人参-茯苓药对抗衰老活性条件筛选及机制研究Δ

白竹林*，赵大庆，陈静静，曾　婧，白雪媛，王思明#（长春中医药大学吉林省人参科学研究院，长春　130117）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）21-2584-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.05

摘　要　目的　筛选人参-茯苓药对抗衰老的最佳配伍比例及给药条件，并探讨其作用机制。**方法**　制备不同配伍比例（1∶1、1∶2、2∶1、1∶4、4∶1，*m*/*m*）的人参-茯苓药对提取物，并以酿酒酵母为衰老模型生物，采用MTT法绘制酿酒酵母生长曲线，筛选人参-茯苓药对的最佳配伍比例、给药浓度和给药时间点，检测酿酒酵母细胞内抗氧化酶[超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）]活性和活性氧（ROS）、丙二醛（MDA）水平以及三磷酸腺苷（ATP）含量和线粒体膜电位（MMP），检测酿酒酵母细胞内SOD1、CTT1、GSH1、ATP1、MRS1、CDC19 mRNA的表达水平。**结果**　人参-茯苓药对抗衰老的最佳配伍比例为1∶4（*m*/*m*），最佳给药浓度为220 μg/mL，最佳给药时间点为第28 h。人参-茯苓药对1∶4提取物可显著升高酿酒酵母细胞内SOD、POD、CAT活性，ATP含量和MMP以及CTT1、GSH1、MRS1 mRNA表达水平（$P<0.01$），显著降低MDA、ROS水平和SOD1、ATP1、CDC19 mRNA表达水平（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　人参-茯苓药对以1∶4（*m*/*m*）配伍时对酿酒酵母的抗衰老作用较好，其作用机制可能与正向调控酿酒酵母细胞氧化应激以及能量代谢有关。

关键词　人参；茯苓；药对；配伍比例；酿酒酵母；抗衰老；氧化应激；能量代谢

Study on activity conditions screening and mechanism of *Panax ginseng-Poria cocos* pair against aging

BAI Zhulin，ZHAO Daqing，CHEN Jingjing，ZENG Jing，BAI Xueyuan，WANG Siming（Jilin Provincial Academy of Ginseng Science，Changchun University of Chinese Medicine，Changchun 130117，China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To screen the best compatibility ratio and administration conditions of *Panax ginseng-Poria cocos* pair against aging，and investigate its mechanism. **METHODS** *P. ginseng-P. cocos* pair extracts with different compatibility ratios（1∶1，1∶2，2∶1，1∶4，4∶1，*m*/*m*）were prepared；taking *Saccharomyces cerevisiae* as the aging model organism，the *S. cerevisiae* growth curve was drawn by MTT method，the best compatibility ratio，administration concentration and administration time point of *P. ginseng-P. cocos* pair were screened out；the activities of antioxidant related enzymes [superoxide dismutase（SOD），peroxidase（POD），catalase（CAT）]，the levels of reactive oxygen species（ROS）and malondialdehyde（MDA），the content of adenosine triphosphate（ATP），and the mitochondrial membrane potential（MMP）in *S. cerevisiae* cells were detected；mRNA expressions of SOD1，CTT1，GSH1，ATP1，MRS1 and CDC19 were also detected. **RESULTS** The optimal ratio of *P. ginseng-P. cocos* pair for anti-aging activity was 1∶4（*m*/*m*），the optimal administration concentration was 220 μg/mL，and the optimal administration time point was the 28th hour. The extracts of *P. ginseng-P. cocos* pair（1∶4，*m*/*m*）could significantly increase the activities of SOD，POD and CAT，ATP content，MMP，mRNA expression of CTT1，GSH1 and MRS1（$P<0.01$），but decrease the levels of MDA and ROS，mRNA expressions of SOD1，ATP1 and CDC19（$P<0.05$ or $P<0.01$）. **CONCLUSIONS** *P. ginseng-P. cocos* pair（1∶4，*m*/*m*）has a good anti-aging effect on *S. cerevisiae*，its mechanism may be related to the positive regulation of oxidative stress and energy metabolism of *S. cerevisiae* cell.

KEYWORDS　*Panax ginseng*；*Poria cocos*；drug pair；compatibility ratio；*Saccharomyces cerevisiae*；anti-aging；oxidative stress；energy metabolism

衰老是生物体正常的生理过程，其受体内外多种因素（环境因素、心理因素、遗传因素等）的影响，涉及全身多个器官和系统。根据2020年全国人口普查结果，中国60岁及以上老人有26 402万人，占总人口的18.70%，比十年前的数据增加了5.44%[1]，提示中国人口老龄化进程进一步深化。随着老龄化问题的日益严重，越来越多的学者开始关注抗衰老研究。

目前，用于研究衰老的模型十分广泛，从简单的单细胞生物到复杂的哺乳动物均有所应用，如酿酒酵母、线虫、果蝇、鼠等[2]。酿酒酵母是抗衰老研究中最简单的生物模型，其衰老代谢反应机制与人体细胞非常相似[3]，生长周期短且易于培养，可进行高通量药物活性筛选[4]。基于上述优点，酿酒酵母已被广泛用作研究衰老的模式生物。

中医学认为，衰老是指随着年龄的增长，人体阳气

Δ**基金项目**　国家重点研发计划项目（No.2017YFC1702100）

* **第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药化学。E-mail：bzl299801@163.com

\# **通信作者**　高级实验师，硕士。研究方向：中药大健康产品开发及生物学机制。E-mail：lwsm126030@126.com

下降，气血不足，内脏功能下降，气血阴阳失衡。中医衰老学说包括肾虚衰老说、脾胃虚弱衰老说、气虚血瘀衰老说等[5]。根据中医古籍记载，人参-茯苓药对是一种常用的配伍组合，在古代抗衰老方剂中，人参和茯苓配伍的比例排在第1位，二者配伍组合出现了146次[6—7]。《神农本草经》记载“人参主补五脏，久服轻身延年”[8]。研究表明，茯苓具有安魂、养神、延年的作用[9]。目前关于人参、茯苓二者配伍抗衰老的相关研究较少，且作用机制尚不明确。基于此，本研究以酿酒酵母为衰老模型生物，筛选人参-茯苓药对抗衰老的最佳配伍比例、给药浓度和给药时间点，通过测定抗氧化酶活性，活性氧（reactive oxygen species，ROS）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）水平，三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）含量和线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP），以及氧化应激与能量代谢相关基因mRNA表达水平，初探人参-茯苓药对抗衰老作用机制，以期为人参-茯苓药对治疗由衰老导致的疾病提供实验参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有innova40型全温振荡培养箱、Eppendorf AG型高速离心机（德国Eppendorf公司），AB135-S型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司），infinite M200PRO型酶标仪（瑞士TECAN公司），SCIENTZ型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司），CFX型实时荧光定量聚合酶链式反应（qPCR）仪（美国Bio Rad公司）。

1.2 主要药品与试剂

人参、茯苓购自吉林省长春市宏检大药房（批号分别为20210326、20210415），经长春中医药大学中药鉴定教研室王哲副教授鉴定为真品；磷酸盐缓冲液（PBS）购自美国Hyclone公司（批号AC10257442）；YPD液体培养基、MTT、卡那霉素、酵母破壁酶、过氧化氢酶（catalase，CAT）检测试剂盒、过氧化物酶（peroxidase，POD）检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司（批号分别为626J031、1015D052、325P0414、20201130、20210924、20211009）；BCA蛋白定量试剂盒、ROS检测试剂盒、MDA检测试剂盒、MMP检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司（批号分别为070721211011、061821211119、073120201113、020421210406）；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）检测试剂盒、ATP含量检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所（批号分别为20210830、20190708）；总RNA提取试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司（批号W9113）；RNA逆转录试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™试剂盒均购自日本Takara公司（批号分别为AK71647A、AJG1875A）；目标基因*TUB*1、*SOD*1、*CTT*1、*GSH*1、*ATP*1、*MRS*1、*CDC*19由长春库美生物科技有限公司合成，引物序列和扩增产物长度见表1。

表1 PCR引物序列和扩增产物长度

基因	序列（5’→3’）	扩增产物长度/bp
*TUB*1	上游：CCAAGGGCTATTTACGTGGA	117
	下游：GGTGTAATGGCCTCTTGCAT	
*SOD*1	上游：CCGAATCCGAGCCAACC	115
	下游：TAACGACGCTTCTGCCTACAA	
*CTT*1	上游：TCATCACCCATACGCTTCT	118
	下游：GGACATTTGTAACCCACATTCT	
*GSH*1	上游：GCTGTTCGTGCTTACAAGTGAC	118
	下游：ATGCCTCCAAATCCGTTCT	
*ATP*1	上游：AACTGCTTTGCCTGTTATTGAA	115
	下游：GCGGAACCGACACGAG	
*MRS*1	上游：ACCCTTCCATTTCTGTACCTC	118
	下游：AAGTTTCCAGCCTTTATCCA	
*CDC*19	上游：AGAAGAACCTCCATCATT	113
	下游：AGACTTGTGGTATTCGTA	

1.3 菌种

本研究所用酿酒酵母BY4742购自武汉淼灵生物科技有限公司。

2 方法

2.1 人参-茯苓药对提取物的制备

笔者查阅相关文献发现，人参、茯苓在临床上的常用配伍比例为1∶1、1∶2和1∶4（*m*/*m*，下同）[10—11]，故本研究设置人参、茯苓的配伍比例为1∶1、1∶2、2∶1、1∶4、4∶1。将人参、茯苓分别粉碎过60目筛后，按1∶1、1∶2、2∶1、1∶4、4∶1混匀备用，每份50 g。取混匀后的药材粉末加10倍量水（mL/g，下同）煎煮2 h，过滤；滤渣加8倍量水煎煮1.5 h，过滤；合并2次滤液，以5 000 r/min离心10 min，取上清液，浓缩，烘干，即得不同配伍比例的人参-茯苓药对提取物（得率分别为14.83%、11.03%、16.07%、7.74%、22.06%）。另外，同法制备人参、茯苓单味药材提取物，得率分别为28.36%、2.46%。

2.2 酿酒酵母的培养及生长曲线绘制

将酿酒酵母以平板划线方式在YPD固体培养基上培养，于28 ℃培养箱中倒置培养48 h活化。取活化后的单菌落置于5 mL YPD液体培养基中（培养基中加入50 mg/mL卡那霉素5 μL），于28 ℃、180 r/min培养箱中扩大培养，再进行二次扩大培养，使接种量为2%[12]。取经二次扩大培养后的菌液，以2%的接种量接种于新的培养基中，置于28 ℃、180 r/min培养箱中培养，并将此时记为0 h（初始接种期），每隔4 h取样。孔板中加入不同培养时间的酿酒酵母菌液30 μL，再加420 μL培养基，采用MTT法于600 nm波长处测定样品吸光度值，以培养时间为横坐标、吸光度值×稀释倍数为纵坐标绘制生长曲线，以确认酿酒酵母进入衰老期的时间点。

2.3 人参-茯苓药对最佳配伍比例和给药条件的筛选

2.3.1 最佳配伍比例的筛选 笔者参考文献[13]方法，先将不同配伍比例的人参-茯苓药对提取物的给药浓度

设置为180 μg/mL，给药时间点设置为第16 h。取“2.2”项下经二次扩大培养的酿酒酵母菌液，按2%的接种量接种于新的培养基中（此时开始计时，下同），培养至第16 h时，分为空白对照组和不同配伍比例（1∶1、1∶2、2∶1、1∶4、4∶1）的人参-茯苓药对提取物组，空白对照组加入等体积无菌水，给药组分别加入180 μg/mL不同配伍比例的人参-茯苓药对提取物，继续培养至第96 h，取样；采用MTT法测定细胞吸光度值（吸光度值越大，表明细胞存活率越高），以筛选最佳配伍比例。实验重复3次。

2.3.2 最佳给药浓度的筛选 参考文献[14]方法，将给药时间点设置为第16 h，人参-茯苓药对1∶4提取物（根据“2.3.1”项下结果确定）的给药浓度设置为100、140、180、220、260、300 μg/mL。取“2.2”项下经二次扩大培养的酿酒酵母菌液，按2%的接种量接种于新的培养基中，培养至第16 h时，分为空白对照组和人参-茯苓药对1∶4提取物不同给药浓度组，空白对照组加入等体积无菌水，给药组分别加入不同浓度的人参-茯苓药对1∶4提取物，继续培养至第96 h，取样；采用MTT法测定细胞吸光度值，以筛选最佳给药浓度。实验重复3次。

2.3.3 最佳给药时间点的筛选 选择“2.3.1”“2.3.2”项下筛选出的最佳配伍比例和给药浓度，将给药时间点设置为第16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88 h。取“2.2”项下经二次扩大培养的酿酒酵母菌液，按2%的接种量接种于新的培养基中，分为空白对照组和不同给药时间点组，然后分别培养至上述时间点时给药，继续培养至第96 h，取样；采用MTT法测定细胞吸光度值，以筛选最佳给药时间点。实验重复3次。

2.4 酿酒酵母细胞内抗氧化酶活性及ROS、MDA水平的测定

2.4.1 分组及给药 取“2.2”项下经二次扩大培养的酿酒酵母菌液，按2%的接种量接种于新的培养基中，培养至第28 h时，分为空白对照组、人参-茯苓药对1∶4提取物组（220 μg/mL）、人参单药组（220 μg/mL）、茯苓单药组（220 μg/mL）。空白对照组加入等体积无菌水，各给药组分别加入相应药物，继续培养至第96 h后，取样进行后续实验。

2.4.2 粗酶液的制备 取“2.4.1”项下各组酿酒酵母菌液500 μL，以3 000 r/min离心5 min，吸弃培养基；沉淀用PBS洗涤3次后，加入500 μL PBS，置于冰水浴中超声（功率300 W，工作9 s，间歇3 s，总时间为5 min）破碎，然后于4 ℃条件下以12 000 r/min离心10 min，取上清液（即粗酶液），采用BCA法测定蛋白浓度后，于－20 ℃保存备用。

2.4.3 酿酒酵母细胞内SOD、POD、CAT水平及MDA水平的检测 取“2.4.2”项下各组酿酒酵母细胞粗酶液适量至96孔板中，每组设3个复孔，按照试剂盒说明书方法检测细胞内抗氧化酶（SOD、POD、CAT）活性及MDA水平。实验重复3次。

2.4.4 酿酒酵母细胞内ROS水平的检测 取“2.4.1”项下各组酿酒酵母菌液50 μL，以3 000 r/min离心5 min，吸弃培养基；沉淀用PBS洗涤3次后，加入DCFH-DA染色液500 μL，置于28 ℃培养箱中孵育30 min。离心弃去染色液，以PBS洗涤细胞3次后，用500 μL PBS重悬，取100 μL重悬液加入荧光板中，采用荧光酶标仪检测各组细胞内ROS的水平。实验重复3次。

2.5 酿酒酵母细胞内ATP含量及MMP的测定

2.5.1 ATP含量的测定 取“2.4.1”项下各组酿酒酵母菌液50 μL，以3 000 r/min离心5 min，吸弃培养基；沉淀用PBS洗涤3次后，加入酵母破壁酶，于30 ℃孵育2 h，再离心除去上清液，沉淀用PBS清洗3次；加入200 μL裂解液涡旋5 s，反复3次，于4 ℃条件下以12 000 r/min离心5 min，取上清液按照试剂盒说明书方法操作，检测ATP含量。实验重复3次。

2.5.2 MMP的测定 取“2.4.1”项下各组酿酒酵母菌液50 μL，以3 000 r/min离心5 min，吸弃培养基；沉淀用PBS洗涤3次后，加入2 μmol/L罗丹明123溶液500 μL，于28 ℃培养箱中避光孵育30 min；离心除去上清液，沉淀用PBS洗涤3次后，加入500 μL PBS重悬，采用流式细胞仪检测MMP。实验重复3次。

2.6 酿酒酵母细胞内氧化应激与能量代谢相关基因mRNA表达水平的测定

取“2.4.1”项下各组酿酒酵母菌液5 mL，用Trizol法提取总RNA，利用反转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA，再以cDNA为模板，进行PCR。PCR反应体系（共25 μL）为SYBR 12.5 μL，DEPC水8 μL，cDNA模版2.5 μL，上、下游引物各1 μL。反应条件为95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸15 s，共40个循环。以TUB1为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法定量分析SOD1、CTT1、GSH1、ATP1、MRS1、CDC19 mRNA的表达水平。实验重复3次。

2.7 统计学方法

数据采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析，计量资料均采用$\bar{x} \pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 酿酒酵母的生长曲线

由图1可知，第0～4 h时为酿酒酵母的迟滞期，第4～16 h时为对数生长期，16 h以后进入稳定期，第68 h时到达拐点，酿酒酵母开始进入衰老期，直至第96 h左右酵母细胞数量趋于稳定，因此选择第96 h作为本实验的检测时间点。

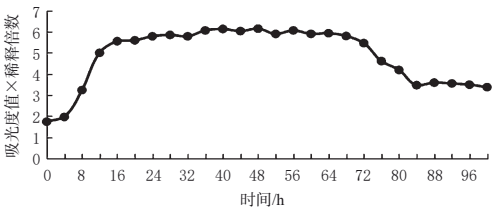


图1　酿酒酵母的生长曲线

3.2　人参-茯苓药对最佳配伍比例和给药条件

3.2.1　最佳配伍比例　与空白对照组（0.46±0.02）比较，人参-茯苓药对2∶1提取物组（0.58±0.06）和人参-茯苓药对1∶4提取物组（0.78±0.03）的吸光度值均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），且后者的吸光度值更大，提示酿酒酵母细胞的存活率更高。由此可知，人参、茯苓的最佳配伍比例为1∶4。

3.2.2　最佳给药浓度　与空白对照组（5.36±0.12）比较，人参-茯苓药对1∶4提取物220 μg/mL组（7.61±0.13）和人参-茯苓药对1∶4提取物300 μg/mL组（6.52±0.17）的吸光度值均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），且前者的吸光度值更大（即酿酒酵母细胞的存活率更高）、给药浓度更小。由此可知，人参-茯苓药对1∶4提取物的最佳给药浓度为220 μg/mL。

3.2.3　最佳给药时间点　与空白对照组（8.22±0.24）比较，第28 h组（10.55±0.08）和第64 h组（8.71±0.06）的吸光度值均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），且前者吸光度值更大，提示酿酒酵母细胞的存活率更高。由此可知，最佳给药时间点为第28 h。

3.3　酿酒酵母细胞内抗氧化酶活性及MDA、ROS水平

与空白对照组比较，人参-茯苓药对1∶4提取物组酿酒酵母细胞内抗氧化酶SOD、POD、CAT活性均显著升高（$P<0.01$），MDA、ROS水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；人参单药组酿酒酵母细胞内POD、CAT活性显著升高（$P<0.05$）；茯苓单药组酿酒酵母细胞内SOD、POD、CAT活性均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

表2　各组酿酒酵母细胞内抗氧化酶活性及MDA、ROS水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	SOD/（U/mg prot）	POD/（U/mg prot）	CAT/（U/mg prot）	MDA/（μmol/mg prot）	ROS
空白对照组	63.70±1.42	4.97±0.07	0.65±0.03	0.88±0.01	4 155.77±137.73
人参-茯苓药对1∶4提取物组	96.22±1.29[a]	14.09±0.12[a]	8.12±0.17[a]	0.50±0.08[a]	3 553.84±261.97[b]
人参单药组	72.21±2.57	10.21±0.12	4.38±0.19[b]	0.55±0.06	3 992.93±246.53
茯苓单药组	78.83±0.84[b]	13.06±0.08[a]	2.97±0.08[a]	0.74±0.03	4 082.47±47.66

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$

3.4　酿酒酵母细胞内ATP含量及MMP水平的测定结果

与空白对照组比较，人参-茯苓药对1∶4提取物组酿酒酵母细胞内ATP含量及MMP均显著升高（$P<0.01$）；人参单药组和茯苓单药组酿酒酵母细胞内ATP含量显著升高（$P<0.05$）。结果见表3、图2。

表3　各组酿酒酵母细胞内ATP含量及MMP的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	ATP/（nmoL/mg）	MMP/Hz
空白对照组	153.41±15.78	165.98±10.08
人参-茯苓药对1∶4提取物组	863.32±23.59[a]	367.30±18.90[a]
人参单药组	746.52±18.13[b]	223.40±8.87
茯苓单药组	689.37±11.19[b]	226.48±9.99

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$

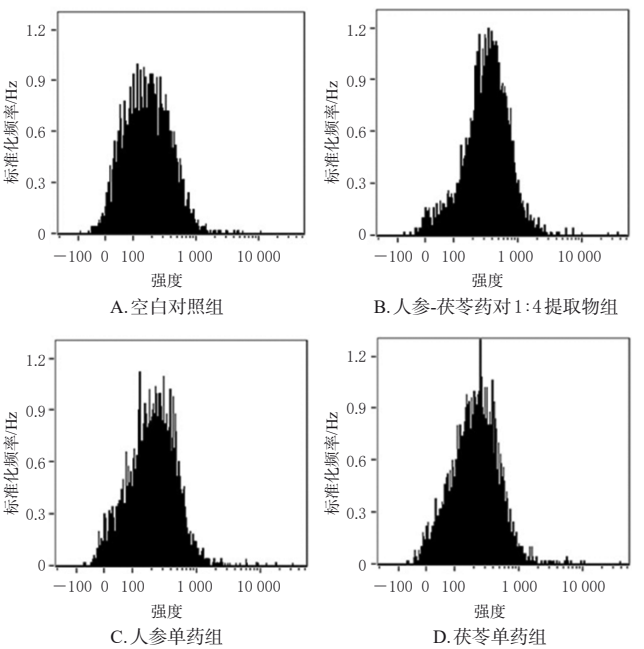


图2　各组酿酒酵母细胞内MMP的荧光强度图

3.5　酿酒酵母细胞内氧化应激与能量代谢相关基因mRNA表达水平的测定结果

与空白对照组比较，人参-茯苓药对1∶4提取物组酿酒酵母细胞内SOD1、ATP1、CDC19 mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），CTT1、GSH1、MRS1 mRNA的表达水平均显著升高（$P<0.01$）；人参单药组和茯苓单药组酿酒酵母细胞内SOD1（茯苓单药组除外）、ATP1 mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表4。

表4　各组酿酒酵母细胞内氧化应激与能量代谢相关基因mRNA表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	SOD1 mRNA	CTT1 mRNA	GSH1 mRNA	ATP1 mRNA	MRS1 mRNA	CDC19 mRNA
空白对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
人参-茯苓药对1∶4提取物组	0.61±0.01[a]	2.50±0.12[a]	1.71±0.18[a]	0.31±0.01[a]	1.40±0.05[a]	0.49±0.01[b]
人参单药组	0.63±0.01[b]	0.97±0.01	1.40±0.05	0.37±0.06[a]	1.09±0.11	0.74±0.04
茯苓单药组	0.91±0.02	1.41±0.39	1.15±0.09	0.68±0.02[b]	0.82±0.01	0.95±0.02

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$

4　讨论

人参和茯苓均具有抗衰老作用，在古代许多方剂中均有应用，且人参-茯苓药对是抗衰老最常见的配伍。目前，大多数学者研究的是人参或茯苓中某种化学成分的抗衰老作用，如：人参总皂苷对果蝇有抗衰老作用；人参皂苷Rg_1可在造血干/祖细胞连续移植中延缓细胞衰

老；人参皂苷Re可修复自然衰老大鼠的学习记忆能力；人参多糖可通过抑制ROS表达延缓细胞衰老；茯苓多糖可通过清除自由基实现抗衰老作用；茯苓水提取物可抑制人成纤维细胞HS68的衰老凋亡；茯苓酸可延缓人肺成纤维细胞WI-38的衰老，等等[15—21]。基于此，笔者首先对人参、茯苓的配伍比例进行筛选，结果发现，当人参、茯苓的质量比为1∶4时，酿酒酵母细胞的存活率最高；再通过进一步筛选，得到人参-茯苓药对1∶4提取物的最佳给药浓度为220 μg/mL、最佳给药时间点为第28 h。

相关研究表明，氧化反应可为生命体提供能量，该反应过程中产生的ROS越高，则抗氧化能力越弱[22]。因此，ROS的清除对机体具有重要作用。清除ROS的过程常需要一系列抗氧化酶的参与，其中就包括SOD、POD和CAT等[23]。MDA是脂质过氧化反应中的重要标志物，可间接反映细胞遭受自由基损害的严重程度[24]。本研究发现，经人参-茯苓药对1∶4提取物干预后，酿酒酵母细胞内抗氧化酶SOD、POD、CAT活性均显著升高，ROS和MDA水平均显著降低，这表明人参-茯苓药对1∶4提取物可缓解酿酒酵母细胞内的氧化应激程度。

酿酒酵母中的抗氧化活性基因主要有*SOD*1、*CTT*1、*GSH*1等[25]。*SOD*1基因编码铜/锌过氧化物歧化酶，可将氧自由基转化为H_2O_2，再进一步被机体清除[26]。*CTT*1基因的高表达可抵御氧化损伤；谷胱甘肽具有抗氧化作用，*GSH*1是编码谷胱甘肽合成酶的基因，对谷胱甘肽的合成具有重要作用[27]。本研究发现，经人参-茯苓药对1∶4提取物干预后，酿酒酵母细胞中*CTT*1、*GSH*1 mRNA的表达水平均显著升高，*SOD*1 mRNA的表达水平显著降低，这进一步说明人参-茯苓药对1∶4提取物可通过正向调控氧化应激相关基因的表达来发挥抗衰老的作用。

衰老与细胞凋亡密切相关，在衰老过程中伴随着细胞凋亡、坏死等。衰老细胞内ATP含量下降，MMP会随着细胞状态的改变而发生改变，MMP的丢失被认为是早期凋亡的特征之一[28]。线粒体是能量代谢的主要场所，ATP合酶是线粒体氧化磷酸化的关键酶，其功能缺陷会导致能量代谢障碍，从而引起细胞衰老。*ATP*1基因是调控ATP酶的α亚基，其水平下调可以促进ATP酶的合成，从而维持细胞能量代谢稳定[29]；*CDC*19基因可调控丙酮酸脱氢酶激酶，其水平下调可以增加ATP的有效循环，对能量代谢有正向作用[30]；*MRS*1是编码细胞线粒体转运蛋白的基因，其高表达有利于维持线粒体的正常结构及功能[31]。本研究发现，经人参-茯苓药对1∶4提取物干预后，酿酒酵母细胞内ATP1、CDC19 mRNA的表达水平均显著降低，ATP含量和MMP以及MRS1 mRNA的表达水平均显著升高，这表明人参-茯苓药对1∶4提取物对酿酒酵母细胞的能量代谢具有正向调控作用。

综上所述，人参-茯苓药对以1∶4的质量比配伍时对酿酒酵母的抗衰老作用较好，其作用机制可能与正向调控酿酒酵母细胞氧化应激以及能量代谢有关。

参考文献

[1] 国家卫生健康委老龄健康司发布《2020年度国家老龄事业发展公报》[J].上海护理，2021，21(11)：19.

[2] 周玉枝，闫明亮，高丽，等.衰老动物模型的研究及其在抗衰老药物活性筛选中的应用[J].中草药，2017，48(6)：1061-1071.

[3] HE C，ZHOU C K，KENNEDY B K. The yeast replicative aging model[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2018，1864(9 Pt A)：2690-2696.

[4] WU Z，SONG L，LIU S Q，et al. Tanshinones extend chronological lifespan in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Microbiol Biotechnol，2014，98(20)：8617-8628.

[5] 孙伟正.中医衰老学说[J].中国老年保健医学，2005，3(1)：3-6.

[6] 郭林.基于数据挖掘技术的茯苓配伍规律研究[D].南宁：广西中医药大学，2017.

[7] 张敏.古代抗衰老方剂用药规律研究[D].北京：中国中医科学院，2018.

[8] 孙卫东.解读《神农本草经》之人参功效[J].人参研究，2017，29(1)：62-64.

[9] 邓桃妹，彭代银，俞年军，等.茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中草药，2020，51(10)：2703-2717.

[10] 陈曦，孙旭.温病四大家医案中的人参用药及药症规律研究[J].长春中医药大学学报，2020，36(6)：1115-1118.

[11] 陈东元.《伤寒杂病论》中人参的配伍规律及其学术思想探析[D].昆明：云南中医学院，2015.

[12] 王敏，廖林锋，孙晓宇，等.延衰组合物对酵母细胞寿命及氧化应激的研究[J].食品研究与开发，2021，42(12)：1-7.

[13] 陈静静，白雪媛，边帅，等.基于酿酒酵母体系的人参皂苷抗衰老活性筛选及评价[J].食品工业科技，2022，43(1)：1-9.

[14] MEDKOUR Y，MOHAMMAD K，ARLIA-CIOMMO A，et al. Mechanisms by which PE21，an extract from the white willow *Salix alba*，delays chronological aging in budding yeast[J]. Oncotarget，2019，10(56)：5780-5816.

[15] 乔巨慧.人参总皂苷对果蝇衰老及相关行为的调控和分子机制研究[D].长春：长春中医药大学，2021.

[16] 周玥，王亚平，王建伟，等.人参皂苷Rg_1在造血干/祖细胞连续移植中对延缓细胞衰老的作用与去乙酰化酶6/核因子-κB信号轴的关系[J].解剖学报，2015，46(5)：623-628.

[17] 赵莹，刘金平，卢丹，等.人参皂苷Re促进自然衰老大鼠学习记忆作用及其机理的研究[J].中药新药与临床药理，2007，18(1)：20-22.

[18] 田耀博，赵大庆，李香艳，等. 人参多糖通过抑制ROS水平和凋亡保护H_2O_2诱导的心肌细胞氧化应激损伤[J]. 华中师范大学学报（自然科学版），2018，52（2）：240-247.
[19] 段超，许刚豪，王冬冬，等. 茯苓发酵液多糖含量分析及其抗氧化性能研究[J]. 日用化学品科学，2016，39（2）：31-34.
[20] FANG C L，PAUL C R，DAY C H，et al. *Poria cocos*（Fuling）targets TGFβ/Smad7 associated collagen accumulation and enhances Nrf2-antioxidant mechanism to exert anti-skin aging effects in human dermal fibroblasts[J]. Environ Toxicol，2021，36（5）：729-736.
[21] LEE S G，KIM M M. Pachymic acid promotes induction of autophagy related to IGF-1 signaling pathway in WI-38 cells[J]. Phytomedicine，2017，36：82-87.
[22] 王郅媛，王友升，李丽萍. 抗衰老研究新模型：酵母细胞活性氧代谢研究进展[J]. 食品科学，2012，33（7）：354-358.
[23] 时桂芹，任菲，谢冰宗，等. 高糖胁迫对酿酒酵母抗氧化活性及代谢的影响[J]. 食品工业科技，2019，40（20）：94-100.
[24] 谢红军，旦增久美，雪嘎，等. 芫参颗粒对正常小鼠抗氧化和抗缺氧作用的研究[J]. 中国药房，2020，31（19）：2371-2375.
[25] 张晓茹. 在发酵过程中，植物乳杆菌对酿酒酵母氧化代谢的调控[D]. 北京：北京化工大学，2020.
[26] 林梦姣，刘德果，赵姣，等. 益肾通癃汤对前列腺癌裸鼠模型Nrf-2、SOD1的影响[J/OL]. 中医药信息，2022.[2022-09-27]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1194.r.20220916.1011.006.
[27] 袁方. 酵母抗老化研究[D]. 大连：大连工业大学，2014.
[28] 刘珂娣，段佳林，苏晶，等. 紫铆花素对PC12细胞氧化应激损伤的保护作用及对线粒体功能的影响研究[J]. 中国药房，2020，31（24）：2974-2981.
[29] 吕妍，张艳丽，张展鹏，等. ATP1通过调节氧化应激促进白念珠菌逃逸巨噬细胞杀伤的研究[J]. 中华皮肤科杂志，2020，53（7）：519-524.
[30] GRIGNASCHI E，CEREGHETTI G，GRIGOLATO F，et al. A hydrophobic low-complexity region regulates aggregation of the yeast pyruvate kinase Cdc19 into amyloid-like aggregates *in vitro*[J]. J Biol Chem，2018，293（29）：11424-11432.
[31] 胡传旺，李巧玉，周朝晖，等. 酱醪细菌菌株的分离及功能分析[J]. 微生物学通报，2017，44（8）：1899-1907.

（收稿日期：2022-03-12　修回日期：2022-09-27）
（编辑：唐晓莲）

（上接第2583页）

[16] ULUBELEN A，TOPCU G，OLÇAL S. Rearranged abietane diterpenes from *Teucrium divaricatum* Subsp. villosum[J]. Phytochemistry，1994，37（5）：1371-1375.
[17] 朱耀魁，胡颖，程妮，等. 瑶药臭屎茉莉化学成分研究[J]. 中药材，2013，36（1）：67-69.
[18] AN J P，HA T K，KIM J，et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the stems of *Akebia quinata*[J]. Molecules，2016，21（8）：E1091.
[19] 于洋，高昊，戴毅，等. 栀子中的木脂素类成分研究[J]. 中草药，2010，41（4）：509-514.
[20] 陈伊蕾，谭俊杰，陆露璐，等. 肾茶水溶性成分的研究[J]. 中草药，2009，40（5）：689-693.
[21] LIU S S，ZHU H L，ZHANG S W，et al. Abietane diterpenoids from *Clerodendrum bungei*[J]. J Nat Prod，2008，71（5）：755-759.
[22] WANG J S，DI Y T，YANG X W，et al. Hydroquinone diglycoside acyl esters from the stems of *Glycosmis pentaphylla*[J]. Phytochemistry，2006，67（5）：486-491.
[23] 卢龙海，杨明，林生，等. 红波罗花醋酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2009，34（14）：1799-1801.
[24] 杨凡，王利霞，唐飞，等. 美花圆叶筋骨草化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发，2019，31（8）：1386-1391.
[25] KUANG H X，TANG Z Q，WANG X G，et al. Chemical constituents from *Sambucus williamsii* Hance fruits and hepatoprotective effects in mouse hepatocytes[J]. Nat Prod Res，2018，32（17）：2008-2016.
[26] FERRARI F，MONACHE F D. A new phenolic glycoside from *Sorocea ilicifolia* stem bark[J]. Fitoterapia，2004，75（3/4）：417-419.
[27] DIAO Y L，RE-ZENG C D，WANG R F，et al. Phenolic compounds from stems of *Rubus amabilis* Focke[J]. Nat Prod Res Dev，2014，26（1）：11-14，49.
[28] 朱敏汇，杨贵香，郑林，等. 钩毛茜草正丁醇部位化学成分的研究[J]. 中成药，2021，43（12）：3367-3372.
[29] 薛刚强，靳茂礼，李三妮，等. 熟地黄化学成分及其体外生物活性[J]. 中成药，2018，40（12）：2689-2692.
[30] YAN X J，BAI X Y，LIU Q B，et al. Two new glycosides from the fruits of *Forsythia suspense*[J]. J Asian Nat Prod Res，2014，16（4）：376-382.

（收稿日期：2022-07-11　修回日期：2022-09-20）
（编辑：林　静）