

黄花菜甲醇提取物对糖脂损伤的干涉作用

秦喜悦¹, 张雷¹, 温艳斌², 李景明¹, 张雅丽^{1*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100089) (2. 大同市农业农村局, 山西大同 037000)

摘要: 该研究以秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 作为模式生物研究了黄花菜甲醇提取物对糖脂损伤的干涉作用。该研究利用 UPLC-QQQ-MS/MS 对黄花菜甲醇提取物中的成分进行了分析, 并以野生型 N2 秀丽线虫为基础, 以 100 μmol/mL 蔗糖诱导糖损伤模型, 以 100 μg/mL 硬脂酸诱导脂损伤模型, 对三个模型分别喂食 0、400、800、1200 μg/mL 浓度的黄花菜甲醇提取物, 检测黄花菜甲醇提取物对秀丽线虫产卵量、身长、寿命表型的干涉作用。结果表明, 黄花菜甲醇提取物中的主要成分为芦丁, 含量为 5721.11 ng/mg。对普通 N2 秀丽线虫, 喂食 800 μg/mL 浓度黄花菜甲醇提取物的线虫比空白组线虫的总子代数 and 身长分别提高 24.76% 和 7.73%; 对糖损伤秀丽线虫, 喂食 800 μg/mL 浓度黄花菜甲醇提取物的线虫比空白组线虫的寿命和总子代数分别提高 24.47% 和 3.40%; 对于脂损伤秀丽线虫, 喂食 1200 μg/mL 浓度黄花菜甲醇提取物的线虫比空白组线虫的寿命、身长和总子代数分别提高 30.04%、10.36% 和 97.32%。因此, 中高浓度的黄花菜甲醇提取物对秀丽线虫的糖脂损伤有一定的干涉作用。

关键词: 黄花菜甲醇提取物; 秀丽线虫; 糖脂损伤

文章篇号: 1673-9078(2021)12-14-22

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0430

Interference Effect of *Hemerocallis citrina* Baroni Methanol Extract on Glycolipid Damage

QIN Xiyue¹, ZHANG Lei¹, WEN Yanbin², LI Jingming¹, ZHANG Yali^{1*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100089, China)

(2. Agriculture and Rural Bureau of Datong, Datong 037000, China)

Abstract: *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was used as a model organism to study the interference effects of methanol extract from *Hemerocallis citrina* Baroni on glycolipids damage. UPLC-QQQ-MS/MS was used to analyze the ingredients in methanol extract of *Hemerocallis citrina* Baroni, and based on the wild-type N2 *C. elegans*, sugar damage model was induced by 100 μmol/mL sucrose, lipid injury model was induced by 100 μg/mL stearic acid. To observe the interference effects of methanol extract from *Hemerocallis citrina* Baroni, the three models were added with 0, 400, 800, 1200 μg/mL methanol extract of *Hemerocallis citrina* Baroni, egg production, body length and lifespan of *C. elegans* were detected. The results showed that the main component of methanol extract in *Hemerocallis citrina* Baroni was rutin with a content of 5721.11 ng/mg. For common N2 *C. elegans*, the total progeny and body length of the nematodes fed with 800 μg/mL *Hemerocallis citrina* Baroni methanol extract increased by 24.76% and 7.73%, respectively, compared with the blank group; for sugar-damaged *C. elegans*, fed with 800 μg/mL *Hemerocallis citrina* Baroni methanol extract, the lifespan and total progeny number of nematodes were increased by 24.47% and 3.40% respectively than those of the blank group; for lipid-damaged *C. elegans*, the lifespan, body length and total progeny number of nematodes fed with 1200 μg/mL *Hemerocallis citrina* Baroni methanol extract were increased by 30.04%, 10.36% and 97.32% than those of the blank group, respectively. Therefore, the results showed that the mid-to-high concentration of *Hemerocallis citrina* Baroni methanol extract had a certain interference effect on *C. elegans* glycolipids damage.

引文格式:

秦喜悦, 张雷, 温艳斌, 等. 黄花菜甲醇提取物对糖脂损伤的干涉作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 14-22

QIN Xiyue, ZHANG Lei, WEN Yanbin, et al. Interference effect of *Hemerocallis citrina* Baroni methanol extract on glycolipid damage [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 14-22

收稿日期: 2021-04-20

基金项目: 山西省大同市农业农村局省校合作项目

作者简介: 秦喜悦 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物与人体健康, E-mail: 849344034@qq.com

通讯作者: 张雅丽 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物与人体健康, E-mail: zhangyali@cau.edu.cn

Key words: *Hemerocallis citrina* Baroni methanol extract; *Caenorhabditis elegans*; glycolipids damage

黄花菜 (*Hemerocallis citrina* Baroni) 又名金针菜、萱草花、忘忧草, 为百合科阿福花亚科萱草属的一种多年生草本植物, 主要种植于中国各地以及日本^[1]。中医认为^[2]黄花菜具有平肝养血、安神醒脑、消炎止痛、消肿利尿等功能, 能治疗耳鸣、心悸不稳、黄疸、痢疾、水肿等多种病症。黄花菜营养丰富, 含有维生素、糖类、氨基酸、蛋白质以及无机盐等营养成分。有研究^[3]表明黄花菜中占比含量最高的营养成分分别是碳水化合物、蛋白质以及脂肪, 它们的占比含量分别为 60%、14% 和 2%, 此外还含有 60 余种挥发性物质, 其中醇类 6 种 (28.06%), 醛类 6 种 (11.86%), 酮类 10 种 (14.34%), 酯类 3 种 (4.85%), 烷烃类 8 种 (7.12%), 烯烃类 6 种 (7.47%), 羧酸类 9 种 (16.00%), 酚类 3 种 (2.10%), 其他 9 种 (8.19%)。黄花菜的活性功能主要表现在抗抑郁^[4-6]、降血脂^[7,8]、降血糖^[9]、抗肿瘤^[10,11]、抗氧化^[12,13]、抑菌^[14,15]等方面。目前黄花菜活性功能成分的常用提取方法是溶剂萃取法^[16], 但该法的提取溶剂会造成污染, 容易对后期的实验造成影响, 因此常采取一些辅助手段如超声、微波等^[17], 起到破坏植物细胞壁, 促使功能成分尽快、尽量多溶出的作用。

糖脂代谢紊乱疾病是指由于机体长期处于高糖、高脂环境下, 体内糖、脂代谢发生异常, 并对机体健康造成损坏, 从而导致一系列慢性疾病的发生, 如高血压、高血脂、糖尿病、心脑血管疾病等^[18-20]。目前, 我国心血管疾病死亡率居于首位^[21], 此外, 预计到 2045 年全球糖尿病患者将达到 6.29 亿人^[22], 糖脂代谢紊乱所带来的人体健康问题日益严重。近年来, 天然植物由于其生物活性物质的高效性和低毒性, 在开发新药等方面取得重要进展与认可^[23], 国内外学者正在积极寻找干涉和治疗糖脂紊乱的天然植物。

本研究利用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法 (Ultra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-QQQ-MS/MS) 分析了黄花菜甲醇提取物中的成分, 并以秀丽线虫为基础, 对糖脂损伤模型喂食不同浓度的黄花菜甲醇提取物, 观察其产卵量、身长及寿命表型, 深入探讨黄花菜甲醇提取物对秀丽线虫糖脂损伤的干涉作用, 对于综合开发利用黄花菜资源具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄花菜, 山西省大同市; 秀丽隐杆线虫 (*C.elegans* Bristol N2), 由美国 CGC (Caenorhabditis Genetics Center) 提供; 线虫的培养采用线虫生长培养基 (NGM), 以 *Escherichia coli* strain OP 50 为食物饲喂, 在 22 °C 恒温培养箱中培养。

甲醇、甲酸、正己烷、乙酸铵 (色谱级), 德国 Merck Millipore 公司; 蔗糖、硬脂酸、胆固醇、琼脂、酵母浸粉、胰蛋白胨 (生物级), 蓝博立德试剂公司。莨菪亭标准品: 芦丁、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素、柯伊利素、芹菜素、莨菪亭、槲皮素、异鼠李素、花旗松素、原儿茶素、对香豆酸、龙胆酸、咖啡酸, 所有标准品纯度 >97% (质量百分数), 麦克林公司。

1.2 仪器与设备

中药粉碎机, 江阴万通药化器械有限公司; RV10 旋转蒸发仪, 德国 IKA 公司; ALPHA 1-4 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; SCQ-3201 超声波清洗机, 上海声彦超声波有限公司; TQ-S 超高效液相色谱联用仪, 美国 Waters 公司; 3-30k 高速冷冻离心机, Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司; SZ66013ZL 体视镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; SHP-80 生化培养箱, 上海培因实验仪器有限公司; THZ-C 恒温振荡箱, 太仓市实验设备厂; DL-CJ-FND-[] 超净台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司。

1.3 黄花菜甲醇提取物的制备及成分分析

将黄花菜样品干燥制成粉末, 过 100 目筛。取黄花菜样品 20 g, 分散于 500 mL 甲醇 (80%) 溶液中, 超声萃取 20 min 后, 经 7000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 重复上述步骤 3 次使上清液基本呈无色。合并上清液, 减压浓缩后冷冻干燥得到黄花菜甲醇提取物, 并用于后续实验。

取黄花菜样品 0.2 g, 分散于 5 mL 甲醇 (80%) 溶液中, 并加入低中高三个浓度的莨菪亭标准品, 超声萃取 20 min 后, 经 7000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。重复上述步骤 3 次使上清液基本呈无色, 合并上清液, 定容至 25 mL。取 10 mL 定容后的上清液, 加入 10 mL 正己烷, 剧烈震荡后静置 10 min, 弃去上层液体, 重复步骤使上层液体无色。取稀释 50 倍的黄花菜甲醇提取物样液 0.9 mL 分别与 0.1 mL, 100 ng/mL 的大豆苷元二级标准液混合, 过 0.22 μm 滤膜后进样。利用 UPLC-QQQ-MS/MS 对黄花菜甲醇提取物进行成分分析。

1.4 秀丽线虫糖脂损伤模型的构建

分别挑取同期化后的 L1 期秀丽线虫幼虫于含有 100 $\mu\text{mol/mL}$ 蔗糖和 100 $\mu\text{g/mL}$ 硬脂酸的培养基中, 每天观察其寿命、身体长度和产卵量的情况并准确记录。

1.5 黄花菜甲醇提取物对普通秀丽线虫及糖脂损伤模型的影响

将黄花菜甲醇提取物分别配成质量浓度为 0、400、800、1200 $\mu\text{g/mL}$ 的稀释液, 做如下秀丽线虫实验。

1.5.1 秀丽线虫寿命的测定

挑取同期化后的 L1 期秀丽线虫幼虫于添加了相应大肠杆菌 OP50 的 NGM 上, 之后每天将培养基中活着的秀丽线虫转移至新培养基中培养, 计数每天秀丽线虫存活数量, 直至全部死亡, 计每组线虫存活天数的平均数为平均寿命。每组 20 条线虫, 重复三次。

平均寿命的计算公式如下:

$$\text{平均寿命} = \frac{\sum T}{D}$$

式中:

T: 每条线虫的存活天数, d;

D: 线虫总条数。

$$\text{相对寿命变化率} = \frac{S - K}{K} \times 100\%$$

式中:

S: 实验组平均寿命, d;

K: 空白组平均寿命, d。

1.5.2 秀丽线虫身长的测定

挑取同期化后的秀丽线虫幼虫于相应的 NGM 中, 在体式显微镜下, 转动培养皿, 使秀丽线虫的身体与标尺刻度尽可能重合, 读取其身长度格数, 按照标尺与实际长度的比例换算得到秀丽线虫实际身长。线虫同期化当天记为第 0 d, 记录线虫身体长度, 直至第 6 d。每组 10 条线虫, 重复三次。

1.5.3 秀丽线虫产卵量的测定

线虫同期化当天记为第 0 d, 挑取 L1 期幼虫至已添加相应大肠杆菌 OP50 的 NGM 上, 当秀丽线虫长至 L4 期时, 将每条 L4 期线虫置于一个培养板上单独培养。每天将该线虫转移至新 NGM 上, 直到其产卵结束。每次转移后, 清点旧培养基上子代的数量。每组 10 条线虫, 重复三次。

1.6 数据统计

本实验数据使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,

采用 ANOVA 模块中的 LSD 和 Duncan's Test 分析比较组间差异, $p < 0.05$ 为差异显著。采用 Origin Pro 8.5 作图, 以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 黄花菜甲醇提取物的成分分析

本研究使用 80% 的甲醇通过超声萃取对黄花菜进行提取, 并利用 UPLC-QQQ-MS/MS 对黄花菜甲醇提取物进行成分分析, 分析结果如表 1 所示, 黄花菜甲醇提取物中含有芦丁、绿原酸、槲皮素、咖啡酸、原儿茶素、对香豆酸、异鼠李素、花旗松素、龙胆酸等成分。其中, 芦丁含量最高, 为 5721.11 ng/mg。

表 1 黄花菜甲醇提取物的成分与含量

Table 1 The content in methanol extract of *Hemerocallis citrina*

Baroni		
序号	名称	含量/(ng/mg)
1	芦丁	5721.11
2	绿原酸	73.62
3	槲皮素	13.02
4	咖啡酸	9.35
5	原儿茶素	3.02
6	对香豆酸	2.36
7	异鼠李素	1.50
8	花旗松素	0.79
9	龙胆酸	0.34

2.2 黄花菜甲醇提取物对普通秀丽线虫的影响

普通秀丽线虫喂食不同浓度黄花菜甲醇提取物后的寿命情况如图 1a 与表 2 所示, 与空白组相比, 喂食 400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物对普通秀丽线虫的平均寿命无明显作用, Vc 阳性对照组也没有明显提高的作用; 而喂食 1200 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物对普通秀丽线虫的平均寿命却有降低作用, 其生存率也一直低于空白组, 说明高浓度的黄花菜甲醇提取物会对普通秀丽线虫造成一定程度的损伤。

身长情况如图 1b 所示, 在第 1~3 d 快速生长期时, 不同浓度的黄花菜甲醇提取物对普通线虫身长无明显作用; 在第 4 d 时, 与空白组相比, 喂食 400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物对普通秀丽线虫的身长均有显著提高作用, 分别提高了 4.40%、7.73%、10.51%, Vc 阳性对照组提高了 11.27%; 在第 5 d 时, 喂食 800 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物对普通秀丽线虫的身长仍有显著提高作用, 与空白组相比分别提高了 5.39%、4.99%, Vc 阳性对照组提

高了 3.14%；但在第 6 d 进入衰老期后，线虫身长缩短，各实验组之间并没有显著差异。由此表明，喂食 400 $\mu\text{g/mL}$ ~1200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的黄花菜甲醇提取物在一定程度上可以增强普通秀丽线虫的最大身长，对线虫的生长发育有一定的影响。

子代情况如图 1c、d 所示，由图 1c 可知，在第 2~6 d 产卵期时，普通秀丽线虫在喂食不同浓度黄花菜甲醇提取物后其子代随时间呈现先增高后减少的趋势，且产卵高峰期主要集中在第 3 d 和第 4 d。由图 1d 可知，与空白组对比，普通秀丽线虫在喂食 800 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物后其总子代数提高了 24.76%、50.82%，Vc 阳性对照组提高了 5.70%。由此表明，800 $\mu\text{g/mL}$ ~1200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的黄花菜甲醇提取物可以显著提高普通秀丽线虫的生殖能力。

表 2 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的普通秀丽线虫平均寿命
Table 2 The mean lifespan of normal *C. elegans* with different concentrations of methanol extract of *Hemerocallis citrina*

Baroni		
黄花菜甲醇提取物浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	平均寿命/d	相对寿命变化率/%
0	9.38 ^a	0
400	9.42 ^a	0.43
800	9.40 ^a	0.21
1200	8.43 ^b	-10.13
Vc (200)	9.47 ^a	0.96

注：检测水平 $p < 0.05$ ，每列不同字母表示统计学差异显著。

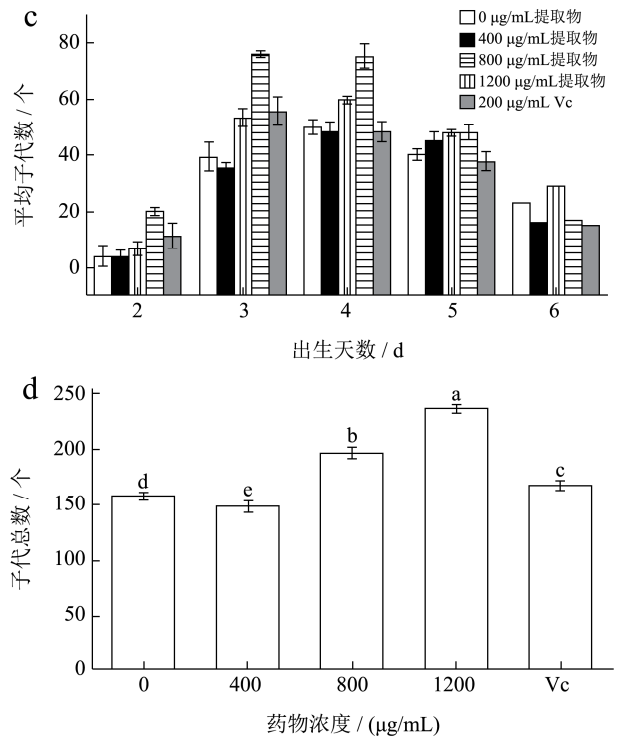
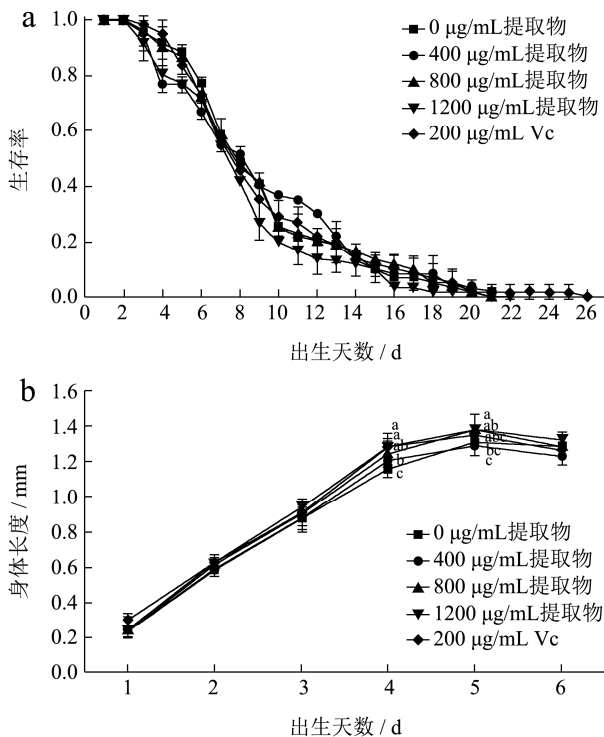


图 1 黄花菜甲醇提取物对普通秀丽线虫的影响

Fig.1 Effect of methanol extract of *Hemerocallis citrina* Baroni on common *C. elegans*

注：(a) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的普通秀丽线虫生存率情况；(b) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的普通秀丽线虫身长情况；(c) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的普通秀丽线虫平均子代情况；(d) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的普通秀丽线虫总子代情况。检测水平 $p < 0.05$ ，图中不同字母表示统计学差异显著。

2.3 黄花菜甲醇提取物对糖损伤秀丽线虫模型的影响

为研究黄花菜甲醇提取物是否对糖损伤的线虫有干涉作用，给线虫喂食 100 $\mu\text{mol/mL}$ 蔗糖造成线虫在高糖饲喂情况下寿命和生长发育指标（身长、产卵量）的改变，同时，添加不同浓度的黄花菜甲醇提取物进行干涉实验。糖损伤秀丽线虫喂食不同浓度黄花菜甲醇提取物后的寿命情况如表 3 与图 2a 所示，与普通秀丽线虫平均寿命 9.38 d 相比，糖损伤线虫平均寿命为 8.05 d，降低了 14.18%。喂食 400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物可显著提高糖损伤线虫的平均寿命，与未添加提取物的糖损伤线虫相比分别提高了 9.69%、24.47%、22.73%，Vc 阳性对照组也提高了 25.47%。与普通秀丽线虫相比，黄花菜甲醇提取物干涉的糖损伤秀丽线虫的平均寿命获得了明显的提高，甚至超过普通线虫添加黄花菜甲醇提取物的平

均寿命, 但由图 2a 可知, 平均寿命的增加主要归因于第 5~10 d 线虫生存率的提高, 而不是线虫最长生存天数的提高。

身长情况如图 2b 所示, 与图 1b 相比, 糖损伤线虫在生长发育上受到了抑制, 普通线虫第 2 d 的身长约为 0.62 mm, 100 $\mu\text{mol/L}$ 蔗糖会导致线虫生长缓慢, 第 2 d 的身长只有 0.56 mm, 而添加 400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物则均可显著改善糖损伤秀丽线虫的身长情况。线虫在第 5 d 时身长达到最大, 与普通线虫相比, 糖损伤线虫最大身长没有明显变化 (都在 1.35 mm 左右), 添加不同浓度的黄花菜甲醇提取物在此指标上也没有明显作用。

子代情况如图 2c、d 所示, 由图 2c 可知, 喂食不同浓度黄花菜甲醇提取物后, 糖损伤秀丽线虫在第 2 d 几乎不产卵, 与图 1c 比较可知其产卵期推迟了 1 d, 产卵总量降低了 40.13%。在第 3~6 d 产卵期时, 糖损伤线虫的产卵高峰期也延长到第 4 d 至第 5 d, 而添加不同浓度黄花菜甲醇提取物后产卵高峰主要集中在第 4 d。由图 2d 可知, 喂食 400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄花菜甲醇提取物后, 对糖损伤秀丽线虫的生殖能力具有一定的修复作用, 其产卵总量分别提高了 2.74%、3.40%、3.88%, Vc 阳性对照组提高了 2.91%。

表 3 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的糖损伤秀丽线虫平均寿命

Table 3 The mean lifespan of sugar-damaged *C. elegans* with different concentrations of methanol extract of *Hemerocallis citrina* Baroni

黄花菜甲醇提取物浓度/ $\mu\text{g/mL}$	平均寿命/d	相对寿命变化率/%
0	8.05 ^d	0
400	8.83 ^c	9.69
800	10.02 ^{ab}	24.47
1200	9.88 ^b	22.73
Vc (200)	10.10 ^a	25.47

注: 检测水平 $p < 0.05$, 每列不同字母表示统计学差异显著。

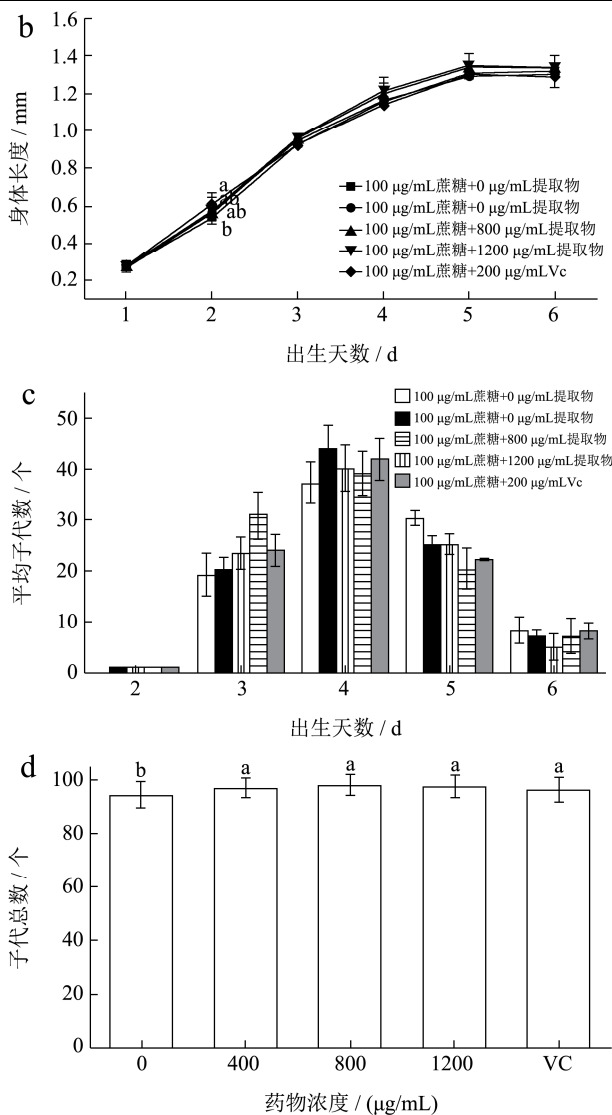
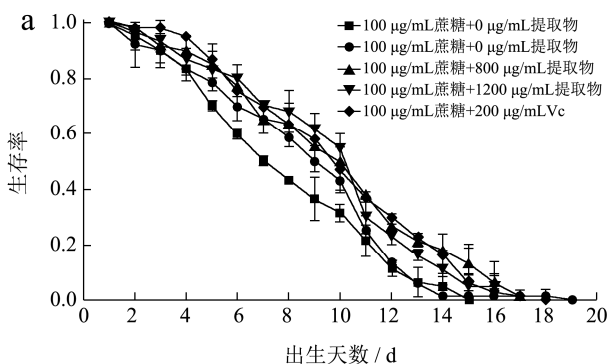


图 2 黄花菜甲醇提取物对糖损伤秀丽线虫模型的影响

Fig.2 Effect of methanol extract of *Hemerocallis citrina* Baroni on sugar-damaged *C. elegans*

注: (a) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的糖损伤秀丽线虫生存率情况; (b) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的糖损伤秀丽线虫身长情况; (c) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的糖损伤秀丽线虫平均子代情况; (d) 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的糖损伤秀丽线虫总子代情况。检测水平 $p < 0.05$, 图中不同字母表示统计学差异显著。

2.4 黄花菜甲醇提取物对脂损伤秀丽线虫模型的影响

脂损伤线虫喂食不同浓度黄花菜甲醇提取物后其寿命情况如表 4 和图 3a 所示, 空白组为未喂食黄花菜甲醇提取物的脂损伤线虫, 其平均寿命为 9.02 d, 与普通秀丽线虫寿命相比缩短了 3.94%。添加不同浓度的黄花菜甲醇提取物后, 不同程度地延长了线虫的平

均寿命。其中,添加 1200 $\mu\text{g/mL}$ 黄花菜甲醇提取物的脂损伤线虫的平均寿命天数为 11.73 d,与脂损伤空白组线虫相比提高了 30.04%,Vc 阳性对照组提高了 8.43%。由图 3a 可知,黄花菜甲醇提取物的添加,不但显著提高了产卵后线虫的生存率,而且使线虫的最大寿命也提高至 27 d。另外,高脂饲喂还引发了线虫在发育阶段(0~3 d)生存率的降低,而添加低浓度黄花菜甲醇提取物对此指标影响不明显,但中高浓度黄花菜甲醇提取物能够很好地回复线虫在发育阶段的生存率,Vc 效果介于二者之间。

表 4 不同黄花菜甲醇提取物浓度下的脂损伤秀丽线虫平均寿命

Table 4 The mean lifespan of stearic acid-damaged *C. elegans* with different concentrations of methanol extract of

<i>Hemerocallis citrina</i> Baroni		
黄花菜甲醇提取物浓度/ $\mu\text{g/mL}$	平均寿命/d	相对寿命变化率/%
	9.02 ^d	
400	9.07 ^d	0.55
800	11.02 ^b	22.17
1200	11.73 ^a	30.04
Vc (200)	9.78 ^c	8.43

注:检测水平 $p < 0.05$,每列不同字母表示统计学差异显著。

身长情况如图 3b 所示,与图 1b 相比,脂损伤秀丽线虫的身长在各阶段无明显差别。但在添加黄花菜甲醇提取物后,脂损伤线虫的身长发生了一定程度的增加,在第 2 d 时,喂食 1200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄花菜甲醇提取物的脂损伤秀丽线虫的身长比未添加组提高了 10.36%,第 4 d 时提高了 7.81%;但第 5 d 时 1200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄花菜甲醇提取物却加剧了脂损伤秀丽线虫的身长的缩短,推测可能脂损伤线虫产卵后身体机能变得脆弱,不能耐受高浓度的黄花菜甲醇提取物。Vc 阳性对照组能够转变高脂饲喂对线虫身长的影响,较大程度地提高了线虫发育期身长(第 2 d 提高了 17.08%)以及最大身长(第 4 d 提高了 13.39%)。

子代情况如图 3c、d 所示,与图 1c、d 普通秀丽线虫空白组的产卵总量相比可知,脂损伤秀丽线虫的产卵总量下降了 73.88%,且第 2 d 基本不产卵。添加不同浓度的黄花菜甲醇提取物后,脂损伤线虫第 2 d 恢复了少量的产卵,且 400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄花菜甲醇提取物都对脂损伤秀丽线虫的产卵总量有显著的干涉作用,分别提高了 83.32%、84.94%、97.32%。Vc 阳性对照组无论在恢复线虫早期产卵还是总产卵量方面,都比黄花菜甲醇提取物有更好的效果。

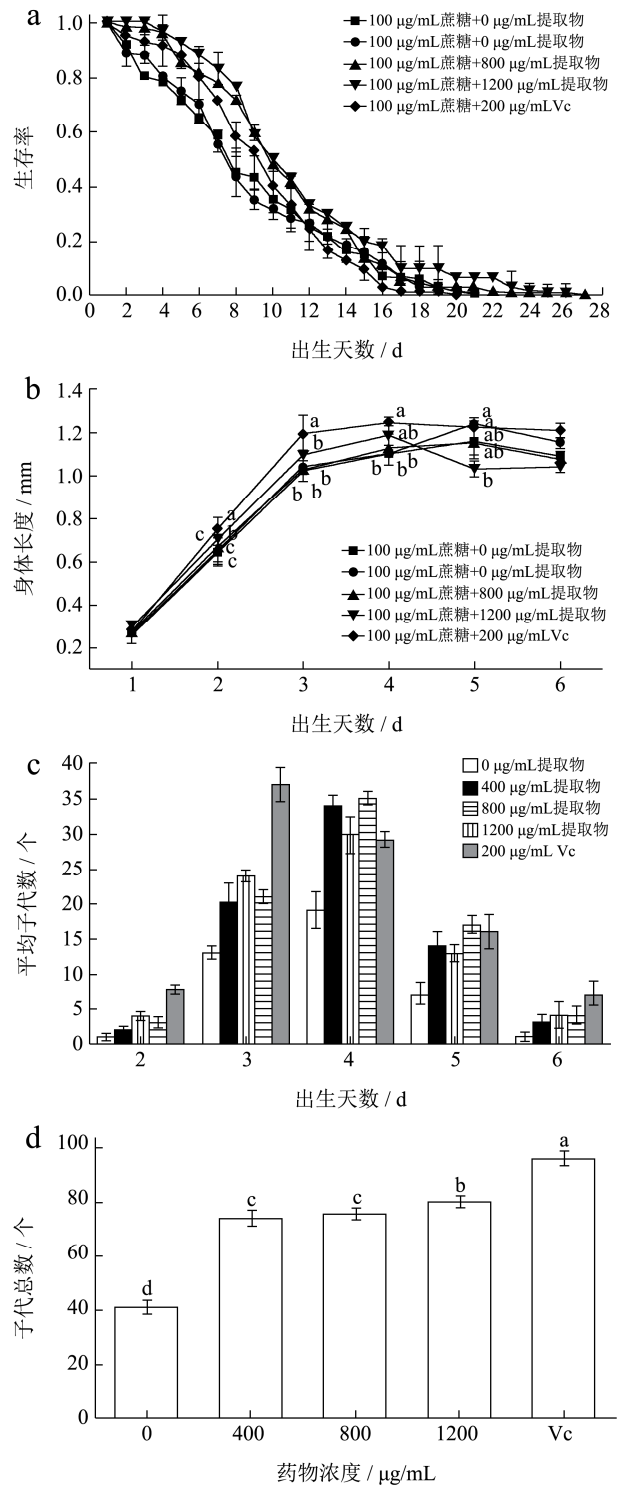


图 3 黄花菜甲醇提取物对脂损伤秀丽线虫模型的影响

Fig.3 Effect of methanol extract of *Hemerocallis citrina* Baroni on stearic acid-damaged *C. elegans*

注:(a)不同黄花菜甲醇提取物浓度下的脂损伤秀丽线虫生存率情况;(b)不同黄花菜甲醇提取物浓度下的脂损伤秀丽线虫身长情况;(c)不同黄花菜甲醇提取物浓度下的脂损伤秀丽线虫平均子代情况;(d)不同黄花菜甲醇提取物浓度下的脂损伤秀丽线虫总子代情况。检测水平 $p < 0.05$,图中不同字母表示统计学差异显著。

秀丽线虫从卵孵化后第 0~3 d 是生长发育最快的时期,也是身长变化最大的时间段,其在第 3 d 左右进入产卵期,一般产卵高峰期在第 4 d,基本结束于第 6 d^[24-27]。普通秀丽线虫的产卵总量在 150~180 个/条,最长寿命约为 15~22 d^[28-31]。在本实验中,对普通秀丽线虫饲喂不同浓度的黄花菜甲醇提取物后,能够显著提高线虫的生殖(产卵数量)和发育(身长)指标,尤其高浓度的黄花菜甲醇提取物能够使得线虫的产卵量达到 230 个/条,说明黄花菜甲醇提取物可能在生殖功能上发挥作用,李云霞^[32]研究发现黄花菜中的黄酮类化合物能够显著增加性未成熟的小鼠子宫的湿重和子宫系数,迅速提升小鼠血清中的雌激素水平,表明黄花菜中的黄酮类化合物对于机体内雌激素的调节具有一定作用。秀丽线虫在产卵后会发生身长的缩短和死亡率的提升,而且总产卵量与寿命呈现负相关性^[33,34],本实验中,高浓度的黄花菜甲醇提取物极显著地提高了线虫的产卵量,但其生存率在产卵后急速下降,同时平均寿命也出现了缩减。

高浓度蔗糖处理秀丽线虫会引起幼虫生长阻滞,发育迟缓;同时,高浓度蔗糖也会改变线虫培养基的渗透压,加剧线虫应对外界氧化应激的压力^[24]。本实验中,100 $\mu\text{mol/mL}$ 蔗糖导致线虫发育阻滞、产卵量下降、平均寿命和最长寿命都显著缩短。在给予不同浓度的黄花菜甲醇提取物后,虽然对糖损伤线虫的生殖和发育指标只有较小的干涉回复作用,但在平均寿命方面表现出了非常显著的正向回复作用,尤其对产卵后线虫(5~10 d)的生存率明显提升,且此提升效果随黄花菜甲醇提取物添加浓度的提高而增加。在添加 100 $\mu\text{g/mL}$ 硬脂酸后,线虫出现了产卵量和平均寿命下降的现象,这与之前的报道类似^[24]。给予黄花菜甲醇提取物进行干涉后,极显著地恢复了线虫的产卵能力及生存率,且效果都随黄花菜甲醇提取物添加浓度的提高而增加。糖脂代谢紊乱会使机体产生大量自由基,主要以氧自由基为主,这些自由基会导致机体激烈的氧化应激反应,而过多的活性氧会破坏大多数生物分子的结构,如构成细胞膜的脂质和蛋白质以及细胞核内的遗传物质 DNA 等,甚至还会干扰人体的正常生命代谢活动,降低机体免疫功能,引起疾病,加速人体衰老进程^[26,27]。Suresh 的研究表明^[35,36],黄花菜中提取的多酚类物质,具有很强的抗氧化活性(清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、 H_2O_2 、磷钼检测和还原能力),以及抗革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌,可作为抗菌类、抗氧化与糖尿病生物药物的天然来源。Wang 等^[12]利用 UPLC-PDA/MS 分析鉴定了黄花菜中 17 种黄酮类化合物,并发现其能通过抗氧化和抗凋亡

途径有效保护 BRL-3A 细胞免受 t-BHP 诱导的氧化应激损伤,并显著降低活性氧积累。潘焯^[37]研究发现黄花菜中含有槲皮素、芦丁、阿魏酸等多酚,其提取物的金属离子螯合能力、清除自由基与超氧阴离子能力、还原能力都较为显著,还可以有效减低小鼠体内丙二醛的含量,增强超氧化物歧化酶的表达。由此推测,黄花菜甲醇提取物对糖脂损伤秀丽线虫生殖能力、生长发育以及寿命的干涉作用可能与降低其体内的氧化应激反应有关。

3 结论

本研究利用 UPLC-QQQ-MS/MS 对黄花菜甲醇提取物中的成分进行了定性、定量分析,测得黄花菜甲醇提取物含有槲皮素、异鼠李素、花旗松素、原儿茶素、芦丁、对香豆酸、龙胆酸、绿原酸、咖啡酸等 9 种物质,其中,芦丁含量最高。通过对普通秀丽线虫、糖损伤秀丽线虫、脂损伤秀丽线虫三种模型的秀丽线虫喂食不同浓度的黄花菜甲醇提取物,并与空白组和 Vc 阳性对照组对比,评价黄花菜甲醇提取物对三种不同模型的秀丽线虫的干涉作用。结果表明,对普通秀丽线虫,800 $\mu\text{g/mL}$ ~1200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄花菜甲醇提取物对其最大身长有一定的增强作用,且可以明显增强其生殖能力;对糖损伤秀丽线虫,400 $\mu\text{g/mL}$ ~1200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄花菜甲醇提取物对其生殖能力有一定的干涉作用,可以显著延长其平均寿命,且随浓度增高呈现先增加后减少的趋势;对于脂损伤秀丽线虫,400 $\mu\text{g/mL}$ ~1200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄花菜甲醇提取物对其生殖能力、身长和寿命都有显著的干涉作用,且对生殖能力与平均寿命的干涉作用都随浓度升高而增强。未来可继续深入探究黄花菜甲醇提取物的对糖脂损伤的干涉作用机理和抗氧化功能,为黄花菜甲醇提取物功能性食品的开发提供理论支撑。

参考文献

- [1] Tai C Y, Chen B H. Analysis and stability of carotenoids in the flowers of daylily (*Heemerocallis disticha*) as affected by various treatments [J]. Journal Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48(12): 5962-5968
- [2] 王艳,张海丽,许腾,等.黄花菜不同品种及不同部位营养与功能成分差异性研究[J].食品科技,2017,42(6):68-71
WANG Yan, ZHANG Haili, XU Teng, et al. Study on the difference of nutritional and functional components in different varieties and parts of *Heemerocallis citrina* Baroni [J]. Food Technology, 2017, 42(6): 68-71
- [3] 毛建兰.黄花菜的营养价值及加工技术综述[J].安徽农业科

- 学,2008,36(3):1197-1198
- MAO Jianlan. Summary of nutritional value and processing technology of *Hemerocallis citrina* [J]. Anhui Agricultural Science, 2008, 36(3): 1197-1198
- [4] LI Chengfu, CHEN Xuemei, CHEN Shaomei, et al. ERK-dependent brain-derived neurotrophic factor regulation by hesperidin in mice exposed to chronic mild stress [J]. Brain Research Bulletin, 2016, 124: 40-47
- [5] XU Pan, WANG Kezhu, LU Cong, et al. Antidepressant-like effects and cognitive enhancement of the total phenols extract of *Hemerocallis citrina* Baroni in chronic unpredictable mild stress rats and its related mechanism [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 194: 819-826
- [6] LI Chengfu, CHEN Xuemei, CHEN Shaomei, et al. Evaluation of the toxicological properties and anti-inflammatory mechanism of *Hemerocallis citrina* in LPS-induced depressive-like mice [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 91: 167-173
- [7] Shinobu M, Takizawa M, Satou M, et al. Enhancement of lipolytic responsiveness of adipocytes by novel plant extract in rat [J]. Experimental Biology and Medicine, 2009, 234(12): 1445-1449
- [8] 杨大伟,钟菊英.黄花菜粗卵磷脂提取工艺研究[J].食品工业科技,2008,1:204-206
- YANG Dawei, ZHONG Juying. Study on the extraction technology of daylily crude lecithin [J]. Food Industry Technology, 2008, 1: 204-206
- [9] 黄红焰,李玉白.萱草活性成分黄酮干对糖尿病大鼠抗动脉粥样硬化活性的研究[J].湖南环境生物职业技术学院学报, 2010,16(4):26-28
- HUANG Hongyan, LI Yubai. Study on the anti-atherosclerotic activity of the active ingredient of *Hemerocallis fulva* [J]. Journal of Hunan Environmental Biological Vocational and Technical College, 2010, 16(4): 26-28
- [10] Robert H Cichewicz, ZHANG Yanjun, Seeram Navindra-P, et al. Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies [J]. Life Sciences, 2004, 74(14): 1791-1799
- [11] 欧丽兰,余昕,张椿,等.黄花菜多糖的提取工艺及抗肿瘤活性研究[J].四川农业大学学报,2016,2(34):201-205
- OU Lilan, YU Xin, ZHANG Chun, et al. Study on the optimal extraction technology and anti-tumor effect of polysaccharide in *Hemerocallis fulva* [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2016, 34(2): 201-205
- [12] JING Wang, HU Dongmei, HOU Jing, et al. Ethyl acetate fraction of *Hemerocallis citrina* Baroni decreases tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress damage in *BRL-3A* cells [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 5: 1-13
- [13] 周向军,高义霞,张继.黄花菜多酚提取工艺及抗氧化作用的研究[J].作物杂志,2012,1:68-72
- ZHOU Xiangjun, GAO Yixia, ZHANG Ji. Study on the extraction process and antioxidant effect of polyphenols in daylily [J]. Crop Journal, 2012, 1: 68-72
- [14] Mugunthu R Dhananjeyan, Milev Youli P, Kron Michael A, et al. Synthesis and activity of substituted anthraquinones against a human filarial parasite, *Brugia malayi* [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48(8): 2822-2830
- [15] 周纪东,李余动.黄花菜多糖的提取、结构性质及抑菌活性[J].食品科学,2015,36(8):61-66
- ZHOU Jidong, LI Yudong. Study on different extraction methods and content determination of polysaccharides from daylily [J]. Food Science, 2015, 15(1): 69-72, 88
- [16] 梁燕妮,何秋妹,李娇媛.微波辅助提取六堡茶多酚工艺的研究[J].农业与技术,2019,39(13):4-5,26
- LIANG Yanni, HE Qiumei, LI Jiaoyao. Study on microwave-assisted extraction of polyphenols from Liubao tea [J]. Agriculture and Technology, 2019, 39(13): 4-5, 26
- [17] 周志娥,杜华英,林丽萍,等.超声波辅助提取黄花菜中多酚类物质工艺的优化[J].食品工业科技,2014,35(18):284-287
- ZHOU Zhie, DU Huaying, LIN Liping, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extracting polyphenols from the *Hemerocallis fulva* [J]. Food Industry Technology, 2014, 35(18): 284-287
- [18] Difeliceantonio A G, Coppin G, Rigoux L, et al. Supra-additive effects of combining fat and carbohydrate on food reward [J]. Cell Metab, 2018, 28(1): 33-44
- [19] Yeh S H, Shie F S, Liu H K, et al. A high-sucrose diet aggravates Alzheimer's disease pathology, attenuates hypothalamic leptin signaling, and impairs food-anticipatory activity in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice [J]. Neurobiol Aging, 2019, 90: 60-74
- [20] Oshio L T, Andreazzi A E, Lopes J F, et al. A paternal hypercaloric diet affects the metabolism and fertility of F1 and F2 wistar rat generations [J]. J Dev Orig Health Dis, 2020, 11(6): 1-11
- [21] Robles Romero J M, Gomez Salgado J, Fernandez Ozcorta E J, et al. Differences between real health and health perceived as a difficult to improve healthy behaviors in costaleros [J].

- Rqr Enfermeria Comunitaria, 2020, 8(1): 46-54
- [22] Mohammad H Forouzanfar, Ashkan Afshin, Lily T Alexander, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015 [J]. Lancet, 2016, 388(10053): 1659-1724
- [23] Eugene Delyan. Analisis of component composition of volatile [J]. The Pharma Innovation Journal, 2016, 5(10): 118-126
- [24] WANG Xiong, ZHANG Lin, ZHANG Lei, et al. Effects of excess sugars and lipids on the growth and development of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genes & Nutrition, 2020, 15(1): 1-18
- [25] ZHENG Jolene, GAO Chenfei, WANG Mingming, et al. Lower doses of fructose extend lifespan in *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Dietary Supplements, 2016, 14(3): 264-277
- [26] Watts Jennifer L, Ristow Michael. Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2017, 207(2): 413-446
- [27] LI Hongyuan, LIU Xin, WANG Dan, et al. O-glcacylation of skn-1 modulates the lifespan and oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 43601
- [28] 呼鑫荣,饶欢,熊海宽,等.松露的体外抗氧化性评价及对秀丽线虫的体内抗氧化[J].中国食品学报,2020,20(7):27-33
- HU Xinrong, RAO Huan, XIONG Haikuan, et al. Evaluation of truffle's antioxidation in vitro and its antioxidation to *Caenorhabditis elegans in vivo* [J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(7): 27-33
- [29] 张春艳,陈韬,罗思源,等.二甲基砷对秀丽线虫运动、个体发育和生殖的影响[J].基因组学与应用生物学,2020,39(5): 2050-2055
- ZHANG Chunyan, CHEN Tao, LUO Siyuan, et al. Effects of dimethyl sulfoxide on movement, ontogeny and reproduction of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(5): 2050-2055
- [30] 刘传铃,王佳贺.秀丽线虫衰老模型及机制的研究进展[J].国际老年医学杂志,2020,41(5):326-330
- LIU Chuanling, WANG Jiahe. Research progress of *Caenorhabditis elegans* aging model and mechanism [J]. International Journal of Geriatrics, 2020, 41(5): 326-330
- [31] 李卓航,杨敏,张锋伦,等.羧甲基壳聚糖在秀丽线虫体内的抗衰老作用[J].食品工业科技,2020,41(19):327-331
- LI Zhuohang, YANG Min, ZHANG Fenglun, et al. Anti-aging effects of carboxymethyl chitosan in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(19): 327-331
- [32] 李云霞.黄花菜中黄酮的提取及雌激素样调节作用的研究[J].实用中西医结合临床,2014,14(9):83-84
- LI Yunxia. Study on extraction of flavonoids from daylily and its estrogen-like regulation [J]. Practical Integrated Chinese and Western Medicine Clinic, 2014, 14(9): 83-84
- [33] 吕振宇,孟姣,孙传鑫,等.枸杞对秀丽隐杆线虫寿命和产卵的影响及其抗氧化作用[J].食品科学,2019,40(5):183-188
- LYU Zhenyu, MENG Jiao, SUN Chuanxin, et al. The effect of wolfberry on the life span and oviposition of *Caenorhabditis elegans* and its antioxidant effect [J]. Food Science, 2019, 40(5): 183-188
- [34] 李贞景,张金阳,王昌禄,等.4种有毒中药对秀丽隐杆线虫致死率和产卵数的影响[J].毒理学杂志,2013,27(4):297-299
- LI Zhenjing, ZHANG Jinyang, WANG Changlu, et al. Effects of four toxic traditional Chinese medicines on the lethality and number of eggs of *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Toxicology, 2013, 27(4): 297-299
- [35] Suresh Y, Gutha R, Narayanaswamy L, et al. Antioxidant and antidiabetic properties of isolated fractions from methanolic extract derived from the whole plant of *Cleome viscosa* L [J]. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 6(1): 103
- [36] Suresh Y, Gutha R, Narayanaswamy L, et al. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles from the whole plant of *Cleome viscosa* and evaluation of their characterization, antibacterial, antioxidant and antidiabetic properties [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(12): 3601-3614
- [37] 潘妍.黄花菜保鲜与保健功能的研究[D].杭州:浙江大学, 2006
- PAN Xin. Study on the fresh-keeping and health function of *Hemerocallis citrina* Baroni [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006