

曾智康, 朱晨, 魏瑞霖, 等. 桑椹果粉乙醇提取液对秀丽隐杆线虫衰老的影响及机制 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 414-420. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040230

ZENG Zhikang, ZHU Chen, WEI Ruilin, et al. Effects and Mechanism of Ethanol Extract of Mulberry Fruit Powder on Aging of *Caenorhabditis elegans*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(3): 414-420. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040230

· 营养与保健 ·

桑椹果粉乙醇提取液对秀丽隐杆线虫衰老的影响及机制

曾智康, 朱晨, 魏瑞霖, 段树华, 安淦鼎, 孙在兴, 雷激, 李玉锋*
(西华大学食品与生物工程学院, 四川成都 610036)

摘要:目的: 探究桑椹果粉乙醇提取液对秀丽隐杆线虫动物模型 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*, 线虫) 抗衰老的作用机制。方法: 研究桑椹果粉乙醇粗提取液 (Mulberry ethanol extract, MEE) 对线虫刺激后, 其寿命、抗热应激、运动能力、吞咽能力、生殖能力的变化, 同时进行了线虫体的 SOD 活力、CAT 活力及抗衰老基因转录水平等研究。结果: 与对照组相比, 用 5 mg/mL 的 MEE 刺激线虫后使剂量组最长寿命极显著增加了 22.24% ($P<0.01$)、显著提高了线虫运动能力和抗热应激能力 ($P<0.05$), 使吞咽能力提升了 30.43% 且不显著影响线虫的生殖能力 ($P>0.05$), 同时在该刺激下线虫体内的 SOD、CAT 酶活力分别增加了 21.44 和 13.84 U/mg prot, 氧化应激反应阈值降低。经 5 mg/mL 的 MEE 处理后, 抗氧化基因 *sir-2.1*、*skn-1* 表达水平分别上调了 45.70% 和 51.73%, 胰岛素基因 *daf-16* 表达水平上调 161.63%、*daf-2* 表达水平下调 57.10%, 寿命和抗压力、热冲击性能的关键调节基因 *hsp-16.2*、*hsf-1* 表达水平分别上调了 121.13% 和 41.07%。结论: 桑椹果粉乙醇提取液通过增强线虫体内 SOD、CAT 的活力, 上调体内各组基因的表达水平达到抗衰老的作用。

关键词: 秀丽隐杆线虫, 抗衰老, 桑椹果粉乙醇提取物, 寿命

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)03-0414-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040230

本文网刊:



Effects and Mechanism of Ethanol Extract of Mulberry Fruit Powder on Aging of *Caenorhabditis elegans*

ZENG Zhikang, ZHU Chen, WEI Ruilin, DUAN Shuhua, AN Ganding, SUN Zaixing, LEI Ji, LI Yufeng*

(School of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu 610036, China)

Abstract: Objective: To investigate the mechanism of anti-aging effect of ethanolic extract of mulberry fruit powder on the animal model of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, nematode). Methods: To study the changes in longevity, resistance to heat stress, motility, swallowing ability and reproductive ability of nematodes after stimulation with mulberry ethanol extract (MEE). And SOD activity, CAT activity and transcript levels of anti-aging genes in nematode bodies were also investigated. Results: When the nematodes were stimulated with 5 mg/mL of MEE, the maximum lifespan extremely significantly increased by 22.24% compared to the control group ($P<0.01$), significantly improved the nematode motility and resistance to heat stress ($P<0.05$), and did not affect the reproductive capacity of the nematodes ($P>0.05$) when the swallowing capacity was improved by 30.43% compared to the control group. Meanwhile, the results showed that the enzymatic activity of SOD and CAT enzymes in nematodes increased by 21.44 and 13.84 U/mg prot, respectively, reducing the threshold of oxidative stress response. After treatment with 5 mg/mL of MEE, the expression levels of antioxidant genes *sir-2.1* and *skn-1* were up-regulated by 45.70% and 51.73%, respectively, and the expression levels of insulin genes *daf-16* were up-regulated by 161.63% and *daf-2* were down-regulated by 57.10%. The expression levels of *hsp-16.2* and *hsf-1*, key

收稿日期: 2022-04-20

基金项目: 四川省科技厅重大项目四川特色水果加工关键技术研究及产品开发 (2020YFN0149)。

作者简介: 曾智康 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 34728758@qq.com。

* 通信作者: 李玉锋 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物活性物质资源化利用, E-mail: 907493056@qq.com。

regulators of life span and resistance to stress and thermal shock, were up-regulated by 121.13% and 41.07%. Conclusion: The ethanolic extract of mulberry fruit powder achieved anti-aging effects by enhancing the activity of SOD and CAT in nematodes and up-regulating the expression levels of various groups of genes *in vivo*.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; anti-aging; mulberry fruit powder alcohol extract; lifetime

人体对环境的生理和心理适应能力降低, 从而逐渐趋于死亡的现象, 称为衰老。随着全球人口老龄化进程加剧, 研究预防抗衰老和加强抗衰老治疗已成为各个领域的研究热点话题, 同时也成为人们最关心的健康问题^[1-2]。秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 是一种理想的模式生物, 其作为研究模型具有易于培养、周期短、易于观察、成本低等特点。研究发现, 秀丽隐杆线虫是一种多细胞真核生物, 其约有 65% 的基因与人类有关。同时, 还有 12 条与人体相同的信号通路, 其中大部分与人体的营养代谢密切相关, 这使 *C. elegans* 成为食品营养评价中的优秀模型^[3-4]。

桑椹 (*Fructus mori*) 又名桑果、葇子, 是桑科植物桑树的成熟果穗, 成熟后呈长椭圆状。大量研究证明在桑椹中含有多种游离酸和氨基酸, 富含人体缺少的锌、铁、钙、锰等微量元素, 以及桑椹多糖、黄酮、多酚、花青素等生物活性物质^[5-6], 是“药食同源”农产品之一, 被赋予“第三代水果”的称号^[7-8]。研究表明桑椹具有良好的抗氧化及抗衰老作用。桑椹中的花青素、多糖、多酚类物质是良好的天然自由基清除剂, 可以有效地清除新陈代谢产生的有害自由基避免损害体内的生物大分子^[9-10]。刘凡等^[11] 研究发现桑椹提取液能降低小鼠血清、肝脏、脑组织及心脏中的 MDA 含量, 提高小鼠血清、肝脏、脑组织和心脏中的 T-SOD 活性, 同时提高血清、肝脏和心脏中的 CAT 活性, 降低肝脏和脑组织的 MAO 活性, 表现出一定的延缓衰老作用。江岩^[12] 研究发现用桑椹花青素刺激果蝇, 随着浓度升高, 果蝇寿命延长, 雌雄果蝇体内的 GSH-Px、SOD 及 CAT 活力明显升高、MDA 含量明显下降, 具有一定的抗衰老作用。桑椹作为一种特殊的水果, 保质期极短加工成本高, 将桑椹制成果粉可以极大地延长桑椹的保质期且方便运输和加工, 而对于桑椹果粉的生物活性研究还未见报道, 本研究首次将秀丽隐杆线虫模型引入桑椹的抗衰老活性研究中。对于明确桑椹果粉生物活性, 以果粉为原料开发产品延长桑椹产业链有着重要作用。

因此, 本文选取桑椹乙醇提取液 (Mulberry ethanol extract, MEE) 为材料, 以秀丽隐杆线虫为模型, 研究其对线虫衰老的影响, 并探讨其作用机制, 为以桑椹果粉为原料进行进一步的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

德昌“德果一号”桑椹 四川凉山德昌桑椹自貿中心, 采自 3 月中下旬; N2 型秀丽隐杆线虫 秀丽隐杆线虫遗传学中心 (*Caenorhabditis elegans* Genetics

Center); OP50 (尿嘧啶缺陷型大肠杆菌 *Escherichia coli*) 西华大学食品重点实验室提供; 超氧化歧酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒 购自南京建成生物研究所; 蛋白胨、琼脂粉、NaCl、CaCl₂、PBS 缓冲液、MgSO₄·7H₂O、酵母提取液、胆固醇 北京奥博星生物技术有限公司; 乙醇、NaClO、M9 缓冲液、NaOH 成都市科龙化学制品有限公司; 麦芽糊精 山西隆特酶制有限公司 (以上试剂均为分析纯)。

DHP-9082 恒温生化培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司; Spectra Max-i3x 多功能酶标仪 美谷分子仪器有限公司; GI54DWS 全自动高压灭菌锅 致微 (厦门) 有限公司; TD-5M 台式离心机 四川蜀科仪器有限公司; FDU-1200 冻干机 东京理化器械有限公司; 907 型超低温冰箱 赛默飞世尔科技有限公司 AK-100SD 超声机 深圳钰洁清洗设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桑椹果粉乙醇提取液 (MEE) 的制备 桑椹果粉的制备: 采取樊晓静等^[13] 制备紫薯粉的方法, 稍作改进。取德昌“德果一号”桑椹 (含水率 6.28%) 50 g 去蒂洗净后, 按 1:4 g/mL 的料液比复水后加入 3% 麦芽糊精 (助冻干剂, 增稠) 匀浆, 经 -80 °C 超低温预冻 12 h 后放入冻干机 -40 °C 干燥 24 h 得到桑椹果粉。

MEE 的制备: 按照迟东泽等^[14] 制备鹿茸乙醇提取液的方法, 稍作改进。取桑椹果粉 25 g 按照 1:20 g/mL 的比例加入 70% 乙醇溶液浸溶, 40 °C 下 300 W 进行超声提取, 60 min 后抽滤, 在抽滤后过滤出剩余的滤液 10000 r/min 离心 10 min 取上清液体。将上清液经旋转蒸发浓缩至原体积的四分之一后转移到试剂瓶中, 摇匀, 备用。

1.2.2 线虫生长培养基 (NGM) 的制备 NGM 的配制^[15]: 取 17.0 g 琼脂粉、1 mL 5.0 mg/mL 胆固醇乙醇溶液、3.0 g NaCl、2.50 g 蛋白胨于 1000 mL 容量瓶内, 后加入 25.0 mL 1 mol/L 的 PBS 缓冲液、1.0 mL 1 mol/L 的 CaCl₂、1.0 mL 1 mol/L 的 MgSO₄ 混匀加水, 定容, 摇匀, 备用, 121 °C 灭菌 15 min, 待温度降至室温, 倒入培养皿中冷却、备用。

1.2.3 秀丽隐杆线虫的同期化培养 *C. elegans* 的同期化培养^[16]: 采用次氯酸钠裂解法并稍作改进, 用 20 mL M9 缓冲液将培养基中的线虫冲洗至离心管中振荡后静置, 弃掉上清液, 后再加入 1 mL 1 mol/L NaClO、1 mL 1 mol/L NaOH, 后以 3000 r/min 离心 2 min, 废弃上清液, 再每次加入 2 mL M9 缓冲液冲洗, 重复冲洗三次后得到的沉淀即为线虫卵, 将虫卵转移到含有 OP50 的 NGM 中在 20 °C 的恒温下培

养 2 d, 得到同期化成虫(L4)。

1.2.4 剂量组和对照组 NGM 的配制 剂量组 NGM 配制方法同 1.2.2, 加入桑椹果粉提取液后, 分别配制成 1 mg/mL(低剂量组, LD)、2.5 mg/mL(中剂量组, MD)、5 mg/mL(高剂量组, HD)的剂量组 NGM^[17], 对照组 NGM 的配制方法同 1.2.2, 加入等量的蒸馏水, 配制成对照组(BC 组)NGM。

1.2.5 线虫寿命的测定 随机挑取 90 只健康 L4 线虫, 分别加入剂量组和 BC 组 NGM 中。实验当天记为第 0 d, 在 20 ℃ 下恒温培养(每 48 h 进行转板, 转移至新的对应浓度的培养基中), 观察线虫存活情况。实验持续至最后一条线虫死亡为止, 整理数据进行统计^[18]。

线虫存活判断标准: 以铂丝轻碰线虫头部 10 s 后是否有反应。

1.2.6 线虫抗热应激能力测定 随机挑取 90 只健康 L4 线虫, 分别加入剂量组和 BC 组 NGM 中。20 ℃ 培养 48 h 后, 转移至 35 ℃ 下恒温培养, 每隔 1 h 观察存活情况, 实验持续至最后一条线虫死亡为止^[19]。

1.2.7 线虫运动能力测定 随机挑取若干只健康 L4 线虫, 分别加入剂量组和 BC 组 NGM 中。20 ℃ 恒温培养(每 48 h 进行转板, 转移至新的对应浓度的培养基中), 各组挑取 10 只运动状态相当的线虫于新培养基中显微镜下观察其在第 0、4、8、12、16 d 时的运动能力作为评价指标。其中不需要外界刺激可自由活动的归为①类, 经外界刺激可自由活动的归为②类, 经外界刺激仅可活动头尾的归为③类^[20], 统计各组线虫数量。

1.2.8 线虫吞咽能力测定 随机挑取若干只健康 L4 线虫, 分别加入剂量组和 BC 组 NGM 中。20 ℃ 恒温培养(每 48 h 进行转板, 转移至新的对应浓度的培养基中), 各组随机挑选 10 只存活的线虫于显微镜下观察其在第 1、2、3、4、5 d 时 1 min 内的吞咽次数^[21], 并进行统计。

1.2.9 线虫生殖能力测定 随机挑取 10 只运动状态优良 L4 线虫分别加入剂量组和 BC 组 NGM 中, 每组 5 个培养皿, 每个培养皿放置一只线虫, 5 d(在第 3 d 进行转板, 转移至新的对应浓度的培养基中)后观察到每个培养基上的线虫数目即为产卵数目并进行统计。

1.2.10 线虫体内抗氧化酶活力测定 随机挑取若干只健康 L4 线虫至剂量组和 BC 组 NGM 平板中产卵 3 h, 然后将成年线虫挑走, 得到虫卵 L1, 于 20 ℃ 下恒温培养 5 d(在第 3 d 进行转板, 转移至新的对应浓度的培养基中)。收集各实验组和对照组的成年线虫按照试剂盒所述的方法测定 SOD 活力和 CAT 活力^[22]。

1.2.11 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 随机挑取若干只健康 L4 线虫至含有 BC 组、HD 组 NGM 平板中产卵 3 h, 然后将成年线虫挑走, 得到虫卵 L1, 于 20 ℃ 下恒温培养 5 d(在第 3 d 进行转板, 转移至新的对应

浓度的培养基中)。收集各实验组和对照组的成年线虫, 按试剂盒方法提取 RNA。测定基因 *sir-2.1*、*skn-1*、*hsp-16.2*、*daf-16*、*daf-2*、*hsf-1* 的转录水平, 以 *cdc-42* 基因为内参。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对表达基因进行相对定量, 各基因引物序列设置如表 1。

表 1 待测基因的引物序列

引物名称	序列(5'-3')
<i>sir-2.1</i> -F	CCCATTTTACAAGTCGATGG
<i>sir-2.1</i> -R	CTTCCTCTGCAGTTTTTCCA
<i>skn-1</i> -F	CGTCCAACCACATCATCTC
<i>skn-1</i> -R	TCGGCTTTTGTAGTTGGATGT
<i>daf-16</i> -F	CTAACTTCAAGCCAATGCCACTA
<i>daf-16</i> -R	TCCAGCTTGACTCAGCTCATGTC
<i>hsp-16.2</i> -F	GGTGCAAGTTCGAAATCTT
<i>hsp-16.2</i> -R	TCTTCCTGAACCGCTTCTTTC
<i>daf-2</i> -F	GTTGATAATGCTGCCGAG
<i>daf-2</i> -R	ATCCCGTGCCGATTCTT
<i>hsf-1</i> -F	TTTGCAATTTCTCGTCTCTGTC
<i>hsf-1</i> -R	TCTATTTCCAGCACACCTCGT
<i>cdc-42</i> -F	CTGCTGGACAGGAAGATTACG
<i>cdc-42</i> -R	CTCGGACATTCTCGAATGAAG

1.3 数据处理

试验均独立重复 3 次。采用 Graphpad prism 9.0 作图, 用 One-way ANOVA 进行统计分析, 试验结果采用均值±标准差(a±b)表示, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 桑椹果粉乙醇提液对线虫寿命的影响

秀丽线虫的寿命长短是反映其衰老情况最直观的一个指标, 也是抗衰老研究中必选的指标之一^[23]。本试验测定了不同浓度 MEE 对秀丽线虫寿命的影响, 对其寿命中位数、平均寿命、最长寿命进行分析, 结果如图 1、表 2, 可以看出三个剂量组的寿命曲线相较于 BC 组均有右移, 说 MEE 对线虫寿命有一定的延长功效。LD 组平均存活 15.12 d, MD 组平均存活 16.09 d, HD 组平均存活 16.72 d, 分别较 BC 组增加了 10.04%、17.10%、21.69%, 中位寿命分别提高了 1.33、2.33、3.67 d, 最大寿命分别提高了 1.67、3.00、4.67 d。剂量组线虫平均寿命、中位寿命、最长

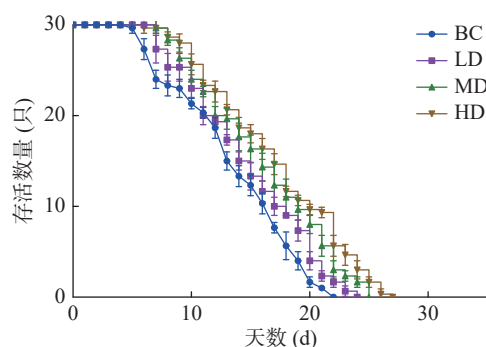


图 1 桑椹果粉乙醇提取液对线虫寿命的影响

Fig.1 The effect of MEE on the longevity of nematodes

表 2 桑椹果粉乙醇提取液对线虫寿命的影响
Table 2 The effect of MEE on the longevity of nematodes

指标	组别			
	BC	LD	MD	HD
平均寿命(d)	13.74±0.36	15.12±0.68*	16.09±0.53**	16.72±0.78**
中位寿命(d)	14.00±0.58	15.33±0.58*	16.33±1.15**	17.67±0.58**
最长寿命(d)	21.00±0.00	22.67±0.58*	24.00±0.00**	25.67±1.58**
死亡数	30/30	30/30	30/30	30/30

注: 试验数据均以“平均值±标准差”表示; *表示剂量组与BC组间存在显著差异($P<0.05$), **表示剂量组与BC组间存在极显著差异($P<0.01$)。

寿命与 BC 组相比均具有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$)且呈一定的剂量依赖性。以上分析说明桑椹果粉乙醇提取液能够一定程度地延长线虫的寿命。

2.2 桑椹果粉乙醇提液对线虫抗热应激性的影响

高温可导致生物体内 ROS(活性氧簇)水平增加,破坏自由基稳定,引起氧化应激,进而引起衰老^[24]。秀丽线虫的耐热能力也是考察抗衰老能力的一个重要指标,抗衰老能力与抗热应激能力呈正相关^[25]。本试验测定了 35℃ 下不同浓度 MEE 对秀丽线虫抗热应激能力的影响,结果如图 2 所示,可以看出三个剂量组的存活时长曲线相较于 BC 组均有右移,说明线虫的抗热应激能力得到提升。LD 组、MD 组、HD 组较 BC 组最大存活时长分别显著增加了 2、4、4 h($P<0.05$)。抗热应激能力明显升高且呈一定的剂量依赖性。

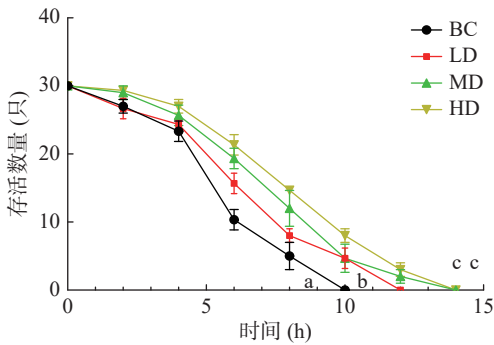


图 2 桑椹果粉乙醇提取液对线虫抗热应激能力的影响
Fig.2 The effect of MEE on the heat stress resistance of nematodes

注: 不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

2.3 桑椹果粉乙醇提液对线虫运动能力的影响

衰老可导致肌肉退化,线虫的运动能力直观反映了其生存状态,运动能力与年龄呈明显的反比关系,是评价抗衰老的重要指标之一^[26]。本试验测定了不同浓度 MEE 对秀丽线虫运动能力的影响,对其第 0、4、8、12、16 d 运动能力进行分析,结果如图 3,可以看出 0~4 d 剂量组与 BC 组线虫的运动状态近乎相同没有明显差异,到第 12 d 后 BC 组②③类线虫数量明显增多,各剂量组①类线虫数量远远大于 BC 组。到第 16 d 后 BC 组无线虫能自主活动,各剂量组仍有部分线虫能保持自主运动,相较于 BC 组,剂量组线虫运动能力明显增强。以上分析表明桑椹

果粉乙醇提取液能提高秀丽线虫的运动能力。

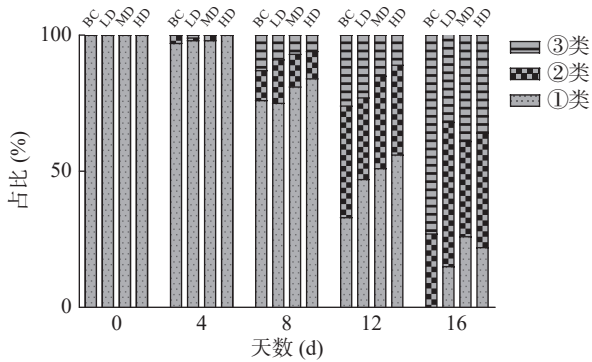


图 3 桑椹果粉乙醇提取液对线虫运动能力的影响
Fig.3 The effect of MEE on motor ability of nematodes

2.4 桑椹果粉乙醇提液对线虫吞咽能力的影响

线虫的吞咽能力反映了线虫对药品的摄入能力及活动能力,与衰老状况呈负相关,本试验测定了不同 MEE 对秀丽线虫吞咽能力的影响,结果如图 4、表 3,可以看出三个剂量组的吞咽次数曲线相较于 BC 组均有明显上移,说明 MEE 增强了线虫的吞咽功能。BC 组平均吞咽次数为第 1 d 147.72 次/min、第 2 d 140.30 次/min、第 3 d 129.33 次/min、第 4 d 107.40 次/min、第 5 d 99.25 次/min; LD 组平均吞咽次数相较于 BC 组整体平均提升了 13.91%; MD 组平均吞咽次数相较于 BC 组整体平均提升了 20.61%; HD 组平均吞咽次数相较于 BC 组整体平均增加了 30.43%。剂量组线虫吞咽次数与 BC 组相比均具有显著差异($P<0.05$)且呈一定剂量依赖性。以上分析

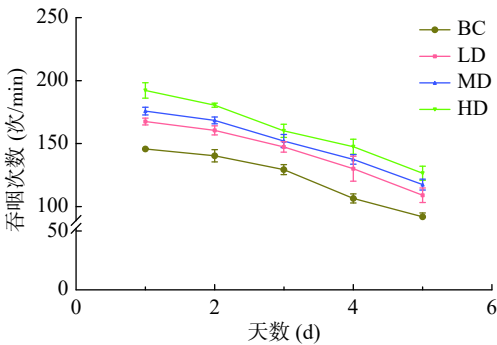


图 4 桑椹果粉乙醇提取液对线虫吞咽能力的影响
Fig.4 The effect of MEE on swallowing ability of nematodes

表 3 桑椹果粉乙醇提取液对线虫吞咽能力的影响(次/min)

天数(d)	组别			
	BC	LD	MD	HD
1	147.72±1.21	167.50±2.70 ^a	175.83±3.03 ^b	192.33±6.14 ^c
2	140.30±3.82	160.47±3.63 ^a	168.53±2.72 ^a	180.57±1.58 ^b
3	129.33±3.12	147.47±4.31 ^a	152.07±5.15 ^a	160.13±5.28 ^b
4	107.40±2.21	127.70±3.24 ^a	137.50±3.84 ^a	147.53±5.94 ^b
5	99.25±1.46	108.07±4.20 ^a	117.46±4.34 ^b	126.53±5.58 ^c

注: 试验数据均以“平均值±标准差”表示; *表示BC组与LD组间存在显著差异($P<0.05$); 同行不同字母代表各剂量组间存在显著性差异($P<0.05$)。

说明桑椹果粉乙醇提取液能够一定程度增强线虫吞咽能力。

2.5 桑椹果粉乙醇提液对线虫生殖能力的影响

有报道指出许多生物寿命的延长与生殖能力呈反比关系,王艳菊^[27]在研究中发现原花青素在延长线虫寿命的同时降低了线虫的生殖能力,但黄少杰等^[28]在研究中发现铁皮石斛多糖在延长线虫寿命的同时不影响线虫的生殖能力。本试验测定了不同剂量 MEE 对秀丽线虫生殖能力的影响,结果如图 5,可以看出三个剂量组的产卵数相较于 BC 组均无显著变化($P>0.05$)。以上分析说明桑椹果粉乙醇提取液可在延长线虫寿命的情况下不影响线虫的生殖能力。

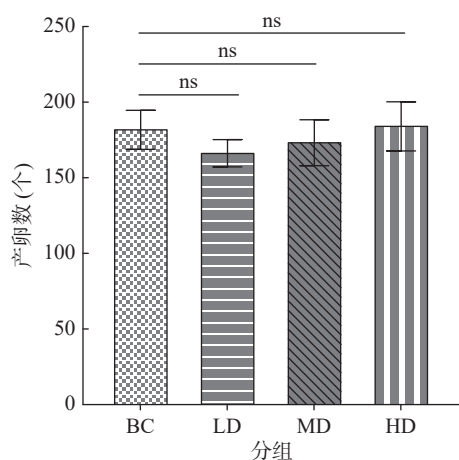


图5 桑椹果粉乙醇提取液对线虫生殖能力的影响

Fig.5 The effect of MEE on the reproductive ability of nematodes

注: ns 表示各组间不存在显著性差异($P>0.05$)。

2.6 线虫体内抗氧化酶活力测定结果

SOD、CAT 酶是线虫体内主要的抗氧化酶,线虫体内的抗氧化酶可以清除线虫体内多余的自由基达到促进体内平衡延长寿命的目的^[29]。

本试验测定了不同剂量 MEE 对秀丽线虫体内 SOD、CAT 活力的影响,结果如图 6,可以看出三个剂量组 SOD、CAT 活力相较于 BC 组均有提升。在 SOD 实验中 LD、MD、HD 组相较于 BC 组活力增加了 6.03、15.28、21.44 U/mg prot,在 CAT 实验中,LD、MD、HD 组相较于 BC 组活力增加了 7.51、9.95、13.84 U/mg prot。剂量组线虫 SOD、CAT 活力与 BC 组相比均有提升,具有显著差异($P<0.05$)且呈一定剂量依赖性。以上分析说明桑椹果粉乙醇提取液可有效提高线虫抗氧化能力,提升线虫抗氧化应激能力达到延长寿命的目的。

2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定结果

本试验研究 MEE(HD 组)对秀丽线虫体内基因的影响,结果如图 7,可以看出 HD 组所测的六组基因除 *daf-2* 相较于 BC 组均有提升。HD 组相较于 BC 组 *sir-2.1* 转录水平提升了 45.70%; *skn-1* 转录水平提升了 51.73%, *sir-2.1*、*skn-1* 同为抗氧化基因,表

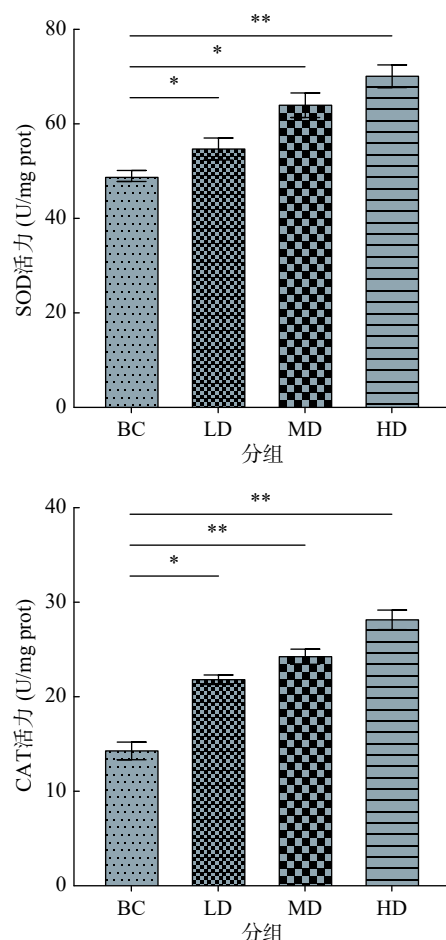


图6 桑椹果粉乙醇提取液对线虫 SOD、CAT 活力的影响

Fig.6 The effect of MEE on SOD and CAT activities of nematodes

注: *表示剂量组与 BC 组间存在显著差异($P<0.05$), **表示剂量组与 BC 组间存在极显著差异($P<0.01$);图 7 同。

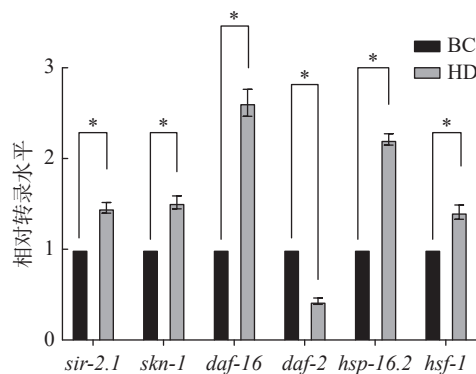


图7 桑椹果粉乙醇提取液对线虫基因转录水平的影响

Fig.7 The effect of MEE on gene transcription of nematode

达水平会随着抗氧化能力的上升而增加,抗氧化基因表达水平的上升表明抗氧化能力的上升^[30]。*daf-16* 转录水平提升了 161.63%; *daf-2* 转录水平降低了 57.10%, *daf-2*、*daf-16* 同属于 IIS 信号通路, *daf-2* 的表达水平会随着寿命的增加而降低, *daf-16* 表达水平会随着寿命的增加而增加^[31-32], IIS 信号通路是研究衰老模型的经典信号通路, *daf-16* 是线虫体内提高应激抵抗及代谢基因表达的重要转录因子,可在一定程度上延长寿命。其作用机制胰岛素信号通路的激活

引起一系列磷酸化级联反应, 最终导致 *FOXOS/daf-16* 核转录因子排出细胞核失活^[33]。 *hsp-16.2* 转录水平提升了 121.13%; *hsf-1* 提升了 41.07% ($P < 0.05$), 热休克蛋白中的 *hsp-16.2*、*hsf-1* 同为抗热性基因, 表达水平的上升表明抗热性能力的上升^[34]。以上分析说明桑椹果粉乙醇提取液可改变线虫体内基因的表达水平, 达到延长寿命的目的。

3 结论

本试验通过利用秀丽隐杆线虫为研究模型, 研究了桑椹果粉乙醇提取液对线虫衰老进程的影响, 并对其作用机制做了初步探究。试验结果表明, 桑椹果粉提取液能显著提升线虫的寿命 ($P < 0.05$), 并使线虫的运动能力、抗应激能力、吞咽能力得到显著提升 ($P < 0.05$), 且不显著影响线虫的生殖能力 ($P > 0.05$), 同时显著增加线虫体内 SOD、CAT 的活力 ($P < 0.05$), 提升抗氧化应激能力。试验表明, MEE 能显著提升 *daf-16* 表达水平、显著降低 *daf-2* 表达水平 ($P < 0.05$), 达到延长寿命的目的。在线虫体内, *sir-2.1* 及其下游因子 *skn-1* 是调控机体氧化应激的重要转录因子, 同样受 IIS 信号通路的调控^[35], 结果表明桑椹果粉提取液能显著提升 *sir-2.1* 及其下游因子 *skn-1* 的表达水平 ($P < 0.05$)。 *hsp-16.2*、*hsf-1* 是线虫体内寿命和抗压力、热冲击性能的关键调节因子, 结果表明桑椹果粉提取液能显著提升 *hsp-16.2*、*hsf-1* 的表达水平 ($P < 0.05$)。

综上, 本研究结果表明桑椹果粉乙醇提取液对秀丽隐杆线虫有延缓衰老的功效, 为之后以桑椹果粉为母体开发一系列具有抗衰老功效的产品奠定了基础。

参考文献

- [1] 孙晓康, 张艳艳, 张晓元, 等. 衰老机制及抗衰老治疗的研究进展[J]. *食品与药品*, 2022, 24(1): 74–80. [SUN Xiaokang, ZHANG Yanyan, ZHANG Xiaoyuan, et al. Research progress of aging mechanism and anti-aging treatment[J]. *Food and Drugs*, 2022, 24(1): 74–80.]
- [2] ZIA A, FARKHONDEH T, POURBAGHER-SHAHRI A M, et al. The role of curcumin in aging and senescence: Molecular mechanisms[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021: 134.
- [3] NIGON V M, FELIX M A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms[J]. *Worm Book: The Online Review of C. elegans Biology*, 2017, 2017: 1–84.
- [4] 杨番, 夏程程, 钟晓凌, 等. 秀丽隐杆线虫模型在食品营养评价中的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(11): 268–276. [YANG Fan, XIA Chengcheng, ZHONG Xiaoling, et al. Research progress on the application of *Caenorhabditis elegans* model in food nutrition evaluation[J]. *Food Science*, 2019, 40(11): 268–276.]
- [5] 胡晓波, 汪小明, 完颜红影, 等. 桑葚多糖的磷酸化修饰及其抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2022, 47(2): 215–220. [HU Xi-aobo, WANG Xiaoming, WANYAN Hongying, et al. Study on phosphorylation modification and antioxidant activity of mulberry polysaccharides[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(2): 215–220.]
- [6] 李中意, 柯倩华, 刘焕, 等. 基于甲状腺激素及脱碘酶探讨桑葚多酚类物质对壬基酚所致神经行为毒性的干预效应[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(18): 390–398. [LI Zhongyi, KE Qianhua, LIU Huan, et al. To explore the intervention effect of mulberry polyphenols on neurobehavioral toxicity induced by nonylphenol based on thyroid hormone and deiodinase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(18): 390–398.]
- [7] 曾俊. 桑葚的植物化学成分及其在食品加工中的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(7): 127–130. [ZENG Jun. The phytochemical constituents of mulberry and its research progress in food processing[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(7): 127–130.]
- [8] ABOUZED T K, SADEK K M, GHAZY E W, et al. Black mulberry fruit extract alleviates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: Targeting TNF- α inflammatory pathway[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2020, 72(11): 1615–1628.
- [9] 陈春华, 唐炜, 殷军艺, 等. 桑葚多糖结构特征和生物活性研究进展[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 367–382. [CHEN Chunhua, TANG Wei, YIN Junyi, et al. Research progress on structural characteristics and bioactivity of mulberry polysaccharides[J]. *Chinese Journal of Food*, 2022, 22(5): 367–382.]
- [10] CHEN C P, CHAN K C, HO H H, et al. Mulberry polyphenol extracts attenuated senescence through inhibition of Ras/ERK via promoting ras degradation in VSMC[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2022, 19(1): 89–97.
- [11] 刘凡, 游庭活, 温露, 等. 桑椹多酚对 D-半乳糖致衰老小鼠的延缓衰老作用[C]. 中国蚕学会 2018 年学术年会, 2018: 135–136. [LIU fan, YOU Tinghuo, WEN Lu, et al. Anti aging effect of mulberry polyphenols on aging mice induced by D-galactose[C]. 2018 Academic Annual Meeting of Chinese Silkworm Society, 2018: 135–136.]
- [12] 江岩. 新疆药桑椹花青素延缓衰老作用的研究[C]. 中国西部第六届营养与健康学术会议, 2011: 173–176. [JIANG Yan. Study on the anti-aging effect of Xinjiang medicinal mulberry anthocyanins[C]. The Sixth Academic Conference on Nutrition and Health in Western China, 2011: 173–176.]
- [13] 樊小静, 任广跃, 段续, 等. 不同干燥方式对紫薯全粉物性品质及花青素含量的影响[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1–10 [2022-11-17]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029748. [FAN Xiaojing, REN Guangyue, DUAN Xu, et al. Effects of different drying methods on physical properties, quality and anthocyanin content of purple potato powder[J/OL]. *Food and Fermentation Industries*: 1–10 [2022-11-17]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029748.]
- [14] 迟东泽, 何源, 刘芳芳, 等. 鹿鞭醇提物对秀丽隐杆线虫衰老的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(10): 327–335. [CHI Dongze, HE yuan, LIU Fangfang, et al. Effect of alcohol extract of deer whip on aging of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2021, 42(10): 327–335.]
- [15] 肖媚方, 陈欣彤, 蔡雯雯, 等. 竹荪水提物抗氧化及改善秀丽线虫脂质代谢作用[J]. *食品科学*, 2022, 43(19): 191–199. [XIAO Meifang, CHEN Xintong, CAI Wenwen, et al. Antioxidation and improvement of lipid metabolism of *Caenorhabditis elegans* by water extract of *Dictyophora*[J]. *Food Science*, 2022, 43(19): 191–

199.]

[16] 王猛, 马浩天, 关思宇, 等. 螺旋藻多糖对秀丽隐杆线虫氧化应激及寿命的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 137-146.

[WANG Meng, MA Haotian, GUAN Siyu, et al. Effects of *Spirulina* polysaccharide on oxidative stress and longevity of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chinese Journal of Food*, 2022, 22(5): 137-146.]

[17] 刘春红, 汤赟聪, 高瑜培, 等. 鹿茸乙醇提取液对秀丽隐杆线虫抗衰老的作用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(7): 354-359. [LIU Chunhong, TANG Yichong, GAO Yupei, et al. Anti aging effect of ethanol extract of Pilose Antler on *Caenorhabditis elegans*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2021, 42(7): 354-359.]

[18] 马晓丽. 芝麻粕多肽延长秀丽隐杆线虫健康寿命的分子机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2020. [MA Xiaoli. Molecular mechanism of sesame meal polypeptide prolonging the healthy life span of *Caenorhabditis elegans*[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.]

[19] LIN C X, XIAO J, XI Y, et al. Rosmarinic acid improved antioxidant properties and healthspan via the IIS and MAPK pathways in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Biofactors*, 2019, 45(5): 774-787.

[20] WOOD J G, ROGINA B, LAVU S, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans[J]. *Nature*, 2004, 431(7004): 107.

[21] WANG J, DENG N, WANG H, et al. Effects of orange extracts on Longevity, healthspan, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Molecules*, 2020, 25(2): 43-46.

[22] 张佳婵, 王昌涛, 刘瑶, 等. 沙棘粕醇提取液对秀丽隐杆线虫的抗衰老功效及其机制[J]. *食品科学*, 2017, 38(23): 141-148.

[ZHANG Jiachan, WANG Changtao, LIU Yao, et al. Anti aging effect and mechanism of alcohol extract of seabuckthorn meal on *Caenorhabditis elegans*[J]. *Food Science*, 2017, 38(23): 141-148.]

[23] 王雪. 鹿茸醇提物对秀丽隐杆线虫抗衰老机制的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020. [WANG Xue. Study on the anti-aging mechanism of alcohol extract of Pilose Antler on *Caenorhabditis elegans*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020.]

[24] MOHAPATRA C, CHAND R, TIWARI J K, et al. Effect of heat stress during flowering and pod formation in pea (*Pisum sativum* L.)[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(6): 1119-1125.

[25] 王海璐. 鹿鞭的化学成分分析及药理活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017. [WANG Hailu. Chemical composition analysis and pharmacological activity study of deer whip[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2017.]

[26] YANG X Y, WANG H, LI T, et al. Nobiletin delays aging

and enhances stress resistance of *Caenorhabditis elegans*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(1).

[27] 王艳菊. 葡萄籽原花青素对秀丽隐杆线虫生命周期的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2014. [WANG Yanju. Effect of grape seed proanthocyanidins on the life cycle of *Caenorhabditis elegans*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.]

[28] 黄少杰, 陈宏著, 钟淳菲, 等. 铁皮石斛叶多糖对秀丽隐杆线虫体内抗衰老作用[J/OL]. *食品科学*: 1-9[2022-11-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220310.1530.024.html>.

[HUANG Shaojie, CHEN Hongzhu, ZHONG Chunfei, et al. Anti aging effect of Dendrobium Candidum leaf polysaccharide on *Caenorhabditis elegans*[J/OL]. *Food Science*: 1-9[2022-11-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220310.1530.024.html>]

[29] 王红, 张晓寒, 程静, 等. 紫薯提取液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 Hong, ZHANG Xiaohan, CHENG Jing, et al. Effect of purple potato extract on antioxidation of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Food Science*, 2017, 38(23): 165-170.]

[30] SRIVASTAVA S, SAMMI S R, LAXMAN T S, et al. Silymarin promotes longevity and alleviates Parkinson's associated pathologies in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 31: 32-43.

[31] HOSHIKAWA H, UNO M, HONJOH S, et al. Octopamine enhances oxidative stress resistance through the fasting-responsive transcription factor DAF-16/FOXO in *C. elegans*[J]. *Genes to Cells*, 2017, 22(2): 210-219.

[32] WOLLENHAUPT S G N, SOARES A T, SALGUEIRO W G, et al. Seleno- and telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64: 192-199.

[33] WU J Z, HUANG J H, KHANABDALI R, et al. Pyrroloquinoline quinone enhances the resistance to oxidative stress and extends lifespan upon DAF-16 and SKN-1 activities in *C-elegans*[J]. *Experimental Gerontology*, 2016, 80: 43-50.

[34] TAIRA N, NGUYEN B C Q, TU P T B, et al. Effect of okinaawa propolis on PAK1 activity, *Caenorhabditis elegans* longevity, melanogenesis, and growth of cancer cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(27): 5484-5489.

[35] LI R, TAO M F, XU T T, et al. *Artemisia selengensis* Turcz. leaf extract promotes longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(11): 4532-4541.