

基于葡萄糖诱导的秀丽隐杆线虫模型探讨黄芪抗氧化的作用及机制

杨美美¹, 刘汉滢¹, 彭美中¹, 马盼¹, 牛艺婷¹, 胡腾月¹, 籍宇星¹,
郝改梅², 韩静^{3*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 证候与方剂基础研究北京市重点实验室, 证候与方剂基础研究教育部重点实验室, 北京 102488; 2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; 3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 102488)

摘要: 本研究考察黄芪对高糖诱导的秀丽隐杆线虫的作用并探讨其作用机制。采用 UPLC-MS 法鉴定黄芪的成分。以秀丽隐杆线虫为模式生物, 建立高糖模型, 测定黄芪对线虫的体长、头尾摆动、咽泵运动能力、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的影响; 运用实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测黄芪对 BZIP 结构域蛋白 1 (protein skinhead-1, *SKN-1*) 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响。结果显示, 与正常组相比, 高糖状态下线虫体长、头尾摆动、咽泵频率表达均显著降低, 体内 ROS 含量显著增加; 黄芪给药后体长、头尾摆动、咽泵频率表达均显著增加, ROS 含量显著降低 ($P < 0.01$)。与正常组相比, 高糖状态下秀丽隐杆线虫中 *SKN-1*、超氧化物歧化酶 3 (superoxide dismutase-3, *SOD-3*)、抗氧化基因谷胱甘肽 S-转移酶 4 (glutathione S-transferase 4, *GST-4*)、谷胱甘肽 S-转移酶 7 (glutathione S-transferase 7, *GST-7*) 的表达均显著降低; 黄芪给药后 *SKN-1*、*SOD-3*、*GST-4*、*GST-7* 表达均显著增加 ($P < 0.01$)。本研究表明, 在秀丽隐杆线虫内, 黄芪通过调控 *SKN-1* 信号通路改善高糖引起的氧化应激反应。

关键词: 黄芪; 秀丽隐杆线虫; 氧化应激反应; BZIP 结构域蛋白 1; 高糖

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2556-08

Exploration of the antioxidant role and mechanism of *Astragalus membranaceus* based on a glucose-induced *Caenorhabditis elegans* model

YANG Mei-mei¹, LIU Han-ying¹, PENG Mei-zhong¹, MA Pan¹, NIU Yi-ting¹,
HU Teng-yue¹, JI Yu-xing¹, HAO Gai-mei², HAN Jing^{3*}

(1. Beijing Key Laboratory of TCM Syndrome and Formula, Key Laboratory of TCM Syndrome and Formula of the Ministry of Education, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: The objective of this study was to observe the effect of *Astragalus membranaceus* on high sugar-induced *Caenorhabditis elegans*, and to explore its mechanism of action. UPLC-MS method was used to identify the components of *Astragalus membranaceus*. A high glucose model was established by using *Caenorhabditis elegans* as a model organism, and the effects of *Astragalus membranaceus* on body length, body bending, swallowing frequency, and reactive oxygen species (ROS) of the nematode were determined; the effects of

收稿日期: 2023-12-20; 修回日期: 2024-04-23.

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (81873165, 82074238); 中国中医科学院基础理论研究所自主选题 (YZX202208, YZX202210, YZX202316, YZX202328).

*通讯作者 Tel: 86-10-53911875, E-mail: hanjing8585@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1423

Astragalus membranaceus on the expression of mRNA of genes related to the protein skinhead-1 (*SKN-1*) signaling pathway were examined by using the real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The results showed that compared with the normal group, the nematode body length, body bending, and swallowing frequency expression were significantly reduced and the ROS content in the body was significantly increased in the high glucose state; after the administration of *Astragalus membranaceus*, the body length, body bending, and swallowing frequency expression were significantly increased, and the ROS content was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the normal group, *SKN-1*, superoxide dismutase-3 (*SOD-3*), glutathione S-transferase 4 (*GST-4*), and glutathione S-transferase 7 (*GST-7*) expression were significantly decreased in *Caenorhabditis elegans* in the high glucose condition; *SKN-1*, *SOD-3*, *GST-4*, and *GST-7* expression were significantly increased after administration of *Astragalus membranaceus* ($P < 0.01$). In the present study, we demonstrated that *Astragalus membranaceus* has an effect on high glucose-induced *Caenorhabditis elegans* nematodes, and its mechanism of action may be through the modulation of the *SKN-1* signaling pathway in order to ameliorate the oxidative stress response induced by high glucose.

Key words: *Astragalus membranaceus*; *Caenorhabditis elegans*; oxidative stress; protein skinhead-1; high glucose

糖尿病是一种以高血糖为特征的慢性代谢性疾病。流行病学数据表明,全球的糖尿病患者数量已经达到4.15亿^[1]。糖尿病并发症涉及血管、眼、肾和足,致残致死率高,严重危害机体健康和生活方式。糖尿病及其并发症的发生发展与氧化应激密切相关。氧化应激的产生来自于自由基的产生与抗氧化防御系统能力之间的不平衡^[2],若平衡被打破,则产生氧化应激反应,导致细胞、组织和器官的结构和功能损伤,从而损伤生物体的健康和生存^[3]。新近研究显示,他汀类药物、血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、噻唑烷二酮类等药物具有很强的细胞内抗氧化能力,用于防治糖尿病并发症^[4]。但这些药物不良反应多,存在局限性,因此,寻求药效高且毒副作用小的药物刻不容缓。

黄芪 (*Astragalus membranaceus*, AM) 又名黄耆,是豆科植物蒙古黄芪或膜黄芪干燥的根^[5]。研究发现黄芪具有抗氧化活性,可显著改善 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS 自由基的清除能力^[6]。另外,黄芪多糖提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 等抗氧化酶的水平,降低丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量,调节大鼠体内氧化应激反应;同时降低空腹血糖 (fasting blood glucose, FPG)、血清总胆固醇 (total serum cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 水平,从而影响糖脂代谢^[7]。黄芪甲苷可以通过抗氧化应激和激活钙蛋白酶-1 活性改善血管内皮功能障碍^[8]。黄芪的总黄酮类化合物通过清除超氧化物和羟基自由基,从而改善动脉粥样硬化^[9]。虽然黄芪及其有效部

位可以调节糖代谢,抑制氧化应激,但是黄芪在高糖环境中发挥抗氧化的机制尚未得到科学的阐释,严重限制其在防治糖尿病及其并发症的应用。

秀丽隐杆线虫是目前研究氧化应激的理想模型之一,它以大肠杆菌为食,身体呈透明状;生长周期通常分为 L1、L2、L3、L4 四个时期以及成虫期,生命周期短,生长迅速,培养简单,繁殖能力强,遗传途径完整且与人类有同源的基因;此外,线虫的氧化应激反应可通过探针可视化,而且高等动物体内的氧化应激反应、基本生理过程以及诸多重要通路在秀丽线虫模型内都有一定的体现^[10-13]。因此,本课题组采用葡萄糖诱导的秀丽隐杆线虫深入探讨黄芪的抗氧化作用。

本研究观察葡萄糖刺激后,线虫的体长、咽泵运动、生存率以及体内活性氧水平,并应用 qRT-PCR 实验揭示黄芪对 BZIP 结构域蛋白 1 (protein skinhead-1, *SKN-1*)、*SOD-3*、抗氧化基因谷胱甘肽 S-转移酶 4 (glutathione S-transferase 4, *GST-4*)、谷胱甘肽 S-转移酶 7 (glutathione S-transferase 7, *GST-7*) 基因表达的影响。本课题将为黄芪抗氧化的规律提供实验依据,为黄芪的二度开发奠定基础。

材料与方法

线虫及菌株 野生型秀丽隐杆线虫 N2; 转基因线虫 CF1553 (muls84 [(pAD76) sod-3::GFP]), 均为中国科学院遗传与发育生物学研究所惠赠。

主要试剂 胰蛋白酶 (3438287)、酵母提取物 (2495802)(赛默飞世尔 Oxoid 公司); 琼脂粉 (Solarbio 公司, 711A0217); 蛋白胨 (北京奥博星生物技术有限责任公司, 01-001); 胆固醇 (北京博奥拓达科技有限公

司, 180805); 磷酸二氢钾 (20210705)、磷酸二氢钠 (20210331)、无水硫酸镁 (20210112)(天津市光复科技发展有限公司); 氯化钠 (7647-14-5)、氢氧化钠 (1310-73-2)、无水氯化钙 (10043-52-4)(大茂化学试剂厂); 胡桃醌 (上海麦克林生化科技有限公司, H861192)。

主要仪器 电子天平 (德国赛多利斯公司, Sartorius BSA124S-CW); 荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司, D-LH/LC); 迷你离心机 (中国其林贝尔仪器制造有限公司, LX-300); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica, SP8)。

黄芪水提物的制备 称取黄芪饮片 50 g, 放置在圆底烧瓶内, 加 10 倍量去离子水煎煮 2 h, 用纱布过滤黄芪饮片, 重复上述步骤 2 次后, 合并滤液, 蒸发减压浓缩滤液为浸膏, 将盛放浸膏的蒸发皿放置于真空干燥箱内, 在 60 °C 下干燥 12 h, 将干燥后的黄芪水提物浸膏研磨为细粉状, 制成黄芪水提物粉末。

黄芪样品溶液的制备 取上述黄芪水提物粉末 (过 4 号筛) 约 1 g, 加入甲醇充分涡旋 30 s, 4 °C 静置 2 h, 15 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 摇匀, 即得。

含糖菌液的配制 向大肠杆菌内加入葡萄糖以构建高糖环境。将 19.800 mg 葡萄糖加入至 2 mL 大肠杆菌菌液内, 充分混合均匀后即配制成浓度为 50 mmol·L⁻¹ 含糖菌液。

含药菌液的配制 在无菌环境下培养秀丽隐杆线虫及 CF1553 线虫, 线虫通常以尿嘧啶缺陷型大肠杆菌为食物。给药前, 将黄芪水提物加至大肠杆菌菌液内配制成不同组别所需的浓度备用。

UPLC-MS 检测条件

色谱条件 色谱柱: 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~15.5 min, 8%~35% B; 15.5~32.5 min, 35%~95% B; 32.5~32.6 min, 95%~8% B; 32.6~35.6 min, 8% B); 体积流量 0.2 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C, 进样量 5 μL。

质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 正负离子模式; 数据采集模式: 全扫描和自动触发二级质谱扫描 (full MS/dd-MS2); 扫描范围为 *m/z* 100~1 500, 一级质谱分辨率 70 000, 二级质谱分辨率 17 500; 喷雾电压正负离子模式下分别为 3.8、3.0 kV; 碰撞能量 (CE) 为 20、35、60 eV; 脱溶剂气体温度正负离子模式下分别为 310、350 °C, 毛细管温度正负离子模式下分别为 320、350 °C。

线虫培养及传代 线虫通常放置于 22 °C 的恒温培养箱内培养。在无菌环境下, 将线虫接种于滴有大肠杆菌菌液的 NGM 培养基中培养, 将培养皿放置在

22 °C 的恒温培养箱内^[14]。

线虫同步化 取生长发育良好且正处于产卵期的成虫 NGM 培养基, 抽取适量的 M9 缓冲液冲洗 NGM 培养基, 尽量将 NGM 培养基上的线虫完全冲下来, 转移至 1.5 mL 灭菌的离心管内, 10 000 r·min⁻¹ 离心 90 s, 弃上清。加入 1 mL 线虫裂解液, 涡旋 4 min, 待虫体完全裂解且离心管内含有大量虫卵时, 终止涡旋, 10 000 r·min⁻¹ 离心 90 s, 弃上清。再加入 1 mL M9 缓冲液, 10 000 r·min⁻¹ 离心 90 s, 重复上述步骤 3 次以洗去裂解液。第三次离心后保留 100 μL 液体, 将含有虫卵的剩余液体转移至滴有大肠杆菌的 NGM 培养基上, 为避免污染, 应滴加在非大肠杆菌所在区域。放置于 22 °C 的恒温培养箱中培养约 36 h, 待其生长至 L4 时期即可开展后续实验^[15]。

黄芪对秀丽隐杆线虫身体长度的影响 将经过同步化处理且生长发育至 L4 时期的线虫分为不同组别, 每组线虫数量不少于 60 条, 给药 24 h 后, 收集线虫至 1.5 mL 离心管内, 10 000 r·min⁻¹ 离心 90 s, 离心弃上清, 加入 20 μL 麻药, 吹打均匀, 抽取线虫将其放置在载玻片上, 并用倒置显微镜仔细观察拍摄, 用 NIS-Elements 软件测量线虫的身体长度。

黄芪对秀丽隐杆线虫头部摆动的影响 将经过同步化处理且生长发育至 L4 时期的线虫移至各组。每组线虫数量不少于 10 条。给药 3 天后, 将线虫转至含有 M9 缓冲液但不含有大肠杆菌的空白培养基上。在观察线虫头部摆动前, 让线虫在 M9 缓冲液中适应性生存 1 min, 再使用显微镜仔细观察 20 s 内线虫的头部摆动次数并记录。线虫头部摆动的方向须以身体方向为基准, 视为一次摆动。

黄芪对秀丽隐杆线虫咽泵运动的影响 将经过同步化处理且生长发育至 L4 时期的线虫移至各组。每组线虫数量不少于 10 条。给药 5 天后, 将线虫转至不含有大肠杆菌的空白培养基上, 在显微镜下仔细观察 20 s 内线虫咽泵运动次数并记录。将线虫咽泵与头部上下移动 1 次视为 1 次运动。

黄芪对秀丽隐杆线虫 ROS 的影响 将经过同步化处理且生长发育至 L4 时期的线虫移至各组。每组线虫数量不少于 30 条。给药 4 天后, 用 M9 缓冲液冲洗收集各组线虫, 转移至 1.5 mL 离心管内, 10 000 r·min⁻¹ 离心 90 s, 弃上清, 避光向离心管内加入 50 μL 浓度为 100 μmol·L⁻¹ DCFH-DA 荧光探针, 于 37 °C 恒温箱内孵育 30 min, 用 M9 缓冲液冲洗 3 次后, 向离心管内加入 20 μL 麻药, 吹打均匀, 抽取线虫将其放置在载玻片上, 并用激光共聚焦显微镜仔细观察拍摄线虫体内的荧光成像情况, 荧光强度用 Image J 软件分析。

黄芪对线虫 SOD-3 的检测 将经过同步化处理的 CF1553 线虫的虫卵, 移至各组。每组线虫数量不少于 30 条。给药 3 天后, 收集线虫至 1.5 mL 离心管内, 10 000 r·min⁻¹ 离心 90 s, 弃上清, 向离心管内加入 20 μL 麻药, 吹打均匀, 抽取线虫, 将其放置在载玻片上, 用激光共聚焦显微镜仔细观察并拍照, 使用 Image J 软件分析线虫体内的荧光强度。

实时荧光定量 PCR 将经过同步化处理且生长发育至 L4 时期的线虫移至各组。每组线虫数量不少于 1 000 条。给药 4 天后, 用 M9 缓冲液冲洗线虫, 并转移至 1.5 mL 离心管内 10 000 r·min⁻¹, 离心 90 s, 弃上清, 收集至 1.5 mL 离心管内。Trizol 法提取组织总 RNA, 测得 RNA 的浓度, 参照逆转录试剂盒说明书以 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, 采用 PCR 仪检测基因表达, 2^{-ΔΔCT} 法计算相对基因表达量。各基因引物序列见表 1。

Table 1 The primers using for RT-qPCR analyses

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')
SKN-1	Forward primer	ACTCCCACCCGAATGTCACCT
	Reverse primer	GCCGTGTTGATCCACCTGTT
GST-4	Forward primer	TTTGATGCTCGTGCTCTTGC
	Reverse primer	GGAGTCGTTGGCTTCAGCTT
GST-7	Forward primer	GTCAGATCTTGGCCTACGCT
	Reverse primer	CCAAGTAACGGGCGATAGCA
SOD-3	Forward primer	TCTACTGCTCGCACTGCTTC
	Reverse primer	TGTTACAGTAGGTGGCATGA
β-Actin	Forward primer	AGGATCTATCCTCGCTCCC
	Reverse primer	TCCGTAAGGCAGATGACGTT

统计学分析 采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布者, 多组间比较采用方差分析, 方差齐组间两两比较采用 LSD 法, 方差不齐用 Tamhane 检验。非正态性分布者, 选择卡方检验 (Kruskal-Wallis test), 当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

Table 2 LC-MS data of *Astragalus membranaceus* chemical constituents

No.	Identification	Formula	Ion mode	Detected	Expected	MS/MS fragmentation (<i>m/z</i>)
1	Astragaloside I	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	869.482 7	869.489 3	689.426 9, 671.416 2, 653.405 8, 635.400 6, 473.361 5, 455.352 5, 437.341 9, 419.331 3, 157.048 9
2	Astragaloside III	C ₄₄ H ₈₆ O ₂₆	[M+H] ⁺	1 031.548 0	1 031.543 9	869.491 4, 437.342 0, 217.071 0
3	Astragaloside A	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	[M+H] ⁺	785.020 8	785.468 1	587.391 7, 569.382 4, 587.391 7, 473.362 3, 437.342 4, 419.330 8, 143.106 9, 125.096 4
4	Calycosin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.192 3	285.075 7	270.052 6, 253.049 5, 225.055 8, 214.062 1, 197.059 6, 137.023 7
5	Calycosin-7-glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	447.129 2	447.128 5	285.076 0, 270.052 5, 253.049 6
6	Ononin	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	429.125 9	429.118 0	256.133 4, 112.984 6, 269.081 1
7	formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.136 3	269.080 8	253.050 1, 237.055 0, 225.054 9, 197.060 3, 118.041 7
8	Isoastragaloside I	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	869.667 9	869.489 3	689.431 2, 671.420 1, 653.405 1, 473.362 2

结果

1 黄芪的质量控制研究

采用 UPLC-MS 技术, 以 0.1% 甲酸溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 并采用 ESI 离子源, 分别在正、负离子模式进行全扫描和二级质谱扫描, 获得化合物的一级和二级质谱数据, 结合文献报道对黄芪进行分析鉴定。鉴定出黄芪中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、芒柄花素、异黄芪皂苷 I 8 种化合物 (表 2)。

2 黄芪对秀丽隐杆线虫身体长度的影响

实验结果表明 (图 1), 与对照组相比, 模型组秀丽隐杆线虫体长显著缩短 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 5、10 和 20 mg·mL⁻¹ 黄芪给药组均能显著增加秀丽隐杆线虫的体长 ($P < 0.001$)。由此可见, 黄芪对秀丽隐杆线虫的生长发育具有明显的改善作用。

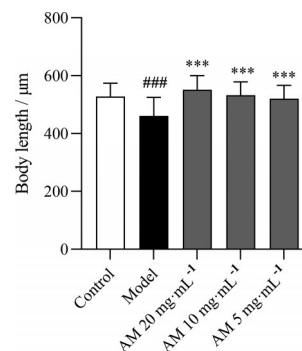


Figure 1 Effect of *Astragalus membranaceus* (AM) on the body length of *C. elegans*. $n = 60$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control; *** $P < 0.001$ vs model

3 秀丽隐杆线虫头部摆动的影响

实验结果表明 (图 2), 与对照组相比, 模型组秀丽隐杆线虫头部摆动显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 5、10 和 20 mg·mL⁻¹ 黄芪给药组均能显著提高秀丽

隐杆线虫的头部摆动频率 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。由此可见, 黄芪能有效延缓肌肉的萎缩退化, 提高其运动能力。

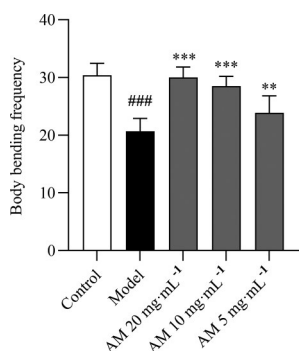


Figure 2 Effects of AM on body bending frequency of *C. elegans*. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

4 秀丽隐杆线虫咽泵的影响

咽泵运动次数是线虫实验常用的一种定量指标, 可以反映线虫的进食情况、基本运动能力和健康状况等。实验结果表明 (图3), 与对照组相比, 模型组秀丽隐杆线虫咽泵频率显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 5、10和20 mg·mL⁻¹黄芪给药组均能显著提高秀丽隐杆线虫的咽泵频率 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。由此表明, 黄芪干预后能增强线虫的运动和消化能力。

5 黄芪对秀丽隐杆线虫ROS的影响

实验结果表明 (图4), 与对照组相比, 模型组秀丽隐杆线虫ROS水平显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 10和20 mg·mL⁻¹黄芪给药组均能显著降低秀丽隐杆线虫的ROS水平 ($P < 0.01$)。这表明黄芪能有效降低线虫体内的ROS, 减缓ROS对线虫的损伤, 提高其生存能力。

6 黄芪对CF1553线虫SOD-3的影响

CF1553线虫是一种含有绿色荧光蛋白GFP融合SOD-3的转基因线虫, 实验结果表明 (图5), 与对照组

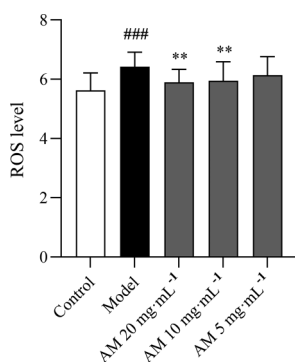


Figure 4 Effect of different concentrations of AM on the levels of reactive oxygen species (ROS) in *C. elegans*. Scale bar: 500 μm . $n = 30$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$ vs model

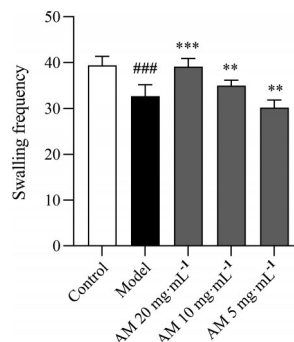


Figure 3 Effects of AM on swallowing frequency in *C. elegans*. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

相比, 模型组CF1553线虫荧光表达量显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 5、10和20 mg·mL⁻¹黄芪组均能显著提高CF1553线虫的荧光表达量 ($P < 0.001$)。由此可见, 黄芪显著提高SOD-3蛋白的表达, 从而减轻秀丽隐杆线虫的氧化损伤程度。

7 黄芪对SKN-1、GST-4、GST-7、SOD-3表达的影响

氧化应激是体内氧化和抗氧化作用失衡的一种状态, 体内的抗氧化系统会减少自由基产生的影响。实验结果表明 (图6), 与对照组相比, 模型组秀丽隐杆线虫的SKN-1表达显著降低 ($P < 0.05$), GST-4、GST-7和SOD-3表达亦显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 20 mg·mL⁻¹黄芪给药组能显著提高秀丽隐杆线虫的SKN-1表达 ($P < 0.01$); 10和20 mg·mL⁻¹黄芪给药组均能显著提高秀丽隐杆线虫GST-4和GST-7的表达 ($P < 0.001$); 5、10和20 mg·mL⁻¹的黄芪给药组均能显著提高秀丽隐杆线虫SOD-3的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。由此可见, 黄芪可能通过调控SKN-1信号通路以改善高糖对秀丽隐杆线虫的氧化损伤。

讨论

一定浓度的糖和脂质会促进线虫的生长发育, 长

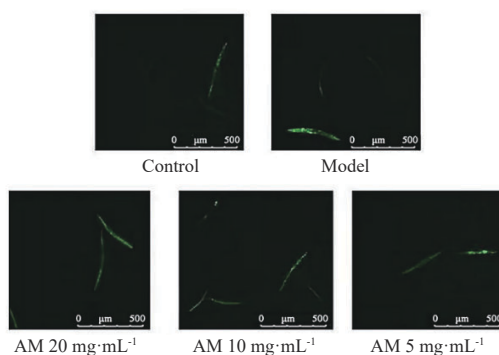


Figure 5 Effects of AM on SOD-3 expression in *C. elegans*. Scale bar: 500 μm . $n = 30$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$ vs model

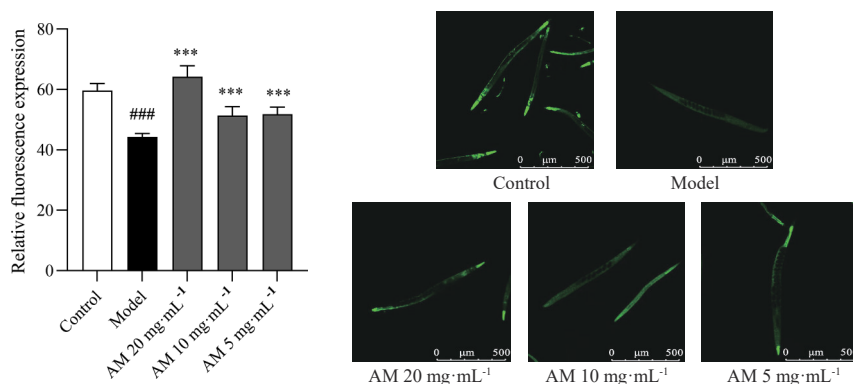


Figure 5 Effect of AM on the fluorescence expression of CF1553 nematodes. Scale bar: 500 μm . $n = 30$, $\bar{x} \pm s$. $###P < 0.001$ vs control; $***P < 0.001$ vs model

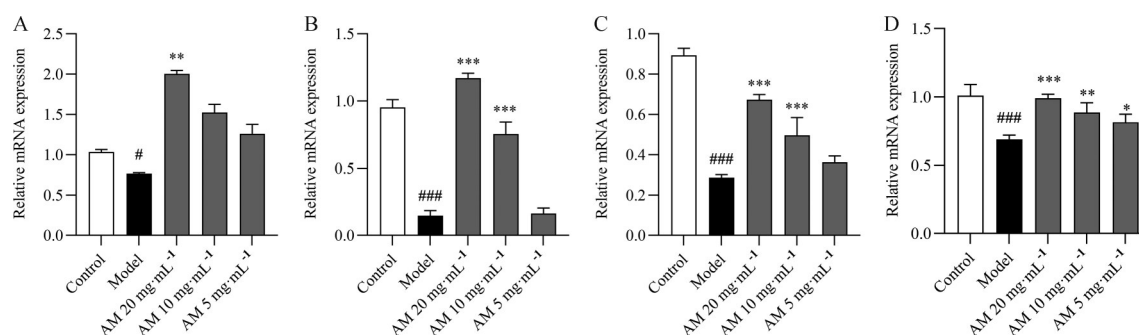


Figure 6 Effect of AM on the mRNA expression level of *C. elegans*. A: Protein skinhead-1 (*SKN-1*); B: Glutathione S-transferase 4 (*GST-4*); C: Glutathione S-transferase 7 (*GST-7*); D: Superoxide dismutase-3 (*SOD-3*). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $\#P < 0.05$, $###P < 0.001$ vs control; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs model

期过量的糖和脂质产生抑制作用。研究表明在线虫生存的培养基内加入葡萄糖建立高糖环境后, 线虫的寿命、体长和生殖能力都有显著的抑制, 同时线虫的 ROS 显著升高、MDA 含量降低、SOD 活性显著下降^[16,17]。此外, 线虫暴露于高葡萄糖浓度条件下时可以通过积累甲基乙二醛衍生的晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 和破坏线粒体功能来限制秀丽隐杆线虫的寿命^[18]。本课题采用高浓度葡萄糖培育秀丽隐杆线虫后, 与正常组相比, 高糖状态下线虫体长、头尾摆动、咽泵频率表达均显著降低, 氧自由基含量显著增加, 与文献报道一致。

SKN-1 (哺乳动物的 NRF1/2 同源基因) 是调节氧化应激所必需的通路之一^[19]。在秀丽隐杆线虫内, 抗氧化酶主要通过 *SKN-1* 调节^[20]。*GST-4*、*GST-7*、*SOD-3* 同属于 *SKN-1* 的下游靶基因。*GST-4*、*GST-7* 归属于谷胱甘肽 S-转移酶家族, 能够缓解细胞或者 DNA 的氧化损伤, 并催化 GSH 与环氧化物、卤代化合物的结合, 发挥抗氧化作用^[21]。SOD 是一种抗氧化金属酶, 能催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢, 该酶存在于秀丽线虫线粒体膜上, 具有清除线粒体内氧自由基的作用^[22]。研究表明, 高糖刺激的秀丽隐杆线虫体

内 *SKN-1* 的表达明显降低^[23]; 此外, 通过百草枯诱导秀丽隐杆线虫产生氧化应激反应, 可观察到 *SKN-1* 的表达水平明显降低^[24]; 胡桃醌和 H_2O_2 诱导的氧化应激实验中, *GST-4*、*GST-7*、*SOD-3* mRNA 的相对表达量均显著降低^[25,26]; 在自然衰老模型中, *SOD-3* 和 *SKN-1* 基因的表达下调^[27,28]。本课题采用高浓度葡萄糖培育秀丽隐杆线虫后, 检测线虫体内 *SOD-3* 以及 *GST-4* 的表达, 结果表明高糖组 *SKN-1*、*SOD-3*、*GST-4* mRNA 的表达显著下降^[29-31], 表明高糖在线虫体内抑制抗氧化酶及上游信号通路的表达。

研究表明在百草枯建立的线虫氧化应激损伤中, 黄芪显著延长线虫寿命^[32,33]。另外, 黄芪多糖可提高 SOD 活性, 抑制 ROS, 减少 MDA, 缓解秀丽隐杆线虫内的氧化应激反应^[34,35]。课题组发现在高糖环境中, 黄芪给药后线虫的体长、头尾摆动、咽泵频率表达均显著增加; 氧自由基含量显著降低, *SKN-1*、*SOD-3*、*GST-4*、*GST-7* 表达均显著增加。这表明黄芪无论在正常的环境中, 还是在高糖条件下, 均能提高线虫抗氧化能力, 提示黄芪可以缓解糖尿病中的氧化应激, 可能通过抗氧化改善糖尿病或糖尿病并发症。本文采用 UPLC-MS 技术对黄芪所含化合物进行定性分析, 发现黄芪有黄

芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、异黄芪皂苷 I、芒柄花素等 8 种化合物。文献报道, 毛蕊异黄酮明显降低线虫体内 ROS 的水平, 具有抗氧化能力^[36]。黄芪甲苷通过提高线虫体内 SOD 和过氧化氢酶的活性, 发挥抗氧化作用^[37]。文献提示, 毛蕊异黄酮与黄芪甲苷可能是黄芪抗氧化的活性成分, 但是本实验并未对此两种成分在葡萄糖环境中的药效进行确认, 而且未能深刻解析 *SKN-1* 通路在黄芪药效中发挥的核心作用。综上所述, 黄芪可能通过调控 *SKN-1* 信号通路提高线虫抗氧化能力, 降低 ROS 水平, 增强运动能力, 改善消化功能, 从而改善高糖诱导的损伤, 本实验为黄芪的深入研究奠定了理论和实验基础。

作者贡献: 杨美美负责实验设计及论文写作; 彭美中、马盼、牛艺婷、刘汉滢、胡腾月、籍宇星参与实验操作及数据分析收集; 郝改梅负责审核数据及论文指导; 韩静负责实验设计及修改论文。

利益冲突: 作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Wong TY, Sun J, Kawasaki R, et al. Guidelines on diabetic eye care: the International Council of Ophthalmology Recommendations for screening, follow-up, referral, and treatment based on resource settings [J]. *Ophthalmology*, 2018, 125: 1608-1622.
- [2] Liu S, Ju Y, Gu P. Experiment-based interventions to diabetic retinopathy: present and advances [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 7005.
- [3] Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress [J]. *Physiol Res*, 2010, 59: 459-469.
- [4] Liu W. Progression of antioxidant drugs in diabetic vascular complications [J]. *J Grad Sun Yat-Sen Univ (Nat Sci, Med)* (中山大学研究生学刊: 自然科学、医学版), 2007, 28: 17-23.
- [5] Jiang Y. Pharmacological effects of *Astragalus membranaceus* and its application in formula compounding [J]. *China Pract Med (中国实用医药)*, 2015, 10: 226-227.
- [6] Wu HW, Li DH, Song QJ, et al. Comparative study on chemical composition and *in vitro* anti-oxidant activity of *Astragali Radix* fresh-cut pieces and traditional pieces [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 7039-7047.
- [7] Liu XF, Feng J, Wang SJ, et al. Effects and mechanisms of *Astragalus* polysaccharide on oxidative stress and autophagy in diabetic nephropathy rats [J]. *J Shanxi Med Univ (山西医科大学学报)*, 2023, 54: 343-351.
- [8] Nie Q, Zhu L, Zhang L, et al. Astragaloside IV protects against hyperglycemia-induced vascular endothelial dysfunction by inhibiting oxidative stress and calpain-1 activation [J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116662.
- [9] Wang D, Zhuang Y, Tian Y, et al. Study of the effects of total flavonoids of *Astragalus* on atherosclerosis formation and potential mechanisms [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 282383.
- [10] Nigon VM, Félix MA. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms [J]. *WormBook*, 2017, 2017: 1-84.
- [11] Watts JL, Ristow M. Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2017, 207: 413-446.
- [12] Petersen C, Dirksen P, Schulenburg H. Why we need more ecology for genetic models such as *C. elegans* [J]. *Trends Genet*, 2015, 31: 120-127.
- [13] Jia XH, Cao C. *Caenorhabditis elegans*: a powerful tool for drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 687-694.
- [14] Lv ZY, Meng J, Sun CX, et al. Effect of Goji Berries (*Lycium barbarum*) on lifespan and spawning of *Caenorhabditis elegans* and its antioxidant capacity [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2019, 40: 183-188.
- [15] Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1 [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e8758.
- [16] Wang X, Zhang L, Wang W, et al. Effects of excess sugars and lipids on the growth and development of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genes Nutr*, 2020, 15: 1.
- [17] Yan F, Chen X, Zheng X. Protective effect of mulberry fruit anthocyanin on human hepatocyte cells (LO2) and *Caenorhabditis elegans* under hyperglycemic conditions [J]. *Food Res Int*, 2017, 102: 213-224.
- [18] Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, et al. *C. elegans* as model for the study of high glucose mediated life span reduction [J]. *Diabetes*, 2009, 58: 2450-2456.
- [19] Walker AK, See R, Batchelder C, et al. A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *Caenorhabditis elegans* SKN-1 and Cap'n/Collar related basic leucine zipper proteins [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 22166-22171.
- [20] An JH, Blackwell TK. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 1882-1893.
- [21] Yan F, Chen Y, Azat R, et al. Mulberry anthocyanin extract ameliorates oxidative damage in HepG2 cells and prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through MAPK and Nrf2 pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 7956158.
- [22] Guan SW, Huang L, Luo J, et al. Model of rapid aging based on RNAi-mediated gene silencing of *sod-3* expression in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Jilin Univ (Sci Ed)* (吉林大学学报(理学版)), 2007, 45: 676-680.
- [23] Blackwell TK, Bowerman B, Priess JR, et al. Formation of a monomeric DNA binding domain by SKN-1 bZIP and homeodomain elements [J]. *Science*, 1994, 266: 621-628.
- [24] Park S, Park SK. Anti-oxidant and anti-aging effects of phlorizin

- are mediated by DAF-16-induced stress response and autophagy in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Antioxidants* (Basel), 2022, 11: 1996.
- [25] Shi TT, Luo SJ, Liang FY, et al. Extract of Korean pine seed protects against β -amyloid toxicity in an Alzheimer disease model of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2019, 28: 996-1000.
- [26] Zhao JP, Wu LM, Lu XN, et al. Study on the effects of *Atractylodes macrocephala* ethanol extract on life span of *Cryptobacterium elegans* and its mechanism [J]. *China Pharm* (中国药房), 2021, 32: 418-424.
- [27] Zhang SY, Bai XY, Qiao JH, et al. Study on the lifespan and antioxidant effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on *Caenorhabditis* [J]. *J Food Safety Quality* (食品安全质量检测学报), 2022, 13: 4689-4697.
- [28] Pang XX, Yang J, Yang HL, et al. Anti-aging and mechanism of 2-*O*-cinnamic acid magnolol [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2023, 58: 3321-3329.
- [29] Leite NR, de Araújo LCA, Dos Santos da Rocha P, et al. Baru Pulp (*Dipteryx alata* Vogel): fruit from the Brazilian Savanna protects against oxidative stress and increases the life expectancy of *Caenorhabditis elegans* via SOD-3 and DAF-16 [J]. *Biomolecules*, 2020, 10: 1106.
- [30] Shi YC, Liao VH, Pan TM. Monascin from red mold dioscorea as a novel antidiabetic and antioxidative stress agent in rats and *Caenorhabditis elegans* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52: 109-117.
- [31] Hu Q, Liu Z, Guo Y, et al. Antioxidant capacity of flavonoids from *Folium Artemisiae Argyi* and the molecular mechanism in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114398.
- [32] Zhang WY. Cognitive Characteristics of Qi Deficiency Mild Cognitive Impairment and the Effect of Qi Supplementing Traditional Chinese Medicine on Longevity of *Caenorhabditis elegans* under Oxidative Stress (气虚型轻度认知障碍认知特点及补气中药对氧化应激秀丽隐杆线虫寿命影响研究)[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2023.
- [33] Zhang XL. Preliminary Study on the Anti-aging Effect of Tonic Medicine by *Caenorhabditis elegans* (以秀丽隐杆线虫为模型初探补益药抗衰老作用)[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022.
- [34] Li H, Shi R, Ding F, et al. Astragalus polysaccharide suppresses 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 4856761.
- [35] Zhang H, Pan N, Xiong S, et al. Inhibition of polyglutamine-mediated proteotoxicity by *Astragalus membranaceus* polysaccharide through the DAF-16/FOXO transcription factor in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biochem J*, 2012, 441: 417-424.
- [36] Lu LL. The Effect of Calycosin on *Caenorhabditis elegans* Lifespan and Its Molecular Mechanism (毛蕊异黄酮对秀丽隐杆线虫寿命的影响及分子机制)[D]. Tianjin: Tianjin University, 2018.
- [37] Xue XL. Study on the Effect Mechanism of Astragaloside IV on Antiaging in *Caenorhabditis elegans* (在秀丽隐杆线虫中黄芪甲苷抗衰老的作用机制研究)[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019.