

发酵乳杆菌S1荚膜多糖的免疫调节及抗衰老活性

王 坤, 邵孟蝶, 潘禹溪, 李思露, 李梦迪, 赵 婧, 左 锋

Immunomodulatory and Anti-aging Activities of a Capsular Polysaccharide from *Lactobacillus fermentum* S1

WANG Kun, TAI Mengdie, PAN Yuxi, LI Silu, LI Mengdi, ZHAO Jing, and ZUO Feng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024070325>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

植物乳杆菌W1荚膜多糖结构、免疫及抗衰老活性的研究

Structure, Immune and Anti-aging Activities of Capsular Polysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* W1

食品工业科技. 2025, 46(4): 90-99 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030207>

海洋硫酸多糖的免疫调节活性研究进展

Research Progress on Immune Regulation Activities of Marine Sulfate Polysaccharides

食品工业科技. 2025, 46(1): 413-423 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020170>

六堡砖茶多糖制备及其免疫调节活性

Preparation of Polysaccharides from Liubao Brick Tea and Its Immunomodulatory Activity

食品工业科技. 2024, 45(14): 327-334 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070068>

海洋生物活性物质抗衰老作用研究进展

Research Progress on the Anti-aging Effect of Marine Bioactive Substances

食品工业科技. 2021, 42(22): 433-441 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090202>

提取温度对黑果枸杞多糖理化特性及抗氧化、免疫调节活性的影响

Effects of Extraction Temperature on Physicochemical Properties and Antioxidant and Immunomodulatory Activities of Polysaccharides from *Lycium ruthenicum* Murr.

食品工业科技. 2025, 46(3): 60-70 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120353>

鲍鱼多糖的大孔树脂纯化工艺及其免疫调节活性分析

Purification Technology by Macroporous Resin and Immunomodulatory Activity of Abalone Polysaccharide

食品工业科技. 2024, 45(13): 186-194 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080185>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王坤, 邵孟蝶, 潘禹溪, 等. 发酵乳杆菌 S1 荚膜多糖的免疫调节及抗衰老活性 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(12): 360–369. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070325

WANG Kun, TAI Mengdie, PAN Yuxi, et al. Immunomodulatory and Anti-aging Activities of a Capsular Polysaccharide from *Lactobacillus fermentum* S1[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(12): 360–369. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070325

· 营养与保健 ·

发酵乳杆菌 S1 荚膜多糖的免疫调节及抗衰老活性

王 坤^{1,2}, 邵孟蝶¹, 潘禹溪¹, 李思露¹, 李梦迪¹, 赵 婧¹, 左 锋^{1,3,*}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;

2. 黑龙江八一农垦大学国家杂粮工程技术中心, 黑龙江大庆 163319;

3. 粮食副产物加工与利用教育部工程研究中心, 黑龙江大庆 163319)

摘 要: 为探究发酵乳杆菌 S1 荚膜多糖 (capsular polysaccharides, CPS) 的免疫调节及抗衰老活性, 本研究首先测定 CPS 浓度对 RAW264.7 细胞的活力、吞噬活性、酸性磷酸酶活性、NO 和细胞因子分泌水平的影响并评估其免疫调节活性。再以秀丽隐杆线虫为模型, 测定线虫寿命、氧/热应激能力、生殖能力, 来探究 CPS 的抗衰老作用。结果表明, 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 CPS 能提高 RAW264.7 细胞的增殖能力、细胞吞噬率和酸性磷酸酶活力, 并通过上调相关基因表达促进其 NO 及细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的释放 ($P < 0.05$)。与对照相比, CPS 处理组细胞活力、吞噬率和酸性磷酸酶活力最大提升幅度分别达到 58.22%、33.48% 和 39.5%, NO、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的最大分泌水平分别增加 101.29%、31.33%、161.08% 和 79.90%, 从而表现出较好的免疫调节活性。线虫试验表明, 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 CPS 对正常、氧应激和热应激环境下线虫寿命的延长率分别为 19.87%、39.39% 和 29.02%, 显示出良好的抗衰老活性。同时, CPS 有效提高了线虫的生殖能力, 其最高产卵数目较对照组增加了 0.19 倍。RT-qPCR 分析揭示 CPS 是通过协同调控线虫胰岛素信号通路 (*Daf-16* 和 *Sir-2.1*) 和热应激信号通路 (*Hsf-1* 和 *Hsp-16.2*) 发挥抗衰老作用的。以上结果表明 CPS 具有良好的免疫调节活性和抗衰老活性。本研究可以为乳酸菌 CPS 在免疫调节和抗衰老产品中的应用提供理论支撑。

关键词: 乳酸菌, 荚膜多糖, 免疫调节, 抗衰老

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)12-0360-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024070325

本文网刊:



Immunomodulatory and Anti-aging Activities of a Capsular Polysaccharide from *Lactobacillus fermentum* S1

WANG Kun^{1,2}, TAI Mengdie¹, PAN Yuxi¹, LI Silu¹, LI Mengdi¹, ZHAO Jing¹, ZUO Feng^{1,3,*}

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

3. Engineering Research Center for Processing and Utilization of Grain By-products, Ministry of Education, Daqing 163319, China)

Abstract: To investigate the immunomodulatory and anti-aging activities of capsular polysaccharides (CPS) from *Lactobacillus fermentum* S1, this study first determined the effects of CPS concentration on the viability, phagocytic activity, acid phosphatase activity, NO production, and cytokine secretion levels in RAW264.7 cells, and evaluated its

收稿日期: 2024-07-24

基金项目: 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (YQ2021C029)。

作者简介: 王坤 (1987-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: wangkun6zzu@126.com。

* 通信作者: 左锋 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物蛋白及农副产品加工利用, E-mail: zuofeng-518@126.com。

immunomodulatory activity. Subsequently, using *Caenorhabditis elegans* as a model, the effects of CPS on *C. elegans* lifespan, oxidative/heat stress resistance, and reproductive capacity were assessed to explore its anti-aging properties. The results indicated that within the range of 25~200 $\mu\text{g/mL}$, CPS significantly enhanced cell proliferation ability, phagocytosis rate, and acid phosphatase activity in RAW264.7 cells, and promoted the release of NO and cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α by up-regulating the expression of related genes ($P<0.05$). Compared to control group, the maximum increase in cell viability, phagocytosis rate, and acid phosphatase activity in the CPS-treated group reached 58.22%, 33.48%, and 39.5%, respectively. The maximum secretion levels of NO, IL-6, IL-1 β , and TNF- α increased by 101.29%, 31.33%, 161.08%, and 79.90%, respectively, demonstrating good immunomodulatory activity. The *C. elegans* experiment showed that treatment with 50 $\mu\text{g/mL}$ CPS extended lifespan of *C. elegans* under normal, oxygen-stressed, and heat-stressed conditions by 19.87%, 39.39%, and 29.02%, respectively, suggesting strong anti-aging activity. CPS also effectively improved the RT-qPCR analysis revealed that CPS exerted its anti-aging effect through co-regulation of insulin signaling pathway (*Daf-16* and *Sir-2.1*) and heat shock signaling pathway (*Hsf-1* and *Hsp-16.2*) in *C. elegans*. These findings indicate that CPS possesses good immunomodulatory and anti-aging activities. This study provides theoretical support for the application of CPS produced by lactic acid bacteria in immunoregulation and anti-aging products.

Key words: lactic acid bacteria; capsular polysaccharide; immune regulation; anti-aging

乳酸菌作为公认的益生菌,因其可延长食品贮存期、赋予食品特殊的风味和质构特性而被广泛应用于发酵食品中^[1]。同时,乳酸菌也被应用在动物生产中,以改善家禽的健康状况,并促进它们的生长和繁殖^[2]。在动物体内,乳酸菌具有提高机体抗氧化能力^[3]、抗菌^[4]和抗肿瘤^[5]等生理功能。研究显示,乳酸菌的上述功能可能与其次级代谢产物胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)有关^[6-7]。EPS可分为附着在菌体细胞表面的荚膜多糖(CPS)和释放到周围环境中的释放多糖(released polysaccharides, RPS)^[8]。大量研究表明乳酸菌EPS具有抗肿瘤、抗氧化、降胆固醇和免疫调节等多种生物活性^[9]。然而,目前国内外对乳酸菌EPS生物活性的研究还主要集中于RPS^[10],关于其CPS生物活性的研究仍然很缺乏。

在过去的几十年中,免疫调节一直是多糖生物活性研究的热点之一^[11]。巨噬细胞作为主要的先天免疫细胞,在维持体内稳态中起着关键作用^[12]。多糖可以通过刺激巨噬细胞增殖、增强吞噬作用、促进NO和细胞因子的分泌等来发挥免疫调节活性。许多研究已经证实了乳酸菌RPS的免疫调节潜力。例如:Wang等^[13]发现植物乳杆菌JLAU103的RPS能提高巨噬细胞的吞噬能力,并促进其IL-6、TNF- α 和NO的释放;瑞士乳杆菌LZ-R-5的RPS可促进RAW264.7细胞TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的分泌^[9],此外,戊糖乳杆菌LZ-R-17的RPS也被发现能提高RAW264.7细胞TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-10的分泌水平^[14]。因此,乳酸菌多糖具有充当有效免疫调节剂的潜力。然而,到目前为止,关于乳酸菌CPS免疫调节活性的研究还很少。同时,随着全球老龄化人口比例不断升高,老龄化带来的健康和社会问题已逐渐成为人们关注的重点^[15]。寻找安全有效的减缓衰老的益生产品或药物已成为当前研究的一个热点^[16-17]。秀丽隐杆线虫寿命周期短,体积小,繁殖率高,易于培养,与人类基因组同源性高^[18],是抗衰老研究重要的模型生物。大量利用秀丽隐杆线虫为模型

的研究揭示一些植物源多糖具有良好的抗衰老活性,例如:黄精多糖可以通过调控胰岛素信号通路对秀丽隐杆线虫产生抗衰老作用,达到延长线虫寿命的效果^[19]。黄萱草多糖在正常条件和热应激条件下均能延长线虫寿命,并具有较强的体内抗氧化活性^[20]。但关于微生物源,尤其是乳酸菌源多糖对线虫寿命影响的相关研究依然较少。利用线虫探索CPS的生物活性不仅可以增进对乳酸菌CPS的认知,而且比体外化学反应和细胞实验更具说服力。

基于上述背景,本研究拟对前期获得的发酵乳杆菌S1 CPS的免疫调节和抗衰老活性展开研究。该CPS的平均分子量为 7.19×10^5 Da,其主链由 α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3), α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2), α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3), β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3), β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2)和 β -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3,4)残基构成,末端为 α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 残基)。同时,CPS表现出较好的体外抗氧化能力,并能显著提高线虫总抗氧化能力和超氧化物歧化酶活力,降低丙二醛含量^[21]。为进一步探究其生物活性,本实验通过测定RAW264.7细胞的细胞活力、吞噬活性、酸性磷酸酶活性、NO分泌量、细胞因子的分泌水平及mRNA表达量来评估CPS的免疫调节能力;并选择秀丽隐杆线虫为生物模型,通过测定CPS对线虫寿命、抗氧/热应激能力、生殖能力及衰老相关基因表达的影响,探究其抗衰老作用及机制。本研究将有助于进一步揭示CPS在乳酸菌健康功效中发挥的作用,并为乳酸菌CPS在功能性食品或药品中的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

细胞培养级二甲基亚砜、胰蛋白酶消化液(0.25%)、二苯基四氮唑溴盐(MTT, $\geq 98\%$)、青/链霉素(10000 U/mL和10 mg/mL) 北京索莱宝科技有限公司;脂多糖(LPS, $\geq 99\%$) 美国西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)公司;特级胎牛血清 美国克拉克生物科技(Clark-Bioscience)有限公司;中性红

染色液(0.33%)、酸性磷酸酶试剂盒 碧云天生物科技有限公司; NO 试剂盒 南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子(TNF- α)、细胞白介素(IL-1 β 、IL-6)试剂盒 上海朗顿生物技术有限公司; Trizol 试剂

上海碧云天生物技术有限公司; 反转录试剂盒 艾德来生物公司; 引物 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2 $\times$ SYBR[®] Green 荧光染料 湖南一诺唯真科技有限公司; 蛋白胨、氯化钠、硫酸镁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等 均为国产分析纯; 发酵乳杆菌 S1 (Genbank 登录号: MK226442) 本实验室分离自富源泡菜^[22], 采用甘油保藏法冻存于-20 ℃ 中; 小鼠单核巨噬细胞 RAW246.7 中国科学院上海细胞库; 秀丽隐杆线虫 N2 野生型及基因敲除型大肠杆菌 OP50 菌株 美国秀丽隐杆线虫遗传学中心; NGM 培养基、M9 缓冲液 参照张娟梅^[23]的方法配制。

VICTOR NIVO[™] 发光酶标仪 美国 Perkin-Elmer 公司; qTOWER³ 型荧光定量 PCR 仪 德国耶拿公司; CBS-170 CO₂ 培养箱 德国 Binder 公司; LRH-150 生化培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; H1650 离心机 上海湘仪; Scandrop100 超微量核酸蛋白测定仪、EASCYCLER 96 普通 PCR 仪 德国耶拿公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CPS 免疫活性的研究

1.2.1.1 细胞培养 将 RAW264.7 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 完全培养基中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。每 2~3 d 传代一次以保持细胞处于对数生长期^[9]。

1.2.1.2 细胞活力 采用 MTT 法测定 CPS 对 RAW 264.7 细胞增殖活性的影响^[14]。将 100 μ L 细胞密度为 2 $\times$ 10⁵ 个/mL 的细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后弃去培养液, 然后用 100 μ L 含有不同浓度(25~400 μ g/mL) CPS 的培养基预处理细胞, 每组设置 4 个重复。对照组在不含 CPS 的培养基中进行培养。空白组为未接种细胞的培养基, 24 h 后弃去培养基, PBS 清洗 3 次后, 每孔加入 100 μ L MTT (1 mg/mL) 溶液, 37 ℃ 孵育 4 h, 弃去上清液后每孔加入 100 μ L DMSO 溶液, 轻微振荡以溶解蓝色结晶。室温静置 10 min 后, 使用酶标仪在 570 nm 处测定其吸光度(OD 值)。细胞活力计算公式如下:

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

1.2.1.3 细胞吞噬活性 采用中性红摄取法评价 CPS 对细胞吞噬作用的影响^[12]。细胞培养 24 h 后弃去上清液, 按照 1.2.1.2 中的方法设置对照组、样品组、空白组, 阳性对照组为 1 μ g/mL 的 LPS, 每组设置 4 个重复。培养 24 h, 弃去上清后每孔加 100 μ L 0.1% 中性红溶液静置 30 min 染色, 染色完成后弃去

染液并用 PBS 冲洗 3 次, 用 100 μ L 裂解缓冲液(冰醋酸:乙醇=1:1, v/v)室温作用 1 h 裂解细胞, 在 540 nm 处测定其吸光度。中性红吞噬率计算公式如下:

$$\text{中性红吞噬率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{样品组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.1.4 酸性磷酸酶活性 按照 1.2.1.2 中的方法设置对照组和样品组, 细胞预处理 24 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 40 μ L 的 Triton X-100(1%)置于 37 ℃ 孵育 10 min 以溶解细胞, 然后按照试剂盒说明书进行操作, 在 405 nm 处测定其吸光度值^[24]。酸性磷酸酶活性计算公式如下:

$$\text{酸性磷酸酶活性指数} = \frac{\text{OD}_{\text{样品组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \quad \text{式(3)}$$

1.2.1.5 NO 释放量 细胞预处理 24 h 后, 每孔吸取 50 μ L 培养基至 96 孔板中, 按照 NO 检测试剂盒说明书进行 NO 释放量的测定。

1.2.1.6 细胞因子分泌水平 细胞预处理 24 h 后, 每孔吸取 100 μ L 培养基至 96 孔板中, 依照 ELISA 试剂盒(IL-6、TNF- α 、IL-1 β)说明书进行细胞因子释放量的测定。

1.2.1.7 RAW264.7 细胞中 mRNA 的表达 参考 Wang 等^[25]的方法并略作调整, 对 RAW264.7 细胞相关细胞因子 mRNA 表达量进行测定。将 2 mL 细胞密度为 2 $\times$ 10⁵ 个/mL 的细胞悬液接种于 6 孔板中培养 24 h 后, 再分别用含 0 μ g/mL 和 100 μ g/mL CPS 的 DMEM 培养基培养 24 h, PBS 清洗两次后, 采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 并使用全波长紫外/可见光扫描分光光度计测定 RNA 的浓度, 按照反转录试剂盒说明书进行反转录, 采用 qTOWER3 型荧光定量 PCR 仪测定各组细胞中 iNOS、COX-2、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的 CT 值。PCR 反应体系总体积为 20 μ L, 体系组分包括 2 $\times$ SYBR[®] Green 10 μ L、上下游引物各 1 μ L、cDNA 模板 2 μ L、DEPC H₂O 6 μ L。反应条件为: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 10 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 共 39 个循环。引物由生工生物工

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers for fluorescent quantitative PCR

引物名称	引物序列
IL-6	5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'(forward) 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA-3'(reverse)
TNF- α	5'-AGCACAGAAAGCATGATCCG-3'(forward) 5'-CTGATGAGAGGGAGGCCATT-3'(reverse)
iNOS	5'-CATGCTACTGGAGGTGGGTG-3'(forward) 5'-CATTGATCTCCGTGACAGCC-3'(reverse)
COX-2	5'-TGCTGTACAAGCAGTGGCAA-3'(forward) 5'-GCAGCCATTTCCTTCTCTCC-3'(reverse)
β -actin	5'-ATCACTATTGGCAACGAGCG-3'(forward) 5'-TCAGCAATGCCTGGGTACAT-3'(reverse)
IL-1 β	5'-TGACAAACGGTCAGAAGCAG-3'(forward) 5'-CGTCTTGCCCAAGGTTGTAG-3'(reverse)

程(上海)有限公司合成,以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法进行数据分析,以得到目的基因的 mRNA 相对表达量,目的基因引物序列见表 1。

1.2.2 CPS 抗衰老活性的研究

1.2.2.1 线虫的培养和同期化 将线虫置于涂有大肠杆菌 OP50 菌膜的 NGM 平板上 23 ℃ 恒温培养,并每天转移至新的 NGM 平板上进行传代。培养至成虫即可进行同期化实验。同期化操作之前先用 M9 缓冲液将线虫冲洗下来,置于 1.5 mL 离心管中,1300 r/min 条件下离心 1 min,弃去上清液,重复操作 3~5 次。然后依次加 600 μ L M9 缓冲液、100 μ L 0.5 mol/L NaOH 和 200 μ L 次氯酸钠(有效氯含量 10%),涡旋振荡 3~5 min 至虫体完全裂解,置于 2000 r/min 条件下离心 1 min,弃去上清,经 M9 缓冲液反复清洗后,将虫卵转移到 NGM 平板上于 23 ℃ 培养 48 h 后可得到同期化后的 L4 期成虫^[23]。

1.2.2.2 线虫寿命调控 将同期化的 L4 期线虫分别转移到含 25、50 和 100 μ g/mL CPS 的 NGM/OP50 (含终浓度为 50 μ mol/L 5-氟尿嘧啶)平板,以不含多糖的 NGM 平板为对照。每个平板约 40 条线虫,每组样品做 3 个平行。置于 23 ℃ 培养箱中培养,每天将存活的线虫转移至新的平板上,并详细记录线虫的死亡数目^[19]。

1.2.2.3 线虫氧化应激实验 采用叔丁基过氧化氢(tBHP)法^[23]来评价线虫的氧化应激能力。将 CPS 预处理 4 d 的线虫转移至含 15 mmol/L tBHP 的 NGM/OP50(含终浓度为 50 μ mol/L 5-氟尿嘧啶)平板上于 23 ℃ 条件下继续培养,每天更新一次平板,每 2 h 对线虫的死亡情况进行一次计数。每组样品做 3 个平行,每个平行约 40 条线虫。

1.2.2.4 线虫热应激实验 将同期化的 L4 期线虫分别转移到含 25、50 和 100 μ g/mL CPS 的 NGM/OP50 平板(含终浓度为 50 μ mol/L 5-氟尿嘧啶),以不含多糖的 NGM 平板为对照,于 23 ℃ 培养 4 d,每天更换一次平板,每组样品做三个平行,每个平板大约 40 条线虫。然后将平板移至 35 ℃ 条件下继续培养,每 2 h 记录一次死亡线虫的数目^[20]。

1.2.2.5 线虫生殖能力 将 5 条同期化的 L4 期线虫转移到含 25、50 和 100 μ g/mL CPS 的 NGM 平板上,以不含多糖的 NGM 平板为对照,于 23 ℃ 条件下连续培养,每天挑取线虫至新的平板,并将替换下来的平板继续培养 24 h 后,统计长出虫体的数量即为线虫前一天的产卵数,连续观察直至产卵数目为零^[23]。

1.2.2.6 线虫体内寿命相关基因的表达 将同期化后生长至 L4 期成虫期的线虫转移到含 50 μ g/mL CPS 的 NGM/OP50(含终浓度为 50 μ mol/L 5-氟尿嘧啶)平板,以不含多糖的 NGM 平板为对照。每天更换一次平板,在 23 ℃ 下培养 4 d,用 M9 将线虫冲

洗至 1.5 mL 离心管中,保证每管中虫体量为 500~600 条,每个样品做三组平行。将线虫置于液氮冷冻后研磨,采用 RNA 提取试剂盒提取线虫总 RNA,并使用超微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 的浓度,按照反转录试剂盒说明书进行反转录,采用荧光定量 PCR 仪测定各组线虫中相关基因的 CT 值。PCR 反应体系总体积为 10 μ L,体系组分包括 2 $\times$ SYBR® Green Supermix 5 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、cDNA 模板 1 μ L、ddH₂O 3 μ L。反应条件为:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,共 39 个循环。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,以 *hgapd-1* 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析,引物序列参照表 2。

表 2 荧光定量 PCR 引物序列
Table 2 Primers for fluorescent quantitative PCR

引物名称	引物序列
<i>hgapd-1</i>	5'-ACTGGCGAAGGTTATCAATG-3'(forward) 5'-TTCTGGGTTGCGGTAC-3'(reverse)
<i>Daf-2</i>	5'-ATAATAGTCAACAAGTCAAC-3'(forward) 5'-ACATCTCGTCATAACAAT-3'(reverse)
<i>Daf-16</i>	5'-TCCAAGTGATATTGTTGATAGA-3'(forward) 5'-CGACTCCTGCTTAATCTG-3'(reverse)
<i>Sir-2.1</i>	5'-GATACATTAGAGCATCAGACT-3'(forward) 5'-CTTCCTCACGAATCTCATT-3'(reverse)
<i>Skn-1</i>	5'-AGATGTCATTAAGCGAGTT-3'(forward) 5'-CAGCAACCTTGTTCTTTC-3'(reverse)
<i>Ctl-1</i>	5'-GGTGATGTTCTCTACTC-3'(forward) 5'-GATTTCCCTCCTTGTTGA-3'(reverse)
<i>Hsp-16.2</i>	5'-CTATCAATCCAAGGAGAACAAAG-3'(forward) 5'-GCACCAACATCTACATCTTC-3'(reverse)
<i>Hsf-1</i>	5'-ATGGAGGATAAGATGAATAAGC-3'(forward) 5'-TGTTGTTGACGCATTGAG-3'(reverse)

1.3 数据处理

每组实验至少重复 3 次,实验数据以(平均值 $\pm$ 标准差)形式表示。采用 Origin 2019 软件绘制图表,利用 SPSS 25.0 软件进行数据统计学处理,使用 Duncan's ANONA 进行多重比较,显著差异水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 CPS 免疫活性分析

2.1.1 细胞活力 RAW264.7 细胞被广泛应用于多糖免疫活性研究中,它不仅在启动先天性免疫反应方面发挥着独特的作用,还能通过增加增殖、吞噬、NO 生成和细胞因子分泌来对抗感染和炎症^[26]。为了确定 CPS 对细胞免疫调节能力的影响,首先采用 MTT 法评估 CPS 对 RAW264.7 细胞活力的影响。如图 1 所示,当样品浓度为 0~100 μ g/mL 时,RAW 264.7 细胞的活力呈现出剂量效应关系增强($P<0.05$)。100 μ g/mL CPS 作用细胞的活力达到最高,与对照组相比提高了 58.22%。当浓度升至 400 μ g/mL 时,细胞活力显著减弱($P<0.05$),说明 CPS 浓度过高会对巨噬细胞有一定的毒性。大量研究已证实乳酸菌 EPS 具有较高的生物安全性。如 Wang 等^[27]发现从 *L. plantarum* JLK0142 分离的 EPS(EPS0142)

在浓度范围为 50~1000 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 RAW264.7 细胞无毒性作用。从植物乳杆菌 KX041 分离得到的三个 EPS 组分在 100~400 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内均能促进 RAW264.7 的增殖^[28]。根据细胞活力测定结果,本研究选取 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围进行后续实验。

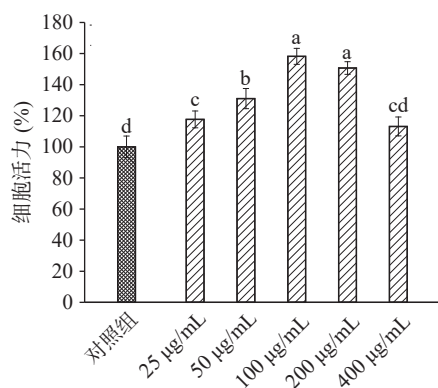


图1 CPS对RAW264.7细胞活力的影响

Fig.1 Effects of CPS on cell viability in RAW264.7 cells

注:不同字母代表差异显著($P < 0.05$),图2~图5同。

2.1.2 细胞吞噬活性 巨噬细胞可以通过吞噬作用清除受损细胞和病原体,维持机体内稳态,因此吞噬活性可以在一定程度上反映机体免疫功能的状态^[29]。本实验采用中性红法研究 CPS 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响。CPS 对巨噬细胞吞噬中性红能力的影响如图 2 所示:与对照组相比,经 CPS (50~200 $\mu\text{g/mL}$)刺激后,RAW264.7 细胞的吞噬活性显著增强($P < 0.05$),并呈现先增高后降低的趋势,最高吞噬率与对照组相比提升了 33.48%。其他多糖如黑根霉胞外多糖(EPS1-1)在浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,巨噬细胞的吞噬活性显著增强($P < 0.05$),与对照组相比提升了 20.41%^[26]。蛹虫草多糖在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 下以剂量依赖方式增强 RAW264.7 细胞的吞噬活性,最大提升率为 21.92%^[30],这些多糖都被证实能够增强巨噬细胞的吞噬活性。

2.1.3 酸性磷酸酶活性 酸性磷酸酶是巨噬细胞的

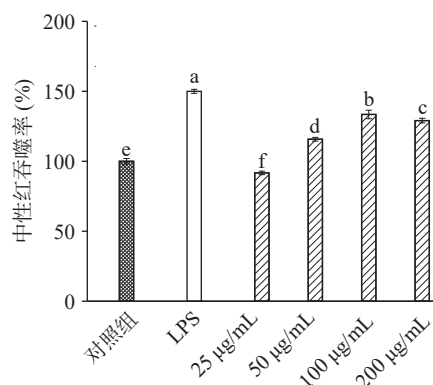


图2 CPS对RAW264.7细胞吞噬活性的影响

Fig.2 Effects of CPS on cytophagocytosis activity in RAW264.7 cells

一种标记酶,在巨噬细胞吞噬过程中起着非常重要的作用。酸性磷酸酶的活性会随着巨噬细胞的激活而升高^[31]。如图 3 所示,LPS 组巨噬细胞酸性磷酸酶指数显著高于其他组($P < 0.05$)。与对照组相比,样品组巨噬细胞酸性磷酸酶活性随 CPS 浓度升高而显著增强($P < 0.05$),当样品浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,酸性磷酸酶活性指数最高,达到 1.395,与对照组相比提升了 39.5%。而高剂量组(200 $\mu\text{g/mL}$)酸性磷酸酶指数有所下降,但仍高于对照组,说明高浓度样品可能会抑制酸性磷酸酶活性。这与 Rajoka 等^[24]的研究结果相似,他们的研究也发现植物乳杆菌 MM89 的 EPS 通过增强巨噬细胞酸性磷酸酶活性而显示出较强的免疫调节活性。

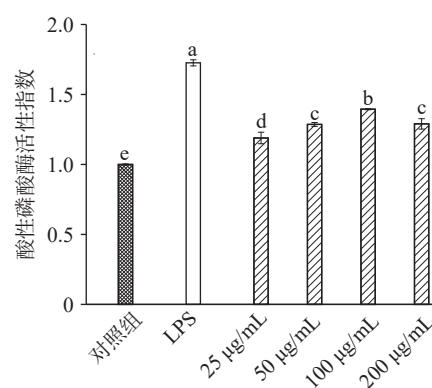


图3 CPS对RAW264.7细胞酸性磷酸酶活性的影响

Fig.3 Effects of CPS on acid phosphatase activity in RAW264.7 cells

2.1.4 NO 释放量 NO 在免疫系统中起着关键作用,机体通过调节 NO 的水平以维持体内平衡。适当水平的 NO 有助于有效防御入侵的微生物^[32]。由图 4 可知,与对照组相比,随着 CPS 浓度的升高,巨噬细胞的 NO 释放量呈阶梯式增长($P < 0.05$),并在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最大值 $20.989 \pm 0.402 \mu\text{mol/L}$,释放量增长了 101.29%。赵彪希等^[33]发现,当冬虫草多糖(FCSP)在浓度同样为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,RAW 264.7 细胞 NO 释放量最高,达到为 $12.75 \mu\text{mol/L}$ 。Cui 等^[34]也证实了经 40 $\mu\text{g/mL}$ 的白灵菇多糖 PN-S

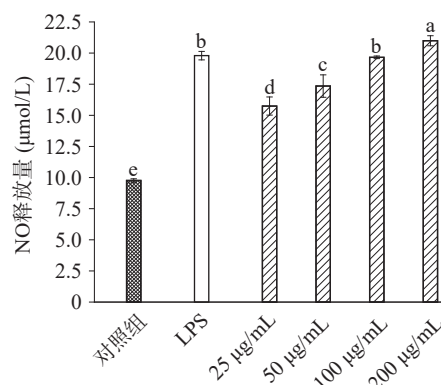


图4 CPS对RAW264.7细胞NO分泌的影响

Fig.4 Effects of CPS on NO secretion in RAW264.7 cells

处理后的 RAW264.7 细胞的 NO 分泌量显著高于对照组,并且可将 NO 的分泌量提升 43.30%。以上结果表明 CPS 可以通过刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 来增强细胞的免疫调节能力。

2.1.5 细胞因子分泌水平 活化的巨噬细胞可通过分泌 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等细胞因子参与免疫反应来抑制多种外来病原体入侵^[35]。为探究 CPS 对 RAW264.7 细胞细胞因子分泌情况的影响,使用 ELISA 试剂盒检测不同浓度 CPS 对细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的分泌水平影响,结果如图 5(A)~图 5(C)所示,与对照组相比,除 25 μ g/mL 组的 TNF- α 外,其他细胞因子的分泌水平均显著增加 ($P<0.05$)。当样品浓度为 200 μ g/mL 时,IL-1 β 的分泌量达到最大值,为 62.57 ± 5.81 pg/mL,比对照组增加了 161.08%。IL-6 和 TNF- α 的分泌量在 CPS 浓

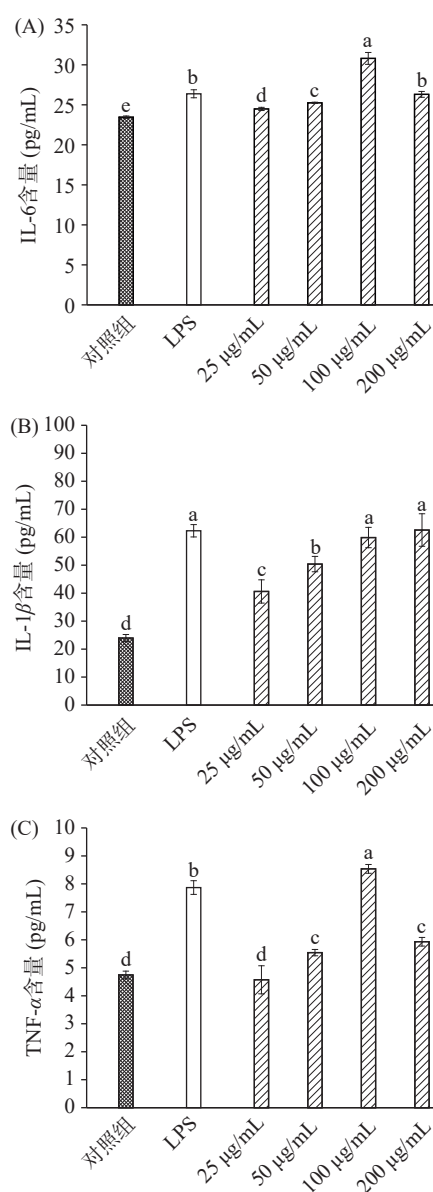


图 5 CPS 对 RAW264.7 细胞 IL-6(A)、IL-1 β (B) 和 TNF- α (C)分泌量的影响

Fig.5 Effects of CPS on secretion of IL-6 (A), IL-1 β (B) and TNF- α (C) in RAW264.7 cells

度为 100 μ g/mL 时达到最大值,分别为 30.81 ± 0.74 pg/mL 和 8.54 ± 0.16 pg/mL,与对照组相比分别增加了 31.33% 和 79.90%。以上结果表明,CPS 可以促进巨噬细胞因子的分泌,从而发挥免疫调节作用。这一结果与 Tian 等^[36]的报道一致,在他们的研究中,从蝉拟青霉 TJJ1213 菌丝体中提取的 EPS 能提高巨噬细胞的细胞活力,增强吞噬作用,促进 NO 的产生,提高炎症细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的表达。此外,从西藏开菲尔颗粒中分离出的副干酪乳杆菌 GL1 的 EPS 也能提高 RAW264.7 细胞的活力,并通过增强吞噬作用、增加 NO 释放和促进细胞因子的产生,来发挥免疫调节作用^[25]。

2.1.6 RAW264.7 细胞中 mRNA 的表达 iNOS 和 COX-2 是免疫刺激下 RAW264.7 巨噬细胞合成 NO 和 PGE2 的两个关键酶。NO 和 PGE2 的释放量表明巨噬细胞在免疫刺激下的活化程度。巨噬细胞通过分泌 NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等免疫细胞因子,在宿主对抗病原微生物和其他外来物质入侵的免疫应答中发挥重要作用^[37]。本实验采用 RT-qPCR 方法检测了 iNOS、COX-2 和相关细胞因子的 mRNA 表达水平。结果如图 6 所示,与对照组相比,CPS 在 mRNA 水平上极显著上调了 iNOS、COX-2、IL-1 β 和 IL-6 的基因表达 ($P<0.01$)。但 TNF- α 的 mRNA 表达量与对照组相比并不显著 ($P>0.05$)。经 CPS 处理后的巨噬细胞的 iNOS、COX-2、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 平均表达量分别为对照组的 1.49、1.99、1.28、1.16 和 2.93 倍。这表明 CPS 是通过上调巨噬细胞 iNOS、COX-2、IL-1 β 和 IL-6 基因的表达促进免疫刺激介质 NO、L-1 β 和 IL-6 的产生。Teng 等^[38]也发现大肠杆菌 K5 的 CPS 能够诱导 RAW264.7 细胞 iNOS 的表达并促进 TNF- α 和 IL-1 β 等细胞因子的释放,从而表现出较强的免疫调节活性。

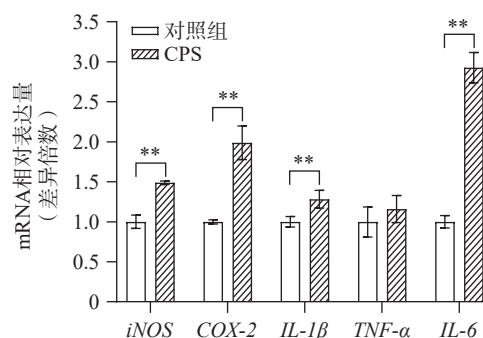


图 6 CPS 对 RAW264.7 细胞 mRNA 相对表达量的影响

Fig.6 Effect of CPS on mRNA relative expression in RAW264.7 cells

注: * $P<0.05$ 表示差异显著, ** $P<0.01$ 表示差异极显著, 图 10、图 11 同。

多糖免疫调节活性与其分子量、单糖组成、糖苷键等结构特征密切相关^[39]。分子量在 10~1000 kDa 之间的多糖通常被认为具有良好的免疫调节活

性^[14]。研究还表明,由 α -葡萄糖或 α -甘露糖组成的多糖可能由于更易被 Toll 样受体 4(TLR4)或 TLR2 识别而对巨噬细胞表现出更好的免疫调节活性^[36]。此外,分支结构也可能有助于多糖的生物活性^[40]。本研究中,发酵乳杆菌 S1 CPS 的分子量为 7.19×10^5 Da,糖链中含有 α -葡萄糖和 α -甘露糖,并具有分支结构,这可能是其具有良好免疫调节活性的主要原因。

2.2 CPS 的抗衰老活性研究

2.2.1 CPS 对线虫寿命的影响 CPS 对秀丽隐杆线虫寿命的影响如图 7 所示。根据寿命生存曲线图可以看出,CPS 处理组线虫的生存曲线都发生了不同程度的右移,说明各浓度的 CPS 都能延长线虫的寿命。寿命延长效果随 CPS 浓度的增大呈先升高后降低的趋势。与对照组寿命(9.58 ± 0.28 d)相比,实验组线虫的寿命分别增加到 9.69 ± 0.27 d、 11.49 ± 0.27 d 和 10.01 ± 0.26 d。其中 $50 \mu\text{g/mL}$ 样品处理的线虫生存曲线右移程度最明显,比对照组线虫平均寿命延长了 19.87%,而 $25 \mu\text{g/mL}$ 和 $100 \mu\text{g/mL}$ 的 CPS 处理线虫寿命延长效果则不明显,仅延长了 1.15% 和 4.48%。有报道称,山茱萸多糖在实验浓度范围内对线虫寿命的延长效果也呈现了先增加后降低的趋势,当浓度为 $150 \mu\text{g/mL}$ 时,线虫的平均寿命延长率最高,达到了 26.74%^[41],这一效果略高于本实验结果。三七多糖在浓度为 $250 \mu\text{g/mL}$ 时对线虫寿命延长效果最明显,但仅延长了 7.78%^[42]。不同多糖对线虫寿命延长效果不同可能与其结构差异有关。

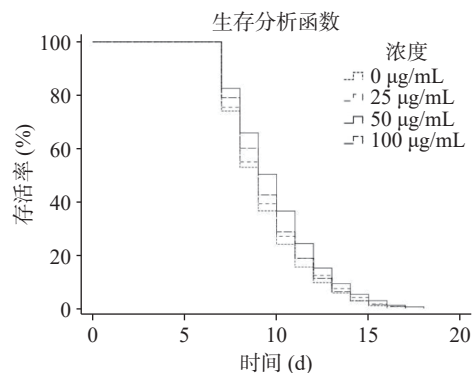


图 7 不同浓度 CPS 处理线虫的生存曲线

Fig.7 Survival curves of *C. elegans* treated with different concentrations of CPS

2.2.2 CPS 对线虫氧化应激的影响 过量诱导的氧化应激会导致生物体细胞结构及分子功能损伤,具有抗氧化活性物质可缓解氧化应激造成的机体损伤^[43]。如图 8 所示,在叔丁基过氧化氢诱导的氧化应激环境下,随着 CPS 浓度的增加,线虫的生存曲线均发生了明显的右移,与对照组线虫的平均寿命(4.24 h)相比,实验组线虫的平均寿命分别增加至 4.70 、 5.91 和 5.03 h,分别延长了 10.80%、39.39%、18.58%,寿命延长效果显著($P < 0.05$)。这一结果说明 CPS 可以增强线虫抵御氧化应激的能力。Zhu

等^[44]也以秀丽隐杆线虫为模型,分析了 $200 \mu\text{g/mL}$ 金银花多糖对百草枯诱导的氧化应激环境下线虫的存活率的影响,结果表明金银花多糖对线虫有明显的保护作用,在氧化应激条件下线虫的平均寿命延长了 16.76%,这一效果低于本实验的结果。发酵乳杆菌 S1 的 CPS 对线虫显示出较强的氧化应激保护能力可能与其较强的抗氧化活性有关^[21]。

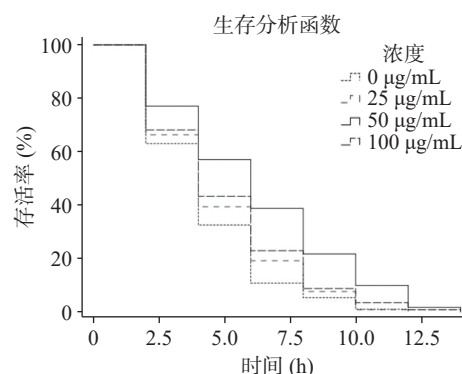


图 8 不同浓度 CPS 处理线虫氧化应激环境下的生存曲线
Fig.8 Survival curves of *C. elegans* treated with different concentrations of CPS under oxidative stress environment

2.2.3 CPS 对秀丽隐杆线虫热应激的影响 秀丽隐杆线虫在高温环境下的抗逆能力是验证其抗衰老能力的一个重要指标,抗衰老能力与其抗热应激能力成正比^[45]。由图 9 可以看出,与对照组相比,CPS 处理后的线虫生存曲线都向右移动,说明不同样品浓度都能促进线虫寿命延长。与寿命和氧化应激分析结果类似,经 CPS 处理后线虫的寿命也随 CPS 浓度的提高呈现先增加后降低的趋势,且 $50 \mu\text{g/mL}$ 样品对线虫热应激抵抗能力提升作用最强。 25 、 50 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 浓度 CPS 处理线虫的平均寿命分别提高了 11.07%、29.02%、6.64%。这表明 CPS 不仅可以显著提高线虫的平均寿命,且能提高线虫在热应激条件下的存活率。宋祯彦等^[46]也发现茯苓多糖能够增强线虫的热应激抵抗能力,其中 $40 \mu\text{g/mL}$ 剂量组的提升效果最好,寿命延长率达到了 18.51%。

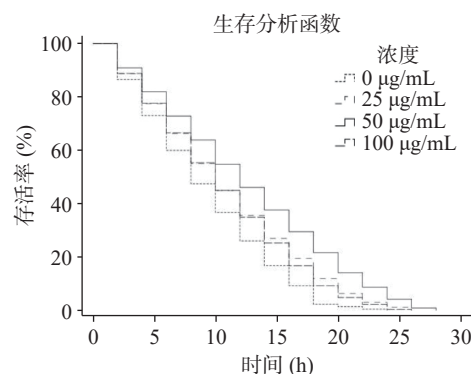


图 9 不同浓度 CPS 处理线虫热应激环境下的生存曲线
Fig.9 Survival curves of *C. elegans* treated with different concentrations of CPS under heat stress environment

2.2.4 CPS 对线虫生殖能力的影响 线虫的产卵量

反映了线虫的生殖能力。有研究表明,线虫寿命的延长可能是通过降低繁殖率来提供能量以延长寿命^[47],因此为了探究 CPS 在延长寿命的同时对线虫生殖能力的影响,进行了线虫的产卵量测定。结果如图 10 所示:线虫产卵期持续 6 d,第 1~3 d 产卵数较多,并在第 2 d 达到峰值,第 4 d 时线虫产卵数开始大幅下降,直到 6 d 以后所有组线虫产卵数为零。对照组以及 25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ CPS 处理组线虫的产卵总数分别为 110.88 ± 1.69 、 116.26 ± 3.70 、 132.28 ± 2.92 和 120.08 ± 3.86 个。所有处理组线虫的平均产卵数目均出现了增长,其中 50 $\mu\text{g/mL}$ CPS 处理组线虫的产卵数最多,较对照组增加了 0.19 倍。这说明 CPS 延缓线虫衰老的同时不仅不会对其生殖能力造成损伤,还能够增强线虫的生殖能力。这与 Zhang 等^[48]的研究结果类似,他们的研究表明苦参种子多糖可在延长线虫的寿命同时提高其繁殖能力。

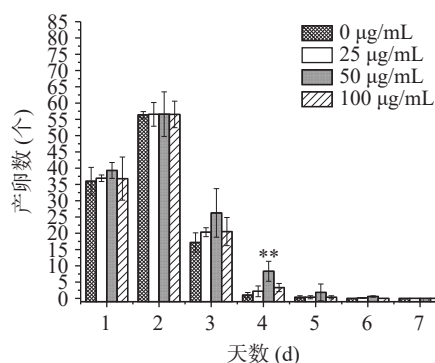


图 10 不同浓度 CPS 对线虫生殖能力的影响
Fig.10 Effect of different concentrations of CPS on reproductive ability of *C. elegans*

2.2.5 CPS 对线虫体内有关寿命基因表达水平的影响 胰岛素/胰岛素样生长因子 1 (Insulin/IGF-1, IIS) 信号是已知调节寿命的关键通路之一^[18], 通路上的 *Daf-16* 基因是经典的长寿调控基因, 是线虫体内提高应激抵抗及代谢基因表达的重要转录因子; *Daf-2* 为 IIS 信号通路中 *Daf-16* 的上游基因; *Sir-2.1* 为调节 *Daf-16* 的辅助因子, 可在一定程度上延长寿命^[49]。如图 11 所示, 与对照组相比, 喂食 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 CPS 线虫的 *Daf-16* 转录水平提升了 87.90%, *Sir-2.1* 的转录水平提升了 58.01%, 而 *Daf-2* 转录水平无显著差异, 说明 CPS 可以通过促进 IIS 信号通路中 *Daf-16* 基因及 *Sir-2.1* 的表达, 发挥其抗衰老作用。这与王猛等^[50]的研究结果相符, 他们的研究表明螺旋藻多糖同样是通过上调 IIS 信号通路上的转录因子 *Daf-16/Sir-2.1* 的表达实现线虫寿命延长的。*Hsf-1* 及其下游基因 *Hsp-16.2* 是线虫体内寿命和抗压力、热冲击性能的关键调节因子^[51]。实验组线虫 *Hsf-1* 和 *Hsp-16.2* 的平均表达量较对照组有显著的提升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 分别提升了 114.35%、68.18%, 表明 CPS 良好的寿命延长效果可能与 *Hsf-1*

所在的热应激反应信号通路中 *Hsf-1*、*Hsp-16.2* 转录因子表达水平的提高有关。此外, 与对照组相比, 实验组线虫体内 *Skn-1* 及其下游基因 *Ctl-1* 表达差异不显著 ($P > 0.05$), 表明 CPS 可能不是通过 p38MAPK 通路来调控线虫寿命, 从而延缓线虫衰老的。因此, 本研究中, 发酵乳杆菌 S1 的 CPS 可能是通过胰岛素信号和热应激信号双通路调控实现线虫寿命延长的。有研究表明, 甜茶多糖可能依赖于胰岛素信号通路和热应激信号通路协同作用发挥抗衰老活性^[52]。这与本研究中 CPS 的抗衰老作用机制一致。

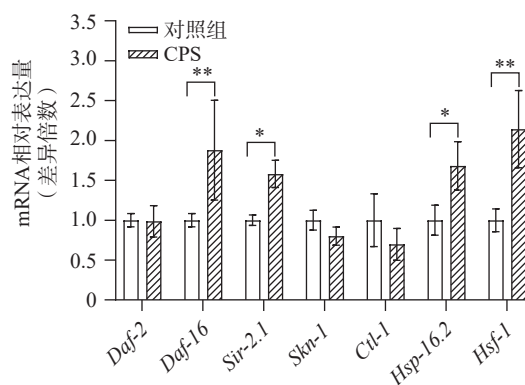


图 11 CPS 对线虫体内寿命相关基因表达水平的影响
Fig.11 Effect of CPS on the expression level of lifespan-related genes in *C. elegans*

3 结论

本文探究了发酵乳杆菌 S1 CPS 的免疫调节和抗衰老活性, 发现 CPS 可以提高 RAW264.7 细胞的活力和吞噬活性, 并促进其 NO 和细胞因子的分泌, 表现出良好的免疫调节活性。同时, CPS 还能显著改善线虫抗氧/热应激能力, 并通过协同调控线虫的胰岛素信号通路和热应激信号通路实现衰老延缓作用, 显示出优异的抗衰老活性。这些研究表明发酵乳杆菌 S1 CPS 有望开发为天然免疫调节剂和抗衰老成分应用于功能性食品或药品中, 同时也为乳酸菌 CPS 未来的开发利用提供了理论依据。然而, 目前的研究仅在基因水平上进行了机制探索, 后续还应利用蛋白质组学和代谢组学等手段继续深入分析, 并结合体内实验进一步验证 CPS 的有效性。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 侯金丽. 乳酸菌在发酵食品中的应用研究进展[J]. 工业微生物, 2023, 53(1): 1-3. [HOU J L. Research progress on the application of lactic acid bacteria in fermented foods[J]. Industrial Microorganism, 2023, 53(1): 1-3.]
- [2] RAMOS O Y, BASUALDO M, LIBONATTI C, et al. Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(5): 1248-1260.

- [3] SEONYOUNG K, YEON J L, YULAH J, et al. Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria[J]. *Fermentation*, 2022, 8(1): 29–38.
- [4] GUO Z H, BATBATAN C. Screening and biological characteristics of excellent lactic acid bacteria from Kefir[J]. *BIO Web of Conferences*, 2023, 59: 01018.
- [5] KATARZYNA G. Anticancer activity of lactic acid bacteria[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 86: 356–366.
- [6] 席进成, 甄子辰, 刘阳, 等. 基于文献计量的胞外多糖研究现状和热点分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(24): 398–407. [XI J C, ZHEN Z C, LIU Y, et al. Bibliometric-based analysis of the current status and hotspots of extracellular polysaccharide research[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(24): 398–407.]
- [7] 谭凤翔, 余元善, 温靖, 等. 乳酸菌胞外多糖的合成、生物活性及应用研究进展[J]. *中国酿造*, 2023, 42(9): 7–13. [TAN F X, YU Y S, WEN J, et al. Progress in the synthesis, biological activity and application of extracellular polysaccharides from lactic acid bacteria[J]. *China Brewing*, 2023, 42(9): 7–13.]
- [8] 张雪, 李达, 赵玉娟, 等. 内蒙古奶豆腐中产胞外多糖乳酸菌的分离筛选[J]. *食品科学*, 2010, 31(1): 141–144. [ZHANG X, LI D, ZHAO Y J, et al. Isolation and screening of extracellular polysaccharide-producing lactic acid bacteria from inner mongolian milk tofu[J]. *Food Science*, 2010, 31(1): 141–144.]
- [9] YOU X, LI Z, MA K, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 235: 115977.
- [10] 杜瑞平, 郭帅, 潘娜, 等. 乳酸菌胞外多糖益生功能研究进展[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(7): 2439–2444. [DU R P, GUO S, PAN N, et al. Advances in the study of the probiotic function of extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria[J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(7): 2439–2444.]
- [11] TABARSA M, JAFARI A, YOU S G, et al. Immunostimulatory effects of a polysaccharide from *Pimpinella anisum* seeds on RAW264.7 and NK-92 cells[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 213: 546–554.
- [12] WANG M, YANG X, ZHAO J, et al. Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Smilax glabra* Roxb[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156: 390–402.
- [13] WANG J, FANG X B, WU T, et al. *In vitro* immunomodulatory effects of acidic exopolysaccharide produced by *Lactobacillus planetarium* JLAU103 on RAW264.7 macrophages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 1308–1315.
- [14] YOU X, YANG L, ZHAO X J, et al. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 isolated from Tibetan kefir[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 158: 408–419.
- [15] 况沛, 王志. 中国人口老龄化问题现状、成因及应对[J]. *现代商贸工业*, 2024, 45(10): 160–163. [KUANG P, WANG Z. Current situation, causes and responses to population ageing in China[J]. *Modern Business Industry*, 2024, 45(10): 160–163.]
- [16] ZHANG W M, LÜ T, LI M, et al. Beneficial effects of wheat gluten hydrolysate to extend lifespan and induce stress resistance in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Plos One*, 2017, 8(9): e74553.
- [17] MARTEL J, WU C Y, PENG H H, et al. Plant and fungal products that extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Microb Cell*, 2020, 7(10): 255–269.
- [18] ZHANG S W, LI F, ZHOU T, et al. *Caenorhabditis elegans* as a useful model for studying aging mutations[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 554994.
- [19] ZHANG X, CHEN Q, CHEN L M, et al. Anti-aging in *Caenorhabditis elegans* of polysaccharides from polygonatum cyrtoneura hua[J]. *Molecules*, 2024, 29(6): 1276–1291.
- [20] ZHOU Y, QIN X Y, WANG W L, et al. Anti-aging effect of hemerocallis citrina Baroni polysaccharide-rich extract on *Caenorhabditis elegans*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(1): 655–676.
- [21] WANG K, NIU M M, YAO D, et al. Physicochemical characteristics and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of a cell-bound exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* S1[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139: 252–261.
- [22] WANG K, NIU M M, SONG D, et al. Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from *Lactobacillus fermentum* S1[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(2): 206–214.
- [23] 张娟梅. 玫瑰花渣中多酚的超声辅助提取制备、组分分析及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014. [ZHANG J M. Ultrasound assisted extraction and preparation of polyphenols from rose pomace, analysis of their fractions and their biological activities[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.]
- [24] RAJOKA M S R, MAHREEN H M, HARUKI K, et al. Techno-functional properties and immunomodulatory potential of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* MM89 isolated from human breast milk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 377: 131954.
- [25] WANG X M, TIAN J J, ZHANG X L, et al. Characterization and immunological activity of exopolysaccharide from *Lactococcus paracasei* GL1 isolated from tibetan kefir grains[J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3330.
- [26] YU Z D, KONG M L, ZHANG P Y, et al. Immune-enhancing activity of extracellular polysaccharides isolated from *Rhizopus nigricans*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 148: 318–325.
- [27] WANG J, WU T, FANG X B, et al. Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* JLK0142 isolated from fermented dairy tofu[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 115: 985–993.
- [28] XU Y M, CUI Y L, WANG X, et al. Purification, characterization and bioactivity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* KX041[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 128: 480–492.
- [29] HUANG L X, SHEN M Y, MORRIS A G, et al. Sulfated polysaccharides; Immunomodulation and signaling mechanisms[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 92: 1–11.
- [30] 苗月, 任桂红, 甄东, 等. 蛹虫草多糖调节小鼠巨噬细胞 RAW264.7 免疫活性的分子机制[J]. *食品科学*, 2019, 40(9): 188–194. [MIAO Y, REN G H, ZHEN D, et al. Molecular mechanism of cordyceps militaris polysaccharides in regulating the immune function of macrophage RAW264.7 cells[J]. *Food Science*, 2019, 40(9): 188–194.]
- [31] WANG M C, JIANG C X, MA L P, et al. Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hovenia dulcis*[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 41–47.
- [32] KARPUGUZLU E, AHMED A S. Estrogen regulation of ni-

tric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis[J]. *Nitric Oxide*, 2006, 15(3): 177–186.

[33] 赵彪希, 张海德, 张媚健, 等. 冬虫夏草多糖单糖组成及免疫活性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 27–31. [ZHANG B X, ZHANG H D, ZHANG M J, et al. The monosaccharides composition and immune activity of polysaccharides from cordyceps sinensis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(13): 27–31.]

[34] CUI H Y, WANG C L, WANG Y R, et al. The polysaccharide isolated from *Pleurotus nebrodensis* (PN-S) shows immune-stimulating activity in RAW264.7 macrophages[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(5): 355–360.

[35] YUAN Q X, ZHAO L Y, CHA Q Q, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of a homogeneous polysaccharide from *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(36): 7986–7994.

[36] TIAN J J, ZHANG C P, WANG X M, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of intracellular polysaccharide from the mycelium of *Paecilomyces cicadae* TJJ1213[J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110515.

[37] XIE X Q, LIN X Y, HU J W, et al. The polysaccharide from *Camellia oleifera* fruit shell enhances immune responses via activating MAPKs and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 macrophages[J]. *Food & Nutrition Research*, 2022, 66: 8963.

[38] TENG L P, FU H T, WANG M, et al. Stimulation of RAW264.7 macrophages by sulfated *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide *in vitro*[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(4): 5545–5553.

[39] ZHANG J, XIAO Y, WANG H C, et al. Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharide: Formation, immunomodulatory ability, health effects, and structure-function relationship[J]. *Microbiological Research*, 2023, 274: 127432.

[40] HU D T, FAN S, YANG G, et al. Purification, structural characterization, and anti-inflammatory effects of a novel polysaccharide isolated from *orostachys fimbriata*[J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7116–7131.

[41] 李美霖, 王平, 尹灿, 等. 山茱萸多糖延缓秀丽隐杆线虫衰老的药效评价及机制研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(21): 6996–7003. [LI M L, WANG P, YIN C, et al. Pharmacodynamic evaluation and mechanism study of *Corni fructus* polysaccharide on anti-aging of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2022, 13(21): 6996–7003.]

[42] FENG S L, CHENG H R, XU Z, et al. *Panax notoginseng* polysaccharide increases stress resistance and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 45: 15–23.

[43] YANG X Y, WANG H, LI T, et al. Nobiletin delays aging and enhances stress resistance of *Caenorhabditis elegans*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(1): 341–359.

[44] ZHU J H, JIA Y M, WANG C, et al. *Lonicera japonica* polysaccharides improve longevity and fitness of *Caenorhabditis elegans* by activating DAF-16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 229: 81–91.

[45] HUI H P, XIN A Y, CUI H Y, et al. Anti-aging effects on *Caenorhabditis elegans* of a polysaccharide, o-acetyl glucomannan, from roots of *Lilium davidii* var. unicolor cotton[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 846–852.

[46] 宋祯彦, 黄亚琦, 王也彤, 等. 茯苓多糖在秀丽隐杆线虫中的抗氧化和抗衰老作用及其作用机制[J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1133–1144. [SONG Z Y, HUANG Y Q, WANG Y T, et al. Antioxidant and anti-aging effects and mechanism of *Poria cocos* polysaccharides in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2024, 55(4): 1133–1144.]

[47] 宋兵兵. 蓝莓和苹果皮提取物联合抗衰老活性及作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [SONG B B. Study on the combined anti-aging activity and mechanism of action of blueberry and apple peel extracts[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]

[48] ZHANG Y, MI D Y, WANG J, et al. Constituent and effects of polysaccharides isolated from *Sophora moorcroftiana* seeds on lifespan, reproduction, stress resistance, and antimicrobial capacity in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2018, 16(4): 252–260.

[49] WU J Z, HUANG R, KHANABDALI R, et al. Pyrroloquinoline quinone enhances the resistance to oxidative stress and extends lifespan upon DAF-16 and SKN-1 activities in *C. elegans*[J]. *Experimental Gerontology*, 2016, 80: 43–50.

[50] 王猛, 马浩天, 关思宇, 等. 螺旋藻多糖对秀丽隐杆线虫氧化应激及寿命的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 137–146.

[WANG M, MA H T, GUAN S Y, et al. Effects of polysaccharide from *Spirulina platensis* on oxidative stress and longevity of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(5): 137–146.]

[51] NOZOMI T, QUAN C B N, THI P T B, et al. Effect of *Okinawa propolis* on PAK1 activity, *Caenorhabditis elegans* longevity, melanogenesis, and growth of cancer cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(27): 5484–5489.

[52] LIU M Y, LI N N, LI X F, et al. Sweet tea (*Rubus suavissimus* S. Lee) polysaccharides promote the longevity of *Caenorhabditis elegans* through autophagy-dependent insulin and mitochondrial pathways[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 207: 883–892.