

阿魏酸通过胰岛素/IGF信号通路和DAF-16促进秀丽隐杆线虫寿命和应激抵抗力

况琪斐¹, 陈巧超¹, 张玲¹, 何文¹, 裴中²

(1. 中山大学附属第一医院老年医学科, 广东广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院神经内科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】观察阿魏酸对秀丽隐杆线虫寿命及应激抵抗能力的影响,探究其可能机制。【方法】使用秀丽隐杆线虫作为抗衰老模型,给予不同浓度的阿魏酸(0、1、10、50 mmol/L),探究其对线虫寿命、抗应激能力、脂褐素水平的调控作用;使用qPCR筛选衰老相关基因,采用 *daf-2(DR1572)*、*daf-16(CF1038)* 突变体线虫,对阿魏酸的潜在作用机理进行初步探讨。【结果】与空白对照组相比,阿魏酸能明显延长秀丽隐杆线虫寿命并提高抗氧化应激和热应激能力 ($P < 0.001$),抑制与衰老相关的脂褐素的沉积 ($P < 0.001$),同时不影响生育力和发育 ($P > 0.05$)。用 50 mmol/L 阿魏酸组喂线虫后, *daf-2*、*akt-2* 和 *age-1* 基因的 mRNA 表达水平下调 ($P < 0.05$), *daf-16* 基因的 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.05$),并上调其下游靶基因 *sod-3*、*clk-2* 的 mRNA 表达,以及下调 *ctl-1*、*dod-17* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。50 mmol/L 阿魏酸处理后 DAF-16::GFP 在细胞核定位的线虫比例从 (5.3±1.5)% 增加到 (28±3)%。 *daf-2(DR1572)*、*daf-16(CF1038)* 突变体线虫在 50 mmol/L 阿魏酸处理后,寿命未见明显延长 ($P > 0.05$)。【结论】阿魏酸可通过胰岛素/IGF 信号通路,促进 DAF-16 的核定位,提高机体应激抵抗能力,并延长线虫寿命。

关键词:阿魏酸;胰岛素/IGF 信号通路;DAF-16;衰老;秀丽隐杆线虫

中图分类号:R592

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2021)02-0193-09

Ferulic Acid Promotes Longevity and Stress Tolerance via the Insulin/IGF Signaling Pathway and DAF-16 in *Caenorhabditis Elegans*

KUANG Qi-fei¹, CHEN Qiao-chao¹, ZHANG Ling¹, HE Wen¹, PEI Zhong²

(1. Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: HE Wen; E-mail: hewen@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the effect on life extension and the mechanism of ferulic acid in *Caenorhabditis elegans*.【Methods】We used *C. elegans* as an anti-aging model, and different concentrations of ferulic acid (0, 1, 10, 50 mmol/L) were given to explore its regulatory effects on the lifespan, anti-stress ability, and lipofuscin level of *C. elegans*. And we used qPCR to screen senescence related genes, and *DAF-2(DR1572)* and *DAF-16(CF1038)* mutants were used to investigate the potential mechanism of ferulic acid.【Results】Compared with the blank control group, ferulic acid significantly extended the lifespan of *C. elegans* and increased its antioxidant and thermal stress ($P < 0.001$), inhibited the accumulation of lipofuscin related to aging ($P < 0.001$), and did not affect its fertility and body shape ($P > 0.05$). After feeding nematode in the 50 mmol/L ferulic acid group, mRNA expression levels of *DAF-2*, *Akt-2* and *AGE-1* genes were down-regulated ($P < 0.05$), mRNA expression levels of *DAF-16* genes were up-regulated ($P < 0.05$) and the expression levels of its downstream target genes *sod-3*, *ctl-1*, *clk-2* and *dod-17* were activated ($P < 0.05$). After 50 mmol/L ferulic

收稿日期:2021-01-06

基金项目:国家自然科学基金(81671102);广州市科技计划项目(202002020011)

作者简介:况琪斐,在读硕士生,研究方向:衰老与认知,E-mail:Kuangqf@mail2.sysu.edu.cn;何文,通信作者,教授,硕士生导师,E-mail:hewen@mail.sysu.edu.cn

acid treatment, the proportion of daf-16::GFP in the nematode cell nucleus increased from (5.3±1.5) % to (28±3) %. The lifespan of *DAF-2 (DR1572)* and *DAF-16 (CF1038)* mutant nematodes was not significantly extended after treatment with 50 mmol/L ferulic acid ($P>0.05$). [Conclusions] Ferulic acid can promote the nuclear localization of *daf-16* through insulin/IGF signaling pathway, improve the stress resisting ability of the organism, and prolong the lifespan of nematode.

Key words: ferulic acid; insulin/IGF signaling pathway; DAF-16; aging; *C. elegans*

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(2): 193-201]

衰老和疾病是生命科学领域的热门研究领域。衰老的本质是由于被动的随机错误积累(随机老化理论)或主动的非随机过程(程序老化理论)导致身体结构和功能随年龄而发生的退化^[1]。许多与年龄有关的疾病,包括癌症、心血管疾病和神经退行性疾病,将变得越来越普遍^[2]。如果能够有效地控制衰老的进程,那么疾病的数量将减少,人类的寿命和健康状况将得到有效改善。迄今为止,虽然药物干预在延缓衰老方面已经取得了一定的效果,但目前还没有获得国家药监局批准的抗衰老药物,因此寻找天然有效的抗衰老药物十分重要^[3]。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)是研究衰老的经典生物学模型。秀丽隐杆线虫具有寿命短,易于培养,体积小的优点^[4]。此外,在秀丽隐杆线虫的基因中已鉴定出近80%的人类基因同源物。最近的研究表明,特定的遗传和环境因素影响线虫的衰老和寿命^[5]。特别注意的是,秀丽隐杆线虫与人类具有相似的衰老方面,其中寿命的延长与压力的承受能力有关^[6]。因此,秀丽隐杆线虫作为模型生物,在鉴定可能有益于长寿的化合物和机制方面具有很高的价值。阿魏酸(ferulic acid, FA; 3-甲氧基-4-羟基肉桂酸)是大麦颗粒、麦麸、大米胚乳、玉米糠等植物细胞壁中常见的多酚类化合物^[7]。它通过酯键与多糖共价连接^[8]。在植物细胞壁中,脂肪酸可通过阿魏酸酯酶的作用释放出来^[9]。阿魏酸具有广泛的抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物活性^[10]。阿魏酸在日本被用作食品添加剂的抗氧化剂和食品防腐剂^[11]。在中国,治疗者们利用阿魏酸的抗氧化性,使用阿魏酸钠治疗心血管和脑血管疾病^[12]。阿魏酸可调控促炎性NF-κB及其相关的基因信号,从而减弱老年大鼠中氧化应激引起的炎症相关疾病^[13],也可通过激活中央毒蕈碱和烟碱样受体和抗氧化酶,从而减少认知缺陷的进展^[14]。然而,其在延长寿命和抗衰老机制方面的研

究甚少,本研究以秀丽隐杆线虫为模型,对阿魏酸的延缓衰老机制做进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

阿魏酸(分子式: $C_{10}H_{10}O_4$,分子质量:194.18)购自美国Sigma公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) OP50、野生型N2秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)、突变体线虫*daf-2 (DR1572)*、*daf-16 (CF1038)*由线虫遗传中心(norhabditis Genetics Center, CGC)提供并保存于本实验室;胰蛋白胨、琼脂粉、NaCl、CaCl₂、KH₂PO₄、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、酵母提取物、胆固醇购自上海萨恩科技有限公司;Trizol试剂、cDNA反转录试剂盒、SYBRGreen购自南京建成生物工程研究所。

MyCycler 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、MyiQ2实时荧光定量PCR仪,美国Bio-Rad公司;智能恒温培养箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;Neofuge 13R台式高速冷冻离心机,力康发展有限公司;NewClassic MS电子天平,上海奕宇电子科技有限公司;SMZ-168显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司;U-RFLT50型荧光显微镜,日本Olympus公司。

1.2 秀丽隐杆线虫同步化

固体培养基(nematode growth media, NGM)配制:称4.0 g琼脂、0.5 g蛋白胨、0.6 g NaCl加入195 mL蒸馏水溶解摇匀。121℃高压蒸汽灭菌20 min,温度降至60℃左右,加入5 mg/mL胆固醇乙醇溶液、1 mol/L MgSO₄溶液、1 mol/L CaCl₂溶液各200 μL, pH6.0磷酸氢钾缓冲液5 mL,倒板备用。用M9缓冲溶液收集生长健康无染的L4期线虫到EP管中,反复离心清洗3~5次,弃上清。每管线虫加入裂解液(0.5 mol/L氢氧化钠和2.5%次氯酸),

裂解 8 min, 1 000 r/min, 离心 2 min, 离心机半径 $r=17$ cm, 弃上清, 用 M9 反复清洗 5 次, 加入 M9 在 20 °C 恒温静置 12 h, 1 000 r/min, 离心 1 min, 离心机半径 $r=17$ cm, 弃上清, 转移至含有 OP50 大肠杆菌的线虫培养基 (nematode growth medium, NGM), 20 °C 恒温培养 2 d, 即得同期化 L4 期幼虫。

1.3 寿命测定

首先, 使用阿魏酸对大肠杆菌 OP50 增殖的影响评估毒性试验, 以确定所有实验均在无毒浓度下进行。在 20 °C 室温下, 将线虫在接种有大肠杆菌 OP50 的 NGM (线虫生长培养基) 平板上培养到产卵期, 然后使用强酸强碱溶液处理获得同步线虫。将同步化的线虫, 随机挑取 50 条至加药组 (1、10、50 mmol/L FA) 与对照组, 此时记为第 0 天, 20 °C 下培养, 每天同一时间将线虫转移至新的同浓度培养皿内, 并观察线虫的存活情况。线虫死亡及剔除标准: 无运动迹象, 用铂丝轻触后 10 s 无反应; 线虫因爬出培养皿失踪或贴壁致死的不计入数据。实验重复 3 次, 整理数据并绘制曲线。使用 Graphpad 软件进行统计分析, 并计算 Kaplan - Meier 寿命和 P 值。实验重复 3 次, 整理数据并作图。

1.4 抗应激实验

将同期化的野生型 N2 线虫随机挑取 50 条至加药组 (1、10、50 mg/mL FA) 与对照组, 预先培养 6 d 后进行应激实验。在热冲击实验中, 线虫暴露于 37 °C 培养箱中进行应激, 每小时统计一次寿命, 直到所有线虫死亡为止。实验重复 3 次, 整理数据并作图。氧化应激实验与抗热应激实验的线虫培养方法相同, 将同期化的野生型 N2 线虫随机挑取 50

条至加药组 (1、10、50 mg/mL FA) 与对照组, 预先培养 6 d 后进行应激实验。在急性氧化应激实验中, 线虫暴露于每 10 mL 含 10 μ L 30 mmol/L 双氧水的 NGM 培养基中, 每小时统计 1 次寿命, 直到线虫全部死亡为止。实验重复 3 次, 整理数据并作图。

1.5 体长和脂褐素积累分析

将同期化的野生型 N2 线虫随机挑取 30 条至加药组 (1、10、50 mg/mL FA) 与对照组, 预先培养 5 d 后, 将线虫放在载玻片滴有 1% 琼脂糖垫上, 并用 NaN_3 (20 μ mol/L) 麻醉。在荧光显微镜下观察线虫 (激发波长: 340~380 nm; 发射波长: 430 nm, 10 \times)。使用 Image J 8.5 软件测量线虫的荧光强度和体长。实验重复 3 次, 整理数据并作图。

1.6 产卵实验

将同步化的 L4 期野生型 N2 线虫, 随机挑取 1 条至加药组与空白对照组, 每组 10 个培养皿, 此时记为产卵第 1 天, 每隔 24 h 将线虫挑至新培养基中, 每天记录虫卵数目 (产卵量), 连续记录 4 d 计算总产卵量。实验重复 3 次, 整理数据并作图。

1.7 衰老相关基因测定

使用定量实时 PCR 确定抗衰老相关基因的表达。将同期化线虫分别在空白和含有不同浓度阿魏酸的 NGM 培养基中培养 5 d 后, 采用 TRIzol 从大约 1 000 条线虫中提取总 RNA, 并采用定量 RT 试剂盒提取 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 检测系统, 使用 SYBR green 对实时荧光定量 PCR 进行评估。引物如表 1 所示, *act-1* 作为参考基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析比较基因表达水平。

表 1 线虫抗衰老相关基因实时定量 PCR 引物

Table 1 Real-time quantitative PCR primers for *C. elegans* aging-related genes

Genes	Forward primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
<i>Act-1</i>	TCGGTATGGGACAGAAGGAC	CATCCCAGTTGGTGACGATA
<i>Daf-2</i>	TGAAAGCGAAGCAGCGAGAAGG	CGTCCGAAGTCCGCATCACTC
<i>Akt-2</i>	CACCACAATACGCCCCACACTC	AGGACCTCGCGCCACTATAGC
<i>Daf-16</i>	CGGGAGAGAGGGACACGCTTC	ACGGAATTGCTCAGCCACCATG
<i>Sod-3</i>	GGCTAAGGATGCTGGAGAAC	ACAGGTGGCGATCTTCAAG
<i>Clk-1</i>	GCACATACTGCTGCTTCTCG	TCATTCCATCGTGTCTACTCC
<i>Ctl-2</i>	ACACGGACACGCATTACCA	TTCCTCCAAACAGCCACC
<i>Age-1</i>	CGCCACGGCAACATCCTCAG	GGCTGCTCAATCGCCAACTCC

1.8 DAF-16::GFP 核易位测定

本实验采用 TJ356 突变体线虫,该品系线虫特异性标记了 DAF-16::GFP(zls356)。将同步化的 TJ356 突变体用 FA 处理 6 d,然后用 NaN₃(20 μmol/L)固定在 2% 琼脂糖垫中,然后在荧光显微镜下观察(激发波长:460~495 nm;发射波长:510~550 nm, 10×)。将 DAF-16::GFP 的表达模式评估为“胞质定位”和“核定位”,并计算 DAF-16 蛋白定位在每个治疗组中的百分比。

1.9 数据处理

使用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料用均数±标准差表示。通过单因素方差分析(one-way ANOVA)和独立样本 *t* 检验(independent-samples *t* test)对观察到的差异进行统计学检验, *P* < 0.05 (双侧)为差异具有统计学意义。所有实验均独立重复 3 次。

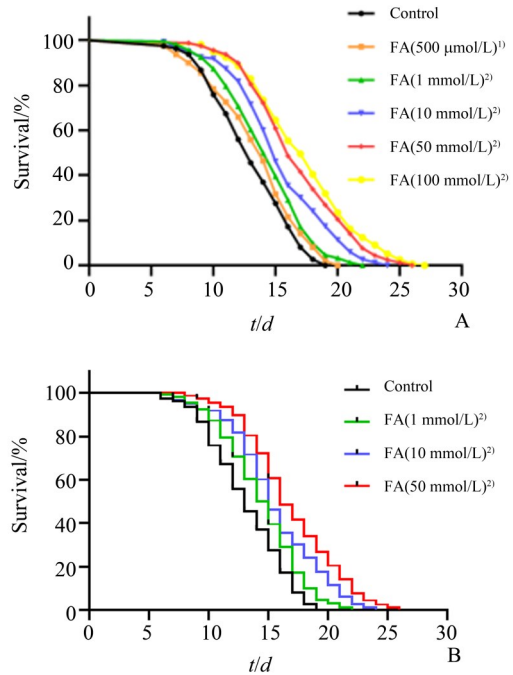
2 结果

2.1 阿魏酸对线虫寿命的影响

使用不同浓度的阿魏酸(500 μmol/L)和 1、10、50、100 mmol/L 对野生型 N2 线虫进行处理后,对线虫寿命的影响示于图 1 和表 2。在给予 500 μmol/L 和 1、10、50、100 mmol/L 阿魏酸后,秀丽隐杆线虫寿命明显延长(*P* < 0.05),且呈浓度依赖趋势,但阿魏酸在 1~50 mmol/L 范围内延寿效果最为明显,故本研究选取 1、10 和 50 mmol/L 浓度梯度进行实验。与对照组相比,给予阿魏酸后线虫的平均寿命由(12.89±0.2) d 分别增加至(14.49±0.21)、(15.41±0.11)、(17.01±0.13) d,线虫的寿命分别延长了 12.41%、19.55%、31.96%。对 4 组线虫寿命检测比较,经单因素方差分析,4 组间差异具有统计学意义(*F* = 271.482, *P* < 0.001);采用 LSD-*t* 检验进一步作两两比较,我们发现与对照组相比,阿魏酸(1、10、50 mmol/L)处理后的秀丽隐杆线虫寿命明显增加(*P* < 0.001、*P* < 0.001 和 *P* < 0.001;表 2,图 1)。

2.2 阿魏酸对线虫抵抗应激能力的影响

将秀丽隐杆线虫暴露于热应激和氧化应激环境下,比较处理组与对照组对寿命的影响。经过热应激处理后(图 2A),对照组中线虫的平均存活时间为(6.81±0.13) h,而 50 mmol/L 阿魏酸处理组的线虫的平均存活时间可延长至(8.35±0.43) h。4 组线虫寿命检测比较,经单因素方差分析,4 组间差



A: Effect of ferulic acid on lifespan in a wide range of concentrations; B: Effects of ferulic acid on lifespan in a small range of concentrations; 1) means *P* < 0.05 vs. control; 2) means *P* < 0.001 vs. control by LSD-test after ANOVA.

图 1 秀丽隐杆线虫寿命曲线

Fig.1 Lifespan curve of *C. elegans*

表 2 阿魏酸对线虫寿命的影响

Table 2 Effects of ferulic acid on lifespan of *C. elegans*

Groups	Starting number	Valid number	Mean lifespan/days
Control	480	467	12.89±0.2
FA(1 mmol/L)	480	470	14.49±0.21 ¹⁾
FA(10 mmol/L)	480	462	15.41±0.11 ¹⁾
FA(50 mmol/L)	480	464	17.01±0.13 ¹⁾
<i>F</i>			271.482
<i>P</i>			<0.001

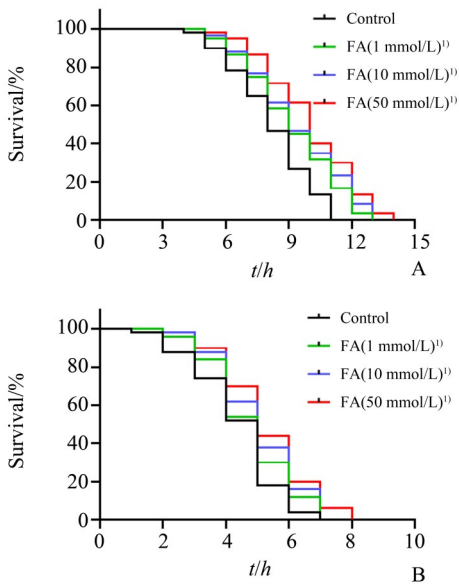
¹⁾ *P* < 0.001 vs. control by LSD-test after ANOVA

异具有统计学意义(*F* = 9.825, *P* = 0.005);采用 LSD-*t* 检验进一步作两两比较,与对照组相比,阿魏酸在 10 mmol/L 和 50 mmol/L 时抗热应激力明显增加(*P* = 0.019, *P* = 0.001)。接下来,我们采用双氧水急性应激实验来测试阿魏酸的抗氧化能力(图 2B)。结果显示,阿魏酸处理组可将线虫的寿命从(4.16±0.16) h 最高延长到(5.14±0.24) h。同样,我们使用单因素方差分析对 4 个不同浓度组进行寿

命比较,与对照组相比,4组间差异具有统计学意义($F=6.571, P=0.015$);采用LSD- t 检验进一步作两两比较,与对照组相比,阿魏酸在1 mmol/L时抗应激能力没有明显差异($P>0.05$),但在10 mmol/L和50 mmol/L时抗氧化应激力明显增加($P=0.016, P=0.003$)。

2.3 阿魏酸对线虫体长和脂褐素的影响

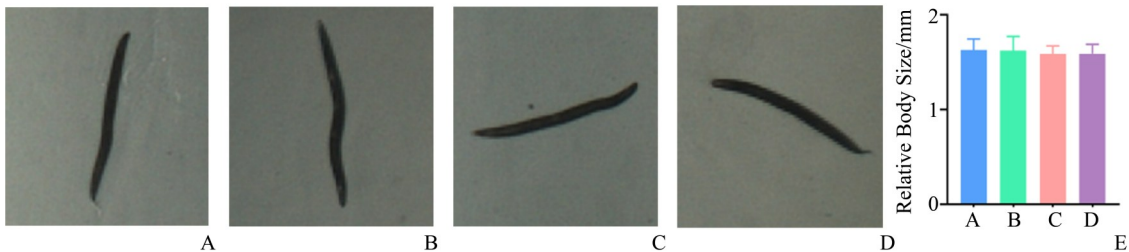
接下来,我们比较了不同处理组中线虫的体



A: Effect of ferulic acid on the survival of nematodes at 37 °C thermal shock; B: Effects of ferulic acid on survival of nematodes under oxidative stress; 1) means $P<0.001$ vs. control by LSD-test after ANOVA.

图2 阿魏酸对应激抵抗的影响

Fig.2 Effects of ferulic acid on stress resistance of *C. elegans*



A: control; B: FA(1 mmol/L); C: FA(10 mmol/L); D: FA(50 mmol/L); E: Ferulic acid had no significant effect on the body length.

图3 阿魏酸对线虫体长的影响

Fig.3 Effects of ferulic acid on body length of *C. elegans*

2.4 阿魏酸对线虫繁殖力的影响

为证实该药物是否会对线虫产生副作用,我们进行了繁殖力测定。结果表明,与对照组相比,在分别补充1、10、50 mmol/L阿魏酸后的线虫在子代

Groups	Starting number	Valid number	Mean lifes-pan after Thermal shock/h	Mean lifes-pan after oxidative stress/h
Control	150	150	6.81±0.13	4.16±0.16
FA(1 mmol/L)	150	150	7.29±0.13	4.68±0.33
FA(10 mmol/L)	150	150	7.68±0.55 ¹⁾	4.85±0.34 ²⁾
FA(50 mmol/L)	150	150	8.35±0.43 ³⁾	5.14±0.24 ⁴⁾
<i>F</i>			9.825	6.571
<i>P</i>			0.005	0.015

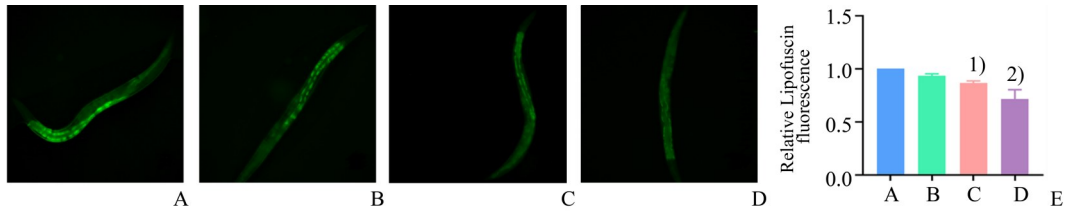
¹⁾ $P=0.019$ vs. control ; ²⁾ $P=0.016$ vs. control ; ³⁾ $P=0.001$ vs. control ; ⁴⁾ $P=0.003$ vs. control by LSD-test after ANOVA.

型。经过单因素方差分析,比较四组的虫体长度,结果表明虫体长度间无统计学差异($F=0.101, P>0.05$;图3)。接着我们继续测量了线虫的脂褐素积累情况。比较四组的脂褐素积累情况,经单因素方差分析,四组间的脂褐素积累差异具有统计学意义($F=20.752, P<0.001$;图4)。采用LSD- t 检验进一步作两两比较,10 mmol/L和50 mmol/L阿魏酸组线虫的脂褐素含量比对照组分别降低了13.3%、28.3% ($P=0.008, P<0.001$)。

总数上差异无统计学意义($P>0.05$;图5)。这些结果表明阿魏酸对线虫的繁殖力没有明显副作用。

2.5 衰老相关基因的表达

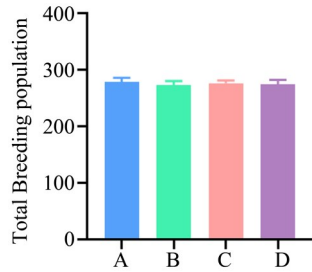
综合图1~5的结果,阿魏酸可延长线虫衰老,



A: control; B: FA (1 mmol/L); C: FA (10 mmol/L); D: FA (50 mmol/L); E: Relative lipofuscin accumulation, $n=3/\text{group}$, $F=20.75$, $P<0.001$. ¹⁾ $P=0.008$ vs. control; ²⁾ $P<0.001$ vs. control by LSD-test after ANOVA.

图4 阿魏酸对线虫脂褐素的影响

Fig.4 Effects of ferulic acid on the lipofuscin accumulation of *C. elegans*



A: control; B: FA (1 mmol/L); C: FA (10 mmol/L); D: FA (50 mmol/L); Different concentrations of ferulic acid had no significant effect on the fecundity of *C. elegans* compared with the control group. $n=3/\text{group}$, $F=0.345$, $P=0.794$ after ANOVA.

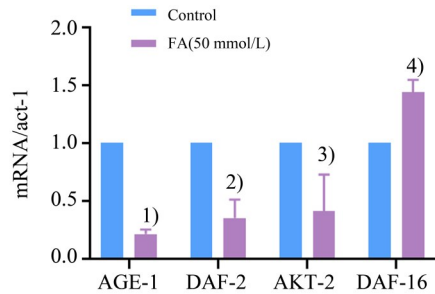
图5 阿魏酸对线虫繁殖力的影响

Fig.5 Effects of ferulic acid on the total breeding population of *C. elegans*

并且在 50 mmol/L 时效果最佳,但是影响这些作用的机制尚不清楚。因此,我们选择了此浓度用于后续的研究。首先,我们确定了与寿命相关的基因的表达水平。结果表明,阿魏酸可以明显影响 *age-1*、*daf-2*、*akt-2*、*daf-16* 的表达(图6)。对照组的基因表达定义为 1。与对照组相比,在阿魏酸处理后,线虫体内的 *age-1*、*daf-2*、*akt-2* 的基因表达量分别下调至 0.79 ± 0.04 、 0.65 ± 0.16 、 0.59 ± 0.32 ($P<0.001$ 、 $P=0.002$ 、 $P=0.033$)。同时,*daf-16* mRNA 的相对表达量较空白组相比升高至 1.44 ± 0.11 ($P=0.002$)。

2.6 阿魏酸对 *daf-2* (DR1572) 和 *daf-16* (CF1038) 秀丽隐杆线虫寿命的影响

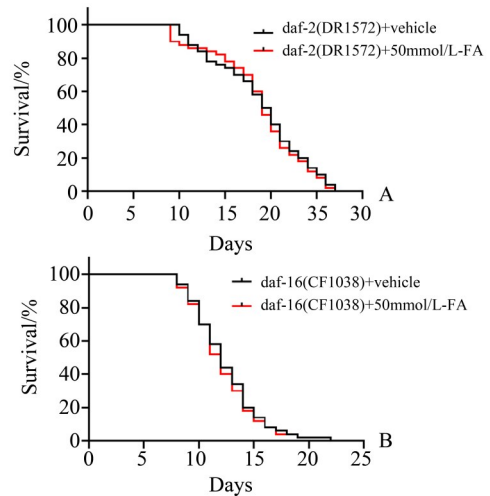
daf-2 和 *daf-16* 基因通过胰岛素信号通路(IIS)调控线虫的应激抗性和寿命。我们确定了阿魏酸是否能影响 *daf-2* (DR1572) 的突变体 *daf-16* (CF1038) 秀丽隐杆线虫的寿命(图7,表4)。阿魏酸处理后,*daf-2* (DR1572) 突变体的平均寿命没有明显增加 ($P>0.05$), *daf-16* (CF1038) 秀丽隐杆线虫的平均寿命也未见明显延长 ($P>0.05$)。



$n=3/\text{group}$. ¹⁾ $t=32.73$, $P<0.001$ vs. control; ²⁾ $t=7.02$, $P=0.002$ vs. control; ³⁾ $t=3.21$, $P=0.033$ vs. control; ⁴⁾ $t=7.046$, $P=0.002$ vs. control by independent t -test.

图6 阿魏酸对衰老相关基因表达的影响

Fig.6 Effects of ferulic acid on expression of senescence related genes



A: Ferulic acid had no significant effect on the lifespan of *daf-2* mutant nematode (DR1572); B: Ferulic acid had no significant effect on the lifespan of *daf-16* mutant nematode (CF1038).

图7 阿魏酸对突变体线虫寿命的影响

Fig.7 Effect of ferulic acid on the lifespan of mutant Nematodes

2.7 DAF-16 核定位

daf-16 是胰岛素信号通路中主要的转录因子,

表4 阿魏酸对 *daf-2*(*DR1572*)突变体和 *daf-16*(*CF1038*)秀丽隐杆线虫寿命的影响

Table 4 Effect of RE on the lifespan of *daf-2*(*DR1572*) mutants and *daf-16*(*CF1038*) mutants *C. elegans*

Groups	Starting number	Valid number	Mean lifespan/days	
			<i>daf-2</i> (<i>DR1572</i>) mutants	<i>daf-16</i> (<i>CF1038</i>) mutants
Control	150	150	19.38±0.62	13.39±1.27
FA(50mmol/L)	150	150	19.35±0.82	13.57±1.31
<i>t</i>			0.045	0.174
<i>P</i>			0.966	0.870

The mean lifespan between the control group and FA-treated group were compared with independent *t*-test.

可调节秀丽隐杆线虫的寿命和应激抵抗力,DAF-16的核定位对于下游基因的激活至关重要。因此,我们利用转基因菌株 DAF-16::GFP 观察其核易位并确定了阿魏酸对 DAF-16核定位的影响(图8)。GFP信号分为胞质定位或核定位。结果表明,被50 mmol/L阿魏酸处理后 DAF-16::GFP在细胞核定位的线虫比例从(5.3±1.5)%增加到(28±3)% ($P<0.001$)。

2.8 阿魏酸对 *daf-16* 下游基因表达的影响

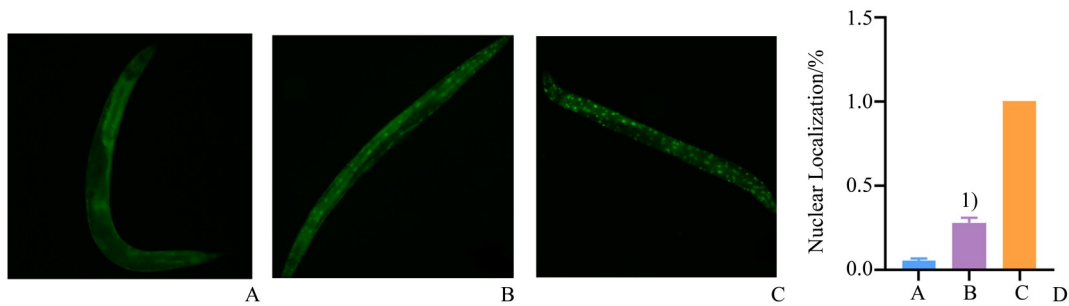
以上结果表明,突变体的寿命与 DAF-16的调控密切相关,转录因子 DAF-16可以调控下游基因,延长线虫的寿命。因此,我们确定了 *daf-16*下游基因的表达水平(*sod-3*, *ctl-2*, *dod17*和 *clk-1*;图9A)。对照组的基因表达定义为1。与对照组相

比,加药组的野生型 N2 菌株中, *sod-3*和 *ctl-2*的相对表达水平上调至 1.69 ± 0.33 和 1.38 ± 0.12 ($P=0.021$, $P=0.005$;图9A),并且 *dod17*和 *clk-1*相对表达水平分别下调至 0.46 ± 0.07 和 0.74 ± 0.18 ($P<0.001$, $P=0.002$;图9A)。然而,通过比较 *daf-16*(*CF1038*)秀丽隐杆线虫中的基因表达(图9B),发现50 mmol/L阿魏酸处理组与对照组相比, *sod-3*, *ctl-2*, *dod17*和 *clk-1*的 mRNA 表达没有明显差异 ($P>0.05$;图9B)。

3 讨论

衰老过程中伴随着人体免疫功能的下降,生理完整性逐渐丧失,导致功能受损并加剧了许多慢性疾病^[15]。尽管老化是不可逆的过程,但老化速度可以延迟^[16]。饮食干预是一种抗衰老和改善健康的有效非遗传方法。马齿苋可以通过胰岛素/IGF-1样信号通路来提高超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性,并且降低活性氧和丙二醛的含量从而增强秀丽隐杆线虫的抗逆性并延长寿命^[17]。忍冬提取物的3种主要化合物(绿原酸、1,5-二咖啡酰奎尼酸和1,3-二咖啡酰奎尼酸)的组合可显著延迟由Aβ毒性引起 CL4176品系秀丽隐杆线虫的麻痹^[18]。蓝莓提取物可以通过在胰岛素/IGF信号传导途径和 DAF-16延长线虫寿命,改善健康指标并且增强应激抵抗能力^[19]。

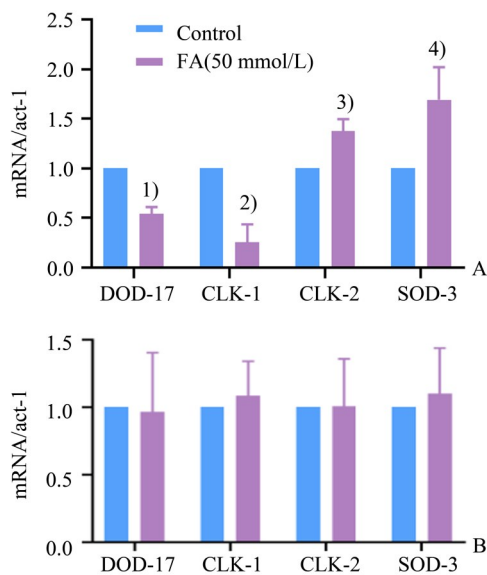
阿魏酸是一种常见的多酚化合物,多见于蔬菜,尤其是洋葱、茄子(约占总多酚的90%)和玉米糠(约占总多酚的3.1%)^[20]。同时,它也是一种含有多种生物活性的植物化学单体,先前已有研究^[21]



A: control; B: FA (50 mmol/L); C: positive control; Scale bar = 100 μ m. D: DAF-16 nuclear translocation histogram. $n=3$ /group, $F=1940.235$, $P<0.001$. ¹⁾ $P<0.001$ vs. control by LSD-test after ANOVA.

图8 阿魏酸对 DAF-16核转位的影响

Fig.8 Effects of ferulic acid on nuclear translocation of DAF-16



A: Effects of ferulic acid on the downstream gene of DAF-16 in N2 nematodes. $n=3/\text{group}$. ¹⁾ $t=5.47$, $P=0.005$ vs. control; ²⁾ $t=7.15$, $P=0.002$ vs. control; ³⁾ $t=3.67$, $P=0.021$ vs. control; ⁴⁾ $t=11.62$, $P<0.001$ vs. control by independent t -test. B: Ferulic acid had no significant effect on the downstream gene of DAF-16 in *daf-16* (CF1038) mutants nematodes.

图9 阿魏酸对DAF-16下游基因的影响
Fig.9 Effects of ferulic acid on the downstream genes of DAF-16

表明阿魏酸在体外具有抗氧化性、抗炎活性以及有助于抵抗神经退行性病变,它被认为在预防各类疾病和促进健康方面效果显著。然而,阿魏酸的抗衰老活性及其作用机制尚未见报道。在当前的研究中,我们采用秀丽隐杆线虫作为模式动物,系统的探究了阿魏酸对线虫衰老的影响。同空白对照组相比,阿魏酸能够显著延长野生型线虫 N2 的寿命。随着秀丽隐杆线虫的衰老,它们对外部刺激的抵抗力急剧下降,内源性 ROS 的增加进一步加速了衰老过程,形成了恶性循环。于是我们测试了线虫的抗应激能力,结果发现阿魏酸可明显提高线虫在抗氧化应激和抗热应激环境下的寿命,降低来自过氧化氢和热应激所诱导的氧化损伤和热冲击。体长和脂褐素都是评估线虫健康状况的常用指标。寿命的增加通常伴随着其他生理指标的降低。我们发现阿魏酸能够明显减少脂褐素在线虫中的沉积并且不影响体型的变化。上述实验证明,阿魏酸可以有效延长线虫的寿命,提高对环境的应激能

力,并降低线虫脂褐素的积累水平,而对线虫的体长没有显著影响。但是,一些研究人员观察到寿命的延长可能与生殖力的下降有关。因此,我们进行了繁殖力测定以阐明阿魏酸是否对线虫有副作用。结果显示,阿魏酸对线虫的繁殖力没有明显的副作用。阿魏酸可能不会影响种系信号导致的生殖细胞的生育变化,例如精子发生和卵子生成,也不会影响其生长速率^[22]。同时不影响线虫的产卵量和体型,体现出抗衰老作用。胰岛素/IGF-1 信号传导 (IIS) 途径是调节秀丽隐杆线虫衰老的主要途径,该途径从 DAF-2 胰岛素受体通过 AGE-1/PI3K 到 AKT-1/2,再到 DAF16/FOXO 转录因子,从而控制线虫的寿命和相关代谢^[23]。为探究阿魏酸延长秀丽隐杆线虫是否涉及此条通路,我们首先测定了通路中几个主要基因的表达。本实验结果表明,在阿魏酸处理后,*age-1*、*daf-2* 和 *akt-2* 基因的 mRNA 相对表达水平分别下调,且 *daf-16* 基因的 mRNA 相对表达水平上调 ($P=0.002$)。此外,通过对通路上两种基因突变体线虫 *daf-2* (DR1572) 和 *daf-16* (CF1038) 的进一步研究,发现阿魏酸处理组与对照组的突变体线虫的寿命之间没有显著差异性,线虫在缺失 *daf-2* 和 *daf-16* 基因后,阿魏酸的延寿效果消失。以上结果表明,阿魏酸可能通过胰岛素 *daf-2/daf-16* 延长线虫寿命。DAF-16 是胰岛素信号通路调控应激抵抗和长寿的关键因子,它主要分布在细胞质中,当被磷酸化并激活时,会导致其在细胞核中积累,从而激活其功能以调节下游靶基因,例如 *sod-3*、*ctl-2*、*clk-1* 和 *dod-17*,这几个基因在新陈代谢、氧化应激和衰老中起着重要作用^[24]。我们的进一步研究发现,经过阿魏酸处理后,促进了 DAF-16 的核定位,并上调其下游基因 *sod-3*、*ctl-2* 基因的 mRNA 表达,同时下调 *dod-17* 和 *clk-1* 基因的 mRNA 表达水平。Song 等^[25] 研究发现,激活 *daf-16* 基因可促进其核定位以及调节下游靶基因的表达,提高应激抵抗力并延长寿命与本实验结果相似。

综上所述,阿魏酸可通过胰岛素/IGF-1 信号通路和 DAF-16 增强线虫的抗应激能力,延长线虫寿命,改善健康水平。本研究结果为阿魏酸的研究和开发进一步提供了有力的理论基础,但寿命调控机制错综复杂,有待于继续深入探究。

参考文献

- [1] Olovnikov AM. Aging theories [M]. Cham: Springer International Publishing, 2019: 1–9.
- [2] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging [J]. Cell, 2013, 153(6): 1194–1217.
- [3] Stroustrup N. Measuring and modeling interventions in aging [J]. Curr Opin Cell Biol, 2018, 55: 129–138.
- [4] Shen P, Yue Y, Park Y. A living model for obesity and aging research: *Caenorhabditis elegans* [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(5): 741–754.
- [5] Gems D, Riddle DL. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2000, 154(4): 1597–1610.
- [6] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239–247.
- [7] Mathew S, Abraham TE. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications [J]. Crit Rev Biotechnol, 2004, 24(2–3): 59–83.
- [8] Wong DW, Chan VJ, Batt SB, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to produce feruloyl esterase for the release of ferulic acid from switchgrass [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011, 38(12): 1961–1967.
- [9] Benoit I, Danchin EG, Bleichrodt RJ, et al. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity [J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(3): 387–396.
- [10] Barone E, Calabrese V, Mancuso C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases [J]. Biogerontology, 2009, 10(2): 97–108.
- [11] Yagi K, Ohishi N. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants [J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1979, 25(2): 127–130.
- [12] Wang BH, Ou-Yang JP. Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system [J]. Cardiovasc Drug Rev, 2005, 23(2): 161–172.
- [13] Jung KJ, Go EK, Kim JY, et al. Suppression of age-related renal changes in NF- κ B and its target gene expression by dietary ferulate [J]. J Nutr Biochem, 2009, 20(5): 378–388.
- [14] Tsai FS, Wu LY, Yang SE, et al. Ferulic acid reverses the cognitive dysfunction caused by amyloid beta peptide 1–40 through anti-oxidant activity and cholinergic activation in rats [J]. Am J Chin Med, 2015, 43(2): 319–335.
- [15] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging [J]. Cell, 2013, 153(6): 1194–1217.
- [16] Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(17): 7915–7922.
- [17] Zhang W, Zheng B, Deng N, et al. Effects of ethyl acetate fractional extract from *Portulaca oleracea* L. (PO-EA) on lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Food Sci, 2020, 85(12): 4367–4376.
- [18] Yang ZZ, Yu YT, Lin HR, et al. *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 310–322.
- [19] Wang H, Liu J, Li T, et al. Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Funct, 2018, 9(10): 5273–5282.
- [20] D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability [J]. Ann Ist Super Sanita, 2007, 43(4): 348–361.
- [21] Barone E, Calabrese V, Mancuso C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases [J]. Biogerontology, 2009, 10(2): 97–108.
- [22] Kim DK, Jeon H, Cha DS. 4-Hydroxybenzoic acid-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Functional Foods, 2014, 7: 630–640.
- [23] Kampkotter A, Gombitang NC, Zurawski RF, et al. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans* [J]. Arch Toxicol, 2007, 81(12): 849–858.
- [24] Tambara AL, de Los SML, Dal Forno AH, et al. Purple pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.) protects against oxidative stress and increase the lifespan in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16/FOXO pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 120: 639–650.
- [25] Song B, Wang H, Xia W, et al. Combination of apple peel and blueberry extracts synergistically induced lifespan extension via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Funct, 2020, 11(7): 6170–6185.