

地鳖多肽提取物的抗氧化衰老机制

谷崇高, 张永红, 白若雨, 田美杰, 沈红

(北京农学院动物科学技术学院, 兽医学(中医药)北京市重点实验室, 北京 102206)

【摘要】 目的 探讨地鳖多肽(ESW polypeptide)提取物抗氧化衰老机制的研究。**方法** 小鼠连续腹腔注射 D-半乳糖 20 d, 建立衰老模型, 同时小鼠灌服不同剂量地鳖多肽提取物每日(0、40、80、160 mg/kg), 观察小鼠的正常活动、运动和耐应激能力。分别采用黄嘌呤氧化酶法、分光光度法检测小鼠血液和不同组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力, 以及丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量; 免疫荧光法检测细胞核转录因子 2(Nrf2)在 Caco-2 细胞的表达。**结果** 与对照和多肽组比较, 衰老组小鼠体重增重缓慢、组织脏器系数降低、运动时间缩短、抗应激能力降低、组织中抗氧化酶活力降低。随着地鳖多肽剂量增加, 多肽组小鼠体重增加明显, 肝脏、脾脏和肾脏指数增加显著, 小鼠静力和动力运动时间明显延长, 小鼠耐缺氧、耐高温和运动时间延长并接近对照组, 血液和不同组织中的 SOD、CAT、GSH-PX 活力及 GSH 含量显著提高, 但 MDA 含量降低。与对照组比较, 地鳖多肽组 Caco-2 细胞核内 Nrf2 表达量明显增加, 接近阳性对照组。**结论** 地鳖多肽可能通过启动 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路, 提高 D-半乳糖致衰老小鼠抗应激和抗氧化能力, 从而延缓小鼠氧化衰老。

【关键词】 地鳖多肽; D-半乳糖; 衰老模型鼠; 抗氧化作用; 细胞核转录因子 2

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0066-09

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005 - 4847. 2014. 06. 012

Mechanism of polypeptide extracts of *Eupolyphaga sinensis* Walker against oxidative aging in mice

GU Chong-gao, ZHANG Yong-hong, BAI Ruo-yu, TIAN Mei-jie, SHEN Hong

(College of Animal Science and Technology, Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese
Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Corresponding author: SHEN Hong, Email: shenhong921@sina.com

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the mechanism of action of polypeptide extracts of *Eupolyphaga sinensis* Walker (ESW) against oxidative aging. **Methods** Mice were intraperitoneally injected D-galactose for consecutive 20 days to establish an aging mouse model. The model mice were administered with different doses of ESW polypeptide (0, 40, 80, 160 mg/kg/d). The normal activity, movement and anti-stress ability of the mice were observed. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-PX) in blood and different tissues and the content of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) of the aging mice were assessed by xanthin oxidase activity measurement and spectrophotometry, respectively. The expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in Caco-2 cells was detected by immunofluorescence. **Results** Comparing the control and polypeptide groups, there were significant decreases of body weight gain, organ indexes, anti-stress ability and activity capacity, the activity of SOD, CAT, GSH-PX and the content of GSH, and an increase of the content of MDA in blood and different

[基金项目] 北京市教委项目(PXM2013014207000067 和 KM201410020005); 北京农学院科技创新团队科研能力提升工程项目(KCT2014012); 2014 北京市本科生研究训练项目。

[作者简介] 谷崇高(1988 年-), 硕士研究生, 研究方向为中兽药药理, Email: 285294925@qq.com

[通讯作者] 沈红, 从事免疫药理研究, Email: shenhong921@sina.com

tissues in the aging mice. With the increasing dose of polypeptide extracts of ESW, the body weight gain, organ indexes of the liver, spleen and kidney were significantly increased, the static and dynamic exercise time was prolonged in the polypeptide group, and their abilities of hypoxia tolerance and heat tolerance were close to that of normal controls. The SOD, CAT, GSH-PX activity and GSH level in blood and different tissues were significantly increased, but MDA content decreased. The expression of Nrf2 in Caco-2 cell nuclei was significantly increased in the polypeptide group, close to that of the positive control group. **Conclusions** The results of our study show that polypeptide extracts of ESW improve the anti-stress and antioxidative capacity in D-galactose-induced mouse models of oxidative aging by initiating Nrf2-ARE antioxidant signaling pathway, therefore, delay the oxidative aging in mice.

【Key words】 *Eupolyphaga sinensis* Walker, polypeptide; Oxidative aging; Mice; Antioxidation; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2.

地鳖 (*Eupolyphaga sinensis* Walker, ESW) 为活血化瘀类中药,《神农本草经》记载其味咸,性寒,归肝经,具有破血逐瘀的功效^[1]。现代研究表明,地鳖提取物具有良好的抗肿瘤、抗氧化、增强免疫功能的作用^[2]。1955 年美国科学家 Hannan 提出衰老自由基学说,认为体内过多的自由基可引起衰老^[3]。机体自身具有抗氧化体系,通过提高体内超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽含量,补充抗氧化物质等,提高机体抗氧化能力,清除多余自由基,但是随着年龄增长、疾病发生等情况,易造成抗氧化体系失衡^[4]。天然产物抗氧化剂可以提高机体抗氧化能力,维持体内氧化还原的平衡尤为重要。抗氧化多肽具有抑制生物大分子过氧化和清除体内自由基功能的小分子多肽,有研究人员采用蛋白酶水解制备地鳖多肽,体外试验其能清除自由基,结果表明地鳖多肽具有抗氧化活性^[5-6],但有关其抗氧化机制未见报道。细胞核转录因子 2-抗氧化反应元件(Nrf2-ARE)是抗氧化应激损伤的重要信号通路,可调控血红素加氧酶(HO-1)等在内的多种抗氧化酶的表达,从而对细胞产生保护作用^[7]。Nrf2-ARE 信号通路的核心分子 Nrf2 位于胞质,正常情况下是无活性状态,在活性氧等信号刺激下,Nrf2 被激活移入核内与 ARE 结合激活靶基因的表达,调节抗氧化酶/蛋白的转录,保护机体免受活性氧等物质侵害,抑制氧化应激引起的细胞衰老^[7-8]。叔丁基对苯二酚是 Nrf2 激活剂,可以激活 Nrf2-ARE 信号通路,使 Nrf2 在细胞核表达增加,促进抗氧化蛋白的表达^[9]。

本研究通过体内外试验,分析小鼠血液和组织中抗氧化酶活力、细胞内抗氧化信号通路关键分子 Nrf2 表达,探讨地鳖多肽提取物抗氧化衰老作用及机制,为开发地鳖多肽作为抗氧化衰老保护剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器

Caco-2 细胞株,购于中国科学院上海细胞生物学研究所;DMEM 高糖培养基、双抗、胎牛血清(FBS)等,购于美国 Gibco 公司;兔源 Nrf2 多克隆抗体,购于美国 Abcam 公司;FITC-羊抗兔 IgG,购于北京博奥森有限公司;地鳖多肽提取物为本实验室提取制备;硫代巴比妥酸(TBA)、D-半乳糖((D-gal), 购于美国 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和过氧化氢酶(CAT)试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)含量试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;UV-3 紫外可见分光光度计,购于上海美普达有限公司;荧光倒置显微镜购于日本 Olympus 公司。

1.1.2 实验动物

6~8 周龄 KM 雌性小鼠 80 只,体重 20~22 g,清洁级,购于中国军事医学科学院实验动物中心【SCXK-(京)2012-001】。无菌手术在北京农学院实验动物示范中心屏障动物实验设施进行【SYXK(京)2010-0003】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

取 80 只 KM 小鼠随机分五组,对照组(C),衰老模型组(M),低、中、高剂量(40、80、160 mg/kg)地鳖多肽组,每组 16 只。除对照组小鼠外,其余所有小鼠每天腹腔注射 5% D-半乳糖 0.5 mL,连续注射 20 d,建立衰老小鼠。多肽组小鼠每天需灌服不同剂量地鳖多肽提取物,对照组和衰老组小鼠每天灌服等量生理盐水,连续给药 20 d。

1.2.2 衰老小鼠运动能力的测定

(1) 静力性运动能力测定:取长 2m、直径 0.5 cm 的悬垂导线,将各组小鼠置于距导线末端 12 cm 处,记录小鼠 3 次从抓住线绳至掉落的时间。

(2) 运动性运动能力测定:取各组小鼠将其尾负重 100 g/kg 的重物,然后放入 50 cm × 40 cm × 30 cm 的水箱中游泳,水温 (28 ± 2) °C,记录下小鼠连续 3 次沉入水中的时间。

1.2.3 衰老小鼠耐应激能力的测定

(1) 力竭游泳测定:将各组小鼠放入水箱中,观察游泳,记录小鼠的死亡时间。

(2) 耐高温测定:将部分小鼠放入 50 °C 干热箱,记录小鼠的死亡时间。

(3) 耐缺氧测定:将各组小鼠放入含有碱石灰的广口瓶中,瓶口涂有白凡士林,密闭缺氧,记录小鼠的死亡时间。

1.2.4 SOD、CAT 和 GSH-PX 测定

(1) 血清和血液的制备:末次小鼠灌胃 24 h 后眼眶采血,其中一部分小鼠血液加入离心管内,离心制备血清备用;另一部分小鼠血液加入含有肝素的离心管内,制备血液备用。

(2) 红细胞抽提液的制备:取小鼠血液 50 μL 加入盛有 2 mL 的生理盐水的离心管内,2000 r/min 离心 3 min,弃上清收集红细胞,向红细胞中加预冷的双蒸水 0.2 mL 混匀,然后加 95% 乙醇 0.1 mL 振荡 30 s,再加三氯甲烷 0.1 mL,置于漩涡混匀器上混匀 1 min,3500 r/min 离心 8 min,收集上层红细胞抽提液,4 °C 备用。

(3) 脏器指数计算:小鼠颈椎脱臼处死,打开腹腔分离出肝脏、肾脏、脾脏、心脏组织,用预冷的生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重,根据公式计算:脏器指数 = 脏器重/体重 × 100%。

(4) 组织匀浆上清液的制备:准确称取 1 g 不同组织放入小烧杯中,加 9 mL 预冷生理盐水,组织匀浆,收集匀浆液离心,弃去沉淀,制备 10% 组织匀浆上清液备用。

根据 SOD、CAT 和 GSH-PX 试剂盒说明,检测小鼠全血、血清、红细胞以及肝、肾、脾脏、心脏组织中的 SOD、CAT 和 GSH-PX 活力。

1.2.5 MDA、GSH 含量测定

取 1 mL 组织匀浆上清液加入离心管内,置于 -20 °C 冰箱 10 min,然后放入 37 °C 水浴锅水浴 10 min,反复冻融破碎细胞,最后向离心管加 1 mL 6% TBA 溶液,沸水中煮沸 15 min 显色,冷却后离心,取

适量上清液加比色杯内,紫外分光光度计检测 A_{450} , A_{532} , A_{600} 吸光度值,根据公式计算:MDA 浓度 (μmol/L) = $6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$ 。

取组织匀浆液、血液及血清,根据试剂盒要求,测定 $A_{405\text{nm}}$ 值,由标准曲线算出 GSH 含量。

1.2.6 免疫荧光法检测 Nrf2 在 Caco-2 细胞表达

(1) 细胞处理:复苏 Caco-2 细胞培养至对数生长期,将细胞加入 24 孔细胞培养板,药物处理细胞培养 24 h。实验分三组,对照组为 10% FBS DMEM 培养基、阳性对照组为含终浓度为 50 μmol/L tBHQ 的 10% FBS DMEM 培养基、药物组为含终浓度为 80 μg/mL 地鳖多肽的 10% FBS DMEM 培养基。

(2) Nrf2 表达检测:取板吸弃培养基,向孔内加入预冷的 4% 多聚甲酸 1 mL,固定细胞 20 min,用预冷 PBS 洗 3 次;加预冷 0.3% Triton X-100,将细胞板置于冰上破膜 15 min, PBS 洗 3 次;每孔加 200 μL 山羊血清于 37 °C 恒温封闭 2 h,吸弃血清并 PBS 洗 3 次,每孔加 50 μL 兔源 Nrf2 多克隆抗体,4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 次;每孔加 100 μL FITC-IgG 二抗,37 °C 避光孵育 1 h。荧光显微镜下观察。

1.2.7 实验结果统计分析

实验数据以平均数 ± 标准差表示,采用 *t* 检验分析比较各组数据,方差不齐时用 *t'* 检验, * *P* < 0.05 为差异有显著性, ** *P* < 0.01 为差异有极显著性。

2 结果

2.1 一般情况观察

小鼠连续给药 20 d 后对照组和地鳖多肽组小鼠毛发光亮而浓密、皮肤富有弹性;衰老模型组小鼠出现衰老迹象,表现毛发稀疏、行动迟缓、采食量减少、皮肤松弛和弹性下降等。随饲养天数增加,对照组小鼠体重逐步增加,衰老模型组小鼠在 1 ~ 15 d 之间体重增加缓慢,15 ~ 20 d 体重下降,与衰老模型组比较地鳖多肽组小鼠体重增加显著 (图 1)。衰老模型组小鼠的肝脏、脾脏和肾脏指数均低于对照组 (图 2),高剂量地鳖多肽组肝脏指数显著高于对照组比和衰老模型组 (图 2A),地鳖多肽组小鼠脾脏指数都高于对照组比和衰老模型组,其中低剂量多肽组小鼠脾脏指数提高最明显 (图 2B),模型组小鼠肾脏指数显著低于对照组,与模型组相比地鳖多肽组小鼠肾脏指数略有提高 (图 2C)。

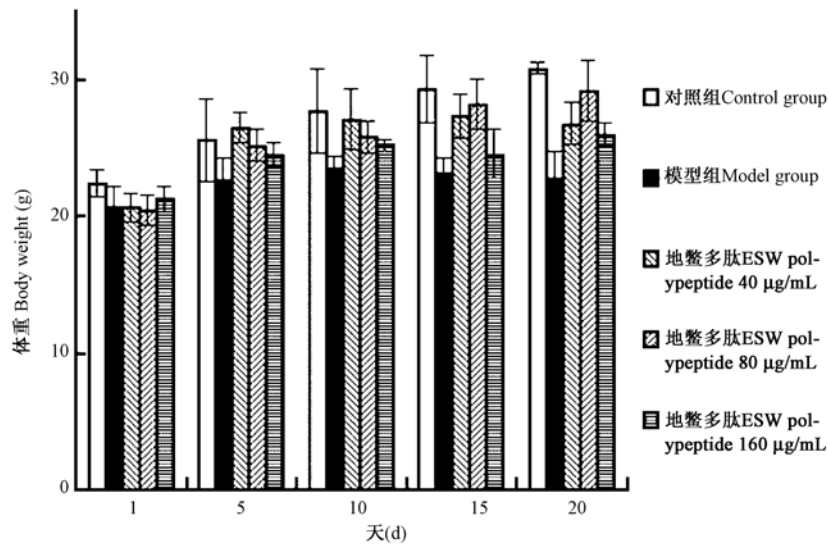
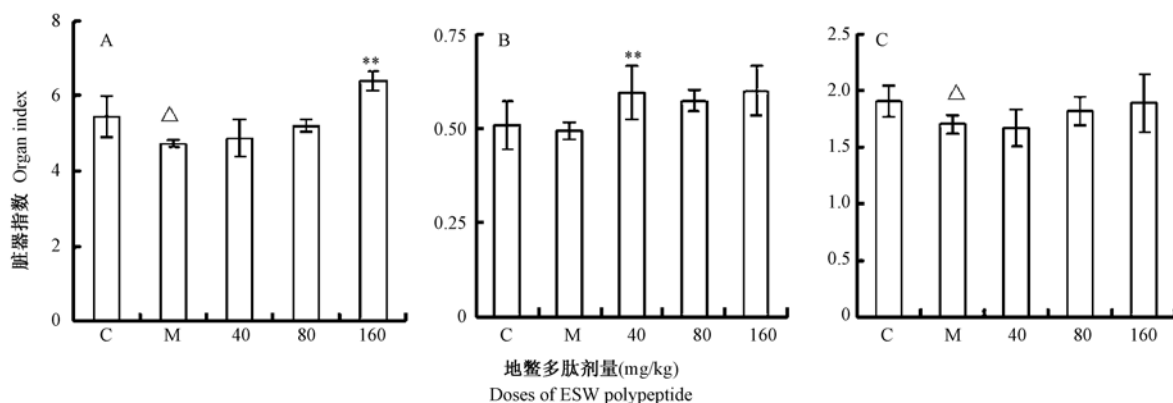


图1 地鳖多肽对衰老小鼠体重的影响

Fig. 1 Effects of ESW polypeptides on body weight of the aging mice



注:与 C 相比 $\Delta P < 0.05$,与 M 相比 $** P < 0.01$ 。

图2 地鳖多肽对衰老小鼠脏器指数的影响(A 肝脏、B 脾脏、C 肾脏)

Note: Compared with the control group $\Delta P < 0.05$, Compared with the model group $** P < 0.01$.

Fig. 2 Effects of ESW polypeptide on organ index of the aging mice (A: Liver, B: Spleen, C: Kidney)

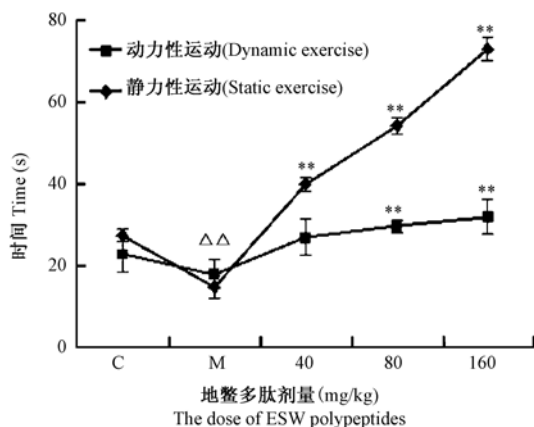
2.2 地鳖多肽对衰老小鼠运动和耐应激能力的影响

实验分析了地鳖多肽对 D-半乳糖致衰老小鼠的运动能力的影响,结果衰老模型组小鼠静力性和动力性运动时间明显低于对照组,地鳖多肽组小鼠运动时间显著高于衰老模型组,随地鳖多肽灌服量增加,小鼠运动时间逐渐延长(图 3)。小鼠抗应激能力结果见图 4,衰老模型组小鼠的耐高温、耐缺氧、游泳时间都显著比对照组缩短,而多肽组小鼠耐高温、耐缺氧和游泳时间比衰老模型组延长,随着小鼠灌服地鳖多肽量增加,小鼠耐高温、耐缺氧和游泳时间逐渐延长;高剂量多肽组小鼠游泳时间接近对照组(图 4A),多肽组小鼠耐高温时间高于模型衰老组但低于对照组(图 4B),中高剂量多肽组小鼠

耐缺氧时间高于对照组(图 4C)。结果表明地鳖多肽提高衰老小鼠的运动和耐应激能力,有延缓衰老作用。

2.3 地鳖多肽对衰老小鼠 SOD 活力的影响

通过黄嘌呤氧化酶法测定小鼠组织和血液中 SOD 活力,结果见图 5。与对照组和多肽组比较,衰老模型组小鼠肝肾组织中 SOD 活力显著降低;随着小鼠灌服地鳖多肽量增加,肝肾组织中 SOD 活力逐渐提高,中高剂量多肽组小鼠肝脏 SOD 活力提高最明显,而高剂量多肽组肾脏 SOD 活力极显著提高;多肽组肝脏 SOD 活力显著高于肾脏(图 5A)。衰老组小鼠红细胞 SOD 活力显著低于对照组,多肽组小鼠红细胞中 SOD 活力极显著高于对照组,且存在量



注:与 C 相比 $\Delta\Delta P < 0.01$,与 M 相比 $**P < 0.01$ 。

图 3 地鳖多肽对衰老小鼠运动能力的影响

Note. Compared with the control group $\Delta\Delta P < 0.01$, Compared with the model group $**P < 0.01$.

Fig. 3 Effects of ESW polypeptide on the movement ability of aging mice

效关系(图 5B)。结果表明地鳖多肽可以缓解甚至改善 D-半乳糖致小鼠 SOD 活力的降低,提高抗氧化酶的活力。

2.4 地鳖多肽对衰老小鼠 CAT 活力的影响

通过紫外分光光度法测定 CAT 活力,结果如图 6。衰老组小鼠肝肾心的组织中 CAT 活力显著低于对照组,而地鳖多肽组小鼠 CAT 活力显著高于对照组,同时 CAT 活力随着地鳖多肽剂量增加而升高(图 6A)。衰老组小鼠血液中 CAT 活力均显著低于对照组和多肽组,中高剂量多肽组 CAT 活力提高最

显著,且 CAT 活力随着地鳖多肽的剂量升高而升高(图 6B)。结果表明地鳖多肽能提高衰老小鼠 CAT 抗氧化酶的活力。

2.5 地鳖多肽对小鼠 GSH-PX 活力的影响

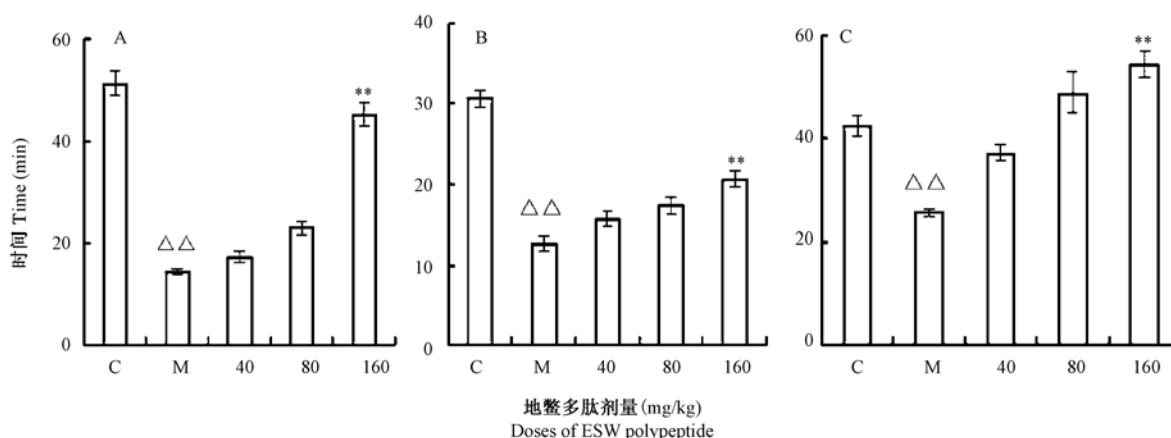
通过分光光度法测定 GSH-PX 活力,结果见图 7。衰老模型组小鼠肝肾组织中 GSH-PX 活力显著降低对照组和多肽组,地鳖多肽组小鼠肝组织中 GSH-PX 活力接近对照组,高剂量多肽组小鼠肾中 GSH-PX 的活力最显著升高,GSH-PX 活力在肝脏组织高于肾脏(图 7A)。衰老组小鼠血液中 GSH-PX 活力低于对照组,与衰老组相比,低、中剂量地鳖多肽组小鼠血液中的 GSH-PX 活力变化不大,高剂量地鳖多肽组 GSH-PX 活力显著升高(图 7B)。结果表明地鳖多肽可提高衰老小鼠血液 GSH-PX 抗氧化酶的活力。

2.6 地鳖多肽对小鼠不同组织 MDA 含量的影响

TBA 比色法测定小鼠不同组织中 MDA 的含量,结果衰老模型组小鼠肝肾心脾组织中 MDA 含量高于对照组和多肽组,随着地鳖多肽增加各组织中 MDA 含量逐渐降低,高剂量多肽组 MDA 含量降低最明显;不同组织中 MDA 含量之间比较,肾组织中 MDA 含量高于肝心脾,心肌中最低(图 8)。结果表明地鳖多肽可以缓解衰老小鼠组织中 MDA 升高,从而延缓组织脂质过氧化。

2.7 地鳖多肽对衰老小鼠 GSH 含量的影响

通过二硫二硝基苯甲酸(DTNB)显色法测定小鼠不同组织中 GSH 的含量,结果如图 9 显示。由图

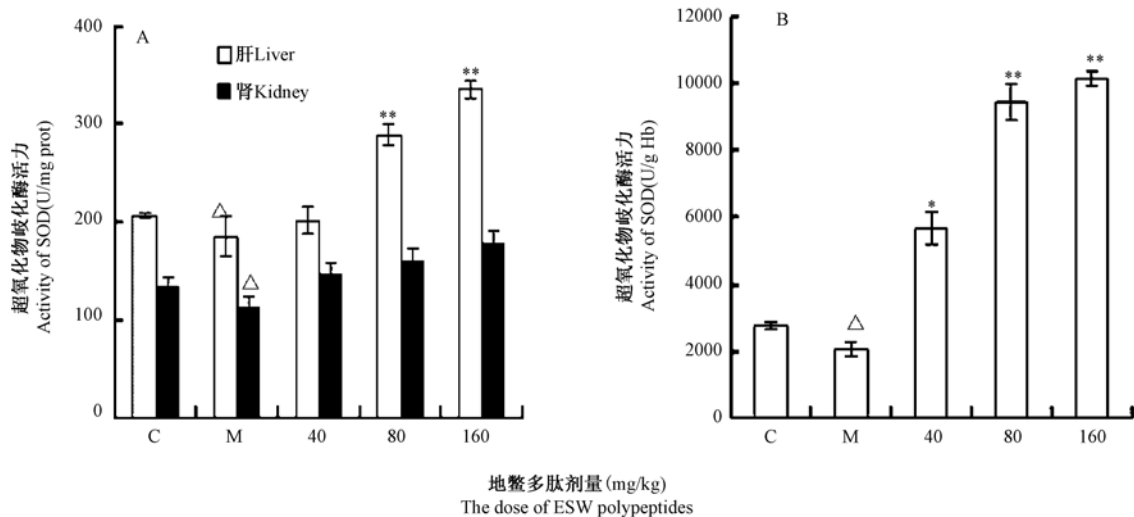


注:A. 游泳时间;B. 耐高温时间;C. 耐缺氧时间。与 C 相比 $\Delta\Delta P < 0.01$,与 M 相比 $**P < 0.01$ 。

图 4 地鳖多肽对衰老小鼠抗应激的影响

Note: A indicates swimming time, B indicates the time of tolerance to high temperature, C indicates the time of tolerance to hypoxia. Compared with the control group $\Delta\Delta P < 0.01$. Compared with the model group $**P < 0.01$.

Fig. 4 Effects of ESW polypeptide on the anti-stress ability of aging mice

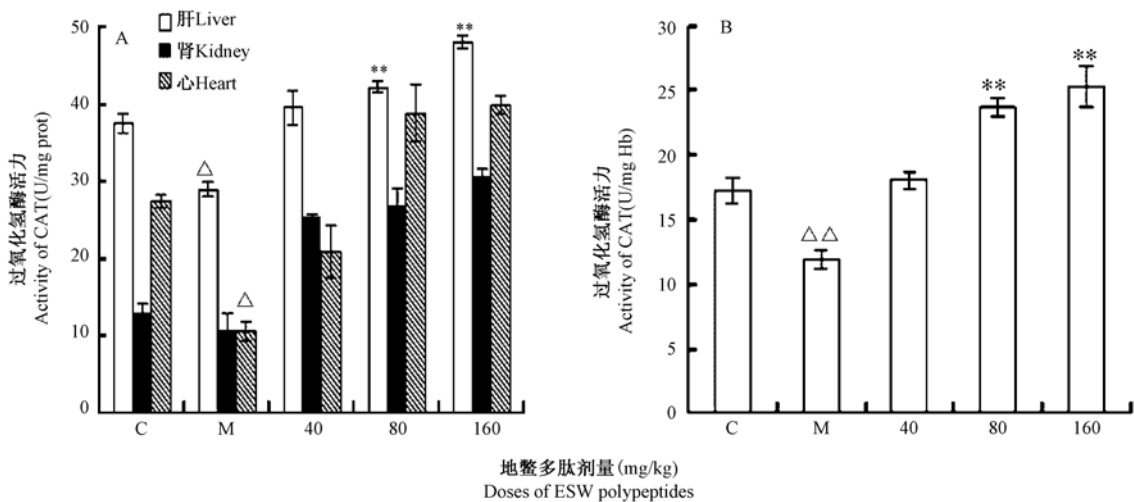


注: A. 不同组织; B. 红细胞。与 C 相比^Δ $P < 0.05$, 与 M 相比^{**} $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

图 5 地鳖多肽对 SOD 活力的影响

Note. A indicates different tissues, B indicates red blood cells compared with the control group ^Δ $P < 0.05$, Compared with the model group ^{**} $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Fig. 5 Effects of ESW polypeptide on the activity of SOD



注: A. 不同组织; B. 血液。与 C 相比^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^Δ $P < 0.05$, 与 M 相比^{**} $P < 0.01$ 。

图 6 地鳖多肽对 CAT 活力的影响

Note. Compared with the control group ^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^Δ $P < 0.05$. Compared with the model group ^{**} $P < 0.01$.

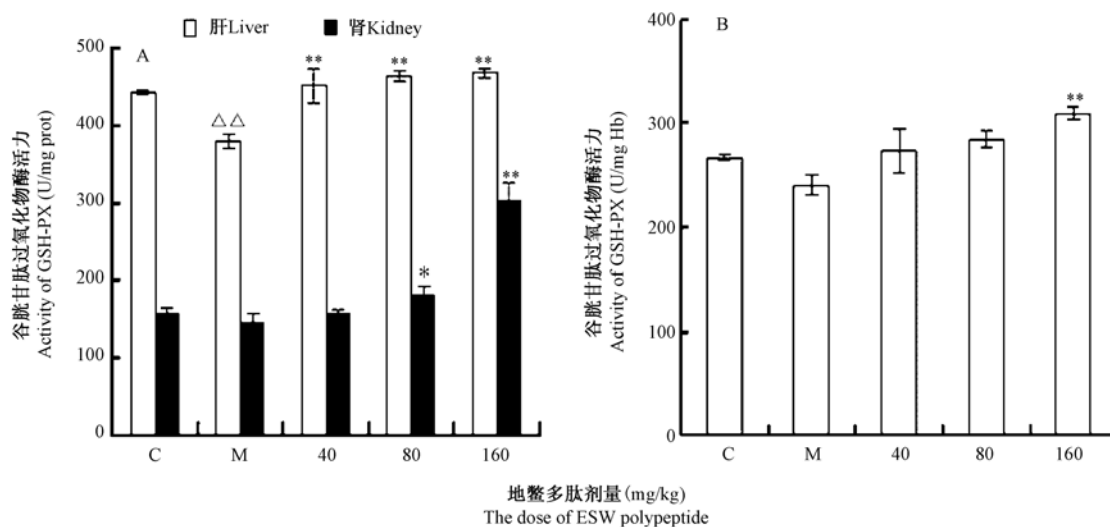
Fig. 6 Effects of ESW polypeptide on the activity of CAT (A indicates different tissues, B indicates blood)

9 知,与对照组比较,衰老模型组小鼠肝中 GSH 含量显著降低,地鳖多肽组肝中 GSH 含量高于衰老组,高剂量组小鼠肝中 GSH 含量显著升高;衰老模型组小鼠肾中 GSH 含量低于对照组,中高剂量多肽组小鼠肾 GSH 含量高于对照组和衰老组;多肽组小鼠心脏组织中 GSH 含量高于对照和模型组,以中高剂量组升高最明显(图 9A)。地鳖多肽组血液中 GSH 含量均高于对照和衰老模型组,呈现剂量和效

应关系,多肽组血液中 GSH 含量均高于衰老组(图 9B)。结果表明地鳖多肽可以缓解甚至改善 D-半乳糖致小鼠组织中 GSH 含量的降低,升高机体内抗氧化因子的含量,提高抗氧化能力。

2.8 地鳖多肽对 Nrf2 在 Caco-2 细胞表达的影响

通过免疫荧光法检测地鳖多肽对 Caco-2 细胞 Nrf2 表达的影响,结果如图 10(见彩插 14)所示,红色箭头指示的绿色荧光是 Nrf2 在细胞中的表达。

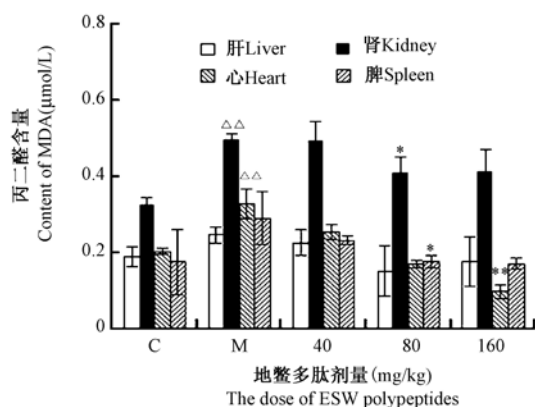


注: A. 不同组织; B. 血液。与 C 相比^{△△} $P < 0.01$, [△] $P < 0.05$, 与 M 相比^{**} $P < 0.01$ 。

图 7 地鳖多肽对 GSH-PX 活力的影响

Note. Compared with the control group ^{△△} $P < 0.01$, [△] $P < 0.05$. Compared with the model group ^{**} $P < 0.01$.

Fig. 7 Effects of ESW polypeptide on the activity of GSH-PX (A indicates different tissue, B indicates blood)



注: 与 C 相比^{△△} $P < 0.01$; 与 M 相比^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

图 8 地鳖多肽对衰老小鼠不同组织中 MDA 含量的影响

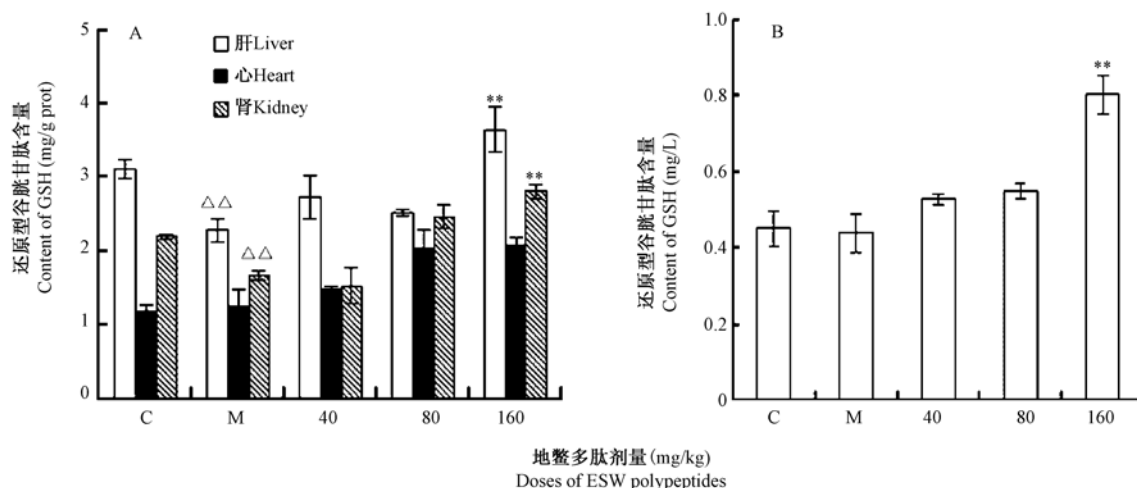
Note. Compared with the control group ^{△△} $P < 0.01$, Compared with the model group ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

Fig. 8 Effects of ESW polypeptide on the MDA content in different tissues in aging mice

对照组 Caco-2 细胞胞质及胞核内极少量 Nrf2 表达 (图 10A), tBHQ 组 Nrf2 蛋白在细胞胞质及细胞核内的表达均较多肽组明显增高 (图 10B); 地鳖多肽组细胞胞质及胞核内 Nrf2 表达均明显增多 (图 10C), 接近阳性对照组。结果说明地鳖多肽可能启动 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路, 促进 Nrf2 和 keap1 解离后移入细胞核。

3 讨论

美国科学家 Hannan 1955 年提出衰老的自由基学说, 认为自由基攻击生命大分子造成组织细胞损伤是引起机体衰老的根本原因, 为此建立衰老模型是研究机体衰老机制以及药物抗衰老机制的关键。衰老模型的建立有多种方法, 其中 D-半乳糖衰老模型建立的依据主要是自由基氧化损伤衰老学说, 由于该模型具有造模方法简单、模型复制成功率高等优点, 近年来它已成为研究抗衰老常用动物模型^[10]。D-半乳糖致衰老的作用机制在于: 第一, 半乳糖在其氧化酶作用下, 与氧反应生成二醛糖及 H_2O_2 , 且半乳糖在体内亦可发生非酶糖基化反应, 形成蛋白质交联^[11]; 第二, 半乳糖在醛糖还原酶催化下还原生成半乳糖醇, 细胞不能代谢半乳糖醇, 使其在细胞内堆积, 形成高渗透压致细胞肿胀和功能障碍, 最终引起衰老^[12]; 第三, D-半乳糖可使生物体中产生大量的活性氧 (ROS), 导致细胞线粒体系统损伤, 产生大量过氧化脂质, 同时 ROS 及其发生氧化反应后的过氧化产物, 进一步导致 MDA 水平升高和 SOD、GSH-PX 及 CAT 等抗氧化酶活力下降, 最终导致抗氧化水平降低甚至损伤, 出现各种衰老变化^[13]。本试验结果衰老模型组小鼠的体重升高缓慢甚至降低, 运动和耐应激能力下降, 肝肾脏器指数比对照组低, 肝肾组织抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性降低, 组织中氧化损伤产物 MDA 含量升高及



注: A. 不同组织, B. 血液。与 C 相比^{△△} $P < 0.01$, 与 M 相比^{**} $P < 0.01$ 。

图 9 地鳖多肽对 GSH 含量的影响

Note: A indicates different tissue, B indicates blood. Compared with the control group ^{△△} $P < 0.01$. Compared with the model group ^{**} $P < 0.01$.

Fig. 9 Effects of ESW polypeptide on the GSH content

抗氧化因子 GSH 含量降低, 结果与文献报道相似^[14]。

机体的稳态受到氧化和抗氧化体系平衡的影响, 各种原因如 ROS 增加、外源性毒物、电离辐射等刺激, 使机体的自由基水平明显增高, 各种抗氧化物质如 SOD、GSH、CAT 等含量下降, 抗氧化能力降低, 超过机体抗氧化体系的清除能力, 造成机体的氧化应激。机体的抗氧化体系由酶系统和非酶系统组成, 而体内的抗氧化酶主要有 SOD、GSH-PX 和 CAT 等。地鳖多肽是一种通过蛋白酶水解地鳖虫得到的小分子多肽, 前期研究结果表明地鳖多肽能清除自由基。本试验结果灌服地鳖多肽小鼠体重升高, 肝肾组织脏器指数升高, 小鼠运动能力、耐应激能力增强、抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性增强, 组织中 MDA 含量显著降低, 结果与 Cui 等^[15] 研究结果相似, 进一步说明地鳖多肽可能是通过提高小鼠抗氧化能力来延缓氧化衰老。

机体的正常生理功能有赖于氧化/抗氧化系统的相互拮抗平衡, 体内过多的 ROS 能攻击生物膜中不饱和脂肪酸, 引发细胞氧化损伤。Nrf2-ARE 是重要信号通路, 机体应对氧化应激的防御机制之一是 ARE, ARE 是许多抗氧化酶/蛋白基因上游增强元件, Nrf2 是 Nrf2-ARE 通路中的核心分子, 在生理状态下 Nrf2 位于细胞质中, 与胞浆蛋白伴侣分子 (Keap1) 结合, 处于无活性状态, 由泛素蛋白酶途径迅速降解。在活性氧簇或其它亲核剂信号刺激下,

Nrf2 与 Keap1 解耦联后被激活转移入细胞核中, 通过 bZIP 与小分子肌腱纤维瘤蛋白质 (Maf) 结合后形成稳定异二聚体, 并与位于 II 相代谢酶基因上游启动子区域的 ARE 结合, 调控下游 II 相酶和抗氧化酶基因的转录活性, 如血红素单加氧酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶 (NQO1) 等, 这些酶能够保护机体免受活性物质等的侵害^[8]。叔丁基对苯二酚 (tBHQ) 是 Nrf2 的激活剂, 通过激活 Nrf2 蛋白, 促进 Nrf2 的核转位, 增加其与 ARE 的结合, 激活抗氧化蛋白基因的表达^[9]。本实验通过地鳖多肽与 tBHQ 阳性药物作比较, 通过实验结果说明地鳖多肽组的细胞核内 Nrf2 表达极显著高于对照组, 结果与文献报道一致^[16]。

综上所述, 地鳖多肽具有提高机体的抗氧化能力, 促进 Nrf2 核移位启动 Nrf2-ARE 抗氧化应激信号通路, 提高抗氧化蛋白酶的转录表达, 发挥抗氧化作用, 从而延缓氧化衰老。

(本文图 10 见彩插 14)。

参 考 文 献

- [1] 田军鹏, 黄文, 雷朝亮. 地鳖虫药理作用研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 418-419.
- [2] 杨耀芳. 土鳖虫药效的实验研究进展 [J]. 中药材, 2002, 25(2): 150.
- [3] 肖政华, 张光奇. 益气聪明汤对 D-半乳糖衰老小鼠抗自由基作用的实验研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(1): 91-93.
- [4] 李淑莲, 刘睿妹, 王振宇, 等. 黄芪建中汤对 D-半乳糖致衰

- 老小鼠的抗氧化作用 [J]. 中医药学报, 2011, 39(2): 56 - 58.
- [5] 张璐, 朴美子, 王莹. 地鳖虫酶解液体外抗氧化作用的研究 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(3): 159 - 162.
- [6] 王懋存, 金玉兰, 朴美子等. 中华真地鳖抗氧化肽的分离及其抗氧化活性的研究 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(3): 34 - 38.
- [7] Shibata T, Ohta T, Tong KI, et al. Cancer related mutations in Nrf2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy [J]. PNAS, 2009, 105(36): 13568 - 13573.
- [8] Cullinan SB, Gordan J, Jin J, et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24: 8477 - 8486.
- [9] 李航, 张连珊, 刘青娟, 等. 叔丁基对苯二酚对早期糖尿病小鼠肾脏氧化应激损伤影响的实验研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(3): 191 - 192.
- [10] 吴克芬, 胡予. D-半乳糖致衰老动物模型的建立及评价 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2012, 11(1): 74 - 78.
- [11] Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose [J]. Biogerontology, 2003, 4: 15 - 18.
- [12] 楚晋, 李林. D-半乳糖致脑老化动物模型及其机理 [J]. 中国康复理论与实践, 2003, (9): 521 - 522.
- [13] Zhou Y, Dong Y, Xu Q, et al. Mussel oligopeptides ameliorate cognition deficit and attenuate brain senescence in D-galactose-induced aging mice [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 59: 412 - 420.
- [14] 王传鹏, 杨超, 赵俊, 等. 芹菜素对雄性小鼠肝脏 SOD、CAT、GSH-PX 活力影响 [J]. 中国实用医药, 2013, 8(6): 21 - 22.
- [15] Cui Y, Zhang B, Zhang R, et al. Effects of resveratrol on morphology and oxidative stress of brain tissues in aging mice [J]. J Hygiene Res, 2013, 42(6): 995 - 998.
- [16] 武小媛, 曲丽艳, 全康, 等. tBHQ 和 Sulforaphane 对 Caco-2 细胞 Nrf2-ARE 信号通路的影响 [J]. 浙江医学院学报, 2010, 39(1): 17 - 23.

[收稿日期] 2014-06-19

(上接第 59 页)

- [3] Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview [J]. Indian J Med Res, 2007, 125(3): 451 - 472.
- [4] 郑素玲, 陈超, 武炜, 等. 链脲佐菌素诱导小鼠 2 型糖尿病模型的研究 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(7): 60 - 63.
- [5] 闵筱辉, 陈其奎, 于涛, 等. 链脲佐菌素诱导建立长期稳定糖尿病小鼠模型的给药方案研究 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(4): 7 - 10.
- [6] 唐慧青, 陈立新, 梁磊, 等. II 型糖尿病模型 C57BL/KsJ-db/db 小鼠的生物学特性研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(1): 62 - 65.
- [7] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. Pharmacol Res, 2005, 52(4): 313 - 320.
- [8] Bates SH, Kulkarni RN, Seifert M, et al. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis [J]. Cell Metab, 2005, 1(3): 169 - 178.
- [9] Kumar R, Ramachandran U, Srinivasan K, et al. Design, synthesis and evaluation of carbazole derivatives as PPAR alpha/gamma dual agonists and antioxidants [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(13): 4279 - 4290.
- [10] 朱华, 徐艳峰, 刘颖, 等. 恒河猴糖尿病动物模型血清及组织中细胞因子的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3): 35 - 40.
- [11] Erbagci AB, Tarakcioglu M, Coskun Y, et al. Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children [J]. Clin Biochem, 2001, 34: 645 - 650.
- [12] Pradhan AD, Manson JE, Rafai N, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus [J]. JAMA, 2001, 286: 327 - 334.
- [13] 王春田, 王莉, 石岩. 2 型糖尿病动物模型制备方法探讨 [J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(4): 27 - 30.
- [14] 李楠, 孙云峰, 范颖, 等. 两种实验性糖尿病模型血糖血脂的比较研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(6): 1220 - 1222.
- [15] 陆洁, 刘静, 裴天仙, 等. 自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(5): 341 - 345.
- [16] 李娜, 张周. 两种自发性 2 型糖尿病小鼠生物学特性比较 [J]. 第九届中国实验动物科学年会(新疆), 2010, 388 - 396.
- [17] 刘倩, 王清, 张学梅. 两种实验性糖尿病模型小鼠的比较 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(9): 999 - 1003.

[收稿日期] 2014-08-08