

归芪多糖延缓大鼠脑组织衰老的作用机制

张凯丽, 陈博, 田昌义, 张琦, 张九洲, 雷李涛, 蒲秀瑛*

(兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 研究归芪多糖(GQP)延缓大鼠脑组织衰老的作用机制。将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组(Control)、模型组(Model)、GQP 低剂量组(LP)、GQP 中剂量组(MP)、GQP 高剂量组(HP)、阳性药物白藜芦醇组(Res)。采用皮下注射 *D*-半乳糖(*D*-gal)建立大鼠衰老模型,实验组和阳性药物组分别给予 GQP 和 Res 灌胃。测定脑组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)和谷胱甘肽(GSH)活性、丙二醛(MDA)和 ATP 质量摩尔浓度;苏木素-伊红(HE)染色观察脑组织病理学变化;检测线粒体膜电位变化以及线粒体膜肿胀程度;免疫组化法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白质的表达水平。结果发现:*D*-gal 可致大鼠脑组织中 T-SOD、GSH 水平和 ATP 质量摩尔浓度明显降低,MDA 质量摩尔浓度显著升高($P<0.05$);GQP 和 Res 逆转了上述指标($P<0.05$);正常大鼠脑组织未呈现出明显的病理变化,模型大鼠细胞核明显变大、深染,GQP 显著减轻了上述病灶;与正常组相比,模型组线粒体膜电位,ATP 质量摩尔浓度和 Bcl-2 蛋白质表达水平显著降低($P<0.01$),线粒体膜明显肿胀,Bax 表达升高($P<0.01$);GQP 和 Res 明显提高了线粒体膜电位、ATP 质量摩尔浓度及 Bcl-2 的表达($P<0.05$),同时,减弱了线粒体膜的肿胀,降低了 Bax 表达($P<0.05$)。因此,推测 GQP 可能通过减轻机体氧化损伤和改变线粒体功能发挥延缓衰老的作用。

关键词: 归芪多糖;*D*-半乳糖;脑组织;线粒体

中图分类号:R 966 文章编号:1673-1689(2022)02-0051-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.02.007

Study on the Mechanism of Guiqi Polysaccharides Delaying Rat Brain Aging

ZHANG Kaili, CHEN Bo, TIAN Changyi, ZHANG Qi, ZHANG Jiuzhou, LEI Litao, PU Xiuying*

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The mechanism of Guiqi polysaccharides (GQP) in delaying the aging of rat brain tissue was investigated. 60 SD rats were randomly divided into the control group (Control), model group (Model), GQP low-dose group(LP), GQP medium-dose group(MP), GQP high-dose group(HP), and positive drug resveratrol group (Res).The aging model of rats was established by subcutaneous injection of *D*-galactose (*D*-gal). The experimental group and the positive drug group were orally administered GQP and resveratrol, respectively. The activities of total superoxide dismutase(T-SOD) and glutathione(GSH) were determined and the level of malondialdehyde(MDA) and ATP of rat brain tissues were measured. The pathological changes of brain tissue were observed by hematoxylin-eosin

收稿日期: 2020-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860257);甘肃省科技计划项目(20YF8FA060);甘肃省高校中藏药筛选评价及深加工重点实验室开放基金项目(20180808)。

* 通信作者: 蒲秀瑛(1968—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事药理学和毒理学方面的研究。E-mail:xiuypu@163.com

(HE) staining. The change of mitochondrial membrane potential and the degree of swelling of mitochondrial membrane were detected. In addition, the expression levels of Bax and Bcl-2 were tested by immunohistochemical method. The results showed that *D*-gal significantly reduced the levels of T-SOD, GSH and ATP in brain tissues of rats, and significantly increased the content of MDA ($P < 0.05$). However, GQP and Res reversed the above indicators ($P < 0.05$). There were insignificant pathological changes of brain tissue in normal rats, but the nuclei in model group were significantly enlarged and deep-stained, and GQP significantly alleviated the above-mentioned lesions. Compared with the control group, the mitochondrial membrane potential, ATP content and Bcl-2 expression were significantly decreased ($P < 0.01$), while the mitochondrial membrane was significantly swollen and the expression of Bax was increased in model group ($P < 0.01$). Meanwhile, GQP and Res increased the mitochondrial membrane potential, ATP content and Bcl-2 expression ($P < 0.05$), but decreased the swelling of mitochondrial membrane and the expression of Bax ($P < 0.05$). Consequently, it was suggested that GQP might play a role in delaying aging by reducing the oxidative damage and changing the mitochondrial function.

Keywords: guiqi polysaccharide (GQP), *D*-galactose, brain tissue, mitochondria

脑老化是人类机体老化的突出表现之一^[1], 脑组织衰老会发生一系列特征性改变, 包括神经细胞萎缩, 脑细胞数减少, 脂褐素沉积增多, 细胞间突触数量减少等^[2]; 脑衰老与脑梗死、阿尔兹海默症帕金森病等疾病的发生有密切联系。因此, 了解脑衰老的机制及如何延缓脑衰老对预防一些疾病具有重要意义。本研究所用归芪多糖是通过水提醇沉的方法从经典验方“当归补血汤”而来, 其主要原料当归与黄芪是我国传统的药食同源中药, 有悠久的药用历史。研究表明, 归芪多糖可增强抗氧化活性和免疫功能^[3], 通过调控细胞周期来降低 P53 和 P16 蛋白质的表达^[4], 增加 CyclinD1 和 SIRT1 蛋白质的表达^[5]来延缓细胞的衰老。因此, 作者以 *D*-半乳糖诱导建立大鼠衰老模型, 研究归芪多糖延缓大鼠脑组织衰老的机制, 为归芪多糖的进一步开发利用提供理论基础, 使其在食品工业中具有广阔的开发应用前景。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

健康 SD 大鼠 60 只; 购自中国农业科学院兰州兽医研究所, 许可证编号: SYXK(甘)2019-0001, 体质量约 180 g, 雌雄各半, 在 SPF 级别环境适应性饲养一周, 实验操作遵守实验动物伦理委员会规定; GQP: 作者所在实验室从当归 (*Angelica sinensis*) 和

黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 中提取 (当归: 黄芪质量比为 1:5); *D*-gal、白藜芦醇: 购自阿拉丁试剂公司; 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、还原型谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒、ATP 测定试剂盒: 南京建成生物公司研究所提供; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、罗丹明 123: 购自碧云天生物试剂; 兔 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒: 购自中杉金桥。

1.2 仪器

台式电热恒温鼓风干燥箱: 上海精宏设备公司制造; 包埋机: 浙江省金华市科迪仪器制造; 切片机: LEICA2016, 德国制造; 恒温水浴锅: HH-S4, 北京科伟永兴仪器有限公司制造; 酶标仪: INFINITE M PLEX, Tecan 公司制造; 流式细胞仪: AccuriTM C6 Plus, BD 公司制造; 超低温离心机: TGL16E, 长沙英泰仪器有限公司制造。

1.3 动物分组及造模

60 只大鼠随机分为 6 组, 对照组 (Control 组)、模型组 (Model 组)、归芪多糖低剂量组 (LP 组)、归芪多糖中剂量组 (MP 组)、归芪多糖高剂量组 (HP 组)、白藜芦醇组 (Res 组)。除对照组外, 其他组大鼠每日颈背部皮下注射 *D*-半乳糖 (150 mg/kg) (无菌条件下, 用生理盐水配制成 150 mg/mL 的 *D*-半乳糖), 同时 LP 组、MP 组、HP 组和 Res 组每天分别灌胃给予归芪多糖 0.5、1、2 g/kg (用蒸馏水配制 50、

100、200 mg/mL 的溶液)和白藜芦醇100 mg/kg(配制成 10 mg/mL 的溶液);对照组给予等量的生理盐水,连续给药 6 周。

1.4 行为学观察

造模期间观察并记录各组大鼠的体征及行为变化。

1.5 脑组织病理变化观察

治疗结束后,解剖大鼠,取大鼠脑组织,用预冷的生理盐水清洗干净,切取一半用体积分数 10% 甲醛固定,脱水、浸蜡、包埋、切片并进行 HE 染色,在光学显微镜下观察各组大鼠脑组织病理学形态变化。

1.6 脑组织中 T-SOD、MDA、GSH、ATP 的测定

称取脑组织 0.2 g,制成 10% 的组织匀浆,按照 T-SOD、MDA、GSH、ATP 测定试剂盒说明书测定脑组织中 T-SOD、MDA、GSH、ATP 水平。

1.7 脑组织线粒体膜电位测定

线粒体制备:称取漂洗干净的脑组织 0.2 g 于玻璃匀浆器中,加入 9 倍体积预冷的质量分数 0.86% 的生理盐水,将匀浆器放置在盛有冰水混合物的器皿中充分研磨(6~8 min),使组织匀浆化,2 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,4 ℃ 条件下上清液以 9 500 r/min 离心 15 min,沉淀即为线粒体。用 BCA 法测定线粒体蛋白质质量浓度。线粒体用 PBS 洗涤两次,3 000 r/min 离心 10 min,加入 10 mg/L 罗丹明 123 0.5 mL,37 ℃ 避光孵育 30 min,用流式细胞仪检测各组线粒体膜电位变化($E_x=488\text{ nm}$; $E_m=530\text{ nm}$)。

1.8 脑组织线粒体膜肿胀度测定

按照 1.7 中的方法提取脑组织线粒体,配制反

应缓冲液(蔗糖 250 mmol/L,磷酸二氢钾 5 mmol/L,琥珀酸钠 3 mmol/L,氯化钙 0.3 mmol/L,pH7.2),调整线粒体蛋白质质量浓度为 0.5 mg/mL,于 520 nm 处测定 OD 值,记录 0、2、4、6、8、10、20 min 时的 $A_{520\text{ nm}}$ 值,以吸光度的下降值表征线粒体的肿胀程度。

1.8 免疫组化分析 Bcl-2、Bax 的表达

厚度为 10 μm 石蜡切片,脱蜡,水化,用体积分数 3% 的过氧化氢封闭,孵育兔源的抗 Bax 和 Bcl-2 的抗体(1:100),滴加羊抗兔 IgG,DAB 显色,显微镜下观察,显示为棕黄色时终止反应,酒精梯度脱水,中性树胶封片,显微镜下观察拍照。

1.9 统计学方法

统计分析采用 Graph Pad Prism 5.0 进行方差分析,所有数据以“平均值 \pm 标准差”表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 行为学变化

对照中大鼠行动敏捷,毛色光亮,精神状态良好,模型组大鼠,行动变迟缓,背部毛发变黄,变粗,掉毛,嗜睡,精神状态较差。各 GQP 组和 Res 组大鼠较模型组活动多,毛发脱落较少,精神状态佳。

2.2 脑组织病理学变化

HE 染色结果见图 1。对照组大鼠脑组织形态结构清晰,神经元细胞排列较整齐,密集;模型组大鼠海马区轮廓模糊,神经元细胞密度降低,排列稀疏,细胞间质变大;GQP 组和 Res 组大鼠上述病理变化均有一定程度的改善。

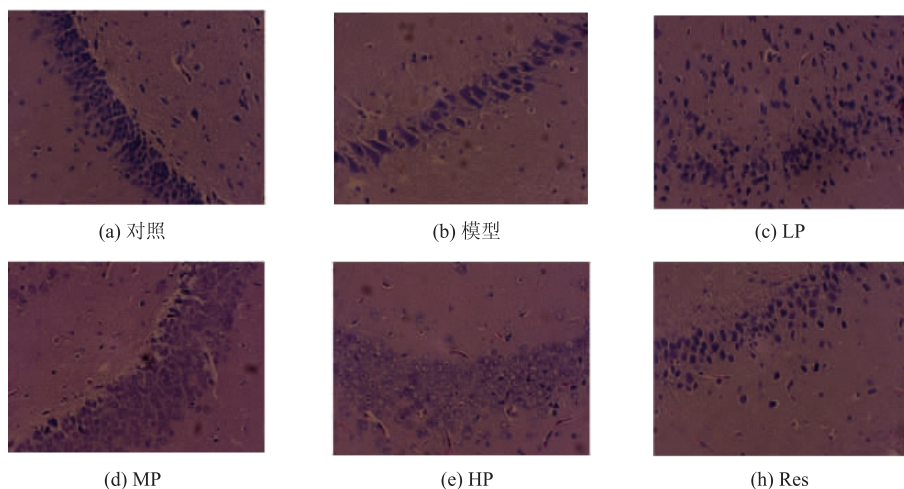


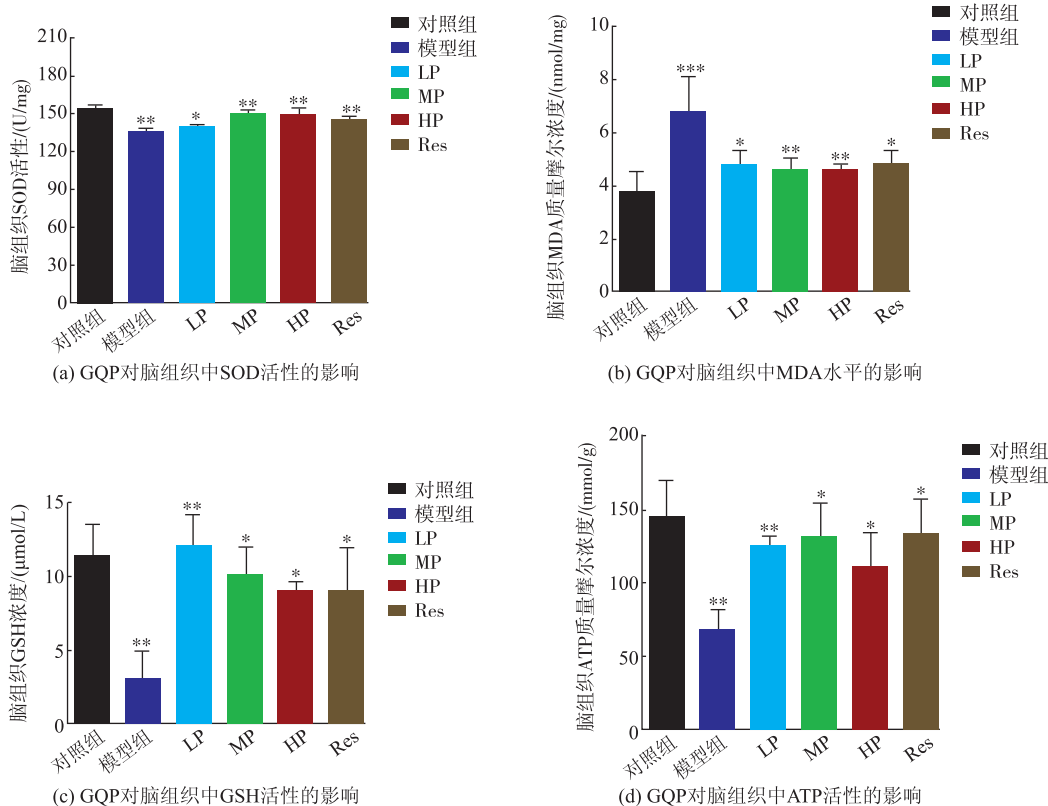
图 1 各组大鼠脑组织 HE 染色

Fig. 1 HE staining of rat brain tissues in each group

2.3 脑组织中 T-SOD、MDA、GSH、ATP 水平

各组大鼠脑组织中 T-SOD、MDA、GSH、ATP 比较结果显示,模型组中 T-SOD、GSH、ATP 水平较正常组有所降低,MDA 质量摩尔浓度升高,差异有统

计学意义 ($P<0.01$); 与模型组相比,各 GQP 组和 Res 组中 T-SOD、GSH、ATP 水平升高,MDA 质量摩尔浓度降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$),结果见图 2。



与 Model 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Control 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 GQP 影响衰老大鼠脑组织中的 SOD、MDA、GSH 活性以及 ATP 水平

Fig. 2 Activities of SOD, MDA, GSH and ATP levels in the brain tissue of aging rats affected by GQP

2.4 脑组织线粒体膜电位变化

线粒体膜电位测定结果见图 3~4。对照组中荧光强度较弱,线粒体膜电位较高,模型组中荧光显著增强(Rhl123⁺增加),线粒体膜电位去极化程度增强,线粒体膜电位降低,差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 而各 GQP 组和 Res 组,荧光强度降低,线粒体膜电位显著升高 ($P<0.05$)。

2.5 脑组织线粒体膜肿胀度变化

对照组中 $A_{520\text{nm}}$ 降低较慢,模型组中吸光度下降快。与对照组相比,模型组大鼠脑组织线粒体膜的肿胀度显著增加 ($P<0.01$); 与模型组相比,GQP 组和 Res 组线粒体膜的肿胀度降低 ($P<0.01$),见图 5。

2.6 Bcl-2 和 Bax 的表达

免疫组化结果显示,Bcl-2 和 Bax 蛋白质阳性信号显示为棕黄色,对照组中可见大量的 Bcl-2 阳

性细胞,模型组中有少量的 Bcl-2 阳性细胞,Bcl-2 的表达显著降低 ($P<0.01$); 而 GQP 组和 Res 组中 Bcl-2 阳性细胞较模型组中多,Bcl-2 蛋白质的表达增加 ($P<0.05$)。对照组中 Bax 阳性细胞数量较少,模型组中 Bax 阳性细胞显著增加,Bax 的表达显著增加 ($P<0.01$); 但是,GQP 组和 Res 组中可见少量的 Bax 阳性细胞,Bax 蛋白质的表达显著降低 ($P<0.05$),见图 6~7。

3 结语

衰老是引起许多非传染性急病、慢性疾病的因素之一,主要包括充血性心力衰竭、老年痴呆、心脑血管疾病、糖尿病和癌症等。如何延缓衰老、提高人类健康是当今研究的热点之一,也是整个生命科学研究面临的挑战。研究报道,内源性抗氧化酶 SOD、

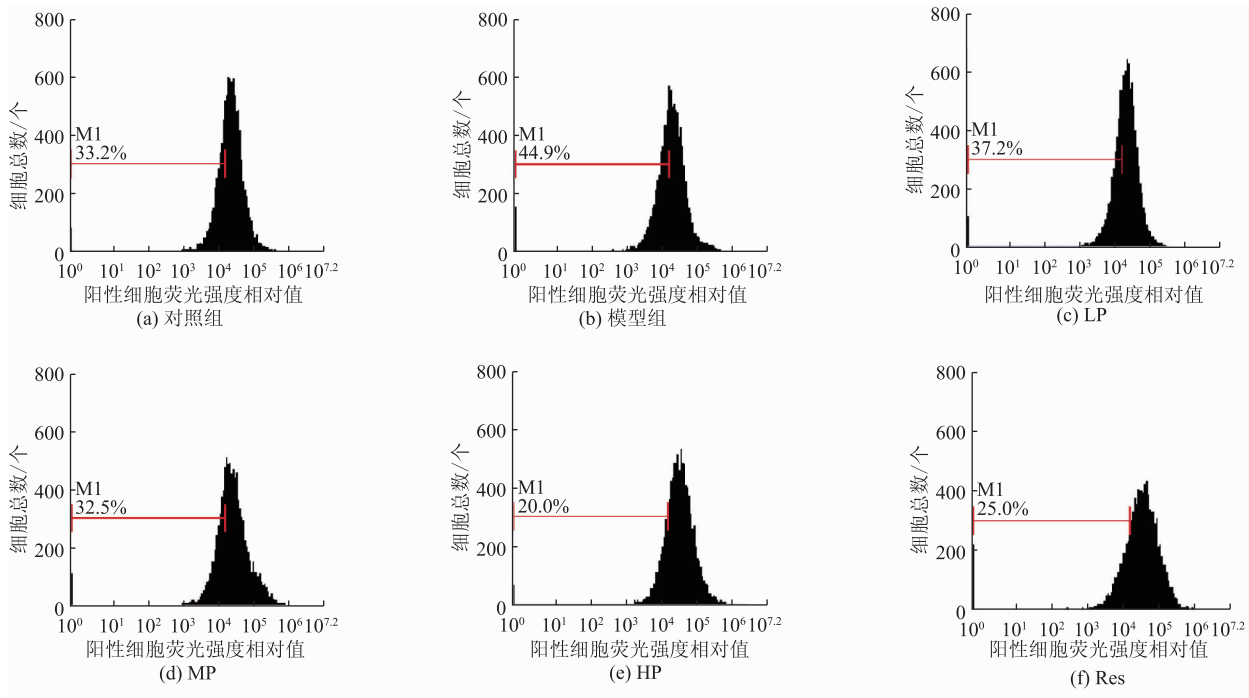


图3 线粒体膜电位测定结果

Fig. 3 Mitochondrial membrane potential measurement results

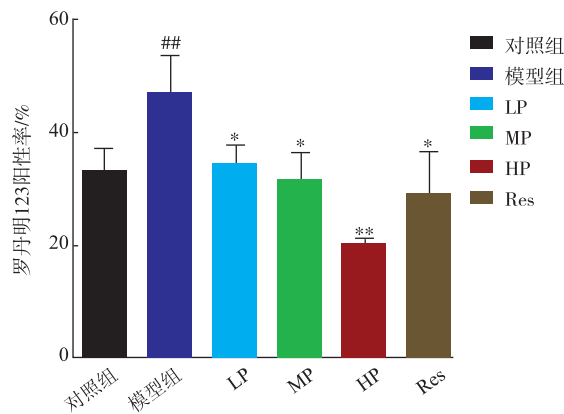


图4 线粒体膜电位

Fig. 4 Mitochondrial membrane potential

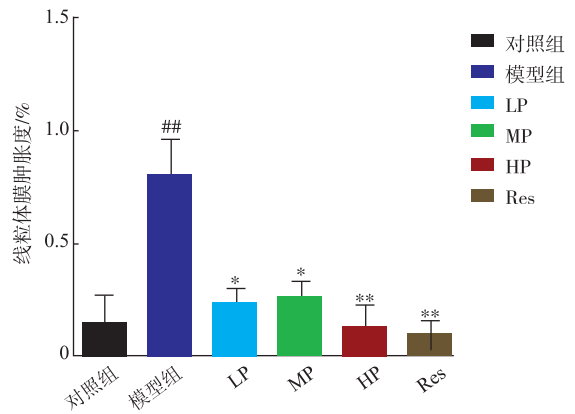


图5 线粒体肿胀度

Fig. 5 Mitochondrial swelling

MDA、GSH 等是组织氧化应激的指示剂, 决定了机体抗氧化损伤的能力^[6]。SOD 是机体内存在的超氧自由基清除因子, 能够减轻氧自由基对机体的损害, 从而延缓衰老^[7]; MDA 是生物体内自由基作用于脂质发生过氧化反应的主要降解产物, 可以反映机体过氧化的程度; GSH 具有清除自由基、抗氧化、抗衰老等生物功能。本研究结果显示, GQP 提高了大鼠脑组织中 SOD 和 GSH 水平, 降低了 MDA 的质量摩尔浓度, 表明 GQP 可能通过提高机体的抗氧化能力来降低自由基对机体的损害, 从而发挥其延缓衰老

的作用。

ATP 又称为三磷酸腺苷, 作为细胞内能量传递的“能量通货”, 用来储存和传递化学能, 为细胞各项生命活动的供应能量。因此 ATP 的含量可用于衡量细胞代谢相关的生命活动, 是衡量细胞衰老的最重要指标之一^[8]。线粒体是细胞内氧化磷酸化和合成三磷酸腺苷(ATP)的主要场所, 为细胞的活动提供了能量, 细胞生命活动所需的能量 95% 来自线粒体, 所以称之为“细胞动力工厂”。有研究表明, 衰老细胞中的形态与功能发生明显的变化, 主要表现为

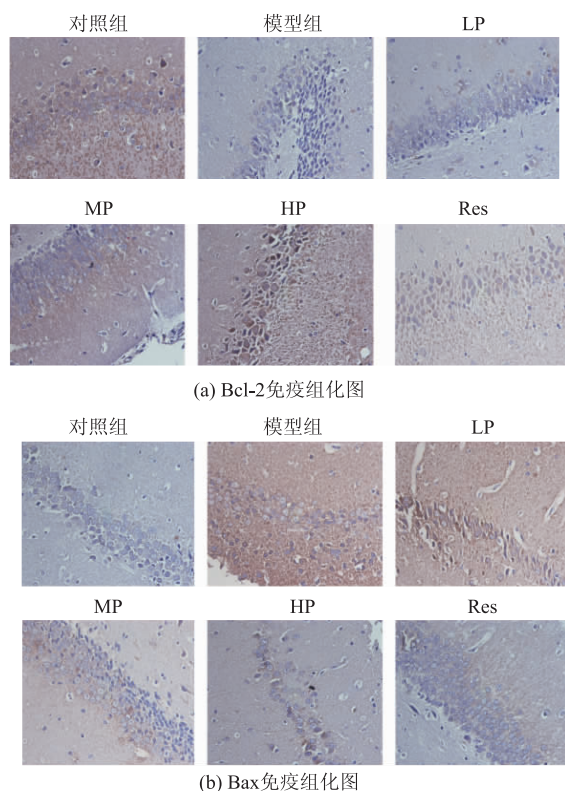


图6 Bcl-2免疫组化图和Bax免疫组化图

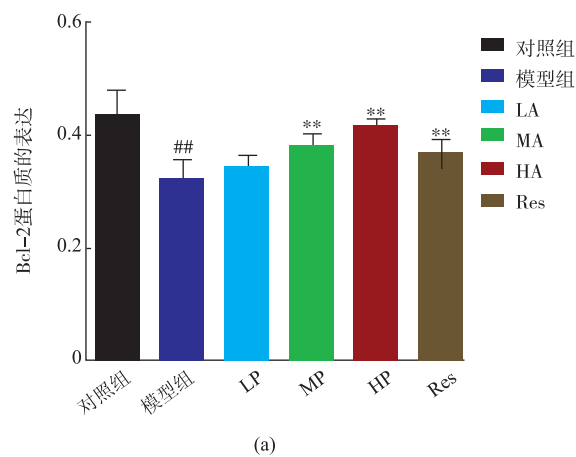
Fig. 6 Immunohistochemistry of Bcl-2 and Bax

线粒体膜肿胀程度增加,跨膜电位降低^[9-10]。据报道,白藜芦醇可通过保护线粒体功能来延缓MSC的衰老^[11]。线粒体膜电位的降低可以使线粒体能量产生障碍,能量代谢障碍是内皮细胞衰老的机制之一^[12]。本研究结果显示,GQP升高了大鼠脑组织中ATP质量摩尔浓度,同时GQP提高了脑组织线粒体膜电位变化,降低了线粒体膜肿胀程度。罗阿苗^[5]等的研究也表明,GQP通过改善线粒体结构功能从而延缓细胞衰老,与本研究结果一致。

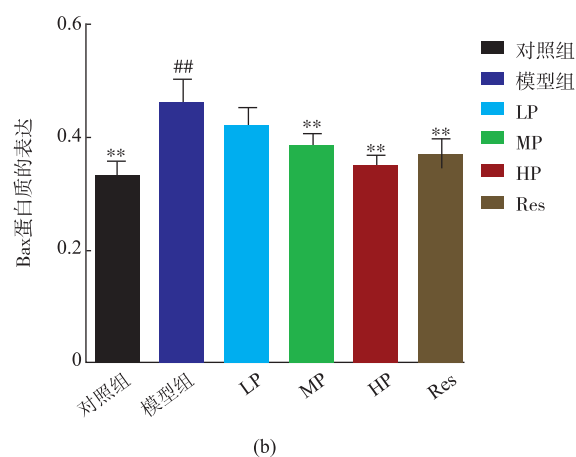
Bcl-2家族中有的可以抑制凋亡(Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w等),有的可以促进细胞凋亡(Bax、Bak、Noxa等)。B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)基因是公认的长寿基因之一,大多位于线粒体外膜上,具有明显抑制细胞凋亡的作用。当Bcl-2的表达增强时,细胞的存活期则延长,抑制细胞凋亡。Bax基因是最主要的凋亡基因之一,编码的Bax蛋白质可与Bcl-2形成异二

参考文献:

- [1] 金贺,赵志炜,王玉兰,等. 追赶生长饮食诱导小鼠代谢综合征并发脑衰老样病变模型的建立[J]. 中国实验动物学报,2018,26(6):681-687.



(a)



(b)

图7 Bcl-2和Bax的表达结果

Fig. 7 Expression results of Bcl-2 and Bax

聚体,对Bcl-2产生阻抑作用。研究表明,P53的过表达可以激活下游靶蛋白Bax的表达,抑制Bcl-2的表达,从而导致细胞凋亡^[13-14]。过度表达的Bcl-2能抑制线粒体通透性改变,并影响巨孔的形成,从而抑制凋亡。本研究的结果表明,GQP增加脑组织中Bcl-2蛋白质的表达,减少Bax蛋白质的表达。上调Bcl-2/Bax比值,可使线粒体膜电位降低,减弱了线粒体膜的肿胀,从而改善细胞衰老,这与林文毅等^[15]的研究结果一致。

综上所述,GQP可能通过减轻脑组织的氧化损伤来改变其线粒体的功能,调节Bcl-2和Bax蛋白质的表达,从而发挥延缓衰老的作用,此研究结果为GQP的进一步应用提供科学依据。

- [2] MARIONA J, MANUEL P O, ALBA N, et al. Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases[J]. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 2014, 73(7): 640-657.
- [3] 蒲秀瑛, 李言, 张伟杰, 等. 归芪多糖延缓衰老作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1630-1633.
- [4] 蒲秀瑛, 于双, 樊文博, 等. 归芪多糖对衰老细胞周期及 p53、p16 蛋白的影响[J]. 中医药学报, 2015, 43(4): 36-39.
- [5] 罗阿苗, 蒲秀瑛, 张凯丽, 等. 归芪多糖延缓细胞衰老的分子作用机制[J]. 西北农业学报, 2020, 29(10): 1583-1592.
- [6] KUMARIN K, PANIGRAHI M, PRAKASH B P. Changes in endogenous antioxidant enzymes during cerebral ischemia and reperfusion[J]. **Neurological Research**, 2007, 29(8): 877-883.
- [7] KERASIOTI E, STAGOS D, TZIMI A, et al. Increase in antioxidant activity by sheep/goat whey protein through nuclear factor-like 2 (Nrf2) is cell type dependent[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2016, 97: 47-56.
- [8] 刘海云, 纪玉龙, 何志坚. 菟丝子提取物对自然衰老小鼠学习记忆能力及肝和脑组织 ATP 酶活力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(23): 5794-5796.
- [9] HAO Z Z, LIU S S, WU Y Y, et al. Abnormal changes in mitochondria, lipid droplets, ATP and glutathione content, and Ca²⁺ release after electro-activation contribute to poor developmental competence of porcine oocyte during in vitro ageing [J]. **Reproduction Fertility Development**, 2009, 21(2): 323-332.
- [10] MIQUEL J, 赵增翰. 线粒体在细胞衰老中的作用[J]. 国外医学(老年医学分册), 1982(3): 19-23.
- [11] 张大勇, 林九洲, 王雅艳, 等. 白藜芦醇通过保护线粒体功能延缓骨髓间充质干细胞衰老[J]. 浙江大学学报(医学版), 2019, 48(6): 617-624.
- [12] 杨彬, 赵海梅, 成蓓. 血管内皮细胞在传代中的衰老与线粒体膜电位的变化[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2006, 8(6): 412-415.
- [13] 赵学发, 杨名慧, 葛正龙. 紫外线照射对 SD 大鼠晶状体上皮细胞 p53、Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 眼科新进展, 2017, 37(5): 423-427.
- [14] KIM S T, KOH J W. Mechanisms of apoptosis on human lens epithelium after ultraviolet light exposure[J]. **Korean Journal of Ophthalmology**, 2011, 25(3): 196-201.
- [15] 林文弢, 王震, 翁锡全, 等. 抗阻训练对衰老大鼠线粒体介导腓肠肌细胞凋亡通路相关因子表达影响的研究[J]. 中国运动医学杂志, 2014, 33(10): 994-997.

科 技 信 息

美国制订测定食品中亚硫酸盐质量分数的新分析方法

2022 年 1 月 14 日, 美国联邦公报消息, 美国食药局(FDA)发布 2022-00816 号公告, 制订用于确定食品中亚硫酸盐质量分数的分析方法, 能够快速检测食品中亚硫酸盐。主要内容包括:

1) 使用液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)方法替代美国分析化学家协会(AOAC)官方检测方法测定食品中的亚硫酸盐质量分数, 检测限为 10 mg/kg。液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)一次能够同时检测 30 个样品;

2) 修订美国联邦法规 21CFR 第 101 部分食品标签内容为: 可以使用液相色谱串联质谱法测定食品中亚硫酸盐(二氧化硫、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、焦亚硫酸钠和焦亚硫酸钾等)的质量分数, 检测限为 10 mg/kg;

3) 修订 21CFR 第 130 部分食品标准中关于亚硫酸盐的内容为: 食品中亚硫酸盐质量分数超过 10 mg/kg 时, 须在食品标签中标识所含亚硫酸盐品种; 食品中亚硫酸盐的质量分数可以使用以下两种方法: 液相色谱串联质谱法和美国分析化学家协会(AOAC)方法。

该公告将在 2022 年 1 月 18 日的联邦公报上正式发布 30 日后生效。

[信息来源] 厦门 WTO/TBT-SPS 通报咨询工作站. 美国制订测定食品中亚硫酸盐浓度的新分析方法[EB/OL]. (2022-1-20). <http://swj.xm.gov.cn/xmtbt-sps/show.asp?id=66246>