

胥婷婷,陶明芳,李蓉,等.生姜提取物缓解秀丽隐杆线虫热胁迫的研究[J].华中农业大学学报,2022,41(5):223-231.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.027

生姜提取物缓解秀丽隐杆线虫热胁迫的研究

胥婷婷,陶明芳,李蓉,徐晓云,吴婷

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/
果蔬加工与品质调控湖北省重点实验室,武汉 430070

摘要 为研究生姜提取物(ginger extract, GE)对高温胁迫的影响及机制,建立秀丽隐杆线虫急性热应激(37℃)模型,测定了生姜对热应激下野生型线虫的寿命及运动状态、基因缺失株系的热应激寿命以及不同热应激程度下野生型线虫中与热休克反应相关基因的mRNA表达量。结果显示,相比于对照组(CK),30、60、120 μg/mL的GE处理组分别显著延长野生型线虫热应激寿命16.96%、18.73%、14.44%,显著改善热应激过程中(1 h、2 h、3 h)线虫的运动状态。GE介导的野生型线虫热应激寿命的延长依赖调控热休克反应(heat shock response, HSR)的转录因子*hsf-1*。GE的干预显著上调常温(20℃)下野生型线虫HSR相关基因*hsf-1*、*hsp-90*和*hsp-16.2*的mRNA表达水平以及HSP-16.2的蛋白表达水平。此外,在不同程度热应激(短暂热应激、持续热应激)状态下,GE对野生型线虫体内参与HSR相关基因的mRNA表达水平都具有调节作用。相比于常温(20℃),短暂热应激使野生型线虫*hsf-1*、*hsp-16.2*、*hsp-70*和*hsp-90*显著上调,而GE处理后显著下调;相比于常温(20℃),持续热应激使线虫HSR相关基因下调,而GE处理后*hsp-16.2*显著上调,并且*hsf-1*和*hsp-90*具有上调趋势,表明膳食补充GE在一定程度上可以使参与HSR相关基因的mRNA表达恢复至常态水平。以上结果表明,生姜提取物可通过调节HSR缓解秀丽隐杆线虫热胁迫。

关键词 生姜提取物;耐热性;热休克反应;秀丽隐杆线虫;热胁迫

中图分类号 TS255.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0223-09

持续的高温环境会打破机体的热平衡,破坏机体氧化还原稳态和蛋白质稳态,进一步导致肺、心、肾等器官损伤,甚至引发热相关疾病,如热痉挛、热射病等^[1]。因为环境温度的持续升高,对人体造成不可逆转的伤害,所以对热相关疾病的预防已成为国内外研究热点^[2]。研究表明,膳食干预对预防热应激有一定的效果^[3]。目前,膳食干预对机体耐热性机制的研究主要围绕3个方面:天然产物通过清除高温诱导过量生成的活性氧自由基维持氧化还原稳态、植物化学成分通过调节机体内应答热应激的保护机制——热休克反应(heat shock response, HSR)以及通过缓解高温诱导的炎症反应提高机体耐热性。如咖啡提取物/咖啡因通过上调HSR提高秀丽隐杆线虫耐热性^[4]、姜黄/姜黄素减缓应激诱导的氧化应激损伤并能提高果蝇及C57BL/6J小鼠抗热应激能力^[2]、高丽参在SD大鼠模型中被证实可减轻热应激

引起的炎症反应^[5]。

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe),作为我国传统药食两用资源,具有解表散寒、温中止呕等功效。研究表明,生姜中主要的活性成分是一类具有辛辣味的非挥发性物质,具有3-甲氧基-4-酚羟基苯基结构,统称为姜辣素类化合物。姜辣素类化合物赋予了生姜丰富的生物活性功能,能够调节机体代谢紊乱如降血糖^[6]、降血脂^[7],并能预防神经退行性疾病^[8]、提高抗炎能力^[9]。对于其耐热性的研究,已有报道表明生姜作为家禽饲料中的营养强化剂通过上调机体内抗氧化酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶)活力、降低脂质过氧化标志物丙二醛的含量,从而缓解热胁迫^[10]。但尚未有研究从生姜调节HSR的角度来探究其耐热作用及机制。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)因其具有生命周期短、与人类基因有着40%的同源性以及

收稿日期:2022-05-18

基金项目:华中农业大学自主科技创新基金项目(2662020SPPY009)

胥婷婷, E-mail: xutt@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:吴婷, E-mail: ting.wu@mail.hzau.edu.cn

3 000多株突变株系等优势,广泛用于药物开发以及食品成分的生物活性及分子机制的研究^[11]。此外,基于线虫具有对外界环境变化敏感且能够作出快速的生理反应的特点,可以建立热应激研究模型^[12]。HSR是机体内重要的热应激应答保护机制,其基因在进化上高度保守。热休克因子1(heat shock factor 1, HSF-1/HSF1)是参与HSR的核心转录因子,且在线虫模型中被大量研究^[13]。在高温刺激下,HSF-1可直接被激活^[14],启动下游热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)的快速表达。HSPs作为分子伴侣可以协助蛋白质重新折叠,促进受损蛋白质降解,恢复蛋白质稳态,增强机体对热应激的抵抗能力^[13]。

因此,本研究采用秀丽隐杆线虫模型,从生姜提取物调节HSR的角度探究其对机体应答热应激的作用机制,旨在进一步为生姜提取物缓解热胁迫提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂及试验株系

生姜(乙醇)提取物(ginger extract, GE)购自西安赛邦生物科技有限公司,生产批号为XASB-SJ200825,生产日期为2020年8月25日。

一水合柠檬酸、一水合柠檬酸钾、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、十二水合磷酸氢二钠、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、无水氯化钙、七水合硫酸镁、氢氧化钠、次氯酸钠、无水乙醇、胆固醇、98%福林酚、葡萄糖、苯酚、浓硫酸、碳酸钠、亚硝酸钠、三氯化铝,国药集团化学试剂有限公司;没食子酸、香兰素、芦丁、考马斯亮蓝、牛血清白蛋白,上海源叶生物科技有限公司;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),上海鼎国生物科技有限公司;总RNA提取试剂盒,北京艾德莱生物科技有限公司;cDNA反转录试剂盒、qPCR试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™,日本TaKaRa Bio株式会社;正反引物,北京擎科生物科技有限公司。

野生型线虫株系N2和CL2070 [*(dvl57) hsp16.2::GFP*]购自美国明尼苏达大学秀丽隐杆线虫遗传学中心(*Caenorhabditis* Genetics Center, CGC)。大肠埃希氏菌OP50 (*E. coli* OP50)和PS3551 [*hsf-1(sy441) I*]由西南医科大学罗怀荣教授惠赠。

1.2 GE中姜辣素含量、总酚、总黄酮、总糖、总蛋白含量测定

1)姜辣素含量测定。参照孔繁东等^[15]的方法稍作修改。分别移取250 μL 不同质量浓度(2、4、6、8、10、12、14、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的香兰素标准溶液或稀释不同倍数的样品溶液(溶于DMSO)于5 mL容量瓶中,加入无水乙醇定容至刻度,以无水乙醇为空白对照,在280 nm处测定吸光度值。姜辣素含量计算时需乘以香兰素与姜辣素间的换算系数2.003。

2)总酚含量测定。采用福林-酚法^[16]。分别移取100 μL 不同质量浓度(0、75、125、175、250、325、375、450 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的没食子酸标准溶液或稀释不同倍数的样品溶液(溶于DMSO)于2 mL离心管中,依次加入150 μL 的超纯水、250 μL 98%福林酚后摇匀,再加入375 μL 5%碳酸钠溶液、超纯水1 125 μL ,摇匀,静置60 min,于765 nm处测定吸光度值。

3)总黄酮含量测定。采用亚硝酸钠-三氯化铝法^[17]。分别吸取400 μL 不同质量浓度(0、40、80、160、240、320、400、480、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的芦丁标准溶液或稀释不同倍数的样品溶液(溶于DMSO)于2 mL离心管中,加入80 μL 5% NaNO_2 ,摇匀后静置6 min,再加入80 μL 10%的 AlCl_3 ,摇匀后静置6 min,加入0.8 mL 10% NaOH 溶液,加640 μL 50%乙醇,摇匀,静置15 min,于510 nm处测定吸光度值。

4)总糖含量测定。采用苯酚-硫酸法^[18]。分别将不同质量浓度(0、20、40、80、100、120、160、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的葡萄糖标准溶液或稀释不同倍数的样品溶液(溶于DMSO)放入5 mL离心管,并加入超纯水、6%苯酚、浓硫酸以体积比1:1:1:5混合均匀,冷却静置20 min,于490 nm处测定吸光度值。

5)总蛋白含量测定。采用考马斯亮蓝法^[18]。分别将不同质量浓度(0、10、20、40、60、100、140、180 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的牛血清白蛋白标准溶液或稀释不同倍数的样品溶液(溶于DMSO)放入5 mL离心管,并加入考马斯亮蓝溶液以体积比1:5混合均匀,于595 nm处测定吸光度值。

1.3 秀丽隐杆线虫培养

试验所用线虫的传代和同步化过程以及缓冲液和培养基的配制,参考WormBook (<http://www.wormbook.org/>)。

1)试验所用线虫株系的传代。将所用的株系从已有大量线虫的线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)固体平板中切块转移到已涂布*E. co-*

li OP50的新的NGM板中,于20℃恒温培养箱培养。

2) 试验所用线虫株系同步化。待线虫处于产卵期,用M9缓冲液(pH=7.4)冲洗到2 mL离心管中并离心(20℃,12 000 r/min,1 min)。离心后弃上清,再用M9缓冲液清洗并离心去上清,重复清洗3次。最后1次弃上清后,加入1 mL裂解液,手动震荡至虫体完全裂解后离心(20℃,12 000 r/min,1 min),离心后弃上清,用M9再清洗3次。最后1次离心结束后,弃上清,将离心管底部虫卵转移至涂有*E. coli* OP50的NGM板中,并放置20℃培养箱。根据株系及试验要求选择不同生长时期的幼虫进行试验。

1.4 秀丽隐杆线虫热应激寿命及运动能力试验

将同步化至L4时期的野生型幼虫分别用0(0.1% DMSO作对照)、30、60、120、240、360和480 μg/mL GE在含有6 mg/mL灭活的*E. coli* OP50的S-Complete液体培养基中处理6 d。在成虫第5天,将药物处理后的线虫转移到新的含有M9缓冲液的96孔板中,并对其进行热应激处理,温度为37℃。每隔2 h对其存活率进行记录,直至所有线虫死亡(当线虫对紫外线或强光照射没有反应时,则判定为死亡)。

对暴露于热应激下1、2、3 h的野生型线虫进行运动状态分析。线虫的培养和给药方式与热应激寿命试验中一致。在成虫第5天,将处理后的线虫转移到新的含有M9缓冲液的96孔板中,对其进行热应激处理并在热应激1、2、3 h后分别对其运动状态进行观察,并根据不同的运动状态分为ABC三类。具体是:A类指线虫自发的进行余弦曲线运动;C类指线

虫在受到紫外线或强光刺激下头部或尾部轻微摆动;B类介于A、C之间的运动。

1.5 热休克蛋白HSP-16.2表达量测定试验

将同步化至L1时期转基因株系CL2070(HSP-16.2::GFP)线虫转移至含有6 mg/mL灭活的*E. coli* OP50的S-Complete液体培养基中,并分别加入终质量浓度为0(0.1% DMSO作对照)、30、60和120 μg/mL GE进行处理,于20℃孵育3 d。收集线虫,用M9缓冲液洗涤3次后置于载玻片上,用50 mmol/L叠氮化钠麻醉。利用倒置荧光显微镜对每个处理组的线虫(随机取30只)进行拍摄。通过ImageJ(ImageJ Software, Bethesda, MD, USA)计算CL2070线虫中HSP-16.2的蛋白平均荧光强度,以确定不同药物处理组其相对表达量。

1.6 HSR相关基因mRNA表达量测定试验

将同步化至L4时期的野生型线虫转移至含有6 mg/mL灭活的*E. coli* OP50的S-Complete液体培养基中,用60 μg/mL的GE处理,于20℃孵育3 d。收集线虫并用M9进行洗涤,随后进行热应激。瞬时热应激试验:将线虫在37℃下孵育15 min,再于20℃恢复30 min;持续热应激试验:将线虫在37℃下孵育60 min,再于20℃恢复30 min,随后进行研磨、RNA提取^[4]。以基因*actin-1*作为内源性对照,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算mRNA表达水平的相对变化量。相关基因的引物序列参考qPrimerDB-qPCR Primer Database(<https://biodb.swu.edu.cn/qprimerdb/>)。

表1 秀丽隐杆线虫HSR相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of genes related to heat shock response in *Caenorhabditis elegans*

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer
<i>actin-1</i>	CCAGGAATTGCTGATCGTATGCAGAA	TGGAGAGGGAAGCGAGGATAGA
<i>hsf-1</i>	CCGCAACAAGACTATTCGGG	TGGTGGATGAGGTGGAAGTC
<i>hsp-16.2</i>	CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTC	AGATTCTGAAGCAACTGCACC
<i>hsp-70</i>	AAAATCCCATCCCCAACCTAT	GGAGTTGGAAGTACGTGAT
<i>hsp-90</i>	TGTCCGAACGGAAA	GTCGACCTTCCATGCG

1.7 数据统计与分析

线虫生存曲线用GraphPad Prism 8作图并用SPSS进行log-rank分析,采用ANOVA进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。所有试验进行3次重复,线虫寿命试验的数据以“平均值±标准误差”表示,其余试验数据以“平均值±标准偏差”表示。

2 结果与分析

2.1 GE中姜辣素、总酚、总黄酮、总糖和总蛋白含量

测定GE中姜辣素、总酚、总黄酮、总糖和总蛋白含量,对应标准品所得的标准曲线分别为 $Y=0.031X+0.0652$ ($R^2=0.9988$)、 $Y=0.0023X-0.0262$ ($R^2=0.9965$)、 $Y=0.0055X+0.0071$ ($R^2=0.9981$)、 $Y=$

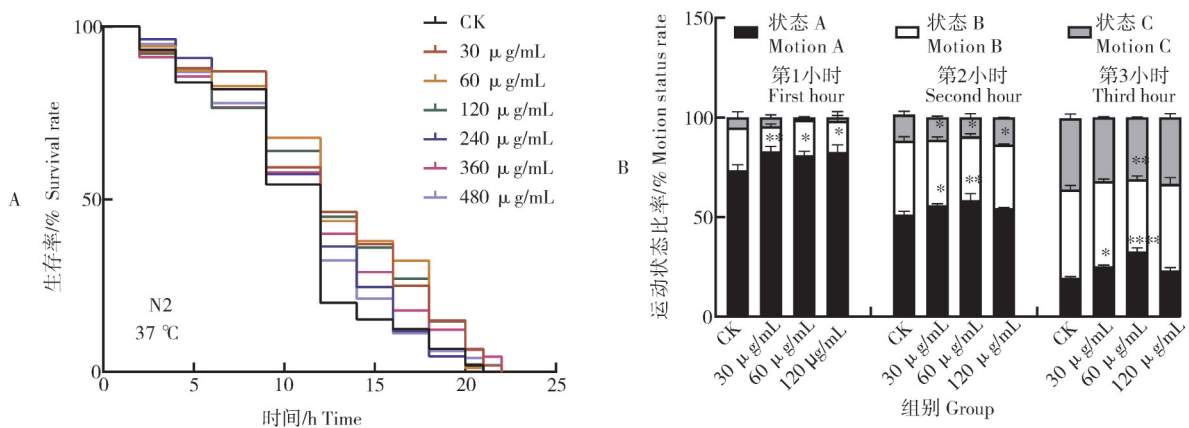
0.0052X-0.1147($R^2=0.9821$), $Y=0.0016X+0.4293$ ($R^2=0.9899$)。根据标准曲线可得,GE中总姜辣素含量为(112.16±0.53) mg/g,总酚含量为(74.03±6.82) mg/g(以没食子酸计),总黄酮含量为(23.45±0.77) mg/g(以芦丁计),总糖含量为(83.32±9.00) mg/g(以葡萄糖计),总蛋白含量为(9.31±0.17) mg/g(以牛血清白蛋白计)。

2.2 GE处理下野生型线虫热应激寿命及运动状态

采用野生型线虫N2株系评估不同浓度GE预处理下的热应激寿命,结果如图1A和表2显示,相比于CK组,低剂量(30、60、120 μg/mL)GE能够显著延长线虫热应激寿命($P<0.05$),高剂量GE处理组(240、360、480 μg/mL)在热应激下将线虫寿命延长了7.00%、8.67%、4.10% ($P>0.05$)。后续试验剂

量确定为能够延长线虫热应激寿命的30、60、120 μg/mL。如表2所示,线虫在30、60、120 μg/mL GE处理后,相比于CK组的(10.73±0.45) h,线虫的平均寿命分别增加到(12.55±0.53)、(12.74±0.59)、(12.28±0.60) h,生存率分别提高了16.96%、18.73%、14.44% ($P<0.05$),表明GE可以延长秀丽隐杆线虫寿命,提高机体耐热性。

采用野生型线虫评估GE处理下热应激3 h期间的运动状态,如图1B所示,随着热应激时间的延长,线虫的弯曲摆动能力下降。相比CK组,热应激前3 h 30、60 μg/mL 药物处理组线虫自由弯曲摆动(A类运动)的比率都显著提高。但是120 μg/mL GE处理组的线虫仅在第1小时自由弯曲摆动率显著提高。与上述热应激寿命测定结果一致,相比于120 μg/mL 剂量组,30和60 μg/mL 处理后线虫的运动状态更佳。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 表示与CK组比较差异显著或极显著。* $P<0.05$ and ** $P<0.01$ indicated a significant or extremely significant difference compared to the CK group.

图1 GE作用下热胁迫野生型线虫的Kaplan-Meier生存曲线图(A)和运动状态变化图(B)

Fig. 1 Kaplan-Meier survival curve (A) and movement state changes (B) of wild-type worms under heat stress with treatment of GE

表2 GE作用下热胁迫野生型线虫的寿命

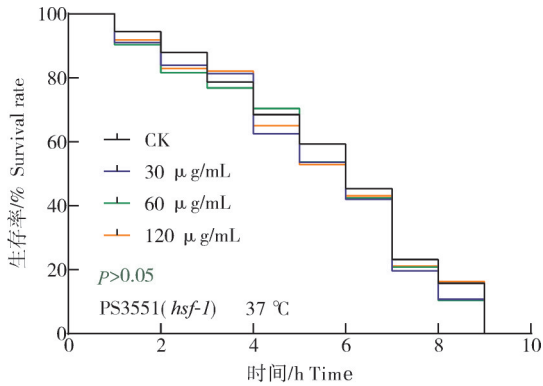
Table 2 Heat-stress lifespan of wild-type worms with treatment of GE

组别 Group	数量 Amount	寿命/h Lifespan	变化率/% Percentage change	P值 P value
CK	105	10.73±0.45a	—	—
30 μg/mL	108	12.55±0.53b	16.96	0.004
60 μg/mL	87	12.74±0.59b	18.73	0.006
120 μg/mL	89	12.28±0.60b	14.44	0.021
240 μg/mL	110	11.48±0.44a	7.00	0.416
360 μg/mL	90	11.66±0.59ab	8.67	0.067
480 μg/mL	99	11.17±0.49a	4.10	0.413

注:同列中不同字母表示组间存在显著差异, $P<0.05$ 。Note: Different letters indicated significant differences between groups, $P<0.05$.

2.3 GE处理下 *hsf-1* 基因缺失突变株热应激寿命

采用 *hsf-1* 基因缺失株系 PS3551 进行热应激寿命试验,结果如图2、表3所示,在GE干预后,未观察到 *hsf-1* 突变体的热应激寿命 ($P>0.05$) 的延长。这表明GE延长秀丽隐杆线虫的热应激寿命依赖 *hsf-1*。



$P>0.05$ 表示与CK组比较无显著差异。 $P>0.05$ indicated no significant difference compared with the CK group.

图2 GE作用下热胁迫 *hsf-1* 基因缺失线虫的Kaplan-Meier生存曲线图

Fig. 2 Kaplan-Meier survival curve of *hsf-1* mutants under heat stress with treatment of GE

表3 GE作用下热胁迫 *hsf-1* 基因缺失线虫的寿命

Table 3 Heat-stress lifespan of *hsf-1* mutants with treatment of GE

组别 Group	数量 Amount	寿命/h Lifespan	变化率/% Percentage change	P值 P value
CK	108	5.37±0.23a	—	—
30 μg/mL	112	5.45±0.23a	1.49	0.342
60 μg/mL	125	5.46±0.22a	1.68	0.358
120 μg/mL	123	5.55±0.22a	3.35	0.777

注:同列中相同字母表示组间无显著差异, $P>0.05$ 。Note: The same letter indicated no significant differences between groups, $P>0.05$.

2.5 GE处理下野生型线虫不同程度热应激 HSR 相关基因的 mRNA 表达

采用野生型线虫测定了GE处理后不同热应激程度 HSR 基因的表达变化量。图4 A是GE对短暂热应激(37 °C, 15 min)下的基因转录水平,与CK组相比,热应激使 *hsf-1*、*hsp-16.2*、*hsp-70* 和 *hsp-90* 的 mRNA 表达量显著上调($P<0.05$),机体内的保护机制响应应答,而在GE作用下,热休克相关基因的表达水平相比于模型组显著降低($P<0.05$)。随着热应激时间的延长(37 °C, 60 min),相比于CK组,热应激使热休克相关基因 mRNA 表达水平降低,机体的 HSR 很大程度被抑制,但在GE作用下,总体上热休克相关基因相比于模型组具有上调趋势,

2.4 GE 作用下野生型线虫 HSR 相关基因的 mRNA 以及 HSP-16.2 蛋白表达

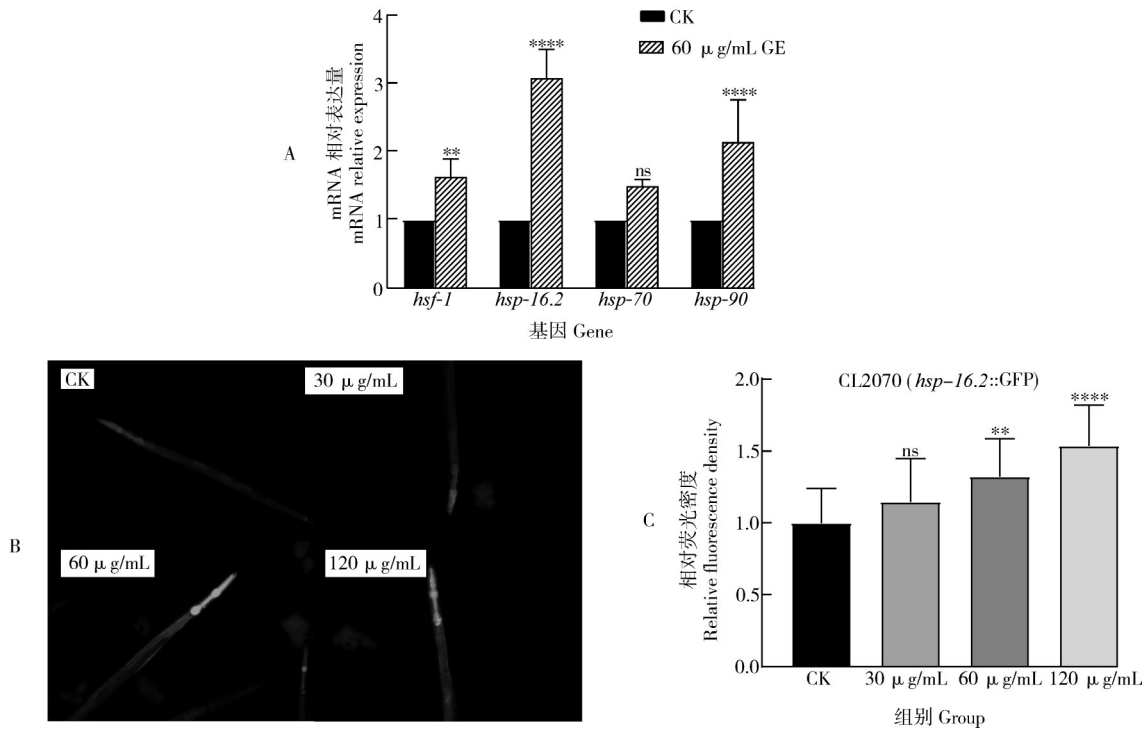
野生型线虫在GE处理后,其常温下(20 °C) HSR 相关基因的 mRNA 表达变化量如图3A所示。GE将 *hsf-1* 的 mRNA 表达量上调1.63倍($P<0.05$)。此外,该基因调控的小热休克蛋白 *hsp-16.2* 以及其他热休克蛋白家族 *hsp-90* 的 mRNA 量分别被显著上调3.07、2.14倍($P<0.05$), *hsp-70* 具有上调的趋势(1.47倍),但差异不显著。

利用绿色荧光蛋白标记 HSP-16.2 的转基因株系 CL2070,从蛋白表达水平分析GE对 HSP-16.2 的调节作用,结果如图3B、3C所示,60、120 μg/mL GE 处理分别使线虫 HSP-16.2 的表达量显著提高1.32、1.54倍($P<0.05$)。该结果表明GE能促进常态下线虫 HSP-16.2 表达,因此在一定程度上有助于促进蛋白质稳态。综上所述,GE显著上调常态下 *hsf-1*、*hsp-90* 和 *hsp-16.2* 的 mRNA 表达量以及 HSP-16.2 蛋白的表达,使其具有调节热应激状态下线虫胞内稳态的潜力。

hsf-1 下游基因 *hsp-16.2* 显著上调(如图4B)。结果表明,GE的干预对不同程度热应激下的 HSR 相关基因 mRNA 表达都具有调节作用,使其在一定程度恢复到常态下(CK组)的 mRNA 水平,从而维持了胞内 HSR 相关基因转录水平的稳定,由此认为GE是通过调节 HSR 相关基因表达而提高线虫耐热性。

3 讨论

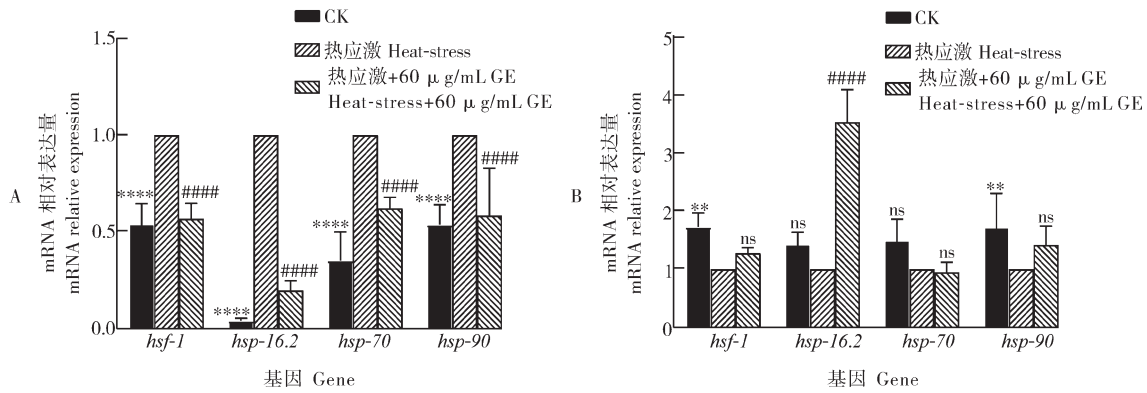
当机体处于高温环境时会出现非特异性应答反应,细胞内稳态、机体的生长代谢都会受到影响进而产生炎症反应,造成组织器官的损伤,甚至导致机体急性死亡。研究表明,许多植物化学成分具有增强



** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, 表示与CK组比较差异极显著。 ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ indicated extremely significant difference compared to the CK group.

图3 GE作用下野生型线虫 *hsf-1*、*hsp-16.2*、*hsp-70*和 *hsp-90* mRNA表达量的变化(A)、HSP-16.2蛋白表达荧光图(B)及HSP-16.2蛋白表达量的变化(C)

Fig.3 Changes of *hsf-1*, *hsp-16.2*, *hsp-70* and *hsp-90* mRNA expression levels (A), HSP-16.2 protein expression fluorescence images (B) and HSP-16.2 protein expression changes in nematodes with treatment of GE (C)



** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 表示CK组与热应激模型组比较差异极显著, #### $P < 0.0001$ 表示GE处理组与热应激模型组比较差异极显著。 ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ indicated extremely significant difference between the CK group and the heat-stress group, #### $P < 0.0001$ indicated extremely significant difference between GE treatment group and the heat-stress group.

图4 GE作用下短暂热胁迫(A)和持续热胁迫(B)野生型线虫 *hsf-1*、*hsp-16.2*、*hsp-70*和 *hsp-90* mRNA表达量的变化

Fig.4 Changes of *hsf-1*, *hsp-16.2*, *hsp-70* and *hsp-90* mRNA expression in wild-type worms under transient heat stress (A) and persistent heat stress (B) with supplement of GE

机体耐热性的作用^[19],因此膳食干预能有效抵御高温实现预保护作用。已有报道表明,生姜能够通过增强热应激下肉鸡的抗氧化能力,提高机体耐热

性^[10]。本研究利用秀丽隐杆线虫,从GE调节HSR角度探究其对急性热胁迫(37 $^{\circ}$ C)的调节作用。存活率是研究秀丽隐杆线虫耐热性的最基本参数。我们

发现 30、60、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GE 都能够显著延长野生型线虫热应激寿命,其中以 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 这一剂量组效果最佳,延长 18.73%。高剂量的生物活性不如低剂量组在天然成分的活性研究中常有报道^[20],主要因为过高剂量可能产生毒副效应。在线虫模型中,多数天然植物提取物可以延长其热应激寿命 10%~20%,如青钱柳多糖提取物^[21]、苦参籽多糖提取物^[22]、绿豆皮提取物^[20]分别将线虫热应激寿命提高了 14.31%、10.00%、10.70%。因此,GE 延长线虫热应激寿命的能力处于较良好水平。

秀丽隐杆线虫中参与调节热应激的信号通路主要包括核激素受体途径、转化生长因子- β 途径以及胰岛素信号通路,其中胰岛素信号通路研究的最为透彻^[23]。在胰岛素信号通路中,HSF-1 是参与调节高温应激的核心转录因子,敲除 *hsf-1* 基因的线虫其热应激寿命显著缩短^[24]。常态下 HSF-1 与 DDL-1/2 以及 HSB-1 形成抑制复合物以抑制 HSF-1 的活性,热应激状态下胰岛素信号通路通过调节该复合物将 HSF-1 解离,HSF-1 被激活后参与 HSR,从而增强机体对热应激的抵抗能力^[13]。我们发现 GE 对线虫寿命的延长依赖 *hsf-1*,并且能够上调常态下 (20 $^{\circ}\text{C}$) HSR 相关基因 mRNA 表达水平。此外,有报道称 *hsf-1*、*hsp-16.2* 以及 *hsf-70* 过表达都能够延长线虫寿命,维持与衰老相关蛋白的构象以及减少毒蛋白的积累^[25],这表明生姜的干预有利于维持蛋白稳态,具有对高温刺激 (37 $^{\circ}\text{C}$) 线虫存在预保护作用的潜力。

已有研究表明线虫机体内的应答保护机制在常态下处于基线水平,环境温度的改变将其激活以维持内稳态,稳态恢复后该调控途径恢复至基线水平。短暂的热应激可以提高机体对不良环境的抵抗,而持续的热应激使体内保护机制崩溃,从而造成机体内稳态失衡^[26]。另外,不同热应激程度下药物对线虫的 HSR 相关基因表达的调节不同,如咖啡提取物^[4] (主效成分为咖啡因) 作用于短暂热应激 (33 $^{\circ}\text{C}$, 15 min), HSR 相关基因上调,而香椿子提取物^[27] 在较长时间热应激 (35 $^{\circ}\text{C}$, 3 h), HSR 相关基因下调。基于此,本试验探究了不同应激程度 GE 对热胁迫的缓解作用。在本试验中,GE 的干预使短时热应激 HSR 相关基因表达下调,这可能是由于常态下 *hsf-1*、*hsp-16.2* 及 *hsp-90* 等基因上调实现了预保护,使得瞬时的急性热应激下相关基因仍处于常态水平,该结

果与高丽参介导热应激 SD 大鼠中热休克相关基因的调节趋势一致^[5]。随着热应激时间的延长,GE 预处理下秀丽隐杆线虫中 HSR 相关基因表达上调,本结果与上述两篇报道相反^[4,27]。分析认为可能是热应激温度以及时间导致的差异,相较于 33 $^{\circ}\text{C}$ 及 35 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 对于线虫是极端高温,不同温度下线虫对 HSR 相关基因的影响存在差异^[28]。急性热应激下,线虫机体内稳态失衡同时保护机制响应应答,随着热应激时间的延长,机体稳态被彻底破坏,HSR 失效,膳食补充 GE 促进维持机体内转录水平的稳态。综上所述,GE 通过调节 HSR 缓解热胁迫发挥预保护作用,增强机体的耐热性。

本研究采用线虫模型评价了 GE 的耐热性,并围绕热休克反应途径探究了其对热应激的调控机制,后续仍需进一步确定 GE 中通过调节 HSR 发挥耐热性作用的主效成分,以及 GE 对热应激诱发机体内活性氧过量积累造成的氧化应激和热应激引发机体炎症造成组织器官损伤的影响。

参考文献 References

- [1] GAUER R, MEYERS B K. Heat-related illnesses[J]. American family physician, 2019, 99(8): 482-489.
- [2] 陈勇. 姜黄素对果蝇和小鼠应激反应的影响及分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019. CHEN Y. Effects of curcumin on the stress responses and molecular mechanisms in *Drosophila* and mice[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [3] RHOADS R P, BAUMGARD L H, SUAGEE J K, et al. Nutritional interventions to alleviate the negative consequences of heat stress[J]. Advances in nutrition, 2013, 4(3): 267-276.
- [4] BRUNQUELL J, MORRIS S, SNYDER A, et al. Coffee extract and caffeine enhance the heat shock response and promote proteostasis in an HSF-1-dependent manner in *Caenorhabditis elegans* [J]. Cell stress and chaperones, 2018, 23(1): 65-75.
- [5] SONG J H, KIM K J, CHOI S Y, et al. Korean ginseng extract ameliorates abnormal immune response through the regulation of inflammatory constituents in Sprague Dawley rat subjected to environmental heat stress[J]. Journal of ginseng research, 2019, 43(2): 252-260.
- [6] KUMAR A, SUNDARAM K, TENG Y, et al. Ginger nanoparticles mediated induction of Foxa2 prevents high-fat diet-induced insulin resistance[J]. Theranostics, 2022, 12(3): 1388-1403.
- [7] CHENG Z, XIONG X Y, ZHOU Y, et al. 6-gingerol ameliorates metabolic disorders by inhibiting hypertrophy and hyperplasia of adipocytes in high-fat-diet induced obese mice [J/OL]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2022, 146: 112491 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112491>.

- [8] ARCUSA R, VILLANO D, MARHUENDA J, et al. Potential role of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in the prevention of neurodegenerative diseases [J/OL]. *Frontiers in nutrition*, 2022, 9: 809621 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.809621>.
- [9] LASHGARI N, MOMENI ROUDSARI N, KHAYATAN D, et al. Ginger and its constituents: role in treatment of inflammatory bowel disease [J]. *BioFactors*, 2022, 48(1): 7-21.
- [10] REHMAN Z U, CHAND N, KHAN R U. The effect of vitamin E, L-carnitine, and ginger on production traits, immune response, and antioxidant status in two broiler strains exposed to chronic heat stress [J]. *Environmental science and pollution research*, 2017, 24(34): 26851-26857.
- [11] SHEN P Y, YUE Y R, PARK Y. A living model for obesity and aging research: *Caenorhabditis elegans* [J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2018, 58(5): 741-754.
- [12] DAWE A S, SMITH B, THOMAS D W P, et al. A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Bioelectromagnetics*, 2006, 27(2): 88-97.
- [13] CHIANG W C, CHING T T, LEE H C, et al. HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity [J]. *Cell*, 2012, 148(1/2): 322-334.
- [14] JEONG D E, ARTAN M, SEO K, et al. Regulation of lifespan by chemosensory and thermosensory systems: findings in invertebrates and their implications in mammalian aging [J/OL]. *Frontiers in genetics*, 2012, 3: 218 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00218>.
- [15] 孔繁东, 王恋峰, 祖国仁, 等. 超声波辅助提取姜渣中姜辣素工艺研究 [J]. *中国酿造*, 2010, 29(1): 102-104. KONG F D, WANG L F, ZU G R, et al. Study on the extraction of gingerol in ginger slag with supersonic radiation [J]. *China brewing*, 2010, 29(1): 102-104 (in Chinese with English abstract).
- [16] İNCİLİ G K, KARATEPE P, AKGÖL M, et al. Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation *in vitro* antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks [J/OL]. *Food microbiology*, 2022, 104: 104001 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104001>.
- [17] WANG C T, CHENG D, CAO J K, et al. Antioxidant capacity and chemical constituents of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) at different ripening stages [J]. *Food science and biotechnology*, 2013, 22(3): 639-644.
- [18] 阎芙洁. 桑葚花色苷对糖代谢的调控作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018. YAN F J. Study on the beneficial effect and mechanism of mulberry anthocyanins on glucose metabolism regulation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [19] KANDASAMY S, FAN D, SANGHA J S, et al. Tasco® , a product of *Ascophyllum nodosum*, imparts thermal stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Marine drugs*, 2011, 9(11): 2256-2282.
- [20] 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.
- [21] LIN C X, SU Z X, LUO J, et al. Polysaccharide extracted from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja enhanced stress resistance in *Caenorhabditis elegans* via *skn-1* and *hsf-1* [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 143: 243-254.
- [22] ZHANG Y, MI D Y, WANG J, et al. Constituent and effects of polysaccharides isolated from *Sophora moorcroftiana* seeds on lifespan, reproduction, stress resistance, and antimicrobial capacity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Chinese journal of natural medicines*, 2018, 16(4): 252-260.
- [23] RODRIGUEZ M, SNOEK L B, DE BONO M, et al. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging [J]. *Trends in genetics*, 2013, 29(6): 367-374.
- [24] PRAHLAD V, CORNELIUS T, MORIMOTO R I. Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons [J]. *Science*, 2008, 320(5877): 811-814.
- [25] KUMSTA C, HANSEN M. Hormetic heat shock and HSF-1 overexpression improve *C. elegans* survival and proteostasis by inducing autophagy [J]. *Autophagy*, 2017, 13(6): 1076-1077.
- [26] LAMECH L T, HAYNES C M. The unpredictability of prolonged activation of stress response pathways [J]. *Journal of cell biology*, 2015, 209(6): 781-787.
- [27] 李孝丽. 香椿子不同部位提取物对秀丽隐杆线虫热应激的防护作用研究 [D]. 阜阳: 阜阳师范大学, 2020. LI X L. The protective effect of extracts from different parts of *Toona sinensis* furits on heat stress of *C. elegans* [D]. Fuyang: Fuyang Normal University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [28] ZEVIAN S C, YANOWITZ J L. Methodological considerations for heat shock of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Methods*, 2014, 68(3): 450-457.

Study on alleviating thermal stress of *Caenorhabditis elegans* by ginger extract

XU Tingting, TAO Mingfang, LI Rong, XU Xiaoyun, WU Ting

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education/Hubei Key
Laboratory of Fruit & Vegetable Processing & Quality Control, Wuhan 430070, China

Abstract To explore the effect and mechanism of ginger extract (GE) on high temperature stress, an acute heat stress (37 °C) model of *Caenorhabditis elegans* was established. The lifespan and movement status of wild-type nematodes, the lifespan of mutants under acute heat stress and the mRNA expression of genes related to heat shock response (HSR) in wild-type nematodes under different degree of heat stress after GE treatment were measured. The results showed that compared with the control group (CK), 30, 60 and 120 µg/mL GE treatment significantly prolonged the heat-stress lifespan of wild-type nematodes by 16.96%, 18.73% and 14.44%, respectively, and significantly improved the movement status of worms at 1st, 2nd, and 3rd hour under heat stress. GE-mediated extension of heat-stress lifespan in wild-type nematodes depended on the transcription factor *hsf-1*, which regulated the heat shock response. GE intervention significantly up-regulated the mRNA expression of the HSR-related genes, *hsf-1*, *hsp-90*, *hsp-16.2*, and the protein expression of HSP-16.2 in wild-type nematodes at 20 °C. Besides, GE had a regulatory effect on the expression levels of HSR-related genes in wild-type nematodes with different degrees of heat stress (transient heat stress, continuous heat stress). Compared with normal temperature (20 °C), transient heat stress significantly up-regulated the expression of *hsf-1*, *hsp-16.2*, *hsp-70* and *hsp-90* in nematodes, while GE treatment significantly down-regulated the expression of HSR-related genes. Compared with normal temperature (20 °C), continuous heat-stress down-regulated the expression of HSR-related genes in nematodes, and GE treatment significantly up-regulated the expression of *hsp-16.2* and the expression of *hsf-1* and *hsp-90* showed an up-regulation trend, indicating that GE treatment reversed the effect of heat stress on the mRNA expression of HSR-related genes to a certain extent. According to the results above, ginger extract could alleviate heat stress in *C. elegans* by regulating HSR.

Keywords ginger extract; thermal tolerance; heat shock response; *Caenorhabditis elegans*; heat stress

(责任编辑:边书京)