

酸枣仁中 6"-阿魏酰斯皮诺素的抗氧化活性研究

张 妹¹, 刘锦芮¹, 张彦青^{1*}, 解军波^{2*}

(1. 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134; 2. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617)

摘要: **目的** 探讨酸枣仁黄酮成分 6"-阿魏酰斯皮诺素抗氧化活性。**方法** 分析 6"-阿魏酰斯皮诺素的总还原力以及清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟基自由基的能力, 评价 6"-阿魏酰斯皮诺素的体外抗氧化能力; 以秀丽隐杆线虫为模型, 检测 6"-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫热应激抗性、氧化应激抗性、体内 ROS 和 MDA 水平、GSH-Px 活性等影响, 评价 6"-阿魏酰斯皮诺素的体内抗氧化能力。**结果** 6"-阿魏酰斯皮诺素具有抗氧化能力, 其 DPPH 自由基、ABTS 自由基以及羟基自由基清除率 IC₅₀ 值分别为 239.02、124.38、192.96 μmol/L; 6"-阿魏酰斯皮诺素可以增强秀丽隐杆线虫热应激抗性、氧化应激抗性, 改善热应激诱导氧化损伤, 降低秀丽隐杆线虫体内 ROS 和 MDA 水平, 升高 GSH-Px 活性, 增加 SOD-3 和 GST-4 表达。**结论** 6"-阿魏酰斯皮诺素可以清除自由基, 同时提高秀丽隐杆线虫氧化应激抗性, 具有良好的抗氧化活性。

关键词: 酸枣仁; 6"-阿魏酰斯皮诺素; 秀丽隐杆线虫; 抗氧化活性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)05-1670-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.050

酸枣仁为鼠李科植物酸枣的干燥成熟种子, 具有悠久的历史, 是中医治疗虚烦不眠、惊悸多梦的首选药物^[1-2]。随着药理研究的逐渐深入, 酸枣仁的作用被进一步发掘, 包括调节血糖、血脂, 缓解焦虑、抑郁, 增强学习记忆能力等^[3], 且酸枣仁作为卫生部颁布的第 1 批药食两用药材, 具有温和、可长期服用、副作用低等特点, 被认为是具有良好开发前景的热门研究品种。

黄酮是酸枣仁的主要活性成分, 目前已经从酸枣仁中分离得到二十余种黄酮类单体^[4-5], 其中 6"-阿魏酰斯皮诺素是酸枣仁黄酮类成分之一, 近年来多项研究表明, 该成分在神经功能调节方面表现出生物活性, 包括调节线粒体自噬、调控阿尔兹海默症的发生与发展^[6]、镇静安眠^[7]等。丁轲等^[8]采用活性追踪法对酸枣仁提取组分中多种单体成分体外抗氧化活性进行比较, 发现 6"-阿魏酰斯皮诺素体外抗氧化活性强于酸李碱、斯皮诺素, 但对于 6"-阿魏酰斯皮诺素抗氧化能力尚欠缺系统性实验分析。本研究采用体外和体内相结合的方法, 综合讨论 6"-阿魏酰斯皮诺素的抗氧化活性, 以期为酸枣仁的深入开发与应用提供基础。

1 材料

1.1 动物 野生型秀丽隐杆线虫 N2、转基因秀丽隐杆线

虫 CF1553、转基因秀丽隐杆线虫 CL2166、缺陷型大肠杆菌 (*E. coli* OP50) 均由美国明尼苏达大学惠赠。

1.2 试剂与药物 6"-阿魏酰斯皮诺素 (批号 drk1727, 纯度 ≥98%, 成都德锐可生物科技有限公司)。1, 1-二苯基-2-三硝基胍 (DPPH, 批号 20200217)、2, 2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS, 批号 20200412) (北京华迈科生物技术有限责任公司); 磷酸钠 (批号 20190812)、钼酸铵 (批号 20200722) (天津市鼎盛鑫化工有限公司); 硫酸 (批号 20210812)、过硫酸钾 (批号 20190312)、30% H₂O₂ (批号 20210724) [市福晨 (天津) 化学试剂有限公司]; 无水乙醇 (批号 20210322, 天津市鑫桥化工贸易有限公司); 水杨酸 (批号 20200825)、维生素 C (批号 20200107) (天津市光复精细化工研究所); 硫酸亚铁 (批号 20181026, 天津市化学试剂供销公司); 5-氟尿嘧啶 (批号 BSF20100418, 合肥巴斯夫生物科技有限公司); 叠氮钠 (批号 20191009, 上海诚凛生物科技有限公司); BCA 蛋白试剂盒 (批号 20210421, 北京索莱宝科技有限公司); 氧自由基 (ROS) 检测试剂盒 (批号 20200624)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒 (批号 20190911)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (批号

收稿日期: 2021-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101235); 天津市“131”创新型人才团队项目 (201927)

作者简介: 张 妹 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为药食同源物质研究与开发。Tel: 15122257267, E-mail: zm48690311@163.com

* 通信作者: 张彦青 (1976—), 女, 博士, 教授, 研究方向为食品和药品营养功能及农副产品高值化综合利用。Tel: 13752524378,

E-mail: zhyqing@ticu.edu.cn

解军波 (1975—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药食同源物质的开发与评价。Tel: 13902153236, E-mail: xiejb@

tjutcm.edu.cn

网络出版日期: 2022-03-28

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220325.2009.018.html>

20190911) (南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器 SpectraMax-M5 型多功能读板机 (美国 Molecular Devices 公司); UV-2550 型紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); DZKW-D-2 型电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器有限公司); BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); HNY2102 型恒温培养箱 (天津市欧诺仪器股份有限公司)。

2 方法

2.1 6''-阿魏酰斯皮诺素体外抗氧化活性检测

2.1.1 总还原力 按照文献 [9] 报道, 配制终浓度为浓硫酸 0.6 mol/L、磷酸钠 28 mmol/L、钼酸铵 4 mmol/L 的磷钼试剂。用 50% 乙醇配制 100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$ 6''-阿魏酰斯皮诺及维生素 C 样品溶液, 将 60 μL 样品溶液与 0.6 mL 磷钼试剂混合均匀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 1.5 h。在 695 nm 波长处检测吸光度 (A), 以 50% 乙醇代替样品溶液测得吸光度 (A_0), 计算总还原力, 公式为总还原力 = $A - A_0$ 。

2.1.2 DPPH 自由基清除率 按照文献 [10] 报道, 用无水乙醇配制 1.0×10^{-4} mol/L DPPH 工作液, 使用 50% 乙醇配制浓度为 50、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ 6''-阿魏酰斯皮诺及维生素 C 样品溶液。将 100 μL 样品溶液与 900 μL DPPH 溶液混合均匀后避光反应 0.5 h, 在 517 nm 波长处检测吸光度 (A); 用 900 μL 无水乙醇代替 DPPH 溶液, 在 517 nm 波长处检测吸光度 (A_0); 使用 100 μL 50% 乙醇代替样品溶液, 在 517 nm 波长处检测其吸光度 (A_1), 计算得到 DPPH 自由基清除率, 公式为清除率 = $[1 - (A - A_0) / A_1] \times 100\%$ 。

2.1.3 ABTS 自由基清除率 按照文献 [10] 报道, 配制 ABTS^+ 工作液, 将 7.4 mmol/L ABTS 与等体积 2.6 mmol/L 过硫酸钾混合, 用无水乙醇稀释使其在 734 nm 波长处吸光度为 0.68~0.72。使用 50% 乙醇稀释样品溶液, 得到浓度为 50、75、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 样品溶液。将 200 μL 样品溶液与 800 μL ABTS^+ 工作液振荡混匀, 室温静置 5 min, 在 734 nm 波长处检测吸光度 (A); 使用无水乙醇代替 ABTS^+ 工作液, 在 517 nm 波长处检测吸光度 (A_0); 将样品溶液替换成 50% 乙醇, 在 517 nm 波长处检测吸光度 (A_1), 计算 ABTS 自由基清除率, 公式为清除率 = $[1 - (A - A_0) / A_1] \times 100\%$ 。

2.1.4 羟基自由基清除率 按照文献 [10] 报道, 用 50% 乙醇配制浓度为 100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$ 6''-阿魏酰斯皮诺及维生素 C 样品溶液, 将 200 μL 样品溶液、200 μL 9 mmol/L 硫酸亚铁和 200 μL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇混合均匀, 再加入 200 μL 30% H_2O_2 , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 0.5 h, 在 510 nm 波长处检测吸光度 (A); 用水替换 30% H_2O_2 在 510 nm 波长处检测吸光度 (A_0); 用 50% 乙醇替换样品溶液在 510 nm 波长处检测吸光度 (A_1), 计算羟基自由基清除率, 公式为清除率 = $[1 - (A - A_0) / A_1] \times 100\%$ 。

2.2 秀丽隐杆线虫培养 按照文献 [11] 报道, 配制线虫培养基 (NGM) 及 M9 缓冲液, 在 NGM 表面涂布 OP50 菌液, 紫外照射灭菌后使用。N2、CL2166、CF1553 秀丽隐杆线虫均在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下培养。秀丽隐杆线虫同期化时选取进入产卵期的秀丽隐杆线虫, 使用 M9 缓冲液洗涤 3 次, 加入裂解液, 漩涡振荡 4~5 min, 离心去除裂解液后用 M9 缓冲液洗涤 3 次, 将虫卵转移到新的 NGM 培养基上, 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。

2.3 秀丽隐杆线虫给药 将同期化的秀丽隐杆线虫培养至 L4 期, 用 M9 缓冲液洗涤 3 次后转移到含有 0、10、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 6''-阿魏酰斯皮诺素及 0.1% 5-氟尿嘧啶的培养基中, 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 48 h。培养结束后将线虫分为 2 组, 一组继续在 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 6 h, 另一组在 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 6 h。设置对照组 (16 $^{\circ}\text{C}$), 模型组 (35 $^{\circ}\text{C}$), 6''-阿魏酰斯皮诺素 10、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 组 (35 $^{\circ}\text{C}$)。

2.4 秀丽隐杆线虫热应激实验 野生型秀丽隐杆线虫给药后用 M9 缓冲液洗涤 3 次, 转移到含有 0.1% 5-氟尿嘧啶的 NGM 培养基中, 使每 1 个培养基中约有 100 只秀丽隐杆线虫, 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。每隔 0.5 h 记录秀丽隐杆线虫存活数量, 直至秀丽隐杆线虫全部死亡。

2.5 秀丽隐杆线虫氧化应激实验 野生型秀丽隐杆线虫给药后用 M9 缓冲液洗涤 3 次, 转移到 96 孔板中, 使每孔约有 20 只线虫。每孔中加入 200 μL 含有 0.01% H_2O_2 的 M9 缓冲液, 16 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。每隔 0.5 h 记录秀丽隐杆线虫存活数量, 直至秀丽隐杆线虫全部死亡。

2.6 荧光体式显微镜检测秀丽隐杆线虫体内活 ROS 水平、SOD-3 和 GST-4 表达 野生型秀丽隐杆线虫给药 48 h 后, 转移到 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 6 h。用 M9 缓冲液清洗后转移至含有 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 荧光探针的 M9 缓冲液中, 16 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min。制作含 1 mol/L 叠氮钠的 2% 琼脂垫载玻片, 挑取约 20 只秀丽隐杆线虫, 在荧光显微镜下观察并拍照。利用转基因秀丽隐杆线虫 CF1553 及 CL2166 检测 6''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内超氧化物歧化酶 3 (SOD-3)、谷胱甘肽 S-转移酶 4 (GST-4) 表达的影响。转基因秀丽隐杆线虫 CF1553 及 CL2166 给药 48 h 后, 转移到 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 6 h, 用 M9 缓冲液清洗后备用。制作含 1 mol/L 叠氮钠的 2% 琼脂垫载玻片, 挑取约 20 只秀丽隐杆线虫, 在荧光显微镜下观察并拍照。采用 Image J 软件对图片中荧光强度进行定量分析。

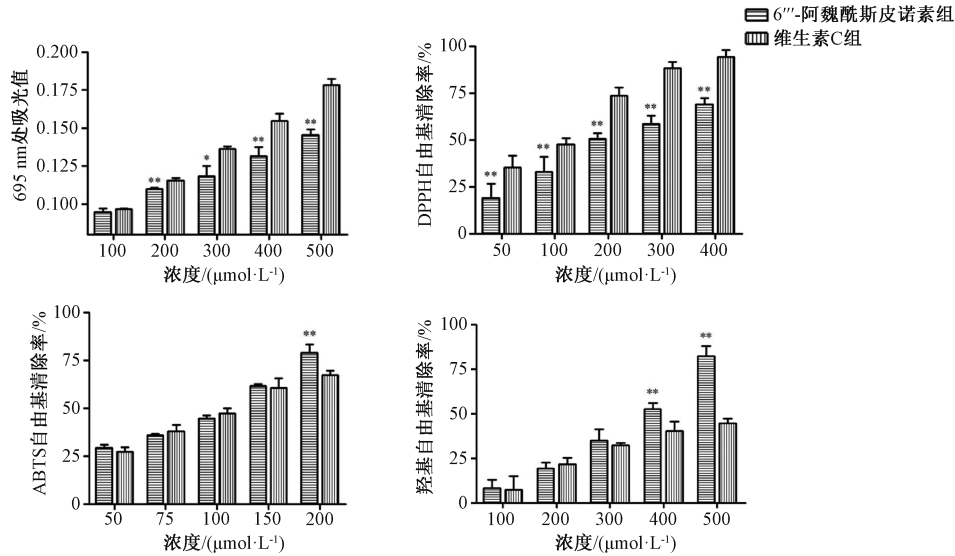
2.7 秀丽隐杆线虫体内 GSH-Px 活性、MDA 水平检测 野生型秀丽隐杆线虫给药 48 h 后, 转移到 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h。使用 M9 缓冲液清洗并收集秀丽隐杆线虫, 利用超声探头将线虫破碎。按照相关试剂盒说明书检测各组秀丽隐杆线虫蛋白浓度、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、丙二醛 (MDA) 水平。

2.8 统计学分析 通过 GraphPad 5.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 6'''-阿魏酰斯皮诺素体外抗氧化活性 由图 1 可知，在相同浓度条件下，6'''-阿魏酰斯皮诺素总还原力弱于维生素 C。6'''-阿魏酰斯皮诺素清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基及羟基自由基的 IC₅₀ 值分别为 239.02、124.38、192.96 μmol/L；维生素 C 清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基及羟基

自由基的 IC₅₀ 值分别为 107.21、112.98、523.32 μmol/L。与维生素 C 组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 DPPH 自由基清除率降低 ($P<0.01$)，ABTS 自由基清除率无明显差异 ($P>0.05$)，当浓度为 400~500 μmol/L 时，6'''-阿魏酰斯皮诺素清除羟基自由基率升高 ($P<0.01$)，且 6'''-阿魏酰斯皮诺素清除自由基能力呈浓度依赖性。



注：与维生素 C 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 6'''-阿魏酰斯皮诺素体外抗氧化活性 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 6'''-阿魏酰斯皮诺素体内抗氧化活性

3.2.1 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫热应激抗性的影响 由图 2、表 1 可知，与对照组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 100、200 μmol/L 组秀丽隐杆线虫存活时间、最高寿命、半数死亡时间延长 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈浓度依赖性。提示，6'''-阿魏酰斯皮诺素可以增强秀丽隐杆线虫热应激抗性。

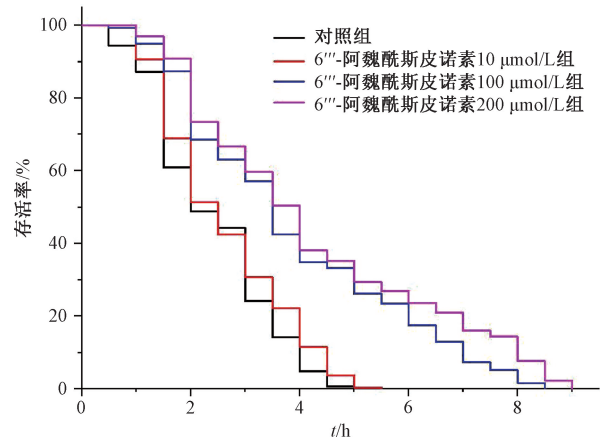


图 2 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫抗热应激能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=300$)

3.2.2 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫氧化应激抗性的影响 由图 3、表 2 可知，与对照组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 100、200 μmol/L 组秀丽隐杆线虫存活时间、最高

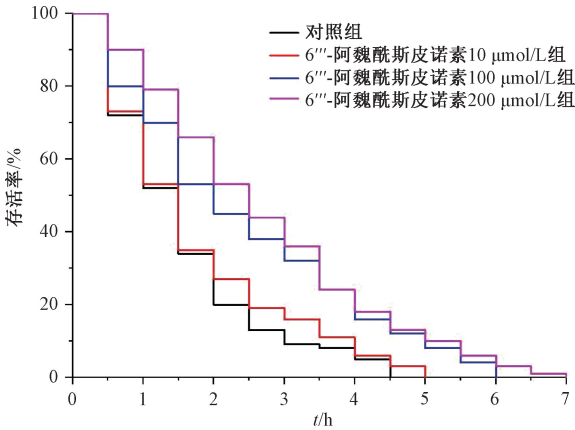


图 3 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫抗氧化应激能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=300$)

寿命、半数死亡时间延长 ($P<0.01$)，并呈现浓度依赖性。提示，6'''-阿魏酰斯皮诺素可以增强秀丽隐杆线虫氧化应激抗性，缓解 H₂O₂ 诱导的秀丽隐杆线虫氧化损伤。

3.2.3 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 ROS 水平的影响 由图 4 可知，与对照组比较，模型组秀丽隐杆线虫体内 ROS 水平升高 ($P<0.01$)，约为对照组的 1.86 倍；与模型组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 100、200 μmol/L 组秀丽隐杆线虫体内 ROS 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，分别为 132.01%、108.85%，并呈浓度依赖性。提示，6'''-阿魏酰斯皮诺素处理可以减少热应激作用下秀丽隐杆线虫体内 ROS 的累积。

表 1 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫抗热应激能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=300$)

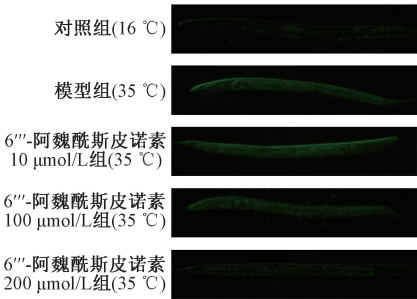
组别	存活时间/h	最高寿命/h	半数死亡时间/h
对照组	2.00±0.19	4.23±0.25	2.04±0.44
6'''-阿魏酰斯皮诺素 10 μmol/L 组	2.13±0.07	4.74±0.35 **	2.15±0.21
6'''-阿魏酰斯皮诺素 100 μmol/L 组	3.36±0.26 **	7.63±0.44 **	3.16±0.28 *
6'''-阿魏酰斯皮诺素 200 μmol/L 组	3.82±0.15 **	8.50±0.38 **	3.53±0.10 **

注：与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 2 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫抗氧化应激能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=300$)

组别	存活时间/h	最高寿命/h	半数死亡时间/h
对照组	1.11±0.12	3.82±0.47	1.17±0.29
6'''-阿魏酰斯皮诺素 10 μmol/L 组	1.41±0.15	4.32±0.39	1.08±0.11
6'''-阿魏酰斯皮诺素 100 μmol/L 组	2.02±0.10 **	5.63±0.45 **	1.73±0.23
6'''-阿魏酰斯皮诺素 200 μmol/L 组	2.22±0.05 **	6.25±0.50 **	2.19±0.08 **

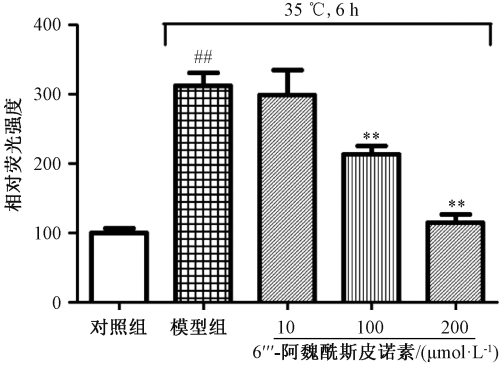
注：与对照组比较,** $P<0.01$ 。



注：与对照组比较,## $P<0.01$ ；与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 4 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 ROS 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

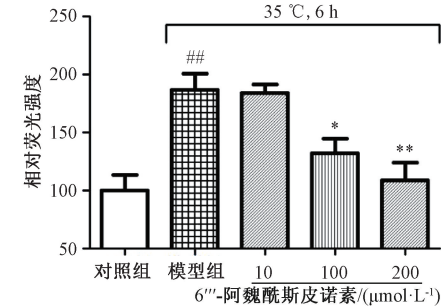
3.2.4 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 MDA 水平的影响 由图 5 可知，与对照组比较，模型组秀丽隐杆线虫体内 MDA 水平升高 ($P<0.01$)，约为对照组的 3.12 倍；与模型组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 100、200 μmol/L 组秀丽隐杆线虫体内 MDA 水平降低 ($P<0.01$)，分别为 213.10%、114.73%，并呈现浓度依赖性。提示，6'''-阿魏酰斯皮诺素处理可以减少热应激作用下秀丽隐杆线虫体内 MDA 的累积。



注：与对照组比较,## $P<0.01$ ；与模型组比较,** $P<0.01$ 。

图 5 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2.5 6'''-阿魏酰斯皮诺素对转基因秀丽隐杆线虫 CF1553 体内 SOD-3 表达的影响 由图 6 可知，与对照组比较，模型组秀丽隐杆线虫体内 SOD-3 表达降低 ($P<0.01$)，约为

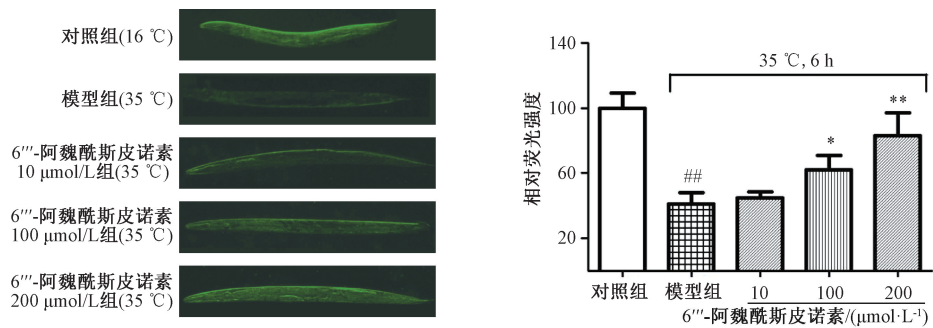


对照组的 0.41 倍；与模型组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 100、200 μmol/L 组秀丽隐杆线虫体内 SOD-3 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，分别为 61.99%、82.99%，并呈现浓度依赖性。提示，6'''-阿魏酰斯皮诺素处理可以增加热应激作用下秀丽隐杆线虫体内 SOD-3 表达。

3.2.6 6'''-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 GST-4 表达与 GSH-Px 活性的影响 由图 7 可知，与对照组比较，模型组秀丽隐杆线虫体内 GST-4 表达降低 ($P<0.01$)，约为对照组的 0.5 倍；与模型组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 100、200 μmol/L 组秀丽隐杆线虫体内 GST-4 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，分别为 71.90%、79.05%，并呈现浓度依赖性。提示，6'''-阿魏酰斯皮诺素处理可以增加热应激作用下秀丽隐杆线虫体内 GST-4 表达。由图 8 可知，与对照组比较，模型组秀丽隐杆线虫体内 GSH-Px 活性降低 ($P<0.01$)，约为对照组的 0.68 倍；与模型组比较，6'''-阿魏酰斯皮诺素 100、200 μmol/L 组秀丽隐杆线虫体内 GSH-Px 活性升高 ($P<0.01$)，分别为 73.99%、89.61%，并呈现浓度依赖性。提示，6'''-阿魏酰斯皮诺素处理可以增强热应激作用下秀丽隐杆线虫体内 GSH-Px 活性。

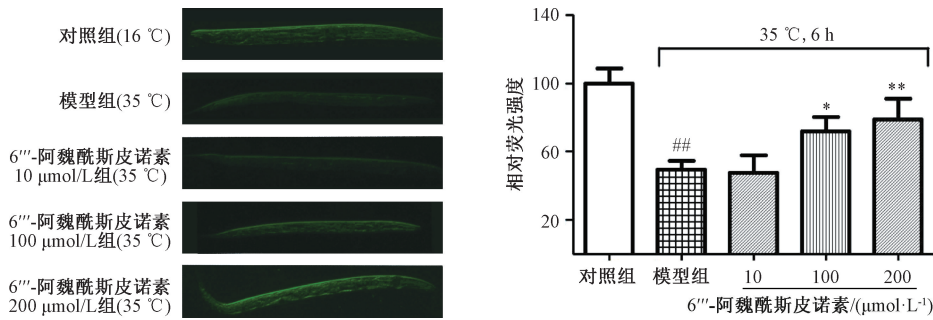
4 讨论

自由基是一种极为活跃的原原子团，当机体处于应激状态时，其恒稳状态被破坏，体内堆积造成细胞和组织氧化损伤，引发多种疾病^[12]，如氧自由基存在会攻击生物膜中的不饱和脂肪酸，引起脂质过氧化，形成 MDA 等脂质过氧



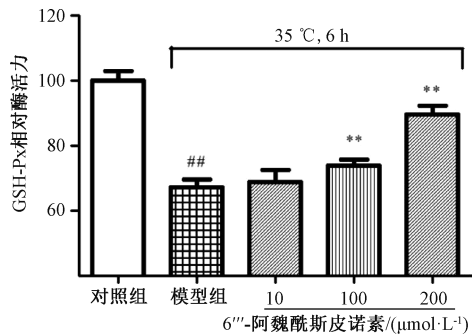
注：与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 6 6'-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 SOD-3 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



注：与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 7 6'-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 GST-4 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



注：与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。

图 8 6'-阿魏酰斯皮诺素对秀丽隐杆线虫体内 GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

化产物，MDA 与蛋白质的游离氨基相互作用，使蛋白质结构发生变化，导致细胞损伤^[13]。在正常情况下机体可以利用抗氧化酶转化分解自由基，如 SOD 可清除超氧阴离子 (O²⁻)，将其转化为 H₂O₂ 和 O₂；过氧化氢酶 (CAT)、GSH-Px 可清除 H₂O₂，将其还原为 H₂O^[14-15]。

秀丽隐杆线虫是第一个完成测序的多细胞真核生物^[16]，其神经及消化系统与哺乳动物具有高度同源性，同时具有与哺乳动物相似的抗氧化胁迫机制，是研究物质体内抗氧化活性的有力工具^[17-18]，且相较于小鼠等其它动物模型，秀丽隐杆线虫具有产卵量大、生存周期短、容易饲养等优点^[19]。因此，本研究选用多品系秀丽隐杆线虫研究 6'-阿魏酰斯皮诺素体内抗氧化活性，其中转基因秀丽隐杆线虫 CF1553 是在秀丽隐杆线虫体内 SOD-3p 基因后插入 1

个表达绿色荧光蛋白 (GFP) 标记基因的品系。SOD-3 属于超氧化物歧化酶家族，编码的 SOD-3 蛋白是一种线粒体锰-超氧化物歧化酶^[20]。转基因秀丽隐杆线虫 CL2166 是在秀丽隐杆线虫体内 GST-4 基因后插入 1 个 GFP 标记基因的品系，GST-4 是谷胱甘肽转移酶 (GST) 家族的一员，谷胱甘肽转移酶可以缓解细胞或 DNA 的氧化损伤，催化谷胱甘肽 (GSH) 与多种卤代化合物和环氧化合物结合，发挥抗氧化的作用^[21]。本研究通过检测荧光显微镜下秀丽隐杆线虫体内的绿色荧光强度，分析得到相应表达的强度。

本研究从总还原能力、DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力以及羟基自由基清除能力对酸枣仁黄酮类成分 6'-阿魏酰斯皮诺素体外抗氧化能力进行探讨，结果表明，6'-阿魏酰斯皮诺素可呈浓度依赖性地清除自由基，具备体外抗氧化能力。同时，本研究发现，100、200 μmol/L 6'-阿魏酰斯皮诺素可以延长野生型秀丽隐杆线虫在不良环境中存活的时间，提高野生型秀丽隐杆线虫热应激及氧化应激抗性，并可以降低热应激诱导的野生型秀丽隐杆线虫体内 ROS、MDA 水平，增强 GSH-Px 酶活性等。通过检测转基因秀丽隐杆线虫 CF1553 及转基因秀丽隐杆线虫 CL2166 体内的绿色荧光强度，得到 6'-阿魏酰斯皮诺素可以呈浓度依赖性地增加损伤秀丽隐杆线虫体内 SOD-3、GST-4 表达，提高线虫抵抗氧化损伤的能力。综上所述，6'-阿魏酰斯皮诺素具有良好的抗氧化能力，可为其成为天然抗氧化剂和保健产品提供依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部

[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：591.

[2] 黄之锴, 马伟光. 酸枣仁及活性物质的药理研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(3): 57-60.

[3] 韩 鹏, 李 冀, 胡晓阳, 等. 酸枣仁的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(2): 110-114.

[4] Zhang F X, Li M, Qiao L R, *et al.* Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 122: 59-80.

[5] 刘世军, 唐志书, 崔春利, 等. 酸枣仁化学成分的研究进展[J]. 西部中医药, 2016, 29(9): 143-146.

[6] Yang T T, Zhao X T, Zhang Y Q, *et al.* 6'''-Feruloylspinosin alleviated beta-amyloid induced toxicity by promoting mitophagy in *Caenorhabditis elegans* (GMC101) and PC12 cells[J]. *Sci Total Environ*, 2020, 715: 136953.

[7] Li Y J, Bi K S. Study on the therapeutic material basis of traditional Chinese medicinal preparation Suanzaoren decoction [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2006, 54(6): 847-851.

[8] 丁 轲, 马崑松, 韩 涛, 等. 酸枣仁抗氧化成分的分离及其相互作用研究[J]. 高校化学工程学报, 2013, 27(5): 842-853.

[9] 杨婷婷. 酸枣仁黄酮的超声辅助提取及抗 A β_{1-42} 损伤的机制研究[D]. 天津：天津商业大学，2019.

[10] Sun Y, Zhang Y Q, Qi W Q, *et al.* Saponins extracted by ultrasound from *Zizyphus jujuba* Mil var. *spinosa* leaves exert resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Food Meas Charact*, 2020, 15(1): 541-554.

[11] Li Y J, Guan S W, Liu C, *et al.* Neuroprotective effects of *Coptis chinensis* Franch polysaccharide on amyloid-beta (A β) - induced toxicity in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease (AD) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 991-995.

[12] Butterfield D A, Boyd-Kimball D. Oxidative stress, amyloid- β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(3): 1345-1367.

[13] 翟晓虎, 杨海锋, 陈慧英, 等. 丙二醛的毒性作用及检测技术研究进展[J]. 上海农业学报, 2018, 34(1): 144-148.

[14] Braidy N, Zarka M, Jugder B E, *et al.* The precursor to glutathione (GSH), γ -glutamylcysteine (GGC), can ameliorate oxidative damage and neuroinflammation induced by A β 40 oligomers in human astrocytes[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 177.

[15] 王 芳, 符晨星, 陈家顺, 等. 过氧化氢酶的生物学功能及在动物中的应用[J]. 饲料研究, 2021, 44(5): 126-129.

[16] Sulston J E. Neuronal cell lineages in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1983, 48(2): 443-452.

[17] Ma L, Zhao Y D, Chen Y C, *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 819: 169-180.

[18] Petersen G, Dirksen P, Schulenburg H. Why we need more ecology for genetic models such as *C. elegans*[J]. *Trends Genet*, 2015, 31(3): 120-127.

[19] Park H E H, Jung Y, Lee S J V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(2): 90-99.

[20] Yang Z Z, Yu Y T, Lin H R, *et al.* *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129: 310-322.

[21] Kadioğlu E, Taçoy G, Özçağlı E, *et al.* The role of oxidative DNA damage and GSTM1, GSTT1, and hOGG1 gene polymorphisms in coronary artery disease risk [J]. *Anatol J Cardiol*, 2016, 16(12): 931-938.