

海参花成分分析及对小鼠认知辨别能力的影响

陆涛¹, 张军伟¹, 唐雪², 周鹏^{*1}, 夏旭斌³, 胡炜³

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122;

3. 山东好当家海洋发展股份有限公司, 山东 威海 264200)

摘要: 本研究主要对海参花进行了成分分析并研究了其对小鼠认知辨别能力的影响。70 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠按体重随机分为空白组、东莨菪碱模型组、吡拉西坦阳性组(400 mg/kg), 海参花低、中、高剂量组(75、150、450 mg/kg)。每天灌胃给药 30 min 后腹腔注射 1 mg/kg 东莨菪碱造模。30 d 后进行旷场实验、新物体识别实验、Y 迷宫、Morris 水迷宫、避暗实验等行为学实验。在行为学实验训练期继续灌胃给药并造模。结果表明:与模型组相比,海参花组能显著增加小鼠在旷场中心区域活动的时间 ($P<0.05$), 在新物体识别实验中能显著提高小鼠的辨别指数 ($P<0.05$), 在 Y 迷宫实验中能显著增加自发交替 ($P<0.01$), 在 Morris 水迷宫空间探索实验中能显著减少小鼠的逃避潜伏期 ($P<0.01$), 同时显著增加小鼠在平台所在区域的穿越次数 ($P<0.05$) 和累计时间 ($P<0.05$)。在避暗实验测试期中能显著增加小鼠进入暗室的潜伏期 ($P<0.05$) 和降低错误次数 ($P<0.05$)。

关键词: 海参花; 东莨菪碱; 认知辨别能力; 行为学实验

中图分类号: TS 201.1 文章编号: 1673-1689(2021)05-0060-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.05.008

Composition Analysis of Sea Cucumber Ovum and Its Effect on Cognitive Discrimination of Mice

LU Tao¹, ZHANG Junwei¹, TANG Xue², ZHOU Peng^{*1}, XIA Xubin³, HU Wei³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Shandong Homey Aquatic Development CO., LTD., Weihai 264200, China)

Abstract: This study mainly analyzed the components of sea cucumber ovum and studied their effects on the cognitive discrimination in mice. 70 SPF (Specific Pathogen Free) male ICR (Institute of Cancer Research) mice were randomly divided into the control group, scopolamine group, piracetam positive group (400 mg/kg), sea cucumber ovum low, medium and high dose groups (75, 150 and 450 mg/kg). Mice were intragastrically administered 30 minutes before intraperitoneal injection of 1 mg/kg scopolamine daily. After 30 days, mice were subjected to different behavioral experiments including open field test, new object recognition test, Y maze, Morris water maze, and step-through task. During the behavioral experimental training period, oral administration and

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 江南大学食品科学与工程国家一级学科计划项目(JUFSTR20180201)。

* 通信作者: 周 鹏(1975—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品组分与物性研究。E-mail: zhoupeng@jiangnan.edu.cn

scopolamine injection were continued to establish the model. The results showed that compared with the scopolamine group, the sea cucumber ovum group significantly increased the active time of mice in the central area of open field ($P<0.05$), and significantly improved their discrimination index in the object recognition test ($P<0.05$). Spontaneous alternation was significantly increased in the Y maze ($P<0.01$), and the escape latency was significantly reduced in the Morris water maze space exploration test ($P<0.01$). At the same time, it significantly increased the crossing times ($P<0.05$) and cumulative time ($P<0.05$) of mice in the platform area. During the dark avoidance experiment, the latency of mice entering the dark room was significantly increased ($P<0.05$) and the number of errors was significantly decreased ($P<0.05$).

Keywords: sea cucumber ovum, scopolamine, cognitive discrimination, behavioral experiment

学习和记忆是大脑的重要功能之一。阿尔兹海默病 (Alzheimer disease; AD) 是目前最常见的神经退行性疾病之一。它会让人们的学习和记忆能力退化,理解和表达能力下降,导致痴呆等认知障碍,严重影响人们的工作和生活。《世界阿尔兹海默病 2015 报告》指出,到 2050 年,全球该病患者数量将从 4 680 万增加至 1.315 亿^[1]。AD 最明显的病理学特征为: β -淀粉样蛋白 (β -amyloid; A β)^[2]沉积在神经元细胞周围,最终形成的老年斑和神经元细胞内微管蛋白 (Tau) 过度磷酸化,导致神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles; NFTs)^[3]。二者最终会导致神经细胞的凋亡和突触功能的丧失。但 AD 的发病机制并没有完全被解释清楚,主要有如下几种学说:胆碱能系统障碍^[4]、氧化应激^[5]、免疫和炎症反应^[6]、线粒体功能紊乱^[7]、遗传与基因突变^[8]、脑内钙稳态失调^[9]。基于上述学说开发出了各种治疗药物,如胆碱酶抑制剂他克林^[10]、多奈哌齐^[11]、利斯的明^[12]、NMDA 受体拮抗剂美金刚^[12]、大脑代谢调节剂尼麦角林^[13]、吡拉西坦^[14]、抗炎药吲哚美辛^[15]、萘普生,其他还有一些自由基清除剂和抗氧化剂^[16]等保护神经的药物目前也引起了人们的关注。这些药物在一定程度上缓解了 AD 病情的发展。

海参是一种珍贵的海洋资源,其体内含有蛋白质、不饱和脂肪酸、海参多糖、皂苷、磷脂。目前关于海参改善记忆的研究也有报道。Li 等^[17]研究发现:源自刺参的肽能通过免疫调节和抗氧化作用来改善小鼠在 Y 迷宫和 Morris 水迷宫的表现。Lin 等^[18]也发现:海参酶解后通过超滤纯化得到的多肽产物可抑制小鼠体内脂质过氧化和蛋白质氧化水平,同时还下调了脑部乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的表达。Li 等^[19]对大鼠灌胃 40 mg/kg 海参脑苷脂 27 d 后,大鼠脑

部神经元的损伤和细胞凋亡被明显抑制。海参花属于海参的内脏,主要是海参的卵。目前国内外对海参花的研究鲜见报道。海参加工过程中海参花大多作为加工副产物被丢弃,使海参花含有的活性因子和营养成分不被利用。市场上人们也主要食用海参体壁。这些都造成了较大浪费。成分分析测得:海参花蛋白质质量分数较高,为 (62.08 $\pm$ 0.83)%。其含有的氨基酸种类丰富,有 19 种。其中质量分数最高的是谷氨酸和天冬氨酸,两者是脑内重要的兴奋性神经递质^[20]。海参花还含有不饱和脂肪酸,在抑制炎症反应方面有一定效果。张婕等^[21]研究发现海参花还具有抗氧化作用,小鼠灌胃海参花后,其性腺内的超氧化物歧化酶 (SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 明显升高,脂质过氧化水平明显降低 (MDA)。此外海参花还含有多糖、钒等其他珍贵的活性成分。因此海参花具有很大的开发、应用价值。

常用的记忆损伤模型有:A β 模型^[22]、东莨菪碱模型^[23]、D-半乳糖模型^[24]、转基因模型^[25]、正常衰老模型^[26]和血管性痴呆模型^[27]。本研究选用东莨菪碱模型,相比其他造模方法更加便捷和经济。东莨菪碱是一种毒蕈碱胆碱受体 (M 受体) 拮抗剂。它能够阻滞乙酰胆碱与受体结合,降低脑内乙酰胆碱的含量,从而导致胆碱能功能障碍和认知障碍,使得小鼠学习记忆能力下降。Goverdhan 等^[28]发现对小鼠连续 9 d 腹腔注射 1.4 mg/kg 东莨菪碱后会诱发脑内氧化应激。Demirci 等^[29]发现对大鼠连续 14 d 腹腔注射 1 mg/kg 东莨菪碱后,大鼠脑部和血浆的脂质过氧化水平 (MDA) 以及血浆的肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白介素-1 β (IL-1 β) 和白介素-4 (IL-4) 的水平比空白组均有所升高。此外东莨菪碱还增加了大鼠脑部凋亡基因的表达,如半胱天冬酶-3

(caspase-3), 半胱天冬酶-9(caspase-9)和 DNA 修复酶(poly ADP-ribose polymerase;PARP)。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

70 只 3 周龄 SPF 级雄性 ICR 小鼠: 购自海斯莱克实验动物有限责任公司; 海参花冻干粉: 购自山东好当家海洋发展股份有限公司; 氢溴酸东莨菪碱: 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; 吡拉西坦片: 购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司; 氯化钠注射液: 购自安徽双鹤药业有限责任公司; 动物饲料: 江南大学动物实验中心提供。

1.2 仪器与设备

旷场实验装置、新物体识别装置、Y 迷宫装置、Morris 水迷宫装置、避暗装置: 均由江南大学动物实验中心提供; 行为学分析软件 EthoVision XT: 荷兰 Noldus 公司产品; 分析天平: 梅特勒托利多国际贸易上海有限公司产品; Agilent 1260 高效液相色谱仪: 美国安捷伦公司产品; 气质联用仪四极杆质谱: 美国布鲁克公司产品; 凯氏定氮仪: 上海晟声自动化分析仪器有限公司产品; 超低温冷冻冰箱: 美国 Thermo Scientific 公司产品; 台式离心机: 德国 Eppendorf 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 成分测定 水分测定按照 GB5009.3-2016《食品中水分的测定》第一法直接干燥法; 蛋白质测定按照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》第一法凯氏定氮法; 游离脂肪和总脂肪测定分别按照 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》第一法索氏抽提法和第二法酸水解法; 盐分测定按照 SC/T 3011-2001《水产品中盐分的测定》直接滴定法; 多糖的测定按照苯酚硫酸法^[30]; 灰分测定按照 GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定》第一法食品中总灰分的测定; 氨基酸测定按照 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》; 色氨酸采用 GB/T 18246-2000 碱水解法前处理, 高效液相色谱法测定; 脂肪酸测定按照 GB 5009.168-2016《食品中脂肪酸的测定》完成样品前处理后, 用气质联用仪(GC-MS)测定。

1.3.2 动物分组及模型建立 70 只雄性 SPF 级 ICR 小鼠经过一周自由采食适应性饲养后, 按体质量分为 6 组^[31-32]: 空白组、东莨菪碱模型组、吡拉西坦阳性组、海参花低剂量组、海参花中剂量组和海参花

高剂量组。其中空白组和模型组每组 15 只, 其他组别每组 10 只。空白组和模型组每日灌胃生理盐水, 阳性组按 400 mg/kg 剂量灌胃吡拉西坦。海参花低、中、高 3 个组剂量分别为 75、150、450 mg/kg。灌胃体积为 10 mL/kg。每日灌胃 30 min 后, 除空白组腹腔注射生理盐水, 其他组别均腹腔注射 1 mg/kg 的东莨菪碱, 注射体积为 10 mL/kg。30 d 后进行行为学实验。第 1 天进行旷场实验, 紧接着第 2 天和第 3 天进行新物体识别实验, 休息 5 d 后进行 Y 迷宫实验, 再休息 5 d 后进行 Morris 水迷宫实验, 最后休息 6 d 后进行避暗实验。行为学实验在开始前 1 h 灌胃受试样品, 开始前 30 min 腹腔注射东莨菪碱。整个实验周期中一直给小鼠灌胃受试样品。

1.3.3 行为学实验方法

1) 旷场实验^[33](open filed test)主要用于评价小鼠的自发活动行为和探索行为。旷场装置由一个 40 cm×40 cm×50 cm 的实验箱组成, 上方有红外摄像头追踪小鼠的路径。底部的测试区被分为 16 块 10 cm×10 cm 正方形, 中间 4 块被定义为中心区。每只小鼠从旷场中心点放下, 自由活动 10 min。每次实验结束后用体积分数 75% 的乙醇擦拭实验箱以消除气味的影响。记录小鼠的速度、路程、中心区域的活动时间等指标。

2) 新物体识别实验^[34](object recognition test)是利用啮齿类动物天生喜欢探索新事物的特点建立的一种学习记忆评价方法。它主要分为: 适应期、熟悉期和测试期。每个时期间隔 24 h。在适应期将小鼠放入实验箱内, 自由探索环境 8 min。在熟悉期, 箱内有两个完全相同的圆柱积木(底部直径 4 cm; 高度 10 cm), 积木摆放的位置距两边的墙角分别为 5 cm。小鼠在箱内自由探索 8 min。24 h 后将其中一个圆柱体积木替换为圆锥体积木(底部直径 4 cm; 高度 10 cm), 再次让小鼠自由活动 8 min。小鼠在放入箱内时背对着积木, 从积木对面墙面的中心点放下。每次实验结束后用体积分数 75% 的乙醇擦拭实验箱以消除气味的影响。实验期间由红外摄像头追踪记录小鼠对新、旧物体探索的时间。评价指标用辨别指数(DI)来计算, $DI = (\text{新物体探索时间} - \text{旧物体探索时间}) / \text{总探索时间}$ 。

3) Y 迷宫^[35]主要用于评价啮齿类动物的工作记忆。实验装置由 3 个夹角各呈 120° 的水平臂组成。实验期间任意定义 3 个臂分别为 A、B、C。实验开始

后将小鼠从任意一个臂内放下,红外摄像头记录小鼠进入每个臂的顺序和次数。定义连续进入不同的臂为一次交替(如ABC、BAC、CBA,而不是BAB)。评价Y迷宫的指标为:自发交替=交替数/(进入臂的总次数-2)。每次测试时间为5 min,每次实验结束后用体积分数75%的乙醇擦拭实验箱以消除气味的影响。

4)Morris水迷宫^[36]是评估啮齿类动物空间记忆最经典的方法之一。实验装置由一个直径120 cm,高60 cm的水池组成。水池按照东、南、西、北被分为4个象限。实验期间,水池放入40 cm深的水,并用黑色墨汁染黑。水温维持在(21±1)℃。实验分为:台可见期、定位航行期和空间探索期3个时期。

第1天为平台可见期,平台高出水面1 cm,同时放置一面旗帜以增加可视度。水池的四周贴上不同的标识物,供小鼠参考方向。实验开始后,将小鼠面朝池壁从平台顺时针一边的象限放入,上方红外摄像头追踪小鼠的运动轨迹。测试时间为60 s,小鼠在测试时间内找到平台的时间,即为逃避潜伏期。若超过测试时间,逃避潜伏期则记为60 s。每只小鼠进行4次训练,每次训练更换平台所在的象限位置。

第2天起进行定位航行实验,平台固定在水下1 cm处,且在一个象限内不移动。实验开始后,将小鼠面朝池壁从其中一个象限放入,上方红外摄像头追踪小鼠的运动轨迹。测试时间为60 s,小鼠在测试时间内找到平台的时间,即为逃避潜伏期。若超过测试时间,逃避潜伏期则记为60 s。未找到平台的小鼠需要引导它找到平台并在上面待满15 s。每只小鼠训练4次,每次从不同的象限放入,连续训练5 d。

第7天起进行空间探索实验,将平台从水池撤掉。将小鼠从原先平台所在象限的对角处面朝池壁放入。测试时间为60 s,记录小鼠的速度、潜伏期、路程、穿台次数等指标。

5)避暗实验^[37]又称被动回避实验(passive avoidance),是利用小鼠趋暗避明的特点设计的实验方法。该实验常用于检测条件性恐惧记忆,适合检测小鼠记忆再现过程。装置由一个暗室和一个明室组成,两室中间有一扇小门可通过。底部铺满铜栅,暗室的铜栅可通电,电压为36 V,电流为0.2~0.3 mA。小鼠进入暗室一次则记为犯错一次。实验分为学习

训练期和记忆保持测试期。训练前,先将小鼠放入避暗箱内自由活动3 min以适应环境。

学习阶段:将小鼠背朝暗室放入明室,此时暗室通电,并开始计时。小鼠从明室进入暗室的时间为潜伏期。整个训练期为5 min,记录每只小鼠的第一次潜伏期和整个实验中的犯错次数。

24 h后同一时间段进行记忆保持测试。断开暗室的电流,测试时间为3 min,其他条件与训练期的相同。每次实验结束后,用体积分数75%的乙醇擦拭实验箱以消除气味的影响。

1.4 数据分析

实验结果均表示为($\bar{X} \pm SD$)。采用IBM SPSS Statistics 23.0软件对所有数据进行统计学分析。数据满足正态分布和方差齐次后,采用单因素方差分析(ANOVA)。组间有差异时采用Tukey检验进行组间比较。当数据不满足方差齐次时,通过数据转换来满足齐次。若转换后仍然不满足方差齐次,则采用Tamhane's T^2 检验。组间差异显著水平为 $P < 0.05$,极显著水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果分析

2.1 海参花基本成分组成

由表1可知海参花是一种蛋白质质量分数高、脂肪质量分数低的食物。其蛋白质质量分数高达(62.08±0.83)%。

表1 海参花基本成分组成

Table 1 Components of sea cucumber ovum

成分	质量分数/%
水分	8.89±0.17
蛋白质	62.08±0.83
脂肪	10.07±0.52(游离态脂肪)
	14.13±0.13(总脂肪)
盐分	3.74±0.06
多糖	2.06±0.12
灰分	8.77±0.03

2.2 海参花氨基酸组成

由表2可知,海参花氨基酸种类丰富,其中质量分数较高的是谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)。Glu和Asp是脑部的兴奋性氨基酸,在神经元信息传递中起着重要的作用。此外,有研究表明海参多肽具有抗氧化、降血压、降血糖、抗疲劳、改善记忆等多种功能,而这些功能机制又与多肽的氨基酸组

成、氨基酸序列和空间构象有关^[38-39]。

Rupsingh 等^[40]研究发现 AD 患者脑部的 Glu 含量比正常老年人脑部的含量低，这表明海马体内 Glu 减少可能是 AD 的一种特征。Hosseini 等^[41]研究发现 Arg 可以延长大鼠在避暗实验中的潜伏期并改善机体的氧化应激水平。景洪江等^[42]用添加质量分数 2% Gln 的饲料喂养大鼠 2 周后。大鼠的主动回避反应率显著增加，被动逃避时间缩短，脑中 Glu、Asp、Gln、Arg 含量增加。

表 2 海参花氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of sea cucumber ovum

氨基酸	质量分数/%
Glu	8.4±0.22
Asp	4.68±0.11
Lys	3.86±0.13
Leu	3.47±0.09
Arg	3.29±0.11
Ala	2.94±0.09
Gly	2.85±0.1
Val	2.79±0.08
Thr	2.41±0.08
Ile	2.36±0.06
Phe	2.04±0.06
Pro	1.86±0.04
Ser	1.71±0.1
Tyr	1.34±0.03
Met	1.02±0.05
His	0.86±0.04
Trp	0.46±0.05
Tau	0.31±0.02
Cys	0.16±0.02
总计	46.81

2.3 海参花脂肪酸组成

由表 3 可知,海参花脂肪酸中饱和脂肪酸质量分数约为 30%, 不饱和脂肪酸质量分数约为 70%。脂肪酸占比最多的是棕榈油酸 (palmitoleic acid)。Souza 等^[43]研究发现棕榈油酸可改善小鼠体内的炎症反应,降低炎症因子的基因表达。目前已知 ω-3 脂肪酸可以促进大脑发育,提高人的记忆力。海参花中含有的 ω-3 脂肪酸主要为二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid; EPA)。Kawashima 等^[44]研究发现 EPA 能显著增加神经元和神经胶质细胞内 EPA 含量以及神经胶质细胞内 DHA 的含量。同时

EPA 可以通过调节突触可塑性和激活 PI3-K/Akt 途径来预防神经退行性变。

表 3 海参花脂肪酸组成

Table 3 Fatty acid composition of sea cucumber ovum

脂肪酸	质量分数/%
C14:0	0.34±0.008
C14:1	0.80±0.004
C15:0	2.27±0.002
C16:0	2.54±0.51
C16:1	35.73±0.42
C17:0	1.49±0.05
C18:0	20.18±0.26
C18:1	8.09±0.74
C18:2(ω-6)	1.95±0.76
C18:3(ω-3)	0.35±0.01
C20:0	2.13±0.02
C20:1	7.48±0.14
C20:4(ω-6)	1.57±0.12
C20:5(ω-3)	6.39±0.01
C21:0	0.39±0.06
C22:0	1.02±0.02
C22:1	3.52±0.02
C24:1	3.81±0.27
合计	100
饱和脂肪酸(SFA)	30.36
单不饱和脂肪酸(MUFA)	59.43
多不饱和脂肪酸(PUFA)	10.26
(ω-3)PUFA	6.74

2.4 旷场实验结果

由表 4 可知小鼠在注射东莨菪碱 30 min 后,活动量增加了。其他组别与空白组相比,路程显著增加($P<0.01$),速度显著提高($P<0.01$)。SAHBA 等^[32]的研究也发现,东莨菪碱会增大小鼠的活动量,使小鼠情绪上变得焦虑。东莨菪碱对大脑中枢神经系统有抑制作用,但对呼吸系统有兴奋作用。模型组在中心区域停留的时间比空白组显著降低($P<0.01$),中心区域停留时间的占比显著减少($P<0.01$)。而海参花对此结果有一定改善作用。其中海参花低剂量组与模型组相比,中心区域停留时间显著提高($P<0.05$),中心区域停留时间的占比显著增加($P<0.05$)。而阳性组在旷场实验中效果并不明显,只是有一定改善趋势。如图 1 所示,与空白组相比,模型组的活动轨迹主要集中在旷场周围,自发探索活动大大减少。海参花组的活动轨迹与模型组相比更倾向于中心区

表4 海参花对小鼠自发活动和探索行为的影响

Table 4 Effect of sea cucumber ovum on spontaneous activity and exploration behavior in mice

组别	总路程/cm	速度/(cm/s)	中心区域停留时间/s	中心区域停留时间的占比/%
空白组	2 409.0±590.1	5.04±1.24	61.2±27.38	12.78±5.73
模型组	6 949.4±544.8 ^{###}	14.52±1.14 ^{###}	28±5.75 ^{###}	5.85±1.2 ^{###}
阳性组	6 531.9±716.5	13.66±1.51	39.12±12.48	8.18±2.61
海参花低剂量组	6 294.7±1189.4	13.17±2.49	48.27±13.35*	10.09±2.79*
海参花中剂量组	6 688.2±1394.3	13.98±2.91	44.49±23.56	9.3±4.93
海参花高剂量组	6 454.1±947.3	13.49±1.97	42.42±14.19	8.86±2.96

注: #.与空白组比较差异显著($P<0.05$); ##.与空白组比较差异极显著($P<0.01$); *.与模型组比较差异显著($P<0.05$); **.与模型组比较差异极显著($P<0.01$)。

域。综上所述,海参花能够增加小鼠的探索行为,可能在抗焦虑方面也有一定改善作用。

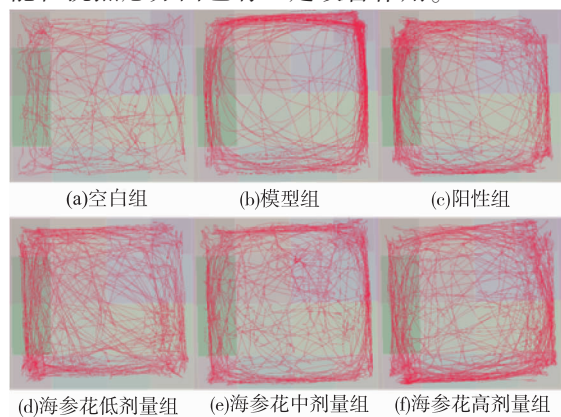


图1 海参花对小鼠轨迹线路的影响

Fig. 1 Effect of sea cucumber ovum on mouse trajectory

2.5 新物体识别实验结果

由表5可知:与空白组相比,模型组的辨别指数显著降低($P<0.01$),这表明东莨菪碱明显降低了小鼠的学习和认知记忆能力。而海参花低剂量组显著提高了辨别指数($P<0.05$),海参花中剂量组和高剂量组也有提高的趋势,但无显著性差异。阳性组也显著提高了小鼠的辨别指数($P<0.05$),略低于海参花低剂量组。综上所述,海参花能改善东莨菪碱造成的小鼠学习能力和认知记忆的损伤。

2.6 Y迷宫实验结果

由表6可知:与空白组相比,模型组自发交替显著降低($P<0.01$)。这表明东莨菪碱会损伤小鼠的工作记忆和参考记忆。海参花低剂量组($P<0.01$)和中剂量组($P<0.05$)显著提高了小鼠的自发交替。阳性组表现最好,也显著提高了小鼠的辨别指数($P<0.01$)。综上所述,海参花能够改善东莨菪碱对小鼠工作记忆和参考记忆的损伤。

表5 海参花对小鼠辨别指数的影响

Table 5 Effect of sea cucumber ovum on mouse discrimination index

组别	辨别指数
空白组	0.48±0.18
模型组	0.18±0.22 ^{###}
阳性组	0.41±0.22*
海参花低剂量组	0.43±0.15*
海参花中剂量组	0.34±0.23
海参花高剂量组	0.3±0.13

注: #.与空白组比较差异显著($P<0.05$); ##.与空白组比较差异极显著($P<0.01$); *.与模型组比较差异显著($P<0.05$); **.与模型组比较差异极显著($P<0.01$)。

表6 海参花对小鼠自发交替的影响

Table 6 Effect of sea cucumber ovum on spontaneous alternation in mice

组别	自发交替
空白组	0.53±0.06
模型组	0.39±0.09 ^{###}
阳性组	0.54±0.11**
海参花低剂量组	0.50±0.07**
海参花中剂量组	0.48±0.05*
海参花高剂量组	0.44±0.07

注: #.与空白组比较差异显著($P<0.05$); ##.与空白组比较差异极显著($P<0.01$); *.与模型组比较差异显著($P<0.05$); **.与模型组比较差异极显著($P<0.01$)。

2.7 Morris水迷宫实验结果

2.7.1 平台可见期实验结果 可见期实验是为了排除小鼠在游泳能力、视觉能力上的差异,这些因素与水迷宫的指标有很大关系。由表7可知:各组小

表 7 平台可见期实验结果

Table 7 Platform visible period experiment results

组别	逃避潜伏期/s	路程/cm	速度/(cm/s)
空白组	21.01±9.35	22.48±2.3	562.76±253.65
模型组	21.5±8.8	23.26±3.75	574.09±321.32
阳性组	22.21±8.03	23.95±1.78	560.17±153.35
海参花低剂量组	22.93±9.27	22.72±1.93	552.06±245.97
海参花中剂量组	20.22±5.29	22.01±2.48	529.15±121.03
海参花高剂量组	19.38±7.65	24.23±2.19	539.21±180.91

鼠在逃避潜伏期、路程、速度上均无显著性差异。说明各组小鼠的视力和游泳能力没有差别。

2.7.2 定位航行实验结果 由表 8 可知:随着训练天数的增加,小鼠找到平台的速度越来越快,逃避潜伏期越来越短。到第五天训练时,与空白组相比,模型组的逃避潜伏期较大,但没有出现显著性差异。海参花组有降低逃避潜伏期的趋势,但无显著性差异。

2.7.3 空间探索实验结果 由表 9 可知:在速度没有显著差异的条件下,模型组的逃避潜伏期比空白组显著增加($P<0.01$),海参花低剂量组($P<0.01$)和高剂量组($P<0.05$)与模型组相比,显著降低了逃避

潜伏期。模型组在平台区域累计时间($P<0.01$)和穿越次数($P<0.01$)也比空白组显著减少。海参花低剂量和高剂量显著增加了小鼠在平台区域的累计时间($P<0.05$)。平台区域穿越次数:海参花低剂量组较模型组显著增加($P<0.05$),海参花中剂量组和高剂量组均有增加的趋势,但无显著性差异。平台穿越次数:模型组比空白组少,海参花组相比模型组有改善趋势,但无显著性差异。阳性组在整个实验中,与模型组相比差别不大,仅有一点改善趋势。结合图 2 能够更加直观地看出上述结果。综上所述,海参花能改善东莨菪碱导致的小鼠空间记忆损伤。

表 8 海参花对小鼠定位航行逃避潜伏期的影响

Table 8 Effect of sea cucumber ovum on training escape latency of mice

组别	逃避潜伏期/s				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
空白组	29.82±11.05	17.32±7.56	16.35±8.14	15.29±8.75	11.31±8.61
模型组	39.9±11.7	35.05±13.52	28.36±14.75	28.96±14.59	28.98±17.74
阳性组	41.53±14.73	33.35±15.66	30.7±15.96	30.62±18.72	24.29±18.9
海参花低剂量组	41.77±9.53	18.36±9.71	18.45±10.73	15.14±7.72	14.21±7.29
海参花中剂量组	38.12±6.26	21.59±11.87	19.64±8.57	19.93±15	18.21±11.33
海参花高剂量组	40.51±14.85	20.73±14.35	18.97±12.09	16.17±5.36	16.99±11.37

表 9 海参花对小鼠在空间探索实验中的影响

Table 9 Effect of sea cucumber ovum on mice in space exploration experiments

组别	速度/(cm/s)	逃避潜伏期/s	平台区域累计时间/s	平台区域穿越次数	平台穿越次数
空白组	28.32±2.34	9.51±6.92	6.58±1.99	13.77±5.06	4.53±2.99
模型组	30.81±2.31	25.08±16.55 ^{###}	3.12±1.35 ^{###}	7.75±4.79 ^{###}	2.5±1.61
阳性组	28.79±2.81	17.87±16.91	3.6±2.06	8.33±3.5	2.75±1.71
海参花低剂量组	28.75±2.43	7.76±4.64 ^{**}	5±1.94 [*]	13±4.9 [*]	4.22±2.3
海参花中剂量组	28.67±2.25	13.74±6.87	5.23±1.91	11.25±4.89	4.14±1.73
海参花高剂量组	28.21±2.81	11.7±7.08 [*]	4.53±1.27 [*]	11.13±4.26	4±2.58

注: #.与空白组比较差异显著($P<0.05$); ##.与空白组比较差异极显著($P<0.01$); *.与模型组比较差异显著($P<0.05$); **.与模型组比较差异极显著($P<0.01$)。

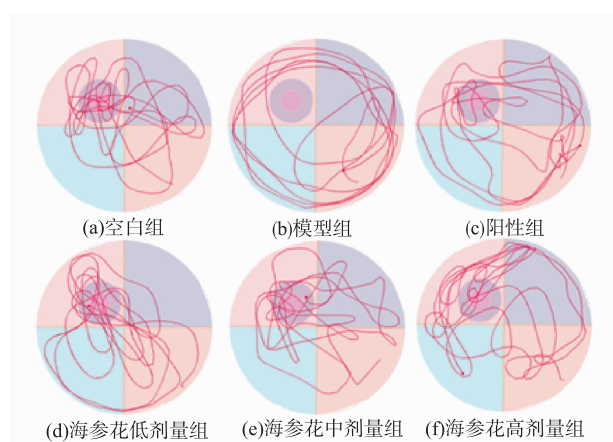


图2 海参花对小鼠空间探索轨迹的影响

Fig. 2 Effect of sea cucumber ovum on trajectory of space exploration in mice

2.8 避暗实验结果

除了上述的行为学实验外,还研究了海参花对小鼠被动回避实验的影响。由表10可知:训练期间,与空白组相比,模型组小鼠进入通电暗室的潜

伏期显著降低($P<0.01$),犯错受电击的次数显著增加($P<0.01$)。与模型组相比,海参花3个剂量组在这两个指标上均有显著改善,其中海参花中剂量组和高剂量组能显著增加小鼠进入通电暗室的潜伏期($P<0.01$),同时显著降低小鼠的错误次数($P<0.01$)。阳性组与模型组相比,潜伏期显著增加($P<0.01$),错误次数显著降低($P<0.01$)。

在测试期,考虑到电击对小鼠的刺激和伤害较大,关闭了暗室的电击。结果表明:模型组比空白组的潜伏期显著减少($P<0.01$),错误次数显著增加($P<0.01$)。而与模型组相比,海参花低剂量组的潜伏期显著增加($P<0.05$),错误次数显著减少($P<0.05$);海参花高剂量组的潜伏期显著增加($P<0.05$);海参花中剂量组错误次数显著减少($P<0.05$)。阳性组的潜伏期增加,错误次数减少,但无显著性差异。综上所述,海参花能提高东莨菪碱诱导的记忆损伤小鼠的被动回避反应能力和恐惧记忆再现能力。

表10 海参花对小鼠在避暗实验中潜伏期和错误次数的影响

Table 10 Effect of sea cucumber ovum on latency and number of errors of mice in step-through task

组别	训练期		测试期	
	潜伏期/s	错误次数	潜伏期/s	错误次数
空白组	12.48±5.23	3±0.65	115.41±56.6	0.8±0.83
模型组	5.02±1.08 ^{##}	6.4±1.02 ^{##}	26.71±27.48 ^{##}	2.86±0.99 ^{##}
阳性组	7.17±2.07 ^{##}	4.89±1.1 ^{##}	62.52±51.17	2.33±1.25
海参花低剂量组	6.17±1.81 [*]	4.44±0.96 ^{**}	78.98±32.93 [*]	1.3±0.64 [*]
海参花中剂量组	7.63±2.97 ^{**}	3.56±0.83 ^{**}	87.79±59.38	1.2±0.75 [*]
海参花高剂量组	8.26±2.18 ^{**}	4.13±0.93 ^{**}	68.59±23.5 [*]	1.7±0.78

注: #, 与空白组比较差异显著($P<0.05$); ##, 与空白组比较差异极显著($P<0.01$); *, 与模型组比较差异显著($P<0.05$); **, 与模型组比较差异极显著($P<0.01$)。

3 结 语

作者对海参花的主要成分进行了分析测定,结果表明:海参花是一种蛋白质质量分数高、脂肪质量分数低的食物。海参花含有不饱和脂肪酸和多糖,且氨基酸种类丰富,可作为蛋白质来源。本研究利用东莨菪碱建立小鼠记忆障碍模型来评估海参花改善小鼠学习和记忆的功效。结果表明:海参花在旷场实验中能增加模型组在中心区域的探索行为;在新物体识别实验中能改善模型组的学习能力

和认知记忆;在Y迷宫中能改善模型组的工作记忆和参考记忆;在Morris水迷宫中能改善模型组的空间记忆;在避暗实验中能改善小鼠的被动回避反应能力和恐惧记忆再现能力。海参花对小鼠学习和记忆的改善效果并未随海参花剂量的增大而增强,综合效果最好的是海参花低剂量组,原因有待在后续的实验中进一步探讨。综上所述,本研究证明海参花在改善学习和记忆方面具有一定功效,为海参花进一步开发利用提供了一些理论依据。同时能够给海参养殖业带来良好的经济效益。

参考文献:

- [1] PRINCE M, WIMO A, GUERCHET M, et al. World Alzheimer Report 2015 - the Global Impact of Dementia: an Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends[M]. London: Alzheimer's Disease International, 2015.
- [2] CHEN Y, FU A K Y, IP N Y. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies[J]. **Pharmacology & Therapeutics**, 2019, 19: 186-198.
- [3] ISING C, VENEGAS C, ZHANG S, et al. NLRP₃ inflammasome activation drives tau pathology[J]. **Nature**, 2019, 575 (7784): 669-673.
- [4] FERREIRA-VIEIRATH, GUIMARAESIM, SILVAFR, et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system[J]. **Current Neuropharmacology**, 2016, 14(1): 101-115.
- [5] HUANG W J, ZHANG X, CHEN W W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. **Biomedical Reports**, 2016, 4(5): 519-522.
- [6] HENEKA M T, CARSON M J, KHOURY J E, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. **The Lancet Neurology**, 2015, 14(4): 388-405.
- [7] ONYANGO I G, DENNIS J, KHAN S M. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease and the rationale for bioenergetics based therapies[J]. **Aging and Disease**, 2016, 7(2): 201-214.
- [8] SANCHEZ-MUT J V, HEYN H, SILVA B A, et al. PM20D1 is a quantitative trait locus associated with Alzheimer's disease[J]. **Nature Medicine**, 2018, 24(5): 598-603.
- [9] MAGI S, CASTALDO P, MACR, et al. Intracellular calcium dysregulation: implications for Alzheimer's disease[J]. **Bio Med Research International**, 2016, 2016, 6701324.
- [10] SAMEEM B, SAEEDI M, MAHDAVI M, et al. A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease[J]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017, 128: 332-345.
- [11] YOO J H, VALDOVINOS M G, WILLIAMS D C. Relevance of donepezil in enhancing learning and memory in special populations: a review of the literature[J]. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, 2007, 37(10): 1883-1901.
- [12] KUMAR A, SINGH A, EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update [J]. **Pharmacological Reports**, 2015, 67(2): 195-203.
- [13] ZANG G, FANG L, CHEN L, et al. Ameliorative effect of nicergoline on cognitive function through the PI3K/AKT signaling pathway in mouse models of Alzheimer's disease[J]. **Molecular Medicine Reports**, 2018, 17(5): 7293-7300.
- [14] MALYKH A G, SADAIE M R. Piracetam and piracetam-like drugs from basic science to novel clinical applications to CNS disorders[J]. **Drugs**, 2010, 70(3): 287-312.
- [15] ROGERS J, KIRBY L C, HEMPELMAN S R, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease[J]. **Neurology**, 1993, 43(8): 1609-1611.
- [16] WOJTUNIK-KULESZA K A, ONISZCZUK A, ONISZCZUK T, et al. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease[J]. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2016, 78: 39-49.
- [17] LI Y, SHANG J, JIANG Z, et al. Regulation mechanism of peptides derived from sea cucumber (*Apostichopus japonicas*) for modulation of learning and memory[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2016, 25(1): 241-246.
- [18] LIN L, YANG K, ZHENG L, et al. Anti-aging effect of sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) hydrolysate on fruit flies and d-galactose-induced aging mice[J]. **Journal of Functional Foods**, 2018, 47: 11-18.
- [19] LI Q, CHE H X, WANG C C, et al. Cerebrosides from sea cucumber improved A β 1-42-induced cognitive deficiency in a rat model of Alzheimer's disease[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2019, 63(5): e1800707.
- [20] EL-NAGGAR T, CARRETERO M E, ARCE C, et al. Methanol extract of *Nigella sativa* seed induces changes in the levels of neurotransmitter amino acids in male rat brain regions[J]. **Pharmaceutical Biology**, 2017, 55(1): 1415-1422.
- [21] 张婕, 刘坤, 高华, 等. 海参花醇提取物对卵巢早衰小鼠生殖系统的作用研究[J]. **中国海洋药物**, 2014, 33(2): 69-73.
- [22] WU L, FENG X, LI T, et al. Risperidone ameliorated A β 1-42-induced cognitive and hippocampal synaptic impairments in mice [J]. **Behavioural Brain Research**, 2017, 322: 145-156.
- [23] RAHNAMA S, RABIEI Z, ALIBABAEI Z, et al. Anti-amnesic activity of *Citrus aurantium* flowers extract against scopolamine-induced memory impairments in rats[J]. **Neurological Sciences**, 2015, 36(4): 553-560.

- [24] REHMAN S U, SHAH S A, ALI T, et al. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats[J]. **Molecular Neurobiology**, 2017, 54(1): 255-271.
- [25] LAI A Y, DORR A, THOMASON L A M, et al. Venular degeneration leads to vascular dysfunction in a transgenic model of Alzheimer's disease[J]. **Brain**, 2015, 138(4): 1046-1058.
- [26] NEUNER S M, WILMOTT L A, HOFFMANN B R, et al. Hippocampal proteomics defines pathways associated with memory decline and resilience in normal aging and Alzheimer's disease mouse models [J]. **Behavioural Brain Research**, 2017, 322: 288-298.
- [27] SAGGU R, SCHUMACHER T, GERICH F, et al. Astroglial NF- κ B contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia[J]. **Acta Neuropathologica Communications**, 2016, 4(1): 76.
- [28] GOVERDHAN P, SRAVANTHI A, MAMATHA T. Neuroprotective effects of meloxicam and selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress[J]. **International Journal of Alzheimers Disease**, 2012, 2012: 974013.
- [29] DEMIRCI K, NAZIROGLU M, ÖVEY I S, et al. Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia[J]. **Metabolic Brain Disease**, 2017, 32(2): 321-329.
- [30] 宋思媛, 李美琪, 王泽旭, 等. 海参多糖对小鼠肠道菌群紊乱的恢复作用[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(9): 1023-1026.
- [31] LI W, ZHAO T, ZHANG J, et al. Effect of walnut protein hydrolysate on scopolamine-induced learning and memory deficits in mice[J]. **Journal of Food Science and Technology**, 2017, 54(10): 3102-3110.
- [32] SUI Z, QI C, HUANG Y, et al. Aqueous extracts from asparagus stems prevent memory impairments in scopolamine-treated mice [J]. **Food & Function**, 2017, 8(4): 1460-1467.
- [33] JAFARIAN S, LING K-H, HASSAN Z, et al. Effect of zerumbone on scopolamine-induced memory impairment and anxiety-like behaviours in rats[J]. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, 2019, 5: 637-643.
- [34] CHEN H, XIANG S, HUANG L, et al. Tacrine (10)-huprydone, a dual-binding acetylcholinesterase inhibitor, potently attenuates scopolamine-induced impairments of cognition in mice[J]. **Metabolic Brain Disease**, 2018, 33(4): 1131-1139.
- [35] GARABADU D, SHARMA M. Eugenol attenuates scopolamine-induced hippocampal cholinergic, glutamatergic, and mitochondrial toxicity in experimental rats[J]. **Neurotoxicity Research**, 2019, 35(4): 848-859.
- [36] XU Y, YANG Y, SUN J, et al. Dietary methionine restriction ameliorates the impairment of learning and memory function induced by obesity in mice[J]. **Food & Function**, 2019, 10(3): 1411-1425.
- [37] MOOSAVI M, SOUKHAKLARI R, MOEZI L, et al. Scopolamine-induced passive avoidance memory retrieval deficit is accompanied with hippocampal MMP2, MMP-9 and MAPKs alteration [J]. **European Journal of Pharmacology**, 2018, 819: 248-253.
- [38] LI Y, SHANG J, JIANG Z, et al. Regulation mechanism of peptides derived from sea cucumber (*Apostichopus japonicas*) for modulation of learning and memory[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2016, 25(1): 241-246.
- [39] LIN L, YANG K, ZHENG L, et al. Anti-aging effect of sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) hydrolysate on fruit flies and D-galactose-induced aging mice[J]. **Journal of Functional Foods**, 2018, 47: 11-18.
- [40] RUPSINGH R, BORRIE M, SMITH M, et al. Reduced hippocampal glutamate in Alzheimer disease[J]. **Neurobiology of Aging**, 2011, 32(5): 802-810.
- [41] HOSSEINI M, ANAEIGOUDARI A, BEHESHTI F, et al. Protective effect against brain tissues oxidative damage as a possible mechanism for beneficial effects of L-arginine on lipopolysaccharide induced memory impairment in rats[J]. **Drug and Chemical Toxicology**, 2018, 41(2): 175-181.
- [42] 景洪江, 程义勇, 李树田, 等. 谷氨酸和谷氨酰胺对大鼠学习记忆的影响[J]. 卫生研究, 2000, 29(1): 40-42.
- [43] SOUZA C O, TEIXEIRA A A S, BIONDO L A, et al. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NF- κ B, independently of PPARs[J]. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2017, 44(5): 566-575.
- [44] KAWASHIMA A, HARADA T, KAMI H, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signaling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells[J]. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2010, 21(4): 268-277.