

牡蛎及其酶解产物抗皮肤光老化的初步研究

吕佳桐¹, 林海生^{1,2}, 秦小明^{1,2}, 章超桦^{1,2}, 曹文红^{1,2}, 高加龙^{1,2}, 郑慧娜^{1,2}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东省水产品加工与安全重点实验室/广东普通高等学校水产品深加工重点实验室/国家贝类加工技术研发分中心(湛江)/南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 湛江 524088)

摘要: 文章探讨了香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 肉粉 (Oyster meat, OM) 及其酶解产物 (Oyster hydrolysis, OH) 对紫外线诱导的小鼠 (*Mus musculus*) 皮肤光老化的保护作用。紫外线 (UVA+UVB) 每天照射构建小鼠皮肤光老化模型并灌胃 OM 和 OH, 分为低、中、高三组 (30、90、180 mg·kg⁻¹) 给药, 持续 8 周。结果表明, OM 和 OH 可减轻小鼠皮肤皱纹, 提高皮肤弹性, 减少皮下血管的萎缩, 防止血管通透性增加; 皮肤 HE 染色结果表明, 中高剂量的 OM 和 OH 可显著减缓表皮层过度角化增厚 ($P<0.05$); Masson 染色和醛品红染色结果表明, OM 和 OH 可减少胶原纤维的卷曲和降解, 避免弹性纤维的异常增生, 恢复真皮细胞外基质的排列; 与模型组相比, OM 和 OH 可使皮肤中超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化氢酶 (GSH-Px) 的活力显著提高, 同时使丙二醛 (MDA) 和 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHDG) 的浓度降低 ($P<0.05$); OM 和 OH 可抑制基质金属蛋白酶 (MMP-3、MMP-9) 的表达, 显著降低真皮中羧脯氨酸 (Hyp) 的降解; 此外, 高剂量的 OH 可显著降低皮肤中炎症因子细胞白介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的表达, 并通过提高转化生长因子 (TGF- β) 来提高皮肤抗炎能力。

关键词: 牡蛎; 酶解产物; 皮肤; 光老化; 抗氧化; 紫外线辐射

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Preliminary study on resistance of oyster and its enzymatic hydrolysis products to skin photoaging

LÜ Jiatong¹, LIN Haisheng^{1,2}, QIN Xiaoming^{1,2}, ZHANG Chaohua^{1,2},
CAO Wenhong^{1,2}, GAO Jialong^{1,2}, ZHENG Huina^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety/Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution/National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang)/South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: To explore the protective effects of Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*) meat (OM) and its enzymatic hydrolysis (OH) products on UV-induced photoaging of mouse (*Mus musculus*) skin. Ultraviolet rays (UVA+UVB) were irradiated every day to build a mouse skin photoaging model. The mice were given OM and OH daily and divided into low, medium and high dose

收稿日期: 2020-07-07; 修回日期: 2020-08-21

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-49); 国家重点研发计划项目“水产品非宏量营养素的健康功效解析” (2018YFD0901105)

作者简介: 吕佳桐 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋功能活性物质。E-mail: 1141432665@qq.com

通信作者: 秦小明 (1964—), 男, 博士, 教授, 从事水产品精深加工、贝类活性物质研究。E-mail: xiaoming0502@21cn.com

groups (30, 90, 180 mg·kg⁻¹) for eight weeks. The results show that OM and OH can reduce mice skin wrinkles, improve skin elasticity, reduce subcutaneous blood vessel atrophy, and prevent increase in vascular permeability. The results of skin HE staining show that medium and high doses of OM and OH can slow down hyperkeratosis and epidermis thickening significantly ($P<0.05$). Masson staining and aldehyde fuchsin staining results show that OM and OH can reduce the curling and degradation of collagen fibers, avoid abnormal proliferation of elastic fibers, and restore the arrangement of the dermal extracellular matrix network. Compared with the model group, OM and OH can increase the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione catalase (GSH-Px) in skin, while malondialdehyde (MDA) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHDG) concentration decreased significantly ($P<0.05$). OM and OH can inhibit the expression of matrix metalloproteinases (MMP-3, MMP-9), and reduce the degradation of hydroxyproline (Hyp) in the dermis significantly. In addition, high doses of OH can reduce the expression of inflammatory factors, interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF- α) in the skin significantly, and increase the skin's anti-inflammatory ability by increasing transforming growth factor (TGF- β).

Key words: Oyster; Enzymatic hydrolysis product; Skin; Photoaging; Antioxidant; Ultraviolet radiation

近年来, 药食同源的健康理念越来越深入人心。人们不仅对食品的营养和风味有要求, 而且更注重食品的附加功能, 因此功能食品迅速获得了消费者的青睐^[1-2]。在美容方面, 维 A 酸是迄今为止最有效的抗光老药物^[3], 可通过口服或涂抹使用, 但其衍生物可引起肝损害、皮肤脱皮和胎儿畸形^[4], 因此茶多酚、胶原蛋白肽、益生菌、虾青素和微藻叶黄素等^[5-7] 被加入食品中, 制成了多种具有美容功效而又无副作用的功能食品。藻类多糖、鱼类胶原蛋白、贝类多肽具有多种生物活性, 且在抗氧化和抗光老化方面效果显著^[8-10]。牡蛎 (*Os-treidae*) 作为我国第一大养殖贝类, 目前已被证实具有生殖保健^[11]、解酒护肝^[12]、抗光老化^[13] 等生物活性, 且牡蛎中的多肽也在动物实验中被证实具有抗光老化功效^[14-15]。UVB (Ultraviolet radiation B) 是皮肤光老化的重要影响因素^[8,16], 因此多数研究仅以 UVB 照射建立皮肤光老化模型, 但近年来 UVA (Ultraviolet radiation A) 愈发得到研究人员的重视^[17], 其穿透力更强, 可作用于真皮层, 增加基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 表达, 最终导致胶原降解。因此, 本实验通过模拟日光中 UVA+UVB 比例, 建立 UVA+UVB 联合照射的小鼠 (*Mus musculus*) 皮肤光老化模型, 从小鼠皮肤的宏观光老化程度、胶原蛋白和弹性蛋白的分布情况、皮肤的抗氧化能力、皮肤中 MMPs 活性、牡蛎的抗炎效果等方面, 初步探究了香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 及其酶解产物的抗皮肤光老化活性, 筛选抗光老化的有效活性成分, 为后续牡蛎活性成分的分纯化化和抗光老化作用机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 SPF 级 7 周龄雌性 KM 小鼠 (体重 18~22 g), 购自广州迪恩基因技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (鲁) 2014-0007, 饲养温度为 18~22 °C, 湿度为 50%~60%, 光周期为 12 h 明暗交替, 普通维持饲料喂养。

1.1.2 原料及对照药物 香港牡蛎 (购自广东省湛江市水产品批发市场); 维 A 酸片 (山东良福制药有限公司)。

1.1.3 实验试剂 动物蛋白酶 (30×10^4 U·g⁻¹, 庞博生物工程有限公司); 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒 (羟胺法)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定试剂盒 (比色法)、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (TBA 法)、羟脯氨酸 (Hyp) 测定试剂盒 (碱水解法)、Masson 染色液 (南京建成生物工程研究所); 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHDG) 试剂盒、基质金属蛋白酶 (MMP-3、MMP-9) 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司); 小鼠白介素 6 (IL-6) 试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 试剂盒、转化生长因子 β (TGF- β) 试剂盒 (江苏雨桐生物科技有限公司); 苏木精-伊红染色液 (南昌雨露实验器材有限公司); 醛品红染色液 (雷根生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

LED 紫外灯 (深圳永霖光电有限公司); Vari-oskan Flash 全自动酶标仪 (美国 Thermo 公司); UNIVERSAL 320R 台式高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); FE28 型 pH 计 (瑞士 Mettler Toledo 公司); DF-101T 集热氏恒温加热磁力搅拌器 (上海精宏实验设备有限公司); FD-551 大型立式冷冻干燥

机(东京理化器械公司); DM2000 LED 显微镜(德国 Leica 公司); JB-L5 石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品的制备 1) 全牡蛎肉粉(Oyster meat, OM) 的制备。采用新鲜牡蛎肉匀浆后冷冻干燥, 其低、中、高剂量组分别命名为 OM-L、OM-M、

OM-H。2) 牡蛎酶解粉(Oyster hydrolysis, OH) 的制备。参照李婉^[18]的酶解工艺制备。其低、中、高剂量组分别命名为 OH-L、OH-M、OH-H。

1.3.2 分组及给药 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分成每组 10 只, 所有小鼠自由饮水饮食, 阳性对照组给药维 A 酸, 模型组和空白组不灌胃, 分组、照射及灌胃剂量见表 1。

表1 分组、照射及灌胃剂量
Table 1 Grouping, irradiation and intragastric dosage

组别 Group	是否照射UVA+UVB Whether to irradiate UVA+UVB	每日灌胃剂量 Daily intragastric dose/(mg·kg ⁻¹)
空白组 Blank group (B)	否	-
模型组 Model group (M)	是	-
阳性对照组 Positive control group (P)	是	10
全牡蛎低剂量组 Oyster meat low dose (OM-L)	是	30
全牡蛎中剂量组 Oyster meat medium dose (OM-M)	是	90
全牡蛎高剂量组 Oyster meat high dose (OM-H)	是	180
牡蛎酶解低剂量组 Oyster hydrolysis low dose (OH-L)	是	30
牡蛎酶解中剂量组 Oyster hydrolysis medium dose (OH-M)	是	90
牡蛎酶解高剂量组 Oyster hydrolysis high dose (OH-H)	是	180

注: 每日光照后给药, 维 A 酸的剂量以维 A 酸质量百分比计, 全牡蛎粉及牡蛎酶解粉的剂量以蛋白质量百分比计

Note: After daily light administration, the dosage of retinoic acid is based on the quality of retinoic acid, and the dosages of whole oyster powder and oyster enzymolysis powder are based on protein quality.

1.3.3 小鼠皮肤光老化模型的建立 小鼠适应性喂养 1 周后, 使用脱毛刀将其背部绒毛剃净, 背部裸露面积为 3 cm×4 cm, 每日剃掉新长出的绒毛, 保持背部皮肤始终暴露。采用 LED 紫外灯 [紫外线强度: UVA (365 nm)=360 μW·cm⁻² 和 UVB (310 nm)=30 μW·cm⁻²] 每日照射小鼠背部皮肤。正式实验开始前测得最小红斑量为 117 mJ·cm⁻², 即照射 5 min。第 1 至第 2 周照射最小红斑量的一半 (2.5 min·d⁻¹), 之后每 2 周增加 30 s, 即第 3 至第 4 周 3 min·d⁻¹, 第 5 至第 6 周 3.5 min·d⁻¹, 第 7 至第 8 周 4 min·d⁻¹, 共照射 8 周, 总照射剂量为 4 258.8 mJ·cm⁻²。

1.3.4 指标评测 1) 皮肤表征评价。皮肤等级评分: 小鼠二氧化碳 (CO₂) 麻醉处死后, 对其背部皮肤进行拍照和皮肤等级评分。皮肤皱纹等级评分标准的制定参照 Kong 等^[19]的评分标准, 并加以改进 (表 2); 皮肤总厚度的测定: 皮肤组织经过长期 UV 照射后, 会产生增生增厚的现象, 主要表现为表皮层增厚和皮肤整体厚度增加。剪开小鼠背部皮肤后, 在皮肤自然松弛的状态下使用电子游标卡尺

表2 皮肤皱纹等级评分标准

Table 2 Skin wrinkle rating scale

评分 Score	评分标准 Grading
0	无褶皱或松弛, 无增厚, 纵向细条纹贯穿背部, 随运动出现或消失
1	皮肤大部分为纵向细纹, 少部分横向细纹, 可随运动出现或消失
2	尚存在少量纵向细纹, 大部分横向细纹, 随运动出现或消失, 皮肤稍有增厚
3	纵向细纹全部消失, 出现少量横向浅皱纹, 不随运动出现或消失, 皮肤稍有增厚
4	持续存在横向深皱纹和松弛, 皮肤泛红, 皮肤明显增厚
5	持续存在大量横向粗糙深皱纹和松弛, 出现小红斑, 皮肤明显增厚
6	严重的皱纹, 大面积红斑, 肿瘤或病变的发展, 皮肤增生异常

量取单层小鼠皮肤厚度 (mm)。提皮恢复时间测试: 小鼠二氧化碳麻醉处死后, 用食指和中指轻轻提起小鼠背部中轴线处皮肤, 以四肢刚好接触桌面为准, 松手即开始计时, 测量背部皮肤恢复至提皮

前原始状态的时间 (s)^[20]。

2) HE 染色、Masson 染色及醛品红染色。组织石蜡包埋：采取小鼠同一处背部皮肤约 0.5 cm×0.5 cm，立即浸泡于 4% 多聚甲醛组织固定液中，常温固定 72 h 后，采用常规方法脱水，按照皮肤纵向方向石蜡包埋。常规 HE 染色：石蜡切片 4 μm，苏木精染细胞核，伊红染细胞质。100 倍显微镜下观察切片，每个切片随机选取 3 处测量皮肤表皮层厚度；Masson 染色：石蜡切片胶原纤维被苯胺蓝染成蓝色，显微镜下观察胶原纤维分布情况；醛品红染色：弹力纤维被染成紫色，背景呈黄色。显微镜下观察弹性纤维的聚集情况。

3) 生化指标测定。取小鼠 0.1 g 皮肤组织剪碎，加入 9 倍体积的磷酸盐缓冲液，pH 为 7.2，使用手持组织研磨器置于冰上充分匀浆，3 600 r·min⁻¹ 离心 20 min，取上清液于 4 °C 冷藏待测。通过检测 SOD、GSH-Px、MDA 和 8-OHdG 水平评估皮肤抗氧化能力；通过检测 Hyp、MMP-3 和 MMP-9 水平评估皮肤基质损伤情况；通过检测 IL-6、TGF-β 和 TNF-α 水平评估皮肤炎症程度和自我修复能力。测量方法：测量前预实验确定样品稀释浓度，最佳稀释浓度的百分抑制率介于 45%~50%，以此作为加样浓度以获得最佳线性关系，减小测量误差。标准曲线和样本的测量均参照试剂盒说明，当标准曲线 $R^2 > 0.995$ ，认为该次实验有线性关系，将吸光值代入公式计算加样测定指标的值。

1.4 数据统计分析

数据使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，数据

结果以“平均值±标准差 ($\bar{X} \pm SD$)”表示，组间差异用样本均数比较的 LSD 检验， $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 牡蛎及其酶解产物对皮肤表征的影响

测得 OM 蛋白质质量分数为 605.2 g·kg⁻¹，OH 为 603.2 g·kg⁻¹。外源性皮肤老化 80% 是由紫外线长期照射引起，主要表现为皮肤松弛、皱纹加深并出现皮革样的粗糙增厚，此类皮肤衰老也被称为皮肤光老化^[21]。与 B 组相比，M 组小鼠的皮肤评分、提皮恢复时间和皮肤总厚度三项指标均显著上升 ($P < 0.05$ ，表 3)，说明小鼠光老化皮肤造模成功。与 M 组相比，OH-H 组皮肤评分、提皮恢复时间和皮肤总厚度均显著下降 ($P < 0.05$)；B 和 P 组皮肤呈现光滑紧致状态；M 组背部横向皱纹深且明显；OM-H、OH-M 和 OH-H 组皮肤较光滑，低、中剂量组皮肤出现轻微红斑，这一现象在高剂量组消失 (图 1-a)。皮肤光老化后皮下血管的状态具有双向性变化，慢性光老化表现为血管萎缩，急性光损伤表现为血管扩张和血管通透性增加，导致血管附近炎症反应加剧^[22-23]。B 和 P 组的血管清晰且分布呈树枝状，分支多且血管周围无炎症现象；M 组血管明显萎缩且血管通透性增加、伴随炎症 (图 1-b)；随着 OM 的剂量增加，小鼠皮下血管萎缩情况有所改善，但均有明显的炎症反应；随着 OH 的剂量增加，小鼠皮下血管萎缩情况和炎症反应均有所改善，OH-H 组血管状态接近 B 组。综上，OM 和 OH 可减轻皮肤光老化产生的皱纹和炎

表3 皮肤表征评价

Table 3 Evaluation of skin characterization

$\bar{X} \pm SD$

组别 Group	皮肤评分 Skin score	提皮恢复时间 Skin recovery time/s	皮肤总厚度 Total skin thickness/mm
空白组 Blank group (B)	0.00±0.00 ^f	1.97±0.19 ^e	0.39±0.03 ^f
模型组 Model group (M)	5.60±0.49 ^a	8.40±1.29 ^a	1.01±0.06 ^a
阳性对照组 Positive control group (P)	2.00±0.63 ^{de}	2.54±1.00 ^{de}	0.66±0.05 ^e
全牡蛎低剂量组 Oyster meat low dose (OM-L)	3.80±0.40 ^b	4.99±0.68 ^b	0.92±0.07 ^b
全牡蛎中剂量组 Oyster meat medium dose (OM-M)	3.20±0.40 ^{bc}	4.31±0.27 ^{bc}	0.83±0.05 ^{cd}
全牡蛎高剂量组 Oyster meat high dose (OM-H)	2.80±0.40 ^c	2.30±0.38 ^e	0.71±0.04 ^e
牡蛎酶解低剂量组 Oyster hydrolysis low dose (OH-L)	3.20±0.40 ^{bc}	4.80±0.20 ^b	0.89±0.07 ^{bc}
牡蛎酶解中剂量组 Oyster hydrolysis medium dose (OH-M)	2.60±0.49 ^{cd}	3.43±0.25 ^{cd}	0.78±0.06 ^d
牡蛎酶解高剂量组 Oyster hydrolysis high dose (OH-H)	1.40±0.49 ^e	2.21±0.42 ^e	0.65±0.02 ^e

注：每列不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different letters in the same column represent significant difference ($P < 0.05$).

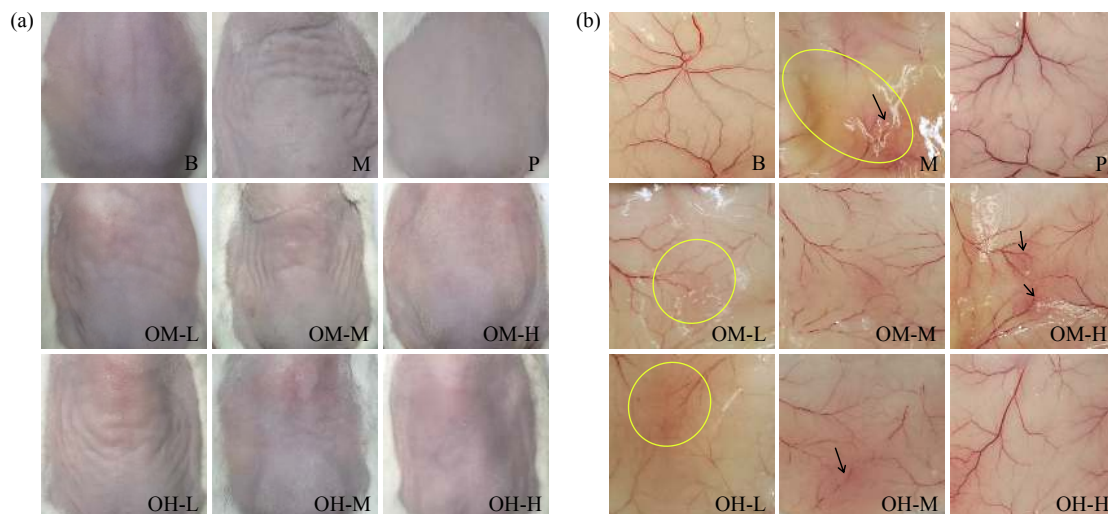


图1 牡蛎及其酶解产物对小鼠光老化皮肤表征的影响

a. 小鼠背部皮肤的宏观外观; b. 小鼠皮下血管状态; 图 1-b 中黑色箭头指示血管通透性增加引发炎症, 黄色圆圈区域指示血管萎缩

Figure 1 Effects of oyster and its enzymatic hydrolysis products on skin characterization of photoaging skin in mice

a. Macroscopic appearance of skin on the back of mice; b. State of subcutaneous blood vessels in mice; the black arrows in Figure 1-b indicate inflammation caused by increased vascular permeability, and the yellow circle area indicates vascular atrophy.

症, 且均在光老化皮肤表征评价上表现出剂量依赖性, OM 的中、高剂量组在皮肤评分和提皮恢复时间上、OM 各剂量组的皮肤总厚度以及 OH 各剂量组的组间差异均为显著 ($P < 0.05$), 同剂量下 OH 的效果优于 OM。

2.2 皮肤病理染色组织学分析

2.2.1 牡蛎及其酶解产物对皮肤结构和表皮层厚度的影响 皮肤长期经受 UV 照射会导致皮肤表皮层增厚^[24], UVA 导致真皮层成纤维细胞变形和减

少^[25]。图 2-a 中 B 组表皮层结构完整, 表皮细胞排列紧密均匀, 真皮组织呈波浪状, 真皮层成纤维细胞形态正常; 与 B 组相比, M 组表皮角化过度, 细胞增大, 真皮层细胞排列扭曲, 细胞核变形, 由于毛细血管通透性增加, 组织间隙可见少量红细胞, 表现出典型的光老化症状; 使用 OM 和 OH 治疗后小鼠真皮层组织的紊乱变形现象减少, 有效改善了表皮层角化过度现象, 中高剂量组真皮层纤维细胞丰富, 排列紧密, 基本无变形。表皮层厚度结

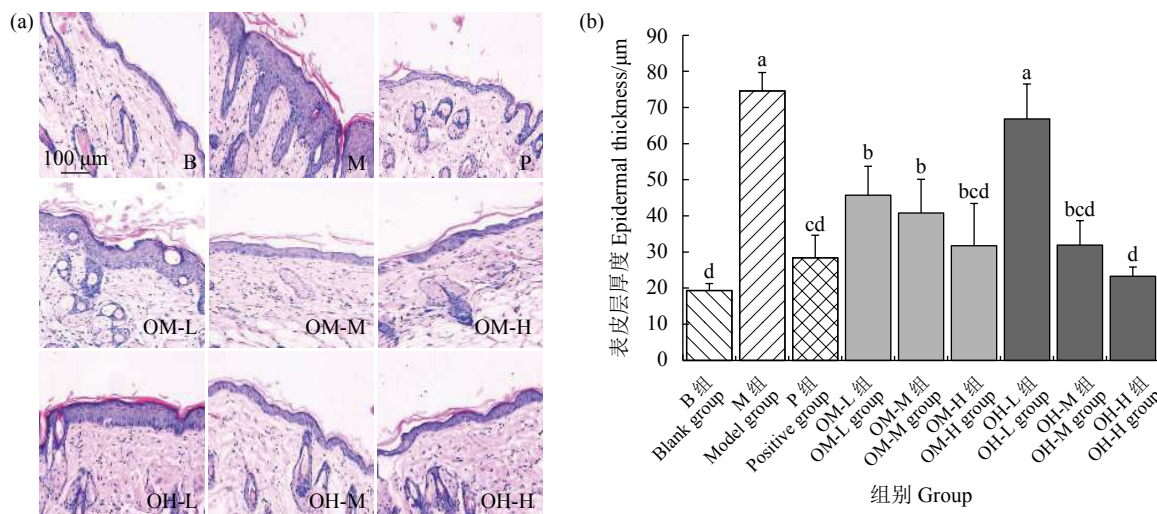


图2 牡蛎及其酶解产物对小鼠光老化皮肤结构和表皮层厚度的影响

同一指标中标有不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$); 图 4-图 6 同此

Figure 2 Effect of oysters and their enzymatic hydrolysis products on the structure and thickness of photoaging skin in mice For the same indicator, different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same case in Figure 4-Figure 6.

果见图 2-b, 与 B 组相比, M 组表皮层显著增厚 ($P < 0.05$), 小鼠每日摄入 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 OH 后, 表皮层厚度相比 M 组显著下降 ($P < 0.05$), 与 B 组无显著差异 ($P > 0.05$)。摄入 OM 后也具有同样作用, 但中、高剂量的 OH 效果优于同剂量的 OM。结果表明食用 OH 后, 真皮层细胞得到保护, 细胞变形和凋亡的情况也有所减少, 并能够防止表皮角化过度。

2.2.2 牡蛎及其酶解产物对胶原纤维和弹力纤维的影响 UVA 会穿过表皮层作用于真皮层, 导致皮肤成纤维细胞中的基质金属蛋白酶 (MMPs) 表达增加, 最高可达 10 倍^[26]。MMPs 的不同亚型作用于不同基质, 几种 MMPs 协同作用可完全降解皮肤基质, 导致不可逆的皮肤光老化。目前已知 MMP-1 作用于 I 型和 III 型胶原纤维, 可几乎完全裂解胶原纤维; MMP-3 可以广泛作用于 IV 型胶原纤维、蛋白聚糖、纤维粘连蛋白和板层素胶原纤维; MMP-9

可进一步降解 MMP-1 所产生的胶原蛋白片段, 使皮肤不能自主修复胶原蛋白结构, 并使胶原纤维和弹性纤维减少、胶原合成降低、异常弹性纤维增生、成束、细胞外基质消失断裂, 最终导致皮肤出现光老化症状^[27-28]。M 组的胶原纤维呈现卷曲、排列混乱的状态, 弹力纤维在表皮层明显增多、呈现大面积的紫色, 且在真皮层聚集扭曲、增粗、分布不均。与 M 组相比, OM 和 OH 可减少光老化皮肤中的胶原排列卷曲紊乱和弹性纤维聚集增生的现象, 随着剂量的增加, 小鼠皮肤中平行有序排列的胶原蛋白增多, 胶原卷曲聚集的区域减少 (图 3-a); 表皮层被染成紫色的弹力纤维的增生程度降低, 真皮层的弹力纤维呈网状分布, 聚集成束的区域减少 (图 3-b)。以上结果表明 OM 和 OH 可以减轻皮肤中的胶原蛋白流失, 降低皮肤表层的过度角化, 保持胶原蛋白和弹性纤维呈网状均匀分布, 避免皮肤松弛。

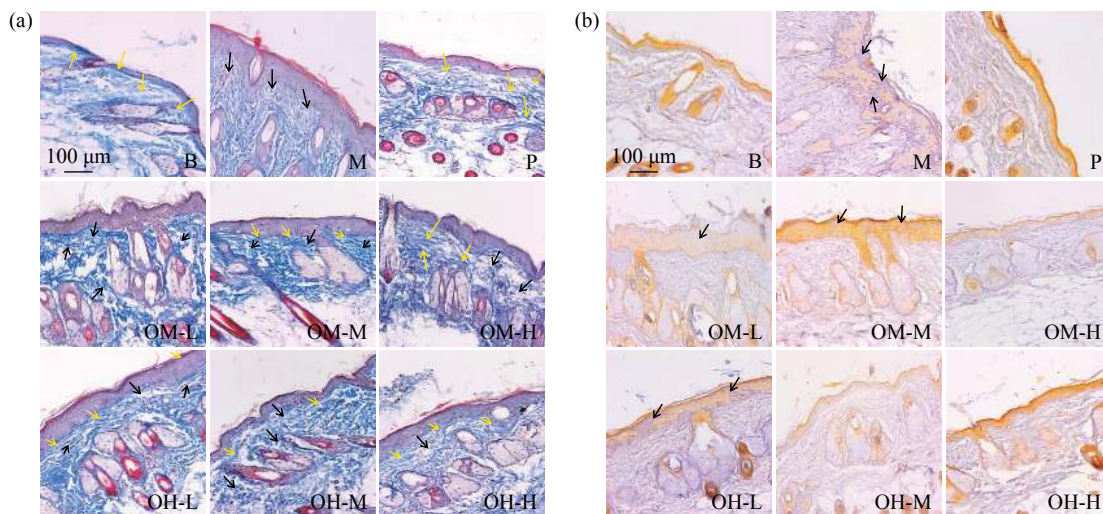


图3 牡蛎及其酶解产物对小鼠光老化皮肤中胶原纤维 (a) 和弹力纤维 (b) 的影响 (100×)

图 3-a 中黑色箭头指示混乱卷曲的胶原纤维, 黄色箭头指示排列规律的胶原纤维; 图 3-b 中黑色箭头指示弹力纤维在表皮层的异常增生

Figure 3 Effect of oysters and their enzymatic hydrolysis products on collagen fibers (a) and elastic fibers (b) in photoaging skin of mice (100×)

In Figure 3-a, the black arrows indicate the disorderly and curly collagen fibers, and the yellow arrows indicate the regularly arranged collagen fibers; in Figure 3-b, the black arrows indicate the abnormal proliferation of elastic fibers in the epidermis.

2.3 牡蛎及其酶解产物对皮肤抗氧化能力的影响

氧化应激是皮肤光老化的重要机制之一, UVB 主要作用于表皮层和真皮层浅表, 诱导细胞产生过量自由基 (ROS), 机体内的抗氧化酶不能够及时将其消灭, 多余的 ROS 会攻击细胞内的脱氧核糖核苷酸 (DNA)、蛋白质和脂质^[29], 剥夺蛋白质、生物膜、DNA、RNA 等生物大分子, 导致蛋

白质失活、细胞功能病变、DNA 扭曲变形和 RNA 转录障碍, 对皮肤产生不可逆伤害; 本研究通过检验 DNA 的标志性氧化产物 8-OHdG 和细胞膜脂质的过氧化产物 MDA 来衡量皮肤氧化程度。自由基还会引起调控能量稳态的重要激酶 AMPK 和核因子 NF- κ B 等信号通路异常, 进而触发其他光老化机制^[30-31]。因此, 研究皮肤中的几种关键抗氧化

酶的活性以及生物大分子的氧化产物, 即可衡量 OM 和 OH 对皮肤抗氧化能力的影响。小鼠皮肤中的抗氧化酶和氧化产物变化见图 4, 与 M 组相比, 小鼠摄入 OM 和 OH 后, 皮肤中的 GSH-Px 表达量显著增加, OH-M 和 OH-H 组的 SOD 活性较 M 组显著增加, MDA 显著降低 ($P<0.05$), 但所有剂量组之间在 MDA 含量上均无显著差异 ($P>0.05$)。其中

OH-H 组在保护 DNA 方面表现优异, 小鼠皮肤中的 8-OHDG 显著低于 M 和 B 组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结果表明, OM 和 OH 能够显著提高光老化小鼠皮肤的抗氧化酶活力, 保护细胞膜脂质和 DNA 不受自由基攻击, 从而提升皮肤抑制由 ROS 导致的氧化应激能力。

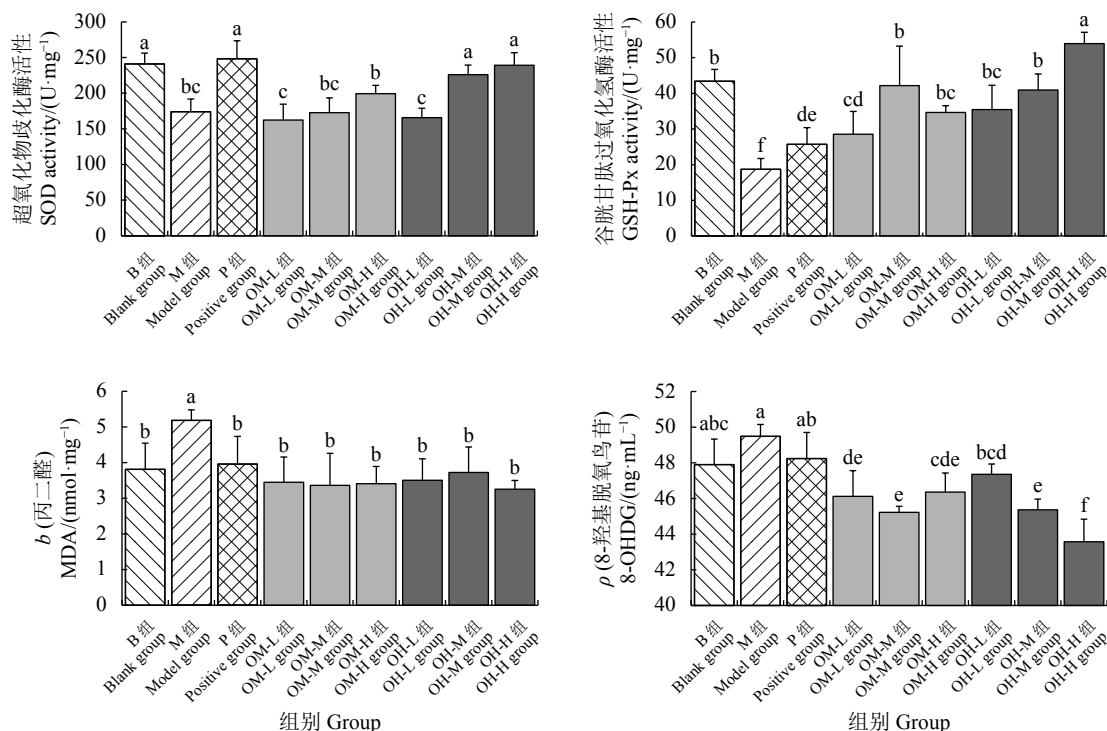


图4 牡蛎及其酶解产物对超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化氢酶、丙二醛和8-羟基脱氧鸟苷的影响
Figure 4 Effect of oysters and their enzymatic hydrolysis products on SOD, GSH-Px, MDA and 8-OHDG

2.4 牡蛎及其酶解产物对减轻皮肤基质损伤的影响

紫外线导致 MMPs 活性增强, MMPs 协同作用于胶原纤维、弹性纤维和明胶等基质, 最终导致皮肤产生皱纹和松弛。本研究中小鼠皮肤在 Masson 染色中, OM 和 OH 对皮肤中胶原蛋白和弹性纤维的有序排布产生了积极影响, 因此本研究选取 MMP-3 和 MMP-9 以及胶原蛋白特有的羟脯氨酸 (Hyp) 进一步探究 OM 和 OH 对保护皮肤中胶原的作用途径。与 B 组相比, M 组的 MMP-3 和 MMP-9 均增加 ($P<0.05$), Hyp 降低 ($P<0.05$, 图 5)。与 M 组相比, 小鼠摄入中、高剂量的 OH 后, MMP-3 的表达显著降低, 摄入中、高剂量的 OM 和 OH 后, MMP-9 的表达降低 ($P<0.05$)。在摄入 OH 和高剂量的 OM 后, 皮肤中 Hyp 含量与 B 组相比无显著差异 ($P>0.05$)。Han 等^[32]的研究表明, UVB 照射的光老化小鼠服用牡蛎水解物可降低 MMPs

基因, 同时增加 I 型胶原和 TIMP-1 基因表达。因此猜测对于 UVA+UVB 导致的皮肤光老化, OH 具有相似的作用机制, OH 通过抑制 MMPs 活性来减缓胶原蛋白分解, 有效保护了皮肤中的胶原蛋白, 结合小鼠背部皮肤的 Masson 染色结果, 猜测 OH 能够减少皮肤中胶原蛋白的扭曲变形^[33]。

2.5 牡蛎及其酶解产物对光老化皮肤组织中炎症反应的影响

紫外线刺激皮肤产生的大量 ROS 和 TNF- α , 可激活 MAPK 途径中的蛋白激酶和磷酸酶, 导致 c-Jun 和 c-Fos 蛋白的表达增加, 最终形成 AP-1 和 NF- κ B, 而 NF- κ B 调节许多促炎细胞因子, 具有代表性的则是成纤维细胞分泌的 IL-6, 可导致细胞毛细血管的通透性增加、中性粒细胞和其他吞噬细胞浸润和激活, 最终引发皮肤红斑等急性炎症损伤^[34]。与 TNF- α 相反的是 TGF- β 可促进前胶原基

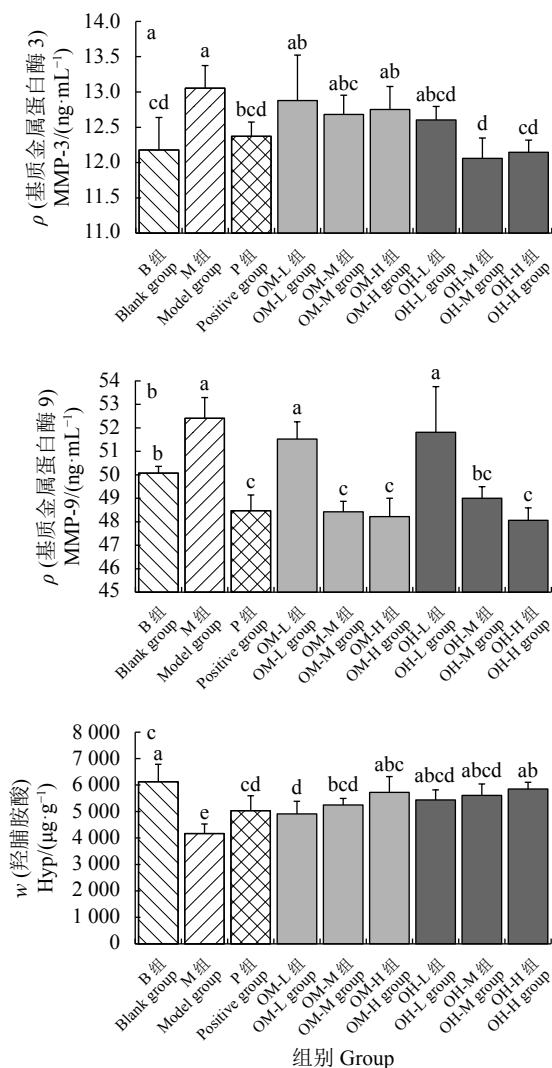


图5 牡蛎及其酶解产物对MMP-3 (a)、MMP-9 (b)和羟脯氨酸 (c) 的影响

Figure 5 Effect of oysters and their enzymatic hydrolysis products on MMP-3 (a), MMP-9 (b) and Hyp (c)

因转录, 起到抗炎作用^[35]。本研究选取 IL-6、TNF- α 和 TGF- β 衡量皮肤炎症反应程度。皮肤光老化小鼠摄入 OM 和 OH 后, 皮肤中的 IL-6 水平有所降低, OM-H、OH-M、OH-H 组 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$), 代表 NF- κ B 调节炎症反映途径受到阻碍, 在增强 TGF- β 表达方面, OH-M 组最显著 ($P < 0.05$)。在摄入高剂量的牡蛎酶解物后, TNF- α 水平显著低于 B 组 ($P < 0.05$, 图 6)。结果表明 OM 和 OH 可降低皮肤中炎症因子的表达, 切断 IL-6 激活 AMPK 通路, 从而降低 MMP-1 的表达。牡蛎酶解物通过提高 TGF- β 水平提升皮肤的抗炎能力, 结合小鼠皮下组织血管分布图, 和小鼠背部图中皮肤红斑的形成程度, 发现 OH 通过降低促炎因子表达和降低 MMPs 表达 2 种途径实现抗皮肤光老化的

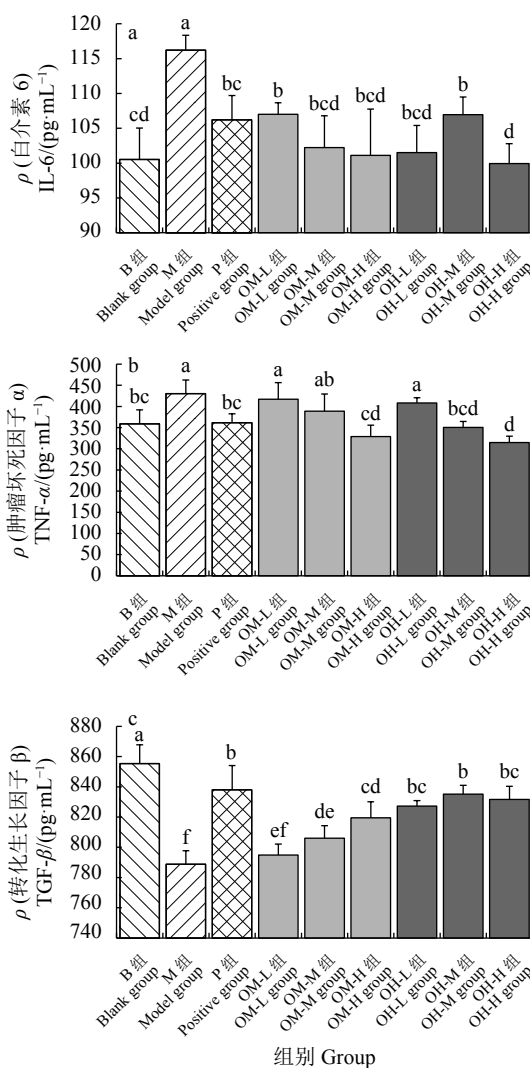


图6 牡蛎及其酶解产物对白细胞素6、肿瘤坏死因子 α (b) 和转化生长因子 β (c) 的影响

Figure 6 Effect of oysters and their enzymatic hydrolysis products on IL-6 (a), TNF- α (b) and TGF- β (c)

作用。

3 结论

本研究通过模拟自然光比例的 UVA+UVB 每天照射构建小鼠皮肤光老化模型探究牡蛎的抗光老化活性。结果表明, OM 和 OH 能够使光老化皮肤的皱纹减轻、防止皮肤呈皮革样增厚、增加皮肤弹性、保护皮肤中的胶原蛋白的网状排列、避免弹性纤维在表皮的异常增生, 并能够改善皮下毛细血管萎缩和通透性增加。参考光老化机理相关的研究^[36], 总结 OM 和 OH 的 3 种抗皮肤光老化途径: 1) 显著提高皮肤中抗氧化酶的活力、保护皮肤组织中的细胞膜脂质和 DNA 不被氧化; 2) 抑制基质金属蛋白酶的表达式 (MMP-3、MMP-9), 保护真皮

胶原蛋白 (Hyp); 3) 高剂量的 OH 可显著降低皮肤中炎症因子的表达 (IL-6 和 TNF- α), 并提高皮肤的抗炎能力 (TGF- β)。OM 和 OH 均在抗光老化活性上表现出剂量依赖性, OH 的抗光老化效果更显著。虽然实验数据证实 OH 具有抗光老化活性, 但牡蛎主要以藻类为食, 已经有大量文献证实海藻多糖具有良好的抗氧化活性^[37-38], 而 ROS 学说作为光老化机制中的一条重要通路, 难免会将牡蛎内脏团中藻类多糖的抗氧化活性与之联系起来。因此, 需要对牡蛎酶解物中的多肽、多糖进一步分离纯化, 进行更详细的研究。

参考文献:

- [1] TANNA B, MISHRA A. Metabolites unravel nutraceutical potential of edible seaweeds: an emerging source of functional food[J]. *Comp Rev Food Sci Food Saf*, 2018, 17(6): 1613-1624.
- [2] CUELLAR-BERMEDEZ S P, AGUILAR-HERNANDEZ I, CARDENAS-CHAVEZ D L, et al. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins[J]. *Microb Biotechnol*, 2015, 8(2): 190-209.
- [3] BAGATIN E, GUADANHIM L R S, ENOKIHARA M M S S, et al. Low-dose oral isotretinoin versus topical retinoic acid for photoaging: a randomized, comparative study[J]. *Int J Dermatol*, 2014, 53(1): 114-122.
- [4] KONG R, CUI Y, FISHER G J, et al. A comparative study of the effects of retinol and retinoic acid on histological, molecular, and clinical properties of human skin[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2016, 15(1): 49-57.
- [5] 蔡淑娟, 黄建安, 郑新, 等. 茶叶延缓皮肤老化的作用 [J]. *中国茶叶*, 2019, 41(12): 10-15.
- [6] BIRCH C S, BONWICK G A. Ensuring the future of functional foods[J]. *Int J Food Sci Technol*, 2019, 54(5): 1467-1485.
- [7] ASSERIN J, LATI E, SHIOYA T, et al. The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an *ex vivo* model and randomized, placebo-controlled clinical trials[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2015, 14(4): 291-301.
- [8] 陈贝, 曲海东, 刘智禹. 抗光老化海洋生物活性物质作用机制研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(7): 1280-1285.
- [9] ZHANG L, ZHENG Y, CHENG X, et al. The anti-photoaging effect of antioxidant collagen peptides from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin is preferable to tea polyphenols and casein peptides[J]. *Food Funct*, 2017, 8(4): 1698-1707.
- [10] WU Y, TIAN Q, LI L, et al. Inhibitory effect of antioxidant peptides derived from *Pinctada fucata* protein on ultraviolet-induced photoaging in mice (Review)[J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(2): 527-538.
- [11] 张雪妍, 秦小明, 高加龙, 等. 牡蛎酶解工艺优化及其酶解产物对小鼠睾酮分泌的影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(3): 96-102.
- [12] 钟佳佳, 章超桦, 高加龙, 等. 马氏珠母贝肉酶解产物的抗酒精性肝损伤作用 [J]. *南方水产科学*, 2020, 16(2): 107-114.
- [13] 叶昱辉. 近江牡蛎多肽的分离纯化及其抗氧化、抗光老化活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2018: 41-57.
- [14] BANG J S, JIN Y J, CHOUNG S. Low molecular polypeptide from oyster hydrolysate recovers photoaging in SKH-1 hairless mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 386: 114844.
- [15] PENG Z, CHEN B, ZHENG Q, et al. Ameliorative effects of peptides from the oyster (*Crassostrea hongkongensis*) protein hydrolysates against UVB-induced skin photodamage in mice[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18: 288.
- [16] SOLLBERGE G, STRITTMATTER G E, GROSSI S, et al. Caspase-1 activity is required for UVB-induced apoptosis of human keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(5): 1395-1404.
- [17] WU Z, ZHANG L. Polycomb group proteins: novel molecules associated with ultraviolet A-induced photoaging of human skin[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2554-2562.
- [18] 李婉. 牡蛎免疫活性成分的分离纯化及产品开发 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017: 10-16.
- [19] KONG S, LI D, LUO H, et al. Anti-photoaging effects of chitosan oligosaccharide in ultraviolet-irradiated hairless mouse skin[J]. *Exp Gerontol*, 2018, 103: 27-34.
- [20] FENG X, YU X, LI W, et al. Effects of topical application of patchouli alcohol on the UV-induced skin photoaging in mice[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 63: 113-123.
- [21] CHUNG J H. Photoaging in Asians[J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2003, 19(3): 109-121.
- [22] HASEGAWA K, FUJIWARA R, SATO K, et al. Increased blood flow and vasculature in solar lentigo[J]. *J Dermatol*, 2016, 43(10): 1209-1213.
- [23] CHUNG J H, EUN H C. Angiogenesis in skin aging and photoaging[J]. *The J Dermatol*, 2007, 34(9): 593-600.
- [24] RITTIÉ L, FISHER G J. UV-light-induced signal cascades and skin aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2002, 1(4): 705-720.
- [25] BATTIE C, JITSUKAWA S, BERNERD F, et al. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types[J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23(s1): 7-12.
- [26] FAGOT D, ASSELINEAU D, BERNERD F. Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation[J]. *Arch Dermatol Res*, 2002, 293(11): 576-583.
- [27] 吴斯敏, 杨慧龄. 紫外线引起皮肤光老化机制及防治的研究进展 [J]. *医学综述*, 2018, 24(2): 341-346.
- [28] KAMMEYER A, LUITEN R M. Oxidation events and skin aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 21: 16-29.
- [29] FISHER G J, KANG S, VARANI J, et al. Mechanisms of photo-

- aging and chronological skin aging[J]. Arch Dermatol Res, 2002, 138(11): 1462-1470.
- [30] KOMATSU J, KOYAMA H, MAEDA N, et al. Earlier onset of neutrophil-mediated inflammation in the ultraviolet-exposed skin of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH oxidase[J]. Inflamm Res, 2006, 55(5): 200-206.
- [31] AFAQ F, MUKHTAR H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging[J]. Exp Dermatol, 2006, 15: 678-684.
- [32] HAN J H, BANG J, CHOI Y J, et al. Oral administration of oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates protects against wrinkle formation by regulating the MAPK pathway in UVB-irradiated hairless mice[J]. Photochem Photobiol Sci, 2019, 18(6): 1436-1446.
- [33] DOREN V, STEVEN R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin[J]. Matrix Biol, 2015, 44-46: 224-231.
- [34] TANG S C, LIAO P Y, HUNG S J, et al. Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF-kB signaling pathway in keratinocytes and mice skin[J]. J Dermatol Sci, 2017, 86(3): 238-248.
- [35] LI L, HWANG E, NGO H T T, et al. *Ribes nigrum* L. prevents UVB-mediated photoaging in human dermal fibroblasts: potential antioxidant and antiinflammatory activity[J]. J Photochem Photobiol C, 2018, 94(5): 1032-1039.
- [36] SUN L, ZHANG Y, ZHUANG Y. Antiphotaging effect and purification of an antioxidant peptide from tilapia (*Oreochromis niloticus*) gelatin peptides[J]. J Funct Foods, 2013, 5(1): 154-162.
- [37] 黄海潮, 王锦旭, 潘创, 等. 超声波辅助过氧化氢法降解坛紫菜多糖及其抗氧化活性的研究 [J]. 南方水产科学, 2020, 16(1): 110-119.
- [38] 马军, 侯萍, 陈燕, 等. 几种海藻多糖抗氧化活性及体外抗脂质过氧化作用的研究 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(6): 97-104.