

灯盏细辛总咖啡酰奎宁酸调控 PI3K/Akt/FoxO3a 通路延缓衰老的作用机制研究

普元柱¹, 陈海丰¹, 苏 灿^{2*}

¹ 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; ² 云南省科学技术院, 昆明 650051

摘要: 研究灯盏细辛总咖啡酰奎宁酸 (caffeoylquinic acid from *Erigeron breviscapus*, EBCQA) 的抗衰老作用, 并探讨其潜在作用机制。以线虫为模型, 观察 EBCQA 对其寿命、氧化抗性、热抗性、运动能力、DAF-16 入核, 以及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量的影响。腹腔注射 *D*-半乳糖构建衰老大鼠模型, 检测 EBCQA 对大鼠学习记忆能力、胸腺和脾脏系数、肝脏中磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (Akt/protein kinase B, Akt)、磷酸化 Akt (phospho-Akt, p-Akt)、叉头框蛋白 O3a (forkhead box class O3a, FOXO3a)、磷酸化 FOXO3a (phospho-FOXO3a, p-FOXO3a) 表达, 以及肝脏和血清中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量的影响。结果显示, EBCQA 能够延长野生型线虫寿命, 并提升其氧化抗性、热抗性和运动能力, 但对线虫 PI3K、Akt、FoxO3a 同源体突变株寿命没有显著影响; EBCQA 能促进 DAF-16 入核, 通过 DAF-16 提升线虫的 SOD、GSH-Px、CAT 活性, 降低 MDA 水平。在 *D*-半乳糖诱导衰老大鼠中, EBCQA 给药显著改善大鼠的学习记忆功能, 提升胸腺和脾脏系数, 降低 PI3K、Akt、p-Akt、p-FoxO3a 表达和 MDA 含量, 增强 SOD、GSH-Px、CAT 活性。以上结果表明, EBCQA 具有延缓衰老的作用, 其机制可能与抑制 PI3K 和 Akt 激活、降低 FOXO3a 磷酸化、促进 FOXO3a 入核和转录活性、提升抗氧化酶活性和抑制氧化应激相关。

关键词: 灯盏细辛总咖啡酰奎宁酸; 线虫; *D*-半乳糖诱导衰老大鼠; PI3K/Akt/FOXO3a 通路; 抗衰老

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)5-0737-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.5.001

Mechanisms of caffeoylquinic acids from *Erigeron breviscapus* in delaying aging through regulating the PI3K/Akt/FoxO3a pathway

PU Yuan-zhu¹, CHEN Hai-feng¹, SU Can^{2*}

¹ School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

² Yunnan Provincial Academy of Science and Technology, Kunming 650051, China

Abstract: To investigate the anti-aging effect of caffeoylquinic acid from *Erigeron breviscapus* (EBCQA), and explore its underlying mechanism of action. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was used as a model to investigate the impact of EBCQA on its lifespan, oxidative and thermal resistance, motility, nuclear translocation of DAF-16, enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) content. The aging rat model was established by intraperitoneal injection of *D*-galactose, and the effects of EBCQA on its learning and memory ability, thymus and spleen coefficients, the expression of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Akt/protein kinase B (Akt), phospho-Akt (p-Akt), forkhead box class O3a (FOXO3a) and phospho-FOXO3a (p-FOXO3a) in liver, the enzyme activities of SOD, GSH-Px, CAT, and MDA content in liver and serum were assessed. The results showed that EBCQA was able to extend lifespan of wild-type nematodes, enhance oxidative resistance, thermal resistance, and motility, but it has no significant effects on the lifespan of mutant strains of nematode orthologs of PI3K, Akt, and FoxO3a. Furthermore, EBCQA could promote DAF-

收稿日期: 2023-10-30 接受日期: 2024-04-09

基金项目: 云南省科技厅基础研究专项-面上项目 (202201AT070213, 202401AT070146); 云南省科技厅中医联合专项-面上项目 (2019FF002(049), 202301AZ070001-054)

* 通信作者 Tel: 86-871-63138976; E-mail: sucana126@126.com

16 nuclear translocation, elevate the SOD, GSH-Px, CAT activities and decrease MDA levels in a DAF-16 dependent manner. In *D*-galactose-induced aging rat, the administration of EBCQA notably improved the learning and memory function, increased thymus and spleen coefficients, reduced the protein expression of PI3K, Akt, p-Akt, p-FoxO3a and MDA content, enhanced SOD, GSH-Px, CAT activities. The above results indicate that EBCQA has an anti-aging effect and the mechanism may be attributed to its potential inhibition of PI3K and Akt activation, reduction of FOXO3a phosphorylation, promotion of FOXO3a nuclear translocation and transcriptional activity, enhancement of antioxidant enzyme activity, and inhibition of oxidative stress.

Key words: caffeoylquinic acid from *Erigeron breviscapus*; *Caenorhabditis elegans*; *D*-galactose-induced aging rat; PI3K/ Akt/ FOXO3a pathway; anti-aging

衰老是一个与年龄相关的渐进的生理功能衰退,导致生存能力散失和脆弱性增加的过程^[1]。衰老受环境因素和遗传因素影响,具有基因组不稳定、表观遗传改变、端粒耗损、营养感知失调、蛋白稳态失衡、线粒体功能失调、细胞衰老、细胞间交流异常、干细胞耗竭、巨噬失活、慢性炎症、肠道微生物失调十二大特征^[1]。在这些特征中,“营养感知失调”是第一个在分子层面证实,通过胰岛素和胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 与胰岛素受体结合,调节下游信号通路,从而影响寿命的现象^[2]。胰岛素/IGF-1 与胰岛素受体结合激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), PI3K 催化 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂) 生成 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP₃), 进而将蛋白激酶 B (Akt/protein kinase B, Akt/PKB) 募集到质膜中,并分别通过 PIP₃ 依赖性激酶-1 和-2 (phosphoinositide-dependent kinase-1 and -2, PDK-1 和 PDK-2) 使 Akt 中苏氨酸 308 位点 (Thr308) 和丝氨酸 473 位点 (Ser473) 磷酸化,形成磷酸化 Akt (phospho-Akt, p-Akt) 而激活 Akt。叉头框蛋白 O3a (forkhead box class O3a, FOXO3a) 是叉头框转录因子 O 亚族中的 4 个成员之一,激活后的 Akt 使 FoxO3a 的苏氨酸 32 位点 (Thr32) 和丝氨酸 253 位点 (Ser253) 磷酸化,形成磷酸化 FOXO3a (phospho-FOXO3a, p-FOXO3a), 促进 FoxO3a 与 14-3-3 蛋白结合,从而阻止 FoxO3a 入核,失去转录活性。FoxO3a 是一个调节衰老的关键转录因子,其可能通过促进自噬、提升氧化抗性、维持干细胞多能性等,发挥促长寿作用^[3]。在氧化抗性方面, FoxO3a 转录激活提升超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 等基因表达,清除活性氧 (reactive oxygen species, ROS),

减少脂质过氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平,从而延缓机体衰老,延长寿命。在无脊椎动物和脊椎动物模型中的研究表明,降低胰岛素/IGF-1 水平,突变胰岛素受体、PI3K、Akt,可以促进 FoxO3a 入核,提升其转录活性,延缓衰老^[3-5]。

灯盏细辛 (*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. - Mazz.), 又名灯盏花,首载于《滇南本草》,具有活血通络止痛,祛风散寒的功效,主治中风偏瘫,胸痹心痛,风湿痹痛,头痛,牙痛^[6]。黄酮类和咖啡酰奎宁酸 (caffeoylquinic acid, CQA) 类成分是灯盏细辛的主要活性组分^[6]。前期采用网络药理学和分子对接研究发现,黄酮类和 CQA 类成分是灯盏细辛抗衰老的潜在活性成分,可能通过调控 p53、AKT、HDAC1、SIRT1 这 4 个关键靶点而发挥抗衰老作用^[7]。在分子对接中,咖啡酰类成分包括单 CQA 成分 4-CQA、5-CQA、绿原酸,以及二咖啡酰奎宁酸 (dicaffeoylquinic acid, DCQA) 成分 4,5-DCQA、3,4-DCQA、3,5-DCQA、1,3-DCQA、1,5-DCQA 与 AKT 的对接打分高于其抑制性原配体。寿命实验发现,这些成分均具有延长线虫寿命的作用^[8-10]。其中,通过突变株和转基因线虫证实,3,5-DCQA 抑制线虫的 PI3K 和 AKT 的同源体 AGE-1 和 AKT-1 活性,促进 FoxO3a 的同源体 DAF-16 入核,从而发挥促长寿作用^[10]。以上发现提示灯盏细辛中的 CQA 类成分可能通过抑制 AKT 活性,调节 PI3K/Akt/FoxO3a 通路,从而起到延缓衰老的作用。本研究旨在前期基础上,观察灯盏细辛总咖啡酰奎宁酸 (caffeoylquinic acid from *Erigeron breviscapus*, EBCQA) 的抗衰老作用,并基于 PI3K/Akt/FoxO3a 通路探讨 EBCQA 的抗衰老机制。

1 材料与方法

1.1 动物

线虫株: N2 (wild type), CF1038 *daf-16* (*mu86*), TJ356 *daf-16* (*zls356*), RB759 *akt-1* (*ok525*), TJ1052

age-1 (*hx546*), 以及大肠杆菌 OP50 (*E. coli* OP50), 均购自美国明尼苏达大学秀丽隐杆线虫遗传中心。线虫培养于线虫生长培养基 (nematode growth medium, NGM) 平板, 培养温度 20 °C, 湿度 60%, 以 OP50 为食物。

SD 大鼠: 30 只, SPF 级, 雄性, 体重 250 ± 20 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。分笼饲养于云南中医药大学动物实验中心, 实验动物使用许可证号 SYXK (滇) 2017-0005, 温度 23 ± 3 °C、相对湿度 35% ~ 45%, 室内光线每 12 h 明暗交替, 适应性饲养 1 周后进行实验。实验方案经云南中医药大学动物伦理委员会批准 (编号 R-062021S002)。

1.2 药品与试剂

灯盏细辛药材购自昆明螺蛳湾中药材市场, 经云南中医药大学陈海丰副教授鉴定为短葶飞蓬 *E-rigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 的干燥全草; DM-130 大孔树脂 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司, 批号 20190505); D-半乳糖、百草枯、二甲基亚砜 (DMSO)、左旋咪唑、苯甲基磺酰氟 (PMSF) (上海阿拉丁生化科技有限公司, 批号分别为 G100367、M106761、D103277、L118865、P105539); PI3K 兔多克隆抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 GB113360); AKT 兔多克隆抗体、磷酸化 AKT (Ser473) 兔多克隆抗体、FOXO3A 兔多克隆抗体、磷酸化 FoxO3a (Ser253) 兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗、DAB 显色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为 bs-0115R、bs-0876R、bs-1548R、bs-3140R、bs-0295G-HRP、C-0010); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天, 批号 P0010); 丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 测定试剂盒、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测试盒、过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 A003-1-2、A005-1-2、A001-1-2、A007-1-1); 蛋白酶抑制剂 Cocktail (北京兰博利德商贸有限公司, 批号 C0100)。

1.3 实验仪器

恒温恒湿培养箱 (型号: HP300S, 武汉瑞华仪器设备有限公司); 超净工作台 (型号: SW-CJ-1D, 苏州江东精密仪器有限公司); 体式显微镜 (型号: SZ6000B, 上海缔伦光学仪器有限公司); 正置荧光显微镜 (型号: Axio Scope. A1, 德国卡尔蔡司有限公

司); Morris 水迷宫设备及视频分析系统 (型号: XR-XM101, 上海欣软信息科技有限公司); 玻片扫描影像系统 (型号: SQS-1000, 深圳生强科技有限公司); 组织高速冷冻匀浆机 (型号: KZ-III-F, 武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.4 EBCQA 制备

取灯盏细辛药材 20 kg, 粉碎, 加入 70% 乙醇回流提取 3 次, 合并滤液。滤液减压浓缩至无醇味, 然后直接上 20 kg 大孔树脂 (DM-130) 柱, 先用 20 L 去离子水洗脱, 再用 40 L 50% 乙醇洗脱。收集乙醇洗脱液, 减压浓缩至无醇味, 加入 1 L 乙酸乙酯萃取 3 次, 减压浓缩乙酸乙酯萃取液至无溶剂, 再转入真空干燥箱干燥, 得 EBCQA 150.6 g^[11]。密封包装, -20 °C 保存。

1.5 线虫寿命实验

实验分为空白溶剂组 (0.1% DMSO, 以下同) 以及 EBCQA 不同给药浓度 (50、100、200 mg/L) 组, 每组 5 个 NGM 板, 每板 30 条线虫。将同期化的 L4 期线虫转移至板上, 开始寿命实验, 此时记为第 0 d, 每 2 d 更换 NGM 培养板, 并记录死亡线虫数, 直至所有线虫死亡为止。

1.6 线虫氧化抗性实验

将同步化培养至 L4 期线虫, 转移至含药 (100 mg/L) 或空白溶剂且均含 5 mmol/L 百草枯的 NGM 小板上, 后续其他步骤同寿命实验。

1.7 线虫热抗性实验

将同步化培养至 L4 期线虫, 转移至含药 (100 mg/L) 或空白溶剂的 NGM 小板上, 在 20 °C 培养至成虫第 4 d, 然后转至 35 °C 培养, 之后每隔 2 h 统计死亡情况, 后续其他步骤同寿命实验。

1.8 线虫身体弯曲实验

将同步化培养至 L4 期线虫, 转移至含药 (100 mg/L) 或空白溶剂的 NGM 小板上, 培养至给药第 2 d 和第 7 d 进行身体弯曲实验, 每组取 20 条线虫转移至 M9 溶液中, 统计 30 s 内线虫弯曲扭动的次数。

1.9 DAF-16 入核检测

将同步化的 L1 期线虫株 TJ356, 转移至含药 (100 mg/L) 或空白溶剂的 NGM 小板上, 在 20 °C 培养 3 d, 收集线虫, 吸取适量线虫滴加于载玻片上, 再滴加 8 mmol/L 左旋咪唑麻醉线虫, 待虫体变直, 盖上玻片, 荧光显微镜下观察线虫并拍摄荧光图片。统计各组线虫绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 核转位线虫数。每组实验至少计数 30 条

线虫。

1.10 线虫 SOD、GSH-Px、CAT 活力及 MDA 含量测定

将同步化培养至 L4 期的线虫 N2 和 *daf-16* (*mu86*), 转移至含药 (100 mg/L) 或空白溶剂且均含 5 mmol/L 百草枯的 NGM 小板上, 在 20 °C 培养至成虫第 5 d, 用 M9 溶液收集线虫于 1.5 mL 离心管内, 加入 500 μ L 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 内含 0.1 mmol/L PMSF 和蛋白酶抑制剂, 超声破碎, 离心取上清液, 按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度, 再按试剂盒说明书分别测定 SOD、CAT、GSH-Px 的活性及 MDA 含量。

1.11 大鼠分组、造模及给药

30 只 SD 大鼠, 随机分为 5 组, 每组 6 只, 包括: 正常组 (control, Con)、衰老模型组 (model, Mod), EBCQA 低剂量组 (EBCQA low-dose group, L-EBCQA)、EBCQA 中剂量组 (EBCQA medium dose group, M-EBCQA)、EBCQA 高剂量组 (EBCQA high-dose group, H-EBCQA)。正常组每天腹腔注射生理盐水 + 灌胃蒸馏水, 衰老模型组每天腹腔注射 *D*-半乳糖 (200 mg/kg) + 灌胃蒸馏水; L-EBCQA、M-EBCQA、H-EBCQA 组每天腹腔注射 *D*-半乳糖 (200 mg/kg) + 分别灌胃 EBCQA 100、200、400 mg/kg。每周测量体重一次, 根据新体重调整给药剂量, 连续造模及给药 10 周。

1.12 Morris 水迷宫检测

连续给药 10 周后, 进行水迷宫实验。前 4 d 进行定位航行实验, 用以评价空间学习能力。大鼠每天每只随机从 4 个不同象限入水游泳, 入水学习 4 次, 游泳时间最长每次为 60 s。60 s 内大鼠爬上平台, 则本次测试结束。所经历时间记作本次实验潜伏期, 并让大鼠在平台上停留 15 s, 进行学习及适应; 若在 60 s 内大鼠未找到平台, 则潜伏期记作 60 s, 并将大鼠放上平台, 停留 15 s, 以使大鼠学习与适应。第 5 d 为空间探索实验, 撤去平台, 测试大鼠 60 s 内穿越平台次数, 以及在平台象限内运动时间, 用以评价空间记忆能力。

1.13 样本采集

水迷宫实验结束 24 h 后, 称量并记录大鼠体重, 然后腹腔注射 10% 的水合氯醛麻醉。腹主动脉取血, 收集各组大鼠血样, 分离血清, 并迅速取出肝脏、脾脏、胸腺等组织。每只大鼠肝脏分为两部分, 一部分置 4% 多聚甲醛溶液中固定, 用于免疫组化检测, 一部分和血清一起 -80 °C 冻存, 用于抗氧化酶

活力及 MDA 含量检测。

1.14 胸腺和脾脏系数测定

鲜取的脾脏和胸腺, 用预冷的生理盐水冲洗血渍, 滤纸吸干表面水分, 去掉胸腺与脾脏表面的包膜和脂肪等组织, 立即称重, 按: 胸腺系数 (mg/g) = 胸腺重量 (mg) / 大鼠体重 (g), 脾脏系数 (mg/g) = 脾脏重量 (mg) / 大鼠体重 (g), 计算胸腺系数和脾脏系数。

1.15 免疫组化检测 PI3K、Akt、p-Akt、FOXO3a、p-FOXO3a 蛋白表达

取 4% 多聚甲醛固定的肝脏组织, 石蜡切片。将切片脱蜡, 3% H_2O_2 处理去除内源性过氧化氢酶、修复抗原后, 5% BSA 封闭 30 min, 滴加一抗 (PI3K, 1: 2000; Akt, 1: 400; p-Akt, 1: 400; FOXO3a, 1: 400; p-FOXO3a, 1: 400) 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗, 滴加 HRP 标记的二抗室温孵育 90 min, PBS 冲洗后 DAB 显色。苏木素复染, 脱水、透明后, 中性树脂封片, 扫描玻片保存图片, 阳性表达呈棕黄色。用 Image J 软件统计分析阳性区域平均积分光密度值 (integral optical density, IOD)。

1.16 大鼠 SOD、GSH-Px、CAT 活力及 MDA 含量测定

制备肝脏匀浆液, 按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。再按试剂盒说明书测定各组大鼠血清、肝脏匀浆液中 SOD、GSH-Px、CAT 酶活力及 MDA 含量。

1.17 数据分析

线虫寿命实验数据采用 SPSS 分析软件中的 log-rank (Mantel-Cox) 检验绘制生存曲线以确定差异显著性。定位航行实验逃逸潜伏期组间比较采用重复测量方差分析, 空间探索实验检测指标组间差异比较采用多元方差分析, 其他统计计算使用单因素方差分析, 采用 LSD 和 Duncan 检验差异显著性。所有数据均表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 EBCQA 对线虫寿命、抗性和运动能力的影响

为验证 EBCQA 是否能延长寿命, 用不同浓度 (50、100、200 mg/L) 的 EBCQA 处理野生型线虫 N2。结果显示, 在 20 °C 培养条件下, 50、100、200 mg/L 的 EBCQA 分别延长线虫寿命 7.9%、17.7% 和 9.8% (见图 1A); 当线虫培养在含 5 mmol/L 百草枯平板中时, 线虫体内产生更多的活性氧, 在此条

件下,100 mg/L 的 EBCQA 延长线虫寿命达 22.3% (见图 1B)。在 35 °C 培养下,100 mg/L 的 EBCQA 也延长线虫寿命(见图 1C)。在运动能力方面,与对照相比,在第 7 d EBCQA 给药的线虫身体弯曲率明

显高于未给药组(见图 1D)。以上结果表明,EBCQA 能够延长线虫寿命,提升氧化抗性、热抗性和运动能力。

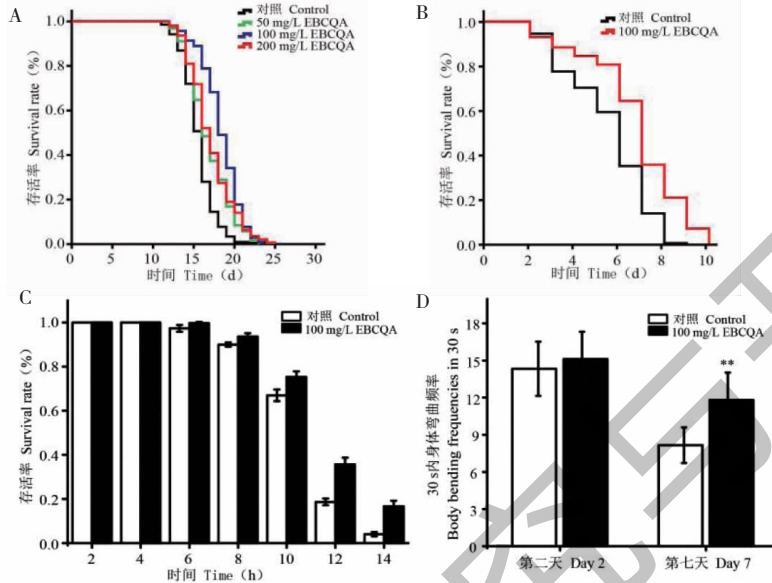


图 1 EBCQA 对线虫寿命(A)、氧化抗性(B)、热抗性(C)以及运动能力(D)的影响

Fig. 1 Effect of EBCQA on the lifespan (A), oxidative resistance (B), thermal resistance (C), and motility (D) of *C. elegans*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。图3、图4同。Note:Compared with control,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$. The same as Fig. 3 and Fig. 4.

2.2 EBCQA 对线虫 PI3K、Akt、FoxO3a 同源体突变株寿命及 DAF-16 入核的影响

前期分子对接发现,灯盏细辛中的 CQA 类成分与 AKT 具有较好的结合能力^[7]。在线虫中,AGE-1、AKT-1、DAF-16 分别是哺乳动物 PI3K、AKT 和 FoxO3a 的同源体(<https://wormbase.org/>)。因此,研究了 EBCQA 对线虫 PI3K、Akt、FoxO3a 同源体突变株寿命的影响,发现 100 mg/L 的 EBCQA 不能延长突变株 *akt-1(ok525)*、*age-1(hx546)*、*daf-16(mu86)* 的寿命(见图 2A~2C)。FoxO3a 是调节衰

老的关键转录因子,能否入核是决定其转录活性的重要因素^[3]。在转基因线虫 TJ356 中,FOXO3a 的同源蛋白 DAF-16 连接有 GFP,DAF-16::GFP 在胞质中时,绿色荧光是分散的,DAF-16::GFP 入核后,绿色荧光聚集呈点状。以 37 °C 热激 30 min 作为阳性对照,分析 EBCQA 的促 DAF-16::GFP 入核作用。相比于对照,100 mg/L 的 EBCQA 可增强 DAF-16::GFP 核定位(见图 3A、3B)。这些结果表明 EBCQA 可能通过调控 PI3K 和 Akt 活性,促进 FoxO3a 入核而延长线虫寿命。

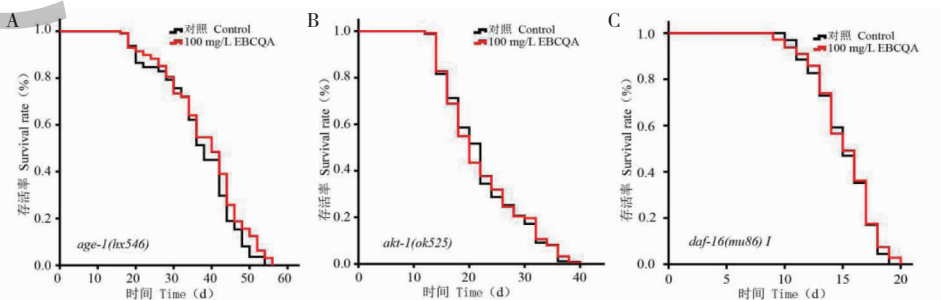


图 2 EBCQA 对线虫 PI3K(A)、Akt(B)、FoxO3a(C)同源体突变株寿命的影响

Fig. 2 Effect of EBCQA on the lifespan of mutant strains of nematode orthologs of PI3K (A), Akt (B), FoxO3a (C)

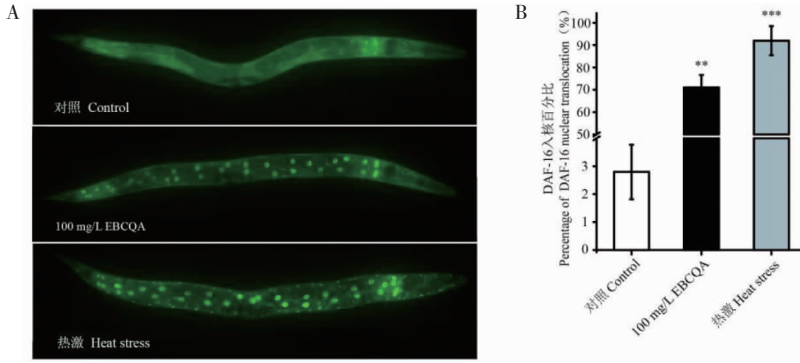


图3 EBCQA对DAF-16入核的影响

Fig. 3 Effect of EBCQA on the DAF-16 nuclear localization

2.3 EBCQA对线虫抗氧化酶活性和MDA水平的影响

EBCQA能够提升百草枯诱导氧化应激条件下的线虫寿命,促进DAF-16::GFP核定位,提示EBCQA可能具有增强抗氧化酶活性的作用。与对照组相比,EBCQA给药后,暴露于百草枯处理的N2线虫SOD、CAT、GSH-Px活性分别提升50.91%、29.56%和19.64%(见图4A~4C),MDA水平下调37.50%(见图4D)。然而,EBCQA的抗氧化作用在 $daf-16$ ($mu86$)突变体线虫中几乎被消除(见图4A~4D)。这些结果表明,EBCQA延长线虫寿命的作用可能与增强抗氧化酶活性、降低脂质过氧化产物水平相关,并依赖于DAF-16。

2.4 EBCQA对D-半乳糖诱导衰老大鼠学习记忆能力的影响

Morris水迷宫实验显示,在前4d的定位航行实验中,随着训练次数的增加,各组平均潜伏期总体呈下降趋势。与模型组比较,正常组潜伏期显著缩短($P < 0.01$),H-EBCQA组潜伏期也明显小于模型组($P < 0.01$)(见图5A)。大鼠游泳轨迹也表明,正常组、H-EBCQA组轨迹清晰,能较快找到目标站台(见图5D)。第5d空间探索实验,正常组穿越平台次数和在目标象限停留的时间显著高于模型组($P < 0.001$);与模型组比较,H-EBCQA组给药治疗后,穿越平台次数和在目标象限停留的时间明显增加($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$)(见图5B、5C)。

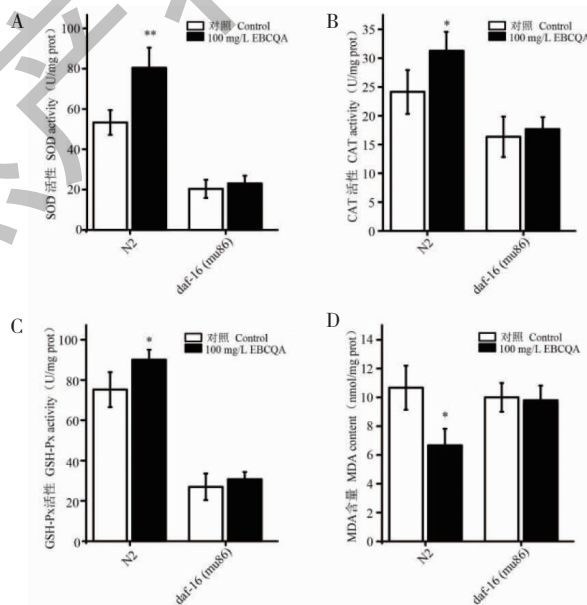


图4 EBCQA对线虫SOD、CAT、GSH-Px活性以及MDA含量的影响

Fig. 4 Effect of EBCQA on the SOD, CAT, GSH-Px activities and MDA contents of *C. elegans*

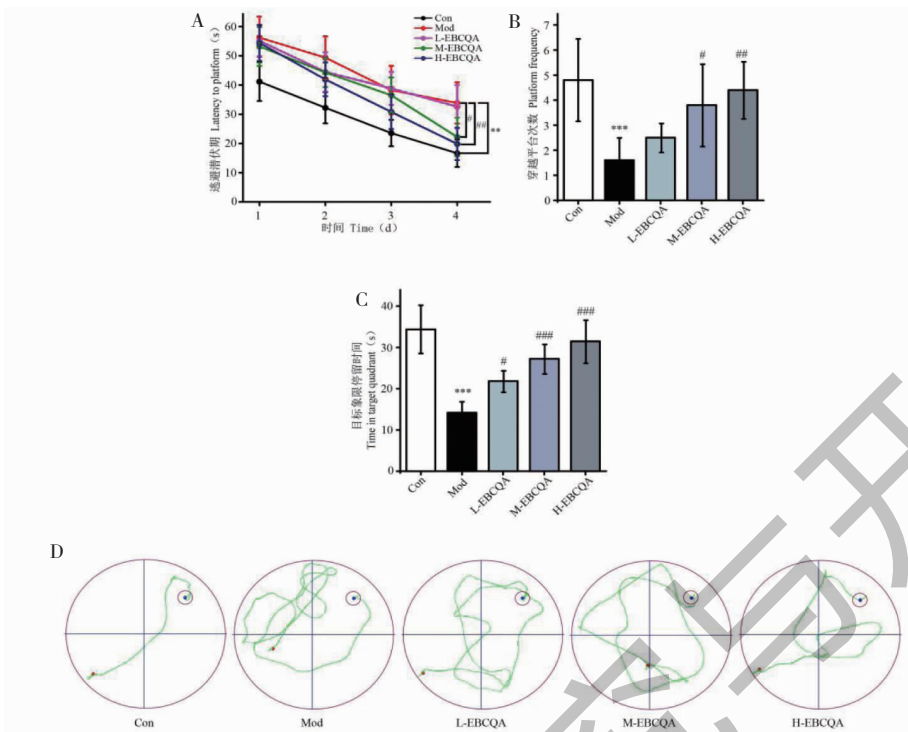


图5 EBCQA对D-半乳糖诱导衰老大鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of EBCQA on the learning and memory function of *D*-galactose-induced aging rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (图6~9同)。Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. (The same as Fig. 6-Fig. 9).

2.5 EBCQA对D-半乳糖诱导衰老大鼠免疫器官脏器系数的影响

脾脏和胸腺是机体重要的免疫器官,其随着年龄的增长而萎缩,导致机体免疫能力下降^[12]。在D-半乳糖注射造模10周后,大鼠胸腺系数和脾脏系数明显降低($P < 0.01$)(见图6A、6B),表明衰老

模型造模成功。EBCQA给药显著拮抗D-半乳糖处理诱导的这些变化,特别是M-EBCQA组和H-EBCQA组,胸腺系数和脾脏系数显著提高($P < 0.01$)(见图6A、6B)。这些结果说明,EBCQA能有效拮抗D-半乳糖诱发的衰老。

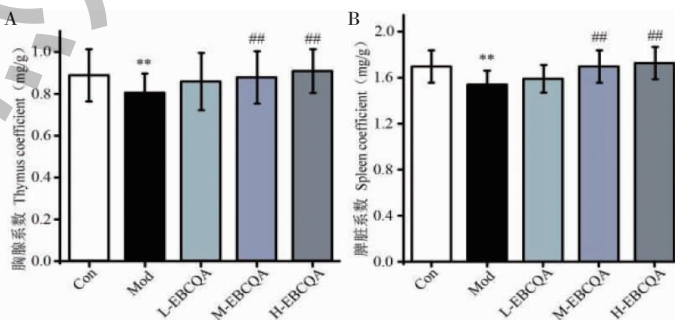


图6 EBCQA对D-半乳糖诱导衰老大鼠胸腺和脾脏系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of EBCQA on the thymus and spleen coefficients of *D*-galactose-induced aging rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.6 EBCQA对PI3K、Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FOXO3a蛋白表达的影响

PI3K/Akt/FoxO3a是受胰岛素调节的信号通

路,而肝脏是胰岛素发挥主要靶器官^[13]。因此,研究了EBCQA对D-半乳糖诱导衰老大鼠肝脏PI3K/Akt/FoxO3a通路的调控作用。如图7所示,

D-半乳糖处理显著增加 PI3K、p-Akt 和 p-FoxO3a 的水平($P < 0.001$),也增加 Akt 水平,而降低 FoxO3a 水平,表明 *D*-半乳糖处理可能激活 PI3K 和 Akt,促进 FoxO3a 磷酸化而抑制其入核,使其失去转录功能,从而诱导衰老。给药 EBCQA 显著抑制 *D*-半乳糖诱导的 PI3K、p-Akt、和 p-FoxO3a 水平增加($P <$

0.01),另外对 Akt 表达也有抑制作用($P < 0.05$),可增加 FoxO3a 表达但不是很明显。这些结果表明,PI3K/Akt/FoxO3a 通路参与了 *D*-半乳糖诱导的衰老过程,EBCQA 可通过调控 PI3K/Akt/FoxO3a 通路而拮抗 *D*-半乳糖诱导衰老。

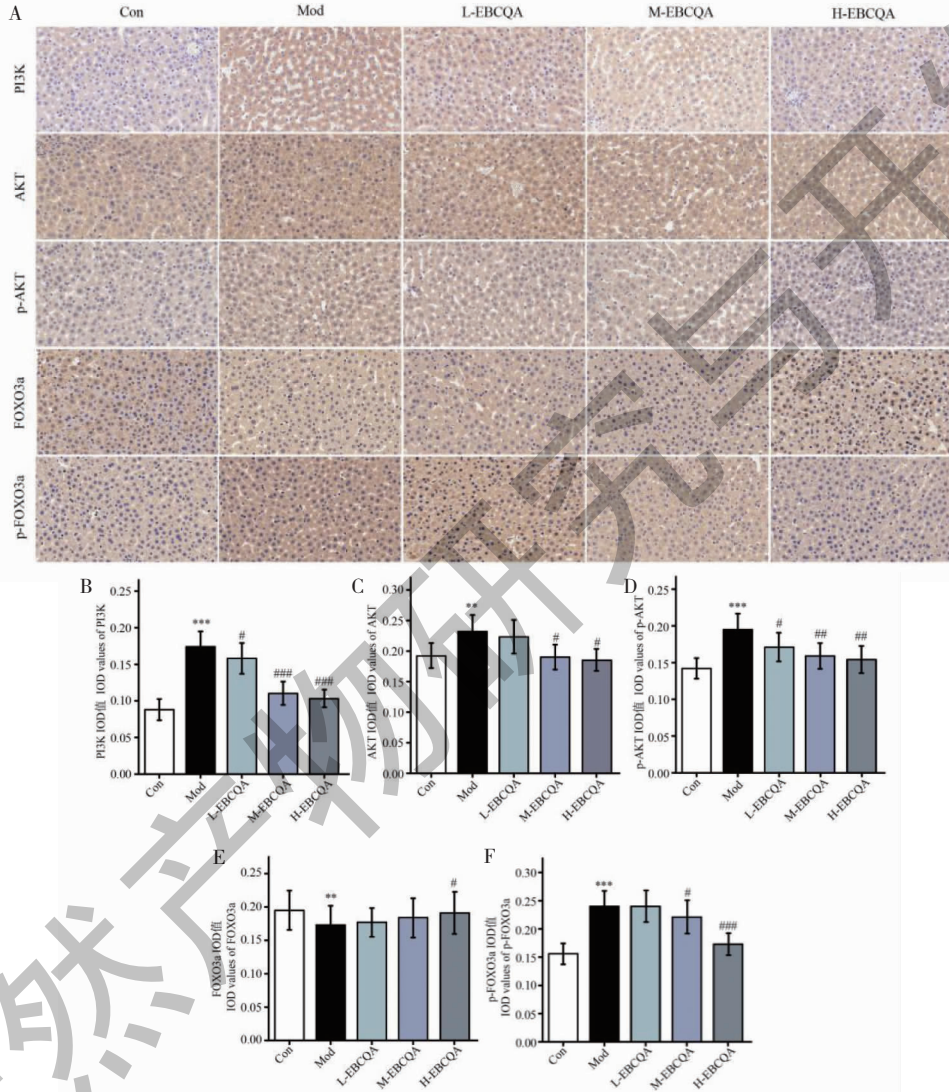


图7 EBCQA对*D*-半乳糖诱导衰老大鼠PI3K/Akt/FoxO3a通路蛋白表达的影响($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of EBCQA on PI3K/Akt/FoxO3a pathway protein expression of *D*-galactose-induced aging rat($\times 200$; $\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7 EBCQA对*D*-半乳糖诱导衰老大鼠抗氧化酶活性和MDA水平的影响

氧化应激是 *D*-半乳糖诱导衰老的最重要机制之一^[14]。如图8和图9所示,*D*-半乳糖处理显著降低血清和肝脏中SOD、GSH-Px、CAT活性,而增加MDA水平。给药EBCQA后,血清和肝脏中的抗氧

化酶活性增强,MDA水平降低,其中肝脏中的SOD、GSH-Px、CAT活性显著增强($P < 0.01$),血清和肝脏中MDA水平均显著降低($P < 0.01$)。这些结果表明,氧化应激在 *D*-半乳糖诱导的衰老中起着关键作用,EBCQA可通过提高多种抗氧化酶活性和抑制 *D*-半乳糖诱发的氧化应激而发挥抗衰老作用。

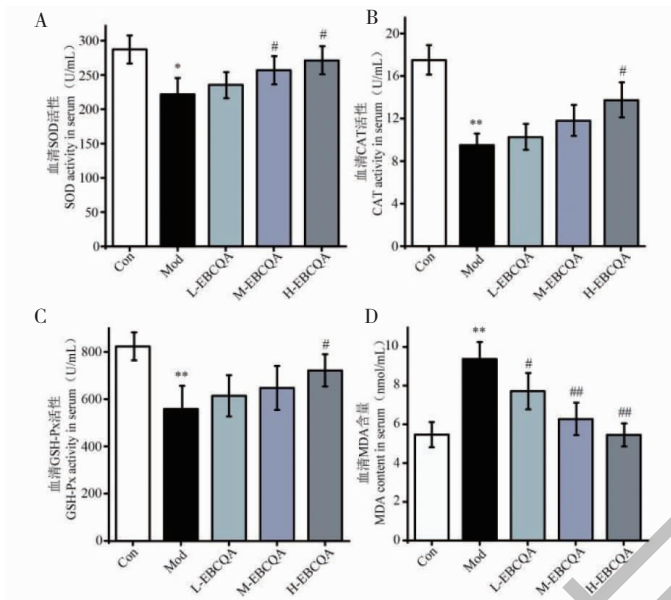


图8 EBCQA对D-半乳糖诱导衰老大鼠血清SOD、GSH-Px、CAT活性和MDA含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Effect of EBCQA on the activities of SOD, GSH-Px, CAT, and MDA contents of D-galactose-induced aging rat in serum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

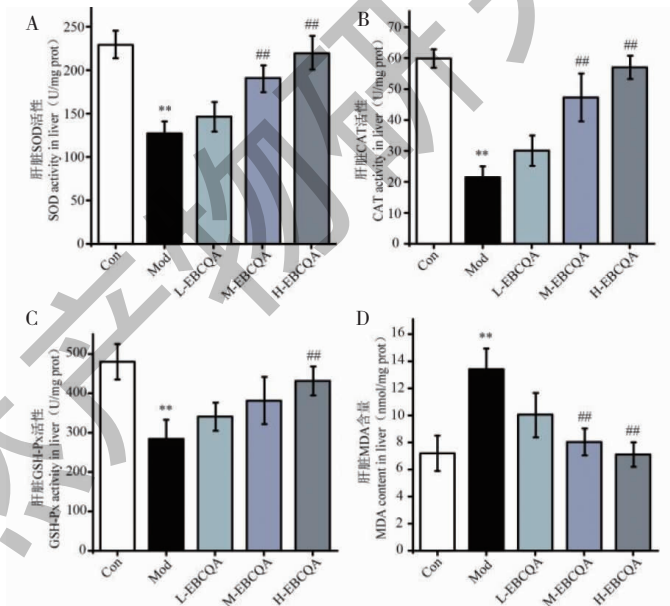


图9 EBCQA对D-半乳糖诱导衰老大鼠肝脏SOD、GSH-Px、CAT活性和MDA含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 9 Effect of EBCQA on the activities of SOD, GSH-Px, CAT, and MDA contents of D-galactose-induced aging rat in liver ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论与结论

衰老是生命的自然过程,尽管衰老不可避免,但可通过营养调节、遗传操作、药物干预等方式延缓衰老^[15]。更重要的是,这些延缓衰老的干预措施,不但延长寿命,而且明显改善机体健康状况^[15]。在之

前的研究中,我们发现EBCQA具有抗衰老的潜在作用,并可能与调节AKT活性有关^[7]。本研究中,我们证实EBCQA具有延长线虫寿命,增强氧化抗性和热抗性,增强运动能力的作用,通过突变株线虫证实EBCQA的抗衰老作用与调节PI3K/Akt/

FoxO3a 通路,增强抗氧化酶活性,降低 MDA 水平有关;在 *D*-半乳糖诱导的衰老大鼠中,EBCQA 提升学习记忆能力、胸腺和脾脏系数,抑制 PI3K 和 Akt 激活,以及 FoxO3a 磷酸化,增强抗氧化酶活性,降低 MDA 水平。

CQA 类成分是灯盏细辛中一类重要的酚类活性组分,也是众多食物(如紫薯、绿咖啡)和药材中所含有的成分。CQA 类成分具有神经保护、心血管保护、抗氧化、抗炎、抗糖尿病等作用^[16]。在抗衰老方面,富含 CQA 类成分的绿咖啡提取物和金银花提取物延长了线虫寿命^[8,17],但其抗衰老机制是否涉及 PI3K/Akt/FoxO3a 通路仍不清楚;CQA 类成分在哺乳动物中的抗衰老作用则鲜见报道。与先前 CQA 类成分具有延长线虫寿命的报道一致,我们发现 EBCQA 延长线虫寿命,最高延长率为 17.7%,并增强氧化抗性、热抗性和运动能力。*D*-半乳糖诱导的衰老大鼠模型已被证明可以有效模拟自然衰老,因而被广泛用于研究衰老机制和筛选延缓衰老的药物^[14]。学习记忆能力减退是伴随衰老的常见生理现象,有的则可能发展为神经退行性疾病,如阿尔茨海默病^[18]。随着年龄的增长或疾病的发生,机体的免疫能力通常会逐渐降低。胸腺和脾脏是重要的免疫器官,其器官指数在一定程度上可反应机体免疫能力的大小^[12]。因而,学习记忆能力和胸腺/脾脏脏指数是评价衰老和抗衰老的常用指标^[18,19]。*D*-半乳糖诱导的衰老大鼠,学习记忆能力下降,胸腺和脾脏系数降低,EBCQA 给药有效改善学习记忆能力,提升胸腺和脾脏系数。这些结果说明,无论是在无脊椎动物线虫,还是在脊椎动物 *D*-半乳糖诱导衰老大鼠中,EBCQA 均具有延缓衰老的作用。

PI3K/Akt/FoxO3a 通路是一条在进化上保守的受胰岛素、IGF-1 等调节的信号通路^[3-5]。在衰老调节中,PI3K 和 Akt 发挥促衰老作用,FOXO3a 发挥抗衰老作用。在线虫中,AGE-1、AKT-1、DAF-16 分别是哺乳动物 PI3K、Akt 和 FoxO3a 的同源体,AGE-1 突变的线虫平均寿命延长 40%~65%^[20],AKT-1 突变的线虫寿命也显著延长,而 DAF-16 突变则显著缩短寿命^[21]。在哺乳动物中,过表达 AKT-1 诱导细胞衰老,AKT-1 突变的小鼠(*Akt1*^{+/-}),雄性寿命延长 8%,雌性寿命延长 15%^[22]。对长寿人群的研究也发现,导致 IGF-1 受体、胰岛素受体或其下游因子(如 PI3K、AKT)功能丧失的遗传多态性/突变与人类寿命的延长有关^[23,24]。对日裔美国人、汉族人、

加利福尼亚人、新英格兰人、阿什肯纳兹犹太人、丹麦人、德国人和意大利人中的长寿人群研究表明,FOXO3a 的 rs2764264、rs2802292 等遗传多态性与寿命和健康衰老有关^[3]。在 PI3K/Akt/FoxO3a 通路的调节中,Akt 的 Thr308 和 Ser473 磷酸化后,Akt 被激活,FoxO3a 的 Thr32 和 Ser253 磷酸化后,FoxO3a 被抑制。本研究中,EBCQA 延长野生型线虫 N2 寿命,促进 DAF-16 入核,但对 AGE-1、AKT-1、DAF-16 突变体的寿命没有影响,说明 EBCQA 延长寿命的作用依赖于对 PI3K/Akt/FoxO3a 通路的调控。*D*-半乳糖处理的大鼠,PI3K、Akt、p-Akt 和 p-FOXO3a 表达上调,FOXO3a 表达下调,这与先前报道的 *D*-半乳糖诱导衰老大鼠和自然衰老小/大鼠的变化一致^[19,25,26],这些蛋白表达的改变可能导致学习记忆能力下降,胸腺和脾脏系数降低,从而诱导了衰老。给药 EBCQA 后抑制了这些变化,从而可能起到抗衰老的作用。

1956 年,英国学者 Harman 首次提出自由基衰老学说,认为自由基攻击生物大分子造成的细胞功能障碍是引起机体衰老的根本原因之一^[27]。本研究中,EBCQA 提升百草枯处理线虫和 *D*-半乳糖处理大鼠 SOD、GSH-Px、CAT 的活性,降低 MDA 水平。这些抗氧化酶活性的提升可能导致 ROS 和氧化损伤减少,从而有助于延缓衰老。PI3K/Akt/FoxO3a 通路影响寿命的下游机制之一是调节氧化抗性。在线虫中,一些长寿的线虫突变株,如 *daf-2*(*e1368*)、*age-1*(*hx546*),其抗氧化酶 SOD、GSH-Px、CAT 活性增强,这些酶活性的增强依赖于 DAF-16,因为突变 DAF-16 后,这些突变株的抗氧化酶活性几乎接近于野生型线虫 N2^[28]。在哺乳动物中,FoxO3a 调控着 SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶的表达,抑制 FoxO3a 的活性致使细胞内 ROS 积累,导致动脉粥样硬化加速,患癌风险增加等^[3]。EBCQA 促进线虫 DAF-16 入核,抑制大鼠 FoxO3a 磷酸化,表明 EBCQA 可能通过提升 FoxO3a 转录活性,增强抗氧化酶活性,从而起到抗衰老的作用。

综上所述,EBCQA 能够有效延长线虫寿命,拮抗 *D*-半乳糖诱导大鼠衰老,其作用机制可能是通过抑制 PI3K 和 Akt 激活,降低 FOXO3a 磷酸化,促进 FOXO3a 入核和转录活性,提升抗氧化酶活性,抑制氧化应激,从而延缓衰老。

参考文献

1 López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. Hallmarks of ag-

- ing; an expanding universe [J]. Cell, 2023, 186: 243-278.
- 2 Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants [J]. Cell, 2005, 120: 449-460.
 - 3 Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity [J]. Aging Cell, 2016, 15: 196-207.
 - 4 Davy PMC, Allsopp RC, Donlon TA, et al. FOXO3 and exceptional longevity: insights from hydra to humans [J]. Curr Top Dev Biol, 2018, 127: 193-212.
 - 5 McIntyre RL, Liu YJ, Hu M, et al. Pharmaceutical and nutraceutical activation of FOXO3 for healthy longevity [J]. Aging Res Rev, 2022, 78: 101621.
 - 6 PuYZ, Su C. Research progress in pharmacological effects of *Erigeron breviscapus* and its active ingredients for treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 5650-5657.
 - 7 PuYZ, Su C, ZhuYT, et al. Study on the anti-aging mechanism of *Erigeron breviscapus* based on network pharmacology and molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1758-1768.
 - 8 Yang ZZ, Yu YT, Lin HR, et al. *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 310-322.
 - 9 Zheng SQ, Huang XB, Xing TK, 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: 464-472.
 - 10 Li R, Tao MF, Wu T, et al. A promising strategy for investigating the anti-aging effect of natural compounds: a case study of caffeoylquinic acids [J]. Food Funct, 2021, 12: 8583-8593.
 - 11 Wang SX, Guo H, Hu LM, et al. Caffeic acid ester fraction from *Erigeron breviscapus* inhibits microglial activation and provides neuroprotection [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18: 437-444.
 - 12 Masters AR, Haynes L, Su DM, et al. Immune senescence: significance of the stromal microenvironment [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 187: 6-15.
 - 13 Jayashree S, Indumathi D, Akilavalli N, et al. Effect of Bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in liver of adult male albino rat [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 35: 300-310.
 - 14 Azman KF, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. Biogerontology, 2019, 20: 763-782.
 - 15 Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing [J]. Nature, 2019, 571: 183-192.
 - 16 Liu WW, Li JD, Zhang XM, et al. Current dvances in naturally occurring caffeoylquinic acids: structure, bioactivity, and synthesis [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68: 10489-10516.
 - 17 Amigoni L, Stuknyte M, Ciaramelli C, et al. Green coffee extract enhances oxidative stress resistance and delays aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Funct Foods, 2017, 33: 297-306.
 - 18 Nadeeshani H, Li JY, Ying TL, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product-promises and safety concerns [J]. J Adv Res, 2021, 37: 267-278.
 - 19 Li YN, Guo Y, Xi MM, et al. Saponins from *Aralia taibaiensis* attenuate D-galactose-induced aging in rats by activating FOXO3a and Nrf2 pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014; 320513.
 - 20 Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility [J]. Genetics, 1988, 118: 75-86.
 - 21 Uno M, Nishida E. Lifespan-regulating genes in *C. elegans* [J]. NPJ Aging Mech Dis, 2016, 2: 16010.
 - 22 Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, et al. Haploinsufficiency of akt1 prolongs the lifespan of mice [J]. PLoS one, 2013, 8: e69178.
 - 23 Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans [J]. Science, 2010, 328: 321-326.
 - 24 Milman S, Atzmon G, Huffman DM, et al. Low insulin-like growth factor-1 level predicts survival in humans with exceptional longevity [J]. Aging Cell, 2014, 13: 769-771.
 - 25 Choi YJ, Kim DH, Lee EK, et al. Attenuation of age-related changes in FOXO3a activity and the PI3K/Akt pathway by short-term feeding of ferulate [J]. Age, 2012, 34: 317-327.
 - 26 Ma HF. The effects of huperzine A on insulin signaling pathway and oxi-inflamm in aging mice liver [D]. Shanghai: Fudan University (复旦大学), 2014.
 - 27 Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. J Gerontol, 1956, 11: 298-300.
 - 28 Song SJ, Zhang XY, Wu HH, et al. Molecular basis for antioxidant enzymes in mediating copper detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. PLoS one, 2014, 9: e107685.