

## 壳寡糖对乙醇诱导的炎症反应的保护作用

王 斌<sup>1,2</sup>, 赵宇珂<sup>1</sup>, 姜启兴<sup>1,2</sup>, 许艳顺<sup>1,2</sup>, 夏文水<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>江南大学食品学院 江苏无锡 214122

<sup>2</sup>江苏省食品安全与质量控制协同创新中心 江苏无锡 214122)

**摘要** 为研究壳寡糖对酒精损伤海马组织的保护作用,将 39 只新生 SD 大鼠随机分为 3 组,分别是空白对照组(CON 组)、模型组(ETOH 组)和壳寡糖干预组(COS 组)。建立新生 SD 大鼠酒精损伤模型,对 COS 组进行壳寡糖干预,在出生后第 9 天(PD9)干预结束,在 PD9 到 PD24 之间不再进行干预,分别检测 PD9 和 PD24 的磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和凋亡诱导因子(AIF1)的表达,炎症因子白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 10(IL-10)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达量,在 PD24 进行新物体识别试验。结果表明:在 PD9 时,COS 组中 PI3K 和 Akt 及其磷酸化水平、GFAP 和 AIF1 蛋白水平与 ETOH 组相比无显著差异,IL-10 显著增加,IL-6 和 TNF- $\alpha$  显著降低。在 PD24 时,与 ETOH 组相比,COS 组中 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平显著上升,GFAP 表达下降,IL-10 显著增加,IL-6 和 TNF- $\alpha$  显著降低。壳寡糖可以在 PD24 缓解 PI3K/Akt 通路的抑制,抑制星形胶质细胞标志物 GFAP 的过表达,在 PD9 和 PD24 抑制 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的过表达,缓解 IL-10 的抑制。

**关键词** 壳寡糖; 酒精; 海马组织; 抗炎

**文章编号** 1009-7848(2024)08-0216-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.021

酒精可以通过降低运输硫胺素的能力、代谢物的毒性和诱发神经炎症等途径来引起神经毒性<sup>[1]</sup>。最近的研究结果表明,乙醇也会在发育中的大脑中诱导神经免疫激活<sup>[2]</sup>。海马体和皮层是学习和识别记忆的关键大脑区域,这些大脑区域也容易受到神经胶质细胞和神经免疫激活的影响<sup>[3]</sup>。较高剂量的乙醇会导致较高的血液乙醇浓度并对发育中的大脑造成严重伤害。乙醇会引起大脑内的神经炎症,特别是在海马区域,这可能会影响大脑中抗氧化剂浓度低的早期生长阶段<sup>[4]</sup>。抗氧化作用的降低和神经炎症的升高可能会破坏正常神经元的生长,如神经发生和突触可塑性。在人类和大鼠中,最容易受到乙醇神经毒性影响的时期之一是大脑生长的突增期。对于大鼠,这个时期发生在出生后第 4 天和出生第 10 天之间<sup>[5]</sup>。

由于壳寡糖具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌等生物活性,因此在药物、食品、化妆品、生物材料和组织工程等领域具有广泛的应用前景<sup>[6]</sup>。壳寡糖容易通过肠上皮吸收并表现出良好的血脑屏障穿

透能力<sup>[7]</sup>。壳寡糖所具有的上述生物活性,可能与免疫失调、代谢异常、感染等相关的几种疾病中起到治疗或预防作用。事实上,已有几种作用机制可以解释壳寡糖广泛的生物活性。迄今为止,许多研究表明壳寡糖具有抗炎和抗氧化的效果,其被证明通过自由基清除或诱导抗氧化酶表达的机制表现出抗氧化活性<sup>[8]</sup>。在提出的机制中,AMPK 的激活和炎症信号通路的抑制被认为是壳寡糖发挥包括抗炎、抗癌和抗糖尿病等多种作用的主要机制<sup>[9]</sup>。

作者前期研究表明,在 PD9,HE 染色后壳寡糖干预组的海马区的神经细胞结构相较于模型组更加完整,可改善酒精诱导的新生大鼠的脑损伤<sup>[10]</sup>,然而尚不清楚在 PD9 检测到的这种保护作用是否具有长期效果。海马是整个中枢神经系统中对各种损伤耐受能力较差的部位之一,因此关注海马组织,建立新生 SD 大鼠酒精性海马损伤模型,对 SD 大鼠在 PD5~PD9 给予重复乙醇处理和壳寡糖干预,在最后一次酒精暴露,即第 1 阶段 PD9 处死并进行急性研究,之后,不再进行酒精暴露和壳寡糖干预。在第 2 阶段,即 PD24 时评估壳寡糖对酒精损伤海马组织的长期影响,探究海马中 PI3K/Akt 通路的激活及酒精诱导的相关炎症标志物等

收稿日期: 2023-08-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901104)

第一作者: 王斌,女,博士,副教授

E-mail: wangbin@jiangnan.edu.cn

的变化,以及壳寡糖产生的保护作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

壳寡糖( $M_w=900$  u,脱乙酰度 $>90\%$ ),浙江金壳生物科技有限公司;抗体 PI3K、AIF1、GFAP, Affinity Biosciences (美国);Akt、p-Akt、p-PI3K、GAPDH, 上海碧云天生物技术有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG,上海生物工程公司;HRP 标记的山羊抗鼠 IgG,武汉蛋白科技有限公司;超敏 E-CL 化学发光试剂盒(BeyoECL Plus),上海碧云天生物技术有限公司;IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  试剂盒,上海生物工程公司。

### 1.2 设备与仪器

4K15 冷冻型离心机,德国 Sigma 公司;Mini PROTEAN 3 cell 型电泳仪、ChemiDoc MP 全能型成像系统,美国 Bio-Rad 公司;FC 全自动酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 模型建立 39 只新生 SD 大鼠 (SPF 级),斯贝福公司提供。在 12 h 光照明暗循环下,动物舍的温度控制在 25  $^{\circ}\text{C}$  左右。所有动物实验的操作已通过江南大学实验管理与动物福利委员会的审核,伦理审核的编号为 JN.No20210915S0051120

[324]。新生大鼠出生日定为第 1 天 (Postnatal day1, PD1),在 PD4 随机分为空白对照组 (CON 组)、模型组 (ETOH 组)、壳寡糖干预组 (COS 组)。每日灌胃之前进行称重,灌胃结束后立即将新生鼠放回母鼠笼盒。根据批准壳寡糖等 6 种新食品原料的公告<sup>[11]</sup>,壳寡糖的每人每日推荐量低于 0.5 g。如图 1 所示步骤灌胃,配制 2.25 mg/mL 的壳寡糖溶液,以 45 mg/kg 体质量的剂量在 PD4~PD9 期间灌胃,灌胃体积为 0.2 mL/10 g 体质量。按照 Kelly 等<sup>[12]</sup>的方法并稍作改动,由 95% 药用级酒精配制体积分数为 20% 的乙醇溶液,COS 组、ETOH 组在 PD5~PD9 期间用壳寡糖灌胃 90 min 后再灌胃 20% 乙醇 (20% 乙醇灌胃量为 5.25 g/kg 体质量,灌胃体积为 0.33 mL/10 g 体质量,分两次给药,间隔时间 2 h),而 CON 组灌胃相同体积的生理盐水。在 PD9 灌胃结束后,将 SD 大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛溶液 (0.35 mL/100 g 体质量),麻醉后颈椎脱臼处死,快速分离海马并暂存在液氮中,之后储存在  $-80$   $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。其它大鼠继续饲养在实验动物中心,不加干预,于 PD24 按照 PD9 的步骤全部处死。本实验中使用雌、雄 SD 大鼠,尽量保持每组有相同数量、比例的雌性和雄性,以防性别引起的差异。

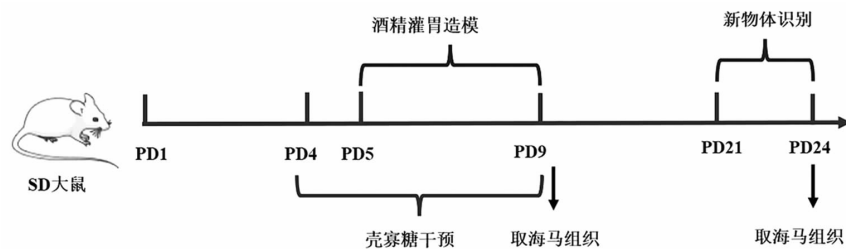


图 1 酒精损伤海马组织模型建立及壳寡糖干预实验步骤

Fig.1 Establishment of model of alcohol induced hippocampal injury and experimental steps of chitosan oligosaccharide intervention

1.3.2 新物体识别实验 新物体识别实验分为 3 个阶段。第 1 阶段为适应阶段,在 PD21~PD22 期间,将大鼠放在空测试箱中,适应新环境,每只大鼠每天 20 min。第 3 天,即学习阶段,将两个相同的物体放入测试箱中,依次让每只大鼠自由探索 5 min 熟悉物体。在学习阶段 24 h 后进入测试阶段,用 1 个新物体替换测试箱中的 1 个物体,让大

鼠再次自由探索 5 min。分别记录每只大鼠探索新物体或旧物体的时间<sup>[13]</sup>。

辨别率( $\%$ )=(新物体探索时间-旧物体探索时间)/总探索时间 $\times 100$

1.3.3 海马组织中炎症因子测定 从海马组织中提取蛋白,将蛋白裂解液(RIPA)裂解液和苯甲磺酰氟(PMSF)按照 100:1 的体积比制备混合液,按

照 $10\ \mu\text{L}/\mu\text{g}$  海马组织称取海马组织并加入混合液防止蛋白降解。于高通量组织研磨器中将组织匀浆(60 Hz, 60 s), 冰上裂解 30 min, 将匀浆以 10 000 r/min 离心 15 min, 将上清液吸出、收集, 储存在 $-80\ ^\circ\text{C}$ , 备用。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  含量。

**1.3.4 免疫印迹法(Western blot)** 按照 1.3.3 节方法提取海马组织蛋白, 测定其浓度。将海马组织蛋白与 5 $\times$ 上样缓冲液混合并在 $95\ ^\circ\text{C}$ 加热 4 min 后, 在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(10%分离胶、5%浓缩胶)上通过电泳分离蛋白质样品, 80 V 恒压 15 min 后条带泳动到浓缩胶与分离胶的分界线, 将电压升至 120 V 继续电泳, 当溴酚蓝泳动至靠近胶的底部时停止电泳, 将分离的蛋白质转移到 PVDF 膜。用 5% 牛血清白蛋白(BSA)或 5% 脱脂牛奶在 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)和 0.05% Tween-20 (TBST)中室温封闭 1.5 h, 一抗孵育过夜, 二抗室温孵育 1.5 h 后, 使用 ECL 显影液在凝胶成像系统中曝光成像。一抗按一定的比例稀释[Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、GFAP(1:1 000)、AIF1(1:500)和 GAPDH(1:2 000)]。

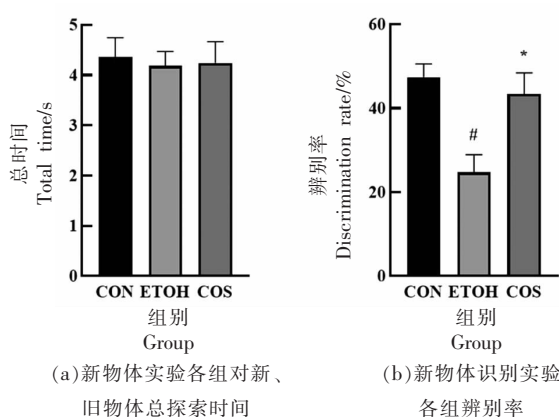
#### 1.4 数据统计与分析

所有试验数据的分析使用 SPSS 软件(美国伊利诺伊州芝加哥), 数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示。通过单因素方差分析(ANOVA)分析实验组间的差异。 $P<0.05$  被认为具有统计学意义。使用 Tukey 检验各组显著差异的情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 壳寡糖对酒精损伤大鼠学习和记忆的影响

新生大鼠在酒精暴露下会出现学习障碍<sup>[14]</sup>。为了评估壳寡糖是否能缓解酒精诱导的早期学习缺陷, 进行一项海马依赖性行为学实验。在新物体识别实验中, COS 组、ETOH 组和 CON 组的总探索时间没有显著差异(图 2a,  $P>0.05$ ), 表明大鼠对位置没有偏好, 探索能力也没有差异, 探索能力不会对新物体识别实验产生影响。如图 2b 所示, ETOH 组的辨别率显著低于 CON 组, 表明酒精造成识别记忆的缺陷, 而 COS 组的辨别率显著高于 E-



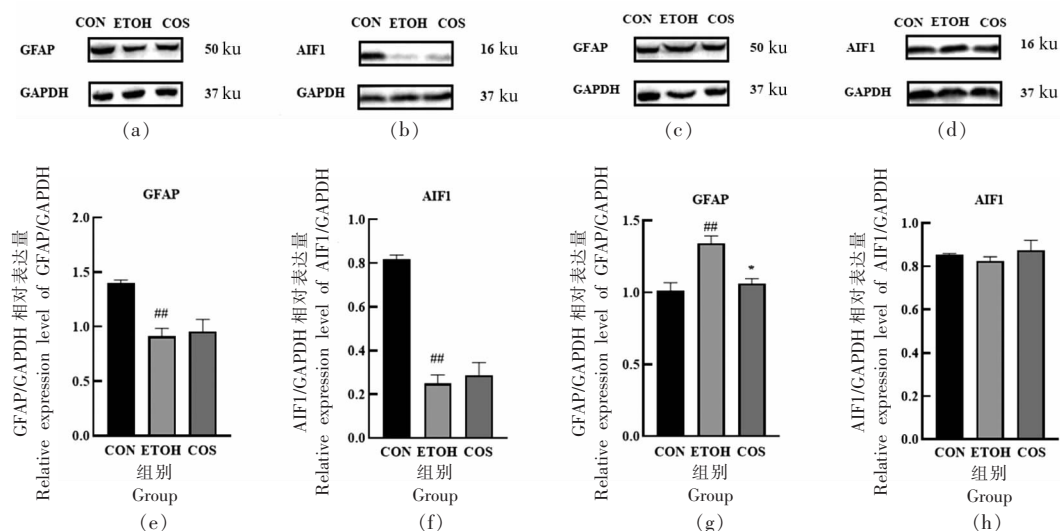
注: #. ETOH 组与 CON 组相比,  $P<0.05$ ; \*. COS 组与 ETOH 组相比,  $P<0.05$ , 下同;  $n=3$ 。

图 2 壳寡糖对酒精损伤大鼠学习和记忆的影响  
Fig.2 Effects of chitosan oligosaccharide on learning and memory in ethanol-injured rats

TOH 组( $P<0.05$ ), 表明它可以区分新物体和旧物体。结果表明, 壳寡糖可以改善酒精损伤 SD 大鼠的记忆能力。

### 2.2 壳寡糖对酒精损伤大鼠海马组织中 GFAP 和 AIF1 蛋白水平的影响

GFAP 是星形胶质细胞细胞骨架中间丝的主要成分, 是新型胶质细胞的主要标志物。对 GFAP 的分析可以评估幼鼠神经胶质细胞到星形胶质细胞的分化以及幼鼠暴露于酒精对大脑的影响。幼鼠在暴露于酒精后 GFAP 水平有降低的趋势<sup>[15]</sup>。如图 3a、3b、3e 和 3f 所示, 在 PD9, 与 CON 组相比, ETOH 组的 GFAP 蛋白水平显著下降( $P<0.01$ ), 而与 ETOH 组相比, COS 组的 GFAP 蛋白水平无显著差异( $P>0.05$ )。有研究表明, 壳寡糖可以通过降低胶质细胞的活性来减少炎症细胞因子的产生<sup>[16]</sup>。乙醇会导致神经炎症引起的神经变性, 神经炎症的一个特征是小胶质细胞激活, AIF1 是小胶质细胞的标志物, 现大多数关于酒精诱导的小胶质细胞活化中活化的小胶质细胞具有促炎活性<sup>[17]</sup>。在酒精干预的最后几天观察到小胶质细胞的损失, 而小胶质细胞增殖发生在停止酒精干预的后几天<sup>[18]</sup>。在 PD9, 与 CON 组相比, ETOH 组海马中 AIF1 的蛋白水平被显著抑制, 而 COS 组 AIF1 组的蛋白水平与 ETOH 组相比无显著差异( $P>0.05$ )。如图 3c、3d、3g 和 3h 所示, 在 PD24, 与



注:图 3a、3b、3e 和 3f 为在 PD9 中 GFAP 和 AIF1 的蛋白表达水平;图 3c、3d、3g 和 3h 为在 PD24 中 GFAP 和 AIF1 的蛋白表达水平;##. ETOH 组与 CON 组相比,  $P < 0.01$ , 下同;  $n = 3$ 。

图 3 在 PD9 和 PD24 壳寡糖对酒精损伤的海马组织的 GFAP 和 AIF1 蛋白水平的影响

Fig.3 Effects of chitosan oligosaccharide on GFAP and AIF1 protein levels in ethanol injured hippocampus on PD9 and PD24

CON 组相比, ETOH 组的 GFAP 蛋白水平显著上升 ( $P < 0.01$ ), 乙醇可能通过  $Ca^{2+}$  刺激线粒体产生氧化自由基, 并增加大鼠海马星形胶质细胞中的 GFAP 含量<sup>[19]</sup>。而与 ETOH 组相比, 观察到壳寡糖可显著防止乙醇相关的影响 ( $P < 0.05$ )。在 PD24, CON 组、ETOH 和 COS 组的海马中 AIF1 的蛋白水平无明显差异 ( $P > 0.05$ )。急性暴饮暴食乙醇双相改变小胶质细胞 AIF1 基因表达, 酒精干预期间最初 6 h 后降低, 随后停止干预后增加<sup>[20]</sup>。

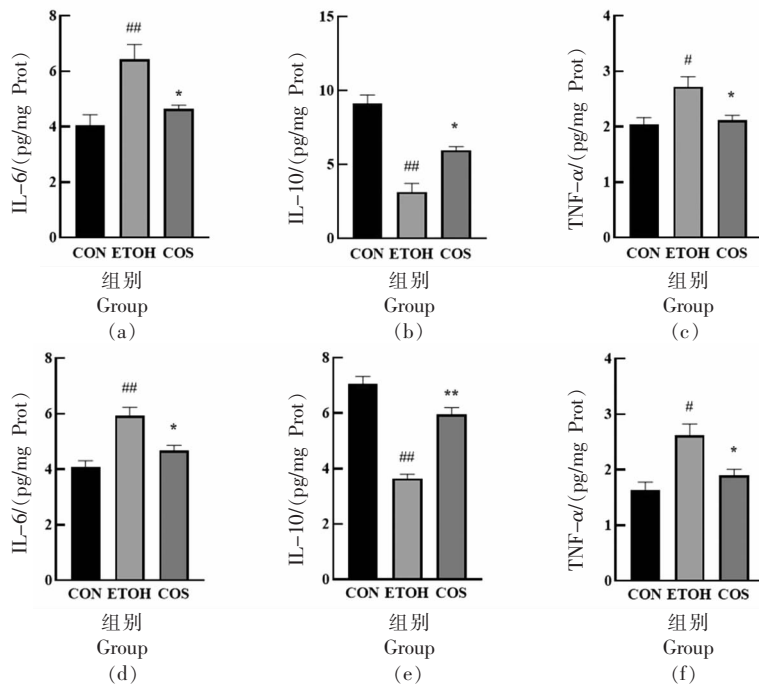
### 2.3 壳寡糖对酒精损伤大鼠海马组织中炎症因子的影响

胶质细胞被多种炎症因子激活活化产生抗炎因子或促炎因子。酒精增强了促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白水平, 同时抑制抗炎细胞因子 IL-10 表达<sup>[21-22]</sup>。如图 4a~4c 所示, 在 PD9 中, ETOH 组的促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量显著高于 CON 组, 抗炎细胞因子 IL-10 的表达量显著低于 CON 组 ( $P < 0.05$ )。在壳寡糖干预下, IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量相比于 ETOH 组显著降低, IL-10 的表达量显著增加 ( $P < 0.05$ )。如图 4d~4f 所示, 在 PD24, ETOH 组 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量显著高于 CON 组, IL-10 表达量显著低于 CON 组 ( $P <$

0.05)。与 ETOH 组相比, COS 组 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量得到缓解 ( $P < 0.05$ ), IL-10 的表达量显著增加 ( $P < 0.01$ )。乙醇对中枢神经系统 IL-6、IL10、TNF- $\alpha$  等炎症因子稳态的破坏, 会改变海马中抑制性 GABA 能系统水平, 影响多巴胺神经传递, 改变学习、记忆、情绪平衡等多种神经功能<sup>[23-25]</sup>。壳寡糖可能通过调节炎症因子的表达来保护酒精诱导的 SD 大鼠的神经损伤。炎症因子可能通过激活由 PI3K 和 Akt/PKB 组成的通路介导神经保护作用<sup>[24-26]</sup>。之后, 评估了 PI3K/Akt 信号通路的蛋白表达水平。

### 2.4 壳寡糖对酒精损伤大鼠海马组织中 PI3K/Akt 信号通路的影响

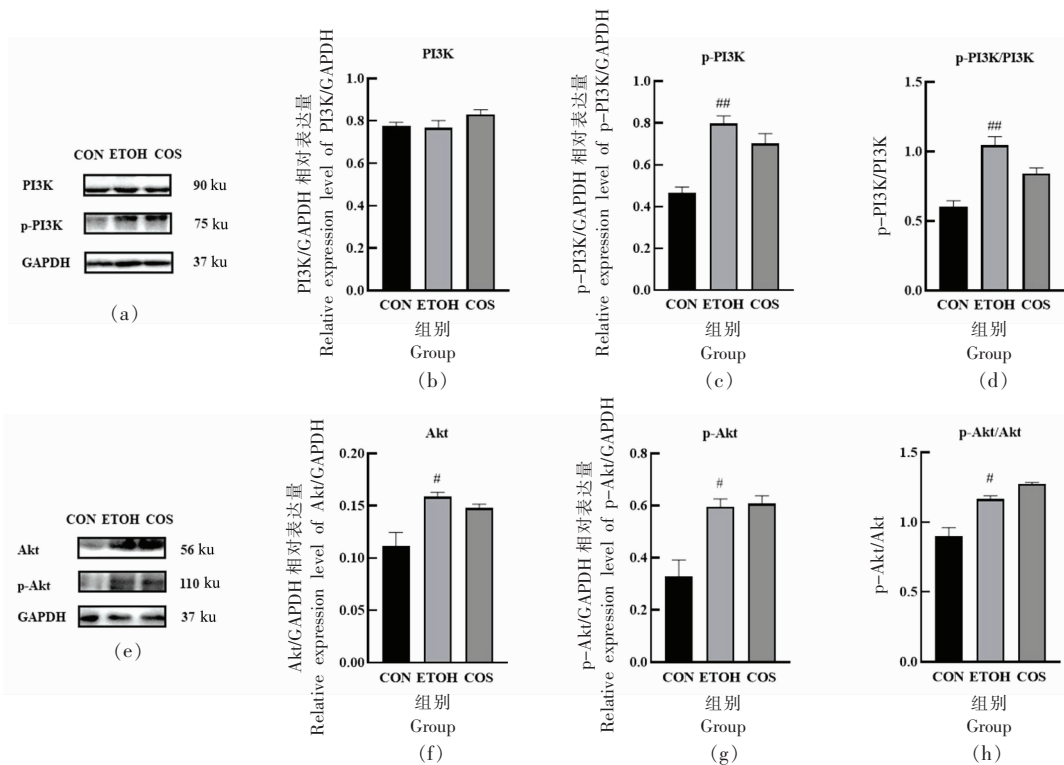
本文评估了 PD9 海马组织 PI3K/Akt 信号通路的激活情况, 该通路被证实与炎症细胞因子的调节有关<sup>[27]</sup>。Akt 是负责介导抗凋亡信号的主要靶标, Akt 通路被 PI3K 激活, Akt 通过阻断促凋亡蛋白和相关过程的功能来增强细胞的存活。如图 5 所示, 在 PD9, CON 组、ETOH 和 COS 组的 PI3K 的蛋白水平无明显差异, 与 CON 组相比, ETOH 组的 PI3K 蛋白的磷酸化水平显著上升 ( $P < 0.01$ ), 而与 ETOH 组相比, COS 组的 PI3K 蛋白的磷酸化



注:图 4a~4c. PD9 炎症因子表达水平;图 4d~4f. PD24 炎症因子表达水平;\*\*, COS 组与 ETOH 组相比,  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ ;下同。

图 4 壳寡糖对酒精损伤的海马组织中炎症因子(IL-6、IL10、TNF-α)的影响

Fig.4 Effect of chitosan oligosaccharide on inflammatory factors (IL-6, IL10, TNF-α) in alcohol-induced hippocampal tissue



注:图 5a~5d. PI3K 和 p-PI3K 的蛋白表达水平;图 5e~5h. Akt 和 p-Akt 的蛋白表达水平;  $n = 3$ 。

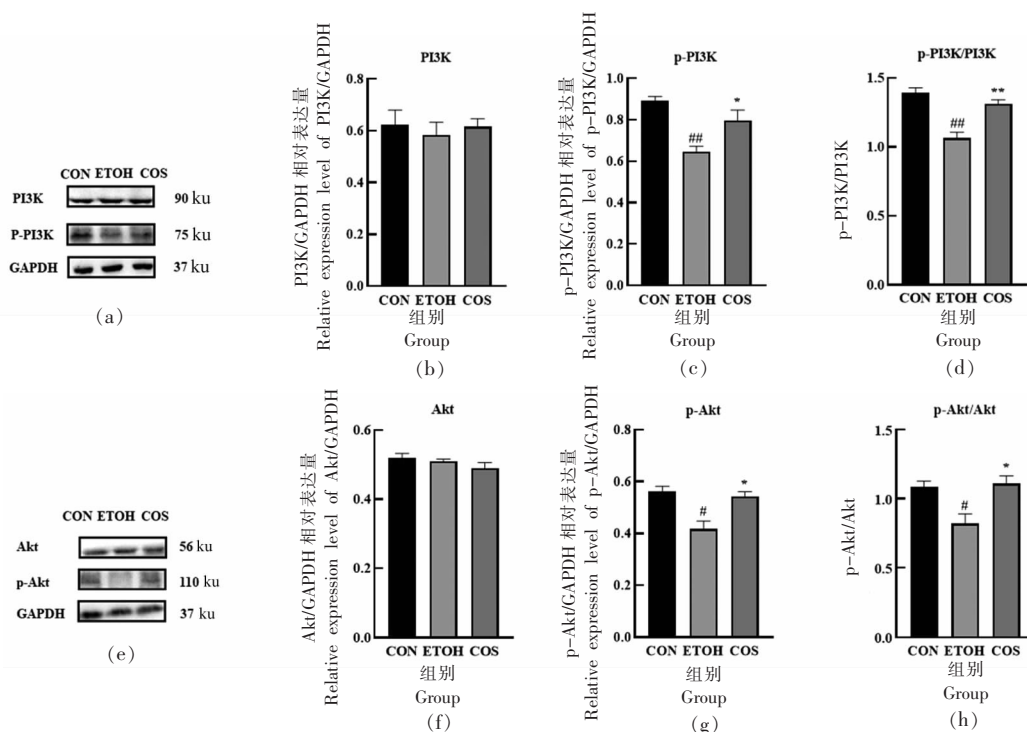
图 5 在 PD9 壳寡糖对酒精损伤的海马组织 PI3K/Akt 信号通路的影响

Fig.5 Effect of chitosan oligosaccharide on PI3K/Akt signaling pathway in alcohol-injured hippocampus on PD9

水平无明显差异( $P>0.05$ )。与 CON 组相比, ETOH 组的 Akt 蛋白和其磷酸化水平显著上升( $P<0.05$ ), 与先前的一项研究乙醇处理后 PI3K 蛋白和 AKT 蛋白磷酸化水平增加的结果一致<sup>[28]</sup>。结果表明, 壳寡糖干预, 在 PD9 未对 Akt 和 PI3K 蛋白及其磷酸化水平产生明显差异( $P>0.05$ )。

如图 6 所示, 在 PD24, CON 组、ETOH 和 COS 组的 PI3K 和 Akt 的蛋白水平无明显差异, 与 CON

组相比, ETOH 组的 PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化水平显著下降( $P<0.05$ ), 与小鼠乙醇干预后 Akt 磷酸化减少的结果一致<sup>[29]</sup>。而与 ETOH 组相比, COS 组的 PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化水平显著上升( $P<0.05$ )。PI3K/Akt 信号通路在神经元生长、增殖、存活功能方面具有重要意义。ETOH 组的 PI3K/Akt 信号通路被显著抑制, 壳寡糖干预在 PD24 可以缓解 PI3K 和 Akt 磷酸化被抑制。



注:图 6a~6d. PI3K 和 p-PI3K 的蛋白表达水平;图 6e~6h. Akt 和 p-Akt 的蛋白表达水平; $n=3$ 。

图 6 在 PD24 壳寡糖对酒精损伤的海马组织 PI3K/Akt 信号通路的影响

Fig.6 Effect of chitosan oligosaccharide on PI3K/Akt signaling pathway in alcohol-injured hippocampus on PD24

### 3 结论

综上, 新物体实验中壳寡糖组的辨别率显著高于模型组, 壳寡糖可以改善酒精损伤的 SD 大鼠的记忆能力。在酒精和壳寡糖干预结束初期, COS 组中 PI3K 和 Akt 蛋白及其磷酸化水平、GFAP 蛋白、AIF1 蛋白与 ETOH 组比无显著差异, 促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量显著低于 ETOH 组, 抗炎细胞因子 IL-10 表达量显著高于 ETOH 组。在酒精结束干预结束两周, 即 PD24 时, ETOH 组中 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平与 CON 组相比被显著抑制, GFAP 蛋白过表达, AIF1 蛋白无明显差异。与 ETOH 组相比, COS 组中 PI3K、Akt 蛋白

的磷酸化水平显著上升, GFAP 蛋白表达下降, 促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量显著低于 ETOH 组, 抗炎细胞因子 IL-10 表达量显著高于 ETOH 组。结果表明: 壳寡糖可在 PD24 时缓解 PI3K/Akt 通路的抑制, 抑制 GFAP 的过表达; 在 PD9 和 PD24 时缓解酒精引起的促炎细胞因子 (IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 过表达和抗炎细胞因子 (IL-10) 的抑制。在实验中, 酒精暴露可以导致海马组织的功能受损, 在对海马组织的长期影响中通过调控改变 PI3K/Akt 信号通路、星形胶质细胞细胞 GFAP 等的表达, 促进酒精损伤海马组织的修复。本研究对壳寡糖作为功能性食品开发提供新思路。

## 参 考 文 献

- [1] NUTT D, HAYES A, FONVILLE L, et al. Alcohol and the brain[J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3938.
- [2] WANG X, ZHANG K, YANG F, et al. Minocycline protects developing brain against ethanol-induced damage[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 129(11): 84–99.
- [3] DREW P D, JOHNSON J W, DOUGLAS J C, et al. Pioglitazone blocks ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders[J]. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 2015, 39(3): 445–454.
- [4] HE L, MARECKI J C, SERRERO G, et al. Dose-dependent effects of alcohol on insulin signaling: Partial explanation for biphasic alcohol impact on human health[J]. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(10): 2541–2550.
- [5] TSUJI R, FATTORI V, ABE S, et al. Effects of postnatal ethanol exposure at different developmental phases on neurotrophic factors and phosphorylated proteins on signal transductions in rat brain[J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2008, 30(3): 228–236.
- [6] AZUMA K, OSAKI T, MINAMI S, et al. Anti-cancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides[J]. *Journal of Functional Biomaterials*, 2015, 6(1): 33.
- [7] ZHU L M, LI R L, JIAO S M, et al. Blood-Brain barrier permeable chitosan oligosaccharides interfere with beta-amyloid aggregation and alleviate beta-amyloid protein mediated neurotoxicity and neuroinflammation in a dose- and degree of polymerization-dependent Manner[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(10): 488.
- [8] BENCHAMAS G, HUANG G L, HUANG S Y, et al. Preparation and biological activities of chitosan oligosaccharides[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 107(1): 38–44.
- [9] NAVEED M, PHIL L, SOHAIL M, et al. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 827–843.
- [10] 王斌, 陈逸伦, 夏文水. 壳寡糖对酒精诱导的新生大鼠脑组织氧化应激损伤和凋亡因子的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 105–111.
- WANG B, CHENG Y L, XIA W S. Effect of chitooligosaccharide on ethanol-induced oxidative stress injury and apoptotic factors in neonatal rat brain[J]. *Food Science*, 2022, 43(7): 105–111.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. 国家卫生计生委批准壳寡糖等6种新食品原料[EB/OL]. (2014-04-16)[2022-10-25]. <http://law.foodmate.net/show-182766.html>. National Health and Family Planning Commission. The National Health and Family Planning Commission approved six new food raw materials including chitosan oligosaccharide[EB/OL]. (2014-04-16)[2022-10-25]. <http://law.foodmate.net/show-182766.html>.
- [12] KELLY S J, LAWRENCE C R. Intra-gastric intubation of alcohol during the perinatal period[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 447(4): 101–110.
- [13] BOBOT M, THOMAS L, MOYON A, et al. Uremic toxic blood-brain barrier disruption mediated by AhR activation leads to cognitive impairment during experimental renal dysfunction[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2020, 31(7): 1509–1521.
- [14] ROCHA R, ANDRADE L, ALVES T, et al. Behavioral and brain morphological analysis of non-inflammatory and inflammatory rat models of preterm brain injury[J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2021, 185(1): 17540.
- [15] ALMEIDA-TOLEDANO L, ANDREU-FERNANDEZ V, ARAS-LOPEZ R, et al. Epigallocatechin gallate ameliorates the effects of prenatal alcohol exposure in a fetal alcohol spectrum disorder-like mouse model[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(2): 715.
- [16] WU W, WEI W, LU M, et al. Neuroprotective effect of chitosan oligosaccharide on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. *Neurochemical Research*, 2017, 42(11): 3186–3198.
- [17] MARSHALL S A, GEIL C R, NIXON K. Prior binge ethanol exposure potentiates the microglial response in a model of alcohol-induced neurodegeneration[J]. *Brain Sciences*, 2016, 6(2): 16.
- [18] MCCLAIN J A, MORRIS S A, DEENY M A, et al. Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia[J]. *Brain, Be-*

- havior, and Immunity, 2011, 25 (Suppl.1): S120–S128.
- [19] GONZALEZ A, PARIENTE J A, SALIDO G M. Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes [J]. Brain Research, 2007, 8(48): 28–37.
- [20] WALTER T J, CREWS F T. Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal[J]. Journal of Neuroinflammation, 2017, 14(1): 86.
- [21] KING J A, NEPHEW B C, CHOUDHURY A, et al. Chronic alcohol-induced liver injury correlates with memory deficits: Role for neuroinflammation[J]. Alcohol, 2020, 83(7): 75–81.
- [22] NOOR S, SANCHEZ J J, VANDERWALL A G, et al. Prenatal alcohol exposure potentiates chronic neuropathic pain, spinal glial and immune cell activation and alters sciatic nerve and DRG cytokine levels[J]. Brain, Behavior and Immunity, 2017, 61(6): 80–95.
- [23] GRUOL D L, HUITRON-RESENDIZ S, ROBERTS A J. Altered brain activity during withdrawal from chronic alcohol is associated with changes in IL-6 signal transduction and GABAergic mechanisms in transgenic mice with increased astrocyte expression of IL-6[J]. Neuropharmacology, 2018, 138(5): 32–46.
- [24] SURYANARAYANAN A, CARTER J M, LANDN J D, et al. Role of interleukin-10 (IL-10) in regulation of GABAergic transmission and acute response to ethanol[J]. Neuropharmacology, 2016, 107(16): 181–188.
- [25] EMMONS H A, WALLACE C W, FORDAHL S C, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  attenuate dopamine release in mice fed a high-fat diet, but not medium or low-fat diets[J]. Nutritional Neuroscience, 2023, 26(9): 1–11.
- [26] ZHONG W H, QIAN K J, XIONG J B, et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B related signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 83(6): 302–313.
- [27] FU D, SHANG X, NI Z, et al. Shikonin inhibits inflammation and chondrocyte apoptosis by regulation of the PI3K/Akt signaling pathway in a rat model of osteoarthritis[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2016, 12(4): 2735–2740.
- [28] QIAO X M, GAI H Y, SU R, et al. PI3K-AKT-GSK3 $\beta$ -CREB signaling pathway regulates anxiety-like behavior in rats following alcohol withdrawal[J]. Journal of Affective Disorders, 2018, 235(4): 96–104.
- [29] SHAH S A, YOON G H, KIM M O. Protection of the developing brain with anthocyanins against ethanol-induced oxidative stress and neurodegeneration[J]. Molecular Neurobiology, 2015, 51(3): 1278–1291.

### Protective Effect of Chitosan Oligosaccharide on Ethanol Induced Inflammatory Reaction

Wang Bin<sup>1,2</sup>, Zhao Yuke<sup>1</sup>, Jiang Qixing<sup>1,2</sup>, Xu Yanshun<sup>1,2</sup>, Xia Wenshui<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

<sup>2</sup>Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, Wuxi 214122, Jiangsu

**Abstract** To study the protective effect of chitosan oligosaccharide on alcohol-induced hippocampal tissue, 39 newborn SD rats were randomly divided into three groups: Blank control group (CON group), model group (ETOH group) and chitosan oligosaccharide intervention group (COS group). The alcohol injury model of newborn SD rats was established. The COS group received chitosan oligosaccharide intervention. At the end of the intervention on the 9<sup>th</sup> day after birth (PD9), no intervention was conducted between PD9 and PD24. The phosphatidylinositol-4,5-bisphosphoinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) of PD9 and PD24 were observed respectively expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and apoptosis-inducing factor1 (AIF1), inflammatory factors interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ). The new object recognition experiment is carried out at PD24. The results showed that at PD9, PI3K, Akt proteins and their phosphorylation levels, GFAP and AIF1 protein in



COS group were not significantly different from those in ETOH group, but IL-6 and IL-10 were significantly increased, TNF- $\alpha$  significantly decreased. At PD24, compared with ETOH group, the phosphorylation level of PI3K and Akt protein in COS group increased significantly, the expression of GFAP decreased, IL-6 and IL-10 increased significantly, and TNF- $\alpha$  significantly decreased. Chitosan oligosaccharide can alleviate the inhibition of PI3K/Akt pathway and inhibit the overexpression of astrocyte marker GFAP in PD24.

**Keywords** chitosan oligosaccharide; alcohol; hippocampus; antiinflammatory