DOI: 10.11844/cjcb.2025.12.0007
中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2025, 47(12): 3088–3098 CSTR: 32200.14.cjcb.2025.12.0007

*col-93*调控热休克因子1信号通路影响秀丽隐杆线虫运动与衰老

杨苏 姜禹唯 窦晓兵 陈步扬*
(浙江中医药大学, 生命科学学院, 杭州 310053)

摘要 该文探究秀丽隐杆线虫胶原蛋白COL-93编码基因对衰老的影响。通过公开数据库获得线虫衰老显著差异基因*col-93*, 通过*col-93p*::HIS-24::mCherry(SD1391)线虫品系检测*col-93*的表达部位和表达水平, 开展寿命实验、急性热应激实验、产卵量实验、子代寿命实验, 并应用qRT-PCR检测热休克因子-1(HSF-1)信号通路、IIS(insulin/IGF-1 signaling)通路和mTOR信号通路基因的表达量。结果显示*col-93*集中表达于线虫的角质层, 且敲低*col-93*的表达会缩短线虫的寿命并且降低其热耐受能力和运动能力, 但不影响其产卵量和子代寿命。*col-93*敲低会使HSF-1信号通路基因(*hsf-1*、*hsp-70*)表达水平降低; IIS通路基因(*daf-16*、*ctl-1*、*sod-3*)表达水平提高。结果表明, 衰老线虫的*col-93*表达水平显著下降, 且*col-93*通过影响HSF-1信号通路影响其运动能力及寿命。

关键词 秀丽隐杆线虫; 胶原蛋白; 衰老; 寿命; 热休克因子-1信号通路

The Impact of *col-93* on Locomotion and Aging in *Caenorhabditis elegans* through Regulation of the Heat Shock Factor-1 Signaling Pathway

YANG Su, JIANG Yuwei, DOU Xiaobin, CHEN Buyang*
(*School of Life Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China*)

Abstract This study investigates the impact of COL-93 encoding gene on the aging process of *Caenorhabditis elegans*. The age-associated significantly differentially expressed gene *col-93* was identified from public databases. The *col-93p*::HIS-24::mCherry (strain SD1391) nematode line was used to detect the spatial expression pattern and expression levels of *col-93*. Subsequent *col-93* gene silencing was performed for lifespan assays, acute heat stress tests, fecundity assays and progeny lifespan assays. qRT-PCR analyses were to quantify expression levels of key genes in the HSF-1, IIS (insulin/IGF-1 signaling), and mTOR signaling pathways. The results demonstrated that *col-93* was predominantly expressed in the cuticle of *C. elegan*s. Knocking down *col-93* shortened lifespan and reduced thermotolerance and motility, but did not affect the amounts of eggs laid or the lifespan of their offspring. Furthermore, *col-93* knockdown decreased the expression of genes in the HSF-1 pathway-related genes (*hsf-1*, *hsp-70*) and increased the expression of genes in the IIS pathway-related genes (*daf-16*, *ctl-1*, *sod-3*). The results showed that *col-93* expression was significantly decreased in senescent nematodes, and *col-93* modulated their motility and lifespan by regulatingthe HSF-1 signaling pathway.

Keywords *Caenorhabditis elegans*; collagen; aging; life span; heat shock factor-1 signaling pathway

收稿日期: 2025-07-02 接受日期: 2025-10-16
国家自然科学基金青年项目(批准号: 82505055)和浙江中医药大学2023年校级科研项目(批准号: 2023RCZXZK38)资助的课题
*通信作者。Tel: 17855828683, E-mail: 17855828683@163.com
Received: July 2, 2025 Accepted: October 16, 2025
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Program (Grant No.82505055) and the 2023 Universty-Level Scientific Research Project of Zhejiang Chinese Medical University (Grant No.2023RCZXZK38)
*Corresponding author. Tel: +86-17855828683, E-mail: 17855828683@163.com

衰老是生物体不可避免的生命过程, 伴随着生理功能的下降和代谢水平的降低[1]。皮肤作为人体最大的器官, 直接同外界环境接触, 具有保护、排泄、调节体温和感受外界刺激等作用, 皮肤的老化对人体衰老的进程具有重要的影响[2]。

皮肤由多层组织构成, 可分为表皮、真皮和脂肪层。随着年龄的增长, 真皮基质变薄、交联增多并且呈现出碎片化, 出现胶原纤维的重塑且其刚度增加[3], 其影响不仅仅只体现在对外界各种因素的干扰能力减弱, 还体现在影响到机体的多种代谢过程[4]。胶原蛋白是一种生物高分子纤维蛋白, 是人类体内含量最多、分布最广的功能性蛋白, 占蛋白质总量的25%~30%, 胶原蛋白主要存在于真皮层, 占皮肤组成成分的70%, 与皮肤的状态、保水能力紧密相关, 而衰老产生的皮肤皱纹也被认为与胶原蛋白的大量流失有密切联系。目前已有多项证据表明补充小分子胶原蛋白、局部应用人血小板衍生提取物与多酚类物质，并辅以适量紫外刺激能够促进胶原蛋白产生, 可改善皮肤特性[5-7]。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是抗衰老研究领域中非常重要的生物模型, 具有明确的全基因组序列和遗传背景, 也有研究将秀丽隐杆线虫作为皮肤研究的模式生物[8]。本研究发现秀丽隐杆线虫的*col-93*基因可能与其衰老的过程息息相关, 通过测定线虫的衰老指标、运动能力、应激抵抗能力, 探究*col-93*在秀丽隐杆线虫生命周期中发挥的作用, 为研究胶原蛋白在生物体中的抗衰老作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生型秀丽隐杆线虫N2品系、*col-93p*::His-24::mcherry线虫SD1391, 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) OP50购自美国线虫保藏中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC); 5-氟尿嘧啶(FUdR)、琼脂粉、酵母粉、氯化钙、硫酸镁购自北京索莱宝科技有限公司; 蛋白胨购自上海生工生物工程股份有限公司; 磷酸氢二钾购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 磷酸氢二钠购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 次氯酸钠购自山东科源生化有限公司; TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; QuantiTect Reverse Transcription Kit购自德国QIAGEN公司; TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)购自日本TaKaRa公司; SYBR GreenPro TaqHS qPCR Kit购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 其余生化试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

仪器和设备包括: 恒温培养摇床、生物培养箱(上海一恒科学仪器有限公司), 体式显微镜(SZX16, 日本Olympus公司), 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司), 超纯水系统(Mii-Q lntegral, 德国Mipore公司), 倒置荧光显微镜(IX81,日本Olympus公司), 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪(Lightcycler480 II, 瑞士Roche公司), 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), 电子天平(上海上天精密仪器有限公司), 电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司), 线虫培养箱(博安特仪器科技武汉有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 常用试剂溶液的配制 线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)的配制: 称取1.5 g NaCl、8.5 g琼脂粉(agar)、1.25 g蛋白胨(peptone), 加入500 mL ddH_2O于1 L锥形瓶中, 锡箔纸封住瓶口, 经121 °C高压蒸汽灭菌30 min。待培养基冷却至65 °C后, 加入12.5 mL 1 mol/L KPO_4、0.5 mL 1 mol/L $MgSO_4$、0.5 mL 1 mol/L $CaCl_2$和0.5 mL 5 mg/mL胆固醇(溶解于无水乙醇), 混匀后倒入60 mm细菌培养皿中。NGM平板室温放置1天后, 滴加大肠杆菌OP50, 再用涂布棒将其涂开晾干, 37 °C培养箱培养过夜, 取出备用。

LB培养基: 称取25 g LB, 加入1 000 mL ddH_2O于1 L锥形瓶中, 锡箔纸封住瓶口, 经121 °C高压蒸汽灭菌30 min。

M9缓冲液的配制: 分别称取3.0 g KH_2PO_4、6.0 g Na_2HPO_4、5.0 g NaCl, 1 000 mL双蒸水溶解后, 高压灭菌, 冷却加入1 mL $MgSO_4$。

Bleach 裂解液: 量取1 mL 5 mol/L NaOH, 加入5 mL ddH_2O, 4 mL 4%(*w/V*)次氯酸钠混匀, 现用现配。

1.3.2 线虫的培养和同期化处理 将L4线虫转移到涂有大肠杆菌OP50的NGM平板上, 放置于20 °C培养箱培养48 h。使用M9缓冲液收集NGM培养板上线虫及虫卵, 转移至1.5 mL EP管中, 室温下, 1 500 r/min离心2 min后去除上清。加入3 mL Bleach裂解液。不断摇晃混匀管内的液体与线虫沉淀直至在肉眼

无法观察到线虫形态, 室温下, 1 500 r/min离心1.5 min。去上清, 加入6 mL M9缓冲液混匀虫卵, 室温下, 1 500 r/min离心1.5 min, 重复洗涤3次, 留约1 mL液体。取适量含虫卵的液体滴加至无菌NGM培养板中央, 备用。

1.3.3 线虫寿命的测定 线虫经同步化后置于NGM培养基在20 °C环境下培养直至线虫发展到L4时期。将线虫分别转入含有FUdR的NGM培养基, 每个品系线虫准备90~120条, 平均饲养于3个60 mm NGM培养板中。每天检查其死亡情况: 用铂金丝针轻轻触碰线虫头部, 多次触碰后均没有发生摆动反应的线虫判定为死亡, 同时将线虫同步化时间记录为第0天, 以最后一只线虫死亡的时间作为实验结束, 每天记录线虫死亡情况及数目, 意外死亡线虫(线虫爬至培养板边缘干死)不计入死亡结果, 以此绘制生存曲线。

1.3.4 线虫摆动频率的测定 线虫经同步化后置于NGM培养基在20 °C环境下培养直至线虫发展到L4时期。 将线虫从培养基转移至滴有M9缓冲液的无菌培养基上。在显微镜下计数线虫30 s内身体弯曲次数, 当线虫头部摆动从身体一端至另一端, 角度超过90°时, 定义为一次头部摆动, 线虫相对于咽泵方向做正弦式移动定义为一次身体弯曲。每剂量组选取10~20条线虫。

1.3.5 热应激实验 线虫经同步化后置于NGM培养基在20 °C环境下培养直至线虫发展到L4时期。 将线虫转移至涂有L4440和*col-93* RNAi(W05B2.5)大肠杆菌的培养基, 每个培养基100条, 每组进行3次重复。于20 °C培养箱培养1天后, 将培养基在37 °C培养箱中热激1 h, 热激过程中避免培养基之间堆叠, 且尽量放置于培养箱的相同位置。热激结束后将培养基放回20 °C培养箱培养过夜。12 h后统计线虫生存率, 用铂金丝针轻轻触碰线虫头部, 多次触碰后均没有发生摆动反应的线虫判定为死亡。

1.3.6 脂褐素测定实验 收集特定时期(线虫经同步化后置于NGM培养基在20 °C环境下培养直至线虫发展到L4时期)的秀丽隐杆线虫培养并用M9缓冲液洗去表面大肠杆菌, 将线虫用25 mmol/L的叠氮化钾溶液进行麻醉, 再将其转移到2%的琼脂糖载玻垫片上, 采用荧光显微镜观察并采集图片。使用ImageJ软件统计分析其荧光强度。

1.3.7 线虫产卵率实验 选取特定时期(线虫经同步化后置于NGM培养基在20 °C环境下培养直至线虫发展到L4时期)形态相近的线虫用铂金丝针将其转移新的NGM培养皿内, 每个培养皿内放置1条线虫, 每组设置5~10个平行, 将线虫开始产卵的当天记为第1天, 进行产卵计数, 每隔24 h再次计数, 并将线虫转移至新的培养皿中, 统计线虫前5天的每日产卵数和产卵总数, 并绘制曲线。

1.3.8 渗透压实验 收集待实验的线虫(线虫经同步化后置于NGM培养基在20 °C环境下培养直至线虫发展到L4时期), 并用M9缓冲液洗去表面大肠杆菌, 将20只线虫分别转移至600 mmol/L的NaCl溶液和蒸馏水中, 每5 min记录线虫的运动状态, 统计观察时刻活跃线虫的数量(观察时线虫头部摆动从身体一端至另一端且角度超过90°的线虫称为活跃线虫), 共统计180 min, 并绘制线虫活跃率的变化曲线。

1.3.9 qRT-PCR 用M9缓冲液将约300条检测时期的线虫样品收集至1.5 mL EP管中, 用M9缓冲液清洗线虫3次以去除携带的大肠杆菌。加入1 mL TRIzol试剂和研磨珠, 使用组织研磨仪研磨90 s, 裂解线虫。将已裂解的线虫样品上清转移至另一个1.5 mL EP管中, 参照TRIzol试剂说明书进行线虫RNA提取, 然后使用QuantiTect Reverse Transcription Kit将RNA反转录为cDNA。根据GenBank数据库中的基因序列, 使用Primer Premier 5.0软件设计PCR引物。引物序列见表1, 内参基因为*cdc-42*。cDNA样品通过TB Green™ Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)扩增, 荧光信号均由LightCycler®480(Roche公司)检测记录, 扩增结束后得到Ct值, 采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对基因表达量。每个样品进行3个复孔, 至少重复3次实验。

1.3.10 *col-93p*::HIS-24::mCherry荧光观察 将特定时期(线虫经同步化后置于NGM培养基在20 °C环境下培养直至线虫发展到L4时期)的SD1391(*col-93p*::HIS-24::mCherry)线虫从培养基上洗脱, 用叠氮化钾麻醉, 在荧光显微镜下观察线虫的表达部位和荧光强度, 并拍照记录, 用ImageJ软件对目的图案灰度值进行分析。

1.3.11 蛋白–蛋白对接分析 从alphafold数据库(https://alphafold.ebi.ac.uk/)中下载秀丽隐杆线虫的HSF-1和COL-93 三维蛋白结构(UniProt ID: Q9U348和G5EFT5)。通过HDOCK网站(http://hdock.phys.hust.edu.cn/)将HSF-1和COL-93进行蛋白–蛋白对接

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	正向引物序列(5′→3′) Forward primer sequence (5′→3′)	反向引物序列(5′→3′) Reverse primer sequence (5′→3′)
cdc-42	TGG AGA TGG AGC TGT CGG TA	GCT CGC CAC CGA TCA TTA CT
col-93	CGG CTG TTA CCT TCT CGG TT	CAC GGA TGT GGT TCA CCT CA
col-103	AAG GAG GAT CTT CCC GAC CA	GTT CCT GGG GTT CCA TCG TT
col-159	CGA CCC CGC AAT GAA CAA TC	GAC TGG ACC GGG AAG TCA AG
hsf-1	AGC GGC AGA AGC TCA GAT TT	CCT CCA CAG TTC TTG CCG AT
lgg-1	CCA GAC CGT ATT CCA GTG ATT GTT GA	TCG TGA TGG TCC TGG TAG AGT TGT
hsp-70	CAT CAA ATC CCC GCG CAA TT	CGA AGT GCC TTT TCA ACC GG
hsb-1	GCC GTG GGA CCC AAT TAG AA	GAA TAA CGG TGC AAT CGG CC
daf-16	GGT GGA GTT CAG ATT AAG CAG GAG TC	CAG GCA GTG GAG ATG AGT TGG ATG
daf-2	CGG TTG TTG TTC GTG TTC GGC TAT	TCG TCT CAC TCG CAT CGT GTC TC
sir-2.1	ACG ATT CAG AAG TTG CGG TCA CA	TGG AGT GGC ACC ATC ATC AAG AAG
ctl-1	CTT CTC CTA CAC GGA CAC GCA TTA C	CCT TCA CAT CAT CAC GAG TAC GGT ATC
sod-3	TCA ATG GTG GTG GAC ACA TCA ATC AT	CAG AGC CTT GAA CCG CAA TAG TGA
let-363	CAG CAG CCT CAA CAA CCG AAG AA	GAA GAC CGA CGA GTG AAC CAA GTG
gst-4	CTC TTG CTG AGC CAA TCC GTA TCA T	AGA CAT TGA CTG ACC GAA TTG TTC TCC

模拟, 分析对接的不同构象、不同构象下的结合活性以及相互作用距离在0.5 nm以内的氨基酸残基。利用Pymol软件对蛋白三维结构进行预处理, 绘制两个蛋白之间相互作用的氨基酸残基。

1.4 数据统计与分析

采用Prism GraphPad 7.0软件进行制图及生物学统计分析。针对不同类型数据所选用的统计分析方法如下所示: 线虫运动能力、热应激实验, 基因表达水平数据采用*t*-test分析, 以平均值±标准误表示; 线虫寿命数据采用LogRank and Gehan-Breslow-Wilcoxon test分析。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胶原蛋白COL-93、COL-103、COL-159编码基因在衰老秀丽隐杆线虫的表达水平降低

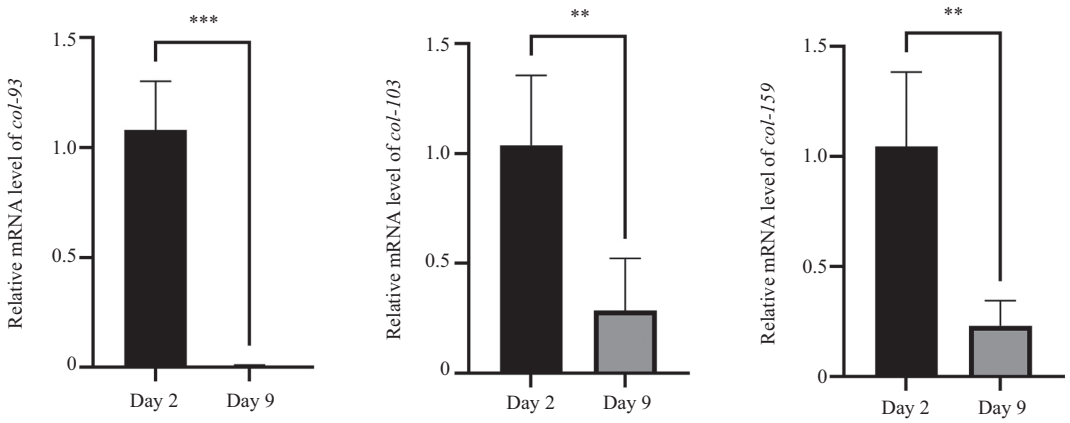
根据已有的转录组数据[9], 发现在秀丽隐杆线虫五种关键的体细胞组织(即神经元、肠道、体壁肌肉、皮下组织和腔细胞)中, 线虫衰老过程中的组织特异性是不同的。在以上五类组织中仅发现*col-93*、*col-103*、*col-159*的表达水平在秀丽隐杆线虫的衰老过程中是不断降低的。我们从mRNA水平比较了2天和9天的秀丽隐杆线虫*col-93*、*col-103*、*col-159*的表达量。在衰老线虫中三者均显著性下降, 其中*col-93*的变化幅度最大, *col-159*变化幅度最小, 和文献中的变化幅度一致(图1)。围绕*col-93*开展后续实验。

2.2 胶原蛋白编码基因*col-93*在秀丽隐杆线虫的角质层表达

为探究不同时期线虫*col-93*的表达部位, 我们在荧光显微镜下分别观察了3天和9天的SD1391(*col-93p*::HIS-24::mCherry)品系线虫, 其结果表明*col-93*在年轻线虫的体表均发生转录, 且分布相对均匀, 在头部和尾部均有表达(图2A), 在衰老线虫中, *col-93*的转录水平显著下降, 且主要集中于头部, 且尾部和躯干部位的荧光强度显著下降, 荧光由明亮点状变为弥散(图2B)。经统计发现其荧光强度呈现显著性差异(图2C)。

2.3 敲低*col-93*加速线虫的衰老, 降低其运动能力和抗热应激能力

我们将N2线虫的*col-93*进行敲低, 并分别测定了线虫的寿命、脂褐素含量、运动能力、抗热应激能力、产卵量以及子代寿命等多项指标, 来研究*col-93*对线虫的影响。我们分别在线虫第2天和第12天将其转移到涂有*col-93* RNAi的大肠杆菌的培养基上, 发现无论在线虫年轻或衰老状态, 敲低*col-93*均会缩短寿命(图3A)。荧光结果显示, 年轻阶段(第4天)*col-93*敲低组和对照组并无显著差异, 而在衰老阶段(第9天) *col-93*敲低组的荧光加深, 表明敲低*col-93*使得线虫脂褐素累积加剧, 加速衰老(图3B)。

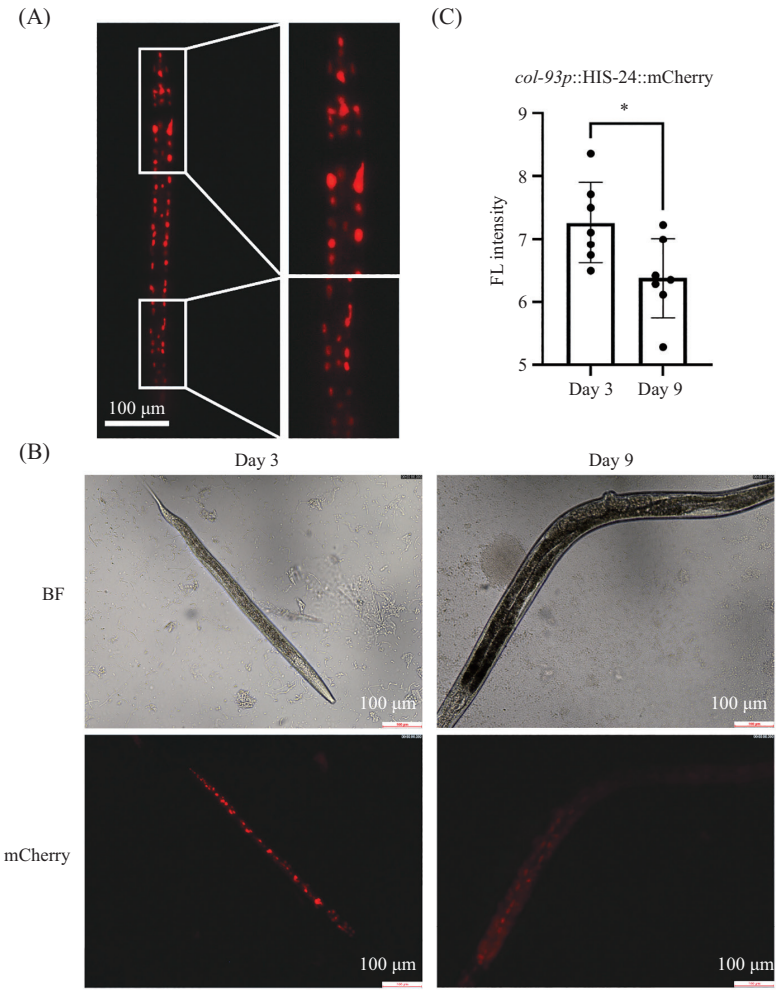


qRT-PCR检测胶原蛋白编码基因*col-93*、*col-103*和*col-159*的表达情况, ***P*<0.01, ****P*<0.001。

The expression levels of *col-93*, *col-103*和*col-159* were assessed using qRT-PCR. ***P*<0.01, ****P*<0.001.

图1 不同阶段秀丽隐杆线虫*col-93*、*col-103*、*col-159* mRNA表达情况

Fig.1 Expression of *col-93*, *col-103*, and *col-159* mRNA in *Caenorhabditis elegans* at different stages



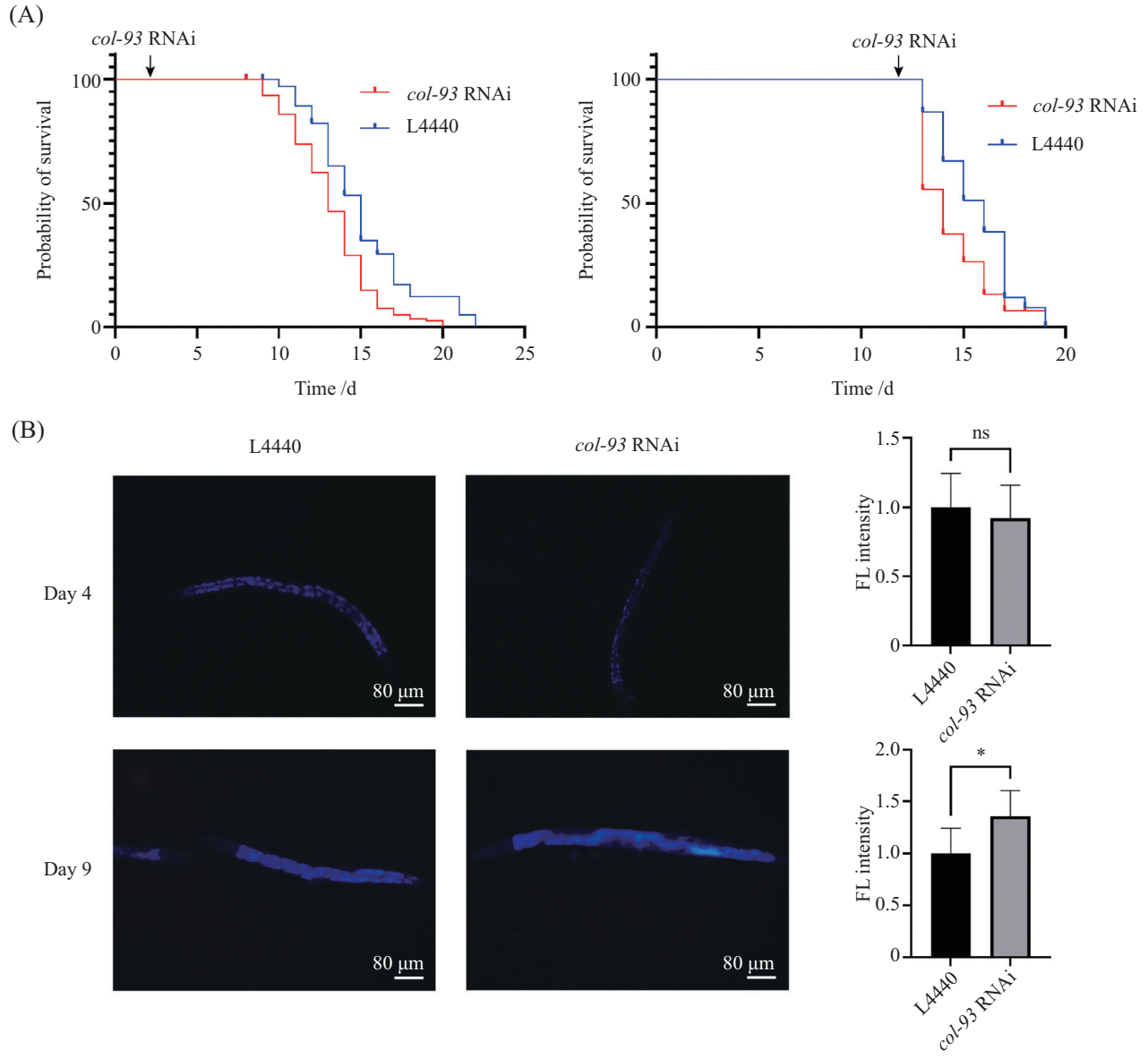
A: SD1391(*col-93p*::HIS-24::mCherry)品系线虫的荧光分布情况; B: 年轻和衰老SD1391(*col-93p*::HIS-24::mCherry)品系线虫的形态及*col-93*基因的转录分布; C: 年轻和衰老线虫荧光强度统计柱状图. **P*<0.05。

A: fluorescence distribution of SD1391 (*col-93p*::HIS-24::mCherry) strain; B: morphology and transcriptional distribution of the *col-93* gene in nematodes of the young and aged SD1391 (*col-93p*::HIS-24::mCherry) strains; C: bar plots of fluorescence intensity statistics for young and aged nematodes. **P*<0.05.

图2 *col-93*在不同阶段秀丽隐杆线虫中的转录情况

Fig.2 Transcription of *col-93* in *Caenorhabditis elegans* at different stages

在年轻阶段, 线虫的摆动频率并未呈现出显著差异, 在运动了15 min后, *col-93*敲低组线虫的摆动频率显著降低, 而对照组的摆动频率下降不明显(图4A)。在衰老阶段, *col-93*敲低组线虫较对照组的摆动频率也显著下降(图4B), 说明*col-93*与运动能力具有关联。在热应激实验中, 我们发现*col-93*敲低后, 其死亡率显著增加, 表明其抗热应激能力减弱(图4C)。*col-93*敲低线虫寿命的缩短, 运动能力和抗热应激能力的减弱可能是其角质层结构受损的结果, 为此我们将线虫放置在低渗和高渗溶液中, 通过观察其运动状态(是否运动)判断角质层是否产生损伤。我们将线虫分别放入蒸馏水和0.6 mol/L的NaCl溶液中, 每5 min观察线虫的运动情况, 共统计180 min, 发现两者并未出现显著差异, 由此认为线虫的角质层结构相对完整(图4D)。此外我们对*col-93*敲低线虫的生殖能力和后代寿命进行测试, 发现敲低组前5天的

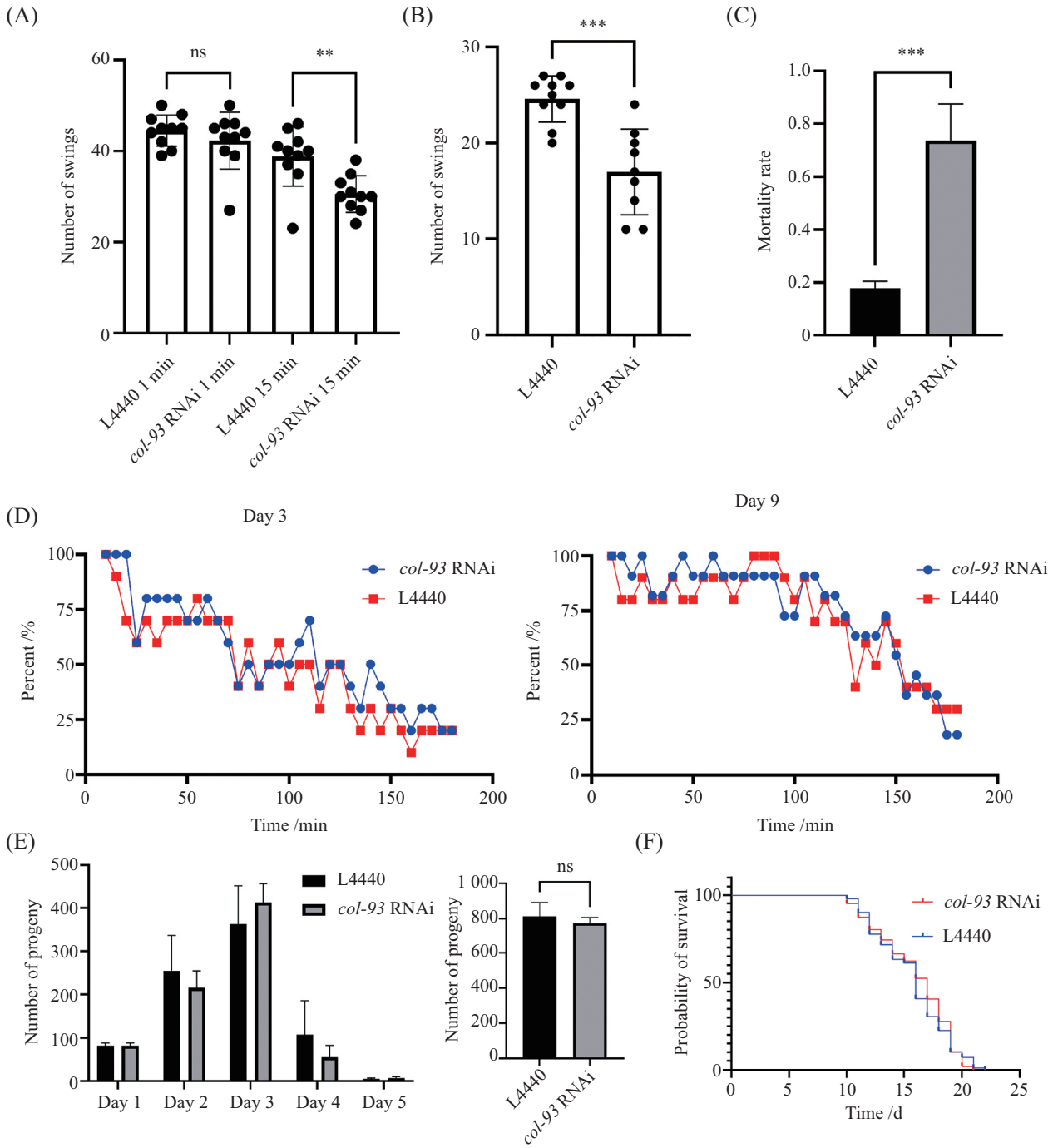


A: 在年轻和衰老两个阶段分别对线虫进行*col-93* RNAi, 并进行寿命实验; B: *col-93* RNAi线虫在年轻和衰老阶段的脂褐素含量比较。 ns: $P>0.05$; *$P<0.05$。

A: nematodes were subjected to *col-93* RNAi at young and senescent stages, and lifespan experiments were performed; B: comparison of lipofuscin content in *col-93* RNAi nematodes at young and aged stages. ns: $P>0.05$; *$P<0.05$.

图3 敲低*col-93*对不同阶段线虫衰老的影响

Fig.3 Effects of *col-93* knockdown on aging in *Caenorhabditis elegans* at different stages



A: *col-93* RNAi降低年轻线虫的持续运动能力; B: *col-93* RNAi降低衰老线虫的运动能力; C: *col-93* RNAi降低线虫的抗热应激能力; D: 在低渗和高渗环境中的活跃线虫的占比情况; E: *col-93* RNAi线虫的产卵能力; F: *col-93* RNAi子代线虫的生存曲线。ns: $P>0.05$; **$P<0.01$; ***$P<0.001$.

A: *col-93* RNAi reduces the sustained motor ability of young nematodes; B: *col-93* RNAi reduces the motor ability of aged nematodes; C: *col-93* RNAi reduces heat stress resistance in *Caenorhabditis elegans*; D: proportion of active nematodes in hypotonic and hypertonic environments; E: oviposition ability of *col-93* RNAi nematodes; F: survival curves of *col-93* RNAi progeny nematodes. ns: $P>0.05$; **$P<0.01$; ***$P<0.001$.

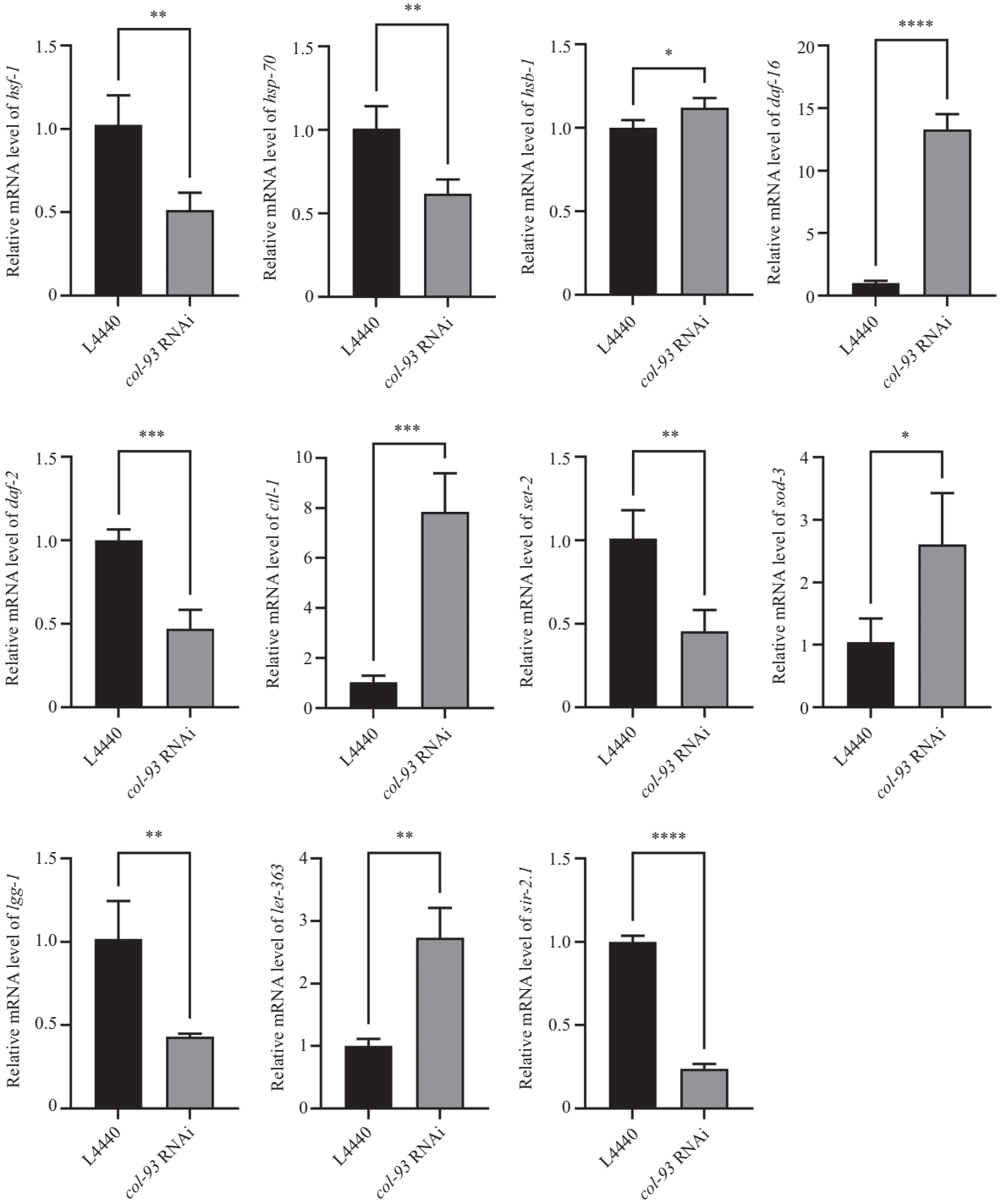
图4　敲低*col-93*对秀丽隐杆线虫运动、抗热应激和生殖能力的影响

Fig.4　The effects of *col-93* knockdown on motility, thermotolerance, and reproductive capacity in *Caenorhabditis elegans*

产卵量与对照组没有显著差异，对其后代的寿命实验也未发现显著差异(图4E和图4F)。

2.4　敲低*col-93*下调HSF-1信号通路

我们将*col-93*敲低组的线虫和对照组的寿命相关基因进行比较，发现其HSF-1信号通路相关基因*hsf-1*、*hsp-70*表达水平显著降低，*hsb-1*表达水平显著升高，而IIS信号通路相关基因*daf-16*、*ctl-1*、*sod-3*、*gst-4*表达量显著增加，*daf-2*表达水平显著降低，



qRT-PCR检测*hsf-1*、*hsp-70*、*hsb-1*、*daf-16*、*daf-2*、*ctl-1*、*set-2*、*sod*-3、*lgg-1*、*let-363*、*sir2.1*在线虫中的表达情况。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.000 1。

The expression of *hsf-1*, *hsp-70*, *hsb-1*, *daf-16*, *daf-2*, *ctl-1*, *set-2*, *sod-3*, *lgg-1*, *let-363*, *sir2.1* in nematodes was detected by qRT-PCR. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.000 1.

图5 敲低*col-93*对寿命相关基因表达量的影响

Fig.5 The effect of *col-93* knockdown on the expression levels of lifespan related genes

mTOR信号通路基因*let-363*表达量显著增加, 而受多个通路共同调控的基因*lgg-1*和*sir-2.1*, 其表达水平也显著降低(图5)。以上变化中HSF-1信号通路相关基因朝着目前文献报道线虫缩短寿命的方向变化, IIS信号通路相关基因和*let-363*均朝着目前文献报道线虫延长寿命的方向变化。

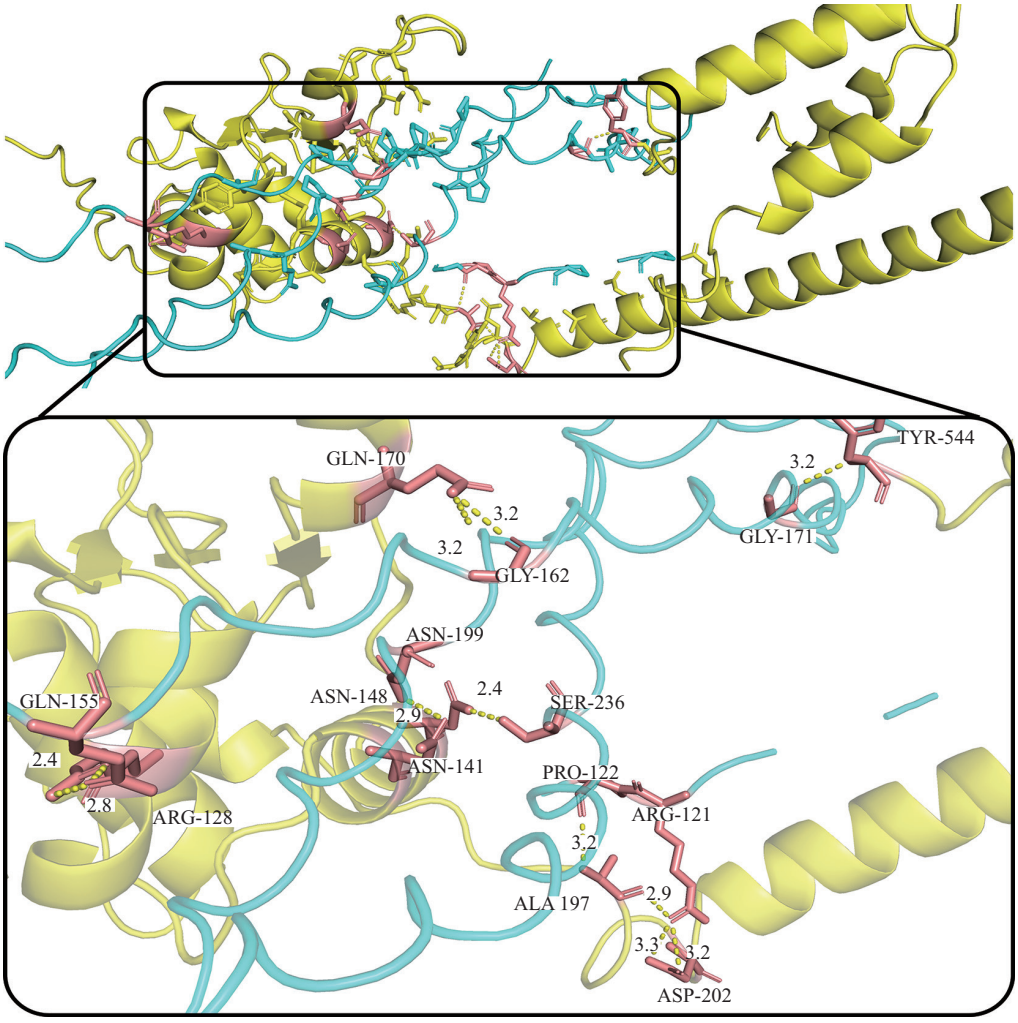


图6　HSF-1和COL-93蛋白对接结果

Fig.6　Docking results of HSF-1 and COL-93 proteins

表2　排名前十模型得分汇总

Table 2　Summary of scores for the top ten models

模型 Model	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6	Model 7	Model 8	Model 9	Model 10
Docking score	–256.56	–255.65	–253.58	–251.79	–245.74	–240.84	–236.55	–236.49	–229.63	–227.28
Confidence score	0.893 9	0.892 2	0.888 1	0.884 5	0.871 6	0.860 2	0.849 5	0.849 4	0.831 0	0.824 3
Ligand rmsd (A)	122.35	117.59	118.73	106.21	86.91	126.29	76.69	105.79	101.18	77.59

2.5　HSF-1和COL-93蛋白–蛋白对接分析

为尝试探索HSF-1和COL-93之间的分子机制，我们对HSF-1和COL-93进行了蛋白–蛋白对接分析，其结果显示，两者分别有多个氨基酸残基通过氢键相互作用，还可以通过多条疏水作用力结合(图6)。预测的前十个模型显示HSF-1和COL-93之间存在较强的相互作用，且具有较高的可信度(表2)。

3　讨论

本研究基于秀丽隐杆线虫寿命实验、急性热应激等经典实验，从线虫运动能力、抗逆性及衰老相关指标等方面综合探讨胶原蛋白COL-93编码基因对线虫衰老的作用。*col-93*的表达在年轻线虫与衰老线虫体内有着较大的差异，在寿命实验中表现出显著的正相关性，且在不同的生命阶段敲低其表达均会降低其寿命，且其表达与线虫的运动能力、抗

逆性能力有密切联系, 年轻阶段(第2天)敲低*col-93*, 线虫的运动持久性显著降低, 衰老时期(第12天) *col-93*敲低组线虫的摆动频率显著降低, 表明*col-93*可调控线虫的运动功能。此外, *col-93*敲低组的线虫其在高温环境的耐受能力减弱, 这可能与其角质层的结构与功能有关, 线虫在高渗和低渗环境中的运动状态表明其角质层相对完整。进一步的实验结果证明, 其耐受能力的减弱可能与线虫体内代谢通路的变化有关。相比于对照组, *col-93*敲低组的HSF-1信号通路基因表达水平显著降低, IIS信号通路基因表达水平提高, HSF-1信号通路已被大量研究证实与热应激密切相关[10-12], 我们认为*col-93*的敲低下调了HSF-1信号通路, 缩短了寿命, 而线虫为了应对HSF-1信号通路下调带来的不利影响, 代偿性地上调了IIS信号通路基因。由此我们认为应该重视胶原蛋白, 其生物体的作用不仅局限于角质层的完整性, 也可能引起机体代谢的变化。

胶原蛋白一直以来都被认为与衰老息息相关, 衰老导致机体的胶原蛋白流失, 而减缓胶原蛋白的流失可以延缓机体的衰老。添加重组TGF-β2可延缓人真皮细胞(human dermal papilla cells, hDPCs)细胞衰老, 上调胶原蛋白COL13A1和COL15A1水平可恢复老年hDPC中球状体的形成, 增加DPC头发的维持和诱导率[13]。紫草提取物紫草素可以通过自噬维持线虫体内胶原基因表达水平, 稳定线虫消化系统结构, 提高线虫面对氧化胁迫及急性热激的应激能力, 以延缓线虫衰老[14]。HSF-1作为其信号通路关键转录因子会影响秀丽隐杆线虫的寿命, 其延寿作用可能是通过自噬作用[15]与影响IIS通路[16]发生的。目前已经有研究将HSF-1与胶原蛋白的功能联系起来, 生物体上调HSF-1的表达, 促使其下游靶蛋白(如热休克蛋白)的表达量增加, 从而上调胶原蛋白。裸鼹鼠HspB1蛋白在线虫体内的高水平表达能够使其在多种条件下表现出更长的寿命, 并且对热应激的抵抗力也有所提高, RNAseq结果显示HspB1促进了胶原蛋白和溶酶体基因的表达[17]。TRAIL药物下调HSF-1依赖性HSP47的表达, 从而减少活化肝星状细胞中胶原蛋白的产生, 以缓解肝纤维化[18]。西藏凹乳芹根提取物HLB01可以通过促进胶原蛋白的表达、抗氧化潜力和抗逆性来延长秀丽隐杆线虫的寿命, 并抵抗Doxo诱导的小鼠衰老[19]。

本研究发现, 敲低胶原蛋白*col-93*同样会影响HSF-1信号通路, 并带来寿命缩短、运动能力下降和热耐受能力降低等不良影响, 说明胶原蛋白与HSF-1信号通路的关系不是单向传递, 而是相互的影响, 但是其具体作用机制尚不清晰, 需要深入研究, 且这一特性在哺乳动物上是否一致尚不可知。本研究阐述了秀丽隐杆线虫胶原蛋白COL-93编码基因在衰老过程中可能带来的影响, 为胶原蛋白抗衰老提供新观点和依据, 但本研究中采用生物秀丽隐杆线虫模型下的研究结果仍存在一定局限性, 需要在哺乳动物中进一步探索胶原蛋白对衰老的影响和作用。

参考文献 (References)

[1] KHAN H T A, ADDO K M, FINDLAY H. Public health challenges and responses to the growing ageing populations [J]. Public Health Chall, 2024, 3(3): e213.

[2] BOISMAL F, SERROR K, DOBOS G, et al. Vieillissement cutané [J]. Med Sci, 2020, 36(12): 1163-72.

[3] BLAIR M J, JONES J D, WOESSNER A E, et al. Skin structure-function relationships and the wound healing response to intrinsic aging [J]. Adv Wound Care, 2020, 9(3): 127-43.

[4] HAN H M, KIM S Y, KIM D H. Mechanotransduction for therapeutic approaches: cellular aging and rejuvenation [J]. APL Bioeng, 2025, 9(2): 021502.

[5] CHOWDHURY A, NOSOUDI N, KARAMCHED S, et al. Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts, implications to improve skin health [J]. J Dermatol Sci, 2021, 102(2): 94-100.

[6] WYLES S P, PROFFER S L, FARRIS P, et al. Effect of topical human platelet extract (HPE) for facial skin rejuvenation: a histological study of collagen and elastin [J]. J Drugs Dermatol, 2024, 23(9): 735-40.

[7] PU S Y, HUANG Y L, PU C M, et al. Effects of oral collagen for skin anti-aging: a systematic review and Meta-analysis [J]. Nutrients, 2023, 15(9): 2080.

[8] CHISHOLM A D, XU S. The caenorhabditis elegans epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2012, 1(6): 879-902.

[9] WANG X, JIANG Q, SONG Y, et al. Ageing induces tissue-specific transcriptomic changes in *Caenorhabditis elegans* [J]. EMBO J, 2022, 41(8): e109633.

[10] KOVÁCS D, BIRÓ J B, AHMED S, et al. Age-dependent heat shock hormesis to HSF-1 deficiency suggests a compensatory mechanism mediated by the unfolded protein response and innate immunity in young *Caenorhabditis elegans* [J]. Aging Cell, 2024, 23(10): e14246.

[11] MIN K J, SUGAWARA T, SAKAMOTO K. Quercetin enhances motility in aged and heat-stressed caenorhabditis elegans nematodes by modulating both HSF-1 activity, and insulin-like and p38-MAPK signalling [J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0238528.

[12] KUMSTA C, CHANG J T, SCHMALZ J, et al. Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and pro-

teostasis in *C. elegans* [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 14337.

[13] KIM H, CHOI N, KIM D Y, et al. TGF-β2 and collagen play pivotal roles in the spheroid formation and anti-aging of human dermal papilla cells [J]. Aging, 2021, 13(16): 19978-95.

[14] 王俊玲, 杨春菊, 李秀萍, 等. 紫草素延缓秀丽隐杆线虫衰老的实验研究[J]. 安徽医药(WANG J L, YANG C J, LI X P, et al. An experimental study on the antiaging effects of shikonin on *Caenorhabditis elegans* [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal), 2025, 29(6): 1127-32.

[15] 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): 1076-7.

[16] 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): 322-34.

[17] ALEXANDER C C, MUNKÁSCY E, TILLMON H, et al. HspB1 overexpression improves life span and stress resistance in an invertebrate model [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2022, 77(2): 268-75.

[18] PARK S J, SOHN H Y, PARK S I. TRAIL regulates collagen production through HSF1-dependent Hsp47 expression in activated hepatic stellate cells [J]. Cell Signal, 2013, 25(7): 1635-43.

[19] LIU W, GUAN Y, QIAO S, et al. Antiaging effects of vicatia thibetica de boiss root extract on caenorhabditis elegans and doxorubicin-induced premature aging in adult mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021(1): 9942090.