

· 论 著 ·

# Oncolyn 对半乳糖致衰老小鼠氧化损伤影响的实验研究

张艳淑<sup>1</sup>, 姚林<sup>1</sup>, Arthur H. K. Djang<sup>2</sup>, 闫立成<sup>1</sup>, 李清钊<sup>1</sup>, 刘英莉<sup>1</sup>, 王广增<sup>1</sup>

(1. 华北煤炭医学院预防医学系, 河北 唐山 063000; 2. Sané International Inc, NY USA 14701)

**摘要:** 目的 探讨 Oncolyn 对 D-半乳糖致衰老小鼠氧化损伤的缓解作用。方法 昆明种小鼠随机分为对照组、衰老组和 Oncolyn 干预组; 用 D-半乳糖颈部皮下注射 42 d 复制衰老小鼠模型。Oncolyn 组在小鼠注射半乳糖后 22 d, 经口给入 Oncolyn, 共 70 d。实验结束后取脑组织、血液和心脏组织检测超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS)、丙二醛 (MDA)、单胺氧化酶 (MAO)、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的水平, 以及海马和大脑皮层中 Caspase-3 的表达情况。结果 衰老组小鼠血液中 SOD 和 GSH-Px 活性 (143.19 U/ml, 105.81 U) 降低, NO、NOS (49.19 mmol/L, 25.29 U/ml) 的水平增加, 与对照组 (173.23 U/ml, 130.74 U, 39.20 mmol/L, 18.60 U) 比较差异有显著性。在心肌组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性降低。脑组织中 SOD、NO、NOS、GSH-Px (24.57 U/mg Pro, 1.28 mmol/mg Pro, 0.46 U/mg Pro, 4.79 U/mg Pro) 水平均下降, 而 MDA 和 MAO 水平 (1.14 mmol/mg Pro, 1.23 U/mg Pro) 增加, 同样 Caspase-3 的蛋白表达无论在海马还是在大脑皮质中均增加。衰老小鼠经口给入 Oncolyn 后, 血液中 SOD 和 GSH-Px 活性均比衰老组增加, NO 含量和 NOS 活性下降。心肌组织中 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的活性 [0.31 μmol/PiV (mgPro<sup>o</sup>·h)] 比衰老组 [0.22 μmol/PiV (mgPro<sup>o</sup>·h)] 增加。Oncolyn 组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px 活性增加, 而 NOS 活性高于衰老组。另外脑组织中 MDA 和 MAO 的水平均低于衰老组。Caspase-3 在海马和大脑皮质的表达均下降。结论 Oncolyn 能提高机体氧化应激能力, 对机体的衰老有一定的缓解作用。

**关键词:** 衰老; 抗氧化酶; 三磷酸腺苷酶; Oncolyn; Caspase-3

中图分类号: R339.38; Q553 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)04-0193-03

## Study of effect of Oncolyn on oxidative damage caused by galactose in senescent mice

ZHANG Yan-shu<sup>1</sup>, YAO Lin<sup>1</sup>, Arthur H. K. Djang<sup>2</sup>, YAN Li-cheng<sup>1</sup>, LI Qing-zhao<sup>1</sup>, LIU Ying-li<sup>1</sup>, WANG Guang-zeng<sup>1</sup>

(1. Dept of Preventive Medicine, North China Medical College Affiliated to Ministry of Coal Industry, Tangshan 063000, China; 2. Sané International Inc, NY 14701, USA)

**Abstract Objective** To investigate the neutralization effect of Oncolyn on oxidative damage in aging mice. To explore the effect of Oncolyn on the oxidative damage caused by D-galactose in aging mice. **Method** The Kun-ming mice were divided into three groups: control group, aging mice group and Oncolyn intervening group. The senescence model was made by injecting of D-galactose for 22 days. Oncolyn were administered by oral for 70 days from the 22nd day after injection of galactose. The levels of SOD, GSH-Px, NO, NOS, MDA, MAO in blood and brain tissue were detected, the activities of ATPase in myocardial tissues were also measured. Additionally, the expression of Caspase-3 in pallium and hippocampus was measured too, using immunohistochemical technique. **Result** Compared with the control group, the activities of SOD and GSH-Px in blood and brain tissue were all lowered in senescent mice, the levels of NO and NOS were higher in blood and lowered in brain tissue ( $P < 0.05$ ), and the levels of MDA and MAO, the expression of Caspase-3 in senescent mice rose than that in control group. In Oncolyn group, the activities of SOD and GSH-Px in blood were 190.31 U/ml and 163.15 U/ml respectively, were higher than that of aging group (were 143.19 U/ml and 105.81 U respectively,  $P < 0.05$ ), the change trends of SOD and GSH-Px in brain tissue were the same like that in blood, but the activity of NOS was higher in brain tissue, not lowered like that in blood. Additionally, the levels of MDA and MAO and the expression of Caspase-3 also were lower both in pallium and hippocampus of the mice from Oncolyn group compared with aging group. **Conclusion** Oncolyn could enhance the ability of anti-oxidation, thereby could remit the process of aging.

**Key words:** Aging; Anti-oxidation enzyme; ATPase; Oncolyn; Caspase-3

研究表明<sup>[1,2]</sup>, 氧化应激是许多疾病和损伤的病理基础, 也是加速机体衰老的重要原因。Oncolyn

是从大豆等可食用植物中提取的天然物质, 其中含有黄酮、多酚、花色素和皂角苷等天然植物成分, 功能试验证实它具有 SOD 活性, 可以直接清除活性氧, 提高机体的免疫力。本研究通过探讨衰老小鼠血液和脑组织内抗氧化酶 SOD、GSH-Px 和活性氮自由基

收稿日期: 2005-01-07; 修回日期: 2005-03-14

作者简介: 张艳淑 (1970-), 女, 副教授, 研究方向: 神经毒理

NO, 心肌组织中 ATP 酶的变化, 大脑皮层以及海马组织中 Caspase-3 的变化来进一步探讨机体衰老的机理以及 Oncolyn 对衰老的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

D-半乳糖, 北京生化试剂公司, 批号: 020123, 将 D-半乳糖溶解于生理盐水中高压灭菌, 浓度为 100 mg/ml。Oncolyn 由 Sanitc International Inc 提供, 为淡黄色粉末, 临用前用生理盐水稀释成 60 mg/ml 备用。

### 1.2 实验动物及分组

昆明种小鼠, 雄性, 体重 20 g 左右, 由河南大学医学部实验动物中心提供。随机分为 3 组, 即对照组、衰老组和 Oncolyn 预防组, 每组实验动物 30 只。衰老组和 Oncolyn 组均颈部皮下连续注射 D-半乳糖 42 d 造成衰老模型, Oncolyn 组在注射 D-半乳糖的第 22 天开始经口给予 Oncolyn (灌胃), 剂量为 0.6 g/(kg·d), 共 70 d。

### 1.3 检测指标

动物乌拉坦麻醉后, 心脏采血, 一部分用肝素抗凝, 其余血液 1 200 r/min 离心 15 min 后, 取血清用于实验。取脑、心肌组织液氮中冻存, 检测前用生理盐水制成 10% 的组织匀浆。检测指标有 SOD、GSH-Px、NO、NOS、MDA、MAO 以及 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶水平。这些指标的检测试剂盒均由南京

建成生物工程公司提供。

### 1.4 Caspase-3 的蛋白表达

小鼠乌拉坦麻醉后, 打开胸腔, 经心室快速灌注灭菌生理盐水 40 ml 冲洗血液, 随即灌注 4% 多聚甲醛 (PBS 配制) 100 ml。摘取脑组织, 放入 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片。切片 37 °C 过夜后, 脱蜡至水, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。再用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min 后 PBS 洗 3 次。进行抗原修复, 然后加封闭血清孵育 10 min, 倾去血清后滴加 1:70 Caspase-3 一抗, 4 °C 过夜。再用 PBS 洗 3 次后加二抗, 37 °C 孵育 30 min。PBS 洗 3 次滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素三抗, 37 °C 孵育 30 min。最后 DAB 显色观察。

### 1.5 数据分析

所有的数据用 Excel 建库, 用 SAS6.0 进行统计分析。分析方法为方差分析和两两比较的 *q* 检验。

## 2 结果

### 2.1 Oncolyn 对衰老小鼠血液中 SOD、NO、NOS、GSH-Px 的影响

由表 1 可见, 与对照组比较, 衰老组血液中抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性明显下降, 而一氧化氮含量、一氧化氮合酶的活性增加, 差异有显著性。Oncolyn 组 SOD 和 GSH-Px 活性明显比衰老组增加, 且一氧化氮含量和一氧化氮合酶的水平也有所下降。

表 1 Oncolyn 对小鼠血液中 SOD、NO、NOS、GSH-Px 的影响 (n=10)

组别	SOD (U/ml)	GSH-Px (U)	NO (mmol/L)	NOS (U)
对照组	173.23±22.94	130.74±15.21	39.20±3.17	18.60±0.77
衰老组	143.19±13.80*	105.81±13.18*	49.19±4.92*	25.29±2.73*
Oncolyn 组	190.31±30.97#	163.15±25.9#	43.36±4.83#	21.73±2.81#

与对照组比较, \*P<0.05; 与衰老组比较, #P<0.05

### 2.2 Oncolyn 对小鼠脑组织中 SOD、NO、NOS、GSH-Px、MDA、MAO 的影响

由表 2 可见, 衰老组脑组织中抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性下降, 一氧化氮含量和一氧化氮合酶的水平也下降, 这与血液中 NO 和 NOS 的变化相反。而

MDA 和 MAO 的水平增加, 与对照组比较差异有显著性。Oncolyn 组的抗氧化酶 SOD、GSH-Px 的活性和 NO、NOS 的水平比衰老组增加, MDA 和 MAO 的水平下降, 与衰老组比较差异有显著性。

表 2 Oncolyn 对小鼠脑组织中 SOD、NO、NOS、GSH-Px、MDA、MAO 的影响

组别	SOD (U/mg Pro)	GSH-Px (U/mg Pro)	NO (mmol/mg Pro)	NOS (U/mg Pro)	MDA (mmol/mg Pro)	MAO (U/mg Pro)
对照组	39.65±2.91	6.69±1.93	2.89±0.76	1.92±0.34	0.61±0.18	1.09±0.34
衰老组	24.57±2.70*	4.79±1.79*	1.28±0.15*	0.46±0.40*	1.14±0.27*	1.23±0.39*
Oncolyn 组	29.74±2.26#	8.06±1.07#	1.39±0.12	1.97±0.15#	0.63±0.21#	0.92±0.21#

与对照组比较, \*P<0.05; 与衰老组比较, #P<0.05

### 2.3 Oncolyn 对心肌组织中 ATP 酶的影响

小鼠处死后, 迅速取心脏, 制成 10% 的匀浆, 测定心肌组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的变化。

表 3 结果显示, 衰老组 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性低于对照组 (P<0.05)。应用 Oncolyn 进行预防后 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的活性比衰老组增加, 但 Na<sup>+</sup>-

K<sup>+</sup>-ATP 酶活性增加不明显。

表 3 Oncolyn 对小鼠心肌组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的影响  $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg Pro} \cdot \text{h})$

组别	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶	Ca <sup>2+</sup> -ATP 酶
对照组	0.35 ± 0.060	0.29 ± 0.019
衰老组	0.30 ± 0.035 *	0.22 ± 0.037 *
Oncolyn 组	0.33 ± 0.050	0.31 ± 0.015 #

与对照组比较, \*P < 0.05; 与衰老组比较, #P < 0.05

## 2.4 Oncolyn 对大脑皮层和海马组织中 Caspase-3 表达的影响

采用北京航空学院图像分析管理系统软件对各组大脑皮层和海马组织切片进行分析, 每张片随机选取 6 个视野, 得出每张切片的平均光密度值, 见表 4。结果显示衰老组无论海马还是皮层组织中 Caspase-3 的表达均增加, 而 Oncolyn 组皮层组织中 Caspase-3 表达的降低有统计学意义, 海马组织中有下降的趋势, 但差异无显著性。

表 4 实验各组大脑皮层和海马组织中 Caspase-3 的平均光密度值

组别	海马	皮层
对照组	0.17 ± 0.032	0.13 ± 0.021
衰老组	0.25 ± 0.041 *	0.29 ± 0.034 *
Oncolyn 组	0.22 ± 0.036	0.24 ± 0.026 #

与对照组比较, \*P < 0.05; 与衰老组比较, #P < 0.05

## 3 讨论

机体内产生的过量自由基如活性氧 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、OH<sup>·</sup>和活性氮 NO 等可以使生物膜中的不饱和脂肪酸发生过氧化, 产生的脂质过氧化产物可以反映机体氧化损伤的程度, 是老化的指标<sup>[3]</sup>。在正常情况下, 机体有多种防御自由基损伤的物质如抗氧化酶 SOD、GSH-Px, 及时清除机体产生的过量自由基, 从而保护机体免受自由基损伤。一旦机体的这种氧化抗氧化平衡失调就可导致机体器质性和/或功能性的损伤, 从而导致机体衰老。生物体内的抗氧化系统中 SOD、GSH-Px 是重要的抗氧化酶, 本研究结果显示衰老小鼠血液和脑组织中 SOD、GSH-Px 的活性均呈下降的趋势, 而用 Oncolyn 预防的衰老小鼠在血液和脑组织中这两种抗氧化酶的活性均有所增加, 所以 Oncolyn 具有提高机体抗氧化酶活性的能力。

生理浓度的 NO 参与多种生理过程, NO 产生不足或过量都将对机体稳态产生影响, 过量的 NO 通过与蛋白质、核酸以及糖类、脂肪酸等相互作用, 损伤机体组织, 参与衰老过程<sup>[4]</sup>。本研究中衰老小鼠血液里 NO 含量上升, 这种活性氮自由基能够与超氧阴离子结合

生成 NOO<sup>-</sup>, 具有更强的损伤生物大分子的能力。另外 NO 兼具有细胞间和细胞内信号传递和神经递质作用的信使分子, 本研究中衰老小鼠对新异环境的反映兴奋性降低可能与脑组织 NO 含量下降有关, 其机制有待于进一步探讨。NOS 是 L-精氨酸合成 NO 的酶, 它在血液和脑组织中的变化与 NO 变化一致。

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶对维持细胞内外离子平衡起着重要作用, 它们也易遭受自由基的攻击。Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶是由 α 和 β 两种亚基组成的跨膜蛋白, 主要参与细胞内外 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 的运输, 在调节细胞内外渗透压、神经和肌肉冲动传导等方面起重要作用。Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶也是跨膜蛋白, 对维持细胞钙稳态起着重要作用。衰老后心肌组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性降低, 这可能与大量的自由基对酶结构的直接破坏, 以及脂质过氧化引起的膜流动性改变有关, 另外自由基还可以直接氧化巯基蛋白和巯基酶, 使 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶失活。本研究发现衰老组心肌中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性下降, 但 Oncolyn 组小鼠的 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性增加显著, 这有助于维持心肌细胞的离子平衡和收缩能力。

氧化应激还可以启动细胞的凋亡程序, Caspase-3 是细胞凋亡信号中最后执行处决任务的酶家族<sup>[5]</sup>, 其表达的增加可以间接表明细胞凋亡的增加。本研究中衰老小鼠大脑皮层以及海马中 Caspase-3 均增加, 同时抗氧化酶活性降低, 提示在衰老中可能有神经元的凋亡的参与, 但是否活性氧直接参与了 Caspase-3 的启动表达值得进一步的研究探讨。Oncolyn 可以降低大脑皮层和海马中 Caspase-3 的表达, 从而延缓衰老进程。

总之, Oncolyn 可以提高机体的抗氧化酶的活性, 降低脂质过氧化水平, 降低凋亡蛋白 Caspase-3 在大脑皮层和海马中的表达, 对机体的衰老进程有一定的延缓作用。

## 参考文献:

- [1] 陈瑾 李荣亨. 衰老的自由基机制 [J]. 中国老年学杂志, 2004, 24 (7): 677-679.
- [2] Mecocci P, Fano G, Fulle S, et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids and proteins in human skeletal muscle [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26 (3-4): 303-308.
- [3] Wang Z, Lu CR. Physiological and biochemical changes of mimetic aging in rats [J]. 中国临床康复, 2004, 8 (10): 1970-1971.
- [4] Szabo C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system [J]. Brain Res Bull, 1996, 41 (3): 131-141.
- [5] 张海风, 祝其锋. Caspase 和阿尔茨海默病 [J]. 中国老年学杂志, 2001, 21 (6): 480-482.