

茯苓多糖在秀丽隐杆线虫中的抗氧化和抗衰老作用及其作用机制

宋祯彦¹, 黄亚琦^{1#}, 王也彤¹, 邓嘉¹, 甄达贵², 谭年花¹, 成绍武^{1*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

2. 靖州苗族侗族自治县质量计量检验检测中心, 湖南 怀化 418400

摘要: **目的** 分析茯苓多糖成分对秀丽隐杆线虫体内抗氧化和抗衰老作用的影响, 并阐明其潜在机制。 **方法** 将 L4 期线虫随机分为低、中、高剂量 (10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 的茯苓多糖组和空白组进行培养; 采用百草枯抗氧化实验、寿命实验、脂褐素测定实验、应激实验 (紫外/高温)、生理功能实验 (吞咽频率/摆动次数/产卵量) 探究茯苓多糖对野生型秀丽隐杆线虫抗氧化和抗衰老作用; 将突变体线虫分为茯苓多糖组 (40 $\mu\text{g/mL}$) 和空白组, 采用应激实验、寿命实验、线虫 BZIP 结构域蛋白 1 (protein skinhead-1, *skn-1*) 绿色荧光蛋白的细胞定位检测、qRT-PCR 实验、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测探究茯苓多糖的抗衰老的作用机制。 **结果** 茯苓多糖显著延长线虫的寿命, 减少脂褐素的产生, 增强对紫外线和热胁迫的抵抗力, 提高咽部泵血频率和运动能力, 显示出显著的抗衰老生物活性。茯苓多糖的抗衰老作用是通过 *skn-1* 信号通路介导的, 而不依赖于胰岛素样受体 β 亚基 (insulin-like receptor subunit beta, *daf-2*) 和神经元乙酰胆碱受体亚基 eat-2 (neuronal acetylcholine receptor subunit eat-2, *eat-2*) 信号通路。茯苓多糖增加了线虫中 *skn-1* 转录因子的核定位, 上调了下游抗氧化基因谷胱甘肽 S-转移酶 4 (glutathione S-transferase 4, *gst-4*) 和 *gst-7* 的转录水平, 并显著降低了细胞内 ROS 水平。然而, 在 *skn-1* 突变体线虫中未观察到这些效应。 **结论** 茯苓多糖在秀丽隐杆线虫中表现出抗氧化和抗衰老的作用, 其机制涉及调控 *skn-1* 转录因子及其下游抗氧化基因, 最终降低 ROS 水平, 增强机体的抗氧化应激能力。

关键词: 茯苓多糖; 秀丽隐杆线虫; 抗衰老; 抗氧化; BZIP 结构域蛋白 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1133-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.008

Antioxidant and anti-aging effects and mechanism of *Poria cocos* polysaccharides in *Caenorhabditis elegans*

SONG Zhenyan¹, HUANG Yaqi¹, WANG yetong¹, DENG Jia¹, ZHEN Dagui², TAN Nianhua¹, CHENG Shaowu¹

1. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Jingzhou Miao and Dong Autonomous County Quality Measurement Inspection and Testing Center, Huaihua 418400, China

Abstract: **Objective** To analyze the impact of *Poria cocos* polysaccharides (PCP) on antioxidant and anti-aging effects in *Caenorhabditis elegans* and elucidate its potential mechanisms. **Methods** L4 stage *C. elegans* were randomly divided to low-, medium-, high-dose (10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$) PCP groups, and control group for cultivation. Anti-oxidant experiments, lifespan assays, lipofuscin determination, stress tests (UV/heat), and physiological function experiments (swallowing frequency/number of swings/egg-laying amount) were conducted to investigate the anti-oxidant and anti-aging effects of PCP on wild-type *C. elegans*. Mutant *C. elegans* were divided into PCP group (40 $\mu\text{g/mL}$) and control group. Stress tests, lifespan assays, cell localization detection of *C. elegans* BZIP domain protein 1 (*skn-1*) green fluorescent protein, qRT-PCR experiments, and reactive oxygen species (ROS) detection were performed to explore the mechanisms of PCP in anti-aging. **Results** PCP significantly extended the lifespan of *C. elegans*, reduced lipofuscin production, enhanced resistance to UV and heat stress, increased pharyngeal pumping frequency, and improved locomotor

收稿日期: 2023-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774129); 国家自然科学基金资助项目 (82004184); 湖南省科技创新计划项目 (2023RC3166); 湖南省自然科学基金优秀青年项目 (2023JJ20033); 湖南省教育厅科研基金项目 (23A0297); 2023 年度湖南省大学生创新创业训练计划项目 (S202110541094)

作者简介: 宋祯彦, 博士研究生, 高级实验师, 主要从事中西医结合神经退行性疾病防治研究。E-mail: songzhenyan2013@hnu.edu.cn

#共同第一作者: 黄亚琦, 本科, 主要从事中西医结合神经退行性疾病防治研究。E-mail: hyq0420@stu.hnu.edu.cn

***通信作者:** 成绍武, 博士生导师, 教授, 主要从事中西医结合神经退行性疾病防治研究。E-mail: scheng@hnu.edu.cn

activity, demonstrating significant anti-aging biological activity. The anti-aging effect of PCP was mediated through the *skn-1* signaling pathway, independent of the insulin-like receptor subunit beta (*daf-2*) and neuronal acetylcholine receptor subunit eat-2 signaling pathways. PCP increased the nuclear localization of *skn-1* transcription factor in *C. elegans*, upregulated the transcription levels of downstream anti-oxidant genes, including glutathione S-transferase 4 (*gst-4*) and putative glutathione S-transferase 7 (*gst-7*), and significantly reduced intracellular ROS level. However, these effects were not observed in *skn-1* mutant worms. **Conclusion** PCP exhibit antioxidant and anti-aging effects in *C. elegans*, involving the regulation of the *skn-1* transcription factor and its downstream anti-oxidant genes, ultimately reducing ROS level and enhancing the organism's anti-oxidant stress capacity.

Key words: *Poria cocos* polysaccharides; *Caenorhabditis elegans*; anti-aging; antioxidant; *skn-1*

衰老是以生物机能的下降和适应性、抵抗力的减退为特征的退行性生理过程,其中氧化应激损伤与衰老密切相关^[1]。正常情况下机体维持着“氧化-抗氧化”之间的动态平衡,但这种平衡可随着年龄增长被打破,伴随年龄增长的是自由基过剩和(或)抗氧化剂的缺失,进而导致生物膜结构被破坏、细胞器功能出现障碍,蛋白质、脂质等生物大分子物质出现损伤^[2]。在机体衰老的有氧代谢中,自由基增加或抗氧化剂缺失使得细胞毒性增加和机体抗氧化能力下降,这种变化将造成生物膜、氨基酸链及 DNA 分子结构的不可逆损害,诱发机体衰老相关退行性疾病的产生,加速衰老进程^[3]。

秀丽隐杆线虫是研究机体衰老基本机制的绝佳模型,因其具有寿命短、细胞模式简单、繁殖迅速、后代数多、行为反应模式稳定、结果灵敏可靠等特点,可表现出具有一系列类似于哺乳动物的衰老特征^[4]。线虫中高达 60%~80%的基因与人类基因组具有同源性,为人类遗传分析提供了有利条件。其中 BZIP 结构域蛋白 1 (protein skinhead-1, *skn-1*) 与哺乳动物的核因子 E2 相关转录因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) 蛋白在功能上具有一致性,可在体内发挥相似的抗氧化应激作用^[5]。

Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) /Nrf2 通路是体内氧化还原平衡的细胞防御机制和重要调控途径^[6]。Keap1 是 Nrf2 的主要负调节因子,生理状态下可介导 Nrf2 的泛素化及降解。在氧化应激状态下,Keap1 通过氧化还原反应被修饰,构象发生变化,从而与 Nrf2 解离。Nrf2 被激活进入细胞核内,与肌肉腱膜纤维肉瘤 (musculoaponeurotic fibrosarcoma, MAF) 结合为异质二聚体后,启动抗氧化反应元件 (antioxidant response elements, ARE),增加细胞对于氧化应激的抵抗力,并减少细胞凋亡以提高存活率,从而恢复内稳态。已有研究证明,Nrf2 活性水平与物种寿命之间存在正向相关,且会随着年龄的

增长而逐渐降低^[7-8]。

为实现健康老龄化,衰老医学将目标投向衰老相关疾病的早期干预和预防,其中干细胞移植、促进抗衰老因子表达、中医治疗、针灸、膳食补充剂等最新治疗方法的研究,为衰老相关疾病的治疗提供了新的方向^[9]。中医药因其宏观辨证,用药精当,不良反应较少,逐渐得到国际认可,在抗衰老研究与治疗中发挥越来越重要的作用。常用药食两用传统中药茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核。茯苓性味甘、平、淡,归心、肺、脾、肾经,具有利水渗湿、和胃健脾、宁心安神的功效。茯苓自古为延年益寿佳品,在《神农本草经》中谓其“久服安魂养神,不饥延年。”现代药理研究表明,茯苓具有抗肿瘤、调节免疫功能、保肝健脾、镇静安神、利水消肿、抗炎抑菌、抗衰老、抗突变等多方面的药理作用^[10-11]。目前,从茯苓中已成功分离提取出茯苓多糖、三萜类、甾醇类、挥发油类、蛋白质等成分,其中茯苓多糖作为茯苓的主要生物活性成分之一,具有抗氧化、抗衰老、抗炎、免疫调节、抑菌、保肝及抗癌等生物学功能^[12-14]。茯苓作为当归芍药散的主要成分之一,已被证明对衰老相关疾病阿尔茨海默症具有较好的疗效^[12-13]。因此茯苓的主要成分茯苓多糖将在延缓衰老和预防衰老方面的表现出巨大的潜力。本研究基于科学理论支持和相关研究基础,构建线虫模型,揭示茯苓多糖通过调控 *skn-1* 信号通路延缓衰老的分子机制,进一步证明中药在延缓衰老中的价值,并为药食同源理念提供新依据。

1 材料

1.1 线虫

所有线虫品系和菌株均购自美国隐杆线虫遗传中心 (Caenorhabditis Genetics Center, CGC),包括野生型 N2、CB1370 [*daf-2* (e1370)]、DA116 [*eat-2* (ad1116)]、EU1 [*skn-1* (zu67)]、LD1 [*ldIs7* [*skn-1b/c*:GFP + *rol-6* (su1006)]] 和埃希氏大肠杆菌

OP50 (*Escherichia coli*)。

1.2 药品与试剂

靖州茯苓(批号 2022081201)由靖州苗族侗族自治县质量计量检验检测中心提供并经甄达贵高级工程师鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *P. cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核;葡萄糖标准品(批号 PHR1000)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;百草枯(批号 M106760)购自上海阿拉丁公司;盐酸左旋咪唑(批号 L8230)购自北京索莱宝科技有限公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号 S0033S)购自碧云天生物工程有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;逆转录试剂盒(批号 0521751)购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;快速抗体染料法定量 PCR 预混液(批号 MQ10401S)购自莫纳生物科技有限公司。

1.3 仪器

Medifuge™小型台式离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Cytation3 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);T100™型 qRT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Axio Vert.A1 倒置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 茯苓多糖的提取和鉴定

参考李晓洁等^[15]的研究方法,挑选色泽均匀、无霉斑的茯苓块于 50 ℃烘箱中烘干,经粉碎机粉碎后过 50 目筛得茯苓粉,封存,备用。取 1 g 茯苓粉,按照不同料液比 1:50(g:mL),加入 0.6 mol/L 的 NaOH 溶液,在恒温水浴锅中进行浸提 1.0 h,浸提后的溶液用 0.5 mol/L 的 HCl 中和,8 000 r/min 离心 10 min,取沉淀。将沉淀放入透析袋中,在水中透析 7 d,透析完毕后,离心出尽可能多的水,最后通过真空冷冻干燥得到茯苓多糖。使用葡萄糖标准品,采用酶标仪于 490 nm 最大吸收波长处测定吸光度(A)值,绘制多糖浓度(x)与 A 值(y)的标准曲线。配制 0.1 mg/mL 茯苓多糖溶液,测定茯苓多糖含量^[16]。

2.2 线虫与大肠杆菌 OP50 培养条件

在所有实验中,用碱性次氯酸盐处理受精的雌雄同体^[17],使线虫同步。将实验线虫保存在含有大肠杆菌 OP50 的线虫生长培养基(NGM)板上培养,温度为 20 ℃。

2.3 毒理实验

将同期化 L4 期野生型 N2 线虫转移到含有不同质量浓度(10、20、40、80、160、320、640、

1 280 $\mu\text{g/mL}$)的茯苓多糖和空白含菌培养皿中培养。培养 48、72 h 后观察线虫存活情况。以铂丝轻碰触秀丽线虫后 10 s 无反应判断线虫死亡。意外死亡、逃逸(爬壁干燥死亡)、囊袋虫、内部孵育^[18]线虫,剔除判断。

2.4 寿命实验

将 L4 期 N2 线虫转移到含(10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)茯苓多糖组和空白组的含菌培养皿中,每组 50 只。为了确保药物在整个实验过程中不失效,每天将线虫转至新的培养皿,并使用铂金丝轻轻刺激,记录存活线虫数量,持续到最后 1 条线虫死亡^[19]。

2.5 抗逆性实验

为检测对百草枯的抗性,将 L4 期 N2 线虫分组同上,每组 50 只,处理 3 天后进行氧化应激处理,则将其移至含有 10 mmol/L 百草枯的培养皿,此时记为第 0 天,每 12 小时记录线虫存活数量及死亡数量,直至最后 1 条线虫死亡^[20]。为评价对紫外和高温的抗性,将 L4 期 N2 线虫分组同“2.4”项,每组 40 只。将各组线虫分别转移至未加 OP50 的 NGM 培养皿中,紫外应激处理是置于超净台中开盖紫外灯光照射 2 h,高温应激处理则将其置于 35 ℃恒温培养箱中开盖静置 2 h,然后将线虫分别转入对应浓度的含菌培养皿中继续培养,每天记录存活线虫的数量,持续到最后 1 条线虫死亡^[19]。

2.6 脂褐素分析

将 L4 期 N2 线虫分别转移到含(10、20 $\mu\text{g/mL}$)茯苓多糖各 1 组,40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓多糖和空白组各 2 组的含菌培养皿中,每组 20 只,处理 7 d 后将 1 组空白组和 1 组 40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓多糖组的线虫挑到含 10 mmol/L 百草枯的培养皿中,其余组不变,12 h 后,将线虫挑至含 2%琼脂糖凝胶的载玻片上,用 10 μL 浓度为 10 mmol/L 的盐酸左旋咪唑溶液麻醉后,压片。在倒置荧光显微镜下进行观察,Image-Pro Plus 软件定量分析荧光强度^[20]。

2.7 生理机能实验

2.7.1 吞咽频率测定 将 L4 期 N2 线虫分组同“2.4”项,每组 50 只,此时记为第 0 天。分别在给药培养后的第 3、6、9、12 天,每组选取生长状态良好且状态相近的 5 条线虫移至无 OP50 的 NGM 培养皿中,适应 1 min 后,观察并记录 30 s 内单条线虫吞咽泵完成跳动的次数。线虫摄取食物主要通过吞咽泵完成,当其吞咽泵分别向上和向下各进行 1 次跳动,即为完成 1 次跳动^[21]。

2.7.2 虫体摆动频率测定 每组选取生长状态良好且状态相近的 5 条线虫观察并记录虫体摆动状况,向载玻片上滴加 M9 溶液 10 μ L,每次随机挑取 1 只线虫置于 M9 溶液中,使其在 M9 溶液中适应 1 min,然后记录线虫虫体 30 s 内摆动的次数,将其头部和尾部摆动到同一侧的线虫运动被计为 1 次摆动^[22]。

2.7.3 生殖测定 将 L4 期 N2 线虫分组同“2.4”项,每组 5 条。每板 1 条,为方便统计产卵数量,采用直径 35 mm 培养皿。每天同一时间将成虫转移至新的培养基继续产卵,连续转 4 d(产卵高峰期)。所有含有虫卵的培养皿置于 20 $^{\circ}$ C 培养箱中,待发育至幼虫期即培养 2 d 后计数各组子代的数目^[21]。

2.8 突变体线虫应激与寿命实验

选取同期化 L4 期 *daf-2*、*eat-2*、*skn-1* 3 种突变体线虫和 N2 野生型线虫转移到含有 40 μ g/mL 茯苓多糖的药物组和空白组的含菌培养皿中,每组 50 条,按照“2.5”项下方法进行抗氧化应激实验^[22]。选取 L4 期 *skn-1* 突变体线虫和 L4 期 N2 线虫分组同上,每组 50 条,按照“2.4”项下方法进行寿命实验。

2.9 线虫 *skn-1* 绿色荧光蛋白的细胞定位检测

选取 L4 期 *skn-1b/c::GFP* 线虫转入 2 组含有 40 μ g/mL 茯苓多糖的药物组和 2 组空白组的含菌培养基中,每组 50 条,处理 7 d 后将 1 组空白组和 1 组 40 μ g/mL 茯苓多糖的药物组转至含 10 mmol/L 百草枯的培养基培养,其余组不变,处理 12 h 后,每组

各取 40 条线虫将线虫挑至含 2%琼脂糖凝胶的载玻片,用 10 μ L 浓度为 10 mmol/L 的盐酸左旋咪唑溶液麻醉后,压片。在倒置荧光显微镜下进行观察。计取 *skn-1* 绿色荧光蛋白全部和部分进入肠道细胞核以及未进入肠道细胞核的线虫的数目,并拍照保存。高表达表示在线虫的从头到尾大部分肠道细胞核中都能观察到强烈的 *skn-1b/c::GFP* 信号;中表达表示在线虫的头和尾部的肠道细胞核中能观察到 *skn-1b/c::GFP* 信号或者在所有肠核中都观察到微弱的 *skn-1b/c::GFP* 信号;低表达表示在线虫的头部至尾部几乎检测不到 *skn-1b/c::GFP* 信号,用 Image-Pro Plus 软件处理图像并进行数据的统计与分析^[23]。

2.10 qRT-PCR 实验

将 L4 期 N2 线虫分组及处理同“2.6”项,每组 100 只,按照试剂盒说明书提取线虫 RNA,测定浓度后进行逆转录,采用 SYBR Green 染料法在 Real-time qPCR 仪上进行扩增,反应程序为 95 $^{\circ}$ C、5 min, 95 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环。以 GAPDH 为参比基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。抗氧化基因谷胱甘肽 S-转移酶 4 (glutathione S-transferase 4, *gst-4*)、*gst-7*、超氧化物歧化酶 3 (superoxide dismutase-3, *sod-3*)、热休克蛋白 16.2 (heat shock protein Hsp-16.2, *hsp16.2*) 引物序列(表 1)参照 Wang 等^[23]的研究。同时选取 L4 期 *skn-1* 突变体线虫分组及处理同“2.9”项,采用上述同样处理后检测各基因的表达水平。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')	长度/bp
<i>GAPDH</i>	GGAAGTCGCAGCACAAGAT	AGCAGATGGAGCAGAGATGAT	176
<i>gst-4</i>	TGATGCTCGTGCTCTTGCT	TGATGCTCGTGCTCTTGCT	167
<i>gst-7</i>	CGGATACTTGGTTGGAGACTCT	CGGATACTTGGTTGGAGACTCT	156
<i>sod-3</i>	TTGGCTAAGGATGGTGGAGAA	GAACCGCAATAGTGATGTCAGA	112
<i>hsp16.2</i>	CGCTATCAATCCAAGGAGAACA	GCAACTGCACCAACATCTACA	109

2.11 ROS 水平检测

将 L4 期 N2 线虫分组及处理同“2.6”项,每组 30 只,用 M9 缓冲液收集各组线虫并清洗后,放入含有 200 μ L PBS 缓冲液的 EP 管中,在冰上超声破碎后,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心,取上清,移入黑色 96 孔板中每个孔中(每组平行 3 孔,每孔加入 50 μ L 上清液),再加入 50 μ L 提前稀释好的 100 μ mol/L H2DCF-DA 荧光探针,设置不加线虫和 DCFH-DA 溶液的空白组,只加线虫不加 DCFH-DA 溶液的对

照组,将加样后的 96 孔黑板室温避光孵育 30 min,酶标仪检测荧光,每 5 分钟读 1 次数,读 60 min,激发光为 485 nm,发射光为 528 nm,测定荧光强度,从而确定 ROS 水平^[19]。同时选取 L4 期 *skn-1* 突变体线虫分组及处理同“2.9”项,采用上述同样处理后检测 ROS 水平。

2.12 统计学分析

实验结果采用 Prism GraphPad 8 统计软件分析,生存曲线实验结果采用 Log-Rank 检验进行分析,

其余实验采用方差分析进行两组间比较。

3 结果

3.1 茯苓多糖提取物多糖含量和毒性检测

葡萄糖标准曲线线性方程为 $y = 3.6086x + 0.0868$ ($R^2 = 0.9919$), 葡萄糖质量浓度为 $0.02 \sim 0.10$ mg/mL, A 值与其呈良好线性关系, 提取物中总多糖质量分数为 276.746 mg/g。茯苓多糖对秀丽隐杆线虫的毒理实验结果表明, 质量浓度在 1.28 mg/mL 以下的茯苓多糖对秀丽隐杆线虫均无毒性作用, 40 μ g/mL 以上的质量浓度茯苓多糖对秀丽隐杆线虫寿命影响无显著差异, 故选取 10、20、40 μ g/mL 的茯苓多糖开展后续实验 (表 2)。

表 2 茯苓多糖对秀丽隐杆线虫的毒性作用

Table 2 Toxic effect of *Poria cocos* polysaccharides on *C. elegans*

茯苓多糖/(μ g·L ⁻¹)	时间/h	死亡率/%
0	48	4
	72	16
10	48	6
	72	18
20	48	4
	72	14
40	48	8
	72	12
80	48	6
	72	18
160	48	6
	72	20
320	48	6
	72	14
640	48	10
	72	20
1 280	48	8
	72	18

3.2 茯苓多糖延长秀丽隐杆线虫的寿命并提高抗衰老能力

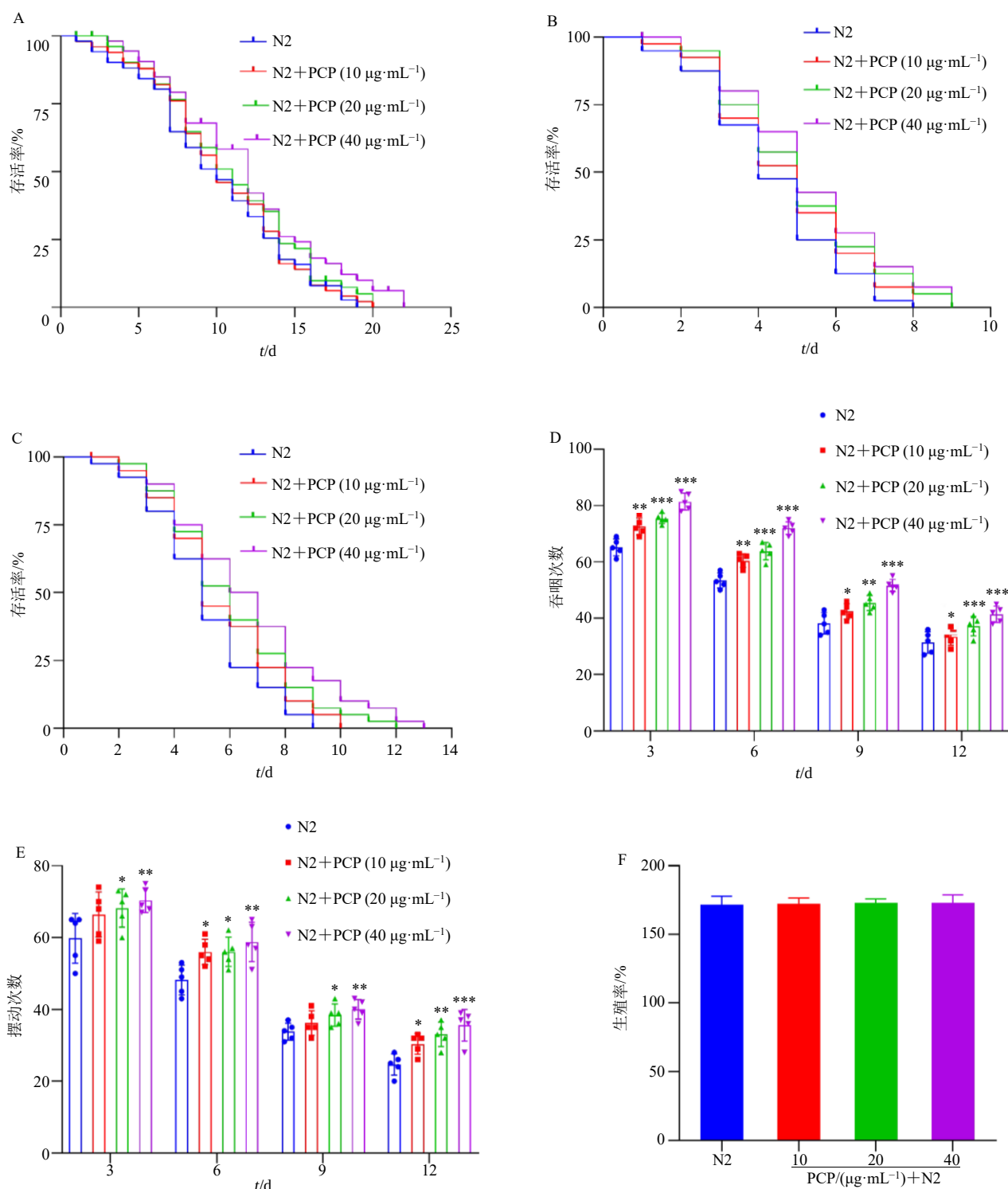
寿命的长短是衡量线虫衰老最重要的指标。茯苓多糖对线虫寿命的影响见图 1-A, 在正常的实验条件下, N2 线虫的平均寿命为 (11.420 ± 0.635) d, 在给予 10、20、40 μ g/mL 茯苓多糖后, 平均寿命分别增加到 (12.130 ± 0.469) 、 (13.261 ± 0.475) 、 (14.247 ± 0.719) d。与 N2 组比较, 10、20、40 μ g/mL 茯苓多糖组的寿命分别增加 6.21%、16.12%、24.75%, 寿命以茯苓多糖剂量相关性的方式增加, 说明茯苓多糖具有延长成年线虫寿命的效应。蠕虫

的寿命与其在各种应激源下的存活率呈正相关^[24]。在紫外应激条件下线虫寿命如图 1-B 所示, 与 N2 组比较, 20、40 μ g/mL 茯苓多糖延长了线虫生存时间。在 35 $^{\circ}$ C 热休克条件下线虫寿命如图 1-C 所示, N2 组平均生存时间为 (4.570 ± 0.528) d, 而 40 μ g/mL 茯苓多糖延长线虫生存时间到 (5.416 ± 0.532) d, 综上, 提示茯苓多糖能增加对紫外照射的耐受性和提高线虫的耐热性。

线虫的进食是通过头部后端的吞咽泵跳动完成的, 咽泵速在整个发育幼虫期逐渐增加, 在 L4 期达到峰值, 然后在衰老期间逐渐降低^[22]。茯苓多糖能够显著提高野生型 N2 成虫给药后第 3、6、9、12 天的吞咽次数 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001, 图 1-D)。观察 M9 液体中线虫在一定时间内的弯曲次数, 可评价线虫衰老进程^[22]。茯苓多糖给药培养后的第 3、6、9、12 天线虫弯曲次数均高于 N2 组 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001, 图 1-E)。线虫的产卵数量是反映线虫生理能力强弱的一个重要指标^[20]。各质量浓度的茯苓多糖均对线虫的产卵数量无显著影响 (图 1-F), 说明药物质量浓度并不影响线虫正常繁殖。综上, 提示茯苓多糖能够延缓野生型 N2 线虫的衰老进程, 增强抗衰老能力, 其中 40 μ g/mL 茯苓多糖干预后效果最显著。

3.3 茯苓多糖降低秀丽隐杆线虫脂褐素和 ROS 的含量, 促进抗氧化基因表达

随着机体的老化, 细胞的新陈代谢被破坏, 产生大量自由基, 可能与不饱和脂肪酸发生反应, 导致脂褐素的产生^[25]。如图 2-A、B 所示, 与 N2 组比较, 20、40 μ g/mL 茯苓多糖组线虫体内的脂褐素荧光强度显著降低 ($P < 0.001$), 提示茯苓多糖能减轻衰老过程中的脂褐素生成。在正常衰老过程中会不断产生 ROS, ROS 具有很强的氧化能力, 因此 ROS 被认为是引起衰老的主要原因^[26]。本实验采用 H2DCF-DA 荧光探针法检测茯苓多糖对线虫内源性 ROS 水平的影响。如图 2-D 所示, 与 N2 组比较, 40 μ g/mL 茯苓多糖处理后 N2 线虫内源性 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$), 而较低的 ROS 水平可能与提高抗氧化应激能力和延长寿命相关。在生理条件下, 采用 qRT-PCR 检测 N2 线虫中抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp-16.2* 的 mRNA 表达。如图 2-C 所示, 与 N2 组比较, 40 μ g/mL 茯苓多糖干预后 *gst-4*、*gst-7* 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。 *gst-4* 的转录激活通常被用来考察 *skn-1* 活性^[27]。

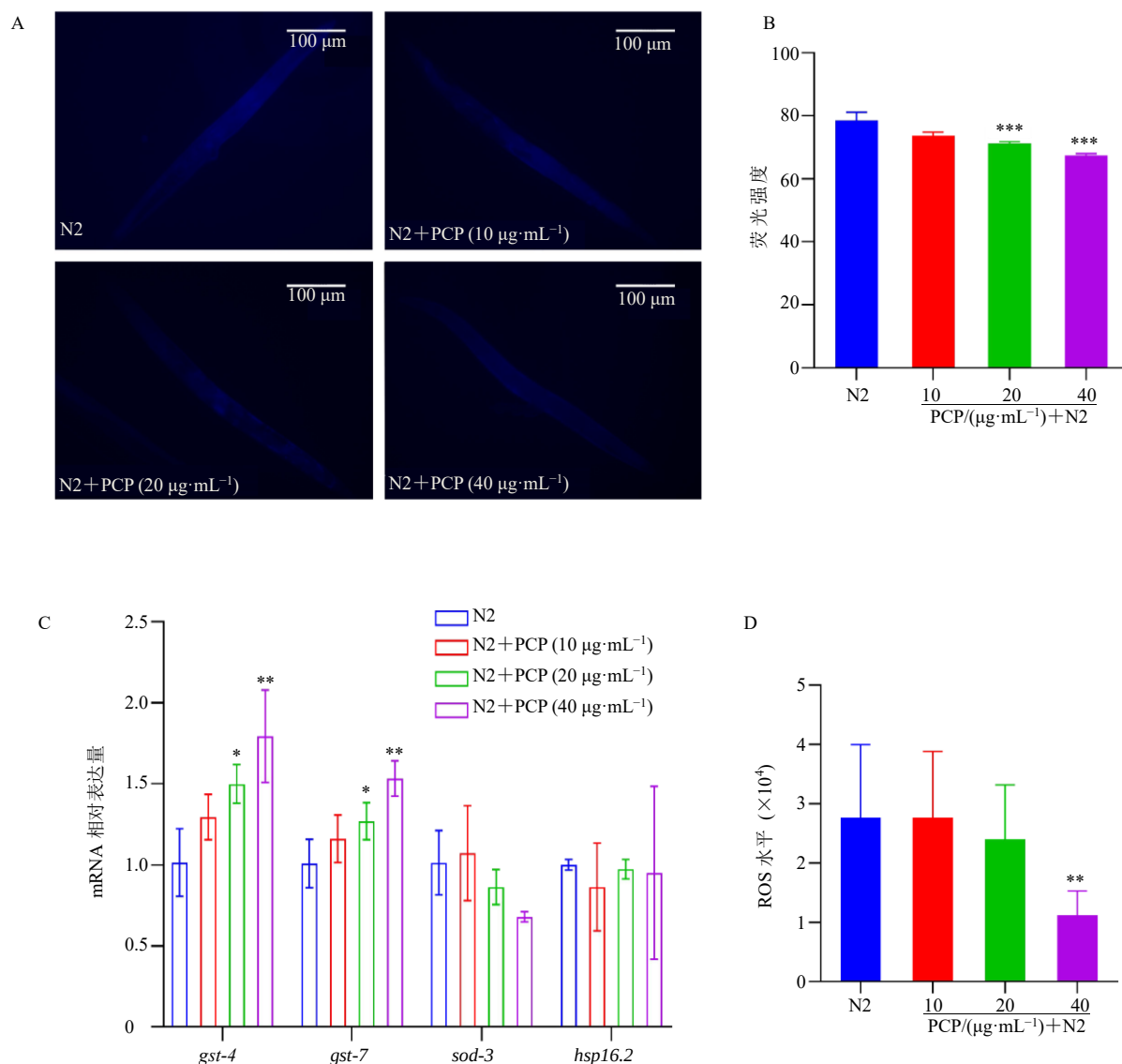


A-茯苓多糖对线虫寿命的影响; B-紫外应激条件下茯苓多糖对线虫生存时间的影响; C-热休克条件下茯苓多糖对线虫生存时间的影响; D-茯苓多糖对线虫第3、6、9、12天吞咽次数的影响; E-茯苓多糖对线虫第3、6、9、12天摆动次数的影响; F-茯苓多糖对线虫生殖能力的影响; 与 N2 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-effect of *P. cocos* polysaccharides (PCP) on lifespan of nematodes; B-effect of *P. cocos* polysaccharides on survival time of nematodes under UV stress conditions; C-effect of *P. cocos* polysaccharides on survival time of nematodes under heat shock conditions; D-effect of *P. cocos* polysaccharides on swallowing frequency of nematodes on 3rd, 6th, 9th, and 12th day; E-effect of *P. cocos* polysaccharides on oscillation frequency of nematodes on 3rd, 6th, 9th and 12th day; F-effect of *P. cocos* polysaccharides on reproductive ability of nematodes; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs N2 group.

图 1 茯苓多糖延长秀丽隐杆线虫的寿命并提高抗衰老能力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

Fig. 1 *P. cocos* polysaccharides extends lifespan of *C. elegans* and enhances anti-aging abilities ($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)



A-生理条件下脂褐素荧光图; B-生理条件下脂褐素荧光强度统计; C-qRT-PCR 检测抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp-16.2* 表达水平; D-内源性 ROS 水平; 与 N2 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-fluorescence map of lipofuscin under physiological conditions; B-statistics of fluorescence intensity of lipofuscin under physiological conditions; C-expression levels of antioxidant genes *gst-4*, *gst-7*, *sod-3* and *hsp-16.2* detected by qRT-PCR; D-endogenous ROS levels; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs N2 group.

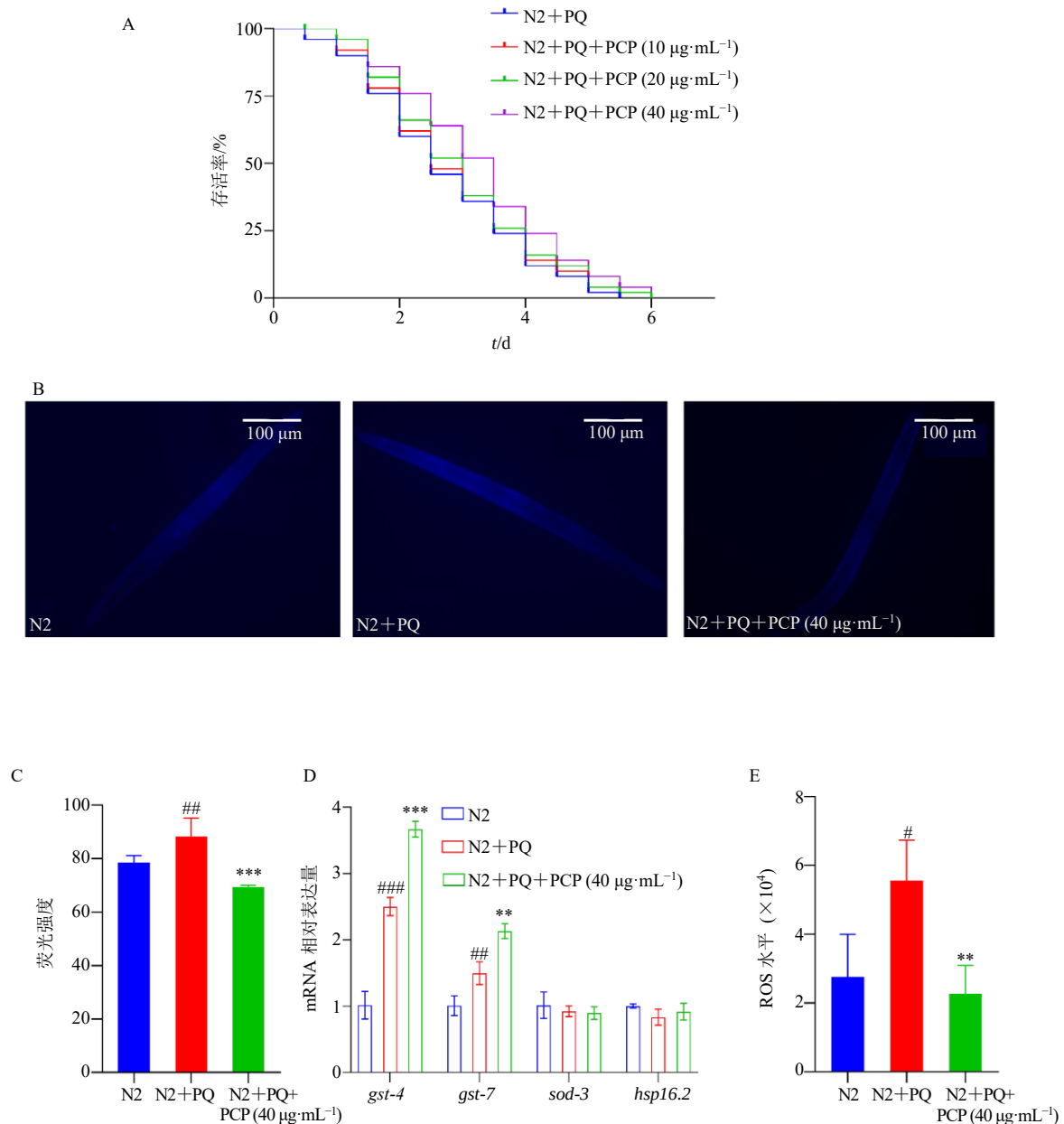
图 2 茯苓多糖降低秀丽隐杆线虫脂褐素和 ROS 的含量, 促进抗氧化基因表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

Fig. 2 *P. cocos* polysaccharides reduces lipofuscin and ROS levels, promotes expression of antioxidant genes in *C. elegans* ($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

3.4 茯苓多糖诱导秀丽隐杆线虫抗氧化应激, 减少损伤

利用百草枯建立氧化损伤模型, 该模型会诱导线虫产生大量的 ROS, ROS 是一种高活性氧分子, 可诱导遗传毒性和生理损伤, 破坏抗逆性的先天机制, 可能导致 DNA 损伤、基因表达改变、细胞信号紊乱、脂质过氧化和蛋白质稳态失衡, 最终导致细胞衰老和死亡^[28]。如图 3-A 所示, 与模型组比较,

20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 茯苓多糖在氧化应激条件下能延长线虫寿命, 提高其抗氧化应激能力。在氧化应激条件下测定脂褐素, 与模型组比较, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 茯苓多糖在氧化应激条件下能显著降低线虫体内脂褐素荧光强度 ($P < 0.001$, 图 3-B、C)。同时在氧化应激条件下, 与模型组比较, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 茯苓多糖组线虫体内抗氧化相关基因 *gst-4*、*gst-7* 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001 , 图 3-D)。ROS 的生成与氧化损伤



A-氧化应激条件下茯苓多糖对线虫寿命的影响; B-氧化应激条件下脂褐素荧光图; C-氧化应激条件下脂褐素荧光强度统计; D-氧化应激条件下 qRT-PCR 检测抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp-16.2* 表达水平; E-氧化应激条件下内源性 ROS 水平; 与 N2 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-effect of *P. cocos* polysaccharides on lifespan of nematodes under oxidative stress conditions; B-fluorescence map of lipofuscin under oxidative stress conditions; C-statistics of fluorescence intensity of lipofuscin under oxidative stress conditions; D-expression levels of antioxidant genes *gst-4*, *gst-7*, *sod-3*, and *hsp-16.2* under oxidative stress conditions detected by qRT-PCR; E-endogenous ROS level under oxidative stress conditions; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs N2 group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 3 茯苓多糖诱导秀丽隐杆线虫抗氧化应激并减少损伤 ($\bar{x} \pm s$, $n = 40$)

Fig. 3 *P. cocos* polysaccharides induces antioxidant stress in *C. elegans* and reduce damage ($\bar{x} \pm s$, $n = 40$)

密切相关, 如图 3-E 所示, 与模型组比较, 在氧化应激条件下 40 µg/mL 茯苓多糖处理的 N2 线虫体内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$)。综上提示, 茯苓多糖能延长线虫在氧化应激状态下的寿命, 具有抗氧化活性, 茯苓多糖能减少线虫氧化应激状态下 ROS

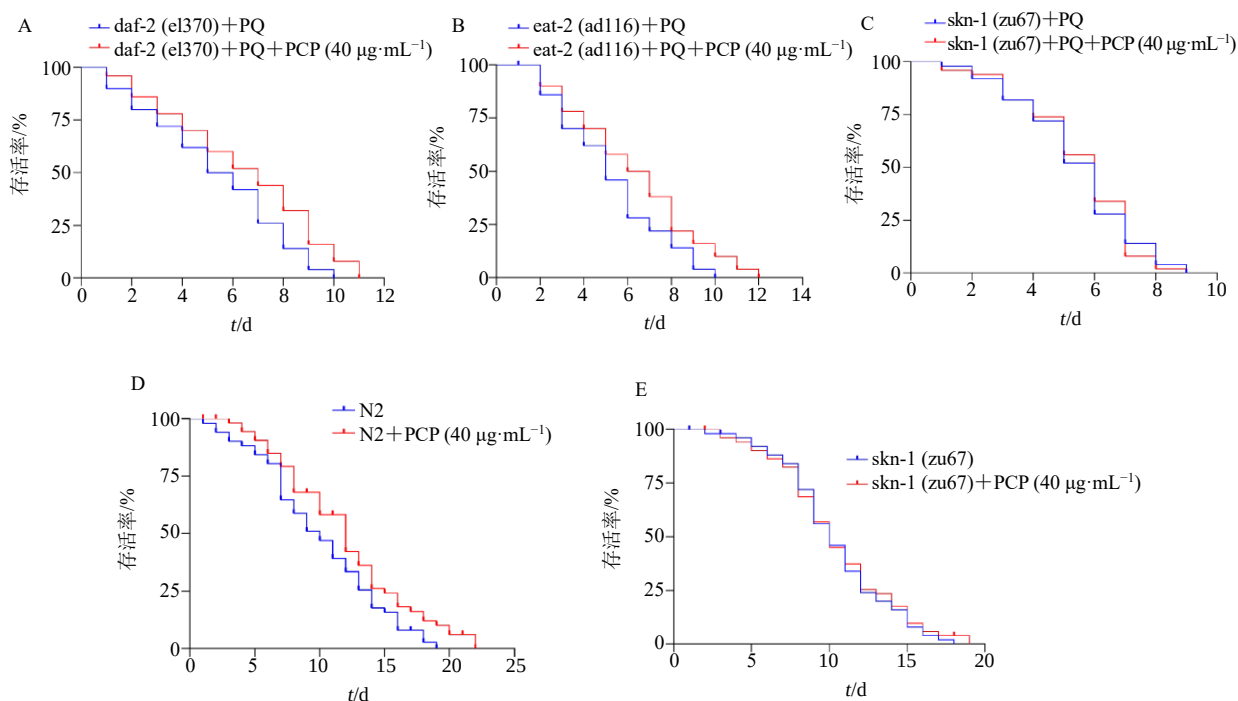
的产生, 调控抗氧化基因抑制内源性 ROS 产生可能与茯苓多糖的抗氧化活性相关。

3.5 茯苓多糖诱导秀丽隐杆线虫体内的氧化应激抗性需要 *skn-1*

利用与衰老相关的胰岛素信号通路 *daf-2* 突变

体线虫、饮食限制信号通路 *eat-2* 和 *skn-1* 转录因子 *skn-1* 突变体线虫,探究茯苓多糖在体内的抗氧化作用途径^[23]。如图 4 所示,40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓多糖可以延长氧化应激下胰岛素样受体 β 亚基 (insulin-like receptor subunit beta, *daf-2*) 和神经元乙酰胆碱受体亚基 *eat-2* (neuronal acetylcholine receptor subunit *eat-2*)

2, *eat-2*) 突变体线虫的寿命,但不能延长 *skn-1* 突变体线虫的寿命。而在生理情况下 40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓多糖能延长 N2 线虫寿命,但不能延长 *skn-1* 突变体线虫的寿命,提示茯苓多糖延长线虫寿命与调控 *skn-1* 信号通路抗氧化有关,而非 *daf-2* 和 *eat-2* 途径介导。



A-氧化应激条件下 *daf-2* 突变体线虫的生存曲线; B-氧化应激条件下 *eat-2* 突变体线虫的生存曲线; C-氧化应激条件下 *skn-1* 突变体线虫的生存曲线; D-生理条件下 N2 线虫的生存曲线; E-生理条件下 *skn-1* 突变体线虫的生存曲线。

A-survival curve of *daf-2* mutant nematodes under oxidative stress conditions; B-survival curve of *EAT-2* mutant nematodes under oxidative stress conditions; C-survival curve of *skn-1* mutant nematodes under oxidative stress conditions; D-survival curve of N2 nematodes under physiological conditions; E-survival curve of *skn-1* mutant nematodes under physiological conditions.

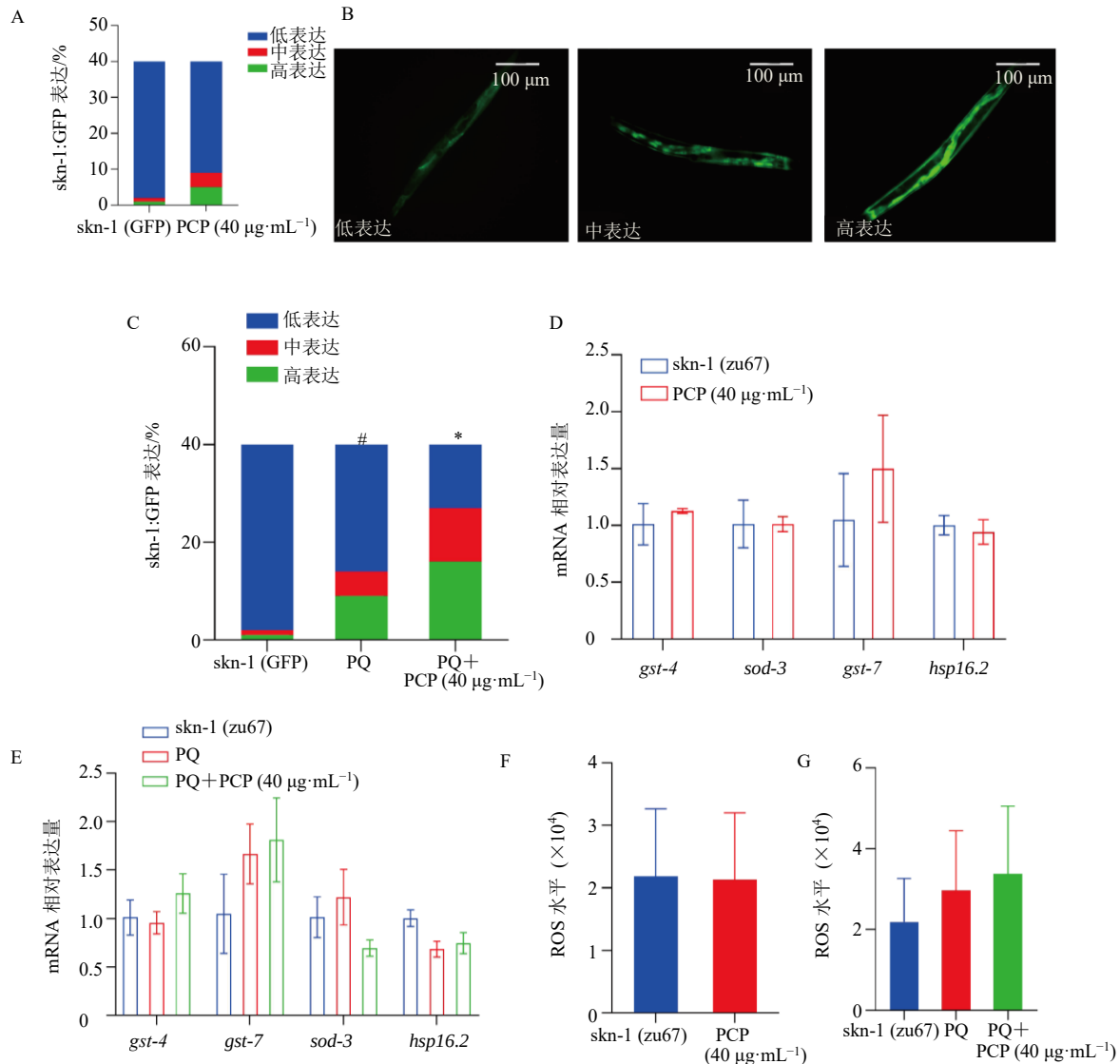
图 4 茯苓多糖诱导秀丽隐杆线虫体内的氧化应激抗性需要 *skn-1* ($\bar{x} \pm s, n = 40$)

Fig. 4 *P. cocos* polysaccharides require *skn-1* for induction of oxidative stress resistance in *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 40$)

3.6 茯苓多糖通过 *skn-1* 信号通路诱导氧化应激抵抗

skn-1 是哺乳动物抗氧化酶调节基因 Nrf2 在秀丽隐杆线虫的同源基因,可促进线虫氧化应激抵抗力,帮助延长寿命^[29]。为进一步检测 *skn-1* 活性,检测了 *skn-1b/c::GFP* 线虫中 *skn-1* 的核定位情况,结果显示 40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓多糖明显促进了 *skn-1* 的入核 ($P < 0.05$, 图 5-A、B); 在氧化应激条件下,40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓多糖也能促进 *skn-1* 的入核 ($P < 0.05$, 图 5-C),提示 *skn-1* 的入核激活下游转录发挥抗氧化作用。*skn-1*/Nrf2 信号通路在秀丽隐杆线虫衰老过程中起着至关重要的作用^[30]。为了确定茯苓多糖是否通过这一机制发挥作用,分析了 *skn-1* 突变体

线虫中 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp16.2* 的 mRNA 表达。结果显示,在 *skn-1* 突变体线虫中,40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓多糖干预后 *skn-1* 转录因子下游的抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp16.2* 的表达水平均无明显差异 (图 5-D),而在氧化应激条件下茯苓多糖对 *skn-1* 转录因子下游的抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp16.2* 的表达也均无明显影响 (图 5-E),说明茯苓多糖的抗氧化活性可能与调控 *skn-1* 转录因子及其下游的抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7* 有关。进一步提示茯苓多糖可能通过 *skn-1* 转录因子调控下游抗氧化基因 *gst-4* 和 *gst-7* 来延长 N2 线虫寿命。为研究 ROS 的减少是否与 *skn-1*/Nrf2 信号通路有关,使用 *skn-1* 突变体线虫进行研究,发现 40 $\mu\text{g/mL}$ 茯苓



A-生理情况下茯苓多糖对 *skn-1b/c::GFP* 表达的影响; B-*skn-1b/c::GFP* 线虫中 *skn-1* 的核易位图像; C-氧化应激条件下茯苓多糖对 *skn-1b/c::GFP* 表达的影响; D-生理情况下 qRT-PCR 检测 *skn-1* 突变体线虫体内抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp16.2* 表达水平; E-氧化应激条件下 qRT-PCR 检测 *skn-1* 突变体线虫体内抗氧化基因 *gst-4*、*gst-7*、*sod-3* 和 *hsp16.2* 表达水平; F-生理情况下 *skn-1* 突变体线虫体内内源性 ROS 水平; G-氧化应激条件下 *skn-1* 突变体线虫体内内源性 ROS 水平; 与 *skn-1* (GFP) 组比较: * $P < 0.05$, 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

A-effect of *P. cocos* polysaccharides on expression of *skn-1b/c::GFP* under physiological conditions; B-image of nuclear translocation of *skn-1* in *skn-1b/c::GFP* nematode; C-effect of *P. cocos* polysaccharides on expression of *skn-1b/c::GFP* under oxidative stress conditions; D-expression levels of antioxidant genes *gst-4*, *gst-7*, *sod-3*, and *hsp16.2* in *skn-1* mutant nematode under physiological conditions detected by qRT-PCR; E-expression levels of antioxidant genes *gst-4*, *gst-7*, *sod-3*, and *hsp16.2* in *skn-1* mutant nematode under oxidative stress conditions detected by qRT-PCR; F-endogenous ROS level in *skn-1* mutant nematode under physiological conditions; G-endogenous ROS level in *skn-1* mutant nematodes under oxidative stress conditions; * $P < 0.05$ vs *skn-1* (GFP) group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 5 茯苓多糖通过 *skn-1* 信号通路诱导氧化应激抵抗 ($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

Fig. 5 *P. cocos* polysaccharides induce oxidative stress resistance via *skn-1* signaling pathway ($\bar{x} \pm s$, $n = 50$)

多糖处理后内源性 ROS 水平没有显著性 (图 5-F), 说明茯苓多糖降低线虫内源性 ROS 水平可能是由 *skn-1* 转录因子调控的。而在氧化应激条件下, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 茯苓多糖处理 *SKN-1* 突变体线虫后内源性 ROS 水平也没有显著性 (图 5-G), 提示线虫降低 ROS 的产生可能是由 *skn-1* 转录因子调控的。综上,

茯苓多糖能延长线虫寿命, 其机制可能是通过调控 *skn-1* 转录因子提高抗氧化能力从而减少内源性 ROS 的产生。

4 讨论

中药多糖发挥抗氧化作用主要体现在清除自由基和调控抗氧化酶或氧化酶活性 2 方面。现代研究

表明, 茯苓多糖是高效的抗氧化剂, 可通过破坏反应链, 清除羟自由基、过氧化氢、超氧阴离子、一氧化氮等易诱导细胞氧化损伤的自由基, 缓解机体氧化应激反应, 同时茯苓多糖可有效提高超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶的活性, 增加谷胱甘肽水平, 限制脂质过氧化和超氧阴离子的产生, 降低氧化损伤, 茯苓多糖为茯苓发挥抗氧化的主要药效基础, 具有保护生物膜和延缓衰老的作用^[31-32]。本研究发现, 从茯苓中提取的茯苓多糖在秀丽隐杆线虫中具有显著的抗衰老活性。茯苓多糖处理后 N2 线虫的脂褐素、吞咽次数、虫体摆动次数和对紫外辐射以及热应激抵抗能力等衰老指标显著提高, 寿命显著延长, 体现出显著的抗衰老作用。

在衰老的支持细胞中存在着多种改变, 如 ROS 水平升高、炎症状态、DNA 受损、自噬受损、线粒体功能障碍等^[33]。其中, 氧化应激和炎症是中心环节。在本研究中, 茯苓多糖处理线虫后在氧化应激条件下的存活时间显著延长, 脂褐素表达明显下降, 线虫体内 ROS 水平显著降低, 说明茯苓多糖可能通过降低 ROS 水平来调控秀丽隐杆线虫抗衰老。

据报道, 细胞对氧化应激的防御反应受到许多转录因子的调节, 包括 *skn-1* 和 *daf-16*^[34-35]。茯苓多糖可以延长氧化应激条件下 *daf-2*、*eat-2* 2 种突变体线虫的寿命, 仅 *skn-1* 突变体线虫寿命未得到改善。结果表明, 胰岛素信号传导 (*daf-2*)、热量限制 (*eat-2*) 与茯苓多糖的抗氧化活性无关。由外源性氧化剂或环境条件引起的 ROS 生成和清除失衡被称为氧化应激, 以秀丽隐杆线虫死亡为特征。鉴于秀丽隐杆线虫寿命的延长通常伴随着抗应激能力的增强, 本研究进行了抗氧化应激和解毒基因的 qRT-PCR 检测。*sod-3* 刺激线粒体呼吸体中的蛋白质异构化、活性和超氧自由基的清除^[36], *gst-4* 是一种谷胱甘肽 S-转移酶, 可促进 II 期解毒过程^[37]。其表达受 *daf-16* 和 *skn-1* 调控^[38], *gst-7* 增加谷胱甘肽转移酶活性, 参与谷胱甘肽的制造和代谢, 减少 ROS 水平, 通过解毒氧化应激副产物对抗氧化应激^[39], *hsp16.2* 是由 *hsf-1* 控制的热休克蛋白, *hsf-1* 转录因子通过控制伴侣型热休克蛋白的表达和在热应激下保持蛋白稳态来保护机体免受热休克, *hsp16.2* 的增加降低了谷胱甘肽水平, 增强了未折叠蛋白结合活性, 提高了抗热应激能力^[40]。在秀丽隐杆线虫中这些抗氧化基因与 *skn-1*/Nrf2 途径调控有关。已有研究表明,

铁皮石斛水提物通过激活 *skn-1* 转录因子延长秀丽隐杆线虫寿命作用及机制研究^[41]。本研究结果表明, 茯苓多糖能诱导生理和氧化应激条件下 *skn-1* 从细胞质到细胞核的易位, 并激活下游抗氧化基因 *gst-4* 和 *gst-7* 的表达, 这可能与延长寿命有关。但茯苓多糖不能促进生理和氧化应激条件下 *skn-1* 突变体线虫下游 *gst-4* 和 *gst-7* 表达, 也不能降低 ROS 的水平, 进一步证明茯苓多糖抗衰老的机制与调控 *skn-1*/Nrf2 经典抗氧化途径有关。

综上, 茯苓多糖具有延长秀丽隐杆线虫寿命, 增强抗衰老的能力。机制研究表明, 茯苓多糖可以促使 *skn-1* 入核, 上调相关抗氧化基因的表达, 降低线虫体内活性氧自由基水平进而增强其抗氧化应激能力, 延缓衰老速度, 提示其很可能是一种有前景的天然抗衰老成分, 值得进一步研究。然而, 在模式生物秀丽线虫模型下的研究结果仍然是局限的, 需要在哺乳动物和临床试验中进一步证实茯苓多糖的抗衰老效应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Martemucci G, Portincasa P, Di Ciaula A, *et al.* Oxidative stress, aging, antioxidant supplementation and their impact on human health: An overview [J]. *Mech Ageing Dev*, 2022, 206: 111707.
- [2] Hajam Y A, Rani R, Ganie S Y, *et al.* Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives [J]. *Cells*, 2022, 11(3): 552.
- [3] Bakula D, Ablasser A, Aguzzi A, *et al.* Latest advances in aging research and drug discovery [J]. *Aging*, 2019, 11(22): 9971-9981.
- [4] Wang X Q, Jiang Q L, Song Y Y, *et al.* Ageing induces tissue-specific transcriptomic changes in *Caenorhabditis elegans* [J]. *EMBO J*, 2022, 41(8): e109633.
- [5] Li H Y, Su L P, Su X, *et al.* Arginine methylation of SKN-1 promotes oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Redox Biol*, 2019, 21: 101111.
- [6] Matsumaru D, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system in healthy aging and longevity [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(12): 1929.
- [7] Fão L, Mota S I, Rego A C. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 54: 100942.
- [8] Xia M J, Zhang Q Y, Zhang Y N, *et al.* Growth differentiation factor 15 regulates oxidative stress-dependent ferroptosis post spinal cord injury by stabilizing the p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 905115.
- [9] Guo J, Huang X Q, Dou L, *et al.* Aging and aging-related diseases: From molecular mechanisms to interventions and

- treatments [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 391.
- [10] 叶青, 刘东升, 王兰霞, 等. 茯苓化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(2): 75-79.
- [11] 冯静, 李玲玲, 崔瑛. 茯苓对阴虚水肿模型大鼠及其热象的影响 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 586-592.
- [12] Li L, Zuo Z T, Wang Y Z. The traditional usages, chemical components and pharmacological activities of *Wolfiporia cocos*: A review [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(2): 389-440.
- [13] Pei H, Ma L N, Cao Y, *et al.* Traditional Chinese medicine for Alzheimer's disease and other cognitive impairment: A review [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 487-511.
- [14] 左军, 祁天立, 胡晓阳. 茯苓化学成分及现代药理研究进展 [J]. 中医学学报, 2023, 51(1): 110-114.
- [15] 李晓洁, 曾百慧, 陈慕兰, 等. 酸性茯苓多糖的提取工艺优化 [J]. 中国酿造, 2018, 37(10): 158-161.
- [16] 张越. 茯苓多糖提取纯化及对脾虚大鼠免疫功能 and 肠道菌群调节作用研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [17] Syntichaki P, Tavernarakis N. Genetic models of mechanotransduction: The nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(4): 1097-1153.
- [18] Kim Y J, Lee J E, Jang H S, *et al.* Oleanolic acid protects the skin from particulate matter-induced aging [J]. *Biomol Ther*, 2021, 29(2): 220-226.
- [19] Zhang J L, Lu L L, Zhou L J. Oleanolic acid activates daf-16 to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4): 843-849.
- [20] Li J, Cui X D, Wang Z H, *et al.* rBTI extends *Caenorhabditis elegans* lifespan by mimicking calorie restriction [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 67: 62-71.
- [21] Diomedea L, Rognoni P, Lavatelli F, *et al.* Investigating heart-specific toxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chains: A lesson from *C. elegans* [J]. *Worm*, 2014, 3(3): e965590.
- [22] Geens E, van de Walle P, Caroti F, *et al.* Yolk-deprived *Caenorhabditis elegans* secure brood size at the expense of competitive fitness [J]. *Life Sci Alliance*, 2023, 6(6): e202201675.
- [23] Wang X, Li H Y, Liu Y, *et al.* Velvet antler methanol extracts (MEs) protects against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* by SKN-1 [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 121: 109668.
- [24] Olsen A, Vantipalli M C, Lithgow G J. Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1067: 120-128.
- [25] Rózanowska M B. Lipofuscin, its origin, properties, and contribution to retinal fluorescence as a potential biomarker of oxidative damage to the retina [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(12): 2111.
- [26] Zhang X, Zhong H Q, Chu Z W, *et al.* Arsenic induces transgenerational behavior disorders in *Caenorhabditis elegans* and its underlying mechanisms [J]. *Chemosphere*, 2020, 252: 126510.
- [27] Ferguson G D, Bridge W J. The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101171.
- [28] Zhang F, Zhang X, Liang X F, *et al.* Defensing against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* of a polysaccharide LFP-05S from *Lycii Fructus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 289: 119433.
- [29] Phan H D, Nguyen T T M, Lee S J, *et al.* The metabolic contribution of SKN-1/Nrf2 to the lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Metabolomics*, 2023, 19(6): 58.
- [30] Koch K, Weldle N, Baier S, *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L. extract prolongs lifespan and protects against amyloid- β toxicity in *Caenorhabditis elegans*: Involvement of the FoxO and Nrf2 orthologues DAF-16 and SKN-1 [J]. *Eur J Nutr*, 2020, 59(1): 137-150.
- [31] 刘英语, 吴西芝, 韩帅, 等. 茯苓多糖的生物学功能及其在动物生产中的应用研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(5): 76-80.
- [32] 孙明杰, 张越, 姚亮, 等. 茯苓多糖的分离纯化、组成及其抗氧化活性研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(1): 86-91.
- [33] Cai Y S, Song W, Li J M, *et al.* The landscape of aging [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(12): 2354-2454.
- [34] Gusarov I, Shamovsky I, Pani B, *et al.* Dietary thiols accelerate aging of *C. elegans* [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4336.
- [35] Tissenbaum H A. Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012, 67(5): 503-510.
- [36] Xu Q X, Zheng B S, Li T, *et al.* *Hypsizygus marmoreus* extract exhibited antioxidant effects to promote longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Food Funct*, 2023, 14(21): 9743-9754.
- [37] Pohl F, Teixeira-Castro A, Costa M D, *et al.* GST-4-dependent suppression of neurodegeneration in *C. elegans* models of Parkinson's and machado-joseph disease by rapeseed pomace extract supplementation [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1091.
- [38] Tullet J M, Hertweck M, An J H, *et al.* Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans* [J]. *Cell*, 2008, 132(6): 1025-1038.
- [39] Wang S Y, Lin D F, Cao J F, *et al.* APPA increases lifespan and stress resistance via lipid metabolism and insulin/IGF-1 signal pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 13682.
- [40] Ogawa T, Kodera Y, Hirata D, *et al.* Natural thioallyl compounds increase oxidative stress resistance and lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating SKN-1/Nrf [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21611.
- [41] 王晨曦, 张思雨, 白雪媛, 等. 铁皮石斛水提物通过激活 SKN-1 转录因子延长秀丽隐杆线虫寿命作用及机制研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(19): 215-224.

[责任编辑 李亚楠]