

野菊花黄酮提取物对秀丽隐杆线虫氧化应激抗性作用研究

崔海林, 唐海轮, 刘 恋, 李佐昊, 向晶晶, 李 蓉

Chrysanthemum indicum Flavonoid Extract on the Oxidative Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans*

CUI Hailin, TANG Hailun, LIU Lian, LI Zuohao, XIANG Jingjing, and LI Rong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024070078>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

蓝莓酵素的体外抗氧化及对秀丽隐杆线虫的氧化应激保护作用

Antioxidant Activity *in Vitro* and Promoting Resistance to Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans* of Blueberry Jiaosu

食品工业科技. 2021, 42(15): 343-350 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110157>

芫荽提取物对秀丽隐杆线虫体内抗氧化活性的初步探究

Exploring the Antioxidant Activity *in Vivo* of Coriander Extract in *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2020, 41(20): 285-289 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.047>

鹿茸乙醇提取物对秀丽隐杆线虫抗衰老的作用

Anti-aging Effect of Ethanol Extract of Velvet Antler on *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2021, 42(7): 354-359 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060027>

酸枣叶黄酮的提取工艺优化 及其抗秀丽隐杆线虫氧化损伤活性

Optimization of Extraction Process of Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* Leaves and Its Antioxidant Damage Activity in *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2020, 41(8): 143-150 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.08.023>

发酵陈皮水提物体外抗氧化活性及对秀丽隐杆线虫抗衰老作用

Anti-aging and *in Vitro* Antioxidant Effects of Water Extracts of Fermented *Pericarpium Citri Reticulatae* on *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2023, 44(17): 428-437 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110162>

忧遁草乙醇提取物对秀丽隐杆线虫的抗衰老作用及机制

Anti-aging Effect and Mechanism of Ethanol Extract of *Clinacanthus nutans* on *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2023, 44(11): 411-417 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090024>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

崔海林,唐海轮,刘恋,等.野菊花黄酮提取物对秀丽隐杆线虫氧化应激抗性作用研究[J].食品工业科技,2025,46(11):338-345.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070078

CUI Hailin, TANG Hailun, LIU Lian, et al. *Chrysanthemum indicum* Flavonoid Extract on the Oxidative Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(11): 338-345. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070078

· 营养与保健 ·

野菊花黄酮提取物对秀丽隐杆线虫氧化应激抗性作用研究

崔海林,唐海轮,刘恋,李佐昊,向晶晶,李蓉*

(荆楚理工学院特色食品功能挖掘与综合利用团队,湖北荆门 448000)

摘要:为了探究野菊花黄酮提取物体内抗氧化效果及对氧化应激抗性的影响,本研究以秀丽隐杆线虫(简称线虫)为模型,考察了野菊花黄酮提取物对线虫体内抗氧化酶活和氧化应激条件下寿命的影响,并通过多种转基因线虫株系对其增强线虫氧化应激抗性机制进行了初步探究。结果显示,与对照组相比,经过 50、200、300 $\mu\text{g/mL}$ 野菊花黄酮提取物处理的线虫在氧化应激条件下其平均寿命分别显著延长了 14.00%、27.15%、18.65% ($P<0.01$),且线虫体内 SOD 酶活和还原型谷胱甘肽 GSH 水平均显著提高 ($P<0.01$)。此外,200 $\mu\text{g/mL}$ 野菊花黄酮提取物处理后 LD1 线虫体内 SKN-1 入核比例由 17.16% 上升至 51.46%,且 EU1 突变体线虫寿命实验结果表明野菊花黄酮提取物增强线虫氧化应激抗性的作用依赖于 *skn-1*。野菊花黄酮提取物增强线虫氧化应激抗性的机制可能是其激活了转录因子 SKN-1,并提高了抗氧化相关蛋白 SOD-3、GCS-1、GST-4 的表达。本研究为野菊花黄酮类化合物在缓解氧化应激损伤中的应用提供了科学依据。

关键词:野菊花黄酮提取物,秀丽隐杆线虫,抗氧化,氧化应激抗性

中图分类号:TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2025)11-0338-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070078



本文网刊:

Chrysanthemum indicum Flavonoid Extract on the Oxidative Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans*

CUI Hailin, TANG Hailun, LIU Lian, LI Zuohao, XIANG Jingjing, LI Rong*

(Characteristic Food Function Mining and Comprehensive Utilization Research Center, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China)

Abstract: To investigate the *in vivo* antioxidant activity of flavonoid extract from *Chrysanthemum indicum* and its effects on oxidative stress resistance, this study evaluated the effects of *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract on the antioxidant enzyme activities and the mean lifespan of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) under oxidative stress. Moreover, the mechanisms of enhancing oxidative stress resistance in nematodes were explored by utilizing a variety of transgenic strains. The results showed that pretreatment with *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract significantly prolonged the mean lifespan of worms under oxidative stress by 14.00%, 27.15%, and 18.65% ($P<0.01$) at concentrations of 50, 200, and 300 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In addition, *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract significantly increased the SOD activity and GSH level of *C. elegans* ($P<0.01$). Furthermore, the nuclear proportion of SKN-1 was increased from 17.16% to 51.46% in LD1 strains when treated with 200 $\mu\text{g/mL}$ *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract. Additionally, the results of lifespan assay of EU1 strains indicated that the lifespan extension effect of *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract under oxidative stress was relied on *skn-1*. The mechanism of enhancing oxidative stress resistance of

收稿日期: 2024-07-08

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目(Q20234303);荆楚理工学院大学生创新创业训练计划项目(S202411336029);荆楚理工学院博士启动金项目(YY202403)。

作者简介: 崔海林(2003-),男,本科,研究方向:天然产物研究与开发,E-mail: 18672401271@163.com。

* 通信作者: 李蓉(1987-),女,博士,副教授,研究方向:天然产物研究与开发,E-mail: lirong2022@jcut.edu.cn。

Chrysanthemum indicum flavonoid extract might occur by activating the transcription factor SKN-1, which in turn increased the expression of antioxidant-related proteins SOD-3, GCS-1 and GST-4. This study provides a scientific basis for the application of *Chrysanthemum indicum* flavonoids in alleviating oxidative stress damage.

Key words: *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract; *Caenorhabditis elegans*; antioxidant; oxidative stress resistance

野菊花为菊科植物野菊(*Chrysanthemum indicum* L.)的干燥头状花序,具有清热解毒、泻火平肝等功效。野菊花分布广泛,在我国多个地区均有生长。研究表明,野菊花具有降血压、抗氧化、抗炎、增强机体免疫、抑菌等多种药理学作用^[1]。野菊花中主要生物活性物质包括黄酮类、有机酸类、挥发油类、萜类等^[2],其中黄酮类物质是野菊花的主要成分和药效成分,也是用来评价野菊花质量的重要指标之一^[3]。陈佳敏^[4]对我国 31 个地区野菊花中的黄酮进行分析发现,其中的总黄酮含量分布在 30.17~94.28 mg·g⁻¹之间,且这些地区中的黄酮类化合物均对黄嘌呤氧化酶和脂肪氧化酶具有较好的抑制活性。此外,研究表明野菊花黄酮类化合物具有体外抗氧化活性、降血压、缓解小鼠结肠炎并调节肠道菌群等多种生物活性^[5-7]。

秀丽线虫在 20 世纪 60 年代首次作为发育生物学研究的模式生物被广泛应用于衰老、神经退行性疾病、糖脂代谢等方面的研究^[8]。与传统的动物模型相比,这种真核多器官生物具有尺寸小(成虫体长约为 1 mm)、寿命短(野生型线虫约 21 d)、传代快(约 3 d)、繁殖能力强、通体透明、基因组序列注释详细、正反向遗传操作简单、与人类基因组有 38% 的同源性等诸多优势^[9-10]。此外,秀丽线虫模型凭借其独特的优势也广泛应用于体内抗氧化及氧化应激损伤研究中。最近的研究报道,水黄皮黄酮提取物展现出卓越的抗应激能力,可以增强线虫的抗氧化防御系统,稳定细胞膜结构^[11]。柑橘皮黄酮提取物也展现出显著的抗氧化特性,能够有效清除秀丽线虫体内过多的自由基,调节抗氧化酶系统的活性^[12]。然而,目前关于野菊花黄酮类物质体内抗氧化作用及缓解氧化应激损伤的效果尚未报道。

因此,本研究利用秀丽线虫模型测定了野菊花黄酮提取物对线虫体内抗氧化酶活和氧化应激条件下寿命的影响,并对其增强氧化应激抗性的作用机制进行了初探。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

野菊花 安徽省六安市丹贝尔生物科技有限公司,由荆楚理工学院生物工程学院植物科学教研室范淑芳副教授鉴定为野菊花(*Chrysanthemum indicum* L.)的干燥花;秀丽线虫株系包括:野生型秀丽线虫株系(N2)、EU1[skn-1(zu67) IV]、CF1553[(pAD76) sod-3p::GFP]、CL2166[(pAF15) gst-4p::GFP::NLS]、LD1[lldIs7(skn-1b/c::GFP+rol-6(su1006))], LD1171[lldIs3(gcs-1p::GFP+rol-6(su1006))] 明尼苏达大学

秀丽隐杆线虫遗传学中心 Caenorhabditis Genetics Center(CGC);无水乙醇、无水氯化钙、七水合硫酸镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠、氯化钠、一水合柠檬酸钾、一水合柠檬酸、十二水合磷酸氢二钠、胆固醇、次氯酸钠、EDTA、七水合硫酸亚铁、四水合氯化锰、七水合硫酸锌、五水合硫酸铜 均为分析纯,国药集团;二甲基亚砜(DMSO)、5-氟-2-脱氧尿苷(FudR) 纯度≥98%,美国 Sigma 公司;DPPH(1,1-二苯基-2-苦基肼,纯度≥97%)、ABTS(2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸),纯度≥98%)、芦丁(纯度≥95%) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;SOD 试剂盒、GSH 试剂盒、BCA 试剂盒 南京建成生物工程研究所。

SW-CJ-3F 超净工作台 上海沪静医疗器械有限公司;MY-10 手持研磨器 上海净信实业发展有限公司;XFH-50CA 全自动高压灭菌锅 浙江新丰医疗器械有限公司;冷冻离心机 德国艾本德 Eppendorf 公司;YB710FL 荧光显微镜 安徽越视精密仪器有限公司;Multiskan Skyhigh 全波长酶标仪 美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 野菊花黄酮化合物的提取 参照豆佳媛等^[13]的方法制备野菊花黄酮类提取物。野菊花经烘干、粉碎,过 60 目筛得到野菊花粗粉。称取一定量野菊花粗粉,按料液比 1:50 加入 40% 乙醇溶液进行超声辅助提取,提取功率为 480 W,提取温度为 35 ℃,提取时间为 2 h,提取 2 次,过滤得到滤液。合并滤液,于 55 ℃ 旋转蒸发浓缩至无乙醇,再进行冷冻干燥,得到野菊花黄酮提取物冻干粉,用 DMSO 配制成 50 mg/mL 储备液置于-80 ℃ 保存备用。

1.2.2 野菊花提取物中黄酮含量的测定 利用亚硝酸钠-硝酸铝法测定总黄酮含量^[14]。取 250 μL 不同浓度的芦丁标准品溶液或样品溶液,加入 75 μL 0.5% NaNO₂ 溶液混匀后,避光静置 5 min,再加入 150 μL 10% Al(NO₃)₃·6H₂O 溶液,混匀后,室温避光静置反应 5 min,最后加入 500 μL 1mol/L NaOH 溶液混匀后,在 λ=510 nm 处测定反应液吸光值,得到芦丁标准曲线: y=10.321x-0.0031, R²=0.9991。准确称取野菊花提取物冻干粉 50.0 mg,加入无水乙醇 10.0 mL 溶解配成浓度为 5.0 mg/mL 提取物溶液,按上述方法在同样条件下测定其吸光度,根据芦丁标准品标准曲线计算样品中的黄酮含量,结果以 mg Rutin/g 样品表示。

1.2.3 体外抗氧化活性评价

1.2.3.1 DPPH 自由基清除率测定 将野菊花黄酮

提取物分别配制成 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 储备液。分别取 2 mL 野菊花黄酮提取物溶液, 分别加入 2 mL 0.1 mg/mL DPPH-无水乙醇溶液混匀, 避光反应 30 min, 在 517 nm 下测定吸光度 A_1 ^[15]。对照组用无水乙醇代替 DPPH, 测定其吸光度为 A_2 。空白组用无水乙醇代替样品溶液, 测定其吸光度 A_0 。以等体积抗坏血酸溶液(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)作为阳性对照。按照式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率(\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.3.2 ABTS⁺自由基清除率测定 分别取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 野菊花黄酮提取物溶液 50 μ L, 分别加入 150 μ L ABTS 工作液, 充分混匀在室温下静置 6 min, 于 734 nm 下测定吸光度 $A_{\text{样}}$ 。以 ABTS 工作液和无水乙醇的混合液作为空白组, 测定吸光度 $A_{\text{空}}$ 。以等体积抗坏血酸溶液(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)作为阳性对照^[16]。按照式(2)计算 ABTS⁺自由基清除率。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率(\%)} = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{空}}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.4 线虫的同步化及培养

1.2.4.1 线虫的同步化 将处于产卵期的线虫用 M9 缓冲液从 NGM 板上洗入 1.5 mL 离心管中, 去上清, 再用 M9 洗三次除去线虫身上粘附的菌。再在离心管中加入 1 mL 线虫裂解液, 迅速剧烈振荡 15 min 至虫体完全裂解, 常温下 10000 r/min 离心 1 min, 弃去上清, 并用 M9 缓冲液重悬离心 4 次, 最后一次离心, 去上清, 加入 1 mL M9 缓冲液混匀, 待其孵化成幼虫备用^[17]。

1.2.4.2 线虫培养 参照 Solis 等^[18]的方法采用液体培养法。用 24 孔板培养, 每孔加入 300 μ L S-complete 培养基, 其中设置仅含有 DMSO 的空白对照组和含有 50、200、300 μ g/mL 野菊花黄酮提取物的加药组。将同步化至 L4 期的线虫用挑针挑取至 S-complete 培养基中, 每孔挑取约 300 条线虫, 挑取线虫的时间设为第 0 d, 密封后放入 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养。

1.2.5 线虫氧化应激寿命实验 按照 1.2.4.2 所述方法分别培养线虫株系 N2、EU1, 待线虫培养至成虫第 7 d 收集不同处理组的线虫用 M9 洗三次除去黏附的菌, 再将线虫转移至每孔含有 100 μ L 终浓度为 1 mmol/L H_2O_2 的 M9 缓冲液的 96 孔板中, 室温避光静置。每隔 2 h 记录线虫存活率, 直至所有线虫全部死亡^[19]。最后用 GraphPad 软件绘制生存曲线并用 log-rank (Mantel-Cox) 分析方法分析数据。

1.2.6 线虫体内抗氧化酶活测定 按照 1.2.4.2 所述方法培养线虫 N2、EU1, 待线虫培养至成虫第 3 d, 收集不同处理组的线虫用 M9 缓冲液洗 3 次去除粘

附的杂菌, 在冰上充分研磨, 再在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10000 r/min 离心 5 min 得到上清液, 按照 SOD 试剂盒、GSH 试剂盒、BCA 试剂盒说明书操作, 测定不同处理组线虫体内 SOD 酶活、还原型谷胱甘肽 GSH 含量^[20]。

1.2.7 野菊花黄酮提取物对 SKN-1 蛋白核定位的影响 按照 1.2.4.1 方法对转基因线虫株系 LD1 进行同步化处理, 将处于 L4 期的线虫分别转移至含有 200 μ g/mL 野菊花黄酮提取物和 0.4% DMSO 的 S-complete 培养基(不含 FudR)中培养 48 h。收集不同处理组的线虫, 用 M9 洗 3 次除去虫体粘附的杂质, 用 NaN_3 溶液麻醉线虫并用荧光显微镜采集图片^[21]。SKN-1::GFP 表达的核易位模式分为三类: “细胞质” “核间质” “细胞核”。当 SKN-1::GFP 发生核易位, 就会观察到较亮的绿色荧光点。“细胞质”是指线虫整个身体没有明显的绿色荧光点, “核间质”是指线虫身体有部分绿色荧光点, “细胞核”是指线虫整个身体布满绿色荧光点^[21]。统计并分析不同处理组线虫每种表达模式所占比例。

1.2.8 线虫绿色荧光蛋白可视化定量分析 利用带有 GFP 报告基因的线虫株系 CF1553、CL2166、LD1171 分别测定 SOD-3、GST-4、GCS-1 蛋白表达。按照 1.2.4.1 方法分别对转基因线虫株系 CF1553、CL2166、LD1171 进行同步化处理, 将处于 L1 期的幼虫在 200 μ g/mL 野菊花黄酮提取物和 0.4% DMSO 的 S-complete 培养基(不含 FudR)中分别培养 72 h 至成虫早期, 收集不同处理组的线虫, 用 M9 洗 3 次除去虫体粘附的杂质, 用 NaN_3 溶液麻醉线虫并用荧光显微镜采集图片^[22-23]。最后利用 Image J 软件分析不同处理组线虫的荧光强度。

1.3 数据处理

所有实验重复三次, 结果以均值 $\pm$ 标准偏差表示。实验数据用 SPSS 进行统计分析, 采用 ANOVA 进行显著性分析, 并用 GraphPad Prism9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 野菊花提取物中黄酮含量测定结果

对野菊花中黄酮含量进行测定, 得到提取物粉末中黄酮含量为 41.21 ± 0.61 mg/g, 与豆佳媛等^[13]报道的黄酮含量接近。

2.2 野菊花黄酮提取物体外抗氧化活性评价

基于化学分析法测定野菊花黄酮提取物 (*Chrysanthemum indicum* flavonoid extract, CE) 体外对 ABTS⁺和 DPPH 自由基的清除率, 结果如图 1 所示。结果显示, 随着黄酮提取物浓度的增加, 其对 ABTS⁺和 DPPH 自由基的清除率也随之增加, 并且在 1.0 mg/mL 浓度下其清除率与 V_C 非常接近, 其中 V_C 对 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率 IC_{50} 分别为 0.0035、0.0790 mg/mL, 野菊花黄酮提取物对 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率 IC_{50} 分别为 0.1214、

0.1632 mg/mL, 表明野菊花黄酮提取物对上述两种自由基具有较强的清除能力, 这与王天顺^[24]的报道一致, 提示野菊花黄酮提取物具有较强的直接抗氧化能力。

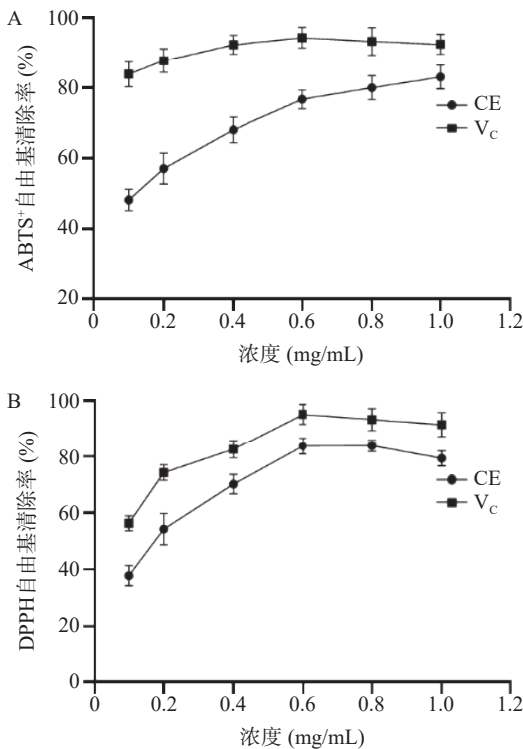


图 1 野菊花黄酮提取物体外抗氧化活性

Fig.1 *In vitro* antioxidant activity of *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract

2.3 野菊花黄酮提取物对野生型秀丽线虫氧化应激条件下寿命的影响

野菊花黄酮提取物在体外具有较强的自由基清除能力,但其是否能够提高秀丽线虫抵抗外界不良刺激的能力还不明确。基于此,本研究测定了野菊花黄酮提取物对野生型秀丽线虫在氧化应激条件下的寿命,如图 2 和表 1 所示。结果显示,在 H₂O₂ 诱导的氧化应激条件下,野菊花黄酮提取物能够显著延长野生型线虫的寿命,与对照组相比,经过 50、200、300 μg/mL 野菊花黄酮提取物处理的线虫其平均寿

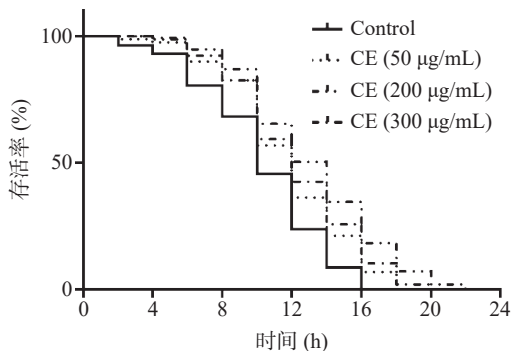


图 2 野菊花黄酮提取物对野生型秀丽线虫(N2)在氧化应激条件下寿命的影响

Fig.2 Effects of *Chrysanthemum indicum* flavonoid extract (CE) on the lifespan of N2 worms under oxidative stress

命分别显著延长了 14.00%($P<0.01$)、27.15%($P<0.0001$)、18.65%($P<0.0001$), 表明野菊花黄酮提取物增强了线虫氧化应激抗性,其中野菊花黄酮提取物在 200 μg/mL 浓度下延寿效果最佳。研究表明,过量自由基造成的氧化应激损伤的累积是衰老的根本原因^[25]。常见的氧化损伤剂会刺激机体产生过量的自由基,其会加剧细胞的氧化应激损伤,促进机体衰老^[9]。由于野菊花黄酮提取物对自由基的清除能力较强,因此其可以通过在体内清除自由基,从而缓解外界氧化应激造成的机体损伤。Tao 等^[23]也报道了具有体外抗氧化活性的绿豆皮黄酮提取物可以显著延长野生型秀丽线虫在氧化应激下的寿命,与对照组相比,200 μg/mL 绿豆皮黄酮提取物处理的线虫其平均寿命显著延长了 20.0%。

表 1 野菊花黄酮提取物对野生型秀丽线虫(N2)氧化应激条件下寿命的影响

Table 1 Effects of CE on the lifespan of N2 worms under oxidative stress

组别	平均寿命(h)	变化百分比(%)	线虫数目	P值
Control	10.35±0.28 ^a	—	160	—
CE(50 μg/mL)	11.80±0.28 ^b	14.00	160	0.0047
CE(200 μg/mL)	13.16±0.32 ^c	27.15	153	<0.0001
CE(300 μg/mL)	12.28±0.27 ^b	18.65	152	<0.0001

注: 同列不同字母表示组间存在显著差异, $P<0.05$, 相同字母表示组间无显著差异, $P>0.05$; 表 2 同。

2.4 野菊花黄酮提取物对野生型秀丽线虫体内抗氧化活性的影响

目前关于菊花中黄酮类物质抗氧化性活性研究主要集中在体外实验,关于其是否具有较好的体内抗氧化活性并未明确。本研究测定了野菊花黄酮提取物对野生型秀丽线虫体内超氧化物歧化酶 SOD 酶活和还原型谷胱甘肽 GSH 水平的影响,结果如图 3 所示。结果表明,野菊花黄酮提取物能够显著提高线虫体内的 SOD 酶活和 GSH 水平。与对照组相比,50、200、300 μg/mL 野菊花黄酮提取物处理的线虫其体内 SOD 酶活分别提高了 39.52%($P<0.01$)、64.70%($P<0.001$)、68.01%($P<0.001$),其体内 GSH 含量分别提高了 49.95%($P<0.01$)、63.56%($P<0.001$)、68.89%($P<0.001$)。随着线虫的衰老,其体内的活性氧水平不断增加,而过量的自由基积累又会加速衰老进程。研究表明 SOD 酶和 GSH 都参与自由基的清除,而自由基的清除对于机体抵抗氧化应激造成的损伤、延缓衰老至关重要^[9,19]。Xu 等^[20]报道了具有抗衰老作用的生姜提取物可以显著提高线虫体内的 SOD 酶活和 GSH 水平。吴梦思等^[15]也报道了具有增强线虫氧化应激抗性的卷丹百合提取物处理的线虫其体内 SOD 酶活和 GSH 含量分别提高了 1.38 倍和 1.48 倍。因此推测野菊花黄酮提取物增强秀丽线虫氧化应激抗性与其能够显著提高线虫体内 SOD 酶活和 GSH 含量有关。由于 200 μg/mL

野菊花黄酮提取物增强线虫氧化应激抗性效果最佳,因此后续实验选择 200 $\mu\text{g/mL}$ 这一浓度。

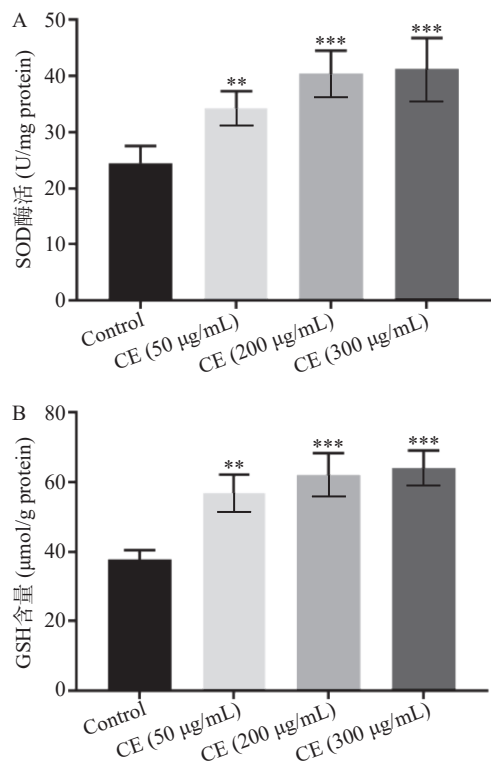


图3 野菊花黄酮提取物对 N2 线虫体内 SOD 酶活和还原型谷胱甘肽水平的影响

Fig.3 Effects of CE on the SOD enzyme activities and GSH contents of N2 worms

注:与对照组比较,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,图4、图7~图9同。

2.5 野菊花黄酮提取物对 SKN-1 蛋白核定位的影响

SKN-1 是哺乳动物 Nrf2 的同源蛋白,当受到外界环境刺激时会进入细胞核通过激活 II 相解毒基因和氧化应激响应来调控线虫的寿命,同时它也在多种长寿调控通路中发挥作用^[9,26]。LD1 是带有 GFP 标签蛋白的转基因线虫株系,可以用来观察转录因子 SKN-1 的细胞核定位情况。如图4所示,200 $\mu\text{g/mL}$ 野菊花黄酮提取物处理后线虫 SKN-1 入核比例由 17.16% 上升至 51.46% ($P<0.01$),在细胞质中的比例由 52.70% 下降至 22.71% ($P<0.01$),表明野菊花黄酮提取物促进了线虫 SKN-1 的核定位。有研究表明活性成分丹皮酚可以通过促进 SKN-1 入核,从而激活线虫体内的抗氧化信号通路,起到增强线虫氧化应激抗性、延缓衰老的效果^[26]。基于前文结果中野菊花黄酮提取物可以提高线虫体内抗氧化酶活和 GSH 含量,因此推测由于野菊花黄酮提取物促进了 SKN-1 的入核,激活抗氧化信号通路从而增加线虫体内抗氧化能力,有助于提高线虫氧化应激抗性。

2.6 野菊花黄酮提取物对突变体线虫 EU1 在氧化应激条件下寿命的影响

前文研究结果已经表明野菊花黄酮提取物可以延长野生型线虫在氧化应激条件下的寿命,且促进

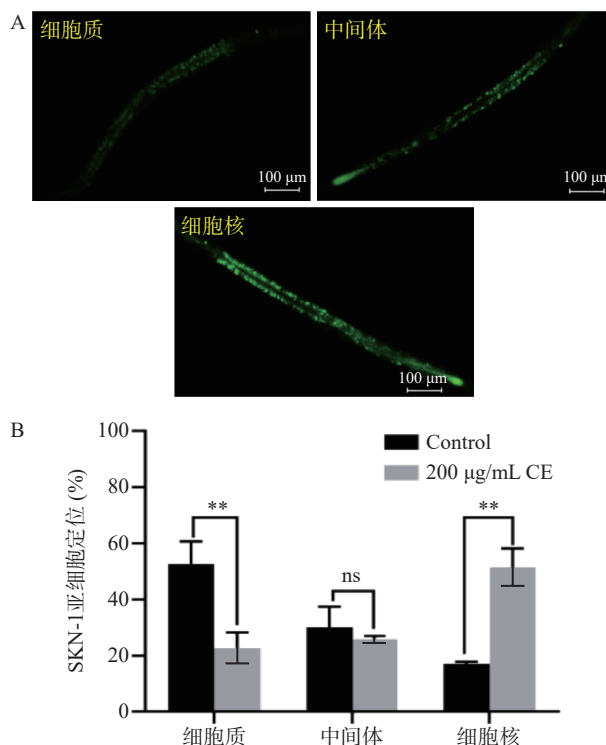


图4 野菊花黄酮提取物对 LD1 线虫 SKN-1 蛋白核定位的影响

Fig.4 Effects of CE on the nuclear localization of SKN-1 in LD1 worms

注: A 分别为 SKN-1::GFP 在 LD1 线虫株系中细胞质、中间体和细胞核分布的典型荧光图像; B 为 200 $\mu\text{g/mL}$ CE 对 SKN-1 核定位的影响; ns 表示无显著性差异 ($P>0.05$),图6同。

了 SKN-1 进入细胞核,然而其增强氧化应激抗性是否依赖 *skn-1* 仍未明确,基于此,本文测定了 *skn-1* 缺失突变体 EU1 在氧化应激条件下的寿命。如图5和表2所示,对照组线虫平均寿命为 8.23 h,加

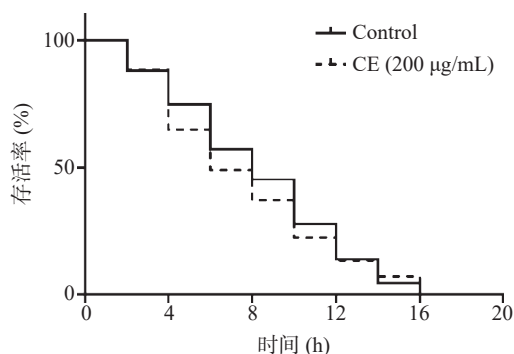


图5 野菊花黄酮提取物对 EU1 线虫在氧化应激条件下寿命的影响

Fig.5 Effect of CE on the lifespan of EU1 worms under oxidative stress

表2 野菊花黄酮提取物对 EU1 线虫氧化应激条件下寿命的影响

Table 2 Effect of CE on the lifespan of EU1 worms under oxidative stress

组别	平均寿命(h)	变化百分比(%)	线虫数目	P值
Control	8.23±0.32 ^a	—	159	—
CE(200 $\mu\text{g/mL}$)	7.64±0.33 ^a	-7.17%	158	0.4127

药组线虫平均寿命为 7.64 h, 与对照组相比, 野菊花黄酮提取物并没有显著延长 *skn-1* 缺失突变体 EU1 在氧化应激条件下的寿命 ($P>0.05$), 表明野菊花黄酮提取物增强线虫氧化应激抗性的作用依赖于 *skn-1*。

2.7 野菊花黄酮提取物对突变体线虫 EU1 体内抗氧化活性的影响

前面研究结果已经表明野菊花黄酮提取物可以显著提高野生型线虫体内 SOD 酶活和 GSH 水平, 且其增强线虫氧化应激抗性的作用依赖于 *skn-1*, 基于此, 本文测定了野菊花黄酮提取物对 *skn-1* 缺失突变体 EU1 线虫体内抗氧化活性的影响, 结果如图 6 所示。与对照组相比, 野菊花黄酮提取物并没有显著提高 EU1 线虫体内 SOD 酶活和 GSH 含量 ($P>0.05$), 表明野菊花黄酮提取物提高线虫体内抗氧化活性的作用依赖于 *skn-1*。

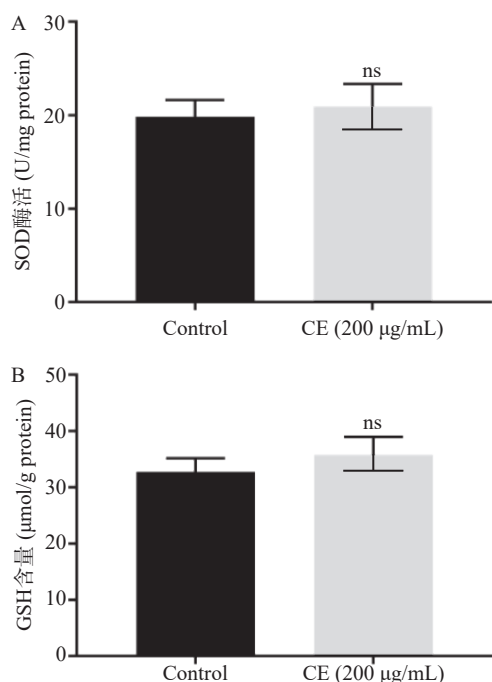


图 6 野菊花黄酮提取物对 EU1 线虫体内 SOD 酶活和还原型谷胱甘肽水平的影响

Fig.6 Effects of CE on the SOD enzyme activities and GSH contents of EU1 worms

2.8 野菊花黄酮提取物对 SOD-3::GFP 蛋白表达的影响

采用绿色荧光蛋白标记的 SOD-3 线虫株系 CF1553 可以用来可视化检测线虫体内 SOD-3 蛋白表达, 其强荧光点主要分布在头部和尾部^[27]。由于野菊花黄酮提取物可以显著提高线虫体内 SOD 酶活, 而 *sod-3* 是线虫体内调节超氧化物歧化酶活性的基因^[28], 因此本文研究了野菊花黄酮提取物对 SOD-3 蛋白表达的影响。如图 7 所示, 与对照组相比, 野菊花黄酮提取物处理的 CF1553 线虫株系其头部和尾部绿色荧光显著增强。经过 Image J 软件处理, 与对照组相比, 野菊花黄酮提取物处理组线虫中 SOD-3::GFP 蛋白表达显著提高了 16.94% ($P<0.001$)。以

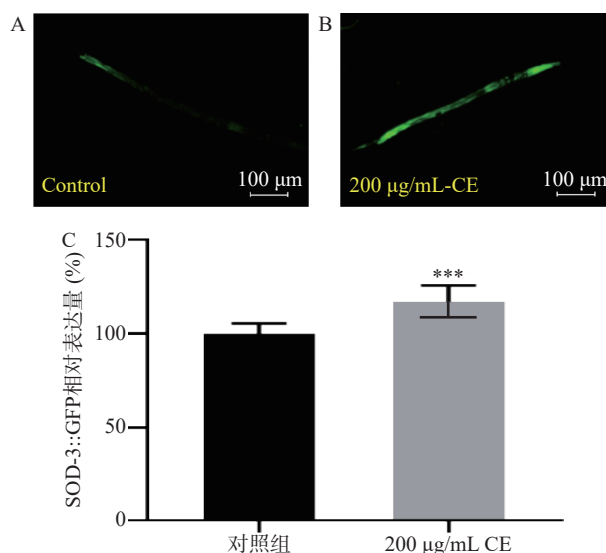


图 7 野菊花黄酮提取物对 CF1553 线虫株系中 SOD-3::GFP 表达的影响

Fig.7 Effect of CE on the expression of SOD-3::GFP in CF1553 worms

注: A 为 CF1553 线虫株系对照组代表性荧光照片; B 为 CF1553 线虫株系野菊花黄酮提取物处理组代表性荧光照片; C 为对照组和 200 µg/mL CE 处理组线虫体内 SOD-3 蛋白相对表达量。

上结果表明, 野菊花黄酮提取物通过促进 SOD-3::GFP 蛋白的表达从而提高线虫体内的 SOD 酶活, 最终增强了线虫体内抗氧化活性。

2.9 野菊花黄酮提取物对 GCS-1::GFP 蛋白表达的影响

采用绿色荧光蛋白标记的 GCS-1 线虫株系 LD1171 可以用来可视化检测线虫体内 GCS-1 蛋白表达, 其强荧光点主要分布在头部^[29]。在线虫体内,

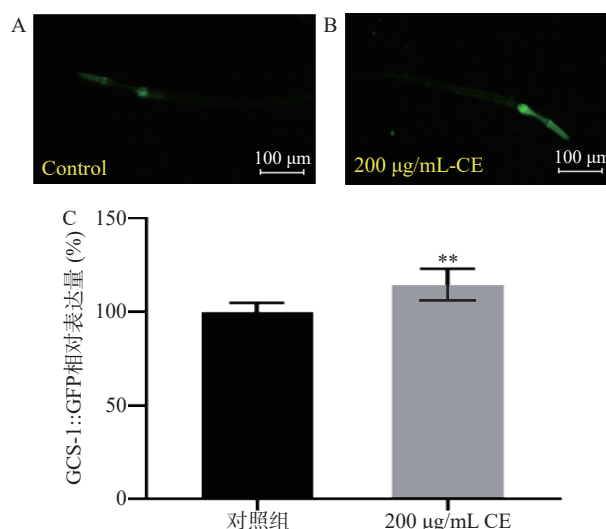


图 8 野菊花黄酮提取物对 LD1171 线虫株系中 GCS-1::GFP 表达的影响

Fig.8 Effect of CE on the expression of GCS-1::GFP in LD1171 worms

注: A 为 LD1171 线虫株系对照组代表性荧光照片; B 为 LD1171 线虫株系野菊花黄酮提取物处理组代表性荧光照片; C 为对照组和 200 µg/mL CE 处理组线虫体内 GCS-1 蛋白相对表达量。

gcs-1 是转录因子 SKN-1 下游的靶基因, 用来编码 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶, 与谷胱甘肽的生物合成和线虫氧化应激抗性有关^[30]。由于野菊花黄酮提取物促进了 SKN-1 的入核, 因此本文测定了其对 SKN-1 下游靶蛋白 GCS-1 表达的影响。如图 8 所示, 与对照组相比, 野菊花黄酮提取物处理的 LD1171 线虫株系其头部绿色荧光显著变亮。经过软件分析, 与对照组相比, 野菊花黄酮提取物处理线虫中 GCS-1::GFP 蛋白表达显著提高了 14.16% ($P < 0.01$)。以上结果表明野菊花黄酮提取物通过促进 SKN-1 入核, 激活了其下游的 *gcs-1*, 从而有助于提高谷胱甘肽的含量和增强线虫氧化应激抗性。

2.10 野菊花黄酮提取物对 GST-4::GFP 蛋白表达的影响

采用绿色荧光蛋白标记的 GST-4 线虫株系 CL2166 可以用来可视化检测线虫体内 GST-4 蛋白表达, 其强荧光点主要集中在线虫周围的背部神经索。在秀丽线虫中, *gst-4* 是转录因子 SKN-1 下游的靶基因之一, 编码谷胱甘肽 S-转移酶, 其是一种 II 相解毒酶, 与谷胱甘肽的生物合成和线虫抗氧化应激响应有关^[31]。如图 9 所示, 与对照组相比, 野菊花黄酮提取物处理的 CL2166 线虫株系表皮绿色荧光显著变亮。经过软件分析, 与对照组相比, 野菊花黄酮提取物处理线虫中 GST-4::GFP 蛋白表达显著提高了 20.44% ($P < 0.001$)。上述结果表明野菊花黄酮提取物通过促进转录因子 SKN-1 入核, 提高了 GST-4 蛋白的表达, 有助于提高谷胱甘肽的含量和增强线虫氧化应激抗性。

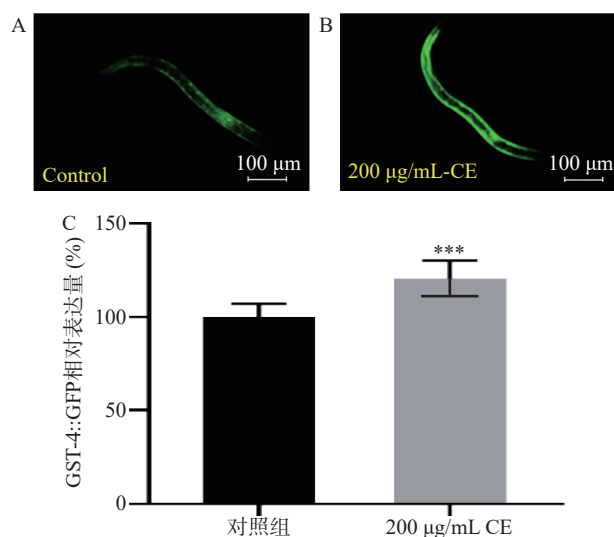


图9 野菊花黄酮提取物对 CL2166 线虫株系中 GST-4::GFP 表达的影响

Fig.9 Effect of CE on the expression of GST-4::GFP in CL2166 worms

注: A 为 CL2166 线虫株系对照组代表性荧光照片; B 为 CL2166 线虫株系野菊花黄酮提取物处理组代表性荧光照片; C 为对照组和 200 µg/mL CE 处理组线虫体内 GST-4 蛋白相对表达量。

3 结论

本研究首次利用秀丽线虫这一模式生物研究了野菊花黄酮提取物对线虫氧化应激抗性的影响, 并对其作用机制进行了探究。通过寿命实验发现野菊花黄酮提取物可以显著延长野生型线虫在氧化应激条件下的平均寿命。进一步研究发现, 野菊花黄酮提取物提高了线虫体内 SOD 酶活和还原型谷胱甘肽含量, 表明其具有良好的体内抗氧化活性。此外, 通过分析转录因子 SKN-1 核定位进一步证实, 野菊花黄酮提取物促进了 SKN-1 的入核, 并提高了与氧化应激抗性有关的蛋白 SOD-3、GCS-1、GST-4 的表达。本研究通过研究野菊花黄酮提取物对线虫氧化应激抗性的影响并解析其作用机制, 明确野菊花黄酮提取物可能的作用靶点, 为野菊花在体内抗氧化活性研究方面提供了新思路, 并拓展了其在改善健康、缓解氧化应激损伤方面的应用。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 汤亚芳, 余婉婷, 余港, 等. 野菊花药用活性成分及调控措施研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(10): 255-258. [TANG Y F, YU W T, YU G, et al. Research progress on pharmacological active constituents and regulation in Yejuhua (*Chrysanthemum indicum* L.)[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2023, 41(10): 255-258.]
- [2] 曹双, 刘瑞, 张秋月, 等. 野菊花化学成分和药理作用研究进展[J]. 广东化工, 2023, 50(3): 203-204. [CAO S, LIU R, ZHANG Q Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of wild *Chrysanthemum*[J]. Guangdong Chemical Industry, 2023, 50(3): 203-204.]
- [3] 孙平, 董萍萍, 董丹华, 等. 超声波辅助低共熔溶剂提取野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 147-152. [SUN P, DONG P P, DONG D H, et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of total flavonoids from *Chrysanthemum indicum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 147-152.]
- [4] 陈佳敏. 不同产地野菊花主要活性成分及其体外活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020. [CHEN J M. Studies on the active components and their biological activities of *Chrysanthemum indicum* L. from different areas[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.]
- [5] WANG Y, LI Y, GUO W, et al. Comparison of the chemical components, efficacy and mechanisms of action of *Chrysanthemum morifolium* flower and its wild relative *Chrysanthemum indicum* flower against liver-fire hyperactivity syndrome of hypertension via integrative analyses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(22): 13767.
- [6] JIN C, LIU J, JIN R, et al. Linarin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in C57BL/6J mice via the improvement of intestinal barrier, suppression of inflammatory responses and modulation of gut microbiota[J]. Food & Function, 2022, 13(20): 10574-1058.

- [7] THU H N, THU H N, NGUYEN V P. Optimization of β -cyclodextrin-assisted extraction of apigenin and luteolin from *Chrysanthemum indicum* L. using response surface methodology combined with different optimization algorithms and evaluation of its antioxidant capacity[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2023, 20(8): e202300873.
- [8] SHEN P Y, YUE Y R, PARK Y. *Caenorhabditis elegans*: A convenient *in vivo* model for assessing the impact of food bioactive compounds on obesity, aging, and Alzheimer's disease[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2018, 9(9): 1–22.
- [9] YE Y L, GU Q Y, SUN X L. Potential of *Caenorhabditis elegans* as an antiaging evaluation model for dietary phytochemicals: A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(6): 3084–3105.
- [10] TISSENBAUM H A. Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences*, 2012, 67(5): 503–510.
- [11] WU S, MIAO J, ZHU S, et al. Pongamol prevents neurotoxicity via the activation of MAPKs/Nrf2 signaling pathway in H_2O_2 -induced neuronal PC12 cells and prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Molecular Neurobiology*, 2024, 61: 8219–8233.
- [12] DONG Q, CUI Z, WU X, et al. Natural flavonoid hesperetin blocks amyloid β -protein fibrillogenesis, depolymerizes preformed fibrils and alleviates cytotoxicity caused by amyloids[J]. *Food & Function*, 2024, 15(8): 4233–4245.
- [13] 豆佳媛, 田巍, 唐琴, 等. 超声波辅助法提取野菊花中总黄酮的研究[J]. *皮革与化工*, 2022, 39(2): 19–26. [DOU J Y, TIAN W, TANG Q, et al. Study on ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Chrysanthemum indicum*[J]. *Leather and Chemicals*, 2022, 39(2): 19–26.]
- [14] 缪园欣, 廖明星, 孙爱红, 等. 超声-乙醇法提取铁皮石斛花总黄酮及其体外抗氧化性的研究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(4): 155–159. [MIAO Y X, LIAO M X, SUN A H, et al. Extraction of total flavonoids from *Dendrobium officinale* flowers by ultrasonic-ethanol synergistic and its antioxidant activity[J]. *China Brewing*, 2019, 38(4): 155–159.]
- [15] 吴梦思, 金建宇, 尚书游, 等. 卷丹百合黄酮提取物抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(15): 163–169. [WU M S, JIN J Y, SHANG S Y, et al. Study on antioxidant activity of *Lilium lancifolium* Thunb flavonoid extract[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(15): 163–169.]
- [16] YANG T, LIU X, XUE L, et al. Quality assessment of red yeast rice by fingerprint and fingerprint-effect relationship combined with antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2024, 438(16): 137744.
- [17] LI R, TAO M F, WU T, et al. A promising strategy for investigating the anti-aging effect of natural compounds: A case study of caffeoylquinic acids[J]. *Food & Function*, 2021, 12(18): 8583–8593.
- [18] SOLIS G M, PETRASCHECK M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates[J]. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 2011, 49(10): e2496.
- [19] LI R, TAO M F, XU T T, et al. *Artemisia selengensis* Turcz. leaf extract promotes longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(11): 4532–4541.
- [20] XU T T, TAO M F, LI R, et al. Longevity-promoting properties of ginger extract in *Caenorhabditis elegans* via the insulin/IGF-1 signaling pathway[J]. *Food & Function*, 2022, 13(19): 9893–9903.
- [21] PENG Y, SUN Q, GAO R, et al. AAK-2 and SKN-1 are involved in chioric-acid-induced lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(33): 9178–9186.
- [22] TAO M F, LI R, XU T T, et al. Vitexin and isovitexin delayed ageing and enhanced stress-resistance through the activation of the SKN-1/Nrf2 signaling pathway[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2023, 74(6): 685–694.
- [23] TAO M F, LI R, XU T T, et al. Flavonoids from the mung bean coat promote longevity and fitness in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Food & Function*, 2021, 12(17): 8196–8207.
- [24] 王天顺. 杭白菊、野菊花和神农香菊抗氧化损伤作用及有效成分研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2023. [WANG T S. Antioxidative damage effect and active ingredients of *Chrysanthemum Morifolium* Ramat., *Chrysanthemum indicum* L. and *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2023.]
- [25] LIOCHEV S I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 60: 1–4.
- [26] LI R, YI Q P, WANG J S, et al. Paeonol promotes longevity and fitness in *Caenorhabditis elegans* through activating the DAF-16/FOXO and SKN-1/Nrf2 transcription factors[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 173: 1–15.
- [27] WOLLENHAUPT S G, SOARES A T, SALGUEIRO W G, et al. Seleno- and telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64: 192–199.
- [28] WAN Q L, FU X, MENG X, et al. Hypotaurine promotes longevity and stress tolerance via the stress response factors DAF-16/FOXO and SKN-1/NRF2 in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 347–357.
- [29] NGUYEN V T, PARK A R, DURAISAMY K, et al. Elucidation of the nematicidal mode of action of grammicin on *Caenorhabditis elegans*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2022, 188: 105244.
- [30] 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.
- [31] WAN Q L, FU X, DAI W, et al. Uric acid induces stress resistance and extends the life span through activating the stress response factor DAF-16/FOXO and SKN-1/NRF2[J]. *Aging-Us*, 2020, 12(3): 2840–2856.