

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.01.025

蝉花提取物促进酿酒酵母寿命延长的机制研究

杨力, 闫孟利, 刘科

(四川大学生命科学学院 生物资源与生物环境重点实验室, 成都 610065)

摘要: 本实验探究蝉花提取物(*Cordyceps cicadae* extracts, CCE)促进酿酒酵母抵抗 H_2O_2 诱导的氧化胁迫并延长其时序性寿命的机制。实验使用不同浓度的 CCE 处理酿酒酵母细胞, 检测细胞的时序性寿命。然后通过 H_2O_2 诱导酿酒酵母细胞氧化胁迫, 检测 CCE 处理组和不加药对照组的抗氧化胁迫能力以及细胞内的活性氧(ROS)水平的变化。酿酒酵母细胞经 CCE 处理后, 通过实时荧光定量实验在 mRNA 水平检测抗氧化基因 SOD2、GPX2、CTT1 的表达量。结果显示 CCE 能够延长酿酒酵母时序性寿命, 并且其作用随 CCE 浓度的增加而增强。此外, 在 H_2O_2 诱导的氧化应激下, CCE 预处理的细胞抗氧化胁迫能力增强, 细胞内 ROS 水平显著降低。这些结果表明 CCE 延长了酿酒酵母的时序性寿命并通过上调 CTT1 和 SOD2 从而抵抗 H_2O_2 诱导的氧化胁迫。

关键词: 蝉花; 活性氧; 寿命; 抗氧化

中图分类号: Q591.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)01-0169-05

Study on the mechanism of *Cordyceps cicadae* extracts promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae*

YANG Li, YAN Meng-Li, LIU Ke

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: This study aims to explore the role of *Cordyceps cicadae* extracts (CCE) in resistance against H_2O_2 -induced oxidative stress and chronological lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. The experiments are performed with various concentrations of CCE to test the chronological lifespan extension. Then, the resistance against H_2O_2 induced oxidative stress was measured in terms of intracellular ROS accumulation. The mRNA levels of SOD2, GPX2 and CTT1 were measured by real-time PCR. The results indicate that CCE can prolong yeast chronological lifespan in a dose-dependent manner. Furthermore, the CCE pre-treated cells accumulate significantly lower ROS in the case of H_2O_2 -induced oxidative stress. Taken together these results suggest that CCE extends chronological lifespan and develops resistance against H_2O_2 induced oxidative stress through upregulation of CTT1 and SOD2.

Keywords: *Cordyceps cicadae*; ROS; Lifespan; Anti-oxidant

收稿日期: 2019-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31870849)

作者简介: 杨力(1994-), 女, 四川威远县人, 硕士生, 主要从事生物化学与分子生物学研究. E-mail: 568303301@qq.com

通讯作者: 刘科. E-mail: kliu@scu.edu.cn

1 引言

活性氧(ROS)在细胞呼吸过程中被认为是分子氧的代谢物,由于其不成对的电子而具有很强的反应活性^[1-2].活性氧参与许多重要的细胞活动,包括基因转录,信号转导和免疫应答^[3].低水平的ROS可能对机体产生有益作用,但其过量产生涉及到各种慢性疾病和退行性疾病的发展,例如癌症,呼吸系统疾病,神经退行性疾病和消化系统疾病^[4-5].在生理条件下,ROS的浓度受到抗氧化剂的微妙调节.通过补充抗氧化剂能够减少内源性抗氧化剂消耗,从而在一些临床研究中减轻相关的氧化损伤^[6].天然抗氧化剂具有清除ROS功能,对肿瘤、心脑血管疾病、神经退行性疾病等都有明显的防治作用^[7-8].

该文选取了我国传统的中草药蝉花,探究其作为一种天然抗氧化剂的潜力,研究蝉花提取物(CCE)在促进酿酒酵母的氧化胁迫应答,抑制H₂O₂诱导的细胞衰老中的作用^[9],研究发现CCE能够通过诱导抗氧化防御基因SOD2、CTT1的转录,增强酿酒酵母的抗氧胁迫能力,降低胞内活性氧的水平,从而延长酿酒酵母的时序性寿命.该研究对以蝉花为代表的我国传统中药的开发和应用具有参考意义.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 试剂 野生型酿酒酵母BY4742(本实验室提供),蝉花干粉(浙江泛亚生物医药股份有限公司),氨基酸(Biotopped),无水葡萄糖(成都科龙试剂),YNB(BD公司,291930),酵母提取物(OXODID),胰蛋白胨(Solarbio),琼脂粉(Bio-froxx),DCFH-DA(Sigma公司),RNA提取试剂盒(TIANGEN)、逆转录试剂盒(碧云天生物公司),实时荧光定量试剂盒(碧云天生物公司).

2.1.2 主要仪器和设备 气浴恒温振荡器(鸿科仪器),SW-CJ-1C超净工作台(中国苏州安泰),一次性0.22 μm除菌滤器(Millipore公司),倒置荧光显微镜(Leica DMi8),CFX manager real-time PCR系统(美国Bio-Rad),超纯水处理系统(美国Millipore公司),pH计(中国上海康仪),立式压力蒸汽灭菌锅(中国上海申安医疗).

2.2 实验方法

2.2.1 蝉花提取物的制备 将2g蝉花干粉,20 mL 95%乙醇放入带磨口塞的50 mL锥形瓶中(盖上塞子),混匀,于30℃ 200 r/min振荡48 h,过滤后收集滤液.40℃旋转蒸发滤液,得到淡黄色粉末状的CCE.将CCE溶于无水乙醇,配成50 mg/mL CCE醇溶液置于4℃冰箱备用^[8].

2.2.2 酵母细胞的培养 将野生型酿酒酵母BY4742于YPD固体培养基活化,挑取单菌落接种于SDC-2% Glucose液体培养基,30℃、200 r/min恒温培养.

2.2.3 酿酒酵母时序性寿命(CLS)的测定 将活化的酵母细胞接种到20 mL SDC液体培养基,使其在波长600 nm处的吸光度为0.005.接种时向CCE处理组中加入终浓度为1.000 mg/mL的CCE.30℃,200 r/min恒温振荡培养.每个样品3个平行样,培养至饱和后,取菌液稀释10万倍.取适量菌液均匀涂布于YPD固体培养基,倒置于30℃培养箱生长2~3 d,统计YPD固体培养基上的菌落数(A).之后每隔1天重复以上步骤,依次获得菌落数(B、C...).A/A、B/A、C/A...则表示存活菌落所占的比例,以存活菌落所占比例为纵坐标、时间为横坐标所绘制的曲线代表酿酒酵母的时序性寿命.

2.2.4 酿酒酵母抗氧化胁迫能力的测定 将活化的酵母细胞接种到10 mL SDC液体培养基,使其在波长600 nm处的吸光度为0.005.接种时向CCE处理组中加入终浓度为1.000 mg/mL的CCE.30℃,200 r/min恒温振荡培养24 h.然后取2 mL,波长600 nm处吸光度为0.5的酵母细胞于离心管中,离心后弃掉培养基.加入995 μL新鲜的SDC液体培养基,混匀.向H₂O₂处理组中加入5 μL 10 mol/L H₂O₂,分别处理30 min和60 min后逐级稀释10倍,稀释4次.然后按浓度由低到高,从右往左依次点样于YPD固体培养基上,最后将培养基倒置于30℃培养箱生长2~3 d.

2.2.5 酿酒酵母细胞内ROS水平的测定 将活化的酵母细胞接种到20 mL SDC液体培养基,使其在波长600 nm处的吸光度为0.005.接种时向CCE处理组中加入终浓度为1.000 mg/mL的CCE.30℃,200 r/min恒温振荡培养24 h.然后取2 mL,波长600 nm处吸光度为0.5的酵母细胞于EP管中,离心后弃掉培养基.每个样品中加入含有10 μmol/L DCFH-DA探针的PBS缓冲液

1 mL, 于 30 °C 避光孵育. 1 h 后弃去探针孵育液, 用 PBS 缓冲液洗涤两遍. 然后向 H₂O₂ 处理组中加入 2 mmol/L H₂O₂, 其余实验组中加入等体积的 PBS 缓冲液作为对照, 孵育 1 h. 然后在荧光显微镜下观察 ROS 的变化(激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm). 做三组独立重复实验.

2.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 CAT、SOD1、SOD2、GPX2 基因表达 将活化的酵母细胞接种到 10 mL SDC 液体培养基, 使其在波长 600 nm 处的吸光度为 0.005. 接种时向 CCE 处理组中加入终浓度为 1.000 mg/mL 的 CCE. 于 30 °C, 200 r/min 恒温振荡培养 24 h 后用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 然后用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA, 再用实时荧光定量试剂盒分别检测基因 SOD2、CTT1、GPX2 的表达量. 其中, β -actin 基因的上游引物为 5'-CGTTCCAATT-TACGCTGGTT-3', 下游引物为 5'-AGCG-GTTTGCATTT-CTTGTT-3'; SOD2 基因的上游引物为 5'-TTTGGCAAAGGCAATCGACG-3', 下游引物为 5'-CGCCTGCTAGCTTTGTGT-TG-3'; GPX2 基因的上游引物为 5'-TAATGTT-GCCTCCAAGTGCG-3', 下游引物为 5'-GGT-TCCTGCTTCCCGA ACTG-3'; CTT1 基因的上游引物为 5'-AGAAAGAGTTCCGGAGCGTG-3', 下游引物为 5'-ACATTCTGGTATGGAGCG-GC-3'. 采用 20 μ L 反应体系, 反应条件为 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 75 °C 1 min, 总共进行 40 个循环反应, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算基因表达的相对变化, 以 β -actin 作为内参进行归一化处理. 做

三组独立重复实验.

3 实验结果

3.1 CCE 延长酿酒酵母寿命

通过对比加药处理组与不加药对照组的时序性寿命, 发现分别加入 0.050 mg/mL CCE 和 0.100 mg/mL CCE 都会对酵母的时序性寿命产生有益的影响, 其延长作用随着 CCE 浓度的增加而增强, 结果如图 1 所示.

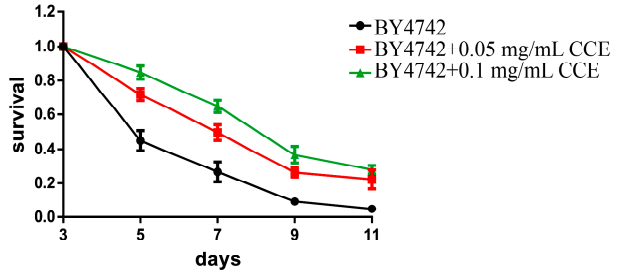


图 1 CCE 延长酿酒酵母寿命

Fig. 1 CCE extends the lifespan of *Saccharomyces Cerevisiae*

3.2 CCE 增强酿酒酵母的抗氧化胁迫能力

通过对比加药处理组与不加药对照组对 H₂O₂ 引起的氧化胁迫抵抗能力, 发现当加入 H₂O₂ 后反应 30 min, 其抗氧化胁迫能力增强的不明显; 当加入 H₂O₂ 后反应 60 min, 其加药组 0.050 mg/mL CCE 和 0.100 mg/mL CCE 都能一定程度的增强酿酒酵母的抗氧化胁迫能力, 并且其增强效果随着 CCE 浓度的增加而增强, 结果见图 2.

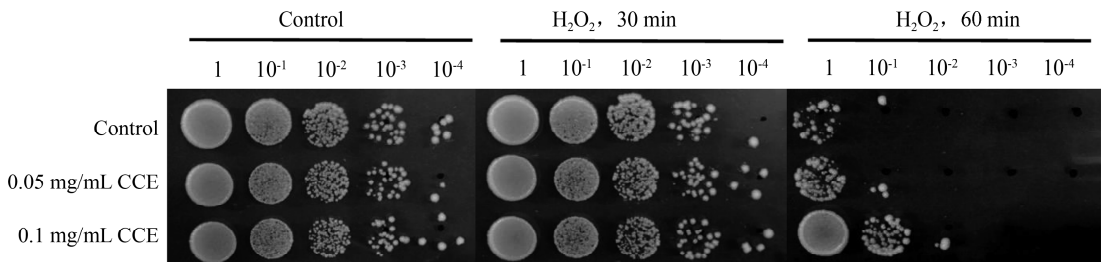


图 2 CCE 增强酿酒酵母的抗氧化胁迫能力

Fig. 2 CCE enhances the anti-oxidant capacity of *Saccharomyces Cerevisiae*

3.3 CCE 抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生

使用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内的 ROS, 其原理是 DCFH-DA 进入细胞后经过酶切反应生成 DCFH, DCFH 能与 ROS 反应生成发绿色荧光的 DCF, 其荧光强度与 ROS 的含量成正比. 实验结果表明, 加入 0.100 mg/mL CCE 处理

组中的细胞内 ROS 含量弱于不加药对照组 (Control) 细胞, Control+H₂O₂ 组细胞内的 ROS 含量对比 Control 组细胞显著增加; 虽然 CCE + H₂O₂ 组细胞内的 ROS 含量也比 CCE 组细胞高, 但却远远低于 Control+H₂O₂ 组细胞内的 ROS 含量, 如图 3 所示. 证明 CCE 可明显抑制酿酒酵母中由

H₂O₂诱导的 ROS 产生.

3.4 CCE 对 SOD2、GPX2 和 CTT1 基因表达的影响

SOD2、GPX2 和 CTT1 基因的相对表达量如图 4 所示, 0.100 mg/mL CCE 处理组中 SOD2 和 CTT1 的 mRNA 水平都上调了 3 倍左右, 可知

CCE 可以明显提高酿酒酵母 SOD2 和 CTT1 基因在 mRNA 水平的表达; 而 CCE 对 GPX2 基因在 mRNA 水平的表达没有明显影响. 证明 CCE 的抗氧化活性主要是通过上调 SOD2 和 CTT1 的表达所致.

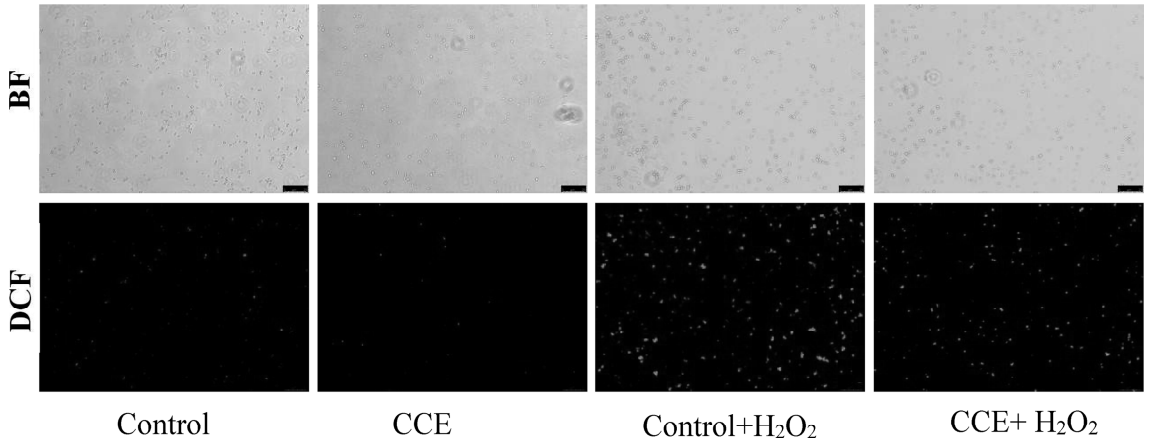


图 3 CCE 抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生

酵母细胞经 0.100 mg/mL 的 CCE 处理 24 h, 之后孵育 DCFH-DA 探针 1 h, PBS 洗涤两遍之后, 加入 2 mmol/L H₂O₂ 处理 1 h, 在荧光显微镜下观察 ROS 水平

Fig. 3 CCE inhibits H₂O₂-induced ROS production

Yeast cells were pre-treated with CCE at 0.100 mg/mL for 24 h, and then were stained using DCFH-DA for 1 h, washed twice with PBS. Yeast cells were treated with 2 mmol/L H₂O₂ for 1 h, and the ROS level were detected under a fluorescence microscope.

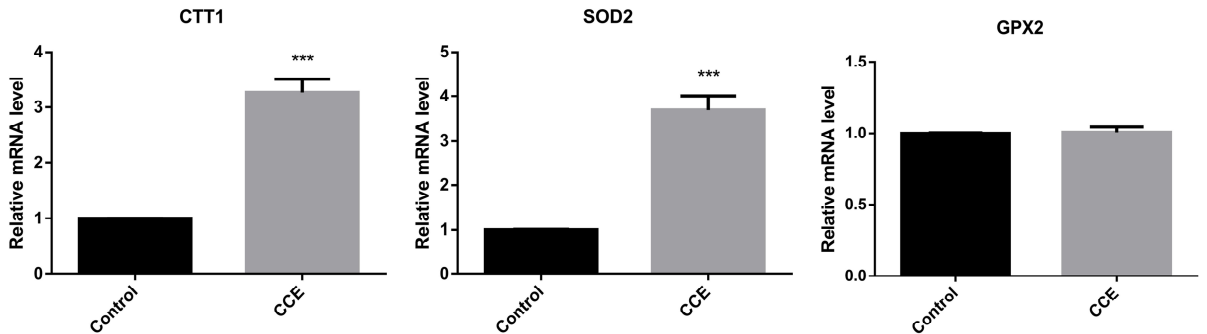


图 4 CCE 提高 SOD2、CTT1 的 mRNA 水平表达量

*** $P < 0.001$

Fig. 4 CCE up-regulate the mRNA level of SOD2、CTT1 in yeast

*** $P < 0.001$

4 讨论

很多研究表明衰老是源自于氧化胁迫所导致的有机体在氧化防御、免疫功能、代谢调控等方面所产生的损伤^[10-12], 固而增强生物体的抗氧化能力是抵抗衰老的一种有效手段. 蝉花作为一种在我国已经有上千年药用历史的传统中药, 具有增强人体抗氧化的能力, 但其有效活性成分一直不甚明确, 因此将蝉花活性成分进行萃取, 进而检测它们对细胞的作用效果是一种行之有效的方法. 本

文从抗氧化胁迫的角度出发, 以酿酒酵母为研究模型, 检测 CCE 对酵母细胞氧化胁迫应答的影响. 结果显示, CCE 处理能够延长酿酒酵母的时序性寿命. 进一步研究发现, CCE 处理能够增强酿酒酵母的抗氧化胁迫能力并且其增强效果随着 CCE 浓度的增加而增强, CCE 处理还显著的降低了由 H₂O₂ 诱导的细胞内 ROS 的上升; 通过对细胞内具有抗氧化能力的一些基因 SOD2、CTT1、GPX2 的表达进行检测发现, CCE 能够显著地促进 CTT1 和 SOD2 基因在 mRNA 水平的表达. 最后我们得

出结论:蝉花提取物(CCE)能够通过诱导抗氧化防御基因 CTT1 和 SOD2 的表达,增强酿酒酵母的抗氧化胁迫能力,降低胞内活性氧的水平,延长酿酒酵母的时序性寿命。

参考文献:

- [1] Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. *Cell Signal*, 2012, 24: 981.
- [2] Barbosa M C, Grosso R A, Fader C M. Hallmarks of aging: an autophagic perspective [J]. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 790.
- [3] Rogers N M, Seeger F, Garcin E D, *et al.* Regulation of soluble guanylate cyclase by matricellular thrombospondins: implications for blood flow [J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 134.
- [4] Fitzpatrick A M, Teague W G, Holguin F, *et al.* Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123: 146.
- [5] Gumral N, Naziroglu M, Ongel K, *et al.* Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods [J]. *Cell Biochem Funct*, 2009, 27: 276.
- [6] Liu Z, Ren Z, Zhang J, *et al.* Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 477.
- [7] 赵保路. 自由基,天然抗氧化剂与神经退行性疾病 [J]. *生物物理学报*, 2010, 26: 263.
- [8] 王为岩,高雪洁,刘冰花,等. 蝉花提取物通过促进 HeLa 细胞氧化胁迫应答抑制 H₂O₂ 诱导的细胞衰老 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 632.
- [9] Frippiat C, Chen Q M, Remacle J, *et al.* Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins [J]. *Exp Gerontol*, 2000, 35: 733.
- [10] Chandrasekaran A, Idelchik M P S, Melendez J A. Redox control of senescence and age-related disease [J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 91.
- [11] 黄韵璇,李海峰,黄泽波,等. 天然药物抗氧化活性物质研究进展 [J]. *广东药科大学学报*, 2016, 32: 532.
- [12] 康晶,孙鲁宁. 天然药物抗衰老的线粒体机制研究进展 [J]. *山东医药*, 2015, 978: 109.

引用本文格式:

中文: 杨力, 闫孟利, 刘科. 蝉花提取物促进酿酒酵母寿命延长的机制研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2020, 57: 169.

英文: Yang L, Yan M L, Liu K. Study on the mechanism of *Cordyceps cicadae* extracts promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 169.