

姬松茸多肽提取物对D-半乳糖致衰老模型小鼠的保护作用

冯晴霞¹, 闫宇宁¹, 杨 峰¹, 周嘉宁¹, 李乐斌¹, 卢学春^{2,*}, 安丽萍^{1,*}

(1.北华大学药学院, 吉林 吉林 132013; 2.中国人民解放军总医院血液科, 北京 100853)

摘 要:目的: 建立姬松茸多肽提取方法, 并研究姬松茸多肽提取物对D-半乳糖(D-galactose, D-gal)致衰老模型小鼠的保护作用。方法: 硫酸铵沉淀法从姬松茸蛋白酶解物分离多肽, 用Sephadex G-50凝胶层析纯化得到姬松茸多肽; 将ICR小鼠随机分为4组, 即空白组、模型组、阳性药物(吡拉西坦)组和姬松茸多肽组, 除空白组外, 其余各组小鼠皮下注射300 mg/(kg m_b · d) D-gal, 建立衰老模型, 通过Morris水迷宫和避暗仪测试小鼠学习记忆能力, 检测小鼠血清总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)浓度、过氧化氢酶(catalase, CAT)活力和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察小鼠脑组织海马区神经元结构变化; 逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测脑组织中核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、NAD(P)H:醌氧化还原酶(NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1)、谷氨酸半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCLM)mRNA相对表达量。结果: Sephadex G-50分离得一个明显色谱峰即为姬松茸多肽提取物; 与模型组比较, 姬松茸多肽组小鼠水迷宫及避暗潜伏期缩短, 错误次数显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 血清CAT活力、T-AOC明显提高, ROS水平、MDA浓度显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$); HE染色结果显示, 与模型组相比, 姬松茸多肽组小鼠神经元排列紧密, 核固缩细胞数量减少; RT-PCR结果显示姬松茸多肽组小鼠脑组织中Nrf2、NQO1、GCLM mRNA相对表达量显著增高($P<0.05$)。结论: 姬松茸多肽提取物可以对D-gal致衰老模型小鼠产生保护作用, 可能与其抗氧化作用相关。

关键词: 姬松茸多肽提取物; D-半乳糖; 衰老; 抗氧化; 核因子E2相关因子2/NAD(P)H:醌氧化还原酶

Protective Effect of *Agaricus blazei* Protein Peptides on D-Galactose-Induced Aging Model in Mice

FENG Qingxia¹, YAN Yuning¹, YANG Yi¹, ZHOU Jianing¹, LI Lebin¹, LU Xuechun^{2,*}, AN Liping^{1,*}

(1. College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China;

2. Department of Hematology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective: To explore the protective effect of peptides purified from an enzymatic protein hydrolysate from *Agaricus blazei* on D-galactose (D-gal)-induced aging in mice. Methods: The peptides were separated by ammonium sulfate precipitation and purified by Sephadex G-50 column chromatography. ICR mice were randomly divided into four groups: blank, model, positive control (piracetam) and *Agaricus blazei* protein peptide (ABPP) treatment. The aging model was established by injecting D-gal at a dose of 300 mg/(kg m_b · d). Morris water maze and step-through tests were used to evaluate the learning and memory ability of mice. The serum levels of total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and reactive oxygen species (ROS) were detected. The structural changes of hippocampal neurons were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutamate-cysteine ligase (GCLM) in brain tissues were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: A significant chromatographic fraction from Sephadex G-50 was identified corresponding to a peptide. Compared with the model group, ABPP could significantly shorten the

收稿日期: 2019-03-19

基金项目: 吉林省发展和改革委员会产业技术与开发项目(2018C046-3); 吉林省卫生健康委员会技术创新项目(2017J083); 北华大学研究生创新计划项目(2018029)

第一作者简介: 冯晴霞(1995—)(ORCID: 0000-0001-7583-215X), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。

E-mail: fengqingxia57@163.com

*通信作者简介: 卢学春(1970—)(ORCID: 0000-0002-4123-0625), 男, 主任医师, 博士, 研究方向为血液病的临床和生物信息学。E-mail: luxuechun@126.com

安丽萍(1973—)(ORCID: 0000-0002-3292-2937), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物与生物化学。

E-mail: 630114130@qq.com

step-through latency and improve learning and memory capacity ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), accompanied by a significant increase in the serum levels of CAT and T-AOC and a significant reduction in ROS and MDA levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HE staining results showed that the hippocampal neuron was closely arranged in the ABPP treatment group, and the number of cells with nuclear pyknosis was significantly reduced. The expression mRNA levels of *Nrf2*, *NQO1* and *GCLM* in the ABPP treatment group were significantly increased ($P < 0.05$). Conclusion: ABPP can delay the aging process of mice, which may be associated with its anti-oxidation effect.

Keywords: peptide extract from *Agaricus blazei*; D-galactose; aging; antioxidant; nuclear factor erythroid 2-related factor 2/ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190319-249

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 07-0164-07

引文格式:

冯晴霞, 闫宇宁, 杨峰, 等. 姬松茸多肽提取物对D-半乳糖致衰老模型小鼠的保护作用[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 164-170. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190319-249. <http://www.spkx.net.cn>

FENG Qingxia, YAN Yuning, YANG Yi, et al. Protective effect of *Agaricus blazei* protein peptides on D-galactose-induced aging model in mice[J]. Food Science, 2020, 41(7): 164-170. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190319-249. <http://www.spkx.net.cn>

人体细胞及组织的衰老是指在结构和机能上出现退化性变化, 在衰老过程中神经系统逐步衰退进而产生学习记忆能力减退等现象^[1-2]。机体氧化应激程度加剧是衰老发生的重要原因, 而氧化应激的程度取决于氧化与抗氧化体系的平衡^[3-6]。因此, 提高机体的抗氧化能力可以延缓衰老进程。天然产物中含有大量的抗氧化活性物质, 将天然抗氧化活性物质用于预防衰老及相关疾病已成为现代生物研究领域的热点。

真菌作为天然产物的重要来源, 其抗氧化活性物质的研究已显示出广阔的发展前景。姬松茸 (*Agaricus blazei* Murill) 又名小松菇、巴西蘑菇, 是一种大型真菌, 具有浓郁杏仁香味, 属担子菌亚门层菌纲伞菌目蘑菇 (黑伞) 科蘑菇 (黑伞) 属^[6]。姬松茸子实体中富含蛋白质、糖类、甾醇、黄酮等多种生物活性物质, 具有广泛的生物活性, 如抗肿瘤、降血糖、抗炎、增强免疫力等^[7-8]。姬松茸蛋白具有明显的抗氧化和提高乙酰胆碱酯酶活性等功效^[9]。蛋白质经蛋白酶部分水解后, 可获得具有生物活性的多肽; 与大分子蛋白相比, 活性生物多肽具有安全稳定、易溶于水、易吸收等优点, 且其清除自由基的能力与分子质量有关, 分子质量越小, 其抗氧化能力越强^[10-12]。姬松茸多肽是姬松茸子实体中提取的蛋白质经过蛋白酶水解后的活性物质, 本课题组前期实验证明, 姬松茸多肽对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和羟自由基均具有较好的清除作用, 体外抗氧化作用明显, 但其抗衰老作用和机制还需要进一步研究。

本研究优化姬松茸多肽的提取方法, 通过建立D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导的小鼠衰老模型, 观察姬松茸多肽对衰老模型小鼠的保护作用, 为姬松茸的应用提供更多的理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

SPF级雄性ICR小鼠 (4~5周龄, 体质量 (20.0 ± 2.0) g, $n=40$, 生产许可证号: SCXK (吉)-2016-0003) 及饲料 长春亿斯实验动物技术有限责任公司; 姬松茸子实体粉末 江苏省苏威微生物研究有限公司。

Sephadex G-50 中国长征制药厂; D-gal 美国Sigma-Aldrich公司; 总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 南京建成生物工程研究院; 核因子E2相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、NAD(P)H:醌氧化还原酶 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (glutamate-cysteine ligase, GCLM)、 β -actin引物、BCA蛋白定量试剂盒 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; RNA提取试剂盒、一步法逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 诺唯赞生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2550型紫外-可见分光光度计 岛津国际贸易 (上海) 有限公司; MT-200 Morris水迷宫分析仪、BA-200小鼠避暗仪 成都泰盟科技有限公司; PCR仪 美国Applied Biosystems公司。

1.3 方法

1.3.1 姬松茸多肽的提取

将姬松茸子实体粉末去除颗粒杂质, 称取一定量与蒸馏水以1:2 (m/V) 比例混合, 于冰上匀浆后 $5\,000 \times g$

离心3 min, 取上清液, 加入0.157 g/mL硫酸铵溶液, 在4 °C下将上清液中的可溶性蛋白质沉淀过夜, 4 000×g离心10 min, 合并沉淀。用去离子水溶解沉淀, 并使用截留分子质量30 kDa的透析膜在4 °C下用去离子水透析24 h, 透析后冷冻干燥制得姬松茸蛋白粉。取一定量姬松茸蛋白粉按1:20 (m/V) 加入蒸馏水, 用0.1 mol/L盐酸溶液调节pH值至2.5, 加入胃蛋白酶解液 (3 000 U/mg), 混匀后置于37 °C恒温水浴中水解4 h, 酶解结束后, 100 °C加热10 min灭酶, 冷冻干燥制得初步提取粗多肽级分。

1.3.2 姬松茸多肽的纯化

称取Sephadex G-50 (50~100 目) 约50 g, 加入1 L纯净蒸馏水中, 于室温 (22 °C) 下静置3 h, 进行溶胀。垂直安装色谱柱, 蒸馏水平衡3 h后加样, 以蒸馏水为洗脱液进行洗脱, 流速1 mL/min, 检测波长280 nm。收集组分冷冻干燥, 即为姬松茸多肽提取物。使用BCA蛋白定量试剂盒测定得到姬松茸多肽提取物中多肽质量分数为87%。

1.3.3 姬松茸多肽的鉴定

采用Tricine-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 鉴定小分子肽, 凝胶制备参考表1。取样品溶液10 μL, 加入40 μL样品缓冲液后, 沸水浴冷却后上样。按预定顺序加样后电泳电压为60 V, 当样品进入分离胶后, 120 V恒压继续电泳直至溴酚蓝移动至分离胶底部。电泳结束后取出凝胶染色1 h, 脱色液脱色。

表1 Tricine-SDS-PAGE凝胶的组成

Table 1 Compositions of Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel

| 组成成分 | 质量分数4% 浓缩胶 | 质量分数10% 夹层胶 | 质量分数16.5% 分离胶 |
|-----------------------|---------------|----------------|------------------|
| 3×凝胶缓冲液/mL | 3 | 2 | 1.5 |
| 甘油/mL | 1.02 | | |
| 5C凝胶储备液/mL | 3 | | |
| 3C凝胶储备液/mL | | 1.22 | 0.48 |
| ddH ₂ O/mL | 1.98 | 2.78 | 2.70 |
| 10 g/100 mL过硫酸铵/μL | 60 | 40 | 60 |
| 四甲基乙二胺/μL | 6 | 4 | 6 |
| 总体积/mL | 9 | 6 | 6 |

1.3.4 实验动物分组与给药

选取6周龄雄性ICR小鼠40只, 喂养7 d, 随机分为4组, 每组10只, 分别为空白组、模型组、姬松茸多肽组和阳性药物 (吡拉西坦) 组。除空白组外, 其余各组小鼠每日固定时间皮下注射D-gal 300 mg/(kg $m_b \cdot d$), 空白组小鼠注射相同剂量的生理盐水。同时, 阳性对照组小鼠灌胃400 mg/(kg $m_b \cdot d$) 吡拉西坦, 姬松茸多肽组小鼠灌胃400 mg/(kg $m_b \cdot d$) 姬松茸多肽提取物, 空白组、模型组小鼠每日灌胃等量蒸馏水, 持续6周。

1.3.5 避暗实验

末次给药后第2天进行避暗实验。小鼠放入明室中, 使其适应环境后给予5 min持续电流, 小鼠进入暗室即受电击返回明室, 实验重复2 d。从实验开始至第1次进入暗室的时间记为潜伏期, 实验开始5 min内小鼠进入暗室的次数记为错误次数, 记录小鼠潜伏期和错误次数。实验期内未进入暗室的小鼠潜伏期计为300 s^[13]。

1.3.6 Morris水迷宫实验

末次给药后第2天进行Morris水迷宫实验检测小鼠的空间学习记忆能力。固定隐形平台位置, 将各组小鼠沿池壁从定点放入水池, 记录每只小鼠在120 s内到达隐形平台的时间 (逃避潜伏期), 并能够在隐形平台区停留10 s。若超过120 s则记为120 s, 共训练6 d。第7天撤去平台, 随机选下水点, 记录120 s内小鼠分别在中心区、中环、目标象限的游泳穿梭次数^[14-15]。

1.3.7 生化指标检测

末次给药结束第2天处死小鼠, 眼球取血, 4 °C、10 000×g离心分离血清。T-AOC采用比色法测定; CAT活力采用黄嘌呤氧化酶法测定, 以每毫克血红蛋白计; MDA浓度采用硫代巴比妥酸法测定; ROS水平使用荧光探针2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐进行检测, 以每毫升血清的荧光强度表示ROS水平。具体操作流程按照试剂盒说明书进行。

1.3.8 小鼠脑组织海马区及周围组织形态病理学观察

末次给药后第2天, 小鼠注射0.2 mL 10 g/100 mL水合氯醛溶液麻醉后开胸, 在右心耳处剪开, 缓慢灌注20 mL磷酸盐缓冲液和20 mL 4 g/100 mL多聚甲醛, 灌注后取全脑, 脱水后冷冻切片。加入体积比1:1的乙醚-乙醇固定5~10 s, 自来水冲洗2~5 s, 加入苏木精染液滴染1~2 min, 自来水冲洗2~5 s, 再加入盐酸-乙醇 (体积比1:99) 分化液反应2~5 s, 自来水冲洗2~5 s, 加入1%氨水反蓝, 自来水冲洗5~10 s, 加入伊红染液染色2~5 s, 自来水冲洗, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。染色结束后, 分别用体积分数80%、92%和无水乙醇脱水, 按体积比1:3加入苯酚二甲苯反应2~5 s, 再加入二甲苯透明3次, 中性树脂封片, 观察小鼠脑组织海马区及周围组织形态变化。

1.3.9 RT-PCR检测Nrf2、NQO1、GCLM mRNA相对表达量

小鼠取脑组织海马区应用试剂盒提取组织总RNA。按照试剂盒说明书进行RT-PCR扩增, PCR条件为: 50 °C、30 min; 94 °C、3 min; 94 °C、30 s, 30个循环; 55~58 °C、30 s, 30个循环; 72 °C、30 s, 30个循环; 72 °C、5 min; 37 °C、4 min。以 β -actin为内参, 计算Nrf2、NQO1、GCLM mRNA的相对表达量。引物设计见表2。

表2 RT-PCR引物
Table 2 Primer sequences used for RT-PCR

| 引物名称 | 上游引物 (5'→3') | 下游引物 (5'→3') |
|----------------|----------------------|------------------------|
| <i>Nrf2</i> | CCGGGAACAGAACAGGAAA | ACCGTAAGCACGGCTAAGA |
| <i>NQO1</i> | AGGGCAGAAGGGAATTGCTC | AAAGAGCTGGAGAGCCAACC |
| <i>GCLM</i> | GGAGCTTCGGGACTGTATCC | CCATCTCAATCGGAGGCGA |
| <i>β-actin</i> | GGCTGTATTCCCTCCATCG | CCAGTTGGTAACAATGCCATGT |

1.4 数据处理与分析

采用SPSS 16.0统计软件处理各组数据,结果用平均值±标准差表示,选用*t*检验判断结果的显著性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 姬松茸多肽的纯化结果

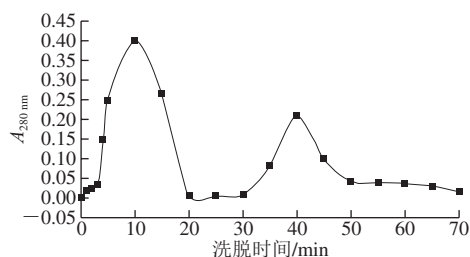
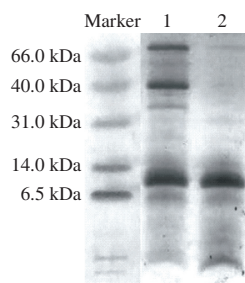


图1 姬松茸多肽粗提物的Sephadex G-50凝胶层析图
Fig. 1 Sephadex G-50 chromatogram of crude peptide extract from *Agaricus blazei*

由图1可知,经过Sephadex-50葡聚糖凝胶过滤后洗脱,洗脱曲线出现2个波峰,12 min处呈现出1个明显的波峰即为姬松茸多肽。

2.2 姬松茸多肽的Tricine-SDS-PAGE结果



泳道1.酶解后的姬松茸粗多肽级分;泳道2.纯化后的姬松茸多肽提取物。

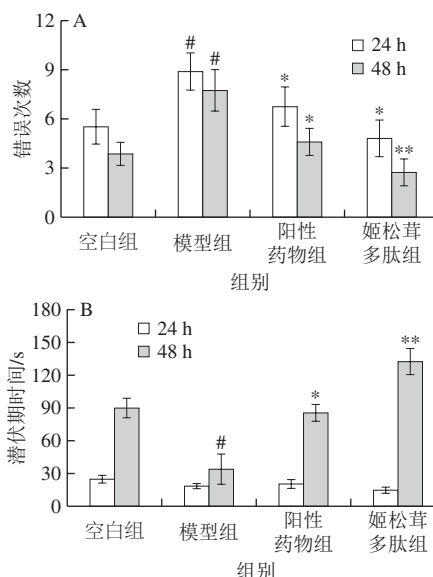
图2 姬松茸多肽提取物的Tricine-SDS-PAGE图
Fig. 2 Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified peptide extract from *Agaricus blazei*

将酶解后的姬松茸粗多肽级分和纯化后的姬松茸多肽提取物进行Tricine-SDS-PAGE。由图2可知,酶解后的姬松茸粗多肽级分分子质量在6~70 kDa内均有分布;而经Sephadex-50葡聚糖凝胶纯化后的姬松茸多肽提取物,显示均一条带,分子质量在10 kDa左右。

2.3 姬松茸多肽对小鼠一般情况的影响

给药实验结束后,空白组小鼠组行动活跃,反应灵敏,且毛色光滑。模型组小鼠毛色发黄、无光泽,皮肤松弛,行动缓慢,精神萎靡,四肢无力,易抓取,呈趴伏蜷缩态,出现明显的衰老特征。姬松茸多肽组与阳性药物组小鼠毛色发暗、脏乱,但无明显毛发稀疏的现象,其中个别呈趴伏蜷缩态,且有弓背现象,剩余小鼠外观及状态介于空白组与模型组之间。

2.4 小鼠避暗实验结果



与空白组比较, #.差异显著 ($P<0.05$); 与模型组比较, *.差异显著 ($P<0.05$), **.差异极显著 ($P<0.01$)。

图3 小鼠避暗实验错误次数 (A) 和潜伏期时间 (B) ($n=10$)
Fig. 3 Effect of purified peptide extract from *Agaricus blazei* on number of errors (A) and step-through latency in mice (B) ($n=10$)

由图3可知,与空白组比较,模型组小鼠避暗实验2 d内错误次数显著增高,潜伏期时间 (48 h) 显著缩短 ($P<0.05$); 与模型组比较,阳性药物组小鼠错误次数显著减少 ($P<0.05$),潜伏期时间 (48 h) 显著延长 ($P<0.05$),姬松茸多肽组小鼠错误次数显著减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),潜伏期时间 (48 h) 极显著延长 ($P<0.01$)。

2.5 Morris水迷宫实验结果

表3 Morris水迷宫实验中小鼠的逃避潜伏期 ($n=10$)
Table 3 Effect of purified peptide extract from *Agaricus blazei* on escape latency of mice in Morris water maze ($n=10$)

| 组别 | 第1天 | 第2天 | 第3天 | 第4天 | 第5天 | 第6天 |
|--------|--------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 空白组 | 81.68±29.10 | 86.23±25.32 | 90.56±27.82 | 60.11±28.50 | 36.78±27.47 | 35.63±32.18 |
| 模型组 | 111.25±12.12 | 100.36±23.58 [#] | 103.41±25.58 [#] | 98.43±20.03 [#] | 83.76±16.88 [#] | 85.28±8.66 [#] |
| 阳性药物组 | 76.41±18.09* | 85.00±30.32 | 88.00±43.96 | 46.79±28.12 | 45.21±23.24 | 35.18±11.23* |
| 姬松茸多肽组 | 94.50±19.21* | 82.67±14.78** | 67.12±22.83* | 53.23±23.19* | 26.97±8.64** | 24.23±7.67** |

注:与空白组比较, #.差异显著 ($P<0.05$), ##.差异极显著 ($P<0.01$); 与模型组比较, *.差异显著 ($P<0.05$), **.差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

表4 Morris水迷宫实验中小鼠的游泳穿梭次数 ($n=10$)
Table 4 Effect of purified peptide extract from *Agaricus blazei* on platform-crossing number of mice in Morris water maze ($n=10$)

| 组别 | 中心区 | 中环 | 目标象限 |
|--------|--------------------------|------------------------|------------|
| 空白组 | 2.13±0.08 | 6.53±0.12 | 10.65±0.09 |
| 模型组 | 1.00±0.12 ^{###} | 5.75±0.65 [#] | 10.26±0.13 |
| 阳性药物组 | 1.88±0.07* | 6.65±0.15* | 10.54±0.07 |
| 姬松茸多肽组 | 3.64±0.09** | 6.57±0.10* | 10.57±0.10 |

由表3、4可知,与空白组比较,模型组小鼠在定位航行(水迷宫实验)中的逃避潜伏期(除第1天)显著延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),同时中心区和中环的穿梭次数显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),目标象限的穿梭次数稍有减少但不显著。与模型组比较,姬松茸多肽组小鼠定位航行中的逃避潜伏期显著缩短,且实验期内呈递减趋势,第6天时逃避潜伏期仅为24.23 s,较模型组(85.28 s)极显著降低($P<0.01$)。模型组小鼠穿越中心区次数仅有1次,姬松茸多肽组小鼠约为3次,穿越次数极显著增多($P<0.01$)。与模型组小鼠比较,姬松茸多肽组小鼠穿越中环次数显著增多($P<0.05$)。

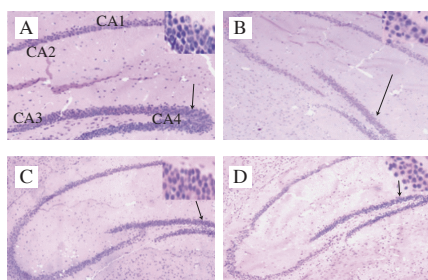
2.6 姬松茸多肽对小鼠血清生化指标的影响

表5 小鼠血清MDA、CAT、ROS、T-AOC水平 ($n=8$)
Table 5 Effect of purified peptide extract from *Agaricus blazei* on MDA, CAT, ROS and T-AOC levels in serum of mice ($n=8$)

| 组别 | MDA浓度/ (nmol/mL) | CAT活力/ (U/mg) | ROS水平/ (U/mL) | T-AOC/ (mmol/L) |
|--------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 空白组 | 1.601±0.421 | 3.470±0.568 | 60.972±1.142 | 0.824±0.024 |
| 模型组 | 4.820±0.541 ^{###} | 2.400±0.412 [#] | 72.916±1.079 [#] | 0.670±0.017 [#] |
| 阳性药物组 | 1.334±0.845** | 3.392±0.489** | 67.084±1.002* | 0.713±0.015* |
| 姬松茸多肽组 | 2.921±0.367* | 4.821±0.526** | 64.155±1.012** | 0.740±0.009** |

由表5可知,与空白组比较,模型组小鼠血清MDA浓度极显著升高($P<0.01$),ROS水平显著升高($P<0.05$),CAT活力和T-AOC显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,姬松茸多肽组小鼠血清MDA浓度显著降低($P<0.05$),ROS水平极显著降低($P<0.01$),CAT活力和T-AOC极显著升高($P<0.01$)。

2.7 小鼠脑组织海马区神经元形态学变化



CA1~CA4.分别表示小鼠脑组织海马区CA1~CA4区;

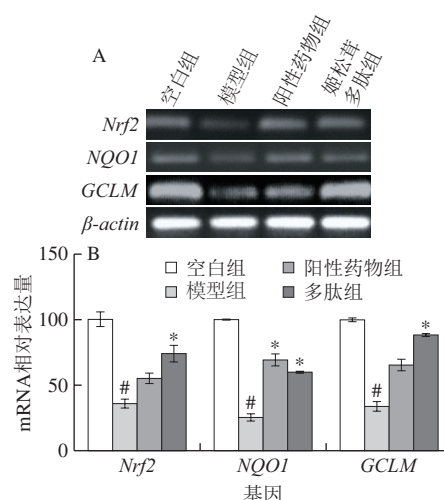
A.空白组; B.模型组; C.阳性药物组; D.姬松茸多肽组。

图4 HE染色观察小鼠脑组织海马区神经元形态变化 ($\times 200$)

Fig. 4 Morphological changes of hippocampal neurons observed by HE staining ($\times 200$)

由图4可知,空白组小鼠脑组织海马区神经元排列紧密有序,胞核和胞浆清晰可见,单个细胞面积较大。而模型组与空白组相比,小鼠脑组织海马区锥体神经元结构松散,排列稀疏,间隙增大,正常锥体神经元数量明显减少,大部分细胞出现核固缩,细胞形态不一。姬松茸多肽干预后小鼠海马锥体细胞形态基本保持正常,与模型组比较排列紧密,间隙减少,层次清晰,形状体积均一。

2.8 姬松茸多肽对脑组织中Nrf2、NQO1、GCLM基因表达的影响



A、B.分别为Nrf2、NQO1、GCLM表达电泳图和mRNA相对表达量。

图5 姬松茸多肽对Nrf2、NQO1、GCLM基因表达的影响 ($n=3$)

Fig. 5 Effect of purified peptide extract from *Agaricus blazei* on the expression of Nrf2, NQO1 and GCLM genes ($n=3$)

由图5可知,与空白组相比,模型组小鼠脑组织Nrf2、NQO1、GCLM mRNA相对表达量显著降低($P<0.05$);与模型组相比,姬松茸多肽组小鼠脑组织中Nrf2 mRNA相对表达量显著增高($P<0.05$),诱导其下游靶基因NQO1、GCLM mRNA相对表达量显著增高($P<0.05$)。进一步验证有可能通过影响Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1 (Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1, Keap1)/Nrf2/抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 信号通路中Nrf2、NQO1、GCLM表达而发挥相关作用。

3 讨论

姬松茸多肽是从姬松茸中提取的有效成分,许多动、植物蛋白中的多肽在体内或体外释放后均表现出生物活性,这些多肽除具有营养作用外,在体内还具有一些生理功能,如抗菌、促进矿物质吸收、增强免疫和抗氧化等^[9]。本研究采用硫酸铵沉淀结合酶解法提取姬松茸活性多肽并通过葡聚糖凝胶进行纯化,冷冻干燥后得到有活性的姬松茸多肽提取物。

自由基损伤学说是众多科学家共识的衰老学说。*D*-gal诱导的衰老模型是目前较经典的衰老动物模型,能够阻断大脑皮层、隔区、海马区中受体的结合位点并且伴随脑内氧化应激状态的改变,从而使自由基过量引起衰老^[16-18],接近于自然衰老规律。其具体机制在于可使生物体中产生大量ROS,导致细胞线粒体系统损伤,产生大量过氧化脂质,同时ROS及其过氧化产物MDA水平升高,CAT等抗氧化酶活力下降,最终导致机体抗氧化水平降低甚至损伤,出现各种衰老变化^[18-22]。本实验结果提示,模型组小鼠毛发稀疏、状态萎靡,并伴随学习记忆力衰退、行为能力降低、反应迟缓等,具有明显的衰老症状。而给予姬松茸多肽干预后,衰老小鼠运动和耐应激能力有所提高,血清T-AOC、CAT活力增强,并且能够清除过剩ROS,降低脂质过氧化物的产生。且海马区神经细胞的结构完整性好,出现退化固缩的细胞数量明显减少,抗衰老作用明显。

Nrf2作为细胞氧化应激反应的重要因子,可以在氧化应激中发挥核心调控作用,提高体内的抗氧化能力,减轻细胞氧化损伤,增强对ROS的清除能力,延缓衰老^[22-26]。当机体遭受氧化损伤时,Nrf2磷酸化进而与Keap1解偶联,进入细胞核内,随后结合相关基因的ARE转录,并诱导其下游靶基因*GCLM*、*NQO1*表达,使其表达量降低^[26-30]。本实验结果中,与空白组相比,模型组小鼠脑组织中*Nrf2*、*NQO1*、*GCLM* mRNA相对表达量显著降低,而给予姬松茸多肽后表达水平较模型组增高,表明姬松茸多肽抗衰老作用机制可能与Nrf2/ARE抗氧化信号通路有关。

综上所述,姬松茸多肽提取物对*D*-gal诱导的衰老小鼠具有保护作用,该作用为开发姬松茸系列产品提供理论参考。

参考文献:

- [1] FENG Yan, YU Yinghua, WANG Shuting, et al. Chlorogenic acid protects *D*-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54(6): 132-135. DOI:10.3109/13880209.2015.1093510.
- [2] 刘富岗,冯素香,刘炯,等. 泽兰多糖对*D*-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用[J]. *中成药*, 2018, 40(8): 1833-1836. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.034.
- [3] HUANG Kaipeng, CHEN Cheng, HAO Jie, et al. Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating Sirt1 to resist AGEs-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor- β 1 in rat glomerular mesangial cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 399: 178-189. DOI:10.1016/j.mce.2014.08.014.
- [4] YU Feng, XU Bo, SONG Chenghui, et al. Treadmill exercise slows cognitive deficits in aging rats by antioxidant and inhibition of amyloid production[J]. *Neuroreport*, 2013, 24(6): 342-347. DOI:10.1097/WNR.0b013e3283606c5e.
- [5] XU Jiajie, LI Yanyan, REGENSTEIN J, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-oxidation and anti-fatigue effect of monkfish liver hydrolysate[J]. *Food Bioscience*, 2017, 18: 9-14. DOI:10.1016/j.fbio.2017.03.002.
- [6] TIAN Bing, WU Yuanyuan, SHENG Duohong, et al. Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*[J]. *Luminescence*, 2004, 19(2): 78-84. DOI:10.1002/bio.761.
- [7] CHANG Jinbiou, WU Mingfang, YANG Yiyuan, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and its amelioration by *Agaricus blazei* Murrill extract in a mouse model[J]. *In Vivo*, 2011, 25(6): 971-976. DOI:10.1016/j.exphem.2011.08.001.
- [8] JIANG Liyan, YU Zhipu, LIN Yu, et al. Low-molecular-weight polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill modulate the Th1 response in cancer immunity[J]. *Oncology Letters*, 2018, 15(3): 3429-3436. DOI:10.3892/ol.2018.7794.
- [9] WANG H T, YANG L C, YU H C, et al. Characteristics of fucose-containing polysaccharides from submerged fermentation of *Agaricus blazei* Murrill[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017, 26(2): 678-687. DOI:10.1016/j.jfda.2017.07.006.
- [10] YU Wenli, SHENG Mingwei, XU Rubin, et al. Berberine protects human renal proximal tubular cells from hypoxia/reoxygenation injury via inhibiting endoplasmic reticulum and mitochondrial stress pathways[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2013, 11(1): 24-28. DOI:10.1186/1479-5876-11-24.
- [11] KIM H Y, KOO S C, KANG B K, et al. Growth characteristics of sprouts and changes of antioxidant activities in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with cultivated temperature[J]. *Korean Journal of Crop Science*, 2014, 59(2): 201-207. DOI:10.7740/kjcs.2014.59.2.201.
- [12] 王颖,王欣卉,徐炳政,等. 芸豆芽菜多酚对*D*-半乳糖致小鼠机体氧化及肾脏损伤的修复作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(13): 219-223. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201713036.
- [13] 陈建光,孙靖辉,李贺,等. 五味子淫羊藿混合提取物对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 43(1): 42-46. DOI:10.13481/j.1671-587x.20170109.
- [14] 李悦,马丽娟,肖辉,等. 琐琐葡萄多糖对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力及氧化应激的影响[J]. *中国医药*, 2018, 13(5): 705-709. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2018.05.018.
- [15] 高璐,王滢,饶胜其,等. 葡萄籽原花青素提取物对衰老模型小鼠抗氧化作用[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 253-256. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201423049.
- [16] KOU Xianjuan, LIU Xingran, CHEN Xianbing, et al. Ampelopsin attenuates brain aging of *D*-gal-induced rats through miR-34a-mediated SIRT1/mTOR signal pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(46): 74484-74495. DOI:10.18632/oncotarget.12811.
- [17] WANG Xiaokang, LIU Jianghong, WU Tiesong, et al. Bergapten attenuates *D*-galactose-induced immunosenescence in BALB/c mice[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(4): 309.
- [18] 马蕾,郝红伟,李慧玲. 蔷薇红景天低聚原花青素对*D*-半乳糖诱导小鼠氧化损伤的拮抗作用[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(11): 341-345. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.11.067.
- [19] NITA M, GRZYBOWSKI A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 3164734. DOI:10.1155/2016/3164734.

- [20] MALTESE G, PSEFTELI P, RIZZO B, et al. The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells[J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2017, 21(3): 621-627. DOI:10.1111/jcmm.12996.
- [21] 彭新颜, 贺红军, 柳全文, 等. 抗氧化活性酸奶对D-半乳糖诱导氧化损伤大鼠脑的保护作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(23): 157-164. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201723025.
- [22] 彭新颜, 黄磊, 崔云, 等. 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段对H₂O₂诱导Caco-2细胞氧化损伤的保护作用[J]. *水产学报*, 2017, 41(3): 456-464. DOI:10.11964/jfc.20160510410.
- [23] LI Lingrui, DONG Hui, SONG E, et al. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, 209(1): 56-67. DOI:10.1016/j.cbi.2013.12.005.
- [24] JEONG Y, HOANG N T, LOVEJOY A, et al. Role of *KEAP1/NRF2* and *TP53* mutations in lung squamous cell carcinoma development and radiation resistance[J]. *Cancer Discovery*, 2016, 7(1): 86-101. DOI:10.1158/2159-8290.CD-16-0127.
- [25] TANIGAWA S, FUJII M, HOU D X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated *NQO1* expression by quercetin[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 42(11): 1690-1703. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.017.
- [26] HOU D X, KORENORI Y, TANIGAWA S, et al. Dynamics of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated *NQO1* expression by wasabi 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(22): 11975-11982. DOI:10.1021/jf2032439.
- [27] 胡流芳, 王迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. *国际药理学研究杂志*, 2016, 43(1): 146-152; 166. DOI:10.13220/j.cnki.jipr.2016.01.022.
- [28] DINKOVA-KOOSTOVA A T, WANG X J. Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2011, 192(1/2): 101-106. DOI:10.1016/j.cbi.2010.09.010.
- [29] SHEN Jianlin, RASMUSSEN M, DONG Qirong, et al. Expression of the NRF2 Target gene *NQO1* is enhanced in mononuclear cells in human chronic kidney disease[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 3: 9091879. DOI:10.1155/2017/9091879.
- [30] SUZUKI T, YAMAMOTO M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2015, 88: 93-100. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006.