

[文章编号] 1000-4718(2008)04-0523-04

维生素 E 对 D-半乳糖诱致衰老小鼠脑抗氧化能力、钙稳态和线粒体 DNA (mtDNA) 损伤的影响

曲 娟¹, 方文娟², 李 冰¹, 郑 浩¹, 吕俊华^{2△}⁽¹⁾ 北华大学医学院, 吉林 吉林 132013; ⁽²⁾ 暨南大学药学院药理教研室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨维生素 E (Vit-E) 对 D-半乳糖诱致衰老小鼠脑抗氧化能力、胞浆游离 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 稳态和线粒体 DNA (mtDNA) 损伤的影响。方法: 小鼠连续皮下注射 (sc) D-半乳糖 ($1\ 000\ mg \cdot k^{-1} \cdot d^{-1}$) 8 周制备衰老模型, 并于第 3 周开始给予维生素 E ($100\ mg \cdot kg^{-1}$; $250\ mg \cdot kg^{-1}$) 处理; 8 周后采用水迷宫测定小鼠学习记忆能力, 并取脑组织测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性, 测定一氧化氮 (NO) 含量和一氧化氮合酶 (NOS) 活性。Fura-2/AM 负载法和 PCR 方法分别测定海马神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度和 mtDNA 缺失突变。结果: 维生素 E 处理能明显改善 D-半乳糖诱致衰老小鼠学习记忆障碍, 抑制脑组织 NOS 活性, 降低 NO 含量, 提高 GSH-Px 和 SDH 活性, 降低 $[Ca^{2+}]_i$ 水平 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 并防止 mtDNA 缺失突变的发生。结论: 维生素 E 具有提高衰老小鼠脑抗氧化能力和调节 $[Ca^{2+}]_i$ 稳态的作用, 并抑制氧化应激引起的 mtDNA 损伤, 从而改善衰老动物学习记忆障碍。

[关键词] 半乳糖; 衰老; 线粒体; 抗氧化剂; 钙; 维生素 E**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

Influences of Vit-E on the mtDNA damage and Ca^{2+} homostasis of hippocampus and antioxidative ability in brain of aging mice induced by D-galactose

QU Xian¹, FANG Wen-juan², LI Bing¹, ZHENG hao¹, LÜ Jun-hua²⁽¹⁾ Medical College of Beihua University, Jilin 132013, China; ⁽²⁾ Department of Pharmacology, Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: yaolilv@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the influences of vitamin E (Vit-E) on the mtDNA damage and Ca^{2+} homeostasis in hippocampus and antioxidative ability in aging brain induced by D-galactose. **METHODS:** D-galactose ($1\ 000\ mg \cdot k^{-1} \cdot d^{-1}$) was injected into mice hypodermically for 8 weeks to induce aging animal model, and Vit-E ($100\ mg \cdot kg^{-1}$; $250\ mg \cdot kg^{-1}$) was administered for 6 weeks by ig at the 3rd week of making model. After Vit-E treatment for 8 weeks, water maze test was used to determine the ability of mice's learning and memory. The activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and succinate dehydrogenase (SDH), the content of nitric oxide (NO) and activity of nitric oxide synthase (NOS) in the brain tissue were detected separately. Fura-2/AM, double-wave-length fluorospectrophotometer and PCR method were used to measure the concentration of calcium ion and mtDNA mutation in the hippocampus cells. **RESULTS:** Administration of Vit-E improved significantly the ability of learning and memory in model mice, inhibited the activity of NOS and decreased the amount of NO, and increased the activities of GSH-Px and SDH respectively in brain tissues, decreased the concentration of calcium ion ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and prevented the damage of mtDNA in hippocampus. **CONCLUSION:** Vit-E can enhance the antioxidative ability, regulate the homeostasis of Ca^{2+} and inhibit the damage of mtDNA caused by oxidative stress in aging brain, and improve the ability of learning and memory in aging mice.

[KEY WORDS] Galactose; Aging; Mitochondrial; Antioxidants; Calcium; Vitamin E

衰老的发生和发展与自由基损伤和线粒体缺失突变有着直接的关系^[1,2], 但机制尚不清楚^[3]。由于线粒体自身遗传特点, 易于受到自由基和外界环境因素的影响, 产生线粒体氧应激损伤, 如线粒体内活

性氧 (ROS) 生成增多, 导致线粒体内膜脂质过氧化损伤, 氧化磷酸化水平下降, 钙稳态失调和线粒体 DNA (mtDNA) 的突变率增加等, 使得线粒体能量代谢障碍, 并触发脑神经细胞凋亡或死亡, 引起脑衰老

[收稿日期] 2006-09-16

[修回日期] 2007-04-09

△通讯作者 Tel: 020-85223764; E-mail: yaolilv@163.com

或其它神经细胞退行性病变^[4,5]。因此,减少神经细胞自由基的生成或加速其消除,或降低 mtDNA 缺失或突变发生率,对于延缓脑衰老和神经细胞退行性病变有着重要的意义。本研究采用 D-半乳糖诱致衰老模型小鼠,探讨维生素 E 对模型小鼠脑抗氧化能力、胞浆游离 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 稳态和 mtDNA 损伤的影响。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 实验动物 昆明种小鼠,体重 25-30 g(广东省医学实验动物中心。合格证号:SCXK2003-0002,粤监证字 2004A019)。在恒温(22℃)、相对湿度 65%-75%、光照周期 12 h 的环境中适应性饲养 1 周后实验。

1.2 药品与试剂 维生素 E(Sigma,批号:10191-41-0);D-半乳糖(D-gal,上海恒信化学试剂有限公司产品,批号:20050525);GSH-Px 试剂盒(批号:20050414),SDH 试剂盒(批号:20050419),考马斯亮蓝蛋白测试盒(批号:200500409),NO 试剂盒(批号:20050408),NOS 试剂盒(批号:20050413),均由南京建成生物工程研究所提供。Fura-2/AM(Sigma,批号:1004-7-2);200 bp marker(英津创伟公司);小鼠线粒体 DNA(mtDNA)缺失检测引物(TaKaRa 公司合成)参照曾昭惠等^[6]设计的引物序列,共用 3 个引物: L_1 、 L_2 和 H。 L_1 /H 用于扩增缺失型 mtDNA 片段,反应缺失型(突变型)mtDNA 量; L_2 /H 用于扩增有无改种缺失的 mtDNA 片段,反应正常 mtDNA 含量,以此作为内参。引物位置及序列: L_1 8858 TCTATTCATCGTCTCGGAAG 8877; L_2 12885 TACCATTCTAACAGGGTTC 12904;H 13354 TTTATGGGTGTAATGCCGTG 13335。

1.3 主要仪器 LW-II 型水迷宫(中国医科院药物研究所);紫外分光光度计(Lambda 45,箔金埃尔默公司);生物冷冻离心机(28S, Heraeus 公司);TGL-16G 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);KDC-16H 高速台式离心机(Zonkia 科大创新科技股份有限公司);双波长荧光分光光度计(HI-TACHI F-4500 型);梯度基因扩增仪 PC808(ASTEC 公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制、分组及给药 2 月龄健康昆明种小鼠 46 只,将其随机分为 4 组:正常对照组(14 只)、模型对照组(13 只)、维生素 E 高剂量组(250 $mg \cdot k^{-1}$, 11 只)、维生素 E 低剂量组(100 $mg \cdot k^{-1}$, 8 只)。除正常对照组给予同体积的注射用水外,其余各组动物参照文献^[7]方法,皮下(sc)注射 D-半

乳糖($1\ 000\ mg \cdot k^{-1} \cdot d^{-1}$),连续 8 周,并以水迷宫测试确定学习记忆障碍模型的成立。于造模第 3 周开始给予上述药物灌胃,连续给药 6 周,给药容积为 $10\ mL \cdot kg^{-1}\ BW$ 。

2.2 LW-II 型水迷宫法 参照文献^[8]方法,将迷宫水温控制在 $(25 \pm 2)^\circ C$,水深 10 cm。第 1 d 先将小鼠放在出口台阶上使之爬上 3 次,使其了解逃离方式,并在每次操作前先让小鼠由出口台阶爬上 1 次。本实验所用水迷宫共分 4 个盲端区域。离出口由近及远依次是 4 区、3 区、2 区、1 区。盲端有自动感应装置,自动控制记录仪记录数据。前 4 d 训练按照由易到难,离出口由近及远的顺序每天选择 1 个区域将小鼠放入,然后引导小鼠至出口,第 5 d 将小鼠放入 1 区强化训练 1 次,记录其游完全程时间(swimming time),进入盲端次数(number of errors),3 min 不能游出者按 3 min 计,并将其测试成绩作为学习成绩,24 h 后重复测试上述指标,作为记忆成绩。

2.3 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和琥珀酸脱氢酶(SDH)的测定 小鼠断头后,立刻分离脑组织(不包括海马部分),并在冰浴状态下制成 10% 组织匀浆, $2\ 000\ r \cdot min^{-1}$,离心 10 min,取上清,用生理盐水稀释至 1% 和 2% 浓度,严格按试剂盒说明书方法和步骤分别测定脑组织中 GSH-Px、SDH 活性和脑匀浆中总蛋白的含量。

2.4 一氧化氮(NO_2^-/NO_3^-)含量和一氧化氮合酶(NOS)活性的测定 取上述 10% 脑组织匀浆, $1\ 000\ r \cdot min^{-1}$,离心 5 min,取上清,550 nm 处,0.5 cm 光径比色,测定各管吸光度值,并按试剂盒说明书公式计算 NO_2^-/NO_3^- 含量和 NOS 活性。组织蛋白含量用考马斯亮蓝法测定。

2.5 海马神经细胞胞浆钙浓度的测定 Fura-2/AM 负载法^[9]测定小鼠脑海马神经细胞胞浆钙浓度。参照文献方法^[6]分离双侧海马组织,取一侧海马组织用冰冷的 Hanks 液冲洗 3 次,剪碎脑组织,加入 0.125% 胰酶,37℃ 消化 10 min,并移至冰冷的 10 mL 含 10% BSA 的 Hanks 液中终止消化,将组织块吹打成细胞悬液,经 200 目筛网过滤,收集细胞悬液,台盼蓝排斥试验检测细胞存活率大于 90%,细胞数调至 $2 \times 10^9\ cells \cdot L^{-1}$ 。将细胞悬液 37℃ 预温 5 min,加入 Fura-2/AM(终浓度为 $5\ \mu mol \cdot L^{-1}$),37℃ 恒温振荡 45 min,负载后的细胞用含 0.2% BSA 的 Hanks 液洗 2 次。测定前将细胞预温 5 min,然后再进行荧光测定。测定条件为发射波长为 500 nm、激发波长为 340 nm 和 380 nm、光栅为 5 nm,测得静息期荧光值,然后测得最大荧光值 R_{max} (加 20 μL 10% Triton X-100 获得)和最小荧光强度值 R_{min} (加 50 μL 200 mmol/L 浓度的 EGTA 获得)。按公式

$[Ca^{2+}]_i$ (nmol · L⁻¹) = $Kd \cdot (R - R_{min}) \cdot F_{(min_{380})} / (R_{max} - R) \cdot F_{max_{380}}$ 由电脑软件自动计算, 式中 $Kd = 224 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $R = F_{340} / F_{380}$ 。

2.6 mtDNA 检测 取另一侧海马组织提取 mtDNA 作 PCR 扩增模板。采用 PCR 法扩增 DNA, PCR 标准反应体系在 0.5 mL Eppendoff 管中进行: TaKaRa Ex Taq(5 U · μL⁻¹) 0.2 μL、10 × Ex Taq buffer (Mg²⁺ plus) 2 μL、dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL、模板 DNA 50 ng、引物各 0.3 μmol · L⁻¹、灭菌蒸馏水加至 30 μL。循环条件为: 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 反应 30 个循环; 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Goodview 染色, 紫外光下观察结果并照相。

3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件处理, 各组组间差异比较采用单因素方差分析。

结 果

1 维生素 E 对 D - 半乳糖诱致衰老小鼠学习记忆能力的影响

D - 半乳糖处理 8 周后, 模型组小鼠学习和记忆能力明显低于正常对照组小鼠 ($P < 0.01$), 说明小鼠衰老模型的行为学特征已经形成。维生素 E 高、低剂量预防性给药 6 周后, 明显缩短小鼠游泳时间, 并减少错误次数 ($P < 0.01, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 维生素 E 对 D - 半乳糖诱致衰老小鼠水迷宫活动的影响

Tab 1 Influences of Vit - E on learning and memory activity in the water maze in mice induced by D - galactose ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Learning activity		Memory activity	
		Swimming time(s)	Number of errors	Swimming time(s)	Number of errors
Normal control	14	38.97 ± 17.39	2.00 ± 1.13	24.50 ± 14.04	1.17 ± 0.83
Model	13	104.63 ± 36.29 ^{△△}	6.64 ± 2.65 ^{△△}	78.49 ± 40.19 ^{△△}	5.64 ± 2.90 ^{△△}
Vit - E (high)	11	49.52 ± 36.29 ^{**}	2.93 ± 1.64 ^{**}	35.33 ± 24.04 ^{**}	2.29 ± 1.59 ^{**}
Vit - E (low)	8	65.72 ± 17.97 ^{**}	4.56 ± 1.67 [*]	46.05 ± 37.18 ^{**}	2.89 ± 2.09 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ^{△△} $P < 0.01$ vs normal control group.

2 维生素 E 对模型小鼠脑组织 SDH 和 GSH - Px 活性的影响

模型组小鼠脑组织 SDH 和 GSH - Px 活性明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), 而维生素 E 处理后明显提高模型小鼠脑组织 SDH 和 GSH - Px 活性 ($P < 0.01, P < 0.05$), 见表 2。

3 维生素 E 对模型小鼠脑组织 NO 水平和 NOS 活性的影响

模型组小鼠脑 NO 水平和 NOS 活性明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 而维生素 E 高、低剂量预防性给药后, 明显抑制模型小鼠脑神经组织 NOS 的活性

和降低 NO 的水平 ($P < 0.01, P < 0.05$), 见表 3。

表 2 维生素 E 对 D - 半乳糖诱致衰老小鼠脑组织 SDH 和 GSH - Px 活性的影响

Tab 2 Influences of vitamin E on activities of SD and GSH - Px in brain tissues of aging mice induced by D - galactose ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	GSH - Px	SDH
		(10 ³ U · g ⁻¹ protein)	(10 ³ U · g ⁻¹ protein)
Normal control	14	7.6714 ± 2.7861	8.9489 ± 2.1385
Model	13	3.4558 ± 1.3600 ^{△△}	5.5673 ± 1.2667 ^{△△}
Vit - E (high)	11	6.6970 ± 2.3031 ^{**}	8.4072 ± 1.7848 ^{**}
Vit - E (low)	8	5.8276 ± 1.1677 [*]	7.9308 ± 1.7611 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ^{△△} $P < 0.01$ vs normal control group.

表 3 维生素 E 对 D - 半乳糖诱致衰老小鼠脑 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平和 NOS 活性的影响

Tab 3 Influences of vitamin E on the level of NO₂⁻/NO₃⁻ and activity of NOS in brain tissues of aging mice induced by D - galactose ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	NOS
		(μmol · g ⁻¹ protein)	(10 ³ U · g ⁻¹ protein)
Normal control	14	2.0975 ± 0.9732	0.3883 ± 0.1171
Model	13	6.9765 ± 1.6149 ^{△△}	0.8559 ± 0.2142 ^{△△}
Vit - E (high)	11	2.9547 ± 1.0545 ^{**}	0.4154 ± 0.1576 ^{**}
Vit - E (low)	8	4.3142 ± 0.8203 [*]	0.5492 ± 0.0932 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ^{△△} $P < 0.01$ vs normal control group.

4 维生素 E 对模型小鼠脑海马神经细胞 [Ca²⁺]_i 浓度的影响

模型组小鼠脑神经细胞 [Ca²⁺]_i 含量明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 而维生素 E 处理后, 小鼠脑神经细胞 [Ca²⁺]_i 含量明显低于模型组 ($P < 0.01, P < 0.05$), 见表 4。

表 4 维生素 E 对 D - 半乳糖诱致衰老小鼠脑神经细胞 [Ca²⁺]_i 的影响

Tab 4 Influences of Vit - E on the level of Ca²⁺ in hippocampus cells of aging mice induced by D - galactose ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	[Ca ²⁺] _i (nmol · L ⁻¹)
Normal control	11	300.89 ± 133.00
Model	9	572.34 ± 79.00 ^{△△}
Vit - E (high)	10	362.21 ± 83.00 ^{**}
Vit - E (low)	8	462.26 ± 67.00 [*]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ^{△△} $P < 0.01$ vs normal control group.

5 维生素 E 对模型小鼠脑海马神经细胞 mtDNA 的影响

提取海马组织 DNA 后, 以 L₁/H 作为引物对, 进行 PCR 扩增, 测试标本 (n = 4) 可见 0.47 kb 片段条

带,而模型小鼠扩增出另一个约 0.63 kb 片段的条带,说明模型小鼠海马 mtDNA 存在约 3.87 kb 片段缺失。此条带在 L₂/H 作为引物对时并未出现,说明在以 L₁/H 为引物对时所扩增出的 0.63 kb 片段不是由引物退火错误所产生。维生素 E 高剂量处理动物标本未出现缺失片段,见图 1。

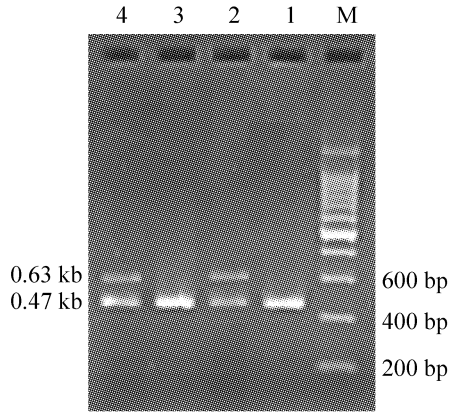


Fig 1 The agarose electrophoresis of PCR product of mtDNA in hippocampus tissues. M: DNA markers; 1: control; 2: model; 3: Vit - E(high); 4: Vit - E(low).

图 1 脑海马组织 mtDNA PCR 扩增产物电泳图

讨 论

D - 半乳糖诱发动物衰老与氧化应激损伤和自由基毒性有关。D - 半乳糖在细胞内被醛糖还原酶催化还原成过多的半乳糖醇,后者在细胞内堆积而影响细胞正常渗透压,导致细胞肿胀和功能障碍。同时,D - 半乳糖可诱发体内自由基蓄积,使得蛋白、脂质及核酸过氧化,引起线粒体结构损伤和功能紊乱,出现能量代谢障碍,导致细胞损伤。过多的自由基和 NO 也会引起脑神经细胞膜脂质过氧化损伤,而影响膜通透性及离子转运,触发 Ca²⁺ 内流^[10];脑细胞内 Ca²⁺ 超载,干扰线粒体能量产生,并引起 mtDNA 缺失突变,中性蛋白酶活性病理性增加,使得细胞膜结构分解,神经元骨架破坏导致细胞死亡^[11,12]。本实验结果表明,D - 半乳糖处理动物后,脑组织 GSH - Px 和 SDH 活性明显降低,NO 含量和 NOS 活性增加,并伴有胞浆内钙离子浓度增加和 mtDNA 缺失等,说明 D - 半乳糖可降低动物脑组织和细胞内线粒体的抗氧化能力,使氧化性物质增多,出现钙稳态失调,导致脑神经细胞损伤,表现学习记忆障碍,形成衰老样的行为学和生化学方面的改变。

维生素 E 是一种天然的脂溶性抗氧化剂。研究表明维生素 E 具有增加脑组织 SOD、GST 和过氧化氢酶抗氧化活性,增加还原型谷胱甘肽水平,抑制细胞和亚细胞膜磷脂多不饱和脂肪酸的过氧化,减轻脂质过氧化,对氧化应激所引起的衰老和神经退行性疾病具有保护作用^[13-15]。本实验结果表明,维

生素 E 可明显提高 D - 半乳糖诱发衰老动物脑组织抗氧化能力,增强对氧自由基的清除作用,减少一氧化氮等氧化性物质的生成,改善 D - 半乳糖引起的氧化应激损伤,并减低脑神经细胞内 Ca²⁺ 含量,阻止 D - 半乳糖引起氧化应激 - Ca²⁺ 超载 - 氧化应激的恶性循环,减少对线粒体 DNA 的损伤作用,从而保护脑神经细胞结构和功能的完整性,改善衰老动物的学习和记忆,延缓衰老的发生和发展。

[参 考 文 献]

[1] Barja G. Free radicals and aging[J]. Trends Neurosci, 2004, 27(10):595 - 600.

[2] Sastre J, Pallardo FV, Vina J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(1):1 - 8.

[3] 弭守玲,樊慧芝,孙爱军,等. 老年大鼠心肌线粒体的比较蛋白质组学研究[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(12):2306 - 2310.

[4] 陈 媛,周 玫 主编. 自由基医学基础与病理生理之线粒体与自由基[M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社,2002. 321 - 340.

[5] Mattson PM, Duan W, Chan SL, et al. Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior[J]. Neurobiol Aging, 2002, 23(5):695 - 705.

[6] 曾昭惠,于宏升,张宗玉,等. 小鼠衰老与脑缺血时脑细胞线粒体 DNA 片段的缺失[J]. 中华老年医学杂志,1998,17(3):136 - 138.

[7] 曹俊岭,陈刚正,任汉阳,等. 火麻仁油对 D - 半乳糖致亚急性衰老模型小鼠脑组织 NO、SOD、GSH - Px、MDA 的影响[J]. 四川中医,2004,22(5):17 - 18.

[8] 徐叔云,卞如濂,陈 修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2001. 828.

[9] Dildy JE, Steven WL. Ethanol inhibits NMDA - induced increases in free intracellular Ca²⁺ indissociated brain cells[J]. Brain Res, 1989, 499(2):383 - 387.

[10] Mather M, Rottenberg H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(2):603 - 608.

[11] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D - galactose induced mouse aging model[J]. Mech Ageing Dev, 1999, 108(3):239 - 251.

[12] Sastre J, Pallardo FV, Vina J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(1):1 - 8.

[13] 臧雪冰,胡怡秀,刘秀英,等. 天然维生素 E 延缓衰老作用的实验研究[J]. 实用预防医学,2002,9(1):32 - 33.

[14] 谢书阳,杨玲玲,陈 浩,等. Aβ 和氧自由基诱导的培养神经元凋亡及维生素 E 的保护作用[J]. 中国老年学杂志,2005,25(4):436 - 438.

[15] Farris MW, Zhang JG. Vitamin E therapy in Parkinson's disease[J]. Toxicology, 2003, 189(1 - 2):129 - 146.