

发酵葛根与水提葛根的抗氧化活性与延缓线虫衰老的作用研究

赵丹, 吴迪, 李萌*, 王昌涛, 张佳婵, 王冬冬

北京工商大学化学与材料工程学院 北京市植物资源研究与开发重点实验室, 北京 100048

摘要: 为挖掘葛根在抗氧化和抗衰老领域中的应用, 使用发酵法和水提法对葛根活性物质进行提取, 通过生化方法对其体外抗氧化功效进行检测, 并以线虫为模式生物对两种提取物的抗衰老功效进行了比较研究。结果表明 6.8% 体积浓度的葛根发酵液的总抗氧化能力、清除羟自由基和超氧阴离子的能力均高于葛根水提液。与对照组相比, 葛根发酵液能够显著延长线虫寿命 ($P < 0.05$), 同时促进线虫产卵量增加 4.8%, 葛根发酵液作用后线虫耐热时间增加至对照组的 111.6%。基因检测显示葛根发酵液能够抑制促衰老基因 *daf-2* 的表达, 上调延缓衰老基因 *daf-16* 的表达, 并对耐热基因 *hsp-16.2*、抗氧化基因 *sod-3* 表达均有促进作用, 因此相比对照组, 葛根发酵液通过提高线虫的抗氧化性和对温度的耐受性来延长线虫寿命。葛根发酵液良好的抗氧化效果以及抗衰老的功效为其在相关食品、化妆品领域的应用提供参考。

关键词: 葛根; 发酵; 抗氧化; 线虫; 衰老

中图分类号: TS201.4 文献标识码: A

Study on the antioxidant activity of fermented *Pueraria lobata* and aqueous-extracted *Pueraria lobata* and their effect on delaying *Caenorhabditis elegans* aging

ZHAO Dan, WU Di, LI Meng*, WANG Chang-tao, ZHANG Jia-chan, WANG Dong-dong

Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, College of Chemistry and Materials

Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Abstract: To explore the application of *Pueraria lobata* in antioxidant and anti-aging field, two methods of fermentation and aqueous extraction were used to extract the active substances of *P. lobata*. The biochemical experiments were detected to evaluate the antioxidant activity of the extracts and *Caenorhabditis elegans* were used as model animal to detect the anti-aging effect. Results showed that 6.8% fermented broth of *P. lobata* (FBP) had better antioxidant ability than aqueous extract of *P. lobata* (AEP). The antioxidant ability included the total antioxidant capacity, the scavenging capacity of hydroxyl free radicals and superoxide anions. Compared with the control group, FBP could significantly prolong the lifespan of *C. elegans* ($P < 0.05$), and promote the fecundity of *C. elegans* by 4.8%. At the same time, the heat-resistant time of *C. elegans* was increased to 111.6% of the control group. Real time quantitative PCR results showed that FBP could inhibit the expression of the pro-aging gene *daf-2* and up-regulate the expression of the anti-aging gene *daf-16*. In addition, the FBP promote the expression of

the downstream heat-resistant gene *hsp-16.2* and the antioxidant gene of *sod-3*. In conclusion, the FBP could prolong the lifespan of *C. elegans* by improving the antioxidant activity and heat resistance of the *C. elegans*. The good antioxidant and anti-aging effect of FBP provide a reference for its application in the field of anti-aging related food and cosmetics.

Key words: *Pueraria lobata*; fermentation; antioxidant; *Caenorhabditis elegans*; aging

葛根 (*Pueraria lobata*) 为豆科葛属植物的根, 在我国分布广泛。作为传统的中药材, 葛根具有治疗金疮、解热生津的作用, 在《神农本草经》《本草拾遗》《中国药典》中均有记载^[1,2]。随着中药理论的不完善, 以及人们追求健康的意识不断提高, 许多药食同源的植物被开发并制成饮料、保健食品。当前研究具有抗衰老功效的植物很多, 包括人参、葛根、沙棘、枸杞等^[3]。其中葛根的抗衰老活性成分主要包含葛根异黄酮、葛根素、葛根多糖和生物碱。Zhou 等^[4]发现葛根素能够显著改善淀粉样前体蛋白/早老蛋白-1 小鼠的认知障碍, 降低脑组织中的氧化应激水平, 葛根异黄酮能够增加大鼠血液和肝脏中抗氧化酶的活性, 降低丙二醛的含量。Shao 等^[5]发现葛根多糖具有延长线虫寿命的功效。Li 等^[6]研究表明复方葛根片具有保护血管, 抵抗氧化应激损伤, 减缓血管老化的作用。

为使葛根功效成分更好地被吸收利用, 当前葛根提取的方法多种多样, 如水浴提取^[7]、超声提取^[8]、酶法提取^[9]等。利用发酵技术对中草药进行提取, 通过微生物代谢产生的次级代谢产物与中药成分共同作用可达到协同增效的效果, 同时由于微生物胞外酶的作用, 有助于中草药活性成分的释放^[10]。

线虫是研究衰老的典型模式生物, 具有易于培养、生长周期短、进化高度保守等特点, 同时与人类基因的同源性较高, 因此常用线虫进行抗衰老天然产物的筛选^[11,12]。本文利用发酵法和水提法对葛根活性物质进行提取, 并从抗氧化能力, 对线虫寿命、产卵、热应激的影响, 探究葛根发酵液与葛根水提液的抗氧化与抗衰老功效。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黄酒酵母, 由实验室保存; 大肠杆菌 *Escherichia coli* OP50、野生型秀丽隐杆线虫由北京市农林科学院提供。葛根, 购于北京同仁堂药店。

七水硫酸镁 (批号: 20170522)、无水氯化钙 (批号: 20200817)、磷酸二氢钾 (批号: 20190324)、胆固醇 (批号: 20180916)、氯化钠 (批号: 20200415)、次氯酸钠 (20191008)、氢氧化钠 (批号: 20180215)、葡萄糖 (批号: 20190713)、亚硝酸钠 (批号: 20190602)、硝酸铝 (批号: 20190421)、硫酸亚铁 (批号: 20160613)、水杨酸 (批号: 20180527)、双氧水 (批号: 20191120) 购自国药集团化学试剂有限公司; 苯酚 (批号: 20180821)、甲醇 (批号: 20180506)、浓硫酸 (批号: 20190615) 购自北京化工厂; 蛋白胨 (批号: 20201102)、

酵母浸粉(批号: 20200713)购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 维生素 C(批号: L2017033)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Trizol 试剂(批号: S0147), 总抗氧化能力检测试剂盒(批号: S0119)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒(批号: S0131S)购自碧云天生物科技有限公司; cDNA 合成试剂盒(批号: 011228)购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 仪器和设备

BXM-30R 高压蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司); TGL-20br 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); Multiskan FC 酶标仪(美国赛默飞世尔仪器公司); Real-time PCR 仪(美国应用生物系统公司); DQHZ-2001A 恒温震荡培养箱(太仓华美生化仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 葛根发酵液与水提液的制备

制备葛根水提液: 取 10 g 葛根粉末加入 200 mL 去离子水, 70 °C 水浴提取 3 h, 4 800 r/min 离心 30 min, 取上清液, 得到葛根水提液, 使用 0.22 μm 滤膜过滤。

制备葛根发酵液: 取 10 g 葛根粉末加入 200 mL 去离子水, 121 °C 高压灭菌, 冷却后, 接种黄酒酵母, 于 28 °C 培养箱中震荡培养 48 h。将发酵液于 4 800 r/min 离心 30 min, 得到上清液, 使用 0.22 μm 滤膜备用。

1.2.2 活性成分检测

黄酮含量检测采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法, 多酚检测采用福林酚还原比色法^[13], 葛根素含量检测采用高效液相色谱法^[14]。

1.2.3 抗氧化活性测试

1.2.3.1 总抗氧化能力检测

取 96 微孔板, 每孔加入 20 μL 过氧化氢酶工作液; 标准曲线孔加入 10 μL 不同浓度的 Trolox 标准溶液, 样品检测孔内加入 10 μL 不同浓度的样品; 接着每孔加入 170 μL ABTS 工作液, 混合均匀; 室温孵育 6 min 后于 414 nm 测定吸光度, 根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力。

1.2.3.2 羟自由基清除能力检测

取 0.5 mL 0.75 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液于试管中, 依次加入 1 mL 0.15 mol/L PBS 和 0.5 mL 蒸馏水, 接着加入 0.5 mL 0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液, 混匀后加入 0.01% 双氧水 0.5 mL。37 °C 水浴 1 h 后, 于 536 nm 测量吸光值测得数值为 A_1 。

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{A_{\text{样品}} - A_1}{A_2 - A_1} \times 100\%$$

式中, A_2 为将蒸馏水代替双氧水测得吸光度值; $A_{\text{样品}}$ 为样品代替蒸馏水测得的吸光度。

1.2.3.3 超氧阴离子清除能力检测

取 0.05 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液 2.25 mL 于试管中, 置于 25 °C 水浴中预热 20 min; 分别加入不同浓度的样品 0.05 mL 和 0.2 mL 的 25 mmol/L 邻苯三酚溶液, 混合均匀后于 25 °C 水浴中反应 5 min; 加入 0.5 mL 8 mol/L 盐酸终止反应, 测量 299 nm 处吸光值, 计算清除率。空白对照组以 0.05 mL 试样溶剂代替样品。

$$\text{超氧阴离子清除率} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

式中, A_1 为空白的吸光度, A_2 为样品的吸光度。

1.2.4 葛根发酵液和水提液对线虫生长及基因表达的影响

1.2.4.1 线虫的培养及同期化

配制 NGM 培养基涂平板, 待凝固后, 向 NGM 平板加入 200 μ L *E. coli* OP50 菌液并涂布均匀, 将平板皿置于 37 °C 过夜培养。将 L4 期线虫转移至 NGM 平板, 20 °C 培养。

同期化线虫的培养: 选取生长状态良好的线虫, 用 4.5 mL 无菌水将其收集至离心管中。加入 2 mL 裂解液, 每隔 2 min 涡旋振荡一次, 重复 4~6 次, 至线虫裂解完全。将裂解后的混合溶液转移至 1.5 mL 离心管, 3 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。再加入无菌水冲洗线虫, 离心后弃上清, 重复 3 次。吸取离心管底部虫卵, 滴在涂有 *E. coli* OP50 的 NGM 平板无菌区, 直至吹干, 20 °C 培养 48 h 后受精卵发育成 L4 期线虫, 为后续实验备用。

1.2.4.2 葛根水提液、葛根发酵液对线虫寿命的影响

配制含有不同浓度样品的平板, 使葛根水提液、葛根发酵液在 *E. coli* OP50 菌液中的终浓度为 1、5 μ g/mL, 对照组为 M9 缓冲液。将同期化后的线虫挑至含有样品的培养基中于 20 °C 培养, 每板 30 条线虫, 每组做三个平行。每天将线虫挑至新的相应培养皿中并记录线虫的存活和死亡数量, 直到所有线虫死亡。若线虫刺激两次无反应, 判断其死亡。线虫发生逃逸、干死、生殖道外翻, 则被剔除。根据实验记录数据制作线虫寿命曲线。

1.2.4.3 葛根水提液、葛根发酵液对线虫生殖能力的影响

配制含有葛根水提液、葛根发酵液的培养基, 使得在 *E. coli* OP50 菌液中终浓度为 5 μ g/mL (寿命实验筛选出的最佳浓度), 对照组为 M9 缓冲液。将同期化后的线虫挑至平板中, 每个平板 1 条线虫, 共 10 个平行, 置于 20 °C 培养。每天将线虫挑至新的平板中, 直至产卵期结束, 统计每条线虫的产卵量。

1.2.4.4 葛根水提液、葛根发酵液对线虫抗热应激的影响

配制含有葛根水提液、葛根发酵液的培养基, 使得在 *E. coli* OP50 菌液中终浓度为 5 μ g/mL (寿命实验筛选出的最佳浓度), 对照组为 M9 缓冲液。将同期化线虫挑至平板中, 每板挑 30 条线虫, 共 10 个平行。置于 35 °C 培养, 开始计时为 0 h。每隔 2 h 将线虫快速取

出，记录存活和死亡数量。由于平板从培养箱取出，温度发生变化会对实验结果造成影响，取出后即丢弃平板。

1.2.4.5 线虫衰老相关基因检测

配制含有葛根水提液、葛根发酵液的培养基，使得在 *E. coli* OP50 菌液中终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ （寿命实验筛选出的最佳浓度），对照组为 M9 缓冲液。将同期化线虫挑至平板中。每个平板 30 条线虫，共 3 个平行组。每天将线虫挑至新的平板中，培养 5 天后，将成虫冲洗收集至离心管中，3 500 r/min 离心 1 min，弃去上清液后用 M9 缓冲液将秀丽隐杆线虫重悬，于 3 500 r/min 离心 1 min，重复三次。液氮速冻之后，保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。使用 Trizol 法提取线虫 RNA。使用 cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA 后进行荧光定量检测。基因引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列表

Table 1 Primer list of the genes

基因	引物
Gene	Primer
<i>β-actin</i>	F: CTGAAGCCCCACTCAATCCA
	R: GCCAAGTCAAGACGGAGGAT
<i>sod-3</i>	F: GACGATCAACCCCTGTTCGAA
	R: TACTGTTCTTCGGGGAACGC
<i>daf-16</i>	F: AAGCCAGGAAGGAATCCACG
	R: TTGAGTTCGGGGACGGAAAG
<i>daf-2</i>	F: GTAATTGGAGGCCGTTTCGCT
	R: CGTGGGCACATCAATCCAGT

1.2.5 数据分析

实验中数据均做三个重复，数据分析使用 SPSS statistics 软件。两两比较采用 *t* 检验，多重比较使用单因素 ANOVA，显著性标准： $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 葛根发酵液与水提液成分分析

葛根富含异黄酮类成分，包含葛根素、大豆苷元和大豆苷等^[5]。如表 2 所示经过发酵，葛根发酵液（fermented broth of *P. lobata*, FBP）与葛根水提液（aqueous extract of *P. lobata*, AEP）活性成分有明显区别，其中总黄酮含量有较大增加，增加率约为 38.3%，总酚含量降

低，葛根素含量增加 4.51%。这可能是由于发酵过程中微生物代谢产生的酶将植物细胞壁分解，有助于功效成分的释放^[16]，从而使葛根发酵液中葛根素和黄酮含量增加。

表 2 样品成分含量

Table 2 Component of sample

成分	葛根水提液	葛根发酵液
Component	AEP (mg/mL)	FBP (mg/mL)
葛根素 Puerarin	2.88±0.21	3.01±0.39
总酚 Total phenols	0.94±0.25	0.62±0.37
总黄酮 Total flavonoids	3.47±0.23	4.8±0.32**

注：与葛根水提液组比较，** $P < 0.01$ ，差异显著。

Note: compared with AEP, ** $P < 0.01$, significant difference.

2.2 葛根发酵液与水提液的抗氧化功效

2.2.1 葛根水提液、葛根发酵液的总抗氧化能力的检测

如图 1a 所示，当葛根发酵液体积浓度低于 5% 时，葛根水提液的总抗氧化能力较高，随着浓度的增加，相同体积浓度的葛根发酵液总抗氧化能力高于葛根水提液，当体积浓度为 20% 时葛根发酵液的总抗氧化能力最强，约与 1.62 mM Trolox 标准品相当。因此葛根水提液、葛根发酵液均具有一定的抗氧化能力，且在高浓度时葛根发酵液的总抗氧化能力更强。本实验阳性对照为 Vc，其总抗氧化能力标准曲线如图 1b，200 $\mu\text{g/mL}$ Vc 的总抗氧化能力为 0.86 mM，与 6.67% 的葛根发酵液相近。

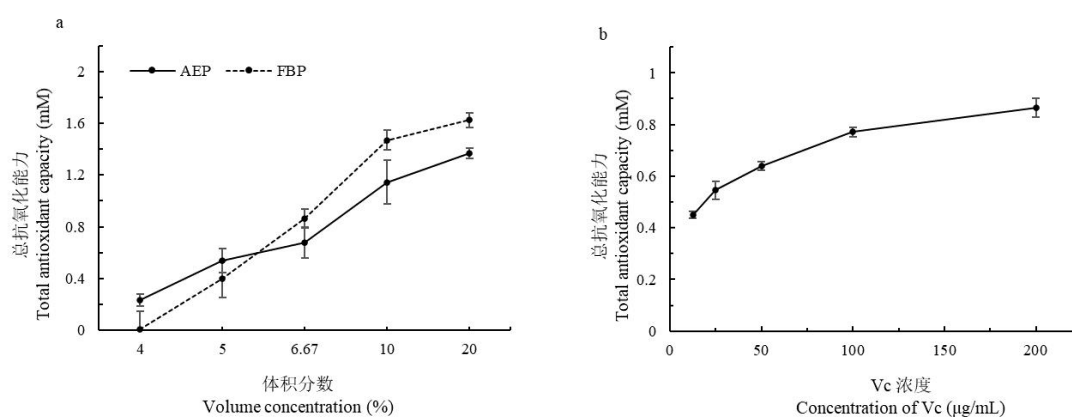


图 1 不同样品的总抗氧化能力

Fig.1 Total antioxidant capacity of different samples

2.2.2 葛根水提液、葛根发酵液对羟自由基清除能力的检测

如图 2a 所示，葛根水提液与葛根发酵液对羟自由基的清除能力呈剂量相关。当体积浓度低于 5% 以内时，两者清除羟自由基的能力接近，当体积浓度在 6.67%~20% 之间时，葛根发酵液清除羟自由基的能力大幅增加。葛根发酵液与葛根水提液清除超氧阴离子的 IC_{50} 分别为 5.66%、11.35%。因此两种发酵液均具有良好的清除羟自由基的能力，且葛根发酵液在高体积浓度时清除羟自由基的能力更强。阳性对照 Vc 对羟自由基的清除作用与浓度呈正相关，如图 2b 所示，Vc 清除羟自由基的 IC_{50} 为 39.32 $\mu\text{g/mL}$ 。

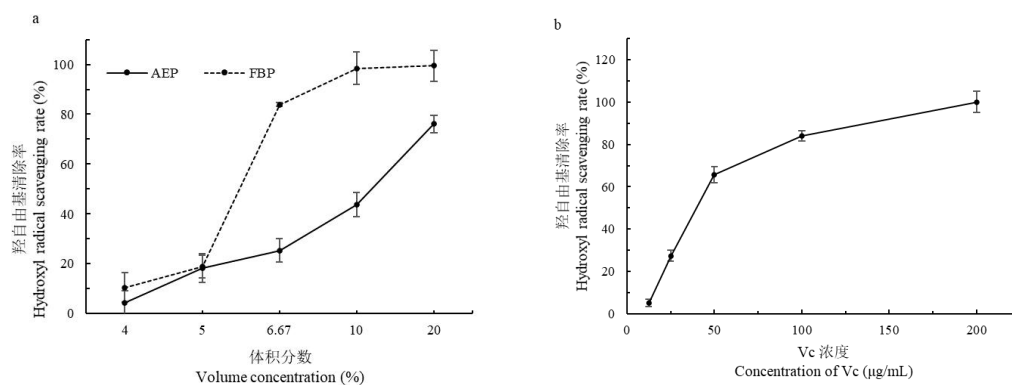


图 2 不同样品对羟自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging effect of different samples on hydroxyl radicals

2.2.3 葛根水提液、葛根发酵液对超氧阴离子清除能力的检测

如图 3a 所示，当样品体积浓度在 4%~20% 时，葛根发酵液清除超氧阴离子能力始终高于葛根水提液，当体积浓度达到 20% 时，葛根发酵液、葛根水提液对超氧阴离子清除率分别为 97.5%、82.5%。葛根发酵液和水提液清除超氧阴离子的 IC_{50} 分别为 4.21% 和 6.68%。阳性对照 Vc 清除超氧阴离子的效果如图 3b 所示，其对超氧阴离子的清除能力与作用浓度呈正相关， IC_{50} 为 23.8 $\mu\text{g/mL}$ 。

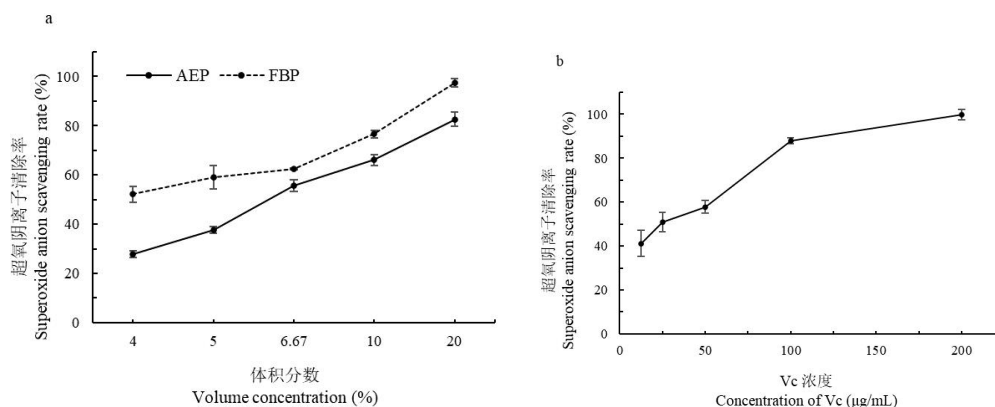


图 3 不同样品对超氧阴离子的清除作用

Fig.3 Scavenging effect of different samples on superoxide anion

2.3 葛根发酵液与水提液延缓线虫衰老的功效

2.3.1 葛根水提液、葛根发酵液对线虫寿命的影响

葛根水提液、葛根发酵液对线虫寿命的影响如表 3 所示。1 $\mu\text{g/mL}$ 葛根发酵液作用组线虫的平均寿命为 14.56 ± 1.01 天，最大寿命为 26.39 ± 1.44 天，均高于对照组。5 $\mu\text{g/mL}$ 葛根发酵液作用组线虫的平均寿命为 17.38 ± 1.08 天，显著高于对照组 ($P < 0.05$)，最大寿命为 30.82 ± 1.61 天，与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。葛根水提液实验组中，与对照组相比，1 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 实验组线虫的平均寿命和最大寿命均无显著性差异。由此可知，5 $\mu\text{g/mL}$ 葛根发酵液能够显著延缓线虫的衰老，增加线虫的寿命。

表 3 葛根水提液、葛根发酵液对线虫寿命的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of FBP and AEP on lifespan of *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	线虫条数	平均寿命	最大寿命
Group	<i>C. elegans</i> number	Average lifespan (d)	The longest lifespan (d)
1 $\mu\text{g/mL}$ AEP	50	14.5 ± 0.96^b	24.55 ± 1.51^b
5 $\mu\text{g/mL}$ AEP	50	15.19 ± 0.99^b	25.17 ± 1.32^b
1 $\mu\text{g/mL}$ FBP	50	15.56 ± 1.01^{ab}	26.39 ± 1.44^b
5 $\mu\text{g/mL}$ FBP	50	17.38 ± 1.08^a	30.82 ± 1.61^a
对照组 Control	50	14.38 ± 0.96^b	26.31 ± 1.32^b

注：不同字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: Different letters indicate significant difference, $P < 0.05$.

由线虫的生存曲线可以得知，实验的第 1 天至第 8 天，线虫均处于良好的生存状态，运动灵活。从第 8 天开始线虫开始出现死亡的现象，其运动缓慢，感应外部刺激能力降低，5 $\mu\text{g/mL}$ 葛根发酵液延长线虫寿命效果均优于 1 $\mu\text{g/mL}$ （见图 4）。

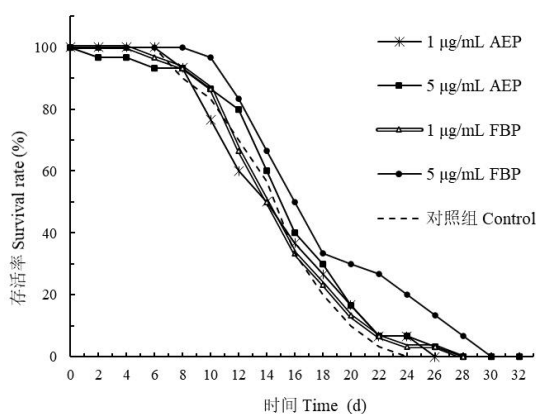


图 4 葛根发酵液和水提液对线虫存活率的影响

Fig. 4 Effect of FBP and AEP on the viability of *C. elegans*

2.3.2 葛根水提液、葛根发酵液对线虫生殖能力的影响

线虫的产卵能力和线虫的生长发育状况有关，通常线虫长至成虫才能产卵^[17]。葛根发酵液、葛根水提液对线虫生殖能力的影响如表 5 所示。实验选用延长线虫寿命较为显著的 5 $\mu\text{g/mL}$ 为作用浓度，统计线虫第 1 天至第 5 天的产卵量。葛根水提液作用后，线虫的总产卵量为 262.27 ± 17.25 个，与对照组相比，产卵量变少，减少率为 9.54%，但变化并不显著。葛根发酵液作用后，线虫的总产卵量为 303.85 ± 20.16 个，与对照组相比，增加率为 4.8%，产卵量显著增加 ($P < 0.05$)。有衰老理论认为，寿命的延长以生殖减少或丧失为代价^[18]，但是葛根发酵液在延长线虫寿命的同时并未对线虫的生殖造成损伤。

表 4 葛根水提液、葛根发酵液对线虫生殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of FBP and AEP on lifespan of reproductive capacity *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	总计
Group						Total amount
葛根水提 AEP	56.31 ± 9.67^a	141.22 ± 9.22^a	51.77 ± 10.74^a	9.53 ± 3.45^a	3.44 ± 1.27^a	262.27 ± 17.25^a
葛根发酵 FBP	58.49 ± 6.18^a	173.73 ± 8.18^b	73.67 ± 10.53^b	2.23 ± 1.65^b	5.73 ± 1.69^a	303.85 ± 20.16^b
对照组 Control	45.25 ± 8.34^a	158.29 ± 3.67^c	80.91 ± 8.99^b	1.89 ± 1.23^b	3.6 ± 1.51^a	289.94 ± 15.33^a

注：不同字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

2.3.3 葛根水提液、葛根发酵液对线虫抗热应激的影响

由图 5 可知，葛根水提液作用线虫后，线虫的平均耐热时间为 24.03 ± 1.08 h，与对照组相比增加率为 5.72%，最长耐热时间为 38.33 ± 3.67 h，最长耐热时间增加率为 11.1%。葛根发酵液作用线虫后，线虫的平均耐热时间为 25.57 ± 1.86 h，最长耐热时间为 39.04 ± 2.35 h，与对照组相比，平均耐热和最长耐热时间均显著延长 ($P < 0.05$)，分别增加 12.49% 和 13.16%。

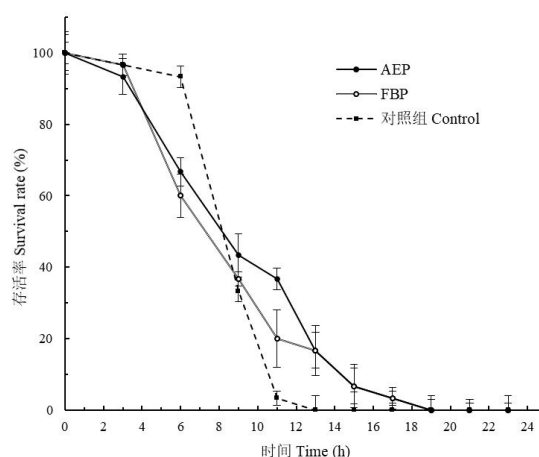


图 5 热应激条件下葛根发酵液和水提液对线虫存活率的影响

Fig. 5 Effect of FBP and AEP on the viability of *C. elegans* under heat stress

表 5 葛根水提液、葛根发酵液对线虫耐热时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of FBP and AEP on the heat-resistant time of *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	线虫数目	平均耐热时间	最长耐热时间
Group	Number	Average heat-resistant time (h)	The longest heat-resistant time (h)
葛根水提液 AEP	30	24.03±1.08	38.33±3.67
葛根发酵液 FBP	30	25.57±1.26*	39.04±2.35*
对照组 Control	30	22.73±0.66	34.5±1.71

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$.

2.3.4 葛根发酵液对线虫衰老相关基因的表达的影响

秀丽隐杆线虫体内的胰岛素信号传导途径 Insulin/IGF 对于线虫的衰老的调节起关键性作用^[19]。此通路中的 *daf-2* 基因是线虫衰老的关键基因，发育过程中 *daf-2* 通过抑制 *daf-16* 表达从而影响线虫的寿命^[20-22]。*hsp-16.2* 和 *sod-3* 基因是位于 *daf-16* 的下游效应因子，在线虫受到外界热应激和氧化应激时，*daf-16* 会在这些逆境信号的刺激下迅速向细胞核转移，进而诱导这些下游效应元件的高表达，以此抵抗外界胁迫造成的压力^[23-25]。由图 6 可知葛根发酵液能够显著增加线虫体内 *daf-16* ($P < 0.05$)、*hsp-16.2* ($P < 0.01$)、*sod-3* ($P < 0.01$) 的表达量，同时下调 *daf-2* 表达。由此说明，在热应激条件下，葛根发酵液作用下的线虫可能通过抑制 *daf-2* 的表达，促进 *daf-16* 进入细胞核转录，从而促使 *daf-16* 下游基因 *sod-3*、*hsp-16.2* 的表达，其中 *sod-3* 基因表达量上调显著，表明线虫在葛根发酵液的作用下超氧化物歧化酶过量表达，因此能够更加高效的清除线虫体内的活性氧和自由基，进而延长线虫寿命。

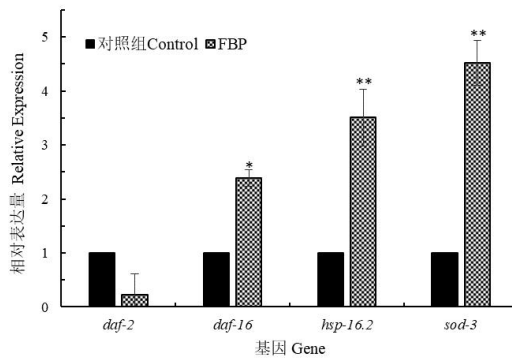


图 6 葛根发酵液和对线虫基因表达的影响

Fig. 6 Effect of FBP on the relative expression of *C. elegans* genes

3 讨论与结论

葛根作为药食两用的中草药，具有清除自由基、退热生津、预防心脑血管疾病等功效，其中葛根黄酮类和异黄酮类物质是其主要功效成分，具有良好的抗氧化性。本文通过发酵和水提两种方式对葛根的活性成分进行提取，比较发现经过发酵得到的提取液中黄酮含量为 4.8 ± 0.32 mg/mL，显著高于水提法得到的黄酮含量 3.47 ± 0.23 mg/mL ($P < 0.01$)，发酵法提取获得的葛根素含量略高、总酚含量略低，但是均无显著性差异。为进一步对两种提取液的抗氧化和抗衰老效果进行评估，首先采用 3 种体外的自由基的清除模型对提取物的抗氧化能力进行检测，结果显示 6.8% 体积浓度的葛根发酵液在总抗氧化能力、对羟自由基和超氧阴离子的清除能力均强于葛根水提液，葛根发酵液抗氧化效果更佳。

线虫作为衰老的模式生物，广泛用于中药提取物延缓衰老的评价。将发酵液与葛根水提液分别作用于秀丽隐杆线虫，在正常培养条件下与对照组相比，葛根发酵液能够显著延长线虫的寿命 ($P < 0.05$)，在热应激条件下，葛根发酵液培养的线虫耐热时间显著高于对照组 ($P < 0.05$)。产卵实验表明葛根发酵液在延长线虫寿命的同时不以牺牲线虫的产卵为代价，其产卵量高于葛根水提液组。基因检测结果显示葛根发酵液通过下调促衰老基因 *daf-2*，上调抗衰老基因 *daf-16*、抗氧化基因 *sod-3* 以及热应激基因 *hsp-16.2* 的表达，实现对高温的耐受性以及更高的抗氧化能力，从而实现延长线虫寿命的作用，葛根发酵液延长线虫寿命作用机制见图 7。

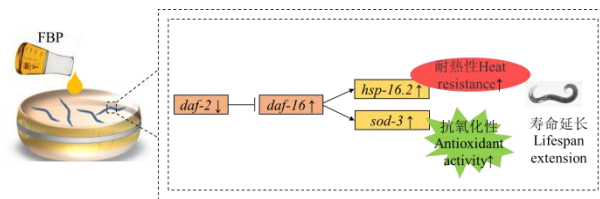


图 7 葛根发酵液延长线虫寿命作用机制示意图

Fig. 7 Schematic diagram of the mechanism of FBP extending the lifespan of *C. elegans*

Zhang 等^[26]将葛根黄酮喂食线虫的存活率显著高于对照组。Shao^[5]研究显示葛根水提多糖作用能够保护线虫抵御热应激损伤，同时增强运动能力，延长线虫寿命。Jeon^[27]研究结果表明葛根素对结肠炎小鼠有抗炎和抗氧化功效。由此可知葛根发酵液延缓线虫衰老的功效是由发酵液中黄酮、多糖、葛根素等多种物质共同作用的结果。结合本课题组此前研究结果^[28]，葛根水提液中总糖含量 (3.46 ± 0.18 mg/mL) 高于葛根发酵液 (2.52 ± 0.5 mg/mL)，但是葛根水提液在延缓线虫衰老效果并不显著。推断葛根发酵液中的主要功效成分黄酮在延缓线虫衰

老方面起关键作用。

本课题组 Wu 等^[28]从生化水平和细胞水平对葛根水提液与葛根发酵液的抗氧化和抗衰老功效进行了检测,结果显示葛根发酵液在生化水平具有良好的清除 DPPH 自由基的效果,并能增加成纤维细胞中抗氧化酶活性,促进胶原蛋白的表达。为了更加全面地评价其抗氧化功效,本篇文章在生化水平补充了葛根两种提取液对羟自由基、超氧阴离子的清除效果以及总抗氧化能力水平的测试。由于细胞实验的局限性,为进一步对葛根发酵液的抗衰老效果进行验证,本篇文章使用衰老模式生物秀丽隐杆线虫作为研究对象,从动物水平检测了葛根发酵液延缓线虫寿命的效果和机制,因此更具备参考价值。结果表明葛根发酵液具有良好的抗氧化效果以及延缓线虫衰老的作用,其通过调节胰岛素信号通路 Insulin/IGF 中关键基因的表达发挥抗衰老功效。以上结果可为葛根发酵液在抗衰老食品、化妆品领域的开发应用提供一定的参考。

参考文献

- 1 Qin D.Studys on the changes of the principal component and the post-harvest physio-biochemicals of Kudzu(*P. thomsonii* Benth)[D].Changsha:Hunan Agricultural University(湖南农业大学),2002.
- 2 Huang XW,Zhang DD,Wang JJ,et al.Chemical composition and pharmacological action of *Pueraria lobata*[J].Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药),2018,38:87-89.
- 3 Xue LY,Gao L,Qin XM,et al.A review of recent literature on anti-aging activity of medical and edible traditional Chinese herbs[J].Food Sci(食品科学),2017,38:302-309.
- 4 Zhou YY,Xie N,Li L,et al. Puerarin alleviates,cognitive impairment and oxidative stress in APP/PS1 transgenic mice[J].Int J Neuropsychopharmacol,2014,17:635-644.
- 5 Shao XY.Biological effects of water-soluble polysaccharide from *Pueraria lobata* and the mechanism of extending *C. elegans* lifespan under heat stress[D].Hefei:University of Science and Technology China(中国科学技术大学),2020.
- 6 Li YJ,Bi YS,Zhang SY,et al.Protective effect of compound puerarin tablets on vascular oxidative stress in aging rats[J].Pharm J Chin PLA(解放军药学学报),2016,32:491-493.
- 7 Luo QS,Du HY,Xiong JH,et al.Extraction process optimization of pueraria Isoflavones and studies on its antioxidant activity[J].J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报),2015,15:104-110.
- 8 Qiu Y,Rui X,Xie YD.Optimization of ultrasound extraction process of puerarin by response surface method[J].Food Sci(食品科学),2014,35:1-5.
- 9 Zhang XS,Liu HY,Zhou Y,et al.Optimized enzymatic extraction of puerarin flavonoids by reponse

- surface[J].China Food Addit(中国食品添加剂),2018:55-66.
- 10 Li YF,Zhai MY,Li YX,et al.Application of fermentation method in study of traditional Chinese medicine[J].Med Recap(医学综述),2020,26:753-757.
 - 11 Argyropoulou A,Aligannis N,Trougakos IP,et al.Natural compounds with anti-ageing activity[J].Nat Prod Rep,2013,30,1412-1437.
 - 12 You TH,Wen L,Liu F.Recent advances on active substances of anti-aging and its mechanisms[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:1985-1990.
 - 13 Thabti I,Elfalleh W,Hannachi H,et al.Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS[J].J Fun Food,2012,4:367-374.
 - 14 Zhang J,Hao JP,Wang F,et al.Determination of puerarin,daidzin and total flavonoids in six wild *Pueraria lobata* from Shanxi[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:99-102.
 - 15 Li X, Pan JX,Chen SG,et al.Research progress of chemical components and pharmacological action of *Pueraria lobata*[J].J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报),2017,17:189-195.
 - 16 Li Y.Antioxidant whitening ingredients produced by the fermentation of probiotics from Chinese herbs[D].Wuxi:Jiangnan University(江南大学),2018.
 - 17 LI J,Chen YX,Zhang GL,et al.Integration of behavioural tests and transcriptome sequencing of *C. elegans* reveals how the nematode responds to peanut shell biochar amendment[J].Sci Total Environ,2020,707:136024.
 - 18 Luo QX,Liu XJ,Cao Y,et al.Effects of astaxanthin on *Caenorhabditis elegans* aging and its underlying mechanisms[J].Mod Food Sci Technol(现代食品科技),2015,31:56-60.
 - 19 Zhang P.Comprehensive proteomic analysis of *C.elegans* insulin signaling mutants[D].Beijing:Peking Union Medical College(北京协和医学院),2014.
 - 20 Mao YQ,Han SF,Wang LS.Advances of DAF-2/IGF-1 signaling pathway relevant to aging in *Caenorhabditis elegans*[J].J Shanghai Jiaotong Univ:Med Sci(上海交通大学学报:医学版),2014,34:929-933.
 - 21 Kimura KD,Tissenbaum HA,Liu Y,et al.Daf-2,an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*[J].Science,1997,277:942-946.
 - 22 Libina N,Bennan JR,Kenyon C.Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan[J].Cell,2003,115:489-502.
 - 23 Wang HL.Research on antiaging activity and mechanism of blueberry polyphenols[D].Guangzhou:South China University of Technology(华南理工大学),2018.

- 24 Braeckman BP, Vanfleteren JR. Genetic control of longevity in *C. elegans*[J]. *Exp Gerontol*, 2007, 42: 90-98.
- 25 Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJ, et al. *C. elegans* tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms[J]. *Cell Metab*, 2008, 282: 73-80.
- 26 Zhang LM, Xu J, Zhou T, et al. Optimization of extraction technology and antioxidation of flavonoids in *Pueraria lobata*[J]. *J Jilin Univ(吉林大学学报)*, 2017, 55: 1020-1024.
- 27 Jeon YD, Lee JH, Lee YM, et al. Puerarin inhibits inflammation and oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis mice model[J]. *Biomed Pharmacother*. 2020, 124: 109847.
- 28 Wu D, Liu PP, Li M, et al. Evaluation of antioxidant and anti-aging effect of *Pueraria* water extracts and *Pueraria* fermentation broth *in vitro*[J]. *Sci Technol Food Ind(食品与工业科技)*, 2019, 40: 285-290.

收稿日期: 2021-09-15 接受日期:

基金项目: 国家自然科学基金(31971382)

*通信作者 Tel: 010-68984917; E-mail: limeng@btbu.edu.cn