

文章编号:2095-7386(2019)03-0004-09

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2019.03.002

游离态羧甲基赖氨酸对秀丽隐杆线虫的毒性作用

许浩,张虎,姚丽云,池晟,方敏,肖甚圣,宫智勇

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院,湖北 武汉 430023;

2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室,湖北 武汉 430023)

摘要:羧甲基赖氨酸(CML)是食品加工中经美拉德反应由蛋白质与糖类通过非酶催化反应产生的一种晚期糖基化终末产物,是一种新型食品潜在有害物质。本文通过研究外源游离性CML对秀丽隐杆线虫寿命、子代数量、热环境中线虫存活时间的影响,探讨其可能的毒性机制。结果表明,外源游离性CML导致线虫产卵期缩短,寿命试验以及热刺激下存活的线虫数量呈现出剂量-反应关系。影响了TOR信号通路的Skn-1基因和生殖系统信号通路中的hsf-1基因,提高线虫的热环境阻力的抵抗力并延长其寿命。高浓度的CML降低了线虫的DAF-16的表达水平从而影响其寿命,抑制线虫体内Folt-1基因的表达,从而减少其子代线虫的数量。

关键词:羧甲基赖氨酸(CML);秀丽隐杆线虫;寿命;作用机制

中图分类号:TS 251.6

文献标识码:A

The toxic effects of free state N^ε-(Carboxymethyl)-lysine on *C. elegans*

XU Hao, ZHANG Hu, YAO Li-yun, CHI Cheng, FANG Ming, XIAO Shen-sheng, GONG Zhi-yong

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, 430023 China;

2. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil, Ministry of Education, Wuhan, 430023 China)

Abstract: N^ε-(Carboxymethyl)-lysine (CML) is an advanced glycation end product formed on protein by combined nonenzymatic glycation and oxidation (glycoxidation) reactions during the maillard reaction in food processing. In this study, the effects of exogenous free CML on the life span, the number of offspring and the thermal environment of *C. elegans* and the survival time of *C. elegans* at different concentrations were investigated, and the possible toxic mechanism was speculated. The results showed that CML resulted in shorter spawning period of nematode worms, and the dose-response relationship was observed in the life test and the number of nematode worms surviving under thermal stimulation. It affects skn-1 gene of TOR signaling pathway and hsf-1 gene of reproductive system signaling pathway, improves resistance to thermal environment resistance of *C. elegans* and extends its life span. High concentration of CML reduces the expression level of daf-16 in nematode, thus affecting their life span, inhibiting the folt-1 gene expression in nematode worms, and thus reducing the number of offspring.

Key words: carboxymethyl lysine (CML); *caenorhabditis elegans*; life; mechanism of action

收稿日期:2019-04-08.

作者简介:许浩(1992-),男,硕士,研究方向为食品营养与安全。E-mail: xuhaowhpu201601038@163.com.

通信作者:宫智勇(1968-),男,教授,博士,研究方向为食品营养与安全。E-mail: gongzycn@whpu.edu.cn.

基金项目:食品污染物暴露组解析和总膳食研究(2017YFC1600503);武汉市居民膳食乳制品中羧甲基赖氨酸暴露水平的研究(2015y13).

1 引言

美拉德反应是食品加工过程中最常见的反应之一,晚期糖基化终产物(AGES)是该反应过程中一典型的潜在有害食品加工产物。羧甲基赖氨酸(CML)是在食品加工中经美拉德反应由蛋白质与糖类通过非酶催化反应产生的一种晚期糖基化终产物(AGEs)。广泛存在于乳制品、肉类和糕点中,长期摄入该类食物的人群存在着累积暴露风险^[1]。内源性的CML已引起科学界的高度关注,但对外源性CML毒性尚未进行深入研究^[2]。大多数CML在食品加工中与蛋白质结合,在体内经过消化分解后形成游离态的CML^[3],因此人体有暴露于高浓度游离态CML的风险。

近年来,食品被认为是外源性CML的主要来源,在牛肉饼和牛奶中相继检出,热处理后其含量明显高于未经热处理的食物^[4]。一般情况下,油炸食品的CML含量明显高于煮食食品,长期高温处理的食物CML含量高于短期高温处理的食物;乳制品中的CML含量远高于其它碳水化合物食品,平均超过5 000 mg/kg^[2]。肉制品中CML的主要来源是酱料,这可能是加工过程中氨基酸、维生素和还原糖含量高所致^[5]。水果和蔬菜中的CML含量低于其他食品^[6]。

CML比其他AGEs更稳定,具有可检测到的特异性,因此CML是一种具有代表性的AGEs检测标志产物。研究表明,大约10%的AGEs可以被人体吸收,1/3的AGEs通过肾脏排出,其余的则滞留在人体中,与蛋白质结合成结合态CML,从而改变正常细胞的生化性质,诱发炎症和各种疾病^[7]。CML作为抗原可直接结合细胞表面受体,阻碍细胞内信号传递,影响蛋白表达,与许多疾病有关^[8]。CML也可诱导单核巨噬细胞分泌过多的生长因子,导致血管增生,或诱导磷酸化与磷酸化蛋白,直接损伤神经细胞^[8]。此外,CML还可以改变内皮细胞通透性。大量临床研究表明,CML积累的患者其肾病、阿尔兹海默病、动脉粥样硬化、糖尿病及其并发症的发病率高于正常人^[8]。慢性肾衰竭引起的代谢紊乱导致体内CML合成量增加,引起糖尿病、肾病及其并发症。Lee(2011)等研究发现CML能够诱导细胞内质网应激并通过Nox4/MKP-3相互作用

促进内皮细胞凋亡;而Liu(2014)等通过胶原蛋白结合型CML染毒脐带血内皮细胞,发现CML能显著抑制该细胞生长并诱导细胞凋亡^[9,10]。在动物实验中,用富含CML的食物喂养大鼠,可显著提高尿蛋白含量,这说明肾脏具有明显的损伤作用,肾小球滤过未受损伤。更多实验表明CML与血管内损伤、急性心肌梗死形成及巨噬细胞迁移有关^[11]。目前,外源性CML的毒性作用研究主要通过喂养富含CML的食物给动物,食品基质可能影响CML的吸收、分布及其生物利用率,不利于对外源性游离态CML毒性作用的深入了解。

秀丽隐杆线虫作为一种主要的模式生物,已被用于评价多种毒性终点和几乎所有类型的食品和环境污染物^[12]。线虫作为一种多细胞真核生物,不仅具有与高等生物相同的结构,而且具有较为复杂的发育过程,由此得到的实验信息可应用于更复杂的生命形式。自1983年休斯顿大学克拉斯实验室首次发现影响线虫预期寿命的信号通路以来^[14],已经发现了线虫大约400个基因^[15,16]。这些基因通过各种生物过程的影响导致生物体性状的改变,主要有胰岛素信号通路/IGF-1^[17]、TOR信号通路和生殖信号通路^[18]、饮食限制^[19]、发育进程等^[20]。

本研究采用本课题组实验室前期合成的CML,研究游离态羧甲基赖氨酸对秀丽隐杆线虫的毒性作用,包括多毒终点,如致死率、寿命、热环境中的生存时间和生殖的影响,并利用荧光定量PCR检测秀丽隐杆线虫繁殖和生活相关基因的mRNA表达,探讨外源性CML可能的毒性作用机制。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 试剂

游离态CML(纯度>97.8%),实验室内合成;KOH、MgSO₄、K₂HPO₄、KOH、NaOH、胆固醇、制霉菌素、NaClO、Na₂HPO₄、NaCl、CaCl₂、甘油、KCl、异丙醇、氯仿、冰乙酸、EDTA-Na、PBS,均购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白胨、Agar、5-氟-2'-脱氧尿苷(FUDR)、胰蛋白胨,阿拉丁试剂网;RNase-free水,碧云天生物技术;Vetec Trizma © base(Tris-base),美国sigma公司;RNAiso Plus总RNA提取试剂,美国Invitrogen公司;逆转录试剂

盒、SYBR © Green I 荧光染料、6xLoading Buffer、Marker,购自大连 TaKaRa 公司;Tris-base、溴化乙锭(EB)、琼脂糖,Biosharp 生物科技公司。

2.1.2 线虫

本研究选用野生型秀丽隐杆线虫 N2 株和大肠杆菌 OP50 株系,购自美国国立卫生研究院线虫品系中心(CGC),按 Brenner 等人制定的标准方法进行培养^[21]。在 NGM 培养基上,采用 LB 培养基增殖出来的 OP50 菌液饲喂线虫,获得大量秀丽线虫用于同步化处理。并按 Dhawan 和 Williams 方法,获得年龄同步化至 L4 期成虫后进行毒性试验^[22]。

2.2 仪器与设备

高压灭菌锅,上海三申;高速离心机,长沙湘智;—86 °C 超低温冰箱,中科美菱;线虫培养箱,上海博迅;IMS-50 全自动雪花制冰机,常熟市雪科电器有限公司;Nanodrop 2000 超微量分光光度计,美国 Thermo Scientific 公司;iQTM 5 多重实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

2.3 方法

2.3.1 急性毒性试验

急性致死毒性试验作为线虫毒性评价研究的第一阶段,为后续毒性试验提供参考。准备 5 板 N2 野生型线虫培养板,每板在 25 °C、湿度 60% 条件下同步孵化至 L4 期。每 10 条线虫挑移至一新的培养板,每个梯度设 3 个平行组。通过不同浓度 CML 25 °C 下染毒作用 48 h,期间每 12 h 观测一次线虫存活状态并挑出死亡的线虫个体。线虫死亡判定:用铂丝轻触线虫头部,10 s 内无任何反应即可认定死亡。

2.3.2 寿命试验

寿命试验是最重要的线虫毒性实验,在 25 °C、湿度 60% 下进行^[23]。根据线虫急性毒性试验结果,将 CML 的染毒浓度设置为:0、0.08、0.4、2、10、50 mmol/L。经过同步化生长至 L4 期后,将每 30 条线虫转移至新的 NGM 培养基上,每组设置 3 个平行组,开始染毒后,每隔 24 h 观察线虫的生存状态,直至所有线虫全部死亡。记录下死亡线虫数量并将其挑出,其余每隔一天转移到新培养皿中。在实验过程中,爬至培养基边缘或远离 NGM 培养基的线虫数据须从总体中剔除^[19]。采用 Kaplan-Meier 生存分析不同浓度组线虫的存活率差异。

2.3.3 热环境刺激试验

热环境刺激实验组与寿命实验组分组相同。怀孕的母虫在 25 °C 同步化后,直到所有的后代都进入成年期。然后,在 37 °C、湿度 60% 下,30 条同步化后的线虫被转移到每个新培养板。每 1 h 观察线虫死亡情况,记录并挑出死亡个体,每个梯度设置 3 个平行组。

2.3.4 子代产卵数试验

生殖毒性可以通过计算 L4 期线虫暴露于 CML 后产生的卵的数量来评估。在不同浓度的 CML 中培养同步线虫。在 L4 期间,将一只线虫转移到一个新的 NGM 培养板,使之暴露于不同浓度 CML 中,持续观察,每隔 24 h 将板上的 CML 线虫转移至新的同浓度的 NGM 培养板上,直到其产卵终止。通过计算卵的孵出或数量来表示产卵总数。

2.3.5 线虫相关基因表达分析

本实验通过采用实时荧光定量 PCR 技术,检测与寿命活动相关的 daf-16、daf-2、pha-4、skn-1、daf-12、hsf-1、jnk-1 基因,以及与生殖相关的 fer-1、folt-1、spe-10、spe-15 基因。首先,选取 12 板未染毒的线虫,在 25 °C 下,经过同步化培养至 L4 期后将线虫转移至 CML 浓度为 0、0.08、0.4、2、10、50 mmol/L 的培养基中继续培养 48 h。RT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析, β -actin 作为内参基因,目标基因的表达水平通过采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目标的多个基因,得出相对于内参基因的表达水平。

2.3.6 数据分析

数据采用平均值±标准误差表示,所有分析均采用 SPSS17.0 软件进行,分析实验组与对照组的差异,其显著性水平为 0.05;采用单因素方差分析检验统计学差异;采用 Microsoft Office Excel 2007 绘制生存曲线图。

3 结果与分析

3.1 急性毒性试验

在 48 h 内,各浓度 CML 的实验组中,秀丽隐杆线虫死亡率均未超过 50%(10 mmol/L 及 50 mmol/L 下分别是 90.0%±0%,76.7%±15.3%)。因此,CML 对线虫的毒性非常低,数据文中未显示。

3.2 CML 对秀丽隐杆线虫寿命的影响

不同浓度 CML 对秀丽隐杆线虫寿命的影响,

如图 1 所示。与对照组(0 mmol/L)相比,高剂量组的最长寿命显著降低($P < 0.01$),而低剂量组(0.08 mmol/L 和 0.4 mmol/L)均无显著差异。实验组 0.4 mmol/L 组线虫的最长寿命达 24 d; 0.08 mmol/L 作为最低浓度实验组,最长寿命(23 d)低于 0.4 mmol/L,但差异无统计学意义。2 mmol/L、10 mmol/L、50 mmol/L 的最长寿命(18 d, 14 d,

14 d),随 CML 浓度的增加而降低,呈现反向的剂量效应关系。从 26 d 生存实验来看,无论是低浓度 CML 实验组(0.08 mmol/L、0.4 mmol/L),还是中浓度(2 mmol/L)、高浓度 CML 实验组(10 mmol/L、50 mmol/L),线虫的生存曲线明显向左偏移。与对照组相比,差异均有统计学意义。如图 2 所示。

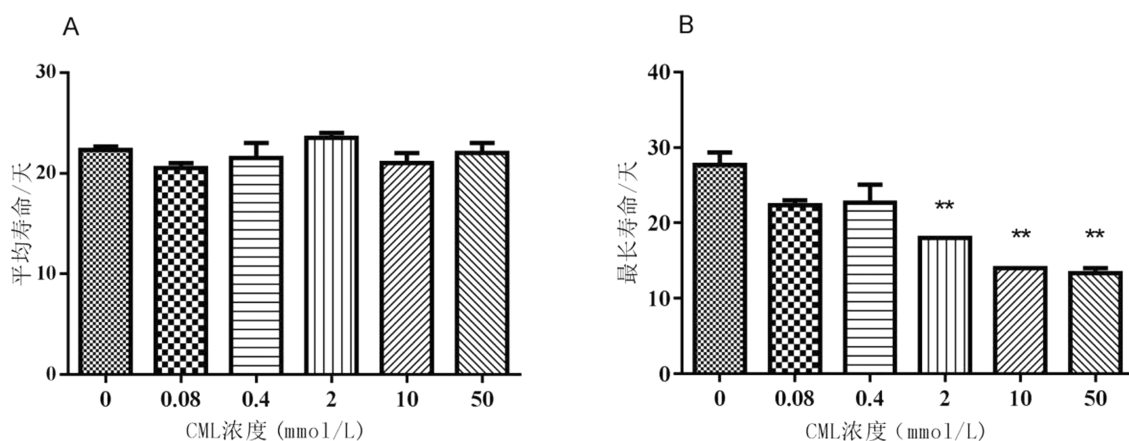


图 1 不同浓度 CML 作用下的平均寿命(A)和最大寿命(B)

* 表示与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$), ** 表示与对照组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。

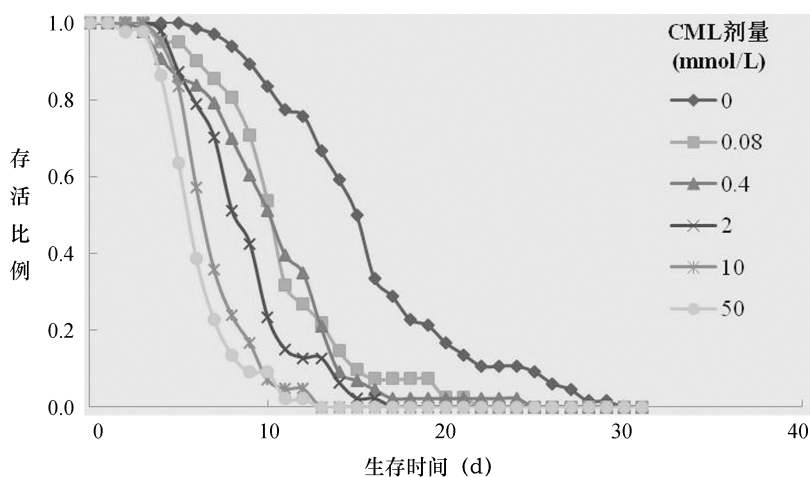


图 2 不同浓度 CML 下秀丽隐杆线虫的生存时间曲线

3.3 CML 对秀丽隐杆线虫的生殖毒性作用

在不同浓度 CML 暴露下的实验中,以秀丽隐杆线虫的后代数目反映 CML 对秀丽隐杆线虫的生殖作用的影响。如表 1 和图 3 所示。对照组线虫平均产卵量是 95 ± 36 个。CML 高剂量实验组(10 mmol/L、50 mmol/L)与对照组相比,产卵量明显减少($P < 0.05$);低剂量组(0.08 mmol/L、0.4 mmol/L)与中剂量组(2 mmol/L)均无显著差

异。同时,经 CML 干预后,受 CML 影响的线虫第 1 天产出了大量的卵,尤其是中、低浓度组产卵量最多,所有 CML 实验组第 3 天均不再产卵,且第 2 天中剂量 CML 实验组(2 mmol/L)就未产卵。可见,中、低浓度 CML 可以促进线虫产卵,而高浓度 CML 会导致线虫后代数量减少,这可能是 CML 对生殖细胞的影响所致。

表1 不同浓度 CML 作用下线虫每天产卵数量($n=4$, mean $\pm$ SD)

	0 mmol/L	0.08 mmol/L	0.4 mmol/L	2 mmol/L	10 mmol/L	50 mmol/L
第一天	59.33 $\pm$ 47.51	67.55 $\pm$ 38.00	88.73 $\pm$ 25.96	88.69 $\pm$ 29.03	42.53 $\pm$ 40.71	43.82 $\pm$ 27.35
第二天	31.87 $\pm$ 27.46	19.64 $\pm$ 26.42	5.73 $\pm$ 9.84	0 $\pm$ 0	20.67 $\pm$ 32.09	7.27 $\pm$ 16.18
第三天	3.60 $\pm$ 4.03	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
平均产卵数	94.80 $\pm$ 36.08	87.18 $\pm$ 31	94.45 $\pm$ 30.52	88.69 $\pm$ 41.2	63.20 $\pm$ 28.35*	51.09 $\pm$ 17.58*

* 表示有显著性差异($P<0.05$), ** 表示有非常显著性差异($P<0.01$)。

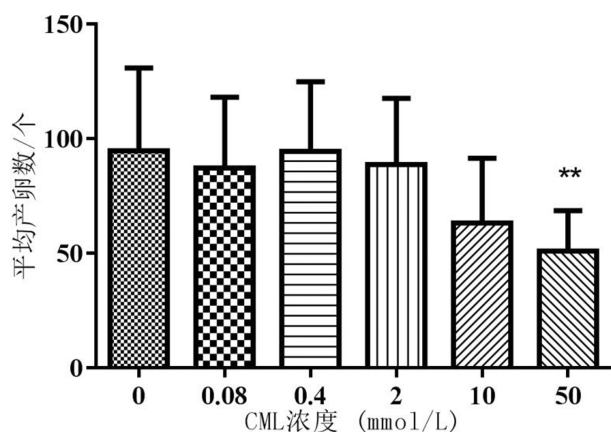


图3 不同浓度 CML 对秀丽隐杆线虫产卵数的影响
($n=4$, mean $\pm$ SD)

* 表示有显著性差异($P<0.05$), ** 表示有非常显著性差异($P<0.01$)。

3.4 CML 对线虫热刺激的影响

线虫在 37 °C 环境中培养的生存曲线如图 4 所示。在前 15 h, 低浓度 0.08 mmol/L 组的死亡率明显高于 0.4 mmol/L 组和 2 mmol/L 组, 而 10 mmol/L 组和 50 mmol/L 组的死亡率明显高于其他组。在 21 h, 除未受干扰的对照组外, 其余各组基本死亡。

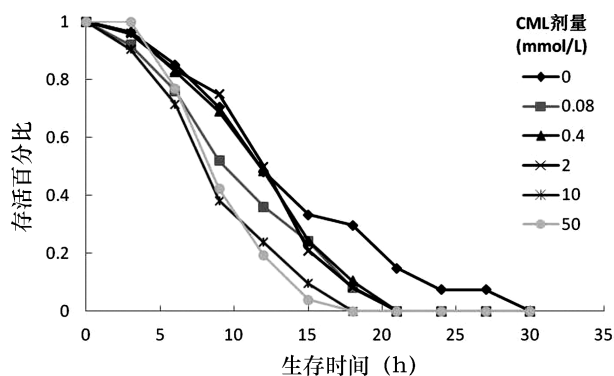


图4 不同浓度 CML 对线虫热刺激的影响

3.5 CML 对秀丽隐杆线虫相关基因表达的影响

3.5.1 秀丽隐杆线虫寿命相关的基因

Daf-2 编码秀丽隐杆线虫 IGF 受体同源的胰岛素受体酪氨酸激酶。它与线虫的胚胎和幼虫发育、幼虫发育时间、成虫寿命、繁殖行为、脂肪储存、耐高温和抗氧化能力密切相关^[26]。通过调节细胞内各种功能蛋白, 影响 dauer 期幼虫的形成和成虫的寿命, 并通过内分泌的辅助调节来调节生命。与 0 mmol/L (对照组) 相比, daf-2 在 0.08 mmol/L、0.4 mmol/L、2 mmol/L 中表达水平升高, 0.4 mmol/L 组较对照组升高 59%; 而 10 mmol/L 和 50 mmol/L 组 daf-2 水平各降低了 27% 和 16% (图 5A)。研究表明, CML 实验组与对照组在 daf-2 表达水平上无显著差异。DAF-16 的活性与线虫的寿命直接相关, daf-2 共同调控线虫的 dauer 发育。DAF-16 活性越高, 线虫的寿命越长, 抗压能力越强。如图 5B 所示, 对照组与干预组比较差异无统计学意义。Jnk-1 是线虫中唯一编码丝氨酸/丝氨酸激酶的应激激活蛋白激酶。它主要协调秀丽隐杆线虫的运动能力和成虫的寿命, 以及对高温和氧化应激的耐受力^[25, 26]。Daf-12 是维生素 D 的受体, 最终促进 daf-16 的表达。Hsf-1 与热休克转录因子同源, 与生命调控有关^[27]。各 CML 实验组 jnk-1 表达水平平均高于对照组, 但差异无统计学意义 (图 5C)。结果表明, CML 直接影响线虫体内 jnk-1 的表达, 高于正常水平。此外, 与对照组相比, 所有实验组 daf-12 和 hsf-1 的表达水平无显著差异 (图 5D, 5F)。pha-4 可以通过饮食调节调节生命^[28]。在胚胎早期发育过程中, skn-1 影响囊胚细胞, 在胚胎发育过程中, skn-1 通过 P38 MAPK 通路调控氧化应激, 并通过 DAF-16/FOXO、DAF-2、胰岛素/IGF 信号通路调控生命^[29]。如图 5E、5G 所示, 与对照组相比, 0.4 mmol/L 中 pha-4、skn-1 的表达水平明显升高 ($P<0.05$), 而其他 4 个实验组均升高, 但差异无统计学意义。

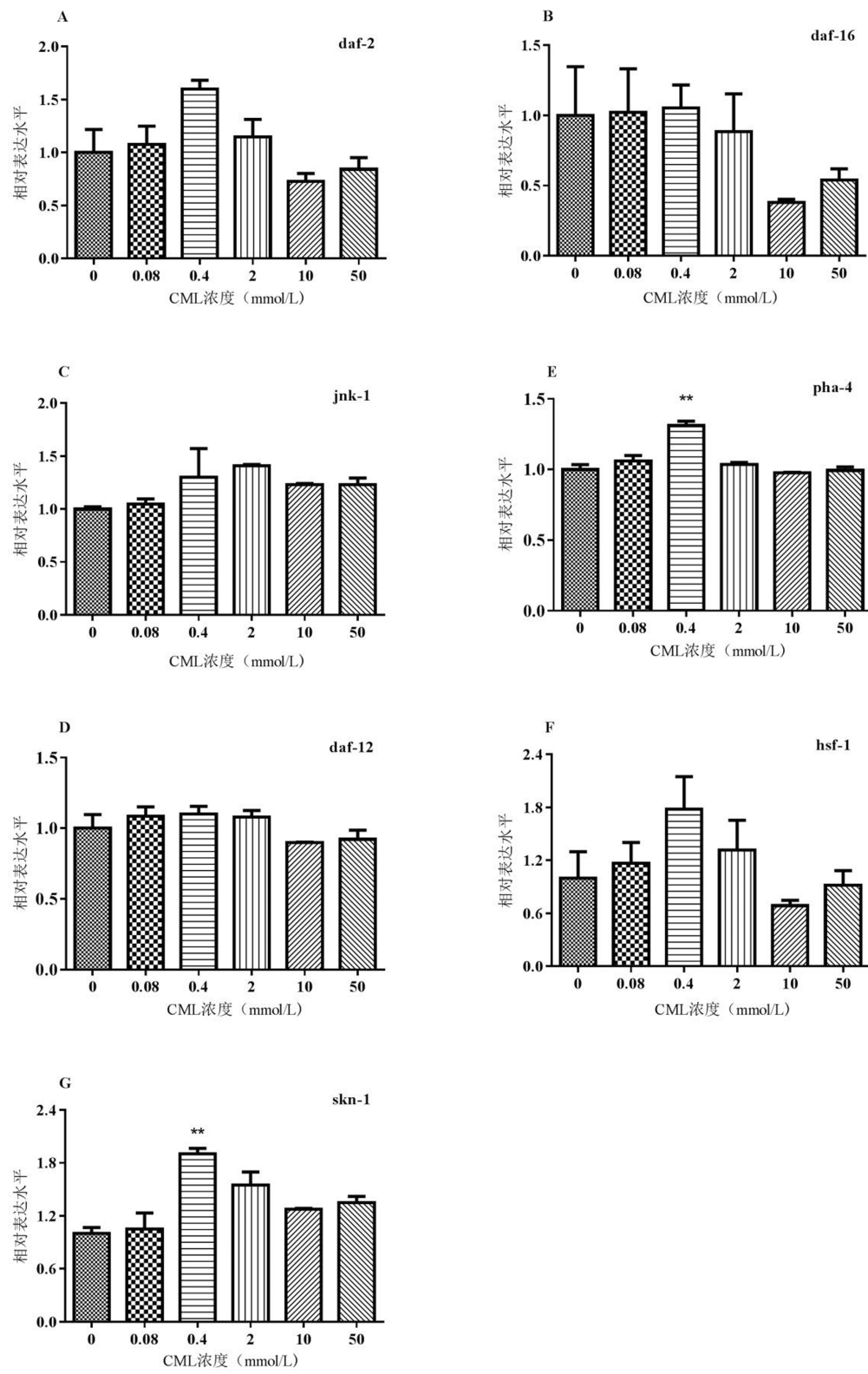


图 5 秀丽隐杆线虫寿命相关基因的表达水平的变化(n=4,mean±SD)

* 表示有显著性差异($P<0.05$), ** 表示有非常显著性差异($P<0.01$)。

3.5.2 与生殖有关的基因

Ferlin 家族蛋白由参与囊泡和膜转运的 *fer-1* 编码,用于监测膜细胞器的融合。在精子发生过程

中,钙离子与精子胞质膜泡融合,促进精子成熟,增强精子活力。实验表明,*fer-1* 突变体精子功能不完整,模型细胞器不能与精子膜结合,后代数量明显减

少^[30]。如图 6A 所示,所有干预组与未干预组比较均无明显变化,其中 0.4 mmol/L 下线虫的 *fer-1* 表达水平较未干预组提高 11%。*Folt-1* 编码运输叶酸所需的载体,并通过改变精子数量和受精卵数量来影响生殖。它与头部、身体、耻骨肌肉和性腺细胞有关^[31]。如图 6B 所示,各治疗组虽然在不同水平上有所增加,但与对照组比较差异无统计学意义。*spe-10* 编码 DHHC-CRD 家族的跨膜蛋白,与精子

发生有关,导致精子功能障碍。*SPE-15* 编码一种在精子形成和精子不对称发育中起作用的肌凝蛋白。与 N2 野生型相比,*spe-15* 突变体的精子由于缺乏肌动蛋白丝而不能生育。与对照组相比,治疗组 *spe-10* 和 *spe-15* 的表达无明显差异(图 6C, 6D)。实验结果表明,CML 对 *fer-1*、*folt-1*、*spe-10*、*spe-15* 的表达水平没有直接影响。

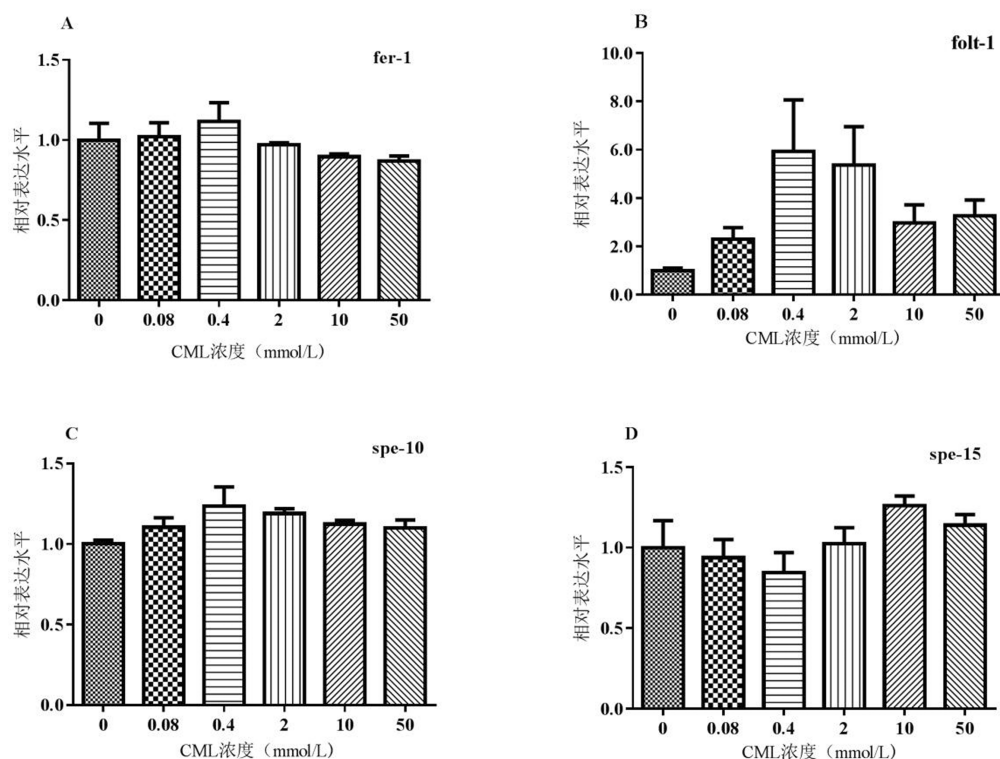


图 6 秀丽隐杆线虫生殖相关基因表达水平的变化($n=4$, $\text{mean} \pm \text{SD}$)

* 表示有显著性差异($P < 0.05$), ** 表示有非常显著性差异($P < 0.01$)。

4 结论

秀丽线虫被广泛用于评估各种物质的毒性,如重金属、农药、纳米材料、有机污染物、代谢产物以及新兴污染物^[32]。同时,致命性被用来确定这些化合物的亚致死浓度以及更复杂的亚致死毒性终点如生殖,生长参数,基因表达的变化和选择脂质积累分析内分泌干扰也已经得到发展^[33]。本研究通过外源性游离 CML 对秀丽隐杆线虫的毒性作用开展研究,并对秀丽隐杆线虫各相关基因表达水平进行分析,探讨外源性游离 CML 可能毒性作用。

CML 作为第一种在体内分离出的糖基化蛋白的 AGEs 产物,是一种无色无荧光特性和交联性的赖氨酸衍生物^[34]。虽然 CML 广泛存在于各类食品中,但外源性 CML 最终可通过机体代谢转化为

CML 的游离态,并积累在相关器官和组织中,人体处于高浓度 CML 游离态的危险中。24 h LC₅₀ 数据表明 CML 对秀丽隐杆线虫具有较低的急性毒性。线虫作为一种低水平生物,具有较强的耐药性,在 CML 浓度最高的 NGM 培养基中死亡的线虫不超过半数。在寿命试验中,50 mM CML 对线虫的寿命影响最大。虽然最长寿命为 14 d,与 10 mM 相同,但平均寿命小于 10 mM,且随着 CML 染毒浓度的增加,线虫的群体死亡时间逐渐提前。在 5—18 d 的集体死亡中,对照组线虫的生存曲线死亡率有显著的下降,而 CML 实验组没有产生类似现象。随着 CML 浓度的增加,5—18 d 的生存曲线更加平坦,说明 CML 在线虫体内沉积并持续作用,随着线虫年龄的增加,对线虫的影响越来越明显。同时,

CML对秀丽隐杆线虫,具有毒物兴奋效应,这与Courtney Scerbak等人的描述是一致的^[23]。毒物兴奋效应描述了剂量依赖性,其中低剂量的处理导致有益反应,而高剂量的相同处理引起负面反应或产生毒害作用。从秀丽隐杆线虫产卵实验来看,CML对线虫生殖系统有影响:高浓度(10、50 mmol/L) CML作用可导致线虫产卵量显著减少($P<0.05$),但在CML浓度0.08、0.4、2和10 mmol/L的作用下,对线虫生殖系统影响并不明显。但在低浓度(0.08、0.4 mmol/L)的影响下,线虫提前两天产卵。综上所述,CML处理后,线虫在高温环境下的生存时间会减少。与对照组相比,中、低浓度CML实验组,前12 h生存率暂时升高。随着时间的推移,CML沉积在线虫体内,各CML实验处理组的存活率逐渐低于对照组。

在研究CML对秀丽隐杆线虫寿命、生殖以及线虫热刺激作用影响的基础上,采用荧光定量RT-PCR方法研究了CML对秀丽隐杆线虫11个基因组基因表达的影响,探讨CML对秀丽隐杆线虫毒性作用的可能机制。与寿命相关的7个基因中,daf-16在多种途径上直接影响寿命,在CML的直接作用下,与daf-2的表达水平并没有显著变化,说明CML在胰岛素/IGF-1通路中通过daf-2不影响daf-16的表达。同时,JNK-1和daf-12的表达水平变化不显著,说明CML并没有通过JNK信号通路和生殖系统信号通路中的类固醇信号通路调节生命。Hsf-1是在生殖系统信号通路中直接影响daf-16的基因,调节线虫对热环境的抗性。不同浓度CML干预下线虫的表达水平无明显变化,说明CML并没有通过调节生殖系统的信号通路来调节线虫的寿命。Pha-4是TOR信号通路中同时调控C1和C2生命周期的基因,skn-1也是TOR信号通路中可以被TORC1和TORC2直接调控的基因。在0.4 mmol/L CML的直接作用下,其表达水平显著升高($P<0.05$),这说明CML通过TOR通路中的pha-4和skn-1增强了线虫的抗性,消除了线虫自身的毒性。在对与生殖通路相关的4种基因fer-1、spe-10、spe-15、folt-1的研究中显示,CML作用后实验组表达水平较对照组均无显著性变化,与线虫生殖实验结果并不完全一致,因此,认为它可能受到生殖通路中其他基因的调控,这需要进行进一步的实验研究。综上所述,线虫在CML作用下可以自行调节长寿基因的表达,使线虫更容易在逆境中生存。

然而,在高浓度下,这种自我调节作用是无效的。

参考文献:

- [1] Fu, M X, Requena, J R Jenkins, A J et al. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions [J]. The Journal of biological chemistry, 1996, 17(271): 9982-9986.
- [2] 张振华, 孙建霞, 白卫滨等. 羧甲基赖氨酸的毒理学研究进展 [J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 10(14): 1403-1408.
- [3] Sebeková K, Saavedra G, Zumpé C, et al. Plasma Concentration and Urinary Excretion of Nepsilon-(Carboxymethyl)lysine in Breast Milk - and Formula - fed Infants [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1126(1): 177-180.
- [4] 李梅. 食品中晚期糖基化终末产物的生物毒性评价 [D]. 无锡, 江南大学, 2016.
- [5] 刘慧琳, 陈晓默, 倪天鸿等. 食源性羧甲基赖氨酸的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2017, 03(38): 220-224.
- [6] Wellner A, Huettl C, Henle T. Formation of Maillard reaction products during heat treatment of carrots [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 14(59): 7992-7998.
- [7] Wells-Knecht K J, Zyzak D V, Litchfield J E et al. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose [J]. Biochemistry, 1995, 11(34): 3702-3709.
- [8] Hull G, L Woodside J V, Ames J M, et al. Validation study to compare effects of processing protocols on measured N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine and N (epsilon)-(carboxyethyl)lysine in blood [J]. Journal of clinical biochemistry and nutrition, 2013, 3(53): 129-133.
- [9] Hong C, Lee J, Nam M, et al. Determination of N-carboxymethyllysine by HPLC in Korean meals [J]. The FASEB Journal, 2011, 25(1): 722-725.

- [10] Lee W J, Sheu W H H, Liu S H, et al. N^ε-carboxymethyllysine-mediated endoplasmic reticulum stress promotes endothelial cell injury through Nox4/MKP-3 interaction [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 74: 294-306. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.015
- [11] 李晓赞, 尤寿江, 谢莹. 晚期糖基化终产物对血管内皮细胞通透性影响的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 05(22): 464-466.
- [12] Tejeda-Benitez L, Olivero-Verbel J. *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology[J]. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 2016, 237: 1-35.
- [13] Hunt, P R. . The *C. elegans* model in toxicity testing[J]. *Journal of applied toxicology*, 2017, 1(37): 50-59.
- [14] Hsin H, Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*[J]. *Nature*, 1999, 399 (6734): 362-366.
- [15] Antebi A. Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*[J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(9): 1565-1571.
- [16] Kenyon C. The genetics of ageing[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 504-512.
- [17] Tatar M, Bartke A, Antebi A. The Endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals[J]. *Science*, 2003, 299: 1346-1351.
- [18] Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, et al. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*, 2003, 426: 620.
- [19] Louis R Lapierre, Malene Hansen. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity *Endocrinology and Metabolism* [J]. *Cell*, 2012, 12(23): 637-644.
- [20] Gems D, Sutton A J, Sundermeyer M L, et al. Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 1998, 1 (150): 129-155.
- [21] Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 1974, 1(77): 71-94.
- [22] Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Toxicol. Environ. Health A*, 1999, 58: 451 - 462.
- [23] Scerbak C, Vayndorf E M, Hernandez A, et al. Mechanosensory Neuron Aging: Differential Trajectories with Lifespan-Extending Alaskan Berry and Fungal Treatments in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Frontiers in aging neuroscience*, 2016, 8: 273.
- [24] Harris T W, Raymond L, Erich S, et al. WormBase: a cross-species database for comparative genomics [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(1): 133-7.
- [25] Seung Wook O, Arnab M, Nenad S, et al. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(12): 4494-4499.
- [26] Kawasaki M, Hisamoto N, Iino Y, et al. A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons[J]. *Embo Journal*, 1999, 18(13): 3604-3615.
- [27] Shen X, Valencia C, Gao W, et al. Ca⁽²⁺⁾/Calmodulin-binding proteins from the *C. elegans* proteome[J]. *Cell Calcium*, 2008, 43(5): 444-456.
- [28] Panowski S H, Suzanne W, Hugo A, et al. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans* [J]. *Nature*, 2007, 447(7144): 550-555.
- [29] Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, et al. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*[J]. *Genes & Development*, 2004, 18(24): 3004-3009.

Dermatitis,2000,43:182-183.

- [11] Masukawa Y. Separation and determination of basic dyes formulated in hair care products by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A,2006,1108:140-144.
- [12] Wang Shuping,Huang Tuen -Hwei. Separation and determination of aminophenols and phenylenediamines by liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Anal Chim Acta, 2005,534: 207-214.
- [13] Schettgen T,Heinrich K,Kraus T,Gube M. Determination of 2,5-toluylenediamine(2,5-TDA) and aromatic amines in urine after personal application of hair dyes: kinetics and doses[J]. Arch Toxicol,2011,85: 127-133.
- [14] 钱跣,金柔男,赵亮,等. 高效液相色谱-紫外检测法同时测定染发剂中的 20 种染料成分[J]. 第二军医大学学报,2014,35(1): 110-114.
- [15] 邓培红,梁姣丽,陈冬儿,等. β -环糊精功能化石墨烯修饰电极同时测定邻硝基苯酚与对硝基苯酚[J]. 分析测试学报,2018,37(2): 204-210.
- [16] Geim A K,Novoselov K S. The Rise of Graphene[J]. Nat Mater,2007,3(6):183-191.
- [17] 罗启枚,王辉宪,等. 石墨烯修饰玻碳电极测定邻苯二酚[J]. 应用化学,2012,29(9): 1070-1074.

(上接第 12 页)

- [30] Predrag K,Jane H,Olga L,et al. C. elegans dysferlin homolog fer-1 is expressed in muscle,and fer-1 mutations initiate altered gene expression of muscle enriched genes [J]. Physiological Genomics,2009,40(1):8-14.
- [31] Austin M U,Liau W S,Balamurugan K,et al. Knockout of the folate transporter folt-1 causes germline and somatic defects in C. elegans [J]. BMC Developmental Biology, 2010,10(3): 46.
- [32] Guo X,Li Q,Shi J,et al. Perfluorooctane sulfonate exposure causes gonadal developmental toxicity in Caenorhabditis elegans through ROS-induced DNA damage [J]. Chemosphere,2016,155:115-126.
- [33] Anderson G L,Boyd W A,Williams P L. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode Caenorhabditis elegans[J]. Environmental toxicology and chemistry,2001,4(20):833-838.
- [34] Wang YW,Wang Y. Degradation of lignocellulose and changes of several polysaccharide degrading enzyme activity[J]. Microbiology China,1989,16(3): 137-140.

(上接第 26 页)

- [5] 林瑞民,王大力. 补骨脂中两种黄酮类成分的高效液相色谱测定[J]. 中国中药杂志,2002,27(9):669.
- [6] 李俊娟. 补骨脂高效液相色谱法指纹图谱研究[J]. 中医学报,2012,27(170):855.
- [7] 张羽,孟宪生. 补骨脂药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药产业,2011,8(05-06):12.