

白藜芦醇对 D-半乳糖致衰老小鼠 GCL 和 GSH 含量的影响

李朝敢, 农嵩, 黄晓敏, 胡红柳, 郭会娜, 孙科

(右江民族医学院生物化学教研室, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 观察白藜芦醇对 D-半乳糖致衰老小鼠脑、心脏和肝脏等不同组织器官中谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)和谷胱甘肽(GSH)含量的影响,探讨白藜芦醇的抗衰老作用。 **方法** 将 60 只小鼠随机分成正常对照组、衰老模型组、白藜芦醇治疗组。衰老模型组和白藜芦醇治疗组小鼠每日皮下注射 D-半乳糖(150 mg/kg),同时白藜芦醇治疗组每日给予白藜芦醇(20 mg/kg)灌胃治疗,42 d 后处死小鼠,取肝脏、脑和心脏等不同组织测定 GCL 和 GSH 含量。 **结果** 与正常对照组比较,衰老模型组、白藜芦醇治疗组小鼠肝脏、脑和心脏等不同组织 GCL 和 GSH 含量均显著降低($P < 0.01$),与衰老模型组比较,白藜芦醇治疗组小鼠肝脏、脑和心脏等不同组织 GCL 和 GSH 含量均显著增高($P < 0.01$)。 **结论** 白藜芦醇具有抗氧化及延缓小鼠衰老作用。

关键词: 白藜芦醇;谷氨酰半胱氨酸连接酶;谷胱甘肽;抗氧化剂;抗衰老酶

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)06-0549-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.06.010

Effect of resveratrol on GCL and GSH content in aging mice induced by D-galactose

Li Chaogan, Nong Song, Huang Xiaomin, Hu Hongliu, Guo Huina, Sun Ke

(Department of Biochemistry of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of resveratrol on glutamyl-L-cysteine ligase (GCL) and glutathione (GSH) content in the brain, heart and liver tissues of aging mice induced by D-galactose and to explore the anti-aging effect of resveratrol. **Methods** Sixty mice were randomly divided into a normal group, an aging model group and a resveratrol treatment group. The mice in the aging model group and the resveratrol treatment group were subcutaneously injected with D-galactose (150 mg/kg) daily. Meanwhile, mice of the resveratrol treatment group were treated by means of intragastric administration of resveratrol (20 mg/kg) daily. After 42 days, the mice were sacrificed and the contents of GCL and GSH in different tissues of liver, brain and heart drawn out from the sacrificed mice were determined. **Results** Compared with the normal control group, both the content of GCL and GSH in the mouse liver, brain and heart tissues of the aging model group and the resveratrol treatment group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the aging model group, the contents of GCL and GSH in the mouse liver, brain and heart tissues of the resveratrol treatment group all increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Resveratrol has antioxidant and delaying aging effects on mice.

Key words: resveratrol; glutamyl-L-cysteine ligase; glutathione; antioxidants; sirtuins

白藜芦醇(resveratrol, Res)天然存在于葡萄、花生、桑葚和虎杖等植物中,研究发现它具有抗衰老、抗肿瘤、预防心血管疾病以及可提高机体免疫力等多种

作用^[1]。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是生物体内重要的抗氧化物质,可清除生物体脂质过氧化物或氧自由基^[2]。谷氨酰半胱氨酸连接酶(glutamyl-L-cysteine

ligase, GCL)催化生物体内从头合成 GSH, GCL 含量的增加能使生物体内 GSH 合成量增加,从而保证机体抗氧化作用和清除自由基。本研究以白藜芦醇对 D-半乳糖致衰老小鼠灌胃治疗,观察小鼠肝脏、脑和心脏等不同组织中 GCL 和 GSH 含量,探讨白藜芦醇的抗氧化作用及延缓衰老作用,为白藜芦醇功效的深入研究以及开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 白藜芦醇、D-半乳糖、 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)测定试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司;总蛋白(TP)测定试剂盒购于长春汇力生物技术有限公司。

1.2 动物及动物分组 选用6个月龄 SPF 级健康昆明种小白鼠 60 只,雌雄各半,体重(20±2) g,购自右江民族医学院实验动物中心(实验动物生产许可证号:SCXK 桂 2012-0003)。动物适应性饲养 5 d 后被随机分成正常对照组、衰老模型组和白藜芦醇治疗组等 3 个实验小组,每组 20 只。

1.3 衰老模型的建立及给药 衰老模型组和白藜芦醇治疗组小鼠每日颈背部注射 D-半乳糖(150 mg/kg)建立衰老动物模型,正常对照组注射等量生理盐水,连续注射 42 d。同时,白藜芦醇治疗组小鼠每日给予白藜芦醇(20 mg/kg)灌胃治疗,正常对照组、衰老模型组给予等量生理盐水灌胃处理,连续灌胃 42 d。

1.4 小鼠肝脏、脑和心脏等不同组织中的 GCL、GSH 含量测定 第 43 d,麻醉并处死小鼠,在冰上操作分别摘取肝脏、脑和心脏,4℃生理盐水清洗后,称取各器官组织,后按重量(g):体积(ml)=1:9 加入 4℃生理盐水进行冰浴匀浆,8000 r/min 4℃离心 10 min,取上清液,制成 10%组织匀浆。按照测定试剂盒操作说明分别测定各组小鼠肝脏、脑和心脏等不同组织 GCL、GSH 含量。

1.5 统计学方法 计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理和统计分析,多组间均数比较采用单因素的方差分析,各组和对照组比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脏、脑和心脏等不同组织 GCL 含量的影响 从表 1 中可以看出,与正常对照组比较,衰老模型组和白藜芦醇治疗组小鼠肝脏、脑和心脏中的 GCL 含量均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与衰老模型组比较,白藜芦醇治疗组小鼠肝脏、脑和心脏中的 GCL 含量均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 白藜芦醇对 D-半乳糖致衰老小鼠不同组织 GCL 含量的影响 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	肝	脑	心
正常对照组	20	2.49±0.23	3.78±0.47	4.01±0.48
衰老模型组	20	1.58±0.15 ^a	2.88±0.22 ^a	2.99±0.20 ^a
白藜芦醇治疗组	20	2.31±0.15 ^{ab}	3.47±0.26 ^{ab}	3.61±0.29 ^{ab}
F		141.533	37.242	44.208
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,a: $P < 0.01$;与衰老模型组比较,b: $P < 0.01$

2.2 白藜芦醇对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脏、脑和心脏等不同组织 GSH 含量的影响 从表 2 中可以看出,与正常对照组比较,衰老模型组和白藜芦醇治疗组小鼠肝脏、脑和心脏中的 GSH 含量均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与衰老模型组比较,白藜芦醇治疗组小鼠肝脏、脑和心脏中的 GSH 含量均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 白藜芦醇对 D-半乳糖致衰老小鼠不同组织 GSH 含量的影响 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	肝	脑	心
正常对照组	20	0.34±0.06	0.49±0.03	0.52±0.04
衰老模型组	20	0.18±0.03 ^a	0.30±0.05 ^a	0.31±0.04 ^a
白藜芦醇治疗组	20	0.27±0.05 ^{ab}	0.39±0.04 ^{ab}	0.42±0.04 ^{ab}
F		56.747	120.238	115.630
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,a: $P < 0.01$;与衰老模型组比较,b: $P < 0.01$

3 讨论

GSH 是生物体内重要的抗氧化和自由基清除剂,可清除细胞内自发或酶促反应所产生的自由基,降低体内氧化应激物质的堆积,能够保护机体免受活性氧的损伤,保护体内许多酶类分子、蛋白质分子中的巯基(-SH)。GSH 在生物体内以氧化型谷胱甘肽(GSSG)或还原型谷胱甘肽(GSH)等两种形式存在,在正常生理条件下,主要以还原型谷胱甘肽(GSH)形式存在^[3]。在谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的催化下,GSH 能够把生物体代谢过程中产生的 H_2O_2 还原成 H_2O ,其自身则被氧化成 GSSG,而过多的 GSSG 又可以利用 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 提供 H 和在谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase,GR)催化下再生成 GSH;与此同时,生物体内的 GCL 和谷胱甘肽合成酶也不断催化 GSH 的合成^[4],及时补充 GSH。由此可见,为了保证生物体内抗氧化反应和清除自由基能够持续有效地进行,也就是要维持 GSH/GSSG 的动态平衡,GR 催化 GSSG 的还原和 GCL 等酶催化 GSH 的合成是关键条

件。当机体内细胞受到氧化和其他各种应激因素作用时,GSH生物合成就会相应增加,这对于保持机体内细胞的氧化还原状态具有十分重要的作用^[5]。

GCL是生物体内GSH生物合成过程中的第一步反应的催化酶,也是从头合成GSH过程中的关键酶,因此机体内GSH的合成自然会受到GCL含量的影响,机体内GCL含量的升高能够有效地加速GSH的生物合成,从而升高GSH的含量,保证机体的清除自由基能力和抗氧化反应^[4]。生物体内的GCL是由一个催化亚基(GCLc)和一个调节亚基(GCLm)组成的异二聚体。有研究表明GCL基因的表达量与机体衰老相关。研究发现老龄大鼠肝脏中GCLc、GCLm和GCL酶含量均显著下降,能够通过服用抗氧化剂如硫辛酸后可使体内GCLc含量升高,能够增强GCL活性,从而提高GSH含量,补充机体内因衰老导致的GSH含量的减少^[6]。衰老小鼠GCLc亚基的表达显著下降^[7]。GCLc基因缺失(也意味着GSH生物合成功能的缺失)的小鼠在出生前就死亡了,再一次证明机体衰老与体内GCL含量之间存在着关联性。另有研究结果也表明,通过增加GCL含量,能够促进GSH的生物合成,可以显著延长果蝇寿命^[8]。

大脑、肝脏、心脏等三种器官是动物体内中枢器官和最重要的物质代谢器官,同时肝脏又是合成GSH的重要器官,在机体衰老过程中,大脑、肝脏、心脏中的GSH含量均出现显著的下降趋势,因此通过检测这三种器官中GCL和GSH含量可以反映机体抗氧化反应和清除自由基能力。白藜芦醇属于非黄酮类多酚化合物,是葡萄、桑葚、虎杖等许多种植物在遇到不利环境时自然产生的一种植物抗毒素,研究发现,白藜芦醇能够延长机体的平均存活时间,延长正常的生命周期^[9]。

本研究的目的是探讨白藜芦醇是否对D-半乳糖致衰老小鼠脑、心脏和肝脏等不同组织器官中GCL和GSH含量造成影响,以及机体衰老是否与GCL和GSH含量之间存在着关联性,为白藜芦醇在抗氧化作用以及抗衰老领域的研究中提供有效的科学数据。从我们的实验结果中发现,正常对照组小鼠肝脏、大脑和心脏等三种组织器官中GCL和GSH含量均显著高于衰老模型组和白藜芦醇治疗组,三个实验组中又以衰老模型组为最低,由此可见机体衰老GCL和GSH含量下降。但是这种下降能够被白藜芦醇的治疗得到有效的逆转,从研究结果中可以看出,经过白藜芦醇治疗后,小鼠肝脏、脑和心脏中的GCL和GSH含量均比衰老模型组显著升高,提示白藜芦醇治疗后GCL和GSH含量得到有效的恢复。与原江水^[10]研究发现白藜芦醇能够显著提高老龄大鼠肝脏、心脏、脑中GCLc

亚基与GCLm亚基的基因表达,增加GCL含量和活性结果一致。另外从三组小鼠的肝脏、脑和心脏中的GCL和GSH含量进一步分析可以看出,三种组织器官中GCL含量升高则GSH的含量也相应升高,GCL含量下降则GSH的含量也相应下降,与文献报道^[6]结果相一致。提示白藜芦醇可能影响小鼠肝脏、脑和心脏中的GCL基因表达,增加GCL含量,有效地加速GSH的生物合成,从而升高GSH的含量。有关白藜芦醇是否影响GCL的mRNA水平还需要下一步的实验证实。

由此可见,白藜芦醇在抗氧化作用、清除自由基以及延缓衰老作用方面是值得深入研究的课题。

参考文献:

- [1] Whitlock NC, Baek SJ. The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors[J]. *Nutrition and cancer*, 2012, 64(4): 493-502.
- [2] Zhang ZZ, Lee EE, Sudderth J, et al. Glutathione depletion, pentose phosphate pathway activation, and hemolysis in erythrocytes protecting cancer cells from vitamin C-induced oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(44): 22861-22867.
- [3] Forman HJ. Glutathione - From antioxidant to post-translational modifier[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 595: 64-67.
- [4] Ferguson G, Bridge W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: the therapeutic potential of r-glutamylcysteine[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 593: 12-23.
- [5] 原江水, 张宗亮, 宋卫青. 谷氨酰半胱氨酸连接酶活性在系统性红斑狼疮中的变化及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(6): 975-977.
- [6] Liu R, Choi J. Age-associated decline in gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression in rats[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(4): 566-574.
- [7] Guerretaz LM, Johnson SA, Cambier JC. Acquired hematopoietic stem cell defects determine B-cell repertoire changes associated with aging[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33): 11898-11902.
- [8] Toroser D, Sohal RS. Kinetic characteristics of native gamma-glutamylcysteine ligase in the aging housefly, *Musca domestica* L[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(3): 586-593.
- [9] Wong YT, Gruber J, Jenner AM, et al. Chronic resveratrol intake reverses pro-inflammatory cytokine profile and oxidative DNA damage in ageing hybrid mice[J]. *Age (Dordr)*, 2011, 33(3): 229-246.
- [10] 原江水. 白藜芦醇对大鼠的抗衰老作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.

收稿日期: 2018-11-05; 修回日期: 2018-11-30