

山葡萄花青素对慢性酒精中毒小鼠 认知障碍的改善作用

Effects of anthocyanins from *Vitis amurensis* on cognitive impairment in mice with chronic alcoholism

刘 贺 贺 阳 谷家栋 文连奎

LIU He HE Yang GU Jia-dong WEN Lian-kui

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

摘要:目的:研究山葡萄花青素对慢性酒精中毒介导认知障碍的改善作用。方法:将小鼠分为空白组、模型组、山葡萄花青素低剂量组和山葡萄花青素高剂量组,建立慢性酒精中毒模型并进行山葡萄花青素灌胃干预,测定 Morris 水迷宫和跳台试验、抗氧化应激和胆碱能系统相关指标,并对小鼠海马体进行切片观察。结果:山葡萄花青素干预后水迷宫试验逃避潜伏期缩短了 41.38%、游泳总游程缩短了 28.53%、首次登台时间缩短了 27.00%、穿台次数增加至 (3.00 ± 2.55) 次、第Ⅳ象限停留时间和路程百分比分别增加了 21.13% 和 24.24%,跳台试验跳台潜伏期延长了 26.39% 和 26.61%、错误次数减少至 (3.38 ± 0.92) 次和 (2.63 ± 0.74) 次;增加了血清和海马体中超氧化物歧化酶(分别增加 8.62% 和 6.80%)、过氧化氢酶(25.34% 和 17.39%)、谷胱甘肽(28.14% 和 3.57%)、谷胱甘肽过氧化物酶(16.14% 和 25.85%)水平,丙二醛含量分别降低了 21.24% 和 27.70%;降低了海马体中乙酰胆碱酯酶活性,增加了乙酰胆碱含量。结论:山葡萄花青素能够提高慢性酒精中毒小鼠抗氧化应激能力,有效对抗胆碱能损伤,促进神经传递并改善认知障碍。

关键词:山葡萄;花青素;酒精中毒;改善;认知障碍

Abstract: Objective: To study the effect of *Vitis amurensis* anthocyanins on cognitive impairment induced by chronic alcoholism. **Methods:** The mice were divided into blank group, model group, low-dose and high-dose groups treated by anthocyanins from *V. amurensis*. The model of chronic alcoholism was established and intervened with anthocyanin from *V. amurensis*. Morris water maze and step-down test, antioxidant stress and cholinergic system related indexes were measured, and the hippocampal slices were observed. **Results:** After anthocyanins intervention, the escape latency of water maze test was shortened by 41.38%, the total swimming distance was shortened by 28.53%, the first stage time was shortened by 27.00%, the times of crossing the stage was increased to (3.00 ± 2.55) times, the residence time in the fourth quadrant was increased by 21.13%, the percentage of distance in the fourth quadrant was increased to 24.24%, the platform jumping latency was prolonged by 26.39% and 26.61%, the number of errors was reduced to (3.38 ± 0.92) and (2.63 ± 0.74) times. Moreover, the levels of total superoxide dismutase (8.62% and 6.80%), catalase (25.34% and 17.39%), glutathione (28.14% and 3.57%), glutathione peroxidase (16.14% and 25.85%) were increased and malondialdehyde was decreased by 21.24% and 27.70% in serum and hippocampus. Acetylcholinesterase activity in hippocampus was decreased and the acetylcholine content was increased. **Conclusion:** Anthocyanins from *V. amurensis* could improve the ability of anti-oxidative stress in mice with chronic alcoholism, resist cholinergic injury effectively, promote neurotransmission and cognitive impairment.

Keywords: *Vitis amurensis*; anthocyanins; alcoholism; impairment cognitive impairment

基金项目:吉林省科技发展计划项目(编号:20180201054NY)

作者简介:刘贺,女,吉林农业大学在读硕士研究生。

通信作者:文连奎(1962—),男,吉林农业大学教授,博士。

E-mail: wenliankui@163.com

贺阳(1986—),女,吉林农业大学讲师,博士。

E-mail: heyang200704@126.com

收稿日期:2021-01-30

酒精是一种嗜神经类脂性中枢神经抑制剂,能够通过机体血脑屏障与脑组织卵磷脂结合产生神经细胞毒性作用^[1]。长期过量饮酒会使人依赖成瘾导致慢性酒精中毒(Chronic alcoholism, CA),增加机体氧化应激反应,造成大脑神经元结构被破坏甚至凋亡,导致中枢胆碱能系

统功能紊乱和神经信号传导异常,从而引发认知功能障碍^[2-3]。据报道^[4],CA 发病率逐年增长且发病人群趋于年轻化。目前主要采取强制戒酒和临床药物改善 CA 导致的认知障碍,但强制戒酒具有极强的个体差异性且临床治疗副作用大,因此寻求天然安全的功能因子改善 CA 导致的认知障碍具有重大意义^[5]。花青素是天然类黄酮多酚类化合物,对阿尔兹海默症以及东莨菪碱诱导认知障碍具有改善作用^[6-8],但对 CA 导致认知障碍的改善作用未见报道。山葡萄作为花青素良好来源,物质资源丰富但利用率低^[9]。

试验拟以山葡萄花青素为试材,采用 Morris 水迷宫和跳台试验评价山葡萄花青素对 CA 小鼠认知功能的影响,探讨山葡萄花青素对 CA 小鼠氧化应激反应及胆碱能系统的改善作用,旨在为山葡萄花青素保健食品以及临床药物深度开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

试验用无特定病原体动物雄性 ICR 小鼠:许可证号 SCXK(京)2019-0008,体重约 25~30 g,饲养于吉林农业大学小动物实验中心(批号 NO.1103221911001900)屏障环境中,北京华阜康生物科技股份有限公司;

山葡萄花青素:参照 He 等^[10]的方法自制;

56%vol 二锅头酒:食品级,北京红星股份有限公司;

二氧化硅:分析纯,北京化工厂;

4%多聚甲醛溶液、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、乙酰胆碱(ACh)、乙酰胆碱酯酶(AChE)、蛋白定量测定试剂盒:南京建成生物工程有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子分析天平:CPA-125 型,德国 Sartorius 公司;

离心机:KL04-A 型,美国 Agilent 公司;

Morris 水迷宫视频跟踪分析系统:WMT-100 型,成都泰盟科技有限公司;

跳台仪:DTT-2 型,上海欣曼科教有限公司;

酶标仪:HBS-1096B 型,美国 Molecular Devices 公司;

电动玻璃匀浆机:DY89-II 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

超低温保存箱:MDF-382E 型,日本 SANYO 电器有限公司;

奥林巴斯生物显微镜:BX53 型,北京瑞科中仪科技有限公司;

轮转式切片机:RM2016 型,德国徕卡公司。

1.2 方法

1.2.1 试验动物分组 将 40 只小鼠饲养在(23±2)℃,相对湿度(55±10)%,明暗交替各 12 h,自由摄食和进水的屏障环境中,适应 7 d 后随机分为 4 组:空白组(CK,等体积生理盐水)、模型组[NC,30%乙醇,10 mL/(kg·d)]、山葡萄花青素低剂量组[LD,25 mg/(kg·d)]和山葡萄花青素高剂量组[HD,50 mg/(kg·d)]。

1.2.2 模型建立 参照蒋曦等^[11-12]的方法修改如下:造模共 30 d 并分为两个阶段:CK 灌胃生理盐水,其他组动物每天灌胃 30%乙醇溶液,连续灌胃 15 d;从第 16 天开始,灌胃乙醇溶液 1 h 后开始灌胃相应剂量的山葡萄花青素,连续灌胃 15 d。第 31 天开始 Morris 水迷宫试验(MWM),第 37 天开始跳台试验。试验期间每 3 d 记录小鼠体重。

1.2.3 Morris 水迷宫试验 参照卢聪^[13]的方法修改如下:水池内置圆形透明安全平台(直径 80 mm,高 150 mm)。试验开始时将水池水面分成 4 个象限,将安全平台放置于第Ⅳ象限中央,向水池中加水至水面高出安全平台 1 cm,调整水温为(25.0±0.5)℃,加入 300 g 二氧化钛,混匀成乳白色液体,隐藏透明安全平台所在位置。小鼠给药 1 h 后进行水迷宫试验。

(1) 定位巡航阶段(5 d):除第Ⅳ象限外,小鼠从其他 3 个象限边缘中点位置进入水池,每只小鼠每天训练 3 次,每次训练时间 120 s。记录逃避潜伏期(即小鼠从入水到找到安全平台所需时间。若小鼠未找到安全平台,则需将其引导至安全平台并停留 10 s,记录其逃避潜伏期为 120 s)、小鼠总游程。

(2) 空间探索阶段(1 d):试验开始撤掉水中安全平台,第Ⅱ象限为小鼠入池位置,入水时间固定 120 s。记录小鼠首次登台时间、穿台次数、第Ⅳ象限停留时间、第Ⅳ象限路程百分比及小鼠游泳轨迹。

1.2.4 跳台试验 参照王方^[14]的方法修改如下:小鼠置于跳台仪中自由探索 30 s,将小鼠放在橡胶圆台上,小鼠跳下圆台给予电流刺激,重复 2~3 次,24 h 后开始试验。

(1) 获得阶段(1 d):将小鼠置于橡胶圆台上,电栅栏通电(24 V,3 s)。记录 300 s 内小鼠跳台潜伏期(即第一次跳下平台的时间,若 300 s 内未跳下平台,则记录其潜伏期为 300 s)和错误次数(即 300 s 内跳下平台次数)。

(2) 巩固阶段(1 d):将小鼠置于橡胶圆台,电栅栏通电。记录 300 s 内小鼠潜伏期和错误次数。

1.2.5 生化指标测定 水迷宫和跳台试验结束,各组小鼠禁食不断水 12 h 后进行眼球取血,静止 30 min,4℃、3 500 r/min 离心 10 min,取上清液;取脑组织在冰上分离海马体,并与冷生理盐水按 $m_{\text{海马体}}:m_{\text{生理盐水}}$ 为 1:9 混合匀浆,4℃、3 500 r/min 离心 10 min,取上清液。测定血清和海马体上清液 T-SOD、MDA、CAT、GSH、GSH-

Px、Ach 及 AChE 含量。

1.2.6 海马体组织病理学观察 用生理盐水将小鼠海马体洗净,放入 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,用乙醇脱去组织中水分,用透明剂二甲苯替换出组织中的乙醇,再经石蜡包埋、切片、染色、脱蜡、脱水、封片后,于显微镜下进行观察。

1.2.7 数据统计与分析 试验结果均以平均值±标准差表示,使用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,采用单因素 ANOVA 分析比较组间差异, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 山葡萄花青素对小鼠 Morris 水迷宫试验的影响

2.1.1 定位巡航阶段 由表 1 可知,训练 5 d 后,CK、NC、HD 潜伏期分别缩短了 48.50%,25.91%,41.38%,小鼠逃避潜伏期虽有所缩短,但与 CK 比较 NC 明显延长,且从试验第 1 天开始差异极显著($P<0.01$),表明 CA 能够显著延长小鼠逃避潜伏期,造成空间学习及记忆保持

能力损伤。花青素干预后,训练第 2 天开始逃避潜伏期显著缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$),这是由于山葡萄花青素增强了小鼠对于水中安全平台所在位置的记忆能力,使小鼠在短时间内找到并登陆安全平台。

由表 2 可知,各组小鼠经过训练后总游程均有所缩短,CK、NC、HD 小鼠总游程分别缩短了 35.82%,21.41%,28.53%。与 CK 相比 NC 在第 1 天总游程开始差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$),NC 小鼠在水迷宫中缓慢沿着边缘循环式游动,基本无空间探索行为,CA 造成小鼠机体运动能力和认知能力失调;与 NC 相比 HD 在第 3~5 天总游程极显著缩短($P<0.01$),说明花青素可提高小鼠机体运动能力,期间产生平台探索行为,提高认知能力。

2.1.2 空间探索阶段 由表 3 可知,与 CK 相比,NC 首次登台时间极显著延长($P<0.01$),穿台次数、第Ⅳ象限停留时间和路程百分比均极显著减少($P<0.01$),表明 CA 导致小鼠不能准确定位到安全平台所在区域以及具

表 1 山葡萄花青素对小鼠逃避潜伏期的影响[†]

Table 1 Effect of anthocyanins from *Vitis amurens* on escape latency of mice s

组别	训练时间				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
CK	88.54±16.64	79.05±11.93	68.93±5.60	63.52±7.47	45.96±5.65
NC	113.10±5.15 **	107.06±8.41 **	98.00±6.81 **	92.48±9.60 **	83.80±7.11 **
LD	111.59±4.04	99.37±12.21	93.62±6.51	86.32±9.44	77.52±3.75
HD	108.54±10.37	95.73±6.75 #	85.32±7.65 #	75.35±8.79 #	63.63±6.61 #

† 与 CK 组比较,* 为 $P<0.05$,** 为 $P<0.01$;与 NC 组比较,# 为 $P<0.05$,## 为 $P<0.01$ 。

表 2 山葡萄花青素对小鼠总游程的影响[†]

Table 2 Effect of anthocyanins from *Vitis amurens* on total run length of mice mm

组别	训练时间				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
CK	22 479.20±1 705.83	20 682.92±1 661.23	17 498.24±1 299.76	16 131.62±1 021.37	14 427.38±1 336.29
NC	26 489.58±4 435.44 *	25 667.40±798.43 **	24 972.14±1 317.91 **	22 359.32±1 598.01 **	20 818.60±1 183.17 **
LD	25 310.62±3 507.20	24 520.44±2 963.45	23 825.78±952.50	20 734.08±1 115.68	19 412.84±1 258.58
HD	24 581.58±1 591.26	23 636.88±3 384.62	21 139.24±1 368.33 #	18 175.66±1 173.51 #	17 714.34±1 047.14 #

† 与 CK 组比较,* 为 $P<0.05$,** 为 $P<0.01$;与 NC 组比较,# 为 $P<0.05$,## 为 $P<0.01$ 。

表 3 山葡萄花青素对小鼠空间探索阶段试验指标的影响[†]

Table 3 Effects of anthocyanins from *Vitis amurens* on spatial exploration indexes of mice

组别	首次登台时间/s	穿台次数	第Ⅳ象限停留时间/s	第Ⅳ象限路程百分比/%
CK	29.38±3.08	4.60±0.55	36.06±1.67	28.90±1.38
NC	66.74±7.54 **	0.80±0.34 **	21.62±2.60 **	20.44±1.83 **
LD	58.28±12.80	2.00±1.00	22.58±0.90	20.90±2.41
HD	48.72±3.43 #	3.00±2.55 #	26.62±1.27 #	24.24±0.94 #

† 与 CK 组比较,* 为 $P<0.05$,** 为 $P<0.01$;与 NC 组比较,# 为 $P<0.05$,## 为 $P<0.01$ 。

体位置,产生空间记忆能力障碍。与 NC 相比花青素干预后首次登台时间显著缩短了 27.00% ($P < 0.01$),穿台次数显著增加至 (3.00 ± 2.55) 次 ($P < 0.05$),第 IV 象限停留时间及路程百分比分别增加了 21.13% 和 24.24% ($P < 0.01$),这是因为山葡萄花青素代谢产物进入到脑中增强了海马体对外界刺激信号接受及传导能力,增加了小鼠对安全平台的位置记忆能力和位置探索行为,并提高了其空间记忆能力。

由图 1 可知,CK 小鼠游泳轨迹大多呈直线式且能够产生安全平台定位探索行为,在短暂搜索后即可定位并登陆平台。NC 和 LD 游泳轨迹呈边缘循环轨迹,没有明确目标。HD 轨迹呈趋向式,有探索安全平台位置行为,穿台次数及平台所在象限游泳轨迹增加。MWM 试验表明,CA 能够降低小鼠的空间记忆及学习能力,与王蓉等^[5,15-16]的结果吻合。山葡萄花青素能够提高 CA 导致的认知功能损伤,与原花青素^[1]、大豆异黄酮^[17]等类黄酮多酚物质对于认知障碍改善作用相似。

2.2 山葡萄花青素对小鼠跳台试验的影响

由表 4 可知,与 CK 相比,NC 跳台潜伏期极显著缩短 ($P < 0.01$),跳台错误次数极显著增加 ($P < 0.01$),表明 CA 对小鼠空间学习和被动回避记忆能力产生损伤作用。与 NC 相比,HD 在获得阶段和巩固阶段的跳台潜伏期分

别延长了 26.39% 和 26.61% ($P < 0.01$),错误次数分别减少至 (3.38 ± 0.92) , (2.63 ± 0.74) 次 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),花青素干预后小鼠延长安全平台停留时间,且跳下平台受到强直刺激后能够立即跳回平台。由于海马体 CA1 区对于强直刺激反应明显,花青素能够改善该区域神经元受损,增强机体对于该种刺激记忆及反射进而跳回安全平台。跳台试验表明 CA 会造成小鼠认知障碍且山葡萄花青素对此有显著改善作用,与石哲^[12]的结果不同,可能是干预物质不同,在机体代谢中生成的产物不同导致其改善作用存在差异,其具体机制有待深入研究。

2.3 山葡萄花青素对小鼠抗氧化应激的影响

机体内源性抗氧化系统中,SOD/GSH-Px/CAT 共同发挥抵御氧化应激损伤作用^[18]。由表 5 可知,与 CK 相比 NC 小鼠血清和海马体中 T-SOD、CAT、GSH、GSH-Px 水平均极显著降低 ($P < 0.01$),MDA 含量极显著增加 ($P < 0.01$),这是由于 CA 导致血液中酒精含量增加,酒精代谢产物乙醛可通过血脑屏障进入神经元产生大量活性氧,抑制抗氧化酶活性并降低抗氧化蛋白含量,攻击细胞中多不饱和脂肪酸引起脂质过氧化形成过氧化脂质,造成核酸、蛋白质等生物大分子物质损伤,与吴伟青^[5]的结果一致。与 NC 相比 HD 小鼠血清和海马体中 T-SOD 分别增加了 8.62% 和 6.80%,CAT 分别增加了 25.34% 和 17.39%,GSH 分别增加了 28.14% 和 3.57%,GSH-Px 分别增加了 16.14% 和 25.85%,MDA 分别降低了 21.24% 和 27.70%,这是由于山葡萄花青素进入血脑屏障,发挥抗氧化应激作用,抑制脂质过氧化,修复神经细胞损伤,平衡细胞间神经兴奋传导稳态,进一步加强学习记忆能力,与荣爽^[19]的结果相近。

试验发现 T-SOD 差异不显著但活性增加明显,CAT 和 GSH 分别在海马体和血清中具有显著性,可能是由于花青素在机体不同位置的代谢产物不同,具体原因仍需进一步研究。Cui 等^[20]研究发现,花青素抑制脑缺血模型小鼠脑组织中 MDA 的增加和 SOD 的减少,能够激活核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)和 HO-1 蛋白表达,通过 Nrf-2/HO-1 途径减轻氧化应激损伤保护神经元;Ali 等^[21]研究发现,阿尔兹海默症模型中花青素能够调节磷

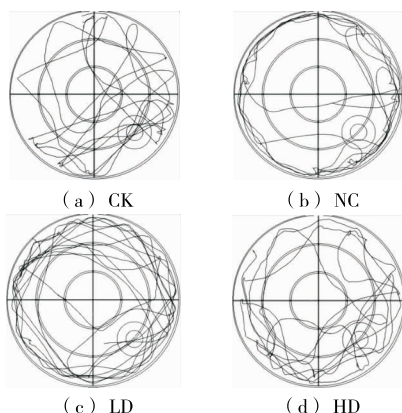


图 1 山葡萄花青素对小鼠游泳轨迹的影响

Figure 1 Effects of *Vitis amurensis* anthocyanins on swimming trajectory of mice

表 4 山葡萄花青素对小鼠跳台试验的影响[†]

Table 4 Effects of anthocyanins from *Vitis amurensis* on platform jumping test in mice

组别	获得阶段		巩固阶段	
	潜伏期/s	错误次数	潜伏期/s	错误次数
CK	267.14 ± 16.51	2.17 ± 0.75	285.72 ± 15.46	1.67 ± 0.52
NC	168.32 ± 20.30 **	4.86 ± 0.90 **	183.06 ± 9.73 **	3.57 ± 0.98 **
LD	186.98 ± 12.53	4.33 ± 0.82	196.54 ± 15.66	3.00 ± 0.63
HD	212.74 ± 14.12 #	3.38 ± 0.92 #	231.78 ± 10.10 #	2.63 ± 0.74 #

[†] 与 CK 组比较,* 为 $P < 0.05$,** 为 $P < 0.01$;与 NC 组比较,# 为 $P < 0.05$,## 为 $P < 0.01$ 。

表 5 山葡萄花青素对小鼠抗氧化应激指标的影响[†]

Table 5 Effects of anthocyanins from *Vitis amurens* on antioxidant stress indexes in mice

组别	血清				
	T-SOD/(U · mL ⁻¹)	CAT/(U · mL ⁻¹)	GSH/(mg · L ⁻¹)	GSH-Px/(U · mL ⁻¹)	MDA/(nmol · mL ⁻¹)
CK	158.64±13.13	38.33±7.53	2.48±0.32	407.92±24.31	9.72±1.26
NC	120.83±12.29**	20.32±2.73**	1.67±0.27**	271.08±26.70**	22.22±2.28**
LD	123.90±8.06	22.79±2.63	1.97±0.40	283.67±19.46	20.55±2.28
HD	131.25±14.53	25.94±8.78	2.14±0.35 [#]	314.83±33.35 [#]	17.50±0.91 [#]
组别	海马体				
	T-SOD/(U · mg ⁻¹)	CAT/(U · mg ⁻¹)	GSH/(mg · g ⁻¹)	GSH-Px/(U · mg ⁻¹)	MDA/(nmol · mg ⁻¹)
CK	259.62±12.22	3.22±0.51	5.71±0.16	45.73±2.98	9.69±0.40
NC	203.06±13.38**	2.07±0.21**	3.92±0.39**	25.07±2.49**	16.46±0.39**
LD	207.70±15.82	2.27±0.11	4.10±0.32	27.72±2.98	14.53±0.97
HD	216.86±13.07	2.43±0.25 [#]	4.06±0.23	31.55±2.51 [#]	11.90±1.04 [#]

[†] 与 CK 组比较, * 为 $P<0.05$, ** 为 $P<0.01$; 与 NC 组比较, [#] 为 $P<0.05$, ^{##} 为 $P<0.01$ 。

酸化磷脂酰肌醇 3-激酶/Akt/糖原合成酶激酶 3 β (p-PI3K/Akt/GSK3 β)途径,进而刺激 Nrf-2/HO-1 内源性抗氧化系统,降低氧化应激损伤,改善认知功能障碍。花青素调节 PI3K/Akt/GSK3 β 途径激活内源性抗氧化剂 Nrf2/HO-1 途径,可能是其抗氧化应激的可能通路,可以此作为切入点探究关于花青素改善 CA 导致认知障碍的通路。

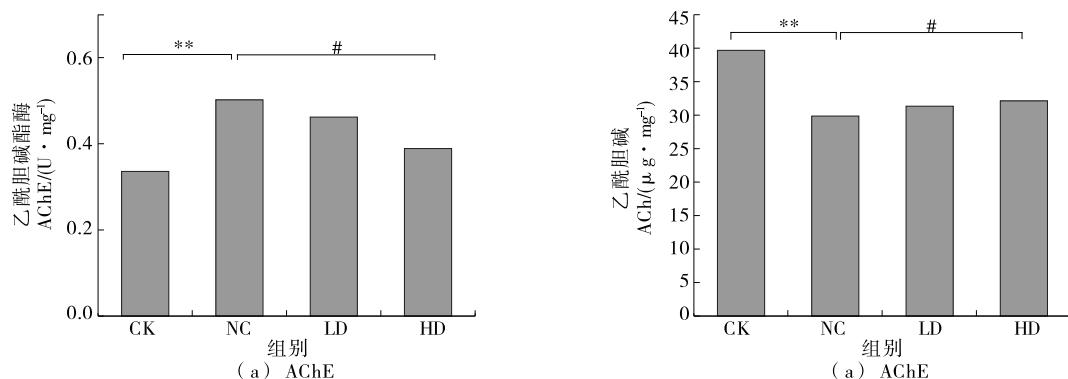
2.4 山葡萄花青素对小鼠胆碱能系统指标的影响

研究^[5]表明,CA 引起机体大脑相关中枢神经系统的损伤,通过引发氧化应激反应紊乱中枢胆碱能系统平衡,引起神经信息传递功能障碍,最终导致机体出现多种神经行为改变。ACh 是关于认知功能的重要神经递质,在学习记忆中起重要作用,AChE 作为胆碱能神经元生理活性特异性标记物的蛋白质酶,在神经元乙酰胆碱的稳态中发挥重要作用。由图 2 可知,与 CK 相比 NC 中 AChE 极显著升高($P<0.01$),ACh 含量极显著降低($P<0.01$),AChE 活性升高会过量分解 ACh,引发中枢胆碱能系统失衡,无法作用于突触后膜发挥信号传导作用,导致兴奋

传导及记忆存储信号混乱,甚至导致神经元细胞凋亡。与 NC 相比 HD 能显著抑制 AChE 活性($P<0.05$),显著增加 ACh 含量($P<0.05$),花青素干预后能够有效改善海马体中胆碱能系统损伤,增强 ACh 与突触后膜特异性受体的结合,增强突触可塑性及突触后效应,使神经元突触间的信息传递效率增强,促进记忆形成。

2.5 山葡萄花青素对小鼠海马体组织的影响

海马体是机体中神经元可塑性区域,在学习记忆认知功能过程中发挥重要作用。酒精造成学习记忆损伤的一个重要原因是其对海马体神经细胞的毒性作用^[22]。由图 3 可知,CK 海马体 CA1 区神经细胞层次分明,细胞结构完整形态清晰可见。NC 海马体 CA1 区神经细胞排列分散层次混乱,细胞数目减少,部分细胞变性、坏死溶解呈空泡且难以辨别。这与石哲等^[12,23]的结果相似,表明 CA 会导致海马体 CA1 区神经细胞损伤。与 NC 组比较 HD 海马体 CA1 区神经细胞排列较整齐,结构相对正常,细胞数目增多,表明山葡萄花青素可以改善 CA 导致的小鼠海马神经元受损。



与 CK 组比较, * 为 $P<0.05$, ** 为 $P<0.01$; 与 NC 组比较, [#] 为 $P<0.05$, ^{##} 为 $P<0.01$

图 2 山葡萄花青素对胆碱能系统指标的影响

Figure 2 Effects of *Vitis amurens* anthocyanins on cholinergic system in mice

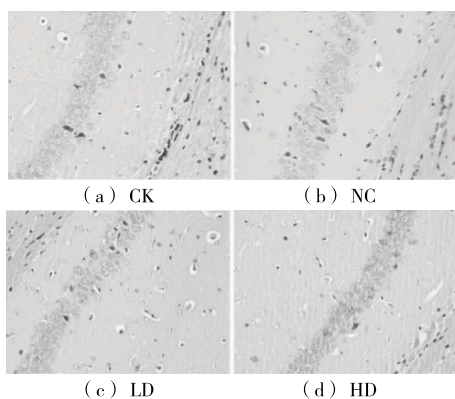


图3 山葡萄花青素小鼠海马体CA1区神经元的影响
Figure 3 Effects of *Vitis amurensis* anthocyanins on hippocampal CA1 neurons in mice (HE, 400×)

3 结论

试验表明,慢性酒精中毒会导致小鼠认知功能障碍;酒精导致机体氧化应激水平增加,引发中枢神经系统中胆碱能稳态失衡,这是慢性酒精中毒导致认知障碍的可能机制之一。山葡萄花青素对此具有改善作用,可显著提高慢性酒精中毒小鼠学习记忆能力,提高血脑中抗氧化应激水平,调节海马体胆碱能神经系统稳态,恢复受损神经元,改善认知障碍。后续将深入分析山葡萄花青素抗氧化应激作用相关靶点,并进行 PI3K/Akt/GSK3 β -Nrf2/HO-1 途径机制研究。

参考文献

- [1] 许继取. 莲房原花青素对老年认知障碍大鼠记忆功能的改善作用及其机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010: 1-2.
XU Ji-qu. Study on the ameliorating memory impairment and the mechanisms of procyanidins extracted from the lotus seedpod in cognitively impaired aged rats[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010: 1-2.
- [2] YANG Jing-yu, XUE Xue, TIAN Hua, et al. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2014, 144(3): 321-337.
- [3] ANKRAH N K, ROSENBLATT M S, MACKEY S. Effect of chronic alcoholism on traumatic intracranial hemorrhage[J]. World Neurosurgery, 2020, 144: e421-e427.
- [4] 李强, 汪凯, 时鹏. 慢性酒精中毒患者认知功能障碍的评估[J]. 蚌埠医学院学报, 2013, 38(10): 1309-1311.
LI Qiang, WANG Kai, SHI Peng. The evaluation of cognitive dysfunction in patients with chronic alcoholism[J]. Journal of Bengbu Medical College, 2013, 38(10): 1309-1311.
- [5] 吴伟青. 大蒜多糖对慢性酒精中毒小鼠脑损伤的保护作用[D]. 广州: 暨南大学, 2012: 2-3.
WU Wei-qing. The protective effect of garlic polysaccharide on chronic alcoholic brain damage in mice[D]. Guangzhou: Jinan University, 2012: 2-3.
- [6] PACHECO S M, SOARES M S P, GUTIERRES J M, et al. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2018, 56: 193-204.
- [7] GUTIERRES J M, CARVALHO F B, SCHETINGER MR C, et al. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2014, 33(1): 88-97.
- [8] RUPASINGHE H P V, ARUMUGGAM N, AMARARATHNAM, et al. The potential health benefits of haskap (*Lonicera caerulea* L.): Role of cyanidin-3-O-glucoside [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 44: 24-39.
- [9] 贺阳. 山葡萄花青素提取、结构鉴定及稳态化机理研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017: 13-28.
HE Yang. Studies on extraction, structure identification and stabilization mechanism of anthocyanins of *Vitis amurensis* Rupr [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2017: 13-28.
- [10] HE Yang, WEN Lian-kui, YU Han-song, et al. Isolation and structural identification of the main anthocyanin monomer in *Vitis amurensis* Rupr[J]. Natural Product Research, 2018, 32(7): 867-870.
- [11] 蒋曦. 反式虾青素对慢性酒精中毒小鼠记忆功能和 NF- κ B, iNOS, TNF- α 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 105-113.
JIANG Xi. Effect of ASX on chronic alcoholism induced memory impairment and expressions of NF- κ B p65, iNOS, TNF- α in mice[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2017, 33(1): 105-113.
- [12] 石哲. 水迷宫计算机检测分析系统的改进和人参皂苷改善酒精所致认知功能障碍的比较研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2009: 25-26.
SHI Zhe. The improvement of morris water maze online detection & analysis system & comparative efficacy research of ginsenoside in improving cognitive dysfunction caused by ethanol [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2009: 25-26.
- [13] 卢聪. 四种达玛烷型三萜皂苷益智作用特点及机制研究[D]. 北京: 药用植物研究所, 2017: 27-28.
LU Cong. The research on the nootropic characteristics and the mechanisms of four dammarane triterpenoid saponins[D]. Beijing: Institute of Medicinal Plants, 2017: 27-28.
- [14] 王方. 安神补心丸对正常小鼠及 APP/PS1 转基因老年痴呆模型小鼠记忆的影响[D]. 青岛: 青岛大学, 2020: 7-8.
WANG Fang. Effects of anshenbuxin pill on memory of normal mice and mice with APP/PS1 alzheimer's disease model[D]. Qingdao: Qingdao University, 2020: 7-8.
- [15] 王蓉, 张丽凤, 潘誉, 等. 急性酒精中毒大鼠学习记忆能力与脑组织钙离子含量的关系研究[J]. 中外医学研究, 2019, 17(32): 9-11.
WANG Rong, ZHANG Feng-li, PAN Yu, et al. Study on the relationship between the ability of learning and memory and the content of calcium ions in brain tissue in rats with acute alcoholism[J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2019, 17(32): 9-11.

(下转第 200 页)

- [19] LI Xuan, PAN Zhong-li, ATUNGULU G G, et al. Peeling mechanism of tomato under infrared heating: Peel loosening and cracking[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 128: 79-87.
- [20] THOMPSON K A, MARSHALL M R, SIMS C A, et al. Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes[J]. Journal of Food Science, 2000, 65: 791-795.
- [21] 毛立科, 高彦祥. 番茄红素稳定性研究综述[J]. 中国食品添加剂, 2008(2): 57-60.
- MAO Li-ke, GAO Yan-xiang. Review on the study of lycopene stability[J]. China Food Additives, 2008(2): 57-60.
- [22] 才美慧. 加工过程对番茄红素稳定性及其异构化影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018: 18-42.
- CAI Mei-hui. Effect of processing on the stability and isomerization of lycopene[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018: 18-42.
- [23] GOMEZ-LOPEZ M, GARCIA-QUIROGA M, ARBONES-MACI-NEIRA E, et al. Comparison of different peeling systems for ki-wifruit (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward)[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 49(1): 107-113.
- [24] WANG Bi-ni, VENKITASAMY C, ZHANG Fu-xin, et al. Feasibility of jujube peeling using novel infrared radiation heating technology[J]. LWT-Food Science & Technology, 2016, 69: 458-467.
- [25] ILKER R, SZCZESNIAK A S. Structural and chemical bases for texture of plant food stuffs[J]. Journal of Texture Studies, 1990, 21: 1-36.
- [26] SHI J, MAGUER M L. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2000, 20(4): 293-334.
- [27] FLOROS J D, WETZSTEIN H Y, CHINNANH M S. Chemical (NaOH) peeling as viewed by scanning electron microscopy: Pimiento peppers as a case study[J]. Journal of Food Science, 2010, 52(5): 1 312-1 316.
- [28] FLOROS J D, CHINNAN M S. Diffusion phenomena during chemical (NaOH) peeling of tomatoes [J]. Journal of Food Science, 2010, 55(2): 552-553.
- [29] LI Xuan, ZHANG A, ATUNGULU G G, et al. Effects of infrared radiation heating on peeling performance and quality attributes of clingstone peaches[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 55(1): 34-42.
- [30] MOELANTS K R N, JOLIE R P, PALMERS S K J, et al. The effects of process-induced pectin changes on the viscosity of carrot and tomato sera[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012 (6): 2 870-2 883.
- [31] BELIE N D, HERPPICH W, BAERDEMAEKER J D. A kinetic model for turgor loss in red cabbage cells during mild heat treatment[J]. Journal of Plant Physiology, 2000, 157(3): 263-272.
- [32] DAS D J, BARRINGER S A. Potassium hydroxide replacement for lye (sodium hydroxide) in tomato peeling[J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2010, 30(1): 15-19.
- [33] DOMINGUEZ E, CUARTERO J, HEREDIA A. An overview on plant cuticle biomechanics [J]. Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology, 2011, 181(2): 77-84.
- (上接第 168 页)
- [16] 陈荻, 李阳, 田梦, 等. 人参皂苷 Re 对慢性酒精中毒大鼠学习、记忆能力的影响及机制[J]. 中华中医药学刊, 2016(12): 2 974-2 977.
- CHEN Di, LI Yang, TIAN Meng, et al. Effects and mechanism of ginsenoside Re on learning and memory abilities of rats with chronic alcoholism[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2016(12): 2 974-2 977.
- [17] 吕兆良, 许宙, 李季, 等. 食源性抗氧化剂在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 243-247, 273.
- LU Zhao-liang, XU Zhou, WEN li, et al. Progress of foodborne antioxidant in neurodegenerative diseases[J]. Food & Machinery, 2015, 31(2): 243-247, 273.
- [18] 朱西平, 李文治, 陶倩, 等. 维生素 B 族复合 TRP 肽和 SOD 对焦虑性抑郁症 C57BL/6 小鼠行为学改善的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(3): 166-172.
- ZHU Xi-ping, LI Wen-zhi, TAO Qian, et al. Effects of a formula containing vitamin B on ameliorates anxious/depression-like behaviors in anC57BL/6 mice model[J]. Food & Machinery, 2020, 36(3): 166-172.
- [19] 荣爽. 莲房原花青素对老年大鼠学习记忆减退障碍的影响及其机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009: 33-35.
- RONG Shuang. The ameliorative effect and mechanism of rocyanidins extracted from the lotus seedpod on age-associated memory impairment in rats[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2009: 33-35.
- [20] CUI Hong-xin, CHEN Ji-hong, LI Jing-wan, et al. Protection of anthocyanin from myrica rubra against cerebral ischemia-reperfusion injury via modulation of the TLR4/NF- κ B and NLRP3 pathways[J]. Molecules, 2018, 23(7): 1 788.
- [21] ALI T, KIM T, REHMAN S U, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Molecular Neurobiology, 2017, 55: 6 076-6 093.
- [22] MENDOZA-WILSON A M, CASTRO-ARREDONDO S I, BAL-ANDRAN-QUINTANA R R. Computational study of the structure-free radical scavenging relationship of procyanidins[J]. Food Chemistry, 2014, 161(15): 155-161.
- [23] 张颖, 张蓓琳, 冯加纯. 葡多酚对慢性酒精中毒大鼠的脑保护作用[J]. 浙江医学, 2008, 30(10): 1 069.
- ZHANG Ying, ZHANG Bei-lin, FENG Jia-chun. Cerebral protection effect of grape polyphenols in rats with chronic alcoholism[J]. Zhejiang Medical Journal, 2008, 30(10): 1 069.