

医药与日化原料

乳酸菌发酵提取物保护皮肤氧化损伤的作用与机理

赵 丹, 刘平平, 李 萌*, 王昌涛, 张佳婵, 王冬冬

(北京工商大学 化学与材料工程学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048)

摘要: 通过发酵培养获得了 5 种乳酸菌发酵提取物: 植物乳杆菌发酵提取物 (FE1)、类干酪乳杆菌发酵提取物 (FE2)、嗜酸乳杆菌发酵提取物 (FE3)、高加索酸奶乳杆菌发酵提取物 (FE4)、瑞士乳杆菌发酵提取物 (FE5)。从生化、细胞、分子 3 种水平对所得提取物的抗氧化功效和保护细胞氧化应激损伤的效果和机制进行检测。质量浓度为 10 g/L FE1 清除自由基的能力最强, 可清除 49.14%的 $\cdot\text{OH}$ 和 73.99%的 $\cdot\text{O}_2^-$ 。质量浓度为 10 g/L 的 FE1、FE2 和 FE3 能够显著提高氧化应激损伤条件下人皮肤成纤维细胞的存活率与谷胱甘肽过氧化物酶活性, 降低细胞内活性氧含量。FE1 保护下胞内过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性及总抗氧化能力显著提升。FE1 通过促进 Sirt1 以及 Wnt/ β -catenin 通路中 β -catenin、SMP30、FoxO3a、Tbx3 的表达以提升抗氧化能力。结果表明, FE1 良好的抗氧化功效能够减缓 H_2O_2 刺激引起皮肤细胞的氧化损伤。

关键词: 乳酸菌; 发酵提取物; 保护; 氧化; 损伤; 医药与日化原料

中图分类号: TQ658; TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 04-0752-09

Effect and mechanism of lactic acid bacteria fermentation extracts to protect skin from oxidative stress damage

ZHAO Dan, LIU Pingping, LI Meng*, WANG Changtao,
ZHANG Jiachan, WANG Dongdong

(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, College of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Five kinds of lactic acid bacteria fermentation extracts, *Lactobacillus plantarum* fermentation extract (FE1), *Lactobacillus paracasei* fermentation extract (FE2), *Lactobacillus acidophilus* fermentation extract (FE3), *Lactobacillus kefir* fermentation extract (FE4) and *Lactobacillus helveticus* fermentation extract (FE5) were obtained by fermentation culture. The antioxidant effect and mechanism of protecting cells from oxidative stress damage of the obtained extracts were tested at biochemical, cellular, and molecular levels. Mass concentration of 10 g/L FE1 had the strongest ability to scavenge free radicals, which could scavenge 49.14% of $\cdot\text{OH}$ and 73.99% of $\cdot\text{O}_2^-$. Mass concentration of 10 g/L FE1, FE2 and FE3 could significantly improve the survival rate and glutathione peroxidase activity of human skin fibroblasts and reduce the content of reactive oxygen species in cells under oxidative stress damage conditions. Under the protection of FE1, the activities of intracellular catalase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity were significantly increased. FE1 enhanced the antioxidant capacity by upregulating the expression of Sirt1 and genes in Wnt/ β -catenin pathways including β -catenin, SMP30, FoxO3a, and Tbx3. The above results indicated that the good antioxidant effect of FE1 could slow down the oxidative stress damage of skin cells caused by H_2O_2 .

Key words: lactic acid bacteria; fermentation extract; protection; oxidaton; damage; drug and cosmetic materials

收稿日期: 2021-09-08; 定用日期: 2021-12-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20210907

基金项目: 国家自然科学基金 (31971382)

作者简介: 赵 丹 (1988—), 女, 实验师, E-mail: zhaodanustb@126.com。联系人: 李 萌 (1981—), 女, 副教授, E-mail: mengmengli@163.com。

随着生活水平的日益提高,人们越来越注重对皮肤的防护。紫外线暴露、机体衰老等外源性和内源性因素均会导致自由基的产生,从而破坏皮肤细胞氧化平衡状态发生氧化损伤,加速皮肤衰老,产生皱纹、色斑、弹性下降等问题。抗氧化剂能够消除细胞内的活性氧(ROS)和自由基,减缓氧化应激引起的皮肤细胞损伤^[1-2]。因此,天然抗氧化剂的开发逐渐成为近年来的研究热点。

乳酸菌是公认的最安全的食品级微生物,广泛用于食品饮料中,同时也是天然的抗氧化剂。研究发现,乳酸菌及其发酵产物可以降低机体内ROS的累积量,维持人体ROS正常水平^[3-4],同时,乳酸菌及其相关产物还能够提升抗氧化酶活性,清除机体过量自由基,维持氧化与抗氧化系统的平衡,起到抵御氧化应激损伤的作用^[5-6]。乳酸菌的抗氧化性成分包含乳酸菌菌体、乳酸菌溶胞物以及发酵上清液,其中乳酸菌发酵上清液抗氧化能力最强^[7]。目前,对于对乳酸菌发酵产物的生物活性研究主要集中在食品领域,虽然化妆品市场上已经出现了乳酸菌发酵相关的产品,但其在化妆品功效原料方面研究尚不充分。有研究表明,乳酸菌能够增强皮肤抵御光老化的能力,减缓紫外线诱导引发的皮肤光损伤,但乳酸菌防护皮肤氧化应激引起损伤的效果与作用机制均有待进一步探究^[8-9]。

本文在已有乳酸菌抗氧化相关研究的基础上,探究不同乳酸菌发酵提取物保护人皮肤细胞抵御氧化损伤的效果与作用机制,以弥补当前乳酸菌发酵提取物在化妆品领域研究的不足,筛选出能够保护皮肤细胞抵御氧化应激引起损伤的乳酸菌,为乳酸菌发酵成分在延缓皮肤衰老方面的使用提供依据,以及为开发与制备乳酸菌发酵成分相关的化妆品原料提供理论支撑。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、类干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、高加索酸奶乳杆菌(*Lactobacillus kefir*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*),北京市植物资源研究开发重点实验室保藏;FeSO₄、双氧水(质量分数为30%),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;总抗氧化能力检测试剂盒、ROS检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(WST-8法)、胞内过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒、青霉素(1×10⁵ U/L)、链霉素(质量浓度为100 mg/L),

上海碧云天生物技术有限公司;人皮肤成纤维细胞(HSF),中国科学院细胞库;FM培养基,美国康宁公司;EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix反转录试剂盒、TransStart® Top Green qPCR SuperMix,北京全式金技术股份有限公司。

UV mini-1240型紫外-可见分光光度计,岛津企业管理(中国)有限公司;WJ-80A-II型CO₂恒温培养箱,上海圣科仪器设备有限公司;Olympus IX 73倒置显微镜,上海普赫光电科技有限公司;TGL-16冷冻高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;Infinite M200 PRO荧光酶标仪,瑞士Tecan贸易有限公司;QuantStudio 3实时荧光定量PCR仪,美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 发酵提取物的制备

将质量分数为3%的不同乳酸菌接种到牛乳培养液中,置于37℃培养箱内培养,当酸度达到80°T时取出,90℃灭菌30 min,4500 r/min离心10 min弃沉淀得到发酵提取物,将其在-80℃下冻干48 h,获得乳酸菌发酵提取物,分别为植物乳杆菌发酵提取物(FE1)、类干酪乳杆菌发酵提取物(FE2)、嗜酸乳杆菌发酵提取物(FE3)、高加索酸奶乳杆菌发酵提取物(FE4)、瑞士乳杆菌发酵提取物(FE5)。

酸度检测:以酸碱滴定法按照文献[10]进行检测,滴定至颜色微红,且30 s颜色不消失时记录0.1 mol/L NaOH标准溶液体积。酸度(°T)=消耗NaOH标准溶液体积(mL)/样品质量(g)。

1.2.2 发酵提取物的抗氧化能力检测

对•OH清除实验按照文献[11]进行。•OH的清除率按照式(1)计算:

$$\text{清除率}/\% = (A_0 - A_1 + A_2)/A_0 \times 100 \quad (1)$$

式中:A₀、A₁、A₂分别为空白对照组(去离子水)、样品组和本底组(样品与反应液同等体积的去离子水)的吸光度。

对•O₂的清除实验按照文献[12]进行,•O₂的清除率计算公式同式(1)。

1.2.3 发酵提取物对HSF存活率的影响

将V_c与5种不同的发酵提取物样品分别以无血清的DMEM培养液配制成质量浓度为10、2、0.4、0.08、0.016 g/L的样品。按照文献[13]培养人皮肤成纤维细胞,并按照式(2)计算HSF存活率:

$$\text{HSF存活率}/\% = [\text{样品 OD} - \text{空白对照 OD}] / (\text{细胞对照 OD} - \text{空白对照 OD}) \times 100 \quad (2)$$

式中:OD为光密度值。

1.2.4 HSF衰老模型建立

计数HSF,以5.0×10⁵个/孔密度加入96孔板中。

在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养过夜，以 1000、500、250、100、50、25、10、1 mmol/L 的双氧水分别处理细胞 1、2、3、4 h 后，以 MTT 法检测 HSF 的活性。

1.2.5 发酵提取物缓解 HSF 衰老作用的探究

1.2.5.1 乳酸菌发酵提取物对 HSF 存活率的保护作用

计数 HSF，以 1.0×10⁴ 个/孔的密度加入 96 孔培养板中。在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 环境下培养过夜。将不同乳酸菌发酵提取物处理细胞后再以双氧水（100 μmol/L）作用 HSF 2 h。检测 HSF 存活率以确定发酵提取物对双氧水引起的 HSF 的氧化应激是否存在保护作用。

1.2.5.2 细胞样品制备

计数 HSF，调节细胞密度使 6 孔培养板中的细胞密度为 1.5×10⁶ 个/孔。在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 环境下培养过夜，弃培养基后先以发酵提取物作用细胞 24 h 后，再以 100 μmol/L 双氧水作用 HSF 2 h。取出，置于冰上，清洗细胞，除去双氧水，每孔加入 100 μL 裂解液裂解细胞，可得细胞裂解液。保持 4 °C、1.2×10⁴ g 离心 5 min，弃沉淀得到细胞裂解液的上清液。

1.2.5.3 HSF 内 ROS 含量的检测

细胞培养同 1.2.5.2 节，培养完成后以磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4，0.01 mol/L）清洗细胞，加入质量分数为 0.25%胰酶将细胞从 6 孔板中消化，离心收集细胞沉淀，参照 ROS 检测试剂盒说明书操作，以激发波长 488 nm，发射波长 525 nm 进行荧光的检测，记录荧光强度，其中荧光强度与 ROS 含量成正相关性。

1.2.5.4 HSF 的抗氧化活性测定

得到细胞裂解液及上清后按照试剂盒检测发酵提取物对 HSF 中 SOD、CAT、GSH-Px、总抗氧化能力的影响及对 MDA 含量的影响。

1.2.6 qRT-PCR 检测衰老相关基因表达量

1.2.6.1 细胞培养及总核糖核酸（RNA）的提取与转录

计数 HSF，并以 1.0×10⁶ 个/孔的密度接种于 6 孔培养板中。在细胞培养箱中培养过夜，弃培养基并用 100 μmol/L 双氧水处理细胞 2 h，吸弃双氧水，用 PBS（pH 7.4，0.01 mol/L）洗 3 次，再以质量浓度为 5.0、2.5、0.5 g/L 的 FE1 处理细胞 24 h。Trizol 法提取 RNA，将抽提所得 RNA 储存于-80 °C 冰箱中。cDNA 第 1 条链合成反应使用 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒进行。特异性引物、引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for Real-time PCR

基因	方向	引物
GADPH	F	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	R	GACAAGCTTCCC GTTCTCAG
Sirt1	F	TGTGGTAGAGCTTGCATTGATCTT
	R	GGCCTGTTGCTCTCCTCATT
FoxO3a	F	GCA AGC ACA GAG TTG GAT GA
	R	CAG GTC GTC CAT GAG GTT TT
SMP30	F	CCG TGG ATG CCT TTG ACT AT
	R	TCC AAA GCA GCA TGA AGT TG
Tbx3	F	CCC CTT CCT CAA TCT GAA CA
	R	GAC ATG GAG CTG GAG GAG AG
β-catenin	F	CAC TAC CAC AGC TCC TTC TC
	R	GAG CAG CAT CAA ACT GTG TA

1.2.6.2 qPCR 检测

根据 TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书操作 qPCR，将反应物混合后在实时荧光定量 PCR 仪上进行。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌发酵提取物的抗氧化能力检测

在衰老的过程中，ROS 升高导致机体内抗氧化能力的减弱。机体在外界环境刺激下，以及线粒体、脂肪酸等均可产生·O₂⁻、H₂O₂、·OH 等各种过氧化因子，诱导细胞内物质发生过氧化并且引起细胞凋亡，加速推进衰老进程^[14]。因此，通过检测不同乳酸菌发酵提取物对·OH 和·O₂⁻的清除作用来评估其防护氧化损伤的能力。

2.1.1 乳酸菌发酵提取物对·OH 的清除作用

不同乳酸菌发酵提取物对·OH 的清除作用结果见图 1。

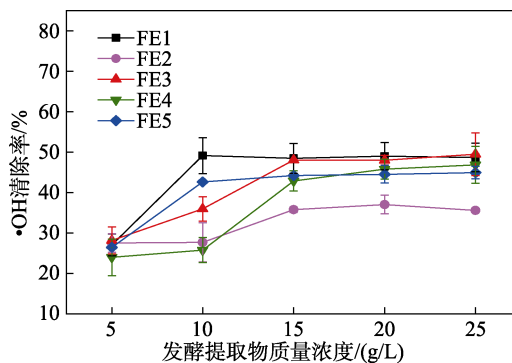


图 1 5 种乳酸菌发酵提取物对·OH 的清除作用
Fig. 1 Scavenging effect of five different lactobacillus fermentation extracts on ·OH

由图 1 可以看出，5 种乳酸菌发酵提取物对·OH 均有一定的清除作用，但清除能力各异。FE1 质量

浓度为 10 g/L 时, 对 $\cdot\text{OH}$ 清除率达到最大值, 为 49.14%。FE3 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力呈量效关系, 当质量浓度升高至 20 g/L 时, 其对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力与质量浓度 10 g/L 的 FE1 几乎相同。随着质量浓度的变化, FE2、FE4 和 FE5 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力变化不大, 且都小于质量浓度为 10 g/L 的 FE1。 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用与金属离子的螯合作用密切相关^[15]。不同乳酸菌发酵所得的胞外成分不同, 对金属离子的螯合能力各有差异, 因此, 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除程度不同。5 种乳酸菌发酵提取物在低质量浓度时对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用均呈剂量依赖性, 质量浓度达到 15 g/L 后, 清除效果趋于稳定。这可能是由于样品达到一定质量浓度后, 其对溶液中金属离子的螯合能力达到阈值, 因此, 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力不再随质量浓度升高而增强。

2.1.2 乳酸菌发酵提取物对 $\cdot\text{O}_2$ 的清除作用

$\cdot\text{O}_2$ 是生物体生理反应中自然产生的中间产物, 是 ROS 的一种, 具有极强的氧化能力, 是机体生物氧损害的重要因素之一^[16]。不同乳酸菌发酵提取物对 $\cdot\text{O}_2$ 的清除作用见图 2。

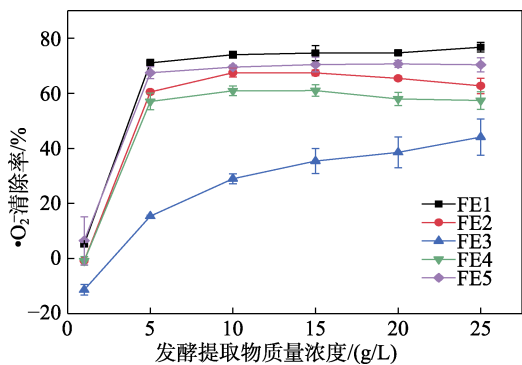


图 2 不同发酵提取物对 $\cdot\text{O}_2$ 的清除作用

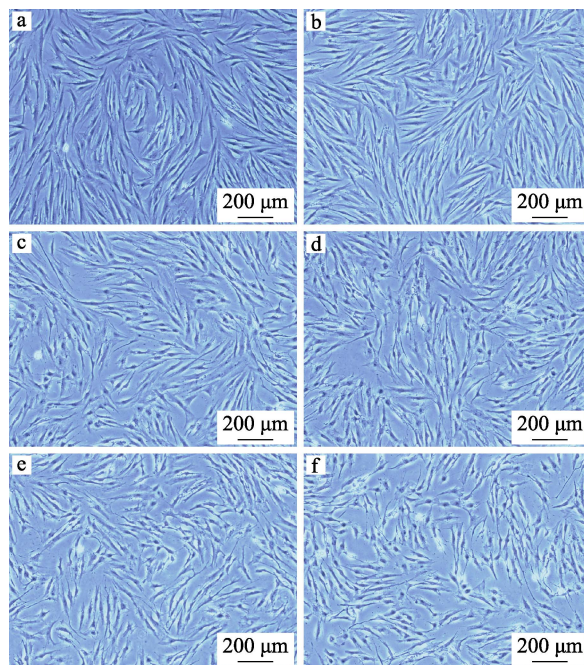
Fig. 2 Scavenging effect of different fermentation extracts on $\cdot\text{O}_2$

由图 2 可知, 不同乳酸菌发酵提取物对 $\cdot\text{O}_2$ 均有一定的清除作用, 当发酵提取物质量浓度 <5 g/L 时, 对 $\cdot\text{O}_2$ 的清除能力与发酵提取物质量浓度呈正相关, 当质量浓度 >5 g/L 时, FE1、FE2、FE4、FE5 发酵提取物对 $\cdot\text{O}_2$ 的清除率基本不变。5 种发酵提取物清除 $\cdot\text{O}_2$ 的半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 4.85、7.42、28.69、9.47、5.53 g/L。由此可见, 5 种乳酸菌发酵提取物清除 $\cdot\text{O}_2$ 由大到小的顺序为 FE1 $>$ FE5 $>$ FE2 $>$ FE4 $>$ FE3, 其中 10 g/L FE1 能够清除 73.99% 的 $\cdot\text{O}_2$ 。乳酸菌的抗氧化性质源于其主要胞外成分多糖和多肽, 乳酸菌胞外多糖与抗氧化密不可分, 多肽类物质也具有诸如降血压、抗氧化等功效^[17]。因此, 乳酸菌发酵提取物对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2$ 两种自由基的清除作用能够减缓自由基引起的氧化损伤。

2.2 建立双氧水诱导的氧化应激损伤模型

双氧水处理对 HSF 形态的影响见图 3, 其中 a

为空白, b~f 分别为 50、100、250、500、1000 $\mu\text{mol/L}$ 的双氧水作用 HSF 2 h。由图 3 可见, 未经处理 HSF 形态一致, 呈长梭形。随着双氧水浓度的增加, 经双氧水处理后的 HSF 不断变短变细, 且数量不断减少。



a—空白; b—50 $\mu\text{mol/L}$; c—100 $\mu\text{mol/L}$; d—250 $\mu\text{mol/L}$; e—500 $\mu\text{mol/L}$; f—1000 $\mu\text{mol/L}$

图 3 不同浓度双氧水处理对 HSF 形态的影响

Fig. 3 Effect of treatment of hydrogen peroxide with different concentration on cellular morphology of HSF

双氧水刺激对 HSF 存活率的影响结果见图 4。

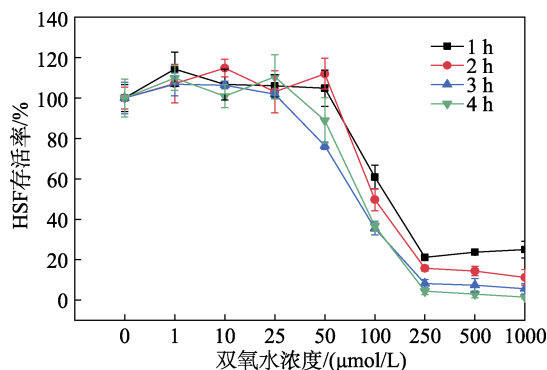


图 4 双氧水对 HSF 存活率的影响

Fig. 4 Effect of hydrogen peroxide on viability of HSF

由图 4 可知, HSF 存活率与双氧水浓度呈负相关, 当双氧水浓度 >25 $\mu\text{mol/L}$ 时, HSF 存活率急剧下降。当 100 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水作用 HSF 时间为 2 h 时, HSF 存活率为 $49.74\% \pm 5.48\%$ 。考虑时间成本与双氧水用量, 选择以 100 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水处理 HSF 2 h 建立 HSF 损伤模型。

2.3 发酵提取物缓解 HSF 衰老的机制

2.3.1 MTT 法检测发酵提取物对 HSF 的毒性

乳酸菌发酵提取物与 V_C 对 HSF 存活率的影响见图 5。

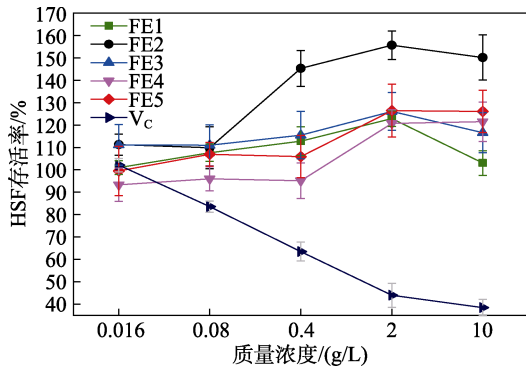


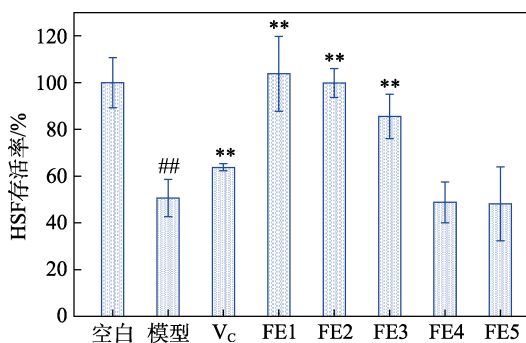
图 5 乳酸菌发酵提取物与 V_C 对 HSF 存活率的影响
Fig. 5 Cell viability with different lactic acid fermentation extracts and V_C

由图 5 可知, 当发酵提取物质量浓度为 10 g/L 时, HSF 存活率均>90%, 说明该质量浓度的发酵提取物对 HSF 无毒或低毒, 因此, 选择质量浓度 10 g/L 发酵提取物进行后续实验。

随着 V_C 质量浓度的增加, HSF 存活率逐渐降低, 当 V_C 质量浓度为 0.086 g/L 时, HSF 存活率为 80%, 为避免过高质量浓度 V_C 对细胞活性的影响, 后续实验选择质量浓度为 0.086 g/L V_C 处理 HSF。

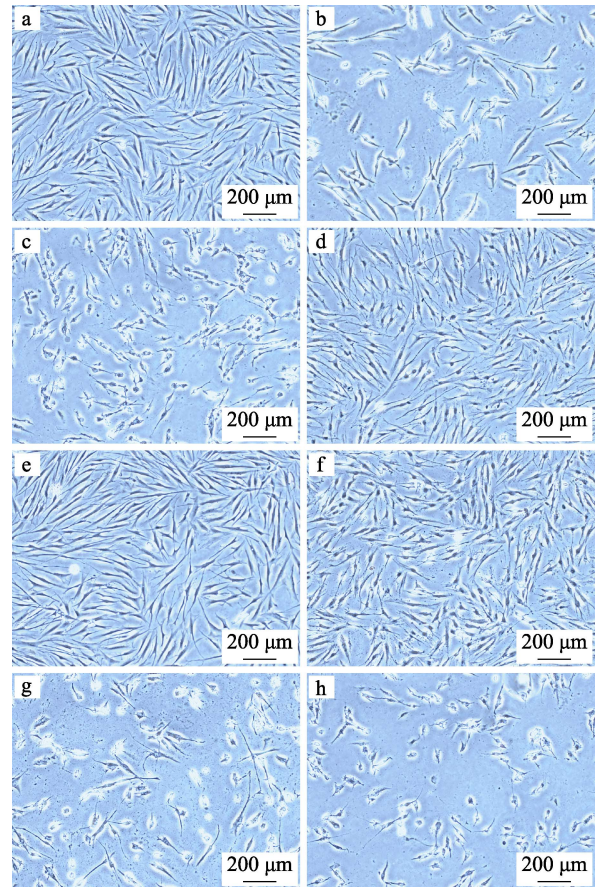
2.3.2 发酵提取物对 HSF 存活率的保护作用

不同乳酸菌发酵提取物保护下 24 h 后 HSF 存活率见图 6, 图 7 为相应物质作用下 HSF 的形态图。由图 6 可知, 双氧水处理的模型组 HSF 数量明显减少, FE1、FE2、FE3 与 V_C 处理组的细胞数量明显多于模型组, FE4、FE5 组相对于模型组其细胞数量无明显增加。因此, FE1、FE2、FE3 与 V_C 对氧化损伤的 HSF 有显著保护作用, 后续实验选择 V_C 作为阳性对照, 对 FE1、FE2、FE3 样品作进一步检测。



“##”表示与空白相比, 差异极显著 ($p < 0.01$); “**”表示与模型组相比, 差异极显著 ($p < 0.01$), 下同

图 6 乳酸菌发酵提取物保护下的 HSF 存活率
Fig. 6 HSF survival rate protected by lactic acid fermentation extracts



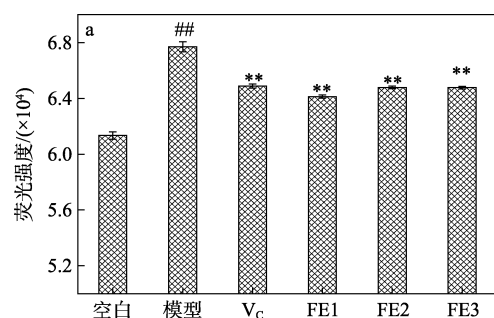
a—空白组; b—模型组; c—V_C; d—FE1; e—FE2; f—FE3; g—FE4; h—FE5

图 7 乳酸菌发酵提取物保护作用对氧化应激损伤 HSF 形态的影响

Fig. 7 Protective effect of lactic acid bacteria fermentation extracts on the morphology of HSF damaged by oxidative stress

2.3.3 发酵提取物对氧化损伤 HSF 细胞抗氧化活性的影响

Harman 提出自由基衰老学说指出, 线粒体产生的 ROS 过量/ROS 的防御能力减弱之间矛盾的激化, 最终导致衰老^[18]。因此, 通过检测乳酸菌发酵提取物对 HSF 中 ROS 含量的影响来评估其抗氧化效果, 结果见图 8a。由图 8a 可知, 模型组 ROS 含量显著增加, 阳性对照 V_C 和 FE1、FE2、FE3 均可极显著降低双氧水氧化应激导致的 HSF 内 ROS 含量的增加 ($p < 0.01$), 从而减缓 ROS 过多导致的氧化损伤。



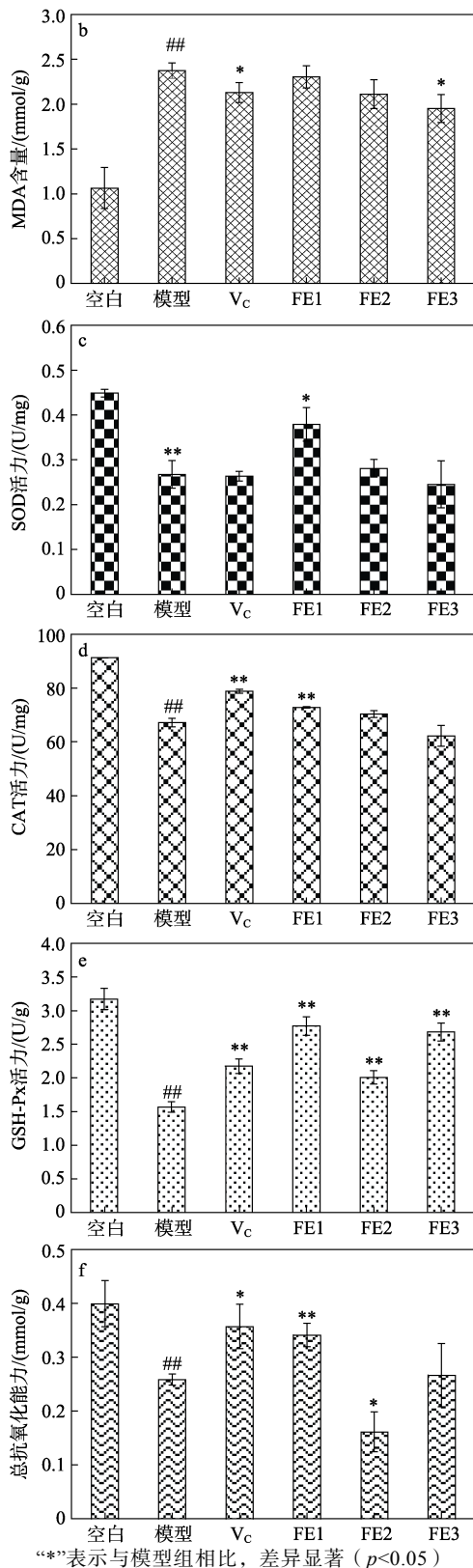


图8 乳酸菌发酵提取物对 HSF 内 ROS (a) 和 MDA 含量 (b)、SOD (c)、CAT (d) 及 GSH-Px (e) 活力、总抗氧化能力 (f) 的影响

Fig. 8 Effects of lactic acid fermentation extracts on the contents of ROS (a) and MDA (b), activities of SOD (c), CAT (d) and GSH-Px (e), as well as total antioxidant capacity (f) in HSF

机体中过剩的自由基攻击不饱和脂肪酸发生氧化, 脂质过氧化产物 (MDA) 就会升高。因此, MDA 的水平高低可以直接反映出机体氧自由基水平, 以及过氧化反应的强度和速率, 是反映因过氧化导致机体组织和细胞损伤程度的重要指标^[19]。发酵提取物对 HSF 中 MDA 的影响见图 8b。双氧水作用 HSF 后, 引起 HSF 氧化损伤, 与空白组相比, 模型组 MDA 含量显著增加 ($P < 0.01$)。Vc 和 FE3 均能显著降低所作用 HSF 内 MDA 含量 ($p < 0.05$), 且 FE3 抑制 MDA 产生的效果强于 Vc。这是由于 FE3 的作用减缓了 ROS 对 HSF 造成的损伤, 从而减少了 MDA 的产生。

SOD 是体内天然存在的 $\cdot\text{O}_2$ 清除因子, 通过歧化反应可以把有害的 $\cdot\text{O}_2$ 转化为 H_2O_2 。体内的过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 会立即将其分解为 H_2O 和 O_2 , 3 种酶便组成了一个完整的抗氧化链条^[20]。乳酸菌发酵提取物对 SOD 活性的影响如图 8c 所示, FE1 可显著升高 HSF 内被双氧水降低的 SOD 活力 ($p < 0.05$), 但 Vc 与 FE2、FE3 对 HSF 内 SOD 活性无显著的升高作用 ($p > 0.05$)。

乳酸菌发酵提取物对 CAT 酶活性的影响如图 8d 所示, 氧化应激损伤下 CAT 酶活力显著下降, FE1 及 Vc 保护作用下可显著增加细胞内 CAT 活性 ($p < 0.05$), 从而增强对胞内 H_2O_2 的清除效果, 降低对细胞的氧化应激损伤。但 FE1 效果不如 Vc, 而 FE2、FE3 对细胞内 CAT 活力无显著的升高作用 ($p > 0.05$)。

发酵提取物对细胞 GSH-Px 活力的影响作用见图 8e。FE1、FE2、FE3 与细胞共培养后, 体系中加入双氧水造成细胞氧化损伤, 模型组 GSH-Px 活力比空白组显著降低 ($p < 0.01$)。与模型组相比, FE1、FE2、FE3 均可以显著增加 GSH-Px 活力, 且 FE1、FE3 对 HSF 内 GSH-Px 活力的提高能力强于 Vc, FE2 作用效果比 Vc 弱。FE1、FE2 和 FE3 通过提高 GSH-Px 活力可实现对 HSF 内 H_2O_2 及其他过氧化物更好的清除, 进而维持细胞正常的生理功能和延缓衰老^[21]。

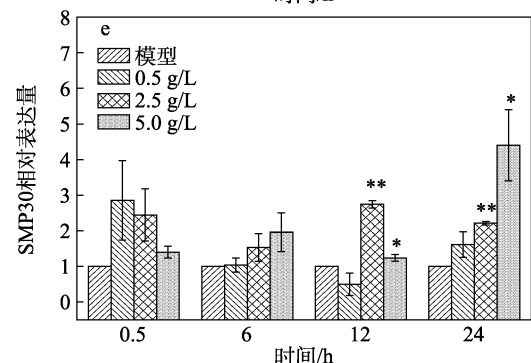
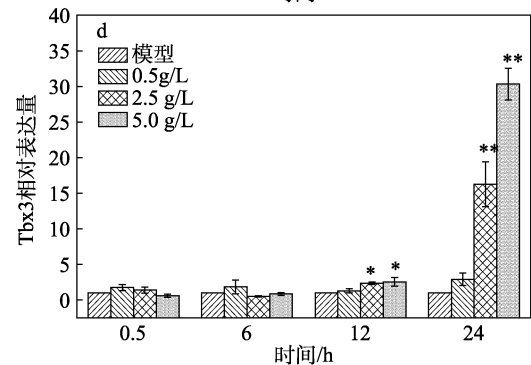
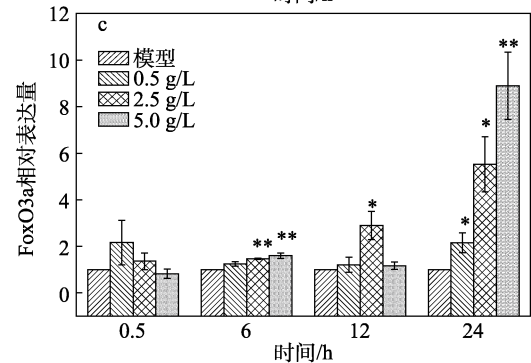
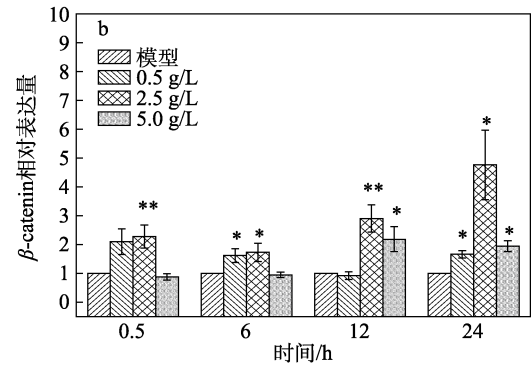
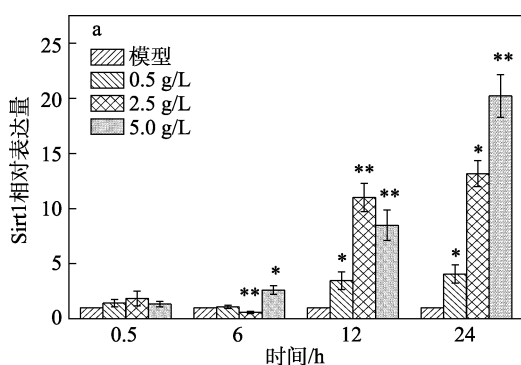
细胞内的各种抗氧化酶、小分子等抗氧化物质通过清除机体产生的各种 ROS 来抵御氧化应激引起的损伤。因此, 体系内的总抗氧化能力体现了其总体的抗氧化水平。发酵提取物对 HSF 中总抗氧化能力的影响见图 8f。由图 8f 可知, 在保护作用下氧化损伤处理后, FE1、Vc 可显著提升 HSF 被双氧水降低的总抗氧化能力 ($p < 0.05$), FE2 和 FE3 保护下的细胞中总抗氧化能力低于模型组。

综上, FE1 能够保护 SOD、CAT、GSH-Px 3 种抗氧化酶免受氧化酶损伤导致的活性降低。FE2 和 FE3 仅对 GSH-Px 活性的提升有显著效果。说明不同发酵提取物发挥抗氧化功效的路径不同, 但 FE1 能够实现同时对 3 种酶活性的调节, 从而达到抗氧化的效果。FE1 在能够显著提高细胞内抗氧化酶活性、降低 ROS 产生的同时, 表现出出色的总抗氧化能力。以上结果表明, FE1 具有良好的保护 HSF 抵御氧化应激引起损伤的作用。为进一步分析其作用机制, 采用实时荧光定量 PCR 仪对其作用机制进行分析。

2.4 植物乳杆菌对 HSF 衰老相关基因表达的影响

Sirt1 可调节细胞增殖、氧化应激、炎症反应与维持机体新陈代谢, 从而延缓细胞凋亡, 被称为“长寿基因”, 是细胞自我保护的重要分子^[22]。FE1 对 HSF 内 Sirt1 表达影响见图 9a。由图 9a 可知, 与模型组相比, 3 种不同质量浓度 FE1 作用细胞 0.5 h 对 Sirt1 相对表达量没有较大影响。从 6 h 开始, 中剂量 (2.5 g/L) FE1 首先抑制 Sirt1 的表达, 接着 12 h 后显著提升细胞 Sirt1 的表达水平 ($p < 0.01$)。高剂量 (5.0 g/L) 的 FE1 在作用细胞 6 h 后显著提升细胞 Sirt1 的表达水平 ($p < 0.05$)。因此, FE1 能够提高 Sirt1 的表达, 从而抵抗氧化应激引起的损伤, 高剂量 (5.0 g/L) 能够促使 Sirt1 基因提前响应。

β -catenin 是经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键性下游效应器, 在许多器官组织的发育和成人体内平衡等方面都发挥了重要作用, β -catenin 在调控细胞增殖、分化、凋亡和衰老方面有着非常重要的作用^[23]。FE1 对 HSF 内 β -catenin 表达影响见图 9b。由图 9b 可知, 中剂量 (2.5 g/L) 的 FE1 作用 HSF 0.5 h 起能显著促进 β -catenin 表达 ($p < 0.05$), 高剂量 (5.0 g/L) 的 FE1 在作用 HSF 12 h 后促进 β -catenin 表达。在低、中、高 3 种不同质量浓度 FE1 作用下, 中剂量对 β -catenin 的促进作用最明显, 在 0.5~24 h 之间, FE1 作用 HSF 后 β -catenin 相对表达量不断提升^[23]。



“*”表示与该时间模型组相比, 差异显著 ($p < 0.05$); “**”表示与该时间模型组相比, 差异极显著 ($p < 0.01$)

图 9 FE1 对 HSF 内 Sirt1 (a)、 β -catenin (b)、FoxO3a (c)、Tbx3 (d) 和 SMP30 (e) 表达的影响
Fig. 9 Effects of FE1 on Sirt1 (a), β -catenin (b), FoxO3a (c), Tbx3 (d) and SMP30 (e) expression in HSF

FoxO3a 参与调控细胞周期、抵抗氧化应激损伤等多种细胞内的生物学调控, 在维持细胞内 ROS 稳态方面起重要作用^[24]。FE1 对 HSF 内 FoxO3a 表达影响如图 9c 所示。中、高剂量 FE1 作用 HSF 6 h 后, 显著促进 FoxO3a 的表达 ($p < 0.01$), 且相对表达量

随着作用时间的延长而增加。说明 FE1 可通过促进 β -catenin、FoxO3a 的表达以缓解双氧水作用细胞后引起的氧化应激损伤,从而延缓细胞的衰老^[25-26]。

Tbx3 是 β -catenin 的靶基因, β -catenin 通路的活化能够上调 Tbx3 的表达,通过调节周期蛋白依赖激酶抑制因子来抑制细胞衰老^[27]。FE1 对 HSF 内 Tbx3 表达影响如图 9d 所示。中剂量和高剂量的 FE1 作用 HSF 后 12~24 h 均表现为对 Tbx3 表达的促进作用。且随着作用时间和作用剂量的增加,其上调表达的效果逐渐增强,中剂量和高剂量 FE1 作用 24 h 后, Tbx3 相对表达量极显著增加 ($p<0.01$),表明 FE1 通过促进 β -catenin 的表达调控 Tbx3 的表达,从而调节周期蛋白激酶抑制因子而延缓细胞衰老^[28]。

衰老标记蛋白 (SMP30) 是钙结合蛋白,具有抗凋亡和抗氧化应激的作用,与 β -catenin 一起能够延缓细胞衰老的进程^[29-30]。FE1 对 HSF 内 SMP30 表达影响如图 9e 所示。由图 9e 可知,FE1 作用 12 h 后,中、高剂量可促进 SMP30 表达,并且中剂量促进效果极为显著 ($p<0.01$)。因此,FE1 可通过促进 β -catenin 表达以调节 SMP30 的表达,进而增强细胞抗氧化应激效果而保持细胞活力^[31]。

信号通路可谓是机体防御氧化应激损伤的最后一道防线,诸多研究表明,乳酸菌有多个调节氧化应激相关的通路,包括 NF- κ B、Wnt/ β -catenin、Nrf2、AKT 等^[32-33]。FE1 通过调节 Sirt1 与 Wnt/ β -catenin 信号通路氧化应激相关基因 β -catenin、FoxO3a、Tbx3、SMP30 的表达来保护 HSF 抵御 H_2O_2 导致的氧化应激损伤,这些基因均与细胞的氧化应激、凋亡有关。因此,也进一步阐明了 FE1 保护下 HSF 的总抗氧化能力和存活率均高于模型组的机理。

FE1 保护 HSF 抵御氧化应激损伤的作用机制如图 10 所示。

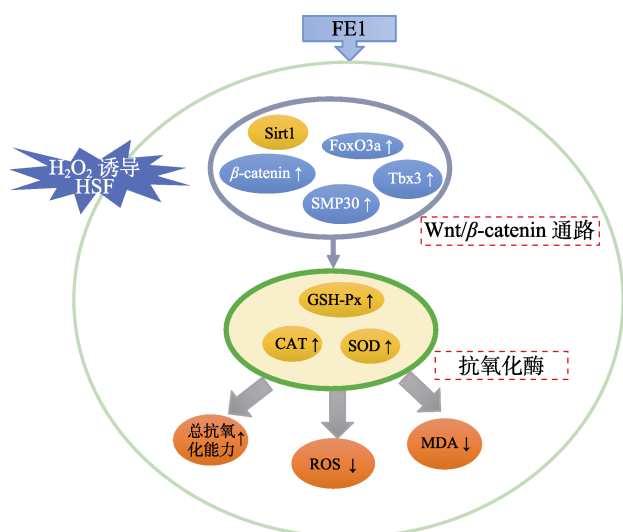


图 10 FE1 保护 HSF 作用机制示意图

Fig. 10 Schematic diagram of mechanism of FE1 protecting HSF

FE1 通过上调 Sirt1 基因以及抗氧化相关基因 β -catenin、FoxO3a、Tbx3 的表达来增强 GSH-Px、CAT 与 SOD 3 种抗氧化酶的活性,从而增加 HSF 的总抗氧化能力,减少 ROS 和 MDA 的产生,进而减缓 H_2O_2 对 HSF 造成的氧化应激损伤。

3 结论

所选的 5 种乳酸菌发酵提取物均具有良好的抗氧化功效,其中,FE1 在清除 \cdot OH 和 \cdot O₂ 能力上优于其他 4 种乳酸菌发酵提取物。在双氧水诱导 HSF 损伤模型中,FE1、FE2 和 FE3 对双氧水诱导的 HSF 损伤有显著的保护作用 ($p<0.05$),且在保护作用中,FE1、FE2 和 FE3 可显著降低 HSF 内 ROS 含量、增强 GSH-Px 活力 ($p<0.05$)。FE3 能显著降低 MDA 含量 ($p<0.05$),FE1 可显著提升 HSF 内 CAT、SOD 活力及总抗氧化能力 ($p<0.05$)。因此,FE1 具有良好的减缓 HSF 由于氧化应激导致的损伤作用。基因水平检测显示,HSF 发生氧化损伤时,FE1 可以通过促进 HSF Sirt1 表达并激活 Wnt/ β -catenin 通路中关键抗氧化基因 β -catenin、FoxO3a、SMP30、Tbx3 的上调表达以降低氧化水平,从而延缓 HSF 衰老。

FE1 作为植物乳杆菌的发酵提取物,在生化和分子水平的抗氧化效果均高于其他乳酸菌发酵提取物。这可能是由植物乳杆菌分泌的胞外多糖良好的抗氧化性所赋予的。结果表明,FE1 可作为天然抗氧化、延缓衰老的功效原料添加到化妆品或食品中,为乳酸菌的进一步开发应用提供参考。

参考文献:

- [1] LI X T (李兴太), JI Y (纪莹). Recent advances in mitochondrial oxidative stress and natural antioxidants[J]. Food Science (食品科学), 2015, 36(7): 268-277.
- [2] GÜLÇİN İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(1): 210-218.
- [3] LIU C F, PAN T M. *In vitro* effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity[J]. Drug Food Analysis, 2010, 18(2): 77-86.
- [4] LIU J (刘晶), MENG Y (孟杨), ZHAO Z (赵征). Antioxidant activity of *Lactobacillus bulgaricus* fermented whey[J]. Food Science and Technology (食品工业科技), 2012, 33(9): 146-149.
- [5] EJTAHED H S, MOHTADI N J, HOMAYOUNI R A, et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients[J]. Nutrition, 2012, (5): 539-543.
- [6] NG C C, WANG C Y, WANG Y P, et al. Lactic acid bacterial fermentation on the production of functional antioxidant herbal *Anoectochilus formosanus* Hayata[J]. Journal of Bioscience, 2011, 111(3): 289-293.
- [7] HUANG L (黄丽), YANG P (杨攀), ZENG Q K (曾庆坤), et al. Antioxidant activity of extracellular secretions of different lactic acid bacteria[J]. China Brewing (中国酿造), 2019, 38(11): 49-53.
- [8] LEE D E, HUH C S, RA J, et al. Clinical evidence of effects of *Lactobacillus plantarum* HY7714 on skin aging: A randomized,

- double blind, placebo-controlled study[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(12): 2160-2168.
- [9] HUANG H C, CHANG T M. Antioxidative properties and inhibitory effect of *Bifidobacterium adolescentis* on melanogenesis[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28(9): 2903-2912.
- [10] LI Y Z (李玉珍). Comparative study on the composition and functional characteristics of different traditional fermented milk [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (内蒙古农业大学), 2015.
- [11] FU Y Y (付依依), WANG Y X (王永霞), LI Y (李月), *et al.* Study on *in vitro* anti-inflammatory and antioxidant activities of flavonoids from sea buckthorn[J]. *China Food Additives (中国食品添加剂)*, 2021, 32(10): 67-74.
- [12] WANG X (王新). Extraction and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[D]. Zhenjiang: Jiangsu University (江苏大学), 2007.
- [13] LIU P P (刘平平), YU D (虞旦), WANG C T (王昌涛), *et al.* Anti-aging activity of polysaccharides from Sanqi fermentation broth[J]. *Daily Chemical Industry (日用化学工业)*, 2019, (6): 369-387.
- [14] ZHANG C L (张翠利), FU L N (付丽娜), YANG X Y (杨小云), *et al.* Review of the relationship between ROS and senescence[J]. *Guangzhou Chemical Industry (广州化工)*, 2015, 43(19): 5-7.
- [15] AHIRE J J, MOKASHE N U, PATIL H J, *et al.* Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 50(1): 26-34.
- [16] DONG K (董坤), ZHAI W L (翟文丽), WANG L Q (王兰青), *et al.* Protective effect of strawberry (*Fragaria*×*Ananassa*) leaves water extract on skin damage by UVB[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(4): 806-814.
- [17] LI J Y (李景艳). Antioxidant activities and structure of lactic acid bacteria exopolysaccharides[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2013.
- [18] XIA S J (夏世金), SUN T (孙涛), WU J Z (吴俊珍). Free radicals, inflammation and senescence[J]. *Practical Geriatrics (实用老年医学)*, 2014, 28(2): 100-103.
- [19] MA J D (马金丹), HUANG Y (黄艳), GU M E (顾沐恩), *et al.* Effects of moxibustion at BL23 (Shenshu) on serum MDA, liver and kidney function in aging rats[J]. *Journal of Changchun University of Chinese Medicine (长春中医药大学学报)*, 2018, 34(2): 215-217.
- [20] LI T (李婷), LIANG S T (梁舒婷), LIAO M A (廖美爱), *et al.* Research on the relationship between the ability of learning and memory and the levels of SOD, GSH-Px, and MDA in aging mice with *Ligusticum* and *Chuan Qiong Hort*[J]. *The Journal of Medical Theory and Practice (医学理论与实践)*, 2017, 30(18): 2661-2663.
- [21] ZHANG J (张军), WANG S (王硕), MENG F J (孟繁杰), *et al.* Research progress on the role of glutathione peroxidase in tumors[J]. *Cancer (癌症)*, 2019, 38(6): 282-287.
- [22] MORITA Y, WADA H O, YANO T, *et al.* Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: An implicative role of SIRT1 in the ovary[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012, 10: 1-10.
- [23] TIAN L M (田黎明). Study of β -catenin against oxidative stress-induced senescence human skin fibroblasts[D]. Changsha: Central South University (中南大学), 2011.
- [24] PETER K, BOUDEWIJN B, DANSEN T B. Forkhead box O as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 14(6): 1093-1106.
- [25] CLAVEL S, SIFFROIFERANDEZ S, COLDEFY A S, *et al.* Regulation of the intracellular localization of FoxO3a by stress-activated protein kinase signaling pathways in skeletal muscle cells[J]. *Molecular Cellular Biology*, 2010, 30(2): 470-480.
- [26] CHEN Y J (陈用军), SHI N (石年), LIU X M (刘晓明), *et al.* Effects of high expression of β -catenin on the expression of FoxO3a in human skin fibroblasts induced by UVB[J]. *Medical Journal of Wuhan University (武汉大学学报: 医学版)*, 2018, 39(1): 57-61.
- [27] LU J, LI X P, DONG Q, *et al.* Tbx2 and Tbx3: The special value for anticancer drug targets[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1806(2): 268-274.
- [28] ABRAHAMS A, MOWLA S, PARKER M L, *et al.* UV-mediated regulation of the anti-senescence factor Tbx2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(4): 2223-2230.
- [29] TIAN L M, XIE H F, XIAO X, *et al.* Study on the roles of β -catenin in hydrogen peroxide-induced senescence in human skin fibroblasts[J]. *Experimental Dermatology*, 2011, 20(10): 836-838.
- [30] MARUYAMA N, ISHIGAMA A, KONDO Y. Pathophysiological significance of senescence marker protein-30[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2010, 10(S1): S88-S98.
- [31] SON T G, ZOU Y, JUNG K J, *et al.* SMP30 deficiency causes increased oxidative stress in brain[J]. *Mechanisms of Ageing*, 2006, 127(5): 451-457.
- [32] GAO D W, GAO Z R, ZHU G H. Antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2[J]. *Food & Function*, 2013, 4(6): 982-989.
- [33] PENG X Y, JIANG Y J. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 against lipopolysaccharide-induced liver injury in mice[J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1599-1607.
- (上接第 751 页)
- [15] ZHU H F (朱洪法). Preparation and application methods of catalyst supports[M]. Beijing: Petroleum Industry Press (石油工业出版社), 2014.
- [16] LI X T, SU H J, REN G Y, *et al.* A highly stable Pd/SiO₂/cordierite monolith catalyst for 2-ethyl-anthraquinone hydrogenation[J]. *RSC Advances*, 2015, 5: 100968-100977.
- [17] ZHANG Y, WANG L, WANG N, *et al.* Catalytic performance of morphology-controlled Pd/SBA-15 in hydrogenation of alkyl-anthraquinone[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2021, 312: 110672.
- [18] NAG N K. A study on the dispersion and catalytic activity of gamma alumina-supported palladium catalysts[J]. *Catalysis Letters*, 1994, 24: 37-46.
- [19] LI Z (李中), ZHAO X D (赵晓东), ZHANG H P (张惠平), *et al.* Application of new technology using tetrabutylurea-containing working solution in production of hydrogen peroxide[J]. *Chemical Propellants & Polymeric Materials (化学推进剂与高分子材料)*, 2015, 13(5): 21-25.
- [20] CHEN Y J (陈拥军), WANG Q Z (王庆忠), ZHANG S H (张三华), *et al.* Development and application of hydrogenation catalyst EK-III for producing hydrogen peroxide through anthraquinone route[J]. *Petroleum Processing and Petrochemicals (石油炼制与化工)*, 2021, 52(6): 39-43.
- [21] YU J Q (余建强), CAO F H (曹风华), LIU R (刘荣), *et al.* The alumina supported palladium catalyst used in the production of hydrogen peroxide via the anthraquinone process and its preparation: CN102626618B[P]. 2012-03-22.