

# 基于秀丽隐杆线虫模型探讨白芥子水提物 抗氧化作用及机制

施 滢<sup>1</sup>, 王 平<sup>2</sup>, 代君怡<sup>1</sup>, 尹 灿<sup>1,3</sup>, 刘军锋<sup>1,3</sup>, 咎俊峰<sup>1\*</sup>

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学老年医学研究所, 武汉 430065;  
3. 湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065)

**摘 要:** **目的** 研究白芥子水提物抗氧化活性, 探讨其抗氧化的相关机制。 **方法** 采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基、羟基自由基、铁离子还原能力 3 种方法对其体外抗氧化活性进行评价。采用秀丽隐杆线虫野生型 N2 线虫观察白芥子水提物对线虫寿命、运动能力、生殖能力的影响; 通过氧化应激、热应激、脂褐素和活性氧(reactive oxygen species, ROS)评估其对线虫抗氧化能力的影响。采用实时荧光定量技术测定白芥子水提物作用下线虫抗氧化、胰岛素信号途径相关基因表达情况。 **结果** 白芥子水提物具有一定的 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力。通过氧化应激筛选出最佳给药质量浓度为 10 mg/mL, 且该给药质量浓度对线虫的运动能力和生殖能力无影响( $P>0.05$ ), 并能够显著延长线虫的平均寿命和中位寿命( $P<0.01$ ); 10 mg/mL 给药组显著提高线虫抗热应激能力, 降低脂褐素积累和 ROS 水平; 同时上调 *daf-16*、*sod-3*、*clt-2*、*skn-1* 的 mRNA 表达量, 下调 *daf-2* 的 mRNA 的表达量。 **结论** 白芥子具有良好的体内外抗氧化能力, 可能与调控胰岛素/胰岛素样生长因子(insulinlike growth factor, IGF)-1 信号(insulin/IGF-1 signaling, IIS)通路上的基因表达有关。

**关键词:** 白芥子; 抗氧化; 作用机制; 氧化应激

## Study on antioxidative effect and mechanism of water extracts of white mustard seed based on *Caenorhabditis elegans* model

SHI Ying<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>2</sup>, DAI Jun-Yi<sup>1</sup>, YIN Can<sup>1,3</sup>, LIU Jun-Feng<sup>1,3</sup>, ZAN Jun-Feng<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3. Key Laboratory of Ministry of Education on Tradition Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the antioxidant activity of the water extract of white mustard seed and explore its antioxidant mechanism. **Methods** The antioxidant activity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, hydroxyl radical and iron ion reducing ability *in vitro* was evaluated. The wild-type N2 nematode of *Caenorhabditis elegans* was used to observe the effect of the water extracts of white mustard seed on the life span, locomotor ability and reproductive ability of the nematode. The effects on the antioxidant capacity of nematodes were assessed by

基金项目: 湖北省教育厅青年基金项目(Q20142006)

Fund: Supported by the Youth Fund Project of Education Department of Hubei Province (Q20142006)

\*通信作者: 咎俊峰, 博士, 副教授, 主要研究方向为中药及其复方物质基础研究。E-mail: 914120885@qq.com

\*Corresponding author: ZAN Jun-Feng, Ph.D, Associate Professor, School of Pharmaceutical Science, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China. E-mail: 914120885@qq.com

oxidative stress, heat stress, lipofuscin and reactive oxygen species (ROS). The expression levels of genes related to antioxidant and insulin signaling pathways in *Caenorhabditis elegans* induced by the water extracts of white mustard seed were determined by real-time fluorescence quantitative analysis. **Results** The water extracts of white mustard seed had certain DPPH free radical and hydroxyl radical scavenging activities. The optimal concentration of 10 mg/mL was screened out by oxidative stress and it had no effect on the locomotor ability and reproductive ability of *Caenorhabditis elegans* ( $P>0.05$ ) and could significantly prolong the average and median life span of *Caenorhabditis elegans* ( $P<0.01$ ). The 10 mg/mL treatment group significantly improved the heat stress resistance of *Caenorhabditis elegans* and reduced the accumulation of lipofuscin and ROS level. At the same time, the mRNA expression levels of *daf-16*, *sod-3*, *clt-2* and *skn-1* were increased, and the mRNA expression level of *daf-2* was decreased. **Conclusion** Mustard seed has good antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*, which may be related to the expression of genes regulating insulin like growth factor (IGF)-1 signaling (IIS) pathway.

**KEY WORDS:** white mustard seed; antioxidant; mechanism; oxidative stress

## 0 引言

芥子为十字花科植物白芥 *Sinapis alba* L. 或芥 *Brassica juncea* (L.) Czern et Coss 的干燥成熟种子, 前者习称“白芥子”, 后者习称“黄芥子”<sup>[1]</sup>。白芥子味辛性温, 归肺、胃经, 具有温肺化痰、通络止痛之功效, 可用于治疗寒痰喘咳、关节肿痛等, 在《中国药典》中与黄芥子一起作为芥子入药<sup>[2]</sup>。

白芥子在中医临床上常被用于化痰止咳, 在食品工业中也可以作为调味品食用。芥末是由白芥子碾磨成的一种粉状调味品, 在商周时就开始在宫廷食用<sup>[3-5]</sup>, 还有人以白菜和白芥子为主原料开发白芥子味泡菜<sup>[6]</sup>。白芥子含有芥子油苷、芥子碱、芥子酶、脂肪酸等成分, 因此也有人将白芥子油应用在化妆品行业<sup>[7]</sup>。白芥子的脂肪酸含量为 25%~30%, 常被用于生产柴油燃料<sup>[8]</sup>、润滑剂<sup>[9]</sup>、调味品<sup>[10]</sup>、精油<sup>[11]</sup>等。由于白芥子油的需求增加, 白芥子渣的生产量正在积累, 虽然一些被用来作为动物饲料, 但也会造成一定的存储问题。人们对寻找合理利用副产品的方法较为关注, 例如提取高质量的蛋白质<sup>[12]</sup>和具有高价值的天然抗氧化剂<sup>[13]</sup>等。BOSCARO 等<sup>[14]</sup>对白芥子的提取物进行了研究, 发现白芥子提取物具有抗增殖、促凋亡、抗氧化和抗菌作用。此外, 芥子碱可降低氧化应激水平, 有效抑制心脏再灌注过程中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生<sup>[15]</sup>。芥子酸具有保护 PC12 细胞、拮抗  $A\beta_{1-42}$  诱导 PC12 细胞损伤作用<sup>[16]</sup>。抗氧化被认为是延缓衰老的一个重要方式, 目前白芥子的抗氧化研究大多集中在体外抗氧化方向, 对于其在延缓衰老以及抗氧化机制研究方面鲜有报道, 亟待进一步深入的研究与探索。

油菜籽和芥菜籽的内源芥子酸、芥子碱、葡萄糖和卡诺醇是各种含脂体系中的有效抗氧化剂, 菜籽粕和原油中的各种酚类生物活性成分也具有抗氧化性能<sup>[17]</sup>。为了验证白芥子加工副产品是否同样具有较好的生物活性, 从而扩

大对白芥子的应用范围, 本研究选用秀丽隐杆线虫作为动物模型, 探究白芥子加工副产品的体内外抗氧化作用。秀丽隐杆线虫作为一种模式生物, 其结构简单、生命周期短、与人类基因保守性较高, 在抗氧化和延缓衰老研究领域具有一定优势<sup>[18]</sup>。本研究应用除酯后的白芥子水提物喂食 N2 野生型秀丽隐杆线虫, 通过其对寿命实验、应激实验、体内 ROS 水平等方面进行研究, 探究白芥子水提物在其体内的抗氧化作用及其机制, 以期对白芥子加工副产品的利用提供参考, 为开发抗氧化、抗衰老的药品和功能性食品提供重要的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

白芥子(批号: 1809033, 安徽毫药千草国药股份有限公司), 经湖北中医药大学陈林霖研究员鉴定为十字花科植物白芥的干燥成熟种子; 大肠杆菌(*E. coli* OP50)、野生型 N2 线虫购于美国明尼苏达大学线虫库(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)。

胰蛋白胨(英国 OXOID 公司); 琼脂粉(日本株式会社公司); 百草枯(纯度 98%)、一水合柠檬酸钾(分析纯)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)[纯度>97.0%, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司]; 活性氧检测试剂盒[内含 2',7'-二乙酸二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA), 上海碧云天生物科技有限公司]; 氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫酸镁、一水合柠檬酸、氯化钙、叠氮化钠、无水乙醇、石油醚(60~90℃)、水杨酸、硫酸亚铁、过氧化氢、三氯乙酸、铁氰化钾、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司);

XTL-2B 体视显微镜(重庆光电仪器有限公司); DSX-24L 立式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂); SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); IX51 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Microfuge 22R 冷冻离心机(韩国 Reckman 公司); FDU-1110 冷冻干燥机(EYEL4 日本东京理化公司); SpectraMax M5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); MD-803 研磨机(华申电器制造有限公司); JE-1002 百分之一电子天平(上海浦春计量仪器有限公司); PURELABUltra 超纯水机(英国 ELGA 公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 白芥子水提物的制备

将白芥子粉碎后, 使用石油醚脱脂, 获得脱脂芥子粉。称取 50 g 脱脂芥子粉, 加入 8 倍量的水回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液, 冷冻干燥得白芥子水提物。

#### 1.3.2 体外抗氧化活性测定

##### (1) DPPH 自由基清除活性

参考文献[19]测定方法并略作改动, 用无水乙醇配制 DPPH 反应溶液(0.02 mol/L, 超声 30 min, 现配现用)。取 96 孔板, 每孔中加入 100  $\mu$ L 样品和 100  $\mu$ L DPPH 反应液, 混匀后室温避光反应 30 min, 用酶标仪在 517 nm 处测定光密度(optical density, OD)值( $A_2$ ), 其中无水乙醇与 DPPH 反应液混匀的 OD 值为样品对照( $A_0$ ), 无水乙醇代替 DPPH 反应液的 OD 值为空白( $A_1$ )。以维生素 C (vitamin C, VC)作为阳性对照组。每个样品 3 个平行组, 取平均值。按公式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

##### (2) 羟基自由基清除活性

参考文献[20]测定方法。

##### (3) 还原力测定

参考文献[21]测定方法。

#### 1.3.3 线虫培养与同期化

线虫的培养使用 NGM 培养基, 以 OP50 大肠杆菌作为线虫食物, 于 20°C 恒温恒湿培养箱中培养。

采用高氯酸钠漂白法将线虫进行同期化处理<sup>[7]</sup>: 用 1 mL M9 缓冲溶液将产卵期线虫洗至无菌 EP 管中, 加 1 mL 裂解液裂解线虫, 反复振荡, 置低速离心机上 5500 r/min 离心 1 min, 弃上清, 再用 S-Medium 缓冲液冲洗线虫 2 次, 离心弃上清后用移液枪吸取 EP 管底部线虫滴于线虫生长 NGM 培养基的无菌区, 约 48 h 后裂解的线虫体内的受精卵基本发育成 L4 期幼虫, 完成同期化操作。

#### 1.3.4 秀丽隐杆线虫应激实验

##### (1) 百草枯氧化应激实验

同期化后的线虫生长到 L4 期后, 使用 50 mmol/L 百

草枯溶液致线虫急剧死亡而建立氧化损伤模型, 百草枯加入时记为 0 h, 每隔 12 h 观察线虫存活状态, 直至线虫全部死亡, 实验重复 3 次。

##### (2) 热应激实验

按照文献方法[22]并略作改动, 将同步化成虫转到白芥子水提物 10 mg/mL 组和含 0.5% DMSO 空白 NGM 培养基中, 每组各 40 条, 20°C 培养 3 d, 转移到 35°C 培养箱中培养 2 h 后, 转移到 20°C 培养箱中培养, 每天统计各自死亡数目, 直至线虫全部死亡, 绘制生存曲线。

#### 1.3.5 秀丽隐杆线虫寿命、运动能力和生殖能力检测实验

##### 寿命实验: 将同步化至 L4 期线虫转入白芥子水提物

10 mg/mL 和含 0.5% DMSO 空白 NGM 培养基中各 40 条, 每天更换新板(防止线虫产卵影响实验结果), 统计死亡条数, 直至线虫全部死亡。

##### 运动能力和生殖能力实验: 将同步化至 L4 期线虫分

别置于白芥子水提物 10 mg/mL 组和含 0.5% DMSO 空白组中, 每个培养基中 1 条, 每组 10 条, 观察线虫每天产卵数目(给药后第 1 d 至第 5 d)、虫体摆动次数(给药后第 3、5、7、9 d), 上述实验均重复 3 次。

#### 1.3.6 脂褐素荧光检测

将同步化至 L4 期线虫分别置于白芥子水提物 10 mg/mL 组和含 0.5% DMSO 空白组中, 20°C 培养 10 d, 随机挑取 10 条线虫, 于荧光显微镜下观察, 拍照, 并用 Image J 统计分析荧光强度。

#### 1.3.7 秀丽隐杆线虫体内 ROS 含量测定

将同步化至 L4 期线虫分别置于白芥子水提物 10 mg/mL 组和含 0.5% DMSO 空白组中, 20°C 培养 4 d, 用 S-Medium 缓冲液冲洗 3 次后, 加入 50  $\mu$ mol/L DCFH-DA 1 mL, 20°C 孵育 2 h。用 S-Medium 缓冲液清洗 3 次, 加入 0.5  $\mu$ mol/L 叠氮化钠麻醉。在荧光倒置显微镜下观察每只线虫体内荧光情况, 拍照保存, 并用 Image J 统计分析荧光强度。每组约 10 条线虫。

#### 1.3.8 荧光定量聚合酶链式反应检测

将同步化至 L4 期线虫分别置于白芥子水提物 10 mg/mL 组和含 0.5% DMSO 空白组中, 20°C 培养 4 d, 收集虫体于离心管中, 磷酸盐缓冲液清洗 3 次。Trizol 法提取线虫的总 RNA, 用 SYBR Green 为 DNA 荧光染料, 实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)测定, 以 *actin-1* 为内参测定 *daf-16* 及其下游靶基因的表达量, 基因表达以 PCR 的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示。引物设计如表 1。

#### 1.3.9 数据统计与分析

所有实验均至少重复 3 次, 结果以平均数 $\pm$ 标准差表示, 并通过 SPSS 25.0 软件采用单因素方差分析法进行显著性分析,  $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为极显著差异。其中, 生存曲线使用 GraphPad Prism 软件进行 log-rank 检验分析显著性。

表 1 秀丽隐杆线虫抗氧化基因实时定量 PCR 引物  
Table 1 Real time quantitative PCR primers for antioxidant genes of *Caenorhabditis elegans*

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>daf-2</i>	CGTCAATCGTCACCGT TTATCTC	GTTATTGGCAATTGA CACAGTTCC
<i>daf-16</i>	AAAGACAACGACCAG ACGGAAC	ACTGTTTGAATCTCC CTTATCCC
<i>skn-1</i>	ATACTCACCGAGCATC CACCA	TTCTCCATAGCACAT CAATCAAGTC
<i>sod-3</i>	AACTTGGCTAAGGATG GTGGAG	CCTTGAACCGCAAT AGTGATG
<i>clt-2</i>	TCCATACCCAGAAGCG TAATCC	TCACATAGATAGCCT TTCCGTCC
<i>actin-1</i>	GAACGCCTACGATCTT CTCCAC	TATCTGCACTCCTTT CCGTCTC

## 2 结果与分析

### 2.1 体外抗氧化活性测试结果

#### 2.1.1 白芥子水提取物对 DPPH 自由基清除能力的影响

白芥子水提取物对 DPPH 自由基的清除率与浓度呈显著正相关。半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )的数值可衡量被测抗氧化剂的半抑制浓度,  $IC_{50}$  值越小, 表明抗氧化活性越强。由图 1 可知, 随着白芥子水提取物浓度的增加, 对 DPPH 自由基的清除率也逐渐增大, 呈现明显的剂量依赖性, 在 0.08~1.28 mg/mL 范围内, 白芥子水提取物对 DPPH 自由基的清除率从 28.01%增长到 80.07%, 其  $IC_{50}$  为 280  $\mu$ g/mL。而 VC 的清除能力较强, VC 的  $IC_{50}$  为 3.34  $\mu$ g/mL。研究结果显示白芥子水提取物对 DPPH 自由基具有一定的清除率。

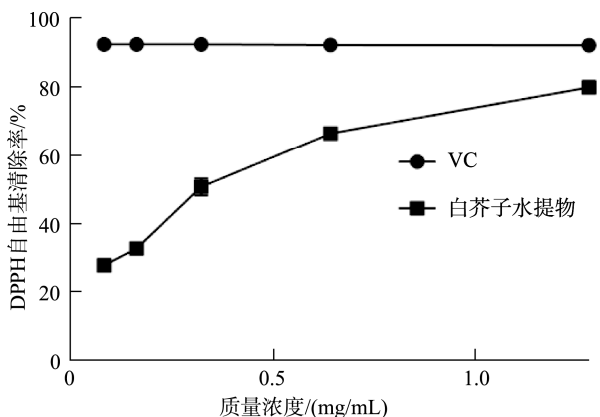


图 1 白芥子水提取物对 DPPH 自由基的清除能力的影响( $n=3$ )  
Fig.1 Effects of water extract from white mustard seed on DPPH radical scavenging activity ( $n=3$ )

#### 2.1.2 白芥子水提取物对羟基自由基清除活性的影响

白芥子水提取物和 VC 对羟基自由基的清除率与浓度呈

显著正相关, 白芥子水提取物与 VC 的  $IC_{50}$  值分别为 8.77 与 35.03  $\mu$ g/mL。由图 2 可知, 随着白芥子水提取物浓度的增加, 对羟基自由基的清除率也逐渐增大, 呈现明显的剂量依赖性。在 0.0625~0.2500 mg/mL 浓度范围内, 白芥子水提取物对羟基自由基的清除率与 VC 相当( $P>0.05$ )。说明白芥子水提取物对羟基自由基具有一定的清除能力。

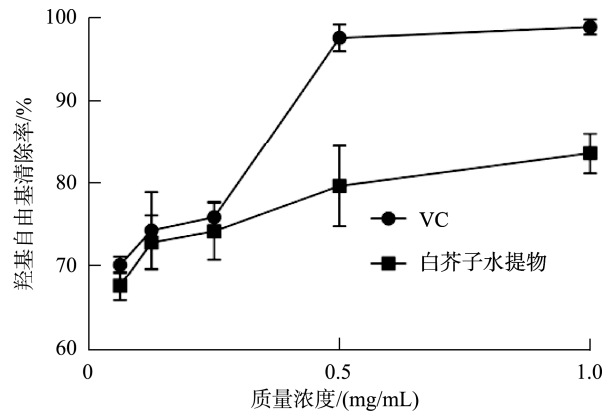


图 2 白芥子水提取物对羟基自由基的清除能力的影响( $n=3$ )  
Fig.2 Effects of water extract from white mustard seed on hydroxyl radical scavenging ability ( $n=3$ )

#### 2.1.3 白芥子水提取物总还原力测定结果

本研究通过在 700 nm 波长下测定吸光度来检验还原性物质的总还原能力, 吸光度值越大, 表示样品的还原能力越强。白芥子水提取物和 VC 对总还原能力与浓度呈正相关。由图 3 可知, 质量浓度为 0.5~2.5 mg/mL 时, 白芥子水提取物和 VC 的还原能力随着其相应质量浓度的增加而逐渐增大, 但白芥子水提取物的还原活性远远低于 VC ( $P<0.01$ ), 说明白芥子水提取物中还原性物质活性较弱。

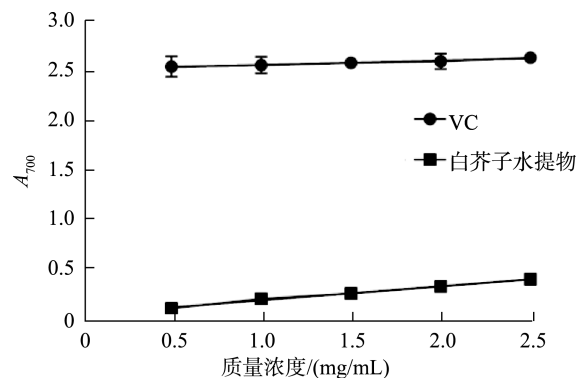


图 3 白芥子水提取物对总还原能力的影响( $n=3$ )  
Fig.3 Effects of water extract of white mustard seed on total reducing capacity ( $n=3$ )

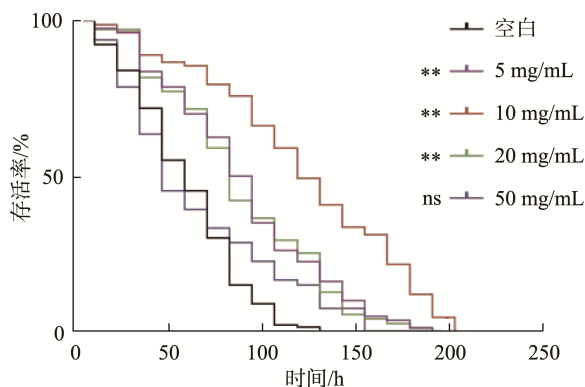
## 2.2 秀丽隐杆线虫应激实验结果

在百草枯急性氧化胁迫下, 如图 4 所示, 与空白组相比, 在给药质量浓度为 5、10、20 mg/mL 时, 都促进了线虫生存曲线显著右移( $P<0.01$ ), 最大延寿率分别增加了

45.45%、54.55%、45.45%。表明在 5~20 mg/mL 的给药范围内具有明显的延寿效果, 从而说明白芥子水提物具有提高线虫的抗氧化应激的潜力。与空白组相比, 当给药质量浓度达到 50 mg/mL 时, 对线虫的存活率无显著差异 ( $P>0.05$ ), 且在 0~70 h 之间与空白组相比存活率较低, 故最大给药质量浓度不得高于 50 mg/mL。

通过使用 GraphPad Prism 软件进行 log-rank 检验分析, 与给药质量浓度为 5、20 mg/mL 时相比, 当给药质量浓度为 10 mg/mL 时线虫生存曲线显著右移 ( $P<0.01$ ), 表明在 10 mg/mL 给药质量浓度时线虫对百草枯引起的氧化应激的抵抗能力最佳, 因此选择 10 mg/mL 给药质量浓度进行后续实验。

高温会导致机体内部代谢紊乱、酶失活等, 使得机体内部产生大量的 ROS, 引起氧化应激。由图 5 可知, 与空白组相比, 给药组生存曲线右移, 说明给药组能显著增强线虫的耐热能力 ( $P<0.05$ )。



注: 与空白组相比, \*\* $P<0.01$  有极显著性差异, ns  $P>0.05$  无显著性差异。

图 4 百草枯诱导的氧化胁迫下野生型 N2 的存活曲线 ( $n=3$ )  
Fig.4 Survival curves of wild type N2 under oxidative stress induced by paraquat ( $n=3$ )

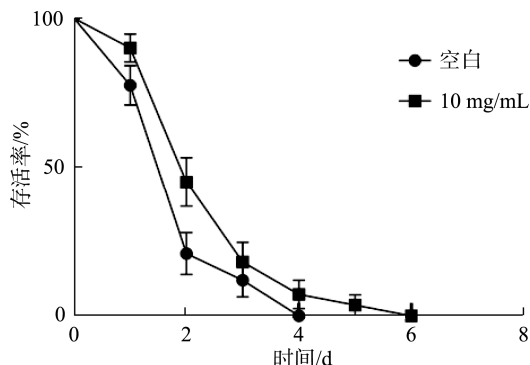


图 5 热应激胁迫下野生型 N2 的存活曲线 ( $n=3$ )  
Fig.5 Survival curves of wild type N2 under heat stress ( $n=3$ )

### 2.3 秀丽隐杆线虫寿命实验结果

野生型线虫的寿命约为 2~3 周, 由图 6 可知, 经对数秩检验(Log-rank)分析可知空白组与实验组线虫寿命存活

曲线差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 说明实验组对线虫的寿命延长有促进作用。由表 2 可知, 与空白组相比, 秀丽隐杆线虫的平均寿命、中位寿命都得到极显著延长 ( $P<0.01$ ), 平均寿命增加了 16.13%, 中位寿命增加了 30.77%, 最大寿命增加了 15.90%, 说明白芥子水提物能明显延长线虫的寿命。

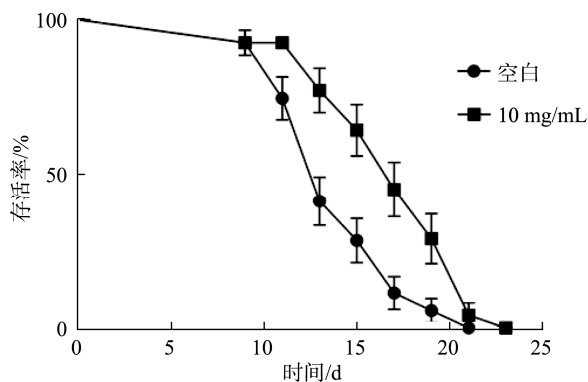


图 6 标准条件下野生型 N2 的存活曲线 ( $n=3$ )  
Fig.6 Survival curves of wild type N2 under standard conditions ( $n=3$ )

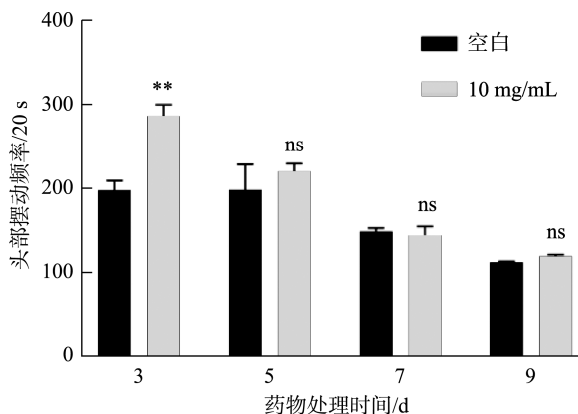
表 2 线虫存活时间统计分析 ( $n=3$ )  
Table 2 Statistical analysis of survival time of nematodes ( $n=3$ )

组别	平均寿命/d	中位寿命/d	最大寿命/d
空白	14.20±0.34	13.00±0.00	21.00±0.00
10 mg/mL	16.49±0.31**	17.00±0.00**	24.33±2.31

注: 与空白组相比, \* $P<0.05$  有显著性差异, \*\* $P<0.01$  有极显著性差异。

### 2.4 秀丽隐杆线虫运动能力和生殖能力测定结果

由图 7 可知, 随着处理时间的增加, 线虫的头部摆动次数逐渐减少, 说明在线虫衰老过程中, 其运动能力逐渐



注: 与空白组相比, \*\* $P<0.01$  有极显著性差异, ns  $P>0.05$  无显著性差异, 下同。

图 7 对线虫头部摆动的影响 ( $n=3$ )

Fig.7 Effects on head swing of nematodes ( $n=3$ )

下降。与空白组相比,实验组线虫在第 3 d 的头部摆动次数有明显提高,具有极显著差异( $P<0.01$ ),但在第 3 d 之后线虫头部摆动次数没有显著差异( $P>0.05$ ),说明白芥子水提物在提高线虫寿命的前提下,没有对线虫的运动行为能力造成不利影响,并且在生命前期还具有一定促进作用。

为了探究白芥子水提物延缓寿命是否以降低或丧失生殖能力为代价,考察了白芥子水提物对线虫生殖能力的影响。与空白组总后代数( $135.00\pm 43.59$ )相比,给药组线虫的总后代数( $137.67\pm 10.02$ )并无显著性差异( $P>0.05$ ),因此白芥子水提物不会损害线虫的生殖能力。

## 2.5 脂褐素测定结果

脂褐素是溶酶体降解后剩余的物质,具有荧光自发特性,是被广泛认可的衰老标志物<sup>[23]</sup>。由图 8 可知,与空白组平均荧光强度( $5.780\pm 2.449$ )相比,实验组线虫体内脂褐素荧光强度( $2.647\pm 1.013$ )显著降低( $P<0.01$ ),缓解了线虫与年龄相关的身体衰退特征。

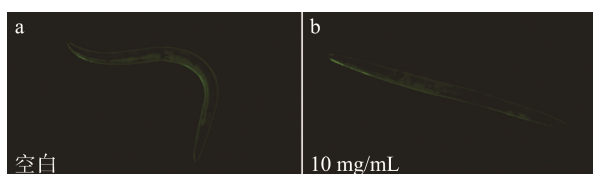


图 8 脂褐素积累的测定  
Fig.8 Determination of lipofuscin accumulation

## 2.6 ROS 水平测定结果

随着机体逐渐衰老,其调节能力下降,ROS 出现异常积累,导致氧化应激,损害细胞结构和功能的完整性,破坏机体氧化还原的平衡,进而细胞代谢减慢,影响正常寿命<sup>[24]</sup>。由图 9 可知,与空白组平均荧光强度( $1.377\pm 0.091$ )相比,实验组线虫体内 ROS 水平( $1.293\pm 0.069$ )显著降低( $P<0.05$ )。表明白芥子水提物可以有效降低线虫内源性 ROS 水平,可能与其增强抗氧化应激能力有关。

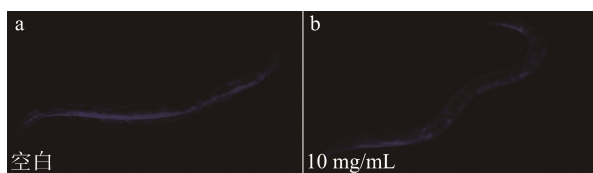
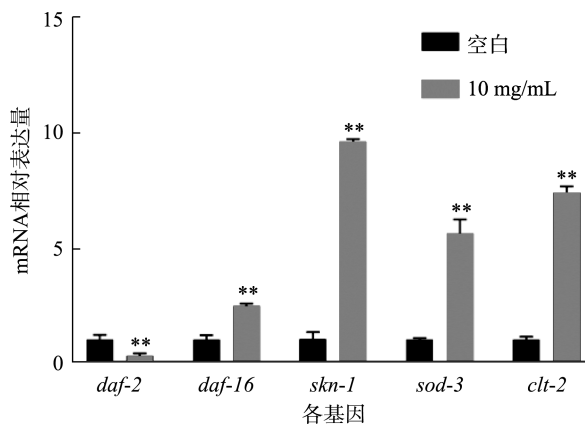


图 9 ROS 水平测定  
Fig.9 Determination of ROS levels

## 2.7 荧光定量 PCR 检测

由图 10 可知,经白芥子水提物干扰后,线虫体内 *daf-2* mRNA 相对表达量显著下调,*daf-16*、*skn-1*、*sod-3* 和 *clt-2* mRNA 表达量极显著上调( $P<0.01$ )。*sod-3* 和 *clt-2* 作

为 *daf-16* 的下游基因,可以清除细胞内多余超氧阴离子,从而共同保护机体免受氧化损伤。而 *skn-1* 是胰岛素信号通路下游重要转录因子,主要通过增加应激胁迫靶基因的表达来延长线虫寿命,因此推测白芥子水提物通过胰岛素信号通路提高线虫的应激能力来发挥延缓衰老的作用。这与王力等<sup>[25]</sup>研究发现牡蛎多肽组分 OE-I 通过调控胰岛素信号通路和氧化应激调控因子 *skn-1*、*sod-3* 表达来延长线虫寿命的结果一致,证实了 *daf-16* 在调节线虫寿命和抗氧化能力方面的重要性。



注:与空白组相比,\*\* $P<0.01$ 有极显著性差异。

图 10 实时荧光定量 PCR 结果检测( $n=3$ )

Fig.10 Detection of real-time fluorescence quantitative PCR results ( $n=3$ )

## 3 结论

目前,关于衰老的机制主要有自由基氧化应激学说、DNA 损伤学说、端粒学说、细胞凋亡学说等<sup>[26]</sup>。自由基衰老学说认为自由基过度积累导致 DNA 损伤或蛋白质等大分子氧化损伤是导致衰老的重要原因,所以抗氧化被认为是实现延缓衰老的重要方法<sup>[27-29]</sup>。

本研究采用了 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率以及铁离子还原能力对白芥子水提物进行了体外抗氧化能力的研究。研究发现白芥子水提物对 DPPH 自由基和羟基自由基具有良好的清除活性,表明白芥子水提物中具有清除羟基自由基和 DPPH 自由基的物质。基于上述体外抗氧化研究结果,选用秀丽隐杆线虫模型对白芥子水提物进行了体内抗氧化研究,以便更好地探究白芥子的抗氧化机制。

寿命的延长与提高压力应激具有很强的关联性<sup>[30]</sup>,因此通过百草枯、热应激实验考察线虫对急性氧化损伤的抵抗能力。实验发现质量浓度为 10 mg/mL 的白芥子水提物对百草枯的抗氧化损伤效果最好,并且该浓度下能够延长线虫的寿命,提高线虫抵抗高温应激的能力,减少脂褐素和 ROS 的积累。实验结果说明白芥子不仅延长线虫寿命,更进一步地改善了健康参数。胰岛素/胰岛素样生长因子-1

信号通路, 目前已经在酵母<sup>[31]</sup>、秀丽隐杆线虫<sup>[32]</sup>、果蝇<sup>[33]</sup>、小鼠<sup>[34]</sup>等动物模型中进行过与衰老相关的研究, 并且该信号通路还与胁迫抗性和热量限制等多条信号有着密切关系。实验结果表明白芥子可通过胰岛素/IGF 信号通路, 促进 *daf-16* 的核定位, 提高机体的应激能力来延长线虫寿命。

本研究表明白芥子水提物具有良好的抗氧化及抗衰老等作用, 为白芥子应用于药品和食品开发提供了依据。未来可以考虑将白芥子作为天然食品抗氧化剂加以开发利用, 也可以开发抗氧化、抗衰老的药品和功能性食品。然而白芥子中具体发挥作用的活性成分, 及其抗氧化作用靶点和详细分子机制还需进一步深入探讨。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.  
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: A. 2020 Edition [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2020.
- [2] 孙银芳. 中药白芥子最新研究进展[J]. 新中医, 2015, 47(10): 209–211.  
SUN YF. The latest research progress of Chinese herb *Mustardia chinensis* [J]. New Chin Med, 2015, 47(10): 209–211.
- [3] 王延群. 温中散寒用芥末[J]. 家庭医学(下半月), 2018, (10): 39.  
WANG YQ. Mustard is used to dissipate cold and warm [J]. Fam Med, 2018, (10): 39.
- [4] 张健. 药食兼用调味品—芥末[J]. 现代养生, 2010, (6): 20.  
ZHANG J. Mustard is used as a condiment for both medicine and food [J]. Mod Health, 2010, (6): 20.
- [5] 黄怀庆. 芥末传奇[J]. 食品与健康, 2006, (8): 17.  
HUANG HQ. Legends of mustard [J]. Food Health, 2006, (8): 17.
- [6] 朱博, 孙睿, 艾麦提·巴热提. 白芥子味泡菜加工工艺研究[J]. 现代食品, 2017, (18): 96–98.  
ZHU B, SUN R, AIMAITI-BRT. Study on processing technology of white mustard seed pickle [J]. Mod Food, 2017, (18): 96–98.
- [7] 周小燕. 一种含有白芥子油的化妆品: 中国, CN201610332432.1[P]. 2016-08-03.  
ZHOU XY. A cosmetic product containing white mustard oil: China, CN201610332432.1 [P]. 2016-08-03.
- [8] CHEN J, BIAN X, RAPP G, et al. From ethyl biodiesel to biolubricants: Options for an Indian mustard integrated biorefinery toward a green and circular economy [J]. Ind Crop Prod, 2019, 137: 597–614.
- [9] KULKARNI RD, DESHPANDE PS, MAHAJAN SU, et al. Epoxidation of mustard oil and ring opening with 2-ethylhexanol for biolubricants with enhanced thermo-oxidative and cold flow characteristics [J]. Ind Crop Prod, 2013, 49: 586–592.
- [10] MERAH O. Genetic variability in glucosinolates in seed of *Brassica juncea*: Interest in mustard condiment [J]. J Chem, 2015, 2015: 1–6.
- [11] PENG C, ZHAO SQ, ZHANG J, et al. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation [J]. Food Chem, 2014, 165: 560–568.
- [12] CAMPBELL L, REMPEL CB, WANASUNDARA JPD. Canola/rapeseed protein: Future opportunities and directions—Workshop proceedings of IRC 2015 [J]. Plants (Basel), 2016, 5(2): 17.
- [13] YATES K, POHL F, BUSCH M, et al. Determination of sinapine in rapeseed pomace extract: Its antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties [J]. Food Chem, 2019, 276: 768–775.
- [14] BOSCARO V, BOFFA L, BINELLO A, et al. Antiproliferative, proapoptotic, antioxidant and antimicrobial effects of *Sinapis nigra* L. and *Sinapis alba* L. extracts [J]. Molecules, 2018, 23(11): 3004.
- [15] BOULGHOBRA D, GRILLET PE, LAGUERRE M, et al. Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes [J]. Redox Biol, 2020, 34: 101554.
- [16] 薛迪, 刘宇超, 汪娜, 等. 芥子酸对  $A\beta_{1-42}$  致 PC12 细胞损伤的改善作用及对 BDNF/TrkB/ERK 信号通路的影响[J]. 中国药房, 2021, 32(10): 1181–1186.  
XUE D, LIU YC, WANG N, et al. Effect of sinapic acid on improving PC12 cell damage induced by  $A\beta_{1-42}$  and BDNF/TrkB/ERK signaling pathway [J]. China Pharm, 2021, 32(10): 1181–1186.
- [17] MAYENGBAM S, AACHARY A, THIYAM HU. Endogenous phenolics in hulls and cotyledons of mustard and canola: A comparative study on its sinapates and antioxidant capacity [J]. Antioxidants (Basel), 2014, 3(3): 544–558.
- [18] 黄少杰, 陈宏著, 钟淳菲, 等. 铁皮石斛叶多糖对秀丽隐杆线虫体内抗衰老作用[J/OL]. 食品科学: 1-9. [2022-11-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220310.1530.024.html>  
HUANG SJ, CHEN HZ, ZHONG CF, et al. Effects of *Dendrobium officinale* leaf polysaccharide on anti-aging in *Caenorhabditis elegans* [J/OL]. Food Sci: 1-9. [2022-11-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220310.1530.024.html>
- [19] 刘星雨, 曹素芳, 朱秋轶, 等. 牛乳源促睡眠肽的体外抗氧化活性评价及对秀丽隐杆线虫的体内抗氧化作用[J]. 食品科学, 2022, 43(5): 151–157.  
LIU XY, CAO SF, ZHU QY, et al. Evaluation of antioxidant activity of sleep-inducing peptide derived from cow milk *in vitro* and its antioxidant effect on *Caenorhabditis elegans in vivo* [J]. Food Sci, 2022, 43(5): 151–157.
- [20] 王世彬, 许子竞, 李洪庆, 等. 绵竹叶黄酮的提取工艺及体外抗氧化性研究[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(9): 95–99.  
WANG SB, XU ZJ, LI HQ, et al. Study on extraction technology and antioxidant activity of flavonoids from leaves of Mianzhu [J]. Cere Oils, 2021, 34(9): 95–99.
- [21] 王连倩, 刘小双, 陈湛娟, 等. 番木瓜叶提取物抗氧化活性研究[J]. 广东化工, 2021, 48(20): 45–47.  
WANG LQ, LIU XS, CHEN ZJ, et al. Study on the antioxidant activity of papaya leaf extract [J]. Guangdong Chem Ind, 2021, 48(20): 45–47.
- [22] 李振旺, 李云飞, 关红霞, 等. 马鹿角对秀丽隐杆线虫衰老的影响及抗氧化机制研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 136–140.  
LI ZW, LI YF, GUAN HX, et al. Effects of red deer antlers on the aging of *Caenorhabditis elegans* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(4):

- 136–140.
- [23] 刘瑾, 周磊, 宋祯彦, 等. 人参皂苷 Ro 延长秀丽隐杆线虫的寿命并增强氧化应激抵抗力[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(2): 626–637.
- LIU J, ZHOU L, SONG ZY, *et al.* Ginsenoside Ro enhances oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2022, 24(2): 626–637.
- [24] 张晓寒, 赵江, 韩英, 等. 根皮素对秀丽隐杆线虫寿命的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(1): 187–196.
- ZHANG XH, ZHAO J, HAN Y, *et al.* Effects of rhizocellin on longevity of *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Sci, 2021, 42(1): 187–196.
- [25] 王力, 肖帽方, 陈弘培, 等. 牡蛎多肽组分 OE-I 抗氧化活性及其对秀丽隐杆线虫抗衰老作用[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 152–160.
- WANG L, XIAO MF, CHEN HP, *et al.* Antioxidant activity of oyster polypeptide OE-I and its anti-aging effect on *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Sci, 2022, 43(3): 152–160.
- [26] 孙晓康, 张艳艳, 张晓元, 等. 衰老机制及抗衰老治疗的研究进展[J]. 食品与药品, 2022, 24(1): 74–80.
- SUN XK, ZHANG YY, ZHANG XY, *et al.* Research progress on the mechanism of aging and anti-aging therapy [J]. Food Drugs, 2022, 24(1): 74–80.
- [27] POMATTO LCD, DAVIES KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 124: 420–430.
- [28] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases [J]. Clin Inter Aging, 2018, 13: 757–772.
- [29] ZIEGLER DV, WILLEY CD, VELARDE MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: Beyond the free radical theory of aging [J]. Aging Cell, 2015, 14(1): 1–7.
- [30] KUDRYAVTSEVA AV, KRASNOV GS, DMITRIEV AA, *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 44879–44905.
- [31] BARBIERI M, BONAFÈ M, FRANCESCHI C, *et al.* Insulin/IGF-I-signaling pathway: An evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(5): E1064–E1071.
- [32] LIN K, HSIN H, LIBINA N, *et al.* Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling [J]. Nat Genet, 2001, 28(2): 139–145.
- [33] ALTINTAS O, PARK S, LEE SJ. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster* [J]. BMB Rep, 2016, 49(2): 81–92.
- [34] HOLZENBERGER M, DUPONT J, DUCOS B, *et al.* IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice [J]. Nature, 2003, 421(6919): 182–187.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

### 作者简介



施 滢, 硕士研究生, 主要研究方向为中药及其复方物质基础研究。  
E-mail: 1844896960@qq.com



管俊峰, 博士, 副教授, 主要研究方向为中药及其复方物质基础研究。  
E-mail: 914120885@qq.com