

# 补肾复方对慢性疲劳综合征线虫模型的影响

聂立锦 蔡外娇 张新民 沈自尹

**摘要 目的** 以各种应激状态在线虫上模拟应激疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS), 评估补肾复方对成年线虫应激生存状态及整体寿命的影响。**方法** 在高、中、低浓度(500、250、100 mg/L)补肾复方干预下, 观察成年线虫对体外环境的热应激(35 ℃)、氧化应激(250 μg/mL)及体内毒性蛋白应激(Aβ<sub>1-42</sub>转基因突变株 CL4176)的耐受能力和平均存活时间, 评估补肾复方对正常状态下线虫平均生存时间(25 ℃)、20 s 运动距离、30 s 咽泵运动频次及生殖能力的作用效果。**结果** 与对照组比较, 补肾复方干预各组均能增加线虫热应激存活时间( $P < 0.01$ ); 高、中浓度干预组可增加线虫氧化应激存活时间, 减轻蛋白毒性作用, 延长线虫生存时间( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 高浓度干预组亦能增加线虫的运动距离和咽泵运动频次( $P < 0.01$ )。各组间生殖能力比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 补肾复方能增强线虫对内外环境压力的应激能力, 延长线虫寿命的同时不干扰线虫正常生殖, 提高生命质量, 为补肾复方在防治 CFS 方面的进一步机制探索及药理研究奠定基础。

**关键词** 应激; 秀丽线虫; 补肾复方; 慢性疲劳综合征

Effect of Compound Bushen Recipe on Chronic Fatigue Syndrome in *C. elegans*: an Experimental Study NIE Li-jin, CAI Wai-jiao, ZHANG Xin-min, and SHEN Zi-yin *Institute of Chinese Integrative Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040), China*

**ABSTRACT Objective** To evaluate the effect of Compound Bushen Recipe (CBR) in improving the survival state of stress and the overall life span in *C. elegans* by simulating chronic fatigue syndrome (CFS) under various stress states. **Methods** The tolerance and the average survival time of adult larvae against heat stress (35 ℃), oxidative stress (250 μg/mL juglone), and *in vivo* Aβ protein toxicity (Aβ<sub>1-42</sub> transgenic mutant CL4176) under the intervention of the high (500 mg/L), middle (250 mg/L), and low (100 mg/L) dose CBR were observed. The effect of CBR on the average live time (at 25 ℃), movement distance in 20 seconds, the frequency of pharyngeal pump in 30 seconds, and the reproductive capability were assessed. **Results** Compared with the control group, the survival time of heat stressed *C. elegans* could be significantly increased in each CBR group ( $P < 0.01$ ). The survival time of heat stressed *C. elegans* could be elongated, the protein toxicity be attenuated, and the live time prolonged in the high and middle dose CBR groups ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The movement distance and the frequency of pharyngeal pump could also be increased in the high dose CBR group ( $P < 0.01$ ). There was no statistical difference in the reproductive capability among all groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** CBR could significantly enhance the stress capacity of *C. elegans* against internal and external environment, and prolong their lifespan. It did not interfere their normal production, and also could improve the quality of life, thus laying a foundation for further mechanism studies and pharmacological researches on CBR in preventing and treating CFS.

**KEYWORDS** stress; *C. elegans*; Compound Bushen Recipe; chronic fatigue syndrome

应激是机体对各种内外环境的损伤因子产生应答

和自我修复调节的整体反应过程。适度刺激可激活下丘脑-垂体-肾上腺轴[hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis]和神经-内分泌-免疫(neuroendocrine and immune, NEI)网络, 提高机体的适应能力; 而过强或过长时间的刺激会造成机体 HPA 轴紊乱, 蛋白错误折叠等进而引发多器官受损, NEI 网络功能失衡, 导致慢性疲劳综合征(chronic fatigue syn-

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2010CB530400)

作者单位: 复旦大学华山医院中西医结合研究所(上海 200040)

通讯作者: 张新民, Tel: 021 - 52888226, E-mail: xmzhang54@

yahoo.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 06. 0728

drome, CFS), 并诱发早衰及多种其他伴随疾病如老年痴呆症等, 甚至诱发猝死, 严重降低寿命预期, 影响生命质量<sup>[1]</sup>。目前现代医学对此尚无有效防治措施。中医学将 CFS 归为“虚劳、脏躁”等范畴, 临床多以补肾复方为主, 疗效较佳, 从临床补肾为主的治疗方药中筛选鉴定出对 CFS 具有确切疗效的药物及组合具有重要意义。本课题组前期研究发现, 以淫羊藿及其提取物等为代表的补肾药及其补肾复方如补肾益寿胶囊、自拟右归饮等, 能改善老年人群及肾虚证患者的 HPA 轴和 NEI 网络功能, 增强细胞免疫功能, 激活老年大鼠沉默干细胞, 延缓线虫衰老等<sup>[2,3]</sup>, 但对 CFS 探索不多。本研究从临床使用频次较高的效方精简成由淫羊藿、何首乌、女贞子组成的补肾复方, 并以秀丽线虫为受试生物, 探讨补肾复方对线虫 CFS 模型方面的影响, 为其防治 CFS 的机制及药理研究做基础。

## 材料与方法

1 受试生物及培养 本实验采用 3 种型号秀丽隐杆线虫雌雄同体株: 野生型 N2 (*C. elegans* Bristol N2)、限食型长寿株 eat-2 和  $\text{A}\beta_{1-42}$  转基因株 CL4176, 其全称为  $\text{dvIs27}[\text{pAF29}(\text{myo-3}/\text{A}\beta_{1-42}/\text{let UTR}) + \text{pRF4}(\text{rol-6}(\text{su1006}))]$ ; 线虫饲养菌株为 *E. coli* OP50。均由美国明尼苏达大学线虫遗传中心惠赠。除非特殊说明, 线虫株均遵照标准程序<sup>[4]</sup>生长在 20℃ 涂布 OP50 菌落的 NGM 琼脂培养基上。

2 试剂与仪器 胆固醇 (Sigma 公司, 批号: 69008214)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorodeoxyuridine, 5-Fu, Sigma 公司, 批号: D8418)、胡桃醌 (Sigma 公司, 批号: 06315HH)、胰蛋白胨 (OXOID 公司, 批号: 976116)、琼脂粉 (日本株式会社, 批号: 5146181) 等, 其余为市售分析纯。SFC-11 体式显微镜: Motic 公司产品; ZWP-A1150 低温恒湿生化培养箱: 上海智城仪器有限公司; 5810R 离心机: Eppendorf 公司; 3913 恒温培养箱: Thermo Scientific 公司等。

3 药物及分组 补肾复方 (以下简称 BS) 由淫羊藿 30 g 制首乌 30 g 女贞子 30 g 组成, 药材浓缩剂由江阴天江药业公司惠赠, 每 1 g 浓缩剂含生药 20 g, 避光干燥恒温保存, 去离子水配制并过滤成药液, 终浓度为 1 g/mL, 按实验所需剂量添加入 NGM 培养基, 使药物干预组浓度从高到低分别 500、250、100 mg/L, 对照组不含药物。参考 Zheng SQ 文献<sup>[5]</sup>, 为避免 *E. coli* OP50 对药物干预的影响, 65℃ 处理 30 min 以灭活。组别分别命名为对照组、BS-1 (500 mg/L) 组、BS-2 (250 mg/L) 组、BS-3 (100 mg/L)

组, 仅在寿命实验中增加 eat-2 组为长寿阳性参照。

## 4 检测指标及方法

4.1 热应激状态测试 参考 Kampkötter A 等<sup>[6]</sup>描述, 将同期化的 L4 期 (成虫期) N2 线虫转入对照组、BS-1、BS-2、BS-3 各组培养板中, 30 条/板。各组培养基中均添加 12.5 mg/L 5-Fu 以阻止虫卵孵化。取 20℃ 下经药物干预 4 天的 N2 线虫, 转入 35℃, 进行热应激耐受测试, 每隔 1 h 统计线虫生死数目至全部死亡。死亡标准: 无任何活动且轻触线虫头部无任何反应。

4.2 氧化应激状态测试 参考 De Castro 等<sup>[7]</sup>描述, 将同期化的 L4 期 (成虫期) N2 线虫转入对照及干预各组, 同热应激实验。取 20℃ 下经药物干预 4 天的野生型线虫, 分别转入含胡桃醌终浓度为 250 μg/mL 的 NGM 板, 每隔 1 h 统计线虫存活、死亡、删失数目至全部死亡。

4.3 蛋白毒性耐受测试 参考 Gutierrez-Zepeda A 等<sup>[8]</sup>描述, 将同期化的 L1 期 (幼虫期) CL4176 转至对照组、BS-1、BS-2、BS-3 各组板, 30 条/板, 16℃ 培养 50 h 至 L3 期 (线虫青年期) 后, 温度升至 23℃ 以诱导线虫  $\text{A}\beta_{1-42}$  毒性蛋白表达。以同时期 N2 作参照, 继续培养 24 h 后, 每 2 h 统计各组线虫的非瘫痪率, 直至所有线虫瘫痪。瘫痪标准<sup>[9]</sup>: 轻触线虫仅头部能摆动, 或线虫头部周围出现“月晕”状菌区。

4.4 寿命分析 参照 Libina N 等<sup>[10]</sup>方法。将同期化并在 25℃ 下生长的 L4 期 (成虫期) N2 线虫株, 随机挑取每组 120 条至对照组、BS-1、BS-2、BS-3、eat-2 各组培养皿中, 每板约 30 条, 为排除限食等干扰因素, 以同时期 eat-2 线虫株作限食阳性参照。继续在 25℃ 下培养。每天将它们转移至新鲜板到生育期结束, 以后视食物充足情况每 2~3 天转移 1 次。L4 期起始转板日记录为第 0 天 (d0)。隔天记录线虫生死数至全部死亡。剔除标准: 爬出培养皿、意外伤亡或体内孵化出幼虫。利用 Kaplan-Meier 法<sup>[11]</sup>计算各组线虫生存率并绘制曲线, 并用时序检验比较各组生存曲线, 得出平均存活时间及延寿百分比 (和对照组比较), 以描述 BS 对群体生存的影响。

4.5 运动能力检测 参照 Huang C 等<sup>[12]</sup>方法。将 25℃ 下 L4 期 (成虫期) 线虫转入对照组、BS-1 两组的培养板中, 每块 2 板每板 40 条线虫, 其余同寿命实验。全观测期内每日各组随机挑 50 条情况相似的线虫测定 20 s 移动距离 (mm), 取平均值。一个完整的体长运动计为 1 mm。记录持续到全部死亡。

4.6 咽泵运动频率测定 参照 Huang C 等<sup>[12]</sup> 步骤,同运动实验。对照组、BS-1 组各板随机隔日挑 20 条线虫测定 30 s 咽动次数(次/30 s),取平均值。如线虫呈无规律吞咽状态,则 1 天内多次测定取平均值,计数为当日咽动频率。测定持续到全部死亡。

4.7 生殖能力测定 参照 Gruber JAN 等<sup>[13]</sup> 方法将在 20℃ 生长的 L4 期(成虫期)线虫转至对照组、BS-1 板中,并在 25℃ 下继续培养。线虫每日转板直至繁殖期结束,并从各组板中计数产卵数量,每条线虫各板产卵总和即为产卵量。所有数据测定均随机挑取线虫,1 条/板。

5 统计学方法 运用 SPSS 17.0 软件进行处理分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验,生存曲线绘制采用 Graphpad Prism 5.0 的时序检验生存分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1 各组 N2 成虫热应激、氧化应激模式和 CL4176 线虫毒性蛋白平均存活时间比较(表 1) 热应激模式:与对照组比较,BS-1、BS-2、BS-3 组线虫平均存活时间均延长,差异有统计学意义(*P* < 0.01),与 BS-1 组比较,BS-2、BS-3 组线虫平均存活时间减少,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

氧化应激模式:与对照组比较,BS-1、BS-2 组线虫平均存活时间均延长(*P* < 0.01),与 BS-3 组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。与 BS-1 组比较,BS-2、BS-3 组线虫平均存活时间明显缩短,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

毒性蛋白损伤模式:与对照组比较,BS-1、BS-2 组线虫瘫痪时间分别延迟了约 3.1 h(*P* < 0.01)、1.1 h(*P* = 0.0406),BS-3 组无延迟作用(*P* > 0.05);与 BS-1 组比较,BS-2、BS-3 组线虫平均存活时间明显缩短,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

表 1 各组 N2 成虫热应激、氧化应激模式和 CL4176 线虫毒性蛋白平均存活时间比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	存活时间 (h)		
		热应激模式	氧化应激模式	毒性蛋白损伤
对照	120	7.1 ± 1.7	3.3 ± 1.6	34.1 ± 3.6
BS-1	120	10.0 ± 2.2**	4.6 ± 2.1**	37.2 ± 4.9**
BS-2	120	8.7 ± 1.9** <sup>Δ</sup>	3.9 ± 1.8** <sup>Δ</sup>	35.2 ± 4.4* <sup>Δ</sup>
BS-3	120	7.9 ± 1.9** <sup>Δ</sup>	3.6 ± 1.7 <sup>Δ</sup>	34.5 ± 3.9 <sup>Δ</sup>

注:与对照组比较,\**P* < 0.05,\*\**P* < 0.01;与 BS-1 组比较,<sup>Δ</sup>*P* < 0.01

2 各组 N2 成虫平均生存时间比较(表 2) 与对照组比较,BS-1 组、BS-2 组与 eat-2 均能使 N2 线虫生存时间延长(*P* < 0.01, *P* < 0.05)。BS-1 组延长平均寿命达 14.8%,eat-2 延寿百分比为 18.7%,两组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 2 各组 N2 成虫平均生存时间比较

组别	n (删失数目)	生存时间 (天, $\bar{x} \pm s$ )	延寿百分比 (%)	<i>P</i> 值
对照	104 (16)	18.2 ± 4.9	—	—
BS-1	112 (8)	20.9 ± 7.8**	14.8	< 0.010 0
BS-2	110 (10)	19.9 ± 7.0*	9.4	0.039 8
BS-3	108 (12)	18.6 ± 5.0	2.2	0.557 3
eat-2	107 (13)	21.6 ± 6.9**	18.7	< 0.010 0

注:与对照组比较,\**P* < 0.05,\*\**P* < 0.01

3 全观测期内对照组与 BS-1 组对线虫运动能力比较(图 1) 全观测期内 BS-1 组线虫日平均移动距离为(2.3 ± 1.5) mm,对照组为(1.7 ± 1.2) mm,两组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。BS-1 组线虫日平均移动距离比对照组最大提高 34.2%,且 BS-1 组线虫活跃期比对照组多 4 天。

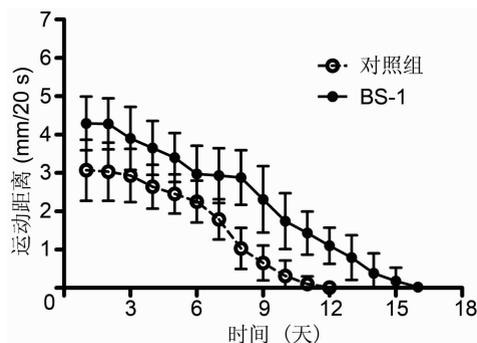


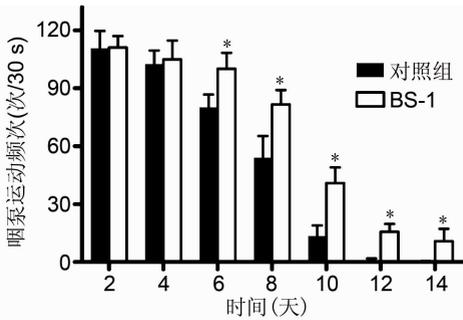
图 1 全观测期内对照组与 BS-1 组日平均移动距离

4 全观测期内对照组与 BS-1 组线虫咽泵运动频次比较(图 2) 在观测初期(第 2、4 天),对照组线虫咽泵运动频次(分别为 110.6 ± 9.1、102.5 ± 7.0)与 BS-1 组(分别为 111.0 ± 6.0、105.0 ± 10.0)比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),从第 6 - 14 天,BS-1 组(分别为 100.0 ± 8.3、81.5 ± 7.6、40.9 ± 8.2、15.6 ± 4.1、10.8 ± 6.5)与对照组(分别为 80.0 ± 6.8、54.0 ± 11.4、13.3 ± 5.6、0.7 ± 1.1、0)比较,差异有统计学意义(*P* < 0.01),且 BS-1 组日平均咽泵运动频次(66.4 ± 43.1)次/30 s 与对照组(51.6 ± 47.6)次/30 s 比较,差异有统计学意义(*P* = 0.012)。

5 高浓度 BS 对线虫生殖能力的影响(表 3) 与对照组比较,BS-1 组线虫生殖期内各天产卵量差异

表 3 观测期内线虫对照组与 BS - 1 组生殖能力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	生殖期内各天产卵数量					
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
对照	8	55.6 ± 10.0	105.0 ± 9.4	34.0 ± 7.1	33.0 ± 7.0	15.6 ± 3.0	4.6 ± 2.7
BS-1	8	55.9 ± 8.0	108.0 ± 6.0	39.0 ± 4.3	38.0 ± 10.7	17.8 ± 5.4	6.9 ± 2.6



注:与对照组比较,\*P < 0.01

图 2 全观测期内对照组与 BS-组线虫咽泵运动频次的比较

无统计学意义( $P > 0.05$ )。平均产卵总量 BS - 1 组 ( $265.5 \pm 11.5$ ) 个与对照组 ( $248 \pm 25$ ) 个,两组比较,差异无统计学意义( $P = 0.0971$ )。在体式显微镜下观察线虫生殖器官等亦无明显异常。

### 讨 论

CFS 临床症状描述最早见于《灵枢·海论》,表现为长时间不能自行缓解的头晕耳鸣、腰膝酸软、肢体倦怠、肌痛、记忆减退等症候群,并提示主要病机为肾精不足,髓海失充。《素问·生气通天论》则强调肾藏精以调节机体稳态,并提示肾精是脏腑功能正常运转的物质储备,并能“起亟”以防护机体应激损伤。现代生活压力增大,极端天气增多,各种应激源使机体长期处于过度的应激环境中,损耗肾精,致使机体适应能力下降,机体稳态失衡,造成 HPA 轴紊乱,病理蛋白蓄积进而影响器官功能,出现全身性症状,导致 CFS 发生,并进一步影响人类寿命和生活质量。CFS 发病过程中,以“因虚致瘀”为病机关键,而“肾精不足”则贯穿始终。本实验根据前期研究,结合临床常用 CFS 效方频次分析,参考阴阳互根互用及药对研究的思想,精简提炼补肾复方,方中淫羊藿温肾补阳温而不燥,意在阳中求阴,何首乌、女贞子补肾填精,三药合用以提高机体应激耐受力,修复机体应激损伤。现代药理实验已发现方中淫羊藿具有调节免疫功能及骨代谢、调节自然衰老动物下丘脑神经递质等作用<sup>[14]</sup>,何首乌具有促进神经细胞生长、减轻氧化应激损伤及抑制动脉粥样硬化等作用<sup>[15]</sup>,女贞子具有抑制肿瘤生长、降低辐射

损伤、减轻肝损伤、增强免疫及抗炎抗衰老等作用<sup>[16]</sup>。

目前 CFS 研究常用大小鼠造模测量相关局部表征和生化指标,但成本高,周期长,测量指标缺乏整体性,制约了 CFS 研究<sup>[17]</sup>。秀丽线虫作为国际通用的模式生物,整体生命功能活动及相关调控路径与人类高度同源,且生存周期短,成本低,操作便捷,是研究应激相关疾病的良好素材。本研究采用热应激、氧化应激及体内异常蛋白毒性构建多种单因素 CFS 模型,模拟人类常见致病高危应激因子如极端气温(致使卒中及死亡率上升)<sup>[18]</sup>、氧化损伤(老年退行性变等)及病理蛋白的慢性蓄积<sup>[19]</sup>如阿尔茨海默病等),并通过相关生存状态及指标测试反映 CFS 整体性发病特点。如上述,应激条件下线虫生存率较正常下降,存活时间严重缩短,运动能力受损;镜下线虫摄食行为减退,咽泵运动紊乱,基本符合 CFS 的整体发病特征。

本实验发现 BS 能提高线虫热耐受力,减轻线虫氧化损伤和体内病理蛋白造成的运动损伤,提高应激条件下线虫存活率,以高浓度 BS 效果最佳。同时进行寿命分析,进一步了解 BS 是否具有延长正常状态线虫生存时间的效果。结果发现低浓度 BS 对线虫生存时间无明显作用,而中、高浓度 BS 从成虫期对线虫开始干预,可延长线虫平均和最大寿限,以 500 mg/L 浓度效果佳。和 eat-2 这一咽部肌肉存在缺陷的限食长寿株比较,延寿效果相当,但限食延寿缺乏可行性,因此 BS 干预研究更有现实意义。因此笔者选取寿命分析筛选的高浓度 BS 测定生命活力相关指标。20 s 运动距离是体现线虫运动能力和反应灵敏度的重要指标,30 s 咽泵运动频次是体现线虫摄食能力和机体健康程度的重要指标。本结果显示 500 mg/L BS 可增加线虫的平均运动距离和活跃时间( $P < 0.01$ ),有助于延缓线虫中后期咽泵运动频次的衰减,延长咽泵运动期( $P < 0.01$ ),提示 BS 可提高线虫寿命质量。产卵过程需要机体神经肌肉功能相互协调,生殖能力同时可反映神经和肌肉协调能力。本研究结果显示高浓度 BS 不影响线虫生殖能力,对正常线虫生殖进程和神经协调功能无异常干扰,这与方剂配伍“以平为期”治疗理念是相符的。

应激相关疾病与衰老研究的机制高度相关<sup>[20]</sup>。

目前认识主要包括调节胰岛素/胰岛素样生长因子-1 信号传导通路(Insulin/IGF-1)、提高热休克蛋白表达、热量限制及毒物兴奋效应等<sup>[21]</sup>。前期补肾单味药研究发现淫羊藿总黄酮能上调模型大鼠热休克蛋白表达<sup>[22]</sup>,而淫羊藿次苷 II 则通过 Insulin/IGF-1 通路延长线虫寿命<sup>[23]</sup>,基于此,推测高浓度 BS 能有效治疗 CFS 线虫模型可能和热休克蛋白保护作用有关,同时 Insulin/IGF-1 通路及毒物兴奋效应机制也可能参与其中,但具体作用机制有待进一步探索。

综上,本研究利用模式生物建立多种单因素 CFS 模型,证实补肾复方对多种应激模式下的线虫具有保护作用;在不干扰正常生殖同时延长线虫寿命,提高生命质量,为进一步探索补肾复方治疗 CFS 的机制及药理研究奠定基础。

### 参 考 文 献

- [1] Sorenson MR, Jason L. Dysregulation of the HPA axis in chronic fatigue syndrome[J]. *Adv Neuro-immune Biol*, 2013, 4(4): 275-279.
- [2] 沈自尹. 中西医结合肾本质研究回顾[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(3): 304-306.
- [3] 蔡外娇, 张新民, 黄建华, 等. 淫羊藿总黄酮延缓秀丽隐杆线虫衰老的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(6): 522-525.
- [4] Brenner S. Genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94.
- [5] Zheng SQ, Ding AJ, Li GP, et al. Drug absorption efficiency in *Caenorhabditis elegans* delivered by different methods [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56877.
- [6] Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, et al. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans* [J]. *Toxicology*, 2007, 234(1): 113-123.
- [7] de Castro E, Hegde DS, Johnson TE. Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(2): 139-145.
- [8] Gutierrez - Zepeda A, Santell R, Wu Z, et al. Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans* [J]. *BMC Neurosci*, 2005, 6(1): 54.
- [9] Link CD, Taft A, Kapulkin V, et al. Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model [J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24(3): 397-413.
- [10] Libina N, Berman JR, Kenyon C. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of life span[J]. *Cell*, 2003, 115(4): 489-502.
- [11] Gill MS, Olsen A, Sampayo JN, et al. An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Free Radical Biol Med*, 2003, 35(6): 558-565.
- [12] Huang C, Xiong C, Kornfeld K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21): 8084-8089.
- [13] Gruber JN, Tang SY, Halliwell B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1100(1): 530-542.
- [14] 李婍, 王学美. 淫羊藿苷的药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2009, 33(23): 2727-2732.
- [15] 佟海宁, 刘丽君. 何首乌的药理研究与临床应用[J]. *亚太传统医药*, 2011, 7(11): 166-167.
- [16] 秦海霖, 高月. 女贞子化学成分及药理研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2007, 18(1): 84-85.
- [17] 苏成虎, 陈晓农, 杨新波, 等. 水芹提取物对应激致小鼠慢性疲劳综合征的对抗作用[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(12): 3100-3103.
- [18] Sung TI, Wu PC, Lung SC, et al. Relationship between heat index and mortality of 6 major cities in Taiwan[J]. *Sci Total Environ*, 2013, 442: 275-281.
- [19] Morimoto RI, Driessen AJ, Hegde RS, et al. The life of proteins: the good, the mostly good and the ugly [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(1): 1-4.
- [20] Benedetti MG, Foster AL, Vantipalli MC, et al. Compounds that confer thermal stress resistance and extended life span [J]. *Exp Gerontol*, 2008, 43(10): 882-891.
- [21] Olsen A, Vantipalli MC, Lithgow GJ. Life span extension of *Caenorhabditis elegans* following repeated mild hormetic heat treatments [J]. *Biogerontology*, 2006, 7(4): 221-230.
- [22] 沈自尹, 黄建华, 陈伟华. 以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(2): 135-137.
- [23] Cai WJ, Huang JH, Zhang SQ, et al. Icaritin and its derivative icariside II extend health span via insulin/IGF-1 pathway in *C. elegans* [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28835.

(收稿:2013-09-26 修回:2014-03-02)