

# 兰州百合多糖 BHP-1 抗衰老活性的初步研究

惠和平<sup>1,2</sup>, 金辉<sup>2</sup>, 杨晓燕<sup>2</sup>, 柳皓月<sup>2</sup>, 秦波<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃农业职业技术学院, 兰州 730020; <sup>2</sup>兰州化学物理研究所 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室 甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000

**摘要:**以秀丽隐杆线虫为模型,通过观察和测定兰州百合多糖对线虫寿命、繁殖、咽泵抽动、脂褐素、活性氧(ROS)水平、应激反应能力和体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量的影响探究兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton)鳞茎中一种 O-乙酰葡甘聚糖 BHP-1 对线虫的抗衰老活性。结果表明,BHP-1 能有效延缓秀丽隐杆线虫的衰老,且呈剂量依赖性。当 BHP-1 浓度达 4 mg/mL 时,线虫的平均寿命在正常、高温和氧化胁迫条件下分别延长了 40%、61% ( $P < 0.01$ ) 和 50% ( $P < 0.05$ )。此外,BHP-1 能明显降低线虫体内的 ROS 和脂褐素水平且不降低线虫的繁殖和进食能力。进一步研究表明,BHP-1 能显著增强线虫体内抗氧化酶系的活性,在 4 mg/mL 时,线虫体内 SOD 和 CAT 的活性分别提高了 39.03% ( $P < 0.01$ ) 和 41.89% ( $P < 0.05$ ),MDA 的含量降低了 52.59% ( $P < 0.005$ )。可见 BHP-1 在不损害线虫繁殖和进食能力的前提下主要通过激活并提高线虫体内抗氧化酶系的活性来延缓线虫的衰老。

**关键词:**兰州百合多糖;秀丽隐杆线虫;抗衰老活性;应激能力

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)Suppl-0015-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.S.003

## Preliminary study on anti-aging activity of a polysaccharide BHP-1 from *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton

HUI He-ping<sup>1,2</sup>, JIN Hui<sup>2</sup>, YANG Xiao-yan<sup>2</sup>, LIU Hao-yue<sup>2</sup>, QIN Bo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Gansu Agriculture Technology College, Lanzhou 730020, China;

<sup>2</sup>CAS Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** The anti-aging activities on *Caenorhabditis elegans* of a polysaccharide, O-acetyl glucomannan (BHP-1), purified from bulbs of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton, were assessed by observing the mean lifespan, reproduction, pharyngeal pumping and stress response on nematodes. Additionally, the fluorescence intensity of lipofuscin and the level of reactive oxygen species (ROS) were detected. Also the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and contents of malondialdehyde (MDA) were determined by the kit method. The results showed that BHP-1 effectively delayed the aging of *C. elegans* in a dose-dependent manner. When the concentration reached 4 mg/mL, BHP-1 extended the mean lifespan of *C. elegans* by up to 40%, 61% ( $P < 0.01$ ) and 50% ( $P < 0.05$ ) under normal, thermal and oxidative stress culture conditions, respectively. Moreover, BHP-1 remarkably decreased the ROS and lipofuscin level of *C. elegans* while increased the reproduction and feeding ability duration of the nematodes. Further study illustrated that BHP-1 could significantly enhance the activity of antioxidant enzymes in nematodes, compared to the control, BHP-1 with the dose of 4 mg/mL strongly increased the activity of SOD and CAT by 39.03% ( $P < 0.01$ ) and 41.89% ( $P < 0.05$ ), and decreased the level of MDA in *C. elegans* by 52.59% ( $P < 0.005$ ). It was inferred that BHP-1 prolonged the lifespan of wild type N2 *C. elegans* mainly by elevating the function of nematode antioxidant defense systems without damaging the reproductive and feeding abilities of nematodes.

**Key words:** polysaccharide from *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton; *Caenorhabditis elegans*; anti-aging effects; stress resistance

收稿日期:2021-03-08 接受日期:2021-04-08

基金项目:国家自然科学基金(21775154)

\* 通信作者 Tel:86-931-4968372; E-mail: bqin@licp.cas.cn

公认的自由基学说认为衰老是机体内部产生的过多自由基所致,在正常情况下,机体能维持自由基的动态平衡,以保护身体免受损伤。当受到不利的外部刺激时,自由基就会急剧的产生和积累,并侵入细胞触发 ROS 的大量生成<sup>[1,2]</sup>。过量的 ROS 不仅会损伤细胞,还会引起脂质过氧化作用的发生。作为脂质过氧化的最终产物 MDA 又会促使机体内大分子物质(如蛋白质和核酸)的交联聚合,并入侵细胞诱导产生大量的脂褐素。脂褐素则会沉积在细胞上,进一步加速细胞的老化<sup>[2-4]</sup>。在此程中,生命体就会相应地激活机体内的一系列抗氧化酶系如 SOD、CAT 和 GPX 等<sup>[3-5]</sup>,这些酶可及时的清除机体内过多自由基,有效防止自由基对机体造成损害。然而,抗氧化酶系也有“不在岗”时,此时,外源性补充抗氧化剂则被认为是促进健康和延缓衰老的有效途径<sup>[6]</sup>。

多糖作为一种重要的天然产物和外源性补充剂在延缓衰老方面越来越备受关注,如三七根多糖能显著延长秀丽隐杆线虫在氧化应激条件下的寿命<sup>[7]</sup>;桑葚多糖可明显增加秀丽隐杆线虫的吞咽、产卵能力,同时可减少线虫肠脂褐素的水平<sup>[8]</sup>;地黄花多糖低中剂量均能延长热应激和氧化应激条件下秀丽隐杆线虫的平均寿命及 SOD 活性<sup>[9]</sup>;淫羊藿多糖可激活和提高秀丽隐杆线虫体内抗氧化酶 SOD、CAT、GPX 等的活性,同时可明显抑制线虫的脂质过氧化的发生<sup>[10]</sup>。这表明天然来源多糖在延缓衰老方面具有潜在的应用前景。

兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton)作为中国境内唯一的甜百合被普遍用作食品和药品已有数百年的历史<sup>[11]</sup>,其鳞茎中含有丰富的营养成分,被视为“蔬菜人参”,其中所含多糖达 15% 以上,具有抗疲劳、抗氧化、调节免疫、降血糖和抗癌等多种活性<sup>[12]</sup>。然而,对于兰州百合鳞茎中多糖是否具有抗衰老活性却未见报道。秀丽隐杆线虫因其寿命短、生活环境简单、可大量同期化,同时其遗传背景明确、基因与人类在进化上相似等优点,被认为是研究衰老的首选模式生物<sup>[13,14]</sup>。BHP-1 是兰州百合鳞茎中一种天然的 *O*-乙酰葡甘聚糖,本研究以 N2 野生型秀丽隐杆线虫为模型,喂饲线虫多糖 BHP-1,观察其寿命、摄食量、生殖、脂褐素、ROS 水平、应激抗逆性以及 SOD、CAT、MDA 等生理指标,以初步探究兰州百合多糖 BHP-1 对线虫衰老的影响和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与原料

野生型 N2 秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)、大肠杆菌 OP50(*E. coli* OP50,由中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室陈畅教授馈赠);2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA, Sigma-Aldrich 公司);SOD、CAT、MDA 和蛋白质检测试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司);其它试剂均为国产分析纯。兰州百合多糖 BHP-1,由本课题组实验室自制(热水提取 70% 乙醇沉淀,脱蛋白后经 DEAE-52 和 Sephadex G-100 凝胶柱色谱纯化即得,纯度约为 98%)。

### 1.2 实验设备

Fluoview FV1200 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus);LS55 荧光光谱仪(美国 PerkinElmer);LABCONCO 超低温冰箱(日本岛津公司);IFS 66v/s 超净工作台(德国 Bruker 公司);Bruker DRX 400MHz 摇床培养箱(瑞士 Bruker 公司);BUCHIR-200 生化培养箱(上海亚荣仪器有限公司);UV-1700 紫外仪(日本岛津公司);CR22G II 型离心机(日本日立公司);600 型倒置显微镜(美国 Waters 公司)。

### 1.3 含多糖的 NGM 平板的制备

在超净工作台中用移液枪吸取 50  $\mu$ L OP50 菌种液于 NGM 培养基上,涂布棒涂布均匀,在超净工作台中晾干,加入 100  $\mu$ L 不同浓度(0.25、1、4 mg/mL)的多糖溶液,涂布均匀,晾干后置 4  $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

### 1.4 线虫的同期化

产卵法,在显微镜下挑取 L3 期线虫 10~20 条,置于新鲜的含 OP50 的 NGM 固体平板上,让线虫产卵 4 h 后,将含有虫卵的 NGM 平板置于 20  $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养,当线虫长至 L4 期时,线虫进入成虫期,同期化完成。

### 1.5 寿命实验

将 120 个线虫分为对照组(0 mg/mL)和实验组(分别为 0.25、1、4 mg/mL 多糖溶液),根据文献报道并作稍许改动进行寿命测定<sup>[7,13]</sup>。随机挑选同期化 L4 阶段线虫,放置在新的含多糖的 NGM 培养板上于 20  $^{\circ}$ C 培养并记录为第 0 天。对照组和实验组的线虫分别每天转移到新鲜的含多糖的 NMG 平板上,观察其存活情况。当线虫用铂丝刺激 10 s 后无运动且无反应被认为死亡,从平板中挑出死亡的线虫,记录存活线虫的数量,直到所有线虫死亡为止。

上述实验重复三遍。

### 1.6 产卵实验

将至少 30 只同步化的 L4 期幼虫随机转移到含不同浓度多糖的新鲜 NGM 平板上,每个 NGM 板上仅生活一个线虫,每隔 24 h 将它们转移到新的含多糖的 NGM 板中。将已挑走秀丽隐杆线虫的 NGM 平板放在 20 ℃ 生化培养箱中继续培养,待虫卵长至 L2 或 L3 期时计数平板上幼虫的数目。连续计数 5 天,所有实验均重复 3 次。

### 1.7 咽泵抽动频率实验

将同步化的 N2 线虫培养在 NGM 平板上,长至成年后第 1 天,随机转移到含不同浓度多糖的新鲜 NGM 平板中培养,然后分别在第 5 天、第 10 天和第 15 天随机挑选不少于 10 个线虫置于无 OP50 的 NGM 平板上,运动 2 min 后,计数线虫 20 s 内咽泵抽动的次数。上述实验重复 3 次。

### 1.8 热应激实验

同寿命测定条件培养线虫,分别在新鲜的含多糖的 NGM 平板中将对照组和实验组线虫于 20 ℃ 孵育 48 h。随后,将线虫转移至 35 ℃ 的培养箱中培养,每隔 1 h 记录线虫的存活数量,直到所有线虫死亡为止<sup>[15]</sup>。重复实验三次。

### 1.9 氧化应激实验

参照文献做少量改动<sup>[16]</sup>。先将同步化的 L4 期线虫在 20 ℃ 条件下置于含多糖的 NGM 平板上培养 48 h,然后全部转移到含 40 mmol/mL 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 的 96 孔板中,于 20 ℃ 的生化培养箱中继续培养,同时每隔 20 min 计数一次线虫的存活情况,直到所有线虫死亡。实验重复测定三次。

### 1.10 线虫体内 ROS 水平测定

参照文献描述<sup>[17]</sup>,使用可透过细胞的二氯荧光素 (DCFH-DA) 对 ROS 水平进行测定。随机挑选同步化 L4 期线虫到新鲜的含多糖的 NGM 平板上,20 ℃ 培养 10 天后,将各组线虫转移到含 100 μmol/mL DCFH-DA 的 M9 缓冲液中,在培养箱中于 20 ℃ 孵育 2 h 后,用激光共聚焦显微镜观察荧光强度。采用超声处理制备线虫裂解液以测量荧光强度,裂解条件为 200 W 的超声功率,20 s 的循环时间,间歇 10 s,10~20 个循环。用荧光光谱仪检测裂解液的荧光强度,激发波长为 485 nm,发射波长为 530 nm。同时,用考马斯亮蓝试剂盒测定裂解液的总蛋白质含量。荧光强度通过蛋白质含量校准,并表示为相对荧光单位/毫克蛋白质 (RFU/mg pro)。实验平行

测定三次。

### 1.11 线虫体内脂褐素水平测定

按照寿命试验培养线虫 10 天后,将各组线虫用 1 mmol/L 左旋咪唑麻醉,固定在 2% 的琼脂糖载玻片上,用激光共聚焦显微镜 (激发波长 340~380 nm,发射波长 430 nm) 观察线虫体内脂褐素并拍摄荧光照片,用激光共聚焦显微镜自带的软件分析荧光强度。同时,按照线虫 ROS 测定条件制备线虫裂解液,测定裂解液中总蛋白含量,用蛋白质含量对荧光值进行校准,并表示为相对荧光单位/毫克蛋白质 (RFU/mg pro)。实验重复三次。

### 1.12 线虫体内抗氧化酶活性和 MDA 含量测定

按照寿命实验培养线虫 10 天后,收集各组线虫并用 M9 缓冲液洗涤 3 次,然后转移到 Eppendorf 管中,并悬浮在 1 mL 裂解缓冲液中。将悬浮液在冰浴中超声匀浆,然后在 4 ℃ 以 8 000 rpm 离心 10 min,收集上清液,分别根据试剂盒说明测定 SOD、CAT、MDA 和蛋白质含量。SOD、CAT 和 MDA 含量通过蛋白质含量校准,其单位量纲分别表示为 U/mg pro、nmol/min/mg pro 和 nmol/mg pro。实验重复测定三次。

### 1.13 统计学方法

数据结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 形式表示,采用 SPSS20.0 统计软件和 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理和作图分析,采用指数回归两步差异分析法 (ANOVA) 进行组间比较,利用 Kaplan-Meier 生存函数及其对数秩和检验 (log-rank) 进行线虫寿命差异性分析,以  $P < 0.05$  表示差异显著,有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BHP-1 对秀丽隐杆线虫寿命的影响

从秀丽隐杆线虫的总体存活率曲线来看 (见图 1),与空白对照组 (0 mg/mL) 相比,BHP-1 的实验组 (0.25、1 和 4 mg/mL) 均可以延长秀丽隐杆线虫的寿命。BHP-1 各个实验组的存活曲线总体向右移动,与空白对照组相比,在 BHP-1 浓度为 0.25、1 和 4 mg/mL 的剂量组中,线虫的平均预期寿命分别延长了 13.33%、26.67% 和 33.33%。但是,BHP-1 各个实验组对线虫寿命的延长并没有显著性差异。所以,在实验浓度范围内,BHP-1 是可以延缓正常生长条件下 N2 野生型秀丽隐杆线虫的衰老过程。

### 2.2 BHP-1 对秀丽隐杆线虫产卵的影响

结果如图 2 所示,在第 1 天,三个剂量组的 BHP-1

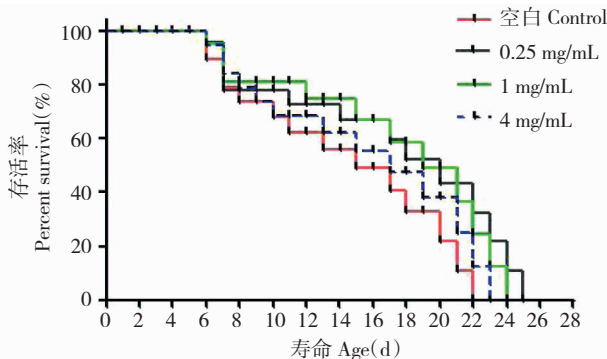


图1 BHP-1 对野生型秀丽隐杆线虫寿命的影响

Fig. 1 Effect of BHP-1 on the wild-type *C. elegans* lifespan

对线虫的产卵呈剂量依赖性增长趋势。在第2天和第3天,与对照组相比,剂量为1 mg/mL的线虫产卵数分别增加了17.98% ( $P < 0.01$ )和75.00% ( $P < 0.005$ ),其他剂量组的增加无明显差异。在第4天到第5天,三个剂量组的BHP-1对线虫的产卵呈一定的增长趋势,但无显著性差异( $P > 0.05$ )。

通常,生殖能力是了解衰老过程的重要指标。有一种“踩踏”机制即物质在延长生命体寿命的同时会不同程度的损害其生殖能力<sup>[18,19]</sup>。在当前的研究中,BHP-1延缓了线虫的衰老,而又不降低或丧失线虫的繁殖能力。也就是说,BHP-1对线虫没有生殖毒性,在延长线虫的寿命同时使其身体处于健康状态。

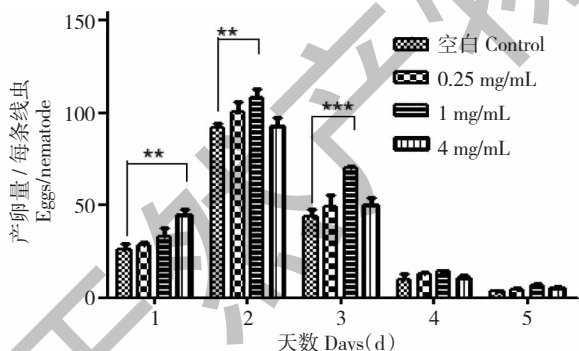


图2 BHP-1 对正常生长条件下线虫产卵的影响

Fig. 2 Effects of BHP-1 on off springs of *C. elegans* under normal growth conditions

注:与空白对照比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\*\* $P < 0.005$ 。Note: Compared with blank control,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\*\* $P < 0.005$ 。

### 2.3 BHP-1 对秀丽隐杆线虫咽泵抽动的影

分别在第5、10和15天观察线虫的咽泵抽动频率。结果如图3所示,实验组和对照组线虫的咽泵抽动频率均随着年龄的增长而逐渐降低,这可能是

因衰老引起的肌肉和神经系统的退化所造成。经BHP-1处理过的线虫在第5天、第10天和第15天的总咽泵抽动频率与空白对照组相比有所增加,但增加甚微,三个处理组之间的增加也没有显著性差异。在第5天、第10天和第15天,4 mg/mL的剂量组线虫平均咽泵抽动频率分别提高了4.72%,7.89%和5.26%。可见BHP-1在延长线虫寿命的同时并不损害线虫的正常进食能力,能够维持线虫的健康状态,这与BHP-1对线虫繁殖实验的结果一致。

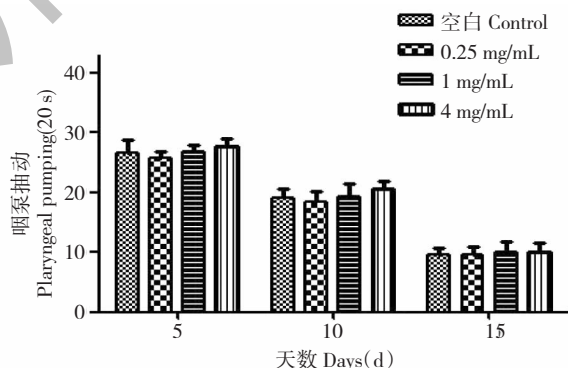


图3 BHP-1 对正常生长条件下线虫咽泵的影响

Fig. 3 Effects of BHP-1 on pharyngeal pumping of *C. elegans* under normal growth conditions

### 2.4 BHP-1 对秀丽隐杆线虫体内 ROS 水平的影

DCFH-DA 探针可被细胞内 ROS 氧化为 DCF,而 DCF 的荧光强度可通过荧光酶标仪测定并反映 ROS 的水平。线虫的发育始于卵,从L1到L4的不同成长阶段,随着年龄的增长,线虫中 ROS 的水平也逐渐积累,在幼年期线虫中 ROS 水平较降。当线虫完成产卵时,即蠕虫的年龄约为10天时,线虫开始进入“老年”状态,其体内的 ROS 急剧增加,至少是L4阶段的4~5倍,使用这个段的线虫作为 ROS

清除实验的对象结果最为明显<sup>[18,20]</sup>。用 BHP-1 处理线虫并培养 10 天后,通过激光共聚焦显微镜观察经荧光探针处理后的线虫,与空白对照组比较,剂量组 1 和 4 mg/mL 对应的线虫体内 ROS 水平显著的

降低(见图 4),在 BHP-1 的剂量分别为 0.25、1 和 4 mg/mL 时,ROS 的水平分别降低了 22.35%、59.36% ( $P < 0.0001$ ) 和 70.95% ( $P < 0.0001$ ),与浓度呈一定的依赖关系。

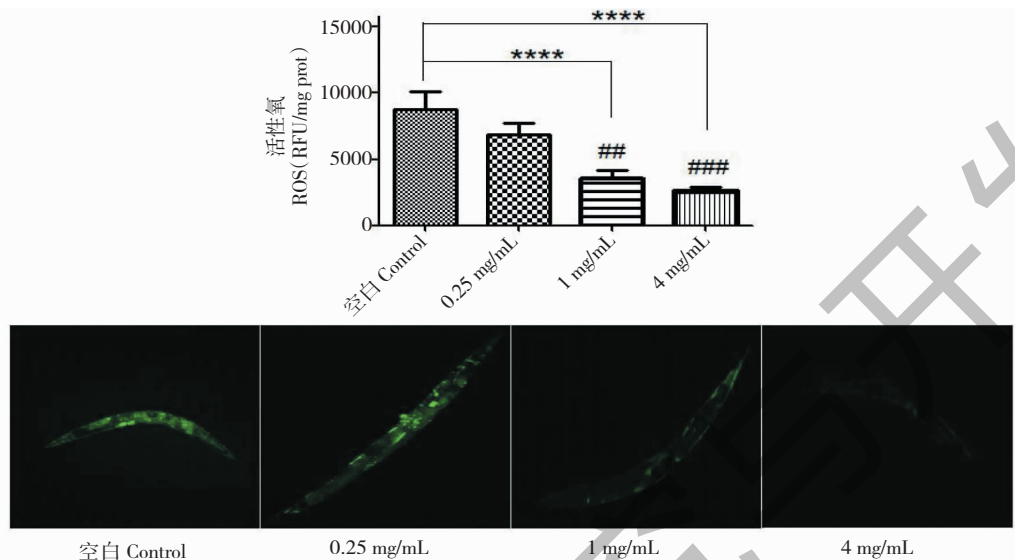


图 4 BHP-1 对秀丽隐杆线虫 ROS 水平的影响

Fig. 4 Effect of BHP-1 on ROS levels in *C. elegans*

注:与空白对照相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.005$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ;与 0.25 mg/mL 相比,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.005$ ,下同。Note:Compared with blank control,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.005$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ;Compared with the 0.25 mg/mL group,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$  and ### $P < 0.005$ ,the same below.

ROS 在体内的过多积累会损害人体功能并引起衰老,而机体的衰老和功能的下降又会促进 ROS 的积累并进一步引发相关疾病的发作。BHP-1 可以显著降低线虫体内的 ROS 水平,从而有效地延缓线虫的衰老。

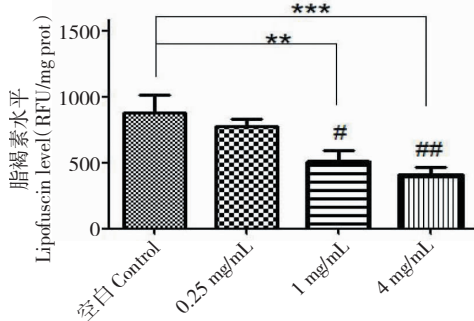
## 2.5 BHP-1 对秀丽隐杆线虫体内脂褐素水平的影响

通常,线虫中脂褐素的含量会随着年龄的增长而逐渐增加。过多的脂褐素沉淀会损害线虫的身体,并最终加速线虫的衰老<sup>[1,13]</sup>。在倒置荧光显微镜下,线虫中脂褐素会自发产生蓝色的荧光。经 BHP-1 处理过的线虫,与空白对照组相比,除 0.25

mg/mL 剂量组,其他剂量组对应的线虫体内脂褐素的荧光强度有明显的降低,结果如图 5 所示。10 天后,与空白对照组相比,用 0.25、1 和 4 mg/mL 的 BHP-1 处理的线虫体内脂褐素的荧光强度分别降低了 5.35%、33.15% ( $P < 0.01$ ) 和 49.80% ( $P < 0.005$ )。此结果表明,BHP-1 降低线虫体内脂褐素的水平与其浓度呈一定的依赖关系。其结果与 BHP-1 对 ROS 的影响趋势一致。

## 2.6 BHP-1 对热应激条件下秀丽隐杆线虫寿命的影响

当身体受到外界强烈的刺激时(如热刺激),就会因此而激剧引发大量的 ROS。野生型线虫在 35



续图 5(Continued Fig.5)

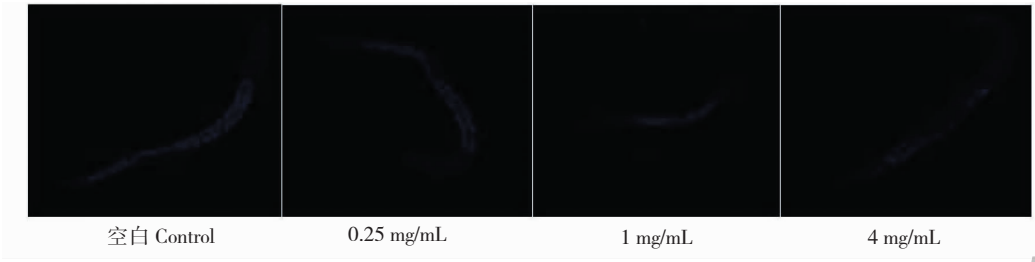


图5 BHP-1对正常生长条件下秀丽隐杆线虫体内脂褐素水平的影响

Fig. 5 Effect of BHP-1 on lipofuscin levels in *C. elegans* under normal growth conditions

℃的热胁迫条件下只能存活约8 h。用浓度为0.25、1和4 mg/mL的BHP-1喂养线虫2天后,转移至热胁迫条件下,其寿命分别延长了25%、37.5% ( $P < 0.05$ )和50% ( $P < 0.05$ )。相比空白对照组,BHP-1显著延长了线虫的寿命。但是,BHP-1各个

浓度组间对线虫寿命的延长并没有显著差异(见图6)。该结果表明BHP-1不仅能清除随着年龄的增长而缓慢增加的ROS,而且还能清除外部突发刺激引发的短时间内爆发的衰老自由基。

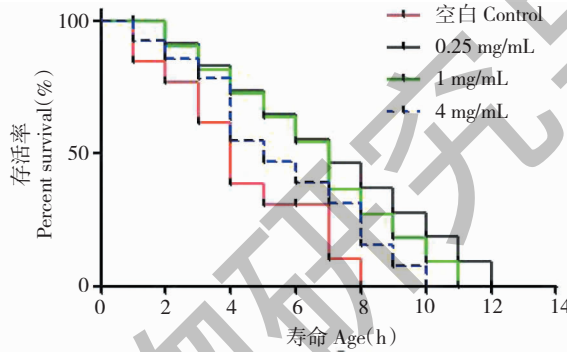


图6 BHP-1对热胁迫下野生秀丽隐杆线虫寿命的影响

Fig. 6 Effect of BHP-1 on the wild-type *C. elegans* lifespan under thermal stress

## 2.7 BHP-1对氧化应激条件下秀丽隐杆线虫寿命的影响

氧化损伤不仅是引发衰老过程中非常重要的一部分,而且还是体内自由基水平高低的指标体现。自由基的过多积累就会引发体内的氧化损伤。BHP-1对过氧化氢引发的线虫的氧化损伤具有显著

的保护作用,可以增强秀丽隐杆线虫适应外界条件变化的能力,结果如图7所示。与空白对照组相比,在0.25、1和4 mg/mL的剂量组浓度下,线虫的平均寿命分别延长了20% ( $P < 0.05$ ),60% ( $P < 0.05$ )和80% ( $P < 0.05$ )。但是,BHP-1各浓度组间对线虫寿命的延长并没有显著差异。

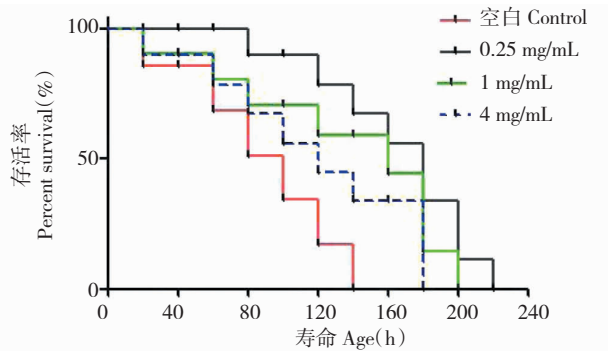


图7 BHP-1对氧化胁迫下野生秀丽线虫寿命的影响

Fig. 7 Effect of BHP-1 on wild-type *C. elegans* lifespan under oxidative stress

## 2.8 BHP-1 对秀丽隐杆线虫体内抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响

随着年龄的增长,机体内机能水平的减退就会引起 ROS 的积累。在此过程中,生命体就会激活细胞内抗氧化酶系如 SOD、CAT 等。该系统将发挥各自的排毒功能,并共同调节体内的氧化还原平衡<sup>[3,4]</sup>。为了研究 BHP-1 对线虫体内抗氧化防御系统的影响,本实验测定了经多糖处理的线虫体内抗氧化酶的活性和 MDA 的水平。结果见图 8,与对照组相比,在多糖实验组中,SOD 和 CAT 活性显著增

加,而 MDA 的水平显著降低。用 0.25、1 和 4 mg/mL 的 BHP-1 处理过的秀丽隐杆线虫,其体内 SOD 的水平分别提高了 21.75%、33.61% ( $P < 0.05$ ) 和 57.27% ( $P < 0.005$ ),CAT 的水平分别提高了 26.91%、30.95% 和 35.23%,而 MDA 的水平分别降低了 14.39%、24.97% ( $P < 0.05$ ) 和 30.35% ( $P < 0.05$ )。可见 BHP-1 可以通过激活并显著提高线虫体内的抗氧化酶 SOD、CAT 的活性和降低 MDA 水平来延长线虫的寿命,这也是 BHP-1 抗衰老的主要机理之一。

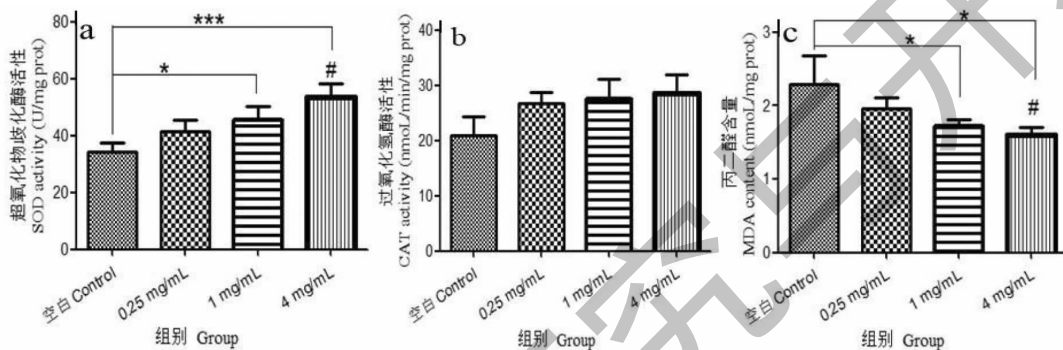


图 8 BHP-1 对秀丽隐杆线虫体内抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响

Fig. 8 Effect of BHP-1 on the antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content of *C. elegans*

## 3 讨论

兰州百合作为中国境内唯一的甜百合享誉海内外,其鳞茎药食两用,其中所含多糖具有抗疲劳、抗氧化、调节免疫、抗过敏、降血糖、抗癌等作用<sup>[13,21]</sup>,但是对于多糖抗衰老活性的数据却是空白。所以,本研究以模式生物秀丽隐杆线虫为活体模型,通过观察线虫体内一些与生命过程相关的生理反应如生殖行为、咽泵抽动力、ROS 和脂褐素水平,体内氧化酶体系活性以及正常生长和应激条件下的存活情况,初步评价了兰州百合鳞茎中多糖 BHP-1 的抗衰老作用。结果表明,BHP-1 可以延长秀丽隐杆线虫的寿命,在实验浓度范围内(0.25 ~ 4 mg/mL),BHP-1 对正常生长条件下线虫寿命的延长无显著性差异,但能明显增强线虫在应激条件下的耐受性,显著延长线虫的寿命。在线虫寿命延长的过程中,实验浓度多糖 BHP-1 对线虫无生物毒性。

“有限资源矛盾需求”学说认为延长寿命与生殖能力成反比关系,即生殖、体细胞的维持和修复、发育、运动等均是机体内耗能多的进程,而体内可利用的资源是有限的,不可能充分供应到各个进程,抗衰老药物应满足不以损害机体的生殖能力和进食能力为代价<sup>[22,23]</sup>。本研究结果表明多糖 BHP-1 在明

显提高秀丽线虫寿命的同时并没有降低其正常的生殖能力(产卵量)也不丧失其正常的进食能力;热应激和氧化应激试验主要考察线虫对应激氧化的抵抗能力和耐受性,试验结果表明不同浓度的多糖 BHP-1 均能显著提高线虫在热应激和氧化应激压力环境下生存时间,由此推测,提高线虫在压力环境下的应激能力可能是兰州百合多糖延长线虫寿命的作用机理之一;“自由基老化”理论认为机体会产生许多自由基,可引起组织和器官老化,进而导致衰老,延缓衰老的关键是保持适当的抗氧化剂水平和内部自由基清除剂的水平<sup>[24]</sup>。过多的 ROS 水平是引发自由基氧化的主要原因,而脂褐素的产生是自由基氧化的结果。BHP-1 可以有效降低线虫体内过多的 ROS 水平,抑制脂褐素的产生,而且还能显著提高线虫的总氧化能力、SOD 和 CAT 酶的活性,降低脂质过氧化酶 MDA 的含量,进而抑制氧化损伤。总之,研究表明 BHP-1 在维持线虫机体正常生理活动的基础上,通过增强线虫对压力应激的耐受性、提高线虫体内抗氧化酶的活性、降低脂质过氧化酶的活性、抑制线虫体内过多自由基的产生而延长了线虫的寿命。然而衰老的原因和机理相当复杂,比如衰老因子的产生与消除、DNA 损伤与修复、热休克应答、基

因遗传等<sup>[23-26]</sup>,对于BHP-1抗衰老的详细机理有待进一步研究。

各实验浓度下多糖BHP-1对线虫表现出了较为明显的抗衰老作用,尤其是应激状态下对线虫显著的寿命延长效应,提示兰州百合多糖对外界的理化刺激或瞬时应激引起的衰老有潜在的抑制能力,这说明兰州百合多糖有潜力作为抗衰老因子被开发应用到食品、药品、保健品和化妆品等行业中。

#### 参考文献

- 1 Wang YF, Chen C, Wang H, et al. Study on the effects of hawthorn fruit extract on aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2016, 38: 391-396.
- 2 Niki E. Lipid peroxidation and its inhibition: overview and perspectives [J]. *J Oleo Sci*, 2001, 50: 313-320.
- 3 Feng SL, Chen H R, Xu Z, et al. Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 81: 188-194.
- 4 Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78: 547-581.
- 5 Finkel T, Holbrook NJ. Oxidative stress and the biology of ageing [J]. *Nature*, 2000, 408: 239-247.
- 6 Escobedo J, Pucci AM, Koh TJ. HSP25 protects skeletal muscle cells against oxidative stress [J]. *Free Radi Biol Med*, 2004, 37: 1455-1462.
- 7 Feng SL, Chen C, Xu Z, et al. Antioxidant and anti-aging activities and structural elucidation of polysaccharides from *Panax notoginseng* root [J]. *Process Biochem*, 2019, 78: 189-199.
- 8 Zhang PL, Chen XX, Wang Q, et al. Optimization of the extracting parameters of mulberry polysaccharide and its anti-aging activity study [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med* (天津中医药大学学报), 2017, 36: 136-141.
- 9 Li YJ, Han QQ, Cen X, et al. Anti-aging effect and mechanism of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2018, 38: 3469-3471.
- 10 Xu Z, Feng SL, Shen SA, et al. The antioxidant activities effect of neutral and acidic polysaccharides from *Epimedium acuminatum* Franch on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 144: 122-130.
- 11 Hui HP, Li XZ, Jin H, et al. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of two heteropolysaccharides purified from the bulbs of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 133: 306-315.
- 12 Hui HP, Jin H, Yang XY, et al. Chemical structure analysis and morphological features of a polysaccharide BHP-1 purified from the bulbs of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26(6): 52-57.
- 13 Hui HP, Xin AY, Cui HY, et al. Anti-aging effects on *Caenorhabditis elegans* of a polysaccharide, *O*-acetyl glucomannan, from roots of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 846-852.
- 14 Shao XY. Biological effects of water-soluble polysaccharide from *Pueraria lobata* and the mechanism of extending *C. elegans* lifespan under heat stress [D]. Hefei: University of Science and Technology of China (中国科学技术大学), 2020.
- 15 Ogawa T, Kodera Y, Dai H. Natural thioallyl compounds increase oxidative stress and lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating SKN-1/Nrf [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 1-13.
- 16 Jin SY, Li DQ, Lu S, et al. Ethanol extracts of *Panax notoginseng* increase lifespan and protect against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the insulin/IGF-1 signaling pathway [J]. *J Funct Foods*, 2019, 58: 218-226.
- 17 Feng SL, Chen HR, Xu Z, et al. *Panax notoginseng* polysaccharide increases stress resistance and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Funct Foods*, 2018, 45: 15-23.
- 18 Kim D K, Jeon H, Cha DS, et al. 4-Hydroxybenzoic acid mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Funct Foods*, 2014, 7: 630-640.
- 19 Large EE, Padmananhan R, Watkins KL, et al. Modeling of a negative feedback mechanism explains antagonistic pleiotropic in reproduction in domesticated *Caenorhabditis elegans* strains [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13: e1006769.
- 20 Zhu W, Xue X, Zhang Z. Ultrasonic-assisted extraction, structure and antitumor activity of polysaccharide from *Polygonum multiflorum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 132.
- 21 Zhao BT, Zhang J, Guo X, et al. Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation [J]. *Food Hydrocol*, 2013, 31: 346-356.
- 22 Ma XL. Molecular mechanisms of sesame meal polypeptides in prolonging healthy lifespan of *C. elegans* [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2020.
- 23 Zhang C, Gao Z, Hu C, et al. Antioxidant, antibacterial and anti-aging activities of intracellular zinc polysaccharides from *Grifola frondosa* SH-05 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 778-787.
- 24 Lao ZZ, Liao F, Wu MY, et al. Study on the anti-aging and antioxidant effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on *Drosophila melanogaster* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2018, 41: 1740-1743.
- 25 Park HH, Jung Y, Le SV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans* [J]. *Mol Cells*, 2017, 40: 90-99.
- 26 Takuma S. Genome editing in *C. elegans* and other nematode species [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 295.