

【专论】

果蝇在抗衰老药物研究中的应用

冯雪¹, 高丽¹, 秦雪梅¹, 杜冠华^{1,2}, 周玉枝^{1*}

1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006

2. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050

摘要: 果蝇作为广泛应用于衰老研究领域的模式生物, 与其他衰老的动物模型相比较, 果蝇衰老模型具有生长周期短, 繁殖力强, 雌雄易分辨, 实验操作简单的优点, 能够保证足够的数量以及足够的空间进行实验, 同时还有基因保守性高等特点, 因此是一种常用的衰老模式生物, 近些年其在加快抗衰老药物的筛选速度和衰老的机制研究等方面显示出潜在的应用价值。对果蝇衰老模型的建立方法、给药方式、药效学评价、抗衰老通路及果蝇在部分抗衰老中药中的应用5个方面进行综述, 分别介绍了5种果蝇衰老模型, 不同的给药方式以及行为学, 生化指标和代谢组学方面的研究, 分析了模式生物果蝇与衰老相关的信号通路和机制, 列举了的部分抗衰老中药在衰老模式生物果蝇中的应用, 为今后衰老机制的研究、抗衰老中药和保健品的开发等提供理论依据和实验参考。

关键词: 果蝇; 衰老模型; 机制; 应用

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2019) 08-1489-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.08.001

Application of drosophila in anti-aging drug research

FENG Xue¹, GAO Li¹, QIN Xuemei¹, DU Guanhua^{1,2}, ZHOU Yuzhi¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: *Drosophila* is a model organism widely used in the field of aging research. Compared with other aging animal models, *Drosophila* aging model has easy feeding, short growth cycle, strong fertility, easy to distinguish between male and female, simple experimental operation, and sufficient to ensure sufficient The quantity and sufficient space for experiments, as well as the high degree of gene conservation, are a common aging model organism. In recent years, it has shown potential in accelerating the screening speed of anti-aging drugs and the mechanism of aging. Value. In this paper, the establishment methods, mode of administration, pharmacodynamic evaluation, anti-aging pathway and application of *Drosophila* in some anti-aging Chinese medicines were reviewed. Five fruit fly aging models were introduced. The mode of administration, as well as behavioral, biochemical and metabolomic studies, analyzed the signaling pathways and mechanisms associated with aging in *Drosophila*, and listed some of the anti-aging Chinese medicines used in aging model organisms. Provide theoretical basis and experimental reference for the research of aging mechanism, the development of anti-aging drugs and health products.

Key words: *Drosophila*; aging model; mechanism; application

衰老是组织和器官功能随年龄增长而发生的多因素共同作用的结果。因为它会导致细胞生长
退化性变化, 不是单个因素造成的, 而是体内外许停滞, 组织功能和代谢的受损, 最终影响人的寿命,

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201703D321023-3); 山西省科技基础条件平台建设项目(2014091022)。

第一作者: 冯雪(1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。Tel: 15738856831 E-mail: m15735013199@163.com

*通信作者: 周玉枝(1981—), 女, 博士生导师, 教授, 主要研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。

Tel: (0351)7019178 E-mail: zhouyuzhi@sxu.edu.cn

所以近年来对衰老的研究日益受到人们的关注^[1]。研究者在药理研究中采用细胞培养、酶或受体结合的实验,这些手段筛选出的物质在动物模型中常常无效或者药效不明显,所以新药的研发速率大大降低^[2],因此动物模型成为药物和保健品研发的重要部分。研究者选取各种衰老模型,如酵母、果蝇和小鼠等。模型应用时存在各自的优势,也有局限性。高等动物衰老模式与人类的衰老更接近,但是其实验操作有复杂性,实验的成本高等,难以应用到大规模的药物治疗中。低等生物是研究衰老机制的理想模型,有系统简单、成本低和实验时间短等特点。但其衰老过程与人类的存在差异,所以存在研究成果难以转化为临床上的应用等问题^[3-6]。适当地选择合适的模式生物对衰老及其机制进行深入的研究显得尤为重要。

多年的研究表明,果蝇衰老方面的研究有重大突破。并且拥有重要的地位^[7-8]。果蝇作为衰老研究的模型存在雌雄易辨别、易喂养、生长周期短、繁殖力强等优点,在发现通路的靶点和小分子药物的筛选等方面具有较大的价值^[9]。另外研究表明在果蝇中都存在着近70%的同源基因与人类相似^[10]。因此果蝇衰老模型的建立和其机制的深入探索以及抗衰老药物的研究成为研究的热点。随着研究者不断挖掘中医药理论以及人们的健康意识逐渐提高,人们把中药相继开发成各色饮料或保健品,如菊花茶、阿胶滋养膏等^[11],用来调理身体以达到保健、预防、和治疗疾病的效果。因为目前部分中药的抗衰老活性尚未进行考察,故本文基于果蝇衰老模型综合国内外相关研究,对果蝇衰老模型的建立方法、给药途径、药效学指标、生化指标、代谢组学研究和果蝇衰老过程中的重要信号通路以及近几年以果蝇衰老模型为基础的中药对抗衰老的研究进展进行几个方面综述和展望,以期抗衰老药物和保健食品的开发和研发以及其抗衰老机制的进一步研究提供参考。

1 基于果蝇衰老模型的建立方法

果蝇作为抗衰老研究的模式生物已广泛应用于抗衰老研究。研究的意义在于缩短新药的研发时间和提高药物的发现率。果蝇可以建立多种衰老的模型,包括自然衰老模型、过氧化氢或百草枯损伤的急性衰老模型和高脂损伤模型以及转基因果蝇模型等。

1.1 自然衰老模型

自然衰老模型是从收集同一批次3 d内羽化的

果蝇成虫,随机进行分组,每天统计死亡果蝇数,直至果蝇全部自然死亡,计算各组果蝇的平均寿命和最高寿命。Shen等^[12]通过设计实验以研究姜黄素(0、0.5、1.0 mg/g)对果蝇寿命的影响。实验结果显示,0.5、1.0 mg/g的姜黄素可显著延长雌雄果蝇的寿命。其他研究者们对小檗碱、红参^[13-16]等对果蝇寿命的影响同样进行了考察。因为果蝇的寿命比较短,所以自然衰老模型能够很好地模拟衰老的进程,一般用于研究自然状态下寿命长短的比较。

1.2 高脂损伤模型

人体摄入大量的脂肪酸会使血脂浓度升高。人体的抗氧化能力会降低,脂质过氧化反应增强,从而产生大量的脂质过氧化物和中间产物,机体的衰老会随之加速。高脂损伤模型的建立是在培养基里添加20%椰子油高脂。Wang等^[17]在高脂肪培养基中加入不同浓度白藜芦醇(100、200 mol/L)结果显示可以延长果蝇的寿命。高脂损伤模型的优势是可以减短实验的周期。

1.3 急性衰老模型

1.3.1 过氧化氢急性衰老模型 H_2O_2 为一种活性氧,在某些金属离子存在的情况下可以产生羟基自由基($\cdot OH$)。而羟基自由基是活性最强的自由基,可与细胞中的生物大分子起反应,对机体造成氧化损伤,从而导致其产生功能性衰退。果蝇的过氧化氢急性模型一般是收集3 d内羽化的果蝇,随机进行分组,培养2周,饥饿2 h后,在培养管底部放入滤纸,加入50 μL 含有30% H_2O_2 的6%葡萄糖溶液,然后将果蝇放入,每小时记录果蝇的死亡只数,计算的平均寿命、中位和最高寿命并绘制果蝇生存曲线。段丹丹等^[18]研究发现黄芩素(0、0.04、0.2 mg/mL)能够延长 H_2O_2 损伤模型W1118品系果蝇的寿命。

1.3.2 百草枯急性衰老模型 百草枯能够通产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)对机体造成氧化损伤。果蝇的百草枯急性衰老模型为收集3 d内羽化的雄性果蝇成虫,随机进行分组培养2周,之后使其饥饿2 h后,在培养管底部放入滤纸,用50 μL 含有20 mmol/L百草枯的6%葡萄糖溶液,放入果蝇,记录计算方式与过氧化氢损伤模型一样。研究发现黄芩素(0、0.04、0.2 mg/mL),可延长果蝇的寿命,并能有效减弱百草枯引起的急性氧化应激损伤^[18]。

1.4 紫外损伤模型

紫外线照射是日常生活中最容易接触到的辐射之一,它会对生物体产生损伤,并且可以加快果蝇的衰老。紫外线照射对生物体的损害的方式为:

一为产生自由基,二是产生嘧啶二聚体直接使基因产生突变^[19]。紫外损伤模型是一种常见的研究果蝇衰老的模型。将果蝇轻度麻醉后收集培养皿内。实验在紫外辐射期间控制温度在25℃,培养皿置于紫外灯正下方15 cm处。照射完成后,再次将果蝇收集于相应培养管培养。张泽生等^[20-21]分别研究了酸枣提取物及黑蒜对紫外照射损伤果蝇寿命和抗氧化能力的影响,实验组果蝇寿命均得到了一定程度延长,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性升高,丙二醛(MDA)含量降低。

1.5 转基因果蝇模型

研究发现果蝇基因组有一段特异的具有转位特性的独立的DNA序列,能够在基因组内对DNA进行剪切和粘贴。使果蝇成为研究退行性疾病的理想模型^[22]。构建的转基因果蝇神经退行性疾病模型具有寿命短,运动能力损伤等特点。

1.5.1 AD果蝇模型 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,表现为记忆缺失和认知功能障碍, A β 沉积及tau蛋白的过磷酸化是关键致病因素^[23-24]。Wang等^[25]研究表明,美金刚(memantine)具有预防A β 42过表达果蝇记忆能力丧失的作用。深入探索其机制可能与抑制表皮生长因子受体相关。王俊杰等^[26]构建AD果蝇模型,这种模型具有显著缩短寿命和损伤运动能力两种表型。应用此模型检测了阿片受体拮抗剂纳曲酮和多奈哌齐的药效,结果显示,给予30 μ mol/L多奈哌齐或纳曲酮均能延长此AD果蝇模型的寿命,并且能缓解其运动能力缺陷。

1.5.2 PD果蝇模型 帕金森病(Parkinson's disease, PD)的表现为静止性震颤,动作迟缓等。构建PD果蝇模型最常用的方法是在GAL4/UAS系统下使果蝇中的 α -synuclein基因过表达。Siddique等^[27]用该模型分别给予姜黄素25、50、100 μ mol/L,实验结果发现姜黄素可以改善果蝇的PD症状。此外,研究者还发现表儿茶素没食子酸酯(0.25、0.50、1.0 μ g/mL)能剂量相关性延长果蝇寿命,并且可以改善运动能力损伤、减少氧化应激等。

1.6 D-半乳糖果蝇衰老模型

D-半乳糖(D-galactose)造模是常见的衰老模型。研究表明长期给予D-半乳糖使机体抗氧化酶活性降低,形成超负离子及各种氧化产物,诱发机体损伤。D-半乳糖的培养基是在基础培养基上添加4%的D-半乳糖。韩凯顺等^[28]用D-半乳糖培养基分别给予叶黄素(0.03、0.1、0.3 mg/mL),发现与模型

组相比能显著延长果蝇的最高寿命。

综上所述,这几种果蝇抗衰老的模型每一种都有各自的特点和适用范围。自然衰老模型能够较好地模拟衰老进程,可以研究自然衰老整个过程抗衰老药物的药效,很好的展示整个衰老过程中对寿命的延长程度。而高脂损伤模型是给予高脂会生成大量的脂质过氧化物和中间产物,从而加速衰老,此模型特点一是时间短,其次此模型应用于由高脂造成的衰老及其特定的抗衰老药物和保健品的研究。过氧化氢和百草枯急性衰老模型的特点为实验时间短,这类模型是为了研究衰老过程中的相关机制,以便可以更好的探索衰老的相关信号通路,对衰老进行更深层次的研究。紫外损伤模型是通过给予紫外线照射使其衰老,用于研究抗衰老药物在光毒性作用下对衰老的影响和相关的氧化应激反应。而转基因果蝇模型则使果蝇成为研究退行性疾病的理想模型。因为其针对性比较强,其组织器官均相对比较完善,在药物筛选及抗衰老机制研究中拥有重要的地位。实验者在设计相关实验时可以根据实验的需求选择适合实验的模型,实验设计可以设计一个模型也可以多个模型相互配合,更好的考察抗衰老中药和保健品的药效,作为衰老机制探索的基础。

2 果蝇的给药途径

果蝇的给药方式有很多。如果实验对象是果蝇的胚胎,则可以用渗透法的方式给药^[29];而成虫则可以通过添加到培养基或者蒸汽,还可以用添加有蔗糖/药物的饱和滤纸或是注射^[30]等方式进行给药;若是幼虫,则可通过将药物添加到培养基中给药。如果采用将果蝇饥饿16~18 h后置入含有药物的培养基中几分钟,这种方法可以用于观察和测定药物的急性作用,因为果蝇将一次消耗大量的药物,更有利于快速检测。采用含有药物的培养基24 h以上给药的优点是可以使药物处于稳定水平。

实验者设计实验时会选择不同时期的果蝇,果蝇的时期不同给药的方式就不同,不论是渗透法给药还是固体培养基给药,这里没有一个固定的要求。实验者应当考虑抗衰老药物的特性,果蝇的接受程度和操作的方便与可行性进行选择合适的给药方式。

3 药效学指标

在机体的生理衰退水平上,可以观察到许多与衰老有关的功能丧失的变化。这些变化包括代谢变化、行为学上的变化、抗逆性与繁殖能力的变化、

神经元功能的改变、活动力的变化等。这些特征对于果蝇抗衰老方面的研究尤为重要。

3.1 寿命

寿命是对果蝇衰老模型的直接指标。一般通过计算果蝇的平均、中位和最高寿命,然后绘制果蝇生存曲线直观地反映造模的情况和寿命的比较结果。实验研究时不仅通过寿命曲线来评价造模的情况还可通过下文所总结的行为学实验对果蝇的衰老模型进行评价。

3.2 果蝇的行为学

在果蝇的大脑存在复杂的神经纤维网和神经回路。这些神经网络调节着果蝇的各种行为,如繁殖力、摄食量、性活力、学习和记忆和昼夜节律等。在果蝇抗衰老研究中用相应的行为学指标来反映药物的抗衰老效果。

3.2.1 繁殖力 人们一直认为繁殖力和寿命是因果关系和负相关的。因为用于繁殖的物质不能用于维持体细胞的寿命,因此推断繁殖和寿命之间存在因果关系^[31]。Chattopadhyay等^[32]研究芦丁促进黑腹果蝇寿命的调节功效时,在培养基中添加芦丁15 d后做了繁殖力实验。繁殖力的实验分为空白组和给药组,且两组分别平行设置10组,这是10组中的每组用刚孵化的两个雄性和两个雌性果蝇进行试验。每天将果蝇转移到新的培养基中,并记录当天的产卵数。研究发现,200、400 $\mu\text{mol/L}$ 芦丁可以使果蝇的寿命延长,但是雌性果蝇的繁殖力下降。

繁殖力下降这个结论的比较对象是同组果蝇之间的比较,结果显示年老果蝇的繁殖力下降。若实验组与空白组同个年龄段的比较结果提高,这两个结论之间不矛盾。

3.2.2 摄食量 已知摄食量少对健康有益,可以防止组织损伤和改善代谢。研究表明果蝇的食物摄取减少可以延长果蝇的寿命。摄食量考察的目的是排除摄食量减少使果蝇抗衰老,从而准确判断抗衰老药物的效果。果蝇摄食量是收集3 d内羽化的果蝇成虫,雌雄分开,随机分组,每组4管,每管约15只。饲养10 d后将各组果蝇转移至各剂量组对应的含0.2%FD&C no.1蓝色食用素培养基的管中。24 h后,每组选10只果蝇用生理盐水充分匀浆,离心,取上清200 μL 在625 nm处测定吸光度。米诺环素是一种半合成四环素衍生物抗生素,它在抗炎、肿瘤抑制和神经保护方面受到了越来越多的关注, Lee等^[33]研究米诺环素对果蝇的寿命的影响,实验结果显示米诺环素可以显著延长Canton S和W1118

果蝇的寿命,结果显示药物引起的寿命延长与饮食摄入减少无关。

3.2.3 求爱行为 果蝇的求爱行为是性别特异性行为,受大脑内的中枢神经系统调控。一般果蝇在交尾前,雄果蝇因为要吸引雌果蝇所以会发出一套完整的求爱行为。求爱行为包括雄果蝇追逐雌果蝇,或者用其前腿轻敲雌蝇腹部,或振动翅膀尝试交配等^[34]。雌雄果蝇需要在实验前被隔离2 d^[35]。将其在不进行麻醉的情况下被转入新的培养基中进行求爱行为的观察。在解剖镜($\times 10$)下观察30 min。实验需要算出求爱指数(CI),即雄果蝇发出求爱行为所用时间与总时间的比值^[36]。王哲鹏等^[34]研究黑色素在紫外辐射(UVR)保护方面的重要作用时做了求爱行为实验,实验得到的结论是UVR不利于果蝇的求爱行为的进行。

3.2.4 认知能力 为了评估认知能力,Weinrich等^[37]使用恶趋光性抑制测定法。实验用由清洁管制成的两个相邻腔室通过门连接的操作装置。一端是光室,另一端是暗室。光室内放置浸有奎宁的滤纸,在门打开后训练果蝇避开光室到暗室中去。在6 h重复训练后重新进行评估,以确定它们是否记得光与奎宁的关联。实验结果显示果蝇的认知能力与年龄存在显著性差异。

3.2.5 运动性能 Weinrich等^[37]将果蝇放置在清澈的圆柱体中,侧面放置距离底部8 cm的标记。每组使用80~100只果蝇,实验开始时将果蝇拍到底部,计录在10 s内爬上标记的果蝇的数量(10次)。实验结果显示随着年龄的增加运动性能随之降低。

3.2.6 视觉 Weinrich等^[37]通过实验进行视网膜电图记录以评估视网膜功能。在 CO_2 的暴露下,将果蝇固定在尼龙网片下的显微镜载玻片上,将其放置在电屏蔽的黑暗记录室中,并暴露一只眼睛。将电极插入胸腔,并将玻璃微量移液管插入视网膜。通过Axoprobe 1A放大器记录视网膜反应,通过CED1401接口数字化(5 kHz),并存储在PC(电脑)上。实验结果显示6周的果蝇与2周的相比视网膜功能显著降低。其应该是与线粒体的代谢有关。

3.3 生理应激反应

研究者常使用3种方法来测量果蝇对生理应激的反应:饥饿抵抗力、热敏感性和寒冷昏迷恢复时间。抗饥饿实验是将果蝇放入含有10 mL 1%琼脂(不提供营养)的小瓶(每瓶20只果蝇和每组80只果蝇)中。对果蝇的数量进行6 d的计数来确定果蝇的死亡率。实验时每24小时更换1次实验

小瓶。

果蝇热应激反应是将它们置于空瓶中(每瓶10~15只果蝇,每组105只果蝇),然后置于37℃的水浴中1 h。随后将它们转移到含新的培养基的小瓶中。在2、4、24 h的时候记录存活的果蝇数。

果蝇寒冷昏迷恢复时间实验是将其置于空的5 mL小瓶中(每瓶10只果蝇,每组60只果蝇),0℃水浴2 h。随后将它们放置在20℃下,记录自发冷却昏迷恢复时间。

宋朝春等^[38]使用阿司匹林考察果蝇的抗应激能力,结果显示阿司匹林可以使果蝇对饥饿、热休克、双氧水和百草枯的抵抗能力显著提高。

3.4 生化指标

研究表明,中药延缓果蝇衰老主要是通过调节果蝇体内抗氧化酶来实现。体内的抗氧化酶主要包括有超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶(GSH)、过氧化脂质(LPO)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)以及过氧化氢酶(CAT)等。Gao等^[39]用自然衰老果蝇对黄芩素的抗衰老作用机制进行了研究,发现的黄芩素(0.04、0.2、1 mg/mL)能够延长果蝇寿命,同时发现其可能主要是通过增强GSH水平、CAT活性等抗氧化途径来实现的。

大量的研究表明氧化应激与衰老存在密切的关系,研究一般主要集中在氧化应激相关酶的活性测定。抗氧化酶测定方面的研究结果表明果蝇不仅操作简单,而且能够结合建立的多种实验模型进行多方面的研究,所以果蝇衰老模型在抗衰老药物筛选及抗衰老机制研究中拥有重要地位。

3.5 代谢组学

近年来相关研究表明,代谢组学技术在多种复杂疾病研究中的应用,有助于寻找与疾病相关的代谢标志物,更有利于对疾病的临床诊断。研究者^[37]通过代谢组学的手段分析了黄芩提取物对果蝇寿命的影响的相关代谢标志物的调节,得出黄芩提取物主要通过调节异亮氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、甘氨酸、琥珀酸、半胱氨酸、乳酸、缬氨酸、醋酸和葡萄糖等代谢物的含量从而达到延长果蝇寿命的效果。

果蝇的抗衰老研究中与衰老相关的指标众多,不论是行为学、抗逆性、繁殖能力、神经元功能还是活动力方面都有相关的研究,抗衰老相关生化指标的研究首先是了解任何寿命修改干预措施如何随时间影响这些“健康”指标的进展;其次是确定这些与衰老相关的生物指标在果蝇中的变化是否在人

的衰老中起到因果作用,因此可以达到通过干预这些指标来缓解衰老的预期目的。不同的实验设计有不同的侧重点,研究者在选择时要根据实验本身的特点进行针对性的选择,正确的行为学实验能够反映实验的实际情况。

4 信号通路及作用机制

在衰老机制研究中发现衰老相关的分子机制与多种细胞信号传导通路和生物活性物质关系密切。但目前衰老的生物学机制仍没有被完全阐明是由于生物系统的复杂性造成的。本文以(*Drosophila melanogaster*; anti-aging)为主题,通过Web of Science和PubMed分别进行主题搜索,搜索结果显示果蝇的抗衰老通路多集中在胰岛素/胰岛素样生长因子1(IGF-1)信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶信号通路(AMPK)、雷帕霉素(mTOR)信号通路、一般性调控阻遏蛋白激酶2(GCN2)/活化转录因子4(ATF4)信号通路等通路。从搜索结果中选择常见的相关信号通路进行归纳。

4.1 胰岛素/IGF-1样信号传导(IIS)途径

胰岛素在生长繁殖过程中起到了重要作用。主要是通过调控代谢程度和生物合成过程中营养供给而调节有机体的生长。胰岛素的信号传导分子必须通过相应的受体才可以将信号传递下去,如果通路中某一部位出现突变则会对生物体产生相应的影响。实验研究表明如果阻断胰岛素信号转导的介导受体则可以延缓衰老。同时研究表明通过饮食限制而延长果蝇寿命的现象是通过胰岛素信号传导这条通路实现的,但是后续的研究表明此现象可能并不是仅是通过这个机制来实现的^[40]。目前鉴于抗衰老目标是寻找干预措施来促进健康的老齡化,所以果蝇胰岛素信号通路成为干预措施研究中较热门的一条途径。

4.2 mTOR信号通路

mTOR属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶家族,本身是一种对生长有重要作用的氨基酸敏感性信号激酶。在细胞内有mTORC1和mTORC2两种复合体形式存在。研究表明目前衰老与线粒体功能紊乱相关,主要是增加机体的氧自由基。mTOR在生物体的生命活动中起着极为重要的作用,其是通过多种信号通路来调控细胞的生命活动。尤其在线粒体能量稳态的维持方面发挥重要的作用。其中mTORC1主要是受能量与生长因子等的调节。它能够抑制自噬和溶酶体的形成,促进蛋白质合成、能量代谢和脂肪生成。mTORC2则在肌细胞骨架、

细胞存活和代谢方面起到作用。最常研究的mTOR磷酸化分子靶标是翻译激活因子S6K激酶和翻译抑制因子4EBP。据报道,敲除S6K足以延长果蝇的寿命,雷帕霉素需要抑制S6K来延长果蝇的寿命。4EBP也被证实特定条件下与mTOR通路有关。研究表明mTOR信号通路与衰老有密切相关的联系但具体的机制还在探索中^[41]。

4.3 GCN2/ATF4信号通路

GCN2是适应营养不平衡饮食的另一重要氨基酸传感器上保守的蛋白激酶。它被不带电荷的tRNA激活,使翻译起始因子eIF2磷酸化失活,从而减少了翻译的进行。在果蝇衰老的研究中发现GCN2会磷酸化eIF2,导致4EBP的上调。eIF2磷酸化会引起ATF4的表达量增加,ATF4的表达量增加可以诱导氨基酸应激反应从而起到抑制mTOR功能的作用。GCN2通路被激活后会增加转录调节因子ATF4的表达量,而ATF4和激活果蝇长寿相关的基因相关联^[42-43]。果蝇的GCN2的类似作用被少量报道,所以这条信号通路仍有待研究和探索。

4.4 应激感应c-Jun氨基端激酶(JNK)途径

JNK通路是一种应激感应信号通路,由各种应激激活,包括紫外线辐射和氧化应激。JNK磷酸化许多转录因子并增强它们的转录活化能力。Wang等^[43]发现突变的果蝇的神经元中JNK信号传导增强,与野生型果蝇相比氧化损伤积累的较少,寿命更长。他们后来表明JNK激活了果蝇脑中的胰岛素样肽神经内分泌细胞(IPs),而这些细胞特异性阻断dilp2(编码胰岛素样分子的基因组序列)的表达从而降低了JNK的活性。由JNK活性增加使得果蝇寿命延长,研究表明此过程还需要寿命调控的关键下游转录因子(dFOXO)的协助。JNK拮抗IIS,导致dFOXO激活其下游靶标。JNK和dFOXO通过拮抗IPC中IIS配体的表达来系统地限制IIS活性。因此,JNK在自主和非自主两方面调节dilp2的表达。

4.5 腺苷酸活化蛋白激酶信号通路(AMPK)

研究表明AMPK主要是通过两种途径来调节能量代谢,即主要是通过抑制腺苷三磷酸(ATP)的消耗和促进ATP的产生。在果蝇的研究中上调AMPK可以延长寿命^[44-45]。当细胞ATP合成受阻或消耗应激提高,会导致细胞处于能量枯竭状态,这种情况下腺苷一磷酸/腺苷三磷酸(AMP/ATP)上调,AMPK被激活。当AMPK被激活后可改变脂类和糖类代谢,使其能促进ATP的生成,够抑制ATP

的消耗,使细胞能量得到迅速恢复正常水平。有研究发现热应激、缺氧、运动和禁食等多种应激都能够激活该通路。

以上的通路归纳了果蝇抗衰老研究中的常用通路,研究者在研究抗衰老通路的时候可参考这几条通路的研究进展,也可在此思路或基础上探索新的通路,从多个方面着手探索衰老的机制,使得抗衰老的研究更深入。

5 抗衰老中药的研究

衰老果蝇模型的应用不仅有助于对衰老机制的进一步探索,更有利于对抗衰老药物的活性筛选,并取得了相应的成果。本文以(*Drosophila melanogaster*; anti-aging)为主题,通过Web of Science、PubMed进行主题检索,同时以(果蝇;抗衰老)为主题,通过中国知网进行主题检索,从检索结果中以抗衰老药物、果蝇衰老模型、抗衰老作用机制3方面确定文献纳入范围。从确定的范围中选取部分常见的抗衰老中药进行归纳总结,研究实例见表1。

目前运用果蝇衰老模型对药物抗衰老作用的验证已经成熟,研究者在确定其有抗衰老作用后继续探索抗衰老的机制。但研究的程度不一样。研究者可以参考已有的抗衰老药物和保健品的研究为实验的设计开发新的思路,以此加快抗衰老中药和保健品的开发与研究。

6 总结与展望

随着人们对果蝇衰老的研究的深入,对抗衰老药物的研究也逐渐深入。但是实验用的动物模型和人的衰老之间存在着部分差异。随之产生了一个疑问和关键问题即模式生物果蝇的衰老模型能否模拟人类衰老。

本文对果蝇的衰老模型及其建立方法、给药方式、药效学评价、部分抗衰老通路与抗衰老药物的研究进行综述。果蝇虽然体积比较小但其内分泌系统比较完整,器官也相对比较复杂,许多功能都类似于哺乳动物,所以多被用于衰老机制的研究。其作为模式生物的优势体现在易饲养、生长周期短、繁殖力强、雌雄易分辨、能够保证足够的数量以及足够的空间进行实验、实验操作简单。研究表明在果蝇中系统地抑制胰岛素/IGF-1信号可延长果蝇寿命^[53]。同时也有研究表明此信号通路对寿命的影响是保守的^[54]。对于人类而言抑制了IGF-1信号通路的活性,也会延长人的寿命^[55]。与胰岛素/IGF-1一样其他的通路也有类似的发现,衰老的相关通路有很多地方和人类的衰老是相通的,虽然果蝇模

表1 基于果蝇模型的常见抗衰老中药作用机制研究

Table 1 Based on the mechanism of common anti-aging medicine *Drosophila* model role

抗衰老药	模型	给药剂量	给药周期	检测指标的选择	潜在抗衰老作用机制	参考文献
黄芩素	自然衰老	0.04、0.2、1 mg/mL	自然寿命实验: 喂食持续64 d(直到所有果蝇死亡) 摄食量: 10 d 繁殖力: 15 d	摄食量、繁殖力、蛋白含量测定、CAT、GSH和GSSG的测定	抗氧化	[46]
朝鲜红参	自然衰老	1.2、12 µg/mL	自然寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡	饥饿胁迫实验、体重	调节生物体内代谢	[14]
红景天	自然衰老	30 mg/mL	自然寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡 繁殖力: 10 d 摄食量:	摄食量、繁殖力、代谢率的测定	氧化应激	[47]
蜂王浆	自然衰老	1.25、2.50、5.00 g/100 g	自然寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡	摄食量、繁殖力、果蝇体内抗氧化酶活性测定	调节体内 CuZn-SOD; 调节表皮生长因子受体介导的信号通路	[48]
姜黄素	自然衰老	0.5、1.0、1.5 mg/g	自然寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡	果蝇衰老相关基因表达的荧光定量 RT-PCR、果蝇体内抗氧化酶活性测定	调节 Notch 信号通路、Wnt 信号通路、p53 通路; 对细胞周期进行调控	[49]
毛龙草	高热量饮食和低热量饮食模型	50、100、1 000 µg/mL	寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡 摄食量: 10 d 繁殖力: 20 d	摄食量、繁殖力、自发运动、巴甫洛夫嗅觉联想实验、百草枯诱导的氧化应激和4-羟基-2-壬烯醛(HNE)测定、	饮食限制相关机制	[50]
小檗碱	高温	0.4、2 mg/mL	寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡	寿命、活动力	色氨酸 - 犬尿氨酸代谢途径 AMPK、胰岛素信号通路	[51]
叶黄素	自然衰老、急性模型、紫外损伤模型、D-半乳糖模型	0.03、0.1、0.3 mg/mL	寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡	体内酶活力测定和脂质过氧化产物的含量	CAT、SOD 的活性、MDA	[28]
酸枣	紫外损伤	1、5、10 mg/mL	寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡	酶活及脂质过氧化产物	CAT、SOD 的活性 MDA	[20]
长山药	自然衰老	基础培养基加 1%、3% 和 5% 多糖	寿命实验: 喂养直到所有果蝇死亡 性活力测定: 15 d 飞行力: 40 d	摄食量、性活力、飞行能力	摄食量、性活力、飞行能力	[52]

式生物衰老的研究并不能代替对人类衰老的研究,但是果蝇的衰老模型可以探索衰老的相关机制,能够为人类衰老的研究提供新的思路。果蝇抗衰老的几种不同的模型每一种都有各自的特点和适用的范围,针对性较强。实验者可以根据实验需求选择适合实验的模型,按照实验果蝇的具体情况选择

合适的给药方式,以便于方便快捷的给予药物。实验设计最重要的部分是药效学的评价和抗衰老相关通路的方面,这不仅是创新的关键部分,更是研究工作意义的所在。研究者可以参考目前药物在果蝇抗衰老方面的研究进展自行设计实验,也可在此基础上对实验设计进行完善与创新,以便后续进

行更加深入的研究。

目前很多中药研究表明其具有抗衰老作用,但是中药成分复杂,衰老机制研究尚不明确,所以目前对衰老还在深入研究探索中。如果未来能够明确中药延缓机体的衰老机制,将推动抗衰老药物以及保健食品的研发,可以有效地解决衰老相关的疾病,从而减缓当今社会老龄化的现状,为人类社会作出巨大贡献。文章介绍了模式生物果蝇在研究衰老及衰老机制方面的优势,虽然果蝇不能全面的代替人类,但其可以为抗衰老中药的机制探索起到抛砖引玉的作用。因此合理的选择果蝇衰老模型和适合的行为学实验进行实验和模型验证,同时结合其他几个方面联用深入探究衰老机制,对深入探索对人类衰老的探索和抗衰老药物的研究有很大的帮助。

参考文献

- [1] Turnheim K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly [J]. *Exp Gerontol*, 2003, 38(8): 843-853.
- [2] Pandey U B, Nichols C D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63 (2): 411-436.
- [3] Manayi A, Saeidnia S, Gohari A R, et al. Methods for the discovery of new anti-aging products - targeted approaches [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9(4): 383-405.
- [4] Rodal A A, del Signore S J, Martin A C. *Drosophila* comes of age as a model system for understanding the function of cytoskeletal proteins in cells, tissues, and organisms [J]. *Cytoskeleton*, 2015, 72(5): 207-224.
- [5] Gruber J, Chen C, Fong S, et al. *Caenorhabditis elegans*: what we can and cannot learn from aging worms [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(3): 256-279.
- [6] Stenvinkel P, Kooman J P, Shiels P G. Nutrients and ageing [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2016, 19(1): 19-25.
- [7] Rubin G M. A brief history of *drosophila*'s contributions to genome research [J]. *Science*, 2000, 287(5461): 2216-2218.
- [8] Giot L. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 2003, 302(5651): 1727-1736.
- [9] Jana S C, Bettencourt-Dias M, Durand B, et al. *Drosophila melanogaster* as a model for basal body research [J]. *Cilia*, 2016, 5: 22.
- [10] Martinek S, Young M. Specific genetic interference with behavioral rhythms in *Drosophila* by expression of inverted repeats [J]. *Genetics*, 2000, 156(4): 1717.
- [11] 薛立英,高丽,秦雪梅,等.药食同源中药抗衰老研究进展 [J]. *食品科学*, 2017, 38(15): 302-309.
- [12] Shen L R, Xiao F, Yuan P, et al. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila* [J]. *AGE*, 2013, 35(4): 1133-1142.
- [13] Navrotskaya V V, Oxenkrug G, Vorobyova L I, et al. Berberine prolongs life span and stimulates locomotor activity of *Drosophila melanogaster* [J]. *Am J Plant Sci*, 2012, 3(7): 1037-1040.
- [14] Kim M S. Korean red ginseng tonic extends lifespan in *D. melanogaster* [J]. *Biomol Ther*, 2013, 21(3): 241-245.
- [15] Mora M, Bonilla E, Medina-Leendertz S, et al. Minocycline increases the activity of superoxide dismutase and reduces the concentration of nitric oxide, hydrogen peroxide and mitochondrial malondialdehyde in manganese treated *Drosophila melanogaster* [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(7): 1270-1278.
- [16] Peng C, Chan H Y E, Li Y M, et al. Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies [J]. *Exp Gerontol*, 2009, 44(12): 773-783.
- [17] Wang C X, Wheeler C T, Alberico T, et al. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster* [J]. *AGE*, 2013, 35(1): 69-81.
- [18] 段丹丹,高丽,王珂欣,等.黄芩素通过抗氧化应激延长果蝇寿命的机制 [J]. *药学报*, 2016, 51(9): 1401-1406.
- [19] Snellman E, Strozyk M, Segerbäck D, et al. Effect of the spectral range of a UV lamp on the production of cyclobutane pyrimidine dimers in human skin *in situ* [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2003, 19(6): 281-286.
- [20] 张泽生,邵婵,胡莎.酸枣提取物对紫外损伤果蝇抗衰老的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(22): 5642-5644.
- [21] 雷萌萌,张民,张泽生,等.黑蒜对紫外照射损伤果蝇寿命和抗氧化能力的影响 [J]. *食品科技*, 2014, 39(8): 87-90.
- [22] Castro J P, Carareto C M A. *Drosophila melanogaster* P transposable elements: mechanisms of transposition and regulation [J]. *Genetica*, 2004, 121(2): 107-118.
- [23] Williamson J, Goldman J, Marder K S. Genetic aspects of alzheimer disease [J]. *Neurol*, 2009, 15(2): 80-86.
- [24] 段丹丹,高丽,秦雪梅,等.果蝇在药理学研究中的应用 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(19): 1638-1642.
- [25] Wang L, Chiang H C, Wu W, et al. Epidermal growth factor receptor is a preferred target for treating Amyloid- β -induced memory loss [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(41): 16743-16748.
- [26] 王俊杰,王敏,张丽红,等. $\text{A}\beta 42$ 转基因AD果蝇的构建及在药物筛选中的运用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(6): 745-751.
- [27] Siddique Y H, Naz F, Jyoti S. Effect of curcumin on lifespan, activity pattern, oxidative stress, and apoptosis

- in the brains of Transgenic *Drosophila* Model of Parkinson's disease [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 1-6.
- [28] 韩顺凯. 叶黄素对果蝇抗衰老机理的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2013.
- [29] Rand M D. Drosophotoxicology: the growing potential for drosophila in neurotoxicology [J]. Neurotoxicology Teratol, 2010, 32(1): 74-83.
- [30] Howlett I C, Tanouye M A. Seizure-sensitivity in drosophila is ameliorated by dorsal vessel injection of the antiepileptic drug valproate [J]. J Neurogenetics, 2013, 27(4): 143-150.
- [31] Dean J M. The relationship between lifespan and reproduction in the grasshopper *Melanoplus* [J]. Oecologia, 1981, 48(3): 385-388.
- [32] Chattopadhyay D, Chitnis A, Talekar A, et al. Hormetic efficacy of rutin to promote longevity in *Drosophila melanogaster* [J]. Biogerontology, 2017, 18(3): 397-411.
- [33] Lee G J, Lim J J, Hyun S. Minocycline treatment increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila* via FOXO [J]. Oncotarget, 2017, 8(50): 87878-87890.
- [34] 王哲鹏, 刘瑞芳, 王安如, 等. 紫外辐射对野生型、黑檀体和黄体果蝇寿命、繁殖力、求爱行为及生化指标的影响 [J]. 中国科学(C辑: 生命科学), 2008, 38(9): 816-824.
- [35] McRobert S P, Tompkins L. The effect of transformer, doublesex and intersex mutations on the sexual behavior of *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 1985, 111(1): 89-96.
- [36] Gailey D A, Jackson F R, Siegel R W. Conditioning mutations in *Drosophila melanogaster* affect an experience-dependent behavioral modification in courting males [J]. Genetics, 1984, 106(4): 613-623.
- [37] Weinrich T W, Coyne A, Salt T E, et al. Improving mitochondrial function significantly reduces metabolic, visual, motor and cognitive decline in aged *Drosophila melanogaster* [J]. Neurobiol Aging, 2017, 60: 34-43.
- [38] 宋朝春. 阿司匹林对果蝇抗衰老作用及其机制研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- [39] 闫明亮, 周玉枝, 李明花, 等. 基于¹H-NMR代谢组学的黄芩醇提取物延长果蝇寿命研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1714-1722.
- [40] Yin F, Jiang T Y, Cadenas E. Metabolic triad in brain aging: mitochondria, insulin/IGF-1 signalling and JNK signalling: Figure 1 [J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(1): 101-105.
- [41] Zhou Z P, Chen S R, Zhao H S, et al. Probucol inhibits neural cell apoptosis via inhibition of mTOR signaling pathway after spinal cord injury [J]. Neuroscience, 2016, 329: 193-200.
- [42] Mazucanti C, Cabral-Costa J, Vasconcelos A, et al. Longevity pathways (mTOR, SIRT, insulin/IGF-1) as key modulatory targets on aging and neurodegeneration [J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15(21): 2116-2138.
- [43] Piper M D W, Partridge L. *Drosophila* as a model for ageing [J]. Biochim Et Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis, 2018, 1864(9): 2707-2717.
- [44] Bomfim T R, Forny-Germano L, Sathler L B, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers [J]. J Clin Inv, 2012, 122(4): 1339-1353.
- [45] Chae C H, Jung S L, An S H, et al. Retraction notice to 'Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus' [Neuroscience 164 (2009) 1665 - 1673] [J]. Neuroscience, 2013, 231: 445.
- [46] Gao L, Duan D D, Zhang J Q, et al. A bioinformatic approach for the discovery of antiaging effects of baicalein from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Rejuvenation Res, 2016, 19(5): 414-422.
- [47] Jafari M, Felgner J S, Bussel I I, et al. Rhodiola: A promising anti-aging Chinese herb [J]. Rejuvenation Res, 2007, 10(4): 587-602.
- [48] Xin X X, Chen Y, Chen D, et al. Supplementation with major royal-jelly proteins increases lifespan, feeding, and fecundity in drosophila [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(29): 5803-5812.
- [49] 欧海龙, 张庆海. 姜黄素对果蝇抗氧化能力和衰老的影响 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(4): 594-598.
- [50] Lin W S, Chen J Y, Wang J, et al. The anti-aging effects of Ludwigia octovalvis on *Drosophila melanogaster* and SAMP8 mice [J]. AGE, 2014, 36(2): 689-703.
- [51] Xu Z F, Feng W, Shen Q, et al. Rhizoma coptidis and berberine as a natural drug to combat aging and aging-related diseases via anti-oxidation and AMPK activation [J]. Aging Dis, 2017, 8(6): 760.
- [52] 刘帅, 杨小兰, 张晓云. 长山药粗多糖对果蝇抗衰老作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 339-341.
- [53] Bartke A. Insulin and aging [J]. Cell Cycle, 2008, 7(21): 3338-3343.
- [54] Barbieri M, Bonafè M, Franceschi C, et al. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans [J]. Am J Physiol - Endocrinol Metab, 2003, 285(5): E1064-E1071.
- [55] Suh Y, Atzmon G, Cho M O, et al. Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(9): 3438-3442.