

褐藻多糖的体外抗氧化活性及其延长秀丽隐杆线虫的寿命

王猛¹, 关思宇¹, 于杰¹, 薛金爱¹, 狄建兵², 王愈², 姜进举³, 崔红利^{1*}, 李润植^{1*}

(1. 山西农业大学农学院分子农业与生物能源研究所, 山西太谷 030801)(2. 山西农业大学食品科学与工程学院, 山西太谷 030801)(3. 海藻活性物质国家重点实验室, 山东青岛 266400)

摘要: 该研究探讨了褐藻多糖(FSP)的体外抗氧化作用。以秀丽隐杆线虫为模式动物, 采用氧化剂 H₂O₂ 建立急性氧化应激模型, 测定 FSP 对线虫寿命、运动能力、年龄色素及氧化应激指标的影响。研究表明, FSP 对羟基自由基有一定的清除能力, 且作用效果呈剂量依赖性; FSP (50、100、200 μg/mL) 呈剂量依赖性的延长秀丽隐杆线虫寿命, 分别为 7.24%、26.70% 和 48.42%; FSP 显著提高了线虫运动能力, 其中 200 μg/mL 处理组运动能力达 73.50%, 而且减少体内脂褐素的积累及细胞凋亡程度; 在 0.1% H₂O₂ 氧化应激下, 200 μg/mL 的 FSP 通过提升抗氧化酶 SOD、CAT 活性来增强抗氧化能力; qRT-PCR 结果显示, FSP 通过调控 Insulin/IGF-1 信号通路上相关基因的表达影响线虫寿命。综上, FSP 可通过延长秀丽隐杆线虫的寿命, 提升其运动能力, 提升线虫抗氧化酶活性, 调控关键基因的表达, 抑制氧化应激水平, 对线虫氧化损伤发挥保护作用。

关键词: 褐藻多糖; 抗氧化; 秀丽隐杆线虫; 寿命

文章编号: 1673-9078(2022)04-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0629

In Vitro Antioxidant Activity of Fucoidan-containing Sulfated Polysaccharide and Its Prolongation of the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*

WANG Meng¹, GUAN Siyu¹, YU Jie¹, XUE Jin'ai¹, DI Jianbing², WANG Yu², JIANG Jinju³, CUI Hongli^{1*}, LI Runzhi^{1*}

(1. Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China) (2. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China) (3. State Key Laboratory of Bioactive Seaweed Substances, Qingdao Brightmoon Seaweed Group Co. Ltd., Qingdao 266400, China)

Abstract: The *in vitro* antioxidant effect of fucoidan-containing polysaccharide (FSP) was investigated. Taking *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as the model animal, an acute oxidative stress model was established using the oxidizing agent, H₂O₂. The effects of FSP on lifespan, mobility, age pigment and oxidative stress indices were determined. The research showed that FSP exhibited an ability to scavenge hydroxyl radicals and this effect was in dose-dependent; FSP (50, 100 and 200 μg/mL) prolonged the lifespan of *C. elegans* in a dose-dependent manner (by 7.24%, 26.70% and 48.42%, respectively); FSP significantly increased the motility of nematodes, with the motility of the 200 μg/mL FSP treatment group reaching 73.50%, and the accumulation of lipofuscin and the degree of apoptosis decreased; Under 0.1% H₂O₂-induced oxidative stress, the treatment with 200 μg/mL FSP enhanced the antioxidant capacity through increasing the activities of

引文格式:

王猛,关思宇,于杰,等.褐藻多糖的体外抗氧化活性及其延长秀丽隐杆线虫的寿命[J].现代食品科技,2022,38(4):1-9

WANG Meng, GUAN Siyu, YU Jie, et al. *In Vitro* antioxidant activity of fucoidan-containing sulfated polysaccharide and its prolongation of the lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 1-9

收稿日期: 2021-06-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31902394); 山西农谷建设科研专项(SXNGJSKYZX201906); 晋中市重点研发(农业领域)项目(201903D01100013和Y192012); 山西农业大学科技创新基金(博士启动)项目(2018YJ16)

作者简介: 王猛(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物生物技术, E-mail: sxndwangmeng@163.com

通讯作者: 崔红利(1987-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物生物技术, E-mail: cuihongli2005@163.com; 共同通讯作者: 李润植(1959-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物生物技术, E-mail: rli2001@126.com

antioxidant enzymes, SOD and CAT; The qRT-PCR results showed that FSP influenced the lifespan of nematodes through regulating the expression of related genes in the Insulin/IGF-1 signaling pathway. In summary, FSP could exert protective effects on oxidative damage in nematodes through extending the lifespan of *C. elegans*, enhancing its mobility, promoting the activities of antioxidant enzymes, regulating the expression of key genes and inhibiting the level of oxidative stress.

Key words: fucoidan-containing sulfated polysaccharide; antioxidant; *Caenorhabditis elegans*; lifespan

氧化应激是机体在遭受各种有害刺激时, 体内高活性分子如活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 过度积累, 细胞氧化程度超出了氧化物的清除能力, 氧化系统和抗氧化系统失衡, 进而导致细胞衰老, 造成组织损伤^[1]。Harman 等^[2]研究表明, 体内氧自由基反应失衡使得细胞富集大量 ROS, 进而加速细胞衰老。衰老是生命周期中必然经历的生理过程, 衰老导致生物体自我更新能力和修复能力被削弱, 此外, 衰老常伴随多种慢性疾病的发生, 如神经退行性疾病、癌症、糖尿病和心血管疾病等^[3]。因此, 当体内抗氧化酶难以抵挡自由基的过度富集, 需要补充天然无毒的抗氧化剂来缓解细胞损伤。天然活性多糖因毒副作用小而备受关注。Feng 等^[4]研究证明, 三七多糖虽对 ROS 的清除能力较弱, 但是能显著延长线虫寿命, 且该多糖对热应激的作用可能与提高抗氧化酶活性和降低脂质过氧化有关; 潘子康^[5]研究证明, 小球藻多糖在抗氧化胁迫实验中提高了线虫的存活时间, 提高了线虫耐热能力并且提高了线虫 L4 期的运动能力。

褐藻多糖 (Fucoidan-containing sulfated polysaccharide, FSP) 是褐藻细胞壁基质中的一种天然硫酸化多糖^[6]。研究表明, FSP 具有抗病毒、抗凝血、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、调节免疫等多种生理活性^[7,8]。先前研究表明, FSP 是一种能够清除自由基和调节代谢的天然产物, 这可能是由于多糖复杂的结构中带着不同数量的活性羟基和活性氢的缘故, 这些活性基团特异性识别并配对单自由基, 通过改变其结构达到清除自由基的作用^[9]。Wang 等^[10]发现, 不同藻类提取的 FSP 抗氧化能力也大不相同, 且硫酸根含量与超氧阴离子自由基清除能力呈正相关; 栗晓庆等^[11]认为, 通过碱提法获得的 FSP 自由基清除率高, 还原力较弱, 在体外表现出较强的抗氧化活性。此外, FSP 抗氧化能力的关键是其分子量及硫酸根含量^[12]。先前的研究多集中于体外验证, 然而其体内验证及分子机制尚不明确。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C.elegans*) 是一种存在于土壤中的食菌生物, 因其生命周期短、易维护、可获得数千个突变株, 被广泛用作研究抗氧化、抗衰老、抗阿尔兹海默症、抗糖尿病药物作用的模式生物^[13]。胰岛素/类胰岛素样生长因子 (Insulin/

IGF-1, IIS) 是调节生命周期且高度保守的信号通路, 在线虫的发育、代谢和衰老过程中起关键作用^[14]。研究表明, 天然多糖通过调节某些信号通路中关键分子的表达, 引起一系列级联反应, 从而调控线虫的衰老^[15]。Yuan 等^[16]证明地黄中性多糖通过 IIS 增强线虫的抗应激能力, 从而延长线虫寿命; Zhang 等^[17]报道枸杞多糖主要通过 *sir-2.1*、*daf-12* 和 *daf-16* 延长了线虫的寿命。基于此, 推测 FSP 通过调控 Insulin/IGF-1 信号通路增强线虫抵抗氧化应激的能力。目前, 对 FSP 体外抗氧化研究较多, 但是其抗氧化及抗衰老的机理研究鲜有报道。本研究以秀丽隐杆线虫为模式动物, 研究 FSP 抗氧化性及其作用机理, 为其作为天然食品开发利用提供数据支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验所用褐藻多糖 (即岩藻多糖) FSP 来自于裙带菜, 由青岛明月海藻集团有限公司姜进举博士惠赠。FSP 的化学组成如表 1 所示, 其中, FSP 的总糖和总蛋白的含量分别为 70.4% 和 4.77%, 糖醛酸含量为 7.22%, 硫酸基含量为 21.5%, 岩藻糖含量为 63.38%。菌株购自美国线虫遗传中心 (Caenorhabditis Genetics Center, CGC): N2 株系; Nematode Growth Medium (NGM) 培养基, 尿嘧啶缺陷型大肠杆菌 (*Escherichia coli*) OP50, DPPH、抗坏血酸, 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH=7.8), Trizol 试剂 (上海生工), PrimeScript RT 试剂盒 (Takara), BCA 蛋白试剂盒、SOD 试剂盒、CAT 试剂盒采购自南京建成生物技术公司。

表 1 褐藻多糖化学组成

名称	含量/%	单糖种类	摩尔分数/%
总糖	70.40±1.03	甘露糖	2.21
糖醛酸	7.22±0.40	阿拉伯糖	1.03
硫酸基	21.50±0.18	鼠李糖	1.01
蛋白质	4.77±0.41	葡萄糖	1.89
水分	7.6	半乳糖	21.18
多酚	-	木糖	2.07
分子量/u	2000~5600	岩藻糖	63.38

1.2 方法

1.2.1 羟基自由基清除率的测定

在试管中加入 0.5 mL 不同浓度的 FSP 溶液 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL)、0.5 mL 9 mmol/L FeSO₄ 溶液、0.5 mL 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液, 混匀后加入 0.5 mL 9 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液, 在 37 °C 水浴中反应 0.5 h 后于 510 nm 处测定其吸光度值, Vc 作为阳性对照。

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:

A₀——水代替样品测得的吸光度值;

A₁——多糖溶液测得的吸光度值;

A₂——乙醇代替水杨酸-乙醇溶液测得的吸光度值。

1.2.2 超氧阴离子清除率的测定

样液配制同 1.2.1, 向具塞玻璃试管中分别加入 0.026 mol/L 的甲硫氨酸 1.5 mL, 500 μL 的磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH=7.8), 然后加入 300 μL 的核黄素 (0.02 mmol/L) 和 300 μL NBT (0.75 mmol/L), 混匀后在光照下反应 30 min, 同时以蒸馏水作为空白对照 A₀, 以不同浓度的 Vc 作为阳性对照, 测定 560 nm 处的吸光值 A, 按照如下公式计算清除率。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_0 - A}{A_0}\right) \times 100\%$$

1.2.3 总还原力测定

将 1 mL 不同浓度 FSP (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL) 放入 2.5 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=6.6) 中, 与 2.5 mL 铁氰化钾 (1%, m/V) 混合, 50 °C 反应 20 min, 然后加入 2.5 mL 三氯乙酸 (10%, m/V) 终止反应, 5000 r/min 离心 10 min 后取 2.5 mL 上清液与 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL FeCl₃ (0.1%, m/V) 混合, 静置 10 min 后于 700 nm 处测定各组吸光度值, Vc 作为阳性对照。

1.2.4 FSP 对线虫寿命及运动能力的影响

随机挑取 20 条同期化至 L4 期线虫分为 4 组, 分别将其接种至不含或含有不同浓度 FSP-L (50 μg/mL)、FSP-M (100 μg/mL)、FSP-H (200 μg/mL) 的 NGM 培养基饲养 (饲喂 OP50, 同时为防止排卵影响每天转板)。每组 3 次重复, 每板 20 条, 于恒温恒湿培养箱中培养, 此时记为线虫寿命的第 0 d。每天更换新鲜培养基, 第 2 d 起, 在显微镜下观察线虫存活状态, 死亡标准以用 picker 轻碰线虫, 线虫头部或身体不摆动弯曲为准, 每天对各板中线虫死亡数详细记

录, 计算存活率; 钻入培养基的线虫及由于其他因素死亡的线虫将从统计数据中排除, 以生存率百分比为纵坐标绘制生存曲线。

线虫运动能力检测根据参考文献^[18]。实验组各挑取状态相当的线虫放置在 2% 的琼脂糖凝胶上, 先让线虫运动约两分钟适应环境, 在体式显微镜下观察 30 s 内线虫头部的摆动次数并记录, 用以评价线虫运动能力的指标。一次头部摆动是指线虫的头部呈弓形运动 (每组检测线虫数目最少 15 条)。

1.2.5 脂褐素及细胞凋亡荧光检测

制作 2% 琼脂糖凝胶, 倒在培养皿盖里, 厚度大概控制在 1~3 mm, 凝固后, 切下一小块琼脂放在载玻片上, 将线虫挑在培养基上, 于荧光显微镜激发 485 nm、发射 530 nm 波长蓝光观察。

线虫细胞凋亡程度采用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚荧光染色法^[19] (DAPI) 测定: 取线虫培养平板, 切除 2.0 cm×2.0 cm 的琼脂, 加入 M9 缓冲液低速离心后收集虫体。荧光检测前, 将 0.5 mol/L 碳酸盐缓冲液与甘油等体积混合, pH=9.5, 每个虫体样品避光染色 10 min, 用磷酸盐-生理盐水缓冲液冲洗 3 次, 荧光显微镜激发 360 nm、发射 400 nm 波长紫外光下镜检。

1.2.6 H₂O₂ 诱导的急性氧化应激

随机挑取 30 条同期化至 L4 期线虫分为 4 组, 分别将其接种至不含或含有不同浓度 FSP-L (50 μg/mL)、FSP-M (100 μg/mL)、FSP-H (200 μg/mL) 的 NGM 培养基培养, 将培养 2 d 后的线虫急性暴露于 0.1% H₂O₂ 的 48 孔板内, 每孔 10 条, 每组三次重复, 每隔 30 min 计数线虫的存活个数, 绘制生存曲线, 直至全部死亡。

1.2.7 抗氧化酶测定

按 1.2.4 寿命实验线虫培养方法, 用 3 mL 磷酸盐缓冲液收集线虫至 10 mL 离心管, 设置破碎功率和时间分别为 800 W 和 8 min 对线虫组织破碎, 之后对破碎的组织液离心, 离心后取上清^[20]。按照 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, SOD 试剂盒和 CAT 试剂盒测定线虫酶活。

1.2.8 mRNA 提取及荧光定量 PCR 检测

将同期化 L4 期线虫 FSP 处理后, 培养 2 d。收集虫体于离心管中, PBS 缓冲液清洗 3 次。Trizol 法提取线虫的总 RNA, Primer 5.0 设计相关基因引物。用 SYBR Green 为 DNA 荧光染料, 实时荧光定量 PCR 测定, 以 β-actin 为内参测定 *daf-16* 及其下游靶基因的表达量, 基因表达以 PCR 的 2^{-ΔΔCt} 值表示。

表 2 秀丽隐杆线虫抗氧化基因实时定量 PCR 引物

Table 2 Real time quantitative PCR primers for antioxidant genes of *C. elegans*

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>daf-2</i>	5'-CCCGGTTGTTGTCGTCGTC-3'	5'-TGATCGTCTCACTCGCATCG-3'
<i>daf-16</i>	5'-GACATGCAAGCGTGGAAGT-3'	5'-GCCGAACGCTCTTGTGATG-3'
<i>skn-1</i>	5'-TCGCCTCTTTCGGAATCTC-3'	5'-CTGGAAGCTCGTTGTCAGT-3'
<i>β-actin</i>	5'-CCAGGAATTGCTGATCGTATGCAGAA-3'	5'-TGGAGAGGGAAGCGAGGATAGA-3'

1.3 统计学分析

本文数据处理采用 Graphpad Prism 5.0, $p < 0.05$ 表示差异显著。数据采用平均值±标准差 (Mean±SD) 表示, 用 One-way ANOVA 进行处理, 活力脂褐素以及 DAPI 荧光显微镜拍照, 作图用 Origin 9.1。

2 结果与分析

2.1 FSP 对羟基自由基的清除作用

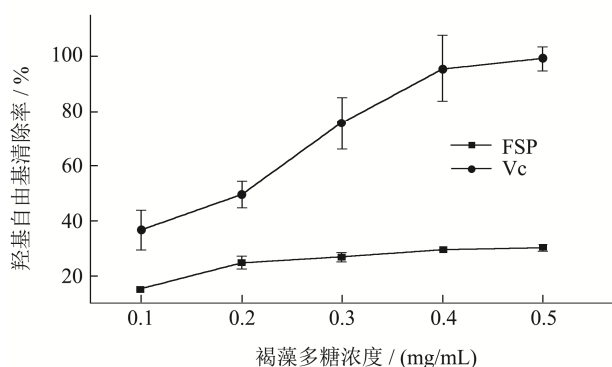


图 1 FSP 对羟基自由基的清除能力

Fig.1 Scavenging ability of FSP to hydroxy free radical

羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 是重要的活性氧之一, 氧化能力强且危害性较大。因此, 研究 FSP 对羟基自由基的清除作用是 FSP 抗氧化性研究中重要的部分。Fenton 反应 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$) 产生 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 与水杨酸反应生成 2,3-二羟基苯甲酸, 该物质在 510 nm 处有一个特殊的吸收峰。研究表明, 在体系中若加入抗氧化剂时, 会产生的较少的 $\cdot\text{OH}$, 吸光度降低^[21]。本试验中通过 Fenton 法测定褐藻多糖对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果, 如图 1 所示。在 0.1~0.5 mg/mL 浓度时 FSP 对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用呈显著的浓度依赖性, 当 FSP 的浓度为 0.5 mg/mL 时, 对羟基自由基的清除率是 30.13%。FSP 对羟基自由的清除活性低于张志东等^[22]提取的从大连海域得到的褐藻多糖, 当褐藻多糖浓度为 0.6 mg/mL 时, 清除率达 50%。

2.2 FSP 对超氧阴离子自由基的清除作用

作为机体诱发脂质过氧化的原因之一, 超氧阴离

子自由基是氧化反应过程中最先产生的一种自由基。如图 2 所示, FSP 具有清除超氧阴离子的能力, 但相比于 Vc, 其清除率较低。在浓度为 0.1~0.5 mg/mL 内, FSP 对超氧阴离子自由基的清除率呈剂量依赖性增加, 并在 0.5 mg/mL 时, 趋于平缓, 清除率达 41.13%。本实验研究结果, 与王雪等^[23]结果相似, 羊栖菜褐藻糖胶超氧阴离子清除能力随多糖的浓度的增加而增强, 但是此清除率低于其实验结果。

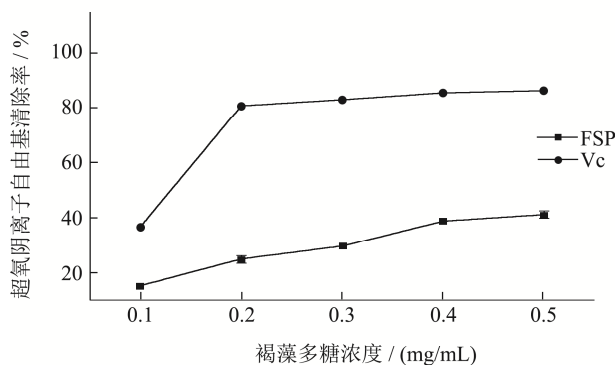


图 2 FSP 对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig.2 Scavenging ability of FSP to superoxide anion radical

2.3 FSP 的总还原力

所测样品将 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 还原成 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 与 Fe^{3+} 反应产生普鲁士蓝, 在 700 nm 波长处检测普鲁士蓝的吸光度, 吸光度值越高, 样品的还原能力越强。如图 3 所示, 在不同浓度下, 所测样品的还原能力都很低。随着 FSP 浓度的增加, FSP 的还原能力并未有显著变化, 当多糖浓度为 0.5 mg/mL 时, 在 700 nm 处, FSP 最大吸光度也没有超过 0.07, 这一结果可能与实验所用多糖的含糖量有关。先前研究结果表明, 随着吸光度不断增加, 还原力逐渐增强, 12 mg/mL 的羊栖菜褐藻多糖的吸光度值为 1.49。尽管本试验中多糖还原力较低, 但我们也能发现吸光度值与多糖浓度呈正相关趋势^[24]。

2.4 FSP 对线虫寿命及运动能力的影响

在衰老过程中, 机体细胞内环境稳态逐渐衰退, 最终导致生命的终结。寿命长短作为抗衰老研究的定量指标, 具有重要意义。如图 4a 所示, 随着 FSP 浓度

的增加, 线虫存活曲线向右移, 表明其最大寿命延长; 图 4b 所示, 与对照组相比, FSP 干预后线虫的平均寿命显著 ($p < 0.05$) 提高, 其中 FSP-L、FSP-M 和 FSP-H 组线虫的平均寿命较对照组分别延长了 7.24%、26.70% 和 48.42%。综上, 在一定浓度梯度内 FSP 显著 ($p < 0.05$) 延长了线虫的寿命。Zhang 等^[25]的研究结果表明, 高剂量的毛竹多糖处理的线虫, 平均寿命为 27.3 d; 张宗敏等^[26]研究表明, 与空白对照组相比, 金钗石斛多糖显著延长秀丽隐杆线虫的平均寿命, 质量浓度为 0.24 mg/mL 的多糖延长了 33.89%。本研究发现 FSP 可以延长线虫寿命, 且作用效果呈剂量依赖性, 证明了摄食活性物质可以延长线虫寿命。

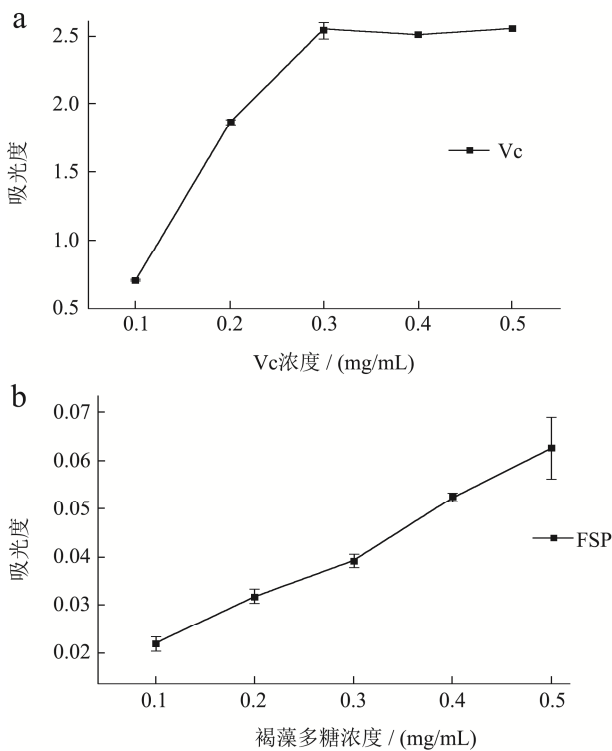


图3 FSP的总还原力

Fig.3 Total reducing power of FSP

随着机体的衰老, 运动能力也会减弱, 头部摆动和身体弯曲频率常作为分析线虫运动能力的指标。为了探究 FSP 是否可以减缓因衰老所致的线虫运动能力下降, 本实验选择线虫的头部摆动次数为评价指标。从表 3 中可看出, 与 CK 相比, FSP 干预后线虫的头部摆动次数显著增加, 并呈现浓度依赖性。当给予 FSP 多糖浓度为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其运动能力比对照组分别增加了 14.62%、35.52% 和 73.50%, 每组之间均有显著 ($p < 0.05$) 差异。Gu 等^[27]研究黑木耳多糖对线虫生物学功能的影响中指出, 0.8 mg/mL 的黑木耳多糖能显著增加线虫的头部摆动频率, 且线虫头部摆动与多糖浓度呈剂量依赖性, 与本研究结果相一致。

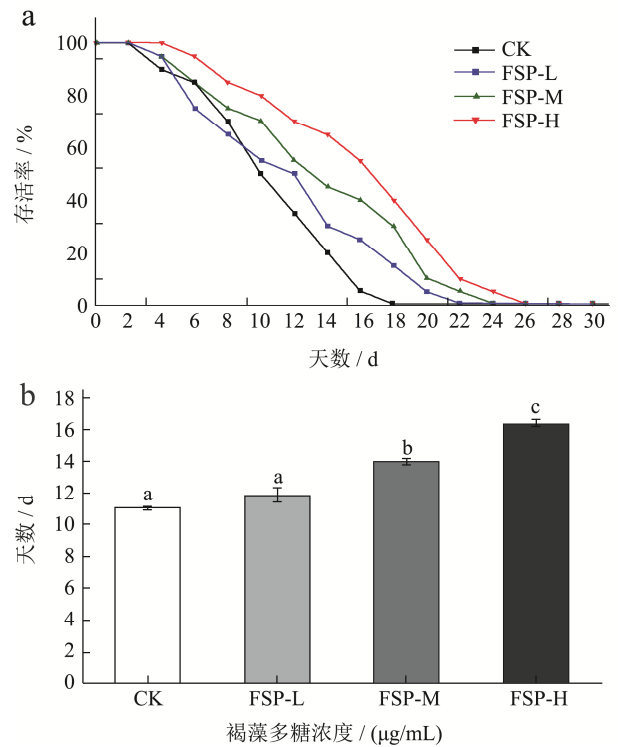


图4 褐藻多糖对秀丽隐杆线虫寿命的作用

Fig.4 Effect of FSP on lifespan of *C. elegans*

注: a: 生存曲线; b: 平均寿命; 不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

表3 FSP对线虫运动能力的影响

Table 3 Effect of FSP on the head swing of *C. elegans*

组别	头部摆动次数
CK	10.53±3.59 ^a
FSP-L	12.07±3.69 ^{ab}
FSP-M	14.27±2.86 ^b
FSP-H	18.27±4.58 ^c

注: 不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

2.5 FSP 对线虫体内脂褐素和细胞凋亡的影响

脂褐素^[28]是线虫氧化应激和衰老的指示剂, 是一种自发荧光色素, 脂褐素含量随线虫年龄的增加而逐渐增加, 过多的脂褐素沉淀会对线虫的机体造成损害, 最终加速线虫的衰老。由图 5 可知, 在线虫的同一时期, FSP 处理组的线虫体内自发的荧光强度较对照组均有不同程度的降低, 所以 FSP 可以减缓线虫体内脂褐素的积累, 从而延缓线虫的衰老进程。DAPI 染色常用于细胞凋亡检测^[19], 细胞形态的变化如包膜褶皱或出泡, 核染色质高度凝聚、边缘化等都可作为细胞凋亡的证据。DAPI 染色结果表明, 对照组中细胞核染色质高度聚集, 形态改变, 而 FSP 一定程度上缓解了细胞凋亡程度且呈剂量依赖性。有研究报道, 青钱柳多糖在线虫生命周期的不同阶段均能显著降低年龄

色素的积累^[29]。张晓寒等^[30]的研究表明,随着线虫生命的进程,机体衰老导致体内脂褐素堆积,根皮素能显著降低体内脂褐素含量,作用效果呈剂量依赖性,其中 75 $\mu\text{g/mL}$ 的根皮素脂褐素水平较正常组降低了 36.96%。Suetomi 等^[31]研究表明,在线虫衰老过程中,

伴随着细胞失活,凋亡的细胞在 DAPI 染色后,呈现亮蓝色,天然的活性物质一定程度上会延缓衰老、缓解细胞凋亡程度,本研究结果表明,200 $\mu\text{g/mL}$ 的褐藻多糖能够缓解细胞凋亡程度。

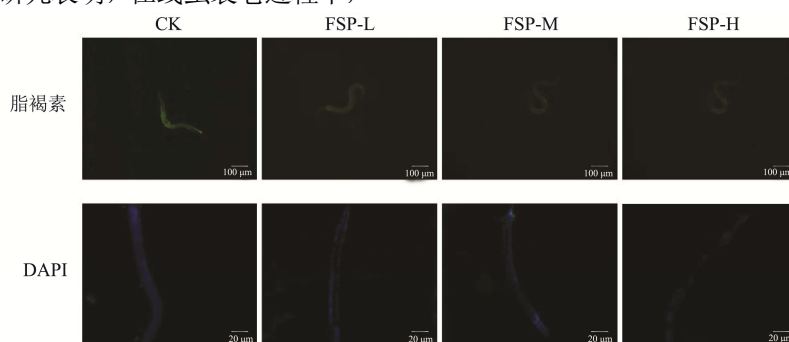


图5 FSP对线虫脂褐素积累及DAPI染色的影响($\times 100$)

Fig.5 Effect of FSP on lipofuscin accumulation and DAPI staining in *C. elegans*

2.6 FSP对线虫应激能力的影响

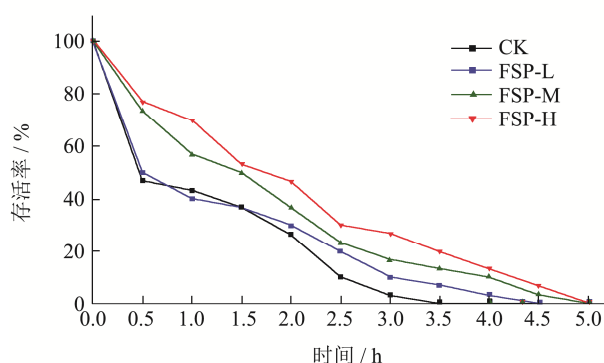


图6 不同浓度FSP对线虫抵抗氧化应激的作用

Fig.6 Effect of different concentrations of FSP on stress resistance of *C. elegans* oxidative stress

表4 FSP对线虫氧化应激下寿命的影响

Table 4 Effect of FSP on longevity of *C. elegans* under oxidative stress

组别	剂量/ $(\mu\text{g/mL})$	平均寿命/h
双氧水	0	1.37 ± 0.06^a
	50	1.43 ± 0.14^a
	100	1.88 ± 0.37^{ab}
	200	2.22 ± 0.46^b

氧化应激被认为是诱发衰老的风险因素,线虫抵抗氧化应激能力与寿命密切相关,氧化应激会加速线虫的衰老甚至死亡,这可能是由于氧化剂引起的DNA损伤^[32]。线虫寿命的延长与抗压能力的增强有关。为了全面评价FSP的抗逆性,测定了线虫对氧化应激的抗性。 H_2O_2 可产生羟基自由基,会促进细胞氧化损伤,所以选择0.1%的 H_2O_2 致线虫急性氧化应激。由图6可知,对照组在氧化应激3.5h时,线虫已无存活,但

是在4.5h时,FSP-M、FSP-H组存活率还为3.3%和6.7%,经FSP处理后,生存曲线显著右移,线虫的平均寿命均显著($p < 0.05$)增加,且与空白对照组相比分别增加了4.3%、37.2%、62%(表4)。先前研究表明,根皮素可有效保护线虫抵抗氧化应激的影响^[30],且75 $\mu\text{g/mL}$ 的根皮素处理后线虫平均寿命延长了35.96%。

2.7 FSP对线虫抗氧化酶活力的影响

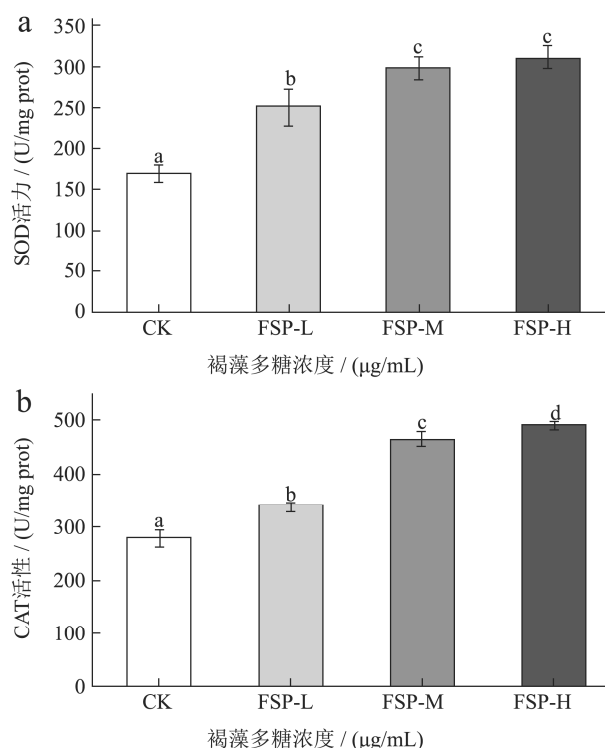


图7 FSP对线虫抗氧化酶活性的影响

Fig.7 Effect of FSP on antioxidant enzyme activity in *C. elegans*

注:a:超氧化物歧化酶活;b:过氧化氢酶活性;不同小写字母表示0.05水平差异显著。

抗氧化酶活性及含量直接影响了机体在氧化损伤中的免疫能力^[33]。由图 7 可知, 线虫体内 SOD 活性和 CAT 活性均与 FSP 浓度呈一定的剂量依赖效应关系。FSP 显著 ($p<0.05$) 增强了 SOD 和 CAT 活性。其中 FSP-L、FSP-M、FSP-H 分别提高 SOD 活力 48.48%、75.91% 和 82.75%, CAT 活性分别增强了 58.26%、65.85% 和 74.95%。结果表明, FSP 通过促进线虫体内抗氧化酶活性清除自由基。先前研究表明, 南瓜多糖及其降解产物能显著提高 SOD 和 CAT 等应激相关的抗氧化酶活性^[34]。Wang 等^[35]的结果表明, 400 mg/mL 的橘皮素能够显著 ($p<0.05$) 提高抗氧化酶活性, 与对照组相比, 分别提高了 2.9 倍和 2.2 倍。本实验结果发现, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FSP 显著提高了 CAT 及 SOD 活性, 与对照组相比分别提高了 1.75 倍和 1.83 倍。

2.8 FSP 对线虫基因表达的影响

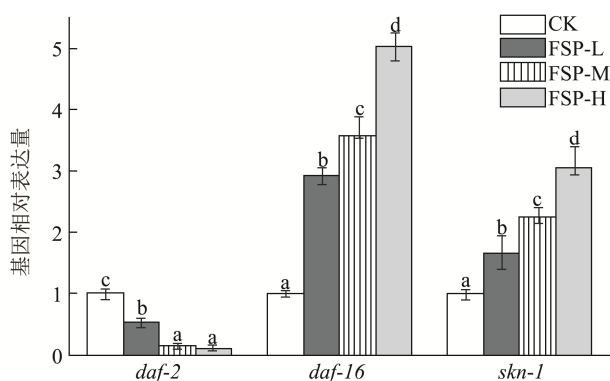


图 8 FSP 对胰岛素信号通路关键基因转录水平的影响

Fig.8 Effect of FSP on transcription of key genes in insulin signaling pathway

注: 不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

为了进一步检测 FSP 对线虫体内抗氧化分子机制, 利用 PCR 技术对 (图 8) Insulin/IGF-1 信号通路上关键因子进行分析。Insulin/IGF-1 信号通路在调控线虫衰老中扮演着重要的角色^[36], 该通路主要起调节作用的信号基因有 *daf-2*、*daf-16* 和 *skn-1*^[37]。在 IIS 中, 转录因子 *daf-16* 是调控长寿的关键因子; 而其上游基因 *daf-2* 可以负向调控该通路^[38], 当 *daf-2* 的转录活性受到抑制时, *daf-2* 下游的 *daf-16* 在细胞核内表达增加, 从而达到抗压、延长寿命的效果^[39]。此外, 线虫转录因子 *skn-1* 也可以通过激活第二阶段的解毒反应来抵抗氧化应激, 而且 *skn-1* 延长寿命的机制是独立于 *daf-16* 的^[40]。本实验结果表明, 经 FSP 处理后, 线虫体内 *daf-2* 的基因表达较对照组显著 ($p<0.05$) 下调, 而 *daf-16* 和 *skn-1* 的基因表达显著 ($p<0.05$) 升高, 提示 FSP 通过下调 *daf-2* 基因和上调 *daf-16* 基因延长

线虫的寿命。本研究结果与大多植物多糖抗衰老作用的机制相似^[41], FSP 通过调节 Insulin/IGF-1 信号通路关键基因的表达进而调控线虫衰老。

3 结论

FSP 已被证明具有多种生理活性且具有潜在的药用价值。以其抗氧化作用为例, 本实验首先研究 FSP 体外抗氧化活性, 随后研究其在体内抗氧化活性。本研究发现, FSP 可有效延缓线虫寿命, 提升线虫抗氧化酶活性, 通过影响 Insulin/IGF 信号通路上关键基因表达进而参与了线虫衰老过程的调控。综上, 本研究为 FSP 抗氧化研究提供实验依据, 同时为天然抗氧化剂及抗衰老辅助因子的开发提供理论基础, 但线虫氧化应激分子机制较为复杂, 更深入的分子水平研究有待进一步开展。

参考文献

- [1] YANG Zhenzhou, YU Yingting, LIN Hongru, et al. *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 129: 310-322
- [2] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. Journal of Gerontology, 1956, 11(3): 298-300
- [3] WU Xueyan, LI Ruichang, ZHAO Yongjie, et al. Separation of polysaccharides from *Spirulina platensis* by HSCCC with ethanol-ammonium sulfate ATPS and their antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173: 465-472
- [4] FENG Shiling, CHENG Haoran, XU Zhou, et al. Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 188-194
- [5] 潘子康. 蛋白核小球藻抗氧化活性物质提取及其抗衰老作用的研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2020
- [6] PAN Zikang. Study on extraction of antioxidant bio-active components from *Chlorella* and its anti-aging effect [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2020
- [7] Luthuli S, WU Siya, CHENG Yang, et al. Therapeutic effects of fucoidan: a review on recent studies [J]. Marine Drugs, 2019, 17(9): 487
- [8] Korolenko T A, Bgatova N P, Ovsyukova M V, et al. Hypolipidemic effects of β -glucans, mannans, and fucoidans: mechanism of action and their prospects for clinical application [J]. Molecules, 2020, 25(8): 1819
- [8] 程仕伟, 陈超男, 冯志彬, 等. 海带褐藻多糖的水提制备及其

- 抗氧化活性研究[J].食品科学,2010,31(6):101-104
- CHENG Shiwei, CHEN Chaonan, FENG Zhibin, et al. Water extraction and antioxidant activity of fucoidan from *Laminaria japonica* [J]. Food Science, 2010, 31(6): 101-104
- [9] Huang G, Mei X, Hu J. The antioxidant activities of natural polysaccharides [J]. Current Drug Targets, 2017, 18(11): 1296-1300
- [10] Wang J, Zhang Q B, Zhang Z S, et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42(2): 127-132
- [11] 栗晓庆,吕俊平,刘琪,等.裸藻多糖碱提工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J].食品科技,2019,44(9):209-215
- LI Xiaoqing, LYU Jumping, LIU Qi, et al. Optimization of alkaline extraction and antioxidant activities of paramylon *in vitro* [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(9): 209-215
- [12] Lei W, Jing S, Su X, et al. A review about the development of fucoidan in antitumor activity: progress and challenges [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 154: 96-111
- [13] Zemel M B. Modulation of energy sensing by *Leucine Synergy* with natural sirtuin activators: effects on health span [J]. Journal of Medicinal Food, 2020, 23(11): 1129-1135
- [14] Kaletsky R, Lakhina V, Arey R, et al. The *C. elegans* adult neuronal IIS/FOXO transcriptome reveals adult phenotype regulators [J]. Nature, 2016, 529(7584): 92-96
- [15] Kim D K, Jeon H, Cha D S. 4-Hydroxybenzoic acid-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 630-640
- [16] Yuan Y, Kang N, Li Q, et al. Study of the effect of neutral polysaccharides from *Rehmannia glutinosa* on lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. Molecules, 2019, 24(24): 4592
- [17] Zhang Z K, Zhou Y N, Fan H T, et al. Effects of lyciumbarbarum polysaccharides on health and aging of *C. elegans* depend on *daf-12/daf-16* [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 6379493
- [18] Wang J, Deng N, Wang H, et al. Effects of orange extracts on longevity, healthspan, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. Molecules, 2020, 25(2): 351
- [19] Prapaporn J, Pawanrat C, Tanapan S, et al. *Holothuria scabra* extracts possess anti-oxidant activity and promote stress resistance and lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* [J]. Experimental Gerontology, 2018, 110: 158-171
- [20] 宁粤,欧阳雅琦,郑汝婷,等.蕨菜提取液对秀丽隐杆线虫体内抗氧化特性的影响[J].中国食物与营养,2019,25(1):58-63
- NING Yue, OUYANG Yaqi, ZHENG Ruting, et al. Effect of fern extract on antioxidant properties of *Caenorhabditis elegans in vivo* [J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(1): 58-63
- [21] Elena M B, Enma C, Andres M, et al. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3): 673-680
- [22] 张志东,王一飞,钱垂文,等.裙带菜多糖的体外抗氧化作用研究[J].中药材,2012,35(4):620-622
- ZHANG Zhidong, WANG Yifei, QIAN Chuiwen, et al. The antioxidant effect of polysaccharide from *Undaria Pinnatifida in vitro* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 35(4): 620-622
- [23] 王雪,兰丽,原晶莹,等.3种海藻多糖抗氧化及其抗衰老活性的初步研究[J].药物生物技术,2020,27(1):29-32
- WANG Xue, LAN Li, YUAN Jingying, et al. Preliminary studies on antioxidant and anti-aging activity of three seaweed polysaccharides [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2020, 27(1): 29-32
- [24] 刘雪,王桂宏,赵福江,等.羊栖菜褐藻糖胶的结构表征及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(3):79-84
- LIU Xue, WANG Guihong, ZHAO Fujiang, et al. Structural characterization and antioxidant activities of fucoidan from *Sargassum fusiforme* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(3): 79-84
- [25] Zhang Y, Mi D, 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(6): 252
- [26] 张宗敏,潘先花,周姝,等.金钗石斛多糖对秀丽隐杆线虫衰老的影响[J].贵州医药,2018,42(8):913-916
- ZHANG Zongmin, PAN Xianhua, ZHOU Shu, et al. Aging effects of *Dendrobium nobile* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans* [J]. Guizhou Medical Journal, 2018, 42(8): 913-916
- [27] Gu J, Li Q, Liu J, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Auricularia auricula* and effects of its acid hydrolysate on the biological function of *Caenorhabditis elegans* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167(Pt 2): 423-433
- [28] Uitrakul S, Hutton C, Veal GJ, et al. A novel imaging flow cytometry method for the detection of histone H4 acetylation in myeloid cells [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2019, 49(7): e13115

- [29] 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
- [30] 张晓寒,赵江,韩英,等.根皮素对秀丽隐杆线虫寿命的影响[J].食品科学,2021,42(1):187-196
ZHANG Xiaohan, ZHAO Jiang, HAN Ying, et al. Effects of phloretin on lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science, 2021, 42(1): 187-196
- [31] Suetomi K, Mereiter S, Mori C, et al. *Caenorhabditis elegans* ATR checkpoint kinase ATL-1 influences life span through mitochondrial maintenance [J]. Mitochondrion, 2013, 13(6): 729-735
- [32] Lithgow G J, Walker G A. Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan [J]. Mechanisms of Ageing & Development, 2002, 123(7): 765-771
- [33] Wan X, Li X, Liu D, et al. Physicochemical characterization and antioxidant effects of green microalga *Chlorella pyrenoidosa* polysaccharide by regulation of micro RNAs and gut microbiota in *Caenorhabditis elegans* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168: 152-162
- [34] Fang Z, Xiao B, Jiang W, et al. The antioxidant capacity evaluation of polysaccharide hydrolyzates from pumpkin using *Caenorhabditis elegans* model [J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(3): e13275
- [35] Wang J, Deng N, Wang H, et al. Effects of orange extracts on longevity, healthspan, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. Molecules, 2020, 25(2): 351
- [36] Susannah H, Hans U H, Wim W. Baicalein modulates stress-resistance and lifespan in *C. elegans* via *skn-1* but not *daf-16* [J]. Fitoterapia, 2016, 113: 123-127
- [37] Weeks K R, Dwyer D S, Aamodt E J. Antipsychotic drugs activate the *C. elegans* AKT pathway via the *daf-2* Insulin/IGF-1 receptor [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2010, 1(6): 463-473
- [38] Ayuda D B, González M S, Miranda V A, et al. Epicatechin modulates stress-resistance in *C. elegans* via Insulin/IGF-1 signaling pathway [J]. PloS One, 2019, 14(1): e0199483
- [39] Shi Y C, Yu C W, Liao H C, et al. *Monascus-fermented dioscorea* enhances oxidative stress resistance via *daf-16*/FOXO in *Caenorhabditis elegans* [J]. PloS One, 2012, 7(6): e39515
- [40] Tullet J M A, Green J W, Au C, et al. The *skn-1*/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms [J]. Aging Cell, 2017, 16(5): 1191-1194
- [41] 黎晨,尤培蒙,王晨曦,等.黄芪多糖抗氧化作用的分子机制研究进展[J].西北民族大学学报(自然科学版),2019,40(4): 78-82
LI Chen, YOU Peimeng, WANG Chenxi, et al. Molecular mechanism and research progress of antioxidant effect of *Astragalus polysaccharide* [J]. Journal of Northwest Minzu University (Natural Science), 2019, 40(4): 78-82

(上接第 128 页)

- [45] Wang A R, Kang D C, Zhang W G, et al. Changes in calpain activity, protein degradation and microstructure of beef *M. semitendinosus* by the application of ultrasound [J]. Food Chemistry, 2018, 245(12): 724-730
- [46] Yeung C K, Huang S C. Effects of ultrasound pretreatment and ageing processing on quality and tenderness of pork loin [J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2017, 5(11): 809-816
- [47] 戚军.反复冻融对羊肉品质的影响研究[D].南京:南京农业大学,2009
QI Jun. Study on the effect of repeated freezing and thawing on mutton quality [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009
- [48] Hasnain A, Saleem R, Ahmad R. Biochemical variations in salt soluble fractions of ultrasonicated actomyosin isolated from broiler breast-muscle [J]. International Journal of Food Properties, 2016, 19(10): 2284-2296
- [49] Saleem R, Ahmad R. Effect of low frequency ultrasonication on biochemical and structural properties of chicken actomyosin [J]. Food Chemistry, 2016, 205: 43-51
- [50] 张潮,吴宇桐,孔保华.超声辅助冷冻对鸡胸肉肌原纤维蛋白乳化稳定性的影响[J].食品科学,2020,41(17):104-110
ZHANG Chao, WU Yutong, KONG Baohua. Effect of ultrasound assisted freezing on emulsification stability of myofibrillar in chicken breast [J]. Food Science, 2020, 41(17): 104-110