

保护蛋白对 D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠保护作用的初步研究

吴 歆 王 斌¹ 顾熊飞²(广州 510180 广东省药品检验所生化室; ¹510080 中山医科大学科技开发部; ²中山医科大学生化教研室)

摘要 目的: 初步研究保护蛋白对 D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠的保护作用并探讨其机制。方法: 昆明鼠随机分成三组, 模型组和保护组腹腔注射 D-半乳糖 120mg/(Kg·d) 诱导小鼠亚急性衰老, 保护组同时注射保护蛋白 6mg/(Kg·d), 对照组注射等量生理盐水。40d 后, 处死小鼠, 分别测定各组小鼠血清总 SOD 活性, 脑组织 MDA 及脂褐素含量, 并电镜观察小鼠大脑皮层神经元的超微结构。结果: 对照组、保护组小鼠的血清总 SOD 活性明显高于模型组($P < 0.05$), 脑组织 MDA 和脂褐素含量显著低于模型组($P < 0.05$), 而保护组与对照组的各项指标无显著性差异($P > 0.05$)。电镜观察可见模型组小鼠次级溶酶体增多并有脂褐素沉积, 线粒体有轻度肿胀; PRP 保护组次级溶酶体增多但无脂褐素沉积, 其它细胞器基本正常。结论: 保护蛋白对 D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠有一定的保护作用。

关键词 保护蛋白; D-半乳糖; 亚急性衰老模型

Effect of protective protein (PRP) on subacute mouse aging model induced by D-galactose

Wu Xin, Wang Bin¹, Gu Xiongfei²(GuangDong Provincial Institute for Drug Control, Guangzhou, 510180; ¹Department of Science Development, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080; ²Department of Biochemistry, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effect of Protective Protein (PRP) on subacute aging model mice induced by D-galactose. **METHOD:** Kunming mice were divided into three groups. The Control group was injected with normal saline, and the subacute aging model was induced by injection of D-galactose 120mg/kg×d in mice. The mice of protection group were injected with activated PRP at a dose of 6mg/kg×d together with D-galactose treatment. After 40 days, mice were killed and parts brain were cut for histological examination. The activity of superoxide dismutase in serum and the contents of lipid peroxides in brain were measured by test kits. The contents of lipofuscin in brain were quantitated by fluorometry. **RESULTS:** Histological examination of brain showed that mice of model group has more remarkable aging characteristics than those of control and protection group. Furthermore, compared with control group and protection group, it showed that in model group the activity of superoxide dismutase decreased in serum; the contents of lipid peroxides and lipofuscin in brain both increased. **CONCLUSION:** PRP might delay aging process in mice induced by D-galactose.

KEY WORDS protect protein, D-galactose, subacute aging model

保护蛋白(protector protein, PRP)是 Kim 等 1988 年首先从啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中提取的一种新型的抗氧化蛋白。PRP 没有 SOD, CAT, GSH-Px 等传统过氧化物酶的活性, 在 DNA 与氨基酸序列上也没有任何同源性^[1,2]。它能特异性防止由巯基化合物如二巯苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇等充当电子供体的混合功能氧化系统(mixed-function oxidation system, MFO)介导的多种氧化损伤, 防止多种酶的失活和质粒 DNA, 小牛胸腺 DNA 的断裂^[3,4], 而对不含巯基化合物的 MFO 系统不表现相应活性。由于 PRP 抗氧化活性对巯基的依赖性, 因此又称之为巯基依赖性保护蛋白(thiol-dependent protector, TPP)或巯基特异性抗氧化蛋白(thiol-specific antioxidant protein, TSA)。此后, 在多种原核生物和真核生物中发现大量类似具有依赖巯基的抗氧化活性的蛋白质, 它们的氨基酸、DNA 序列与 PRP 有不同程

度的同源性, 是一类进化保守的同源蛋白, 目前将它们归为一类新型的抗氧化蛋白家族, 统称为过氧化氧还蛋白(peroxiredoxin, PRx), 并根据它们氨基酸序列的相似程度分为六个亚类(I-VI)。酵母与人红细胞的保护蛋白同属于 PRx II, 主要分布于细胞胞浆, 并有 C-末端与细胞膜相连。

根据衰老的自由基学说, 衰老是由于自由基主要是氧自由基对细胞成分的有害进攻造成的。国内外研究发现, PRP 在体外具有清除羟基自由基和 H_2O_2 ^[5-6]的作用, 本实验拟从人红细胞中分离纯化 PRP, 并在整体动物水平研究其对亚急性衰老模型小鼠的保护作用及初步探讨其作用机制。

1 实验材料

1.1 动物

昆明种雄性小鼠, 体重(20±3)g, 中山医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂

人的压积红细胞购自广州血站;二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, Sigma);人重组保护蛋白由美国国立卫生研究所(NIH)惠赠;D-半乳糖(上海试剂二厂);SOD及MDA检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

723型分光光度计;荧光分光光度计;内切式高速匀浆机。

2 实验方法

2.1 保护蛋白(PRP)的纯化与鉴定

压积红细胞经破膜、离心得取上清液(样品I)。上清液加入饱和硫酸铵溶液盐析,离心,弃去上清液,沉淀用蒸馏水溶解得样品II。样品II上样CM-Sephadex C50柱,用枸橼酸缓冲液洗脱,分段收集洗脱液,合并含有PRP的洗脱液,洗脱液浓缩得样品III。样品III上样DEAE-Sephacel柱,用0~600mmol/L KCl/Tris-HCl缓冲液线性梯度洗脱,经SDS-PAGE鉴定,合并含有PRP的洗脱液,超滤浓缩(样品IV,即高纯度PRP),冷冻干燥备用。

2.2 亚急性衰老模型的复制与保护

小鼠随机分为三组:对照组、模型组与保护组,每组10只。模型组和保护组腹腔注射D-半乳糖120mg/(kg·d),保护组同时腹腔注射活化PRP 6mg/(kg·d)(PRP 1mg/ml加DTT至20mmol/L活化1h);对照组同法给予等量生理盐水。连续40d。

2.3 指标的测定及形态学观察

2.3.1 血清总SOD活性测定 小鼠末次给药后24h,眼眶取血,分离血清,按试剂盒说明书方法测定SOD活性。

2.3.2 小鼠脑组织MDA含量测定 小鼠颈椎脱臼处死,取部分小鼠新鲜脑组织,按1:9加入预冷生理盐水制成10%脑匀浆液,4000×g离心15min,取上清液,按试剂盒说明书方法测定MDA含量。

2.3.3 小鼠脑组织脂褐素含量测定 取上述小鼠部分脑组织,吸尽血液,精密称重100mg,加入新鲜配制的氯仿甲醇混合液(氯仿:甲醇2:1)2ml,高速匀浆,过滤,滤渣用提取液洗涤,合并滤液至5ml,测定其荧光强度。以0.05mol/L硫酸新鲜配制的0.1μg/ml硫酸奎宁为标准,氯仿甲醇液为空白,激发波长(EX)为360nm,发射波长(EM)为450nm,测定样品的荧光强度。

2.3.4 形态学观察 取上述小鼠部分脑组织,锇酸固定,电镜观察。

3 实验结果

3.1 保护蛋白的纯化与鉴定

纯化各步样品的SDS-PAGE见图1,凝胶经考马斯亮蓝R-250染色液染色,脱色后扫描,根据峰面积计算纯化得到的PRP的纯度为98.4%。

3.2 小鼠血清总SOD活性,脑组织MDA含量、脂褐素含量

结果见表1。由表1可见,D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠血清总SOD活性降低,脑组织MDA、脂褐素含量升高,与对照组相比差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$);保护蛋白能抑制小鼠血清总SOD活性降低,脑组织MDA、脂褐素含量升高,保护组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

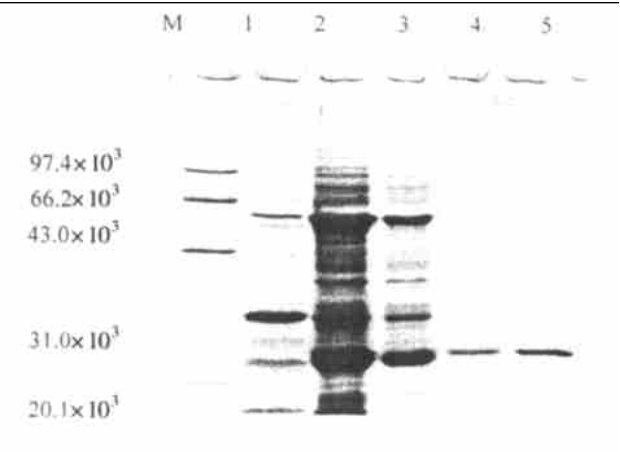


图1 纯化各步样品的SDS-PAGE图

M: 蛋白标准; 1: 样品 I; 2: 样品 II; 3: 样品 III; 4: 样品 IV; 5: 重组HRPRP

表1 保护蛋白对D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠的保护作用

组别	n	血清总SOD活性 (NU/ml)	脑组织MDA含量 (nmol/g×wt)	脑组织脂褐素含量 (μg/g×wt)
对照组	10	177.89±12.70	103.36±9.76	5.79±1.46
模型组	10	154.20±19.14 ¹⁾	135.81±25.43 ²⁾	8.36±0.86 ²⁾
保护组	10	173.04±12.10 ³⁾	111.94±13.73 ³⁾	7.10±1.10 ³⁾

注:与对照组比较 1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$;与模型组比较 3) $P < 0.05$

3.3 小鼠大脑皮层神经元超微结构观察

结果见图2,对照组小鼠神经元核膜清晰,线粒体丰富,嵴清晰,具多层扁平膜囊的高尔基体,粗面内质网及核糖体丰富,胞浆可见次级溶酶体。模型组小鼠次级溶酶体增多并有脂褐素沉积,线粒体有轻度肿胀。PRP保护组次级溶酶体增多但无脂褐素沉积,其线粒体、高尔基体、粗面内质网等细胞器基本正常。

4 讨论

衰老的发生机制是人类长期以来一直在探索的课题。各国学者在衰老研究中提出了如遗传学说、交联学说、自身免疫学说、应激学说等多种学说。衰老的自由基学说是Harman于1956年首先提出的。该学说认为衰老是由自由基,主要是氧自由基对细胞成分的有害进攻造成的,维持体内适当水平的抗氧化剂和自由基清除剂可以延长寿命和推迟衰老。

国内外学者根据现代的衰老学说设计了多种的衰老动物模型以供研究。D-半乳糖致亚急性衰老模型最初是根据代谢紊乱学说而设计的^[7],但近年研究表明D-半乳糖代谢过程中会产生活性氧自由基(如 O_2^- 等), O_2^- 本身和/或与其

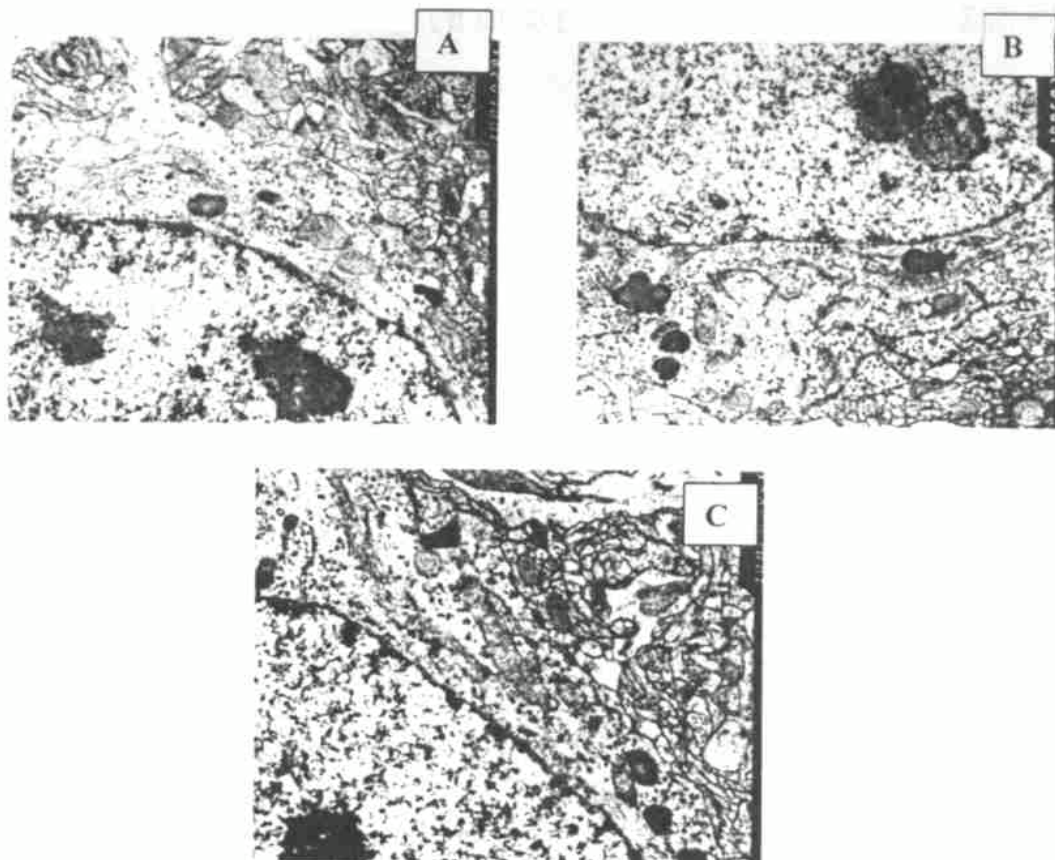


图2 小鼠大脑皮层神经元胞体超微结构电镜图($\times 10,000$)

A: 对照组; B: 模型组; C: 保护组

H_2O_2 进一步反应生成的过量羟基自由基($\cdot OH$)引起组织细胞损伤及抗氧化酶活力下降, 过氧化产物增多。因此产生过多的活性氧自由基可能是 D-半乳糖诱导衰老的主要原因^[8,9]。

保护蛋白是一种新型的抗氧化蛋白, 野生型及重组型多通过 Cys-47 与 Cys-170 形成二硫键而以二聚体形式存在。实验证明其抗氧化活性依赖巯基, PRP 在体外经 DTT 破坏二硫键, 暴露其还原性巯基而具有清除羟基自由基和 H_2O_2 的作用。本实验结果显示 PRP 可以防止 SOD 活性的下降, 脂质过氧化及脂褐素沉积; 组织切片显示, PRP 可以改善 D-半乳糖诱导小鼠亚急性衰老的脑组织的形态学变化, 提示 PRP 在体内可通过清除体内自由基, 抑制自由基的积累, 减少自由基对组织细胞的损伤而延缓衰老过程。

参考文献

- Kim K, Kim IH, Lee KY, *et al.* The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/ O_2 mixed-function oxidation system. *J Biol Chem*, 1988, 263(10): 4704.
- Chae HZ, Kim IH, Kim K, *et al.* Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1993, 268(22): 16815.
- Kwon SJ, Park JW, Kim K. Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thiol. *Biochem Mol Biol Int* 1994, 32(3): 419.
- Park JW, Floyd R. A. Generation of strand breaks and formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by a thiol/Fe(III)/ O_2 catalyzed oxidation system. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 312(1): 285.
- Lim YS, Cha MK, Uhm TB, *et al.* Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(1): 273.
- Netto LES, Chae HZ, Kang SW, *et al.* Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J Biol Chem*, 1996, 271(26): 15315.
- 龚国清, 徐赓本. 小鼠衰老模型研究. *中国药科大学学报*, 1991, 22(2): 101.
- 李文彬, 韦丰, 范明, 等. D-半乳糖在小鼠上诱导的拟脑老化效应. *中国药理学与毒理学杂志*, 1995, 9(2): 93.
- 崔旭, 李文彬, 张炳烈, 等. D-半乳糖对神经元和成纤维细胞拟老化作用的实验研究. *中国应用生理学杂志*, 1997, 13(2): 131.

收稿日期: 2001-08-13