

螺旋藻多糖对秀丽隐杆线虫氧化应激及寿命的影响

王 猛¹, 马浩天¹, 关思宇¹, 狄建兵², 王 愈², 李润植¹, 崔红利^{1,2*}

(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)

摘要 机体多种慢性疾病发生归因于自由基反应失衡诱发的氧化应激,螺旋藻多糖(PSPs)作为一种天然抗氧化物质,其抗氧化、抗衰老作用机制尚不明确。本文采用化学方法测定 PSPs 体外抗氧化活性。以秀丽隐杆线虫为模式动物,检测 PSPs 对线虫氧化应激抵抗作用。结果表明:PSPs 具有 DPPH·清除能力和提升总还原力的作用,其作用效果呈剂量依赖性;PSPs 呈剂量依赖性地延长秀丽隐杆线虫寿命;PSPs 通过提高运动能力和抗氧化酶 SOD、CAT 活性,降低衰老色素的积累和细胞内活性氧(ROS)水平来增强抗氧化能力;在 1% H₂O₂ 氧化应激压力下,PSPs 显著延长线虫寿命。qRT-PCR 显示,PSPs 上调 *daf-16*、*skn-1*、*sir-2.1* 等基因 mRNA 表达量。结论:PSPs 通过胰岛素信号通路提高抗氧化酶活性以及相关基因表达来增强氧化应激抵抗能力并延长线虫寿命。

关键词 螺旋藻多糖(PSP); 秀丽隐杆线虫; 抗氧化; 寿命; 胰岛素信号通路

文章编号 1009-7848(2022)05-0137-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.016

氧自由基反应及脂质过氧化是维持机体新陈代谢、免疫应答的重要因素。当机体受到内源或外源刺激而引起氧化应激时,氧自由基反应失衡,体内积累大量的活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS),进而导致自身抗氧化能力下降。现有研究表明,癌症、衰老、心血管疾病、糖尿病或其它慢性疾病大多与氧化应激反应有关^[1-3]。例如:ROS 刺激中枢神经氧化会导致多种神经退行性疾病,如阿尔茨海默综合症(Alzheimer's disease, AD)和亨廷顿氏病(Huntington's disease, HD)等^[4-5]。生物体细胞 ROS 富集会引起生物体机能退化,而药物合理干预动物机体会提高抗氧化性,缓解 ROS 迸发所致衰老及疾病。目前,人工合成的抗氧化剂毒副作用较大,抗氧化效率较低,在应用范围上有很大的局限性。寻找天然抗氧化药物至关重要。来源于海藻的天然产物,如海藻多糖因毒副作用小而备受关注。有研究表明,海藻多糖因具有较强的抗氧化作用,故能够显著延缓线虫衰老^[6]。

螺旋藻多糖(*Spirulina polysaccharides*, PSPs)是一种生理活性多糖,广泛存在于蓝藻门螺旋藻属,具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗便秘以及提高机体免疫等多重功效^[7-15]。Zheng 等^[16]研究表明,PSPs 对阿尔茨海默病小鼠脑线粒体氧化有保护作用。陈帅行等^[17]发现,PSPs 可缓解急性酒精中毒引起的小鼠内脏氧化损伤。近年来,随着 PSPs 生物活性作用研究的不断深入,市场上 PSPs 功能食品应运而生,然而其作为外源活性物质对缓解生物氧化应激及延缓寿命的分子机制尚不明确,本文将针对 PSPs 的抗氧化分子机制做进一步研究。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)具有成本低、繁殖力强、遗传背景清晰、与人类因同源性高等特点,被广泛用作抗氧化和抗衰老研究的模型生物^[18-19]。胰岛素/类胰岛素生长因子(Insulin/IGF-1, IIS)是一条经典的进化高度保守的衰老调控通路,广泛存在于在模式动物体内。前人研究发现通过对 IIS 信号通路的适度抑制,可延缓哺乳动物衰老,延长寿命^[20-21]。此外,研究表明多糖可通过作用于某些信号通路信号分子来调节下游基因的表达^[22]。据此推测 PSPs 可以通过调控相关信号通路增强线虫抵抗氧化应激的能力。本研究以饲喂 OP50 的秀丽隐杆线虫为模式动物,研究 PSPs 对线虫抗氧化性及其作用机制,为

收稿日期: 2021-05-04

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, Y192012)

作者简介: 王猛(1997—),男,硕士生

通信作者: 崔红利 E-mail: cuihongli@sxau.edu.cn

其作为天然食品开发利用提高理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 试验材料 PSPs, 购自福清市新大泽螺旋藻有限公司, 由山西农业大学分子农业与生物能源研究所保管。菌株(N2株系), 购自美国线虫遗传中心(*Caenorhabditis genetics center*, CGC)。将线虫接种于添加尿嘧啶缺陷型大肠杆菌(OP50)的线虫生长培养基(NGM)培养基, 培养于在20℃恒温培养箱, 光暗时间为12 h/12 h, 光强3 000 Lx。

无水乙醇、甲醇、H₂O₂, 天津恒兴化学试剂制造有限公司(分析纯级)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, 分析纯级)、ROS 荧光探针二氢乙锭(Dihydroethidium, DHE)试剂盒、荧光素二乙酸(FDA)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、BCA 法蛋白质浓度测定等相关试剂盒, 南京建成生物科技研究所。

1.1.2 仪器与设备 WFJ2100 紫外分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司; LX73 正置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; Boxun BJ-CD 超净工作台, 上海博讯实业有限公司; 体式显微镜, 重庆奥特光学仪器公司; H1850 台式冷冻离心机, 湘潭湘仪仪器有限公司; LRH-250F 生化培养箱, 无锡玛瑞特科技有限公司; MyCycler PCR 仪、MyiQ2 qPCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 DPPH 自由基清除能力的测定 DPPH 自由基清除能力测定根据参考文献[23]所述方法。首先将 PSPs 分别配制成质量浓度为 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL 的样品溶液, 每个质量浓度重复 3 次, 避光室温反应 30 min, 然后用紫外分光光度计在波长 517 nm 处测定每组吸光度值, 根据公式计算自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times$$

100

式中, A₀——2 mL 无水乙醇+2 mL DPPH 吸光度; A₁——2 mL 样液+2 mL DPPH 吸光度;

A₂——2 mL 无水乙醇+2 mL 样液吸光度。

1.2.2 总还原力的测定 总还原力测定方法根据参考文献[30]的方法。取 1.2.1 节的 PSPs 样品溶液 1 mL, 分别加入 2.5 mL PBS (pH=6.6) 和 1% K₃Fe(CN)₆, 充分混匀后 50℃水浴 20 min。冷却后加入 2.5 mL 10% CH₃COOCl₃、蒸馏水和 0.5 mL 0.1% FeCl₃ 充分反应, 静置 10 min 后用紫外分光光度计测定波长 700 nm 处的吸光度。

1.2.3 线虫寿命、运动能力和活力的测定 将同期化至 L4 期线虫随机分为 4 组, 分别接种至不含或含有不同质量浓度 (50, 100, 200 μg/mL) PSPs 的 NGM 培养基饲养 (饲喂 OP50, 为防止排卵影响, 添加 150 μmol/L 五氟尿嘧啶)。每组 3 次重复, 每板 30 条, 于恒温、恒湿培养箱中培养, 此时记为线虫寿命的第 0 天。每天更换新鲜培养基, 同时挑出死亡线虫, 记录存活个数, 计算生存率, 直至所有线虫死亡 (判别标准: 线虫无移动及吞咽动作, 用铂金探针轻触虫体无任何反应的即为死亡)。钻入培养基的线虫及因其它因素死亡的线虫从统计数据中排除, 每个独立试验至少 3 次平行。以生存率百分比为纵坐标, 绘制生存曲线, 并用 Origin 软件进行单因素方差分析 (One-way analysis of variance, One-way ANOVA), 数据采用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

线虫运动能力检测参考文献[24]的方法。将同期化至 L4 期线虫转入含有或不含 PSPs 的 NGM 培养基上, 恒温培养, 在第 5, 10 天时挑在 1 mL M9 缓冲液的平板上, 适应 5 min 后观察并记录 30 s 内头部摆动次数, 每条线虫统计 3 次重复, 取平均值为最终结果。每个独立试验至少设置 3 次平行。线虫活力采用二乙酸荧光素法 (FDA) 测定: 取一线虫培养平板, 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。将 5 mL FDA 溶于 1 mL 丙酮中, 避光 4℃保存。荧光检测前, 将 0.4 mL FDA 加入 0.65 mol/L 甘露醇溶液中, 每个虫体样品避光染色 40 min, 用磷酸盐-生理盐水缓冲液冲洗 3 次, 用荧光显微镜在激发波长 485 nm、发射波长 530 nm 的蓝光下镜检。

1.2.4 体内脂褐素、ROS 及抗氧化酶的测定 采取自发荧光法检测脂褐素。收集不同处理的虫体, 置于荧光显微镜紫外激发光下观察。ROS 测定: 取

灭菌平板,加入 M9 缓冲液,收集虫体后用 DHE 荧光探针避光孵育 30 min,于激发波长 485 nm、发射波长 530 nm 蓝光观察。为了确定 PSPs 是否介导体内抗氧化酶活性表达,收集 PSPs 给药 2 d 后的虫体,检测其 SOD 和 CAT 酶活性。测定方法:选取离心后的虫体样本 1 mL,置于 EP 管中,离心后收集沉淀,加入液氮研磨,其 CAT、SOD 活性分别用相应的试剂盒测定,结果以对照组的 100% 表示。同时将收集的部分虫卵离心、研磨,取上清液用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.5 秀丽隐杆线虫氧化应激模型的建立 将接种于含有或不含 PSPs 的培养基(培养基含有 150

μL 五氟尿嘧啶)上培养 2 d 的线虫,急性暴露于 1% H_2O_2 的 NGM 培养基上,饲喂 OP50,每隔 1 h 计数线虫的存活个数,绘制生存曲线,直至全部死亡。

1.2.6 mRNA 提取及荧光定量 PCR 检测 将同期化 L4 期线虫用多糖处理后,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 $\beta\text{-Actin}$ 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 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示。

表 1 秀丽隐杆线虫抗氧化基因实时定量 PCR 引物

Table 1 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>$\beta\text{-Actin}$</i>	5'-CGGAGCTGAACGGAAAACTC-3'	5'-TCAGTGTAGGCGAGGATTCC-3'
<i>daf-16</i>	5'-CGCTTCTTCATCGGCTCTTC-3'	5'-CTTTCGAACAACACCAGGGG-3'
<i>sir-2.1</i>	5'-TTCAGAAAGTTGCGGTCACAC-3'	5'-TGTGTTTGTTCGGGTGCAT-3'
<i>skn-1</i>	5'-TCGCCTCTCTTCGGAATCTC-3'	5'-CTGGAAGCTCGTTGTCACTG-3'
<i>sod-3</i>	5'-GCGCTGAAATTC AATGTTGG-3'	5'-ATATCCCAACCATCCCCAGC-3'
<i>ctl-2</i>	5'-CTTCAACAAGGTCGGGAAGC-3'	5'-GTTTCGGGAAGTGGATAGGGT-3'

1.3 统计学分析

数据处理采用 Graphpad Prism 5.0, $P < 0.05$ 表示差异显著,图中用 * 标记; $P < 0.01$ 表示极显著差异,图中用 ** 标记。数据采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 One-way ANOVA 处理, FDA 染色、脂褐素以及 ROS 荧光用显微镜观察并拍照,作图用 Origin 9.1。

2 结果

2.1 PSPs 清除 DPPH 自由基和提升总还原力能力

DPPH·清除率是典型的体外抗氧化活性定量评价指标。本文用 VC 作对照,评价 PSPs 对 DPPH 自由基的清除能力,如图 1a 所示。当 PSPs 质量浓度 0~5 mg/mL 时,随着给药质量浓度的增加,DPPH 自由基清除率显著增加,效果呈质量浓度依赖性;当 PSPs 质量浓度为 5 mg/mL 时,其对 DPPH·清除率最大,为 42.37%。众所周知,抗氧化剂对 Fe^{3+} 的还原能力与抗氧化活性成正相关,

PSPs 的还原力越强抗氧化效果越强。图 1b 显示,在质量浓度为 0~5 mg/mL 范围,PSPs 对铁氰化钾的还原力呈质量浓度依赖性增加。

2.2 PSPs 对秀丽隐杆线虫寿命的影响

用不同质量浓度的 PSPs (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养 N2 野生型秀丽隐杆线虫,研究 PSPs 对线虫寿命的影响。存活率曲线以及各剂量 PSPs 处理对线虫平均寿命的影响结果见图 2a 和表 2。结果表明,不同质量浓度的样品溶液处理的线虫均显示寿命延长的趋势,特别是 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSPs 治疗组。由图 2a 可见,对照组线虫的最长寿命为 20 d,而 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSPs 处理组的最长寿命为 24, 24, 28 d,分别延长了 4, 4, 8 d。在适当生活条件下,对照组平均寿命为 (10.58 \pm 1.21) d。与对照组相比,高质量浓度 PSPs 显著延长线虫平均寿命至 (16.82 \pm 0.62) d,存活率提高 58.98%。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSPs 组平均寿命为 (14.38 \pm 1.93) d,与对照组相比存活率增加 35.92%。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSPs 组存活率增加相对较低,为 20.13%,平均寿命为 (12.71 \pm

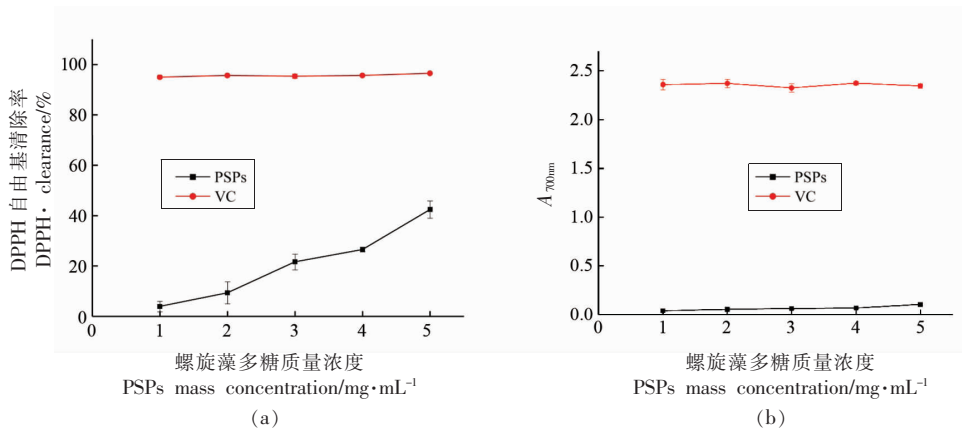


图1 螺旋藻多糖自由基清除率(a)和总还原力(b)测定

Fig.1 Determination of free radical clearance (a) and total reducing power (b) of PSPs

表2 不同质量浓度 PSPs 对线虫平均寿命的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effects of different mass concentrations of PSPs on the average lifespan of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均寿命/ d	寿命延长率/ %
对照组	空白	10.58 ± 1.21	-
	50	12.71 ± 0.90	20.13
PSPs 组	100	$14.38 \pm 1.93^*$	35.92
	200	$16.82 \pm 0.62^{**}$	58.98

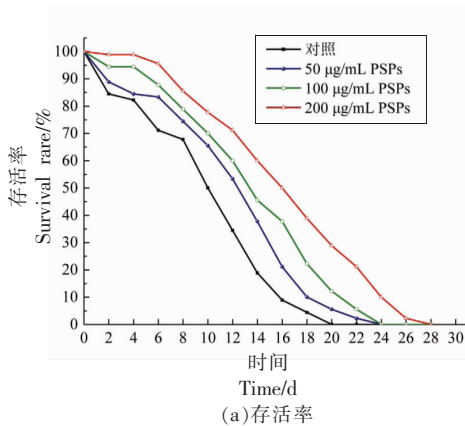
注:与对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

0.90)d。综上所述,与对照组相比,PSPs 对线虫寿命的影响存在显著性差异且呈剂量依赖性。

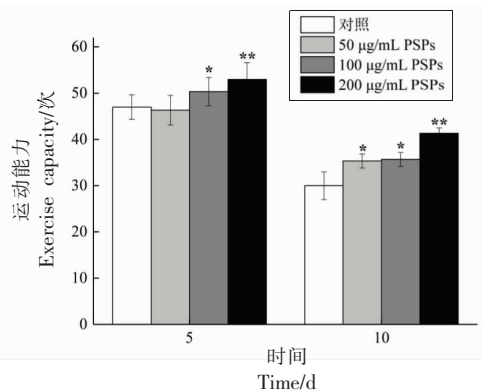
2.3 PSPs 对秀丽隐杆线虫活力及运动能力的影响
机体衰老会伴随着各项生理机能的衰退,线

虫运动能力也会衰退。本试验以线虫是否做连续头臂摆动运动为衡量标准,在线虫生活的第 5,10 天评估 PSPs 对线虫的运动能力的影响。如图 2b 所示,PSPs 干预后的第 5 天,与对照组相比低剂量 PSPs 试验组线虫的运动能力未见明显差异,饲喂 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSPs 的线虫则表现出较强的运动能力。值得注意的是直至第 10 天,虽然随着生命周期的进展线虫的代谢能力有所降低,但与对照组相比,治疗组线虫运动能力仍然较强。

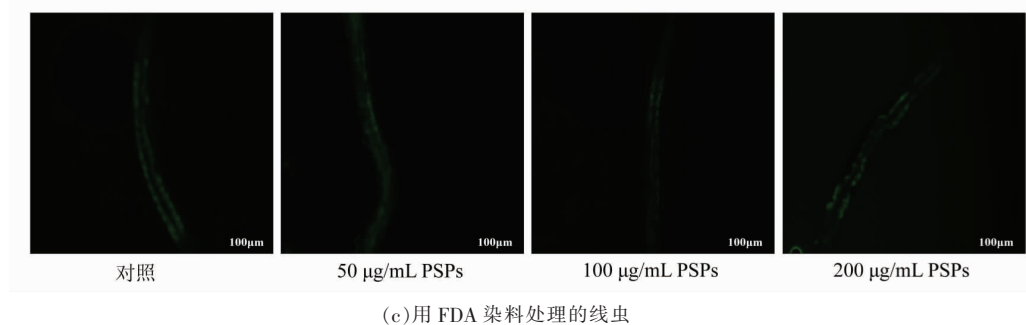
如图 2c 所示,PSPs 处理后,利用 FDA 染液在荧光显微镜下观察虫体。因 FDA 本身特性,进入虫体后细胞具有活性而发出绿色荧光,与对照组相比,饲喂 PSPs 对线虫活力影响不显著,间接提示 PSPs 对虫体无任何毒害作用。



(a)存活率



(b)线虫培养第 5 和 10 天的运动能力



(c)用 FDA 染料处理的线虫

注:与对照组相比,*代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$ 。

图 2 PSPs 对线虫寿命、运动能力以及活力的影响

Fig.2 The effect of PSPs on life span, exercise capacity and vitality of *C. elegans*

2.4 PSPs 对延长线虫氧化应激抵抗力的影响

H_2O_2 通过诱导细胞产生自由基诱发细胞氧化损伤,进而破坏机体代谢功能。图 3 表明,在 H_2O_2 急性应激试验中,与对照组相比,经不同质量浓度 PSPs 处理的线虫暴露于 H_2O_2 环境中的生存能力显著提高($P < 0.05$),并呈剂量依赖性。50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSPs 干预后,线虫的平均寿命分别为 (4.20 ± 0.24) , (4.56 ± 0.17) , (4.67 ± 0.29) h, 寿命相对延长率为 14.44%, 24.25% 和 27.25% (表 3), 表明在急性氧化应激下, PSPs 对线虫有显著保护作用($P < 0.05$), 可有效提高线虫氧化应激耐受性, 且 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时效果最佳。

2.5 PSPs 降低体内 ROS 含量

随着机体的衰老,线虫各项代谢功能下降,脂褐素大量积累在细胞内造成细胞损伤。由图 4a 可见,与对照组相比,用 PSPs 处理后线虫脂褐素水平显著降低,表明 PSPs 可改善年龄色素沉积,缓解细胞的衰老。活性氧 ROS 在正常生理代谢过程中维持稳态,在氧化剂的诱导下,机体自由基反应失衡,大量的自由基会聚集在细胞内,因此限制线虫寿命的主要因素是 ROS 积累所引起的氧化应激反应^[25-26]。如图 4b 所示,与对照组相比, PSPs 可改善体内 ROS 水平,随着 PSPs 质量浓度的增加,作用效果显著。

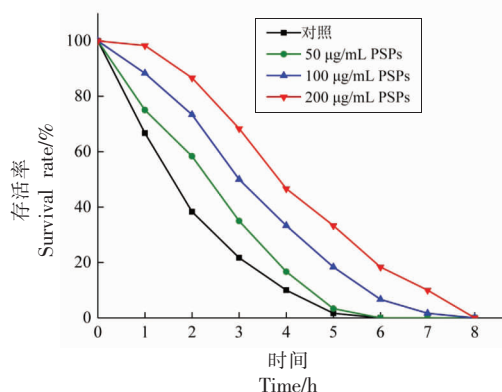
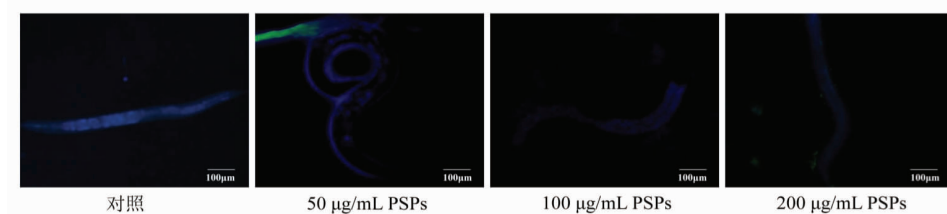


图 3 急性氧化应激下 PSPs 对线虫寿命的影响

Fig.3 Effect of PSPs on life span of *C. elegans* under acute oxidative stress表 3 急性氧化应激下不同质量浓度 PSPs 对线虫的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effect of different mass concentrations of PSPs on *C. elegans* under acute oxidative stress ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均寿命/ h	寿命延长率/ %
对照组	空白	3.67 ± 0.12	-
PSPs 组	50	$4.20 \pm 0.24^*$	14.44
	100	$4.56 \pm 0.17^{**}$	24.25
	200	$4.67 \pm 0.29^{**}$	27.25

注:与对照组相比,*代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$ 。



(a)脂褐素

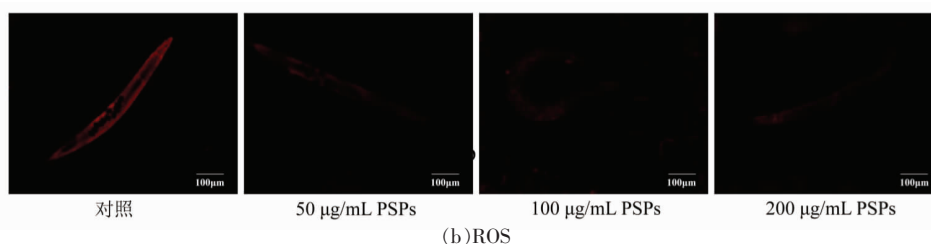


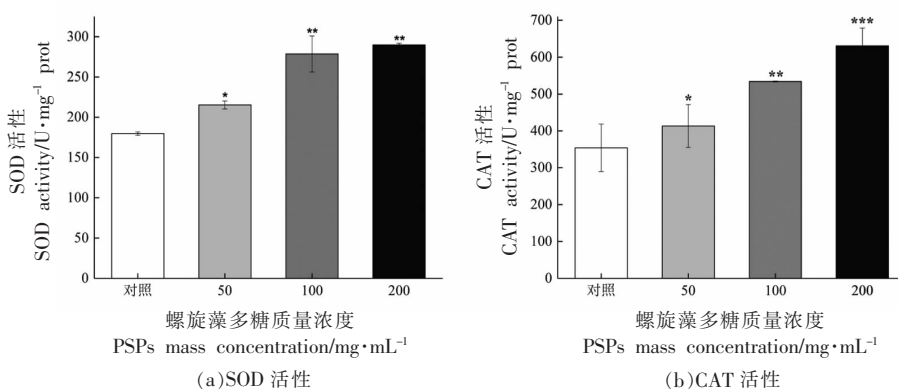
图4 PSPs对线虫脂褐素和ROS影响

Fig.4 Effect of PSPs on lipofuscin and ROS levels in *C. elegans*

2.6 PSPs提高线虫体内SOD、CAT的活性

细胞发生氧化应激进而发展到细胞损伤等一系列级联反应,往往是由抗氧化酶类物质难以清除过量的自由基所致,在这一过程中,SOD和CAT发挥了重要作用。如图5a和b所示,与对照组相

比,PSPs显著增强CAT和SOD的活力,其中100 μg/mL PSPs和200 μg/mL PSPs组CAT活性分别增加1.55倍和1.61倍。同时SOD活性也分别增加了1.50和1.78倍。结果表明PSPs通过促进线虫体内抗氧化酶表达清除自由基。



注:与对照组相比,*代表 $P < 0.05$;**代表 $P < 0.01$ 。

图5 PSPs抗氧化酶对秀丽隐杆线虫的影响

Fig.5 Effect of PSPs antioxidant enzymes on *C. elegans*

2.7 PSPs对线虫IIS信号通路基因表达量的影响

以上试验表明,PSPs介导了线虫抗氧化及寿命的延长。为进一步检测PSPs对线虫体内抗氧化分子机制,利用qRT-PCR分析PSPs对IIS信号通路上转录因子*Daf-16*和*Skn-1*以及下游基因的影响。结果如图6所示,相比于对照组,试验组线虫体内转录因子*Daf-16*的转录水平显著增强,其下游靶基因*sod-3*和*ctl-2*转录水平极显著增强。*Skn-1*和长寿基因*sir2.1*是线虫体内寿命调节的重要调控因子,这两个基因转录水平均显著提高($P < 0.05$),且呈剂量依赖性,在200 μg/mL PSPs

处理下,*Skn-1*和*sir2.1*的表达分别增加1.88倍和1.95倍。这几个胰岛素信号通路上关键因子表达的提高,表明PSPs是通过上调抗氧化相关基因的表达及寿命调控因子水平,提高线虫抵抗氧化应激及延缓衰老的能力。

3 讨论

随着年龄的增长,细胞受到氧化损伤而引起其抗氧化功能紊乱。氧化应激在衰老相关疾病发作中的作用已有文献记载,抗氧化剂被认为能够减弱或预防衰老所带来的影响^[27]。PSPs是一种具有多种生物学活性的天然产物,具有强大的抗氧

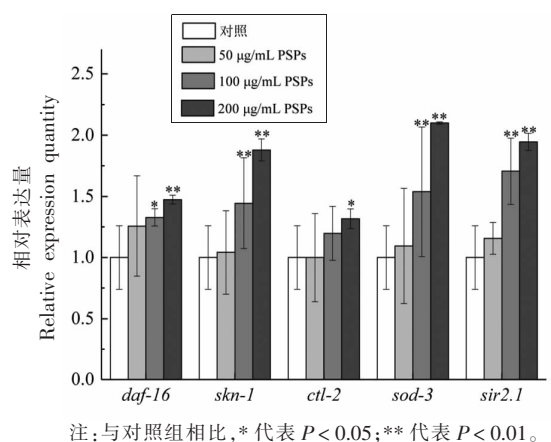


图 6 PSPs 对胰岛素信号通路基因转录水平的影响
Fig.6 The effect of PSPs on the transcription level of insulin signaling pathway genes

化能力。线虫能够调节细胞抗逆性和新陈代谢,符合衰老的自由基理论,被广泛用作研究氧化应激和衰老的模式生物^[28]。Li 等^[29]研究表明,连翘花色素通过提升线虫体内 SOD 和 CAT 酶活性以及上调寿命相关基因的表达来抵抗氧化应激。 H_2O_2 介导下细胞会产生大量的 ROS,从而加快虫体组织损伤,缩短寿命;细胞受到氧化剂的诱导,会发生过氧化反应,造成组织损伤甚至细胞凋亡,为维持机体正常代谢活动,生物体在长期的进化过程中形成了能够特异性抑制机体氧化损伤的抗氧化体系,主要包括抗氧化酶和非酶类抗氧化剂。研究发现,天然多糖通过作用于部分信号通路分子调控机体抗氧化^[30]。作者通过胰岛素信号通路来验证 PSP 对机体氧化应激的影响。

IIS 信号通路是在分子水平上研究衰老模型的保守信号通路^[31],如图 7 所示。*Daf-16* 是线虫体内参与提高应激抵抗以及代谢基因表达的重要转录因子,可在一定程度上延长寿命。通常在哺乳动物体内,胰岛素信号通路的激活引起一系列磷酸化级联反应,最终导致 *FOXOS/daf-16* 核转录因子排出细胞核失活^[32]。本研究表明,PSPs 处理后,线虫体内 *daf-16* 的表达量显著升高 ($P < 0.05$),且其下游靶基因 *sod-3* 和 *ctl-1* 的 mRNA 相对表达量极显著升高 ($P < 0.01$) (图 6),表明 PSPs 可促进 *daf-16* 激活并上调下游基因的表达,进而提升线虫对氧化应激的抵抗力。Zhang 等^[33]研究表明,紫山药多糖通过作用胰岛素信号通路使 *daf-16* 进

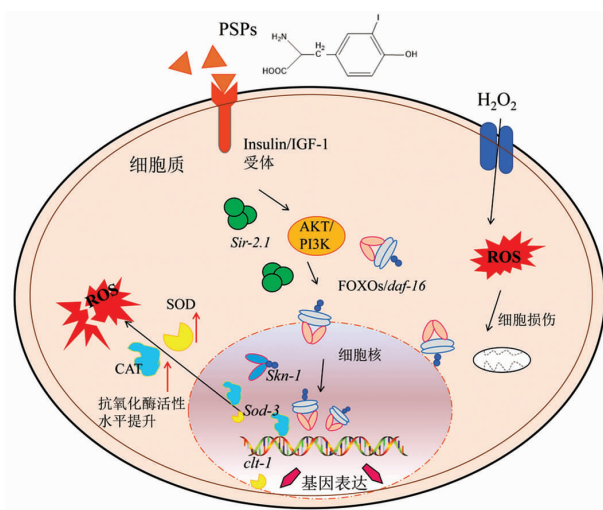


图 7 PSPs 通过 Insulin/IGF-1 通路在秀丽隐杆线虫中抗氧化功能的假想机理图

Fig.7 Hypothetical mechanism diagram of PSPs antioxidant function in *C. elegans* via the Insulin/IGF-1 pathway

入细胞核,调控细胞核内抗氧化酶基因的表达,从而增强细胞的抗氧化能力并延长线虫的寿命。

Sir-2.1 (沉默信息调节蛋白) 是一类进化相对保守的蛋白因子, *sir-2.1* 可通过抑制 AKT/PI3K 的磷酸化及基因表达,促使 *FOXOS/daf-16* 转录因子的表达,发生核转位并与下游调控抗氧化酶基因相结合,上调其表达,从而清除 ROS,增强机体抵抗氧化应激的能力^[34]。本研究结果显示,PSPs 处理后,与空白组相比 *sir-2.1* 转录水平显著升高 ($P < 0.01$)。在线虫体内, *skn-1* 是调控机体氧化应激的重要转录因子,同样受 IIS 信号通路的调控。本研究结果表明,PSPs 能够显著提高 *skn-1* mRNA 的表达水平 ($P < 0.01$)。推测 PSPs 对线虫氧化应激抵抗力的提高以及寿命的延长,是通过调控 *sir-2.1*, *daf-16* 和 *skn-1* 的表达作用的结果。

4 结论

总之,线虫经不同质量浓度的 PSPs 干预后,其寿命、运动能力和内源性抗氧化水平提高。此外,通过对衰老相关信号通路转录因子表达水平的测定,揭示了 PSPs 提高线虫氧化应激的抵抗力和延长寿命的潜在分子机制,为 PSPs 抗氧化的研究提供了理论依据,并为未来 PSPs 作为抗氧化剂的开发应用提供数据支撑。线虫氧化应激及寿命

的调控机制较为复杂,且PSPs为水溶性大分子活性物质,本试验中并没有将提取的PSPs进行分离,具体何种组分对线虫氧化应激发挥作用还不得而知。后续试验过程中应重点探究PSPs不同组分对线虫的影响,整合多组学技术挖掘PSPs的抗氧化、抗衰老功能的新型作用靶点。

参 考 文 献

- [1] NAVARRO S L, SCHWARZ Y, SONG X, et al. Cruciferous vegetables have variable effects on biomarkers of systemic inflammation in a randomized controlled trial in healthy young adults[J]. *J Nutr*, 2014, 144(11): 1850–1057.
- [2] WU X Y, LI R C, ZHAO Y J, et al. Separation of polysaccharides from *Spirulina platensis* by HSC-CC with ethanol-ammonium sulfate ATPS and their antioxidant activities[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 173(1): 465–472.
- [3] MA H T, XIONG H Y, ZHU X L, et al. Polysaccharide from *Spirulina platensis* ameliorates diphenoxylate-induced constipation symptoms in mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 133(15): 1090–1101.
- [4] BOEING H, BECHTHOLD A, BUB A, et al. Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases[J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(6): 637–663.
- [5] FREEDMAN D A, PEÑA-PURCELL N, FRIEDMAN D B, et al. Extending cancer prevention to improve fruit and vegetable consumption[J]. *J Cancer Educ*, 2014, 29(4): 790–795.
- [6] SUGAWARA T, SAKAMOTO K. Killed *Bifidobacterium longum* enhanced stress tolerance and prolonged life span of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16[J]. *Br J Nutr*, 2018, 120(8): 872–880.
- [7] KURD F, SAMAVATI V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and *in vitro* anti-cancer activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 74(10): 498–506.
- [8] EL-TANTAWY W H. Biochemical effects, hypolipidemic and anti-inflammatory activities of *Artemisia vulgaris* extract in hypercholesterolemic rats[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2015, 57(1): 33–38.
- [9] CHEN Y H, CHANG G K, KUO S M, et al. Well-tolerated *Spirulina* extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality[J]. *Sci Rep*, 2016, 12(6): 24253.
- [10] PARAGES MARÍA L, RICO R M, ABDALA-DÍAZ, et al. Acidic polysaccharides of *Arthrospira (Spirulina) platensis* induce the synthesis of TNF- α in RAW macrophages[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(6): 1537–1546.
- [11] WANG B Y, LIU Q, HUANG Y H, et al. Extraction of polysaccharide from *Spirulina* and evaluation of its activities[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018(11): 3425615.
- [12] YANG L, WANG Y, ZHOU Q, et al. Inhibitory effects of polysaccharide extract from *Spirulina platensis* on corneal neovascularization[J]. *Molecular vision*, 2009, 15(207/208): 1951–1961.
- [13] OVANDO C A, CARVALHO J C D, PEREIRA G V D M, et al. Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from *Spirulina*: A review[J]. *Food Reviews International*, 2018, 34(1/2/3/4): 34–51.
- [14] PAK W, TAKAYAMA F, MINE M, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of spirulina on rat model of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2012, 51(3): 227–234.
- [15] ZHENG Y, ZHU F, LIN D, et al. Optimization of formulation and processing of *Moringa Oleifera* and *Spirulina* complex tablets[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2017, 24(1): 122–126.
- [16] ZHENG X M, LI C H, LIU Z, et al. Effects of *Spirulina* on the level of homocysteine with Alzheimer's disease model mice[J]. *Science & Technology Information*, 2020, 18(22): 196–199.
- [17] 陈帅行, 马浩天, 李润植, 等. 螺旋藻多糖对急性酒精中毒小鼠肝、心、肾、胸腺抗氧化损伤的研究[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(3): 54–57.
- [18] CHEN S H, MA H T, LI R Z, et al. Protective effect of *Spirulina* polysaccharide on liver, heart, kidney and thymusliver oxidative injury induced by acute alcoholism in mice[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(3): 54–57.
- [19] TATAR M, BARTKE A, ANTEBI A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals[J]. *Science*, 2003, 299(5611): 1346–1351.
- [20] LU L L, ZHAO X, ZHANG J Y, et al. Calycosin promotes lifespan in *Caenorhabditis elegans* through insulin signaling pathway via *daf-16*, *age-1*, and

- daf-2*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 124(1): 1-7.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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 C, YOU P M, WANG C X, 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.
- [23] DUAN X J, ZHANG W W, LI X M, et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia Urceolata*[J]. Food Chemistry, 2006, 95(1): 37-43.
- [24] 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.
- [25] RIECKHER M, BUJARRABAL A, DOLL M A, et al. A simple answer to complex questions: *Caenorhabditis elegans* as an experimental model for examining the DNA damage response and disease genes[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4): 2781-2790.
- [26] RAY P D, HUANG B W, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. Cellular Signalling, 2012, 24(5): 981-990.
- [27] ALTINTAS O, PARK S, LEE S J. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*[J]. BMB Rep, 2016, 49(2): 81-92.
- [28] PEIXOTO H, ROXO M, RÖHRIG T, et al. Anti-aging and antioxidant potential of *Paullinia cupana* var. *sorbilis*: Findings in *Caenorhabditis elegans* indicate a new utilization for roasted seeds of *Guarana* [J]. Medicines (Basel), 2017, 4(3): 61.
- [29] LI Y Y, ZHANG D D, LI J, et al. Yellow pigment from *Forsythia flower* promotes resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*[J]. Chin J Biochem Mol Bio, 2019, 35(4): 436-445.
- [30] YUAN Y Y, KANG N X, LI Q X, et al. Study of the effect of neutral polysaccharides from *Rehmannia Glutinosa* on lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. Molecules, 2019, 24(24): 4592.
- [31] WU J Z, HUANG J H, KHANABDALI R, et al. Pyrroloquinoline quinone enhances the resistance to oxidative stress and extends lifespan upon *DAF-16* and *SKN-1* activities in *C. elegans*[J]. Exp Gerontol, 2016, 80(1): 43-50.
- [32] JIA W Z, PENG Q, SU L N, et al. Novel bioactive peptides from meretrix protect *Caenorhabditis elegans* against free radical-induced oxidative stress through the stress response factor *DAF-16/FOXO*[J]. Mar Drugs, 2018, 16(11): 444.
- [33] ZHANG L M, CHENG Y Q, SONG S H. Effect of purple yam polysaccharide on the liver and brain of *D-galactose* induced aging rats [J]. Food Science, 2017, 38(13): 196-200.
- [34] SAIER C, BÜCHTER C, KOCH K, et al. *Polygonum multiflorum* extract exerts antioxidative effects and increases lifespan and stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans* via *daf-16* and *sir-2.1*[J]. Plants, 2018, 7(3): 60.

Effects of *Spirulina* Polysaccharides on Oxidative Stress and Life Span of *Caenorhabditis elegans*

Wang Meng¹, Ma Haotian¹, Guan Siyu¹, Di Jianbing², Wang Yu², Li Runzhi¹, Cui Hongli^{1,2*}

¹Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi

²College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi

Abstracts A variety of chronic diseases are attributed to oxidative stress induced by imbalance of free radical reaction.

Spirulina polysaccharides (PSPs) are natural active substances with strong antioxidant, but its mechanisms of antioxidant and anti-aging are still unclear. In the current study, the antioxidant activity of PSPs *in vitro* was determined by chemical methods, and the resistance of PSPs to oxidative stress of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was tested *in vivo*. The results showed that PSPs had DPPH· scavenging capacity and total reducing power promoting capacity, which was dose-dependent. PSPs prolonged the life span of *C. elegans* in a dose-dependent manner. The antioxidant capacity was enhanced by improving the exercise abilities and the activities of antioxidant enzymes SOD and CAT, reducing the accumulation of senescence pigment and the level of intracellular reactive oxygen species (ROS). Under the oxidative stress of 1% H_2O_2 , PSPs significantly prolonged the life span of *C. elegans*. The qRT-PCR results indicated that PSPs could significantly up-regulate the mRNA expression of *daf-16*, *skn-1*, and *sir-2.1* genes. These results suggested that PSPs could enhance the resistance to oxidative stress and prolong the life span of *C. elegans* by increasing the activity of antioxidant enzymes and the expression of related genes through the insulin signaling pathway.

Keywords *Spirulina* polysaccharides (PSPs); *Caenorhabditis elegans*; antioxidation; life span; insulin signaling pathway