doi:10.12301/spxb202300229 文章编号:2095-6002(2023)05-0058-10
引用格式:冯晴霞, 孙艳艳, 孙晶波, 等. 姬松茸多肽对D-半乳糖致衰老小鼠的作用机制[J]. 食品科学技术学报,2023,41(5):58-67.
FENG Qingxia, SUN Yanyan, SUN Jingbo, et al. Mechanism of *Agaricus blazei* polypeptide on aging mice induced by D-galactose[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(5):58-67.

姬松茸多肽对D-半乳糖致衰老小鼠的作用机制

冯晴霞[1,2], 孙艳艳[1], 孙晶波[2], 苑广信[2], 安丽萍[2,*]

(1. 吉林省经济管理干部学院 食品药品工程学院, 吉林 长春 130012;
2. 北华大学 药学院, 吉林 吉林 132013)

摘　要: 多肽为姬松茸中重要的活性物质,为探究姬松茸多肽(*Agaricus blazei* polypeptide,ABp)的抗衰老作用,采用胃蛋白酶水解姬松茸蛋白制备ABp,利用蛋白质纯化系统对ABp进行柱层析纯化。采用D-半乳糖注射建立小鼠衰老模型,通过行为学实验、血清生化指标、转录组测序分析ABp对衰老模型小鼠的影响,并进一步采用蛋白质印迹法探讨ABp的潜在作用机制。研究结果表明:经分离纯化后的ABp分子质量为3.3 kDa;ABp可显著改善由D-半乳糖引起的小鼠血清中活性氧簇和丙二醛水平升高,显著提升小鼠血清的总抗氧化能力及过氧化氢酶活性。转录组测序结果显示,ABp组与模型组小鼠海马区脑组织中有295个基因表达水平差异显著。与衰老模型组相比,ABp上调基因79个,下调基因216个。蛋白表达检测结果表明,ABp抗衰老具体机制可能与Keap1/Nrf2/P53信号通路有关。研究旨在为姬松茸抗衰老功能食品的开发提供理论依据。

关键词: 姬松茸多肽; D-半乳糖; 衰老; 转录组测序; Keap1/Nrf2/P53
中图分类号: TS201.4 **文献标志码:** A

人体的衰老是指细胞及组织结构和机能上所出现的退行性变化,如神经系统逐步发生衰退进而产生行为障碍、学习记忆能力减退等[1-2]。机体氧化应激程度加剧是衰老发生的重要原因,主要取决于氧化与抗氧化体系的平衡[3-6]。因此,提高机体的抗氧化能力,可以延缓衰老进程。天然产物含有大量的抗氧化活性物质,其所具有的预防衰老及相关疾病功能已成为食品营养研究领域的热点。

姬松茸(*Agaricus blazei* Murill)又名小松菇、巴西蘑菇,是一种大型真菌,具有浓郁杏仁香味,属担子菌亚门层菌纲伞菌目蘑菇(黑伞)科蘑菇(黑伞)属[7-8]。姬松茸子实体富含蛋白质、糖类、甾醇、黄酮等多种生物活性物质,具有广泛的生物活性,如抗肿瘤、降血糖、抗炎、增强免疫力等[9-10]。姬松茸蛋白具有突出的抗氧化活性,能够提高乙酰胆碱酯酶的活性。蛋白质经蛋白酶部分水解后,可获得具有多种生物活性的多肽。与大分子蛋白相比,小分子生物多肽具有安全稳定、易溶于水、易吸收等优点。并且多肽抗氧化的能力与分子质量有关,分子质量越小,其抗氧化能力越好[10]。蒲超等[11]研究表明,姬松茸多糖可以抑制软骨细胞炎症反应和凋亡。徐天雄[12]研究发现,姬松茸水提物具有良好的肿瘤微环境免疫调节活性,并促进 $CD8^+$ T细胞的肿瘤杀伤

收稿日期: 2023-04-18
基金项目: 吉林省中医药管理学项目(2019128);吉林省经济管理干部学院2023年度院级课题(YZ202305)。
Foundation: Jilin Province Traditional Chinese Medicine Management Project (2019128);Jilin Province Economic Management Cadre College 2023 Academic Level Project (YZ202305).
第一作者: 冯晴霞,女,助教,硕士,主要从事药品质量与安全方面的研究。
*通信作者: 安丽萍,女,教授,博士,主要从事生物活性方面的研究。

作用。而国内目前对于姬松茸多肽的研究鲜见报道,因此,本研究选择姬松茸子实体中提取的蛋白质经过蛋白酶水解后的活性物质,即姬松茸多肽(*Agaricus blazei* polypeptide, ABp)。本团队前期实验也证明,ABp 具有体外抗氧化作用,对羟基自由基具有较好的清除作用,但其抗衰老效果和作用机制还需要进一步研究。

本研究拟通过 D-半乳糖(D-gal)注射建立小鼠衰老模型,并评价 ABp 的抗衰老作用,利用转录组学和蛋白免疫印迹分析 ABp 干预后衰老小鼠的基因及蛋白表达差异,探讨 ABp 抗衰老的潜在作用机制。研究旨在为姬松茸的抗衰老功能食品的开发利用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

姬松茸子实体,江苏省苏威微生物研究有限公司,经北华大学药学院韩东教授鉴定;D-gal,西格玛奥(上海)贸易公司;SPF 级雄性 ICR 小鼠,4 ~ 5 周龄,体质量(20.0 ± 2.0) g,52 只,实验动物许可证编号为 SCX(吉)-2016-0003,长春亿斯实验动物技术有限责任公司;活性氧簇(ROS)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒,南京建成生物工程研究院;大鼠单克隆 BrdU 抗体、单克隆抗体 NeuN、山羊抗大鼠 IgG-Alexa Fluor 594、山羊抗兔 IgG-Alexa Fluor 488,abcam 公司;HOECHST 33258,ABclonal 公司;反转录试剂盒,北京艾德来生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2　仪器与设备

AKTA Purifer TM10 型蛋白质层析仪,美国通用电气公司;UV-2550 型紫外可见分光光度计,岛津国际贸易有限公司;MT-200 型 Morris 水迷宫分析仪,成都泰盟科技有限公司;BA-200 型小鼠避暗仪,成都泰盟科技有限公司;TOWER2.2 型荧光定量 PCR 仪,德国 ANALYTIKJENA;scandrop 型超微量核酸蛋白测定仪,德国耶拿分析仪器有限公司。

1.3　实验方法

1.3.1　ABp 的制备

将姬松茸的粉状子实体(约 2 500 g)在5 000 mL 冰水混合物中匀浆,5 000 r/min 离心 3 min 取上清液,随后采用硫酸铵,在 4 ℃下,将上清液中的可溶性蛋白质沉淀过夜。合并得到的沉淀,在去离子水中溶解,并使用截留分子质量 30 kDa 的透析膜,在 4 ℃下,用去离子水透析 24 h。透析后,冷冻干燥得到姬松茸蛋白粉,按料液比 1∶20(g/mL)加入蒸馏水,用 0.1 mol/L 的盐酸调 pH 值至 2.5,按照 3 000 U/mg 的加酶量加入胃蛋白酶解液,混匀后置于 37 ℃恒温水浴中酶解 4 h,100 ℃条件下加热 10 min 使酶失活,冻干后初步提取出姬松茸粗多肽。

利用蛋白质层析仪分离多肽。将 Preswollen DEAE-32 柱填料装入 5 mL 柱体中。随后用 1.5 mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡 3 个柱体积,流速为 0.5 mL/min。将粗蛋白质溶于 Tris-HCl 缓冲液中,使用0.45 μm 滤膜过滤后进行上样,0 ~ 0.5 mol/L 线性梯度 NaCl 溶液连续洗脱,并使用级分收集器收集 220 nm 吸收峰处的级分,冻干。使用同样的方法安装并平衡 Cellulose CM-52 柱,将级分进一步于 CM-52 柱进行分离,并用 0 ~ 0.5 mol/L 的线性梯度 NaCl 溶液冲洗 3 个柱体积,流速为0.5 mL/min,收集 220 nm 吸收峰处的组分。将组分冻干成粉末溶于去离子水中,最终通过 Hi TrapTM 脱盐柱净化脱盐,使用去离子水洗脱 1.5 个柱体积,流速为 1.0 mL/min,检测波长 220 nm。

1.3.2　实验动物分组及处理

选取 6 周龄雄性 ICR 小鼠 52 只,适应性喂养 7 d,随机分为 4 组:空白对照(Con)组、模型(Mod)组、ABp 组和吡拉西坦(Pir)组,每组 13 只。除 Con 组外,其他组小鼠按体质量每日皮下注射 D-gal 300 mg/kg。Con 组小鼠注射相同剂量的生理盐水,Pir 组每日按体质量灌胃 800 mg/kg 的吡拉西坦,ABp 组每日按体质量灌胃 400 mg/kg ABp。Con 组、Mod 组每日灌胃等量蒸馏水。

1.3.3　小鼠行为学实验

小鼠处理第 42 天进行行为学实验。小鼠放入明室中使其适应环境后,给予 5 min 持续电流,以 2 d 为训练周期,记录 5 min 内的小鼠错误总数和小鼠第 1 次被电击的错误潜伏期。

采用 Morris 水迷宫实验,检测小鼠的空间学习记忆能力。将各组小鼠定点放入水池,记录每只小鼠在 120 s 内到达隐形平台的潜伏期,共训练 6 d。第 7 天撤去平台,以 120 s 内小鼠分别在中心环、中环、目标象限的游泳穿梭次数评估小鼠学习记忆的能力[12]。

1.3.4　小鼠血清生化指标检测

小鼠末次处理 24 h 后,眼球取血,4 ℃离心

(10 000 r/min)分离血清,按照试剂盒说明书检测血清总抗氧化能力及 SOD、MDA、ROS 水平。

1.3.5 小鼠海马区转录组学分析

选取小鼠海马区进行差异基因筛选。利用 Hisat 软件将测序数据比对参考基因组,利用比对的结果组装转录本。采用 edgeR 进行差异表达分析,采用 R 语言对差异表达结果进行图形化展示。

采用 FPKM 度量基因表达的丰度值以衡量基因的表达水平。同时通过 t 检验阈值以及对 t 检验 P 值进行 FDR 校正的 Q 阈值初步筛选出目的基因。按照同时满足 $FPKM>10$、Q 阈值 <0.05、差异倍数 >1.5 或差异倍数 <0.6 的标准筛选差异基因。

1.3.6 小鼠海马区基因的表达水平检测

采用反转录试剂盒对小鼠海马区的 mRNA 进行反转录操作,合成的 cDNA 在 94 ℃进行预变性 5 min,35 个循环扩增(94 ℃、30 s,60 ℃、30 s,72 ℃、30 s),72 ℃退火 7 min,基因引物见表 1。测定软件为 SDS v2.2,基于 Ct 方法计算靶基因表达水平。

表 1 基因引物序列

Tab.1 Sequences of gene primers

基因名称	上游引物	下游引物
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG
Atp1a3	CAGTCATCTTCCTCATCGGCATCA	TTGGCGGTCAGCGTCAGA
Trim32	GAACGCCGCATCCAGGAA	GGACTTCTCAACCTCAGCCAAG
Hsph1	ACCTCAAGAAGCCAGTGACAGACT	GCAGCATCCAGCACAGACCTT
Stxbp1	CACAAGCACATCGCAGAGGT	GGTCTTCTCGCCAGTGTTCATC
Hk1	AGCAAGCAGGCACTGATGG	CTCCGAACATAAGAAGGCAGCATT
Apoe	ACCGCTTCTGGGATTACCT	GTGCCGTCAGTTCTTGTGT
Mapk8ip1	AAGCGACTCTGCCACTGT	CCTCCTCATACTCCTCACCAAT
Hnrnpa1	AGGTGGCTATGGCGGTTC	CCTGTCACTTCTCTGGCTCTC
Grik5	CAGTCTCCCGAATCCTCAAGTC	AGCCTCGCACCAGTTCTTC

1.3.7 小鼠海马区蛋白的表达水平检测

取小鼠海马区加入适量体积的 RIPA 裂解液进行裂解和蛋白抽提。利用 Bradford 法测定抽提液的蛋白浓度。采用聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白的分离,随后进行转膜处理。转膜结束后,用质量分数为 5% 的脱脂奶粉封闭条带 1 h,孵育 Nrf2、HO-1、Keap1、p53、Hsph1、Apoe、Trim32 一抗(体积比 1∶500 稀释)过夜,于 37 ℃恒温静置孵育二抗(体积比 1∶200 0 稀释) 1 h,清洗 3 次,显色后用扫描仪扫描胶片。

1.4 数据处理

采用 SPSS 16.0 统计软件处理各组数据,结果表示为平均数 ± 标准偏差,采用 t 检验判断结果的显著性,$P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 ABp 的制备及纯化结果

姬松茸蛋白水解物经不同柱层析纯化结果,见图 1。由图 1 可知,DEAE-32 离子交换色谱柱纯化蛋白水解物得到 4 个主峰。将响应值最大的 DE2 峰组分用于 CM-52 离子交换色谱纯化,得到 2 个主峰。采用脱盐柱纯化响应值最大的 CM1 组分得到 ABp。ABp 在蛋白电泳实验结果中呈现单一条带,分子质量为 3.3 kDa。

2.2 ABp 对 D-gal 诱导的衰老小鼠记忆能力的影响

小鼠避暗实验结果见图 2。由图 2 可知,与 Con 组比较,Mod 组小鼠避暗错误次数增高 100% ($P<0.05$)。与 Mod 组比较,ABp 组错误次数减少 37.5% ($P<0.05$),且潜伏期时间显著增加。Morris 水迷宫测试,见图 3。研究结果表明,与 Con 组比较,Mod 组小鼠在第 4 ~5 d 期间到达平台的潜伏期显著增加($P<0.05$)。与 Mod 组相比,ABp 组小鼠的潜伏时间显著降低,为 Mod 组的 56.3% ($P<0.05$)。第 7 d 的空间探索实验结果显示,相较 Con 组,Mod 组小鼠找到平台所用的时间显著增加,穿越中心环和中环的次数显著减少($P<0.05$)。而与 Mod 组的相比,ABp 组小鼠的潜伏期更短,在中心环和中环逗

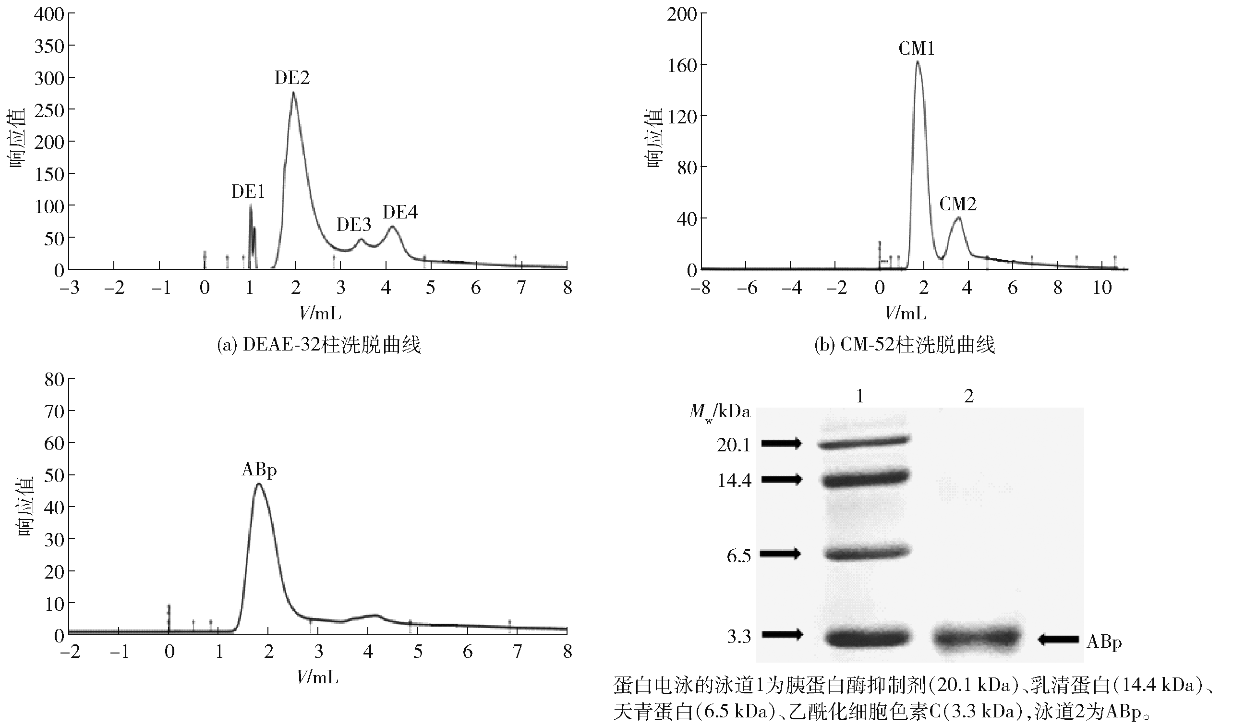
留的时间及穿越次数显著增加($P<0.05$)。

2.3　ABp对 D-gal 诱导的衰老小鼠血清氧化水平的影响

小鼠血清中 MDA 浓度、ROS 水平、CAT 活力及总抗氧化能力变化见图 4。与 Con 组比较,Mod 组小鼠血清中 MDA 浓度及 ROS 含量显著升高,而血清抗氧化能力及 CAT 活性明显降低($P<0.05$)。而与 Con 组比较,ABp 组小鼠血清中 MDA 浓度降低 65.0% ($P<0.05$),CAT 活性升高 98.6% ,总抗氧化能力升高 30.2% ($P<0.05$)。

2.4　ABp 对 D-gal 诱导的衰老小鼠海马区基因表达的影响

Mod 组和 ABp 组小鼠海马区基因表达差异见图 5。由图 5 可知,ABp 组与 Mod 组相比存在大量



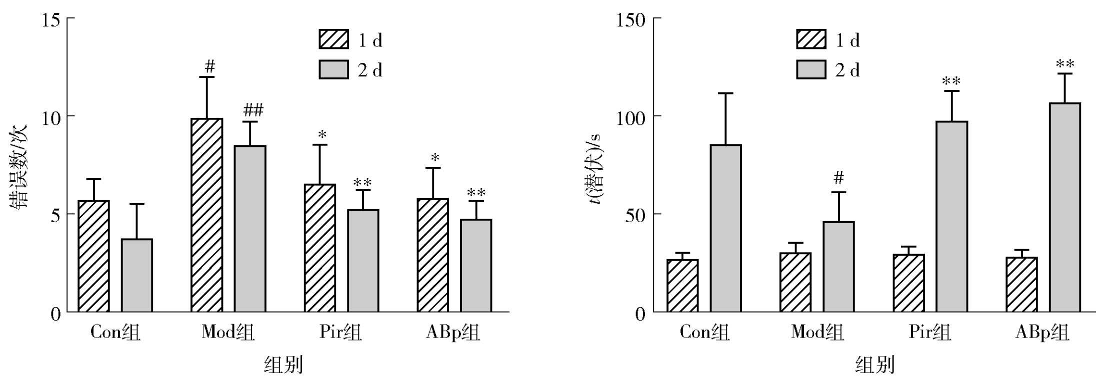
(a) DEAE-32柱洗脱曲线　(b) CM-52柱洗脱曲线　(c) Hi TrapTM柱洗脱曲线

蛋白电泳的泳道1为胰蛋白酶抑制剂(20.1 kDa)、乳清蛋白(14.4 kDa)、天青蛋白(6.5 kDa)、乙酰化细胞色素C(3.3 kDa),泳道2为ABp。

(d) 蛋白条带

图 1　ABp 的纯化及鉴定

Fig. 1　Purification and identification of ABp

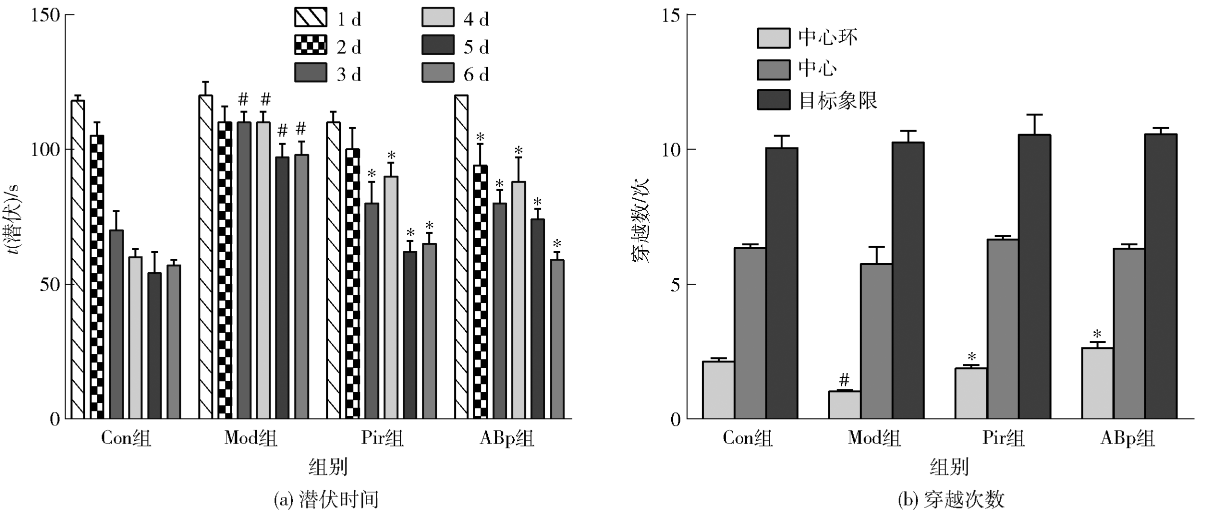


(a) 错误次数　(b) 潜伏时间

与 Con 组比较,#表示组间数据差异显著($P<0.05$),##表示组间数据差异极显著($P<0.01$)。与 Mod 组比较,* 表示组间数据差异显著($P<0.05$),** 表示组间数据差异极显著($P<0.01$)。

图 2　小鼠避暗实验结果

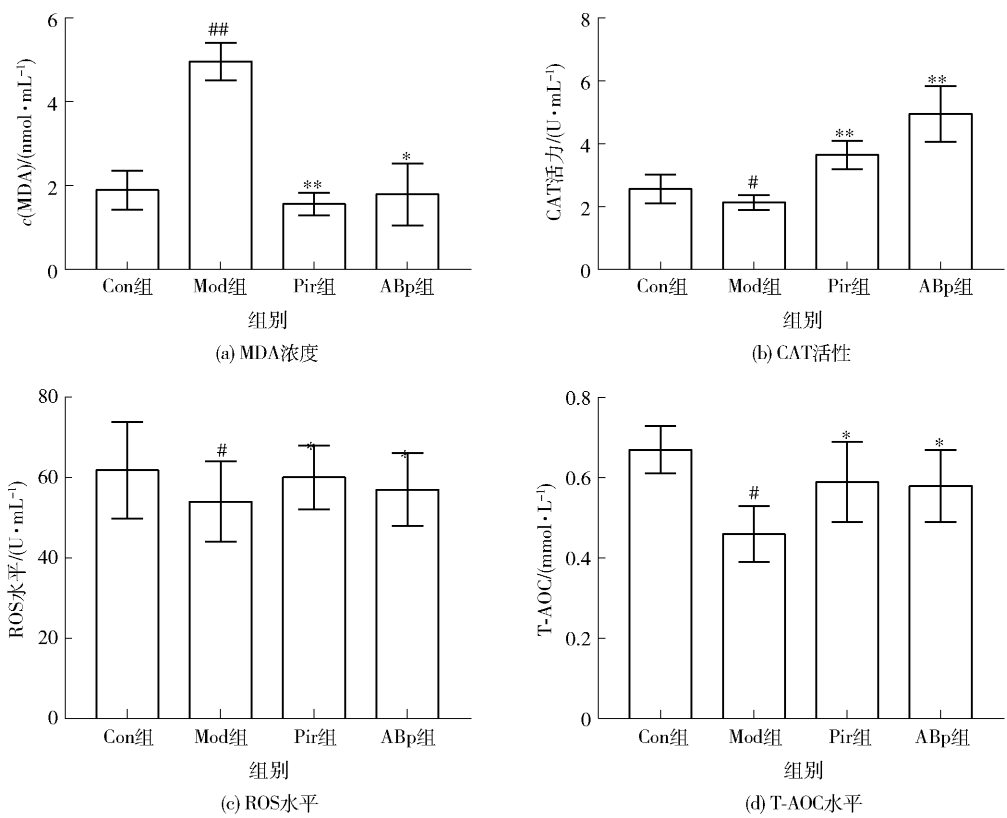
Fig. 2　Results of step-through test



与 Con 组比较,#表示组间数据差异显著($P<0.05$)。与 Mod 组比较,*表示组间数据差异显著($P<0.05$)。

图 3 Morris 水迷宫实验结果

Fig. 3 Results of Morris water maze test



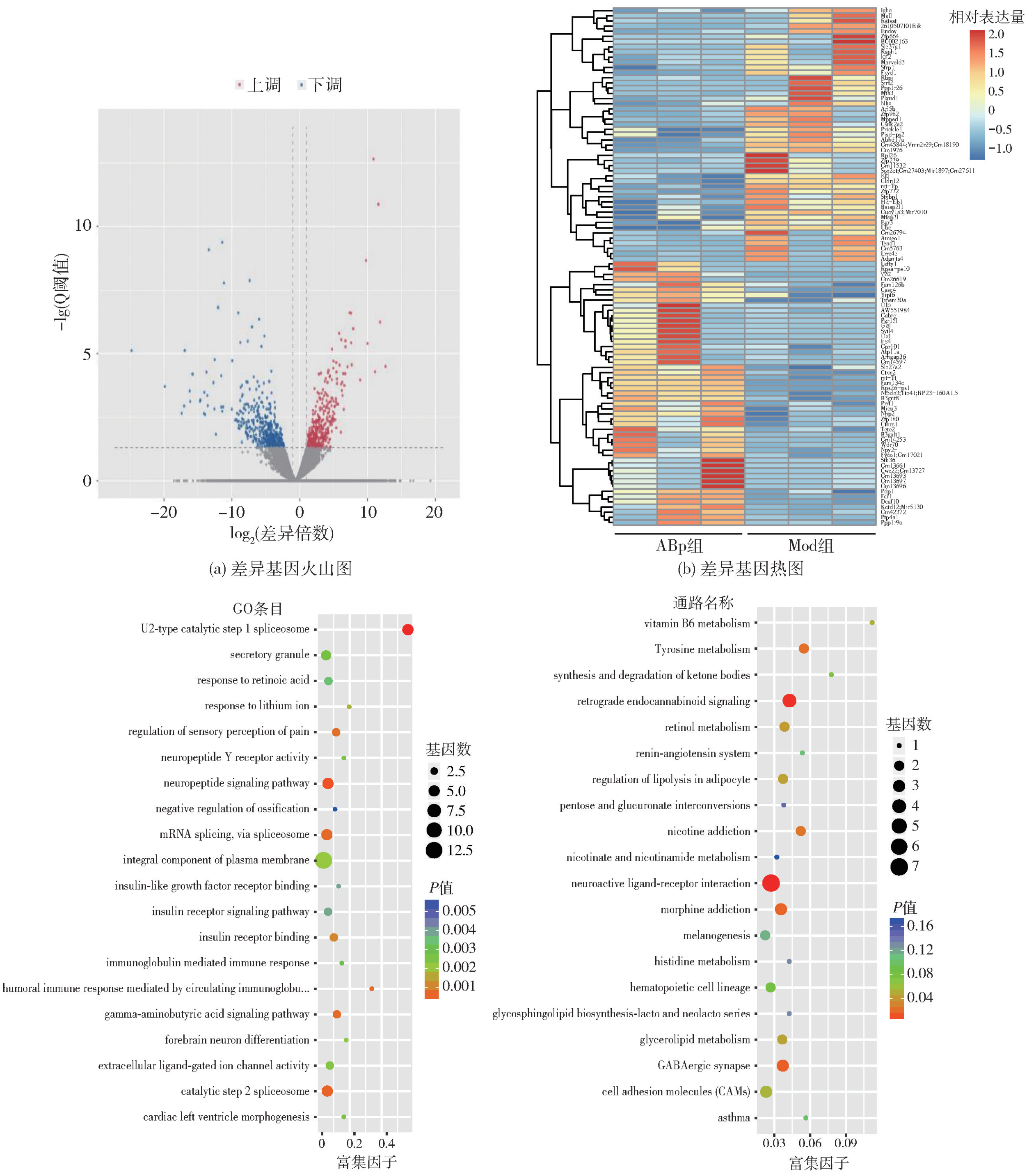
与 Con 组比较,#表示组间数据差异显著($P<0.05$),##表示组间数据差异极显著($P<0.01$)。与 Mod 组比较,*表示组间数据差异显著($P<0.05$),**表示组间数据差异极显著($P<0.01$)。

图 4 ABp 对 D-gal 诱导的衰老小鼠氧化应激的影响

Fig. 4 Effects of ABp on oxidative stress in aging mice induced by D-gal

具有显著性差异的基因。

基因聚类分析结果表明,Mod 组和 ABp 组小鼠中共存在 295 个差异基因。与 Mod 组比较,ABp 上调小鼠海马区基因 79 个,下调基因 216 个。



(a) 差异基因火山图　　(b) 差异基因热图

(c) GO富集性分析散点图　　(d) KEGG富集性分析散点图

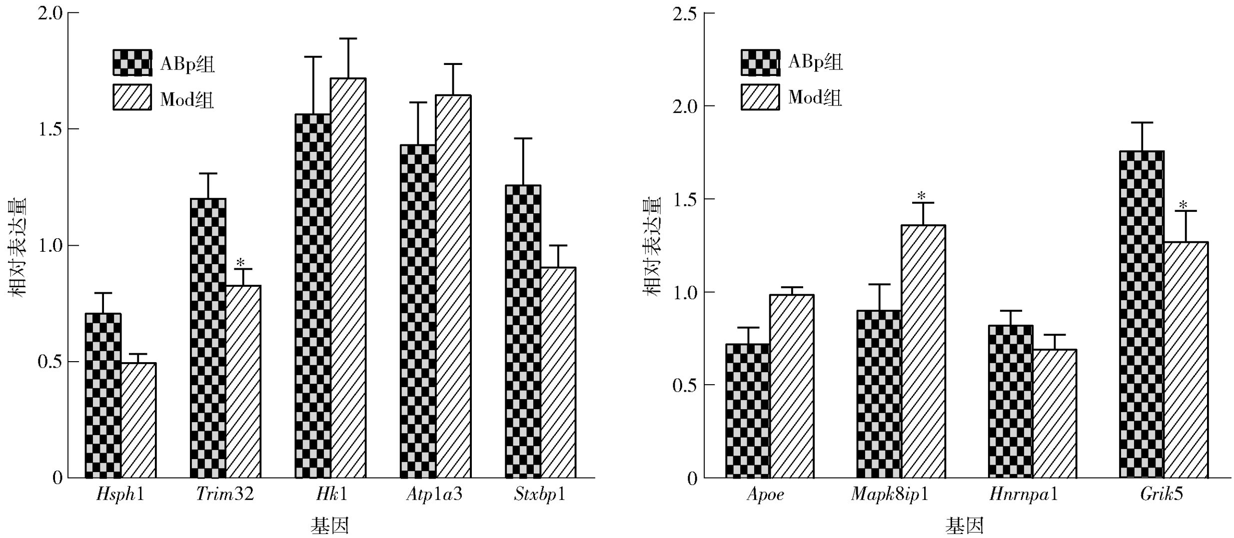
图 5　差异基因数据分析

Fig. 5　Analysis on data of differentially expressed genes

GO 和 KEGG 富集性分析结果显示，Mod 组与 ABp 组小鼠的差异基因主要涉及细胞膜组成、蛋白质结合，如神经活性配体–受体相互作用，突触功能等。表达差异显著的基因分别是 *Apoe*、*Hsph1*、*Trim32*、*Atp1a3*、*Stxbp1*、*Mapk8ip1*、*Hnrnpa1*、*Hk1*、*Grik5*。小鼠海马区脑组织 mRNA 的验证结果见图 6。与 Mod 组相比，ABp 组小鼠海马区的 *Hsph1*、*Trim32*、*HK1*、*Hnrnpa1*、*Grik5* mRNA 表达水平增加（$P<0.05$），*Atp1a3*、*Stxbp1*、*Apoe*、*Mapk8ip1* mRNA 表达水平降低（$P<0.05$）。

2.5　ABp 对 D-gal 诱导的衰老小鼠海马区蛋白表达影响

小鼠海马区蛋白表达水平差异见图 7。与 Con 组比较，Mod 组小鼠海马区中 Keap1、P53、Apoe 蛋白水平显著升高（$P<0.05$），Nrf2、HO-1、Hsph1、Trim32 蛋白水平显著降低（$P<0.05$）。与 Mod 组相比，ABp 组小鼠海马区中 Keap1、P53、Apoe 蛋白水平分别降低 32.6%、71.4%、25.7%（$P<0.05$），Nrf2、HO-1、Hsph1、Trim32 蛋白水平分别显著上升 20.5%、52.8%、125.4%、52.4%（$P<0.05$）。



(a) 神经功能相关基因　(b) 氧化损伤相关基因

* 表示同一基因组间数据差异显著（$P<0.05$）。

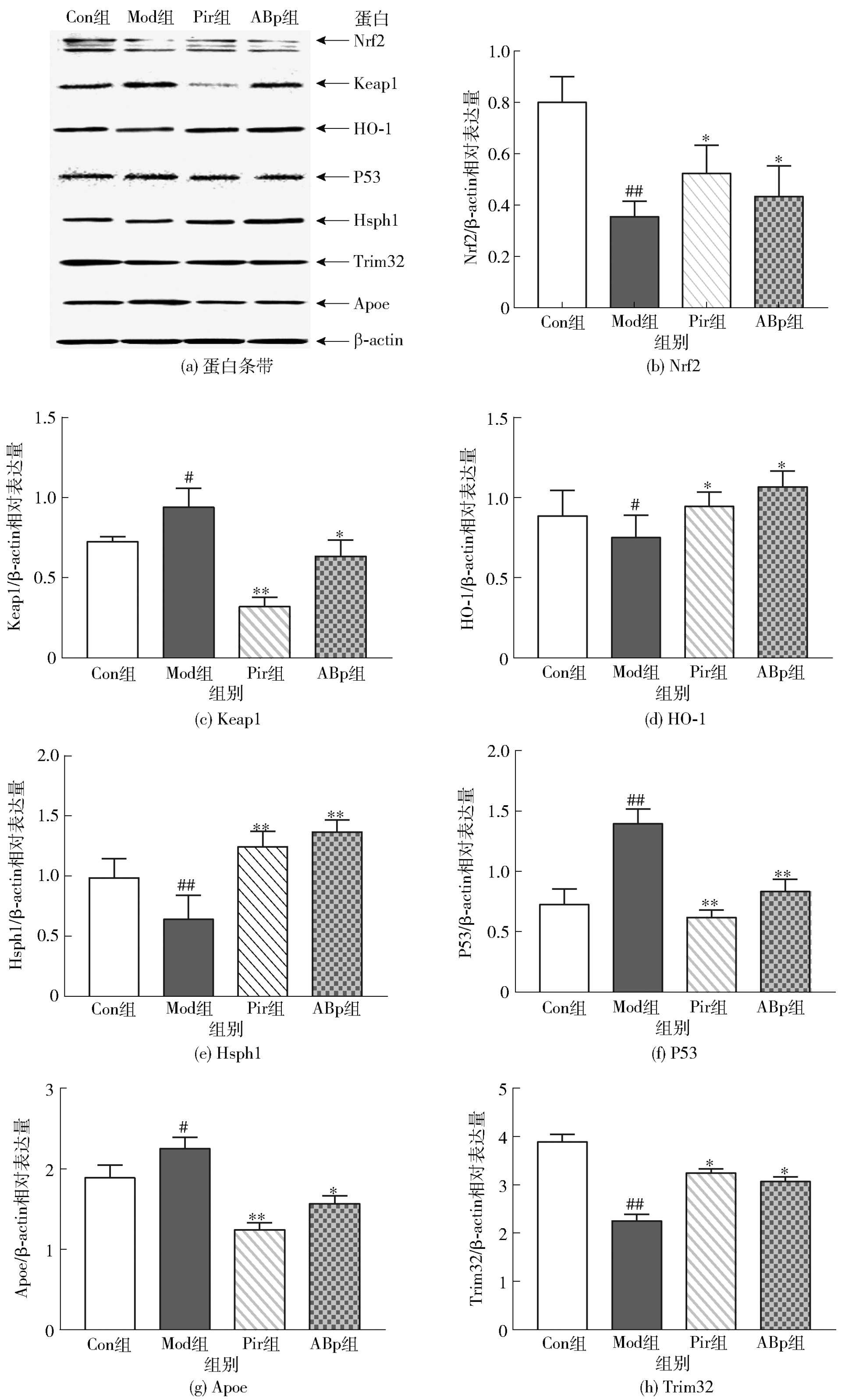
图 6　ABp 对衰老小鼠脑组织中基因表达水平的影响

Fig. 6　Effects of ABp on mRNA expressions in hippocampal tissue of aging mice

3　讨　论

衰老是机体各组织、器官功能随年龄增长而发生退行性变化的过程。衰老可降低机体面对环境胁迫维持动态平衡的能力，从而增加机体患病和死亡的可能性，其发生与氧化应激的积累密切相关[10-14]。D-gal 诱导的衰老模型能够阻断大脑皮层、隔区、海马中受体的结合位点，并引发脑内氧化应激状态改变[15-16]。D-gal 致衰老的机制在于可使生物体中产生大量的 ROS，导致细胞线粒体系统损伤，产生大量过氧化脂质，同时过氧化产物使 MDA 水平升高，CAT 等抗氧化酶活力下降，最终导致抗氧化水平降低及机体损伤；同时，海马区神经元细胞出现弥散、细胞核变小、排列松散等现象[17-18]。研究结果显示，Mod 组小鼠出现学习记忆力衰退、行为学能力降低、反应迟缓，具有明显的衰老症状。而 ABp 干预后，小鼠运动和记忆力能力有所提高。小鼠避暗实验结果表明，ABp 组与 Mod 组比较，错误次数减少 37.5%。水迷宫实验中，相比 Mod 组，ABp 组小鼠的潜伏期更短，在中心环和中环逗留的时间增加，穿越次数增加。与 Mod 组比较，ABp 组小鼠血清 MDA 浓度降低 65.0%、CAT 活性升高 98.6%、总抗氧化能力升高 30.2%。研究结果表明，ABp 能够显著增强抗氧化酶的活力，清除过剩的 ROS，降低脂质过氧化物的产生。

转录组测序结果表明，ABp 在参与转录调节、细胞膜的组成、蛋白质结合的过程中影响基因分布最广，包括神经活性配体 - 受体相互作用、GABA 突触功能等。在中枢神经系统中，Apoe 可以调控多种氧化损伤相关基因，包括 Atp1a3、Mapk8ip1、Hnrnpa1 等，在神经元的发育、修复和重塑中发挥重要作用。Stxbp1 复合物调节发育中的神经元突触前囊泡融合，参与脑部发育与神经传递[19]。HK1 为线粒体外膜蛋白（已糖激酶），是糖酵解过程中的第一个限速酶，参与细胞的糖脂代谢。Grik5 为谷氨酸受体离子型，在中枢神经系统的许多突触中充当兴奋性神经递质[20]。经 ABp 干预的衰老小鼠海马区中 *Hsph*1、*Trime*32、*HK*1 mRNA 表达量显著增高，*Atp*1*a*3、*Stxbp*1 mRNA 表达量显著降低。ABp 的抗衰老作用可能通过调节脂蛋白代谢功能、神经传递障碍、氧化损



与 Con 组比较，#表示组间数据差异显著（$P<0.05$），##表示组间数据差异极显著（$P<0.01$）。与 Mod 组比较，* 表示组间数据差异显著（$P<0.05$），* * 表示组间数据差异极显著（$P<0.01$）。

图 7　ABp 对衰老小鼠海马区蛋白表达的影响

Fig. 7　Effects of ABp on expression of proteins in hippocampal tissue of aging mice

伤、新神经元生长发育,并对 *Apoe*、*Hsph*1、*Trim*32、*Atp*1*a*3、*Stxbp*1、*Mapk*8*ip*1、*Hnrnpa*1、*Hk*1、*Grik*5 基因表达进行调控,从而发挥抗衰老作用。

Nrf2 是细胞氧化应激的关键调节因子,对脑组织中氧化应激敏感;通过增强体内 Nrf2 的活性,可以有效地对抗氧化应激损伤,进而减轻衰老症状[21]。Apoe 和 Keap1 是 Nrf2 负调控因子,其自身的泛素化、磷酸化以及核穿梭水平影响 Nrf2 的活力,在神经元的发育、修复和重塑中发挥重要作用。P53 作为一种控制多种分子信号通路的关键性蛋白,参与细胞周期调节并受 Nrf2 调控,能够诱导细胞因氧化损伤而出现的生长停滞或凋亡[21-22]。研究结果显示,与 Mod 组相比,ABp 组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白水平降低 32.6%、P53 蛋白水平降低 71.4%、Nrf2 显著上升 20.5%。因此,ABp 可能通过调节 Keap1/Nrf2/P53 信号通路减轻氧化应激,发挥抗衰老作用。

4 结 论

通过胃蛋白酶水解姬松茸子实体蛋白,获得分子质量为 3.3 kDa 的 ABp。研究结果表明,ABp 可显著改善由 D-gal 引起的小鼠记忆功能紊乱。相比 Mod 组小鼠,ABp 显著降低了衰老模型小鼠血清中 ROS 含量和 MDA 浓度,显著提升总抗氧化能力及 CAT 酶活力。转录组学分析结果表明:ABp 组与 Mod 组小鼠基因表达水平对比,出现 295 个差异基因;与 Mod 组小鼠海马区脑组织基因表达水平相比,ABp 显著上调了 79 个基因表达水平,显著下调 216 个基因表达水平。蛋白印迹结果表明,ABp 抗衰老活性的潜在作用机制可能与 Keap1/Nrf2/P53 信号通路有关。

参考文献:

[1] LIU X, LUO Q, RAKARIYATHAM K, et al. Antioxidation and anti-ageing activities of different stereoisomeric astaxanthin *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 25: 50-61.

[2] FENG Y, YU Y H, WANG S T, et al. Chlorogenic acid protects D-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(6): 132-135.

[3] XU J, LI Y, REGENSTEIN J, et al. *In vitro*, and, *in vivo*, anti-oxidation and anti-fatigue effect of monkfish liver hydrolysate[J]. Food Bioscience, 2017, 18: 9-14.

[4] TIAN B, WU Y, SHENG D, et al. Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*[J]. Luminescence, 2004, 19(2): 78-84.

[5] DING J F, LI Y Y, XU J J, et al. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1350-1353.

[6] XU J, LI Y, REGENSTEIN J, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-oxidation and anti-fatigue effect of monkfish liver hydrolysate[J]. Food Bioscience, 2017, 18: 9-14.

[7] CHANG J B, WU M F, YANG Y Y, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and its amelioration by *Agaricus blazei* Murrill extract in a mouse model[J]. In Vivo, 2011, 25(6): 971-976.

[8] JIANG L, YU Z, LIN Y, et al. Low-molecular-weight polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill modulate the Th1 response in cancer immunity[J]. Oncology Letters, 2018, 15(3): 3429-3436.

[9] REN C, ZHOU Y, XIAN S, et al. Study on anti-infection effect of polysaccharide from *Agaricus blazei* Murrill on mice[J]. Agricultural Biotechnology, 2018, 7(4): 110-112.

[10] DA S D S A, CORREA V G, DE A G G, et al. *Agaricus blazei* bioactive compounds and their effects on human health: benefits and controversies[J]. Current Pharmaceutical Design, 2017, 23(11):67-81.

[11] 蒲超,张珊珊,吴青霞等. 姬松茸多糖上调 miR-382-3p 表达保护 IL-1β 诱导的软骨细胞损伤[J]. 中国药师,2022,25(4):573-578.
PU C, ZHANG S S, WU Q X, et al. Upregulation of miR-382-3p expression by *Agaricus blazei* polysaccharides to protect IL-1 β Induced chondrocyte damage[J]. Chinese Pharmacist, 2022, 25(4): 573-578.

[12] 徐天雄. 姬松茸水提物对肿瘤微环境的影响与免疫调节机制研究[D]. 广州:华南理工大学,2022.
XU T X. Study on the effect of water extract of Agaricus blazei on Tumor microenvironment and immune regulation mechanism[D]. Guangzhou: South China University of Technology,2022.

[13] KOWALCZYK M S, TIROSH I, HECKL D, et al. Single-cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells[J]. Genome Research, 2015, 25(12): 1860.

[14] WHITE R R, MILHOLLAND B, MACRAE S L, et al. Comprehensive transcriptional landscape of aging mouse liver[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 1-15.

[15] KOU X, LIU X, CHEN X, et al. Ampelopsin attenuates brain aging of D-gal-induced rats through miR-34a-mediated SIRT1/mTOR signal pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 74484 - 74495.

[16] LI Q, ZENG J, SU M, et al. Acetylshikonin from Zicao attenuates cognitive impairment and hippocampus senescence in D-galactose-induced aging mouse model via upregulating the expression of SIRT1[J]. Brain Research Bulletin, 2018, 137:311 - 318.

[17] MA GORZATA N, ANDRZEJ G. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016: 1 - 23.

[18] MALTESE G, PSEFTELI P, RIZZO B, et al. The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells[J]. Journal of Cellular & Molecular Medicine, 2017, 21(3): 621 - 627.

[19] JEONG Y, HOANG N T, LOVEJOY A, et al. Role of KEAP1/NRF2 and TP53 mutations in lung squamous cell carcinoma development and radiation resistance[J]. Cancer Discovery, 2016, 7(1): 86 - 101.

[20] LI L, DONG H, SONG E, et al. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling[J]. Chemico-Biological Interactions, 2014, 209(1): 56 - 67.

Mechanism of *Agaricus blazei* Polypeptide on Aging Mice Induced by D-Galactose

FENG Qingxia[1,2], SUN Yanyan[1], SUN Jingbo[2], YUAN Guangxin[2], AN Liping[2,*]

(1. *Food and Drug Engineering College, Jilin Province Economic Management Cadre College, Changchun* 130012, *China*;
2. *School of Pharmacy, Beihua University, Jilin* 132013, *China*)

Abstract: Polypeptides are important active substances in *Agaricus blazei*. To investigate the anti-aging effect of *Agaricus blazei* polypeptide (ABp), ABp was prepared by hydrolyzing *Agaricus blazei* protein with pepsin, and purified by column chromatography using a protein purification system. A mouse aging model was established by injecting D-galactose. The effects of ABp on aging model mice were investigated by behavioral experiments, serum biochemical indicators and transcriptome sequencing. Furthermore, Western blotting was used to explore the potential mechanism of ABp. The results indicated that the molecular weight of ABp was 3.3 kDa after separation and purification. ABp could significantly inhibit the elevated levels of reactive oxygen species and malondialdehyde in mouse serum caused by D-galactose, significantly enhanced the total antioxidant capacity and catalase activity in mouse serum. The transcriptome sequencing results showed significant differences in the expression levels of 295 genes in mouse hippocampus between ABp group and model group. Compared with the aging model group, ABp upregulated 79 genes and downregulated 216 genes in mouse hippocampus. The results of Western blotting indicated that the potential mechanism of ABp anti-aging might be related to the Keap1/Nrf2/P53 signaling pathway. This study aims to provide a theoretical basis for the development of anti-aging functional food of *Agaricus blazei*.

Keywords: *Agaricus blazei* polypeptide; D-galactose; aging; transcriptome sequencing; Keap1/Nrf2/P53

(责任编辑:郝一铭)