海带内生真菌 *Galactomyces geotrichum* 次生代谢产物改善小鼠的学习记忆能力

刘佳[1]，田淑娟[1]，仇宏伟[2]，王凤舞[1]

（1.青岛农业大学食品科学与工程学院，山东青岛 266109）（2.青岛农业大学学报编辑部，山东青岛 266109）

摘要：报道了海带内生真菌白地霉 *Galactomyces geotrichum* 次生代谢产物的乙酸乙酯萃取物具有改善小鼠学习、记忆能力的作用。以 D-半乳糖所致的阿尔兹海默病（AD）小鼠为模型，采用 Morris 水迷宫实验测定了不同剂量组的上述萃取物对小鼠血清、肝脏和脑部组织中的超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）活性和丙二醛（MDA）的含量及脑组织中乙酰胆碱转移酶（ChAT）和乙酰胆碱酯酶（AchE）的活性的影响。Morris 水迷宫结果显示，试验各剂量组的逃避潜伏期的时间均显著缩短（$p<0.05$），而空间探索能力也有所改善；与模型组相比，低、中、高剂量组血清、肝脏与脑部组织的 SOD、GSH-Px、CAT 活力升高，而 MDA 含量降低，脑部组织中 AchE 活力下降、ChAT 活力上升。上述发现说明，该次代谢产物的乙酸乙酯萃取物对 AD 模型小鼠具有明显改善学习记忆能力的作用。

关键词：内生真菌；学习记忆；抗氧化活性；白地霉

文章篇号：1673-9078(2018)07-1-7 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.001

Improvement of Memory and Learning Ability of Mice by Secondary Metabolites of *Galactomyces geotrichum*

LIU Jia[1], TIAN Shu-juan[1], QIU Hong-wei[2], WANG Feng-wu[1]

(1.College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2.Editorial Department of Journal, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: This work reported that the ethyl acetate extract of secondary metabolites of endophytic fungus *Galactomyces geotrichum* could improve the memory and learning ability of mice. With D-galactose-induced the Alzheimer's disease (AD) mice as the model, the influence of different levels of dosages of the extract on the contents of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) in serum, liver and brain of the mice was investigated, using the Morris water maze test. The activities of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AchE) in mice brain were also evaluated. The results showed that the escape latent period of the mice in each dose group was significantly shortened($p<0.05$), and there was also noticable improvement in the spatial probe capability of the mice. Compared with the model group, the activities of SOD, GSH-Px and CAT in serum, liver and brain tissue of the low, middle and high dose groups were increased, while the MDA content decreased, the activity of AchE decreased, as well as that of ChAT increased in brain tissue. The findings indicated that the ethyl acetate extract of secondary metabolites could improve the memory and learning ability of the AD mice.

Key words: endophytic fungi; ability of learning and memory; antioxidant activity; *Galactomyces geotrichum*

阿尔茨海默病（AD）是一种神经系统退行性疾病。其临床表现为记忆力减退、认知功能发生障碍、行为异常和社交障碍[1]。阿尔茨海默病发病机制十分复杂，有关病因学说颇多，其中包括胆碱能缺失学说、基因突变学说、氧化应激学说和炎症因子学说等[2]。胆碱能缺失学说认为神经递质乙酰胆碱的缺失，胆碱酯酶活性的增强和胆碱乙酰转移酶活性的减弱打破脑内平衡，发生 AD[3,4]。氧化应激学说认为 AD 患者存在较高水平的 DNA 和 RNA 氧化损伤，脂质过氧化反应，蛋白质氧化修饰及其它氧化应激损伤，大脑内部自由基氧化损伤是导致阿尔茨海默病的关键原因[5,6]。目前为止临床上使用最广泛的药物，主要为单靶向的乙酰胆碱酯酶抑制剂，如他克林、多奈哌齐、卡巴拉汀等，但疗效不是很理想且多数价格昂贵[7]，筛选具有抑制 AchE 活性和抗氧化双重功能的活性物质具有很重要的意义，它既能提高 AD 患者大脑中 Ach 的含量，促

收稿日期：2018-03-07

基金项目：山东省自然科学基金项目（ZR2015BM016）

作者简介：刘佳（1993-），女，硕士，研究方向：天然产物化学

通讯作者：王凤舞（1979-），女，博士，副教授，研究方向：天然产物化学

进胆碱能神经系统功能的恢复，提高 AD 患者的认知，又能保护大脑，延缓 AD 病人神经系统退化。植物真菌的次生代谢产物是天然活性物质的重要来源，海带中含有降血压、抗疲劳耐缺氧、抗氧化和抑菌抗病毒等多种功能的活性成分，而与海带互利共生的内生真菌产生的次生代谢产物中可能会有能够加以利用的功能成分。

在前期试验中，我们课题组从海带中分离出内生真菌 QDFBLJ-1，发现其代谢产物的乙酸乙酯相有较强的体外抗抑制乙酰胆碱酯酶和抗氧化的活性。因此本试验以内生真菌 QDFBLJ-1 次生代谢产物为研究对象，采用 D-半乳糖致衰老模型小鼠，进行 Morris 水迷宫实验和测定小鼠血清、肝脏和脑部组织 CAT、SOD、MDA、GSH-Px 及脑部组织 AchE、ChAT 的变化，以探讨其对 AD 模型鼠的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级昆明种小鼠 80 只，体重 20~22 g。购自青岛大任富城畜牧有限公司，许可证号：SCXK(鲁)20140007。

1.2 材料试剂与仪器

海带内生真菌 *Galactomyces geotrichum* QDFBLJ-1，由青岛农业大学中韩食品生物技术研究所从青岛海域海带中分离获得；CAT 测试盒、SOD 测试盒、GSH-Px 测试盒、MDA 测试盒、AchE 测试盒、ChAT 测试盒、总蛋白测试盒，均购于上海源叶生物科技有限公司；他克林、抗坏血酸、D-半乳糖，均购于美国 sigma 公司；其他试剂均为国产分析纯。

DU-800 型紫外分光光度计，美国贝克曼公司；TGL-16M 高速台式冷冻离心机，湖南湘仪离心机仪器有限公司；iMark 酶标仪，美国 bio-rad 有限公司；Morris 水迷宫，北京众实迪创科技发展有限责任公司；旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；恒温振荡器 ISRDH1，苏州麦可旺志生物技术有限公司；电子分析天平，美国奥豪斯电子天平公司；移液枪，法国 GILSON 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 海带内生真菌 *Galactomyces geotrichum* QDFBLJ-1 代谢产物乙酸乙酯相与培养基浸提物的制备

选用从青岛海域海带中分离得到的一株内生真菌 QDFBLJ-1 进行液体发酵，培养基为察氏培养基，接种量为 10%，28 ℃培养 14 d。发酵结束后，用 4 层无菌纱布过滤，得到过滤液。将过滤液和察氏培养基分别经旋转蒸发仪浓缩，乙酸乙酯萃取 3 次，合并萃取相，得待测样品浸提物和培养基浸提物。

1.3.2 实验分组及造模方法

小鼠经 3 d 适应性喂养后，随机分为 8 组，每组 10 只。分别为：空白对照组、模型对照组、他克林阳性对照组、Vc 阳性对照组、乙酸乙酯相低、中、高剂量组。除空白组，其余各组每日皮下注射 360 mg/(kg bw·d)D-半乳糖，空白组皮下注射等体积生理盐水。他克林和 Vc 阳性对照组按 10 mg/(kg bw·d)灌胃并使其灌胃量与空白组、模型组相同。乙酸乙酯相低、中、高剂量组分别按 13 mg/(kg bw·d)、38 mg/(kg bw·d)和 63 mg/(kg bw·d)灌胃，培养基浸提物对照组按 63 mg/(kg bw·d)灌胃，空白组和模型组每日灌胃等体积生理盐水。小鼠饲养温度为 18~22 ℃，自然光照，自由进食和饮水。每日定时灌胃、皮下注射一次，连续饲喂 6 周，记录小鼠体重增加量。

1.3.3 Morris 水迷宫实验

定位航行实验使用 Morris 水迷宫[8]测定小鼠的学习和记忆能力。第 43 d 开始进行试验，共 4 d。实验开始前小鼠自由游泳 2 min。正式实验每天训练 2 次，每次 120 s，随机选择东、南、西、北 4 个象限中的一个，将小鼠面向池壁放入水中，记录小鼠寻找并爬上平台所需时间，该时间即为逃避潜伏期。如果实验小鼠在 120 s 内未找到平台，则由实验者将其引至平台，停留 30 s，该实验小鼠的逃避潜伏期记为 120 s。每只小鼠训练次数共 8 次。计算每天各组小鼠 2 次逃避潜伏期。

空间搜索实验用于测定小鼠对平台空间位置的记忆保持能力。试验小鼠训练 4 d 后，于第 5 d 将平台撤离，选取平台所在象限的对侧将小鼠放入池中，使小鼠在水中游泳 120 s，记录 120 s 内小鼠经过平台所在象限的停留时间以及穿越平台所在象限的次数。

1.3.4 生化指标测定

在空间搜索实验后将小鼠禁食 12 h，称重。摘除眼球取血处死，加入抗凝血剂，静置 3 h 后，血样在 4 ℃下 5000 r/min 离心 10 min，收集上清液即血清；取血后立即解剖小鼠，迅速取出肝脏和脑部用生理盐水清洗，用滤纸吸干，将肝脏和脑部组织研磨，以制备 10%匀浆液（匀浆过程始终处于冰水中），在 4 ℃下 5000 r/min 离心 10 min 后除去细胞碎片，取上清液备用[9]。按照试剂盒说明书测定血清、肝脏和脑部组织 SOD、GSH-Px、CAT 酶活力及 MDA 含量以及小鼠脑部 AchE 和 ChAT 活性。

1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行分析，平均值±标准差($\bar{x}$±s)来表示，组间均值比较采用单因素方差分析和 Duncan 多重比较分析，显著性水平 p=0.05。

2 结果与讨论

2.1 Morris 水迷宫实验结果

2.1.1 小鼠体重变化结果

表 1 小鼠体重增加量

Table 1 The result of mice weigh gain

动物组别	体重增加量/g
空白对照组	6.37±0.23^{a}
模型对照组	5.80±0.10^{a}
Vc 阳性对照组	5.81±0.78^{a}
他克林阳性对照组	5.83±0.25^{a}
低剂量组	7.43±0.40^{a}
中剂量组	6.60±2.20^{a}
高剂量组	5.83±0.49^{a}
培养基浸提物对照组	5.91±0.25^{a}

注: 同列不同小写字母代表差异显著(p<0.05), 表 1~7 同。

模型建造期间，空白对照组仅体重稳定增加，其他指标无变化。体重测定结果表明：8 组小鼠处死前与给药前相比体重均有所增加，无显著性差异，表明小鼠身体除氧化损伤、痴呆方面，其他各项机能基本稳定。模型对照组小鼠和浸提物对照组小鼠体重亦增加，但活动量减少，精神萎靡，反应迟钝。说明 D-半乳糖对小鼠体内氧化应激反应剧烈，造成氧化损伤、小鼠身体衰老、大脑痴呆，初步表明建模成功。

2.1.2 对 AD 模型小鼠学习和记忆能力的影响

定位航行试验：培养基浸提物对照组与模型对照组基本一致，无显著性差异。说明培养基浸提物对小鼠的学习记忆能力无改善影响。各组小鼠随着训练时间的延长，逃避潜伏期均有所缩短。与空白组相比，模型组逃避潜伏期明显高于空白组小鼠（p<0.05）。与模型组相比，他克林、Vc 阳性对照组明显延长于模型对照组（p<0.05），中、高剂量组逃避潜伏期与模型对照组差异性显著（p<0.05）。随着样品剂量的增加，受试动物组中小鼠的逃避潜伏期相对应缩短。与 Vc 阳性对照组相比，高剂量组逃避潜伏期与其差距较小，说明待测样品尤其是高剂量组有增强 D-半乳糖模型小鼠学习记忆能力的作用。

空间探索实验：培养基浸提物对照组与模型对照组基本一致，无显著性差异。撤出平台后，与模型组相比，空白组在 Morris 水迷宫穿越平台次数和象限停留的时间明显延长（p<0.05）。阳性对照组和低、中、高剂量组穿越平台次数与模型对照组差异显著（p<0.05），高剂量组穿越平台次数大于 Vc 阳性对照组，且与他克林阳性对照组基本一致。阳性对照组和高剂量组平台象限时间明显延长于模型对照组（p<0.05）。随着待测样品剂量的增高，受试动物组有逐步延长的趋势。说明待测样品尤其是高剂量组有改善 D-半乳糖模型小鼠对空间位置记忆能力作用趋势。

表 2 定位航行和空间探索结果

Table 2 The result of locates the navigation and easpace exploration experiment

组别	平均逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	平台象限时间/s
空白对照组	33.41±3.31^{a}	4.43±0.50^{a}	41.49±3.79^{d}
模型对照组	74.73±2.03^{e}	2.18±0.69^{b}	19.85±5.00^{a}
他克林阳性对照组	55.37±3.81^{b}	4.34±0.30^{a}	36.54±3.36^{cd}
Vc 阳性对照组	59.12±4.39^{bc}	4.12±0.53^{a}	32.11±3.87^{bc}
低剂量组	66.57±4.13^{cde}	3.50±0.35^{a}	22.83±4.68^{a}
中剂量组	65.31±6.30^{cd}	3.94±0.44^{a}	26.01±3.58^{ab}
高剂量组	60.80±7.41^{bc}	4.33±0.47^{a}	30.73±3.56^{bc}
培养基浸提物对照组	70.47±3.21^{de}	2.14±0.49^{b}	19.64±4.74^{a}

2.2 生化指标测定结果

2.2.1 QDFBLJ-1 次生代谢产物对小鼠血清、肝脏和大脑组织 MDA 含量的影响

从表 3 可知，培养基浸提物对照组与模型对照组基本一致，无显著性差异。模型组小鼠血清、肝脏和大脑中 MDA 含量显著高于空白组（p<0.05），说明建模成功。与模型组相比，阳性对照组和组织中、高剂量组 MDA 含量明显降低（p<0.05）。

与 Vc 阳性对照组相比，高剂量组小鼠的肝脏和大脑组织中 MDA 含量均少于 Vc 阳性对照组，表明抗氧化效果优于 Vc 阳性对照组。低、中、高剂量组与模型对照组相比，血清中 MDA 含量分别下降 8.29%、12.71%和 16.71%，肝脏组织中 MDA 含量分

别下降 17.75%、20.41%和 46.08%，大脑组织中 MDA 含量分别下降 14.95%、28.47%和 36.48%。说明样品组尤其是高剂量组能够抑制肝脏和大脑组织中的脂质过氧化，延缓衰老。

表 3 小鼠血清、肝脏和大脑 MDA 含量

Table 3 MDA content of serum, liver and brain in mice

组别	血清/(nmol/mL)	肝脏/(nmol/mg pro)	大脑/(nmol/mg pro)
空白对照组	5.63±0.47^{a}	2.87±0.40^{a}	3.25±0.18^{a}
模型对照组	7.00±0.81^{b}	5.86±1.58^{b}	5.62±0.68^{c}
Vc 阳性对照组	5.79±0.62^{a}	3.51±1.13^{ab}	3.67±0.72^{ab}
低剂量组	6.42±0.39^{ab}	4.82±1.98^{ab}	4.78±0.65^{bc}
中剂量组	6.11±0.43^{ab}	4.67±1.42^{ab}	4.02±0.94^{ab}
高剂量组	5.83±0.66^{a}	3.16±1.23^{a}	3.57±0.57^{a}
培养基浸提物对照组	6.98±0.51^{b}	5.84±0.41^{b}	5.21±0.07^{b}

2.2.2 QDFBLJ-1 次生代谢产物对小鼠血清、肝脏和大脑组织 SOD 活力的影响

由表 4 可知，培养基浸提物对照组与模型对照组基本一致，无显著性差异。与空白组相比，模型组小鼠血清、肝脏和脑部组织中 SOD 酶活力明显降低（p<0.05）。

与 Vc 组相比，高剂量组小鼠大脑组织 SOD 活力较高。与模型对照组相比，低、中、高剂量组小鼠血清、肝脏和脑部组织中 SOD 活力高于模型组，且各组织中、高剂量组与模型组差异显著（p<0.05）。样品组血清中 SOD 活力分别上升 15.71%、20.37%和 25.97%，肝脏组织中分别上升 8.00%、21.35%和 28.91%，大脑组织中分别上升 10.86%、26.06%和 40.23%。可以看出样品组尤其是高剂量组能够有效清除大脑内超氧离子自由基，减少大脑氧化损伤，延缓衰老。

表 4 小鼠血清、肝脏和大脑 SOD 活力

Table 4 SOD activity of serum, liver and brain in mice

组别	血清/(U/mL)	肝脏/(U/mg pro)	大脑/(U/mg pro)
空白对照组	158.66±11.83^{b}	182.64±6.91^{d}	217.07±5.60^{d}
模型对照组	125.84±14.00^{a}	137.89±7.34^{ab}	146.35±13.33^{a}
Vc 阳性对照组	162.94±10.91^{b}	178.16±3.80^{cd}	201.23±7.88^{d}
低剂量组	145.62±11.63^{ab}	148.92±6.89^{b}	162.25±11.07^{b}
中剂量组	151.48±10.34^{b}	167.33±4.73^{c}	184.49±6.31^{c}
高剂量组	158.52±11.62^{b}	177.75±7.62^{cd}	205.22±8.85^{d}
培养基浸提物对照组	128.38±14.56^{a}	131.91±6.83^{a}	144.94±7.18^{a}

表 5 小鼠血清、肝脏和大脑 GSH-Px 活力

Table 5 GSH-Px activity of serum, liver and brain in mice

组别	血清/(U/mL)	肝脏/(U/mg pro)	大脑/(U/mg pro)
空白对照组	258.52±26.22^{c}	201.98±13.47^{b}	235.78±16.87^{b}
模型对照组	155.90±32.60^{a}	154.72±15.62^{a}	161.51±14.23^{a}
Vc 阳性对照组	228.51±28.04^{bc}	197.48±17.88^{b}	233.93±23.61^{b}
低剂量组	196.44±32.60^{ab}	149.32±14.92^{a}	171.29±18.54^{a}
中剂量组	219.67±26.91^{bc}	172.54±20.10^{ab}	205.73±19.02^{b}
高剂量组	237.91±27.35^{bc}	189.22±16.78^{b}	225.16±21.76^{b}
培养基浸提物对照组	157.19±20.60^{a}	159.25±12.13^{a}	165.47±15.91^{a}

2.2.3 QDFBLJ-1 次生代谢产物对小鼠血清、肝脏和大脑组织 GSH-Px 活力的影响

由表 5 可知，培养基浸提物对照组与模型对照组基本一致，无显著性差异。模型组小鼠血清、肝脏和脑部组织中 GSH-Px 活力较空白对照组显著降低（p<0.05）。与模型组相比，与 Vc 组相比，小鼠血清高剂量组 GSH-Px 活力较高。小鼠血清中、高剂量组和肝脏高剂量组以及大脑中、高剂量组中 GSH-Px 活力显著降低（p<0.05）。血清中低、中、高剂量组 GSH-Px 分别升高 26.00%、40.90%和 52.60%，肝脏组织中、

高剂量组分别升高 11.52%和 22.30%，大脑组织中分别升高 6.06%、27.38%和 39.41%。可以看出，样品组能够较好的催化血清中还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应，保护细胞膜结构和功能完整。

2.2.4 QDFBLJ-1 次生代谢产物对小鼠血清、肝脏和大脑组织 CAT 活力的影响

由表 6 可知，培养基浸提物对照组与模型对照组基本一致，无显著性差异。模型组小鼠肝脏、脑部组织和血清中 CAT 活力较空白对照组显著降低（p<0.05）。与 Vc 组相比，小鼠血清高剂量组 CAT 活力较高。与模型组相比，血清高剂量组中 CAT 活力与模型组差异显著（p<0.05），血清中低、中、高剂量组 CAT 活力分别上升 4.16%、18.94%和 29.79%，肝脏组织中分别上升 14.11%、26.13%和 33.43%，大脑组织中分别上升 7.89%、25.41%和 34.29%。可以看出，样品最对肝脏和大脑中 CAT 活力提高较多，尤其是高剂量组能够较好的分解大脑中的过氧化氢，减少氧化应激反应，延缓大脑衰老。

表 6 小鼠血清、肝脏和大脑 CAT 活力

Table 6 CAT activity of serum, liver and brain in mice

组别	血清/(U/mL)	肝脏/(U/mg pro)	大脑/(U/mg pro)
空白对照组	5.67±0.73^{b}	21.02±3.84^{c}	18.41±2.26^{c}
模型对照组	4.33±0.83^{a}	14.39±4.29^{ab}	12.16±1.78^{a}
Vc 阳性对照组	5.47±0.75^{ab}	20.81±2.11^{bc}	17.92±2.54^{c}
低剂量组	4.51±0.47^{ab}	16.42±3.75^{abc}	13.12±1.69^{a}
中剂量组	5.15±0.76^{ab}	18.15±2.43^{abc}	15.25±1.77^{ab}
高剂量组	5.62±0.18^{b}	19.20±1.99^{abc}	16.33±2.41^{ab}
培养基浸提物对照组	4.36±0.53^{a}	14.05±4.23^{a}	12.34±2.69^{a}

2.2.5 QDFBLJ-1 次生代谢产物对小鼠大脑 AchE、ChAT 活力的影响

表 7 小鼠大脑 AchE、ChAT 活力

Table 7 Activity of AchE and ChAT in mouse brain

组别	AchE/(nmol/mg)	ChAT/(U/g)
空白对照组	4.82±0.45^{a}	246.11±55.02^{b}
模型对照组	6.11±0.21^{b}	98.02±47.38^{a}
他克林阳性对照组	4.46±0.79^{a}	227.38±30.75^{b}
低剂量组	4.98±0.22^{a}	188.97±62.85^{b}
中剂量组	4.74±0.54^{a}	200.34±33.59^{b}
高剂量组	4.36±0.16^{a}	239.63±45.05^{b}
培养基浸提物对照组	6.01±0.47^{b}	101.23±55.03^{a}

由表 7 可知，培养基浸提物对照组与模型对照组基本一致，无显著性差异。与空白组相比，模型组小鼠大脑 AchE 活性显著升高（p<0.05），ChAT 活性显著降低（p<0.05），说明建模成功，可以认为 D-半乳糖导致小鼠衰老和记忆障碍的机制之一是胆碱能系统损伤。与模型对照组相比，小鼠脑部低、中、高剂量组 AchE 活性明显降低（p<0.05），其中高剂量组 AchE 活性升高了 28.64%。小鼠大脑中、高剂量组 ChAT 活性明显升高（p<0.05），低剂量组已提高 ChAT 活力 92.79%。说明样品对于胆碱能系统的损伤修复，主要是 Ach 的合成，神经递质增多，从而抑制老年痴呆。与他克林阳性对照组相比，小鼠大脑高剂量组 AchE 活力低于阳性对照组，ChAT 活力高于阳性对照组。说明该菌株次生代谢产物尤其是高剂量组可以在一定程度上改善 D-半乳糖对小鼠大脑造成的胆碱能系统损伤，提高小鼠的学习和记忆能力。

3 结论

3.1 本实验中，Morris 水迷宫行为学实验评价 *G. geotrichum* QDFBLJ-1 次生代谢产物对小鼠学习记忆力有改善作用。研究表明，培养基浸提物对照组与空白组基本一致，无显著性差异，排除培养基浸提物对实验的影响。在定位航行与空间探索实验中，三个样品剂量组较衰老模型组相比逃避潜伏期缩短、穿越平台次数增加、平台象限时间增加，以高剂量组的效果尤为显著。

3.2 氧化应激和中枢胆碱功能损伤是神经性退行疾病中认知功能减退的主要原因之一。MDA 是机体内的自由基引发脂质过氧化的一种产物，能够间接反映细胞损伤程度和机体过氧化水平[10]。SOD 是体内一种重要的抗氧化酶，能够有效清除超氧阴离子自由基，降低 MDA 及自由基代谢产物的产生，使细胞免受破坏[11]。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶，它催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应，能够保护细胞膜结构和功能完整，缓解机体内的氧化损伤[12]。CAT 是存在于红细胞和某些组织内的过氧化体中，催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2，延缓机体衰老[13]。因此本实验选用 SOD、MDA、GSH-Px、CAT 作为评估抗氧化作用的指标。Ach 是大脑中枢系统内与学习记忆相关的重要神经递质，能特异性的作

用于各类胆碱受体，其含量与 ChAT 和 AchE 活性有关，AchE 分解 Ach，ChAT 则是催化 Ach 合成的限速酶，二者相互作用共同维持脑内 Ach 量的动态平衡[14]，通过检测其活性可以间接推测出 Ach 含量的高低[15]。因此本实验选择 AchE 和 ChAT 作为评估胆碱能神经系统活性的指标。结果表明，*G. geotrichum* QDFBLJ-1 次生代谢产物显著提高了小鼠血清、特别是肝脏和脑部组织中 SOD、CAT、GSH-Px 水平、降低 MDA 水平，而且能够显著降低小鼠脑部组织 AchE 活性，提高 ChAT 活性，部分高剂量组效果优于阳性对照 Vc。说明 *G. geotrichum* QDFBLJ-1 次生代谢产物能够降低氧化应激程度，减轻自由基对脑组织的损伤，延缓大脑衰老，恢复小鼠中枢胆碱功能，从而改善 D-半乳糖所致衰老模型小鼠的学习记忆能力。

3.3 本课题组多年来致力于从海洋微生物中寻找具有抑制乙酰胆碱酯酶和抗氧化双重活性的功能活性物质，以期开发新型的抗 AD 天然药物。通过本次实验可以看出，海带内生真菌白地霉 *G. geotrichum* QDFBLJ-1 次生代谢产物属于实际无毒，其乙酸乙酯相有抗氧化损伤和抑制乙酰胆碱酯酶的双重活性，能够改善 D-半乳糖致 AD 模型小鼠学习记忆能力。说明调节中枢胆碱能系统、保护神经元细胞、提高机体自由基清除能力和抗脂质氧化损伤可能是改善 AD 模型小鼠学习记忆能力的作用机制之一。目前国内外有关海带内生菌的研究报道仅见于海带内生菌 DNN6 蛋白对小黄鱼的保鲜效果[16]和抗肿瘤活性[17]，DNN7 蛋白的分离及抗肿瘤研究[18]以及 HSN2 胞外蛋白对粉红单端孢霉的影响[19]，未发现关于海带内生菌的抗老年痴呆相关活性报道。因此本次研究对开发新型的抗 AD 天然药物具有重要意义。

参考文献

[1] 梁汉周,梁雁,黄波.老年痴呆病的发病机制及临床药物治疗分析[J].当代医学,2013,19(22):150-151
LIANG Han-zhou, LIANG Yan, HUANG Bo. Analysis of the pathogenesis of alzheimer's disease and clinical drug therapy [J]. Modernity Medicine, 2013, 19(22): 150-151

[2] 王惠国,赵小红,张楠楠,等.阿尔茨海默病发病机制概况[J].辽宁中医杂志,2016,43(10):2234-2236
WANG Hui-guo, ZHAO Xiao-hong, ZHANG Nan-nan, et al. Pathogenesis of Alzheimer's Disease [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 43(10): 2234-2236

[3] Xi Zha, Xiaohong Xu. Dissecting the hypothalamic pathways that underlie innate behaviors [J]. Neuroscience Bulletin, 2015, 31(6): 629-648

[4] Cristina Angeloni, Marco Malaguti, Silvana Hrelia. Antiglycative Activity of Sulforaphane: A New Avenue to Counteract Neurodegeneration? [J]. Neural Regeneration Research, 2015, 10(11): 1750-1751

[5] 刘纯青,申林林,栾艺,等.CeO_2 的制备、表征及对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J].大连医科大学学报,2015,37(6):526-528
LIU Chun-qing, SHEN Lin-lin, LUAN Yi, et al. Preparation, Characterization of Nanoceria and Its Protection on Oxidative Damage of PC12 Cells [J]. Journal of Dalian Medical University, 2015, 37(6): 526-528

[6] Jaime Santo-Domingo, Andreas Wiederkehr, Umberto De Marchi. Modulation of the Matrix Redox Signaling by Mitochondrial $Ca^{(2+)}$ [J]. World Journal of Biological Chemistry, 2015, 6(4): 310-323

[7] 应侠,吴振,雷严,等.阿尔茨海默病的发病机制及治疗药物研究进展[J].中国药房,2014,25(33):3152-3155
YING Xia, WU Zhen, LEI Yan, et al. Progress in the pathogenesis and therapeutic drugs of Alzheimer's disease [J]. Chinese Pharmacy, 2014, 25(33): 3152-3155

[8] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002
XU Shu-yun, BIAN Ru-lian, CHEN Xiu. Pharmacological experimental methodology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002

[9] 黄海,王莹,郭云瑕,等.黑果腺肋花楸酵素的抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016,37(22):336-339
HUANG Hai, WANG Ying, GUO Yun-xia, et al. Antioxidant activity of *Aronia* melanocarpa enzyme [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(22): 336-339

[10] 郭永月,陶明煊,程光宇,等.黑牛肝菌多糖对急性酒精肝损伤小鼠的保护作用[J].中国食品学报,2016,16(1):35-41
GUO Yong-yue, TAO Ming-xuan, CHENG Guang-yu, et al. Protective effect of polysaccharides from boletus aereus on alcoholic liver injury in mice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 35-41

[11] 孙玉军,江昌俊,任四海.秀珍菇多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠的保护作用[J].食品科学,2017,38(5):251-256
SUN Yu-jun, JIANG Chang-jun, REN Si-hai. Protective effect of polysaccharides from the fruiting body of *Pleurotus Geesteranus* against D-galactose-induced aging mice [J]. Food Science, 2017, 38(5): 251-256

[12] 李卫芬,张小平,宋文辉,等.养殖水体中添加芽孢杆菌对草鱼免疫和抗氧化功能的影响[J].中国水产科学,2012,19(6):1027-1033

LI Wei-fen, ZHANG Xiao-ping, SONG Wen-hui, et al. Effects of *Bacillus* preparation add to culture water on immune and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 1027-1033

[13] 陈伟,林映才,马现永,等.一些抗氧化剂的抗/促氧化作用及其机制[J].动物营养学报,2012,24(4):595-605
CHEN Wei, LIN Ying-cai, MA Xian-yong, et al. Anti/Pro-oxidative functions of antioxidants and their mechanisms [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(4): 595-605

[14] 高莉,彭晓明,霍仕霞,等.毛蕊花糖苷改善 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用[J].中草药,2014,45(1):81-85
GAO Li, PENG Xiao-ming, HUO Shi-xia, et al. Improvement of acteoside on cerebral injury in subacute aging mice induced by D-galactose [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(1): 81-85

[15] 陈燏,刘洪吉,尤倩倩,等.活性肽-N 对 D-半乳糖致衰老小鼠的作用效果[J].食品科学,2018,39(1):178-184
CHEN Ju, LIU Hong-ji, YOU Qian-qian, et al. The effect of active peptide-n in d-galactose-induced aging mice [J]. Food Science, 2018, 39(1): 178-184

[16] 赵宇,张付云,于清铭,等.海带内生菌 DNN6 蛋白对小黄鱼保鲜作用的研究[J].食品工业科技,2014,35(17):321-324, 328
ZHAO Yu, ZHANG Fu-yun, YU Qing-ming, et al. Study on the effect of the protein from kelp endophytes DNN6 on preservation of pseudosciaena polyactis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(17): 321-324, 328

[17] 赵宇.海带内生菌DNN7蛋白的分离及抗肿瘤活性研究[D].大连:大连海洋大学,2015
ZHAO Yu. Study on the isolation and antitumor activity of DNN7 protein from the endophytic [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2015

[18] 李雪.海带内生菌 DNN6 代谢产物的分离纯化及其对小黄鱼保鲜的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2016
LI Xue. The separation and purification of metabolites of endophy DNN6 isolated from *Laminaria Japonica* asesch and research on the preservation of pseudosciaena polyactis [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016

[19] 赵宇,刘浩舶,李振,等.海带内生菌 HSN2 胞外蛋白对粉红单端孢霉的影响[J].食品与机械,2014,30(6):31-34,114
ZHAO Yu, LIU Hao-bo, LI Zhen, et al. Influence of the extracellular protein of kelp endophytes HSN2 on *Trichothecium roseum* (Bull.) Link [J]. Food & Machinery, 2014, 30(6): 31-34, 114

现代食品科技