

临床与基础 桥接研究

Clinical and Basic
Bridging Research

当归多糖对 D - 半乳糖致衰老模型小鼠的影响 Effect of angelica sinensis polysaccharide on D - galactose - induced aging model mice

武 铮^{1a}, 程木子^{2a}, 安士恩^{2b},
杨聚岭^{2c}, 李利萍^{2a}, 林 旭^{1b}

(1. 河北北方学院, a. 研究生院; b. 基础医学院, 河北 张家口 075000; 2. 邯郸市第一医院, a. 内分泌科; b. 神经外科; c. 健康管理医疗技术研究中心, 河北 邯郸 056001)

WU Zheng^{1a}, CHENG Mu - zi^{2a},
AN Shi - en^{2b}, YANG Ju - ling^{2c},
LI Li - ping^{2a}, LIN Xu^{1b}

(1. a. Graduate School; b. Basic Medical, College Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China; 2. a. Department of Endocrinology; b. Department of Neurosurgery; c. Health Management Medical Technology Research Center, Handan First Hospital, Handan 056001, Hebei Province, China)

收稿日期: 2021 - 04 - 06

定稿日期: 2021 - 05 - 05

作者简介: 武铮 (1992 -), 男, 医师, 主要从事老年医学方向的研究

通信作者: 程木子, 主治医师

MP: 15630033315

E - mail: 429269139@qq.com

摘要:目的 探究当归多糖 (ASP) 通过调节 c - Jun 氨基末端激酶 (JNK)/转录因子 NF - E2 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) (JNK/Nrf2/ARE) 信号通路对 D - 半乳糖致衰老模型小鼠的影响。方法 用皮下注射 D - 半乳糖溶液 125 mg · kg⁻¹, 每日 1 次, 连续 6 周, 建立小鼠衰老模型; ICR 小鼠 120 只, 随机分为对照组、模型组及低、高剂量实验组, 各 30 只。造模成功后, 低、高剂量实验组小鼠分别每日腹腔注射 100, 200 mg · kg⁻¹ ASP, 对照组与模型组注射等量生理盐水, 连续干预 4 周。用试剂盒测定脑组织总抗氧化能力 (T - AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH - Px) 活性及丙二醛 (MDA) 含量; 用蛋白质免疫印迹法检测脑组织中 JNK、Nrf2 和 ARE 蛋白表达水平; 用免疫组织化学法检测脑组织衰老相关 β - 半乳糖苷酶 (SA - β - Gal) 表达情况。结果 对照组、模型组、低、高剂量实验组小鼠脑组织 T - AOC 活性分别为 (4.95 ± 0.38), (0.69 ± 0.71), (2.98 ± 0.17), (3.76 ± 0.21) U · mg⁻¹; SOD 活性分别为 (84.21 ± 2.62), (49.33 ± 2.15), (60.76 ± 2.42), (71.23 ± 2.51) U · mg⁻¹; GSH - Px 活性分别为 (45.56 ± 2.84), (16.23 ± 2.92), (25.97 ± 1.31), (34.43 ± 2.11) U · mg⁻¹; MDA 含量分别为 (3.54 ± 1.02), (9.21 ± 2.83), (6.13 ± 2.60), (4.86 ± 1.25) nmol · mg⁻¹; 脑组织 JNK 蛋白相对表达量分别为 0.95 ± 0.05, 0.23 ± 0.06, 0.41 ± 0.11, 0.68 ± 0.12; Nrf2 蛋白相对表达量分别为 0.92 ± 0.07, 0.09 ± 0.05, 0.32 ± 0.07, 0.70 ± 0.11; ARE 蛋白相对表达量分别为 0.90 ± 0.06, 0.13 ± 0.07, 0.30 ± 0.08, 0.62 ± 0.09。低、高剂量实验组分别与模型组比较, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05)。结论 ASP 可通过抑制氧化应激损伤, 同时下调 SA - β - Gal 表达, 发挥抗衰老作用, 其作用机制可能与激活 JNK/Nrf2/ARE 抗氧化信号通路的信号转导有关。

关键词: 衰老小鼠; 当归多糖; D - 半乳糖; c - Jun 氨基末端激酶; 转录因子 NF - E2 相关因子 2; 抗氧化反应元件

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2021.12.027

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1001 - 6821 (2021) 12 - 1577 - 04

Abstract: Objective To explore the effect of Angelica polysaccharide (ASP) on D - galactose - induced aging model mice by regulating c - Jun N - terminal kinase (JNK)/transcription factor NF - E2 related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway.

Methods The aging model of mice was established by subcutaneous injection of D - galactose 125 mg · kg⁻¹ once daily for 6 weeks. A total of 120 ICR mice were randomly assigned to control group (n = 30), model group (n = 30), exp - L group (n = 30) and exp - H group (n = 30). After successful modeling, mice in exp - L group and exp - H group were intraperitoneally injected with 100 mg kg⁻¹ ASP and 200

mg · kg⁻¹ ASP once daily, respectively, while mice in control group and model group were injected with the same amount of normal saline for 4 weeks. The activities of total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) content in brain tissue were detected by ELISA; the expression levels of JNK, Nrf2 and are protein in brain tissue were detected by Western blot; the expression of aging related β -galactosidase (SA- β -Gal) in brain tissue was detected by immunohistochemistry.

Results In the control group, model group, exp-L group and exp-H group, the activities of T-AOC were (4.95 ± 0.38), (0.69 ± 0.71), (2.98 ± 0.17), (3.76 ± 0.21) U · mg⁻¹; the activities of SOD were (84.21 ± 2.62), (49.33 ± 2.15), (60.76 ± 2.42), (71.23 ± 2.51) Umg⁻¹; the activities of GSH-Px were (45.56 ± 2.84), (16.23 ± 2.92), (25.97 ± 1.31), (34.43 ± 2.11) U · mg⁻¹; the level of MDA were (3.54 ± 1.02), (9.21 ± 2.83), (6.13 ± 2.60), (4.86 ± 1.25) nmol · mg⁻¹; the relative expressions of JNK protein were 0.95 ± 0.05, 0.23 ± 0.06, 0.41 ± 0.11, 0.68 ± 0.12; the relative expressions of Nrf2 protein were 0.92 ± 0.07, 0.09 ± 0.05, 0.32 ± 0.07, 0.70 ± 0.11; the relative expressions of are protein were 0.90 ± 0.06, 0.13 ± 0.07, 0.30 ± 0.08, 0.62 ± 0.09. There were statistically significant differences between the exp-L/-H group and the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** ASP can inhibit oxidative stress injury, down regulate the expression of SA- β -Gal, and play an anti-aging role. Its mechanism may be related to the activation of JNK/Nrf2/signal transduction pathway.

Key words: aging mice; Angelica polysaccharide; D-galactose; c-jun N-terminal kinase; transcription factor NF-E2 related factor 2; antioxidant response element

当归是中医临床“补气活血”要药,当归多糖(Angelica sinensis polysaccharide, ASP)是其主要药效成分,具有提高免疫、抗氧化、抗衰老等作用。ASP可拮抗D-半乳糖从而减轻对胰腺的损伤^[1-2]。本研究旨在探究ASP对D-半乳糖致衰老模型小鼠的影响。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级、雄性ICR小鼠,4周龄,体重18~22 g,购自河北北方学院(药理学系),动物许可证号:SYXK(冀)2019-004。

药品与试剂 当归多糖 ASP,纯度>95%,规格:每瓶30 mg,批号:CY130421,陕西慈缘生物技术有限公司生产;D-半乳糖,纯度:98%,规格:每瓶30 mg,批号:F20110615,国药集团化学试剂有限公司生产;总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒,北京博奥森生物技术有限公司生产;兔抗鼠衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)抗体,英国Abcam公司生产;兔抗鼠c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、转录因子NF-E2相关因子2(transcription factor NF-E2 related factor 2, Nrf2)、抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)抗体,美国Santa

Cruz公司生产。

仪器 CX21 光学显微镜,日本Olympus公司产品;DNM-9602G酶标分析仪,上海京工实业有限公司产品。

2 实验方法

2.1 模型建立^[3]

小鼠颈部皮下注射D-半乳糖125 mg · kg⁻¹,每日1次,连续注射6周,建立衰老小鼠模型。第6周末,若小鼠出现毛色枯黄、行动迟缓、精神萎靡等现象,判为造模成功。

2.2 分组与给药方法

120只ICR小鼠随机分为对照组、模型组及低、高剂量实验组,各30只。除对照组外,其余3组小鼠均进行造模处理。造模成功后,低、高剂量实验组小鼠分别每日腹腔注射100、200 mg · kg⁻¹ ASP,对照组与模型组注射等量生理盐水,连续干预4周。

2.3 主要观察指标

2.3.1 用试剂盒测定脑组织抗氧化活性^[4]

末次干预结束后,脱颈椎处死小鼠,取脑组织,制备10%组织匀浆,4℃条件下,以3000 r · min⁻¹离心15 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定脑组织中T-AOC、SOD、GSH-Px活性与MDA含量。

2.3.2 用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察脑组织病理学形态^[5]

脑组织采集同“2.3.1”,4%多聚甲醛固定,经常

规乙醇脱水、包埋、切片后,行常规 HE 染色,中性树脂胶封固,光学显微镜下观察脑组织病理变化。

2.3.3 用蛋白质印迹法检测小鼠脑组织 JNK、Nrf2 和 ARE 蛋白表达^[6]

脑组织采集与组织匀浆制备同“2.3.1”,以 $1.2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清液,BCA 法测定蛋白定量。取蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、封闭,加入一抗 4°C 孵育过夜,加入二抗。使用 Quantity One 软件分析结果,目的蛋白的相对表达量以目的蛋白与内参 β -actin 的灰度值比值表示。

2.4 次要观察指标

2.4.1 用免疫组织化学法检测各组小鼠脑组织 SA- β -Gal 蛋白表达^[7]

取脑组织石蜡切片,常规脱蜡至水,高温高压修复、滴加过氧化酶阻断剂孵育 10 min,滴加一抗 (SA- β -Gal, 1:2000), 4°C 过夜,次日滴加二抗生物素标记的 IgG 孵育 10 min, DAB 显色,苏木素复染。采用 Image pro plus 6.0 软件分析结果,细胞质出现棕黄色颗粒,则视其为阳性细胞,每张切片取 3 个视野对阳性细胞进行计数,阳性细胞百分比 = 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

3 统计学处理

用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,数据符合正态分布时,2 组间比较采用 Dunnett- t 检验,数据不符合正态分布时,采用秩和检验。

表 1 各组小鼠脑组织抗氧化能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of antioxidant capacity of brain tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	<i>n</i>	T-AOC ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	SOD ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	MDA ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Control	—	30	4.95 ± 0.38	84.21 ± 2.62	45.56 ± 2.84	3.54 ± 1.02
Model	—	30	$0.69 \pm 0.71^*$	$49.33 \pm 2.15^*$	$16.23 \pm 2.92^*$	$9.21 \pm 2.83^*$
Exp-L	100	30	$2.98 \pm 0.17^{* \#}$	$60.76 \pm 2.42^{* \#}$	$25.97 \pm 1.31^{* \#}$	$6.13 \pm 2.60^{* \#}$
Exp-H	200	30	$3.76 \pm 0.21^{* \# \oplus}$	$71.23 \pm 2.51^{* \# \oplus}$	$34.43 \pm 2.11^{* \# \oplus}$	$4.86 \pm 1.25^{* \# \oplus}$

Control group: Normal saline; Model group: Normal saline for 4 weeks; Exp-L/-H group: 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ASP; Compared with control group,

* $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with Exp-L group, @ $P < 0.05$

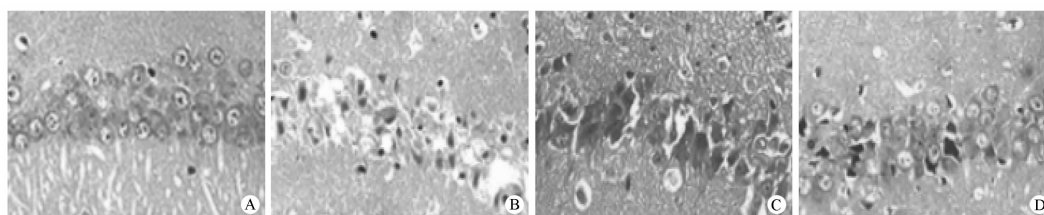


图 1 光学显微镜下观察脑组织 HE 染色 ($\times 400$)

Figure 1 Observation of brain tissues HE staining under the optical microscope ($\times 400$)

A: Control group; B: Model group; C, D: Exp-L/-H groups

结 果

1 各组小鼠脑组织抗氧化能力比较

与对照组相比,模型组小鼠脑组织 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著升高;与模型组相比,低、高剂量实验组小鼠脑组织 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性显著升高,MDA 含量显著降低,且呈剂量依赖性,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见表 1。

2 各组小鼠脑组织病理学变化

对照组小鼠脑组织结构正常,细胞形态正常且排列整齐;模型组小鼠海马细胞排列紊乱,且部分神经元出现细胞固缩、深染甚至空泡化等凋亡现象;而低、高剂量实验组小鼠脑组织病理变化明显改善,神经元形态逐渐恢复正常,且高剂量实验组病理改善优于低剂量实验组。见图 1。

3 各组小鼠脑组织 JNK、Nrf2 和 ARE 蛋白表达

对照组、模型组及低、高剂量实验组小鼠脑组织 JNK 蛋白相对表达量分别为 0.95 ± 0.05 , 0.23 ± 0.06 , 0.41 ± 0.11 , 0.68 ± 0.12 ; Nrf2 蛋白相对表达量分别为 0.92 ± 0.07 , 0.09 ± 0.05 , 0.32 ± 0.07 , 0.70 ± 0.11 ; ARE 蛋白相对表达量分别为 0.90 ± 0.06 , 0.13 ± 0.07 , 0.30 ± 0.08 , 0.62 ± 0.09 。对照组与低、高剂量实验组与模型组比较,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图 2。

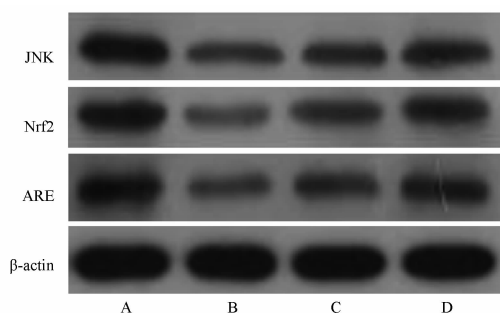


图2 各组小鼠脑组织 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)、抗氧化反应元件(ARE)蛋白表达

Figure 2 Expression of c-Jun N-terminal kinase (JNK), transcription factor NF-E2 related factor 2 (Nrf2) and antioxidant response element (ARE) protein in brain tissues of each group mice

A, B, C, D, refer to Figure 1

4 各组小鼠脑组织 SA-β-Gal 蛋白表达

对照组、模型组及低、高剂量实验组小鼠脑组织 SA-β-Gal 蛋白阳性细胞百分比分别为 $(14.32 \pm 5.11\%)$, $(76.28 \pm 3.56\%)$, $(48.72 \pm 5.42\%)$, $(31.46 \pm 4.83\%)$ 。对照组与低、高剂量实验组与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

ASP 能延缓或拮抗 D-半乳糖致大鼠骨髓造血细胞衰老,其机制可能与 ASP 抑制氧化应激有关。SA-β-Gal 是经典的细胞衰老的生物学标志物,随衰老进程的发展,其表达量可逐步升高。此外衰老受分子信号通路和转录因子精密调控,JNK 蛋白是机体重要的氧化应激蛋白,可识别抗氧化调控因子 Nrf2 并激活 Nrf2/ARE 信号通路而发挥抗氧化和抗衰老的分

子机制。研究^[8-9]显示,羊栖菜多糖可显著提高老年小鼠 JNK1-β2 和 Nrf2/ARE 信号通路的表达水平,进而提高机体的抗氧化能力,延缓小鼠的衰老进程。

本研究发现,ASP 可显著拮抗 D-半乳糖致衰老模型小鼠的衰老进程。其机制可能是通过下调 SA-β-Gal 表达,同时上调 JNK, Nrf2, ARE 蛋白表达,激活 JNK/Nrf2/ARE 抗氧化信号通路,从而抑制氧化应激损伤,发挥抗衰老的作用。

参考文献:

- [1] 万静枝,袁丁,王婷. 竹节参皂苷对 D-半乳糖致 SH-SY5Y 神经细胞损伤的保护作用研究[J]. 贵州医药, 2018, 42(4): 387-389.
- [2] 董照瀛,黄杰,许梦雄,等. 当归多糖对 D-半乳糖致小鼠胰腺损伤的保护作用[J]. 解剖学报, 2018, 49(6): 740-744.
- [3] 赵芷含,庞博,高慧. 五味子及其不同炮制品对 D-半乳糖诱导衰老小鼠的影响[J]. 中成药, 2021, 43(3): 769-773.
- [4] 郭静,李斌,王智超,等. 远志散对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆及氧化应激水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2144-2147, 2314.
- [5] 罗雅琪. 姜黄素类化合物改善 D-gal 联合三氯化铝所致小鼠大脑 β 淀粉样蛋白沉积的机理研究[D]. 四川 泸州: 西南医科大学, 2018.
- [6] ALI T, BADSHAH H, KIM T H, *et al.* Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF-κB/JNK signaling pathway in aging mouse model[J]. *J Pineal Res*, 2015, 58(1): 71-85.
- [7] 朱正威,唐成林,李小宏,等. 电针对衰老性肌萎缩小鼠腓肠肌中促血管生成和蛋白转运相关因子的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(12): 973-979.
- [8] 赵子慧. 羊栖菜多糖 SFPS 激活 JNK/NRF2/ARE 信号通路并发挥抗氧化和抗衰老作用[D]. 浙江 温州: 温州大学, 2018.
- [9] 赵志敏,黄恺,沈丽,等. 欧当归内酯 A 对实验性纤维化肝脏 NO 及内皮细胞功能的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(19): 2850-2856.

(本文编辑 谢菁菁)