

鲟鳇鱼子提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响

李玉娟^{1*}, 王义国¹, 张启明^{1#}, 李国志², 柴方营^{3#}

¹中国中医科学院医学实验中心, 北京

²抚远东龙鲟业有限公司, 黑龙江 抚远

³黑龙江科技大学, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2022年5月7日; 录用日期: 2022年5月23日; 发布日期: 2022年5月31日

摘要

虽然衰老是生物个体正常生理功能不可逆的衰退过程, 但采取相应的措施能够对衰老进程起到一定的延缓作用。本文研究了鲟鳇鱼子提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响。结果表明, 不同配方的鲟鳇鱼子提取物对线虫平均寿命、最大寿命均具有延长作用。

关键词

衰老, 秀丽隐杆线虫, 寿命, 鲟鳇鱼子提取物

The Effect of Extract of Caviar on the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*

Yujuan Li^{1*}, Yiguo Wang¹, Qiming Zhang^{1#}, Guozhi Li², Fangying Chai^{3#}

¹Medical Experiment Center of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing

²Fuyuan Donglong Sturgeon Industry Co., Ltd., Fuyuan Heilongjiang

³Heilongjiang University of Science and Technology, Harbin Heilongjiang

Received: May 7th, 2022; accepted: May 23rd, 2022; published: May 31st, 2022

Abstract

Aging has been regarded as an irreversible process, but the course of aging can be delayed with the help of prevention efforts. The effect of extract of caviar on aging in *C. elegans* was studied. The results showed that relative to the control, the extract of caviar treatment caused a significant increase in mean lifespan, and maximum lifespan.

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 李玉娟, 王义国, 张启明, 李国志, 柴方营. 鲟鳇鱼子提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响[J]. 药物化学, 2022, 10(2): 204-210. DOI: 10.12677/hjmce.2022.102020

Keywords

Aging, *C. elegans*, Lifespan, Extract of Caviar

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

衰老是指生物个体正常生理功能出现不可逆的衰退过程。随着年龄的增长, 机体各器官均会出现衰老现象, 继而发生多种与之相关的疾病, 如肿瘤、心脑血管疾病和阿尔茨海默病等。这些疾病直接或间接地影响了人们的生活质量和寿命。据报道[1], 2017年占中国人疾病死因前10位的分别是脑中风、缺血性心脏病、肺癌、慢性阻塞性肺病、肝癌、交通事故伤害、胃癌、阿尔茨海默病、新生儿疾病和高心病, 这里除了交通事故伤害和新生儿疾病外, 其他均与衰老有着密切关系。如何延缓衰老、保持健康已成为社会关注的热点。衰老的过程虽然不可逆, 但是随着对衰老机制的深入研究, 采取相应的措施对衰老进程能够起到一定的延缓作用。

鲟鳇鱼为达氏鳇鱼与史氏鳇鱼的统称, 系白垩纪时期保存下来的古生物, 曾与恐龙在地球上共同生活, 有“水中活化石”之称。鲟鱼全身都是宝, 《本草纲目》记载, 鲟鱼肝主治恶疮疥, 肉治血淋, 脾肺补虚益气。籽如小豆, 食之健美, 杀腹内小虫。现代医学研究证明, 鲟鱼具有多种保健功能, 鲟鱼鱼油含有不饱和脂肪酸, 对软化人体心脑血管、促进大脑发育及预防老年痴呆有重要疗效; 鲟鱼骨对预防老年骨质疏松、增强机体免疫力、阻断癌细胞生长具有显著功效, 食之明目壮阳、延年益寿[2]。胶原蛋白肽能够保护补充人体胶原蛋白, 具有修复细胞功能, 增加细胞活力, 提升免疫细胞数量及免疫能力, 从而增加机体的免疫能力[3]。中医普遍认为肾精不足、气血亏虚是导致衰老的主要原因。精血是万物生命产生、存在的本原和物质基础, 同时, 精血也是生命之后天滋养升发的重要物质基础。《素问·上古天真论》指出, “竭其精”、“耗散其真”, 可致人“半百而衰”。元代《寿亲养老新书·戒忌保护第七》称老年人是“精血耗竭, 神气浮弱, 返同小儿”。这些论述都认识到衰老的各种变化其根源在于精血随着年龄增长而不断衰耗[4]。本研究中采用的补肾填精方由覆盆子、益智仁、芡实等具有补肾固精作用的中药, 与鲟鳇鱼子及骨胶原肽按不同比例配比组成鲟鳇鱼子提取物, 采用模式生物——秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, 以下简称线虫)为实验模型, 研究了鲟鳇鱼子提取物的延寿作用, 为其产品的深度开发应用提供实验依据。

2. 材料

2.1. 线虫品系

N2 线虫由中科院生物物理所惠赠, 本实验室保存。

2.2. 药物及试剂

琼脂粉, 日本协和株式会社生产; 蛋白胨(peptone), 英国 OXOID 公司生产; 胰蛋白胨(tryptone), 英国 OXOID 公司生产; 五氟尿嘧啶, sigma 公司生产; 胆固醇, 北京奥博星生物技术有限公司; NaCl、MgSO₄ 等均为国产试剂。

受试物:

鲟鱼子: 由抚远东龙鲟业有限公司提供鲟鱼子酱, 匀浆, 冻干, 备用。

骨胶原肽固体饮料: 由梅州市富德食品科技有限公司提供。

补肾填精方(由覆盆子、益智仁、芡实、莲子肉、枸杞、桑椹等组成): 由医学实验中心张启明教授提供。

鲟鱼子酱、补肾填精方、骨胶原肽用 DMSO 配成 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 储存液。按表 1 的比例(体积比)混合, 得到配方 1、2、3、4, 命名为鲟鱼子提取物。使用时不同配方分别以 0.25% (高浓度)、0.125% (中浓度)、0.0625% (低浓度)比例加入线虫培养基中。

Table 1. Formula ratio of sturgeon roe extract

表 1. 鲟鱼子提取物配方比例

	鲟鱼子酱	补肾填精方	骨胶原肽
配方 1	3	1	1
配方 2	1	3	1
配方 3	1	1	3
配方 4	1	1	1

2.3. 仪器

MIR-553 恒温培养箱(日本 SANYO 公司), XTS30-D 体视显微镜(北京泰克仪器有限公司), 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、MLS-3780 高压灭菌锅(日本 SANYO 公司)等。

3. 方法

3.1. 主要缓冲液配制

主要缓冲液配制如下表 2。

Table 2. Primary buffer preparation

表 2. 主要缓冲液配制

M9 缓冲液(1 L):	KH_2PO_4	3 g
	NaHPO_4	6 g
	NaCl	5 g
	MgSO_4 (1 M)	1 ml
121°C 灭菌 30 分钟		
B Broth (1 L):	胰蛋白胨	10 g
	NaCl	5 g
	121°C 灭菌 30 分钟	

Continued

	KH ₂ PO ₄	136.1 g
1 M 磷酸钾缓冲液(1 L):	KOH	17.9 g
121℃灭菌 30 分钟		

3.2. 实验处理

3.2.1. 实验分组

设对照组及四个实验组, 分别为配方 1 组、配方 2 组、配方 3 组、配方 4 组。使用时以 0.25% (高浓度)、0.125% (中浓度)、0.0625% (低浓度) 比例加入线虫培养基中。对照组按 1:1000 比例加入 DMSO。

3.2.2. 线虫标准培养基和常规培养条件

NGM 标准培养基(1 L): 3 g/L NaCl, 20 g/L 琼脂粉, 2.5 g/L 胰蛋白胨, 1 ml 5 mg/ml 溶解于乙醇中的胆固醇, 加入 970 ml 蒸馏水 121℃灭菌 30 分钟, 灭菌后加入 1 M CaCl₂ 及 1 M MgSO₄ 各 1 ml 和 25 ml 1 M pH 6.0 磷酸钾缓冲液。

E. coli OP50 培养条件: 将 *E. coli* OP50 接种于 B Broth 培养液, 37℃ 过夜后, 置于 4℃ 备用。

线虫常规培养条件[5]: 雌雄同体线虫接种于涂布 *E. coli* OP50, 且细菌生长良好的 NGM 上, 于 20℃ 恒温培养。

3.2.3. 线虫同步化

用 M9 缓冲溶液将年轻成虫洗至无菌 EP 管中, 加适量裂解液(0.5% 次氯酸钠, 0.5 N 氢氧化钠)裂解线虫, 置低速离心机上离心(3000 rpm, 1 min), 弃上清, 再用 M9 冲洗线虫 3 次, 离心弃上清后用移液器吸取 EP 管底部线虫滴于 NGM 的无菌区, 约 48 小时后裂解的线虫体内的受精卵基本发育成 L4 期幼虫, 完成同步化用于下一步实验。

3.2.4. 鲟鲤鱼子提取物干预对 N2 线虫寿命的影响

取同步化的 L4 期线虫到各组培养基中, 于 20℃ 培养。分组同 2.2.1, 各组培养基中均加入 40 mM 的五氟尿嘧啶以抑制线虫后代繁育, 15 天以后停止加入五氟尿嘧啶。从转移时刻起开始计算线虫存活天数, 转移当天记为寿命实验第 0 天。每 2~3 天检查线虫, 记录死亡线虫数。线虫死亡判断标准用铂丝轻触虫体或光线刺激线虫, 如无任何反应, 即判断为死亡。

3.3. 统计学分析

采用 GraphPadPrism 6.0 软件进行生存曲线分析。数据以平均值 ± 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示, 采用 t 检验比较对照组与实验组的平均寿命、最大寿命(每组最后存活 15% 数量线虫的平均寿命)差异, $p < 0.05$ 视为有显著性差异。

4. 结果

4.1. 配方高浓度组对线虫寿命的影响

配方 1 及配方 4 高浓度组对线虫平均寿命和最大寿命均具有显著的延长作用, 配方 3 高浓度组显著延长线虫的平均寿命(图 1、表 3)。

4.2. 配方中浓度组对线虫寿命的影响

配方 1、2、3、4 中浓度组对线虫平均寿命和最大寿命均具有显著的延长作用(图 2、表 4)。

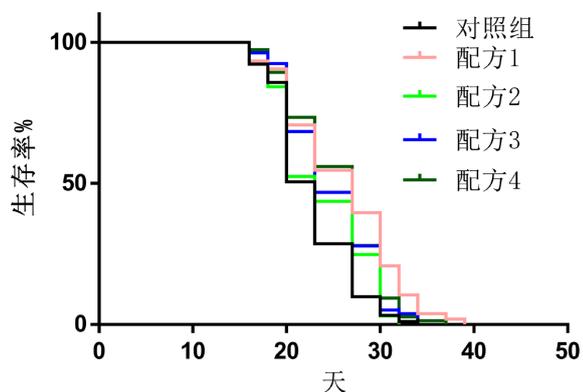


Figure 1. Effects of high-concentration formula groups on the lifespan of N2 nematodes
图 1. 配方高浓度组对 N2 线虫寿命的影响

Table 3. Effects of formula high concentration group on nematode lifespan ($\bar{X} \pm SD$)

表 3. 配方高浓度组对线虫寿命的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	n (条)	平均寿命(天)	延长%	最大寿命(天)	延长%
对照组	91	22.60 ± 4.23	-	29.50 ± 2.24	-
配方 1	106	25.95 ± 5.82 ^{***}	14.81	34.38 ± 2.39 ^{***}	16.52
配方 2	101	23.66 ± 4.94	4.68	30.93 ± 1.67	4.86
配方 3	79	24.71 ± 4.71 ^{**}	9.31	31.17 ± 1.80	5.65
配方 4	75	25.29 ± 4.80 ^{***}	11.90	31.91 ± 2.11 [*]	8.17

与对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

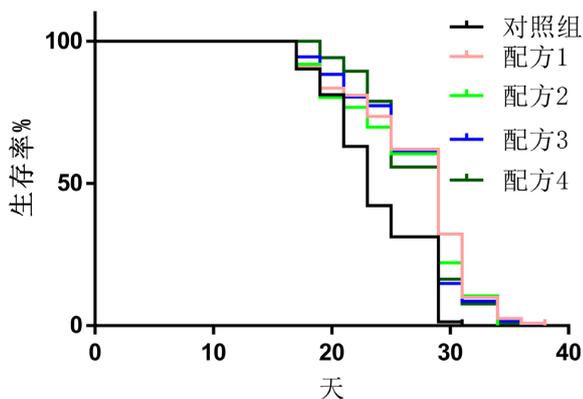


Figure 2. Effects of sturgeon roe extract on the lifespan of N2 nematodes
图 2. 鲟鱼子提取物对 N2 线虫寿命的影响

Table 4. Effects of concentration groups in formula on nematode lifespan ($\bar{X} \pm SD$)

表 4. 配方中浓度组对线虫寿命的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	n (条)	平均寿命(天)	延长%	最大寿命(天)	延长%
对照组	154	23.80 ± 4.14	-	29.17 ± 0.58	-
配方 1	121	27.07 ± 5.23 ^{***}	13.70	33.44 ± 2.06 ^{***}	14.64

Continued

配方 2	86	26.55 ± 5.19 ^{***}	11.52	33.08 ± 1.44 ^{***}	13.38
配方 3	128	26.85 ± 4.63 ^{***}	12.80	33.05 ± 2.04 ^{***}	13.30
配方 4	104	27.06 ± 3.90 ^{***}	13.66	32.62 ± 1.75 ^{***}	11.83

与对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

4.3. 配方低浓度组对线虫寿命的影响

配方 1 及 2 低浓度组对线虫平均寿命具有显著的延长作用, 配方 4 低浓度组对线虫最大寿命具有显著的延长作用(图 3、表 5)。

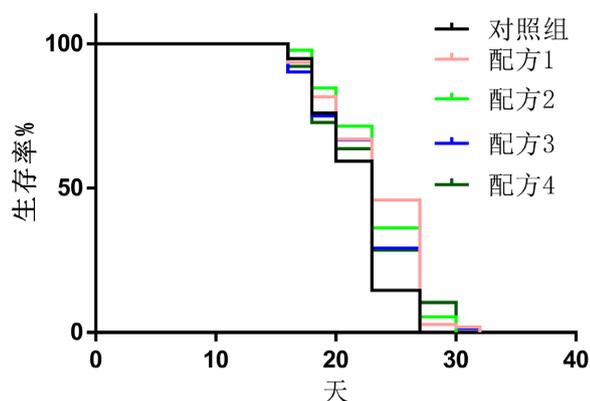


Figure 3. Effects of sturgeon roe extract on the lifespan of N2 nematodes
图 3. 鲟鲤鱼子提取物对 N2 线虫寿命的影响

Table 5. Effects of formula low concentration group on nematode lifespan ($\bar{X} \pm SD$)

表 5. 配方低浓度组对线虫寿命的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	n(条)	平均寿命(天)	延长%	最大寿命(天)	延长%
对照组	102	22.15 ± 3.38	-	27.40 ± 1.06	-
配方 1	109	23.47 ± 4.03*	5.96	27.81 ± 1.80	1.50
配方 2	91	23.40 ± 3.63*	5.69	28.07 ± 1.49	2.45
配方 3	72	22.58 ± 3.92	1.97	27.73 ± 1.68	1.19
配方 4	77	22.66 ± 4.20	2.33	29.00 ± 1.48**	5.84

与对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

5. 讨论

衰老是机体各组织、器官功能随年龄增长而发生的退行性变化, 是机体各种生化反应的综合表现。延缓衰老的根本目的在于尽可能地延长寿命, 并在此基础上提高生命活力。目前延寿研究中选用的大多是针对某个学说而制造的动物模型或者离体细胞, 与正常的衰老生理、生化病理过程存在一定的差异。衡量延缓衰老效果最为准确的方法是动物生存实验。因此, 国内外均将整体寿命实验特别是动物平均寿命和最高寿命作为药物延缓衰老研究的主要检测手段[6]。

然而自然衰老动物模型的饲养时间长、价格昂贵,而且由于繁殖力和饲养条件的原因,同一实验中选用的通常不是同批动物,环境影响因素复杂难以控制,易造成实验结果出现较大的偏差。线虫雌雄同体,细胞个数确定,其生命周期分为4个阶段[7][8],即胚胎发育期(卵至幼虫)、生长发育期(幼虫至成虫早期)、生殖期(产卵阶段)和生殖后期。线虫生长较快,20℃时从虫卵发育到可产卵的线虫需3.5天,整个生命周期大约需要20天[9]。并且,线虫约有50%的基因与人类具有同源性,因具有以上诸多优点,线虫成为优秀的延缓衰老研究的模式动物[10]。

基于以上原因,本实验利用线虫研究鲟鲤鱼子提取物延缓衰老的作用。研究表明,鲟鲤鱼子提取物四种配方均能显著延长线虫的平均寿命和最大寿命,且四种配方中浓度延长线虫寿命均能达到10%以上,如果中国人的平均寿命按70岁来算的话,那么推测服用鲟鲤鱼子提取物能够使人均寿命至少增加7岁,这对中国老年人来说将是一个巨大的福利。其中配方1(鲟鲤鱼子:补肾填精方:骨胶原肽=3:1:1)呈现了很好的剂量效应关系,其延缓衰老的机制有待进一步研究。

基金项目

中央支持地方高校改革发展高水平人才项目(编号:2020GSP14)。

参考文献

- [1] Zhou, M., Wang, H., Zeng, X., *et al.* (2019) Mortality, Morbidity, and Risk Factors in China and Its Provinces, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, **394**, 1145-1158. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30427-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30427-1)
- [2] 王蕊. 鲟鱼营养保健功能及其深加工产品的开发研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(22): 135-138.
- [3] 王毅虎, 张兵, 王富荣, 等. 胶原蛋白增强免疫力功能研究[J]. 明胶科学与技术, 2015, 35(3): 137-143.
- [4] 陈川. 林水淼“还精”学术思想初探[J]. 中医文献杂志, 2012(3): 30-32.
- [5] Amrit, F.R.G., Ratnappan, R., Keith, S.A., *et al.* (2014) The *C. elegans* Lifespan Assay Toolkit. *Methods*, **68**, 465-475. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.002>
- [6] 李春生, 侯荣先. 国内应用寿命试验和衰老动物模型研究抗衰老中药的近十年概况[J]. 中医杂志, 1998, 39(11): 690-693.
- [7] Jorgensen, E.M. and Mango, S.E. (2002) The Art and Design of Genetic Screens: *Ceanorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 356-369. <https://doi.org/10.1038/nrg794>
- [8] Sulston, J.E. and Horvitz, H.R. (1977) Post-Embryonic Cell Lineages of the Nematode *Ceanorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, **56**, 110-156. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0)
- [9] Bargmann, C.I. (1998) Neurobiology of the *Ceanorhabditis elegans* Genome. *Science*, **282**, 2028-2033. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2028>
- [10] Gershon, H. and Gershon, D. (2002) *Ceanorhabditis elegans*—A Paradigm for Aging Research: Advantage and Limitations. *Mechanisms of Ageing and Development*, **123**, 261-274. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00401-8](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00401-8)