

王继岚, 乔巨慧, 刘颖, 等. 人参提取物延缓果蝇衰老的作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 406-413. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040160

WANG Jilan, QIAO Juhui, LIU Ying, et al. Anti-aging Effect of Ginseng Extract and Its Mechanism on *Drosophila melanogaster*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(3): 406-413. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040160

· 营养与保健 ·

人参提取物延缓果蝇衰老的作用及机制研究

王继岚¹, 乔巨慧², 刘颖², 赵雨初², 张思雨², 王思明², 刘美辰^{2*}

(1. 吉林省药品审核查验中心, 吉林长春 130062;

2. 长春中医药大学东北亚中医药研究院, 吉林长春 130117)

摘要:目的: 基于果蝇模式生物, 探讨人参提取物对果蝇衰老的延缓作用及其机制。方法: 通过高效液相色谱法分析人参提取物中人参皂苷成分组成; 将野生型 Canton-S 果蝇随机分成对照组及人参提取物组, 通过寿命实验及检测摄食量、甘油三酯水平、繁殖能力、运动能力, 以及在饥饿、热应激以及氧化应激条件下果蝇的存活时间来分析人参提取物的抗衰老能力; 通过聚合酶链式反应测定腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 通路及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路相关基因转录水平。结果: 人参提取物中含 13 种人参皂苷成分。与对照组相比, 7.5 mg/mL 人参提取物对果蝇的延寿率达 9.72%, 且不显著影响其摄食量、甘油三酯水平以及产卵量 ($P>0.05$), 能够显著提高果蝇的攀爬能力 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 可显著增加果蝇抵抗压力应激能力 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与对照组相比, 人参提取物的摄入显著提高了 AMPK、FoxO、Sirt1、LKB1 和 CaMKII 的转录水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 显著降低 HDAC4 和 SREBP 的转录水平 ($P<0.05$)、提高 ATP 含量和 ATP/ADP 比值 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 显著降低 mTOR 通路相关基因 PI3K、TORC、4E-BP 和 S6K 的转录水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 极显著提高 Atg1、Atg5、Atg8a 和 Atg8b 的转录水平 ($P<0.01$)。结论: 人参提取物可通过激活 AMPK 通路并抑制 mTOR 通路延缓果蝇衰老。

关键词: 人参提取物, 果蝇, 延缓衰老, AMPK, mTOR

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)03-0406-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040160



本文网刊:

Anti-aging Effect of Ginseng Extract and Its Mechanism on *Drosophila melanogaster*

WANG Jilan¹, QIAO Juhui², LIU Ying², ZHAO Yuchu², ZHANG Siyu², WANG Siming², LIU Meichen^{2*}

(1. Jilin Provincial Center for Drug Inspection, Changchun 130062, China;

2. Northeast Asian Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: Objective: Based on the model organism of *Drosophila melanogaster*, the anti-aging effect of ginseng extract and its mechanism on *Drosophila melanogaster* were investigated. Methods: The composition of ginsenosides in ginseng extract were analyzed by HPLC. Wild Canton-S *Drosophila melanogaster* were randomly divided into control group and ginseng extract group. The life span test, food intake, triglyceride level, reproductive ability, exercise ability, and the survival time of *Drosophila melanogaster* under starvation, heat stress and oxidative stress were applied to analyze the anti-aging function of ginseng extract. The transcription levels of genes related to AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway were determined by polymerase chain reaction. Results: Ginseng extract contained 13 ginsenosides. Compared with the control group, 7.5 mg/mL ginseng extract could prolong the

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 吉林省重大科技专项 (20210304002YY); 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JKH20210966KJ); 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202201ZYTS683)。

作者简介: 王继岚 (1971-), 女, 本科, 主任药师, 研究方向: 中药有效成分及其传统功效, E-mail: wjlan1971@163.com。

* 通信作者: 刘美辰 (1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药有效成分及其传统功效, E-mail: liumc0367@163.com。

life span of *Drosophila melanogaster* by 9.72%, and had no significant effect on the food intake, triglyceride level and fecundity ($P>0.05$), significantly improved the climbing ability ($P<0.05$ or $P<0.01$), and increased the ability to resist stress ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the control group, the intake of ginseng extract significantly increased the transcript levels of *AMPK α* , *FoxO*, *Sirt1*, *LKB1* and *CaMKII* ($P<0.05$ or $P<0.01$), decreased the transcript levels of *HDAC4* and *SREBP* ($P<0.05$), and enhanced ATP content and ATP/ADP ratio ($P<0.05$ or $P<0.01$). In addition, ginseng extract significantly decreased the transcription levels of mTOR-related genes *PI3K*, *TORC*, *4E-BP* and *S6K* ($P<0.05$ or $P<0.01$), and significantly increased the transcription levels of *Atg1*, *Atg5*, *Atg8a* and *Atg8b* ($P<0.01$). Conclusion: Ginseng extract could delay the aging of *Drosophila melanogaster* by activating AMPK pathway and inhibiting mTOR pathway.

Key words: ginseng extract; *Drosophila melanogaster*; anti-aging; AMPK; mTOR

衰老被定义为组织、器官和神经元功能的进行性衰退,与癌症、糖尿病、心血管疾病和神经退行性疾病等慢性和致命疾病密切相关,且这些疾病的患病率几乎随年龄的增加而呈指数性增长^[1-3]。因此,寻找能够有效延缓衰老、延长寿命的药物或治疗方案是目前生命科学领域的主要挑战之一。中药作为我国文化瑰宝,因生物活性高、毒副作用小等优势在抗衰老方面的研究引发人们的广泛关注。

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)是我国吉林地区地道药材,因具有大补元气、益气安神等作用,被广泛应用于衰老及与衰老相关疾病的治疗及预防,是延年益寿的首选中药之一^[4-6]。果蝇模式生物因其生命周期短、遗传背景清晰等优势,是研究药物延缓衰老的理想实验模型^[7-8]。研究表明,人参水提物以及水浸提法所得的人参提取液均能够延长 Oregon K 雄性黑腹果蝇寿命并提高其抗氧化能力^[9-10]。然而,现阶段关于人参提取物延缓果蝇衰老的研究主要集中在寿命实验及抗氧化活性方面,评价指标单一且机制不清晰,亟待进一步深入的研究与探索。

本研究基于果蝇评价体系,分析人参提取物对寿命的延长作用。进一步以果蝇生殖能力、攀爬能力以及抵抗压力应激能力为指标,多层次、多角度地分析人参提取物的抗衰老活性。最后,应用聚合酶链式反应(PCR)技术,通过测定 AMPK 通路及 mTOR 通路相关基因表达水平,探索人参提取物延缓果蝇衰老的作用机制,以期为人参提取物延缓衰老研究以及抗衰老药物的开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

果蝇品系 野生型 Canton-S,由福州大学生物工程学院杨宇丰教授惠赠,培养条件为温度 25 °C,恒定湿度 65%,光照周期 12 h;人参(园参) 吉林省宏检大药房有限公司(批号 2021060301);人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rg2、Rh1、Ro、Rb1、Rc、Rb2、Rb3、Rd、Rg3(S)、Rh2(S) 成都德思特生物技术有限公司;酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、尼泊金甲酯、丙酸 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;蔗糖 上海源叶生物有限公司;琼脂 西陇化工股份有限公司;无水乙醇、过氧化氢 北京化工厂;葡聚糖硫酸钠、食用色素亮蓝 北京索莱宝生物技术有限公司;

TRIzol 美国 Invitrogen 公司;甘油三酯测定试剂盒 南京建成生物工程研究所;ATP 含量测定试剂盒、ATP/ADP 比值测定试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司;TaKaRa 反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒 日本 TaKaRa 公司。

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 美国赛默飞公司;Infinite 200 Pro 型酶标仪 瑞士 TECAN 公司;MJX-430 型恒温培养箱 浙江托普仪器有限公司;EVOS 型数码倒置显微镜 美国 AMG 公司;CFX96 型 PCR 仪 美国 BIO-RAD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人参提取物的制备工艺 参考姜婷婷等^[11]的方法稍作修改,取 200 g 人参洗净切片,按 1:10 (w/v)料液比第一次水煎煮 1.5 h,第二次水煎煮 1 h,合并滤液并浓缩,加入 75% 乙醇,进行醇沉,离心取上清,冷冻干燥后即得人参提取物。

1.2.2 人参提取物的成分分析 参考 Zhu 等^[12]的方法稍作修改,利用高效液相色谱法(HPLC)对人参提取物中的皂苷类成分进行分析。供试品溶液制备:精密称取人参提取物 0.15 g,加入 10 mL 水饱和正丁醇,在 80 °C 条件下加热回流萃取 1 h。取水饱和正丁醇层,蒸干后用 5 mL 甲醇溶解定容,使用 0.22 μ m 滤膜过滤。对照品溶液制备:精密称取人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rg2、Rh1、Ro、Rb1、Rc、Rb2、Rb3、Rd、Rg3(S)、Rh2(S)适量,用甲醇溶解并稀释至刻度,制成浓度分别为 0.485、0.400、0.475、0.390、0.450、0.445、0.520、0.410、0.375、0.370、0.460、0.335、0.390 mg/mL 的对照品溶液混合物。利用外标法,以对照品的保留时间和峰面积,对人参提取物中的人参皂苷进行定性和定量分析。

色谱条件:安捷伦 ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱

表 1 流动相梯度

Table 1 Gradient of mobile phase

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~30	19	81
30~40	19~29	81~71
40~70	29	71
70~80	29~32	71~68
80~90	32~42	68~58
90~105	42~60	58~40
105~113	60	40

(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A 为乙腈和 B 为 0.05% 磷酸水溶液, 按表 1 的方法进行梯度洗脱; 检测波长为 203 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; 流速 1 mL/min。理论板数按人参皂苷 Rb1 峰计算应不低于 5000。

1.2.3 果蝇培养基的制备 参考张婉迎等^[9]的方法稍作修改。

1.2.3.1 饮食限制(dietary restriction, DR)培养基 含有 21 g/L 酵母, 18 g/L 蔗糖, 7 g/L 琼脂, 14 mL/L 10% 尼泊金甲酯(无水乙醇溶解), 7 mL/L 丙酸。

1.2.3.2 基础培养基 除含有 42 g/L 酵母外, 基础培养基制备方法与上述相同。

1.2.3.3 含药培养基 将人参提取物加入基础培养基, 制备成终浓度为 2.5、5、7.5、10 mg/mL 的培养基。

1.2.4 寿命实验 参考吴俊豪等^[13]的方法稍作修改, 取羽化 6~8 h 内的果蝇, 在 CO₂ 麻醉作用下将雌性和雄性果蝇分开。雌蝇随机分为对照组、人参提取物组, 给予基础培养基或不同浓度人参提取物培养基, 每瓶 10 只雌蝇, 每个实验组 10 瓶。记录死亡情况和检查情况, 计算果蝇的存活率、平均寿命及延寿率。

存活率(%)=现存活的果蝇数/每组果蝇总数×100 式(1)

平均寿命(d)=每组所有果蝇寿命之和/每组果蝇总数 式(2)

延寿率(%)=(实验组平均寿命-对照组平均寿命)/对照组平均寿命×100 式(3)

1.2.5 食物摄取实验 参考乔巨慧^[14]的方法稍作修改, 收集对照组、7.5 mg/mL 人参提取物组、葡聚糖硫酸钠组(阳性对照, 待测前 3 d 喂食终浓度为 3% 葡聚糖硫酸钠, 稀释液为 5% 蔗糖溶液)果蝇各 100 只, 饲养于含有 2.5% 食用色素亮蓝(w/v)的 DR 培养基中。喂食 1 h 后, 将果蝇在液氮中快速冷冻, 于 200 mL 的蒸馏水中匀浆。然后加入 800 mL 蒸馏水, 用 0.22 mm 滤膜过滤去除碎片和脂质。酶标仪在 629 nm 下测量吸光度。

摄食百分比(%)=(OD_{实验组}/OD_{阳性对照组})×100 式(4)

1.2.6 甘油三酯含量检测 参考成丹^[15]的方法稍作修改, 对照组、7.5 mg/mL 人参提取物组果蝇饲养 10 d, 在液氮中快速冷冻, 并根据甘油三酯测定试剂盒的方法进行含量测定。

1.2.7 繁殖能力检测 参考单建英^[16]的方法稍作修改, 取 3 日龄的处男蝇与对照组或 7.5 mg/mL 人参提取物组雌性果蝇放入基础培养基中交配, 每管 5 对, 每组 10 管, 每隔 12 h 收集果蝇卵, 并统计果蝇产卵数。

1.2.8 运动能力检测 参考乔巨慧^[14]的方法稍作修改, 收集第 20、30 和 40 d 的果蝇, 对照组、7.5 mg/mL 人参提取物组各 100 只。将果蝇转移至长移液管

中, 实验时摇晃至管底, 拍摄第 5 s 时攀爬位置, 并计算攀爬速度。

攀爬速度(mm/s)=攀爬距离(mm)/攀爬时间(s) 式(5)

1.2.9 应激能力测试 参考单建英^[16]的方法稍作修改, 对照组、7.5 mg/mL 人参提取物组果蝇饲养 10 d, 每组 100 只。饥饿实验: 将果蝇饲养在含有 1.5% 琼脂糖、3% 尼泊金甲酯、0.5% 丙酸的培养基中, 每 12 h 记录一次果蝇存活情况直至全部死亡。热应激实验: 将果蝇饲养在 37 °C 恒温培养箱中, 每 1 h 记录一次果蝇存活情况直至全部死亡。氧化应激实验: 用 5% 蔗糖溶液稀释过氧化氢至终浓度为 5%, 加 400 μL 在滤纸上, 将果蝇转至放置过氧化氢滤纸的测定管中, 每 2 h 记录一次果蝇存活情况直至全部死亡。

1.2.10 ATP 含量及 ATP/ADP 比值测定 参考吴楠^[17]的方法稍作修改, 对照组、7.5 mg/mL 人参提取物组果蝇饲养 10 d, 在液氮中快速冷冻, 并根据 ATP 含量测定试剂盒和 ATP/ADP 比值测定试剂盒测定 ATP 含量和 ATP/ADP 比值。

1.2.11 基因表达分析 通过 RT-PCR 法对 AMPK 通路相关基因 *AMPKα*、*FoxO*、*Sirt1*、*HDAC4*、*SREBP*、*LKB1*、*CaMKII* 以及 *mTOR* 通路相关基因 *PI3K*、*TORC*、*4E-BP*、*S6K*、*Atg1*、*Atg5*、*Atg8a*、*Atg8b* 的 mRNA 水平进行检测。参考吴楚璇^[18]的方法稍作修改, 对照组、7.5 mg/mL 人参提取物组果蝇饲养 10 d, 在液氮中研磨并加 TRIzol 试剂以提取总 RNA。根据 TaKaRa 反转录试剂盒及 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒说明书依次进行反转录及 PCR 实验。以 *GAPDH* 为内参基因, 利用 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因表达水平。引物由库美生物公司合成, 序列如表 2。

1.3 数据处理

数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件中 long-rank test、T test 或 One-way ANOVA 方法进行统计分析, *P*<0.05 具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 人参提取物成分分析

人参皂苷是人参中主要的有效成分, 其组成和含量是决定人参生物活性的关键因素^[19]。本研究通过 HPLC 法测定人参提取物中人参皂苷的组成及含量, 样品及对照品溶液的色谱图及含量如图 1 和表 3 所示。以对照品溶液中各标准品的出峰时间为参照, 辨别出人参提取物中含 13 种人参皂苷, 种类和含量分别为 Rg1(0.1282 mg/g)、Re(0.2066 mg/g)、Rf(0.0503 mg/g)、Rg2(0.0319 mg/g)、Rh1(0.0072 mg/g)、Ro(0.0071 mg/g)、Rb1(0.2472 mg/g)、Rc(0.3198 mg/g)、Rb2(0.2230 mg/g)、Rb3(0.0360 mg/g)、Rd(0.1616 mg/g)、Rg3(S)(0.0149 mg/g)、Rh2(S)(0.0006 mg/g)。

表 2 引物序列

Table 2 The sequences of primers

基因名称	上游序列	下游序列
<i>GAPDH</i>	5'-CTCGACTCACGGTCGTTTCA-3'	5'-GGTGATCTTCTGGCCGTTCA-3'
<i>AMPKa</i>	5'-GGCCATCGCTTACCATCTGA-3'	5'-ATCGATGATTGGGGAACGGG-3'
<i>FoxO</i>	5'-GCGCCTCTACTTTGATAGGAC-3'	5'-TATTGATGTCCAGCAGGCCG-3'
<i>Sirt1</i>	5'-AACCAGGTGCCAGACACTAC-3'	5'-GTTGAGGCCAGAATTTCCGC-3'
<i>HDAC4</i>	5'-CGAATGGCACAACGACAACG-3'	5'-GTTCCGTTCCGATGCTGTCT-3'
<i>SREBP</i>	5'-TGGCTTCTACCAAGTGCCAG-3'	5'-CAAGAGCTGTGCGTTGGAC-3'
<i>LKB1</i>	5'-ATACGCCACGACACTTGGTT-3'	5'-ACCGTGGAGTTGCGGTATTT-3'
<i>CaMKII</i>	5'-CTCGCAGTGCTCTTCAGCTA-3'	5'-TTTGCAGTTTTTACCAAGAAC-3'
<i>PI3K</i>	5'-CCTAATCTGCCTGTTGCCCA-3'	5'-ACTGAGTCGCTTCGTTTCGT-3'
<i>TORC</i>	5'-GCGCCTCTACTTTGATAGGAC-3'	5'-TATTGATGTCCAGCAGGCCG-3'
<i>4E-BP</i>	5'-ACCCTTACTCCACCCTCC-3'	5'-GGAGTTTGGCTCAATGGGGA-3'
<i>S6K</i>	5'-CATGCATTTGGAGCGTGAGG-3'	5'-TCCTTGACAGTCCGAAGTC-3'
<i>Atg1</i>	5'-GCCAGTCCATCGAAAATAACC-3'	5'-GCGGCGCAGCAGGCACAG-3'
<i>Atg5</i>	5'-GCCCTGCGACTTCACTATCC-3'	5'-CCATTAATCGCCAAACTTCT-3'
<i>Atg8a</i>	5'-CCAATACAAGGAGGAGCAC-3'	5'-AGGAAGTAGAACTGACCGAC-3'
<i>Atg8b</i>	5'-AATGTGATCCCACCGACATC-3'	5'-TTGAGCGAGTAGTCCCAATG-3'

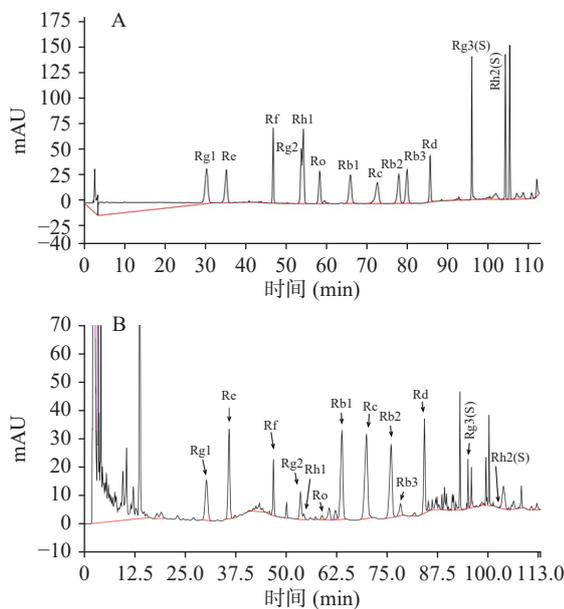


图 1 HPLC 法测定人参提取物中人参皂苷组成

Fig.1 Determination of ginsenosides in ginseng extract by HPLC

注: A: 标准品; B: 人参提取物。

表 3 人参提取物中各人参皂苷含量

Table 3 Contents of ginsenosides in ginseng extract

人参皂苷	含量(mg/g)
Rg1	0.1282
Rc	0.2066
Rf	0.0503
Rg2	0.0319
Rh1	0.0072
Ro	0.0071
Rb1	0.2472
Rc	0.3198
Rb2	0.2230
Rb3	0.0360
Rd	0.1616
Rg3(S)	0.0149
Rh2(S)	0.0006

2.2 人参提取物对果蝇寿命的影响

寿命是确定药物是否具有延缓衰老作用最直观的评价指标。已有研究证实, 人参水提物及皂苷类成分具有延缓果蝇衰老的作用^[9, 14]。经实验证实, 由图 2 可知, 5.0 mg/mL 人参提取物对果蝇寿命具有显著延长作用($P < 0.05$), 7.5 mg/mL 人参提取物对果蝇寿命具有极显著延长作用($P < 0.01$), 在低于或高于这些浓度时均无显著影响($P > 0.05$)。由果蝇平均寿命的剂量-反应曲线可知, 在果蝇的饮食中添加 7.5 mg/mL 人参提取物对寿命具有最大延长效果, 延寿率高达 9.72%。因此, 后续实验以 7.5 mg/mL 作为最佳剂量。

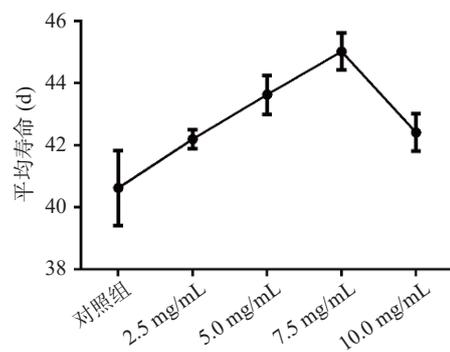
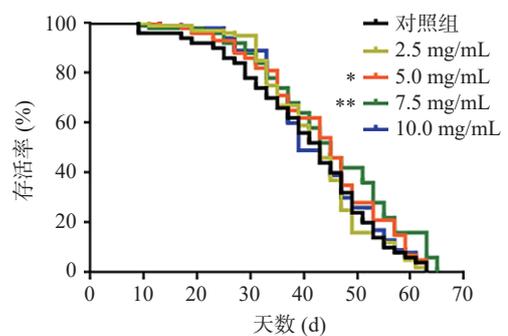


图 2 人参提取物对果蝇寿命的影响

Fig.2 Effect of ginseng extract on the life span of *Drosophila melanogaster*

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 图 5~图 9 同。

2.3 人参提取物对果蝇摄食量及甘油三酯含量的影响

众所周知,适当的饮食限制可以通过减少热量摄入、改善代谢而达到降低衰老速率、延长健康寿命的效果^[20-22]。Lee等^[23]发现,在果蝇饮食中补充韩国红参能够通过限制黑腹果蝇摄食量,从而延长寿命。为确定人参提取物的延寿作用是否因饮食限制而引起,本研究以果蝇摄食量和甘油三酯为评价指标,进一步了解人参提取物的延寿途径。由图3可知,与对照组相比,7.5 mg/mL 人参提取物对果蝇摄食量无显著影响($P>0.05$),且未显著降低果蝇的甘油三酯水平($P>0.05$)。由此推测,人参提取物的延寿作用并不依赖于饮食限制途径。

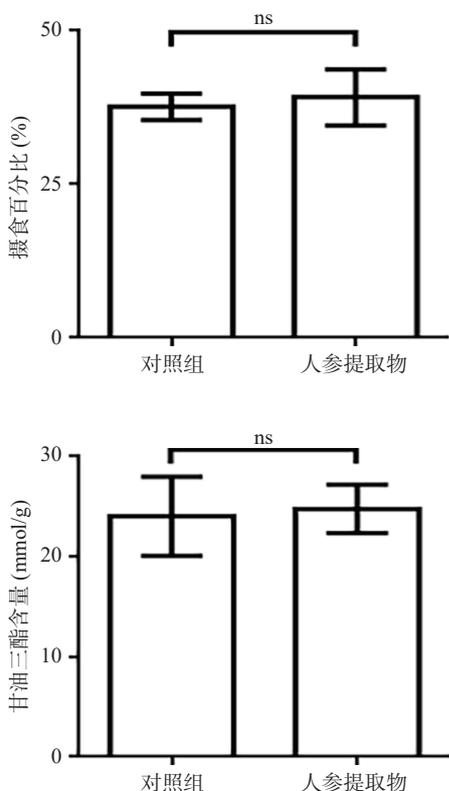


图3 人参提取物对果蝇摄食量及甘油三酯含量的影响

Fig.3 Effect of ginseng extract on the food intake and triglyceride content of *Drosophila melanogaster*

注:与对照组相比,ns表示差异不显著 $P>0.05$;图4同。

2.4 人参提取物对果蝇繁殖能力的影响

果蝇的生殖活动会触发与衰老相关基因表达的变化,进而导致过度生殖后寿命缩短^[24],因此减少生殖活动被认为是延长果蝇寿命的方案之一。但是,理想的抗衰老药物不应该以损伤生殖功能为前提。先前研究表明,人参总皂苷能够在不牺牲生殖能力的基础上发挥对果蝇的延寿作用^[14]。为确定人参提取物的延寿作用是否与干涉生殖功能相关,本研究以产卵量为评价指标,进行进一步分析。由图4可知,与对照组相比,添加7.5 mg/mL 人参提取物的饮食对雌性果蝇的产卵量无显著影响($P>0.05$)。由此推测,人参提取物能够在不牺牲生殖能力为前提的情况下,发挥对寿命的延长作用。

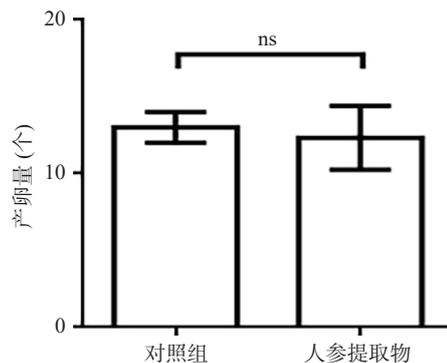


图4 人参提取物对果蝇繁殖能力的影响

Fig.4 Effect of ginseng extract on reproductive ability of *Drosophila melanogaster*

2.5 人参提取物对果蝇运动能力的影响

果蝇的运动能力是评价衰老的一个重要标志^[25]。攀爬能力作为果蝇健康指标,可以衡量药物对果蝇衰老肌肉的改善程度。因此,本研究通过记录果蝇攀爬速度,评价人参提取物对运动能力的影响。由图5可知,两组果蝇的攀爬速度均随年龄的增长而下降。在摄入7.5 mg/mL 人参提取物后,第20和30 d果蝇的攀爬速度显著高于对照组($P<0.05$),而第40 d果蝇攀爬速度与对照组相比有极显著差异($P<0.01$)。由此推测,人参提取物对果蝇运动能力有显著提升作用。

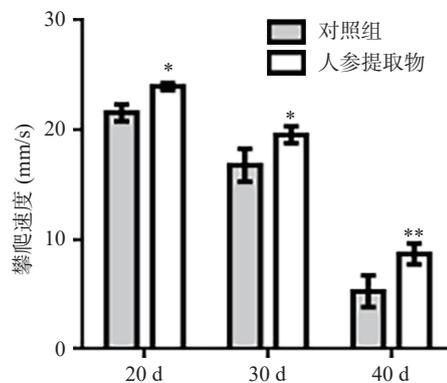


图5 人参提取物对果蝇运动能力的影响

Fig.5 Effect of ginseng extract on athletic ability of *Drosophila melanogaster*

2.6 人参提取物对果蝇应激能力的影响

应激能力被认为是衰老的关键因素,且寿命会因抵抗应激能力增强而延长^[14]。通常以饥饿应激、热应激以及氧化应激的抵抗力来评价果蝇对生理应激的反应^[16]。本研究将果蝇分别置于饥饿、热应激和过氧化氢环境下,考察人参提取物对果蝇存活率的影响,进一步分析人参提取物的延寿作用是否部分归因于对果蝇压力耐受性的增强。由图6可知,在饥饿和热应激的干预条件下,与对照组相比,摄入人参提取物的果蝇生存曲线均显著右移($P<0.05$)。此外,在过氧化氢干预条件下,摄入人参提取物的果蝇生存曲线与对照组相比极显著右移($P<0.01$)。以上结果

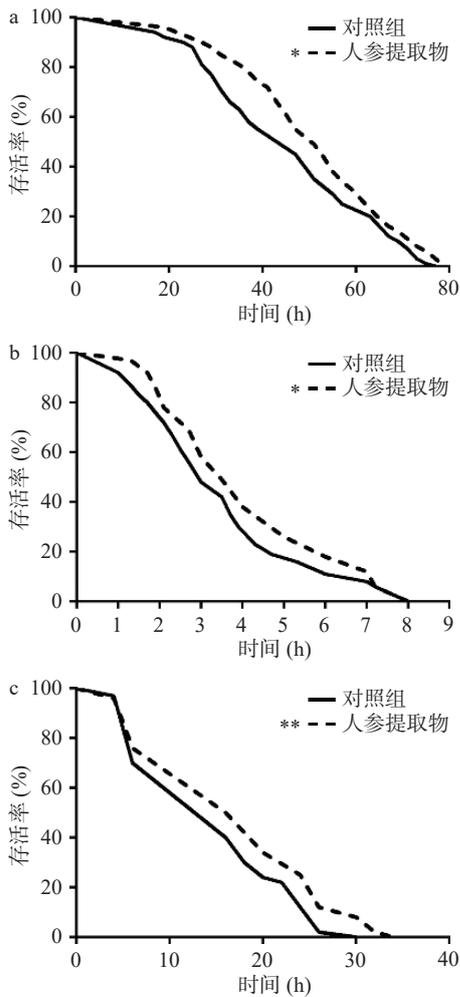


图 6 人参提取物对果蝇应激能力的影响
Fig.6 Effect of ginseng extract on stress ability of *Drosophila melanogaster*

注: a: 饥饿应激; b: 热应激; c: 氧化应激。

说明人参提取物可延长果蝇在应激环境下的存活时间。由此推测, 人参提取物对果蝇寿命的延长作用与增强其抵抗应激能力相关。

2.7 人参提取物对 AMPK 信号通路的影响

AMPK 是细胞内能量状态的感受器, 在衰老的生物体内, 由于能量代谢水平降低, AMPK 的活性受到抑制^[26]。研究表明, 激活 AMPK 能够通过调控一系列与衰老相关的基因(如上调 *FoxO* 和 *Sirt1*、下调 *HDAC4* 和 *SREBP*), 达到延缓衰老的目的^[27]。已有研究提示, 人参组方或人参皂苷 Rb1 能够通过激活 AMPK 信号通路拮抗内皮细胞衰老^[28-29], 然而关于人参提取物延缓衰老是否与激活 AMPK 相关却未见报道。本研究首先利用 PCR 技术考察对 AMPK 信号通路相关基因转录水平的影响。结果可知, 与对照组相比, 摄入人参提取物的果蝇中 *AMPKα* 及其下游基因 *FoxO* 的转录水平极显著增加 ($P < 0.01$), *Sirt1* 的转录水平显著增加 ($P < 0.05$), *HDAC4* 和 *SREBP* 的转录水平显著降低 ($P < 0.05$) (图 7), 该结果表明人参提取物能激活 AMPK, 并调控 AMPK 介导的衰老相关基因表达的改变。ATP 是生物体内能量的“通

货”, AMPK 信号通路的激活能够增加 ATP 的合成, 提高机体能量代谢^[30]。进一步对 ATP 含量及 ATP 生成趋势-ATP/ADP 比值进行检测分析, 结果如图 8 所示, 与对照组相比, 摄入人参提取物的果蝇中 ATP 含量极显著升高 ($P < 0.01$), ATP/ADP 比值显著升高 ($P < 0.05$)。AMPK 的激活与 LKB1 和 CaMKII 两个主要上游激酶相关。研究表明, LKB1 和 CaMKII 均能够通过磷酸化 Thr172 位点从而激活 AMPK, 维持代谢稳态、延长寿命^[31]。接下来对 AMPK 的上游调控基因进行考察, 结果如图 7 所示, 果蝇中 *LKB1*

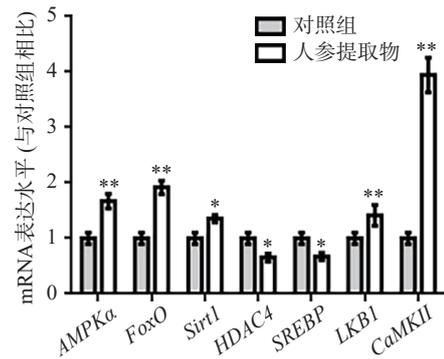


图 7 人参提取物对 *AMPKα*、*FoxO*、*Sirt1*、*HDAC4*、*SREBP*、*LKB1* 和 *CaMKII* 转录水平的影响
Fig.7 Effect of ginseng extract on transcription levels of *AMPKα*、*FoxO*、*Sirt1*、*HDAC4*、*SREBP*、*LKB1* and *CaMKII*

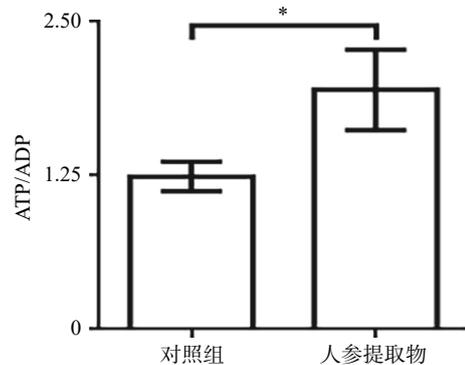
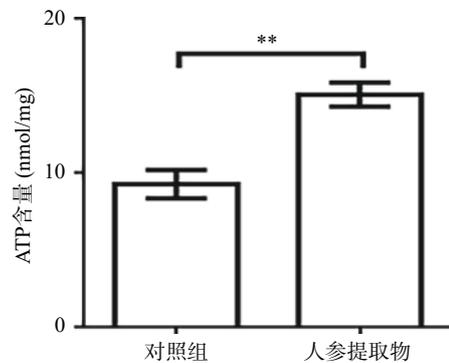


图 8 人参提取物对 ATP 含量和 ATP/ADP 比值的影响

Fig.8 Effect of ginseng extract on ATP content and ATP/ADP ratio

和 *CaMKII* 的表达在摄入人参提取物后均极显著增加($P<0.01$)。以上结果表明,人参提取物对果蝇寿命的延长作用与激活 AMPK 信号通路相关。

2.8 人参提取物对 mTOR 信号通路的影响

mTOR 是一种多功能蛋白质,可作为主要枢纽,整合来自生长因子、营养供应、能量状态和各种压力源的信号,调节包括 mRNA 翻译、自噬、转录和线粒体功能等生物学过程,抑制 mTOR 信号通路是延缓衰老的重要手段^[32]。mTOR 受 PI3K 调节并通过 mTOR 复合体 TORC 行使其功能^[33]。为了探知人参提取物对果蝇寿命的延长作用是否与抑制 mTOR 途径相关,利用 PCR 技术考察对 mTOR 信号通路相关基因转录水平的影响。由结果可知(图 9),与对照组相比,摄入人参提取物的果蝇中 *PI3K* 转录水平显著抑制($P<0.05$), *TORC* 转录水平极显著抑制($P<0.01$)。4E-BP 和 S6K 激酶是受 mTOR 通路调节的两个主要下游基因,研究表明,在酵母、果蝇、线虫和老鼠上,S6K 激酶的损失会促进寿命的延长,而增加 4E-BP 的活性可以促进果蝇长寿^[34]。与对照组相比,摄入人参提取物的果蝇中 *4E-BP* 和 *S6K* 转录水平均被极显著抑制($P<0.01$)。自噬是细胞清除废弃细胞成分、实现自我更新、维持机体稳态的重要途径,其能力随年龄的增长而下降^[35]。因此,增加衰老生物体内自噬对延长寿命具有重要意义。进一步分析人参提取物对 mTOR 下游途径中抑制细胞自噬的因子的影响。结果可知,人参提取物能显著提高 *Atg1*、*Atg5*、*Atg8a* 和 *Atg8b* 等参与调控细胞自噬的因子的表达量($P<0.01$)。以上结果为人参提取物通过抑制 mTOR 通路延长果蝇说明提供有力支撑。

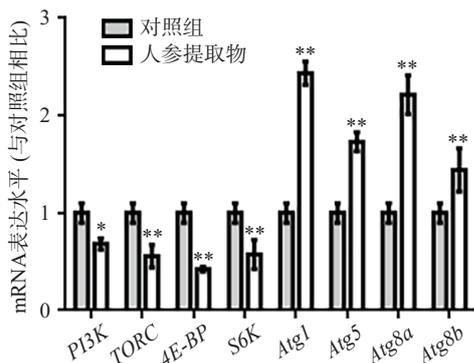


图9 人参提取物对 *PI3K*、*TORC*、*4E-BP*、*S6K*、*Atg1*、*Atg5*、*Atg8a* 和 *Atg8b* 转录水平的影响

Fig.9 Effect of ginseng extract on transcription levels of *PI3K*, *TORC*, *4E-BP*, *S6K*, *Atg1*, *Atg5*, *Atg8a* and *Atg8b*

3 结论

本研究利用果蝇模式生物探索人参提取物对衰老的延缓作用及可能作用机制。研究发现,人参提取物中含有 13 种人参皂苷成分,并具有延缓果蝇衰老的作用,能够延长果蝇寿命、提高果蝇运动能力以及抗应激能力,且这种延缓作用不依赖于饮食限制、不影响果蝇繁殖能力。进一步通过实验证实,人参提取

物能够激活 AMPK 通路并抑制 mTOR 通路,表明其对果蝇寿命的延长作用是通过调控多靶点完成的。本研究成果提示人参提取物在衰老以及衰老等相关疾病的预防和治疗中存在潜在应用价值,同时为抗衰老药物开发提供理论参考。

参考文献

- [1] MARUZS T, SIMON-VECSEI Z, KISS V, et al. On the fly: Recent progress on autophagy and aging in *Drosophila*[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 140.
- [2] PARKHITKO A A, RAMESH D, WANG L, et al. Downregulation of the tyrosine degradation pathway extends *Drosophila lifespan*[J]. *Elife*, 2020, 9: e58053.
- [3] CAMPISI J, KAPPAHI P, LITHGOW G J, et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 183–192.
- [4] RU W, WANG D, XU Y, et al. Chemical constituents and bioactivities of *Panax ginseng* (C. A. Mey.) [J]. *Drug Discov Ther*, 2015, 9(1): 23–32.
- [5] LIU Y, WENG W, GAO R, et al. New insights for cellular and molecular mechanisms of aging and aging-related diseases: Herbal medicine as potential therapeutic approach[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4598167.
- [6] 郑心怡, 马国. 抗衰老中药的研究进展[J]. *药学研究*, 2021, 40(6): 386–391. [ZHENG X Y, MA G. Research progress on studies of the antiaging traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2021, 40(6): 386–391.]
- [7] PIPER M D W, PARTRIDGE L. *Drosophila* as a model for ageing[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(9): 2707–2717.
- [8] TAORMINA G, FERRANT F, VIENI S, et al. Longevity: Lesson from model organisms[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(7): 518.
- [9] 张婉迎, 赵文学, 尹翌秋, 等. 人参水提物对果蝇抗衰老的作用机制[J]. *吉林农业大学学报*, 2018, 40(5): 557–562. [ZHANG W Y, ZHAO W X, YIN Y Q, et al. Mechanism of anti-aging activity of water extract of ginseng in *Drosophila melanogaster*[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2018, 40(5): 557–562.]
- [10] 厉曙光, 白莉华, 王力强, 等. 人参对果蝇寿命的影响及其抗氧化作用[J]. *卫生研究*, 2008, 37(1): 104–106. [LI S G, BAI L H, WANG L Q, et al. Effects of *Panax ginseng* on *Drosophila lifespan* and its antioxidant effect[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2008, 37(1): 104–106.]
- [11] 姜婷婷, 黄清霞, 李香艳, 等. 人参提取物对棕榈酸诱导心肌细胞损伤的保护作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2019, 45(6): 1248–1255, 1481. [LOU T T, HUANG Q X, LI X Y, et al. Protective effect of ginseng extract on cardiomyocyte injury induced by palmitic acid and its mechanism[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2019, 45(6): 1248–1255, 1481.]
- [12] ZHU L, LUAN X, YUAN Y, et al. The characteristics of ginsenosides and oligosaccharides in mountain- and garden-cultivated ginseng[J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 101(4): 1491–1498.
- [13] 吴俊豪, 王晶, KHO SETHYKUN, 等. 龟肉蛋白肽延缓果蝇衰老的作用及机制研究[J/OL]. *食品工业科技*, 1–12 [2022-06-01]. <http://www.spjgkj.com/cn/article/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2021>

110057. [WU J H, WANG J, KHO S, et al. Research on anti-aging function and mechanism of pond turtle protein-derived peptides on *Drosophila melanogaster*[J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1–12 [2022-06-01]. <http://www.spgykj.com/cn/article/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2021110057>.]
- [14] 乔巨慧. 人参总皂苷对果蝇衰老及相关行为的调控和分子机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021. [QIAO J H. Study on the regulation and molecular mechanism of *Panax ginseng* saponins on senescence and related behaviors of *Drosophila melanogaster*[D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2021.]
- [15] 成丹. dfoxo-Mio/d ChREBP 介导规律运动改善高糖饮食果蝇心脏舒张功能[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2020. [CHENG D. Dfoxo-Mio/d ChREBP mediates regular exercise to improve the diastolic function of *Drosophila melanogaster* fed with high glucose [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2020.]
- [16] 单建英. 盐酸托莫西汀对果蝇活动状态和寿命的影响研究[D]. 杭州: 杭州电子科技大学, 2021. [SHAN J Y. Effect of atomoxetine hydrochloride on active state and lifespan of *Drosophila melanogaster*[D]. Hangzhou: Hangzhou Dianzi University, 2021.]
- [17] 吴楠. α -酮戊二酸在果蝇抗衰老中的作用及其机制研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017. [WU N. The anti-aging effect of α -ketoglutarate on *Drosophila melanogaster*[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2017.]
- [18] 吴楚璇. 党参水提物延缓自然衰老果蝇的作用及其机制[D]. 太原: 山西大学, 2021. [WU C X. Anti-aging effect of aqueous extract from *Codonopsis pilosula* and its mechanism on natural senescence *Drosophila melanogaster*[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.]
- [19] 陈树东, 胡文军, 孔祥词, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定人参、人参叶与人参花中 10 种人参皂苷含量[J]. 分析测试学报, 2021, 40(9): 1348–1354. [CHEN S D, HU W J, KONG X C, et al. Determination of ten ginsenosides in roots, leaves and flowers buds of *Panax ginseng* by solid phase extraction/ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2021, 40(9): 1348–1354.]
- [20] FONTANA L, PARTRIDGE L, LONGO V D. Extending healthy life span—from yeast to humans[J]. *Science*, 2010, 328(5976): 321–326.
- [21] BRANDHORST S, LONGO V D. Protein quantity and source, fasting-mimicking diets, and longevity[J]. *Adv Nutr*, 2019, 10(4): S340–S350.
- [22] LEE M B, HILL C M, BITTO A, et al. Antiaging diets: Separating fact from fiction[J]. *Science*, 2021, 374(6570): 7365.
- [23] LEE S H, LEE H Y, YU M, et al. Extension of *Drosophila lifespan* by Korean red ginseng through a mechanism dependent on dSir2 and insulin/IGF-1 signaling[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(21): 9369–9387.
- [24] BRANCO A T, SCHILLING L, SILKAITIS K, et al. Reproductive activity triggers accelerated male mortality and decreases lifespan: Genetic and gene expression determinants in *Drosophila* [J]. *Heredity (Edinb)*, 2017, 118(3): 221–228.
- [25] 吴越, 郑澜. 利用果蝇动物模型研究运动抗心脏衰老的分子机制[J]. 科教文汇(中旬刊), 2015, 311(4): 185–186. [WU Y, ZHENG L. Research on the molecule system of anti-aging-heart by sports through using *Drosophila* animal model[J]. The Science Education Article Collects, 2015, 311(4): 185–186.]
- [26] LONG J K, DAI W, ZHENG Y W, et al. MiR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Mol Med*, 2019, 25(1): 26.
- [27] JENSEN T E, ROSE A J, JØRGENSEN S B, et al. Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(5): 1308–1317.
- [28] 王雪. 人参三七川芎提取物调控线粒体自噬延缓血管内皮细胞衰老的机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2019. [WANG X. Effects and mechanisms of GSC extracts against vascular endothelial senescence via regulating mitophagy[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medicinal Sciences, 2019.]
- [29] 郑振达. 人参皂苷 Rb1 通过 Sirt1/AMPK 信号通路拮抗内皮细胞衰老[C]. 2017 年第五次世界中西医结合大会论文摘要集(下册). [出版者不详]. 2017: 127. [ZHENG Z D. Ginsenoside Rb1 antagonizes endothelial cell senescence through Sirt1/AMPK signaling pathway[C]. Abstracts of the 5th World Integrative Medicine Congress (WIMCO 2017) III. [Publisher unknown]. 2017: 127.]
- [30] LI J, MCCULLOUGH L D. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(3): 480–492.
- [31] 张宸崧, 王子涵, 陈燕雯, 等. 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK): 能量、葡萄糖感受器和代谢性疾病治疗靶标[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2022, 61(3): 325–345. [ZHANG C S, WANG Z H, CHEN Y W, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK): An energy and glucose sensor and a therapeutic target in metabolic disease[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2022, 61(3): 325–345.]
- [32] KAPAHI P, KAEBERLEIN M, HANSEN M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 39: 3–14.
- [33] WEICHHART T. mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: A mini-review[J]. *Gerontology*, 2018, 64(2): 127–134.
- [34] CLANCY D, GEMS D, HARSHMAN L, et al. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein[J]. *Science (New York, NY)*, 2001, 292(5514): 104–106.
- [35] HAN Y, GUO Y, CUI S W, et al. Purple sweet potato extract extends lifespan by activating autophagy pathway in male *Drosophila melanogaster*[J]. *Exp Gerontol*, 2021, 144: 111190.