橄榄苦苷通过调节脂代谢紊乱和抗氧化应激延缓秀丽隐杆线虫衰老

黄三郡[1, 2]，宋伍[1, 2]，顿明媚[3]，钱奕敏[1, 2]，王馨慧[1, 2]，姜爽[2]，张驰[1, 2*]

（1.长春中医药大学基础医学院，吉林长春 130117）（2.长春中医药大学中西医结合学院，吉林长春 130117）

（3.公主岭市中心医院心内科，吉林公主岭 136100）

摘要：该研究为了探究橄榄苦苷延缓衰老的作用及机制，构建 0.11 mol·L^{-1} 葡萄糖饮食诱导的慢性高糖氧化应激模型，评估橄榄苦苷对线虫寿命、脂代谢及氧化应激相关指标的影响。研究表明，50、100 及 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组呈剂量依赖式延长线虫寿命，分别为 23.36%、32.51%、42.01%，同时降低其体宽和体面积，提高身体和头部摆动频率；油红 O、尼罗红染色、甘油三酯（Triglyceride，TG）及游离脂肪酸含量检测结果均表明，橄榄苦苷可以减少线虫体内脂肪沉积；此外，橄榄苦苷能够降低线虫体内活性氧、脂褐素及丙二醛水平，增强超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）和过氧化氢酶活性。200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷能上调 *daf-16*、*lipl-4* 及 *sod-3* mRNA 表达，分别为 2.47 倍、1.39 倍、2.20 倍，同时可以使 TJ356 线虫 DAF-16 核易位比例降低 56.80%；而在 CF1038 线虫中，橄榄苦苷对寿命、TG 含量及 SOD 活性均无影响。综上，橄榄苦苷能有效延长线虫寿命，起到延缓衰老的作用，其机制与 *daf-16* 介导的调节脂代谢紊乱和抗氧化应激作用有关，也为橄榄苦苷作为抗衰老食品的开发利用提供了理论基础。

关键词：橄榄苦苷；秀丽隐杆线虫；衰老；脂代谢紊乱；氧化应激；*daf-16*

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.8.0805

Oleuropein-Mediated Aging Delay in *Caenorhabditis elegans* via Regulation of Lipid Metabolism and Antioxidant Stress Responses

HUANG Sanjun[1,2], SONG Wu[1,2], DUN Mingmei[3], QIAN Yimin[1,2], WANG Xinhui[1,2], JIANG Shuang[2], ZHANG Chi[1,2*]

(1.College of Basic Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

(2.College of Integrative Chinese and Western Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)(3.Department of Cardiology, Gongzhuling Central Hospital, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The anti-aging effect and underlying mechanism of oleuropein were investigated in this study, where a 0.11 mol·L^{-1} glucose diet-induced chronic high-glucose oxidative stress model was established, and the effects of oleuropein on lifespan, lipid metabolism, and oxidative stress-related parameters in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) were evaluated. The lifespan of *C. elegans* was significantly prolonged in a dose-dependent manner by 23.36%, 32.51%, and 42.01% via oleuropein at 50, 100, and 200 μmol·L^{-1}, respectively. Concomitantly, body width and area were reduced, while the frequencies of body and head swinging were increased. The attenuation of fat accumulation in *C. elegans* by oleuropein was confirmed through Oil Red O/Nile Red staining and decreased levels of triglyceride (TG) and free fatty acid. Furthermore, levels of reactive oxygen species, lipofuscin, and malondialdehyde were decreased by oleuropein, while the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase were enhanced. At 200 μmol·L^{-1}, the mRNA expression of *daf-16*, *lipl-4*, and *sod-3* was upregulated by 2.47-fold, 1.39-fold, and 2.20-fold, respectively, and the nuclear translocation ratio of DAF-16 in TJ356 *C. elegans* was reduced by 56.80%. In contrast, no effects on lifespan, TG content, or SOD activity were observed in CF1038 *C. elegans*. In conclusion, oleuropein was demonstrated to effectively have the lifespan of *C. elegans* extended and anti-aging effects exerted, with its mechanism being attributed to *daf-16*-mediated modulation of lipid metabolism homeostasis and antioxidant stress responses. A solid theoretical foundation for the translational

收稿日期：2025-06-11；修回日期：2025-08-20；接受日期：2025-08-27

基金项目：吉林省科技发展计划项目（YDZJ202401104ZYTS）

作者简介：黄三郡（1999-），女，硕士研究生，研究方向：中西医结合防治衰老相关疾病的药物机制研究，E-mail：haj1887588166@163.com

通讯作者：张驰（1985-），男，硕士，副教授，研究方向：中西医结合防治衰老相关疾病的药物机制研究，E-mail：447279754@qq.com

development and practical application of oleuropein is provided by this finding.

Keywords: Oleuropein; *Caenorhabditis elegans*; aging; lipid metabolism; oxidative stress; *daf-16*

全球老龄化进程持续加速，世卫组织预计全球 60 岁以上人口将在 2050 年增至 21 亿，较 2020 年翻倍，当前衰老及相关疾病如高脂血症、神经退行性疾病、糖尿病等已成为严峻的公共卫生挑战[1]。衰老表现为多系统功能的退行性改变，其特征性变化包括平均寿命缩短、氧化应激水平升高、脂代谢紊乱加剧及慢性炎症反应激活[2]。研究发现[3]，通过饮食调控、运动干预、药物治疗等手段改善脂代谢紊乱、减轻氧化应激，更有望从源头干预衰老进程。因此，在天然植物资源中寻找具有抗氧化及调节脂代谢紊乱作用的活性成分，已成为近年来抗衰老领域的研究热点[4]。

油橄榄（*Olea Europaea* L.）为地中海地区的亚热带树脂，属木犀科木犀榄属植物，其果实及叶片具有极高的营养价值和经济价值[5]。橄榄苦苷（Oleuropein，OLE）是从橄榄果实和叶片中分离得到的具有天然裂环烯醚萜苷骨架的多酚化合物，具有保护心脑血管健康、抗菌、防癌、减轻氧化应激、抑制炎症反应等多种生物活性，且其安全性已在多项临床研究和动物实验中被充分证实[6]。近年来，橄榄苦苷的抗衰老作用也逐渐引起了人们的关注。研究发现[7]，D-半乳糖诱导的衰老小鼠经橄榄苦苷干预后，胸腺指数、脾脏指数、超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathion Peroxidase，GSH-Px）及过氧化氢酶（Catalase，CAT）活性升高，丙二醛（Malondialdehyde，MDA）及晚期糖基化终末产物含量下降，提示橄榄苦苷可通过增强机体免疫功能、提高抗氧化能力等发挥延缓衰老作用。但目前为止，橄榄苦苷延缓衰老作用与脂代谢紊乱是否有关，及橄榄苦苷抗氧化应激、调节脂代谢紊乱作用的深入机制等均未明确。

秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*，*C. elegans*）因其通体透明的特性可实时观察肠道脂褐素沉积及脂滴动态变化，同时具有全基因组序列已知、信号机制高度保守、突变体资源丰富等优势，常作为研究衰老的经典模式生物[8]。研究发现[9]，高糖饮食可通过多重机制加速衰老进程，过量葡萄糖经糖酵解途径为脂肪酸合成提供乙酰辅酶 A 等前体，促进甘油三酯（Triglyceride，TG）合成与脂滴积累；同时诱导线粒体功能障碍，导致活性氧（Reactive Oxygen Species，ROS）过量积累，形成"脂代谢紊乱-氧化应激"的恶性循环。该研究基于高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫模型，在进一步明确橄榄苦苷抗衰老活性基础上，着重分析该活性与调节脂代谢紊乱及抗氧化应激作用的相关性，旨在将橄榄苦苷开发成为新型抗衰老功能性食品或药品的提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

N2 野生型秀丽隐杆线虫、TJ356（DAF-16::GFP）线虫、CF1038[*daf-16*(mu86)]线虫、大肠杆菌 OP50（*Escherichia coli* OP50，*E. coli* OP50），上海南方模式生物科技股份有限公司；橄榄苦苷（纯度≥95%，批号 2024021201）、二甲基亚砜（纯度 99%），上海源叶生物科技有限公司；二辛可酸蛋白浓度测定试剂盒、油红 O 染色试剂盒、尼罗红染色试剂盒及 2′,7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯（2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate，DCFH-DA）染色试剂盒、磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffered Solution，PBS）、葡萄糖（纯度≥99.5%），上海碧云天生物技术有限公司；TG、游离脂肪酸（Free Fatty Acid，FFA）、MDA、SOD 及 CAT 生化分析试剂盒，南京建成生物工程研究所；Trizol 试剂盒、逆转录及实时定量聚合酶链式反应（Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction，qPCR）试剂盒，上海翌圣生物科技股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

SPX-150B-Z 生化培养箱，上海博迅实业有限公司；TG16b 台式高速离心机，江苏科析仪器有限公司；JY92-IIN 超声细胞破碎仪，宁波新芝生物科技股份有限公司；DW-HL100 超低温冰箱，中科美菱低温科技股份有限公司；SZX16 体式显微镜、BX53 荧光显微镜，日本 Olympus 公司；Infinite M1000 Pro 多功能微孔板检测仪，瑞士 Tecan 公司；CFX96 实时荧光定量 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

称取 64.86 mg 橄榄苦苷，溶于 0.3 mL 二甲基亚砜（Dimethyl Sulfoxide，DMSO）溶液中，充分混匀，配制成 400 mmol·L^{-1} 橄榄苦苷母液。在无菌条件下，取 0.1 mL 橄榄苦苷母液，分别加入 0.7、0.3 和 0.1 mL DMSO，稀释后得到橄榄苦苷工作液。分别取 0.01 mL 上述三种橄榄苦苷工作液，加入 10 mL 经高压灭菌的 *E. coli* OP50 菌液中，混匀后配制成终浓度分别为 50、100 和 200 μmol·L^{-1} 的橄榄苦苷菌液，橄榄苦苷的浓度参考 Feng 等[10]的研究并结合预实验结果而设定。称取 59.49 g 奥利司他粉末，溶解于 0.01 mL DMSO 中，随后将全部溶液加入 10 mL 经高压灭菌的的 *E. coli* OP50 菌液中，混匀后配制成终浓度为 12 μmol·L^{-1} 的奥利司他菌液。所有组别中菌液 DMSO 的终浓度均控制在 0.1%，以确保实验条件的一致性。

1.3.2 培养基配制及分组

线虫生长培养基（Nematode Growth Medium，NGM）制备参照严静等[11]实验方法，稍作修改。琼脂粉 5.1 g、蛋白胨 0.75 g、NaCl 0.9 g，蒸馏水定容至 300 mL，121 ℃高压灭菌 30 min，冷却至 55 ℃；置于超净工作台内分别加入 1 mol·L^{-1} $MgSO_4$、1 mol·L^{-1} $CaCl_2$、0.01 mol·L^{-1} 胆固醇溶液各 300 μL 及 1 mol·L^{-1} KH_2PO_4/K_2HPO_4缓冲液 7.5 mL，除空白组均加入 6 g 葡萄糖配制 0.11 mol·L^{-1} 高糖培养基。将 NGM 培养基于超净台紫外照射 30 min，随后将菌液均匀平铺于 NGM 中央，室温静置至形成菌膜。其中空白组与模型组均加入 100 μL 经高压灭菌的 *E. coli* OP50 菌液；橄榄苦苷干预组分别加入含 50、100 及 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷的 *E. coli* OP50 菌液各 100 μL；奥利司他组加入含 12 μmol·L^{-1} 奥利司他的 *E. coli* OP50 菌液 100 μL。

1.3.3 秀丽隐杆线虫寿命测定

随机挑取同期化至 L1 期的线虫到各组平板上（每组 3 个平板，每个平板约 30 条线虫），将平板置于 20 ℃恒温培养箱，从转移时刻（0 d）开始记录存活率。为维持各组线虫环境稳定，每天转移到相应的新鲜 NGM 板中，产卵期结束后每 2 d 记录线虫死亡数，当所有组别中的线虫均死亡时，则实验结束[12]。

1.3.4 秀丽隐杆线虫体长、体宽、体面积、咽泵、身体摆动及头部摆动测定

每组取 10 条同步化处理的 L1+8 d 线虫，在显微镜下观察并拍照，采用 Image J 软件测定各组线虫的体长、体宽、体面积，并计数 30 s 的咽泵（咽部肌肉的抽动）、身体摆动（线虫相对于身体长轴一个波长的移动记作 1 次）、头部摆动（线虫头部相对于身体长轴方向摆到一侧记为 1 次）次数[13]。

1.3.5 秀丽隐杆线虫油红 O、尼罗红、DCFH-DA 染色及脂褐素水平测定

1.3.5.1 油红 O 染色

每组取约 30 条同步化处理的 L1+8 d 的线虫，PBS 洗涤两次。各组线虫于-80 ℃冷冻 15 min，继而在 40 ℃水浴中复温 15 min，重复此冻融循环 3 次，再加入 60%异丙醇脱水 20 min，随后按照油红 O 染色试剂盒说明书对线虫进行染色和脱色，在显微镜下观察并拍照。

1.3.5.2 尼罗红染色

每组取约 30 条同步化处理的 L1+8 d 的线虫，PBS 洗涤两次。用 4%多聚甲醛固定线虫 15 min，PBS 洗涤 2 次。于 200 nmol·L^{-1} 尼罗红中避光孵育 1 h，PBS 洗涤 2 次，在荧光显微镜下观察并拍照。Image J 软件量化每组拍摄线虫的荧光或染色强度。

1.3.5.3 DCFH-DA 染色

每组取约 30 条同步化处理的 L1+8 d 的线虫，PBS 洗涤两次。随后将各组线虫于 25 μmol·L^{-1} DCFH-DA 中避光孵育 1 h，PBS 洗涤 2 次，在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.5.4 脂褐素水平测定

每组取约 30 条同步化处理的 L1+8 d 的线虫，PBS 洗涤两次。在载玻片中央吸取 0.5 mmol·L^{-1} 左旋咪唑 50 μL，分别将各组线虫挑至左旋咪唑液滴中，在荧光显微镜镜下观察并拍照[14]。

1.3.6 秀丽隐杆线虫 TG、FFA、MDA 含量及 SOD、CAT 活性测定

每组取约 1 000 条同步化处理的 L1+8 d 的线虫，并用 PBS 清洗 3 次。样品在冰浴中超声处理以获得匀浆。离心后（13 000 r·min^{-1}，5 min，4 ℃），收集上清液，按照制造商的说明，分别使用试剂盒测定 TG、MDA 含量及 SOD、CAT 活性[15]。

1.3.7 秀丽隐杆线虫 *daf-2*、*daf-16*、*sod-3* 及 *lipl-4* mRNA 表达检测

空白组、模型组及 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组均取约 1 000 条同步化处理的的 L1+8 d 线虫，按 Trizol 法提取线

虫总 RNA，检测紫外吸光度 260/280 比值为 1.8~2.0，按逆转录试剂盒说明书步骤，取 1 μg 总 RNA 进行逆转录合成 cDNA。使用 SYBR Green 染料在 PCR 仪上进行扩增，反应程序为 95 ℃，2 min；95 ℃、10 s，60 ℃、30 s，共 40 个循环。以 *act-1* 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量[16]。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物（5'-3'）
daf-2	GGATAAAGGCGAATCAAAGTGTC	CGATACACTTTCCCTTGTGATAGAC
daf-16	CTTCAAGCCAATGCCACTACC	GGAGATGAGTTGGATGTTGATAGC
sod-3	CCAACCAGCGCTGAAATTCAATGG	GGAACCGAAGTCGCGCTTAATAGT
lipl-4	GCCGAGAAGTTCCTACATCGTCAG	GTCAGCGAACACAAATCCAGCAC
act-1	CAATCTACGAAGGATATG	ATGAGGTAATCAGTAAGA

1.3.8 TJ356 线虫 DAF-16 核易位测定

空白组、模型组及 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组均取约 30 条同步化处理的 L1+8 d 的 TJ356 线虫，并用 PBS 洗涤两次，在载玻片中央吸取 50 μL 0.5 mmol·L^{-1} 左旋咪唑，分别将各组线虫挑至左旋咪唑液滴中，在荧光显微镜下观察并拍摄 DAF-16 的亚细胞定位情况[17]。

1.3.9 CF1038 线虫平均寿命、TG 含量及 SOD 活性测定

空白组、模型组及 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组的寿命测定步骤参照 1.3.3，TG 含量及 SOD 活性测定步骤参照 1.3.6。

1.4 数据处理与统计分析

实验结果以均值±标准差表示。采用 GraphPad Prism 9.4 软件进行统计学分析，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），采用 log-rank 检验对生存曲线进行显著性分析，所有实验均至少重复 3 次。$P<0.05$ 或 $P<0.01$，表示差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫寿命的影响

高糖饮食会影响秀丽隐杆线虫寿命，加速衰老[18]。在该实验中，与空白组相比，模型组生存曲线左移，平均寿命为 13.12 d，缩短了 32.80%（$P<0.01$）；与模型组比较，橄榄苦苷处理后，生存曲线均右移，其中 50、100 及 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组的平均寿命分别延长了 23.36%（$P<0.05$）、32.51%（$P<0.05$）、42.01%（$P<0.01$），结果见图 1A、1B。Feng 等[10]研究结果发现，在非高糖饮食条件下，与空白组相比，40、180 及 440 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫平均寿命分别延长了 6.03%（$P<0.05$）、16.59%（$P<0.01$）和 22.29%（$P<0.01$）。该研究结果发现，在高糖饮食诱导下，橄榄苦苷同样能有效延长秀丽隐杆线虫寿命，起到延缓衰老的作用。

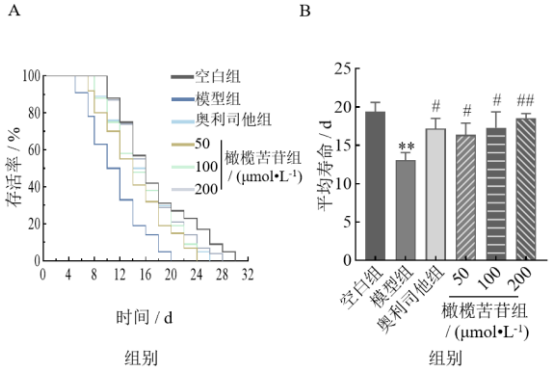

图 1 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫寿命的影响

Fig.1 Effects of oleuropein on the lifespan in *C. elegans* induced by high-glucose diet

注：A.线虫寿命生存曲线；B.线虫平均寿命；与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。下图同。

2.2 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫体长、体宽及体面积的影响

体长和体宽是秀丽隐杆线虫的形态学指标，而体面积作为体长和体宽的综合参数，能够更全面地反映线虫的生长状态[19]。该研究结果发现，与空白组相比，模型组线虫的体长无明显差异（P>0.05），而体宽和体面积分别增加了 10.15%（P<0.01）、23.19%（P<0.01），提示高糖饮食可能会通过增加线虫的脂质积累增加体宽和体面积。与模型组比较，50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫的体长无明显差异（P>0.05），而体宽分别降低了 7.10%（P<0.05）、7.29%（P<0.05）、9.02%（P<0.01），体面积分别降低了 14.33%（P<0.05）、15.17%（P<0.05）、17.47%（P<0.01），结果见图 2。李芸等[20]研究结果显示，低、中剂量鲜掌叶大黄茎提取物降低 1 mol·L^{-1} 葡萄糖饮食诱导线虫体宽和体面积。该实验结果表明，橄榄苦苷能显著降低高糖饮食诱导的线虫体宽和体面积，这可能与其减少线虫脂肪积累的作用相关。

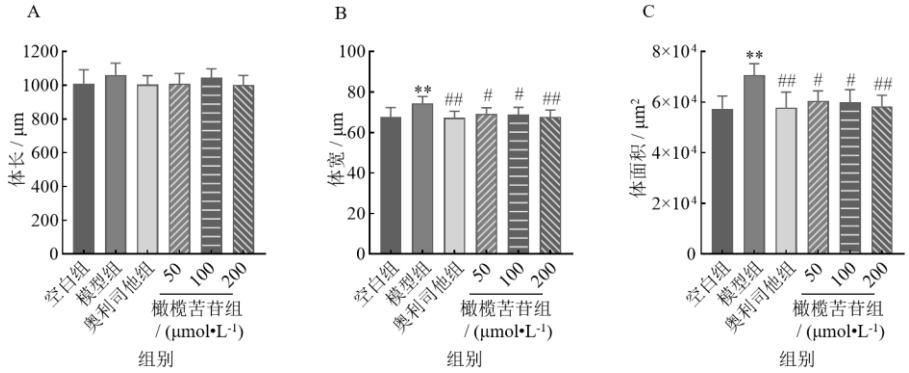

图 2 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫体长、体宽及体面积的影响

Fig.2 Effects of oleuropein on body length, width and area in *C. elegans* induced by high-glucose diet

注：A.线虫体长；B.线虫体宽；C.线虫体面积。

2.3 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫咽泵、身体摆动及头部摆动的影响

咽泵是评估线虫食物摄入量的重要指标，直接影响能量摄入和脂肪积累[21]。该实验检测了线虫的咽泵频率（图 3A），发现各组线虫咽泵频率均无明显差异（P>0.05），提示线虫脂肪积累的变化与摄食行为无关。身体和头部摆动是评估线虫运动能力的关键指标，频率越高，表明线虫的代谢活动越旺盛，脂肪积累越少[22]。实验结果如图 3B、3C 显示，与空白组比较，模型组线虫的身体和头部摆动频率分别降低了 28.85%（P<0.05）、27.42%（P<0.01）；与模型组相比，50 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫的身体摆动频率无明显变化（P>0.05），而 100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫的身体摆动频率分别增加了 24.32%（P<0.05）、37.84%（P<0.05），50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫的头部摆动频率分别增加了 27.78%（P<0.05）、32.22%（P<0.05）、33.33%（P<0.01），表明橄榄苦苷能显著增加线虫的身体和头部摆动，从而加速能量消耗和代谢，减少脂肪积累。

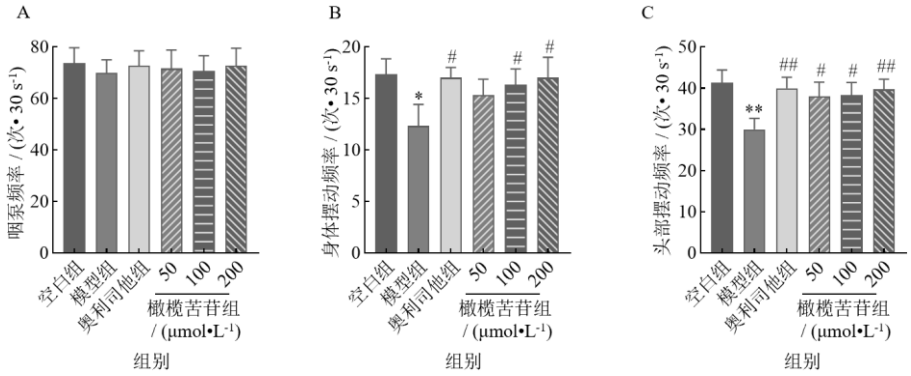

图 3 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫咽泵、身体摆动及头部摆动的影响

Fig.3 Effects of oleuropein on pharyngeal pumping, body swing and head swing in *C. elegans* induced by high-glucose diet

注：A.咽泵频率；B.身体摆动频率；C.头部摆动频率。

2.4 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫体内脂肪积累的影响

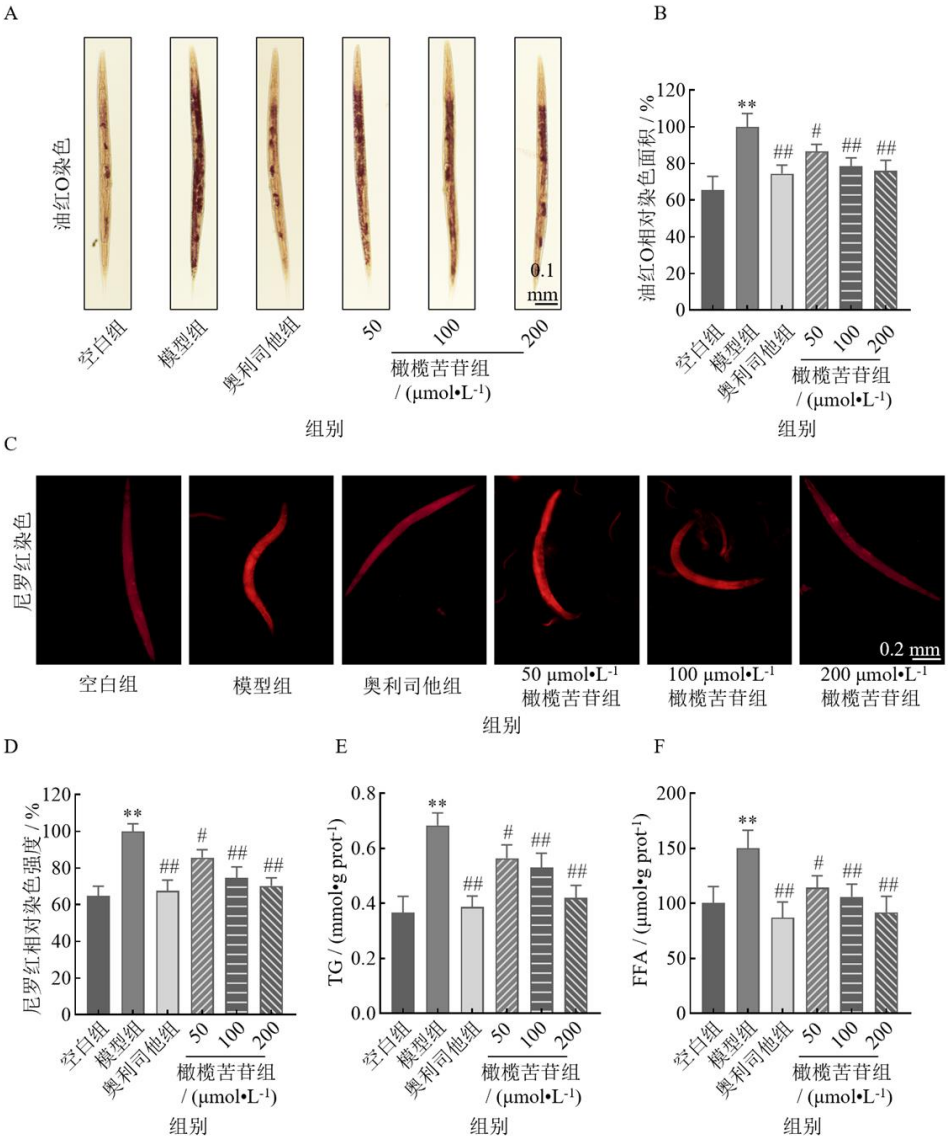

图 4 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫体内脂肪积累的影响

Fig.4 Effects of oleuropein on fat accumulation in *C. elegans* induced by high-glucose diet

注：A.油红 O 染色；B.油红 O 相对染色面积；C.尼罗红染色；D.尼罗红相对染色强度；E. TG 含量；F.游离脂肪酸含量。

脂代谢紊乱与衰老密切相关，降低脂肪沉积水平均有助于延长寿命及延缓衰老[23]。线虫的脂肪主要以脂滴形式分布于肠道和皮下组织，油红 O 作为脂溶性染料可特异性与脂滴结合，因此油红 O 染色可用于直观观察线虫脂肪的分布与含量[24]。油红 O 染色结果见图 4A、4B，与空白组比较，模型组红色脂滴信号增多，相对染色面积增加了 38.51%（P<0.01）；与模型组比较，50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫红色脂滴逐渐减少，相对染色面积分别降低了 13.30%（P<0.05）、21.52%（P<0.01）、23.93%（P<0.01）。尼罗红是一种疏水性荧光染料，能够特异性地与脂质结合，常用于观察线虫体内的脂质分布和积累情况[25]。尼罗红染色结果见图 4C、4D，与空白组相比，模型组线虫荧光信号密集且呈点状分布，相对染色强度增加了 54.64%（P<0.01）；经过橄榄苦苷处理后，50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫点状分布减少，相对染色强度减弱了 14.31%（P<0.05）、25.21%（P<0.01）、29.73%（P<0.01）。TG 是线虫脂肪的主要成分，约占其总脂肪含量的 40%~50%，广泛分布于肠道和皮下组织，其含量可直接反映脂肪沉积程度[12]。该研究结果发现，与空白组相比，模型组线虫 TG 含量增加了 86.17%（P<0.01）；与模型组比较，50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组 TG 含量分别降低了 22.42%（P<0.05）、38.53%（P<0.01）、43.41%（P<0.01），结果见图 4E。为进一步探究橄榄苦苷对线虫脂肪积累的影响，该研究检测了 FFA 含量。已有研究表明[26]，FFA 作为 TG 合成的直接前体，其含量升高不仅能为 TG 合成提供充足底物，还可促进脂滴形成，进而加速脂肪在体内的积累。实验结果如图 4F，与空白组相比，模型组 FFA 含量增加了 49.37%（P<0.01），与模型组相

比，50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组游离脂肪含量分别降低了 23.91%（P<0.05）、29.54%（P<0.01）、38.83%（P<0.01）。罗明珠等[27]研究结果发现橄榄苦苷可降低油酸诱导的 AML12 细胞脂肪堆积并提高对葡萄糖的摄取能力，同时抑制 3T3-L1 细胞成脂分化，表现出较明显的改善糖脂代谢活性。此外，从食物中提取的天然产物如柚皮苷、苦瓜皂苷等均可通过减少脂肪积累延缓秀丽隐杆线虫的衰老[28,29]。以上结果进一步证明，橄榄苦苷可抑制高糖饮食诱导的线虫脂质沉积，并通过调节脂代谢稳态发挥延缓衰老作用。

2.5 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫氧化应激水平的影响

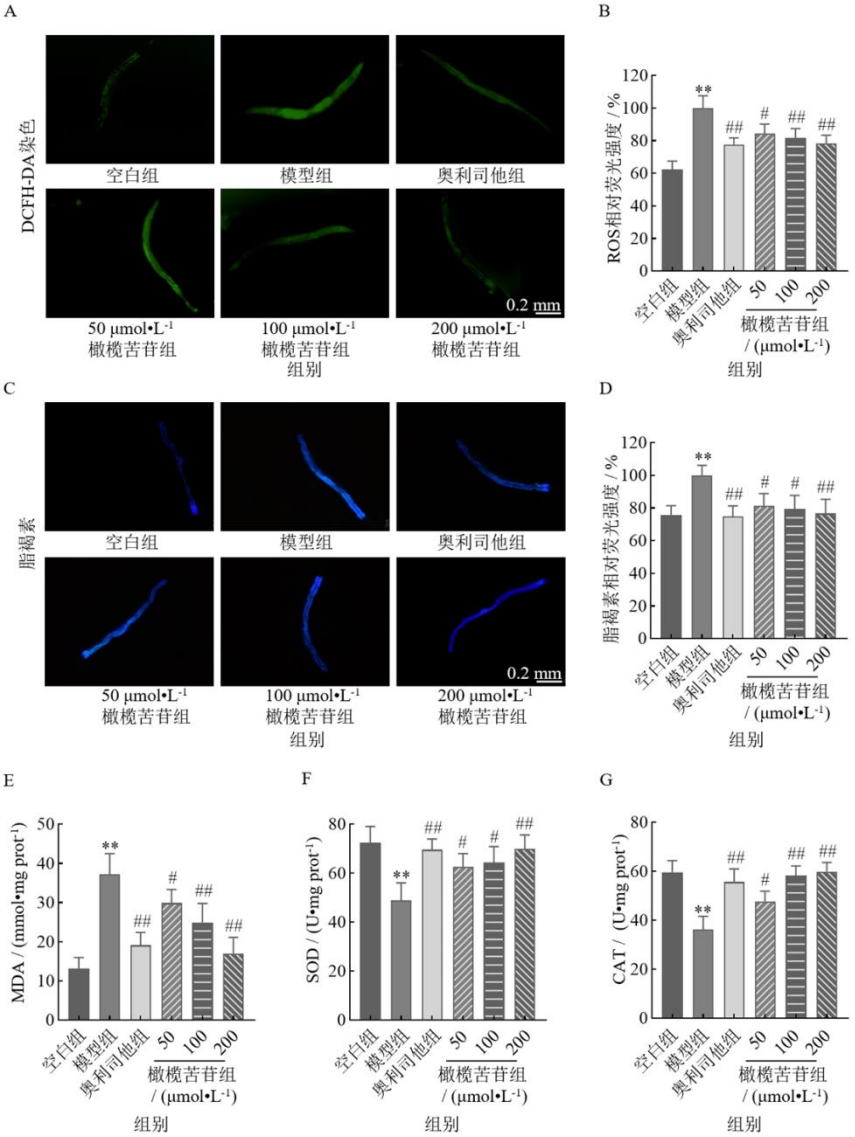

图 5 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫氧化应激水平的影响

Fig.5 Effects of oleuropein on the antioxidant capacity of *C. elegans* induced by high-glucose diet

注：A. DCFH-DA 染色；B. ROS 相对荧光强度；C. 脂褐素荧光检测；D. 脂褐素相对荧光强度；E. MDA 含量；F. SOD 活性；G. CAT 活性。

高糖饮食会诱导线粒体功能发生障碍，促进 ROS 生成，抑制抗氧化酶表达，使细胞处于氧化应激状态，增加脂肪积累，加速衰老[30]。DCFH-DA 是检测细胞内总 ROS 的常用荧光探针，在 ROS 存在情况下，被氧化为具有强绿色荧光的 2′,7′-二氯荧光，可在一定范围内反映细胞内 ROS 的总体水平[31]。DCFH-DA 染色结果发现，与空白组相比，模型组线虫肠道和体壁区域呈现明亮的荧光，荧光强度增加了 60.16%（P<0.01）；与模型组比较，50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组荧光强度分别减弱了 15.68%（P<0.05）、18.38%（P<0.01）、21.72%（P<0.01），结果见图 5A、5B。脂褐素是氧化应激导致的终末交联产物，具有荧光特性，常用于评估细胞氧化损伤程度[32]。与

空白组相比，模型组线虫的脂褐素荧光强度增加了 32.06%（$P<0.01$）；与模型组相比，50、100、200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组线虫荧光强度分别降低了 18.68%（$P<0.05$）、20.71%（$P<0.01$）、23.38%（$P<0.01$），结果见图 5C、5D。MDA 作为脂质过氧化的终产物之一，其含量可反映脂质过氧化和氧化损伤的程度，而 SOD 和 CAT 是线虫体内关键的抗氧化酶，能够保护细胞免受氧化损伤[33]。为进一步探究橄榄苦苷对线虫抗氧化系统的影响，测定了其对 MDA 含量及 SOD、CAT 活性的影响，结果如图 5E、5F 及 5G 所示。与空白组比较，模型组线虫 MDA 含量增加了 182.05%（$P<0.01$），SOD、CAT 活性分别降低了 32.43%（$P<0.01$）和 39.11%（$P<0.01$）；与模型组相比，橄榄苦苷处理组 MDA 降低（$P<0.05$，$P<0.01$），而 SOD 和 CAT 活性增强（$P<0.05$，$P<0.01$），其中 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷组的 MDA 含量降低了 48.60%（$P<0.01$），SOD 和 CAT 活性均增强了 42.07%（$P<0.01$）、53.18%（$P<0.01$）。李文杰等[34]研究结果发现，橄榄苦苷处理 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞后，GSH-Px、SOD 等抗氧化酶活性升高，呈现出明显的抗氧化应激作用。与此同时，黄精皂苷、根皮苷等天然产物可通过降低秀丽隐杆线虫的氧化应激水平发挥抗衰老作用[35,36]。以上结果表明，橄榄苦苷能够提高高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫的抗氧化能力，进而降低氧化应激水平，延缓衰老进程。

2.6 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫 IIS 通路的影响

Daf-2 和 *daf-16* 是胰岛素/胰岛素样生长因子-1 信号（Insulin/insulin Like Growth Factor-1 Signaling, IIS）通路中调控寿命、脂质代谢和氧化应激的关键基因，*daf-2* 抑制 *daf-16* 转录活性，*lipl-4* 和 *sod-3* 作为 *daf-16* 下游效应分子，分别执行脂肪分解和抗氧化功能，共同促进寿命的延长，并延缓衰老[37]。该实验发现，与空白组相比，模型组 *daf-2* mRNA 表达增加了 66.67%（$P<0.01$），*daf-16*、*lipl-4* 及 *sod-3* mRNA 表达分别降低了 48.33%（$P<0.05$）、40.33%（$P<0.05$）、39.67%（$P<0.05$），这表明在高糖饮食诱导下，IIS 通路被激活，*daf-16* 被抑制，从而削弱脂质代谢和抗氧化应激能力。与模型组相比，橄榄苦苷组 *daf-2* mRNA 表达无显著差异（$P>0.05$），而 *daf-16*、*lipl-4* 及 *sod-3* mRNA 表达分别增加了 2.47 倍（$P<0.01$）、1.39 倍（$P<0.01$）、2.20 倍（$P<0.01$），结果见图 6。此结果表明，橄榄苦苷可能绕过 *daf-2* 的上游抑制作用，直接或间接激活 *daf-16* 的活性，从而增强下游调节脂质代谢紊乱和抗氧化应激作用。

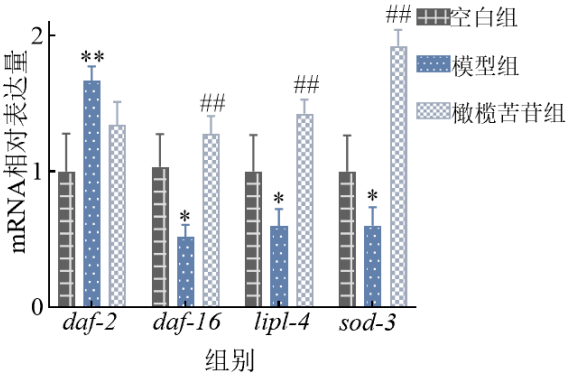

图 6 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的秀丽隐杆线虫 IIS 通路的影响

Fig.6 Fffect of oleuropein on the IIS pathway in *C. elegans* induced by high-glucose diet

2.7 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的 TJ356 线虫 DAF-16 核易位的影响

TJ356 线虫通过转基因技术实现了 DAF-16::GFP 融合蛋白的特异性标记，在生理状态下，DAF-16 主要定位于细胞质；而当线虫遭受氧化应激时，DAF-16 可发生核易位[38]。橄榄苦苷对高糖饮食诱导的 TJ356 线虫 DAF-16 核易位的影响，如图 7 所示。空白组 DAF-16::GFP 荧光信号呈弥散性分布于细胞质，形成均匀的绿色荧光背景，细胞核区域无特异性富集；模型组 DAF-16::GFP 荧光信号向细胞核内聚集，呈现清晰的点状绿色荧光，其核易位线虫比例是空白组的 5.21 倍（$P<0.01$）；这表明高糖饮食可能通过诱导氧化应激促使线虫 DAF-16 发生核易位；橄榄苦苷组 DAF-16::GFP 荧光信号以细胞质弥散分布为主，可见少量核内点状荧光，DAF-16::GFP 核易位线虫比例较模型组降低了 56.80%（$P<0.01$）。Liu 等[39]研究结果发现，天然产物芍药苷能抑制高糖诱导的 TJ356 线虫 DAF-16 核易位，并延长寿命。这些结果表明，橄榄苦苷可能通过减轻高糖饮食诱导的氧化应激损伤以拮抗高糖毒性应激来抑制 DAF-16 核易位，进而发挥延长寿命和延缓衰老的作用。

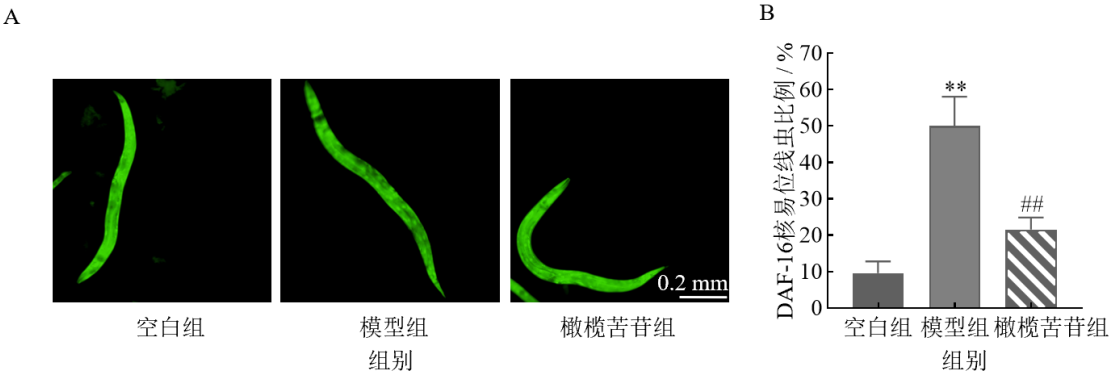

图 7 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的 TJ356 线虫 DAF-16 核易位的影响

Fig.7 Effect of oleuropein on DAF-16 nuclear translocation induced by high-glucose diet in TJ356 *C. elegans*

注：A. TJ356 线虫 DAF-16 分布情况；B. DAF-16 核易位线虫比例。

2.8 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的 CF1038 线虫平均寿命、TG 含量及 SOD 活性的影响

为进一步明确 *daf-16* 在橄榄苦苷调节脂代谢、抗氧化及延缓衰老中的作用，该研究采用 *daf-16* 突变线虫即 CF1038 线虫，分析了其对高糖饮食诱导的 CF1038 线虫平均寿命、TG 含量及 SOD 活性的影响，结果如图 8 所示。当 *daf-16* 基因缺失时，线虫的平均寿命未受高糖饮食影响（$P>0.05$），提示 *daf-16* 是高糖饮食影响线虫寿命的必要条件，其缺失可阻断高糖诱导的衰老路径[40]。与空白组相比，模型组线虫 TG 含量升高了 25.29%（$P<0.05$），SOD 活性降低了 27.04%（$P<0.05$），提示高糖饮食诱导的脂代谢紊乱及氧化应激并非完全依赖 *daf-16*；而橄榄苦苷组 TG 含量和 SOD 活性与模型组相比均无显著差异（$P>0.05$），进一步证实 *daf-16* 在橄榄苦苷调控高糖饮食诱导的代谢紊乱和氧化应激中发挥关键作用。

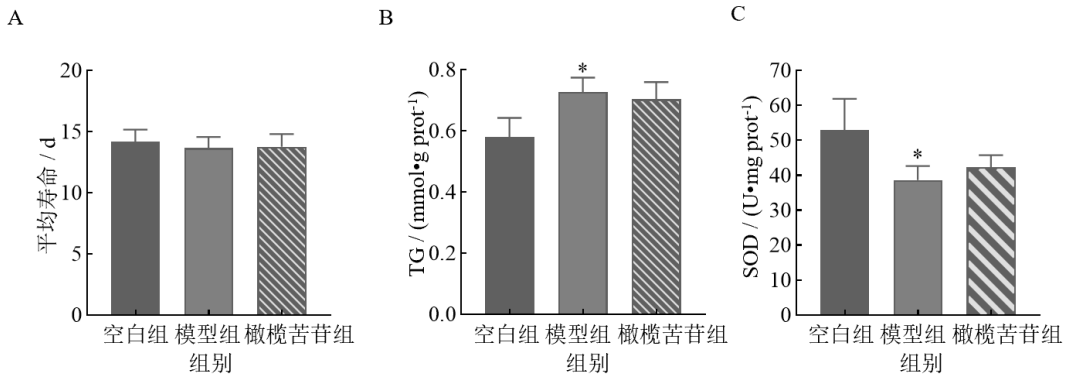

图 8 橄榄苦苷对高糖饮食诱导的 CF1038 线虫平均寿命、TG 含量及 SOD 活性的影响

Fig.8 Effects of oleuropein on mean lifespan, TG content, and SOD activity in CF1038 *C. elegans* Induced by high-glucose Diet

注：A.平均寿命；B.TG 含量；C. SOD 活性。

3 结论

该研究通过构建线虫慢性高糖氧化应激模型，探究了橄榄苦苷对线虫的抗衰老作用及机制，结果表明 50、100 及 200 μmol·L^{-1} 橄榄苦苷均能显著延缓线虫衰老进程，且 200 μmol·L^{-1} 的橄榄苦苷组效果最佳，该组线虫的平均寿命为 18.54 d，较模型组延长了 42.01%，同时改善体宽、运动频率等相关表型。机制研究显示，橄榄苦苷可通过双重途径延缓衰老，一是调节线虫脂代谢紊乱，降低异常积累的脂肪水平，二是增强抗氧化应激能力，减轻高糖诱导的氧化损伤。分子层面上，橄榄苦苷能显著上调 *daf-16* 及其下游靶基因 *lipl-4* 和 *sod-3* mRNA 表达，并抑制 TJ356 线虫 DAF-16 核易位，进一步实验证实，其对 CF1038 线虫平均寿命、TG 含量及 SOD 活性无显著影响，提示其抗衰老机制与 *daf-16* 介导的调节脂代谢紊乱和抗氧化应激作用有关。综上，该研究明确了橄榄苦苷在延缓衰老方面的显著潜力，为其作为天然抗衰老功能性保健食品的开发与应用提供了坚实的理论依据和实验支撑。

参考文献

[1] EWA R, PAULINA N, AGNIESZKA P, et al. The World Health Organization (WHO) approach to healthy ageing [J]. Maturitas, 2020, 139(7): 6-11.

[2] MARY A, RAFAEL D C, JOAN M, et al. Translational strategies in aging and age-related disease [J]. Nature Medicine, 2015, 21(12): 1395-1399.

[3] JERRY H G, STEVEN D P. Novel therapies for an aging population: grappling with price, value, and affordability [J]. Journal of the American Medical Association, 2019, 321(16): 1567-1568.

[4] HO Y S, SO K F, CHANG C C. Anti-aging herbal medicine--how and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? [J]. Ageing Research Reviews, 2010, 9(3): 354-362.

[5] 郭卫平,鲁绪,褚泽军,等.橄榄苦苷提取工艺及生物活性研究进展[J].食品与机械,2023,39(10):233-240.

[6] KONSTANTINOS K, EVANGELOS K, ARHONTOULA C. Antioxidant activity and thermal stability of Oleuropein and related phenolic compounds of Olive Leaf extract after separation and concentration by salting-out-assisted cloud point extraction [J]. Antioxidants (Basel), 2014, 3(2): 229-344.

[7] 折丽婷,赵彩红,陈春红,等.橄榄苦苷对 D-半乳糖诱导衰老小鼠的抗衰老作用研究[J].中国中医药科技,2020,27(1):37-40.

[8] YE Y L, GU Q Y, SUN X L. Potential of *Caenorhabditis elegans* as an antiaging evaluation model for dietary phytochemicals: A review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 3084-3105.

[9] WU Z Q, LI K, HOU A X, et al. The positive effect of *Akkermansia muciniphila* postbiotics on the glycolipid metabolism of *Caenorhabditis elegans* induced by high-glucose diet [J]. Nutrients, 2025, 17(6): 976-1011.

[10] FENG S L, ZHANG C Y, CHEN T, et al. Oleuropein enhances stress resistance and extends lifespan via Insulin/IGF-1 and SKN-1/Nrf2 signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. Antioxidants, 2021, 10(11): 1697-1709.

[11] 严静,薛秋艳,王旸,等.发酵米荞对高脂肪秀丽隐杆线虫的降脂及抗氧化作用[J].食品工业科技,2023,44(6):8-15.

[12] ADRIAN M, JI Y C P, ANITA G, et al. Improved resilience and proteostasis mediate longevity upon DAF-2 degradation in old age [J]. GeroScience, 2024, 46(5): 5015-5036.

[13] SHEN P Y, YUE Y R, KEE-HONG K, et al. Piceatannol reduces fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Medicinal Food, 2017, 20(9): 887-894.

[14] QIN X J, WANG W Q, CHU W H. Antioxidant and reducing lipid accumulation effects of Rutin in *Caenorhabditis elegans* [J]. Biofactors, 2021, 47(4): 686-693.

[15] GE Y, CHEN H B, WANG J L T, et al. Naringenin prolongs lifespan and delays aging mediated by IIS and MAPK in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food & Function, 2021, 12(23): 12127-12141.

[16] CHEN W J, HE L, PEI H Y, et al. Neuroprotective effect of total flavonoids in stems and leaves of *Glycyrrhiza uralensis Fisch*. on oxidative stress in HT-22 cells and *Caenorhabditis elegans* [J]. Aging, 2023, 15(12): 5290-5303.

[17] QI Z M, JI H H, MONIKA L, et al. Sulforaphane promotes *C. elegans* longevity and healthspan via DAF-16/DAF-2 insulin/IGF-1 signaling [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(2): 1649-1670.

[18] ANDREAS S, GEORGI K, FARASTUK F, et al. *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction [J]. Diabetes, 2009, 58(11): 2450-2456.

[19] THAYANARA C D S, TÁSSIA L D S, LUIZA V D S, et al. Exogenous adenosine modulates behaviors and stress response in *Caenorhabditis elegans* [J]. Neurochemical Research, 2023, 48(1): 117-130.

[20] 李芸,熊继东,张国玉,等.鲜掌叶大黄茎地上部分对秀丽隐杆线虫的生殖毒性和降脂作用[J].中成药,2025,47(2):612-617.

[21] ANASTASIA L, SERGE F, RACHEL Z B, et al. The conserved endocannabinoid anandamide modulates olfactory sensitivity to induce hedonic feeding in *C. elegans* [J]. Current Biology, 2023, 33(9): 1625-1639.

[22] XIE J T, CAI R Q, HOU X N, et al. Z-Astaxanthin exhibits superior anti-obesity effects in *Caenorhabditis elegans*: insights from geometric isomers and signaling pathways [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2025, 105(9): 4795-4807.

[23] AYSE S M, JONATHON D, WANG C M. Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity [J]. Developmental Cell, 2021, 56(10): 1394-1407.

[24] BAN F F, HU L B, ZHOU X H, et al. Inverse molecular docking reveals a novel function of thymol: inhibition of fat deposition induced by high-dose glucose in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science and Nutrition, 2021, 9(8): 4243-4253.

[25] GAO C F, GAO G Z, FRANK G L, et al. Oat consumption reduced intestinal fat deposition and improved health span in *Caenorhabditis elegans* model [J]. Nutrition Research, 2015, 35(9): 834-843.

[26] JIAO K, LIU H L, CHEN J K, et al. Roles of plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha and FFA and TG in the development of insulin resistance induced by high-fat diet [J]. Cytokine, 2008, 42(2): 161-169.

[27] 罗明珠,王怡婷,楚薇,等.橄榄苦苷通过抑制 PPARγ 稳定糖脂代谢调控 NAFLD 的作用机制[J].中华中医药杂志,2024,39(10):5462-5467.

[28] GUO P S, WANG P P, LIU L M, et al. Naringin alleviates glucose-induced aging by reducing fat accumulation and promoting autophagy in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nutrients, 2023, 15(4): 907-925.

[29] LIU C X, CHEN Y, LIN Y Z, et al. Antistress and anti-aging activities of *Caenorhabditis elegans* were enhanced by Momordica saponin extract [J]. European Journal of Nutrition, 2021, 60(4): 1819-1832.

[30] GUO C, SHEN W Y, JIN W P, et al. Effects of epigallocatechin gallate, caffeine, and their combination on fat accumulation in high-glucose diet-fed *Caenorhabditis elegans* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2023, 87(8): 898-906.

[31] INAM U, SHAHAB U, ZHAO L H, et al. Autophagy and UPS pathway contribute to nicotine-induced protection effect in Parkinson's disease [J]. Experimental Brain Research, 2024, 242(4): 971-986.

[32] ZACHARY P, FRANK J S. Developmental biomarkers of aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(5): 1306-1314.

[33] WANG B, YIN Z B, LIU J S, et al. Diquat induces cell death and dopamine neuron loss via reactive oxygen species generation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Environmental Science & Technology, 2025, 59(1): 152-162.

[34] 李文杰,李静.橄榄苦苷对 H_2O_2 诱导的 PC12 氧化应激损伤的保护作用[J].中医药学报,2019,47(3):37-41.

[35] 栾雅格.基于秀丽隐杆线虫的黄精炮制前后抗衰老作用比较及机制研究[D].北京:北京中医药大学,2023.

[36] ZHANG X H, WANG H. Phlorizin prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by insulin and SIR-2.1 regulation [J]. American Chemical Society, 2025, 10(12): 11922-11934.

[37] NIKOLETTA P, NIKI C. Anti-aging and anti-aggregation properties of polyphenolic compounds in *C. elegans* [J]. Current Pharmaceutical Design, 2018, 24(19): 2107-2120.

[38] MARGARETH D I, MARÍA T A,LUCELLYS S M, et al. Hydroalcoholic extract of *Haematoxylum brasiletto* protects *Caenorhabditis elegans* from cadmium-induced toxicity [J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2022, 22(1): 1-10.

[39] LIU T W, ZHUANG Z H, WANG D Y. Paeoniflorin mitigates high glucose-induced lifespan reduction by inhibiting insulin signaling in *Caenorhabditis elegans* [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14(12): 79-90.

[40] SEUNG-JAE L, COLEEN T M, CYNTHIA K. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression [J]. Cell Metabolism, 2009, 10(5): 379-391.