

花色苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠认知功能的保护作用

王 潇, 房子舒, 李媛媛, 胡小松, 张 燕*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 国家果蔬加工工程技术研究中心

北京食品营养与人类健康高精尖创新中心 北京 100083)

摘要 通过构建 *D*-半乳糖致衰老小鼠模型,研究不同剂量的蓝莓和紫甘蓝花色苷对小鼠体重、运动探索、认知记忆等方面的改善作用。结果表明:120 mg/(kg·d)剂量的蓝莓花色苷和 60 mg/(kg·d)剂量的紫甘蓝花色苷均可显著改善衰老小鼠的学习记忆能力,并显著提高衰老小鼠血清和脑中的 SOD、GSH-Px 活性($P<0.05$),抑制脂褐素的生成,具有良好的抗衰老效果。

关键词 花色苷; 抗衰老; 认知功能

文章编号 1009-7848(2023)03-0168-09 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2023.03.018

随着年龄的增加,机体在形态、结构和功能等方面发生不可逆转的各种渐进性退行性变化,是所有生物的共同特征。衰老是生物生命进程的必然规律,它是一个组织和器官功能逐渐丧失的过程^[1]。许多研究表明氧化应激与衰老有关,氧化应激对大脑皮层和海马区 DNA 造成损伤,最终导致神经元细胞衰老死亡^[2]。抑制氧化应激引起的神经损伤,可能是治疗或预防衰老和神经退行性疾病的潜在策略。研究表明,膳食果蔬中丰富的花色苷成分,对改善认知功能和记忆表现有保护作用,且可预防神经退行性疾病,如阿尔茨海默病和帕金森病^[3-4]。花色苷通过抑制海马体白细胞介素(Int-leukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)和核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的表达以及 NO 的生成来减轻神经炎症,或者通过胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)活化环磷酸腺苷反应元件,结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB),实现对神经信号的调节作用^[5-8]。

目前,有研究证实蓝莓具有改善脑功能障碍的作用。Rutledge 等^[9]发现蓝莓冻干粉可以改善老年人认知能力;Krikorian 等^[10]表明蓝莓汁可显著改善老龄化脑功能下降;Strömberg 等^[11]证实含蓝莓的饲料可增强大鼠多巴神经细胞的恢复及小神

经胶质细胞的活化;Wang 等^[12]证明蓝莓可降低大鼠脑动脉脑缺血引起的神经细胞凋亡及梗塞。Ramirez 等^[13]用冷冻干燥的蓝莓粉饲喂成年大鼠 30 d,发现其对短期记忆失常有改善作用。蓝莓果实对抗神经认知减退的研究较为常见,而其有效成分花色苷的作用却鲜有报道。

蓝莓中花色苷种类丰富,单糖率高,酰基化低,抗氧化能力强,其生理活性一直是国内外学者的研究热点,而紫甘蓝花色苷种类单一,单糖率低,酰基化高,仅有少数文献报道其在抗炎、抗氧化、降血脂等方面的作用^[14-16],未见二者在抗衰老方面的比较研究。*D*-半乳糖致衰老小鼠具有简单操作、效果明显等特点。本试验采用 *D*-半乳糖致衰老小鼠模型,比较蓝莓和紫甘蓝花色苷在抗衰老方面的作用,以期丰富人类健康膳食提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

SPF 级雄性 BLAB/c 近交系小鼠,6 周龄,体重 18~20 g,120 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号 SCXK(京)2012-0001。动物经 7 d 适应性饲养,自由饮水饮食,室温(22 \pm 1) $^{\circ}$ C,湿度(40 \pm 10)%,光照周期 12/12 h。

蓝莓花色苷冻干粉(以下简称花色苷 A)、紫甘蓝花色苷冻干粉(以下简称花色苷 B)由实验室工作人员自行提取、纯化。避光、真空保存于-80 $^{\circ}$ C

收稿日期: 2022-03-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571844)

第一作者: 王潇,女,博士生

通信作者: 张燕 E-mail: zhangyan348@163.com

冰箱内,备用。

1.2 主要试剂

Amberlite XAD-7 树脂、D-半乳糖, Sigma-Aldrich 公司; 色谱级乙醇、盐酸, 国药试剂有限公司; 考马斯亮蓝、GSH-PX 谷胱甘肽-过氧化物酶试剂盒、SOD 过氧化物酶试剂盒、MDA 丙二醛试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.3 试验仪器与设备

KC-junior 酶标仪, 美国 Bio-TEK 公司; UV-762 紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; MT-200 Morris 水迷宫分析仪, 成都泰盟科技有限公司; LGJ-10 型冷冻干燥机, 军事医学科学院实验仪器厂; FT-01B 型溶剂过滤器, 北京友仪四方科技发展有限公司; JHBE-50 型闪式提取仪, 河南金鼎科技发展有限公司; SENCQR-501 型旋转蒸发仪, 北京申顺生物科技有限公司; CR21GIII 低温高速离心机, 日本日立公司。

1.4 试验方法

1.4.1 花色苷提取和纯化 花色苷的提取参照文献[17]并稍作改动。新鲜蓝莓、紫甘蓝置于烧杯中, 按料液比为 1:4(g/mL) 加入体积分数为 70% 的乙醇溶液 (pH=3) 混合打浆。取果浆乙醇混合液, 采用闪式提取法, 在冰水浴、电压 60 V 条件下避光提取 3 min。将提取液在 4 ℃、8 000 r/min 条件下离心 10 min 后, 用 4 层纱布过滤得花色苷浓缩样品。将浓缩样品稀释 1 倍后, Amberlite XAD-7 树脂柱纯化并于 39 ℃ 避光旋蒸, 收集组分冷冻干燥, 即样本冻干粉, 于 -80 ℃ 保存备用。

1.4.2 实验动物饲养及分组 经适应性饲养 7 d 后, 120 只小鼠随机分为 8 组, 每组 15 只, 分别为对照组、模型组、花色苷 A 低、中、高剂量组 (A1、A2、A3)、花色苷 B 低、中、高剂量组 (B1、B2、B3)。模型组和各干预组小鼠均在背部皮下注射 120 mg/(kg·d) D-半乳糖, 对照组注射等体积生理盐水。造模第 2 周同时给予受试样品, 花色苷 A1、A2、A3 组灌胃剂量分别为 20、60 和 120 mg/(kg·d), 花色苷 B1、B2、B3 组灌胃剂量分别为 20、60 和 120 mg/(kg·d), 对照组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。造模及灌胃给药持续 5 周^[18], 给药体积 0.2 mL/10 g 体重。

1.4.3 行为实验测试

1.4.3.1 跳台实验 给药 5 周后进行跳台训练, 分为训练期和测试期。将实验小鼠放入跳台测试仪中适应 3 min, 当启动通电 (50 V/50 Hz 交流电) 后, 小鼠受到底部通电铜栅电击刺激, 正常反应是跳上绝缘平台以避免伤害性刺激。训练时, 若有小鼠始终没有跳上平台则舍弃。记录小鼠受电击第 1 次跳下平台的时间, 即潜伏期, 观察小鼠在 3 min 内跳下平台的次数, 即错误次数。潜伏期越长, 错误次数越少, 表示小鼠在第 1 次跳下平台前的时间越长, 错误越少, 小鼠的记忆能力越好。训练完成后, 小鼠正常进食。

1.4.3.2 水迷宫实验 动物都有一种探索和更替倾向, 当离开一个臂时, 总是跑向久未跑过的新臂, 小鼠不愿在水中, 因而寻找能爬出水的阶梯。小鼠在训练后能记住并找到阶梯的路线。末次给药次日开始训练, 训练期间继续给药, 迷宫水深 9 cm, 水温 20 ℃, 训练时间 120 s, 120 s 未到达终点的小鼠记为 120 s, 试验分阶段进行, 视动物学习成绩逐步加长路程。第 1 次训练时用挡板在岔路口 1 挡死, 从红色处开始训练记录到达终点时间, 见图 1 中 A 迷宫示意图。第 2 次加长路程在岔路口 2 挡死, 训练 2 次, 时间间隔 24 h, 分别记录小鼠到达终点所需时间和发生错误次数 (进入任一盲端计 1 次错误), 见图 1 中 B 迷宫示意图。第 3 次训练水迷宫全程, 见图 1 中 C 迷宫示意图, 记录到达终点时间和错误次数。每次训练, 2 min 未到达终点的小鼠引导其到达终点, 爬上阶梯, 达到训练目的。3 次路径如图 1 所示 (黄色三角为迷宫终点, 红色三角为小鼠起点, 红色虚线为迷宫挡板位置)。

1.4.4 组织采集及处理 在小鼠饲养过程中, 每 5 d 称量 1 次体重。饲养 45 d 后, 小鼠禁食禁水 12 h, 称量体重, 摘眼球取血, 所采集血液于 4 ℃ 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 分装, 冻存于 -80 ℃。

取血后颈椎脱臼法处死动物, 分离脑组织等器官, 生理盐水洗净, 滤纸吸干并称重。取脑组织放入其 9 倍体积的生理盐水, 使用玻璃匀浆器在冰水浴中匀浆, 将匀浆液于 4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液检测。

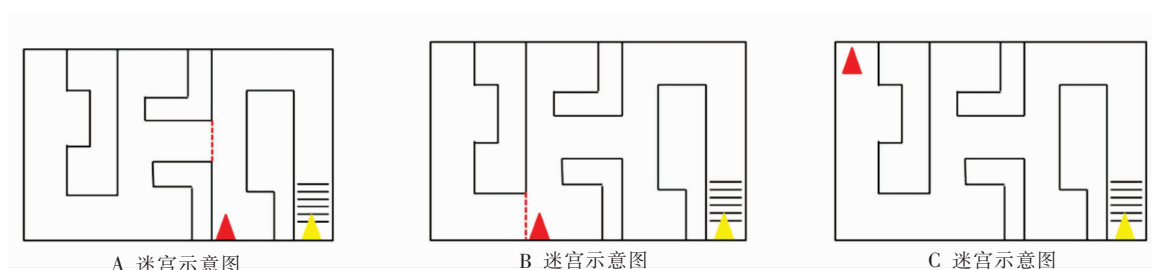


图1 3种水迷宫示意图

Fig.1 The schematic diagrams of three kinds of water maze

1.4.5 生化指标检测 按照试剂盒说明书,分别检测血清和脑中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)及脑组织中脂褐素含量。

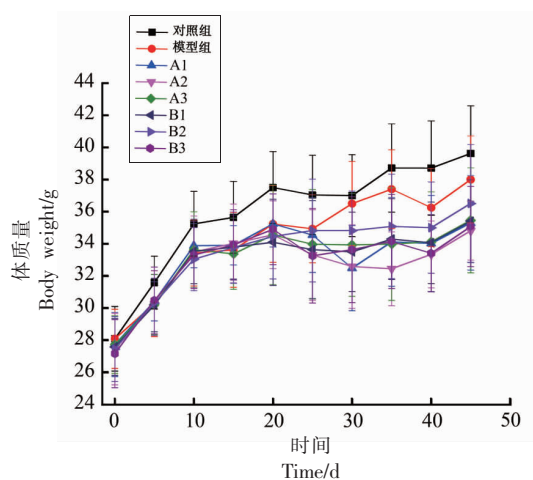
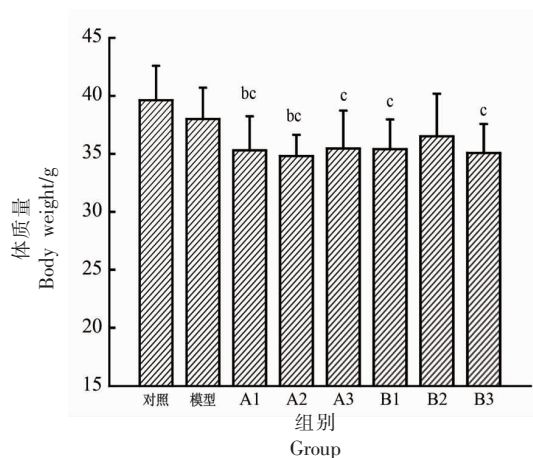
1.4.6 数据统计与分析 每个试验至少重复3次,采用SPSS Statistics 23.0单因素方差分析(ANOVA)模块进行差异显著性检验, $P<0.05$ 时,差异显著。采用Origin 9.0 (Microcal Software, Inc., 美国 Northampton)统计数据并制图。

2 结果与讨论

2.1 不同花色苷对小鼠体质量的影响

由图2可知,各组小鼠的体质量随时间的延长而增加。然而,从第5天起,模型组和各干预组体质量逐渐低于对照组。其中,蓝莓中剂量组在25~35 d时体质量逐渐下降;紫甘蓝低剂量组体质量在此期间出现波动。

饲养结束,对各组小鼠体质量绘制柱形图(图3)进行分析。模型组和对照组小鼠体质量间无差异,而蓝莓花色苷低、中剂量组(A1和A2)的体质量显著低于对照组和模型组($P<0.05$)。蓝莓花色苷高剂量组(A3)、紫甘蓝花色苷低剂量组(B1)和高剂量组(B3)小鼠的体质量显著低于对照组($P<0.05$)。这表明两种花色苷可能具有减重作用。从数值上来看,蓝莓花色苷剂量为20 mg/(kg·d)时小鼠体质量明显下降,且以60 mg/(kg·d)剂量减重效果最好。紫甘蓝花色苷中剂量组因个体差异较大而无法做出统计学差异,推断从20 mg/(kg·d)剂量开始,紫甘蓝花色苷对小鼠可能存在减重作用,且以120 mg/(kg·d)剂量的效果最好。有研究表明蓝莓花色苷提取物可显著抑制高脂饮食小鼠体重增加^[19-20],与本研究结果一致,这可能与花色苷调节脂肪细胞因子表达方式有关^[21]。

图2 不同花色苷对D-半乳糖致衰老小鼠体质量变化的影响($n=15$)Fig.2 Effects of different anthocyanins on the changes of body weight in aging mice induced by D-galactose ($n=15$)

注:a. 对照组与模型组有显著性差异($P<0.05$); b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异($P<0.05$); c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

图3 不同花色苷对D-半乳糖致衰老小鼠体质量的影响($n=15$)Fig.3 Effects of different anthocyanins on body weight of D-galactose-induced aging mice ($n=15$)

2.2 跳台实验结果分析

各组小鼠跳台实验结果见表 1。对照组的潜伏时间显著高于模型组 ($P<0.05$),紫甘蓝花色苷中剂量组的潜伏时间明显高于对照组和模型组 ($P<0.05$),其它各组间没有显著性差异。*D*-半乳糖

衰老模型小鼠的记忆能力严重损伤,较正常小鼠严重下降,说明试验造模成功。同时发现,60 mg/(kg·d)的中剂量紫甘蓝花色苷可明显修复记忆损伤,甚至远超正常水平,有效提高了小鼠的记忆能力,而跳下平台率有所下降。

表 1 不同花色苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠在跳台中学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)
Table 1 Effects of different anthocyanins on learning and memory abilities of *D*-galactose-induced aging mice during jumping experiment($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	潜伏时间/s	错误次数(n)	跳下平台率/%
对照	66.87 \pm 6.16 ^a	2.07 \pm 0.50 ^a	76.6
模型	51.87 \pm 23.20	2.80 \pm 0.88	86.6
A ₁	66.20 \pm 34.83	2.80 \pm 1.76	80.0
A ₂	83.40 \pm 42.64	1.80 \pm 1.41	66.6
A ₃	84.93 \pm 49.93	1.87 \pm 1.34	73.3
B ₁	85.73 \pm 52.21	1.87 \pm 1.44	80.0
B ₂	115.13 \pm 39.21 ^{bc}	1.07 \pm 1.01 ^{bc}	53.3
B ₃	80.40 \pm 39.04	1.87 \pm 1.46	73.3

注:a. 对照组与模型组有显著性差异($P<0.05$); b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异($P<0.05$); c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 水迷宫实验结果分析

2.3.1 小鼠在 A 迷宫测试 对各组小鼠进行 A 水迷宫的测试,各组小鼠到达时间和到达率均无显著性差异。采用更复杂的 B 迷宫来对其进行测定。

2.3.2 小鼠在 B 迷宫测试 第 1 次为训练后立即测试,小鼠到达时间和错误次数代表小鼠的学习能力。第 2 次为训练过后 1 天测试,到达时间和错误次数代表小鼠的记忆能力,结果见表 2。

在针对小鼠学习能力的第 1 次测试中,各组到达时间无统计学显著性差异;在错误次数上,模型组和对照组小鼠因个体差异较大而无统计学差异。同时,蓝莓花色苷中、高剂量以及紫甘蓝中剂量组的小鼠 B 迷宫错误次数均显著低于模型组 ($P<0.05$)。到达率实验表明,蓝莓花色苷组到达率均在 80%以上,其中高剂量组达到 100%;紫甘蓝花色苷各组的到达率均大于等于模型组,其中,以紫甘蓝中剂量组最高。中高剂量的蓝莓花色苷和中剂量的紫甘蓝花色苷可能在一定程度上对衰老小鼠的学习能力有帮助,对其认知功能有一定程度的改善作用。

在针对小鼠记忆能力的第 2 次测试中,对照组的到达时间和错误次数均明显低于模型组 ($P<0.05$),表明衰老模型小鼠的学习记忆能力显著下降。蓝莓花色苷高剂量组和紫甘蓝花色苷中剂量组的到达时间和错误次数明显少于模型组 ($P<0.05$)。120 mg/(kg·d)剂量的蓝莓花色苷和 60 mg/(kg·d)的紫甘蓝花色苷对小鼠的记忆能力和认知功能具有明显的改善作用。因紫甘蓝花色苷有效剂量较低,故对 *D*-半乳糖致衰老小鼠记忆的改善效果好于蓝莓花色苷。

2.3.3 小鼠在 C 迷宫测试 各组小鼠记忆能力比较结果见表 3。到达时间结果表明,对照组的到达时间明显低于模型组 ($P<0.05$),然而其它受试组和模型组间的到达时间无显著性差异。错误次数结果表明,蓝莓高剂量组和紫甘蓝低剂量组的错误次数显著低于模型组 ($P<0.05$),说明这两个组对衰老小鼠在水迷宫 C 的学习记忆方面有改善作用。模型组的到达率小于对照组,蓝莓组的到达率随剂量的增加而不断增高,紫甘蓝组的到达率没有显著变化,可能是因水迷宫 C 距离较长、复杂程度较高。

表2 不同花色苷对D-半乳糖致衰老小鼠在B型水迷宫中学习记忆能力的影响($\bar{X} \pm s$, $n=15$)

Table 2 Effects of different anthocyanins on the learning and memory ability of D-galactose-induced aging mice in B-type water maze($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	第1次			第2次		
	到达时间/s	错误次数(n)	到达率/%	到达时间/s	错误次数(n)	到达率/%
对照	58.10 ± 13.48	5.10 ± 1.50	100.0	23.30 ± 3.56 ^a	2.20 ± 0.70 ^a	100.0
模型	66.60 ± 16.04	6.80 ± 2.00	73.3	37.70 ± 9.70	4.80 ± 1.60	93.3
A ₁	53.20 ± 20.64	5.80 ± 2.40	80.0	38.30 ± 5.84	4.60 ± 1.70	93.3
A ₂	60.90 ± 14.10	4.50 ± 1.30 ^b	80.0	33.30 ± 14.30	3.60 ± 1.20	80.0
A ₃	48.20 ± 16.24	4.20 ± 2.00 ^b	100.0	23.70 ± 6.30 ^b	2.60 ± 1.70 ^b	86.7
B ₁	62.60 ± 26.08	4.70 ± 1.80	73.3	38.60 ± 13.48	3.30 ± 1.00	100.0
B ₂	49.60 ± 11.80	4.40 ± 1.20 ^b	86.6	21.70 ± 4.24 ^b	1.80 ± 0.80 ^b	100.0
B ₃	63.30 ± 19.90	5.70 ± 2.10	80.0	30.20 ± 17.84	2.80 ± 2.00	93.3

注:a. 对照组与模型组有显著性差异($P<0.05$); b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异($P<0.05$); c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

表3 不同花色苷对D-半乳糖致衰老小鼠在C型水迷宫中学习记忆能力的影响($\bar{X} \pm s$, $n=15$)

Table 3 Effects of different anthocyanins on the learning and memory ability of D-galactose-induced aging mice in C-type water maze($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	到达时间/s	错误次数(n)	到达率/%
对照	31.80 ± 4.02 ^a	5.40 ± 3.00	93.3
模型	39.70 ± 8.52	5.30 ± 2.00	86.6
A ₁	40.90 ± 10.46	5.50 ± 3.20	86.6
A ₂	39.90 ± 8.90	4.30 ± 1.40	93.3
A ₃	31.30 ± 7.90	2.50 ± 0.90 ^b	100.0
B ₁	38.80 ± 21.12	3.00 ± 1.20 ^b	73.3
B ₂	35.60 ± 8.60	5.20 ± 1.90	73.3
B ₃	41.00 ± 9.40	4.90 ± 1.70	73.3

注:a. 对照组与模型组有显著性差异($P<0.05$); b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异($P<0.05$); c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

综上所述,水迷宫B的难易程度适中,可有效评价花色苷能否改善衰老小鼠的学习记忆能力。水迷宫B测试中,衰老小鼠模型组的到达时间和错误次数均明显低于正常组。同时,120 mg/(kg·d)的蓝莓花色苷高剂量组和60 mg/(kg·d)的紫甘蓝花色苷中剂量组对衰老小鼠的学习记忆能力有很明显的改善作用。结合跳台实验结果,紫甘蓝花色苷的有效剂量低于蓝莓花色苷,说明其在改善衰老小鼠认知方面优于蓝莓花色苷。

2.4 不同花色苷对小鼠血清和脑中SOD、GSH-Px活力、MDA含量的影响

如表4所示,模型组小鼠的血清SOD活性较

对照组显著降低($P<0.05$),蓝莓花色苷组的低、中、高剂量组的血清SOD活性均显著高于模型组($P<0.05$)。脑SOD活性以蓝莓花色苷中、高剂量组提高更为显著($P<0.05$),且高剂量组血清和脑均显著高于模型组和对照组($P<0.05$)。蓝莓花色苷组的SOD活性呈现剂量依赖趋势。紫甘蓝花色苷低、中、高剂量组的血清SOD活性显著高于模型组和对照组($P<0.05$),中、高剂量组在脑中的SOD活性显著高于模型和对照组($P<0.05$)。紫甘蓝组SOD活性平均值远高于蓝莓组,且以中剂量组的SOD活性为最高,此结果与行为学实验吻合。综上,蓝莓和紫甘蓝花色苷均能明显地提高血清和

脑中的 SOD 活性,具有明显的抗衰老作用;而紫甘蓝组效果更明显,且剂量较低仅为 60 mg/(kg·d)。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是一种重要的自由基清除酶,能特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,抑制烟酰胺腺嘌呤二核苷酸形成羟自由基,以保护脂质不受氧自由基作用而发生过氧化,具有保护细胞膜结构和功能完整的作用^[22]。GSH-Px 活性可反映小鼠的衰老情况,如表 5 所示,模型组小鼠的血清 GSH-Px 活性较对照组显著降低($P<0.05$),而脑中无显著变化。蓝莓低、中、高剂量组的脑中 GSH-Px 活性均显著高于模型组($P<0.05$),血清中以中、高剂量组提高更为显著($P<0.05$),蓝莓高剂量组的 GSH-Px 活性在血清和脑中都显著高于模型组和对照组($P<0.05$),且各组数据间呈较强的正相关关系。紫甘蓝花色苷的低、中、高 3 个剂量组的血清和脑中的 GSH-Px 活性均显著高于模型组和对照组($P<0.05$)。蓝莓组结果与前人^[23-24]研究结论相同,而紫甘蓝未见报道。紫甘蓝 GSH-Px 活性平均值远高于蓝莓组,在血清和脑中均以中剂量的 GSH-Px 活性为最高,这与行为学实验吻合。此结果说明蓝莓和紫甘蓝花色苷均能明显提高衰老小鼠的 GSH-Px 活性,对模型小鼠有明显的抗衰老作用,且紫甘蓝花色苷的效果更明显。

丙二醛(MDA)作为脂质氧化产物,会引起蛋白质、核酸等大分子交联聚合,具有细胞毒性^[25]。如表 6 所示,对照组小鼠的 MDA 含量高于模型组小鼠,脑中 MDA 无显著性差异,而血清中 MDA 含量有显著性差异。蓝莓低剂量组和紫甘蓝各组均显著低于对照组($P<0.05$),与模型组无显著性差异($P>0.05$)。MDA 含量可反映脂质过氧化速率,也可间接反映组织过氧化损伤程度,是评价衰老的重要指标。结果表明,模型组小鼠的 MDA 显著下降,氧化损伤程度较低,与前人结果不同^[24-25]。

2.5 花色苷提取物对小鼠脑中脂褐素含量的影响

脂褐质的沉积是衰老的一种标志。脑中脂褐素的变化可有效反映机体的衰老情况^[26]。如表 7 所示,模型组小鼠的脑中脂褐素水平较对照组无统计学差异($P>0.05$),蓝莓高剂量组的脑中脂褐素水平较对照组显著降低($P<0.05$)。紫甘蓝低剂

表 4 花色苷粗提物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠血清和脑中 SOD 含量的影响($\bar{X} \pm S$, $n=15$)

Table 4 Effects of different anthocyanins on SOD content in serum and brain of *D*-galactose-induced aging mice($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	血清 SOD/U·mL ⁻¹	脑 SOD/U·mL ⁻¹
对照	1.51 ± 3.05 ^a	40.62 ± 4.72
模型	3.46 ± 2.64	38.32 ± 3.85
A ₁	3.97 ± 3.02 ^b	42.94 ± 5.30
A ₂	6.29 ± 5.88 ^b	45.66 ± 6.34 ^b
A ₃	18.01 ± 8.31 ^{bc}	47.43 ± 3.98 ^{bc}
B ₁	19.53 ± 9.46 ^{bc}	52.75 ± 18.44
B ₂	29.19 ± 7.08 ^{bc}	62.45 ± 5.75 ^{bc}
B ₃	26.74 ± 5.42 ^{bc}	53.73 ± 7.59 ^{bc}

注:a. 对照组与模型组有显著性差异 ($P<0.05$);b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异 ($P<0.05$);c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

表 5 不同花色苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠血清和脑中 GSH-Px 含量的影响($\bar{X} \pm S$, $n=15$)

Table 5 Effects of different anthocyanins on GSH-Px content in serum and brain of *D*-galactose-induced aging mice($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	血清 GSH-Px/ U·mL ⁻¹	脑 GSH-Px/ U·mL ⁻¹
对照	294.92 ± 15.38 ^a	89.98 ± 13.82
模型	268.27 ± 16.14	79.86 ± 11.39
A ₁	291.46 ± 37.91	106.01 ± 26.12 ^b
A ₂	302.24 ± 24.00 ^b	117.55 ± 19.59 ^{bc}
A ₃	360.61 ± 17.16 ^{bc}	166.70 ± 20.24 ^{bc}
B ₁	378.92 ± 24.44 ^{bc}	147.34 ± 17.23 ^{bc}
B ₂	365.69 ± 35.30 ^{bc}	163.15 ± 23.55 ^{bc}
B ₃	360.81 ± 17.49 ^{bc}	163.01 ± 21.27 ^{bc}

注:a. 对照组与模型组有显著性差异 ($P<0.05$);b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异 ($P<0.05$);c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

量组的脑脂褐素水平显著低于模型组 ($P<0.05$),且低、中、高 3 组含量均显著低于对照组($P<0.05$)。本研究结果说明,120 mg/(kg·d)剂量的蓝莓花色苷和 20 mg/(kg·d)以上剂量的紫甘蓝花色苷可降低衰老小鼠脑组织中脂褐质含量,进而延缓脑认知功能衰退。紫甘蓝花色苷以 60 mg/(kg·d)中剂量效果最佳。

表 6 不同花色苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠血清和脑中 MDA 含量的影响($\bar{X} \pm s$, $n=15$)

Table 6 Effects of different anthocyanins on MDA content in serum and brain of *D*-galactose-induced aging mice($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	血清 MDA/ nmol·mL ⁻¹	脑 MDA/ nmol·mg ⁻¹
对照	23.24 ± 1.56 ^a	29.88 ± 3.81
模型	20.92 ± 1.07	26.59 ± 1.27
A ₁	20.55 ± 0.93 ^c	31.07 ± 3.58 ^b
A ₂	24.08 ± 3.65	26.58 ± 2.88 ^c
A ₃	22.39 ± 2.08	31.12 ± 5.62
B ₁	21.13 ± 1.13 ^c	27.24 ± 3.95
B ₂	21.02 ± 0.95 ^c	28.62 ± 2.47
B ₃	20.39 ± 1.02 ^c	29.76 ± 2.82 ^b

注: a. 对照组与模型组有显著性差异($P<0.05$); b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异 ($P<0.05$); c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

3 结论

采用 *D*-半乳糖致衰老小鼠模型对蓝莓和紫甘蓝的抗衰老作用进行评价,发现蓝莓和紫甘蓝花色苷均可显著改善衰老小鼠的学习记忆能力,并显著提高衰老小鼠血清和脑中的 SOD、GSH-Px 活性,抑制脂褐素的生成,具有良好的抗衰老效果。

参 考 文 献

[1] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases[J]. Clinical Interventions in Aging, 2018, 13: 757-772.

[2] SINHA J K, GHOSH S, SWAIN U, et al. Increased macromolecular damage due to oxidative stress in the neocortex and hippocampus of WNIN/Ob, a novel rat model of premature aging[J]. Neuroscience, 2014, 269: 256-264.

[3] BELL L, LAMPORT D J, BUTLER L T, et al. A review of the cognitive effects observed in humans following acute supplementation with flavonoids, and their associated mechanisms of action[J]. Nutrients, 2015, 7(12): 10290-10306.

[4] dos SANTOS N M, BATISTA P B, BATISTA Â G, et al. Current evidence on cognitive improvement and neuroprotection promoted by anthocyanins [J].

表 7 不同花色苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑中脂褐素含量的影响($\bar{X} \pm s$, $n=15$)

Table 7 Effects of different anthocyanins on lipofuscin content in serum and brain of *D*-galactose-induced aging mice($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	脂褐素/nmol·mg ⁻¹
对照	205.74±6.51
模型	211.32±7.82
A ₁	199.22±7.26 ^b
A ₂	204.34±7.16
A ₃	194.56±6.51 ^b
B ₁	175.95±9.30 ^{bc}
B ₂	157.33±9.49 ^c
B ₃	175.95±6.33 ^c

注: a. 对照组与模型组有显著性差异($P<0.05$); b. 灌胃花色苷粗提物的各组与模型组有显著性差异($P<0.05$); c. 灌胃花色苷粗提物的各组与对照组有显著性差异($P<0.05$)。

Current Opinion Food Science, 2019, 26: 71-78.

[5] TSUDA T. Dietary anthocyanin -rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2012, 56(1): 159-170.

[6] GOYARZU P, MALIN D H, LAU F C, et al., Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats[J]. Nutritional Neuroscience, 2004, 7(2): 75-83.

[7] SHUKITT-HALE B, LAU F C, CAREY A N, et al. Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus[J]. Nutritional Neuroscience, 2008, 11(4): 172-182.

[8] LAU F C, BIELINSKI D F, JOSEPH J A. Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia[J]. Journal of Neuroscience Research, 2007, 85(5): 1010-1017.

[9] RUTLEDGE G A, SANDHU A K, MILLER M G, et al. Blueberry phenolics are associated with cognitive enhancement in supplemented healthy older adults[J]. Food & Function, 2020, 12 (1): 107-118.

[10] KRIKORIAN R, SHIDLER M D, NASH T A, et al. Blueberry supplementation improves memory in

- older adults[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7): 3996–4000.
- [11] STRÖMBERG I, GEMMA C, VILA J, et al. Blueberry- and spirulina-enriched diets enhance striatal dopamine recovery and induce a rapid, transient microglia activation after injury of the rat nigrostriatal dopamine system[J]. Experimental Neurology, 2005, 196(2): 298–307.
- [12] WANG Y, CHANG C F, CHOU J, et al. Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage[J]. Experimental Neurology, 2005, 193(1): 75–84.
- [13] RAMIREZ M R, IZQUIERDO I, RASEIRA M C B, et al. Effect of lyophilised vaccinium berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats[J]. Pharmacological Research, 2005, 52(6): 457–462.
- [14] MAGALHAES L M, SEGUNDO M A, REIS S, et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 613(1): 1–19.
- [15] 徐微, 敬璞. 紫甘蓝花色苷及其复合体的抗炎活性研究[J]. 上海交通大学学报, 2018, 36(3): 73–79.
- XU W, JIN P. Anti-inflammatory effects of red cabbage anthocyanin and its complexes[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2018, 36(3): 73–79.
- [16] CRUZ A B, PITZ H S, VEBER B, BINI L A, et al. Assessment of bioactive metabolites and hypolipidemic effect of polyphenolic-rich red cabbage extract. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(12): 3033–3039.
- [17] 薛宏坤, 谭佳琪, 刘成海, 等. 超声-闪式联合法制备蓝莓花色苷提取物及其体内外抗肿瘤活性评价[J]. 食品科学, 2019, 41(6): 259–269.
- XUE H K, TAN J Q, LIU C H, et al. Preparation of blueberry anthocyanin extract by ultrasound-assisted flash extraction and evaluation of its anti-tumor activity in vivo and in vitro[J]. Shipin Kexue / Food Science, 2019, 41(6): 259–269.
- [18] 王荣, 杨宽, 陈春妮, 等. 亚麻籽提取物对D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化保护机制研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 92–95.
- WANG R, YANG K, CHEN C N, et al. Antioxidant protection mechanism of linseed extract on D-galactose-induced aging mouse model[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(8): 92–95.
- [19] GUO J L, HAN X, TAN H Y, et al. Blueberry extract improves obesity through regulation of the gut microbiota and bile acids via pathways involving FXR and TGR5[J]. iScience, 2019, (19): 676–690.
- [20] SHI M, MATHAI M L, XU G Q, et al. The effects of supplementation with blueberry, cyanidin-3-O-beta-glucoside, yoghurt and its peptides on obesity and related comorbidities in a diet-induced obese mouse model[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56: 92–101.
- [21] 赵君操. 蓝莓对D-半乳糖模型小鼠学习记忆及抗氧化的研究[J]. 河南医学研究, 2010, 19(4): 401–403.
- ZHAO J C. The study on memory and antioxidant of blueberry to the D-galactose model of mouse[J]. Henan Medical Research, 2010, 19(4): 401–403.
- [22] YAO Y J, WANG H L, XU F R, et al. Insoluble-bound polyphenols of adlay seed ameliorate H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signalling[J]. Food Chemistry, 2020, 325. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126865.
- [23] 孟宪军, 于欣灵, 孙仁艳, 等. 蓝莓提取物对小鼠记忆力及抗衰老作用的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2012, 42(6): 740–742.
- MENG X J, YU X L, SUN R Y, et al. Impacts of blueberry extract on the memory and anti-aging role of laboratory mouse[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2012, 42(6): 740–742.
- [24] 杨红澎, 蒋与刚, 庞伟, 等. 蓝莓花色苷单体改善老龄小鼠学习记忆的研究[J]. 营养学报, 2009, 31(6): 583–587.
- YANG H P, JIANG Y G, PANG W, et al. Study on the effect of anthocyanin from blueberry on improving learning and memory in aged mice[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2009, 31(6): 583–587.
- [25] HUANG B, DING C, ZOU Q, et al. Cyclophosphamide regulates n6-methyladenosine and m6a RNA enzyme levels in human granulosa cells and in ovaries of a premature ovarian aging mouse model[J]. Frontiers in Endocrinology, 2019, 10: 415.
- [26] KAKIMOTO Y, OKAZEMBALADA C, KAWABE N, et al. Myocardial lipofuscin accumulation in aging and sudden cardiac death[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 3304.

Protective Effects of Anthocyanins on Cognitive Function of *D*-Galactose-Induced Aging Mice

Wang Xiao, Fang Zishu, Li Yuanyuan, Hu Xiaosong, Zhang Yan*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, National Engineering Research Centre for Fruit and Vegetable Processing, Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing 100083)

Abstract In this research, the effects of different doses of blueberry and red cabbage anthocyanin on weight, exercise exploration, cognitive memory and other aspects of mice were studied by constructing *D*-galactose-induced aging mice model. The results showed that 120 mg/(kg·d) of blueberry anthocyanin and 60 mg/(kg·d) of purple cabbage could significantly improve the learning and memory ability of aging mice, significantly increase the activities of SOD and GSH-PX in serum and brain of aging mice ($P<0.05$) and inhibit the production of lipofuscin.

Keywords anthocyanin; anti-aging; cognitive function