

太子参多糖对 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼认知损伤的改善作用

何传统¹, 蒋嘉慧¹, 李文龙¹, 区海燕¹, 卢慧蕴¹, 陈瑞烨¹, 杨志友^{1, 2*}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

(2. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 该研究利用脑室显微注射 $A\beta_{1-42}$ 斑马鱼模型探究太子参分级多糖 PF30、PF60、PF90 对 AD 认知功能损伤的改善作用、机制及发挥作用主要成分。利用苯酚-硫酸法、考马斯亮蓝法和凝胶色谱分别测定 PF30、PF60、PF90 的总糖、蛋白质含量和分子量, 并对其进行紫外光谱、红外光谱表征; 采用新物体识别、奖励 T 迷宫行为实验检验其对斑马鱼模型认知损伤的影响; 荧光定量 PCR 测定斑马鱼脑相关 mRNA 表达水平。结果发现 PF30、PF60、PF90 的总糖含量质量分数分别为 70.54%、69.00%、80.19%; 蛋白质含量质量分数为 2.51%、5.08%、1.89%; 分子量 (M_w) 为 23.1、8.97、1.72 ku。通过斑马鱼实验比较发现 PF30 显著提高斑马鱼新臂和奖励臂停留时间, 显著增加斑马鱼进入新臂和奖励臂次数, 减轻了斑马鱼大脑神经炎症, 显著抑制 CDK5 和 GSK-3 β 的表达, 改善了斑马鱼认知记忆损伤。综上, 三种太子参分级多糖中 PF30 对斑马鱼认知损伤的改善作用最佳。

关键词: 阿尔茨海默病; 太子参分级多糖; 认知损伤; 神经炎症

文章编号: 1673-9078(2025)06-13-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0293

Ameliorating Effects of *Pseudostellaria heterophylla* Polysaccharides on $A\beta_{1-42}$ -induced Cognitive Impairment in Zebrafish

HE Chuantong¹, JIANG Jiahui¹, LI Wenlong¹, OU Haiyan¹, LU Huiyun¹, CHEN Ruiye¹, YANG Zhiyou^{1, 2*}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The $A\beta_{1-42}$ zebrafish model, established via intracerebroventricular microinjection, was employed to investigate the ameliorative effects of *Pseudostellaria heterophylla* fractionated polysaccharides (PF30, PF60, PF90) on Alzheimer's disease (AD)-associated cognitive deficits, as well as the underlying mechanisms and the primary active constituents responsible for these effects. The total sugar, protein content and molecular weight of PF30, PF60 and PF90 were determined by phenol-sulfuric acid method, Coomassie brilliant blue method and gel chromatography, respectively. UV and FT-IR spectroscopy were used for characterization. Novel object recognition, reward T-maze behavior experiments were performed to explore the effects of PF30, PF60, and PF90 on cognitive impairment in the AD zebrafish model. Fluorescence

引文格式:

何传统, 蒋嘉慧, 李文龙, 等. 太子参多糖对 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼认知损伤的改善作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(6): 13-24.

HE Chuantong, JIANG Jiahui, LI Wenlong, et al. Ameliorating effects of *Pseudostellaria heterophylla* polysaccharides on $A\beta_{1-42}$ -induced cognitive impairment in zebrafish [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 13-24.

收稿日期: 2024-03-11

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2022A1515011419); 广东省教育厅重点领域专项 (2022ZDZX2029)

作者简介: 何传统 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 神经免疫药理学, E-mail: hct17876042334@126.com

通讯作者: 杨志友 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 神经免疫药理学, E-mail: yang_zhiyou@sina.com

quantitative PCR was used to determine the expression levels of related mRNAs in the zebrafish brain. The results revealed that the mass fractions of total sugar contents of PF30, PF60 and PF90 were 70.54%, 69.00% and 80.19%, respectively; the mass fractions of protein contents were 2.51%, 5.08% and 1.89%, respectively; the molecular weights (M_w) were 23.1, 8.97 and 1.72 ku, respectively. The comparison of the results of zebrafish experiments revealed that PF30 significantly increased the retention time of zebrafish in the new arm and the reward arm, increased the number of times the zebrafish entered the new arm and the reward arm, alleviated the brain neuroinflammation, significantly inhibited the expression of CDK5 and GSK-3 β , and ameliorated the cognitive memory impairment in zebrafish. Therefore, PF30 showed the greatest ameliorating effect on cognitive impairment in zebrafish among the three graded polysaccharides of *Pseudostellaria heterophylla*.

Key words: Alzheimer's disease; *Pseudostellaria heterophylla* graded polysaccharide; cognitive impairment; neuroinflammation

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种进行性、不可逆且起病隐匿的神经退行性疾病, 多发于 65 岁以上的老年人群体^[1]。AD 临床上以思维和认知能力减退、学习和记忆功能障碍为特征, AD 的病理特征主要是患者大脑中细胞内微管结合蛋白过度磷酸化形成的神经元纤维缠结和细胞外以淀粉样蛋白 β 肽 (Amyloid Beta Peptide, A β) 积累与变性细胞碎片为核心形成的老年斑。Tau 蛋白过度磷酸化和 A β 积累导致神经元之间失去连接, 进而导致神经元死亡和脑组织损伤^[2]。

目前, AD 药物研发面临着多重挑战。抗 AD 与抗淀粉样蛋白生成之间存在不等价性, 临床试验中部分治疗方法在降低 A β 低聚物或相关生物标志物水平方面具有一定的效果, 但在临床症状改善方面未达到理想效果^[3,4]。实验动物模型与 AD 患者临床试验之间存在差异, 大多数动物模型 AD 的阵发性是早发家族性 AD 的基因突变所导致的, 但该病因在人类病例中仅占 1%, 且人类与动物在生理、病理结构上的差异也阻碍 AD 药物的研发^[5,6]。此外, 单一靶点治疗、给药后复杂的下游效应引起的一系列副作用以及对 A β 致病机制的不完全认识等均是 AD 药物研发过程中所面临的挑战^[4]。相对于单靶点的药物, 传统中药有多成分、多靶点、多途径及副作用小等天然优势, 其在预防治疗多病因、复杂程度高的疾病中有优异的治疗效果, 近年来应用中药及其提取物、衍生物治疗 AD 的相关研究呈增长趋势。

太子参是我国传统中药材之一, 已有数千年应用的历史, 已被中华人民共和国卫生部批准可用于“保健食品”^[7]。其具有多种功效, 在临床治疗上常用于脾虚体倦等症状^[8]。太子参含有多糖、环肽、皂苷、氨基酸等活性成分, 其中太子参多糖具有抗炎^[8]、抗糖尿病^[9]、抗肿瘤^[10]和免疫调节^[11]等药理

活性。太子参多糖具有改善东莨菪碱诱导小鼠记忆障碍的作用, 这可能与改善脑缺血及抗氧化作用有关^[12]。但其对 AD 改善的作用部位和机制尚未完全阐明。我们前期研究发现太子参能改善 APP/PS1 转基因小鼠与脑室注射 A β_{1-42} 斑马鱼模型的认知记忆损伤^[13], 太子参水提取物也具有增强认知记忆功能^[14], 太子参环肽 B 通过免疫调节和神经轴突再生可以改善 i.c.v.A β 诱导小鼠的认知记忆功能^[15]。作为太子参主要成分之一的多糖对 AD 是否也具有改善记忆和增强认知功能值得进一步探究。

小鼠、大鼠等啮齿动物已被广泛用于神经退行性疾病方面的研究。与啮齿动物相比, 斑马鱼具有成本低廉、繁殖周期短、与人类基因组同源性高等优点, 被广泛用于疾病的研究。研究表明, 成年斑马鱼脑室注射 A β_{1-42} 后, 出现了神经元凋亡、小胶质细胞活化和认知记忆损伤等 AD 病理特征, 斑马鱼已成为一种新兴的 AD 模型动物, 广泛用于 AD 药物筛选、保健食品研发等方面^[16,17]。基于以上研究背景, 本研究通过水提醇沉法提取太子参多糖, 使用不同浓度乙醇溶液进行醇沉分级, 得到太子参分级多糖 PF30、PF60、PF90, 采用脑室注射 A β_{1-42} 诱导斑马鱼 AD 模型探究太子参分级多糖对斑马鱼 AD 模型是否具有记忆改善作用, 确定太子参多糖改善斑马鱼 AD 模型认知记忆损伤的最佳分子量范围, 为开发大脑健康营养补充剂等太子参多糖相关产品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

太子参产自中国福建省, 购自北京同仁堂。斑马鱼购自上海佳誉水族馆, 实验室温度 (28 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$,

光暗周期 14/10 h, 斑马鱼实验用水 pH 值为 7.0~7.4。UPLC-Q-Exactive 系统, 美国 Thermo Fisher Science; 考马斯亮蓝 G250, 购自上海源叶生物科技有限公司; $A\beta_{1-42}$, 购自吉尔生化有限公司; PBS (磷酸盐缓冲液), 购自 Gibco 公司; Trizol 裂解液, 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 反转录试剂盒、SYBR Green 染料, 购自南京诺维赞生物科技有限公司。实验所用试剂均为 AR 分析纯。

YZ36 体视解剖显微镜, 上海跃河生物科技有限公司; SRT-24 多样品快速研磨仪, 深圳市赛尔特生物科技有限公司; DS-11 超微量分光光度计, 美国丹诺尔公司; CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪, 安捷伦科技有限公司; UltiMate3000 高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 太子参多糖及分级多糖得率计算公式

(1) 太子参多糖得率计算公式为:

$$D = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——太子参多糖得率, %;

m_0 ——太子参总质量, mg;

m_1 ——太子参多糖总质量, mg。

(2) 太子参分级多糖得率计算公式为:

$$D_1 = \frac{m_3}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D_1 ——太子参分级多糖得率, %;

m_2 ——用于醇沉分级的太子参多糖的总质量, mg;

m_3 ——太子参分级多糖总质量, mg。

1.2.2 太子参分级多糖的制备

取 375.00 g 太子参干燥块根磨碎为 40 目粉末, 取粉末, 加入石油醚 (料液比为 1:4) 超声 15 min 后浸泡过夜, 除去表面脂类。过夜后, 倒出上层石油醚, 留下层太子参粉末。挥干石油醚后, 加入蒸馏水 1:10, 煎煮 1 h, 并使用玻璃棒进行搅拌, 使其受热均匀。过滤, 滤去滤渣, 6 000~7 000 r/min 离心 20 min。然后加入木瓜蛋白酶 (20 mg/mL), 40 °C 水浴 3~5 h, 初步除去蛋白。过滤、离心除去沉淀, 取上清液。使用 Sevage 试剂再次除蛋白, Sevage 试剂配比为氯仿:正丁醇=4:1, 药液与 Sevage 试剂配比为 1:1, 混合均匀后振荡 5 min, 等待静置分层,

蛋白质呈胶状处于水和试剂中间层, 重复 5 次及以上, 合并水层。根据药液体积添加乙醇, 直至溶液中乙醇体积分数达到 80%, 4 °C 静置沉淀过夜, 过滤、去除上清液, 最后冷冻干燥。

① PF30: 太子参多糖按 10 g/100 mL 溶于超纯水, 加入无水乙醇, 使溶液体系中乙醇体积分数为 30%, 4 °C 醇沉 24 h, 4 °C 4 000 r/min 低温离心 10 min, 保留沉淀, 附着在烧杯壁和玻璃棒的多糖可用水溶解于离心管中, 待后续冻干, 减少损耗;

② PF60: 上述①中上清液中继续添加无水乙醇, 使溶液中乙醇体积分数为 60%, 后续参考①中方法进行实验;

③ PF90: 上述②中上清液中继续添加无水乙醇, 使溶液中乙醇体积分数为 90%, 后续参考①中方法进行实验。

分别将各级多糖用水溶解, 集中于培养皿中, 冷冻干燥。将冷冻干燥的各级多糖用无水乙醇溶解清洗, 充分搅拌, 低温离心 (4 °C, 4 000 r/min, 离心 10 min), 保留沉淀, 反复 3 次。并用丙酮溶解清洗 1 次, 低温离心 (4 °C, 4 000 r/min, 离心 10 min), 保留沉淀, 放置于通风橱内挥干丙酮。最后分别用超纯水溶解于培养皿中进行冷冻干燥, 最终即得 PF30、PF60、PF90 太子参分级多糖。

1.2.3 太子参分级多糖总糖及蛋白质含量的测定

太子参分级多糖总糖及蛋白质含量分别采用苯酚-硫酸法^[8]和考马斯亮蓝法进行测定^[18]。

1.2.4 紫外光谱和红外光谱测定

使用 Cary60 UV-Vis 紫外可见分光光度计 (美国安捷伦) 在 190~400 nm 波长范围内分别测量质量浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ PF30、PF60、PF90 溶液。

将 2 mg PF30、PF60、PF90 分别与 100 mg 经 120 °C 烘干 4 h 后的溴化钾进行充分研磨混合、压片, 在 4 000~400 cm^{-1} 范围内使用 TENSOR27 傅立叶红外光谱仪 (德国布鲁克) 进行红外光谱扫描分析。

1.2.5 太子参分级多糖分子量的测定

将样品溶解在 0.1 mol/L NaNO_3 水溶液 (含质量分数为 0.02% 的 NaN_3) 中, 样品最终质量浓度为 1 mg/mL, 并使用孔径为 0.45 μm 的滤膜进行过滤, 然后上机检测。采用凝胶排阻色谱柱 Ohpak SB-803 HQ (300 $\times$ 8 mm) 和 Ohpak SB-805 HQ (300 $\times$ 8 mm), 两条色谱柱串联使用, 进样量 100 μL , 柱温 45 °C, 流动相 (含质量分数为 0.02% 的 NaN_3 , 0.1 mol/L

NaNO₃), 流量 0.6 mL/min, 75 min 等度洗脱。

1.2.6 动物实验分组及药物干预

斑马鱼以 15 条 50 mg 的标准每日喂食斑马鱼专用饲料两次, 时间固定为中午 12 点、晚上 10 点。刚购入时斑马鱼鱼缸中加入适量浓度的土霉素和杀菌盐, 适应环境一周。一周后随机分组, 分为: 空白对照组 (Cont)、模型组 (Veh)、太子参分级多糖 PF30 组 (PF30)、太子参分级多糖 PF60 组 (PF60)、太子参分级多糖 PF90 组 (PF90), 每组 15 条, 共 75 条。分组后适应环境一周, 斑马鱼呈分散、缓慢的游动在水箱中至上层。Cont 组与 Veh 组正常给予普通斑马鱼饲料, 而太子参分级多糖 PF30、PF60、PF90 则均分别按 200 mg/kg bw 的比例与适量的普通斑马鱼饲料及蒸馏水搅拌均匀, 冷冻干燥, 即分别得 PF30、PF60、PF90 组的饲料, 按相同方式进行喂食。

1.2.7 斑马鱼脑室注射AD模型建立

使用 1×PBS 溶解 A β ₁₋₄₂, 配成 100 μ mol/L 的母液, 在 37 °C 培养箱中老化 7 d, 使用时稀释 A β ₁₋₄₂ 至终浓度为 20 μ mol/L, Cont 组注射 1 μ L 1×PBS, Veh 组其他给药组脑室注射 1 μ L A β ₁₋₄₂ 建立 AD 样急性模型。在质量体积分数为 1% 的琼脂糖中盛放、固定斑马鱼, 将 1 μ L A β ₁₋₄₂ 转移到毛细玻璃管, 并将毛细玻璃管放入持针器。将斑马鱼小心捞出放入麻醉剂 (体积分数为 0.04% 的三甲卡因) 中, 待使用镊子夹鱼尾不再挣扎时, 便可进行注射。调节显微镜粗、细准焦螺旋, 放大、调整视野, 使用 30 G 注射针在斑马鱼的视顶盖前端上方颅骨上形成直径约为 0.3 mm, 深度约为 0.2 mm 的圆形切口, 切口位于斑马鱼大脑的中脑与端脑之间的腔室, 取持针器、将毛细玻璃管尖端插入圆形切口, 小心注射 1 μ L 的 A β ₁₋₄₂, 注射深度约为 0.4 mm, 然后将斑马鱼放入含有体积分数为 0.002% 的双抗 (青霉素、链霉素) 的水箱, 避免伤口感染, 1 min 以内便恢复运动, 次日将含有双抗的水换成日常用水。脑室注射后休息 1 d, 然后分别依次进行新物体识别、奖励 T 迷宫行为测试。

1.2.8 斑马鱼新物体识别行为测试实验

新物体识别测试利用动物先天对新物体有探索倾向, 评价斑马鱼的物体认知记忆能力。T 字型迷宫侧面贴有黑色不透光自粘膜, 剪裁成不同的形状, 起始臂为三角形, 训练臂为圆形, 新臂为正方形。脑室注射后第 2 天开始进行新物体识别训练, 使用黑色隔板将新臂隔绝, 斑马鱼五个小组依次分批次

放入, 每组 30 min 熟悉起始臂和训练臂。第 2 天, 将新臂的隔板拆除, 将斑马鱼逐一进行测试, 测试时间为 5 min/尾, 记录斑马鱼进入新臂的停留时间、进入次数、新臂游动距离、总游动距离和总平均速度, 进而评估各分级多糖对其认知记忆功能的影响。

1.2.9 斑马鱼奖励T迷宫行为测试实验

斑马鱼奖励 T 迷宫行为测试使用的 T 迷宫外部贴满黑色不透光自粘膜 (底部不贴)。训练时将一组斑马鱼放入起始区, 喂食环放入左右侧臂中, 且在距离喂食环的合适距离的位置各放置两个隔板, 避免斑马鱼肉眼看到哪个侧臂有食物。斑马鱼熟悉 2 min, 然后给予左臂 (即为奖励臂) 饲料, 于 13 min 后再次给予奖励臂饲料, 共自由活动 30 min。只在训练期间喂食, 即每组训练时共喂食 50 mg, 提前训练 2 d, 第 3 天开始测试, 测试期间不再给予饲料, 测试时间为 5 min/尾, 记录每条鱼进入奖励臂的停留时间、进入次数、奖励臂游动距离、总游动距离和总平均速度, 进而评估各分级多糖对其奖赏记忆功能的影响。

1.2.10 样本采集

斑马鱼行为学实验结束后, 禁食 12 h, 称量体质量, 将斑马鱼放置冰水混合物中麻醉牺牲, 吸干鱼体表面水分, 在低温环境下把脑组织分离, 立即放于液氮下速冻, 最终放置于 -80 °C 冰箱保存。

1.2.11 荧光定量PCR测定mRNA表达

取 5~10 mg 斑马鱼脑组织至 1.5 mL 已灭菌的离心管中, 加入 1 mL Trizol 裂解液充分匀浆, 室温静置 10 min, 低温 (4 °C 12 000 r/min) 离心 5 min, 吸取上清液至新的离心管; 加入 200 μ L 氯仿, 充分涡旋混匀, 静置 10 min, 低温 (4 °C 12 000 r/min) 离心 15 min; 再次吸取上清液至新的 1.5 mL 已灭菌离心管, 加入 500 μ L 异丙醇, 充分混匀, 室温静置 10 min, 低温 (4 °C 12 000 r/min) 离心 10 min, 弃上清液; 加入 1 mL 体积分数为 80% 的乙醇 (-20 °C 预冷), 清洗沉淀, 低温 (4 °C 12 000 r/min) 离心 5 min, 重复清洗两次; 自然晾干, 加入 20 μ L DEPC (焦碳酸二乙酯) 水充分溶解, 核酸定量仪检测 RNA 浓度, 将 $1.8 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ 的无污染 RNA 可用于反转录。然后依次进行反转录和荧光定量 PCR 实验, 具体操作分别按照反转录试剂盒和 SYBR Green 荧光染料说明书相关操作流程进行实验。以 Actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 方法分析 mRNA 表达差异。相关引物序列见表 1。

表 1 荧光定量PCR引物序列

Table 1 Fluorescence quantitative PCR primer sequences

中文基因名称	英文缩写基因名称	上下引物序列
肌动蛋白 F	Actin F	CATCAGGGTGTTCATGGTTGGT
肌动蛋白 R	Actin R	TCTCTTGCTCTGAGCCTCATCA
白细胞分化抗原 11b F	CD11b F	GGAGATTTTCCAGTCAGTCTTGC
白细胞分化抗原 11b R	CD11b R	AACTGAAGGGTGCATGAGGG
巨噬细胞甘露糖受体 F	CD206 F	CGACACAGATGGCAGATGGAAGAC
巨噬细胞甘露糖受体 R	CD206 R	ACGCTTCTTTGACTCAGGACAGTTC
补体 C3 F	C3 F	TGATTCTGGCTCGCAGTGATGATG
补体 C3 R	C3 R	CATGGCTGAGGCTGGACAGTTATC
钙结合-S100 蛋白 10 F	S100A10 F	TCCGAAGTAGAGACCGCCAT
钙结合-S100 蛋白 10 R	S100A10 R	CTCAAAGTCAACCTCGCCGT
精氨酸酶 1 F	Arg1 F	TCCGTTCTCCAAAGGACAGC
精氨酸酶 1 R	Arg1 R	GACTCGTCGTTGGGAAGGTT
胶质纤维酸性蛋白 F	GFAP F	AATGTCAAAGTGGCCCTGGAT
胶质纤维酸性蛋白 R	GFAP R	CTCTCCGTCACGGGTCTCAA
白细胞介素-1 β F	IL-1 β F	TTCCCCAAGTGCTGCTTATT
白细胞介素-1 β R	IL-1 β R	AAGTTAAACCGCTGTGGTCA
细胞周期素依赖蛋白激酶 5 F	CDK5 F	TGCTCATCAACAGAAACGGGGAAC
细胞周期素依赖蛋白激酶 5 R	CDK5 R	GTACCACAACGTCACCACCTCAG
糖原合成酶激酶-3 β F	GSK-3 β F	GTGCTGGCTGAACTGCTGCTC
糖原合成酶激酶-3 β R	GSK-3 β R	TGCGGGAATTTGAACTCGGTGTAG

1.2.12 数据统计

实验数据用 mean±SEM 表示，使用 Graphpad Prism 8.0.2 和 Origin 2021 软件进行绘图、分析，采用单因素方差分析（One-way ANOVA）对组间差异进行显著性分析，当 $P<0.05$ 时，表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 太子参分级多糖的得率

最终得到 71.51 g 太子参多糖，得率质量分数为 19.07%，与栗园^[19]的太子参多糖得率相比提高了 10.51%，比黄雅婷^[20]的太子参多糖得率高了 0.44%。各级多糖得率分别为：PF30 得率 3.21%，PF60 得率 12.02%，PF90 得率 44.90%。而陈锦龙^[21]将太子参多糖分级为：PF40、PF60、PF90，得率分别为 1.41%、2.89%、1.60%；栗园^[19]的 PF40 得率为 1.14%。

2.2 太子参分级多糖总糖及蛋白质含量的测定

由苯酚-硫酸法测得太子参分级多糖的总

糖含量质量分数分别为 PF30：70.54%，PF60：69.00%，PF90：80.19%。总糖含量高于陈锦龙^[21]分级的 PF40：47.28%，PF60：41.08%，PF90：45.89%。

由考马斯亮蓝法测得太子参分级多糖的蛋白质含量质量分数分别为 PF30：2.51%，PF60：5.08%，PF90：1.89%。蛋白质含量略高于陈锦龙^[21]分级的 PF40：0.19%，PF60：0.21%，PF90：0.17%。

2.3 太子参分级多糖的结构表征

2.3.1 紫外光谱扫描

太子参分级多糖 PF30、PF60、PF90 紫外光谱图如图 1 所示，由图 1 可知三种太子参分级多糖在 200 nm 波长附近有最大吸收峰，200 nm 波长附近为多糖的特征吸收峰，且在 260~280 nm 波长附近没有出现明显的吸收峰，表明三种太子参分级多糖蛋白质与核酸含量很低^[22]。

2.3.2 红外光谱扫描

图 2 傅里叶变换红外光谱表明，PF30、PF60、PF90 在 3 400 cm⁻¹ 附近具有较强的吸收峰，这是由

O-H 拉伸振动引起的, 在 $2\,927\text{ cm}^{-1}$ 处有一个吸收峰, 代表 C-H 拉伸振动, $1\,650\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰归因于结合水, 位于 $1\,411$ 和 $1\,357\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是由 C-H 弯曲振动引起的; 在 $1\,200\sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$ 存在吸收峰确定三种太子参分级多糖具有与 C-O-C 和 C-O-H 伸缩振动重叠的吡喃糖环; 此外, PF30、PF60 在 929 cm^{-1} 存在一个小的特征峰, 表明 PF30、PF60 存在 β -糖苷键, 但具体糖苷键的构型和连接方式还需要甲基化和核磁共振进一步解析^[23,24]。但黄雅婷^[20]的太子参分级多糖 PF40 红外光谱显示其结构含有 α -吡喃环, 所用原料、提取方法等差异均会导致多糖结构出现差异^[25]。

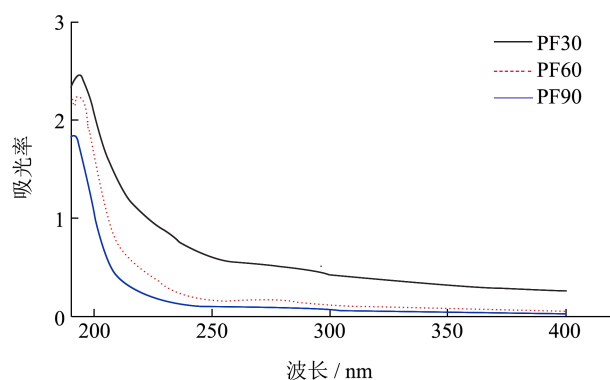


图 1 紫外光谱图

Fig.1 UV spectrum

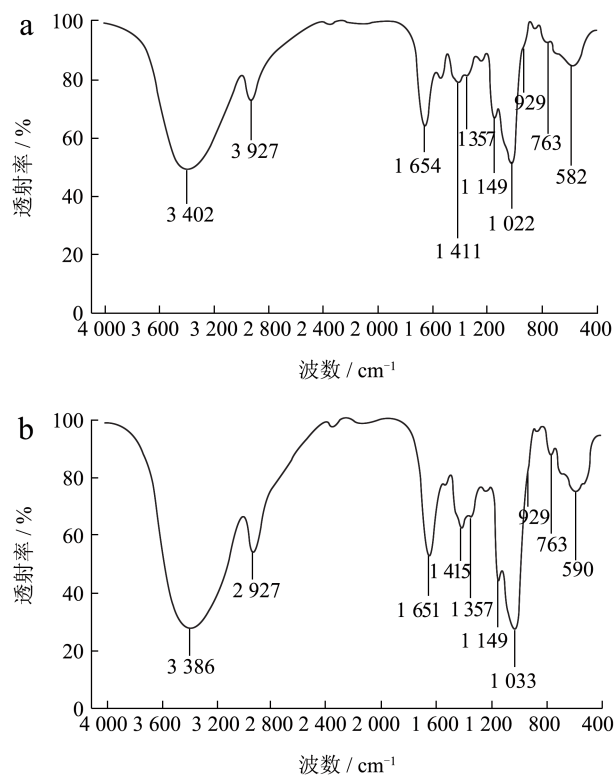


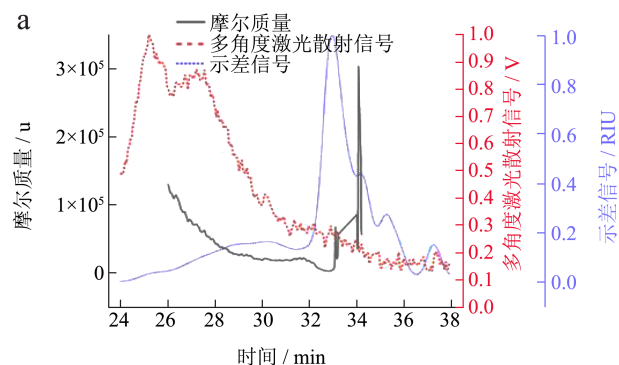
图 2 红外光谱图

Fig.2 Infrared spectrum

注: a~c 分别为 PF30、PF60、PF90 红外光谱图。

2.3.3 分子量测定

以检测的保留时间 (min) 为横坐标, 以摩尔质量 (g/mol) 为纵坐标得到三种太子参分级多糖的绝对分子量分析图, 如图 3 所示。红线代表多角度激光光散射信号 (单位是 V), 散射光强度与物质的分子尺寸、分子量大小成正比; 蓝线代表示差信号 (单位是 RIU), 与物质的类型、浓度和分子量均有关; 黑线是由两种信号拟合出的分子量。37 min 附近为流动相的溶剂峰。最终测得 PF30 的重均分子量 (Weight-Average Molecular Weight, M_w) 为 23.1 ku, PF60 的 M_w 为 8.97 ku, PF90 的 M_w 为 1.72 ku。PF30、PF60、PF90 分子量接近于陈锦龙^[21]分级多糖分子量范围: PF40 : 52~210 ku, PF60 : 10~210 ku, PF90 : 3~7 ku。太子参多糖具有抗炎^[8]、抗糖尿病^[9]等药理活性, 不同分子量的太子参多糖的单糖组成、连接方式等均有不同, 其药理活性也存在差异^[21]。目前太子参多糖对 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼 AD 模型认知改善的最佳分子量范围尚未明确。有研究发现^[21], 太子参 PF40 多糖的抗二型糖尿病活性也优于分子量更低的 PF60 和 PF90, 但差异作用机制还有待进一步阐明。



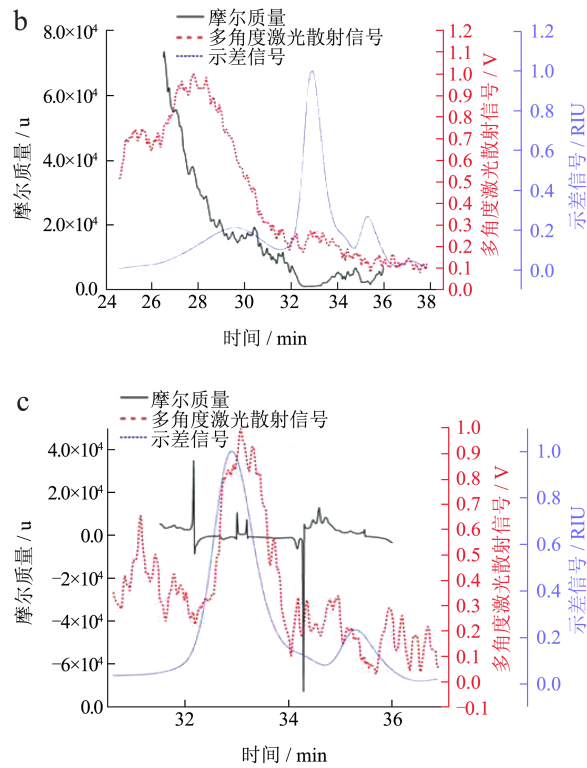


图3 绝对分子量分析图

Fig.3 Absolute molecular weight analysis

注: a~c 分别为 PF30、PF60、PF90 绝对分子量分析图。

2.4 太子参分级多糖对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的斑马鱼认知功能损伤的改善作用

2.4.1 太子参分级多糖对 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼体重的影响

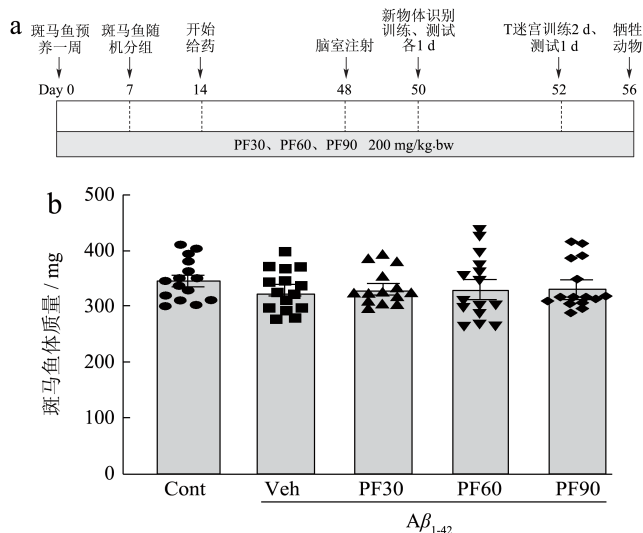


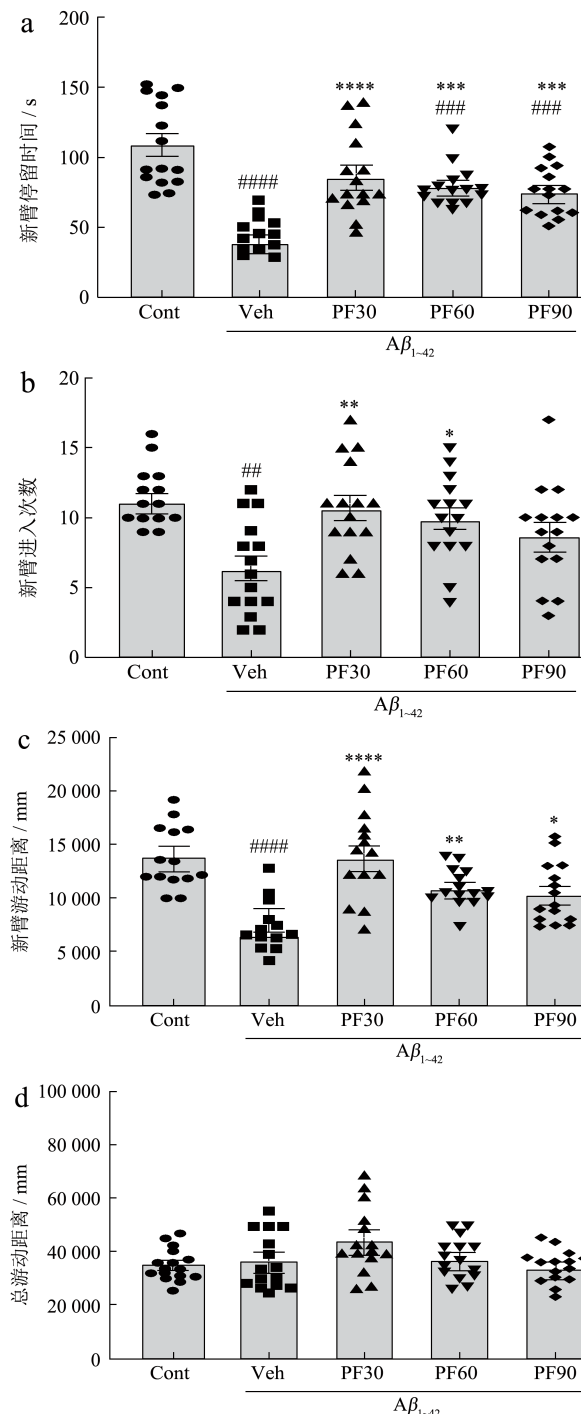
图4 (a) 斑马鱼实验流程; (b) 三种太子参分级多糖对斑马鱼体质量的影响 ($n=15$)

Fig.4 (a) Experimental procedure in zebrafish; (b) Effects of three graded polysaccharides of *Pseudostellaria heterophylla* on the body weight of zebrafish ($n=15$)

实验全部结束后牺牲动物, 称取各组斑马鱼体重, 结果如图4b所示, 五个小组之间的体质量均没有显著性差异, Cont组、Veh组、PF30组、PF60组、PF90组斑马鱼的平均体质量分别为347.1、329.3、332.6、333.9、336.1 mg, 且在实验过程中所有斑马鱼均未出现死亡、游动行为异常等现象, 说明三种太子参分级多糖 PF30、PF60、PF90 对斑马鱼无明显毒副作用。

2.4.2 行为学实验

2.4.2.1 斑马鱼新物体识别行为测试实验



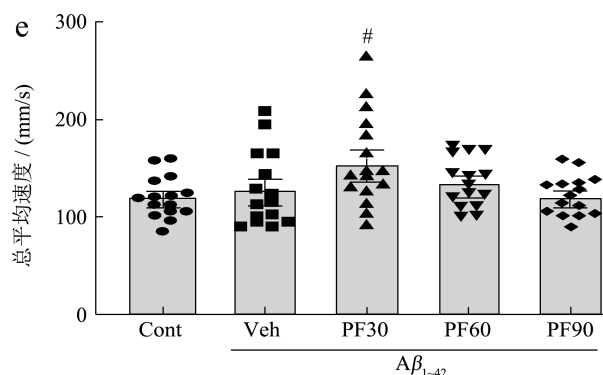


图5 三种太子参分级多糖对斑马鱼新物体识别的作用

Fig.5 Effects of three *Pseudostellaria heterophylla* graded polysaccharides on the novel object recognition in zebrafish

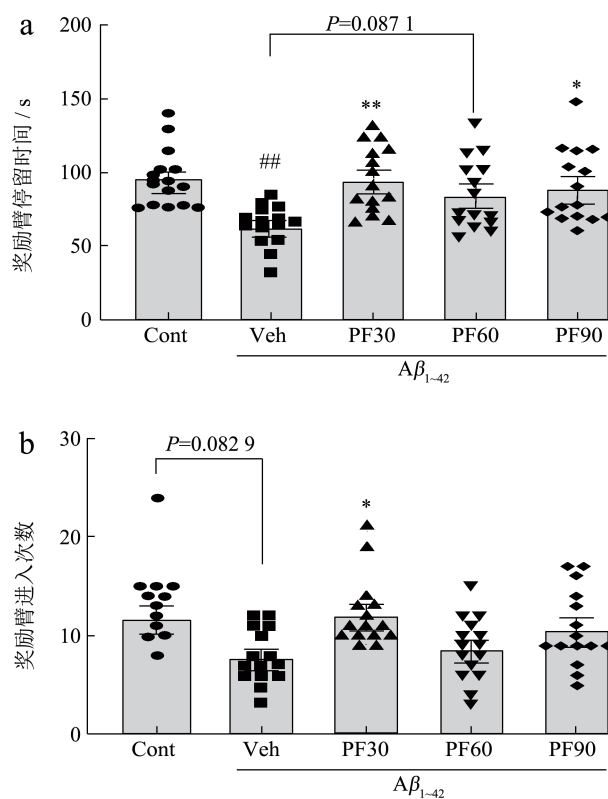
注: $n=15$, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, #### $P<0.0001$ vs Cont; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Veh.

新物体识别的结果表明, Veh组的新臂停留时间($P<0.0001$)、新臂进入次数($P<0.01$)与新臂游动距离($P<0.0001$)的平均值分别为39.8 s、6次、6 466.1 mm, 均显著低于Cont组(图5a~5c), 说明Veh组斑马鱼无法区分新臂与训练臂, $A\beta_{1-42}$ 导致Veh组斑马鱼出现严重的空间认知记忆损伤, 实验结果与丰心月^[13]等通过 $A\beta_{1-42}$ 脑室注射建立的斑马鱼记忆损伤模型相似。太子参分级多糖PF30、PF60、PF90给药干预后, 与Veh组相比, PF30、PF60组新臂停留时间(PF30组: 86.4 s, PF60组: 79.3 s)、新臂进入次数(PF30组: 11次, PF60组: 10次)与新臂游动距离(PF30组: 13 695.2 mm, PF60组: 10 961.1 mm)均显著增加(图5a~5c), PF90组新臂停留时间($P<0.001$)与新臂游动距离($P<0.05$)显著增加(图5a、5c), 分别为75.7 s、10 343.6 mm, 说明太子参分级多糖PF30、PF60、PF90对 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼模型的空间认知损伤具有一定的改善作用, 其中PF30组改善效果较佳。此外, PF30组的平均速度显著比Cont组高($P<0.05$), 但其与Veh组相比无显著性差异(图5e), 且总游动距离与其他组相比均无显著性差异(图5d), 因此无法说明PF30是否对斑马鱼的运动能力具有影响, 其余各组间的总游动距离与总平均速度均无显著性差异(图5d、5e), 提示太子参分级多糖PF30、PF60、PF90对斑马鱼运动能力基本没有影响。

2.4.2.2 斑马鱼奖励T迷宫行为测试实验

在奖励T迷宫测试期间, Veh组奖励臂停留时

间($P<0.01$)与奖励臂游动距离($P<0.05$)的平均值分别为64.2 s、7 022.9 mm, 均显著低于Cont组(图6a、6c), 且Veh组进入奖励臂的次数(图6b)呈下降趋势($P=0.0829$), 表明 $A\beta_{1-42}$ 导致Veh组斑马鱼无法分辨哪个臂有食物, 出现了奖赏记忆缺陷, 实验结果与丰心月^[13]等通过 $A\beta_{1-42}$ 脑室注射建立的斑马鱼记忆损伤模型相似。太子参分级多糖特别是PF30给药干预后, 斑马鱼在奖励臂的停留时间($P<0.01$)、进入奖励臂的次数($P<0.05$)与奖励臂游动距离($P<0.05$)显著增加, 分别为95.5 s、12次、11 170.6 mm, PF60和PF90对 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼也具有一定的奖赏记忆改善作用(图6a~6c)。PF90组总游动距离与总平均速度(图6d、6e)显著高于Veh组、PF60组($P<0.05$), 但个别样本数值较大, 新物体识别实验中未发现PF90对斑马鱼的焦虑样行为和运动能力有影响。此外, 各组间总游动距离与总平均速度均无显著性差异(图6d、6e), 提示太子参分级多糖对斑马鱼的焦虑样行为和运动能力无显著影响。因此, 基于新物体识别测试与奖励T迷宫行为测试的结果, 太子参分级多糖PF30可能是改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼认知损伤的有效部位。



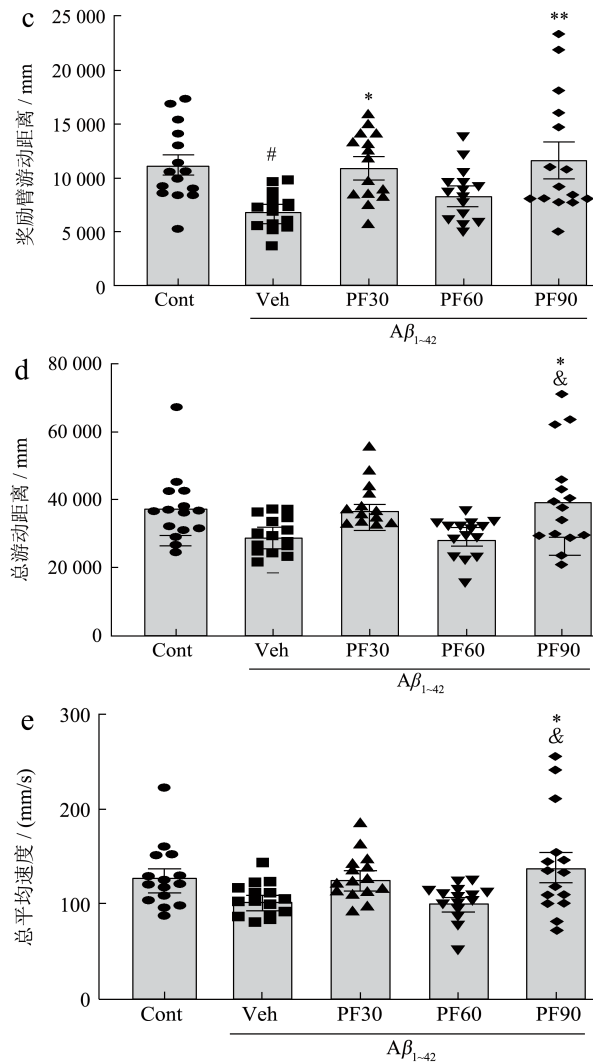


图6 三种太子参分级多糖对斑马鱼奖励T迷宫测试结果的影响

Fig.6 Effect of three graded polysaccharides of *Pseudostellaria heterophylla* on zebrafish T-maze memory function

注: $n=15$, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ vs Cont; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs Veh; $^{\&}P<0.05$ vs PF60。

2.4.3 太子参分级多糖的干预调节斑马鱼大脑相关炎症mRNA表达水平

2.4.3.1 斑马鱼大脑内CD11b、CD206和Arg1表达水平的变化

CD11b 是 M1 型小胶质细胞的标志物, M1 型小胶质细胞过度活化产生多种促炎因子, 导致大脑神经炎症; CD206 和 Arg1 是 M2 型小胶质细胞的标志物, M2 型小胶质细胞能释放抗炎因子, 在组织修复、 $A\beta$ 清除和记忆恢复中发挥重要作用^[26]。与 Cont 组的正常斑马鱼相比, 经过脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 诱导后 Veh 组斑马鱼脑内 CD11b mRNA 的表达水平显著上升 ($P<0.05$), CD206 ($P=0.0857$) 和

Arg1 mRNA 的表达水平呈下降趋势 (图 7), 太子参分级多糖干预后 PF30 组 ($P=0.0786$) 和 PF90 组 ($P=0.0619$) 的 CD11b mRNA 表达水平有所下降 (图 7a), 太子参分级多糖 PF30、PF90 抑制斑马鱼大脑中小胶质细胞转化为 M1 型小胶质细胞; 除 PF60 组的 Arg1 表达水平呈上升趋势外, 太子参分级多糖均显著增强了 CD206 和 Arg1 mRNA 的表达水平, 促进小胶质细胞转化为 M2 型小胶质细胞, 减轻了 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼大脑神经炎症 (图 7b、7c)。

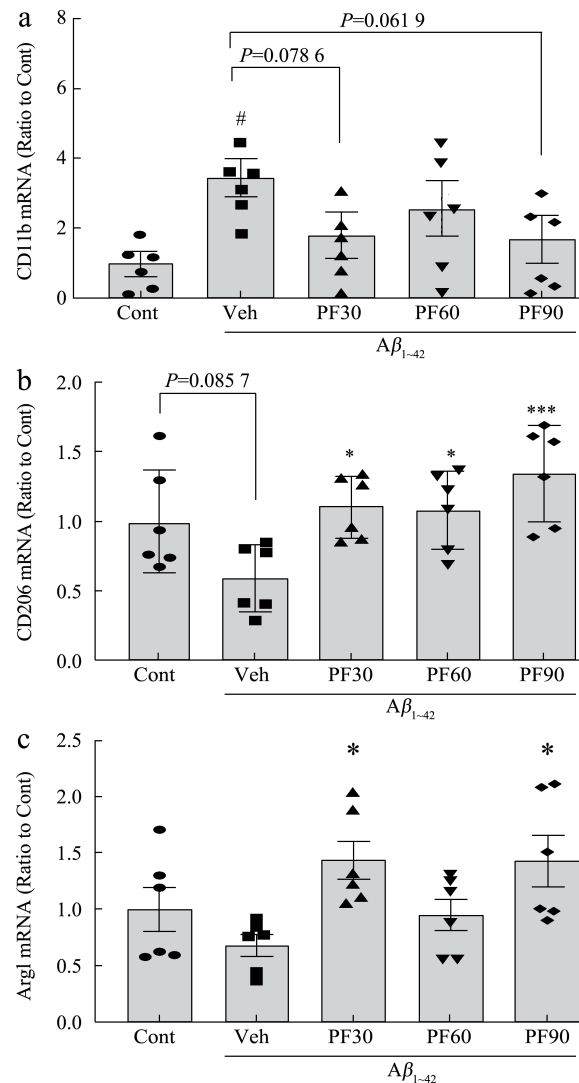


图7 斑马鱼脑内 CD11b、CD206 和 Arg1 mRNA 表达水平的变化

Fig.7 The mRNA expression levels of CD11b, CD206 and Arg1 in zebrafish brain

注: $n=6$, $^{\#}P<0.05$ vs Cont; $^*P<0.05$, $^{***}P<0.001$ vs Veh。

2.4.3.2 斑马鱼大脑内GFAP、C3和S100A10 mRNA表达水平的变化

GFAP 是反应性星形胶质细胞的一个重要特征,

通常用于识别星形胶质细胞形态的变化,反应性星形胶质细胞是AD患者大脑内的独特特征。最常见的反应性星形胶质细胞亚型分类是A1(促炎表型)和A2(抗炎表型),A1型星形胶质细胞可通过补体成分C3的表达来识别,它们可以分泌可溶性神经毒素导致神经元死亡;而A2型星形胶质细胞具有神经保护作用,S100A10是A2星形胶质细胞的标记物^[27,28]。

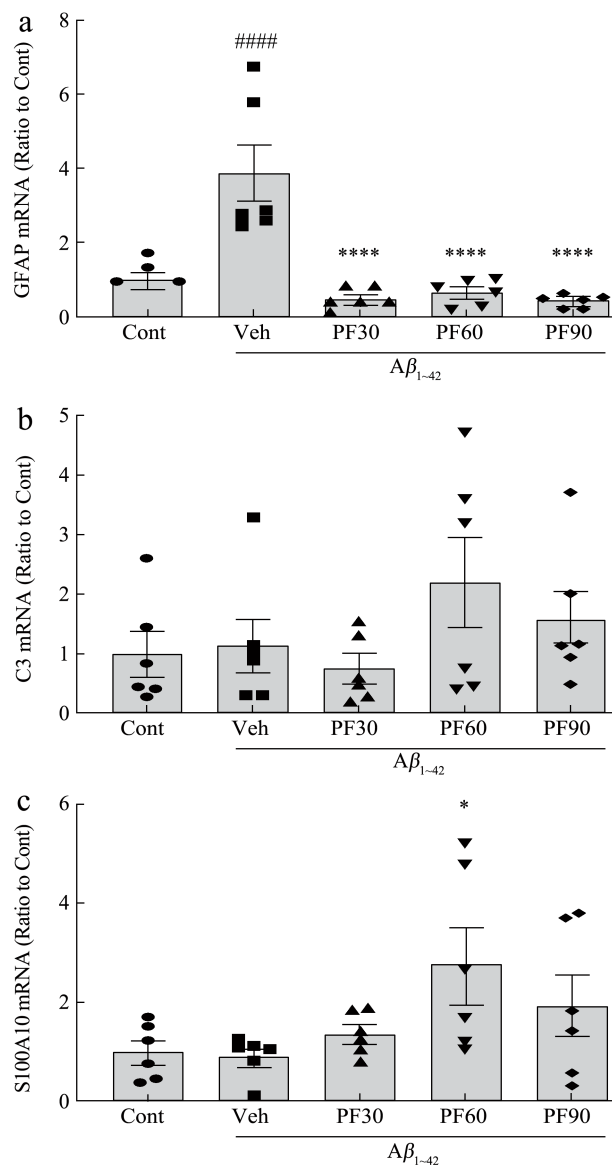


图8 斑马鱼脑内GFAP、C3和S100A10 mRNA表达水平的变化

Fig.8 The mRNA expression levels of GFAP, C3 and S100A10 in zebrafish brain

注: $n=6$, #### $P<0.0001$ vs Cont; * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ vs Veh。

与Cont组的正常斑马鱼相比,经过脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 诱导后Veh组斑马鱼脑内GFAP mRNA表达

水平极显著上升($P<0.0001$),增强了星形胶质细胞的活化(图8a),过度活化的星形胶质细胞与 $A\beta$ 斑块的积累呈正相关。太子参分级多糖干预后,GFAP mRNA的表达水平极显著降低($P<0.0001$),PF30、PF60、PF90减轻了星形胶质细胞的活化(图8a)。此外,PF30干预后补体成分C3 mRNA表达水平呈下降趋势,PF30、PF90组S100A10 mRNA表达水平呈上升趋势,而PF60、PF90并未降低补体成分C3 mRNA的表达水平,PF60组S100A10 mRNA表达水平($P<0.05$)显著升高(图8b、8c)。PF30、PF60、PF90降低了斑马鱼脑内星形胶质细胞的活化。

2.4.3.3 斑马鱼大脑内IL-1 β 表达水平的变化

IL-1 β 是典型的促炎细胞因子,其含量在AD患者大脑内显著上升。图9反映了IL-1 β mRNA的表达情况,与Cont组相比,Veh组斑马鱼IL-1 β 表达水平显著上升($P<0.01$),经脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 诱导后斑马鱼大脑中出现了严重炎症反应。PF30、PF90干预后,IL-1 β 表达水平显著下降;PF60干预后IL-1 β 表达水平呈下降趋势。三种太子参分级多糖在不同程度上缓解了经脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼大脑内的炎症反应。

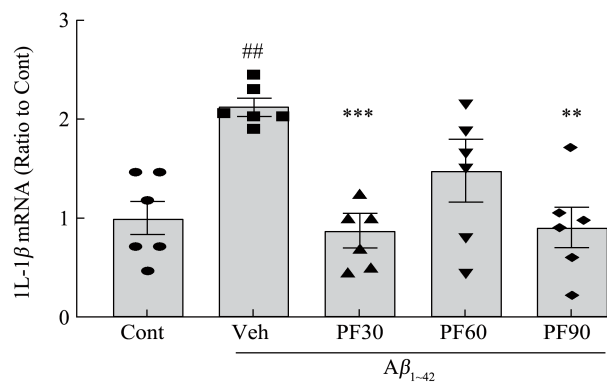


图9 斑马鱼脑内IL-1 β 表达水平的变化

Fig.9 The mRNA expression levels of IL-1 β in zebrafish brain

注: $n=6$, ## $P<0.01$ vs Cont; *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ vs Veh。

2.4.3.4 斑马鱼大脑内CDK5和GSK-3 β mRNA表达水平的变化

CDK5通过介导STAT3磷酸化诱导的BACE1转录,增强淀粉样前体蛋白的淀粉样变性过程,进而生成 $A\beta$,CDK5抑制剂可以保护神经元免受 $A\beta$ 诱导的神经毒性^[29]。GSK-3 β 介导小胶质细胞的炎症反应,促进小胶质细胞向脑损伤或异常蛋白质(如 $A\beta$)等部位迁移,发挥小胶质细胞的吞噬作用,

同时产生促炎介质或神经毒素^[30]。与 Cont 组相比, Veh 组斑马鱼的 CDK5 mRNA 表达水平(图 10a)极显著上升($P<0.0001$), GSK-3 β mRNA 表达水平(图 10b)显著上升($P<0.01$)。太子参分级多糖干预后 CDK5 表达水平均显著下降(图 10a)。PF30($P<0.01$)、PF60($P<0.05$)干预后,经脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 诱导后斑马鱼大脑中 GSK-3 β mRNA 表达水平显著下降,PF90 组呈下降趋势(图 10b)。因此太子参分级多糖 PF30、PF60 通过抑制 CDK5 和 GSK-3 β 的表达,抑制神经毒性,发挥神经保护作用。

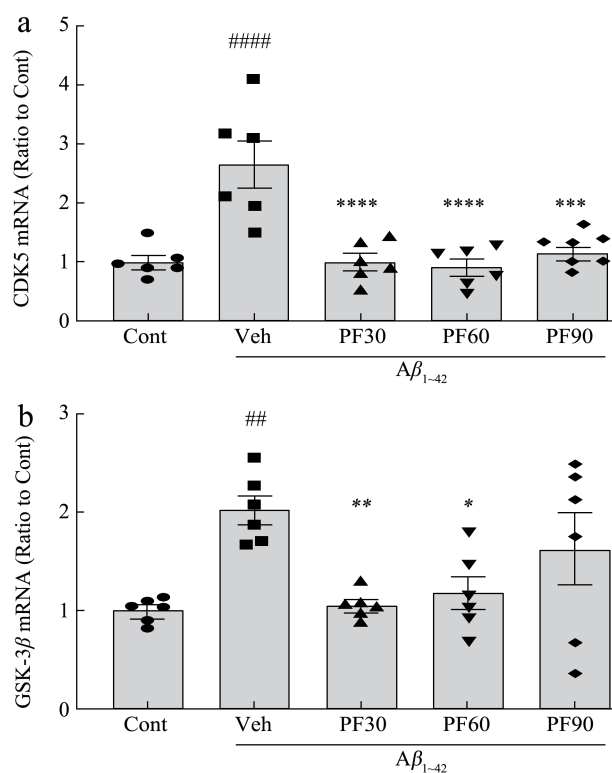


图 10 斑马鱼脑内 CDK5 和 GSK-3 β mRNA 表达水平的变化

Fig.10 The mRNA expression levels of CDK5 and GSK-3 β in zebrafish brain

注: $n=6$, ## $P<0.01$, #### $P<0.0001$ vs Cont; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Veh.

3 结论

本实验通过水提醇沉法提取太子参多糖,使用不同浓度乙醇进行醇沉分级,得到太子参分级多糖 PF30、PF60、PF90,以三种太子参分级多糖为研究对象,研究发现 PF30、PF60、PF90 的总糖含量质量分数分别为 70.54%、69.00%、80.19%,蛋白质含量质量分数分别为 2.51%、5.08%、1.89%, M_w

分别为 23.1、8.97、1.72 ku,分级多糖 M_w 的大小随着分级醇沉时乙醇浓度的升高而减小。通过建立脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼 AD 模型发现三种太子参分级多糖对斑马鱼无明显毒性,同时对斑马鱼焦虑样行为与运动能力无显著影响,通过新物体识别、奖励 T 迷宫行为实验发现 PF30、PF60、PF90 能改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼的空间记忆认知损伤与奖赏记忆损伤。

为进一步探究 PF30、PF60、PF90 改善斑马鱼认知记忆障碍的作用机制,我们探究了斑马鱼脑内炎症相关 mRNA 的表达水平,基于行为学实验与荧光定量 PCR 实验结果,三种太子参分级多糖中 M_w 最大的 PF30 对斑马鱼认知损伤的改善作用最佳, M_w 相近的 PF60 与 PF90 对斑马鱼认知损伤的改善作用相近,太子参分级多糖对斑马鱼认知损伤的改善作用随着 M_w 的降低而减弱。总之,PF30 通过减少 M1 型小胶质细胞的转化,增加 M2 型小胶质细胞的转化,抑制星形胶质细胞的活化,使大脑中小胶质细胞和星形胶质细胞功能恢复正常,减轻大脑神经炎症和神经毒性,抑制 CDK5 和 GSK-3 β ,最终改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导斑马鱼模型的认知记忆损伤。

参考文献

- [1] 朱振霞,于浩,谢文丽.阿尔茨海默症发病机制及治疗药物研究进展[J].武警后勤学院学报(医学版),2021,30(5): 146-149.
- [2] KHAN S, BARVE H K, KUMAR S M. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease [J]. Current Neuropharmacology, 2020, 18(11): 1106-1125.
- [3] KARRAN E, HARDY J. Anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease-are we on the right road? [J]. The New England Journal of Medicine, 2014, 370(4): 377-378.
- [4] WU T, LIN D, CHENG Y Q, et al. Amyloid cascade hypothesis for the treatment of Alzheimer's disease: Progress and challenges [J]. Aging and Disease, 2022, 13(6): 1745-1758.
- [5] AMEMORI T, JENDELOVA P, RUZICKA J, et al. Alzheimer's disease: Mechanism and approach to cell therapy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(11): 26417-26451.
- [6] MOUSSA P N M, ABDIN S M, OMAR H A, et al. BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease [J]. Medicinal Research Reviews, 2020, 40(1): 339-384.
- [7] WENG Q X, CAI X X, ZHANG F, et al. Fabrication

- of self-assembled *Radix Pseudostellariae* protein nanoparticles and the entrapment of curcumin [J]. Food Chemistry, 2019, 274: 796-802.
- [8] YOU S Y, LIU X W, XU G T, et al. Identification of bioactive polysaccharide from *Pseudostellaria heterophylla* with its anti-inflammatory effects [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 78: 104353.
- [9] FANG Z H, DUAN X C, ZHAO J D, et al. Novel polysaccharide H-1-2 from *Pseudostellaria Heterophylla* alleviates type 2 diabetes mellitus [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 49(3): 1037-1047.
- [10] SUN H W, SHI K Q, QI K, et al. *Pseudostellaria heterophylla* extract polysaccharide H-1-2 suppresses pancreatic cancer by inhibiting hypoxia-induced AG2 [J]. Molecular Therapy-Oncolytics, 2020, 17: 61-69.
- [11] YANG Q, CAI X X, HUANG M C, et al. Immunomodulatory effects of *Pseudostellaria heterophylla* peptide on spleen lymphocytes via a Ca^{2+} /CaN/NFATc1/IFN- γ pathway [J]. Food & Function, 2019, 10(6): 3466-3476.
- [12] 李志华.太子参多糖对东莨菪碱所致小鼠记忆障碍的改善作用[J].泰山医学院学报,2009,30(9):673-675.
- [13] 丰心月,王奕霏,邓嘉航,等.太子参改善斑马鱼和APP/PS1小鼠学习记忆[J].食品与发酵工业,2024,50(8):55-61.
- [14] YANG Z Y, ZHANG C, LI X H, et al. Heterophyllin B, a cyclopeptide from *Pseudostellaria heterophylla*, enhances cognitive function via neurite outgrowth and synaptic plasticity [J]. Phytotherapy Research, 2021, 35(9): 5318-5329.
- [15] DENG J H, FENG X Y, ZHOU L J, et al. Heterophyllin B, a cyclopeptide from *Pseudostellaria heterophylla*, improves memory via immunomodulation and neurite regeneration in i.c.v. A β -induced mice [J]. Food Research International, 2022, 158: 111576.
- [16] BHATTARAI P, THOMAS A K, COSACAK M I, et al. IL4/STAT6 signaling activates neural stem cell proliferation and neurogenesis upon amyloid- β 42 aggregation in adult zebrafish brain [J]. Cell Reports, 2016, 17(4): 941-948.
- [17] BASHIRZADE A A, ZABEGALOV K N, VOLGIN A D, et al. Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish [J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2022, 138: 104679.
- [18] LIU Y, YE Y F, HU X B, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from the lignified okra [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 265: 118081.
- [19] 栗园.太子参抗T2DM活性部位均一多糖的分离、结构表征及其吸收特征研究[D].福建:福建中医药大学,2018.
- [20] 黄雅婷.太子参多糖改善T2DM大鼠肠道免疫的作用机制研究[D].福建:福建中医药大学,2022.
- [21] 陈锦龙.闽产柘荣太子参多糖抗糖尿病药效筛选及结构表征[D].福建:福建中医药大学,2014.
- [22] 刘树兴,任益平,李浩恒,等.藜麦多糖的分离纯化及结构初步分析[J].中国食品添加剂,2019,30(10):48-52.
- [23] ZHAN X, XU X, ZHANG P, et al. Crude polysaccharide from *Danggui Buxue* decoction enhanced the anti-tumor effect of gemcitabine by remodeling tumor-associated macrophages [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242: 125063.
- [24] ZHANG W Y, HU B, HAN M, et al. Purification, structural characterization and neuroprotective effect of a neutral polysaccharide from *Sparassis crispa* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 201: 389-399.
- [25] 徐湘,庞旭佳,张名位,等.不同提取工艺淮山多糖的理化性质及抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2023,39(10): 128-138.
- [26] HASHIOKA S, WU Z, KLEGERIS A. Glia-Driven neuroinflammation and systemic inflammation in Alzheimer's disease [J]. Current Neuropharmacology, 2021, 19(7): 908-924.
- [27] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487.
- [28] GUO M F, ZHANG H Y, LI Y H, et al. Fasudil inhibits the activation of microglia and astrocytes of transgenic Alzheimer's disease mice via the downregulation of TLR4/Myd88/NF- κ B pathway [J]. Journal of Neuroimmunology, 2020, 346: 577284.
- [29] XU X H, LEI Y, LUO J, et al. Prevention of β -amyloid induced toxicity in human iPS cell-derived neurons by inhibition of cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events [J]. Stem Cell Research, 2013, 10(2): 213-227.
- [30] KOISTINAHO J, MALM T, GOLDSTEINS G. Glycogen synthase kinase-3 β : a mediator of inflammation in Alzheimer's disease? [J]. International Journal of Alzheimer's Disease, 2011, 2011: 129753.