·实验技术及其应用·

大豆异黄酮改善衰老去势大鼠记忆的机制

郭沁菲[1],李明锴[1],赵娅菲[1],薛璐珊[1],张骋[1],吕晨慧[1],杨倩[2],赵海峰[1,3]
1.山西医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室 / 山西医科大学营养与食品科学研究所,山西 太原 030001;
2.山西省肿瘤医院、中国医学科学院肿瘤医院山西医院、山西医科大学附属肿瘤医院;
3.煤炭环境致病与防治教育部重点实验室,山西 太原 030001

摘要:目的　探究大豆异黄酮(soy isoflavones, SIF)改善衰老去势大鼠记忆的机制。**方法**　40 只 8 周龄 SD 雌性大鼠随机分为假手术组(CON)、衰老去势组(OVX/D-Gal)、160 mg/kg SIF 组(SIF)和 0.8 mg/kg 雌二醇组(ERT)。除 CON 组外,各组大鼠行双侧卵巢摘除术合并腹腔注射 D- 半乳糖(100 mg/kg·d),干预 12 周。干预后穿梭箱实验检测大鼠记忆能力;透射电镜观察海马神经元突触超微结构;Western Blot 检测海马 P53、PSD-95、GluA1 及 P38、p-P38 蛋白表达;酶联免疫吸附分析检测 TNF-α 和雌二醇表达。One-way ANOVA 法分析总体差异,方差齐者组间比较采用最小显著差数法(least significant difference,LSD)(方差齐)或 Dunnett 法(方差不齐),检验水准 α=0.05。**结果**　各组大鼠回避潜伏时间(avoidance latency time, ALT)、主动回避反应率(active avoidance response rate, AAR)、突触界面曲率(synaptic interface curvature, SIC)、突触间隙宽度(synaptic cleft width, SCW)和突触后致密物(postsynaptic density, PSD)厚度、血清雌二醇水平、海马 P53、PSD-95、GluA1 及 P38 及 p-P38/P38 蛋白表达量总体差异均有统计学意义 (F 值 =10.905、9.825、8.027、124.228、24.981、16.410、5.667、6.091、8.766、25.218、19.014, P 值<0.010、<0.010、<0.010、<0.001、<0.001、<0.001、<0.050、<0.050、<0.050、<0.001、<0.001)。与 CON 组相比,OVX/D-Gal 组大鼠血清雌二醇水平下降,海马 P53 表达上升;ALT 延长、AAR 降低;SIC 及 PSD 厚度降低、SCW 增宽;海马 TNF-α 表达和 p-P38/P38 比值升高,P38、PSD-95 和 GluA1 表达减少(均 P 值<0.050);与 OVX/D-Gal 组相比,SIF 组血清雌二醇未见明显改变,P53 表达下降;ALT 缩短、AAR 上升;SIC 及 PSD 厚度增加、SCW 变窄;海马 TNF-α 表达和 p-P38/P38 比值下降,PSD-95、GluA1 和 P38 表达上升(均 P 值<0.050)。**结论**　SIF 可改善衰老去势大鼠的记忆能力,其作用可能与抑制 TNF-α 及下游 P38MAPK 进而增加 GluA1 表达改善突触可塑性有关。

关键词:大豆异黄酮;衰老;去势;记忆;突触可塑性
中图分类号:R151.2;R749.1　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1003-8507(2025)23-4383-07
DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202507188

Mechanisms of memory improvement by soy isoflavones in aging ovariectomized rats

GUO Qin-fei*, LI Ming-kai, ZHAO Ya-fei, XUE Lu-shan, ZHANG Cheng, LV Chen-hui, YANG Qian, ZHAO Hai-feng
Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health/Institute of Nutrition and Food Science, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of soy isoflavones (SIF) in improving memory in aging ovariectomized rats. **Methods** Forty 8-week-old SD female rats were randomly assigned to the sham control (CON), aging combined with ovariectomy (OVX/D-Gal), 160 mg/kg SIF (SIF) and 0.8 mg/kg estradiol replacement therapy (ERT). Except for the CON group, rats in other groups underwent bilateral ovariectomy combined with intraperitoneal injection of D-galactose (100 mg/kg·d) for 12 weeks. After the intervention, memory was assessed using the shuttle box test. Transmission electron microscopy was used to observe the synaptic ultrastructure of hippocampal neurons. The protein P53, PSD-95, GluA1, P38 and the phosph-P38 (p-P38) expressions were measured by Western blot. The levels of TNF-α and estradiol were detected by ELISA. One-way ANOVA method was used to analyze the overall differences. LSD method was used to analyze the pairwise comparison between groups with homogeneous variance, and Dunnett's test was used to analyze those with uneven variance, with α=0.05. **Results** Significant differences were observed among the groups in avoidance latency time (ALT), active avoidance response rate (AAR), synaptic interface curvature (SIC), synaptic cleft width (SCW), postsynaptic density (PSD) thickness, serum E2

基金项目:山西省基础研究计划自由探索类(202403021222456);中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX20231A056);山西省回国留学人员科研资助项目(2023-103)
作者简介:郭沁菲(2001—),女,硕士在读,研究方向:营养与疾病
通信作者:赵海峰,E-mail:haifengzao75@163.com

levels, protein expressions of P53, PSD-95, GluA1 and P38 in the hippocampus, and p-P38/P38 (F-value=10.905, P-value<0.010; F-value=9.825, P-value<0.010; F-value=8.027, P-value<0.010; F-value=124.228, P-value<0.001; F-value=24.9810, P-value<0.001; F-value=16.410, P-value<0.001; F-value=5.667, P-value<0.050; F-value=6.091, P-value<0.050; F-value=8.766, P-value<0.050; F-value=25.218, P-value<0.001; F-value=19.014, P-value<0.001). Compared with CON group, rats in the OVX/D-Gal group exhibited significantly reduced serum E2 and increased hippocampal P53, accompanied by prolonged ALT and decreased AAR. The SIC and PSD thickness declined, and the SCW widened. The level of TNF-α and the ratio of p-P38/P38 in the hippocampus increased, while the protein expressions of P38, PSD-95 and GluA1 were decreased (all P-value<0.050). In the SIF group, there was no significant change in serum E2 level compared to the OVX/D-Gal group, while P53 expression was decreased. The ALT shortened and the AAR increased. Besides, higher SIC, increased PSD thickness, and narrower SCW were observed in the SIF group. The level of TNF-α and the ratio of p-P38/P38 in the hippocampus declined, while the protein expressions of PSD-95, GluA1 and P38 increased (all P-value<0.050). **Conclusion** SIF can improve the memory ability of aging rats with ovariectomy, which may be related to the enhancement of synaptic plasticity through inhibiting TNF-α and its downstream P38MAPK, thereby increasing GluA1 expression.

Keywords: Soy isoflavones; Aging; Ovariectomy; Memory; Synaptic plasticity

女性自绝经后至生命终止的阶段称为绝经后期，占近三分之一的生命周期，影响全球近 10 亿女性[1]。此阶段女性易因衰老伴雌激素缺乏导致多种退行性疾病，如认知功能障碍，其中记忆力减退发病率高达 70%[2-3]。因此了解该阶段女性衰老伴雌激素缺乏对记忆障碍的影响，并对其预防以提高生活质量具有重要意义。2024 年世界绝经大会指出：绝经后 10 年内开始雌激素用药可使血雌二醇（estradiol）水平稳定达到 40～80 pg/ml，减少脑白质病变，改善记忆；但由于患者个体差异导致有效剂量范围狭窄，引发不良结局，且 60 岁后再用可能错过最佳时机[4]。因此，寻找可长期应用、无年龄限制的安全有效物质来预防女性绝经后记忆障碍迫在眉睫。

大豆异黄酮（soybean isoflavones, SIF）是植物雌激素，与雌二醇具有结构同源性，可结合雌激素受体发挥类雌激素样作用。SIF 具有抗衰老和改善记忆障碍的作用，一项纳入 403 位 60～81 岁老人的纵向研究报告，老年女性每增加 25.6 mg/d SIF 摄入，认知障碍风险降低 45%；动物实验也证明 50 mg/kg SIF 和 40 mg/kg 大豆卵磷脂联合干预可通过调节脑血流量预防 Aβ 所致的认知障碍[5-6]。染料木黄酮（genistein, Gen）作为 SIF 的主要活性物质，可通过线粒体生物发生和自噬减轻去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞衰老[7]。

一项基于英国生物银行的数据分析提示卵巢衰老及医疗干预引发的雌二醇合成减少与女性大脑中广泛的系统级效应有关，包括若干神经过程如突触形成及免疫调节改变[8-9]。在衰老伴雌激素缺乏的进程中，突触可塑性受损表现之一为树突棘密度和突触数量下降，雌二醇补充后得到缓解[10-11]。AMPA 型谷氨酸受体（α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor, AMPAR）是由不同的 GluA1/2/3/4 亚基构成的四聚体复合物，神经元内 AMPAR 的转运调控过程决定其在突触后膜的动态变化，是突触可塑性产生的关键前提[12]。P38 丝裂原活化蛋白激酶（P38 Mitogen-activated Protein Kinase, P38 MAPK）被 TNF-α 激活，通过磷酸化下游靶蛋白启动级联反应来调控 GluA1 的转运效率，是神经元突触可塑性形成的关键分子基础[13]。潜伏转录因子肿瘤蛋白 53（Tumor Protein 53, P53）激活后导致细胞衰老，活化的 P38MAPK 激活了 P53 进而抑制胚胎干细胞向神经元分化[14]。综上，TNF-α 激活的 P38MAPK 可能从多方面对突触可塑性产生抑制。SIF 与雌二醇结构相似，能否也通过改善突触结构可塑性损伤，来进一步缓解衰老与雌激素缺乏共同导致的记忆障碍。因此，本文通过对雌性大鼠行双侧卵巢摘除术（ovariectomy, OVX）合并腹腔注射 D- 半乳糖（D-galactose, D-Gal）建立衰老去势（OVX/D-Gal）大鼠模型，旨在探讨 SIF 干预对其记忆及突触结构、功能的影响，以期为绝经后期记忆障碍的防治提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及干预 40 只 8 周龄 SPF 雌性 SD 大鼠由中国食品药品检测研究院提供 [SCXK（京）2022-0002]。动物通过山西省肿瘤医院实验动物伦理审查委员会审查（SDL2024092）。室温（25±2）℃，湿度（50±5）%，自然采光，自由摄食、饮水。适应性饲养 1 周后，按体重随机分为假手术组（Sham control, CON）、衰老去势组（OVX/D-Gal）、160 mg/kg SIF 组（SIF）和 0.8 mg/kg 雌二醇组（estradiol replacement therapy, ERT）。除 CON 组外，其余大鼠切除双侧卵巢并腹腔注射 100 mg/kg D-Gal；CON 组大鼠仅切除卵巢附近等体积脂肪组织并注射等量生理盐水。SIF 及雌二醇溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠后分别给予灌胃，其余组每日给予等体积溶剂灌胃，持续 12 周。

1.2 主要试剂及仪器 SIF（纯度 ≥ 90%，其中大豆甙 54.58%，黄豆黄甙 27.63%，染料木甙 8.65%，大豆

甙元 1.52%，黄豆黄素 0.43%，染料木素 0.29%，HPLC 检测，西安霖草生物工程有限公司）；D-Gal（美国 Amresco）；戊酸雌二醇片（法国 DELPHARM Lile S.A.S）；穿梭箱实验仪（荷兰 Noldus 公司）；透射电镜（日本电子株式会社）。BCA 蛋白定量试剂盒（武汉 博士德）；一抗包括：P53（美国 Proteintech Group）、P38（英国 Abcam）、p-P38（美国 Cell Signaling Technology）、GluA1（美国 Millipore）、PSD-95（武汉 爱博泰克）、β-actin（武汉 赛维尔）；二抗包括：HRP 标记山羊抗兔 IgG（武汉 赛维尔）、HRP 标记山羊抗鼠 IgG（英国 Cohesion Biosciences）；大鼠雌二醇、TNF-α 的 ELISA 试剂盒（江苏 晶美）。

1.3　实验方法

1.3.1　酶联免疫吸附分析（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测大鼠血清雌二醇及海马 TNF-α 水平　3%戊巴比妥钠麻醉大鼠，颈静脉取血后 503 ×g 离心 15 min，取血清。称取海马置于组织重量 9 倍体积 PBS 中匀浆，503 ×g 离心 10 min 后取上清。稀释标品后，按说明书在 96 孔板中依次加入每组 6 只不同大鼠血清或海马匀浆、标品、生物素标记抗体及酶标试剂，温育 60 min 后洗涤 5 次。加入显色剂后 37℃避光 15 min，加入终止液，15 min 内用酶标仪在 450 nm 波长下检测，计算样品浓度。

1.3.2　穿梭箱实验检测记忆能力　实验前 4 d 训练，第 5 d 测试，每只大鼠每日连续训练 10 个循环，每次间隔 15 s。实验开始前将大鼠置于穿梭箱左侧适应 2 min，开始后先予 2 200 Hz 蜂鸣音 5 s，后用 1 mA 交流电持续电击足底 10 s。若大鼠在蜂鸣音期间移动至对侧，记为主动逃避反应；电击后移动至对侧，记为被动回避反应；电击结束后仍未到达对侧，记为无反应。记录数据包括主动回避反应率（active avoidance response rate, AAR）、被动回避反应率（passive avoidance response rate, PAR）及回避潜伏时间（avoidance latency time, ALT）。

1.3.3　透射电子显微镜观察突触超微结构变化　取 1 mm^3 海马 CA1 区组织，4%多聚甲醛固定，脱水、包埋后切片。醋酸铀及柠檬酸铅染色后，在透射电镜下观察突触并采集照片。以 Image-Pro Plus 6.0 为图像分析软件，定量分析突触界面曲率（synaptic interface curvature, SIC）、突触间隙宽度（synaptic cleft width, SCW）和突触后致密物（postsynaptic density, PSD）厚度。

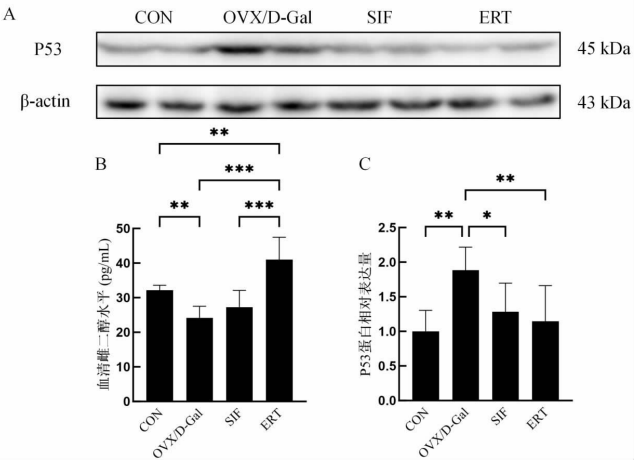
1.3.4　Western blot 法检测海马 PSD-95、GluA1、P38、p-P38 蛋白称取适量海马，每克组织加入 10 ml 裂解液、100 μl PMSF 及磷酸酶抑制剂，匀浆后冰上放置 30 min，4 ℃ 224 ×g 离心 10 min 后取上清，BCA 蛋白定量。每孔加入 30～40 μg 蛋白样品电泳并转膜，室温下用含 5%脱脂奶粉的封闭液封闭至少 1 h，分别加入 β-actin、PSD-95、GluA1、P38、p-P38 抗体，4 ℃ 孵育过夜，次日 TBST 溶液洗 3 次后置于对应二抗室温孵育 1 h，再用 TBST 溶液洗膜 3 次，ECL 发光液显影。上述流程独立进行 3 次，每次实验使用 2 个同组不同样本，依次检测 6 个不同样本蛋白印迹。用 Image J 进行蛋白条带灰度分析，并计算各目的蛋白相对于内参 β-actin 的相对表达量。

1.4　统计学分析　用 SPSS 27.0 对数据进行分析，各指标结果用（$\bar{x} \pm s$）表示，One-way ANOVA 法分析总体差异，组间比较采用最小显著差数法（least significant difference，LSD）（方差齐）或 Dunnett（方差不齐），检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　SIF 干预对 OVX/D-Gal 大鼠血清雌二醇水平及海马衰老相关蛋白 P53 的影响　干预 12 周后，各组大鼠血清雌二醇水平总体差异有统计学意义（F 值 =16.410, P 值＜0.001）。与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组雌二醇水平下降 24.81%（P 值＜0.050）；SIF 组大鼠雌二醇水平与 CON 组及 OVX/D-Gal 组无统计学差异（P 值 ＞0.050）；ERT 组雌二醇水平较其余三组分别升高 27.54%、69.63%及 50.35%（P 值＜0.050）。见图 1 B。

各组大鼠海马 P53 蛋白水平总体差异具有统计学意义（F 值 =5.667, P 值＜0.050）。与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组 P53 蛋白水平增加 88.45%；与 OVX/D-Gal 组相比，SIF 组和 ERT 组 P53 蛋白水平分别下降 31.89%和 60.88%（P 值＜0.050）。见图 1 A、C。



注：A 为大鼠海马中 P53 及 β-actin 蛋白条带图；B 为 ELISA 试剂盒测定血清雌二醇水平；C 为大鼠海马中 P53 蛋白的表达定量分析；* 表示 P＜0.050；** 表示 P＜0.010；*** 表示 P＜0.001；n=6。

图 1　SIF 对各组大鼠血清雌二醇水平及海马 P53 蛋白表达的影响

Figure 1　Effect of SIF on the estradiol level in serum and the expression of P53 protein in the hippocampus of each group of rats

2.2　SIF 干预对 OVX/D-Gal 大鼠记忆能力的影响　各组大鼠 ALT 及 AAR 总体差异有统计学意义（F 值 =10.905, P 值<0.050; F 值 =9.825, P 值<0.050）。与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组 ALT 延长、AAR 降低；与 OVX/D-Gal 组相比，SIF 组 ALT 缩短且 AAR 增加，ERT 组仅 ALT 缩短（P 值<0.050）。见表 1。

2.3　SIF 干预对 OVX/D-Gal 大鼠海马神经元突触结构的影响　CON 组突触结构完整，突触前后膜界限清晰，前膜囊泡充足，密度均一；OVX/D-Gal 组与 CON 组相比突触前后膜界限模糊，囊泡减少且密度不均；SIF 组及 ERT 组突触前后膜界限较清晰，囊泡密度较 OVX/D-Gal 组有所改善，见图 2 A。

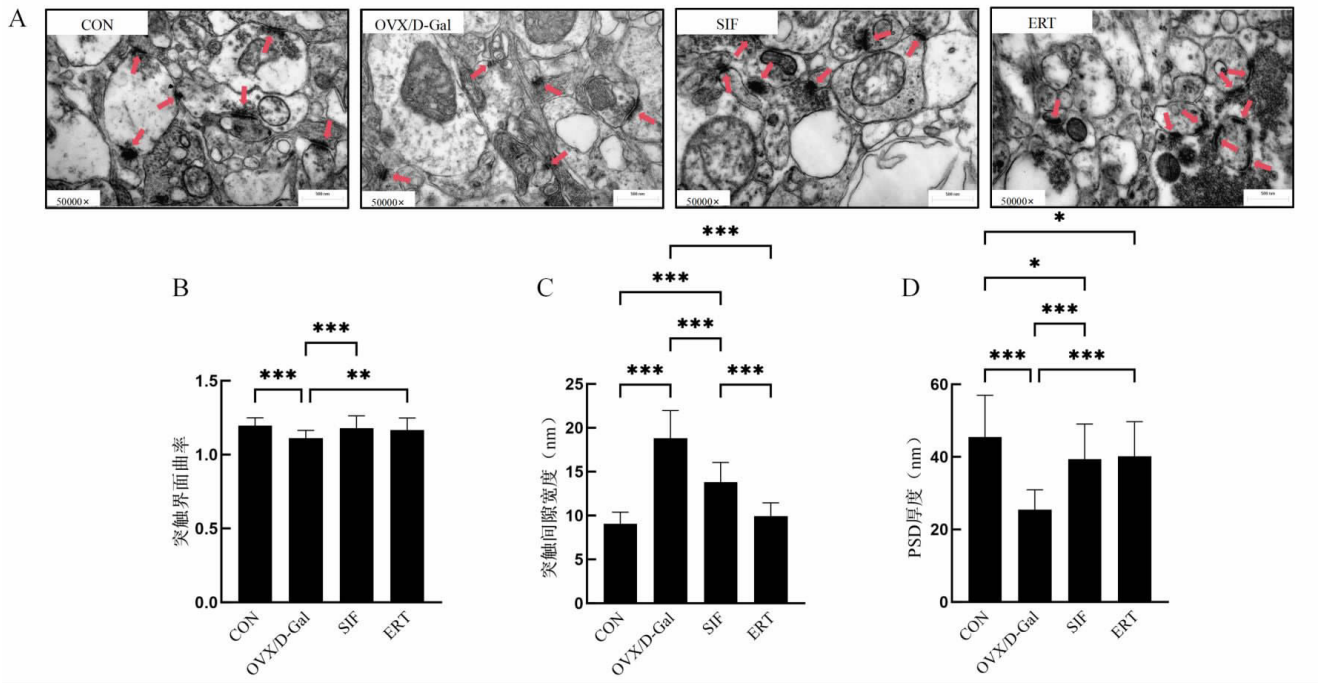
对突触结构进行量化分析，各组的 SIC、SCW 及 PSD 厚度均存在差异（F 值 =8.027, P 值<0.010; F 值 =124.228, P 值<0.001; F 值 =24.9810, P 值<0.001）。与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组大鼠 SIC 及 PSD 厚度分别下降了 7.1%、44.04%，见图 2 B、C，SCW 较 CON 组增加了 107.89%，见图 2 D；与 OVX/D-Gal 组相比，SIF 及 ERT 组 SIC 分别上升了 6.04%、4.85%，见图 2 B，且 PSD 厚度分别上升了 54.79%、58.01%，见图 2 D，而 SCW 分别下降了 26.58%、47.18%，见图 2 C（P 值<0.050）。

表 1　各组大鼠回避反应能力的比较[$(\bar{x} \pm s)$, n=10]

Table 1　Comparison of avoidance response ability among rats in each group [$(\bar{x} \pm s)$, n=10]

组别	ALT(s)	AAR(%)	PAR(%)
CON 组	5.61 ± 0.56	28.33 ± 3.07	71.67 ± 3.07
OVX/D-Gal 组	9.86 ± 2.71[a]	1.67 ± 1.67[a]	78.33 ± 9.46
SIF 组	5.27 ± 1.00[b]	33.33 ± 6.67[b]	71.67 ± 7.49
ERT 组	5.39 ± 1.48[b]	18.33 ± 4.77	61.67 ± 6.00
F 值	10.905	9.825	0.988
P 值	<0.001	<0.001	0.418

注：与 CON 组相比，[a]P<0.050；与 OVX/D-Gal 组相比，[b]P<0.050。



注：A 为海马体突触结构的代表性透射电子显微镜（transmission electron microscope, TEM）图像（放大倍数：×50 000；标尺：500 nm；箭头表示突触）；B 为突触界面曲率定量分析；C 为突触间隙宽度定量分析；D 为突触后致密物厚度定量分析。

图 2　大鼠海马 CA1 区超微结构图及突触界面结构参数比较[$(\bar{x} \pm s)$, n=30]

Figure 2　Comparison of ultrastructural images and synaptic interface structure parameters in rat hippocampus CA1 region [$(\bar{x} \pm s)$, n=30]

2.4　SIF 干预对 OVX/D-Gal 大鼠海马 PSD-95、GluA1 蛋白表达的影响　各组大鼠 PSD-95 及 GluA1 蛋白水平总体差异有统计学意义（F 值 =6.091, P 值<0.050; F 值 =8.766, P 值<0.050）。与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组 PSD-95、GluA1 蛋白水平分别下降了 37.31%、40.89%；与 OVX/D-Gal 组相比，SIF 组 PSD-95、GluA1 蛋白水平分别上升了 48.64%、38.59%，ERT 组 PSD-95、GluA1 蛋白水平分别上升了 36.74%、15.98%（P 值<0.050）。见图 3 A～C。

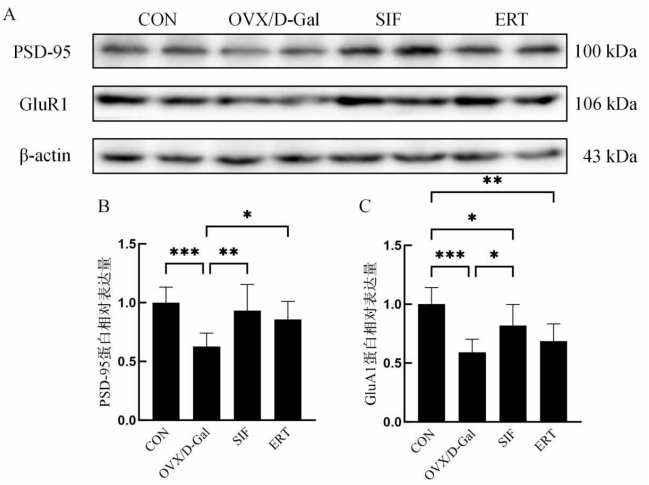
2.5　SIF 干预对 OVX/D-Gal 大鼠海马 P38、p-P38 及 TNF-α 表达的影响　各组大鼠 P38 及 p-P38/P38 蛋白表达量总体差异有统计学意义（F 值 =25.218, P 值<0.001; F 值 =19.014, P 值<0.001）。与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组 P38 蛋白水平降低了 44.49%，p-P38/P38 升高了 149.28%；与 OVX/D-Gal 组相比，SIF 组和 ERT 组 P38 蛋白水平分别上升 55.66%、143.54%，p-P38/P38 分别下降了 46.31%、70.32%；ERT 组 P38 蛋白水平较 SIF 组上升 56.46%，

p-P38/P38 降低 44.73%（P 值<0.050）。见图 4 A ~ D。

各组大鼠海马 TNF-α 水平总体差异有统计学意义（F 值 =14.716，P 值<0.001），与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组大鼠 TNF-α 水平上升 44.25%；与 OVX/D-Gal 组相比，SIF 组及 ERT 组大鼠 TNF-α 水平分别下降了 11.62%、14.4%（P 值<0.050）。见图 4 E。

3　讨　论

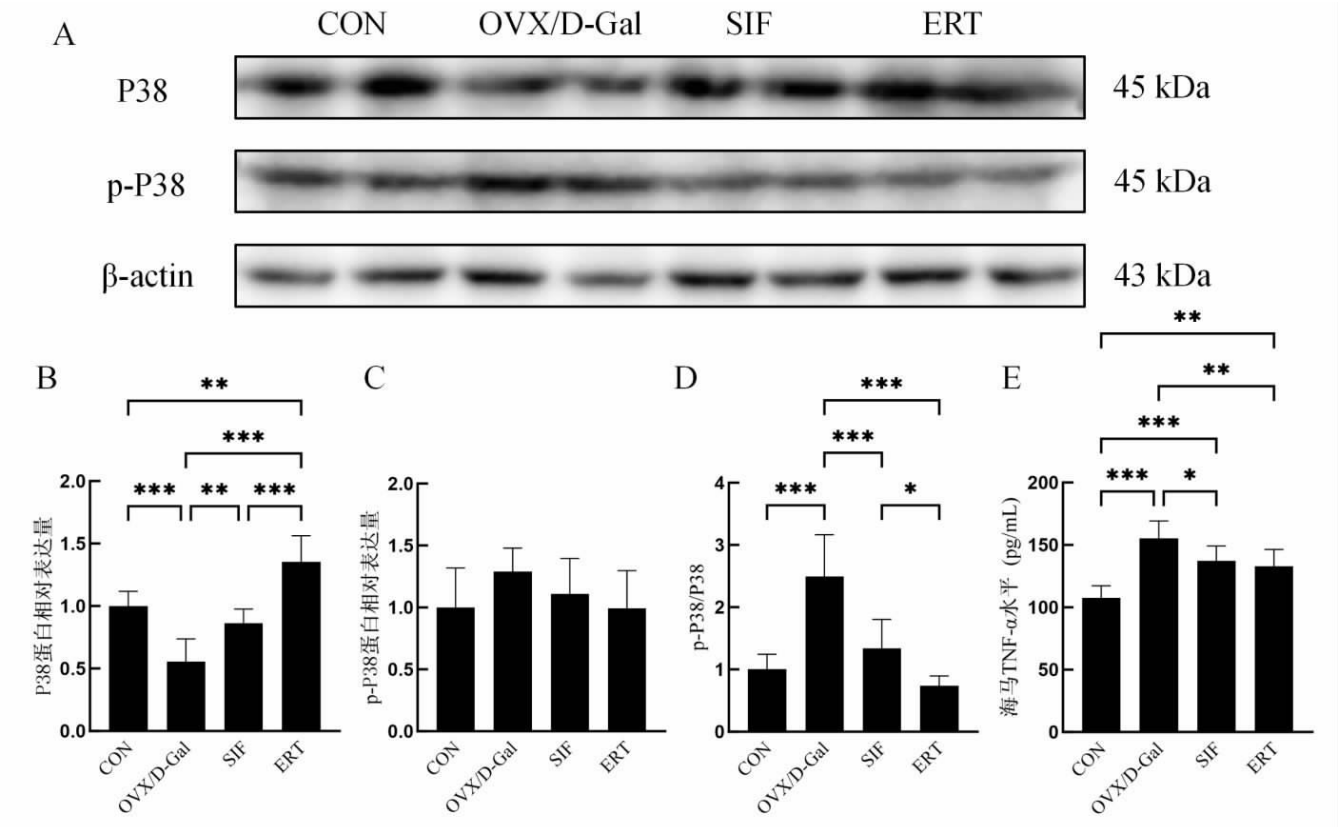
雌激素具有长期神经保护和抗衰老作用，卵巢功能减退导致的雌激素缺乏会引起大脑代谢紊乱，进一步加速衰老，二者共同加剧了记忆障碍，使该时期女性患痴呆症的风险是男性的 2 ~ 3 倍[15]。双侧 OVX 通过降低雌激素水平模拟围绝经状态，来研究该时期的病理生理变化；长期使用 D-gal 会导致炎症和细胞死亡，可模拟自然衰老过程，广泛用于研究衰老相关的认知障碍，故通过对雌性大鼠行双侧 OVX，连续 12 周 D-gal 腹腔注射来模拟衰老伴雌激素缺乏的状态[16]。既往研究发现，SIF（40、80 和 160 mg/kg）预处理 14 d 双侧海马 CA1 区注射 Aβ 1-42 大鼠存在正相关式剂量 - 反应关系[17]；且 200 和 400 mg/kg SIF 灌胃 6 周均可改善 D-gal 大鼠记忆能力[18]；另 300 mg/kg SIF 喂养雌性大鼠 6 周后卵巢产生组织病理改变[19]；而大豆提取物 60 mg/kg 干预 24 月龄衰老大鼠 10 月，才观察到齿状回新细胞生成[20]。据此，考虑 SIF 低生物利用率的特性，本次实验采用 160 mg/kg SIF 灌胃干预 12 周，并以雌二醇为阳性对照，以探究 SIF 长期干预对 OVX/D-Gal 大鼠记忆的保护作用。



注：A 为大鼠海马中 PSD-95、GluA1 及 β-actin 蛋白条带图；B 为大鼠海马中 PSD-95 蛋白的表达定量分析；C 为大鼠海马中 GluA1 蛋白的表达定量分析。

图 3　SIF 干预对各组大鼠海马中 PSD-95 及 GluA1 蛋白表达的影响

Figure 3　Effect of SIF on the expression of PSD-95 and GluA1 in the hippocampus of each group of rats



注：A 为大鼠海马中 P38、p-P38 及 β-actin 蛋白条带图；B 为大鼠海马中 P38 蛋白的表达定量分析；C 为大鼠海马中 p-P38 蛋白的表达定量分析；D 为大鼠海马中 p-P38/P38 的相对蛋白表达水平（磷酸化 / 总比值）；E 为 ELISA 试剂盒测定大鼠海马中 TNF-α 水平。

图 4　SIF 干预对各组大鼠海马中 P38、p-P38 蛋白表达及 TNF-α 水平的影响

Figure 4　The effect of SIF on the expressions of P38 and p-P38 proteins, and the level of TNF-α in the hippocampus of each group of rats

激活的 P53 是 DNA 损伤反应的关键因子，通过增强 DNA 修复抑制染色质碎片形成，是细胞衰老的重要标志物，其缺失或抑制可防止多种细胞衰老[21]。本研究中，与 CON 组相比，OVX/D-Gal 组大鼠 P53 蛋白表达升高且血清雌二醇水平下降，表明 OVX/D-Gal 模型建立成功。干预 12 周后，与 OVX/D-Gal 组相比，SIF 组及 ERT 组 P53 表达降低，提示 SIF 和雌二醇干预均有一定延缓 OVX/D-Gal 大鼠衰老作用；但 SIF 组雌二醇水平未见明显差异，与 Gabrielle 等人[22]队列研究一致，提示 SIF 并未改变循环中雌二醇水平，可能通过与雌激素受体结合发挥类雌激素样作用。

穿梭箱实验通过在声电刺激下的主被动回避反应研究动物在面对刺激时的回避行为和学习记忆能力。这一过程中，大鼠受非条件刺激逃向安全区，习得与条件刺激的关联，逐渐形成主动条件反射，属于不断强化学习记忆过程[23]。ALT 越短记忆能力越好、AAR 越高学习成功率越高[24-25]。OVX/D-Gal 大鼠随着成模时间延长出现记忆障碍，SIF 组较 OVX/D-Gal 组 ALT 缩短、AAR 提高，而 ERT 组仅 ALT 缩短，提示长期 ERT 仅改善大鼠回避行为，对学习记忆能力无显著作用，而 SIF 对二者均有明显改善作用。有研究发现 18～24 月龄老年 SD 大鼠腹腔注射 60 mg/kg Gen 8 周后，大鼠回避记忆有明显改善，与我们结果一致，表明 SIF 可以明显提高 OVX/D-Gal 大鼠的学习记忆能力[26]。

本实验通过透射电镜观察大鼠突触超微结构，比较了 SIC、SCW 和 PSD 厚度等反应突触传递效率的指标，SIC 是扩大神经元接触面的有效方式，SCW 越窄有利于提高神经递质的有效浓度和降低裂隙阻力。有研究表明，80 mg/kg SIF 灌胃 14 d 预处理可以改善侧脑室注射 Aβ1-42 诱导的 AD 大鼠海马突触前后膜融合、间隙模糊等病理改变，本研究亦在 OVX/D-Gal 大鼠模型下观察到相似改善作用[27]。进一步量化突触病理改变，OVX/D-Gal 组大鼠 SIC 减小、SCW 增宽，神经元接触面下降，神经传递有效性降低，SIF 组 SIC、SCW 表现出明显改善，提示 SIF 可能提高神经递质在突触间传递效率。PSD-95 是兴奋性突触后膜下方的电子致密结构中最丰富的蛋白，可将 AMPAR 锚定在突触后膜，并通过掩盖内吞信号位点阻止内吞；AMPAR 与 PSD-95 结合，CaMKII 磷酸化 GluA1，提高突触传递强度[28]。OVX/D-Gal 组大鼠 PSD 厚度下降，PSD-95、GluA1 蛋白水平下降，SIF 干预时上述指标均升高，提示 SIF 可能通过恢复 PSD 的表达来增加 GluA1 锚定位置，表现出 GluA1 蛋白表达增加，而 AMPAR 通过与 PSD-95 结合，减少 PSD 蛋白降解，维持 PSD 的结构完整性，二者共同作用，维护了海马 CA1 区结构突触可塑性[28-30]。TNF-α 与老年人生理衰弱和失能相关，对认知障碍有预测作用[31]。TNF-α 激活 P38MAPK，进而促进其他促炎细胞因子的合成与释放，形成“炎症正反馈”；激活的 P38MAPK 与下游 MAPK 激活蛋白激酶 2（MAPK activated protein kinase 2, MK2）构建信号轴，抑制 AMPAR 在突触后膜中的锚定，表现为 GluA1 降低，突触后达到动作电位阈值难度增加，突触传递效率下降[13]。OVX/D-Gal 组大鼠海马中 TNF-α 水平上升引起 P38 磷酸化激活，表现为 p-P38/P38 比值上升及 P38 蛋白水平下降，而过度激活的 P38MAPK-MK2 轴导致了 AMPAR 内吞过度或转运异常；SIF 干预降低了 TNF-α 及 p-P38/P38 水平，通过抑制 P38 激活减少的内吞与降解，使更多保留在突触后膜，表现为促进 GluA1 表达增加，结构突触可塑性改善[13]。此外，氢化异黄酮通过抑制 P38 磷酸化阻断 NF-κB 来减少 LPS 刺激巨噬细胞 RAW264.7 的炎症以发挥抗炎作用，SIF 通过抑制 P38MAPK 减少 800 μM $CoCl_2$ 建立的 PC12 细胞缺氧损伤模型细胞凋亡[32-33]。由此推断，SIF 通过抑制 P38MAPK 减轻炎症损伤，进而改善突触可塑性，有待进一步研究。

综上，本研究提示 160 mg/kg SIF 通过抑制 TNF-α 及下游 P38MAPK 进而增加 GluA1 表达来缓解结构突触可塑性损伤，改善 OVX/D-Gal 大鼠记忆。本实验从突触结构、突触后受体及上游机制进行探讨，未来通过电生理以及动物 / 细胞实验的激动 / 抑制剂进一步验证该机制，并寻找不同 SIF 成分的最佳配比，为探索 SIF 类雌激素样作用对记忆的改善机制提供线索。

利益冲突声明　本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Hickey M, LaCroix AZ, Doust J, et al. An empowerment model for managing menopause[J]. Lancet, 2024, 403(10430): 947-957.

[2] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 中国绝经管理与绝经激素治疗指南 2023 版[J]. 中华妇产科杂志，2023，58(1)：4-21. Chinese Medical Association Obstetrics and Gynecology Branch Menopause Group. Guidelines for menopause management and hormone therapy in China, 2023 edition [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2023, 58(1): 4-21.(In Chinese)

[3] Zhang LY, Ruan XY, Cui YM, et al. Menopausal symptoms among Chinese peri- and postmenopausal women: a large prospective single-center cohort study[J]. Gynecological Endocrinology, 2021, 37(2): 185-189.

[4] James AS, Susan RD, Angelica LH, et al. State of the art in menopause: current best practice approaches from the IMS World Congress 2024, Melbourne[J]. Climacteric, 2025, 28(2): 98-103.

[5] Nakamoto M, Otsuka R, Nishita Y, et al. Soy food and isoflavone intake reduces the risk of cognitive impairment in elderly Japanese women [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2018, 72(10):

1458–1462.

[6] Li HR, Wang XY, Li XY, et al. Role of soy lecithin combined with soy isoflavone on cerebral blood flow in rats of cognitive impairment and the primary screening of its optimum combination [J]. Nutrition Research and Practice, 2023, 17(2): 371–385.

[7] Li MY, Yu YJ, Xue K, et al. Genistein mitigates senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via ERR α –mediated mitochondrial biogenesis and mitophagy in ovariectomized rats [J]. Redox Biology, 2023, 61: 102649.

[8] Than S, Moran C, Beare R, et al. Interactions between age, sex, menopause, and brain structure at midlife: a UK biobank study[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2021, 106 (2): 410–420.

[9] Barth C, Crestol A, de Lange AMG, et al. Sex steroids and the female brain across the lifespan: insights into risk of depression and Alzheimer's disease [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2023, 11(12): 926–941.

[10] Maroteaux MJ, Noccioli CT, Daniel JM, et al. Rapid and local neuroestrogen synthesis supports long–term potentiation of hippocampal Schaffer collaterals–cornu ammonis 1 synapse in ovariectomized mice [J]. Journal of Neuroendocrinology, 2024, 36(12): e13450.

[11] Zhong Q, Xiao XN, Qiu YJ, et al. Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications[J]. MedComm (2020), 2023, 4(3): e261.

[12] Ma PC, Wan LP, Li YW, et al. RNF220 is an E3 ubiquitin ligase for AMPA receptors to regulate synaptic transmission[J]. Sci Adv, 2022, 8(39): eabq4736.

[13] Beamer E, Corrêa SAL. The p38MAPK–MK2 signaling axis as a critical Link between inflammation and synaptic transmission [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 635636.

[14] Kolahdouzmohammadi M, Pahlavan S, Sotoodehnejadnematalahi F, et al. Activation of AMPK promotes cardiac differentiation by stimulating the autophagy pathway[J]. Journal of Cell Communication and Signaling, 2023, 17(3): 939–955.

[15] Bezzini D, Smeralda CL, Pasqualetti P, et al. Mortality of Alzheimer's disease in Italy from 1980 to 2015[J]. Neurological Sciences, 2024, 45(12): 5731–5737.

[16] Hong C, Wang Z, Zheng SL, et al. Metrnl regulates cognitive dysfunction and hippocampal BDNF levels in D–galactose–induced aging mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(4): 741–751.

[17] 向丽,余焕玲,张淑华,等. 不同水平的大豆异黄酮拮抗 β 淀粉样肽介导的大鼠空间学习记忆损伤作用[J]. 中国食品卫生杂志,2009,21(1):4–8.
Xiang L, Yu HL, Zhang SH, et al. Protective effects of soybean isoflavones on spatial learning and memory ability impairment in rats induced by β –Amyloid peptides 1–42 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2009, 21(1): 4–8.(In Chinese)

[18] 顾饶胜,范红艳,王艳春,等. 大豆异黄酮对 D– 半乳糖所致衰老大鼠的影响[J]. 吉林医药学院学报,2013,34(3):161–164.
Gu RS, Fan HY, Wang YC, et al. Effects of soybean isoflavon on the aging in rats induced by D–galactose [J]. Journal of Jilin Medical College, 2013, 34(3): 161–164.(In Chinese)

[19] 迟晓星,张涛,郑丽娜,等. 大豆异黄酮对青年雌性大鼠的抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报,2010,10(5):78–82.
Chi XX, Zhang T, Zheng LN, et al. The antioxidant effect of Soy isoflavone on young female rat[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(5): 78–82.(In Chinese)

[20] Perez–Martin M, Salazar V, Castillo C, et al. Estradiol and soy extract increase the production of new cells in the dentate gyrus of old rats [J]. Experimental Gerontology, 2005, 40(5): 450–453.

[21] Miller KN, Li B, Pierce–Hoffman HR, et al. p53 enhances DNA repair and suppresses cytoplasmic chromatin fragments and inflammation in senescent cells[J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 2229.

[22] Viscardi G, Back S, Ahmed A, et al. Effect of Soy isoflavones on measures of estrogenicity: a systematic review and Meta–Analysis of randomized controlled trials [J]. Advances in Nutrition, 2025, 16(1): 100327.

[23] 曾妍,温红梅,孙瑞芳,等. 重复经颅磁刺激结合穿梭箱训练对脑梗死恢复期大鼠认知功能的影响 [J]. 中国康复医学杂志,2019,34(4):397–402.
Zeng Y, Wen HM, Sun RF, et al. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation combined with shuttle–box training on cognitive function in rats with transient middle cerebral artery occlusion at the recovery stage [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(4): 397–402.(In Chinese)

[24] 陈静,魏鉴腾,陈文雅,等. 鱼籽多肽对小鼠记忆改善的影响[J]. 食品研究与开发,2022,43(4):34–39.
Chen J, Wei JT, Chen WY, et al. Effect of polypeptides from fish Roes on memory improvement in mice [J]. Food Research and Development, 2022, 43(4): 34–39.(In Chinese)

[25] 陈祖培,王栋,姚德焱,等. 穿梭式条件反射测试仪简介[J]. 心理科学通讯,1984,7(2):62–64.
Chen ZP, Wang D, Yao DY, et al. Introduction to the shuttle conditioned reflex tester [J]. Psychological Science Newsletter, 1984, 7(2): 62–64.(In Chinese)

[26] Hosseini SA, Salehi O, Keikhosravi F, et al. Mental health benefits of exercise and genistein in elderly rats [J]. Experimental Aging Research, 2022, 48(1): 42–57.

[27] Ding J, Xi YD, Zhang DD, et al. Soybean isoflavone ameliorates β–amyloid 1–42–induced learning and memory deficit in rats by protecting synaptic structure and function[J]. Synapse, 2013, 67(12): 856–864.

[28] Nicoll RA, Schulman H. Synaptic memory and CaMKII[J]. Physiological Reviews, 2023, 103(4): 2877–2925.

[29] Choquet D, Opazo P. The role of AMPAR lateral diffusion in memory [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2022, 125: 76–83.

[30] Sumi T, Harada K. Muscarinic acetylcholine receptor–dependent and NMDA receptor–dependent LTP and Ltd share the common AMPAR trafficking pathway[J]. iScience, 2023, 26(3): 106133.

[31] Pan YM, Ma LN. Inflammatory markers associated with physical frailty and cognitive impairment [J]. Aging and Disease, 2024, 16(2): 859–875.

[32] Li KT, Hu WS, Yang YB, et al. Anti–inflammation of hydrogenated isoflavones in LPS–stimulated RAW264.7 cells via inhibition of NF–κB and MAPK signaling pathways [J]. Molecular Immunology, 2023, 153: 126–134.

[33] Zhang YZ, Yin LQ, Dong JJ, et al. Soy isoflavones protect neuronal PC12 cells against hypoxic damage through Nrf2 activation and suppression of p38 MAPK and AKT–mTOR pathways [J]. Antioxidants, 2022, 11(10): 2037.

收稿日期:2025–07–13