

基于 BCL-XL/Bax/Caspase-3/p53/CREB/BDNF 信号通路 解析南极磷虾蛋白肽辅助增强记忆的靶向作用机理

郑景如¹, 孙娜^{1,2}, 杨晶琦¹, 林松毅^{1,2*}

(¹大连工业大学食品学院 国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034

²辽宁省特殊膳食食品工程技术研究中心 辽宁省食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034)

摘要 目的:探索南极磷虾蛋白肽(EHAK)对东莨菪碱所致小鼠记忆损伤的预防作用。方法:将小鼠分为 5 组:空白对照组、记忆损伤模型组、南极磷虾蛋白肽低(31.25 mg/kg)、中(62.5 mg/kg)、高(125 mg/kg)剂量组,测定小鼠行为学指标、血清以及海马的生化指标和神经细胞蛋白表达水平,观察海马神经元状态。结果:行为实验表明 EHAK 能提高小鼠的空间学习记忆能力。在氧化应激水平和胆碱能系统方面,与模型组相比,125 mg/kg EHAK 组小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性升高(10.13 ± 1.00)U/mg prot,丙二醛(MDA)含量降低(1.04 ± 0.26)nmol/mg prot,乙酰胆碱(ACh)含量增加(10.13 ± 1.00)μg/mg prot,乙酰胆碱酯酶(AChE)活性和 MDA 含量分别下降(0.90 ± 0.05)U/mg prot 和(1.16 ± 0.01)nmol/mg prot。这些数据表明,EHAK 通过预防氧化应激和胆碱能功能障碍来减轻东莨菪碱诱导的认知障碍。海马神经元状态显示南极磷虾蛋白肽可有效预防海马神经元凋亡,发生排列不均等情况。此外,EHAK 可通过 BCL-XL/Bax/Caspase-3/p53/CREB/BDNF 信号通路抑制神经元凋亡,调节神经元的可塑性。结论:EHAK 通过调节胆碱能系统和保护海马神经元来预防东莨菪碱引起的记忆障碍,提示 EHAK 有潜力作为有关功能食品的组成成分。

关键词 南极磷虾蛋白肽; 记忆损伤; 信号通路

文章编号 1009-7848(2024)08-0206-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.020

南极磷虾(*Euphausia superba*)是地球上最大的动物蛋白质资源,维持着南大洋食物链的平衡^[1],含有 18 种常见氨基酸,其中 8 种为必需氨基酸。目前,南极磷虾主要被加工成磷虾粉,用作食品和饲料添加剂,其资源利用率较低,不能得到充分利用。近年来,南极磷虾蛋白水解物作为功能性食品中重要的生物活性物质受到广泛关注^[2]。Kim 等^[3]以南极磷虾的酶解物为研究对象,寻找其最佳反应风味,并应用于拉面酱中,以提高南极磷虾的商业价值。Hatanaka 等^[4]研究发现,口服南极磷虾尾肉经酶解制备得到的肽粉,可显著降低自发性高血压大鼠的收缩压。Zhao 等^[5]发现,可从南极磷虾的水解蛋白中分离出具有降压活性的多肽,并能纠正去甲肾上腺素诱导的内皮细胞功能障碍。然而,关于南极磷虾蛋白肽(EHAK)预防氧化应激和记忆障碍的研究仍很少。

记忆与大脑海马结构和内部化学成分的变化有关,是大脑对客观事物的信息进行编码、储存和提取的认知过程,其基本过程由记忆、保留、回忆和识别组成。在大脑中,海马体对学习记忆至关重要,参与各种正常的大脑功能,包括潜在的情绪调节、应激反应的调节和突触可塑性调节^[6]。东莨菪碱是一种抗胆碱能药物,可降低神经元的兴奋性,从而诱发记忆和认知障碍,并可减少海马等神经组织中的神经元数量^[7]。Lu 等^[8]发现从海参中提取的多肽可有效抑制东莨菪碱对小鼠的记忆损伤。Sheng 等^[9]研究发现,同时服用茶多酚和脱脂核桃粕水解物对东莨菪碱引起的小鼠学习和记忆损伤具有神经保护作用。

本研究通过东莨菪碱诱导小鼠形成记忆损伤,探索南极磷虾蛋白肽(EHAK)对小鼠记忆损伤的预防作用。采用被动回避实验和莫里斯水迷宫实验观察小鼠行为,并测定血清和海马生化指标。用显微镜成像系统观察海马神经细胞的状态。采用免疫印迹试验研究小鼠神经细胞的保护机制。本研究旨在探究 EHAK 对小鼠空间学习和记忆能力的影响,EHAK 对氧化应激水平和胆碱能系统

收稿日期: 2023-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(32022067);辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才项目(XLYC2007078)

第一作者: 郑景如,女,硕士生

通信作者: 林松毅 E-mail: linsongyi730@163.com

的影响,分析 EHAK 对海马神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南极磷虾粉购自辽渔集团有限公司。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乙酰胆碱(ACh)、乙酰胆碱酯酶(AChE)检测试剂盒,南京建成股份有限公司;Tris、预染色蛋白标记物、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、BCA 检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;主要抗体(caspase-3、BCL-XL、Bax、p53、CREB、p-CREB、BDNF 和 β -actin),上海艾博抗贸易有限公司;二抗,中国武汉 AB 克隆技术有限公司。

1.2 仪器与设备

DF-101S 水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司;JJ-1 精密定时电动搅拌器,常州荣华仪器制造有限公司;PB-10 pH 计、BT125D 分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司;SCIENTZ-10ND 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;CR22N 高速冷冻离心机,日立工机株式会社;UV-5200 紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司。

1.3 实验动物

无特定病原体(SPF)级别的雄性昆明小鼠(6~8 周龄)购自辽宁长生生物科技有限公司[SCXK(辽)2015-0003],适应环境 7 d 后进行实验。本研究所有实验方案均由大连工业大学实验动物伦理委员会(DLPU2021029)审核通过。所有实验都尽量减少动物的数量和对动物造成的痛苦。

1.4 实验方法

1.4.1 南极磷虾蛋白肽的制备 EHAK 的提取方法基于罗艳等^[10]的研究。将南极磷虾粉置于烧杯中,按料液比 1:2 加入提前配好的正己烷/乙醇混合液($V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙醇}}=3:1$)进行脱脂处理。在脱脂后的磷虾粉中加入去离子水,使其底物蛋白质量分数为 2%,制备酶解反应溶液,然后 90 °C 水浴中搅拌 10 min,使原有酶失活。将温度降至 37 °C,调整 pH 值至 7.5。加入胰蛋白酶进行酶解反应,酶解过程中酶解液 pH 值保持在 7.5 左右。酶解 3 h 后,升温至 90 °C,搅拌 10 min 使酶失活。冷却后,6 000 r/min 条件下离心 20 min,收集上清液,调整 pH 值至 7.0,冷冻干燥制得 EHAK。

1.4.2 动物实验设计 参考 Xu 等^[11]的方法,将实验小鼠随机分为 5 组(每组 10 只):1)盐水处理对照组(Con);2)1 mg/kg 东莨菪碱处理模型组(M);3)31.25 mg/kg EHAK 低剂量组(EHAK-L);4)62.5 mg/kg EHAK 中剂量组(EHAK-M);5)125 mg/kg EHAK 高剂量组(EHAK-H)。灌胃时,对照组和模型组均给予生理盐水处理,其余各组给予相应剂量的 EHAK 处理。30 d 后,对照组腹腔注射生理盐水,其余各组腹腔注射东莨菪碱,连续 7 d。之后采用莫里斯水迷宫(MWM)实验和被动回避实验对小鼠行为进行观察和分析。最后,小鼠在禁食 12 h 后被处死。

1.4.3 被动回避实验 参考 Hosseini 等^[12]的方法并稍作修改。该实验是基于小鼠趋暗的本能。小鼠进入不透明的盒子后,盒子内的铁丝与小鼠的脚形成一个闭环,小鼠受到电击。在电击的被动驱使下,小鼠被迫离开黑暗的盒子。连接设备后,将小鼠灌胃 1 h 后放进设备内,点击“实验开始”按钮。计算机自动记录小鼠在 2 min 内通过小孔进入黑盒的次数。测试结束后,小鼠被放回笼子。

1.4.4 莫里斯水迷宫实验 MWM 是一种局部学习和记忆测试,参考 Gupta 等^[13]的方法。在实验准备阶段,在水迷宫中注入 22 °C 的水。实验开始时,5 组小鼠灌胃 1 h 后,从起点进入迷宫。小鼠在迷宫中游泳的时间由计算机自动记录,并记录为逃出迷宫的时间。实验结束后,将小鼠用干净的棉花擦干后放回笼子。

1.4.5 血清 SOD 活性和 MDA 水平测定 采集小鼠血液,2 400 r/min 离心 20 min,采集上层血清。将小鼠血清稀释 2.5 倍,根据试剂盒按照厂家说明书测定 SOD 活性和 MDA 含量。

1.4.6 测定海马组织 AChE 活性、ACh 含量及 MDA 水平 将小鼠海马与脑组织分离,称重后研磨,形成组织匀浆。2 500 r/min 离心 10 min 后,弃沉淀,并根据制造商的说明使用试剂盒测定海马中 AChE 活性、ACh 含量和 MDA 水平。

1.4.7 蛋白免疫印迹试验 Caspase-3、BCL-XL、Bax、p53、CREB、p-CREB、BDNF 蛋白表达水平参考 Chan 等^[14]的方法,并稍作修改。用含 1%苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液均匀研磨小鼠海马,10 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀。蛋白质样品

用12%~15%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离,转移到0.45 μm 的PVDF膜上。然后用TBST溶液清洗PVDF膜3次。随后,PVDF膜与一抗(Caspase-3、BCL-XL、Bax、p53、CREB、p-CREB、BDNF)在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用TBST溶液清洗后,加入二抗并孵育1 h。以 β -actin为内参,每个试验进行3次。然后用超灵敏的ECL化学发光剂显影,用凝胶成像仪拍照。采用Image J软件进行灰度分析。

1.5 数据处理

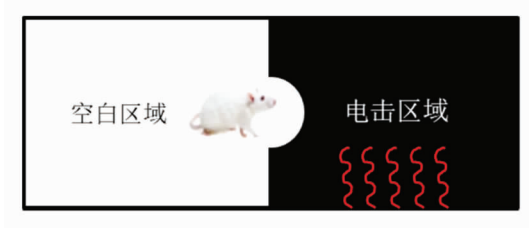
使用SPSS 19.0软件和Origin 8.5软件进行数据分析。采用方差分析(ANOVA)、最小差值检验(LSD)和邓肯检验对结果进行显著性分析。所有数据平行测定3次以减小误差,结果以均数 \pm 标准差表示。以 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

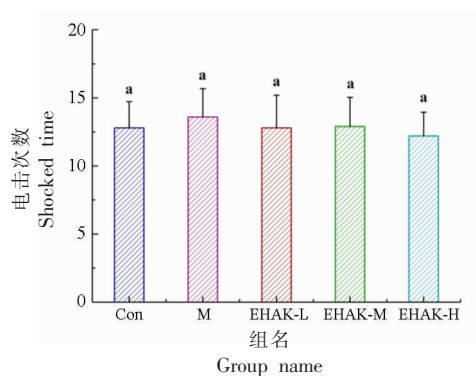
2.1 南极磷虾蛋白肽对小鼠的空间学习和记忆能力的影响

采用被动回避实验和MWM实验分析EHAK对小鼠行为和记忆能力的影响。基于Kostadinova等^[15]的研究,被动回避实验可用于评估小鼠的短

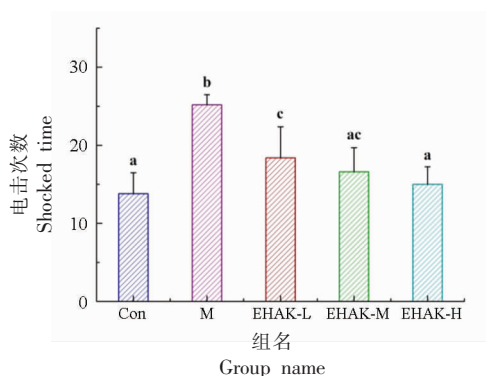
期学习和记忆。图1a为被动回避实验示意图。如图1b所示,灌胃期间,5组小鼠被电击次数无显著差异($P>0.05$)。小鼠腹腔注射东莨菪碱7 d后再次进行暗回避实验,发现与对照组相比,模型组小鼠被电击次数明显增多(图1c);而EHAK组的电击次数与模型组相比明显减少($P<0.05$)。此外,MWM通常被认为是空间学习和记忆的测试^[16]。在这个实验中,小鼠需要学习复杂的行为并形成特定的记忆来识别平台和逃离水迷宫。图1d为水迷宫试验示意图。如图1e所示,灌胃期间,5组小鼠逃离迷宫所需时间无显著差异($P>0.05$)。小鼠腹腔注射东莨菪碱7 d后再次进行水迷宫试验,发现与对照组相比,模型组出现了明显的记忆损伤(图1f);与模型组相比,EHAK组逃离迷宫所用时间明显减少($P<0.05$)。这与Labban等^[17]的研究结果一致,褪黑素、白藜芦醇等可以改善阿尔茨海默病小鼠模型的识别和记忆能力以及被动回避表现。结合本研究结果,灌胃EHAK可有效提高小鼠的学习能力,减少电击次数和逃离水迷宫的时间,预防东莨菪碱对小鼠的记忆损伤。



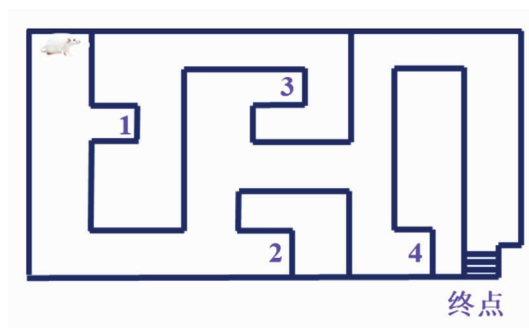
(a) 被动回避实验示意图



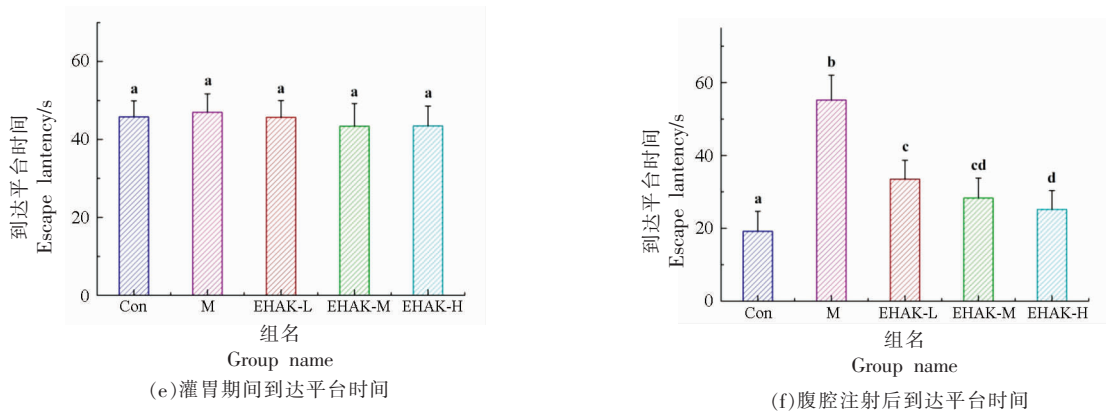
(b) 灌胃期间电击次数



(c) 腹腔注射后电击次数



(d) 水迷宫实验示意图



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 1 EHAK 对小鼠行为的影响

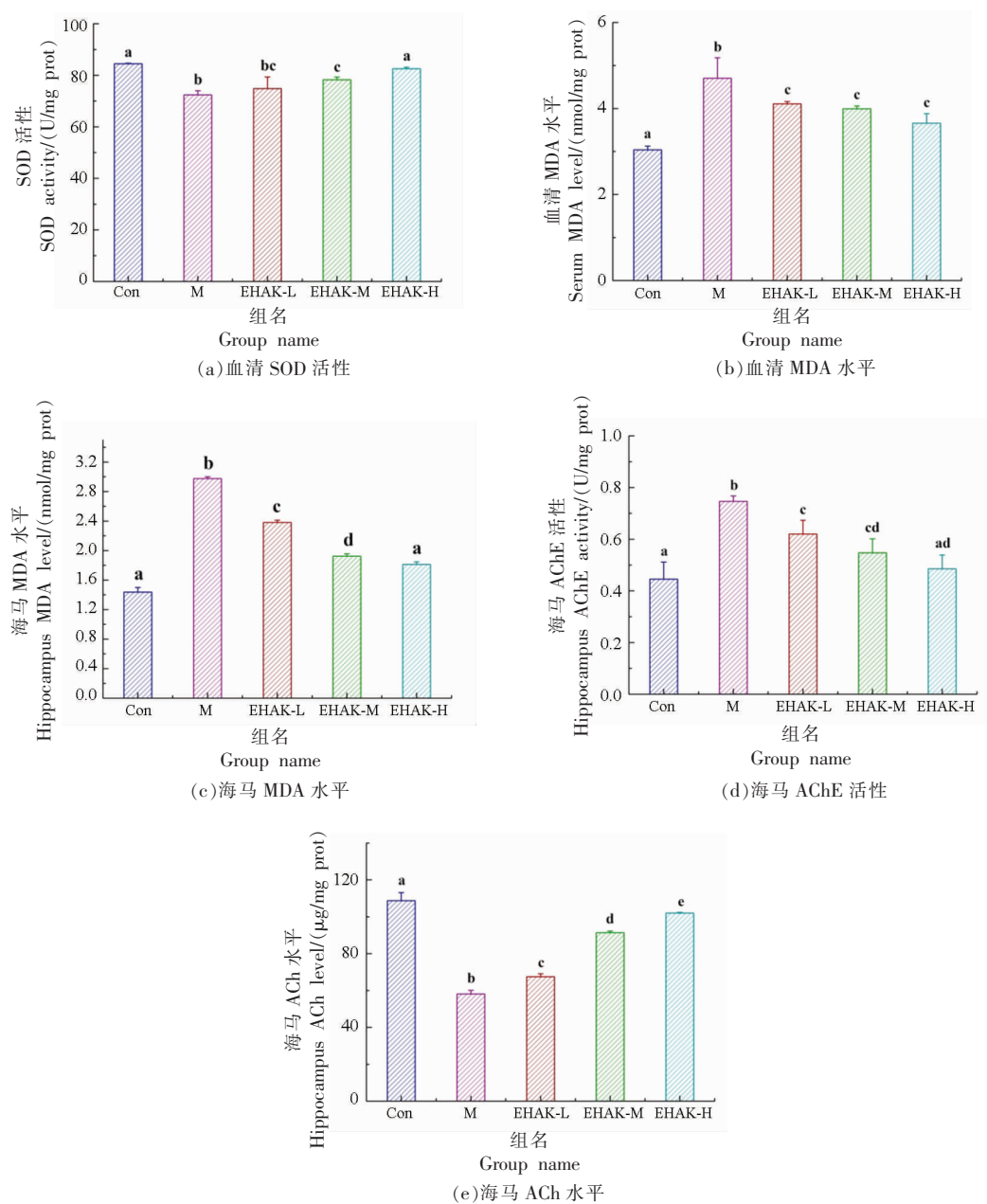
Fig.1 Effects of EHAK on mouse behavior

2.2 南极磷虾蛋白肽对小鼠血清和海马氧化应激和胆碱能系统的影响

SOD 是需氧细胞中最重要的抗氧化酶,负责清除超氧自由基,催化过氧化氢和分子氧的突变^[18]。在缺乏这些酶的情况下,升高的超氧阴离子浓度可能导致氧化应激、DNA 损伤和细胞凋亡^[19]。MDA 是衡量氧化应激程度、反映脂质过氧化程度的常用指标之一。MDA 是脂质过氧化的产物,是评价脑功能受损程度的直观指标^[20]。为探讨 EHAK 对氧化应激的缓解作用,测定小鼠血清和海马组织中 SOD 活性及海马组织中 MDA 含量。如图 2a 所示,与对照组相比,模型组小鼠血清 SOD 活性降低了 (12.03 ± 1.37) U/mg prot。与模型组比较,灌胃剂量为 125 mg/kg EHAK 时,小鼠血清 SOD 活性提高 (10.13 ± 1.00) U/mg prot。结果表明,EHAK 能有效预防东莨菪碱所致小鼠血清 SOD 活性下降的情况。图 2b 显示,与对照组相比,用东莨菪碱单独处理时,小鼠血清中 MDA 水平增加了 (1.66 ± 0.39) nmol/mg prot。与模型组比较,灌胃 125 mg/kg EHAK 组小鼠血清 MDA 含量下降 (1.04 ± 0.26) nmol/mg prot。结果表明,EHAK 能有效抑制东莨菪碱所致小鼠血清 MDA 水平升高。有研究也有类似结果,海参肽可以缓解东莨菪碱诱导小鼠血清 SOD 活性下降,抑制血清 MDA 含量升高,从而改善氧化失衡和学习记忆障碍^[21]。综上推测 EHAK 能有效抑制东莨菪碱诱导的小鼠血清氧化应激现象。

由图 2c 可知,与对照组相比,模型组小鼠海

马组织中 MDA 含量增加 (1.54 ± 0.04) nmol/mg prot。与模型组比较,灌胃 125 mg/kg EHAK 可使小鼠海马 MDA 含量降低 (1.16 ± 0.01) nmol/mg prot,说明 EHAK 可有效抑制东莨菪碱引起的小鼠海马 MDA 水平升高。AChE 是一种重要的酶,可以将乙酰胆碱水解为胆碱,是几种外源性生物的功能靶点^[22]。另外,AChE 还与许多非胆碱能生理过程有关,如加速细胞生长分化、参与细胞凋亡等,也与阿尔茨海默病、肿瘤发生等病理过程有关^[23]。ACh 是外周和中枢神经系统中最重要神经递质之一,其水解是神经系统调节的关键步骤^[24]。为探讨 EHAK 对小鼠胆碱能系统的影响,测定了小鼠海马内 AChE 活性及 ACh 水平。图 2d 显示,与对照组相比,模型组小鼠海马中 AChE 活性增加了 (0.91 ± 0.01) U/mg prot。与模型组相比,当灌胃剂量为 125 mg/kg 时,EHAK 能有效抑制小鼠海马组织 AChE 活性。随着小鼠海马区 AChE 活性的降低,乙酰胆碱酯水平相应升高。图 2e 显示,与对照组相比,模型组小鼠海马中 ACh 水平降低了 (12.03 ± 1.37) μ g/mg prot。与模型组相比,当灌胃剂量为 125 mg/kg 时,ACh 含量显著增加 (10.13 ± 1.00) μ g/mg prot,说明 EHAK 能有效预防东莨菪碱所致小鼠海马 ACh 水平下降的问题。综上,一定剂量的 EHAK 可预防小鼠乙酰胆碱系统功能障碍,降低海马 MDA 水平,缓解东莨菪碱对小鼠的记忆损伤,具有预防记忆损伤的作用。林海生^[25]的研究获得了类似的结果,口服牡蛎蛋白酶解肽可显著改善小鼠行为,恢复大脑胆碱能系统紊乱,抑制氧



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图2 EHAK对小鼠血清及海马生化指标的影响

Fig.2 Effects of EHAK on serum and hippocampus biochemical indices in mice

化应激,并对东莨菪碱引起的小鼠记忆损伤具有神经保护作用。

2.3 南极磷虾蛋白肽对小鼠海马细胞状态的影响

海马功能损伤会导致认知障碍。海马是大脑胆碱能系统的重要组成部分,主要由CA1区、CA3区和齿状回(DG)区组成。研究表明,记忆丧失与海马体中锥体细胞紊乱和核萎缩有关^[26]。图3显

示了小鼠海马不同区域的细胞状态。对照组海马区CA1、CA3、DG神经元排列整齐,细胞结构完整清晰。东莨菪碱诱导的模型组海马CA1、CA3区神经元紊乱、疏松、稀疏(图3a、3b),DG区神经元无明显影响(图3c),而EHAK可预防这种症状。由此可见,EHAK可以预防海马CA1和CA3区域的病变,从而使海马各区域的神经元排列良好。Liu

等^[27]研究发现,生酮饮食可显著改善小鼠海马区 作用。
神经元脱髓鞘,从而对小鼠海马区起到神经保护

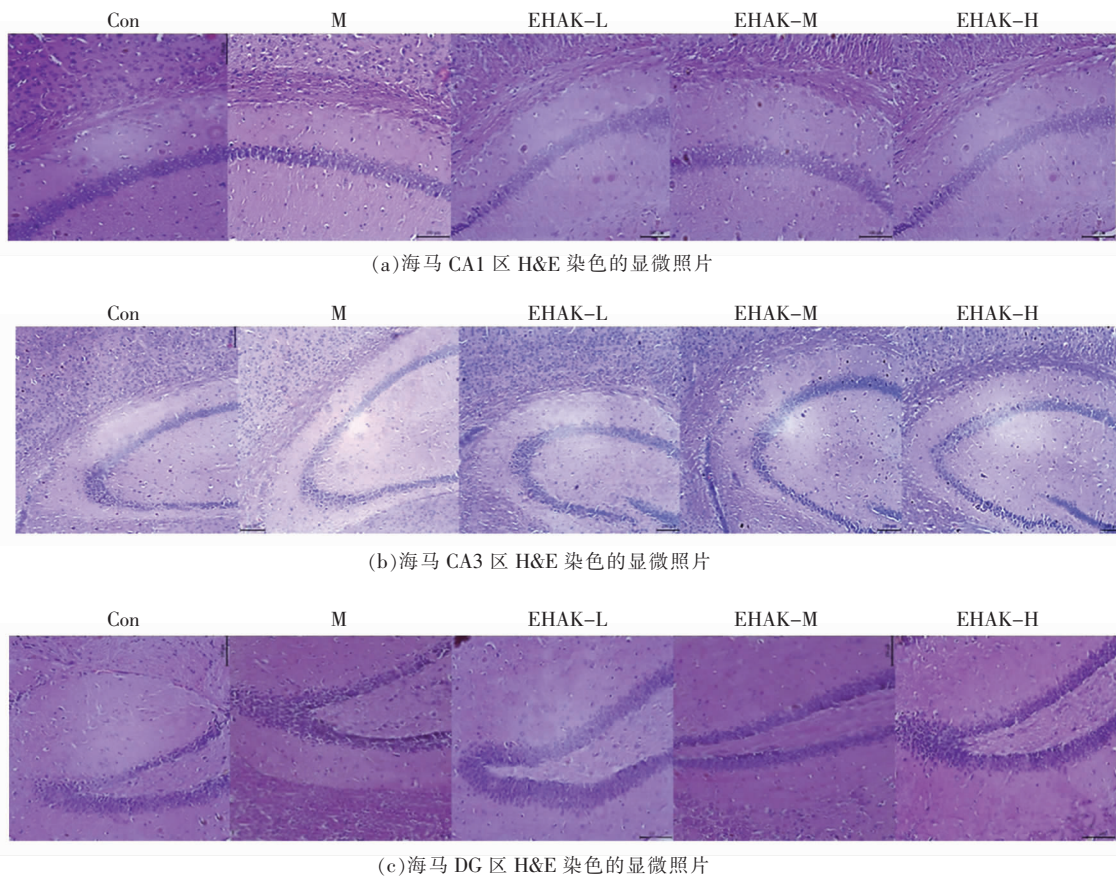


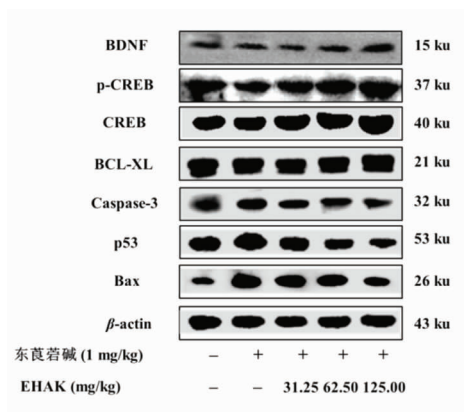
图 3 EHAK 对东莨菪碱诱导的海马区域特异性病变的影响

Fig.3 Effects of EHAK on scopolamine-induced specific lesions in hippocampus

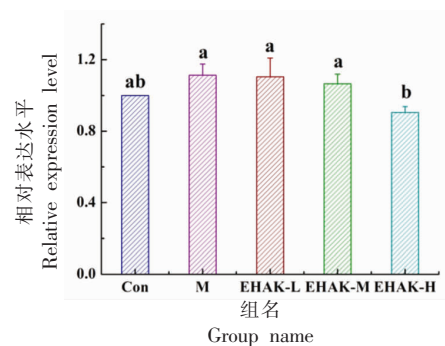
2.4 南极磷虾蛋白肽对海马神经元凋亡的影响

细胞凋亡,被称为程序性细胞死亡,是正常发育和组织稳态的关键,也是一个严格控制的过程,通过激活特定的信号通路发生,并与各种神经退

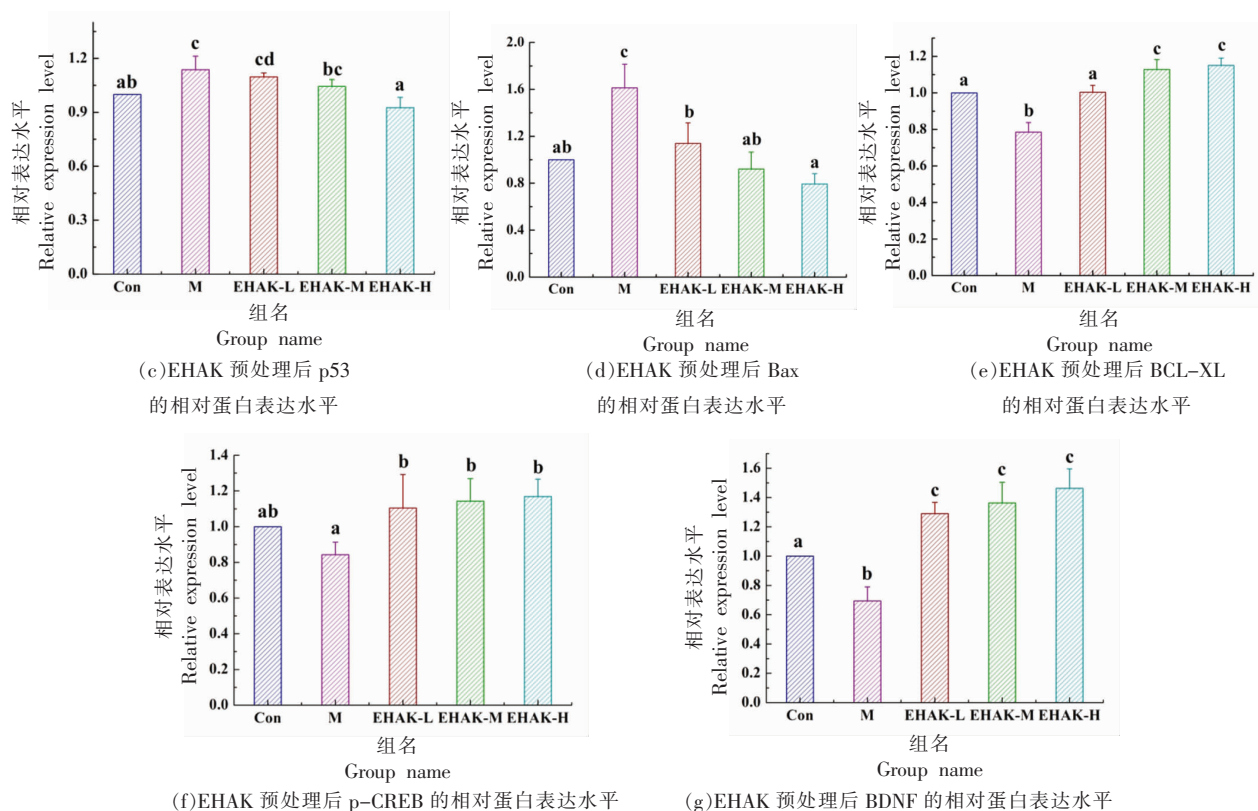
行性疾病有关。凋亡主要是信号蛋白的级联反应,其中促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 和抗凋亡蛋白起主要作用^[28]。如图 4a 所示,与模型组相比,EHAK 提高了抗凋亡蛋白 BCL-XL 的表达量,降低了促



(a)免疫印迹检测 EHAK 预处理后蛋白表达含量



(b)EHAK 预处理后 Caspase-3 的相对蛋白表达水平



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图4 EHAK对东莨菪碱诱导小鼠相关蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of EHAK on scopolamine induced expression of related proteins in mice

凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 和 p53 的表达量。如图 4b~4e 所示,与模型组相比,Bax、Caspase-3、p53 蛋白表达量分别下降 $(0.82 \pm 0.11)\%$ 、 $(0.21 \pm 0.03)\%$ 、 $(0.21 \pm 0.02)\%$,BCL-XL 蛋白表达量上升 $(0.37 \pm 0.01)\%$ 。CREB 作为最重要的细胞转录因子之一,可以调节酪氨酸羟化酶和许多神经肽的表达^[29]。BDNF 是神经营养因子家族的一员,在神经系统的生长、发育、维持和分化中起着重要作用^[30]。BDNF 在整个中枢神经系统以及周围组织中表达,包括肝脏、脂肪组织和肌肉。一项研究也表明,它在脑损伤的神经保护中起着重要作用^[31]。如图 4a 所示,与模型组相比,CREB、p-CREB 和 BDNF 蛋白表达水平明显提高。图 4f 和 4g 显示,与模型组相比,p-CREB/CREB 和 BDNF 蛋白表达量分别增加 $(0.33 \pm 0.03)\%$ 和 $(0.77 \pm 0.04)\%$ 。图 5 显示 EHAK 抑制东莨菪碱诱导小鼠海马神经元损伤的保护性信号通路。综上所述,EHAK 可通过

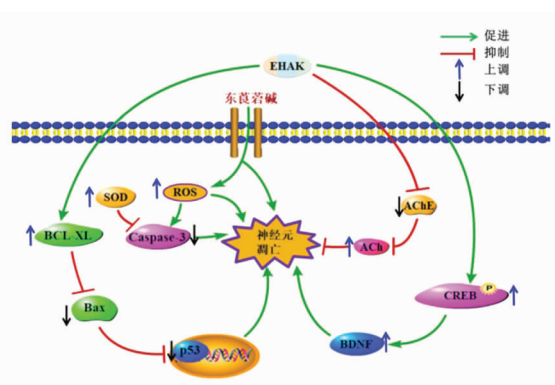


图5 EHAK对东莨菪碱诱导的小鼠海马神经元的保护作用示意图

Fig.5 Schematic illustration of the protective effects of EHAK on scopolamine-induced hippocampal neurons in mice

BCL-XL/Bax/Caspase-3/p53/CREB/BDNF 信号通路,有效抑制东莨菪碱诱导的小鼠海马神经细胞凋亡,增强神经蛋白的表达,具有保护海马神经元的作用。

3 结论

本研究采用东莨菪碱建立小鼠记忆损伤模型,探讨 EHAK 对记忆损伤的预防作用。通过观察分析小鼠的行为,测定血清氧化应激指标和海马生化指标,发现与模型组相比,灌胃 EHAK 的小鼠的记忆障碍现象明显改善。EHAK 组海马细胞完整,细胞核清晰可见。免疫印迹试验显示 EHAK 通过 BCL-XL/Bax/Caspase-3/p53/CREB/BDNF 信号通路对海马神经细胞具有保护作用。综上所述,EHAK 可调节胆碱能系统,保护海马神经元,从而预防东莨菪碱所致小鼠记忆障碍。

参 考 文 献

- [1] 刁华玉, 林松毅, 梁瑞, 等. 南极磷虾肉冻融循环过程水分的迁移及微观结构变化[J]. 中国食品学报, 2022, 22(6): 242-250.
DIAO H Y, LIN S Y, LIANG R, et al. Water migration and microstructure changes of krill Antarctic meat during freeze-thaw cycle[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology, 2022, 22(6): 242-250.
- [2] JI W, ZHANG C H, JI H W. Two novel bioactive peptides from Antarctic krill with dual angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activities[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(7): 1742-1749.
- [3] KIM Y J, PARK J Y, PARK H J, et al. Development of reaction flavors with enzymatic hydrolysate of krill *Euphausia superba* in ramen sauce[J]. Fisheries and Aquatic Sciences, 2014, 17(4): 403-408.
- [4] HATANAKA A, MIYAHARA H, SUZUKI K I, et al. Isolation and identification of antihypertensive peptides from antarctic krill tail meat hydrolysate[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(4): H116-H120.
- [5] ZHAO Y Q, ZHANG L, TAO J, et al. Eight antihypertensive peptides from the protein hydrolysate of Antarctic krill (*Euphausia superba*): Isolation, identification, and activity evaluation on human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)[J]. Food Research International, 2019, 121: 197-204.
- [6] LEUNER B, GOULD E. Structural plasticity and hippocampal function[J]. Annual Review of Psychology, 2010, 61(1): 111-140, C111-113.
- [7] ZHONG C B, PAN Y P, TONG X Y, et al. Delayed rectifier potassium currents and Kv2.1 mRNA increase in hippocampal neurons of scopolamine-induced memory-deficient rats[J]. Neuroscience Letters, 2005, 373(2): 99-104.
- [8] LU Z Q, XU X M, LI D M, et al. Sea cucumber peptides attenuated the scopolamine-induced memory impairment in mice and rats and the underlying mechanism[J]. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 2021, 70(1): 157-170.
- [9] SHENG J H, YANG X Y, LIU Q Y, et al. Co-administration with tea polyphenols enhances the neuroprotective effect of defatted walnut meal hydrolysate against scopolamine-induced learning and memory deficits in mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(3): 751-758.
- [10] 罗艳, 黄权新, 蔡捷. 牡蛎酶解产物的种类, 生物活性及应用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2022(11): 49-53.
LUO Y, HUANG Q X, CAI J. Research progress on the species, biological activity and application of enzymatic hydrolysis products of oyster[J]. Chinese Food and Nutrition, 2022(11): 49-53.
- [11] XU X M, LIANG R, LI D M, et al. Evaluation of sea cucumber peptides-assisted memory activity and acetylation modification in hippocampus of test mice based on scopolamine-induced experimental animal model of memory disorder[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 68: 103909.
- [12] HOSSEINI A, ALLAHYARI F, AZIZI V. Effects of *Tanacetum polycephalum* on passive avoidance learning and oxidative stress in epileptic model of memory impairment in the male Wistar rats[J]. Advances in Traditional Medicine, 2020, 21(30): 545-552.
- [13] GUPTA S, SINGH V, GANESH S, et al. siRNA mediated GSK3beta knockdown targets insulin signaling pathway and rescues Alzheimer's disease pathology: Evidence from *in vitro* and *in vivo* studies[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2022, 14(1): 69-93.
- [14] CHAN K, HO H, LIN M, et al. Mulberry water extracts inhibit atherosclerosis through suppression of the integrin-beta (3)/focal adhesion kinase complex and downregulation of nuclear factor kappaB signaling *in vivo* and *in vitro*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(39): 9463-9471.

- [15] KOSTADINOVA I I, DANCHEV N D, VEZENKOV L T, et al. Effect of original peptide derivatives of galantamine on passive avoidance in mice[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2020, 170(2): 200–202.
- [16] BRODY D L, HOLTZMAN D M. Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury[J]. *Experimental Neurology*, 2006, 197(2): 330–340.
- [17] LABBAN S, ALGHAMDI B S, ALSHEHRI F S, et al. Effects of melatonin and resveratrol on recognition memory and passive avoidance performance in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Behavioural Brain Research*, 2021, 402: 113100.
- [18] 朱梦梅, 欧阳涛, 华天桢, 等. 胞外超氧化物歧化酶(EC-SOD)抗辐射作用的研究进展[J]. *辐射防护*, 2022, 42(2): 102–110.
- ZHU M M, OU Y T, HUA T Z, et al. Research progress on the anti-radiation effects of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD)[J]. *Radiation Protection*, 2022, 42(2): 102–110.
- [19] MILLER A F. Superoxide dismutases: Active sites that save, but a protein that kills[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8(2): 162–168.
- [20] CHEN L, LONG R, HUANG G, et al. Extraction and antioxidant activities *in vivo* of pumpkin polysaccharide[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 146: 112199.
- [21] ZHAO Y, LU Z Q, XU X M, et al. Sea cucumber-derived peptide attenuates scopolamine-induced cognitive impairment by preventing hippocampal cholinergic dysfunction and neuronal cell death[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(2): 567–576.
- [22] FRASCO M F, FOURNIER D, CARVALHO F, et al. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity[J]. *Biomarkers*, 2005, 10(5): 360–375.
- [23] BEHRA M, COUSIN X, BERTRAND C, et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(2): 111–118.
- [24] MA J, SI T, YAN C, et al. Near-infrared fluorescence probe for evaluating acetylcholinesterase activity in PC12 cells and *in situ* tracing AChE distribution in zebrafish[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(1): 83–92.
- [25] 林海生. 牡蛎蛋白肽的酶法制备及其改善小鼠学习记忆功能的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.
- LIN H S. Study on enzymatic preparation of oyster protein peptide and its improvement on learning and memory function in mice[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013.
- [26] TAN W, ZHANG Q J, DONG Z J, et al. Phosphatidylcholine ameliorates LPS-induced systemic inflammation and cognitive impairments via mediating the gut-brain axis balance[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(50): 14884–14895.
- [27] LIU C H, ZHANG N, ZHANG R Y, et al. Cuprizone-induced demyelination in mouse hippocampus is alleviated by ketogenic diet [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(40): 11215–11228.
- [28] LU J H, HOU H, FAN Y, et al. Identification of MMP-1 inhibitory peptides from cod skin gelatin hydrolysates and the inhibition mechanism by MAPK signaling pathway[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 33: 251–260.
- [29] HONG S W, YOO D H, WOO J Y, et al. Soyasaponins Ab and Bb prevent scopolamine-induced memory impairment in mice without the inhibition of acetylcholinesterase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(9): 2062–2068.
- [30] JAMES M C, JULIE C L, QIAO Y, et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport [J]. *The Journal of Neuroscience*, 1997, 17(7): 2295–2313.
- [31] DEGOS V, CHARPENTIER T L, CHHOR V, et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression[J]. *Anesthesiology*, 2013, 118(5): 1123–1132.

Analysis of Targeting Mechanism of Memory Enhancing Peptides Assisted by Antarctic Krill Based on the BCL-XL/Bax/Caspase-3/p53/CREB/BDNF Signaling Pathway

Zheng Jingru¹, Sun Na^{1,2}, Yang Jingqi¹, Lin Songyi^{1,2*}

¹National Engineering Research Center of Seafood, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

²Engineering Research Center of Special Dietary Food of Liaoning Province, Food Engineering Technology Research Center of Liaoning Province, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract The study aimed to explore the preventive effect of Antarctic krill protein peptide (EHAK) on memory injury caused by scopolamine in mice. The mice were divided into 5 groups: Blank control group, memory damage model group, and low (31.25 mg/kg), medium (62.5 mg/kg) and high (125 mg/kg) dose groups of EHAK. The behavioral indices, serum and biochemical indices of the mice and the protein expression levels of hippocampal nerve cells were determined, and the states of hippocampal neurons were observed. Behavioral experiments indicated that EHAK could improve the spatial learning and memory ability of mice. Regarding the oxidative stress levels and cholinergic systems, when 125 mg/kg EHAK was administered to mice, compared with the model group, the SOD activity in serum increased by (10.13 ± 1.00) U/mg prot and the MDA content in serum decreased by (1.04 ± 0.26) nmol/mg prot. The hippocampal AChE activity and MDA content declined by (0.90 ± 0.05) U/mg prot and (1.16 ± 0.01) nmol/mg prot, respectively, while the ACh content increased by (10.13 ± 1.00) μ g/mg prot. These data indicated that EHAK could attenuate scopolamine-induced cognitive impairment by preventing oxidative stress and cholinergic dysfunction. The status of hippocampal neurons showed that the EHAK could effectively prevent hippocampal neuron apoptosis and uneven arrangement. In addition, EHAK could inhibit neuronal apoptosis and regulate prominent plasticity through the BCL-XL/Bax/ Caspase-3/p53/CREB/BDNF signaling pathway. Therefore, EHAK could prevent scopolamine-induced memory impairment by modulating the cholinergic system and protecting neurons in the hippocampus, which demonstrated the potential to be used as food ingredient with functional appeal.

Keywords Antarctic krill protein peptide; memory impairment; signaling pathway