

α -乳白蛋白对秀丽隐杆线虫寿命、繁殖力与活力的影响

郜鑫洋¹, 樊振江², 张莉杰², 王晓楠¹, 陈树兴^{1*}

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471023; 2. 漯河食品职业学院, 漯河 462300)

摘要: **目的** 研究 α -乳白蛋白对秀丽隐杆线虫寿命、活力和繁殖力的影响。**方法** 使用不同浓度的 α -乳白蛋白(提取自纯牛奶)喂养秀丽隐杆线虫, 并观察其寿命、繁殖力与活力变化。**结果** α -乳白蛋白添加量为45 mg/L时, 与对照组相比, 线虫寿命延长到(26.33±0.72) d(增幅 59.58%, $P<0.05$); 平均运动速率达到(149.00±7.79)次/min(增幅 19.20%, $P<0.05$); 平均弯曲度达到了(17.00±1.63)次/20 s(增幅 54.54%, $P<0.05$), 继续增加 α -乳白蛋白含量时, 以上指标无显著性变化($P>0.05$)。当 α -乳白蛋白添加量为30 mg/L时, 平均产卵数相对对照组增加到(236.33±12.23)个(增幅 53.13%, $P<0.05$), 而继续增加 α -乳白蛋白含量, 平均产卵数无显著性变化($P>0.05$)。**结论** α -乳白蛋白喂养对线虫寿命延长、繁殖能力提升、运动能力保持(减缓衰退)等具有一定的作用。

关键词: α -乳白蛋白; 秀丽隐杆线虫; 繁殖力; 活力

Effects of α -lactalbumin on the lifespan, fecundity and vitality of *Caenorhabditis elegans*

GAO Xin-Yang¹, FAN Zhen-Jiang², ZHANG Li-Jie², WANG Xiao-Nan¹, CHEN Shu-Xing^{1*}

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
2. Luohe Food Vocational College, Luohe 462300, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of α -lactalbumin on lifespan, viability and fecundity of *Caenorhabditis elegans*. **Methods** *Caenorhabditis elegans* were fed with α -lactalbumin (extracted from pure milk) at different concentrations, and the changes of lifespan, fecundity and vitality were observed. **Results** When the supplemental level of α -lactalbumin was 45 mg/L, compared with the control group, the lifespan of nematodes was extended to (26.33±0.72) d (increased by 59.58%, $P<0.05$). The average exercise rate was (149.00±7.79) times/min (increased by 19.20%, $P<0.05$). The average bending degree reached (17.00±1.63) times/20 s (increased by 54.54%, $P<0.05$). When continuing to increase the content of α -lactalbumin, there was no significant change in the above indicators ($P>0.05$). When the α -lactalbumin supplemental level was 30 mg/L, compared with the control group, the average spawning number increased to (236.33±12.23) (increased by 53.13%, $P<0.05$). However, there was no significant difference in average oviposition number when α -lactalbumin content was continuously increased ($P>0.05$). **Conclusion** α -lactalbumin feeding was proved to have a certain role in prolonging the life of nematodes, improving reproduction capabilities, and maintenance athletic ability (slowing down the decline caused by aging

基金项目: 北京市科技计划项目(Z201100008020005)

Fund: Supported by the Beijing Science and Technology Project (Z201100008020005)

*通信作者: 陈树兴, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性乳制品。E-mail: chenshuxing1@163.com

*Corresponding author: CHEN Shu-Xing, Ph.D, Professor, College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, No.243, Kaiyuan Street, Luolong District, Luoyang 471023, China. E-mail: chenshuxing1@163.com

included).

KEY WORDS: α -lactalbumin; *Caenorhabditis elegans*; fecundity; vitality

0 引言

α -乳白蛋白属于乳清蛋白,是乳汁中一种重要的蛋白质。 α -乳白蛋白在牛乳中的含量约为牛乳蛋白的2%~3%,在母乳中含量相对较高,为总蛋白的20%~25%,其不仅营养价值高,而且具有保护消化道、调节免疫、延缓衰老和防癌抗癌等多种生物功能,并对婴儿的生长发育具有重要的促进作用^[1]。ELENA等^[2]在探究了乳清蛋白的变性与聚集对其在水解与功能肽释放的影响后发现, α -乳白蛋白水解后产生的功能肽可以防御胃黏膜损伤并调节动物肠道菌群。乳蛋白大都具有免疫调节功能,SHI等^[3]发现小鼠摄入糖基化酪蛋白后免疫系统得到改善,其机制是激活小鼠的免疫细胞;王瑶等^[4]通过果蝇与小鼠实验发现 α -乳白蛋白可能具有延缓衰老、延长寿命等重要功效;SAILENDRA等^[5]实验发现乳蛋白水解物在一定条件下可合成直径小、高稳定性且能够特异杀伤癌细胞的自组装 α -乳白蛋白,它们在抗击癌症中表现出较大的潜力;FANG等^[6]发现了 α -乳白蛋白可与油酸结合成抗肿瘤复合物。作为牛乳中的一种重要的蛋白, α -乳白蛋白功能特性的深入研究对其应用的发展具有重要的意义。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)在自然界中分布广泛,具有结构和基因简单,便于养殖,生命周期短等优势,被广泛用作功能性研究、寿命与衰老研究的模式生物^[7]。WAN等^[8]在尿酸延长动物寿命的实验研究中使用的模式生物就是秀丽隐杆线虫。LEE等^[9]研究证明朝鲜榭寄生的提取物可以延长秀丽隐杆线虫寿命,并认为这种提取物延长线虫寿命可能是轻度刺激诱导兴奋的结果。CAI等^[10]的研究发现无菌饮食限制可以改善线虫代谢进而延长线虫寿命。TIAN等^[11]为了探究绿茶的能效使用秀丽隐杆线虫进行实验,发现绿茶中的儿茶素可以改变线虫代谢通路并抑制自由基,因此可以有效延长线虫的寿命。DOSHI等^[12]为了研究植物效应,使用秀丽隐杆线虫进行实验,发现Kumbharao提取物能够在逆境条件下有效延长线虫寿命。WANG等^[13]在实验中发现饱和长链脂肪酸可以调节线虫细胞中溶酶体的稳态并借此延长秀丽隐杆线虫的寿命。这些都说明秀丽隐杆线虫是一种优越的模式生物。使用秀丽隐杆线虫作为研究对象,具有更低的实验成本和重复性。同时秀丽隐杆线虫的基因组和哺乳动物甚至人类都有一定的相似性^[14],但目前鲜少使用秀丽隐杆线虫作为模型研究 α -乳白蛋白。

因此,本研究通过喂食秀丽隐杆线虫从牛乳中提取的不同浓度的 α -乳白蛋白,观察线虫的寿命、产卵数、运动速率和弯曲度等与繁殖力与活力相关指标,分析推测 α -

乳白蛋白的生理功能,以期为 α -乳白蛋白的功能研究与应用提供方法与数据支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

秀丽隐杆线虫野生型:本实验室保存,冷冻保存于 -80°C 超低温冰箱中。

大肠杆菌 OP50:供试大肠杆菌为 OP50 尿嘧啶突变型,为本实验室保藏菌种, -20°C 低温冷冻保存。

牛乳:伊利袋装纯牛乳。

1.1.2 实验试剂

硼酸、5-氟-脱氧尿嘧啶(floxuridine, FUDR)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钙、硫酸镁、氯化钾、氢氧化钡(分析纯,天津德恩化学试剂有限公司);吐温-20、冰醋酸(分析纯,无锡市亚泰联合化工有限公司);氯化钠、氢氧化钠(分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司);酵母浸粉、胰蛋白胨(北京奥博星生物技术有限公司);凝乳酶(生物试剂,北京鸿润宝顺科技有限公司);琼脂粉(分析纯,上海蓝季科技发展有限公司);DEAE 纤维素凝胶(北京恒辉集团);次氯酸钠(分析纯,广东云星生物技术有限公司)。

1.1.3 实验仪器设备

UV2100 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);DH-600 恒温培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司);THZ-103B 恒温培养摇床(上海一恒科技仪器有限公司);BBS-SDC 超净工作台(济南鑫贝西生物技术有限公司);85-2 恒温磁力搅拌器(常州越新仪器最早有限公司);TYAIB 型立式高压蒸汽灭菌锅(宁波久兴医疗器械有限公司);LGJ-10C 真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司);BONA-GM-18 型 UF 有机膜超滤设备(山东博纳集团);M1-16 型纤维素凝胶色谱柱(上海耗材仪器厂)。

1.1.4 培养液与试剂的配制

LB 培养基:1 g 胰蛋白胨、0.5 g 酵母浸粉、0.5 g NaCl(固体培养基需要加入 1.7 g 琼脂粉)加水定容至 100 mL,溶解后高压灭菌(115°C , 15 min),冷却后放入 4°C 冰箱中备用。

线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM):取 0.3 g NaCl、1.7 g 琼脂、0.25 g 蛋白胨、2.5 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)缓冲液。加水定容至 100 mL 后高压灭菌(115°C , 15 min),待培养液降温至 60°C 后再加入胆固醇乙醇溶液 0.1 mL (5 mg/mL)、 MgSO_4 0.1 mL (1 mol/L)、 CaCl_2 0.1 mL (1 mol/L)。然后迅速摇匀并倒入平板制得 NGM 固体培养基, 4°C 冰箱冷藏备用。

5-氟-脱氧尿嘧啶: 1000 mg 的 FUDR 溶解于 4 mL 灭菌的去离子水中, 4°C 保存。

线虫裂解液: NaOH 0.6 g、10% NaClO 溶液 100 μ L、无菌水 49.9 mL, 现用现配。

1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌 OP50 的培养与菌液的制备

使用接种环蘸取大肠杆菌 OP50 菌种液, 在 LB 培养基上划 2~3 条平行线。每划一次线都将接种环灼烧灭菌, 之后以上一区域末尾处为起点继续划平行线, 划出 3~4 个区域。之后将划线的培养基在 37°C 条件下恒温培养 72 h。然后在超净工作台中使用接种环挑取单个菌落, 将单菌落接种于 LB 液体培养基中。37°C 下在 200 r/min 的摇床中培养 24 h, 之后将菌液放入 4°C 冰箱中冷藏备用。

1.2.2 α -乳白蛋白的分离与纯化

参考 TRUJILLO 等^[15]的分离方法, 并按照如下操作进行 α -乳白蛋白的分离。

将牛乳于 4°C 下、7104 \times g 离心 15 min 后除去上层凝固脂肪。之后水浴加热到 85°C, 保温 15 s 进行杀菌处理, 然后放入冰水浴中迅速冷却至室温。然后添加活力为 20000 U/g 的凝乳酶, 使溶液中酶含量为 0.01% (*m:m*), 滴加 1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液, 使溶液中 CaCl₂ 质量分数为 0.1% (*m:m*); 38°C 下酶凝 30 min; 将酶凝后的牛乳降温至 10°C 后 50000 \times g 离心 40 min 取上清液得到乳清。将分离出酪蛋白的乳清的 pH 调节为 5.0, 加热至 80°C, 保温 15 min (以进一步去除酪蛋白)。之后降温到 35°C 进入 UF 超滤机中, 乳清液将在依次通过 100、50、10 kd 的聚砜膜后成为富集 α -乳白蛋白的截留液^[16]。回收截留液, 进行进一步纯化。

按照 SIVAKUMAR 等^[17]所报道的方法, 使用琼脂糖凝胶阴离子交换色谱进行进一步纯化。即: 使用含 0~0.3 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液梯度洗脱, 收集目标蛋白溶液, 透析 24 h, 浓缩后得到 α -乳白蛋白溶液。真空冷冻干燥后可获得高纯度的 α -乳白蛋白粉备用。

1.2.3 秀丽隐杆线虫的培养

取冻存的 L4 期的秀丽隐杆线虫样本, 在 37°C 水浴中解冻复苏后接种到涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上, 22°C 恒温培养。培养 24 h 后从每个培养皿中挑取 5~10 只秀丽隐杆线虫到新的培养皿上扩大培养。每隔 48 h 重复一次上述操作, 直到培养出足够数量的线虫为止。之后对线虫进行同步化处理。

将含有线虫的培养基在显微镜下观察, 取产卵期线虫数量最多的培养皿进行实验。首先使用 M9 缓冲液冲洗含有线虫的培养基, 冲洗完后将液体转移到锥形瓶中静置 20 min, 之后加入裂解液, 振荡裂解 15 min 后分装入 4 mL 离心管。2517 \times g 离心 1 min 后, 沉淀用 4 mL 缓冲液悬浮后离心, 沉淀再加入无菌水悬浮后离心重复 3 次, 之后在沉淀中加入 1 mL 无菌水放入 NGM 培养基中 22°C 培养过夜, 获得同步化的

L1 期线虫, 继续培养 48 h 后可获得同步化的 L4 期线虫。

1.2.4 秀丽隐杆线虫的喂养实验及其生理指标的测定

在室温下, 将 500 mg 的 α -乳白蛋白粉末溶于 100 mL 去离子水中, 磁力搅拌过夜, 得到 α -乳白蛋白溶液, 4°C 保存; 实验时将乳白蛋白溶液加入大肠杆菌 OP50 悬液中调配到所需要的浓度。

1) 秀丽隐杆线虫寿命的测定

制备加有 1 mg/mL 5-氟-脱氧尿嘧啶的 NGM 培养基, 分别滴入含有 0、5、15、30、45、60 mg/L α -乳白蛋白溶液的大肠杆菌 OP50 的悬液 1 mL, 然后将同期化处理后的培养至 L4 期的秀丽隐杆线虫分别挑入, 22°C 恒温培养。每组样本为 30 条, 每个浓度组设 3 个平行组。此时记为观测 0 d, 此后每隔 12 h 探视线虫一次, 每隔 24 h 滴加一次菌液 (1 mL), 每 48 h 需更换一次培养基 (培养基中含有大肠杆菌悬液和 FUDR 溶液)。更换培养基时使用显微钩针将线虫挑到新的培养基上。在显微镜下对外部机械性刺激无应答的线虫判定为死亡。提供相同的培养环境, 直至平板内线虫全部死亡, 记录线虫正常死亡的条数, 除去逃跑和挑飞的线虫条数按照下列公式 (1)~(2) 计算得到单个样本的平均寿命^[18]。

$$\text{单只线虫寿命} = \text{线虫观测寿命} + 2 \text{ d} \quad (1)$$

$$\text{平均寿命} = \frac{\sum \text{单只线虫寿命} \times \text{寿命对应的线虫数量}}{\text{正常线虫总数}} \quad (2)$$

2) 秀丽隐杆线虫产卵数量的测定

制备不含脱氧尿嘧啶的 NGM 培养基, 将以上同步化并喂养至 L4 阶段的线虫挑入一条, 每天滴入含有 0、5、15、30、45、60 mg/L 的 α -乳白蛋白的大肠杆菌 OP50 的悬液 1 mL, 22°C 恒温培养 24 h 后将所有成虫转移至新的培养皿上。之后每隔 12 h 将所有的成虫转移到新的培养皿上, 直至转移后上一培养皿内无线虫生长为止; 将产卵板在 22°C 下恒温孵化 24 h, 每次转移线虫培养 24 h 后在显微镜下计数前一个培养皿上线虫个数可得到单期产卵数, 累加每期产卵数得到总产卵数。每个浓度组做 3 个平行实验。

3) 秀丽隐杆线虫运动速率、弯曲度及快速运动率的测定

首先将同期化, 并喂养至 L4 期的秀丽隐杆线虫挑到含有 1 mg/mL 脱氧尿嘧啶 NGM 培养基中。每个平板内仅放置 1 条线虫, 每组设置 3 个平行实验。每天滴入含有 0、5、15、30、45、60 mg/L 的 α -乳白蛋白的大肠杆菌 OP50 的悬液 1 mL, 每 48 h 更换一次培养基, 22°C 恒温培养。24 h 后用实体显微镜观察其运动状态。秀丽隐杆线虫的头部在 1 min 内摆动次数计算为运动速率, 在 20 s 内秀丽隐杆线虫做一个完整正弦运动的次数计算为弯曲度。

为进一步了解其影响, 使用参考并改进自 YANG 等^[19]的实验方法。将同期化并喂养至 L4 期的秀丽隐杆线虫分别挑到含有 1 mg/mL 脱氧尿嘧啶 NGM 培养基中。每个平板内放置 15 条线虫, 每组设置 3 个平行实验。每天滴入含有 0、5、15、30、45、60 mg/L 的 α -乳白蛋白的大肠杆菌

OP50 的悬液 1 mL, 每 48 h 更换一次培养基, 22°C 恒温培养。在显微镜下用显微钩针轻轻触碰线虫, 观察其在 30 s 内的运动状况。如果线虫做连续一致的正弦运动则记为快速运动, 反之则为缓慢运动。当使用尺子测量线虫头部运动的直线距离时, 快速运动相当于每 10 s 移动 1 mm。每隔 2 d 在显微镜下进行一次计数, 维持相同培养条件, 直到没有快速运动线虫为止。

1.2.5 统计分析

使用 SPSS 26 进行数据分析和图表绘制, 实验数值采用平均值±标准偏差表示。使用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)单个指标的影响, 当 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

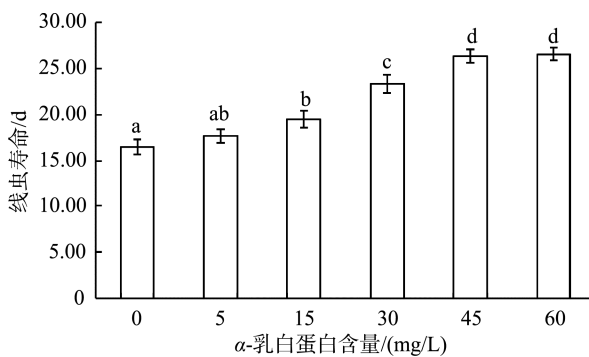
2 结果与分析

2.1 α -乳白蛋白的提取结果

本研究使用的 α -乳白蛋白的分离纯化方法是一种较为成熟的方法^[15], 可获得纯度较高的 α -乳白蛋白, 所得的 α -乳白蛋白的纯度为(95.4±1.4)%。

2.2 α -乳白蛋白对秀丽隐杆线虫寿命的影响

如图 1 所示, 当添加的 α -乳白蛋白的质量浓度为 5 mg/L 时, 线虫的平均寿命与对照组(0 mg/L)之间无显著差异($P > 0.05$); 而从 15 mg/L 实验组开始, 之后实验组线虫的平均寿命均显著高于对照组($P < 0.05$); 随着 α -乳白蛋白用量的增加, 线虫的平均寿命会不断增加, 30 mg/L 组显著高于 15 mg/L 组而 45 mg/L 组也显著高于 30 mg/L 组($P < 0.05$); 但 45 mg/L 组和 60 mg/L 组之间则差异不显著($P > 0.05$)。



注: 不同字母表示组间具有显著性($P < 0.05$), 下同。

图 1 α -乳白蛋白添加量对秀丽隐杆线虫寿命的影响(n=3)

Fig.1 Effects of α -lactalbumin dosage on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* (n=3)

研究表明, α -乳白蛋白具有显著延长秀丽隐杆线虫的寿命的能力, 且呈现一定范围的浓度梯度依赖性。具体表现在当 α -乳白蛋白含量为 45 mg/L 时, 线虫寿命最长为(26.33±0.72) d。相比于空白对照组的(16.50±0.83) d, 增幅为 59.58%。

2.3 同浓度的 α -乳白蛋白对秀丽隐杆线虫产卵的影响

如图 2 所示, α -乳白蛋白含量为 5 mg/L 时, 线虫产卵数与对照组(0 mg/L)无显著差异($P > 0.05$); 15 mg/L 组与对照组相比线虫产卵数有了显著的提升($P < 0.05$), 但与 5 mg/L 组差异不显著($P > 0.05$); 此后线虫产卵数随着 α -乳白蛋白含量的增加而增加, 第 30 mg/L 组显著多于 15 mg/L 组($P < 0.05$); 但与 45 mg/L 组和 60 mg/L 组相比差异不显著($P > 0.05$)。

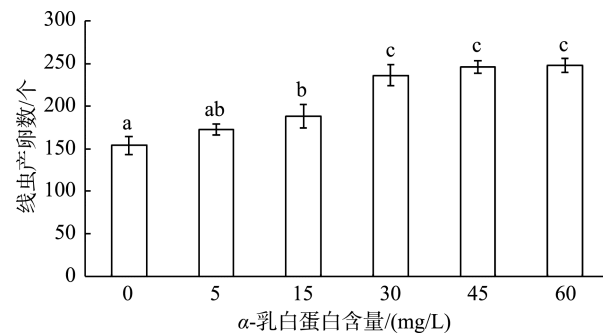


图 2 线虫产卵实验结果(n=3)

Fig.2 Results of nematode oviposition experiment (n=3)

当 α -乳白蛋白含量为 30 mg/L 时, 线虫的产卵数量为(236.33±12.23)个, 相比于空白对照组的(154.33±10.62)个, 增幅达到 53.13%。说明 α -乳白蛋白具有显著延长秀丽隐杆线虫的繁殖力的能力, 且呈现一定范围的浓度梯度依赖性。

2.4 同浓度的 α -乳白蛋白对秀丽隐杆线虫运动能力的影响

2.4.1 运动能力与弯曲度的实验结果

由表 1 可知, α -乳白蛋白含量为 5 mg/L 时, 线虫弯曲度与空白对照组(0 mg/L)相比差异不显著($P > 0.05$); 当 α -乳白蛋白含量为 15 mg/L 时, 线虫弯曲度显著高于空白对照组($P < 0.05$), 但与 5 mg/L 组和 30 mg/L 组均无显著差异($P > 0.05$), 此后线虫弯曲度随着蛋白含量增加而不断增加; 45 mg/L 组显著高于对照组和 15 mg/L 实验组($P < 0.05$), 但与第 30 mg/L 组和第 60 mg/L 组均无显著差异($P > 0.05$)。

由表 1 可知, 当 α -乳白蛋白含量为 5、15 mg/L 时, 线虫运动速率与对照组相比均无显著差异($P > 0.05$), 表明 α -乳白蛋白显著增加线虫运动速率需要足够的浓度。当 α -乳白蛋白含量为 45 mg/L 时, 线虫运动速率显著高于对照组($P < 0.05$)和 15 mg/L 实验组($P < 0.05$); 但是 45 mg/L 实验组与 30、60 mg/L 实验组均无显著差异($P > 0.05$)。

α -乳白蛋白含量为 45 mg/L 时, 线虫弯曲度为(17.00±1.63)次/20 s。相比空白对照组的(11.00±0.82)次/20 s, 增加了 54.54%; 运动频率达到了(149.00±7.79)次/min, 相比空白对照组的(125.00±5.35)次/min, 增加了 19.20%。说明 α -乳白蛋白具有显著提高秀丽隐杆线虫的运动力的能力, 且呈现一定范围的浓度梯度依赖性。

表 1 α -乳白蛋白添加量对秀丽隐杆线虫运动能力(运动速率, 弯曲度)的影响($n=3$)

Table 1 Effects of α -lactalbumin dosage on the athletic abilities (exercise rate, bending degree) of *Caenorhabditis elegans* ($n=3$)

α -乳白蛋白添加量 (mg/L)	线虫运动速率 (次/min)	线虫弯曲度 (次/20 s)
0	125.00±5.35 ^a	11.00±0.82 ^a
5	128.00±6.38 ^{ab}	13.00±0.82 ^{ab}
15	130.00±7.48 ^{ab}	14.00±1.41 ^b
30	139.00±9.42 ^{bc}	16.00±1.41 ^{bc}
45	149.00±7.79 ^c	17.00±1.63 ^c
60	150.00±7.79 ^c	18.00±1.82 ^c

注: 同列不同字母表示具有显著差异, $P<0.05$ 。

2.4.2 运动能力随时间的变化趋势

运动能力随时间的变化趋势如图 3 所示。随着时间推移, 所有线虫快速运动率都呈下降趋势。但是随着 α -乳白蛋白含量的不同, 快速运动率下降的速率也有所不同; 随着蛋白含量增加, 快速运动率下降曲线于平缓。实验开始后的前 3 d, 线虫快速运动率下降缓慢。但是在实验的第 3~15 d, 线虫快速运动率急剧下降。空白对照组在 17 d 后没有快速运动的线虫, 第 2 组(5 mg/L)也是如此; 而含量为 45 mg/L 时, 可以延长到 25 d。但是如果继续加大用量, 则不再有显著效果。具体表现为当 α -乳白蛋白含量为 60 mg/L 时, 最长时间仍为 25 d, 此趋势与线虫寿命趋势基本相同。

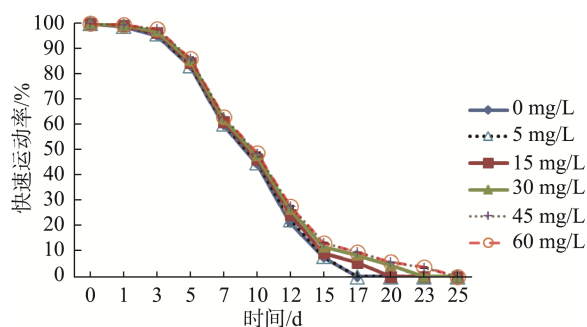


图 3 快速运动率与时间的关系实验结果

Fig.3 Experimental results of the relationship between fast exercise rates and time

3 讨论

α -乳白蛋白具有显著延长秀丽隐杆线虫的寿命的能力, 且呈现一定范围的浓度梯度依赖性, 此特性与从植物中提取的益生物物质相似。NAVARRO-HORTAL 等^[20]为了探究草莓对健康的有益作用, 进行了线虫喂养实验: 发现草莓提取物喂养的线虫能够显著延长寿命。王红等^[21]研究了紫薯提取物对线虫寿命的影响并对其机制进行了推测, 发

现紫薯提取物能够提高线虫寿命。标准培养条件下, 野生型秀丽隐杆线虫的寿命大约为 2~3 周, 实验也表明秀丽隐杆线虫是动物寿命实验中很好的模式生物。 α -乳白蛋白能够延长线虫寿命, 可能是因为 α -乳白蛋白自身的营养作用, 并且 α -乳白蛋白水解可以产生功能性多肽, 它们也可能具有延长秀丽隐杆线虫的作用。

α -乳白蛋白在一定浓度梯度范围内显著提高秀丽隐杆线虫繁殖力的能力, 这种特性与有益植物提取物类似, 而与有毒的纳米材料相反。TANBARA 等^[22]发现富含花青素的紫色 Pitanga 果实提取物可以提高线虫繁殖能力并延长线虫寿命, 其原因是 Pitanga 果实提取物可以改善线虫基因表达。WANG 等^[23]发现蓝莓提取物能够有效提升线虫寿命并增强其繁殖能力。YIN 等^[24]研究有机污染物全氟化合物对线虫生殖能力的破坏。而 ZHANG 等^[25]通过实验发现纳米二氧化硅材料会导致线虫生殖细胞不正常凋亡, 进而影响线虫繁殖能力。因此可知, 不同的功能成分可以通过不同途径影响线虫繁殖能力。本研究所用的 α -乳白蛋白自身作为一种常用的功能性蛋白, 其水解产生功能性多肽可能是提高线虫繁殖力的重要原因。

α -乳白蛋白具有提高线虫运动速率与弯曲度的能力, 此性质类似于有益植物提取物。NAN 等^[26]发现银杏果提取物能够提高线虫运动能力并延缓衰老, 而 XU 等^[27]发现铃兰毒苷能够帮助清除线虫体内自由基以提高线虫运动能力并延缓衰老。MENG 等^[28]在实验中发现芍药花蕊茶能够提高线虫运动能力和抗氧化能力。因此, 测定线虫运动速率与弯曲度是研究线虫运动能力较好的方法。 α -乳白蛋白被线虫吸收后会分解为多肽等小分子产物, 其中可能含有一些功能性多肽, 而这些多肽能够提升线虫的运动能力, 同时 α -乳白蛋白是一种营养物质, 加强线虫的营养也会一定程度上提升线虫的运动能力。

运动能力随时间变化实验结果证明了 α -乳白蛋白具有延缓线虫衰老并减缓因为衰老导致的运动能力减退。空白对照组在实验 17 d 后没有快速运动的线虫。当 α -乳白蛋白含量为 45 mg/L 时, 这个时间被延长至 25 d; 并且如果继续增加 α -乳白蛋白含量, 也不再能够显著延长。这和有益植物提取物相类似, 与纳米金属材料相反。SHEN 等^[29]在实验中发现白皮杉醇不仅能够延长线虫寿命, 还能延缓线虫因衰老导致的运动能力减弱。LIN 等^[30]从青钱柳叶片中提取出青钱柳的多糖, 并通过实验证明青钱柳多糖可以延长线虫寿命、延缓衰老及其导致的运动力减弱。但是 CHEN 等^[31]发现纳米 TiO₂ 材料对秀丽隐杆线虫的运动能力具有抑制作用并且会加速线虫运动能力减退。以上研究也证明了线虫运动能力与寿命具有较大的相关性, 推测 α -乳白蛋白水解产生功能性多肽可能是延缓衰老的重要原因。

4 结 论

本研究证明了饲喂不同浓度 α -乳白蛋白能够延长秀丽隐杆线虫寿命、提高线虫繁殖力、延缓衰老以及增强线虫活力,但是该功能具有一定范围内的浓度梯度依赖性。当 α -乳白蛋白添加量为 45 mg/L 时,线虫寿命增幅 59.58%、平均运动速率增幅 19.20%、平均弯曲度增幅 54.54%;而当 α -乳白蛋白添加量为 30 mg/L 时,线虫产卵数增幅 53.13%,并且如果继续增加 α -乳白蛋白含量差异也不再显著。同时 α -乳白蛋白也能够延缓线虫衰老及衰老导致的运动能力减退。除 α -乳白蛋白自身的营养功能外,其水解产生的功能性多肽也可能是 α -乳白蛋白具有以上功能的重要原因。但是对 α -乳白蛋白的功能的作用机制仍然有待于更深入的研究,需要通过更多的动物实验与临床实验验证。本研究结论有望对未来乳白蛋白功能性食品的开发提供方法和数据的支撑。

参考文献

- [1] 朱凌燕,朱晗,王军波. α -乳白蛋白对婴儿生长发育影响的研究现状[J]. 中国生育健康杂志, 2015, (2): 193–196.
ZHU LY, ZHU H, WANG JB. Research status of the effect of α -lactalbumin on infant growth and development [J]. Chin J Reprod Health, 2015, (2): 193–196.
- [2] ELENA L, ALEXANDER G, THOMAS L, *et al.* Influence of denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides [J]. Food Chem, 2015, 187: 545–554.
- [3] SHI J, ZHAO XH. *In vitro* immuno-modulatory ability of tryptic caseinate hydrolysate affected by prior caseinate glycation using the Maillard reaction or transglutaminase [J]. Food Agric Immunol, 2017, 28(5/6): 1029–1045.
- [4] 王瑶,杨宇. 乳清蛋白用于结直肠癌营养不良患者的研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(2): 150–152.
WANG Y, YANG Y. Research progress of whey protein in patients with colorectal cancer malnutrition [J]. Chin J Mult Org Dis Elder, 2018, 17(2): 150–152.
- [5] SAILENDRA M, SUBHANKAR P. Stable self-assembly of bovine α -lactalbumin exhibits target-specific antiproliferative activity in multiple cancer cells [J]. ACS Appl Mater Int, 2015, 7(51): 28177–28187.
- [6] FANG B, ZHANG M, TIAN M, *et al.* Bovine lactoferrin binds oleic acid to form an anti-tumor complex similar to HAMLET [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(4): 535–543.
- [7] BAUMEISTER R, GE LM. The worm in US-*Caenorhabditis elegans* as a model of human disease [J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(4): 147–148.
- [8] WAN QL, FU XD. Uric acid induces stress resistance and extends the life span through activating the stress response factor DAF-16/FOXO and SKN-1/NRF2 [J]. Aging-US, 2020, 12(3): 2840–2856.
- [9] LEE SH, AN HS, JUNG YW, *et al.* Korean mistletoe (*Viscum album* Coloratum) extract extends the lifespan of nematodes and fruit flies [J]. Biogerontology, 2014, 15(2): 153–164.
- [10] CAI H, RASULOVA M, LIESELOT V, *et al.* Life-span extension by axenic dietary restriction is independent of the mitochondrial unfolded protein response and mitohormesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Gerontol A-Biol, 2017, 72(10): 1311–1318.
- [11] TIAN J, GEISS C, ZARSE K, *et al.* Green tea catechins EGCG and ECG enhance the fitness and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by complex I inhibition [J]. Aging-US, 2021, 13(19): 22629–22648.
- [12] DOSHI SHITAL, BRAGANZA VINCENT. Ameliorative effect of *Argyrea boseana* Sant. & Pat. on stress in *C. elegans* [J]. J Ayurveda Integr Me, 2020, 11(2): 147–152.
- [13] WANG F, DAI YX, ZHU XF, *et al.* Saturated very long chain fatty acid configures glycosphingolipid for lysosome homeostasis in long-lived *C. elegans* [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1–14.
- [14] 栾雅琨. 降低 BCCIP 基因表达对秀丽隐杆线虫应激抗性的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
LUAN YK. The effect of reducing BCCIP expression on stress resistance of *Caenorhabditis Elegans* [D]. Changchun: University of Jilin, 2021.
- [15] TRUJILLO CL, CAMACHO BM, CANO SC, *et al.* Development of an infant formula high in alpha-lactalbumin with only A2 beta-casein by spray drying, designed to resemble the protein composition of human milk [J]. Rev Mex Ing Quim, 2019, 18(1): 215–229.
- [16] TOUHAMI S, CHAMBERLAND J, PERREAULT V, *et al.* Coupling high hydrostatic pressure and ultrafiltration for fractionation of alpha-lactalbumin from skim milk [J]. Sep Sci Technol, 2021, 56(6/9): 1102–1111.
- [17] SIVAKUMAR K, IYYASWAMI R. Synergistic extraction of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization [J]. Sep Purif Technol, 2015, 146: 301–310.
- [18] WANG C, SAAR V, LEUNG KL, *et al.* Human amyloid β -peptide and tau co-expression impairs behavior and causes specific gene expression changes in *Caenorhabditis elegans* [J]. Neurobiol Dis, 2018, 109: 88–101.
- [19] YANG J, WAN QL, MU QZ, *et al.* The lifespan-promoting effect of otophylloside B in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nat Product Biopros, 2015, 5(4): 177–183.
- [20] NAVARRO-HORTAL MD, ROMERO-MARQUEZ JM, VARELA-LÓPEZ TY, *et al.* Strawberry phenolic extract increases lifespan in *C. elegans* [J]. IX Int Strawb Sym, 2021, 1309: 995–1001.
- [21] 王红, 张晓寒, 程静, 等. 紫薯提取物对秀丽隐杆线虫抗氧化作用的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 165–170.
WANG H, ZHANG XH, CHENG J, *et al.* Effect of purple sweet potato extract on antioxidant activity of *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Sci, 2017, 38(23): 165–170.
- [22] TANBARA AL, MORAES LLS, DAL F, *et al.* Purple pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 120: 639–650.
- [23] WANG HL, LIU J, LI T, *et al.* Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Funct, 2018, 9(10): 5273–5282.

- [24] YIN JC, JIAN ZH, ZHU GC, *et al.* Male reproductive toxicity involved in spermatogenesis induced by perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2021, 28(2): 1443–1453.
- [25] ZHANG FF, YOU XY. Silica nanoparticles enhance germ cell apoptosis by inducing reactive oxygen species (ROS) formation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Toxicol Sci*, 2020, 45(3): 117–129.
- [26] NAN S, WEN Z, FENG L, *et al.* Ginkgo seed extract promotes longevity and stress resistance of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Food Funct*, 2021, 12(24): 12395–12406.
- [27] XU J, GUO YM, SUI TZ, *et al.* Molecular mechanisms of anti-oxidant and anti-aging effects induced by convallatoxin in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Free Radical Res*, 2017, 51(5): 529–544.
- [28] MENG JS, CHENG ML, LIU L, *et al.* *In-vitro* antioxidant and *in-vivo* anti-aging with stress resistance on *Caenorhabditis elegans* of herbaceous peony stamen tea [J]. *Int J Food Prop*, 2021, 24(1): 1349–1366.
- [29] SHEN PY, YUE YR, SUN QC, *et al.* Piceatannol extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 [J]. *Biofactors*, 2017, 43(3): 379–387.
- [30] LIN CX, SU ZX, LUO J, *et al.* Polysaccharide extracted from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) *Ilijinskaja* enhanced stress resistance in *Caenorhabditis elegans* via skn-1 and hsf-1 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 243–254.
- [31] CHEN XJ, ZHU Y, YANG K, *et al.* Nanoparticle TiO₂ size and rutile content impact bioconcentration and biomagnification from algae to daphnia [J]. *Environ Pollut*, 2019, 247(4): 421–430.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



郜鑫洋, 硕士研究生, 主要研究方向为生物工程。

E-mail: gaoxinyang0409@163.com



陈树兴, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性乳制品。

E-mail: chenshuxing1@163.com