

土茯苓多糖对秀丽隐杆线虫脂代谢的影响

杨慧玲¹, 梅漫雪², 许嘉雨², 朱 伟^{1*}

(1. 广东省中医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学青蒿研究中心, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 研究土茯苓多糖对秀丽隐杆线虫脂代谢的影响。**方法** 以秀丽隐杆线虫为模式生物, 分为对照组、奥利司他组 (6 $\mu\text{g/mL}$) 及土茯苓多糖低、中、高剂量组 (0.25、0.5、1 mg/mL)。通过苏丹黑 B 和油红 O 染色观察线虫肠道内脂质沉积情况, 荧光探针法检测线虫体内 ROS 水平, ELISA 法检测线虫 MDA、TG 水平及 SOD 活性, RT-qPCR 法检测线虫 *fat-2*、*nhr-80*、*sbp-1* mRNA 表达, 检测突变型线虫 TG 水平。**结果** 与对照组比较, 奥利司他组和土茯苓多糖各剂量组线虫肠道内苏丹黑 B 和油红 O 染色变浅, 脂滴密度降低, 线虫体内 TG 水平降低 ($P<0.01$), 且土茯苓多糖呈剂量依赖性, 奥利司他组和土茯苓多糖中、高剂量组线虫体内 MDA 水平降低 ($P<0.01$), SOD 活性升高 ($P<0.01$)。土茯苓多糖高剂量组线虫体内 *fat-2*、*nhr-80*、*sbp-1* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 土茯苓多糖对 *nhr-80* (BX165) 突变型线虫体内 TG 水平的影响无差异 ($P>0.05$)。**结论** 土茯苓多糖可通过降低 *fat-2*、*nhr-80* mRNA 表达来减少不饱和脂肪酸的形成和氧化, 缓解氧化应激, 减少氧化产物产生, 且能升高 SOD 活性, 降低 MDA、ROS 水平, 并通过降低 *sbp-1* mRNA 表达来减少脂质的生成和积累。

关键词: 土茯苓多糖; 秀丽隐杆线虫; 脂代谢

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)07-2396-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.046

土茯苓为百合科植物光叶菝葜的根茎, 有解毒化湿、通利关节的功效, 用于治疗湿热下注之带下、淋证、疮痈肿毒, 具有调节免疫、利尿、镇痛、护肝、脑保护、抗菌、抗胃溃疡等作用^[1-2]。此外, 土茯苓对肥胖和糖尿病大鼠有治疗作用^[3], 而肥胖和糖尿病均伴有脂代谢紊乱。目前已证实, 中药多糖可以影响脂代谢相关因子水平^[4], 但关于土茯苓多糖的研究大多侧重于抗炎、免疫调节^[5-6], 缺少脂代谢方面。

秀丽隐杆线虫具有体型小、生命周期短、寿命短的特点, 适合实验室培养^[7], 其以细菌为食, 可将后者分解为前体氨基酸、单糖和脂肪酸。它有超过 300 个与人类同源的脂质相关基因, 具有与人类同源的关键脂代谢途径、代谢旁路和脂代谢分解酶^[8], 可通过固定染料染色来检测其肠道内脂质的积累, 如油红 O 染色、苏丹黑 B 染色等。

本实验拟选择野生型秀丽隐杆线虫 N2 和突变线虫 *nhr-80* (BX165)、*sbp-1* (ep79) 为模式生物, 探索土茯苓多糖对其脂代谢的影响, 以期对相关后续研究提供依据。

1 材料

1.1 动物 野生型秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans* Bristol, N2)、突变型线虫 *nhr-80* (BX165)、*sbp-1* (ep79)、大肠杆菌 (*E. coli* OP50) 均购自美国线虫遗传中心。

1.2 试剂与药物 土茯苓 (批号 160601211) 购自康美药业股份有限公司, 经广东省中医院袁小红主任中药师鉴定

为正品。木瓜蛋白酶 (批号 P6321-500 g)、奥利司他 (批号 O4139-100MG)、琼脂 (批号 A800729-1 kg)、蛋白胨 (批号 S832651-250 g)、1 mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液 (pH 6.0) (批号 H6505-500 mL) 均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; MgSO_4 (批号 7487-88-9)、 Na_2HPO_4 (批号 7487-82-9)、 KH_2PO_4 (批号 7486-87-9) 均购自华中海威 (北京) 基因科技有限公司; 叠氮化钠 (批号 NSC 3072) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; NaCl (批号 AM9760G)、 H_2DCFDA (批号 D399) 均购自美国 Invitrogen 公司; NGM 培养基 (批号 CB001907-250G) 购自上海西默通信技术有限公司。

MDA (批号 A003-1-1)、TG (批号 A110-1-1)、CAT (批号 A007-1-1)、SOD (批号 A001-3-2) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司; 油红 O 染色液试剂盒 (批号 O1391-250ML)、苏丹黑 B 染色液试剂均购自试剂盒 (批号 199664) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 逆转录试剂盒 (批号 4897030001) 购自瑞士 Roche 公司。

1.3 仪器 Infinite M1000Pro 多功能微孔板检测仪购自瑞士 Tecan 公司; BX53LRH-250-G 正置成像显微镜购自日本 Olympus 公司; U570U9270-0001 超低温冰箱购自德国 Eppendorf 公司; ViiA7 荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司; ABI Quant Studio 7 Flex 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; Allegra X-22R 多功能冷冻台式离心机购自美国

收稿日期: 2023-06-13

基金项目: 广州市科技局市校 (院) 联合资助项目 (202201020296); 广东省中医院科技研究专项项目 (YN2019MJ11)

作者简介: 杨慧玲 (1993—), 女, 硕士, 研究方向为中医药治疗心血管疾病。Tel: 19866916782, E-mail: pruna_flores@126.com

* 通信作者: 朱 伟, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药复方物质基础。E-mail: zhuwei9201@163.com

Beckman 公司。

2 方法

2.1 药物制备 称取土茯苓饮片适量，粉碎，过 80 目筛，称取 1.0 g 粉末，置于 50 mL 锥形瓶中，加入 0.6% 木瓜蛋白酶，50 ℃ 水浴中酶解 150 min，在 pH 8、料液比 1：35 条件下提取多糖，酶解完成后，以沸水灭酶 5 min，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，冷冻干燥，得率为 26.31%。用 MgSO₄ 0.13 g、Na₂HPO₄ 3 g、NaCl 2.5 g、KH₂PO₄ 1 g 配置 M9 缓冲液 500 mL。取 10 片奥利司他研磨成粉，使用 NGM 培养基配成 10 mg/mL 母液，过滤，即为阳性对照。

2.2 NGM 培养基制备 称取琼脂 1.7 g、蛋白胨 0.25 g、NaCl 0.3 g、1 mol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄ 缓冲液（pH 6.0）2.5 mL，加水至 100 mL，高压灭菌，加入 1 mol/L CaCl₂ 0.1 mL、1 mol/L MgSO₄ 0.1 mL 摇匀，加入灭菌水、奥利司他、土茯苓多糖，快速混匀，得到土茯苓多糖终质量浓度分别为 0、0.25、0.5、1 mg/mL 和奥利司他终质量浓度为 6 μg/mL 的培养基，4 ℃ 保存。

2.3 秀丽隐杆线虫培养与传代 将雌雄同体的线虫置于“2.2”项下培养基中，加入大肠杆菌液，在温度 20 ℃、相对湿度 40%~60% 下培养。使用灭菌手术刀片，从长满秀丽隐杆线虫的 NGM 培养基上取 1 块培养基，倒置于新配置的加入大肠杆菌菌液的 NGM 培养基中，继续传代培养。

2.4 秀丽隐杆线虫同步化 当 NGM 培养基中有 80% 的线虫处于产卵期时，使用 M9 缓冲液洗下，将冲洗液置于离心管中，3 000 r/min 离心 2 min，吸去上清液，在离心管中加入线虫裂解液，涡旋振荡 30 s，共 3 次，吸去上清液，加入 M9 缓冲液冲洗 3 次，放入 25 ℃ 培养箱中 24 h 后在显微镜下观察虫卵是否孵化。

2.5 给药 分为对照组、奥利司他组（6 μg/mL）及土茯苓多糖低、中、高剂量组（0.25、0.5、1 mg/mL），分别将同步化至 L1 期的野生型秀丽隐杆线虫（N2）、突变型线虫 nhr-80（BX165）、sbp-1（ep79）放入相应药物培养基中，在 21 ℃ 培养箱中培养，其中 2 种突变线虫不放入奥利司他培养基培养。

2.6 油红 O 染色和苏丹黑 B 染色检测线虫脂肪积累情况 每组挑选约 100 条线虫至 1.5 mL EP 管中，M9 缓冲液清洗残留的大肠杆菌 3 次，室温下 4% 多聚甲醛固定 30 min，于-80 ℃ 下反复冻融 3 次，1 500 r/min 离心 1 min，清洗 3 次，使用油红 O 室温染色，30 min 后于显微镜下观察线虫体内脂滴积聚情况，并拍照记录，苏丹黑 B 染色方法相同，多聚甲醛固定，M9 缓冲液清洗 3 次，再分别用 25%、50%、70% 乙醇清洗，室温染色过夜，于显微镜下观察线虫体内脂滴积聚情况，并拍照记录。

2.7 荧光探针法检测线虫体内 ROS 水平 每组挑选 50 条线虫至 1.5 mL EP 管中，用 M9 缓冲液清洗残留的大肠杆菌 3 次，加入适量 5 μg/mL H2DCFDA，于 23 ℃ 培养箱中避光孵育 30 min，30 mmol/L 叠氮化钠麻醉线虫，在荧光

显微镜下观察其荧光强度，并拍照记录。

2.8 ELISA 法检测线虫体内 MDA、TG 水平及 SOD 活性 每组收集 3 000 条线虫至匀浆管中，用 M9 缓冲液清洗残留的大肠杆菌 3 次，加入新的 M9 缓冲液，匀浆仪破碎虫体，4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min，取上清液至 1.5 mL 离心管中，严格按照相关试剂盒说明书检测线虫体内 MDA、TG 水平及 SOD 活性。同时，检测野生型线虫 N2 及突变型线虫 nhr-80（BX165）、sbp-1（ep79）虫株 TG 水平。

2.9 RT-qPCR 法检测线虫 *fat-2*、*nhr-80*、*sbp-1* mRNA 表达 收集 3 000 条线虫至匀浆管中，M9 缓冲液清洗 3 次残留的大肠杆菌，1 500 r/min 离心 1 min，用 TRIzol 试剂提取线虫的总 RNA，Nano Drop 浓度检测仪检测总 RNA 浓度，TranscriPtor cDNA Synth Kit 逆转录试剂盒进行 RNA 逆转录。再以 cDNA 为模板，使用 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix（ROX1 plus）预混型 qPCR 试剂盒进行扩增反应，反应条件为 95 ℃ 5 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环，以 *β-actin* 为内参，使用 2^{-ΔΔCT} 法进行相对定量处理，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')
<i>fat-2</i>	正向 TACACCATCGTCGGTCTTCC
	反向 CAACTCCAGAAACTGCACA
<i>sbp-1</i>	正向 TGGCACGGCAACACTATTCA
	反向 CATTCCGGCGTGTAACCTTCCT
<i>nhr-80</i>	正向 TCGACCGAATGTCACTGCTC
	反向 GTCTCATCTCTCCAGCCAAC
<i>β-actin</i>	正向 GATTCCACCCATGGCAAATT
	反向 CTGGAAGATGCTGATGGGAT

2.10 统计学分析 通过 SPSS Statistics 22.0、GraphPad 9.0 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，2 组间比较采用 LSD 检验；若方差不齐，2 组间比较采用 Dunnett’s T3 分析。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 土茯苓多糖对线虫脂质积累和 TG 水平的影响 如图 1A 所示，与对照组比较，奥利司他组和土茯苓多糖各剂量组染色脂滴聚集程度减少，且土茯苓多糖呈剂量依赖性。如图 1B 所示，与对照组比较，奥利司他组和土茯苓多糖各剂量组染色较浅，脂滴聚集减少。如图 1C 所示，与对照组比较，奥利司他组和土茯苓多糖各剂量组线虫体内 TG 水平降低（*P*<0.01），其中土茯苓多糖高剂量组和奥利司他组作用相当（*P*>0.05）。

3.2 土茯苓多糖对线虫氧化应激的影响 如图 2A 所示，与对照组比较，奥利司他组和土茯苓多糖各剂量组荧光强度减弱，ROS 水平降低，且土茯苓多糖呈剂量依赖性。如图 2B~2C 所示，与对照组比较，奥利司他组和土茯苓多糖中、高剂量组线虫体内 MDA 水平降低（*P*<0.01），SOD 活性升高（*P*<0.01）。

3.3 土茯苓多糖对线虫 *fat-2*、*nhr-80*、*sbp-1* mRNA 表达的

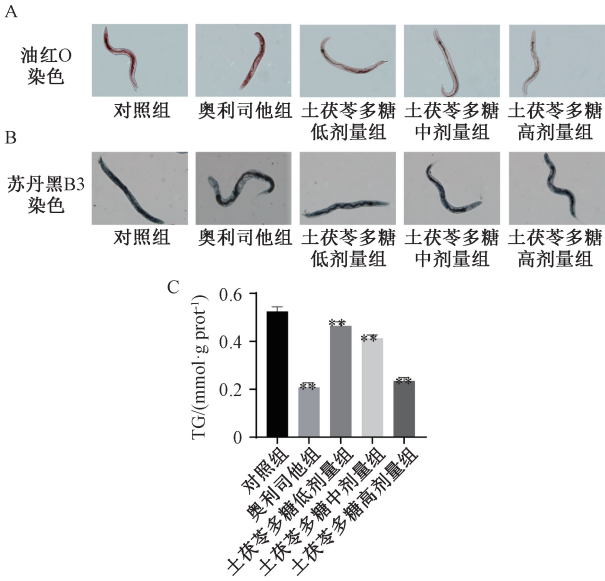


图 1 土茯苓多糖对线虫脂质积累和 TG 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

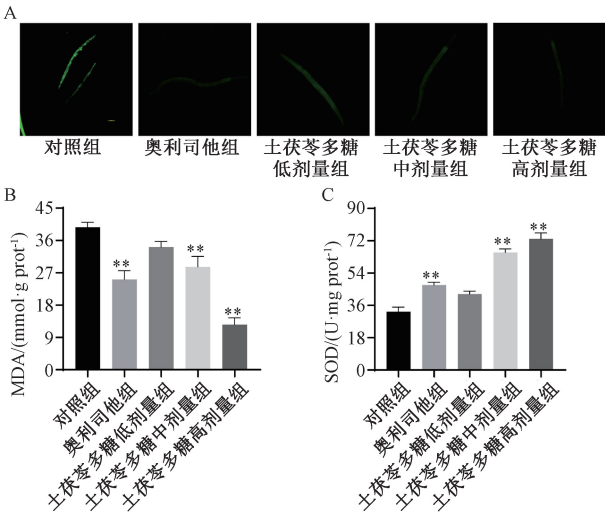


图 2 土茯苓多糖对线虫氧化应激的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

影响 如图 3 所示,与对照组比较,奥利司他组和土茯苓多糖中、高剂量组线虫 *fat-2*、*nhr-80*、*sbp-1* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.4 土茯苓多糖对突变型线虫 TG 水平的影响 如表 2 所示,与对照组比较,土茯苓多糖各剂量组突变型线虫 TG 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),即仅在敲除线虫体内 *nhr-80* 基因后,土茯苓多糖不能降低 TG 水平。

4 讨论

根据预实验结果,设置 0.25、0.5、1 mg/mL 土茯苓多糖进行验证。研究发现,土茯苓多糖可降低线虫体内 TG 水平,效果同奥利司他组,具有剂量依赖性。脂质染色结果发现,与对照组比较,土茯苓多糖各剂量组和奥利司他

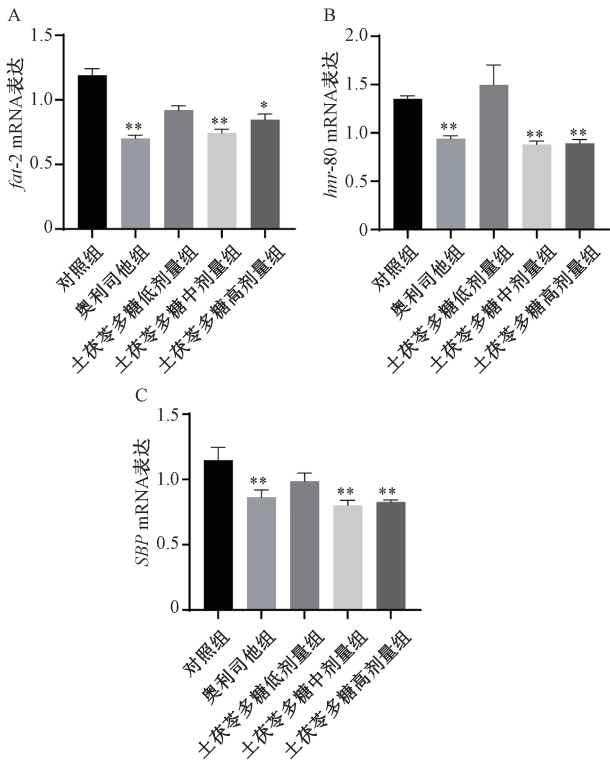


图 3 土茯苓多糖对线虫 *fat-2*、*nhr-80*、*sbp-1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

表 2 土茯苓多糖对突变型线虫 TG 水平的影响 (mmol/g prot, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	N2	BX165	ep79
对照组	0.53±0.02	0.53±0.05	0.50±0.01
土茯苓多糖低剂量组	0.46±0.01	0.52±0.01	0.42±0.02
土茯苓多糖中剂量组	0.42±0.01	0.51±0.03	0.39±0.01*
土茯苓多糖高剂量组	0.24±0.01*	0.52±0.01	0.23±0.02**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
组线虫肠道内的脂滴密度更小,染色程度更浅,说明该成分可减少线虫肠道内的脂质沉积,并呈剂量依赖性。

脂质过氧化可生成更多氧自由基和 MDA,诱发氧化应激反应,最终造成组织损伤^[9-10],MDA 水平可反应脂质过氧化的程度和速度。中药多糖成分可通过抑制氧化应激反应减少氧自由基的生成,如佛手多糖^[11]、鸡内金山药多糖^[12]等。SOD 是一类重要的抗氧化酶,可清除糖脂代谢产生的 ROS^[13-14]。本研究发现,土茯苓多糖各剂量组可升高 SOD 活性,呈剂量依赖性;中、高剂量土茯苓多糖可降低 MDA 水平,并呈剂量依赖性;与对照组比较,土茯苓多糖各剂量组荧光强度减弱,高剂量组和奥利司他组荧光最弱,说明它可能通过提高 SOD 水平清除 ROS,减少 MDA 等的产生,加快线虫体内的脂肪分解代谢。

nhr-80、*sbp-1* 均为线虫中调节脂质代谢的传感器,前者与哺乳动物 *HNF4* 基因同源,其过表达可与油酸协同将脂肪酸去饱和以延长线虫的寿命^[15],但多不饱和脂肪酸较饱和脂肪酸性质不稳定,极易被氧化^[16],*fat-2* 也参与了

多不饱和脂肪酸形成过程,该基因编码了 ρ -12 脂肪酸脱氢酶,是 ω -6 多不饱和脂肪酸 (ω -6PUFAs) 生成的催化酶^[17-18]。*sbp-1* 与人类调控脂质代谢的 *SREBP* 同源,可通过激活参与脂肪生成的相关酶诱导脂质合成^[19-20]。本研究表明,中、高剂量土茯苓多糖可降低线虫中 *fat-2*、*nhr-80*、*sbp-1* 等基因的表达; *nhr-80* 基因缺失的线虫 BX165 的 TG 水平与对照组比较无差异,说明土茯苓多糖可通过降低 *nhr-80*、*fat-2* 表达,减少不饱和脂肪酸的生成及氧化,进而使氧化产物 MDA 减少,缓解氧化应激,并通过降低 *sbp-1* 表达,减少激活脂肪生成的相关酶类,以减少脂质的形成与积累。

综上所述,土茯苓多糖可能通过降低 *nhr-80*、*fat-2* 基因的表达以减少不饱和脂肪酸的生成,防止其过氧化生成一系列氧化产物进一步造成细胞和组织的损伤也可降低 *sbp-1* 以减少脂质的生成和积累。本实验结果为土茯苓多糖对脂代谢的影响提供了依据,有利于开发新的中药类降脂减肥药物。在后续研究中,可进一步通过细胞或动物实验来探索土茯苓多糖对脂代谢异常相关性疾病的影响。

参考文献:

[1] 于广莹,刘 维. 土茯苓临床应用概况[J]. 辽宁中医药大学学报,2009, 11(3): 61-63.

[2] 万 涛,侯如艳. 自拟复方土茯苓洗剂塌浸治疗慢性湿疹 30 例[J]. 光明中医,2022, 37(10): 1810-1813.

[3] Ansari S A, Bari A, Ullah R, *et al.* Gold nanoparticles synthesized with *Smilax glabra* rhizome modulates the anti-obesity parameters in high-fat diet and streptozotocin induced obese diabetes rat model[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2019, 201: 111643.

[4] 代云云,谢晓蓉,王鹏波,等. 中药多糖降脂作用机理的研究进展[J]. 中药药理与临床,2021, 37(5): 219-223.

[5] 王 敏. 土茯苓中性杂多糖的分离纯化、结构解析及其免疫调节作用的研究[D]. 广州: 广州中医药大学,2016.

[6] 赵靖雯. 土茯苓粗多糖硫磺熏蒸前后免疫调节功能的变化及其机制[D]. 广州: 广州中医药大学,2017.

[7] 李宗军,吴中琴,李 珂. 基于秀丽隐杆线虫的酒精生物

效应研究进展[J]. 现代食品科技,2018, 34(2): 271-279.

[8] 冯亚芳,米生权. 秀丽隐杆线虫在降脂类生物活性物质功能评价中的应用研究进展[J]. 食品工业科技,2017, 38(19): 346-351.

[9] 石 晶,郭兆安. 铁死亡在急性肾损伤中的研究进展[J]. 中国血液净化,2022, 21(11): 835-839.

[10] 马 尧,姜维娜,江 红. 2 型糖尿病伴高脂血症患者氧化应激反应与血脂代谢紊乱的关系研究[J]. 临床和实验医学杂志,2017, 16(11): 1102-1104.

[11] 植 飞,邢琪昌,汪 莹,等. 佛手山药多糖对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响[J]. 食品科学,2017, 38(5): 262-266.

[12] 蒋长兴,蒋顶云,熊清平,等. 鸡内金多糖对高脂血症大鼠血脂、血液流变学及氧化应激指标的影响[J]. 中药药理与临床,2012, 28(5): 75-78.

[13] 黄 伟,李 涵,李本岳,等. 川芎嗪对 t-BHP 致 PC12 细胞损伤的保护及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2019, 25(11): 67-72.

[14] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(10): R453-R462.

[15] Goudeau J, Bellemin S, Toselli-Mollereau E, *et al.* Fatty acid desaturation links germ cell loss to longevity through NHR-80/HNF4 in *C. elegans*[J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(3): e1000599.

[16] Iuchi K, Ema M, Suzuki M, *et al.* Oxidized unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in cultured cells[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2767-2773.

[17] Viktorinová I, König T, Schlichting K, *et al.* The cadherin Fat2 is required for planar cell polarity in the *Drosophila* ovary[J]. *Development*, 2009, 136(24): 4123-4132.

[18] Dyer L A, Palmer A D N. Piper: A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution [M]. Berlin: Springer, 2004.

[19] Nomura T, Horikawa M, Shimamura S, *et al.* Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1 [J]. *Genes Nutr*, 2010, 5(1): 17-27.

[20] 白 娟,张金富,张佩熙,等. 苦瓜皂苷对秀丽隐杆线虫寿命的影响及其机制研究[J]. 食品科学,2022, 43(7): 165-173.