

· 基础研究 ·

maFGF 对慢性衰老大鼠肝组织 ATP 酶、SOD 活力及丙二醛和羟自由基水平的影响*

黄俊杰, 王彩冰, 黄丽娟, 赵善民, 何显教, 黄彦峰, 梁祚仁

(右江民族医学院应用生理研究室, 广西百色 533000)

摘要:目的 探讨改构型酸性成纤维细胞生长因子(maFGF)对衰老大鼠肝组织中 ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)、羟自由基(OH·)水平的影响。方法 采用皮下注射 D-半乳糖建立衰老大鼠模型,将其随机分为衰老模型组、生理盐水对照组和 maFGF 治疗组。另 10 只不给任何药物,正常饲养,作为正常对照组。测定各组肝组织中 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和 SOD 活力以及 MDA、OH· 水平。结果 衰老模型组大鼠肝组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和 SOD 活力均显著降低,MDA 和 OH· 含量均升高($P < 0.05$);maFGF 治疗组大鼠肝组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和 SOD 活力均显著升高,MDA 和 OH· 含量均降低($P < 0.05$)。结论 maFGF 通过降低自由基,提高 ATP 酶活力和抗氧化能力而对衰老大鼠有保护作用。

关键词:成纤维细胞生长因子;衰老;ATP 酶;羟自由基;超氧化物歧化酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)34-3469-03

Effects of maFGF on activities of ATPase and SOD, levels of malondialdehyde and hydroxyl radical in liver tissue of chronic aging rats*

Huang Junjie, Wang Caibing, Huang Lijuan, Zhao Shanming, He Xianjiao, Huang Yanfeng, Liang Zuoren

(Laboratory of Applied Physiology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Objective To study the effects of modified acidic fibroblast growth factor(maFGF) on activities of ATPase and superoxide dismutase(SOD), levels of malondialdehyde(MDA) and hydroxyl radical(OH·) in liver tissue of aging rats. **Methods** Aging rat models were established by subcutaneous injection of D-galactose. They were randomly divided into aging model group, physiological saline control group and maFGF treatment group. Other 10 rats accepted drug-free normal feeding served as normal control group. Activities of Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and SOD, levels of MDA and OH· in liver tissue were measured. **Results** In aging model group, activities of Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and SOD in liver tissue of rats were markedly decreased, while levels of MDA and OH· increased($P < 0.05$). In maFGF treatment group, activities of Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and SOD in liver tissue of rats were significantly increased, while levels of MDA and OH· decreased($P < 0.05$). **Conclusion** maFGF exhibit a protective effect on aging rats via reducing free radicals, enhancing ATPase activities and antioxidant capacity.

Key words: fibroblast growth factors; aging; ATPase; hydroxyl radical; superoxide dismutase

中国已经步入老龄社会,抗衰老的研究是现代医学研究的焦点和热点,但目前尚无非常有效的抗衰老药物。改构型酸性成纤维细胞生长因子(maFGF)是多功能生长因子,具有多种生物活性作用^[1]。本研究通过观察 maFGF 对 D-半乳糖致衰老大鼠肝组织中 ATP 酶和超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、羟自由基(OH·)的影响,探讨 maFGF 对衰老大鼠肝损伤的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 取成年清洁级 Wistar 大鼠 30 只,由广西医科大学动物实验中心提供[动物合格证号:SCXK(桂)2009-0003],雌雄各半,体质量 250 g 左右。

1.2 方 法

1.2.1 动物衰老模型与分组 衰老模型每日皮下注射 D-半乳糖 100 mg/kg,1 次/天,连续注射 60 d 后,大鼠体质量下降,行动迟缓,毛色松散无光泽,自发性活动减少,形体瘦弱,呈现

明显的衰老体征;Y 型迷宫潜伏期延长,错误次数增多,证明衰老模型成功建立^[2-4]。衰老模型建立成功的动物入选本实验。入选 30 只 Wistar 大鼠随机抽签法分为衰老模型组、生理盐水对照组(NS 对照组)和 maFGF 治疗组,maFGF 治疗组皮下注射 D-半乳糖的同时,1 h 后按 maFGF 12 μg/kg 剂量肌内注射,1 次/天,共 14 d,NS 对照组皮下注射 D-半乳糖的同时,1 h 后肌内注射与 maFGF 治疗组相同容量的生理盐水,1 次/天;衰老模型组只皮下注射 D-半乳糖,不作任何干预。另外 10 只大鼠不注射 D-半乳糖,正常饲养,作为正常对照组。

1.2.2 标本采集 各组大鼠到时间点分别迅速取出肝组织,用生理盐水洗去表面残血,用生理盐水分别制成肝组织匀浆,离心取上清液待测定。

1.2.3 肝组织中 ATP 酶、SOD 活力、MDA 含量和抑制 OH· 能力的测定 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力及 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力的测定按试剂盒说明书操作,规定每小时每毫克组织蛋白的

* 基金项目:广西教育厅科研项目(200707LX136)。

组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。SOD 活力检测采用黄嘌呤氧化酶法, 结果以 U/mgprot 表示。MDA 含量检测采用硫代巴比妥酸法, 结果以 nmol/mgprot 表示。在波长 550 nm 处测定吸光度, 运用公式计算得到抑制 OH \cdot 能力, 规定每毫克组织蛋白在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 min, 使反应体系中的 H $_2$ O $_2$ 的浓度降低 1 mmol/L 为一个抑制 OH \cdot 能力单位。抑制 OH \cdot 能力越高, 则反映肝组织样品中 OH \cdot 的含量越低。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 并做 LSD 法两两组间比较, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 maFGF 对慢性衰老大鼠肝组织 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶活力和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力的影响 4 组间肝组织中 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶活力和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力比较差异均有统计学意义 ($F=9.600, P<0.01; F=5.391, P<0.01$)。衰老模型组和 NS 对照组与正常对照组相比, 肝组织 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶活力和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$); NS 对照组与衰老模型组相比, 肝组织 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶活力和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力差异均无统计学意义 ($P>0.05$); maFGF 治疗组与衰老模型组和 NS 对照组相比, 肝组织 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶活力和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 4 组大鼠肝组织 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶活力和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{molPi}\cdot\text{mgprot}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

组别	Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活力	Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATPase 活力
正常对照组	1.28 \pm 0.16	0.71 \pm 0.13
衰老模型组	1.02 \pm 0.13**	0.55 \pm 0.11**
NS 对照组	1.06 \pm 0.10**	0.57 \pm 0.09**
maFGF 治疗组	1.16 \pm 0.05 \blacktriangle	0.67 \pm 0.10 \blacktriangle

** : $P<0.01$, 与正常对照组比较; \blacktriangle : $P<0.05$, 与衰老模型组和 NS 对照组比较。

表 2 4 组大鼠肝组织 SOD 活力、MDA 含量和抑制 OH \cdot 能力比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	SOD 活力 (U/mgprot)	MDA 含量 (nmol/mgprot)	抑制 OH \cdot 能力 (U/mgprot)
正常对照组	154.83 \pm 15.97	6.11 \pm 0.91	83.86 \pm 4.75
衰老模型组	133.10 \pm 11.80**	9.20 \pm 0.80**	68.44 \pm 9.04**
NS 对照组	136.10 \pm 10.07**	9.65 \pm 0.85**	66.00 \pm 79.23**
maFGF 治疗组	148.26 \pm 12.25 \blacktriangle	6.81 \pm 0.67 $\blacktriangle\blacktriangle$	80.24 \pm 9.02 $\blacktriangle\blacktriangle$

** : $P<0.01$, 与正常对照组比较; \blacktriangle : $P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$: $P<0.01$, 与衰老模型组和 NS 对照组比较。

2.2 maFGF 对慢性衰老大鼠肝组织 SOD 活力、MDA 含量和抑制 OH \cdot 能力的影响 4 组间肝组织 SOD 活力和 MDA 含量比较差异有统计学意义 ($F=6.466, P<0.01; F=46.023, P<0.01$)。衰老模型组和 NS 对照组与正常对照组相比, 肝组织 SOD 活力显著降低而 MDA 含量显著升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$); maFGF 治疗组与衰老模型组和 NS 对照组

相比, 肝组织 SOD 活力明显升高而 MDA 含量明显降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。4 组间肝组织抑制 OH \cdot 能力比较差异有统计学意义 ($F=11.291, P<0.01$)。衰老模型组和 NS 对照组与正常对照组相比, 肝组织抑制 OH \cdot 能力均显著降低, 表明肝组织 OH \cdot 的含量高, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$); maFGF 治疗组与衰老模型组和 NS 对照组相比, 肝组织抑制 OH \cdot 能力均明显升高, 表明肝组织 OH \cdot 的含量低, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 见表 2。

3 讨 论

随着人口老龄化趋势的加快, 抗衰老研究日益受到重视。目前的研究认为, 人类的衰老与氧自由基的损伤有关^[5-6], 衰老的自由基学说已得到公认, 该学说认为, 由于诸多因素的作用, 使体内产生过多的自由基, 氧自由基是指由氧衍生出来的自由基及其产物, 包括过 OH \cdot 、超氧阴离子等, OH \cdot 被公认是生物系统中最具活性的活性氧物种, 能导致生物体内 DNA、蛋白质和脂质氧化损伤。注射 D-半乳糖建立亚急性衰老模型, D-半乳糖在体内氧化产生的大量自由基超过机体的清除能力, 可引发脂质过氧化作用和细胞膜损伤^[7-8], 导致机体心、肝、肾、脑等重要器官损伤老化。SOD 属于金属酶, 主要作用是歧化氧自由基, 及时清除机体生成的过量自由基, 以防自由基对组织细胞产生毒害作用, 从而保护细胞免受氧自由基的攻击。SOD 活力高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。自由基攻击膜脂中的不饱和脂肪酸, 使其发生氧化, 脂质过氧化产物 MDA 就会升高。脂质过氧化是造成生物体氧化损伤的主要原因。通过测定体内 MDA 含量, 可间接反映体内自由基对机体的损伤程度^[9]。

ATP 酶是存在于组织细胞及细胞器生物膜上的一种蛋白酶, 其在物质运送、能量转换、信息传递以及维持细胞膜的完整、组织代谢等方面具有重要的意义, 可作为代谢紊乱及损伤组织恢复能力的可靠指标, 其中重要的为 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶^[10-12]。研究发现, 随着年龄增加, Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力下降, 势必引起神经细胞内游离钙浓度增加, 最终引起钙稳态的失调, 细胞内钙超载, 从而加速细胞的衰老^[13]。提高 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶和 Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ -ATP 酶活力, 能起到抗自由基和维持钙稳态的作用, 故在一定程度上可以起到延缓衰老的作用。

本实验研究结果表明, 衰老模型组肝组织不仅 ATP 酶活力降低, 这与文献报道一致^[14]; 而且 SOD 活力显著降低, MDA 含量显著升高, 抑制 OH \cdot 能力降低即 OH \cdot 的含量升高。说明衰老时, OH \cdot 的增多, 攻击生物膜, 因此脂质过氧化物生成增多, 为了清除过多的 OH \cdot , SOD 水平也下降。经过用 maFGF 治疗慢性衰老大鼠后肝组织 ATP 酶活力和 SOD 活力显著升高, MDA 含量和 OH \cdot 的含量均明显降低。说明 maFGF 降低自由基, 提高肝组织的抗氧化能力和 ATP 酶活力, 对细胞具有保护作用^[15-16]。综上所述, maFGF 对衰老大鼠肝损伤具有保护作用。

参考文献:

- [1] 曹定国, 李校塑, 付小兵, 等. 改构酸性成纤维细胞生长因子对小鼠胸腺细胞凋亡的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(9): 80-83.
- [2] 陈树元, 金伟军, 陈志良, 等. D-半乳糖致大鼠亚急性衰老

- 模型的建立[J]. 第一军医大学学报, 1995, 15(3): 233-235.
- [3] 秦红兵, 杨朝晔, 范忆江, 等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立与评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7): 1275-1278.
- [4] 洪亮, 方胜. 三种不同方法建立小鼠衰老模型的比较[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(18): 607-2608.
- [5] Dei R, Takeda A, Niwa H, et al. Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2002, 104(2): 113-122.
- [6] Zoric L, Colak E, Canadanovic V, et al. Oxidation stress role in age-related cataractogenesis[J]. *Med Pregl*, 2010, 63(7/8): 522-526.
- [7] 张熙, 李文彬, 张炳烈. D-半乳糖亚急性中毒大鼠拟衰老生化变化[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 4(4): 309-310.
- [8] Cherian E, Sudheesh NP, Janardhanan KK, et al. Free-radical scavenging and mitochondrial antioxidant activities of Reishi-Ganoderma lucidum (Curt:Fr) P. Karst and Arogyapacha-Trichopus zeylanicus Gaertn extracts[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2009, 20(4): 289-307.
- [9] Halliwell BL, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*[M]. London: Clarendon Press, 1995: 2032-2046.
- [10] 黄河, 肖颖彬, 杨天德, 等. 线粒体 KATP 通道开放剂对培养大鼠心肌细胞缺血/再灌注损伤心肌线粒体的保护作用[J]. 重庆医学, 2008, 37(5): 479-480.
- [11] 文玉杰, 李晓玫. 钠钾 ATP 酶的信号转导功能新进展[J]. 生理科学进展, 2005, 36(2): 159-162.
- [12] Sopjani M, Alesutan I, Wilmes J, et al. Stimulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity and Na⁺ coupled glucose transport by β -catenin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(3): 467-470.
- [13] Barber D, Hunt J, Ehrlich M. Inhibition of calcium-stimulated ATPase in the hen brain P2 synaptosomal fraction by organophosphorus esters; relevance to delayed neuropathy[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2001, 63(2): 101-113.
- [14] 许得盛, 陈伟华. 健康人红细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性与细胞质游离 Ca²⁺ 浓度的随龄变化[J]. 上海医科大学学报, 1995, 22(3): 203-206.
- [15] 汪小凤, 郑青, 蔡绍晖, 等. 非促有丝分裂型人酸性成纤维细胞生长因子的受体结合特征及对 MAPK 信号通路的影响[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(2): 179-182.
- [16] Jungnickel J, Haastert K, Grzybek M, et al. Mice lacking basic fibroblast growth factor showed faster sensory recovery[J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(1): 166-172.

(收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-08-12)

(上接第 3468 页)

- assessment of transpedicular screw fixation in the cervical spine[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1994, 19(22): 2529-2539.
- [6] Jones EL, Heller JG, Silcox DH, et al. Cervical pedicle screws versus lateral mass screws. Anatomic feasibility and biomechanical comparison [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1997, 22(9): 977-982.
- [7] 谢宁, 李家顺, 贾连顺, 等. 下颈椎后路固定方法的力学比较[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(7): 618-620.
- [8] 王东来, 唐天驷, 黄土中, 等. 五种颈椎内固定方法的稳定性生物力学评价[J]. 中华外科杂志, 1999, 37(5): 301-303.
- [9] Abumi K, Shono Y, Kotani Y, et al. Indirect posterior reduction and fusion of the traumatic herniated disc by using a cervical pedicle screw system [J]. *J Neurosurg*, 2000, 92(1 Suppl): S30-37.
- [10] Abumi K, Shono Y, Taneichi H, et al. Correction of cervical kyphosis using pedicle screw fixation systems [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1999, 24(22): 2389-2396.
- [11] Abumi K, Shono Y, Ito M, et al. Complications of pedicle screw fixation in reconstructive surgery of the cervical spine[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(8): 962-969.
- [12] Kamimura M, Ebara S, Itoh H, et al. Cervical pedicle screw insertion; assessment of safety and accuracy with computer-assisted image guidance [J]. *J Spinal Disord*, 2000, 13(3): 218-224.
- [13] Karaikevic EE, Yingsakmongkol W, Gaines RW Jr. Accuracy of cervical pedicle screw placement using the funnel technique [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001, 26(22): 2456-2462.
- [14] Miller RM, Ebraheim NA, Xu R, et al. Anatomic consideration of transpedicular screw placement in the cervical spine. An analysis of two approaches [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1996, 21(20): 2317-2322.
- [15] Ludwig SC, Kowalski JM, Edwards CC 2nd, et al. Cervical pedicle screws; comparative accuracy of two insertion techniques [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(20): 2675-2681.
- [16] Ludwig SC, Kramer DL, Balderston RA, et al. Placement of pedicle screws in the human cadaveric cervical spine: comparative accuracy of three techniques [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(13): 1655-1667.
- [17] 田伟. 使用计算机导航技术辅助脊柱骨折和不稳定的固定手术 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(11): 1218-1219.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-07-12)