

陈静静,白雪媛,边帅,等. 基于酿酒酵母体系的人参皂苷抗衰老活性筛选及评价 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 1-9. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050033

CHEN Jingjing, BAI Xueyuan, BIAN Shuai, et al. Screening and Evaluation of Anti-aging Activity of Ginsenosides Based on *Saccharomyces cerevisiae* System[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 1-9. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050033

· 未来食品 ·

基于酿酒酵母体系的人参皂苷抗衰老活性筛选及评价

陈静静,白雪媛,边 帅,吉世禹,王思明*

(长春中医药大学吉林省人参科学研究院,吉林长春 130000)

摘要:以酿酒酵母作为模式生物对人参皂苷进行抗衰老活性筛选并对其活性展开初步探讨。基于模式菌酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* BY4742) 的生长曲线筛选出人参皂苷的最适给药浓度,在此基础上,根据酵母的生长曲线和超氧化物歧化酶 SOD 活性筛选八种人参皂苷单体 Rb1、Rb2、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2、Rd 的抗衰老作用,找出效果最佳的一种单体皂苷,再通过抗氧化指标检测及细胞形态变化分析,初步探究人参皂苷的抗衰老作用。同时提取酿酒酵母蛋白进行蛋白组学分析,确定具有显著差异的蛋白,结合 GO 富集分析相关生物学分析,对差异蛋白的功能通路、属性和代谢通路等进行分析研究。结果表明,人参皂苷的最适给药浓度是 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$,常用的八种单体皂苷中人参皂苷 Rg1 具有明显的抗衰老作用,能延缓酵母进入衰老期。人参皂苷 Rg1 可以不同程度提高酵母细胞内的抗氧化酶:超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性,减少活性氧(ROS)含量和丙二醛(MDA)含量。蛋白组学分析结果显示人参皂苷延缓酿酒酵母衰老可能与 14 个显著差异蛋白有关,同时与细胞代谢有密切关系。

关键词:人参皂苷,酿酒酵母,抗衰老,氧化应激

中图分类号:TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2022)01-0001-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050033



本文网刊:

Screening and Evaluation of Anti-aging Activity of Ginsenosides Based on *Saccharomyces cerevisiae* System

CHEN Jingjing, BAI Xueyuan, BIAN Shuai, JI Shiyu, WANG Siming*

(Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130000, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* was used as a model organism to screen the anti-aging activity of ginsenosides and explore its activities. The optimal concentration of ginsenoside was screened out based on the growth curve of the model strain *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. On this basis, the anti-aging effects of eight ginsenoside monomers Rb1, Rb2, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2 and Rd were screened out based on the growth curve of yeast and the activity of superoxide dismutase SOD to find out the monomer saponin with the best effect. The anti-aging effect of ginsenoside was initially explored through the detection of antioxidant indicators and cell morphological changes. At the same time, the protein of *S. cerevisiae* was extracted for proteomic analysis to identify the proteins with significant differences, and the functional pathways, attributes and metabolic pathways of the differential proteins were analyzed and studied in combination with the biological analysis related to GO enrichment analysis. The results showed that the optimal concentration of ginsenoside was 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Among the eight monomer saponins commonly used, ginsenoside Rg1 had significant anti-aging effect and could delay the yeast entering the decline phase. Ginsenoside Rg1 could improve the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) in yeast cells to varying degrees, and reduce the

收稿日期: 2021-05-08

基金项目: 人参产业关键技术研究及大健康产品开发 (No:2017YFC1702100)。

作者简介: 陈静静 (1997-),女,硕士研究生,研究方向: 中药生物技术,E-mail: meetchenjj@163.com。

* 通信作者: 王思明 (1987-),男,硕士,实验师,研究方向: 中药大健康产品开发及生物学机制研究,E-mail: lwsm126030@126.com。

contents of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA). Proteomic analysis showed that ginsenoside could delay the senescence of *S. cerevisiae* by involving 14 significantly different proteins and was closely related to cell metabolism.

Key words: ginsenoside; *Saccharomyces cerevisiae*; anti-aging; oxidative stress

酿酒酵母是抗衰老研究中最简单的生物模型^[1],也是最成熟的真核生物表达系统。其正常细胞的衰老新陈代谢反应机制与人体正常细胞的衰老新陈代谢反应机制很相似^[2]。它生长周期短、易大规模培养,具有相对较短、易于测量的时间和复制寿命,并完成基因组测序,有完整的核苷酸序列^[3],并与哺乳动物有高度的同源性。酿酒酵母衰老模型作为一种单细胞生物模型,不仅能够高通量筛选药物活性,更能够进一步从细胞水平探寻衰老的机制^[4]。目前国内外用酿酒酵母作为研究衰老的模式生物已有30余年,基于酵母模式生物,相关研究已经发现了多酚白藜芦醇和天然多胺亚精胺可作为潜在的抗衰老剂^[5]。酵母细胞同哺乳动物类似,其中存在着超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等抗氧化酶^[6-11]。蛋白质组学是在大规模水平上研究蛋白质的特征,包括蛋白质的表达水平、翻译后的修饰、蛋白与蛋白相互作用等,由此可以获得蛋白水平上的关于酿酒酵母衰老发生及给药后细胞的整体而全面的认识^[12]。

人参被誉为“百草之王”,具有很大的药用价值^[13]。人参皂苷是人参中的重要活性成分之一,它已经被证明是具有抗衰老作用的药物之一,在抗衰老过程中起非常重要的作用^[14-16]。经查阅文献资料,最终确定选用较多人使用研究的和人参中含量较高的人参皂苷单体进行实验,因此前期筛选使用了八种人参皂苷 Rb1、Rb2、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2、Rd^[17-19]。然而人参皂苷抗衰老涉及到多种作用机制,目前尚不清楚,其中,具有明显抗衰老作用的单体皂苷也不甚明晰,本实验旨在探究人参皂苷减弱氧化应激从而达到延缓酿酒酵母衰老的作用及确定出效果最为明显的一种或多种单体皂苷对其进行活性评价^[20]。

以往研究人参皂苷的抗衰老作用,用动物或细胞作为研究模型较多,但研究不够深入,未清楚其作用机制^[21],以酿酒酵母作为抗衰老模型,不仅可说明人参皂苷在不同物种上的保守性,也能为后期人参皂苷的作用机制研究提供方便。本文以酿酒酵母作为模型生物进行实验,为人参皂苷更进一步的有效使用提供一定参考。以比较有代表性的 SOD 作为抗氧化指标,筛选出较为有效的单体皂苷。后面再通过 ROS 含量、MDA 含量以及多种抗氧化酶活性进行验证人参皂苷是否具有抗氧化作用从而达到抗衰老作用。通过对酿酒酵母的正常组及给药组的蛋白质组比较分析,找到某些“衰老特异性的蛋白质分子”与药物产生抗衰老作用的主要途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酿酒酵母 BY4742 淼灵生物公司; YPD 培养

基: 1% 酵母膏、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖,溶于蒸馏水中, 121 °C 灭菌 20 min, YPD 固体培养基是在液体培养基中加入 2% 的琼脂; 人参皂苷标准品 源叶生物科技有限公司; 酵母膏、蛋白胨、葡萄糖、琼脂、MTT、二甲基亚砷、DNS、卡那霉素、磷酸盐缓冲液、愈创木酚、TCA、过氧化氢酶检测试剂盒 索莱宝科技有限公司; BCA 试剂盒、活性氧检测试剂盒、MDA 检测试剂盒 碧云天生物试剂公司; SOD 试剂盒 南京建成生物工程研究所。

EYELA 恒温培养箱 东京理化公司; infinite M200PRO 酶标仪 瑞士 TECAN 公司; SCIENTZ 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物有限公司; SX-700 蒸汽灭菌器 日本 Tomy Digital Biology 公司; SW-CJ-2D 型双人净化工作台 苏州净化设备有限公司; innova40 全温振荡培养箱 德国 Eppendorf 公司; KQ-600E 型超声清洗器 昆山超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酿酒酵母活化与培养 将购买的菌种在 YPD 固体培养基上进行划线或涂布,于 28 °C 培养箱倒置培养 48 h 活化^[22]。再进行单克隆培养即挑单菌落于灭完菌的小体积 YPD 液体培养基里扩大培养,再进行大体积的二次扩大培养,培养条件为 28 °C、180 r/min,每次培养 24 h 即可连续传代培养使用。培养基中均加入卡那霉素 50 mg/mL 作抗生素,避免染菌^[23]。

1.2.2 酵母细胞生长曲线的绘制及降糖能力测定 取经两次扩大培养后的菌液,以 2% 的接种量接种于新的培养基中置于合适条件下培养,将此时记为 0 h (初始接种期),每隔 4 h 从中取样,用 MTT 法测定 OD₆₀₀ 值。菌浓度以 OD₆₀₀ 值表示。取样测定绘制酿酒酵母的生长曲线^[24]。

采用二硝基水杨酸(DNS)法测定菌液中的残糖含量,先绘制出葡萄糖标曲,测定 OD₅₄₀ 值,用空白管进行调零,即可绘制出检测还原糖的标准曲线。

样品测定:取发酵液 1 mL, 8000 r/min 离心 10 min 取上清液,加入 0.75 mL 的 DNS 混匀,煮沸 5 min,立即冷却,加入蒸馏水稀释到 10 mL,测定 OD₅₄₀ 值,将结果带入标曲即可得到各时间点菌液的残糖含量。若 OD 值不在标曲内,可以先稀释样品找出合适的浓度。

1.2.3 酿酒酵母不同时期凝絮能力比较 根据 1.2.2 的生长曲线,选出分别处于稳定前期、稳定中期和衰老期的三个时间点,将菌液浓度用生理盐水稀释至 $2.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4$ CFU/mL,摇匀,取等体积稀释后样品 1 mL 于 Ep 管中,用 PBS 定容至 20 mL,室温静置,每隔 30 min 从管中取样,测定其 OD₆₀₀ 值。

1.2.4 最适给药浓度筛选 查阅文献, 选出药物浓度为 100、150、180、200、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 给药^[25-26], 确定较合适的给药浓度。进行后续实验, 每隔 6 h 取样测定, 绘制给药后酵母细胞生长曲线, 与未给药的正常生长曲线进行对比, 观察是否延长酵母细胞的时序寿命, 实验做三组平行。

1.2.5 有效人参皂苷初步筛选 根据前期药物浓度筛选确定药物浓度, 于酵母菌刚进入稳定期时进行, 分别给药人参皂苷 Rb1、Rb2、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2、Rd。之后隔 12 h 取样, 根据 MTT 实验结果确定细胞浓度, 绘制生长曲线, 进行比较。同时在将要进入衰老期时测定不同皂苷作用的酵母菌抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)含量, 以确定效果较好的人参皂苷单体进行后续实验。

1.2.6 不同时期酵母细胞的形态观察 取经磷酸盐缓冲液洗涤 2 次的酵母细胞, 用 PBS 稀释细胞悬液到适当浓度, 置于干净的聚酰胺玻片上, 进行爬片, 洗涤, 固定, 用扫描电镜观察细胞形态。

1.2.7 粗酶液制备 取 1 mL 菌液, 用反复冻融加超声波破碎细胞法进行处理, 3000 r/min 离心 6 min 得到的细胞沉淀用 PBS 洗涤三次, 再加入 0.5 mL PBS, 功率 300 W, 工作 3 s, 间歇 9 s, 置于冰水浴中持续 10 min 进行超声处理。得到的细胞破碎液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 的条件下离心 10 min, 取上清即得到粗酶液。由于蛋白易降解失活, 要将粗酶液置于 -20°C 下并分装保存, 避免反复冻融。

1.2.8 抗氧化指标测定

1.2.8.1 ROS 含量的测定 采用荧光探针 DCFH-DA 检测法^[9]进行测定。YPD 液体培养基稀释 DCFH-DA 探针使终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 收集细胞悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 细胞浓度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ CFU/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, PBS 清洗三次, 使用荧光酶标仪在 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长下测定。

1.2.8.2 POD 酶活性的测定 采用愈创木酚法^[9]进行测定。依次加入 2 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液、0.1 mL 0.05 mol/L 愈创木酚溶液、0.1 mL 的粗酶液、1.0 mL 的 2% H_2O_2 , 充分摇匀, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 15 min, 立即加入 2% 的 TCA 溶液 2 mL 终止反应, 混匀, 用双蒸水调零, 在 470 nm 处测吸光度值, 以每分钟吸光度值变化 0.01 为一个酶活单位 (U)。使用 BCA 试剂盒测定粗酶液中的蛋白含量。

$$\text{POD活力(U/(mg} \cdot \text{min))} = \frac{\Delta A_{470}}{0.01 \times N \times C \times T}$$

式中: ΔA_{470} 表示样品在 470 nm 下的吸光度值; N 表示加酶量, mL; C 表示蛋白浓度, mg prot/mL; T 表示反应时间, 1 min。

1.2.8.3 SOD 酶活性的测定 采用 WST-1 法^[23]进行测定。取 1.2.7 得到的粗酶液稀释 10 倍, 测定孔

接 20 μL 稀释好的粗酶液, 再加入酶工作液 20 μL 和 200 μL 底物应用液, 混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 450 nm 测吸光度 A。测定空白孔同测定孔用酶稀释液代替酶工作液, 其余步骤相同。在反应体系中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量为一个 SOD 活力单位(U)。按公式计算 SOD 抑制率:

$$\text{SOD抑制率(\%)} = \frac{[(A_h - A_i) - (A_j - A_k)]}{(A_h - A_i)} \times 100$$

$$\text{SOD活力(U/mg prot)} = \frac{\text{SOD抑制率} \times 2 \times K \times 12}{C_{\text{待测}}}$$

式中: A_h 表示对照孔 450 nm 下的吸光度值; A_i 表示空白对照孔 450 nm 下的吸光度值; A_j 表示测定孔 450 nm 下的吸光度值; A_k 表示空白测定孔 450 nm 下的吸光度值; K 表示反应体系稀释倍数; C 待测表示待测样本蛋白浓度, mg prot/mL。

1.2.8.4 CAT 酶活性的测定 采用微量法^[23]进行测定。取 30 μL 菌液加 1 mL CAT 提取液, 超声破碎, 离心取上清(与 1.2.7 相同)。取 10 μL 粗酶液加入 190 μL 检测工作液, 记录每 min 样品在 240 nm 下的吸光度变化值。使用 BCA 试剂盒测定粗酶液中的蛋白含量。CAT 活力计算公式如下:

$$\text{CAT(U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{总}} / (\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times d) \times 10^6}{(C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \times T} = \frac{765.4 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

式中: ΔA 表示每分钟样品在 240 nm 下的吸光度变化值; $V_{\text{总}}$ 表示反应总体积, mL; $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}$ 表示 H_2O_2 的摩尔消光系数, 43.6 L/mol/cm; d 表示孔板孔径, 0.6 cm; C_{pr} 表示样品蛋白浓度, mg prot/mL; $V_{\text{样}}$ 表示样品体积, mL; T 表示反应时间, min。

1.2.8.5 MDA 含量测定 TBA 显色法^[27]。取 1.2.7 得到的粗酶液 100 μL , 加入 0.2 mL MDA 检测工作液, 混匀, 沸水浴 15 min, 水浴冷却至室温, 1200 r/min 离心 10 min 后取 200 μL 上清加入到 96 孔板中, 随后用酶标仪在 535 nm 测定吸光度。由此通过比色法对样品中的 MDA 进行定量检测。

1.2.9 蛋白质组学分析 取 68 h 的给药与空白样品各 3 个, 离心回收沉淀, 清洗两次, 液氮研磨成细胞粉, 加入四倍体积裂解液, 超声三次, 收集上清液进行蛋白质提取, 再以 1:50 的比例进行胰酶酶解, 再用 TMT 肽段标记, 标记的肽段用高 pH 反向液相色谱进行分离, 质谱检测分子量进行成分分析和结构分析, 最后进行蛋白质的定性与定量分析。

1.2.9.1 TMT 标记及肽段分级 将各样品得到的所有蛋白进行酶解, 肽段定量。按照 TMT 标记试剂盒说明书, 每份样品分别取 100 μg 肽段进行标记, 标记试剂解冻后用乙腈溶解, 与肽段混合后室温孵育 2 h, 标记后的肽段混合后除盐, 真空冷冻干燥。首先采用乙腈和 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 进行柱平衡, 然后将混合的标记肽段样品上样, 将其脱盐处理、梯度

洗脱、真空干燥后用适量 0.1% FA 溶液复溶冻干样品,在吸光度 280 nm 处测定肽段浓度。

1.2.9.2 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析 采用纳升流速的 HPLC 液相系统对每份分级样品进行分离;样品经色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析,正离子检测方式,母离子扫描范围 300~1800 m/z。多肽和多肽碎片的质量电荷比采集方式:每次全扫描后采集 20 个碎片图谱(MS2 scan, HCD)。

1.2.9.3 蛋白质鉴定和定量分析 LC-MS/MS 质谱分析原始数据使用软件 Mascot 2.2 和 Proteome Discoverer 1.4 进行查库鉴定及定量分析,最后生物信息学分析得到差异蛋白筛选和 GO 功能集分析。

1.3 数据处理

数据处理均采用 Prism 8 软件作图,结果用“平均值±标准差”表示,数据用 ANOVA 方法作差异分析($P < 0.05$)。实验均做 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母的生长曲线和残糖变化

由图 1 可知,酿酒酵母的迟滞期为 0~4 h,对数生长期在 4~16 h,并在 16 h 进入稳定期(静止期),说明这个时期的酵母菌个体形态及生理指标都较为稳定,是菌种采样留种的好时期。在 68 h 开始进入衰亡期(也叫衰老期)。与此对应的培养基残糖变化也表明在对数生长期 16 h 之前残糖含量快速下降,说明此时酵母菌生长消耗大量的葡萄糖,16~68 h 进入稳定期,残糖含量下降缓慢,说明随着酿酒酵母培养时间的增加,酵母细胞对葡萄糖的代谢能力逐渐变慢,当培养到 68 h 时,残糖浓度下降极度缓慢基本保持不变,由此可见细胞衰老使得酿酒酵母对糖的代谢能力减弱。

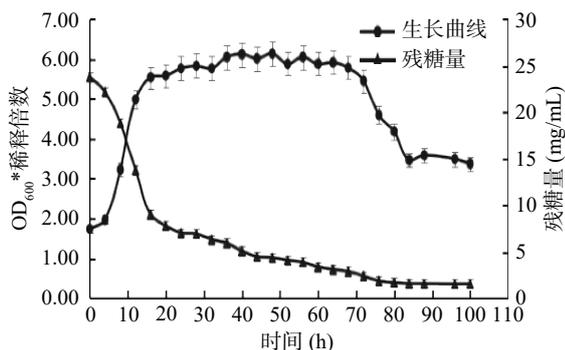


图 1 酿酒酵母的生长曲线和残糖变化图
Fig.1 Growth curve and residual sugar diagram of *Saccharomyces cerevisiae*

2.2 不同时期的酵母菌凝絮能力变化

凝絮能力测定要选用比较有代表性的时间点样品进行实验,因此选用了刚到达稳定期的 16 h、稳定期中点的 44 h 和进入衰亡期的 68 h 的菌液进行絮凝能力对比实验,由图 2 可知,16 h 的酿酒酵母凝絮曲线斜率为 0.0006,44 h 凝絮曲线的斜率为 0.001,68 h 斜率为 0.0015。随着酵母细胞培养时间的增

加,其絮凝速率明显加快,这可能是由于酵母在衰老过程中,细胞经多次出芽繁殖,表面细胞壁褶皱程度增加,导致了细胞间表面粘附力增强,从而促进了细胞聚集引起絮凝速率加快,也有可能是由于菌体在衰老过程中胞内活性氧积累,脂质过氧化加剧,产生氧化应激,导致细胞损伤,从而导致细胞絮凝速率加快^[28]。还有可能是细胞衰老过程中,细胞活力下降,导致絮凝能力增强。

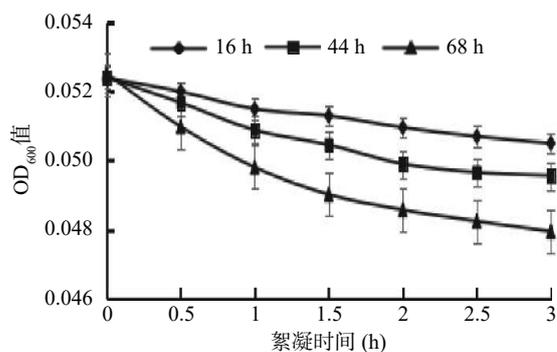


图 2 酿酒酵母不同时间凝絮能力变化
Fig.2 Changes of flocculation ability of *Saccharomyces cerevisiae* at different time

2.3 筛选最适给药浓度

使用人参皂苷 Rg1 根据酵母菌的生长曲线筛选出最适的给药浓度。根据图 3 生长曲线结果得出当给药浓度是 150、180、200 $\mu\text{g/mL}$ 时,均在 84 h 进入衰亡期,有明显延长酵母菌稳定期的作用。而浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 和空白组一样于 72 h 进入衰老期,但由结果可知 180 $\mu\text{g/mL}$ 时对酵母还具有明显的增殖效果,说明当给药浓度为 180 $\mu\text{g/mL}$ 时,既能延长酵母的稳定期同时具有明显增殖效果,作用最佳。因此选定给药浓度为 180 $\mu\text{g/mL}$ 进行后续实验。

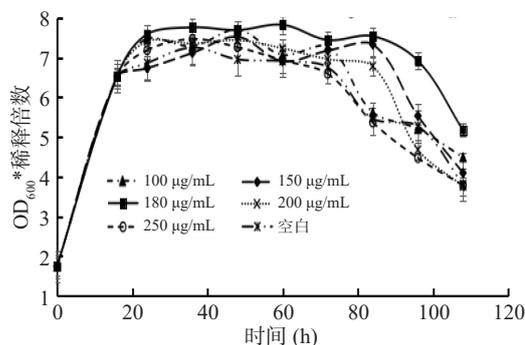


图 3 不同给药浓度的生长曲线
Fig.3 Growth curve of different drug concentration

2.4 不同人参皂苷对酿酒酵母作用结果

据图 4 可以比较直观的得出人参皂苷 Rb1、Rb2、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1 均有延缓酵母衰老的作用,均延长了酿酒酵母进入衰老拐点的时间:空白组是在 72 h 附近开始有菌浓度下降的趋势,而给药组 Rg1 在 96 h 附近开始下降,Rb2 是在 84 h 处出现下

降趋势。同时, Rg3 有非常明显的酵母菌增殖效果, Rb1、Rg2、Rh1 也都有一定的增殖作用。为了使结果更清楚, 选用了拐点附近的 5 个时间点 64、68、70、72、76 h 进行抗氧化酶 SOD 活性的检测, 以便观察哪些药物有明显增强抗氧化酶活性的效果。由图 5 可以得出, 人参皂苷 Rg1、Rg3 有明显增强抗氧化的作用, 在各时间点均增大 SOD 活力($P < 0.05$)。人参皂苷 Rb1、Rb2、Rh1 也有增加抗氧化酶活性的作用, 但效果不如 Rg1 和 Rg3。人参皂苷 Rg3 造价较为昂贵且效果较 Rg1 稍低。由此, 结合这两个实验结果, 最终确定使用人参皂苷 Rg1 进行接下来的活性研究实验。

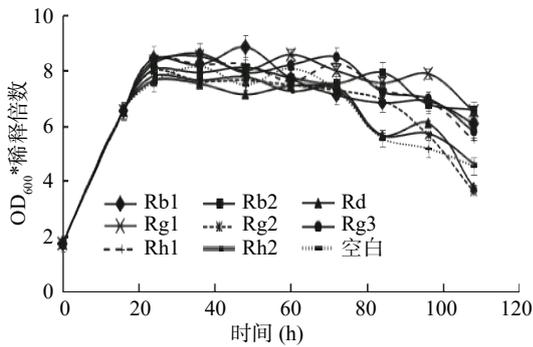


图 4 不同人参皂苷作用下的酵母菌生长曲线
Fig.4 Growth curve of yeast under the action of different ginsenosides

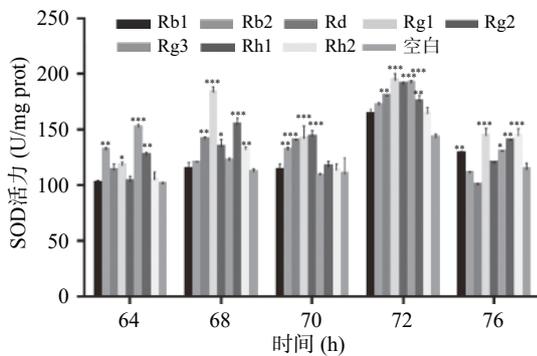


图 5 不同人参皂苷作用下的酵母细胞 SOD 活力比较
Fig.5 Comparison of SOD activity in yeast cells under different ginsenosides

注: Rb1、Rb2、Rd、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2 分别指人参皂苷 Rb1、Rb2、Rd、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2 给药组, 空白指空白对照酿酒酵母组。*表示给药组与空白组相比存在显著差异, $P < 0.05$; **表示给药组与空白组相比存在较显著差异, $P < 0.01$; ***表示给药组与空白组相比存在高度显著差异, $P < 0.001$ 。

2.5 人参皂苷 Rg1 给药组与空白组的生长曲线对比

由图 6 给药组与空白组比较可知, 给药后显著延长了酵母细胞的时序寿命, 约延长了 24 h。空白组在 84 h 时已经进入衰老期, 而给药组还处于稳定期, 且给药组于 96 h 进入衰老期, 细胞浓度较空白组有较显著提升($P < 0.01$)。由此可以看出给药人参皂苷 Rg1 使酿酒酵母稳定期延长, 进入衰老期的时间点延缓, 且菌浓度较未给药的正常培养的酵母菌浓度

较高, 说明人参皂苷 Rg1 具有延缓酿酒酵母衰老的作用并能够促进酵母增殖。

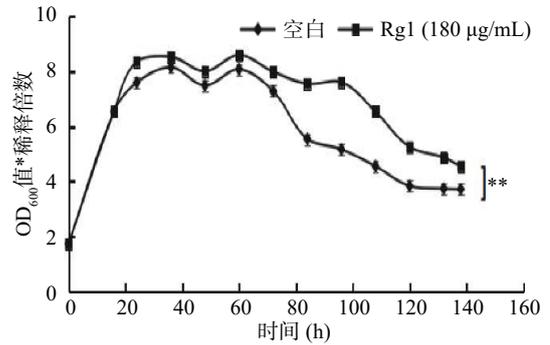


图 6 给药与未给药的生长曲线对比图

Fig.6 Comparison of growth curve between drug administration and non drug administration

注: **表示人参皂苷 Rg1 给药组与空白组相比存在较显著差异, $P < 0.01$ 。

2.6 不同时期细胞形态对比

图 7 是不同时期的酵母细胞扫描电镜图。A 是正常对照组在刚进入稳定期时的细胞形态, 其形态稳定, 细胞呈不规则球状, 表面光滑无皱褶。B 是正常对照组在刚进入衰亡期的细胞状态, 细胞经过多次出芽生殖, 表面粗糙产生大量絮状物, 表面褶皱增加, 出现核仁碎片, 细胞有明显衰亡痕迹。C 是在正常培养基基础上给药人参皂苷 Rg1, 同样是 68 h 的细胞状态, 从图中可以看出细胞正在进行分裂, 细胞表面虽有芽痕, 但细胞形态保留较为完好, 与未给药组对比有明显改善, 因此可知人参皂苷 Rg1 在一定程度上可以改善酵母细胞的衰老情况。

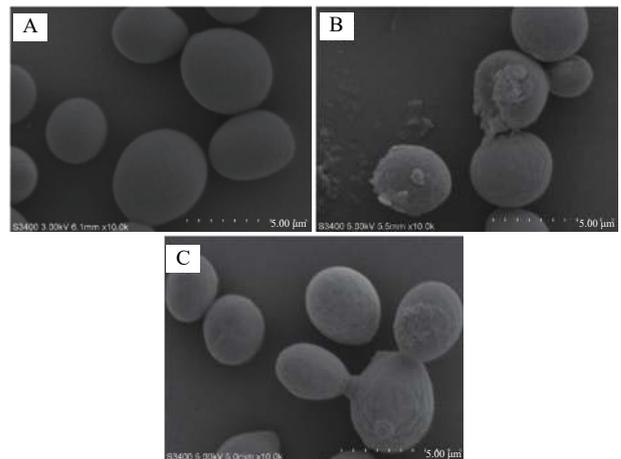


图 7 酿酒酵母不同时期细胞形态

Fig.7 Cell morphology of *Saccharomyces cerevisiae* at different stages

注: A-16 h 对照组细胞形态; B-68 h 对照组细胞形态; C-68 h 给药组细胞形态。

2.7 抗氧化指标测定

细胞内的活性氧含量越高, 说明抗氧化能力越弱。POD 和 CAT 是主要的抗氧化酶之一, 含量越高, 说明抗氧化能力越强。SOD 水平与自由基含量

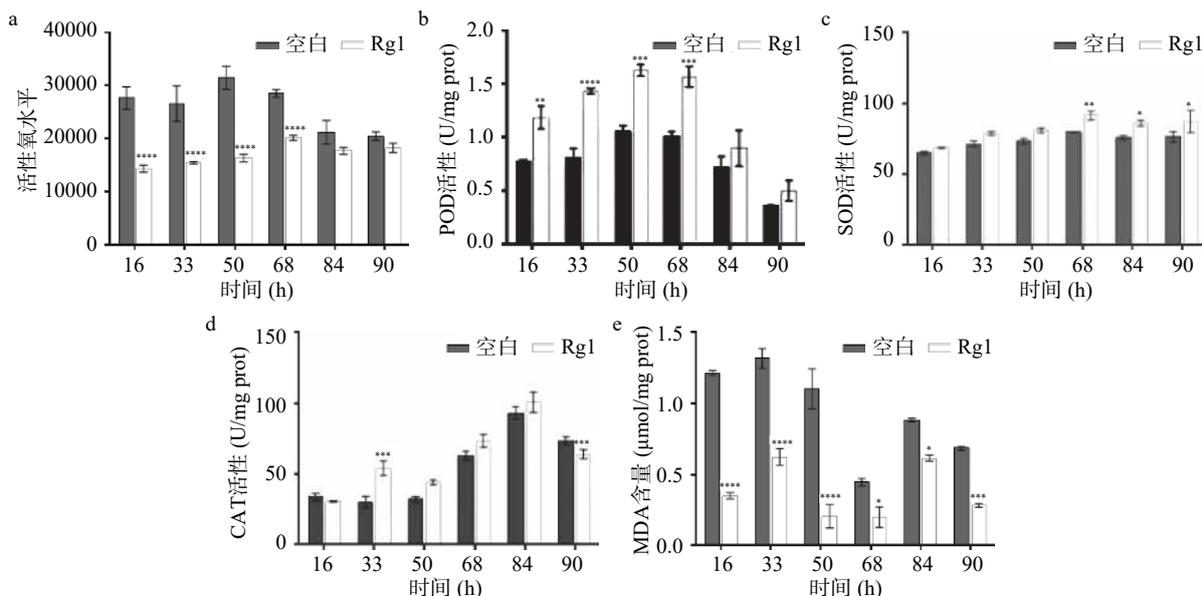


图8 给药与未给药的抗氧化酶活性及活性氧含量对比图

Fig.8 Comparison of antioxidant enzymes and reactive oxygen content between drug administration and non drug administration

注: (a)活性氧水平, (b)POD 活性, (c)SOD 活性, (d)CAT 活性, (e)MDA 含量; *表示给药组与空白组相比存在显著差异, $P < 0.05$; **表示给药组与空白组相比存在较显著差异, $P < 0.01$; ***表示给药组与空白组相比存在高度显著差异, $P < 0.001$; ****表示给药组与空白组相比存在极显著差异, $P < 0.0001$ 。

呈负相关,其水平的高低可间接反映机体内自由基的含量。测定 MDA 含量即可得到细胞氧化脂质的情况^[29]。由图 8 可以看出,空白组酿酒酵母随培养时间的增加,胞内活性氧含量出现先升高后下降的趋势,而给药组能明显降低酵母的活性氧含量,特别在刚给药后存在极显著差异($P < 0.0001$)。POD 也是酵母中的主要抗氧化酶之一,随着时间的延长,POD 出现先上升后下降的趋势,同时给药后显著提升酵母细胞内的 POD 活性($P < 0.01$)。由图 c 可知酿酒酵母 SOD 活力随培养时间的增加而增强,给药后能使酵母细胞 SOD 活性更强,结果有显著性差异($P < 0.05$)。CAT 同 POD 一样,都呈现先上升后下降的趋势,进入衰老期后抗氧化酶活力便开始下降。由图 e 可知 MDA 含量随培养时间的增加而增大,在 68 h 进入衰老期后细胞数减少所以 MDA 含量总体有所减少,但给药后能显著降低细胞内 MDA 的含量,说明细胞抗氧化能力显著增强($P < 0.05$)。从图中可以看出,给药后不仅细胞中的活性氧含量有所降低,各抗氧化酶的活力增强,在酵母进入衰老期抗氧化酶活力开始下降后也能抵御活性氧或超氧阴离子带来的氧化损伤,尤其是 POD 和 SOD 酶活力有明显增强,MDA 含量也有明显降低。因此可以说明人参皂苷 Rg1 具有延缓酿酒酵母衰老的作用,并且可以降低酿酒酵母的活性氧含量,同时增加胞内抗氧化酶的活力,抑制脂质过氧化率,可为后续的研究提供数据支撑。人参皂苷 Rg1 可能是通过抗氧化达到抗衰老的目的。

2.8 蛋白组学分析结果

在差异蛋白质筛选中,以表达倍数>1.5 倍(上调大于 1.5 倍或下调小于 0.67 倍)且 P -value<0.05(T-

test)为标准,得到比较组间的上调、下调的蛋白质数目。将比较组间蛋白质以表达差异倍数和 P -value(T-test)两个因素为标准绘制火山图(图 9),无差异的蛋白质为灰色,显著下调的蛋白质以蓝色标注($FC < 0.67$ 且 $P < 0.05$),下调蛋白质数量为 10 个。显著上调的蛋白质以红色标注($FC > 1.5$ 且 $P < 0.05$),上调蛋白质数量为 4 个,人参皂苷延缓酿酒酵母衰老可能与 14 个显著差异蛋白有关。

为了全面了解蛋白在生物体中的功能、定位及

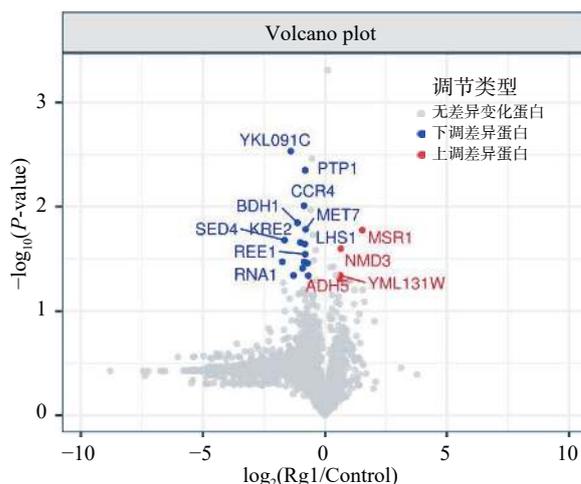


图9 酿酒酵母的差异蛋白筛选

Fig.9 Screening of differential protein in *Saccharomyces cerevisiae*

注:横坐标为差异倍数(以 2 为底的对数变换),纵坐标为差异的显著性 P -value(以 10 为底的对数变换)。图中红色点为上调的显著性差异表达蛋白质,蓝色点为下调的显著性差异表达蛋白质,灰点为无差异变化的蛋白质。标注 ID 的点为 P -value 上下调差异蛋白最显著的 top10。

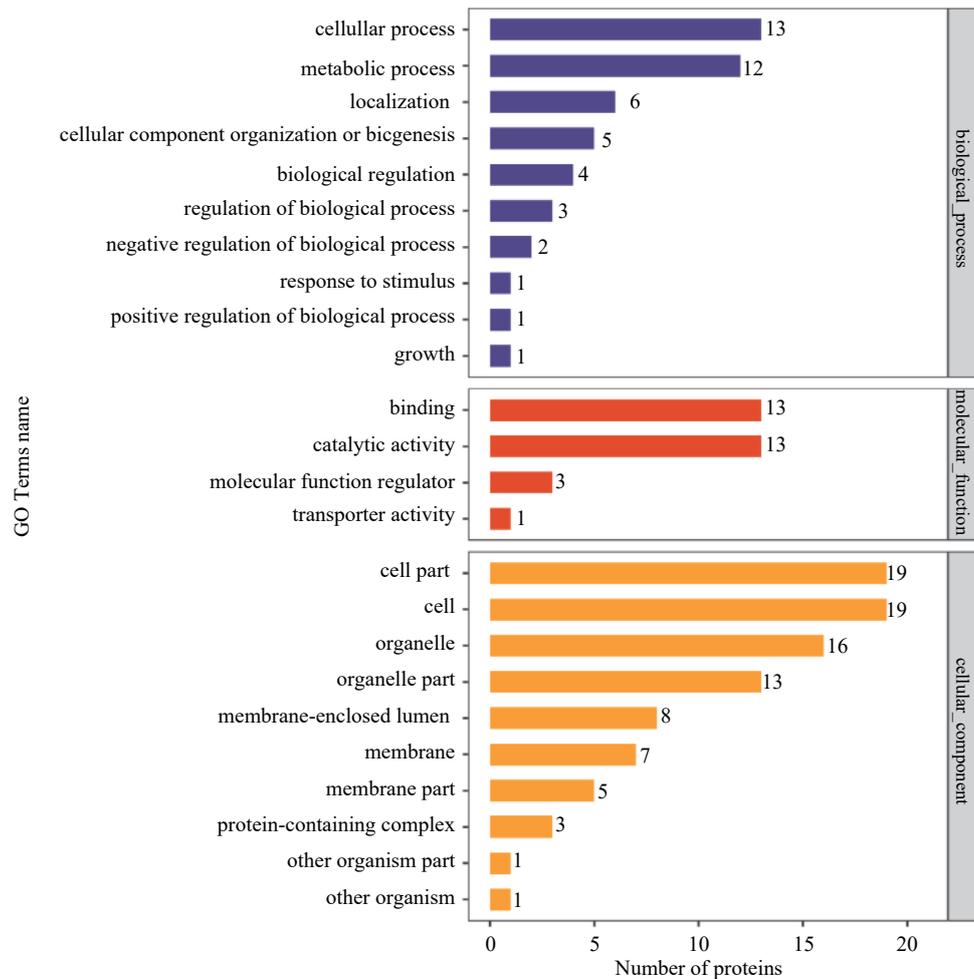


图 10 酿酒酵母差异表达蛋白 GO 的分类及注释

Fig.10 Classification and annotation of differentially expressed protein GO in *Saccharomyces cerevisiae*

注: 图中纵坐标表示 GO 二级功能注释信息(GO Level2), 包含生物过程(Biological Process), 分子功能(Molecular Function)和细胞组分(Cellular Component), 依次以蓝色, 红色, 橙色予以区分; 横坐标(下)表示每个功能分类下的差异表达蛋白质数目, 横坐标(上)表示每个功能分类下的差异表达蛋白质数目占总的差异表达蛋白质数目的百分比。

参与的生物学途径, 通过基因本体对蛋白质进行注释。GO 是一个标准化的功能分类体系, GO 功能注释主要分为 3 类: 生物过程, 分子功能和细胞组分。蛋白质可以根据 ID 序列注释的方法找到与之对应的蛋白的功能以及组成。根据图 10 发现它们主要包含细胞、细胞器等细胞组分(CC), 具有结合和催化活性等分子功能(MP), 并参与细胞转化和代谢等生物过程(BP)。一般情况下, 某一功能类别对应的差异表达蛋白质数目越多, 说明该功能越重要, 需要重点关注或者进行后续深入的机制探讨, 为后续的研究提供思路。因此, 酿酒酵母的差异蛋白在细胞组分和分子功能的改变中较多, 可能与细胞代谢有密切关系。

3 讨论与结论

酿酒酵母的寿命包括时序寿命和复制寿命, 此次实验以其时序寿命为研究对象。本实验以酿酒酵母体系为实验模型, 在酵母刚进入稳定期时进行给药, 筛选确定药物浓度为 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。查阅文献可知很多药物均被证明有抗衰老作用, 例如姜黄素衍生物(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 柳树提取物(0.1%)等^[30-31], 相比较来

说, 人参皂苷 Rg1 的给药浓度(180 $\mu\text{g}/\text{mL}$)要更小一些也具有抗衰老作用。本文筛选的人参皂苷 Rb1、Rb2、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1 均有延缓酵母衰老的作用, 但人参皂苷 Rg1 的效果最为显著, 据酵母生长曲线得出 Rg1 可明显延缓酵母进入衰老期时间。结合酿酒酵母空白组和给药人参皂苷 Rg1 组的生长曲线图对比结果以及电镜下的细胞状态对比, 加上给药组与空白组的抗氧化指标对比结果, 可以证明人参皂苷 Rg1 有显著的延缓酿酒酵母衰老作用。

ROS 水平可以决定不同的生物学结果。低水平的 ROS 可诱导细胞增殖和适应氧化, 而高水平的 ROS 可促进衰老, 造成 DNA、蛋白质或脂质损伤, 最终导致细胞死亡和疾病^[32]。在酿酒酵母培养过程中添加人参皂苷 Rg1, 可显著提高细胞内抗氧化酶类 SOD、CAT 及 POD 活性并且降低活性氧的含量, 减少脂质氧化, 从而降低胞内活性氧对细胞的氧化损伤情况。说明人参皂苷 Rg1 是通过上调了内源性抗氧化系统组成部分 CAT、POD 与 SOD 的酶活水平并且降低了酵母细胞内的 ROS 和 MDA 含量, 从而达到有效

减缓氧化应激,延长酵母的存活时间的目的^[33]。结果也表明人参皂苷 Rg1 既可抑制自由基的产生,也可直接对抗自由基对组织及细胞的损伤作用,或直接清除自由基,还可增强机体本身抗氧化系统的功能,从多个环节阻断自由基的损伤作用。蛋白质组学分析结果的差异蛋白筛选和 GO 富集分析为后续进一步验证研究人参皂苷 Rg1 抗衰老提供理论与实验基础。人参皂苷延缓酿酒酵母衰老可能与 14 个显著差异蛋白有关,并且药物通过作用在细胞组分和细胞器中产生疗效,同时很大部分作用在代谢过程中。

因此人参皂苷 Rg1 用来作为抗衰老药物前景较好,具有治疗各种氧化或衰老所致疾病的巨大潜力,也可以用来作为某些药物的辅助药物来使用。本实验也为抗衰老与抗氧化之间的关系依据进一步进行了验证。同时也为人参药物、保健、美容等系列产品的开发利用提供了一定的理论指导。

参考文献

- [1] 周佳,康亚妮.单细胞衰老研究的模式生物——酿酒酵母[J].生命科学,2013,25(5):504-510. [ZHOU J, KANG Y N. *Saccharomyces cerevisiae*: A model organism for single cell aging research[J]. Life Sciences, 2013, 25(5): 504-510.]
- [2] 周玉枝,闫明亮,高丽,等.衰老动物模型的研究及其在抗衰老药物活性筛选中的应用[J].中草药,2017,48(6):1061-1071. [ZHOU Y Z, YAN M L, GAO L, et al. Study on aging animal model and its application in the screening of anti-aging drug activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Medicine, 2017, 48(6): 1061-1071.]
- [3] SHI G, LIU D, ZHOU B, et al. Ginsenoside Rb1 alleviates oxidative low-density lipoprotein-induced vascular endothelium senescence via the SIRT1/Beclin-1/Autophagy axis[J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 75(2): 155-167.
- [4] KAEBERLEIN M, POWERS R W, 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.
- [5] BONAWITZ N D, CHATENAY-LAPOINTE M, PAN Y, et al. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression[J]. *Cell Metab*, 2007, 5(4): 265-277.
- [6] HE CHONG, ZHOU CHUANKAI, KENNEDY BRIAN K. The yeast replicative aging model[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2018, 1864(9): 2690-2696.
- [7] 莫睿,魏智民,杨云生.抗衰老机制研究进展[J].解放军医学杂志,2017,42(8):743-748. [MO R, WEI Z M, YANG Y S. Research progress on anti-aging mechanism[J]. Chinese PLA Medical Journal, 2017, 42(8): 743-748.]
- [8] HARMAN D. The aging process[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78(11): 7124-7128.
- [9] 尹亚辉,安文涛,董亮,等.不同世代酿酒酵母胞内抗氧化酶活性变化[J].食品科技,2013,38(8):38-41,47. [YIN Y H, AN W T, DONG L, et al. Changes of intracellular antioxidant enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* in different generations[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(8): 38-41,47.]
- [10] 王郅媛,王友升,李丽萍.抗衰老研究新模型——酵母细胞活性氧化代谢研究进展[J].食品科学,2012,33(7):354-358. [WANG Z Y, WANG Y S, LI L P. A new model for anti-aging research—research progress of active oxygen metabolism in yeast cells[J]. Food Science, 2012, 33(7): 354-358.]
- [11] 张爱利.酿酒酵母衰老机制研究进展[J].生命科学,2009,21(2):303-306. [ZHANG A L. Research progress on senescence mechanism of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Life Science, 2009, 21(2): 303-306.]
- [12] 钟云. Candidatus liberibacter asiaticus 诱导的柑橘转录组学及蛋白组学研究[D].长沙:湖南农业大学,2012. [ZHANG Y. Transcriptomic and proteomic studies of Candidatus liberibacter asiaticus in citrus[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012.]
- [13] 于雪妮,冯小刚,张建民,等.人参化学成分与药理作用研究新进展[J].人参研究,2019,31(1):47-51. [YU X N, FENG X G, ZHANG J M, et al. New progress in research on chemical constituents and pharmacological effects of ginseng[J]. *Ginseng Research*, 2019, 31(1): 47-51.]
- [14] 向玥,陈艮波,姚辉,等.人参皂苷 Rg1 对 D-半乳糖所致衰老小鼠海马的保护机制[J].中草药,2017,48(18):3789-3795. [XIANG Y, CHEN L B, YAO H, et al. Protective mechanism of Ginsenoside Rg1 on hippocampus of aging mice induced by D-galactose[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2017, 48(18): 3789-3795.]
- [15] TANG Y L, ZHOU Y, WANG Y P, et al. Ginsenoside Rg1 protects against Sca-1+ HSC/HPC cell aging by regulating the SIRT1-FOXO3 and SIRT3-SOD2 signaling pathways in a γ -ray irradiation-induced aging mice model[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 20(2): 1245-1252.
- [16] WANG Z L, CHEN L B, QIU Z, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates testicular senescence changes in D-gal-induced aging mice via anti-inflammatory and antioxidative mechanisms[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6269-6276.
- [17] 乔巨慧,赵大庆,刘美辰,等.人参总皂苷对 D-半乳糖致 PC12 细胞衰老的改善作用及其机制研究[J].中国药房,2020,31(24):2993-2999. [QIAO J H, ZHAO D Q, LIU M C, et al. Effect of ginseng total saponins on the aging of PC12 cells induced by D-galactose[J]. *Pharmacy of China*, 2020, 31(24): 2993-2999.]
- [18] 李成鹏,张梦思,刘俊,等.人参皂苷 Rg1 延缓脑衰老机制研究[J].中国中药杂志,2014,39(22):4442-4447. [LI C P, ZHANG M S, LIU J, et al. Mechanism of ginsenoside Rg1 in delaying brain aging[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 39(22): 4442-4447.]
- [19] 彭彬,王朝丽,冯丽,等.人参皂苷 Rg1 调控神经干细胞衰老作用及机制探讨[J].中国细胞生物学学报,2011,33(10):1116-1122. [PENG B, WANG C L, FENG L, et al. Effects of ginsenoside Rg1 on neural stem cell senescence[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(10): 1116-1122.]
- [20] 柯世业,石光耀,刘定辉,等.人参皂苷 Rb1 通过 Sirt3/SOD2 通路延缓高糖诱导的人脐静脉内皮细胞衰老[J].中

- 山大学学报(医学版), 2019, 40(3): 329-336. [KE S Y, SHI G Y, LIU D H, et al. Ginsenoside Rb1 prevents senescence of human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose through Sirt3/SOD2 pathway[J]. Journal of Sun Yat-sen University(Medical Edition), 2019, 40(3): 329-336.]
- [21] 刘春红, 汤焱聪, 高瑜培, 等. 鹿茸乙醇提取物对秀丽隐杆线虫抗衰老的作用 [J/OL]. 食品工业科技: 1-8 [2021-04-20]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060027>. [LIU C H, TANG Y C, GAO Y P, et al. Antler antler ethanol extract on the anti-aging effect of *Caenorhabditis elegans*[J/OL]. Science and Technology of Food Industry : 1-8 [2021-04-20]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060027>.]
- [22] 时桂芹, 任菲, 谢冰宗, 等. 高糖胁迫对酿酒酵母抗氧化活性及代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 94-100. [SHI G Q, REN F, XIE B Z, et al. Effects of high sugar stress on antioxidant activity and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(20): 94-100.]
- [23] 袁方, 朴永哲, 刘巨涛, 等. 外源肌醇、柚皮苷及姜黄素对酿酒酵母抗衰老性能影响[J]. 酿酒科技, 2014, 4(7): 43-47. [YUAN F, PU Y Z, LIU J T, et al. Effects of exogenous inositol, naringin and curcumin on anti-aging performance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Brewing Technology, 2014, 4(7): 43-47.]
- [24] ISWARYA A, ANJUGAM M, SHANTHINI S, et al. Protective activity of beta-1, 3-glucan binding protein against AAPH induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 890-902.
- [25] 吴奇. 人参皂苷 Rg1 延缓神经干细胞衰老与调控 Nrf2/ARE 信号通路关系的研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020. [WU Q. Study on the relationship between ginsenoside Rg1 delaying neural stem cell senescence and regulating Nrf2/ARE signaling pathway[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020.]
- [26] 王敏, 廖林锋, 孙晓宇, 等. 延衰组合物对酵母细胞寿命及氧化应激的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(12): 1-7. [WANG M, LIAO L F, SUN X Y, et al. Studies on the longevity and oxidative stress of yeast cells by prolonging decay composition[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(12): 1-7.]
- [27] OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction[J]. *Anal Biochem*, 1979, 95(2): 351-358.
- [28] 石润霖. 不同营养物质对酵母生长及衰老的影响 [D]. 大连: 大连工业大学, 2015. [SHI R L. Effects of different nutrients on growth and senescence of yeast[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2015.]
- [29] 袁方. 酵母抗老化研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2014. [YUAN F. Study on anti-aging of yeast[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2014.]
- [30] MEDKOUR Y, MOHAMMAD K, ARLIA-CIOMMO A, et al. Mechanisms by which PE21, an extract from the white willow *Salix alba*, delays chronological aging in budding yeast[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(56): 5780-5816.
- [31] BATUBARA I, ASTUTI R I, PRASTYA M E, et al. The anti-aging effect of active fractions and ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid isolated from *Adenostemma lavenia*(L.) O. kuntze at the cellular level[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(8): 719.
- [32] HAMANACA R, CHANDEL N. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signalling and dictate biological outcome[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2010, 35: 505-513.
- [33] 王高坚, 王珍珍, 李嘉嘉, 等. 蓝莓酵素的体外抗氧化及对秀丽隐杆线虫的氧化应激保护作用 [J/OL]. 食品工业科技: 1-13 [2021-01-19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110157>. [WANG G J, WANG Z Z, LI J J, et al. Effects of blueberry enzyme on antioxidant activity and oxidative stress protection against *Caenorhabditis elegans*[J/OL]. Science and Technology in Food Industry : 1-13 [2021-01-19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110157>.]