

研究报告

虾青素和/或有氧运动对D-半乳糖诱导大鼠心脏衰老的干预作用

范妍君¹,胡海威²,曹建民¹,周绮云^{3,4},胡戈⁵,杨静晨³,周海涛^{3,4},常平^{3,4}

(1. 北京体育大学运动人体科学学院,北京 100084;2. 中国中医科学院望京医院,北京 100102;
3. 北京联合大学,北京 100101;4. 北京联合大学,生物活性物质与功能食品北京市重点实验室,
北京 100191;5. 常州大学体育学院,江苏常州 213164)

摘要:目的 探究虾青素和/或有氧运动延缓D-半乳糖诱导大鼠心脏衰老的潜在作用机制。方法 SPF级3月龄SD雄性大鼠40只随机分为安静对照组(C组)、急性衰老模型组(D组)、急性衰老+虾青素组(DA组)、急性衰老+有氧运动组(DE组)及急性衰老+虾青素+有氧运动组(DAE组),每组各8只。C组不进行任何干预,急性衰老各组大鼠腹腔注射100 mg/kg·d的D-半乳糖,同时分别以20 mg/kg·d虾青素和/或运动强度为60%最大摄氧量的有氧运动进行干预,实验周期为6周。末次训练12 h后取心脏,光学显微镜观察心脏组织形态并检测相关生化指标。结果 心脏组织形态,C组正常;与C组比较,D组出现心肌细胞排列紊乱、心肌纤维断裂及炎性细胞浸润等现象;DA、DE、DAE心肌细胞排列整齐、心肌纤维断裂及炎性细胞浸润情况有所缓解,DAE组最为显著,心肌组织形态更接近于正常状态。与C组比较,D组心脏组织超氧化物歧化酶(SOD)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶(γ -GCS)活性及沉默信息调节因子1(SIRT1)、核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶(HO-1)、B淋巴细胞瘤因子-2(Bcl-2)蛋白质表达水平、Bcl-2/Bcl-2相关X蛋白(Bax)比值显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);细胞凋亡水平、Bax蛋白质表达、丙二醛(MDA)含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与D组比较,DA组心肌组织SIRT1、Nrf2、HO-1蛋白质表达均显著升高($P<0.05$),Bax蛋白质表达及MDA含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);DE组心肌组织SOD活性和SIRT1、HO-1蛋白质表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Bax蛋白质表达及MDA含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);DAE组心肌组织SOD、 γ -GCS活性及SIRT1、Nrf2、HO-1、Bcl-2蛋白质表达和Bcl-2/Bax比值显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),细胞凋亡水平、Bax蛋白质表达及MDA含量极显著降低($P<0.01$)。与DA、DE组比较,DAE组心肌组织SIRT1、Bcl-2蛋白质表达及Bcl-2/Bax比值均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),细胞凋亡水平显著降低($P<0.05$);心肌组织细胞凋亡水平、SIRT1和Bcl-2蛋白质表达水平及Bcl-2/Bax比值具有协同效应。结论 虾青素和/或有氧运动干预均可通过上调SIRT1/Nrf2信号通路相关蛋白质表达,缓解和改善D-半乳糖诱导的氧化应激,降低心肌细胞凋亡水平,延缓大鼠心脏衰老。

关键词: 虾青素; 有氧运动; 衰老; 氧化应激; SIRT1/Nrf2信号通路; 大鼠; 心脏

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)06-1185-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.06.010

Effects of astaxanthin and/or aerobic exercise on D-galactose-induced myocardial aging in rats

FAN Yanjun¹, HU Haiwei², CAO Jianmin¹, ZHOU Qiyun^{3,4}, HU Ge⁵, YANG Jingchen³,
ZHOU Haitao^{3,4}, CHANG Ping^{3,4}

(1. Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing 100084, China; 2. Wangjing Hospital,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 3. Beijing Union University,
Beijing 100101, China; 4. Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union
University, Beijing 100191, China; 5. Physical Education College of Changzhou University,
Changzhou, Jiangsu Changzhou 213164, China)

Abstract: Objective To investigate the potential mechanism of astaxanthin and/or aerobic exercise in relieving D-

收稿日期:2021-11-24

基金项目:北京联合大学科研项目(ZK10202210);北京联合大学“启明星”大学生科技创新创业项目(20212021)

作者简介:范妍君 硕士研究生 研究方向为运动营养与运动监控 E-mail:fanyj@bsu.edu.cn

胡海威 主治医师 研究方向为传统医学与健康促进 E-mail:huhighway@aliyun.com

范妍君和胡海威为并列第一作者

通信作者:周海涛 副教授 研究方向为运动和营养促进健康 E-mail:zsettle@sina.com

常平 高级实验师 研究方向为天然产物抗衰老活性及机制研究 E-mail:changping@buu.edu.cn

周海涛和常平为共同通信作者

galactose-induced myocardial aging in rats. **Methods** Forty SD male rats aged 3 months were randomly divided into five groups, with 8 rats in each group: control group (group C), aging model group (group D), aging + astaxanthin group (group DA), aging + aerobic exercise group (group DE) and aging + astaxanthin + aerobic exercise group (group DAE). There was no intervention for group C. The other four groups were intraperitoneally injected with 100 mg/kg·d D-galactose. Group DA, DE and DAE were treated with 20 mg/kg·d astaxanthin and/or aerobic exercise at 60% VO_2 max, respectively. The experiment lasted for 6 weeks. Twelve hours after the last training, the rats were sacrificed for heart harvesting. The morphology of the heart tissue was observed under light microscope and the related biochemical indicators were measured. **Results** The morphology of myocardium in group C was normal. Compared with group C, the myocardial cell in group D showed disorder, fiber rupture and inflammatory cell infiltration. Compared with group D, groups DA, DE and DAE showed improvement, including orderly arrangement of myocardial cells, relieved myocardial fiber rupture and reduction of inflammatory cells, especially in group DAE. and the morphology of myocardial tissue in group DAE was much closer to normal. Compared with group C, the activity of superoxide dismutase (SOD), γ -glutamate cysteine synthase (γ -GCs) and the expression of sirtuin 1 (SIRT1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in myocardium and the ratio of Bcl-2/Bcl-2-associated X (Bax) of group D decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the apoptosis level, the expression of Bax and the malondialdehyde (MDA) content increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with group D, the expressions of SIRT1, Nrf2 and HO-1 in group DA increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of Bax and the MDA content decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activity of SOD and the expressions of SIRT1, HO-1 in group DE increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression of Bax and the MDA content decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activity of SOD, γ -GCs, the expressions of SIRT1, Nrf2, HO-1, Bcl-2 and the ratio of Bcl-2/Bax in group DAE increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the apoptosis level, the expression of Bax and the MDA content decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with group DA and DE, the expression of SIRT1, Bcl-2 and the ratio of Bcl-2/Bax in group DAE were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the apoptosis level decreased significantly ($P < 0.05$). Astaxanthin and aerobic exercise had synergistic effect on the apoptosis level, the expression of SIRT1, Bcl-2 and the ratio of Bcl-2/Bax in myocardium. **Conclusion** Astaxanthin and/or aerobic exercise intervention can alleviate and improve D-galactose-induced oxidative stress, which is achieved by increasing the expression of proteins related to the SIRT1/Nrf2 signaling pathway. It can also reduce the level of cardiomyocyte apoptosis and delay the myocardial aging of rats.

Key words: Astaxanthin; aerobic exercise; aging; oxidative stress; SIRT1/Nrf2 signaling pathway; rats; heart

《中国心血管健康与疾病报告 2021》发布:中国心血管病现患人数高达 3.3 亿;心血管病死亡率高居首位,占居民疾病死亡构成的 40% 以上^[1]。心脏衰老是心血管系统疾病发生最重要的独立危险因素^[2]。伴随年龄增长,衰老的出现,心肌细胞凋亡速率上升,加速了心脏功能/结构退化^[3]。氧化应激不仅是心脏走向衰老的重要危险因素,也是心肌细胞凋亡加剧的重要影响因素及心脏疾病发生的生理/病理基础^[4-5]。如何抑制和改善氧化应激,防控衰老诱导的心肌细胞凋亡,延缓心脏衰老已成为热点问题。

正确有效的运动方式和科学合理的饮食习惯、营养摄入在促进和提升人类健康中发挥着重要作用。研究表明,适度运动能够通过调控沉默信息调节因子 1(Sirtuin1, SIRT1)/核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)通路转录水平,延缓氧化应激诱导的机体衰老^[6]。虾青素具有良好的抗氧化性,在拮抗氧化应激、抑制炎症、延缓衰老等方面具有积极的作用^[7]。虾青素可

以通过调控 SIRT1/Nrf2 信号通路改善氧化应激和神经元死亡,提升小鼠创伤性脑损伤后的神经功能,保护脑损伤^[8]。L-精氨酸与运动的联合干预可以有效改善心肌细胞氧化应激损伤,防止年龄增长诱导的心肌细胞丢失^[9]。本团队前期研究亦发现,虾青素与有氧运动的联合干预具有协同作用,可以有效改善 D-半乳糖诱导大鼠肾脏组织氧化应激及衰老^[10],但二者联合干预能否通过调控 SIRT1/Nrf2 信号通路相关蛋白质表达改善 D-半乳糖致衰大鼠心脏组织氧化应激及细胞凋亡水平,延缓心脏衰老尚未见报道。

本研究采用 6 周腹腔注射 D-半乳糖建立急性衰老大鼠模型,期间以虾青素和/或有氧运动进行干预,观察大鼠心脏组织形态结合氧化应激、细胞凋亡水平和 SIRT1/Nrf2 信号通路及凋亡因子相关蛋白质表达水平等多层次指标,深入探讨虾青素联合有氧运动改善 D-半乳糖致衰大鼠心脏组织氧化应激及细胞凋亡水平,延缓心脏衰老的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物

虾青素微囊粉,北京绿色金可生物技术股份有限公司馈赠,虾青素浓度2%。

1.1.2 实验动物

SPF级雄性3月龄SD大鼠40只,体质量380~415 g[斯贝福(北京)生物技术有限公司(SCXK-2019-0010)],饲养于北京体育大学SPF级动物实验室(SYXK(京)2021-0053)。饲养环境温度为22℃~26℃,相对湿度为55%~75%,昼夜各半循环照明。

1.1.3 主要仪器与试剂

DSPT-202小动物跑台(杭州段氏制造厂),Leica UC7超薄切片机(德国Leica公司),BX51F32H01光学显微镜(日本OLYMPUS公司),全自动数字切片扫描系统(匈牙利3D HISTECH公司),Allegra 25R台式高速离心机(美国Beckman Coulter公司),Wellscan MK3酶标仪(美国雷博公司)。

D-半乳糖购自麦克林试剂有限公司,SIRT1、血红素氧合酶(Heme oxygenase-1, HO-1)抗体、Tunel细胞凋亡检测试剂盒购自武汉谷歌生物科技有限公司,Nrf-2抗体购自英国Abcam,B淋巴细胞瘤因子-2(B cell lymphoma-2 protein, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体购自美国Santa Cruz,超氧化物歧化酶(Super-oxide dismutase, SOD)、谷氨酰半胱氨酸合酶(Glutamyl cysteine synthase, γ -GCS)以及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒均购自北京华英生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

实验大鼠经适应性喂养4 d后,采用两因素两水平(2×2)析因设计随机分为5组:安静对照组(C组,8只)、D-半乳糖衰老模型组(D组,8只)、D-半乳糖衰老+虾青素组(DA组,8只)、D-半乳糖衰老+有氧运动组(DE组,8只)、D-半乳糖衰老+虾青素+有氧运动组(DAE组,8只)。

1.2.2 运动及给药方案

D组、DA组、DE组和DAE组采用腹部皮下注射剂量和体积分别为100 mg/kg·d、5 mL/kg的D-半乳糖溶液(溶剂为生理盐水)建立急性衰老大鼠模型,建模周期6周。C组腹腔注射等体积生理盐水。

建模期间,DE和DAE组大鼠进行运动强度为60%最大摄氧量的有氧运动(跑台训练):速度15 m/min,坡度0°,运动时长60 min/d,每周训练6 d,其他组无运动干预。DA组、DAE组进行虾青素灌胃,根据预实验及相关文献^[11-12],灌胃剂量和体积分

别为1 g/kg·d(相当于20 mg/kg·d纯品)、5 mL/kg;其他组的大鼠以等体积蒸馏水作为安慰剂灌胃。

1.2.3 标本采集

末次训练后,禁食不禁水12 h。大鼠的组织处理:用1%戊巴比妥钠(0.4 mL/kg)腹腔注射麻醉,腹主动脉取血后迅速取出心脏组织。将心脏置于预冷的生理盐水中洗净血污,心脏1/2处环切,心尖部分浸入4%多聚甲醛固定液中固定。心脏其余部分锡纸包裹后投入液氮,移至-80℃冰箱保存待测。

1.2.4 心脏组织病理学检查

将心脏组织从固定液中取出,流水洗涤24 h,修切组织,脱水、透明后石蜡包埋,制成4 μ m切片,进行HE染色。在200倍光镜下,观察心脏组织病理变化。

1.2.5 心脏组织SIRT1、Nrf-2、HO-1、Bcl-2、Bax蛋白质表达水平检测

采用免疫组化法检测SIRT1、Nrf-2、HO-1、Bcl-2、Bax蛋白质表达水平。石蜡切片脱蜡至水经抗原修复后,加入3%双氧水溶液室温避光孵育25 min后脱色洗涤3次进行血清封闭,随后加入一抗、二抗,进行DAB显色,苏木素复染细胞核后脱水封片。

1.2.6 心脏组织细胞凋亡水平检测

采用Tunel法检测心脏组织细胞凋亡水平。石蜡切片经脱蜡至水后修复、破膜,PBS清洗后,加入3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶,室温孵育20 min后再次清洗。室温平衡后,滴加Tunel反应液,湿盒内37℃孵育60 min。加Streptavidin-HRP反应液,湿盒内37℃孵育30 min。DAB显色,苏木素复染细胞后脱水封片。

1.2.7 H-score评分方法^[13]

采用病理切片扫描仪全视野数字扫描整张组织切片,依据阳性强弱关系依次为深棕色、棕黄色、浅黄色,蓝色为阴性,识别细胞核各强度阳性和阴性面积(单位:像素)以及阳性百分比,代入公式计算H-score。H-score=(浅黄色细胞密度×1)+(棕黄色细胞密度×2)+(深棕色细胞密度×3)。

1.2.8 抗氧化相关指标检测

称取约100 mg心脏组织与0.9%生理盐水按1:9比例混合,冰水浴条件下,机械匀浆,制备成10%的匀浆液,离心速率3 000 r/min,离心10 min,取上清液进行SOD、 γ -GCS活性以及MDA含量的检测。

1.3 统计学分析

所有数据均使用IBM SPSS Statistics 21.0软件统计处理,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用Shapiro-Wilk方法对数据进行正态分布检验,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时采用LSD法,方差不齐采用Tamhane法。

因素间协同效应采用适用于两因素两水平(2×2)析因设计(因素A为虾青素,因素B为有氧运动)的方差分析方法。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏组织病理学检查结果

光镜下观察显示,C组心肌细胞横排列整齐紧密、组织结构完整且清晰,细胞核形态正常。D组心

肌组织形态相对C组呈现出明显变化:心肌损伤显著,心肌细胞排列紊乱,肌束间隔增宽,并出现广泛性心肌纤维断裂,间质水肿,可见炎性细胞浸润。DA、DE、DAE组心脏组织形态相比D组有所改善:心肌细胞的结构相对完整,细胞边界较清晰,排列整齐,细胞间质水肿及炎性细胞浸润情况有所缓解。其中DAE组改善程度更加显著,心肌组织形态更接近正常状态,见图1。

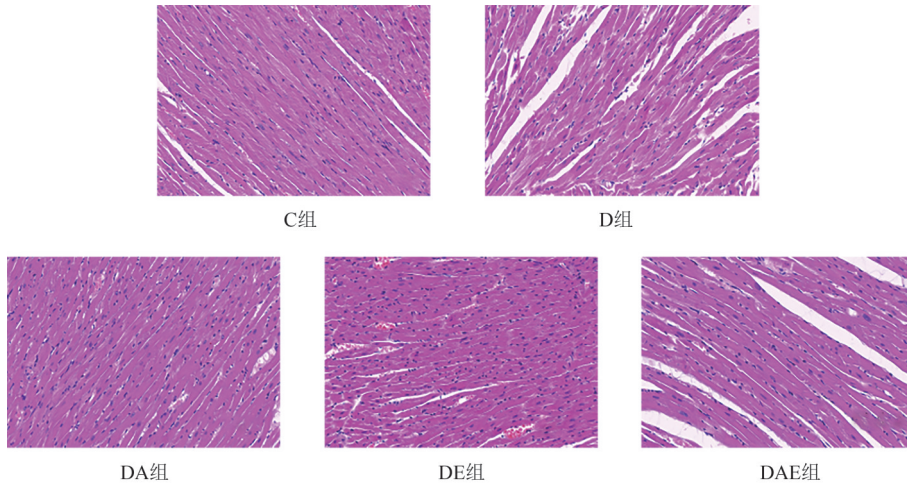


图1 各组大鼠心脏组织病理学检查结果(HE, 200×)

Figure 1 Myocardial pathological examination results of rats in each group (HE, 200×)

2.2 各组大鼠心脏组织氧化应激指标水平

由表1可知,心脏组织SOD活性,与C组比较,D组极显著降低($P<0.01$);与D组比较,DA组无显著性变化($P>0.05$)、DE、DAE组极显著升高($P<0.01$);与DA、DE组比较,DA、DE、DAE组组间无显著性差异($P>0.05$),但DAE组均呈升高趋势。 γ -GCS活性,与C组比较,D组显著降低($P<0.05$);与D组比较,DA、DE组无显著性差异($P>0.05$),DAE组极显著升高($P<0.01$);与DA、DE组比较,DA、DE、DAE组组间无显著性差异($P>0.05$),但DAE组均呈升高趋势。MDA含量,与C组比较,D组显著升高($P<0.05$);与D组比较,DA、DE、DAE组均呈现极显著降低($P<0.01$);与DA、DE组比较,DA、DE、DAE组组间无显著性差异($P>0.05$),但DAE组均呈降低趋势。SOD、 γ -GCS活性及MDA含量无显著协同效应($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠心脏组织SIRT1、Nrf-2和HO-1蛋白质表达水平

由表2、图2可知,心脏组织SIRT1蛋白质表达水平,与C组比较,D组极显著降低($P<0.01$);与D组比较,DA、DE、DAE组均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与DA、DE组比较,DAE组均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Nrf2蛋白质表达水平,与C组比较,D组极显著降低($P<0.01$);与D组比较,DA组、

表1 各组大鼠心脏组织氧化应激指标水平($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 The levels of oxidative stress indicators in myocardium of rats in each group

分组	SOD/(U/mg)	γ -GCS/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)
C组	13.00±0.28	1.61±0.34	1.28±0.15
D组	10.69±0.21**	1.24±0.12*	1.37±0.21*
DA组	11.38±0.55	1.37±0.21	0.99±0.19##
DE组	11.89±0.38##	1.55±0.32	0.86±0.17##
DAE组	14.98±0.89##	1.92±0.29##	0.78±0.22##

注:*与C组相比, $P<0.05$;**与C组相比, $P<0.01$;##与D组相比, $P<0.01$

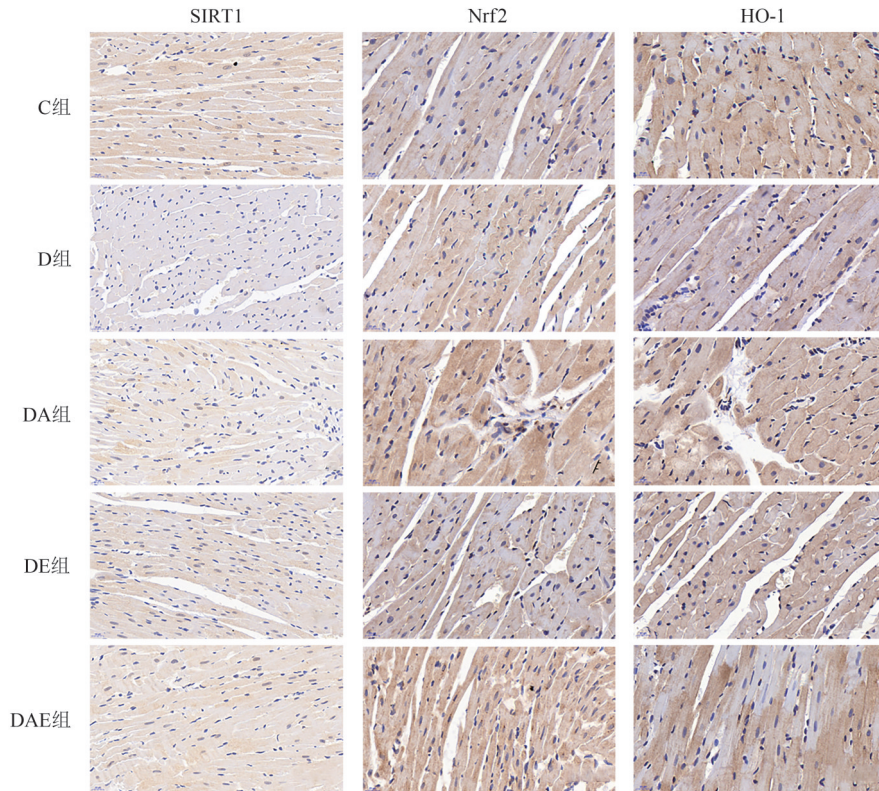
表2 各组大鼠心脏组织SIRT1、Nrf2和HO-1蛋白质表达水平(H-score, $\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 H-score of SIRT1, Nrf2 and HO-1 in myocardium of rats in each group

分组	SIRT1	Nrf2	HO-1
C组	98.20±5.42	128.85±6.89	149.76±6.88
D组	38.55±4.02**	108.70±9.78**	125.59±6.60**
DA组	51.27±4.13#	123.09±6.53#	145.00±10.23#
DE组	57.40±5.44##	118.00±4.99	142.97±11.59#
DAE组	69.67±9.48## $\Delta\Delta\Delta$	126.33±8.03#	153.46±9.56##

注:**与C组相比, $P<0.01$;#与D组相比, $P<0.05$;##与D组相比, $P<0.01$; $\Delta\Delta\Delta$ 与DA组相比, $P<0.01$;▲与DE组相比, $P<0.05$

DAE组显著升高($P<0.05$),DE组呈升高趋势,但无显著性差异($P>0.05$);与DA、DE组比较,DA、DE、DAE组组间无显著性差异($P>0.05$),但DAE组均呈升高趋势。HO-1蛋白质表达水平,与C组比较,D组极显著降低($P<0.01$);与D组相比,DA、DE、



注:细胞核呈深棕色为强阳性,棕黄色为中度阳性,浅黄色为弱阳性,蓝色为阴性

图2 各组大鼠心脏组织 SIRT1、Nrf2 和 HO-1 蛋白质表达水平

Figure 2 The expression of SIRT1, Nrf2 and HO-1 in myocardium of rats in each group

DAE 组均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 DA、DE 组比较, DA、DE、DAE 组组间无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 DAE 组均呈升高趋势。心脏组织 SIRT1 蛋白质表达水平具有协同效应 ($P < 0.05$), Nrf2、HO-1 蛋白质表达水平无显著协同效应 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠心脏组织细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白质表达水平

由表 3、图 3 可知, 与 C 组比较, D 组心脏组织细胞凋亡水平极显著升高 ($P < 0.01$); 与 D 组比较, DA、DE 组降低, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), DAE 组极显著降低 ($P < 0.01$); 与 DA、DE 组比较, DAE 组均显著降低 ($P < 0.05$)。Bcl-2 蛋白质表达水平, 与 C 组比较, D 组极显著降低 ($P < 0.01$); 与 D 组比较, DA、DE 组呈升高趋势, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), DAE 组极显著升高 ($P < 0.01$); 与 DA、DE 组比较, DAE 组均显著升高 ($P < 0.05$)。Bax 蛋白质表达水平, 与 C 组比较, D 组极显著升高 ($P < 0.01$); 与 D 组相比, DA、DE、DAE 组均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 DA、DE 组比较, DAE 呈降低趋势, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。Bcl-2/Bax 比值, 与 C 组比较, D 组极显著降低 ($P < 0.01$); 与 D 组比较, DA、DE 组呈升高趋势, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), DAE 组极显著升高 ($P < 0.01$); 与 DA、DE 组比较, DA、DE、DAE 组组间无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 DAE 组均

呈升高趋势。心脏组织细胞凋亡水平、Bcl-2 蛋白质表达水平及 Bcl-2/Bax 比值具有协同效应 ($P < 0.05$), Bax 蛋白质表达水平无显著协同效应 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠心肌组织细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 蛋白质表达水平 (H-score, $\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 H-score of Bax, Bcl-2 and apoptosis level in myocardium of rats in each group

分组	细胞凋亡	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
C 组	14.70±4.13	15.67±3.02	61.00±9.27	0.26±0.05
D 组	47.73±7.05**	1.70±0.18**	100.12±10.55**	0.02±0.01**
DA 组	38.63±8.08	3.42±0.83	82.84±4.35#	0.04±0.01
DE 组	40.68±6.39	4.24±1.70	81.58±4.49#	0.05±0.02
DAE 组	26.79±6.05##▲	7.83±2.15##▲	71.22±8.01##	0.11±0.04##▲

注: **与 C 组相比, $P < 0.01$; #与 D 组相比, $P < 0.05$; ##与 D 组相比, $P < 0.01$; ▲与 DA 组相比, $P < 0.05$; ▲与 DE 组相比, $P < 0.05$

3 讨论

衰老诱发的心脏结构/功能退行性病变, 是动脉粥样硬化、冠状动脉狭窄、心肌梗死等心血管疾病最大的危险因素^[2]。研究表明衰老过程与 SIRT1 蛋白质失活和氧化应激加剧有关^[14]。氧化应激加剧所产生的过量自由基, 会通过破坏线粒体 DNA, 诱导细胞功能失调, 激活细胞凋亡信号, 加速细胞死亡进程, 促进心肌细胞衰老^[3-5]。SOD 作为机体抵御氧自由基损伤的第一道防线, 其活性随年龄递减^[15]。谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 是氧化应激时维持细胞

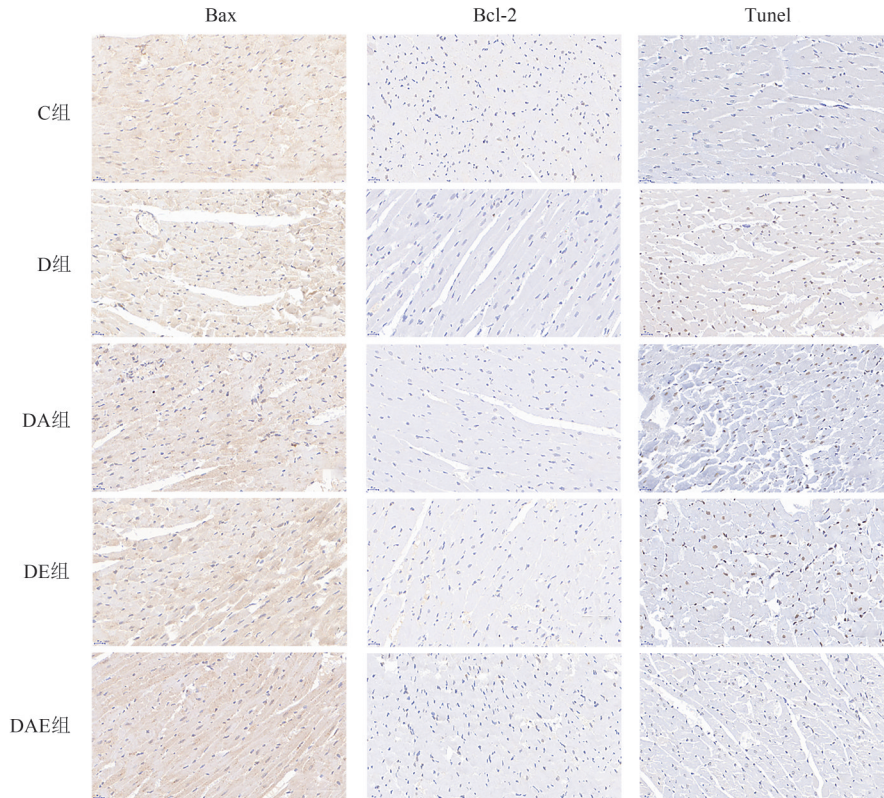


图3 各组大鼠心脏组织细胞凋亡及Bax、Bcl-2蛋白质表达水平

Figure 3 The expression of Bax, Bcl-2 and the level of apoptosis in myocardium of rats in each group

氧化还原状态的重要三肽。 γ -GCS作为GSH体内生物合成的限速酶和催化酶,其活性直接影响GSH的合成及利用^[16]。MDA是不饱和脂肪酸脂质过氧化反应的终产物^[17]。三者均可有效反映体内自由基代谢水平,同时也是公认的衰老标志物。SIRT1是一种烟酰胺腺苷二核苷酸依赖性蛋白脱乙酰酶,与细胞代谢、衰老、凋亡、炎症和氧化应激等生物学过程密切相关,可通过脱乙酰多种底物发挥显著的抗氧化能力,进而调控氧化应激、缓解炎症反应及细胞凋亡,在组织损伤和修复中发挥重要作用^[18]。Nrf2是氧化还原平衡和信号传导的关键调节因子,在防御氧化应激损伤与调节抗氧化基因中发挥重要作用^[19]。当细胞暴露于氧化应激下时,Nrf2易位到细胞核,与编码抗氧化酶的抗氧化反应元件ARE结合,调节下游血红素氧合酶(Heme oxygenase-1,HO-1)等众多抗氧化酶的基因表达。HO-1作为Nrf2下游靶标,广泛参与Nrf2介导的抗氧化应答过程,是公认的具有细胞保护作用的抗氧化酶,可有效减轻机体氧化应激损伤^[20]。SIRT1能够去乙酰化Nrf2,降低Nrf2的泛素化水平,并增加Nrf2/ARE通路的活性,从而增强机体的抗氧化作用^[21]。Bcl-2家庭重要成员抗凋亡蛋白质Bcl-2和促凋亡蛋白质Bax间的平衡,决定着线粒体外膜各种通道的通透性,直接影响细胞命运^[22]。Nrf2可以通过与Bcl-2上的抗

氧化反应元件结合,调节Bcl-2基因的诱导型表达,抑制细胞凋亡。

半乳糖致亚急性衰老模型能够较好地模拟自然衰老,已成为国内外公认的衰老模型。其造模原理为动物持续、过量摄入的D-半乳糖后在体内被还原半乳糖醇,半乳糖醇无法被进一步代谢,诱发机体糖代谢及脂代谢紊乱的同时,抗氧化防御系统被破坏,抗氧化酶活性降低,D-半乳糖还原成半乳糖醇过程中产生的自由基无法有效清除,氧化应激加剧,心、肾等重要器官代谢异常的同时出现与自然衰老相似的退行性改变^[23]。与C组大鼠比较,D组大鼠心脏组织SIRT1、Nrf2、HO-1、Bcl-2蛋白质表达、Bcl-2/Bax比值、SOD、 γ -GCS活性显著降低,细胞凋亡水平、Bax蛋白质表达、MDA含量显著升高,组织形态出现退改性改变,建模成功。

虾青素作为一种具有特殊分子结构的叶黄素类胡萝卜素,可以有效地拮抗氧化应激,改善炎症、神经变性、心血管疾病、非酒精性脂肪性肝病等衰老相关疾病^[7, 24]。NI等^[25]研究发现,虾青素可以有效降低氧化应激,改善年龄相关基因表达,发挥显著抗衰老作用。FARRUGGIA等^[26]研究发现,虾青素可通过调节脂多糖刺激的巨噬细胞中Nrf2表达,抑制氧化应激。KANG等^[27]研究发现,虾青素可以有效抑制乙醇处理的巨噬细胞中SIRT1活性和表达

的降低,抑制乙醇诱导的活性氧积累和氧化应激。XUE 等^[28]研究发现,虾青素可以通过调控 Nrf2/HO-1 通路抑制氧化应激,改善大鼠冠状动脉微栓塞后的心肌细胞凋亡。适度运动可以有效改善氧化应激及衰老诱导的心肌细胞凋亡,延缓心脏衰老。张旭^[29]研究发现,爬梯运动、自由转轮运动可以通过激活 SIRT1/Nrf2 信号通路,提高下游多种抗氧化酶活性,抑制细胞凋亡,对自然衰老大鼠心肌损伤产生保护作用。徐席等^[30]研究发现,抗阻运动可以提高衰老诱导的 SIRT1 表达的降低,改善心脏结构或功能。

与 D 组比较,DA 组 SIRT1、Nrf2、HO-1 蛋白质表达均显著升高,Bax 蛋白质表达及 MDA 含量显著降低;DE 组 SOD 活性和 SIRT1、HO-1 蛋白表达显著升高,Bax 蛋白质表达及 MDA 含量显著降低;DAE 组 SOD、 γ -GCS 活性及 SIRT1、Nrf2、HO-1、Bcl-2 蛋白质表达和 Bcl-2/Bax 比值显著升高,细胞凋亡水平、Bax 蛋白质表达及 MDA 含量显著降低。与 DA、DE 组比较,DAE 组 SIRT1、Bcl-2 蛋白质表达及 Bcl-2/Bax 比值均显著升高,细胞凋亡水平均显著降低,其他指标组间无显著差异。同时心脏组织形态,DA、DE、DAE 组较 D 组有所改善,DAE 组最为明显。提示虾青素和/或有氧运动均可通过激活 SIRT1 蛋白质表达,促进 Nrf2 去乙酰化,提升其稳定性及下游抗氧化酶活性,缓解氧化应激,抑制细胞凋亡,延缓衰老^[31]。同时,与单一干预组比较,联合干预组效果更为显著,其中心肌组织细胞凋亡水平、SIRT1 和 Bcl-2 蛋白质表达水平及 Bcl-2/Bax 比值具有协同效应。

综上,虾青素与有氧运动具有协同作用,可有效调控 SIRT1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达,提升抗氧化酶活性,缓解和改善衰老所致氧化应激,抑制细胞凋亡,延缓心脏衰老,且联合干预具有协同效应。本研究为积极、有效地防控衰老诱导心血管疾病提供实践依据,同时也为虾青素的深度开发与利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要[J]. 中国循环杂志, 2022, 37(6): 553-578.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on Cardiovascular Health and Diseases in China 2021: an Updated Summary [J]. Chinese Circulation Journal, 2022, 37(6): 553-578.
- [2] OBAS V, VASAN R S. The aging heart [J]. Clinical Science: London, England: 1979, 2018, 132(13): 1367-1382.
- [3] 李嘉欣, 钱欣, 赵俊捷, 等. 衰老对心脏结构和功能的影响与机制的研究[J]. 心脏杂志, 2020, 32(2): 190-192, 205.
- [4] LI J X, QIAN X, ZHAO J J, et al. Effect of aging on cardiac structure and function and its mechanism [J]. Chinese Heart Journal, 2020, 32(2): 190-192, 205.
- [5] CHILDS B G, GLUSCEVIC M, BAKER D J, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16(10): 718-735.
- [6] MARCHIO P, GUERRA-OJEDA S, VILA J M, et al. Targeting early atherosclerosis: a focus on oxidative stress and inflammation [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 8563845.
- [7] GOUNDER S S, KANNAN S, DEVADOSS D, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45697.
- [8] PASHKOW F J, WATUMULL D G, CAMPBELL C L. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease [J]. The American Journal of Cardiology, 2008, 101(10): S58-S68.
- [9] ZHANG X S, LU Y, LI W, et al. Astaxanthin ameliorates oxidative stress and neuronal apoptosis via SIRT1/NRF2/Prx2/ASK1/p38 after traumatic brain injury in mice [J]. British Journal of Pharmacology, 2021, 178(5): 1114-1132.
- [10] DARBAND S G, SADIGHPARVAR S, YOUSEFI B, et al. Combination of exercise training and L-arginine reverses aging process through suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in the rat heart [J]. Pflugers Archiv: European Journal of Physiology, 2020, 472(2): 169-178.
- [11] 牛衍龙, 曹建民, 周绮云, 等. 虾青素复合有氧运动对 D-半乳糖诱导大鼠肾脏衰老的干预作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(4): 433-438.
- [12] NIU Y L, CAO J M, ZHOU Q Y, et al. Effects of astaxanthin combined with aerobic exercise on renal aging of rat induced by D-galactose and its mechanism [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2021, 37(4): 433-438.
- [13] 海璇隼, 凌雪萍, 卢英华. 虾青素对正常小鼠与衰老模型大鼠免疫指标的影响 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2013, 52(5): 703-709.
- [14] HAI X J, LING X P, LU Y H. Effect of astaxanthin on immunological indexes of normal mice and aging model rats [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2013, 52(5): 703-709.
- [15] NAI Y, LIU H, BI X Z, et al. Protective effect of astaxanthin on acute cerebral infarction in rats [J]. Human & Experimental Toxicology, 2018, 37(9): 929-936.
- [16] PASCHALIS A, SHEEHAN B, RIISNAES R, et al. Prostate-specific membrane antigen heterogeneity and DNA repair defects in prostate cancer [J]. European Urology, 2019, 76(4): 469-478.
- [17] YAO H W, RAHMAN I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence [J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 84(10): 1332-1339.
- [18] WANG Y, BRANICKY R, NOË A, et al. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling [J]. The Journal of Cell Biology, 2018, 217(6): 1332-1339.

- 1915-1928.
- [16] SONG A J, WU G F, HANG H, et al. Rosiglitazone pretreatment influences thrombin-induced anti-oxidative action via activating NQO1 and γ -GCS in rat microglial cells [J]. *Neurological Research*, 2018, 40(2): 139-145.
- [17] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges [J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 524: 13-30.
- [18] YANG D Q, TAN X, LV Z J, et al. Regulation of Sirt1/Nrf2/TNF- α signaling pathway by luteolin is critical to attenuate acute mercuric chloride exposure induced hepatotoxicity [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37157.
- [19] NGUYEN T, NIOI P, PICKETT C B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (20): 13291-13295.
- [20] ZAKARIA A, RADY M, MAHRAN L, et al. Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress, dopaminergic neuronal loss and neurobehavioral impairment by activating Nrf2/ARE/HO-1 [J]. *Neurochemical Research*, 2019: 2019Nov12.
- [21] BONKOWSKI M S, SINCLAIR D A. Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(11): 679-690.
- [22] PIHÁN P, CARRERAS-SUREDA A, HETZ C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2017, 24(9): 1478-1487.
- [23] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782.
- [24] YANG Y, KIM B, LEE J Y. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits [J]. *Journal of Human Nutrition & food science*, 2013, (1): 1003-1014.
- [25] NI Y H, WU T, YANG L N, et al. Protective effects of astaxanthin on a combination of D-galactose and jet lag-induced aging model in mice [J]. *Endocrine Journal*, 2018, 65 (5): 569-578.
- [26] FARRUGIA C, KIM M B, BAE M, et al. Astaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2018, 62: 202-209.
- [27] KANG H, LEE Y, BAE M, et al. Astaxanthin inhibits alcohol-induced inflammation and oxidative stress in macrophages in a sirtuin 1-dependent manner [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 85: 108477.
- [28] XUE Y G, SUN C, HAO Q M, et al. Astaxanthin ameliorates cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization by inhibiting oxidative stress via Nrf2/HO-1 pathway in rats [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2019, 392 (3): 341-348.
- [29] 张旭. 自由转轮或爬梯运动对老年大鼠心肌保护作用与机制研究 [D]. 武汉: 武汉体育学院, 2018.
- ZHANG X. Voluntary wheel running or ladder-climbing exercise protects against myocardial damage in aged rats [D]. Wuhan: Wuhan Sports University, 2018.
- [30] 徐席斌, 刘晨涛. 抗阻力运动促进衰老的心功能和心肌线粒体重构 [J]. *西北大学学报: 自然科学版*, 2018, 48(3): 399-403.
- XU X B, LIU C T. The promotion of resistance training to aged cardiac function and remodels myocardial mitochondria [J]. *Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*, 2018, 48 (3): 399-403.
- [31] HUANG K P, CHEN C, HAO J, et al. Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating Sirt1 to resist AGEs-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor- β 1 in rat glomerular mesangial cells [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 399: 178-189.