

# 铆钉菇黑色素抗氧化活性及对秀丽隐杆线虫抗衰老与应激损伤的作用

潘一强, 戴德慧, 陈贵才, 胡伟莲\*  
(浙江科技大学生物与化学工程学院 杭州 310063)

**摘要** 研究了铆钉菇 D1 胞外黑色素分子结构、体内外抗氧化、抗衰老及应激损伤作用。通过紫外-可见光谱、红外光谱及扫描电镜对铆钉菇黑色素结构特性进行分析;通过测定羟基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、超氧阴离子自由基清除能力及铁氰化钾还原力评价体外抗氧化能力;通过秀丽隐杆线虫自然衰老、过氧化氢、高温及紫外线等应激损伤模型,评价黑色素抗衰老及应激损伤的作用;通过测定秀丽隐杆线虫体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量评价其体内抗氧化能力。结果表明:铆钉菇黑色素为无定型结构,具有典型的黑色素紫外-可见光及红外吸收光谱特征;羟基、DPPH 及超氧阴离子自由基清除率最高达到 68.42%,67.1%,34.3%;1.00 g/L 的铆钉菇黑色素可显著提高线虫的自然寿命( $P<0.05$ ),0.50~1.00 g/L 的铆钉菇黑色素可显著提高过氧化氢应激下线虫的平均寿命( $P<0.01$ ),0.50~4.00 g/L 的铆钉菇黑色素可显著提高热应激下线虫的平均寿命( $P<0.01$ ),0.25~4.00 g/L 的铆钉菇黑色素可显著提高紫外线应激下线虫的平均寿命( $P<0.01$ );0.50~1.00 g/L 的铆钉菇黑色素,可显著提高线虫体内 SOD( $P<0.05$ )和 CAT 活力( $P<0.01$ ),降低 MDA 含量( $P<0.01$ )。结论:铆钉菇胞外黑色素具有典型的黑色素分子结构,良好的体内外抗氧化能力及抗衰老与应激损伤作用。

**关键词** 铆钉菇;黑色素;抗氧化活性;秀丽隐杆线虫;抗应激损伤

**文章编号** 1009-7848(2024)10-0156-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.015

天然黑色素是一类由多羟基酚类物质氧化和聚合产生的黑色或棕色大分子化合物,广泛存在于动、植物及微生物中<sup>[1]</sup>。天然黑色素具有多种生物学效应,包括抗氧化活性<sup>[2]</sup>、抗辐射活性<sup>[3]</sup>、抗炎活性<sup>[4]</sup>、抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>、保肝活性<sup>[6]</sup>等,在食品、医药、化妆品及农业等领域有较高的应用价值。相比于动、植物提取法和化学合成法,真菌来源的黑色素具有成本低廉、生产周期短及反应条件温和等优点,使得真菌成为获取黑色素的重要途径之一<sup>[7]</sup>。虽然对短梗霉属、木耳属、粒毛盘菌属、灵芝属和曲霉属等真菌已有黑色素的研究报道<sup>[8]</sup>,但是仍未见有成功应用于工业化生产的菌种。真菌黑色素在技术应用中的挑战包括对其结构的详细解析、黑色素的产量、黑色素的分离,以及真菌的致病性或毒性等。随着今后研究的深入,真菌黑色素将在未来几年具有巨大的社会效益<sup>[9]</sup>。

铆钉菇(*Gomphidius viscidus*)分布于北温带

地区,是我国常见的可食药大型真菌<sup>[10]</sup>。铆钉菇菌丝体富含多种活性物质,如多糖、黄酮都具有良好的抗氧化活性<sup>[11-12]</sup>,然而,对于铆钉菇的次级代谢产物黑色素却鲜见文献报道。相比于产量低且提取繁琐的灵芝属、曲霉属等胞内黑色素<sup>[8]</sup>,铆钉菇不需添加酪氨酸的诱导就能在简单的察氏培养基中大量积累胞外黑色素。

本研究以铆钉菇菌丝体液态发酵的胞外黑色素为研究对象,分析其分子结构。在此基础上,对其体内外抗氧化活性、抗衰老与应激损伤作用进行探讨,为铆钉菇胞外黑色素的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

铆钉菇 D1(*Gomphidius viscidus* D1)、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、大肠杆菌 OP<sub>50</sub>(*Escherichia coli* OP<sub>50</sub>),本实验室保存。

### 1.2 试剂、仪器和设备

30%过氧化氢、抗坏血酸(Vitamin C,VC)、5-氟尿嘧啶、水杨酸、铁氰化钾、三氯化铁、邻苯三

收稿日期:2023-10-21

基金项目:浙江省重点研发计划项目(2021C02008)

第一作者:潘一强,男,硕士

通信作者:胡伟莲 E-mail: weilian89@126.com

酚、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、三羟甲基氨基甲烷,国药集团化学试剂有限公司;SOD、CAT、MDA测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;NGM培养基,山东拓普生物工程有限公司。

ISO-9001 电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;F28 pH计,梅特勒-托利多仪器有限公司;ZWYR-2112B 智城恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;Allegra X-30R 高速冷冻离心机,贝克曼库尔特股份有限公司;UV-5500PC 紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;ZXFD-B5140 恒温培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;DHG 电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;SpectraMax 190 光吸收型酶标仪,Mocular Devices 公司;SZ2-ILST 显微镜,Olympus 公司;iCAN 9 红外光谱仪,天津市能谱科技有限公司;SU1510 型扫描电镜分析仪,北京驰奔科技有限公司。

### 1.3 铆钉菇黑色素的制备

铆钉菇发酵液抽滤后取滤液,采用酸化沉淀法纯化<sup>[13]</sup>,加入浓盐酸调节 pH 值至 1~2,静置 24 h,10 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,将所得沉淀与 255.22 g/L 盐酸按 1:50 (M/V) 比例混合后,99 ℃水浴 2 h,酸解除去蛋白质和多糖,10 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,用 1 mol/L NaOH 溶解,加入浓盐酸调节 pH 值至 1~2,静置 24 h,10 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,用去离子水洗涤沉淀至中性,再用乙醇、氯仿、乙酸乙酯分别洗涤,70 ℃烘干至恒重,即得黑色素样品。将黑色素样品完全溶解于 1 mol/L NaOH 中,加入盐酸调节至 pH 7.0,用透析袋除盐即得黑色素溶液。

### 1.4 铆钉菇黑色素的光谱及扫描电镜分析

使用紫外-可见分光光度计,在波长 190~800 nm 区间范围内测定紫外可见光吸收光谱;采用溴化钾压片法,在 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 区间范围内测定红外吸收光谱;黑色素样品真空喷金后,在扫描电镜下观察。

### 1.5 体外抗氧化活性的测定

取铆钉菇黑色素样品,分别配制成质量浓度为 0.025~0.3 g/L,0.03~0.15 g/L 及 0.2~1.0 g/L 的溶液,以同质量浓度的 VC 作为对照,参照参考文献

献[14]的方法进行 DPPH、羟基、超氧阴离子自由基清除率的测定,参照参考文献[15]的方法进行总还原力的测定。

### 1.6 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫体内抗氧化及抗应激损伤活性

1.6.1 秀丽隐杆线虫同期化和培养 线虫同期化和培养方法参考李芳等<sup>[16]</sup>,以只含有大肠杆菌 OP<sub>50</sub> 的 NGM 培养基上培养的线虫为对照组,混有不同质量浓度黑色素和大肠杆菌 OP<sub>50</sub> 的 NGM 培养基上培养的线虫为给药组,各组线虫均在 20 ℃条件下持续培养 3 d。

1.6.2 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫自然寿命的影响 方法参考吕宏安<sup>[17]</sup>,挑选同期化后的 L4 期线虫,配制黑色素质量浓度为 0.25,0.5,1.0,2.0,4.0 g/L 的给药组和对照组,每组 20 只,3 个平行组,每天把线虫转移到相同的新平板中,直至所有线虫死亡(线虫头部受到机械刺激 10 s 后没有反应视为死亡)。

1.6.3 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫运动能力的影响 方法参考吕宏安<sup>[17]</sup>,每组挑选 20 只已给药 3 d 的线虫,观察线虫 1 min 内头部摆动(大于 90°)和身体弯曲次数(身体从一个方向转向另一方向并转回原方向)。

1.6.4 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激的影响 方法参考王亚超<sup>[18]</sup>并略作修改,每组挑选 20 只已给药 3 d 的线虫,暴露于 100 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的急性氧化应激环境下,每 10 min 统计线虫存活数量,直至所有线虫死亡。

1.6.5 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫抗紫外辐射应激的影响 方法参考马云蕾<sup>[19]</sup>并略作修改,每组挑选 20 只已给药 3 d 的线虫,暴露于紫外辐射环境下(15 W, 50 cm),每 10 min 观察并记录各组线虫存活数量,直至所有线虫死亡。

1.6.6 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫抗热应激的影响 方法参考王亚超<sup>[18]</sup>,每组挑选 20 只已给药 3 d 的秀丽隐杆线虫,转移至 35 ℃恒温箱内,每 30 min 观察并记录线虫死亡情况,直至所有线虫死亡。

1.6.7 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫体内抗氧化指标的影响 选同期化后的 L4 期线虫,每组挑选 50 只已给药 3 d 的秀丽隐杆线虫制备线虫匀浆<sup>[20]</sup>,

然后按照试剂盒说明书对线虫匀浆液中 SOD、CAT 酶活和 MDA 含量进行测定。

### 1.7 统计学处理

试验均重复 3 次,采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析,试验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。组间数值比较采用单因素方差分析,其中  $P < 0.05$  具有显著性差异, $P < 0.01$  具有极显著性差异,绘图及 log-rank 分析使用 Origin2023。

## 2 结果与分析

### 2.1 铆钉菇黑色素外观

铆钉菇在液体察氏培养基摇瓶培养 9 d 后,因产生大量的胞外黑色素而使培养基呈现棕黑色(图 1a)。培养液经纯化处理后,得到纯黑色、无异味,略有光泽的黑色素粉末(图 1b)。扫描电镜显示铆钉菇黑色素为无定型结构(图 1c 和图 1d),这与大多数文献报道的天然黑色素结构相似<sup>[21-22]</sup>,然而与鱿鱼墨黑色素微球状结构有所差异<sup>[23]</sup>。

### 2.2 铆钉菇黑色素的紫外可见光扫描分析

对纯化后的铆钉菇黑色素进行紫外可见光扫描,结果如图 2 所示,铆钉菇黑色素在波长 190~800 nm 均有吸收,在波长 195 nm 处有最大吸收,此后随着波长的增大,吸光度逐渐减少。与文献报道的天然黑色素一致,而最大吸收波长略有差异,如金针菇、乌鳖源黑色素的最大吸收波长分别为 206.5 nm 和 215 nm<sup>[24-25]</sup>。

### 2.3 铆钉菇黑色素的红外光谱分析

对纯化后的铆钉菇黑色素进行红外扫描,结果如图 3 所示,在  $3\,393.66\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰,表明黑色素含有 -OH 与吡啶的 -NH 结构。在  $1\,697.28\sim 1\,356.88\text{ cm}^{-1}$  出现的吸收峰表明黑色素中含有大量的苯环结构, $1\,615.64\text{ cm}^{-1}$  和  $1\,356.88\text{ cm}^{-1}$  处具有 N-H 弯曲振动峰和 C-N 伸缩振动峰吸收峰,表明其有黑色素典型的吡啶结构。 $1\,263.57\text{ cm}^{-1}$  和  $2\,922.64\text{ cm}^{-1}$  这两处出现的吸收峰为  $\text{CH}_2$  不对称伸缩振动。 $1\,040.79\text{ cm}^{-1}$  出现的吸收峰为酚类或羧基的 C-O 结构。在  $846.45\text{ cm}^{-1}$  处的吸收带较弱,是由于芳环被取代,并形成共轭体系,芳氢含量随之相对减少。柱状田头菇黑色素在  $3\,500\text{ cm}^{-1}$  处有较宽的波谷,在  $2\,927\text{ cm}^{-1}$  与  $2\,853\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰为  $\text{CH}_2$  不对称伸缩振动, $1\,078.04\text{ cm}^{-1}$  的

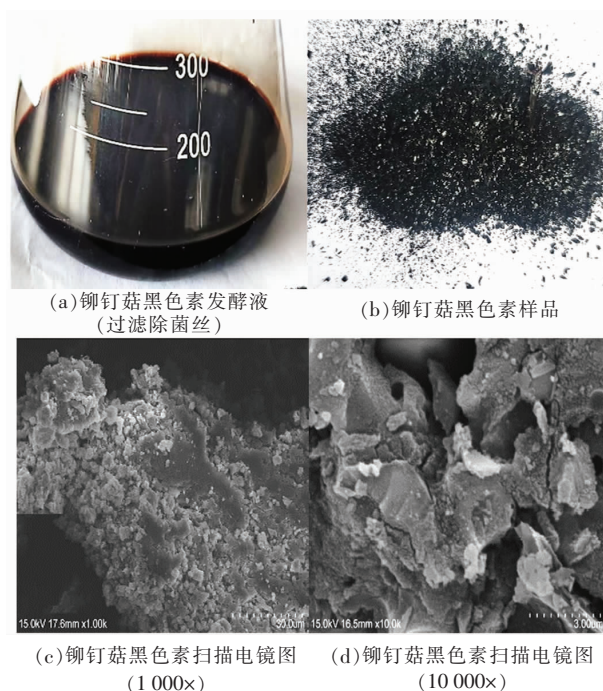


图 1 铆钉菇黑色素

Fig.1 Melanin from *Gomphidius viscidus*

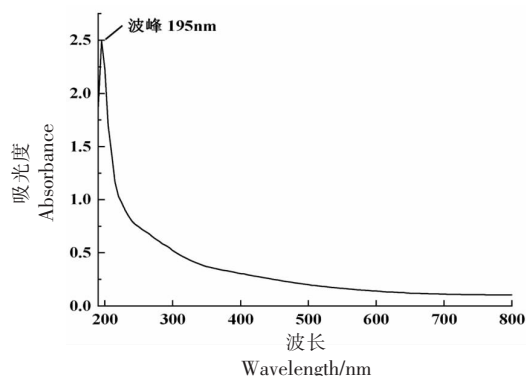


图 2 铆钉菇黑色素的紫外可见光扫描图谱

Fig.2 UV-Vis spectrum of melanin from *Gomphidius viscidus*

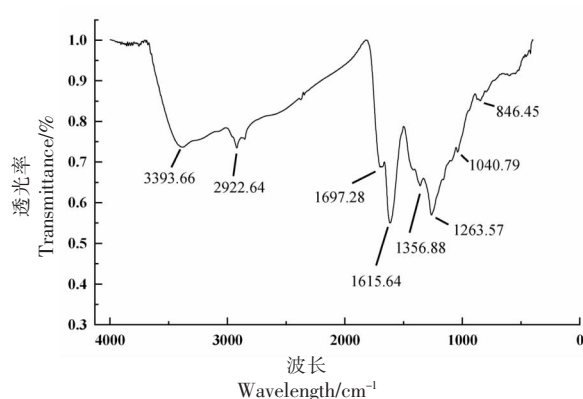


图 3 铆钉菇黑色素的红外光谱图

Fig.3 IR spectra of melanin from *Gomphidius viscidus*



波谷是由于苯环上连接的氢向内收缩形成,  $889.13\text{ cm}^{-1}$  吸收很弱, 是由于苯环被取代形成共轭体系<sup>[26]</sup>。巴西粒毛盘菌黑色素在  $1\ 600, 1\ 500, 1\ 440\text{ cm}^{-1}$  附近有较强的吸收峰, 在  $860\sim 650\text{ cm}^{-1}$  范围内的吸收带很弱, 在  $2\ 930\sim 2\ 830\text{ cm}^{-1}$  存在相对较弱的吸收峰, 表明存在较多的芳环结构和较少的烷烃结构; 在  $3\ 400\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰表明含有  $-\text{OH}$  和  $-\text{NH}$  结构<sup>[27]</sup>。根据红外光谱表征分析结果对比, 铆钉菇黑色素具有黑色素的典型结构。

## 2.4 铆钉菇黑色素的体外抗氧化活性

通过羟基、DPPH、超氧阴离子自由基清除率及总还原力等 4 种主要体外抗氧化分析方法评价了铆钉菇黑色素的体外抗氧化能力。结果如图 4 所示, 铆钉菇黑色素在还原力、清除 DPPH 自由基、超氧阴离子和羟基自由基等方面均有一定作用, 其活性随着质量浓度的增加而增强。铆钉菇黑色素质量浓度为  $0.3\text{ g/L}$  时, 羟基自由基清除率最大达到  $68.42\%$ , 黑色素质量浓度达到  $0.12\text{ g/L}$  时, DPPH 自由基清除率最大达到  $67.1\%$ ,  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $0.049\text{ g/L}$  和  $0.098\text{ g/L}$ , 均明显高于灵芝孢子黑色素 ( $0.964\text{ g/L}$  和  $0.469\text{ g/L}$ )、灵芝菌丝体黑色素

( $1.464\text{ g/L}$  和  $0.207\text{ g/L}$ ) 和灵芝子实体黑色素 ( $4.236\text{ g/L}$  和  $0.284\text{ g/L}$ ) 清除羟基自由基和 DPPH 自由基的  $\text{IC}_{50}$  值<sup>[28]</sup>, 也高于黑木耳<sup>[29]</sup>及乌鳖中黑色素<sup>[30]</sup>  $30\%\sim 50\%$  的羟基自由基清除率及黑芝麻黑色素  $47.7\%$  DPPH 自由基清除率<sup>[25]</sup>。此外, 铆钉菇黑色素质量浓度为  $0.8\text{ g/L}$  时, 清除超氧阴离子清除率最大达到  $34.3\%$ , 铁氰化钾还原力则表明了铆钉菇黑色素可供应较多的电子, 这些电子可使  $\text{Fe}^{3+}$  还原为  $\text{Fe}^{2+}$ , 使自由基变成更加稳定的物质, 这与同质量浓度的黑木耳黑色素一致<sup>[29]</sup>。

虽然黑色素分子结构相对多样且不明确, 单个黑色素的整体性质和功能尚未得到充分的研究和表征<sup>[31]</sup>, 但已报道的黑色素分子结构中大多含有酚羟基和醌式结构, 黑色素的抗氧化活性可能与这种结构密切相关。Jacobson 等<sup>[32]</sup>研究表明黑色素的抗氧化功能可能与其结构中含有的类似醌和对苯二酚的残基结构有关。金春英等<sup>[33]</sup>研究得出具有多酚羟基或易氧化成醌式共轭结构的化合物对自由基有显著的清除作用。铆钉菇黑色素相比于灵芝<sup>[28]</sup>、黑木耳<sup>[29]</sup>、乌鳖<sup>[30]</sup>及黑芝麻<sup>[25]</sup>等黑色素可能拥有更多的酚羟基或醌式结构。

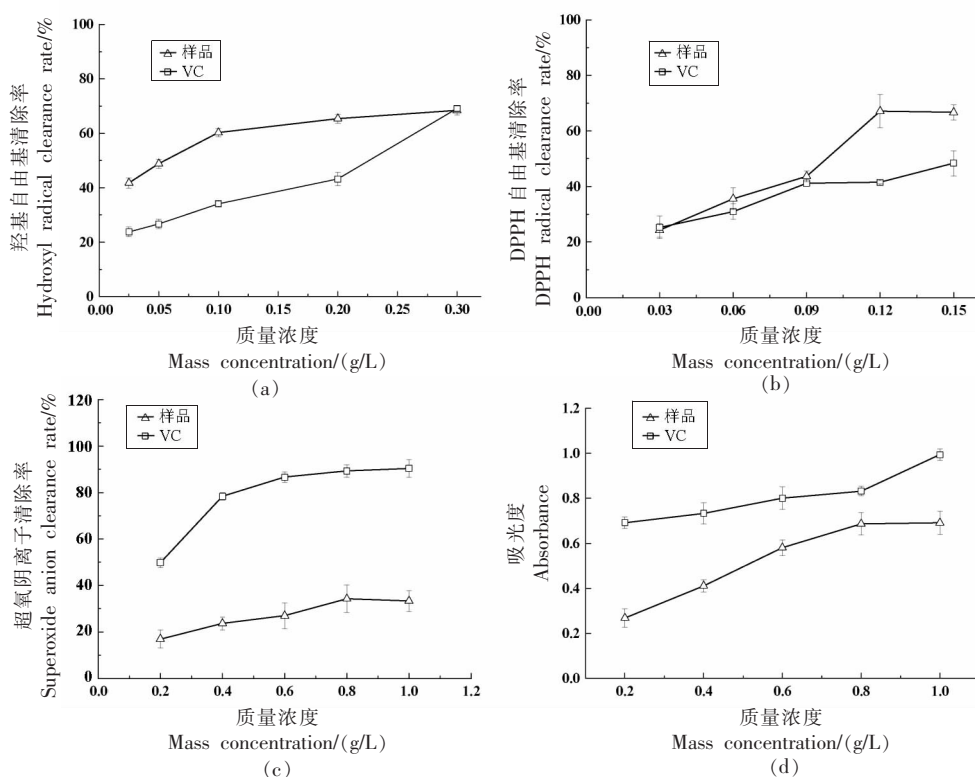


图4 铆钉菇黑色素的体外抗氧化能力

Fig.4 Antioxidant activity of melanin from *Gomphidius viscidus* in vitro

## 2.5 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫自然寿命的影响

自然寿命是评价铆钉菇黑色素抗衰老能力最有效的参数<sup>[14]</sup>。由秀丽隐杆线虫生存曲线(图5)及平均寿命(图6)可知,在铆钉菇黑色素0.25~1.0 g/L质量浓度范围内,随着质量浓度增加,线虫的生存曲线明显不断右移,总寿命得到明显提升。与对照组比,平均寿命也在不断增加。当铆钉菇黑色素质量浓度达到1.00 g/L时,平均寿命显著提升( $P<0.05$ )。当质量浓度超过2.00 g/L后,生存曲线左移,平均寿命减少( $P<0.05$ )。通过Log-Rank分析可知,与对照组相比,0.50~1.00 g/L范围内的铆钉菇黑色素显著提高了线虫的自然寿命( $P<0.05$ ),表明适量的铆钉菇黑色素能够延缓线虫的衰老,提高线虫自然寿命。

## 2.6 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫运动能力的影响

秀丽隐杆线虫运动能力的强弱,是评价线虫衰老的一个重要指标<sup>[18]</sup>。由摆头和弯曲次数(图7)可知,相对于对照组,所有给药组的摆头次数和身体弯曲次数都有极显著的提高( $P<0.01$ ),反映了铆钉菇黑色素通过对线虫神经系统健康的促进作用,从而提高了秀丽隐杆线虫运动能力。

## 2.7 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫抗 $H_2O_2$ 氧化应激的影响

过氧化物是脂质过氧化的强诱导剂,脂质过氧化物相比其它活性氧(ROS)分子具有更长的寿命,能在体内发生自由基连锁反应<sup>[34]</sup>,对线虫构成氧化胁迫。由图8和图9可知,在100  $\mu$ L 30%  $H_2O_2$ 的急性氧化应激环境下,相较于对照组,所有给药组生存曲线均发生右移,平均寿命呈现一定的质量浓度依赖性,随着质量浓度增大平均寿命延长,其中给药质量浓度为0.50~1.00 g/L时,线虫平均寿命极显著提高( $P<0.01$ ),质量浓度大于2.00 g/L后,平均寿命有所降低而仍大于对照组。通过Log-Rank分析可知,与对照组相比,0.50~1.00 g/L范围内的铆钉菇黑色素显著提高了线虫在 $H_2O_2$ 氧化应激环境下的存活时间( $P<0.05$ ),表明适量的铆钉菇黑色素能够增强秀丽隐杆线虫的抗氧化应激能力,从而减缓 $H_2O_2$ 对秀丽隐杆线虫的氧化胁迫。

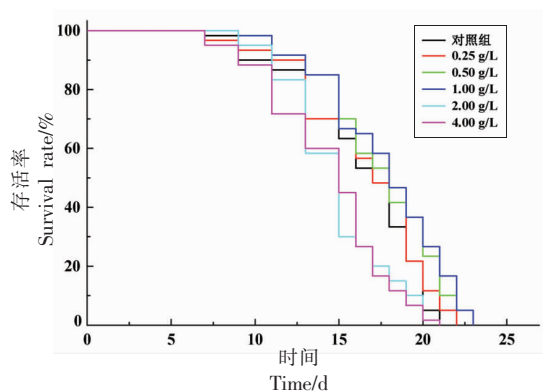
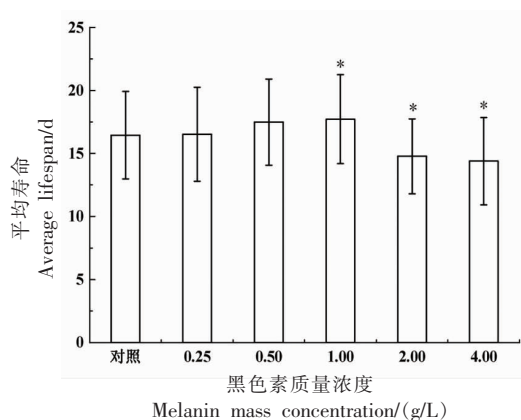


图5 铆钉菇黑色素对自然条件下秀丽隐杆线虫的生存曲线的影响

Fig.5 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the survival curves of *Caenorhabditis elegans* under natural conditions



注:与对照组(0 g/L)相比,\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ ,下同。

图6 铆钉菇黑色素对线虫平均寿命的影响

Fig.6 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the average lifespan of *Caenorhabditis elegans*

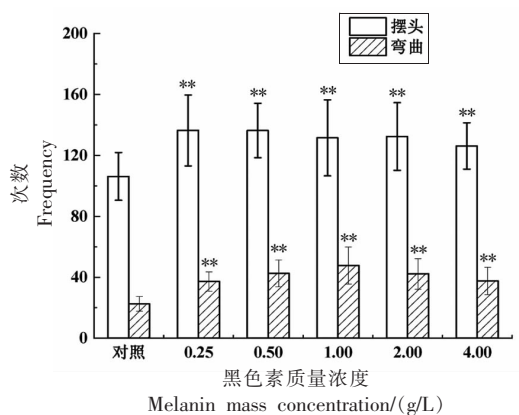


图7 铆钉菇黑色素对线虫运动能力的影响

Fig.7 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the locomotion of *Caenorhabditis elegans*

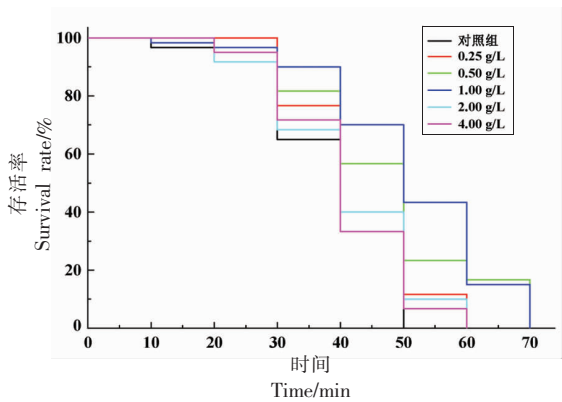


图 8 铆钉菇黑色素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化胁迫下秀丽隐杆线虫的生存曲线的影响

Fig.8 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the survival curves of *Caenorhabditis elegans* under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress

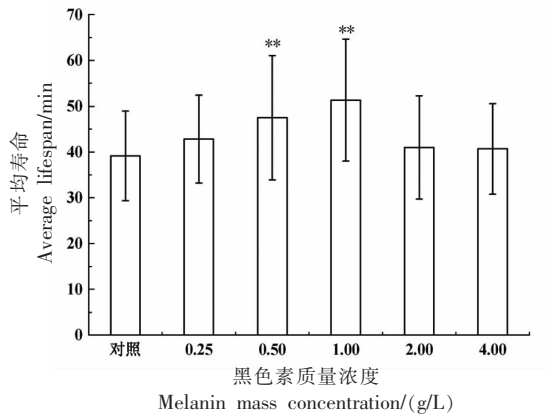


图 9 铆钉菇黑色素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化胁迫下秀丽隐杆线虫的平均寿命的影响

Fig.9 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the average lifespan of *Caenorhabditis elegans* under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress

2.8 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫抗紫外辐射应激的影响

紫外辐射会使线虫体内产生大量自由基,破坏体内自由基平衡造成组织损伤而引起线虫寿命缩短<sup>[35]</sup>。由图 10 和图 11 可知,在紫外辐射环境下与对照组相比,给药组平均寿命均有所提升,给药

质量浓度大于 0.25 g/L 时,生存曲线明显右移,线虫平均寿命极显著提高( $P<0.01$ )。通过 Log-Rank 分析可知,与对照组相比,0.50~4.00 g/L 范围内的铆钉菇黑色素显著提高了线虫在紫外辐射应激环境下的存活时间( $P<0.05$ ),表明适量铆钉菇黑色素能增强秀丽隐杆线虫抵抗紫外辐射的能力。

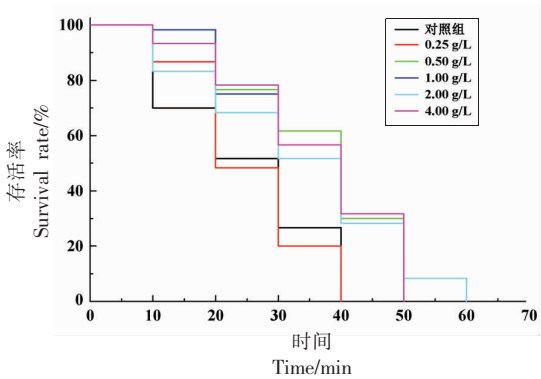


图 10 铆钉菇黑色素对紫外辐射下秀丽隐杆线虫的生存曲线的影响

Fig.10 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the survival curve of *Caenorhabditis elegans* under UV

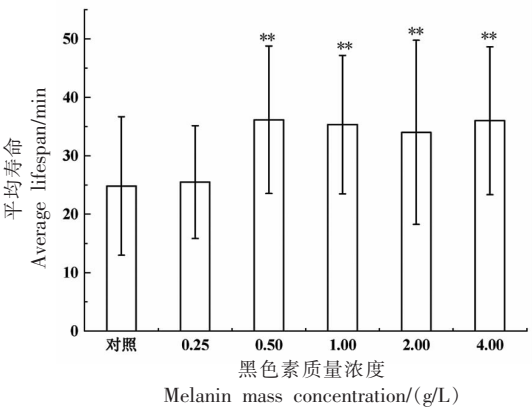


图 11 铆钉菇黑色素对紫外辐射下秀丽隐杆线虫的平均寿命的影响

Fig.11 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the average lifespan of *Caenorhabditis elegans* under UV

2.9 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫抗热应激的影响

秀丽隐杆线虫正常生长温度为 20 ℃,升高培养温度会造成线虫组织损伤,破坏体内自由基平衡,加速线虫衰老<sup>[16]</sup>。由图 12 和图 13 可知,在 35

℃急性热应激环境下,给药组生存曲线均有明显右移,与对照组相比,给药组秀丽隐杆线虫平均寿命均得到极显著延长( $P<0.01$ )。通过 Log-Rank 分析可知,与对照组相比,0.25~2.00 g/L 范围内铆钉菇黑色素显著提高了线虫在急性热应激环境下的

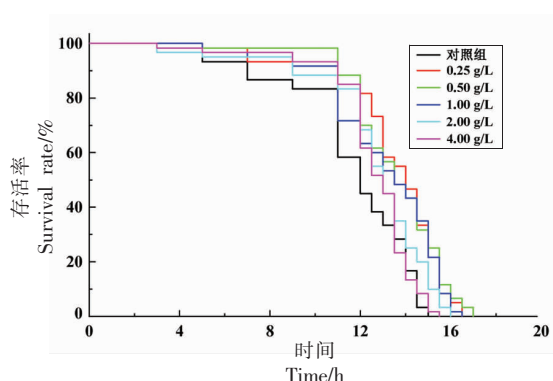


图 12 铆钉菇黑色素对热应激胁迫下秀丽隐杆线虫的生存曲线的影响

Fig.12 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the survival curves of *Caenorhabditis elegans* under heat-shock stress

存活时间 ( $P<0.05$ ), 表明适量的铆钉菇黑色素能增强秀丽隐杆线虫抵抗热应激的能力。

## 2.10 铆钉菇黑色素对秀丽隐杆线虫体内抗氧化指标的影响

衰老是指机体随着年龄增长生理功能逐渐衰退、组织器官逐渐老化的过程。自由基假说是衰老的热门假说, 自由基是包含了不成对价电子的一类高活性物质, 作为机体新陈代谢的正常产物, 与人体疾病的发生和有机体的衰老密切相关<sup>[36]</sup>。自由基的产生包含内源性和外源性两种途径。真核细胞中大多数的内源性自由基, 来源于线粒体电子逃逸后与氧分子结合产生的超氧阴离子, 外源性自由基则有广泛的来源, 热、辐射、光或超声等外部刺激都能导致机体产生自由基<sup>[37]</sup>。自由基在

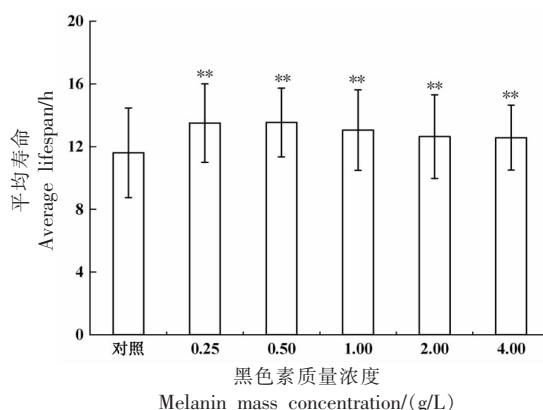


图 13 铆钉菇黑色素对热应激胁迫下秀丽隐杆线虫的平均寿命的影响

Fig.13 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on the average lifespan of *Caenorhabditis elegans* under heat-shock stress

体内的产生和清除处于动态平衡, 当平衡被打破, 体内的自由基过多积累时, 会损伤蛋白质、DNA 和脂质过氧化物等生物分子, 引发一系列疾病<sup>[38]</sup>。为减缓自由基带来的衰老, 就需要通过抗氧化来抑制自由基的破坏性。机体抗氧化性的发挥离不开抗氧化防御系统<sup>[39]</sup>, CAT 主要存在于所有需氧细胞的过氧化物酶体中, 催化  $H_2O_2$  转化为分子氧和水而不产生毒性自由基, 保护细胞免受  $H_2O_2$  的伤害, SOD 可以通过歧化反应清除 ROS 以维持细胞氧化还原平衡, 降低损伤<sup>[40]</sup>, MDA 作为生物体内脂质氧化主要终产物, 具有交联细胞大分子 DNA 或蛋白质的特性, 可以反映机体的受损伤程度<sup>[41]</sup>。

由图 14 可知, 与对照组相比, 给药组 SOD 酶活力均有提高, 当给药质量浓度为 0.50~1.00 g/L

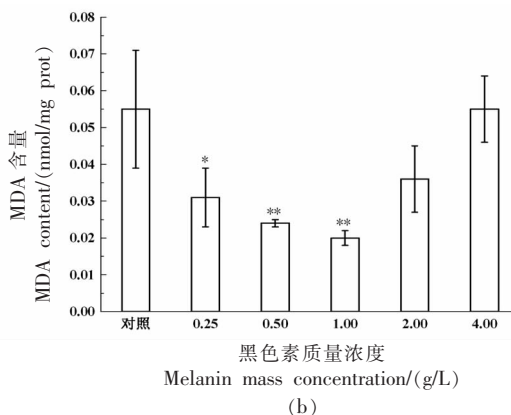
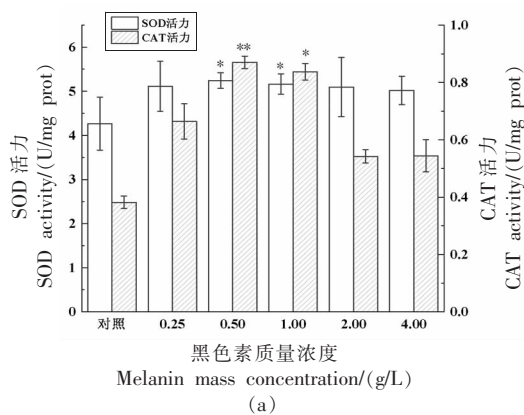


图 14 铆钉菇黑色素对线虫体内 SOD、CAT 活力和 MDA 含量的影响

Fig.14 Effect of melanin from *Gomphidius viscidus* on SOD, CAT activity and MDA content in *Caenorhabditis elegans*



时SOD酶活力显著提高( $P<0.05$ ),给药质量浓度为0.50 g/L达到最高,提高22.93%;给药组的CAT酶活力均有极显著的提高( $P<0.01$ ),给药质量浓度为0.50 g/L达到最高,提高127.71%;当给药质量浓度为0.25~1.00 g/L时,MDA含量显著降低( $P<0.05$ ),给药质量浓度为1.00 g/L时达到最低,降低64.50%( $P<0.01$ )。以上数据表明,适量的铆钉菇黑色素可以显著提高体内抗氧化能力,对线虫的氧化损伤和衰老起到缓解作用。铆钉菇黑色素上调了内源性抗氧化系统组成部分SOD与CAT的酶活力水平,并且降低了线虫体内的MDA含量实现了对秀丽隐杆线虫应激氧化损伤和衰老的保护作用,然而具体的抗衰老分子机制还需要进一步研究。

### 3 结论

铆钉菇黑色素具有典型的天然黑色素微观结构、紫外及红外光谱特征。羟基、DPPH、超氧阴离子自由基清除能力及铁氰化钾还原力等4种常用的抗氧化评价方法表明其具有较高的体外抗氧化能力。模式动物秀丽隐杆线虫体内实验进一步表明其具有良好的体内抗氧化能力,显著提高了自然条件下的寿命及运动能力,减轻了强氧化剂、紫外线、高温环境下的应激损伤,表明铆钉菇黑色素具有较强的抗衰老与应激损伤生物活性。为今后开发与应用提供了可靠的理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] LIU R F, MENG X F, MO C Y, et al. Melanin of fungi: From classification to application[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(12): 1-14.
- [2] YIN C M, YAO F, WU W, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of natural melanin extracted from the wild wood ear mushroom, *Auricularia auricula* (Agaricomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2022, 24(1): 67-82.
- [3] HOU R L, LIU X, XIANG K K, et al. Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 533-542.
- [4] XIE J W, LIU L, LI H Y, et al. Ink melanin from *Sepiapharaonis ameliorates* colitis in mice via reducing oxidative stress, and protecting the intestinal mucosal barrier[J]. Food Research International, 2022, 151: 110888.
- [5] POLAPALLY R, MANSANI M, RAJKUMAR K, et al. Melanin pigment of *Streptomyces puniceus* RH-PR9 exhibits antibacterial, antioxidant and anticancer activities[J]. PloS one, 2022, 17(4): e0266676.
- [6] 刘城移, 戚梦, 吕虹燕, 等. 黑木耳黑色素对急性肝损伤的改善作用[J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 1741-1750.  
LIU C Y, QI M, LV H Y, et al. The improvement of *Auricularia heimuer* melanin on acute liver injured mice[J]. Mycosystema, 2018, 37(12): 1741-1750.
- [7] OH J J, KIM J Y, KWON S L, et al. Production and characterization of melanin pigments derived from *Amorphotheca resinae* [J]. Journal of Microbiology, 2020, 58: 648-656.
- [8] 薛帆正, 黄海辰, 吴福泉, 等. 真菌黑色素研究现状与产业应用[J]. 生物技术通报, 2021, 37(11): 32-41.  
XUE F Z, HUANG H C, WU F Q, et al. Research status and industrial application of fungal melanin[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(11): 32-41.
- [9] MATTOON E R, CORDERO R J B, CASADEVALL A. Fungal melanins and applications in healthcare, bioremediation and industry[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(6): 488.
- [10] 孙海涛, 邵信儒. 长白山野生血红铆钉菇的开发利用现状与发展前景[J]. 人参研究, 2010, 22(4): 23-24.  
SUN H T, SHAO X R. Current research situation of using and development of wild *Gomphidius rutilus* of Changbai Mountain[J]. Ginseng Research, 2010, 22(4): 23-24.
- [11] 吴也, 刘中正, 宋见喜, 等. 响应面法优化微波萃取血红铆钉菇多糖及抗氧化活性研究[J]. 吉林化工学院学报, 2021, 38(1): 4-12.  
WU Y, LIU Z Z, SONG J X, et al. Optimization of the microwave extraction condition and antioxidant



- activity of polysaccharides from *Chroogomphidius viscidus* using response surface analysis[J]. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2021, 38 (1): 4-12.
- [12] 张海悦, 杨雪, 李震, 等. 血红铆钉菇黄酮体外抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37 (19): 109-113.
- ZHANG H Y, YANG X, LI Z, et al. Antioxidant activity *in vitro* of *Chroogomphus rutilus* flavonoids[J]. Food Research and Development, 2016, 37 (19): 109-113.
- [13] YE M, WANG Y, GUO G Y, et al. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum* YM-346 [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2490-2497.
- [14] 王力, 肖媚方, 陈弘培, 等. 牡蛎多肽组分 OE-I 抗氧化活性及其对秀丽隐杆线虫抗衰老作用[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 152-160.
- WANG L, XIAO M F, CHEN H P, et al. Antioxidant activity of oyster peptide fraction OE-I and its anti-aging effect on *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science, 2022, 43(3): 152-160.
- [15] 王会, 郭立, 谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法(二)[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 98-102.
- WANG H, GUO L, XIE W L. Methods for determining antioxidative activity of antioxidants ( II ) [J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32 (4): 98-102.
- [16] 李芳, 崔晓东, 马晓丽, 等. 谷氧还蛋白 rhGrx 可延缓 CL4176 秀丽隐杆线虫中  $\beta$  淀粉样蛋白诱导的毒性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34 (8): 844-853.
- LI F, CUI X D, MA X L, et al. Glutaredoxin delays the toxicity induced by  $\beta$ -amyloid in AD transgenic *C. elegans* [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 34(8): 844-853.
- [17] 吕宏安. 以线虫为模型研究茶叶的生物学功能[D]. 长春: 长春理工大学, 2010.
- LV H A. Study the biological functions of tea on *Caenorhabditis elegans* [D]. Changchun: Changchun University of Science and Technology, 2010.
- [18] 王亚超. 以秀丽隐杆线虫为模型对水果发酵液在抗衰老等生理功效方面的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2022.
- WANG Y C. Study on the physiological effects of fruit fermentation broth on anti-aging with *Caenorhabditis elegans* as model [D]. Jilin: Jilin University, 2022.
- [19] 马云蕾. 应用秀丽隐杆线虫模型研究龙眼提取物在应激反应中的作用机制[D]. 吉林: 吉林大学, 2021.
- MA Y L. Applying using *Caenorhabditis elegans* to study the mechanism of longan extract in stress response [D]. Jilin: Jilin University, 2021.
- [20] LIN C X, XIAO J, XI Y, et al. Rosmarinic acid improved antioxidant properties and healthspan via the IIS and MAPK pathways in *Caenorhabditis elegans* [J]. Biofactors, 2019, 45(5): 774-787.
- [21] CHEN S R, JIANG B, ZHENG J X, et al. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) [J]. Food Chemistry, 2008, 111(3): 745-749.
- [22] 张敏. 木耳黑色素的发酵制备及其抗氧化活性[D]. 温州: 温州大学, 2015.
- ZHANG M. Production and antioxidant activity of melanin by submerged fermentation of *Auricularia auricula* [D]. Wenzhou: Wenzhou University, 2015.
- [23] 高然, 陈俊德, 李剑瑛, 等. 鱿鱼 (*Uroteuthis chinensis*) 黑色素酶法制备工艺优化及理化特征分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 14-21, 27.
- GAO R, CHEN J D, LI J Y, et al. Optimization of enzymolysis preparation process and physicochemical properties of squid melanin (*Uroteuthis chinensis*) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(18): 14-21, 27.
- [24] 刘丽娜, 翁榕安, 张平. 金针菇黑色素的提取与鉴定[J]. 食用菌学报, 2015, 22(2): 72-75.
- LIU L N, WENG R A, ZHANG P. Extraction and identification of melanin from *Flammulina velutipes* [J]. Acta Edulis Fungi, 2015, 22(2): 72-75.
- [25] 李杰, 贾栩超, 张瑞芬, 等. 黑芝麻黑色素的分离纯化、结构表征及体外抗氧化活性[J]. 中国农业科学, 2020, 53(12): 2477-2492.
- LI J, JIA X C, ZHANG R F, et al. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of black sesame melanin [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(12): 2477-2492.
- [26] 陈博文, 张小林, 孙晓瑞, 等. 柱状田头菇黑色素的分离、鉴定及其稳定性和抗氧化活性[J]. 食用菌学报, 2017, 24(3): 57-62.
- CHEN B W, ZHANG X L, SUN X R, et al. Extraction, characterization, stability and antioxidative

- of *Agrocybe aegerita* melanin[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2017, 24(3): 57–62.
- [27] 叶明, 朱立, 谭炜, 等. 巴西粒毛盘菌黑色素理化性质与结构[J]. 菌物学报, 2009, 28(3): 393–398.
- YE M, ZHU L, TAN W, et al. Properties and structure of the melanin from *Lachnum brasiliense*[J]. *Acta Mycolica Sinica*, 2009, 28(3): 393–398.
- [28] 王昭玉, 常明昌, 徐丽婧, 等. 灵芝子实体、菌丝体和孢子黑色素的结构表征与理化性质研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(11): 81–91.
- WANG Z Y, CHANG M C, XU L J, et al. Structural characterization, physicochemical properties of melanin from fruiting body, hyphae and spores of *Ganoderma lucidum*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(11): 81–91.
- [29] 邹宇, 尹冬梅, 胡文忠, 等. 黑木耳天然黑色素理化性质及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 118–120, 125.
- ZOU Y, YIN D M, HU W Z, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of *Auricularia auricula* melanin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(5): 118–120, 125.
- [30] 项锦敏, 赵琼瑜, 远航, 等. 乌鳖黑色素理化性质及其抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(3): 453–461.
- XIANG J M, ZHAO Q Y, YUAN H, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin from Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. *Natural Product Research and Development*, 2021, 33(3): 453–461.
- [31] CAO W, ZHOU X H, MCCALLUM N C, et al. Unraveling the structure and function of melanin through synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(7): 2622–2637.
- [32] JACOBSON E S, TINNELL S B. Antioxidant function of fungal melanin[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(21): 7102–7104.
- [33] 金春英, 张小勇, 崔胜云. DPPH 及邻苯三酚法对牛蒡和小根蒜提取液及其他抗氧化剂的清除自由基能力的比较研究[J]. 延边大学学报(自然科学版), 2008, (1): 43–46, 61.
- JIN C Y, ZHANG X Y, CUI S Y. Comparison of antioxidant properties of extracts from *Arctum lappa* L, *Allium macrostemon* Bunge and other antioxidants[J]. *Journal of Yanbian University (Natural Science Edition)*, 2008, 34(1): 43–46, 61.
- [34] AYYADEVARA S, BHARILL P, DANDAPAT A, et al. Aspirin inhibits oxidant stress, reduces age-associated functional declines, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(5): 481–490.
- [35] PARK H E H, JUNG Y, LEE S J V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*[J]. *Molecules and Cells*, 2017, 40(2): 90.
- [36] HAYYAN M, HASHIM M A, ALNASHEF I M. Superoxide ion: Generation and chemical implications [J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(5): 3029–3085.
- [37] CAI K, SHI Y, CAO C S, et al. Tuning radical interactions in trisradical tricationic complexes by varying host-cavity sizes[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(1): 107–112.
- [38] MARX J L. Oxygen free radicals linked to many diseases: The oxygen free radicals, although made as by-products of normal oxygen-using reactions, nevertheless have a wide potential for causing cell injury[J]. *Science*, 1987, 235(4877): 529–531.
- [39] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing[J]. *Nature*, 2000, 408: 239–247.
- [40] SRIVASTAVA S, SINGH D, PATEL S, et al. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress and autoimmune disorders[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 502–517.
- [41] 王凤, 肖楚翔, 刘淑珍, 等. 榴莲核黄酮的提取及其对秀丽隐杆线虫氧化和衰老的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 123–129.
- WANG F, XIAO C X, LIU S Z, et al. Extraction of flavonoids from durian seeds and its antioxidant and anti-aging effects in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Food Science*, 2021, 42(9): 123–129.

## Antioxidant Activities of Melanin from *Gomphidius viscidus* and Its Anti-aging, Anti-stress Injury Effects on *Caenorhabditis elegans*

Pan Yiqiang, Dai Dehui, Chen Guicai, Hu Weilian\*

(School of Biological & Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310063)

**Abstract** The structure characteristics, antioxidant activity and anti-aging of melanin from *Gomphidius viscidus* D1 were studied. Ultraviolet-visible spectroscopy, infrared spectroscopy and scanning electron microscope (SEM) were used to evaluate structure characteristics; Hydroxyl, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide anion radical scavenging assays, and potassium ferricyanide reducing power were used to evaluate antioxidant activity *in vitro*; Natural aging, hydrogen peroxide, heat and ultraviolet damage models were used to evaluate anti-aging and anti-stress injuries on *Caenorhabditis elegans*; SOD, CAT activities and MDA content were measured to evaluate antioxidant activity *in vivo*. The results showed that melanin from *Gomphidius viscidus* is an amorphous structure, it has typical ultraviolet visible and infrared absorption spectra of melanin; It has good scavenging activities, the DPPH, hydroxyl radical and superoxide anion scavenging rates reached 67.1%, 68.42% and 34.3%; The natural lifespan of *Caenorhabditis elegans* was prolonged significantly by 1.00 g/L melanin ( $P<0.05$ ), lifespan under oxidative stress, heat stress and ultraviolet radiation stress could be prolonged by melanin at the mass concentration of 0.50–1.00 g/L, 0.50–4.00 g/L and 0.25–4.00 g/L respectively ( $P<0.01$ ); At 0.50–1.00 g/L, the SOD ( $P<0.05$ ), CAT ( $P<0.01$ ) activities were significantly increased, and MDA content ( $P<0.01$ ) was significantly decreased. In conclusion, melanin from *Gomphidius viscidus* has good antioxidant activity both *in vitro* and *in vivo* and has good anti-aging and anti-stress injury effects.

**Keywords** *Gomphidius viscidus*; melanin; antioxidant activity; *Caenorhabditis elegans*; anti-stress injury