

绣球菌浓缩液抑制黑色素合成和抗氧化活性研究

徐媛媛¹, 陈萌¹, 徐晓飞^{1,2*}, 何瑞琪²

(1. 广东海洋大学食品科学与工程学院, 阳江 529500; 2. 华南协同创新研究院, 东莞 523808)

摘要: **目的** 探究绣球菌浓缩液(concentrated *Sparassis crispa* extract, SCE)对黑色素合成和氧化损伤成纤维细胞的影响。**方法** 以酵母 β -葡聚糖为对照, 通过检测酪氨酸酶活抑制率、黑色素瘤 B16 细胞内黑色素产生、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率及人成纤维细胞存活率、细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平和细胞合成胶原蛋白、弹性蛋白的浓度, 探讨 SCE 抑制黑色素合成和成纤维细胞氧化损伤的保护作用。**结果** 在本研究的测试浓度范围内, SCE 对酪氨酸酶活性抑制率为 35.0%~79.4%, 对黑色素瘤 B16 细胞黑色素产生抑制率为 24.6%~52.1%, 并表现出浓度依赖性。同时, SCE 能有效清除 DPPH 自由基, 对 H₂O₂ 诱导的人成纤维细胞凋亡具有保护作用, 并可降低细胞内 ROS 水平; 与模型组比较, SCE 在 10~100 μ g/mL 范围内对成纤维细胞合成 III 型胶原蛋白提高了 67%~79%、弹性蛋白合成提高了 124%~199%, 且效果优于酵母 β -葡聚糖。**结论** SCE 具有抑制黑色素合成、保护氧化损伤成纤维细胞和提高成纤维细胞合成胶原蛋白、弹性蛋白的作用, 这为其应用于美容功能食品提供依据。

关键词: 绣球菌; 黑色素; 人成纤维细胞; 胶原蛋白; 弹性蛋白

Study on the inhibition of melanin synthesis and antioxidant activities of concentrated *Sparassis crispa* extract

XU Yuan-Yuan¹, CHEN Meng¹, XU Xiao-Fei^{1,2*}, HE Rui-Qi²

(1. College of Food Science and Engineering, Guangdong Ocean University, Yangjiang 529500, China;
2. South China Institute of Collaborative Innovation, Dongguan 523808, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of the concentrated *Sparassis crispa* extract (SCE) on melanin synthesis and oxidatively damaged fibroblasts. **Method** Yeast β -glucan was chosen as a control, the inhibition rate of tyrosinase activity, melanin synthesis in B16 melanoma cells, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical clearance rate, human fibroblast survival rate, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, and the concentrations of collagen and elastin synthesized by fibroblasts were investigated to evaluate the inhibitory effect of SCE on melanin synthesis and its protective effect on oxidative damage of fibroblasts. **Results** The inhibition rates of tyrosinase activity of SCE were 35.0%~79.4% in the range of testing concentrations and the inhibition rates of melanin synthesis in B16 melanoma cells were 24.6%~52.1%, both exhibiting a concentration-dependent manner. Meanwhile, SCE could effectively scavenge DPPH radicals, have a protective effect on H₂O₂-induced apoptosis of human fibroblasts and reduce the levels of intracellular ROS. Furthermore, compared with the model, SCE increased the content of type III collagen by 67%~79% and elastin by 124%~199% in fibroblasts in the range of 10~100 μ g/mL.

基金项目: 广东海洋大学大学生创新创业项目

Fund: Supported by the Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship of Guangdong Ocean University

***通信作者:** 徐晓飞, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为天然活性分子结构与功能、功能食品。E-mail: xfxufe@gdou.edu.cn

***Corresponding author:** XU Xiao-Fei, Ph.D, Senior Engineer, Guangdong Ocean University, No.1, Luoqin Road, Yangjiang 529500, China. E-mail: xfxufe@gdou.edu.cn

Particularly, the improvement effects of SCE were better than those of yeast β -glucan regarding antioxidative actions.

Conclusion SCE can inhibit melanin synthesis in B16 melanoma cells, protect fibroblasts from oxidative damages, and improve the synthesis of collagen and elastin in fibroblasts, which provides a basis for its application in cosmetic functional food.

KEY WORDS: *Sparassis crispa*; melanin; human fibroblasts; collagen; elastin

0 引言

随着全球人口老龄化和人们预期平均寿命的增加,衰老引发的健康问题成为全社会共同面临的挑战。从生物学角度来看,衰老是生物体内渐进性、结构和功能退行性的生理过程^[1]。皮肤作为分隔机体与外界环境的屏障,受内源性(基因组成与表达活性)和外源性(环境、营养和生活方式)致衰因素的双重影响,随着年龄的增长呈现出肉眼可见的皱纹、松弛、色素沉着、干燥等肌肤衰老特征^[2]。皮肤生理功能下降和皮肤病易感性增加如瘙痒、溃疡、真菌感染等已成为全球老年人皮肤常见问题^[3]。皮肤黑色素是皮肤表皮层黑色素细胞合成的一种色素,可以保护皮肤基底细胞免受紫外辐射、氧化应激压力等带来的不利影响,但黑色素过量产生会导致如雀斑、老年斑、色素沉着等皮肤美观问题^[4]。皮肤成纤维细胞通过产生胞外基质成分(如胶原蛋白、弹性蛋白、透明质酸等)、分泌周围细胞信号因子等作用参与维持皮肤组织稳态^[5],已成为体外抗皮肤衰老研究的常用模型^[6]。随着人们对天然健康产品追捧,从天然食材中寻找具有延缓皮肤衰老作用的成分成为国内外学者研究的热点之一^[7]。

绣球菌是一种大型珍稀食用菌,子实体外形似绣球颜色白色或淡黄色,肉质脆嫩、滋味鲜美。在生物学分类上绣球菌隶属绣球菌科(*Sparassidaceae*)绣球菌属(*Sparassis*)^[8]。绣球菌营养丰富,含有大量的蛋白质和丰富的氨基酸、多种维生素和矿物质等营养成分^[9-10]。此外,子实体中还富含高比例的 β -1,3-葡聚糖,日本食品分析化验所用酶法测得绣球菌子实体中 β -1,3-葡聚糖含量达43.5 g/100 g干重^[11];廉添添等^[8]用酶法分别测得绣球菌柄部和瓣片部位的 β -葡聚糖含量均超40%,极显著高于猴头菇、香菇、蛹虫草。另外,绣球菌中还含有多酚类、黄酮类、萜类、生物碱、邻苯二甲酸酯、葡萄糖基神经酰胺等成分^[11-12]。研究显示,绣球菌 β -1,3-葡聚糖可促进人皮肤成纤维细胞合成I型胶原蛋白^[13-14],而绣球菌中的多酚、黄酮类、萜类也是公认的抗氧化成分^[12],由此提示绣球菌具有皮肤美容作用。本团队与行业食用菌种植企业合作,采用子实体粉碎结合微压提取方式,开发了一种绣球菌的深加工标准化原料,并取得了食品原料标准备案(广东省食品安全企业标准 Q/WQYS 0083 S—2022《绣球菌浓缩液》,备案号:44020005S-2023)。为进一步明确绣球菌浓缩液(concentrated *Sparassis crispa* extract, SCE)在皮肤美

容方面的应用潜力,本研究利用黑色素细胞、成纤维细胞等细胞模型,评估SCE对酪氨酸酶活性、黑色素瘤细胞合成黑色素、自由基氧化损伤的影响,对成纤维细胞氧化损伤的保护作用及对氧化损伤成纤维细胞中活性氧清除作用与胶原蛋白、弹性蛋白合成的影响,并以酵母 β -葡聚糖为对照,评估 β -葡聚糖在上述活性中发挥作用的程度,以期SCE在功能食品领域开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人真皮成纤维细胞(normal human dermal fibroblasts, NHDF)由上海东方美谷功能护肤品研究院提供;小鼠B-16F10黑色素瘤细胞购自中国科学院细胞库;BETASSG™绣球菌浓缩液(批号20221027,可溶性固形物16.5%, β -1,3-葡聚糖含量3.6%,m/m,折算成干基计 β -1,3-葡聚糖含量为21.8%,m/m)由上海雪榕源生物有限公司提供。

水溶性酵母 β -葡聚糖(β -1,3-葡聚糖 $\geq 70\%$,m/m)(食品级,安琪酵母股份有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯酚(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、蘑菇酪氨酸酶(1000 U/mg)、L-酪氨酸、 α -促黑色素激素(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)(分析纯,美国Sigma公司);曲酸、熊果苷、乳铁蛋白(分析纯,上海麦克林有限公司);Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)培养基、胎牛血清、胰酶(trypsin, 0.25%)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetra-acetic acid, EDTA)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(分析纯,美国Thermo Fisher Scientific公司);Cell counting kit 8 (CCK-8)、放射免疫沉淀分析(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(DCFH-DA 荧光探针法)(碧云天生物技术研究);人III型胶原(collagen III, COL3)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、人弹性蛋白(elastin, ELN) ELISA检测试剂盒(武汉云克隆股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

MCO-15AC CO₂培养箱(日本三洋电机有限公司);SW-CJ-2F超净工作台(苏州净化设备有限公司);H2050R高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司);Spectra MAX190

酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); IX73-DP80 倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯); FA2204C 精密电子天平(0.0001 g, 上海精科天美科学仪器有限公司); 752N 紫外可见分光光度计(上海精科科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 酪氨酸酶活性抑制试验

根据文献[15]的方法并稍作修改, 将试验样品用 PBS 溶解后稀释至所需浓度, 向 96 孔板中加入 40 μL 浓度为 5 mmol/L *L*-酪氨酸, 再加入 40 μL 阳性对照(曲酸)或不同浓度的待测样品、80 μL PBS 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后, 加 40 μL 的酪氨酸酶溶液(30 U/mL), 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后迅速在酶标仪中测定 490 nm 处吸光度(OD 值)。每个样品浓度设置 3 个复孔, 重复 2 次; 同时设置空白组和对照组, 空白组不加酪氨酸酶, 以 PBS 补足体积; 对照组不加样品, 以 PBS 补足体积。通过公式(1)计算样品对酪氨酸酶抑制率:

$$\text{酪氨酸酶抑制率}/\%=[1-(A_s-A_b')/(A_c-A_b)]\times 100 \quad (1)$$

式中, A_s 为样品加酶的吸光度; A_b' 为样品不加酶的吸光度; A_c 为空白加酶的吸光度; A_b 为空白不加酶的吸光度。

1.3.2 黑色素瘤 B16 细胞增殖试验

根据文献[16]的方法并稍作修改。将试验样品用培养基溶解后调整至所需浓度。分别取处于对数生长期的黑色素瘤 B16 细胞, 经消化后以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调节细胞浓度至 2.5×10^4 个/mL, 向 96 孔板中每孔加入 200 μL 细胞悬液(每孔约 5×10^3 个), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳、饱和湿度环境下培养 24 h, 弃去培养基并加入含 PBS 的不同浓度样品, 继续培养 24 h 后更换新培养基并加入 10 μL CCK-8 试剂^[19], 继续培养 4 h, 于酶标仪上 450 nm 处读取吸光度。每个样品浓度设置 3 复孔, 重复 2 次; 同时设置空白组和对照组, 空白组不含样品以相同体积培养基补足, 对照组不加细胞以相同体积的样品溶剂补足。通过公式(2)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}/\%=(A_s-A_b')/(A_c-A_b)\times 100 \quad (2)$$

式中, A_s 为样品孔的吸光度; A_b' 为样品不加细胞孔的吸光度; A_c 为空白孔的吸光度; A_b 为空白不加细胞孔的吸光度。

1.3.3 黑色素细胞合成黑色素试验

参考文献[16-18]方法并稍作修改。取处于对数期黑色素瘤 B16 细胞于 96 孔板中每孔加入细胞为 6×10^4 个, 加入含 10% 胎牛血清、1% 双抗 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳、饱和湿度环境下 24 h; 除空白组外, 阳性对照组(曲酸、熊果苷)和各样品组分别加入 5 μL 1 mmol/L 的 α -MSH, 每组 3 复孔, 继续培养 72 h, 每孔用 150 μL 0.25% 胰酶消化后加入 0.5 mL PBS 吹打均匀, 转入 1.5 mL 离心管中 10000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入含 10% DMSO 的 NaOH 溶液 200 μL , 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 冷却后转入 96 孔板中于酶标仪读取 405 nm 处的吸光度。通过公式(1)计算样

品对黑色素生成抑制率, 式中, A_s 为样品加细胞孔的吸光度; A_b' 为样品不加细胞孔的吸光度; A_c 为空白加细胞孔的吸光度; A_b 为空白不加细胞孔的吸光度。

1.3.4 DPPH 自由基清除试验

根据文献[19]的方法并稍作修改。用去离子水配制试验样品。向 96 孔板中加入 30 μL 的样品溶液, 加入 150 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 工作液(乙醇溶液), 室温避光反应 30 min 后测定 517 nm 处的吸光度, 设置空白组。通过公式(3)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\%=(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (3)$$

式中, A_1 为样品加 DPPH 工作液吸光度; A_2 为样品加不含 DPPH 工作液吸光度; A_0 是空白加 DPPH 工作液吸光度。

1.3.5 对 NHDF 氧化损伤的保护作用研究

参考文献[20]方法并稍作修改。于 96 孔板中加入对数期生长良好的 NHDF 细胞(1×10^4 个/孔), 加入含 10% 胎牛血清、1% 双抗 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳、饱和湿度环境下 24 h; 弃去培养基加入试验样品, 除空白组外, 模型组、阳性组(选乳铁蛋白^[21])和样品组都加入 200 μL 含 2.5 mol/L H_2O_2 的培养基(每组 3 复孔), 继续培养 24 h, 然后加入含 CCK-8 溶液 10 μL , 继续培养 4 h 后于酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。重复 2 次。通过公式(2)计算 NHDF 细胞存活率, 式中, A_s 为样品组的吸光度; A_b' 为样品不加细胞的吸光度; A_c 为空白组的吸光度; A_b 为空白不加细胞的吸光度。

1.3.6 对氧化损伤 NHDF 内活性氧的清除作用研究

按 1.3.5 方法培养 NHDF, 除空白组外添加试验样品和加入 200 μL 含 2.5 mol/L H_2O_2 的培养基(每组 3 复孔), 继续培养 2 h, 根据 ROS 检测试剂盒的说明稀释 ROS 探针并换液, 培养 20 min 后用无血清培养基洗 3 次, 用倒置荧光显微镜观察拍照并记录 ROS 水平。

1.3.7 对氧化损伤 NHDF 中胶原蛋白、弹性蛋白合成影响研究

按 1.3.5 方法培养 NHDF。除空白组外, 模型组、阳性对照组和样品组都加入 200 μL 含 2.5 mol/L H_2O_2 的培养基(每组 3 复孔), 继续培养 24 h 后弃去上清, 每孔加入 500 μL 细胞裂解液, 将细胞溶液反复冻融后取裂解液, 按照胶原蛋白、弹性蛋白 ELISA 试剂盒说明书检测溶液中的胶原蛋白、弹性蛋白浓度。

1.4 数据统计

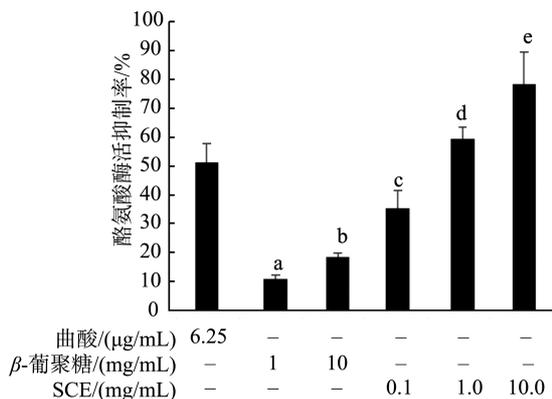
所有数据以平均值 \pm 标准偏差表示, 采用单因素方差分析比较组间数据是否有显著性差异, 采用 Dunnett 法进行后续多重比较, 显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 SCE 对黑色素合成的影响

酪氨酸酶是细胞内黑色素合成过程中关键的酶, 其

抑制率常用于评估天然物质作为抑制皮肤黑色素生成药物或美白化妆品原料的潜在应用价值^[22]。如图 1 所示, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 曲酸的酶活性抑制率为 51.3%, 而 0.1~10.0 mg/mL SCE 的酪氨酸酶抑制率在 35.0%~79.4%, 并呈现明显的浓度依赖性; 而 10 mg/mL 酵母 β -葡聚糖的酶活抑制率仅为 18.3%。可见 SCE 对酪氨酸酶的抑制作用显著高于酵母 β -葡聚糖。根据 SCE 中 β -葡聚糖含量计算可知, 10.0 mg/mL SCE 中 β -葡聚糖的浓度约为 2.0 mg/mL , 因此推测 SCE 中非 β -葡聚糖成分对酪氨酸酶酶活抑制作用贡献较大。有报道显示, 90 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 提取的绣球菌水提取物的酪氨酸酶抑制率分别为 48.2% 和 53.8%^[23], 不同提取温度时绣球菌成分的溶出有一定差异, 进一步说明绣球菌中除 β -葡聚糖外, 其他成分也有抑制酪氨酸酶的作用。



注: 不同字母代表组间差异显著, $P < 0.05$, 下同。

图 1 SCE 和酵母 β -葡聚糖的酪氨酸酶抑制率

Fig.1 Tyrosinase inhibition rates of the SCE and yeast β -glucan

SCE 对黑色素细胞的增殖影响结果见图 2, 以 100% 细胞存活率为分界线, 酵母 β -葡聚糖在 1000 $\mu\text{g/mL}$ 及以下, SCE 在 750.0 $\mu\text{g/mL}$ 及以下对黑色素细胞生长无抑制作用。同时, 由图 2 结果可知, 酵母 β -葡聚糖在 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 和 SCE 在 15.0~150.0 $\mu\text{g/mL}$ 对 B16 细胞有一定的增殖作用。考虑到酵母 β -葡聚糖中 β -葡聚糖含量约为 SCE(以干基计)

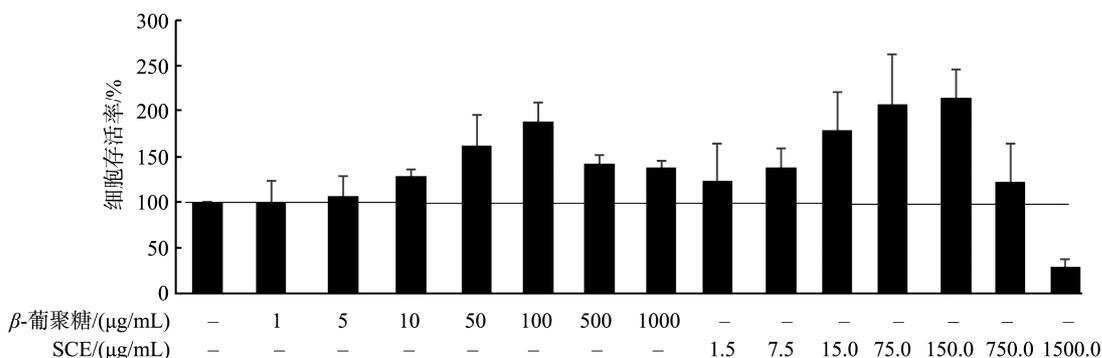


图 2 SCE 和酵母 β -葡聚糖对黑色素瘤 B16 细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of SCE and yeast β -glucan on survival rates of B16 melanoma cells

的 3.5 倍, 在测试样品对 B16 合成黑色素的影响时, 把 SCE 中、高浓度设置比酵母 β -葡聚糖样品高一定程度, 使两样品中 β -葡聚糖浓度接近以便初步判断 β -葡聚糖浓度对黑色素产生抑制效果的贡献程度。故分别选取 10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 酵母 β -葡聚糖和 10.0、100.0、150.0 $\mu\text{g/mL}$ SCE 测试对 B16 合成黑色素的影响。

曲酸和熊果苷是化妆品原料中公认的黑色素合成抑制剂, 如图 3 所示, 5 $\mu\text{g/mL}$ 的曲酸和熊果苷对 B16 细胞合成黑色素抑制率为 35.7% 和 17.9%, 曲酸优于熊果苷, 效果与文献报道一致^[24]; 而在测试浓度范围内, SCE 对 B16 细胞合成黑色素抑制率为 24.6%~52.1%, 而酵母 β -葡聚糖的黑色素抑制率为 26.0%~85.5%, 两者均表现出浓度依赖性。对比发现, 可推知绣球菌中 β -葡聚糖是发挥抑制黑色素产生的主要成分。有报道显示, β -葡聚糖抑制黑色素合成机制可能与下调 B16 细胞产生黑色素相关酶酪氨酸酶、5,6-二羟吲哚羧酸(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHICA)氧化酶(tyrosinase-related protein-1, TRP-1)和多巴色素异构酶的表达有关^[25], 除了 β -葡聚糖外, SCE 对黑色素合成的抑制作用还可能与绣球菌所含的小分子吲哚等代谢物有关^[26]。

2.2 SCE 清除 DPPH 自由基活性

自由基理论是目前主要的衰老理论之一。DPPH 法常用于体外抗氧化活性评价^[27]。如图 4 所示, 酵母 β -葡聚糖和 SCE 清除 DPPH 自由基活性呈现出剂量依赖性, 在 1~10 mg/mL 范围内, DPPH 自由基清除率分别为 3.5%~9.4% 和 32.4%~62.8%, 且 SCE 的活性优于酵母 β -葡聚糖($P < 0.05$)。酵母 β -葡聚糖清除 DPPH 自由基的活性已有文献报道^[28], 其抗氧化活性可能与其糖链上羟基单元及数量有关^[29]; 此前也有文献证实了绣球菌提取物对 DPPH 自由基的清除作用^[23], 食用菌富含多糖、萜类、多酚类、黄酮类、麦角甾醇等抗氧化物质^[30], 除 β -葡聚糖外, SCE 中还有多酚类、黄酮类、对羟基苯甲酸、萜类等其他抗氧化物质^[12], 因而在相等的物质浓度下, SCE 体外清除自由基活性高。

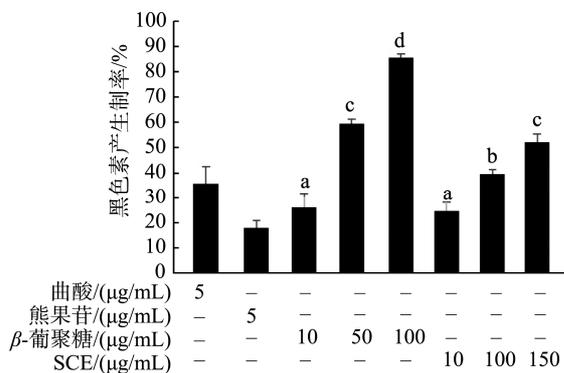


图 3 SCE 和酵母 β-葡聚糖对黑色素细胞 B16 合成黑色素的抑制作用

Fig.3 Inhibiting effects of SCE and yeast β-glucan on the melanin production in B16 melanoma cells

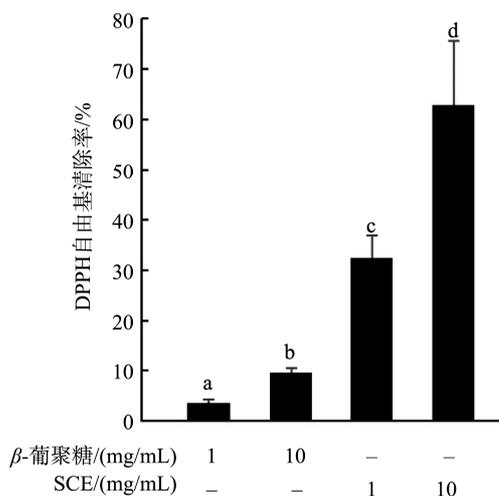


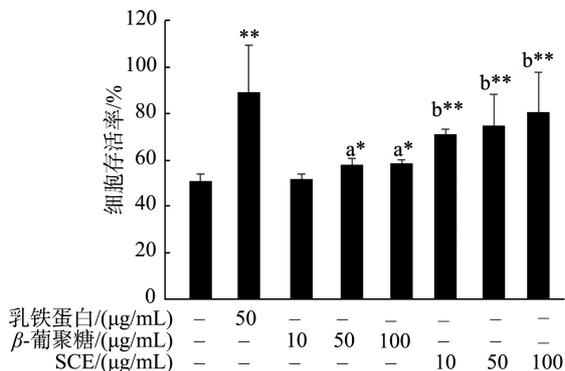
图 4 SCE 和酵母 β-葡聚糖的 DPPH 自由基清除率

Fig.4 DPPH radical scavenging rates of SCE and yeast β-glucan

2.3 SCE 对 NHDF 氧化损伤的保护作用

H₂O₂ 是细胞内一种氧化应激因子, 过量产生可导致细胞损伤加速衰老^[31]。为了检测 SCE 对 NHDF 细胞氧化损伤的保护作用, 以 H₂O₂ 处理建立细胞氧化损伤模型, 采用不同浓度的酵母 β-葡聚糖和 SCE 进行处理, 细胞存活率结果见图 5。H₂O₂ 处理后细胞存活率为 51%, 说明氧化损伤造模成功; 乳铁蛋白作为阳性对照, 细胞存活率达 89%, 与文献报乳铁蛋白具有抗氧化作用的结果相吻合^[21]; SCE 各浓度组的细胞存活率为 71%~81%, 高于酵母 β-葡聚糖各浓度组的细胞存活率(52%~58%), 说明酵母 β-葡聚糖和 SCE 对 H₂O₂ 处理引起的细胞凋亡具有一定的保护作用, 且 SCE 的保护作用强于酵母 β-葡聚糖(P<0.05)。对比样品组内差异, 发现酵母 β-葡聚糖和 SCE 对细胞氧化损伤保护作用的浓度依赖性并不明显。有文献报道姬松茸多糖通过 p-蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路保护心肌细胞免受 H₂O₂ 诱导的氧化损伤和凋亡^[32], 提示 β-葡聚糖具

有一定的氧化损伤保护作用。然而, SCE 中 β-葡聚糖含量约 3.6%, 还有高比例其他未知成分, 未来有必要对绣球菌中发挥保护细胞氧化损伤的物质基础和生物学机制进行深入研究。



注: 与模型对照比较, *P<0.05, **P<0.01。

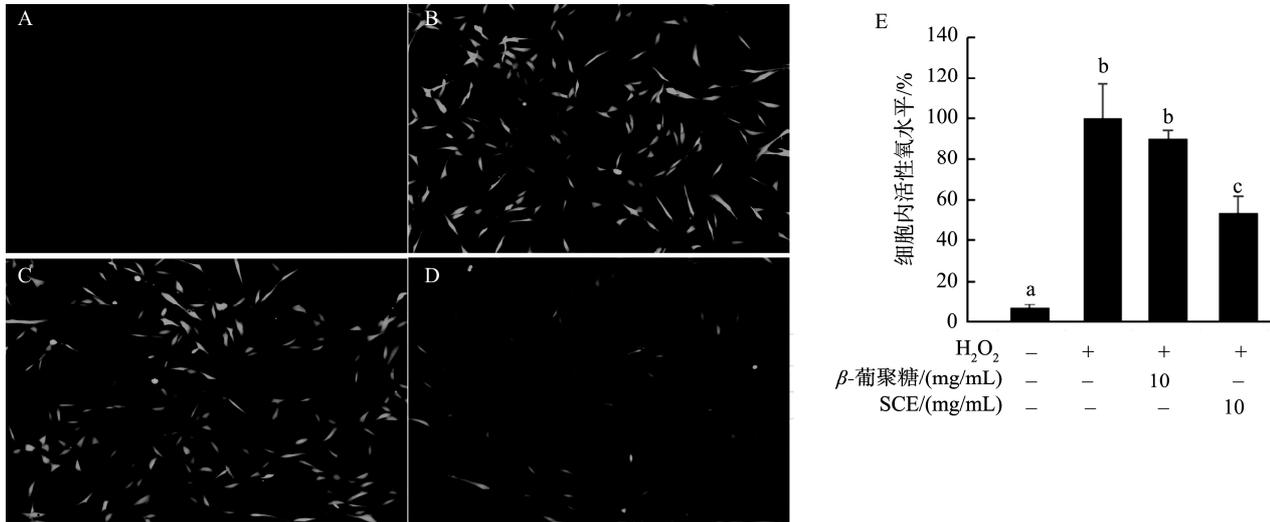
图 5 SCE 和酵母 β-葡聚糖对 H₂O₂ 氧化损伤人成纤维细胞的保护作用

Fig.5 Protective effects of SCE and yeast β-glucan on H₂O₂ oxidatively damaged human fibroblasts

进一步利用 ROS 检测试剂盒检测样品对模型细胞内 ROS 水平的影响。DCFH-DA 进入细胞后被细胞内的酯酶水解为 DCFH, DCFH 不能透过细胞膜而停留在细胞内, 细胞内的 ROS 可以将 DCFH 氧化为发荧光 DCF。因此, 检测细胞内 DCF 的荧光强度可评价细胞内 ROS 水平。如图 6 所示, 正常细胞内 ROS 水平低(空白对照, 图 6A); H₂O₂ 处理后, 细胞内 ROS 水平极显著提升, 是空白对照的 13 倍(图 6B); 模型细胞用 10 μg/mL 酵母 β-葡聚糖处理后细胞内 ROS 水平并无明显下降, 说明对细胞氧化损伤保护作用较弱, 与细胞存活率的结果一致(图 5); 而相同浓度下 SCE 处理后细胞内 ROS 水平下降了约 50%(与模型组比较, P<0.01), 效果明显优于酵母 β-葡聚糖的作用, 此结果与 SCE 对氧化损伤细胞的存活率相吻合。

2.4 SCE 对 NHDF 合成胶原蛋白和弹性蛋白的影响

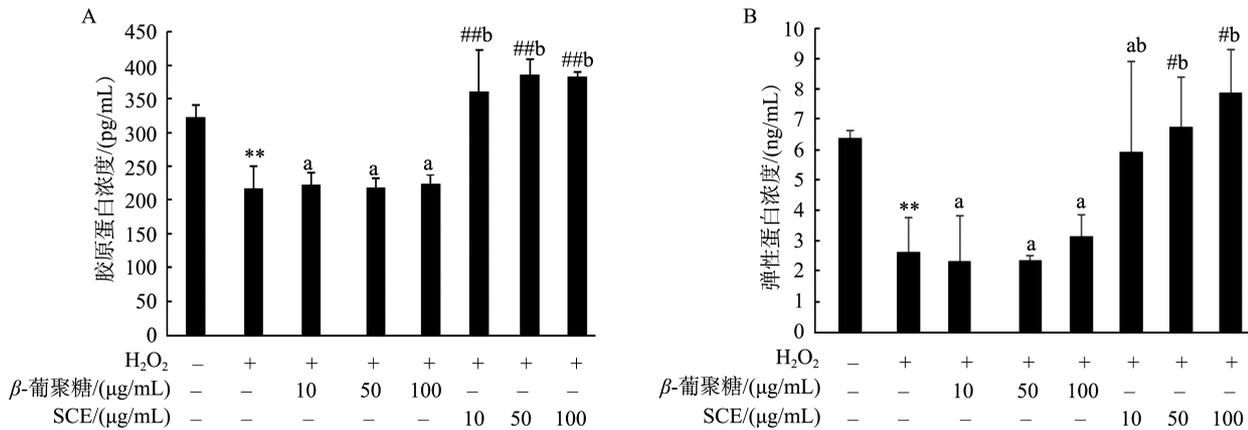
NHDF 合成胶原蛋白、弹性蛋白能力常用于筛选具有皮肤美容潜力的活性成分^[33]。如图 7 所示, 经 H₂O₂ 氧化损伤处理后, NHDF 中 III 型胶原蛋白和弹性蛋白含量分别下降了 33%和 59% (P<0.01), 表明氧化损伤对细胞合成代谢造成了严重影响; 不同质量浓度酵母 β-葡聚糖处理对氧化损伤细胞的 III 型胶原蛋白、弹性蛋白合成没有明显改善作用(P>0.05), 提示酵母 β-葡聚糖可能无相关作用; 而采用不同质量浓度(10~100 μg/mL) SCE 处理氧化损伤细胞, 可显著提高 III 型胶原蛋白和弹性蛋白的合成(P<0.05, P<0.01), III 型胶原蛋白含量相比模型组提高了 67%~79%, 而弹性蛋白含量分别比模型组提高了 124%、144%和 199%,



注: A 为空白组 NHDF 荧光照片(200×); B 为模型组 NHDF 荧光照片(200×); C 为酵母 β-葡聚糖处理后 NHDF 荧光照片(200×); D 为 SCE 处理后 NHDF 荧光照片(200×); E 为各处理组中 NHDF 内 ROS 水平。

图 6 SCE 和酵母 β-葡聚糖对 H₂O₂ 处理 NHDF 的 ROS 水平的影响

Fig.6 Effects of SCE and yeast β-glucan on the ROS levels in H₂O₂ treated NHDF



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$, 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 7 SCE 和酵母 β-葡聚糖对氧化损伤 NHDF 的 III 型胶原蛋白(A)和弹性蛋白(B)合成影响

Fig.7 Effects of SCE and yeast β-glucan on the synthesis of type III collagen and elastin in oxidatively damaged NHDF

接近甚至超过了正常细胞的合成水平,但未表现出浓度依赖性。前人研究发现,从绣球菌中分离的 β-葡聚糖在 NHDF 模型中可以促进 NHDF 合成 I 型胶原蛋白^[13],但该研究中 β-葡聚糖样品并未进行结构鉴定且含有蛋白成分。一般而言,商业化酵母 β-葡聚糖的 β 葡聚糖含量在 74%~86%,且含有不同比例的糖蛋白(0~20%),其精细多糖结构与菌种、制备方法密切相关^[34]。在本研究中,酵母 β-葡聚糖无明显的促进 NHDF 合成 III 型胶原蛋白和弹性蛋白的作用,其原因可能是酵母 β-葡聚糖与以前报道的绣球菌 β-葡聚糖结构^[34]差异较大有关。未来可尝试对绣球菌中 β-葡聚糖进行分离纯化和结构表征,使用高纯度 β-葡聚糖进行研究来揭示对 NHDF 合成代谢的影响及分子机制。

3 结论

本研究结果表明, SCE 在体外能有效抑制酪氨酸酶活性、减少黑色素瘤 B16 细胞合成黑色素、降低 H₂O₂ 诱导的成纤维细胞凋亡和细胞内 ROS 水平。同时, SCE 能改善 H₂O₂ 氧化损伤人皮肤成纤维细胞中 III 型胶原蛋白、弹性蛋白的合成水平,其效果优于酵母 β-葡聚糖。本研究结果可为 SCE 应用于美容功能食品提供一定参考。

参考文献

- [1] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO MA, PARTRIDGE L, *et al.* The hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1194-217.
- [2] KRUTMANN J, SCHIKOWSKI T, MORITA A, *et al.* Environmentally-

- induced (extrinsic) skin aging: Exosomal factors and underlying mechanisms [J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(Suppl 4): 1096–103.
- [3] BLUME-PEYTAVI U, KOTTNER J, STERRY W, *et al.* Age-associated skin conditions and diseases: Current perspectives and future options [J]. *Gerontologist*, 2016, 56(Suppl 2): S230–S242.
- [4] 赵美娟, 户晶晶, 倪辉, 等. 黑色素生成信号通路研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(9): 1633–42.
ZHAO MJ, HU JJ, NI H, *et al.* Research progress in melanogenesis signaling pathway [J]. *Chin J Biotechnol*, 2019, 35(9): 1633–1642.
- [5] PLIKUS MV, WANG X, SINHA S, *et al.* Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease [J]. *Cell*, 2021, 184(15): 3852–72.
- [6] CHOWDHURY A, NOSOUDI N, KARAMCHED S, *et al.* Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts; implications to improve skin health [J]. *J Dermatol Sci*, 2021, 102(2): 94–100.
- [7] DOMASZEWSKA-SZOSTEK A, PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M, KURYŁOWICZ A. Flavonoids in skin senescence prevention and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6814.
- [8] 廉添添, 杨涛, 孙军德, 等. 人工栽培绣球菌的鉴定及其子实体 β -葡聚糖含量的酶法测定[J]. *菌物学报*, 2014, 33(3): 254–261.
LIAN TT, YANG T, SUN JD, *et al.* Molecular identification of cultivated *Sparassis* species and determination of β -glucan content of the fruit body by using enzymatic method [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(2): 254–261.
- [9] 朱斗锡, 何荣华. 珍稀名贵绣球菌的经济价值及开发前景[J]. *食用菌*, 2008, 3: 8.
ZHU DX, HE RH. Economic value and development prospects of *Sparassis crispa* [J]. *Edible Fungi*, 2008, 3: 8
- [10] 黄建成, 李开本, 林应椿, 等. 绣球菌子实体营养成分分析 [J]. *营养学报*, 2007, 29(5): 514–515.
HUANG JC, LI KB, LIN YC, *et al.* Analysis of main nutritional components of *Sparassis crispa* (Wulf.) Fr. fruitbody [J]. *Acta Nutr Sin*, 2007, 29(5): 514–515
- [11] KIMURA T. Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa* [J]. *BioMed Res Int*, 2013, 2013: 982317.
- [12] SHARMA N, TAPWAL A, VERMA R, *et al.* Medicinal, nutritional, and nutraceutical potential of *Sparassis crispa* s. lat.: A review [J]. *IMA Fungus*, 2022, 13(1): 8.
- [13] KWON AH, QIU Z, HASHIMOTO M, *et al.* Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Am J Surg*, 2009, 197(4): 503–509.
- [14] YAMAMOTO K, KIMURA T. Orally and topically administered *Sparassis crispa* (Hanabiratake) improved healing of skin wounds in mice with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(6): 1303–1305.
- [15] WANG GH, CHEN CY, LIN CP, *et al.* Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of three *Bifidobacterium bifidum*-fermented herb extracts [J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 89: 376–382.
- [16] 刘俐, 曾安琪, 张敏, 等. 四氢姜黄素抗氧化、抑制黑色素生成及其作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(5): 698–704.
LIU L, ZENG ANQ, ZHANG M, *et al.* Study on antioxidation and inhibiting melanin production of tetrahydrocurcumin and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2022, 38(5): 698–704.
- [17] 蔡文涛. MTT 法和 CCK-8 法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较[J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(3): 305–310.
CAI WT. The comparison of MTT and CCK-8 by detecting cytotoxicity of antiviral active components in traditional Chinese medicine [J]. *J Hubei Univ (Nat Sci)*, 2017, 39(3): 305–310.
- [18] YANG YM, SON YO, LEE SA, *et al.* Quercetin inhibits α -MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(8): 1166–1173.
- [19] YE S, LIU F, WANG J, *et al.* Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6 [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(1): 764–770.
- [20] 宋菲, 王挥, 唐敏敏, 等. 天然椰子油提取物对 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *日用化学工业*, 2017, 47(9): 517–521.
SONG F, WANG H, TANG MM, *et al.* Protective effects of virgin coconut oil extracts on oxidative damage of human skin fibroblasts cells induced by H_2O_2 [J]. *China Surfactant Deterg Cosmetics*, 2017, 47(9): 517–521.
- [21] ODATSU T, KUROSHIMA S, SHINOHARA A, *et al.* Lactoferrin with Zn-ion protects and recovers fibroblast from H_2O_2 -induced oxidative damage [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 190: 368–374.
- [22] 汪婕, 李昕洁, 潘源峙, 等. 银杏叶中抑制酪氨酸酶活性的成分研究[J]. *华西药理学杂志*, 2023, 38(2): 147–50.
WANG J, LI XJ, PAN YS, *et al.* Study on the active substances in *Ginkgo biloba* leaves to inhibit tyrosinase [J]. *West China J Pharmaceut Sci*, 2023, 38(2): 147–150.
- [23] 李永齐, 杨莹, 王芬, 等. 广叶绣球菌水提物酪氨酸酶抑制、抗氧化及保湿功能[J]. *菌物学报*, 2019, 38(9): 1491–1500.
LI YQ, YANG Y, WANG F, *et al.* Tyrosinase inhibition, antioxidant and moisture-retention properties of water extract from *Sparassis latifolia* [J]. *Mycosystema*, 2019, 38(9): 1491–1500.
- [24] 陆晔, 周名权, 翁康生, 等. 三种美白剂对酪氨酸酶活性的抑制[J]. *香料香精化妆品*, 2001, 5: 15–17.
LU Y, ZHOU MQ, WENG KS, *et al.* Inhibition of tyrosinase activity by three white-making ingredients [J]. *Flavour Frag Cosmetics*, 2001, 5: 15–17.
- [25] 朱祯慧. 基于 B16/HaCat 细胞模型探究双孢蘑菇 β -葡聚糖的美白作用[D]. 漳州: 闽南师范大学, 2017.
ZHU ZH. Whitening effect of β -glucan from *Agaricus bisporus* based on B16/HaCat cell model [D]. Zhangzhou: Minnan Normal University, 2017.
- [26] KAWAGISHI H, HAYASHI K, TOKUYAMA S, *et al.* Novel bioactive compound from the *Sparassis crispa* mushroom [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(7): 1804–1806.
- [27] 倪俊, 靖恒焯, 高玉婷, 等. 滇西北地区鱼腥草抗氧化活性研究[J]. *化*

- 学与生物工程, 2022, 39(7): 26–31.
- NI J, JING HY, GAO YT, *et al.* Antioxidant activity of *Houttuynia cordata* Thunb. in Northwest Yunnan [J]. *Chem Bioeng*, 2022, 39(7): 26–31.
- [28] 张军, 聂卉, 李寒露, 等. 三相萃取法提取啤酒废酵母 β -葡聚糖及其抗氧化活性研究[J]. *中国酿造*, 2022, 41(11): 150–154.
- ZHANG J, NIE H, LI HL, *et al.* Extraction β -glucan in waste beer yeast by three-phase extraction and its antioxidant activity [J]. *China Brew*, 2022, 41(11): 150–154.
- [29] LUO D, LIU X, GUAN J, *et al.* Effects of *Tremella fuciformis*-derived polysaccharides with different molecular weight on *D*-galactose-induced aging of mice [J]. *Pol J Food Nutr Sci*, 2023, 73: 163–174.
- [30] 姜明, 么越, 范蓓, 等. 食用菌活性成分抗氧化机制的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(9): 257–265.
- JIANG M, YAO Y, FAN B, *et al.* Research progress on antioxidant mechanism of active components of edible mushrooms [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(9): 257–265.
- [31] 张翠利, 付丽娜, 杨小云, 等. 活性氧自由基与细胞衰老关系的研究进展[J]. *广州化工*, 2015, 43(19): 5–7.
- ZHANG CL, FU LN, YANG XY, *et al.* Review of the relationship between ROS and cell senescence [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2015, 43(19): 5–7.
- [32] 马竞, 武国利, 王潇伟, 等. 姬松茸多糖对过氧化氢诱导的心肌细胞损伤的保护作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(2): 196–203.
- MA J, WU GL, WANG XW, *et al.* Protective effect of *Agaricus blazei* polysaccharide on the injury of myocardial cells induced by H_2O_2 [J]. *J Shenyang Pharmaceut Univ*, 2022, 39(2): 196–203.
- [33] 马永庆, 严建刚, 魏颖, 等. Nahlsgen 和胶原肽对人皮肤成纤维细胞的保护作用 and 胶原蛋白合成的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(19): 86–91.
- MA YQ, YAN JG, WEI Y, *et al.* Effects of Nahlsgen and collagen hydrolysate on protection and collagen synthesis in human skin fibroblasts [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(19): 86–91.
- [34] BOUTROS JA, MAGEE AS, COX D. Comparison of structural differences between yeast β -glucan sourced from different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processed using proprietary manufacturing processes [J]. *Food Chem*, 2022, 367: 130708.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



徐媛媛, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: muzheng@stu.gdou.edu.cn

徐晓飞, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为天然活性分子结构与功能、功能食品。
E-mail: xfxufe@gdou.edu.cn