

D- α -生育酚醋酸酯复配物对D-半乳糖致衰老小鼠的改善作用

阚绪甜, 陈炜莉, 李家旭, 何文江, 丁刘刚, 黎攀, 杜冰, 李文治

Ameliorative Effect of D- α -Tocopherol Acetate Complexes on D-Galactose-Induced Aging in Mice

KAN Xutian, CHEN Weili, LI Jiaxu, HE Wenjiang, DING Liugang, LI Pan, DU Bing, and LI Wenzhi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022120187>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大鲵活性肽对D-半乳糖致小鼠机体氧化损伤的修复作用

Protective Effects of Giant Salamander Bioactive Peptides on D-galactose Induced Oxidative Damage in Mice

食品工业科技. 2021, 42(16): 344-352 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110023>

非标记定量蛋白质组方法分析鲟鱼肽抗D-半乳糖导致的小鼠衰老作用的研究

Label-free Quantitative Proteomic Analysis of *Acipenser schrenki* Brandt Peptides on Aging Mice Induced by D-galactose

食品工业科技. 2019, 40(3): 290-295 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.046>

沙棘多糖对D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用

Antioxidant Effects of *Hippophae rhamnoides* Polysaccharide on Aging Mouse Induced by D-galactose

食品工业科技. 2020, 41(4): 293-297,306 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.050>

苦丁茶黄酮提取物对D-半乳糖致小鼠衰老的改善作用

Improvement effects of Kudung tea flavonoids extracts on D-galactose induced mice aging

食品工业科技. 2017(16): 303-308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.057>

姬松茸多糖的提取及其对D-半乳糖诱导衰老小鼠的免疫调节作用

Extraction of *Agaricus blazei* Polysaccharides and Its Immunomodulatory Effect on D-galactose-induced Aging Mice

食品工业科技. 2019, 40(12): 295-299,308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.048>

农大4号'欧李果实花色苷对D-半乳糖致衰老小鼠保护作用研究

Protection Effect of Anthocyanins from the Chinese Dwarf Cherry 'Nongda No 4' on Aging Mouse by D-galactose

食品工业科技. 2020, 41(17): 292-296,307 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.049>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

阚绪甜, 陈炜莉, 李家旭, 等. D- α -生育酚醋酸酯复配物对 D-半乳糖致衰老小鼠的改善作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 327-334. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120187

KAN Xutian, CHEN Weili, LI Jiaxu, et al. Ameliorative Effect of D- α -Tocopherol Acetate Complexes on D-Galactose-Induced Aging in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 327-334. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120187

· 营养与保健 ·

D- α -生育酚醋酸酯复配物对 D-半乳糖致衰老小鼠的改善作用

阚绪甜¹, 陈炜莉², 李家旭², 何文江¹, 丁刘刚¹, 黎攀², 杜冰², 李文治^{1,*}

(1. 无限极(中国)有限公司科研中心, 广东广州 510623;

2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为探究 D- α -生育酚醋酸酯复配物对 D-半乳糖致衰老小鼠的改善作用, 通过测定天然油脂复配物+植物甾醇组 (VEO 组)、D- α -生育酚醋酸酯+植物甾醇复配组 (VEZ 组)、D- α -生育酚醋酸酯+植物甾醇+虾青素复配组 (VEX 组) 的体外抗氧化能力, 并采用小鼠颈背注射 D-半乳糖建立衰老模型, 同时用不同复配物进行干预。结果表明, 三组复配物均有较强的抗氧化作用, 其中 VEZ 组的体外抗氧化效果较佳; 与衰老模型小鼠相比, 经三组复配物干预后, 小鼠体内谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px)、总抗氧化能力 (Total antioxidant capacity, T-AOC) 升高, 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 生成量下降 ($P < 0.01$), 血清中炎症因子白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor, TNF- α) 和肝功能指标谷丙转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST) 水平均显著下降 ($P < 0.01$); 经过干预后, 小鼠体内的核因子-E2-相关因子 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、醌氧化还原酶 (Quinone oxidoreductase, NQO-1)、血红素氧合酶-1 (Heme Oxygenase-1, HO-1) 的 mRNA 和蛋白表达显著增强 ($P < 0.0001$), 说明不同复配物通过上调 Nrf2、NQO-1、HO-1 的表达, 发挥其抗氧化作用, 从而达到抗衰老的效果, 其中 VEZ 组表达效果最佳。综上, D- α -生育酚醋酸酯复配物是通过增加抗氧化相关 mRNA 和蛋白表达量, 从而增强下游抗氧化酶水平来实现抗衰老的效果, 其中 D- α -生育酚醋酸酯与植物甾醇复配的效果更佳。

关键词: D- α -生育酚醋酸酯, D-半乳糖, 抗氧化作用, 抗衰老作用, 核因子-E2-相关因子 (Nrf2)

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0327-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120187



本文网刊:

Ameliorative Effect of D- α -Tocopherol Acetate Complexes on D-Galactose-Induced Aging in Mice

KAN Xutian¹, CHEN Weili², LI Jiaxu², HE Wenjiang¹, DING Liugang¹, LI Pan², DU Bing², LI Wenzhi^{1,*}

(1. Research and Development Centre of Infinitus (China), Guangzhou 510623, China;

2. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To investigate the ameliorative effect of the D- α -tocopheryl acetate compound on D-galactose-induced aging in mice, the *in vitro* antioxidant capacity of the compound of natural oils+phytosterols (VEO), the compound of D- α -tocopheryl acetate+phytosterol (VEZ), and the compound of D- α -tocopheryl acetate+phytosterol+astaxanthin (VEX) were measured. The aging model was established using mice injected with D-galactose on the back of the neck, while the intervention was carried out with different compounds. The results showed that all three groups of compounds had strong antioxidant effects, with the VEZ group showing better *in vitro* antioxidant effects. Compared with the aging model mice, the intervention of the three compounds increased glutathione peroxidase (GSH-Px) and total antioxidant capacity (T-AOC), decre-

收稿日期: 2022-12-21

作者简介: 阚绪甜 (1992-), 男, 硕士, 研究方向: 健康食品开发, E-mail: kanxt@live.com。

* 通信作者: 李文治 (1977-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 健康食品开发, E-mail: Peter.wenzhi.li@infinitus-int.com。

ased malondialdehyde (MDA) ($P<0.01$), and a decrease in the serum inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- α) and liver function indicators alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were significantly reduced ($P<0.01$). After the intervention, the mRNA and protein expression of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), quinone oxidoreductase (NQO-1) and heme oxygenase-1 (HO-1) in mice were significantly enhanced ($P<0.0001$). This indicated that the different combinations exerted their antioxidant effects through up-regulating the expression of Nrf2, NQO-1 and HO-1, thus achieving anti-aging effects, with the VEZ group showing the best expression effect. In conclusion, D- α -Tocopheryl acetate complex achieved their anti-aging effects by increasing the expression of antioxidant-related mRNAs and proteins, thus enhancing the levels of downstream antioxidant enzymes, among which D- α -tocopheryl acetate was more effective when combined with phytosterols.

Key words: D- α -tocopherol acetate; D-galactose; antioxidant effect; anti-aging effect; nuclear factor-E2-related factor (Nrf2)

衰老是机体内细胞、组织、器官渐渐衰退的生物学过程,这个过程往往伴随着一些并发症,如阿尔茨海默症、心血管疾病等^[1]。迄今,关于衰老机制的理论有自由基学说、基因学说、细胞凋亡学说、端粒学说等,其中被人们认可和研究最多就是自由基学说^[2]。当自由基的产生和抗氧化系统之间的平衡被破坏,会引起氧化应激和炎症反应的发生,从而导致衰老和疾病^[3]。核因子-E2-相关因子(Nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)是氧化还原动态平衡和细胞解毒反应的主要调节者,通过激活几种抗氧化剂和解毒酶的基因转录,如醌氧化还原酶 1(Quinone oxidoreductase 1, NQO-1),血红素氧合酶 1(Hemeoxygenase1, HO-1)发挥抗氧化作用,从而起到抗衰老作用^[4-5]。因此,寻找具有抗氧化及抗衰老作用的物质,并探究其作用机制是当前研究的热点之一。

脂溶性维生素 E 是一种天然抗氧化剂,可通过酯化反应,生成维生素 E 酯化衍生物,使维生素 E 酯化衍生物既有维生素 E 原有的生理功能,又比维生素 E 更稳定^[6]。天然形式的 D- α -生育酚醋酸酯是目前常用的维生素 E 酯化衍生物之一。美藤果油是从美藤果的果仁中提取出来的,含有很高的不饱和脂肪酸含量,具有良好的体外抗氧化性^[7]。植物甾醇可提高超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)等抗氧化酶的活性,降低丙二醛(Malondialdehyde, MDA)浓度,改善氧化应激^[8]。虾青素,一种类胡萝卜素的含氧衍生物,具有很好的体外抗氧化和提高抗氧化酶活性的能力^[9]。大量研究表明,多种抗氧化剂的合用,能形成一个氧化-还原体系,其抗氧化能力明显高于单一的抗氧化剂^[10]。王娜等^[11]研究发现维生素 E 和白藜芦醇联合应用会有明显的抗氧化协同增效作用。Tang 等^[12]研究发现 α -生育酚、 γ -谷维素和植物甾醇的抗氧化能力随复配浓度的增加而增加。仅使用单一抗氧化剂不容易对机体的抗氧化系统产生全面的作用,因此采用多种抗氧化剂联合应用逐渐成为抗氧化研究新趋势。

鉴于此,本研究通过对比 D- α -生育酚醋酸酯复配物的抗氧化和抗衰老效果,从而得出最佳的 D- α -生育酚醋酸酯复配物,为抗衰老的相关研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

天然油脂复配物+植物甾醇(按小麦胚芽油:美藤果油:红花籽油:虾青素油:植物甾醇的比例为 70:20:5:1:2 制得)、D- α -生育酚醋酸酯+植物甾醇复配物(按 D- α -生育酚醋酸酯:植物甾醇的比例为 45:1 混合而制)、D- α -生育酚醋酸酯+植物甾醇+虾青素复配物(按 D- α -生育酚醋酸酯:植物甾醇:虾青素比例为 90:2:1 混合而制)均由无限极(中国)有限公司提供;雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 50 只, (18 $\pm$ 2)g, 生产许可 SCXK(粤)2021-0041 南方医科大学实验动物中心;丙二醛试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒、总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)测试盒、天门冬氨酸氨基转移酶(Astaxanthin, AST)测试盒、白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)测试盒、白介素-6(Interleukin-6, IL-6)测试盒、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor, TNF- α)测试盒 南京建成生物工程研究所

ANKE TDL-5-A 型离心机 上海安亭分析仪器有限公司; Labserv K3 酶标仪、Evolution 300 紫外可见分光光度计、PIKOREAL96 荧光定量 RCP 仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DYY-6C 电泳仪 北京六一生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 体外抗氧化实验

1.2.1.1 DPPH·清除率 参照王肖行等^[7]的方法,并略作修改。用乙醇将不同复配物、维生素 C 稀释成质量浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/mL 的溶液,取 2 mL 不同质量浓度的样品溶液于试管中,加入 2 mL 0.2 mmol/L 的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)溶液,混匀,4000 r/min 离心 6 min,静置 30 min,用乙醇为参比组调零,在 517 nm 处测定吸光度。按照以下公式计算清除能力:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \frac{1 - (A_s - A_0)}{A_0} \times 100$$

式中: A_s 为样品吸光度; A_c 为用无水乙醇替代 DPPH 溶液的对照组吸光度; A_0 为用无水乙醇替代复配物样品溶液的空白组吸光度。

1.2.1.2 ·OH 清除率 参照王钰等^[13]的方法修改, 用乙醇将不同的复配物、维生素 C 稀释成质量浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/mL 的溶液, 在试管中加入 2 mL 配好的不同质量浓度的样品溶液、6 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液、6 mmol/L 的 H_2O_2 溶液, 摇匀后静置 10 min, 再加入 6 mmol/L 的水杨酸 2 mL, 混匀, 室温避光静置 30 min, 在 510 nm 测其吸光度。羟基自由基 (Hydroxyl radical, ·OH) 清除率按以下公式计算:

$$\cdot OH \text{清除率}(\%) = \frac{1 - (A_s - A_c)}{A_0} \times 100$$

式中: A_s 为样品组吸光度; A_c 为用蒸馏水替代水杨酸的对照组吸光度; A_0 为用蒸馏水替代复配物溶液的空白组吸光度。

1.2.1.3 Fe^{2+} 螯合能力 参考王寒等^[14]的方法。用乙醇将不同复配物、维生素 C 稀释成质量浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/mL 的溶液, 在试管中加入 1 mL 不同质量浓度复配物溶液, 3.7 mL 蒸馏水、2 mmol/L 的 $FeCl_2$ 溶液 0.1 mL 和 5 mmol/L 的非啰嗦溶液 0.2 mL, 振荡摇匀, 避光静置 10 min 后, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液在 562 nm 处测定吸光度, Fe^{2+} 螯合率按以下公式计算:

$$Fe^{2+} \text{螯合率}(\%) = \frac{1 - (A_s - A_c)}{A_0} \times 100$$

式中: A_s 为样品组吸光度, A_c 为用蒸馏水替代反应体系中的 $FeCl_2$ 的空白组吸光度, A_0 为用蒸馏水替代复配物的空白组吸光度。

1.2.1.4 总还原能力 参考邢海亮等^[15]的方法, 用乙醇将不同复配物、维生素 C 稀释成质量浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/mL 的溶液, 利用三氯乙酸法测定总还原能力, 在 700 nm 测其吸光度。还原能力按以下公式计算:

$$\text{总还原能力} = A_s - A_0$$

式中: 其中 A_s 为样品组吸光度, A_0 为用乙醇替代复配物稀释液作为空白组的吸光度。

1.2.2 衰老小鼠模型的抗氧化及抗衰老研究

1.2.2.1 衰老模型建立及干预 50 只 SPF 级小鼠适应性喂养 1 周后, 按体重随机分为 5 组, 每组 10

只。其中, 阴性对照组 (NC) 小鼠每日于颈背处皮下注射等体积的 0.9% 生理盐水; 衰老模型组 (SLM 组)、天然油脂复配物+植物甾醇组 (VEO 组)、D-α-生育酚醋酸酯+植物甾醇复配组 (VEZ 组)、D-α-生育酚醋酸酯+植物甾醇+虾青素复配组 (VEX 组) 小鼠每日于颈背处皮下注射 300 mg/kg 的 D-半乳糖, 同时 VEO 组、VEZ 组、VEX 组经口灌胃, 给予剂量为 1.7 mg/kg 体重的相应受试样品, 按照体重计算给药体积 (0.1 mL/10 g), 连续 6 周。

1.2.2.2 血清及肝脏组织的采集 实验结束后, 小鼠禁食 12 h, 使用 1% 巴比妥钠 (3.5 μL/g) 麻醉各组小鼠, 摘除小鼠眼球, 用离心管收集小鼠血液, 将收集好的血液, 静置 2 h, 然后 3500 r/min 离心 15 min, 取上清液 -20 ℃ 保存待测。采血后, 即刻颈椎脱臼处死小鼠, 迅速取出肝脏, 并将其在预冷的生理盐水中漂洗, 去除血液, 用滤纸吸干表面水分, 冻存备用。

1.2.2.3 抗氧化指标测定 根据 GSH-Px 试剂盒、T-AOC 试剂盒、MDA 试剂盒的说明书, 测定血清中相应的指标。

1.2.2.4 血清炎症因子测定 根据试剂盒说明书, 测定 IL-6、IL-1β、TNF-α 炎症因子水平。

1.2.2.5 肝功能指标测定 根据试剂盒说明书, 测定血清中 AST、ALT 含量。

1.2.2.6 RT-qPCR 检测 Nrf2 通路中 mRNA 的表达

参照胡丽等^[16]的方法, 取肝脏组织 0.02 g, 用 Trizol 法提取组织总 RNA, 以组织总 mRNA 为模板, 逆转录 cDNA, 根据 SYBR Premix EX Taq II 试剂盒使用说明配制反应体系, 扩增条件为: 预变性, 95 ℃, 10 min; 扩增反应, 95 ℃, 15 s 和 95 ℃, 30 s, 共 40 个循环; 溶解曲线分析在 60~95 ℃。2^{-ΔΔCt} 法分析 Nrf2 相对内参基因 β-肌动蛋白 (β-actin) 的表达水平。PCR 引物由北京擎科有限公司设计合成, 引物序列见表 1。

1.2.2.7 Western Blot 检测 Nrf2 通路中蛋白的表达

剪取 0.025 g 肝脏组织, 用冰预冷 PBS 洗组织, 加入 300 μL RIPA 裂解液于生物样品均质仪中研磨, 冰上裂解 10 min; 裂解结束后于 4 ℃, 12000 r/min 离心 15 min, 取上清液进行蛋白定量。上样 20 μL 样品进行电泳分离后, 转膜封闭; 将膜与 Nrf2、NQO-1、HO-1、β-actin 抗体一起室温孵育 60 min, 4 ℃ 过夜; 第 2 d 室温放置 30 min, 加入二抗孵育 90 min 后, 在 ECL 化学发光液中显色, 利用凝胶图像处理系统

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列上游	序列下游	长度(bp)
β-actin	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	223
Nrf2	GCTCCTATGCGTGAATCCCAA	TTTGCCCTAAGCTCATCTCGT	143
NQO-1	TACGACAACGGTCCTTTCC	AGAAACGCAGGATGCCACT	142
HO-1	TCCATGTTGACTGACCACGACT	CCCACCCCTCAAAAGATAGCC	191

处理。

1.3 数据处理

所得实验数据利用 GraphPad Prism 9 软件进行汇总、显著性分析以及绘图,数据用平均值 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 则有显著差异。

2 结果与分析

2.1 体外抗氧化能力

2.1.1 DPPH·清除率 DPPH·清除率常用来评估物质的抗氧化能力,该值越大,抗氧化能力越强^[17]。由图 1 可知,质量浓度为 1~5 mg/mL 时,VEO 组、VEZ 组、VEX 组的 DPPH·清除率分别从 20.83%、16.08%、14.25% 升高到 58.86%、67.81%、63.18%;在 5 mg/mL 时,VEZ 组的清除率最高。

2.1.2 ·OH 清除率 ·OH 是活性氧的一种,具有极强的氧化性^[13]。由图 1 可知,除 VEX 组之外,其余复配物的·OH 清除率随质量浓度的增加而升高,其中 VEZ 组的清除率显著优于 VEO 组($P<0.001$)。VEX 组的·OH 清除能力在 3 mg/mL 达到最大;在 5 mg/mL 时,VEZ 组的清除能力为 67.48%,优于 VEO 组和 VEX 组。

2.1.3 Fe^{2+} 螯合能力 Fe^{2+} 离子具有强烈的助氧化能力,通过与过氧化氢(H_2O_2)之间的芬顿反应加速催化过氧自由基($\cdot\text{OOH}$)生成,诱导氧化反应的发生,而螯合剂可使 Fe^{2+} 转化为稳定的氧化形式 Fe^{3+} ,从而抑制芬顿反应中自由基的产生,发挥抗氧化作用^[18]。从图 1 可知,在质量浓度为 1~5 mg/mL 范围内,不同复配物的 Fe^{2+} 螯合能力随质量浓度的增加而升高,表现出比维生素 C 的 Fe^{2+} 螯合能力强的效果;其中 VEZ 组表现最佳,在 5 mg/mL 时可达 61.64%。

2.1.4 总还原能力 总还原能力指的是自由基接收到电子后转化为稳定物质的能力,抗氧化能力随总还原能力增强而增强^[19]。由图 1 可知,在质量浓度为 1~5 mg/mL 范围内,不同复配物总还原能力随质量浓度的增加而升高,当质量浓度高于 3 mg/mL 后,VEZ 组的总还原能力更好。刘晓飞等^[20]研究表明植物甾醇具有良好的抗氧化能力,这与本实验结果相似。综上,不同复配物中,VEZ 组的 DPPH·清除能力、·OH 清除能力、 Fe^{2+} 螯合能力、总还原能力较强。

2.2 衰老小鼠模型抗氧化结果

2.2.1 不同复配物对衰老小鼠体内抗氧化指标的影响 在正常生理状态下,抗氧化系统负责清除组织中过多的活性氧(ROS),以保护机体免受氧化应激损伤,GSH-Px 是抗氧化系统中主要的抗氧化酶,负责把组织中的 ROS 转化为乙醇和水,以中断过度氧化反应^[21]。T-AOC 各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成的总抗氧化水平,是抗氧化系统功能状态的综合指标^[22]。MDA 是脂质过氧化的重要降解产物之一,其

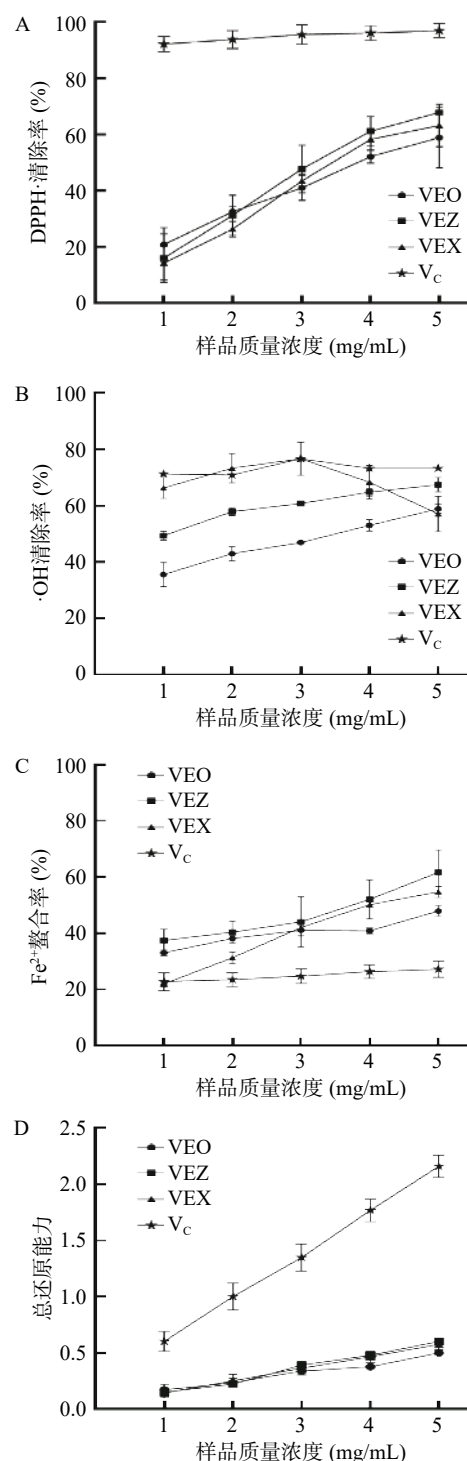


图 1 不同复配物的体外抗氧化能力

Fig.1 Antioxidant capacity of different complexes *in vitro*

含量的表达间接反映了活性氧对细胞和组织的损害程度^[23]。

从图 2 可知,与 NC 组相比,SLM 组的 GSH-Px 酶活力和 T-AOC 活性分别显著($P<0.001$)下降了 63.54%、45.00%,MDA 量显著增加了 70.60%($P<0.0001$),这表明 D-半乳糖致衰老小鼠模型造模成功。与 SLM 组相比,不同复配物的 GSH-Px 酶活力都提高了,VEO 组、VEZ 组、VEX 组分别增加了 34.28%、98.12%、170.49%;Min 等^[24]研究表明向饲料中添加维生素 E 能够通过上调 GSH-Px 基因的表

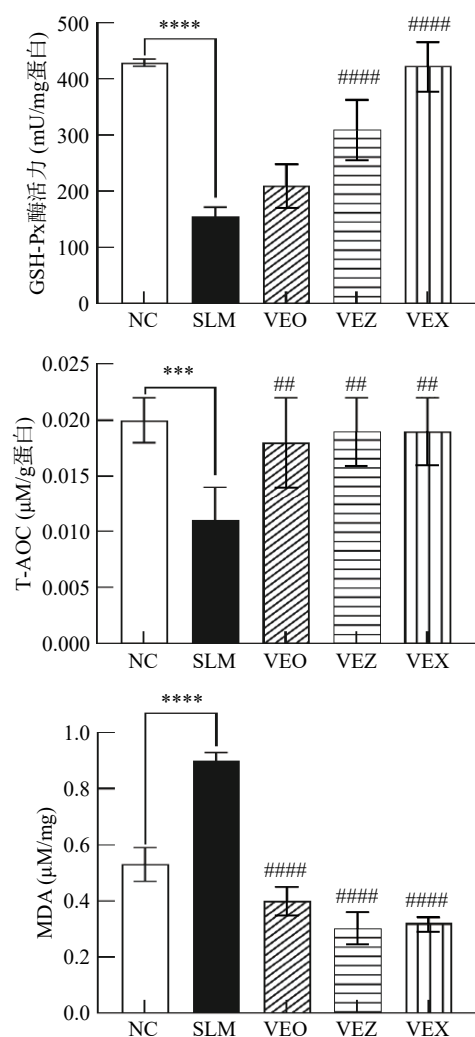


图2 不同复合物对小鼠体内抗氧化指标的影响

Fig.2 Effects of different complexes on antioxidant indexes in mice

注:“*”表示与 NC 组比较;“#”表示与 SLM 组比较;“*/#”表示 $P<0.05$, “**/##”表示 $P<0.01$, “***/###”表示 $P<0.001$, “****/####”表示 $P<0.0001$;图 3~图 5 同。

达,发挥抗氧化能力,这与本研究结果一致。对于 T-AOC 活性, VEO 组、VEZ 组、VEX 组分别比 SLM 组增加了 65.01%、70.18%、70.67% ($P<0.01$);对于 MDA 生成量, VEO 组、VEZ 组、VEX 组分别比 SLM 组降低了 56.04%、67.04%、64.04% ($P<0.0001$)。张露等^[25]研究表明虾青素预处理,使高糖作用下晶状体上皮细胞的 GSH-Px 显著升高、MDA 显著降低;李晓钰等^[26]研究表明植物甾醇能降低高脂饮食建立的非酒精性脂肪肝小鼠模型的 MDA 上升。本研究发现,三组复合物显著降低了 D-半乳糖诱导的脂质过氧化产物 MDA 的表达,并增加了 GSH-Px 和 T-AOC 的抗氧化酶活性,说明三组复合物具有良好的抗氧化能力,对小鼠体内氧化应激损伤具有一定的改善作用。

2.2.2 不同复合物对衰老小鼠血清中炎症因子的影响 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 是参与炎症反应的细胞因子,参与到各种炎症反应与氧化应激中,当炎症增

加, IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 均升高^[27]。由图 3 可知,与 NC 组相比, SLM 组血清中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量表现出显著的升高 ($P<0.0001$),通过不同复合物的干预后,均有所下降。与 SLM 组相比, VEO 组、VEZ 组、VEX 组的 IL-6 含量分别下降了 4.45%、3.34%、1.76%, IL-1 β 含量分别下降了 4.79%、1.96%、2.30%, TNF- α 含量分别下降了 9.99%、8.07%、13.71%。这与丁婷婷等^[28]研究结果一致,表明三组复合物在一定程度上具有缓解 D-半乳糖致衰老小鼠炎症的能力。

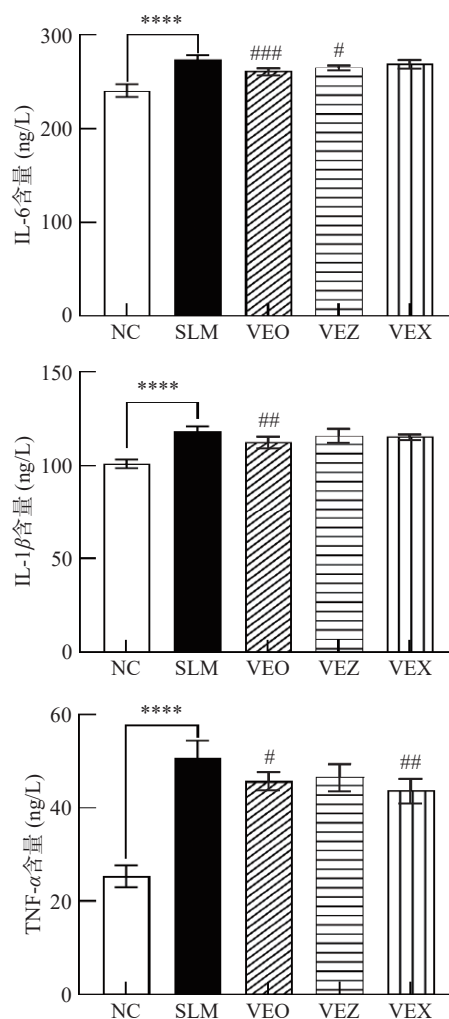


图3 不同复合物对小鼠血清中炎症因子的影响

Fig.3 Effects of different complexes on serum inflammatory factors in mice

2.2.3 不同复合物对衰老小鼠 ALT、AST 含量的影响 氧化应激引发的肝功能破坏导致 ALT、AST 等酶的释放、脂质过氧化、抗氧化功能丧失以及活性氧的产生,因此 ALT、AST 酶活性的大小可以用于衡量肝功能的受损程度^[29-30]。从图 4 可知,与 NC 组相比, SLM 组的 ALT 和 AST 水平显著升高 ($P<0.0001$),说明衰老导致了小鼠肝功能损伤。在不同复合物干预后,与 SLM 组相比, VEO 组、VEZ 组、VEX 组的 ALT 水平分别下降 22.21%、25.96%、24.11%, AST

水平分别下降了 8.85%、12.75%、16.01% ($P<0.01$)。这与 Li 等^[31] 研究结果相似,表明三组复配物有利于降低 D-半乳糖致衰老小鼠的血清中 AST、ALT 含量,以缓解衰老导致的肝损伤。

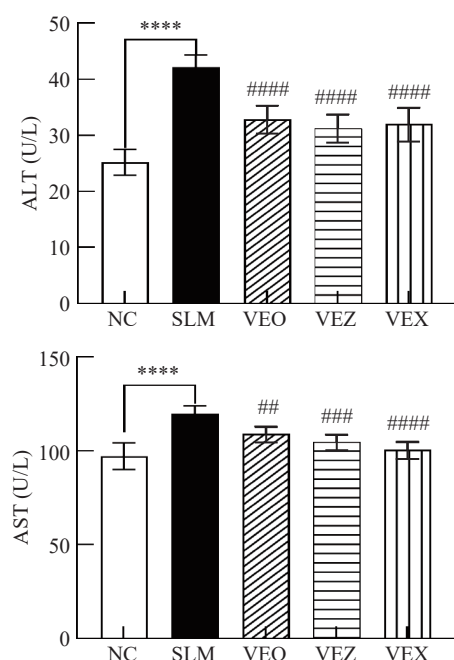


图4 不同复配物对小鼠 AST、ALT 活力的影响
Fig.4 Effects of different complexes on AST and ALT activity in mice

2.2.4 Nrf2 通路的 mRNA 和蛋白的相对表达量

Nrf2 是机体在氧化应激损伤时重要的转录调节因子,对位于其下游靶基因的表达起活化作用,当出现氧化应激时,Nrf2 会激活下游 NQO-1、HO-1 等基因的表达^[32]。Nrf2 基因表达上调可能显著改善衰老相关疾病或延缓衰老过程,HO-1 是体内负责把血红素分解的诱导酶,NQO-1 能调节细胞的氧化还原电位

水平,来发挥抗氧化作用^[33-34]。由图 5~图 6 可知,与 NC 组相比,SLM 组的 Nrf2、NQO-1、HO-1 的 mRNA 和蛋白相对表达量显著下降 ($P<0.0001$)。对于 mRNA 表达水平而言,与 SLM 组相比,VEO 组、VEZ 组、VEX 组的 Nrf2 表达水平分别上升了 336.31%、749.80%、393.06%,NQO-1 的表达量分别上升了 319.57%、668.94%、419.10%,HO-1 表达量上升了 404.83%、727.48%、460.43% ($P<0.0001$);对于蛋白表达水平而言,与 SLM 组相比,VEO 组、VEZ 组、VEX 组的 Nrf2 表达水平分别上升了 42.6.67%、1093.33%、746.67% 显著上升 ($P<0.0001$),NQO-1 的表达量分别上升了 844.44%、1088.89%、1033.33% ($P<0.0001$),HO-1 表达量上升了 1150.00%、1912.50%、1412.50% ($P<0.0001$)。这与李晓钰等^[28]、Sun 等^[35] 研究结果一致,说明通过给予 D-α-生育酚醋酸酯复配物可能通过激活 Nrf2 信号通路,减少氧化损伤,增加衰老小鼠下游靶基因 NQO-1 和 HO-1 的表达,能调节抗氧化酶活性,从而延缓衰老进程,并且在这不同 D-α-生育酚醋酸酯复配物中,VEZ 组的效果最好。

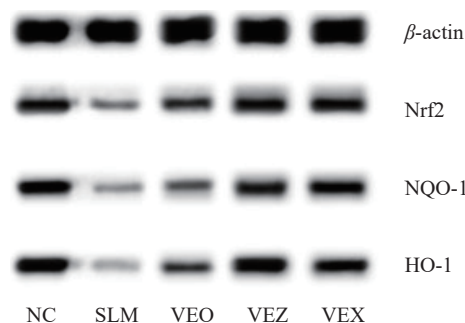
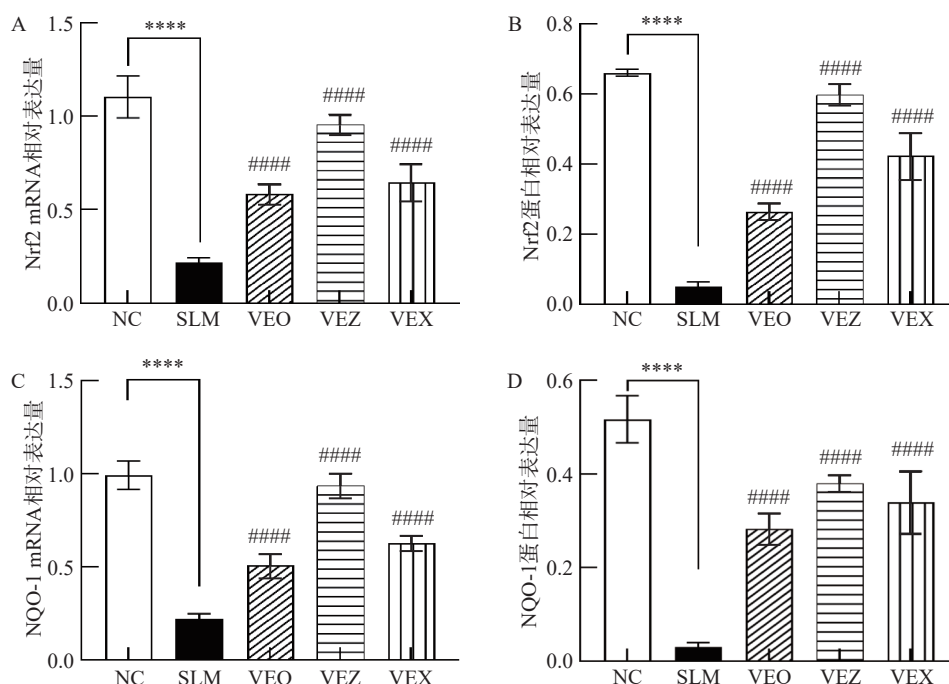


图5 Nrf2、NQO1、HO-1 的蛋白表达
Fig.5 Protein expression of Nrf2, NQO1 and HO-1



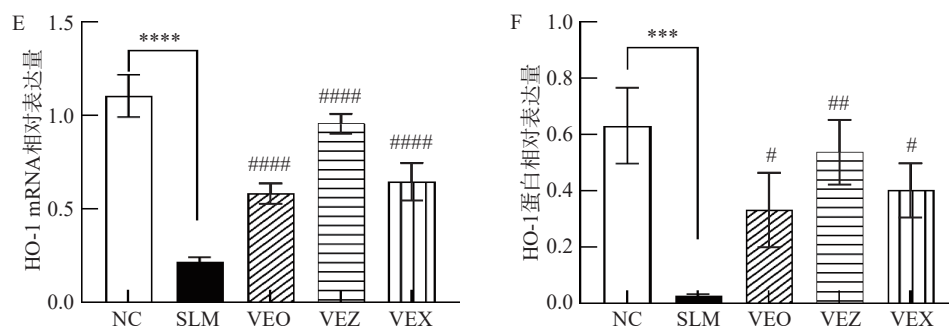


图 6 Nrf2、NQO-1、HO-1 mRNA 和蛋白的相对表达量

Fig.6 Relative expression of Nrf2, NQO-1, HO-1 genes and proteins

3 结论

本研究通过测定不同复配物的体外抗氧化能力,并采用 D-半乳糖致小鼠衰老模型评价复配物的抗衰老作用。结果显示,三组复配物中 VEZ 组的体外抗氧化效果较佳;与衰老模型小鼠相比,经过三组复配物干预后,小鼠体内 GSH-Px、T-AOC 升高,MDA 生成量下降,从而改善氧化应激损伤,血清中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和肝功能指标 ALT、AST 水平均下降;三组复配物干预后,Nrf2、NQO-1、HO-1 的 mRNA 和蛋白相对表达量增强,其中 VEZ 组表达效果最佳。综上所述,D- α -生育酚醋酸酯复配物能激活 Nrf2 通路,增加 NQO-1 和 HO-1 的表达,提高抗氧化酶活性,降低脂质过氧化水平,来提升 D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化应激能力增强抗氧化效果,从而延缓衰老进程,其中 D- α -生育酚醋酸酯与植物甾醇复配的效果更佳。通过本研究结果将为 D- α -生育酚醋酸酯复配物开发成为延缓衰老的食品提供实验依据。

参考文献

- [1] CHEN Huiying, DONG Ling, CHEN Xueyan, et al. Anti-aging effect of phlorizin on D-galactose-induced aging in mice through antioxidant and anti-inflammatory activity, prevention of apoptosis, and regulation of the gut microbiota[J]. *Experimental Gerontology*, 2022, 163: 111769.
- [2] 李明伟,路军章.衰老机制与中药抗衰老研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(9): 215-218. [LI Mingwei, LU Junzhang. Research progress on aging mechanism and anti-aging of traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Liaoning University of Tcm*, 2016, 18(9): 215-218.]
- [3] DI M S, PAOLA V. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020.
- [4] TAN S M, DE H J B. Combating oxidative stress in diabetic complications with Nrf2 activators: How much is too much?[J]. *Redox report: Communications in Free Radical Research*, 2014, 19(3): 107-117.
- [5] NARD K, ZHANG W, WANG L, et al. Repression of the antioxidant Nrf2 pathway in premature aging[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1361-1374.
- [6] 张婧菲,胡志萍,王恬.天然维生素 E 及其衍生物的研究进展[J]. *饲料工业*, 2015, 36(8): 31-35. [ZHANG Jingfei, HU Zhiping, WANG Tian. Research progress of natural vitamin E and its

- analogues[J]. *Feed Industry*, 2015, 36(8): 31-35.]
- [7] 王肖行,余旭亚,耿树香,等.美藤果油体外抗氧化性能研究[J]. *中国油脂*, 2021, 46(4): 63-67. [WANG Xiaohang, YU Xuya, GENG Shuxiang, et al. *In vitro* antioxidant activity of Sacha inchi oil[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(4): 63-67.]
- [8] BASKAR A A, AL N K S, GABRIEL P M, et al. β -Sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histioarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012(4): 335-343.
- [9] HORMOZI M, GHOREISHI S, BAHARVAND P. Astaxanthin induces apoptosis and increases activity of antioxidant enzymes in LS-180 cells[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 891-895.
- [10] 盛雪飞,彭燕,陈健初.天然抗氧化剂之间的协同作用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(7): 414-417, 421. [SHENG Xuefei, PENG Yan, CHEN Jianchu. Research progress in synergistic effect between natural antioxidants[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(7): 414-417.]
- [11] 王娜,高恩光,李娜,等.白藜芦醇与维生素 E 协同抗氧化效应研究[J]. *河南农业大学学报*, 2022, 56(6): 1007-1014. [WANG Na, GAO Enguang, LI Na, et al. Study on synergistic antioxidant effect of resveratrol and vitamin E[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2022, 56(6): 1007-1014.]
- [12] TANG Lin, LIU Ruru, XU Ying, et al. Synergistic and antagonistic interactions of α -tocopherol, γ -oryzanol and phytosterol in refined coconut oil[J]. *LWT*, 2022, 154: 112789.
- [13] 王钰,周一萍,汤运嘉,等.麻疯树种子乙醇提取物体外抗氧化性研究[J/OL]. *中国油脂*: 1-9[2023-02-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.ts.20210913.1514.004.html> [WANG Yu, ZHOU Yiping, TANG Yunjia, et al. Antioxidant activity of ethanol extracts from *Jatrophaa curcas* seeds[J]. *China Oils and Fats*: 1-9[2023-02-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.ts.20210913.1514.004.html>.]
- [14] 王寒,罗庆华,魏梦雅,等.大鲵油体外抗氧化活性研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(9): 149-153. [WANG Han, LUO Qinghua, WEI Mengya, et al. *In vitro* antioxidant activity of Chinese giant salamander oil[J]. *China Oils and Fats*, 2018, 43(9): 149-153.]
- [15] 邢海亮,余旭亚,耿树香,等.核桃虾青素复合油体外抗氧化活性研究[J]. *中国油脂*, 2021, 46(5): 48-52. [XING Hailiang, YU Xuya, GENG Shuxiang, et al. *In vitro* antioxidant activity of walnut astaxanthin oil blend[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(5): 48-52.]
- [16] 胡丽丽,赵小鸽,倪磊,等.大鼠海马组织 RNA、DNA 和蛋白质共提取方法的研究[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014, 35(2): 276-280. [HU Lili, ZHAO Xiaoge, NI Lei, et al. A method

- to extract RNA, DNA and protein from rat hippocampus[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2014, 35(2): 276-280.]
- [17] KEDARE S B, SINGH R P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2011, 48(4): 412-422.
- [18] SHAHIDI F, ZHONG Y. Measurement of antioxidant activity[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 757-781.
- [19] 沈成龙, 陈怡帆, 曾英杰, 等. 松茸多糖的体外抗氧化性及对乙醇氧化损伤小鼠作用的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 371-377. [SHEN Chenglong, CHEN Yifan, ZENG Yingjie, et al. Study on antioxidant activity of Tricholoma matsutake polysaccharide *in vitro* and its effect on mice damaged by ethanol oxidation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 371-377.]
- [20] 刘晓飞, 宋洁, 王薇, 等. 发芽糙米植物甾醇的提取优化及抗氧化性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2019, 35(1): 44-48, 70. [LIU Xiaofei, SONG Jie, WANG Wei, et al. Study on extraction optimization and antioxidant activity of phytosterols from germinated brown rice[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Science Edition), 2019, 35(1): 44-48, 70.]
- [21] WANG Kai, HAN Lihua, TAN Yuqing, et al. Generation of novel antioxidant peptides from silver carp muscle hydrolysate: Gastrointestinal digestion stability and transepithelial absorption property[J]. *Food Chemistry*, 2023, 403: 1-12.
- [22] ZHAO Shoupei, SHAN Chunhua, WU Zhanjun, et al. Fermented Chinese herbal preparation: Impacts on milk production, nutrient digestibility, blood biochemistry, and antioxidant capacity of late-lactation cows under heat stress[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2022, 292: 115488.
- [23] GAO Zexin, WU Chuanchao, WU Jianrong, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an aminoglycan-rich exopolysaccharide from the submerged fermentation of *Bacillus thuringiensis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 220: 1010-1020.
- [24] MIN Y N, NIU Z Y, SUN T T, et al. Vitamin E and vitamin C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene[J]. *Poultry Science*, 2018, 97(4): 1238-1244.
- [25] 张露, 赵芳, 杨万举, 等. 虾青素预处理抑制高糖作用下晶状体上皮细胞损伤的机制[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(17): 4321-4325. [ZHANG Lu, ZHAO Fang, YANG Wangju, et al. Mechanism of astaxanthin pretreatment on inhibition of lens epithelial cell injury induced by high glucose[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2022, 42(17): 4321-4325.]
- [26] 李晓钰, 郑明明, 郭艳, 等. α -亚麻酸植物甾醇酯抑制氧化应激改善非酒精性脂肪性肝病[J]. 营养学报, 2020, 42(6): 575-580. [LI Xiaoyu, ZHENG Mingming, GUO Yan, et al. α -linolenic acid phytosterol ester inhibits oxidative stress and improves non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Nutrition*, 2020, 42(6): 575-580.]
- [27] FEREIDOUNI A, KHALEGHIAN A, MOUSAVINIRI N, et al. The effects of supplementation of *Nannochloropsis oculata* microalgae on biochemical, inflammatory and antioxidant responses in diabetic rats[J]. *Biomolecular Concepts*, 2022, 13(1): 314-321.
- [28] 丁婷婷, 柳佳莹, 沈明浩. 山刺玫叶总黄酮的抗衰老作用研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(12): 140-146. [DING Tingting, LIU Jiaying, SHENG Minghao. Study on the anti-aging effect of total flavonoids from the leaves of *Rosa davidiana*[J]. Journal of Northwest University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2019, 47(12): 140-146.]
- [29] SONG Xinling, SHEN Qiang, LIU Min, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of intracellular mycelium polysaccharides from *Pleurotus geesteranus* against alcoholic liver diseases[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114.
- [30] YANG Weiguang, CHEN Jiayi, GUO Guangzhen, et al. The effects of fucoidan dietary supplementation on growth performance, serum antioxidant capacity, immune function indices and intestinal morphology in weaned kids[J]. *Animals*, 2022, 12(5): 574.
- [31] LI Huan, ZHAI Bingtao, SUN Jing, et al. Antioxidant, anti-aging and organ protective effects of total saponins from *Aralia taibaiensis*[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021, 15: 4025-4042.
- [32] RUOTSALAINEN A, LAPPALAINEN J P, HEISKANEN E, et al. Nuclear factor E2-related factor 2 deficiency impairs atherosclerotic lesion development but promotes features of plaque instability in hypercholesterolaemic mice[J]. *Cardiovascular Research*, 2019, 115(1): 243-254.
- [33] LUO Yuhong, WANG Wentao, ZENG Yi, et al. A bioluminescent probe for NQO1 overexpressing cancer cell imaging *in vitro* and *in vivo*[J]. *The Analyst*, 2022: 5264-5268.
- [34] WANG Qianqian, YANG Zherui, ZHUANG Jiachen, et al. Antiaging function of Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii*) peptide through activation of the Nrf2/Keap1 signaling pathway and its structure-activity relationship[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 96192.
- [35] SUN Liyang, ZHAO Qi, XIAO Yao, et al. Trehalose targets Nrf2 signal to alleviate d-galactose induced aging and improve behavioral ability[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 521(1): 113-119.