

6'-唾液酸乳糖对秀丽隐杆线虫运动功能和神经发育的改善作用

王碧蔓¹, 梁子晴¹, 彭小雨^{2,3}, 瓦云超⁴, 周雯婧², 汪家琦², 李威², 曹庸¹, 陈运娇^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510640)

(2. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南长沙 410200) (3. 国家乳业技术创新中心, 内蒙古呼和浩特 010100)

(4. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 神经发育不良给婴幼儿成长带来巨大的痛苦, 亟需开发能够改善婴幼儿运动功能和神经发育的活性物。6'-唾液酸乳糖(6'-Sialyllactose, 6'-SL)具有改善肠道健康等功效。该研究利用秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)探究了6'-SL对神经发育和运动能力的改善功效。主要结果如下: 6'-SL在0.02~1.00 mg/mL范围内延长线虫的瘫痪寿命。在最佳浓度6'-SL作用下线虫平均、中位和最大寿命分别为8.70、8.67和12.67 h。根据6'-SL在实际中的应用, 选择0.56 mg/mL 6'-SL继续探究。0.56 mg/mL 6'-SL改善了CL4176线虫的头摆和吞咽频率, 分别提高了7.39%和4.25%, 并使运动速率提高了16.27%。6'-SL能够保护线虫胆碱能神经元形态。此外, 6'-SL使线虫乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)活性下降了22.60%, 同时提高了多巴胺(Dopamine, DA)、5-羟色胺(Serotonin, 5-HT)、 γ -氨基丁酸(4-aminobutyric Acid, GABA)和谷氨酸(Glutamate, Glu)4种神经递质的水平, 分别提升了148.71%、72.17%、34.72%、68.47%。综上所述, 6'-SL可通过改善线虫头摆、吞咽和运动速度改善运动能力并通过抑制AChE活性、提高神经递质含量促进神经发育, 为6'-SL在婴幼儿配方食品和保健品领域的应用提供理论支持。

关键词: 母乳低聚糖; 秀丽隐杆线虫; 神经发育; 运动协调性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.9.0793

The Effect of 6'-Sialyllactose and its Improvement of Locomotion and Neural Development in *Caenorhabditis elegans*

WANG Biman¹, LIANG Ziqing¹, PENG Xiaoyu^{2,3}, WA Yunchao⁴, ZHOU Wenjing², WANG Jiaqi², LI Wei², CAO Yong¹, CHEN Yunjiao^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China) (2. Ausnutria Dairy (China) Co. Ltd., Changsha 410011, China) (3. National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010100, China) (4. School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The infants are brought enormous pain for the developmental delay caused by neurodevelopmental disorders. Some active substances that can improve locomotion and neurodevelopment in infants and young children urgently need to be developed. 6'-Sialyllactose (6'-SL) can improve intestinal health. This study investigated the effect of 6'-sialyllactose on promoting neural development and improving locomotion ability in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). The main results are as follows: within the range of 0.02~1.00 mg/mL, the average lifespan, median lifespan, and maximum lifespan of *C. elegans* were 8.70, 8.67, and 12.67 h, respectively. Choosing 0.56 mg/mL 6'-SL to the follow researches based on the practical application of 6'-SL. 0.56 mg/mL of 6'-SL significantly improved the head swing frequency and swallowing frequency of CL4176 by 7.39% and 4.25%, respectively, and increased the movement rate of the *C. elegans* by 16.27%. 6'-SL can significantly protect the morphology of cholinergic neurons in *C. elegans*. In addition, 6'-SL reduced the acetylcholinesterase (AChE) activity by 22.60%, while increasing the levels of dopamine (DA), serotonin (5-HT), 4-aminobutyric acid (GABA), and glutamate (Glu) by 148.71%,

收稿日期: 2024-06-05; 修回日期: 2024-09-17; 接受日期: 2024-09-25

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2023A1515011266); 国家乳业技术创新中心项目(2023-KFKT-17)

作者简介: 王碧蔓(2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 利用线虫评价低聚糖促神经发育和改善运动功能, E-mail: aaa145123145@163.com; 共同第一作者:

梁子晴(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品与新原料, E-mail: sugaliang@163.com

通讯作者: 陈运娇(1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性成分及分子营养, E-mail: yunjiaochen@scau.edu.cn

72.17%, 34.72% and 68.47%, respectively, in the *C. elegans*. In summary, 6'-SL can effectively improve locomotion ability by improving the head swing frequency, swallowing frequency and movement rate and promote neural development by inhibiting AChE activity and increasing neurotransmitters content in *C. elegans*, providing theoretical support for the application of 6'-SL in infant formula and health products.

Key words: human milk oligosaccharides; *Caenorhabditis elegans*; neurodevelopment; locomotor coordination

对婴幼儿而言,母乳是最富营养的食物。母乳营养成分全面,富含蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、免疫球蛋白等营养物质^[1],其中母乳低聚糖(Human Milk Oligosaccharides, HMOs)是母乳中特有的物质,对婴幼儿成长至关重要。母乳低聚糖种类繁多,可分为中性岩藻糖基化 HMOs、酸性唾液酸化 HMOs、中性非岩藻糖基化 HMOs。常见的母乳低聚糖有 2'-岩藻糖基乳糖(2'-Fucosyllactose, 2'-FL)、6'-唾液酸乳糖、乳糖-N-四糖(Lacto-N-tetraose, LNT)、乳糖-N-三糖 II(Lacto-N-triose II, LNT II)等^[2]。葡萄糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、岩藻糖、唾液酸是构成 HMOs 的基础单糖。几乎所有 HMOs 的还原末端都为乳糖,然后通过糖苷键与乳糖-N-二糖或与 N-乙酰乳糖胺进行扩展,形成多种 HMOs^[3]。

许多研究发现,HMOs 对婴幼儿的生长发育不可或缺。Tahereh 等^[4]诱导小鼠过敏性气道疾病来模拟人类哮喘,然后利用 2'-FL 和 6'-SL 进行给药治疗,发现 2'-FL 和 6'-SL 可减弱过敏反应且改变了肠道菌群的组成,使拟杆菌群的丰度激增。刘干等^[5]发现对生长期小鼠补充高剂量 2'-FL 可以延长小鼠股骨长度、骨密度、血清中矿物质含量、骨钙素水平等。Kim 等^[6]对葡聚糖硫酸钠诱导的急性结肠炎模型小鼠进行 2'-FL 和 3'-FL 给药治疗,发现 2'-FL 和 3'-FL 能降低血清中白介素 6(Interleukin 6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α 的水平,缓解肠道炎症。Ke 等^[7]利用 2'-FL 对银屑病样小鼠模型进行治疗,发现 2'-FL 治疗小鼠表现出减弱的皮肤损伤和炎症,促炎细胞因子有所减少,降低了咪喹莫特刺激下小鼠皮肤组织中 STAT3 的磷酸化。有人利用 6'-SL 对小鼠进行重复全身治疗,改善了小鼠因新霉素诱导的听力损失,并减轻了耳蜗螺旋神经节中由新霉素触发的巨噬细胞活化^[8]。Huang 等^[9]采用乳化/内凝胶法成功制备动物芽孢杆菌 F1-7-HMO 合生元微胶囊,其封装效率为 92.16%;其中含有 6'-SL 的益生菌混合物在 48 小时内显著促进了 F1-7 的生长和醋酸盐产量($P<0.05$),提高了体外粪便发酵中 SCFAs 的产量,减少了多雷氏菌、志贺氏菌和链球菌等有害肠道细菌的数量。

婴幼儿健康的大脑和神经发育至关重要,而唾液酸能够促进婴幼儿大脑发育。唾液酸化 HMOs 参与脑组织中神经节苷脂和糖蛋白构成,对神经传导和突触有很大的影响^[10]。有研究表明 6'-SL 与由髓鞘化介导的社交情感技能有关,而髓鞘化是生命早期发育过程中的一个关键神经发育过程^[11]。唾液酸乳糖被认为可能会影响大脑发育的时间^[12]。

秀丽隐杆线虫是一种常用的模式生物,被广泛用以生物活性物的功能评价。在 2019 年,线虫的神经系统连接图谱已经被完全解析出来,成为第一个连接组完全被解析的多细胞生物。线虫中有 302 个神经元,这些神经元操控着线虫觅食、交配、学习等行为^[13]。科学家可以通过荧光蛋白探针对接线虫的神经元和肌肉进行在体操控,并通过钙离子探针观测神经元活动变化。此外,线虫细胞数量稳定且相对较少,细胞发育谱系和基因组也已经被解析清楚^[14]。

本研究利用神经生物学理想模式生物-秀丽线虫探究 6'-唾液酸乳糖的促神经发育作用和行为改善作用。本研究先采用瘫痪寿命指标来筛出 6'-SL 的有效浓度范围,然后利用线虫的吞咽频率、头摆频率、运动速度作为行为学指标探究 6'-SL 对线虫的行为改善作用;最后采用线虫乙酰胆碱酯酶活性、神经递质含量、趋向性等指标来探究 6'-SL 对线虫的神经发育的影响。本研究结果为 6'-SL 在婴幼儿配方食品和保健品领域的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

氯化钠、氢氧化钠、次氯酸钠、磷酸二氢钾和磷酸氢二钠均购于天津市福晨化学试剂厂;技术琼脂粉、LB 肉汤、胰蛋白胨和琼脂计数培养基均购于广东环凯微生物科技有限公司;胆固醇和硫酸链霉素均购于上海源叶生物科技有限公司;6'-唾液酸乳糖购于 Dutch State Mines;微量 BCATM 蛋白质试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器设备

Axio Imager Z2 倒置荧光显微镜, 德国 ZEISS 公司; CX31 正置荧光显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; EnSpire 酶标仪, 美国 PerkinElmer 公司; L530 台式低速离心机, 湖南湘宜实验室仪器开发有限公司; TXFSTPR-32 全自动样品快速研磨器, 上海净信实业发展有限公司; AL104 万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; PL203 千分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Centrifuge 5415R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Wormlab 视频采集系统, 美国 MBF Bioscience 公司。

1.3 实验办法

1.3.1 线虫的培养

在标准培养基(Nematome Growth Medium, NGM)中涂上尿嘧啶缺陷型大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) OP50, 将线虫转移到涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基中, 在温度 20 °C 下进行培养。

1.3.2 CL4176 线虫瘫痪寿命测试

CL4176 线虫从虫卵开始, 置于 NGM 平板中培养, 并在 16 °C 培养箱中培养 48 h, 然后转移至 25 °C 继续培养, 利用高温诱导 CL4176 出现“瘫痪”表型, 即当线虫仅有头部微微摇摆, 而线虫身体不再运动或在触碰下不能使其身体发生移动时定义为瘫痪。当出现第一条“瘫痪”线虫时开始记时, 直至所有个体全部瘫痪, 停止计时, 绘制寿命曲线。

1.3.3 CL4176 线虫 AChE 活性测试实验

CL4176 线虫从虫卵开始, 置于 NGM 平板中培养, 在 16 °C 培养箱中培养 48 h, 然后转移至 25 °C 继续培养 48 h。收集线虫, 并对线虫进行研磨破碎, 离心(4 °C, 12 000 r/min, 10 min)后收集上清液进行测定。每组实验重复三次, 每次至少需要 600 条线虫。线虫样本中 AChE 活性的计算公式为:

$$AA = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times C_1 \div C_2 \quad (1)$$

式中:

AA——乙酰胆碱酯酶活性;

A₁——测定组的吸光度值;

A₂——对照组的吸光度值;

A₃——标准组的吸光度值;

A₄——空白组的吸光度值;

C₁——乙酰胆碱酯酶标准品浓度;

C₂——组织匀浆蛋白浓度。

线虫 AChE 活性下降百分比的计算公式为:

$$M = \frac{AA_1 - AA_2}{AA_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

M——乙酰胆碱酯酶活性下降百分比;

AA₁——对照组乙酰胆碱酯酶活性;

AA₂——样品组乙酰胆碱酯酶活性。

1.3.4 CL4176 线虫运动力测试实验

CL4176 线虫 16 °C 培养 48 h, 然后 25 °C 继续培养 10 h。培养结束后, 挑取线虫至 NGM 中, 在显微镜下观察 CL4176 线虫的咽部和头部运动状态, 记录 30 s 内咽部泵送次数和头部摆动次数。线虫的头部从左侧摆动到右侧记录为一次, 然后摆回左侧再记录为一次, 记录 30 s 内线虫头部摆动的次数。每组随机挑选 10 条线虫进行观察。进行三次重复。

1.3.5 N2 线虫运动力测试实验

N2 线虫在 20 °C 中培养 3、7 和 11 d。培养结束后, 将线虫挑至新 NGM, 在显微镜下观察线虫的咽部运动状

态和头部摆动状态,记录 30 s 内咽部泵送次数和头部摆动的次数。每组随机挑选 10 条线虫进行观察。进行三次重复。

N2 线虫在 20 ℃培养箱中培养 3 d 后,利用 Wormlab 线虫视频采集系统以 1 s/帧的间隔录像 1 min,分析线虫的平均运动速率,共进行三次重复。

1.3.6 CL2355 线虫学习记忆能力测试实验

CL2355 线虫从虫卵开始,在 16 ℃培养箱中培养 48 h,后续转移至 25 ℃继续培养 48 h。培养结束后,收集线虫,然后线虫放置在培养皿中心,将气味引诱剂(5 μL φ=0.1%苯甲醛+5 μL 1 wt.%叠氮化钠)滴入到平板边缘的一个点上,在其对称点处加入溶剂对照(5 μL 100%无菌水+5 μL 1%叠氮化钠)。30 min 后记录从中央移动至两边的线虫数量。趋向性指数(Chemotaxis Index, CI)的计算方法如下:

$$CI = \frac{X - Y}{N} \quad (3)$$

式中:

CI——趋向性指数;

X——苯甲醛一侧线虫的数量;

Y——无菌水一侧线虫的数量;

N——线虫的总数量。

1.3.7 LX929 线虫胆碱能神经元测定

LX929 线虫从虫卵开始,在 20 ℃下培养,并于 3、7 和 11 d 拍摄线虫体内的胆碱能神经元状态。该实验共进行三次生物学重复,

1.3.8 N2 线虫神经递质含量的测定

N2 线虫从虫卵开始,在 20 ℃下培养,并于 3 d 时,通过液相色谱-质谱联用仪对线虫中的谷氨酸(GLU)、γ-氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺(5-HT)和多巴胺(DA)进行定性和定量分析。

1.3.9 样品制备

6'-SL 溶解于无菌水中,配置成 20 mg/mL 的储备液,用封口膜封口,并于 4 ℃下避光保存。使用前,将储备液与 OP50 混合稀释成相应的浓度(0.02、0.51、0.56 和 1.0 mg/mL),并将 6'-SL 菌液混合物均匀涂布在 NGM 平板中,晾干后 4 ℃下保存备用。

1.3.10 数据分析

所有实验至少重复三次,结果以平均数±标准差(mean±SD)表示。利用 IBM SPSS Statistics 26 软件对数据进行处理,作图采用 GraphPad Prism 9.0 软件分析,并对各组间进行单因素方差分析。*P* 值小于 0.05 为显著差异。

2 结果与分析

2.1 6'-SL 抑制高温诱导下 CL4176 线虫的瘫痪

β-淀粉样蛋白(Amyloid-beta, Aβ)在正常大脑中维持着正常水平,但在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者的大脑中发现高水平 and 异常聚集的 β-淀粉样蛋白^[15]。Aβ 聚集和代谢异常是 AD 的主要病理特征。CL4176 线虫作为研究神经退行性疾病的经典模型,当温度从 16 ℃上升到 25 ℃时,β-淀粉样蛋白在线虫体内大量表达和迅速聚集,导致瘫痪。因此使用 CL4176 线虫的瘫痪寿命作为初步筛选 6'-SL 浓度的指标。根据欧盟委员会发布新条例^[16],6'-唾液酸乳糖钠盐在婴儿配方奶粉中的批准使用量为 0.4 g/L,在巴氏杀菌和灭菌(包括超高温灭菌)乳制品中批准使用量为 0.5 g/L,食品补充剂(不包括婴幼儿)中批准使用量为 1.0 g/d。本研究测定 6'-SL 在 0.02~1.0 mg/mL 质量浓度范围内对线虫的影响,并选用 0.02、0.51 和 1.0 mg/mL 三个质量浓度进行测定。如图 1 所示,相比与 OP50 对照组,在 OP50 中分别添加 0.02、0.51 和 1.0 mg/mL 6'-SL 均能够显著延长线虫在高温下的瘫痪寿命(*P*<0.01)。由表 1 可知,0.02、0.51 和 1.0 mg/mL 6'-SL 均提高了 CL4176 线虫在高温下的平均寿命、中位寿命和最大寿命。其中,0.51 mg/mL 6'-SL 效果最佳,平均寿命、中位寿命和最大寿命分别为 8.70、8.67 和 12.67 h。所以在 0.02~1.0 mg/mL 的质量浓度范围内,6'-SL 对线虫有着神经保护作用,能够抑制 β-淀粉蛋白的沉积,抑制

瘫痪和 AD 的发生。根据 6'-SL 在产品运用中的实际需求，本研究选择在 0.02~1.0 mg/mL 范围内的 0.56 mg/mL 继续探究 6'-SL 对线虫的运动改善作用和促神经发育作用。

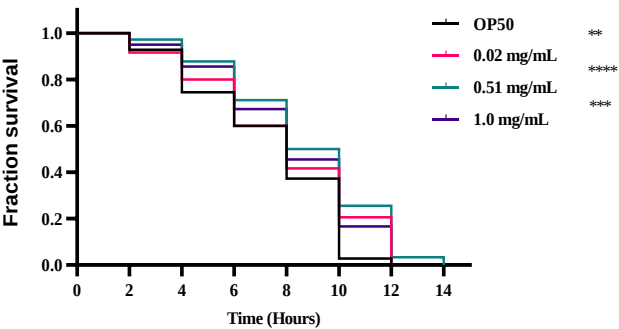


图 1 不同浓度 6'-SL 对 CL4176 线虫瘫痪寿命的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of 6'-SL on the paralysis lifespan of CL4176

注：**表示 $P<0.01$ ，差异具有统计学意义；***表示 $P<0.001$ ，差异具有统计学意义；****表示 $P<0.0001$ ，差异具有统计学意义。

表 1 不同浓度 6'-SL 对 CL4176 线虫瘫痪寿命的影响

Table 1 The effect of different concentrations of 6'-SL on the paralysis lifespan of CL4176

样品	平均生存时间/h	中位生存时间/h	最大生存时间/h
OP50	7.34±0.13	8.00±0.00	10.67±0.67
6'-SL 低质量浓度	7.88±0.05	8.00±0.00	12.00±0.00
6'-SL 中质量浓度	8.70±0.64	8.67±1.15	12.67±0.67
6'-SL 高质量浓度	8.20±0.09	8.00±0.00	12.00±0.00

2.2 6'-SL 对线虫行为学的影响

2.2.1 6'-SL 对线虫吞咽频率的影响

行为运动是线虫神经发育的敏感终点。线虫有着丰富的行为学特征供以研究 6'-SL 对线虫神经发育的影响^[14]。用 6'-SL 样品分别处理 N2 线虫 11 d，处理 CL4176 线虫 2.4 d。如图 2A 所示，0.56 mg/mL 6'-SL 在第 3、7 和 11 天对 N2 线虫吞咽频率无影响 ($P>0.05$)，没有呈现出更优越的神经保护和促神经发育效果。但是 6'-SL 显著提升了高温诱导后 CL4176 线虫的吞咽频率，提高了 4.25% ($P<0.0001$)。

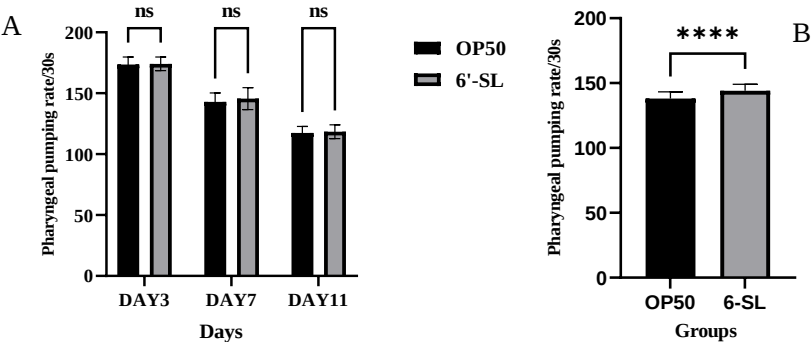


图 2 6'-SL 对线虫吞咽频率的影响

Fig.2.The effect of 6'-SL on the pharyngeal pumping rate of *C. elegans*

注：A.6'-SL 在第 3、7、11 天对 N2 线虫吞咽频率的影响；B.6'-SL 对高温诱导后 CL4176 线虫吞咽频率的影响。****表示 $P<0.0001$ ，ns 表示 $P>0.05$ ，差异不具有统计学意义。

2.2.2 6'-SL 对线虫头摆速率的影响

本实验用 6'-SL 样品处理 N2 线虫 11 d, 处理 CL4176 线虫 2.4 d。如图 3A 所示, 0.56 mg/mL 6'-SL 在第 3、7 和 11 天对 N2 线虫吞咽频率的影响均与 OP50 组无显著差异 ($P>0.05$); 但 6'-SL 明显提升了高温诱导后 CL4176 线虫的头摆频率, 提高了 7.39% ($P<0.01$)。

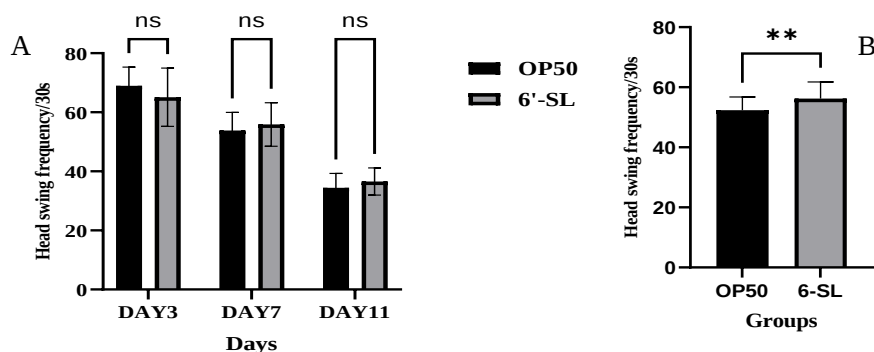


图 3 6'-SL 对线虫头摆频率的影响

Fig.3 The effect of 6'-SL on the head swing frequency of *C. elegans*

注: A. 6'-SL 在第 3、7、11 天对 N2 线虫头摆频率的影响; B. 6'-SL 对高温诱导后 CL4176 线虫头摆频率的影响。**表示, $P<0.01$, ns 表示 $P>0.05$, 差异不具有统计学意义。

2.2.3 6'-SL 对线虫运动速率的影响

用 6'-SL 处理 N2 线虫 3 d。如图 4 所示, 相比于 OP50 组, 0.56 mg/mL 6'-SL 组显著提高了 N2 线虫的运动速度。OP50 组线虫运动平均速度为 39.48 $\mu\text{m/s}$, 6'-SL 组线虫平均速度为 45.91 $\mu\text{m/s}$, 提高了 16.27% ($P<0.05$)。

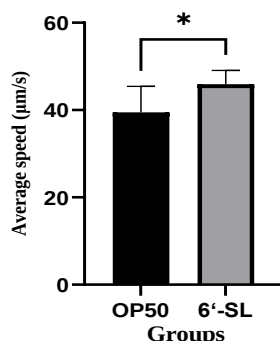


图 4 6'-SL 对线虫运动速率的影响

Fig.4 The effect of 6'-SL on the average speed of *C. elegans*

注: *表示 $P<0.05$, 差异具有统计学意义。

姚鉴芯等^[17]发现火麻油可能通过增强神经系统功能来提高线虫的运动频率。此外, 有研究表明线虫被长时间暴露于稳态磁场下会导致线虫的咽部泵送频率升高, 且引起 5-HT 含量水平和基因表达上升^[14], 6'-SL 改善线虫运动功能的机制可能类似于稳态磁场。综上所述, 0.56 mg/mL 的 6'-SL 能够改善线虫的吞咽频率、头摆频率和运动速度, 改善行为协调和运动学功能, 特别是改善 β -淀粉样蛋白沉积所诱导的线虫急性瘫痪和运动障碍。

2.3 6'-SL 对 CL2355 线虫趋向性的影响

CL2355 菌株线虫在高温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 的情况下, 在神经元中诱导 A β 导致瘫痪。趋化性是秀丽隐杆线虫所具备的先天性行为。线虫可以利用嗅觉受体检测多种挥发性化学物质, 产生趋避行为^[18]。如图 5 所示, 相较于 OP50 组, 6'-SL 在一定程度上提高了 CL2355 线虫的趋向性指数, 但并没有显著性 ($P>0.05$)。Xin 等^[19]发现黑米花青素提取物能够延长野生型线虫寿命, 同时缓解 CL4176 线虫的麻痹表型和高温处理过的 CL2355 线虫趋向性缺陷。Miaosi 等^[20]研究表明豆类抗衰老的主要活性成分 D-松醇 (DP) 可延长线虫寿命和抗应激能力, 且提高表达 A β

的 CL2355 线虫的 CI 值，并减少 Aβ 斑点沉积。6'-SL 不仅和黑米花青素提取物一样缓解高温诱导下 CL4176 线虫的麻痹表型，且 6'-SL 和黑米花青素提取物、D-松醇均可改善高温处理过的 CL2355 线虫趋向性缺陷。

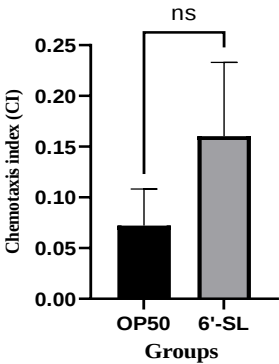


图 5 6'-SL 对线虫趋向性的影响

Fig.5 The effect of 6'-SL on Chemotaxis index of *C. elegans*

注：ns 表示 $P>0.05$ ，差异不具有统计学意义。

2.4 6'-SL 对线虫胆碱能神经元的影响

胆碱能神经元可产生神经递质乙酰胆碱，并参与大多数脑活动。胆碱能神经元损坏与 AD 患者的病变有关^[21]。胆碱能神经元主要位于线虫的腹侧，为线虫体内数量最多的神经元。当线虫日龄增加时，可能会引发胆碱能神经元的异常损伤，表现为神经元萎缩、缺失以及树突断裂，其异常也会导致线虫的学习及记忆能力产生障碍。

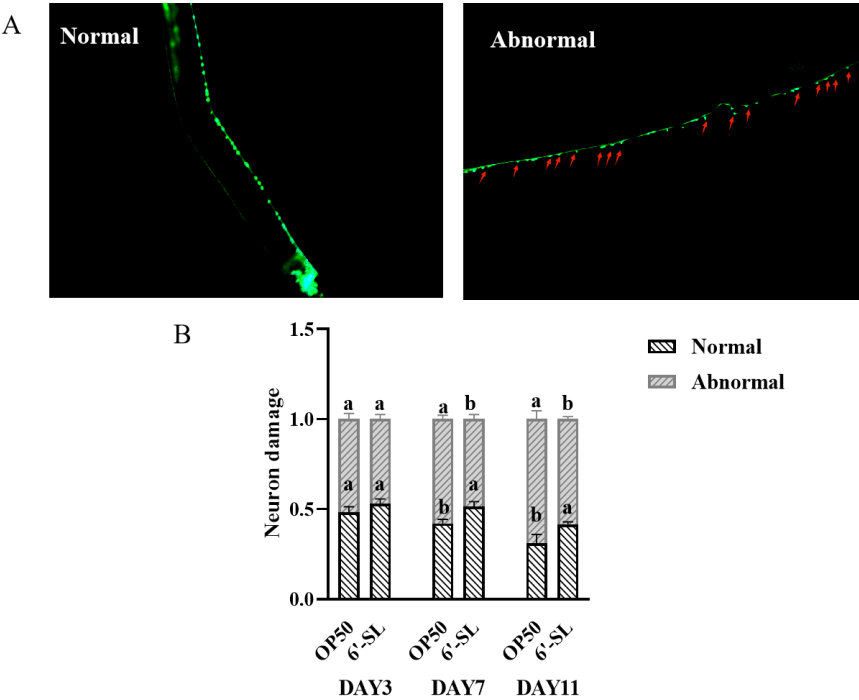


图 6 6'-SL 对线虫胆碱能神经元的形态影响

Fig.6 The effects of 6'-SL on cholinergic neurons in *C. elegans*

注：A.正常与不正常的代表性胆碱能神经元图像；B.6'-SL 对线虫胆碱能神经元的形态影响。不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。

报告基因虫株 LX929 可用于评价 6'-SL 对秀丽线虫胆碱能神经元的影响。损伤胆碱能神经元的表现为沿神经索的 GFP 信号异常的分支或斑点形成^[22]。由图 6 可知，6'-SL 提升第 7 和 11 天线虫胆碱能神经元正常表型的比例 ($P<0.05$)，同时降低异常表型的比例 ($P<0.05$)，这说明 6'-SL 可以有效地保护胆碱能神经元的正常发育和免于

年龄衰老导致胆碱能神经元的损坏,且随着线虫年龄的增长,6'-SL 对胆碱能神经元的保护效果更加明显。与 6'-SL 对胆碱能神经元的保护不同, Aline 等^[23]发现线虫暴露于氧化铁/银混合纳米粒子会引起线虫胆碱能神经元损伤,并导致产卵和运动的缺陷。所以 6'-SL 可能通过促进胆碱能神经元的生长和保护胆碱能神经元免于年老而造成衰退,来改善线虫的肌肉运动功能。

2.5 6'-SL 对线虫乙酰胆碱酯酶活性的影响

乙酰胆碱 (Acetylcholine, ACh) 是人体内关键的神经递质,对学习行为和记忆行为至关重要。在神经元兴奋时 ACh 从突触前膜释放到突触间隙,作用于突触后膜,从而发生信号传导。在阿尔茨海默病大脑中,胆碱能系统被破坏,乙酰胆碱酯酶活性升高,ACh 含量明显降低,胆碱能神经元数量减少等^[24]。

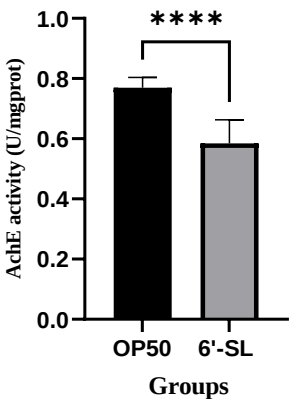


图 7 6'-SL 对 CL4176 线虫乙酰胆碱酯酶活性的影响

Fig.7 The effect of 6'-SL on acetylcholinesterase activity in CL4176

注: ****表示 $P<0.0001$, 差异具有统计学意义。

表 2 6'-SL 对 CL4176 线虫乙酰胆碱酯酶活性的影响

Table 2 The effect of 6'-SL on acetylcholinesterase activity in CL4176

样品	AChE 活性/(U/mgprot)	AChE 活性下降百分比 (均值±标准差)
OP50	0.77	/
6'-SL	0.60	22.60±8.01

如图 7 和表 2 所示,0.56 mg/mL 6'-SL 能显著降低高温诱导后 CL4176 线虫的乙酰胆碱酯酶活性。相较于 OP50 组,6'-SL 组 AChE 活性为 0.60 U/mg prot,下降了 22.60% ($P<0.0001$)。所以,6'-SL 能够降低 AChE 水平,从而避免乙酰胆碱的过度酶解,维护神经系统的正常发育。

2.6 6'-SL 对线虫神经递质含量的影响

脑内功能的改变受中枢神经递质调控,许多神经类疾病与神经递质相关联^[25]。多巴胺,5-羟色胺是线虫体内主要的生物胺,除此之外还有谷氨酸和氨基丁酸,这些神经调节因子在线虫体内分布广泛并影响线虫许多行为功能,如产卵、运动和觅食等^[26]。

由图 8 和表 3 可知,6'-SL 显著提高了 N2 线虫中的 DA、5-HT 和 Glu 含量水平,分别提升了 148.71% ($P<0.0001$)、72.17% ($P<0.01$) 和 68.47% ($P<0.01$);6'-SL 提高了 N2 线虫中的 GABA 水平,提升了 34.72% ($P>0.05$),但无统计学意义。多巴胺、血清素、谷氨酸和氨基丁酸这 4 种神经递质对神经系统的健康发育影响重大。研究表明长期向老年小鼠补充牛磺酸会导致 GABA 能系统发生变化,并使 GABA 和 Glu 水平增加,改善老年小鼠记忆获取和保留的年龄依赖性^[27]。溴氰菊酯诱导大鼠海马体和前额叶皮层组织中 DA 和 5-HT 含量降低,并诱导 DA 和 5-HT 相关的转运蛋白基因和合成基因下调,造成神经毒性损伤,进而引起神经退行性疾病^[28]。

因此,6'-SL 不仅可以抑制线虫体内 AChE 的活性,避免乙酰胆碱的过度酶解还可以有效提升 N2 线虫体内多巴胺、5-羟色胺、谷氨酸和氨基丁酸的含量,促进这些神经递质的释放和功能,进而改善线虫运动能力并维护神经系统的正常发育。

在生命发育周期中，大脑中都含有高浓度的内源性 HMO 相关化合物^[12]。6'-SL 是一种 HMO，已被证明具有改善肠道健康、抗黏附、抗病毒等功效。在实际生产中，6'-SL 作为食品添加剂，可与其它低聚糖或益生菌复配，如具有免疫调节、抗过敏等功效母乳源乳酸菌^[29]，添加至婴幼儿配方食品、发酵乳制品或者特殊医学用途配方食品。

Arellano 等^[30]发现 6'-SL 提高了线虫在耐力型运动中的表现，减少了 120 min 游泳后的疲惫感，这可能是 6'-SL 改变了线虫肠道的代谢状态，肠道通过神经系统向肌肉细胞发出信号，进而提高运动表现。Chen 等^[31]发现 6'-SL 模拟肽增加了 SK-N-SH 人神经母细胞瘤细胞中神经细胞粘附分子 L1 的活力和表达，促进神经元存活和神经发生。Elena 等^[32]发现在断奶前补充 6'-唾液酸乳糖，大鼠在某些认知评估中表现得更好。以上研究可以进一步支持 6'-SL 很可能通过调控神经递质、乙酰胆碱酯酶合成与分解，相关转运蛋白和受体的表达来发挥其功效。6'-SL 的功效机制还需未来进一步通过荧光蛋白表达、转录组学、突变体验证、小鼠模型验证等多角度进行深入探究。

此外，本研究发现 6'-SL 在 0.02~1.0 mg/mL 浓度范围内都能促进线虫的健康生长，这扩大了 6'-SL 在开发婴幼儿食品、乳制品和特殊医疗用途配方食品时的可利用浓度范围，为不同浓度 6'-SL 在实际运用中的使用提供理论依据。此外，本研究说明了 6'-SL 的促神经发育功效和改善运动能力功效，表明 6'-SL 作为营养强化剂具有的丰富营养价值。

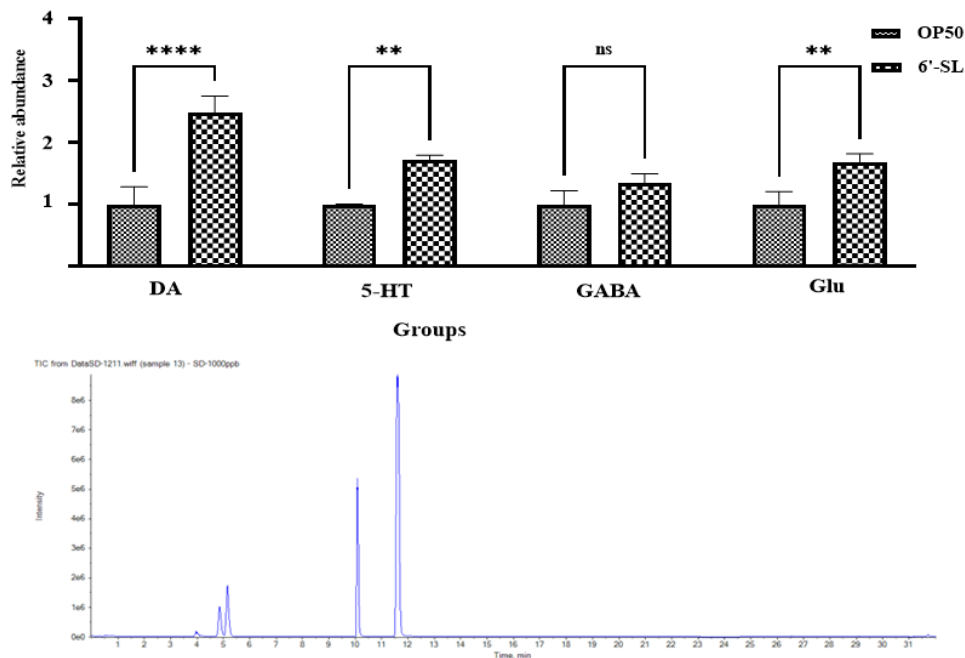


图 8 6'-SL 对线虫神经递质的影响

Fig.8 The effect of 6'-SL on neurotransmitters in *C. elegans*

注：A.四种神经递质含量变化图；B.四种神经递质的总离子流图。**表示 $P < 0.01$ ，****表示 $P < 0.0001$ ，ns 表示 $P > 0.05$ ，差异不具有统计学意义。

表 3 6'-SL 对线虫神经递质含量的影响

Table 3 The effects of 6'-SL on the neurotransmitter content of *C. elegans*

神经递质种类	含量上降百分比（均值±标准差）
DA	148.71±26.30
5-HT	72.17±7.78
GABA	34.72±15.38
Glu	68.47±13.77

3 结论

本研究表明 6'-SL 在 0.02~1.0 mg/mL 内均能够延缓高温引起的 CL4176 线虫瘫痪行为。6'-SL 能够显著改善线

虫的头摆频率、吞咽频率和运动速率,提升胆碱能神经元正常表型的比例,同时轻微提高了线虫的趋向性。此外,6'-SL降低高温诱导后CL4176线虫的乙酰胆碱酯酶活性,并显著提高了线虫中的DA、5-HT和Glu含量水平。综上所述,6'-SL改善了线虫的运动能力,促进了神经系统的发育。

参考文献

- [1] 李敏,熊菲.母乳成分及其影响因素的研究现状[J].中华妇幼临床医学杂志(电子版),2023,19(3):267-272.
- [2] 梁宸,齐悦,陈龙,等.母乳低聚糖对人体保护作用的研究进展[J].食品安全导刊,2023,28:185-188.
- [3] 史玉东,刘梦瑶,卢卫红.母乳低聚糖的结构与功能研究进展[J].食品安全质量检测学报,2020,11(21):7656-7662.
- [4] TAHEREH B, ROZLYN C T B, SARAH E W, et al. Early life exposure to human milk oligosaccharides reduces allergic response in a murine asthma model [J]. Journal of Immunology Research, 2023, 2023: 9603576.
- [5] 刘干,崔东影,王旭婷,等.2'-岩藻糖基乳糖对生长期小鼠骨骼发育的影响[J].食品科技,2023,48(3):253-259.
- [6] YEON J K, HAN H K, CHUL S S, et al. 2'-Fucosyllactose and 3-fucosyllactose alleviates interleukin-6-induced barrier dysfunction and dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and modulating the intestinal microbiome [J]. Nutrients, 2023, 15(8): 1845.
- [7] LEI K, WANG DI, LIN L, et al. 2'-Fucosyllactose inhibits imiquimod-induced psoriasis in mice by regulating Th17 cell response via the STAT3 signaling pathway [J]. International Immunopharmacology, 2020, 85: 106659.
- [8] TAWFIK A A, THOMAS K, TAMARA S, et al. 6'-Sialyllactose ameliorates the ototoxic effects of the aminoglycoside antibiotic neomycin in susceptible mice [J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1264060.
- [9] HUANG X, LIU R, WANG J, et al. Preparation and synbiotic interaction mechanism of microcapsules of *Bifidobacterium animalis* F1-7 and human milk oligosaccharides (HMO) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259: 129152.
- [10] 蒋思瑾,石璐,周静,等.母乳低聚糖在婴幼儿生长发育中的作用及其影响因素[J].中国妇幼健康研究,2023,34(3):105-112.
- [11] PURVA R, FABIO M, SEAN A, et al. The role of human milk oligosaccharides in myelination, socio-emotional and language development: observational data from breast-fed infants in the United States of America [J]. Nutrients, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023, 15(21): 4624.
- [12] REBECCA K G, LORETTA T S, SHARON M D, et al. Dietary supplementation of 3'-sialyllactose or 6'-sialyllactose elicits minimal influence on cognitive and brain development in growing pigs [J]. Frontiers in Behavioral Neuroscience, Frontiers, 2024, 17: 1337897.
- [13] JOHN G W, EILEEN S, SYDNEY B, et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, 1986, 314(1165): 1-340.
- [14] 程雷.稳态磁场对秀丽隐杆线虫神经行为和早期胚胎发育的影响[D].合肥:中国科学技术大学,2023.
- [15] NICHOLAS J A, MARION M K, ANDREA L B, et al. Alzheimer disease blood biomarkers in patients with out-of-hospital cardiac arrest [J]. JAMA Neurology, 2023, 80(4): 388-396.
- [16] DOMINIQUE T, TORSTEN B, JACQUELINE C, et al. Safety of 6'-sialyllactose (6'-SL) sodium salt produced by a derivative strain (*Escherichia coli* NEO6) of *E. coli* W (ATCC 9637) as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283 [J]. EFSA Journal, 2023, 21(6): e08025.
- [17] 姚鉴芯,张哲皓,张帅,等.火麻油水解提取多酚工艺优化及多酚对线虫行为能力的影响[J].食品与生物技术学报,2022,41(6):60-66.
- [18] HE Q D, HUANG G, CHEN Y X, et al. The protection of novel 2-arylethenylquinoline derivatives against impairment of associative learning memory induced by neural A β in *C. elegans* Alzheimer's disease model [J]. Neurochemical Research, 2017, 42(11): 3061-3072.
- [19] LI X, WANG X X, WANG K X, et al. Black rice anthocyanin extract enhances the antioxidant capacity in PC12 cells and improves the lifespan by activating IIS pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2023, 265: 109533.
- [20] ZHANG M, XU Z, SHAO L, et al. D-pinitol ameliorated H₂O₂-induced oxidative damage in PC12 cells and prolonged the lifespan by IIS pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2023, 274: 109755.
- [21] 王会民.胆碱能系统在阿尔茨海默症病理生理中的意义[J].吉林医学,2022,43(6):1690-1693.
- [22] 张颖.铜暴露诱导认知障碍及神经毒性的机制研究[D].南京:东南大学,2022.

- [23] ALINE C S, ALISSON G R D S, JOANA C P, et al. Iron oxide/silver hybrid nanoparticles impair the cholinergic system and cause reprotoxicity in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food and Chemical Toxicology, 2023, 179: 113945.
- [24] 康瑶,唐瑗,张东星,等.药食同源物质防治阿尔茨海默病作用机制的研究进展[J].食品工业科技,2024,45(12):18-27.
- [25] 田微.合欢皮提取物抗焦虑活性筛选及其对脑内神经递质的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2016.
- [26] 刘辉.线虫进食行为的神经信号及神经回路研究[D].武汉:华中科技大学,2020.
- [27] ABDESLEM E I. Taurine improves learning and retention in aged mice [J]. Neurosci Lett, 2008, 436(1): 19-22.
- [28] BERNARDO L T, IRMA A, MARTA M, et al. Neurotoxicity induced by the pyrethroid lambda-cyhalothrin: Alterations in monoaminergic systems and dopaminergic and serotonergic pathways in the rat brain [J]. Food Chem Toxicol, 2022, 169: 113434.
- [29] 赵丽霞,刘文俊.母乳中乳酸菌多样性及益生菌开发利用研究进展[J].食品与生物技术学报,2024,43(4):25-34.
- [30] JESUS A S, YUKIHIRO H, YUKIHISA M, et al. 3'-Sialyllactose and 6'-sialyllactose enhance performance in endurance-type exercise through metabolic adaptation [J]. Food Science & Nutrition, 2023, 11(10): 6199-6212.
- [31] CHEN S X, HE J H, MI Y J, et al. A mimetic peptide of alpha2,6-sialyllactose promotes neuritogenesis [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(6): 1058-1065.
- [32] ELENA O, ENRIQUE V, ALEJANDRO B, et al. Sialic acid and sialylated oligosaccharide supplementation during lactation improves learning and memory in rats [J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1519.