

虾青素对秀丽隐杆线虫衰老的影响及其机制的初步研究

罗卿心, 刘晓娟, 曹庸, 贺丽苹, 赵力超, 刘欣
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本文研究了虾青素对秀丽隐杆线虫衰老和正常生理功能的影响及其相关作用机制。试验设立对照组和虾青素组(0.08 mM、0.16 mM、0.40 mM、0.80 mM), 观察 N2 野生型线虫的寿命及相关生理指标(生殖能力、吞咽频率和移动力), 评价不同浓度虾青素对线虫衰老过程的影响, 明确虾青素作用的最佳剂量; 选用最佳剂量的虾青素处理 N2 野生型、*daf-16* 基因缺陷型和 *age-1* 基因缺陷型线虫, 分析其寿命长短, 探讨虾青素在胰岛素信号通路上延缓线虫衰老的作用机理。结果表明, 虾青素可显著延长线虫的寿命 ($P < 0.05$), 0.16 mM 虾青素的作用效果最佳, 线虫的平均寿命达到 26.03 d, 显著延长了 31.68%; 虾青素对线虫的生殖能力和吞咽频率没有显著影响, 能显著增强 10 d 和 15 d 线虫的移动力。0.16 mM 虾青素可显著提高 *age-1* 缺陷型线虫的寿命, 对 *daf-16* 缺陷型线虫的寿命无显著影响。因此, 虾青素可显著延长线虫寿命, 其作用机制与胰岛素信号通路上的 *daf-16* 基因密切相关。

关键词: 虾青素; 秀丽隐杆线虫; 抗衰老; 胰岛素信号通路

文章编号: 1673-9078(2015)9-56-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.010

Effects of Astaxanthin on *Caenorhabditis elegans* Aging and Its Underlying Mechanisms

LUO Qing-xin, LIU Xiao-juan, CAO Yong, HE Li-ping, ZHAO Li-chao, LIU Xin

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effects and related mechanism of astaxanthin (Ax) on aging and normal physiological functions of *Caenorhabditis elegans* were studied. The nematodes were divided into normal control group and Ax groups (0.08 mM, 0.16 mM, 0.40 mM, and 0.80 mM). The lifespan and related physiological indexes (reproductive capacity, pumping rate, and locomotion assay) of N2 wild-type nematodes were observed to evaluate the impact of Ax on the aging process of nematodes and to determine the optimal dose of Ax. To explore the mechanisms underlying the effects of Ax on the insulin/insulin-like growth factor (Ins/IGF-1) signaling pathway in delaying the aging process, wild-type N2, *daf-16* null, and *age-1* null mutant strains, treated with the optimal dose of Ax, were tested. The results revealed that the lifespan of the Ax group was longer than that of the control group ($P < 0.05$) and 0.16 mM of Ax was the optimal concentration. The mean lifespan of the nematodes reached 26.03 d, with a significant increase of 31.68%. Ax treatment enhanced the mobility of the nematodes at 10 d and 15 d, but did not cause any significant effects in reproductive capacity or pharyngeal pumping rate. A concentration of 0.16 mM Ax significantly extended the lifespan of *age-1* null mutant strains, but did not have a significant effect on that of *daf-16* null mutants. These findings suggest that Ax led to significant lifespan extension via the Ins/IGF-1 signaling pathway during normal aging, which could be dependent on *daf-16*.

Key words: astaxanthin; *Caenorhabditis elegans*; anti-aging; insulin/insulin-like growth factor (Ins/IGF-1) signaling pathway

衰老是生物体普遍存在的一种生理现象, 其过程错综复杂, 受环境和遗传等多种因素的影响。目前已建立多种解释衰老进程的理论, 其中 1956 年 Harman

收稿日期: 204-11-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31401481)

作者简介: 罗卿心 (1990-), 女, 在读研究生, 研究方向为食品化学及功能食品

通讯作者: 刘晓娟 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品化学及功能食品

率先提出的衰老自由基学说占有主导地位^[1]。该学说认为, 一些能够加强生物体清除自由基能力, 协助体内防御酶体系维持氧化代谢平衡的抗氧化物质, 可以延缓机体衰老的进程^[2]。虾青素 (astaxanthin) 是人类膳食中重要的抗氧化活性成分, 广泛存在于虾、蟹、鱼、藻类及真菌中。近年来大量研究表明, 虾青素可有效清除自由基, 抑制生物体内过氧化反应, 具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤和增强免疫功能等多种生物学活性^[3-4]。迄今为止, 关于虾青素延缓衰老作用的报道并不

多, 研究大多采用果蝇、小鼠等模型, 虾青素抗衰老作用机理也尚不清楚。因此, 虾青素作为一种来源丰富的天然活性物质, 研究其延缓衰老的效果及其作用机制, 具有十分重要的理论意义和应用价值。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 因具有易培养、生命周期短、基因调控简单、进化中高度保守、与人类的同源性基因高达 60%~80% 等优点, 近 30 年来有关秀丽线虫的研究迅速超过了果蝇和小鼠, 成为国际上公认的衰老研究领域的首选模式生物^[5,6]。胰岛素信号通路 (Insulin/IGF-1, IIS) 是一个高度保守 (包括线虫、果蝇、小鼠乃至灵长类动物), 且最为详尽和清楚的寿命调控环节, 也是治疗老年性常见疾病如癌症和糖尿病等的主要调控因素^[7~8]。许多被证实有延长线虫寿命作用的抗氧化剂, 其抗衰老作用机制皆与 IIS 信号通路密切相关^[9~10]。抗衰老产品应同时满足延缓衰老和维持机体正常生理功能两方面的条件, 关于延缓线虫衰老作用是否以损害生理活动为代价, 不同抗氧化物质的研究结果不同。迄今为止, 虾青素在该方面的研究尚属空白。因此, 本文以秀丽线虫为研究对象, 首次研究虾青素在延缓衰老的同时对其正常生理指标 (生殖能力、吞咽频率和移动力) 的影响; 并选用 IIS 上的两个关键基因缺陷型 *daf-16* 和 *age-1* 线虫, 进一步探究虾青素延长线虫寿命的作用机制。研究结果对于阐明虾青素抗衰老机制以及干预衰老进程具有十分重要的理论意义, 对于虾青素在健康食品方面的应用具有重要的指导价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料与试剂

N2 野生型秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, the Bristol strain N2), 雌雄同体, 由北京生命科学研究所以惠赠; *age-1 (hx546)* 基因缺陷型、*daf-16 (mgDf50)* 基因缺陷型线虫购于 *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) OP50 由华南农业大学资环学院惠赠。该菌株是尿嘧啶合成缺陷菌株, 在线虫标准培养基上生长缓慢, 显微镜下观察线虫时不会影响视野的清晰度。全反式虾青素 (astaxanthin, Ax) 标准品购于德国 Dr 公司, 纯度为 97.1%; 二甲基亚砜 (DMSO) 等其他试剂均购于天津市福晨化学试剂厂。

1.1.2 主要仪器设备

LRH 系列生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; SMZ-T4 连续变倍体视显微镜, 重庆奥特光学仪器有

限公司; AL 104 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; YSQ-LS-18SI 不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器, 上海博速实验有限公司医疗设备厂。

1.2 试验方法

1.2.1 不同 Ax 浓度的线虫培养基 (Nematode Growth Medium, NGM) 的配制

准确称取一定量的 Ax, 以 DMSO 溶解, 配制成 16 mM 的母液。将母液稀释成不同浓度的 Ax 溶液, 加入 *E.coli* OP50 菌液混合均匀, 涂于 NGM 板上 (每板含有 95 μ L *E.coli* OP50 菌液和 5 μ L 药物溶液)。药物组最终浓度为: 0.08 mM、0.16 mM、0.40 mM 和 0.80 mM; 对照组为 2% DMSO。

1.2.2 线虫的培养与同期化

线虫的培养参照 Brenner^[6]所用方法, 将线虫挑于含 *E.coli* OP50 的 NGM 板中, 20 $^{\circ}$ C 培养。线虫的同期化采用高氯酸钠裂解法, 即将正处于产卵期的雌雄同体线虫用已灭菌的 M9 溶液从 NGM 板上冲洗下, 用 M9 溶液将含线虫的溶液定容至 1 mL 于 EP 管内。向管中加入 1 mL 裂解液 (4.5 mL 0.5 M NaOH 和 0.5 mL 5% NaOCl), 上下颠倒混合约 3~5 min, 3000 r/min 离心 1 min, 弃上清收集沉淀。沉淀用已灭菌的 M9 溶液反复清洗 2~3 次, 再转到含 *E.coli* OP50 的 NGM 板中 20 $^{\circ}$ C 培养, 约 48 h 后线虫的受精卵发育至 L4 期, 完成同期化。

1.2.3 线虫寿命的测定

分为空白组和 4 个浓度的 Ax 组。挑取一定数量 L4 期线虫到各组 NGM 板中, 此时计为线虫寿命的第 0 d。20 $^{\circ}$ C 培养, 每天将它们转移到新的 NGM 板中, 到生殖后期 (通常为第 4 d) 之后每两天将线虫转移到新的 NGM 板中, 以保证药物的浓度。隔天探视线虫, 记录其存活、死亡和排除数目。线虫无移动及吞咽动作, 用铂丝轻触虫体无任何反应者判断为死亡; 虫卵在体内孵化而成袋样虫, 逃离至皿壁和盖上而干死的, 钻入琼脂中的线虫应从统计数据中排除。

1.2.4 线虫相关生理指标的测定

1.2.4.1 有效产卵量的测定

参照 Onken 等^[11]的方法, 挑取 10 条 L4 期的线虫到各组 NGM 板中, 每板放置 2 条线虫。每隔 24 h 将线虫转移至新板中, 直至线虫生殖能力丧失。所有产卵板在 20 $^{\circ}$ C 下培养, 待虫卵孵化至 L4 期, 记录板内线虫的数量即为产卵量。

1.2.4.2 移动力的测定

测定伴随寿命实验, 在第 5 d、10 d 和 15 d 时, 观察并记录每组线虫的运动情况。记录标准: ①线虫

自发运动,不需要触碰刺激,记为 A;②线虫必须受到触碰刺激才运动,记为 B;③线虫受到触碰刺激后只摆动头或尾,记为 C。

1.2.4.3 吞咽频率的测定

测定伴随寿命实验,在第 5 d、10 d 和 15 d 时,每组随机挑选 10 条线虫转移至涂有各组 NGM 新板上,测定方法为在显微镜下观测线虫咽部肌肉 30 s 内抽动的次数。

1.2.5 不同基因型线虫的寿命实验

选择 N2 野生型、*age-1* 基因缺陷型、*daf-16* 基因缺陷型三种基因型线虫为试验对象,比较对照组和 Ax 组线虫的寿命长短。方法与寿命实验一样,可参考 1.2.3。

1.2.6 数据处理

实验均重复 3 次,结果以均数±标准差表示,采用 SPSS 18.0 统计分析软件进行数据的统计学处理,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度虾青素 (Ax) 对线虫寿命的影响

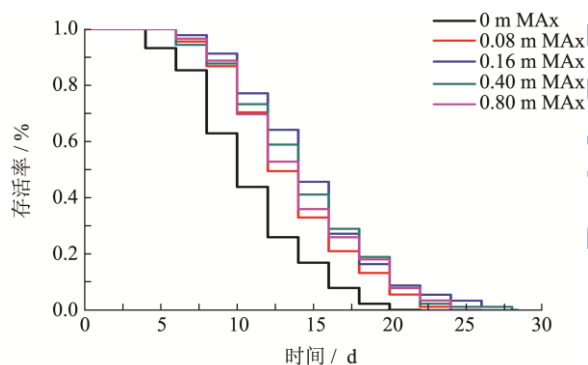


图 1 不同浓度虾青素对线虫生存曲线的影响

Fig.1 Survival curves of *C. elegans* treated with different concentrations of Ax

表 1 不同浓度虾青素对线虫寿命的影响

Table 1 Lifespan of *C. elegans* treated with different concentrations of Ax

Ax 浓度 /mM	平均寿命 /d	最大寿命 /d	寿命提升率/% (与对照组比较)
0(Control)	12.74±0.48	20.50±0.91	-
0.08	15.52±0.96**	24.00±0.73**	21.82
0.16	16.78±0.98***	26.03±1.05**	31.68
0.40	16.35±0.84***	25.53±1.36**	28.34
0.80	15.98±0.65***	25.09±0.58**	25.46

注:与对照组比较** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

寿命长短是衰老过程研究中的一个主要依据,试验比较了不同浓度 Ax 对线虫寿命的影响。对线虫整个生命周期的存活情况作生存曲线(图 1),结果发现 4 个浓度的 Ax 均能使线虫的生存曲线右移。与对照组相比,0.08 mM、0.16 mM、0.40 mM 和 0.80 mM Ax 均能显著延长线虫的平均寿命和最大寿命,且当处理浓度为 0.16 mM 时,Ax 组的平均寿命比对照组提高 31.68%,最大寿命比对照组提高约 5.5 d,效果优于其它剂量组(表 1)。

2.2 不同浓度虾青素对线虫相关生理指标的影响

线虫的衰老过程伴随着生理功能的衰减,研究已经证实,线虫生殖能力、移动能力和吞咽频率这三项生理指标同线虫的寿命具有直接相关性^[12]。因此,在测定线虫寿命的同时测定一些特定的生理功能指标(包括生殖能力、移动力和吞咽能力等)来量化线虫的生命质量,可更好的研究活性物质作用的特点。

2.2.1 不同浓度虾青素对线虫生殖能力的影响

为了评价虾青素在延长线虫寿命时是否会对其生殖能力造成影响,实验记录了虾青素处理下雌雄同体线虫自产卵孵化后的幼虫数量。如图 2 所示,4 个浓度 Ax 组的线虫在产卵期内产卵量与正常组没有统计学差异。

在众多的衰老理论中,长寿与生殖的关系备受争议。科学家通过对多种模型生物的研究发现寿命与生殖能力之间存在着一个叫做“利弊权衡(trade-off)”的机制,即寿命的延长会以降低或丧失生殖能力为代价^[13]。本试验的研究结果表明,Ax 延缓线虫衰老并没有降低或丧失其生殖能力,即虾青素延长线虫寿命的同时其机体处于健康状态。

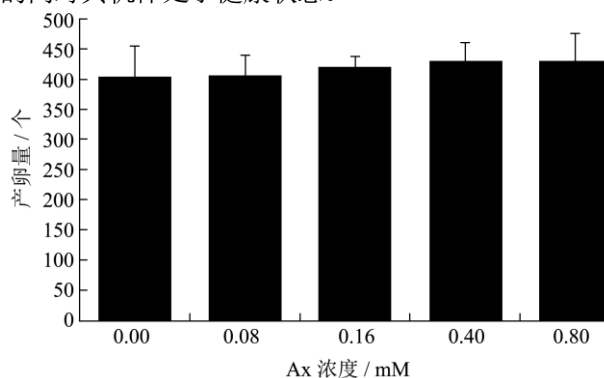


图 2 不同浓度虾青素对线虫生殖能力的影响

Fig.2 Fecundity of *C. elegans* treated with different concentrations of Ax

2.2.2 不同浓度虾青素对线虫吞咽频率的影响

线虫吞咽动作是神经肌肉系统调控下的有规律性的收缩，衰老的一个明显特征就是吞咽频率下降。实验观察了虾青素对线虫第 5 d、10 d 和 15 d 吞咽频率的变化。结果发现线虫的吞咽频率随着年龄增长而下降，与对照组相比，Ax 的 4 个浓度组并没有显著影响线虫的吞咽频率。

研究发现，在保持充足营养的情况下，减少热量的摄入能延长包括秀丽线虫在内的许多生物寿命，即热量限制 (CR) 途径^[14]。本实验结果可以排除虾青素是通过降低线虫吞咽频率，进而减少食物摄入而引起能量限制途径来影响寿命的可能性。

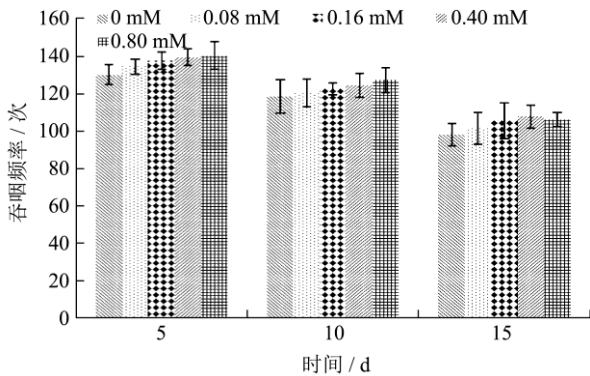


图 3 不同浓度虾青素对线虫吞咽频率的影响

Fig.3 Pumping rate of *C. elegans* treated with different concentrations of Ax

2.2.3 不同浓度虾青素对线虫移动力的影响

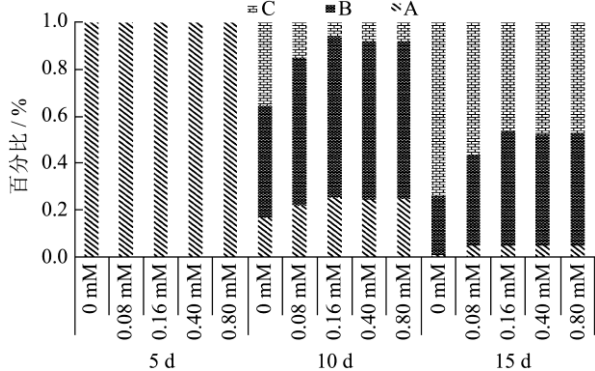


图 4 不同浓度虾青素对线虫移动力的影响

Fig.4 Pumping rate of *C. elegans* treated with different concentrations of Ax

线虫在培养基上的移动能力会随着年龄增长而下降，这是由衰老引起肌肉退化所致。为了探究虾青素是否通过增强线虫的移动力促进机体健康，实验观察了虾青素对第 5 d、10 d 和 15 d 线虫移动力的变化。研究发现，在第 5 d 时，对照组和药物组线虫均能自发运动，不需要触碰刺激；而在第 10 d 和 15 d 时，与对照组相比，虾青素处理组线虫的移动力评分中 B (线虫必须受到触碰刺激才运动) 和 C (线虫受到触碰刺激后只摆动头或尾) 级别占比明显降低，这说明虾青

素能显著提高线虫在第 10 d 和 15 d 时的移动能力。

2.2 虾青素对 *age-1* 和 *daf-16* 基因缺陷型线虫寿命的影响

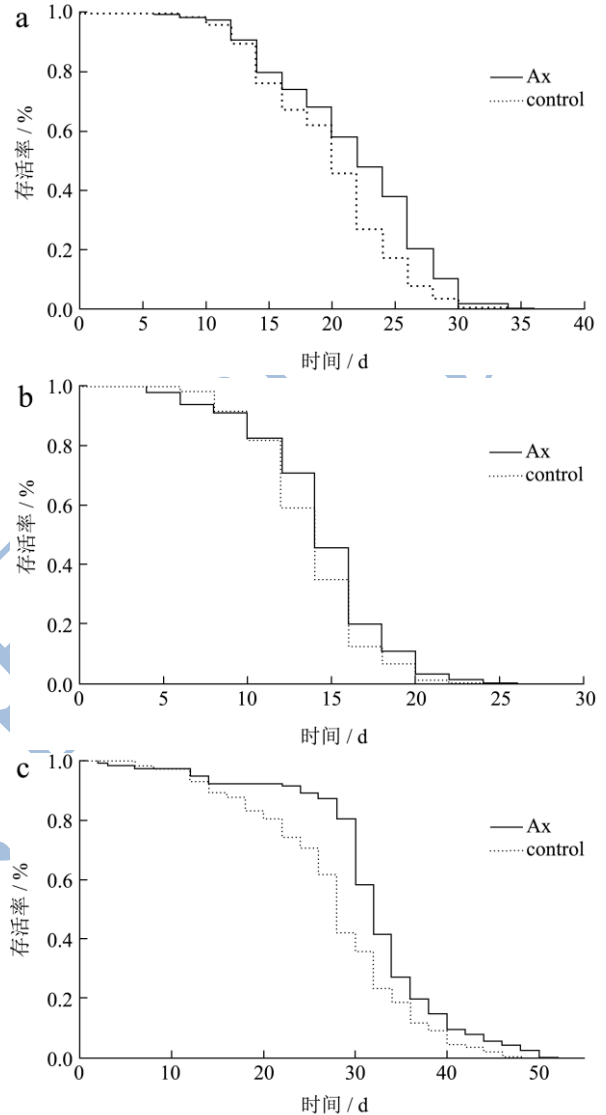


图 5 虾青素对不同基因型线虫生存曲线的影响

Fig.5 Survival curves of wild-type N2 (A), *daf-16* (B), and *age-1* (C) worms treated with 0.16 mM Ax

注: a: N2 野生型, b: *daf-16* 基因缺陷型, c: *age-1* 基因缺陷型。

胰岛素信号通路 (IIS) 在线虫寿命调控中发挥重要作用，该信号通路通过控制磷酸化 DAF-16 转移因子来调控。为了研究 Ax 延长线虫寿命机理是否需要 IIS 信号通路相关基因，本研究检测了用 0.16 mM Ax 处理 N2 野生型、*daf-16* 基因缺陷型和 *age-1* 基因缺陷型线虫的寿命。结果表明，与对照组相比，Ax 能使 N2 野生型和 *age-1* 基因缺陷型线虫的生存曲线右移 (图 5)；且可显著延长这两种基因型线虫的平均寿命

和最大寿命(表2),这说明Ax的抗衰老作用不依赖*age-1*基因。Ax处理与对照组处理的*daf-16*缺陷型线虫的平均寿命分别是13.33 d和14.42 d,结果没有显著性差异,Ax并不能显著提高线虫的寿命(表2),这说明Ax的抗衰老作用可能与IIS信号通路上的*daf-16*基因有直接关系。

表2 虾青素对不同基因突变型线虫寿命的影响

Table 2 Genetic requirement for lifespan extension induced by Ax

基因型	浓度/mM	平均寿命/d	最大寿命/d	基因需求
N2	0(Control)	19.81±0.58	29.33±1.05	
	0.16(Ax)	22.28±0.28*	31.93±1.01*	
<i>daf-16</i>	0(Control)	13.33±0.38	20.67±1.15	是
	0.16(Ax)	14.42±0.45	21.22±1.15	
<i>age-1</i>	0(Control)	27.64±0.37	45.33±1.15	否
	0.16(Ax)	31.52±0.50*	50.67±2.31*	

注:与对照组比较* $P < 0.05$ 。

3 结论

本文以秀丽线虫为模型,研究了Ax的抗衰老作用,以及Ax对其相关生理功能指标(生殖能力、吞咽频率和移动力)的影响,并对其可能的作用机制进行了探究。结果表明,0.08~0.80 mM Ax均能显著延缓秀丽线虫的衰老($P < 0.05$),且0.16 mM浓度的效果最优,线虫的平均寿命达到26.03 d,显著延长了31.68%。Ax在延缓线虫衰老的同时并没有降低其正常生理功能,且Ax对线虫寿命的延长不通过trade-off机制和CR途径发挥作用。Ax显著提高了N2野生型和*age-1*基因缺陷型线虫寿命,对*daf-16*基因缺陷型线虫寿命没有显著影响,由此推测Ax的抗衰老作用机制与IIS信号通路上的*daf-16*基因有很大的关系,可能通过对*daf-16*基因的调控影响一大批调节代谢、抗菌、抗胁迫基因表达,进而延长线虫寿命。

参考文献

- [1] Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry [J]. *Journal of Gerontology*, 1956, 11(3): 298-300
- [2] He L, Ji P, Gong X, et al. Physico-chemical characterization, antioxidant and anticancer activities in vitro of a novel polysaccharide from *Melia toosendan* Sieb. Et Zucc fruit [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49(3): 422-427
- [3] Seabra L M J, Pedrosa L F C, Seabra L M J. Astaxanthin:

structural and functional aspects [J]. *Revista De Nutricao-Brazilian Journal of Nutrition*, 2010, 23(6): 1041-1050

- [4] Mitrowska K, Vincent U, von Holst C. Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isosbestic wavelength approach [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1233: 44-53
- [5] Honda Y, Tanaka M, Honda S. Trehalose extends longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(4): 558-569
- [6] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94
- [7] Yazaki K, Yoshikoshi C, Oshiro S. Supplemental cellular protection by a carotenoid extends lifespan via Ins/IGF-1 signaling in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 596240
- [8] Wolff S, Dillin A. The trifecta of aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Experimental Gerontology*, 2006, 41: 894-903
- [9] Saul N, Pietsch K, Menzel R, et al. Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2008, 129(10): 611
- [10] Grünz G, Haas K, Soukup S, et al. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans* [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2012, 133(1):1-10
- [11] Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1 [J]. *Plos One*, 2010, 5(1):8758
- [12] Huang C, Xiong C, Kornfeld K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2004, 101: 8084-8089
- [13] Gruber J, Tang S Y, Halliwell B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1100: 530-542
- [14] Houthoofd K, Johnson T E, Vanfleteren J R. Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences*, 2005, 60(9): 1125-1131