

摘要

透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 广泛存在于哺乳动物皮肤、眼睛、大脑、关节软骨和关节滑液及其它组织中, 具有抗氧化、润滑、保湿和促进细胞增殖、发育及伤口愈合的作用。机体内的 HA 含量随着机体衰老逐渐降低, 而补充外源性 HA 能够改善 HA 流失导致的皮肤和眼睛干燥、记忆衰退和关节疼痛僵硬等症状, 但是 HA 分子量高和半衰期短, 使得外源性 HA 的吸收利用率低, 基于此背景, 本文将增加机体 HA 含量的手段由外源性补充转变为促进内源性 HA 产生, 本课题前期选用肠上皮细胞 HT29 以及角质形成细胞 HaCaT, 基于 HA 代谢通路的关键靶点, 筛选具有潜在调控 HA 作用的后生元, 进一步通过动物实验探究后生元的体内抗衰老和 HA 调控作用, 最后通过代谢组学和细胞实验解析功效物质。主要研究结果如下:

(1) 筛选获得具有潜在调控 HA 合成能力的后生元。采用 HT29 细胞和 HaCaT 细胞, 筛选能够使 UDP-葡萄糖脱氢酶 (UGDH)、HA 合成酶 1-3 (HAS1-3) 基因表达量上调或 HA 解聚蛋白 (HYBID) 基因表达量下调的后生元, 共得到 8 种后生元, 分别为由副干酪乳酪杆菌 CCFM1293、副干酪乳酪杆菌 CCFM1294、植物乳植杆菌 CCFM1295、植物乳植杆菌 CCFM1296、植物乳植杆菌 CCFM1297、副干酪乳酪杆菌 CCFM1224、副干酪乳酪杆菌 FXJWS3M2、副干酪乳酪杆菌 MZ06-F-L4-2-3 制备的后生元。

(2) 体外筛选的后生元具有抗衰老作用, 其中副干酪乳酪杆菌 CCFM1293、植物乳植杆菌 CCFM1296 和副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元能够促进内源性 HA 产生。建立小鼠衰老模型, 并检测皮肤水分和弹性、衰老相关的血清生化指标和皮肤抗氧化能力以及皮肤、关节、眼睛和大脑的 HA 含量等指标, 结果显示, 体外筛选的后生元不同程度地表现出缓解衰老作用, 如增加肝脏指数、脾脏指数、胸腺指数和大脑指数以及降低血清 CRP 水平和 ALT、AST、ALP 活性; 副干酪乳酪杆菌 CCFM1293、植物乳植杆菌 CCFM1296 和副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元促进内源性 HA 产生和增加皮肤水分和弹性, 且副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元上调皮肤 HA 含量的能力最强, 比模型组提高 26.8%, 在提高皮肤抗氧化能力方面, 仅有副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元显著提高了 CAT、GSH-Px 活力、T-AOC 水平和 GSH 含量。

(3) 进一步探究了后生元促进内源性 HA 产生的方式。对皮肤、关节、眼睛和大脑组织中参与 HA 代谢的合成酶类 (UGDH、HAS1、HAS2、HAS3) 和降解酶类 (HYAL1、HYAL2、HYBID) mRNA 表达量进行检测, 结果显示, 副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元主要通过上调 HAS1-3 mRNA 表达的方式促进了皮肤、关节的 HA 合成; 副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 制备的后生元通过上调 UGDH、HAS2 mRNA 表达的方式增加了皮肤、关节的 HA 合成; 植物乳植杆菌 CCFM1296 制备的后生元通过上调 HAS2 mRNA 表达促进 HA 合成和下调 HYBID mRNA 表达抑制 HA 降解的方式共同维持皮肤、眼睛和大脑的 HA 水平; 且这 3 株具有体内 HA 调控作用的后生元在体外

实验中对细胞 HAS2 mRNA 表达具有较强地促进作用。

(4) 解析副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 和副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 制备的后生元调控 HA 的物质基础。通过代谢组学分析差异代谢物以及细胞实验验证的方式探究副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 和副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 制备的后生元能够发挥 HA 调控作用的功效物质, 结果显示, 副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元中肌苷含量和副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 制备的后生元含有的尿苷含量分别比 MRS 培养基高 4 倍多和 2 倍多。此外, 肌苷和尿苷上调了 HT29 细胞 HA 水平, 分别比对照组提高 104% 和 52%, 并分别上调了 HT29 细胞 HAS1-2 mRNA 表达和 UGDH、HAS2 mRNA 表达; 肌苷和尿苷也上调了 HaCaT 细胞 HA 水平, 分别比对照组升高了 106% 和 61%, 并分别上调了 HaCaT 细胞 UGDH、HAS1-3 mRNA 表达和 UGDH、HAS2-3 mRNA 表达, 肌苷和尿苷对细胞 HA 的调控作用分别与副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元和副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 制备的后生元在体内的 HA 调控作用相似, 以上结果表明后生元副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 和副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 中调控 HA 的功效物质可能分别为肌苷和尿苷。

总之, 在细胞实验上调 HAS2 mRNA 表达的副干酪乳酪杆菌 CCFM1224、副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 和植物乳植杆菌 CCFM1296 制备的后生元在动物实验中具有较好地抗衰老作用和调控皮肤、关节、眼睛、大脑等组织 HA 含量的能力, 且副干酪乳酪杆菌 CCFM1224 制备的后生元发挥 HA 调控能力的功效物质可能是肌苷, 而副干酪乳酪杆菌 CCFM1293 制备的后生元发挥 HA 调控能力的功效物质可能是尿苷。

关键词: 后生元; 透明质酸; 调控作用; 功效物质解析

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is widely present in mammalian skin, eyes, brain, articular cartilage and synovial fluid, and other tissues, and has antioxidation, lubrication, moisturizing, and promoting cell proliferation, development, and wound healing effects. HA content in the body gradually decreases with the increase of age, and exogenous HA supplementation can improve discomfort symptoms caused by HA loss, such as skin and eye dryness, memory decline, joint pain and stiffness. Due to the high molecular weight and short half-life of HA, the absorption and utilization rate of exogenous HA is low. In view of this background, this paper changed the means of increasing HA content from exogenous supplementation to promoting endogenous HA production. Based on the key targets of HA metabolic pathway, this study selected from intestinal epithelial cells HT29 and keratinocytes HaCaT to screen postbiotics that has the potential HA regulation, further explored the anti-aging and HA regulatory effects of the postbiotics through animal experiments in vivo. Finally, the functional substances were analyzed through metabolomics and cell tests. The main results are as follows:

(1) Screening for postbiotics with potential regulatory ability for HA synthesis. The postbiotics that can upregulate the expression of UDP glucose dehydrogenase (UGDH) and HA synthase 1-3 (HAS1-3) genes or downregulate the expression of HA depolymerizing protein (HYBID) genes in HT29 cells and HaCaT cells were screened. A total of 8 strains of postbiotics were obtained, prepared respectively by *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1293, *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1294, *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1295, *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1296, *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1297, *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1224, *Lacticaseibacillus paracasei* FXJWS3M2, *Lacticaseibacillus paracasei* MZ06-F-L4-2-3.

(2) The screened postbiotics in vitro have anti-aging effects, among which the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1293, *L. plantarum* CCFM1296, and *L. paracasei* CCFM1224 can promote endogenous HA production. The aging model of mice was established, and the skin moisture and elasticity, aging related serum biochemical indicators and skin antioxidant capacity, as well as skin, joint, eye and brain HA content were detected. The results showed that the postbiotics screened in vitro exhibited aging alleviating effects to varying degrees, such as increasing liver index, spleen index, thymus index and brain index, and reducing serum CRP levels and ALT, AST, ALP activities; while only the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1293, *L. plantarum* CCFM1296 and *L. paracasei* CCFM1224 had the ability to promote endogenous HA production and increase skin moisture and elasticity, and the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 had the strongest ability to upregulate skin HA content, which was 26.8% higher than the model group, and in terms of improving skin antioxidant capacity, only the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 significantly increased CAT, GSH-Px activity, T-AOC levels and GSH content.

(3) The way in which postbiotics promote endogenous HA production was further explored. The mRNA expression levels of related HA synthases (UGDH, HAS1, HAS2, HAS3) and degrading enzymes (HYAL1, HYAL2, HYBID) involved in HA metabolism in skin, joint, eye

and brain tissues were detected. The results showed that the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 increased the HA synthesis of skin and joints mainly by up-regulating the expression of HAS1-3 mRNA; the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1293 increased HA synthesis in skin and joint by up-regulating the expression of UGDH and HAS2 mRNA. The postbiotics prepared by *L. plantarum* CCFM1296 maintained the HA levels in skin, eyes and brain by up-regulating HAS2 mRNA expression to promote HA synthesis and down-regulating HYBID mRNA expression to inhibit HA degradation. Moreover, these three strains of postbiotics with HA regulation in vivo had promoted strongly HAS2 mRNA expression in vitro.

(4) The material basis for the regulation of HA by the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 and *L. paracasei* CCFM1293 was analyzed. The differential metabolites were analyzed by metabolomics and verified by cell experiments to explore the functional substances that can play the role of HA regulation in the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 and *L. paracasei* CCFM1293. The results showed that the inosine content of the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 and the uridine content of the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1293 were 4 times and 2 times higher than MRS medium respectively. In addition, compared with the control group, inosine and uridine up-regulated HA levels in HT29 cells by 104% and 52% respectively, and promoted HAS1-2 mRNA expression and UGDH, HAS2 mRNA expression in HT29 cells severally; inosine and uridine also up-regulated HA levels in HaCaT cells by 106% and 61% respectively, and stimulated UGDH, HAS1-3 mRNA expression and UGDH, HAS2-3 mRNA expression in HaCaT cells respectively. The regulatory effects of inosine and uridine on HA in cells were similar to the HA regulation in vivo of postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 and *L. paracasei* CCFM1293 respectively. The above results suggest that the functional substances regulating HA in *L. paracasei* CCFM1224 and *L. paracasei* CCFM1293 may be inosine and uridine, separately.

In conclusion, the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224, *L. paracasei* CCFM1293 and *L. paracasei* CCFM1296, which up-regulated the expression of HAS2 mRNA in vitro, have better ability to alleviate aging and regulate the content of HA in skin, joint, eye and brain in animal experiments. The effective substance of the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1224 to exert HA regulation ability may be inosine, while the postbiotics prepared by *L. paracasei* CCFM1293 may be uridine.

Key words: postbiotics, hyaluronic acid, regulation effect, functional substances analysis

缩写词对照表

缩略词	英文全称	中文全称
HA	Hyaluronic acid	透明质酸
GlcA	Glucuronic Acid	葡萄糖醛酸
GlcNAc	N-acetylglucosamine	N-乙酰氨基葡萄糖
ECM	Extracellular Matrix	细胞外基质
IOP	Intraocular Pressure	眼压
GAG	Glycosaminoglycan	糖胺聚糖
DED	Dry Eye Disease	干眼症
TM	Trabecular Meshwork	小梁网组织
CNS	Central Nervous System	中枢神经系统
PNNs	Perineuronal Nets	神经元周网
NSCs	Neural Stem Cells	神经干细胞
HAS1-3	Hyaluronic Acid Synthase	透明质酸合成酶 1-3
HYALs	Hyaluronidases	透明质酸酶
UDP-GlcA	UDP-glucuronic acid	UDP-葡萄糖醛酸
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetylglucosamine	UDP-N-乙酰氨基葡萄糖
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	UDP-葡萄糖脱氢酶
HBP	Hexosamine biosynthesis pathway	己糖胺生物合成途径
G1P	Glucose-1-phosphate	葡萄糖-1-磷酸
F6P	Fructose-6-phosphate	果糖-6-磷酸
4-MU	4-Methylumbelliferone	4-甲基伞形酮
GFAT1-2	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase1-2	谷氨酰果糖-6-磷酸转氨酶 1-2
GNPDA1-2	Glucosamine-6-phosphate deaminases1-2	氨基葡萄糖-6-磷酸脱氨酶 1-2
HYBID	Hyaluronan Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization	HA 解聚蛋白
TMEM2	Transmembrane protein 2	跨膜蛋白 2

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 HA 概述.....	1
1.2 HA 的生物学功能.....	1
1.2.1 HA 对皮肤的有益作用	1
1.2.2 HA 对关节的有益作用	2
1.2.3 HA 对眼睛的有益作用	3
1.2.4 HA 对脑的有益作用	3
1.3 HA 代谢.....	4
1.3.1 HA 合成	4
1.3.2 HA 降解	6
1.4 调控 HA 含量的策略.....	8
1.4.1 外源性补充 HA.....	8
1.4.2 促进内源性 HA 合成.....	8
1.4.3 抑制内源性 HA 降解.....	9
1.5 后生元研究进展.....	10
1.5.1 后生元研究意义.....	10
1.5.2 后生元制备方法.....	10
1.6 液相质谱在功效物质解析中的应用	10
1.7 立体意义与研究内容.....	11
1.7.1 立题意义.....	11
1.7.2 主要研究内容.....	12
第二章 基于 HA 代谢通路的后生元筛选	14
2.1 前言.....	14
2.2 实验材料与设备.....	14
2.2.1 实验细胞及菌株.....	14
2.2.2 菌株.....	14
2.2.3 实验试剂.....	15
2.2.4 培养基的配制.....	15
2.2.5 主要仪器与设备.....	15
2.3 实验方法.....	15
2.3.1 菌株活化与培养.....	15
2.3.2 后生元制备	15
2.3.3 细胞复苏和培养.....	15
2.3.4 细胞传代.....	16

2.3.5 细胞冻存	16
2.3.6 检测细胞 mRNA 表达	16
2.3.7 数据统计与分析	16
2.4 结果与讨论	17
2.4.1 不同后生元对 HT29 细胞中 HA 代谢关键基因表达的影响	17
2.4.2 不同后生元对 HaCaT 细胞中 HA 代谢关键基因表达的影响	20
2.5 本章小结	24
第三章 后生元的体内抗衰老和 HA 调控作用研究	25
3.1 前言	25
3.2 实验材料与设备	25
3.2.1 实验菌株	25
3.2.2 实验动物	25
3.2.3 实验试剂	25
3.2.4 主要仪器与设备	25
3.3 实验方法	26
3.3.1 菌株培养	26
3.3.2 后生元制备	26
3.3.3 动物实验方案设计	26
3.3.4 小鼠体重的测定	27
3.3.5 皮肤水分和弹性测定	27
3.3.6 脏器系数测定	27
3.3.7 血清指标检测	27
3.3.8 皮肤组织 CAT、GSH-Px 和 T-AOC 活力以及 GSH 含量测定	28
3.3.9 HA 含量测定	28
3.3.10 实时荧光定量法检测小鼠组织 mRNA 表达	28
3.3.11 数据统计与分析	28
3.4 结果与讨论	28
3.4.1 后生元对小鼠体重的影响	28
3.4.2 后生元对皮肤水分和皮肤弹性的影响	29
3.4.3 后生元干预对器官指数的影响	30
3.4.4 后生元对血清生化指标的影响	31
3.4.5 后生元对皮肤抗氧化能力的影响	32
3.4.6 不同后生元对皮肤 HA 的调控作用	33
3.4.7 后生元对关节 HA 的调控作用	35
3.4.8 后生元对机体眼球 HA 的调控作用	38

3.4.9 后生元对大脑 HA 的调控作用	40
3.5 本章小结	42
第四章 具有 HA 调控作用的后生元功效物质解析	44
4.1 前言	44
4.2 实验材料与设备	44
4.2.1 实验细胞	44
4.2.2 实验菌株	44
4.2.3 实验试剂	44
4.2.4 主要仪器与设备	44
4.3 实验方法	44
4.3.1 代谢组学样品制备	44
4.3.2 标准品溶液配制	45
4.3.3 LC-MS 检测条件	45
4.3.4 代谢组学分析	46
4.3.5 细胞活力检测	46
4.3.6 细胞 HA 含量测定	47
4.3.7 检测细胞 mRNA 表达	47
4.3.8 数据统计与分析	47
4.4 结果与讨论	47
4.4.1 后生元干预后的小鼠血清差异代谢物筛选	47
4.4.2 后生元 CCFM1293、CCFM1224 的差异代谢物筛选	51
4.4.3 后生元中肌苷、尿苷、葡萄糖 6-磷酸的含量检测	52
4.4.4 肌苷、尿苷对 HT29 细胞的 HA 调控作用	53
4.4.5 肌苷、尿苷对 HaCaT 细胞的 HA 调控作用	55
4.5 本章小结	57
主要结论与展望	58
主要结论	58
展望	58
参考文献	60

第一章 绪论

1.1 HA 概述

人类对于透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 的探究已经有一个世纪左右^[1], HA 的第一项研究可追溯到 1880 年, 当时一位法国科学家在玻璃体中观察到不同于角膜和软骨粘蛋白的一种类粘蛋白物质, 命名“透明粘蛋白”。半个世纪后, Meyer 和 Palmer 从牛玻璃体中分离出含有氨基糖和糖醛酸组成的新的多糖, 将其命名为 HA^[2]。在 20 世纪 30 年代和 50 年代, 人们从人类脐带、鸡冠和链球菌中分离出 HA^[3, 4]。

HA 是由葡萄糖醛酸 (Glucuronic acid, GlcA) 和 N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 组成的一种非硫酸化线性糖胺聚糖^[5], 分别通过 β -1, 3 和 β -1, 4 糖苷键结合在一起, 天然 HA 的分子量约为 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$ kDa^[6]。HA 分子同时含有极性基团和非极性基团, 既能与水分子通过羧基和乙酰氨基形成氢键, 也能自身之间形成氢键^[7], 这一方面使 HA 大分子在溶液中保持平衡, 另一方面, 使得 HA 在聚合物体系中维持刚性。当两个或多个 HA 分子通过氢键相互作用时, 促进了 HA 的二级和三级结构形成。

对于半柔性 HA 来说, 水分子增加了每个大分子 HA 的有效尺寸^[8], 聚合物构型处于不断运动和变化的状态, 因此聚合物链的摩擦啮合影响着溶剂的运动, 与聚合物没有结合的水分子构成了 HA 占据空间的大部分体积。高分子量的 HA (>1000 kDa) 链占据了极大的体积, 当聚合物的长度增加时, 由于质量的增加慢于体积的增加, 所以平均密度降低^[9]。HA 羧基的 pKa 值介于 3 与 4 之间, HA 多糖在生理 pH 下带负电荷^[10], 因此它们之间的排斥相互作用也显著地扩大聚合物线团的体积。在稀 HA 溶液中, 聚合物可能是单独的分子片段, 但随着聚合物浓度的增加, 形成分子内聚合物网络, 三维网状结构被组织起来^[11]。HA 的粘度除受到浓度的影响, 还与分子量有关, 比如, 当 HA 的分子量达到 1×10^6 kDa 时, HA 的浓度即使在极低的浓度 $1 \mu\text{g/mL}$ 时可产生缠结的聚合物网络^[12]。如上所述, 聚合物溶液中 HA 的分子量和浓度的增加导致聚合物的三维网络的增强, 它导致溶液粘度和粘弹性的增加。

HA 水溶液可表示为具有剪切稀释和弹性粘度的非牛顿流体^[13, 14], 当 HA 溶液受到压力时, 很容易移动, 以寻找新边界来抵消这种压力并且会形成新形状, 这为许多组织提供了延展性和弹性^[15, 16]。根据这些特性, HA 可作为润滑剂、关节结构稳定剂、水平衡调节剂和细胞迁移引导剂^[16]。

1.2 HA 的生物学功能

1.2.1 HA 对皮肤的有益作用

皮肤作为机体中最大的器官, 是保护机体免受外界有害物质入侵和水分流失的第一道屏障。皮肤中最主要的细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 就是 HA, 皮肤

HA 占全身 HA 的 50%^[17]，皮肤中的 HA 由表皮角质细胞和真皮成纤维细胞合成，且真皮 HA 含量高于表皮^[18, 19]。表皮 HA 与角质细胞的增殖分化相关^[20]，在真皮中，HA 通过强大的保湿能力以及粘弹性调节水平衡和维持细胞结构^[17]，真皮和表皮重要区域的 HA 结合水对皮肤水合作用至关重要，在表皮的上棘层和颗粒层含有 HA，其中大部分存在于细胞外，基底层含有的 HA 主要存在于细胞内，并且在水固定过程中不容易被吸出。含水物质通过表皮的扩散被颗粒层中的角质细胞合成的脂质所阻断，低于该层的富含 HA 的区域可以从富含水分的真皮获得水，并且其中包含的水不能渗透到富含脂质的颗粒层之外。皮肤的水合作用主要依赖于真皮和表皮重要区域的 HA 结合水，而水合作用的维持主要依赖于颗粒层^[21]。另外，在皮肤中，HA 由于其良好的保水能力，在维持细胞外空间、保持组织水合作用以及促进离子溶质和营养物质向上层细胞的运输方面起着主要作用^[22]，因此，HA 对保持皮肤健康很重要，而随着年龄增长，皮肤 HA 流失，而通过补充 HA 能够缓解皮肤干燥、弹性降低、慢性损伤等 HA 含量降低带来的衰老问题（表 1-1）。

表 1-1 补充 HA 对皮肤的改善作用

Table 1-1 The improvement effect of HA supplementation on skin

研究对象	给予方式	分子量	结果
60 名有鱼尾纹的受试者	口服	2 kDa 300 kDa	抑制了皱纹和改善了皮肤质地 ^[23]
61 名皮肤干燥的受试者	口服	300 kDa 800 kDa	增加了皮肤水分 ^[24]
HR-1 无毛小鼠（6 周龄）	口服	300 kDa <10 kDa	抑制了皮肤水分的下降 ^[25]
20 名健康人的衰老皮肤	口服	≥ 1000 kDa	增加了皮肤弹性和水分，降低了皮肤的皱纹深度 ^[26]
60 名皮肤有中等衰老迹象的受试者	口服	全谱 HA	改善了皮肤质量，增加血清 HA 浓度 ^[27]
40 名受试者（35-64 岁）	口服	空白	皮肤状况得到改善 ^[28]
SKH-1 无毛小鼠	口服	空白	增加了胶原蛋白含量，改善了 UVB 照射后的皱纹水平 ^[29]
Wistar 大鼠	外用	空白	促进了皮肤擦伤后的上皮再生 ^[30]
轻度至中度面部酒渣鼻患者	外用	低分子量 HA	改善了酒渣鼻 ^[31]
C57BL/6 小鼠	外用	<200 kDa	增加了 β -防御素 2 的释放 ^[32]
60 名韩国女性	注射	空白	显著增加了皮肤水分 ^[33]
57 名女性（35-55 岁）	注射	空白	显著提高了面部皮肤的主观感觉和总体评价 ^[34]

注：空白代表无此项。

1.2.2 HA 对关节的有益作用

HA 是关节软骨和滑液的重要成分，健康关节软骨中存在的高分子和高浓度 HA 有很高的粘弹性，另外，由于 HA 的疏水性和长链特征，HA 可以结合大量的水，从而膨

胀到超过原始体积 1000 倍的体积^[35]，因此，HA 聚合物也非常适合作为润滑剂，可以减少关节间隙的摩擦和磨损。关节中 HA 的浓度和分子量会随着年龄、慢性损伤和炎症的发生逐渐损耗，关节软骨中 HA 的耗竭可导致更大的表面摩擦和加速的软骨退变，进而导致关节运动异常、膝关节疼痛和僵硬^[36, 37]。关节润滑是改善关节健康和减少软骨退化的有效措施^[38]，除了润滑作用外，HA 还具有许多潜在的生物学功能，这包括减少炎症、缓解关节疼痛和僵硬，以及保护滑膜细胞免受自由基损伤^[39, 40]。总之，维持关节软骨中 HA 的完整性或恢复 HA 的分子量可能会解决关节软骨中的炎症和分解代谢，从而保护和修复软骨。

1.2.3 HA 对眼睛的有益作用

HA 存在于包括角膜、房水、虹膜、晶状体、玻璃体、视网膜和脉络膜的多种眼部组织中^[41]，其中 HA 参与眼睛内压（Intraocular Pressure, IOP）的调节，小梁网组织（Trabecular Meshwork, TM）细胞的主要功能是调节房水的流动阻力以增加 IOP，而 HA 占 TM 细胞中总糖胺聚糖（Glycosaminoglycan, GAG）的 20-25%左右^[42, 43]。此外，HA 可促进角膜上皮细胞伤口愈合，阻止角膜脱水，并润滑角膜上皮^[44, 45]。润滑性滴眼液的开发是 HA 在眼部最广泛的应用，由于 HA 的粘膜粘附性和高水结合能力，各种人工泪液都使用 HA 作为粘度增强剂来治疗干眼病（Dry Eye Disease, DED）^[46, 47]。DED 是最常见的眼科疾病之一，其特征为视力受损和泪膜不稳定^[48]。泪腺不稳定增加泪膜的浸润和眼表炎症，而 HA 显示出非常强的泪膜稳定性^[49]。因此，HA 溶液可用于干眼润滑剂，替代丢失的泪液，使泪膜渗透压正常化。滴眼液的粘度和润滑性随着 HA 浓度的增加而增加，进而在较高浓度下减少眨眼摩擦。由于眼结构的复杂性和特异性，HA 经常被广泛外用，如今也有研究开始探讨口服 HA 对眼健康和功能的影响，在一项随机对照试验中，口服和外用 HA 的联合补充在改善角膜上皮伤口愈合以及其他相关眼部疾病方面比单独外用 HA 表现出更好的效果^[50]，这意味着机体内 HA 的增加也可以维护眼部健康。

1.2.4 HA 对脑的有益作用

HA 在哺乳动物中枢神经系统（Central Nervous System, CNS）的 ECM 中含量很高^[51]。啮齿动物新生儿脑中的总 HA 含量占到胚胎水平的 25%左右，HA 水平在出生后 7 天在大鼠大脑 ECM 中达到峰值，并在大脑成熟后 18 天迅速下降至峰值的 51%^[52]，HA 被认为对 CNS 的发育起重要作用。除了作为细胞外基质组织中心的一部分外，现在已经证实 HA 参与神经元周网（Perineuronal Nets, PNNs）的形成，HA 在 PNNs 中也高度表达。一项研究证明，当从啮齿动物胚胎的大脑中分离原代皮层神经元在不存在神经胶质源性 ECM 成分的情况下培养时，聚集蛋白聚糖和 HA 足以使正常 PNNs 在体外继续发育^[53]。另一项研究表明透明质酸合成酶 3（Hyaluronic Acid Synthase 3, HAS3）的共表达和 HA-结合连接蛋白诱导 PNNs 样致密 ECM 的形成^[54]。这些发现提示 HA，聚

集蛋白聚糖和 HA 连接蛋白是形成致密 PNNs 的必要组分, PNNs 是一种在神经元细胞和近端树突周围发现的特化、致密的细胞外基质结构^[55]。

HA 也影响神经干细胞 (Neural Stem Cells, NSCs) 的增殖和成熟^[56]。存在于健康 CNS 组织的 ECM 中并在 NSC 生境中富集的高分子量 HA ($>1\times 10^3$ kDa) 通常维持着 NSC 静止状态, 低分子量 HA (<30 kDa) 影响着 NSC 的分化^[57], 尽管 HA 含量随着年龄的增长而持续降低, 但 HA-NSC 的相互作用对于整个成年期 CNS 的正常功能和修复仍然至关重要^[58]。

HA 在 CNS 损伤后以降解的形式提供保护, 研究证明损伤后的脊髓中存在 HA 寡糖, 特别是 HA 四糖, 减少了损伤中巨噬细胞和小胶质细胞的积累, 增强了运动神经元的存活, 并增加了皮质脊髓束中运动神经元的出芽^[59]。

总之, HA 影响着 CNS 中的多种细胞类型, HA 含量及其在 ECM 中的分子量分布的平衡, 并对 CNS 损伤后的修复至关重要。

1.3 HA 代谢

尽管 HA 的化学组成比较简单, 但它的分子量范围很广, 不同分子量和组织浓度介导了不同的功能^[60]。HA 的生物合成与 HA 的分解代谢一起, 平衡 HA 的分子大小以及组织浓度, 起到调节细胞行为和维持组织稳态的作用^[61]。而 HA 合成和降解的不平衡会导致不同分子量的 HA 积累, 导致机体发生炎症甚至癌症^[62]。为了维持组织稳态, HA 的代谢必须受到严格控制, HA 合成酶 (Hyaluronic Acid Synthetase, HAS) 和 HA 降解酶 (Hyaluronidases, HYALs) 以细胞和组织特异性方式调节着哺乳动物组织的 HA 含量。

1.3.1 HA 合成

HA 是由两种前体 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 在 HAS 的作用下交替连接而成的线性多糖, HA 前体 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 分别由 UDP-葡萄糖脱氢酶 (UDP-glucose dehydrogenase, UGDH) 和己糖胺生物合成途径 (Hexosamine biosynthesis pathway, HBP) 介导合成。UGDH 是合成 HA 前体 UDP-GlcA 的唯一酶, 它的过表达或者敲除能够特异性调节 HA 合成^[63]。HA 前体的合成启动物质是糖酵解的副产物^[64], UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 分别由葡萄糖-1-磷酸 (Glucose-1-phosphate, G1P) 和果糖 6-磷酸 (Fructose-6-phosphate, F6P) 开始合成, 起始物质都来源于糖酵解产生的葡萄糖 6-磷酸 (Glucose-6-phosphate, G6P), 合成过程还需要谷氨酰胺、辅酶 A、UTP、 NAD^+ 等物质的参与, 由于合成过程涉及葡萄糖、脂肪酸、氨基酸的代谢, HA 的合成也受到细胞能量的影响, HA 的合成过程如图 1-1 所示^[65]。HA 是一类广泛存在细胞基质上的一类糖胺聚糖, 与在高尔基体中产生并共价连接到蛋白质核心的其他糖胺聚糖相反, HA 在真核细胞中是通过质膜内侧的膜结合合成酶 HAS 合成的, 该合酶能够产生高达 $3\sim 4\times 10^3$ kDa 的庞大 HA 聚集体。之后, 它通过孔状结构被挤压到细胞表面, 合成的 HA

没有被硫酸化或葡萄糖醛酸部分差向异构化为糖醛酸并进一步修饰^[66]。HAS 是一种嵌入膜的糖基转移酶，这种酶不仅能识别合成 HA 的两种不同的底物 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc，还能以严格交替的方式聚合供体糖，并形成两种不同的糖苷键：GlcNAc 和 GlcA 之间的 $\beta(1\rightarrow4)$ ，然后是 GlcA 和 GlcNAc 之间的 $\beta(1\rightarrow3)$ ，并通过自身膜整合结构域形成的通道分泌质膜上新合成的 HA 聚合物^[67]。

哺乳动物体内，有三种同工酶，分别为 HAS1、HAS2、HAS3，这些 HAS 亚型之间具有相似的结构和氨基酸序列，HA 在机体发育过程的不同作用由三种 HAS 进行调控^[68]。HAS2 和 HAS1 可以合成比 HAS3 更高质量的 HA 聚合物^[69]，而 HAS3 产生短于 3×10^2 kDa 的 HA 链，并且比 HAS1 和 HAS2 更有活性^[70]。在三个 HAS 基因中，HAS2 的作用最重要。它参与了胚胎心脏形态发生过程中的上皮-间充质转化和血管形成，缺失具有严重致畸和致死性^[71]，并且 HAS2 的表达变化对 HA 的合成速率有非常大的影响^[69]。因此，HAS2 被认为是调节组织中高分子量 HA 含量的主要酶。

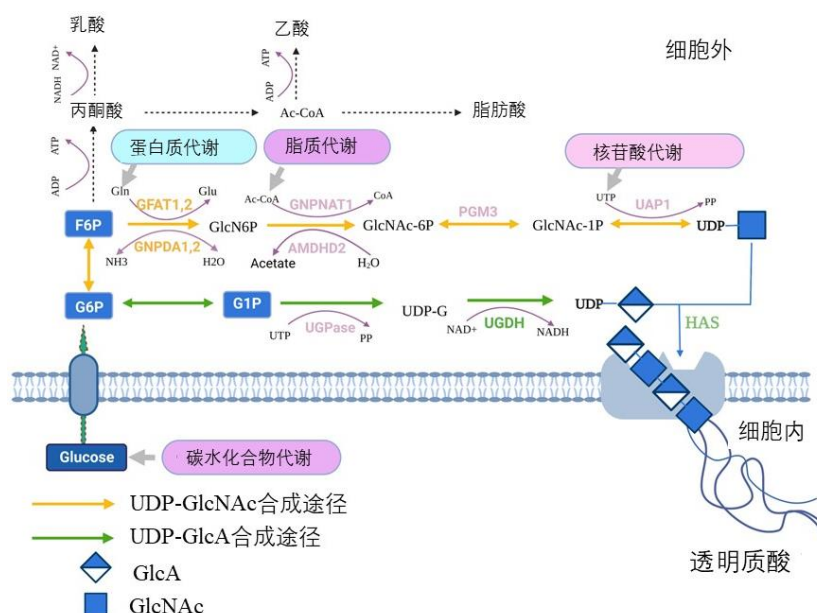


图 1-1 HA 合成示意图。GFAT1、2，谷氨酰果糖-6-磷酸转氨酶 1、2；GNPDA1、2，氨基葡萄糖-6-磷酸脱氢酶；PGM3，磷酸葡萄糖变位酶 3；UAP1，UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶 1；UGDH，UDP-葡萄糖脱氢酶；HAS，HA 合成酶。

Fig.1-1 Schematic representation of the intracellular HA synthesis pathway. GFAT1-2, Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase1-2; GNPDA1-2, Glucosamine-6-phosphate deaminases 1-2; PGM3, Phosphoglucomutase 3; UAP1, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1; UGDH, UDP-Glucose dehydrogenase; HAS, Hyaluronic acid synthase.

影响 HA 合成的两大重要因素主要为 HAS 的活性和 HA 合成前体 UDP-GlcNAc 和 UDP-GlcA 的供应。HAS 需要进行一系列的翻译后修饰以及向质膜的运输及稳定，才能发挥催化作用^[70]。在哺乳动物 HAS 亚型中，酶的活性受到磷酸化、泛素化、酰基化的调节。HA 的合成是一个严重耗能的过程，能量稳态的主要细胞调节剂，AMPK 通过苏氨酸残基 110 (Threonine-110) 的磷酸化抑制 HAS2 活性，从而抑制 HA 合成^[65]。

AMPK 在细胞中的作用是感知 AMP 的增加, 对 ATP 耗竭做出反应, 因此, AMPK 通过恢复 ATP 水平和抑制 ATP 消耗途径调控 HA 的过程。ERK 活化增加了三种同工酶 HAS 的磷酸化, 表明不同于 AMPK 修饰的残基中的蛋白质磷酸化可导致 HA 积累^[72]。HAS 的活性和稳定性也受到泛素化调节, 研究鉴定了 HAS2 赖氨酸残基 190 (lysine-190) 可能是泛素化的一个受体位点, 对该残基突变会导致 HAS2 酶活性失活, 说明 Lysine-190 的泛素化可能是 HA 合成或实际催化所需的底物对接所必需的^[73]。O 连接的 N-乙酰葡萄糖胺修饰酰化 (O-GlcNAcylation, O-glcN) 还可以通过增加 HAS2 在质膜上的稳定性来调节 HA 的代谢, 从而有利于 HA 的增加^[64], 此外 O-glcN 酰化还可控制 HAS3 的定位和运输^[74], HAS 从内质网经高尔基体向质膜的囊泡转运, 或返回内质体和溶酶体, 或向外进入胞外囊泡, 对 HA 合成的调节具有重要意义^[75]。

HA 的两个合成前体 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 也能调控 HA 的合成速率。4-甲基伞形酮 (4-Methylumbelliferone, 4-MU) 利用 UDP-GlcA 作为供体, 通过与 GlcA 的酶促结合来消耗细胞中的 UDP-GlcA, 从而抑制依赖于这种前体的 HA 合成^[76]。UGDH 是合成 UDP-GlcA 的唯一酶, 促进此酶的活性能够增加 UDP-GlcA 的积累^[63], 从而显著增加 HA 合成。向培养基中添加甘露糖消耗 UDP-GlcNAc 后, HA 的合成速率减慢^[77], 通过向生长培养基中添加葡萄糖胺能够提高 UDP-GlcNAc 的含量, 从而增加 HA 的合成^[77]。此外, 一种含氟氨基葡萄糖类似物被发现能够抑制 HA 的合成^[78]。从糖酵解产物 F6P 生成 UDP-GlcNAc 需要四种酶的调控, 分别是谷氨酰果糖 6-磷酸转氨酶 (Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase1-2, GFAT1-2) 和氨基葡萄糖 6-磷酸脱氨酶 (Glucosamine-6-phosphate deaminase1-2, GNPDA1-2), 改变他们的活性可以增加或减少 UDP-GlcNAc 的积累, 导致 HA 的合成增加或减少^[79]。由此可知, 通过增加或减少 UDP-GlcA 或 UDP-GlcNAc 的含量能够调控 HA 的合成速率。此外, 葡萄糖的浓度也决定了 HA 合成的速率和含量, 这与糖尿病人体内 HA 合成速率很高的结果一致^[80]。另外, UDP-GlcNAc 的细胞浓度是蛋白质的 O-酰化水平和质膜中 HAS 的强决定因素^[74], 表明 UDP-GlcNAc 的细胞含量在控制 HA 的合成水平方面非常重要。另外一些生长因子如表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF)^[81]、转化生长因子 β (Transforming Growth Factor β , TGF- β)^[82]、血小板衍生生长因子 BB (Platelet-Derived Growth Factor BB, PDGF-BB)^[83]也能调节 HA 产生, 激素如血管舒张性前列腺素^[84]也能够促进 HA 合成以及一些细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β ^[85]亦能够调节 HA 合成。生长因子和细胞因子介导的 HAS 亚型的诱导, 以及随后 HA 的产生因细胞类型而异。总之, HA 的合成受到上述一种或多种调节机制的严格和多重调节。细胞代谢可在不同水平上影响 HA 的合成, 但是许多涉及能量稳态、糖前体可用性和蛋白质修饰的细胞溶质过程可以直接调节 HAS 酶的转录、活性和稳定性, 从而调节 HA 的合成和分泌。

1.3.2 HA 降解

HA 的分解代谢是在一系列酶和受体的作用下进行的, HA 酶被认为是 HA 分解代

谢的主要参与者，哺乳动物基因组包含六个 HYALs 基因，分别是 HYAL1-4、HYALP1、PH20^[86]。在体细胞内对 HA 降解发挥重要作用的是 HYAL1 和 HYAL2^[87]，研究发现 HYAL1 和 HYAL2 敲除导致 HA 在外周组织的积累^[88]。HYAL1 将 HA 降解成随机寡糖小分子，随后分解成四糖，HYAL2 降解高分子 HA 为约 20 kDa 的 HA 片段^[89, 90]。除此之外，CD44 对 HA 结合内化降解也非常重要，其中 CD44 是 HA 的主要受体，几乎广泛表达于所有组织的上皮、间质和淋巴样细胞^[91]。CD44 在 HA 介导的生理过程中发挥重要作用，涉及细胞间和细胞基质粘附、细胞聚集、迁移、增殖和信号传导^[92]。在没有 CD44 的情况下，HYAL1 不能切割细胞中的 HA，HYAL2 的活性也依赖 CD44 的表达^[93]，因此说 HYAL1 和 HYAL2 均以 CD44 依赖的方式促进 HA 的细胞内和细胞外分解代谢。总之，HA 的降解首先是高分子量 HA 在细胞表面被 HA 受体 CD44 捕获，CD44 在质膜上与 HYAL2 形成复合物，引起酶构象改变从而使其降解活性得到增强^[94]，接着 HYAL2 将捕获的高分子 HA 解聚成中等大小的片段（约 20 kDa），然后，中等 HA 片段被 CD44 递送至细胞溶酶体内，在 HYAL1 与 β -乙酰葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶的协同作用下将 HA 切割成寡糖^[95, 96]。

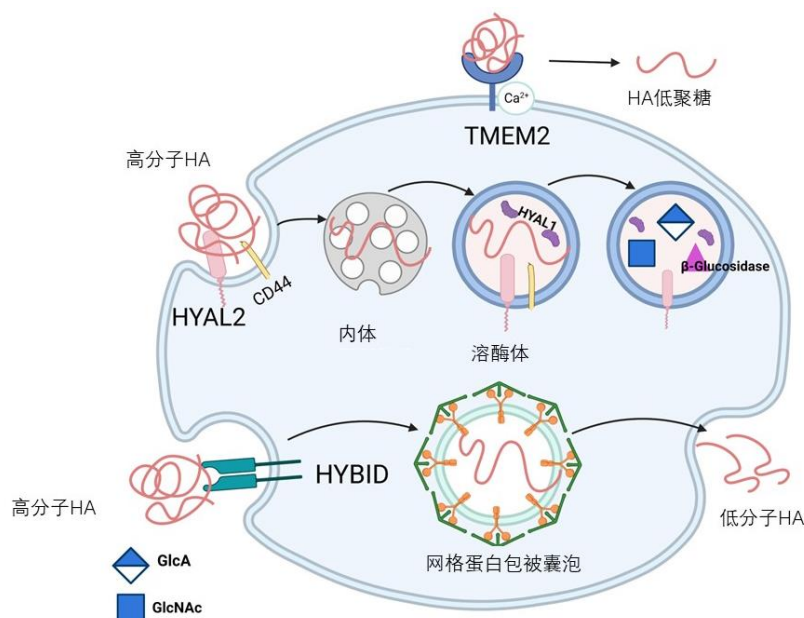


图 1-2 HA 代谢途径。HYBID，HA 解聚蛋白。

Fig.1-2 Schematic representation of the catabolism of HA. HYBID, Hyaluronan Binding Protein Involved in Depolymerization.

此外，除了 HYAL1、HYAL2 介导 HA 降解外，还有其它物质也被发现参与 HA 分解，如 HA 解聚蛋白（Hyaluronan Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization, HYBID）和跨膜蛋白 2（Transmembrane protein 2, TMEM2）。HYBID 独立于 HYALs 和 CD44 发挥 HA 结合降解作用^[96]，与 HYALs 家族蛋白没有同源性，在多种正常人体组织中表达，包括脑、皮肤、关节、肺、胰腺、睾丸和卵巢，但在肝、肾和脾中几乎不表达^[97]，研究证实 HYBID 在皮肤成纤维细胞、关节炎滑膜成纤维细胞和大脑的 HA 解聚中起关键作用^[98-100]。此外，HYBID 介导的 HA 解聚需要细胞内吞机制参与 HA 降解

活性,被认为是以内切 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶依赖的方式通过网格蛋白包被的 pit 途径快速的囊泡内吞和循环而发生的,而不需要在溶酶体中的胞浆内积累进行消化^[99-101]。TMEM2 在正常组织部位均有表达,发育过程的基因表达量高于 HYBID^[102],以 Ca^{2+} 依赖的方式将高分子 HA 降解为分子量约为 5 kDa 的 HA 片段,它的最适 pH 在 6~7 之间^[102, 103],可溶性 TMEM2 可以在无细胞存在的情况下降解 HA, TMEM2 可以在不参与细胞内吞途径的情况下自行发挥 HA 酶活性^[88]。总之,细胞外空间中的高分子量 HA 首先被细胞表面或细胞外空间中的 HA 酶 HYAL2、HYBID、TMEM2 降解成中等大小的片段,这些片段随后在溶酶体透明质酸酶如 HYAL1 和外葡糖苷酶的共同作用下被内化并最终降解为单糖^[103],如图 1-2 所示。除酶促降解外,氧化应激或紫外线也可降解高分子 HA 产生低分子 HA^[104]。

HA 由位于质膜上的三种不同同工酶 (HAS1-3) 合成, HAS 将 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 聚合到 HA 链的还原端,并将生长中的 GAG 链直接挤出到 ECM 中。而 HA 分解由一系列 HA 降解酶介导,这些酶产生不同尺寸的 HA 片段,影响细胞增殖、迁移、血管生成、免疫调节等过程^[105],因此, HAS 和 HYALs 的调节是维持组织 HA 含量平衡的主要控制点。HA 是细胞微环境中普遍存在的组成部分,在生理和病理条件下对细胞行为具有关键影响,所以由 HAS 和 HYALs 介导的 HA 合成和降解的平衡对组织稳态有重要意义。

1.4 调控 HA 含量的策略

1.4.1 外源性补充 HA

目前, HA 已先后在韩国、日本和中国被批准为新资源食品^[106],这使得 HA 在食品领域的应用不断扩大。HA 的含量随着机体衰老不断减少,从而引起皮肤老化、眼干、关节疼痛、记忆力衰退等症状,为了缓解这些症状,人们常常通过注射或者口服 HA 增加血清或局部 HA 浓度来发挥润滑、抗炎和抗衰老的作用。注射 HA 因直接是在指定组织进行,所以短时间内组织部位的 HA 浓度迅速增高,如关节腔内注射和脸部填充^[106]。一些实验研究发现口服 HA 能够通过胃肠道到达组织部位,在一项使用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记 HA ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HA) 的研究中,大鼠口服 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HA 后在皮肤、关节、肌肉等组织中检测到放射性^[107], Yuki Sato 向大鼠口服 HA 后也在其血液和淋巴液检测到了 HA^[108], Mariko Oe^[109]采用 C^{14} 标记的 HA 口服给大鼠,在其血浆测到了放射性,这些实验表明口服或者注射 HA 可调控组织 HA 含量。

1.4.2 促进内源性 HA 合成

HA 是大分子聚合物,很难通过肠屏障,且吸收利用率低,其次 HA 的半衰期很短,进入体内迅速被 HA 降解酶快速代谢后排泄出体外,故需要源源不断补充外源性 HA 来维持临床长期功效。虽然注射外源性 HA 能够绕过肠屏障直接到达组织部位,且能够在短时间内达到高浓度和高粘弹性,但使用者需要定期去医院接受注射,对患者来说比

较繁琐，此外，HA 注射还存在感染风险和一些不良反应，例如，一名女性在前额注射 HA 后出现皮肤坏死和疼痛、红斑和水肿^[110]。针对上述问题，有研究者将注意力从外源摄入 HA 转移到增加内源 HA 合成上，以实现体内 HA 含量增加。有许多研究发现利用益生菌制备的后生元具有促进内源性具有促进内源性 HA 合成的能力（表 1-2）。

表 1-2 具有促进内源性 HA 合成的后生元总结

Table 1-2 Summary of postbiotics that promoting endogenous HA synthesis

菌株名称	浓度	研究对象	结果
植物乳植杆菌 L-137	10 $\mu\text{g/mL}$	HR-1 无毛小鼠； 表皮细胞； BALB/3T3 成纤维细胞；	增加了小鼠皮肤水分； 上调了细胞 HAS1-2 mRNA 表达 ^[111]
凝结芽孢杆菌 MTCC5856	2.5 mg/mL 胞外代谢物	人真皮成纤维细胞	上调了 HAS1 mRNA 表达 ^[112]
植物乳植杆菌 K8	1 $\times 10^9$ CFU/鼠； 100、1000 $\mu\text{g/mL}$	SKH-1 无毛小鼠； HaCaT 细胞	抑制了经皮失水量 ^[113] ，增加了细胞 HA 含量 ^[114]
嗜热链球菌 TCI633	5 $\times 10^8$ CFU/mL	健康志愿者（年龄 30-55 岁）	显著提高了志愿者血清 HA 浓度 ^[115]
植物乳植杆菌 HFY09	3.6 $\times 10^8$ CFU/mL	雌性健康小鼠	增加了小鼠皮肤 HA 含量 ^[116]
副干酪乳酪杆菌 JS1	50、100、200 mg/kg 小鼠体重	C57BL/6J 小鼠	上调了皮肤 HAS1-3 mRNA 表达 ^[117]
发酵乳杆菌 CQPC04	1.3 $\times 10^8$ CFU/mL	7 周龄 ICR 小鼠	上调了皮肤 HA 水平 ^[118]
德氏乳杆菌保加利亚亚种	粗多糖提取物	人真皮成纤维细胞	增加了细胞 HA 含量 ^[119]
植物乳杆菌	10%胞外代谢物	人真皮成纤维细胞	促进了皮肤细胞 HAS2 的蛋白表达 ^[120]
短乳杆菌 MJM60390	100 $\mu\text{g/mL}$	HaCaT 细胞	处理后 HA 含量比对照组提高 59.38%，并显著上调 HAS2-3 mRNA 表达 ^[121]

1.4.3 抑制内源性 HA 降解

衰老是所有生物体不可避免的过程，在此过程中，活性氧物质的产生增加，导致 HA 降解酶活性增加，使得 HA 分解增加，进一步促进皮肤老化，因此下调 HA 降解酶的活性能够抑制 HA 流失，从而缓解机体因 HA 流失带来的不良症状^[122]。一些植物提取物被发现能够下调 HEK293 细胞和正常人皮肤成纤维细胞中的 HYBID 基因表达，不仅抑制了细胞 HA 降解，还产生高分子量 HA^[123]。将能够下调 HYBID 基因表达的植物提取物用于受试者一侧外眼角，另一侧采用安慰剂作对照试验，持续 8 周，结果表明，与安慰剂相比，该植物提取物明显改善受试者的皮肤弹性和质地^[124]。短乳杆菌 MJM60390 发酵薏苡仁后制备的后生元处理 HaCaT 细胞后，与未经短乳杆菌 MJM60390 发酵的薏苡仁组相比，HYAL1 和 HYAL2 mRNA 表达量显著降低，最终使得 HA 含量高于短乳杆菌 MJM60390 未发酵的薏苡仁组，并具有良好的抗氧化和抗

衰老功效^[121]。在嗜热链球菌 TCI633 制备的溶液（1000 $\mu\text{g/mL}$ ）处理人皮肤成纤维细胞后将 HA 酶抑制至未处理对照组的 15.5%，口服后显著改善了志愿者皮肤弹性和光泽，并增加血清 SOD 和 CAT 活性以及 HA 浓度^[115]。

总之，外源性补充 HA 虽能够一定程度缓解机体 HA 流失引起的不适症状，但因为 HA 分子量高和半衰期短，需要长期不断补充，这一方式既提高了消费者成本，又限制了外源性补充 HA 的功效持久发挥，而通过上调 HA 合成酶促进内源性 HA 合成和下调 HA 降解酶抑制内源性 HA 降解的方式保持组织部位的 HA 含量，避免了外源性补充 HA 的吸收问题，又能恢复组织 HA 平衡，对机体的微环境稳态具有重要意义，目前已经有研究开始聚焦通过后生元干预的方式来维持细胞 HA 含量，既增加后生元的应用，又为解决机体 HA 含量流失提供了一种新的手段。

1.5 后生元研究进展

1.5.1 后生元研究意义

根据 WHO 的定义，益生菌必须是活的微生物，而后来的科学研究发现失活的益生菌仍能对宿主产生生物活性，且不含菌体的代谢物也有益生功效，所以便产生了后生元的概念。国际益生菌和益生元科学协会提出“对宿主健康有益的无生命微生物和/或其成分的制剂可定义为后生元”^[125]。后生元的成分主要有肽聚糖、胞外多糖、磷壁酸、细菌素和有机酸等^[126]，具有维持肠道微生物平衡、增强免疫功能、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、防治抑郁和降血脂等功能^[127]。另外，因后生元是由灭活的微生物制备而成的，具有良好的安全性和稳定性，便于生产和贮存^[128]，而相比益生菌产品来说，常需要从发酵条件和生产工艺技术手段保持益生菌细胞的活性，因此以安全易得的后生元可作为活益生菌细胞的替代品可降低成本，且还具有无需定植、适用强等优势，这些优势拓宽了后生元产品的开发和应用。

1.5.2 后生元制备方法

通过一定手段对益生菌菌体细胞处理，使得菌体成分释放，从而得到后生元。常用的后生元制备手段包括高压处理、热处理、溶剂提取、酶处理、辐照、紫外线处理、超声波处理、超临界 CO_2 等^[129]，其中高压处理是以增加压力的方式改变益生菌细胞膜的通透性，破坏细胞膜的完整性和降低细胞内 pH^[130]；热处理以高温方式破坏菌体细胞，包含多种时间-温度组合，与益生菌种类有关，还取决于益生菌的耐热性及其比热^[131]。后生元的不同灭活方式会得到不同的活性成分，使得制备的后生元具有不同的组成成分，从而存在不同的健康作用。鉴于益生菌菌体细胞具有多种多样的灭活技术，为了保障后生元的成分和功效稳定性，需要依据益生菌菌株的特点和健康特性，探讨经济、可控、易操作的灭活方式，为后生元的大规模生产和应用提供助力。

1.6 液相质谱在功效物质解析中的应用

生物样本基质复杂多样，且许多功效物质含量较低，其中含有的内源性成分往往

会对仪器测定造成较大干扰，一直以来是生物分析领域的难题。近年来，科研人员采用多种检测技术，如核磁共振技术（Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR）、毛细管电泳技术（Capillary electrophoresis, CE）、气相色谱-质谱联用技术（Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）和液相色谱-质谱联用技术（Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS）测定不同组织样本中的功效物质。其中，NMR 检测灵敏度低，动态检测范围窄，要求样本量大，样品纯度高，对样本体系中浓度相差较大的代谢物同时测定困难，也对微量样本的物质检测困难^[132, 133]；CE 虽具有灵敏度高等优点，然而存在操作困难、重现性差等不足，应用并不广泛^[134]；GC-MS 技术上样前需要对样本衍生化处理，此外也不能分析对热不稳定或分子量较大的一些物质^[135]。LC-MS 是以高效液相色谱（HPLC）作为分离手段和质谱（MS）作为检测器的一种现代分析技术。色谱与质谱的在线联用能够将色谱的分离能力和质谱的定性功能有效地结合起来，充分发挥液相色谱的分离功能和质谱仪的高灵敏度及高选择性，从而实现生物样本中功效物质准确的定性与定量^[136]，另外，LC-MS 不需要对样品进行预处理，对难以衍生化、对热不稳定以及分子量偏高的物质也能够进行检测^[137]，以上优势使得 LC-MS 在功效物质检测中得到广泛应用。

LC-MS 主要包括两种类型，一个是四级杆-离子阱串联质谱，因为增加了离子阱扫描和多级碎裂功能，对于痕量或超痕量物质的定性定量具有一定优势；另一个是三重四级杆串联质谱，能够进行多级反应监测，具备多类物质定量分析的优点^[138]。目前，LC-MS 的使用已广泛应用于多个领域，如食品安全检测、临床疾病诊断、环境监测、生命科学领域等，而 LC-MS 在代谢组学方面的研究是生命科学领域比较广泛的应用，如严淘等^[139]利用非靶向 LC-MS 代谢组学方法探究了不同提取方式制备的富硒杭白菊提取物组分差异以及菊花抗氧化活性的功效物质；徐杰等^[140]采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱技术（UPLC-Q-TOF-MS）研究了颈腰康胶囊抗炎消肿药效的物质基础；梁婷婷^[141]利用 LC-MS 对植物乳杆菌 84-3 处理的 2 型糖尿病大鼠结肠粪便进行了非靶向代谢组学分析，并进一步解析了植物乳杆菌 84-3 起降糖作用的功效成分；李晓宇^[142]利用 LC-MS 探究了柴胡醋制前后抗抑郁作用的物质基础。如上所述可知，LC-MS 在功效物质解析中具有广泛应用，而对有效成分的挖掘有利于开发新产品，以针对性满足人体某些功能需求。

1.7 立体意义与研究内容

1.7.1 立题意义

HA 是一种内源性非硫酸化的糖胺聚糖，在机体内发挥多种生物学功能，如刺激细胞迁移、分化增殖、抗炎、抗衰老、持水保湿、促进伤口愈合、润滑等。HA 在皮肤、关节、眼睛、脑中的含量比较丰富，但是随着年龄的增长，HA 的分子量和浓度下降，使得 HA 相关生理功能减弱，最终导致机体出现眼花、关节僵硬、皮肤老化等一系列问题，而许多研究证实补充 HA 可以有效改善这些健康问题。

本研究意在筛选可增加机体内源性 HA 含量的后生元，并对有效后生元进行功效物质解析。增加 HA 含量的策略主要有两种：①增加 HA 的合成；②抑制 HA 的分解。在 HA 合成中，有四个关键靶点分别是 UGDH 和 HAS1-3 催化的生物转化途径，UGDH 是 UDP-G 生成 UDP-GlcA 的唯一酶，控制它的表达可影响 HA 的含量；而 HAS1-3 的表达对 HA 含量的调控也是非常重要，敲除 HAS1-3 mRNA 的表达能够降低 HA 的合成，并影响个体生存。所以在 HA 合成通路上，可通过调控 UGDH mRNA、HAS1 mRNA、HAS2 mRNA、HAS3 mRNA 的表达来调节 HA 的含量。

高分子量 HA 在 HYBID 和 TMEM2 的作用下分别降解为 20 kDa、5 kDa 的小分子，之后被细胞膜上的 HA 受体 CD44 和 HYAL2 捕获，通过膜内陷把 HA 递送给内体和溶酶体，被溶酶体内的 HYAL1 降解为游离的 GlcA 和 GlcNAc，最后可被糖苷酶降解为 CO₂ 和 H₂O。研究发现即使敲除皮肤、关节、大脑中 HYAL1 和 HYLA2 基因依然不能抑制 HA 降解，因为皮肤、关节、大脑中起 HA 降解作用的主要是 HYBID，有研究证实抑制 HYBID mRNA 的表达可增加 HA 含量，故也以抑制 HYBID mRNA 的表达作为调控 HA 含量的一个靶点。

综上，本研究以 UGDH mRNA、HAS1 mRNA、HAS2 mRNA、HAS3 mRNA、HYBID mRNA 的表达作为调控 HA 含量的靶点，以能够同时调控肠道细胞 HT29 和皮肤细胞 HaCaT 中上述任一基因表达的后生元，作为具有潜在 HA 调控作用的后生元，进一步通过动物实验探讨体外筛选得到的后生元的体内抗衰老作用和对组织 HA 的调控能力，并采用代谢组学挖掘发挥 HA 调控作用的功效物质。

1.7.2 主要研究内容

本课题的主要研究内容如下：

(1) 基于 HA 代谢通路的后生元筛选

检测不同后生元对 HT29 细胞和 HaCaT 细胞的 UGDH mRNA、HAS1 mRNA、HAS2 mRNA、HAS3 mRNA、HYBID mRNA 表达的影响，以能够上调 UGDH mRNA、HAS1 mRNA、HAS2 mRNA、HAS3 mRNA 表达或下调 HYBID mRNA 表达为筛选标志，筛选具有调控宿主 HA 潜力的后生元。

(2) 后生元的体内抗衰老和 HA 调控作用研究

通过注射 D-半乳糖建立小鼠衰老模型，以灌胃的形式给予小鼠由体外实验筛选的后生元，检测小鼠的脏器指数、衰老相关血清生化指标、皮肤水分和弹性以及抗氧化水平，探讨后生元在体内的抗衰老能力，选取具有抗衰老能力的后生元干预组检测其皮肤、关节、眼球、大脑等组织的 HA 含量，并对这些组织的 HA 合成酶和 HA 降解酶的 mRNA 表达进行相对定量，探讨后生元对宿主 HA 内源性 HA 含量的影响。

(3) 具有 HA 调控作用的后生元功效物质解析

对后生元干预有效组别的小鼠血清和有效后生元分别进行非靶代谢组学分析，寻找实验组与对照组具有 HA 调控作用的差异代谢物，通过靶向定量验证差异代谢物，并

通过细胞实验验证解析到的差异代谢物对 HA 的调控作用，将具有 HA 调控作用的差异代谢物定义为功效物质。

本课题的技术路线如图 1-4 所示：

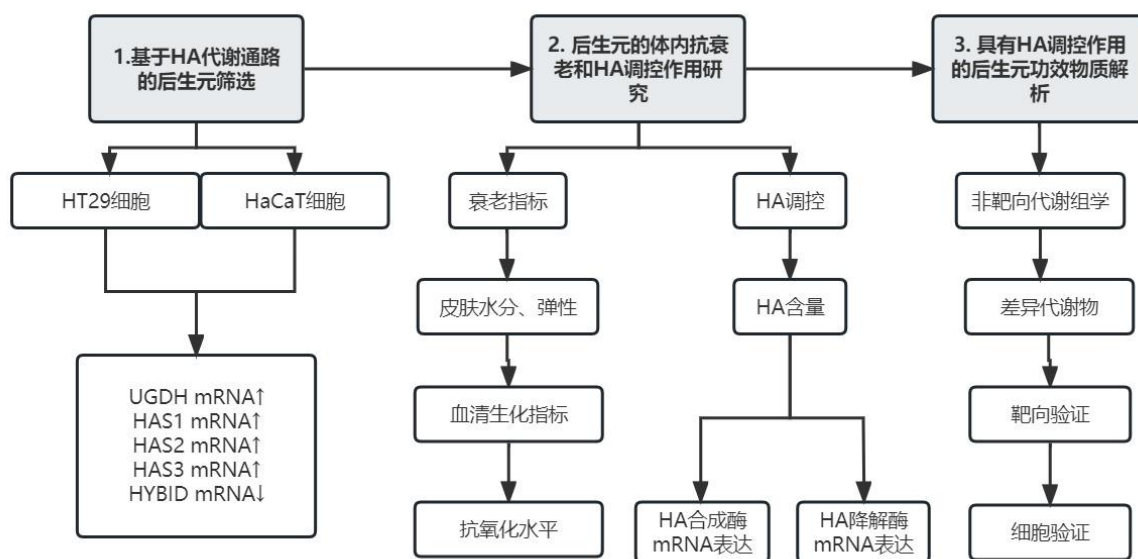


图 1-4 技术路线图

Fig. Schematic workflow showing the technical route

第二章 基于 HA 代谢通路的后生元筛选

2.1 前言

HA 的合成来自糖酵解的产物 G6P, G6P 在相应酶的催化下分别转化为 G1P、F6P, 由 G1P 为底物在一系列酶的作用下合成 UDP-GlcA, 其中由 UGDH 催化的 UDP-G 向 UDP-GlcA 转化是一个限速步骤, 调控其 UGDH mRNA 的表达变化能够影响终产物 HA 的含量, 由 F6P 为底物通过 HBP 进行 UDP-GlcNAc 的合成, 最终合成的 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 在细胞质膜上由 HAS1-3 通过 β -1,3 和 β -1,4 糖苷键交替连接形成具有多个重复二糖单位的线性糖胺聚糖。HAS1、2、3 对 HA 的合成至关重要, 任意调控三种同工酶的 mRNA 表达变化都会引起 HA 的含量改变。在 HA 的降解中, HYBID 主要参与皮肤、关节、脑中高分子 HA 的代谢。因此, 故本章以 UGDH、HAS1-3、HYBID mRNA 的表达变化作为 HA 代谢的关键调控点, 通过体外细胞实验筛选具有潜在调控宿主 HA 含量的后生元。

2.2 实验材料及设备

2.2.1 实验细胞及菌株

人结肠癌细胞株 HT29 和人角质形成细胞系 HaCaT 均来源于上海细胞库。

2.2.2 菌株

副干酪乳酪杆菌 CCFM1293、副干酪乳酪杆菌 CCFM1294、植物乳植杆菌 CCFM1295、植物乳植杆菌 CCFM1296、植物乳植杆菌 CCFM1297、副干酪乳酪杆菌 CCFM1224、副干酪乳酪杆菌 FXJWS3M2、植物乳植杆菌 23、副干酪乳酪杆菌 MZ06-F-L4-2-3、植物乳植杆菌 FZJTZ29M8、短双歧杆菌 FSHMX3M1、动物双歧杆菌 FJS-SZ-6-M5、动物双歧杆菌 FHuN-DA-2-M3、动物双歧杆菌 FJSNJLH-3-M1、动物双歧杆菌 FSD-ZC-2-M1、动物双歧杆菌 FFJ-ND-6-M5、动物双歧杆菌 FSC-YA-1-M1、鼠李糖乳酪杆菌 FAHWH26-1、鼠李糖乳酪杆菌 FSCYA1-2、鼠李糖乳酪杆菌 FSHMX1-2、鼠李糖乳酪杆菌 FSHMX3-1、鼠李糖乳酪杆菌 FJSZJJ2-1、鼠李糖乳酪杆菌 FJSWX22-4、鼠李糖乳酪杆菌 FJSNJ1-2、鼠李糖乳酪杆菌 FHeNJZ8-1、鼠李糖乳酪杆菌 FTJDG11-1、鼠李糖乳酪杆菌 FSDLZ7-M12、鼠李糖乳酪杆菌 FBJCY2-1、副格氏乳杆菌 FFJFZ1-2、副格氏乳杆菌 FSDYT1-1、副格氏乳杆菌 FAHFY1-2、副格氏乳杆菌 FBJHD4-7、植物乳植杆菌 RS15-3、植物乳植杆菌 RS64-12、植物乳植杆菌 QS6-12、植物乳植杆菌 T、植物乳植杆菌 RS16-1、植物乳植杆菌 QS6-1、植物乳植杆菌 CCFM438、植物乳植杆菌 RS24-1、植物乳植杆菌 CCFM11、副干酪乳酪杆菌 1-7、副干酪乳酪杆菌 FFJND15-L2、副干酪乳酪杆菌 FJSWX33-L1、副干酪乳酪杆菌 DP-1-1、副干酪乳酪杆菌 LC3、副干酪乳酪杆菌 FGDZL41、副干酪乳酪杆菌 FJS-CZ-D2-L-3、副干酪乳酪杆菌 CQ-BS-2-1、发酵粘液乳杆菌 9M5 均来源于江南大学食品生物技术中心菌种保藏中心。

2.2.3 实验试剂

胰蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、七水合硫酸镁、无水葡萄糖、无水乙酸钠、一水合硫酸锰、三水合磷酸氢二钾、柠檬酸氢二胺、吐温-80、L-半胱氨酸盐酸盐、琼脂等，国药集团试剂公司；无血清细胞冻存液，上海新赛美生物公司；胎牛血清、DMEM 培养基、胰酶和双抗，美国 Gibco 公司；qPCR 相关引物，上海生工生物公司；RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、qPCR 荧光定量试剂盒、CCK8 试剂盒，南京诺唯赞生物公司；冻干机，西班牙泰事达公司。

2.2.4 培养基的配制

MRS 液体培养基：参照余雅琦^[143]的方法配制，并加入 1 g/L 的半胱氨酸盐酸盐。在液体培养基的基础上添加 1.5%~2% (m/v) 的琼脂配制为 MRS 固体培养基。

细胞完全培养基：DMEM 培养基+10% (v/v) 胎牛血清+1% (v/v) 双抗。

2.2.5 主要仪器与设备

恒温恒湿培养箱，上海森信实验仪器公司；超净工作台，上海智诚分析仪器制造公司；生物安全柜，苏州安泰空气技术公司；涡旋振荡器、磁力搅拌器，德国 Ika 公司；离心机 (5418/5810R)、pH 计，德国艾本德公司；MLS-3750 型高温高压灭菌锅，日本 Sanyo 公司；电子天平，上海梅特勒-托利多仪器公司；PCR 仪、实时定量基因扩增仪，美国 Bio-Rad 公司；CO₂ 培养箱、细胞计数仪、Multiskan GO 酶标仪，赛默飞世尔科技公司；高压均质机，意大利 GEA 机械设备公司；W500SG Electrotek 厌氧工作站，英国依莱泰科。

2.3 实验方法

2.3.1 菌株活化与培养

从-80℃冰箱中取出保藏的乳杆菌菌株，于 MRS 固体平板上划线 37℃ 培养 48 h，用接种环挑单菌落接种至 MRS 液体培养基，37℃ 培养 18 h，之后以 2%~4% (v/v) 的接种量接种于 MRS 液体培养基中，37℃ 培养 18 h，待菌株活力恢复后用于后续试验。

2.3.2 后生元制备

后生元的制备参照 Almada 等^[144]的方法总结，采用热处理与高压均质联合的方式，并对具体条件稍作改动。将菌液于 65℃ 热处理 30 min 后，高压均质 (800~1200 MPa，3 次) 获得菌体裂解物，冻干得到后生元粉备用。

注：因为本课题未研究活菌，为了行文方便，后文由益生菌菌株制备的后生元仍以原菌株命名。

2.3.3 细胞复苏和培养

取出 HT29 细胞和 HaCaT 细胞冻存管，1 min 内于 37℃ 水浴锅中快速融化，在 1000

r/min 的条件离心 3 min，弃净上清，加入细胞完全培养基重悬细胞后置于细胞培养皿，于 37°C 进行培养，定时观察细胞状态。

2.3.4 细胞传代

选择生长至 70% ~ 80%融合时的细胞进行传代。弃去细胞原培养基，加入 2 mL PBS 冲洗 3 遍后，加入 2 mL 胰酶消化，于倒置显微镜下观察细胞状态，消化完成后，迅速加入 2 mL 细胞完全培养基终止消化，将培养皿的细胞转移到离心管，在 1000 rpm 条件下离心 5 min，弃掉上清液，加入细胞完全培养基吹打均匀，制成细胞悬液，取约 30%细胞悬液接种于新的培养皿，补足培养皿里的完全培养基，十字晃动使细胞分散均匀，于 37°C 继续培养。

2.3.5 细胞冻存

选择处于对数生长期和生长状态良好的细胞冻存，按 2.3.4 的步骤操作至离心结束，弃去上清液，加入细胞冻存液并吹打均匀后，按比例分装到冻存管，并标注细胞冻存信息，梯度降温后，于液氮罐中进行保藏。

2.3.6 检测细胞 mRNA 表达

按 2.3.4 步骤操作，并进行细胞计数，计数结束后，将 HT29 细胞或 HaCaT 细胞以 2.5×10^6 个/mL 的密度接种于 12 孔板上，培养细胞过夜待细胞贴壁。弃去旧培养基，使用 PBS 冲洗 3 遍，设置对照组和处理组。对照组为含有细胞培养基和细胞，不加后生元的组别；处理组用细胞完全培养基重悬后生元（重悬后的后生元的量与发酵至 1.0×10^7 CFU/mL 的菌液制备的后生元的量相当），分别吸取 2 mL 后生元溶液加入到 12 孔板里，在培养箱 37°C 培养 4 h，每个样品三个平行。

待后生元与细胞共培养结束后，弃去培养上清，每孔用 PBS 迅速洗涤 3 次，每孔加 1 mL 细胞裂解液，反复吹打，吸取细胞裂解液提取 RNA，并使用 qPCR 反转录试剂盒逆转录为 cDNA，通过实时荧光定量法检测 HT29 细胞中基因的表达情况，利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算 UGDH mRNA、HAS1 mRNA、HAS2 mRNA、HAS3 mRNA、HYBID mRNA，其中内参为 GAPDH，引物如表 2-1 所示。

表 2-1 细胞实验中荧光定量基因扩增引物序列

Table 2-1 Primers sequences in cell experiments

名称	正向序列	反向序列
UGDH	CTTGCCCAGAGAATAAGCAG	CAAATTCAGAACATCCTTTTGA
HAS1	GAGCCTCTTCGCGTACCTG	CCTCCTGGTAGGCGGAGAT
HAS2	TCCTGGATCTCATTCCTCAGC	TGCACTGAACACACCCAAAATA
HAS3	GAGATGTCCAGATCCTCAACAA	CCCACTAATACTGCACAC
HYBID	TCTTTGGGCCACTGCTTCTTCACG	GTCTTGCTGGGCTTGGGGATGTA

2.3.7 数据统计与分析

采用 SPSS 26.0 统计软件来对显著性差异进行统计学分析，实验结果以平均值±标准误差 (Mean±SD) 表示，组间比较使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)， $P<0.05$ 表示差异显著。

2.4 结果与讨论

2.4.1 不同后生元对 HT29 细胞中 HA 代谢关键基因表达的影响

2.4.1.1 不同后生元对 HT29 细胞 UGDH mRNA 表达的影响

为了探究后生元对 HT29 细胞中 UGDH mRNA 表达的影响，通过实时荧光定量法检测了后生元与 HT29 细胞共培养后 HT29 细胞中 UGDH mRNA 的表达，结果如图 2-1 所示。有 3 株益生菌制备的后生元 CCFM1293、CCFM1296 和 MZ06-F-L4-2-3 显著上调了 UGDH mRNA 表达量，其中后生元 CCFM1296 对 HT29 细胞中 UGDH mRNA 表达的影响最大，相比对照组提高了约 180% 左右，后生元 CCFM1293 和 MZ06-F-L4-2-3 分别比对照组提高了约 58%、87%，其它后生元并未上调 HT29 细胞中 UGDH mRNA 表达。

UGDH 通过催化 UDP-G 和 NAD^+ 生成 UDP-GlcA，作为合成 HA 的前体物质，UDP-GlcA 含量能够影响 HA 水平，如向细胞中添加能够消耗 UDP-GlcA 的 4-MU 能够抑制 HA 合成^[145]。作为催化合成 UDP-GlcA 的限速酶，UGDH mRNA 表达量高低也影响着 HA 合成，Clarkin 等^[146]研究发现 UGDH mRNA 过表达增强了 HA 释放，这说明具有增加 UGDH mRNA 过表达的 3 株后生元 CCFM1293、CCFM1296 和 MZ06-F-L4-2-3 具有调控 HA 的潜力。

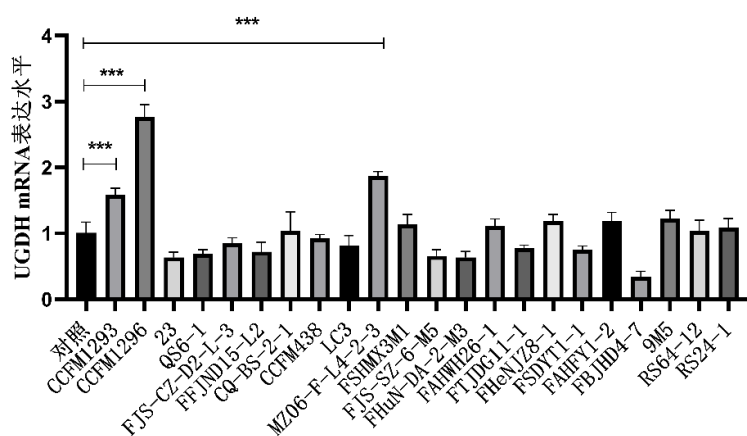


图 2-1 HT29 细胞的 UGDH mRNA 的表达

Fig. 2-1 Expression of UGDH mRNA in HT29 cells.

注：*表示与对照组相比具有显著性差异，*** $P<0.001$

2.4.1.2 不同后生元对 HT29 细胞 HAS1 mRNA 表达的影响

后生元与 HT29 细胞共培养后细胞中 HAS1 mRNA 的表达结果如图 2-1 所示。由图 2-2 可知，有 2 株益生菌制备的后生元 FXJWS3M2 和 FSD-ZC-2-M1 显著上调了 HAS1 mRNA 表达量。其中后生元 FXJWS3M2 对 HT29 细胞中 HAS1 mRNA 表达的影响最大，

相比对照组提高了约 130%左右,而后生元 FSD-ZC-2-M1 比对照组提高了约 53%,其它后生元未促进 HT29 细胞中 HAS1 mRNA 表达。

在哺乳动物体内,HA 的合成通过 3 种质膜结合的 HAS1-3 交替添加 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 在膜上组装 HA,随后将合成的 HA 长链挤出细胞外,3 种 HAS 同工酶活性不同,HAS1 合成分子量高达 4×10^3 kDa 的 HA^[70],研究发现 HAS1 mRNA 在尿路上皮细胞中的高表达提高了 HA 水平^[147],以上结果表明上调 HAS1 mRNA 表达的后生元 FXJWS3M2 和 FSD-ZC-2-M1 具有上调 HA 水平的潜力。

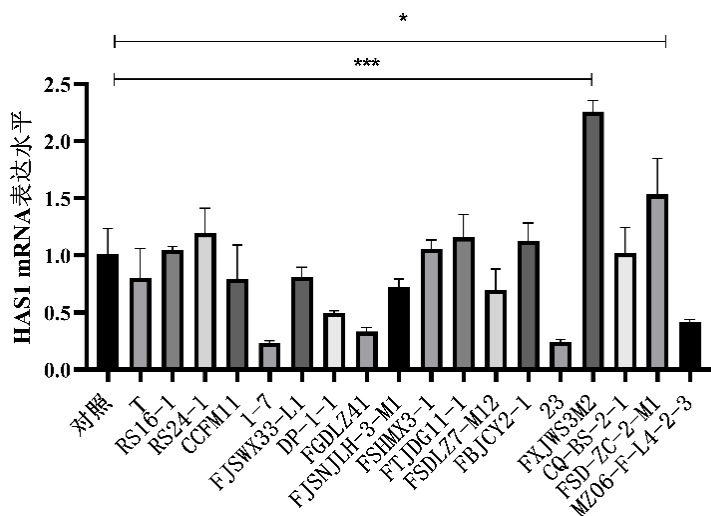


图 2-2 HT29 细胞的 HAS1 mRNA 的表达

Fig. 2-2 Expression of HAS1 mRNA in HT29 cells

注: *表示与对照组相比具有显著性差异, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.4.1.3 不同后生元对 HT29 细胞 HAS2 mRNA 表达的影响

后生元与 HT29 细胞共培养一段时间后细胞中 HAS2 mRNA 表达结果如图 2-3 所示。

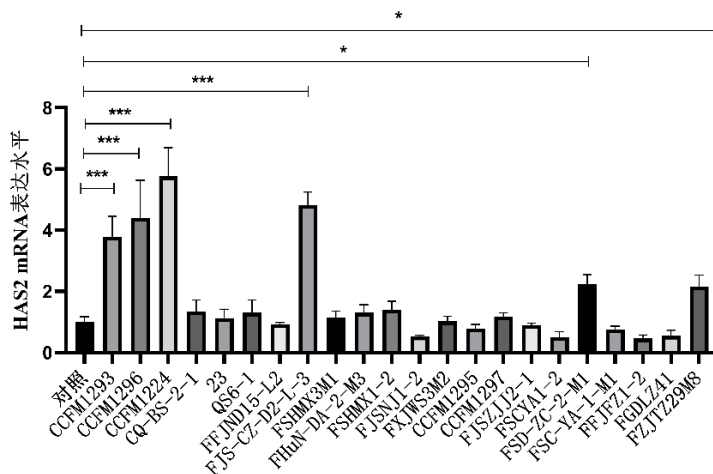


图 2-3 HT29 细胞的 HAS2 mRNA 的表达

Fig. 2-3 Expression of HAS2 mRNA in HT29 cells

注: *表示与对照组相比具有显著性差异, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

由图2-3可知,有6株益生菌制备的后生元CCFM1293、CCFM1296、CCFM1224、FJS-CZ-D2-L-3、FSD-ZC-2-M1和FZJTZ29M8显著上调了HAS2 mRNA表达量。其中后生元CCFM1293、CCFM1296、CCFM1224、FJS-CZ-D2-L-3极大地上调了HT29细胞HAS2 mRNA表达,比对照组分别提高了约278%、340%、476%和382%,而后生元FSD-ZC-2-M1和FZJTZ29M8对HT29细胞中HAS2 mRNA表达的影响较小一些。

HAS2 是哺乳动物中最常见和功能最广泛的 HA 合成酶, 敲除小鼠 HAS2 基因导致胚胎缺乏 HA, 使得妊娠中期的胚胎死亡^[148], 且也有研究证实 HAS2 mRNA 表达能调控心肌中 HA 的合成^[149], 因此能够刺激 HT29 细胞 HAS2 mRNA 表达的后生元 CCFM1293、CCFM1296、CCFM1224、FJS-CZ-D2-L-3、FSD-ZC-2-M1 和 FZJTZ29M8 可能具有 HA 调控能力。

2.4.1.4 不同后生元对 HT29 细胞 HAS3 mRNA 表达的影响

将后生元与 HT29 细胞共培养一段时间后，检测细胞中 HAS3 mRNA 的表达水平，结果如图 2-4 所示。

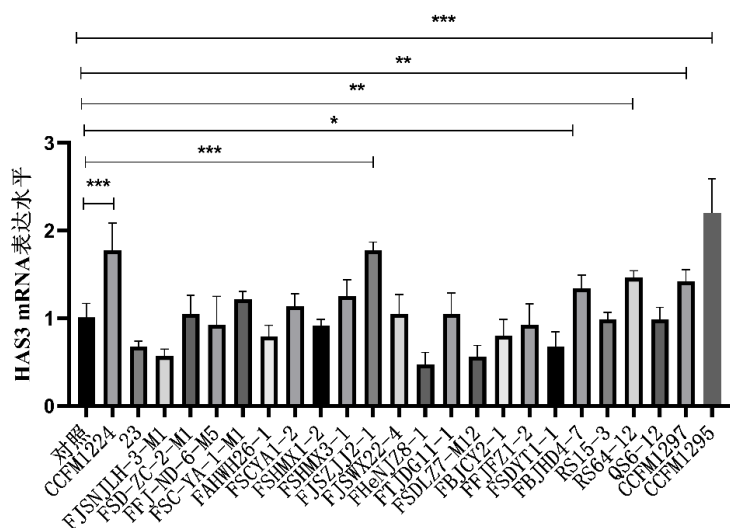


图 2-4 HT29 细胞的 HAS3 mRNA 的表达

Fig. 2-4 Expression of HAS3 mRNA in HT29 cells

注: *表示与对照组相比具有显著性差异, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

由图 2-4 可知, 有 6 株益生菌制备的后生元 CCFM1224、FJSZJJ2-1、FBJHD4-7、RS64-12、CCFM1297 和 CCFM1295 显著上调了 HAS3 mRNA 表达量。其中后生元 CCFM1224、FJSZJJ2-1 和 CCFM1295 对 HT29 细胞中 HAS3 mRNA 表达的促进能力较强, 分别比对照组上调了约 78%、78%和 120%; 后生元 FBJHD4-7、RS64-12、CCFM1297 对 HT29 细胞 HAS3 mRNA 表达的影响差异较小, 约为 40%。

HAS3 产生短于 3×10^2 kDa 的 HA 链, 却比 HAS1 和 HAS2 更有活性^[70], 在肿瘤细胞中 HAS3 mRNA 的过表达促进了 HA 合成^[150], 因此能够刺激 HAS3 mRNA 上调的后生元 CCFM1224、FJSZJ2-1、FBJHD4-7、RS64-12、CCFM1297 和 CCFM1295 可能具有 HA 调控能力。

2.4.1.5 不同后生元对 HT29 细胞 HYBID mRNA 表达的影响

后生元与 HT29 细胞共培养后细胞中 HYBID mRNA 的表达结果如图 2-5 所示。有 7 株益生菌制备的后生元 CCFM1296、23、FXJWS3M2、CCFM1297、MZ06-F-L4-2-3、CCFM1295 和 CCFM1294 显著下调了 HYBID mRNA 表达。其中后生元 CCFM1296 和 CCFM1297 对 HYBID mRNA 的下调作用最强，比对照组降低 80% 左右，另外 5 株具有下调 HYBID mRNA 表达的后生元相比对照组下调了 50% 左右。

HYBID 在 HA 特异性解聚中发挥重要作用，敲除人皮肤成纤维细胞的 HYBID 基因完全消除了 HA 解聚^[151]，因此能够抑制 HYBID mRNA 的后生元 CCFM1296、23、FXJWS3M2、CCFM1297、MZ06-F-L4-2-3、CCFM1295 和 CCFM1294 可能具有 HA 调控作用。

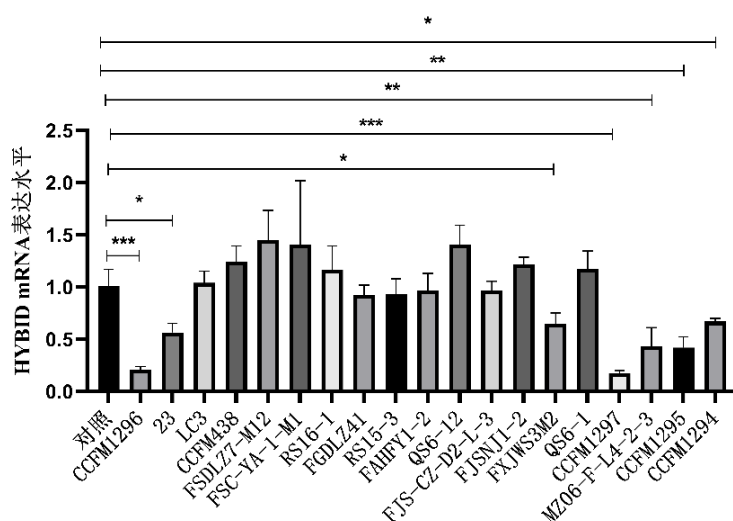


图 2-5 HT29 细胞的 HYBID mRNA 的表达

Fig. 2-5 Expression of HYBID mRNA in HT29 cells

注：*表示与对照组相比具有显著性差异，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

2.4.2 不同后生元对 HaCaT 细胞中 HA 代谢关键基因表达的影响

基于 HA 代谢通路的关键基因表达从 HT29 细胞筛选得到 16 株后生元，分别为 CCFM1293、CCFM1294、CCFM1296、CCFM1297、23、FXJWS3M2、FZJTZ29M8、CCFM1295、MZ06-F-L4-2-3、FJS-CZ-D2-L-3、FSD-ZC-2-M1、FJSZJJ2-1、FBJHD4-7、RS64-12 和 1-7。为了确保后生元口服后能够靶向皮肤等组织发挥调控作用，进一步通过 HaCaT 细胞对这 16 株后生元进行再次验证，确定用于动物实验灌胃的后生元。

2.4.2.1 不同后生元对 HaCaT 细胞 UGDH mRNA 表达的影响

将 HT29 细胞筛选到的 16 株后生元分别与 HaCaT 细胞共培养，检测 UGDH mRNA 的表达量，如图 2-6 所示。7 株后生元 CCFM1293、CCFM1294、CCFM1295、CCFM1296、CCFM1297、MZ06-F-L4-2-3 和 CCFM1224 显著上调了 HaCaT 细胞 UGDH mRNA 表达。其中后生元 CCFM1224 对 HaCaT 细胞的 UGDH mRNA 表达的促进作用

最强，比对照组提高 378%；其余 5 株后生元比对照组提高约 100%左右。

由 2.4.1.1 的结果可知，后生元 CCFM1293、CCFM1296 和 MZ06-F-L4-2-3 显著上调了 HT29 细胞中 UGDH mRNA 表达量，结合 HT29 和 HaCaT 细胞的结果可知，3 株后生元 CCFM1293、CCFM1296 和 MZ06-F-L4-2-3 同时上调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞的 UGDH mRNA 表达，其中后生元 CCFM1296 对 HT29 和 HaCaT 细胞 UGDH mRNA 表达的上调作用较强，后生元 MZ06-F-L4-2-3 次之。

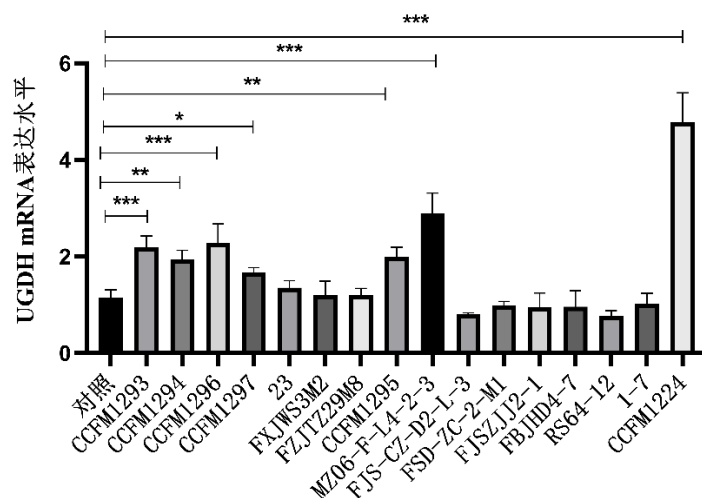


图 2-6 HaCaT 细胞的 UGDH mRNA 的表达

Fig. 2-6 Expression of UGDH mRNA in HaCaT cells

注：*表示与对照组相比具有显著性差异， $P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 、

2.4.2.2 不同后生元对 HaCaT 细胞 HAS1 mRNA 表达的影响

将 HT29 细胞筛选得到的 16 株后生元与 HaCaT 细胞共培养，对 HAS1 mRNA 的表达量进行检测，结果如图 2-7 所示。

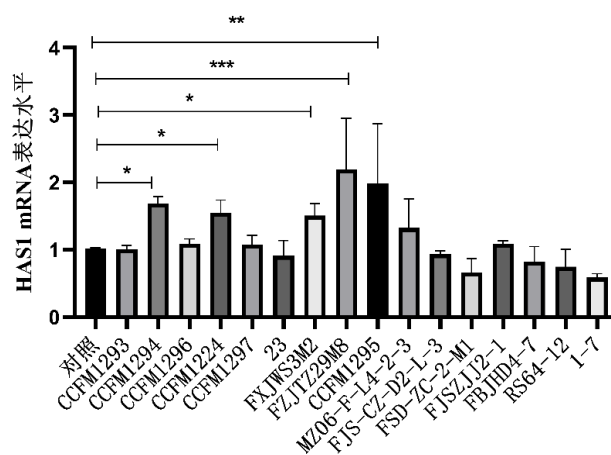


图 2-7 HaCaT 细胞的 HAS1 mRNA 的表达

Fig. 2-7 Expression of HAS1 mRNA in HaCaT cells

注：*表示与对照组相比具有显著性差异， $P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$

如图所示，5 株后生元 CCFM1294、CCFM1224、CCFM1295、FXJWS3M2 和 FZJTZ29M8 显著上调了 HaCaT 细胞的 HAS1 mRNA 的表达。其中后生元 FZJTZ29M8

和 CCFM1295 对 HaCaT 细胞 HAS1 mRNA 的表达促进作用最强，分别比对照组上调了 120%和 98%；其余 3 株后生元比对照组提高约 50%左右。

由 2.4.1.2 的结果可知，后生元 FXJWS3M2 和 FSD-ZC-2-M1 显著上调了 HT29 细胞 HAS1 mRNA 表达量。结合 HT29 和 HaCaT 细胞的结果可知，后生元 FXJWS3M2 同时上调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞的 HAS1 mRNA 的表达。

2.4.2.3 不同后生元对 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达的影响

将 HT29 细胞筛选得到的 16 株后生元与 HaCaT 细胞共培养，对 HAS2 mRNA 的表达量进行检测，如图 2-8 所示。

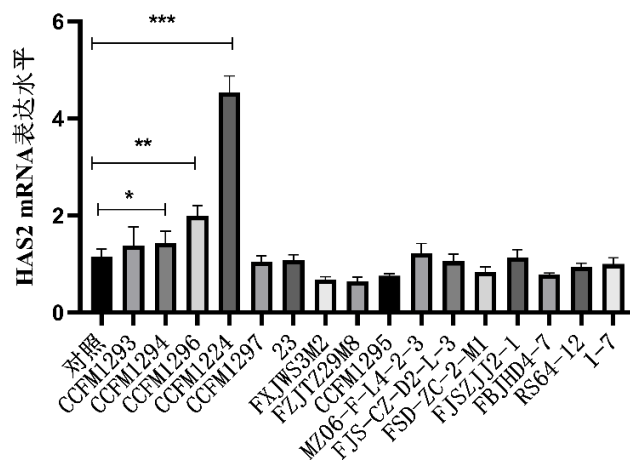


图 2-8 HaCaT 细胞的 HAS2 mRNA 的表达

Fig. 2-8 Expression of HAS2 mRNA in HaCaT cells

注：*表示与对照组相比具有显著性差异，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

如图所示，3 株后生元显著上调了 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 的表达，分别为 CCFM1294、CCFM1296 和 CCFM1224。其中后生元 CCFM1224 对 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达的促进能力最强，比对照组上调了 354%，CCFM1296 次之，提高了 98%左右。由 2.4.1.3 可知，后生元 CCFM1293、CCFM1296、CCFM1224、FJS-CZ-D2-L-3、FSD-ZC-2-M1 和 FZJTZ29M8 显著上调了 HT29 细胞 HAS2 mRNA 表达量。结合 HT29 和 HaCaT 细胞的结果可知，后生元 CCFM1296 和 CCFM1224 同时上调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达。其中，后生元 CCFM1224 对 HT29 细胞和 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达影响最强；其次是后生元 CCFM1296；后生元 CCFM1293 对 HT29 细胞 HAS2 mRNA 表达影响较强，但是对 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达水平相比对照组上调了 38%，并未产生显著性差异。

2.4.2.4 不同后生元对 HaCaT 细胞的 HAS3 mRNA 表达的影响

将由 HT29 细胞筛选得到的 16 株后生元与 HaCaT 细胞共培养，检测 HAS3 mRNA 表达量，结果如图 2-9 所示。如图所示，有 5 株后生元显著上调了 HaCaT 细胞 HAS3

mRNA 表达, 分别为 CCFM1293、CCFM1294、CCFM1295、CCFM1296 和 CCFM1297。其中后生元 CCFM1295 对 HaCaT 细胞 HAS3 mRNA 表达的上调能力最强, 比对照组提高了 318%; 后生元 CCFM1293、CCFM1296 和 CCFM1297 对 HaCaT 细胞 HAS3 mRNA 表达的上调能力相近, 比对照组上调 110%左右。

在 2.4.1.4 的结果中, CCFM1224、FJSZJJ2-1、FBJHD4-7、RS64-12、CCFM1297 和 CCFM1295 显著上调了 HT29 细胞 HAS3 mRNA 表达量。结合 HT29 和 HaCaT 细胞的结果可知, 后生元 CCFM1295 和 CCFM1297 同时上调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞的 HAS3 mRNA 的表达。

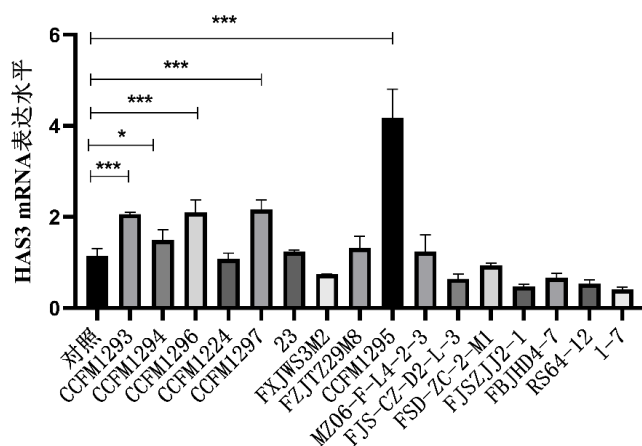


图 2-9 HaCaT 细胞的 HAS3 mRNA 的表达

Fig. 2-9 Expression of HAS3 mRNA in HaCaT cells

注: *表示与对照组相比具有显著性差异, $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.4.2.5 不同后生元对 HaCaT 细胞的 HYBID mRNA 表达的影响

将由 HT29 细胞筛选得到的 16 株后生元与 HaCaT 细胞共培养, 对 HYBID mRNA 的表达量进行检测, 结果如图 2-10 所示。

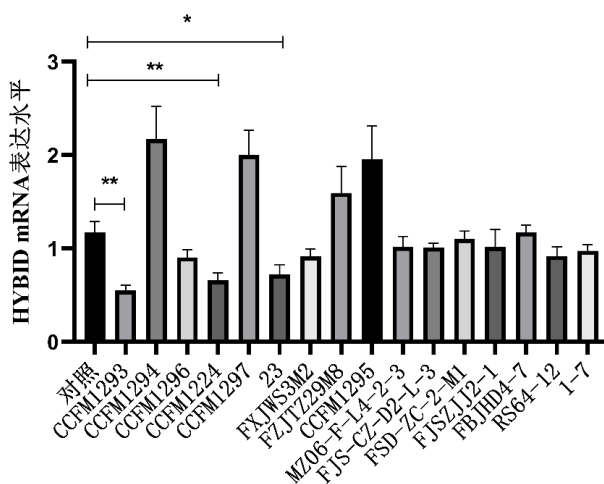


图 2-10 HaCaT 细胞的 HYBID mRNA 的表达

Fig. 2-10 Expression of HYBID mRNA in HaCaT cells

注: *表示与对照组相比具有显著性差异, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

与对照组相比,有3株后生元显著下调了 HaCaT 细胞的 HYBID mRNA 表达,分别为 CCFM1293、CCFM1224 和 23。其中后生元 CCFM1293 下调 HaCaT 细胞 HYBID mRNA 表达的能力最强,比对照组降低了约 45%。由 2.4.1.5 可知,后生元 CCFM1296、23、FXJWS3M2、CCFM1297、MZ06-F-L4-2-3、CCFM1295 和 CCFM1294 显著下调了 HT29 细胞 HYBID mRNA 表达量。结合 HT29 和 HaCaT 细胞的结果可知,后生元 23 同时下调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞的 HYBID mRNA 的表达。

2.5 本章小结

本章以 HA 代谢通路上的关键靶点为切入点,将口服后生元进入体内发挥作用的小肠吸收细胞 HT29 和期望 HA 产生部位的靶细胞 HaCaT 联合起来,评估了不同益生菌制备的后生元对 HT29 细胞和 HaCaT 细胞 UGDH、HAS1、HAS2、HAS3、HYBID mRNA 表达的影响,从 50 株后生元中筛选得到 16 株具有潜在 HA 调控能力的后生元,进一步利用 HaCaT 细胞从 UGDH、HAS1、HAS2、HAS3、HYBID mRNA 表达方面进行再次验证,得到 8 株具有既可能口服吸收后在肠道调控 HA,使其吸收到达组织部位,又可能直接靶向皮肤等组织产生 HA 调控作用的后生元。

(1) 3 株后生元 CCFM1293、CCFM1296 和 MZ06-F-L4-2-3 均上调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞 UGDH mRNA 表达,其中后生元 CCFM1296 对 HT29 和 HaCaT 细胞 UGDH mRNA 表达的上调作用最强;

(2) 后生元 FXJWS3M2 均上调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞 HAS1 mRNA 表达;

(3) 后生元 CCFM1224 和 CCFM1296 对 HT29 细胞和 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达均产生了较强的促进作用,分别比 HT29 细胞的对照组提高了 4.8 倍和 3.4 倍多;比 HaCaT 细胞的对照组提高了 3.5 倍和 1 倍左右;后生元 CCFM1293 也对 HT29 细胞 HAS2 mRNA 表达比对照组提高了 2.8 倍,也上调了 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达水平;

(4) 后生元 CCFM1295 和 CCFM1297 同时上调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞的 HAS3 mRNA 的表达;

(5) 后生元 CCFM1296 对 HT29 细胞 HYBID mRNA 表达的下调作用最强;后生元 CCFM1293 对 HaCaT 细胞 HYBID mRNA 表达的下调作用最强,后生元 23 均下调了 HT29 细胞和 HaCaT 细胞的 HYBID mRNA 的表达;

总之,以 UGDH、HAS1-3、HYBID mRNA 表达为筛选指标,选择同时在 HT29 细胞和 HaCaT 细胞发挥调控作用的后生元作为第三章节动物灌胃的后生元,分别为 CCFM1293、CCFM1294、CCFM1295、CCFM1296、CCFM1297、CCFM1224、FXJWS3M2、MZ06-F-L4-2-3。

第三章 后生元的体内抗衰老和 HA 调控作用研究

3.1 前言

在健康个体中, HA 的合成和降解处于一种动态平衡中。随着机体的衰老, 体内 HA 总含量下降^[152, 153], 随之带来一系列年龄相关问题, 如眼花、皮肤老化、关节功能退化、大脑记忆衰退等。针对这一现象, 本课题致力于增加组织 HA 含量, 以延缓机体衰老。第二章基于 HA 代谢通路的关键靶点, 通过 HT29 和 HaCaT 两种细胞结合筛选得到 8 株具有潜在调控宿主 HA 含量的后生元, 由于 HA 具有良好地抗衰老能力, 首先利用一些易测的衰老指标分析后生元的抗衰老能力, 选取具有缓解衰老作用的后生元, 进一步对 HA 调控能力进行检测。因此, 本章通过建立衰老模型, 检测小鼠的脏器指数、血清生化指标、皮肤水分和弹性、抗氧化水平和组织 HA 水平, 探究了体外得到的 8 株后生元在体内的抗衰老和 HA 调控作用。因 HA 在皮肤组织中含量最高, 对皮肤水分和弹性的保持非常重要^[154]; 且作为机体的天然润滑剂, HA 对眼睛和关节正常运动至关重要^[41, 155], 此外, HA 还构成大脑神经元网并涉及神经元的成熟^[156], 故检测了小鼠皮肤、关节、大脑、眼睛的 HA 含量, 并对 HA 合成相关酶和 HA 降解相关酶的 mRNA 水平进行了相对定量, 通过 HA 代谢通路解析后生元对机体 HA 的调控作用。

3.2 实验材料与设备

3.2.1 实验菌株

副干酪乳酪杆菌 CCFM1293、副干酪乳酪杆菌 CCFM1294、植物乳植杆菌 CCFM1295、植物乳植杆菌 CCFM1296、植物乳植杆菌 CCFM1297、副干酪乳酪杆菌 CCFM1224、副干酪乳酪杆菌 FXJWS3M2、副干酪乳酪杆菌 MZ06-F-L4-2-3 来源于江南大学食品生物技术中心菌种保藏中心。

3.2.2 实验动物

8 周龄的无特定病原体级 (Specific pathogen Free, SPF) 雄性 BALB/c 小鼠 (20-22 g) 购自维通利华实验动物技术有限公司。

3.2.3 实验试剂

过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px)、总抗氧化酶 (Total antioxidant capacity, T-AOC) 和还原型谷胱甘肽 (Reduced glutathione, GSH) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; HA ELISA 试剂盒, 上海酶联生物公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 RIPA 裂解液, 上海碧云天生物公司;

3.2.4 主要仪器与设备

高通量组织破碎机，宁波新芝科技生物有限公司；IM50 制冰机，雪科电器有限公司；ME3002E、ME204E 型电子天平，梅特勒-托利多有限公司；MilliQ8 超纯水发生器，美国 Millipore 公司；泰事达冻干机，西班牙 Telstar 公司。

3.3 实验方法

3.3.1 菌株培养

按照 2.3.1 的方法

3.3.2 后生元制备

按照 2.3.2 的方法

3.3.3 动物实验方案设计

雄性 BALB/c 实验小鼠（8 周龄，SPF 级，体重质量 20 ~ 22 g）购于维通利华。动物实验方案已获得江南大学实验动物实验伦理委员会批准（伦理编号为：JN.No20211215b2050601），所有小鼠均喂养标准饲料和无菌水，适应性饲养一周后，将小鼠随机分为 11 组，分组如表 3-1 所示。除空白组外，其余各组小鼠每天皮下注射生理盐水配制的 D-半乳糖（500 mg/kg）^[157]，造模 9 周。造模期间，以菌株制备的后生元冻干粉（以相应剂量溶于生理盐水）以 0.2 mL/只/天的量对后生元组小鼠进行灌胃，空白组和模型组小鼠每天灌胃等体积生理盐水，直至试验结束，所有分组均为自由饮水和摄食。最后一次干预造模 24 h 后，称记小鼠体重，处死小鼠，立即取样。

表 3-1 动物实验分组
Table 3-1 Animal experimental groups

组别	灌胃物质	灌胃体积	灌胃周期	数量
空白组	生理盐水	0.2 mL	9 周	n=5
模型组	生理盐水	0.2 mL	9 周	n=10
培养基组	500 mg/kg 培养基	0.2 mL	9 周	n=5
副干酪乳酪杆菌 CCFM1293	500 mg/kg 后生元 CCFM1293	0.2 mL	9 周	n=5
植物乳植杆菌 CCFM1295	500 mg/kg 后生元 CCFM1295	0.2 mL	9 周	n=5
植物乳植杆菌 CCFM1296	500 mg/kg 后生元 CCFM1296	0.2 mL	9 周	n=5

续表 3-1 动物实验分组
Table 3-1 Animal experimental groups

组别	灌胃物质	灌胃体积	灌胃周期	数量
植物乳植杆菌 CCFM1297	500 mg/kg 后生元 CCFM1296	0.2 mL	9 周	n=5
副干酪乳酪杆菌 CCFM1224	500 mg/kg 后生元 CCFM1224	0.2 mL	9 周	n=5
植物乳植杆菌 23	500 mg/kg 后生元 23	0.2 mL	9 周	n=5
副干酪乳酪杆菌 FXJWS3M2	500 mg/kg 后生元 FXJWS3M2	0.2 mL	9 周	n=5
副干酪乳酪杆菌 MZ06-F-L4-2-3	500 mg/kg 后生元 MZ06-F-L4-2-3	0.2 mL	9 周	n=5

3.3.4 小鼠体重的测定

动物实验进行期间，每周记录小鼠体重、更换饮水水和垫料，关注小鼠行为活动。

3.3.5 皮肤水分和弹性测定

造模 9 周后，用无菌剃毛刀剃净小鼠颈背部毛发，用皮肤水分和弹性测定仪^[158]检测每只小鼠的下背部到臀部区域的左侧和右侧皮肤水分，交替测量 10 次，剔除 2 个最低值和最高值后，以剩余 6 个值的平均数作为小鼠皮肤水分和皮肤弹性数值，测量于室内进行，测量时固定小鼠，保证仪器表面与待测皮肤垂直接触。

3.3.6 脏器系数测定

在解剖前称取每只小鼠体重并记录，解剖时取出小鼠肝、脾、胸腺、大脑组织，采用低温生理盐水清洗，并且吸干水分之后，称取脏器组织重量，按如下公式计算小鼠各脏器指数：

脏器指数 = 脏器重量（mg）/小鼠体重（g）(1)

3.3.7 血清指标检测

采用眼眶静脉丛采集小鼠的血液，静置 2 h，3000 r/min 低温离心 10 min，取上清。采用生化分析仪测定与衰老相关的血清生化指标，包括 C 反应蛋白（CRP）、谷丙

转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）。

3.3.8 皮肤组织 CAT、GSH-Px 和 T-AOC 活力以及 GSH 含量测定

取小鼠背部皮肤加入预冷的 PBS 于高通量组织研磨仪制成 10% 匀浆后，4℃、3000 r/min 条件下离心 10 min，取上清液，检测蛋白含量后，按照试剂盒说明测定小鼠皮肤过氧化氢酶（CAT）活力、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）和总抗氧化能力（T-AOC）以及谷胱甘肽含量（GSH）。

3.3.9 HA 含量测定

取小鼠背部皮肤、关节组织、大脑组织和眼球组织加入预冷的 PBS 于高通量组织研磨仪制成 10%、16%、33% 和 20% 匀浆后，4℃、3000 r/min 条件下离心 10 min，取上清液，按照 HA ELISA 试剂盒说明书说明检测各组织中 HA 含量。

3.3.10 实时荧光定量法检测小鼠组织 mRNA 表达

根据 RNA 提取试剂盒说明书提取小鼠皮肤、关节、脑、眼总 RNA，用 Nanodrop 检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的数值，将 1 μg 总 RNA 通过逆转录试剂盒反转录成 20 μL cDNA，以 SYBR Green qPCR Master Mix 用于荧光定量 PCR 反应体系配置。以 GAPDH 作为内参基因，基于 2^{-ΔΔCt} 方法计算目的基因表达量，引物见表 3-2。

表 3-2 动物实验用引物序列

Table 3-2 Primer sequences for animal experiments

名称	正向序列	反向序列
UGDH	AGTAGTCGAATCCTGTCGAGG	CTCCGTGACAATTTGTACCCA
HAS1	GGCGAGCACTCACGATCATC	AGGAGTCCATAGCGATCTGAAG
HAS2	TGTGAGAGGTTTCTATGTGTCCT	ACCGTACAGTCCAAATGAGAAGT
HAS3	CCTGGAGCACCGTCGAATG	CCTTGAGGTTTGGAAGGCAA
HYAL1	ACCTGCTTCGCATCTCTACTC	GGTTGGATACCACGGAACCTC
HYAL2	AGATGTTTACCGACAGTCTTCAC	TGACGTAACGGAGAGTGTTCAA
HYBID	TGATGGGAGTCGAGGTCAC	GAGCACTATGGAATTGTCAGGG

3.3.11 数据统计与分析

同 2.3.7

3.4 结果与讨论

3.4.1 后生元对小鼠体重的影响

图 3-1 显示了体外实验得到的 8 株后生元对小鼠体重的影响。实验过程中，空白组小鼠皮毛顺滑光亮，行动比较灵活；模型组小鼠毛色黯淡疏松，行动迟缓；各组小鼠在实验期间体重均出现缓慢增长，组间无明显差异，表明灌胃的后生元对小鼠无副作

用。

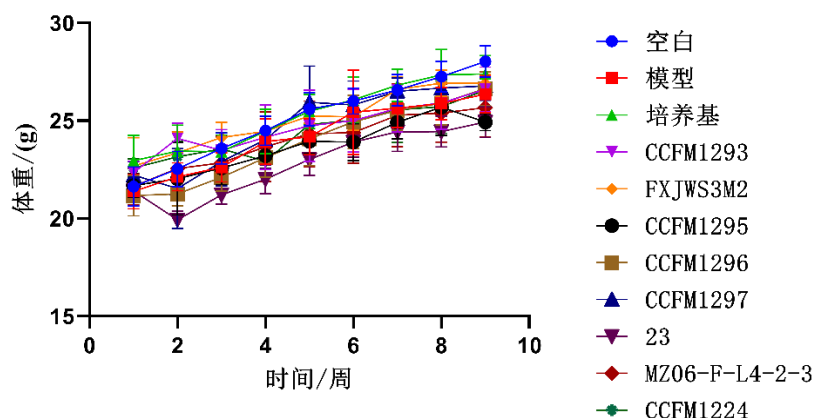


图 3-1 实验期间小鼠体重变化

Fig. 3-1 Changes in body weight of mice during the experiment

3.4.2 后生元对皮肤水分和皮肤弹性的影响

D-半乳糖的过量积累可引起皮肤发生氧化应激，其产生的自由基可攻击 HA 聚合物导致 HA 降解^[159]，同时攻击真皮层纤维细胞，使真皮层厚度变薄和胶原蛋白含量减少，并抑制朗格汉斯细胞活性，导致免疫能力下降和屏障功能受损，发生皮肤水分和弹性均下降的衰老迹象^[160]。为了评估体外筛选得到的后生元口服后对皮肤衰老的缓解作用，对小鼠皮肤水分和弹性进行了检测，结果如图 3-2 所示。

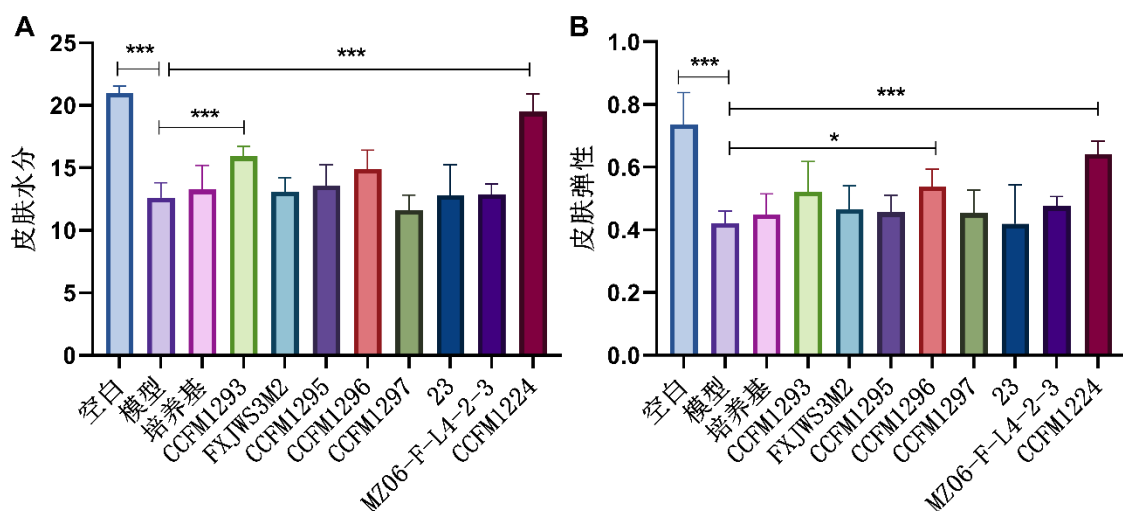


图 3-2 不同组别小鼠的皮肤水分和皮肤弹性。(A) 皮肤水分；(B) 皮肤弹性

Fig. 3-2 Skin moisture and skin elasticity in different groups of mice. (A) Skin moisture, (B) Skin elasticity

注：*表示与模型组相比具有显著性差异，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$

与空白组相比，模型组小鼠皮肤水分和弹性均显著降低，表现出皮肤衰老特征。在不同后生元干预后，后生元 CCFM1293 和 CCFM1224 显著地提高了衰老小鼠的皮肤水分；CCFM1296 和 CCFM1224 则显著地增加了皮肤弹性。一项研究显示体外上调 HaCaT 细胞 HAS2 mRNA 表达的后生元植物乳植杆菌 K8 在体内提高了 SKH-1 无毛小

鼠和志愿者的皮肤水分，在 2.4 的结果中后生元 CCFM1293、CCFM1224 和 CCFM1296 在体外细胞实验中也提高了 HAS2 mRNA 表达，表明能够上调细胞 HAS2 mRNA 表达的后生元具有增加衰老皮肤水分和弹性的能力，其中后生元 CCFM1224 对皮肤水分和皮肤弹性的升高作用最好，相比模型组分别上调了 55%和 52%，后生元 CCFM1293 和 CCFM1296 升高衰老小鼠皮肤水分和皮肤弹性的能力相近。

3.4.3 后生元干预对器官指数的影响

脏器指数可以反映造模物质和灌胃样品对机体器官功能和免疫功能的影响情况^[161]，研究表明 HA 具有保护细胞、促进组织修复和免疫细胞增殖等多种作用^[162]。为了探究具有上调 HA 潜力的后生元对机体免疫功能的影响，检测了小鼠的脏器指数，如图 3-3 所示。

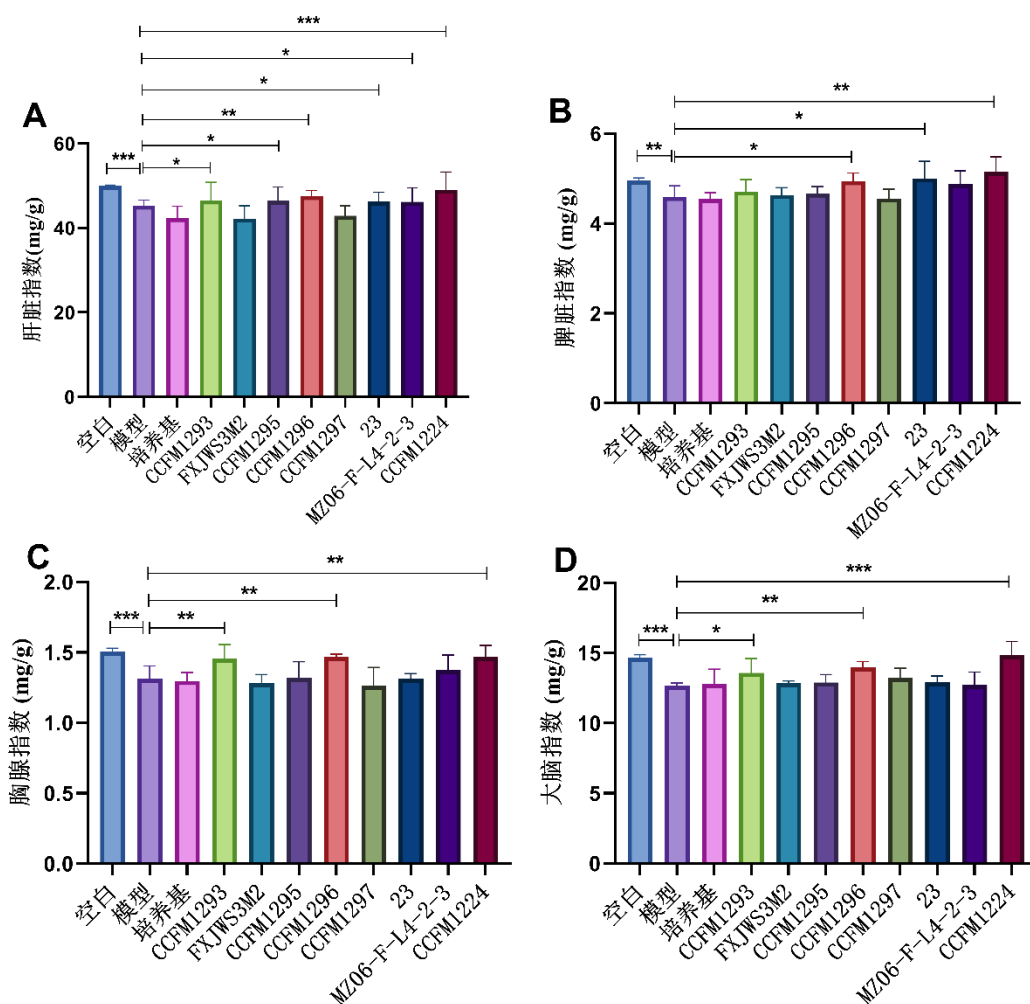


图 3-3 不同组别小鼠的器官指数。(A) 肝脏指数；(B) 脾脏指数；(C) 胸腺指数；(D) 大脑指数

Fig. 3-3 Organ index of different groups of mice. (A)Liver index, (B)Spleen index, (C)Thymus index, (D)Brain index

注：*表示与模型组相比具有显著性差异，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

由图可知，因 D-半乳糖的相对长期作用，导致模型组小鼠的肝脏、脾脏、胸腺和

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/008070076106006041>