

根皮素延缓雌性果蝇的衰老作用

张晓寒, 赵江, 韩英, 闫勇, 王慧, 王浩

(天津科技大学食品科学与食品工程学院, 天津 300457)

摘要: 本文探究了根皮素 (phloretin, PT) 对雌性果蝇延缓衰老作用的影响及其潜在机制。雌性果蝇干预根皮素后 (1.15 mM、2.3 mM、4.6 mM), 观察对寿命、爬行能力、抗应激能力、肠道屏障功能、肠道菌落总数、肠道前体细胞数目、内源抗氧化酶超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathion peroxidase, GSH-PX) 活力、脂质过氧化产物丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量以及相关抗氧化基因 SOD2、CAT、玛士撒拉 (methuselah, MTH) 和叉头蛋白 (forkhead box o, foxo) 的 mRNA 表达水平的影响。结果显示, 雌性果蝇干预根皮素浓度为 4.6 mM 时, 与空白组相比, 平均寿命延长了 23.98%, 30 d 时爬行能力上调了 44.96%, 对双氧水和十二烷基硫酸钠损伤后的寿命延长了 24.35% 和 23.94%, 肠道前体细胞减少了 15.59%, 肠道微生物乳酸杆菌 (lactobacilli, LMRS)、肠杆菌 (enterobacteria, ENT)、醋酸杆菌 (acetobacteria, ACE) 及其他细菌 (nutrient rich medium, NR) 分别下调了 23.73%、33.33%、43.24% 和 27.50%, Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、CAT、GSH-PX 酶活性分别提高了 17.85%、31.03%、32.07% 和 25.57%, MDA 生成量降低了 23.55%, foxo、CAT 和 SOD2 mRNA 表达水平分别上调了 67.21%、32.54% 和 36.27%, MTH mRNA 表达量降低了 27.16%。根皮素可以提高雌性果蝇抗氧化酶活力和抗氧化基因表达水平, 提高机体抗应激能力, 维持肠道稳态, 延长果蝇寿命。

关键词: 根皮素; 果蝇; 衰老; 酶活力; 基因表达

文章编号: 1673-9078(2020)03-9-16

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.3.002

Anti-aging Effects of Phloretin on Female *Drosophila melanogaster*

ZHANG Xiao-han, ZHAO Jiang, HAN Ying, YAN Yong, WANG Hui, WANG Hao

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The anti-aging effects of phloretin on female *Drosophila melanogaster* and its potential mechanism were explored. By supplementing serially diluted phloretin (1.15 mM, 2.3 mM, 4.6 mM) to female *Drosophila melanogaster*, the effects of phloretin on survival rate, crawling ability, stress resistance, intestinal barrier function and microbial colonies, number of intestinal progenitor cells, activity of endogenous antioxidant enzymes of SOD, CAT and GSH-PX and content of lipid peroxidation product MDA, related antioxidant genes SOD2, CAT, MTH and foxo mRNA expression level were investigated. The Results showed that female *Drosophila melanogaster* treated with 4.6 mM phloretin was markedly extended the mean lifespan by 23.98%, crawling ability increased by 44.96% at 30 days, lifespan after H₂O₂ and SDS injury increased by 24.35% and 23.94%, respectively, the number of intestinal precursor cells reduced by 15.59%, the number of LMRS, ENT, ACE, NR in the gut of *Drosophila melanogaster* reduced by 23.73%, 33.33%, 43.24% and 27.50%, respectively, at 40 days of age. The activity of Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, CAT and GSH-PX increased by 17.85%, 31.03%, 32.07% and 25.57%, respectively; the content of MDA decreased by 23.55%, the mRNA expression of foxo, CAT and SOD2 were increased by 67.21%, 32.54% and 36.27%, respectively, while the mRNA expression of MTH was decreased by 27.16%. Phloretin can improve the antioxidant enzymes activity and antioxidant gene expression levels, enhance the stress resistance, promote intestinal homeostasis and prolong the lifespan of female *Drosophila melanogaster*.

Key words: phloretin; *Drosophila melanogaster*; senility; enzyme activity; mRNA expression

引文格式:

张晓寒,赵江,韩英,等.根皮素延缓雌性果蝇的衰老作用[J].现代食品科技,2020,36(3):9-16

ZHANG Xiao-han, ZHAO Jiang, HAN Ying, et al. Anti-aging effects of phloretin on female *Drosophila melanogaster* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 9-16

收稿日期: 2019-09-18

基金项目: 天津市科技计划项目 (17KPHDSF00120)

作者简介: 张晓寒 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子营养学

通讯作者: 王浩 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养学

根皮素是一种二氢查尔酮类黄酮, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和抗癌等多种生物活性, 多存在于苹果、梨等水果中, 目前在人类医学中得到了广泛的应用^[1]。Jing Wang 等^[2]研究发现, 根皮素可降低脂质氧化速度

和抑制微生物的生长。Huang 等^[3]研究发现根皮素通过 AMPK 信号通路介导,增加了脂肪甘油三酯脂肪酶和激素敏感脂肪酶的活性,抑制巨噬细胞的炎症反应。Bu Young Choi 等^[4]研究发现,根皮素可阻断细胞周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶来抑制肿瘤细胞生长,还可激活线粒体来诱导细胞凋亡。氧化应激、炎症和肿瘤细胞增长都可打破机体平衡,加速衰竭,我们设想根皮素是否在延缓衰老方面也发挥着很好的作用。

黑腹果蝇由于具有强大的遗传学、保守的疾病通路和成本低的特点常被用作研究模型^[5]。以果蝇作为研究模型,除了多个同源基因与人类相似外,其肠道内结构、功能和分化与人类也相似^[6]。果蝇肠道作为一个调节系统,随着机体衰老,调节能力减弱,肠道微生物群结构失衡,产生肠道屏障功能障碍,自由基异常,中肠上皮细胞会启动再生机制加速干细胞的增殖来补充损伤细胞来维持平衡,从而导致干细胞异常增殖,诱导癌症的发生^[7]。这种由正常生理代谢产生的副作用,在很大程度上被健康人体的抗氧化防御系统所抵消,主要抗氧化酶有 SOD 和 CAT^[8]。

本实验以野生型黑腹果蝇 W^{1118} 和 *esg-Gal4 UAS-GFP* 转基因型果蝇(特异性的荧光标记了果蝇前体细胞)作为研究模型,测定根皮素对雌性果蝇寿命、爬行性能、抗应激能力、调节肠道平衡能力、内源抗氧化酶活力(SOD、CAT、GSH-PX)、脂质过氧化产物 MDA 含量以及相关抗氧化基因 SOD2、CAT、MTH 和 *foxo mRNA* 表达水平的影响。探究根皮素延缓衰老的作用机制,为今后基于根皮素的功能产品开发和利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

根皮素(>98%),天津尖峰天然产物研究开发有限公司;野生型果蝇 W^{1118} ,天津科技大学食品添加剂与营养调控研究室提供;*esg-Gal4 UAS-GFP* 转基因型果蝇(该品系果蝇特异性的携带标记果蝇肠道前体细胞绿色荧光蛋白),由东北林业大学生命科学学院提供;十二烷基硫酸钠(lauryl sodium sulfate, SDS)、双氧水(hydrogen peroxide, H_2O_2)和非消化染料(FD&C blue no.1),美国 Sigma(St Louis, MI, USA)公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI),上海源叶生物科技有限公司;总 SOD 试剂盒、Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 试剂盒、CAT 试剂盒、GSH-PX 试剂盒、MDA 试剂盒,南京建成试剂公司;Trizol 试剂、cDNA 反转录试剂盒、SYBR

Green, 大连宝生物。

智能恒温培养箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;SW-CJ-1FD 洁净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;Neofuge 13R 台式高速冷冻离心机,力康发展有限公司;NewClassic 系列天平 MS 半微量型号电子天平,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;OLYMPUS U-RFLT50 型荧光显微镜,日本 Olympus 公司;G:box 凝胶图像采集分析系统,英国 Syngene 公司。

1.2 方法

1.2.1 果蝇培养基的制备

果蝇基础培养基(500 mL):由蒸馏水(473.3 mL)、玉米粉(48 g)、无水葡萄糖(48 g)、酵母粉(6.7 g)、琼脂粉(4 g)、防腐剂(6.7 g)(1%的对羟基苯甲酸乙酯)组成^[9]。熬制过程需要提前把琼脂、玉米粉、酵母溶解以备使用。果蝇培养基使用量可根据实验需求按比例进行配置即可,果蝇实验培养基由基础培养基再需添加根皮素(1.15 mM、2.3 mM、4.6 mM)即可。

1.2.2 果蝇寿命和体重实验

收集同一批次野生型果蝇 W^{1118} (年龄差小于 3 d),随机分成 4 组,每组 200 只(每管 20 只),分别为空白对照组(control)、1.15 mM 根皮素组(PT1)、2.3 mM 根皮素组(PT2)和 4.6 mM 根皮素组(PT3)。恒温恒湿培养(温度 25 ± 1 °C,湿度 55 ± 5 °C),每 3 d 更换一次培养基,并统计寿命和体重,直到所有果蝇死亡,每个独立实验平行 3 次。

1.2.3 果蝇摄食量和爬行实验

收集羽化后 1~3 d 的野生型果蝇 W^{1118} ,随机分成 4 组,每组 200 只,果蝇培养如 1.3.2 果蝇寿命培养方法。摄食量测定实验:果蝇培养 4 d 后转移到含有沾有蒸馏水的滤纸条空管中饥饿 20 h,转移到含有 0.2% 罗丹明 B 磺酸钠盐对应的实验粮中培养 2 h。使用从 0 级(无色腹部)到 5 级(完全红腹部)的主观评分等级,对每只果蝇的腹部发红程度进行盲评,腹部发红程度用作果蝇摄取食物量的指标^[10]。爬行实验:果蝇转移到空管中,抖动使果蝇全部处在管底,计时统计 30 s 内果蝇爬到 5 cm 以上的果蝇数量,分别统计 15 d、30 d 和 45 d 的爬行能力^[11]。

1.2.4 果蝇应激损伤实验

收集羽化后 1~3 d 的野生型果蝇 W^{1118} ,随机分成 4 组每组 200 只,分别为 control、PT1、PT2 和 PT3。果蝇培养如 1.3.2 果蝇寿命培养方法,培养 25 d 后将果蝇转入空管中禁食 2 h,然后转移到含有不同滤液的滤纸条的空管中^[12]。模型组中滤液为 5% 葡萄糖与

30% H₂O₂ 或 6 mg/mL SDS, 实验组滤液为 5% 葡萄糖、根皮素(PT1、PT2、PT3)与 30% H₂O₂ 或 6 mg/mL SDS。每 2 h 或 5 h 统计一次寿命, 直到所有果蝇死亡, 每个独立实验重复 3 次。

1.2.5 果蝇肠道通透性实验

收集羽化后 1~3 d 的野生型果蝇 W¹¹¹⁸, 果蝇培养如 1.3.2 寿命培养方法。实验选取饲养不同时间段的果蝇(10 d、35 d、50 d), 进行蓝色染料喂养, 在每组原有实验培养基的基础上每 100 mL 培养基添加 2.5 g 非吸收蓝色染料(FD&C blue no.1)培养 10 h, N₂ 迷晕, 每组随机选取 20 只果蝇进行实验统计, 显微镜下观察果蝇腹部染料区域大小, 并记录结果^[13]。每个独立实验平行 3 次。

1.2.6 果蝇肠道菌落测定

收集羽化后 1~3 d 的野生型果蝇 W¹¹¹⁸, 随机分成 4 组, 每组 200 只, 果蝇培养如 1.3.2 寿命培养方法。每 3 d 更换一次培养基, 饲养 10 d、45 d 时, 转移到

空管禁食 2 h, N₂ 迷晕, 在无菌室内取果蝇中肠, 每组 10 条, 磷酸钾缓冲液清洗, 加入 1 mL 的 PBS 匀浆, 匀浆液十倍梯度稀释, 各梯度吸取 100 μL 涂布于 ENT、LMRS、ACE 及 NR 适宜生长的营养培养基上, 在适宜的环境中无菌培养^[9]。根据平板菌落计数法统计实验结果。每个实验重复 3 次。

1.2.7 果蝇肠道前体细胞测定实验

Esg-Gal4 UAS-GFP 转基因型果蝇培养如 1.3.2 寿命培养方法, 收集培养 4 d 的果蝇, 饥饿 2 h, N₂ 气迷晕, 在磷酸钾缓冲液中解剖果蝇中肠 20 条, 4% 甲醛固定半小时, 用 PBST(含 1% Triton X-100)清洗 3 次(每次至少 1 min), 5% 羊血封闭半小时, 加入一抗(兔抗-GFP、兔抗-PH3), 4 °C 孵育过夜, PBST 清洗, 结合二抗 2 h, PBST 清洗, 70% 的甘油封片, 荧光显微镜下观察^[14](10×)。(本部分实验仅有 control 和 PT3 组) 每组实验重复 3 次。

1.2.8 果蝇抗氧化酶活和脂质过氧化产物测定

表 1 检测雌性果蝇抗氧化基因 PCR 引物

Table 1 PCR primers used for the measurement of antioxidant genes mRNA expression in female *Drosophila melanogaster*

基因	序列号	上游引物	下游引物
RP49	NM_079843.2	CTTACC GCC ACCAGTC	GCACCAGGA A CTTGAATC
SOD2	NM_057577.3	GATTCGGAGCCTTGATGTGGTAG	TCA TCCAGCCTTCCATTCTTACAG
CAT	NM_080483.3	GCAGCACCTGAAGTCATCTC	GAGTGGCGACAGAACGATTG
MTH	NM_079147.4	ACTGAGGCTGAGAATACTG	GCTGAGAAGGAGTTACAATC
Foxo	NM_206483	CCTCATCCAATGCCAGTTC	TGCGTCATCGTTGTGTTTC

收集羽化后 1~3 d 的野生型果蝇 W¹¹¹⁸, 培养如 1.3.2 寿命培养方法。收集培养 45 d 果蝇, 根据 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、CAT、GSH-PX 及 MDA 试剂盒测定。果蝇 mRNA 水平测定: 收集培养 45 d 的果蝇, 生理盐水稀释, 均浆, 按照说明书进行后续实验: TRIzol 提取总 RNA, 逆转录酶试剂盒合成 cDNA, qRT-PCR 采用 SYBR Green PCR Master Mix 和 Applied Bio-systems Plus Real-Time PCR 系统进行。扩增条件: 95 °C, 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 40 个循环。引物见表 1, RP49 为看家基因^[15], 基因表达以 PCR 的 2^{-ΔΔCt} 值表示, 每组实验重复三次。

1.3 数据分析

采用 Prism 7, 进行数据分析和作图, 采用单因素方差(one-way ANOVA)分析组间差异。连续变量用平均值±标准差(mean±SD)表示。p<0.05 表示有差异显著性, p<0.01 表示有差异极显著性。前体细胞荧光用 Image J 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 根皮素对果蝇寿命和体重的影响

随着机体衰老, 正常调节功能会逐渐削弱、代谢受阻, 同时对外界适应能力和抵抗能力也逐渐减弱, 进而引发各种衰老疾病, 影响寿命^[16]。由图 1 可知, 雌性果蝇干预不同浓度梯度根皮素后(5.7 mM、1.15 mM、2.3 mM、4.6 mM、6.9 mM、9.2 mM), 与空白组相比, 寿命依次上调, 并呈现出剂量依赖关系, 但根皮素浓度为 6.9 mM 时, 增长速率下降, 综合考虑, 本文选取 1.15 mM、2.3 mM、4.6 mM 浓度梯度进行后续实验。

由表 2 可知, 雌性果蝇干预根皮素后, 平均寿命显著延长(p<0.05)。其中, 与空白组相比, 果蝇干预根皮素浓度为 1.15 mM、2.3 mM、4.6 mM 时, 平均寿命分别延长了 9.77%、16.72% 和 23.98%, 最大寿命分别延长了 10.01%、12.25% 和 13.48%。以上结果表明, 根皮素可以显著延长雌性果蝇的寿命, 并呈现出剂量

依赖关系($p < 0.05$)。

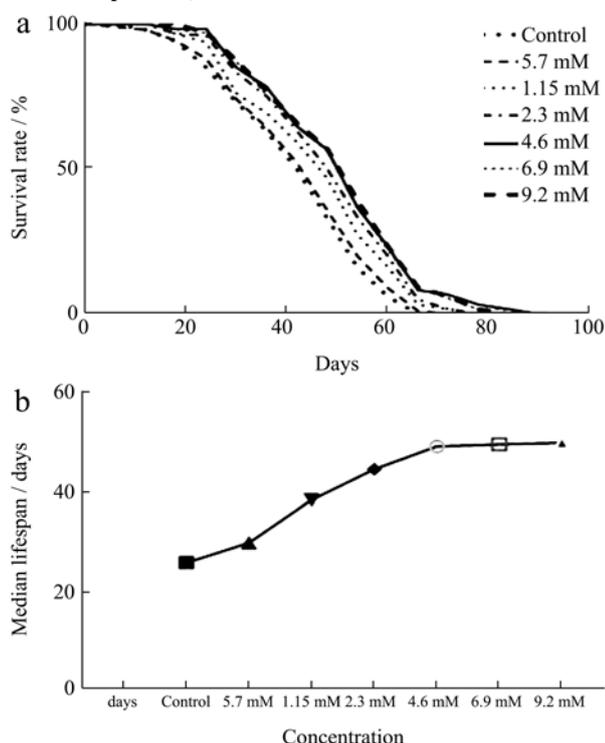


图 1 不同浓度梯度根皮素对雌性果蝇寿命的影响

Fig.1 Effects of different phloretin concentrations on female *Drosophila melanogaster*

注: a: 寿命曲线, b: 50% 寿命曲线。正常组 vs 根皮素组, $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$ 。

表 2 根皮素对雌性果蝇寿命和体重的影响

Table 2 Effects of phloretin on lifespan and weight of

Drosophila melanogaster

组别	平均寿命 \pm SD/d	最大寿命 \pm SD/d	平均体重 \pm SD/d
空白组	47.50 \pm 3.26	79.52 \pm 2.71	1043.56 \pm 2.71
PT1	52.14 \pm 1.46	87.48 \pm 3.02	1087.63 \pm 3.02
PT2	55.44 \pm 2.93*	89.26 \pm 2.19*	1106.24 \pm 4.19
PT3	58.89 \pm 2.14**	90.24 \pm 1.71*	1004.77 \pm 3.71

注: 正常组 vs 根皮素组, $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$ 。下表同。

2.2 根皮素对摄食量和爬行能力的影响

饮食限制可以通过限制能量的摄入, 减少脂肪积累, 增加对生长因子敏感性来延长寿命^[17]。为了探究根皮素延长寿命是否通过饮食限制, 我们测定了雌性果蝇的摄食量和体重。由图 2a 可知, 雌性果蝇摄食量无显著差异; 通过测量体重发现, 雌性果蝇干预根皮素后, 平均体重与空白对照组相比, 无显著差异(表 2) ($p > 0.05$)。以上结果表明, 根皮素延长果蝇寿命不受饮食限制的影响。

随着机体衰老, 调节能力和基本生理功能会逐渐衰退, 以爬行能力作为衡量衰老的一个指标, 间接反

映机体的健康状态^[18]。由图 2b 可知, 雌性果蝇干预根皮素后, 爬行能力显著提高($p < 0.05$)。其中, 果蝇干预根皮素浓度为 4.6 mM 时, 在 15 d 和 30 d, 平均爬行能力分别提高了 31.36% 和 44.96%。以上结果显示, 根皮素可以改善果蝇的爬行能力, 增强机体调节能力, 且根皮素的作用效果与饮食限制无关。本实验结果与 Sepehr Bahadorani 等^[10]研究可可豆延长果蝇寿命, 提高果蝇爬行能力不受饮食限制的影响结果相一致。

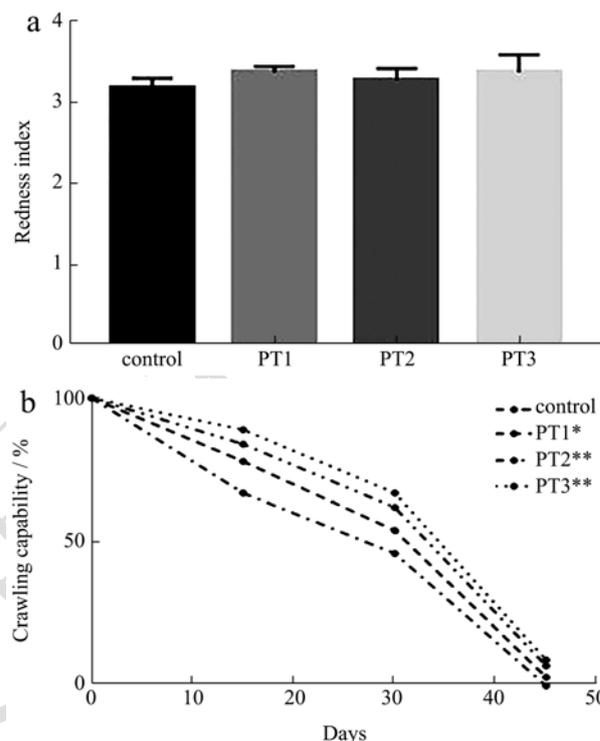


图 2 (a) 根皮素对雌性果蝇摄食量的影响; (b) 根皮素对雌性果蝇爬行能力的影响

Fig.2 (a) Effects of phloretin on food intake of female

Drosophila melanogaster; (b) Effects of phloretin on crawling ability of female *Drosophila melanogaster*

注: 正常组 vs 根皮素组, $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$ 。下图 3、5、6 同。

2.3 根皮素对急性氧化应激的影响

H_2O_2 作为一种强氧化剂, 常被应用于研究抗氧化实验中, H_2O_2 诱导后会导致果蝇机体紊乱, ROS 增多加速老化^[19]。如图 3 所示, 果蝇干预根皮素后, 明显改善了 H_2O_2 和 SDS 急性诱导的寿命缩短($p < 0.05$)。其中, 如图 3a 所示, 在 H_2O_2 急性应激实验中, 果蝇干预根皮素浓度为 1.15 mM、2.3 mM 和 4.6 mM 时, 平均寿命与空白对照组相比, 分别延长了 16.07%、17.21% 和 24.35%。以上结果表明, 根皮素对 H_2O_2 诱导的果蝇氧化损伤具有保护作用。

SDS 是一种有毒化合物, 通过诱导应激反应影响

肠道内环境失衡,进而影响果蝇的寿命^[20]。如图 3b 所示,在 SDS 应激实验中,果蝇干预根皮素浓度为 1.15 mM、2.3 mM 和 4.6 mM 时,与空白对照组相比,平均寿命分别延长了 7.62%、16.8%和 23.94%。以上结果表明,根皮素对 SDS 损伤果蝇肠道紊乱具有保护作用。

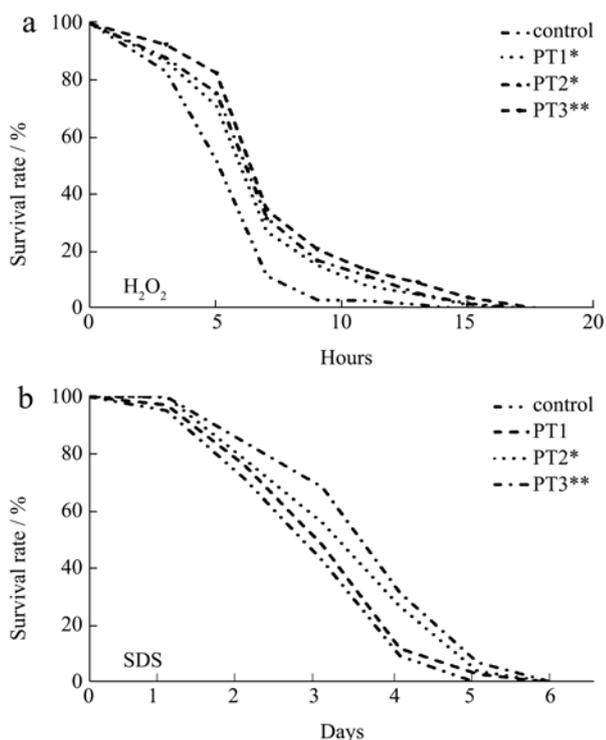


图 3 根皮素对 H₂O₂ (a) 和 SDS (b) 诱导雌性果蝇生存曲线的影响

Fig.3 Effects of phloretin on survival curve of female

Drosophila melanogaster induced by H₂O₂ (a) and SDS (b)

2.4 根皮素对果蝇肠道屏障功能的影响

衰老与机体功能下降有关,而机体功能下降的根源在于细胞退化和组织稳态的丧失^[21]。保持健康的肠道功能和完整性是决定果蝇寿命的一个重要因素。使用一种非消化染料(FD&C blue no.1)喂养果蝇,以突显肠道组织面的老化。由图 4a 可知,雌性果蝇摄食非消化染料后,在 10 d、35 d 和 50 d 不同阶段典型的代表图。当果蝇喂养 10 d 后,蓝色染料仅在嘴巴和消化道部位;当果蝇饲养 35 d 后,果蝇体态蓝色部位普遍增多,包括腹部和四肢;当果蝇喂养 50 d 后,果蝇出现全身都变蓝的状态,一般称此为“蓝精灵”。

由图 4b 可知,果蝇随着机体老化,屏障功能会逐渐增强^[22]。雌性果蝇干预根皮素 10 d 后,与空白对照组相比,“蓝精灵”出现的数量没有显著差异($p>0.05$)。当雌性果蝇干预根皮素 35 d 后,观察出现“蓝精灵”的数量,与空白组相比较,分别下调了 17.96%、29.69%

和 33.59%;雌性果蝇干预根皮素 50 d 后,与空白组比较,根皮素浓度为 1.15 mM、2.3 mM、4.6 mM 时,出现“蓝精灵”的数量分别下调了 5.16%、12.36%和 13.25%。以上结果表明,根皮素可以缓解老年雌性果蝇肠道的屏障功能障碍。

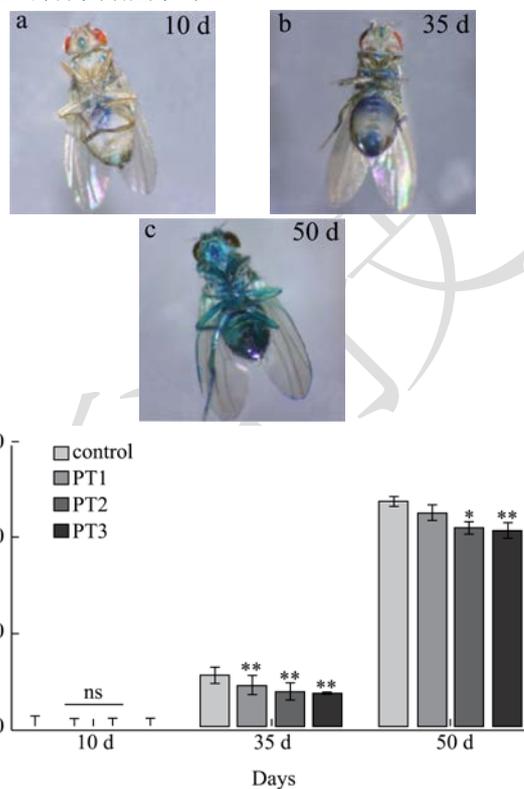


图 4 根皮素对雌性果蝇肠道屏障功能的影响

Fig.4 Effects of phloretin on the barrier function of female

Drosophila melanogaster

注: a、b、c: 不同年龄段 10 d、35 d 和 50 d 雌性果蝇食用非消化染料的典型代表图; d: 根皮素对不同年龄段 10 d、35 d 和 50 d 雌性果蝇出现“蓝精灵”数量的影响。

表 3 根皮素对 10 d 雌性果蝇中肠菌落数量的影响 (CFU/per gut)

Table 3 Effects of phloretin on amount of flora from mid-gut homogenates of female *Drosophila melanogaster* aged 10 days

组别/mM	LMRS	ENT	ACE	NR
空白组	167±21	242±14	266±24	142±20
PT1	160±26	230±29	252±15	138±22
PT2	156±17	220±24	242±24	130±24
PT3	150±16	216±19	238±11	128±16

肠道菌群结构失衡,增加循环系统内毒素特别是脂多糖(LPS)水平,引起代谢和免疫失衡,影响果蝇寿命^[21]。由表 3 可知,雌性果蝇干预根皮素 10 d 后,与空白组相比,菌落计数结果显示, LMRS、ENT、ACE、NR 均无显著差异($p>0.05$)。由表 4 可知,雌性果蝇干预根皮素 45 d 后,与空白对照组相比,肠道内微生物

数量显著下调($p < 0.05$)。其中雌性果蝇干预根皮素的浓度为 4.6 mM 时,与空白组比较,LMRS、ENT、ACE、NR 分别下调了 23.73%、33.33%、43.24%和 27.5%。以上结果表明,根皮素可以调节老年雌性果蝇肠道微生物平衡,缓解因衰老导致的肠道微生物异常增殖。这与 Linlin Guo 等^[23]研究发现,PGRP-SC2 能促进肠道平衡,限制肠道微生物失调,延长寿命的结果一致。表 4 根皮素对 45 d 雌性果蝇中肠菌落数量的影响 (10^4 CFU/per gut)

Table 4 Effects of phloretin on amount of flora from mid-gut homogenates of female *Drosophila melanogaster* aged 45 days

组别/mM	LMRS	ENT	ACE	NR
空白组	59±6	48±3	37±2	40±5
PT1	52±1	42±5*	30±4*	35±2*
PT2	48±2**	38±3**	27±3**	32±2**
PT3	45±3**	32±2**	21±1**	29±4**

2.5 根皮素对果蝇肠道前体细胞数量的影响

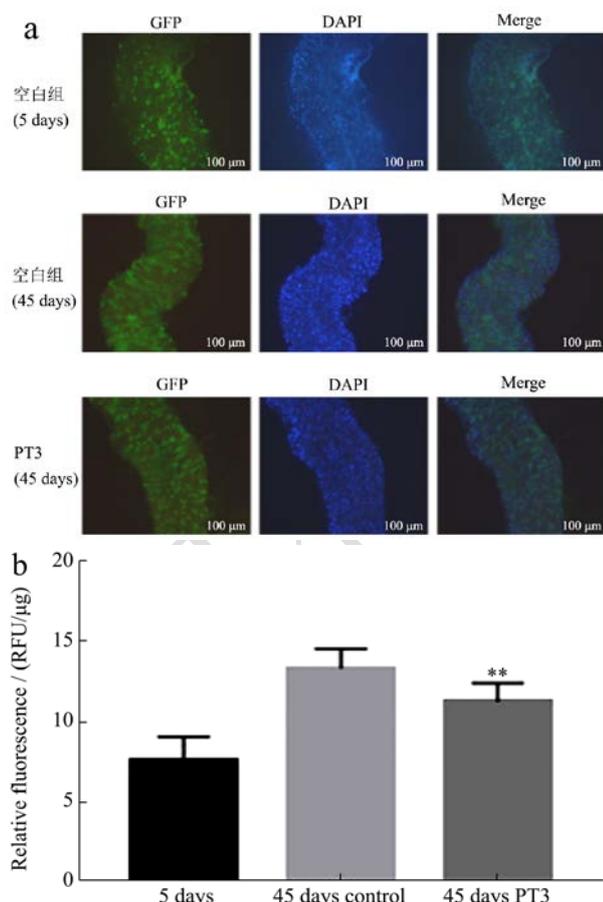


图 5 根皮素对雌性果蝇中肠前体细胞过度增殖的影响

Fig.5 Effects of phloretin on excessive proliferation of progenitor cells in adult mid-gut of female *Drosophila melanogaster*

注: a: 前体细胞代表图; b: 前体细胞定量分析图。

肠道稳态与衰老息息相关,肠道微生物随机机体功能衰退会出现异常增殖现象,可导致肠上皮细胞调节 ROS 和前体细胞异常增多,肠道免疫系统紊乱,促进与年龄相关的疾病发生^[24]。中肠组织稳态由肠干细胞维持,在应激条件下,肠干细胞过度增殖且伴随着错误分化的积累,这是一种再生反应,可以替补应激导致的受损细胞、促进坏细胞的凋亡,但这种再生功能对生物体具有副作用,最终会破坏上皮细胞完整性,导致肠功能丧失和果蝇死亡率增加^[25]。本实验采用 esg-Gal4 UAS-GFP 转基因型果蝇作为研究模型,此品系果蝇特异性的荧光标记了果蝇前体细胞^[13]。由图 5a 可知(空白组),实验结果显示,随着机体衰老,果蝇肠道前体细胞异常增殖,面积扩增,由先前清晰的颗粒形态逐渐增大成层状分布和不规则形状,荧光强度减弱,肠溶质增多。雌性果蝇干预根皮素后,与空白对照组相比(45 d),发现前体细胞颗粒趋于清晰的三角形,荧光强度增强,肠溶质减少趋于清晰,前体细胞数量减少。通过 Image J 软件分析,相对荧光减少 15.59%。以上结果表明,根皮素可以缓解老年雌性果蝇的肠道前体细胞异常增殖。这与 Fan 等^[13]研究,雷帕霉素可以抑制老年肠道前体细胞异常增殖,加速肠道上皮细胞自噬,延长寿命的结果相一致。

2.6 根皮素对雌性果蝇内源抗氧化酶和抗氧化基因 mRNA 表达水平的影响

生物体在有氧代谢过程中会不断产生 ROS,当机体功能衰退和受外界刺激,ROS 失调导致机体失衡,代谢紊乱,加速衰老^[26]。ROS 生成与抗氧化防御之间的平衡决定了氧化应激的程度,氧化应激可促进脂类、碳水化合物、蛋白质和 DNA 的破坏,改变或激活细胞信号通路,导致细胞凋亡或坏死,活性氧的产生主要通过复杂的抗氧化防御系统来抵消,该系统包括 SOD、CAT 和 GSH-Px,其中 SOD 可加速超氧化物转化为过氧化氢,过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶将过氧化氢转化为水,降低脂质的过氧化^[27]。由表 5 可知,机体内的抗氧化酶活力增加,可以提高机体的抗氧化性,进而延缓功能衰退和疾病的发生^[28]。与空白组相比,雌性果蝇干预根皮素浓度为 4.6 mM 时, Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、CAT、GSH-PX 酶活力分别提高了 17.85%、31.03%、32.07%和 25.57%,MDA 生成量降低了 23.55%。这与 Mariadoss 等^[29]研究发现根皮素可以增强细胞抗氧化酶 SOD, CAT 活性和降低脂质过氧化,抑制致癌物引起的自由基异常增殖,增强机体的生存能力的结果相一致。

由图 6 可知, 并通过 qRT-PCR 结果显示, 雌性果蝇干预根皮素后显著提高了 SOD2 和 CAT, 降低了 MTH 的 mRNA 相对表达水平, 并呈剂量依赖关系。其中, 雌性果蝇干预根皮素浓度为 2.3 mM 时, foxo、CAT 和 SOD2 的 mRNA 表达量分别提高了 46.12%、24.33% 和 27.19%, MTH mRNA 表达量降低了 13.63%。当雌性果蝇干预根皮素浓度为 4.6 mM 时, foxo、CAT 和 SOD2 的 mRNA 表达量分别提高了 67.21%、32.54% 和 36.27%, MTH mRNA 表达量降低了 27.16%。以上结果表明, 根皮素可以提高雌性果蝇内源性抗氧化酶活力和抗氧化基因 mRNA 表达水平。FOXO 转录因子是决定衰老和寿命的重要因素, 从秀丽隐杆线虫到哺乳动物都是转录因子的保守家族, 这些转录因子在胰岛素和胰岛素样生长因子信号转导的下游起着关键的抗氧化应激和长寿调节作用^[30]。Lee Gang Jun 等^[31]研究发现, 二甲胺四环素可以通过 FOXO 提高机体抗应激能力, 延长果蝇寿命。Ahn Hye-Mi 等^[32]研究发现 foxo 可以介导过氧化物酶 V (dPrxV, 一种维持肠道氧化还原平衡的抗氧化酶),

表 5 根皮素对雌性果蝇体内 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、CAT、GSH-PX 酶活力和 MDA 生成量的影响

Table 5 Effects of phloretin on Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, CAT, GSH-PX enzyme activity and the content of MDA in female *Drosophila melanogaster*.

组别/mM	Mn-SOD/ (U/mg pro±SD)	Cu/Zn-SOD/ (U/mg pro±SD)	CAT/ (U/mg pro±SD)	GSH-PX/ (U/mg pro±SD)	MDA/ (nmol/mg pro±SD)
空白组	47.72±2.62	32.16±2.46	24.32±2.14	46.70±4.22	4.16±0.45
PT1	49.62±4.16	34.15±1.62	28.42±3.11*	50.20±1.54	3.82±0.22
PT2	53.22±3.17*	39.84±2.44**	30.15±1.86**	54.61±2.64*	3.58±0.52*
PT3	56.24±2.78**	42.14±1.13**	32.12±2.19**	58.64±3.12**	3.18±0.46**

3 结论

综上所述, 雌性果蝇干预一定剂量的根皮素可以显著延长寿命 ($p < 0.05$), 减缓因衰老导致的运动能力下降, 增强抗应激能力, 降低老年肠道屏障功能障碍, 抑制老年肠道微生物和前体细胞异常增殖, 提高抗氧化酶活力, 上调抗氧化基因 mRNA 表达水平。以上结果显示, 根皮素可以通过调控抗氧化酶活力和抗氧化基因表达水平, 提高机体抗应激能力, 维持肠道稳态, 延缓雌性果蝇的衰老。

参考文献

[1] Mariadoss, Vinyagam R, Rajamanickam V, et al. Pharmacological aspects and potential use of phloretin: a systematic review [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2019, 19: 1-8

[2] Wang J, Fang J, Wei L, et al. Decrease of microbial

降低果蝇肠道微生物感染, 保护上皮细胞免受氧化损伤, 提高果蝇生存能力。本实验结果显示, 雌性果蝇干预根皮素后, foxo 的 mRNA 表达水平显著上调, 并呈现出剂量依赖关系 (图 6) ($p < 0.05$)。实验结果表明, 根皮素可通过 foxo 基因, 提高抗应激能力和维持肠道稳态, 延长果蝇的寿命。

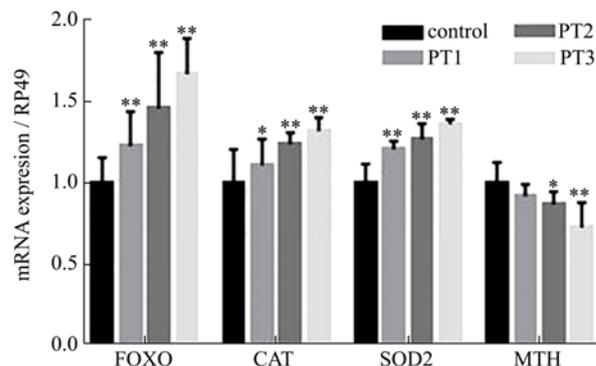


图 6 根皮素对雌性果蝇抗氧化基因 foxo、CAT、SOD2 和 MTH mRNA 表达量的影响

Fig.6 Effects of phloretin on foxo, CAT, SOD2 和 MTH mRNA expression in female *Drosophila melanogaster*

community diversity, biogenic amines formation, and lipid oxidation by phloretin in Atlantic salmon fillets [J]. LWT, 2019, 101: 419-426

[3] Huang W C, Chang W T, Wu S J, et al. Phloretin and phlorizin promote lipolysis and inhibit inflammation in mouse 3T3-L1 cells and in macrophage - adipocyte co-cultures [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2013, 57(10): 1803-1813

[4] Choi Bu Young. Biochemical basis of anti-cancer-effects of phloretin-a natural dihydrochalcone [J]. Molecules, 2019, 24(2): 278

[5] Pandey Udai Bhan, Nichols Charles D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery [J]. Pharmacological Reviews, 2011, 63(2): 411-436

[6] Douglas Angela e. The drosophila model for microbiome research [J]. Lab Animal, 2018, 47(6): 157-164

- [7] E Melo Felipe De Sousa, De Sauvage Frederic J. Cellular plasticity in intestinal homeostasis and disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 54-64
- [8] Orr W C, Sohal R S. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 1994, 263(5150): 1128-1130
- [9] 王慧,赵江,杨胜楠,等.玉米黄质延缓果蝇衰老作用的研究[J].*营养学报*,2018,40(5), 506-508
WANG Hui, ZHAO Jiang, YANG Sheng-nan, et al. Anti-aging effect of zeaxanthin on *Drosophila melanogaster* [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2018, 40(5): 506-508
- [10] Bahadorani S, Hilliker A.J. Cocoa confers life span extension in *Drosophila melanogaster* [J]. *Nutrition Research*, 2008, 28(6): 377-382
- [11] Wang H L, Zhang Z S, Sun Z O, et al. Rosemary extracts mediated lifespan extension in *Drosophila melanogaster* [C]. International Conference on Materials Chemistry and Environmental Protection 2015. Sanya China: Atlantis Press, 2016
- [12] 刘冀婕,黄玲艳,曾照准,等.桂花提取物对雄性果蝇抗氧化及抗衰老作用的研究[J].*食品研究与开发*,2018,39(21): 38-43
LIU Ji-je, HUANG Lin-yan, ZENG Zhao-zhun, et al. Effects of *Osmanthus fragrans* alcohol extract on anti-oxidation and anti-aging for male fruit fly [J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(21): 38-43
- [13] Fan x l, Liang q, Lian T, et al. Rapamycin preserves gut homeostasis during *Drosophila* aging [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35274-35283
- [14] 巩媛,金秋霞,白建洋,等.大黄对十二烷基硫酸钠损伤的果蝇肠道干细胞活性的影响[J].*中草药*,2017,48(12): 2466-2473
GONG Yuan, JIN Qiu-xia, BAI Jian-yang, et al. Effect of *Rheum officinale* on activity of intestinal stem cells in *Drosophila melanogaster* induced by SDS toxicity [J]. *Chinese Traditional drug*, 2017, 48(12): 2466-2473
- [15] 王彦平,曹娅谢,克英紫,等.紫山药多糖抗氧化及延长果蝇寿命的作用[J].*营养学报*,2017,39(4),386-389
WANG Yan-ping, CAO Ya-xie, KE Ying-zi, et al. Effects of purple yam polysaccharides on antioxidant function and lifespan in *Drosophila melanogaster* [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2017, 39(4): 386-389
- [16] 莫睿,魏智民,杨云生.抗衰老机制研究进展[J].*解放军医学杂志*,2017,42(8):743-747
MO Rui, WEI Zhi-min, YANG Yun-sheng. Advances in research of anti-aging mechanism [J]. *Med J Chin PLA*, 2017, 42(8): 743-747
- [17] Haramizu S, Kawabata F, Masuda Y, et al. Capsinoids, non-pungent capsaicin analogs, reduce body fat accumulation without weight rebound unlike dietary restriction in mice [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(1): 95-99
- [18] Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2018, 13: 757-772
- [19] Tina Obecker, Jorg Bajorat, Sabine Ziola, et al. Enhanced expression of thioredoxin - interacting - protein regulates oxidative DNA damage and aging [J]. *FEBS Letters*, 2018, 592(13): 2297-2307
- [20] Zhu C, Guan F, Wang C, et al. The protective effects of *Rhodiola crenulata* extracts on *Drosophila melanogaster* gut immunity induced by bacteria and SDS toxicity [J]. *Phytotherapy Research*, 2014, 28(12): 1861-1866
- [21] Michael Rera, Sepehr Bahadorani, Jaehyoung Cho, et al. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog [J]. *Cell Metabolism*, 2011, 14(5): 623-634
- [22] Rera M, Clark R I, Walker D W. Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(52): 21528-21533
- [23] Guo L, Karpac J, Tran S L, Jasper H. PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan [J]. *Cell*, 2014, 156(1-2): 109-122
- [24] 刘强,金丽华.果蝇肠道干细胞增殖与分化机制及其研究进展[J].*生物化学与生物物理进展*,2015(10):911-919
LIU Qiang, JIN Li-hua. The functional mechanisms and research progresses of midgut intestinal stem cells in *Drosophila* [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2015(10): 911-919
- [25] Zembruski N C L, Stache V, Haefeli W E, et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 429(1): 79-81
- [26] Harraan D. Aging-a theory based on free-radical and radiation-chemistry [J]. *Journals of Gerontology*, 1956, 11(3): 298-300
- [27] Finkel T, Holbrook J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 239-247

(下转第 166 页)