

# 南极磷虾油改善大鼠学习记忆能力研究

刘云, 王亚恩, 李立德, 徐恺, 田丹, 姜国良\*

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**目的:观察南极磷虾油对 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响。方法:采用 Morris 水迷宫法及 Y-型迷宫刺激法观察,比较南极磷虾油和深海鱼油对大鼠学习记忆能力的作用。结果:Morris 水迷宫实验显示南极磷虾油能够显著减少大鼠寻找平台潜伏期时间并且增加垮台次数和目标区域游泳时间所占比例( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );Y-型迷宫刺激实验表明南极磷虾油能够显著减少大鼠达标所需次数,显著提高 48h 后的实验正确率( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论:南极磷虾油可显著改善大鼠学习记忆能力,且效果优于深海鱼油。

**关键词：**南极磷虾油；学习记忆；Morris 水迷宫；Y-型迷宫刺激器；Wistar 大鼠

## Antarctic Krill Oil Improves Learning and Memory of Rats

LIU Yun, WANG Ya-en, LI Li-de, XU Kai, TIAN Dan, JIANG Guo-liang\*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Objective: To observe the effect of Antarctic krill oil on the improvement of learning and memory of rats. Methods: The effect of Antarctic krill oil and deep sea fish oil on learning and memory of rats was evaluated by Morris-water maze and Y-shaped maze methods. Results: Antarctic krill oil could significantly reduce the latency of escaping onto the platform, and increase the frequency of crossing the platform and the proportion of swimming time of rats in the target area of Morris-water maze. Y-shaped maze results indicated that Antarctic krill oil could significantly reduce the number required for achieving the goal and improve the correct response rate after 48 h. Conclusion: Antarctic krill oil can improve learning and memory of rats and the effectiveness is better than that of deep sea fish oil.

**Key words:** Antarctic krill oil; learning and memory; Morris-water maze; Y-shaped maze; Wistar rats

中图分类号: Q519

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0273-04

南极大磷虾(*Euphausia superba*)是南大洋南极海域所发现的磷虾一种。它是目前地球上海洋生物最大聚集的动物之一,也是至今发现分解蛋白质最强的酶生产者。在研究过的4种磷虾目的种类中,南极大磷虾幼体脂肪酸总含量最高,并且,其不饱和脂肪酸是目前自然界中唯一以磷脂型态结合 $\omega$ -3(EPA、DHA)和多样性超强抗氧化物(磷脂型虾青素 astaxanthin)的分子结构,而饱和脂肪酸含量较低,在不饱和脂肪酸中,含有人体必需脂肪酸的亚油酸的比例较大,是一种食用安全、营养价值较高的虾类<sup>[1-4]</sup>。有人利用磷虾油与甲壳素一起制备微颗粒饵料和鱼类保鲜剂<sup>[5-6]</sup>,也有人研究南极磷虾油的药用价值,发现其可以降脂肪肝、降血脂和高血糖等,对非酒精性脂肪肝的治疗有一定的价值<sup>[7-8]</sup>。但未见南极磷虾油对学习记忆功能影响的报道。本实验采

用 Morris 水迷宫法和 Y-型迷宫刺激法观察并比较南极磷虾油和深海鱼油对大鼠学习记忆能力的影响, 以为南极磷虾油的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

南极磷虾由本实验室提供，2010 年初从南极海域捕捞；南极磷虾油 自制；麦金利深海鱼油 荣成市鸿洋神海洋生物技术产业有限公司；脑复康(吡拉西坦)片 天津金世制药有限公司。

Wistar 大鼠 ♂, 60 只, (53.22 ± 5.05)g, 购于鲁抗医药实验动物中心(合格证号: SCXK 鲁 20080002)。

## 1.2 仪器与设备

Morris 水迷宫系统 上海吉量软件科技有限公司;

收稿日期: 2011-12-10

作者简介: 刘云 (1969—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为实验动物学。E-mail: liuyun@ouc.edu.cn

\* 通信作者: 姜国良(1963—), 男, 教授, 学士, 研究方向为海洋生物技术。E-mail: gljiang@ouc.edu.cn

MG-2 Y-型迷宫刺激器 江苏省沙洲县三兴声电公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 南极磷虾油的提取

采用无水乙醇提取法提取南极磷虾中的虾油。取冰鲜南极磷虾经 75℃ 热风烘干后机械粉碎, 将磷虾粉末以料液比 1:9 比例浸入 65℃ 无水乙醇中浸提 3h, 再经过滤分离收集上清液, 最后将上清液蒸馏后烘干得到南极磷虾油。

#### 1.3.2 实验动物分组

60 只雄性 Wistar 大鼠自由饮水摄食 3d 以适应环境后, 按体质量每组 10 只进行随机分为 6 组: 空白对照组、深海鱼油组、南极磷虾油组(低、中、高剂量)以及脑复康组, 分组后开始灌胃相应药物, 其中空白对照组灌胃蒸馏水, 深海鱼油组灌胃 10% 鱼油(100mg/kg, 以体质量计); 南极磷虾油组分别灌胃 10% 南极磷虾油(100、500、1000mg/kg, 以体质量计); 脑复康组灌胃 10% 吡拉西坦溶液(300mg/kg, 以体质量计)。

#### 1.3.3 实验动物饲养条件

大鼠分笼饲养, 动物房内温度控制在(22 ± 3)℃, 湿度(60 ± 15)%, 自然采光, 生活环境保持清洁, 定期通风换气; 垫料保持干燥卫生, 隔天更换垫料。大鼠自由饮水和摄食。连续灌胃 60d, 每周称质量, 灌胃顺序遵循分组的顺序, 确保每组每天在同一时间给样。

#### 1.3.4 Morris 水迷宫实验法

测定装置由 Morris 水迷宫(MWM)和图像自动监测系统(MMEAS)组成。MWM 装置为直径 160cm, 高 50cm 不锈钢圆形水池。根据直角坐标划分水池为 4 个象限。实验前将水池灌以清水至预定高度(约 30cm), 水温控制在(23 ± 1)℃ 之间, 在第 4 象限正中离池壁 33cm 处放一个直径为 9cm, 高为 30cm 的圆形透明平台, 平台顶低于水面 1cm。水池上空通过一摄像机与监视器和计算机连接。计算机可以自动跟踪并记录下大鼠游泳轨迹, 当设定的训练时间已到或大鼠已爬上平台, 计算机停止跟踪, 软件自动计算出大鼠在水池中所游过的路径长度, 找到平台所需的时间(即潜伏期)和游泳速度。实验时保持环境安静, 迷宫外参照物(如门、窗、实验者等)保持不变。用 Morris 水迷宫对大鼠空间学习记忆能力进行测试。1)定位航行实验: 用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力。实验历时 5d, 训练时随机选择一个入水点, 将大鼠头朝池壁放入水中, 记录大鼠寻找并爬上平台时所需要的时间(即逃避潜伏期), 规定每次的实验时间为 90s, 如果大鼠在规定的 90s 内找不到平台, 须将其引导至平台, 让其在平台上站立 10s(这时逃避潜伏期记为 90s)。2)空间搜索实验: 用于测量大鼠学会寻

找平台后, 对平台空间位置记忆的保持能力。在最后 1 次训练后隔一周后撤除水下平台, 然后在原入水点将大鼠面向池壁放入水中游泳 90s, 测其跨过平台相应位置的次数和目标区域游泳时间所占的比例。

#### 1.3.5 Y-型迷宫刺激法

Y-型迷宫刺激器为三等臂式电迷路箱, 各臂末端均装有信号灯。箱底铺有供通电刺激用的铜栅。通过控制器开关, 可使三臂交替作为安全区(不通电, 灯亮)。实验固定在下午 1:00 开始, 保持周围环境安静, 避免刺激。将大鼠放入迷宫刺激器的一臂, 适应环境 1min 后给予 50 V 左右电刺激。其余两臂中的任一臂给予灯光信号, 示为安全区。大鼠进入安全区为正确反应, 否则为错误反应。学习测试是以测试达到连续 10 次中有 9 次正确反应前所需的电击次数表示学习能力。记忆再现测试是 48h 后用同样的方法对每只大鼠检测 10 次, 记录其中正确的次数以反应大鼠的记忆保持能力。

#### 1.3.6 数据处理

数据处理利用 SPSS 17.0 软件, 将测得数据进行 *F* 检验分析, 然后用 *t* 检验进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠体质量差异比较

在整个灌胃及实验过程中, 各组动物饮食活动正常。各组动物体质量随时间而增加, 脑复康组的平均体质量较其他组轻, 但差异不明显(表 1)。

表 1 各组大鼠不同时间的体质量(*n*=10)

Table 1 Body weights of rats at different time points in each group (*n*=10)

组别	第 1 天	第 21 天	第 35 天	第 49 天
空白对照组	53.79 ± 4.11	147.79 ± 26.81	213.76 ± 49.47	289.71 ± 59.03
深海鱼油组	53.56 ± 6.21	137.38 ± 19.17	199.10 ± 33.48	246.75 ± 49.15
南极磷虾油组	52.34 ± 3.27	154.90 ± 11.36	223.01 ± 21.91	276.46 ± 43.36
低剂量	53.83 ± 4.46	145.81 ± 25.80	202.53 ± 37.11	261.03 ± 50.42
中剂量	54.82 ± 3.78	152.91 ± 26.17	207.84 ± 57.21	273.29 ± 48.10
高剂量	51.85 ± 5.50	126.65 ± 32.90	173.19 ± 44.18	236.84 ± 61.87
脑复康组				

### 2.2 南极磷虾油对大鼠学习记忆能力的影响

#### 2.2.1 Morris 水迷宫定位航行实验

在 5d 的定位航行实验中, 随着训练次数的增加, 所有实验组大鼠寻找平台的平均潜伏期都呈下降趋势。南极磷虾油组寻找平台的平均潜伏期始终较空白对照组短, 随着剂量的增加, 其大鼠寻找平台的潜伏期变短, 高、中剂量磷虾油组同深海鱼油组比较, 差异显著(*P* < 0.05)(表 2)。

表2 南极磷虾油对大鼠寻找平台平均潜伏期的影响( $n=10$ )Table 2 Effect of Antarctic krill oil on the average latency of escaping onto the platform for rats( $n=10$ )

组别		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
南极磷虾油组	空白对照组	75.83 ± 21.62	68.04 ± 25.14	59.24 ± 27.59	46.21 ± 30.70	42.60 ± 27.30
	深海鱼油组	79.63 ± 21.28	67.67 ± 28.73	47.25 ± 32.68	37.54 ± 28.48	37.35 ± 17.03
	低剂量	77.49 ± 24.64	55.39 ± 23.93	32.95 ± 24.59**	29.78 ± 23.39	27.37 ± 16.82*
	中剂量	73.43 ± 24.33	40.56 ± 23.87***#	25.97 ± 24.78***#	16.98 ± 12.17***#	19.07 ± 13.02***#
	高剂量	75.10 ± 19.21	34.60 ± 22.39***#	28.11 ± 14.36***#	21.40 ± 14.74***#	15.60 ± 14.49***#
	脑复康组	76.89 ± 20.77	40.46 ± 28.75***#	23.61 ± 25.39***#	18.88 ± 13.44***#	14.74 ± 8.03***#

注: \*.与空白对照组比较, 有显著性差异( $P < 0.05$ ); \*\*.与空白对照组比较, 有极显著性差异( $P < 0.01$ ); #.与深海鱼油组比较, 有显著性差异( $P < 0.05$ ); ##. 与深海鱼油组比较, 有极显著性差异( $P < 0.01$ )。下同。

### 2.2.2 Morris 水迷宫空间搜索实验

在空间搜索实验中, 南极磷虾油组大鼠末次跨平台次数(中、高剂量组差异显著,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )和在目标区域游泳时间所占比例(中、高剂量组差异显著,  $P < 0.05$ )较空白对照组显著增多。南极磷虾油组大鼠多集中在目标附近游动, 反复来回寻找目标(表3)。

表3 大鼠水迷宫末次跨台次数和目标区域游泳时间所占的比例( $n=10$ )Table 3 Frequency of crossing the platform and proportion of swimming time of rats in the target area ( $n=10$ )

组别	跨台次数	目标区域游泳时间所占比例/%
空白对照组	0.90 ± 0.83	25.06 ± 10.19
深海鱼油组	1.40 ± 1.02	30.64 ± 9.31
低剂量	1.80 ± 1.08	31.45 ± 7.32
南极磷虾油组	中剂量	2.10 ± 1.04*
	高剂量	2.20 ± 0.75**
脑复康组	2.10 ± 1.14*	36.73 ± 9.45*

### 2.2.3 Y-型迷宫刺激实验

南极磷虾油组大鼠达标前所需电击次数显著少于空白对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 所需次数越少说明学习能力越强; 48h 后的大鼠正确率测试中, 南极磷虾油组也显著优于空白对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且效果优于深海鱼油, 正确率越高反映大鼠记忆保持能力越强(表4)。

表4 大鼠 Y- 迷宫达标所需次数和 48h 后正确反应率( $n=10$ )Table 4 Number required for achieving the goal and correct response rate of rats in Y-shaped maze after 48 h ( $n=10$ )

组别	达标所需次数	48h 后正确反应率/%
空白对照组	32.50 ± 5.78	61.00 ± 11.36
深海鱼油组	27.20 ± 5.29	72.00 ± 8.72*
南极磷虾油组	低剂量	26.40 ± 2.76*
	中剂量	21.70 ± 3.16***
	高剂量	20.44 ± 2.67***
	脑复康组	21.30 ± 4.56***

## 3 讨论

早期对南极磷虾油的研究, 只 Chandrasekar 等<sup>[9]</sup>在 1996 年利用磷虾油代替鱼油, 研究自身免疫性狼疮鼠的转移生长因子(TGF $\beta$ 1)组织特异性, 结果表明磷虾油可抑制自身免疫性疾病的发生。随着南极磷虾开发不断深入, 人们对南极磷虾油的成分和功能的研究越来越多。现已查明, 南极磷虾油富含多种不饱和脂肪酸, 含有丰富的二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、磷脂、类黄酮、VA、VE、虾青素等, 其中长链 $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 含量很高, 并以 $\omega$ -3 磷脂的形式存在<sup>[2-3]</sup>, 不同于鱼油和鱼肝油 $\omega$ -3 甘油三酯形式<sup>[10]</sup>。DHA 具有改善记忆的显著作用<sup>[11-12]</sup>。由于人体细胞膜是磷脂脂肪酸, 因此各种磷脂脂肪酸的摄取对于人体细胞、组织和器官的功能的发挥着重要的作用, 同时人体对 $\omega$ -3 磷脂的消化和吸收更加简单, 更加迅速和有效。Maki 等<sup>[13]</sup>人体实验表明, 服用磷虾油和鲱鱼油 4 周的超重和肥胖人群, 其血浆 EPA 和 DHA 浓度显著上升。但两者稍有不同, 鲱鱼油降血压功能更强, 血尿素氮含量在磷虾油组下降更快。但都没有迹象表明在耐受度、安全性等方面对人体有任何伤害。因此, 磷虾油在人体中具有更好的吸收性, 没有产生任何毒副作用。

学习与记忆作为脑的高级功能, 是一种非常复杂的神经活动<sup>[14]</sup>。本实验比较了南极磷虾油与深海鱼油对大鼠学习记忆能力的影响。研究结果显示, 在 Morris 水迷宫实验表明南极磷虾油组能够明显减少大鼠寻找平台潜伏期时间并且增加垮台次数和目标区域游泳时间所占比例; Y-型迷宫刺激器实验表明南极磷虾油组能够明显减少大鼠达标所需次数, 明显提高 48h 后的实验正确率。因此, 根据《保健食品功能学评价程序和检测方法》, 可以判定南极磷虾油具有一定的改善大鼠学习记忆的功且效果优于深海鱼油, 与脑复康作用相当。深层原因可能与磷虾油能透过大鼠脑血屏障, 增加大鼠脑内 DHA 含量有一定关系, Marzo 等<sup>[15]</sup>研究发现, 用相

对较低的的(*n*-3)多不饱和脂肪酸喂肥胖 Zucker 大鼠 1 个月, 不管是鱼油还是磷虾油, 都能显著降低甘油三酯(TG)和外周巨噬细胞对炎症的易感性, 进一步研究证明, 鱼油和磷虾油均可影响肥胖 Zucker 大鼠脑内长链多不饱和脂肪酸和内源性大麻素样物质, 但只有磷虾油可显著增加脑磷脂 DHA 水平。因此, 南极磷虾油在健脑方面具有十分广阔的开发前景。

#### 参考文献:

- [1] SAVAGE G P, FOULDS M J. Chemical composition and nutritive value of antarctic krill (*Euphausia superba*) and southern blue whiting (*Micromesistius australis*)[J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1987, 21(4): 599-604.
- [2] PHLEGER C F, NELSON M M, MOONEY B D, et al. Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area[J]. Comp Biochem Physiol B, 2002, 131: 733-747.
- [3] TAKAICHI S, MATSUI K, NAKAMUR M, et al. Fatty acids of astaxanthin esters in krill determined by mild mass spectrometry[J]. Comp Biochem Physiol B, 2003, 136: 317-322.
- [4] 孙雷, 周德庆, 盛晓风. 南极磷虾营养评价与安全性研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 57-64.
- [5] BUSTOS R, ROMO L, YEZ K, et al. Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 56: 289-293.
- [6] DUAN Jingyun, JIANG Yan, CHERIAN G, et al. Effect of combined chitosan-krill oil coating and modified atmosphere packaging on the storability of cold-stored lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets[J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1035-1042.
- [7] 施佳慧, 吕桂善, 徐同成, 等. 磷虾油的脂肪酸成分及其降血脂功能研究[J]. 营养学报, 2008, 30(1): 115-116.
- [8] TANDY S, CHUNGR W S, WATE E, et al. Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis, glycemia, and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 9339-9345.
- [9] CHANDRASEKAR B, TROYER D A, VENKATRAMAN J T, et al. Tissue specific regulation of transforming growth factor beta by omega-3 lipid-rich krill oil in autoimmune murine lupus[J]. Nutrition Research, 1996, 16(3): 489-503.
- [10] 张天民, 郭学平, 荣晓花. 鱼油多不饱和脂肪酸的制备方法[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(1): 43-45.
- [11] HUPPERT F A. Determination of partial molar volumes of EPA and DHA ethyl esters in supercritical carbon dioxide[J]. Chinese Chemical Letters, 2002, 13: 86-88.
- [12] 李晶. 鱼油制剂改善小鼠记忆作用的实验研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 301-304.
- [13] MAKI K C, REEVES M S, FARMER F, et al. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women[J]. Nutrition Research, 2009, 29: 609-615.
- [14] 周星娟. 学习与记忆机制研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(2): 138-141.
- [15] MARZO V D, GRINARI M, CARTA G, et al. Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not *N*-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats[J]. International Dairy Journal, 2010, 20: 231-235.