

小白薇活性成分 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮的抗衰老作用研究

刘宇航¹, 乔思聪², 李宝力^{1*}, 李剑^{2*}, 刘明文^{1*}

(1. 海南大学药学院, 海南海口 570228; 2. 华东理工大学药学院, 上海 200237)

摘要: 目的 研究小白薇体积分数 75% 乙醇提取物 (HL0175) 中的活性成分 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮 (XBW01) 在秀丽隐杆线虫模型上对寿命及健康寿命的延长作用, 以及在复制性衰老人胚肺成纤维细胞 (MRC-5) 模型中对细胞衰老标志物的改善作用。方法 在线虫模型上, 进行寿命实验和一系列健康状态指标的测试, 如线虫咽泵运动频率和身体摆动速度。在 MRC-5 细胞模型上, 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力, 以确定 XBW01 的安全浓度范围, 并采用蛋白质印迹法 (Western Blot) 检测处理前后细胞中衰老相关标志物蛋白的变化情况。结果 与空白对照组相比, HL0175 (200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理显著延长线虫寿命, 提升身体摆动能力。此外, 活性成分 XBW01 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理也显著延长线虫寿命, 提升线虫热应激和渗透压应激能力, 改善咽泵运动频率和身体摆动速度。在细胞水平, XBW01 在 0 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内对 MRC-5 细胞没有增殖抑制作用, 且 XBW01 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后显著降低 MRC-5 细胞水平衰老标志物 p21 和 p53 的表达水平。结论 HL0175 中所含成分 XBW01 具有延长线虫寿命和改善线虫健康参数的作用, 并能够降低 MRC-5 细胞中衰老标志物表达水平。

关键词: 小白薇; 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮; 秀丽隐杆线虫; 细胞衰老; 抗衰老

中图分类号: R 96 **文献标志码:** A

引用本文: 刘宇航, 乔思聪, 李宝力, 等. 小白薇活性成分 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮的抗衰老作用研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2026, 43(4): 335-344.

Cite this article as: LIU Yuhang, QIAO Sicong, LI Baoli, et al. Study on the anti-aging effect of 4-methoxy-3-hydroxyacetophenone, an active ingredient of *Tylophora yunnanensis* Schltr. [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2026, 43(4): 335-344.

随着人口老龄化形势加剧, 老年人“长寿但不健康”问题日渐突出, 抗衰老药物研发成为全球生物医药的前沿热点领域^[1]。抗衰老药物是延缓衰老、延长健康寿命、最有效的干预策略, 其目的是延长个体的健康寿命, 降低衰老相关疾病发病率。近年来, 一系列具有潜在的抗衰老活性的小分子化合物被发现, 且其中一些已经进入临床试验阶段, 这些抗衰老前沿研究推动了抗衰老领域快速发展^[2]。中医药是中华文明瑰宝, 是五千多年文明的结晶, 在维护人民健康领域发挥着重要作用^[3-4]。中药作为中华民族特有医药资源, 其抗衰老用途亟待系统深入挖掘。小白薇, 又名云南娃儿藤 (*Tylophora yunnanensis* Schltr.), 为萝藦科娃儿藤属植物。本课题组前期基于线虫寿命实验的抗衰老活性筛选发现小白薇体积分数 75% 乙醇提取物能够显

著延长线虫寿命, 提升健康水平, 提示小白薇所含成分蕴含着抗衰老潜力。林玉萍等^[5]已从小白薇根茎体积分数 90% 乙醇提取物中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为对羟基苯乙酮、2,4-二羟基苯乙酮、3,4-二羟基苯乙酮、3-羟基-4-甲氧基苯乙酮、新白前醇、新白前酮、 β -香树脂醇、娃儿藤乙素、硬脂酸、 β -谷甾醇、胡萝卜甙。其中, 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮 (XBW01) 因其丰富的自然来源和降血脂等生物活性, 引起了广泛关注^[6-7], 但其在延长寿命、延缓衰老领域的研究还未见报道。本研究作者采用秀丽隐杆线虫模型和人胚肺成纤维细胞模型, 评价 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮的延寿能力、提升健康参数的能力和降低衰老标志物的能力, 旨在挖掘其抗衰老潜力, 为 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮应用于衰老及衰老相关疾病研究提供一定理论依据。

收稿日期: 2025-01-17

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (22037002); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (22207026)

作者简介: 刘宇航 (2001-), 男, 硕士研究生, E-mail 18595911168@163.com; *通信作者: 刘明文 (1996-), 女, 副教授, 博士, 主要从事衰老靶标确证及干预药物研发, E-mail wenwenliu@hainanu.edu.cn; 李剑 (1978-), 男, 教授, 博士, 主要从事老药 (化药和中草药) 二次研发, E-mail jianli@ecust.edu.cn; 李宝力 (1990-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事抗耐药菌与抗衰老及相关疾病创新药物研究, E-mail baolili@hainanu.edu.cn。

1 仪器与材料

Tanon-5200 型全自动化学发光仪(上海天能生命科学有限公司),041BR324935 型电泳仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司],XSC-SM1 型体视显微镜(北京学思创生物科技有限公司),ZXSD-B1430 型生化培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司),Sorvall Legend Micro 17R 型低温高速离心机、Sorvall Legend Micro 17 型高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),800TS 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

秀丽隐杆线虫(批号为 N2, wild type)、大肠杆菌(批号为 OP50)均由美国明尼苏达大学提供,蛋白胨(批号为 2179381,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),人胚肺成纤维细胞(MRC-5,中国科学院干细胞库),琼脂(批号为 20220616,北京百瑞极生物科技有限公司),4-甲氧基-3-羟基苯乙酮(含量质量分数 >98%,批号为 BD98419,上海毕得医药科技股份有限公司),氯化钙(批号为 P2141010)、硫酸镁(批号为 P2353937)、氯化钠(批号为 P2642887)、氢氧化钠(批号为 P2389774)、磷酸二氢钾(批号为 P2287865)、磷酸氢二钾(批号为 P2115064)、DMSO(批号为 P2578391)、胆固醇(批号为 P2383457)、5-氟脱氧尿苷(FudR,批号为 P2383457013421501)均由上海泰坦科技股份有限公司提供,超纯水(广州屈臣氏食品饮料有限公司),84 消毒液(蓝月亮有限公司),DMEM 培养基和胎牛血清由美国 Thermo Fisher Scientific 公司提供,细胞培养用青霉素-链霉素(双抗)(批号为 60162ES76)、RIPA(中)裂解液(批号为 20114ES60)、BCA 试剂盒(批号为 20201ES76)、蛋白上样缓冲液(批号为 20315ES05)、脱脂奶粉(批号为 36120ES76)、山羊抗兔 IgG 抗体(批号为 33101ES60)、山羊抗鼠 IgG 抗体(批号为 33201ES60)、超敏化学发光检测试剂(批号为 36208ES76)、RNA 提取试剂盒(批号为 19211ES08)、逆转录试剂盒(批号为 11141ES60)、qPCR 试剂盒(批号为 11184ES08)均由圣圣生物科技(上海)股份有限公司提供。试剂 TBST、抗体 GAPDH(GB11002)由武汉赛维尔生物科技有限公司提供,抗体 p53(sc-542731)、p21(sc-516214)由美国 Santa Cruz Biotechnology 公司提供。CCK-8 试剂(批号为 C0005)由美国 TargetMol Chemicals 公司提供。

2 方法

2.1 小白薇 75%乙醇提取物的制备

取干燥的小白薇植物全株,浸泡于体积分数 75%乙醇过夜,重复 3 次后合并滤液,加压浓缩后置于冷冻干燥机中冻干成粉末(HL0175),存放至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存。

2.2 线虫复苏与培养

2.2.1 线虫生长培养基(nematode growth medium,NGM)的配制

称取 1.2 g 氯化钠、1 g 蛋白胨、8 g 琼脂,置于 500 mL 锥形瓶中,加 400 mL 超纯水,于 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下高压蒸汽灭菌。灭菌结束后冷却至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$,加入浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸镁溶液 400 μL 、浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钙溶液 400 μL 、质量浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胆固醇溶液 400 μL 以及浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 10 mL,再加入质量浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FudR 2 mL 用于抑制产卵(做线虫扩培时则不加 FudR)。将液体 NGM 倒入线虫培养皿中(此步骤可加入药物母液,制作实验组 NGM),冷却凝固后备用。

2.2.2 线虫食物的制作

取冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的大肠杆菌(*Escherichia coli*,OP50)菌液,室温解冻后,置于超净台中使用接种环轻轻蘸取菌液并涂布在固体卢里亚-贝尔塔尼培养基(Luria-Bertani medium, LB)培养基上。待放置在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜后,取固体培养基中的单克隆菌落接种至 400 mL 液体 LB 培养基中,置于摇床上进行孵育($220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 16 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$),所得菌液离心浓缩作为后续线虫食物使用,使用前加入适量 S-缓冲液进行稀释并置于 NGM 上。

2.2.3 线虫的复苏与培养

将秀丽隐杆线虫样本自 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存环境中取出,待自然回温至室温。随后,将解冻的秀丽隐杆线虫,转移到预先添加好食物的 NGM 平板上,在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行培养。待线虫复苏后,筛选状态良好的个体,转移至新的添加食物的 NGM 平板上进行培养。经过 2~3 d,将孵化出的幼虫移至新的添加食物的 NGM 上,此步骤完成 F1 代的培养。通过重复上述过程,培育至 F3 代线虫用于后续寿命实验。

2.3 秀丽隐杆线虫寿命实验及分析

将处于 L4 阶段的线虫置于添加食物的空白组与实验组 NGM 平板上,标记为实验起始日。

在体式显微镜下观察线虫存活情况,每两天记录各组线虫死亡条数,直到线虫全部死亡,整理数据并进行统计。线虫死亡判断标准:使用挑虫器轻触线虫的头或尾部,若线虫10 s内无扭动或收缩反应,则被视为死亡。使用 log-rank (Mantel-Cox) 计算显著性。

2.4 秀丽隐杆线虫咽泵率实验及分析

将处于 L4 阶段的线虫置于含 OP50 的 NGM 平板上,标记为实验起始日^[8]。自此,于第 1、3、5、7、9、11(或 1、4、8、12)天对每组线虫进行观察,记录其半分钟内的咽泵活动频次,整理数据并进行统计,并使用 two-way ANOVA along with Sidak multiple comparisons test 计算显著性。

2.5 秀丽隐杆线虫身体摆动实验及分析

将处于 L4 阶段的线虫置于含 OP50 的 NGM 平板上,标记为实验起始日^[9]。自此,第 3、8、11(或 1、4、8、12)天,分别从各组培养皿中各取出 15 条线虫置于含有 M9 缓冲液的空白培养基上,先使其适应 30 s,然后在显微镜下观察并记录线虫在半分钟内的身体扭动次数,整理数据并进行统计,并使用 two-way ANOVA along with Sidak multiple comparisons test 计算显著性。

2.6 秀丽隐杆线虫热应激实验及分析

将处于 L4 阶段的线虫置于含 OP50 的 NGM 平板上,标记为实验起始日^[10-11]。在第 6 天,将线虫转移至 37 °C 恒温培养箱中过夜培养 10 h,记录线虫死亡情况。随后每 2 h 记录一次线虫死亡情况,直到线虫全部死亡,整理数据并进行统计,并使用 log-rank (Mantel-Cox) 计算显著性。

2.7 秀丽隐杆线虫渗透压力应激实验及分析

将处于 L4 阶段的线虫置于含 OP50 的高盐 NGM 平板上(氯化钠浓度为 500 mmol·L⁻¹),标记为实验起始日^[10-11]。在第 8 天,向培养皿中加入 1 mL M9 缓冲液将线虫冲洗至 1.5 mL Ep 管中,在 2.0 × 10³ r·min⁻¹ 条件下离心 1 min,吸弃悬液,重复该步骤两次。将沉淀中的线虫转移至高盐培养基中,此时记为第 0 min,每隔 3 min 记录线虫死亡情况,直到线虫全部死亡,整理数据并进行统计,使用 log-rank (Mantel-Cox) 计算显著性。

2.8 线虫体内脂褐素测定

将处于 L4 阶段的线虫置于含 OP50 的培养基中,标记为实验起始日。在第 6 天,将培养基上的线虫分别用 M9 缓冲液洗至离心管中。重复用 M9 缓冲液洗管内线虫 3 次以去除 OP50,而后吸

弃悬浮液,将线虫转移至新的 NGM 上,转移至载有琼脂糖凝胶垫的载玻片上,每片 10 条并保持头尾朝向一致。盖上盖玻片后置于荧光倒置显微镜下拍照,并用 ImageJ 软件进行定量处理。并使用 unpaired *t*-test 计算显著性。

2.9 抑菌实验

如之前文献中的方法^[12]所述,将 OP50 的单个菌落接种到 LB 培养基中,并在 37 °C 下培养。对于每组,取 30 μL 细菌培养物(光密度值 OD₆₀₀ = 0.4)滴加到 NGM 平板上,并在 20 °C 下培养。使用 1 mL M9 缓冲液将细菌洗脱下来,每 12 小时测量一次 OD₆₀₀,以 M9 缓冲液作为空白对照。使用带有 10 mm 石英比色皿的分光光度计评估光密度值进行测量。该实验平行重复 3 次,并使用 log-rank (Mantel-Cox) 计算显著性。

2.10 细胞培养与细胞活力测试

MRC-5 细胞培养于 DMEM 培养基中,该培养基同时含有体积分数 10% 胎牛血清以及体积分数 1% 双抗。MRC-5 细胞在含体积分数为 5% 二氧化碳,37 °C 的条件下进行培养。

在细胞活力检测实验中^[13],将细胞均匀接种到 96 孔板中,并用相关化合物处理 72 h。向每个孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,在分析前孵育 2 h。使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度,并使用 one-way ANOVA 计算显著性。

2.11 ROS 含量测定

将处于 L4 阶段的线虫置于含 OP50 的培养基中,标记为实验起始日。在第 6 天,将培养基上的线虫分别用 M9 缓冲液洗至离心管中。重复用 M9 缓冲液洗管内线虫 3 次以去除 OP50,向管中加入含有 50 μmol·L⁻¹ DCFH-DA 的 M9 缓冲液,在摇床上避光孵育 30 min 后离心,吸弃悬浮液后将线虫转移至新的 NGM 上,并集中收集至载有琼脂糖凝胶垫的载玻片上,每片 10 条并保持头尾朝向一致。盖上盖玻片后置于荧光倒置显微镜下拍照,并用 ImageJ 软件进行定量处理。使用 unpaired *t*-test 计算显著性。

将给药孵育 72 h 后的细胞吸弃原有培养基,加入含有 50 μmol·L⁻¹ DCFH-DA 的培养基,在培养箱中孵育 30 min 后,使用荧光倒置显微镜进行拍照,并使用 ImageJ 软件进行定量处理。使用 unpaired *t*-test 计算显著性。

2.12 免疫蛋白印迹法 (Western Blot)

对于 MRC-5 细胞,使用 RIPA(中)裂解液对

培养皿中的细胞进行裂解,并刮取收集至离心管中,低温离心后取上清液作为样品蛋白溶液,使用BCA试剂盒检测蛋白样品浓度。加入蛋白上样缓冲液放置于95℃蛋白金属孵育仪上孵育10 min后放置于-80℃中保存。使用SDS-PAGE(质量分数10%)凝胶电泳分离蛋白样品并转印在NC膜上,使用脱脂奶粉溶于TBST中封闭2 h。将膜置于4℃下与一抗孵育过夜,所用一抗分别为:GAPDH(1:10 000稀释比)、p53(1:5 000稀释比)、p21(1:5 000稀释比)。用TBST洗涤3次后,将膜在室温下与二抗孵育1 h,二抗分别为:山羊抗兔IgG抗体(1:10 000稀释比);山羊抗鼠IgG抗体(1:10 000稀释比)。在用TBST再次洗涤后,将膜与超敏化学发光检测

试剂)一起孵育。利用全自动化学发光仪进行成像,并使用Image J软件对图像进行定量分析。使用two-sided Student's *t*-test 计算显著性。

2.13 实时定量PCR

线虫RNA的提取:使用M9缓冲液将培养基上的线虫清洗至离心管中,室温高速离心后(2 000 r·min⁻¹,1 min),重复加入M9缓冲液进行清洗残余的OP50。使用总RNA提取试剂盒提取RNA,使用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA,使用qPCR试剂盒进行实时定量分析。使用two-way ANOVA along with Sidak multiple comparisons test 计算显著性。用于qPCR实验的引物信息列于表1。

Table 1 Primer information

表1 引物信息

Genes	Species	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>GADPH</i>		GGAAGTGTACCTACGATGGAGA	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT
<i>sod-1</i>		CGTAGGCGATCTAGGAAATGTG	TGACGAGCGTGTCCGGTGAG
<i>sod-2</i>	<i>C. elegans</i>	GATACTGTCCAAAGGGAAAGAT	GTAGTAAGCGTGTCTCCAGAA
<i>sod-3</i>		ATCTACTGCTCGCACTGCTT	TTCATGGCTGATTACAGGTT
<i>prdx-3</i>		CTTGACTTCACCTTTGTATGCC	GGCGATCTTCTGTGTTGAAATCA
<i>mdt-15</i>		CACGACCCGGTCTTTCGTC	CTAGACCACCGCTTGTCTGG

2.14 统计学方法

所有数据统计分析均为给药处理组与空白对照组比较,统计分析方法包括two-sided Student's *t*-test, unpaired *t*-test, log-rank (Mantel-Cox), one-way ANOVA, two-way ANOVA, 所有图标均使用Graphpad Prism 8软件和微软办公软件生成。

3 结果

3.1 HL0175对线虫寿命的影响

首先,对小白薇75%乙醇提取物HL0175开展多浓度的线虫寿命实验。如图1A~1C所示,HL0175在质量浓度为200 μg·mL⁻¹的处理下显著延长线虫的寿命(**** *P* < 0.000 1),在质量浓度为400 μg·mL⁻¹处理的延寿活性(** *P* < 0.01)低于质量浓度为200 μg·mL⁻¹下的延寿活性(**** *P* < 0.000 1),在质量浓度为50 μg·mL⁻¹下无显著延寿活性。因此,HL0175在质量浓度为200 μg·mL⁻¹展现出最佳的延寿活性,在后续实验中,本文作者优选质量浓度200 μg·mL⁻¹为测试浓度。

3.2 HL0175对线虫健康寿命的影响

为全面评价HL0175的抗衰老能力,本文作

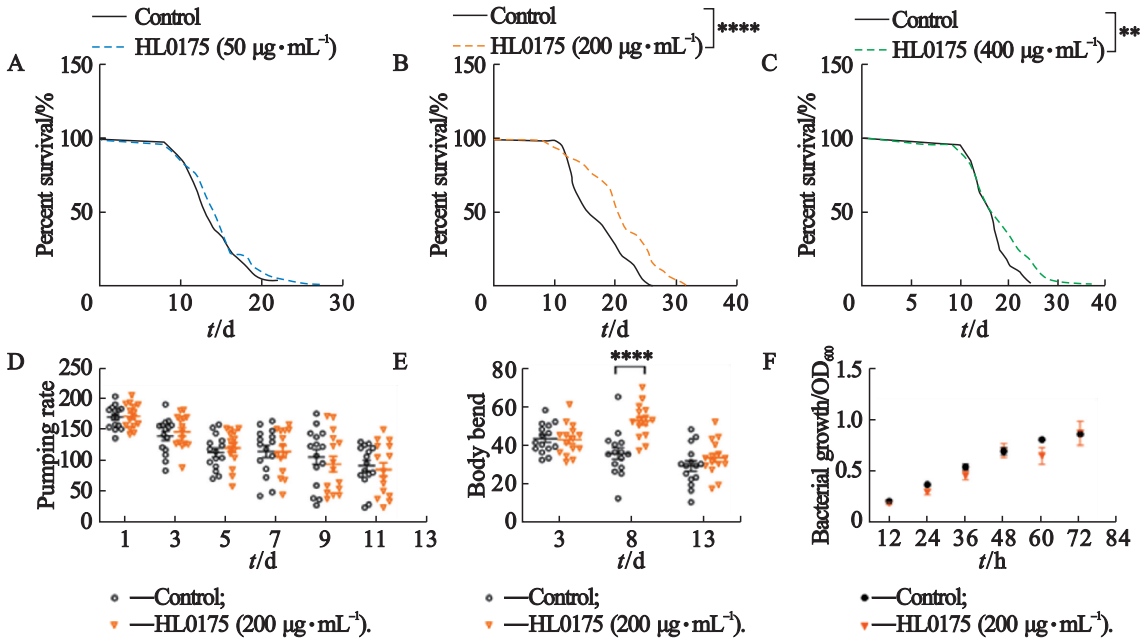
者不仅要检测其延长线虫寿命的效果,还需要检测对线虫健康水平的影响。随着衰老过程的推进,线虫进食和运动器官咽球会出现运动频率下降的现象,吞咽频率是表征其健康的重要指标。所以,本文作者分别检测在线虫成年期的第1、3、5、7、9、11天线虫在30 s内的吞咽次数。结果如图1D所示,HL0175不降低线虫的吞咽次数,说明HL0175对线虫吞咽频率不会产生不良反应,不会因此而降低线虫健康水平。除此之外,线虫的运动能力会随着衰老而下降,导致其在液体里的游动活力减弱。为此,本文作者测试了HL0175在第3、8、13天对线虫身体摆动次数的影响,结果如图1E所示,HL0175提高线虫身体摆动次数,并且在第8天具有显著性差异(**** *P* < 0.000 1)。由此可知,HL0175提升线虫身体摆动能力,促进线虫健康水平,未对吞咽频率产生不利影响。

3.3 HL0175对大肠杆菌生长的影响

为了排除HL0175在质量浓度为200 μg·mL⁻¹条件下是否会对线虫的食物*E. coli*. OP50产生抑制作用,导致饮食限制,从而延长线

虫的寿命。使 OP50 在空白组与 HL0175 组 NGM 平板上分别生长 12、24、36、48、60、72 h,检测不同时间点 OP50 的 OD₆₀₀ 值。结果如图 1F 所示, 12~72 h,与空白组相比,处理组对 OP50 的生长

均无影响,这表明 HL0175 在质量浓度为 200 μg·mL⁻¹的条件下延长线虫寿命不通过抑制细菌生长从而导致饮食限制。



A—Lifespan curve of worms treated with HL0175 50 μg·mL⁻¹; B—Lifespan curve of worms treated with HL0175 200 μg·mL⁻¹, ****—P < 0.0001, Lifespan of HL0175 compared with the control group; C—Lifespan curve of worms treated with HL0175 400 μg·mL⁻¹, **—P < 0.01, Lifespan of HL0175 compared with the control group; D—Pumping rate per 30 s of worms treated with HL0175 200 μg·mL⁻¹; E—Body bend per 30 s worms treated with HL0175 200 μg·mL⁻¹; ****—P < 0.0001, Body bend of HL0175 compared with the control group; F—Bacterial growth curve under the condition of treatment of HL0175 200 μg·mL⁻¹.

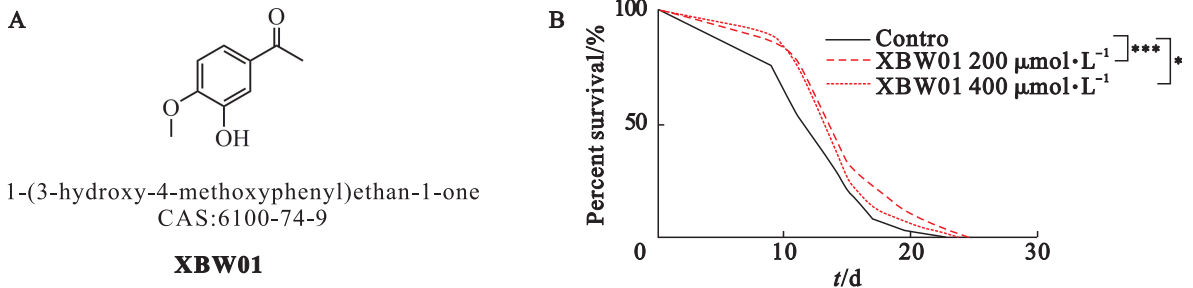
Fig. 1 Effect of HL0175 on lifespan and healthspan of *C. elegans*

图1 HL0175对线虫寿命和健康寿命的影响

3.4 XBW01对线虫寿命的影响

为进一步挖掘中草药中所蕴含的抗衰老潜力成分,本文作者对 HL0175 中的 4-甲氧基-3-羟基苯乙酮(XBW01)开展抗衰老评价。XBW01 结构如图 2A 所示。在线虫水平,与空白对照组相比, XBW01 显著延长线虫寿命,浓度 200 μmol·L⁻¹

的给药组的延寿率为 14.56% (**P < 0.001),浓度 400 μmol·L⁻¹的给药组延寿率为 10.85% (*P < 0.05),结果如图 2B 和表 2 所示。上述结果表明, XBW01 具有显著延长线虫寿命的能力,且在浓度 200 μmol·L⁻¹下活性更佳。



A—Structure of XBW01; B—Lifespan curve of worms treated with XBW01 200 μmol·L⁻¹ or 400 μmol·L⁻¹, ***—P < 0.001, Lifespan of XBW01 (200 μmol·L⁻¹) compared with the control group, *—P < 0.05, Lifespan of XBW01 (400 μmol·L⁻¹) compared with the control group.

Fig. 2 Effect of XBW01 on the lifespan of *C. elegans*

图2 XBW01对线虫寿命的影响

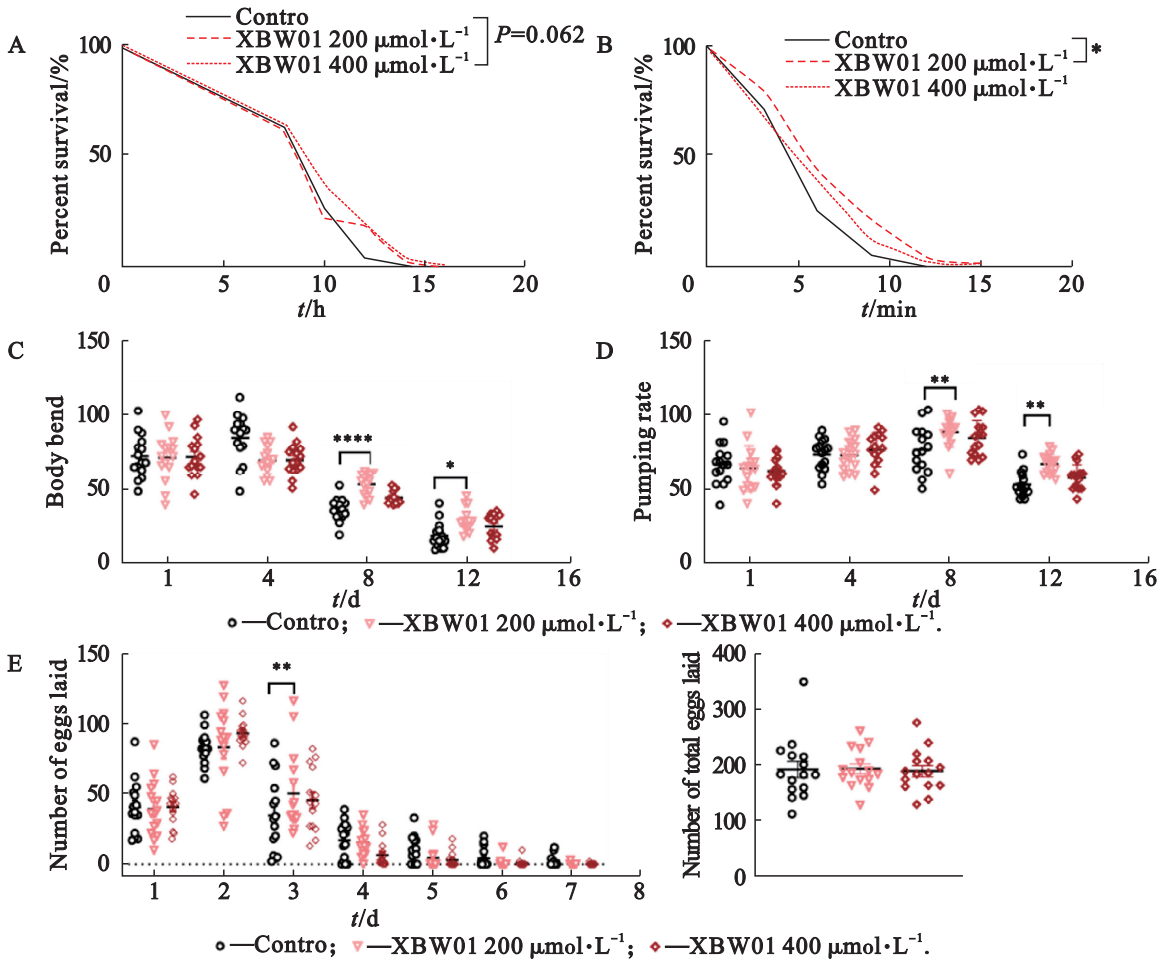
Table 2 Lifespan data of worms treated with XBW01 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表2 线虫经给药 XBW01 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生命实验数据

Treatment	Concentrations/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Mean lifespan/d	Number of worms	Lifespan extension/%
Control	—	13.04	97	—
XBW01	200	14.94	100	14.56
XBW01	400	14.46	92	10.85

3.5 XBW01 对线虫健康寿命的影响

如图 3A 所示,与空白对照组相比,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 XBW01 处理能够增强秀丽隐杆线虫抵抗热应激的能力 ($P = 0.062$);如图 3B 所示,与空白对照组相比,处理浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 XBW01 显著增强线虫抵抗渗透

压力应激的能力 (** $P < 0.01$),处理浓度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 XBW01 具有增强线虫抵抗渗透压力应激能力的趋势;如图 3C 所示,在第 8 天和第 12 天,处理浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够显著增加线虫的身体摆动能力 (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$);如图 3D 所示,在第 8 天和第 12 天,处



A—Heat stress survival curve of worms treated with XBW01 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B—Osmotic pressure survival curve of worms treated with XBW01 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, *— $P < 0.05$, Lifespan of XBW01 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) compared with the control group; C—Body bend per 30 s worms treated with XBW01 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ****— $P < 0.0001$, Body bend of XBW01 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) compared with the control group at day 8, *— $P < 0.05$, Body bend of XBW01 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) compared with the control group at day 12; D—Pumping rate per 30 s of worms treated with XBW01 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **— $P < 0.01$, Pumping rate of XBW01 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) compared with the control group at day 8 and day 12; E—Laid eggs of worms treated with XBW01 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **— $P < 0.01$, Number of eggs laid of XBW01 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) compared with the control group at day 3.

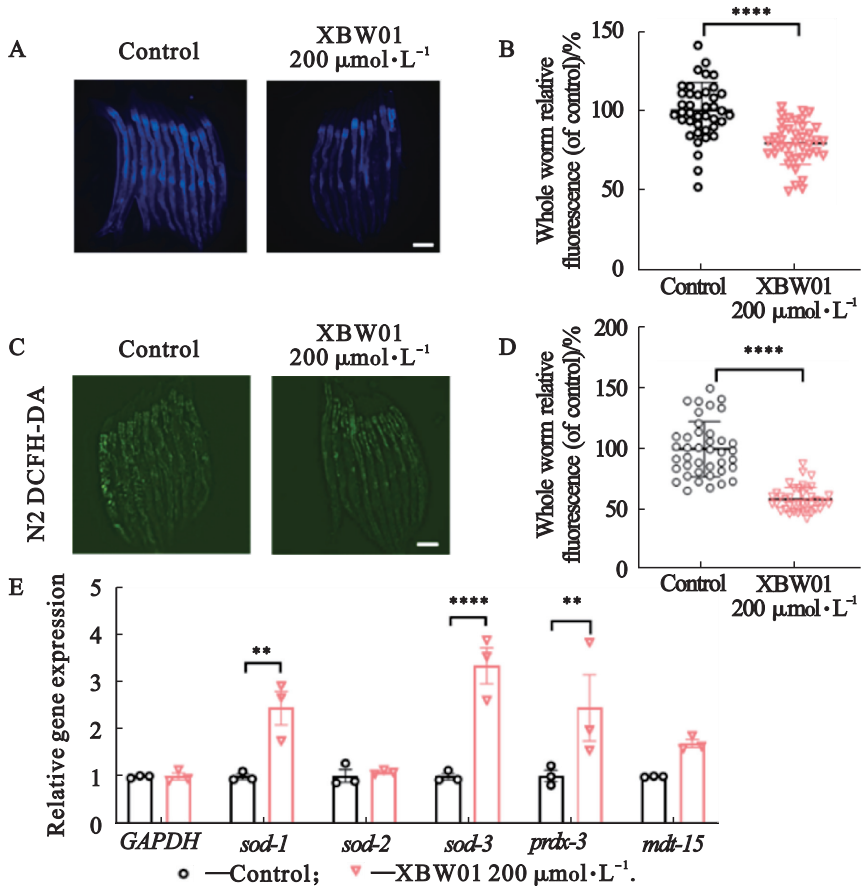
Fig. 3 Effect of XBW01 on the healthspan of *C. elegans*

图3 XBW01 对线虫健康寿命的影响

理浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够显著增加线虫咽部泵送能力 (** $P < 0.01$); 如图 3E 所示, XBW01 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后的线虫产卵量在第 3 天显著多于空白组线虫 (** $P < 0.01$), 但其他时间的产卵量和产量总量与空白组相比没有显著性差异, 说明 XBW01 对于线虫的生殖能力无不利影响。上述结果表明, XBW01 不仅能够延长线虫的寿命, 还能够提升线虫的健康寿命的同时不影响生殖能力, 在 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下活性最佳。

3.6 XBW01 对线虫体内抗氧化标志物的影响

随着年龄的增长, 脂褐素在生物体细胞中的沉积量会越来越多, 同样也导致细胞新陈代谢减慢和活动减少, 从而导致器官功能下降, 这些因素进一步导致生物体的衰老^[14]。如图 4A 和 4B 所示, 在荧光显微镜下, 可以观察到线虫中的脂褐素显示自发的蓝色荧光。与空白对照组相比, $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 XBW01 处理线虫 6 天显著降低线虫体内脂褐素的积累 (**** $P < 0.0001$)。



A—Representative images of worms treated with XBW01 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B—Quantitative analysis of the blue fluorescence intensity in worms, ****— $P < 0.0001$, Level of lipofuscin compared with the control group; C—Determination of ROS in worms treated with XBW01 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); D—Quantitative analysis of the green fluorescence intensity in worms, ****— $P < 0.0001$, Level of ROS compared with the control group; E—Analysis of mRNA levels in worms treated with XBW01 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), **— $P < 0.01$, Expression of *sod-1* compared with the control group, ****— $P < 0.0001$, Expression of *sod-3* compared with the control group, **— $P < 0.01$, Expression of *prdx-3* compared with the control group; Scale bar represents $100 \mu\text{m}$.

Fig. 4 Effect of XBW01 on antioxidant markers in worms

图4 XBW01对线虫体内抗氧化标志物的影响

活性氧(ROS)是一种活性化学物质,与生物体的衰老密切相关。当活性氧自由基过量时,会引起脂质过氧化和氧化应激,破坏生物体的细胞膜,破坏蛋白质、DNA和脂质^[15]。这些变化会触发细胞凋亡并加速衰老过程。DCFH-DA是一种常用的氧化应激指示剂,用于检测活性氧^[16],具有

细胞膜渗透性且无荧光性。如图 4C 和 4D 所示,与空白对照组相比,处理浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 XBW01 显著降低线虫体内 ROS 的积累。

除此之外,本文作者通过检测线虫体内抗氧化基因的表达水平进一步解释线虫体内活性氧和脂褐素表达水平的变化。如图 4E 所示,抗氧化相关基因

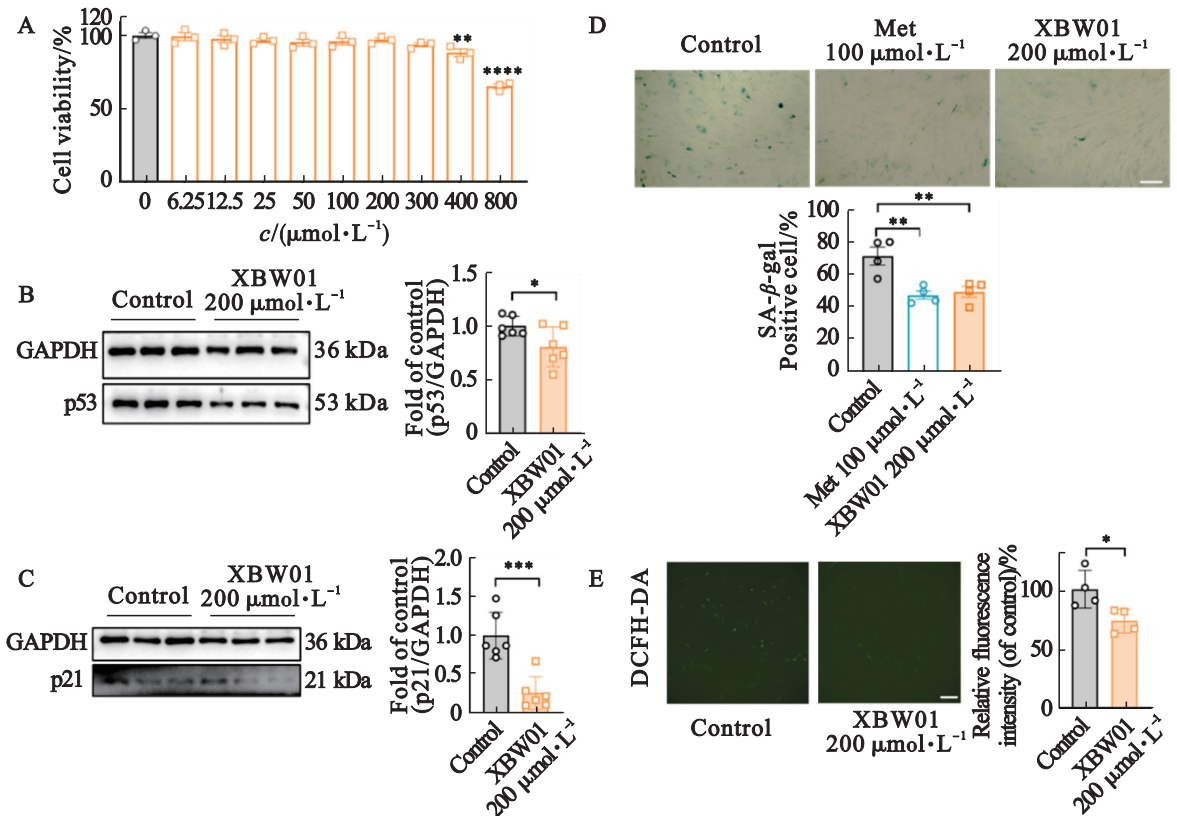
sod-1、*sod-3*、*prdx-3* 在 XBW01 的干预下 mRNA 表达水平显著升高 (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$), 代谢调节相关基因 *mdt-15* 的表达水平也有升高趋势。上述结果进一步确证了 XBW01 的线虫水平具有潜在的抗氧化活性以延长线虫寿命。

3.7 XBW01 在 MRC-5 上细胞活力测试及对衰老标志物表达的影响

进一步, 在细胞水平进行抗衰老药效评价。首先, 需进行细胞活力检测, 寻找安全的孵育浓度。如图 5A 所示, 在对第 26 代 MRC-5 细胞进行梯度浓度给药孵育后, 在 $0 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的给药浓度区间, XBW01 对 MRC-5 细胞没有显著的毒性。为和线虫水平处理浓度保持一致, 后续细胞实验选择最适给药浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。选择第 29 代(衰老期)的 MRC-5 细胞, 经过 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 XBW01 孵育 3 d 后, 提取空白对照组和 XBW01 处理组细胞的蛋白, 经免疫蛋

白印迹实验检测 XBW01 对衰老标志物的影响。结果如图 5B 和 5C 所示, 与空白对照组相比, 衰老相关细胞周期阻滞标志物——细胞周期蛋白依赖性激酶 p21 和 p53 表达水平在 XBW01 干预后显著降低 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)。

衰老相关半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 的表达是评价细胞衰老进程且被广泛认可的指标^[17]。选用更加衰老的第 37 代细胞, 如图 5D 所示在经过给药 XBW01 ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预后, 使用 SA- β -gal 衰老染色后细胞中的蓝色着色显著减少 (** $P < 0.01$), 且 XBW01 的治疗效果接近于阳性对照组(二甲双胍, Met)。如图 5E 所示, 在 XBW01 ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的干预条件下, MRC-5 细胞内的 ROS 含量显著减少 (* $P < 0.05$)。上述结果表明, XBW01 能够改善衰老细胞的周期阻滞, 降低衰老标志物 SA- β -gal 水平, 减少衰老细胞中 ROS 含量, 延缓细胞衰老。



A—CCK8 of XBW01 on P26 MRC-5 cells, **— $P < 0.01$, Cell viability of XBW01 ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) compared with the control group, ****— $P < 0.0001$, Cell viability of XBW01 ($800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) compared with the control group; B—Protein levels of p53 in MRC-5 cells after XBW01 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ administration, *— $P < 0.05$, Expression of p53 compared with the control group; C—Protein levels of p21 in MRC-5 cells after XBW01 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ administration, ****— $P < 0.001$, Expression of p21 compared with the control group; D—Representative images of SA- β -gal staining and quantification of SA- β -gal positivity rate, **— $P < 0.01$, SA- β -gal of XBW and Met groups compared with the control group; E—Representative images and quantification of ROS determination in MRC-5 cells, *— $P < 0.05$, Level of ROS compared with the control group; Scale bar represents $100 \mu\text{m}$.

Fig. 5 Cell viability of XBW01 in MRC-5 cells and its effect on the expression of senescence markers

图5 XBW01 在 MRC-5 细胞上的活力测试及衰老标志物表达水平检测

4 讨论与结论

小白薇是我国云南地区分布广泛的植物^[18],其根部具有药用价值,味苦、性寒,具有清热散肿、清火利湿的功效。4-甲氧基-3-羟基苯乙酮是小白薇所含成分之一,也存在于其他多种植物中,具有抗氧化和抗炎活性^[19],其作用机制与调节细胞内的氧化还原信号通路、抑制炎症因子的表达和释放有关^[20]。当前,对4-甲氧基-3-羟基苯乙酮的研究相对匮乏,其结构类似物丹皮酚的研究也尚处于起步阶段。丹皮酚是从中药芍药提取的天然化合物,具有抗炎、抗氧化等多种生物活性的小分子化合物^[21]。研究表明^[22],在HeLa细胞和MCF-7细胞中,丹皮酚的4-位甲氧基是抗肿瘤活性的增效官能团,酮羰基侧链为其抗肿瘤活性的必需官能团,丹皮酚的羰基结构、双含氧取代结构是其抗肿瘤活性的必需基团。作为丹皮酚的衍生物,4-甲氧基-3-羟基苯乙酮的多种生物学活性值得深入探讨与研究。

在本研究工作中,首次发现小白薇提取物中的4-甲氧基-3-羟基苯乙酮能够延长秀丽隐杆线虫的寿命(约14.56%),还能改善线虫的健康寿命,包括吞咽能力、身体摆动能力以及抵抗热应激和高盐渗透压应激的能力。并且,发现4-甲氧基-3-羟基苯乙酮通过降低线虫体内脂褐素和活性氧的积累以及提高抗氧化基因(*sod-1*, *sod-3*, *prdx-3*, *mdt-15*)的表达以参与改善线虫健康寿命。不仅仅局限于线虫模型,本文作者还在人源的MRC-5细胞的体外模型上发现,4-甲氧基-3-羟基苯乙酮的安全浓度高达 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。p21是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,在不同的衰老刺激下持续上调,是衰老相关细胞周期阻滞的重要标志物^[23]。肿瘤抑制因子p53是一种应激反应转录因子,研究表明,p53具有调节衰老细胞产生和分泌多种生物活性因子(统称为衰老相关分泌表型,SASP)的能力,是细胞衰老标志物之一^[24]。在细胞水平,发现4-甲氧基-3-羟基苯乙酮能够改善复制性衰老引起的细胞周期阻滞基因p21的表达,以及衰老相关分泌表型密切相关的应激反应转录因子p53的表达,通过改善细胞周期阻滞状态来延缓衰老。除此之外,4-甲氧基-3-羟基苯乙酮还能够显著降低细胞内衰老相关标志物SA- β -gal、ROS的水平,有效的延缓细胞衰老。不足的是,还没有将此小分子应用在哺乳动物模

型上以验证体内抗衰老作用及安全性评估。

综上所述,本文作者发现小白薇提取物及其成分4-甲氧基-3-羟基苯乙酮可以延长线虫的寿命和健康寿命,还可缓解人胚肺成纤维细胞MRC-5的衰老状态,为后续在哺乳动物模型的抗衰老研究工作和发掘4-甲氧基-3-羟基苯乙酮作为潜在的抗衰老小分子化合物提供研究基础。

参考文献:

- [1] CAMPISI J, KAPAH P, LITHGOW G J, et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing [J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 183–192.
- [2] GUARENTE L, SINCLAIR D A, KROEMER G. Human trials exploring anti-ageing medicines [J]. *Cell Metab*, 2024, 36(2): 354–376.
- [3] CHEN X J, ZHANG W, LIU R, et al. Protective effect of renal ischemia-reperfusion injury of Yunnan *Diaphragma Juglandis Fructus* in mice [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* (沈阳药科大学学报), 2024, 41(3): 343–350.
- [4] LAI C H, HE W M, YANG D D, et al. Amygdalin ameliorates post-stroke depression by inhibiting JNK signal pathway [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* (沈阳药科大学学报), 2024, 41(1): 112–120.
- [5] LIN Y P, LI X P, FU S N, et al. Chemical constituents from the roots of *Tylophora yunnanensis* [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药杂志), 2020, 42(9): 2342–2346.
- [6] ZHANG Z, HE X D, JI S, et al. Effect of p-hydroxyacetophenone on lowering blood lipids [J]. *World Clinical Drug* (世界临床药物), 2010, 31(10): 599–602.
- [7] ZHANG D J, LIU J Y, WANG J Y. 3, 4-Dihydroxyacetophenone reduces TG content in L02 cells and hepatic tissue via AMPK pathway [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology* (中国病理生理杂志), 2018, 34(10): 1855–1860.
- [8] HANOVER J A, LOVE D C, PRINZ W A. Calmodulin-driven nuclear entry: trigger for sex determination and terminal differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(19): 12593–12597.
- [9] WILSON M A, SHUKITT-HALE B, KALT W, et al. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Aging Cell*, 2006, 5(1): 59–68.
- [10] MAO Z, LIU W, HUANG Y, et al. Anti-ageing effects of chlorpropamide depend on mitochondrial complex-II and the production of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(2): 665–677.
- [11] SOLOMON A, BANDHAKAVI S, JABBAR S, et al. *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments [J]. *Genetics*, 2004, 167(1): 161–170.
- [12] HAN B, SIVARAMAKRISHNAN P, LIN C J, et al. Microbial genetic composition tunes host longevity [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1249–1262.
- [13] JOZEF CZUK J, DREWS K, ADJAYE J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *J Vis Exp*, 2012, (64): 3854.
- [14] GRAY D A, WOULFE J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste [J]. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2005, 2005(5): re1–re5.

- [15] DAVALLI P, MITIC T, CAPORALI A, et al. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3565127.
- [16] KIM H, XUE X. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining [J]. *J Vis Exp*, 2020(160): 60682.
- [17] GASEK N S, KUCHEL G A, KIRKLAND J L, et al. Strategies for targeting senescent cells in human disease [J]. *Nat Aging*, 2021, 1(10): 870–879.
- [18] CHEN Z, CHEN H F, YANG C X, et al. A preliminary study of national anti-inflammatory active ingredients of *Tylophora yunnanensis* [J]. *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine (云南中医中药杂志)*, 2015, 36(8): 68–70.
- [19] WANG J, WU G, CHU H, et al. Paeonol derivatives and pharmacological activities: a review of recent progress [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(6): 466–482.
- [20] ZHANG L, LI D C, LIU L F. Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 413–421.
- [21] VELLASAMY S, MURUGAN D, ABAS R, et al. Biological activities of paeonol in cardiovascular diseases: a review [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 4976.
- [22] WANG X J, LIU J L, WANG J K. Synthesis and anti-tumor activity of paeonol and its derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47(1): 72–76.
- [23] DI MICCO R, KRIZHANOVSKY V, BAKER D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 75–95.
- [24] VADDAVALLI P L, SCHUMACHER B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging [J]. *Trends Genet*, 2022, 38(6): 598–612.

Study on the anti-aging effect of 4-methoxy-3-hydroxyacetophenone, an active ingredient of *Tylophora yunnanensis* Schltr.

LIU Yuhang¹, QIAO Sicong², LI Baoli^{1*}, LI Jian^{2*}, LIU Wenwen^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of 4-methoxy-3-hydroxyacetophenone (XBW01), an active component of 75% ethanol extract (HL0175), on lifespan-extension and health span-promotion in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model, and the reduction of aging-related biomarkers in replicative senescent human embryo lung fibroblasts (MRC-5) model. **Methods** The *C. elegans* was used as a model organism, and a series of health status indexes were tested, including pharyngeal pump frequency and body bending speed. At the MRC-5 cell level, cell viability was evaluated by CCK-8 kit to determine the safe concentration of XBW01, and the expression of aging-related biomarkers in cells was detected by Western Blot. **Results** Compared with blank control group, HL0175 (200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment significantly extended the lifespan of *C. elegans*, improved the body bending ability. In addition, XBW01 (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment significantly extended the lifespan, enhanced the ability of heat stress and osmotic stress, improve the pharyngeal pump frequency and body bending speed of *C. elegans*. At the cellular level, XBW01 showed no significant toxicity to MRC-5 cells at concentrations between 0-200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. XBW01 (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment significantly decreased the expression levels of aging-related biomarkers p21 and p53 at the MRC-5 cell level. **Conclusion** XBW01 contained in HL0175 can extend the lifespan and improve the health parameters of *C. elegans*, and reduce the expression level of biomarkers in senescent cells.

Key words: *Tylophora yunnanensis* Schltr.; 4-methoxy-3-hydroxyacetophenone; *Caenorhabditis elegans*; cellular senescence; anti-aging