

乳酸菌发酵对花生衣抗糖化缓解皮肤衰老功能的影响

岳开妍, 毛丙永, 唐鑫, 张秋香, 赵建新, 崔树茂

(江南大学食品学院, 无锡 214122)

摘要: 糖化会导致晚期糖基化终末产物(AGEs)形成并在体内积累, 引起皮肤衰老。体外实验表明花生衣具有抗糖化作用, 乳酸菌发酵能否提升花生衣的抗糖能力尚不清楚。本研究采用体外 AGEs 生成模型和丙酮醛损伤皮肤成纤维细胞(HSF)模型, 从 10 株乳酸菌中筛出植物乳植杆菌 CCFM1354, 该菌具有很好的抑制 AGEs 生成能力, 能缓解 HSF 细胞的糖化损伤。高糖细胞模型实验发现, CCFM1354 发酵花生衣能显著降低 HSF 细胞中 BAX 和 NFkB1 的 mRNA 的相对表达量; D-半乳糖诱导的衰老小鼠实验结果表明, 口服植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵花生衣能显著降低小鼠血清 AGEs 含量, 提高小鼠皮肤弹性, 改善小鼠皮肤萎缩状况, 且效果优于未发酵花生衣。由此可见, 植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵能显著提升花生衣的抗糖化功能, 缓解皮肤衰老。

关键词: 抗糖化; 晚期糖基化终末产物(AGEs); 乳酸菌发酵; 花生衣; 皮肤衰老

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A

The effects of lactic acid bacteria fermentation on peanut skin's anti-glycation and alleviation of skin aging functions

YUE Kaiyan, MAO Bingyong, TANG Xin, ZHANG Qiuxiang, ZHAO Jianxin, CUI Shumao

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Glycation can lead to the formation and accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in the body, causing skin aging. In vitro experiments have shown that peanut skin has anti-glycation effects. However, it is unclear whether lactic acid bacteria fermentation can enhance the anti-glycation abilities. This study used an in vitro AGEs generation model and skin fibroblast (HSF) injury

收稿日期: 2024-02-04

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(31972086)

第一作者: 岳开妍(1999-), 女, 硕士研究生。研究方向: 食品生物技术。E-mail: yuekaiyan@qq.com

通信作者: 崔树茂(1986-), 男, 教授。研究方向: 食品生物技术。E-mail: cuishumao@jiangnan.edu.cn

引文格式: 岳开妍, 毛丙永, 唐鑫, 等. 乳酸菌发酵对花生衣抗糖化缓解皮肤衰老功能的影响[J]. 上海理工大学学报, 2024, 46(4): 364-374. DOI: 10.13255/j.cnki.jusst.20240204001

Citation: YUE Kaiyan, MAO Bingyong, TANG Xin, et al. The effects of lactic acid bacteria fermentation on peanut skin's anti-glycation and alleviation of skin aging functions[J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2024, 46(4): 364-374.

model induced by pyruvaldehyde to screen out *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1354 from 10 strains of lactic acid bacteria, which had a good ability to inhibit AGEs generation and alleviated glycation damage in HSF cells. It was found that CCFM1354 fermentation of peanut skin significantly reduced the relative expression levels of BAX and NFkB1 mRNA in HSF cells in the high glucose cell model experiments. The oral administration of *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1354 fermented peanut skin significantly reduced the serum AGEs content, improved skin elasticity, and improved skin atrophy in the aging mice experiments induced by D-galactose. The effect was better than the unfermented peanut skin. Thus, *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1354 fermentation can significantly enhance the anti-glycation functions of peanut skin and alleviate skin aging.

Keywords: anti-glycation; advanced glycation end products (AGEs); lactic acid bacteria fermentation; peanut skin; skin aging

糖化反应是还原糖的羰基和蛋白质、核酸等生物大分子的游离氨基,在非酶促的合适条件下,经过一系列复杂的分子重排反应生成稳定、不可逆的共价聚合物的过程,最终生成晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)^[1]。AGEs随着外源摄入或随着年龄增长内源产生后会在血液和多组织中积累,它通过与特异性受体(receptor for AGEs, RAGE)结合激活下游级联反应,以及与蛋白质交联破坏其正常功能特性这两大主要途径引发后续的糖化损伤^[2]。许多器官病变已被报道受AGEs的影响^[3],皮肤作为人体最大的器官直观反映糖化损伤下皮肤衰老加剧的问题:糖化反应使AGEs在皮肤积累、促进皮肤细胞凋亡、激活RAGE并加强与AGEs的结合、刺激NF- κ B等下游级联通路造成皮肤炎症、氧化损伤加剧,并且刺激基质金属蛋白酶活性上调、减少皮肤成纤维细胞正常的胶原蛋白合成功能,造成皮肤状态恶化^[4],这些证据引起人们对基于抗糖化的对抗皮肤衰老研究有了更多的关注。现阶段被提出的常见抗糖化途径包括抑制AGEs的生成、阻断AGE-RAGE结合、破坏蛋白质交联和抑制AGE-RAGE结合后的信号激活^[2]。

花生是世界范围内重要的油料植物,不仅富有营养,而且分布广泛。相关数据显示,全球每年的花生总产量约2900万t^[5]。花生油在加工过程中会产生花生衣、花生壳、花生粕等大量副产品,花生衣受到较多的关注。在食品及药剂配方中应用的花生酚类(主要是原花青素)被证实具有较好的抗氧化、抗糖尿病、抗癌、抗菌等功效^[6]。现有报道显示,红花生的花生衣中最主要的酚类

化合物是儿茶素和阿魏酸,约占总酚类化合物的85%;一些被认为是有效抗氧化剂的酚酸(包括香豆酸和绿原酸)和类黄酮(包括表儿茶素、白藜芦醇),在红花生的花生衣中也被检测到^[7]。近年来,报道指出花生衣具有抗糖化的功能,能减弱早期糖化加合物(阿玛多里产物)的形成以及捕获反应性二羰基化合物,抑制体外AGEs的生成^[5]。此外,也有报道称花生的酚类物质能抑制AGEs的前体物质丙酮醛(MGO)所诱导的人脐静脉内皮细胞的细胞死亡^[8]。

乳酸菌是一类常见的有益细菌,其培养过程中产生的胞外酶破坏植物细胞细胞壁,常促进植物提取物或中药有效成分的酮类、酚类等物质含量增加^[9]。应用乳酸菌发酵天然植物类提取物,使其原有生物活性提升已成为食品和化妆品原料研究的一大新趋势。一些研究证实,植物乳植杆菌能通过发酵果蔬汁提升其原有的抗氧化功能特性^[10-11];也有报道称植物乳植杆菌Kinko-SU4发酵花生牛奶能提升产品在体外牛血清蛋白-果糖(BSA-Fru)体系中的AGEs生成抑制率^[12]。针对花生衣中主要酚类成分儿茶素,有粪菌发酵实验显示,发酵后含3',4'-二羟基化结构的代谢物增多,从而提高了发酵儿茶素的抗氧化活性。因此,通过微生物发酵,打开花生衣中儿茶素的C环并增加3',4'-二羟基化结构的代谢物,有可能会提升花生衣的抗糖化功能^[13]。此外,也有研究发现,乳酸菌会利用阿魏酰酯酶、单宁酶、脱羧酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -半乳糖苷酶等将共轭酚类物质释放或转化为游离的可同化形式^[14]。因此,花生衣中其他酚酸和类黄酮物质也有可能通过乳酸菌发酵过

程中发生代谢与转化。目前，体外发酵对花生衣各方面抗糖化能力影响的研究并不完善，口服花生衣或花生衣发酵液的体内抗糖化效果仍缺乏报道。此外，口服抗糖化物质能否缓解糖损伤造成的皮肤衰老这一问题也亟待回答。

本研究使用乳酸菌发酵花生衣提取物，利用体外 BSA-Fru 模型和人源皮肤成纤维细胞 (HSF) 糖损伤模型筛选出能发酵提升花生衣抗糖化效果的乳酸菌，并体外评估该乳酸菌的花生衣发酵液在皮肤层面的抗糖化能力。本研究利用动物实验，评价花生衣及其发酵物在体内的抗糖化抗衰老能力，主要关注它在缓解皮肤衰老方面的效果，希望为花生衣及其发酵产物在功能性食品或化妆品原料领域的开发应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

植物乳植杆菌 CCFM1354、植物乳植杆菌 FXJCJ22M3、植物乳植杆菌 FSCDJY93L1、植物乳植杆菌 FJLHD2M9、发酵乳杆菌 FBJSY361、发酵乳杆菌 JSWX3L1、副干酪乳酪杆菌 DQHYNQ19M18、副干酪乳酪杆菌 DQHYNQ38M3、鼠李糖乳杆菌 FZJHZ14L3、鼠李糖乳杆菌 FNMGHLBE18L5，均来自于江南大学食品微生物保藏中心 (Culture Collection of Food Microorganisms) (江苏无锡)。

人源皮肤成纤维细胞 (human skin fibroblasts, HSF)，购于中国科学院昆明细胞库。雄性 BABL/c 小鼠 (SPF 级，8 周龄) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

花生衣提取物，陕西盛恒生物科技有限公司，批次号 SH20220328；MTT 试剂，上海碧云天生物技术有限公司；二甲亚砜、果糖、PBS 磷酸盐缓冲液速溶颗粒，国药集团化学试剂有限公司；丙酮醛 (MGO)，北京普西唐生物科技有限公司；qPCR 相关引物，生工生物工程 (上海) 股份有限公司；RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、染料法荧光定量试剂盒，南京诺维赞生物科技股份有限公司；D-半乳糖，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；通用型组织固定液 (中性)，武汉赛维尔生物科技有限公司；牛血清蛋白 (BSA)、小鼠晚期糖基化终末产物 (AGEs) 试剂盒、人源 III 型胶原蛋白 (Col III) 试剂盒，南京森贝伽生物科技有限

公司；脱毛膏，薇婷官方旗舰店。

隔水式恒温培养箱，上海森信实验仪器有限公司；超净工作台，中科美菱低温科技股份有限公司；酶标仪，美国 Thermo 公司；荧光定量 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；皮肤弹性测试仪 MPA580，德国 Courage+Khazaka 公司；数字切片扫描仪，匈牙利 3DHISTECH 公司。

1.2 乳酸菌的活化与菌液制备

将植物乳植杆菌 CCFM1354、植物乳植杆菌 FXJCJ22M3、植物乳植杆菌 FSCDJY93L1、植物乳植杆菌 FJLHD2M9、发酵乳杆菌 FBJSY361、发酵乳杆菌 JSWX3L1、副干酪乳酪杆菌 DQHYNQ19M18、副干酪乳酪杆菌 DQHYNQ38M3、鼠李糖乳杆菌 FZJHZ14L3、鼠李糖乳杆菌 FNMGHLBE18L5 于 MRS 固体培养基划线活化后，挑单菌落接种于液体 MRS 培养基中，37 ℃ 培养，每培养 24 h 以体积分数 2% 的接种量传代，活化 2 代，得到乳酸菌菌液。

1.3 花生衣发酵液的制备

配制花生衣发酵培养基 (记为 Hsp)：5% 花生衣提取物、4 g/L 葡萄糖、5 g/L 酵母粉、4 g/L 碳酸钙以去离子水混合，在 115 ℃ 灭菌 20 min。在花生衣发酵培养基中接入 2×10^6 CFU/mL 的乳酸菌菌液，在 37 ℃ 培养 48 h，发酵终点离心取上清液得到菌株发酵花生衣上清液。

1.4 体外 AGEs 抑制实验

在文献基础上稍加修改制备牛血清蛋白-果糖 (BSA-Fru) 体系^[15-17]，建立体外荧光 AGEs 生成抑制的评估模型。用 0.2 mol/L、pH 7.40 的磷酸缓冲液 (PBS) 溶解牛血清蛋白和 D-果糖，使最终体系中 BSA 浓度为 10 mg/mL，Fru 浓度为 0.5 mol/L，混合均匀的反应溶液体系过 0.22 μm 水系滤膜得到反应液。空白调零组：4 mL 的 PBS 溶液；空白对照组：2 mL 的 PBS 溶液与 2 mL 反应液均匀混合；2 mL 反应液与 2 mL 实验待测样品溶液。上述组别于 37 ℃ 下避光孵化 14 d，用酶标仪测定其在激发波长 370 nm、发射波长 440 nm 处的荧光强度，发射狭缝 5 nm。

Hsp 由 PBS 稀释成 100 μg/mL 的最终浓度并过 0.22 μm 水系滤膜得花生衣待测样品溶液。菌株发酵花生衣上清液由 PBS 稀释成 100 μg/mL，过 0.22 μm 水系滤膜后得实验待测样品。

AGEs 生成抑制率的计算公式如下：

$$R = [1 - (F_1 - F_2) / (F_3 - F_2)] \times 100\%$$

式中： F_1 为样品组荧光值； F_2 为空白调零组荧光值； F_3 为空白对照组荧光值。

1.5 细胞抗糖化实验

1.5.1 细胞培养和细胞毒性筛选

人源皮肤成纤维细胞(HSF)培养于 DMEM 完全培养基中(胎牛血清和双抗的体积分数分别为 10% 和 1%)，在 37 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的恒温培养箱培养，每隔 2 d 以体积分数为 0.25% 胰酶消化，并以 1 : 4 传代。

MTT 法是测定细胞活力的常用方法，可评估药物在细胞的最大安全剂量。当 HSF 细胞生长到对数期时，以胰酶消化制备细胞悬液，计算细胞数使 HSF 细胞以 3 000 个/孔的最终密度接种在 96 孔板中培养 24 h。将 Hsp 和不同菌株的花生衣发酵液分别过 0.22 μm 水系滤膜后，用 DMEM 基础培养基(体积分数 1% 双抗，无胎牛血清)稀释成不同浓度梯度(12.5~1 000 μg/mL)，替换 96 孔板中原有的培养基继续培养 24 h。每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL)，避光继续培养 4 h；终止培养时吸取孔内培养基，每孔加入 100 μL 二甲亚砜(DMSO)，用酶标仪在 490 nm 处测试吸光度，得到 OD₄₉₀^[18]。

1.5.2 MGO 诱导的 HSF 细胞活力损伤测定

以 Park 等的方法为基础^[8]，采用 MGO 诱导 HSF 细胞，建立糖损伤模型。将 HSF 细胞以 3 000 个/孔的最终密度接种在 96 孔板中培养 24 h，之后分成不同组别进行操作。对照组：将培养液换成基础培养基，过 24 h 重复换一次液并继续培养 24 h。模型组：将培养液换成基础培养基，过 24 h 去除培养基并用 400 μM MGO 继续培养 24 h。实验组：去除培养液，加入由基础培养基稀释的 Hsp 或菌株发酵花生衣上清液(使各组花生衣提取物终浓度为 100 μg/mL)培养 24 h，再更换为含 400 μM MGO 的基础培养基培养 24 h。各组培养终点以 1.5.1 中的方法测试细胞活力，得到各实验组对丙酮醛损伤的预防效果。

1.5.3 高糖培养下 HSF 细胞的功能测定

a. HSF 细胞的高糖模型建立。

将 Pang 等^[19]的方法稍加修改，建立 HSF 细胞高糖模型。以葡萄糖含量为 35 mmol/L 的 DMEM 完全培养基(记为 HG)为高糖培养基，建立 HSF 细胞高糖模型。将 HSF 细胞以 1×10⁴ 个/mL

的浓度接种至六孔板中培养 24 h，分成不同组别进行以下操作。对照组：除去原有培养液后，以完全培养基(葡萄糖含量为 5.5 mmol/L)培养 24 h，重复 48 h。HG 组：以完全培养基正常换液培养 24 h，再以高糖培养基培养 24 h。实验组：除去培养基后，加入由完全培养基稀释的 100 μg/mL 的 Hsp 或 100 μg/mL 的植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵花生衣上清液培养 24 h，再以高糖培养基培养 24 h。

b. HSF 细胞基因表达的测定。

培养终点收获细胞，根据 RNA 提取试剂盒操作说明，从 HSF 中提取总 RNA，并根据逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA 备用。用实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)确定 HSF 细胞中 DDOST、MMP9、BAX 和 NFκB1 的 mRNA 的表达。将准备好的 cDNA 根据 Liu 等^[20]描述的方法，使用荧光定量试剂盒在 CFX96 系统(Bio-Rad)上进行实时荧光定量。基因序列在美国国家生物技术信息中心(NCBI)检索，由生工生物工程(上海)股份有限公司设计引物，使用 β-actin 作为内参基因。具体引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-qPCR 专用引物序列
Tab.1 Specific primer sequences for RT-qPCR

基因	序列(5'-3')	
DDOST	Forward	GAGACTCATTCGCTTTTCTTCCG
	Reverse	CTCCAAAATCTTCTACCGAAGGG
MMP9	Forward	AGACCTGGGCAGATTCCAAAC
	Reverse	CGGCAAGTCTTCCGAGTAGT
BAX	Forward	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG
	Reverse	CCAGCCCATGATGGTTCGTAT
NFκB1	Forward	GAAGCACGAATGACAGAGGC
	Reverse	GCTTGCGGATTAGCTCTTTT
β-actin	Forward	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

c. HSF 细胞 III 型胶原蛋白含量的测定。

高糖模型培养结束，收集对照组、模型组、实验组细胞培养液于无菌离心管中，于 4℃、3 000 r/min 离心 20 min，保存上清液，用 ELISA 试剂盒检测其中 III 型胶原蛋白含量。

1.6 动物抗糖化抗衰老实验

1.6.1 动物实验设计

将 20 只实验小鼠随机分为对照组、模型组、花生衣发酵培养基组(记为 Hsp)、植物乳植杆

菌 CCFM1354 发酵花生衣上清液组（记为 H-CCFM1354），每组 5 只。进鼠适应 1 周后，除对照组外，其余小鼠每天皮下注射生理盐水配置的 D-半乳糖（500 mg/kg），造模 6 周^[21]。造模期间，Hsp 组小鼠每只每天分别灌胃 80 mg/kg 花生衣发酵培养基，CCFM1354 组小鼠每只每天分别灌胃 80 mg/kg 植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵花生衣上清液，灌胃量都为 0.1 mL/20 g 小鼠；对照组和模型组的小鼠每天灌胃等体积的生理盐水。实验过程中，每周固定时间对所有小鼠的体重进行测量并记录。最后一次干预造模 24 h 后处死小鼠，立即取样。动物实验方案获得江南大学实验动物实验伦理委员会批准（伦理编号：JN.No20230415 b1430621[132]）。

1.6.2 小鼠皮肤弹性性能测定

造模 6 周后，用脱毛膏脱去小鼠背部毛发，以皮肤弹性测试仪检测每只小鼠背部皮肤弹性性能参数 R_2 ，测定时固定小鼠，确保仪器表面与待测皮肤始终保持垂直^[22]。

1.6.3 小鼠血清糖化衰老标志物测定

采用眼眶静脉丛采集小鼠血液，静置 1 h，以 3000 r/min 低温离心 15 min，取上清液分装。采用 ELISA 试剂盒测定血清中糖化标志物 AGEs 含量。

1.6.4 小鼠皮肤组织病理观察及分析

收获约 1 cm² 皮肤组织块在 10% 多聚甲醛溶液中固定 48 h。将上述组织送武汉赛维尔生物科技有限公司进行 H&E 染色，使用数字切片扫描仪扫描切片，以 Image J 软件对切片结果中皮肤组织表皮厚度进行测量。

1.7 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行作图和对显著性差异完成统计分析，实验结果以平均值±标准差（Mean±SD）表示，组间比较使用单因素方差分析（One-Way ANOVA）。 $P < 0.05$ 记为*， $P < 0.01$ 记为**， $P < 0.001$ 记为***， $P < 0.0001$ 记为****；“ns”表示无显著差异。

2 结果与讨论

2.1 能够提升花生衣抗糖功能的乳酸菌筛选

2.1.1 不同菌株的花生衣发酵液抑制 AGEs 生成能力检测

如图 1 所示，在 100 μg/mL 浓度下，Hsp 的荧

光 AGEs 生成抑制率为 56.89%，与之前的抗糖化研究结果相符；由于前期研究已证实花生衣的体外抑制 AGEs 生成能力与添加浓度成正相关^[8]，为了凸显发酵对花生衣抗糖化能力的提升，本研究选择 100 μg/mL 的低 Hsp 添加浓度进行实验。结果发现，不同菌株发酵液的 AGEs 抑制率有差异变化，植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵 Hsp 显著提高其 AGEs 生成抑制率，达到 76.74%（ $P < 0.0001$ ）；植物乳植杆菌 FSCDJY93L1 和副干酪乳酪杆菌 DQHXNQ38M3 发酵后，AGEs 抑制率也分别显著上升至 65.81% 和 64.05%（ $P < 0.001$ 和 $P < 0.01$ ）。

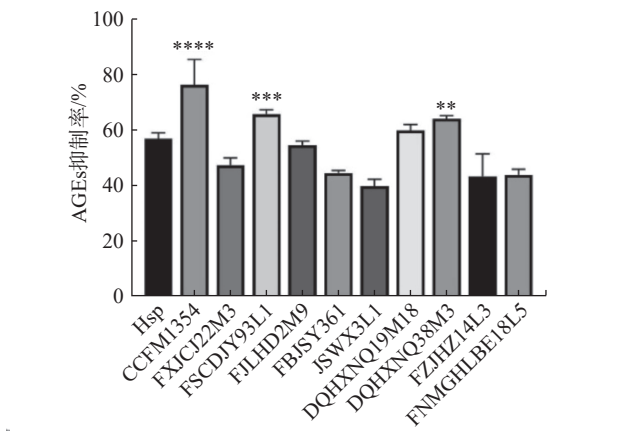


图 1 不同菌株发酵花生衣上清液的 AGEs 生成抑制能力
Fig.1 Inhibition of AGEs production by different strains of fermented peanut skin supernatant

2.1.2 不同菌株的花生衣发酵液对 MGO 诱导的 HSF 细胞活力的影响

a. Hsp 对 HSF 细胞活力的影响。

HSF 细胞是皮肤真皮层重要的细胞。为确定合适的花生衣发酵液浓度，首先测试了不同浓度花生衣发酵培养基（Hsp）对 HSF 细胞活力的影响。

由图 2 可知，12.5~100 μg/mL 的 Hsp 与 HSF 共孵育 24 h 后均未见明显的细胞毒性，但当 Hsp 浓度升高至 500 μg/mL 后 HSF 细胞活力明显下降。因此，选定 100 μg/mL 为后续 Hsp 以及各组别花生衣发酵上清液的给药浓度。在同类研究中，花生衣提取物对于 RAW 264.7 细胞的最大浓度设置为 150 μg/mL，与本实验结果一致^[23]。

b. 预防细胞丙酮醛损伤的能力。

丙酮醛（MGO）是种高活性的二羰基化合物，是 AGEs 生成过程中常见的高反应中间体。MGO 不仅会加剧细胞糖酵解过程中 AGEs 生成、引发后续糖化损伤，也具有抑制与炎症反应、细胞周

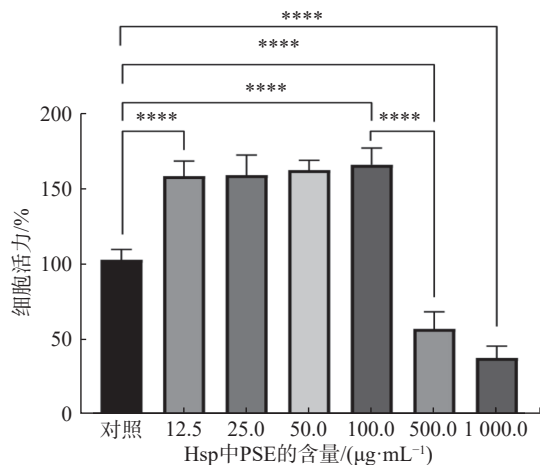


图2 不同浓度 Hsp 对人源皮肤成纤维细胞细胞活力的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of Hsp on cell viability of human skin fibroblasts

期、细胞凋亡相关的基因的细胞毒性, 常被用作糖化损伤相关的实验造模剂^[24]。

由图3可知,与对照组(100%)相比,模型组经过MGO处理会造成细胞活力显著下降至52.84%,证实MGO造成细胞损伤。实验组用100 $\mu\text{g/mL}$ 的Hsp预处理后能使细胞活力提高到62.48%;100 $\mu\text{g/mL}$ 不同菌株的花生衣发酵上清液预防给药后,细胞活力与出现不同程度的上调或下降,其中植物乳植杆菌CCFM1354组的细胞活力显著提高至76.07%($P<0.0001$),发酵乳杆菌JSWX3L1组显著提升至68.52%($P<0.05$)。

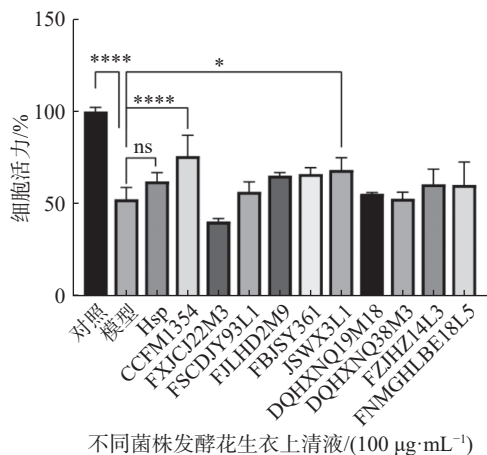


图3 发酵提升花生衣对预防丙酮醛造成的细胞损伤的影响

Fig.3 Effect of fermentation to enhance peanut skin on the prevention of cellular damage caused by pyruvialdehyde

与未发酵的花生衣相比,乳酸菌发酵花生衣可能有两部分成分变化:第一种是花生衣中部分功效物质在乳酸菌作用下发生了转化;第二种是在花生衣原有物质的基础上增加了乳酸菌的某些

代谢产物。这两部分成分变化共同造成发酵花生衣在抑制 AGEs 生成能力和预防细胞丙酮醛损伤能力上的变化。针对第一种可能性, 乳酸菌发酵会产生不同的催化酶, 如木聚糖酶、蛋白酶和单宁酶, 可以解聚和溶解细胞壁结构骨架中的一些特定植物化学物质, 导致发酵底物中一些特殊酚类物质的释放或合成, 增强底物的抗氧化能力。但具体酚类物质的增加及底物功效的增强与乳酸菌菌株密切相关^[14]。针对第二种可能性, 有研究发现不同灭活乳酸菌对脂多糖造成的角质形成细胞活力损伤的预防能力不同^[25], 不同植物乳植杆菌菌株上清液的体外抗氧化能力不同^[26]。因此, 不同乳酸菌发酵会改变花生衣的原有抗糖化功能。综合 2.1.1 和 2.1.2 的结果, 植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵提升花生衣抗糖功能的能力最显著, 既能提高体外 AGEs 生成抑制率, 也能缓解 MGO 对 HSF 细胞造成的糖化损伤, 提升花生衣体外抗糖化能力。

植物乳植杆菌在发酵提升抗糖化功能方面的作用被多次报道：植物乳植杆菌 GKM3 发酵上清液可以通过捕获糖化剂实现抑制蛋白质糖化^[27]，植物乳杆菌 Kinko-SU4 发酵花生乳也提升了花生乳的抗糖化特性^[7]。而本研究筛选出的体外抗糖化功效最强的菌株也是植物乳植杆菌，与相近研究的结果具有一致性。因此，选择植物乳植杆菌 CCFM1354 的花生衣发酵上清液为研究对象，开展体外和体内的抗糖化功效评价。

2.2 植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵提升花生衣预防 HSF 细胞糖化损伤的能力

HG 常被用来模拟糖尿病条件, 该培养条件容易引起糖化反应并对细胞造成不利影响。研究表明, 30 mM 葡萄糖处理不影响 HSF 细胞的增殖活性, 但能明显上调细胞凋亡基因, 诱发炎症, 造成细胞部分功能异常^[19]。

2.2.1 花生衣发酵液对高糖培养下 HSF 细胞基因表达的影响

HG 培养会加剧细胞炎症并促进细胞凋亡,也会促进 AGE-RAGE 结合,从而加剧糖化下游反应,同时会造成蛋白质异常水解。BAX 是动物细胞凋亡基因 Bcl-2 家族一员,高表达会加剧细胞凋亡;NFKB1 能编码蛋白质前体,参与 NF- κ B 复合物形成,使糖化下游级联反应持续作用;DDOST 是调控 RAGE 竞争性受体 AGER1 的基因,能通过

增加 DDOST 的表达减少 AGE-RAGE 的结合；MMP9 是金属蛋白水解酶家族一员，与 HSF 的生理功能紧密相关。HG 培养下 HSF 的基因表达水平结果如图 4 所示。

与对照组相比，模型组 BAX mRNA 相对表达量显著上升至 2.390 ($P<0.0001$) (图 4(a))，与其他研究结果一致^[28]；与模型组相比，Hsp 组中 BAX 表达显著降低至 1.410 ($P<0.001$)，H-CCFM1354 组 BAX 表达量显著降低至 1.100 ($P<0.0001$)。HG 培养后，模型组 NFKB1 mRNA 相对表达量显著上升至 1.680 ($P<0.0001$) (图 4(b))；与模型组相比，Hsp 和 H-CCFM1354 都能显著降低基因 NFKB1 相对表达量 ($P<0.0001$)。HG 培养后，模型组 DDOST mRNA 相对表达量由对照组 1.200 降低至 0.5900 (图 4(c))，Hsp 干预能使基因相对表达量提高至 1.070，而 H-CCFM1354 干预后基因相对表达

量仍仅有 0.5700。HG 培养后，与对照组相比，模型组 MMP9 mRNA 相对表达量显著上升 ($P<0.01$)；与模型组相比，Hsp 组能显著 ($P<0.05$) 降低基因相对表达量至 1.310 (图 4(d))，而 H-CCFM1354 组的基因表达量只能降低为 1.780，即发酵没有明显提升花生衣调控 MMP9 基因表达异常的能力。

花生衣能调控由高糖诱导的细胞中 BAX、NFKB1、DDOST 和 MMP9 基因表达异常，但具体功能成分未见报道。乳酸菌可以发酵花生衣提取物，但其中的物质转化尚未明确。益生菌可以通过抑制 NF- κ B 信号通路，显著降低细胞凋亡蛋白 BAX 的水平^[29]，而 BAX 基因和 NFKB1 基因密切相关，所以乳酸菌发酵花生衣对 BAX 和 NFKB1 具有较好的调控效果。对于 DDOST 基因，目前研究未发现其具体的上游调控机制，我们推测乳酸菌发酵改变了花生衣中原有的缓解 DDOST 基因表

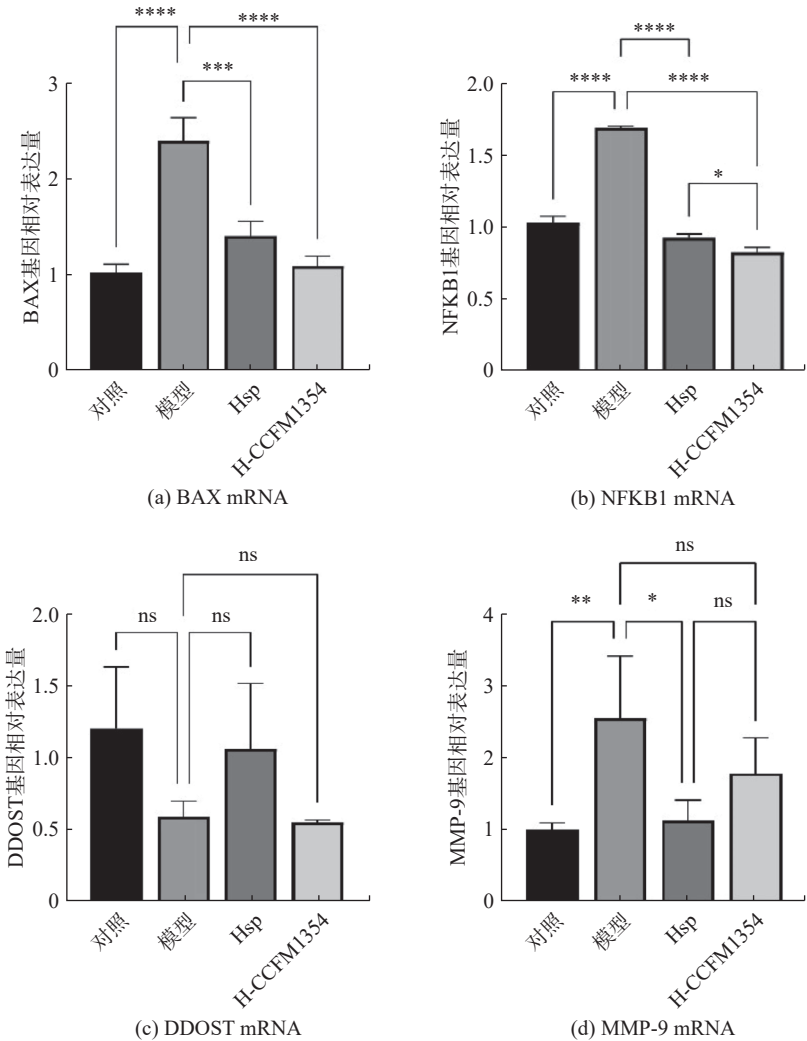


图 4 发酵花生衣对高糖造成的细胞基因表达异常的影响

Fig.4 Effect of fermented peanut skins on abnormal cellular gene expression caused by high glucose

达缺陷的有效成分, 因此, 并未提升花生衣调控 DDOST 基因表达异常的能力。乳酸菌发酵花生衣依旧能降低高糖模型下 HSF 细胞 MMP9 基因的过表达, 只是与发酵前比未得到显著提升; 在未发酵的花生衣中, 白藜芦醇是抑制 MMP9 基因活性的潜在成分^[30], 但白藜芦醇在发酵过程中可能发生生物转化, 变成对 MMP9 调控敏感性低的其他衍生形式, 导致发酵物改善 MMP9 基因异常过表达的能力降低。综上, 尽管植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵未能全面提升 Hsp 的抗糖化功能, 但能明显提升花生衣预防细胞高糖损伤下 BAX 和 NFκB1 基因表达异常的能力。

2.2.2 花生衣发酵液对高糖培养下 HSF 细胞产 III 型胶原蛋白能力的影响

III 型胶原蛋白是维持皮肤弹性的重要胶原蛋白, 人体自然衰老过程中, III 型胶原蛋白的占比会逐渐减低。HSF 细胞可以分泌 III 型胶原蛋白, 对伤口愈合和维持皮肤组织正常强度和完整性有重要意义; HG 培养会加剧 HSF 细胞中蛋白水解酶的表达, 减少胶原蛋白合成。采用 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 III 型胶原蛋白含量, 结果如图 5 所示。与对照组相比, HG 模型组的 III 型胶原蛋白含量显著下降至 31.85 ng/L ($P<0.01$); Hsp 干预后的 III 型胶原蛋白含量显著上升至 36.56 ng/L ($P<0.05$), H-CCFM1354 干预后的 III 型胶原蛋白含量显著上升至 40.05 ng/L ($P<0.001$)。表明植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵花生衣能提升 Hsp 预防 III 型胶原蛋白含量下降的能力。

2.3 植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵花生衣上清液对 D-半乳糖致衰小鼠的影响

2.3.1 灌胃样品对小鼠体重的影响

实验期间小鼠体重变化如图 6 所示。在实验期间, 各组小鼠体重均呈现平稳增长, 组间并未出现明显差异, 表明 Hsp 及 H-CCFM1354 灌胃样品(未发酵花生衣上清液及其发酵上清液)对小鼠无明显副作用。

2.3.2 灌胃样品对血清糖化衰老标志物的影响

D-半乳糖致衰是种常见的模拟衰老模型, 高剂量 D-半乳糖受半乳糖氧化酶催化会刺激活性氧形成, 在造成氧化应激、炎症反应的同时也加剧机体糖化反应标志物 AGEs 的生成, 刺激后续糖化损伤发生。血清中 AGEs 含量测定结果如图 7 所示。以 D-半乳糖连续皮下注射造模后, 模型组小

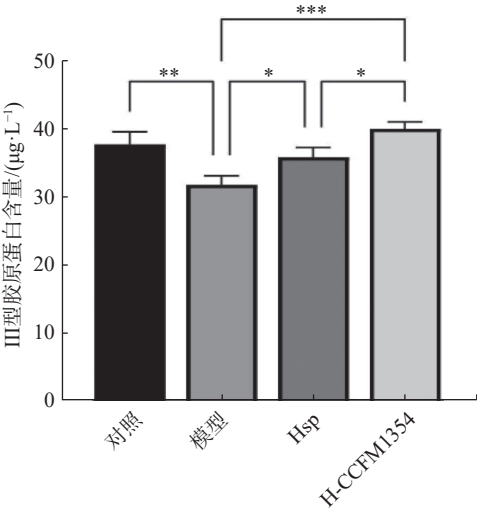


图 5 发酵对花生衣缓解高糖造成的细胞外泌 III 型胶原蛋白含量减少的影响

Fig.5 Effect of fermentation on peanut skins to mitigate the reduction of exocytotic type III collagen content caused by high glucose

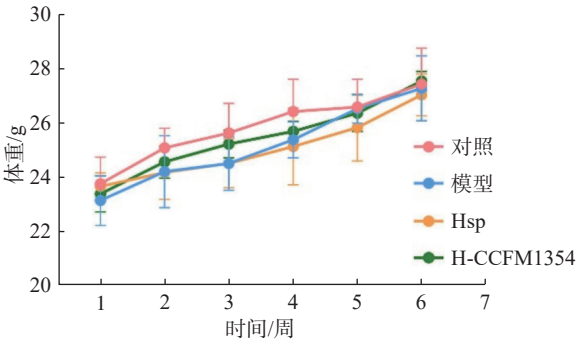


图 6 实验期间小鼠体重变化

Fig.6 Body weight changes in different groups of mice

鼠血清 AGEs 含量较对照组 260.2 ng/L 显著提升至 406.2 ng/L ($P<0.01$), 与其他 D-半乳糖诱导的衰老模型 AGEs 变化趋势相符^[31]。与模型组相比, Hsp 组血清 AGEs 含量显著降低至 247.0 ng/L ($P<0.01$), H-CCFM1354 组显著降低至 208.4 ng/L ($P<0.001$)。由此可见, 植物乳植杆菌 CCFM1354 的发酵强化了花生衣抑制血清 AGEs 积累的能力, 具有更好地抑制后续机体糖化损伤的潜力。

2.3.3 灌胃样品对小鼠皮肤弹性性能的影响

D-半乳糖造成的 AGEs 积累会造成全身糖化损伤, 在皮肤层面主要表现为促进皮肤细胞凋亡并影响其正常生理活性、破坏蛋白质结构、影响伤口愈合等, 直观反映为表皮变薄、皮肤结构松弛等衰老表象^[4]。R₂ 值被认为是最接近皮肤弹性真实状态的参数值, 数值越大表明皮肤弹性越好。由图 8 可知, 与对照组的皮肤弹性 74.90% 相

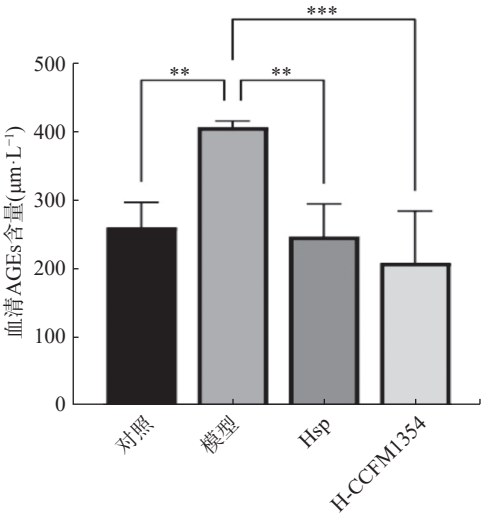


图7 发酵对花生衣口服缓解小鼠血清中AGEs的积累的影响
Fig.7 Effect of fermentation on the accumulation of AGEs in serum of peanut skin orally relieved mice

比,模型组的 R_2 显著降低至53.70%($P<0.01$);与模型组相比,Hsp能缓解 R_2 的降低,使其恢复至64.90%;H-CCFM1354显著恢复了皮肤弹性性能,使 R_2 值达到72.40%($P<0.05$)。由此可见,植物乳植杆菌CCFM1354发酵花生衣显著提高了小鼠皮肤弹性,比未发酵花生衣有提升作用。

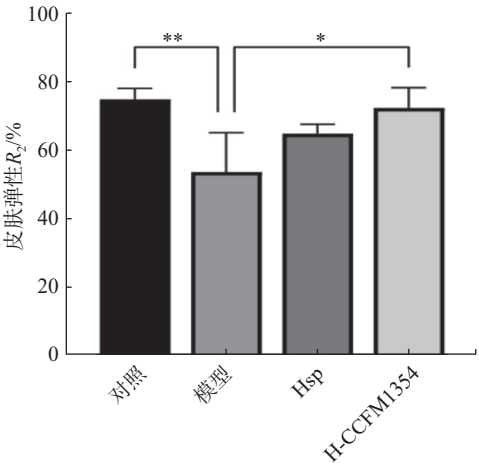
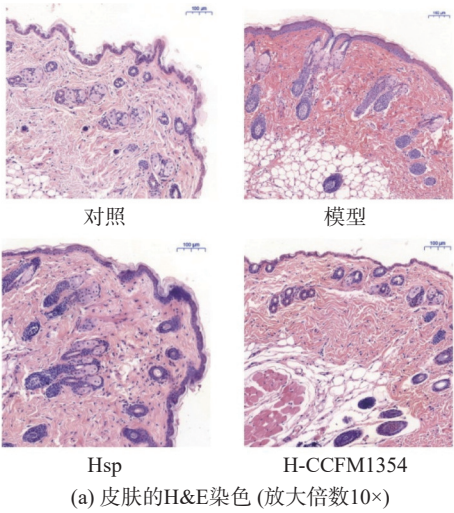


图8 发酵对口服花生衣改善皮肤弹性特性的影响
Fig.8 Effect of fermentation on the improvement of skin elasticity properties by oral administration of peanut skin

2.3.4 灌胃样品对小鼠皮肤病理的影响

皮肤组织H&E染色结果如图9(a)所示。与对照组相比,模型组表皮严重萎缩、皮突明显减少、炎性细胞大量增加,真皮内出现充血现象,并且弹性蛋白结构紊乱不清晰,与先前研究中造模出现的皮肤病理情况相吻合^[32]。与对照组相比,Hsp组和H-CCFM1354组出现表皮萎缩、真



(a) 皮肤的H&E染色(放大倍数10×)

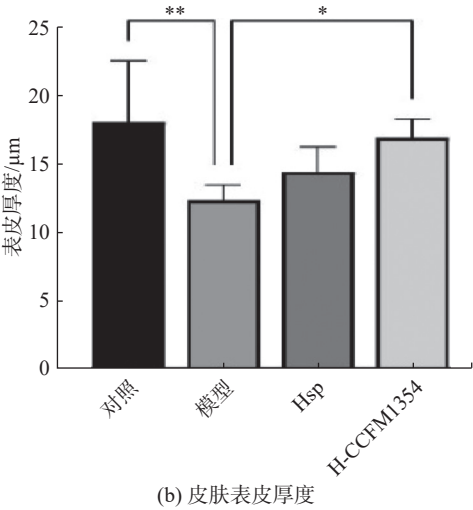


图9 发酵对花生衣保护小鼠皮肤组织状态的影响
Fig.9 Effect of fermentation on the tissue state of skin in peanut skin protected mice

皮内充血的情况有所缓解。此外,H-CCFM1354组较Hsp组的炎性细胞含量明显减少,弹性蛋白结构更完整清晰。以Image J软件对各组皮肤切片的表皮厚度进行测量,结果如图9(b)所示。与对照组相比,模型组表皮厚度显著下降至12.40 μm ($P<0.01$)。与模型组相比,Hsp组的表皮厚度提升至14.05 μm ,H-CCFM1354组的表皮厚度显著提升至17.00 μm ($P<0.05$)。由此可见,植物乳植杆菌CCFM1354发酵花生衣可有效改善衰老小鼠的皮肤表皮萎缩,改善皮肤质构。

3 结 论

通过体外AGEs反应体系、细胞糖损伤模型、D-半乳糖致衰老小鼠模型,研究了乳酸菌发酵对花生衣抗糖化功能的影响,明确花生衣发酵液体内

外抗糖化缓解皮肤衰老的关键机制。本研究得到的主要结论如下:

a. 利用体外 AGEs 生成模型和 HSF 细胞丙酮醛损伤模型,从 10 株乳酸菌中筛选出 1 株能够提升花生衣体外抗糖化能力的植物乳植杆菌 CCFM1354。

b. 构建 HSF 细胞高糖模型,植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵能提高花生衣的抑制 BAX 和 NFkB1 mRNA 过表达的能力、缓解高糖下 HSF 细胞 III 型胶原蛋白含量降低的能力,但植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵花生衣不能阻碍高糖培养下 HSF 细胞的 AGE-RAGE 结合,也不影响 HSF 细胞中蛋白质水解相关的基因表达。

c. 与未发酵花生衣相比,口服植物乳植杆菌 CCFM1354 的花生衣发酵液能有效降低 D-半乳糖致衰小鼠血清中 AGEs 的含量,缓解 D-半乳糖致衰小鼠皮肤弹性降低,能更好地减轻 D-半乳糖致衰小鼠皮肤病理情况。

综上,本研究证实植物乳植杆菌 CCFM1354 发酵可以提升花生衣的抗糖化功能,抗糖化特性在体内依然起效,填补了口服花生衣抗糖化的研究空白,也为花生衣及其发酵物作为化妆品或食品抗糖化功效原料提供数据支持和理论指导。

参考文献:

[1] TWARDA-CLAPA A, OLCZAK A, BIAŁKOWSKA A M, et al. Advanced glycation end-products (AGEs): formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs[J]. *Cells*, 2022, 11(8): 1312.

[2] YUE K Y, MAO B Y, TANG X, et al. Recent updates in anti-glycation strategies: selection of 5 natural products and lactic acid bacteria as potential inhibitors based on the multi-pathway anti-glycation targets[J/OL]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (2023-07-07). <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2232015>

[3] ABDELKADER H, MUSTAFA W W, ALQAHTANI A M, et al. Glycation-induced age-related illnesses, antiglycation and drug delivery strategies[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2022, 74(11): 1546–1567.

[4] CHEN C Y, ZHANG J Q, LI L, et al. Advanced glycation end products in the skin: molecular mechanisms, methods of measurement, and inhibitory pathways[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9: 837222.

[5] ZHAO L, ZHU X L, YU Y, et al. Comprehensive analysis of the anti-glycation effect of peanut skin extract[J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130169.

[6] SORITA G D, LEIMANN F V, FERREIRA S R S.

Phenolic fraction from peanut (*Arachis hypogaea* L.) by-product: innovative extraction techniques and new encapsulation trends for its valorization[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2023, 16(4): 726–748.

[7] KIM M Y, KIM H J, LEE Y Y, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin extracts of various cultivars in oxidative-damaged HepG2 cells and LPS-induced raw 264.7 macrophages[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(2): 973–984.

[8] PARK S H, DO M H, LEE J H, et al. Inhibitory effect of *Arachis hypogaea* (peanut) and its phenolics against methylglyoxal-derived advanced glycation end product toxicity[J]. *Nutrients*, 2017, 9(11): 1214.

[9] 刘波, 张鹏翼, 孟祥璟, 等. 益生菌发酵中药方法概述及其应用研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22(10): 1741–1750.

[10] SHI F F, WANG L, LI S R. Enhancement in the physicochemical properties, antioxidant activity, volatile compounds, and non-volatile compounds of watermelon juices through *Lactobacillus plantarum* JHT78 fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2023, 420: 136146.

[11] YANG W B, LIU J C, ZHANG Q, et al. Changes in nutritional composition, volatile organic compounds and antioxidant activity of peach pulp fermented by lactobacillus[J]. *Food Bioscience*, 2022, 49: 101894.

[12] YAMAMOTO M, HANDA N, NAKAMURA A, et al. *In vitro* antioxidant, anti-glycation, and bile acid-lowering capacity of peanut milk fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* Kinko-SU4[J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5: 992–997.

[13] CHEN W B, ZHU X L, LU Q, et al. C-ring cleavage metabolites of catechin and epicatechin enhanced antioxidant activities through intestinal microbiota[J]. *Food Research International*, 2020, 135: 109271.

[14] ZHANG J G, HUANG X D, CHENG J H, et al. Effect of *Lactobacillus* (*L. acidophilus* NCIB1899, *L. casei* CRL 431, *L. paracasei* LP33) fermentation on free and bound polyphenolic, antioxidant activities in three *Chenopodium quinoa* cultivars[J]. *Journal of Food Science*, 2023, 88(6): 2679–2692.

[15] 周慧吉, 李廷钊, 李波. 多模型评价槐花水提物的抗糖化作用及其活性成分研究 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(5): 371–379.

[16] EZE F N, TOLA A J. Protein glycation and oxidation inhibitory activity of *Centella asiatica* phenolics (CAP) in glucose-mediated bovine serum albumin glycoxidation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 332: 127302.

[17] 沈雪梅, 王荣庆, 肖伟莉, 等. 桑黄提取物对体外蛋白质非酶糖化的抑制作用 [J]. *中国食品添加剂*, 2016, 27(9):

73–77.

- [18] FANG H C, WU B Q, HAO Y L, et al. KRT1 gene silencing ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via the activation of the Notch signaling pathway in mouse models[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(4): 3634–3646.
- [19] PANG L X, WANG Y P, ZHENG M Q, et al. Transcriptomic study of high-glucose effects on human skin fibroblast cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(3): 2627–2634.
- [20] LIU J D, GAO M W, HE J P, et al. The RNA m⁶A reader YTHDC1 silences retrotransposons and guards ES cell identity[J]. *Nature*, 2021, 591(7849): 322–326.
- [21] SHAHROUDI M J, MEHRI S, HOSSEINZADEH H. Anti-aging effect of nigella sativa fixed oil on D-galactose-induced aging in mice[J]. *Journal of Pharmacopuncture*, 2017, 20(1): 29–35.
- [22] BRACONE F, DE CURTIS A, DI CASTELNUOVO A, et al. Skin toxicity following radiotherapy in patients with breast carcinoma: is anthocyanin supplementation beneficial?[J]. *Clinical Nutrition*, 2021, 40(4): 2068–2077.
- [23] FERNANDES A C F, VIEIRA N C, SANTANA Á L D, et al. Peanut skin polyphenols inhibit toxicity induced by advanced glycation end-products in RAW264.7 macrophages[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 145: 111619.
- [24] WETZELS S, WOUTERS K, SCHALKWIJK C G, et al. Methylglyoxal-derived advanced glycation endproducts in multiple sclerosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 421.
- [25] SHIN M J, LEE C S, KIM S H. Screening for lactic acid bacterial strains as probiotics exhibiting anti-inflammatory and antioxidative characteristic via immune modulation in HaCaT cell[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023, 15(6): 1665–1680.
- [26] ZHONG H, ABDULLAH, ZHANG Y P, et al. Screening of novel potential antidiabetic *Lactobacillus plantarum* strains based on *in vitro* and *in vivo* investigations[J]. *LWT*, 2021, 139: 110526.
- [27] LIN S W, WU C H, JAO Y C, et al. Fermented supernatants of *Lactobacillus plantarum* GKM3 and *Bifidobacterium lactis* GKK2 protect against protein glycation and inhibit glycated protein ligation[J]. *Nutrients*, 2023, 15(2): 277.
- [28] KOOPTIWUT S, KAEWIN S, SEMPRASERT N, et al. Estradiol prevents high glucose-induced β -cell apoptosis by decreased BTG2 expression[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12256.
- [29] HUA H Y, PAN C, CHEN X X, et al. Probiotic lactic acid bacteria alleviate pediatric IBD and remodel gut microbiota by modulating macrophage polarization and suppressing epithelial apoptosis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1168924.
- [30] YIN Y L, GUO R, SHAO Y, et al. Pretreatment with resveratrol ameliorate trigeminal neuralgia by suppressing matrix metalloproteinase-9/2 in trigeminal ganglion[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 72: 339–347.
- [31] ZENG L, LIN L, PENG Y Q, et al. L-theanine attenuates liver aging by inhibiting advanced glycation end products in D-galactose-induced rats and reversing an imbalance of oxidative stress and inflammation[J]. *Experimental Gerontology*, 2020, 131: 110823.
- [32] CHEN J M, LI Y F, ZHU Q Q, et al. Anti-skin-aging effect of epigallocatechin gallate by regulating epidermal growth factor receptor pathway on aging mouse model induced by D-galactose[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2017, 164: 1–7.

(编辑: 黄 娟)