



费俭, 博士, 教授, 博士生导师。1988—1999 年就职于中国科学院上海细胞生物研究所; 2000—2007 年就职于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所; 2007 年起就职于同济大学生命科学与技术学院。2000 年作为主要参与者建立了国内首个基因工程小鼠研发和表型分析平台——上海南方模式生物科技发展有限公司(上海南方模式生物研究中心)。主要研究方向是建立各种基因剔除小鼠, 通过分析这些遗传修饰小鼠的表型变化, 获得相关突变基因的功能信息, 并将基因功能直接和疾病进行关联, 从而可以评估这些基因成为药物研发靶点的可能性, 为发现新的基因工程药物奠定基础。主持完成国家级及上海市科研项目 10 余项, 发表学术论文 200 余篇, 获得授权专利 10 余项。

hil-1 基因通过饮食限制通路调节秀丽隐杆线虫寿命

成慧¹, 方菲¹, 石嘉豪¹, 杨桦¹, 张梦杰¹, 杨平², 费俭^{1,2}

(1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200082; 2. 上海模式动物工程技术研究中心, 上海 201309)

[摘要] 目的 揭示 H1 连接子组蛋白基因 (H1 linker histone gene, *hil-1*) 的生理学功能, 以及其调控线虫寿命的分子机制。方法 以秀丽隐杆线虫为模式生物, 采用 RNA 干扰菌喂食、*hil-1(gk229)* 突变体回交纯化以及过表达质粒显微注射技术来敲降、敲除以及过表达 *hil-1* 基因, 然后观察线虫存活寿命及产卵情况, 通过热耐受实验、百草枯应激实验和重金属 Cr⁶⁺ 应激实验评价 *hil-1(gk229)* 突变体的抗逆性, 利用实时荧光定量 PCR 实验以及构建双突变体线虫进一步确定 *hil-1* 调控寿命所关联的信号通路和作用靶点。结果 与野生型 N2 线虫相比, RNA 干扰后的线虫寿命以及 *hil-1(gk229)* 突变体线虫寿命明显缩短 ($P < 0.001$), 而 *hil-1* 全身性过表达后线虫寿命延长 ($P < 0.05$)。与野生型 N2 线虫相比, *hil-1(gk229)* 突变体线虫对热压力和氧化压力的耐受性明显降低 ($P < 0.001$, $P < 0.05$), 而对重金属的耐受能力无差异 ($P > 0.05$)。并且, 相比于野生型 N2 线虫, *hil-1(gk229)* 突变体线虫的发育周期缩短 ($P < 0.001$), 产卵提前 ($P < 0.001$), 但产卵总量没有显著变化 ($P > 0.05$)。给 *eat-2(ad465)* 突变体线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌后, *hil-1* 表达下调不影响 *eat-2(ad465)* 突变体线虫的寿命 ($P > 0.05$)。相较于野生型 N2 线虫, *hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 表达水平明显下调 ($P < 0.001$), 其下游基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 表达也下调 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。与 *daf-2(e1370)* 突变体相比, *daf-2(e1370); hil-1(gk229)* 双突变体线虫的寿命无明显变化 ($P > 0.05$); 而与 *daf-16(mu86)* 突变体相比, *daf-16(mu86); hil-1(gk229)* 双突变体线虫的寿命明显缩短 ($P < 0.001$)。与对照组相比, 在表皮和肠道中 RNA 干扰 *hil-1* 基因表达后线虫寿命明显缩短 ($P < 0.001$)。结论 *hil-1* 基因缺失明显缩短线虫寿命, 同时使线虫对热压力和氧化压力的耐受性降低。*hil-1* 基因可能通过饮食限制信号通路调控秀丽隐杆线虫的寿命, 且该作用主要在表皮和肠道。

[关键词] 秀丽隐杆线虫; H1 连接子组蛋白基因; 衰老; 寿命; 饮食限制通路

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0271-11



H1 Linker Histone Gene Regulates Lifespan via Dietary Restriction Pathways in *Caenorhabditis elegans*

CHENG Hui¹, FANG Fei¹, SHI Jiahao¹, YANG Hua¹, ZHANG Mengjie¹, YANG Ping², FEI Jian^{1,2}

(1. School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200082, China; 2. Shanghai Model Animal

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目“上海模式动物工程技术研究中心”(19DZ2280500)、“上海市比较医学专业技术服务平台”(18DZ2293500)

[第一作者] 成慧 (1996—), 女, 硕士, 研究方向: 遗传与衰老。E-mail: 1931474@tongji.edu.cn

[通信作者] 费俭 (1965—), 男, 博士, 教授、博士生导师, 研究方向: 基因功能的模式生物研究。E-mail: jfei@tongji.edu.cn。ORCID: 0000-0001-7755-0818

Engineering Technology Research Center, Shanghai 201309, China)

Correspondence to: FEI Jian (ORCID: 0000-0001-7755-0818), E-mail: jfei@tongji.edu.cn

[ABSTRACT] Objective To reveal the physiological function of H1 linker histone gene (*hil-1*) and its molecular mechanism for regulating the lifespan in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). **Methods** *C. elegans* was used as a model organism and *hil-1* gene was knock-down, knock-out and over-expressed via RNA interference technology, *hil-1(gk229)* mutants backcross purification and microinjection technology. Then the survival and oviposition of *C. elegans* were observed. Physiological tests including heat shock test, paraquat stress test and heavy metal Cr^{6+} stress test were conducted to evaluate the stress resistance of *hil-1* mutants. After constructing a dual mutant nematode, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to further identify the signaling pathways and target sites associated with *hil-1* gene regulatory lifespan. **Results** Compared with wild-type N2 worms, the lifespan of *C. elegans* of RNA interference and *hil-1(gk229)* mutants were significantly shortened ($P < 0.001$), while overexpression of *hil-1* in the whole body increased lifespan ($P < 0.05$). The tolerance of *hil-1(gk229)* mutants to heat stress and oxidative stress was significantly decreased ($P < 0.001$, $P < 0.05$), but the tolerance to heavy metals was not different compared to wild-type N2 worms ($P > 0.05$). In addition, the developmental cycle of *hil-1(gk229)* mutants was shortened and the time of oviposition was advanced ($P < 0.001$), but there was no significant change in total number of oviposition ($P > 0.05$). After feeding *hil-1* RNA interference bacteria to *eat-2(ad465)* mutants, the down-regulation of *hil-1* expression did not affect the lifespan of *eat-2(ad465)* mutants ($P > 0.05$). Compared with wild-type N2 worms, the expression level of *daf-16* in *hil-1(gk229)* mutants was significantly down-regulated ($P < 0.001$), and the expressions of downstream genes, *mtl-1* and *ctl-1*, were also down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Compared with *daf-2(e1370)* mutants, the lifespan of *daf-2(e1370); hil-1(gk229)* mutants did not shortened ($P > 0.05$). Compared with *daf-16(mu86)* mutants, the lifespan of *daf-16(mu86); hil-1(gk229)* mutants was significantly shortened ($P < 0.001$). The knockdown of *hil-1* via RNA interference technology, specifically in epidermis and intestine, was sufficient for lifespan reduction ($P < 0.001$). **Conclusion** The deletion of *hil-1* gene significantly shortened the lifespan of *C. elegans* and decreased the tolerance to heat and oxidative stress. The *hil-1* gene regulates the lifespan of *C. elegans* via dietary restriction pathway and acts mostly in epidermis and intestine.

[Key words] *Caenorhabditis elegans*; H1 linker histone gene (*hil-1*); Aging; Lifespan; Dietary restriction pathway

衰老是个体随着年龄增长出现的身体结构和生理功能的衰退,是人类癌症、糖尿病、心血管疾病和神经退行性疾病等的重要风险因素^[1]。当今社会人口老龄化严重,与衰老相关的疾病发生率逐年上升,不仅影响自身健康,也日益加重医疗成本和社会负担。现有研究显示,通过合理干预,人们在一定程度上能够延缓衰老的进程。因此,探索衰老的本质,研究延缓衰老的机制,对于了解生命现象、健康老龄化均具有重要意义。

现有研究中,主要是通过各种模式生物如线虫、果蝇和小鼠等探明衰老相关的信号通路和分子机制。其中,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)是衰老研究中常用的一种模式生物,也是第一个完成基因组测序的多细胞生物,有60%~80%的基因与人

类基因同源^[2]。成年线虫体长约1 mm,有雌雄同体和雄虫两种性别,在正常培养条件下主要以雌雄同体的形式存在,雄虫只占到约0.5%;其生活史简单,在20℃的实验条件下,从受精卵发育到成虫仅需3 d,生命周期为3~4周。一只雌雄同体的线虫一生可以产卵约300枚。1974年,科学家们以线虫为模式生物开始开展与衰老相关的工作,许多调控衰老和寿命的通路都是在线虫模型中首先被发现,包括胰岛素/胰岛素样生长因子1信号通路、雷帕霉素受体通路和饮食限制通路等^[3-5],并且这些信号通路在进化上高度保守^[6-9]。

H1连接子组蛋白(H1 linker histone, H1)是一类参与形成超核小体染色质高阶结构的DNA结合蛋白^[10-11]。已知哺乳动物有11种H1亚型^[12]。人类

H1.0由194个氨基酸残基组成,其中无序的N端约占23个残基,无序的C端约占97个残基,中间球状结构域约占74个残基。球状结构域是H1中主要负责与核小体上的DNA结合的区域^[13]。H1参与对基因表达的调控,有研究称H1.0和其他H1亚型相比,更广泛地参与了对基因表达的抑制^[14]。研究发现不同物种间同种亚型的相似性高于同一物种中不同亚型间的相似性,相比于H1的其他亚型,H1.0在人类、黑猩猩、小鼠、猪等哺乳动物中是最保守的^[15]。秀丽隐杆线虫中存在7种H1亚型,由*hil-1*~6和*his-24*基因编码。

前期本课题组为了研究衰老过程中相关基因的表达变化,选取成年线虫(10日龄)与老年线虫(22日龄)进行了基因表达芯片分析,发现随着线虫年龄增长,*hil-1*基因表达上调,推测其可能参与了线虫寿命的调控。由于目前尚未有对*hil-1*基因相关功能的文献报告,因此本研究首次利用RNA干扰技术、突变体线虫杂交以及显微注射过表达质粒技术,探讨了*hil-1*基因表达缺失或过量对线虫寿命的影响,并通过环境耐受实验对*hil-1(gk229)*突变体的抗逆性进行评价,以期了解*hil-1*基因的功能及与个体衰老的相关性。

1 材料与方法

1.1 线虫品系、菌株及质粒

野生型秀丽隐杆线虫Bristol(N2),以及突变品系*hil-1(gk229)*、*daf-2(e1370)*、*daf-16(mu86)*、*eat-2(ad465)*和组织特异性品系NR350、TU3311、NR222和VP303均购自美国明尼苏达大学线虫遗传中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)。在开展寿命实验之前,将*hil-1(gk229)*突变体与野生型N2线虫回交6次,最终获得纯合的*hil-1*基因突变品系。若无特殊说明,实验中线虫的食物为尿嘧啶渗漏缺陷型大肠埃希菌OP50(购自CGC)。HT115感受态菌株购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒L4440、pPD95_75和*Pmyo-3::mCherry::unc-54* 3'UTR均来源于Addgene共享数据库,购自北京中源合聚生物科技有限公司。

1.2 试剂与仪器

胰蛋白胨(tryptone,英国Oxoid公司,LP0042),琼脂粉(Agar Powder,美国Sangon Bitech公司,A505255),异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)(美国Sangon Bitech公司,A600168),5-氟去氧尿苷(5-fluoro-2'-deoxyuridine, FUDR)(美国Sangon Bitech公司,A600080),反转录试

剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(日本TaKaRa公司,RR047A),实时荧光定量PCR试剂盒TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)(日本Takara公司,RR820A),NaCl、CaCl₂、MgSO₄和KH₂PO等试剂(中国医药集团有限公司),反转录试剂TRIzol(天根生化科技(北京)有限公司),48孔培养板(美国Axygen公司)。生化培养箱(日本Sanyo公司,MIR254),体视显微镜(日本Olympus公司,SZ61),PCR仪(德国Eppendorf公司,Eppendorf Mastercycler pro)。

1.3 线虫处理实验方法

1.3.1 线虫生长培养基(*C. elegans* growth medium, NGM)的配制

称取3 g NaCl、2.5 g胰蛋白胨、17 g琼脂粉,溶于970 mL ddH₂O中,灭菌后冷却至60℃左右,依次加入1 mL 5 mg/mL胆固醇、1 mL 1 mol/L CaCl₂、1 mL 1 mol/L MgSO₄和25 mL 1 mol/L KH₂PO₄,无菌状态铺板,室温保存。2 d后涂上适量过夜培养的大肠埃希菌OP50,室温放置2 d,即制成NGM培养基(固态,一般倒置使用,以防细菌污染),可用于线虫培养。

1.3.2 线虫同步化及培养

挑取8~10条复苏后代2~3代并在20℃下正常饲养的产卵期成虫,转移至涂有新鲜OP50菌的60 mm NGM培养基中,放置1 h。收集到适当数量的虫卵后,将成虫移出该培养基,获得的卵孵化后即生长状态一致的同步化线虫。所有品系的线虫均在实验前进行同步化处理。

1.3.3 线虫RNA干扰实验

选取*hil-1*基因的cDNA序列(*hil-1*正向引物为5'-GGACTAGTATGACCACTTCGCTCATC-3';反向引物序列为5'-GGGAAGCTTACAATAGCTCTTT-CTGGTT-3'),以L4440质粒为骨架构建靶标*hil-1*基因的RNA干扰质粒,转入HT115感受态菌株(这是一种RNase III缺陷型大肠埃希菌株,可以用IPTG诱导表达双链RNA,用于RNA干扰),经测序鉴定筛选出含有干扰质粒的克隆菌,将其加到含双抗(100 mg/mL Amp及12.5 mg/mL Tet)的LB液体培养基中,37℃摇床培养过夜。次日将*hil-1* RNA干扰菌株以1:100的体积比接种至LB液体培养基中,加入终质量浓度为50 mg/mL的Amp,37℃摇床培养数小时后用紫外分光光度计测定菌液浓度,待A_{600nm}值为1左右时停止培养,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG。按一定比例将菌

液加至含有 1 mmol/L IPTG 的 NGM 培养基上, 用于线虫培养, 即通过给野生型 N2、*eat-2(ad465)* 突变体、组织特异性 RNA 干扰线虫 (NR350、TU3311、NR222 和 VP303) 喂食这种 RNA 干扰细菌, 获得可降低靶标基因 *hil-1* 表达的 RNA 干扰线虫。实验中以喂食 L4440 空质粒的线虫为对照组。

1.3.4 显微注射法构建过表达线虫

以 pPD95_75 质粒为骨架, 构建 *Pdpy-30::GFP::T2A::hil-1* 过表达质粒 (其中 T2A 为共转录原件), 利用全身性表达的 *dpy-30* 基因的启动子驱动绿色荧光报告基因 GFP (删去终止密码子) 和目标基因 *hil-1* 共转录。将过表达质粒与 *Pmyo-3::mCherry::unc-54 3'UTR* 质粒 (其中 mCherry 为红色荧光标记, 可作为显微注射阳性的筛选标记) 混匀, 制备成终质量浓度分别为 100 ng/mL 和 50 ng/mL 的注射液。用显微注射法将混合质粒注射液注入刚成虫 (体内没有卵或有几个卵的) 的线虫生殖囊中。注射成功的线虫单独培养, 3 d 后在荧光显微镜下挑出既发红光又发绿光的子代线虫, 转移到 35 mm NGM 板上单独培养传代。若其后代发光率稳定在 50% 以上, 则视为过表达线虫建成功, 命名为 *hil-1* OE 线虫。

1.3.5 杂交法构建双突变体线虫

hil-1(gk229) 突变体线虫与野生型 N2 株系雄虫交配, 获得 *hil-1(gk229)* 的雄虫, 再与野生型 N2 的雌雄同体线虫进行 2 次回交, 通过单只线虫基因组 PCR 法鉴定出交配后背景纯化的 *hil-1(gk229)* 基因突变的雌雄同体线虫。使用 *daf-16(mu86)* 雌雄同体线虫和野生型 N2 雄虫进行交配, 得到 *daf-16(mu86)* 的雄虫, 然后再与 *hil-1(gk229)* 雌雄同体线虫交配, 通过单只线虫基因组 PCR 法鉴定出交配后的纯合体雌雄同体, 获得 *daf-16(mu86);hil-1(gk229)* 双突变株线虫。使用 *daf-2(e1370)* 雌雄同体线虫和野生型 N2 雄虫进行交配, 得到 *daf-2(e1370)* 的雄虫, 然后再与 *hil-1(gk229)* 雌雄同体线虫交配, 通过单只线虫基因组 PCR 法和测序法鉴定出交配后的纯合体雌雄同体, 获得 *daf-2(e1370);hil-1(gk229)* 双突变株线虫^[16]。

1.4 观察及评价实验

1.4.1 线虫寿命观察

将 RNA 干扰线虫、过表达线虫、*hil-1(gk229)* 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 挑取产卵期成虫各 30 条。将它们转移至涂有新鲜 OP50 菌的 100 mm NGM 培养基中, 放置 2 h 收集到 200~300 个虫

卵后, 将成虫从培养基挑出。待虫卵发育至成虫后, 将线虫挑至涂有 OP50 菌且含有 12.5 mg/mL FUDR 的 60 mm NGM 培养基中, 每个培养基上放置 35 条线虫。培养过程中用挑针轻轻触碰线虫头部, 如果没有发生摆动反应, 则判断它已死亡, 并将其移出培养基。寿命分析实验设置 3 个重复, 以线虫挑进培养基为第一天 (Day1), 以最后一条线虫死亡为实验终点^[17], 每 2 d 记录线虫死亡情况和存活数量, 以此绘制线虫存活曲线。

1.4.2 热耐受实验

hil-1(gk229) 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 将成虫第一天的同步化线虫挑至涂有 OP50 菌的 60 mm NGM 培养基中, 每个培养基放置 30 条线虫, 每种线虫重复 3 个培养基。将各类线虫及培养基放入 35 °C 培养箱中培养, 每 3 h 记录线虫死亡情况和存活数量。线虫死亡的标准定义为震动、强光照射后身体不动^[18]。

1.4.3 百草枯应激实验

hil-1(gk229) 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 将成虫第一天的同步化线虫挑入加了 90 μ L M9 缓冲液的 48 孔培养板孔中, 每孔 30 条线虫。每种线虫重复 3 个孔, 每孔加入 30 μ L 200 mmol/L 的百草枯溶液 (终浓度为 50 mmol/L), 对照组加入 30 μ L M9 缓冲液。各组线虫置于 20 °C 继续培养, 每 12 h 记录线虫死亡情况和存活数量。线虫死亡的标准为震动、强光照射后身体不动^[18]。

1.4.4 重金属 Cr⁶⁺ 应激实验

hil-1(gk229) 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 将成虫第一天的同步化线虫挑入加了 270 μ L M9 缓冲液的 48 孔培养板孔中, 每孔 30 条线虫。每种线虫重复 3 个孔, 每孔加入 30 μ L 100 mmol/L 的 K₂Cr₂O₇ 溶液 (终浓度为 10 mmol/L), 对照组加入 30 μ L M9 缓冲液。各组线虫置于 20 °C 继续培养, 每 12 h 记录线虫死亡情况和存活数量。线虫死亡的标准为震动、强光照射后身体不动^[18]。

1.4.5 线虫生长及产卵统计

hil-1(gk229) 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 记录线虫从卵发育阶段到产下第一颗卵的时间, 观察 L4 期的体型、生殖囊中有无成型卵, 测量其体长。将 L4 期同步化线虫挑至涂有 OP50 菌的 60 mm NGM 培养基中, 每个培养基放置 5 条, 每种线虫重复 3 个培养基并标记序号。每隔 24 h 将线虫挑至对

应序号的新涂有 OP50 菌的 60 mm NGM 培养基中，记录原来培养基中产卵的数量，直至线虫产卵结束。

1.4.6 实时荧光定量 PCR 检测寿命相关信号通路及靶点基因表达

使用 TRIzol 法从野生型 N2 线虫以及 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫中提取总 RNA，取 1 μ g 转录成 cDNA。应用实时荧光定量 PCR 检测 *hil-1* 以及胰岛素信号通路相关基因 *daf-16* 及其靶基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 的 mRNA 水平，以 *act-4* 作为内参。引物序列见表 1。PCR 反应体系包括 PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (2 $\times$) 10 μ L，正反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L，ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μ L，cDNA 反应液 2 μ L，ddH₂O 6 μ L。PCR 反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min，95 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环。熔解曲线反应条件：95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，95 $^{\circ}$ C 15 s。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因的相对表达量。

表1 PCR引物序列
Table 1 Prime sequences for PCR

基因	引物序列
Gene	Sequences of primers
<i>hil-1</i>	Forward: 5'-AATGGAACCGGAAGCAGCAA-3'
	Reverse: 5'-TCCGCGAGTCTGTCAATGT-3'
<i>daf-16</i>	Forward: 5'-GCTCCCTTCACTCGACACTT-3'
	Reverse: 5'-TTCGATTGAGTTCGGGGACG-3'
<i>mtl-1</i>	Forward: 5'-GCTTGCAAGTGTGACTGCAA-3'
	Reverse: 5'-TTGATGGGTCTTGCTCCGC-3'
<i>ctl-1</i>	Forward: 5'-TACCGAGGAGGGTAAGTGGG-3'
	Reverse: 5'-AGTCTGTGGATTGCGCTTCA-3'
<i>act-4</i>	Forward: 5'-GCCACCGCTGCCTCCTCATC-3'
	Reverse: 5'-CCGGCAGACTCCATACCCAAGAAG-3'

1.5 数据处理和统计学分析

每个实验至少重复 3 次，每次至少 3 个平行操作，实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 GraphPad Prism version 7.0 软件进行数据分析及统计作图。线虫寿命数据采用 log-rank (Mantel-Cox) 检验分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *hil-1* 基因参与调控线虫寿命

首先利用 RNA 干扰技术，给野生型 N2 线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌株，结果显示线虫寿命明显缩短；统计分析显示，与空质粒 L4440 对照组相比，RNA 干扰

线虫的平均寿命缩短了 23.53% ($P<0.001$ ，图 1A)。

为进一步验证 *hil-1* 基因缺失对线虫寿命的影响，利用 *hil-1* (*gk229*) 突变体验证了 *hil-1* RNA 干扰的结果。结果显示 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫的平均寿命是 18 d，野生型 N2 线虫的平均寿命是 22 d，*hil-1* (*gk229*) 突变体的平均寿命相比于野生型 N2 线虫显著缩短 ($P<0.001$ ，图 1B)。

另外，利用显微注射过表达质粒的方法将 *hil-1* 全身性过表达后，*hil-1* OE 线虫的平均寿命相比于野生型 N2 线虫有所延长 ($P<0.05$ ，图 1C)。这些结果表明，*hil-1* 基因参与调控线虫寿命。线虫寿命实验的具体数据分析见表 2。

2.2 *hil-1* 缺失导致线虫对环境耐受能力降低

对 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫和野生型 N2 线虫分别进行了 35 $^{\circ}$ C 热耐受实验、百草枯应激实验和重金属 Cr⁶⁺ 应激实验，以测试它们耐受热压力、氧化压力和重金属压力的能力差异。结果显示，在 35 $^{\circ}$ C 环境下，*hil-1* (*gk229*) 突变体相比于野生型 N2 线虫对热压力的耐受能力显著降低 ($P<0.001$ ，图 2A)。

在用 50 mmol/L 的百草枯处理 12 h 时，野生型 N2 线虫的存活率接近 70%，而 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫的存活率约为 45%，表明 *hil-1* (*gk229*) 突变体相比于野生型 N2 线虫对氧化压力的耐受降低 ($P<0.05$ ，图 2B)。但在 10 mmol/L K₂Cr₂O₇ 处理下，*hil-1* (*gk229*) 突变体相比于野生型 N2 线虫对重金属的耐受力并无显著差异 ($P>0.05$ ，图 2C)。

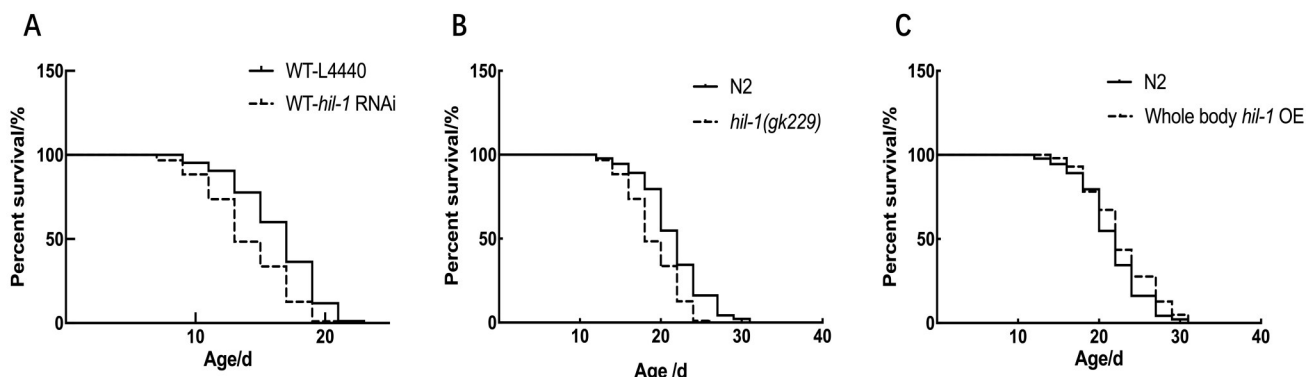
这些结果表明，*hil-1* 缺失导致线虫对热压力和氧化压力的耐受能力降低。

2.3 *hil-1* 缺失影响线虫的生长和生殖

实验过程中发现，*hil-1* (*gk229*) 突变体线虫在发育过程中，相比于野生型 N2 线虫发育成成虫的时间提前。L4 期时，*hil-1* (*gk229*) 突变体比野生型 N2 线虫的体长更长，且在生殖囊中观察到有卵成型，而野生型 N2 线虫的生殖囊中还未有成型的卵，但成虫后两者体型并无明显差异 (图 3A)。

统计了 *hil-1* (*gk229*) 突变体和野生型 N2 线虫从卵发育阶段到产下第一颗卵的时间，发现 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫的平均发育时间是 65 h，而野生型 N2 线虫的平均发育时间是 69 h (图 3B)，表明 *hil-1* 突变会导致线虫发育周期缩短 ($P<0.001$)，但并不影响成虫的体长。

同时，从 L4 期开始，每隔 24 h 统计 *hil-1* (*gk229*)

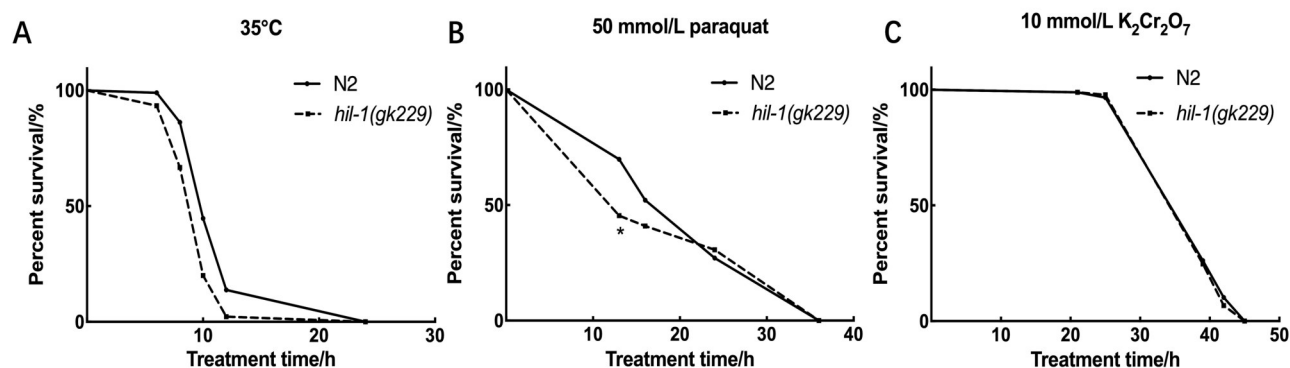


注：A，野生型 N2 线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰 (RNAi) 菌的生存曲线 [与对照组 (喂食 L4440) 相比， $P < 0.001$]；B，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体线虫的生存曲线 (与 N2 线虫相比， $P < 0.001$)；C，野生型 N2 线虫与 *hil-1* 全身性过表达线虫 (*hil-1* OE) 的生存曲线 (与 N2 线虫相比， $P < 0.05$)。

Note: A, Survival curves of wild-type N2 worms fed *hil-1* RNA interference (RNAi) bacteria [compared with control group (fed L4440), $P < 0.001$]; B, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutants (compared with N2, $P < 0.001$); C, Survival curves between wild-type N2 nematode and *hil-1* systemic overexpression worms (compared with N2 nematode, $P < 0.05$).

图1 *hil-1*参与线虫寿命的调控

Figure 1 *hil-1* is involved in regulation of the lifespan in *C. elegans*



注：A，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体线虫从 20 °C 转移至 35 °C 环境中的生存曲线， $P < 0.001$ ；B，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体在 50 mmol/L 百草枯环境中的生存曲线， $*P < 0.05$ ；C，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体在 10 mmol/L $K_2Cr_2O_7$ 环境中的生存曲线， $P > 0.05$ 。

Note: A, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms transferred from 20 °C to 35 °C, $P < 0.001$; B, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms exposed to 50 mmol/L paraquat, $*P < 0.05$; C, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms exposed to 10 mmol/L $K_2Cr_2O_7$, $P > 0.05$.

图2 *hil-1*缺失降低了线虫对热压力和氧化压力的耐受性

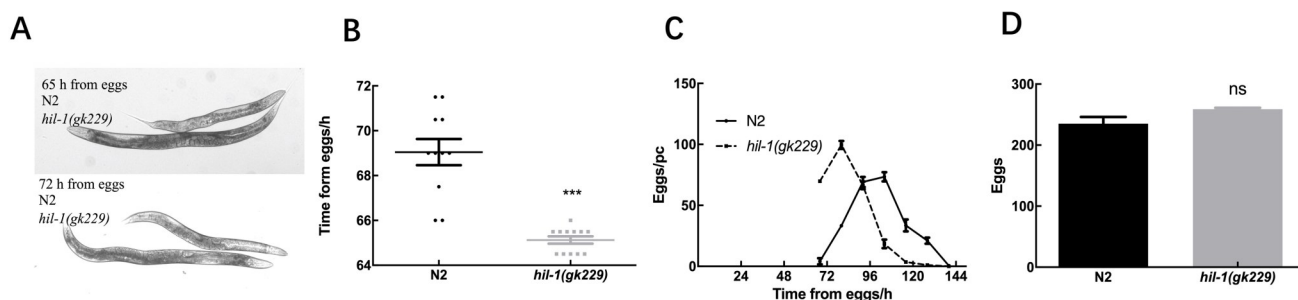
Figure 2 The deletion of *hil-1* reduces the tolerance to heat shock and oxidative stress of *C. elegans*

突变体和野生型 N2 线虫的产卵情况，结果表明 *hil-1(gk229)* 突变体线虫的产卵高峰期在卵孵化后 80 h，而野生型 N2 线虫的产卵高峰期在卵孵化后 116 h，提示产卵时间提前 ($P < 0.001$ ，图 3C)，但在产卵总数方面 *hil-1(gk229)* 突变体与野生型 N2 之间没有显著差异 ($P > 0.05$ ，图 3D)。

以上结果表明 *hil-1* 缺失会导致线虫发育周期缩短，产卵时间提前，但并不影响线虫产卵总数。

2.4 *hil-1* 依赖饮食限制信号通路调控寿命

以往研究发现成年线虫经过急性饥饿处理后，连接组蛋白 HIL-1 的表达水平上调^[19]，而且 HIL-1 主要在线虫咽部的边缘细胞中表达^[20]。*hil-1(gk229)* 是一种 *eat-2* 基因发生无义突变的突变体线虫，由于突变带入了终止密码子，造成了 EAT-2 蛋白翻译提前终止。*hil-1(gk229)* 突变体咽部抽吸能力低于正常线虫，通过减少摄食达到饮食限制的效果，达到饮食限制的目的，



注：A，分别在卵发育 65 h 和 72 h 时在显微镜下观察野生型 N2 线虫和 *hil-1(gk229)* 突变体线虫（放大倍数 100X）；B，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体线虫从卵发育到产下第一颗卵所用时间，每组各 10 条线虫，*** $P < 0.001$ ；C，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体从卵发育开始每 12 h 平均产卵量，每组均不少于 10 条线虫；D，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体平均产卵总量，每组均不少于 10 条线虫， $P > 0.05$ 。

Note: A, Observing the morphology of eggs of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms at 65 h and 72 h of development under microscope, with magnification of 100X; B, The duration of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms from egg to the laying of the first egg, $n = 10$ in each group, *** $P < 0.001$; C, The average number of eggs production every 12 h from egg development in wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms, $n > 10$ in each group; D, The total number of eggs in wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms. $n > 10$ in each group, ^{ns} $P > 0.05$.

图3 *hil-1* 缺失影响线虫发育

Figure 3 The deletion of *hil-1* affects the development of *C. elegans*

并延长线虫寿命^[21]。为了探究 *hil-1* 是否通过饮食限制通路调节线虫寿命，本研究给 *hil-1(gk229)* 突变体线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌，即在饮食限制的背景下，利用 RNAi 干扰技术降低 *hil-1* 的表达，通过探究 *hil-1* 降低表达后短寿效应是否消除，来明确 *hil-1* 与通路之间的关系。

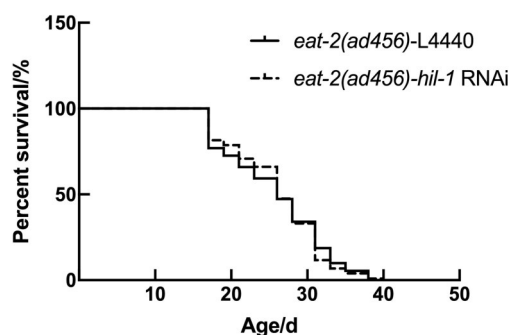
寿命观察结果发现，与喂食空质粒 L4440 的对照组相比，*hil-1* 表达下调并不影响 *eat-2(ad465)* 突变体

线虫的寿命 ($P > 0.05$ ，图4)，这表明 *hil-1* 可能通过影响饮食限制通路来调节线虫寿命。线虫寿命实验的具体数据分析见表2。

2.5 *hil-1* 不完全依赖胰岛素信号通路调控寿命

在线虫中，*daf-2* 编码胰岛素信号通路受体，*daf-16* 是下游转录因子，当 *daf-2* 发生突变后，该信号通路下调，使得 DAF-16 去磷酸化，易位进入细胞核并调控系列基因的表达，从而引起线虫寿命的延长^[22-23]。将 *hil-1(gk229)* 和 *daf-2(e1370)* 突变体线虫进行杂交，得到包含两种基因型的双突变体线虫 *daf-2(e1370); hil-1(gk229)*，进行寿命分析。结果显示，尽管 *hil-1* 的缺失在前期降低了 *daf-2(e1370)* 突变体线虫的生存率，但在整体水平上 *daf-2(e1370); hil-1(gk229)* 突变体与 *daf-2(e1370)* 突变体相比，两者寿命无明显差异 ($P > 0.05$) (图5A)，这说明 *hil-1(gk229)* 突变缩短寿命的效应依赖于 *daf-2*。

为了进一步探究 *hil-1* 与 *daf-2* 下游基因 *daf-16* 之间的相关性，通过实时荧光定量 PCR 检测到相较于野生型 N2 线虫，*hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 表达水平下调幅度近一倍以上 ($P < 0.001$ ，图5B)，其下游基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 的表达也显著下调 ($P < 0.05$, $P < 0.001$ ，图5C)，这提示 *hil-1* 可能通过 *daf-16* 影响线虫寿命。接下来，构建了 *daf-16* 和 *hil-1* 的双突变线虫 *daf-16(mu86); hil-1(gk229)*，观察发现在 *hil-1* 缺失后，*daf-16(mu86)* 突变体线虫的寿命进一步缩短 ($P < 0.001$ ，图



注：*eat-2(ad465)* 突变体喂食 *hil-1* RNA 干扰 (RNAi) 菌的生存曲线。与对照组 (喂食 L4440) 相比， $P > 0.05$ 。

Note: Survival curves of *eat-2(ad465)* mutants fed *hil-1* RNA interference (RNAi) bacteria. Compared with control group (fed L4440), $P > 0.05$.

图4 *hil-1* 敲降不影响 *eat-2(ad465)* 突变体寿命

Figure 4 The knockdown of *hil-1* has no significant effect on the lifespan of *eat-2(ad465)*

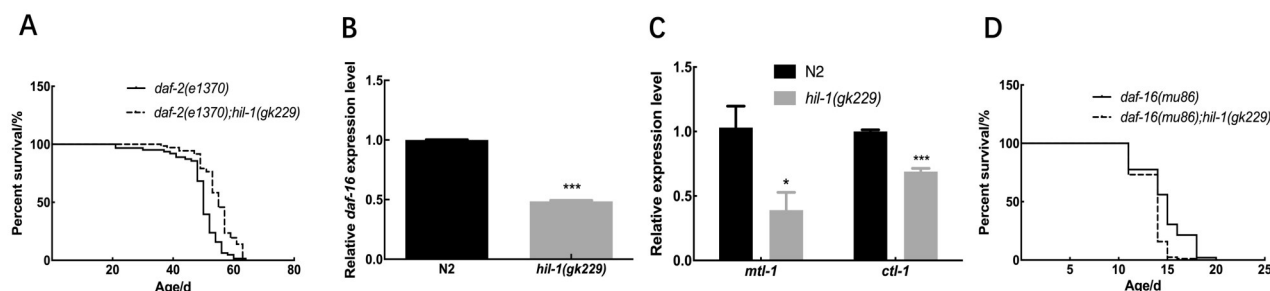
5D), 这表明 *hil-1* 突变导致的寿命缩短不完全依赖于 *daf-16*。线虫寿命实验的具体数据分析见表2。

2.6 *hil-1* 作用于表皮和肠道调控寿命

为了进一步确定 *hil-1* 调控线虫寿命的作用部位, 利用组织特异性 RNA 干扰线虫 (肌肉组织 NR350、神经元 TU3311、表皮组织 NR222、肠道组织 VP303), 给其喂食 *hil-1* RNA 干扰菌株, 进行寿命观察。结果表明, 与对照组相比, 在肌肉和神经元中 RNA 干扰 *hil-1* 基因表达后, 线虫寿命无显著变化 (图 6A ~ B, $P > 0.05$), 而在表皮和肠道中 RNA 干扰 *hil-1* 基因表达后, 线虫寿命明显缩短 (图 6C ~ D, $P < 0.001$)。线虫寿命实验的具体数据分析见表2。这些结果表明 *hil-1* 调节寿命的作用部位主要在表皮和肠道组织。

3 讨论

秀丽隐杆线虫是最早使用且最常用的衰老研究模式生物之一^[24]。本课题组前期实验结果表明, *hil-1* 在线虫衰老过程中表达水平显著上调。*hil-1* 与哺乳动物 H1.0 连接子组蛋白同源, H1.0 连接子组蛋白在维持高阶染色质结构和调节基因表达中起着重要作用^[25], 但尚不清楚是否对寿命有调控作用。本研究发现 *hil-1* 参与了线虫寿命的调控。有研究表明 H1.0 连接子组蛋白参与哺乳动物的发育过程和组织分化^[26]。果蝇中的 H1 变体 dBigH1 是果蝇卵巢中生殖干细胞 (germ line stem cell, GSC) 调节所必需, 该变体缺失激活 GSC 分化因子 *bam*, 导致 GSC 过早分化, 产卵总量减少^[27]。在线虫中, 本研究发现 *hil-1* 缺失并不会导致产卵总量

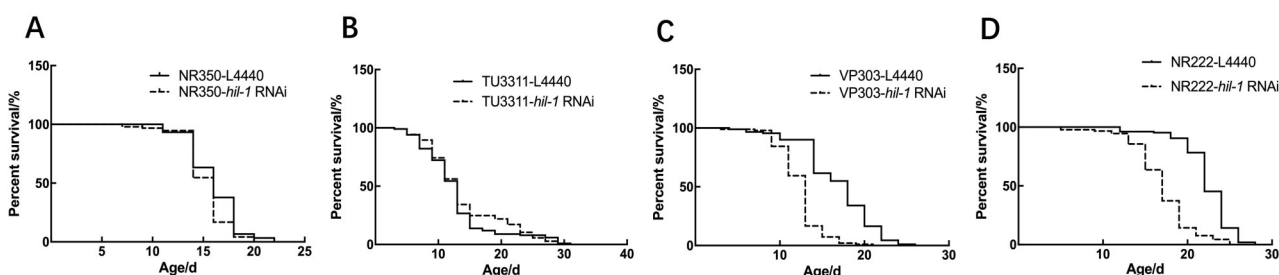


注: A, *daf-2(e1370)* 突变体和 *daf-2(e1370);hil-1(gk229)* 双突变体线虫的生存曲线, $P > 0.05$; B, 野生型 N2 线虫和 *hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 的表达量 (与 N2 相比, $***P < 0.001$); C, 野生型 N2 线虫和 *hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 下游靶基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 的表达 (与 N2 相比, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$); D, *daf-16(mu86)* 突变体和 *daf-16(mu86);hil-1(gk229)* 双突变体线虫的生存曲线, $P < 0.001$ 。

Note: A, Survival curves of *daf-2(e1370)* mutant worms and *daf-2(e1370);hil-1(gk229)* mutant worms, $P > 0.05$; B, Analysis of the expression levels of *daf-16* gene in wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms (Compared with wild-type N2 worms, $***P < 0.001$); C, Analysis of the expression levels of *daf-16* target genes *mtl-1* and *ctl-1* in wild-type N2 and *hil-1(gk229)* mutant worms (compared with wild-type N2 worms $*P < 0.05$, $***P < 0.001$); D, Survival curves of *daf-16(mu86)* mutant worms and *daf-16(mu86);hil-1(gk229)* mutant worms, $P < 0.001$.

图5 *hil-1* 不完全依赖胰岛素信号通路调控线虫寿命

Figure 5 *hil-1* is not completely dependent on insulin signaling pathway to regulate lifespan of *C. elegans*



注: A ~ D 分别为肌肉 (A)、神经 (B)、表皮 (C) 和肠道 (D) 组织特异性 RNA 干扰 (RNAi) 线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌株后的生存曲线。仅在表皮或者肠道组织降敲 *hil-1* 基因表达会显著缩短线虫寿命。

Note: A-D, Survival curves of worms with tissue-specific knockdown of *hil-1* in muscle (A), neuron (B), hypodermis (C) and intestine (D), respectively. Lifespan is shortened only in hypodermis-specific RNA interference (RNAi) or intestine-specific RNAi worms.

图6 *hil-1* 作用于表皮和肠道调控线虫寿命

Figure 6 *hil-1* acts in the hypodermis or intestine to regulate lifespan

表2 线虫寿命实验的数据分析

Table 2 Analysis of experimental data of lifespan in *C. elegans*

线虫种类 <i>C. elegans</i> strains	线虫数量 Number	平均寿命 Mean lifespan /d
N2	94	22±0.23
<i>hil-1(gk229)</i>	95	18±0.67***
Whole body <i>hil-1</i> OE	101	22±0.22*
<i>daf-2(e1370)</i>	101	47±0.46
<i>daf-2(e1370);hil-1(gk229)</i>	97	47±0.57
<i>daf-16(mu86)</i>	98	15±0.24
<i>daf-16(mu86);hil-1(gk229)</i>	82	14±0.26▲▲▲
N2-L4440	85	17±0.23
N2- <i>hil-1</i> RNAi	95	13±0.60△△△
<i>eat-2(ad465)</i> -L4440	91	26±0.41
<i>eat-2(ad465)</i> - <i>hil-1</i> RNAi	103	26±0.42
NR350-L4440	90	16±0.56
NR350- <i>hil-1</i> RNAi	95	16±0.57
TU3311-L4440	101	13±0.28
TU3311- <i>hil-1</i> RNAi	105	13±0.33
NR222-L4440	105	22±0.27
NR222- <i>hil-1</i> RNAi	91	17±0.34 ^{aaa}
VP303-L4440	91	18±0.62
VP303- <i>hil-1</i> RNAi	96	13±0.44 ^{bbb}
AMJ345-L4440	99	15±0.21
AMJ345- <i>hil-1</i> RNAi	99	15±0.23 ^{cc}

注：与N2线虫相比，* $P<0.05$ ，*** $P<0.001$ ；与*daf-16(mu86)*线虫相比，▲▲▲ $P<0.001$ ；与N2-L4440线虫相比，△△△ $P<0.001$ ；与NR222-L4440线虫相比，^{aaa} $P<0.001$ ；与VP303-L4440相比，^{bbb} $P<0.001$ ；与AMJ345-L4440，^{cc} $P<0.01$ 。

Note: Compared with wild-type N2 worms, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; Compared with *daf-16(mu86)* mutant worms, ▲▲▲ $P<0.001$; Compared with N2-L4440 worms, △△△ $P<0.001$; Compared with NR222-L4440 worms, ^{aaa} $P<0.001$; Compared with VP303-L4440 worms, ^{bbb} $P<0.001$; Compared with AMJ345-L4440 worms, ^{cc} $P<0.01$.

减少，但是会导致产卵时间提前。

抗压性检测是研究衰老和健康跨度的重要手段^[28]。本研究通过热耐受和百草枯、重金属Cr⁶⁺应激实验发现，*hil-1*缺失会使线虫对热压力和氧化压力的耐受能力下降，但对重金属镉的耐受能力无影响。并且本研究发现，*hil-1*的缺失降低了*mtl-1*和*ctl-1*基因mRNA水平的表达。以往研究显示，*mtl-1*编码金属硫蛋白可以延长线虫寿命^[29]；在热刺激下，*mtl-1*在咽部细胞诱导表达^[30]；*ctl-1*编码过氧化氢酶，可以帮助线虫抵御氧化损伤^[31]。这些文献报告与本研究中的*hil-1(gk229)*突变体对热压力和氧化压力的耐受能力降低的结果相一致。因此推测，*hil-1(gk229)*突变体线虫寿命缩短可能是由于其对热压力和氧化压力的耐受能力降低所导致。

在不同物种中，饮食限制是延缓衰老、延长寿命最有效的手段之一。对线虫进行间歇性禁食，其寿命可以延长50%以上^[3]。成年线虫经历急性饥饿处理后，HIL-1的表达水平上调^[19]。本研究发现，在饮食限制的条件下，通过RNA干扰下调*hil-1*表达，对线虫寿命无显著性影响。已有研究表明，H1.X在线虫咽部的边缘细胞中突出表达，H1.X的RNA干扰导致咽部纵向扩大^[20]。笔者推测*hil-1*有可能通过影响咽部肌肉的发育改变线虫的抽吸速率，进而通过饮食限制信号通路调节线虫寿命。

另外，饮食限制会导致碳水化合物摄入减少，从而降低胰岛素信号的传导^[32]。本研究发现*hil-1*缺失线虫缩短寿命的效应依赖于*daf-2*，*hil-1*缺失降低了*daf-16*的表达。有文献报告*daf-16*对线虫寿命的调控主要作用于肠道^[33]，而本研究发现*hil-1*对线虫寿命的影响也主要来自其对表皮和肠道的调控，因此提示*hil-1*缺失线虫缩短寿命的效应可能有*daf-16*的参与。但是本研究还发现，*daf-16(mu86);hil-1(gk229)*双突变体线虫的寿命进一步缩短，说明*hil-1*并不完全依赖胰岛素信号通路来调节线虫寿命。

此外，已有研究表明，饮食限制对个体的调节可以是广泛且多位点的。例如，饮食限制可以负调控雷帕霉素和S6激酶信号通路^[34]，抑制这一过程可以阻断饮食限制介导的线虫寿命延长^[35-36]；同时胰岛素/胰岛素样生长因子1信号通路下游最重要的调控寿命的转录因子*skn-1*缺失也会抑制饮食限制引起的线虫寿命延长^[37]。据此，笔者推测*hil-1*对线虫寿命的调控可能涉及多条信号通路，需要进一步探究。

综上所述，本研究揭示了*hil-1*的生理学功能，初步探究了*hil-1*调控线虫寿命的分子机制，为研究衰老机制提供了实验基础和理论依据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

成慧与方菲负责方法设计与实验操作、结果分析、论文构思及初稿撰写；

石嘉豪负责项目管理、质粒构建；

杨桦和张梦杰负责文稿校正；

杨平负责线虫品系提供、方法设计；

费俭负责方案策划、项目管理、获取资助、论文修改及定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging[J]. *Cell*, 2013, 153(6):1194-1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- [2] NIGON V M, FÉLIX M A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms[J]. *WormBook*, 2017, 2017:1-84. DOI: 10.1895/wormbook.1.181.1.
- [3] HONJOH S, YAMAMOTO T, UNO M, et al. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*[J]. *Nature*, 2009, 457(7230): 726-730. DOI: 10.1038/nature07583.
- [4] KENYON C, CHANG J, GENSCH E, et al. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type[J]. *Nature*, 1993, 366(6454):461-464. DOI: 10.1038/366461a0.
- [5] VELLAI T, TAKACS-VELLAI K, ZHANG Y, et al. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*[J]. *Nature*, 2003, 426(6967):620.
- [6] HARRISON D E, STRONG R, DAVE SHARP Z, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice[J]. *Nature*, 2009, 460(7253): 392-395. DOI: 10.1038/nature08221.
- [7] KAEBERLEIN M, POWERS R W 3rd, STEFFEN K K, et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients[J]. *Science*, 2005, 310(5751):1193-1196.
- [8] KENYON C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants[J]. *Cell*, 2005, 120(4):449-460.
- [9] KAPAH P, ZID B M, HARPER T, et al. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(10):885-890.
- [10] NOLL M, KOROBERG R D. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1[J]. *J Mol Biol*, 1977, 109(3):393-404. DOI: 10.1016/S0022-2836(77)80019-3.
- [11] ALLAN J, HARTMAN P G, CRANE-ROBINSON C, et al. The structure of histone H1 and its location in chromatin[J]. *Nature*, 1980, 288(5792):675-679. DOI: 10.1038/288675a0.
- [12] HERGETH S P, SCHNEIDER R. The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle[J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(11): 1439-1453. DOI: 10.15252/embr.201540749.
- [13] HAO F F, KALE S, DIMITROV S, et al. Unraveling linker histone interactions in nucleosomes[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2021, 71: S0959-S440X(21)00083-X. DOI: 10.1016/j.sbi.2021.06.001.
- [14] BHAN S, MAY W, WARREN S L, et al. Global gene expression analysis reveals specific and redundant roles for H1 variants, H1c and H1(0), in gene expression regulation[J]. *Gene*, 2008, 414(1-2):10-18. DOI: 10.1016/j.gene.2008.01.025.
- [15] DI LIEGRO C, SCHIERA G, DI LIEGRO I. H1.0 linker histone as an epigenetic regulator of cell proliferation and differentiation[J]. *Genes*, 2018, 9(6): 310. DOI: 10.3390/genes9060310.
- [16] 石锦平, 任长虹, 李媛, 等. 秀丽隐杆线虫双突变株系 hif-1(ia04); glb-13(tm2825)的制备与鉴定[J]. *军事医学*, 2011, 35(4):253-257. DOI:10.3969/j.issn.1674-9960.2011.04.004.
- [17] SHI J P, REN C H, LI Y, et al. Construction and characterization of double mutant strain hif-1(ia04); glb-13(tm2825) in *C. elegans*[J]. *Military Medical Sciences*, 2011, 35(4):253-257. DOI:10.3969/j.issn.1674-9960.2011.04.004.
- [18] ZHAO Y, GILLIAT A F, ZIEHM M, et al. Two forms of death in ageing *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15458. DOI: 10.1038/ncomms15458.
- [19] YANG P, SUN R L, YAO M H, et al. A C-terminal truncated mutation of spr-3 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(7): 540-548. DOI: 10.1093/abbs/gmt048.
- [20] LARANCE M, POURKARIMI E, WANG B, et al. Global proteomics analysis of the response to starvation in *C. elegans*[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(7): 1989-2001. DOI: 10.1074/mcp.M114.044289.
- [21] JEDRUSIK M A, VOGT S, CLAUS P, et al. A novel linker histone-like protein is associated with cytoplasmic filaments in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 14):2881-2891.
- [22] HUANG C, XIONG C J, KORNFELD K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21):8084-8089.
- [23] LEE S S, KENNEDY S, TOLONEN A C, et al. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism[J]. *Science*, 2003, 300(5619): 644-7. DOI: 10.1126/science.1083614.
- [24] SUN X, CHEN W D, WANG Y D. DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 548. DOI: 10.3389/fphar.2017.00548.
- [25] 尹丹阳, 胡怡, 史仍飞. 动物衰老模型的研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(2): 156-162. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.094.
- [26] YIN D Y, HU Y, SHI R F. Advances in animal aging models[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2): 156-162. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.094.
- [27] HARSHMAN S W, YOUNG N L, PARTHUN M R, et al. H1 histones: current perspectives and challenges[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(21):9593-9609. DOI: 10.1093/nar/gkt700.
- [28] PAN C Y, FAN Y H. Role of H1 linker histones in mammalian development and stem cell differentiation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(3): S1874-S9399(15)00266-7. DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.12.002.
- [29] SUN J, WEI H M, XU J, et al. Histone H1-mediated epigenetic regulation controls germline stem cell self-renewal by modulating H4K16 acetylation[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8856. DOI: 10.1038/ncomms9856.
- [30] YANASE S, YASUDA K, ISHII N. Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (age-1, mev-1 and daf-16) that affect life span[J]. *Mech Ageing Dev*, 2002, 123(12):1579-1587.
- [31] ANBALAGAN C, LAFAYETTE I, ANTONIOU-KOUROUNOTI M, et al. Transgenic nematodes as biosensors for metal stress in

- soil pore water samples[J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(2):439-455. DOI: 10.1007/s10646-011-0804-0.
- [30] MOILANEN L H, FUKUSHIGE T, FREEDMAN J H. Regulation of metallothionein gene transcription[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(42):29655-29665. DOI: 10.1074/jbc.274.42.29655.
- [31] LIN C X, ZHANG X Y, SU Z X, et al. Carnosol improved lifespan and healthspan by promoting antioxidant capacity in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5958043. DOI: 10.1155/2019/5958043.
- [32] GREEN C L, LAMMING D W, FONTANA L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 56-73. DOI: 10.1038/s41580-021-00411-4.
- [33] ZHANG Y P, ZHANG W H, ZHANG P, et al. Intestine-specific removal of DAF-2 nearly doubles lifespan in *Caenorhabditis elegans* with little fitness cost[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6339. DOI: 10.1038/s41467-022-33850-4.
- [34] HAHM J H, JEONG C, NAM H G. Diet restriction-induced healthy aging is mediated through the immune signaling component ZIP-2 in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(5): e12982. DOI: 10.1111/ace1.12982.
- [35] WEIR H J, YAO P, HUYNH F K, et al. Dietary restriction and AMPK increase lifespan via mitochondrial network and peroxisome remodeling[J]. *Cell Metab*, 2017, 26(6): S1550-S1513(17)30612-5. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.09.024.
- [36] CAI H H, RASULOVA M, VANDEMEULEBROUCKE L, 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 Sci Med Sci*, 2017, 72(10):1311-1318. DOI: 10.1093/gerona/glx013.
- [37] SMITH-VIKOS T, DE LENCASTRE A, INUKAI S, et al. MicroRNAs mediate dietary-restriction-induced longevity through PHA-4/FOXA and SKN-1/Nrf transcription factors[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(19): S0960-S9822(14)00991-9. DOI: 10.1016/j.cub.2014.08.013.
- (收稿日期:2022-11-28 修回日期:2023-02-15)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,苏琪)

[引用本文]

成慧, 方菲, 石嘉豪, 等. *hil-1* 基因通过饮食限制通路调节秀丽隐杆线虫寿命[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 271-281. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.183.

CHENG H, FANG F, SHI J H, et al. H1 linker histone gene regulates lifespan via dietary restriction pathways in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(3): 271-281. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.183.

2023年版 ICMJE 推荐规范的更新内容

2023年5月, 国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)发布《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》(Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals)更新版, 简称“2023年版 ICMJE 推荐规范”。现将主要的更新内容摘译如下。正式的英文版本见 www.icmje.org。若需引用, 请用英文官方版本。

II .A.4. 人工智能辅助技术: 在投稿时, 期刊应要求作者披露他们是否在撰稿过程中使用了人工智能(AI)辅助技术[如大型语言模型(LLMs)、聊天机器人或图像创建器]。使用这些技术的作者应该在投稿函和提交的稿件中描述他们是如何使用的。聊天机器人(如ChatGPT)不应被列为作者, 因为它们不能对作品的准确性、完整性和原创性负责, 而这些责任是作者必须承担的(请见II .A.1节)。因此, 人类应对任何提交的材料负责, 包括所使用的人工智能辅助技术。作者应该仔细审查和编辑结果, 因为人工智能可能会输出不正确、不完整或带有偏见的, 但貌似很权威的内容。作者不应将人工智能和人工智能辅助技术列为作者或共同作者, 也不应引用以人工智能为作者的内容。作者应该能够确认他们的论文中没有抄袭, 包括由人工智能生成的文本和图像。人类必须确保所有引用材料都有恰当的出处, 包括完整的引文。

II .C.3. 同行审稿人: 在审稿过程中, 审稿人若寻求实习生或同事的帮助, 应在提交给编辑的书面审稿意见中感谢他们的贡献。审稿人必须按上述规定对稿件内容保密, 不得将稿件上传到无法保证其保密性的软件或其他人工智能技术平台上。审稿人应该向期刊披露是否以及如何使用人工智能技术协助审稿。审稿人应该意识到, 人工智能会输出貌似很权威的内容, 而这些内容可能是不正确、不完整或有偏见的。

IV .A.3.g. 参考文献: 不能将人工智能生成的内容作为一手来源资料进行引用。

完整的中文译本请见 ICMJE 官网: <http://www.icmje.org/recommendations/translations/chinese2023.pdf>。

(张俊彦、于笑天、汪源, 摘译)