

# 酱油发酵基料中染料木素的抗氧化活性评价

李一峰<sup>1</sup>, 朱毅<sup>1</sup>, 梁雪莹<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 符姜燕<sup>2</sup>, 扈圆舒<sup>2</sup>, 蔡惠钿<sup>1</sup>, 彭名军<sup>3</sup>, 曹庸<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642) (2. 广东美味鲜调味食品有限公司, 广东中山 528437) (3. 广州市食品检验所, 广东广州 510410)

**摘要:** 该实验选化学法和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 模型, 探究酱油发酵基料中染料木素的抗氧化活性。体外实验表明, 染料木素能有效清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、超氧阴离子自由基及羟基自由基, 半数清除率 (IC<sub>50</sub>) 分别 0.35 mg/mL、0.16 mg/mL、0.29 mg/mL 及 0.72 mg/mL, 其具有良好体外抗氧化活性。进一步实验发现, 50、100 和 200 μmol/L 染料木素能延长线虫的平均寿命 (17.54%、20.88% 及 17.72%), 提高产卵总量 (17.96%、27.84% 及 41.37%), 改善线虫运动能力 (移动能力、正弦运动及头摆频率), 提高热应激条件下线虫平均寿命 (15.32%、23.88% 及 16.65%)。此外, 50、100 和 200 μmol/L 染料木素能提高线虫体内过氧化氢酶活性 (144.52%、253.87% 及 295.60%)、超氧化物歧化酶活性 (37.32%、31.51% 及 44.05%) 及谷胱甘肽含量 (10.39%、36.21% 及 25.84%), 降低活性氧积累量 (31.22%、38.57% 及 41.40%) 和丙二醛水平 (46.50%、73.52% 及 62.72%), 增强线虫抗氧化防御系统, 其中 100 μmol/L 染料木素抗氧化效果最好。综上, 染料木素能有效清除自由基、延长线虫的健康寿命, 具有良好体内外抗氧化能力。本实验为染料木素的生物活性奠定研究基础, 为其作为天然抗氧化剂的推广及应用提供理论依据。

**关键词:** 酱油发酵基料; 染料木素; 抗氧化; 秀丽隐杆线虫; 衰老

文章编号: 1673-9078(2021)11-134-143

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0238

## Evaluation of Antioxidant Activity of Genistein in Soy Sauce Fermentation Base

LI Yifeng<sup>1</sup>, ZHU Yi<sup>1</sup>, LIANG Xueying<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, FU Jiangyan<sup>2</sup>, HU Yuanshu<sup>2</sup>, CAI Huitian<sup>1</sup>, PENG Mingjun<sup>3</sup>, CAO Yong<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangdong Natural Active Object Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China) (2. Guangdong Meiweixian Seasoning Food Co. Ltd., Zhongshan 528437, China)

(3. Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou 510410, China)

**Abstract:** In this experiment, the chemical method and *Caenorhabditis elegans* model were used to explore the antioxidant activity of genistein in the soy sauce fermentation base. *In vitro* experiments showed that genistein could effectively scavenge DPPH free radicals, ABTS free radicals, superoxide anion free radicals and hydroxyl free radicals, with IC<sub>50</sub> values as 0.35 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.29 mg/mL and 0.72 mg/mL, respectively, indicating significant *in vitro* antioxidant activities. Further experiments revealed that genistein at 50, 100 and 200 μmol/L could prolong the average lifespan of nematodes (by 17.54%, 20.88% and 17.72%, respectively), increase the total number of eggs laid (by 17.96%, 27.84% and 41.37%, respectively), and improve the motility of nematodes (movement ability, sinusoidal movement and head swing frequency), increase the average lifespan of nematodes under heat stress conditions (by 15.32%, 23.88% and 16.65%, respectively). In addition,

引文格式:

李一峰, 朱毅, 梁雪莹, 等. 酱油发酵基料中染料木素的抗氧化活性评价[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 134-143

LI Yifeng, ZHU Yi, LIANG Xueying, et al. Evaluation of antioxidant activity of genistein in soy sauce fermentation base [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 134-143

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目 (2020KJ117); 国家重点研发计划 (2016YFD0600806); 广式酱油风味控制与智能制造研究创新团队项目 (CXTD2020006)

作者简介: 李一峰 (1994-), 男, 硕士, 研究方向: 天然活性物功能, E-mail: 1779459299@qq.com

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物的分离纯化鉴定及活性, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

genistein at 50, 100 and 200  $\mu\text{mol/L}$  could increase catalase activity (by 144.52%, 253.87% and 295.60%, respectively), superoxide dismutase activity (by 37.32%, 31.51% and 44.05%, respectively) and glutathione in nematodes (by 10.39%, 36.21% and 25.84%, respectively), reduce the amount of accumulated reactive oxygen species (by 31.22%, 38.57% and 41.40%, respectively) and malondialdehyde level (by 46.50%, 73.52% and 62.72%, respectively), and enhance the antioxidant defense of nematodes. Among which, 100  $\mu\text{mol/L}$  genistein exhibited the greatest antioxidant effect. In summary, genistein effectively scavenged free radicals, prolonged the healthy life of nematodes, and exerted good antioxidant capacities *in vivo* and *in vitro*. This research lays a foundation for studying the biological activity of genistein and provides a theoretical basis for its promotion and application as a natural antioxidant.

**Key words:** soy sauce fermentation base; genistein; antioxidant; *Caenorhabditis elegans*; senescence

大豆异黄酮为 12 种大豆天然异黄酮的统称, 是一类多酚化合物, 其化学结构与  $17\beta$ -雌二醇类似, 又被称为植物雌激素<sup>[1]</sup>。大豆异黄酮分为游离型苷元和结合型糖苷, 自然界中大豆异黄酮主要以结合型糖苷的形式存在, 但人体吸收游离型苷元的能力更强, 所以游离型苷元更能发挥其生物活性<sup>[2]</sup>。染料木素作为大豆中游离型苷元的主要成分, 其具有抗氧化、治疗糖尿病<sup>[3]</sup>、抗阿兹海默氏病<sup>[4]</sup>、治疗更年期综合症<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>、神经内分泌和神经免疫<sup>[7]</sup>等作用。染料木素作为天然产物, 原料易得、毒副作用小等特点也为它带来了巨大的市场潜力。

酱油发酵基料是大豆经过发酵后剩余的基料, 产量大, 价格低, 含有油脂、蛋白等多种营养成分。大豆异黄酮、膳食纤维、低聚糖等活性物质的存在, 使酱油发酵基料的回收利用成为热门话题<sup>[8]</sup>。原大豆异黄酮主要是以糖苷形式 (97%~99%) 存在, 苷元 (大豆苷元、染料木素和黄豆黄素) 含量少 (1%~3%), 糖苷需降解为苷元才能够被小肠吸收。大豆经过酱油发酵, 苷元含量大幅提高, 由于游离型苷元难溶于水, 其大部分残留在酱油发酵基料中<sup>[9]</sup>。研究表明, 染料木素在酱油发酵基料中剩余率可达到 95%<sup>[10]</sup>。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*), 有雌雄同体或雄体两种性别, 雌雄同体具有 959 个不变的体细胞。虽然秀丽线虫体型微小, 但其具有比较完整的生理系统, 如神经、性腺、咽腺、肌肉以及免疫等系统。83%秀丽隐杆线虫蛋白质组被预测为具有人同源性, 线虫和哺乳动物之间高度保守的基本生物分子和细胞信号通路, 例如胰岛素信号通路、先天免疫调节通路、突触机制和蛋白质稳态所涉及的系统<sup>[11]</sup>。秀丽线虫本身具有微量、生长周期短、后代数量巨大、通体透明易于观察等优点, 因此成为科学研究中被共同认可的生物模型之一。秀丽隐杆线虫已被广泛运用于抗衰老<sup>[12]</sup>、减肥<sup>[13]</sup>和生殖毒性<sup>[14]</sup>等活性研究。

适量的天然活性物对动物的抗氧化、生长和繁殖性能起一定的促进作用, 但高剂量的天然活性物可能会对动物的机体性能产生抑制作用。“权衡”机制宣称

延长寿命将以减少或丧失生殖能力为代价<sup>[15]</sup>。畜禽业和水产养殖业的快速发展, 使染料木素等植物雌激素被广泛应用于饲料中, 但有学者指出, 长期使用植物雌激素可能造成动物机体内分泌紊乱, 从而对家畜的生理机能造成损害<sup>[1]</sup>。抗氧化物质大多具有清除生物体内自由基、激活体内防御酶体系能力, 从而达到延缓机体衰老的目的, 植物多酚摄入机体后具有很强的抗氧化能力, 但是否会对身体产生有害作用, 也是人们研究的重点。因此染料木素的安全使用量及功能活性备受关注。本研究以秀丽隐杆线虫为模型, 通过测定线虫寿命、生殖能力、运动能力、热应激、体内抗氧化酶活力等指标, 研究染料木素对线虫健康寿命的影响, 并找出合理、经济添加量, 以期染料木素作为天然抗氧化剂的推广应用供理论依据和发展思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酱油发酵基料由海天调味食品股份有限公司提供, 存放在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 染料木素标准品 (含量 $\geq 98\%$ ) 购买于上海源叶生物科技有限公司。

无水乙醇、三氯乙酸、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、水杨酸等, 分析纯, 购于天津市永大化学试剂有限公司; HCl (分析纯), 购于重庆川东化工有限公司; 菲罗嗉一钠盐、DPPH 自由基, 购于上海蓝季科技发展有限公司; 邻苯三酚、NaOH、 $\text{FeSO}_4$  等购于广州化学试剂厂; MDA、CAT、SOD、GSH 等试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

### 1.2 仪器与设备

AL104 万分之一电子天平, Mettler; KQ-500B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; LDZX-40B 型立式自控电热蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; SMZ-T4 连续变倍体视显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; SWCJ-A 超净工作台, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司; En Spire 酶标仪, Perkin Elmer 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品制备

酱油发酵基料中大豆异黄酮的提取: 500 g 酱油发酵基料(精准称量至 0.01 g)于 5 L 烧杯中、用固液比 1:10 条件下加入蒸馏水脱盐,离心去掉上清,沉淀中加入 85%乙醇磁力搅拌 30 min,萃取三次,合并上清后浓缩,浓缩后加入适量石油醚脱油,烘干。

染料木素的纯化: 硅胶经烘干预处理后湿法装入层析柱(2.0 cm×50 cm)中,压紧。准确称取一定量的大豆异黄酮提取物粗提物溶解于少量的甲醇后与少量硅胶混匀,加到柱上方,用洗脱剂进行解析,将含有染料木素的洗脱液合并蒸干,将柱层析产物溶于热的 60%乙醇中,冷却,过滤。55 °C 真空干燥得到浅黄色染料木素结晶。将样品进行高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)检测。

染料木素标准品: 称量 10 mg 染料木素,用 85%乙醇定容至 10 mL 容量瓶,配成 1 mg/mL 标准储备液,分别吸取 100 μL、200 μL、300 μL、400 μL、500 μL 标准储备液,用 85%乙醇稀释定容到 10 mL 容量瓶。

色谱条件: 色谱柱为 Agelapromosil C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温 36 °C; 进样量 10 μL; 流动相为 0.1%乙酸水溶液和乙腈(B 泵); 流速 1 mL/min; 检测波长为 260 nm (UV); 乙腈浓度为 10%~85%。

#### 1.3.2 染料木素体外抗氧化活性研究

##### 1.3.2.1 DPPH 自由基清除试验

将 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 浓度染料木素溶液以 1:3 的体积比与 0.5 mmol/L 的 1,1-二苯基-2-苦肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)-甲醇溶液混匀,在室温下避光反应 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光度,重复三次<sup>[16]</sup>。

##### 1.3.2.2 ABTS 自由基清除试验

将 38.4 mg 的 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS)中加入 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液,在 23 °C 下暗处反应 12~16 h,得到 ABTS 自由基,用 PBS 缓冲液稀释,使溶液在 734 nm 下的吸光值在 0.7±0.02 之间,将 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 浓度染料木素溶液以 1:1 的体积比与 ABTS 溶液混合,37 °C 中保温 10 min,测定 734 nm 下的吸光值,重复三次<sup>[17]</sup>。以甲醇为空白对照,抗坏血酸为阳性对照。

##### 1.3.2.3 超氧阴离子自由基清除试验

配备 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 浓度染料木素溶液,取 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液 120 μL 于

96 孔板中,分别加入 40 μL 样液和 25 mmol/L 邻苯三酚溶液 20 μL,震荡摇匀 5 min 后加入 8 mol/L HCl 溶液 20 μL 终止反应,在 325 nm 波长下检测吸光值,重复三次<sup>[17]</sup>。

##### 1.3.2.4 羟基自由基清除试验

取 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 浓度染料木素溶液 20 μL,分别加入 3 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液、6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液和 9 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 60 μL,37 °C 避光反应 30 min,在 510 nm 处检测吸光值,重复三次<sup>[18]</sup>。以甲醇为空白对照,抗坏血酸为阳性对照。

#### 1.3.3 染料木素对秀丽隐睾线虫抗氧化活性的影响

##### 1.3.3.1 培养基的制备

三角瓶中分别加入 NaCl、琼脂、胰蛋白胨,加水定容到 1 L,摇匀后 121 °C 灭菌 30 min。冷却后分别加入 1 mL 灭菌后的 CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub> 和胆固醇溶液,再加入 25 mL 磷酸钾缓冲液,摇匀后趁热倒入培养皿中,每个 10 mL。

##### 1.3.3.2 线虫的培养与同期化

将大肠杆菌菌株 OP50 涂到培养基中,菌液晾干后接种线虫,在 20 °C 培养箱中培养。将 NaOH 和高氯酸钠混匀作为裂解液,缓冲液将培养皿上的卵和体内有卵的线虫一起冲洗至离心管中,去掉上清,加入裂解液,至虫体裂解后 3000 r/min 离心 30 s,将虫卵打到样品板中。

##### 1.3.3.3 寿命实验

将同期化的野生型线虫,随机挑取 60 条至给药组(50、100、200 μmol/L 染料木素)与对照组,20 °C 下培养,每 24 h 将线虫转移至新培养皿内,并观察线虫的存活情况。每天记录存活、死亡、失踪和异常的虫子数量<sup>[19]</sup>,实验重复三次。

##### 1.3.3.4 热应激实验

将同期化 L<sub>4</sub> 期的 N<sub>2</sub> 线虫,放置在 35 °C 的培养箱中<sup>[20]</sup>,此时设为 0 h,每 1 h 记录线虫的存活情况,至全部死亡,每组 3 个平行,每个培养皿 60 条线虫。

##### 1.3.3.5 运动实验

随机挑选 50 条经过同期化的线虫,在第 5、10、15 d 随机挑取 10 条线虫观察同等时间内头摆运动、正弦运动和运动能力,记录标准: A: 自发运动; B: 触碰后可以运动; C: 触碰后头尾轻微运动。

##### 1.3.3.6 产卵实验

将同期化 L<sub>4</sub> 期的 N 线虫,随机挑取 2 条至加药组与空白对照组,每组 5 个培养皿,每 24 h 把虫子转移至新的培养皿中,记录虫子每天的产卵量。

##### 1.3.3.7 抗氧化指标

将同期化 L4 期的 N2 线虫，破碎后离心，取上清液，用试剂盒检测过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 及丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 水平。

### 1.3.3.8 活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 自由基测定

经染料木素培养 96 h 后，M9 缓冲液清洗去除大肠杆菌，用铂金丝挑取 50 条线虫，转移到 96 孔板中，加入荧光探针 H<sub>2</sub>DCF-DA<sup>[21]</sup>，在发射波长为 528 nm，激发波长为 485 nm 条件下测定荧光强度，每组重复 3 次。

## 1.4 数据处理

所有实验均至少重复 3 次，结果以平均数±标准差表示，并通过 SPSS 23.0 软件采用单因素方差分析法 (ANOVA) 进行显著性分析，*p*<0.05 则为显著差异。其中，柱状图、生存曲线使用 GraphPad (ANOVA) (mac 6.00 版) 软件进行分析作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HPLC 检测染料木素体外抗氧化活性的测定

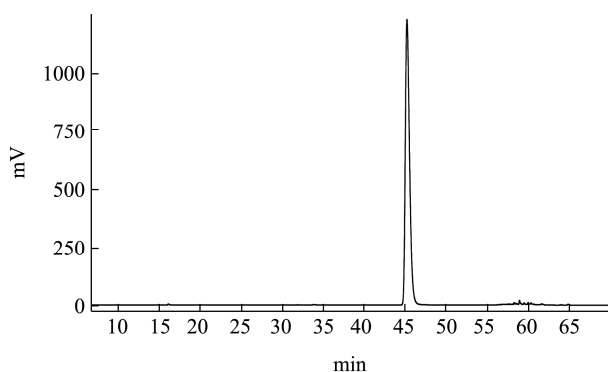


图 1 染料木素单体 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of genistein monomer

表 1 不同样品染料木素含量和得率

Table 1 Genistein content and recovery rate of different samples

样品	染料木素含量/%	染料木素得率/%
酱油发酵基料原料	0.43±0.09	-
染料木素粗提物	12.75±1.26	87.91±4.82
染料木素单体	96.78±1.78	18.94±2.19

酱油发酵基料中染料木素的含量为 0.43%，经过提取后所得染料木素粗提物含量为 12.75%，得率为 87.91%。将粗提物用硅胶进行柱层析分离得到染料木素单体，含量为 96.78%，得率为 18.94%。将所得染料木素单体用于后续线虫实验。

### 2.2 染料木素体外抗氧化活性的测定

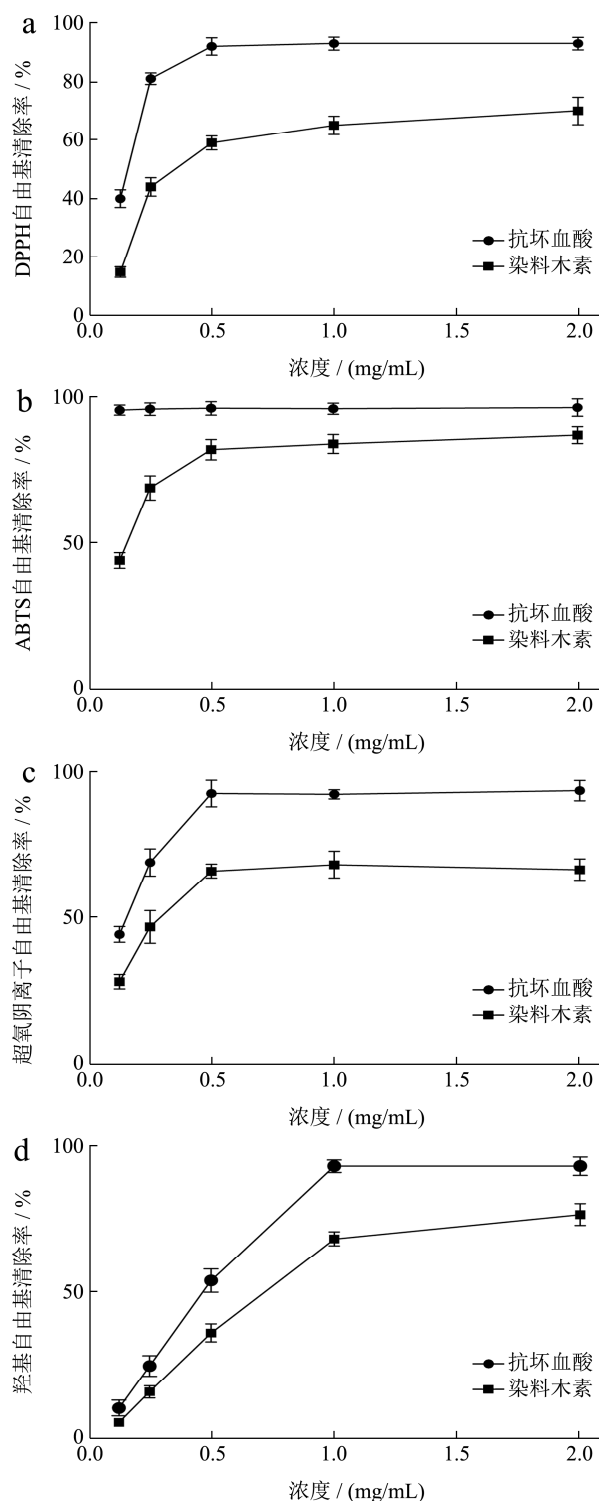


图 2 染料木素对自由基的影响

Fig.2 Effects of genistein on free radicals

自由基在机体代谢过程中不断产生，当体内自由基过多，抗氧化物质不足以抑制时，诱发多种疾病，最终导致机体衰老<sup>[22]</sup>。

图 2a 表明，染料木素清除 DPPH 自由基能力呈浓度依赖性，IC<sub>50</sub> 为 0.35 mg/mL，在 0.125~0.5 mg/mL

范围,随着样品质量浓度增大,对 DPPH 自由基清除能力快速上升,在浓度为 2.0 mg/mL 时, DPPH 清除率达到 69.71%。从图 2b 可知,染料木素清除 ABTS 自由基能力在 0.125~0.5 mg/mL 范围,随浓度增加呈较陡趋势,随后趋于稳定,在浓度为 2.0 mg/mL 时, DPPH 清除率达到 86.89%, IC<sub>50</sub> 为 0.16 mg/mL。图 2c 表明,随着染料木素浓度增加,清除超氧阴离子自由基能力越来越强, IC<sub>50</sub> 为 0.29 mg/mL,在 0.5 mg/mL 质量浓度后清除率保持稳定,2 mg/mL 最大清除率为 68.33%。由图 2d 可得,在 0.125~1.0 mg/mL 范围,染料木素清除羟基自由基能力增加迅猛,随后趋于平稳,在浓度为 2.0 mg/mL 时,羟基自由基清除率可达到 76.62%, IC<sub>50</sub> 为 0.72 mg/mL。

自由基的清除能力是体外抗氧化能力评价中广泛采用的评价指标,总结来看,染料木素在 DPPH 自由基、ABTS 自由基、超氧阴离子及羟基自由基的清除试验中,虽清除效果低于同等样品浓度下的抗坏血酸,但依然表现出有效的抗氧化能力,由此可知,染料木素是一种具研究潜力的抗氧化剂。染料木素会比自由基优先进入生物膜,并通过降低自由基的流动性来抑制生物膜的氧化,同时抑制自由基进入生物膜<sup>[23]</sup>。大量研究也表明,植物多酚具有良好的抗氧化能力,如茶多酚等<sup>[24]</sup>,郭虹雯等<sup>[25]</sup>发现武夷岩茶多酚 ABTS 清除活性分别为 140.27 mg GAE/g; DPPH 清除活性分别为 182.66 mg GAE/g。李伟等<sup>[26]</sup>研究指出桉叶多酚具有清除超氧阴离子自由基能力,当浓度为 2.56 mg/mL 时超氧阴离子自由基清除率为 41.16%,表明染料木素清除超氧阴离子自由基能力更优于桉叶多酚。

### 2.3 染料木素对线虫寿命的影响

研究指出,机体缺乏雌激素,会导致体内自由基清除减少、氧化应激升高。染料木素作为雌激素替代疗法,可以通过降低氧化应激对机体损伤的方式达到延缓衰老的目的<sup>[27]</sup>。与对照组相比,用浓度为 50、100 和 200 μmol/L 的染料木素处理野生型线虫,会使线虫存活曲线显著向右移动(图 3),分别将平均寿命分别延长了 17.54%、20.88%及 17.72%,同时显著增加了秀丽隐杆线虫的中位寿命和最大寿命(表 2)。其中 100 μM 浓度染料木素效果最好,能延长 12.14%中位寿命和 34.55%最大寿命,抗衰老最强。大量研究表明,许多具有抗氧化活性的植物多酚也具有抗衰老作用,例如槲皮素、白藜芦醇等<sup>[28]</sup>。亚麻木酚素是一种植物雌激素, Lu 等<sup>[30]</sup>发现,500 μmol/L 亚麻木酚素能显著提高线虫 22.00%平均寿命。而 100 μmol/L 染料木素抗衰老能力与 500 μmol/L 亚麻木酚素相近。研究指出,DAF-16/FOXO 通路促进长寿,热休克转录因子 1(HSF-1)增加了老 daf-2 突变体线虫的免疫能力, p38 促分裂原激活的蛋白激酶 1(PMK-1),是免疫力的关键决定因素<sup>[30]</sup>。

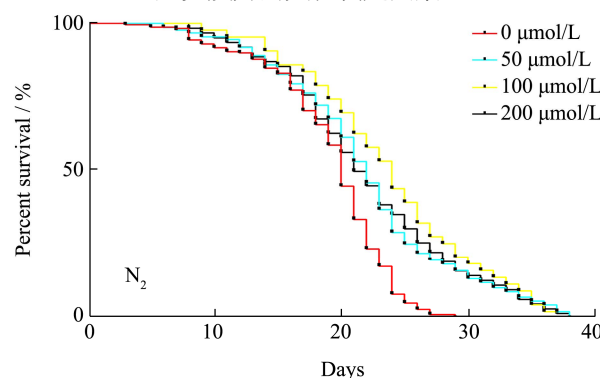


图 3 染料木素对线虫寿命的影响

Fig.3 Effects of genistein on the lifespan in *C. elegans*

表 2 线虫存活时间统计学分析

Table 2 Statistical analysis of survival time in *C. elegans*

样品/(μmol/L)	平均寿命/d	提高百分比/%	中位寿命/d	最大寿命/d
0	19.26±1.09 <sup>a</sup>	-	20.00±0.00 <sup>a</sup>	28.00±1.73 <sup>a</sup>
50	22.64±0.86 <sup>b</sup>	17.54	22.00±1.00 <sup>b</sup>	37.00±1.00 <sup>b</sup>
100	23.28±0.22 <sup>b</sup>	20.88	22.67±0.58 <sup>b</sup>	37.67±0.58 <sup>b</sup>
200	22.67±0.30 <sup>b</sup>	17.72	22.00±0.00 <sup>b</sup>	37.67±0.58 <sup>b</sup>

注: 同列数据对比, 两组含有相同字母代表无显著差异, 不同字母代表有显著差异 p<0.05。下表同。

表 3 热应激下线虫存活时间统计学分析

Table 3 Statistical analysis of survival time in *C. elegans* under high temperature stress

样品/(μmol/L)	平均寿命/d	提高百分比/%	中位寿命/d	最大寿命/d
0	11.97±0.69 <sup>a</sup>	-	11.50±0.50 <sup>a</sup>	19.00±1.00 <sup>a</sup>
50	13.81±0.42 <sup>b</sup>	15.32	13.17±0.29 <sup>b</sup>	22.67±0.58 <sup>b</sup>
100	14.83±0.27 <sup>b</sup>	23.88	14.00±0.00 <sup>c</sup>	24.00±1.00 <sup>b</sup>
200	13.97±0.82 <sup>b</sup>	16.65	13.00±0.00 <sup>bc</sup>	22.33±1.15 <sup>b</sup>

### 2.4 热应激下染料木素对线虫寿命的影响

在现代集约机械化养殖模式下, 牲畜更易处于应激状态, 自由基容易堆积在动物体内, 对机体造成损伤, 不仅降低动物的抗压能力, 同时对生产性能也造成破坏<sup>[31]</sup>。增强耐环境应力, 是提高环境压力下存活率的关键因素<sup>[32]</sup>。在热应激条件下, 50、100 和 200  $\mu\text{M}$  的染料木素处理野生型线虫, 会使线虫存活曲线向右移动 (图 4), 并显著延长线虫 15.32%、23.88% 及 16.65% 平均寿命, 同时显著提高线虫的中位寿命和最大寿命 (表 3)。其中 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度染料木素效果最好, 能延长 21.74% 中位寿命和 26.32% 最大寿命, 抗热应激能力最强。研究指出, 苦瓜皂苷可以提高热应激条件下线虫 11.00% 的平均寿命, 并提高了野生型线虫 11.00% 的平均寿命, 在提高抗逆性的同时改善了线虫的健康寿命<sup>[33]</sup>。而染料木素的抗热应激能力更强于苦瓜皂苷。研究指出, 与野生型 N2 动物相比, grk-1 突变体可从急性热应激中恢复更多。G 蛋白偶联受体激酶 (GRKs) 调节秀丽隐杆线虫的热应激反应<sup>[34]</sup>。

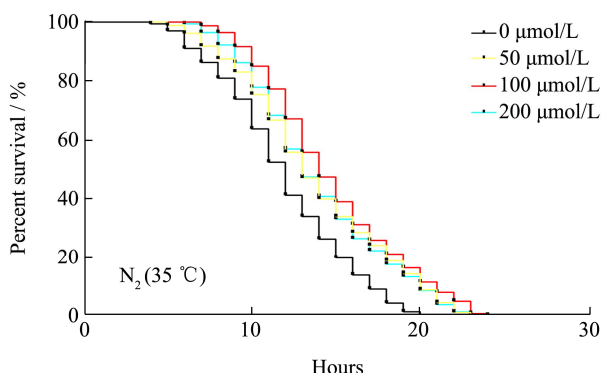


图 4 热应激下染料木素对线虫寿命的影响

Fig.4 Effects of genistein on the lifespan in *C.elegans* under high temperature stress

### 2.5 染料木素对线虫寿命生理功能的影响

运动过程中, 运动疲劳会引起机体氧化应激损伤, 导致抗氧化能力降低<sup>[35]</sup>。机体的衰老伴随着运动能力的下降和表明肌肉的物理退化。如图 5, 分析了线虫生命的早、中和晚期 (分别在第 5、10 及 15 d) 的运动情况, 经过不同浓度染料木素处理后, 不同时期线虫的自发运动比例高于对照组, 尤其是在中晚期。此外, 通过对线虫身体弯曲频率 (正弦运动) 和头摆频率来评价线虫不同部位的运动状态, 与对照组相比, 50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  染料木素的介入在不同程度上提高了运动状态, 其中在 15 d 时最为显著, 分别提高了线虫 25.17%、75.87% 和 64.34% 的头摆频率, 并同时提高 31.29%、48.25% 和 33.57% 的正弦运动频率。这些结果

说明染料木素可以减缓衰老带来的运动能力的退化。

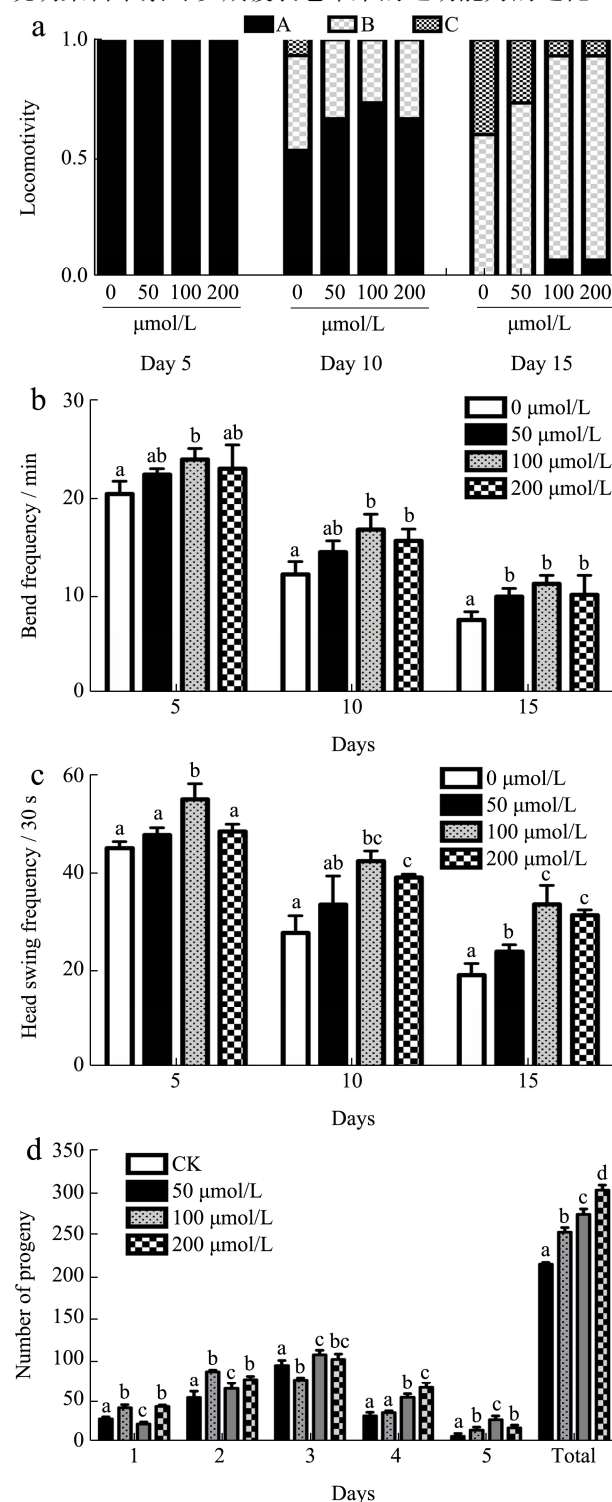


图 5 染料木素对线虫生理功能的影响

Fig.5 Effects of genistein on the physiological function in *C. elegans*

注: 柱状图上不同小写字母表示存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。下同。

为研究染料木素对线虫生殖的影响, 测量了线虫产卵周期每一天的产卵量, 图 5d 表明, 50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  的染料木素处理分别提高 17.96%、27.84% 和



41.37%的产卵总量,说明染料木素能显著提高线虫的产卵总量,且这种提高呈浓度依赖性。研究表明,染料木素可与垂体、下丘脑等处的雌二醇受体结合<sup>[36]</sup>,通过影响神经内分泌系统来提升睾酮、生长激素和催乳素在血清中的浓度,达到促进生殖系统的发育和提高繁殖能力<sup>[37]</sup>的效果。研究指出,在饲料中添加 15~60 mg/kg 的大豆异黄酮,可显著促进蛋鸡雌二醇和卵黄蛋白原的分泌,提高产蛋鸡生产性能和蛋品质<sup>[36]</sup>。大豆异黄酮具有的雌激素作用,使线虫的产卵能力显著提高<sup>[38]</sup>。

### 2.6 染料木素对线虫抗氧化防御体系的影响

研究指出,体内的抗氧化剂可以提升防御系统的能力,缓解过量 ROS 引起的氧化应激,酶和非酶抗氧化防御系统在机体保护中起着关键的作用<sup>[39]</sup>。MDA 是一种氧化应激产物,是反应脂质过氧化损伤程度的重要指标。50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  染料木素分别显著降低了线虫体内的 46.50%、73.52%和 62.72% MDA 含量,说明染料木素能抑制脂质过氧化反应,从而降低线虫的氧化应激。SOD 在清除动物体过多超氧阴离子自由基中起到关键作用<sup>[40]</sup>,自由基可被体内的 SOD 转化为毒性较小的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,再通过催化生成  $\text{H}_2\text{O}$ ,从而减少氧化带来的损伤。50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  染料木素分别显著提高线虫体内 37.32%、31.51%和 44.05% SOD 含量。GSH 作为重要的还原剂,参与体内多种氧化还原反应,其通过巯基与体内的自由基结合,可直接使自由基还原成酸性物质,从而加速自由基的排泄,并抵抗自由基对机体的损害<sup>[41]</sup>,较空白组线虫而言,进食 50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  染料木素的线虫组分别提高 10.39%、36.21%和 25.84%的 GSH 含量,同时提高了线虫体内 144.52%、253.87%和 295.60%的 CAT 酶活力。结果表明染料木素可能具有激活线虫酶促和非酶促抗氧化防御系统的潜力,对提高线虫体内抗氧化能力、缓解线虫衰老均有积极作用。Chen 等<sup>[42]</sup>发现佛手黄酮可以延长线虫 14.94%平均寿命,降低体内 56.06% MDA 含量,同时提高 103.15%和 81.91% SOD 和 CAT 酶活性,展现了植物多酚良好的抗衰老活性。

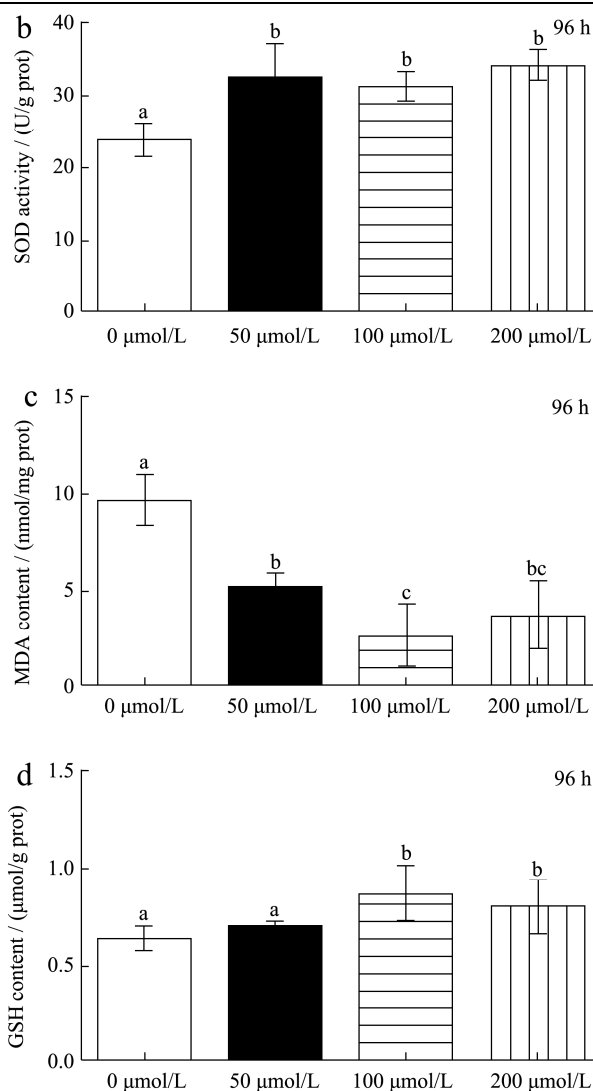
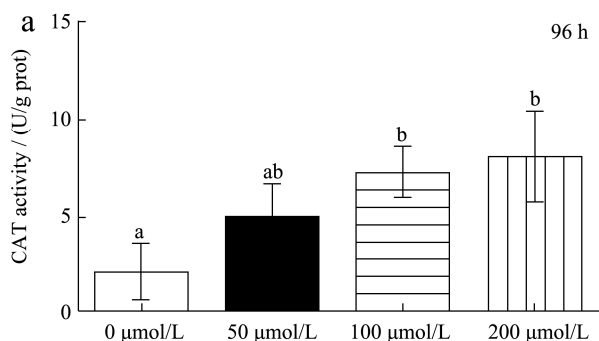


图6 染料木素对线虫寿命抗氧化防御系统的影响

Fig.6 Effects of genistein on the antioxidant defense system in *C. elegans*

### 2.7 染料木素对线虫活性氧自由基积累量的影响

过量的活性氧 (ROS) 引起的氧化应激是造成细胞结构和生物分子功能受损的原因<sup>[43]</sup>,过量的自由基通过使细胞老化等方式累加速机体衰老,从而破坏蛋白和 DNA,最终引起癌症等慢性疾病<sup>[44]</sup>。染料木素结构中的含有多个酚羟基,不仅可以成为自由基的供氢体,还可以螯合有害金属离子,来增强其与自由基结合的能力,从而清除机体内的自由基。经过染料木素 96 h 处理,50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  浓度的染料木素均显著降低线虫体内 31.22%、38.57%和 41.40%活性氧的积累量,这表明染料木素在线虫体内表现较强的抗氧化能力。有研究指出,植物多酚如二氢杨梅素等

能通过抑制肿瘤细胞增殖来调节 ROS 的表达水平,从而发挥抗氧化损伤的作用<sup>[45]</sup>。姜黄素是姜科植物中的酸性多酚, Lin 等<sup>[43]</sup>指出姜黄素可以清除体内的 ROS,降低过氧化脂质水平,减轻紫外线造成的 DNA 损伤,从而达到抗氧化作用。Lin 等<sup>[43]</sup>在用鼠尾草酚喂养线虫中发现,浓度为 180  $\mu\text{mol/L}$  时,鼠尾草酚可以降低线虫体内 76% ROS 积累量。

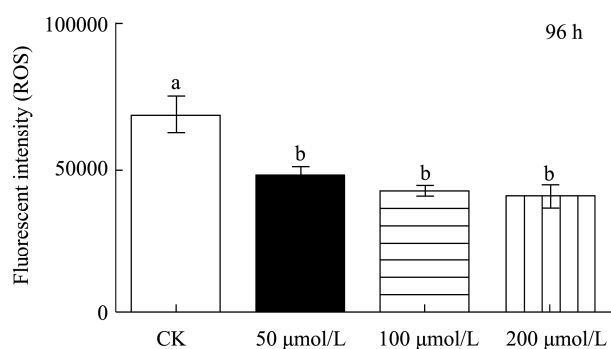


图7 染料木素对线虫活性氧积累量的影响

Fig.7 Effects of genistein treatment on ROS accumulation in *C.elegans*

### 3 结论

本文研究结果表明酱油发酵基料中染料木素在体外能有效清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基及超氧阴离子自由基,具有良好体外抗氧化能力。进一步实验以秀丽隐杆线虫模型评价染料木素的体内抗氧化能力,发现 50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  浓度染料木素能显著提高正常和热应激下线虫寿命,改善线虫运动能力,且提高产卵能力。此外,染料木素能显著降低线虫体内 ROS 积累和 MDA 水平,提高 CAT 活性、SOD 活性及 GSH 含量,改善线虫抗氧化防御能力,具有良好体内抗氧化作用,其中 100  $\mu\text{mol/L}$  染料木素抗氧化效果最好。本研究初步探究了染料木素的体外抗氧化和对秀丽隐杆线虫的体内抗氧化活性,但起抗氧化作用的保护机制通路还有待深入开展研究。总体来说,染料木素具有抗氧化延长健康寿命的作用,为染料木素在医药、饲料、保健品的添加量提供理论指导。

### 参考文献

[1] 刘帅,熊云霞,孙铝辉,等.大豆异黄酮在猪禽养殖中应用的研究进展[J].动物营养学报,2021,33(4):1822-1831  
LIU Shuai, XIONG Yunxia, SUN Lyuhui, et al. Research progress on the application of soybean isoflavones in pig and poultry breeding [J]. Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(4): 1822-1831

[2] 周文红,郭咪咪,毕艳红,等.酶解制备苷元型大豆异黄酮[J].中国油脂,2020,45(12):100-104  
ZHOU Wenhong, GUO Mimi, BI Yanhong, et al. Preparation of aglycon-type soybean isoflavones by enzymatic hydrolysis [J]. China Oils and Fats, 2020, 45(12): 100-104

[3] L Weng, Zhang F, Wang R, et al. A review on protective role of genistein against oxidative stress in diabetes and related complications [J]. Chem Biol Interact, 2019, 310108665

[4] M-S Uddin, Kabir M-T. Emerging signal regulating potential of genistein against Alzheimer's disease: a promising molecule of interest [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7(197): 1-12

[5] P Thangavel, Puga-Olguin A, Rodriguez-Landa J-F, et al. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases [J]. Molecules, 2019, 24(21): 1-17

[6] H-S Tuli, Tuorkey M-J, Thakral F, et al. Molecular mechanisms of action of genistein in cancer: recent advances [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1336

[7] T-L Guo, Chen Y, Xu H-S, et al. Gut microbiome in neuroendocrine and neuroimmune interactions: the case of genistein [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 402(1): 115130

[8] 黄福气,于志成,刘步青,等.酱油渣异黄酮抗氧化功效成分纯化研究[J].食品与生物技术学报,2020,39(10):82-90  
HUANG Fuqi, YU Zhicheng, LIU Buqing, et al. Purification of isoflavone antioxidant components from soy sauce residue [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2020, 39(10): 82-90

[9] 袁佩佩,王明,王陶.酱油渣中大豆异黄酮的提取研究进展[J].粮油加工(电子版),2014,1:80-83  
YUAN Peipei, WANG Ming, WANG Tao. Research progress on the extraction of soybean isoflavones from soy sauce residue [J]. Cereals and Oils Processing (Electronic Edition), 2014, 1: 80-83

[10] 董玲燕,李琳,赵雷,等.酱油渣中大豆异黄酮的提取及纯化工艺[J].食品科学,2012,33(14):30-35  
DONG Lingyan, LI Lin, ZHAO Lei, et al. Extraction and purification of soybean isoflavones from soy sauce residue [J]. Food Science, 2012, 33(14): 30-35

[11] S Giunti, Andersen N, Rayes D, et al. Drug discovery: insights from the invertebrate *Caenorhabditis elegans* [J]. Pharmacol Res Perspect, 2021, 9(2): e721

[12] 赵建平,吴丽敏,鲁晓娜,等.白术乙醇提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响及其机制研究[J].中国药房,2021,32(4):418-424  
ZHAO Jianping, WU Limin, LU Xiaona, et al. The effect of ethanol extract of *Atractylodes macrocephala* on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* and its mechanism [J]. Chinese



- Pharmacy, 2021, 32(4): 418-424
- [13] X Xiao, Zhang X, Bai J, et al. Bisphenol S increases the obesogenic effects of a high-glucose diet through regulating lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Chem, 2021, 339:127813
- [14] W Yue, Mo L, Zhang J. Reproductive toxicities of 1-ethyl-3-methylimidazolium bromide on *Caenorhabditis elegans* with oscillation between inhibition and stimulation over generations [J]. Sci Total Environ, 2021, 765:144334
- [15] C Lin, Xiao J, Xi Y, et al. Rosmarinic acid improved antioxidant properties and healthspan via the IIS and MAPK pathways in *Caenorhabditis elegans* [J]. Biofactors, 2019, 45(5): 774-787
- [16] 何余堂,潘孝明.植物多糖的结构与活性研究进展[J].食品科学,2010,31(17):493-496  
HE Yutang, PAN Xiaoming. Research progress on the structure and activity of plant polysaccharides [J]. Food Science, 2010, 31(17): 493-496
- [17] 李帆,邵佩兰,韩娅婷,等.干燥方式对红枣色素活性成分含量及抗氧化活性的影响[J].食品科技,2019,44(1):120-124  
LI Fan, SHAO Peilan, HAN Yating, et al. The effect of drying methods on the active ingredient content and antioxidant activity of jujube pigment [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 120-124
- [18] 冯艳钰,臧延青.三种小麦麸皮总黄酮的体外抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2021,49(9):16-24  
FENG Yanyu, ZANG Yanqing. *In vitro* antioxidant activity of three kinds of wheat bran total flavonoids [J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 49(9): 16-24
- [19] T Chiba, Yamada M, Sasabe J, et al. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons [J]. Mol Psychiatry, 2009, 14(2): 206-222
- [20] C Lin, Zhang X, 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
- [21] A Kampkotter, Nkwonkam C-G, Zurawski R-F, et al. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans* [J]. Toxicology, 2007, 234(1-2): 113-123
- [22] 魏福华,张永忠.大豆芽中异黄酮抗氧化活性研究[J].食品工业,2012,33(10):16-18  
WEI Fuhua, ZHANG Yongzhong. Antioxidant activity of isoflavones in soybean sprouts [J]. Food Industry, 2012, 33(10): 16-18
- [23] 何学军,齐德生.大豆异黄酮的营养生理功能研究进展[J].兽药与饲料添加剂,2006,2:23-26  
HE Xuejun, QI Desheng. Research progress on the nutritional and physiological functions of soybean isoflavones [J]. Veterinary Medicine and Feed Additives, 2006, 2: 23-26
- [24] 李昊阳,夏继桥,杨连玉,等.植物多酚的抗氧化能力及其在动物生产中的应用[J].动物营养学报,2013,25(11):2529-2534  
LI Haoyang, XIA Jiqiao, YANG Lianyu, et al. Antioxidant ability of plant polyphenols and its application in animal production [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(11): 2529-2534
- [25] 郭虹雯,赵惠茹,倪莉,等.武夷岩茶多酚组分及其抗氧化活性[J].中国食品学报,2018,18(12):319-325  
GUO Hongwen, ZHAO Huiru, NI Li, et al. Polyphenol components of Wuyi rock tea and their antioxidant activities [J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(12): 319-325
- [26] 李伟,陈熔,张小英,等.桉叶多酚的体外抗氧化活性及其改善肉鸡腿肌肉的品质[J].现代食品科技,2020,36(4):105-112  
LI Wei, CHEN Rong, ZHANG Xiaoying, et al. *In vitro* antioxidant activity of eucalyptus leaf polyphenols and its improvement on the quality of broiler thigh muscles [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 105-112
- [27] 宋晨萌,张玉森,成乐,等.白藜芦醇联合大豆异黄酮改善衰老大鼠海马组织氧化应激致细胞凋亡作用[J].卫生研究,2020, 49(6):932-937  
SONG Chenmeng, ZHANG Yusen, CHENG Le, et al. Resveratrol combined with soy isoflavones improves oxidative stress-induced apoptosis in hippocampus of aging rats [J]. Journal of Hygiene Research, 2020, 49(6): 932-937
- [28] 张妍昕,张湘东.白藜芦醇延缓衰老的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(A2):148-149  
ZHANG Yanxin, ZHANG Xiangdong. Research progress of resveratrol in delaying aging [J]. Digest of World Latest Medical Information, 2018, 18(A2): 148-149
- [29] M Lu, Tan L, Zhou X-G, et al. Secoisolaricresinol diglucoside delays the progression of aging-related diseases and extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 and HSF-1 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 1:1-13
- [30] Y Lee, Jung Y, Jeong D-E, et al. Reduced insulin/IGF1 signaling prevents immune aging via ZIP-10/bZIP-mediated feedforward loop [J]. J Cell Biol, 2021, 220(5): e202006174
- [31] 付兴周,李东,路志芳. $\gamma$ -氨基丁酸的生物学功能及其在家禽生产中的应用[J].家畜生态学报,2018,39(4):79-81  
FU Xingzhou, LI Dong, LU Zhifang. The biological function

- of  $\gamma$ -aminobutyric acid and its application in poultry production [J]. Chinese Journal of Livestock Ecology, 2018, 39(4): 79-81
- [32] T-E Johnson, Cypser J, de Castro E, et al. Gerontogenes mediate health and longevity in nematodes through increasing resistance to environmental toxins and stressors [J]. Exp Gerontol, 2000, 35(6-7): 687-694
- [33] C Lin, Chen Y, Lin Y, et al. Antistress and anti-aging activities of *Caenorhabditis elegans* were enhanced by *Momordica* saponin extract [J]. Eur J Nutr, 2021, 60: 1819-1832
- [34] C Heilman, Ibarreta J, Salonga G-A, et al. G protein coupled receptor kinases modulate *Caenorhabditis elegans* reactions to heat stresses [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 530(4): 692-698
- [35] Y Miyake, Tanaka K, Okubo H, et al. Soy isoflavone intake and prevalence of depressive symptoms during pregnancy in Japan: baseline data from the Kyushu Okinawa maternal and child health study [J]. Eur J Nutr, 2018, 57(2): 441-450
- [36] 刘鹿,吕春健,张新胜,等.大豆异黄酮干预对围绝经期女性综合征及性激素水平的影响研究[J].中国食物与营养,2020,26(11):60-63
- LIU Lu, LYU Chunjian, ZHANG Xinsheng, et al. The effect of soybean isoflavone intervention on perimenopausal women's syndrome and sex hormone levels [J]. China Food and Nutrition, 2020, 26(11): 60-63
- [37] 马海田.异黄酮植物雌激素对动物生长及其吸收机理的研究[D].南京:南京农业大学,2005
- MA Haitian. Study on isoflavone phytoestrogens on animal growth and its absorption mechanism [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005
- [38] J Wu, Ibtisham F, Niu Y-F, et al. Curcumin inhibits heat-induced oxidative stress by activating the MAPK-Nrf2 / ARE signaling pathway in chicken fibroblasts cells [J]. J Therm Biol, 2019, 79: 112-119
- [39] E Birben, Sahiner U-M, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense [J]. World Allergy Organ J, 2012, 5(1): 9-19
- [40] 李东,付兴周,陈瑞利,等.大豆异黄酮的生理功能及其在家禽生产中的应用[J].饲料研究,2020,43(2):116-118
- LI Dong, FU Xing-zhou, CHEN Rui-li, et al. The physiological functions of soybean isoflavones and their application in poultry production [J]. Feed Research, 2020, 43(2): 116-118
- [41] 代涛,尹志峰,王良友.还原型谷胱甘肽临床应用研究进展[J].承德医学院学报,2014,31(5):432-435
- DAI Tao, YIN Zhifeng, WANG Liangyou. Research progress in clinical application of reduced glutathione [J]. Journal of Chengde Medical College, 2014, 31(5): 432-435
- [42] CHEN Haiqiang, WANG Jing, LIU Xiaojuan, et al. Optimization in continuous phase - transition extraction of crude flavonoids from finger citron fruit and evaluation on their antiaging activities [J]. Wiley-Blackwell Online Open, 2020, 8(3): 1636-1648
- [43] C Lin, Su Z, Luo J, et al. Polysaccharide extracted from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja enhanced stress resistance in *Caenorhabditis elegans* via skn-1 and hsf-1 [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 143: 243-254
- [44] V Rani, Deep G, Singh R-K, et al. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies [J]. Life Sci, 2016, 148: 183-193
- [45] 杨巍巍,邓航,李娇,等.植物多酚化合物抗氧化损伤研究进展[J].现代食品,2020,16:74-78
- YANG Weiwei, DENG Hang, LI Jiao, et al. Research progress on anti-oxidative damage of plant polyphenols [J]. Modern Food, 2020, 16: 74-78