

何首乌乙酸乙酯提取物对秀丽线虫的抗衰老作用研究^Δ

唐进法^{1*}, 张帆², 李宇辉², 吴宿慧², 李寒冰², 李伟霞¹, 李学林^{1#}(1.河南中医药大学第一附属医院药学部, 郑州 450000; 2.河南中医药大学药学院, 郑州 450000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0493-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.17

摘要 目的:研究何首乌乙酸乙酯提取物(EPM)对秀丽线虫(简称“线虫”)寿命的影响,考察EPM抗衰老作用。方法:设立EPM低、中、高浓度组(25、37.5、50 mg/L,以生药计)和空白组(0 mg/L),考察EPM对线虫寿命的影响;设立EPM组(37.5 mg/L)和空白组(0 mg/L),分别进行线虫的生殖实验、急性热应激实验和急性氧化应激实验,考察EPM对线虫生殖能力以及压力应激的影响。结果:在寿命实验中,EPM低、中、高浓度组线虫的平均寿命较空白组均显著延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以中浓度EPM作用最为明显;增殖实验中,EPM组线虫在第2、3天中的子代数量较空白组显著增加($P < 0.05$);在急性热应激实验和急性氧化应激实验中,EPM组线虫的平均生存时间较空白组明显延长($P < 0.05$)。结论:37.5 mg/L的EPM能延缓线虫衰老且不损害其生殖能力。
关键词 何首乌;乙酸乙酯提取物;抗衰老;秀丽线虫;寿命;氧化应激;热应激

Anti-aging Effect Study of Ethyl Acetate Extract from *Folygonum multiflora* on *Caenorhabditis Elegans*

TANG Jinfa¹, ZHANG Fan², LI Yuhui², WU Suhui², LI Hanbing², LI Weixia¹, LI Xuelin¹(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China; 2.College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the lifespan effect of ethyl acetate extract from *Polygonum multiflora* (EPM) on *caenorhabditis elegans*, and to investigate its anti-aging effect. METHODS: EPM low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (25, 37.5, 50 mg/L, calculated by crude drug) and blank group (0 mg/L) were established to investigate the effects of EPM on the lifespan of *caenorhabditis elegans*. EPM group (37.5 mg/L) and blank group (0 mg/L) were established to perform reproductive test, acute heat stress test and acute oxidative stress test of *caenorhabditis elegans*. The effects of EPM on reproductive capacity and pressure stress of *caenorhabditis elegans* were investigated. RESULTS: The lifespan test, average lifespan of cae-

- [J]. *Int J Pharm*, 2014, 476(1/2): 60-69.
- [4] Sriamornsak P, Limmatvapirat S, Piriayaprasarth S, et al. A new self-emulsifying formulation of mefenamic acid with enhanced drug dissolution[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2014, 10(2): 121-127.
- [5] 应娜, 林高通. 微乳的研究进展及应用[J]. *海峡药学*, 2008, 20(9): 126-128.
- [6] 王金铃, 孙进, 何仲贵. 微乳及其在药学中应用[J]. *中国药剂学杂志*, 2009, 7(4): 356-364.
- [7] 魏玉, 娄玉琴, 刘雅敏, 等. 一种双氯芬酸钠自乳化软膏, 中国: 201210126343.3[P]. 2016-08-01.
- [8] 刘雅敏, 魏玉, 娄玉琴, 等. 一种自乳化基质及其应用, 中国: 201210126344.8[P]. 2012-04-26.
- [9] 秦金淼, 李引乾, 薛琴, 等. 多潘立酮微乳的制备及质量评价[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(3): 33-37.
- [10] 曹璐. 白藜芦醇自微乳的研制[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [11] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 770-774.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 159-160.
- [13] 王锋, 李文娜, 但家立, 等. 蒙药消肿散涂膜剂皮肤刺激和皮肤过敏实验研究[J]. *遵义医学院学报*, 2008, 31(3): 243-244.
- [14] 国家食品药品监督管理局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2005.
- [15] 赵晶, 金凯, 宋光杰, 等. 水杨酸微乳的制备及其体外透皮吸收研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(1): 112-114.
- [16] 刘晨, 王文苹, 戴贵东. 不同方法制备枸杞籽油微乳的比较研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(19): 1749-1752.
- (收稿日期: 2016-03-29 修回日期: 2016-05-19)
(编辑: 邹丽娟)

Δ 基金项目: 2015年度河南省中医药科学研究专项课题(No.2015ZY02101)

* 副主任药师, 硕士生导师。研究方向: 中药药动学。电话: 0371-66233562。E-mail: a0519@163.com

通信作者: 主任药师, 博士生导师。研究方向: 中药的合理应用及中药的应用形式。电话: 0371-66245342。E-mail: lixuelin450000@163.com

norhabditis elegans in EPM low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups were prolonged significantly, compared to blank group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in EPM medium-concentration group. In reproductive test, the number of offspring of caenorhabditis elegans in EPM group on the second and third day were increased significantly, compared to blank group ($P < 0.05$). In acute heat stress test and acute oxidative stress test, average survival time of caenorhabditis elegans in EPM group was prolonged significantly ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: 37.5 mg/L EPM can retard the aging process of caenorhabditis elegans and doesn't damage the reproductive capacity.

KEYWORDS *Polygonum multiflora*; Ethyl acetate extract; Anti-aging; Caenorhabditis elegans; Lifespan; Oxidative stress; Heat stress

何首乌为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根,味苦、甘、涩,性微温,炮制后具有补肝肾、益精血、乌须发等作用。《本草纲目》载:“何首乌……久用长筋骨、益精髓、延年不老……”^[1]。现代药理学研究表明,制首乌主要含有二苯乙烯苷类、磷脂等成分,具有抗衰老、调节血脂等功效,是我国传统的抗衰老中药^[2-3]。目前,何首乌抗衰老的作用及其机制研究多以小鼠、果蝇、鹤鹑等^[4-5]作为动物模型,但因培养条件高、寿命周期长、研究成本高、近亲繁殖等因素限制了对其更深入的研究。

有研究表明,daf-2突变体的寿命是正常寿命的2倍,这标志着秀丽线虫正式进入衰老研究领域^[6]。因其具有易饲养、自我繁殖力强、与人类的同源性基因数量多等优点,使其逐渐成为国际上公认的研究抗衰老的模式生物,有望替代小鼠等动物模型成为中药抗衰老研究的首选模型^[7-10]。本研究以野生秀丽线虫(株系N2)的存活时间、生殖能力和急性热、氧化应激能力等作为指标,研究何首乌乙酸乙酯提取物(Ethyl acetate extract from *P. multiflora*, EPM)的抗衰老作用,为进一步研究其抗衰老机制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

SMZ-140 台式显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

1.2 药材与试剂

何首乌采自广州石鼓镇,经河南中医药大学第一附属医院药学部陈天朝主任药师鉴定为正品;氯仿、乙酸乙酯和二甲基亚砷等试剂均为分析纯。

1.3 菌株与线虫

大肠埃希菌(OP50)和野生秀丽线虫(N2)均由北京生命科学院董梦秋实验室惠赠。

2 方法

2.1 药材的处理

2.1.1 药材的炮制 取适量何首乌,用80%黑豆汁拌匀闷润约8 h,高压清蒸6 h,然后将样品置于采光好的地方,放置1天1夜使其干透,此为一蒸一晒。反复9次蒸、晒即得^[11]。

2.1.2 药液的制备 取283 g上述何首乌炮制品,加10倍量水提取,将水提液浓缩至168 mL后,取84 mL浓缩液,依次用等体积氯仿萃取5次,收集萃取液。取上层萃取液,用等体积乙酸乙酯萃取9次,收集萃取液并置于水浴锅中挥干溶剂,即得EPM。取适量EPM,由二甲基亚砷(浓度 $< 1\%$)助溶于超纯水中,制备成质量浓度分别为25、37.5、50 mg/L的EPM药液。

2.2 线虫的培养

将线虫接种于涂布有大肠埃希菌的NGM(Nematode growth media)培养基上,将培养基置于20℃生化培养箱中培养,观察线虫的生长情况并定期更换培养基^[12]。挑选表面光滑、无气泡、无划痕的培养基进行接种。

2.3 线虫的寿命实验

实验设置EPM低、中、高浓度组(25、37.5、50 mg/L,以生药计)和空白组(0 mg/L)。参考文献[13]中方法,每个组分别挑取2~3条生殖期线虫进行实验,当线虫产卵1 h后均放入20℃生化培养箱中;待发育至第四阶段幼虫期(即L4期)后,转入含相应药物的培养皿中。每组线虫数量均为20条,此时记为寿命实验第0天。每天观察并记录线虫生存、死亡及剔除的数量(在寿命实验期间,发现线虫对外界刺激没有应答时视为死亡;剔除逃离培养基表面而干死、虫卵在体内孵化而成袋样虫或者钻进培养基内部的线虫^[14])。

2.4 线虫的生殖实验

每组分别挑选10条L4期线虫(同寿命实验),单独每条转至标记的空白组(0 mg/L)和EPM组(37.5 mg/L)中,此时记为生殖实验第1天。以后每24 h移至相应的培养基中直至线虫生殖能力丧失。将线虫转移前的培养基置于20℃培养箱中培养24 h后计算子代数(即产卵数量)^[15]。

2.5 线虫的急性热应激实验

参考文献[16]中方法,将线虫分别置于空白组(0 mg/L)和EPM组(37.5 mg/L)的培养基中产卵0.5 h;将受精卵在20℃条件下孵育58 h后,在35℃条件下进行热应激实验。每隔1 h记录1次每组线虫死亡以及存活的数量(线虫死亡的判定标准同寿命实验)。

2.6 线虫的急性氧化应激实验

参考文献[17]方法,将线虫置于空白组(0 mg/L)或EPM组(37.5 mg/L)的培养基中产卵0.5 h;将受精卵在20 ℃下孵育58 h后,将线虫分别置于标记好的含有0.4 mmol/L双氧水(H₂O₂)的96孔板中,每个孔内放置5条线虫,每0.5 h记录1次线虫死亡以及存活的数量(线虫死亡的判定标准同寿命实验)。

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 寿命实验结果

不同质量浓度的EPM均能使线虫的生命曲线右移(详见图1),均能延长线虫的寿命。空白组和EPM低、中、高浓度组线虫的平均寿命分别为(17.50 ± 6.88)、(22.40 ± 8.16)、(23.50 ± 7.42)、(22.97 ± 7.86) d。这提示EPM低、中、高浓度组线虫的平均寿命与空白组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且以EPM质量浓度为37.5 mg/L时延长寿命效果最好。因此用该质量浓度作为其他生理指标的实验浓度。

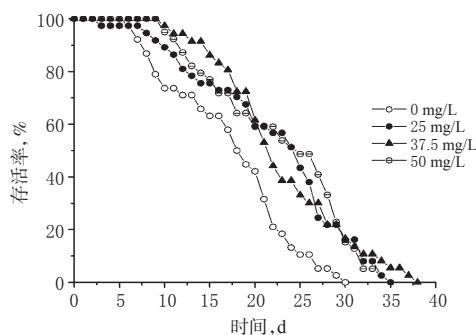


图1 不同质量浓度EPM作用后秀丽线虫的生命曲线
Fig 1 Life curves of caenorhabditis elegans after different concentrations of EPM

3.2 生殖实验结果

EPM组和空白组线虫均为培养第2天的子代数量最多,之后呈下降趋势。其中培养第2、3天后EPM组的子代数量均显著多于空白组($P < 0.05$);在总子代数量上,EPM组多于空白组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),结果详见表1。

3.3 急性热应激实验结果

EPM能显著增强线虫的耐热能力,延长线虫在35 ℃条件下的平均存活时间。与空白组线虫的平均存活时间[(16.23 ± 1.65) d]比较,EPM组线虫的平均存活时间[(17.83 ± 1.45) d]显著延长($P < 0.05$)。

3.4 急性氧化应激实验结果

EPM能显著提高线虫的抗氧化能力,延长线虫在

表1 各组线虫子代数量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 The number of offspring of caenorhabditis elegans in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	子代数量							总子代数量
	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	
空白组	33.30 ± 7.90	59.80 ± 6.81	48.60 ± 9.18	35.50 ± 6.65	22.90 ± 5.64	9.70 ± 4.64	1.40 ± 1.8	217.20 ± 27.10
EPM组	34.60 ± 8.80	80.80 ± 6.09*	65.80 ± 12.9*	32.20 ± 4.79	21.30 ± 6.56	9.60 ± 3.10	1.90 ± 2.16	240.50 ± 18.70

注:与空白组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. blank group,* $P < 0.05$

0.4 mmol/L H₂O₂中的平均存活时间。与空白组线虫的平均存活时间[(5.810 ± 1.800) d]比较,EPM组线虫的平均存活时间[(7.287 ± 2.030) d]显著延长($P < 0.05$)。

4 讨论

线虫同期化即将所需的线虫控制在同一发育期,这将有利于对其表征进行对比实验,故在测定各项指标前需要对线虫进行同期化处理。当所需同期化线虫少时,可采用限时产卵法进行处理^[13];反之,可采用高氯酸钠漂白法^[9]进行处理。饮食限制即对线虫进行热量限制,是延长线虫寿命的一种方法。因此,在进行寿命实验前应考虑EPM是否具有抑制大肠埃希菌的作用,设定药液的质量浓度应低于药物对大肠埃希菌最小抑制浓度(MIC)^[18]。笔者在前期抑菌试验中发现,EPM对大肠埃希菌的MIC为60 mg/L,且自该质量浓度起对线虫开始出现毒害作用,个别线虫的受精卵聚于阴户,形成异形虫。因此,在本研究寿命实验中设置EPM质量浓度分别为25、37.5、50 mg/L。

常见的线虫给药方式有以下两种:(1)在配制NGM培养基时添加所需质量浓度的药液,再经过灭菌分装即可^[19];(2)先配制好所需不同质量浓度的药液,然后将各质量浓度药液直接滴加至涂布有大肠埃希菌的NGM培养基中^[14]。然而值得考虑的是,在第一种方法中药物有效成分的含量以及药效是否会受到灭菌操作的影响;第二种方法中线虫是否有可能进食不含药液的大肠埃希菌。综合以上考虑,在本研究中笔者先将一定量大肠埃希菌和不同质量浓度的药液混合均匀后,再一起滴加至NGM培养基中,然后将培养基置于生化培养箱中培养若干小时后进行实验。

部分科学家认为长寿和生殖力之间存在“利弊权衡”,即寿命延长和生殖能力成反比。延长寿命和生殖需要资源,而体内的资源是有限的,延长线虫寿命这部分资源应该是来源于降低繁殖后代能力的资源^[20]。但随着进一步研究发现,两者并不总是成反比,如蔡外娇等^[21]研究发现,淫羊藿总黄酮不仅能延长线虫寿命,而且能提高其生殖能力;何首乌中所含的白藜芦醇在延长线虫寿命的同时不影响其生殖能力^[19]。可见,本研究考察线虫的生殖指标是有意义的。在抗衰老研究中,压力

应激实验也是较为重要的^[22]。研究显示,寿命的延长有可能是因为应激能力的提升,而且已知线虫的长寿突变体在热休克、氧化以及紫外辐射等压力下,存活率均高于同等条件下的野生型线虫^[6]。

本研究仅采用野生型秀丽线虫 N2 进行寿命、生殖等生理指标的测定,下一步可再采用某些基因型的突变体进一步验证所得结论。秀丽线虫自身对外界环境影响较为敏感,在实验过程应尽量排除干扰因素,增大样本,减少误差。实验过程中添加的二甲基亚砜是非质子极性溶剂,也是一种透皮吸收剂,可促进药物的渗透。关于寿命实验的分组,本研究只设置了空白组和 EPM 组,还可以考虑添加二甲基亚砜组。目前,线虫实验的给药方式常用的有两种,可设立这两种不同加药方式的分组,分别与空白组进行比较,从而得出最佳的给药方式。

本研究结果显示,EPM 组(37.5 mg/L)线虫在各项指标上与空白组比较均有显著差异,这证明了 EPM 能延长线虫平均寿命、提升线虫生殖能力、延长线虫在压力应激环境下的平均存活时间,具有延缓衰老的功效。本课题组后续将重点开展 EPM 抗衰老的机制研究。

参考文献

[1] 李洪兵.何首乌的现代药理学研究综述[J].云南中医中药杂志,2012,33(6):72-76.

[2] 崔莉,陈静娴,朱姮,等.何首乌中顺式和反式-二苯乙烯苷对照品的制备[J].山东科学,2015,28(6):1-5.

[3] 李林福.制何首乌化学成分及其质量标准研究[D].北京:中国中医科学院,2008.

[4] 栗平.何首乌抗衰药理与临床应用[J].慢性病学杂志,2010,12(10):1271-1272.

[5] 曾腾亿.黑豆汁拌蒸何首乌抗衰老作用的原理[J].中国医药指南,2013,11(24):446-457.

[6] Johnson TE, Wood WB. Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(21):6603-6607.

[7] 刘鹏.以线虫为模型研究中药中活性成份的生物学功能及中药紫苏梗降糖功能的研究[D].长春:吉林大学,2013.

[8] 唐晓明.香豆素对秀丽隐杆线虫抗氧化作用研究[D].长春:长春理工大学,2012.

[9] Kai H, Heidler T, Moch J, *et al.* Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis [J]. *Genes Nutr*, 2009, 4(1):59-67.

[10] Zhang L, Jie GJ, Zhao B. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(3):414-421.

[11] 李晓菲.基于质-效-用一体化评控的何首乌炮制减毒研究[D].济南:山东中医药大学,2015.

[12] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 1974, 77(1):71-94.

[13] Lakowski B, Hekimi S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(22):13091-13096.

[14] 吕婷.利用模式生物秀丽隐杆线虫对植物提取物抗衰老的研究[D].南京:南京师范大学,2014.

[15] 韩洪杰,王昌禄,陈勉华,等.槲皮素对线虫抗衰老的影响及其机制的初步研究[J].氨基酸和生物资源,2011,33(2):35-38.

[16] Wilson MA, Shukitt-Hale B, Kalt W, *et al.* Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Aging Cell*, 2006, 38(1):59-68.

[17] Duhon SA, Murakami S, Johnson TE. Direct isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Dev Genet*, 1996, 18(2):144-153.

[18] 郭佑铭.以秀丽隐杆线虫为模型的铃兰毒苷抗衰老研究[D].长春:吉林大学,2014.

[19] 王芳,田仕夫,邬树伟,等.白藜芦醇对线虫寿命的影响及分子机理研究[J].食品工业科技,2011,32(12):126-128.

[20] 王艳菊,马建伟,王曦苗,等.葡萄籽原花青素对秀丽隐杆线虫抗衰老的影响[J].食品工业科技,2014, 35(20):369-373.

[21] 蔡外娇,张新民,黄建华,等.淫羊藿总黄酮延缓秀丽隐杆线虫衰老的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2008, 28(6):522-525.

[22] 黄正杰,崔建云,任发政,等.大鲵粗提物延缓秀丽线虫衰老的研究[J].食品工业,2013,34(1):122-125.

(收稿日期:2016-03-28 修回日期:2016-06-20)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅