中国科学: 生命科学 2024 年 第 54 卷 第 3 期: 537 ~ 547
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

论 文

小麦胚芽活性肽通过AMPK/SIRT1改善大鼠肝脏衰老损伤的作用机制研究

汪芳[1,2†], 罗涛[1†], 陈烩铃[1], Kiyoshi Itagaki[2], 宋海昭[1], 熊玲[1], 王銮凤[1], 沈新春[1*]

1. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室, 南京 210023;
2. Harvard Medical School, Boston 02115, USA
† 同等贡献
* 联系人, E-mail: shenxinchun@nufe.edu.cn

收稿日期: 2023-09-01; 接受日期: 2023-10-18; 网络版发表日期: 2024-03-01
国家自然科学基金(批准号: 32172203)资助

摘要 小麦胚芽作为小麦面粉加工过程中产生的副产品, 资源极为丰富, 但一直以来未能得到充分合理的利用. 本研究以课题组前期获得的麦胚活性肽ADWGGPLPH(ADW)为对象, 以自然增龄的SD大鼠作为肝脏老化损伤的动物模型, 9月龄大鼠作为对照, 用麦胚源活性肽持续灌胃干预至21月龄, 研究麦胚源活性肽对自然增龄大鼠肝脏老化损伤的影响, 并结合H_2O_2诱导衰老HepG2细胞模型初步探明其分子机制. 结果表明, 麦胚源活性肽ADW能够增加大鼠血清及肝脏中SOD, T-AOC, GSH-Px, CAT等抗氧化酶活性, 同时降低MDA水平, 改善大鼠肝脏中氧化应激水平; 降低血清及肝脏中IL-6, IL-1β, MMP3, TNF-α水平, 并且增加抗炎因子IL-10分泌, 改善增龄大鼠肝脏中炎症环境; 麦胚源活性肽干预后肝脏结构明显好转、脂肪空泡减少、细胞排列整齐, ALT以AST水平均显著下降. 麦胚源活性肽能够有效地改善老化肝脏中细胞的结构及生长状态异常, 减少增龄过程中肝脏质量损失, 降低了衰老标志蛋白P53和P21的表达量, 减轻肝脏老化损伤程度并减缓了肝脏的老化进程. 通过加入抑制剂、激活剂、siRNA等手段, 初步阐明麦胚源活性肽能够通过激活AMPK/Sirt1信号通路以调控衰老相关进程. 本研究对于开发健康老龄化膳食结构以及麦胚资源的精深利用具有十分重大的意义.

关键词 小麦胚芽, 活性肽, 衰老, AMPK, 肝脏

衰老是一个不可避免的生物学过程, 但卫生条件的改善以及医疗手段的提升使人类平均寿命不断增长, 预计到2025年我国人均预期寿命将提高至78.3岁. 然而, 单纯延长寿命仍无法解决老龄过程所带来的各种疾病风险, 衰老导致的生理生化动态平衡受损、疾病患病率和死亡的风险并未因此得到改善和降低. 在目前无法突破人类寿命上限的情况下, 健康的老龄化比单纯的延长寿命要更有意义[1]. 因此, 当前的抗衰老策略正在将重点从提升寿限转向促进积极且健康的老龄化, 其主要目的是延长健康的生命, 提升老年群体生

引用格式: 汪芳, 罗涛, 陈烩铃, 等. 小麦胚芽活性肽通过AMPK/SIRT1改善大鼠肝脏衰老损伤的作用机制研究. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 537–547
Wang F, Luo T, Chen H L, et al. Wheat germ peptides improving liver aging damage in rats through the AMPK/SIRT1 pathway (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 537–547, doi: 10.1360/SSV-2023-0200

© 2024 《中国科学》杂志社 www.scichina.com
https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

活质量, 使其免受伴随老龄而来的不利事件的影响[2]. 世界卫生组织发布的《关于老龄化与健康的全球报告》中, 将健康老龄化定义为“发展和维护老年健康生活所需要的功能和功能发挥的过程”. 2022年3月中华人民共和国国家卫生健康委员会等15部门联合印发的《“十四五”健康老龄化规划》也指出, 要尽可能满足老年群体的健康需求、促进老年人健康增龄. 在此基础上, 越来越多的研究希望能够通过食物来源的天然营养物质来干预正常群体的增龄进程[3].

肝脏是易受到增龄影响的器官之一. 老龄群体的肝脏代谢能力会随着细胞的老化而进一步失调, 会导致许多常见的年龄相关疾病发病, 如胰岛素抵抗、糖尿病和非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)[4,5]. 肝功能异常会导致胆固醇和甘油三脂积聚在血管中, 引起动脉粥样硬化, 动脉壁变厚、变硬, 管腔变小, 甚至阻碍血液循环, 进而导致心脑血管疾病[6]. 这种情况如果发生在心脏、脑、眼底血管或者是肾脏等部位, 就会引发冠心病、脑梗塞、失明以及肾衰竭等相应的疾病[7,8]. 由于肝脏老化、功能退变引发的心脑血管疾病已经成为严重影响老年人身体健康的重要因素, 也是导致我国人群死亡的首因. 所以延缓肝脏老龄化进程、保护老龄人群的肝脏功能显得尤为重要.

小麦胚芽作为小麦面粉加工过程中产生的副产品, 资源极为丰富, 我国每年可用于开发的小麦胚芽量可达30万~50万吨, 但一直以来, 小麦胚芽这一宝贵资源未能得到充分、合理的利用. 小麦胚芽含有丰富且优质的营养素和非营养素, 包括蛋白质、多糖、脂类、维生素、矿物质和其他生物活性化合物[9]. 由于小麦胚芽中蛋白质含量较高, 目前国内外相关研究主要集中在小麦胚芽活性肽的营养学研究, 研究表明, 小麦胚芽中的营养物质赋予了小麦胚芽包括抗氧化、抗癌等多种生物活性[10~12]. 此外, 麦胚发酵产物已经被证明能够通过提升肠道益生菌群数量达到抗衰老的效果[13]. 目前, 对于小麦胚芽的高值化开发利用仍处在起步阶段. 随着人们对人体健康要求的不断提高, 以及现阶段世界粮食危机越来越严重, 充分发挥和利用小麦胚芽的营养价值有助于农副产品的高值化利用, 且对于提升国民健康水平, 缓解粮食危机具有重要意义.

本课题组前期以麦胚蛋白为原料, 经过酶解超滤分离得到序列为ADWGGPLPH(ADW)的活性肽, 其具有显著的体外抗氧化作用, 并且对老年性骨质疏松具有积极的干预作用[14,15]. 在此基础上, 本课题组进一步探究麦胚活性肽ADW对增龄过程中代谢器官肝脏老化损伤的影响, 并初步探明其发挥活性的分子机制, 这对于开发健康老龄化饮食结构以及麦胚资源的精深利用都具有十分重大的意义.

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

SD雌性大鼠购于南京青龙山动物中心, 动物许可证号: SCXK(苏)2018-0048, 实验按照南京中医药大学动物保护委员会的指导方针进行, 方案批准号为201905A031; 小麦胚芽肽ADWGGPLPH(纯度95%)购于GenScript生物科技公司(南京); HRP linked山羊抗兔IgG、HRP linked马抗鼠IgG、Tween-20、细胞裂解液、Metformin购于Beyotime生物技术公司(上海); P53抗体购于美国GeneTex生物公司; P21抗体购于美国Santa Cruz生物公司; 蛋白Marker、化学发光检测试剂盒购于Vazyme生物科技公司(南京); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、Compound C购于美国Sigma-Aldrich公司; 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)购于南京建成生物研究所; PVDF膜购于美国Thermo Fisher Scientific公司; T-AOC, GSH-Px, MDA, SOD, CAT, IL-6, IL-10, IL-1β, TNF-α, MMP3试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司; TaKaRa RNA试剂盒购于宝日医生物技术(北京); β半乳糖苷酶染色试剂盒购于上海尚宝生物科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯.

1.2 方法

(1) 动物分组与处理. 24只9月龄无特定病原体SD雌性大鼠((300.0±20.0) g), 用于建立自然老龄大鼠模型. 饲养环境保持在光照与黑暗各半周期条件下, 饲养室温度保持为25℃、湿度为55%, 所有大鼠给予等量膳食以及足量饮用水. 所有大鼠按照6只/组, 随机分为4组, 分别为: 9月龄对照组(Con-9), 21月龄对照组(Con-21), 21月龄低剂量麦胚源活性肽组(L-AOP), 21月龄高剂量麦胚源活性肽组(H-AOP).

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

9月龄对照组大鼠提前处死作为其他组别的时间纵向对照; 其余三组在饲料、饮用水正常条件下, 各组每天分别腹腔注射生理盐水、低剂量麦胚源活性肽(1.5 mg/kg)、高剂量麦胚源活性肽(6.0 mg/kg), 并每周记录大鼠的体重和饮食饮水情况直至21月龄. 实验周期12个月结束后, 小鼠禁食12 h, 收集血液样品, 3500 r/min、4℃离心15 min后分离血清, 保存于−80℃冰箱. 快速解剖取出肝脏等器官和组织, 用生理盐水清洗组织. 用滤纸吸干后, 称质量. 部分样品固定于体积分数10%福尔马林溶液中, 保存在4℃冰箱, 用于形态观察; 部分样品冻存于−80℃冰箱, 用于后续指标分析.

(2) 肝脏组织形态观察. 取固定于体积分数10%福尔马林溶液中的大鼠肝脏组织, 进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 用倒置显微镜观察HE染色组织切片.

(3) 肝脏β半乳糖苷酶染色. 取肝脏组织, 进行常规石蜡包埋, 然后进行脱蜡水化处理. 加入适当体积β半乳糖苷酶染色固定液, 以充分盖住组织, 室温固定20 min, 加入适当染色工作液, 37℃孵育过夜, PBS洗涤, 脱水, 普通光学显微镜下观察结果.

(4) 氧化应激指标测定. 取大鼠血清, 照体积1:4(V/V)的比例加入生理盐水, 2500 r/min离心10 min, 取上清液备用; 肝脏组织按照重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入生理盐水制作组织匀浆, 2500 r/min离心10 min, 取上清液备用, 按照试剂盒说明书操作步骤测定T-AOC, GSH-Px, MDA, SOD, CAT的含量.

(5) 血清炎症因子的测定. 按照试剂盒说明书进行操作, 测定大鼠血清中IL-6, IL-10, IL-1β, TNF-α, MMP3的含量.

(6) 肝脏炎症因子的测定. 取适量肝脏组织, 按照TaKaRa RNA试剂盒, 提取总RNA, 按照试剂盒将RNA逆转录为cDNA后, 再按照试剂盒说明书进行荧光定量实验. 荧光定量PCR仪条件: (ⅰ) 95℃ 30 s 1个循环. (ⅱ) 95℃ 10 s+60℃ 30 s 40个循环. (ⅲ) 95℃ 15 s +60℃ 60 s+95℃ 15 s 1个循环. 定量PCR引物序列见表1.

(7) 肝功能指标测定. 取大鼠血清, 测定步骤按照测试试剂盒说明书操作, 检测ALT和AST含量.

(8) Western blot分析. 称取适量肝脏组织提取蛋白, 采用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白质浓度. 用质量分数12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白样品分离并转至PVDF膜. 然后将PVDF膜于一抗(稀释比例为1:1000)中封闭, 在摇床上4℃过夜. 完成后, 用TBST溶液清洗PVDF膜. 再将PVDF膜转移至相应的二抗(稀释比例为1:5000)中室温封闭1 h, 之后用TBST溶液清洗PVDF膜. 最后, 将ECL显色液覆盖在目标蛋白的相应条带处, 然后对PVDF膜进行显影, 用自动化学发光成像系统扫描成像, 并利用ImageJ 1.40软件量化蛋白表达水平.

表 1　用于定量PCR的引物

Table 1　Primers for quantitative polymerase chain reaction

基因	正/反义引物序列(5′→3′)
IL-6	F: GTAGCCGCCCCACACAGACAGCC
	R: GCCATCTTTGGAAGGTTC
IL-1β	F: ATGACCTGAGCACCTTCTTTC
	R: TGCACATAAGCCTCGTTATCC
IL-10	F: GCTGGAGGACTTTAAGGGTTAC
	R: GATGTCTGGGTCTTGGTTCTC
MMP3	F: AGTCTTCCAATCCTACTGTTGCT
	R: TCCCCGTCACCTCCAATCC
TNF-α	F: GCGTGGAGCTGAGAGATAAC
	R: TGAAGAGGACCTGGGAGTAG
GADPH	F: ACTTTGGTATCGTGGAAGGACTCAT
	R: GTTTTTCTAGACGGCAGGTCAGG

(9) Compound C抑制AMPK. 当HepG2细胞培养至约80%汇合度时, 用胰蛋白酶/EDTA溶液将细胞消化; 用含有10%胎牛血清的DMEM(High Glucose)培养液配置成细胞浓度约为1×10^5个/mL的悬液; 按2 mL/孔置于于6孔板中, 在37℃、5% CO_2条件下培养24 h, 加入终浓度为20 μmol/L的Comp C, 24 h后提取蛋白进行Western blot实验.

(10) siRNA干扰AMPK. 当HepG2细胞培养至约80%汇合度时, 用胰蛋白酶/EDTA溶液将细胞消化; 用含有10%胎牛血清的DMEM(High Glucose)培养液配置成细胞浓度约为1×10^5个/mL的悬液; 按2 mL/孔置于于6孔板中, 在37℃、5% CO_2条件下培养24 h至约80%汇合度时, 利用Lipofectamine 3000试剂进行细胞转染, 用于沉默的siRNA序列见表2.

(11) Metformin激活AMPK. 当细胞培养至约80%汇合度时, 用胰蛋白酶/EDTA溶液将细胞消化; 用含有10%胎牛血清的DMEM(High Glucose)培养液配置成

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

表 2 用于沉默的siRNA序列

Table 2 siRNA sequences for silencing

基因	正/反义引物序列(5′→3′)
si-AMPK-1	F: GGAUCCAUCAUAUAGUUCAdTdT
	R: UGAACUAUAUGAUGGAUCCdTdT
si-AMPK-2	F: GAGUCUACAGUUAUACCAAdTdT
	R: UUGGUAUAACUGUAGACUCdTdT
si-AMPK-3	F: CGGGAUCAGUUAGCAACUAdTdT
	R: UAGUUGCUAACUGAUCCCGdTdT

细胞浓度约为1×10^{5}个/mL的悬液; 按2 mL/孔置于于6孔板中, 在37℃、5% CO_2条件下培养24 h, 衰老组中加入终浓度为300 μmol/L H_2O_2干预2 h后吸弃培养液, 更换10% FBS DEME(High Glucose)培养液, Met组加入终浓度为20 μmol/L的Metformin干预48 h后提取蛋白进行Western blot实验.

(12) 数据分析. 采用SPSS17.0软件进行数据分析, 数据用平均值±标准差的形式表示, 两组间计量资料比较采用 t 检验, 同组不同浓度间比较采用单因素方差分析, 方差齐性 t 检验, 方差不齐性t'检验, P<0.05为差异显著, P<0.01为差异极显著, P>0.05 为无显著差异.

2 结果与分析

2.1 小麦胚芽活性肽对老龄大鼠肝脏氧化应激指标的影响

通过检测SOD, T-AOC, MDA, GSH-Px, CAT水平评价麦胚源活性肽对老龄大鼠肝脏氧化应激的影响. 结果如图1所示, 与9月龄对照组大鼠相比, 21月龄对照组大鼠肝脏内的SOD, T-AOC, GSH-Px, CAT含量显著

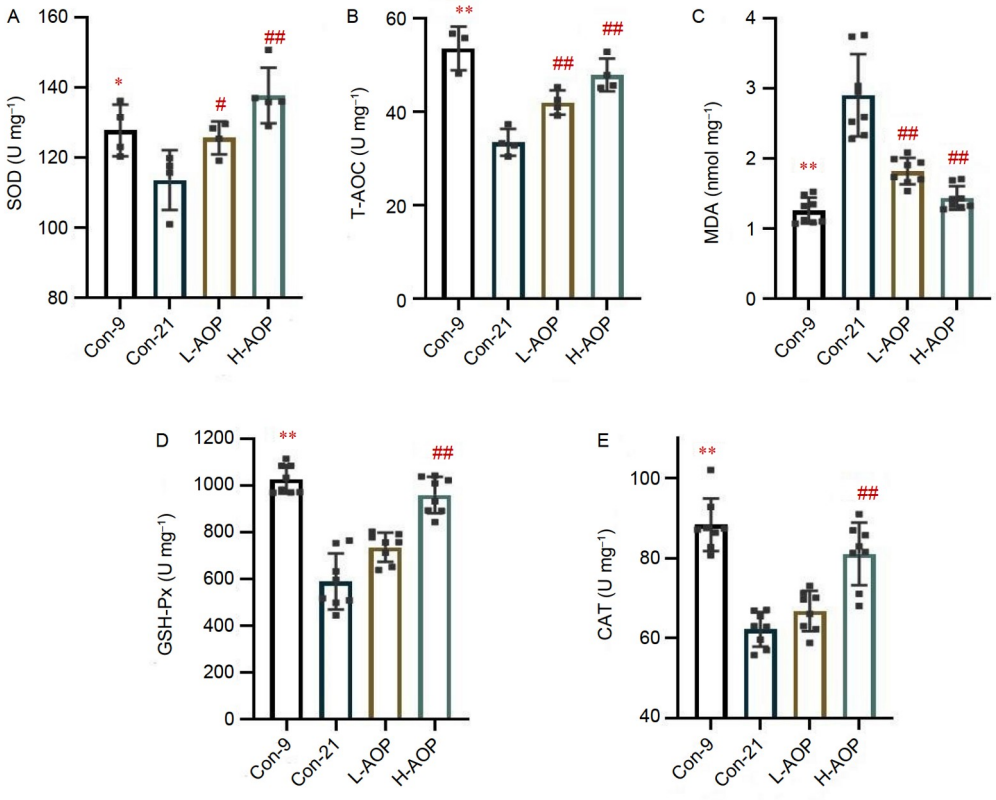

图 1 麦胚源活性肽对老龄大鼠肝脏中(A) SOD, (B) T-AOC, (C) MDA, (D) GSH-Px和(E) CAT的影响. 注: **代表21月龄对照组(Con-21)与9月龄对照组(Con-9)相比有极显著性差异(P<0.01); *代表Con-21与Con-9相比有显著性差异(P<0.05); ##代表麦胚源活性肽干预组与Con-21相比有极显著性差异(P<0.01); #代表麦胚源活性肽干预组与Con-21相比有显著性差异(P<0.05)

Figure 1 Effects of wheat germ-derived active peptide on (A) SOD, (B) T-AOC, (C) MDA, (D) GSH-Px and (E) CAT in the liver of aged rats. Note: ** represents a highly significant difference (P<0.01) between the 21-month control group (Con-21) and the 9-month control group (Con-9); * represents a significant difference (P<0.05) between Con-21 and Con-9; ## represents a highly significant difference (P<0.01) between the wheat germ peptide intervention group and Con-21; # represents a significant difference (P<0.05) between the wheat germ peptide intervention group and Con-21

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

下降(P<0.01), MDA含量显著上升(P<0.01), 表明随着年龄增长, 大鼠体内抗氧化能力变弱. 麦胚源活性肽干预后, SOD, T-AOC, GSH-Px, CAT活力显著上升(P<0.01), MDA值显著下降(P<0.01), 表明麦胚源活性肽可以显著提升老龄大鼠肝脏的抗氧化能力.

2.2　小麦胚芽活性肽对老龄大鼠肝脏SASP的影响

衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)的概念是Coppé等人[16]在2008年提出的, 他们发现衰老细胞可以通过分泌炎症等多种生物因子来增加机体患疾病风险, 于是将这些因子统称为SASP. SASP包含大量细胞因子、基质金属蛋白酶、趋化因子、生长因子和小分子代谢物, 是衰老细胞产生的最重要的环境条件[17,18]. 通过qRT-PCR检测麦胚源活性肽对SD大鼠中肝脏中SASP影响. 结果如图2所示, 与9月龄对照组大鼠相比, 21月龄对照组大鼠肝脏的IL-6, IL-1β, MMP3, TNF-α水平显著上升(P<0.01), IL-10水平显著下降(P<0.01), 在麦胚源活性肽干预后, 老龄大鼠肝脏内IL-6, MMP3, TNF-α水平显著下降(P<0.01), IL-10水平显著上升(P<0.01). 表明麦胚源活性肽可以有效缓解老化肝脏中的炎症因子异常上升, 降低了衰老个体的炎症水平以及自免性疾病的发病率.

2.3　小麦胚芽活性肽对老龄大鼠肝脏组织形态以及β半乳糖苷酶的影响

老龄大鼠肝体比指数结果如图3A所示, 老龄大鼠肝脏指数出现了显著下降(P<0.01), 这与现有研究结果相符. 在高剂量组(6.0 mg/kg)伴随大鼠增龄从9月龄干预至21月龄时, 老龄大鼠肝脏指数显著上升

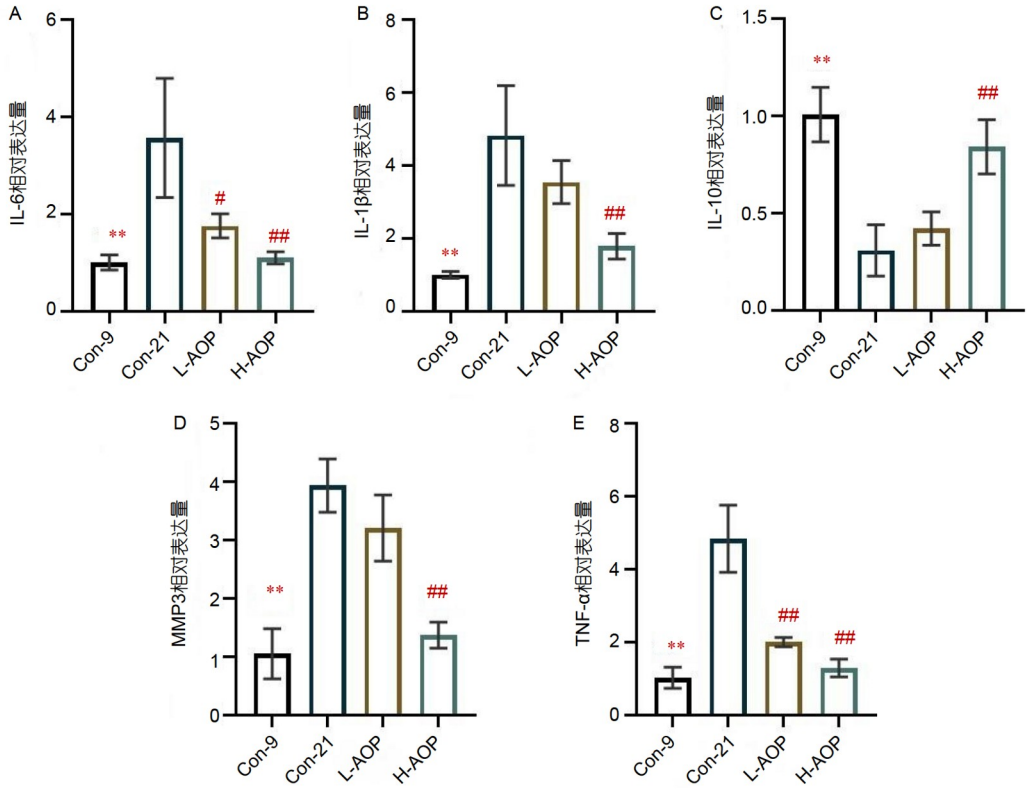

图 2　麦胚源活性肽对老龄大鼠肝脏中(A) IL-6, (B) IL-1β, (C) IL-10, (D) MMP3和(E) TNF-α的影响. 注: **代表21月龄对照组(Con-21)与9月龄对照组(Con-9)相比有极显著性差异(P<0.01); *代表Con-21与Con-9相比有显著性差异(P<0.05); ##代表麦胚源活性肽干预组与Con-21相比有极显著性差异(P<0.01); #代表麦胚源活性肽干预组与Con-21相比有显著性差异(P<0.05)

Figure 2　Effects of wheat germ-derived active peptide on (A) IL-6, (B) IL-1β, (C) IL-10, (D) MMP3, and (E) TNF-α in the liver of aged rats. Note: ** represents a highly significant difference (P<0.01) between the 21-month control group (Con-21) and the 9-month control group (Con-9); * represents a significant difference (P<0.05) between Con-21 and Con-9; ## represents a highly significant difference (P<0.01) between the wheat germ peptide intervention group and Con-21; # represents a significant difference (P<0.05) between the wheat germ peptide intervention group and Con-21

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

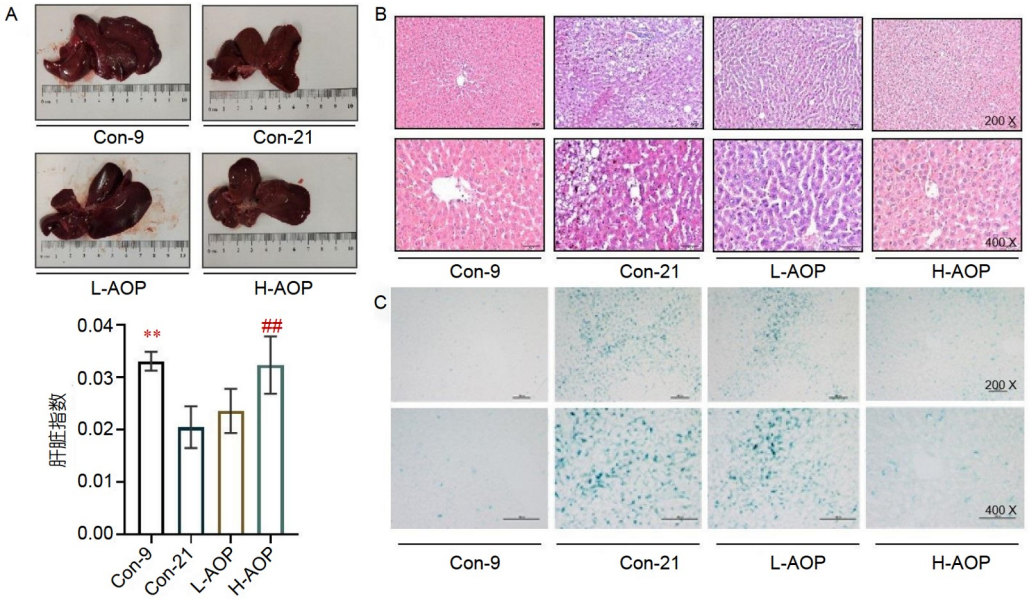

图 3 麦胚源活性肽对老龄大鼠(A)肝脏指数、(B)肝脏组织形态的影响、(C)肝脏β半乳糖苷酶染色切片. 注: **代表21月龄对照组(Con-21)与9月龄对照组(Con-9)相比有极显著性差异(P<0.01); ##代表麦胚源活性肽干预组与Con-21相比有极显著性差异(P<0.01)

Figure 3 Effects of wheat germ-derived active peptide on the (A) liver index, (B) liver tissue morphology of aged rats, and (C) liver β-galactosidase-stained sections. Note: ** represents a highly significant difference (P<0.01) between the 21-month control group (Con-21) and the 9-month control group (Con-9); ## represents a highly significant difference (P<0.01) between the wheat germ peptide intervention group and Con-21

(P<0.01). 随着年龄的增长, 肝脏老化损伤加剧, 肝细胞数量及其再生能力逐渐下降, 这也导致肝脏的体积和重量不可避免地减小和流失. 衰老肝细胞的结构和功能出现明显退化, 会直接影响到肝脏的分泌和吸收等生理功能. 脂肪肝相关疾病等也会增加发病风险[19,20]. 以上结果表明, 麦胚源活性肽能够降低增龄过程中大鼠肝脏质量的流失, 缓解由增龄对大鼠造成的肝脏结构老化损伤.

组织切片HE染色结果如图3B所示, 9月龄对照组肝细胞排列整齐, 形态正常无结构性损伤, 21月龄对照组肝脏细胞结构出现损伤、包括空泡化、双核化、细胞质疏松、核染色质聚集; 细胞排列无序, 形状不规则, 体积增大, 细胞之间界限不清晰, 出现大量脂褐素沉积, 肝细胞老化损伤严重, 且呈现出轻微的脂肪肝的病理学特点. 麦胚活性肽干预后, 肝脏细胞体积有所变小, 脂肪空泡变小且数量减少, 细胞排列相比于21月龄对照组较整齐, 肝脏结构均有不同程度地好转.

β半乳糖苷酶是一种仅在衰老细胞中催化β半乳糖苷水解成单糖的水解酶, 是在衰老组织以及衰老细胞中最广泛使用的生物标记物, 具有相当可靠的和容易检测的特性. 在pH 6.0条件下, 只有处于衰老状态的细胞会被染色[21]. 结果如图3C所示, 9月龄对照组中染色点少, 酶活性低. 21月龄对照组中, 肝脏切片呈现大量蓝色染色点, 表明肝脏老化程度加剧. 在麦胚源活性肽干预后, 肝脏老化程度出现明显好转.

2.4 麦胚源活性肽对老龄大鼠肝脏中AMPK及Sirt1表达影响

激活AMPK能够通过能量调节以及细胞自噬缓等功能, 以类似卡路里限制的方式延缓细胞衰老, 所以AMPK的激活在抗衰老方面起着至关重要的作用[22,23]. DNA在受到氧化损伤后会启动DNA损伤应答机制(DNA-damage response, DDR), 在转录水平激活P53, 导致细胞衰老, 因此P53被视作衰老的生物标志物[24]. Sirt1是衰老标志蛋白P53的直接调控因子之一, 能够通过调节P53参与到细胞的周期调节、DNA修复、凋亡以及炎症水平[25~27].

如图4所示, 与9月龄对照组大鼠相比, 21月龄对照组大鼠肝脏中p-AMPK和Sirt1相对表达量显著性下降(P<0.01), P53相对表达量显著性上调(P<0.01), 在麦胚

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

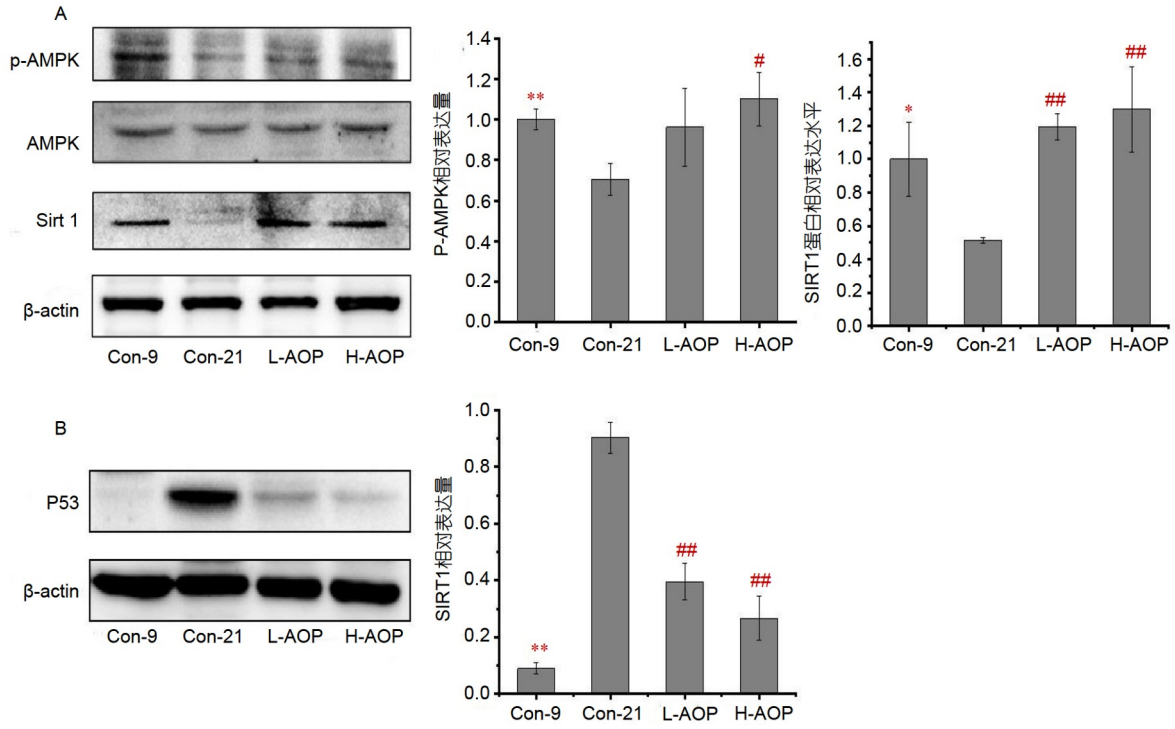

图 4　麦胚源活性肽对老龄大鼠肝脏中AMPK, Sirt1和P53的影响. 注: **代表21月龄对照组(Con-21)与9月龄对照组(Con-9)相比有极显著性差异(P<0.01); *代表Con-21与Con-9相比有显著性差异(P<0.05); ##代表麦胚源活性肽干预组与Con-21相比有极显著性差异(P<0.01); #代表麦胚源活性肽干预组与Con-21相比有显著性差异(P<0.05)

Figure 4　Effects of wheat germ-derived active peptide on AMPK, Sirt1, P53, and P21 in the liver of aged rats. Note: ** represents a highly significant difference (P<0.01) between the 21-month control group (Con-21) and the 9-month control group (Con-9); * represents a significant difference (P<0.05) between Con-21 and Con-9; ## represents a highly significant difference (P<0.01) between the wheat germ peptide intervention group and Con-21; # represents a significant difference (P<0.05) between the wheat germ peptide intervention group and Con-21

源活性肽干预后，p-AMPK和Sirt1相对表达量显著性上升(P<0.01), P53相对表达量显著性下降(P<0.01). 这表明麦胚源活性肽能够延缓通过调节AMPK和Sirt1缓解大鼠肝脏的老化. 然而AMPK与及Sirt1之间的上下游关系需进一步探明.

2.5　小麦胚芽活性肽对H_2O_2诱导衰老HepG2细胞中AMPK及Sirt1表达影响

通过构建H_2O_2诱导衰老HepG2细胞模型，研究小麦胚芽活性肽对衰老HepG2细胞中AMPK及Sirt1表达影响. 结果如图5A所示, 与对照组相比, H_2O_2诱导衰老HepG2细胞中p-AMPK和Sirt1相对表达量显著性下降(P<0.01)，在麦胚源活性肽干预后，p-AMPK和Sirt1相对表达量显著性上升(P<0.01), 与动物研究结果一致.

为了进一步验证AMPK是否为Sirt1的上游信号, 本研究采用了AMPK抑制剂Compound C、AMPK激活剂Metformin以及siRNA沉默AMPK的表达. 如图5B所示, 与对照组相比, Compound C抑制AMPK活性后p-AMPK和Sirt1相对表达量显著性下降(P<0.01)，P53相对表达量显著上升(P<0.01)，表明AMPK的磷酸化被抑制后能够下调Sirt1的表达, 同时上调P53的表达. 在siRNA沉默AMPK的表达后, 结果如图5C所示, 与对照组相比，siRNA沉默组AMPK，p-AMPK和Sirt1相对表达量均显著性下降(P<0.01). 表明AMPK表达量被抑制后, 磷酸化的AMPK表达量也出现下降, 同时Sirt1也受到信号调控出现下降, 而P53相对表达量则出现显著性上升(P<0.01).

Metformin是一种广泛使用的AMPK激活剂，可以通过激活LKB1-AMPK等信号通路参与肝脏相关的疾病调节[28,29]. 在Metformin干预H_2O_2诱导的衰老HepG2细胞后，结果如图5D所示，AMPK的磷酸化表达以及Sirt1表达量显著增加(P<0.01)，P53相对表达量显著下降(P<0.01). 上述结果可以表明，小麦胚芽活性肽能够通过调节AMPK/Sirt1信号通路缓解老龄大鼠的肝脏损伤.

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

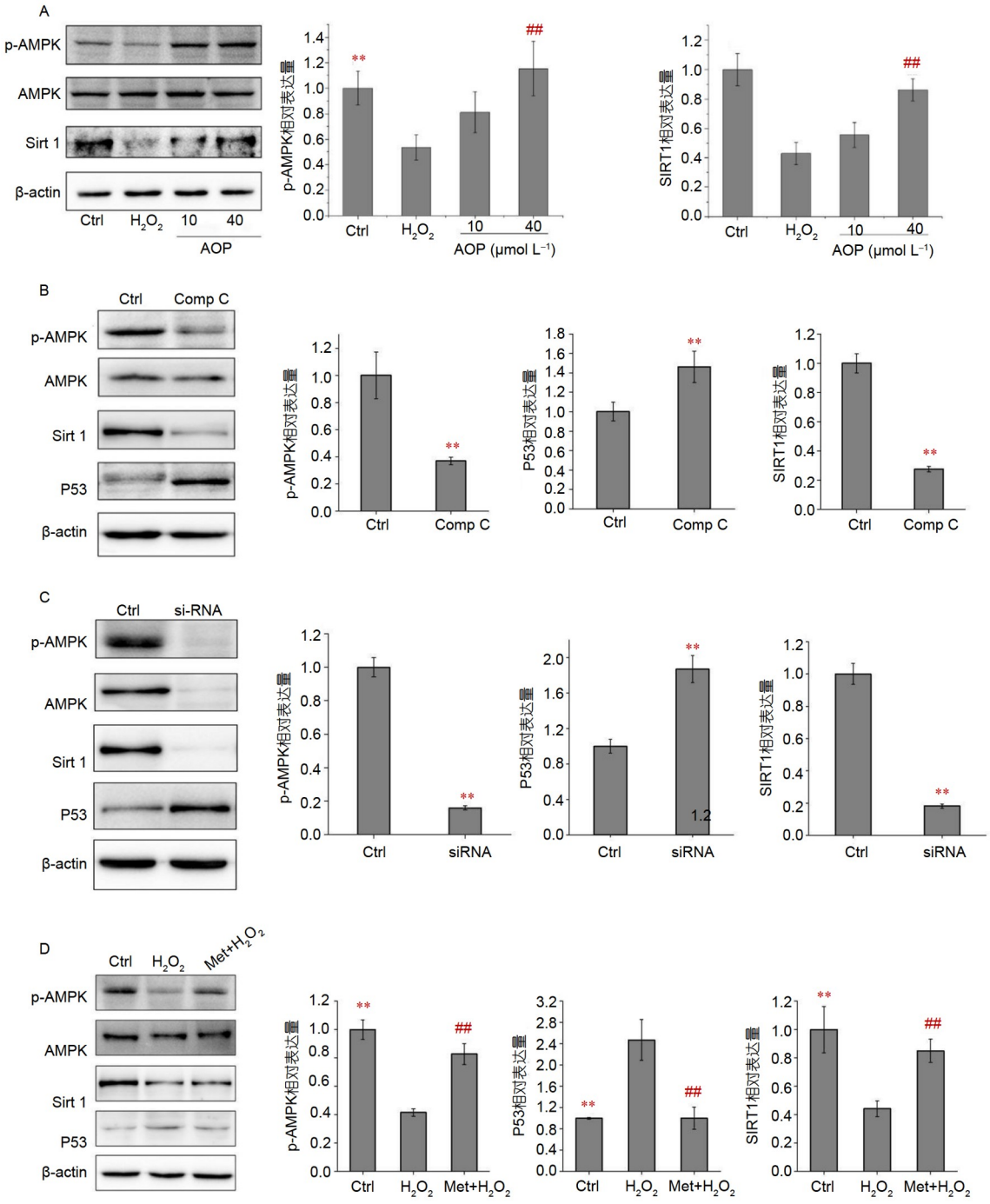

图 5 小麦胚芽活性肽通过AMPK/SIRT1/P53改善肝脏衰老损伤的机制验证. A: 麦胚源活性肽对衰老细胞中AMPK和Sirt1的影响; B: Comp C抑制AMPK对Sirt1表达的影响; C: siRNA沉默AMPK对Sirt1表达的影响; D: 激活衰老细胞中AMPK对Sirt1表达的影响. 注: **代表与对照组(Ctrl)相比有极显著性差异(P<0.01); *代表与对照组(Ctrl)相比有显著性差异(P<0.05); ##代表与模型组(H_2O_2)相比有极显著性差异(P<0.01); #代表与模型组(H_2O_2)相比有极显著性差异(P<0.05)

Figure 5 Wheat germ-derived active peptide improve liver aging damage through AMPK/SIRT1/P53 pathway. A: Effects of wheat germ-derived active peptide on AMPK and Sirt1 of senescent cells; B: effect of Comp C inhibition; C: siRNA silencing of AMPK on Sirt1 expression; D: effect of activated AMPK on Sirt1 expression in senescent cells. Note: ** represents a highly significant difference (P<0.01) compared with the control group (Ctrl); * represents a significant difference (P<0.05) compared with the control group (Ctrl); ## represents a highly significant difference (P<0.01) compared with the model group (H_2O_2); # represents a significant difference (P<0.05) compared with the model group (H_2O_2)

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

3　讨论

衰老过程中伴随产生的氧化应激是引起肝脏损伤, 导致NAFLD等肝脏疾病发病的重要因素[30]. 氧化应激水平过高以及抗氧化酶活性的下降会导致肝细胞的蛋白质、脂质以及核酸降解, 从而导致肝脏损伤[31]. 此外, ROS还会促进肝脏纤维化发展, 并导致肝脏缺血、出现再生障碍以及组织坏死[32]. 据报道, 姜黄素能够通过提高肝脏总抗氧化能力来达到保护肝脏的目的[33]. 本研究中麦胚源活性肽也能够通过增加老龄大鼠肝脏内抗氧化酶SOD, T-AOC, GSH-Px和CAT含量, 降低MDA的水平, 从而缓解老龄大鼠肝脏体内氧化应激水平, 并降低肝脏中炎症因子IL-6, IL-1β, MMP3和TNF-α水平, 增加抗炎因子IL-10的水平, 改善了老龄大鼠肝脏的炎症状态, 且麦胚源活性肽能够降低增龄过程中大鼠肝脏质量的流失, 缓解由增龄对大鼠造成的肝脏结构老化损伤.

AMPK与Sirt1在衰老相关的信号调控中都扮演着十分重要的角色. Kou等人[34]研究发现, 蛇葡萄素能够通过激活AMPK/Sirt1/PGC-1a信号来缓解D-半乳糖诱导的衰老大鼠骨骼肌萎缩. Liu等人[35]也发现, 葡萄糖限制能够激活AMPK/Sirt1-FOXA3-Beclin1通路来延缓衰老并促进HUVECs细胞增殖. 本研究通过加入AMPK激活剂Metformin、抑制剂Compound C以及siRNA等手段, 证明了本研究中AMPK与Sirt1的上下游关系, 阐明了麦胚源活性肽ADW能够通过调控AMPK/Sirt1/P53通路缓解增龄对大鼠造成的肝脏老化作用机制.

总之, 本研究以自然增龄的SD大鼠作为肝脏老化损伤的动物模型以及H_2O_2诱导的衰老HepG2细胞模型, 证明了麦胚源活性肽能够降低老龄肝脏细胞中氧化应激水平、炎症水平, 以及通过调节AMPK/Sirt1信号通路缓解增龄对大鼠肝脏造成的结构异常及功能减退, 表明麦胚源活性肽ADW可以作为膳食补充剂, 发挥抗衰老的功能活性, 本研究为小麦加工副产物的高值化利用以及精准营养设计提供了科学依据.

参考文献

1 Yeung S S Y, Kwan M, Woo J. Healthy diet for healthy aging. Nutrients, 2021, 13: 4310
2 Yu Y. Healthy ageing in urban China: governing the ageing population. Geogr J, 2021, 187: 28–38
3 Le Couteur D G, Simpson S J. 90th Anniversary Commentary: caloric restriction effects on aging. J Nutr, 2018, 148: 1656–1659
4 Bonomini F, Rodella L F, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. Aging Dis, 2015, 6: 109–120
5 Kim I H, Kisseleva T, Brenner D A. Aging and liver disease. Curr Opin Gastroenterol, 2015, 31: 184–191
6 Maeso-Díaz R, Gracia-Sancho J. Aging and chronic liver disease. Semin Liver Dis, 2020, 40: 373–384
7 Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: pathophysiological basis for therapy. J Hepatol, 2020, 72: 558–577
8 Ferreira-Gonzalez S, Rodrigo-Torres D, Gadd V L, et al. Cellular senescence in liver disease and regeneration. Semin Liver Dis, 2021, 41: 050–066
9 Lan X G. The nutritional value and development and utilization of wheat germ (in Chinese). Agric Eng Tech, 2022, 42: 89–90 [兰晓光. 小麦胚芽的营养价值及开发利用. 农业工程技术, 2022, 42: 89–90]
10 Yun L, Wu T, Mao Z, et al. A novel wheat germ polysaccharide: structural characterization, potential antioxidant activities and mechanism. Int J Biol Macromol, 2020, 165: 1978–1987
11 Fărcaş A C, Socaci S A, Nemeş S A, et al. An update regarding the bioactive compound of cereal by-products: health benefits and potential applications. Nutrients, 2022, 14: 3470
12 Weng Z, Chen Y, Liang T, et al. A review on processing methods and functions of wheat germ-derived bioactive peptides. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63: 5577–5593
13 Zhao Y, Liao A M, Liu N, et al. Potential anti-aging effects of fermented wheat germ in aging mice. Food Biosci, 2021, 42: 101182
14 Luo T, Li Y, Wang F, et al. Protective effect of wheat germ-derived peptide on H_2O_2-induced cellular oxidative damage in osteoblast-osteoclast co-culture system (in Chinese). Food Sci, 2022, 43: 126–136 [罗涛, 李宇, 汪芳, 等. 麦胚源活性肽对H_2O_2诱导的成骨细胞-破骨细胞共育体系中细胞氧化损伤的保护作用. 食品科学, 2022, 43: 126–136]
15 Zhang Y, Wang F, Weng Z B, et al. Screening of wheat germ albumin-derived antioxidant peptides and its protective activity against cellular

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

oxidative damage (in Chinese). Food Sci, 2021, 42: 10–18 [张羽, 汪芳, 翁泽斌, 等. 麦胚清蛋白抗氧化肽的筛选及对细胞氧化损伤的保护作用. 食品科学, 2021, 42: 10–18]
16 Coppé J P, Patil C K, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic ras and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol, 2008, 6: 2853–2868
17 Cuollo L, Antonangeli F, Santoni A, et al. The senescence-associated secretory phenotype (SASP) in the challenging future of cancer therapy and age-related diseases. Biology, 2020, 9: 485
18 Han X J, Lei Q, Xie J M, et al. Potential regulators of the senescence-associated secretory phenotype during senescence and aging. J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci, 2022, 77: 2207–2218
19 Schmucker D L. Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? Exp Gerontol, 2005, 40: 650–659
20 Dabravolski S A, Bezsonov E E, Orekhov A N. The role of mitochondria dysfunction and hepatic senescence in NAFLD development and progression. Biomed Pharmacother, 2021, 142: 112041
21 Chan K T, Paavolainen L, Hannan K M, et al. Combining high-content imaging and phenotypic classification analysis of senescence-associated beta-galactosidase staining to identify regulators of oncogene-induced senescence. Assay Drug Dev Technol, 2016, 14: 416–428
22 Ge Y, Zhou M, Chen C, et al. Role of AMPK mediated pathways in autophagy and aging. Biochimie, 2022, 195: 100–113
23 Han X, Zhang T, Zhang X, et al. AMPK alleviates oxidative stress-induced premature senescence via inhibition of NF-κB/STAT3 axis-mediated positive feedback loop. Mech Ageing Dev, 2020, 191: 111347
24 Rai P, Onder T T, Young J J, et al. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 169–174
25 Zhang C Y, Tan X H, Yang H H, et al. COX-2/sEH dual inhibitor alleviates hepatocyte senescence in NAFLD mice by restoring autophagy through Sirt1/PI3K/AKT/mTOR. Int J Mol Sci, 2022, 23: 8267
26 Chen C, Zhou M, Ge Y, et al. SIRT1 and aging related signaling pathways. Mech Ageing Dev, 2020, 187: 111215
27 DiNicolantonio J J, McCarty M F, O'Keefe J H. Nutraceutical activation of Sirt1: a review. Open Heart, 2022, 9: e002171
28 Agius L, Ford B E, Chachra S S. The metformin mechanism on gluconeogenesis and AMPK activation: the metabolite perspective. Int J Mol Sci, 2020, 21: 3240
29 Hasanvand A. The role of AMPK-dependent pathways in cellular and molecular mechanisms of metformin: a new perspective for treatment and prevention of diseases. Inflammopharmacology, 2022, 30: 775–788
30 Sakasai-Sakai A, Takeda K, Takeuchi M. Involvement of intracellular TAGE and the TAGE-RAGE-ROS axis in the onset and progression of NAFLD/NASH. Antioxidants, 2023, 12: 748
31 Luceri C, Bigagli E, Femia A P, et al. Aging related changes in circulating reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyls are indicative of liver oxidative injury. Toxicol Rep, 2018, 5: 141–145
32 Shi C, Wang Q, Rao Z, et al. Diabetes induces hepatocyte pyroptosis by promoting oxidative stress-mediated NLRP3 inflammasome activation during liver ischaemia and reperfusion injury. Ann Transl Med, 2020, 8: 739
33 Farzaei M, Zobeiri M, Parvizi F, et al. Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. Nutrients, 2018, 10: 855
34 Kou X, Li J, Liu X, et al. Ampelopsin attenuates the atrophy of skeletal muscle from d -gal-induced aging rats through activating AMPK/SIRT1/PGC-1α signaling cascade. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 311–320
35 Liu Q, Li H, Wang J, et al. Glucose restriction delays senescence and promotes proliferation of HUVECs via the AMPK/SIRT1-FOXA3-Beclin1 pathway. Exp Gerontol, 2020, 139: 111053

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200

Wheat germ peptides improving liver aging damage in rats through the AMPK/SIRT1 pathway

WANG Fang[1,2], LUO Tao[1], CHEN HuiLin[1], KIYOSHI Itagaki[2], SONG HaiZhao[1], XIONG Ling[1], WANG LuanFeng[1] & SHEN XinChun[1]

1 College of Food Science and Engineering/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/Key Laboratory of Grains and Oils Quality Control and Processing, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China;
2 Harvard Medical School, Boston 02115, USA

Wheat germ, as a byproduct of wheat flour processing, is extremely abundant in resources but has yet to be fully and reasonably utilized. This study focused on the wheat germ active peptide ADWGGPLPH obtained in the early stage using naturally aged SD rats as the animal model of liver aging damage and 9-month-old rats as controls. Wheat germ-derived active peptides were continuously administered by gavage until the age of 21 months. The effect of wheat germ-derived active peptides on liver aging-related damage in naturally aged rats was examined, and its molecular mechanism was preliminarily explored in conjunction with the H_2O_2-induced aging HepG2 cell model. The wheat germ-derived active peptide ADWGGPLPH could increase the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, total antioxidant activity, glutathione peroxidase, and catalase in the rat serum and liver while reducing malondialdehyde levels, improve oxidative stress levels in rat liver, reduce interleukin (IL)-6 and IL-1 levels in the serum and liver and β, matrix metalloproteinase-3, and tumor necrosis factor-alpha levels, and increase the secretion of anti-inflammatory factor IL-10, improving the inflammatory environment in the liver of aging rats. After treatment with wheat germ-derived active peptides, the liver structure was significantly improved, fat vacuoles were reduced, cells were arranged neatly, and alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels were significantly reduced. Wheat germ-derived active peptides can effectively improve the abnormal structure and growth status of cells in the aging liver, reduce the loss of liver quality during aging, reduce the expression levels of aging marker proteins P53 and P21, alleviate the degree of liver aging damage, and slow down the aging process of the liver. By using inhibitors, activators, siRNA, and others, wheat germ-derived active peptides can regulate aging-related processes by activating the AMPK/Sirt1 signaling pathway. This study is significant for the development of a healthy aging dietary structure and comprehensive utilization of wheat germ resources.

wheat germ, active peptide, senescence, AMPK, liver

doi: 10.1360/SSV-2023-0200

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0200