

玉米幼芽提取物对衰老小鼠心肌自由基代谢和超微结构的影响

杨 戈, 欧阳五庆, 杨光敏, 刘玉梅, 茹 琴, 张 黎, 孙红武

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 小鼠颈背部皮下注射D-半乳糖生理盐水溶液(125 mg/(kg·d))诱导其衰老,同时分别灌胃10, 20和40 mg/(kg·d)玉米幼芽提取物(Extract of maize plumule, EMP),每日1次,连续处理42 d后,测定心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)的含量,并用透射电镜观察心肌细胞超微结构,研究EMP对D-半乳糖致衰老小鼠心肌自由基代谢和超微结构的影响。结果表明,与对照组相比,D-半乳糖能明显的降低小鼠心肌组织中的SOD、CAT和GSH-Px活性,提高MDA、NO含量;与衰老模型组比较,20 mg/kg EMP处理组小鼠心肌组织的SOD、CAT和GSH-Px活性均极显著升高,MDA和NO含量均极显著降低;与对照组相比,衰老模型组小鼠的心肌Z线变宽、模糊,肌原纤维断裂、溶解、凝集,线粒体肿胀、空泡化、嵴消失;20 mg/kg EMP处理组的以上病变均有明显的改善。这表明20 mg/kg的EMP具有增强衰老小鼠心肌抗氧化酶活性,改善心肌自由基代谢,保护心肌细胞超微结构的作用。

[关键词] 玉米幼芽提取物;D-半乳糖;抗氧化酶;自由基代谢

[中图分类号] S852.16+6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0023-04

Effect of extract of maize plumule on free radical metabolism and ultrastructure of myocardium in aging mice

YANG Ge, OU YANG Wu-qing, YANG Guang-min, LIU Yu-mei, RU Qin, ZHANG Li, SUN Hong-wu

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Effect of extract of maize plumule (EMP) on free radical metabolism and ultrastructure of myocardium in aging mice induced by D-galactose was investigated. Physiological saline solution of D-galactose was applied in subcutaneous injection on the back of neck 125 mg/kg per day, once daily continuously for 42 days to induce the aging model. At the same time, EMP (10, 20 and 40 mg/kg) was given by gastric perfusion once daily continuously for 42 days too to study the activity of superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO). Meanwhile, the ultrastructure of myocardium was observed under transmission electron microscope. The data show that D-galactose caused a significant decrease in the SOD, CAT and GSH-Px activity and increase in MDA and NO content versus control group. Compared with model group, mice treated with both D-galactose and EMP (20 mg/kg) obviously had a higher SOD, CAT and GSH-Px activity and lower MDA and NO content. Under transmission electron microscope, these pathological changes were observed in aging model group: Z-line broadening and illegibility; Myofibril fragmentation, dissolution, agglutination; Mitochondrion swelling, vacuolization, cristae vanishing. These

· [收稿日期] 2006-08-25

[基金项目] 西北农林科技大学校长专项基金项目(130709)

[作者简介] 杨 戈(1981-),男,陕西户县人,在读硕士,主要从事药物开发研究。

[通讯作者] 欧阳五庆(1960-),男,陕西凤翔人,教授,博士生导师,主要从事生物工程制药和细胞生物学研究。

pathological changes were significantly improved by EMP at a concentration of 20 mg/kg. The result indicates that 20 mg/kg EMP can increase the activity of anti-oxidation enzyme, improve free radical metabolism and protect ultrastructure of myocardium from oxidative stress in aging mice.

Key words: extract of maize plumule (EMP); D-galactose; anti-oxidation enzyme; free radical metabolism

机体代谢过程中,由线粒体产生的大量自由基,尤其是活性氧类自由基(Reactive oxygen species, ROS)会不断攻击细胞内的生物大分子,引起细胞氧化损伤^[1]。氧化产物的不断积累以及ROS对细胞线粒体DNA的破坏,会促使细胞启动凋亡程序^[2],表现为细胞功能降低,器官、系统机能衰退,机体衰老^[3]。D-半乳糖代谢产物半乳糖醇在细胞内的大量蓄积会扰乱细胞自由基代谢,使线粒体产生大量ROS,消耗抗氧化酶,从而增加自由基对细胞的毒性作用,导致心、肝、脑等重要器官的抗氧化酶活性降低,丙二醛(MDA)含量增加,能成功诱导小鼠衰老^[4]。有研究表明,外源性腺嘌呤类物质具有激素样特性,能通过增强抗氧化酶的表达而对动物细胞起到抗氧化保护作用^[5]。玉米幼芽提取物(EMP)中富含的腺嘌呤衍生物,能明显提高家蚕体内的SOD活性,减少其在衰老过程中自由基引起的氧化损伤^[6]。为了进一步揭示EMP对哺乳动物体内抗氧化酶的作用,本试验用D-半乳糖诱导小鼠衰老模型,研究了EMP对衰老小鼠心肌自由基代谢和超微结构的影响,以期EMP在抗心肌氧化损伤领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 EMP,将玉米幼芽用醋酸和甲醇混合溶液进行索式抽提,过PVPP柱分离并纯化获得,编号:0502;腺嘌呤衍生物含量(气质联用检测)为92.16%,用0.06 mol/L的盐酸配制成储备液,4℃保存备用,使用前用2 mol/L NaOH滴定至近中性。D-半乳糖,国药集团化学试剂有限公司生产,批号:F20050711,用生理盐水配成5 g/L溶液,4℃保存备用。SOD检测试剂盒(批号:20060322),CAT检测试剂盒(批号:20060325),GSH-PX检测试剂盒(批号:20060523),MDA检测试剂盒(批号:20060320),考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒(批号:20060323),NO检测试剂盒(批号:200603253)均购自南京建成生物工程研究所。其余所需试剂均为分析纯级。

1.1.2 主要仪器 H-600透射电子显微镜,日本日立公司生产;UV 1102紫外可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司生产;BS224S万分之一电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司生产;HS10268型10~100 μ L移液器,DRA GONMED公司生产;TDZ4WS低速自动平衡离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司生产。

1.1.3 试验动物 清洁级ICR小鼠,雄性,质量(20 $\pm$ 2) g,由陕西省实验动物中心提供。

1.2 试验设计

45只小鼠随机分为5组,每组9只。I组为对照组,II组为衰老模型组,III~V组为药物保护组。I组每天分别灌胃等量EMP溶媒、颈背部多点皮下注射等量的生理盐水;II组每天灌胃等量的EMP溶媒,颈背部多点皮下注射125 mg/kg的D-半乳糖;III~V组每天分别灌胃10, 20, 40 mg/kg的EMP,同时颈背部多点皮下注射125 mg/kg D-半乳糖^[4]。各组小鼠灌胃和颈背部皮下注射每日各1次,连续处理42 d。

1.3 EMP对衰老小鼠心肌组织自由基代谢的影响 于43 d时,从各组中随机抽取4只小鼠处死,取其心脏加4℃生理盐水制成100 g/L的组织匀浆,离心取上清按照试剂盒说明书测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性,以及丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)含量。

1.4 EMP对衰老小鼠心肌组织超微结构的影响

于43 d时,处死各组剩余小鼠,取其心肌组织,在冰上快速切成约1 mm³的小块,用体积分数4%的戊二醛4℃下固定,乙醇逐级脱水,环氧树脂包埋,制作电镜切片,在H-600透射电镜下观察心肌细胞超微结构。

1.5 数据分析

试验数据处理使用医学统计软件SPSS 13.0 (Statistical Program for Linear Modeling)进行方差分析,试验结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 EMP 对衰老小鼠心肌组织自由基代谢的影响

EMP 对衰老小鼠心肌 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性以及MDA、NO 含量的影响结果见表1。由表1可知,与I组(对照组)相比,II组(衰老模型组)小鼠心肌组织的SOD、CAT 和GSH-Px 活性极显著降低($P < 0.01$),MDA 和 NO 含量极显著升高($P < 0.01$),表明D-半乳糖能通过扰乱自由基代谢而消耗抗氧化酶。EMP 处理组中,III和V组的各项

指标与II组相比,仅III组的CAT 活性和NO 含量与II组有显著差异($P < 0.05$),其余指标无显著差异,表明这些剂量的EMP 不能很好地对抗D-半乳糖对小鼠的致衰作用。而IV组的各项指标与II组相比,差异均极显著($P < 0.01$);IV组与I组相比,SOD、CAT、GSH-Px 活性和NO 含量均差异显著($P < 0.05$),MDA 含量差异不显著,说明20 mg/kg 的EMP 能明显的提高D-半乳糖致衰小鼠心肌组织中的抗氧化酶活性,降低自由基含量。

表1 EMP 对衰老小鼠心肌组织SOD、CAT 和GSH-Px 活性及MDA 和NO 含量的影响($n=4, \bar{X} \pm SD$)

Table 1 Effect of EMP on activity of SOD,CAT and GSH-Px and content ofMDA and NO of myocardium in aging mice

组别 Group	SOD 活性/ (U · mg ⁻¹) SOD activity	CAT 活性/ (U · mg ⁻¹) CAT activity	GSH-Px 活性/ (U · mg ⁻¹) GSH-Px activity	一氧化氮含量/ (μmol · L ⁻¹) NO level	MDA 含量/ (nmol · mg ⁻¹) MDA level
I 组 Group I	94.049 ± 4.275 Aa	54.183 ± 2.320 Aa	32.373 ± 2.850 Aa	4.572 ± 0.244 Aa	9.936 ± 0.302 A
II 组 Group II	73.439 ± 1.712 B	34.696 ± 4.183 Bc	20.380 ± 0.852 B	12.159 ± 1.425 Bc	17.292 ± 2.085 B
III 组 Group III	77.799 ± 3.694 B	42.657 ± 3.272 Bd	23.432 ± 2.259 B	9.420 ± 0.733 Bd	14.953 ± 1.066 B
IV 组 Group IV	87.241 ± 3.849 Ab	47.313 ± 2.195 Ab	28.038 ± 1.583 Ab	6.438 ± 0.637 Ab	11.300 ± 1.529 A
V 组 Group V	71.514 ± 1.500 B	36.047 ± 3.302 B	20.121 ± 1.167 B	10.715 ± 1.257 B	14.459 ± 1.505 B

注: 同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 标不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。
Note: Data with different small letters is significant difference ($P < 0.05$), data with different capital letters is extreme significant difference ($P < 0.01$).

2.2 EMP 对衰老小鼠心肌组织超微结构的影响

EMP 对衰老小鼠心肌中肌原纤维、Z 线和线粒

体超微结构的影响见图1。

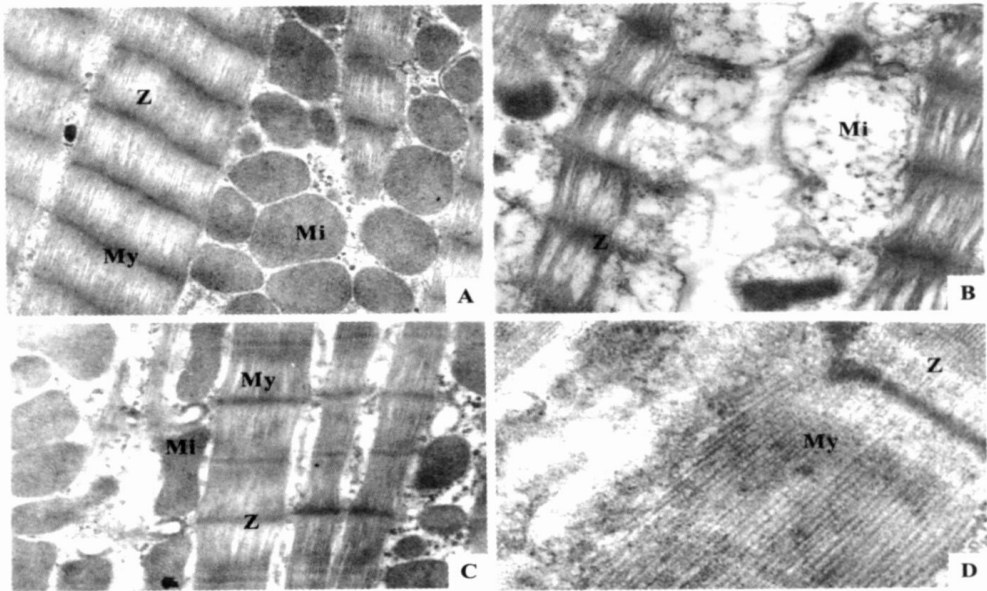


图1 EMP 对衰老小鼠心肌中肌原纤维(My)、Z 线(Z)和线粒体(Mi)超微结构的影响
A. I 组(TEM × 15 000);B. II 组(TEM × 15 000);C. IV 组(TEM × 17 000);D. IV 组(TEM × 40 000)

Fig 1 Effect of EMP on the ultrastructure of Z-line (Z),myofilament (My) and mitochondrion (Mi) of myocardium in aging mice

A. Group I (TEM × 15 000);B. Group II (TEM × 15 000);C. Group IV (TEM × 17 000);D. Group IV (TEM × 40 000)

由图1A 可知, I 组(对照组)小鼠肌节分布均匀,各带清楚,Z 线清晰;肌原纤维排列整齐,走向一

致,无肌丝断裂扭曲;线粒体大小较一致,嵴排列规则,基质均匀,中等电子密度。由图1B可知,II组(衰老模型组)小鼠Z线增粗扭曲,明暗带模糊;肌原纤维排列紊乱,部分断裂,局部肌丝消失;弥漫性线粒体肿大,嵴溶解,部分膜断裂,基质电子密度降低,说明D-半乳糖引起小鼠心肌细胞代谢紊乱而产生的大量自由基,对心肌超微结构产生了氧化损伤。由图1C、D可知,与模型组相比,IV组小鼠的Z线清晰;肌原纤维排列整齐,溶解、凝集减少;线粒体轻微肿胀,空泡化减少,嵴排列规则,基质中等电子密度;高倍镜下可见典型肌节结构。说明20 mg/kg的EMP能明显改善D-半乳糖对心肌超微结构的氧化损伤作用。

3 讨论

细胞代谢过程中产生的ROS会攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA),引发脂质过氧化反应,形成脂质过氧化物,如MDA。因此,MDA的含量可以反映机体内脂质过氧化的程度,进而间接地反映出细胞的损伤程度。高等动物机体内有清除ROS的酶体系,如SOD、CAT和GSH-PX等。SOD将过量的超氧阴离子自由基 O_2^- (Superoxide anion radical)歧化为 H_2O_2 , H_2O_2 在CAT和GSH-PX的催化下转变为 H_2O 和 O_2 ,从而消除ROS对细胞的毒害作用。SOD、CAT和GSH-PX酶活性与生物年龄大小呈负相关,而MDA含量随着年龄的增加而不断升高^[7]。NO在机体内可作为一种化学性质极其活泼的气体自由基引起细胞毒性作用,其对心肌的收缩起双向调节作用:低浓度时起促进作用,高浓度时则起抑制作用^[8]。

D-半乳糖代谢产物半乳糖醇在细胞内的蓄积,能通过扰乱细胞代谢而产生大量自由基,消耗机体抗氧化酶,对细胞结构产生氧化损伤,使脂质过氧化物MDA含量升高,尤其是对线粒体结构的损伤会导致mtDNA损伤,进而引起线粒体呼吸酶功能降低,启动细胞的凋亡程序,影响需能细胞的功能^[9]。本试验II组(衰老模型组)小鼠在连续给予125 mg/kg D-半乳糖处理42 d后,心肌抗氧化酶SOD、CAT和GSH-PX活性明显降低,自由基NO和脂质过氧化物MDA含量显著升高;心肌细胞正常结构模糊,肌原纤维严重损伤,多数线粒体肿胀、空泡化、嵴消失。表明D-半乳糖扰乱了细胞代谢,使其产生了大量自由基,进而消耗了其抗氧化酶,破坏了心肌组织超微结构。

有研究表明,嘌呤类物质具有动、植物激素样作用,可清除自由基,参与损伤修复^[10-11]。本研究结果显示,相对于II组,EMP保护组的各项生化指标都有不同程度的改善,尤其是IV组的各项指标与II组相比均有极显著差异($P < 0.01$);由D-半乳糖引起的肌原纤维损伤和线粒体空泡、嵴消失等病变得到了明显的改善,高倍镜下可见典型肌节结构。这表明20 mg/kg的EMP能通过提高小鼠心肌组织中的抗氧化酶活性、降低自由基含量,从而对抗D-半乳糖对心肌超微结构的氧化损伤作用。

4 结论

本试验从抗氧化酶活性、自由基含量和脂质过氧化产物3个方面研究了EMP对衰老小鼠心肌组织的影响,并观察了心肌细胞超微结构的变化,从形态学上对EMP的抗氧化损伤作用进行了验证。结果表明,20 mg/kg的EMP具有增强心肌抗氧化酶活性,改善心肌自由基代谢,减轻自由基对心肌的氧化损伤,保护心肌细胞超微结构的作用。

参考文献

- [1] Haman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. J Gerontol, 1956, 11(3): 298-300
- [2] Michael T L, Beal M F. The oxidative damage theory of aging[J]. Clinical Neuroscience Research, 2003, 2: 305-315
- [3] Michael S G, Ian M, Poonan B. Functional senescence in *Drosophila melanogaster* [J]. Aging Research Reviews, 2005, 4: 372-397.
- [4] 余资江, 应大君, 董世武. 半乳糖急性致衰老动物模型剂量的探讨[J]. 解剖学杂志, 2005, 28(4): 422-425
- [5] 史明, 游思维. 嘌呤类物质在中枢神经系统损伤中的作用[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(3): 236-239
- [6] 张黎, 欧阳五庆, 胡颖, 等. 玉米幼芽提取物对家蚕抗氧化损伤作用的影响[J]. 蚕业科学, 2005, 31(4): 458-462
- [7] 王春霖, 郭芳, 王永利. 自由基与衰老[J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(4): 308-311
- [8] Vila-Petroff M G, Younes A, Egan J, et al. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes[J]. Circ Res, 1999, 84(9): 1021-1031
- [9] 杨晨. D-半乳糖诱导小鼠mtDNA损伤的研究[D]. 陕西西安: 第四军医大学, 2005
- [10] Anders O, Gunhild E S, Brian F C, et al. N6-furfuryladenine, kinetin, protects against fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 265(2): 499-502
- [11] Philippe V, Gunhild E S, Brian F C, et al. Kinetin inhibits protein oxidation and glycooxidation in vitro [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 276(3): 1265-1270