

菌菇复合多糖对秀丽线虫氧化胁迫抗性的影响

张菊^{1,2}, 贾东升², 赵士豪¹, 谢晓亮², 陈宏³, 李海峰^{3*}

¹河北经贸大学生物科学与工程学院 石家庄 050072

²河北省农林科学院经济作物研究所 石家庄 050051

³广东药科大学生命科学与生物制药学院 广州 510006)

摘要 目的:研究菌菇复合多糖(FHP)的抗氧化效果及作用机制。方法:用化学方法评价 FHP 体外自由基清除效率,通过秀丽线虫的氧化胁迫存活率试验评价 FHP 体内抗氧化效果;通过线虫体内氧化胁迫水平检测,胁迫应激关键转录因子活性及其效应基因表达检测和抗氧化酶活性试验等研究 FHP 的抗氧化活性;通过线虫的寿命试验及脂褐素水平检测研究 FHP 的抗衰老活性。结果:FHP 表现出比单一组成多糖更好的体外自由基清除效率以及更好的延长秀丽线虫氧化胁迫存活率的抗氧化活性。线虫体内试验结果表明,FHP 不仅可以提高秀丽线虫的氧化胁迫存活率,降低线虫体内 ROS 水平及 MDA 含量,而且还可以激活胁迫应激转录因子 SKN-1 和 DAF-16 的活性及其下游效应基因的表达,并增强抗氧化酶 SOD 和 GPx 的活性。然而,FHP 不影响秀丽线虫的寿命及体内脂褐素的积累水平。结论:FHP 虽可增强秀丽线虫的氧化胁迫抗性,但不影响秀丽线虫的衰老,其抗氧化活性机制与激活胁迫应激转录因子 SKN-1 和 DAF-16,影响其下游效应体活性相关。

关键词 菌菇多糖;复合多糖;秀丽线虫;氧化胁迫;衰老;活性氧自由基;抗氧化酶;转录因子

文章编号 1009-7848(2022)02-0150-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.017

菌菇多糖作为食用菌中扶正固本、安全无毒的主要天然活性成分,已被研究证实具有免疫调节^[1-3]、抗肿瘤^[4-5]、抗疲劳^[6-7]、抗衰老^[8-9]、降血糖^[10-12]等多种生理活性和功能,被广泛称为“生物应答调节剂”。现代药理学研究发现,绝大部分病变与体内抗氧化能力衰退有关,当机体不能及时清除体内过氧化物时,则会导致细胞损伤,进而导致机体受损、病变。菌菇多糖的多种生物活性均与其抗氧化性相关^[13-14],即多糖可以通过缓解衰老、疾病、辐射、代谢等引起的氧化应激达到治疗和预防肿瘤发生、免疫力低下等疾病。多糖的抗氧化性被认为是其多种生理活性和功能的作用机理之一^[13]。

近年来,生物活性多糖的研究也正由单独应用向多糖与多糖间的协同效应研究转变^[15-16]。例如,枸杞多糖、黄芪多糖与红枣多糖组成的复合多糖在低剂量时即可对细胞有较好的抗氧化作用,

并可抑制四氯化碳造成的小鼠肝脏损伤,表现出优于单一多糖活性的效果^[17]。同样,我国食用菌种类繁多,菌菇多糖之间的复合使用,无疑为菌菇多糖的开发提供了新的研究方向。

本研究结合菌菇多糖在抗肿瘤、代谢及免疫调节等方面的应用,选取香菇、滑子菇和栗蘑为原料,以抗氧化活性指标为依据,采用试验操作简便、关键信号通路与人类同源的模式生物秀丽线虫为实验模型,通过体内、体外相结合的评价方法对菌菇复合多糖的抗氧化活性进行综合评价,同时结合秀丽线虫体内的氧化胁迫抗性检测初步探究其活性作用机制,以期为食用菌资源的利用,菌菇多糖产品的开发提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 模式动物与试验材料

野生型秀丽线虫 N2、转基因线虫 LG345、GR1352 和大肠杆菌(OP50 和 NA22),购于美国明尼苏达大学秀丽线虫遗传中心(*Caenorhabditis Genetics center*)。香菇【*Lentinusedodes* (Berk.) Sing.】、滑子菇(*Pholiota nameko*)、栗蘑【*Polyporus frondosus* (Dicks.) Fr.】,购于安国市药材市场。

收稿日期:2021-02-26

基金项目:河北省自然科学基金项目(H2020207002);河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2018013);广东省自然科学基金项目(2017A030313864)

作者简介:张菊(1987—),女,博士,副教授

通信作者:李海峰 E-mail: juzi437163804@163.com

1.2 试剂与仪器

维生素 C、DPPH、邻二氮菲、琼脂、胰蛋白酶、酵母提取物、氨基青霉素、2'-脱氧-5-氟尿苷,美国 Sigma 公司;硫酸亚铁、双氧水,国药集团化学试剂有限公司;Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒,美国 Thermo 公司;活性氧(ROS)检测试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒、总谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)检测试剂盒,碧云天生物科技有限公司。

全波长酶标仪(Synergy H1 型),美国 BioTek 公司;Image Xpress Micro 高内涵成像分析仪,美国 Molecular Devices 公司;定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;紫外-可见分光光度计(SP-756 型),上海光谱仪器;研磨机(JX-24 型),上海净信公司。

1.3 方法

1.3.1 菌菇多糖的提取 取等量的香菇、滑子菇和栗蘑的干燥子实体按质量比 1:1:1 的比例配料,粉碎,称重,乙醇回流提取 2 次,每次 2 h。过滤,将滤渣挥干乙醇后,水浴加热提取 2 次,每次 2 h,合并水提液并浓缩。浓缩液按 1:3 的比例加入无水乙醇并搅拌,沉淀出粗多糖,用 75%乙醇反复洗涤、沉淀,离心分离沉淀物,采用喷雾干燥法干燥,得到菌菇复合多糖样品(FHP)。取与复合配料同等质量的香菇、滑子菇和栗蘑的干燥子实体,粉碎,称重,按同样方法制备香菇多糖(XGP)、滑子菇多糖(HZP)和栗蘑多糖(LMP)的单一多糖样品,备用。其中,用于秀丽线虫体内活性试验的样品需溶于秀丽线虫液体培养基中,配制成 5 mg/mL 的多糖样品母液,过 0.22 μm 无菌微孔滤膜后,备用。

1.3.2 体外自由基清除的测定 羟自由基($\cdot\text{OH}$)和 1,1-二苯-2-苦肼基(DPPH \cdot)自由基清除试验参照周萍等^[13]的方法,以 VC 的自由基清除率为阳性对照,等体积的蒸馏水为对照组,平行测量 3 次,数据以($\bar{x} \pm s$)表示。将上述复合及单一多糖样品(FHP、XGP、HZP、LMP)分别配成 1.0 mg/mL 的溶液,用于测量。

1.3.3 秀丽线虫食物清除率的测定 食物清除率试验参考 Zhang 等^[18]方法。将同步化的 L1 期 N2

线虫、食物大肠杆菌 OP50 及样品溶液一同加入 96 孔板中,对照组以液体培养基代替,每个样品质量浓度设置 8 个复孔。用普通光学酶标仪检测 96 孔板每孔的 OD_{570nm} 值,作为第 1 天的初始值。将线虫于 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养,在第 2~7 天每天相同的时间测定 OD_{570nm} 值。

1.3.4 秀丽线虫百草枯氧化胁迫存活率的测定

秀丽线虫百草枯氧化胁迫存活率试验参照 Wang 等^[19]的方法。将同步化的成虫初期线虫,2'-脱氧-5-氟尿苷(终质量浓度 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氨基青霉素(终质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、食物 NA22(OD_{570nm} \approx 0.70) 和不同的多糖样品一同加入 96 孔板中,空白对照组以液体培养基代替,每个样品设 10 个复孔,20 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 48 h 后,加入 10 μL 百草枯溶液(ROS 诱导试剂,终浓度为 60 mmol/L),混合均匀后置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。以加入百草枯为第 0 小时,每 12 h 统计秀丽线虫的存活状况,直至其全部死亡。统计过程中将身体僵直不动及对轻微震动无反应的秀丽线虫判断为死亡状态。

1.3.5 秀丽线虫体内 ROS 水平的测定 线虫体内 ROS 水平测定试验参照 Zhang 等^[18]的 DCFH-DA 探针法。按照氧化胁迫存活试验方法准备秀丽线虫并给药处理,不同之处在于将线虫加入 24 孔板中(终体积 1 000 $\mu\text{L}/\text{孔}$,500 条线虫/孔,设 3 个复孔),20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d 后,加入 10 μL 百草枯溶液(终浓度为 10 mmol/L),之后于 20 $^{\circ}\text{C}$ 下继续培养 2 d,收集每个处理组的虫液,并用液体培养基洗涤 3 次以除去样品、大肠杆菌和百草枯,用 400 μL PBS 重悬线虫,采用研磨机在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下研磨匀浆 6 min(研磨 45 s,间隔 15 s),离心(4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min,10 min),收集上清即酶液。采用 Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒和 ROS 检测试剂盒分别测定酶液的蛋白质浓度和 ROS 水平。测定结果以每 mg 酶液蛋白的 ROS 含量表示。

1.3.6 秀丽线虫体内 MDA 含量的测定 秀丽线虫的培养、处理、酶解液的制备及蛋白含量的测定同 ROS 检测方法。MDA 含量测定采用脂质氧化检测试剂盒测定,结果换算为每 mg 酶液蛋白的 MDA 含量。

1.3.7 抗氧化酶活性的检测 秀丽线虫的培养、处理、酶解液的制备及蛋白含量的测定同 ROS 检

测方法。SOD、CAT和GPx的活力测定采用总SOD活性检测试剂盒、过氧化氢酶检测试剂盒和总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒,结合全波长酶标仪测定,测定结果换算为每mg酶液蛋白的抗氧化酶活力。

1.3.8 转录因子入核的检测 转录因子SKN-1的入核试验通过转基因线虫LG345进行观察^[20],DAF-16的入核试验通过转基因线虫GR1352进行观察^[21]。将同步化的L1期秀丽线虫置于24孔板中培养并给予多糖处理,其中LG345线虫在20℃下多糖处理24h,在线虫L2期进行观察;GR1352线虫在20℃下多糖处理48h,在L3期进行观察。收集指定时间线虫,M9缓冲液洗去残留细菌,重悬于50 μL M9缓冲液中,取约20 μL虫液转移至新的24孔板的正中央,加盖14 mm圆形盖玻片,用Image Xpress Micro设备拍照。收集线虫荧光图片,统计SKN-1和DAF-16的入核情况。每个试验组随机挑选50条线虫进行统计,并计算发生入核转移的线虫比例。判断转录因子入核的标准:GFP在线虫肠道或者体细胞中形成分散的、聚集样荧光斑块。

1.3.9 RNA提取及定量PCR检测 将同步化的L1期N2线虫、大肠杆菌NA22($OD_{570nm} \approx 0.70$)及多糖样品溶液(终质量浓度为0.1 mg/mL)一同加入24孔板中(终体积1 000 μL/孔,500条线虫/孔,设4个复孔),对照组以液体培养基代替样品。20℃继续培养72h后收集各组线虫约2 000条。采用Trizol法提取线虫总RNA,Primer 5设计相关基因引物。SYBR Green为DNA荧光染料,以Real-Time PCR的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示相关基因在秀丽线虫体内的mRNA的相对表达水平。

1.3.10 寿命试验 秀丽线虫寿命试验参考Zhang等^[22]的方法。将同步化的成虫初期线虫(10~15条/孔),2'-脱氧-5-氟尿苷(终质量浓度75 μg/mL)、氨基青霉素(终质量浓度100 μg/mL)、食物NA22($OD_{570nm} \approx 0.70$)和不同质量浓度样品一同加入96孔板中(终体积100 μL/孔),空白对照组以液体培养基代替样品,做液体寿命试验。每个样品质量浓度设置10个复孔,以开始给药为第0天,在20℃、120 r/min条件下培养,每隔2 d统计1次秀丽

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence	
基因	引物
<i>gcs-1</i>	5'-GTCGATGAAGCCAGATGGTTGT-3'
	5'-CGATCGTCGACACTTGCACTAA-3'
<i>gst-4</i>	5'-ATGCTCGTGCTCTTGCTGAG-3'
	5'-GACTGACCGAATTGTTCTCCAT-3'
<i>gst-10</i>	5'-GTCTACCACGTTTTGGATGC-3'
	5'-ACTTTGTGCGCCTTTCTCTT-3'
<i>sod-3</i>	5'-CCAACCAGCGCTGAAATTCAATGG-3'
	5'-GGAACCGAAGTCGCGCTTAATAGT-3'
<i>gsh-px</i>	5'-ATGGCACTTTGGCAGCTCA-3'
	5'-ACGCGCAAAAAGTAGCAACGC-3'
<i>ctl-1</i>	5'-CGGATACCGTACTCGTGATGAT-3'
	5'-CCAAACAGCCACCCAAATCA-3'
<i>actin</i>	5'-GCTGGACGTGATCTTACTGATTACC-3'
	5'-GTAGCAGAGCTTCTCCTTGATGTC-3'

线虫的存活状况,直至全部死亡。统计过程中将身体僵直不动并对轻微震动无反应的秀丽线虫判断为死亡。

1.3.11 脂褐素水平的测定 脂褐素水平检测参照Gerstbrein等^[23]的方法。按照寿命试验方法准备秀丽线虫,加入黑色96孔板中,每个浓度设10个复孔,20℃下培养24h,采用全波长酶标仪测定脂褐素相对荧光强度,激发波长355 nm,发射波长460 nm,记为第1天。每隔2 d测定1次,连续测定3次。

1.3.12 数据处理 所有试验均进行3次以上独立重复试验。存活曲线以重复试验中最具代表性的试验结果表示,其统计学分析采用GraphPad Prism的时序检测(Mantel-Cox test)方法。与对照组相比, $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异。食物清除率试验以10个复孔检测值的($\bar{x} \pm s$)表示。其它试验数据以($\bar{x} \pm SEM$)表示,统计学分析采用GraphPad Prism 5的one-way ANOVA分析和邓尼特多重比较检验(Dunnett's multiple comparisons test)比较试验组和对照组的差异性。与对照组相比, $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

2 结果

2.1 菌菇多糖的体外自由基清除率

为了确定菌菇复合多糖是否具有比单一多糖更优的体外抗氧化效果, 首先检测 XGP、HZIP、LMP 和 FHP 的体外·OH 和 DPPH·的自由基清除效率, 结果见表 2。与对照组比较, 质量浓度为 1.0 mg/mL 的 XGP、HZIP、LMP 和 FHP 对·OH 和 DPPH·均表现出明显的清除活性。相同条件下, 菌菇复合多糖的体外自由基清除能力均大于单一菌菇多糖, 表现出更好的体外抗氧化效果。

2.2 菌菇多糖对秀丽线虫氧化胁迫存活率的影响

在体外检测基础上, 通过模式生物秀丽线虫的氧化胁迫存活率试验研究菌菇多糖的体内抗氧化活性。首先通过 N2 线虫的食物清除率试验, 摸索菌菇多糖合适且不影响线虫正常生长的体内质量浓度。其结果如图 1a 所示。随着培养时间的延长, 培养板中 OP50 的含量呈降低趋势。与空白对

表 2 菌菇多糖的自由基清除能力 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Free radical scavenging ability of mushroom polysaccharide ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ mg·mL ⁻¹	·OH 自由基 清除率/%	DPPH·自由 基清除率/%
阳性对照 (VC)	0.03	49.3 ± 0.8	57.5 ± 0.6
香菇多糖 (XGP)	1.0	65.5 ± 0.8	71.3 ± 1.1
滑子菇多糖 (HZIP)	1.0	46.8 ± 0.7	55.3 ± 0.9
栗蘑多糖 (LMP)	1.0	61.7 ± 1.0	70.7 ± 1.1
复合多糖 (FHP)	1.0	70.7 ± 0.7	82.3 ± 1.0

照组曲线相比, 在质量浓度 0.5 mg/mL 下, 不论是单一组分多糖还是复合多糖对 N2 线虫的食物清除速率均未产生明显影响, 曲线变化趋势与对照

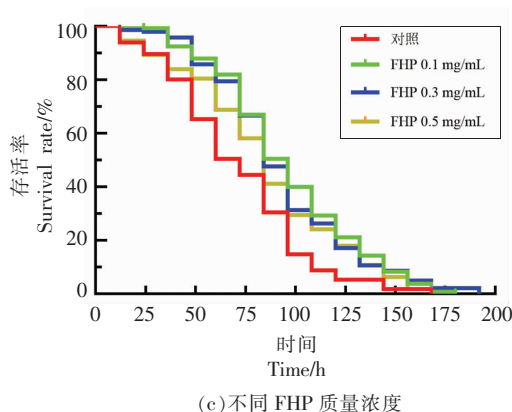
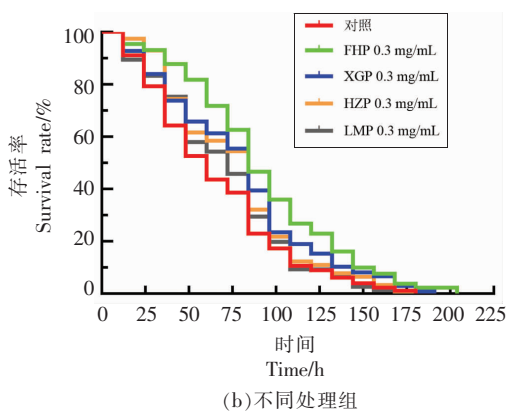
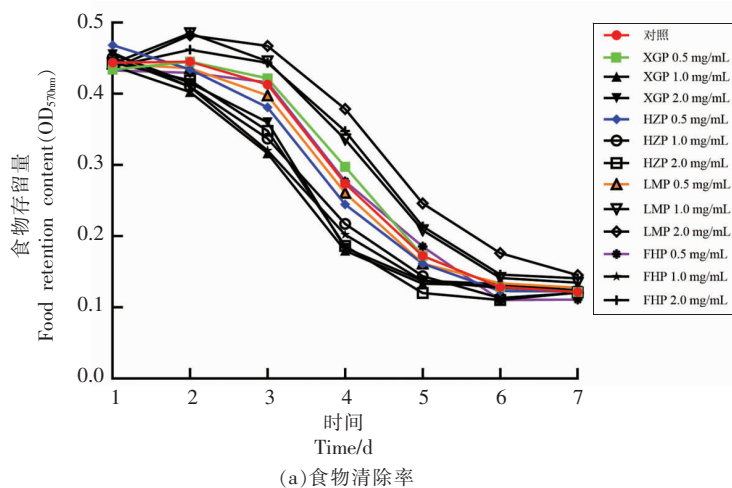


图 1 菌菇多糖对 N2 线虫的体内抗氧化活性的影响

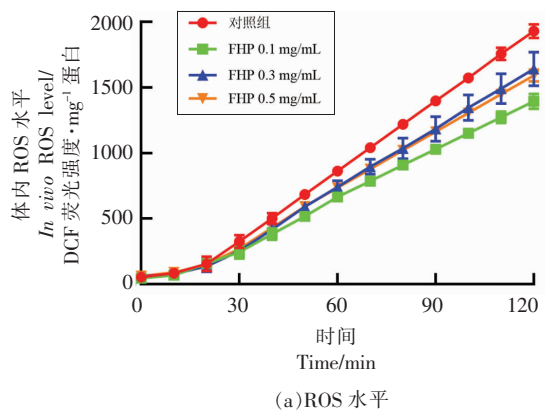
Fig.1 Effects of mushroom polysaccharides on antioxidant activity of N2 nematodes *in vivo*

组一致。质量浓度达到 1.0 mg/mL 和 2.0 mg/mL 时,曲线变化趋势与对照组相比,均出现减缓或加速变化趋势,说明较高的多糖质量浓度对秀丽线虫正常生长繁殖产生一定影响。体内抗氧化活性试验中各多糖处理组均采用 ≤ 0.5 mg/mL 的质量浓度。

之后,检测了菌菇多糖对 N2 线虫抵抗百草枯氧化胁迫能力的影响。结果如图 1b 所示。当随机选择质量浓度 0.3 mg/mL 时,不论是单一多糖组分 XGP、H2P、LMP,还是复合多糖 FHP,均表现出对秀丽线虫氧化胁迫存活时间的延长作用。重复试验结果表明,FHP 处理组的延长效果最显著,其不仅延长 N2 线虫在百草枯胁迫下的中位存活时间,而且延长了线虫的平均存活时间和最大存活时间。该结果表明,菌菇复合多糖的体内抗氧化效果同样优于单一多糖。进一步的研究表明,FHP 对秀丽线虫的体内抗氧化效果与质量浓度存在负相关性,结果如图 1c 所示,质量浓度越低,对秀丽线虫体内的氧化胁迫抗性越明显。

2.3 菌菇复合多糖对秀丽线虫体内氧化胁迫水平的影响

在确定复合多糖 FHP 较单一组成多糖更好



的抗氧化效果后,就 FHP 对秀丽线虫体内氧化胁迫抗性机制进行探讨。线虫氧化胁迫存活率试验中,造模试剂百草枯是公认的 ROS 诱导剂。为了验证 FHP 增加线虫氧化胁迫存活率的抗氧化效果是否与其体内自由基清除相关,检测 FHP 对百草枯胁迫下秀丽线虫体内 ROS 水平,ROS 介导的脂质氧化产物 MDA 含量的影响。其中,线虫体内 ROS 水平检测采用 DCFH-DA 探针法,通过探针在体内与 ROS 反应产物的荧光强度间接反映体内 ROS 的水平。结果如图 2a 所示。随着检测时间的延长,探针检测到的 ROS 含量增多。与对照组相比,FHP 处理组能显著降低线虫体内 ROS 水平,其中 0.1 mg/mL FHP 处理组的效果最显著。ROS 介导的细胞膜脂质氧化产物 MDA 含量检测结果(图 2b)也表明,与对照组相比,FHP 处理可有效降低胁迫条件下 N2 线虫体内的 MDA 水平。其中,低质量浓度(0.1 mg/mL 和 0.3 mg/mL)FHP 处理组的效果最明显。以上结果表明,菌菇复合多糖的抗氧化活性应与其降低胁迫条件下线虫体内 ROS 水平和 MDA 含量,抑制线虫体内氧化胁迫水平相关,而这一活性与质量浓度存在相关性。

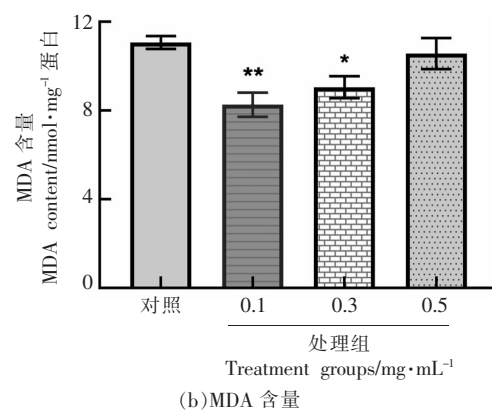


图 2 菌菇复合多糖对胁迫条件下 N2 线虫体内氧化胁迫水平的影响

Fig.2 Effects of FHP on the oxidative stress levels in N2 nematodes under stress

2.4 菌菇复合多糖对秀丽线虫胁迫响应关键转录因子活性的影响

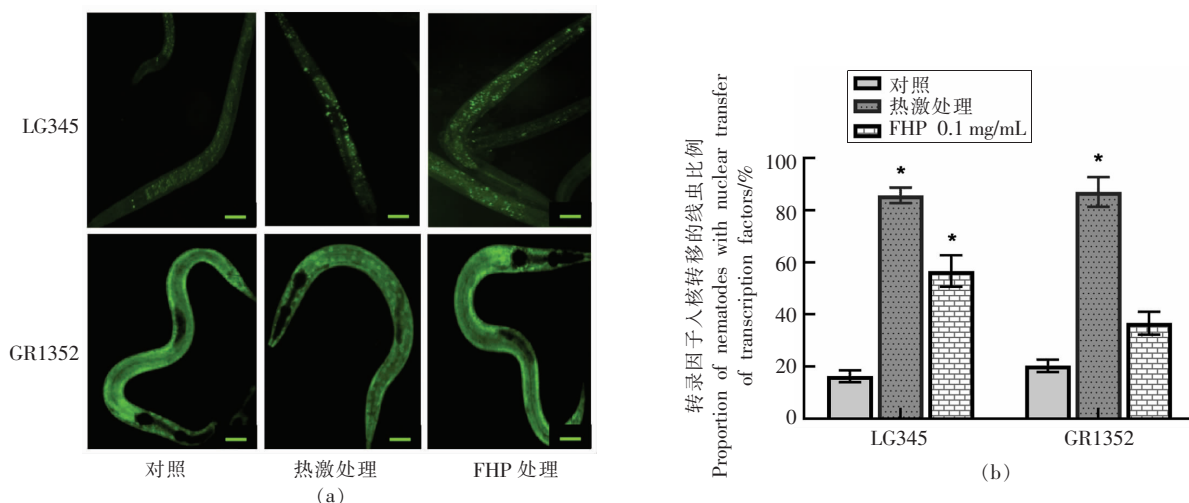
研究表明,胰岛素信号通路(IIS)中与胁迫应激响应相关的关键转录因子 SKN-1/Nrf2 和 DAF-16/FOXO 被证实可以对氧化胁迫信号分子 ROS 作出响应并激活下游的抗氧化酶基因,增强机体

的抗氧化能力^[24]。为了验证菌菇复合多糖的抗氧化活性是否与上述应激响应机制相关,检测 FHP 对关键转录因子 SKN-1 和 DAF-16 活性的影响。

转录因子的入核转移是其被激活的前提。在试验过程中,选用与 SKN-1 和 DAF-16 共表达 GFP 融合蛋白的转基因线虫 LG345 和 GR1352,

检测 FHP 对 SKN-1 和 DAF-16 的入核转移的影响。正常情况下,与 SKN-1 共表达的 GFP 聚集在 ASI 神经元的细胞核,同时以弥散的小点状分散在肠道细胞的细胞质中(图 3a, LG345-对照);与 DAF-16 共表达的 GFP 则分布在线虫多个部位的细胞质中,线虫表现为通体荧光(图 3a, GR1352-对照)。当转录因子被激活时, GFP 从细胞质转移并聚集到细胞核内,形成分散的、荧光聚集斑块(图 3a, 以热激处理为阳性对照)。通过荧光聚集

斑点的有、无可以间接判定转录因子的激活情况。以被检测的线虫体内出现荧光聚集斑块的线虫比例进行统计,结果如图 3b 所示。与各组的空白对照相比, FHP 处理组显著增加了转录因子 SKN-1 入核的线虫比例,而对 DAF-16 入核转移线虫的比例虽有增加趋势,但差异不显著。该结果表明, FHP 处理有效激活了线虫体内胁迫应激关键转录因子 SKN-1 的活性,而 DAF-16 的活性仍需验证。



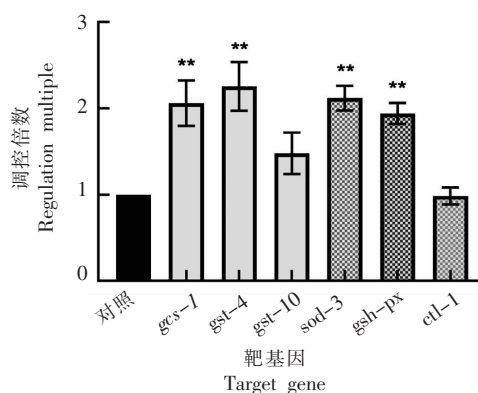
注:a. 用 Image Xpress Micro 拍摄的不同条件下 LG345 (上) 和 GR1352 (下) 中转录因子 SKN-1 和 DAF-16 的定位图像(尺度条, 20 μm); b. 根据荧光聚集斑点的有、无计算 SKN-1 和 DAF-16 入核转移的线虫比例。

图 3 菌菇复合多糖对秀丽线虫胁迫响应关键转录因子活性的影响

Fig.3 Effects of FHP on the activities of key transcription factors in response to stress in *Caenorhabditis elegans*

2.5 菌菇复合多糖对 SKN-1 和 DAF-16 转录因子靶基因表达的影响

为了进一步验证 FHP 对 SKN-1 和 DAF-16 的激活情况,探究 FHP 对 IIS 信号通路的影响。选择野生型秀丽线虫 N2, 提取总 RNA。采用 qRT-PCR 法分别检测 FHP 对 SKN-1 下游靶基因 *gcs-1* (γ 谷酰基半胱氨酸合成酶), *gst-4* (谷胱甘肽 S-转移酶), *gst-10* (谷胱甘肽 S-转移酶) 和 DAF-16 下游靶基因 *sod-3* (超氧化物歧化酶), *gsh-px* (谷胱甘肽过氧化物酶), *ctl-1* (过氧化氢酶) 的 mRNA 表达量的影响,结果如图 4 所示。与对照组相比, FHP 处理后, N2 线虫体内 SKN-1 和 DAF-16 的下游靶基因 *gcs-1*、*gst-4* 和 *sod-3*、*gsh-px* 的转录水平均有显著增加。该结果验证了 FHP 对 SKN-1 和 DAF-16 的激活活性,表明 FHP 可有效调控 IIS 信



注:FHP 处理质量浓度为 0.1 mg/mL; SKN-1 靶基因 *gcs-1*、*gst-4*、*gst-10*; DAF-16 靶基因 *sod-3*、*gsh-px*、*ctl-1*。

图 4 菌菇复合多糖对 N2 线虫胁迫响应效应基因表达的影响

Fig.4 Effects of FHP on expression of stress responsive genes in N2 nematodes

号通路下游胁迫响应效应基因的表达。

2.6 菌菇复合多糖对秀丽线虫体内抗氧化酶活性的影响

抗氧化酶是细胞内抗氧化系统中的关键物质,增强抗氧化酶活力有助于清除过量 ROS 和缓解氧化胁迫。为进一步验证 FHP 通过调控 IIS 信号通路增强秀丽线虫氧化胁迫抗性的作用机制,测定 FHP 对秀丽线虫体内 SOD、CAT 和 GPx 活性的影响,结果如图 5 所示。与对照组相比,FHP 处理组可显著提高 SOD 和 GPx 的酶活力(图 5a、5c),尤其在低质量浓度处理组(0.1,0.3 mg/mL)效果最明显。而对 CAT 的酶活力无显著影响。该结果表明,FHP 的自由基清除活性应主要与其提升线虫体内 SOD 和 GPx 的活性相关,而与 CAT 的关系不大。该结果与 FHP 对 SKN-1 和 DAF-16 下游效应基因的影响相一致,即虽然在入核转移实验中 DAF-16 的入核激活并不显著,但是 FHP 的抗氧化效果仍与 DAF-16 的激活及其下游效应体相关。

2.7 菌菇复合多糖对秀丽线虫衰老的影响

根据衰老的自由基学说,衰老的产生与体内过量自由基的生成及由此产生的氧化胁迫环境直接相关。在确定菌菇复合多糖对秀丽线虫良好的自由基清除及氧化胁迫抗性的生物活性基础上,研究了菌菇复合多糖的抗衰老活性。首先观察了 FHP 对 N2 线虫生存曲线的影响,结果如图 6a 所示。与对照组相比,FHP 处理组线虫的生存曲线没有明显差异,即便是抗氧化效果最好的质量浓度组(0.1 mg/mL 的 FHP 处理组)也并未延长秀丽线虫的寿命。

与此同时,检测了 FHP 对 N2 线虫体内可间接反映衰老进程的脂褐素积累水平的影响。根据脂褐素的光学性质,结合秀丽线虫通体透明的特点,采用荧光酶标仪法定量分析线虫体内的脂褐素,结果如图 6b 所示。与对照组相比,FHP 的处理未显著影响线虫体内脂褐素的积累水平,即 FHP 未延缓 N2 线虫的衰老进程。综上,菌菇复合多糖虽具有较好的抗氧化效果,但未表现出延缓秀丽线虫衰老的抗衰老活性。

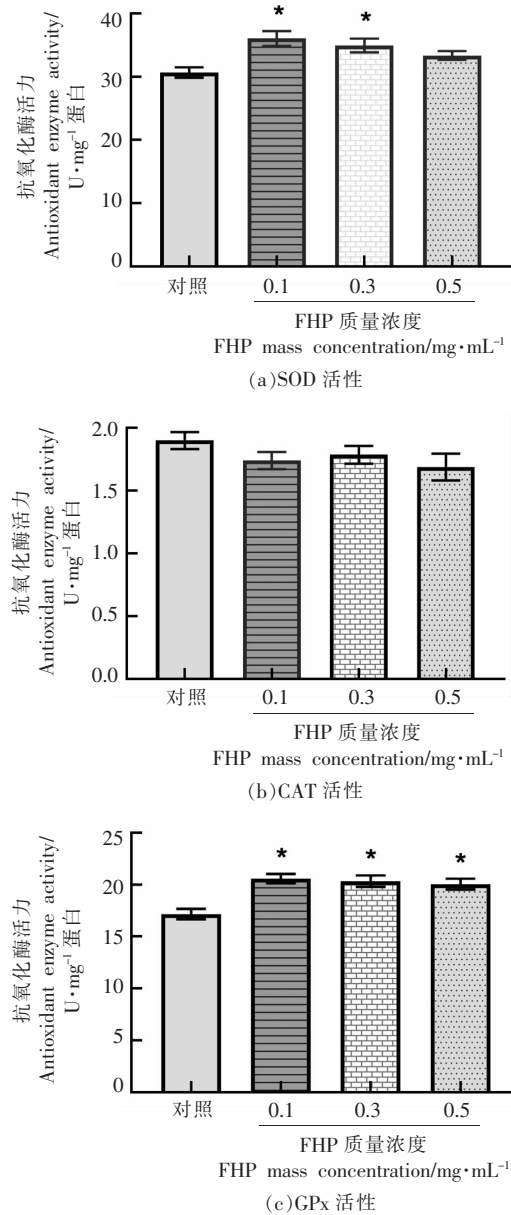


图5 菌菇复合多糖对胁迫条件下 N2 线虫体内抗氧化酶活性的影响

Fig.5 Effects of FHP on the activity of antioxidant enzymes in N2 nematodes under stress

3 讨论与结论

近年来,复合多糖的研究表明,不同的生物活性多糖之间的协同效应往往会获得优于单一多糖的活性效果^[16,25]。菌菇多糖作为“生物应答调节剂”,目前的应用更多偏向于单一应用。探究菌菇

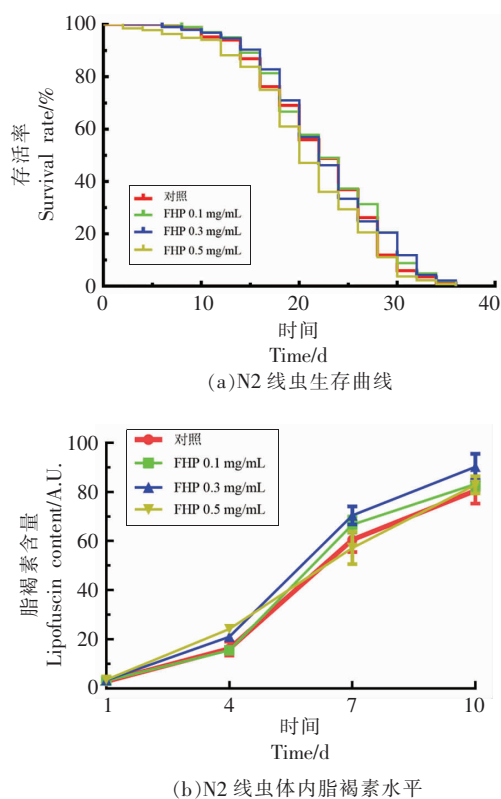


图 6 菌菇复合多糖对 N2 线虫衰老的影响
Fig.6 Effects of FHP on the senescence of N2 nematodes

复合多糖的生物活性及机制有利于菌菇多糖的高效利用及开发。

本研究结果表明:由香菇多糖、滑子菇多糖和栗蘑多糖组成的菌菇复合多糖(FHP)较单一组成多糖具有更好的体外自由基清除效率和延长秀丽线虫氧化胁迫存活率的协同抗氧化效果。其增强秀丽线虫体内氧化胁迫抗性的作用机制与其降低线虫体内 ROS 水平及 MDA 含量等氧化胁迫水平, 激活胁迫应激关键转录因子 SKN-1 和 DAF-16 的活性及其下游效应基因表达和增强抗氧化酶活性相关。FHP 的抗氧化效果与质量浓度存在负相关性,即在较低质量浓度处理时,FHP 的抗氧化效果好。推测可能与粗多糖没有进一步纯化以及多糖质量浓度过高影响细胞渗透压相关。以后还需对复合多糖的纯化做进一步研究。此外,研究结果还表明,虽然 FHP 具有较好的抗氧化活性,但是其对秀丽线虫的衰老并无明显影响,这可能与其对胰岛素信号通路中与衰老相关的 DAF-16

的调控力度不够有关,后期需继续探索。此结果与竹荪多糖^[18]和淫羊藿多糖^[26]的研究结果相一致,即虽然具有良好的体内抗氧化及自由基清除活性,但是竹荪多糖和淫羊藿多糖同样不能延缓秀丽线虫的衰老,未表现出抗衰老活性。同样,生育酚^[27]虽具有强大的抗氧化能力,但其对模式生物寿命的影响不明显。这表明寿命调节和应激响应存在更复杂的机制。

综上所述,菌菇复合多糖 FHP 具有良好的协同增效的体内外抗氧化活性,不具备明显的抗衰老活性。其增强秀丽线虫氧化胁迫抗性的作用机制与其激活胁迫应激转录因子 SKN-1 和 DAF-16,影响其下游效应体活性有关。研究结果为菌菇多糖的高效利用及复合多糖的深入开发提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] WONG K H, LAI C, CHEUNG P. Immunomodulatory activities of mushroom sclerotial polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 150-158.
- [2] GHOSH S, KHATUA S, ACHARYA K. Crude polysaccharide from a wild mushroom enhances immune response in murine macrophage cells by TLR/NF- κ B pathway[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2019, 71(8): 1311-1323.
- [3] 李志涛, 赵娟娟, 王敏, 等. 复合食用菌多糖的免疫活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 39-42.
- [4] LI Z T, ZHAO J J, WANG M, et al. Study on the immune effects of edible fungus polysaccharides compounds[J]. Food Research and Development, 2017, 38(5): 39-42.
- [5] HKD A, DD B, AK C, et al. Structural elucidation of a heteropolysaccharide from the wild mushroom *Marasmiellus palmivorus* and its immune-assisted anticancer activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 211: 272-280.
- [6] XIN M, LIANG H, LUO L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities[J]. Carbohydrate Research, 2016, 424: 30-41.
- [6] HE X, WANG X, FANG J, et al. Structures, bio-

- logical activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericum erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 97: 228-237.
- [7] 续延军. 白灵菇多糖对力竭运动大鼠抗疲劳及抗氧化作用探析[J]. 中国食用菌, 2020, 39(2): 49-51.
XU Y J. Anti-fatigue and antioxidant effects of pleurotusnebrodensis polysaccharide on exhaustive exercise rats[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(2): 49-51.
- [8] 段懿涵, 盛瑜, 徐健, 等. 姬松茸多糖对D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠的抗衰老作用及其Keap1/Nrf2/ARE信号转导途径机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(2): 346-351.
DUAN Y H, SHENG Y, XU J, et al. Anti-aging effects of agaricus blazei polysaccharide in D-galactose-induced aging model mice and Keap 1/Nrf2/ARE signal transduction pathway mechanism [J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2020, 46(2): 346-351.
- [9] 闫永兰. 酶提羊肚菌子实体多糖的抗氧化和抗衰老作用[J]. 中国食用菌, 2020, 39(1): 42-45, 60.
YAN Y L. Antioxidation and anti-aging effects of polysaccharides from zymotic fruit bodies of morchella[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(1): 42-45, 60.
- [10] JIANG X, MENG W, LI L, et al. Adjuvant therapy with mushroom polysaccharides for diabetic complications[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 168-170.
- [11] 牛君, 王傲, 史钊, 等. 中国食用菌降血糖研究进展[J]. 中国食用菌, 2020, 39(1): 1-7, 15.
NIU J, WANG A, SHI C, et al. Advance research on hypoglycemic effect of edible fungi in China[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(1): 1-7, 15.
- [12] 闫文杰, 段昊, 吕燕妮, 等. 食用菌在我国保健食品中的应用[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 296-302.
YAN W J, DUAN H, LÜ Y N, et al. Recent development in the application of edible fungi in health foods in China[J]. Food Science, 2020, 41(21): 296-302.
- [13] 周萍, 安东, 王朝川, 等. 食用菌复合多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国食用菌, 2011, 30(6): 42-44.
ZHOU P, AN D, WANG C C, et al. Studies on antioxidant activities of compound polysaccharides from edible fungus[J]. Edible Fungi of China, 2011, 30(6): 42-44.
- [14] 高绍璞, 周礼元. 食用菌多糖功效的最新研究进展[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2019, 43(3): 102-108.
GAO S P, ZHOU L Y. Recent progress of research on the activity of polysaccharides from edible mushrooms[J]. Journal of Anhui University(Natural Science Edition), 2019, 43(3): 102-108.
- [15] 杨丹, 任谓明, 王艳红, 等. 复合多糖药理活性研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(3): 94-97.
YANG D, REN W M, WAGN Y H, et al. Research progress on pharmacological activity of complex polysaccharides[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 50(3): 94-97.
- [16] 罗霞, 马忠华, 胡明华, 等. 复合多糖对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 186-191.
LUO X, MA Z H, HU M H, et al. Effects of compound polysaccharide on cellular immunity in mice[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(2): 186-191.
- [17] 杨柳, 李胜友, 黄宏靓. 防癌茶方3种中药多糖及其复合多糖的抗氧化活性研究[J]. 广东药科大学学报, 2016, 32(6): 752-756.
YANG L, LI S Y, HUANG H L. Effect of three kinds of Chinese medicine polysaccharides and their compound polysaccharide on antioxidant activity [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2016, 32(6): 752-756.
- [18] ZHANG J, SHI R, LI H, et al. Antioxidant and neuroprotective effects of *Dictyophora indusiata* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 192: 413-422.
- [19] WANG Q, HUANG Y, QIN C, et al. Bioactive peptides from *Angelica sinensis* protein hydrolyzate delay senescence in *Caenorhabditis elegans* through antioxidant activities[J]. Oxidative Medicine & Cellular Longevity, 2016, 2016: 1-10.
- [20] CHEW Y L, GÖTZ J, NICHOLAS H R. Neuronal protein with tau-like repeats (PTL-1) regulates intestinal SKN-1 nuclear accumulation in response to oxidative stress[J]. Aging Cell, 2015, 14(1): 148-151.
- [21] EVASON K, COLLINS J J, HUANG C, et al. Valproic acid extends *Caenorhabditis elegans* with impaired electron transport chain and mitochondrial

- DNA damage[J]. *Mitochondrion*, 2008, 7(1/2): 106–118.
- [22] ZHANG H, PAN N, XIONG S, et al. Inhibition of polyglutamine-mediated proteotoxicity by *Astragalus membranaceus* polysaccharide through the DAF-16/FOXO transcription factor in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biochemical Journal*, 2012, 441(1): 417–442.
- [23] GERSTBREIN B, STAMATAS G, KOLLIAS N, et al. *In vivo* spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Aging Cell*, 2005, 4: 127–137.
- [24] ZARSE K, SCHMEISSER S, GROTH M, et al. Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal[J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15(4): 451–465.
- [25] 谢好贵, 韦明轩, 陈美珍, 等. 3种多糖复合体外抗肿瘤协同增效作用[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 289–294.
- XIE H G, WEI M Q, CHEN M Z, et al. Synergistic antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from three different matrices[J]. *Food Science*, 2013, 34(15): 289–294.
- [26] XIANG Y, ZHANG J, LI H, et al. *Epimedium* polysaccharide alleviates polyglutamine-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans* by reducing oxidative stress[J]. *Rejuvenation Research*, 2017, 20(1): 32–41.
- [27] ERNST I M, PALLAUF K, BENDALL J K, et al. Vitamin E supplementation and lifespan in model organisms[J]. *Ageing Research Reviews*, 2013, 12(1): 365–375.

The Effect of Mushroom Complex Polysaccharide on Resisting to Oxidative Stress of *Caenorhabditis elegans*

Zhang Ju^{1,2}, Jia Dongsheng², Zhao Shihao¹, Xie Xiaoliang², Chen Hong³, Li Haifeng^{3*}

¹College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050072

²Institute of Cash Crop, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051

³School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006

Abstract Objective: To study the antioxidant activity and mechanism of mushroom complex polysaccharide (FHP). Method: The free radical scavenging efficiency *in vitro* and oxidative survival rate in *C. elegans* were used to evaluate the antioxidant capacity of FHP. The reactive oxygen species (ROS) level, malondialdehyde (MDA) content, antioxidant enzyme activity as well as the stress-related transcription factor activity and effector gene expression were used to study the antioxidant mechanism of FHP. Result: Compared with that of single polysaccharide, FHP exhibited higher free radical scavenging efficiency and stress survival rate increase, indicated a better antioxidant effect. Experiments in *C. elegans* showed that FHP could not only increase the survival rate of paraquat-stressed N2 nematodes, but also reduce the internal ROS level and MDA content. Further experiments revealed that FHP could also activate the nuclear translocation of stress response transcription factor SKN-1 and DAF-16 and increase that target gene expression, and these results were further verified in the examination of antioxidant enzyme activity. But FHP did not prolong the lifespan and reduce the lipofuscin level in N2 nematodes. Conclusion: FHP can effectively enhance the oxidative stress resistance of *C. elegans*, but not affect the aging. Its antioxidant mechanism may be related to the activation of transcription factors SKN-1 and DAF-16 and the influence on the downstream effector activity.

Keywords edible fungi polysaccharide; complex polysaccharide; *Caenorhabditis elegans*; oxidative stress; aging; reactive oxide species; antioxidant enzyme; transcription factor