

羊栖菜多糖通过激活 JNK/Nrf2/ARE 信号通路延缓小鼠衰老进程作用研究

赵子慧¹, 徐 曼¹, 刘阿梅¹, 胡晨熙¹, 刘 剑¹, 吴明江^{1,2}, 陈培超^{1,2*}

1. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江 温州 325035

2. 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室, 浙江 温州 325035

摘要: 目的 研究羊栖菜多糖(SFPS)发挥抗氧化、抗衰老的作用机制。方法 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blotting 法检测不同月龄雄性小鼠和 ig 给予 SFPS 的老年雄性小鼠肝脏中 c-Jun 氨基末端激酶 1/2(JNK1/2)的表达; RT-PCR 特异性区分 JNK 的各蛋白异构体,并检测各异构体在 ig SFPS 或生理盐水的自然衰老小鼠肝脏中的表达水平;免疫共沉淀和 ARE-荧光素酶报告基因检测 JNK 激活转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)/ARE 信号通路的分子机制。结果 JNK1/2 的表达水平与小鼠的衰老进程呈负相关, JNK1-β2、JNK2-α1、JNK2-β2 mRNA 表达水平在小鼠衰老过程中显著下降,而 ig 给予 SFPS 能够显著提高老年小鼠 JNK1-β2 (5.4×10^4) 的表达水平, JNK (5.4×10^4) 蛋白与抗氧化因子 Nrf2 存在相互作用,且 JNK1-β2 (5.4×10^4) 能够显著激活 Nrf2/ARE 信号通路。结论 JNK1-β2、JNK2-α1 和 JNK2-β2 与衰老进程负相关,含有 C-terminal tail 的 JNK1-β2 能够显著激活 Nrf2/ARE 抗氧化信号通路。SFPS 能显著提高老年小鼠 JNK1-β2 (5.4×10^4) 和 Nrf2/ARE 信号通路的表达水平,进而提高机体的抗氧化能力,最终延缓小鼠的衰老进程。

关键词: JNK; Nrf2; 羊栖菜多糖; 抗氧化; 抗衰老

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5600-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.018

Effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharides on activating JNK/Nrf2/ARE signaling pathway and slowing down aging process

ZHAO Zi-hui¹, XU Man¹, LIU A-mei¹, HU Chen-xi¹, LIU Jian¹, WU Ming-jiang^{1,2}, CHEN Pei-chao^{1,2}

1. College of Life and Environment Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Water Environment and Marine Biological Resources Protection, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To study the mechanisms of anti-oxidation and anti-aging of *Sargassum fusiforme* polysaccharides (SFPS). **Methods** qRT-PCR and Western blotting were utilized to detect the expression of c-Jun-N-terminal kinase 1/2 (JNK1/2) in male mice with different ages and in the old male mice fed with SFPS. The JNK isoforms were specifically distinguished by RT-PCR and the expression levels of each isoform in the liver of mice by ig administration of SFPS or normal saline were measured. Finally, the mechanism of JNK activating Nrf2/ARE signaling pathway was determined by co-immunoprecipitation and ARE-luciferase reporter gene assay. **Results** The expression levels of JNK1/2 were negatively correlated with aging process. JNK1-β2, JNK2-α1, and JNK2-β2 played important roles in aging process. The mRNA expression level of JNK1-β2, JNK2-α1, and JNK2-β2 were significantly decreased in mice aging process, and the protein expression levels of JNK1-β2 (5.4×10^4) were significantly upregulated by long-term diet with SFPS. The JNK1-β2 (5.4×10^4) protein interacted with anti-oxidant factor Nrf2, and significantly activated Nrf2/ARE signaling pathway. **Conclusion** JNK1-β2, JNK2-α1 and JNK2-β2 had negative correlation with aging process, and the expression level of JNK1-β2 (5.4×10^4) in aged mice were obviously promoted by long-term diet with SFPS. As JNK1-β2 containing C-terminal tail can interact with Nrf2 and activate the Nrf2/ARE signaling pathway, therefore, it was suggested that SFPS can improve the overall anti-oxidant capacity and retard aging process by activating of the JNK1-β2/Nrf2/ARE signaling pathway.

Key words: JNK; Nrf2; *Sargassum fusiforme* polysaccharides; anti-oxidant; anti-aging

收稿日期: 2018-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31470430); 青年科学基金资助项目(31301148); 浙江省科技计划项目(2017C32103); 浙江省新苗人才计划(2017R426014)

作者简介: 赵子慧(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为活性生物大分子。E-mail: 15451382278@wzu.edu.cn

*通信作者 陈培超(1985—), 男, 硕士生导师, 副教授, 主要从事海洋药物资源研究。E-mail: chenpeichao@wzu.edu.cn

大型褐藻羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 为马尾藻科 (Sargassaceae) 植物, 广泛生长在太平洋西北部温带-亚热带海域, 称为“长寿菜”, 可作为蔬菜食用, 也可入药, 具有丰富的营养价值和药用价值。现代研究表明, 水溶性羊栖菜多糖 (SFPS) 具有较强的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 ($\bullet$ DPPH) 清除能力及抗氧化能力^[1-2], 并且具有增强果蝇生育力^[3]、延缓小鼠衰老进程^[2]等作用。然而, SFPS 发挥抗氧化、抗衰老的机制尚不明确。本实验室前期研究发现, 长期喂食 SFPS 的 ICR 雄性小鼠肝脏中 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 的表达水平显著上调^[2], 而 JNK 是一种氧化应激蛋白, 被认为与衰老相关, 提示 SFPS 发挥抗氧化、抗衰老机制可能与调节 JNK 的表达有关。

JNK 可被多种应激信号激活, 参与多种生理和病理过程^[4-5]。近年来, JNK 也被称为长寿基因, 在线虫^[6-7]、果蝇中, 过表达 JNK 可以延长其寿命^[8-11]。而哺乳动物中, 尚未发现 JNK 发挥长寿基因功能的直接证据。这可能与复杂的生物网络调控及 JNK 自身丰富的同源物有关。哺乳动物中, JNK 有 3 种主要的同源物 JNK1、JNK2 和 JNK3 (JNK3 仅在脑、心脏、睾丸中特异表达)^[4], 这 3 种 JNK 同源物通过可变剪切分别产生 4 种异构体, 并且每种都可表达为相对分子质量为 4.6×10^4 或 5.4×10^4 的蛋白^[5,12]。这种可变剪切造成的差异通常被认为是各个蛋白异构体在调控细胞功能及生理过程中差异的主要原因^[12]。然而, 关于 JNK 各个异构体的生物功能的报道比较少, 尤其在衰老过程中的作用仍不清晰。

本实验通过检测不同月龄雄性小鼠肝脏中 JNK1/2 的表达模式, 特异地区分 JNK1、JNK2 的各个异构体并检测其表达模式, 并利用免疫共沉淀 (Co-IP) 实验及报告基因检测 JNK 与转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 的相互作用及 JNK C-terminal tail 的生物学功能, 以探明 SFPS 发挥抗氧化、抗衰老的作用机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级 ICR 雄性小鼠购买于温州医科大学实验动物中心, 动物许可证号 SCXY(浙)2010-0049, 体质量 (30.5 ± 1.0) g。实验设计与操作获动物委员会批准 (批准号 2016-159)。小鼠于室温 (25 ± 1) °C, 湿度 (60 ± 5) %, 12 h 黑暗、12 h 光照条件下饲养。

小鼠纤维细胞 L929 购买于中国科学院上海细胞库。

1.2 药品

SFPS 由温州大学生命与环境科学学院羊栖菜研究所提供。SFPS 采用热水浸提醇沉的方法提取, 相对分子质量为 75 000, 利用苯酚硫酸法等方法^[2]测定其中含多糖 97.9%、糖醛酸 51.1%、硫酸根 9.2%。其中古洛糖醛酸 (GuLA)、甘露糖醛酸 (ManA)、甘露糖 (Man)、鼠李糖 (Rha)、葡萄糖醛酸 (GlcA)、葡萄糖 (Glc)、木糖 (Xyl)、半乳糖 (Gal)、岩藻糖 (Fuc) 的单糖摩尔比为 38.9 : 8.8 : 6.1 : 5.3 : 3.8 : 1.0 : 5.2 : 9.1 : 28.9。

1.3 仪器

Milli-Q 超纯水仪 (德国 Millipore 公司); 洁净工作台 (苏净集团安泰空气技术有限公司); Applied Biosystems Veriti PCR 仪、Light Cycler 480 II (瑞士 Roche 公司); 水平电泳槽 (北京六一仪器厂); ZF-258 全自动凝胶成像分析系统 (上海嘉鹏科技有限公司); Amersham Imager 600 凝胶成像系统 (美国 GE 公司); Bio-Rad 垂直电泳系统及转印系统 (美国伯乐公司); 台式低温离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.4 试剂

Trizol[®] Reagent (Life Technologies 公司); Hiscript[®] II 1st Strand cDNA synthesis kit (Vazyme Biotech 公司); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Takara Biotechnology 公司); dNTP Mix (北京华百泰生物科技有限公司); 蛋白酶抑制剂 Cocktail (Roche Biotechnoogy 公司); JNK 抗体 (BD 公司); Gapdh 抗体 (碧云天生物技术有限公司); Nrf2 抗体 (Abcam 公司); IgG [生工生物工程(上海)股份有限公司]; Protein A+G Sepharose Beads (睿安生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

小鼠分为正常 3、9、11、20 月龄组和 SFPS 处理 20 月龄组, 每组 10 只。根据前期的条件摸索, SFPS 处理组小鼠是在正常小鼠 11 月龄开始按照 100 mg/kg ig 给予 SFPS, 直到 20 月龄, 脱颈椎处死, 取新鲜的肝组织保存于 -80 °C 冰箱, 每组随机选取 6 只小鼠的肝脏进行实验。

2.2 JNK1、JNK2 及各异构体基因扩增

分别取不同月龄小鼠肝脏 100 mg, 快速剪碎, 用预冷 PBS 清洗 2 遍, 采用 Trizol 法提取总 RNA,

并用 RNase Free DNase 酶消化残留的基因组 DNA。参照 Hiscript® II 1st Strand cDNA synthesis kit 说明书,以总 RNA 为模板,将 mRNA 反转录为 cDNA,并保存于-20 °C 备用。

按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明,以上一步所得 cDNA 为模板,分别以 JNK1、JNK2 特异引物(表 1)进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 扩增,β-actin 为内参。反应体系:染料与酶的缓冲液 SYBR premix Ex Taq II (2×) 10 μL,正向和反向引物各 1 μL,模版 cDNA 2 μL,最终反应体系为 20 μL。测定样品 C_t 值,并利用相对定量法进行分析。

以 cDNA 为模板,分别以 JNK1、JNK2 各个异构体的特异引物(表 1)进行 PCR 扩增。反应体系为 dNTP Mix (2×) 5 μL,正向和反向引物各 0.5 μL,模版 500 ng,双蒸水补齐至 10 μL。反应后体系进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,并对结果进行灰度分析。

2.3 Western blotting 法检测 JNK 蛋白表达

分别取不同月龄正常组小鼠和 SFPS 处理 20 月龄组小鼠肝脏 50 mg,快速剪碎,加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 cocktail、PMSF,冰上快速研磨,冰上裂解 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,Braford 法测定蛋白浓度。在定量好的蛋白样品中加入蛋白 loading buffer,沸水煮 5 min 变性,

并保存于-80 °C。

将变性好的蛋白按照每孔上样量 10 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并转移到 0.45 μm 的 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂牛奶 4 °C 封闭 3 h,加入一抗 JNK (1:1 000)、GAPDH (1:1 500),4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次,加入 HRP 标记的二抗,4 °C 孵育 3 h, TBST 洗 3 次,ECL 化学发光,利用 Amersham Imager 600 凝胶成像系统扫描结果并分析。

2.4 免疫共沉淀 (Co-IP) 法检测 Nrf2、IgG 表达

L929 细胞于 10 cm 培养皿中培养,分为对照组、IgG 和 Nrf2 组。细胞用预冷的 PBS 洗 2 遍,加入 500 μL 细胞裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4, 10 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, cocktail) 裂解,取上清。Nrf2 和 IgG 组在等量的全蛋白裂解液 (200 μL) 中分别加入 anti-Nrf2 (1 μg)、IgG (1 μg) 混匀,4 °C 缓慢摇动过夜。将孵育好的蛋白裂解液加入 30 μL 充分重悬的 Protein A+G Sepharose Beads 4 °C 缓慢摇动 3 h,1 000×g、4 °C 离心 5 min,弃上清,Protein A+G Sepharose Beads 用添加蛋白酶抑制剂的预冷 PBS 洗 2 遍。加入 40 μL 的蛋白 2× loading buffer 重悬 Protein A+G Sepharose Beads,沸水煮 5 min 变性,离心,取上清作为样品进行 Western blotting 检测。

2.5 ARE-荧光素酶报告基因检测

L929 细胞铺 24 孔板,细胞密度 2×10^5 /mL,每孔加 0.5 mL 细胞悬液,于 5% CO₂、37 °C 培养 20 h。设置对照组和实验组,对照组为只转染空载体 pcDNA、pCMV、ARE-luciferase 质粒;JNK 4.6×10^4 组为转染空载体 pcDNA 与 pCMV-FLAG-JNK1-β1 (4.6×10^4) 质粒、ARE-luciferase 质粒;JNK (5.4×10^4) 组转染空载体 pcDNA 与 pCMV-FLAG-JNK1-β2 (5.4×10^4) 质粒、ARE-luciferase 质粒;Nrf2 组转染空载体 pCMV、pcDNA-Flag-Nrf2 质粒、ARE-luciferase 质粒;JNK (4.6×10^4) + Nrf2 组转染 pCMV-FLAG-JNK1-β2 质粒、pcDNA-Flag-Nrf2、ARE-luciferase 质粒;JNK (5.4×10^4) + NRF2 组转染 pCMV-FLAG-JNK1-β2 质粒、pcDNA-Flag-Nrf2、ARE-luciferase 质粒。

2.6 统计学方法

每个实验至少重复 3 次,用 SPSS Statistics 20.0 和 Graph Pad Prism 5 进行数据统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据之间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)、LSD-*t* 检验。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers list

名称	引物序列 (5'→3')
JNK1	JNK1-F GCAGAAGCAAACGTGACAACA
	JNK1-R TTCTGAAATGGCCGGCTGAG
JNK1-α1	F1 GGTTCGCCACAAAATCCTCTTTCC
	R1 CACCTGTGCTAAAGGAGACGG
JNK1-β1	F2 AGGTGGTGTGTTTGTTCACAGG
	R2 CACCTGTGCTAAAGGAGACGG
JNK1-α2	F1 GGTTCGCCACAAAATCCTCTTTCC
	R3 TTGACTATTGCTGCACCTAAAGGA
JNK1-β2	F3 GGTGGTGTGTTTGTTCACAGG
	R4 TGATCATTGCTGCACCTAAAG
JNK2	JNK2-F GCAAAGAGAGCCTACCGTGAA
	JNK2-R AGGACATTCTCTCATGGTCCAG
JNK2-α1	F4 GCTGGTGAAAGGTTGTGTGA
	R5 TTACTGCTGCATCTGTGCTGA
JNK2-α2	F4 GCTGGTGAAAGGTTGTGTGA
	R6 ACTGCTGCATCTGAAGGCTGG
JNK2-β1	F5 TCATGGCAGAAATGGTCCTCC
	R5 TTACTGCTGCATCTGTGCTGA
JNK2-β2	F5 TCATGGCAGAAATGGTCCTCC
	R6 TTACTGCTGCATCTGTGCTGA

3 结果

3.1 JNK1、JNK2 在不同月龄小鼠肝脏中的表达情况

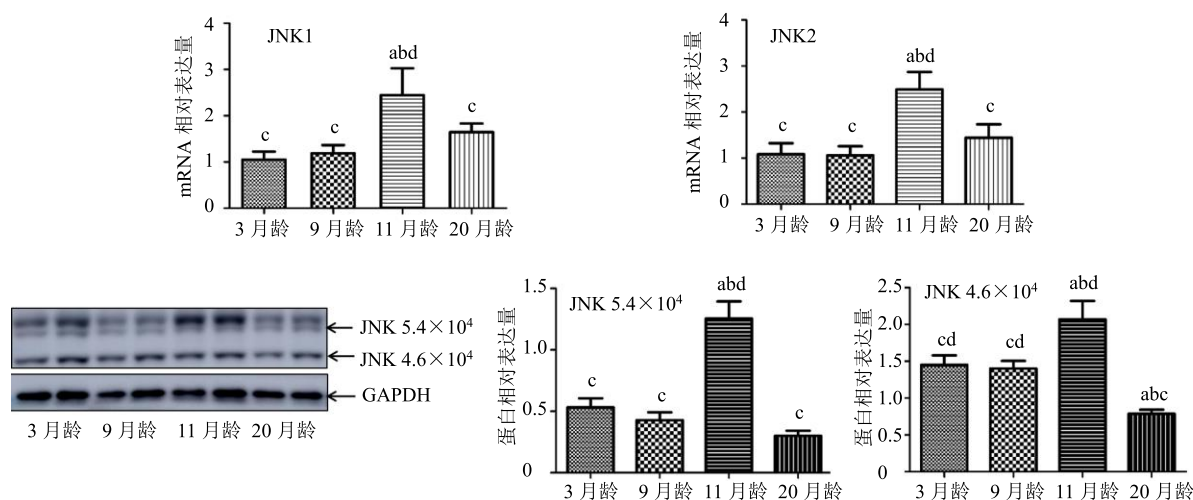
选取不同月龄 (3、9、11、20) 雄性小鼠肝脏, 提取 RNA, 利用 qRT-PCR 检测 JNK1、JNK2 mRNA 表达水平, Western blotting 法检测 JNK 蛋白表达水平。结果表明, 随着小鼠月龄的增加, JNK1、JNK2 mRNA 表达水平呈现先升高后下降的趋势 (图 1-A、B), 同时 JNK (4.6×10^4)、JNK (5.4×10^4) 蛋白也呈现先升高后下降的趋势, 其中 20 月龄老年小鼠与 11 月龄非老年小鼠相比, JNK1、JNK2 mRNA 和蛋白表达水平均显著下调 (图 1)。即在雄性小鼠中 JNK1 和 JNK1 与衰老呈负相关。

3.2 JNK1、JNK2 各异构体在不同月龄小鼠肝脏中的表达情况

小鼠 JNK1 基因位于 14 号染色体上, 共有 13 个外显子。对外显子的可变剪切产生 4 个不同异构体 JNK1- $\alpha 1$ (GI: 225637490)、JNK1- $\beta 1$ (GI: 882939000)、JNK1- $\alpha 2$ (GI: 882939019)、JNK1- $\beta 2$ (GI: 882939047)。4 个异构体的主要差别为对于 7、8 号外显子的选择性转录以及对 13 号外显子的不同程度的翻译 (图 2-A), 即 JNK1- $\alpha 1$ 和 JNK1- $\alpha 2$ 编码 7 号外显子, JNK1- $\beta 1$ 和 JNK1- $\beta 2$ 编码 8 号外显子, 对 13 号外显子的不同翻译使得 JNK1- $\alpha 2$ 、

JNK1- $\beta 2$ 比 JNK1- $\alpha 1$ 、JNK1- $\alpha 2$ 蛋白多 40 多个氨基酸, 因此 JNK1- $\alpha 2$ 、JNK1- $\beta 2$ 翻译为 5.4×10^4 大小的蛋白, JNK1- $\alpha 1$ 、JNK1- $\beta 1$ 翻译为 4.6×10^4 大小的蛋白。JNK2 基因位于 11 号染色体上, 共有 14 个外显子。对外显子的可变剪切产生 4 个不同的异构体 JNK2- $\alpha 1$ (GI: 254750738)、JNK2- $\alpha 2$ (GI: 254750708)、JNK2- $\beta 1$ (GI: 254750711)、JNK2- $\beta 2$ (GI: 254750732)。与 JNK1 的各个异构体类似, JNK2 的 4 个异构体的主要差别为对于 8、9 号外显子的选择性转录以及对 14 号外显子的不同翻译 (图 2-B), 即 JNK2- $\alpha 1$ 和 JNK2- $\alpha 2$ 编码 8 号外显子, JNK2- $\beta 1$ 和 JNK2- $\beta 2$ 编码 9 号外显子, 对 14 号外显子的不同翻译使得 JNK2- $\alpha 2$ 、JNK2- $\beta 2$ 比 JNK1- $\alpha 1$ 、JNK1- $\alpha 2$ 蛋白多 40 多个氨基酸, 因此 JNK2- $\alpha 2$ 、JNK2- $\beta 2$ 翻译为 5.4×10^4 大小蛋白, JNK2- $\alpha 1$ 、JNK2- $\beta 1$ 翻译为 4.6×10^4 大小蛋白。

序列比对得知, JNK1、JNK2 的 4 个可变剪切之间相似度非常高, JNK1 的 4 个异构体在 809~880 (外显子 7、8) JNK1- $\alpha 1$ 与 JNK1- $\alpha 2$ 序列相同, JNK1- $\beta 1$ 与 JNK1- $\beta 2$ 序列相同, 而在 1 229~1 334 (外显子 13) JNK1- $\alpha 1$ 与 JNK1- $\beta 1$ 序列相同, JNK1- $\alpha 2$ 与 JNK1- $\beta 2$ 序列相同 (图 2-C)。同样 JNK2 的 4 个异构体在 891~960 (外显子 8、9) JNK2- $\alpha 1$ 与 JNK2- $\alpha 2$ 序列相同、JNK2- $\beta 1$ 与 JNK2- $\beta 2$ 序列相



a-各组与 3 月龄组相比差异显著 b-各组与 9 月龄组相比差异显著 c-各组与 11 月龄组相比差异显著 d-各组与 20 月龄组相比差异显著 $P < 0.05$

a-significant difference compared to 3 months old mice b-significant difference compared to 9 months old mice c-significant difference compared to 11 months old mice d-significant difference compared to 20 months old mice $P < 0.05$

图 1 不同月龄小鼠肝脏中 JNK 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Expression of JNK in different ages of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-小鼠 JNK1 可变剪切 B-小鼠 JNK2 可变剪切 C-小鼠 JNK1 各个异构体序列比对 D-小鼠 JNK2 各异构体序列比对; 蓝色区域表示外显子, 黑色区域表示非编码区, 红色箭头表示引物所在区域

A-JNK1 alternative splicing B-JNK2 alternative splicing C-JNK1 isoforms comparison map D-JNK2 isoforms comparison map; Structure of JNK is illustrated with exons (blue), non-coding area (black), and position of primers (red arrows).

图 2 小鼠 JNK1、JNK2 选择性剪切及各个异构体比对

Fig. 2 Production of JNK1, JNK2 alternative splicing and individual isoform alignments

同, 而在 1 403~1 407 间 (外显子 14) JNK2-α1 与 JNK2-β1 序列相同, JNK2-α2 与 JNK2-β2 序列相同 (图 2-D)。根据序列比对的结果, 在各可变剪切的

差异位置 (图 2-C、D 箭头) 设计引物, 利用 RT-PCR 的方法特异区分这 8 个可变剪切。引物 F1/R1 特异区分 JNK1-α1, F2/R2 特异区分 JNK1-β1, F1/R3 特

异区分 JNK1- α 2, F3/R4 特异区分 JNK1- β 2, F4/R5 特异区分 JNK2- α 1, F4/R6 特异区分 JNK2- α 2, F5/R5 特异区分 JNK2- β 1, F5/R6 特异区分 JNK2- β 2。

使用能够特异区分 JNK1、JNK2 异构体的引物,选取不同月龄 (3、9、11、20) 雄性小鼠肝脏提取 RNA,测定 JNK1、JNK2 各异构体在正常小鼠衰老过程中的表达 (图 3)。其中 JNK1- α 1、JNK1- α 2 表达量太低难以分析,因此灰度分析没有在图 3 中呈现。结果表明,随着小鼠月龄的增加,JNK1- β 2、JNK2- α 1、JNK2- β 2 mRNA 表达水平显著下调 (其中 JNK2- α 1 可翻译为 4.6×10^4 蛋白,JNK1- β 2 和 JNK2- β 2 可翻译为 5.4×10^4 蛋白)。提示 JNK1- β 2、JNK2- α 1 和 JNK2- β 2 在小鼠衰老过程中发挥重要作用。

3.3 SFPS 对老年小鼠肝脏中 JNK1、JNK2 mRNA 及蛋白表达的影响

与正常老年 (20 月龄,对照组) 小鼠比较,ig 给予 SFPS 的老年小鼠肝脏中 JNK1、JNK2 mRNA 的表达水平升高,其中 JNK1 mRNA 差异显著 ($P < 0.05$,图 4)。同时相对分子质量为 4.6×10^4 和 5.4×10^4 的 JNK1 和 JNK2 蛋白表达量都显著上调 ($P < 0.05$)。表明 SFPS 可以促进老年小鼠肝脏中 JNK (5.4×10^4) 蛋白的表达。

3.4 SFPS 对 20 月龄小鼠肝脏中 JNK1、JNK2 各异构体 mRNA 表达的影响

与正常老年小鼠 (对照组) 比较,ig 给予 SFPS 的老年小鼠肝脏中 JNK2- β 1、JNK2- β 2 的表达量无明显变化,JNK1- β 1、JNK2- α 1、JNK2- α 2 的表达量

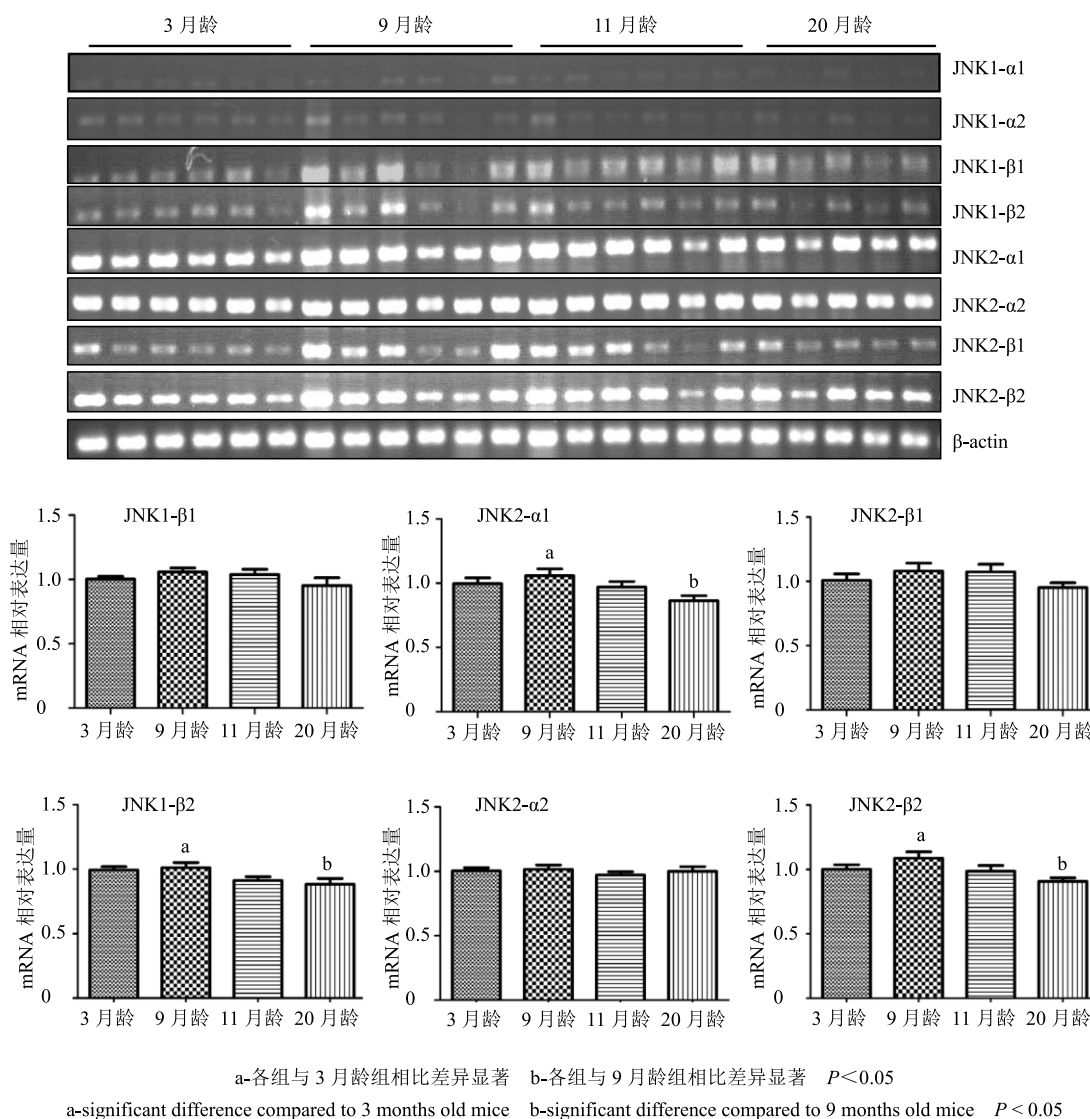
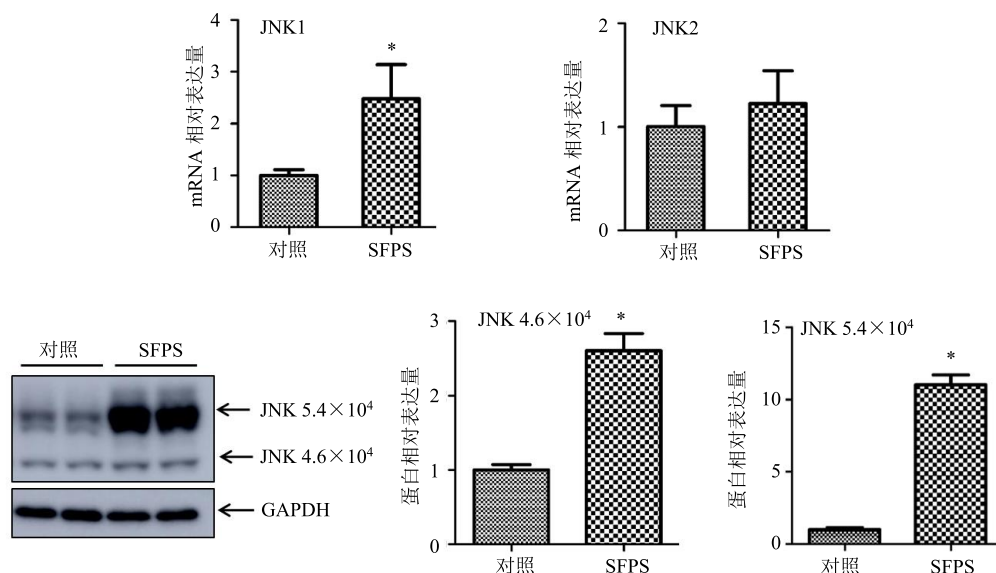


图 3 JNK1、JNK2 各异构体在不同月龄小鼠肝脏中的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Expression of JNK1 and JNK2 isoforms in mice with different ages ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: * $P < 0.05$, 图 5 同

* $P < 0.05$ vs control group, same as fig. 5

图 4 SFPS 对老年小鼠肝脏中 JNK1、JNK2 mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effects of SFPS on mRNA and protein expression level of JNK1 and JNK2 in liver of aged mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

显著下调 ($P < 0.05$), JNK1- $\beta 2$ 的表达量显著上调 ($P < 0.05$, 图 5)。JNK1- $\beta 2$ 翻译为 JNK (5.4×10^4) 蛋白, 表明 SFPS 组小鼠 JNK (5.4×10^4) 蛋白表达水平显著上调与 JNK1- $\beta 2$ 的表达水平密切相关。

3.5 JNK (5.4×10^4) 对 Nrf2/ARE 信号通路的影响

JNK1、JNK2 最后 1 个外显子的差异翻译决定了各 JNK 异构体是否形成无序的 C-terminal tail, 表达为 4.6×10^4 的 JNK 异构体没有 C-terminal tail, 表达为 5.4×10^4 的 JNK 异构体有 C-terminal tail。无序的 C-terminal tail 可以改变 JNK 蛋白的构象, 活化包括 DGF motif、active loop、MAPK insert 等区域, 因此 C-terminal tail 可能会造成的 JNK 生物功能的差异性^[13]。实验前期研究发现喂食羊栖菜的小鼠肝脏中 JNK 表达增加的同时 Nrf2 的表达也上调, 并且提高了 Nrf2 下游一系列抗氧化酶的表达^[2]。

为验证 Nrf2 是否作为 JNK 的底物在调控衰老过程中发挥了重要作用, 设计了 L929 细胞的 Co-IP 实验。对照组和 Nrf2 组都可以检测到 Nrf2 蛋白, 对照组中可以检测到 JNK (4.6×10^4) 蛋白和 JNK (5.4×10^4) 蛋白, 而 Nrf2 组只能检测到 JNK (5.4×10^4) 蛋白。表明 JNK (5.4×10^4) 蛋白可以与 Nrf2 相互作用 (图 6)。

分别将 JNK1- $\beta 1$ (无 C-terminal tail) 质粒或 JNK1- $\beta 2$ 质粒 (含有 C-terminal tail) 与带有 Nrf2

响应原件 ARE-luciferase 的质粒共转染, 通过测定荧光值的变化, 测定 Nrf2 是否被激活。结果显示, Nrf2 组荧光值与对照组荧光值高, 并有显著差异; 共转染不带 C-terminal tail 的 JNK (4.6×10^4) + Nrf2 组与单独转染 Nrf2 荧光值无明显差异, 而共转染带 C-terminal tail 的 JNK (5.4×10^4) + Nrf2 组荧光值比单独转染 Nrf2 的荧光值高, 差异显著 (图 6)。以上结果提示, 含有 C-terminal tail 是 JNK (5.4×10^4) 激活 NRF2/ARE 信号通路重要分子机制。

4 讨论

衰老受分子信号通路和转录因子精密调控^[14-15], 大量研究表明, JNK 与衰老相关的转录因子结合激活相关经典信号通路从而达到调控衰老的作用。同时, JNK 蛋白是机体重要的氧化应激蛋白, 可识别的底物众多, 诸如 AP-1^[5]、FOXO^[8,16]、P53^[16]等。在线虫中, JNK 激活转录因子 FOXO, 减轻重金属的伤害和蛋白折叠胁迫, 延长寿命^[6-7]; 在果蝇中, JNK 通过与 IIS 信号通路拮抗通过调控转录因子 FOXO 的活性从而延长寿命^[8-11], 在轮虫中, JNK 与 TOR 信号通路相互作用, 延长轮虫的寿命^[17], 衰老的大鼠肝脏中, P38、JNK 蛋白磷酸化水平下调及 mTOR 信号通路的激活^[18], 但哺乳动物中 JNK 与何种底物相互作用参与调控衰老的机制仍不明确。本研究检测了不同月龄雄性小鼠肝脏中 JNK1

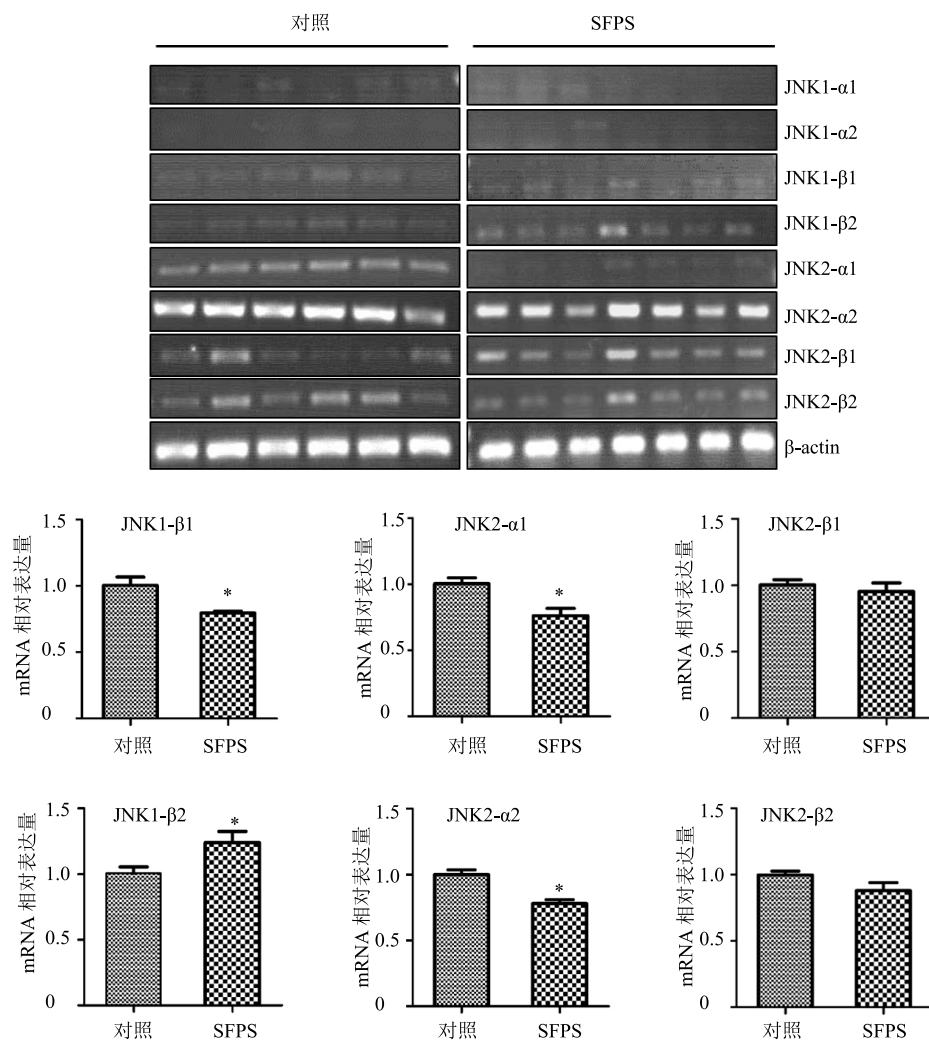


图 5 SFPS 对 20 月龄小鼠肝脏中 JNK1、JNK2 各异构体 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of SFPS on mRNA expression of JNK1 and JNK2 isoforms in liver of 20-month-old mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

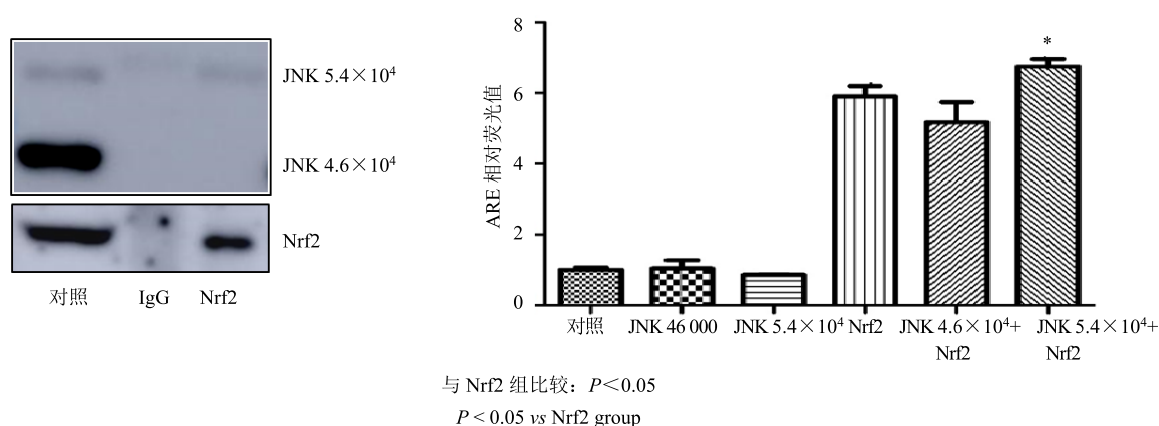


图 6 JNK 54 000 对 Nrf2/ARE 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of protein JNK 54 000 on Nrf2/ARE signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和 JNK2 的表达模式, 结果表明 JNK1 和 JNK2 的表达水平与衰老呈负相关。进一步利用特异引物区分 JNK 各异构体, 并检测小鼠衰老过程中 JNK1/2

异构体的表达。研究发现 JNK1-β2、JNK2-α1 和 JNK2-β2 与衰老进程负相关。SFPS 能显著提高小鼠的抗氧化能力并延缓衰老进程^[2]。其作用机制可能

是 SFPS 促进老年小鼠 JNK1- β 2 (5.4×10^4) 的表达, 而含有 C-terminal tail 的 JNK1- β 2 与 Nrf2 相互作用并激活 Nrf2/ARE 信号通路, 增强 Nrf2 下游相关抗氧化和解毒酶基因的表达, 进而提高机体整体的抗氧化能力, 最终延缓小鼠的衰老进程。

JNK 为 MAPK 蛋白激酶家族的一员, 可能同家族中其他蛋白 P38、ERK 也可以识别抗氧化调控因子 Nrf2 并激活 NRF2 使其入核, 激活 Nrf2/ARE 信号通路^[19-21]。本研究进一步揭示了 SFPS 通过激活 JNK/Nrf2/ARE 信号通路而发挥抗氧化和抗衰老的分子机制, 也首次证明了 C-terminal tail 是 JNK 与 Nrf2 相互作用并激活 Nrf2/ARE 信号通路的重要结构域。

基因的可变剪切可以产生一系列结构和功能差异的蛋白^[22-23], 如 P53 的不同可变剪切在调控小鼠衰老过程中功能不同^[24]。目前尚无证据直接表明 JNK 的可变剪切能造成 JNK 调控细胞功能上的差异^[13], 但 JNK 的不同异构体 JNK2 α , JNK2 β 与底物 c-Jun 及 ATF2 结合能力不同, 是因为异构体的差异区域造成底物结合能力的差异^[12]。本实验结果表明 JNK1- β 2、JNK2- α 1 和 JNK2- β 2 在衰老过程中发挥了更重要的作用, 可能是不同的 JNK 异构体与底物结合能力不同, 因此 JNK1- β 2、JNK2- α 1 和 JNK2- β 2 更容易与下游相关底物反应。此外, JNK1- β 2、JNK2- α 1 和 JNK2- β 2 因为 C-terminal tail 的剪切使得 JNK1- β 2、JNK2- β 2 翻译 54 000 蛋白, JNK2- α 1 翻译为 46 000 蛋白。C-terminal tail 可以影响 JNK 的 DGF motif、active loop、MAPK insert 等区域的活性^[13,25]。SFPS 促进 JNK1- β 2 的表达, JNK1- β 2 因差异区域和 C-terminal tail 的共同影响下与 Nrf2 的相互作用增强, 激活 Nrf2 并入核, 从而启动 Nrf2 下游相关抗氧化和解毒酶基因的表达, 进而提高机体整体的抗氧化能力, 最终延缓小鼠的衰老进程。

本实验中因为 JNK1、JNK2 的异构体的差异位置, 使得区分各个异构体的 PCR 产物约 500 bp 左右, 因此不同月龄小鼠中 JNK1、JNK2 异构体的表达模式不能利用 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 结果表明 SFPS 可以提高小鼠 JNK1、JNK2 总 mRNA 的表达, 而 RT-PCR 检测结果表明 SFPS 组小鼠 JNK1- β 2 的表达上调, JNK1- β 1、JNK2- α 1、JNK2- α 2 的表达下调, JNK2- β 1、JNK2- β 2 的表达无显著变化。JNK1、JNK2 的各个异构体的变化总和并不能与总 mRNA

的变化一致, 原因是不同的检测系统造成的检测上的差别, 区分各异构体的引物是利用不同 PCR 条件获得特异性结果, 这样可能使得不同异构体的 PCR 扩增效率不同。qRT-PCR 退火温度远低于 RT-PCR 中部分异构体的退火温度, 两者的扩增效率不同, 因而不能简单将各个异构体的表达变化简单加和后与 JNK1、JNK2 总 mRNA 的变化相比较。

目前仍有几个问题未得到解决: 首先, SFPS 是如何影响 JNK 的表达模式的前期研究表明, SFPS 直接影响肠道菌群结构^[26]和肠道菌群-宿主共代谢物, 推测可能是这些代谢物(如短链脂肪酸等)进入机体, 进而调控 JNK 的表达模式。其次, 实验中并未发现 JNK (4.6×10^4) 与 NRF2/ARE 信号通路的密切联系, 而给予 SFPS 的小鼠 JNK (4.6×10^4) 蛋白的表达增加, 可能 JNK (4.6×10^4) 与 JNK (5.4×10^4) 识别的底物不同, JNK (4.6×10^4) 可能与其他转录因子如 FOXO 等相互作用, 从而调控衰老或参与其他功能的调控, 这需要进行进一步的实验验证。

参考文献

- [1] Palanisamy S, Vinosha M, Marudhupandi T, et al. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, *in vitro* antioxidant and anticancer activity [J]. *Inter J Biol Macromol*, 2017, 102: 405-412.
- [2] Chen P, He D, Zhang Y, et al. *Sargassum fusiforme* polysaccharides activate antioxidant defense by promoting Nrf2-dependent cytoprotection and ameliorate stress insult during aging [J]. *Food Funct*, 2016, 7(11): 4576-4588.
- [3] 张亚, 赵子慧, 张旭, 等. 羊栖菜多糖促进生育相关基因表达提高果蝇生育力的研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(6): 925-931.
- [4] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 37-40.
- [5] Davis R J, Institute H H M. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell Press*, 2000, 103(2): 239-252.
- [6] Twumasi-Boateng K, Wang T W, Tsai L, et al. An age-dependent reversal in the protective capacities of JNK signaling shortens *Caenorhabditis elegans* lifespan [J]. *Aging Cell*, 2012, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00829.x.
- [7] Oh S W, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, et al. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead

- transcription factor/DAF-16 [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(12): 4494-4499.
- [8] Wang M C, Bohmann D, Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2003, doi: 10.1016/s1534-5807(03)00323-x.
- [9] Biteau B, Karpac J, Hwangbo D, *et al.* Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(5): 349-354.
- [10] Wang M C, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling [J]. *Cell*, 2005, 121(1): 115-125.
- [11] Hwangbo D S, Gershman B, Tu M P, *et al.* *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body [J]. *Nature*, 2004, 429(6991): 562-566.
- [12] Gupta S, Barrett T J, Whitmarsh A, *et al.* Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors [J]. *EMBO J*, 1996, 15(11): 2760-2770.
- [13] Park J Y, Yun Y, Chung K Y. Conformations of JNK3alpha splice variants analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry [J]. *J Struct Biol*, 2017, 197(3): 271-278.
- [14] Lopez-Otin C, Blasco M A, Partridge L, *et al.* The hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1194-217.
- [15] Kenyon C J. The genetics of ageing [J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 504-512.
- [16] Bogoyevitch M A, Kobe B. Uses for JNK: The many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(4): 1061-1095.
- [17] Snell T W, Johnston R K, Rabeneck B, *et al.* Joint inhibition of TOR and JNK pathways interacts to extend the lifespan of *Brachionus manjavacas* (Rotifera) [J]. *Exper Gerontol*, 2014, doi: 10.1016/j.exger.2014.01.022.
- [18] Yang W, Burkhardt B, Fischer L, *et al.* Age-dependent changes of the antioxidant system in rat livers are accompanied by altered MAPK activation and a decline in motor signaling [J]. *Excli J*, 2015, 14: 1273-1290.
- [19] Meng X, Sun G, Ye J, *et al.* Notoginsenoside R1-mediated neuroprotection involves estrogen receptor-dependent crosstalk between Akt and ERK1/2 pathways: A novel mechanism of Nrf2/ARE signaling activation [J]. *Free Radical Res*, 2014, 48(4): 445-460.
- [20] Huang H C, Nguyen T, Pickett C B. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2 [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(23): 12475-12480.
- [21] Xu C, Yuan X, Pan Z, *et al.* Mechanism of action of isothiocyanates: The induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(8): 1918-1926.
- [22] Beenstock J, Ben-Yehuda S, Melamed D, *et al.* The p38beta mitogen-activated protein kinase possesses an intrinsic autophosphorylation activity, generated by a short region composed of the alpha-G helix and MAPK insert [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(34): 23546-23556.
- [23] Daguene E, Dujardin G, Valcarcel J. The pathogenicity of splicing defects: Mechanistic insights into pre-mRNA processing inform novel therapeutic approaches [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(12): 1640-1655.
- [24] Deschenes M. The emerging role of alternative splicing in senescence and aging [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(5): 918-933.
- [25] Nguyen T, Ruan Z, Oruganty K, *et al.* Co-conserved MAPK features couple D-domain docking groove to distal allosteric sites via the C-terminal flanking tail [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119636.
- [26] Chen P, Yang S, Hu C, *et al.* *Sargassum fusiforme* polysaccharide rejuvenates the small intestine in mice through altering its physiology and gut microbiota composition [J]. *Curr Mor Med*, 2017, 17(5): 350-358.