

牛乳源鞘磷脂对秀丽隐杆线虫生命近远期的抗氧化和抗衰老作用

袁玉莹^{1,2}, 赵军英², 张宇^{1,2}, 刘茜^{1,2}, 管志明², 蔡晓倩², 刘彦品^{1,2},
乔为仓², 陈历俊^{1,2*}

(¹东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030

²北京三元食品股份有限公司 国家母婴乳品健康工程技术研究中心 北京市乳品工程技术研究中心
母乳研究技术创新中心 北京 100163)

摘要 鞘磷脂(SM)是母乳中含量较高的极性脂之一,然而在生命早期摄入 SM 对婴幼儿近远期健康的作用尚不清晰。本文以秀丽隐杆线虫为模式生物,探究 SM 干预生命早期对其近远期的抗氧化和抗衰老作用。采用不同浓度牛乳源 SM 干预线虫 L1~L4 时期,研究 SM 对线虫生殖能力、寿命的影响。分析线虫 L4 时期及成年期的抗氧化应激能力和抗氧化酶活力,谷胱甘肽含量、丙二醛含量、脂褐素含量、活性氧(ROS)含量以及抗氧化和抗衰老相关基因表达,解析 SM 的作用机制。生殖实验显示,对幼年线虫补充质量浓度为 0.2 μg/mL(LG)和 20 μg/mL(HG)的乳源 SM 是安全的。与对照组(CG)相比,HG 组的平均寿命和最大寿命分别显著延长了 3.75 d 和 5.67 d,与幼虫和成虫 ROS 含量变化一致;干预后同时提高了幼虫和成虫的应激抵抗能力。在抗氧化酶方面,HG 组幼虫超氧化物歧化酶(SOD)酶活性($P<0.001$)、过氧化氢酶(CAT)酶活性($P<0.05$)和谷胱甘肽(GSH)含量($P<0.01$)均显著提高,且乳源 SM 能显著降低幼虫丙二醛(MDA)水平($P<0.001$)。在生命远期发展中,HG 组脂褐素含量降低($P<0.001$),SOD 酶活性($P<0.001$)和 CAT 酶活性($P<0.001$)显著提高,干预后均提高了 GSH 含量($P<0.001$),降低了 MDA 水平($P<0.001$)。此外,幼年补充乳源 SM 能上调幼虫 *sod-3*、*nsy-1* 基因,而成虫则通过上调 *sod-3*、*ctl-1*、*daf-16* 基因的相对表达来提高抗氧化和抗衰老能力。综上,线虫幼年期补充一定量的乳源 SM,可同时提升生命近远期抗氧化和抗衰老能力。

关键词 牛乳;鞘磷脂;秀丽隐杆线虫;抗氧化;抗衰老

文章编号 1009-7848(2026)01-0140-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.013

衰老是生物体在生物遗传、环境等各种内部和外界因素的影响下,随年龄增长而发生的结构和功能不可逆的退行性变化^[1]。如超氧化物、过氧化氢和羟基自由基在内的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),不断由氧气产生,并被体内的抗氧化系统清除,随着衰老,过量的 ROS 积累会对机体造成损伤。ROS 的产生和抗氧化系统之间的不平衡称为氧化应激,氧化应激的增加会对蛋白质、脂质、核酸等生物分子造成损害,并影响其它生物反应^[2-3]。健康寿命的延长能有效延缓衰老,降低与衰老有关的疾病的患病率^[4]。

鞘磷脂(Sphingomyelin, SM)是一种鞘脂成分,

由神经酰胺(Ceramide, Cer)(长链脂肪酸氨基与鞘氨醇脱水形成的酰胺化合物)和磷脂酰胆碱提供的磷酸胆碱头基组成,是哺乳动物乳中含量最高的极性脂之一^[5]。SM 是真核生物生物膜的组成成分之一,在参与细胞增殖和分化,细胞内、外信号转导,细胞自噬和细胞凋亡等方面均发挥重要作用^[6],广泛分布在质膜和细胞器膜中,在双层膜中呈现对称分布,能与胆固醇结合形成一种有序的结构域,称为“脂筏微域”,这种结构在维持生物膜刚性上发挥着重要作用^[7]。由于目前还没有系统揭示 SM 缺乏对健康的影响,因此 SM 不属于必需营养素的范畴^[8]。SM 的从头合成是从丝氨酸和棕榈酰辅酶 A 在内质网(Endoplasmic reticulum, ER)相关酶的作用下经过缩合、还原、酰化、去饱和,首先形成 Cer,新合成的 Cer 由 ER 转移到高尔基体后,在鞘磷脂合酶的作用下,催化 Cer 和磷脂酰胆碱转化形成 SM 和二酰甘油^[5,8]。当 SM 进入小肠后,大部分 SM 在鞘磷脂酶(Sphingomyelinase,

收稿日期: 2025-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272316);国家重点研发计划项目(2023YFF1104400);北京市家畜创新团队项目(BAIC05)

第一作者: 袁玉莹,女,硕士生

通信作者: 陈历俊 E-mail: chenlijun@sanyuan.com.cn

SMase)的作用下,首先被水解为 Cer 和磷酸胆碱^[9-10],因此 Cer 是 SM 合成和代谢的关键中间物质。有研究表明,SM 的丰度与包括秀丽隐杆线虫在内的几种生物体的寿命均相关,而 SM 的主要代谢物 Cer 也在线虫自噬、线粒体应激反应和运动等方面发挥重要作用^[11-12]。部分临床试验和动物实验表明,低浓度 SM 可以刺激细胞增殖和存活^[13]。此外,SM 是生命早期发育必不可少的关键鞘脂成分之一,具有促进早期大脑发育,肠道菌群建立,皮肤屏障完善等作用^[5]。有研究表明,使用含有 SM 的乳磷脂喂食无毛小鼠,能够有效降低紫外照射无毛小鼠体内的 ROS 水平,从而减少光老化对皮肤屏障的损害^[14]。然而,目前对于婴幼儿补充乳源 SM 是否能提高其抗氧化能力,以及对生命远期健康是否有效,还有待研究。

秀丽隐杆线虫具有体型小,生命周期短,繁殖能力强,实验培养简单等优点,且具有哺乳动物神经元功能和与衰老相关的多数信号家族,甚至表现出与哺乳动物类似的,与衰老相关的退行性变化^[15]。线虫体内的抗氧化和抗衰老作用,可以体现在多项生理指标的改善上^[16]。以秀丽隐杆线虫为动物模型,研究牛乳源 SM 在生命近远期的抗氧化和衰老方面作用是可行的。

本研究使用不同浓度牛乳源 SM 干预线虫 L1~L4 时期(幼虫期),测定其对线虫生殖能力、寿命,以及 L4 期和成年期抗氧化能力、脂褐素水平、ROS 水平、抗氧化酶、谷胱甘肽(GSH)含量、丙二醛(MDA)水平以及抗氧化和抗衰老相关基因表达等的影响,探究在线虫幼年补充乳源 SM 对其生命近远期抗氧化和抗衰老的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

秀丽隐杆线虫品系 N2(野生型),美国明尼苏达大学线虫中心(University of Minnesota Nematode Center, CGC)。

乳源 SM 标准品,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、GSH、MDA 试剂盒、ROS 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;RNA 提取试剂盒,山东思科捷生物技术有限公司;反转录试剂盒、SYBR

qPCR Master Mix 试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

SWE-FP 低温型研磨仪,武汉塞维尔生物科技有限公司;Applied Biosystems™ 7500 实时荧光定量 PCR 系统,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;全自动酶标仪 ID 3,美谷分子仪器(上海)有限公司;Leica DM I 8 倒置荧光显微镜,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 线虫培养和同期化 在标准线虫生长培养基(NGM)上培育秀丽隐杆线虫。在 NGM 平板上添加终浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-氟尿嘧啶制成 FNGM 平板,以抑制成虫期间卵的孵化。除非另有说明,所有实验均在 20 $^{\circ}\text{C}$ 无菌条件下进行。为了获得同步化的 L1 期幼虫,使用碱性次氯酸裂解液将成虫裂解,并将收集的卵在 M9 缓冲液中培养过夜,待多数卵孵化为 L1 幼虫后开始实验。

1.3.2 乳源 SM 干预线虫 将尿嘧啶缺陷型大肠杆菌(OP-50)单菌落接种在 LB 培养基中,摇床培养过夜后,离心、浓缩,备用。SM 标准品在使用前用无菌 M9 缓冲液配制为 2 mg/mL 的母液备用。将 SM 母液稀释后,分别与 OP-50 菌液混合,使 SM 终质量浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (LG),20 $\mu\text{g/mL}$ (HG),而后均匀涂抹在 NGM 培养基上,对照组(CG)仅涂抹 OP-50 菌液。涂布后将平板置于紫外灯下照射 30 min,使 OP-50 失活,防止 OP-50 活菌分解 SM 标准品。培养时将 L1 期线虫转移到不同组别培养基,干预至 L4 时期后,随机选取一部分线虫用于检测 L4 期指标,另一部分则转移到只含有灭活 OP-50 的 FNGM 平板上继续培养 3 d 至成虫,用于检测成虫时期指标。除特殊说明外,每组均为 3 个平行。

1.3.3 线虫生殖能力测定 在幼虫期补充 SM 至 L4 期。将 L4 期线虫转移到只含有灭活 OP-50 的 NGM 培养基中,每板 1 条线虫,每组 20 条,每 24 h 记录 1 次单只线虫产卵量,并将其转移到新板上,连续观察 6 d,记 L4 时期次日为成虫第 1 天。

1.3.4 线虫寿命测定 在幼虫期补充 SM 至 L4 期,将线虫转移到只含有灭活 OP-50 的 FNGM 中继续培养,每个培养皿 50 条线虫。在培养期间,每

24 h 记录 1 次皿中存活和死亡线虫的数量,直至线虫全部死亡,记 L4 时期当天为第 0 天。判定线虫死亡的标准是:线虫不运动,咽泵不活动,对挑虫针轻触无反应。

1.3.5 急性氧化应激能力测定 在 NGM 培养基中加入 0.03% 过氧化氢制成 ONGM 板。按照 1.3.2 节的方法培养线虫幼虫和成虫,随机选择 50 只线虫,转移至 ONGM 平板上,在 20 °C 恒温培养箱中培养,每小时观察 1 次线虫存活情况,直至线虫全部死亡。

1.3.6 ROS 测定 按照 1.3.2 节的方法培养线虫幼虫和成虫,使用 DCFH-DA 探针,测量线虫内源 ROS 水平。使用 M9 缓冲液将线虫冲洗干净,加入 10 μ L 稀释后的 DCFH-DA 探针混匀,20 °C 孵育 2 h。孵育结束后使用 M9 缓冲液清洗 3 次,除去剩余探针,将线虫整齐排列在 2% 琼脂糖垫上,使用 Leica DMI8 倒置荧光显微镜在 FITC 荧光检测条件下,检测线虫内源 ROS 含量。

1.3.7 脂褐素测定 按照 1.3.2 节的方法培养线虫幼虫和成虫,使用 NaN3 麻醉后,将其整齐固定在 2% 琼脂糖垫上,使用 Leica DMI8 倒置荧光显微镜测定线虫脂褐素水平。

1.3.8 抗氧化酶活性、GSH 和 MDA 水平的测定 按照 1.3.2 节的方法培养线虫幼虫和成虫,按照

SOD 试剂盒、CAT 试剂盒、GSH 试剂盒和 MDA 测定试剂盒说明书方法测定线虫 SOD 酶活性、CAT 酶活性、GSH 含量和 MDA 水平,并使用 BCA 试剂盒测定线虫总蛋白含量。SOD、CAT、GSH 和 MDA 的结果用总蛋白含量归一化,SOD、CAT 使用 U/mg prot 表示,GSH 使用 μ mol/g prot 表示,MDA 使用 nmol/mg prot 表示。

1.3.9 定量 PCR 分析基因表达 使用 SPARKeasy 试剂盒按照说明书方法提取线虫总 RNA。使用 HiScript IV RT SuperMix for qPCR 试剂盒获得互补 DNA:25 °C 5 min,42 °C 60 s 和 70 °C 5 min。使用 Applied Biosystems™ 7500 实时荧光定量 PCR 系统和 SYBR Green Super Mix 用于实时定量 PCR 分析,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因表达水平。用于实时荧光定量 PCR 的引物序列如表 1 所示, β -actin 为内参基因。

1.4 数据统计与分析

所有统计分析均使用 GraphPad Prism 10 进行分析。所有荧光图像均在 5 \times 倍放大倍数下拍摄,并使用 Image J 软件测量线虫的相对荧光强度。实验均重复 3 次,数据以 3 个独立实验的平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表示在统计学意义上差异显著。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used for qPCR

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(3'-5')
β -Actin	CCCCACTCAATCCAAAAGGCT	GTACGTCGGAAAGCGTAGAG
sod-3	TTCAAAGGAGCTGATGGACACT	AAGTGGGACCATTCTTCCAA
ctl-1	AATGGATACGGAGCGCATAC	TCCTGTCAGCACCATCTTG
daf-16	TGTCGTTTCATGCCAAGGGAG	GGAACCTTGAGCAGGCTTGA
skn-1	TAGCCGACGACGAAGAAGAGACC	ATTGGATTGAGGTGTTGGACGATGG
sir-2.1	ACTGAGATGCTCCATGACAATAAG	GCAAGACGAACCACACGAAC
nsy-1	AGCGGCTCGATCAACAAGAA	CCCATTCCACCGATATGCCA
sod-1	CGTAGGCGATCTAGGAAATGTG	AACAACCATAGATCGGCCAACC

2 结果与分析

2.1 乳源 SM 对线虫生殖能力的影响

线虫的后代数量稳定,幼虫数量和子宫内受精卵数量可以用来评价线虫的生殖能力。研究发现线虫生殖缺陷的诱导与氧化应激有关,且线虫

寿命的长短可能与生殖能力呈反比^[17-18]。目前,线虫广泛用于生殖毒性研究,因此首先评估线虫的生殖能力,可以确定乳源 SM 是否会对线虫产生毒性影响^[19]。如图 1 所示,线虫在成虫 1~3 d 为产卵高峰期,且在成虫第 2 天达到产卵峰值,与 CG

组相比,不同浓度乳源 SM 干预线虫幼虫期对线虫总产卵量(图 1a)和单日产卵量均无影响(图

1b)。综上,乳源 SM 不会对线虫产生生殖毒性。

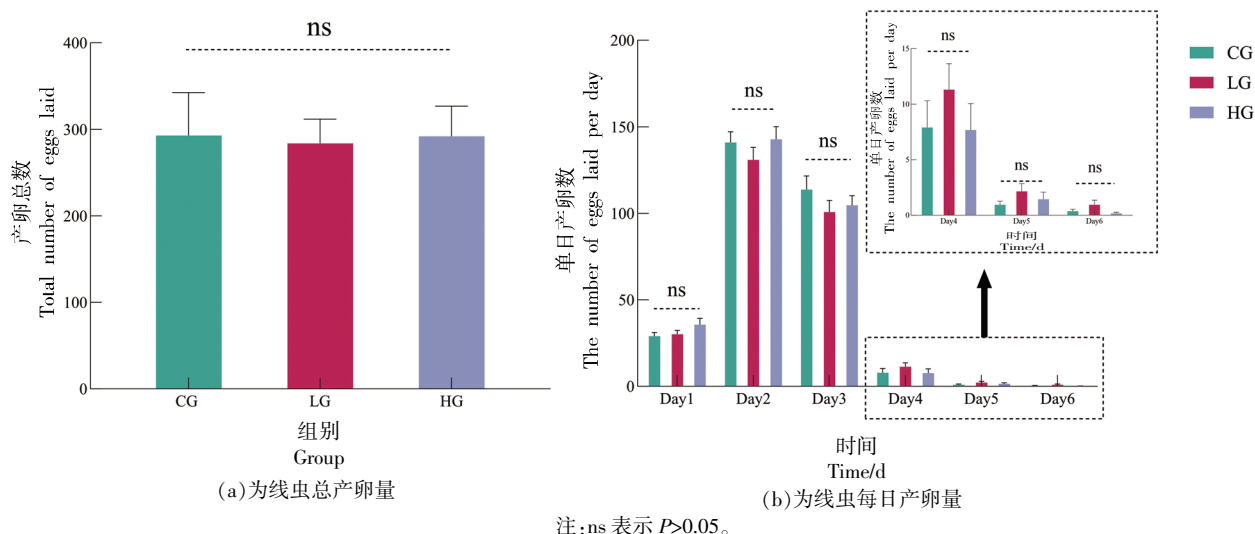


图 1 不同浓度乳源 SM 对线虫生殖能力的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of milk SM on reproductive ability of *C. elegans*

2.2 乳源 SM 对线虫寿命的影响

为研究乳源 SM 在线虫寿命中的作用,采用经典寿命实验通过生存分析比较 CG 组和 LG 组、HG 组的寿命。结果显示,不同浓度乳源 SM 对线

虫的中位寿命均无显著影响,而 HG 组的最大寿命和平均寿命与 CG 组相比均显著延长,分别延长了 5.67 d 和 3.75 d。表明高浓度乳源 SM 具有延长线虫最大寿命和平均寿命的潜力。

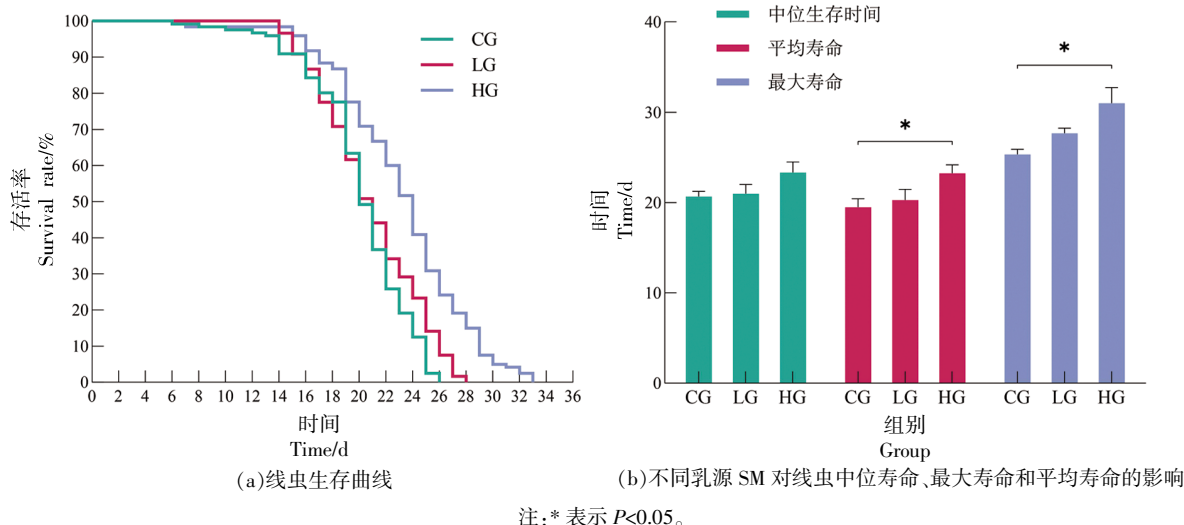


图 2 不同浓度乳源 SM 对线虫寿命的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of milk SM on longevity of *C. elegans*

2.3 乳源 SM 对 L4 期和成年线虫氧化应激能力的影响

为探究线虫幼年期喂养乳源 SM 是否能增强

线虫幼年以及成年后的抗氧化能力,将不同组别的 L4 期线虫和成年线虫分别转移到 ONGM 平板上,观察 L4 期线虫(图 3a)和成年期线虫(图 3b)

的抗氧化能力。与 CG 组相比,喂食乳源 SM 的 L4 期线虫和成年线虫生长曲线均右移,证明乳源 SM 能一定程度上提高线虫的抗氧化应激能力,且这

种效果能够延续到成年。其中,HG 组对提高线虫的抗氧化效果最为有效,幼虫和成虫的存活时间分别提高 100%和 62.5%。

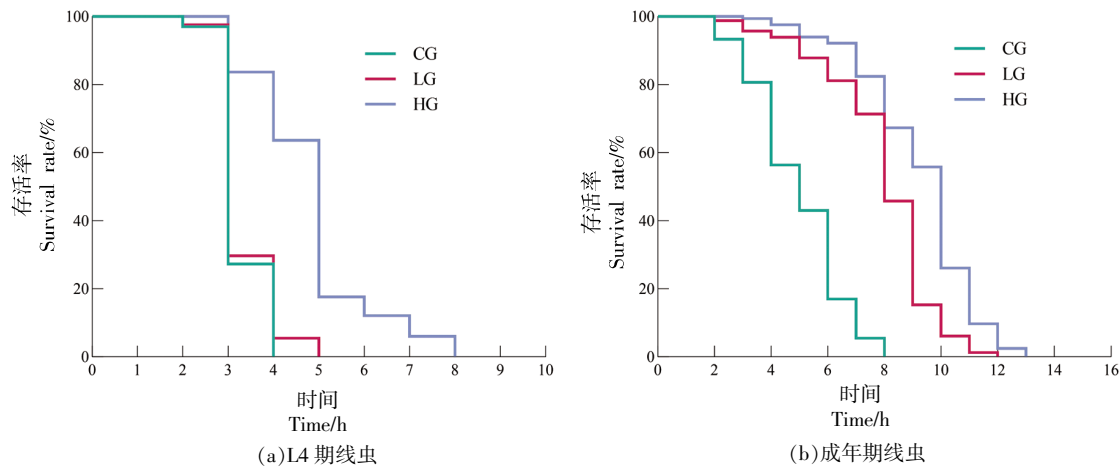


图 3 不同浓度乳源 SM 对线虫氧化应激能力的影响
Fig.3 Effect of different concentrations of milk SM on oxidative stress of *C. elegans*

2.4 乳源 SM 对线虫生命近远期体内 ROS 的影响

喂食乳源 SM 后,HG 组幼虫和成虫体内 ROS 相对荧光含量与 CG 组相比显著下降,较 CG 组分别下降 3.30%和 1.63%(图 4、图 5)。说明,高浓度乳源 SM 干预幼年线虫后能显著降低线虫体内 ROS 的含量,且能将这种作用延续到成年。

2.5 乳源 SM 对线虫生命近远期体内脂褐素的影响

由图 6a 和图 7a 可知,幼年补充乳源 SM,对 L4 时期线虫脂褐素的相对荧光强度未产生显著

影响,而由图 6b 和图 7b 可知,HG 组成虫脂褐素相对荧光强度较 CG 组下降了 9.26%。说明幼年期补充高浓度乳源 SM 能减缓生命远期体内脂褐素的积累。

2.6 乳源 SM 对 L4 期和成年线虫体内抗氧化酶活性、GSH 和 MDA 水平的影响

抗氧化酶可以减少生物氧化损伤,并且可以防止过量 ROS 产生,在维持机体氧化和抗氧化平衡之间发挥重要作用^[20]。SOD 和 CAT 是机体中 2 个关键的抗氧化酶,可以阻断氧自由基造成的损害,并及时修复受损害的细胞^[21]。而 GSH 是好氧

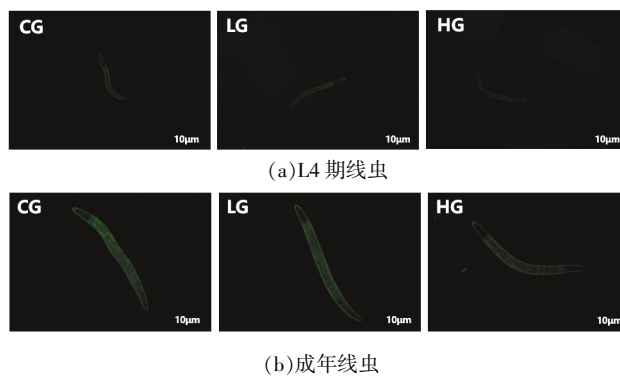


图 4 不同浓度乳源 SM 后线虫 ROS 积累荧光照片

Fig.4 ROS photos of *C. elegans* accumulation after different concentrations of milk SM

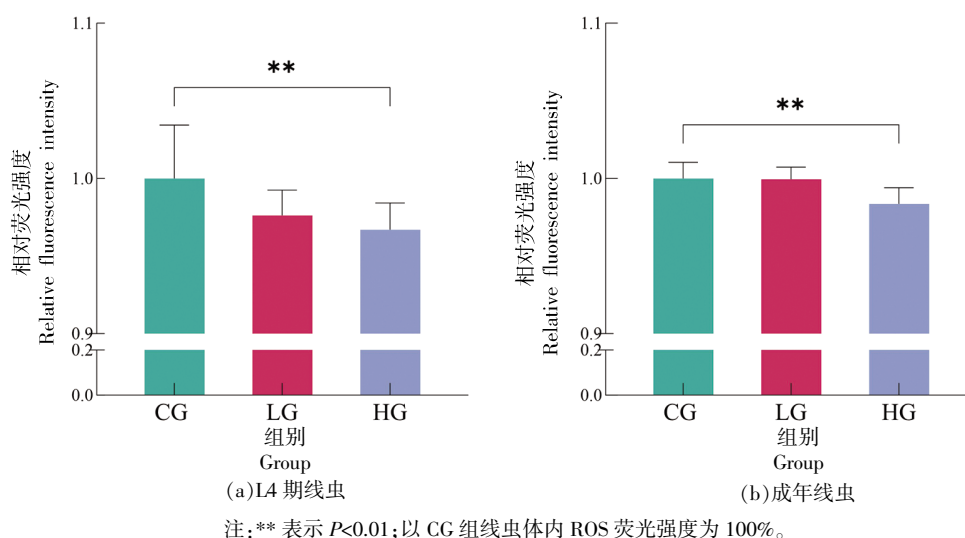


图 5 不同浓度乳源 SM 对线虫体内 ROS 的影响
Fig.5 Effect of different concentrations of milk SM on ROS in *C. elegans*

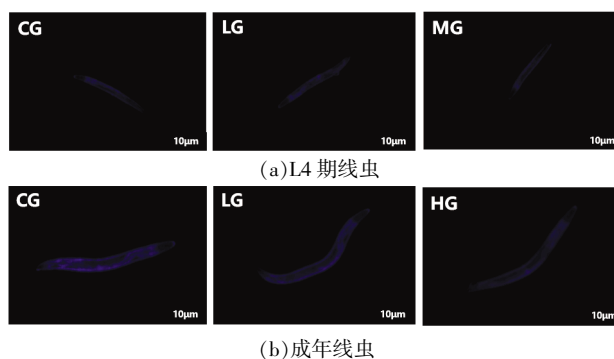


图 6 不同浓度乳源 SM 后线虫脂褐素积累荧光照片

Fig.6 Fluorescence photos of *C. elegans* accumulation after different concentrations of milk SM

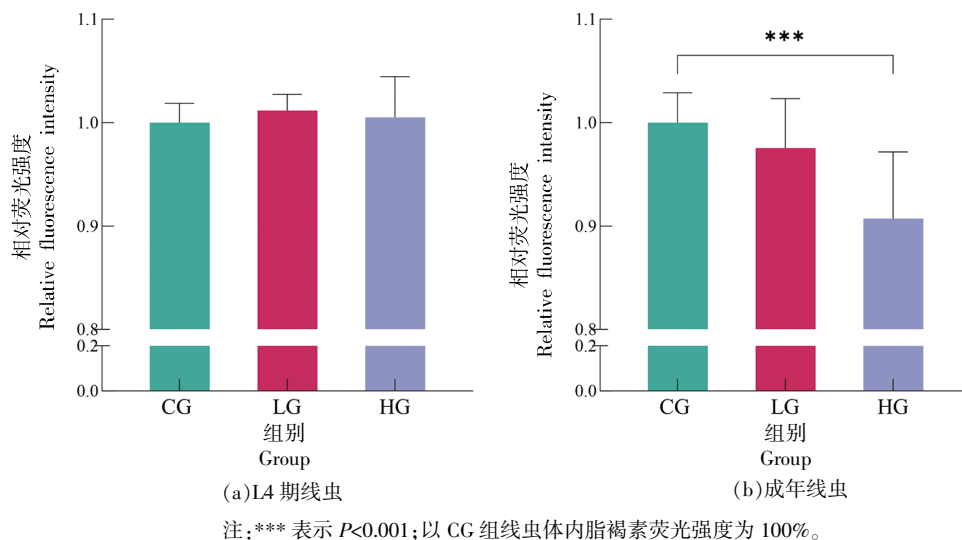


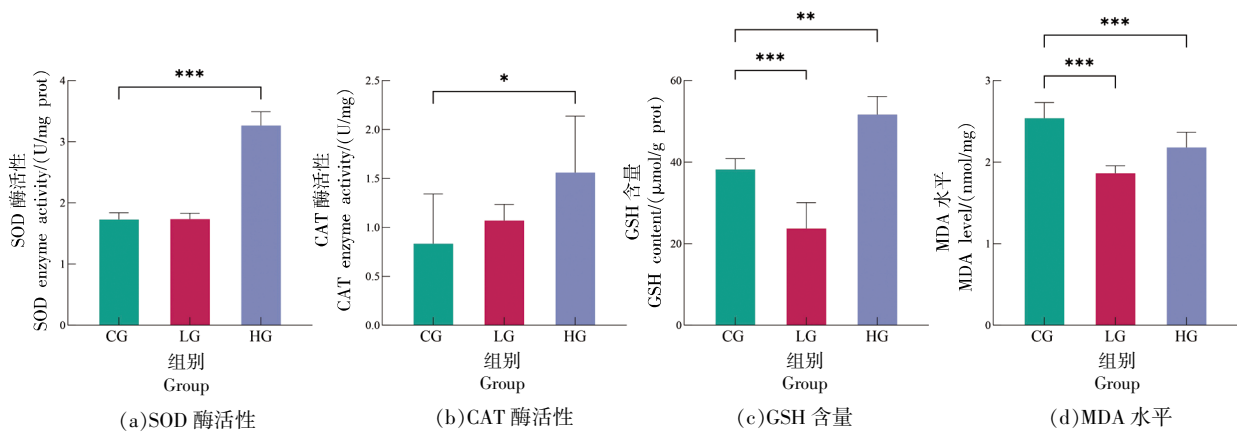
图 7 不同浓度乳源 SM 对线虫体内脂褐素的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of milk SM on lipofuscin fluorescence in *C. elegans*

细胞中最丰富的非酶抗氧化剂之一^[22]。MDA是自由基和脂质氧化的反应产物,会对细胞产生毒性,加重膜结构的损伤,因此也常作为抗衰老研究的重要指标^[20]。

由图 8a 可知, HG 组与 CG 组相比 SOD 酶活性和 CAT 酶活性分别显著提高了 88.9% 和 87.2%, 说明高浓度乳源 SM 干预能够在一定程度上提高 L4 期线虫的抗氧化酶活力。然而值得思考的是, 不同浓度乳源 SM 干预线虫对 GSH 含量的影响呈

相反的变化趋势, 低浓度乳源 SM 干预降低了 GSH 含量, 而高浓度干预, 则显著提高了机体 GSH 含量(图 8c)。在 MDA 方面(图 8d), LG 组和 HG 组都显著降低了 L4 期线虫体内 MDA 水平, 分别降低了 26.70% 和 16.46%。说明乳源 SM 干预剂量为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HG 组)时, 对提高 L4 期线虫的抗氧化能力最有帮助, 既提高了机体抗氧化酶活力和 GSH 含量, 也提高了清除自由基的能力。



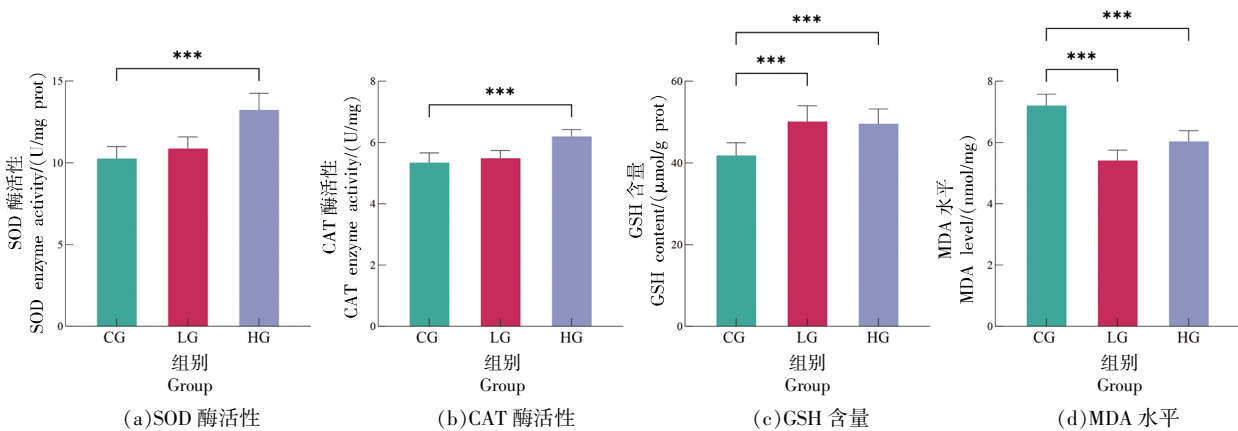
注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

图 8 不同浓度乳源 SM 对 L4 期线虫 SOD 酶活性、CAT 酶活性、GSH 含量和 MDA 水平的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of milk SM on SOD enzyme activity, CAT enzyme activity, GSH content and MDA level in L4 stage *C. elegans*

与幼虫相比, 成虫抗氧化酶活力大幅增强, 由图 9a、9b 可知, HG 组 SOD 酶活性和 CAT 酶活性显著提高, 分别较 CG 组上升 29.00% 和 18.71%。

由图 9c、9d 可知, 乳源 SM 干预幼虫后, 成虫体内 GSH 含量显著提高 ($P < 0.001$), 且 MDA 水平显著降低, 其中 LG 组和 HG 组 MDA 水平分别下降了



注: *** 表示 $P < 0.001$ 。

图 9 不同浓度乳源 SM 对成年线虫 SOD 酶活性、CAT 酶活性、GSH 含量和 MDA 水平的影响

Fig.9 Effect of different concentrations of milk SM on SOD enzyme activity, CAT enzyme activity, GSH content and MDA level in adult *C. elegans*

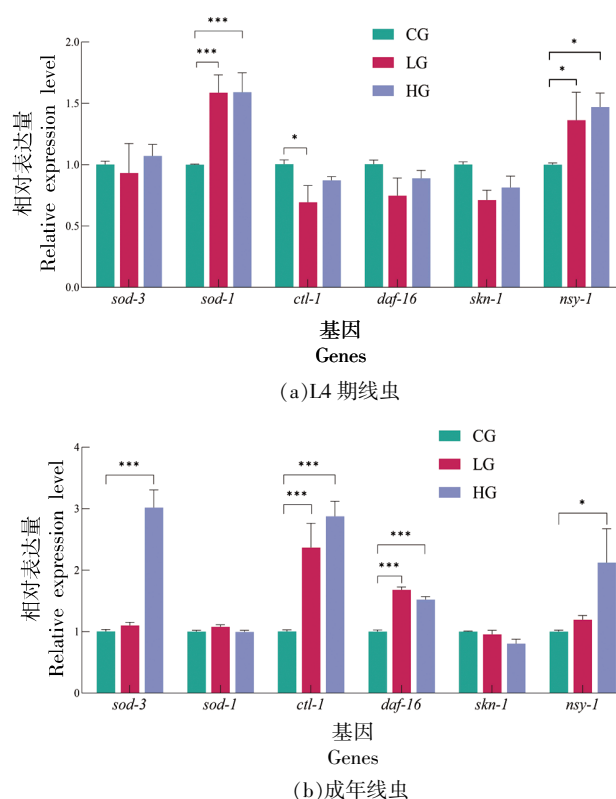
24.89%和 16.23%。综上所述,幼年期补充乳源 SM 不仅能提高幼虫的抗氧化能力,还可以提升生命远期的抗氧化能力。

2.7 乳源 SM 对线虫抗氧化和抗衰老基因表达的影响

有研究表明,秀丽隐杆线虫的多种信号通路,如胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路(Insulin/insulin-like growth factor-1 signaling,IIS)、热休克转录因子、丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinases,MAPK)、线粒体通路等,均可调控衰老和抗应激能力^[23]。*daf-16* 是哺乳动物 FOXO 转录因子的直系同源物,与 *skn-1* 都受 IIS 通路控制^[24],部分 *daf-16* 靶基因编码的蛋白质具有保护细胞免受氧化应激的功能^[25]。*sod-3* 与 *sod-1* 同属于超氧化物歧化酶家族,与 *ctl-1* 相同都是 *daf-16* 的下游基因^[15]。*skn-1* 是哺乳动物 Nrf 蛋白的直系同源物,也受 p38 MAPK 通路的调节^[26]。IIS 通路缺陷或 ROS 水平升高也可通过 *skn-1* 通路激发保守的 II 期解毒反应来对抗氧化应激^[24]。在氧化应激条件下,*nsy-1* 在 *nsy-1* 介导的氧化应激信号通路中起部分调节作用^[26]。

由图 10a 可知,在 L4 幼虫期,LG 和 HG 组的 *sod-1* 基因显著上调,SOD 家族基因编码体内 SOD 的形成,这与 HG 组幼虫体内 SOD 酶活性的变化是一致的。*daf-16* 和 *skn-1* 在 L4 时期幼虫体内的表达与 CG 组相比没有显著差异,而 LG 和 HG 组的 *nsy-1* 基因显著上调。说明乳源 SM 干预后,L4 期线虫通过上调 IIS 通路的 *sod-1* 基因和 p38 MAPK 通路的 *nsy-1* 基因,来提高线虫的抗氧化和抗衰老能力。

由图 10b 可知,乳源 SM 干预线虫幼虫后 HG 组成虫的 *sod-3* 基因显著上调 ($P<0.001$),这与 HG 组线虫体内 SOD 酶活性提高的结果一致,与幼年期不同的是 *sod-1* 基因没有显著变化。在 *ctl-1* 基因的表达上,与 CG 组相比,乳源 SM 干预后两者的 mRNA 相对表达量均显著提高,这与成虫体内 CAT 酶活性的变化一致,同时 *ctl-1* 的上游基因 *daf-16* 也显示出相似的变化。乳源 SM 干预后虽都上调了 *nsy-1* 基因在成虫中的表达,但仅有 HG 组表现出显著差异,而同属于 p38 MAPK 通路的 *skn-1* 则没有显著影响。综上所述,乳源



注:*表示 $P<0.05$,***表示 $P<0.001$,未标注为没有显著差异 $P>0.05$ 。

图 10 不同浓度乳源 SM 对线虫抗氧化和衰老相关基因表达的影响

Fig.10 Effects of different concentrations of milk SM on the expression of antioxidant and age-related genes in *C. elegans*

SM 干预幼虫后,通过上调胰岛素通路的 *daf-16*、*sod-3*、*ctl-1* 基因和 p38 MAPK 通路的 *nsy-1* 基因,来提高生命远期抗氧化和抗衰老能力。

3 讨论

本研究通过秀丽隐杆线虫模型发现,幼年期补充乳源 SM 可以在不影响线虫生殖能力的情况下,延长线虫的平均寿命和最长寿命,同时提高 L4 期线虫和成虫的抗氧化应激能力。在生理学上,ROS 水平升高导致的氧化应激积累是机体衰老的普遍特征^[27]。另外,脂褐素也是衰老的重要指标之一,是一种由错误折叠的蛋白质、脂质和金属离子形成的“不可降解”的色素^[28-29]。通过检测幼虫和成虫的 ROS 相对含量发现,乳源 SM 质量浓度

为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 幼虫和成虫体内 ROS 相对荧光强度和成虫体内脂褐素相对荧光强度显著降低。由 SOD 酶活性、CAT 酶活性、GSH 含量和 MDA 水平的变化可以推断, 补充高浓度乳源 SM 后, 幼虫通过提高抗氧化酶活性, 提高 GSH 含量和降低 MDA 水平, 来增强幼虫的抗氧化和抗衰老能力, 而低浓度干预对抗氧化酶活力没有显著影响。并且, 幼年补充高浓度乳源 SM 对成年线虫的抗氧化酶活力、GSH 含量和 MDA 水平的影响与幼虫一致, 低浓度干预下, 仅能提高生命远期 GSH 含量, 降低 MDA 水平。所以高浓度乳源 SM 干预生命早期, 可提高远期生命抗氧化酶活力和 GSH 含量。

SM 水平与 IIS 通路有关^[11], *skn-1* 和 *daf-16* 是 IIS 通路中 2 个重要的转录因子^[30]。乳源 SM 虽然没有对生命近远期 *skn-1* 的表达产生显著影响, 但是上调了成虫 *daf-16* 基因的表达。*sod-1*、*sod-3* 和 *ctl-1* 是 *daf-16* 的下游基因, 幼年补充乳源 SM 能够上调幼虫 *sod-1* 基因和成虫 *ctl-1* 基因的表达, 且在高浓度乳源 SM 干预下, 成虫的 *sod-3* 基因也显著上调。*nsy-1* 是 p38 MAPK 信号通路的重要转录因子, 在氧化应激条件下, *nsy-1* 充当由 *skn-1* 介导的氧化应激信号通路的部分调节因子, 喂食乳源 SM 后, 提高了幼虫 *nsy-1* 基因的表达, 然而仅在高剂量乳源 SM 干预下, 才能显著上调 *nsy-1* 基因的表达。

当 SM 进入小肠后, SM 会首先在 SMase 的作用下分解成 Cer, 被小肠吸收后部分 Cer 重新转化为 SM 或其它高级鞘脂, 或继续行使 Cer 的生物学功能^[5]。所以, Cer 是鞘脂代谢的重要中间产物之一, 在线虫自噬和应激反应方面都发挥重要作用^[11]。已有研究证明, 激活细胞膜表面中性鞘磷脂酶活性以促进 SM 水解, 可以控制细胞的增殖和凋亡^[31]。在一项对成年人、老年人和百岁老人血脂图谱的研究发现, 老年人体内的 Cer 大部分通过从头合成路径产生, 而 SMase 在百岁老人的血脂中增加, 表明百岁老人能够激活衰老保护机制, 可以直接水解 SM 来获得 Cer^[32]。Song 等^[33]的研究发现, 使用 Cer 含量丰富的海红米糠喂养线虫, 有效延长了线虫的寿命, 提高了线虫急性抗氧化应激能力, 有效逆转了由百草枯和过氧化氢给线虫带

来的不利影响。而神经酰胺合酶(*hyl-2*)能够利用鞘氨醇合成 Cer。已有研究证明, *hyl-2* 突变的线虫与野生型相比寿命更短, 且抗氧化应激能力差^[11]。因此, 幼年时期补充乳源 SM 对远期生命的影响, 可能是通过上调 SMase 活性, 优化 Cer 产生路径, 进而改变体内 Cer 水平而产生。

综上所述, 本实验使用牛乳源 SM 干预线虫幼虫, 不仅能有效提高幼虫的抗氧化和抗衰老能力, 也能对生命远期的抗氧化和抗衰老作用产生有利影响。主要通过提高抗氧化酶活力和调节 IIS 通路相关基因实现。研究结果为生命早期牛乳源 SM 的营养摄入提供了科学支撑, 后续可通过大动物和临床队列循证生命早期 SM 摄入对近远期的健康作用与机制, 进而为婴幼儿食品中 SM 的标准与法规制定提供科学数据和理论支撑。

参 考 文 献

- [1] ZOU Y X, QIN X Y, WANG W L, et al. Anti-aging effect of *Hemerocallis citrina* Baroni polysaccharide-rich extract on *Caenorhabditis elegans*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(1): 655.
- [2] YOKOYAMA I, SETOYAMA O, JIA Y, et al. Effects of the dipeptides comprising leucine and lysine on lifespan and age-related stress in *Caenorhabditis elegans*[J]. Food Science & Nutrition, 2023, 11(6): 2776-2786.
- [3] YOKOYAMA I, SETOYAMA O, URAKAWA A, et al. Lysine-glucose Maillard reaction products promote longevity and stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* via the insulin/IGF-1 signaling pathway [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104750.
- [4] WU Y, YANG J J, XU C M, et al. Sea cucumber (*Acaudina leucoprocta*) peptides extended the lifespan and enhanced antioxidant capacity via DAF-16/DAF-2/SOD-3/OLD-1/PEPT-1 in *Caenorhabditis elegans*[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9(9): 1065145.
- [5] YUAN Y Y, ZHAO J Y, LIU Q, et al. Human milk sphingomyelin: Function, metabolism, composition and mimicking [J]. Food Chemistry, 2024, 447: 138991.

- [6] JIANG C Y, CHEONG L Z, ZHANG X, et al. Dietary sphingomyelin metabolism and roles in gut health and cognitive development [J]. *Advances in Nutrition*, 2022, 13(2): 474–491.
- [7] HU Y S, WEN H Y, LIU M Y, et al. In situ quantitative imaging of plasma membrane stiffness in live cells using a genetically encoded FRET sensor [J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(21): 8501–8509.
- [8] YANG F, CHEN G X. The nutritional functions of dietary sphingomyelin and its applications in food [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1002574.
- [9] LI W X, BELWAL T, LI L, et al. Sphingolipids in foodstuff: Compositions, distribution, digestion, metabolism and health effects – A comprehensive review [J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110566.
- [10] OHLSSON L, HERTERVIG E, JÖNSSON B A, et al. Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2010, 91 (3): 672–678.
- [11] STAAB T A, MCINTYRE G, WANG L, et al. The lipidomes of *C. elegans* with mutations in *asm-3*/acid sphingomyelinase and *hyl-2*/ceramide synthase show distinct lipid profiles during aging [J]. *Aging*, 2023, 15(3): 650–674.
- [12] KIM Y, SUN H. ASM-3 acid sphingomyelinase functions as a positive regulator of the DAF-2/AGE-1 signaling pathway and serves as a novel anti-aging target [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45890.
- [13] CUTLER R G, MATTSON M P. Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2001, 122(9): 895–908.
- [14] AHN Y, KIM M G, JO K, et al. Effects of sphingomyelin-containing milk phospholipids on skin hydration in UVB-exposed hairless mice [J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2545.
- [15] WANG L X, QIAO P, OUYANG Z E, et al. Ginseng volatile oil prolongs the lifespan and healthspan of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biogerontology*, 2022, 23(4): 485–497.
- [16] LIN Y G, LIN C X, CAO Y, et al. *Caenorhabditis elegans* as an *in vivo* model for the identification of natural antioxidants with anti-aging actions [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 167: 115594.
- [17] ZHANG H D, LIU T T, SONG X L, et al. Study on the reproductive toxicity and mechanism of tri-*n*-butyl phosphate (TnBP) in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 227: 112896.
- [18] 王赛男, 陈丹妮, 胡克坚, 等. 穆子总黄酮成分及其对秀丽隐杆线虫的抗衰老作用 [J]. *食品科学*, 2024, 45(14): 94–102.
- WANG S N, CHEN D N, HU K J, et al. Flavonoid composition of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) and its anti-aging effect on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Food Science*, 2024, 45 (14): 94–102.
- [19] MENG K, SHI Y C, LI W X, et al. Testosterone mediates reproductive toxicity in *Caenorhabditis elegans* by affecting sex determination in germ cells through *nhr-69/mpk-1/fog-1/3* [J]. *Toxics*, 2024, 12 (7): 502.
- [20] GU J Y, LI Q W, LIU J, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Auricularia auricula* and effects of its acid hydrolysate on the biological function of *Caenorhabditis elegans* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 167: 423–433.
- [21] HUI H P, XIN A Y, CUI H Y, et al. Anti-aging effects on *Caenorhabditis elegans* of a polysaccharide, *O*-acetyl glucomannan, from roots of *Lilium davidii* var. *unicolor* cotton [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 846–852.
- [22] LIN C X, SU Z X, 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]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 143: 243–254.
- [23] ZHANG S Y, QIN Z C, SUN Y Y, et al. Genistein promotes anti-heat stress and antioxidant effects via the coordinated regulation of IIS, HSP, MAPK, DR, and mitochondrial pathways in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(1): 125.
- [24] AI L, LUO D, WANG H L, et al. Ameliorative effects of *Bifidobacterium longum* peptide-1 on benzo(α)pyrene induced oxidative damages via *daf-16* in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2023, 28(6): 909–920.

- [25] HONG J Q, SONG Y M, XIE J Y, et al. Acrolein promotes aging and oxidative stress via the stress response factor DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*[J]. Foods, 2022, 11(11): 1590.
- [26] HWANG M, SHRESTHA C, KANG S, et al. MEKK-3 acts cooperatively with NSY-1 in SKN-1-dependent manner against oxidative stress and aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. Biology, 2022, 11(10): 1526.
- [27] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases[J]. Clinical Interventions in Aging, 2018, 13: 757.
- [28] BONUCCELLI G, BROOKS D R, SHEPHERD S, et al. Antibiotics that target mitochondria extend lifespan in *C. elegans*[J]. Aging, 2023, 15(21): 11764-11781.
- [29] GUSAROV I, SHAMOVSKY I, PANI B, et al. Dietary thiols accelerate aging of *C. elegans*[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 4336.
- [30] 简沛仪, 冯铭希, 陈榕, 等. 南极磷虾磷脂体外抗氧化活性评价及对秀丽隐杆线虫抗衰老作用[J]. 食品科学, 2024, 45(15): 118-126.
- [31] JIAN P Y, FENG M X, CHEN R, et al. Antioxidant activity *in vitro* of Antarctic krill phospholipids and its anti-aging effect on *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science, 2024, 45(15): 118-126.
- [32] GAMAL M, TALLIMA H, AZZAZY H M E, et al. Impact of HepG2 cells glutathione depletion on neutral sphingomyelinases mRNA levels and activity[J]. Current issues in Molecular Biology, 2023, 45(6): 5005-5017.
- [33] BARBACINI P, TORRETTA E, AROSIO B, et al. Novel Insight into the serum sphingolipid fingerprint characterizing longevity [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2428.
- [34] SONG B B, WANG G, WANG Z, et al. Ceramides from sea red rice bran ameliorate oxidative stress and lifespan in *Caenorhabditis elegans* by activating the p38/MAPK signaling pathway and regulating the gut microbiota [J]. Journal of Functional Foods, 2024, 116: 106205.

The Antioxidant and Anti-aging Mechanisms of Bovine Milk Derived Sphingomyelin on the Short and Long Term of *Caenorhabditis elegans*

YUAN Yuying^{1,2}, ZHAO Junying², ZHANG Yu^{1,2}, LIU Qian^{1,2}, GUAN Zhiming², CAI Xiaoqian², LIU Yanpin^{1,2}, QIAO Weicang², CHEN Lijun^{1,2*}

¹College of Food Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030

²Beijing Sanyuan Food Co., Ltd., National Engineering Research Center of Dairy Health for Maternal and Child, Beijing Engineering Research Center of Dairy, Technical Innovation Center of Human Milk Research, Beijing 100163)

Abstract Sphingomyelin (SM) is one of the most abundant polar lipids in breast milk. However, the effects of SM intake in the early stage of life on the short-term and long-term health of infants and young children are unclear. This article takes *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as a model organism to explore the effects of sphingomyelin intervention in early life on short-term and long-term antioxidant and anti-aging effects. By analyzing the antioxidant stress capacity, antioxidant enzyme activity, glutathione content, malondialdehyde content, lipofuscin content, ROS content, antioxidant and anti-aging related gene expression during the L4 and adult stages of *C. elegans*, the mechanism of SM action was elucidated. Reproductive experiments have shown that supplementing milk source SM at concentrations of 0.2 μg/mL (LG) and 20 μg/mL (HG) during infancy is safe. Compared with the CG group, the average and maximum lifespans of the HG group were significantly prolonged, significantly prolonged by 3.75 days and 5.67 days respectively, consistent with changes in ROS levels in larvae and adults, and the stress resistance ability of both larvae and adults was improved. In terms of antioxidant enzymes, the activity of SOD enzyme activity ($P<0.001$) and CAT enzyme activity ($P<0.05$) and the GSH content ($P<0.01$) in HG group larvae were significantly increased, and milk derived SM could significantly reduce the content of MDA in larvae. In the long-term development of life, the content of lipofuscin in HG group decreased ($P<0.001$), and after intervention, the activity of SOD enzyme activity ($P<0.001$) and CAT enzyme activity ($P<0.001$)

was also significantly increased, and after intervention, both GSH content ($P<0.001$) and MDA level ($P<0.001$) were increased and decreased. In addition, supplementing with milk derived SM during infancy can upregulate the *sod-3* and *nsy-1* genes in larvae, while adults enhance their antioxidant and anti-aging abilities by upregulating the relative expression of *sod-3*, *ctl-1*, and *daf-16* genes. In summary, supplementing with a certain amount of bovine milk derived SM during childhood can simultaneously enhance antioxidant and anti-aging abilities in both the short and long term of life.

Keywords bovine milk; sphingomyelin; *Caenorhabditis elegans*; antioxidant; anti-aging