

张梦婷,李斌,田静.表没食子儿茶素没食子酸酯和茶黄素对秀丽隐杆线虫耐温性的影响[J].华中农业大学学报,2022,41(5):232-239.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.028

表没食子儿茶素没食子酸酯和茶黄素对秀丽隐杆线虫耐温性的影响

张梦婷,李斌,田静

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070

摘要 为探究绿茶和红茶中的代表性组分对秀丽隐杆线虫在不同温度条件下的作用效果及机制,试验设置0.25、2.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)和茶黄素(theaflavin, TF1),测定线虫在4 $^{\circ}\text{C}$ 和35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的存活率,进而测定在4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 和30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下经25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG和TF1孵育后线虫体内脂肪含量和线粒体膜电位的变化。结果显示,25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG将热应激线虫的最大寿命和中位寿命分别提高了8.15%、22.44%,将冷应激线虫的最大寿命和中位寿命分别降低了20.25%、17.94%。25 $\mu\text{mol/L}$ TF1对热应激线虫的存活率无显著影响,将冷应激线虫的最大寿命和中位寿命分别提高了9.43%、19.01%。在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,EGCG和TF1孵育均提高了线虫体内的脂肪含量,TF1孵育降低了线虫的线粒体膜电位水平。在20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,EGCG和TF1具有明显的降脂作用,长时间孵育可显著提高衰老线虫线粒体活性。在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,EGCG和TF1提高了线虫体内的脂肪含量。以上结果表明,在低温条件下TF1通过促进线粒体产热而非脂肪动员提高了线虫的存活率,而EGCG孵育可诱导线虫死亡。

关键词 秀丽隐杆线虫;表没食子儿茶素没食子酸酯;茶黄素;耐温性;线粒体膜电位

中图分类号 TS272 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0232-08

流行病学研究表明,饮茶具有多种健康益处,日常生活中长期习惯性饮茶与高血压发病率和认知障碍风险呈负相关^[1-2]。绿茶中含量最多的茶多酚是儿茶素类物质,而儿茶素中又以表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)含量最高,约占总量的50%~75%^[3]。作为儿茶素中最有效的活性成分,EGCG具有抗氧化、抗菌、抗炎等作用^[4]。茶黄素类物质(theaflavins, TFs)主要是由儿茶素及其衍生物在多酚氧化酶等酶的催化作用下氧化缩合而成的具有苯骈卓酚酮结构的一类化合物的总称^[5],在红茶中的含量约为0.5%~3%,是决定红茶品质的关键成分,影响红茶口感的醇厚度与鲜爽度^[6]。目前发现并鉴定的TFs有28种,其中含量最多的是茶黄素(theaflavin, TF1)、茶黄素-3-没食子酸酯(theaflavin-3-gallate, TF2a)、茶黄素-3'-没食子酸酯(theaflavin-3'-gallate, TF2b)和茶黄素双没食子酸酯(theaflavin-3, 3'-digallate, TF3)4种单体^[7]。众多研究表明,

TFs具有抗氧化^[8]、预防神经退行性疾病^[9]、调节血糖^[10]等多种生物学活性。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是一种发育迅速、生命周期短的非寄生线虫^[11]。20世纪70年代,Brenner^[12]首次将秀丽隐杆线虫作为一种神经科学模型引入研究,使其成为第一个拥有完整基因组测序的多细胞生物。秀丽隐杆线虫有60%~80%的基因与人类基因同源,42%的人类疾病基因在秀丽隐杆线虫基因组中存在清晰的同源物^[13],因此使得秀丽隐杆线虫作为模式生物在研究药物筛选和人类疾病机制等方面成为可能。目前将EGCG和TFs应用于秀丽隐杆线虫的研究主要集中在抗衰老^[14]、抗氧化应激^[15]、抗渗透应激和紫外应激^[16]等方面。已有研究表明,EGCG和富含茶黄素的组分可增加能量消耗、促进生热^[17-18]。在低温条件下秀丽隐杆线虫通过TRP通道延长寿命,高温条件下通过上调应激相关基因的表达来提供较强的应激保护,进而

收稿日期:2022-05-19

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(2662020SPPY010)

张梦婷,E-mail:1510594838@qq.com

通信作者:田静,E-mail:jing.tian@mail.hzau.edu.cn

延长寿命。但是将二者应用于秀丽隐杆线虫进行冷、热应激考察和机制研究未见报道。基于此,本研究以秀丽隐杆线虫为生物模型,体外模拟冷、热环境温度,探究绿茶和红茶中的代表性组分——EGCG和TF1对秀丽隐杆线虫冷、热应激下存活率的影响,进一步测定EGCG和TF1对不同温度条件下秀丽隐杆线虫体内脂肪含量和线粒体膜电位水平的影响,对EGCG和TF1在不同温度下发挥保护作用的机制进行了初探,以期对茶多酚生热研究和秀丽隐杆线虫耐温性研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

N2野生型秀丽隐杆线虫、大肠杆菌OP50(*E. coli* OP50), Caenorhabditis Genetics Center (CGC); 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG, $\geq 95\%$)、牛血清白蛋白(BSA)、TritonTM X-100、胆固醇、蛋白胨、甘油,美国Sigma-Aldrich公司;茶黄素(TF1, 98%),成都普瑞法科技开发有限公司;四甲基罗丹明乙酯(TMRE)、羰基氰基-4-(三氟甲氧基)苯腙(FCCP),上海源叶生物科技有限公司;LB培养基,美国英杰生命技术有限公司;琼脂(BR组培级),北京兰杰柯科技有限公司;二甲基亚砷(DMSO),AppliChem公司;BCA蛋白测定试剂盒,Thermo Fisher Scientific公司;甘油三酯(TG)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;盐酸、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钙、硫酸镁、氢氧化钾,国药集团化学试剂有限公司;S-basal缓冲液(1.47 g K_2HPO_4 、5.93 g KH_2PO_4 、5.85 g NaCl溶于1 L超纯水,121 °C灭菌20 min)。

1.2 秀丽隐杆线虫的培养

提前制备涂布有*E. coli* OP50菌液的线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)平板,每5 d将成年线虫转移到平板上,每次挑取4~5条,置于20 °C生化培养箱中进行恒温培养。

1.3 热、冷应激试验

将同步化64 h后的秀丽隐杆线虫分别转移到含有EGCG和TF1的NGM平板上,于20 °C下孵育5 d,每天使用S-basal缓冲液收集秀丽隐杆线虫后转移至新的NGM平板中以避免产卵带来的干扰。热、冷应激试验以DMSO为空白对照,每组3个平行,每个平行挑取约20条线虫分别置于35、4 °C温度条件下培养。热应激试验每小时计数1次线虫的死亡情况,直至所有线虫死亡,试验温度设置参考Wilson

等^[19]。冷应激试验每天计数线虫的死亡情况,直至所有线虫死亡,试验温度设置参考Liu等^[20]。

1.4 脂肪含量测定

将同步化64 h后的秀丽隐杆线虫分别转移到含有EGCG和TF1的NGM平板上,于不同温度(4、20、30 °C)条件下分别孵育1、5和7 d。用提前冰浴的S-basal缓冲液收集线虫,洗涤3次以除去残留的菌液,随后将线虫转移至2 mL离心管并置于液氮中速冻成颗粒。将线虫颗粒在液氮预冷的研钵中与200 μ L 5% TritonTM X-100一起研磨,收集虫体粉末后置于冰上保存。以30%振幅超声10 min,随后在4 °C条件以12 300 r/min离心15 min。收集离心后的上清液,使用甘油三酯(TG)测试盒测定不同温度条件下秀丽隐杆线虫体内的脂肪含量。同时,使用BCA蛋白测试盒测定秀丽隐杆线虫体内的蛋白质含量。试验结果以蛋白质含量做归一化处理。

1.5 线粒体膜电位测定

线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)水平使用线粒体特异性染料四甲基罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE)检测。试验以1 μ mol/L FCCP为阳性对照,100 μ mol/L TMRE为荧光染料。试验时将同步化64 h后的秀丽隐杆线虫分别转移到含有EGCG和TF1的NGM平板上,于不同温度(4、20、30 °C)条件下孵育1 h、2 h、12 h、24 h、5 d和7 d。提前制备热灭活的*E. coli* OP50菌液,与100 μ L浓度为100 μ mol/L的TMRE检测液混合后涂布于NGM平板上,避光吹干。用S-basal缓冲液分别收集孵育1、2、12、24 h及5 d和7 d的线虫,转移至含有TMRE染料的平板上,于20 °C下孵育2 h。孵育结束后,用S-basal缓冲液收集线虫,转移至含有热灭活*E. coli* OP50菌液的NGM平板上使其自由爬行1 h。最后收集线虫,以100 μ L/孔将线虫悬浮液加至黑色96孔酶标板中。荧光强度测定条件为激发波长540 nm、发射波长595 nm。测定完毕后,使用0.01% TritonTM X-100回收96孔板中的线虫,同本文“1.4”步骤中超声破碎、离心,使用BCA法测定蛋白质含量。试验结果以蛋白质含量做归一化处理。

1.6 蛋白质含量测定

使用BCA蛋白测定试剂盒测定秀丽隐杆线虫体内的蛋白质含量。取超声破碎、离心后的线虫上清液,按照BCA蛋白测定试剂盒的操作说明加样,37 °C条件下孵育30 min后于波长562 nm处测定吸光值。

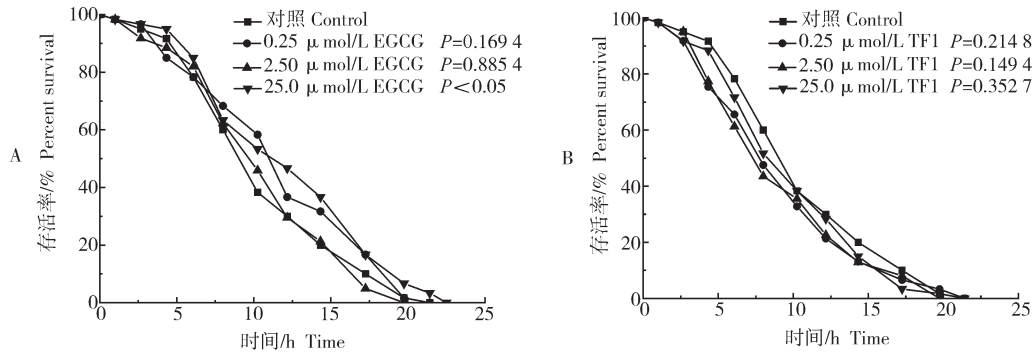
1.7 数据处理

试验数据以“平均值±标准差”表示。使用 GraphpadPrism 7.0 中 Survival 进行生存分析,分析时采用 Log-rank(Mantel-Cox)检验数据的显著性。使用 Origin 2018 软件作图,采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行 ANOVA 单因素方差分析,并采用 Duncan's 法检验数据的显著性。“*”表示 $P<0.05$ ，“**”表示 $P<0.01$ ，“***”表示 $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 EGCG 和 TF1 对热应激秀丽隐杆线虫存活率的影响

由图 1 可知,经 EGCG 和 TF1 孵育后,25 $\mu\text{mol/L}$



$P<0.05$ 表示试验组与对照组之间有显著性差异。 $P<0.05$ represents significant differences between the experimental group and the control groups.

图 1 0.25~25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG(A)和 TF1(B)孵育后 35 °C 条件下热应激秀丽隐杆线虫的存活率

Fig.1 Survival rate of heat stressed *C. elegans* at 35 °C after incubation with 0.25-25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG(A) and TF1(B)

表 1 EGCG 和 TF1 孵育后 35 °C 热应激条件下秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命

Table 1 Maximum and median lifespan of *C. elegans* under heat stress at 35 °C after incubation with EGCG and TF1

| 组别 Group | 浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ Concentration | 秀丽隐杆线虫寿命/h Lifespan of <i>C. elegans</i> | | P 值 P value | 线虫总数 Total number |
|-------------|--|---|-------------------------|----------------|----------------------|
| | | 最大寿命 Maximum lifespan | 中位寿命 Median lifespan | | |
| | | 对照 Control | 0 | | |
| EGCG | 0.25 | 19.42±0.46 | 10.92±0.60 | 0.169 4 | 60 |
| | 2.5 | 17.57±0.63 | 9.72±0.32 | 0.885 4 | 61 |
| | 25 | 20.44±0.92 | 11.24±1.49 | 0.049 7 | 60 |
| TF1 | 0.25 | 18.07±0.05 | 7.63±0.90 | 0.214 8 | 61 |
| | 2.5 | 18.03±0.07 | 7.42±1.10 | 0.149 4 | 62 |
| | 25 | 17.17±1.87 | 8.63±0.99 | 0.352 7 | 60 |

2.2 EGCG 和 TF1 对冷应激秀丽隐杆线虫存活率的影响

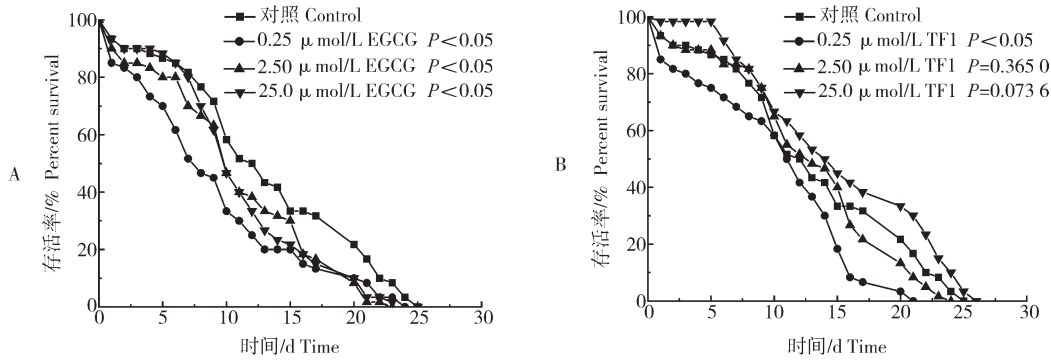
如图 2 所示,在 4 °C 条件下经 EGCG 和 TF1 孵育后,中、高浓度 TF1 对秀丽隐杆线虫具有一定的保护作用,但效果不显著。而 EGCG 则降低了秀丽隐杆线虫在冷应激状态下的存活率,完全丧失了对秀丽

隐杆线虫的保护作用。由表 2 可知,在 4 °C 条件下,经 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 孵育后秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命分别为 17.83、9.97 d。与对照组相比,25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 将秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命分别降低了 20.25%、17.94%。经低浓度 TF1 孵育后秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命分别降

隐杆线虫的保护作用。由表 2 可知,在 4 °C 条件下,经 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 孵育后秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命分别为 17.83、9.97 d。与对照组相比,25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 将秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命分别降低了 20.25%、17.94%。经低浓度 TF1 孵育后秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命分别降

低了22.36%、16.79%。中浓度TF1对秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命无显著影响。而经高浓度TF1孵育后秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命分别提高了9.43%、19.01%。冷应激条件下相同浓度

的TF1对秀丽隐杆线虫的保护作用强于EGCG,特别是当孵育浓度为25 μmol/L时,TF1对秀丽隐杆线虫的保护作用最显著。



$P < 0.05$ 表示试验组与对照组之间有显著性差异。 $P < 0.05$ represents significant differences between the experimental group and the control groups.

图2 0.25~25 μmol/L EGCG(A)和TF1(B)孵育后4 °C条件下冷应激秀丽隐杆线虫的存活率
Fig.2 The survival rate of cold stressed *C. elegans* at 4 °C after incubation with 0.25-25 μmol/L EGCG(A) and TF1(B)

表2 EGCG和TF1孵育后4 °C冷应激条件下秀丽隐杆线虫的最大寿命和中位寿命(线虫总数 $n=60$)
Table 2 Maximum and median lifespan of *C. elegans* under cold stress at 4 °C after incubation with EGCG and TF1 (total number of *C. elegans*, $n = 60$)

| 组别 Group | 浓度/(μmol/L) Concentration | 秀丽隐杆线虫寿命/d Lifespan of <i>C. elegans</i> | | P值 P value |
|-------------|------------------------------|---|-------------------------|---------------|
| | | 最大寿命 Maximum lifespan | 中位寿命 Median lifespan | |
| | | 对照 Control | 0 | |
| EGCG | 0.25 | 18.29±1.81 | 7.33±0.05 | 0.002 9 |
| | 2.5 | 18.30±1.72 | 10.23±0.20 | 0.018 4 |
| | 25 | 17.83±1.59 | 9.97±0.58 | 0.032 1 |
| TF1 | 0.25 | 17.36±0.15 | 10.11±0.40 | 0.003 7 |
| | 2.5 | 21.52±0.50 | 12.94±1.40 | 0.365 0 |
| | 25 | 24.47±0.19 | 14.46±1.51 | 0.073 6 |

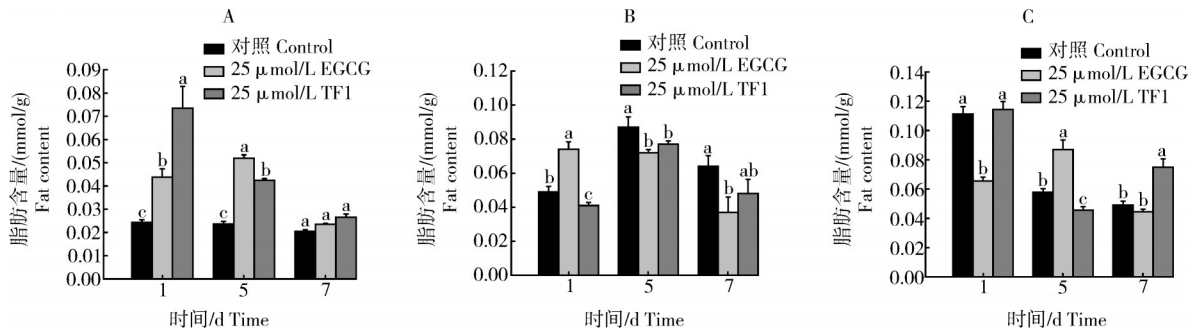
2.3 EGCG和TF1对秀丽隐杆线虫脂肪含量的影响

根据冷、热应激试验结果,选取25 μmol/L的EGCG和TF1孵育秀丽隐杆线虫至不同时间点后测定其体内脂肪含量。由图3A可见,在4 °C条件下经EGCG和TF1分别孵育1、5 d后,秀丽隐杆线虫体内脂肪含量显著高于对照组。长时间(7 d)孵育后,秀丽隐杆线虫体内脂肪含量与对照组相比具有升高的趋势,但无显著差异。图3B显示在正常培养温度20 °C下,经EGCG短时间孵育后,秀丽隐杆线虫体内脂肪含量显著升高,长时间孵育后,秀丽隐杆线虫体内脂肪含量显著降低。与对照组相比,TF1可显著降低秀丽隐杆线虫体内脂肪含量。由图3C可见,在

30 °C条件下经EGCG短时间(1 d)孵育后,秀丽隐杆线虫体内脂肪含量显著降低,长时间(5 d)孵育后脂肪含量逐渐恢复,7 d后与对照组相比无显著差异。经TF1 5 d、7 d长时间孵育后,秀丽隐杆线虫体内脂肪含量呈现出先降低后升高的趋势。

2.4 EGCG和TF1对秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平的影响

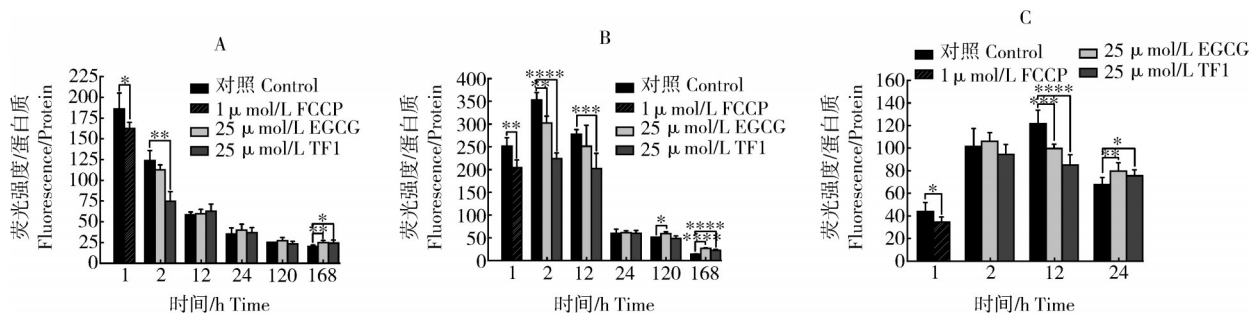
图4显示了在4、20和30 °C条件下,经25 μmol/L EGCG和TF1孵育2 h、12 h、24 h、5 d、7 d后秀丽隐杆线虫线粒体膜电位的变化,试验以线粒体解偶联剂FCCP为阳性对照。由图4A可见,在4 °C条件下,TF1短时间孵育2 h后秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平显著降低,孵育7 d后线粒体膜电位水平显著高



同一时间不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。The different letters in the same time indicate significant differences($P < 0.05$)。

图3 4 °C(A)、20 °C(B)、30 °C(C)条件下经25 μmol/L EGCG和TF1孵育后秀丽隐杆线虫体内的脂肪含量

Fig.3 Fat content of *C. elegans* at 4 °C(A), 20 °C(B), 30 °C(C) after incubation with 25 μmol/L EGCG and TF1



差异性用“*”($P < 0.05$)、“**”($P < 0.01$)和“***”($P < 0.001$)表示。Differences are indicated by “*”($P < 0.05$), “**”($P < 0.01$) and “***”($P < 0.001$)。

图4 4 °C(A)、20 °C(B)、30 °C(C)条件下经25 μmol/L EGCG和TF1孵育后秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平

Fig.4 Mitochondrial membrane potential of *C. elegans* at 4 °C(A), 20 °C(B), 30 °C(C)

after incubation with 25 μmol/L EGCG and TF1

于对照组。与对照组相比,在低温条件下EGCG短时间孵育对秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平无显著影响,长时间孵育可提高线粒体膜电位水平。随着孵育时间的延长,秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平大大降低,但EGCG和TF1可能对衰老秀丽隐杆线虫线粒体活性具有一定的促进作用,使得其线粒体膜电位水平高于对照组。因此,在低温条件下TF1可能对年轻成虫起到了类似线粒体解偶联剂的作用,这与冷应激状态下TF1对秀丽隐杆线虫具有的保护作用一致。由图4B可见,当孵育温度为20 °C时,短时间(2、12 h)孵育后TF1显著降低了秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平,随着孵育时间的延长,与对照组相比秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平显著高于对照组。经EGCG孵育2 h后秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平显著降低,长时间孵育后,线粒体膜电位水平高于对照组。在此温度条件下,EGCG和TF1均表现出类似线粒体解偶联剂的作用,长时间孵育均能改善衰老秀丽隐杆线虫线粒体活性。由图4C可知,在30 °C条件下,EGCG和TF1短时间孵育12 h后秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平显著降低。随着

孵育时间的延长,秀丽隐杆线虫死亡数增加。当孵育至24 h时,对照组秀丽隐杆线虫活力降低,EGCG和TF1孵育可增加线虫活力进而提高线粒体膜电位水平。与低温、正常培养温度条件试验结果一致,EGCG和TF1仅对年轻成虫起到了类似线粒体解偶联剂的作用。当孵育时间为5、7 d时,热应激使秀丽隐杆线虫大部分死亡,无法通过活体秀丽隐杆线虫检测其线粒体膜电位水平。

3 讨论

环境温度是影响生物体存活率的重要因素之一,较低的环境温度可以延长变温动物的寿命^[21]。秀丽隐杆线虫的正常培养温度是20 °C,在此温度下秀丽隐杆线虫的平均寿命为20 d左右。较高的环境温度会大大降低秀丽隐杆线虫的存活率,而低温下秀丽隐杆线虫具有更长的寿命^[22]。本试验结果表明,高温(35 °C)条件下EGCG对秀丽隐杆线虫的保护作用显著强于TF1,低温(4 °C)条件下TF1对秀丽隐杆线虫的保护作用强于EGCG。已有研究表明,0.1 μg/mL EGCG具有抗热应激的能力,可将35 °C

条件下秀丽隐杆线虫的平均寿命提高13.1%^[15]。Xiong等^[16]发现红茶提取物可延长热应激秀丽隐杆线虫的寿命。本研究通过测定不同浓度EGCG以及TF1对秀丽隐杆线虫在冷、热应激条件下存活率的影响发现,25 μmol/L EGCG显著提高了热应激秀丽隐杆线虫的存活率,25 μmol/L TF1对热应激秀丽隐杆线虫的存活率无显著影响。25 μmol/L EGCG降低了秀丽隐杆线虫在冷应激条件下的存活率,而25 μmol/L TF1对冷应激秀丽隐杆线虫具有一定的保护作用。

为进一步验证EGCG及TF1对热、冷应激秀丽隐杆线虫的保护作用差异,本研究测定了不同温度条件下EGCG和TF1对秀丽隐杆线虫脂肪含量和线粒体膜电位水平的影响。有文献报道,冷应激可激活PKA信号进而上调激素敏感脂肪酶 $hosl-1$ 的表达,脂肪酶诱导脂肪动员,导致甘油积累,从而保护秀丽隐杆线虫免受冷应激伤害^[20]。本研究中,低温(4℃)条件下经EGCG和TF1短时间孵育后秀丽隐杆线虫体内脂肪含量显著高于对照组,这一现象说明EGCG和TF1通过某种机制补偿了脂肪分解产生甘油为秀丽隐杆线虫成虫早期提供的保护作用。Zhou等^[23]发现高温培养秀丽隐杆线虫提高了其体内的总脂肪含量。而本研究结果显示高温(30℃)条件下EGCG和TF1短时间孵育会降低秀丽隐杆线虫体内的脂肪含量,但经EGCG孵育5 d、TF1孵育7 d后秀丽隐杆线虫体内脂肪含量升高。作为绿茶和红茶中的代表性组分,EGCG和TF1的生物学活性已被广泛研究。例如,膳食中添加富含EGCG的绿茶提取物(10 mg/mL EGCG)会影响果蝇的葡萄糖代谢,促进健康和延长寿命^[24];在健康小鼠模型中,模拟人类喝茶的方式每天喂食25 mg/kg EGCG可以使其中位寿命延长13.5%^[25]。动物试验和人体试验结果均表明,TF1可有效预防肥胖、减少甘油三酯的积累^[26-27]。与先前报道的EGCG和TF1具有降脂作用一致,本研究以秀丽隐杆线虫为模型,通过测定正常培养温度(20℃)条件下EGCG和TF1对其脂肪含量的影响发现,经EGCG和TF1长时间(5、7 d)孵育后秀丽隐杆线虫体内脂肪含量显著降低。综上所述,在20℃条件下EGCG和TF1均表现出显著的降脂作用,低温条件下可能通过某种机制对秀丽隐杆线虫成虫早期发挥保护作用进而减少了脂肪动员,高温条件下可提高脂肪含量。

线粒体功能与人体稳态息息相关,人类许多疾

病的发生和发展均与线粒体功能紊乱相关,因此,研究外源性物质对其功能的影响尤为重要。研究表明,黄酮类化合物作为质子载体,通过线粒体解偶联消散线粒体膜电位诱导线粒体自噬,从而减轻与衰老相关的神经退行性变^[28]。FCCP是一种线粒体解偶联剂,常作为线粒体膜电位试验中的阳性对照。它作用于线粒体内膜使大量质子回流,从而导致线粒体膜电位降低、氧耗增加,跨膜产生的势能以热能的形式散失而导致ATP生成减少^[29]。为进一步探究TF1是否可作为质子载体起到类似解偶联剂的作用,本研究还测定了不同温度条件下EGCG和TF1对秀丽隐杆线虫膜电位的影响。结果显示,在低温条件下,TF1短时间孵育2 h可显著降低秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平,而EGCG对秀丽隐杆线虫线粒体膜电位水平无显著影响。这一结果说明TF1可能起到类似解偶联剂FCCP的作用,通过降低线粒体膜电位,进而增加热能产生从而提高冷应激线虫的存活率。本研究中线粒体膜电位试验使用的TMRE是一种可渗透细胞膜的橘红色阳离子荧光探针,可在完整的线粒体中聚集,而去极化或非活跃性线粒体膜电位降低,导致TMRE积聚减少。有文献报道,由于线粒体中TMRE的积累依赖于线粒体活性,经TMRE染色之后,老年线虫体内荧光强度降低^[28]。本研究结果与其一致,长时间孵育后秀丽隐杆线虫体内荧光强度降低,但经EGCG和TF1孵育后衰老线虫体内的荧光强度提高,说明EGCG和TF1可提高衰老线虫的活力。

综上,在35℃热应激条件下,EGCG对秀丽隐杆线虫的保护作用强于TF1;在4℃冷应激条件下,TF1对秀丽隐杆线虫的保护作用强于EGCG。在冷、热应激条件下,当孵育浓度为25 μmol/L时二者对比最显著。与对照组相比,4℃条件下经25 μmol/L TF1短时间孵育后,秀丽隐杆线虫体内具有更高的脂肪含量和更低的线粒体膜电位,而25 μmol/L EGCG对秀丽隐杆线虫线粒体膜电位无显著影响,说明在冷应激条件下TF1可能是通过发挥类似线粒体解偶联剂的作用而非脂肪动员,进一步促进线粒体生热从而减轻冷应激对秀丽隐杆线虫造成的伤害。正常温度条件下EGCG和TF1均具有较好的降脂作用。随着孵育时间的延长,衰老秀丽隐杆线虫行为迟钝、生理功能下降,而EGCG和TF1可减轻衰老对其造成的不利影响,改善其线粒体功能。

参考文献References

- [1] YIN J Y, DUAN S Y, LIU F C, et al. Blood pressure is associated with tea consumption: a cross-sectional study in a rural, elderly population of Jiangsu China[J]. The journal of nutrition, health & aging, 2017, 21(10): 1151-1159.
- [2] GU Y J, HE C H, LI S, et al. Tea consumption is associated with cognitive impairment in older Chinese adults[J]. Aging & mental health, 2018, 22(9): 1232-1238.
- [3] KANWAR J, TASKEEN M, MOHAMMAD I, et al. Recent advances on tea polyphenols [J]. Frontiers in bioscience, 2012, 4(1): 111-131.
- [4] 李朝云, 邱树毅, 班世栋, 等. 绿茶中表没食子儿茶素没食子酸酯生物活性研究进展[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 12-18. LI Z Y, QIU S Y, BAN S D, et al. Research progress on bioactivity of epigallocatechin gallate in green tea[J]. China brewing, 2019, 38(9): 12-18 (in Chinese with English abstract).
- [5] 薛金金, 尹鹏, 张建勇, 等. 植物源多酚氧化酶氧化儿茶素形成茶黄素和聚酯型儿茶素的研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 76-81. XUE J J, YIN P, ZHANG J Y, et al. Screening of plant-derived polyphenol oxidase for the formation of theaflavins and theasinensins from the oxidation of catechins[J]. Science and technology of food industry, 2019, 40(20): 76-81 (in Chinese with English abstract).
- [6] HE H F. Research progress on theaflavins: efficacy, formation, and preparation[J/OL]. Food & nutrition research, 2017, 61(1): 1344521 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1344521>.
- [7] 徐燕, 朱创, 邵玲玲, 等. 红茶化学成分及生理活性的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(5): 687-696. XU Y, ZHU C, TAI L L, et al. Research advance on chemical components and biological activities of black tea [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(5): 687-696 (in Chinese with English abstract).
- [8] WU Y Y, LI W, XU Y, et al. Evaluation of the antioxidant effects of four main theaflavin derivatives through chemiluminescence and DNA damage analyses[J]. Journal of Zhejiang University, 2011, 12(9): 744-751.
- [9] 张静. 茶黄素对阿尔茨海默病模型的神经保护作用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017. ZHANG J. Neuroprotective effects of theaflavins on Alzheimer's disease model [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [10] OH J, JO S H, KIM J S, et al. Selected tea and tea pomace extracts inhibit intestinal α -glucosidase activity *in vitro* and postprandial hyperglycemia *in vivo* [J]. International journal of molecular sciences, 2015, 16(4): 8811-8825.
- [11] CORSI A K, WIGHTMAN B, CHALFIE M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2015, 200(2): 387-407.
- [12] BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 1974, 77(1): 71-94.
- [13] CULETTO E, SATTELLE D B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes [J]. Human molecular genetics, 2000, 9(6): 869-877.
- [14] 熊立瑰. 茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)抗衰老的低促效应研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015. XIONG L G. Hormesis of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) to antiaging [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [15] ZHANG L Z, JIE G L, ZHANG J J, et al. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress [J]. Free radical biology and medicine, 2009, 46(3): 414-421.
- [16] XIONG L G, HUANG J N, LI J, et al. Black tea increased survival of *Caenorhabditis elegans* under stress [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62(46): 11163-11169.
- [17] KUDO N, ARAI Y, SUHARA Y, et al. A single oral administration of theaflavins increases energy expenditure and the expression of metabolic genes [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137809 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137809>.
- [18] LEE M S, SHIN Y, JUNG S, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and mitochondrial biogenesis in brown adipose tissues of diet-induced obese mice [J/OL]. Food & nutrition research, 2017, 61(1): 1325307 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1325307>.
- [19] WILSON M A, SHULITT-HALE B, KALT W, et al. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans* [J]. Aging cell, 2006, 5(1): 59-68.
- [20] LIU F, XIAO Y, JI X L, et al. The cAMP-PKA pathway-mediated fat mobilization is required for cold tolerance in *C. elegans* [J/OL]. Scientific reports, 2017, 7: 638 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00630-w>.
- [21] CARVALHO G B, DRAGO I, HOXHA S, et al. The 4E-BP growth pathway regulates the effect of ambient temperature on *Drosophila* metabolism and lifespan [J]. PNAS, 2017, 114(36): 9737-9742.
- [22] XIAO R, ZHANG B, DONG Y M, et al. A genetic program promotes *C. elegans* longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel [J]. Cell, 2013, 152(4): 806-817.
- [23] ZHOU L, TONG H X, TANG H Q, et al. Fatty acid desaturation is essential for *C. elegans* longevity at high temperature [J/OL]. Mechanisms of ageing and development, 2021, 200: 111586 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111586>.
- [24] WAGNER A E, PIEGHOLDT S, RABE D, et al. Epigallocatechin gallate affects glucose metabolism and increases fitness and lifespan in *Drosophila melanogaster* [J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 30568-30578.
- [25] NIU Y C, NA L X, FENG R N, et al. The phytochemical, EGCG, extends lifespan by reducing liver and kidney function damage and improving age-associated inflammation and oxidative stress in healthy rats [J]. Aging cell, 2013, 12(6): 1041-1049.
- [26] IMRAN A, BUTT M S, ARSHAD M S, et al. Exploring the potential of black tea based flavonoids against hyperlipidemia related disorders [J/OL]. Lipids in health and disease, 2018, 17(1): 57 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0688-6>.
- [27] AIZAWA T, YAMAMOTO A, UENO T. Effect of oral theaflavin administration on body weight, fat, and muscle in healthy subjects: a randomized pilot study [J]. Bioscience biotechnology and biochemistry, 2017, 81(2): 311-315.
- [28] CHO I, SONG H O, CHO J H. Flavonoids mitigate neurodegeneration in aged *Caenorhabditis elegans* by mitochondrial uncou-

pling[J]. Food science & nutrition, 2020, 8(12): 6633-6642.
[29] 金甲, 张凤, 杨玲玲, 等. 线粒体解偶联剂的研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(7): 707-715. JIN J, ZHANG F, YANG L L, et al.

Progress of study on mitochondrial uncoupler[J]. Chinese bulletin of life sciences, 2013, 25(7): 707-715 (in Chinese with English abstract).

Effects of epigallocatechin gallate and theaflavin on temperature tolerance of *Caenorhabditis elegans*

ZHANG Mengting, LI Bin, TIAN Jing

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Environmental Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract In order to investigate the effect and underlying mechanism of representative components of green tea and black tea on nematodes (*Caenorhabditis elegans*) at different temperature, the survival rate of nematodes at 4 °C and 35 °C were quantified in the presence of 0.25, 2.5 and 25 μmol/L epigallocatechin gallate (EGCG) or theaflavin (TF1). Then, fat content and mitochondrial membrane potentials were investigated in nematodes incubated with 25 μmol/L EGCG and TF1 at 4 °C, 20 °C and 30 °C were determined. The results showed that 25 μmol/L EGCG increased the maximum and median lifespan of heat stressed nematodes by 8.15% and 22.44%, respectively, and decreased the maximum and median lifespan of cold stressed nematodes by 20.25% and 17.94%, respectively. 25 μmol/L TF1 had no significant effect on the survival rate of heat-stressed nematodes, but increased the maximum and median lifespan of cold-stressed nematodes by 9.43% and 19.01%, respectively. At 4 °C, both EGCG and TF1 incubation increased the fat content of nematodes and TF1 incubation decreased the mitochondrial membrane potential of nematodes. At 20 °C, EGCG and TF1 showed significant lipid-lowering effect and could significantly improve the mitochondrial activity in senescent nematodes after long-term incubation. At 30 °C, EGCG and TF1 increased the fat content in nematodes. The results indicated that TF1 improves the survival rate of nematodes by promoting mitochondrial thermogenesis rather than fat mobilization under low temperature conditions, whereas EGCG incubation can induce nematode death.

Keywords *Caenorhabditis elegans*; epigallocatechin gallate; theaflavin; temperature tolerance; mitochondrial membrane potential

(责任编辑:边书京)