

荔枝发酵物提高人体皮肤HaCat细胞的抗氧化能力及对细胞凋亡的修复作用

甘聃¹, 孙静¹, 杨继国^{2,3*}

(1. 仙乐健康科技股份有限公司, 上海 201702) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(3. 华南协同创新研究院, 广东东莞 523808)

摘要: 该文研究了荔枝发酵物对人体皮肤 HaCat 细胞模型中的 ROS、SOD、透明质酸和水通道蛋白 AQP3 生成, 以及对细胞周期与细胞凋亡的影响。结果表明, 在双氧水诱导的 HaCat 细胞模型中, 中剂量和高剂量组的 ROS 生成抑制率达到 50% 以上; 所有剂量组均显著提升 SOD 活力水平 ($P<0.05$), 高剂量组相比模型组提高 39.96%, 与空白对照组水平一致 ($P>0.05$)。在 HaCat 细胞干燥模型中, 所有剂量组荔枝发酵物均显著提升水通道蛋白 AQP3 和透明质酸的表达水平, 高剂量组相比模型组分别提高 2.08 倍和 1.11 倍; 荔枝发酵物能够调节 HaCat 细胞由 G0/G1 期比例向 S 期和 G2/M 期转化 ($P<0.01$), 且能够显著降低由 UVA 照射导致的 HaCat 人体皮肤细胞的凋亡率 ($P<0.05$)。因此, 荔枝发酵物能有效提升 HaCat 细胞的抗氧化能力, 促进细胞分裂, 修复 UVA 导致的细胞凋亡, 为其在皮肤健康产品研究和应用提供了参考。

关键词: 荔枝发酵物; HaCat 细胞; 抗氧化; 水通道蛋白; 细胞凋亡

文章编号: 1673-9078(2024)11-79-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1000

Lychee Fermentation Products Enhance the Antioxidative Capacity of Human HaCaT Cells and Prevent Cell Apoptosis

GAN Dan¹, SUN Jing¹, YANG Jiguo^{2,3*}

(1. Sirio Pharma Co. Ltd., Shanghai 201702, China)

(2. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3. South China Collaborative Innovation Research Institute, Dongguan 523808, China)

Abstract: The effects of lychee fermentation products on ROS, SOD, hyaluronic acid, and aquaporin 3 (AQP3) production in human HaCaT cells as well as on the cell cycle and apoptosis were examined. In HaCaT cell models with hydrogen peroxide-induced oxidative damage, medium and high doses of lychee fermentation products suppressed the ROS production rate by more than 50%. All groups treated with lychee fermentation products showed significantly higher SOD activity levels, regardless of the treatment dose ($P<0.05$). The SOD activity level of the high-dose treatment group

引文格式:

甘聃,孙静,杨继国.荔枝发酵物提高人体皮肤HaCat细胞的抗氧化能力及对细胞凋亡的修复作用[J].现代食品科技,2024,40(11):79-86.

GAN Dan, SUN Jing, YANG Jiguo. Lychee fermentation products enhance the antioxidative capacity of human HaCaT cells and prevent cell apoptosis [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 79-86.

收稿日期: 2023-08-24

基金项目: 华南协同研究院产学研项目 (2021440002001713)

作者简介: 甘聃 (1981-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品科学与营养, E-mail: dan.gan@siriopharma.com

通讯作者: 杨继国 (1977-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: yangjg@scut.edu.cn

was 39.96% higher than that of the model group and comparable to that of the control group ($P>0.05$). In the HaCaT cell drying models, lychee fermentation products at all doses increased the expression levels of AQP3 and hyaluronic acid; specifically, the high-dose treatment group exhibited levels 2.08 and 1.11 times higher, respectively, compared to the model group. Furthermore, lychee fermentation products could regulate the progression of HaCaT cells from the G0/G1 phase to the S and G2/M phases ($P<0.01$) and significantly reduced the UVA irradiation-induced rate of cell apoptosis ($P<0.05$). Thus, lychee fermentation products can effectively enhance the antioxidative capability of HaCaT cells, promoting their division while preventing their apoptosis. These findings provide valuable reference data for research on the application of lychee fermentation products in the development of skin care products.

Key words: lychee fermentation products; HaCaT cells; antioxidation; aquaporin; cell apoptosis

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是中国南方四大特色名果之一。因其果肉肉质多汁有弹性, 香味独特, 营养丰富, 深受消费者喜爱, 被称为“岭南水果之王”。中国的荔枝起源最早可追溯至秦汉时期, 目前产量每年已超过 250 万 t, 占全球 80% 以上^[1]。《本草纲目》等中华传统医药典籍记载了荔枝能养血健脾, 行气消肿, 可为产妇及老弱补元气; 近年来陆续有关于荔枝在抗氧化、提高免疫力、降血糖、降血脂和抗病毒方面的研究报道。研究证据表明荔枝富含碳水化合物、蛋白、氨基酸、维生素、矿物质及微量元素等营养成分; 荔枝还有丰富的多糖类、黄酮和原花青素等高活性功能成分^[2]。荔枝一直被认为是热性水果, 大量食用容易导致人群“上火”, 并且会有低血糖风险; 此外荔枝还存在上市周期短、保鲜难度大、供大于需、难储存、易腐败等问题。荔枝深加工可缓解上述问题, 目前荔枝深加工主要产品为荔枝干、荔枝汁、荔枝醋、荔枝罐头和荔枝酒, 产品单一、受众有限^[3,4]。采用生物发酵技术对荔枝进行生物转化, 能有效消除过敏成分, 降低果糖含量, 避免人体“上火”和低血糖; 同时发酵过程能产生对人体健康有利的有机酸、小分子多酚和酚酸, 其抗氧化的活性更强, Liu 等^[5]报道采用植物乳杆菌对荔枝进行生物转化, 且能把 78.36% 的多聚原花青素转化成高活性的低聚原花青素, 其 ABTS⁺ 自由基清除能力和 ORAC 体外抗氧化活性分别提升 11.5 倍和 4.13 倍。此外, 所制备的荔枝发酵产物更容易标准化和存贮, 其形态可以是液体、膏状或粉体, 可作为功能性食品、化妆品的原料, 大大增加荔枝的应用场景, 是荔枝产业高值化的关键技术。

研究表明皮肤受到外界有害因素(辐射、紫外线、光老化、氧化损伤、干燥或污染等)时, 会导致组织内产生 ROS, 破坏细胞完整性, 紊乱细胞周

期循环, 使蛋白质发生变性, 引起机体氧化损伤, 最终导致皮肤衰老, 诱导皮肤细胞凋亡^[6,7]。然而皮肤有一个抗氧化系统, 由酶促和非酶促抗氧化剂组成, 以防止其受到有毒外源性/内源性 ROS 水平的改变, 通过饮食或化妆品, 以天然物质支持皮肤的内源性抗氧化系统。近年来, 具有抗氧化特性的天然化合物以及天然发酵物作为皮肤损伤的保护剂受到越来越多的关注^[8-10]。

本研究的目的是利用 HaCat 细胞模型考察荔枝发酵物对细胞内 ROS 的影响, 对细胞中 SOD、透明质酸和水通道蛋白 AQP3 生成的作用; 同时研究其对 HaCat 细胞周期与细胞凋亡的作用。为荔枝发酵物在皮肤健康产品开发与应用提供理论研究依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HaCat 细胞(人永生角质化细胞)、PBS 磷酸盐缓冲溶液(1×), 武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM(1×)培养基、胎牛血清(1×)、体积分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(1×)、青霉素/链霉素溶液(100×), Gibco(Thermo Fisher Scientific); 6-羧基-2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(H2DCFH-DA)、山羊血清, Sigma Aldrich; 人透明质酸(Hyaluronic Acid, HA) ELISA 试剂盒, 武汉华美生物; SOD 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 体积分数 30% H₂O₂ 溶液, 西陇科学股份有限公司; 体积分数 4% 多聚甲醛固定液、体积分数 0.5% Triton X-100, 碧云天; Rabbit-anti-Aquaporin 3 antibody、Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488), Abcam 公司; 细胞计数试剂盒 CCK-8, MedChemExpress; 细胞周期试剂盒, 联科生物; 细胞凋亡试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 主要仪器设备

CForma 3111 型 CO₂ 培养箱, Thermo Fisher; CytoFLEX 型流式细胞仪, Beckman; MS204TS/02 型分析天平, Mettler-Toledo; Vortex 3 涡旋混合仪, IKA; Avanti J-15R 型台式冷冻离心机, Beckman; SynergyH1M 型多功能微孔板读数仪, Bio-Tek; IX73 型倒置荧光显微镜, OLYMPUS; CL-3000 型紫外交叉仪, Analytik Jena。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

荔枝发酵物, 由仙乐健康科技股份有限公司提供, 通过专利技术生产获得 (ZL202210565739.1)。以热带水果荔枝为原料, 采用定向分级发酵的工艺, 将洗净后的荔枝压破后, 加入酵母菌及乳酸菌进行一级发酵, 然后使用专利典藏菌株——巴氏醋酸杆菌 SP021 (CGMCC No.25794, 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心) 进行二级发酵即可获得荔枝发酵物。

称取适量荔枝发酵物, 使用 DMEM (1×) 无血清基础培养基配制质量浓度为 10 mg/mL 的母液, 再梯度稀释成实验所需质量浓度, 样品置于 4 °C 冰箱冷藏保存。

完全培养基: 按体积分数配制完全培养基, 由 84% DMEM (1×) 培养基、15% 胎牛血清 (1×) 和 1% 青霉素/链霉素溶液 (1×) 组成, 用于 HaCat 细胞培养。

实验中设置对照、模型、低、中、高剂量组, 其中对照组使用无血清基础培养基培养, 模型组按各实验要求造模处理后使用无血清培养基培养, 低、中、高剂量组分别为质量浓度 250、500、1 000 μg/mL 的荔枝发酵物。

1.3.2 细胞培养

将 HaCat 细胞接种至含完全培养基的平皿中, 置于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 待细胞融合率为 70%~80% 时, 使用体积分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (1×) 消化离心后进行细胞传代, 细胞使用完全培养基种板培养 24 h 后, 进行加样处理, 为避免血清带来较为复杂的影响, 加样处理期间均使用无血清培养基培养细胞。

1.3.3 增殖活性测定

在 96 孔板中加入每孔 100 μL 细胞悬液 (每孔细胞数量在 1×10⁴ 个), 培养箱中培养 24 h。向培养

板中加入不同质量浓度待测样品, 继续培养 24 h 后, 加入 10 μL 的 CCK-8 溶液, 培养箱中孵育 1~4 h 后, 酶标仪下 450 nm 测吸光值。细胞存活率按以下公式计算:

$$Z = \frac{A_s \times A_b}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Z——细胞存活率;

A_s——实验孔吸光度;

A_c——对照孔吸光度;

A_b——空白孔吸光度。

1.3.4 ROS测定

参考文献^[1]的 ROS 测定方法, 96 孔板铺板每孔 100 μL 细胞悬液 (每孔细胞数量在 1×10⁴ 个), 培养箱中培养至细胞密度在 70%~80%, 分对照组, 实验组和模型组。实验组和模型组使用配置好的 150 μmol/L H₂O₂ 处理 10 min, 完成处理后实验组加入待测样品, 对照和模型组加入无血清培养基, 置于 CO₂ 培养箱中孵育 30 min, 然后用无血清培养基稀释 DCFH-DA 至终浓度 5 μmol/L, 37 °C 培养箱内孵育 30 min, 用无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 使用酶标仪激发光 488 nm, 发射光 530 nm 检测吸光值, 使用荧光显微镜检测成像。相对 ROS 水平和 ROS 抑制率计算公式如下:

$$S = \frac{A_s}{A_c} \times 100\% \quad (2)$$

$$P = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_m - A_c}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

S——相对 ROS 水平;

P——ROS 抑制率;

A_s——实验组 ROS 水平;

A_c——对照组 ROS 水平;

A_m——模型组 ROS 水平。

1.3.5 SOD活力测定

参考文献^[12]的 SOD 活力测定方法, 取处于生长对数期细胞, 以每孔细胞数量为 1.5×10⁵ 个接种细胞于 12 孔板中, 细胞于体积分数 5% CO₂ 培养箱 37 °C 培养 24 h, 胰酶消化收集细胞至 1.5 mL 离心管, 离心管中加入 200 μL 的 PBS, 直接放入液氮中 3~5 s, 立即提出转入 -20 °C 冰箱 (20~30 s), 再取出室温解冻, 解冻后再按前面重复 3 次以达到破碎细胞的

目的。破碎后按 SOD 测定试剂盒使用说明书进行处理, 450 nm 测吸光值计算 SOD 抑制率和蛋白质质量浓度, 最后按如下公式计算 SOD 活力:

$$D = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\% \quad (4)$$

$$E = D \div 50\% \times C_r \times C_s \times 100\% \quad (5)$$

式中:

D —SOD 抑制率;

A_c —对照组 SOD 水平;

A_s —实验组 SOD 水平;

E —SOD 活力, U/mg prot;

C_r —反应体系系数倍数;

C_s —样品测试前系数倍数。

1.3.6 透明质酸含量测定

参考文献^[13]的透明质酸含量测定方法, 按每孔细胞数量为 2×10^5 个种板于 12 孔板中, 在条件为体积分数 5% CO_2 , 37 °C 培养箱中培养 24 h, 于生物安全柜中, 开盖弃上清, 无风暴露 20 min 做干燥处理, 降低细胞活力至 50%~60%。造模完成后实验组加入待测样品, 对照和模型组加入无血清培养基, 置于 CO_2 培养箱中孵育 24 h, 消化收集细胞使用透明质酸 ELISA 检测试剂盒检测透明质酸含量。

1.3.7 AQP3 表达水平测定

参考文献^[14]的细胞中 AQP3 表达水平测定方法, 按每孔细胞数量为 2×10^5 个细胞数量种板于 12 孔板中, 在体积分数 5% CO_2 , 37 °C 培养箱中培养 24 h, 于生物安全柜中, 开盖弃上清, 无风暴露 20 min 做干燥处理, 降低细胞活力至 50%~60%。造模完成后实验组加入待测样品, 对照和模型组加入无血清培养基, 置于 CO_2 培养箱中孵育 24 h。胰酶消化收集细胞约 20 万个, 体积分数 4% 多聚甲醛固定 10 min, 冰 PBS 清洗后, 使用体积分数 0.5% TritonX-100 室温通透 5 min, PBS 清洗后使用体积分数 10% 山羊血清室温封闭 60 min, 离心除封闭液后, 加入 AQP3 一抗孵育 30 min, PBS 清洗后加二抗孵育 30 min, PBS 清洗后加 200 μL PBS, 流式上机检测平均荧光强度, 或荧光显微镜观察拍照。

1.3.8 细胞周期测定

参考文献^[15]的细胞周期测定方法, 以每孔细胞数量为 2×10^5 个接种 12 孔板, 细胞培养 24 h 后, 使用无血清培养基延滞细胞周期, 然后使用无血清培养基配置的样品处理 24 h, 胰酶消化收集 20 万

个细胞, 按细胞周期检测试剂盒处理使用碘化丙啶染色, 流式上机检测 1 万个细胞数量。

1.3.9 细胞凋亡测定

参考文献^[16]的细胞凋亡测定方法, 以每孔细胞数量为 2×10^5 个接种 12 孔板, 细胞培养 24 h 后, 模型和实验组使用 UVA 20 J/cm^2 , 30 min 处理细胞。然后实验组使用待测样品处理 24 h, 模型组和对照组使用无血清培养基处理 24 h。胰酶消化收集 20 万个细胞, 按细胞凋亡检测试剂盒处理使用 Annexin V-PE 和 7-AAD 染色, 流式上机检测 1 万个细胞数量。

1.4 数据处理

数据以平均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, GraphPad prism 8 作图, 采用 ANOVA 多重比较组间差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 荔枝发酵物对 HaCat 细胞增殖的影响

使用不同质量浓度的荔枝发酵物处理 HaCat 细胞 24 h, 检测荔枝发酵物对 HaCat 细胞的毒性, 结果如图 1 所示。在 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞存活率为 87.48%, 与对照 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 无显著差异 ($P > 0.05$), 为研究原料功效, 预实验测定 SOD 等指标后选用 250、500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为低、中、高剂量组进行后续实验。

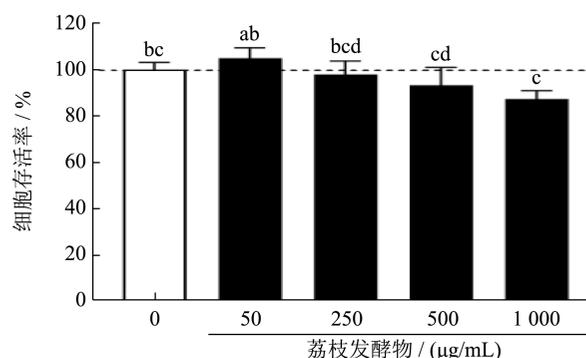


图 1 荔枝发酵物对 HaCat 细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of lychee ferment on viability in HaCat cells

注: 不同的字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。下同。

2.2 荔枝发酵物对 HaCat 细胞 ROS 的影响

使用 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 双氧水造模 HaCat 细胞氧化损伤, 如图 2a 所示, 模型组相比对照组相对 ROS 水平显著提高 ($P < 0.01$), 表明双氧水造模成功^[17]。使用低、中、高剂量组处理氧化损伤细胞后, 相比模型组极显著降低 ($P < 0.01$)。如图 2b 所示, 荔枝

发酵物的低、中、高剂量对于 ROS 的抑制率可分别达到 47.31%、52.23% 和 54.04%。DCFH-DA 探针在进入细胞后,其水解物 DCFH 被活性氧化成 DCF,在激发光 488 nm,发射光 530 nm 左右发出绿色荧光,荧光强度和 ROS 水平呈正比,因此在图 2c 中通过荧光显微镜拍照也可观察到与图 2a 相一致的结果。Zhu 等^[18]发现枸杞多糖能降低 ROS 水平,减少氧化应激和氧化损伤,与本实验结果相似。实验结果表明荔枝发酵物能够显著改善 HaCat 细胞的氧化损伤。

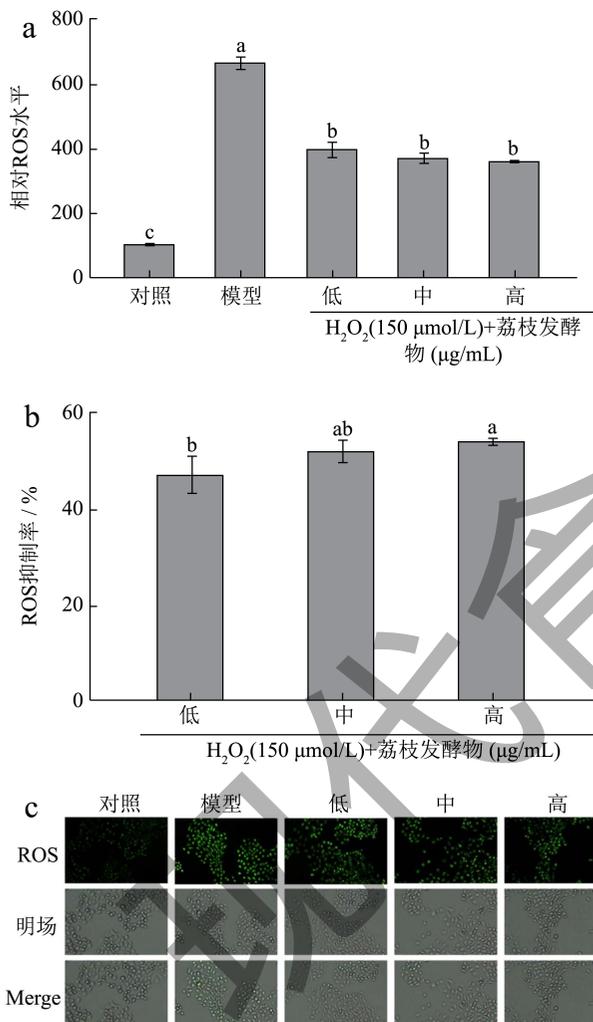


图 2 荔枝发酵物对 HaCat 细胞相对 ROS 水平 (a)、ROS 抑制率 (b) 和荧光图像 (c) 的影响

Fig.2 Effects of lychee ferment on relative ROS level (a), ROS inhibition rate (b) and fluorescence images (c) in HaCat cells

2.3 荔枝发酵物对 HaCat 细胞 SOD 活力的影响

SOD 是反应自由基代谢状态的重要指标,如图 3 所示,通过双氧水造模后,模型组 SOD 活力相比对照组显著降低 28.49% ($P < 0.01$),证明

造模成功^[19]。低、中、高剂量的荔枝发酵物处理双氧水造模的 HaCat 细胞后, SOD 活力分别为 132.00、136.37 和 153.23 U/mg prot, 均显著高于模型组 (SOD 活力为 109.48 U/mg prot) SOD 活力 ($P < 0.05$), 其中高剂量组相比模型组提高 39.96% ($P < 0.01$), 与对照组 (SOD 活力为 153.09 U/mg prot) 之间无明显差异 ($P > 0.05$)。结果表明,荔枝发酵物能够提升氧化应激带来的 SOD 活力下降。Hao 等^[20]在研究绿豆壳提取物时发现,其乙酸乙酯提取物能够在 0.5、1 和 2 $\mu\text{g/mL}$ 时显著提高由 H_2O_2 诱导的 HaCat 细胞 SOD 活力下降,且结果呈剂量效应,在高剂量时达到与对照 SOD 活力一致水平。

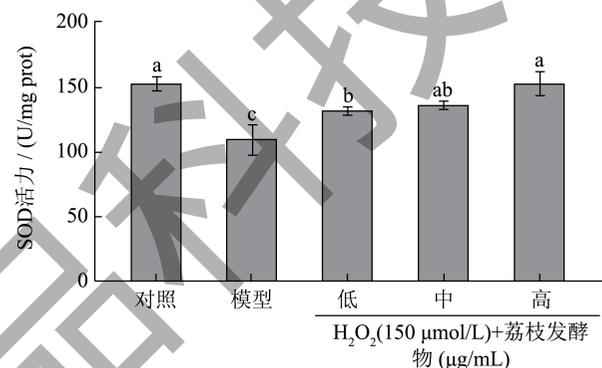


图 3 荔枝发酵物对 HaCat 细胞 SOD 活力的影响

Fig.3 Effects of lychee ferment on SOD activity in HaCat cells

2.4 荔枝发酵物对 HaCat 细胞水通道蛋白 AQP3 的影响

AQP3 是皮肤组织中表达量最高的水通道蛋白,是细胞间水分输送的主要通路,通过检测皮肤角质层 AQP3 的表达量,能一定程度反应原料保湿方向的功能^[12]。

如图 4a 所示,通过干燥处理,使 AQP3 表达水平降低,通过加入低、中、高剂量的荔枝发酵物,相比模型组分别提升 AQP3 表达水平 1.57、1.78 和 2.08 倍 ($P < 0.01$)。实验结果表明,荔枝发酵物能提高 HaCat 细胞水通道蛋白 AQP3 表达水平,改善干燥引起的 AQP3 表达下降。为更直接观察到 AQP3 表达水平的差异,使用 Alexa Fluor 488 二抗荧光标记 AQP3。如图 4b 所示,干燥处理的模型组 AQP3 荧光表达程度显著低于对照及低、中、高剂量组,结果与图 4a 流式检测 AQP3 相对平均荧光强度一致。Shin 等^[14]在研究紫花藜香蓍醇提取物对 AQP3 的影响中,发现其能够上调 HaCat 细胞中 AQP3 的表达,并能够克服 UVB 诱导的 AQP3 表达抑制。该研究与本实验研究结果相似。角质层细胞

位于皮肤最外层，起到渗透屏障的作用，AQP3 在角质形成细胞质膜高度表达，并在基底层充当水和甘油转运蛋白，它的表达降低，会引起皮肤相对干燥和皮肤弹性降低。

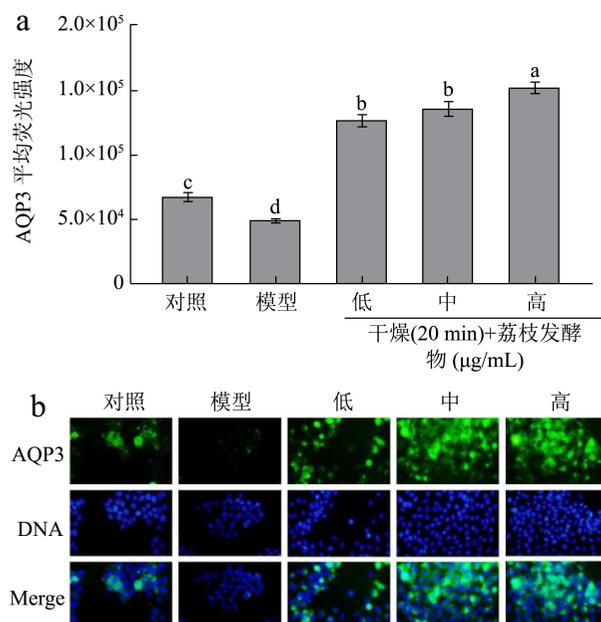


图4 荔枝发酵物对 HaCat 细胞 AQP3 表达 (a) 和荧光图像 (b) 的影响

Fig.4 Effects of lychee ferment on AQP3 expression (a) and fluorescence images of AQP3 (b) in HaCat cells

2.5 荔枝发酵物对HaCat细胞内透明质酸含量的影响

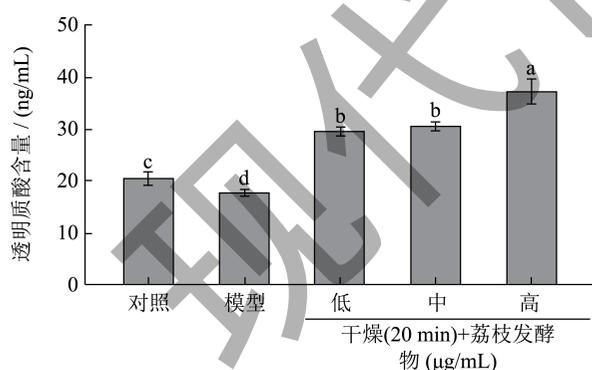


图5 荔枝发酵物对 HaCat 细胞透明质酸含量的影响

Fig.5 Effects of lychee ferment on hyaluronic acid content in HaCat cells

透明质酸是皮肤保湿的一个重要成分，它的含量能够一定程度反映皮肤保湿能力^[13]。如图5所示，通过干燥处理，显著降低 HaCat 细胞中透明质酸含量（模型组透明质酸含量为17.76 ng/mL）(P<0.05)。低中高剂量处理干燥模型后，透明质酸含量分别达到29.77、30.58和37.42 ng/mL，均能显著提高细胞

内透明质酸含量 60% 以上 (P<0.01)，其中高剂量组效果最佳，相比模型组提高 1.11 倍 (P<0.01)。实验结果表明，荔枝发酵物能够改善干燥引起的 HaCat 细胞透明质酸含量降低。透明质酸在皮肤中充当类似海绵作用吸收和保持水分，Kim 等^[21]研究发现发酵干柑橘皮提取物能够诱导产生 38% 左右的透明质酸，与本实验有相似促进透明质酸含量增加的作用。

2.6 荔枝发酵物对HaCat细胞周期的影响

表1 荔枝发酵物对HaCat细胞周期的影响

Table 1 Effects of lychee ferment on the cell cycle of HaCat cells (%)

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照	70.93 ± 0.59 ^a	16.23 ± 1.16 ^c	12.84 ± 0.92 ^b
低	61.13 ± 0.17 ^b	24.25 ± 0.55 ^a	14.62 ± 0.49 ^{ab}
中	60.80 ± 1.51 ^b	25.61 ± 0.34 ^a	13.59 ± 1.17 ^{ab}
高	62.68 ± 0.58 ^b	21.73 ± 0.72 ^b	15.59 ± 0.62 ^a

注：不同的字母表示具有显著差异 (P<0.05)。

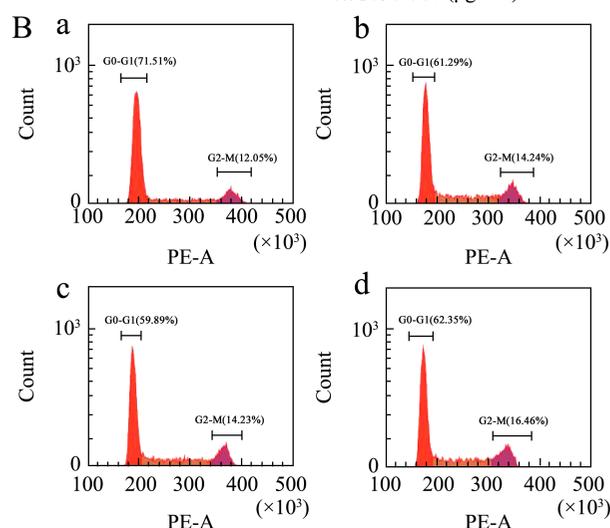
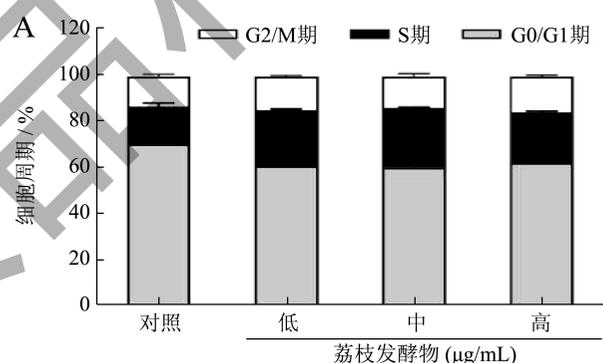


图6 荔枝发酵物对 HaCat 细胞周期分布 (A) 和流式图 (B) 的影响

Fig.6 Effects of lychee ferment on the cell cycle (A) and flow cytometry images (B) in HaCat cells

注：a 为对照组，b-d 分别为低、中、高剂量组。

为研究荔枝发酵物对于 HaCat 细胞周期分布的影响, 通过无血清培养基培养延滞细胞周期集中在 G0/G1 期, 再使用低、中、高剂量荔枝发酵物处理 24 h, 流式上机检测, 结果见表 1 和图 6。结果显示, 低、中、高荔枝发酵物组能显著降低细胞 G0/G1 比例 ($P<0.01$), 提高 S 期比例 ($P<0.01$), 对于 G2/M 期有一定程度的改善, 其中高剂量组对于 G2/M 期化效果最佳 ($P<0.05$)。G1 表示 DNA 合成前期, S 期表示 DNA 合成期, G2 期表示 DNA 合成后期, M 期表示分裂期^[15]。该结果表明, 荔枝发酵物能够调节 HaCat 细胞由 G0/G1 期比例向 S 期和 G2/M 期转化, 促进细胞分裂。Herath 等^[22]研究氧化应激导致 DNA 损伤, 并使 70% 细胞停滞在 G0/G1 期, 橙皮苷将这种停滞降低到 61% 左右。

2.7 荔枝发酵物对 HaCat 细胞凋亡的影响

UVA 照射会造成细胞损伤和诱导细胞凋亡, 被常用于细胞模型造模进行功效评价和测试^[7]。通过使用 20 J/cm² UVA 照射 HaCat 细胞, 造成细胞凋亡率提高, 使用低、中、高剂量荔枝发酵物处理 24 h 后观察对于 UVA 诱导凋亡的 HaCat 细胞的影响。由图 7 可知, 荔枝发酵物能够显著降低由 UVA 照射导致的 HaCat 人体皮肤细胞的凋亡率 ($P<0.05$)。有研究报道二氢杨梅素对暴露在 UVA 的人角质形成细胞系的凋亡有抑制作用^[23]。UVA 照射会刺激活性氧产生, 导致氧化应激、细胞损伤, 最终与细胞内其他分子作用诱导细胞凋亡。本研究中使用的荔枝发酵物有助于预防 UVA 引起的皮肤损伤。

对于氧化应激造成的细胞损伤, 有研究报道鞣花酸能够通过增加 SOD 和 HO-1 的表达来提高 HaCat 细胞抗氧化能力^[24]。ROS 在 UVA 诱导的细胞周期延滞和细胞凋亡过程中起到重要作用, 研究报道蜂胶能够作为自由基清除剂通过抑制 HaCat 细胞 ROS 生成, 降低胞内 ROS 水平来阻止 UVA 诱导的细胞凋亡发生^[22,25]。AQP3 是水/甘油转运蛋白, 能够促进水、甘油和尿素的转运, 它和透明质酸通常作为保湿功能的一个重要考察指标, 有研究发现, 严重的 UVA 照射能够导致细胞氧化应激和诱导细胞凋亡, 同时导致 AQP3 表达下降, 然而过表达 AQP3 能够通过上调 Bcl-2 表达对高剂量 UVA 造成的氧化损伤和细胞凋亡起到保护作用^[26]。

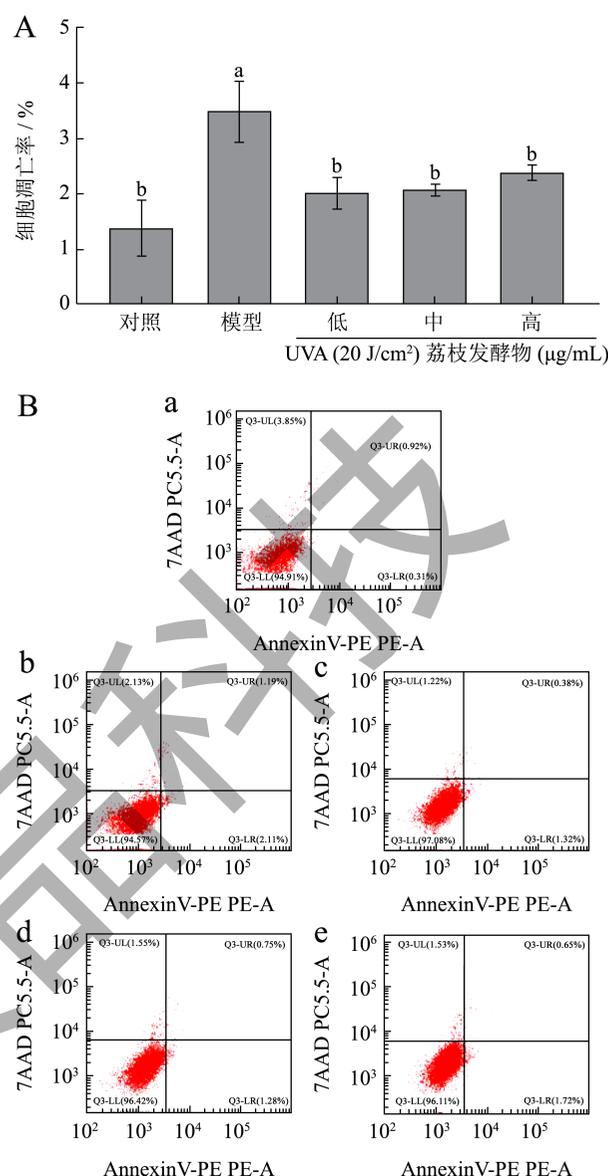


图 7 荔枝发酵物对 HaCat 细胞凋亡 (A) 和细胞凋亡流式图 (B) 的影响

Fig.7 Effects of lychee ferment on the cell apoptosis (A) and flow cytometry images (B) in HaCat cells

注: 不同的字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。a 为模型组, b 为对照组, c 为低剂量组, d 为中剂量组, e 为高剂量组。

3 结论

本文使用热带水果荔枝为原料, 通过专利工艺技术进行发酵处理后获得荔枝发酵物, 探究其在皮肤健康中的功效研究和产品开发潜力。通过 HaCat 细胞模型进行抗氧化能力测试和皮肤保湿方向的能力表征, 荔枝发酵物能够显著改善氧化应激, 降低 ROS 水平, 提升 SOD 含量; 同时增加水通道蛋白 AQP3 和透明质酸的含量起到缓解干燥影响和保

持皮肤水分作用。荔枝发酵物能够促进细胞周期从G0/G1期脱离,减轻HaCat细胞凋亡情况,使细胞能够进行增殖分化,进行皮肤细胞层面的修复。文章从HaCat细胞层面探讨了荔枝发酵物对于皮肤健康方向研究,但是对于更高层面如动物试验、人体试食方面的效果还有待进一步的探究确认。

参考文献

- [1] 陈厚彬,苏钻贤,杨胜男.2022年全国荔枝生产形势分析[J].中国热带农业,2022,3:5-14.
- [2] 张名位,董丽红,张瑞芬.荔枝果肉的主要活性物质及其健康效应研究进展[J].食品科学技术学报,2019,37(3):1-12.
- [3] 孙淑夷.荔枝汁混菌发酵工艺及其功能活性成分研究[D].广州:华南农业大学,2016.
- [4] 唐忠盛.荔枝酒加工过程中香气成分变化规律及特征香气研究[D].广州:华南理工大学,2019.
- [5] LIU H, TANG Y, DENG Z, et al. Boosting the antioxidant potential of polymeric proanthocyanidins in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp via biotransformation of utilizing *Lactobacillus plantarum* [J]. Foods, 2023, 12: 23-84.
- [6] NICULITE C, NECHIFORM, URS A, et al. Keratinocyte motility is affected by UVA radiation-A comparison between normal and dysplastic cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19: 1700.
- [7] HE Y, PI J, HUANG J, et al. Chronic UVA irradiation of human HaCaT keratinocytes induces malignant transformation associated with acquired apoptotic resistance [J]. Oncogene, 2006, 25: 3680-3688.
- [8] PSOTOVA J, SVOBODOVA A, KOLAROVA H, et al. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2006, 84: 167-174.
- [9] 汪五清,曾义斌,张彤,等.姜黄素对人表皮角质形成细胞HaCaT增殖、凋亡的影响及其机制[J].山东医药,2019, 59(35):33-36.
- [10] KWON N, VINAYAGAM R, DO G, et al. Protective effects of fermented *Houttuynia cordata* against UVA and H₂O₂-induced oxidative stress in human skin keratinocytes [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195: 3027-3046.
- [11] XIONG J, HE J, ZHU J, PAN J, et al. Lactylation-driven METTL3-mediated RNA m6A modification promotes immunosuppression of tumor-infiltrating myeloid cells [J]. Molecular Cell, 2022, 82(9): 1660-1677.
- [12] ZHANG J Q, SHEN M, ZHU C C, et al. 3-Nitropropionic acid induces ovarian oxidative stress and impairs follicle in mouse [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e86589.
- [13] DE R, JUSTO S, BEAUVERD Y, et al. Low plasma levels of hyaluronic acid might rule out sinusoidal obstruction syndrome after hematopoietic stem cell transplantation [J]. Disease Markers, 2023, 17: 7589017.
- [14] SHIN S, LEE D, GIL H, et al. Agerarin, identified from *Ageratum houstonianum*, stimulates circadian CLOCK-mediated aquaporin-3 gene expression in HaCaT keratinocytes [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11175.
- [15] XU W, LIU C, DENG B, et al. TP53-inducible putative long noncoding RNAs encode functional polypeptides that suppress cell proliferation [J]. Genome Research, 2022, 32(6): 1026-1041.
- [16] QI Y, DING L, ZHANG S, et al. A plant immune protein enables broad antitumor response by rescuing microRNA deficiency [J]. Cell, 2022, 185(11): 1888-1904.
- [17] 李昕洁,杨彬彬,汪婕,等.抗过氧化氢致人皮肤角质形成细胞氧化损伤活性物质的筛选及其机制初探[J].华西药理学杂志,2023,38(1), 43-46.
- [18] ZHU S, LI X, DANG B, et al. Lycium Barbarum polysaccharide protects HaCaT cells from PM2.5-induced apoptosis via inhibiting oxidative stress, ER stress and autophagy [J]. Redox Report, 2022, 27(1): 32-44.
- [19] 苏小明,王岳杨,徐铭晨,等.五味子丙素对H₂O₂诱导的HaCaT细胞衰老作用的影响及机制[J].解放军医学杂志, 2021,46:221-230.
- [20] HAO R, LI M, LI F, SUN-Waterhouse D, et al. Protective effects of the phenolic compounds from mung bean hull against H₂O₂-induced skin aging through alleviating oxidative injury and autophagy in HaCaT cells and HSF cells [J]. Science of the Total Environment, 2022, 841: 156669.
- [21] KIM C, JI J, HO BAEK S, et al. Fermented dried *Citrus unshiu* peel extracts exert anti-inflammatory activities in LPS-induced RAW264.7 macrophages and improve skin moisturizing efficacy in immortalized human HaCaT keratinocytes [J]. Pharmaceutical Biology, 2019, 57(1): 392-402.
- [22] HERATH HMUL, PIAO MJ, KANG KA, et al. Hesperidin exhibits protective effects against PM2.5-mediated mitochondrial damage, cell cycle arrest, and cellular senescence in human HaCaT keratinocytes [J]. Molecules, 2022, 27(15): 4800.
- [23] HE Z, ZHANG L, ZHUO C, et al. Apoptosis inhibition effect of Dihydromyricetin against UVA-exposed human keratinocyte cell line [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2016, 161: 40-49.
- [24] HSEU YC, CHOU CW, SENTHIL KKJ, et al. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(5): 1245-1255.
- [25] KIM HB, YOO BS. Propolis inhibits UVA-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells by scavenging ROS [J]. Toxicological Research, 2016, 32(4): 345-351.
- [26] XIE H, LIU F, LIU L, et al. Protective role of AQP3 in UVA-induced NBSFs apoptosis via Bcl2 up-regulation [J]. Archives of Dermatological Research, 2013, 305(5): 397-406.