

米糠抗氧化肽的抗衰老作用

樊金娟¹, 付岩松¹, 宗立立³, 张心昱², 罗霞¹, 朱延姝¹

(1.沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.中国科学院地理科学与资源研究所, 北京 100101;

3.吉林农业大学农学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 利用 *D*-半乳糖(*D*-gal)致衰老小鼠模型, 探讨米糠抗氧化肽对小鼠心、脑线粒体过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、琥珀酸脱氢酶(SDH)和总三磷酸腺苷酶(T-ATPase)活性的影响, 并通过聚合酶链反应(PCR)技术和光密度扫描检测该肽对小鼠脑线粒体DNA(mtDNA)缺失突变的影响。结果显示: 与衰老组相比, 高剂量(500mg/kg bw)米糠抗氧化肽可显著提高致衰老小鼠心脑线粒体CAT、GSH-Px、SDH以及T-ATPase活性($P < 0.05$), 明显降低脑mtDNA缺失突变水平($P < 0.01$), 效果优于中、低剂量。结论: 米糠抗氧化肽能够提高*D*-gal致衰老小鼠的抗氧化能力, 对mtDNA具有良好的保护作用。

关键词: 米糠抗氧化肽; 线粒体DNA(mtDNA); 抗衰老

Anti-aging Effect of Antioxidant Peptides from Rice Bran

FAN Jin-juan¹, FU Yan-song¹, ZONG Li-li³, ZHANG Xin-yu², LUO Xia¹, ZHU Yan-shu¹

(1. College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Institute of Geographical Sciences and Natural Resources Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. College of Agricultural, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The *D*-galactose (*D*-gal)-induced aging model mice were used to explore the effects of antioxidant peptides from rice bran on the activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), succinate dehydrogenase (SDH) and total adenosine triphosphatase (T-ATPase) in mitochondria of heart and brain and on deletion mutation of mitochondria DNA (mtDNA) in brain by polymerase chain reaction (PCR) and photodensity scan. Results indicated that rice bran antioxidant peptides at the condition of high dosage could significantly increase the activities of CAT, GSH-Px, SDH and T-ATPase in mitochondria of heart and brain ($P < 0.05$); and significantly decrease the depletion of mtDNA in brain ($P < 0.01$) of *D*-gal-induced-aging mice when compared with the model group. These investigations suggest that rice bran antioxidant peptides are able to enhance antioxidant function of aging mice induced by *D*-gal, and have good protective effect on mtDNA.

Key words: rice bran antioxidant peptides; mitochondrial DNA (mtDNA); anti-aging

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0040-04

随着世界人口老龄化趋势的加重, 如何提高生存质量、延年益寿越来越受到人们的广泛关注。生物活性肽具有抗氧化损伤、调节机体免疫功能、预防与年龄相关疾病等多种生理功能, 适当补充活性肽对于延缓衰老具有重要意义。

米糠是稻米加工后的副产物, 蛋白含量高, 必需氨基酸组成合理。已发现米糠肽具有多种生理活性, 如抗氧化^[1]、降血压^[2]、调节免疫及类阿片拮抗^[3]等作用。但就其抗衰老作用的详细深入研究较鲜见。

近年来研究表明, 线粒体在结构和功能上有很多增

龄性变化, mtDNA突变在组织细胞衰老过程中起重要作用。本实验根据以往工作基础, 以自由基损伤学说为切入点, 考察米糠抗氧化肽对*D*-gal致衰老小鼠心、脑线粒体CAT、GSH-Px、SDH、T-ATPase活性及脑mtDNA缺失情况的影响, 旨在为肽类抗衰老食品、保健品等的开发以及米糠的综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2010-03-27

基金项目: 辽宁省教育厅重点实验室项目(2008S207)

作者简介: 樊金娟(1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向植物资源开发与利用。E-mail: jinjuanf@hotmail.com

米糠, 由沈阳千重浪稻业提供。

昆明种小鼠 60 只, 体质量 18~22g, 雌雄各半, 由长春医学实验动物研究中心提供。

总蛋白定量(考马斯亮蓝法)测试盒, CAT、GSH-Px、SDH、超微量 ATP 酶活性测试盒 南京建成生物工程研究所; Taq DNA 聚合酶 TaKaRa 公司; 琼脂糖 西班牙 Biowet 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

U-3010 型紫外-可见分光光度计 日本 Hitachi 公司; TC-512 型 PCR 仪 英国 Techne 公司; DYY-6B 型稳压稳流电泳仪 北京六一仪器厂; T2A 型凝胶成像仪 BIO-RAD 公司; JY92-2D 超声波细胞粉碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司; HH-6 型数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; D-37520 Osterode 台式高速冷冻离心机 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 米糠抗氧化肽的制备

按本实验室方法进行^[4], 采用 AS1.398 中性蛋白酶, 在 pH7.0、温度 55℃、[E]/[S] 为 12% 条件下酶解米糠蛋白 6h, 4000r/min 离心 10min, 获得米糠抗氧化混合肽。

1.3.2 动物分组及处理

标准饲料饲养小鼠一周后开始正式实验。将 60 只小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只, 雌雄各半, 分别为: 对照组, 衰老组, 米糠抗氧化肽低、中、高剂量治疗组。衰老组和米糠肽各治疗组每日按 100mg/kg bw 颈背部皮下注射 D-gal, 对照组注射等量生理盐水; 米糠肽低、中、高剂量治疗组每日分别灌胃米糠抗氧化肽 100、200、500mg/(kg bw · d)。每日定时灌胃、注射一次, 连续 6 周, 期间按性别一组两笼, 自由饮食饮水, 观察小鼠体征, 每周称量体质量一次。

末次给药次日, 所有小鼠脱颈椎处死, 迅速取脑、心脏, 冷生理盐水冲洗、滤纸吸干, 于液氮速冻, -70℃ 保存, 备用。

1.3.3 线粒体的制备

冰浴中制备 10% 的心、脑肌组织匀浆, 4℃、2000r/min 离心 10min, 取上清 10000r/min 离心 15min, 沉淀物即为线粒体。将分离的线粒体用冰冷的匀浆介质制成混悬液, 超声波破碎线粒体膜, 用于生化指标的测定。

1.3.4 脑 mtDNA 缺失的检测

参考文献[5]提取 mtDNA, 参照小鼠 mtDNA 全序列^[6]及文献[7-8]设计的引物序列, 共用 5 个引物(由金思特科技南京有限公司合成): L₁、L₂、P₁、P₂ 和 H。引物序列及位置: L₁ 8858 TCTATTCATCGTCTCGGAAG 8877; L₂ 12883 TACCATTCTAACAGGGTTC 12902;

H 13354 TTTATGGGTGTAATGCGGTG 13335; P₁ 8955 CCTCCAACAGGAATTCACC 8974; P₂ 13092 AATGCTAGGCGTTTGATTGG 13111。L₁、L₂ 横跨 mtDNA 常见缺失区, 运用巢式 PCR 法, L₁/H、P₁/P₂ 用于扩增缺失型 mtDNA 片段, 产物 304bp 反映缺失型 mtDNA (3867bp) 的含量, L₂/H 用于扩增野生型 mtDNA 片段, 产物 472bp 反映正常 mtDNA 的含量。

PCR 反应体系及扩增条件: 参照文献[8]方法略有改动, 其中以 P₁/P₂ 为引物时的退火温度 56℃。每个样本缺失型和野生型片段各扩增 3 次。

产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, Goldview 染色。运用 JD-801 专业数码凝胶图像分析软件 3.3, 取得各条带积分光密度, 分别以 3 次扩增条带的平均积分光密度值代表各 PCR 产物的含量。计算缺失型 mtDNA 与野生型 mtDNA 的光密度比值, 比较各组缺失差异。

1.3.5 指标测定

组织蛋白含量、CAT、GSH-Px、SDH、T-ATPase 活性按试剂盒说明书方法测定。

1.3.6 统计学分析

数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析, 用最小显著差法(LSD)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 米糠抗氧化肽对 D-gal 致衰老小鼠体征表现的影响

与对照组相比, 衰老组小鼠连续颈背部皮下注射 D-gal 3 周后逐渐出现毛色暗淡发黄, 松散无光泽, 脊背隆起, 皮肤松懈, 食欲减退, 形体瘦弱, 自发活动减少, 行动迟缓, 精神萎靡, 反应迟钝等衰老体征, 并随给药时间的延长, 表现愈明显。与衰老组相比, 米糠抗氧化肽各组随剂量增高, 小鼠毛色、形体、食欲、精神状态及反应灵敏度等情况逐渐得以改善, 其中高剂量组与对照组相比基本无差别。

2.2 米糠抗氧化肽对 D-gal 致衰老小鼠体质量的影响

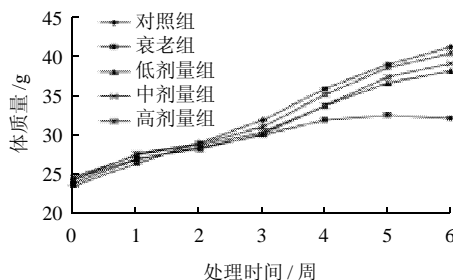


图1 米糠抗氧化肽对 D-gal 致衰老小鼠体质量的影响

Fig.1 Effect of rice bran antioxidant peptides on body weight of aging mice induced by D-gal

体质量的改变是衰老变化的重要生理指标之一。从图1可以看出,处理第1周,各组小鼠体质量均增加迅速,而处理第2周,小鼠体质量增加量有所下降,而后又逐渐回升。可能是由于灌胃操作对动物食道有一定刺激,影响其食欲,但经过一定的适应期又逐渐得到恢复,其中高剂量组接近对照组。而与对照组和米糠抗氧化肽组相比,衰老组小鼠体质量增加缓慢,随着处理时间的延长,其进食量逐渐减少,实验后期体质量有所下降。

2.3 米糠抗氧化肽对 *D*-gal 致衰老小鼠心脑线粒体 CAT、GSH-Px 活性的影响

表1 米糠抗氧化肽对 *D*-gal 致衰老小鼠心、脑线粒体 CAT 活性的影响

Table 1 Effect of rice bran antioxidant peptides on the activity of CAT in mitochondria of heart and brain in aging mice induced by *D*-gal

组别	剂量 / (mg/(kg bw · d))	CAT 活力 / (U/g)	
		心线粒体	脑线粒体
对照组	—	522.378 ± 87.215	654.432 ± 108.905
衰老组	—	385.636 ± 53.075 [△]	432.820 ± 100.873 ^{△△}
低剂量组	100	439.700 ± 85.859	514.593 ± 95.187
中剂量组	200	469.469 ± 89.150	585.841 ± 93.653*
高剂量组	500	503.142 ± 65.999*	646.453 ± 105.951**

注: △.与对照组比较,有显著性差异($P < 0.05$); △△.与对照组比较,有极显著性差异($P < 0.01$); *.与衰老组比较,有显著性差异($P < 0.05$); **.与衰老组比较,有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

表2 米糠抗氧化肽对 *D*-gal 致衰老小鼠心、脑线粒体 GSH-Px 活性的影响

Table 2 Effect of rice bran antioxidant peptides on the activity of GSH-Px in mitochondria of heart and brain in aging mice induced by *D*-gal

组别	剂量 / (mg/(kg bw · d))	GSH-Px 活力 / (U/mg)	
		心线粒体	脑线粒体
对照组	—	31.677 ± 4.068	15.022 ± 2.183
衰老组	—	20.008 ± 5.716 ^{△△}	9.425 ± 0.486 ^{△△}
低剂量组	100	23.897 ± 4.697 [△]	11.712 ± 1.596 [△]
中剂量组	200	25.328 ± 3.791	13.429 ± 1.165**
高剂量组	500	29.099 ± 4.642*	13.994 ± 1.648**

由表1、2可知,衰老组小鼠心脑线粒体 CAT、GSH-Px 活性较对照组显著下降($P < 0.05$);米糠抗氧化肽低、中、高剂量组小鼠心脑线粒体 CAT、GSH-Px 活性较衰老组则有不同程度提高,高剂量组提高水平显著($P < 0.05$),而低剂量组小鼠 GSH-Px 活性与对照组相比仍差异显著($P < 0.05$)。说明米糠抗氧化肽能够提高致衰老小鼠抗氧化酶活性,增强其清除自由基能力,并呈一定剂量效应关系。

2.4 米糠抗氧化肽对 *D*-gal 致衰老小鼠心脑线粒体 SDH、T-ATPase 活性的影响

表3 米糠抗氧化肽对 *D*-gal 致衰老小鼠心、脑线粒体 SDH 活性的影响

Table 3 Effect of rice bran antioxidant peptides on the activity of SDH in mitochondria of heart and brain in aging mice induced by *D*-gal

组别	剂量 / (mg/(kg bw · d))	SDH 活力 / (U/mg)	
		心线粒体	脑线粒体
对照组	—	86.165 ± 4.368	73.331 ± 11.671
衰老组	—	55.607 ± 12.857 ^{△△}	49.201 ± 7.771 ^{△△}
低剂量组	100	66.345 ± 8.668 [△]	57.584 ± 3.351 [△]
中剂量组	200	71.396 ± 5.285 ^{△*}	68.192 ± 9.174*
高剂量组	500	79.525 ± 6.429**	71.838 ± 13.824**

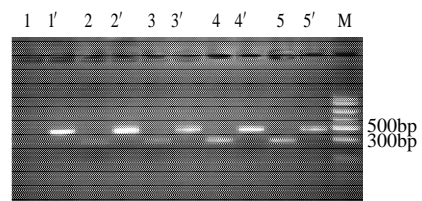
表4 米糠抗氧化肽对 *D*-gal 致衰老小鼠心、脑线粒体 T-ATPase 活性的影响

Table 4 Effect of rice bran antioxidant peptides on the activity of T-ATPase in mitochondria of heart and brain in aging mice induced by *D*-gal

组别	剂量 / (mg/(kg bw · d))	T-ATPase 活力 / (U/mg)	
		心线粒体	脑线粒体
对照组	—	3.409 ± 0.309	5.998 ± 0.199
衰老组	—	2.830 ± 0.211 ^{△△}	4.991 ± 0.201 ^{△△}
低剂量组	100	2.936 ± 0.215 ^{△△}	5.403 ± 0.325 ^{△△*}
中剂量组	200	3.127 ± 0.178	5.672 ± 0.324**
高剂量组	500	3.267 ± 0.174*	5.757 ± 0.236**

SDH 处于呼吸链第二位,是线粒体的标志酶,其活性高低直接影响 ATP 的合成。ATPase 存在于组织细胞和细胞器的膜上,其活力大小是各种细胞能量代谢及功能有无损伤的重要指标。由表3、4可知,衰老组 SDH、T-ATPase 活性较对照组明显降低($P < 0.01$);而米糠抗氧化肽各组 SDH、T-ATPase 活性较衰老组均有不同程度地提高,其中高剂量组提高明显($P < 0.05$),但与对照组相比低剂量组仍有显著差异($P < 0.05$)。说明米糠抗氧化肽具有提高致衰老小鼠能量代谢的作用,并呈量效关系。

2.5 米糠抗氧化肽对 *D*-gal 致衰老小鼠脑 mtDNA 缺失的影响



1~5.分别为对照组,米糠抗氧化肽高、中、低剂量组,衰老组缺失 mtDNA 产物(304bp); 1'~5'.各组野生型 mtDNA 产物(472bp)。

图2 小鼠脑 mtDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR products of mtDNA from brain mitochondria of aging mice induced by *D*-gal

表5 米糠抗氧化肽对D-gal致衰老小鼠脑mtDNA缺失的影响
Table 5 Effect of rice bran antioxidant peptides on mtDNA deletion in brain mitochondria of aging mice induced by D-gal

组别	剂量/ (mg/(kg bw · d))	积分光密度值		M/W
		缺失型M(304bp)	野生型W(472bp)	
对照组	—	10.3 ± 8.5512	152.20 ± 88.0830	0.0762 ± 0.0664
衰老组	—	71.10 ± 18.9059 ^{△△}	142.30 ± 31.6651	0.5024 ± 0.0825 ^{△△}
低剂量组	100	62.00 ± 16.9706 ^{△△}	154.10 ± 27.3026	0.4221 ± 0.1537 ^{△△}
中剂量组	200	42.70 ± 8.1656 ^{△△**}	148.50 ± 36.9060	0.3063 ± 0.1016 ^{△△**}
高剂量组	500	25.90 ± 19.0056 ^{△△**}	159.00 ± 31.6719	0.1520 ± 0.1154 ^{**}

注: M.缺失型mtDNA产物光密度值; W.野生型mtDNA产物光密度值。

由图2及表5可知, 对照组仅个别出现缺失, 且缺失量很少; 衰老组、米糠抗氧化肽各组小鼠均存在3867bp片段不同程度缺失现象, 高剂量组个别未见缺失; 衰老组缺失型与野生型mtDNA的光密度比值较对照组显著升高($P < 0.01$); 而与衰老组相比, 米糠抗氧化肽各组该比值则有不同程度降低, 中、高剂量组降低呈极显著水平($P < 0.01$), 但中、低剂量组较对照组仍有明显差异($P < 0.01$)。说明米糠抗氧化肽能够抑制致衰老小鼠脑mtDNA的缺失突变, 并呈一定的量效关系。

3 讨 论

目前认为, 衰老的发生和发展与自由基损伤和线粒体缺失突变有直接关系^[9-10]。线粒体是细胞能量转换和释放的重要场所, 同时是机体活性氧、自由基的主要产地。mtDNA位于线粒体内膜附近, 无组蛋白保护, 裸露于呼吸链产生的大量自由基环境中, 而且其没有内含子, 任何突变都能影响DNA的编码序列, 又缺乏完善的修复机制, 所以与核DNA相比, mtDNA更易遭受氧化损伤和诱变源的攻击^[11-13]。mtDNA与体内能量代谢直接相关, 参与编码氧化呼吸链组成成分的多个蛋白质亚单位, 因此mtDNA氧化损伤引起mtDNA突变的积累可导致能量产出缺陷, 进而导致细胞衰老和死亡^[14-15], 其中, 心、脑等以ATP为主要能源的代谢旺盛器官首先表现衰老^[16]; 同时, mtDNA突变与体质量减轻、皮下脂肪减少及脊柱弯曲等衰老表现之间亦存在因果关系^[17]。因而延缓线粒体的破坏过程, 可能延长细胞寿命, 进而延长机体的寿命^[18]。

本实验结果显示, 连续皮下注射D-gal 6周后, 与对照组相比, 衰老组小鼠心、脑线粒体CAT、GSH-Px、SDH、T-ATPase活性显著下降, 脑mtDNA缺失明显增加, 同时出现了一系列衰老体征变化, 说明本实验衰老模型的建立是成功的。而米糠抗氧化肽各组小鼠CAT、GSH-Px、SDH、T-ATPase活性及mtDNA缺失状况有不同程度改善, 高剂量效果最佳。说明米糠抗氧化肽可通过减轻线粒体氧化损伤, 保护其结构与功能进而起到延缓衰老的作用。推测其机制可能为:

第一, 抗氧化机制是其发挥抗衰老作用的前提。

米糠抗氧化肽体外测定表现出的良好的清除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 能力^[1], 为其在体内发挥抗氧化活性奠定基础。通过直接清除自由基, 抑制自由基链式反应, 以及提高抗氧化酶活性等, 减少了线粒体内自由基含量, 进而保护线粒体结构与功能的完整: 1)减轻了自由基对膜的攻击, 降低膜脂过氧化程度, 保护脂质体系、膜质完整性; 2)减轻了自由基对mtDNA的攻击, 降低mtDNA氧化损伤程度, 抑制mtDNA缺失突变, 减少有缺陷的呼吸链, 维持细胞的能量稳定, 从而起到抗衰老作用。

第二, 从营养价值角度讲, 发挥主要功能的米糠抗氧化肽由16种氨基酸组成, 含有9种人体必需氨基酸, 占该肽总氨基酸含量的40.28%; 其F值(Fischer Ratio)为4.33, 高于人体正常值, 具有较高的营养价值和较强的保健功能^[4]; 同时小肽能被肠道直接吸收, 而且吸收速度快, 可改善肠道功能。由此推测米糠抗氧化肽可能通过营养保健功能提高了衰老小鼠抗老防衰的能力。

第三, 米糠抗氧化肽是由游离氨基酸、肽段和蛋白质共同组成的混合物, 其成分可能对小鼠体内一些重要酶, 如抗氧化酶、呼吸链复合体酶等的合成代谢或正常功能发挥具有积极作用, 进而提高抗衰老能力。

第四, 米糠抗氧化肽可能具有一定调节糖代谢的能力。

参考文献:

- [1] 樊金娟, 付岩松, 罗霞, 等. 米糠肽的抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(12): 78-81.
- [2] YOSHIYUKI S, KEIKO W. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(10): 1767-1771.
- [3] TAKAHASHI M, YOSHIKAWA M. Isolation and characterization of oryzatensin: a novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin[J]. Biochem and Molecular Biol International, 1994, 33(6): 1151-1158.
- [4] 樊金娟, 罗霞, 董智. 米糠抗氧化肽的提取和纯化工艺研究[J]. 食品科技, 2008, 33(12): 169-173.
- [5] 项平, 高国全, 姚志彬. 大鼠脑线粒体DNA提取方法[J]. 解剖科学进展, 2000, 6(2): 184-185.
- [6] BROSSAS J Y, BAAREAU E, COURTORIS Y, et al. Multiple deletions in mitochondrial DNA are present in senescent mouse brain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 202(2): 654-659.
- [7] 曾昭惠, 于宏升, 张宗玉, 等. 小鼠衰老时脑细胞线粒体DNA片段的缺失[J]. 中华老年医学杂志, 1998, 17(3): 136-138.
- [8] 梁海凌. 康欣口服液对老年小鼠脑线粒体DNA缺失突变影响的实验研究[D]. 福州: 福建中医学院, 2006.
- [9] BARJA G. Free radicals and aging[J]. Trends Neurosci, 2004, 27(10): 595-600.
- [10] SASTRE J, PALLARDO F V, VINA J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(1): 1-8.
- [11] 逆冬冬, 张咸宁, 祁鸣. 人线粒体DNA与衰老和退行性疾病的研究进展[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2007, 36(1): 93-97.
- [12] WALLACE D C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: A dawn for evolutionary medicine[J]. Annu Rev Genet, 2005, 39: 259-407.
- [13] BALABAN R S, NEMOTO S, FINKEL T. Mitochondria, oxidants, and aging[J]. Cell, 2005, 120(4): 483-495.
- [14] SOHAL R S, WEINDRUCH R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging[J]. Science, 1996, 273(5271): 59-63.
- [15] OZAWA T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with aging and diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1271(1): 177-189.
- [16] 张洪泉, 余文新. 中华抗衰老医药学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 95-99.
- [17] TRIFUNOVIC A, WREDENBERG A, FALKENBERG M, et al. Premature aging in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase[J]. Nature, 2004, 429(6990): 417-423.
- [18] 龚开政, 张振刚, 黄铁峰, 等. 线粒体ATP敏感钾通道介导缺氧预处理细胞外信号调节蛋白激酶活化的机制[J]. 中华老年医学杂志, 2004, 23(9): 644-647.