

论著

吡咯喹啉醌对衰老大鼠学习记忆的影响及机制研究

唐靛,李林子,胡文敏,胡志航,张岭,张丽婧,梅松,陈建国,刘冬英,刘臻,王茵

(浙江省医学科学院,浙江 杭州 310013)

摘要:目的 研究吡咯喹啉醌(pyrrroquinoline quinone, PQQ)对受到氧化损伤的神经细胞的修复作用,探讨PQQ在因衰老产生机体氧化损伤的大鼠体内、脑内的抗氧化作用,以及该抗氧化作用对衰老大鼠学习记忆能力产生的影响。方法 使用 H_2O_2 诱导PC12神经细胞(大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株)氧化损伤,随后用噻唑兰法检测PQQ对PC12的修复作用。用PQQ(0、10、20、40 mg/kg)灌胃18月龄雄性SD大鼠,4周后用Morris水迷宫试验测定大鼠的学习记忆能力,6周后测定血清和脑组织的氧化损伤水平和抗氧化能力。结果 200 nmol/L的PQQ使PC12细胞的存活率从59.1%增加到90.5%;与衰老模型组比较,PQQ中和高剂量组(20、40 mg/kg)大鼠在Morris水迷宫试验中的5 d潜伏期缩短、5 d游泳总路程减少,PQQ各剂量组(10、20、40 mg/kg)7 d穿越次数增加、7 d第一次平台穿越时间减少。同时PQQ各剂量组大鼠血清和脑组织中丙二醛、脑组织中脂褐素水平降低,中和高剂量组(20、40 mg/kg)血清和脑组织中超氧化物歧化酶水平、谷胱甘肽过氧化物酶活力以及脑组织中抗氧化能力增强。结论 PQQ可修复神经细胞的氧化损伤,证实了PQQ能够在体内与大脑中同样发挥抗氧化作用,增加衰老大鼠学习记忆能力。

关键词:吡咯喹啉醌; PC12细胞; 衰老; 抗氧化; 学习记忆; 衰老模型; 大鼠; 水迷宫

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)04-0407-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.04.004

Effect of pyrroquinoline quinone on learning and memory ability of apolexis rats

TANG Liang, LI Lin-zi, HU Wen-min, HU Zhi-hang, ZHANG Ling,

ZHANG Li-jing, MEI Song, CHEN Jian-guo, LIU Dong-ying, LIU Zhen, WANG Yin

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang Hangzhou 310013, China)

Abstract: Objective This study aimed to investigate the role of pyrroquinoline quinone (PQQ) in repairing oxidative nerve cells, and to study the antioxidant capacity of PQQ on the oxidative damage of rats caused by apolexis, as well as the effects on learning and memory abilities of apolexis rats. **Methods** Oxidative damage of PC12 was induced by H_2O_2 , and the repairing rate of PQQ on oxidative PC12 cells was tested by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide assay kit. The 18-month-old male SD rats were administered PQQ (0, 10, 20, 40 mg/kg). After 4 weeks, Morris water maze test was used to test the learning and memory ability. After 6 weeks, serum and brain tissue related indicators and antioxidant capacity were recorded. **Results** The survival rate of PC12 cells increased from 59.1% to 90.5% with 200 nmol/L PQQ. Compared with the apolexis model group, the latency of the PQQ group (20, 40 mg/kg) was shortened in the Morris water maze experiment, the swimming distance was reduced, pass-through counts were increased, and the first secure platform pass-through was reduced. Meanwhile, the levels of malondialdehyde and lipofuscin in serum and brain tissue of PQQ group decreased, the levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase vitality, antioxidant capacity of PQQ group (20, 40 mg/kg) were enhanced. **Conclusion** PQQ could repair the oxidative damage of nerve cells, and it was confirmed that PQQ could play the same antioxidant effect in body and brain, and increase the learning and memory ability of apolexis rats.

Key words: Pyrroquinoline quinone; PC12 cell; apolexis; antioxidant; learning and memory abilities; aging model; rat; Morris water maze

收稿日期:2017-06-05

基金项目:浙江省营养学医学支撑学科建设(11-zc03);浙江省科技厅项目(2017F30001;2015C33109);浙江省医药卫生科技计划(2014ZDA004;2016KYB071;2017KY299);浙江省自然科学基金项目(LY17H280008);食品(保健食品)质量安全评价研究实验室建设(2016F10002)

作者简介:唐靛 男 助理研究员 研究方向为微生物与营养食品卫生 E-mail:sakura_tlm@sina.com

通信作者:王茵 女 研究员 研究方向为营养与食品卫生学 E-mail:wy3333@163.com

吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 类似水溶性 B 族维生素, 是甲醇脱氢酶的辅酶, 几乎存在于所有食品中。动物和人类肠道中的微生物都不能合成 PQQ 或合成量极少, 人们只能通过饮食途径获取^[1]。PQQ 结构类似醌类抗氧化剂, 可以通过清除活性氧自由基发挥抗氧化作用。有研究^[2]显示 PQQ 具有保护神经细胞免受氧化损伤的作用。人口老龄化是世界面对的难题, 预计到 2040 年, 65 岁以上的老年人将超过总人口的 20%。大量的研究已证实, 随着年龄增加, 认知功能会逐渐衰退。虽然具体机制仍不明确, 但自由基引起脑神经细胞的氧化损伤假说, 在一定程度上被科研学者所广泛接受^[3]。衰老会使机体出现氧化损伤, 特别是氧化还原反应活跃的脑部区域, 受到氧自由基的攻击尤为剧烈, 导致老年人出现学习记忆能力减退的现象。PQQ 作为一种强抗氧化剂, 理论上应该能够缓解自由基引起的脑神经细胞损伤, 从而改善因老龄化而引起的学习记忆能力减退现象。但是目前采用摄入 PQQ 的方式达到缓解大脑学习记忆能力衰退方面的相关研究报道较少, 因此本研究从细胞学方面入手, 通过 PQQ 修复被氧化损伤的神经细胞, 了解其抗氧化相关的修复能力。通过试剂盒测定大鼠体内与脑部的氧化水平的变化以及大鼠行为学试验, 证实摄入 PQQ 是否能够通过抗氧化途径对大鼠学习记忆能力产生作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

无特定病原体 (SPF 级) 6 周龄雄性 SD 大鼠 12 只, 体质量 180 ~ 200 g; 18 月龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 48 只, 体质量 530 ~ 580 g, 均购自浙江省医学科学院实验动物中心 [生产许可证号: SCXK (浙) 2014-0001]。饲养于浙江省医学科学院实验动物中心 [合格证号: SYXK (浙) 2011-0166], 室温 20 ~ 25 °C, 相对湿度 40% ~ 70%。

1.1.2 主要仪器与试剂

酶标仪 (美国美谷)、二氧化碳培养箱 (美国赛默飞)、Morris 水迷宫 (中国医学科学院药物研究所)、电子天平、低速冷冻多管离心机。

吡咯喹啉醌 (PQQ), 纯度 99%, 购自浙江省海正药业股份有限公司, 用蒸馏水配制成 10、20、40 mg/kg 3 种浓度 PQQ 储备液。F-12K 培养基 (美国 Sigma Aldrich), 胎牛血清、马血清均购自天津润泰生物科技有限公司, 大鼠嗜铬细胞瘤细胞 PC12、噻唑兰 (MTT) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试

盒、丙二醛 (MDA) 测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测试盒、脂褐素测试盒、总抗氧化能力 (T-AOC) 测试盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 MTT 试验方法

解冻 PC12 细胞 (大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株), 用含体积分数 10% 胎牛血清、1% 马血清的 F-12 培养基作为传代培养基, 每 48 h 传代一次。多次传代复壮后, 取生长对数期的 PC12 细胞, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。用血球计数板, 将沉淀用纯 F-12 培养液稀释成 8×10^4 个/ml 的 PC12 细胞工作液待用。

取 96 孔板, 第 1 列 8 孔为试剂空白组; 第 2 列 8 孔为对照组, PC12 细胞正常生长; 第 3 列 8 孔为氧化模型组, 使用过氧化氢 (H_2O_2) 氧化建模; 第 4 列 ~ 第 12 列各 8 孔为 PQQ 修复作用测试组, 使用不同浓度 PQQ 修复被 H_2O_2 氧化的细胞。试验收集 PC12 对数期细胞, 第 1 列加入 F-12K 培养基 100 μ l, 第 2 列 ~ 第 12 列加入 PC12 细胞工作液 100 μ l。5% CO_2 、37 °C 孵育, 使细胞单层贴壁铺满 96 孔板。18 h 后, 分别在第 3 列 ~ 第 12 列加入 3 μ l 10 mmol/L 的 H_2O_2 , 形成终浓度为 0.3 mmol/L 的 H_2O_2 溶液, 对 PC12 细胞进行氧化建模, 随后在 5% CO_2 、37 °C 条件下孵育。培养 24 h 后弃去培养液, 各孔加入 F-12K 试验用培养液 100 μ l。第 4 列 ~ 第 12 列分别另加入 PQQ 溶液, 分别使 PQQ 在培养液中的浓度达到 10、20、50、100、200、400、600、800、1 000 nmol/L, 5% CO_2 、37 °C 孵育 60 h。待 PQQ 充分发挥其抗氧化以及对细胞修复作用之后, 每孔加入 20 μ l MTT, 在 5% CO_2 、37 °C 条件下孵育 4 h 后弃去培养基, 每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷, 振荡 10 min, 490 nm 测定吸光度。试验重复 3 次。

1.2.2 动物分组及处理

所有 SD 大鼠给予普通饲料, 进行适应性喂养 7 d。12 只 6 周龄雄性 SD 大鼠作为青年对照组。48 只 18 月龄 SD 大鼠眼眶静脉丛采血, 检测血清中 SOD、MDA 水平。按照体质量和血清中 SOD、MDA 水平分为 4 组, 每组 12 只, 分别为衰老模型组、PQQ 高剂量组 (40 mg/kg)、PQQ 中剂量组 (20 mg/kg)、PQQ 低剂量组 (10 mg/kg), 使组间体质量、SOD、MDA 水平无差异。

青年对照组、衰老模型组每日上午灌胃双蒸水 1 次, 灌胃量按照大鼠体质量进行计算, 为 0.1 ml/10 g, 连续灌胃 6 周; 各剂量组每日灌胃相应受试药物, PQQ 高剂量组的浓度为 40 mg/kg; PQQ 中剂量组的浓度为 20 mg/kg; PQQ 低剂量组的浓度为 10 mg/kg,

灌胃量均为 0.1 ml/10 g,每日上午灌胃 1 次,连续 6 周。

当所有大鼠灌胃至第 4 周时,使用 Morris 水迷宫测试大鼠学习记忆能力。灌胃到第 6 周结束时,进行生化指标测试。末次给药后禁食 12 h,腹腔注射 1% 戊巴比妥溶液进行麻醉,每 100 g 体质量 0.5 ml。随后腹主动脉采血,血样按试剂盒操作说明检测血清中 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量。同时将大鼠放置于冰面上,迅速取右侧大脑组织,制成质量比为 10% 的组织匀浆,按试剂盒操作说明测定脑组织 SOD、T-AOC、GSH-Px 活力和脂褐素、MDA 的含量。

1.2.3 Morris 水迷宫行为测试试验

Morris 圆形水迷宫主要由圆形不锈钢水池(直径 120 cm,高 50 cm)和隐藏平台(直径 9 cm,高 27 cm)组成,水池上空通过一个数字摄像机与计算机相连接,对动物活动进行全程跟踪。试验时将水池内的水用黑色墨汁染色,以隐藏平台,水面高出平台表面 1 cm,水温控制在 $(22 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。整个试验过程分为隐藏平台获得试验和空间探索试验两部分。

隐藏平台获得试验:旨在评价大鼠的学习和记忆能力。试验开始前,让大鼠自由游泳 2 min 以适应周围环境。正式试验开始时,随机从东、西、南、北 4 个人水点选择一个,将大鼠面向池壁放入水中,记录其寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期。如果大鼠在 90 s 内未找到平台,将其引至平台停留 30 s,潜伏期记为 90 s;若大鼠找到平台,需停留 10 s。试验历时 5 d,每天每只大鼠训练 2 次。计算每天各组 2 次寻找平台潜伏期和总路程的平均值记为当天的寻找平台潜伏期和总路程^[4]。

空间探索试验:旨在评价大鼠空间位置记忆保持的能力。训练 5 d 后,大鼠休息 24 h,于第 7 天去除平台,任选一个入水点将大鼠放入水中,记录 60 s 内,大鼠在目标象限(原平台所在象限)穿越目标次数,记为穿越次数。

1.3 统计学分析

研究数据用 SPSS 20.0 软件统计并分析,计量

资料数据结果均采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异做两样本均数比较的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PQQ 对过氧化氢诱导的 PC12 氧化损伤的修复作用

表 1 可见,PC12 神经细胞模型组经 H_2O_2 氧化损伤后,PC12 细胞存活率为 59.1%。而在 200 ~ 400 nmol/L 浓度的 PQQ 作用下,PQQ 能强力修复被 H_2O_2 氧化的神经细胞,将细胞的存活率提高到 90.5%。大脑由大量的神经细胞构成,是氧化还原的活跃区域,因此 PQQ 也可能对大脑中的神经细胞产生同样的修复作用,达到增加学习记忆能力的效果。

表 1 PQQ 对 H_2O_2 诱导的 PC12 氧化损伤的修复作用
($n = 3$)

PQQ 浓度/(nmol/L)	细胞存活率/%	标准差/%	P
对照组(0)	100	0.0	—
氧化模型组(0)	59.1	2.7	—
10	65.0	1.9	0.055
20	69.0*	1.8	0.013
50	72.5**	1.7	0.004
100	81.4**	4.4	0.001
200	90.5**	2.7	0.000
400	88.9**	2.1	0.001
600	80.1**	1.5	0.001
800	63.7	1.7	0.097
1 000	46.3*	2.9	0.011

注:* 为与氧化模型组比较 $P < 0.05$; ** 为与氧化模型组比较 $P < 0.01$;—为无数值

2.2 PQQ 对衰老模型大鼠学习记忆能力的影响

表 2 可知,在隐藏平台获得试验中,与衰老模型组比较,PQQ 中剂量组和高剂量组(20、40 mg/kg) 5 d 潜伏期明显缩短、5 d 总路程明显减少,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。在空间探索试验中,与衰老模型组比较,PQQ 各剂量组的 7 d 穿越平台次数均有增加,7 d 第一次平台穿越时间均有缩短,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 水迷宫试验中 PQQ 对大鼠的学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect on memory ability of rats in Morris water maze test

组别	剂量 (mg/kg)	5 d 潜伏期 /s	5 d 总路程 /cm	7 d 穿越平台次数	7 d 第一次平台穿越时间 /s
青年对照组	—	17.83 \pm 12.30	247.87 \pm 155.23	4.70 \pm 1.83	10.47 \pm 4.04
衰老模型组	—	30.11 \pm 14.03 [△]	495.18 \pm 231.05 [△]	3.30 \pm 1.64 [△]	16.79 \pm 9.13 [△]
PQQ(低)	10	24.11 \pm 11.73	385.06 \pm 238.48	5.00 \pm 2.05*	10.29 \pm 6.23*
PQQ(中)	20	19.82 \pm 11.27*	322.58 \pm 211.92*	4.90 \pm 2.33*	10.66 \pm 5.46*
PQQ(高)	40	18.48 \pm 10.73*	287.28 \pm 241.46*	4.70 \pm 1.83*	7.68 \pm 3.41*

注:△ 为与青年对照组比较 $P < 0.05$; * 为与衰老模型组比较 $P < 0.05$;—为无剂量

如图1所示,各组大鼠在水迷宫训练的第5天,典型游泳轨迹具有明显的区别。青年对照组大鼠能快速辨认标志物并以最近的线路登上平台。衰老模型组大鼠表现为在池中随机穿梭寻找平台,不

能确切定位平台位置。PQQ各个剂量组,随着给药浓度增加,寻找平台的模式优于衰老模型组并逐渐接近青年对照组。

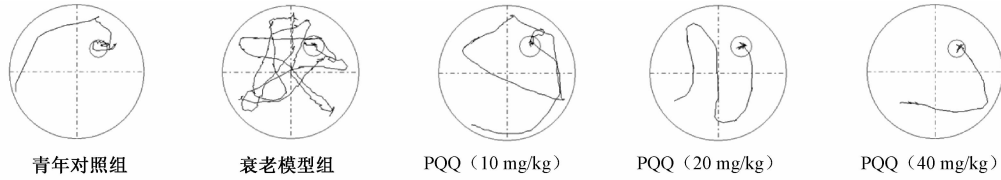


图1 各组大鼠在水迷宫试验最后一天(第5天)的典型游泳轨迹

Figure 1 Representative swimming paths of the different rat groups on last day (day 5) in the Morris water maze test

2.3 PQQ对大鼠血清及脑组织氧化损伤指标的影响

2.3.1 PQQ对大鼠血清中氧化损伤指标的影响

表3可见,与衰老模型组比较,PQQ各剂量组(10、20、40 mg/kg)血清中MDA含量均降低,PQQ中和高剂量组(20、40 mg/kg)血清中SOD、GSH-Px活力升高,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3.2 PQQ对大鼠脑组织中氧化指标的影响

与衰老模型组比较,PQQ各剂量组的脑组织中MDA含量降低,GSH-Px活力升高,T-AOC能力增强,脂褐素含量降低,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。PQQ高剂量组(40 mg/kg)大鼠脑组织中

表3 PQQ对大鼠血清中SOD、MDA、GSH-Px含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect on SOD, MDA, GSH-Px in serum of rats by PQQ

组别	剂量 /(mg/kg)	SOD /(U/L)	MDA /(nmol/ml)	GSH-Px /(U/L)
青年对照组	—	181.14 ± 8.96	7.51 ± 1.23	1044.09 ± 67.78
衰老模型组	—	174.07 ± 8.26 [△]	9.74 ± 1.42 ^{△△}	982.10 ± 75.90 [△]
PQQ(低)	10	177.27 ± 12.72	8.39 ± 1.67*	1021.47 ± 51.41
PQQ(中)	20	181.00 ± 9.04*	8.49 ± 1.62*	1033.99 ± 55.56*
PQQ(高)	40	183.01 ± 12.96*	8.68 ± 1.09*	1071.71 ± 60.71**

注:△为与青年对照组比较 $P < 0.05$;△△为与青年对照组比较 $P < 0.01$;*为与衰老模型组比较 $P < 0.05$;**为与衰老模型组比较 $P < 0.01$;—为无剂量

SOD活力高于衰老模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表4。

表4 PQQ对大鼠脑组织中SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC、脂褐素含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect on SOD, MDA, GSH-Px, T-AOC, lipofuscin in brain of rats by PQQ

组别	剂量/(mg/kg)	SOD/(U/kg)	MDA/(nmol/g)	GSH-Px/(U/kg)	T-AOC/(U/g)	脂褐素/(ng/g)
青年对照组	—	104.05 ± 7.20	7.43 ± 1.16	423.26 ± 37.02	2.60 ± 0.70	2.63 ± 0.14
衰老模型组	—	96.45 ± 7.57 [△]	8.44 ± 1.36 [△]	355.40 ± 30.78 ^{△△}	1.91 ± 0.54 ^{△△}	2.78 ± 0.18 [△]
PQQ(低)	10	97.46 ± 8.74	7.16 ± 1.54*	378.36 ± 26.22*	2.41 ± 0.68*	2.62 ± 0.21*
PQQ(中)	20	97.25 ± 8.36	6.80 ± 1.51**	382.27 ± 30.48*	2.53 ± 0.71*	2.63 ± 0.17*
PQQ(高)	40	102.29 ± 6.46*	6.71 ± 1.10**	413.50 ± 39.70**	2.43 ± 0.71*	2.59 ± 0.28*

注:△为与青年对照组比较 $P < 0.05$;△△为与青年对照组比较 $P < 0.01$;*为与衰老模型组比较 $P < 0.05$;**为与衰老模型组比较 $P < 0.01$;—为无剂量

3 讨论

大脑的老化会形成认知功能障碍并造成学习和记忆能力的衰退。因为氧自由基浓度增加,会使生物膜的脂质发生过氧化反应并产生脂褐素,影响神经细胞活性。同时蛋白质也易受到氧自由基的破坏,发生分子交联,影响抗氧化酶活性^[5]。氧化应激效应会破坏神经元、中断神经细胞信号传导,最终导致神经细胞凋亡^[6]。而大脑是人类最重要的器官,它代谢所需的耗氧量占人体的20%,氧自由基含量远高于人体的其他器官,因而更容易受到氧化损伤^[7]。PQQ具有很强的抗氧化作用,试验采用PC12神经细胞,用H₂O₂诱导氧化PC12细胞建

立体外模型。因为H₂O₂是通过产生氧自由基发挥氧化作用,与大脑时刻受到氧自由基攻击的环境条件类似。试验从细胞学角度证实PQQ能够有效修复被H₂O₂氧化损伤的PC12神经细胞,因此PQQ也可能对大脑中密集的神细胞产生作用,起到抗氧化、修复氧化损伤的作用。

Morris水迷宫是英国心理学家Morris于20世纪80年代初设计并应用于脑学习记忆机制研究的一种试验手段,其在阿尔茨海默病研究中的应用非常普遍。试验中,衰老组大鼠的学习记忆能力弱于青年组大鼠,PQQ灌胃4周后,衰老大鼠在隐藏平台获得试验和空间探索试验中搜索平台的时间与路程明显缩短,随着PQQ剂量浓度的增加,特别是

高剂量组(40 mg/kg)大鼠对平台位置的记忆比衰老模型组大鼠更加深刻,学习记忆能力有明显的提高,证明PQQ具有提高衰老大鼠学习记忆能力、改善记忆障碍的功能。

PQQ能够保护细胞免受氧化应激损伤,进而减轻各种器官受到氧自由基的侵害^[8]。大脑中含有大量自由基,最容易受到氧化损伤,这也是导致老年学习记忆能力减退的主要原因。因为脑组织中的不饱和脂质含量高,易被自由基氧化^[7]。MDA的浓度可反映机体内脂质过氧化的程度。SOD是消除O²⁻毒性效应最重要的抗氧化酶,GSH-Px是清除脂类氢过氧化物的过氧化物分解酶,它们都是机体抗过氧化能力指标。T-AOC是指酶与非酶的总体抗氧化自由基的能力。脂褐素是脑组织衰老细胞中细胞氧化后的产物,沉积会引起智力和记忆力的减退。

目前为止,PQQ在学习记忆能力方面,还未有相关的文献报道。本试验显示,摄入PQQ能明显提高衰老大鼠血清及脑组织中SOD、GSH-Px活力,使老年大鼠大脑与机体的抗氧化能力大大增强,延缓了大脑因神经细胞氧化导致的学习记忆能力减退。衰老大鼠血清中MDA及脑组织中MDA和脂褐素含量明显降低,证明大鼠体内的不饱和脂质的氧化过程被有效阻断,标志着PQQ的抗氧化作用得到了充分发挥。PQQ剂量组与衰老模型组的脑组织中T-AOC的含量差异,反映了PQQ能增加老年大鼠大脑总体抑制自由基的氧化反应能力,对因衰老导致的脑组织氧化损伤具有积极的保护作用。试验证明,PQQ能够有效的从抗氧化途径发挥作用,增加大鼠的学习记忆能力。同时也有相关毒理学试验^[9]报道,大鼠口服400 mg/kg的PQQ,经过41 d与91 d的喂养试验,证明该剂量是一个安全剂量,未表现出相关的毒性危害。

综上所述,PQQ对被氧化损伤的神经细胞具有

很好的修复作用,能够修复大脑神经细胞因氧化损伤导致的学习能力下降与认知功能衰退。本试验为开发抗衰老抗氧化,预防老年痴呆,提高学习记忆能力的保健食品提供了理论依据。

参考文献

- [1] KUMAZAWA T, SATO K, SENO H, et al. Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods [J]. *Biochemical Journal*, 1995, 307(2): 331-333.
- [2] HE K, NUKADA H, URAKAMI T, et al. Antioxidant and prooxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ) implications for its function in biological systems [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 65(1): 67-74.
- [3] GONENC S, UYSAL N, ACIKGOZ O, et al. Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats [J]. *Physiol Res*, 2005, 54(3): 341-348.
- [4] ELDER G A, GAMA SOSA M A, DE GASPERI R, et al. Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease [J]. *Brain Structure and Function*, 2010, 214(2/3): 127-143.
- [5] KOIVISTO K, REINIKAINEN K J, HANNINEN T, et al. Prevalence of age-associated memory impairment in a randomly selected population from eastern Finland [J]. *Neurology*, 1995, 45(4): 741-747.
- [6] LAEDERACH A, SHCHERBAKOVA I, JONIKAS M A, et al. Distinct contribution of electrostatics, initial conformational ensemble, and macromolecular stability in RNA folding [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(17): 7045-7050.
- [7] DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain [J]. *Progress in Neurobiology*, 2000, 62(6): 649-671.
- [8] KUMAR N, KAR A. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) has potential to ameliorate streptozotocin-induced diabetes mellitus and oxidative stress in mice: a histopathological and biochemical study [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 240(10): 278-290.
- [9] LIANG C L, ZHANG X, WANG W, et al. A subchronic oral toxicity study on pyrroloquinoline quinone (PQQ) disodium salt in rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 75(1): 146-150.