激和血清中的炎症指标出现恢复正常的趋势, 突触相关蛋白 SYN 和 PSD-95 表达明显升高, p38MAPK 信号通路得到明显抑制, 整体表现为认知功能的改善, 结果与本研究的假设基本一致。

综上所述, 虾青素具有改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠认知功能障碍的作用, 其作用机制可能与抑制 p38MAPK 信号通路过度激活, 协同抗氧化、抗炎和改善突触可塑性密切相关, 但是虾青素是否还通过其他信号通路发挥改善认知功能的作用, 需要进一步进行研究。

参考文献

- [1] 邵永佳, 席芊, 王培军. 轻度认知障碍患者静息态大脑默认网络变化研究进展[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(25): 2016-2018.
SHAO YJ, XI Q, WANG PJ. Research progress on the changes of resting brain default network in patients with mild cognitive impairment [J]. Chin Med J, 2021, 101(25): 2016-2018.
- [2] 刘雨欣, 秦雪梅, 高丽. 脑细胞衰老在阿尔茨海默症发病机制中的潜在作用[J]. 药理学杂志, 2022, 57(7): 1946-1953.
LIU YX, QIN XM, GAO L. The potential role of brain cell senescence in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(7): 1946-1953.
- [3] 都屹泓, 孙焱, 杨若愚, 等. 轻度认知障碍神经炎症机制的作用靶点[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(29): 4742-4749.
DU YH, SUN Y, YANG RY, et al. The target of neuroinflammatory mechanism in mild cognitive impairment [J]. Chin J Eng Res, 2021, 25(29): 4742-4749.
- [4] 韩吉平, 江宁, 诸永志, 等. 天然虾青素的制备和功能研究进展[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(8): 56-60.
HAN JP, JIANG N, ZHU YZ, et al. Research progress on the preparation and function of natural astaxanthin [J]. Jiangsu Agric Sci, 2021, 49(8): 56-60.
- [5] ZULUAGA M, GUEGUEN V, LETOURNEUR D, et al. Astaxanthin-antioxidant impact on excessive reactive oxygen species generation induced by ischemia and reperfusion injury [J]. Chem Biol Interact, 2017, 279: 145-158.
- [6] FENG Y, CHU A, LUO Q, et al. The protective effect of astaxanthin on cognitive function via inhibition of oxidative stress and inflammation in the brains of chronic T2DM rats [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 748-760.
- [7] 刘翀, 朱宁伟, 蒋晓梅, 等. 虾青素通过抗氧化作用改善血管性痴呆小鼠学习记忆能力[J]. 医药导报, 2020, 39(12): 1641-1646.
LIU C, ZHU NW, JIANG XM, et al. Astaxanthin improves learning and memory ability in vascular dementia mice through antioxidant effect [J]. Herb Med, 2020, 39(12): 1641-1646.
- [8] 孔静雅, 史蒙蒙, 王玉明, 等. 虾青素抑制氧化应激提高 SAMP8 小鼠认知能力[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 110-119.
KONG JY, SHI HH, WANG YM, et al. Astaxanthin inhibits oxidative stress and improves cognitive ability in SAMP8 mice [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2022, 22(5): 110-119.
- [9] 余伟, 黄长山, 丁月超, 等. 香叶木素预处理通过抗炎和抗氧化发挥对小鼠肝缺血/再灌注的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(7): 1017-1022.
YU W, HUANG CS, DING YC, et al. Geranin pretreatment exerts anti-inflammatory and antioxidant protective effects on hepatic ischemia/reperfusion in mice [J]. Chin Pharm Bull, 2022, 38(7): 1017-1022.
- [10] 张玉静, 刘倩. 糖尿病肾病患者外周血 LncRNA KCNQ1OT1 表达与氧化应激水平及 TGF- β 1/p38MAPK 通路的关系[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(17): 4200-4204.
ZHANG YJ, LIU Q. The relationship between peripheral blood LncRNA KCNQ1OT1 expression and oxidative stress level and TGF- β 1/p38MAPK pathway in patients with diabetic nephropathy [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(17): 4200-4204.
- [11] 高雨彤, 肖娜, 敖启林. 非瑟酮通过 Nrf2/HO-1 和 MAPK 信号通路抑制阿霉素诱导的肺动脉内皮细胞衰老[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2021, 50(6): 685-692.
GAO YT, XIAO N, AO QL. Fisetin inhibits doxorubicin-induced senescence of pulmonary artery endothelial cells via Nrf2/HO-1 and MAPK signaling pathways [J]. J Huazhong Univ Sci Technol (Med Ed), 2021, 50(6): 685-692.
- [12] 张景正, 陈娴, 鲍真真, 等. 氧化苦参碱对 CUMS 抑郁模型小鼠抑郁样行为的改善作用研究[J]. 河北医药, 2020, 42(7): 970-974.
ZHANG JZ, CHEN X, BAO ZZ, et al. Effect of oxymatrine on depression-like behavior in CUMS depression model mice [J]. Hebei Med J, 2020, 42(7): 970-974.
- [13] 武铮, 程木子, 安士恩, 等. 当归多糖对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(12): 1577-1580.
WU Z, CHENG MZ, AN SEN et al. Effects of Angelica polysaccharides on *D*-galactose-induced aging model mice [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(12): 1577-1580.
- [14] 翟春梅, 薛迎凤, 郭鹏飞, 等. 白术对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆和抗氧化能力的影响[J]. 中医药学报, 2021, 49(7): 26-31.
ZHAI CM, XUE YF, GUO PF, et al. Effects of *Atractylodes macrocephala* on learning, memory and antioxidant capacity of *D*-galactose-induced aging mice [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2021, 49(7): 26-31.
- [15] 杨善岚, 吴磊, 涂嘉欣, 等. 自由基致衰老的研究进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2022, 26(5): 589-594.
YANG SL, WU L, TU JX, et al. Research progress on aging induced by free radicals [J]. Chin J Dis Control, 2022, 26(5): 589-594.

- [16] 林晓敏, 孙万阳, 段文君, 等. 磷脂过氧化:神经退行性疾病“易感”的关键因素[J]. 药理学报, 2021, 56(8): 2154–2168.
LIN XM, SUN WY, DUAN WJ, *et al.* Phospholipid peroxidation: A key factor in “susceptibility” to neurodegenerative diseases [J]. *Acta Pharm Sin*, 2021, 56(8): 2154–2168.
- [17] 师强, 郑莹莹, 杨增焯. 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症小体与阿尔茨海默病患者神经炎症反应, 氧化应激的相关性分析[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(2): 115–119.
SHI Q, ZHENG YY, YANG ZY. Correlation analysis between nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome and neuroinflammation and oxidative stress in patients with Alzheimer’s disease [J]. *J Int Neurol Neurosurg*, 2021, 48(2): 115–119.
- [18] 徐倩倩, 钱旭东, 孙凡, 等. 西红花苷对缺血性脑卒中后抑郁大鼠炎症反应及 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(2): 179–185.
XU QQ, QIAN XD, SUN F *et al.* Effects of crocin on inflammatory response and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in depressed rats after ischemic stroke [J]. *Chin J Immunol*, 2021, 37(2): 179–185.
- [19] 张松江, 李龙洋, 高剑峰. 电针对 AD 模型幼鼠学习记忆功能和海马突触可塑性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(8): 1447–1453.
ZHANG SJ, LI LY, GAO JF. Effects of electroacupuncture on learning and memory function and hippocampal synaptic plasticity in young AD model rats [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(8): 1447–1453.
- [20] 任庆国, 公卫刚. 孤养对成年大鼠认知行为与不同脑区突触相关蛋白表达的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2016, 25: 877–881.
REN QG, GONG WG. Effects of solitary rearing on cognitive behavior and the expression of synapse-related proteins in different brain regions in adult rats [J]. *Chin J Behav Med Brain Sci*, 2016, 25: 877–881.
- [21] 林阳阳, 徐洋凡, 冯慧婷, 等. 功能性电刺激对血管性痴呆大鼠认知功能和海马区脑源性神经营养因子-突触素-微管相关蛋白 2 通路的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2020, 42(8): 679–684.
LIN YY, XU YF, FENG HT, *et al.* Effects of functional electrical stimulation on cognitive function and hippocampal brain-derived neurotrophic factor synaptophysin microtubule associated protein 2 pathway in vascular dementia rats [J]. *Chin J Phys Med Rehabil*, 2020, 42(8): 679–684.
- [22] 李悦, 王慧, 姚欣雨, 等. 酸枣仁汤对 PCPA 失眠大鼠学习记忆功能及海马突触可塑性相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 12–20.
LI Y, WANG H, YAO XY, *et al.* Effects of suanzaoren decoction on learning and memory function and the expression of hippocampal synaptic plasticity-related proteins in PCPA insomnia rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul*, 2022, 28(8): 12–20.
- [23] 丁志敏, 高静, 苏凯奇, 等. p38 MAPK 信号通路在脑卒中后认知障碍中的作用及在中药防治中的药理研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(8): 1014–1020.
DING ZM, GAO J, SU KQ, *et al.* The role of p38 MAPK signaling pathway in post-stroke cognitive impairment and the progress of pharmacological research in the prevention and treatment of traditional Chinese medicine [J]. *China Pharm*, 2022, 33(8): 1014–1020.
- [24] 赵德萍, 李大龙, 张晏航, 等. 骨碎补总黄酮调控 ER-p38 MAPK 信号通路改善东莨菪碱模型小鼠学习记忆功能障碍机制研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 202–209.
ZHAO DP, LI DL, ZHANG YH, *et al.* Study on the mechanism of improvement of learning and memory dysfunction in scopolamine model mice by regulating ER-p38 MAPK signaling pathway with total flavonoids of *Rhizoma drynariae* [J]. *China J Chin Materia Med*, 2021, 46(22): 202–209.
- [25] 金华. 橄榄苦苷对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡及 JNK/p38MAPK 信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(2): 334–338.
JIN H. Effects of oleuropein on neuronal apoptosis and JNK/p38MAPK signaling pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Gerontol*, 2021, 41(2): 334–338.
- [26] 韩仲谋, 夏杰, 陈静, 等. 抑制 p38/ATF2 信号通路对氯化锂-匹罗卡品致癫痫大鼠海马神经元损伤的保护作用研究[J]. 巴楚医学, 2021, 4(2): 21–25.
HAN ZM, XIA J, CHEN J, *et al.* Protective effect of inhibition of p38/ATF2 signaling pathway on hippocampal neuron damage in epileptic rats induced by lithium chloride-pilocarpine [J]. *Bachu Med J*, 2021, 4(2): 21–25.
- [27] SI P, ZHU C. Biological and neurological activities of astaxanthin [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(4): 1–12.
- [28] MULARCZYK M, BOUREBABA N, MARYCZ K, *et al.* Astaxanthin carotenoid modulates oxidative stress in adipose-derived stromal cells isolated from equine metabolic syndrome affected horses by targeting mitochondrial biogenesis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(8): 1039–1045.
- [29] WANG S, QI X. The Putative role of astaxanthin in neuroinflammation modulation: Mechanisms and therapeutic potential [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(9): 191–203.
- [30] RAJASEKAR J, RANI EA, PEETHAMBARAN D, *et al.* Astaxanthin ameliorates hyperglycemia induced inflammation via PI3K/Akt-NF- κ B signaling in ARPE-19 cells and diabetic rat retina [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 9(26): 174–186.
- [31] ALUGOJU P, KRISHNA SVKD, ANTHIKAPALLI NVA, *et al.* Health benefits of astaxanthin against age-related diseases of multiple organs: A comprehensive review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 16(10): 1–66.
- [32] CHENG LH, CHOU PY, HOU AT, *et al.* *Lactobacillus paracasei* PS23 improves cognitive deficits via modulating the hippocampal gene expression and the gut microbiota in *D*-galactose-induced aging mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13(9): 5240–5251.
- [33] ZHANG T, CHEN L, GUO X, *et al.* N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the *D*-galactose-induced cognitive impairment by up-regulating the levels of 5-hydroxymethylcytosine in the mouse brain [J]. *Food Funct*, 2022, 13(7): 4101–4113.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



张景正, 硕士, 讲师, 主要研究方向为天然活性成分的药理活性研究。
E-mail: zjingzlove@163.com



陈 娴, 护师, 主要研究方向为老年病及慢性病。
E-mail: 836031675@qq.com