

海洋胶原肽改善老年记忆作用试验研究

裴新荣^{1,2}, 杨睿悦¹, 赵海峰¹, 李琼¹, 李勇¹

1. 北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100191

2. 首都医科大学食品药品安全评价中心, 北京 100069

摘要 为探讨海洋胶原肽(MCP)对老年学习记忆的改善作用及其机制,选用20月龄雌性C57BL/6J小鼠,随机分为老年对照组和3个MCP干预组,分别喂饲添加0、0.22%、0.44%和1.32% MCP的特殊加工饲料,另设3月龄青年对照组,喂饲普通小鼠生长饲料,干预6个月后应用跳台试验和Morris水迷宫试验进行行为学检测;nissl染色观察海马形态学;同时检测各组动物肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量及海马组织中脑源性神经营养因子(BDNF)的表达情况。结果表明,MCP干预后老龄小鼠的空间学习记忆能力和被动回避能力明显提高;0.44% MCP干预组小鼠肝脏SOD活性显著高于老龄对照组,而MDA含量显著降低;0.44%和1.32% MCP干预组小鼠海马区BDNF的表达高于老年对照组。各组动物海马神经元数量无明显改变。因此,海洋胶原肽具有预防年龄造成的学习记忆能力下降的功能,其作用机制可能是抗氧化活性和促进BDNF的表达。

关键词 生物活性肽;学习记忆;衰老;氧化应激;脑源性神经营养因子

中图分类号 Q819

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)16-0026-06

Preventive Effects of Marine Collagen Peptide on Learning and Memory in Aged C57BL/6J Mice

PEI Xinrong^{1,2}, YANG Ruiyue¹, ZHAO Haifeng¹,
LI Qiong¹, LI Yong¹

1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

2. Center for Food and Drug Safety Evaluation, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract To observe the preventive effects of Marine Collagen Peptide (MCP) on learning and memory in aged mice, 20-month old female C57BL/6J mice were divided into an aged control group and three MCP-treated groups. The effects on cognitive function, hepatic antioxidative systems, hippocampal morphology and expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) were studied after feeding the aged mice MCP (0.22% or 0.44% or 1.32% (wt/wt) in diet) for 6 months. Cognitive functions were assessed using the step-down test and the Morris water maze, respectively. Hippocampal morphology was examined by nissl stain. RT-PCR and Western blot

were used to evaluate the expression of BDNF in hippocampus. The results show that their spatial memory and passive avoidance ability were significantly improved when they were fed with MCP. Furthermore, the activity of SOD was significantly increased and the level of MDA was decreased in the 0.44% MCP supplementation group as compared to the aged control group. The expression of hippocampal BDNF was significantly up-regulated in the aged mice treated with 0.44% and 1.32% MCP. However, the number of nissl-positive cell saw no significant difference among all groups. These results suggest that MCP administration has a preventive effect on memory tasks by lowering oxidative damage and up-regulating expression of BDNF.

Keywords bioactive peptide; learning and memory; aging; oxidative stress; brain-derived neurotrophic factor

0 引言

随着人口老龄化的发展,脑退行性疾病和认知功能衰退将成为人类,特别是老年人群的“第一杀手”。据报道,中老年人群中约50%主诉有记忆减退;客观记忆检查依据测验方法的不同,记忆力异常率可达32%~78%。目前,全世界老年记忆障碍患者人数约2000万,中国患者人数已达500万~600万;65岁以上的老年人中,约有5%罹患记忆障碍,年龄超过85岁的老年人中这一比例接近50%。老年记忆障碍现在已经

收稿日期: 2009-07-14

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD27B08)

作者简介: 裴新荣, 博士研究生, 研究方向为营养与疾病, 电子信箱: rongpx@163.com; 李勇 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M180200749S, M100102956M), 教授, 研究方向为营养与疾病、分子营养、分子与食品毒理学, 电子信箱: liyong@bjmu.edu.cn

为一个严重危害人类健康的社会问题。因此,通过功能性食品、行为等干预手段提前预防老年记忆障碍的发生,对于提高老年人的生活质量,以及健康老龄化的实现具有重要的科学意义,也是当前生物医学研究领域的重大课题之一^[1-3]。

利用生物酶解技术从海洋生物中提取的活性肽,具有抗菌性、抗氧化、调节血脂、降血压、抗肿瘤等多种生理功能。因此,向海洋索取食物、功能蛋白和特殊活性物质,已成为世界各国保健品、药品开发的重要领域^[4-5]。海洋胶原肽(Marine Collagen Peptide, MCP)是以鲑鱼等深海鱼皮为主要原料,采用生物酶解技术生产得到的混合寡肽。本试验采用 20 月龄雌性 C57BL/6J 小鼠,观察海洋胶原肽对老龄鼠学习记忆的改善作用,为海洋资源的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海洋胶原肽

由北京中食海氏生物技术有限公司提供,是以深海鲑鱼的鱼皮为原料,经过清洗匀浆→复合偶联酶解→酶失活→脱脂→多级膜分离→渗透精制→浓缩→脱色→造粒干燥等工艺制成。

1.1.2 试验动物

20 月龄 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 80 只,3 月龄 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 20 只,由北京大学医学部试验动物中心提供(动物合格证号:SCXK11-00-0004),SPF 级动物房饲养,饲养环境温度 21~23℃,湿度 50%~60% RH。

1.1.3 主要仪器和试剂

Morris 水迷宫系统(中国医学科学院药物研究所),小鼠电刺激跳台仪(中国科学院上海药物研究所),离心机(Eppendorf 5840R),XH2B 型旋涡混匀器,UV-762 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),GeneAmp PCR-9700 PCR 扩增仪(美国 PE 公司),蛋白质电转移装置(美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像系统(日本复日公司)。

RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司,TRIzol 购自 Gibco 公司,SOD、MDA 试剂盒购自南京建成生物制品工程研究所,其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和饲养

动物适应性饲养 3 d 后将小鼠按体重分为老龄对照组和低、中、高 3 个 MCP 干预组,分别喂饲添加 0、0.22%、0.44%和 1.32% MCP 的特殊加工饲料,青年对照组喂饲普通小鼠生长饲料,所有动物自由饮水进食。干预 6 个月后进行行为学测试。

1.2.2 行为学测试

1) 跳台实验

小鼠放入跳台反应箱中适应环境 3 min 后通以 36 V 交流电,动物受到电击后的逃避反应是跳上平台,部分动物会再次或多次跳至铜栅上,受到电击后又迅速跳回平台,训练 5

min,24 h 后在底部铜栅通电的情况下,直接将动物置于平台上,记录第 1 次跳下的时间即跳台潜伏期(step-down latency)和 5 min 内小鼠跳下平台的次数,即错误次数。

2) Morris 水迷宫实验

跳台实验之后进行水迷宫试验,分为定位航行实验和空间探索实验两部分。定位航行实验中每日分别从 4 个入水点将动物面向池壁放入水中,记录动物寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期(escape latency),以及游泳速度和游泳距离。如果动物在 90 s 内未找到平台则将其引至平台并在平台停留 10 s,逃避潜伏期记为 90 s,计算每日 4 次逃避潜伏期及速度和游泳距离的平均值作为当日最终成绩进行统计分析。空间探索实验用于测量小鼠对平台空间位置的准确记忆,即记忆保持能力。第 7 天撤去平台,任选一个入水点将小鼠放入水中,自由游泳 60 s,记录 60 s 内小鼠在目标象限(原平台所在象限)的持续时间和穿越平台次数。

1.2.3 海马组织形态学观察

行为学测试后,每组取 5 只小鼠用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,经左心室进行灌注固定。先快速灌注冷生理盐水至流出液变清亮,再以 4%多聚甲醛(4℃)灌注 30 min,取出脑后在 4℃的 4%多聚甲醛中继续固定 24 h。进行连续冰冻切片,厚度为 10 μm,每只大鼠取 3 张切片,进行 nissl 染色。光镜下对海马 CA1、CA3 和 DG 区 nissl 染色阳性的细胞进行计数:每张切片取连续的 3 个视野,3 张切片的平均值为该样本的阳性细胞数。

1.2.4 肝脏中 SOD 浓度和 MDA 含量测定

行为学测试结束后,将动物处死,取出肝脏组织,PBS 冰浴下匀浆,制备 10%的组织匀浆液,4 500 r/min 离心 15 min 后吸取上清液,按试剂盒说明,采用黄嘌呤氧化酶法测量组织匀浆液中超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)的活性,以硫代巴比妥酸(TBA)方法测量肝脏组织中过氧化产物丙二醛(Malondialdehyde,MDA)的含量。

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应检测 BDNF 表达

按 Trizol 试剂盒说明提取海马总 mRNA,紫外分光光度计测定其浓度。取 1 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA,然后进行 PCR 扩增,反应体系是:3.0 μL cDNA 模板,10×PCR buffer 2.0 μL,10 mmol/L dNTPs 0.5 μL,上下游脑源性神经营养因子(Brain-derived Neurotrophic Factor,BDNF)引物各 0.8 μL,PCR 染料 2.0 μL,Taq 酶 0.3 μL,DEPC 水 10.6 μL,补容至 20 μL(表 1)。

1.2.6 Western blot 方法检测海马 BDNF 蛋白的表达

提取各组小鼠海马组织的蛋白,Lowry 法测定蛋白含量。进行电泳、转膜和免疫检测,按 ECL 免疫检测试剂盒进行显色、曝光、照相。Band Lead 图像分析系统进行条带分析。

1.2.7 统计分析

所有数据应用 SPSS 统计软件进行分析,结果以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,Morris 水迷宫试验中逃避潜伏期和游泳距离采用重复测量的两因素方差分析(two-way repeated measures ANOVA),

Table 1 Sequences of primer pairs and annealing temperatures of RT-PCR

基因来源	引物序列	产物长度/bp	退火温度/°C	循环数
β -actin	5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3'	123	72	30
	5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGG-3'			
BDNF	5'-TTGAGCACGTGATCGAAGAGC-3'	267	70	30
	5'-GTTCCGGCATTGCCAGTTCAG-3'			

其他指标进行单因素方差分析,两组间比较采用最小显著差异法, $P<0.05$ 为统计检验界值。

2 结果

2.1 MCP 对跳台潜伏期和错误次数的影响

由表 2 可见,老年对照组与青年对照组相比,跳台潜伏期延长,错误次数下降,并且差异有显著性,说明老年小鼠学习记忆能力下降;MCP 可以不同程度地延长老年鼠停留在平台上的潜伏期,减少衰老所引起的错误次数的增加,其中,中、高剂量的 MCP 干预后潜伏期与老年对照组相比明显延长,与青年对照组无显著性差异;与老龄对照组相比 0.44% MCP 干预组小鼠错误次数也明显下降,提示 MCP 对老龄小鼠的被动回避能力有明显改善作用,并且以中剂量组效果最好。

Table 2 Effects of MCP on latency and number of errors in step-down passive avoidance test

组别	动物数	潜伏期/s	错误次数
老年对照组	15	90.93±28.81 ^{##}	1.67±0.67
0.22% MCP	16	104.6±21.80 [#]	1.53±0.52
0.44% MCP	16	143.5±34.70*	1.38±0.50
1.32% MCP	16	140.69±33.55*	1.44±0.51
青年对照组	16	153.00±20.25**	1.38±0.62

注:与老年对照组相比,差异有显著性:*为 $P<0.05$,**为 $P<0.01$,与青年对照组相比,差异有显著性:#为 $P<0.05$,##为 $P<0.01$ 。

Notes: Compared to aged control, * means $P<0.05$, ** means $P<0.01$.

Compared to young control, # means $P<0.05$, ## means $P<0.01$.

2.2 MCP 对小鼠空间记忆能力的影响

逃避潜伏期结果分析表明,随着时间的延长,各组小鼠的逃避潜伏期均逐渐缩短($F(5,370)=210.32, P<0.01$);时间与组间无交互作用($F(20,370)=0.728, P>0.05$);各组间的逃避潜伏期差异有显著性($F(4,74)=9.71, P<0.01$),采用LSD方法对各组间的潜伏期两两比较发现,3个MCP干预组和青年对照组小鼠的逃避潜伏期均显著低于老年对照组($P<0.01$),0.22%和1.32% MCP干预组与青年对照组相比,潜伏期延长,并且差异有显著性($P<0.05$)(图1)。

游泳距离结果分析表明,随着训练时间的延长,各组小

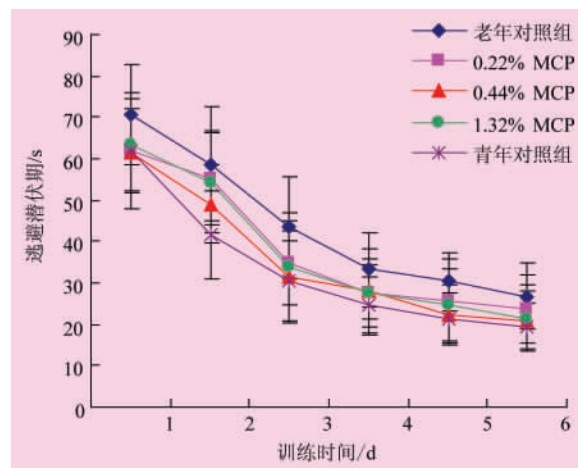


图 1 Morris 水迷宫试验中, MCP 对逃避潜伏期的影响

Fig. 1 Effect of MCP on escape latency in Morris water maze test

鼠的游泳距离逐渐缩短 ($F(5, 370)=292.13, P<0.01$), 时间与组间无交互作用 ($F(20, 370)=1.20, P>0.05$); 各组间游泳距离的差异有显著性 ($F(4, 74)=21.36, P<0.01$); LSD 法进行两两比较发现, 与老年对照组相比, 3 个 MCP 干预组和青年对照组游泳距离缩短, 差异具有显著性 ($P<0.01$); MCP 干预组与青年对照组相比, 游泳距离显著延长 ($P<0.05$) (图 2)。各组间游泳速度无显著性差异 (数据未列出)。

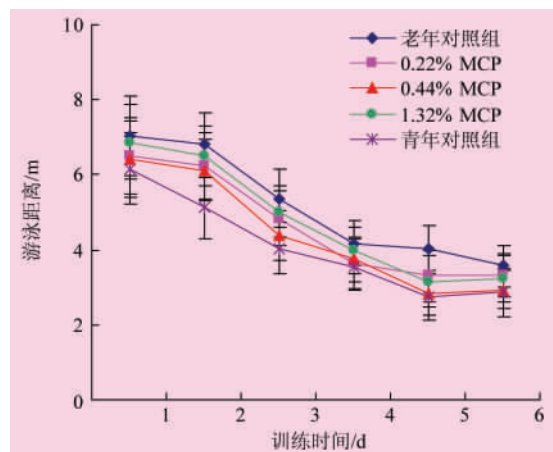
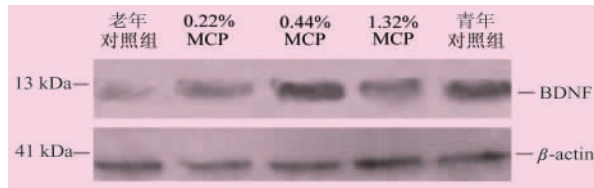


图 2 Morris 水迷宫试验中 MCP 对游泳距离的影响

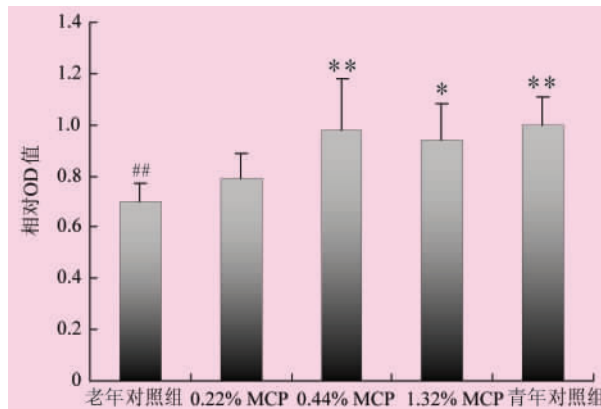
Fig. 2 Effect of MCP on swimming distance in Morris water maze test

照组相比,老年对照组小鼠海马区 BDNF 蛋白的表达下降了 30%,两者具有显著性差异;0.44%和 1.32% MCP 干预 6 个月后,老龄小鼠海马 BDNF 蛋白的表达分别升高了 29%和 26%,与老龄对照组相比具有显著性差异,3 个 MCP 干预组小鼠海马 BDNF 的表达与青年对照组相比无显著性差异(图 5)。



(a) Western blot 表达条带

(a) Expression band of Western blot



(b) 灰度分析结果

(b) Result of densitometric analysis

图 5 BDNF 在各组小鼠海马区的表达 (Western blot)

Fig. 5 Immunoblot analysis of BDNF in the hippocampus of the young, aged and MCP-treated mice

注:与老年对照组相比,差异有显著性:* 为 $P<0.05$,** 为 $P<0.01$;与青年对照组相比,差异有显著性:# 为 $P<0.05$,## 为 $P<0.01$

Notes: Compared to the aged control, * means $P<0.05$, ** means $P<0.01$.

Compared to the young control, # means $P<0.05$, ## means $P<0.01$

3 讨论

衰老的自由基学说认为,衰老引起的学习记忆能力的下降与自由基损伤密切相关,众多研究表明,衰老人群的脑组织中神经元细胞浆、星型胶质细胞中 MDA 的含量明显增高,用免疫电镜可观察到神经元中 MDA 的沉积,而青年人群中几乎检测不到 MDA 的沉积^[6-7]。Kasapoglu 等^[8]对不同年龄段的人血清中 SOD 和 MDA 等指标进行测定,发现 60 岁以上老年人血清中 SOD 活性降低,而 MDA 含量升高。

正常情况下,自由基的产生和消除速率维持着一种动态平衡,随着年龄的增加,体内抗氧化酶的活性逐渐下降,使得清除自由基的能力下降,氧自由基在体内增多,由于脑具有较高的耗氧量,含有丰富的不饱和脂肪酸,因此更容易受到

自由基攻击,功能下降,引起学习记忆能力的降低^[7,9]。本试验发现,同青年对照组小鼠相比,老龄小鼠肝脏中 SOD 活性明显下降,机体清除自由基的能力下降,自由基氧化产物 MDA 含量升高,最终引起神经元损伤,导致学习记忆能力的降低, MCP 干预后,体内抗氧化酶 SOD 活性明显增强,而过氧化产物 MDA 含量下降,提示 MCP 可以提高老龄小鼠的抗氧化能力,防止自由基对神经元的损伤,这可能是 MCP 改善老龄鼠学习记忆能力的机制之一。

nissl 染色表明,同老年对照组相比, MCP 干预组及青年对照组动物海马 CA1、CA3 和 DG 区 nissl 染色阳性的细胞数量有所增加,但无显著性差异,表明 MCP 对学习记忆的改善作用可能主要是通过提高神经细胞的功能,而非影响海马神经元的数量。

BDNF 是由德国神经生物学家于 1982 年首次从猪脑中分离纯化出的具有促进神经生长活性的一种蛋白质,是记忆形成过程中关键蛋白之一,可作用于突触前膜和突触后膜^[10]。本试验中,应用 Western blot 和 RT-PCR 方法对各组动物海马内 BDNF mRNA 和蛋白的表达进行了检测,结果发现,青年组小鼠海马组织 BDNF mRNA 和蛋白的表达明显高于老龄对照组,0.44%和 1.32% MCP 干预 6 个月后,小鼠海马 BDNF 的表达同老龄对照组相比分别升高了 29%和 26%。BDNF 在学习记忆的保持中具有重要意义,能促进多种神经元的存活和生长发育,可以提高神经元的生物活性,减少损伤后神经元的自然死亡,还能促进突触的可塑性,改变脑内神经元的形态,增加突触终末的密度,促进树突和轴突的生长;BDNF 还参与了长时程增强效应和学习的可塑性机制,同时 BDNF 还可以通过调节细胞内钙结合蛋白,稳定细胞内钙浓度,从而保护神经元免受损伤;也可以通过提高细胞内抗氧化酶活性,对抗自由基以促进细胞损伤的修复。此外, BDNF 还可以抑制细胞凋亡^[11-13],所以 MCP 促进 BDNF 的表达可能是其改善老年记忆的重要机制之一。

4 结论

本研究利用老龄动物模型探讨了 MCP 对学习记忆的作用,结果表明 MCP 能显著提高老年鼠的空间学习记忆能力及非空间学习记忆能力,跳台试验中 0.44% MCP 干预后,同老年对照组相比潜伏期明显延长,同时错误次数显著降低,并且与青年对照组相比无显著性差异;Morris 水迷宫定位航行试验中,3 个 MCP 干预组动物逃避潜伏期、游泳距离同老年对照组相比,明显缩短,而空间探索试验中目标象限时间及穿越次数均有不同程度的升高。与此同时,肝脏中抗氧化酶 SOD 活性升高,而过氧化产物 MDA 的含量下降;海马各区尼氏体的数量无明显变化,而海马区 BDNF 的表达则明显增强。

综上所述,本试验明确了 MCP 具有改善老年记忆的功能,并且可以提高老年动物的抗氧化活性,促进神经营养因子的表达,但对海马神经元的数量无明显影响。由于学习记忆障碍的机制非常复杂,如突触形态和功能的改变、神经递

质及受体的改变及钙离子浓度的改变等都可能与学习记忆下降有关,因此其作用机制还需进一步探讨。

参考文献 (References)

- [1] 韩大雄, 杨频. 老年痴呆症的分子病理机制[J]. 化学通报, 2003, 2: 95-101.
Han Daxiong, Yang Pin. *Chemistry Online*, 2003, 2: 95-101.
- [2] Small S A. Age-related memory decline: Current concepts and future directions[J]. *Arch Neurol*, 2001, 58(3): 360-364.
- [3] 全国老龄办公室. 中国人口老龄化发展趋势预测研究报告 [R]. 北京, 2004.
China National Committee on Ageing. The report of developmental trend on China's population aging[R]. Beijing, 2004.
- [4] Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures [J]. *J Chromatogr B Analyt, Technol Biomed Life Sci*, 2004, 803(1): 41-53.
- [5] Hannu K, Anne P. Bioactive peptides: Production and functionality[J]. *International Dairy Journal*, 2006(16): 945-960.
- [6] Kishida K T, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity, memory[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(2): 233-

244.

- [7] Droge W, Schipper H M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline[J]. *Aging Cell*, 2007, 6(3): 361-370.
- [8] Kasapoglu M, Ozben T. Alteration of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging[J]. *Exp Gerontol*, 2001, 36(2): 209-220.
- [9] Muller F L, Lustgarten M S, Jang Y, et al. Trends in oxidative aging theories[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(4): 477-503.
- [10] Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors[J]. *BMB Rep*, 2009, 42(5): 239-244.
- [11] Hwang I K, Yoo K Y, Jung B K, et al. Correlations between neuronal loss, decrease of memory, and decrease expression of brain-derived neurotrophic factor in the gerbil hippocampus during normal aging[J]. *Exp Neurol*, 2006, 201 (1): 75-83.
- [12] Choy K H, de Visser Y, Nichols N R, et al. Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: Effects on learning and memory [J]. *Hippocampus*, 2008, 18(7): 655-667.
- [13] Miyajima F, Ollier W, Mayes A, et al. Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly[J]. *Genes Brain Behav*, 2008, 7(4): 411-417.

(责任编辑 王芷)

时间: 2009年10月

地点: 安徽合肥

2009年中国工程热物理学会 (燃烧学) 学术年会

主办: 中国工程热物理学会

承办: 中国科学技术大学火灾科学国家重点实验室

通信地址: 北京2706信箱 (100080)
中国工程热物理学会秘书处
电子信箱: cset@mail.etp.ac.cn