

# 人参皂苷 Ro 延长秀丽隐杆线虫的寿命并增强 氧化应激抵抗力<sup>\*</sup>

刘瑾，周磊，宋祯彦，郑熙隆<sup>\*\*</sup>，成绍武<sup>\*\*</sup>

(湖南中医药大学中西医结合心脑疾病防治湖南省重点实验室 长沙 410208)

**摘要:**目的 以秀丽隐杆线虫(*(Caenorhabditis elegans, C. elegans)*,下文简称线虫)及其突变株为生物模型,研究人参皂苷 Ro(Ginsenoside-Ro, G-Ro)对健康寿命的影响及抗氧化作用。方法 实验设空白对照组、不同剂量 G-Ro(5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )药物组、阳性药物对照组(40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  二甲双胍),研究 G-Ro 对线虫寿命、脂褐素荧光的影响。另外,在上述基础上利用 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  百草枯(Paraquat, PQ)建立氧化损伤模型,探究 G-Ro 对线虫氧化应激状态下寿命及活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)的影响。利用绿色荧光蛋白标记的 DAF-16::GFP、SOD-3::GFP 线虫及突变株 *daf-16(mu86)* 分析 G-Ro 对 DAF-16 及 SOD-3 的调节作用。结果 与空白对照组相比,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro 延长了线虫寿命( $***P<0.001$ );在氧化应激模型中,延长线虫寿命( $*P<0.05$ );降低脂褐素荧光水平(11.70%)。20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro 降低线虫内源性 ROS(11.92%,  $*P<0.05$ ),降低氧化应激后升高的 ROS(79.67%,  $*P<0.001$ )。与空白对照组相比,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro 提高叉头转录因子(Fork head box O, FOXO)同系物 DAF-16 去磷酸化入核率(51.00%);增强 SOD-3 荧光强度(19.85%,  $***P<0.001$ )。在正常及氧化应激状态下,G-Ro 对突变体 *daf-16(mu86)* 寿命的影响均无统计学意义。结论 在正常及氧化应激状态下 G-Ro 延长线虫寿命的作用,可能与其上调 SOD-3,清除累积的 ROS 相关。DAF-16 的转录活性可能介导 G-Ro 效应。

**关键词:**人参皂苷 Ro 秀丽隐杆线虫 抗衰老 氧化应激 DAF-16 SOD-3

doi: 10.11842/wst.20210714009 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

衰老是一个由多种复杂的因素相互作用决定的生理过程,涉及细胞、组织和器官,最终导致广泛的功能衰退<sup>[1]</sup>。自由基学说认为,在机体衰老的过程中,氧化应激反应造成氧自由基 ROS 累积,破坏大分子(蛋白质、核酸和脂质),从而导致衰老<sup>[2]</sup>,并诱发衰老相关慢性疾病形成,如心血管疾病<sup>[3]</sup>、神经退行性疾病<sup>[4]</sup>和癌症<sup>[5]</sup>等。近年来衰老领域研究的蓬勃发展,大量数据证明衰老相关功能衰退可得到减轻,并且通过干预

措施可以延缓衰老相关疾病发生<sup>[6]</sup>。因此,探索改善衰老及衰老相关疾病中氧化损伤的有效药物,对于延缓衰老及相关疾病的治疗具有较高的临床应用价值。

线虫是衰老研究的理想模型,20世纪90年代首次发现胰岛素通路上游基因 *daf-2* 突变体及 *age-1* 突变体线虫的寿命达到野生线虫的两倍<sup>[7-8]</sup>,且大多数长寿的线虫突变体表现出对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、胡桃醌(Juglone)或 PQ 诱导的氧化应激的抗性增加<sup>[9]</sup>。这些

收稿日期:2021-07-14

修回日期:2022-01-14

\* 国家自然科学基金委员会面上项目(82074046);P53/TUG1 通路调控小胶质细胞糖代谢重编程的机制及阿司匹林姜黄素酯的靶向抗炎作用研究,负责人:成绍武;湖南省科学技术厅湖南创新型省份建设专项(2019RS1064);2019年湖湘高层次人才聚集工程-创新人才,负责人:成绍武;湖南省教育厅科研项目(19K06);乙酰水杨酸姜黄素酯通过 NF<sub>K</sub>B-NLRP3/STAT6-PPAR $\gamma$  调控小胶质细胞表型极化的机制研究,负责人:成绍武。

\*\* 通讯作者:成绍武,本刊编委,教授,医学博士,博士生导师,主要研究方向:神经生物学与中药抗衰老研究;郑熙隆,教授,医学博士,博士生导师,主要研究方向:中西医结合防治心血管疾病及机制研究。

长寿突变体还表达高水平的抗氧化应激相关蛋白，并且通过刺激这些相关蛋白的表达可以提高野生线虫抗氧化应激能力从而延长寿命<sup>[10]</sup>。然而，增强抗氧化应激能力与延长寿命的机制尚不清楚。

人参为五加科草本植物人参的根，在成书于公元200年左右的《神农本草经》中有相关记载，并有“欲轻身益气不老延年”的阐述<sup>[11]</sup>。几千年来，人参一直被用于恢复身体活力、缓解精神和身体压力、抗疲劳和延缓衰老<sup>[12]</sup>。人参皂苷是产生多种药理作用的主要生物活性成分，结构确定的皂苷成分有40余种，可分为原人参二醇(Protopanaxadiol, PPD)、原人参三醇(Protopanaxatriol, PPT)和齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)三类<sup>[13]</sup>。据文献报道，人参总皂苷(Total ginsenoside, TGS)对神经系统疾病、心血管系统疾病、代谢性疾病及癌症等疾病引起的损伤的改善作用<sup>[13]</sup>，可能源于刺激自噬、抗细胞凋亡及抗氧化应激等<sup>[14]</sup>。以往研究结果表明，TGS通过激活抗氧化调节和长寿的信号通路延长了线虫的平均寿命，增强抗氧化应激<sup>[15]</sup>。G-Ro具有潜在的皮肤抗光老化特性，可抵抗成纤维细胞中的紫外线辐射<sup>[16]</sup>。G-Ro是人参中含量丰富的OA型人参皂苷，在体内通过多种途径代谢为OA，具有抗补体、抗炎的活性<sup>[17-18]</sup>。另外，OA作为Ro的苷元，已被证明具有抗炎、抗癌和抗氧化特性<sup>[19]</sup>。OA可以降低由直径小于10 μm的颗粒物(Particulate matter, PM)诱导升高的肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)及自噬体，从而保护皮肤免受由PM<sub>10</sub>引起的皮肤炎症和皮肤老化<sup>[20]</sup>。此外，OA通过调节DAF-16的活性，增强线虫抗逆性并降低了其细胞内ROS水平，从而起到延长线虫寿命的作用<sup>[21]</sup>。虽然有文献表明OA具有很好的抗衰老活性，但G-Ro抗衰老作用及抗氧化损伤效应尚未见报道。那么G-Ro是否也具有抗衰老效应及抗氧化作用？为了解决这些问题，我们对G-Ro是否能延长线虫寿命展开研究。本研究利用模式生物线虫，通过对寿命、脂褐素、氧化应激反应、体内ROS等方面进行研究以及利用绿色荧光标记线虫荧光检测和突变体线虫寿命的分析，探究G-Ro的抗衰老作用及机制。结果表明，G-Ro具有较强的抗衰老作用和抗氧化能力。本研究对后续药物结构改造及开发提供了研究基础，对延长寿命和提高健康水平具有重要的实际意义。

## 1 材料

### 1.1 实验药物及试剂

人参皂苷Ro(B21086)，上海源叶生物科技有限公司；磷酸二氢钾(7778-77-0)、磷酸氢二钾(7785-11-4)、蛋白胨(P8450)，北京索莱宝科技有限公司；氯化钙(10005861)、无水硫酸镁(20025118)、氯化钠(10019318)，国药集团化学试剂有限公司；琼脂(DH010-1)，北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；胆固醇(57-88-5)，德国RUIBIO公司；无水乙醇(20205315)，吉林钟药师药业有限公司；百草枯(M106760)，上海阿拉丁公司；活性氧(ROS)检测试剂盒、总超氧化物歧化酶活性检测试剂盒，碧云天生物工程有限公司。

### 1.2 线虫虫株

所用秀丽线虫分为三大类：野生型秀丽线虫，突变体秀丽线虫以及用绿色荧光标记的转基因秀丽线虫，所用品系如下：N2(wild-type), TJ356(zIs356[daf-16p::daf-16a/b::GFP+rol-6]), CF1553(muIs84[pAD76(sod-3::GFP)]), CF1038[daf-16(mu86) I.]及埃希氏大肠杆菌OP50(Escherichia. Coli)，均由湖南大学生物学院涂海军教授惠赠。

### 1.3 实验仪器

PH-240A电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)；LRH-250A生化培养箱(广东泰宏君科学仪器股份有限公司)；化学发光凝胶成像仪(美国BIO-RAD公司)；小型台式离心机(美国Thermo Fisher公司)；倒置荧光显微镜(德国ZEISS公司)；多功能酶标仪(美国Bio Tek公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 线虫的培养及同期化

线虫培养基NGM(Nematode growth media, NGM)制备：在2 L试剂瓶中混合3 g氯化钠，17 g琼脂和2.5 g蛋白胨，定容1 L，121℃高压灭菌1 h。随后放入55℃烘箱15分钟。(在超净台上进行以下步骤)加入1 ml 1 mol·L<sup>-1</sup>氯化钙、1 ml 1 mol·L<sup>-1</sup>硫酸镁、25 ml 1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸钾缓冲液和1 ml 5 mg/ml乙醇胆固醇，摇匀。使用分液泵(分液泵乳胶管提前灭菌烘干)将NGM溶液分配到培养皿中，室温静置2天，检查有无污染，随后储存在密闭盒中可以使用数周<sup>[21]</sup>。

NGM培养基接菌：在超净台中，将大肠杆菌OP50

液体培养液平铺在NGM培养基上,留出空白边缘。置于37°C生长3 h后储存在密封的容器中可以保持2-3周<sup>[21]</sup>。

**线虫同期化:**将L4期野生型N2线虫,移至含有大肠杆菌OP50的NGM培养基上,置于20°C培养箱,培养2-3天,观察其产卵情况。开始产卵4 h后,将成虫挑去,卵生长至L4期成虫,该批成虫即为同期化成虫。收集同期化线虫,随机分组<sup>[21]</sup>。

## 2.2 线虫生存曲线

将同期化的L4期野生型N2,daf-16(mu86)线虫,分别转移到含有3种不同浓度药物(5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup>)药物组、阳性药物对照组(40 μmol·L<sup>-1</sup>二甲双胍(Metformin, MET))及空白组(不添加药物)的含菌培养皿中,每组50只,3个平行组,每天将线虫转至新的含药培养基上,并记录存活和死亡条数,持续到最后一条线虫死亡<sup>[22]</sup>。线虫死亡判断:以铂丝轻碰触秀丽线虫后10 s无反应;线虫剔除判断:意外死亡、逃逸(爬壁干燥死亡)、囊袋虫、内部孵育。

## 2.3 线虫抗氧化应激生存曲线

将同期化L4期野生型N2,daf-16(mu86)突变线虫,分别转移到含有3种不同浓度药物(5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup>)药物组、阳性药物对照组(40 μmol·L<sup>-1</sup> MET)及空白组(不添加药物)的含菌培养皿中,每组50只,3个平行组。处理3天后,将药物组、1组空白组及阳性对照组转至含有10 mmol·L<sup>-1</sup> PQ的培养基,每12 h记录线虫存活数量及死亡数量,直至最后一条线虫死亡<sup>[23]</sup>。死亡标准同2.2。

## 2.4 脂褐素含量测定

将同期化L4时期野生型N2线虫,分别转移到药物组(20 μmol·L<sup>-1</sup> G-Ro)、阳性药物对照组(40 μmol·L<sup>-1</sup> MET)及空白对照组(不添加药物)的含菌培养皿中,每组20只。处理7天后,将线虫挑至含5%琼脂糖凝胶的载玻片,用10 μL浓度为10 mmol·L<sup>-1</sup>的左旋咪唑溶液麻醉后,压片。在倒置荧光显微镜下进行观察,运用Image-Pro Plus软件,对荧光强度进行定量分析<sup>[24]</sup>。

## 2.5 DCF法活性氧检测线虫内源性ROS

将同期化L4时期野生型N2线虫,转移到空白组、药物组(20 μmol·L<sup>-1</sup> G-Ro)各2组,阳性药物对照组1组,每组30只。处理7天后将1组空白组、药物组(20 μmol·L<sup>-1</sup> G-Ro)及阳性对照组转至含有10 mmol·L<sup>-1</sup>百草枯的培养基培养,其余组不变,处理12 h之后,用

M9缓冲液收集各组线虫并清洗后,放入有200uL PBS缓冲液中ep管中,随后在冰上超声破碎后,使用4°C 12000 r·min<sup>-1</sup>离心,取上清,移入黑色96孔板中每个孔中(每组平行3孔每孔加50 μL上清液),再加入50 μL提前稀释好的100 μmol·L<sup>-1</sup> H2DCF-DA荧光探针(终浓度50 μmol·L<sup>-1</sup>),实验设置不加线虫和DCFH-DA溶液的为空白组,只加线虫不加DCFH-DA溶液的为对照物,将加完样的96孔黑板置于荧光酶标仪中立即检测,室温孵育30 min,酶标仪检测荧光,每10 min读1次数,读120 min,激发光为485 nm,发射光为528 nm,测定DCF的荧光强度,从而确定ROS的浓度<sup>[22]</sup>。

## 2.6 SOD-3::GFP表达检测

将同期化L4时期SOD-3::GFP线虫,分别转移到药物组(20 μmol·L<sup>-1</sup> G-Ro)、阳性药物对照组(40 μmol·L<sup>-1</sup> MET)及空白对照组(不添加药物)的含菌培养皿中,每组15只。处理3天后,将线虫挑至含5%琼脂糖凝胶的载玻片,使用10 μL浓度为10 mmol·L<sup>-1</sup>的左旋咪唑溶液麻醉后,压片。在倒置荧光显微镜下进行观察,使用Image-Pro Plus软件处理图像,对荧光强度进行定量分析<sup>[24]</sup>。

## 2.7 DAF-16核定位检测

将同期化L4时期DAF-16::GFP线虫,分别转移到药物组(20 μmol·L<sup>-1</sup> G-Ro)、阳性药物对照组(40 μmol·L<sup>-1</sup> MET)及空白对照组(不添加药物)的含菌培养皿中,每组20只。处理3天后,将线虫挑至含5%琼脂糖凝胶的载玻片,使用10 μL浓度为10 mmol·L<sup>-1</sup>的左旋咪唑溶液麻醉后,压片。在倒置荧光显微镜下进行观察,使用Image-Pro Plus软件处理图像。DAF-16进入到细胞核中,荧光聚集成点状,若荧光弥散则表示DAF-16蛋白还存在于细胞质中<sup>[25]</sup>。

## 2.8 数据统计分析

所有实验重复3次,实验结果采用Prism GraphPad7统计软件分析,生存曲线实验结果采用Log-Rank检验进行分析,\*P<0.05为差异有统计学意义。其余实验采用方差分析进行两组间比较,\*P<0.05为差异有统计学意义。整体实验流程图见图1。

## 3 结果与分析

### 3.1 G-Ro在正常状态和氧化应激状态下对线虫寿命的影响

生存分析是衡量线虫衰老最直接的指标。G-Ro

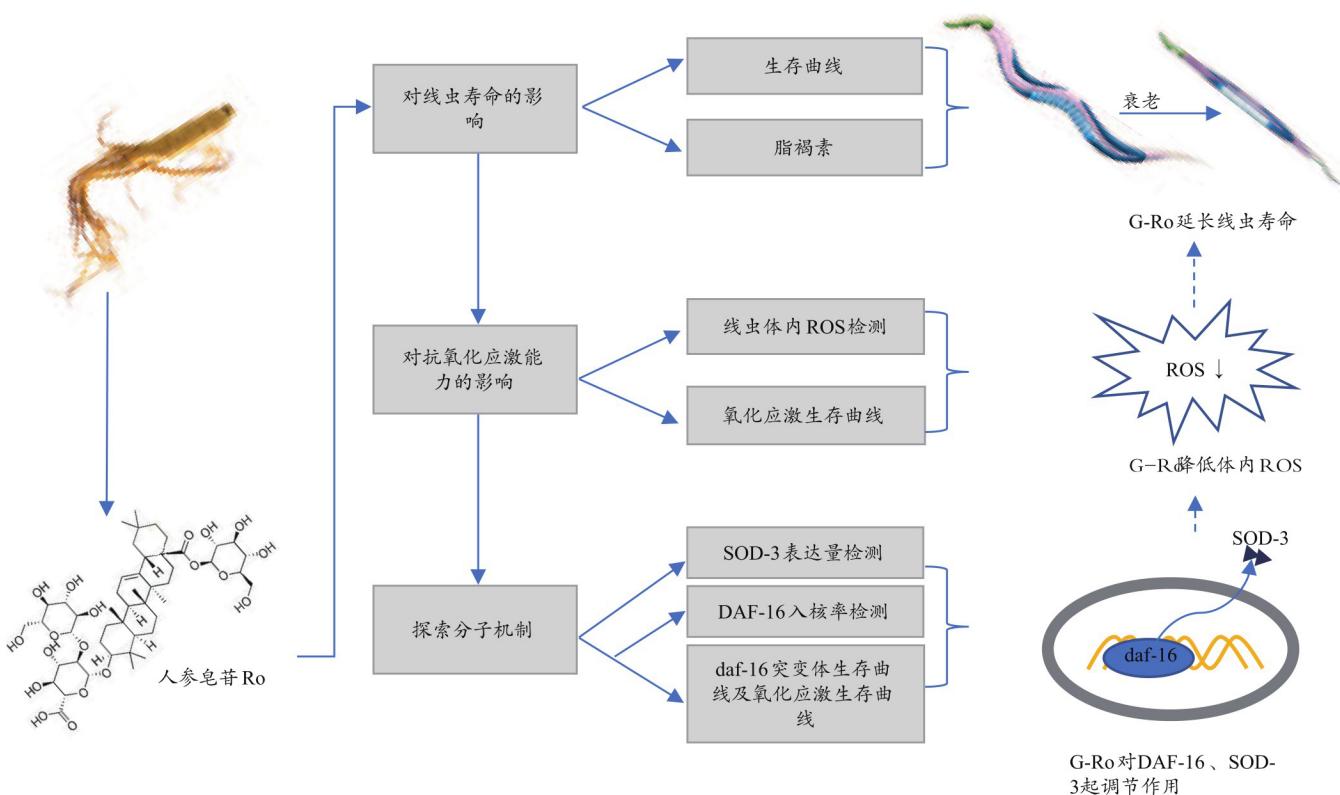


图1 以线虫为模型探讨G-Ro抗衰老效应的实验流程图

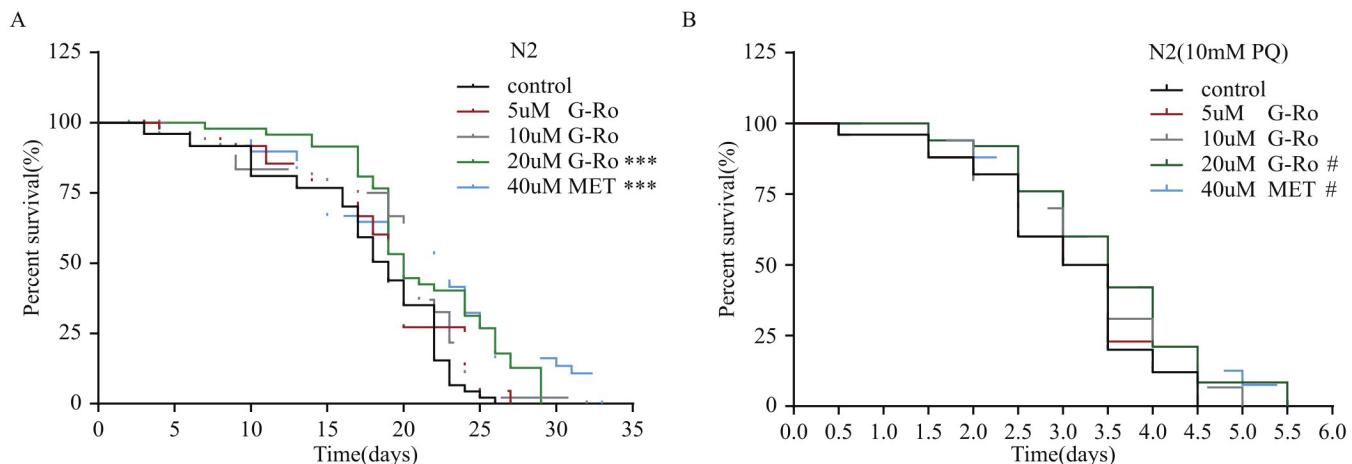


图2 G-Ro对线虫寿命的影响

注:A:野生型线虫生存曲线图,与空白对照组相比,\*\*\*P<0.001,n=50;B:野生型线虫氧化应激条件下生存曲线图,与空白对照组相比,#P<0.05,n=50。

对线虫寿命的影响实验结果(图2A)显示,与空白对照组比,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro,未延长线虫寿命, $P>0.05$ ,无统计学意义;10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro延长了线虫中位生存期,从19.00天延长到21.00天, $P>0.05$ ,无统计学意义;20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro延长了线虫中位生存期,从19.00天延长到20.00天,\*\*\* $P<0.001$ ;MET延长了线虫

中位生存期,从19.00天延长到23.00天,\*\*\* $P<0.001$ ;数据表明,3个浓度G-Ro组、阳性药物组与空白对照组相比,G-Ro使线虫寿命曲线右移,说明G-Ro具有延长成年线虫寿命的效应,对线虫老年期的寿命延长尤为明显。为了确认G-Ro是否可以增加线虫的抗氧化损伤,采用10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PQ诱导的氧化应激探究了

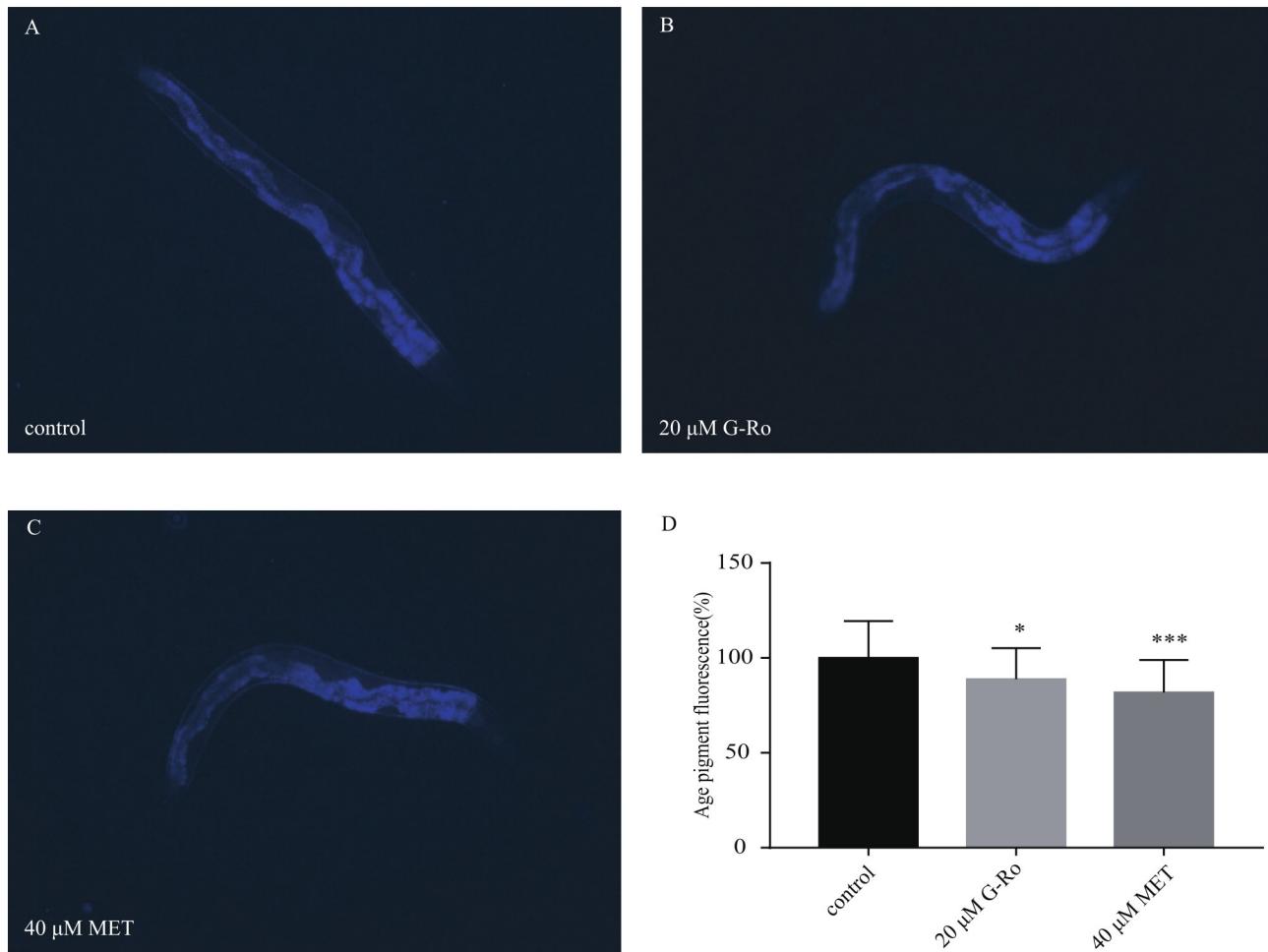


图3 G-Ro对线虫脂褐素的影响

注:A、B、C:野生型线虫脂褐质荧光代表图像;D:脂褐素荧光定量数据分析图,与空白对照组对比,\*P<0.05,\*\*\*P<0.001,n=20。

Ro对线虫压力胁迫条件下生存率的影响。结果如图2B显示,与空白对照组比, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro延长了线虫中位生存期,从6.50天延长到7.00天, $P>0.05$ ,无统计学意义; $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro, $p>0.05$ ,无统计学意义; $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro延长了线虫中位生存期,从6.50天延长到7.00天, $\#P<0.05$ ;MET延长了线虫中位生存期,从6.50天延长到7.00天, $\#P<0.05$ ;数据表明,G-Ro能延长线虫在氧化应激状态下的寿命,具有抗氧化应激能力。

### 3.2 G-Ro对线虫体内脂褐素的影响

衰老伴随着大分子以及细胞器的损伤和有害物质的累积。细胞内出现脂褐素聚集,是细胞开始衰老的特征,标志着细胞内清除系统功能障碍,这些变化具有普遍的特征。脂褐素是溶酶体降解后剩余的物质,具有自发荧光特性,被广泛认可的衰老标志物<sup>[23-24]</sup>。在线虫中,脂褐素由肠道颗粒的邻氨基苯甲

酸酯所致,又称为“肠道颗粒”可以通过荧光显微镜检测其自发荧光强度<sup>[27]</sup>。由图3D可知,与空白组对照组相比, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro药物组的线虫体内脂褐素荧光强度降低( $11.17\%$ ,  $*P<0.05$ )。数据表明,G-Ro缓解了线虫与年龄相关的身体衰退的特征,这表明蠕虫的健康状况有所改善。

### 3.3 G-Ro对线虫体内ROS的影响

随着蠕虫年龄的增长,对外部刺激的抵抗力急剧下降,细胞内ROS累积。当刺激由氧化剂产生时,不断增加的ROS可能是衰老过程的原因。为了探究G-Ro增强线虫抗氧化应激能力的原因,本研究选择 $2',7'$ -二氯二氢荧光素二乙酸酯(H2DCF-DA)检测了G-Ro对线虫内源性ROS水平的影响。结果如图4所示, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro处理7天后,线虫体内ROS的水平与空白对照组相比显著降低( $11.92\%$ ,  $*P<0.05$ ),表明 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro能降低了线虫内源性ROS水平。同

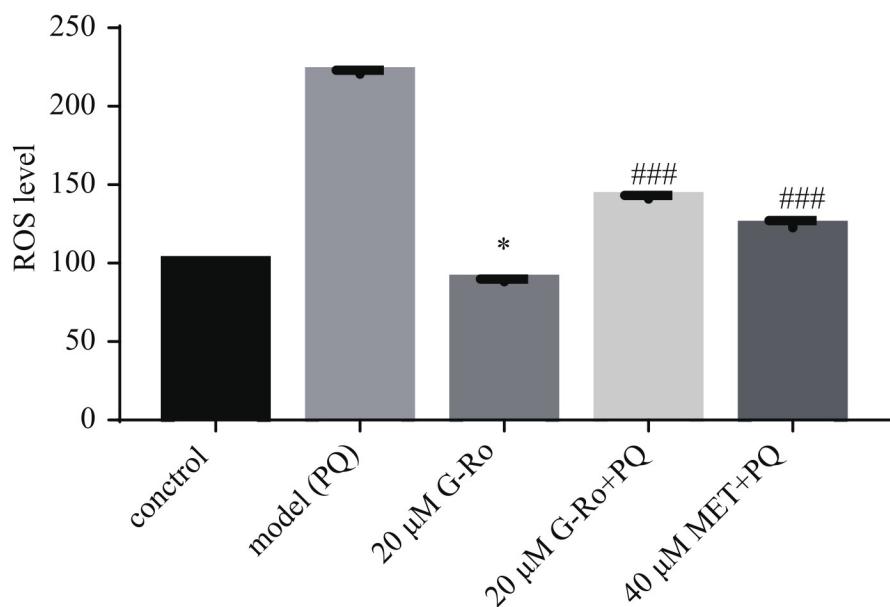


图4 G-Ro对线虫ROS水平的影响

注:与空白对照组(control)相比,\* $P<0.05$ ;与模型组(model)相比,### $P<0.001$ , $n=30$ 。

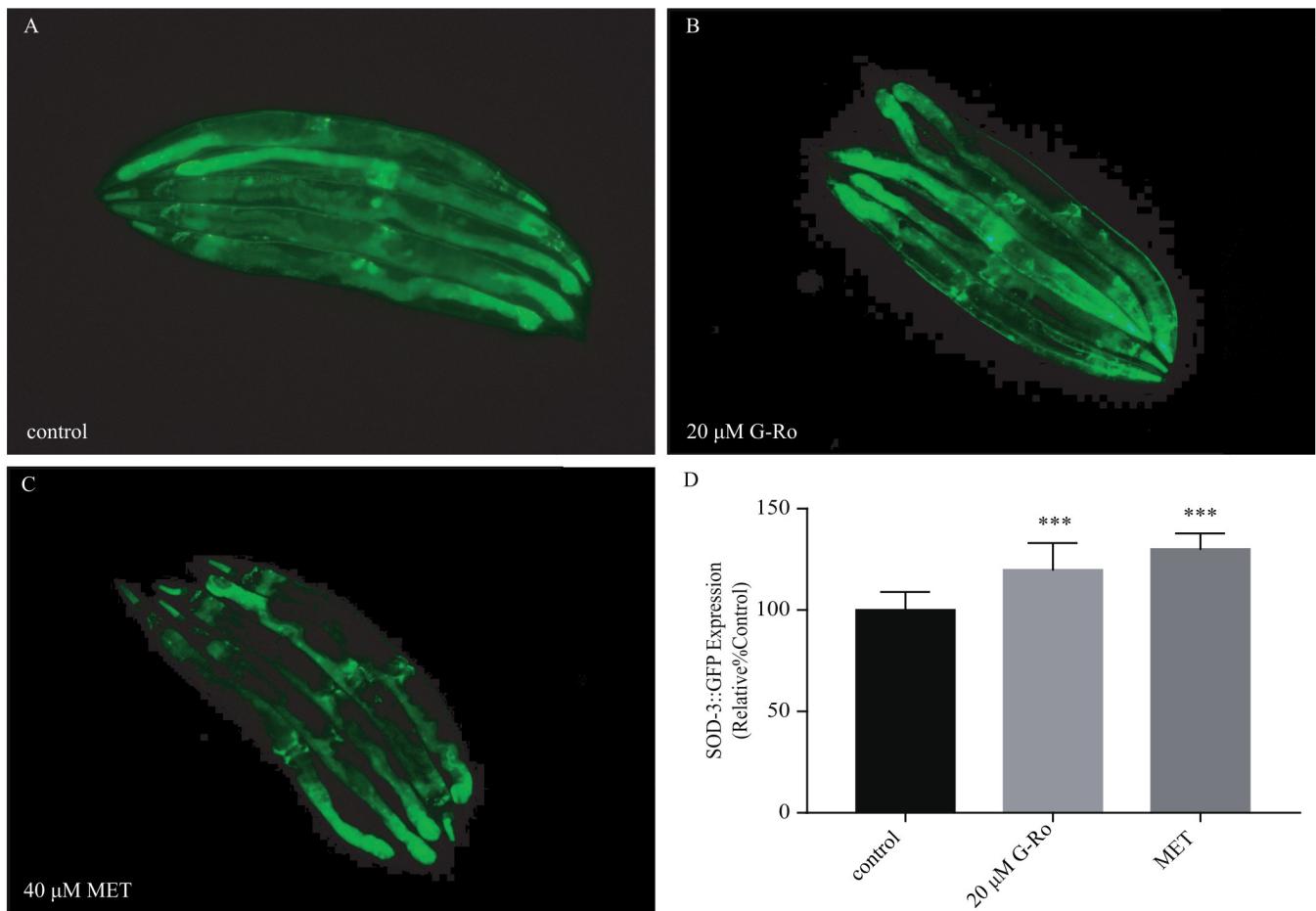


图5 G-Ro对线虫SOD-3荧光表达的影响

注:A、B、C:SOD-3::GFP的转基因菌株CF1553线虫荧光代表图像;D:SOD-3荧光表达半定量数据分析图,与空白对照组对比,\*\*\* $P<0.001$ , $n=15$ 。

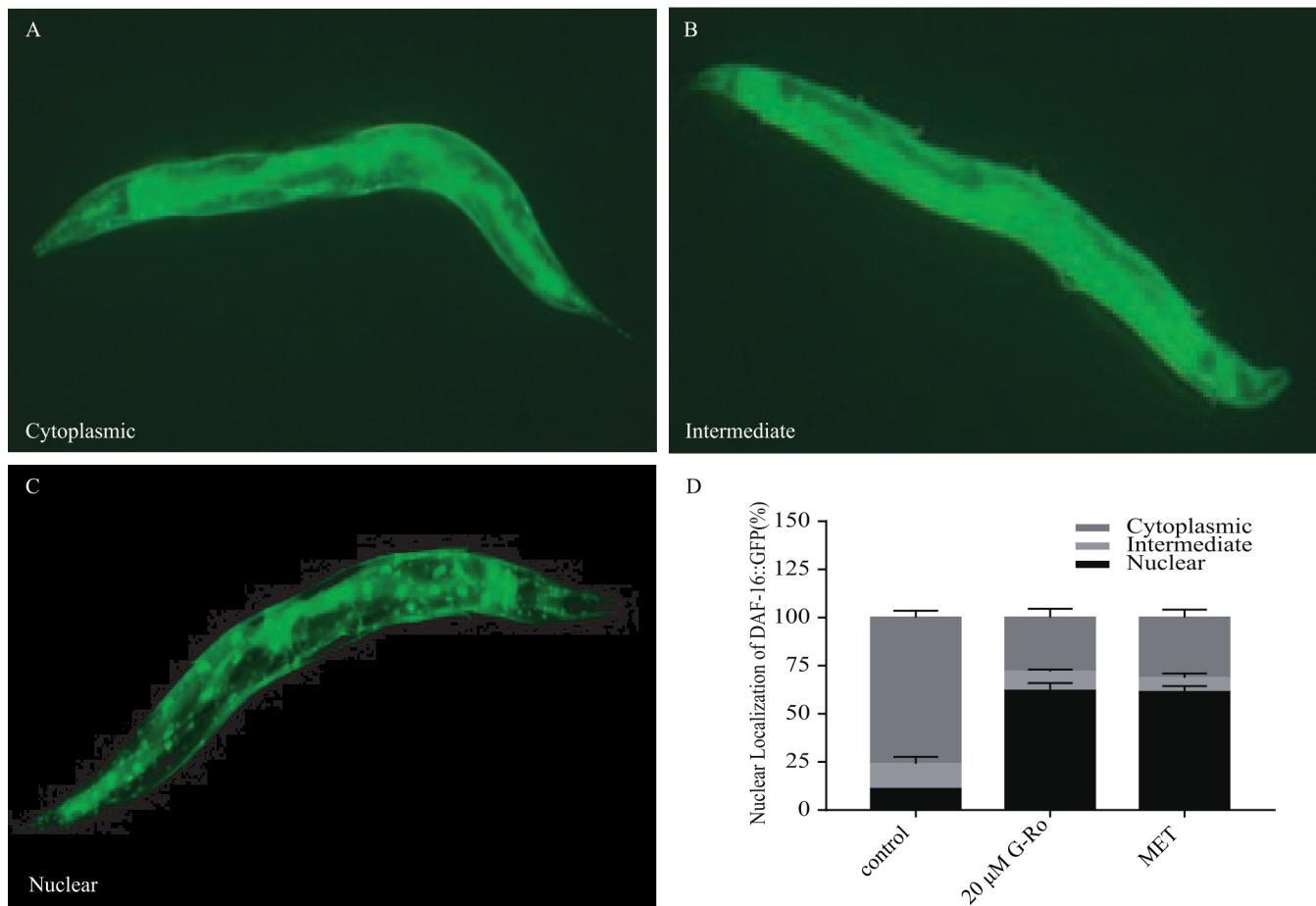


图6 G-Ro对线虫FO XO/DAF-16转录因子的影响

注: A、B、C: DAF-16::GFP 线虫荧光定位代表图像; D: DAF-16::GFP 线虫荧光定量数据分析图, n=20。

样给与  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro 处理 7 天, 再给与  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PQ 诱导的氧化应激处理后, 线虫体内 ROS 水平升高, 而与模型组相比  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro 处理的线虫体内 ROS 显着降低 ( $79.67\%, ***P < 0.001$ )。本次实验表明, G-Ro 不仅能减少线虫内源性 ROS 的产生, 而且能减少氧化应激状态下 ROS 的产生。而较低的 ROS 水平可能与其延长健康寿命及增强抗氧化应激能力相关。

#### 3.4 G-Ro 对线虫 SOD-3 表达的影响。

抗氧化防御系统维持氧化还原平衡, 清除体内累积的 ROS。线虫体内 SOD-3 是 DAF-16 的转录靶点之一, 编码线粒体内清除自由基的超氧化物歧化酶 Mn-SOD<sup>[25]</sup>。因此, 我们利用含有 SOD-3::GFP 的转基因菌株 CF1553 来确定 G-Ro 是否调控 SOD-3 的表达。实验结果如图 5D 所示,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro 处理诱导的荧光强度比对照增加了 ( $19.85\%, ***P < 0.001$ )。这些结果表明, 其上调 SOD-3 表达, 提高了线虫体内抗氧

化酶的水平, 这可能是诱导 ROS 减少的原因之一。

#### 3.5 G-Ro 对线虫FO XO/DAF-16转录因子的调节作用

DAF-16 是叉头转录因子 FOXO 同系物, FOXO 蛋白家族参与氧化应激调控, DNA 修复, 寿命调节等。DAF-16 作为线虫体内多种信号通路的中心调节因子, 调控线虫长寿、发育、抗逆性和繁殖<sup>[26-28]</sup>。为了探究 G-Ro 是否可以调控转录因子 DAF-16, 首先验证了 G-Ro 是否可以激活 DAF-16, 引起 DAF-16 核定位, 选用 DAF16::GFP 线虫, 给药 72 h 后, 在荧光显微镜观察 DAF-16 荧光定位。在荧光显微镜下观察到线虫体内多个点状聚集, 说明 DAF-16 去磷酸化后从细胞质进入到细胞核中聚集, 聚集点越多说明 DAF-16 核转入情况越多。如图 6D 所示, 与对照组相比  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro 使 DAF-16 核转入增加 51.00%。实验结果表明, G-Ro 对线虫体内转录因子 DAF-16 具有调节作用, 能够促使 DAF-16 入核, 这可能与其延长线虫寿命相关。

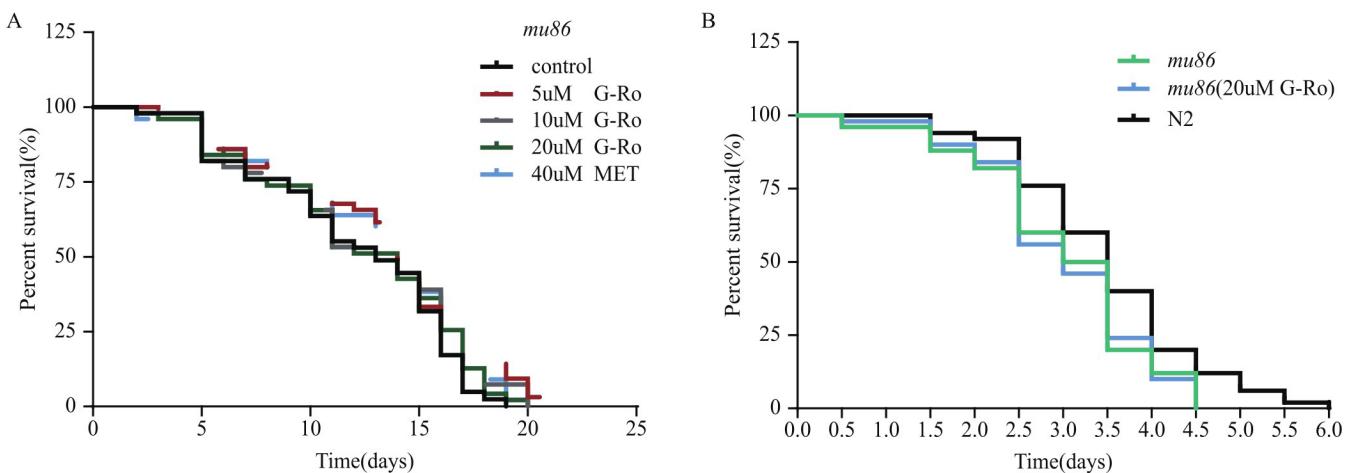


图7 G-Ro对Daf-16(mu86)突变线虫寿命的影响

注:A:Daf-16(mu86)突变线虫生存曲线图,n=50。B:Daf-16(mu86)突变线虫氧化应激生存曲线图,n=50。

### 3.6 G-Ro对突变体 daf-16(mu86)寿命的影响

基于之前的G-Ro能够促使DAF-16促进转录因子转录实验结果,进一步探索G-Ro是否通过调节DAF-16通路延长线虫寿命。的实验结果显示,G-Ro处理的突变体 daf-16(mu86)线虫的寿命曲线与对照相似,无统计学意义(图7A)。本次实验表明DAF-16转录因子可能是G-Ro诱导的寿命延长的关键因子之一。另外,在之前的实验结果分析中观察到了G-Ro能提高线虫抗氧化应激能力。为了阐明DAF-16可能与G-Ro提高线虫抗氧化应激的能力有关,使用突变株 daf-16(mu86)进行急性氧化应激状态下寿命分析。在 10 mmol·L<sup>-1</sup> PQ 的急性氧化损伤的状态下,20 μmol·L<sup>-1</sup> G-Ro 未能起到延长应激状态下 daf-16(mu86)突变体的寿命(图7B)。突变体 daf-16(mu86)逆转了G-Ro带来的长寿效应,这也证实了 daf-16 基因与G-Ro介导的寿命延长效应相关。另外,在氧化应激状态下,daf-16(mu86)突变体也逆转了G-Ro带来的长寿效应,这说明其抗氧化应激能力可能与 daf-16 基因功能相关。

## 4 讨论

衰老是必然的,但寻找延缓衰老的药物是有可能的。《素问·上古天真论》云:“五七,阳明脉衰,面始焦,发始堕”,是指衰老是从“阳明脉衰”开始的,阳明脉衰,也就是脾胃的虚衰<sup>[29]</sup>。老年疾病中脾虚占较大比例,因此,“健脾”在衰老的治疗中显得尤为重要。人参性微寒,入脾、肺、心经,具有大补元气、补虚、抗衰

老等作用,是治疗衰老相关疾病的常用药物<sup>[14,30]</sup>。人参皂苷作为人参中主要活性物质已经广泛应用于衰老相关疾病的基础研究及临床治疗,其中 OA型人参皂苷单体 G-Ro 对衰老相关疾病有确切疗效,如预防血栓形成<sup>[31]</sup>,抗肿瘤活性等<sup>[16]</sup>。但其延缓衰老的基础研究较少,对抗衰老及治疗衰老相关疾病过程的影响机制尚待阐明。MET 是治疗 2 型糖尿病的一线用药,服用 MET 可延长糖尿病患者寿命。此外,MET 还能降低心血管疾病、癌症、代谢综合征和认知障碍的发病率。因此 MET 对人类衰老与年龄相关疾病的保护作用展开了大量的研究,并且有实验证明 MET 能延长小鼠及线虫等动物的健康寿命<sup>[32]</sup>。线虫在衰老研究领域具有多种优势,其生存曲线是药物抗衰老能力评估的金标准<sup>[33]</sup>。本研究以线虫为实验对象,以 MET 为阳性药物对照,探究了 G-Ro 的抗衰老效应。本次实验绘制了不同浓度 G-Ro 及 MET 饲喂的野生线虫的生存曲线,结果表明 G-Ro 与 MET 的作用相似,不仅延长自然状态下野生线虫的最大寿命,而且延长了线虫的平均寿命。这说明 G-Ro 能有效延长线虫寿命,并且能使该种群中的大部分获益。衰老是多因素参与的极其复杂的生理过程,为进一步评价 G-Ro 的抗衰老效应,选用脂褐素荧光检测作为衰老的相关参数。线虫体内包含多种自发荧光物质,脂褐素是其中一种。脂褐素的积累与寿命成反比,其荧光强度被认为是衰老的指标之一。本实验通过 DAPI 通道检测线虫体内的自发荧光强弱,来研究 G-Ro 对线虫体内脂褐素的影响。实验结果表明用 G-Ro 处理 7 天的线虫体内脂褐素累

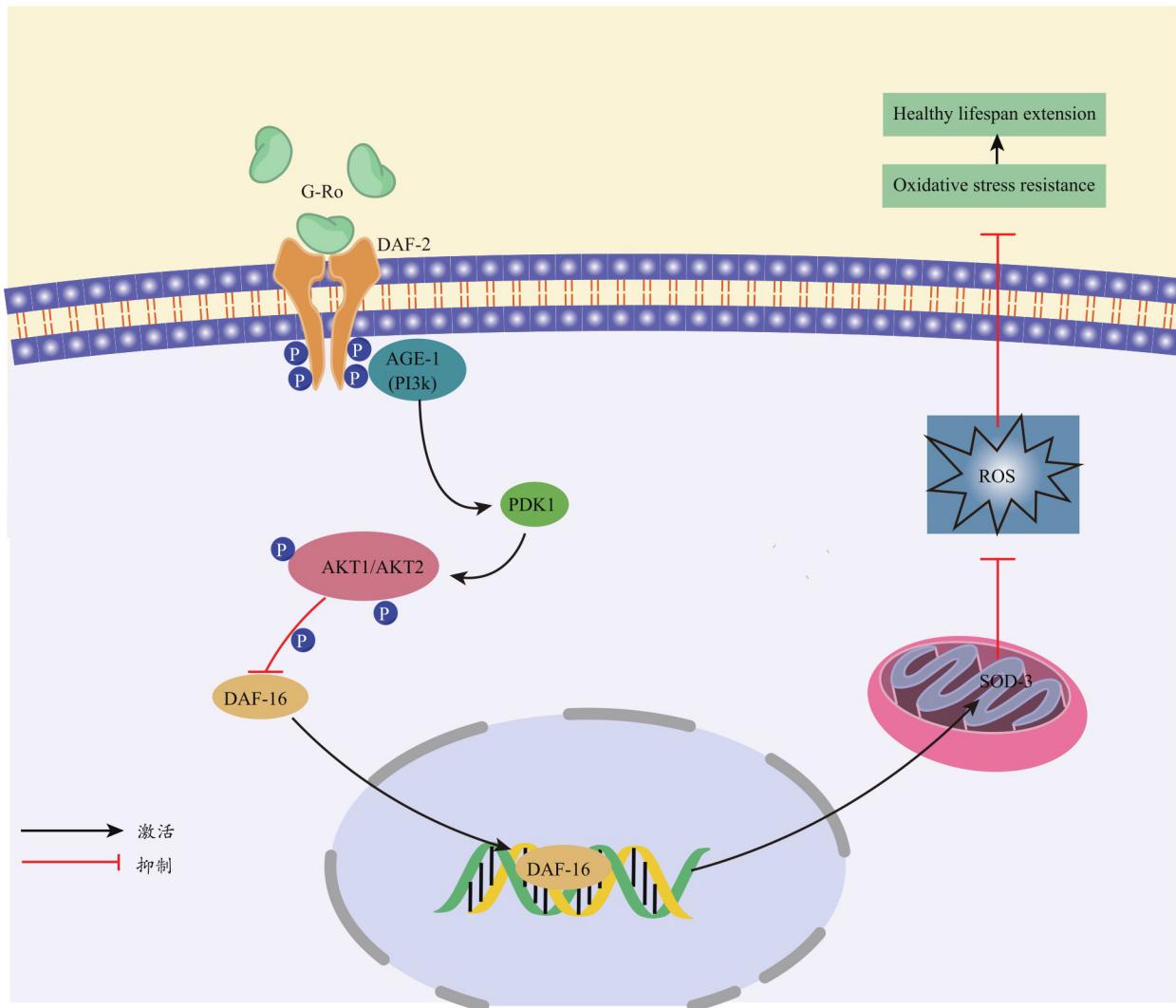


图8 G-Ro通过调节DAF-16诱导线虫长寿的分子机制示意图

积比野生线虫的体内脂褐素累积明显减少。实验结果说明G-Ro不只是延长线虫寿命,更进一步的改善了健康参数。

目前衰老假说有很多种,其中氧化应激假说认为机体在遭受有害刺激时,体内活性氧ROS产生过多,超出了机体的清除速度,氧化系统和抗氧化系统失衡,引起氧化损伤。衰老过程中机体抗氧化酶的减少导致清除ROS的能力减弱,氧化损伤随着机体的衰老而逐渐累积,破坏大分子,造成细胞、组织功能老化或丧失,甚至发生癌变<sup>[32]</sup>。近年来,越来越多的研究利用线虫来探索中草药的抗氧化活性,如姜黄素、槲皮素、马齿苋等,这些中草药对PQ引起的虫体内活性氧水平升高均有抑制作用<sup>[34]</sup>。前期有报道证明,TGS明显改善了与年龄相关的活动能力,脂褐素积累,并增强

了氧化应激下的抵抗力<sup>[21]</sup>。本实验利用PQ建立氧化损伤模型,用10 mmol·L<sup>-1</sup>百草枯处理会产生大量的活性氧ROS,ROS的过度积累通常会导致线粒体功能障碍,加速衰老的过程,因此被广泛用作线粒体呼吸链的应激源<sup>[35]</sup>。为探究TGS中含量丰富的G-Ro单体是否能抗氧化应激,本实验绘制了给药G-Ro的线虫在氧化应激状态下的生存曲线。结果表明,在氧化损伤状态下,G-Ro延长的线虫的平均寿命及中位生存期,表明G-Ro增强了线虫的氧化应激耐受能力。但是氧化应激抵抗力增加并不一定能延长寿命。从生理的角度看,ROS能抵抗外界刺激,被认为有助于抗衰老。但是,随着机体衰老导致自身抗氧化的能力下降,不能清除蓄积过多的ROS,氧化与抗氧能力的失衡,形成恶性循环,进而导致细胞、组织及器官的结构和功

能逐渐丧失<sup>[2]</sup>。本实验检测了线虫内源性 ROS 含量及在 PQ 诱导的氧化应激状态下体内 ROS 水平的变化。实验结果表明 G-Ro 处理 7 天后,降低了内源性 ROS 水平及 PQ 诱导的线虫内升高的 ROS 水平。实验表明,G-Ro 不仅能减少线虫内源性 ROS 的产生,而且具有与 MET 相似的减少氧化应激状态下 ROS 的产生的作用。而较低的 ROS 水平可能与其延长健康寿命及增强抗氧化应激能力相关。

ROS 的清除主要依赖于抗氧化酶,其中最重要的是超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)。线虫体内 SOD-3 是 DAF-16 的转录靶点之一,编码线粒体内清除自由基的超氧化物歧化酶 Mn-SOD<sup>[25]</sup>。DAF-16 在胰岛素信号通路(Insulin receptor signaling pathway, IIS)下游发挥作用,调节 dauer 形成、寿命、脂肪代谢、应激反应和先天免疫<sup>[28]</sup>。IIS 途径具有调节衰老的效应,并且是多物种保守的,包括斑马鱼、果蝇、线虫、小鼠,甚至人类<sup>[36]</sup>。在野生线虫中,IIS 途径(如图 8)由胰岛素样配体结合胰岛素样生长因子 1(Insulin like growth factor-1, IGF-1)跨膜受体(Insulin/IGF-1 transmembrane receptor, IGFR)同源 DAF-2 启动。DAF-2 激活后诱导磷酸肌醇 3-激酶(Phosphoinositide 3-kinase, PI3K)同源 AGE-1 激活和招募,进而激活丝氨酸/苏氨酸激酶 PDK-1、AKT-1 和 AKT-2,使 DAF-16 磷酸化,停留在细胞质中不能入核,无法发挥转录活性;当线虫受到外界压力时,DAF-16 蛋白去磷酸化后,进入细胞核并在细胞核中积累,调节下游靶基因,如 SOD<sup>[28]</sup>。我们利用含有 SOD-3::GFP 的转基因菌株来确定 G-Ro 是否调控 SOD-3 的表达。实验数据显示,G-Ro 处理上调了 SOD-3 的表达,提高了线虫体内抗氧化酶的水平,这可能是诱导 ROS 减少的原因之一。据文献报道,大量中草药如当归、何首乌、黄芪甲苷和枸杞多糖等,通过调节 DAF-16 活性延长线虫的平均寿命并减少 ROS 累积,增强了氧化应激抵抗力<sup>[34]</sup>。SOD-3 的表达可被 DAF-16 调控<sup>[25]</sup>,DAF-16 在衰老氧化应激调节中起核心作用,本研究利用 DAF-16::GFP 荧光蛋白标记线虫,给予 G-Ro 处理后,在荧光显微镜下检测线虫肠内细胞质中进入细胞核的比例显著增加。但是 G-Ro 处理的突变体 *daf-16(mu86)* 在正常及氧化应激状态下

的生存曲线分析无统计学意义。实验数据表明 G-Ro 提高其转录活性,并且 DAF-16 的转录活性对于线虫寿命延长是不可或缺的,这与以前报道的 DAF-16 激活可以延长寿命相互佐证。另外,G-Ro 与阳性对照药 MET 作用相似,对线虫体内 SOD-3 的上游转录因子 DAF-16 具有调节作用,这可能与其延长线虫寿命相关。

G-Ro 作为 OA 型人参皂苷,含量丰富,在抗衰老方面具有潜在的药用价值,为进一步抗衰老研究提供了实验基础。然而,目前 G-Ro 的研究主要集中在抗肿瘤及抗血小板聚集,而未展开其抗衰老作用及机制的探索。因此,实验数据提供了第一个证据来证明 G-Ro 的抗衰老作用,鼓励了进一步的临床研究。我们目前的研究表明,G-Ro 对线虫寿命的延长作用及作用机制类似于阳性药物二甲双胍。而二甲双胍相比需要剂量大,使用的 G-Ro 剂量仅为二甲双胍的八分之一。另外,二甲双胍存在副作用,糖尿病患者服用后可能出现胃肠道不适及乳酸酸中毒<sup>[37]</sup>。这些数据表明 G-Ro 具有优势。G-Ro 无论是在正常条件下,还是在氧化应激条件下,都能以剂量依赖的方式显著延长野生型蠕虫的健康寿命,提示 G-Ro 具有通过提高生物利用度来提供抗衰老和抗应激的潜力。G-Ro 降低了内源性 ROS 的产生,并且上调了具有能清除 ROS 的酶 SOD-3 的水平,提示 G-Ro 具有抗氧化作用的潜在机制,可能是通过上调 SOD-3 相关。进一步实验证明,G-Ro 增加了 DAF-16 的核易位,并且 *daf-16* 基因突变消除了 G-Ro 延长寿命的效应,表明 G-Ro 对线虫体内 SOD-3 的上游转录因子 DAF-16 的调节作用,提示 G-Ro 延长线虫寿命可能与 DAF-16 的转录活性相关。通过 *daf-16(mu86)* 突变体氧化应激生存分析,表明 DAF-16 功能缺失的情况下,G-Ro 失去了延长氧化应激状态下延长寿命的效应,提示 G-Ro 抗氧化应激可能与 DAF-16 转录活性相关。

综上所述,研究结果表明,在正常状态及氧化应激状态下 G-Ro 延长线虫寿命的作用,可能与上调 SOD-3 和清除体内累积的 ROS 的功能相关。DAF-16 的转录活性可能介导 G-Ro 效应。关于 G-Ro 效应背后的机制,还需要进行更多的研究。我们的研究为开发新型抗衰老药物开辟了新的途径。

## 参考文献

- 1 Mittelbrunn M, Kroemer G. Hallmarks of T cell aging. *Nat Immunol*, 2021, 22(6):687–698.
- 2 Sies H, Jones D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363–383.
- 3 Zhang Y, Murugesan P, Huang K, et al. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(3):170–194.
- 4 Stockwell B R, Friedmann A J P, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*, 2017, 171(2):273–285.
- 5 Hayes J D, Dinkova-Kostova A T, Tew K D. Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell*, 2020, 38(2):167–197.
- 6 Pagridge L, Fuentealba M, Kennedy B K, et al. The quest to slow ageing through drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(8): 513–532.
- 7 Kimura K D, Tissenbaum H A, Liu Y, et al. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1997, 277(5328):942–946.
- 8 Johnson T E. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science*, 1990, 249(4971): 908–912.
- 9 Wilkinson D S, Taylor R C, Dillin A. Analysis of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol*, 2012, 107:353–381.
- 10 Lin K, Dorman J B, Rodan A, et al. Daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1997, 278(5341):1319–1322.
- 11 孙巧思. 古代本草著作中延年药物的研究. 北京: 中国中医科学院博士研究生学业论文, 2017.
- 12 Patel S, Rauf A. Adaptogenic herb ginseng (Panax) as medical food: Status quo and future prospects. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 120–127.
- 13 Wang C, Liu J, Deng J, et al. Advances in the chemistry, pharmacological diversity, and metabolism of 20(R)-ginseng saponins. *J Ginseng Res*, 2020, 44(1):14–23.
- 14 Huang Q, Gao S, Zhao D, et al. Review of ginsenosides targeting mitochondrial function to treat multiple disorders: Current status and perspectives. *J Ginseng Res*, 2021, 45(3):371–379.
- 15 Wang H, Zhang S, Zhai L, et al. Ginsenoside extract from ginseng extends lifespan and health span in *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct*, 2021, 12(15):6808.
- 16 Zhu S, Zou K, Cai S, et al. Simultaneous determination of triterpene saponins in Ginseng drugs by high-performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(8):995–998.
- 17 Kang H J, Lee S, Ryu I W, et al. Antioxidative properties of ginsenoside Ro against UV-B-induced oxidative stress in human dermal fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(12): 2018–2021.
- 18 Zeng K, Li Y, Wang S, et al. Inhibition of autophagosome–lysosome fusion by ginsenoside Ro via the ESR2–NCF1–ROS pathway sensitizes esophageal cancer cells to 5-fluorouracil-induced cell death via the CHEK1-mediated DNA damage checkpoint. *Autophagy*, 2016, 12(9): 1593.
- 19 Han J, Kim M, Ban Y, et al. The involvement of β-Amyrin 28-Oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in panax ginseng. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(12):2034.
- 20 Tsipilas D, Fragkiadaki P, Docea A O, et al. Discovery of potent telomerase activators: Unfolding new therapeutic and anti-aging perspectives. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4):3701.
- 21 Kim Y J, Lee J E, Jang H S, et al. Oleanolic acid protects the skin from particulate matter-induced aging. *Biomol Ther (Seoul)*, 2021, 29 (2):220.
- 22 Zhang J, Lu L, Zhou L. Oleanolic acid activates daf-16 to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4):843–849.
- 23 Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 2006, 11:1–11.
- 24 Li J, Cui X, Wang Z, et al. rBTI extends *Caenorhabditis elegans* lifespan by mimicking calorie restriction. *Exp Gerontol*, 2015, 67: 62–71.
- 25 Nemoto-Sasaki Y, Kasai K. Deletion of lec-10, a galectin-encoding gene, increases susceptibility to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(12):1973–1977.
- 26 Hall D H, Hartwig E, Nguyen K C. Modern electron microscopy methods for *C. elegans*. *Methods Cell Biol*, 2012, 107:93–149.
- 27 Hoogewijs D, Houthoofd K, Matthijssens F, et al. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC 550 Mol Biol*, 2008, 9:9.
- 28 Chow D K, Glenn C F, Johnston J L, et al. Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. *Exp Gerontol*, 2006, 41(3):252–260.
- 29 Gems D, Coburn C. The mysterious case of the *C. elegans* gut granule: death fluorescence, anthranilic acid and the kynurenone pathway. *Front Genet*, 2013, 4:151.
- 30 Altintas O, Park S, Lee S V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Rep*, 2016, 49(2):81–92.
- 31 陈学忠. 中医衰老理论的继承和发展. 中国中西医结合学会虚证与老年病专业委员会. 第七次全国中西医结合虚证与老年病学术会议论文摘要集, 2003:166–169.
- 32 陈超, 王丹丹, 程磊, 等.《中华人民共和国药典》2020年版和国外药典的药包材标准体系概述. 中国医药工业杂志, 2021, 52(2): 267–271.
- 33 Kwon H. Inhibitory effects of Ginsenoside Ro on clot retraction through suppressing PI3K/Akt signaling pathway in human platelets. *Prev Nutr Food Sci*, 2019, 24(1):56.
- 34 Chen J, Ou Y, Li Y, et al. Metformin extends *C. elegans* lifespan through lysosomal pathway. *Elife*, 2017, 6:e31268.
- 35 Snider T A, Richardson A, Stoner J A, et al. The Geropathology

- Grading Platform demonstrates that mice null for Cu/Zn-superoxide dismutase show accelerated biological aging. *Geroscience*, 2018, 40(2):97.
- 36 Wang L, Zuo X, Ouyang Z, et al. A systematic review of antiaging effects of 23 traditional chinese medicines. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:5591573.
- 37 Dilberger B, Baumann S, Schmitt F, et al. Mitochondrial oxidative stress impairs energy metabolism and reduces stress resistance and longevity of *C. Elegans*. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:6840540.
- 38 Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*, 2003, 299(5611):1346–1351.
- 39 Salvia M, Pareek K K, Swami Y K. Study of diversity of metformin related gastrointestinal side effects. *J Assoc Physicians India*, 2020, 68 (8):36–38.

## Ginsenoside Ro Prolongs Longevity and Enhances Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*

Liu Jin, Zhou Lei, Song Zhenyan, Zheng Xilong, Cheng Shaowu

(Key Lab of Hunan Province for Prevention and Treatment of Cardio-cerebral Disease with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**Abstract:** Objective To study the effects of Ginsenoside Ro (G-RO) on health life and antioxidant activity of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) and its mutant strains as biological models. Methods The blank control group, different doses of G-Ro (5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) groups and positive control group (40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  metformin) were set up to study the effects of G-Ro on the lifespan and lipofuscin fluorescence of *C. elegans*. The oxidative damage model was established by using 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  paraquat (PQ) to investigate the effects of G-Ro on Reactive oxygen species (ROS) in *C. elegans*. We used DAF-16:: GFP, SOD-3:: GFP, and mutant *daf-16(mu86)* to explore the mechanism of G-Ro. Results Compared with the blank control group, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro prolonged the lifespan of *C. elegans* (\*\*P<0.001). In the oxidative stress model constructed by PQ, the lifespan of nematode was prolonged (\*P<0.05). The fluorescence level of lipofuscin decreased by 11.70%. 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G-Ro decreased ROS levels (11.92%, \*P<0.05), decreased ROS levels after oxidative stress induced by 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PQ (79.67%, \*P<0.001), increased Fork head box O (FOXO) homologous Daf-16 dephosphorylation into nucleus rate (51.00%), increased the fluorescence intensity of SOD-3 (19.85%, \*\*\*P<0.001). However, the effect of G-Ro on the lifespan of mutant *daf-16 (mu86)* was not statistically significant under normal and oxidative stress conditions. Conclusion The effect of G-Ro on prolonging life span of nematodes under normal and oxidative stress conditions may be related to up-regulation of SOD-3 and clearance of accumulated ROS. Transcriptional activity of DAF-16 may mediate G-Ro effect.

**Keywords:** Ginsenoside Ro, *Caenorhabditis elegans*, Anti-aging, Antioxidative stress, DAF-16, SOD-3

(责任编辑:周阿剑、郭思宇, 责任译审:周阿剑, 审稿人:王瑀、张志华)