

袁梦, 阙斐, 肖楚翔, 等. 基于秀丽隐杆线虫模型的樱桃乙醇提取物抗衰老作用研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 375–382.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070218

YUAN Meng, QUE Fei, XIAO Chuxiang, et al. Study on the Anti-aging Effect of Cherry Ethanol Extract Based on *Caenorhabditis elegans* Model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 375–382. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070218

· 营养与保健 ·

基于秀丽隐杆线虫模型的樱桃乙醇提取物 抗衰老作用研究

袁梦¹, 阙斐², 肖楚翔¹, 李钰¹, 王凤舞^{1,*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109;

2. 浙江经贸职业技术学院应用工程学院, 浙江杭州 310018)

摘要: 本文以胶东地区常见的两种樱桃品种——红灯和黄蜜为研究对象, 探究并比较了樱桃的抗衰老作用, 为樱桃的进一步开发利用提供依据。对两种樱桃的果肉和果核分别进行醇溶提取并初步明确成分, 以 DPPH 自由基和羟自由基清除能力为指标评价四种成分的抗氧化活性并探究其抑制 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 聚集的能力。以秀丽隐杆线虫为模型, 测定四种成分对其寿命、运动能力、生殖能力、瘫痪缓解能力的作用效果和抑制 $A\beta$ 沉积情况。结果表明: 两种樱桃果肉的抗氧化活性突出, 样品浓度在 1 mg/mL 时, 黄蜜和红灯的 DPPH 自由基清除率分别为 80.88% 和 83.19%, 羟自由基清除率分别为 88.19% 和 92.85%。果核相对较低, 黄蜜和红灯的 DPPH 自由基清除率分别为 20.76% 和 44.93%, 羟自由基清除率分别为 28.65% 和 38.75%。四种样品均对 $A\beta$ 表现出抑制作用, 且在线虫实验中, 与空白组相比, 四种样品组的线虫寿命能够延长 2~4 d, 增强其运动能力, 对生殖能力无损害且降低线虫瘫痪率, 减少 $A\beta$ 沉积。综上, 四种样品能够通过清除自由基, 抑制 $A\beta$ 的产生从而产生一定的抗衰老效果, 具有潜在的应用价值。

关键词: 樱桃, 抗氧化, β -淀粉样蛋白, 抗衰老, 秀丽线虫

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)13-0375-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070218



本文网刊:

Study on the Anti-aging Effect of Cherry Ethanol Extract Based on *Caenorhabditis elegans* Model

YUAN Meng¹, QUE Fei², XIAO Chuxiang¹, LI Yu¹, WANG Fengwu^{1,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. College of Applied Engineering, Zhejiang Institute of Economics and Trade, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In this paper, the anti-aging effects of two varieties of cherry, Red Light and Yellow Honey in Jiaodong region were investigated and compared, for further development and utilization of cherries. The components of pulp and kernels in the two kinds of cherries were extracted by ethanol and the antioxidant activity was evaluated by the scavenging ability of DPPH and hydroxyl radicals, the ability to inhibit the aggregation of β -amyloid protein ($A\beta$) was investigated. The effects of four components on the life span, locomotor ability, reproductive ability, paralysis relief ability and the inhibition of $A\beta$ deposition of *Caenorhabditis elegans* were studied. The results showed that antioxidant activity of two cherry pulp was outstanding, with DPPH radical scavenging rates of 80.88% and 83.19% and hydroxyl radical scavenging rates of 88.19% and 92.85% for Yellow Honey and Red Light, respectively, when the sample concentration was 1 mg/mL. While the antioxidant activity of fruit kernels was relatively low, with DPPH and hydroxyl radical scavenging rates of Yellow Honey and Red Light were 20.76% and 44.93%, 28.65% and 38.75%, respectively. Compared with the blank group, the life span

收稿日期: 2022-07-19

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2020MB101); 浙江经贸职业技术学院省属高校基本科研业务费专项资金 (20SBYB06)。

作者简介: 袁梦 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品, E-mail: 614257169@qq.com。

* 通信作者: 王凤舞 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性食品, E-mail: wangfengwude@126.com。

of *Caenorhabditis elegans* in the four groups was prolonged by 2~4 days and their locomotor ability was enhanced, and it did not damage the reproduction ability and reduced the paralysis rate of *Caenorhabditis elegans* and A β deposition. In conclusion, the four samples were able to produce certain anti-aging effects by scavenging free radicals and inhibiting the production of A β , which have potential applications.

Key words: cherry; antioxidant; beta-amyloid; anti-aging; *Caenorhabditis elegans*

樱桃(*Prunus pseudocerasus*), 享有“早春第一果”的美誉^[1], 因其抗氧化和抗炎活性而获得越来越多的学者和公众关注, 有不少学者对不同樱桃品种进行了理化成分、氧化活性等方面的分析^[2-4], 发现樱桃果皮与果肉中富含的天然多酚类、黄酮类活性物质, 具有很高的抗氧化、抑菌、消炎、清除自由基等能力^[5]。有学者报道樱桃多酚能够减轻炎症症状以及降低炎症相关因子水平^[6], 对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎有保护作用。樱桃黄酮也有抗氧化、消炎和降尿酸等效果^[7]。樱桃核可以抑制 α -葡萄糖苷酶和脂肪酶的活性, 具有降糖降脂功效、抗疲劳、耐缺氧和镇痛等作用^[8-9]。所以本文以胶东地区两种主要的樱桃鲜食品种-红灯樱桃和黄蜜樱桃的果肉和果核作为研究对象进行相关研究。

目前, 对这两种樱桃的抗衰老效果鲜有研究。国内外仅对红灯樱桃果肉的多酚提取物进行了相关研究^[10], 并无黄蜜樱桃和两种果核的抗衰老研究。因此, 本文对红灯和黄蜜两种樱桃的果肉和果核进行醇溶提取并初步明确成分, 测定其体外抗氧化活性和抑制 A β 聚集的能力, 同时体内利用秀丽隐杆线虫模型, 从线虫行为学等层面, 研究两种樱桃的抗衰老作用并初步探讨其抗衰老作用机制, 旨在为后续樱桃抗衰老活性相关研究提供一定理论依据, 为樱桃资源进一步研究与开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

两种达到食用成熟度的樱桃—黄蜜、红灯 2020 年 5 月于青岛当地购买; 芦丁标准品、没食子酸标准品、福林酚、抗坏血酸、DPPH 北京索莱宝科技有限公司; 胰蛋白胍、酵母提取物、琼脂粉 OXOID 公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠 天津市巴斯夫化工有限公司; 碳酸钠、胆固醇、硫酸镁、氯化钙、亚硝酸钠、硝酸铝 天津市北联精细化学品开发公司; 秀丽隐杆线虫株系 CL4176 和大肠杆菌株系 OP50(尿嘧啶渗漏突变株) 美国线虫中心(*Caenorhabditis Genetics Center*); 96 孔酶标板 美国 Corning 公司; 硫磺素 T 上海创赛科技有限公司; A β 美国 EZBiolab 公司。

FD-1D-80 型 SIM 冷冻干燥机 北京中科星宇商贸中心; TGL-16M 高速台式冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司; WFZUV-2000 分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; DHP-9032 型电热恒温培养箱 龙口市先科仪器公司; 生物显微镜

日本 Olympus 株式会社; Spark 多功能酶标仪 TECAN(奥地利)公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料处理和乙醇提取 两种樱桃洗净, 沥干, 分离果肉和果核, 分别经-20℃预冻 24 h 后, 在真空冷冻干燥机中干燥 2 d(-54℃), 粉碎研磨, 过 60 目筛 4℃保存备用。取保存好的樱桃粉末, 95% 乙醇(料液比 1:10)浸泡 24 h 后进行超声处理, 超声时间 2 min, 超声功率 100 W。超声结束以 4000 r/min, 离心 5 min, 取上清过滤, 倒于圆底烧瓶在 60℃下旋转蒸发至干, 得到四种样品乙醇提取物^[11], 4℃保存备用, 红灯果肉醇提物记为 RP, 红灯果核醇提物记为 RC, 黄蜜果肉醇提物记为 YP, 黄蜜果核醇提物记为 YC。

1.2.2 提取物中总多酚和总黄酮含量的测定

1.2.2.1 标准曲线的绘制 芦丁标准曲线: 准确称取芦丁对照品 10 mg 置于 25 mL 容量瓶, 用 30% 乙醇定容刻度, 即得对照品储备液。分别吸取储备液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 10 mL 容量瓶, 加入 30% 乙醇 5 mL, 5% 亚硝酸钠 0.3 mL, 振摇放置 5 min, 加入 10% 硝酸铝 0.3 mL 摇匀放置 6 min, 加入 1 mol/L 氢氧化钠 2 mL, 最后 30% 乙醇定容至 10 mL, 室温放置 10 min, 于 510 nm 处测定吸光度。

没食子酸标准曲线: 准确称取没食子酸对照品 5 mg 置于 50 mL 容量瓶, 用蒸馏水定容刻度, 即得对照品储备液。吸取没食子酸标准溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶, 加入 6 mL 水, 0.5 mL Folin-酚试剂, 1.5 mL 20%Na₂CO₃ 溶液, 用蒸馏水补足, 混匀, 75℃水浴 10 min, 于 760 nm 处测定吸光度^[12-13]。

1.2.2.2 提取物中总多酚、总黄酮含量的测定 分别称取适量样品提取物配制溶液, 按 1.2.2.1 方法测定吸光度, 依据线性回归方程计算两种樱桃中总黄酮、总多酚的含量。

$$\text{样品中总多酚含量} M(\text{mg/g}) = \frac{c \times D \times V}{m}$$

式中: c 表示根据吸光度值计算出的溶液质量浓度, mg/mL; V 表示供试品溶液体积, mL; D 表示稀释倍数; m 表示样品提取量, g。

$$\text{样品中总黄酮含量} M(\text{mg/g}) = \frac{c \times D \times V}{m}$$

式中: c 表示根据吸光度值计算出的溶液质量浓度, mg/mL; V 表示供试品溶液体积, mL; D 表示稀释倍数; m 表示样品提取量, g。

1.2.3 体外抗氧化活性的测定

1.2.3.1 清除 DPPH 自由基能力的测定 参照文献 [14] 方法, 准确称量四种样品乙醇提取物, 用乙醇配制浓度为 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5 mg/mL 的样品液, 取各样品液 0.5 mL, 加入 0.2 mmol/L DPPH 1.2 mL, 用无水乙醇补足至 4 mL, 充分混匀, 在黑暗处静置反应 30 min, 于 517 nm 处测定吸光度。根据公式计算清除率: $\text{清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样参}}) / A_{\text{对照}}] \times 100$, 以 V_C 为阳性对照。

1.2.3.2 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)活性的测定 参照文献 [15] 方法, 准确称量四种样品乙醇提取物, 用乙醇配制浓度为 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5 mg/mL 的样品液, 取各样品液 1 mL, 加入 0.15 mol/L PBS (pH7.4) 3.25 mL 和 7.5 mmol/L 邻二氮菲 0.25 mL, 充分混匀后, 加入 7.5 mmol/L FeSO_4 0.25 mL, 迅速混匀后加入 0.1% 的 H_2O_2 0.25 mL, 37 °C 水浴 90 min, 于 536 nm 下测定吸光度, 根据公式计算清除率, $\text{清除率}(\%) = [(A_{\text{样品}} - A_{\text{样参}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}})] \times 100$, 以 V_C 为阳性对照。

1.2.4 ThT 荧光检测 $A\beta$ 聚集

1.2.4.1 $A\beta$ 的预处理 根据已有文献 [16–17] 制备 $A\beta$ 寡聚体溶液, 用六氟异丙醇(HFIP)将 $A\beta$ 溶解至 1 mg/mL, 于 4 °C 反应 2 h, 干燥, -80 °C 冻存。使用时, 先用二甲基亚砜(DMSO)溶解, 使 DMSO 终浓度为 2%v/v(DMSO/PBS), $A\beta$ 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.4.2 ThT 荧光检测 $A\beta$ 聚集 称取四种样品提取物 10 mg, 加入 2%v/v(DMSO/PBS)溶液 9 mL 得样品溶液, 后与上述制备得到的 $A\beta$ 溶液 9:1 混合于 37 °C 共同孵育。在不同的时间(0、7、14、21、28、35 h)分别吸取 20 μL 混合溶液, 加入 180 μL 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ThT 溶液(溶剂为 PBS)中, 以单独孵育的 $A\beta$ 作为空白对照, 混匀后置于多功能酶标仪测定其荧光强度^[18]。设定激发波长为 450 nm, 发射波长为 480 nm, 测荧光强度。每个样品测 3 孔, 取平均值, 重复三次^[19]。

1.2.5 线虫模型抗衰老研究

1.2.5.1 线虫培养和同期化 线虫的培养使用线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM), 线虫食物为大肠杆菌 OP50, 涂布培养基后于 16 °C 恒温恒湿培养箱中培养^[20]。线虫活化三代后生长至 L4 期作为同期化处理模型, 体内活性实验将选定一个合适质量浓度作为樱桃提取物的应用浓度。产卵同期化: 在光学显微镜下将产卵期线虫挑至含有大肠杆菌 OP50 的培养基表面, 产卵时间 1~3 h, 产卵约 100 个左右, 挑出成虫, 将含虫卵培养基置于 16 °C 恒温培养箱中培养, 同期化 3~4 d 至线虫生长 L4 期。此时的线虫处于同一生长时期随后用于实验, 四个实验组均以 1 mg/mL 的含有样品提取物的 OP50 菌液涂布培养基, 空白组(NC)以不含样品提取物的 OP50

菌液涂布培养基, 以此比较判定每种样品效果。

1.2.5.2 线虫寿命测定 将产卵期的秀丽线虫挑至涂有提取物的培养基上进行产卵同期化, 待线虫孵化生长至 L4 期后 23 °C 高温(升温培养可加速线虫衰老, 缩短生命周期)诱导 24 h, 记录存活情况, 通过剔除死亡线虫的方式每天计数死亡、丢失和存活线虫的条数, 直至所有线虫死亡完全^[21]。

1.2.5.3 线虫运动能力测定 以线虫头部摆动次数作为衡量标准, 记录涂有样品培养基的同期化生长线虫 30 s 内线虫头部摆动的次数, 每天记录运动次数, 直至线虫停止摆动。

1.2.5.4 线虫生殖能力测定 记录每天空白组和样品组线虫产卵情况, 产第一颗卵的时间记为生殖能力实验第 1 d。后每 24 h 将线虫转至新板, 记录每天线虫产卵数量, 直至线虫停止产卵。

1.2.5.5 瘫痪缓解实验 线虫在 23 °C 高温诱导条件下易出现瘫痪麻痹症状, 反应体内 $A\beta$ 聚集的毒性作用。当外界刺激线虫身体不再弯曲或蠕动, 仅头部摆动即视为瘫痪, 记录每天线虫的非瘫痪率。将 23 °C 诱导 24 h 后的日期记为瘫痪实验第 1 d, 每 24 h 计数一次瘫痪条数并挑出, 直至瘫痪完全。

采用硫黄素 T(ThT)荧光染色法测定了秀丽线虫体内 $A\beta$ 的沉积情况。参考文献 [22], 将同期化处理的秀丽线虫 16 °C 培养 48 h, 接着转移至 23 °C 培养 36 h 后将线虫用 M9 缓冲液冲洗至 EP 管中, 反复冲洗 3 次, 离心机 4200 r/min, 离心 2 min, 去上清。加入 4% 多聚甲醛固定过夜。用 1 mL PBS 缓冲液冲洗后加入 150 μL 含 5%-巯基乙醇、125 mmol/L Tris-HCl(pH7.4)和 1% Triton-100 溶液于 37 °C 中反应 24 h。然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次并用含 50% 乙醇的 0.125% ThT 染色 2 min, 再用 50% 乙醇连续洗涤脱色, 置于显微镜下观察。

1.3 数据处理

所有样品的测定重复进行三次; 使用 Origin 9.1 和 GraphPad 进行数据分析并作图, 使用 SPSS 18.0 版通过单因素方差分析对三个独立实验进行统计分析, 显著性水平($P < 0.05$)的概率值由邓肯多重范围检验接受, 数据以平均值 $\pm$ 标准偏差来表述。

2 结果与分析

2.1 四种样品醇提取物中总多酚、总黄酮的含量

多酚和黄酮类物质均具有一定的抑制氧化反应、清除自由基、抑菌以及抗衰老等一系列作用^[23–24]。由实验得没食子酸标准曲线线性回归方程式: $Y = 0.2543X - 0.0006$, $R^2 = 0.9996$, 其中 Y 代表吸光值, X 代表没食子酸标准液浓度(mg/mL)。由图 1 可知, 不同种类樱桃总多酚含量有显著性差异($P < 0.05$), RP 中多酚含量最多, 为 253.91 ± 20.32 mg/g, 其次从高到低依次是 YP: 190.64 ± 18.49 mg/g、RC: 110.63 ± 4.54 mg/g、YC: 60.03 ± 12.01 mg/g。

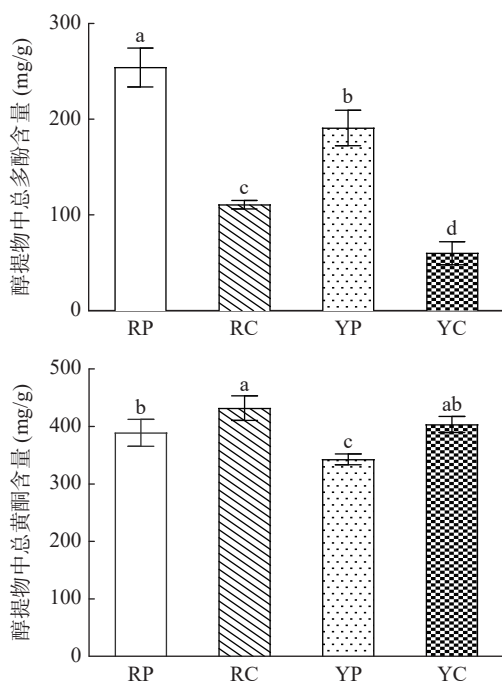


图1 四种样品醇提取物中总多酚和总黄酮含量

Fig.1 Total polyphenols and total flavonoids in four sample ethanol extracts

注: 图中不同小写字母表示差异显著 $P<0.05$; 图7同。

由实验得芦丁标准曲线线性回归方程式: $Y=0.213X-0.0037$, $R^2=0.9990$, 其中 Y 代表吸光值, X 代表芦丁标准液浓度(mg/mL)。由图1可知, 不同种类樱桃总黄酮含量有显著性差异($P<0.05$), 红灯樱桃的总黄酮含量比黄蜜樱桃的要高, 且相对应品种的总黄酮含量果核要高于果肉的。其中, RC中总黄酮含量最高, 为 431.84 ± 21.38 mg/g, YP中总黄酮含量最低, 为 342.76 ± 3.39 mg/g。

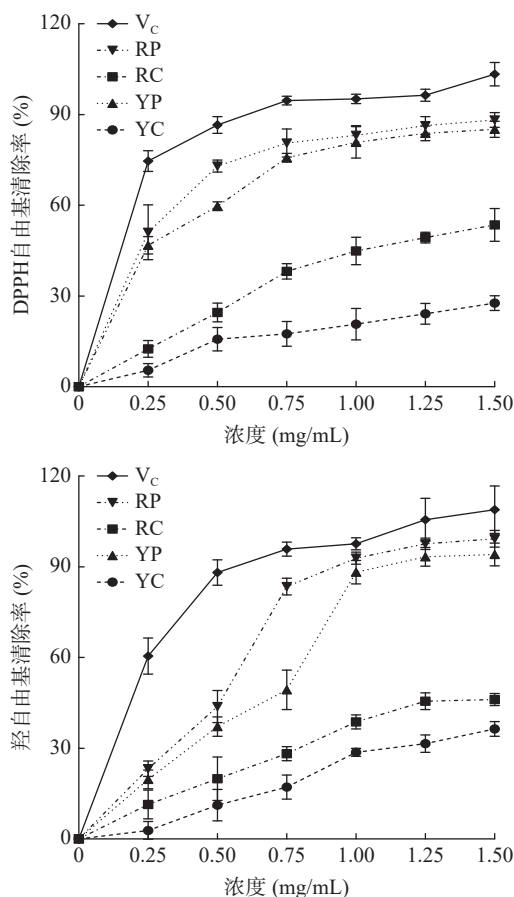
2.2 体外抗氧化活性测定

机体的抗氧化能力与活性氧自由基息息相关。活性氧自由基升高, 产生各种过氧化因子, 从而触发过氧化反应, 诱导细胞内物质发生过氧化并引起细胞凋亡, 进而加速了衰老进程^[25]。所以本实验进行清除DPPH自由基和羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力测定。

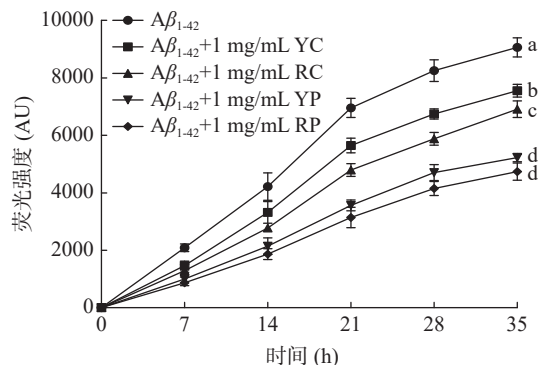
在0~1.5 mg/mL范围内, 两种樱桃果肉和果核不同浓度的醇提取物具有清除DPPH自由基和羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力。果肉醇提取物抗自由基活性均高于果核, 且清除率从高到低为 $\text{RP}>\text{YP}>\text{RC}>\text{YC}$ 。高帆等^[26]对5个甜樱桃品种的酚类物质含量和抗氧化能力进行相关性分析, 证明甜樱桃果实中酚类物质与抗氧化活性显著相关, 且总酚对抗氧化活性的影响最大。结合图1中数据, 判定出现图2中结果可能是总酚发挥主要抗氧化活性作用, 具体作用机制还需进一步研究。

2.3 ThT荧光检测四种样品提取物对 $A\beta$ 聚集的影响

$A\beta$ 的过度产生和聚集会诱使氧化稳态失衡, 产生大量的自由基及其所诱导的脂质过氧化物, 从而破坏机体抗氧化系统的平衡, 对机体造成损伤, 加速机

图2 四种样品醇提取物清除DPPH能力和羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力Fig.2 The ability of four sample ethanol extracts extracts to scavenge DPPH and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$)

体衰老^[27]。ThT是一种用于检测具有 β -折叠结构的纤维聚集体的荧光染料, 其荧光强度与 β -折叠含量成正比^[28]。结果如图3所示, $A\beta_{1-42}$ 单体溶液在37℃单独孵育时, ThT荧光强度逐渐增加, 该过程说明 $A\beta_{1-42}$ 单体随着时间推移转化成含 β -折叠结构的聚集体。然而, 当 $A\beta_{1-42}$ 单体分别与四种样品溶液共同孵育后, 虽然ThT荧光强度也会随着时间逐渐增加, 但荧光强度要明显低于 $A\beta_{1-42}$ 单独孵育时的相应强度, 说明四种样品醇提取物能够抑制 $A\beta$ 聚

图3 ThT荧光检测四种样品醇提取物对 $A\beta$ 的聚集影响Fig.3 ThT fluorescence detection of the effect of four sample alcohol extracts on the aggregation of $A\beta$

注: 具有不同侧标的数据之间具有显著性差异, $P<0.05$ 。

集。以四个样品组 35 h 的 ThT 荧光强度相较于 $A\beta_{1-42}$ 单体单独孵育强度差异显著 ($P<0.05$), 其中, RP 效果最好, 比空白组降低了 47.65%, 其次依次为 YP、RC、YC, 分别降低了 42.26%、23.74% 和 16.69%。出现上述结果可能是由于与 RP 多酚含量最高有关, 因为根据“ π -stacking”理论, 多酚类化合物的苯环可能竞争性地与 $A\beta$ 的芳香基团发生作用, 阻止 $A\beta$ 单体间 π - π 相互作用。此外, 多酚类化合物还可以通过疏水性相互作用抑制淀粉样纤维的生长^[29]。

2.4 对秀丽隐杆线虫抗衰老的效果

秀丽隐杆线虫是一种体型小、繁殖快、生命周期短、易于操作、遗传途径明确及神经系统简单但完善的模型生物^[30], 且有 60%~80% 的基因同人类基因同源^[31]。线虫随着生长周期的增加, 会表现出行为迟钝、生理功能下降等现象, 所以成为研究衰老过程的理想模型^[32-33]。

2.4.1 寿命测定结果 寿命是确定秀丽隐杆线虫衰老程度的直接指标。如图 4 所示, 与空白组相比, 四种样品提取物在一定程度上延长了秀丽隐杆线虫的平均寿命。其中, RP 组寿命最长, 比空白组延长约 17.14%。推测是因为 RP 组的总多酚中花青素含量较高^[34]。WEI 等^[35]指出甜樱桃果实的红色主要归功于花青素, 花青素具有良好的抗衰老效果^[36-38]。因果核中的总黄酮也具有一定的抗氧化效果^[39], 所以, 虽然两种样品的果核提取物延长线虫存活时间相对较短, 但整体存活率仍高于空白组。综上, 四种醇提取物有一定的抗衰老效果且果肉提取物的效果更加明显。

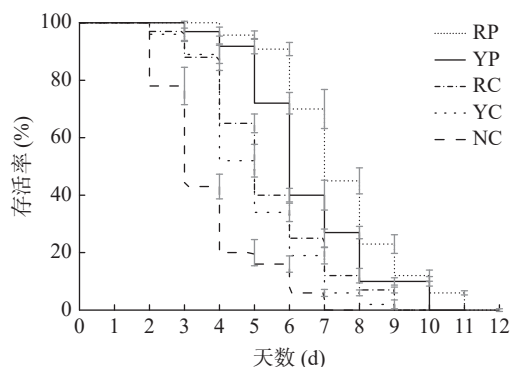


图 4 四种样品醇提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响

Fig.4 Effects of four sample alcohol extracts on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*

2.4.2 运动能力测定 线虫体内 $A\beta$ 聚集会导致线虫的神经性病变, 进而衰老使运动能力下降, 可以通过测定线虫运动能力来判断提取物的抗氧化和抗衰老情况。线虫的衰老伴随着运动能力的下降。结果如图 5 所示, 与空白组相比较, 各组线虫的头部摆动频率均有所提高, 摆动次数由高到低分别是 RP、YP、RC、YC, 与线虫寿命数据基本相符。图中第 2 d 是由于线虫经过耐受期, 成长期间表现更为活泼, 头部摆动次数增加, 而后续随诱导温度升高、时间延长, 体内 $A\beta$ 聚集和自由基的大量产生, 导致线虫日渐衰

老, 摆动频率逐渐降低。

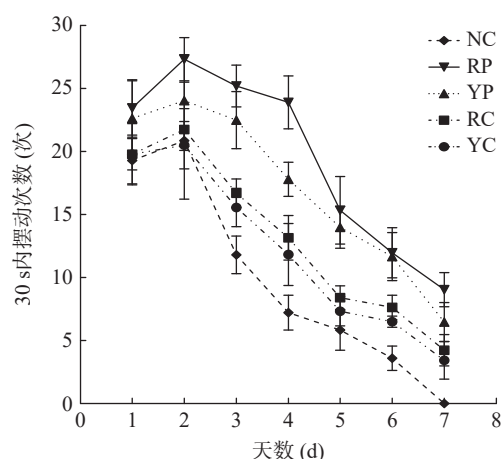


图 5 四种样品醇提取物对秀丽隐杆线虫运动能力的影响

Fig.5 Effects of four sample alcohol extracts on motility of *Caenorhabditis elegans*

2.4.3 生殖能力测定 线虫衰老会导致生理功能的衰退, 生殖能力的降低与衰老密切相关。生殖能力的测定主要是通过判断提取物对线虫子代数目的影响从而来评判样品在抗氧化的同时是否会对秀丽线虫的子代产生抑制作用。结果如图 6 所示, 与空白组相比, 红灯果肉组在第 1、2 d 产卵量有显著性差异 ($P<0.05$), 黄蜜果肉组只有第 2 d 有显著性差异 ($P<0.05$), 而其他组均无出现显著性差异 ($P>0.05$), 但从图中看出, 总产卵量四种样品均高于空白组。这说明, 在高温不利线虫生长条件下, 样品不影响线虫的生殖能力且适当促进了线虫的生殖。

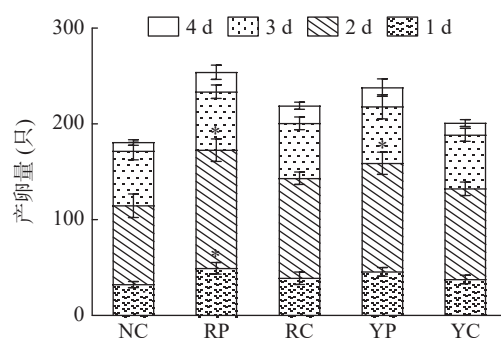


图 6 四种样品醇提取物对秀丽隐杆线虫生殖能力的影响

Fig.6 Effects of four sample alcohol extracts on reproductive capacity of *Caenorhabditis elegans*

注: *表示与同一天空白组相比具有显著性差异, $P<0.05$ 。

2.4.4 瘫痪缓解能力测定 秀丽隐杆线虫瘫痪出现的主要病理变化是 $A\beta$ 的大量沉积, 引起老年神经退行性病变与衰老密切相关。所以通过观察线虫瘫痪情况判断样品是否具有抗衰老效果^[40]。由图 7 可知, 因高温诱导, 瘫痪率逐渐增高, 空白组每天的瘫痪率与四个样品组相比均具有显著性差异 ($P<0.05$), 且红灯果肉抗瘫痪效果最好, 黄蜜果肉次之, 两种果核最差。由图 8 可看出, 空白组(A)线虫中出现 β -蛋白沉积, 而样品组(B)中几乎不出现。有相关研究证

明,酸樱桃的提取物(多酚类)保护了神经元的损失,减少了星形胶质细胞和小胶质细胞的激活,减轻了A β 的沉积^[41]。结合图中数据,说明四种样品提取物在一定程度上能够减少A β 的聚集,缓解线虫瘫痪,起到一定的抗衰老效果。

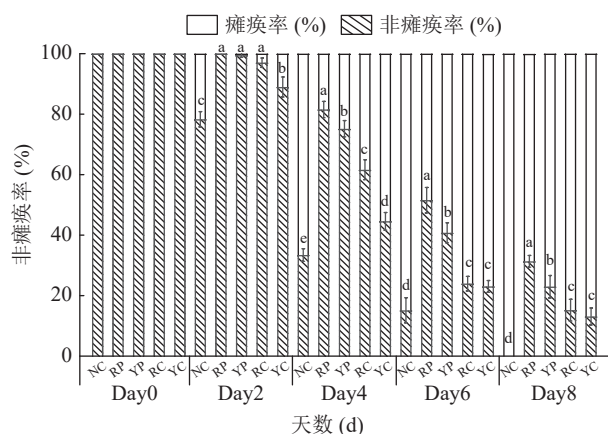


图7 四种样品醇提取物对秀丽隐杆线虫瘫痪的影响

Fig.7 Effects of four sample alcohol extracts on paralysis of *Caenorhabditis elegans*

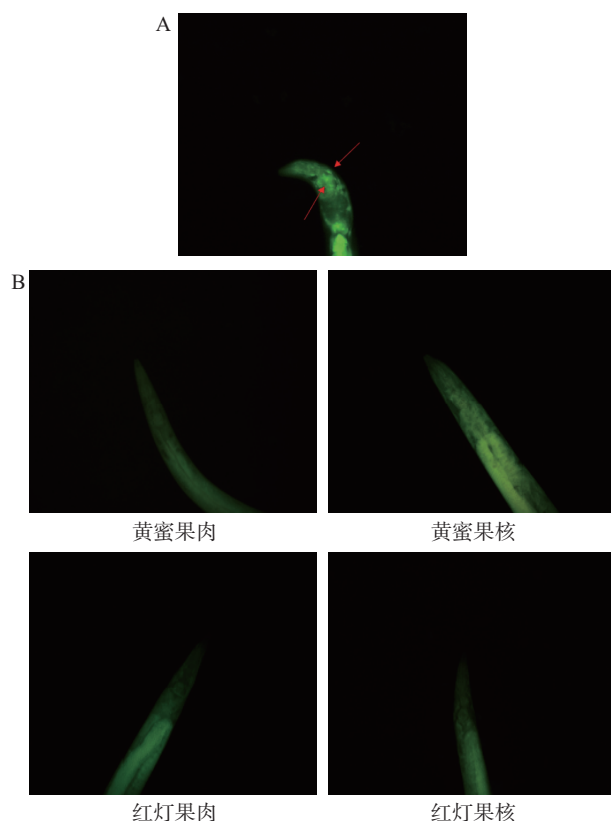


图8 四种样品醇提取物对秀丽隐杆线虫体内A β 蛋白沉积情况的影响(20 μ m)

Fig.8 Effect of alcoholic extracts of four samples on the deposition of A β protein in *Caenorhabditis elegans* (20 μ m)
注: A: A β 蛋白在空白组线虫体内沉积情况; B: A β 蛋白在样品组线虫体内沉积情况。

3 结论

本文对四种样品醇提取物成分测定,发现醇提取物的总多酚含量是两种果肉均高于果核,总黄酮含量是两种果核均高于果肉,抗氧化活性和抑制A β 作用都

是果肉更为明显。其次以秀丽隐杆线虫为模型的实验发现,与空白组相比,四种样品组线虫寿命能够延长约2~4 d,产卵量增加约11.25%~40.59%,能增强线虫运动能力,减缓线虫瘫痪,具有一定的抗衰老效果。相比较之下,果肉的抗衰老效果比果核更加明显,就种类而言,红灯樱桃的效果优于黄蜜樱桃。出现上述结果的原因可能是总多酚发挥主要作用,具体作用机制还需进一步研究。目前对本文两种樱桃抗衰老研究较少,黄蜜樱桃果肉和两种樱桃核暂无抗衰老相关研究。本文不仅为上述两种樱桃和樱桃核对抗衰老功效提供了实验依据,同时对樱桃核的研究,旨在减少樱桃的资源浪费,增加樱桃的经济附加值,为樱桃资源的深度开发提供一定参考。

参考文献

- [1] 张明. 温室甜樱桃品种优选和高效栽培技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014. [ZHANG M. Research on variety selection and high-efficiency cultivation technology of greenhouse sweet cherry[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2014.]
- [2] 高子飞. 樱桃中几种多酚类物质清除自由基机理研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2019. [GAO Z F. Study on the free radical scavenging mechanism of several polyphenols in cherries[D]. Yantai: Yantai University, 2019.]
- [3] 刘英, 雄新艳, 谭延庆, 等. 寒亭区主要甜樱桃品种果实品质比较研究[J]. 北方果树, 2021(2): 10-13. [LIU Y, LUO X Y, TAN Y, et al. Comparative study on fruit quality of main sweet cherry varieties in Hanting District[J]. North Fruit Trees, 2021(2): 10-13.]
- [4] 梁秋萍, 严学迎. 基于熵权TOPSIS法不同品种甜樱桃营养成分综合评价[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(16): 59-64. [LIANG Q P, YAN X Y. Comprehensive evaluation of nutritional quality of different varieties of sweet cherry based on entropy weight TOPSIS method[J]. Food Research and Development, 2021, 42(16): 59-64.]
- [5] 闫慧明. 樱桃多酚提取物对DSS诱导的小鼠溃疡性结肠炎保护作用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2021. [YAN H M. The protective effect of cherry polyphenol extract on DSS-induced ulcerative colitis in mice[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.]
- [6] BECONCINI D, FELICE F, FABIANO A, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cherry extract: Nanosystems-based strategies to improve endothelial function and intestinal absorption[J]. Foods, 2020, 9(2): 207.
- [7] 董渭雪. 樱桃黄酮组分及降尿酸作用研究[D]. 汉中: 陕西理工大学, 2020. [DONG W X. Study on cherry flavonoid components and urate-lowering effects[D]. Hanzhong: Shaanxi University of Technology, 2020.]
- [8] 郭遥遥, 刘洋, 王沙沙, 等. 樱桃核提取物抗疲劳、耐缺氧及镇痛作用的研究[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2018, 39(4): 28-32. [GUO Y Y, LIU Y, WANG S S, et al. Study on anti-fatigue, hypoxia tolerance and analgesic effects of cherry kernel extract[J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology(Natural Science Edition), 2018, 39(4): 28-32.]
- [9] 公衍玲, 郭遥遥, 刘洋青. 樱桃核乙醇提取物体外抗氧化及降糖降脂研究[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2017, 38(6): 14-17. [GONG Y L, GUO Y Y, LIU Y Q. Study on antioxidant and hypoglycemic and lipid lowering of cherry kernel ethanol extract in vitro[J]. Journal of Qingdao University of Science and

Technology (Natural Science Edition), 2017, 38(6): 14–17.]

[10] 王竞珮. 甜樱桃果多酚的提取、纯化及其抗氧化、抗衰老活性研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2020. [WANG J P. Extraction and purification of polyphenols of sweet cherry fruit and their antioxidant and anti-aging activities[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2020.]

[11] 李雯霞, 于司达, 诸葛斌, 等. 芍药花提取物对果蔬腐败菌的抑菌活性及其在樱桃番茄保鲜中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 228–232. [LI W X, YU S D, ZHUGE B, et al. Antibacterial activity of peony flower extract on spoilage bacteria in fruits and vegetables and its application in cherry tomato preservation[J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(2): 228–232.]

[12] 曹小燕, 杨海涛. 超声辅助双水相提取油菜籽粕黄酮及抗氧化性研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(4): 52–56, 63. [CAO X Y, YANG H T. Ultrasound-assisted two-phase extraction of flavonoids from rapeseed meal and its antioxidant activity[J]. China Condiments, 2019, 44(4): 52–56, 63.]

[13] YAN J K, MA H L, PEI J J, et al. Facile and effective separation of polysaccharides and proteins from *Cordyceps sinensis* mycelia by ionic liquid aqueous two-phase system[J]. Separation and Purification Technology, 2014, 135: 278–284.

[14] ALI B. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases[J]. Food Chemistry, 2009(114): 1198–1205.

[15] 杨明琰, 张晓琦, 沈俭, 等. 超氧化物歧化酶两种邻苯三酚自氧化测定活力方法的比较[J]. 微生物学杂志, 2006(3): 40–42. [YANG M Y, ZHANG X Q, SHEN J, et al. Comparison of two catetrial autooxidation determination methods for superoxide dismutase[J]. Chinese Journal of Microbiology, 2006(3): 40–42.]

[16] 孔令娜. 阿尔茨海默病中 β -淀粉样蛋白寡聚体的光学检测和解聚研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2020. [KONG L N. Optical detection and depolymerization of beta-amyloid oligomers in Alzheimer's disease [D]. Shanghai: East China Normal University, 2020.]

[17] 朱立猛. 壳寡糖对阿尔茨海默病的作用效果评价及其机制初探[D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院过程工程研究所), 2021: 67–68. [ZHU L M. Evaluation of the effect of chitosan oligosaccharide on Alzheimer's disease and its mechanism[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences), 2021: 67–68.]

[18] 冯颖. 两种多酚类物质对A β 42聚集和毒性的影响及A β 1-16毒性和炎症反应的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010. [FENG Y. The effects of two polyphenols on the aggregation and toxicity of A β 42 and the toxicity and inflammatory response of A β 1-16[D]. Shenyang: China Medical University, 2010.]

[19] 肖超, 闫啸, 关怡新, 等. 小分子伴侣对淀粉样蛋白 β 聚集抑制作用研究[J]. 高校化学工程学报, 2021, 35(2): 316–323. [XIAO C, YAN X, GUAN Y X, et al. Inhibitory effect of small molecular chaperones on amyloid β aggregation[J]. Journal of Chemical Engineering in Universities, 2021, 35(2): 316–323.]

[20] 王凤, 肖楚翔, 刘淑珍, 等. 榴莲核黄酮的提取及其对秀丽隐杆线虫氧化和衰老的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 123–129. [WANG F, XIAO C X, LIU S Z, et al. Extraction of durian riboflavonoids and their effects on oxidation and aging in *Caenorhabditis elegans*[J]. Food Science, 2021, 42(9): 123–129.]

[21] 张娇龙. 齐墩果酸对秀丽隐杆线虫寿命的影响及分子机制研究[D]. 天津: 天津大学, 2016: 17–40. [ZHANG J L. Effects of oleanolic acid on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* and its

molecular mechanism[D]. Tianjin: Tianjin University, 2016: 17–40.]

[22] 吴浩. Src酪氨酸蛋白激酶抑制剂对AD秀丽隐杆线虫A β 毒性作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021. [WU H. Study on the toxic effect of Src tyrosine protein kinase inhibitor on A β of AD *Caenorhabditis elegans*[D]. Changchun: Jilin University, 2021.]

[23] 王双慧, 梅群芳, 冯晓汀. 燕麦 β -葡聚糖、多酚及黄酮的抑菌活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(12): 96–102. [WANG S H, MEI Q F, FENG X T. Antibacterial activity of oat β -glucans, polyphenols and flavonoids[J]. Food Research and Development, 2020, 41(12): 96–102.]

[24] 高静. 天然抗氧化剂及其协同作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 1859–1864. [GAO J. Natural antioxidants and their synergistic effects[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(6): 1859–1864.]

[25] 张翠利, 付丽娜, 杨小云, 等. 活性氧自由基与细胞衰老关系的研究进展[J]. 广州化工, 2015, 43(19): 5–7. [ZHANG C L, FU L N, YANG X Y, et al. Research progress on the relationship between reactive oxygen species and cell aging[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2015, 43(19): 5–7.]

[26] 高帆, 夏惠, 王秀, 等. 不同甜樱桃品种抗氧化物质及抗氧化活性分析[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(6): 926–932. [GAO F, XIA H, WANG X, et al. Analysis of antioxidant substances and antioxidant activity in different sweet cherry cultivars[J]. Zhejiang Journal of Agricultural Sciences, 2017, 29(6): 926–932.]

[27] REITER R J, PAREDES S D, KORKMAZ A, et al. Melatonin in relation to the “strong” and “weak” versions of the free radical theory of aging[J]. Advances in Medical Sciences, 2008, 53: 119–129.

[28] 李成, 宋吉雪, 刘婷婷, 等. 基于ThT荧光寿命检测蛋清溶菌酶蛋白寡聚体[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(1): 90–95.

[LI C, SONG J X, LIU T T, et al. Detection of egg white lysozyme protein oligomers based on ThT fluorescence lifetime[J]. Journal of Chemistry in Universities, 2019, 40(1): 90–95.]

[29] 刘伟, 孙彦. β -淀粉样蛋白的聚集及其调控[J]. 化工学报, 2022, 73(6): 2381–2396. [LIU W, SUN Y. Aggregation and regulation of β -amyloid protein[J]. CIESC Journal, 2022, 73(6): 2381–2396.]

[30] CORSI A K, WIGHTMAN B, CHALFIE M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 2015, 200(2): 387–407.

[31] KALETTA T, HENGARTNER M O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(5): 387–398.

[32] GUARENTE L, KENYON C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms[J]. Nature, 2000, 408(6809): 255–262.

[33] BRAECKMAN B P, VANFLETEREN J R. Genetic control of longevity in *C. elegans*[J]. Experimental Gerontology, 2007, 42(1–2): 90–98.

[34] OCKUN M A, GERCEK Y C, DEMIRSOY H, et al. Comparative evaluation of phenolic profile and antioxidant activity of new sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes in Turkey[J]. Phytochem Anal, 2022, 33(4): 564–576.

[35] WEI H, CHEN X, ZONG X, et al. Comparative transcriptome analysis of genes involved in anthocyanin biosynthesis in the red and yellow fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.)[J]. Plos One, 2015, 10(3): e0121164.

[36] DHALARIA R, VERMA R, KUMAR D, et al. Bioactive compounds of edible fruits with their anti-aging properties: A com-

prehensive review to prolong human life[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 11–23.

[37] WANG B, TANG X, MAO B, et al. Anti-aging effects and mechanisms of anthocyanins and their intestinal microflora metabolites[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022: 1–17.

[38] JAYARATHNE S, RAMALINGAM L, EDWARDS H, et al. Tart cherry increases lifespan in *Caenorhabditis elegans* by altering metabolic signaling pathways[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1482.

[39] 韩文强, 冯居泰. 樱桃核提取物在中草药化妆品研发中的应用[J]. *中国美容医学*, 2019, 28(9): 171–173. [HAN W Q, FENG J Q. Application of cherry pit extract in the research and develop-

ment of Chinese herbal cosmetics[J]. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 2019, 28(9): 171–173.]

[40] 陆晓达. 尼古丁对转基因秀丽隐杆线虫体内 A β 蛋白聚集作用的研究[D]. 长春: 长春理工大学, 2021. [LU X D. Study on the effect of nicotine on A β protein aggregation in transgenic *Caenorhabditis elegans*[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2021.]

[41] BOWERS Z, MAITI P, BOURCIER A, et al. Tart cherry extract and omega fatty acids reduce behavioral deficits, gliosis, and amyloid-beta deposition in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Brain Sciences*, 2021, 11(11): 1423.