

[doi: 10.3969/j.issn.1006-7795.2021.06.015]

· 基础研究 ·

大豆卵磷脂联合大豆异黄酮改善大鼠学习记忆损伤及脑血管保护作用

余辉艳¹ 池亚菲² 李红睿¹ 王 轩¹ 周雪阳³ 肖 荣¹ 席元第^{1*}

(1. 首都医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,北京 100069; 2. 首都医科大学实验动物部,北京 100069; 3. 北京市顺义区妇幼保健院医务科,北京 101300)

【摘要】 目的 观察大豆卵磷脂(soy lecithin, SL)和大豆异黄酮(soy isoflavone, SIF)改善大鼠学习记忆损伤及脑血管保护的联合作用,探讨二者的最佳联合剂量,为明确大豆活性物质的神经保护作用及其联合效应提供科学依据。**方法** 本研究使用 SPF 级的成年雄性 Wistar 大鼠,采用两因素三水平正交实验设计分为对照组、 β 淀粉样肽(β -amyloid, A β)模型组和 9 个不同的 SL + SIF 剂量组合干预组。应用水迷宫、脑血管 HE 染色、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)以及酶法试剂盒等方法,对大鼠学习记忆能力、脑血管病理损伤、体内氧化损伤水平以及氧化还原平衡体系等相关指标进行检测。**结果** A β 模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P < 0.05$),脑血管组织形态异常改变明显,并且伴有体内丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)显著上升($P < 0.05$),谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽的比值(ratio of glutathione/oxidized glutathione, GSH/GSSG)显著下降($P < 0.05$)。相反,SL + SIF 各干预组与 A β 模型组比较,二者对上述改变均有不同程度的保护作用。SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 是改善大鼠学习记忆、保护脑血管以及调节体内氧化还原平衡体系的最佳联合剂量。**结论** SL + SIF 可以显著改善 A β 介导的大鼠学习记忆损伤,其神经保护作用可能与二者发挥抗氧化活性拮抗 A β 介导的脑血管损伤有关。二者的神经保护作用具有协同效应,SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 是大鼠神经保护的最佳联合剂量。

【关键词】 大豆卵磷脂;大豆异黄酮;联合;学习记忆损伤; β 淀粉样肽

【中图分类号】 R459.3

Joint effects of soy lecithin and soy isoflavone on improving learning and memory impairment and cerebrovascular function in rats

Yu Huiyan¹, Chi Yafei², Li Hongrui¹, Wang Xuan¹, Zhou Xueyang³, Xiao Rong¹, Xi Yuandi^{1*}

(1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Department of Laboratory Animal, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. Maternal and Child Health Hospital, Beijing Shunyi District, Beijing 101300, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of soy lecithin (SL) combined with soy isoflavone (SIF) on cognitive function and cerebrovascular damage in rats with learning and memory impairment, and to explore the best combined dosage in order to provide scientific evidence of the neuroprotective effects of soybean's active substances and their combined supplementary effects. **Methods:** In this study, SPF-grade adult male Wistar rats were used. Using the L9(34) orthogonal experimental design, control group, β -amyloid(A β) group and nine different dose combinations of SIF + SL were obtained. **Methods** Such as water maze, cerebrovascular HE staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and enzymatic kits were used. The rat's learning and memory ability, cerebrovascular pathological damage, the level of oxidative damage, and the redox balance system were tested. **Results** Compared with the control group, the escape latency of the A β model group rats was significantly prolonged ($P < 0.05$), and the morphological changes of cerebrovascular tissue were obvious, and there were increased significant changes in malondialdehyde (MDA) and 3-nitrotyrosine (3-NT) in rats ($P < 0.05$), the ratio of glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) decreased significantly ($P < 0.05$). On the contrary, compared with the model group in the SL + SIF intervention group, SL + SIF played a protective role for the model group. Based on the

基金项目:国家自然科学基金(81973018,82003459),北京市教委科技计划一般项目(KM201910025024),达能营养宣教基金(DIC2019-02)。This study was supported by National Natural Science Foundation of China(81973018,82003459),General Project of Scientific Research Program of Beijing Municipal Education Commission(KM201910025024),Danone Nutrition Education Fund(DIC2019-02)。

* Corresponding author, E-mail: xiaor711@163.com

网络出版时间:2021-12-01 12:58 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3662.R.20211129.1059.022.html

above results, the study found that SL ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) is the best combined dose to improve the rat's learning and memory impairment, protect the cerebral blood vessels and regulate the redox balance system. **Conclusion** SL + SIF can significantly improve A β -mediated learning and memory impairment in rats, and its neuroprotective effect may be related to the antioxidant activity of the two to antagonize A β -mediated cerebrovascular injury, and their neuroprotective effects of SL ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) is the best combined dose for rats.

【Key words】 soy lecithin; soy isoflavone; combination; learning and memory impairment; β -amyloid peptide

学习记忆损伤是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 等神经退行性疾病的典型临床症状, 脑血管损伤在 AD 的发生和发展中发挥了重要作用。研究^[1-2]显示, 在 AD 患者中存在颅内动脉损伤和毛细血管损害的现象, 这种脑血管损伤可能归因于体内严重的氧化损伤及其诱导的慢性脑血流灌注不足, 最终导致神经变性和认知功能障碍的发生^[3]。因此, 寻找简便易行且安全有效的防控脑血管损伤的办法, 无疑是预防和改善认知功能障碍相关神经退行性疾病的关键所在。

大豆卵磷脂 (soybean lecithin, SL) 和大豆异黄酮 (soy isoflavone, SIF) 是我国居民膳食中常见的大豆活性成分。研究^[4]显示, SL 和 SIF 均具有诸如调节血脂、抗氧化、提高免疫等多种生理功能。研究^[5-6]显示, 灌胃给予大鼠 SIF 可以改善 β 淀粉样肽 (β -amyloid, A β) 介导的大鼠学习记忆下降以及拮抗大鼠的脑组织和脑血管损伤。然而目前的研究大多针对单一物质, 虽然可以发挥上述调节作用, 但对疾病的预防及改善效果较弱, 且长期大剂量使用也存在安全风险。因此, 本研究通过建立学习记忆损伤大鼠模型, 使用正交实验设计, 探讨不同剂量 SL 和 SIF 的联合补充对 AD 大鼠学习记忆能力、脑血管病理损伤、体内氧化损伤水平以及氧化还原平衡体系的影响, 明确 SL 联合 SIF 对大鼠学习记忆和脑血管的保护作用, 并探索其最佳联合剂量。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠 132 只, SPF 级、雄性, 体质量 (250 ± 30) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。饲养条件: 温度 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\% \sim 55\%$, 自然采光; 不锈钢笼饲养, 自由摄食进水, 饲以基础饲料。动物实验通过首都医科大学动物伦理委员会批准, 伦理审查编号: AEEI-2017-002。

1.2 主要仪器与试剂

酶标仪 (Tecan 公司, Infinite M200, 瑞士); A β 1-40

购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国), SL 购自上海太伟药业有限公司, 丙酮不溶物为 93.9% (质量分数), 主要化学成分包括 84.2% (质量分数) 的磷脂酰胆碱、2.4% (质量分数) 的磷脂酰胺和无磷脂酰肌醇; SIF 购自正和通科技 (北京) 有限公司, 其中大豆异黄酮的总含量为 92.15% (质量分数), 主要化学成分包括 17.64% (质量分数) 的染料木黄酮、53.24% (质量分数) 的黄豆苷元和 21.27% (质量分数) 的黄豆黄素; 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、硫代巴比妥酸测试试剂盒、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和氧化谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 测定试剂盒均购自南京建城生物工程研究所并严格按照制造商的说明执行实验程序。

试剂配制: SL 和 SIF 溶解在 0.5% (质量分数) 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxyl methyl cellulose, CMC-Na) 中; A β 1-40 溶解于 0.9% (质量分数) 氯化钠注射液 (以下简称生理盐水) 后 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 d。

1.3 动物模型制作

用 1% (质量分数) 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 参照包新民等^[7]的《大鼠脑立体定位图谱》, 采用大鼠脑立体定位仪 (Narishige 公司, 日本) 向大鼠侧脑室以 Bregma 点为 0 点, 前凶后 (anteroposterior, AP) 1.3 mm, 中线旁开 (mediolateral, ML) 1.8 mm, 水平向下 (dorsoventral, DV) 3.4 mm 注射 A β 1-40 溶液 ($10 \text{ } \mu\text{g}/5 \text{ } \mu\text{L}$) 或生理盐水各 $5 \text{ } \mu\text{L}$, 微量注射器缓慢注射 3 min, 留针 5 min, 注射完毕缓慢抽出。术后第 2 天, 给予每只大鼠肌注青霉素 8 万单位, 预防感染。

1.4 动物分组与处理

实验分组: 通过两因素三水平正交实验设计, 所有大鼠根据体质量分为 11 组, 包括 A 组: 对照组 [0.5% (质量分数) CMC-Na 灌胃 + 侧脑室注射生理盐水], B 组: A β 组 [0.5% (质量分数) CMC-Na 灌胃 + 侧脑室注射 A β 1-40] 和 9 个 SIF + SL 干预组 (不同剂量的 SIF + SL 灌胃 + 侧脑室注射 A β 1-40), 具体包括 C 组: SL ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) +

A β 组; D组: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组; E组: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组; F组: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组; G组: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组; H组: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组; I组: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组; J组: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组; K组: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β 组。

实验处理:造模手术前,每天按各组 SIF + SL 或 0.5% (质量分数) CMC-Na 的剂量给大鼠灌胃,连续 14 d,然后进行手术,术后维持相同的灌胃干预 28 d。实验期间,于术后第 21 天,进行 Morris 水迷宫训练(5 d)及测试(1 d),测试完毕后收集脑组织及血液样本进行其他检测。

1.5 Morris 水迷宫

Morris 水迷宫为一个不锈钢的圆柱形水池,水池壁标明 4 个人水点,并以此将水池分为 4 个象限,即第 1、2、3 和 4 象限。平台位于第 1 象限中间位置,水深为高出平台 1 cm,水温控制在 22 °C ~ 25 °C。定位航行实验:实验历时 6 d,前 5 d 学习记忆训练,每天将大鼠面向池壁分别从不同象限的入水点放入水中,记录其找到平台所需的时间,即为逃避潜伏期。如果在 120 s 内找不到平台,则将其引导至平台并停留 20 s,逃避潜伏期记为 120 s。第 6 天为正式实验,并记录测试的逃避潜伏期。

1.6 脑血管苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色

每组采用数字表法随机选择 6 只大鼠,将麻醉大鼠的大脑迅速暴露,立即将解剖后的大脑浸入 4% (体积分数) 甲醛溶液中固定 48 h,移入 70% (体积分数) 乙醇中脱水,并用石蜡包埋切片(片厚 20 μ m)。采用 HE 对切片进行染色并观察大鼠大脑皮质海马区脑血管组织形态变化。

1.7 大鼠体内氧化损伤水平与氧化还原平衡体系检测

每组采用数字表法随机选择 6 只大鼠,从麻醉大鼠心脏收集 EDTA 抗凝血液,在 4 °C 以 3 000 r/min 离心 10 min,收集血浆。采用 ELISA 法检测大鼠血浆中 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)浓度,采用硫代

巴比妥酸测试试剂盒测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)浓度。

每组采用数字表法随机选择 6 只大鼠,采用酶法试剂盒检测血浆 GSH 和 GSSG 浓度,并根据说明计算 GSH/GSSG 比率,以评估大鼠体内氧化还原平衡状态。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 15.5 统计学软件对数据进行处理分析,所有数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较使用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 LSD 法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对 AD 大鼠学习记忆能力的影响

各组间逃避潜伏期的总体比较,差异无统计学意义($F = 1.330, P > 0.05$),但两两比较组间差异有统计学意义,与 A 组比较, B 组大鼠逃避潜伏期显著延长;但与 B 组比较, 9 个 SL + SIF 干预组的逃避潜伏期分别有不同趋势的下降,即 SL + SIF 各干预组中 E、F、G、H、J、K 组大鼠的逃避潜伏期下降差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,大鼠游泳的总路程与逃避潜伏期一致($F = 1.111, P > 0.05$), E、F、H、J、K 组与 B 组相比,总路程缩短差异有统计学意义($P < 0.05$),详见图 1。

2.2 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对 AD 大鼠脑血管病理损伤的影响

B 组大鼠脑血管内皮和平滑肌萎缩,毛细血管壁畸变严重,毛细血管直径变窄甚至发现大鼠脑微血管减少。但这些病理变化在 SL + SIF 干预组,尤其是 E、F、G、I 组大鼠中较少出现(图 2)。

2.3 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对 AD 大鼠氧化损伤的影响

各组间大鼠血浆中 3-NT 和 MDA 浓度差异有统计学意义($F = 2.121, P < 0.05$; $F = 4.110, P < 0.05$)。两两比较结果显示,与 A 组比较, B 组大鼠血浆中 3-NT 和 MDA 浓度显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$); 3-NT 浓度检测, F 组与 A 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其他各组趋势与 B 组一致,依然显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); SL + SIF 各组的 MDA 浓度检测显示,与 B 组比较, F 组和 H 组浓度显著降低,差异有统计学意义

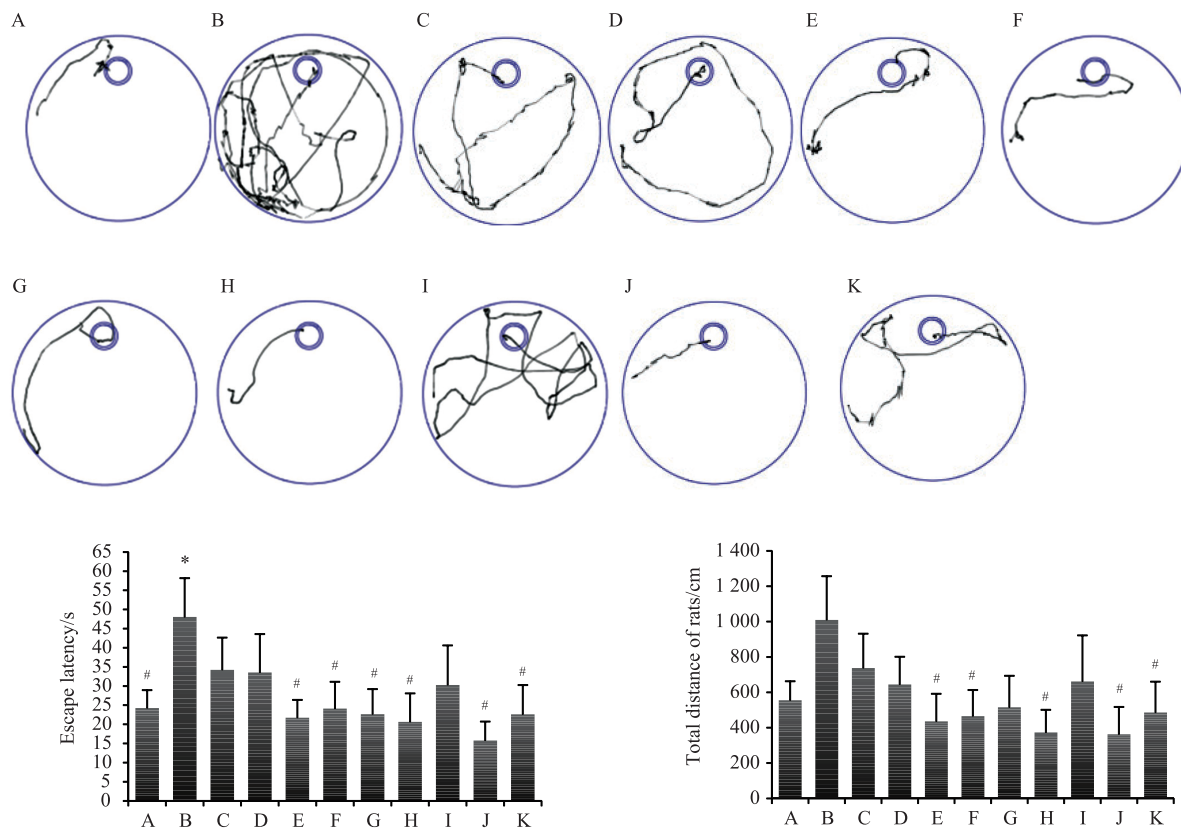


图1 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对AD大鼠学习记忆能力的影响

Fig. 1 Effect of soy lecithin combined with soy isoflavone on learning and memory ability in AD rats ($n = 12$ per group)

* $P < 0.05$ vs A group, # $P < 0.05$ vs B group. A: control group; B: $A\beta$ group; C: SL($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; D: SL($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; E: SL($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; F: SL($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; G: SL($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; H: SL($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; I: SL($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; J: SL($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; K: SL($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group); AD: Alzheimer's disease; $A\beta$: β -amyloid; SL: soy lecithin; SIF: soy isoflavone.

($P < 0.05$), 详见图3。

2.4 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对AD大鼠氧化还原平衡体系的影响

各组之间大鼠GSH/GSSG水平比较,差异有统计学意义($F = 4.772, P < 0.05$)。两两比较结果显示,与A组比较,B组大鼠的GSH/GSSG比率明显降低;与B组比较,GSH/GSSG比值在C、D、E、F、G、H和I组中显著升高($P < 0.05$),但J、K组的干预效果不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图4。

通过正交实验设计以及上述结果的综合比较,可以明确9组SL+SIF干预组中,最佳联合剂量为F组,即SL($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。

3 讨论

学习记忆损伤是AD发生和发展过程中的主要

临床表现,而血管因素在AD的发展进程中扮演着重要角色^[6,8]。研究^[8-9]显示,AD患者脑内的 $A\beta$ 可能是导致脑血管壁细胞发生氧化损伤的重要物质之一。并且,Bennett等^[10]的研究提出,血管损伤可能是AD发展的初始因素。鉴于认知功能障碍的不可逆性,在AD发生和发展早期寻找有效的干预措施就显得尤为重要。诸多研究^[11-13]显示,膳食活性物质,如SL、SIF、番茄红素、姜黄素等植物活性成分对动脉粥样硬化,心血管疾病和AD都有不同程度的改善作用。但是,目前的研究大多针对单一物质,而鉴于单一膳食活性物质的日常摄入量较为有限,因此上述的生理作用较弱。尤其对于神经系统的保护及改善作用,探索膳食活性物质的联合作用则势在必行。已知SL和SIF是大豆及其制品中的主要活性成分,但不同豆制品中该两种成分的含量差异较大,且因膳食吸收率的

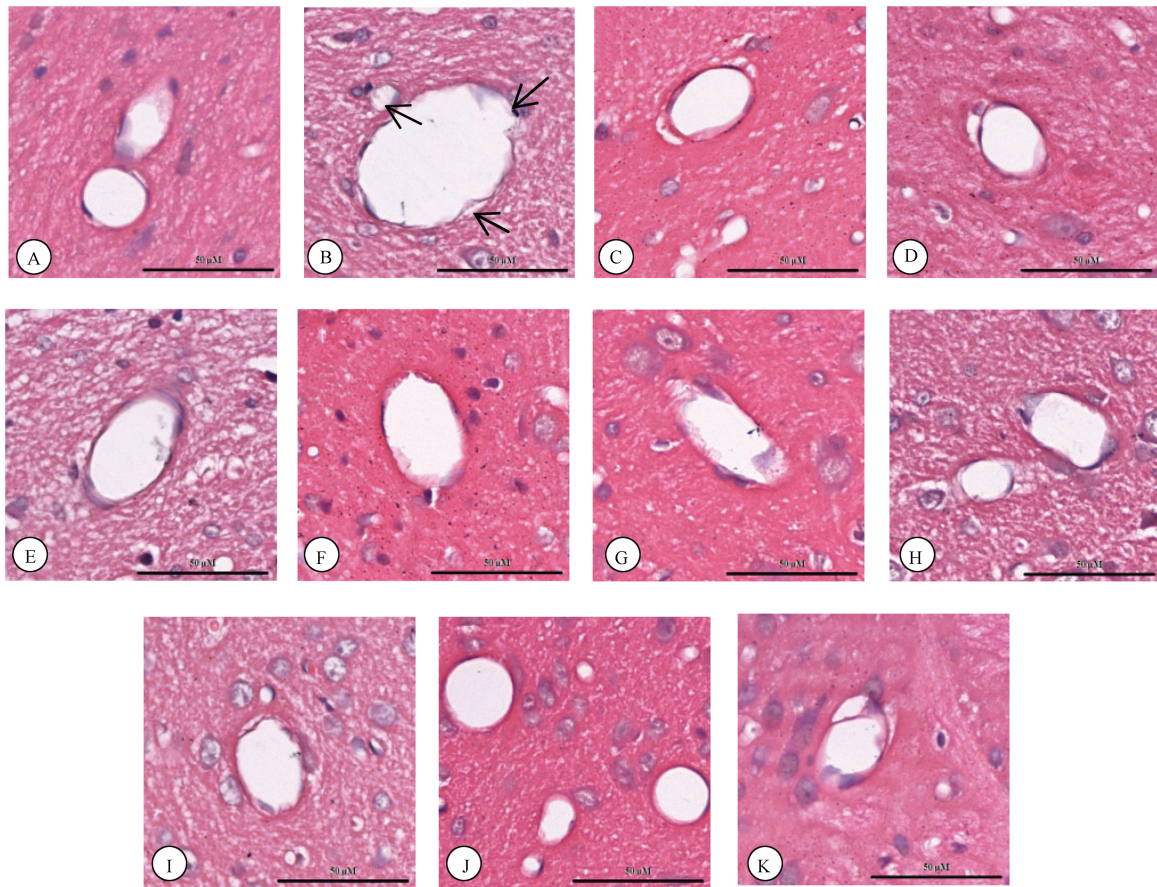


图2 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对AD大鼠脑血管病理损伤的影响

Fig. 2 Effect of soy lecithin combined with soy isoflavone on cerebrovascular pathological damage in AD rats (scale bar = 50 μm , $n = 3$ per group)

A: control group; B: $A\beta$ group, Arrows mean attenuation of endothelium in cerebral vessels and cerebrovascular smooth muscle cells; C: SL ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; D: SL ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; E: SL ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; F: SL ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; G: SL ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; H: SL ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; I: SL ($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; J: SL ($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; K: SL ($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + SIF ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + $A\beta$ group; AD: Alzheimer's disease; $A\beta$: β -amyloid; SL: soy lecithin; SIF: soy isoflavone.

影响,市场上已较多出现单一或复合含有SL和SIF的保健食品及补充剂^[14]。鉴于上述原因,本研究通过正交试验实验设计,观察SL联合SIF对学习记忆损伤大鼠的改善作用,并探索其最佳联合剂量,为后续的人群干预研究提供科学数据。本研究结果显示,SL+SIF处理可以显著缩短 $A\beta_{1-40}$ 介导的学习记忆损伤大鼠的逃避潜伏期和游泳总路程,提示SL和SIF的联合干预可以有效预防 $A\beta_{1-40}$ 引起的大鼠空间学习记忆能力损伤。这与本课题组^[5-6]前期研究发现的单独使用SIF对 $A\beta_{1-42}$ 介导的大鼠学习记忆能力的改善作用一致,且与SIF单独干预剂量 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 比较,联合干预中SIF的最佳剂量 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 较

低,安全性更强。研究^[15]显示,给予大豆磷脂酰丝氨酸6个月治疗可以增强记忆障碍老年人的记忆功能,本研究结果提示SL+SIF可能具有同样的应用价值。

同时,为了进一步观察 $A\beta_{1-40}$ 诱导的大鼠脑血管损伤情况,本研究通过HE染色法观察了各组大鼠的脑血管组织病理改变。 $A\beta$ 组大鼠的脑血管组织病理损伤较为严重,而SL+SIF干预可以保护脑血管组织保持完整。提示SL联合SIF对脑血管组织具有保护作用。

那么,SL联合SIF对脑血管的神经保护作用又有怎样的机制呢?已知SL和SIF均具有抗氧化及改善血脂的作用。研究^[16-17]显示,作为蛋白质氧化损伤

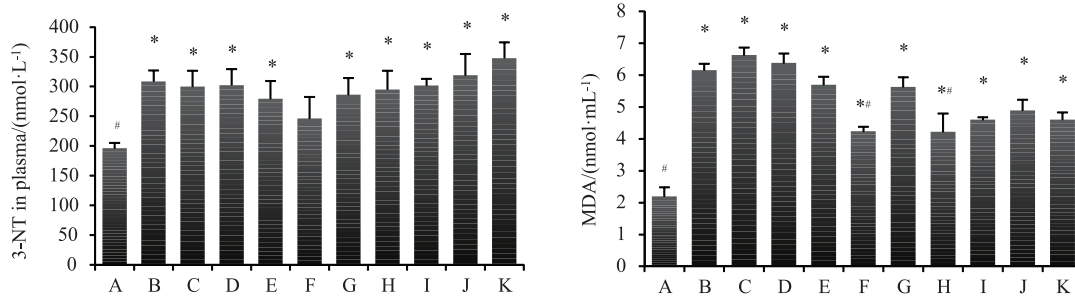


图3 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对AD大鼠氧化损伤的影响

Fig. 3 Effect of soy lecithin combined with soy isoflavone on oxidative damage in AD rats ($n=6$ per group)

* $P < 0.05$ vs A group, # $P < 0.05$ vs B group. A: control group; B: A β group; C: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; D: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; E: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; F: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; G: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; H: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; I: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; J: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; K: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; AD: Alzheimer's disease; A β : β -amyloid; SL: soy lecithin; SIF: soy isoflavone; 3-NT: 3-nitrotyrosine; MDA: malondialdehyde.

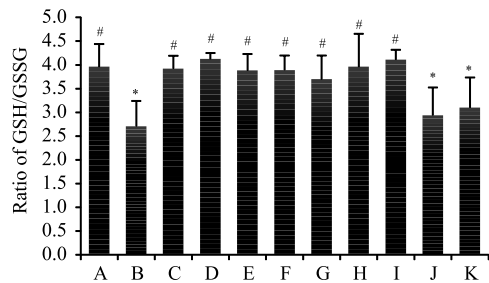


图4 大豆卵磷脂联合大豆异黄酮对AD大鼠氧化还原平衡体系的影响

Fig. 4 Effect of soy lecithin combined soy isoflavone on the oxidation reduction balance system of AD rats ($n=6$ per group)

* $P < 0.05$ vs A group, # $P < 0.05$ vs B group. A: control group; B: A β group; C: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; D: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; E: SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; F: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; G: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; H: SL(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; I: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; J: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; K: SL(160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + A β group; AD: Alzheimer's disease; A β : β -amyloid; SL: soy lecithin; SIF: soy isoflavone; GSH: ratio of glutathione; GSSG: oxidized glutathione.

的标志物 3-NT 在 AD 患者大脑中的星形胶质细胞、神经元和脑血管内皮细胞中均有所增加。同时, Evans 等^[12]的研究证明, 给健康的绝经后妇女补充大豆异黄酮蛋白(25 g/d)联合大豆卵磷脂(20 g/d)可以显著提高其血清高密度脂蛋白胆固醇/低密度脂蛋白胆固醇的比率, 而上述血脂变化正是脑血管的保护因素。在本研究发现, A β 模型组大鼠血浆中, 蛋白质氧

化产物 3-NT 和脂质氧化产物 MDA 均显著升高, 而这种升高可被 SL + SIF 干预所拮抗, 因此提示, SL + SIF 可能通过其发挥抗氧化能力来保护脑血管组织的细胞免受或少受 A β 介导的氧化损伤。

为了验证上述推论, 本研究进一步检测了各组大鼠的血浆 GSH/GSSG 比率, 以反映大鼠体内的氧化还原平衡状态, 结果不仅明确了 SL + SIF 改善大鼠体内氧化还原状态的作用, 同时还反映了高剂量联合补充对体内的氧化损伤水平无改善作用。这与本课题组^[18]前期体外研究发现, 高剂量(200 μ mol/L)的染料木黄酮会导致星形胶质细胞活力降低, 具有毒性作用的结论一致。因此提示, 适宜的最佳联合剂量对健康有益, 但大剂量补充则可能存在安全性问题。

综上所述, 本研究提示, SL 联合 SIF 可通过其抗氧化作用拮抗 A β 介导的大鼠脑血管损伤, 进而发挥对大鼠学习记忆的改善作用, 并且 SL(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) + SIF(50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 是发挥大鼠神经保护作用的最佳联合剂量。本研究得出的 SIF 和 SL 有效联合剂量比其他研究^[15,19]中报道的 SIF 或 SL 的单一有效治疗剂量较低, 安全性更强, 提示 SL 和 SIF 的联合补充可能适合在 AD 高危中老年人中长期补充, 但这种推论需要更多的证据和人群研究的支持。

4 参考文献

- [1] Joyce D P, Gracias C S, Murphy F, et al. Potentially undiagnosed cognitive impairment in patients with peripheral ar-

- terial disease; a systematic review of the literature[J]. *Surgeon*, 2021, epub ahead of print.
- [2] Rius-Pérez S, Tormos A M, Pérez S, et al. Vascular pathology: cause or effect in Alzheimer disease? [J]. *Neurologia*, 2018, 33(2): 112 – 120.
- [3] Apátiga-Pérez R, Soto-Rojas L O, Campa-Córdoba B B, et al. Neurovascular dysfunction and vascular amyloid accumulation as early events in Alzheimer's disease[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, epub ahead of print.
- [4] Robert C, Couédelo L, Vaysse C, et al. Vegetable lecithins; A review of their compositional diversity, impact on lipid metabolism and potential in cardiometabolic disease prevention[J]. *Biochimie*, 2020, 169: 121 – 132.
- [5] Xi Y D, Li X Y, Yu H L, et al. Soy isoflavone antagonizes the oxidative cerebrovascular injury induced by β -amyloid peptides 1 – 42 in rats [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(7): 1374 – 1381.
- [6] Xi Y D, Li X Y, Ding J, et al. Soy isoflavone alleviates A β 1-42-induced impairment of learning and memory ability through the regulation of RAGE/LRP-1 in neuronal and vascular tissue [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2013, 10(2): 144 – 156.
- [7] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:102 – 110.
- [8] Xi Y D, Yu H L, Ding J, et al. Flavonoids protect cerebrovascular endothelial cells through Nrf2 and PI3K from β -amyloid peptide-induced oxidative damage [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2012, 9(1): 32 – 41.
- [9] Hendrickx J O, Martinet W, Van Dam D, et al. Inflammation, nitro-oxidative stress, impaired autophagy, and insulin resistance as a mechanistic convergence between arterial stiffness and Alzheimer's disease [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 651215.
- [10] Bennett S, Grant M M, Aldred S. Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology [J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 17(2): 245 – 257.
- [11] Yamagata K. Soy isoflavones inhibit endothelial cell dysfunction and prevent cardiovascular disease [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(3): 201 – 209.
- [12] Evans M, Njike V Y, Hoxley M, et al. Effect of soy isoflavone protein and soy lecithin on endothelial function in healthy postmenopausal women [J]. *Menopause*, 2007, 14(1): 141 – 149.
- [13] Xu J, Hu H, Chen B, et al. Lycopene protects against hypoxia/reoxygenation injury by alleviating er stress induced apoptosis in neonatal mouse cardiomyocytes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136443.
- [14] Zaheer K, Humayoun Akhtar M. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(6):1280 – 1293.
- [15] Kato-Kataoka A, Sakai M, Ebina R, et al. Soybean-derived phosphatidylserine improves memory function of the elderly Japanese subjects with memory complaints [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2010, 47(3): 246 – 255.
- [16] Dubey H, Gulati K, Ray A. Alzheimer's disease: a contextual link with nitric oxide synthase [J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20(7): 505 – 515.
- [17] Lüth H J, Münch G, Arendt T. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation [J]. *Brain Res*, 2002, 953(1 – 2): 135 – 143.
- [18] 侯成成,麻微微,肖荣,等. 染料木黄酮对星形胶质细胞氧化损伤中 Nrf2/ARE 通路相关因子表达的调节作用 [J]. *中国食品卫生杂志*,2013,25(1):1 – 5.
- [19] Das S K, Gupta G, Rao D N, et al. Effect of lecithin with vitamin-B complex and tocopheryl acetate on long-term effect of ethanol induced immunomodulatory activities [J]. *Indian J Exp Biol*, 2007, 45(8): 683 – 688.

(收稿日期:2021-06-28)

编辑 慕 萌