

玉米肽对小鼠酒精性脑损伤的保护作用及其机制

林巍, 曲国强, 刘晓兰, 任健

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔161006)

摘要:建立小鼠慢性酒精性脑损伤模型,研究玉米肽对酒精性脑损伤的保护作用。将ICR小鼠随机分为5组,分别为正常对照组、慢性酒精性脑损伤模型组、玉米肽高剂量组(2 g/kg)、玉米肽中剂量组(1 g/kg)、玉米肽低剂量组(0.5 g/kg)。采用直接饮用酒精溶液法建立小鼠慢性酒精性脑损伤模型,同时实验组小鼠给予玉米肽,连续5个月,实验结束后取脑组织,进行病理组织学观察,同时采用酶联免疫试剂盒检测各组小鼠脑组织中氧化应激相关指标和促炎细胞因子水平,此外还测定了小鼠脑组织中部分凋亡相关指标。结果表明:脑病理组织学显示玉米肽低、中、高剂量组能够不同程度地减轻酒精对小鼠脑组织的损伤作用;氧化应激指标表明玉米肽能够提高小鼠脑组织中GSH含量,增加GST、GSH-Px和T-SOD活性,降低MDA含量,减少细胞中ROS含量($P < 0.05$);此外玉米肽还能够显著降低小鼠脑组织中TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1和NF- κ B水平($P < 0.05$)。玉米肽不仅通过调节酒精引起的神经细胞氧化应激,而且通过下调促炎细胞因子水平而改善小鼠酒精性脑损伤。

关键词:玉米肽;酒精;脑损伤;氧化应激;促炎细胞因子

中图分类号:TQ936.1;R595.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)03-0041-06

Protective effect of corn peptide on alcoholic brain injury in mice and its mechanism

LIN Wei, QU Guoqiang, LIU Xiaolan, REN Jian

(College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract:The alcoholic brain injury mouse model was established, and the protective effect of corn peptide on the alcoholic brain injury was studied. ICR mice were randomly divided into 5 groups: normal control group, alcohol model group, high dose corn peptide group(2 g/kg), medium dose corn peptide group(1 g/kg) and low dose corn peptide group(0.5 g/kg). The alcoholic brain injury mouse model was induced by drinking alcoholic solution, then the mice in the experimental group were given corn peptide for 5 months. The brain tissue was taken for histopathological observation and ELISA mensuration, including oxidative stress-related indicators, inflammatory cytokines levels and some apoptosis-related indicators. The results showed that the histopathology indicated that the alcoholic brain injury was reduced to different degree in low, medium and high dose corn peptide groups. The results of oxidative stress indexes indicated that corn peptide could increase the content of GSH and the activities of GSH-Px and T-SOD, and decrease the contents of MDA and ROS ($P < 0.05$). In addition, the levels of TNF- α , IL-6, IFN- γ , TGF- β 1 and NF- κ B in brain tissue were significantly decreased ($P < 0.05$) by corn peptide. In conclusion, corn peptide ameliorated alcoholic brain damage not only by regulating oxidative stress of nerve cell, but also by reducing proinflammatory cytokines levels.

Key words:corn peptide; alcohol; brain injury; oxidative stress; proinflammatory cytokine

收稿日期:2021-07-04;修回日期:2021-07-23

基金项目:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(135409407);齐齐哈尔大学研究生创新科研项目(YJSCX2020026);黑龙江省青年科学基金(QC2018028)

作者简介:林巍(1982),女,副教授,博士,研究方向为食品营养与安全(E-mail)0qiu@163.com。

随着我国经济的高速发展,酒类产量和消费量逐年增高,酒精性脑病的发病率呈逐年增长趋势,饮酒导致的脑损伤不仅严重影响人体身心健康,而且对社会也造成严重危害^[1]。长期过量饮酒是脑损伤、脑血管病的主要病因,也是诱发脑血管病突发(如脑梗死)及老年痴呆的重要危险因素^[2]。目前,有关酒精性脑病的临床治疗主要采取戒酒、营养支持和对症治疗等综合疗法,其目的就是减轻酒精性脑病临床症状,阻止酒精性脑病的进一步发展。由于目前慢性酒精中毒所致脑损伤缺乏有效的治疗,因而预防酒精中毒对脑组织的损伤至关重要。所以研究开发拮抗酒精性脑损伤的天然保健食品是目前医学和食品科学领域共同关注的热点。

玉米蛋白多肽链中存在多个功能区,经过蛋白酶控制性酶解之后,生理活性得到显著释放。目前已发现玉米蛋白水解物具有醒酒保肝、降血压、抗疲劳、抗氧化等多种活性^[3-5]。其中玉米肽的醒酒活性研究最早,Yamaguchi等^[6-8]率先报道了玉米肽具有促进乙醇代谢的醒酒作用。国内众多学者也分别制备出具有体外激活乙醇脱氢酶活性的玉米肽^[9-12];体内实验的研究主要集中在玉米肽的解酒效果以及玉米肽对酒精性肝损伤的保护作用^[13-15],而忽视了中枢神经系统毒性。本实验室研制开发的玉米肽不仅具有醒酒作用,并且能够减轻酒精对神经系统的刺激,缓解醉酒后头痛。但是玉米肽如何降低酒精对脑组织的损伤作用,如何改善酒后头痛的机制尚未清楚。本研究在前期研究的基础上,进一步探讨玉米肽对慢性酒精性脑损伤小鼠脑组织氧化应激水平及促炎细胞因子的调节作用,以期找到玉米肽改善酒精性脑损伤的客观依据,从而对长期大量饮酒的人群采取相应的保护措施,为预防脑损伤的天然保健食品的研究开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

清洁级 ICR 小鼠(18 ± 2)g,实验动物生产许可证号 SCXK(吉)2015—0005,购于长春市亿斯实验动物技术有限责任公司;玉米肽粉(蛋白质含量 45.3%,其余为淀粉,肽分子质量 < 1 kDa),依据发明专利 ZL 201910249682.2 实验室自制;基础鼠粮,长春市亿斯实验动物技术有限责任公司;活性氧簇(ROS)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、 γ 干扰素(IFN- γ)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)活性和核因子 κB (NF- κB)试剂盒,购于上海江莱生物科技有限公司;总超氧化物歧化酶(T-SOD)、

丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒,购于南京建成生物工程研究所。

MT70 挤压膨化机,济南美腾机械设备有限公司;EnSpire 全波长多功能酶标仪,美国珀金埃尔默公司;CF15RXII 型高速低温离心机,日本日立公司;1X73 倒置荧光显微镜,奥林巴斯公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物饲养与分组

加肽鼠粮的制作:以 1 g/kg 中剂量玉米肽为例说明添加玉米肽鼠粮的制作。首先,用粉碎机将基础鼠粮粉碎,之后将玉米肽与粉碎后的基础鼠粮以质量比 1:1 000 用搅拌机混合均匀,最后将混合后的饲料利用挤压膨化机制作成具有一定硬度的圆柱体饲料。高剂量玉米肽和低剂量玉米肽的制作,除质量比分别为 2:1 000 和 0.5:1 000 之外,其余过程均与中剂量玉米肽的制作过程一致。

ICR 小鼠 80 只(雌雄各半),随机分为 5 组,每组 16 只,分别为正常对照组、慢性酒精性脑损伤模型组(酒精模型组)、玉米肽高剂量组(2 g/kg)、玉米肽中剂量组(1 g/kg)、玉米肽低剂量组(0.5 g/kg)。慢性酒精性脑损伤模型建立参考 Turchan 等^[16]方法。将小鼠适应性饲养 1 周后,正常对照组饮用蒸馏水,饲喂基础鼠粮;给酒精模型组小鼠依次饮用体积分数为 6%、12%、15%、20% 的酒精溶液,饲喂基础鼠粮,其中体积分数为 6%、12%、15% 的酒精溶液分别饮用 1 周,体积分数为 20% 的酒精溶液一直饮用到实验结束;玉米肽实验组按分组分别饲喂加肽鼠粮,饮用酒精溶液同酒精模型组。各组小鼠皆自由摄食,实验周期为 5 个月。实验结束后,小鼠颈椎脱臼处死,取脑组织,一半用于病理组织学观察,一半用于脑组织中各项指标的测定。

1.2.2 脑组织的病理组织学观察

小鼠脱臼处死后,取出脑组织,留取双侧大脑半球,福尔马林固定,制成 HE 染色切片并做病理组织学观察。

1.2.3 脑组织中氧化应激相关指标的测定

小鼠脱臼处死后迅速取脑组织,称重,加入一定量的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS),用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2~8℃。加入一定量的 PBS,用匀浆器将标本充分匀浆。用低温离心机以 2 000 r/min 离心 20 min。仔细收集上清,分装待检测。按试剂盒说明书进行脑组织中 ROS、MDA、GSH 含量和 GST、GSH-Px、T-SOD 活性的测定。

1.2.4 脑组织中促炎细胞因子含量的测定

脑组织处理同 1.2.3,按试剂盒说明书进行 IFN- γ 、IL-6、TGF- β 1、TNF- α 含量的测定。

1.2.5 脑组织中凋亡相关指标的测定

脑组织处理同 1.2.3,按试剂盒说明书进行 Caspase-3 活性和 NF- κ B 含量的测定。

1.2.6 数据处理

应用 SPSS19.0 软件进行数据处理,各组数据结果以“平均值 \pm 标准差”表示,采用 Duncan's 多重比较法进行显著性检验。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 玉米肽对小鼠酒后脑组织病理组织学的影响

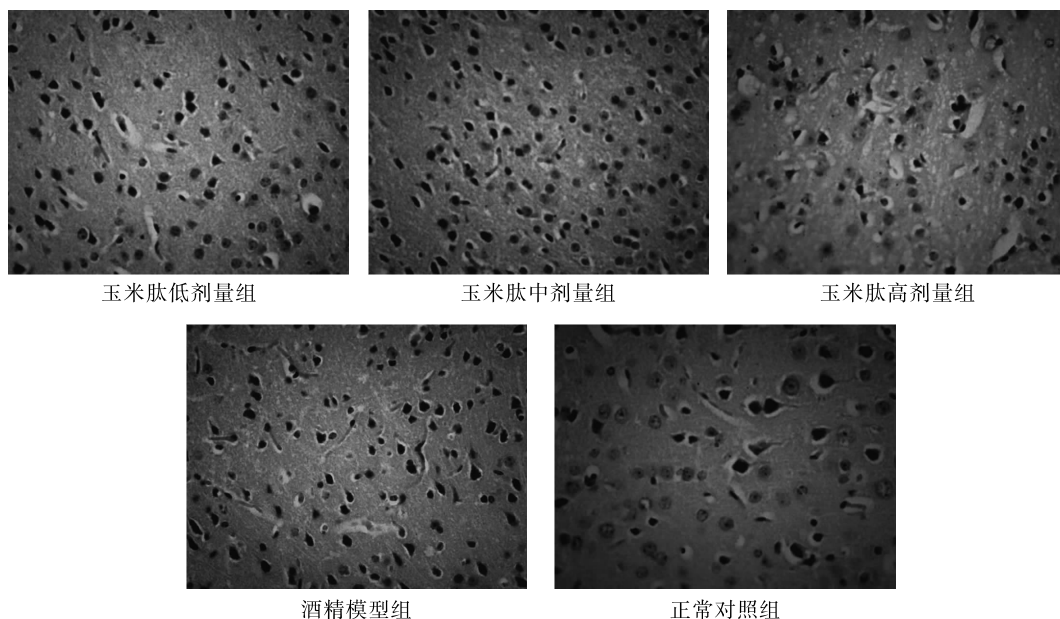
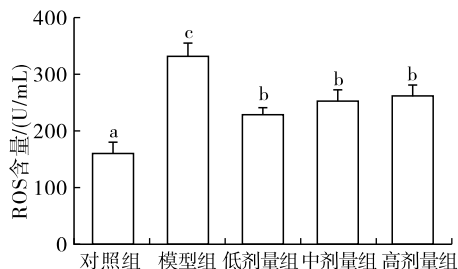


图1 小鼠脑组织病理组织学观察结果(400 \times)

2.2 玉米肽对小鼠酒后脑组织中氧化应激相关指标的影响

2.2.1 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 ROS 含量的影响(见图 2)



注:不同小写字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。下同

图2 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 ROS 含量的影响

由图 2 可见:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 ROS 含量显著升高($P < 0.05$),表明酒精可引起氧化应激,增加小鼠酒后脑组织细胞中

(见图 1)

由图 1 可知,与正常对照组小鼠脑组织相比,酒精模型组小鼠脑组织病理切片可见软脑膜充血(100 倍可见,未展示),神经细胞数量减少,锥体神经细胞固缩、染色加深,神经胶质细胞数量增多。玉米肽低剂量组软脑膜充血略减轻,神经细胞和神经胶质细胞病变也显著减轻。玉米肽中剂量组软脑膜充血明显减轻,但仍可见一定的神经细胞固缩和部分神经细胞溶解,神经胶质细胞增生减轻。玉米肽高剂量组软脑膜充血,可见明显的神经细胞固缩和部分神经细胞溶解,神经胶质细胞增生减轻。3 个剂量组的玉米肽对酒精引起的脑损伤有不同程度的减轻作用。

ROS 含量;与酒精模型组相比,玉米肽低、中、高剂量组中 ROS 含量显著降低($P < 0.05$),表明玉米肽可降低小鼠酒后神经细胞中 ROS 含量,减轻酒精导致的氧化应激。

2.2.2 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 MDA 含量的影响(见图 3)

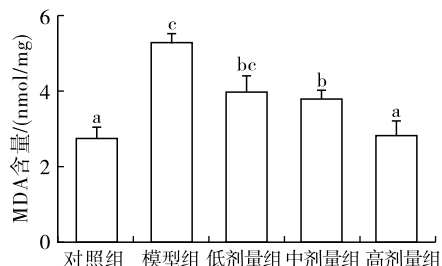


图3 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 MDA 含量的影响

由图 3 可知:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 MDA 含量显著增加($P < 0.05$),表明酒

精摄入增加了脂质过氧化产物 MDA 的形成;与酒精模型组相比,玉米肽中、高剂量组中 MDA 含量皆显著减少($P < 0.05$),其中高剂量组恢复到正常对照组水平($P > 0.05$),表明玉米肽可以减轻酒精及其代谢物乙醛导致的脂质过氧化。

2.2.3 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 GSH、GSH-Px 及 GST 水平的影响(见图 4)

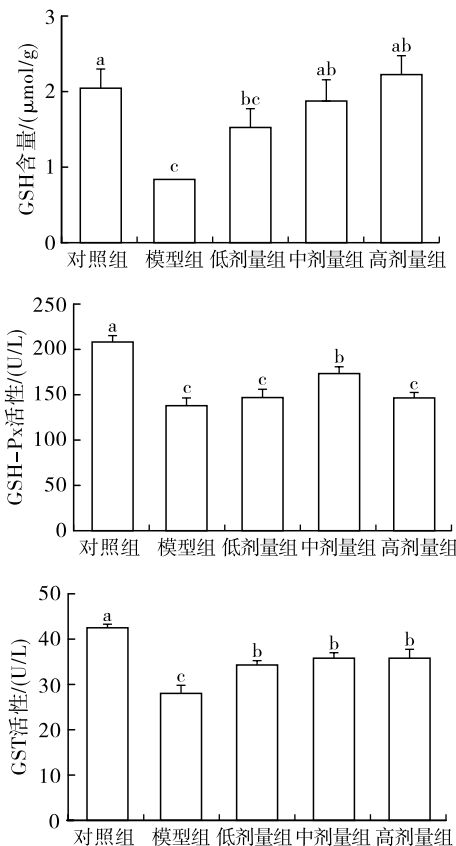


图 4 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 GSH、GSH-Px 及 GST 水平的影响

由图 4 可见:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 GSH 含量显著减少, GST 和 GSH-Px 活性显著降低($P < 0.05$);与酒精模型组相比,玉米肽中、高剂量组 GSH 含量显著增加($P < 0.05$),玉米肽中剂量组 GSH-Px 活性显著增加($P < 0.05$),玉米肽低、中、高剂量组 GST 活性皆显著提高($P < 0.05$)。这表明玉米肽可通过提高脑组织中 GSH 的含量,恢复 GST 和 GSH-Px 活性,缓解酒精及其代谢物对神经细胞的氧化应激和自由基损伤作用。

2.2.4 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 T-SOD 活性的影响(见图 5)

由图 5 可知:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 T-SOD 活性显著降低($P < 0.05$);与酒精模型组相比,玉米肽中、高剂量组中 T-SOD 活性显著提高($P < 0.05$)。小鼠酒后 T-SOD 水平降

低可能与其被氧化自由基大量消耗有关,同时脂质过氧化物可抑制 T-SOD 活性,玉米肽能通过自身较强的抗氧化活性抑制脂质过氧化,从而缓解乙醇导致的 T-SOD 活性下降,提高细胞的抗氧化能力,减轻自由基对神经细胞的损伤。

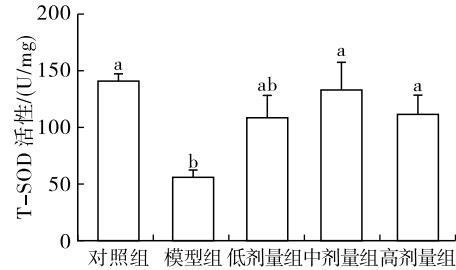


图 5 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 T-SOD 活性的影响

2.3 玉米肽对小鼠酒后脑组织中促炎细胞因子含量的影响

2.3.1 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 IL-6 含量的影响(见图 6)

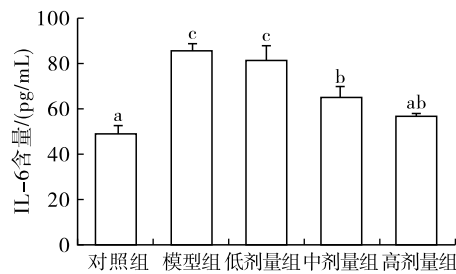


图 6 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 IL-6 含量的影响

由图 6 可见:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 IL-6 含量显著升高($P < 0.05$);与酒精模型组相比,玉米肽中、高剂量组 IL-6 含量显著降低($P < 0.05$),其中玉米肽高剂量组与正常对照组相比无显著差异($P > 0.05$)。

2.3.2 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 TGF- β 1 含量的影响(见图 7)

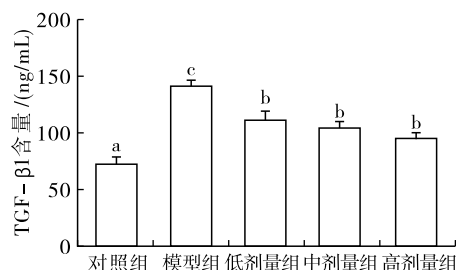


图 7 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 TGF- β 1 含量的影响

由图 7 可见:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 TGF- β 1 含量显著升高($P < 0.05$);与酒精模型组相比,玉米肽低、中、高剂量组 TGF- β 1 含量显著降低($P < 0.05$),但未恢复到正常对照组水平。

2.3.3 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 IFN- γ 含量的影响(见图 8)

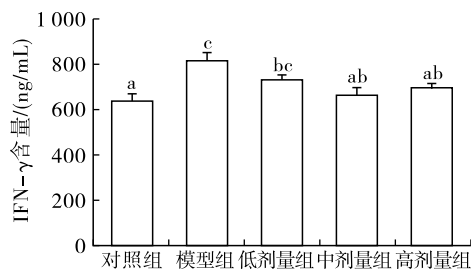


图 8 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 IFN- γ 含量的影响

由图 8 可知:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 IFN- γ 含量显著升高($P < 0.05$);与酒精模型组相比,玉米肽低剂量组没有显著变化,但玉米肽中、高剂量组 IFN- γ 含量显著降低($P < 0.05$),恢复到正常对照组水平($P > 0.05$)。

2.3.4 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 TNF- α 含量的影响(见图 9)

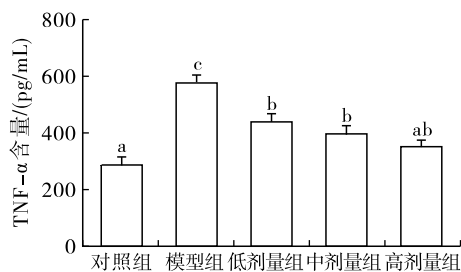


图 9 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 TNF- α 含量的影响

由图 9 可见:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 TNF- α 含量显著升高($P < 0.05$);与酒精模型组相比,玉米肽低、中、高剂量组中 TNF- α 含量显著降低($P < 0.05$),其中高剂量组恢复到正常对照组水平($P > 0.05$)。

2.4 玉米肽对小鼠酒后脑组织中凋亡相关指标的影响

2.4.1 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 Caspase-3 活性的影响(见图 10)

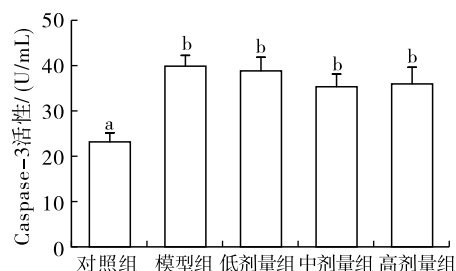


图 10 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 Caspase-3 活性的影响

由图 10 可见:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 Caspase-3 活性显著升高($P < 0.05$),表明细胞凋亡途径在酒精诱导的认知缺陷

中发挥作用;与酒精模型组相比,玉米肽低、中、高剂量组中 Caspase-3 活性未见显著改变($P > 0.05$),表明玉米肽对酒精诱导的 Caspase-3 表达没有调节作用。

2.4.2 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 NF- κ B 含量的影响(见图 11)

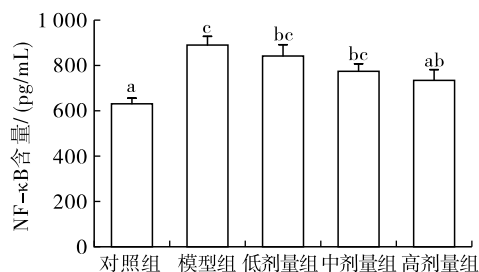


图 11 玉米肽对小鼠酒后脑组织中 NF- κ B 含量的影响

由图 11 可见:与正常对照组相比,酒精模型组小鼠脑组织中 NF- κ B 含量显著升高($P < 0.05$);与酒精模型组相比,玉米肽低、中剂量组 NF- κ B 含量未见显著改变,但玉米肽高剂量组 NF- κ B 含量显著降低($P < 0.05$)。这表明高剂量的玉米肽对酒后 NF- κ B 含量具有一定的调节作用,可以通过抑制 NF- κ B 表达,从而降低多种促炎因子的生成,减轻酒后脑组织炎症反应,缓解酒精对脑组织的损伤作用。

3 结论

玉米肽对小鼠酒精性脑损伤具有显著的改善作用,能够提高脑组织中 GSH 含量,增加 GST、GSH-Px 和 T-SOD 活性,降低 MDA 含量,减少神经细胞中 ROS 含量;同时玉米肽还能够显著降低脑组织中 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1 和 NF- κ B 水平。由此可知玉米肽不仅可调节酒精引起的神经细胞氧化应激,而且还通过下调促炎细胞因子水平从而改善慢性酒精性脑损伤,提示饮酒前食用玉米肽制品,可以减轻酒精对大脑的毒性作用。但是本研究对玉米肽保护脑组织的具体分子机理尚不清楚,还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 向小军,王绪轶,汤宜朗,等.我国酒精相关危害的现状与策略[J].中国药物滥用防治杂志,2015,21(6):368-372.
- [2] PASCUAL M, LOPEZ-HIDALGO R, MONTAGUD-ROMERO S, et al. Role of mTOR-regulated autophagy in spine pruning defects and memory impairments induced by binge-like ethanol treatment in adolescent mice [J]. Brain Pathol, 2021, 31(1): 174-188.
- [3] LI H M, GUO P, HU X, et al. Preparation of corn (*Zea mays*) peptides and their protective effect against alcohol-

- induced acute hepatic injury in NH mice [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 47(3): 169 – 174.
- [4] ZHENG X Q, LI L T, LIU X L, et al. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73(4): 763 – 770.
- [5] MA Z L, HOU T, SHI W, et al. Inhibition of hepatocyte apoptosis: an important mechanism of corn peptides attenuating liver injury induced by ethanol [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 22062 – 22080.
- [6] YAMAGUCHI M, TAKADA M, NOZAKI O, et al. Preparation of corn peptide from corn gluten meal and its administration effect on alcohol metabolism in stroke – prone spontaneously hypertensive rats [J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1996, 42(3): 219 – 231.
- [7] YAMAGUCHI M, NISHIKIORI F, ITO M, et al. Effect of corn peptide on alcohol metabolism and plasma free amino acid concentrations in healthy men [J]. *Eur J Clin Nutr*, 1996, 50(10): 682 – 688.
- [8] YAMAGUCHI M, NISHIKIORI F, ITO M, et al. The effect of corn peptide ingestion on facilitating alcohol metabolism in healthy men [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(9): 1474 – 1481.
- [9] 林兵, 于永超, 陈禹, 等. 玉米肽对急性酒精中毒大鼠的作用研究 [J]. *中国食物与营养*, 2014, 20(4): 66 – 68.
- [10] YU G C, LI J T, HE H, et al. Ultrafiltration preparation of potent bioactive corn peptide as alcohol metabolism stimulator in vivo and study on its mechanism of action [J]. *J Food Biochem*, 2013, 37(2): 161 – 167.
- [11] 赵谋明, 马梅, 苏国万, 等. 具有醒酒活性的玉米肽的制备、富集和鉴定 [J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 86 – 94.
- [12] 郭辉, 何慧, 韩樱, 等. 玉米肽对小鼠酒后肝脏乙醇脱氢酶活力的影响及醒酒机理 [J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 265 – 269.
- [13] 李雍, 林峰, 秦勇, 等. 玉米肽对乙醇氧化损伤模型小鼠的抗氧化作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(15): 31 – 35.
- [14] 马艳秋, 郑喜群, 刘晓兰, 等. 玉米蛋白酶解物的解酒作用 [J]. *食品科学*, 2015, 36(1): 191 – 195.
- [15] 宋雪梅. 玉米源肽对肝细胞酒精性损伤的保护作用 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [16] TURCHAN J, PRZEW B, TOTTH G, et al. The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat [J]. *Neuroscience*, 1999, 91(3): 971 – 977.
-
- (上接第 26 页)
- [21] WÓJCIAK K M, STASIAK D M, FERYSIUK K, et al. The influence of sonication on the oxidative stability and nutritional value of organic dry – fermented beef [J]. *Meat Sci*, 2019, 148: 113 – 119.
- [22] GHASSEMI – GOLEZANI K, FARHANGI – ABRIZ S. Changes in oil accumulation and fatty acid composition of soybean seeds under salt stress in response to salicylic acid and jasmonic acid [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2018, 65: 229 – 236.
- [23] REALINI C E, VÉNIEN A, GOU P, et al. Characterization of *Iongissimus thoracis*, *Semitendinosus* and *Masseter* muscles and relationships with technological quality in pigs. 1. Microscopic analysis of muscles [J]. *Meat Sci*, 2013, 94(3): 408 – 416.
- [24] MOHAMED A M I, MOHAMED F A F, AHMED S, et al. An efficient hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the simultaneous determination of metformin and pioglitazone using high – purity silica column [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 997: 16 – 22.
- [25] LIANG K, ZHANG Q, CONG W. Enzyme – assisted aqueous extraction of lipid from microalgae [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(47): 11771 – 11776.
- [26] WAGNER M. 热分析应用基础 [M]. 陆立明, 译. 上海: 东华大学出版社, 2011.
- [27] ZOU X Q, HUANG J H, JIN Q Z, et al. Lipid composition analysis of milk fats from different mammalian species: potential for use as human milk fat substitutes [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(29): 7070 – 7080.
- [28] YAO L, GERDE J A, LEE S L, et al. Microalgae lipid characterization [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(6): 1773 – 1787.