

# 基于<sup>1</sup>H-NMR代谢组学的黄芪甲苷对秀丽隐杆线虫寿命的延长作用研究

薛晓利, 张建琴\*, 马 雯, 李震宇, 秦雪梅\*

山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

**摘要:**目的 研究黄芪甲苷(AS-IV)对秀丽隐杆线虫寿命的影响,并探索其在干预秀丽隐杆线虫衰老过程中代谢物的变化规律。方法 分别收集对照组、衰老模型组和AS-IV组秀丽隐杆线虫样本,采用<sup>1</sup>H-NMR代谢组学技术及多元统计分析方法研究秀丽隐杆线虫组织内源性代谢产物的变化。结果 5 μmol/L的AS-IV可以显著升高衰老线虫组织中8种氨基酸的含量,包括异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、琥珀酸、牛磺酸和苏氨酸,同时可降低葡萄糖的含量。结论 5 μmol/L的AS-IV能够通过干预机体氨基酸代谢、能量代谢等发挥延缓衰老的作用。代谢组学方法为进一步研究AS-IV延缓衰老的作用机制提供了科学依据。

**关键词:** 黄芪甲苷; 秀丽隐杆线虫; 寿命; 衰老; 代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2274-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.007

## Analysis on effect of astragaloside IV on lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* based on <sup>1</sup>H-NMR metabolomics

XUE Xiao-li, ZHANG Jian-qin, MA Wen, LI Zhen-yu, QIN Xue-mei

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

**Abstract: Objective** To investigate the anti-aging effects and the changes of endogenous metabolites in *Caenorhabditis elegans* by using astragaloside IV (AS-IV). **Methods** Nematodes tissue were collected from control group, age group and AS-IV group to analyze the metabolic profile changes among different groups by nuclear magnetic resonance (NMR). **Results** Using <sup>1</sup>H-NMR metabolomics and multivariate statistical analysis methods, the changes in the levels of endogenous metabolites in the model group *C. elegans* were obtained, including eight increasing amino acids isoleucine, leucine, valine, glutamate, glutamine, succinate, taurine and threonine and decreasing compound glucose, compared with the control group. AS-IV (5 μmol/L) can significantly regulate all of them. **Conclusion** AS-IV can regulate amino acid metabolism and energy metabolism to anti-aging. The metabolomic approach is an effective tool for the investigation of the pharmacologic mechanism of AS-IV and it is helpful for further research.

**Key words:** astragaloside IV; *Caenorhabditis elegans*; lifespan; aging; metabolomics

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,始载于东汉《神农本草经》,列为上品,现为我国的大宗药材之一。其具有补气固表、利尿托毒、敛疮生肌的功效,在临床上是应用最为广泛的补气益中药物。有研究表明,黄芪水提液能够延长斑马鱼的寿命<sup>[1]</sup>。也有研究表明黄芪水提液中的一

些成分具有抗衰老作用,如黄芪多糖可以延长野生型线虫、突变体 AM141 和 HA759 线虫的寿命<sup>[2]</sup>;黄芪总皂苷可以延缓 D-半乳糖所致的衰老<sup>[3]</sup>;黄芪黄酮可以延缓衰老过程中小鼠胸腺的萎缩,提高机体的免疫功能<sup>[4]</sup>。然而,黄芪发挥药理活性的主要物质黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)<sup>[5]</sup>是否具有抗衰老活性及其抗衰老机制鲜有报道。本实验就 AS-IV 对秀丽隐杆线虫寿命的影响展开研究。

收稿日期: 2017-12-07

基金项目: 山西省高等学校科技创新项目(2015119); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 山西省应用基础研究项目(201601D202058)

作者简介: 薛晓利(1992—),女,在读硕士,研究方向为基于模式生物的中药活性成分筛选。E-mail: 695029166@qq.com

\*通信作者 张建琴(1983—),女,博士,讲师,硕士生导师,研究方向为基于模式生物的中药活性成分筛选。

Tel: (0351)7018379 E-mail: jiangqinzh3@sxu.edu.cn

秦雪梅(1964—),女,博士生导师,教授,研究方向为中药质量标准及代谢组学研究。E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

当今社会人口老龄化日益加重,已对我国社会经济的稳定和发展产生了影响,与衰老相关的疾病也引起了研究者的广泛关注,希望能够进一步揭开衰老的神秘面纱,探索更多衰老相关的机制<sup>[6]</sup>。秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 因其生命系统相对简单、生活周期短、研究成本较低、遗传背景清楚和易于在实验室培养,且 60%~80%基因与人类的相关基因高度保守,是研究衰老及衰老相关疾病的理想模式生物。目前,已有许多研究者利用秀丽隐杆线虫自然衰老模型进行了多种药物的抗衰老活性研究,包括中药提取物(黄芪多糖<sup>[2]</sup>、rBTI<sup>[7]</sup>、三七多糖<sup>[8]</sup>和白及多糖<sup>[9]</sup>等)、中药单体化合物(绿原酸<sup>[10]</sup>、黄芩素<sup>[11]</sup>和白藜芦醇<sup>[12]</sup>等)和化学药(阿司匹林<sup>[13]</sup>和二甲双胍<sup>[14]</sup>等)。代谢组学是研究关于生物体基因的改变或所处的环境变化后其内源性代谢物质种类、数量及其变化规律的科学,它是以组群指标分析为基础,以高通量检测和数据处理为手段,以信息建模与系统整合为目标来研究生物体整体或组织细胞系统的动态代谢变化,能够揭示内在和外在因素影响下代谢整体的变化轨迹,进而反映机体生理变化过程中所发生的一系列生物事件,因此在研究系统性病变中有其独特的优势<sup>[15-16]</sup>。秀丽隐杆线虫易于培养、适合于高通量筛选、生活周期短、能够进行稳定同位素标记等优点使其非常适用于代谢组学研究。

核磁共振是一种代谢组学常用的技术,其优点在于样本的前处理方式相对简单、对样本无破坏性、重现性较好、分析时间较短,并且对代谢物的检测比较全面,能够更加完整地展现出整个代谢轮廓<sup>[17-19]</sup>。国外关于秀丽隐杆线虫的代谢组学技术主要集中于核磁方法学的建立和突变体代谢组的研究<sup>[20-23]</sup>,鲜有关于药物干预秀丽隐杆线虫后其机体代谢组动态变化的研究。

本课题组研究表明,5  $\mu\text{mol/L}$  的 AS-IV 可以显著延长线虫的平均寿命和最高寿命,但 AS-IV 是通过何种信号通路来发挥其抗衰老的作用并不清楚。因此本研究拟采用基于  $^1\text{H-NMR}$  的代谢组学方法,建立秀丽隐杆线虫的自然衰老过程的代谢轮廓,并进一步分析 AS-IV 对秀丽隐杆线虫整体代谢水平的影响,以期从代谢水平挖掘 AS-IV 抗衰老的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* N2 和大

肠杆菌 *Escherichia coli* OP50 (*E. coli* OP50) 由山西大学应用生物研究所马恩波教授课题组提供。秀丽隐杆线虫培养采用 Brenner 标准方法<sup>[24]</sup>,即在 NGM 培养基上加适量大肠杆菌 *E. coli* OP50, 20  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养。*E. coli* OP50 为尿嘧啶缺陷型菌株,在 NGM 培养基上不能大量生长,有利于线虫观察。

### 1.2 药品与试剂

AS-IV,江苏永健医药科技有限公司(质量分数 98%,批号 YJ-A4-HQ1120315);琼脂粉, Solarbio 公司(北京);蛋白胨和酵母提取物,北京奥博星生物科技有限责任公司;其他无机试剂,天津市风船化学试剂有限公司;2,3,3-三甲基甲硅烷基丙酸(TSP)、 $\text{D}_2\text{O}$ ,美国默克试剂公司。

NGM 培养基每升含 3 g 氯化钠、21 g 琼脂粉、2.5 g 蛋白胨、1 mL 胆固醇乙醇溶液(5 mg/mL)、1 mL  $\text{CaCl}_2$  溶液(1 mol/L)、1 mL  $\text{MgSO}_4$  溶液(1 mol/L)和 25 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液(pH 值 6, 1 mol/L)。

### 1.3 仪器

生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;体视显微镜,重庆澳浦光电科技有限公司;洁净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;FA2004 电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;BCD-271TMCM 冰箱,青岛海尔股份有限公司;高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;UP-250 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;Bruker 600 MHz Avance III NMR 谱仪,德国布鲁克公司。

## 2 方法

### 2.1 线虫同步化处理

在线虫培养皿中加约 1 mL 的 M9 buffer (1 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液, pH 6) 溶液将线虫冲洗至 1.5 mL EP 管中;5 000 r/min 离心 1 min,弃上清。向 EP 管中加碱裂解液至满,涡旋震荡 5~10 min,直到看不见线虫为止。5 000 r/min 离心 1 min,弃上清。加入 M9 buffer 洗涤,3 000 r/min 离心 1 min,弃上清。重复用 M9 buffer 洗涤 4~6 次,直到闻不到刺激性气味为止,将洗涤干净的线虫放入培养皿中,置于 20  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中。

### 2.2 分组及给药

将同步化的线虫分为 3 组,每组 120 只。对照组线虫以 NGM 培养基喂养 3 d;衰老组线虫以 NGM 培养基喂养 13 d;AS-IV 组线虫以含 5  $\mu\text{mol/L}$  AS-IV

的培养基喂养 13 d; 所有线虫均在相同条件下培养相应时间后收集于 EP 管中, 并以液氮速冻, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 待测。

### 2.3 线虫样品处理

样品处理参考文献方法<sup>[20]</sup>, 稍作修改。取线虫组织约 600 mg 置于 4 mL 的 EP 管中, 加入甲醇-水 (4:1) 2.4 mL, 于冰浴上超声提取 15 min, 以 13 000 r/min 离心 15 min。将上清液转移至 4 mL 的 EP 管中, 再加入 1.2 mL 80% 甲醇提取 1 次, 合并 2 次的上清液, 冷冻干燥即得。

### 2.4 线虫代谢物 $^1\text{H}$ -NMR 测定

干燥后的线虫样品加入含 TSP 的 10% 氘代重水缓冲液 600  $\mu\text{L}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于 5 mm 核磁管中, 于 600 MHz NMR 仪上进行  $^1\text{H}$ -NMR 测定。采用 noesygppr1d 脉冲序列, 扫描次数为 64, 谱宽 12 345.7 Hz, 脉冲时间 14 s, 采样时间 2.654 s, 弛豫时间 1.0 s, 采样数据点 65 536, FID 分辨率 0.188 Hz, 采样间隔 40.5 s, 内标为 TSP, 进行分析。

### 2.5 $^1\text{H}$ -NMR 图谱处理

$^1\text{H}$ -NMR 图谱采用 MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 软件进行处理。以 TSP 校准化学位移, 校准相位和基线后, 谱图中  $\delta$  4.50~5.00 处切除残留水峰, 并以 0.01 对谱图  $\delta$  0.80~9.00 进行分段积分, 以总峰面积进行归一化后生成 Excel 数据文件, 将其导入 SIMCA-P (Version 13.0, Umetrics 公司, 瑞士) 软

件中进行多元统计学分析。

### 2.6 统计学分析

将积分数据导入 SIMCA-P 13.0 软件中进行模式识别分析。模式识别包括无监督模式识别和有监督模式识别。无监督模式的主成分分析 (PCA) 主要用于观察实验中的组间分离趋势以及是否有异常点的出现。有监督模式的正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 用于找到与 AS-IV 抗衰老相关的潜在生物标志物。运用 OPLS-DA 数据的主成分 loading 图结合 VIP 值 ( $\text{VIP} > 1$ ) 和  $P < 0.05$  寻找小分子差异代谢物。并用 SPSS 16.0 软件对差异成分进行  $t$  检验。差异代谢物相对峰面积结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

### 2.7 代谢通路分析

应用 MetPA (metabolomics pathway analysis) 分析平台分析 AS-IV 干预机体后差异显著的代谢通路<sup>[25]</sup>。采用  $^1\text{H}$ -NMR 分析寻找到 33 种代谢产物, 从中筛选出 12 种差异代谢物。将这些代谢物上传到 MetPA 平台, 采用线虫代谢物数据库进行代谢物匹配, 之后进行代谢通路富集分析和拓扑分析。

## 3 结果

### 3.1 NMR 图谱的指认与分析

结合每个代谢物的化学位移、裂峰情况及偶合常数, 并参照 Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc. 公司, 加拿大)、Human Metabolome Database (HMDB)、Biological Magnetic Resonance DataBank (BMRB) 数据库以及文献报道<sup>[26-28]</sup>中数据对秀丽隐杆线虫组织代谢产物进行指认, 结果见图 1 和表 1。

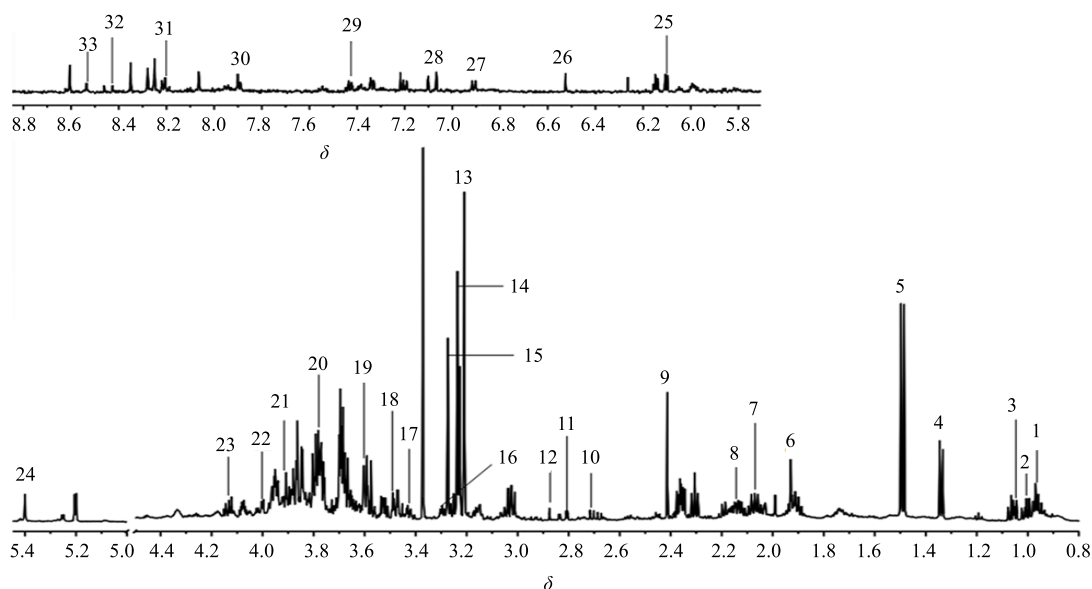


图 1 线虫  $^1\text{H}$ -NMR 核磁图谱

Fig. 1 Typical  $^1\text{H}$ -NMR spectra of *C. elegans*

表 1 线虫组织中主要代谢产物的  $^1\text{H}$ -NMR 谱峰归属

Table 1 Peak attribution in  $^1\text{H}$ -NMR spectra for main metabolites of *C. elegans*

| 峰号 | 代谢物    | $\delta_{\text{H}}$                              | 峰号 | 代谢物           | $\delta_{\text{H}}$                            |
|----|--------|--------------------------------------------------|----|---------------|------------------------------------------------|
| 1  | 异亮氨酸   | 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz), 1.01 (d, $J = 7.0$ Hz)   | 17 | 牛磺酸           | 3.25 (t, $J = 6.0$ Hz), 3.43 (t, $J = 6.0$ Hz) |
| 2  | 亮氨酸    | 0.96 (d, $J = 7.1$ Hz), 0.97 (d, $J = 6.6$ Hz)   | 18 | 甘氨酸           | 3.56 (s)                                       |
| 3  | 缬氨酸    | 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz), 1.05 (d, $J = 7.2$ Hz)   | 19 | 苏氨酸           | 3.60 (d, $J = 7.2$ Hz)                         |
| 4  | 乳酸     | 1.33 (d, $J = 8.4$ Hz), 4.12 (q, $J = 8.3$ Hz)   | 20 | 2-氨基乙酸        | 3.77 (t, $J = 6.2$ Hz)                         |
| 5  | 丙氨酸    | 1.4 (d, $J = 8.6$ Hz)                            | 21 | $\alpha$ -葡萄糖 | 3.90 (dd, $J = 12.3, 2.1$ Hz)                  |
| 6  | 醋酸     | 1.92 (s)                                         | 22 | 马尿酸           | 3.97 (d, $J = 7.5$ Hz)                         |
| 7  | 谷氨酸    | 2.09 (m), 2.35 (m), 3.78 (m)                     | 23 | 苏氨酸           | 4.24 (m)                                       |
| 8  | 谷氨酰胺   | 2.15 (m), 2.46 (m), 3.78 (m)                     | 24 | 尿囊素           | 5.38 (s)                                       |
| 9  | 琥珀酸    | 2.41 (s)                                         | 25 | 肌苷            | 6.11 (d, $J = 6.0$ Hz), 8.24 (s), 8.35 (s)     |
| 10 | 柠檬酸    | 2.54 (d, $J = 18.2$ Hz), 2.70 (d, $J = 18.2$ Hz) | 26 | 延胡索酸          | 6.53 (s)                                       |
| 11 | 天冬酰胺   | 2.82 (m), 2.96 (m)                               | 27 | 酪氨酸           | 6.91 (m), 7.19 (m)                             |
| 12 | 三甲胺    | 2.91 (s)                                         | 28 | 组氨酸           | 7.09 (s), 7.38 (s)                             |
| 13 | 胆碱     | 3.20 (s)                                         | 29 | 苯丙氨酸          | 7.33 (m), 7.38 (m), 7.43 (m)                   |
| 14 | 磷脂酰胆碱  | 3.22 (s)                                         | 30 | 尿苷            | 7.88 (d, $J = 8.4$ Hz)                         |
| 15 | 三甲胺氧化酶 | 3.26 (s)                                         | 31 | 次黄嘌呤          | 8.20 (s), 8.22 (s)                             |
| 16 | 甜菜碱    | 3.26 (s), 3.91 (s)                               | 32 | 甲酸            | 8.46 (s)                                       |
|    |        |                                                  | 33 | 肌苷三磷酸         | 8.51 (s)                                       |

### 3.2 NMR 数据多元统计分析

$^1\text{H}$ -NMR 图谱提供了秀丽隐杆线虫组织中内源性代谢物的基本信息, 为了进一步确定各组间的代谢物差异, 需要对复杂数据进行降维处理, 以消除多信息共存中的重叠部分, 提取出主要成分进行分析。PCA 可以反映数据的原始状态, 直观地显示不同样品之间的整体差异<sup>[29]</sup>, 故先对 3 组线虫样本进行 PCA, 结果见图 2, 对照组和衰老模型组已有分开的趋势, 表明伴随年龄的变化, 线虫的代谢轮廓会产生一定的变化。而 AS-IV 组与衰老模型组分开, 且更接近于对照组, 这表明 AS-IV 在一定程度上可以改善线虫的衰老。对照组组内比较分散, 可能是由线虫个体差异导致。但是 PCA 只能反映数据的原始状态以及组织样本的自然分布和组别关系, 不能忽略与研究目的无关的组内误差和随机误差, 不利于组间差异的分析和差异代谢物的寻找。

为了确定随年龄变化的代谢产物, 对对照组和衰老模型组线虫代谢物进行 OPLS-DA, 使不同年龄组之间得到最大程度的分离, 并有效降低组内个体差异。分别得到 OPLS-DA 散点图 (图 3) 和相应的 S-plot 载荷图 (图 4)。依据图中 S 曲线上离原点越远的点 VIP 值越大, 对分组贡献越大的原则, 得到 VIP>1 的代谢产物。对这些代谢物的峰面积进行独

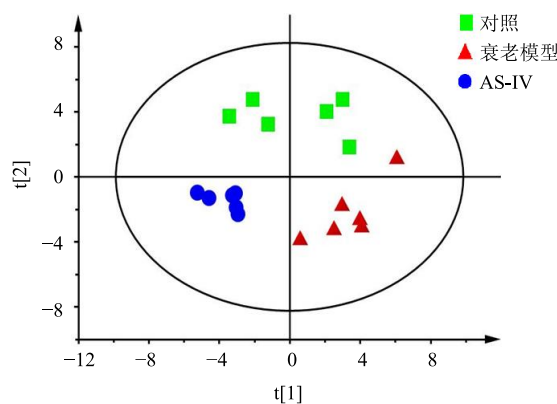


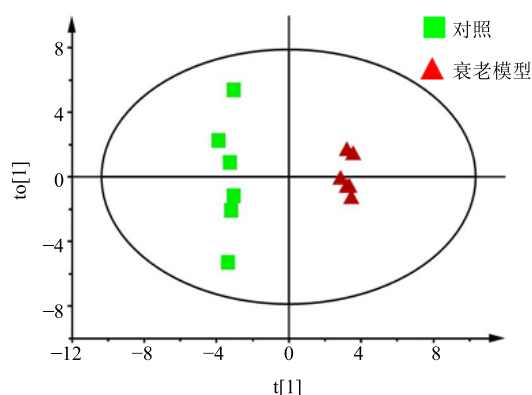
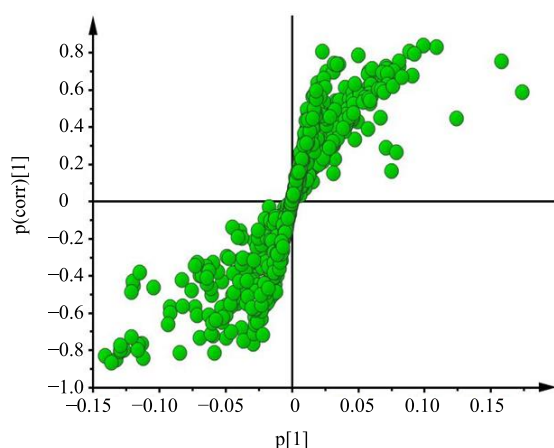
图 2 线虫  $^1\text{H}$ -NMR 谱的 PCA

Fig. 2 PCA analysis in  $^1\text{H}$ -NMR spectra of *C. elegans*

立样本  $t$  检验, 得到峰面积具有显著差异的潜在生物标志物, 共筛选出 12 种差异代谢物 (异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、醋酸、谷氨酸、谷氨酰胺、琥珀酸、牛磺酸、葡萄糖、甜菜碱、苏氨酸)。AS-IV 对这些代谢物影响的进行进一步统计分析结果见图 5。

### 3.3 代谢途径分析

为研究 AS-IV 调节的所有代谢物所涉及的代谢途径, 研究各个标志物之间的相互作用关系, 参考 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库, 寻找 12 个生物标志物所涉及的代谢通路。

图 3 线虫  $^1\text{H-NMR}$  谱 OPLS-DA 散点图Fig. 3 OPLS-DA scores plot derived from  $^1\text{H-NMR}$  spectra of *C. elegans*图 4 线虫  $^1\text{H-NMR}$  谱 S-plot 载荷图Fig. 4 S-plot derived from  $^1\text{H-NMR}$  spectra of *C. elegans*

将上述的 12 个差异代谢物导入 MetPA 软件, 结果见图 6, Pathway Impact 表征由拓扑分析计算所得的代谢通路的重要性值,  $-\lg P$  表示代谢通路富集分析的显著性水平。代谢通路的 Pathway Impact 与  $-\lg P$  值越大, 不同组间代谢差异的相关性越高, 图中的圆圈就越大<sup>[30]</sup>。本研究将代谢通路影响值设置为 0.20, 影响值高于 0.20 即被视为潜在的靶标代谢途径, 主要包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成; 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 谷氨酰胺代谢; 牛磺酸和亚牛磺酸代谢 4 条代谢通路。结果显示衰老过程主要跟一些氨基酸的生物合成和代谢途径密切相关。将这些代谢途径中相关的生物标志物相关联, 构建衰老相关的代谢网络示意图 (图 7)。

#### 4 讨论

衰老是指机体随时间的推移, 多个组织器官系统地发生变化的过程。本实验采用模式生物秀丽隐杆线虫探讨 AS-IV 对自然衰老过程的干预作用。

$^1\text{H-NMR}$  代谢组学从内源性代谢产物出发, 能够较全面地揭示生物体给药前后体内系统性变化<sup>[31]</sup>。实验结果显示对照组线虫的代谢物与衰老模型组可明显区分, 随着线虫年龄增长其代谢轮廓发生了一定变化, 且在给予 AS-IV 后部分氨基酸 (异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、琥珀酸、牛磺酸、葡萄糖和苏氨酸) 发生显著回调。根据上述差异代谢物的变化, 可以从以下几个方面阐述 AS-IV 抗衰老的作用机制。

#### 4.1 能量代谢

异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸同为支链氨基酸, 其合成所需的碳骨架来源于糖无氧代谢和有氧代谢的中间产物。它们在调节机体能量代谢平衡方面起着重要的作用, 而其含量的降低表明机体的衰老可能与能量代谢紊乱相关<sup>[32]</sup>。与对照组相比, 衰老模型组线虫代谢物中这 3 种氨基酸含量降低, 而 AS-IV 组显著回调, 这表明 AS-IV 抗衰老与能量代谢相关。此外, 葡萄糖是体内能量代谢的主要来源, 随着年龄的增长, 机体细胞吸收葡萄糖的能力会下降, 糖原合成及糖氧化代谢也明显降低<sup>[33]</sup>, 因此导致机体在衰老过程中体内葡萄糖的含量升高。本研究发现在线虫衰老过程中体内葡萄糖的含量显著上调, 验证了机体的衰老与能量代谢相关的假说。

#### 4.2 改善线粒体功能

琥珀酸是三羧酸循环的中间产物, 琥珀酸量的降低表明三羧酸循环速率的降低或者线粒体功能的紊乱, 机体能量代谢过程出现障碍, 本研究发现随着线虫衰老进程, 琥珀酸含量显著下降, 表明线虫机体的衰老与能量代谢和线粒体功能紊乱相关; 而 AS-IV 组线虫代谢物中琥珀酸含量显著升高, 表明 AS-IV 抗衰老作用可能与改善线粒体功能相关。

#### 4.3 免疫调节作用

谷氨酰胺能促进营养物质的同化作用, 调节蛋白的合成, 刺激生长激素的产生, 从而增强免疫系统功能, 同时也是体内铵盐的主要存在形式, 其含量伴随年龄的增长降低, 表明机体的衰老可能与免疫调节相关。而 AS-IV 具有抑制炎性介质产生, 增强机体免疫功能的作用<sup>[34]</sup>。由此可见, AS-IV 很可能是通过抗炎、增强机体免疫功能等作用达到延缓衰老的效果。苏氨酸能促进免疫球蛋白和淋巴细胞的合成, 其含量降低会抑制免疫球蛋白、T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的产生, 进而影响免疫功能, 而 AS-IV 具有免疫调节作用<sup>[35]</sup>, 因此 AS-IV 可能是通

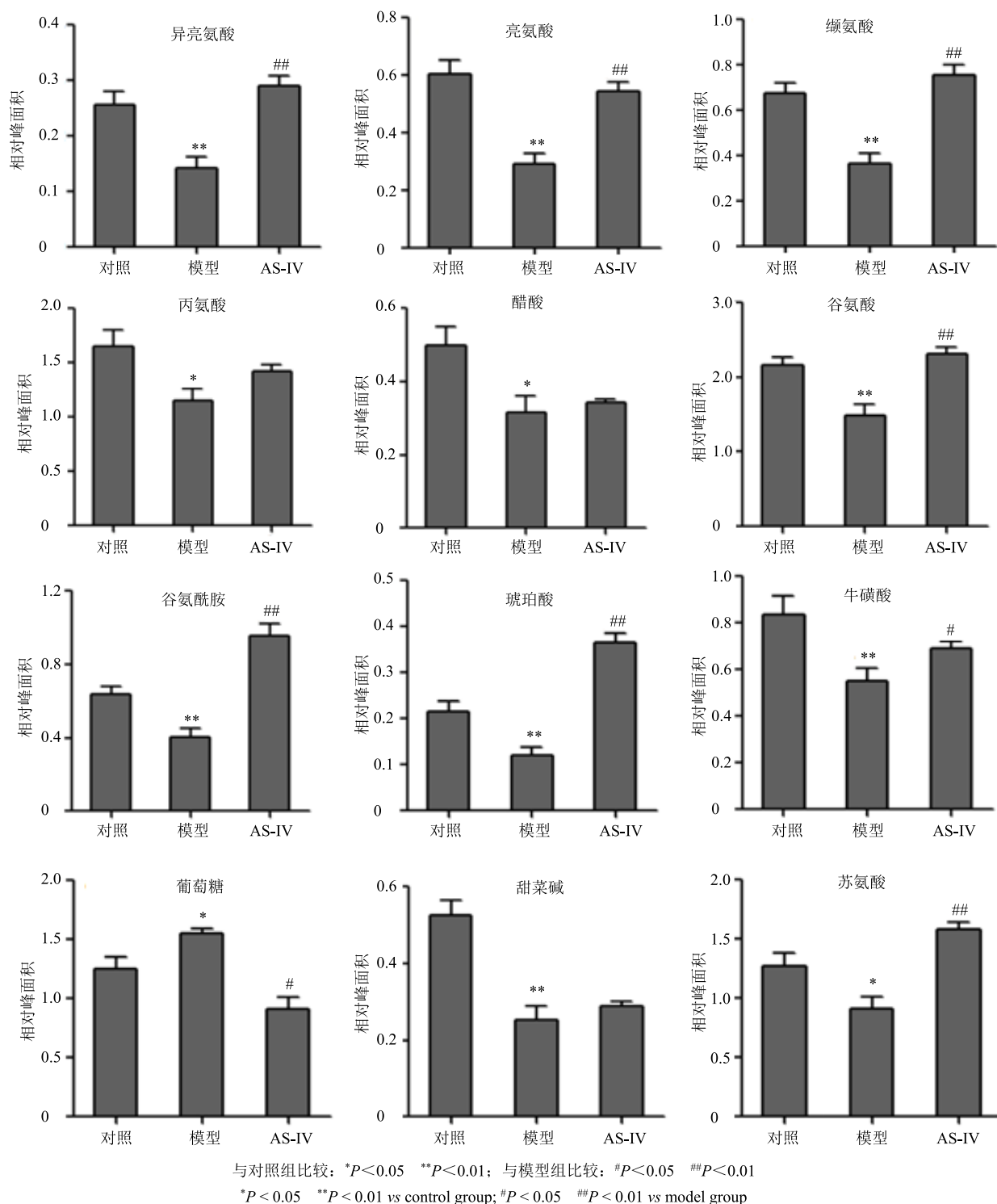


图 5 各组线虫组织中潜在差异代谢物相对峰面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Relative peak areas of some potential differential metabolites in tissues of *C. elegans* in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

过免疫调节作用发挥抗衰老作用。

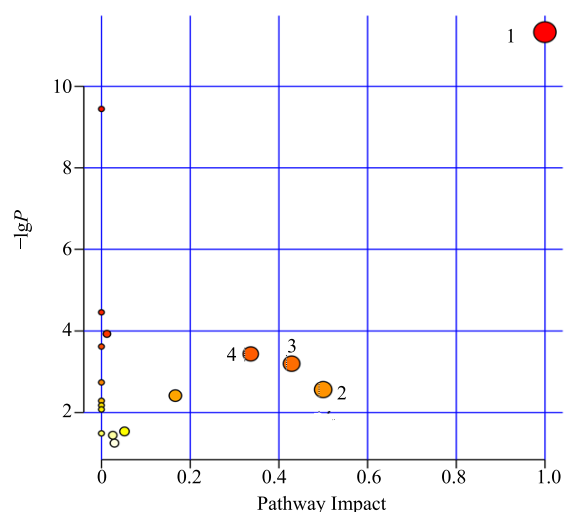
#### 4.4 抗氧化作用

谷氨酸是体内生成谷胱甘肽的底物之一，谷胱甘肽是机体内一种主要的抗氧化剂，因此谷氨酸的缺乏，能直接或间接地降低机体抗氧化能力。本研

究结果显示 AS-IV 可回调衰老线虫体内的谷氨酸。有研究报道 AS-IV 具有抗氧化能力<sup>[36]</sup>，因此其可能通过增强机体的抗氧化能力来发挥其抗衰老作用。

#### 5 小结

综上所述，AS-IV 能够有效干预糖代谢、三羧



1-缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成 2-牛磺酸和亚牛磺酸代谢 3-谷胱甘肽代谢 4-甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢  
1-valine, leucine, and isoleucine biosynthesis 2-taurine and hypotaurine metabolism 3-glutathione metabolism 4-glycine, serine, and threonine metabolism

图 6 代谢通路 MetPA 分析

Fig. 6 MetPA analysis of metabolic pathway

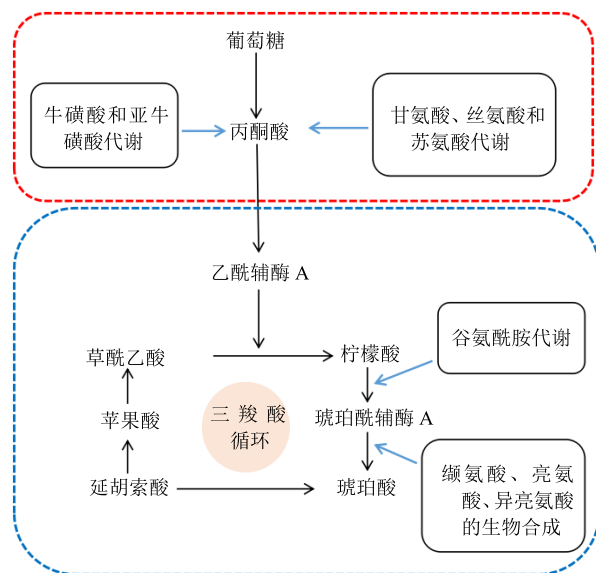


图 7 代谢途径分析

Fig. 7 Analysis plot of metabolic pathways

酸循环和氨基酸代谢，通过抗炎、抗氧化、增强机体免疫和改善线粒体等功能达到延缓衰老的效果。糖代谢、三羧酸循环及氨基酸代谢都会不同程度受到线粒体影响，这为线粒体损伤的衰老机制研究<sup>[37]</sup>提供了依据。本研究从代谢组学角度初步分析了伴随年龄变化线虫组织代谢轮廓的变化，并从代谢谱

图中寻找到有生物学意义的代谢标志物，鉴定了与衰老相关的 12 种生物标志物，并且发现 AS-IV 可回调其中的 8 种标志物，为进一步探讨衰老机制和阐明 AS-IV 延缓衰老的作用机制提供科学依据。

#### 参考文献

- [1] 郭起岳, 张 薇, 茹 丽, 等. 黄芪水提液对斑马鱼衰老模型的作用研究 [A] // 第十一届中国北方实验动物科技年会论文集 [C]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [2] 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(1): 417-424.
- [3] Lei H, Wang B, Li W P, *et al.* Anti-aging effect of astragalosides and its mechanism of action [J]. *Acta Pharm Sin*, 2003, 24(3): 230-240.
- [4] 李淑华, 冯芹喜. 黄芪黄铜 (AF) 延缓衰老作用的实验研究 [J]. *慢性病学杂志*, 2007(2): 40-41.
- [5] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(5): 954-960.
- [6] 赵凡凡, 周玉枝, 高 丽, 等. *D*-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展 [J]. *药学报*, 2017(3): 347-354.
- [7] Li J, Cui X, Wang Z, *et al.* rBTI extends *Caenorhabditis elegans* lifespan by mimicking calorie restriction [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 67(7): 62-71.
- [8] Feng S, Cheng H, Xu Z, *et al.* Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 81(7): 188-194.
- [9] Zhang Y, Lv T, Li M, *et al.* Anti-aging effect of polysaccharide from *Bletillastriata* on nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(43): 449-454.
- [10] Zheng S Q, Huang X B, Xing T K, *et al.* Chlorogenic acid extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2017, 72(4): 464-472.
- [11] Havermann S, Humpf H U, Wäjen W. Baicalein modulates stress-resistance and life span in *C. elegans* via SKN-1 but not DAF-16 [J]. *Fitoterapia*, 2016, 113(3): 123-127.
- [12] Lee J, Kwon G, Park J, *et al.* Brief communication: SIR-2. 1-dependent lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* by oxyresveratrol and resveratrol [J]. *Exp Biol Med*, 2016, 241(16): 1757-1763.
- [13] Ayyadevara S, Bharill P, Dandapat A, *et al.* Aspirin inhibits oxidant stress, reduces age-associated functional declines, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*

- [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(5): 481-490.
- [14] De Haes W, Froominckx L, Van Assche R, *et al.* Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(24): 2501-2509.
- [15] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [16] 赵 珊, 王鹏程, 冯 健, 等. 代谢组学技术及其在中医药研究中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 756-765.
- [17] Williams R E, Lenz E M, Lowden J S, *et al.* The metabonomics of aging and development in the rat: an investigation into the effect of age on the profile of endogenous metabolites in the urine of male rats using <sup>1</sup>H-NMR and HPLC-TOF MS [J]. *Mol Biosyst*, 2005, 1(2): 166-175.
- [18] 田俊生, 那丽丹, 向 欢, 等. 基于核磁代谢组学的驴皮与其伪品的鉴别研究 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 255-261.
- [19] 田俊生, 史碧云, 冯光明, 等. 慢性温和不可预知应激抑郁模型大鼠粪 <sup>1</sup>H-NMR 代谢组学研究 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3170-3176.
- [20] Geier F M, Want E J, Leroi A M, *et al.* Cross-platform comparison of *Caenorhabditis elegans* tissue extraction strategies for comprehensive metabolome coverage [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(10): 3730-3736.
- [21] Izrayelit Y, Robinette S L, Bose N, *et al.* 2D NMR-based metabolomics uncovers interactions between conserved biochemical pathways in the model organism *Caenorhabditis elegans* [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(2): 314-319.
- [22] Atherton H J, Jones O A, Malik S, *et al.* A comparative metabolomic study of NHR-49 in *Caenorhabditis elegans* and PPAR- $\alpha$  in the mouse [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(12): 1661-1666.
- [23] Davies S K, Bundy J G, Leroi A M. Metabolic Youth in middle age: Predicting aging in *Caenorhabditis elegans* using metabolomics [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(11): 4603-4609.
- [24] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(10): 71-94.
- [25] Xia J, Wishart D S. MetPA: A web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(18): 2342-2344.
- [26] Overgaard J, Malmendal A, Sorensen J G, *et al.* Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster* [J]. *J Insect Physiol*, 2007, 53(12): 1218-1232.
- [27] Gey C, Seeger K. Metabolic changes during cellular senescence investigated by proton NMR-spectroscopy [J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134(3/4): 130-138.
- [28] 闫明亮, 周玉枝, 李明花, 等. 基于 <sup>1</sup>H-NMR 代谢组学的黄芩醇提物延长果蝇寿命研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1714-1722.
- [29] 常艳芬, 宫文霞, 郑艳红, 等. 黄芩醇提物干预 D-半乳糖致衰老大鼠的尿液代谢组学研究 [J]. 药理学报, 2016, 51(1): 86-92.
- [30] Su Z H, Jia H M, Zhang H W, *et al.* Hippocampus and serum metabolomic studies to explore the regulation of Chai-hu-Shu-Gan-San on metabolic network disturbances of rats exposed to chronic variable stress [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(3): 549-561.
- [31] Huo T, Chen X, Lu X, *et al.* An effective assessment of valproate sodium-induced hepatotoxicity with UPLC-MS and (HNMR)-H-1-based metabonomics approach [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 969(15): 109-116.
- [32] Li Y, Man S, Li J, *et al.* The antitumor effect of formosanin C on HepG2 cell as revealed by <sup>1</sup>H-NMR based metabolic profiling [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 220(13): 193-199.
- [33] Hoffman J M, Soltow Q A, Li S, *et al.* Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, *Drosophila melanogaster* [J]. *Ageing Cell*, 2014, 13(4): 596-604.
- [34] Zhao P, Wang Y, Zeng S, *et al.* Protective effect of astragaloside IV on lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction via downregulation of inflammatory signaling in mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015, 37(5): 428-433.
- [35] Li Y, Meng T, Hao N, *et al.* Immune regulation mechanism of astragaloside IV on RAW264. 7 cells through activating the NF- $\kappa$ B/MAPK signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49(5): 38-49.
- [36] Lu Y, Li S, Wu H, *et al.* Beneficial effects of astragaloside IV against angiotensin II-induced mitochondrial dysfunction in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(5): 1223-1232.
- [37] Lauri A, Pompilio G, Capogrossi M C. The mitochondrial genome in aging and senescence [J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 18(4): 1-15.