

## 蜜环菌菌索多糖延缓秀丽隐杆线虫衰老机制研究

陈亮稳<sup>1</sup>, 张云侠<sup>1</sup>, 于敏<sup>1\*</sup>, 王顺昌<sup>2</sup>

1. 安徽大学生命科学学院 安徽大学中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230039

2. 淮南师范学院 生命科学系, 安徽 淮南 232000

**摘要:** 目的 探讨蜜环菌菌索多糖(AMP)延缓秀丽隐杆线虫衰老的作用机制。方法 以模式生物秀丽隐杆线虫作为活体模型,测定其在正常培养条件下的生存期与后代平均数量,氧化应激条件下的存活率和热休克蛋白16.2(HSP-16.2)、超氧化物歧化酶-3(SOD-3)的表达。结果 在正常培养条件下,蜜环菌菌索多糖(AMP-1、AMP-2)显著延长秀丽隐杆线虫的生存期,对其生殖力没有损害;在氧化应激条件下,显著提高秀丽隐杆线虫HSP-16.2和SOD-3的表达。结论 提高秀丽隐杆线虫的氧化应激能力可能是AMP延缓秀丽隐杆线虫衰老的作用机制。

**关键词:** 蜜环菌菌索多糖; 抗衰老; 秀丽隐杆线虫; 热休克蛋白; 超氧化物歧化酶-3

中图分类号: R282.710.5; R977.9

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)04-0449-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.015

## Anti-aging mechanism of polysaccharide from rhizomorph of *Armillaria mellea* in *Caenorhabditis elegans*

CHEN Liang-wen<sup>1</sup>, ZHANG Yun-xia<sup>1</sup>, YU Min<sup>1</sup>, WANG Shun-chang<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Chinese Traditional Medicine Research and Development of Anhui University, School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China

2. Department of Life Science, Huainan Normal University, Huainan 232000, China

**Abstract: Objective** To explore the anti-aging mechanism of polysaccharide from rhizomorph of *Armillaria mellea* (AMP) in *Caenorhabditis elegans*. **Methods** With *C. elegans* as living model, the life span and the average number of offsprings were determined under normal culture conditions; The survival rate under oxidative stress and the expression of heat shock protein-16.2 (HSP-16.2) and superoxide dismutase-3 (SOD-3) were determined. **Results** Under the normal culture conditions, the life span of *C. elegans* was significantly extended by AMP-1 and AMP-2 without the damage of the reproductive capacity; The expression of HSP-16.2 and SOD-3 was increased in *C. elegans* under the oxidative stress. **Conclusion** The possible mechanism of AMP for anti-aging of *C. elegans* may be caused by increasing of the capacity of stress resistance.

**Key words:** polysaccharide from the rhizomorph of *Armillaria mellea*; anti-aging; *Caenorhabditis elegans*; heat shock proteins 16.2; superoxide dismutase-3

与天麻共生的蜜环菌 *Armillariella mellea* (Vahl. Ex Fr.) Quel., 又名榛蘑、臻蘑、蜜蘑、蜜环蕈、栎蕈, 属担子菌蜜环菌属, 是促进天麻生长发育的重要共生真菌<sup>[1]</sup>。蜜环菌发酵物及其活性成分与天麻有类似的药理作用, 如抗病毒、抗肿瘤、增强免疫力等<sup>[2]</sup>, 蜜环菌多糖是蜜环菌的主要活性成分之一。蜜环菌菌索多糖(AMP)经精制得到了两种多糖组

分 AMP-1(水洗部位)和 AMP-2(盐洗部位), AMP-1 能使正常小鼠的糖耐量增加, 显著降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠的血糖水平<sup>[3]</sup>, 但其抗氧化损伤效应尚未见报道。近年来, 多糖类抗衰老、抗氧化效应为人们所重视, 并建立了多种评价和筛选方法<sup>[4]</sup>。然而基于个体水平的有关多糖类对氧化应激反应的保护作用的研究较少。

收稿日期: 2012-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21077040)

作者简介: 陈亮稳(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为糖分子生物学与糖工程。Tel: 15155952820 E-mail: chenliangwen123@163.com

\*通信作者 于敏 Tel: 13696512956 E-mail: yuminwy@yahoo.com.cn

秀丽隐杆线虫是广泛应用于遗传学、发育生物学、细胞生物学等领域的模式生物,近年来也用于揭示先天免疫、氧化胁迫效应、环境暴露与损伤的机制<sup>[5]</sup>。秀丽隐杆线虫具有生活周期短、易饲养、生物学终点多、在实验室可大量培养等特点,并拥有与哺乳动物同源的抗氧化胁迫机制和相关基因<sup>[5-6]</sup>。本实验选择野生型和转基因秀丽隐杆线虫品系,以其生存期、产卵率、热休克蛋白-16.2 (HSP-16.2)、超氧化物歧化酶-3 (SOD-3) 的表达等作为生物学终点,研究和评价 AMP-1、AMP-2 在抗氧化胁迫反应中的作用,并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

蜜环菌菌株 4.1201, 由安徽大学糖复合物与糖工程实验室提供,系自然选育的优良野生菌种,安徽大学沈业寿教授鉴定为蜜环菌 *Armillariella mellea* (Vahl. Ex Fr.) Quel.; 胡桃醌,天津一方科技有限公司; 维生素 C、蛋白胨、酵母粉、琼脂、胰蛋白胨,国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂均购于中国医药集团上海化学试剂公司。

### 1.2 仪器

MLR—350H 型恒温恒湿培养箱,日本 Sanyo 公司; DP70 荧光显微镜,日本 Olympus 公司; Motic SFC—11 体视显微镜,麦克奥迪实业集团广州分公司。

### 1.3 线虫品系

秀丽隐杆线虫品系 N2、CL2070、CF1553,其中 CL2070 携带 HSP-16.2::GFP 报告基因(“::”表示 HSP-16.2 启动子与 GFP 基因偶联,GFP 的表达量与 HSP-16.2 的表达量成正比),CF1553 携带 SOD-3::GFP 报告基因,以上所有品系均由美国明尼苏达大学的线虫种质中心赠送。

## 2 方法

### 2.1 蜜环菌菌索多糖的提取与精制

将新鲜的蜜环菌菌索打碎,置于 70 °C 水浴中提取 3 次,滤液浓缩后离心,合并上清,经 DEAE-纤维素柱色谱 Cl<sup>-</sup> 分离,依次用水、0.5 mol/L 氯化钠洗脱,收集多糖部位,经流水、蒸馏水透析,浓缩、离心后取上清,冷冻干燥得 AMP-1 和 AMP-2,得率分别为 14.7%、5.7%。多糖质量分数分别为 91.51%、11.04%。

### 2.2 秀丽隐杆线虫的培养

将秀丽隐杆线虫接种于琼脂平板的线虫培养基

(NGM, 琼脂 17 g、NaCl 3 g、蛋白胨 2.5 g,加入蒸馏水 987 mL 和 5 mg/mL 胆固醇乙醇溶液 1.0 mL,121 °C 灭菌 40 min,冷却至 60 °C 左右后,加入 1 mol/L 无菌磷酸盐缓冲液 25 mL、1 mol/L 无菌 MgSO<sub>4</sub> 和 1 mol/L 无菌 CaCl<sub>2</sub> 均 1 mL,混匀后铺皿),以大肠杆菌 *Escherichia coli* OP50 株为饲料<sup>[7]</sup>,培养至成虫。为达到其同步化生长的目的,用 20% 次氯酸钠和 0.5 mol/L 氢氧化钠处理怀卵秀丽隐杆线虫,收集孵化中的胚胎, M9 缓冲液洗涤 2 遍并在 M9 缓冲液中孵化。孵化后的秀丽隐杆线虫在无食物的条件下停滞在 L1 期,即获得同步化生长的个体,其接种于 NGM 后,即开始正常生长发育。除另有说明外,所有品系秀丽隐杆线虫的常规培养温度均为 20 °C。

### 2.3 对秀丽隐杆线虫存活的影响

参照 Lakowski 等<sup>[8]</sup>的方法,将同步化后的秀丽隐杆线虫(N2 品系)置于 NGM 中培养至 L4 期,每组 20 条,分别转至含有不同质量浓度(0、10、100、300、500、1 000、1 500 μg/mL) AMP-1、AMP-2、维生素 C 的 K-medium (含氯化钠 52 mmol/L、氯化钾 32 mmol/L) 中培养 48 h,再于 35 °C 培养 10 h 以造成热休克,体视显微镜下记录其存活数。

### 2.4 荧光法检测 HSP-16.2 和 SOD-3 的表达

将同步化培养的 L4 期秀丽隐杆线虫(每组 20 条)分别转入对照组、AMP-1(500 μg/mL)组、AMP-2(1 000 μg/mL)组、维生素 C(1 000 μg/mL)组的 K-medium 中,先在 20 °C 下培养 24 h,再移至 35 °C 培养箱中培养 4 h 以造成热休克,或移至只含 50 μmol/L 胡桃醌(胡桃醌可诱导机体产生强烈氧化应激反应) K-medium 中继续培养 24 h。在载玻片中央滴加 1 滴 50 mmol/L 的 NaN<sub>3</sub>(对秀丽隐杆线虫具有麻痹作用),将秀丽隐杆线虫移至载玻片上,盖上盖玻片,荧光显微镜下,以 FITC 波段激发观察(×400)并拍照,利用 Adobe Photoshop CS5 Extended 软件分析照片相对荧光强度,以每条个体咽部平均相对荧光单位表示 HSP-16.2 和 SOD-3 的表达。

### 2.5 对秀丽隐杆线虫生存期的影响

将 N2 品系秀丽隐杆线虫早期成虫分别转入对照组、AMP-1(500 μg/mL)组、AMP-2(1 000 μg/mL)组的 K-medium 中,20 °C 下培养,期间每天记录其死亡数,直至全部死亡。为防止新繁殖个体与成虫混淆,每天转板 1 次,直至无新的个体产生。

### 2.6 对秀丽隐杆线虫生殖力的影响

将同步化的 N2 品系 L4 期秀丽隐杆线虫分别转入对照组、AMP-1 (500 μg/mL) 组、AMP-2 (1 000 μg/mL) 组的液体培养基中, 20 °C 下培养 24 h。分别吸取 1.0 mL 不含药物的 K-medium, 于 24 孔 Costar 板内, 每孔挑取 1 条秀丽隐杆线虫, 20 °C 下培养, 每隔 24 h 后将线虫转移至新的不含药物的 K-medium 内, 直至无新的个体产生为止, 在体视显微镜下记录每条秀丽隐杆线虫产生的后代数目。

### 2.7 数据处理

所有实验均重复 3 次以上, 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。不同组间差异比较采用 Student's *t* 检验, 用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。

## 3 结果

### 3.1 对秀丽隐杆线虫存活的影响

AMP-1、AMP-2、维生素 C 均不同程度地提高秀丽隐杆线虫在热休克条件下的存活率, 最适作用质量浓度分别为 500、1 000、1 000 μg/mL, 其中 AMP-2 对秀丽隐杆线虫的保护作用与同剂量的维生素 C 相当, 表明 AMP 对秀丽隐杆线虫具有较好的保护作用。结果见图 1。在后续实验中, 均采用 AMP-1 500 μg/mL、AMP-2 1 000 μg/mL、维生素 C 1 000 μg/mL。

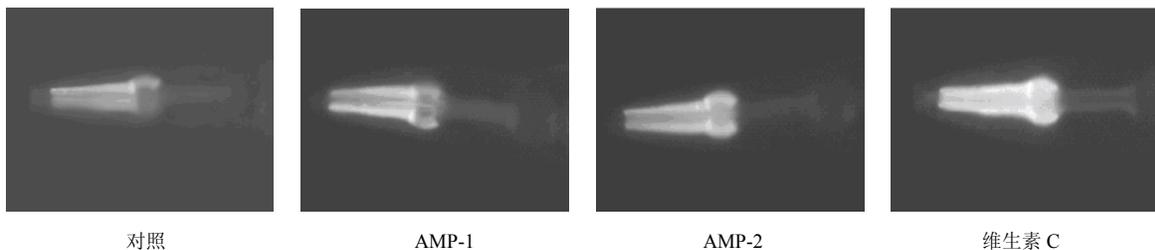


图 2 AMP-1 和 AMP-2 对秀丽隐杆线虫 CL2070 咽部 HSP-16.2 荧光表达的影响

Fig. 2 Effects of AMP-1 and AMP-2 on fluorescence expression of HSP-16.2 in pharyngeal of *C. elegans* CL2070

表 1 AMP-1 和 AMP-2 对秀丽隐杆线虫 CL2070 在热休克和氧化应激条件下 HSP-16.2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 1 Effects of AMP-1 and AMP-2 on expression of HSP16.2 in *C. elegans* CL2070 under heat shock treatment and oxidative stress ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	$\rho /$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	热休克条件下		氧化应激条件下	
		平均相对荧光强度	HSP-16.2 相对提高率 / %	平均相对荧光强度	HSP-16.2 相对提高率 / %
对照	—	44 838.7 ± 1 177.5	—	32 061.9 ± 1 350.8	—
AMP-1	500	59 459.7 ± 568.0*	32.60	46 742.9 ± 516.3*	45.79
AMP-2	1 000	70 565.3 ± 1 033.1**	57.37	67 224.3 ± 542.1**	109.67
维生素 C	1 000	81 130.6 ± 1 064.8**	80.94	70 469.4 ± 1 178.2**	119.79

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下表同

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below

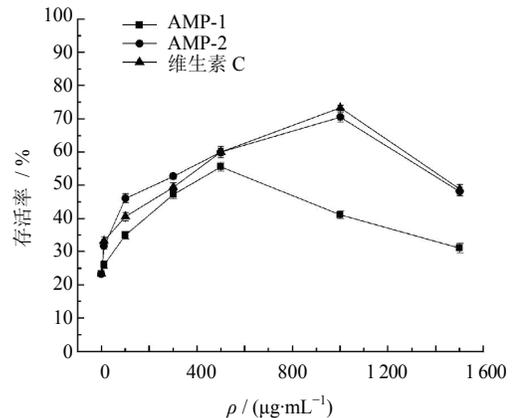


图 1 AMP-1 和 AMP-2 对热休克条件下秀丽隐杆线虫 N2 存活率的影响

Fig. 1 Effects of AMP-1 and AMP-2 on survival rate of *C. elegans* N2 under heat shock treatment

### 3.2 对 HSP-16.2 表达的影响

秀丽隐杆线虫 HSP-16.2::GFP 主要在其咽部表达, 在氧化应激条件下, 对照组秀丽隐杆线虫咽部有稳定的 GFP 表达, 而以 AMP-1、AMP-2、维生素 C 处理后, 秀丽隐杆线虫咽部 GFP 的表达量显著增加, 见图 2。在热休克条件下, 秀丽隐杆线虫咽部 GFP 的表达量也有较大提高, 但提高的程度不及在氧化应激条件下, 见表 1。上述结果表明, AMP-1、

AMP-2 能显著提高秀丽隐杆线虫在氧化应激反应过程中热休克蛋白的表达, 增加对氧化应激抵抗能力, 提示具有显著的抗氧化应激和氧化损伤作用。

### 3.3 对 SOD-3 表达的影响

以 AMP-1、AMP-2、维生素 C 进行预处理后, 均能显著提高秀丽隐杆线虫在热休克条件下和氧化应激条件下 SOD-3 的表达量, 且在氧化应激条件下

的作用更强, 表明 AMP-1、AMP-2 能明显增强秀丽隐杆线虫在氧化损伤条件下 SOD-3 的表达, 增强线虫的抗氧化能力。结果见表 2。

### 3.4 对秀丽隐杆线虫生存期的影响

生存期是反映机体抗氧化损伤的重要指标之一。AMP-1、AMP-2 均能延长秀丽隐杆线虫的生存期, AMP-2 比 AMP-1 更能有效延长秀丽隐杆虫的生存期, 结果见表 3。

表 2 AMP-1 和 AMP-2 对秀丽隐杆线虫 CF1553 在热休克和氧化应激条件下 SOD-3 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of AMP-1 and AMP-2 on expression of SOD-3 in *C. elegans* CF1553 under heat shock treatment and oxidative stress ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	线虫总数 / 条	热休克条件下		氧化应激条件下	
			平均相对荧光强度	SOD-3 相对提高率 / %	平均相对荧光强度	SOD-3 相对提高率 / %
对照	—	100	56 010.3±947.8	—	43 457.7±515.1	—
AMP-1	500	100	59 816.9±714.4*	6.80	49 118.3±722.4*	13.02
AMP-2	1 000	100	65 535.4±504.9**	17.01	55 650.9±690.5*	28.06
维生素 C	1 000	100	67 007.7±773.7**	19.64	57 888.6±669.4*	33.21

表 3 AMP-1 和 AMP-2 对秀丽隐杆线虫 N2 在正常培养条件下生存期的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of AMP-1 and AMP-2 on life span of *C. elegans* N2 under normal culture conditions ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	线虫总数 / 条	平均生存期 / d	平均生存期提高率 / %	最长生存期 / d	最长生存期提高率 / %
对照	—	100	17.09±0.8	—	26.00±1.0	—
AMP-1	500	100	18.76±0.9*	9.77	30.33±0.9*	16.65
AMP-2	1 000	100	19.19±0.9**	12.29	31.05±0.7*	19.42

### 3.5 对秀丽隐杆线虫生殖力的影响

正常秀丽隐杆线虫产生的后代数目为 300~350 个, 且对环境极其敏感。AMP-1 组、AMP-2 组平均后代数目与对照组相比无显著差别, 表明 AMP-1、AMP-2 对秀丽隐杆线虫的生殖能力无影响。结果见表 4。

表 4 AMP-1 和 AMP-2 对秀丽隐杆线虫 N2 后代的影响

Table 4 Effects of AMP-1 and AMP-2 on offsprings of *C. elegans* N2

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	线虫总数 / 条	平均子代数 / 条	最大子代数 / 条
对照	—	100	300.4±9.2	322
AMP-1	500	100	304.6±9.1	319
AMP-2	1 000	100	305.8±8.4	333

## 4 讨论

应激能力, 包括氧化应激能力、DNA 损伤修

复能力、热休克应答能力等, 与衰老进程有密切的关系<sup>[9-10]</sup>。根据衰老的自由基理论, 机体的衰老过程与自由基的产生密切相关, 热休克、药物处理等可导致机体的氧化损伤, 进而加快机体的衰老过程。

AMP 及其组分具有显著的免疫增强作用, 但其抗氧化损伤的作用尚不清楚。本实验结果表明, AMP-1、AMP-2 可显著提高秀丽隐杆线虫在热休克下的成活率, 表明其对热休克条件下的机体具有保护作用。平均后代数目是较成活率更为敏感的生物学检测指标, 本实验结果显示, AMP-1、AMP-2 对秀丽隐杆线虫后代数目没有显著影响, 表明不具有生殖毒性。许多长寿型突变体秀丽隐杆线虫的生存期均伴随着其氧化应激能力的提高而提高<sup>[6-7]</sup>, 因此在氧化应激条件下, 生物体对氧化应激的反应能力可作为机体抗衰老能力的重要指标。本研究结果显示, 在氧化应激条件下, AMP-1、AMP-2 能够增强

HSP-16.2、SOD-3 的表达, 表明其增强秀丽隐杆线虫机体的抗氧化能力, 也提示其可延长秀丽隐杆线虫生存期, 生育酚、丙基没食子酸钠等也有类似的结果<sup>[11-12]</sup>。由于 SOD-3 的表达与胰岛素样受体因子的表达呈负相关关系, 敲除秀丽隐杆线虫的 *daf-2* 基因可显著增强其 SOD-3 的表达, SOD-3 的表达增加与秀丽隐杆线虫生存期具有正相关关系<sup>[13]</sup>。本实验结果显示 AMP-1、AMP-2 显著延长秀丽隐杆线虫的生存期, 但这一效应是否与胰岛素样受体因子的表达有关, 尚需要进一步研究。

本研究以模式生物秀丽隐杆线虫作为活体模型, 利用其在生存期和衰老研究上的优势, 评价了 AMP-1、AMP-2 延缓衰老的作用, 并对其可能的作用机制进行了初步的探索, 为 AMP 的分子机制研究提供了新的内容和方向, 也为研究多糖类药物延缓衰老提供了新的思路和手段。然而对于 AMP 贮藏时间与活性的关系, AMP-1 与 AMP-2 对生存期不同程度影响的原因以及详细的分子机制尚需进一步深入探讨。

#### 参考文献

- [1] 孙士青, 马耀宏, 孟庆军, 等. 野生、退化、复壮蜜环菌对天麻产量及天麻素量的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1300-1302.
- [2] 王秋颖, 郭顺星, 樊锦艳. 不同蜜环菌菌株生物学特性及菌丝体多糖含量的研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 36(9): 588-589.
- [3] 于敏, 沈业寿. 蜜环菌索多糖对小鼠血糖及急性毒性作用研究 [J]. 中国食用菌, 2002, 21(1): 35-37.
- [4] Kishk F M, Al-Sayed M A. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2007, 40(2): 270-277.
- [5] Hartwig K, Heidler T, Moch J. Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis [J]. *Genes Nutr*, 2009, 4(1): 59-67.
- [6] Zhang L, Jie G, Zhang J, et al. Significant longevity effects of EGCG on *C. elegans* under stress [J]. *Free Radic Bio Med*, 2009, 46(3): 414-421.
- [7] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94.
- [8] Lakowski B, Hekimi S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(22): 13091-13096.
- [9] 方允中. 自由基生物学的理论与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 童坦君, 张宗玉. 衰老机制及其学说 [J]. 生理科学进展, 2007, 38(1): 14-18.
- [11] Strayer A, Wu Z, Christen Y, et al. Expression of the small heat-shock protein Hsp-16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761 [J]. *FASEB J*, 2003, 17(15): 2305-2307.
- [12] Benedetti M G, Foster A L, Vantipalli M C, et al. Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan [J]. *Exp Gerontol*, 2008, 43(10): 882-891.
- [13] Keaney M, Matthijssens F, Sharpe M, et al. Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity *in vivo* but do not retard aging in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(2): 239-250.