

铁皮石斛多糖调控线虫寿命及抗氧化作用的研究

张思雨¹, 白雪媛¹, 乔巨慧¹, 王思明¹, 金泽成², 赵大庆¹, 刘美辰^{1*}

(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学药学院, 长春 130117)

摘要: **目的** 基于秀丽隐杆线虫自然衰老模型, 探讨铁皮石斛多糖(*Dendrobium officinale* polysaccharides, DOP)抗衰老作用及其机制。**方法** 将秀丽隐杆线虫野生型 N2 随机分为对照组和铁皮石斛多糖组(低、中、高), 观察铁皮石斛多糖对线虫 N2 寿命、运动能力和咽泵能力的影响; 通过氧化应激、抗氧化酶试剂盒以及活性氧评估铁皮石斛多糖对 N2 线虫抗氧化能力的影响。基于 *skn-1* 基因缺陷型突变株(EU1)线虫及带有荧光标记的转基因线虫 CL2166 分析铁皮石斛多糖延长健康寿命的可能作用途径; 采用实时荧光定量聚合酶链反应技术测定铁皮石斛多糖作用下线虫抗氧化、胰岛素信号途径相关基因转录水平。**结果** 铁皮石斛多糖中剂量组(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)可显著延长线虫 N2 的寿命, 平均延寿率达 12.73%, 可显著提高运动、咽泵、抗氧化应激能力; 显著提高过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量, 降低活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量; 铁皮石斛多糖干预处理对 *skn-1* 基因缺陷线虫的延寿效果缺失; 但能够增强 CL2166 线虫的荧光强度; 同时上调 *sod-5*、*sod-3*、*ctl-1*、*ctl-2*、*daf-16* 和 *skn-1* 基因的表达水平, 下调 *daf-2* 基因的表达水平。**结论** 铁皮石斛多糖可能通过激活 Nrf2/SKN-1 和 DAF-16 途径拮抗氧化应激从而延缓线虫衰老。

关键词: 秀丽隐杆线虫; 铁皮石斛多糖; 衰老; 抗氧化

Study on the lifespan and antioxidant effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*

ZHANG Si-Yu¹, BAI Xue-Yuan¹, QIAO Ju-Hui¹, WANG Si-Ming¹, JIN Ze-Cheng²,
ZHAO Da-Qing¹, LIU Mei-Chen^{1*}

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the anti-aging effect and mechanism of *Dendrobium candidum* polysaccharides (DOP) based on the natural aging model of *Caenorhabditis elegans*. **Methods** Wild type of *Caenorhabditis elegans* N2 were randomly divided into control group and *Dendrobium officinale* polysaccharides group (low, medium and high) to observe the effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on lifespan, exercise capacity and pharyngeal pump capacity of N2 nematodes; the effects of *Dendrobium officinale* polysaccharide on the antioxidant capacities of N2 nematodes were evaluated by oxidative stress, antioxidant enzyme kits and reactive oxygen species. Based on *skn-1* defective mutant (EU1) and fluorescent labeled transgenic nematode CL2166, the

基金项目: 吉林省重大科技专项(20210304002YY)、国家级大学生创新创业训练计划项目(202110199032X)

Fund: Supported by the Major Science and Technology Program of Jilin Province (20210304002YY), and the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (202110199032X)

*通信作者: 刘美辰, 博士, 副研究员, 主要研究方向为中药有效成分及其传统功效研究。E-mail: liumc0367@163.com

*Corresponding author: LIU Mei-Chen, Ph.D, Associate Professor, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China. E-mail: liumc0367@163.com

possible mechanism of *Dendrobium officinale* polysaccharide in prolonging healthy lifespan was analyzed; the transcription levels of genes related to antioxidant and insulin signaling pathways in nematodes under the action of *Dendrobium officinale* polysaccharides were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **Results** The middle-dose group of *Dendrobium officinale* polysaccharides (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could significantly prolong the lifespan of N2 nematodes, with an average lifespan extension rate of 12.73%, and significantly improve the ability of exercise, pharyngeal pump, and anti-oxidative stress, significantly increase catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) activities and glutathione (GSH) content, decrease reactive oxygen species (ROS) levels and malondialdehyde (MDA) content. The life-extending effect of *Dendrobium officinale* polysaccharide treatment on *skn-1* gene-deficient nematodes was missing; the fluorescence intensity of CL2166 nematodes was enhanced. At the same time, the expression levels of *sod-5*, *sod-3*, *ctl-1*, *ctl-2*, *daf-16* and *skn-1* genes were up-regulated, and the expression level of *daf-2* gene was down-regulated. **Conclusion** *Dendrobium officinale* polysaccharides may antagonize oxidative stress by activating Nrf2/SKN-1 and DAF-16 pathways, thereby delaying nematode senescence.

KEY WORDS: *Caenorhabditis elegans*; *Dendrobium officinale* polysaccharides; aging; antioxidant

0 引言

衰老是机体各脏器系统逐渐衰退和病变的复杂过程,是众多神经退行性疾病的主导因素^[1-2]。伴随人口老龄化进程的加剧,迫切需要通过探索衰老的基本机制来降低慢性病发生率^[3]。截至目前,尚无单一的理论能够全面解释衰老现象,其中自由基理论得到了广泛的认可:生物体衰老主要原因是机体自由基产生和清除的失衡。当前众多研究表明天然产物中存在能够延缓衰老过程的天然化合物,作为天然的抗氧化剂可清除体内过多的自由基,减少有毒物质对机体的入侵,进而延缓衰老。因此,寻找和开发天然、高效、易得的抗氧化物,一直是衰老领域的研究热点。

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)被《神农本草经》记载“久服厚肠胃,轻身延年”。现代药理研究表明铁皮石斛在抗氧化、免疫、抗癌等方面具有积极作用^[4]。多糖作为大分子活性物质,既是生物体重要组成,又是机体代谢、免疫等生理功能的重要部分。已有研究显示,铁皮石斛多糖(*Dendrobium officinale* polysaccharides, DOP)可清除自由基和超氧阴离子,并能抑制小鼠体内丙二醛(malondialdehyde, MDA)的生成;同时也能预防胃癌发生^[5-7]。DOP 有一定的抗衰老作用,其机制可能与提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性,促进氧自由基清除,增强机体免疫功能有关^[8]。然而,关于铁皮石斛抗氧化和抗衰老作用多以诱导型衰老动物为研究对象,不能全面反映药物在机体衰老过程中的变化,并且基于自由基理论探索 DOP 对自然衰老的延缓作用鲜有报道,亟待进一步深入的研究与探索。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)生命周期短、遗传背景清楚,且衰老相关调控基因和人类具有高度保守性^[9-10]。本研究应用秀丽隐杆线虫自然衰老模型,探讨 DOP 体内抗氧化应激和延寿作用,进一步综合利

用 *skn-1* 突变体线虫及实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)等技术对其延缓衰老及抗氧化作用靶点进行挖掘,对 DOP 抗衰老更进一步研究和开发利用有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生型线虫 N2 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) OP50 均由复旦大学脑科学研究所的邵志勇教授惠赠。突变体 EU1 和转基因 CL2166 线虫购自秀丽隐杆线虫遗传学中心(美国明尼苏达大学)。

1.2 试剂与仪器

过氧化氢酶(catalase, CAT)、SOD、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); BCA 蛋白试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 无水乙醇(分析纯,天津市汇杭化工有限公司); 30%过氧化氢(分析纯,西陇化工股份有限公司); NaCl(分析纯,天津新技术产业园区科茂化学试剂有限公司); MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 (分析纯,国药化学试剂有限公司); 超纯水为实验室自制。

Infinite® 200 Pro 型全自动酶标仪(上海帝肯贸易有限公司); MJX-430 恒温培养箱(浙江托普仪器有限公司); Mini spin 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司); Sorvall LYNX 6000 高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); EVOS 数码倒置显微镜(美国 AMG 公司); YXQ-LS-30SII 高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 铁皮石斛多糖制备及含量测定

采用水提醇沉法, 按照料液比 1:15 (g:mL) 加入纯化水, 70°C 条件下提取 2 次(每次 1.5 h), 过滤后合并滤液。向滤液加入乙醇至终浓度为 80%, 醇沉过夜。7000 r/min 离心 10 min(离心半径为 194 mm), 所得沉淀即为粗多糖, 采用 *seavage* 法脱蛋白。

多糖检测具体方法参考文献[11]。计算如公式(1):

$$\text{多糖含量}/\% = \frac{C \times D \times V}{W} \times 100\% \quad (1)$$

其中, C -带入标准曲线方程后所得质量浓度, mg/mL; D -样品溶液稀释倍数; V -样品溶液的体积, mL; W -样品质量, mg。

1.3.2 含药培养皿及 M9 缓冲液的制备

含药线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)的制备: 吸取含不同 DOP 浓度菌液 100 μ L 均匀涂抹在 NGM 上。(浓度设置参照相关文献及前期预实验结果)^[12-13]。

M9 缓冲液配制: 称取 0.5 g NaCl, 1.5 g Na₂HPO₄, 0.5 g KH₂PO₄, 加 100 mL 超纯水, 121°C 灭菌 30 min, 冷却后加 0.1 mL 无菌的 1 mol/L MgSO₄ 得 M9 缓冲液。

1.3.3 寿命实验

用无菌自制挑虫器挑取同期化生长到 L4 期线虫 120 条(20°C 条件下培养约 2 d 即为 L4 期)至含有不同 DOP 浓度的 NGM 中, 记录当日为 0 d。之后, 每天将线虫转移至新的含有 DOP 的 NGM 培养基并记录线虫死亡的情况直至全部死亡。判断线虫死亡的标准是: 用自制挑虫器轻触虫体而无任何反应并且观察不到咽食。

1.3.4 运动能力测定

将同期化生长的线虫从 L4 期开始药物处理培养至第 5、10、15 d 进行检测。挑取 20 条线虫 N2 转移到新鲜 NGM 培养皿上, 滴一滴 M9 缓冲液让其自由活动 30 s。然后在显微镜下数 1 min 内弯曲身体的动作次数。

1.3.5 咽泵测定

药物处理培养时间同 1.3.4, 挑取 20 条线虫 N2, 并对其咽部区域进行录像, 对录像进行分析, 以获得 1 min 内咽泵次数。此实验内容仅考虑活动的线虫。

1.3.6 抗氧化应激能力测定

药物处理培养时间同 1.3.4, 挑取 60 条线虫 N2, 暴露于 0.1% 浓度为 30% 的过氧化氢诱导的氧化应激压力下。记录线虫的死亡情况直至全部死亡, 时间间隔为 30 min。死亡的判断标准同 1.3.4。

1.3.7 ROS 水平检测

药物处理培养时间同 1.3.4, 取适量线虫, 加入 500 μ L 含有蛋白酶抑制剂的匀浆缓冲液并在冰上研磨, 12000 r/min 离心 10 min 后取上清, 加入 500 μ L 荧光探针(50 μ mol/L), 20°C 下避光孵育 30 min。酶标仪进行检测(激发波长为 485 nm 发射

波长 528 nm), 每隔 5 min 进行一次测量, 直至读数稳定。使用 BCA 蛋白试剂盒测定匀浆液的蛋白浓度。

1.3.8 抗氧化能力测定

药物处理培养时间同 1.3.4, 取适量线虫冲洗并收集至 EP 管中, 于冰上裂解后离心 10 min (4°C, 12000 r/min), 取上清液用于 SOD 活力、CAT 活力、GSH 和 MDA 含量测定, 具体依据试剂盒说明方法操作。测量结果以蛋白质含量为标准化处理。

1.3.9 线虫 CL2166 荧光显微成像

药物处理培养时间同 1.3.4, CL2166 是携带 GST-4::GFP::NLS 报告基因的转基因线虫, 其 GST-4 启动子与 GFP 融合表达, 故 GFP 荧光表达量与 GST-4 表达量成正比^[14]。挑取线虫 CL2166, 在 M9 缓冲液中使用 10 mmol/L 盐酸左旋咪唑溶液固定, 并将其放入有 2% 琼脂糖垫的载玻片上, 使用荧光显微镜进行拍照, Image J 软件分析荧光强度。

1.3.10 总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR

药物处理培养时间同 1.3.4, 取线虫 N2 进行总 RNA 提取, 检测 RNA 样品的浓度与纯度, 并进行反转录合成 cDNA。按照 TaKaRa 试剂盒说明书进行 qPCR 反应, 每个样品设 3 组平行。内参基因为 β -actin, 采用 2^{- Δ Δ CT} 法进行相对定量分析。引物设计如下表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列
<i>sod-3</i>	F: CCAACCAGCGCTGAAATTC AATGG R: GGAACCGAAGTCGCGCTTAATAGT
<i>sod-5</i>	F: GAACTGCTGTCTTCGGA AACTG R: CCATGAAGTCCTGGTGACAAT
<i>ctl-1</i>	F: GCGGATACCGTACTCGTGAT R: GTGGCTGCTCGTAGTTGTGA
<i>ctl-2</i>	F: GAGAATGTGCCAGAACTTTGC R: CTTGACACGAGCTCCAAAATC
<i>daf-16</i>	F: CTTCAAGCCAATGCCACTACC R: GGAGATGAGTTGGATGTTGATAGC
<i>skn-1</i>	F: GACGTCAATTTATGGAGTGTGCG R: GAAGATGTTTTGTCGTGATCCG
<i>daf-2</i>	F: ATGAAAGCGAAGCAGCGAGAAGG R: CGTCCGAACCTCCGCATCACTC
β -actin	F: TCGGTATGGGACAGAAGGAC R: CATCCCAGTTGGTGACGATA

1.3.11 统计方法

数据统计分析用 Graphpad Prism 9 软件。组间比较采用单向方差分析方法, 存活曲线采用 Long-rank test 方法, 量化指标结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。P<0.05 具有统计学意义。

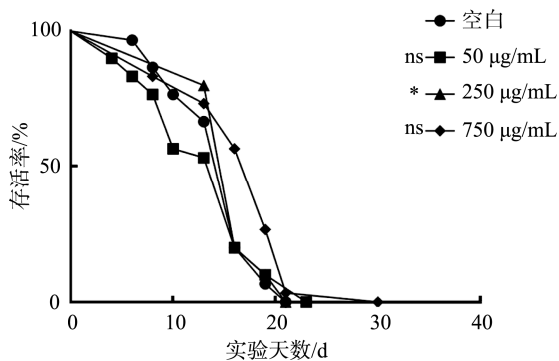
2 结果与分析

2.1 铁皮石斛多糖含量

DOP 收率为 3.24%, DOP 纯度为 72.22%, 以糖的质量浓度为横坐标(X , mg/mL), 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归曲线方程为 $Y=11.251X+0.0433$ ($r^2=0.9906$)。

2.2 铁皮石斛多糖对线虫 N2 寿命的影响

以 N2 自然衰老线虫为模型动物, 来探究 DOP 对线虫 N2 寿命的影响。结果显示, 与对照组相比, DOP 中剂量组 (250 $\mu\text{g/mL}$) 具有较为明显的延寿作用 (图 1, $P<0.05$), 且平均寿命和最大寿命都均具有显著性 (表 2, $P<0.05$, $P<0.01$), 平均延寿率达 12.73%, 最大延寿率达 13.32% (表 2)。



注: 与对照组相比, * $P<0.05$, ns $P>0.05$ 。

图 1 线虫 N2 生存曲线

Fig.1 Survival curves of *Caenorhabditis elegans* N2

表 2 线虫 N2 寿命统计表 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

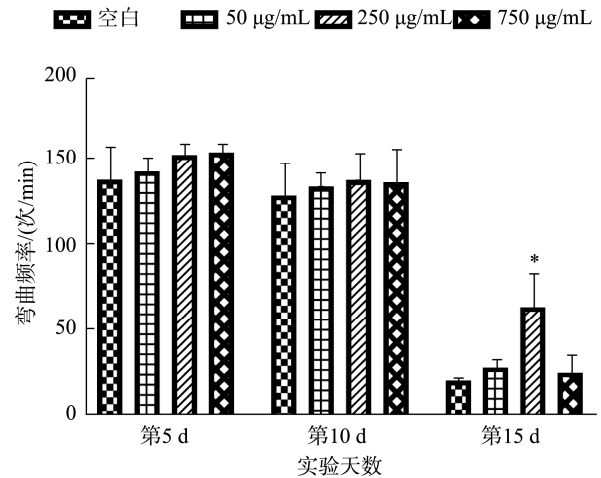
Table 2 Statistical table on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* N2 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

品系	组别	平均寿命/d	平均延寿率/%	最大寿命/d	最大延寿率/%
N2	空白	14.67 \pm 0.45	0	20.44 \pm 0.71	0
	50 $\mu\text{g/mL}$	14.77 \pm 1.41	0.68	22.2 \pm 0.72*	8.59
	250 $\mu\text{g/mL}$	16.53 \pm 0.35*	12.73	23.17 \pm 0.76**	13.32
	750 $\mu\text{g/mL}$	16.27 \pm 0.21	10.91	21.5 \pm 0.5	5.17

注: 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.3 铁皮石斛多糖对线虫 N2 运动能力的影响

本研究通过观察线虫身体弯曲速度评估其运动能力。结果显示, 随着线虫年龄的增加, 身体弯曲速度减慢, 且在生命后期衰老程度明显加快。与对照组相比, 给予 DOP 的线虫在第 5 d 和第 10 d 运动能力没有明显改变, 但在第 15 d 时中剂量组 (250 $\mu\text{g/mL}$) 可显著提升其运动能力 (图 2, $P<0.05$)。



注: 与对照组相比, * $P<0.05$, 下同。

图 2 DOP 对线虫 N2 运动能力的影响 ($n=3$)

Fig.2 Effects of DOP on exercise capacities of *Caenorhabditis elegans* N2 ($n=3$)

2.4 铁皮石斛多糖对线虫 N2 咽泵能力的影响

在线虫进食 DOP 的第 5 d 和第 10 d 咽泵次数无显著差异, 同样在第 15 d 时中剂量组 (250 $\mu\text{g/mL}$) 线虫咽泵次数显著增加 (图 3, $P<0.05$)。综合以上结果, 以 250 $\mu\text{g/mL}$ 作为最佳给药剂量进行后续研究。

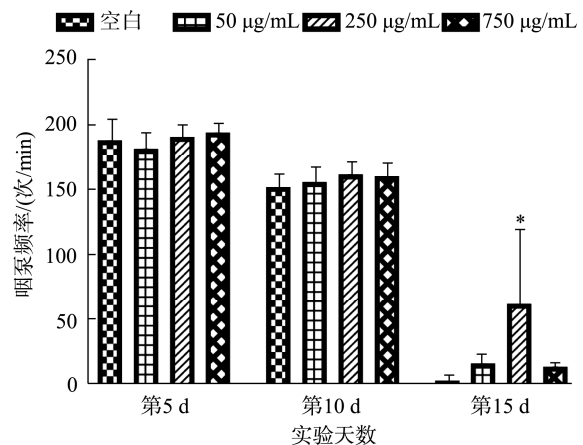


图 3 DOP 对线虫 N2 咽泵能力的影响 ($n=3$)

Fig.3 Effects of DOP on pharyngeal pump capacities of *Caenorhabditis elegans* N2 ($n=3$)

2.5 铁皮石斛多糖对线虫 N2 抗氧化应激能力的影响

结果显示, 正常衰老状态下, 线虫机体抗氧化能力逐渐减弱。且在第 5 d 和第 15 d 时, DOP 对线虫并未产生积极影响。当 DOP 处理第 10 d 时, 可显著提高抗氧化应激能力 (图 4, $P<0.01$)。

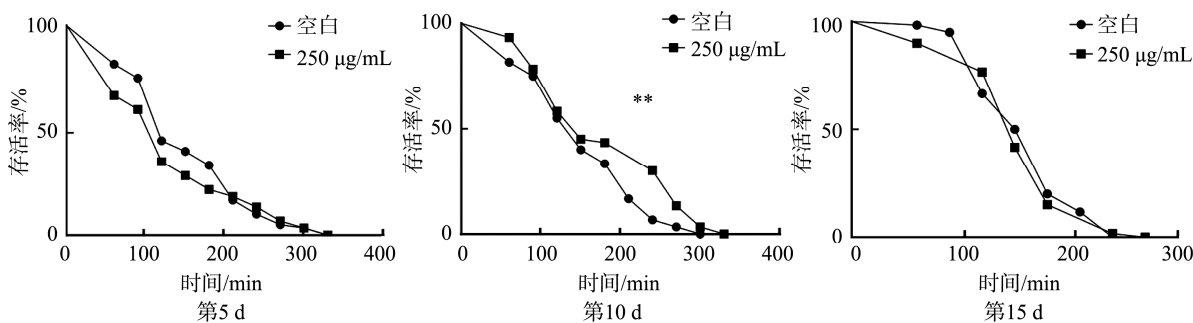
2.6 铁皮石斛多糖对线虫 N2 ROS 水平的影响

本研究对线虫进行 ROS 水平检测。结果显示, DOP 可降低线虫体内由衰老引起 ROS 的积累, 第 5、10 d 与对照组相比给药组 ROS 水平显著降低(图 5, $P<0.01$; $P<0.05$)。而第 15 d 有明显下降趋势, 但未见显著性(图 5, $P>0.05$)。

2.7 铁皮石斛多糖对线虫 N2 抗氧化能力的影响

为进一步确定 DOP 抵抗应激能力是否与抗氧化系统

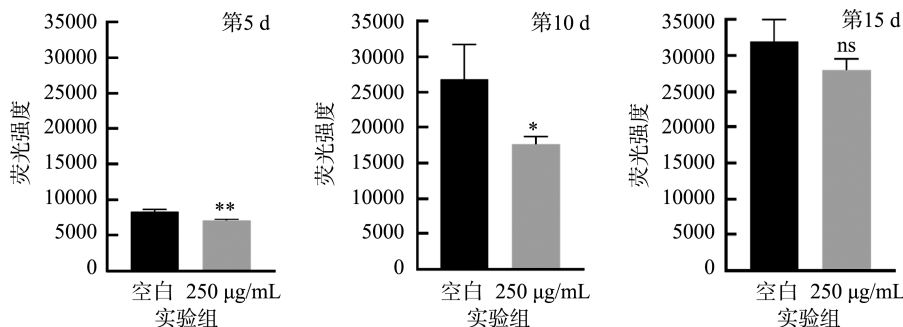
防御有关, 本研究对线虫体内抗氧化酶 CAT、SOD、GSH 以及脂质过氧化物 MDA 进行检测。在 CAT 活力测定中, DOP 对线虫生命周期的 3 个阶段均有较为显著影响(图 6a、b、c, $P<0.01$; $P<0.05$); 在 DOP 作用的第 5 d 和第 10 d 线虫体内 SOD 活力显著增加(图 6a、b, $P<0.01$; $P<0.05$); DOP 仅在第 10 d 对线虫体内 GSH 含量有显著提升(图 6b, $P<0.05$); DOP 可显著降低线虫第 10 d 和第 15 d 的 MDA 的积累(图 6b、c, $P<0.05$, $P<0.01$)。以上数据表明, DOP 可提高线虫体内抗氧化能力, 抵抗氧化应激。



注: 与对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 4 DOP 对线虫 N2 抗氧化应激能力的影响

Fig.4 Effects of DOP on oxidative stress resistance of *Caenorhabditis elegans* N2



注: 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns $P>0.05$, 下同。

图 5 DOP 对线虫 N2 ROS 水平的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of DOP on ROS levels of *Caenorhabditis elegans* N2 ($n=3$)

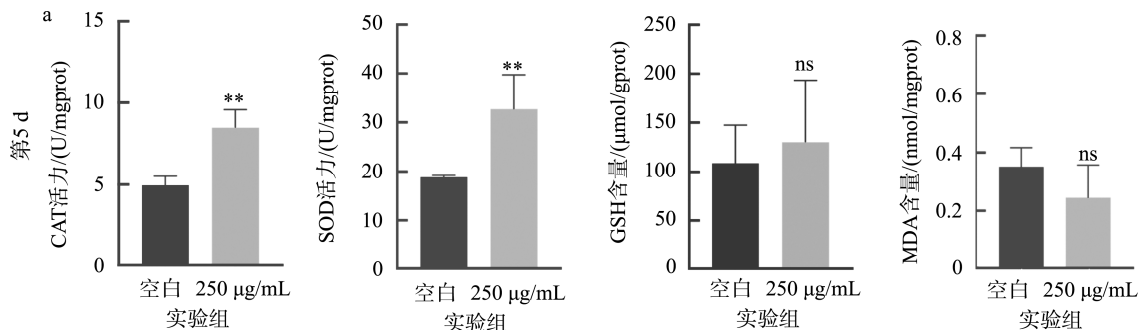


图 6 DOP 对线虫 N2 抗氧化能力的影响($n=3$)

Fig.6 Effects of DOP on antioxidant capacities of *Caenorhabditis elegans* N2 ($n=3$)

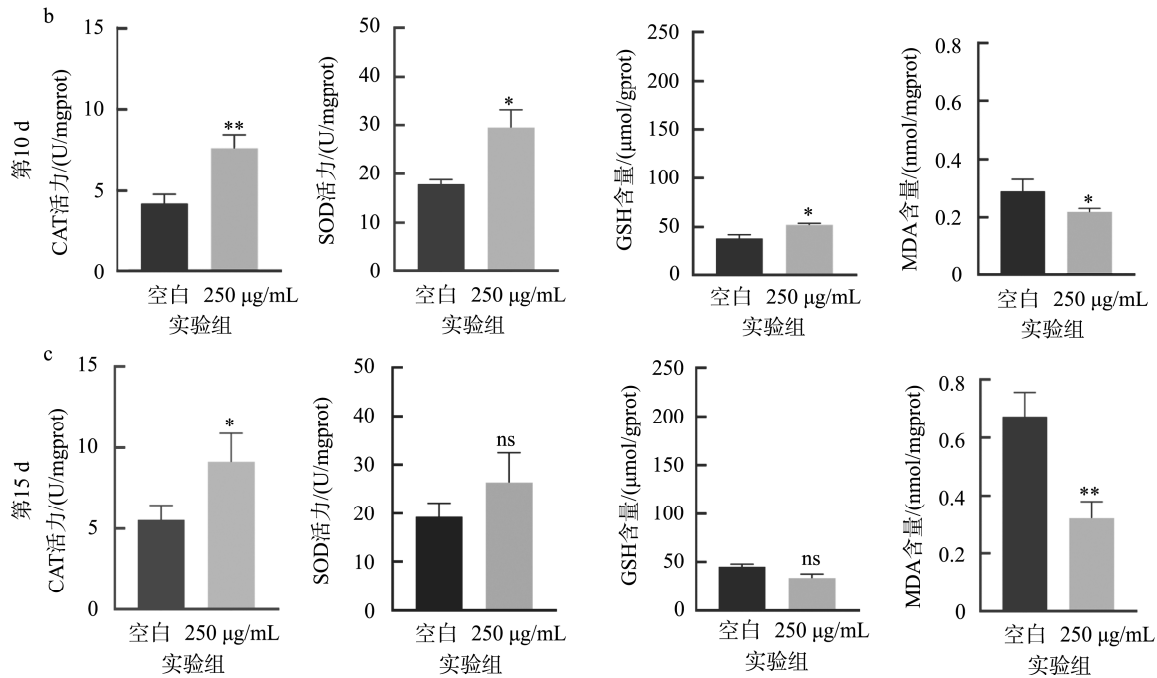


图 6(续) DOP 对线虫 N2 抗氧化能力的影响(n=3)

Fig.6 Effects of DOP on antioxidant capacities of *Caenorhabditis elegans* N2 (n=3)

2.8 铁皮石斛多糖对线虫 EU1 寿命的影响及线虫 N2 中 *skn-1* 基因表达水平

在突变体线虫 EU1 中, DOP 的延寿作用被抑制(图 7a, 表 3)。本研究又检测了 *skn-1* 基因在线虫 N2 中表达情况, 发现在 3 个阶段中均显著上调(图 7b, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$)。且平均寿命和最大寿命都均未见显著性差异(表 3), 平均延寿率 1.56%, 最大延寿率 3.89%, 结果说明 DOP 对线虫抗氧化作用依赖于 *skn-1* 调控。

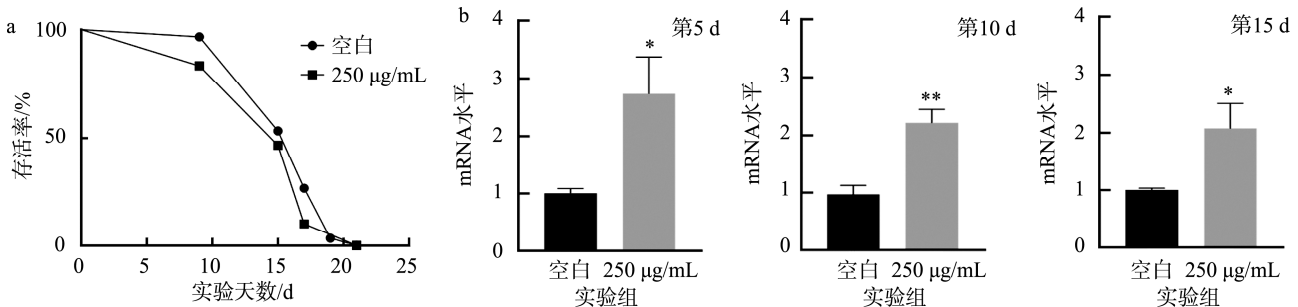
2.9 铁皮石斛多糖对 GST-4 表达的影响

与对照组相比, DOP 处理第 10 d 时, 给药组荧光强度

显著增强(图 8, $P<0.01$)。

2.10 铁皮石斛多糖对衰老相关信号途径的影响

结果表明, DOP 可显著增加 *sod-3*、*sod-5*、*ctl-1*、*ctl-2* 表达水平(图 9, $P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$, 第 5 d *ctl-2* 基因除外)。*daf-2* 和 *daf-16* 是胰岛素信号通路中关键的上、下游基因, 对线虫寿命和耐受性的调控具有重要作用。与对照组相比, DOP 仅在第 15 d 时对 *daf-16* 基因表达有显著增加和对 *daf-2* 基因表达有显著降低作用(图 9c, $P<0.01$)。



注: a: 突变体线虫生存曲线; b: 线虫 N2 中 *skn-1* 基因表达水平; 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

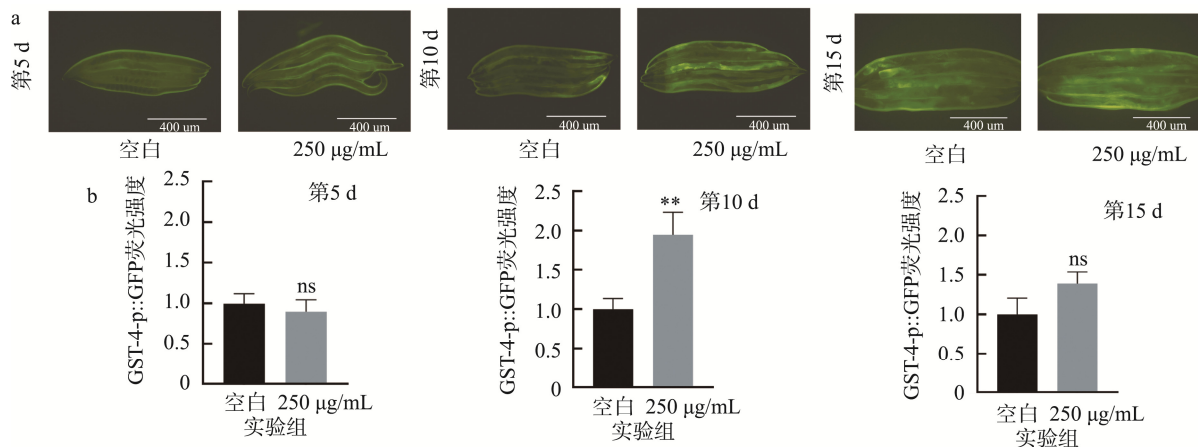
图 7 线虫 EU1 生存曲线和线虫 N2 中 *skn-1* 基因表达水平(n=3)

Fig.7 Survival curves of *Caenorhabditis elegans* EU1 and *skn-1* gene expression levels in *Caenorhabditis elegans* N2 (n=3)

表 3 线虫 EU1 寿命统计表 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 3 Statistical table on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* EU1 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

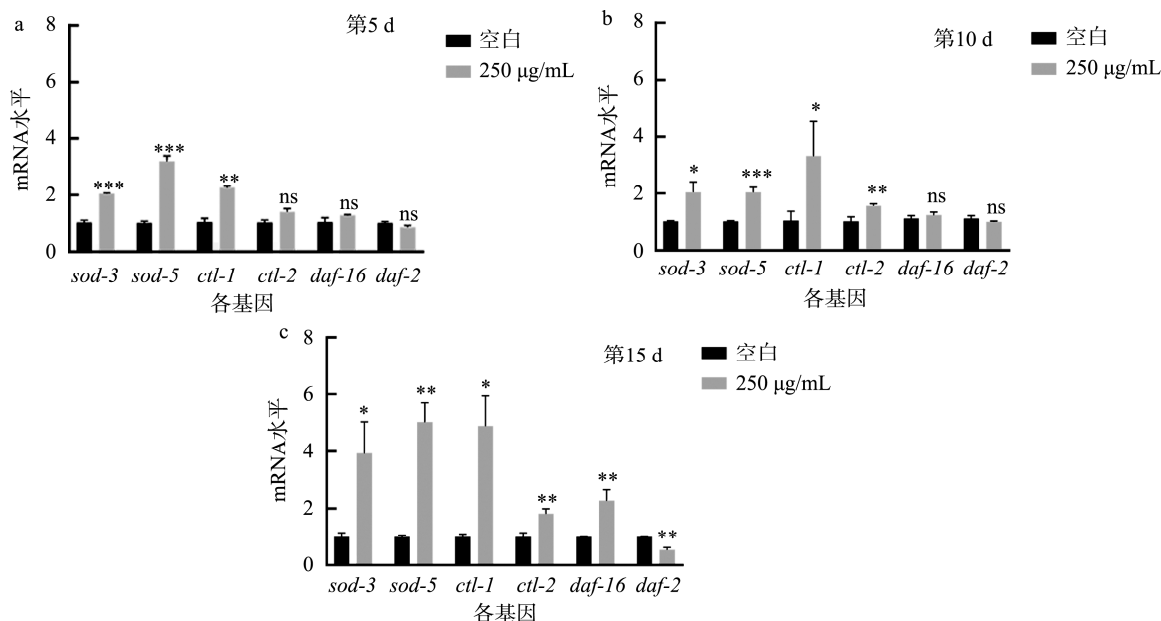
品系	组别	平均寿命/d	平均延寿率/%	最大寿命/d	最大延寿率/%
EU1	空白	15.99±0.61	0	19.16±0.49	0
	250 µg/mL	16.24±0.89	1.56	19.90±0.96	3.89



注: a: 线虫 CL2166 中 GFP 荧光图; b: 荧光强度统计分析图。与对照组相比, ** $P < 0.01$, ns $P > 0.05$ 。

图 8 DOP 对 GST-4 表达的影响($n=3$)

Fig.8 Effects of DOP on expressions of GST-4 ($n=3$)



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns $P > 0.05$ 。

图 9 DOP 对衰老相关信号途径的影响($n=3$)

Fig.9 Effects of DOP on aging-related signaling pathways ($n=3$)

3 讨论与结论

长期以来衰老一直都是研究热点, 截止目前尚未有明确的衰老生物学机制和应对策略。更多的研究表明, 实现健康寿命从机体生理功能减缓衰老进程是首要任务。本研究发现, 250 µg/mL 的 DOP 可显著延长 N2 线虫寿命, 平均延寿率可达 12.73%。通过对衰老线虫的相关指标评价发现, DOP 没有影响线虫的运动行为能力和吞咽能力, 反而在生命后期有促进作用。此外, 本研究检测了 DOP 的延寿作用是否与抵抗应激能力增强相关。结果表明, DOP 可显著增强线虫对过氧化氢的耐受作用, 进一步表明 DOP 可

作为一种潜在的抗氧化剂。

在众多引发衰老发生的理论中, 被普遍接受的是氧化损伤理论。除应激环境会导致 ROS 过量产生外, 衰老也会引起 ROS 不断积累^[15-18]。本研究发现, 线虫体内 ROS 随着年龄增长而增多。因此, 增强抗氧化防御系统修复衰老导致的氧化损伤是关键。SOD、CAT 和 GSH 等抗氧化酶可降低超氧化物自由基和过氧化氢的积累保护细胞结构, 进而延缓衰老进程。另外, MDA 被称作是脂质氧化的关键指标^[19-21]。结果显示, DOP 可提升抗氧化酶活性, 清除线虫体内多余的 ROS, 证实其具有良好的抗氧化活性。

在线虫中, SKN-1 蛋白可以参与多种刺激及信号通路介导的线虫生命活动调节, 如抗氧化应激的能力, 免疫与延寿等^[22-25]。同 Nrf2 蛋白一样, SKN-1 蛋白可以直接调控许多与脱毒反应相关基因的表达^[26]。本研究显示 DOP 增加了线虫 N2 体内 *skn-1* 基因的表达, 且体现在整个衰老进程。当 *skn-1* 缺陷时, DOP 对线虫延寿作用明显受到抑制, 说明 *skn-1* 对 DOP 抗氧化作用至关重要。GST-4 是 SKN-1 亚型 C 的下游靶点, 参与氧化应激反应^[27]。同时也是具有多种生理功能的蛋白质参与机体代谢反应^[28-29]。为进一步探索 DOP 对 Nrf2/SKN-1 通路的激活作用, 本研究观察带有 GFP 荧光标记的转基因线虫 CL2166 在 DOP 处理下 GST-4 的表达情况。结果显示, GST-4 表达水平在线虫生命中期显著增强, 进一步证明了 DOP 可能激活 Nrf2/SKN-1 途径来抵抗氧化应激。

胰岛素信号通路是高度保守的衰老调控通路, 该通路中 *daf-16* 受 *daf-2* 负调控^[12]。若受到压力刺激时, DAF-16/FOXO 可诱导多种应激抵抗基因的表达抵抗外界压力, 如 *sod-3/5*、*ctl-1/2* 等^[30]。本研究结果表明, 在线虫生命后期 DOP 显著提升 *daf-16* 和降低 *daf-2* 基因表达, 促进调节靶基因的表达水平, 提高线虫的抗逆性和寿命。

综上所述, DOP 可能通过激活 Nrf2/SKN-1 和 DAF-16 途径, 减少衰老过程中自由基积累, 提高抗氧化能力来抵抗应激压力, 从而发挥延缓衰老作用。本研究成果对 DOP 的进一步研究和开发利用有重要意义。

参考文献

- [1] GOLDMAN DP, CUTLER D, ROWE JW, *et al.* Substantial health and economic returns from delayed aging may warrant a new focus for medical research [J]. *Health Aff (Millwood)*, 2013, 32(10): 1698-705.
- [2] 李忠, 白宗科, 张丽伟, 等. 免疫衰老及其相关疾病的防治[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(4): 341-350.
LI Z, BAI ZK, ZHANG LW, *et al.* Prevention and treatment of immunosenescence and its related diseases [J]. *Chin J Cancer Biother*, 2020, 27(4): 341-350.
- [3] SEALS DR, MELOV S. Translational geroscience: Emphasizing function to achieve optimal longevity [J]. *Aging*, 2014, 6(9): 718-730.
- [4] 刘雪娜, 吴雪娇, 刘顺航, 等. 铁皮石斛的药理作用及其保健食品研发进展[J]. *保鲜与加工*, 2021, 21(10): 144-150.
LIU XN, WU XJ, LIU SH, *et al.* Pharmacological effects of *Dendrobium officinale* and the development of its health foods [J]. *Storage Process*, 2021, 21(10): 144-150.
- [5] 鲍素华. 铁皮石斛多糖体外抗氧化活性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
BAO SH. Studies on antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrobium candidum in vitro* [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2009.
- [6] 汪群红, 沈艳萍, 冯海英. 铁皮石斛对 D-半乳糖致衰老模型小鼠保护作用的研究[J]. *中国中医药科技*, 2022, 29(2): 210-213.
WANG QH, SHEN YP, FENG HY. Study on protective effect of Tipi Shihu (*Dendrobium candidum*) on D-galactose-induced aging model mice [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*, 2022, 29(2): 210-213.
- [7] 孙晶, 魏静, 米艳, 等. 石斛活性成分及生物模型在胃肠道疾病保护作用中的应用进展[J]. *中草药*, 2021, 52(22): 7025-7031.
SUN J, WEI J, MI Y, *et al.* Application progress of active ingredients in plants of *Dendrobium caulis* and biological models of in protection of gastrointestinal diseases [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(22): 7025-7031.
- [8] 李利娜. 铁皮石斛多糖改善 D-半乳糖诱导小鼠衰老作用研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
LI LN. Polysaccharides of *Dendrobium candidum* improve mouse aging induced by D-galactose [D]. Suzhou: Soochow University, 2012.
- [9] KENYON CJ. The genetics of ageing [J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 504-512.
- [10] CAMPISI J, KAPAHI P, LITHGOW GJ, *et al.* From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing [J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 183-192.
- [11] 杨松. 人參多糖改善氧化应激致肝细胞损伤的药效物质及作用机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
YANG S. Study on the pharmacological substances and mechanism of ginseng polysaccharides to improve liver cell damage caused by oxidative stress [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2020.
- [12] 刘冰冰. 铁皮石斛多糖对秀丽隐杆线虫寿命的影响及其机制的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
LIU BB. Effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* and its mechanism [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016.
- [13] 李海春. 八种石斛多糖抗氧化、抗衰老活性的比较研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
LI HC. Studies on anti-oxidation and anti-aging of polysaccharides from eight dendrobium species [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [14] 何露, 李中, 韦睿, 等. 姜黄素类化合物提高线虫的抗氧化应激能力[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(1): 154-158.
HE L, LI Z, WEI R, *et al.* Effect of curcuminoids on oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2014, 30(1): 154-158.
- [15] 杨慧玲. 土茯苓多糖对秀丽隐杆线虫的降脂作用及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
YANG HL. Study on the lipid-lowering effect and mechanism of polysaccharide from *Smilax glabra* Roxb. on *Caenorhabditis elegans* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2020.
- [16] 金司仪. 三七粉延缓秀丽隐杆线虫衰老的作用机制及其稳定性研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
JIN SY. Mechanism of *Panax notoginseng* on delaying senescence of *Caenorhabditis elegans* and its stability [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2019.
- [17] 李元通. 连翘花提取物减轻 AD 模型线虫 A β 诱导毒性及其机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2021.
LI YT. Effects of forsythia suspensa flowers extract on A β -induced toxicity of AD model nematodes and its mechanism [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [18] 李娇. 在 *C.elegans* 中 rBTI 延缓衰老及对衰老相关疾病的影响[D]. 太原: 山西大学, 2017.
LI J. rBTI slow down aging and its effects on age-related disease in *C. Elegans* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2017.

- [19] 邱现创. 铁皮石斛多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[D]. 太原: 山西大学, 2017.
QIU XC. Study on optimization of extraction technology of polysaccharide and antioxidant activity of polysaccharide from *Dendrobium officinale* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2017.
- [20] 刘星雨, 曹素芳, 朱秋铁, 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.* Antioxidant activity of milk derived sleep-promoting peptide *in vitro* and *in vivo* [J]. Food Sci, 2022, 43(5): 151–157.
- [21] 李纳. 三叶苷延缓秀丽隐杆线虫衰老的作用及其机制研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
LI N. Anti-aging effect of trilobatin on *Caenorhabditis elegans* [D]. Zunyi: Zunyi Medical University, 2020.
- [22] 李宏源. SKN-1 蛋白的 O-GlcNAc 修饰调控秀丽隐杆线虫寿命及氧化应激作用机制的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2017.
LI HY. The O-GlcNAc-modification of SKN-1 regulates *C. elegans* lifespan and oxidative stress resistance [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2017.
- [23] 徐帅帅. 基于秀丽隐杆线虫模式生物探讨参杞中药复方抗 AD 活性及机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
XU SS. Therapeutic effect of Shenqi formula and its mechanism in AD *C. elegans* [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2021.
- [24] 赵建平, 吴丽敏, 鲁晓娜, 等. 白术乙醇提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响及其机制研究[J]. 中国药房, 2021, 32(4): 418–424.
ZHAO JP, WU ML, LU XN, *et al.* Study on the effects of atractyloides macrocephala ethanol extract on life span of *Caenorhabditis elegans* and its mechanism [J]. China Pharm, 2021, 32(4): 418–424.
- [25] 王雪. 鹿茸醇提物对秀丽隐杆线虫抗衰老机制的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
WANG X. Anti-aging mechanism of velvet antler extract on *Caenorhabditis elegans* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020.
- [26] AN JH, BLACKWELL TK. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response [J]. Genes Dev, 2003, 17(15): 1882–1893.
- [27] LEIERS B, KAMPKÖTTER A, GREVELDING CG, *et al.* A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. Free Radic Biol Med, 2003, 34(11): 1405–1415.
- [28] 冯欣, 杜宇, 潘坤, 等. 谷胱甘肽硫转移酶与氧化应激[J]. 医学研究与教育, 2010, 27(5): 80–83.
FENG X, DU Y, PAN K, *et al.* Glutathione S-transferases and its oxidative stress [J]. Med Res Edu, 2010, 27(5): 80–83.
- [29] 蔡洁. 米糠活性肽通过 *daf-16* 和 *skn-1* 调节线虫寿命与应激能力的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021.
CAI J. Rice bran active peptides regulate the lifespan and stress tolerance of *C. elegans* via *daf-16* and *skn-1* [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2021.
- [30] SUZUKI Y, SANO M, HAYASHIDA K, *et al.* Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? [J]. FEBS Lett, 2009, 583(13): 2157–2159.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



张思雨, 硕士研究生, 主要研究方向为中药有效成分发现、生物转化及健康产品研究与开发。

E-mail: 1026350579@qq.com



刘美辰, 博士, 副研究员, 主要研究方向为中药有效成分及其传统功效研究。

E-mail: liumc0367@163.com