

# 萝卜硫素对急性低温暴露鼠骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化能力的影响

徐磊<sup>1,2</sup>, 贾杰<sup>2</sup>, 江秉泽<sup>2</sup>, 张纓<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室; <sup>2</sup>北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084

**摘要:**萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是一种在十字花科植物中含量丰富,且具有抗氧化效应的天然物质。本文基于核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)介导的抗氧化系统,探究不同时长低温暴露对骨骼肌抗氧化酶的影响及 SFN 对低温暴露骨骼肌抗氧化能力的作用。首先,30 只雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为常温对照组(0 h 组)、低温暴露 1 h 组(1 h 组)和低温暴露 3 h 组(3 h 组)。其次,40 只雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为 PBS 常温对照组(PBS + Con),PBS 低温暴露 3 h 组(PBS + Cold),SFN 常温对照组(SFN + Con)和 SFN 低温暴露 3 h 组(SFN + Cold)。小鼠在急性低温干预前腹腔注射 4 次 SFN 或等体积 PBS。急性低温暴露后,取小鼠骨骼肌,试剂盒检测活性氧(ROS)水平、总抗氧化能力(T-AOC)、还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量;荧光实时定量 PCR 检测 Nrf2 介导的抗氧化酶和参与生成谷胱甘肽相关酶的 mRNA 转录水平;Western blot 检测 Nrf2 介导的抗氧化酶蛋白表达。结果显示,与 0 和 1 h 组相比,3 h 组小鼠骨骼肌 Nrf2 和抗氧化酶基因(*Gpx1*、*Hmox1*、*Cat*、*Sod1* 和 *Nqo1*)的 mRNA 转录水平显著降低,ROS 水平显著增加。与 PBS + Con 组相比,PBS + Cold 组小鼠骨骼肌 Nrf2 和抗氧化酶(HMOX1 和 CAT)蛋白表达、GSH/GSSG 比值及 T-AOC 水平显著降低,而 GSSG 含量和 ROS 水平增加。与 PBS + Cold 组相比,SFN + Cold 组小鼠骨骼肌 Nrf2 mRNA 及其蛋白表达、抗氧化酶(HMOX1 和 SOD1)蛋白表达、抗氧化酶基因(*Gpx1*、*Hmox1*、*Cat*、*Sod1* 和 *Nqo1*)mRNA 转录水平、参与 GSH 生成的酶基因(*Gclm* 和 *Gss*)mRNA 转录水平、GSH/GSSG 比值以及 T-AOC 水平显著提高,而 GSSG 含量和 ROS 水平显著降低。综上,3 h 急性低温暴露降低了 Nrf2 介导的抗氧化作用。而低温暴露前给予 SFN 补充,则激活了 Nrf2 介导的抗氧化酶和谷胱甘肽抗氧化系统,增强了骨骼肌抗氧化能力。

**关键词:**急性低温暴露;萝卜硫素;核因子 E2 相关因子 2;氧化还原稳态

中图分类号:Q494

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)2-0194-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.2.003

## Effects of sulforaphane on the antioxidant capacity of skeletal muscle mediated by Nrf2 in mice exposed to acute cold

XU Lei<sup>1,2</sup>, JIA Jie<sup>2</sup>, JIANG Bing-ze<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University;

<sup>2</sup>Sport Science College, Beijing Sport University, Beijing 100084, China

**Abstract:** Sulforaphane (SFN) is a natural substance which rich in cruciferous plants and has the antioxidant effect. Based on the antioxidant system mediated by nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2), this paper explored the effects of different time's cold exposure on antioxidant enzymes of skeletal muscle and the effects of SFN on antioxidant capacity of skeletal muscle exposed to cold exposure. Firstly, 30 male C57BL/6N mice were randomly divided into three groups, including control group (0 h group), 1 hour's cold exposure group (1 h group) and 3 hours' cold exposure group (3 h group). Secondly, 40 male C57BL/6N mice were randomly divided into 4 groups, including PBS with control group (PBS + Con), PBS with 3 hours' cold exposure group (PBS + Cold), SFN with control group (SFN + Con), SFN with 3 hours' cold exposure group (SFN + Cold).

收稿日期:2021-10-15 接受日期:2021-12-21

基金项目:北京体育大学校友基金会基金(JJH20200004)

\* 通信作者 E-mail: zhyi9256@bsu.edu.cn

Mice were intraperitoneally injected with SFN or equal volume PBS four times before acute temperature intervention. After cold exposure, the skeletal muscles of mice were taken and the level of reactive oxygen species (ROS), total antioxidant capacity (T-AOC), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were detected by kit. The mRNA transcription of the antioxidant enzymes and enzymes related to glutathione synthesis mediated by Nrf2 were detected by RT-qPCR. The protein expression of the antioxidant enzymes mediated by Nrf2 were detected by Western blot. Compared with 0 h and 1 h group, the mRNA transcription of *Nrf2* and antioxidant enzyme genes (*Gpx1*, *Hmox1*, *Cat*, *Sod1*, *Nqo1*) of 3 h group were significantly decreased, and the level of ROS was significantly increased. Compared with PBS + Con group, the protein expression of Nrf2 and antioxidant enzymes (HMOX1, CAT), GSH/GSSG ratio and T-AOC of PBS + Cold group were significantly decreased, while the level of GSSG and ROS were increased. Compared with PBS + Cold group, the expression of *Nrf2* mRNA and its protein, the protein expression of antioxidant enzymes (HMOX1, SOD1), the mRNA transcription of antioxidant enzymes genes (*Gpx1*, *Hmox1*, *Cat*, *Sod1*, *Nqo1*) and enzymes genes (*Gclm* and *Gss*) involved in GSH synthesis, GSH/GSSG ratio and T-AOC level of SFN + Cold group were significantly increased, while the level of GSSG and ROS were significantly decreased. These results suggested that the 3-hour acute cold exposure reduced the antioxidant effect mediated by Nrf2. When SFN was given before acute cold exposure, the antioxidant enzymes and glutathione antioxidant system mediated by Nrf2 were activated, and then the antioxidant capacity of skeletal muscle was enhanced.

**Key words:** acute cold exposure; sulforaphane; nuclear factor E2-related factor 2; redox homeostasis

骨骼肌是低温环境下机体产热的重要器官。低温环境下骨骼肌以战栗性与非战栗性产热来维持体温稳态<sup>[1]</sup>,此过程需要水解大量的 ATP,将其化学能转变为机体所需的热能<sup>[2]</sup>。骨骼肌在低温环境下主要以提高脂肪酸氧化分解速率满足产热需求<sup>[3]</sup>,而线粒体脂肪酸氧化速率的增加伴随着活性氧(reactive oxygen species, ROS)的加速产生<sup>[4]</sup>。已有研究表明,急性或长期低温暴露使老鼠的静息代谢速率和骨骼肌 ROS 水平增加<sup>[5,6]</sup>。而 ROS 水平的增加会引起骨骼肌蛋白质、核酸和脂质的氧化损伤,进而影响骨骼肌的运动表现与恢复<sup>[7]</sup>。因此,及时清除低温环境下骨骼肌产生的大量 ROS,提高骨骼肌的抗氧化能力,对维持其正常生理功能至关重要。

核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)介导的抗氧化防御系统,在维持细胞氧化还原稳态中起着非常重要的作用<sup>[8]</sup>。当细胞处于氧化应激时,胞质中的 Nrf2 则不会被其负性调节蛋白——Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(epoxy chloropropane Kelch sample related protein-1, Keap1)泛素化降解,进而入核与众多基因启动子上的抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,上调大多数的抗氧化酶和 II 期解毒酶的表达,对机体的氧化应激刺激起保护作用<sup>[9]</sup>。然而,研究发现,急性或长期低温暴露使鼠心脏、肝脏及肺组织器官中 *Nrf2* mRNA 及其蛋白表达显著降低<sup>[10-12]</sup>,表明在低温环境下可能抑制组织器官 Nrf2 的表达。

但急性低温暴露是否也同样抑制骨骼肌 Nrf2 表达及其抗氧化能力?国内外未见报道。

萝卜硫素(sulforaphane, SFN)在十字花科植物中含量丰富,被公认为是 Nrf2 的特异激活剂<sup>[13]</sup>。因此,本研究试图首先观察 1 和 3 h 不同时间的急性低温暴露,对小鼠骨骼肌 Nrf2 和抗氧化酶表达及抗氧化能力的影响;进而在此基础上,进一步探讨在低温暴露前给予 SFN,对骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化酶系统和谷胱甘肽氧化还原稳态的作用。本研究将为探究 SFN 作为低温环境下运动营养补充品的可能性提供前期实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

70 只 8 周龄健康雄性 C57BL/6N 小鼠分两批购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号为:SCXK(京)2016-0006。动物购进后适应性饲养 3 天,饲养条件:每笼饲养 3~4 只,饲养温度和湿度分别维持在 25 ℃左右和 65%左右,12 h 明暗循环,整个饲养过程中动物自由进食和饮水。该动物实验经过了北京体育大学运动科学实验伦理委员会的批准(批准号:2021042A),实验严格遵循 3R 原则,给予人道关怀。

### 1.2 实验药物与试剂

萝卜硫素(中国深圳市福山生物科技有限公司);活体组织氧化应激 ROS 高质荧光测定试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司,货号:GMS10016.3 v. A);总抗氧化能力检测试剂盒、还原

型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号:BC1315、BC1175、BC1185);RT-PCR 试剂盒和 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO 公司,货号:FSQ-101、QPK-201);RT-qPCR 引物:谷胱甘肽过氧化酶 1 (*Gpx1*)、血红素加氧酶 (*Hmox1*)、过氧化氢酶 (*Cat*)、超氧化物歧化酶 1 (*Sod1*)、醌氧化还原酶 1 (*Nqo1*)、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (*Gclc*)、谷胱甘肽还原酶 (*Gsr*)、18s (Qiagen 公司,货号:QT01195936、QT00159915、QT01058106、QT00165039、QT00094367、QT00130543、QT01758232、

QT02448075), *Nrf2*、谷氨酰半胱氨酸连接酶调节亚基 (*Gclm*) 和谷胱甘肽合成酶 (*Gss*) 的引物在 Invitrogen 公司合成,具体引物序列见表 1;RIPA 裂解液(碧云天公司,货号:P0013B);Pierce 蛋白酶和磷酸酶抑制剂微型片剂、BCA 试剂盒、Bolt 4% -12% Bis-Tris Plu 凝胶 (ThermoFisher Scientific 公司,货号:A32961、23225、NW04125BOX);一抗:*Nrf2*、GPX1、SOD1、NQO1、 $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology 公司,货号:sc-365949、sc-22145、sc-11407、sc-32793、sc-47778);HMOX1 (Abcam 公司,货号:ab13248);CAT (Proteintech 公司,货号:66765-1-Ig)。

表 1 *Nrf2*、*Gclm* 和 *Gss* 的引物序列

Table 1 The primer sequence of *Nrf2*, *Gclm* and *Gss*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>Nrf2</i>	18024	5'-TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTCT-3'	5'-GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC-3'
<i>Gclm</i>	14630	5'-AGGAGCTTCGGGACTGTATCC-3'	5'-GGGACATGTCGCATTCCTCAAAA-3'
<i>Gss</i>	14854	5'-CAAAGCAGGCCATAGACAGGG-3'	5'-AAAAGCGTGAATGGGGCATAC-3'

### 1.3 仪器

快速组织破碎仪(美国 NEXT ADVANCE 公司,型号:BBY24M);iBlot2 转膜仪(ThermoFisher Scientific 公司,型号:IB23001);摇床(海门其林贝尔公司,型号:TS-100);低温离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:Centrifuge 5424R);荧光定量 PCR 仪(ThermoFisher Scientific 公司,型号:ABI7500);多功能微孔板检测仪(美国 Bio-Tek 公司,型号:Bio-Tek Synergy™ H1);Bio-Rad 凝胶成像分析仪(美国伯乐公司,型号:BIO-RADXR)。

### 1.4 动物分组及干预

首先,30 只 8 周龄健康雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为 3 组,每组 10 只:常温对照组(0 h 组)、低温暴露 1 h 组(1 h 组)和低温暴露 3 h 组(3 h 组)。常温对照组置于  $25 \pm 1$  °C 的室温环境,低温暴露组则分别置于  $4 \pm 1$  °C 冷库 1、3 h,在此期间各组均能自由饮水和进食。

其次,40 只 8 周龄健康雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为 4 组,每组 10 只:磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)常温对照组(PBS + Con)、PBS 低温暴露 3 h 组(PBS + Cold)、SFN 常温对照组(SFN + Con)和 SFN 低温暴露 3 h 组(SFN + Cold)。小鼠在进行急性温度干预前 72、48、24 和 3 h 这 4 个时间点通过腹腔注射 SFN 或等体积 PBS<sup>[14]</sup>。SFN 溶

解于 PBS 中,每只小鼠每次的注射剂量为 25 mg/kg 和 0.2 mL。常温对照组置于  $25 \pm 1$  °C 的室温环境,低温暴露组则置于  $4 \pm 1$  °C 冷库 3 h,在此期间各组均能自由饮水和进食。

### 1.5 取材

急性低温暴露结束后即刻将小鼠颈椎脱臼处死,迅速取小鼠腿部的腓肠肌和股四头肌,称重,编号,投入液氮,随后转入 -80 °C 冰箱保存待用。

### 1.6 骨骼肌 ROS 水平测定

骨骼肌 ROS 水平采用活体组织氧化应激 ROS 高质荧光测定试剂盒测定。取各组 50 mg 腓肠肌置于提前加入 GENMED 清洗液的匀浆管并清洗,弃去清理液,用滤纸吸干。然后加入 GENMED 稀释液,用剪刀将组织剪碎,匀浆,并用 BCA 法测蛋白浓度。根据蛋白浓度规定上样量为 10  $\mu$ L 和 50  $\mu$ g 蛋白,随后在避光酶标板相应孔内加入 190  $\mu$ L 的 GENMED 染色工作液,37 °C 避光孵育 20 min,激发波长 490 nm,激发波长 520 nm 检测荧光强度值。计算与空白荧光强度差值,以表示该孔 ROS 水平。

### 1.7 骨骼肌总抗氧化能力测定

骨骼肌总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)采用 T-AOC 检测试剂盒测定。先按照说明书绘制标准曲线。再取 50 mg 股四头肌组织放入提前加入预冷提取液的匀浆管内匀浆,后离心 5 min

(4 °C, 10 000 rpm), 取上清用 BCA 法测蛋白浓度。同时按照说明书, 用 96 孔板测定空白管和测定管在 593 nm 处的吸光值, 计算差值并代入标准曲线中得到各组中  $\text{Fe}^{2+}$  的浓度, 最后按照说明书提供的按蛋白浓度计算的公式得到各组的 T-AOC。

### 1.8 骨骼肌还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽含量及两者比值

骨骼肌还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 含量分别采用还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽含量检测试剂盒测定。取各组股四头肌称重并记录, 再按照说明书绘制标准曲线。再将称好的股四头肌放入提前加入预冷试剂一的匀浆管内匀浆, 后离心 10 min (4 °C, 8 000 rpm), 转移上清置于 4 °C 待测。按照说明书, 用 96 孔石英板测定空白管和样本管在 412 nm 处的吸光值, 计算差值代入标准曲线并按照说明书提供的按样本质量计算的公式得到各组的 GSH 含量。再按照说明书, 用 96 孔石英板分别测定空白管和样本管在 412 nm 处 30 s 与 150 s 的吸光值, 再将样本管两个时间点吸光度差值减去空白管两个时间点吸光度差值, 最后将这个差值代入标准曲线并按照说明书提供的按样本质量计算的公式得到各组的 GSSG 含量。

### 1.9 实时荧光定量 PCR

取 50 mg 腓肠肌加入 0.8 mL 预冷 Trizol 中, 剪碎, 匀浆后, 依次采用氯仿、异丙醇、75% 酒精进行分离提纯总 RNA, 用紫外分光光度计测定总 RNA 的纯度和浓度, 采用 RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 然后用 PCR 扩增仪扩增。随后采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪, 以由 SYBR Green Realtime PCR Master Mix、引物、cDNA 模板和 dd H<sub>2</sub>O 构成的 20  $\mu\text{L}$  反应体系进行实时荧光定量 PCR 检测。使用 ABI7500 PCR 仪自带的软件对实时荧光定量 CT 值进行读取, 用比较 CT 法对目的基因表达结果进行相对定量。具体计算公式为: 目的基因 =  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。

### 1.10 Western blot

按照 0.05 g Pierce 蛋白酶和磷酸酶抑制剂微型片剂溶于 10 mL RIPA 裂解液来配置蛋白提取液。取 50 mg 腓肠肌组织加入含有匀浆珠和 1 mL 蛋白提取液的匀浆管中, 并充分匀浆, 随后置于冰上静置 30 min, 再离心 30 min (4 °C, 12 000 rpm), 最后提取上清。利用 BCA 试剂盒测定组织总蛋白浓度, 并根据蛋白浓度与上样蛋白量 20  $\mu\text{g}$  计算上样体积。电

泳时采用 Bolt 4% ~ 12% Bis-Tris Plu 凝胶分离目的蛋白, 随后采用 iBlot2 转膜仪进行转膜。5% BSA 封闭 1 h, 而后加入一抗并置于 4 °C 摇床过夜。4 °C 孵育过夜后, 用 1  $\times$  TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入相应二抗, 置于摇床室温孵育 1 h。再用 1  $\times$  TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。最后用 Bio-Rad 凝胶成像分析仪和 Image Lab 软件进行条带检测和灰度值分析。

### 1.11 统计学分析

用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析, 结果表示为平均数  $\pm$  标准误。采用单因素方差分析和双因素方差分析对数据进行分析,  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  分别代表具有显著性和非常显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 不同时长急性低温暴露对小鼠骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化酶 mRNA 转录水平和 ROS 水平的影响

由图 1 可知, 与 0 h 组相比, 3 h 组小鼠骨骼肌 *Nrf2* mRNA 转录水平呈下降趋势, *Gpx1*、*Hmox1*、*Cat* 和 *Nqo1* mRNA 转录水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且 ROS 水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 1 h 组并无变化。与 1 h 组相比, 3 h 组小鼠骨骼肌 *Nrf2*、*Gpx1*、*Cat*、*Sod1* 和 *Nqo1* mRNA 转录水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且 ROS 水平显著增加 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 SFN 对急性低温暴露小鼠骨骼肌 Nrf2 表达、ROS 水平和 T-AOC 的影响

由图 2 可知, 与 PBS + Con 组相比, PBS + Cold 组小鼠骨骼肌 Nrf2 蛋白表达呈降低趋势, 且 T-AOC 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而 ROS 水平呈增加趋势。与 PBS + Cold 组相比, SFN + Cold 组小鼠骨骼肌 *Nrf2* mRNA 及其蛋白表达和 T-AOC 显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 ROS 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 SFN 对急性低温暴露小鼠骨骼肌谷胱甘肽抗氧化系统的影响

由图 3 可知, 与 PBS + Con 组相比, PBS + Cold 组小鼠骨骼肌 GSSG 含量和 GSH/GSSG 分别显著增加和降低 ( $P < 0.05$ ); 而 SFN + Con 组小鼠骨骼肌 *Gss* mRNA 转录水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 且 GSH 含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 PBS + Cold 组相比, SFN + Cold 组小鼠骨骼肌 *Gclm* 和 *Gss* mRNA 转录水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 且 GSH 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ), GSSG 含量和 GSH/GSSG 分别显著降低和增加 ( $P < 0.01$ )。

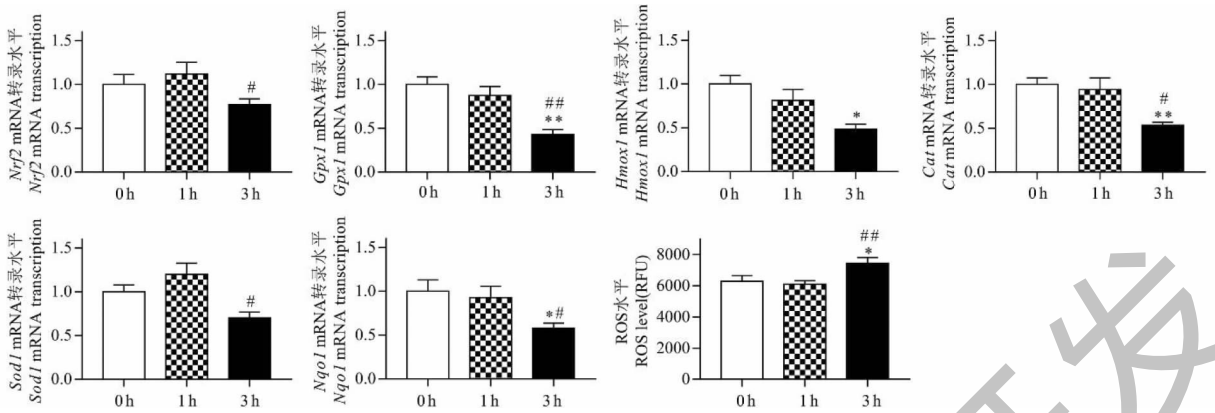


图1 不同时长急性低温暴露对小鼠骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化酶 mRNA 转录水平和 ROS 水平的影响

Fig. 1 Effects of different time acute cold exposure on the mRNA transcription of antioxidant enzymes mediated by Nrf2 and ROS level in mice skeletal muscle

注:与 0 h 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 1 h 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with 0 h group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; Compared with 1 h group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

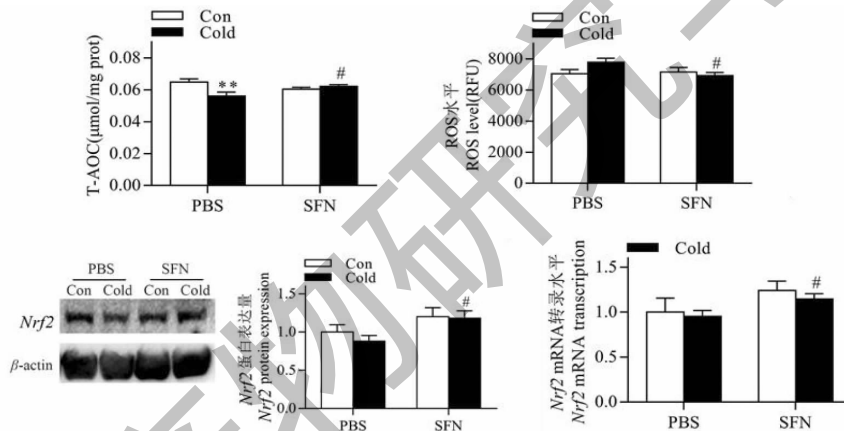


图2 SFN 对急性低温暴露小鼠骨骼肌 T-AOC、ROS 水平和 Nrf2 表达的影响

Fig. 2 Effects of SFN on T-AOC, ROS level and Nrf2 expression in skeletal muscle of mice exposed to acute cold

注:与 PBS + Con 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 PBS + Cold 组相比, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with PBS + Con group, \*\* $P < 0.01$ ; Compared with PBS + Cold group, # $P < 0.05$ 。

## 2.4 SFN 对急性低温暴露小鼠骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化酶 mRNA 转录水平的影响

由图 4 可知,与 PBS + Con 组相比, PBS + Cold 组小鼠骨骼肌 *Gpx1*、*Hmox1*、*Cat*、*Sod1* 和 *Nqo1* mRNA 转录水平均呈降低趋势。与 PBS + Cold 组相比, SFN + Cold 组小鼠骨骼肌 *Gpx1*、*Hmox1*、*Cat*、*Sod1* 和 *Nqo1* mRNA 转录水平均显著增加( $P < 0.01$ )。

## 2.5 SFN 对急性低温暴露小鼠骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化酶蛋白表达的影响

由图 5 可知,与 PBS + Con 组相比, PBS + Cold 组小鼠骨骼肌 HMOX1 和 CAT 蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ )。与 PBS + Cold 组相比, SFN + Cold 组

小鼠骨骼肌 HMOX1 和 SOD1 蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

Nrf2 是维持骨骼肌氧化还原稳态的核心调控因子<sup>[15]</sup>。已有研究报道,低温暴露抑制心脏、肝脏及肺等组织器官 Nrf2 表达,可导致这些器官 ROS 大量产生而无法被清除<sup>[10-12]</sup>。然而,急性低温暴露对骨骼肌 Nrf2 表达及其抗氧化能力的影响,目前未见报道。因此,本研究首先探讨 1 和 3 h 低温暴露对骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化系统的影响,结果发现,3 h 低温暴露小鼠骨骼肌 *Nrf2* mRNA 转录水平显著降低,而 ROS 水平显著升高。后续的实验结果同样

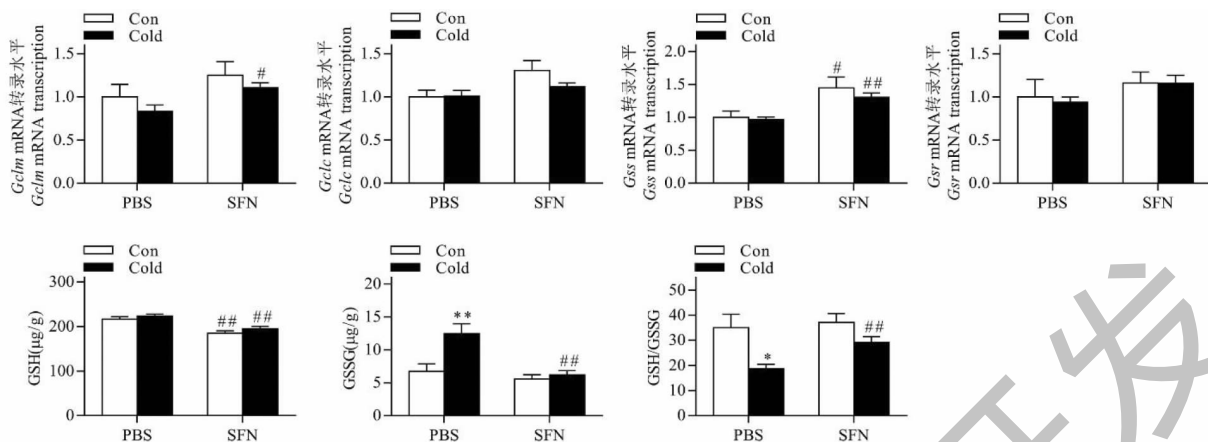


图3 SFN对急性低温暴露小鼠骨骼肌谷胱甘肽抗氧化系统的影响

Fig. 3 Effect of SFN on glutathione antioxidant system in skeletal muscle of mice exposed to acute cold

注:与PBS+Con组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与PBS+Con或PBS+Cold组相比,# $P < 0.05$ ,### $P < 0.01$ 。Note:Compared with PBS+Con group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with PBS+Con or PBS+Cold group,# $P < 0.05$ ,### $P < 0.01$ 。

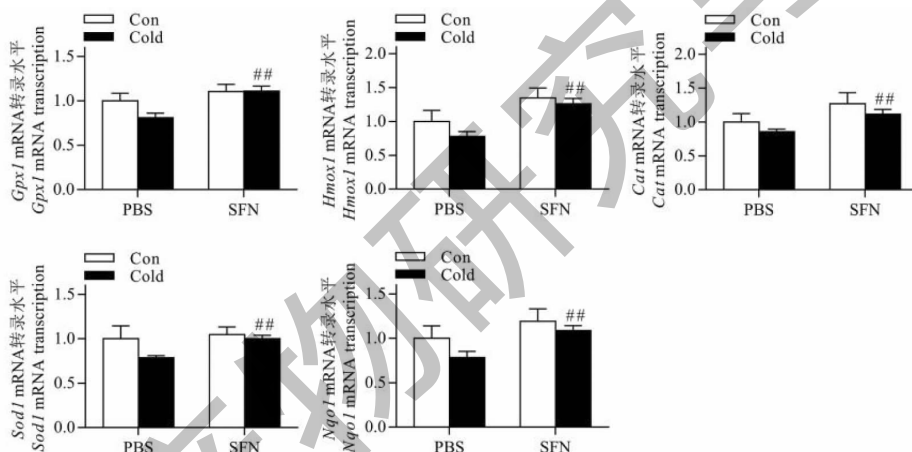


图4 SFN对急性低温暴露小鼠骨骼肌 Nrf2 介导的抗氧化酶 mRNA 转录水平的影响

Fig. 4 Effect of SFN on the mRNA transcription of antioxidant enzymes mediated by Nrf2 in skeletal muscle of mice exposed to acute cold

注:与PBS+Cold组相比,### $P < 0.01$ 。Note:Compared with PBS+Cold group,### $P < 0.01$ 。

显示,与PBS+Con组相比,PBS+Cold组小鼠骨骼肌 Nrf2 蛋白表达呈降低趋势,且 T-AOC 水平显著降低,而 ROS 水平呈增加趋势。由此推测,3 h 低温暴露可能抑制了小鼠骨骼肌 Nrf2 的表达,降低其抗氧化能力。

3 h 低温暴露使骨骼肌抗氧化能力降低,可能与 Nrf2 介导的抗氧化酶表达和谷胱甘肽氧化还原稳态受到抑制有关。已有研究报道,3 h 急性低温暴露可使小鼠肾脏、肺组织以及棕色脂肪 SOD1 表达显著下降<sup>[16]</sup>。间歇性低温暴露(每天 8 h,共 3 天)大鼠肺组织 GPX1 活性和 HMOX1 蛋白表达显著降低<sup>[12]</sup>。长期低温暴露(每天 4 h,每周 6 天,共

2 周)小鼠脑组织 SOD1 活性及 CAT 蛋白表达显著下降<sup>[17]</sup>。本研究发现,与 0 和 1 h 组相比,3 h 组小鼠骨骼肌抗氧化酶基因(*Gpx1*、*Hmox1*、*Cat*、*Sod1*、*Nqo1*) mRNA 转录水平显著降低。后续的实验结果同样显示,与 PBS+Con 组相比,PBS+Cold 组小鼠骨骼肌抗氧化酶基因(*Gpx1*、*Hmox1*、*Cat*、*Sod1*、*Nqo1*) mRNA 转录水平呈降低趋势,且 HMOX1 和 CAT 蛋白表达显著降低。由此可知,3 h 低温暴露可能抑制了 Nrf2 介导的抗氧化酶的转录、翻译,从而影响骨骼肌的抗氧化能力。另外有研究表明,急性低温暴露可使人红细胞中的 GSSG 含量和 GSH/GSSG 的比率降低<sup>[18]</sup>以及大鼠肝脏和胃组织的 GSH

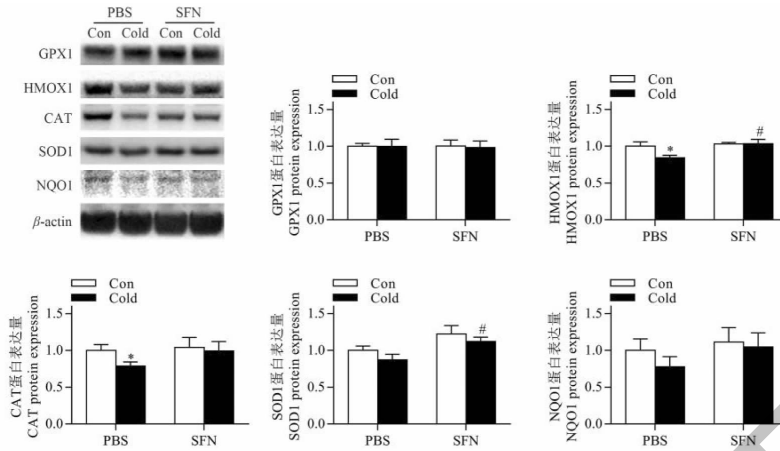


图5 SFN对急性低温暴露小鼠骨骼肌Nrf2介导的抗氧化酶蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of SFN on the protein expression of antioxidant enzymes mediated by Nrf2 in skeletal muscle of mice exposed to acute cold

注:与PBS+Con组相比,\* $P < 0.05$ ;与PBS+Cold组相比,# $P < 0.05$ 。Note: Compared with PBS+Con group,\* $P < 0.05$ ; Compared with PBS+Cold group,# $P < 0.05$ 。

含量减少<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,与PBS+Con组相比,PBS+Cold组小鼠骨骼肌GSSG含量和GSH/GSSG比值分别显著增加和降低,而GSH含量变化不大。表明GSSG的堆积可能是GSH/GSSG比值降低的主要原因。

SFN对Nrf2的特异性激活效应已得到了广泛的证实。研究发现,12周的SFN饮食干预激活了老年小鼠趾长伸肌Nrf2调控的抗氧化酶系统,提高老年小鼠肌肉力量和运动耐力<sup>[20]</sup>。此外,大鼠在力竭运动前3天腹腔注射SFN,其血浆乳酸脱氢酶和肌酸磷酸激酶活性降低,并且股外侧肌Nrf2及抗氧化酶(NQO1、GST、GSR)蛋白表达及活性提高,且运动至力竭的时间和距离增加<sup>[21]</sup>。以上研究结果表明,SFN激活Nrf2对其介导的抗氧化能力和运动耐力的提高有着重要作用。因此,为改善3h低温暴露过程中骨骼肌抗氧化能力的降低,我们在小鼠3h低温暴露前给予SFN补充。实验结果显示,SFN+Cold组与PBS+Cold组小鼠相比,其骨骼肌Nrf2 mRNA及其蛋白表达和T-AOC显著增加,且ROS水平显著降低。提示,SFN激活Nrf2可提高3h低温暴露骨骼肌的T-AOC,消除过量的ROS,对维持骨骼肌的氧化还原稳态有着积极的作用。

补充SFN提高低温暴露小鼠骨骼肌抗氧化能力,与SFN激活Nrf2介导的抗氧化酶系统密切相关。Nrf2调控的内源性抗氧化酶是清除ROS的主要执行者。例如,SOD1催化超氧阴离子自由基歧化生成氧气和过氧化氢;CAT可将过氧化氢歧化为

水和氧气;GPX1以GSH为底物催化过氧化氢或有机过氧化物生成水和相应的醇;NQO1催化醌发生双电子还原反应形成氢醌,并促进醌的排泄,防止醌通过单电子还原反应产生ROS;HMOX1催化有毒的游离血红素分解生成具有抗氧化损伤功能的胆绿素、CO和亚铁离子<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,在3h低温暴露前给予SFN,我们发现SFN+Cold组小鼠与PBS+Cold组相比,骨骼肌抗氧化酶基因(*Gpx1*、*Hmox1*、*Cat*、*Sod1*、*Nqo1*) mRNA转录水平和HMOX1、SOD1蛋白表达显著增加。以上结果表明,SFN激活Nrf2增强这些抗氧化酶基因的转录、翻译。

另外,补充SFN提高低温暴露小鼠骨骼肌抗氧化能力,除了抗氧化酶表达增强外,也与SFN激活Nrf2介导的谷胱甘肽氧化还原系统密切相关。谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽,是生物体抗氧化防御系统中重要的小分子活性寡肽<sup>[23]</sup>。细胞中谷胱甘肽主要以GSH的形式存在,其分子中半胱氨酸的活性巯基可提供电子给ROS,而后GSH转化生成稳定的二聚体GSSG,以阻止ROS持续地抢夺电子,使蛋白质、脂质和核酸免受氧化损伤,进而维持细胞的氧化还原稳态<sup>[24]</sup>。机体内GSH的生成主要通过合成和还原两种途径。首先,谷氨酸和半胱氨酸在GCLC与GCLM的催化下生成谷氨酰半胱氨酸,随后谷氨酰半胱氨酸与甘氨酸在GSS的催化下生成GSH;其次,GSSG在NADPH和GSR的作用下可被还原为GSH<sup>[25]</sup>。因此,

*Gclc*、*Gclm*、*Gss* 和 *Gsr* 是调控生成 GSH 的关键酶基因,并且是 Nrf2 下游靶基因<sup>[26]</sup>。我们发现,给予 SFN 补充后,SFN + Cold 组小鼠与 PBS + Cold 组相比,骨骼肌谷胱甘肽合成酶基因 *Gclm*、*Gss*、*Gsr* mRNA 转录水平显著增加,且 GSH 和 GSSG 含量显著降低。推测,这可能是急性低温应激,SFN 补充可增强 GSH 的从头合成和还原途径,但 GSH 在急性低温暴露引起大量 ROS 产生的消除中发挥重要作用,最终造成了 GSH 的大量消耗。而从评估机体氧化还原平衡的关键指标 GSH/GSSG 比值上看,SFN + Cold 组的 GSH/GSSG 显著提高。

综上,本研究表明 3 h 急性低温暴露抑制了 Nrf2 介导的抗氧化作用。而低温暴露前给予萝卜硫素,则激活了 Nrf2 介导的抗氧化酶和谷胱甘肽抗氧化系统,增强了骨骼肌抗氧化能力。

#### 参考文献

- Pant M, Bal NC, Periasamy M. Sarcosylipin: A Key Thermogenic and Metabolic Regulator in Skeletal Muscle [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27: 881-892.
- Bal NC, Maurya SK, Pani S, et al. Mild cold induced thermogenesis: are BAT and skeletal muscle synergistic partners? [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37: BSR20171087.
- Sepa-Kishi DM, Sotoudeh-Nia Y, Iqbal A, et al. Cold acclimation causes fiber type-specific responses in glucose and fat metabolism in rat skeletal muscles [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 15430.
- Kausar S, Wang F, Cui H. The Role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its implications for neurodegenerative diseases [J]. *Cells*, 2018, 7: 274.
- Wang X, Che H, Zhang W, et al. Effects of mild chronic intermittent cold exposure on rat organs [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11: 1171-1180.
- Selman C, Grune T, Stolzing A, et al. The consequences of acute cold exposure on protein oxidation and proteasome activity in short-tailed field voles, *Microtus agrestis* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33: 259-265.
- Broome SC, Woodhead JST, Merry TL. Mitochondria-targeted antioxidants and skeletal muscle function [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(8): 107.
- Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The Keap1-Nrf2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98: 1169-1203.
- Xu YQ, Wang ZQ, Zhang J, et al. Research advance on an-

- tiioxidant function of fucoidan [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32: 1782-1793.
- Cong P, Liu Y, Liu N, et al. Cold exposure induced oxidative stress and apoptosis in the myocardium by inhibiting the Nrf2-Keap1 signaling pathway [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 36.
- Liu HR. Effects of cold exposure on lipid metabolism in obese mice induced by high-fat diet. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University (黑龙江八一农垦大学), 2020.
- Luo B, Shi H, Zhang K, et al. Cold stress provokes lung injury in rats co-exposed to fine particulate matter and lipopolysaccharide [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 168: 9-16.
- Ruhee RT, Suzuki K. The integrative role of sulforaphane in preventing inflammation, oxidative stress and fatigue: a review of a potential protective phytochemical [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9: 521.
- Oh S, Komine S, Warabi E, et al. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 12902.
- Gao L, Kumar V, Vellichirammal NN, et al. Functional, proteomic and bioinformatic analyses of Nrf2- and Keap1- null skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 2020, 598: 5427-5451.
- Niakao C, Ookawara T, Kizaki T, et al. Effects of acute cold stress on mRNA expression and immunoreactivity of three superoxide dismutase isoenzymes in genetically obese mice [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1999, 106: 47-61.
- Kim HG, Lee JS, Han JM, et al. Myelophil attenuates brain oxidative damage by modulating the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in a chronic cold-stress mouse model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148: 505-514.
- Siems WG, van Kuijk FJ, Maass R, et al. Uric acid and glutathione levels during short-term whole body cold exposure [J]. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16: 299-305.
- Yegen B, Dedeoglu A, Aykac I, et al. Effect of cold-restraint stress on glutathione and lipid peroxide levels in the liver and glandular stomach of rats [J]. *Pharmacol Res*, 1990, 22: 45-48.
- Bose C, Alves I, Singh P, et al. Sulforaphane prevents age-associated cardiac and muscular dysfunction through Nrf2 signaling [J]. *Aging Cell*, 2020, 19: e13261.
- Malaguti M, Angeloni C, Garatachea N, et al. Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2009, 107: 1028-1036.
- Xia N, Daiber A, Forstermann U, et al. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system [J]. *Br J Pharmacol*,



- 2017,174:1633-1646.
- 23 Lu SC. Regulation of glutathione synthesis[J]. Mol Aspects Med,2009,30:42-59.
- 24 Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, et al. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses[J]. Int J Mol Sci,2012,13:3145-3175.
- 25 Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress[J]. Redox Biol,2015,6:183-197.
- 26 He F, Ru X, Wen T. Nrf2, a transcription factor for stress response and beyond[J]. Int J Mol Sci,2020,21:4777.

## HILIC-ESI-HCD-MS/MS 寡糖图谱分析用于海参褐藻糖胶的结构鉴定

褐藻糖胶也称为岩藻黄质、岩藻多糖、褐藻多糖,是一种硫化的多糖,常见于海参、海藻等褐藻纲及海藻类的植物中。研究发现,具有特定硫酸化结构的糖类结构域在生物功能中起着至关重要的作用。因此,对褐藻糖胶寡糖进行精细的结构表征,尤其是确定其硫酸化结构,对于理解褐藻糖胶的结构-功能关系至关重要。

来自中国海洋大学食品科学与工程学院的赵雪团队和青岛海关技术中心张鸿伟团队首次报道了利用水热解聚、亲水作用液相色谱(HILIC)、电喷雾质谱(ESI-FTMS)、高能碰撞诱导解离(HCD-MS/MS)和2D NMR分析相结合(HILIC-ESI-HCD-MS/MS)的方法对海参褐藻糖胶进行寡糖图谱绘制。通过选择褐藻糖胶寡糖的去质子化分子离子及其 NaBD4 还原的醛醇,HILIC-ESI-HCD-MS/MS 为它们提供了结构相关的糖苷产物离子,且在水热解聚过程中所有低聚糖及其异构体从 dp2 到 dp7 的序列和硫酸化结构的确定表明没有硫酸盐损失。总之,该团队结果中的寡糖图谱阐明了具有 2-O-硫酸化和 2,4-O-硫酸化残基的各种寡糖结构域的岩藻糖胶的结构。相关研究发表在《Carbohydrate Polymers》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486172101081X>

原文标题:Oligosaccharide mapping analysis by HILIC-ESI-HCD-MS/MS for structural elucidation of fucoidan from sea cucumber *Holothuria floridana*