

茯苓三种活性成分对秀丽隐杆线虫的体内抗衰老作用

余玉楠¹, 王平^{2,3}, 代君怡¹, 刘军锋^{1,3,4}, 晁俊峰¹

(1.湖北中医药大学药学院,湖北 武汉 430065; 2.湖北中医药大学老年医学研究所,湖北 武汉 430065;

3.湖北时珍实验室,湖北 武汉 430065; 4.湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室,湖北 武汉 430065)

摘要:目的 研究茯苓三种活性成分对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*, N2 线虫)寿命和应激能力的影响及机制,初步探究茯苓抗衰老的潜力。方法 采用溶剂法提取茯苓中水溶性多糖、酸性多糖和三萜;评估3种活性成分对N2线虫寿命、抗应激、生殖能力和运动能力以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)和脂褐素水平的影响;采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)测定衰老相关基因的表达。结果 与空白组相比,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶性多糖组、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酸性多糖组和500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 茯苓三萜组的N2线虫寿命分别延长12.72%、15.07%和12.55%,并增强其抗氧化应激能力($P < 0.05$);酸性多糖和三萜能提高N2线虫在热应激和紫外应激状态下的生存率,降低N2线虫体内ROS水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3种活性成分可显著降低N2线虫体内脂褐素水平($P < 0.05$),并不影响其产卵量和运动能力($P > 0.05$)。茯苓3种活性成分可通过上调 $daf-16$ 和 $ctl-2$ mRNA及下调 $daf-2$ 和 $age-1$ mRNA的表达,延长N2线虫寿命。结论 茯苓3种活性成分在N2线虫中表现出抗氧化和抗衰老的作用,其机制可能与调控胰岛素/胰岛素样生长因子1信号通路中衰老相关基因的表达有关。

关键词:茯苓活性成分;抗衰老;水溶性多糖;酸性多糖;三萜

中图分类号:R931.6

文献标志码:A

In vivo anti-aging effect of *poria cocos* three active ingredients on *caenorhabditis elegans*

YU Yunan¹, WANG Ping^{2,3}, DAI Junyi¹, LIU Junfeng^{1,3,4}, ZAN Junfeng¹

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;

2. Institute of Gerontology, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;

3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, Hubei, China; 4. Key Laboratory of TCM Resources and Compounds of Ministry of Education, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China)

Abstract: Objective To explore the anti-aging potential of *Poria cocos* by investigating the effects of its three active ingredients on the life-span and stress ability in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) and potential mechanisms. **Methods** Water-soluble polysaccharides, acidic polysaccharides, and triterpenes were extracted from *Poria cocos* using a solvent extraction method. The effects of these three active ingredients on the lifespan, stress resistance, reproduction ability, and locomotion of *C. elegans*, as well as their impact on the levels of ROS and lipofuscin, were evaluated. The expression of aging-related genes was determined using qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, water-soluble polysaccharides at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, acidic polysaccharides at 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and triterpenes from *Poria cocos* at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ prolonged the lifespan of *C. elegans* by 12.72%, 15.07% and 12.55%, and enhanced the antioxidant stress

resistance ($P < 0.05$), respectively. Acidic polysaccharides and triterpenes increased their survival rates under heat stress and ultraviolet stress and reduced the levels of ROS in the *C. elegans*, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Meanwhile, these three active ingredients significantly reduced lipofuscin levels in *C. elegans* ($P < 0.05$), and did not affect the egg-laying capacity and motility ($P > 0.05$). The three active ingredients from *Poria cocos* upregulated the expression of *daf-16* and *ctl-2* mRNA, while downregulating the expression of *daf-2* and *age-1* mRNA, thereby extending the lifespan of *C. elegans*. **Conclusion** The three active ingredients of *Poria cocos* exhibited antioxidant and anti-aging effects in *C. elegans*. The mechanism may be related to regulating the expression of aging-related genes in the insulin/IGF-like signaling pathway.

Key words: *Poria cocos* active ingredients; Anti-aging; Water-soluble polysaccharides; Acidic polysaccharides; Triterpenes

由年龄增长引起的认知、运动和感官功能下降以及慢性病等健康问题在降低老年人生活质量的同时,也增加了个体和社会的经济和医疗负担。我国的老龄化程度正逐步加深,社会养老压力也随之增加^[1]。加强抗衰老研究不仅有助于提高老年人的生活质量,也对社会和经济有积极意义。

研究表明,许多源于药食同源资源的小分子药物或天然产物具有潜在抗衰老功效,已成为相关领域的研究热点^[2-4]。茯苓是多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,主要活性成分为多糖和三萜,对糖尿病、心血管疾病、癌症和神经退行性疾病等衰老相关疾病均有一定的治疗作用^[5-8]。胰岛素/胰岛素样生长因子信号 (insulin/IGF-like signaling, IIS) 通路是调节衰老的关键通路之一,能从多条途径干预衰老及相关疾病的发生发展^[9-10]。有研究表明茯苓多糖可通过调控 IIS 通路下游重要转录因子 *skn-1* 发挥延缓衰老的作用^[11-12]。本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物,研究茯苓 3 种活性成分(三萜、水溶性多糖和酸性多糖)的抗衰老作用及相关机制,为其作为食品、保健品或药物的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料

野生型(wild-type)N2 秀丽隐杆线虫和尿嘧啶缺陷型大肠杆菌 (*Escherichia coli strain*) OP50 及 NA22 均购买于美国明尼苏达大学下属的秀丽隐杆线虫遗传信息保藏中心。

1.1.2 主要试剂

茯苓菌核购自安徽亳药千草国药股份有限公司;琼脂粉(EZ3412C303,德国 Biofrox 公司);胰蛋白胨(2855060,英国 OXOID 公司);酵

母粉(2746246-02,英国 OXOID 公司);蛋白胨(20190520,北京双旋微生物培养基制品厂);胆固醇(1107K032,北京索莱宝科技有限公司);硫酸镁(20100315,上海强顺化工有限公司);5-氟尿嘧啶(纯度>99%,D0428A,大连美仑生物技术有限公司);百草枯(纯度98%,A1825070,上海阿拉丁生化科技股份有限公司); KH_2PO_4 (20070612)、 MgSO_4 (20100315)、 NaCl (20190515)、 CaCl_2 (20190713)、 Na_2HPO_4 (20160016)、 NaOH (20181219)、 KCl (20150313)、 NaClO (20190516)、 K_2HPO_4 (20150312)、乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA- Na_2)(20141128)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20140110)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (20170716)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20150614)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20140712)均购自国药集团化学试剂有限公司(上海);引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。序列见表1。

1.1.3 主要仪器

SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州苏净安泰空气技术有限公司);SpectraMax M5 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);IX51 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Microfuge 22R 冷冻离心机(韩国 Reckman 公司);CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 茯苓 3 种活性成分的分离

茯苓加 8 倍质量 70% (体积分数)乙醇浸泡 12 h 后,回流提取 2 次,第 1 次 2 h,第 2 次 1 h;过滤并合并滤液;减压干燥得三萜成分,为棕色粉末。醇提后的药渣挥干乙醇,加 8 倍质量的水回流提取 3 次,1 h/次;过滤并合并滤液;减压干燥得水溶性多糖成分,为棕黄色粉末。水提后的药渣用浓度为 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液搅拌提取 1 h;过滤;盐酸中和后除 NaCl ;冷冻干燥后得酸性多糖成分,为白色粉末^[13-14]。

表1 β -actin、age-1、daf-2、daf-16、ctl-2 的上游引物和下游引物序列
Table 1 Upstream and downstream primers sequences of β -actin age-1、daf-2、daf-16 and ctl-2

| 基因 | 方向 | 引物序列 | 长度(碱基对) |
|----------------|----|---------------------------------|---------|
| β -actin | 正 | 5'-GAACGCCTACGATCTTCTCCAC-3' | 171 |
| | 反 | 5'-TATCTGCACTCCTTTCCGTCCT-3' | |
| age-1 | 正 | 5'-AGACCGAGAATGGCAAAGGA-3' | 111 |
| | 反 | 5'-CAAGAAACCACGGAAATACTACACT-3' | |
| daf-2 | 正 | 5'-CGTCAATCGTCACCGTTTATCTC-3' | 180 |
| | 反 | 5'-GTTATTGGCAATTGACACAGTTCC-3' | |
| daf-16 | 正 | 5'-AAAGACAACGACCAGACGGAAC-3' | 163 |
| | 反 | 5'-ACTGTTCGAATCTCCCTTATCCC-3' | |
| ctl-2 | 正 | 5'-TCCATACCCAGAAGCGTAATCC-3' | 204 |
| | 反 | 5'-TCACATAGATAGCCTTTCCGTCC-3' | |

1.2.2 茯苓3种活性成分含量测定

1.2.2.1 多糖含量测定

取1 mL浓度为0.5 mg/mL的样品水溶液加入至25 mL具塞试管;向试管中加入5% (体积分数)苯酚溶液1 mL;然后加入10 mL 98% (质量分数)浓硫酸混匀,沸水浴反应15 min;冷却至室温后在490 nm处测定吸光度。使用葡萄糖为标准品,以吸收度对浓度作回归计算,得线性回归方程为: $Y = 3.1576X + 0.0128, R^2 = 0.9996$ 。

1.2.2.2 三萜含量测定

取1 mL浓度为0.4 mg/mL样品甲醇溶液加入至10 mL具塞试管,挥干溶液;加入新配制的5% (质量分数)香草醛-冰醋酸溶液0.2 mL及70% (质量分数)高氯酸0.8 mL;充分摇匀后在70 °C水浴中加热15 min;流水冷却至室温,加入冰醋酸5 mL摇匀;室温放置30 min后于556 nm波长处测定吸光度。使用熊果酸为标准品,以吸收度对浓度作回归计算,得线性回归方程为: $Y = 0.0073X - 0.0425, R^2 = 0.9990$ 。

1.2.3 试剂配制

S·Basal 缓冲液:分别称取2.925 g NaCl、0.5 g K_2HPO_4 和3 g KH_2PO_4 于试剂瓶中,加500 mL超纯水溶解;121 °C灭菌30 min,冷却至室温后加入0.5 mL 5 mg/mL胆固醇乙醇溶液。

微量元素溶液:分别称取0.93 g EDTA- Na_2 、0.345 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、0.145 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.0125 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,溶于500 mL超纯水中;超声使其完全溶解后121 °C高压灭菌50 min;冷却至室温后于4 °C密封保存备用。

S·Medium 缓冲液:取500 mL S·Basal 缓冲液,加入5 mL 1 mol/L柠檬酸钾缓冲液、5 mL微量元素溶液、1.5 mL 1 mol/L $CaCl_2$ 及1.5 mL 1 mol/L $MgSO_4$ 混匀。

M9 缓冲液:分别称取1.5 g KH_2PO_4 、3 g

Na_2HPO_4 和2.5 g NaCl于试剂瓶中,加超纯水500 mL溶解;121 °C灭菌30 min,冷却至室温后加入0.5 mL 1 mol/L $MgSO_4$ 。

秀丽隐杆线虫固体培养基(nematode growth medium, NGM):分别称取1.5 g NaCl、10 g琼脂和1.25 g胰蛋白胨,加500 mL超纯水溶解;121 °C灭菌30 min,待温度降至55 °C时,加入0.5 mL 5 mg/mL胆固醇乙醇溶液、0.5 mL 1 mol/L $CaCl_2$ 、0.5 mL 1 mol/L $MgSO_4$ 和12.5 mL 1 mol/L K_2HPO_4 混匀,趁热倒入90 mm无菌培养板中,凝固后倒置备用。

线虫裂解液:等比例混合5% (质量分数)NaClO溶液和2 mol/L NaOH溶液。

含吐温-20的磷酸盐缓冲液:取0.1 mL吐温-20加入100 mL磷酸盐缓冲液中。

1.2.4 N2线虫培养

依据参考文献[15]并略作修改:在NGM固体培养基中央滴加100 μ L光密度值(optical density, OD)为0.4~0.5的OP50菌液作为食物,将平板倒置于20 °C培养箱培养过夜后得NGM板。保存备用。上述操作均在超净台中完成。N2线虫的培养温度为20 °C,每板200~300条,培养2~3 d,待NGM食物耗尽,用M9缓冲液将N2线虫洗至1.5 mL EP管中,离心半径8.7 cm, 2000 r/min离心1 min,弃上清,再用S·Medium缓冲液清洗,离心半径8.7 cm, 2000 r/min离心1 min,弃上清,重复3次;将N2线虫转至新的NGM板。

1.2.5 N2线虫同步化

依据参考文献[16]并略作修改。收集含有产卵期N2线虫的NGM板,用M9缓冲液将N2线虫冲洗至EP管中,离心半径8.7 cm, 2000 r/min离心1 min;用S·Medium缓冲液清洗虫体至上清液澄清后收集沉淀的N2线虫;在N2线虫中加入S·Medium缓冲液和等体积裂解液,剧烈震荡直至大部分N2线虫虫体破碎并释放出虫卵;迅速将混合液体分装

至含有 S·Medium 缓冲液的 EP 管中,离心半径 8.7 cm,5 500 r/min 离心 30 s,收集并合并沉淀;在沉淀加入 S·Medium 缓冲液,继续清洗至 pH 中性后收集同步化的虫卵;将虫卵置于 1 mL S·Medium 缓冲液中,20 °C 孵育过夜获得处于 L1 期的 N2 线虫,加入含食物的培养基上继续培养 N2 线虫至 L4 期;收集备用。

1.2.6 N2 线虫氧化损伤实验

取 1.2.5 中的 L4 期 N2 线虫,随机分为空白组(0.5%二甲基亚砷水溶液)、维生素 C(Vitamin C, Vc)组(1 mg/mL)、水溶性多糖组(31.25、62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、酸性多糖组(31.25、62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和三萜组(31.25、62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。处理 3 d 后,分别挑入 96 孔板中,每孔 10 条;每组设 3 个平行。每孔加入 100 μL 含 OP50 菌液和 10 mmol/L 百草枯的 S·Medium 缓冲液;每隔 12 h 记录 N2 线虫死亡数,直至全部死亡^[17]。统计死亡 N2 线虫的数量,并分别计算水溶性多糖、酸溶性多糖和三萜的最佳实验浓度。

1.2.7 N2 线虫寿命实验

根据 1.2.6 的结果,取 1.2.5 中的 L4 期 N2 线虫,随机分为空白组、Vc 组、水溶性多糖组(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、酸性多糖组(62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和三萜组(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每板 40 条;每组设 3 个平行。在 NGM 板中加入对应药物并置于 20 °C 培养箱中培养。每日更换培养基,挑出并记录死亡 N2 线虫的数量,直至全部死亡。丢失的 N2 线虫不计入总数。

1.2.8 急性热应激实验

实验分组同 1.2.7。每板 30 条 L4 期 N2 线虫;每组设 3 个平行。给药处理 3 d 后将 N2 线虫转移至 37 °C 培养箱,每 2 h 统计生存和死亡数,直至全部死亡。

1.2.9 急性紫外应激实验

实验分组同 1.2.7。每板 30 条 L4 期 N2 线虫;每组设 3 个平行。给药处理 3 d 将 N2 线虫后转移至 254 nm 紫外灯下,每 2 h 统计生存和死亡数,直至全部死亡。

1.2.10 生殖能力实验

实验分组同 1.2.7。每板 1 条 L4 期 N2 线虫,每组设 3 个平行。于每日的同一时间点将 N2 线虫转移至新的含药 NGM 板。5 d 后统计各组总产卵量。

1.2.11 N2 线虫咽泵运动实验

实验分组同 1.2.7。每组 50 条 L4 期 N2 线虫。

分别在第 4、9、14 d,从每组随机挑选 10 条 N2 线虫置于显微镜下,统计 30 s 内每条 N2 线虫咽泵运动的次数。

1.2.12 N2 线虫身体摆动运动实验

实验分组同 1.2.7。每组 50 条 L4 期 N2 线虫。分别在第 5、10、15 d,从每组随机挑选 10 条 N2 线虫转移至新的 NGM 培养基,滴一滴 M9 缓冲液让其自由运动 30 s 后,在显微镜下统计 N2 线虫 30 s 内身体摆动次数。

1.2.13 N2 线虫体内 ROS 水平检测

实验分组同 1.2.7。每组 50 条 L4 期 N2 线虫。给药 4 d 后,加入 50 μL 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(50 $\mu\text{mol}/\text{L}$),37 °C 孵育 2 h;用 S·Medium 缓冲溶液清洗虫体 3 次至上清液不含荧光探针;加入 NaN_3 溶液(30 mmol/L)麻醉后转移至新的 NGM 培养板上。从每组随机挑选 10 条 N2 线虫,在倒置荧光显微镜下观测体内荧光并拍摄照片。荧光强度用 ImageJ 1.54 f 软件分析。

1.2.14 N2 线虫脂褐素水平的测定

实验分组同 1.2.7。每组 50 条 L4 期 N2 线虫。给药 10 d 后,用 S·Medium 缓冲溶液清洗虫体至上清液澄清;加入 NaN_3 溶液(30 mmol/L)麻醉后转移至新的 NGM 培养板上。从每组随机挑选 10 条 N2 线虫,在倒置荧光显微镜下观测体内荧光并拍摄照片,荧光强度用 ImageJ 1.54f 软件分析。

1.2.15 采用 qRT-PCR 法检测 IIS 通路关键因子的 mRNA 表达

实验分组同 1.2.7。取同步化后处于 L4 时期的 N2 线虫,分别加入至含 0.5% (质量分数)二甲基亚砷及相应药物的 S·Medium 中,以终 OD 值为 0.4~0.5 的 NA22 菌液作为食物。每日更换药物。培养 6 d 后,收集 N2 线虫至 50 mL EP 管中,以离心半径 8.7 cm,2 500 r/min 离心 1 min;用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液洗涤 N2 线虫 3 次,再用灭菌水洗涤 3 次以去除表皮残留的大肠杆菌;收集 N2 线虫至 1.5 mL EP 管中。管中加入 Trizol 试剂提取 RNA,再逆转录合成 cDNA。以 β -actin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 *age-1*、*daf-2*、*daf-16*、*ctl-2* mRNA 的相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Spearman 相关分析各实验参数的相关性;Kaplan-Meier 法评估 N2 线虫的存活率;Log-rank 检验和 Breslow 检验比较各组间差异。各个测定时间点的组间比较采用多因素方差分析;组间两两比较采用 Bonferroni 矫正。其他数据比较采

用单因素方差分析。若符合方差齐性,则多重比较使用 Duncan 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 茯苓 3 种活性含量测定

含量测定结果显示,茯苓 3 种活性成分水溶性多糖、酸性多糖、三萜的质量分数分别为 35.40%、86.9%、50.00%。

2.2 茯苓三种活性成分抗氧化损伤药效结果

抗氧化损伤结果显示,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶性多糖组、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酸性多糖组和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三萜组 N2 线虫的生存期较空白组的差异有统计学意义 ($F = 4.412, P = 0.036$; $F = 12.186, P < 0.001$; $F = 10.327, P = 0.001$)。见图 1,表 2。Spearman 相关的分析结果显示,水溶性多糖组 ($r = 0.100, P = 0.060$)、酸性多糖组 ($r = 0.062, P = 0.137$) 和三萜组 ($r = 0.047, P = 0.290$) 的浓度与生存率均无显著相关性。

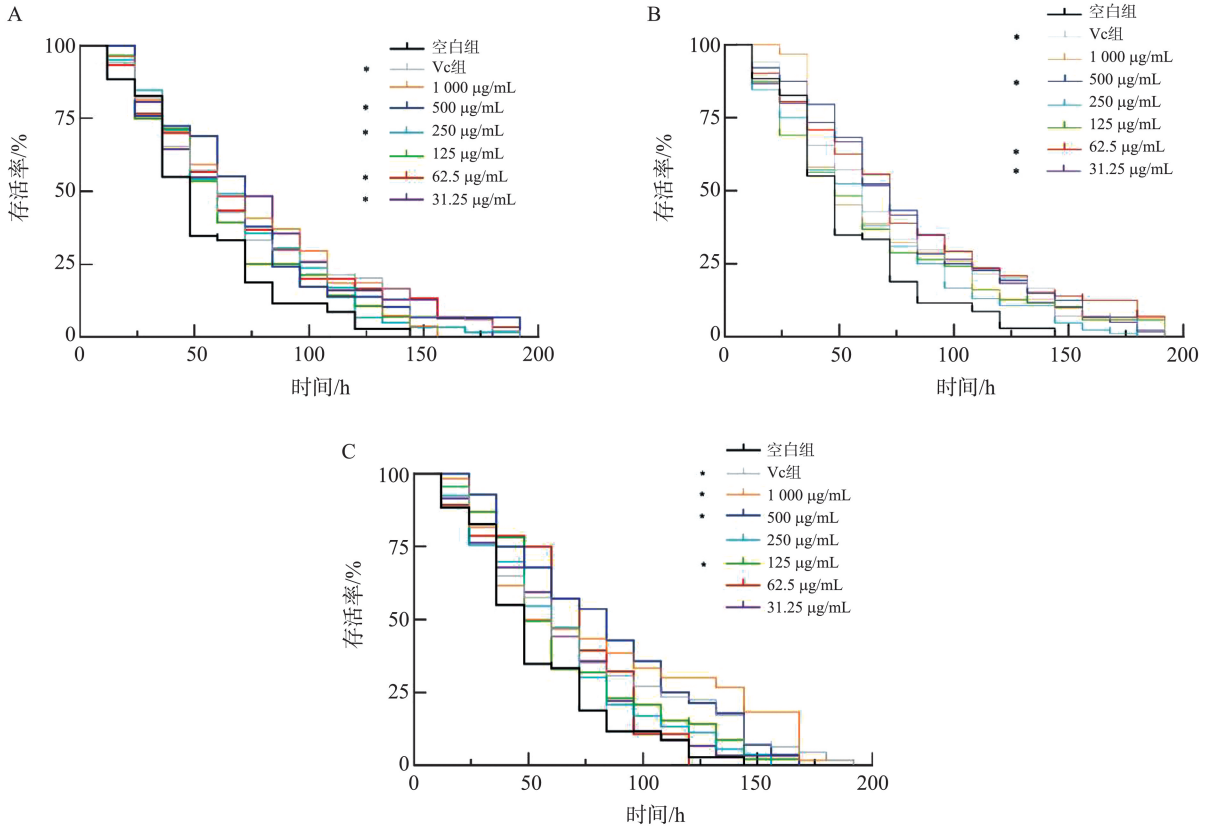


图 1 百草枯氧化胁迫下 N2 线虫的生存曲线 ($*P < 0.05$ vs. 空白组)

A: 饲喂水溶性多糖 N2 线虫的存活率; B: 饲喂酸性多糖 N2 线虫的存活率; C: 饲喂三萜 N2 线虫的存活率。

Figure 1 Survival curves of *C. elegans* under oxidative stress of paraquat ($*P < 0.05$ vs. control group)

A: Survival rate of *C. elegans* fed with water-soluble polysaccharides; B: Survival rate of *C. elegans* fed with acidic polysaccharides; C: Survival rate of triterpenoid *C. elegans* fed.

表 2 百草枯氧化胁迫下 N2 线虫寿命

Table 2 Lifespan of *C. elegans* under oxidative stress of paraquat

| 组别 | 浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 平均 寿命/h | <i>F</i> | <i>P</i> |
|--------|------------------------------------|------------------|----------|----------|
| 空白组 | | 54.09 \pm 3.91 | | |
| Vc 组 | | 73.43 \pm 5.35 | 8.101 | 0.004 |
| 水溶性多糖组 | 1 000 | 73.33 \pm 8.19 | 4.536 | 0.033 |
| | 500 | 74.07 \pm 8.53 | 4.412 | 0.036 |
| | 250 | 69.97 \pm 5.27 | 4.960 | 0.026 |
| | 125 | 64.71 \pm 7.29 | 1.381 | 0.240 |
| | 62.5 | 73.20 \pm 9.21 | 4.950 | 0.026 |
| | 31.25 | 75.48 \pm 8.63 | 6.088 | 0.014 |

续表

| 组别 | 浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 平均 寿命/h | <i>F</i> | <i>P</i> |
|-------|------------------------------------|------------------|----------|----------|
| 酸性多糖组 | 1 000 | 71.61 \pm 8.58 | 3.805 | 0.051 |
| | 500 | 79.36 \pm 5.05 | 16.159 | <0.001 |
| | 250 | 62.71 \pm 4.72 | 2.423 | 0.120 |
| | 125 | 65.38 \pm 5.41 | 2.719 | 0.099 |
| | 62.5 | 80.17 \pm 6.37 | 12.186 | <0.001 |
| | 31.25 | 76.60 \pm 6.27 | 10.419 | 0.001 |
| 三萜组 | 1 000 | 81.60 \pm 7.24 | 12.554 | <0.001 |
| | 500 | 84.00 \pm 8.28 | 10.327 | 0.001 |
| | 250 | 64.98 \pm 5.34 | 2.946 | 0.086 |
| | 125 | 67.39 \pm 4.09 | 6.232 | 0.013 |
| | 62.5 | 68.57 \pm 6.23 | 2.474 | 0.116 |
| | 31.25 | 64.07 \pm 4.86 | 2.372 | 0.124 |

2.3 茯苓三种活性成分延寿药效结果

寿命实验结果显示,Vc组和茯苓各活性成分组N2线虫的生存曲线均向右移动,与空白组的差异有统计学意义($P<0.05$),见图2。Vc、水溶性多糖、酸性多糖和三萜平均寿命分别较空白组延长11.25%、12.72%、15.07%和12.55%。见表3。

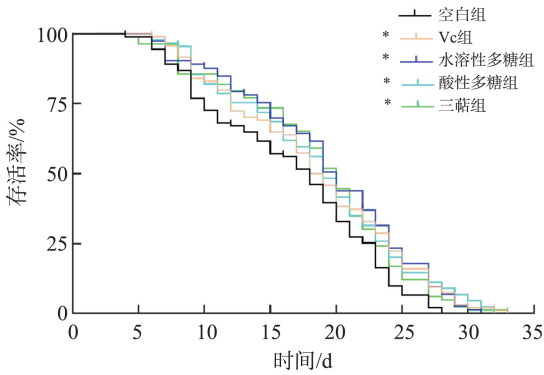


图2 标准条件下N2线虫的生存曲线(* $P<0.05$ vs. 空白组)
Figure 2 Survival curve of *C. elegans* under standard conditions (* $P<0.05$ vs. control group)

表3 标准条件下N2线虫寿命

| 组别 | 平均寿命/d | P |
|--------|------------|-------|
| 空白组 | 16.57±0.69 | |
| Vc组 | 18.44±0.72 | 0.018 |
| 水溶性多糖组 | 19.22±0.78 | 0.005 |
| 酸性多糖组 | 18.70±0.73 | 0.016 |
| 三萜组 | 18.65±0.72 | 0.042 |

2.4 各组急性热应激实验结果

急性热应激结果显示,N2线虫的存活率随时间延长呈现下降趋势,见图3。与空白组相比,Vc组和酸性多糖处理组的N2线虫生存期延长,与空白组的差异有统计学意义($P=0.039$ 、 $P<0.001$);水溶性多糖组、酸性多糖组和三萜组的平均寿命分别提高了21.74%、7.92%和21.63%。见表4。

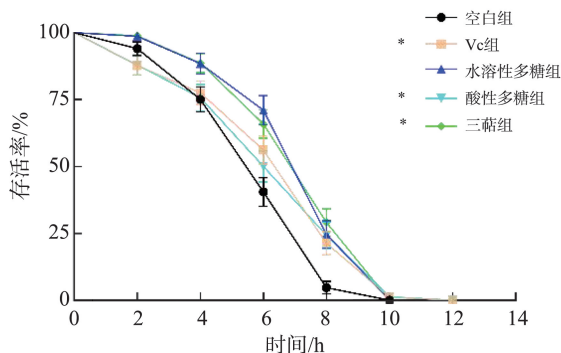


图3 急性热应激下N2线虫的生存曲线(* $P<0.05$ vs. 空白组)
Figure 3 Survival curve of *C. elegans* under acute heat stress (* $P<0.05$ vs. control group)

表4 急性热应激下N2线虫寿命

| 组别 | 平均寿命/h | P |
|--------|-----------|--------|
| 空白组 | 6.29±0.22 | |
| Vc组 | 6.87±0.28 | 0.039 |
| 水溶性多糖组 | 7.65±0.23 | <0.001 |
| 酸性多糖组 | 6.78±0.31 | 0.131 |
| 三萜组 | 7.65±0.23 | <0.001 |

2.5 各组急性紫外应激实验结果

急性紫外应激结果显示,Vc组和茯苓各活性成分组N2线虫的生存期较空白组均延长,且酸性多糖组和三萜组生存期较空白组有统计学意义($P=0.006$ 、 $P<0.001$),其平均寿命分别延长18.29%和25.68%。见图4、表5。

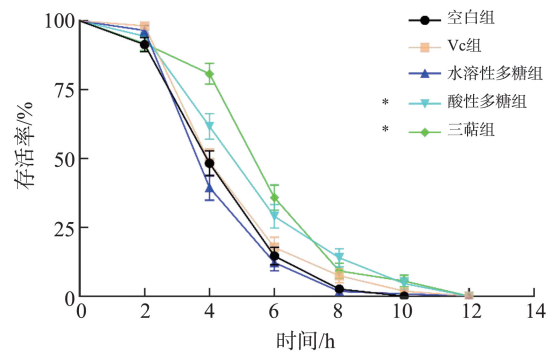


图4 急性紫外应激下N2线虫的生存曲线(* $P<0.05$ vs. 空白组)
Figure 4 Survival curve of *C. elegans* under acute UV stress (* $P<0.05$ vs. control group)

表5 急性紫外应激下N2线虫寿命

| 组别 | 平均寿命/h | P |
|--------|-----------|--------|
| 空白组 | 5.14±0.17 | |
| Vc组 | 5.48±0.19 | 0.412 |
| 水溶性多糖组 | 5.02±0.16 | 0.45 |
| 酸性多糖组 | 6.08±0.24 | 0.006 |
| 三萜组 | 6.46±0.22 | <0.001 |

2.6 N2线虫生殖能力实验结果

生殖能力结果显示,Vc组、水溶性多糖组、酸性多糖组和三萜组N2线虫的平均产卵量分别为(205.67±47.54)个、(193.67±28.94)个、(216.33±44.52)个和(206.33±10.07)个,与空白组的(209.33±31.47)个的差异无统计学意义($P>0.05$)。见图5。

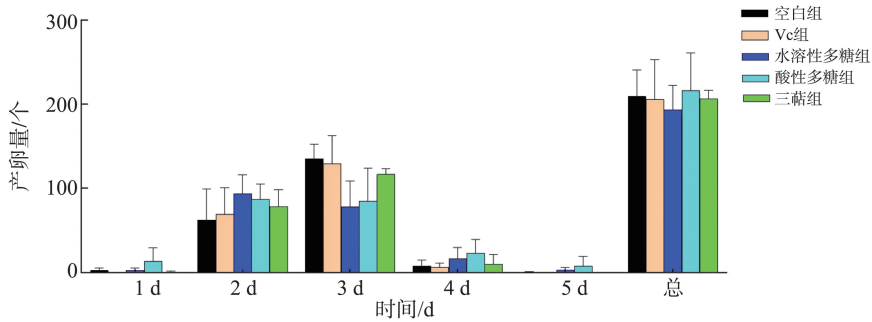


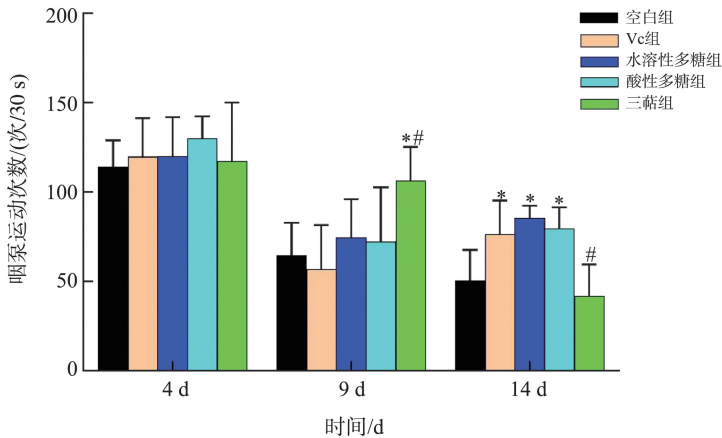
图5 茯苓3种活性成分对N2线虫繁殖能力的影响

Figure 5 Effect of three active ingredients of *Poria Cocos* on the reproductive ability of *C. elegans*

2.7 咽泵运动实验结果

咽泵运动结果显示,在第9天时,三萜组N2线虫的平均咽泵运动次数为(106.50±18.88)次/30s,较空白组的(64.50±18.51)和Vc组(57.00±24.74)次/30s的差异有统计学意义($P<0.001$);在第14天

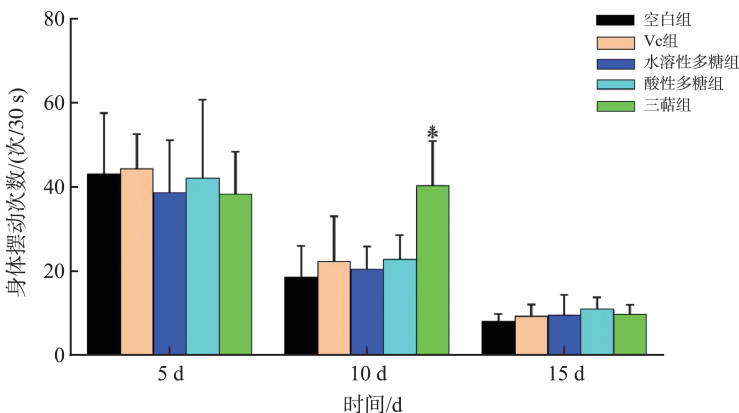
时,Vc组、水溶性多糖组和酸性多糖组N2线虫的平均咽泵运动次数分别为(76.50±18.83)、(85.80±6.84)和(79.60±11.94)次/30s,与空白组(50.80±16.99)次/30s相比,差异有统计学意义($P<0.001$)。见图6。

图6 茯苓三种活性成分对N2线虫咽泵运动能力的影响(* $P<0.05$ vs. 空白组;# $P<0.05$ vs. Vc组)Figure 6 Effect of the three active ingredients of *Poria cocos* on the motility of the pharyngeal pump of the *C. elegans* (* $P<0.05$ vs. control group; # $P<0.05$ vs. Vc group)

2.8 身体摆动运动实验结果

身体摆动运动实验结果显示,在第10天时,三萜组N2线虫的身体摆动次数为(40.50±10.50)次/

30s,较空白组(18.70±7.33)次/30s差异有统计学意义($P<0.001$)。见图7。

图7 茯苓三种活性成分对N2线虫身体摆动运动能力的影响(* $P<0.05$ vs. 空白组)Figure 7 Effect of three active ingredients of *Poria Cocos* on the body oscillating ability of *C. elegans* (* $P<0.05$ vs. control group)

2.9 N2 线虫体内 ROS 含量测定结果

ROS 含量结果显示, Vc 组、酸性多糖组和三萜组 N2 线虫的体内 ROS 相对含量分别为 $90.32\% \pm 5.08\%$ 、 $83.84\% \pm 3.34\%$ 和 $85.47\% \pm 6.17\%$, 较空白组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 酸性多糖组较 Vc 组的差异有统计学意义 ($P = 0.036$)。见图 8。

2.10 N2 线虫体内脂褐素含量测定结果

脂褐素沉积结果显示, Vc 组、水溶性多糖组、酸性多糖组和三萜组处理的 N2 线虫体内脂褐素相对含量分别为 $83.42\% \pm 2.63\%$ 、 $88.51\% \pm 4.92\%$ 、 $86.84\% \pm 3.07\%$ 和 $84.05\% \pm 4.36\%$, 较空白组的差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见图 9。单因素方差分析结果显示各组间整体差异有统计学意义 ($F = 6.182, P = 0.001$)。

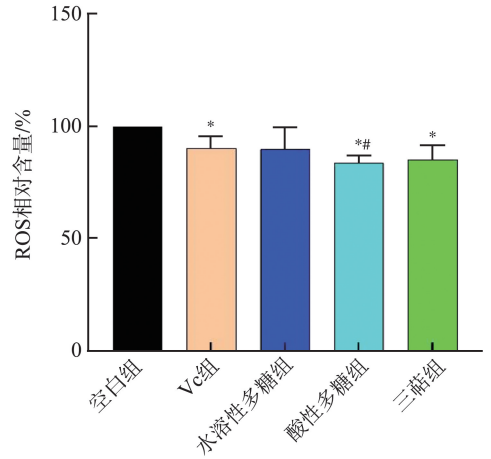


图 8 N2 线虫体内 ROS 水平 (* $P < 0.05$ vs. 空白组; # $P < 0.05$ vs. Vc 组)

Figure 8 ROS levels in *C. elegans* (* $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. Vc group)

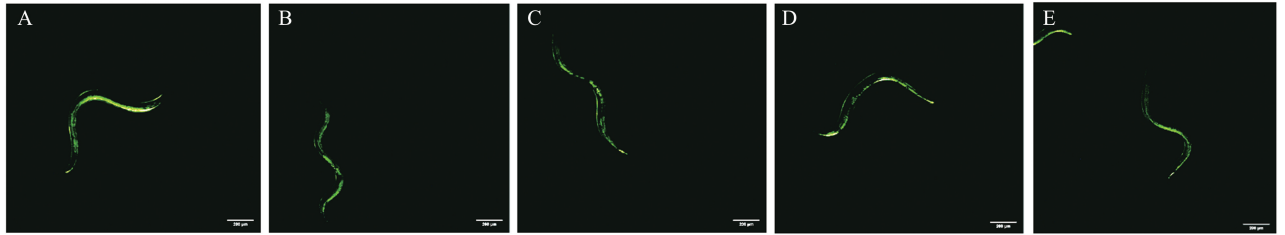


图 9 N2 线虫体内脂褐素积累 (比例尺: 200 μm)

A: 空白组; B: Vc 组; C: 水溶性多糖组; D: 酸性多糖组; E: 三萜组

Figure 9 Accumulation of lipofuscin in *C. elegans* (scale bar: 200 μm)

A: Control group; B: Vc group; C: Water-soluble polysaccharides group; D: Acidic polysaccharides group; E: Triterpenes group

2.11 qRT-PCR 检测结果

qRT-PCR 结果显示, 与空白组相比, 水溶性多糖组、酸性多糖组和三萜组 N2 线虫 *daf-16* 与 *age-1* 的 mRNA 表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Vc

组、水溶性多糖组和三萜组 N2 线虫 *ctl-2* 的 mRNA 表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Vc 组和酸性多糖组 N2 线虫 *daf-2* 的 mRNA 表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 10。

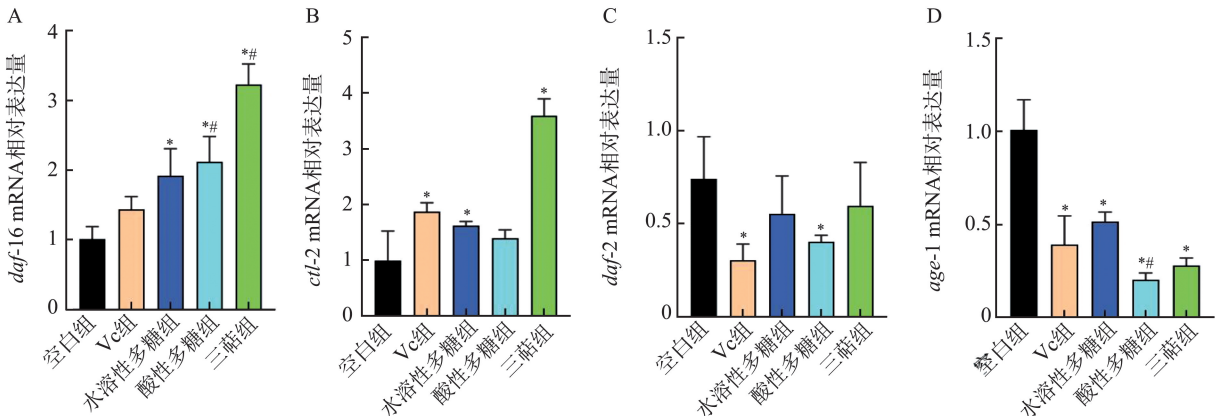


图 10 线虫体内与 IIS 通路相关的 mRNA 表达情况 (* $P < 0.05$ vs. 空白组; # $P < 0.05$ vs. Vc 组)

A: *daf-16* mRNA 相对表达量; B: *ctl-2* mRNA 相对表达量; C: *daf-2* mRNA 相对表达量; D: *age-1* mRNA 相对表达量。

Figure 10 Expressions of mRNAs which related with IIS pathway in *C. elegans* (* $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. Vc group)

A: Relative expression of *daf-16* mRNA; B: Relative expression of *ctl-2* mRNA; C: Relative expression of *daf-2* mRNA; D: Relative expression of *age-1* mRNA.

3 讨论

目前解释衰老机制的主要学说包括线粒体学说、自由基学说、端粒学说等^[18]。其中自由基学说因明确阐释氧化应激与衰老的因果关系而成为研究热点。该理论指出过量自由基可诱导蛋白质、核酸等生物大分子氧化损伤,进而破坏细胞稳态并加速衰老进程。多项研究表明,茯苓水溶性多糖、酸性多糖和三萜可通过清除 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 等活性氧自由基发挥抗氧化作用,进而延缓衰老^[19-21]。茯苓菌核中多糖类物质占其干重的70%~90%,其中水溶性多糖约占2%,其他为酸性多糖。但目前茯苓药材的综合利用率仅约3%^[22],提示其开发潜力尚未被充分挖掘。本研究在经典的线虫模型上发现茯苓酸性多糖具有一定的抗衰老作用,并初步研究了其分子机制,为茯苓的进一步开发和应用提供了思路。

脂褐素是细胞衰老的典型标志物,其过量积累可加速线虫衰老进程^[23]。Rinnerthaler等^[24]研究表明,脂褐素的形成与氧化损伤密切相关:ROS可通过氧化细胞组分(如脂质和蛋白质),促使其形成不可降解的聚合物,最终沉积为脂褐素。Hu等^[25]研究发现,艾叶提取物可通过上调线虫体内的抗氧化酶的活性,增强机体抗氧化防御能力抑制线虫体内的脂褐素沉积。本研究与上述研究一致,说明茯苓有效成分可能是通过降低ROS水平,减少脂褐素形成来调控N2线虫抗衰老。

IIS通路是首个被发现的与衰老进程相关的营养感知通路,在衰老调控中发挥核心作用。该通路作为高度保守的寿命调控机制,其分子机制已被详尽阐明^[26-27]。在秀丽隐杆线虫中,IIS通路通过关键基因 $ctl-2$ 、 $daf-2$ 、 $age-1$ 和 $daf-16$ 协同调控衰老进程。研究表明,IIS通路的调节可通过抑制 $daf-2$ 或激活转录因子 $daf-16$ 延长线虫寿命^[28]。作为IIS通路的核心调控节点, $daf-16$ 可通过调控抗氧化防御系统(如超氧化物歧化酶SOD表达)和代谢稳态以及清除ROS等方式延缓衰老^[29-30]。Zhang等^[31]研究发现,黄精多糖通过促进 $daf-16$ 的核转位,下调 $age-1$ 和 $daf-2$ mRNA水平,并上调 $daf-16$ mRNA水平实现对IIS通路的负调控;Song等^[32]研究发现,覆盆子提取物通过抑制 $ctl-2$ 表达延长秀丽隐杆线虫的寿命。本研究结果与上述研究一致,表明茯苓的抗衰老作用与IIS通路调控直接相关,并可通过 $daf-16$ 介导的抗氧化基因网络实现协同增效。

本研究有一定局限性:①仅测定了相关信号通路中各组分的mRNA水平,还需通过Western blot等方法深入研究茯苓活性成分抗衰老的机制;②N2线虫为无脊椎动物,生理系统相对简单,无法完全模拟哺乳动物的衰老过程,需在小鼠等更高级的动物模型上进一步验证研究结论。

综上所述,茯苓三种活性成分可通过调控抗衰老相关基因的表达,提高机体抗氧化损伤的能力延长N2线虫的寿命,为后续抗衰老产品的研发提供了新思路。

参考文献:

- [1] 关于印发“十四五”健康老龄化规划的通知[EB/OL]. (2022-02-07) [2025-02-22]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-03/01/content_5676342.htm
- [2] Li H, Zhai BT, Sun J, et al. Antioxidant, anti-aging and organ protective effects of total saponins from *Aralia taibaiensis*[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4025-4042. doi:10.2147/DDDT.S330222
- [3] Sun J, Zhong XY, Sun DD, et al. Anti-aging effects of polysaccharides from ginseng extract residues in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 225: 1072-1084. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.168
- [4] Cuong VT, Chen WD, Shi JH, et al. The anti-oxidation and anti-aging effects of *Ganoderma lucidum* in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Exp Gerontol*, 2019, 117: 99-105. doi:10.1016/j.exger.2018.11.016
- [5] Di YM, Sun L, Lu CJ, et al. Benefits of herbal formulae containing *Poria cocos* (Fuling) for type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2022, 17(12): e0278536. doi:10.1371/journal.pone.0278536
- [6] Miao H, Zhao YH, Vaziri ND, et al. Lipidomics biomarkers of diet-induced hyperlipidemia and its treatment with *Poria cocos*[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(4): 969-979.
- [7] 董红敬. 茯苓皮三萜提取物化学成分及抗肿瘤活性研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [8] Du LS, Chen J, Yan JY, et al. Lingguizhugan decoction ameliorates cognitive impairment in AD-like mice by influencing the microbiome-gut-brain axis mediated by SCFAs[J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155942. doi:10.1016/j.phymed.2024.155942
- [9] Wolff S, Ma H, Burch D, et al. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity[J]. *Cell*, 2006, 124(5): 1039-1053.
- [10] Zhang X, Chen Q, Chen LZ, et al. Anti-aging in *Caenorhabditis elegans* of polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua[J]. *Molecules*, 2024, 29(6): 1276. doi:10.3390/molecules29061276
- [11] 宋祯彦, 黄亚琦, 王也彤, 等. 茯苓多糖在秀丽隐杆线

- 虫中的抗氧化和抗衰老作用及其作用机制[J]. 中草药, 2024, 55(4): 1133-1144.
- SONG Zhenyan, HUANG Yaqi, WANG Yetong, et al. Antioxidant and anti-aging effects and mechanism of *Poria cocos* polysaccharides in *Caenorhabditis elegans* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(4): 1133-1144.
- [12] 施滢, 王平, 代君怡, 等. 基于秀丽隐杆线虫模型探讨白芥子水提物抗氧化作用及机制[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(23): 7773-7780.
- SHI Ying, WANG Ping, DAI Junyi, et al. Study on antioxidative effect and mechanism of water extracts of white mustard seed based on *Caenorhabditis elegans* model[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(23): 7773-7780.
- [13] 邵贝贝. 茯苓有效部位提取物的制备工艺、质量分析及其药效学研究[D]. 湖北: 湖北中医药大学, 2012.
- [14] 邓媛媛. 茯苓酸性多糖的提取工艺及其药效学研究[D]. 湖北: 湖北中医药大学, 2012.
- [15] 李美霖, 王平, 尹灿, 等. 山茱萸多糖延缓秀丽隐杆线虫衰老的药效评价及机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(21): 6996-7003.
- LI Meilin, WANG Ping, YIN Can, et al. Pharmacodynamic evaluation and mechanism study of Corni Fructus polysaccharide on anti-aging of *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(21): 6996-7003.
- [16] Lin CX, Zhang XY, Xiao J, et al. Effects on longevity extension and mechanism of action of carnosic acid in *Caenorhabditis elegans*[J]. Food Funct, 2019, 10(3): 1398-1410.
- [17] 刘涵, 陈晓枫, 刘晓娟, 等. 不同几何构型虾青素的体外抗氧化作用及对秀丽隐杆线虫氧化应激的保护作用[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 178-185.
- LIU Han, CHEN Xiaofeng, LIU Xiaojuan, et al. In vitro antioxidant activity of different astaxanthin geometric isomers and their protection against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science, 2019, 40(3): 178-185.
- [18] Guo XY, Li QQ, Shi J, et al. Perfluorooctane sulfonate exposure causes gonadal developmental toxicity in *Caenorhabditis elegans* through ROS-induced DNA damage [J]. Chemosphere, 2016, 155: 115-126. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.046
- [19] 程水明, 桂元, 沈思, 等. 茯苓皮三萜类物质抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 27-30.
- CHENG Shuiming, GUI Yuan, SHEN Si, et al. Antioxidant properties of triterpenes from *Poria cocos* peel [J]. Food Science, 2011, 32(9): 27-30.
- [20] 张熠璇, 雷敏, 黄家浩, 等. 微生物降解制备水溶性茯苓多糖及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(15): 136-141.
- ZHANG Yixuan, LEI Min, HUANG Jiahao, et al. Preparation of water-soluble *Poria cocos* polysaccharides by microbial fermentation and the antioxidant activity [J]. Food Research and Development, 2023, 44(15): 136-141.
- [21] 罗卓雅, 谭宏渊, 谢佳琳, 等. 碱性茯苓多糖的抗氧化作用[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(22): 86-91.
- LUO Zhuoya, TAN Hongyuan, XIE Jialin, et al. Antioxidant activity of alkali-soluble *Poria cocos* polysaccharide [J]. Food Research and Development, 2022, 43(22): 86-91.
- [22] 周旭香, 李慧君, 胡辉, 等. 茯苓标准汤剂的煎煮工艺及其量值传递规律研究[J/OL]. 中药材, 2025, (3): 700-706 [2025-04-25]. <https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2025.03.026>
- [23] Skoczyńska A, Budzisz E, Trznadel-Grodzka E, et al. Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging [J]. Postepy Dermatol Alergol, 2017, 34(2): 97-103.
- [24] Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, et al. Oxidative stress in aging human skin [J]. Biomolecules, 2015, 5(2): 545-589.
- [25] Hu Q, Liu ZG, Guo YJ, et al. Antioxidant capacity of flavonoids from *Folium Artemisiae Argyi* and the molecular mechanism in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114398. doi: 10.1016/j.jep.2021.114398
- [26] Jiang S, Jiang CP, Cao P, et al. Sonneradon a extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* by modulating mitochondrial and IIS signaling pathways [J]. Mar Drugs, 2022, 20(1): 59. doi:10.3390/md20010059
- [27] Mathew R, Pal Bhadra M, Bhadra U. Insulin/insulin-like growth factor-1 signalling (IIS) based regulation of lifespan across species [J]. Biogerontology, 2017, 18(1): 35-53.
- [28] Qi ZM, Ji HH, Le M, et al. Sulforaphane promotes *C. elegans* longevity and healthspan via DAF-16/DAF-2 insulin/IGF-1 signaling [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(2): 1649-1670.
- [29] Suzuki Y, Sano M, Hayashida K, et al. Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? [J]. FEBS Lett, 2009, 583(13): 2157-2159.
- [30] Tambara AL, de Los Santos Moraes L, 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. doi:10.1016/j.fct.2018.07.057
- [31] Zhang X, Chen Q, Chen LZ, et al. Anti-aging in *Caenorhabditis elegans* of polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua [J]. Molecules, 2024, 29(6): 1276. doi:10.3390/molecules29061276
- [32] Song BB, Zheng BS, Li T, et al. Raspberry extract promoted longevity and stress tolerance via the insulin/IGF signaling pathway and DAF-16 in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Funct, 2020, 11(4): 3598-3609.