

利用秀丽线虫糖/脂损伤模型快速鉴定 4 种天然产物的修复功效

魏斯哈, 张雷, 汪雄, 王文利, 程智美, 王洁, 张雅丽*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要 高糖、高脂饮食会导致各种慢性代谢疾病。以野生型秀丽线虫 N2 为研究对象, 通过分别喂食 100 mmol/L 蔗糖和 100 $\mu\text{g/mL}$ 硬脂酸, 构建糖/脂损伤秀丽线虫模型。利用此模型分析日常膳食中的 4 种天然活性成分——胡椒碱、贝萼皂苷元、芍药色素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-芸香糖苷对糖/脂损伤线虫的修复作用。结果: 1) 对糖损伤线虫, 500 $\mu\text{g/mL}$ 胡椒碱和 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 天竺葵素-3-O-芸香糖苷有较好的修复作用, 产卵总量分别提高 25% 和 4.6%, 线虫第 4 天的身长分别提高了 16.84% 和 0.98%, 寿命分别延长了 8.1% 和 3.19%; 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 芍药色素-3-O-葡萄糖苷对其生殖能力和生长发育有较好的修复作用, 产卵总量提高了 55.81%, 而寿命缩短了 22.57%; 贝萼皂苷元具有显著的破坏作用。2) 对脂损伤线虫, 500 $\mu\text{g/mL}$ 胡椒碱、500 $\mu\text{g/mL}$ 贝萼皂苷元和 500 $\mu\text{g/mL}$ 芍药色素-3-O-葡萄糖苷均有一定修复作用, 子代总量分别提高 18.41%、13.41% 和 29.17%, 线虫第 3 天的身长分别提高 6.59%、3.19% 和 10.98%, 寿命分别延长 15.4%、2.84% 和 10.46%; 天竺葵素-3-O-芸香糖苷对其生殖能力和生长发育有较好的修复作用, 而不影响寿命。实验结果表明: 4 种天然产物对糖/脂损伤均有一定修复作用。此模型可作为快速鉴定天然产物对糖脂损伤修复作用的一种简单、可行的技术手段。

关键词 秀丽线虫; 天竺葵素-3-O-芸香糖苷; 胡椒碱; 糖/脂损伤模型; 修复

文章编号 1009-7848(2022)04-0104-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.04.011

长期的高糖、高脂饮食会导致血压、血脂异常, 增加患 2 型糖尿病的风险, 产生认知功能障碍^[1], 破坏男性的生殖能力, 还可能会使后代患慢性疾病^[2]。此外, 高糖、高脂膳食容易导致营养过剩, 进而引发肥胖。大量流行病学调查显示, 肥胖是心脑血管疾病、多种癌症(如乳腺癌、子宫内膜癌)、骨质疏松、骨关节炎等多种慢性疾病的重要诱因。调查报告表明, 目前世界上超重人口数量已经超过偏瘦人口数量, 而中国的肥胖人口已赶超美国, 列于首位^[3]。高 BMI 和高空腹血糖等代谢风险已成为伤残调整寿命年(Disability adjusted life year)升高的主要原因^[4]。寻找具有干预这些慢性代谢疾病的天然活性成分成为国内外研究的热点。

利用传统的小鼠、大鼠、猪等动物模型检测费时、费力, 还需有特定的动物房以及足够的经费, 而且难以进行大批量天然活性成分检测。本试验以秀丽线虫为模式动物, 秀丽线虫由于全基因组

序列已知, 超过 60% 的基因与人类疾病基因同源, 而且糖脂代谢途径的核心基因与高等生物在序列上极度保守, 与许多哺乳动物脂肪生成和脂解酶具有同源性等优点, 被广泛应用到肥胖和糖脂损伤等研究中。秀丽线虫的培养和操作简易的特点可以有助于在动物体内水平快速筛选大量有功效的天然产物, 缩短研究周期, 减少经费投入。

胡椒碱(Piperine)的结构见图 1a, 是存在于多种胡椒属植物果实中的一种生物碱, 为其辛辣味成分之一, 为胡椒中的主要活性物质。我国早在唐代就开始用胡椒来治疗癫痫症, 是国产植物类抗癫痫药伊来西胺片的主要成分, 也常被用来治疗惊厥症。现代医学研究发现胡椒碱具有抗肿瘤、抗氧化、镇静、降糖、降脂等多种药理活性。胡椒碱可以抑制由肥胖引起的炎症^[5], 给高热量饮食大鼠补充胡椒碱后, 可减轻血压异常情况, 改善葡萄糖耐量和主动脉环反应性, 降低血浆氧化应激和炎症参数, 减轻心脏和肝脏炎症细胞浸润和纤维化, 改善肝功能^[6]。静脉注射胡椒碱可以降低血压正常大鼠的平均动脉压, 且呈剂量依赖(1~10 mg/kg)^[7]。此外, 胡椒碱作为生物利用度增强剂, 可以提高很多具有降糖、降脂功效药物的生物利用度^[8]。

目前还没有贝萼皂苷元、芍药色素-3-O-葡

收稿日期: 2021-04-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972185)

作者简介: 魏斯哈(1996—), 女, 硕士生

通信作者: 张雅丽 E-mail: zhangyali@cau.edu.cn

葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-芸香糖苷对糖/脂损伤线虫修复机制的研究,而 3 种天然产物都具有潜在的降糖、降脂功效。贝萼皂苷元(Bayogenin)的结构见图 1b,属于五环三萜类物质。研究发现,贝萼皂苷元是一种中等强度的糖原磷酸化酶抑制剂,可以有效抑制糖原分解,降低血糖浓度^[9]。贝萼皂苷元是贝萼皂苷的组成部分,而贝萼皂苷是一种苜蓿皂苷^[10]。苜蓿是一种多年生豆科牧草,不仅可用于家畜饲养,也是一种历史悠久的食物,富含粗蛋白质、维生素和矿物质等成分,具有降血脂、清热解毒等功效。苜蓿皂苷是一种重要的活性物质,具有抗氧化、抗肿瘤,抑菌杀虫,调节脂类代谢,降胆固醇等多种药理作用^[11]。有研究^[12]发现苜蓿皂苷可以促进体内胆固醇的排出;还有研究^[13]发现苜蓿皂苷可降低动物及人类器官血浆胆固醇水平。

芍药色素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-芸香糖苷都是花色苷类化合物。芍药色素-3-O-葡萄糖苷的结构见图 1c。有研究报道芍药色素-3-O-葡萄糖苷具有消炎作用^[14]。紫小麦中芍药色素-3-O-葡萄糖苷占总花色苷的含量为 39.9%。另外,芍药色素-3-O-葡萄糖苷也是黑米的主要花色苷^[15]。有研究发现紫小麦的甲醇提取物能够延长野生型秀丽线虫和氧化应激敏感型 *mev-1* 突变体寿命^[16]。

天竺葵素-3-O-芸香糖苷的结构见图 1d。天竺葵素-3-O-芸香糖苷存在于多种水果中,如覆盆子、桑葚、樱桃、草莓^[17-19]。在草莓中其含量为 24.7~50.9 $\mu\text{g/g}$,占草莓总抗氧化活性的 8.3%^[20]。花色苷是花色素与糖以糖苷键连接而成的一类黄酮类物质,广泛存在于植物的果实、花、茎叶和根器官的细胞液中。有研究表明,花色苷是一种强抗氧化剂,具有降血脂^[21],减轻高脂饲喂小鼠体重^[22]等效果,其清除自由基的能力与环结构上的酚羟基有关,抗氧化能力受羟基化和糖基化的调节^[23]。

本试验中所研究的 4 种天然产物为胡椒碱、贝萼皂苷元、芍药色素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-芸香糖苷,以胡椒碱为对照,通过观察它们对糖/脂损伤秀丽线虫的生殖能力、生长发育、平均寿命 3 个生理指标的影响,判断其对糖/脂损伤秀丽线虫模型的修复作用。

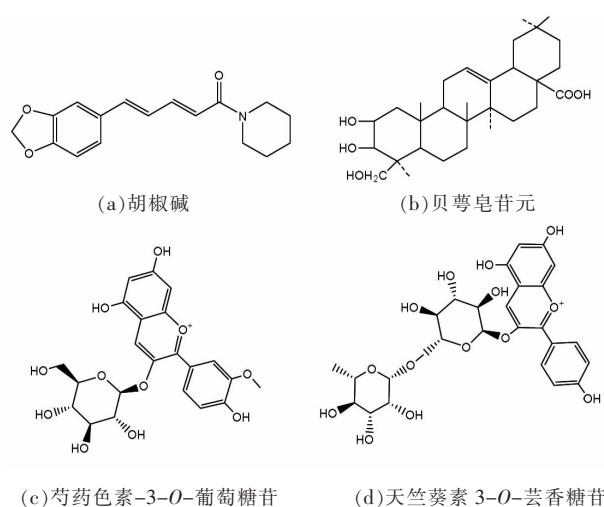


图 1 4 种天然产物结构图

Fig.1 Structure diagram of four natural products

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料与试剂 野生型秀丽线虫 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),以大肠杆菌(*Escherichia coli*)OP 50 为食物饲喂,在 22 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。

硬脂酸,北京索莱宝科技有限公司;蔗糖,北京蓝弋化工产品有限责任公司;贝萼皂苷元、芍药色素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-芸香糖苷,成都埃法生物;胡椒碱,北京百灵威科技有限公司;所有天然产物单体均为色谱纯级。

线虫培养基组成:3 g/L 氯化钠、2.5 g/L 胰蛋白胍、17 g/L 琼脂粉、1 mmol/L 硫酸镁、1 mmol/L 氯化钙、25 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)、5 mmol/L 胆固醇乙醇溶液。

含糖、含脂培养基的配制及活性成分的加入方法参照张林^[24]的试验方法。

1.1.2 仪器与设备 SZ66013ZL 型体视镜,重庆奥特光学仪器有限责任公司;DL-CJ-FND- Π 型超净台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;SHP-80 型生化培养箱,上海培因实验仪器有限公司;LPZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;THZ-C 恒温振荡箱,太仓市实验设备厂;电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;0.2 mm 铂金丝,北京六一仪器厂;一次性无菌

塑料平皿(35 mm),江苏海门市三和龙欣试验仪器总厂。

1.2 方法

1.2.1 秀丽线虫糖损伤模型构建 给野生型秀丽线虫喂食 100 mmol/L 蔗糖,观察其生殖能力、寿命和身体长度等生理指标,以子代数量明显减少而仍能完成生长发育为标准,选出合适剂量,构建糖损伤秀丽线虫模型。

1.2.2 秀丽线虫脂损伤模型构建 给野生型秀丽线虫喂食 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硬脂酸,观察其生殖能力、寿命和身体长度等生理指标,以子代数量明显减少而仍能完成生长发育为标准,选出合适剂量,构建脂损伤秀丽线虫模型。

1.2.3 实验分组及给药 以糖损伤秀丽线虫为对照组,贝萼皂苷元修复组(100 mmol/L 蔗糖+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝萼皂苷元);胡椒碱修复组(100 mmol/L 蔗糖+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胡椒碱);芍药色素-3-O-葡萄糖苷修复组(100 mmol/L 蔗糖+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药色素-3-O-葡萄糖苷);天竺葵素-3-O-芸香糖苷修复组(100 mmol/L 蔗糖+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 天竺葵素-3-O-芸香糖苷)。

以脂损伤秀丽线虫为对照组,贝萼皂苷元修复组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硬脂酸+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝萼皂苷元);胡椒碱修复组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硬脂酸+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胡椒碱);芍药色素-3-O-葡萄糖苷修复组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硬脂酸+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药色素-3-O-葡萄糖苷);天竺葵素-3-O-芸香糖苷修复组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硬脂酸+50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 天竺葵素-3-O-芸香糖苷)。

1.2.4 生殖能力的测定 线虫同期化当天记为第0天,约15 h后线虫由卵生长至L1期,挑取L1期幼虫至做过处理的NGM培养板上,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。每天将这条线虫转移到一个新培养基上,直到其不再产卵。每次转移后约12 h,清点旧培养基上后代的数量。最后合计该虫一生的产卵总量。每组10条线虫,重复3次^[25]。

1.2.5 身体长度的测定 在测定秀丽线虫生殖能力的同时,对每条秀丽线虫进行身体长度的测量,身体长度可以反映秀丽线虫的发育时期,了解不

同处理对秀丽线虫生长发育的影响。挑取实验处理后的同期化幼虫于做过处理的NGM培养板中,置于体式显微镜下,转动培养皿,使秀丽线虫的身体与标尺贴近并尽可能笔直,读取其身体长度为多少小格,按照标尺与实际长度的比例,计算得到秀丽线虫的身体长度。线虫同期化当天记为第0天,之后每隔24 h,记录线虫身体长度,直至第6天。每组10条线虫,重复3次^[25]。

1.2.6 寿命的测定 挑取L1期幼虫至NGM培养板上,每天将培养板中活着的秀丽线虫转移至相同的新平板中培养,记录每天存活的线虫数量,直至全部死亡。丢失的秀丽线虫、因爬到培养皿壁上而死亡的线虫应从统计中排除。每组20条线虫,重复3次^[25]。

1.2.7 数据统计分析 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

2.1 糖/脂损伤模型

野生型秀丽线虫喂食蔗糖或硬脂酸后其子代情况如图2所示。图2a为线虫食用蔗糖或硬脂酸后在不同时间的产卵量,图2b为线虫食用蔗糖或硬脂酸后整个产卵周期的子代总量。由图可知,喂食蔗糖和硬脂酸的线虫,产卵总量显著下降,表明100 mmol/L蔗糖和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硬脂酸显著破坏线虫的生殖能力。

野生型秀丽线虫喂食蔗糖或硬脂酸后的身体长度情况如图3所示。由图可知对照组线虫和喂食蔗糖或硬脂酸的线虫在生长期内,身长都呈现快速增长趋势,在第4天进入产卵期后线虫身长趋于稳定。喂食蔗糖和硬脂酸的线虫身长与对照组相比生长期受到显著抑制,然而随着时间的延长,仍能发育成成虫。

2.2 4种天然产物对糖损伤线虫的修复作用

2.2.1 4种天然产物对糖损伤线虫生殖能力的影响 4种天然产物对糖损伤线虫生殖能力的影响如图4所示。由图可知喂食50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的胡椒碱都可以显著提高糖损伤秀丽线虫的产卵

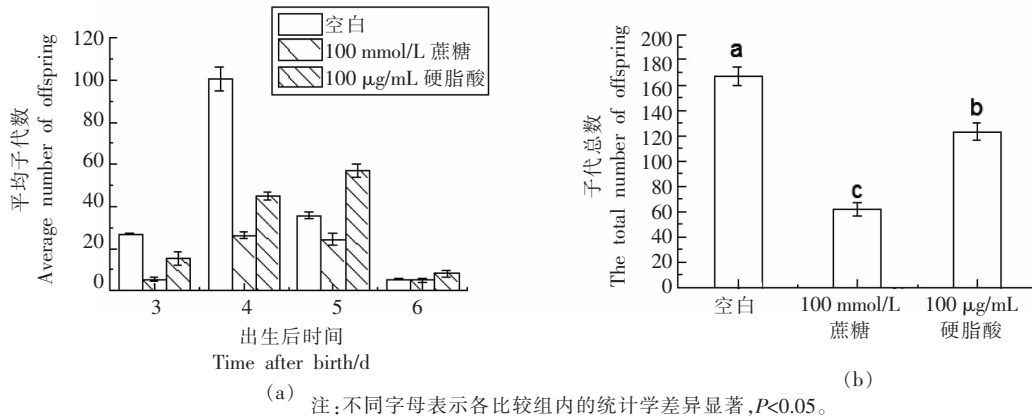


图 2 喂食蔗糖或硬脂酸的 N2 线虫产生子代情况

Fig.2 Subalgebra of N2 feeding by sucrose or stearic acid

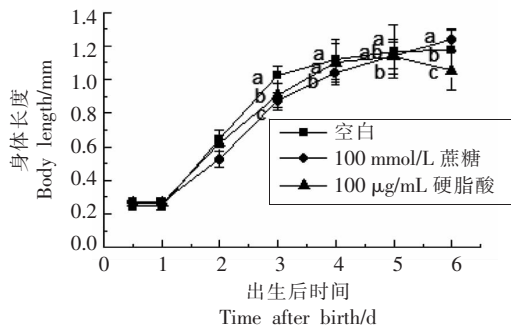
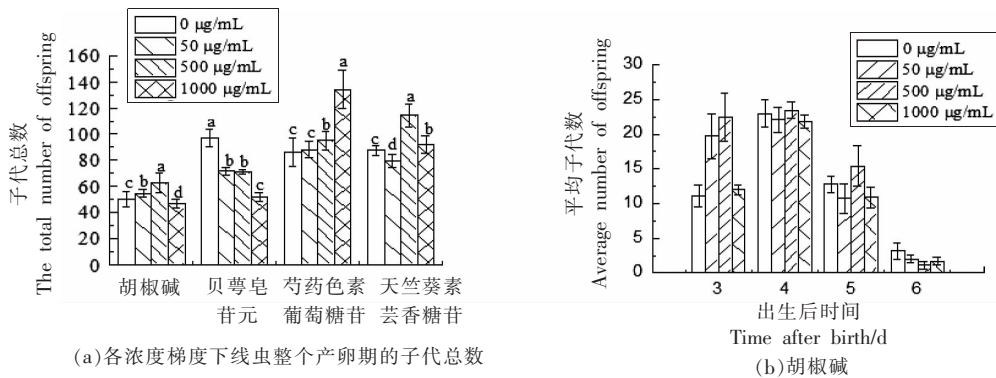


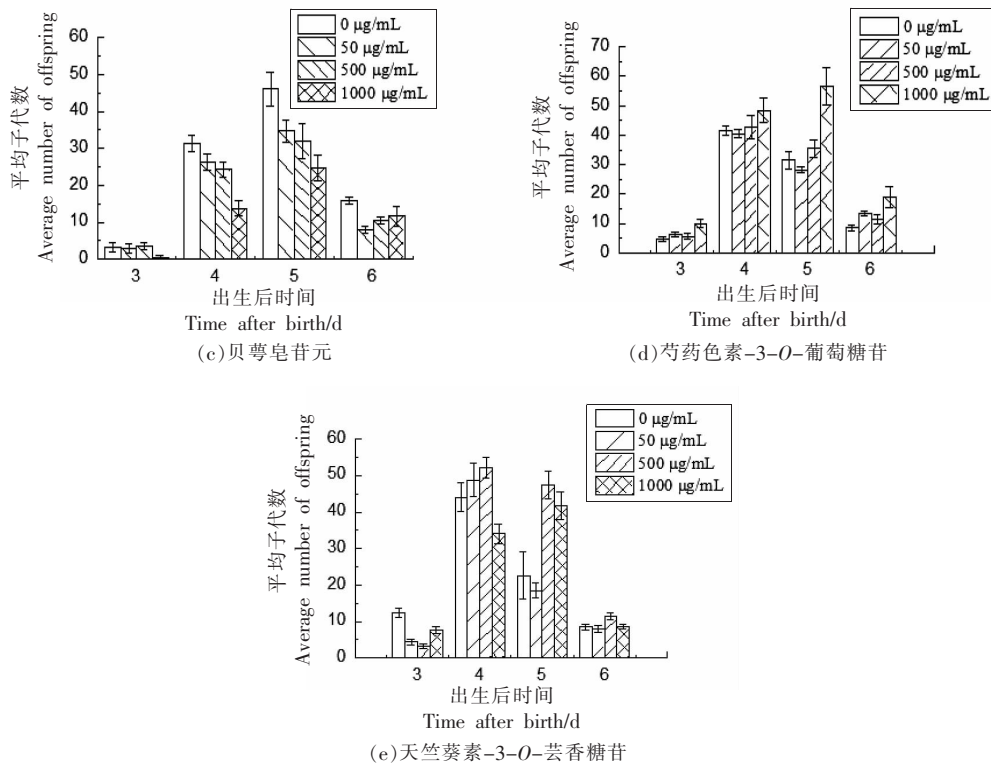
图 3 喂食蔗糖或硬脂酸的 N2 线虫身体长度

Fig.3 Body length of N2 feeding by sucrose or stearic acid

总量,与对照组相比,子代总量分别提高 9.04%和 25%,1 000 µg/mL 的胡椒碱可以显著降低糖损伤线虫产卵总量,与对照组相比降低 7.12%。喂食 50~1 000 µg/mL 范围内的贝萼皂苷元对糖损伤线

虫生殖能力均具有显著的破坏作用,其中喂食 1 000 µg/mL 贝萼皂苷元的破坏作用最强,其子代总量与糖损伤组相比降低 46.97%。喂食 50 µg/mL 以下的芍药色素-3-O-葡萄糖苷对线虫产卵总量无显著影响,喂食 500 µg/mL 和 1 000 µg/mL 芍药色素-3-O-葡萄糖苷的线虫产卵总量与对照组相比分别提高 2.33%和 55.81%。喂食 50 µg/mL 天竺葵素-3-O-芸香糖苷可以显著破坏糖损伤线虫的生殖能力,其子代总量与对照组相比降低 9.14%,与对照组相比,喂食 500 µg/mL 天竺葵素-3-O-芸香糖苷的线虫子代总量与糖损伤组相比提高 31.03%,喂食 1 000 µg/mL 天竺葵素-3-O-芸香糖苷的线虫子代总量与糖损伤组相比提高 4.6%。综上所述,除了贝萼皂苷元外,其它 3 种天然产物均对糖损伤秀丽线虫的生殖能力具有一定修复作用。





注:不同字母表示各比较组内的统计学差异显著, $P < 0.05$ 。

图4 4种天然产物对糖损伤N2线虫生殖能力的影响

Fig.4 Effects of four natural products on the reproductive capacity of sugar damaged N2

2.2.2 4种天然产物对糖损伤线虫身体长度的影响 4种天然产物对糖损伤线虫身体长度的影响,如表1和图5所示。喂食1000 µg/mL胡椒碱可以延缓糖损伤线虫在生长期的生长,在第4天和第5天,喂食胡椒碱可以显著提高糖损伤线虫的身长,在第4天,喂食500 µg/mL胡椒碱的线虫是对照组线虫身长的1.17倍,而不改变身长最大值。喂食贝萼皂苷元的线虫在生长期和产卵期的身长都显著低于糖损伤线虫,而且呈现剂量依赖,

喂食1000 µg/mL贝萼皂苷元的线虫在第3天的身长与对照组相比降低了12.36%。喂食芍药色素-3-O-葡萄糖苷不改变线虫在生长期和产卵期的身长,而在第6天,喂食芍药色素-3-O-葡萄糖苷的线虫身长继续增长,提高糖损伤线虫的身长最大值,如喂食50,500 µg/mL芍药色素-3-O-葡萄糖苷线虫的身长最大值约为对照组线虫身长最大值的1.08倍。喂食不同浓度天竺葵素-3-O-芸香糖苷可以显著提高糖损伤线虫在产卵初期的身

表1 4种天然产物对糖损伤N2线虫身体长度的影响(n=3)

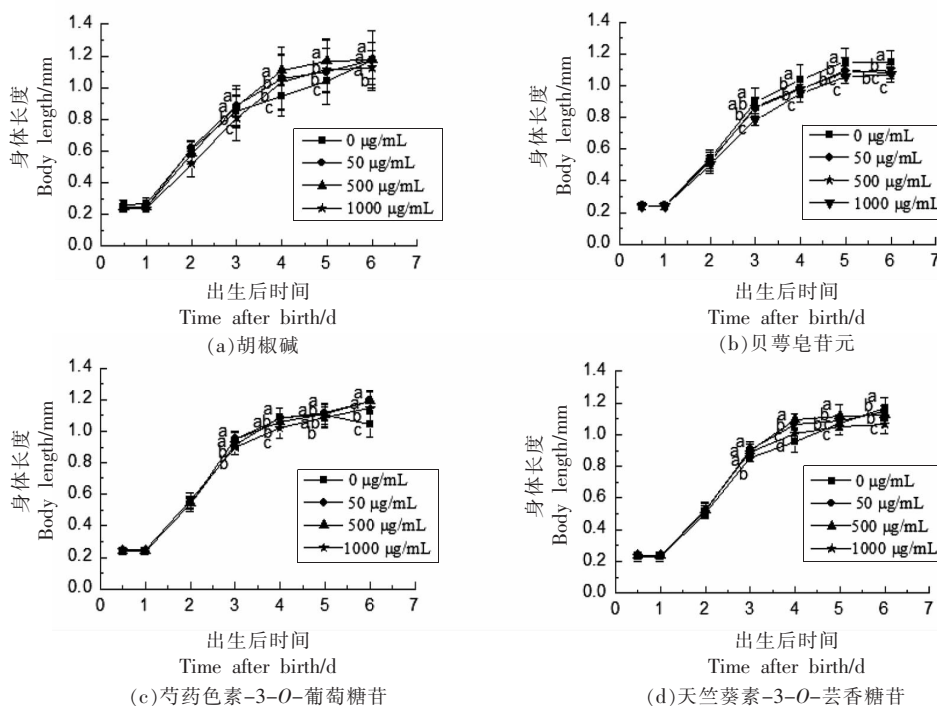
Table 1 Effects of four natural products on the mean body length of sugar damaged N2 (n=3)

质量浓度 梯度/ µg·mL ⁻¹	胡椒碱		贝萼皂苷元		芍药色素-3-O-葡萄糖苷		天竺葵素-3-O-芸香糖苷	
	身体长度/ mm	相对变化 率/%	身体长度/ mm	相对变化 率/%	身体长度/ mm	相对变化 率/%	身体长度/ mm	相对变化 率/%
0	0.95 ^c		1.04 ^a		1.09 ^a		1.02 ^d	
50	1.06 ^b	+11.58	0.98 ^b	-5.77	1.08 ^{ab}	-0.92	1.07 ^b	+4.9
500	1.11 ^a	+16.84	0.98 ^b	-5.77	1.06 ^b	-2.75	1.09 ^a	+6.86
1000	1.04 ^b	+9.47	0.95 ^c	-8.65	1.02 ^c	-6.42	1.03 ^c	+0.98

注:每列不同字母表示统计学差异显著, $P < 0.05$ 。选择线虫出生后第4天的身体长度作比较。

长, 其中喂食 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 天竺葵素-3-O-芸香糖苷的效果最显著。然而在第 6 天, 喂食天竺葵素-3-O-芸香糖苷线虫的身长显著低于对照组线虫,

而且呈现剂量依赖。综上所述, 除了贝萼皂苷元外, 其它 3 种天然产物均对糖损伤秀丽线虫的生长发育具有一定修复作用。



注: 不同字母表示各比较组内的统计学差异显著, $P < 0.05$ 。

图 5 4 种天然产物对糖损伤 N2 线虫身体长度的影响

Fig.5 Effects of four natural products on the body length of sugar damaged N2

2.2.3 4 种天然产物对糖损伤线虫寿命的影响

4 种天然产物对糖损伤线虫寿命的影响, 如表 2 和图 6 所示。糖损伤线虫平均寿命随着胡椒碱浓度的升高, 呈先上升后下降的趋势, 然而都显著高于对照组线虫, 其中喂食 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胡椒碱对糖损伤线虫平均寿命的修复作用最为显著, 较对照组上升 8.1%。喂食 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝萼皂苷元的线虫

的平均寿命与对照组无显著性差异, 喂食其它浓度的贝萼皂苷元线虫的平均寿命与对照组相比均显著降低。喂食 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药色素-3-O-葡萄糖苷的线虫平均寿命较对照组上升 1.88%, 然而与糖损伤组相比无显著差异, 高浓度的芍药色素-3-O-葡萄糖苷会加速秀丽线虫的衰老, 喂食 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药色素-3-O-葡萄糖苷的线虫平均寿命

表 2 4 种天然产物对糖损伤 N2 线虫平均寿命的影响 ($n=3$)

Table 2 Effects of four natural products on the mean life span of sugar damaged N2 ($n=3$)

质量浓度 梯度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	胡椒碱		贝萼皂苷元		芍药色素-3-O-葡萄糖苷		天竺葵素-3-O-芸香糖苷	
	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%
0	7.65 ^d		9.63 ^a		9.04 ^a		8.14 ^b	
50	7.97 ^b	+4.18	9.59 ^b	-0.42	9.21 ^a	+1.88	7.10 ^c	-12.77
500	8.27 ^a	+8.1	9.63 ^a	-0.03	7.67 ^b	-15.15	8.02 ^b	-1.47
1 000	7.74 ^c	+1.18	9.49 ^c	-1.45	7 ^c	-22.57	8.4 ^a	+3.19

注: 每列不同字母表示统计学差异显著, $P < 0.05$ 。

与对照组相比降低 22.57%。与对照组相比,喂食 50,500 $\mu\text{g/mL}$ 天竺葵素-3-O-芸香糖苷的线虫平均寿命分别降低 12.77%,1.47%, 喂食 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 天竺葵素-3-O-芸香糖苷的线虫平均寿命提高 3.19%,说明低浓度天竺葵素-3-O-芸香糖苷对糖损伤线虫的平均寿命无修复作用,反而会加速

衰老,而高浓度天竺葵素-3-O-芸香糖苷可以显著延缓糖损伤线虫的衰老。综上所述,贝萼皂苷元和芍药色素-3-O-葡萄糖苷对糖损伤线虫的寿命具有破坏作用,而胡椒碱和天竺葵素-3-O-芸香糖苷具有一定的修复作用。

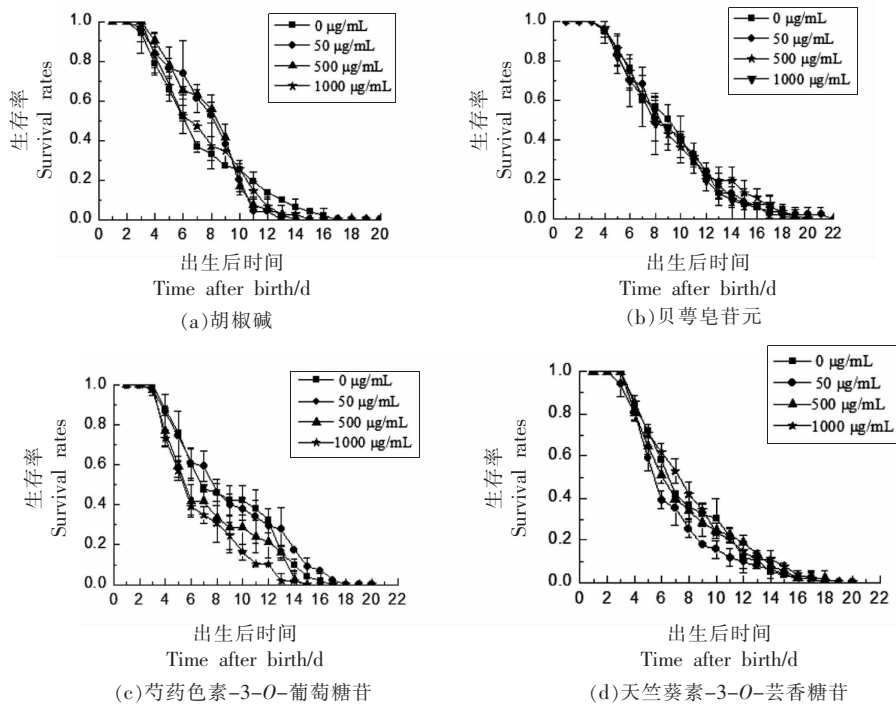


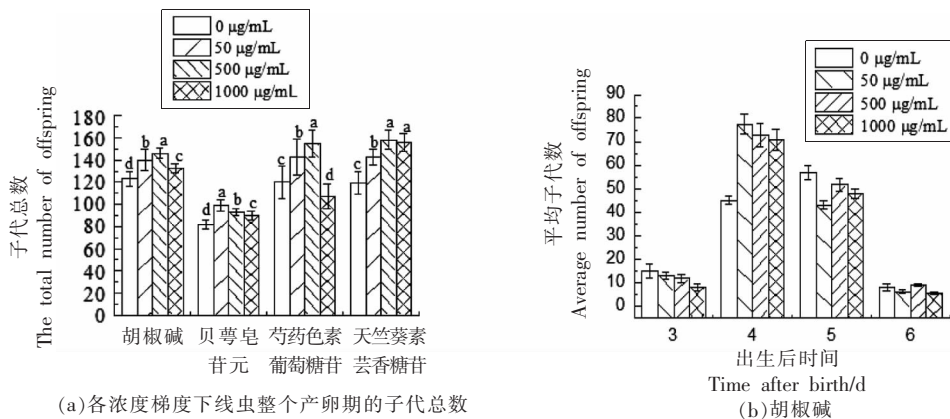
图 6 4 种天然产物对糖损伤 N2 线虫生存率的影响

Fig.6 Effects of four natural products on the survival curve of sugar damaged N2

2.3 4 种天然产物对脂损伤线虫的修复作用

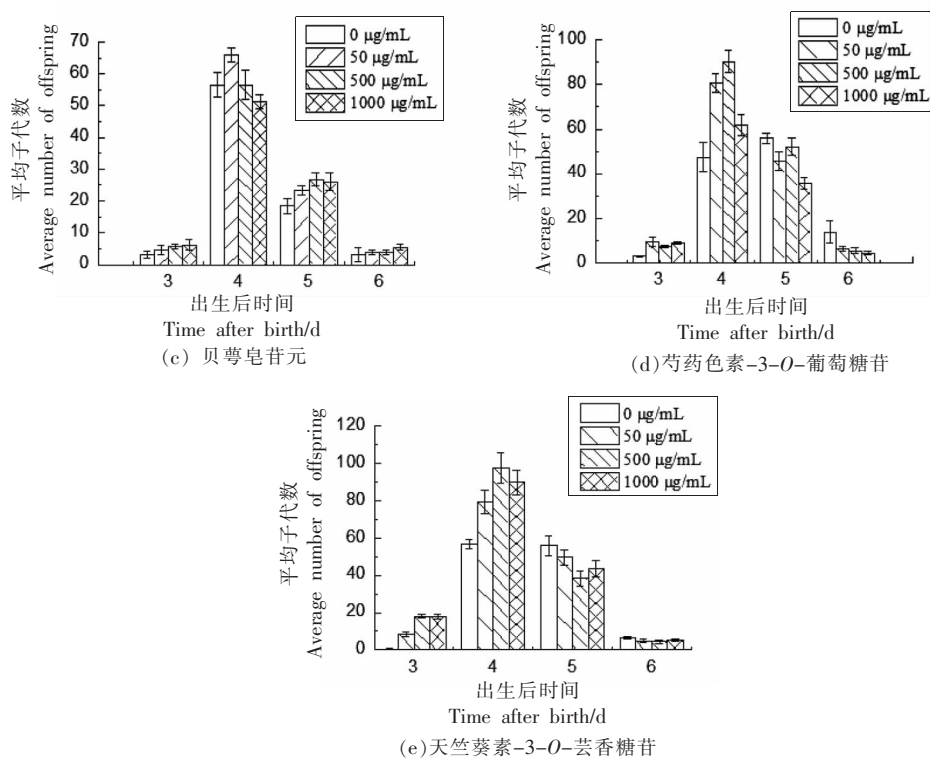
2.3.1 4 种天然产物对脂损伤线虫生殖能力的影响 4 种天然产物对脂损伤线虫生殖能力的影响如图 7 所示。喂食 50~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的胡椒碱都可以显著提高脂损伤秀丽线虫的产卵总量,

与脂损伤线虫相比,喂食 50,500,1 000 $\mu\text{g/mL}$ 胡椒碱的线虫子代总量分别提高 13.63%,18.41%,7.62%。喂食 50,500,1 000 $\mu\text{g/mL}$ 贝萼皂苷元均对脂损伤线虫的生殖能力具有很好的修复作用,喂食 50 $\mu\text{g/mL}$ 贝萼皂苷元的线虫子代总量与脂



(a) 各浓度梯度下线虫整个产卵期的子代总数

(b) 胡椒碱



注:不同字母表示各比较组内的统计学差异显著, $P < 0.05$ 。

图 7 4 种天然产物对脂损伤 N2 线虫生殖能力的影响

Fig.7 Effects of four natural products on the reproductive capacity of ester damaged N2

损伤组相比提高 20.64%。喂食 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的芍药色素-3-O-葡萄糖苷可以显著提高脂损伤秀丽线虫的产卵总量, 与脂损伤线虫相比产卵总量分别提高 18.33% 和 29.17%, 而喂食 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的芍药色素-3-O-葡萄糖苷具有破坏脂损伤秀丽线虫生殖能力的作用, 其线虫子代总量相比对照组降低 10.83%。喂食 50~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的天竺葵素-3-O-芸香糖苷对脂损伤线虫的生殖能力均具有显著的修复作用, 喂食 50, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 天竺葵素-3-O-芸香糖苷的线虫子代总量与与对照组相比分别提高 19.32%, 32.77%, 31.09%。综上所述, 4 种天然产物对脂损伤秀丽线虫的生殖能力均具有一定修复作用。

2.3.2 4 种天然产物对脂损伤线虫身长的影响

4 种天然产物对脂损伤线虫身长的影响, 如表 3 和图 8 所示。喂食胡椒碱可以显著提高脂损伤线虫在生长期的身长, 在第 3 天, 喂食 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胡椒碱的线虫身长为对照组线虫的 1.19 倍。喂食

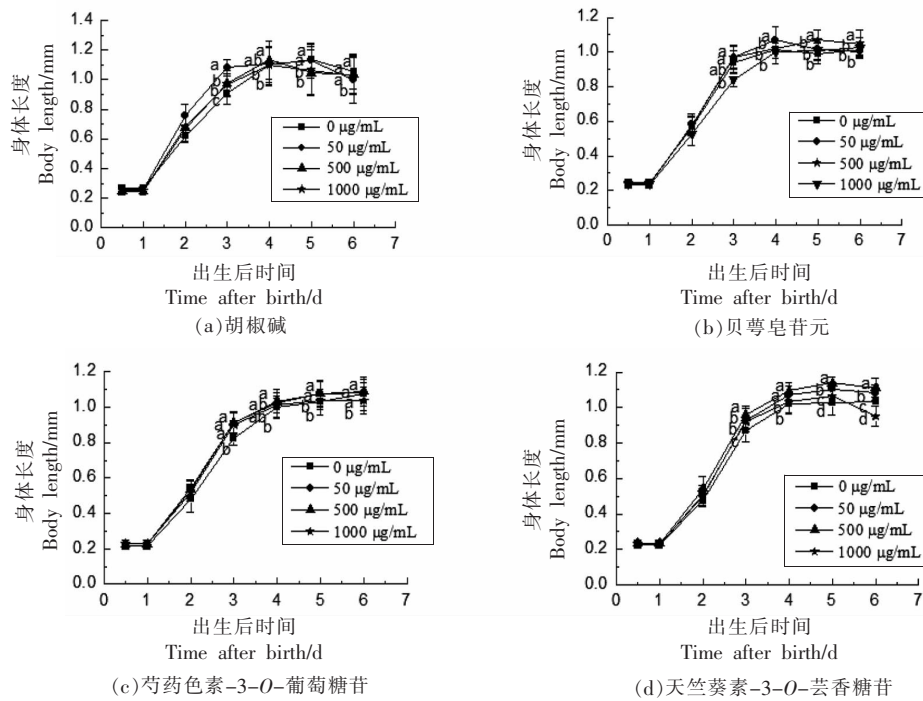
500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胡椒碱的线虫在第 5 天与其余线虫呈显著差异, 表明高浓度胡椒碱会导致脂损伤线虫衰老期提前。喂食不同浓度的贝萼皂苷元可以在不同时期、不同程度上提高脂损伤线虫的身长。如喂食 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝萼皂苷元的线虫在第 4 天身长显著高于脂损伤线虫, 喂食 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝萼皂苷元可以显著提高线虫在第 5、6 天的身长。喂食 50~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的芍药色素-3-O-葡萄糖苷可以显著提高脂损伤线虫在生长期的身长, 50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的芍药色素-3-O-葡萄糖苷对脂损伤线虫在产卵期的身长具有显著修复作用。喂食天竺葵素-3-O-芸香糖苷可以显著提高脂损伤线虫在产卵期的身长, 其中 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的天竺葵素-3-O-芸香糖苷效果最显著, 在第 6 天, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上浓度的天竺葵素-3-O-芸香糖苷可能加速脂损伤线虫衰老致使其身长缩短。综上所述, 4 种天然产物均对脂损伤秀丽线虫的生长发育具有一定修复作用。

表3 4种天然产物对脂损伤N2线虫身体长度的影响(n=3)

Table 3 Effects of four natural products on the mean body length of ester damaged N2 (n=3)

质量浓度 梯度/ μg·mL ⁻¹	胡椒碱		贝萼皂苷元		芍药色素-3-O-葡萄糖苷		天竺葵素-3-O-芸香糖苷	
	身体长度/ mm	相对变化 率/%	身体长度/ mm	相对变化 率/%	身体长度/ mm	相对变化 率/%	身体长度/ mm	相对变化 率/%
	0	0.91 ^c		0.94 ^{ab}		0.82 ^b		0.87 ^c
50	1.08 ^a	+18.68	0.97 ^a	+3.19	0.91 ^a	+10.98	0.93 ^b	+6.9
500	0.97 ^b	+6.59	0.97 ^a	+3.19	0.91 ^a	+10.98	0.96 ^a	+10.34
1 000	0.97 ^b	+6.59	0.84 ^b	-10.64	0.90 ^a	+9.76	0.92 ^b	+5.75

注:每列不同字母表示统计学差异显著,P<0.05。选择线虫出生后第3天的身体长度作比较。



注:不同字母表示各比较组内的统计学差异显著,P<0.05。

图8 四种天然产物对脂损伤N2线虫身体长度的影响

Fig.8 Effects of four natural products on the body length of ester damaged N2

2.3.3 4种天然产物对脂损伤线虫寿命的影响

4种天然产物对脂损伤线虫寿命的影响,如表4和图9所示。喂食50~1 000 μg/mL范围内的胡椒碱对脂损伤线虫的平均寿命均有很好的修复作用,其中喂食500 μg/mL胡椒碱的线虫平均寿命天数为8.17 d,对脂损伤线虫平均寿命的修复作用最显著,较对照组上升15.4%。喂食不同质量浓度的贝萼皂苷元对脂损伤线虫寿命的修复作用不同,与对照组相比,喂食50,500 μg/mL贝萼皂苷元的线虫平均寿命天数显著提高,喂食1 000 μg/mL贝萼皂苷元的线虫平均寿命天数显著降低。与

对照组相比,喂食50,500 μg/mL芍药色素-3-O-葡萄糖苷线虫平均寿命天数分别提高6.54%和10.46%,而1 000 μg/mL以上质量浓度芍药色素-3-O-葡萄糖苷具有加速脂损伤线虫衰老的作用,表明50~500 μg/mL范围内的芍药色素-3-O-葡萄糖苷对脂损伤线虫的平均寿命有一定的修复作用。喂食50,500 μg/mL天竺葵素-3-O-芸香糖苷可以提高脂损伤线虫的平均寿命,然而与对照组相比无显著差异,高质量浓度的天竺葵素-3-O-芸香糖苷(1 000 μg/mL)会显著降低脂损伤线虫的平均寿命,表明50~1 000 μg/mL范围内的天竺

葵素-3-O-芸香糖苷对脂损伤线虫的平均寿命无修复作用,而且质量浓度过高时会加速脂损伤线虫的衰老。综上所述,除了天竺葵素-3-O-芸香糖

苷外,其它 3 种天然产物对脂损伤线虫的平均寿命均有一定的修复作用。

表 4 4 种天然产物对脂损伤 N2 平均寿命的影响 ($n=3$)

Table 4 Effects of four natural products on the mean life span of ester damaged N2 ($n=3$)

质量浓度 梯度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	胡椒碱		贝萼皂苷元		芍药色素-3-O-葡萄糖苷		天竺葵素-3-O-芸香糖苷	
	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%	平均寿命/d	相对寿命 变化率/%
0	7.08 ^c		7.76 ^c		6.12 ^c		7.35 ^a	
50	7.68 ^b	+8.47	7.81 ^b	+0.64	6.52 ^b	+6.54	7.43 ^a	+1.09
500	8.17 ^a	+15.4	7.98 ^a	+2.84	6.76 ^a	+10.46	7.58 ^a	+3.13
1 000	7.69 ^b	+8.62	7.12 ^d	-8.25	6.04 ^c	-1.31	6.98 ^b	-5.03

注:每列不同字母表示统计学差异显著, $P<0.05$ 。

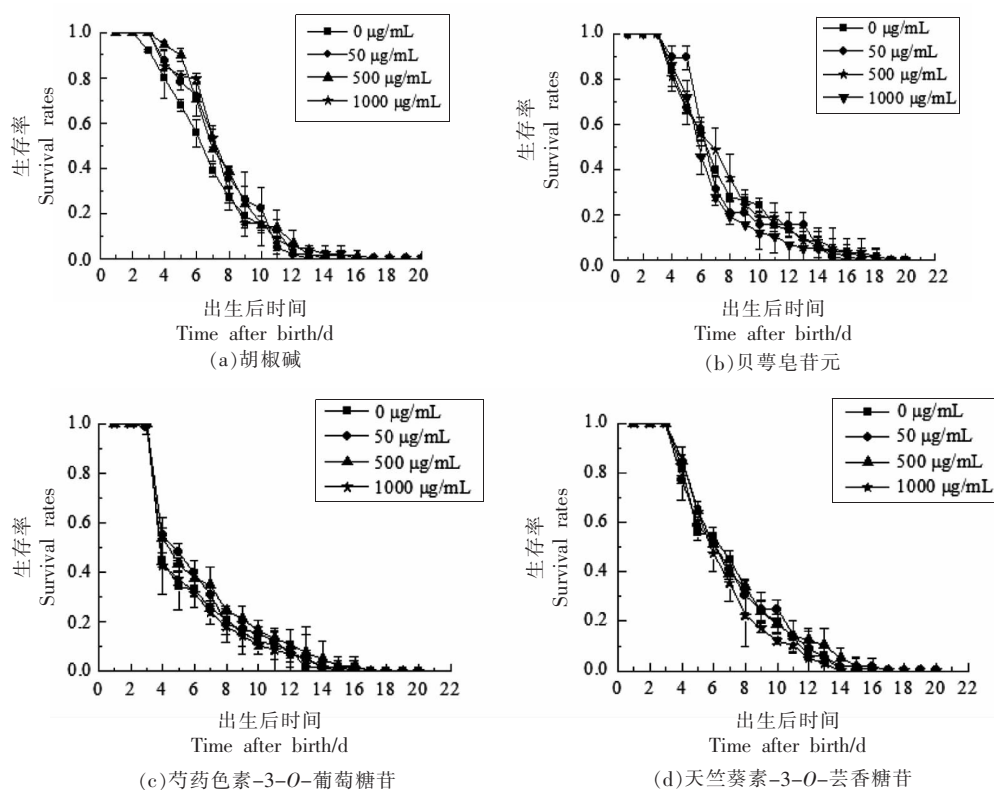


图 9 4 种天然产物对脂损伤 N2 生存率的影响

Fig.9 Effects of four natural products on the survival curve of ester damaged N2

3 讨论

本研究通过分别给野生型秀丽线虫喂食蔗糖和硬脂酸,以子代数量明显减少而仍能完成生长发育为标准选出合适剂量,分别构建糖/脂损伤秀丽线虫模型。在构建的糖/脂损伤秀丽线虫模型基础上,分别喂食不同质量浓度胡椒碱、贝萼皂苷元、芍药色素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-芸

香糖苷,通过表型观察评价这 4 种天然产物分别对糖/脂损伤线虫的修复作用。

胡椒碱对糖损伤线虫和脂损伤线虫的生殖能力和寿命均有一定的修复作用,高浓度胡椒碱显著抑制糖损伤线虫在生长期和脂损伤线虫在产卵后期的生长。已经有研究发现喂食 40 mg/kg 的胡椒碱,可以显著降低高脂饮食诱导的 SD 大鼠体

重、血糖、瘦素水平,增加脂联素水平,减少肠道对胆固醇的吸收和分泌^[26]。Park 等^[27]研究发现胡椒碱可以抑制小鼠胚胎成纤维(前脂肪)细胞分化,降低细胞内的脂质含量,其作用机制与抑制过氧化物增殖体激活受体(PPAR γ)表达有关。由于胡椒碱在哺乳动物中干预脂肪代谢已有一定的研究基础,故本实验以胡椒碱作为有功效的天然产物,检测其在线虫糖脂损伤模型中的各项指标干预情况,作为其它3个未研究的天然产物的对照样品。

贝萼皂苷元作为一种糖原磷酸化酶抑制剂,可以有效抑制糖原分解,降低血糖浓度。在本实验中贝萼皂苷元会显著降低糖损伤线虫的产卵总量,缩短平均寿命,延缓其生长发育,而一定浓度的贝萼皂苷元对脂损伤线虫却有很好的修复作用。研究推测这可能是由于胡椒碱会协同蔗糖加重对线虫的损伤。

芍药色素-3-O-葡萄糖苷可以显著提高糖损伤线虫的身长,低浓度芍药色素-3-O-葡萄糖苷对线虫的平均寿命具有一定的修复作用,高浓度芍药色素-3-O-葡萄糖苷对糖损伤线虫的生殖能力有很好的修复作用,然而会缩短线虫的平均寿命。这可能是由于线虫的寿命和生殖能力成反比,寿命延长和生殖需要资源,而体内的资源是有限的,提高生殖能力这部分资源应该是来源于缩短寿命的资源^[28]。对脂损伤线虫,中、低浓度的芍药色素-3-O-葡萄糖苷对脂损伤线虫有显著的修复作用。天竺葵素-3-O-芸香糖苷可以显著提高糖损伤线虫在生长期的身长,高浓度天竺葵素-3-O-芸香糖苷对糖损伤线虫的平均寿命和生殖能力都有显著的修复作用。天竺葵素-3-O-芸香糖苷可以显著提高脂损伤线虫的生长发育能力和生殖能力,对寿命无显著修复作用。目前还没有对于芍药色素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-芸香糖苷降糖、降脂功效的研究,然而这两种物质都是花色苷类物质,具有抗氧化性。研究发现黑米提取物可以通过减少自由基生成,以及增加超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性,改善 HepG2 细胞和 C57BL/6 小鼠的氧化应激,而其抗氧化作用的主要成分是芍药色素-3-O-葡萄糖苷和矢车菊素-3-O-葡萄糖苷^[29]。氧化应激和活性氧的产生会导致胰岛素抵抗、糖耐量受损和 2 型糖尿病^[30],因此

抗氧化物质可能通过抗脂质氧化、清除自由基等功效,达到干涉高糖、高脂代谢损伤的目的。

胡椒碱是 E 型的桂皮酰胺类化合物,贝萼皂苷元属于五环三萜类物质,是一种糖原磷酸化酶抑制剂,而芍药色素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-芸香糖苷是类黄酮类物质,有很强的抗氧化性。4 种天然产物对糖、脂损伤的修复作用有差异,推测与它们的构效关系不同有关。

4 结论

与胡椒碱相比,贝萼皂苷元对糖损伤线虫具有破坏作用,对脂损伤线虫却具有一定的修复作用;芍药色素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-芸香糖苷均对糖/脂损伤秀丽线虫有很好的修复作用,提高了生殖能力,延长了平均寿命,有效改善了生长发育能力,且修复效果比胡椒碱更好。研究表明,4 种天然产物均有一定的干涉高糖、高脂代谢损伤的功效,为 4 种天然产物在降糖、降脂方面可能存在的功效打下研究基础。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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): 653-663.
- [3] DI CESARE M, BENTHAM J, STEVENS G A, et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants[J]. *Lancet*, 2016, 387(10026): 1377-1396.
- [4] FOROUZANFAR M, AFSHIN A, ALEXANDER L, 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.
- [5] WOO H M, KANG J H, KAWADA T, et al. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes[J]. *Life Sci*, 2007, 80(10): 926–931.
- [6] 张艳华. 胡椒碱和原花青素对高脂高糖饮食诱导代谢综合征大鼠干预作用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2019.
- ZHANG Y H. Study on the effect of piperine and procyanidins on the rats with metabolic syndrome induced by high-fat and high-sugar diet[D]. Beijing: China Agricultural University, 2019.
- [7] TAQVI S I, SHAH A J, GILANI A H. Blood pressure lowering and vasomodulator effects of piperine[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 52(5): 452–458.
- [8] 王秀梅, 彭文兴. 胡椒碱可提高药物生物利用度的作用机制研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2010, 26(6): 471–474.
- WANG X M, PENG W X. Research progress on the mechanism of action of piperine to improve drug bioavailability[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2010, 26(6): 471–474.
- [9] WEN X, LIU J, ZHANG L, et al. Synthesis and biological evaluation of arjunolic acid, bayogenin, hederagonic acid and 4-*epi*-hederagonic acid as glycogen phosphorylase inhibitors[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2010, 8(6): 441–448.
- [10] BIALY Z, JURZYSTA M, OLESZEK W, et al. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(8): 3185–3192.
- [11] 罗雯, 王丹, 边佳辉, 等. 紫花苜蓿的皂苷研究[J]. *草业科学*, 2019, 36(1): 261–271.
- LUO W, WANG D, BIAN J H, et al. Study on saponins of alfalfa[J]. *Pratacultural Science*, 2019, 36(1): 261–271.
- [12] 刘凯, 余书勤. 苜蓿皂甙对胆固醇排泄和内皮细胞释放一氧化氮的影响[J]. *徐州医学院学报*, 1999(6): 442–444.
- LIU K, YU S Q. Effects of alfalfa saponins on cholesterol excretion and nitric oxide release from endothelial cells[J]. *Journal of Xuzhou Medical College*, 1999(6): 442–444.
- [13] MATSUURA H. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease[J]. *Journal of Nutrition*, 2001, 131(3): 1000–1005.
- [14] SARI D, CAIRNS J, SAFITRI A, et al. Virtual prediction of the delphinidin-3-*O*-glucoside and peonidin-3-*O*-glucoside as anti-inflammatory of TNF- α signaling[J]. *Acta Inform Med*, 2019, 27(3): 152–157.
- [15] PARK Y S, KIM S, CHANG H H K A. Isolation of anthocyanin from black rice (Heugjinjubyeo) and screening of its antioxidant activities[J]. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 36(1): 55–60.
- [16] CHEN W, MULLER D, RICHLING E, et al. Anthocyanin-rich purple wheat prolongs the life span of *Caenorhabditis elegans* probably by activating the DAF-16/FOXO transcription factor[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(12): 3047–3053.
- [17] KASSIM A, POETTE J, PATERSON A, et al. Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL)[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(5): 625–634.
- [18] SARIC A, SOBOCANEC S, BALOG T, et al. Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus cerasus* cv. Maraska)[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2009, 64(4): 231–237.
- [19] 邹堂斌, 凌文华. 桑葚花色苷含量测定及种类分析[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(24): 197–200.
- ZHOU T B, LING W H. Determination of anthocyanin content and species analysis of mulberry[J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(24): 197–200.
- [20] WANG S Y, ZHENG W, GALLETTA G J. Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(22): 6534–6542.
- [21] HWANG Y P, CHOI J H, HAN E H, et al. Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice[J]. *Nutrition Research*, 2011, 31(12): 896–906.
- [22] WU T, QI X, LIU Y, et al. Dietary supplementa-

- tion with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice[J]. *Food Chem*, 2013, 141(1): 482–487.
- [23] RICE-EVANS C A, MILLER N J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food[J]. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24(3): 790–795.
- [24] 张林. 白藜芦醇对秀丽线虫高糖高脂损伤的修复作用及机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- ZHANG L. Study on the mechanism of resveratrol in the treatment of *Caenorhabditis elegans* with high glucose and high fat damage[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.
- [25] WANG X, ZHANG L, ZHANG L, et al. Effects of excess sugars and lipids on the growth and development of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genes Nutr*, 2020, 15: 1.
- [26] PARIM B, NEMANI H, MERIGA B, et al. Mitigating efficacy of piperine in the physiological derangements of high fat diet induced obesity in Sprague Dawley rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 221: 42–51.
- [27] PARK U H, JEONG H S, JO E Y, et al. Piperine, a component of black pepper, inhibits adipogenesis by antagonizing PPAR activity in 3T3-L1 cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(15): 3853–3860.
- [28] 唐进法, 张帆, 李宇辉, 等. 何首乌乙酸乙酯提取物对秀丽线虫的抗衰老作用研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(4): 493–496.
- TANG J F, ZHANG F, LI Y H, et al. Study on anti-aging effect of ethyl acetate extract of *Polygonum multiflorum* on *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chinese Pharmacy*, 2017, 28(4): 493–496.
- [29] CHIANG A N, WU H L, YEH H I, et al. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities[J]. *Lipids*, 2006, 41(8): 797–803.
- [30] WRIGHT E J, SCISM-BACON J L, GLASS L C. Oxidative stress in type 2 diabetes: The role of fasting and postprandial glycaemia[J]. *Int J Clin Pract*, 2006, 60(3): 308–314.

Rapid Identification of Repair Efficacy of 4 Natural Products by Sugar/Ester Damage Model of *Caenorhabditis elegans*

Wei Sihan, Zhang Lei, Wang Xiong, Wang Wenli, Cheng Zhimei, Wang Jie, Zhang Yali*
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: High-sugar and high-fat diet leads to a significant increase in the worldwide incidence of various chronic diseases. The study chose wild type *Caenorhabditis elegans* N2 as object of study, construct sucrose / stearic acid damage nematode model by adding 100 mmol/L sucrose or 100 $\mu\text{g/mL}$ stearic acid into the medium, then investigated the repair effects of 4 natural active ingredients: piperine, bayogenin, peonidin-3-O-glucoside and pelargonidin-3-O-rutinoside on sucrose / stearic acid damaged nematodes respectively. The results are as follows: 1) As for sucrose damaged nematodes, 500 $\mu\text{g/mL}$ of piperine and 1 000 $\mu\text{g/mL}$ of pelargonidin-3-O-rutinoside have good repair effects, the spawning volume increased by 25% and 4.6%, the body length of nematode on the fourth day increased by 16.84% and 0.98%, and the lifespan increased by 8.1% and 3.19%, respectively. 1 000 $\mu\text{g/mL}$ of peonidin-3-O-glucoside has a good repair effect on reproductive ability and growth as well as development, the total amount of progeny increased by 55.81%, however the life span was decreased by 22.57%. The bayogenin have a significant destructive effect. 2) As for stearic acid damaged nematodes, 500 $\mu\text{g/mL}$ of piperine, 500 $\mu\text{g/mL}$ of bayogenin, and 500 $\mu\text{g/mL}$ of peonidin-3-O-glucoside have repair effects, the total number of progenies increased by 18.41%, 13.41% and 29.17% respectively. The body length of nematode on the third day increased by 6.59%, 3.19% and 10.98% respectively. The life span increased by 15.4%, 2.84% and 10.46% respectively. Pelargonidin-3-O-rutinoside has a good repair effect on reproductive ability and growth as well as development, but does not affect the life span. The above results indicated that piperine, bayogenin, peonidin-3-O-glucoside and pelargonidin-3-O-rutinoside all have repair effects on sucrose / stearic acid damage. This model can be used as a simple and feasible technique to quickly identify the repair effect of natural products on glycolipid damage.

Keywords *Caenorhabditis elegans*; pelargonidin-3-O-rutinoside; piperine; sucrose / stearic acid damaged model; repair