

福苓方对秀丽隐杆线虫寿命的影响

许巧, 许湘, 王平*

(湖北中医药大学老年医学研究所, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**通过观察福苓方对秀丽隐杆线虫寿命的影响,研究其延缓衰老的效果。**方法:**秀丽隐杆线虫分为空白组和福苓方高、中、低剂量组,通过寿命试验观察福苓方对线虫寿命影响,利用生殖力测试观察药物对线虫生殖力影响,急性热应激、氧化应激试验观察线虫在应激状态下寿命的改变,探讨该复方的作用机制。**结果:**各组的平均寿命分别为(19.96 ± 1.48), (36.03 ± 1.76), (28.47 ± 1.01), (19.39 ± 0.61) d,最大寿命依次为(21.01 ± 1.36), (37.71 ± 2.38), (29.19 ± 3.12), (22.00 ± 2.01) d。与空白组相比,福苓方高、中剂量组均能显著延长线虫的平均寿命、最大寿命及在氧化应激、热应激环境下寿命。福苓方组线虫总子代数与空白组相比差异无统计学意义。**结论:**福苓方可延缓线虫衰老,其作用机制可能与该方能提高线虫的抗压力应激能力有关。

[关键词] 福苓方; 秀丽隐杆线虫; 寿命; 生殖力; 热应激; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0171-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040171

Effect of Fuling Prescription on Lifespan of *Caenorhabditis elegans* XU Qiao, XU Xiang, WANG Ping*
(Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Fuling prescription (FLP) on anti-senility of *Caenorhabditis elegans*. **Method:** *C. elegans* were divided into the control group and high dose, medium dose and low dose groups of FLP. Effect of FLP on lifespan of *C. elegans* was observed by life test, effect of FLP on fertility of *C. elegans* was detected, acute heat stress and oxidative stress were conducted to test ability of stress-resistance and to explore mechanism of FLP. **Result:** Average lifes of each group were (19.96 ± 1.48), (36.03 ± 1.76), (28.47 ± 1.01), (19.39 ± 0.61) d, maximum lifespans were (21.01 ± 1.36), (37.71 ± 2.38), (29.19 ± 3.12), (22.00 ± 2.01) d. Compared with the control group, FLP could significantly extend average life, maximum lifespan and lifespan in acute heat stress and oxidative stress environment of *C. elegans*. But there was no significant difference of total subalgebra between the control group and FLP groups. **Conclusion:** FLP has a remarkable effect of anti-senility, its mechanism may have relation to improvement of stress resistance ability of *C. elegans*.

[Key words] Fuling prescription; *Caenorhabditis elegans*; lifespan; fertility; heat stress; oxidative stress

随着人类平均寿命的不断提高,老龄化问题日益突出,人力资源缺乏及庞大的老年人医疗费用将成为摆在各国政府面前的难题。目前延缓衰老药物十分有限且大多作用机制不明确,研究开发有效延衰药物具有重要意义。福苓方为临床经验方,由茯苓、薏苡仁、百合、葡萄籽提取物、葱粉组成,具有延缓衰老的作用,临床疗效较满意,但作用机制及最佳有效剂量还不明确,故本实验选择秀丽隐杆线虫为衰老模型,观察福苓方延缓衰老的效果,初步研究该

复方的最佳有效剂量及作用机制,为该复方的临床应用提供参考。

1 材料

SPX-1020 型体视显微镜(上海科学器材有限公司),SPX-150B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),LDZX-75KBS 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),CJ-1D 型单人单面超净工作台(天津市泰斯特仪器有限公司)。茯苓、薏苡仁等药材均购于湖北中医药大学国医堂,

[收稿日期] 20140517(009)

[基金项目] 湖北省教育厅协同创新中心项目(鄂教科函[2012]55号)

[第一作者] 许巧,硕士,从事中医药延缓衰老研究,Tel:15827046863, E-mail:15827046863@163.com

[通讯作者] *王平,博士,教授,从事中医药延缓衰老及老年病防治研究,Tel:027-68890008, E-mail:pwang54@aliyun.com

经湖北中医药大学鉴定教研室吴和珍教授鉴定, 均符合 2010 年版《中国药典》(一部) 相关项下规定; 菌株(E. coli OP50)、秀丽隐杆线虫(美国 CGC 公司), 琼脂粉(美国 Sigma 公司), 胰蛋白胨、酵母粉(英国 Oxoid 公司)。

2 方法与结果

2.1 线虫培养基、大肠杆菌的制作及线虫基本培养条件

2.1.1 线虫标准培养基^[1] 取氯化钠 0.6 g, 琼脂粉 4 g, 胰蛋白胨 0.5 g, 溶解于 200 mL 水中, 121 °C 灭菌 30 min, 放置水浴箱冷却至 55 °C, 依次加入 1 mol·L⁻¹ 氯化钙 0.2 mL, 硝酸甘油 0.2 mL, 1 mol·L⁻¹ 硫酸镁 0.2 mL, 磷酸钾缓冲液 5 mL。每个培养皿加入上述液体 2 mL, 风干后于 4 °C 冰箱放置保存。

2.1.2 大肠杆菌培养 从 OP50 菌板挑取单菌落至固态 LB 培养基上室温过夜, 第 2 天从固态培养基上挑取长势较好的菌落至液态 LB 培养基中, 于 37 °C, 200 r·min⁻¹ 振荡培养 16 h 后取液, 8 000 r·min⁻¹ 离心 2 min 浓缩菌液。浓缩的大肠菌液置于离心管中 4 °C 冰箱保存。

2.1.3 线虫常规培养及条件 线虫为雌雄同体, 饲养于加有大肠杆菌的培养基中, 培养温度 20 °C。

2.2 药物制作 福苓方由茯苓、薏苡仁、百合、葡萄籽提取物、葱粉组成, 在前期研究基础上, 取上述药物按质量比 4:2:3:1:1 配伍, 加水浸泡 30 min, 分别加 6, 4 倍量水煎煮 2 次, 合并水煎液, 浓缩至 100 g·L⁻¹, 置 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 寿命试验 将 L4 期线虫分为空白组和福苓方高(80 g·L⁻¹)、中(40 g·L⁻¹)、低(20 g·L⁻¹) 剂量组。每组设 3 个平行对照板, 每个对照板 40 条线虫。转入线虫当天记为寿命 0 d。每天将线虫转移到新的已编号的培养皿中, 每天计数线虫死亡、存活条数。线虫死亡判断标准为无移动及吞咽动作, 轻触后仍无任何反应。剔除标准为逃离至平皿壁或平皿盖上而干死、虫卵在体内孵化而成袋状虫、钻入琼脂中^[2]。结果发现与空白组相比, 福苓方高、中剂量组能延长线虫平均寿命和最大寿命, 尤以高剂量组效果最为显著, 低剂量组对线虫寿命无明显影响, 见表 1。线虫全程存活情况作生存曲线, 结果显示高、中剂量组线虫生长曲线明显右移, 见图 1。

2.4 生殖力试验 挑取 L4 期线虫至各组, 每组 10 条。单独每条转入线虫标准培养基板, 此时记为生殖试验 1 d。以后每 24 h 移至新的线虫标准培养基板中直至线虫生殖能力丧失。所有产卵板均在

表 1 福苓方对线虫寿命的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Fuling prescription on lifespan of *Caenorhabditis elegans* ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	线虫数 /条	平均寿命 /d	最大寿命 /d
空白	-	112	19.96 ± 1.48	21.01 ± 1.36
福苓方	80	109	36.03 ± 1.76 ²⁾	37.71 ± 2.38 ²⁾
	40	111	28.47 ± 1.01 ¹⁾	29.19 ± 3.12 ¹⁾
	20	107	19.39 ± 0.61	22.00 ± 2.01

注: 最大寿命为秀丽线虫最后生存 15% 的平均寿命; 与空白组相比¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

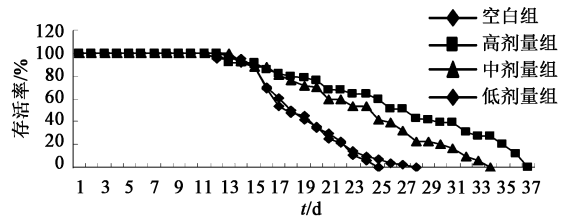


图 1 福苓方对线虫寿命影响的生存曲线

Fig. 1 Survival curve of Fuling prescription on longevity of *Caenorhabditis elegans*

20 °C 下孵育 48 h 后计数子代数, 将线虫每天所产子代数相加便为此条线虫总子代数。正常线虫后代数目约 250 ~ 300 个, 并且对环境极其敏感。空白组与福苓方高、中、低剂量组线虫平均总子代数分别为 275 ± 28.9, 265 ± 23.8, 258 ± 23.8, 267 ± 23.8。统计分析福苓方组线虫平均总子代数、生殖高峰期(第 2, 3 天)子代数与空白组相比无显著差别, 见图 2。

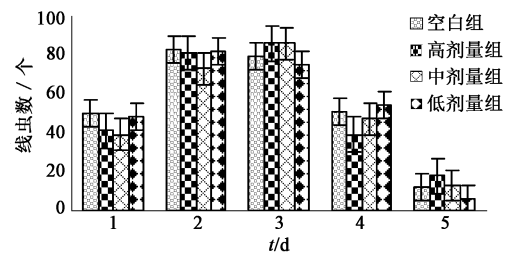


图 2 福苓方对线虫生殖力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of Fuling prescription on fertility of *Caenorhabditis elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.5 急性氧化、热应激试验 挑取 L4 期线虫至各组, 每组 5 个板, 每板 10 条。福苓方组线虫经药物处理 48 h 后与空白组线虫同时置于含有 0.4 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 的线虫标准培养基板中进行观察, 每隔 1 h 记录线虫存活数目。挑取 L4 期线虫至各组, 每组 50 条线虫, 福苓方组线虫经药物处理 48 h 后与空白组线虫同时转移至 35 °C 培养箱中进行观察, 每 0.5 h 记录存活线虫数目。氧化应激测试中, 空白组线虫

在 4~5 h 期间大部分死亡,而福苓方高、中剂量组线虫死亡高峰期在 7~8 h,且高剂量组线虫生存曲线明显右移,见图 3。热应激测试中,空白组线虫在 4~6 h 期间出现大量死亡,而福苓方高、中剂量组线虫此期间仍大部分存活,且高剂量组线虫生存曲线明显右移,见图 4。

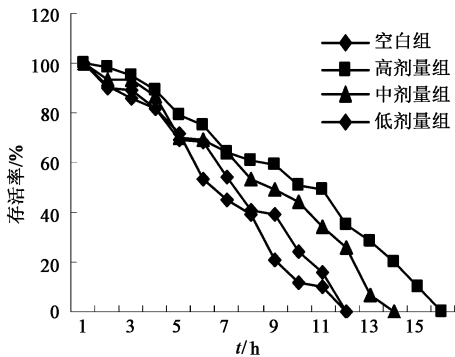


图 3 急性氧化应激条件下线虫生存曲线
Fig. 3 Survival curve of *Caenorhabditis elegans* under acute oxidative stress conditions

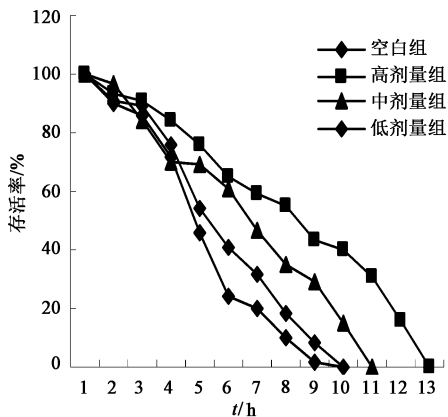


图 4 急性热应激条件下线虫生存曲线
Fig. 4 Survival curve of *Caenorhabditis elegans* under acute heat stress conditions

3 讨论

正常培养条件下线虫整个生命约 20 d。线虫从虫卵发育到成虫约 57 h,经历了 4 期(L1~L4 期),L4 期成虫(显微镜下线虫腹部有个透亮的半月斑)具有生殖能力,平均每条线虫产卵约 250~300 枚,满足了寿命试验同期大样本需求,并且减小了因个体差异对试验的影响。另外线虫具有廉价、易培养、细胞谱系和分子通路清楚、基因与人类高度同源性等优势^[3]。

在众多衰老理论中,寿命与生殖的关系是最具争议的。通过对自然界生物行为、某些长寿突变体的研究,发现寿命的延长与生殖力成反比关

系。故生物学家认为长寿与生殖之间存在“权衡利弊”的关系,即认为寿命的延长是通过降低或丧失生殖力为代价的^[4]。随着研究的深入,发现“权衡利弊”不是总起作用的。例如抗衰老领域研究较多的白藜芦醇在延长线虫寿命的同时证明其对线虫的生殖能力无损害^[5]。本文亦发现福苓方能延长秀丽线虫平均寿命和最大寿命且对生殖力无损害。

科学家对衰老形成的原因看法各一,但有一点是被普遍认同的,即机体正常防护和修复机能的衰退是衰老的主要原因^[6]。研究发现^[7]几乎所有已知线虫的长寿突变体都显示了在应激条件下抵抗能力提高的特性。本文结果证明福苓方能显著延长应激条件下线虫寿命,推测福苓方可能是通过提高线虫的抗压力应激能力来延长寿命。福苓方中几味主要药物具有抗衰老作用^[8],临床显示该方对衰老一些症状具有明显改善作用,本文试验结果进一步对该方的临床应用提供了保证。

[参考文献]

- [1] Tissenbaum H A. Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Gerontol A Biol Sci*, 2012, 67(5):503-510.
- [2] Bishop N A, Guarente L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans* [J]. *Nature*, 2007, 447(7144):545-549.
- [3] Houthoofd K, Braeckman B P, Johnson T E, et al. Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Exp Gerontol*, 2003, 38(9):947-954.
- [4] Watson E, MacNeil L T, Ritter A D, et al. Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits [J]. *Cell*, 2014, 156(4):759-770.
- [5] 陆沛,夏世金,孙涛,等. 白藜芦醇对秀丽线虫衰老的影响 [J]. *成都医学院学报*, 2012, 7(3):359-364.
- [6] Judy M E, Nakamura A, Huang A, et al. A shift to organismal stress resistance in programmed cell death mutants [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(9):e1003714.
- [7] Wang Y, Xu S, Liu J, et al. Regulation of lead toxicity by heat shock protein 90 (daf-21) is affected by temperature in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2014, 104:317-322.
- [8] 侯安继,陈腾云,彭施萍,等. 茯苓多糖抗衰老作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2004, 20(3):10-11.

[责任编辑 刘德文]