



食品与发酵工业

Food and Fermentation Industries

ISSN 0253-990X, CN 11-1802/TS

《食品与发酵工业》网络首发论文

题目：灵芝孢子粉提取物延缓皮肤衰老作用研究
作者：刘春媛，刘振华，陈云霞，何婕，薛圣然，张心怡，郑君，苏宁
DOI：10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032298
收稿日期：2022-05-18
网络首发日期：2022-07-13
引用格式：刘春媛，刘振华，陈云霞，何婕，薛圣然，张心怡，郑君，苏宁. 灵芝孢子粉提取物延缓皮肤衰老作用研究[J/OL]. 食品与发酵工业.
<https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032298>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

灵芝孢子粉提取物延缓皮肤衰老作用研究

刘春媛¹, 刘振华¹, 陈云霞¹, 何婕², 薛圣然², 张心怡², 郑君², 苏宁¹✉

1 (中国检验检疫科学研究院, 北京, 100176)

2 (中检科(北京)化妆品技术有限公司, 北京, 100176)

*通信作者 苏宁, 副研究员, 为通信作者, E-mail: sun@caiq.org.cn

摘要 寻找天然有效成分以延缓皮肤衰老是近年来人们关注与研究的热点。为研究灵芝孢子粉提取物 (*Ganoderma lucidum* spore extract, GLSE) 对 HDFn 细胞氧化损伤保护作用及其抗衰老作用, 构建叔丁基过氧化氢 (*tert*-butyl hydroperoxide, TBHP) 诱导 HDFn 细胞氧化损伤衰老模型。测定 GLSE 对衰老模型的保护作用以及细胞中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性以及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平、线粒体膜电位变化; 同时测定衰老相关 β -半乳糖苷酶活性以及抗氧化应激相关 Nrf2/HO-1 通路表达情况。结果显示, GLSE 预处理后对 TBHP 诱导的衰老模型具有保护作用; GLSE 作用 HDFn 细胞后, 能够降低 MDA 含量, 提高细胞 SOD 和 GSH-Px 活性, 稳定细胞线粒体膜电位, 以及抑制细胞 β -半乳糖苷酶活性, 激活通路 Nrf2/HO-1 mRNA 表达。因此, GLSE 作用 HDFn 细胞后, 可以有效地减弱 TBHP 诱导的氧化损伤, 从而达到延缓皮肤衰老的作用。

关键词 灵芝孢子粉; 延缓衰老; 抗氧化; *tert*-butyl hydroperoxide; HDFn 细胞

DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032298

Study on anti-skin aging effect of *Ganoderma lucidum* spore powder extract

LIU Chunyuan¹, LIU Zhenhua¹, CHEN Yunxia¹, HE Jie², XUE Shengran², ZHANG Xinyi², ZHENG Jun², SU Ning¹✉

1(China Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

2(C C TECH (BEIJING) Co. Ltd, Beijing 100176, China)

Abstract Searching for natural active ingredients to delay skin aging is a hot spot in recent years. To study the protective effect and anti-aging effect of *Ganoderma lucidum* spore extract (GLSE) on HDFn cells from oxidative damage, the model which *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) induced oxidative damage and aging of HDFn cells was constructed. CCK8 method was used to determine the cell survival rate after TBHP induction to determine the protective effect of GLSE on aging model. The activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA) level were measured. Flow cytometry was used to detect the changes of mitochondrial membrane potential after GLSE pretreatment on TBHP-induced oxidative damage. Moreover, the activity of senescence-related β -galactosidase and the expression of Nrf2/HO-1 pathway related to anti-oxidative stress were measured. The results showed that GLSE pretreatment had a protective effect on TBHP induced aging model. After acting on HDFn cells, GLSE decreased the content of MDA, increased the activities of SOD and GSH-Px. Further studies showed that GLSE significantly stabilized the mitochondrial membrane potential of HDFn cells, indicating that GLSE could inhibit the mitochondrial damage induced by TBHP. In addition, GLSE suppressed cells β -Galactosidase activity, activated antioxidant pathway Nrf2/HO-1 mRNA expression. In conclusion, after GLSE acts on HDFn cells, it can effectively attenuate the oxidative damage induced by TBHP, thereby delaying skin aging.

Key words *Ganoderma lucidum* spore powder extracts; anti-aging; antioxidation; *tert*-butyl hydroperoxide; HDFn cells

灵芝是一种药用价值较高的名贵真菌, 被视为延年益寿的珍品, 灵芝孢子是其子实体成熟期从菌盖弹射出来的灵芝种子。研究表明, 灵芝孢子粉富含多糖、肽、有机锗、氨基酸、生物碱、三萜、脂肪酸以及各种微量元素等^[1-2], 其具有抗肿瘤^[3]、调节肠道菌群^[4]、降血糖血脂、抗炎^[5]、抗氧化^[6]、

收稿日期: 2022-05-18

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费 (2020JK040)

作者简介: 刘春媛, 硕士研究生, 助理研究员

网络首发时间: 2022-07-13 11:19:36 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1802.TS.20220712.1713.018.html>

清除自由基等作用^[7]。皮肤衰老是最直观的衰老特征之一，皮肤衰老表现为皮肤失去弹性和柔软性，出现皱纹、干燥角化、色素过量沉积等^[8]。寻找天然安全有效成分以延缓皮肤衰老，是近年来人们关注与研究的热点之一，而对灵芝孢子粉延缓皮肤衰老机理方面的研究却鲜有报道。本文通过以天然产物灵芝孢子粉提取物（*Ganoderma lucidum* spore extract, GLSE）为研究对象，探讨其对体外 HDFn 细胞抗衰老模型的作用及其抗氧化应激作用机制，旨在为 GLSE 在延缓皮肤衰老应用中提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

正常人原代真皮成纤维细胞（HDFn），ATCC，批号 63557078。

1.2 主要试剂

灵芝孢子粉，修正药业；DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(dulbecco phosphate buffer solution, DPBS)、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清，美国 gibco 公司；增强型 CCK-8 试剂盒，碧云天生物技术有限公司；叔丁基过氧化氢，东京化成工业株式会社；总 SOD 活性检测试剂盒（WST-8 法）、总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、β-半乳糖苷酶试剂盒，碧云天生物技术有限公司；线粒体膜电位检测试剂盒（JC-10），北京索莱宝科技有限公司。

1.3 主要仪器

AC2-4S1 生物安全柜，新加坡艺思高科技有限公司；Observer.D1 倒置显微镜，德国 Zeiss 公司；371 二氧化碳培养箱、MULTISKAN GO 全波长酶标仪，美国 Thermo 公司；3K15 离心机，希格玛实验室离心机公司；ME104E 电子分析天平，瑞士 METTLER TOLEDO 公司；S3E 流式细胞仪，美国伯乐公司；SCIENTZ-IIID 超声波细胞破碎仪，宁波新芝生物有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 样品制备

实验参考刘世柱等^[9]方法并加以改进，采用水提法制备灵芝孢子粉提取物，制备方法如下：称取灵芝孢子粉 5 g，加入 40 mL 的超纯水超声 10 min，然后 90 °C 浸提 3 h，涡旋振荡后定容 50 mL，4 000 r/min 离心 10 min，取上清溶液，即为 100 g/L 灵芝孢子粉提取物。

1.4.2 细胞培养

HDFn 细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中，2~3 d 传代 1 次。实验选取 4~7 代细胞。

1.4.3 细胞存活率测定

参照文献^[10]方法采用 CCK-8 检测法检测 HDFn 细胞存活率。取对数生长期的细胞以密度 10⁴ 细胞/孔，接种于 96 孔板。培养 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，每孔加入 100 μL 终质量浓度为 0.63、1.25、2.5、5、10 g/L GLSE 的 DMEM 培养基培养，设置阴性对照（只加培养基）。继续培养 24 h 后，每孔加入 CCK-8 工作液，于培养箱内避光孵育 2 h 后用酶标仪检测各实验组在 450 nm 处的吸光度并按公式（1）计算细胞存活率。选取细胞存活率 > 70% 的样品浓度为工作浓度进行下一步功效测试^[11]。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{样品组} - \text{空白组}}{\text{阴性对照组} - \text{空白组}} \times 100 \quad (1)$$

1.4.4 TBHP 诱导衰老模型建立

将细胞以密度 10⁴ 细胞/孔接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，每孔加入 100 μL 含 TBHP 的培养基，终浓度分别为 78.13、156.25、312.50、625、1 250 μmol/L，同时设置阴性对照（只加培养基），继续培养 2 h 后进行细胞存活率测定（方法及计算公式同 1.4.3）。

1.4.5 GLSE 对衰老模型的保护作用

为了进一步评估 GLSE 对氧化损伤细胞衰老模型的保护作用，将细胞以密度 10⁴ 细胞/孔接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，加入终质量浓度为 0.63、1.25、2.5、5、10 g/L GLSE 的培养基处理 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，加入 312.50 μmol/L TBHP 孵育 2 h 后，进行细胞存活率测定（方法及计算公式同 1.4.3），评价 GLSE 对氧化损伤后细胞的保护作用。

1.4.6 GLSE 对 HDFn 细胞内 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量影响

收集对数生长期细胞，按照 2×10^6 细胞/皿接种于细胞培养皿，培养 24 h 后，加入终浓度为 2.5、5、10 g/L GLSE 的 DMEM 培养基。继续培养 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，加入 312.50 $\mu\text{mol/L}$ TBHP。同时设置阴性对照（只加培养基），以只加 TBHP 的细胞为模型对照。TBHP 作用 2 h 后，DPBS 清洗 2 次后裂解细胞。按照各试剂盒的操作方法分别进行 SOD、GSH-Px、MDA 的检测。

1.4.7 GLSE 对细胞线粒体膜电位的影响

收集对数生长期细胞，按照 2×10^5 细胞/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 后，加入终质量浓度为 2.5、5、10 g/L GLSE 的 DMEM 培养基。继续培养 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，加入 312.50 $\mu\text{mol/L}$ TBHP。同时设置阴性对照（只加培养基），以只加 TBHP 的细胞为模型对照。TBHP 作用 2 h 后，按照线粒体膜电位检测试剂盒说明书进行操作，并通过流式细胞仪分析检测。

1.4.8 GLSE 对 HDFn 细胞 β -半乳糖苷酶活性的影响

收集对数生长期细胞，按照 2×10^5 细胞/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 后，加入终质量浓度为 2.5、5、10 g/L GLSE 的 DMEM 培养基。继续培养 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，加入 312.50 $\mu\text{mol/L}$ TBHP。同时设置阴性对照（只加培养基），以只加 TBHP 的细胞为模型对照。TBHP 作用 2 h 后，按照 β -半乳糖苷酶试剂盒说明书进行操作。光学显微镜下观察细胞染色情况，并按公式（2）计数 100 个细胞中染色阳性细胞百分比。

$$\text{SA} - \beta - \text{Gal 染色率}/\% = \frac{\text{蓝染细胞数}}{\text{全部细胞数}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.9 GLSE 对 HDFn 细胞 Nrf2/HO-1 mRNA 表达的影响

收集对数生长期细胞，按照 3×10^5 细胞/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 后，加入终质量浓度为 2.5、5、10 g/L GLSE 的 DMEM 培养基。继续培养 24 h 后，DPBS 清洗 2 次，加入 312.50 $\mu\text{mol/L}$ TBHP。同时设置阴性对照（只加培养基），以只加 TBHP 的细胞为模型对照。TBHP 作用 2 h 后，收集处理好的细胞，提取 RNA 并测定 RNA 浓度，按照反转录试剂盒说明书进行操作。反应条件：step1: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, step2: 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, step3: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 s, step4: 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, step5: 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ , step2 \rightarrow step4 40 cycles, 以 β -actin 为内参照，用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达量。结果根据目的基因与相应的 β -actin 的表达比值确定基因的表达水平高低。

表1 PCR引物序列
Table 1 Primer sequences

| 基因 | 上游引物 | 下游引物 |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| HO-1 | 5'-TGCCAGTGCCACCAAGTTCAAG-3' | 5'-TGTTGAGCAGG AACGCAGTCTTG-3' |
| Nrf2 | 5'-TCCAAGTCCAGAAGCCAAACTGAC-3' | 5'-GGAGAGGATGCTGCTGAAGGAATC-3' |
| β -Actin | 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' | 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3' |

1.4.10 数据处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。组间差异比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，方差齐者采用 LSD 检验，方差不齐者采用 Tamhane's T2 检验。###：与阴性对照相比 $P < 0.01$ ；*：与模型对照相比 $P < 0.05$ ；**：与模型对照相比 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 细胞存活率结果

使用 CCK-8 法对不同浓度 GLSE 进行 HDFn 细胞毒性研究，研究不同质量浓度的 GLSE 对细胞存活率的影响。由图 1 可知，在试验质量浓度范围（0.63~10 g/L）内，细胞存活率均高于 70%。说明在此质量浓度范围内无细胞毒性作用，此浓度范围可用于后续试验。

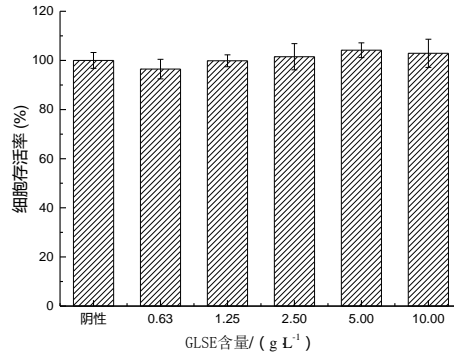


图1 GLSE对HDFn细胞存活率的影响
Fig.1 Effects of GLSE on HDFn cell viability

2.2 TBHP 诱导衰老模型建立

细胞衰老模型的构建是抗衰老研究的前提，TBHP 是一种可在多种细胞系中诱导氧化应激及细胞损伤的氧化剂，可诱导细胞产生 ROS，从而使所介导的生物分子损伤会导致细胞凋亡及衰老，相比 H₂O₂ 结构更稳定，现已被用于构建多种细胞衰老模型^[12-14]。采用 TBHP 诱导 HDFn 细胞建立氧化应激皮肤早衰模型，筛选最佳 TBHP 使用浓度。图 2 为不同浓度 TBHP 对 HDFn 细胞存活率影响结果，不同浓度 TBHP 作用细胞后，细胞存活率随 TBHP 浓度的增加而减小，当浓度小于 156.25 μmol/L 时，TBHP 对 HDFn 细胞的存活率影响甚微，而当浓度增加到 312.50 μmol/L 时，细胞的存活率显著降低(65.34±4.66)%，对 HDFn 细胞损伤效果显著 ($P<0.01$)，表明 HDFn 细胞的存活率受到抑制。故选用 312.50 μmol/L TBHP 作为诱导 HDFn 细胞形成氧化应激早衰模型的最佳浓度。

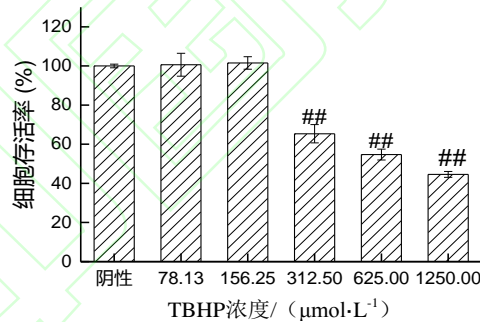


图2 TBHP对细胞存活率的影响
Fig.2 Effects of TBHP on HDFn cell viability

2.3 GLSE 对体外细胞模型的保护作用

利用构建的 TBHP 氧化损伤模型，研究 GLSE 预处理后对氧化损伤的 HDFn 细胞的影响。由图 3 所示，与阴性对照组比较，模型对照组细胞存活率明显下降，细胞存活率为 (62.78±2.98)%，且差异有统计学意义 ($P<0.01$)。质量浓度为 5 g/L 和 10 g/L GLSE 在给药 24 h 后能够显著提高 HDFn 细胞存活率 ($P<0.05$)。以上结果表明，GLSE 能够降低 TBHP 诱导 HDFn 细胞氧化损伤作用。

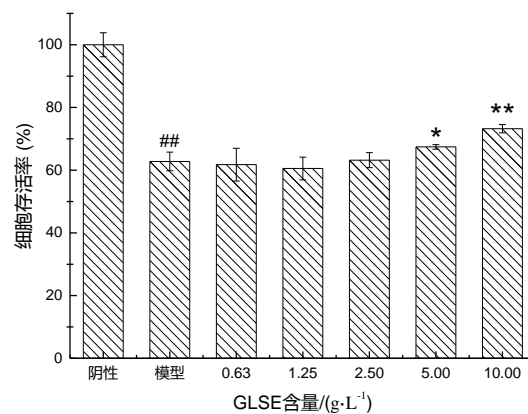


图 3 GLSE 对体外细胞模型的保护作用
Fig.3 Protective effect of GLSE on cell model in vitro

2.4 GLSE 对 HDFn 细胞内 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量影响

SOD 活性、GSH-Px 活性以及 MDA 含量的高低是反映细胞氧化损伤程度的重要指标。SOD 是细胞内重要的抗氧化酶，是细胞防御氧化应激的重要组成部分，能有效清除活性氧自由基，防止脂质过氧化，提升机体的抗氧化能力^[15]。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶，维持机体内部自由基的相对稳定，在保护细胞免受自由基损伤过程中起着关键作用^[16]。ROS 的过量产生和累积致使细胞膜脂质过氧化，产生脂质过氧化产物 MDA，最终引起细胞的氧化损伤或凋亡，故通过 MDA 的含量可间接反映出细胞氧化应激损伤的程度^[17]。

GLSE 对 TBHP 诱导氧化损伤的 HDFn 细胞内 SOD 活力、GSH-Px 活力和 MDA 含量影响的结果如表 2 所示。与阴性对照组比较，模型对照组 SOD 和 GSH-Px 活力明显降低、MDA 含量明显升高，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，说明 TBHP 对 HDFn 细胞具有氧化损伤作用。与模型对照组相比，样品组测试质量浓度 SOD 活力均有升高，随浓度的增大呈上升趋势，10 g/L GLSE 作用 HDFn 细胞后 SOD 活力升高，具有统计学差异 ($P < 0.05$)；与模型对照组相比，2.5、5、10 g/L 质量浓度 GLSE 作用 HDFn 细胞 GSH-Px 活力均显著升高 ($P < 0.01$)，并呈良好的剂量依赖关系；2.5、5、10 g/L 质量浓度 GLSE 作用 HDFn 细胞后 MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。参考刘乔、王冰心、ZHONG 等^[2,18-19]的研究，其中灵芝酸、灵芝多糖、灵芝多糖肽对氧化损伤保护起到主要作用。

综上，GLSE 作用 HDFn 细胞后，能显著提高 TBHP 诱导氧化损伤的细胞内 SOD 和 GSH-Px 活力，抑制脂质的过氧化，显著降低 MDA 含量，对 TBHP 诱导 HDFn 细胞的氧化损伤具有保护作用。

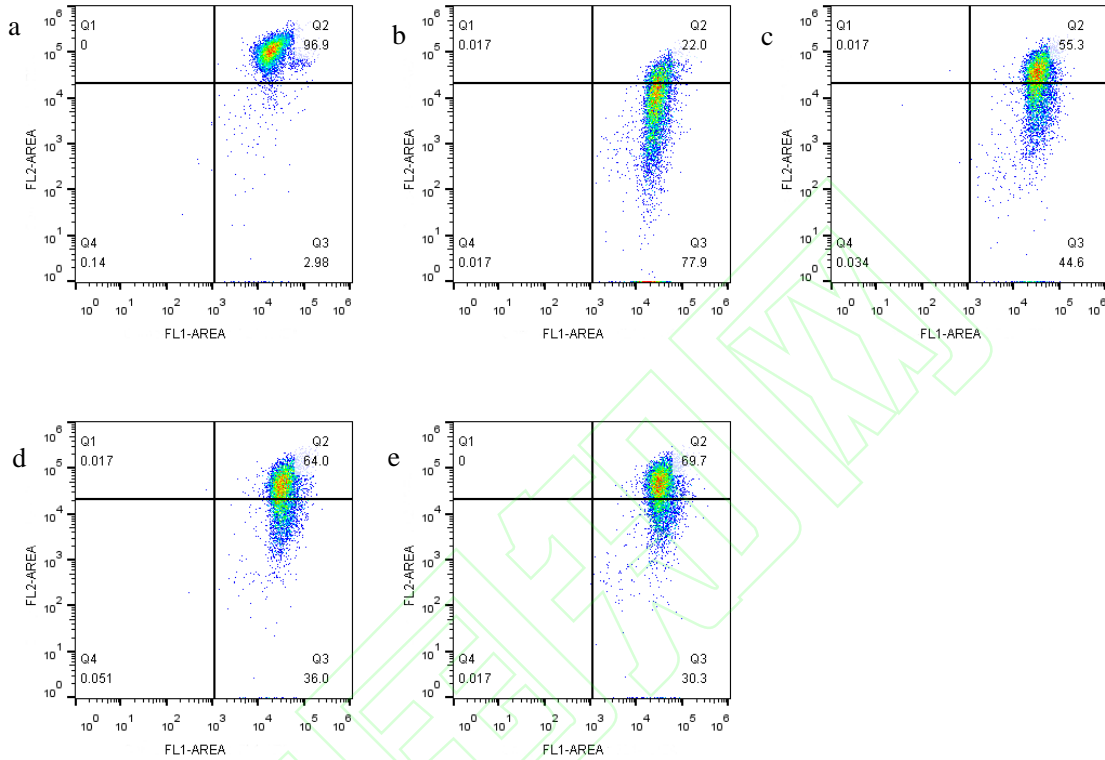
表2 GLSE对HDFn细胞内SOD、GSH-Px活力和MDA含量的影响
Table 2 Effects of GLSE on SOD, GSH-Px activity and MDA content in HDFn cells

| 组别 | SOD/ (U·mg ⁻¹ prot) | GSH-Px/ (U·mg ⁻¹ prot) | MDA/ (μmol·mg ⁻¹ prot) |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 阴性对照 | 16.65±0.20 | 238.78±10.06 | 19.45±3.22 |
| 模型对照 | 13.27±1.66 [#] | 16.09±1.22 ^{##} | 88.91±4.89 ^{##} |
| 2.50 g/L | 14.92±0.45 | 46.40±18.07 [*] | 55.78±5.41 ^{**} |
| 5.00 g/L | 15.47±0.18 | 87.53±10.46 ^{**} | 59.76±7.94 ^{**} |
| 10.00 g/L | 20.60±1.85 [*] | 126.29±19.49 ^{**} | 30.46±4.04 ^{**} |

2.5 GLSE 对细胞线粒体膜电位的影响

线粒体是维持细胞正常功能的重要细胞器，细胞衰老时，线粒体膜电位降低，细胞凋亡增加，加速了细胞的衰老死亡过程^[20]。GLSE 对 HDFn 细胞线粒体膜电位的影响见图 4，与阴性对照相比，

TBHP 模型组能够降低 HDFn 细胞的线粒体膜电位，并且模型组细胞相对荧光值比阴性对照组明显降低 ($P<0.05$)，这表明 TBHP 作用 HDFn 细胞 2 h 后出现了大量细胞凋亡。GLSE 作用 HDFn 细胞后能够增加 TBHP 损伤后的细胞线粒体膜电位，说明 GLSE 能够抑制 TBHP 诱导 HDFn 细胞的线粒体损伤。KOU 等^[21]研究发现灵芝三萜类成分对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞具有保护作用，能够有效的降低线粒体膜电位。



a-阴性对照组; b-模型对照组; c-2.50 g/L; d-5.00 g/L; e-10.00 g/L

图 4 GLSE 对 HDFn 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.4 Effect of GLSE on mitochondrial membrane potential of HDFn cells

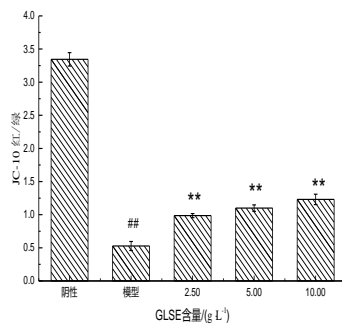


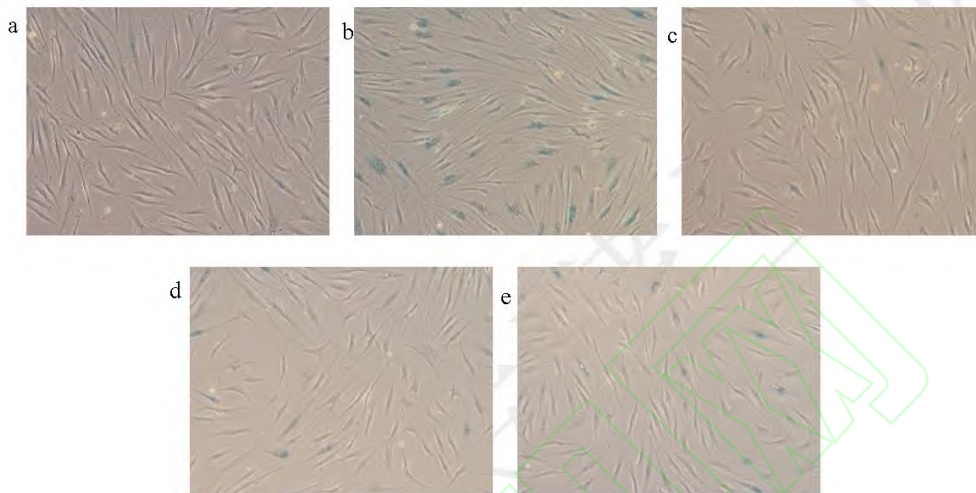
图 5 GLSE 对 HDFn 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.5 Effect of GLSE on mitochondrial membrane potential of HDFn cells

2.6 GLSE 对 HDFn 细胞 β -半乳糖苷酶活性的影响

衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β galactosidase, SA- β -gal) 活性的检测用于识别细胞的衰老状态是目前使用最广泛的方法。模型组中大量的细胞被染成蓝色，即衰老阳性细胞，细胞发

生衰老后,会出现细胞形态学改变、周期阻滞、衰老相关蛋白分子的变化等特点,其中 SA- β -gal 是经典的衰老标志物之一^[22]。结果如图 6 和图 7 所示。模型对照组中 SA- β -Gal 染色率显著升高 ($P<0.01$) ; 当 GLSE 作用 HDFn 细胞后,相比模型对照组 SA- β -Gal 染色率显著降低 ($P<0.01$) 。说明 GLSE 作用 HDFn 细胞后 SA- β -Gal 活性减弱,从而达到延缓衰老的作用。根据邹美圣等^[23]的研究,其中灵芝多糖对血管内皮细胞 SA- β -Gal 活性降低起到关键作用。



a-阴性对照组; b-模型对照组; c-2.50 g/L; d-5.00 g/L; e-10.00 g/L

图 6 GLSE 对 SA- β -Gal 活性的影响图示

Fig.6 Graphical representation of the effect of GLSE on HDFn cells SA- β -Gal activity

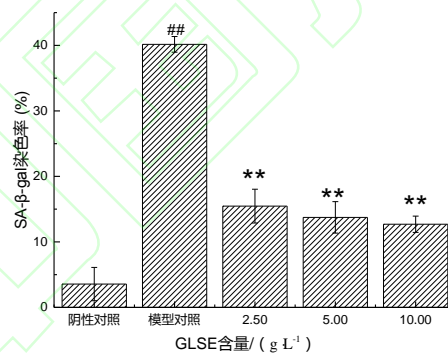


图 7 GLSE 对 HDFn 细胞 SA- β -Gal 活性的影响

Fig.7 Effect of GLSE on HDFn cells SA- β -Gal activity

2.7 GLSE 对 HDFn 细胞 Nrf2/HO-1 mRNA 表达的影响

Nrf2 通路作为重要的内源性抗氧化应激通路,在氧化应激反应应答中起关键作用^[24]。氧化应激状态下 Nrf2 信号通路激活后,启动抗氧化物酶 HO-1 的表达,进而影响机体内各种抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 的活性,在氧化/抗氧化系统中起到重要作用^[25-26]。结果见图 8。与模型组比较,10 g/L 质量浓度 GLSE 作用 HDFn 细胞后 Nrf2 和 HO-1 表达量均显著增加 ($P<0.01$)。说明 GLSE 能够通过激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化应激的保护作用。张佳婵等^[27]研究灵芝菌丝体多糖对人皮肤成纤维细胞氧化应激损伤,发现灵芝多糖抗氧化应激作用与 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路密切相关。

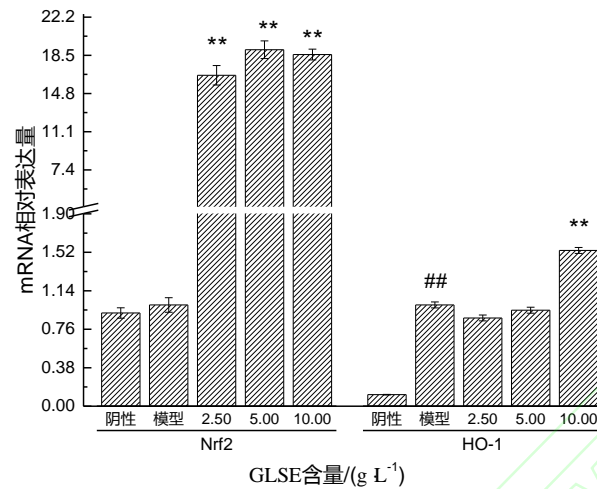


图 8 GLSE 对 HDFn 细胞 Nrf2/HO-1 mRNA 相对表达量的影响
Fig.8 Effect of GLSE on relative Nrf2/HO-1 mRNA expression of HDFn cells

3 结论

(1) 当 GLSE 质量浓度为 10 g/L 及以下时, HDFn 细胞的细胞存活率均超过 70%, 且细胞形态正常, 说明在此质量浓度以下无细胞毒性作用, 此质量浓度范围可用于后续试验。质量浓度为 5 g/L 和 10 g/L 的 GLSE 在作用 24 h 后, 能够明显提高因 TBHP 损伤后的 HDFn 细胞的活性。

(2) GLSE 能够预防 TBHP 诱导氧化损伤, 显著提高细胞内 SOD 和 GSH-Px 活力, 抑制脂质的过氧化, 显著降低 MDA 含量, 从而达到延缓衰老的作用。

(3) GLSE 作用 HDFn 细胞后能够增加 TBHP 损伤后的细胞线粒体膜电位, 进一步说明 GLSE 能够预防并抑制 TBHP 诱导 HDFn 细胞的线粒体损伤。

(4) GLSE 能够降低 SA- β -Gal 染色率, 表明其能有效的抑制 HDFn 细胞中 SA- β -gal 活性的提升, 从而达到抗衰老的作用。

(5) GLSE 作用 HDFn 细胞后, 能缓解 TBHP 诱导的细胞凋亡, 同时 GLSE 能够上调 Nrf2/HO-1 基因 mRNA 表达, 表明 GLSE 对 TBHP 诱导 HDFn 氧化早衰具有保护作用与 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

本研究有助于阐明灵芝孢子粉提取物作为天然产物抗细胞损伤延缓皮肤衰老的作用机制, 为进一步开发抗皮肤衰老保健品的开发以及化妆品等提供了相关理论及实验依据, 具有重要的社会和经济价值。

参 考 文 献

- [1] 姚金福, 赵婉军, 杨波, 等. 灵芝孢子粉对脂多糖诱导的人气道上皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(13): 3 546-3 547.
YAO J F, ZHAO W J, YANG B, et al. Protective effect of Ganoderma lucidum spore powder on lipopolysaccharide-induced human airway epithelial cell injury[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(13): 3 546-3 547.
- [2] 刘乔, 管晓辉, 黄翠菊, 等. GA 的提取分离工艺优化及其体内抗氧化活性作用[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 89-94.
LIU Q, GUAN X H, HUANG C J, et al. Optimized extraction of crude ganoderic acid from Ganoderma lucidum spore and antioxidant effect *in vivo*[J]. Food Science, 2015, 36(24): 89-94.
- [3] 刘春延, 张国财, 程方志, 等. 灵芝孢子粉提取物破壁工艺优化及其抗肿瘤作用[J]. 食品科学, 2016, 37(14): 51-55.
LIU C Y, ZHANG G C, CHENG F Z, et al. Optimization of disruption of Ganoderma lucidum spores and antitumor effect of the broken spores[J]. Food Science, 2016, 37(14): 51-55.
- [4] 杨开, 张雅杰, 张酥, 等. 灵芝孢子粉低聚糖的制备及调节肠道菌群功能研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 37-42.
YANG K, ZHANG Y J, ZHANG S, et al. Preparation of Ganoderma lucidum spore oligosaccharide and its regulation on gut microbiota[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(9): 37-42.
- [5] 刘洋, 覃媚媚, 罗印斌, 等. 灵芝孢子粉提取物孢子主要活性成分及其功能研究进展[J]. 北方园艺, 2020(5): 138-

146.
LIU Y, TAN M M, LUO Y B, et al. Research progress on component and function of *Ganoderma lucidium* spore[J]. Northern Horticulture, 2020(5): 138-146.
- [6] 包县峰, 徐勇, 刘维明, 等. 灵芝孢子粉生物活性成分及药理作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 325-331.
BAO X F, XU Y, LIU W M, et al. Research progress in bioactive ingredients and pharmacological functions of *Ganoderma lucidium* spores[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 325-331.
- [7] 沐华, 蔡铭, 徐靖, 等. 破壁与去壁灵芝孢子粉提取物的化学成分与抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 32-37; 51.
MU H, CAI M, XU J, et al. Comparative analysis of chemical composition and antioxidant activity of sporoderm-removal and sporoderm-broken *Ganoderma lucidium* spore powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(10): 32-37; 51.
- [8] 李萌茹, 周玉枝, 杜冠华, 等. 中药黄酮类化合物抗衰老作用及其机制研究进展[J]. 药学报, 2019, 54(8): 1382-1391.
LI M R, ZHOU Y Z, DU G H, et al. Research progress about the anti-aging effect and mechanism of flavonoids from traditional Chinese medicine[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(8): 1382-1391.
- [9] 刘世柱, 吴欣灿, 胡丽玲, 等. 灵芝破壁孢子粉功效成分提取条件优化及去壁全溶高含量孢子粉的制备[J]. 食药菌, 2021, 29(1): 56-60.
LIU S Z, WU X C, HU L L, et al. Preparation and optimization of extraction conditions of wall-removed and fully soluble high content *Ganoderma lucidium* spore powder[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2021, 29(1): 56-60.
- [10] 赵晶, 李彦杰, 周厚勤, 等. 甲基麦冬黄烷酮 A 降低缺氧复氧诱导 PC12 细胞凋亡及氧化损伤[J]. 中成药, 2020, 42(1): 213-216.
ZHAO J, LI Y J, ZHOU H Q, et al. Methyl Ophiopogon flavanone A reduces the apoptosis and oxidative damage of PC12 cells induced by hypoxia and reoxygenation[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(1): 213-216.
- [11] ISO. Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. 2009.
- [12] SWA B, IMA B, NH C, et al. tBHP treatment as a model for cellular senescence and pollution-induced skin aging[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 190: 111318.
- [13] MANU T M, ANAND T, KHANUM F. Attenuation of cytotoxicity induced by tBHP in H9C2 cells by *Bacopa monniera* and Bacoside A[J]. Pathophysiology, 2018, 25(2):143-149.
- [14] KUČERA O, ENDLICHER R, ROUŠAR T, et al. The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro[J]. Oxidative Medicine & Cellular Longevity, 2014, 2014(5): 752506.
- [15] 刘敏, 刘晓峰, 张苏川, 等. L-茶氨酸抑制 P53/P16 改善 D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞和心肌细胞损伤[J]. 临床心血管病杂志, 2020(1): 79-82.
LIU M, LIU X F, ZHANG S C, et al. L-theanine protects against D-galactose-induced injury of human umbilical vein endothelial cells and cardiomyocytes via inhibiting P53/P16[J]. Journal of Clinical Cardiology, 2020(1): 79-82.
- [16] 孟祥云, 汪永锋, 杨丽霞, 等. 中药多糖抗氧化作用及其机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3504-3509.
MENG X Y, WANG Y F, YANG L X, et al. Research progress on antioxidant mechanism and effects of traditional Chinese medicine polysaccharides[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2018, 33(8): 3504-3509.
- [17] 欧阳健明, 彭花. 植物多糖对细胞氧化损伤的保护和修复作用[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2012, 33(5): 516-523.
OUYANG J M, PENG H. Protective and repairing effects of plant polysaccharides on oxidative damaged cells[J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2012, 33(5): 516-523.
- [18] 王冰心, 钟铭, 卢颖裕, 等. 不同多糖配伍对 H₂O₂ 诱导的皮肤细胞老化的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 57-66; 146.
WANG B X, ZHONG M, LU Y Y, et al. Inhibition of different polysaccharides on H₂O₂-induced skin cell aging[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(9): 57-66; 146.
- [19] ZHONG D D, WANG H K, LIU M, et al. *Ganoderma lucidium* polysaccharide peptides protect kidney from renal ischemia reperfusion injury via counteracting oxidative stress[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2015, 29(S1): 72-73.
- [20] 赵海梅, 杨斌, 成蓓. 衰老血管内皮细胞线粒体膜电位与活性氧的变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(15): 2729-2734.
ZHAO H M, YANG B, CHENG B. Mitochondria membrane potentials and reactive oxygen species of vascular endothelial cells during senescence process[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2013, 17(15): 2729-2734.
- [21] KOU R W, XIA B, WANG Z J, et al. Triterpenoids and meroterpenoids from the edible *Ganoderma resinaceum* and their potential anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptosis activities[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 121: 105689.
- [22] HALL B M, BALAN V, GLEIBERMAN A S, et al. p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli[J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(8): 1867-1884.
- [23] 邹美圣, 刘凌, 刘泽, 等. 灵芝多糖对血管紧张素 II 诱导的血管内皮细胞衰老的干预研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(13): 1386-1387; 1390.
ZOU M S, LIU L, LIU Z, et al. *Ganoderma lucidium* polysaccharides' intervention on the aged endothelial cell induced by angiotensin II [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2012, 21(13): 1386-1387; 1390.
- [24] QAISIYA M, Coda Z C D, BELLAROSA C, et al. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway[J]. Cellular Signalling, 2014, 26(3): 512-520.
- [25] HU T, WEI G, XI M, et al. Synergistic cardioprotective effects of Danshensu and hydroxysafflor yellow A against myocardial ischemia-reperfusion injury are mediated through the Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 38: 83-94.
- [26] 李孟心, 张枫惠, 韩高铨, 等. Nrf2/HO-1 信号通路在人诱导性多能干细胞氧化应激中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(7): 794-802.
LI M X, ZHANG F H, HAN G L, et al. The role of the Nrf2/HO-1 signal pathway in oxidative stress of human induced pluripotent stem cells[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 35(7): 794-802.

- [27] 张佳婵, 邵卿, 王倩, 等. 灵芝菌丝体多糖对人皮肤成纤维细胞氧化应激损伤的防护机制[J]. 食品科学, 2020, 41(13): 174-183.
- ZHANG J C, SHAO Q, WANG Q, et al. Extraction and Purification of Ganoderma lucidum Polysaccharides and Mechanistic Study of Their Protective Effect against Oxidative Stress Injury in Human Skin Fibroblast Cells[J]. Food Science, 2020, 41(13): 174-183.

