荔枝玫瑰酒延缓小鼠皮肤衰老的研究

徐 莹[1]， 李晓娟[2]， 孟 君[2]， 张 凯[1]， 唐 雪*[1]
（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 株洲千金药业股份有限公司，湖南 株洲 412000）

摘要： 为探究荔枝玫瑰酒对衰老小鼠皮肤的干预作用，选用 60 只 ICR 小鼠进行实验分析。将小鼠分为正常组（饲喂含质量分数 12%乙醇的饮用水），*D*-半乳糖处理组（饲喂含质量分数 12%乙醇的饮用水），VC 对照组（饲喂 450 mg/kg（以体质量计）的 VC），低、中、高剂量荔枝玫瑰酒组（分别饲喂 10、20、40 mL/kg（以体质量计）的荔枝玫瑰酒）。正常组注射生理盐水，其余 5 组皮下注射 *D*-半乳糖，6 周后分析。结果显示，小鼠饲喂高剂量荔枝玫瑰酒可在一定程度上恢复皮肤含水率（质量分数）、羟脯胺酸和胶原蛋白质量分数；皮肤切片结果显示高剂量荔枝玫瑰酒饲喂可改善皮肤状态，使真皮层沉积变厚、胶原纤维含量增加；同时，荔枝玫瑰酒可有效降低衰老小鼠皮肤 ROS、MDA 质量摩尔浓度以及血浆炎症因子质量浓度（$P<0.05$）；RT-PCR 结果显示，荔枝玫瑰酒缓解皮肤衰老的功效可能与调节胶原蛋白合成基因（*TGF-β1*、*COl1a1*、*COl3a1*、*NF-κB*、*AP-1*、*MMP-1*、*MMP-8*）以及抗氧化相关基因（*Nrf2*、*GSK-3β*、*HO-1*、*NQO1*）表达水平有关（$P<0.05$）。因此，适宜剂量荔枝玫瑰酒对小鼠皮肤衰老具有一定的干预作用。

关键词： 荔枝玫瑰酒；抗氧化；皮肤衰老；小鼠
中图分类号：TS 201.4　**文章编号：**1673-1689(2022)04-0102-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.04.013

Experimental Study of Lychee Rose Wine on Anti-Skin Aging in Mice

XU Ying[1]， *LI Xiaojuan*[2]， *MENG Jun*[2]， *ZHANG Kai*[1]， *TANG Xue**[1]
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Qianjin Pharmaceutical Co, Zhuzhou 412000, China)

Abstract: The effect of lychee rose wine on the skin of aging mice was investigated. Sixty ICR mice were divided into: Normal group (fed with drinking water containing 12% ethanol), *D*-galactose group (fed with drinking water containing 12% ethanol), VC control group (fed with 450 mg/kg VC), low, medium and high dose lychee rose wine groups (fed with 10, 20 and 40 mL/kg lychee rose wine, respectively). The normal group was injected with normal saline, and the other five groups were subcutaneously injected with *D*-galactose, which were analyzed after 6 weeks. The content of skin moisture, hydroxyprolinic acid and collagen could be recovered in mice fed with high dose lychee rose wine. The results of skin section showed that high dose of lychee rose wine could improve the skin condition, thickening the dermis deposition and increasing the collagen fiber content. Meanwhile, lychee rose wine could effectively reduce the contents of ROS and MDA in skin and the levels of inflammatory factors in plasma of aging mice ($P<0.05$). RT-PCR results showed that the

收稿日期： 2021-05-06
* **通信作者：** 唐 雪（1981—），女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事营养代谢与调控研究。E-mail：tangxue@jiangnan.edu.cn

effect of lychee rose wine on skin aging might be related to the regulation of expression levels of collagen-synthesizing genes (*TGF-β1*, *COl1a1*, *COl3a1*, *NF-κB*, *AP-1*, *MMP-1*, *MMP-8*) and antioxidant related genes (*Nrf2*, *GSK-3β*, *HO-1*, *NQO1*) (P<0.05). The appropriate dosage of lychee rose wine has certain intervention effect on the skin aging of mice.

Keywords: lychee rose wine, antioxidant, skin aging, mice

皮肤受环境、年龄、生活方式等影响,往往容易引起结构、功能和外观的变化,例如皱纹的增加、皮肤松弛、干燥粗糙等衰老特征。皮肤衰老是一个高度复杂且尚未完全了解的过程,自由基衰老学说指出衰老是由各种氧自由基(ROS)在体内过度积累,过剩的活性氧自由基会导致大分子物质氧化损伤并加速其进程,导致细胞功能受损,进而导致机体衰老[1-2]。因此,降低 ROS 生成和增强抗氧化能力可在一定程度上缓解皮肤衰老进程。

荔枝在我国培植历史悠久,主要分布于我国东南和西南部地区。《本草纲目》中认为荔枝果肉具有益智、健气的功效。成熟荔枝的果皮呈暗红色至鲜红色,果肉莹白剔透、状若凝脂、清甜浓香、营养丰富,深受广大消费者喜爱。荔枝作为一种药食同源的果品,其果肉营养成分丰富,富含多糖、酚类等活性物质,具有较强的抗氧化、降血脂等作用[3-5]。玫瑰是集药食同源和美化环境为一身的木本植物,花瓣富含维生素 C、氨基酸等物质,具有降血糖、抗氧抗炎等生物活性[6]。此外,玫瑰富含萜类物质,不仅能保持皮肤湿润,还能深层养护肌肤[7]。

随着人民生活水平的提高,倾向于以绿色健康的饮食方式来延缓衰老,对自然来源的抗皮肤衰老产品的需求也日益迫切。开发一款改善皮肤健康的果酒,不但具有很大的市场潜力,而且也能提升产品竞争力。荔枝和玫瑰自古以来美肤养颜的功效就深入人心,且经大量研究表明,荔枝和玫瑰不仅富含多种营养成分,而且含有大量的多酚类、黄酮类化合物,具有一定的健康功效。目前,荔枝和玫瑰的销售方式以鲜销和提炼精油为主,尽管已有一些发酵型荔枝果酒或玫瑰酒类出现在国内市场上,但是这些产品具有营养健康功效单一、口感色泽欠佳的缺点。为了克服上述问题,综合荔枝和玫瑰的营养保健价值,作者所在课题组前期以新鲜荔枝、玫瑰花(重瓣玫瑰花)为主要原料,配以果葡糖浆,依据传统中药君臣佐使配方,酿制得到了一款香气纯正和谐、口感纯净爽怡的荔枝玫瑰酒。然而,荔枝玫瑰酒是否保留了荔枝、玫瑰原有的营养物质和活性成分,长期饮用是否对皮肤具有营养健康功效,还需进一步研究。因此,作者利用 *D*-半乳糖诱导的小鼠衰老模型对荔枝玫瑰酒可能的功效进行探究,以期为产品的进一步开发和品控提供有价值的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 原料 荔枝玫瑰酒(体积分数 12%):株洲千金药业股份有限公司产品。

1.1.2 主要试剂 *D*-半乳糖、辣根过氧化物酶、多聚甲醛:国药集团提供;过氧化氢酶(CAT)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、羟脯胺酸(HYP)试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)测试盒:南京建成生物研究所提供;总蛋白质定量(BCA)试剂盒:碧云天生物技术研究所提供;Oligo(dT)、dNTP、M-MLV 逆转录酶、RNase Inhibitor:美国赛默飞生物科技有限公司产品。Trizol、SYBR Green Master Mix:南京诺维赞生物科技有限公司产品;肿瘤坏死因子(TNF-α)ELISA 试剂盒、白细胞介素(IL-1、IL-6、IL-10)ELISA 试剂盒:江苏酶免实业有限公司产品;H&E 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒:北京索莱宝科技有限公司产品。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

R686VLT 型超低温冰箱:美国 INVETRO 公司产品;5804R 台式高速冷冻离心机:美国 Thermo Scientific 公司产品;手动轮转切片机:美国徕卡公司产品;倒置相差显微镜:日本 Olympus 公司产品;7900HT Fast Real-Time PCR 仪:美国 ABI 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 动物与分组 动物试验经江南大学动物营养研究所动物保健与使用委员会批准,根据《中国

动物福利和实验指南》,按照规定执行。60 只 5 周龄体质量(29.66±1.21) g 的 ICR 雄性小鼠饲喂于江南大学实验动物中心。保持环境相对温度为(23±2) ℃和相对湿度为(60±5)%条件下,光照/黑暗周期为 12 h/12 h(光照时间为 08:00—20:00),所有小鼠均自由采食与进水,每周称量并记录体质量和饮水量。

参考文献[8]实验方法,除正常组外,剩下 5 组注射 1 200 mg/(kg·d)*D*-半乳糖造模。同时,荔枝玫瑰酒组分别饲喂 10、20、40 mL/kg (以体质量计)荔枝玫瑰酒(根据文献[9]研究表明 60 kg 成人每日果酒推荐饮用量 300 mL,上述荔枝玫瑰酒添加量相当于 60 kg 成人每天分别摄入 75、150、300 mL 产品),VC 对照组饲喂 450 mg/kg(以体质量计)维生素C。所有动物自由采食饮水,6 周后进行样本采集分析。

1.3.2 样本采集 饲养结束后,进行小鼠背部脱毛。眼球采血后,取小鼠颈背部皮肤、肝脏、肾脏、肌肉,称质量。血液放置 15 min 后,3 500 r/min 离心 10 min 分离血清,放置于-80 ℃冰箱待测。皮肤、肝脏、肾脏、肌肉取同一部位 0.1 g,加入 0.9 mL 生理盐水后匀浆,4 000 r/min 离心 10 min 后分离上清液,按照说明书进行 BCA 蛋白质定量后放置于-80 ℃冰箱待测。

1.3.3 氧化应激指标测定 活性氧自由基测定采用化学发光法[10]。T-AOC 能力、MDA 质量摩尔浓度、SOD 活性、CAT 活性、GSH-Px 活性用相应的试剂盒进行测定。

1.3.4 皮肤理化指标测定 皮肤含水率(水分质量分数)测定:参考文献[8]实验方法进行。皮肤羟脯胺酸(HYP)质量分数严格按照试剂盒说明书测定。

1.3.5 血浆炎症因子的测定 血浆中的 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-10 均严格按照 ELISA 试剂盒说明书测定。

1.3.6 总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析 采用 Trizol 法提取皮肤总 RNA,测定 RNA 的纯度和浓度,严格按照逆转录酶试剂盒(MultiScribe Reverse Transcriptase;Applied Biosystems)说明书进行操作,将 RNA 逆转录成 cDNA。将 cDNA、引物和 SYBR Green Master Mix 混合均匀,使用实时荧光定量 PCR 扩增并检测荧光强度,扩增程序如下:95 ℃ 5 min,循环 1 次;95 ℃ 20 s;60 ℃ 30 s、72 ℃ 20 s,循环 45 次;72 ℃终末延伸 2 min。以 *β-actin* 作为参照基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primers used in RT-PCR

基因	上游引物(5′-3′)	下游引物(5′-3′)
β-actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
GSK-3β	TGGCAGCAAGGTAACCACAG	CGGTTCTTAAATCGCTTGTCCTG
Nrf2	GCCGCTTAGAGGCTCATCTC	TGGGCGGCGACTTTATTCTT
HO-1	GGAAATCATCCCTTGCACGC	TGTTTGAACTTGGTGGGGCT
NQO1	AGGATGGGAGGTACTCGAATC	AGGCGTCCTTCCTTATATGCTA
TGF-β1	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
MMP-1	CTTCTTCTTGTTGAGCTGGACTC	CTGTGGAGGTCACTGTAGACT
MMP-8	TCTTCCTCCACACACAGCTTG	CTGCAACCATCGTGGCATTC
NF-κB	ATGGCAGACGATGATCCCTAC	TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG
AP-1	CCTTCTACGACGATGCCCTC	GGTTCAAGGTCATGCTCTGTTT
COl1a1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
COl3a1	CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC

1.3.7 组织切片 解剖小鼠后,取小鼠颈背部皮肤约 1 cm×1 cm 方格于体积分数 4%多聚甲醛固定液中。24 h 后取出组织,按照体积分数 50%~100%乙醇的梯度脱水,每级 30 min。放入正丁醇中进行透明,每级 20 min。浸蜡 6 h。将干净的石蜡在 60 ℃水浴反复溶解 3 次后倒入石蜡包埋机,将组织包埋在组织包埋盒中,冷却后切片,厚度为 5 μm。70 ℃烤片 30 min,取出后脱蜡。

H&E 染色:切片严格按照 H&E 染色试剂盒说明书操作。

Masson 染色:切片严格按照 Masson 染色试剂盒说明书进行水化、初染、盐酸分化、复染、脱水、透

明等步骤进行操作,树脂封片后镜检。

1.4 数据处理

结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用SPSS 17.0 软件对数据进行单因素(ANOVA)方差分析。各组间字母不同表示差异显著(P<0.05),字母相同表示无显著差异。然后进行 Tukey 多重比较检验。GraphPad Prism 7.01 软件处理作图。体外实验各指标均进行 3 次独立重复测定。

2 结果与讨论

2.1 荔枝玫瑰酒对 *D*–半乳糖诱导老化损伤小鼠体质量、饮水量的影响

由表 2 可知,小鼠饲喂 6 周后,各组终体质量、饮水量均无显著性差异(P>0.05),说明饲喂荔枝玫瑰酒对衰老小鼠体质量及饮水量无显著影响。

表 2 荔枝玫瑰酒对小鼠体质量、饮水量的影响

Table 2 Effect of lychee rose wine on body weight and water intake of mice

组别	终体质量/g	体增质量/g	饮水量/mL
正常组	40.61±3.76[a]	11.03±3.75[a]	4.91±0.57[a]
D–半乳糖处理组	41.09±4.60[a]	10.79±4.21[a]	4.68±0.75[a]
VC 对照组	38.03±2.47[a]	8.37±2.59[a]	4.60±0.65[a]
低剂量荔枝玫瑰酒组	38.08±2.51[a]	8.11±2.54[a]	5.05±0.63[a]
中剂量荔枝玫瑰酒组	38.47±3.50[a]	9.07±3.39[a]	4.94±0.49[a]
高剂量荔枝玫瑰酒组	37.28±2.90[a]	7.73±2.94[a]	4.53±0.72[a]

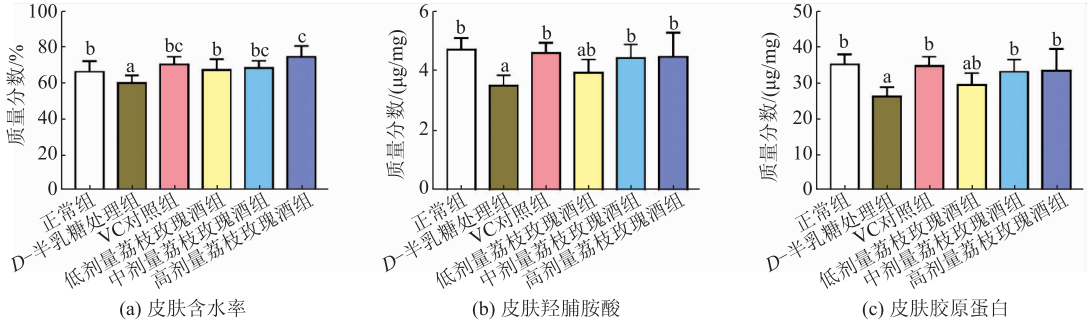
注:所有数据转换为 Mean±SD 的方式;各组数据小写字母标识不同代表组间差异显著(P<0.05),标识相同代表组间差异不显著(P>0.05)。

2.2 荔枝玫瑰酒对 *D*–半乳糖诱导老化损伤小鼠皮肤理化指标的影响

健康皮肤的锁水能力较强,而衰老皮肤的锁水能力降低,导致皮肤干燥粗糙,缺乏光泽。皮肤的结缔组织主要由胶原蛋白和弹性蛋白组成。胶原蛋白占皮肤干质量的 70%~80%,并赋予真皮机械和结构完整性。羟脯氨酸(HYP)仅存在于胶原蛋白中,常用其质量来评价组织胶原蛋白的总量[11]。如图 1 所示,*D*–半乳糖导致小鼠皮肤含水率(质量分数)、羟脯胺酸和胶原蛋白质量分数(以皮肤湿质量计)显著降低(P<0.05),这可能是 *D*–半乳糖引起皮肤氧化损伤,胶原纤维合成能力下降,胶原蛋白流失,纤维之间空间间隙减少、拉伸异常,导致皮肤萎缩,粗糙度、干燥度增加[11]。与之相反,饲喂高剂量荔枝玫瑰酒可显著提高含水率、羟脯胺酸和胶原蛋白质量分数(P<0.05),表明适宜剂量的荔枝玫瑰酒可适当改善衰老小鼠皮肤性能。

2.3 荔枝玫瑰酒对 *D*–半乳糖诱导老化损伤小鼠皮肤组织形态的影响

皮肤 H&E 染色可见,*D*–半乳糖注射使小鼠皮肤组织形态发生改变,真皮层厚度明显减少,皮肤萎缩(见图 2);Masson 染色中胶原纤维呈蓝色,通过比较分析发现 *D*–半乳糖诱导皮肤真皮层胶原纤维含量、胶原束空间密度显著降低(见图 3)。与之相



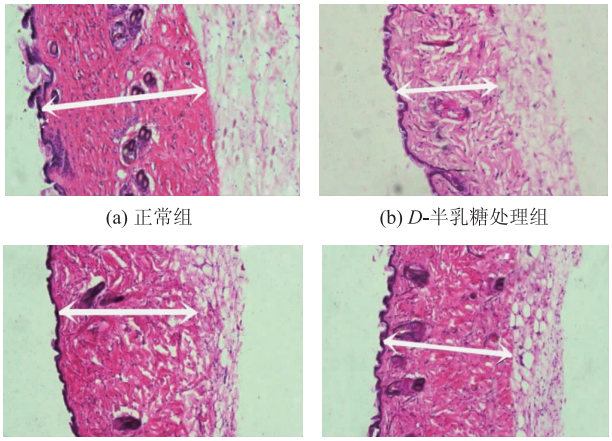
(a) 皮肤含水率 (b) 皮肤羟脯胺酸 (c) 皮肤胶原蛋白

柱形图上方字母相同表示两组间没有显著性差异(P>0.05),不同字母表示两组间有显著性差异(P<0.05)。

图 1 荔枝玫瑰酒对小鼠皮肤理化指标的影响

Fig. 1 Effect of lychee rose wine on physical and chemical indicators of mice skin

反，高剂量荔枝玫瑰酒饲喂可增加真皮层厚度、胶原纤维含量及胶原束空间密度，其效果与 VC 相当(见图 2(c)和(d)和图 3(c)和(d))，表明一定剂量的荔枝玫瑰酒具有改善皮肤老化状态的功效。

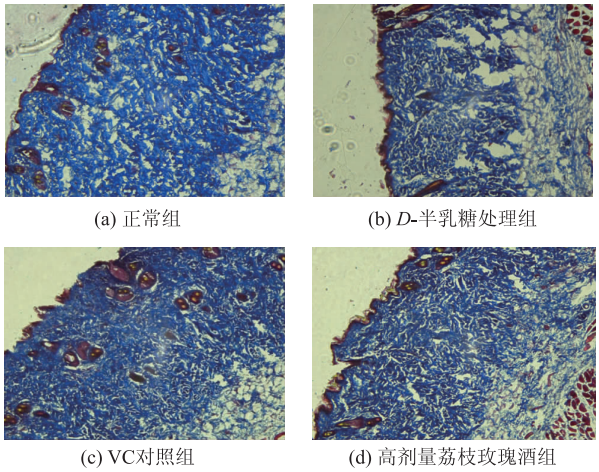


(a) 正常组　(b) *D*-半乳糖处理组

(c) VC对照组　(d) 高剂量荔枝玫瑰酒组

图 2　小鼠皮肤切片 H&E 染色图(×200)

Fig. 2　Mice skin pad slice with H&E staining(×200)



(a) 正常组　(b) *D*-半乳糖处理组

(c) VC对照组　(d) 高剂量荔枝玫瑰酒组

图 3　小鼠皮肤切片 Masson 染色图(×200)

Fig. 3　Mice skin pad slice with Masson staining(×200)

2.4　荔枝玫瑰酒对 *D*-半乳糖诱导老化损伤小鼠皮肤氧化还原稳态和血浆炎症因子质量浓度的影响

老化过程中皮肤抗氧化活性的降低是一个至关重要的因素，导致皮肤发生氧化应激、累积的过剩 ROS 极易攻击生物大分子，进而造成 RNA 断裂、脂质过氧化等。机体处于正常状态下，自由基与抗氧化系统处于微妙平衡中，在 SOD、GSH-Px、CAT 等酶类物质以及维生素 C 等非酶类抗氧化物质的共同参与下，ROS 处于浓度中等，但当机体不足以清除过剩 ROS 时，便会引起细胞信号通路异常，促发氧化应激，从而使得脂质过氧化产物(MDA)大量产生，导致皮肤衰老[12-13]。如表 3~4 所示，与正常组相较，向小鼠连续注射 *D*-半乳糖会引起皮肤 ROS 和 MDA 水平(质量摩尔浓度)显著提高，抗氧化酶(GSH-Px、SOD、CAT)活性和 T-AOC 能力降低($P<0.05$)，促发氧化应激。而饲喂高剂量荔枝玫瑰酒可在一定程度上恢复上述指标($P<0.05$)，改善衰老小鼠皮肤氧化还原稳态。

此外，炎症因子(TNF-α、白细胞介素等)的浸染会生成大量 ROS，进一步加剧氧化损伤，通过激活 NF-κB，使 MMPs 表达增多，降解胶原蛋白，导致胶原蛋白流失，皮肤衰老加剧[14-15]。大量研究表明，多酚、黄酮类物质不仅具有抗氧化、猝灭自由基的能力，而且可以通过调节细胞信号通路，抑制炎症因子生成，有研究者指出，绿茶多酚能减少肠道 IL-6 和 IL-8 的释放，从而对肠道具有一定的保护作用[16]。Wan 等指出荔枝、玫瑰中富含多酚、黄酮类物质并具有较好的抗氧化抗炎能力[17]。由表 5 可知，饲喂高剂量荔枝玫瑰酒可在一定程度上抑制炎症因子(TNF-α、IL-1、IL-6)的分泌，促进抗炎因子(IL-10)的生成($P<0.05$)，这可能与其含有丰富的多酚、黄酮类等植物活性成分有关，能有效地减少炎症反应，进而延缓皮肤衰老进程。

表 3　皮肤氧化还原指标

Table 3　Redox index in skin

组别	ROS/(AUC/ mg)	T-AOC 能力/(U/g)	MDA 质量摩尔浓度/(nmol/mg)
正常组	44.11 ± 10.73^{a}	31.27 ± 7.77^{c}	2.33 ± 0.29^{a}
D-半乳糖处理组	119.56 ± 20.86^{d}	14.87 ± 3.55^{a}	12.18 ± 1.76^{c}
VC 对照组	50.32 ± 10.30^{a}	23.63 ± 3.91^{b}	2.48 ± 0.65^{a}
低剂量荔枝玫瑰酒组	98.41 ± 8.66^{cd}	16.51 ± 0.98^{ab}	10.41 ± 2.49^{c}
中剂量荔枝玫瑰酒组	79.96 ± 18.19^{bc}	20.09 ± 5.03^{ab}	5.15 ± 1.51^{b}
高剂量荔枝玫瑰酒组	62.60 ± 12.07^{ab}	23.53 ± 3.83^{b}	3.17 ± 0.9^{ab}

表 4 皮肤抗氧化酶活性

Table 4 Antioxidase activity in skin

组别	GSH-Px 活性/(U/mg)	SOD 活性/(U/ mg)	CAT 活性/(U/ mg)
正常组	766.37±91.09^{d}	44.67±4.95^{c}	25.38±2.70^{d}
D-半乳糖处理组	424.12±66.06^{a}	30.36±4.31^{a}	18.80±1.15^{a}
VC 对照组	590.68±42.30^{c}	40.55±5.68^{bc}	21.18±1.68^{c}
低剂量荔枝玫瑰酒组	464.37±43.28^{ab}	33.69±6.49^{ab}	19.64±0.44^{ab}
中剂量荔枝玫瑰酒组	517.30±48.01^{abc}	37.94±3.38^{bc}	19.94±0.71^{abc}
高剂量荔枝玫瑰酒组	551.65±72.38^{bc}	39.38±2.19^{bc}	20.07±0.59^{bc}

表 5 血浆炎症因子质量浓度

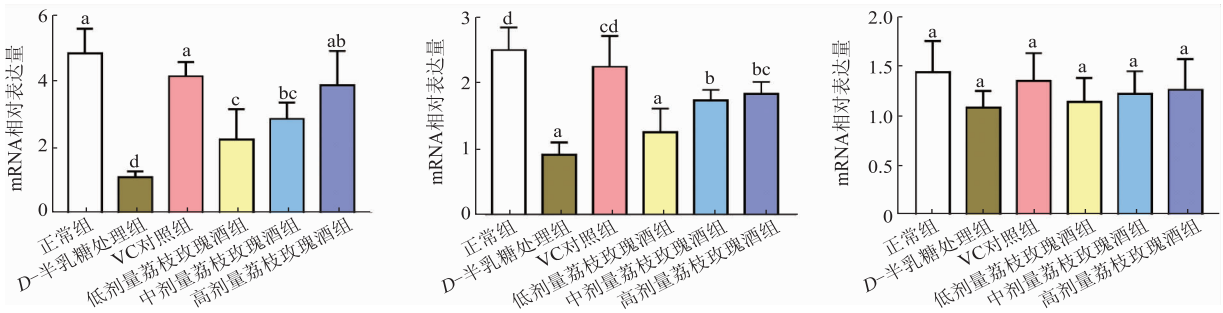
Table 5 Inflammatory factor content in plasma

组别	TNF-α 质量浓度/(ng/L)	IL-1 质量浓度/(ng/L)	IL-6 质量浓度/(pg/mL)	IL-10 质量浓度/(pg/mL)
正常组	295.88±31.30^{a}	38.25±6.03^{a}	25.88±4.20^{a}	329.45±13.96^{c}
D-半乳糖处理组	402.18±16.57^{c}	80.22±13.34^{d}	41.80±8.00^{c}	237.81±25.27^{a}
VC 对照组	322.12±29.53^{a}	47.22±6.35^{ab}	27.94±3.90^{ab}	312.36±4.59^{c}
低剂量荔枝玫瑰酒组	380.83±44.34^{bc}	77.11±6.83^{d}	38.22±4.91^{c}	260.27±10.24^{ab}
中剂量荔枝玫瑰酒组	339.10±25.16^{ab}	63.60±5.50^{c}	35.30±2.72^{bc}	262.45±22.74^{b}
高剂量荔枝玫瑰酒组	330.68±42.29^{a}	53.23±7.82^{bc}	30.12±5.66^{ab}	282.44±16.03^{b}

2.5 荔枝玫瑰酒对小鼠皮肤胶原蛋白代谢相关基因表达水平的影响

TGF-β1 是细胞生长分化的调控者，主要负责促进胶原蛋白前体基因(*COl1a1*、*COl3a1*)的合成[18]。与之相反,MMPs 是一类降解胶原蛋白的内肽酶,其中 MMP-1 和 MMP-8 主要催化Ⅲ型和Ⅰ型胶原蛋白降解[19]。研究发现,炎症因子浸染会激活核因子激活的 B 细胞的 κ-轻链增强子(NF-κB),使 MMPs 表达增多,加剧分解胶原蛋白,导致胶原蛋白减少。转录因子 AP-1 可以调节 TGF-β1 和几种 MMPs 的转录,AP-1 活化,抑制了 TGF-β 的表达,上调了MMPs 的表达,使胶原蛋白分泌减少,胶原分解增加[20]。

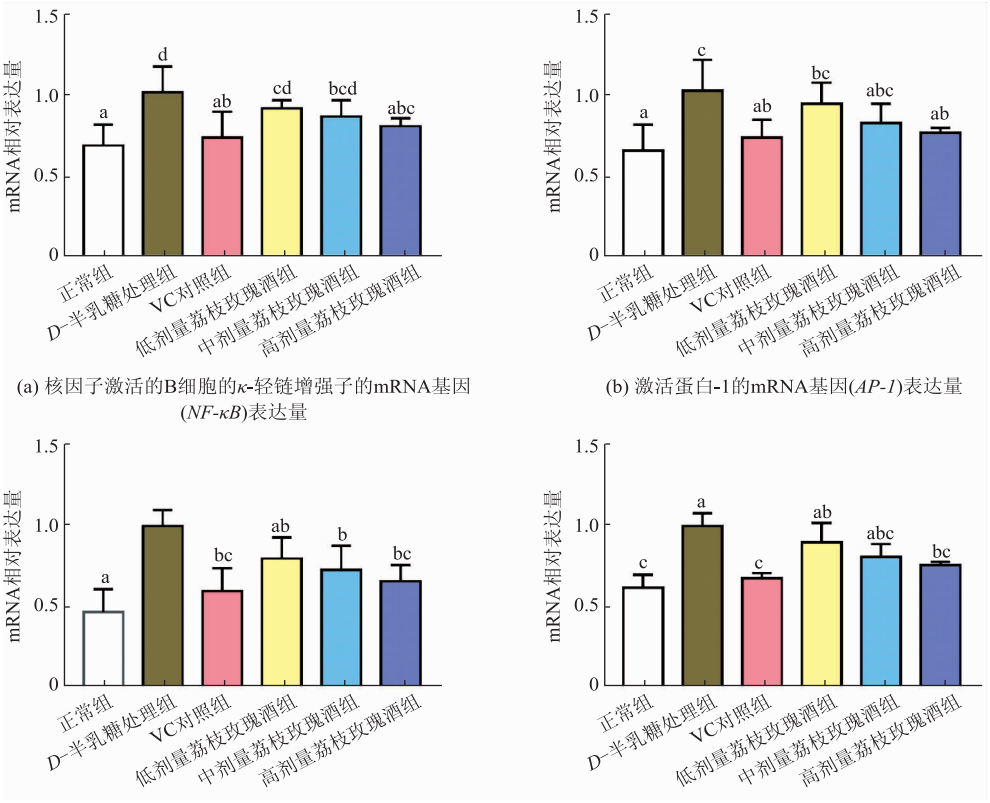
如图 4~5 所示,与正常组相比,*D*-半乳糖处理导致小鼠皮肤 TGF-β1 mRNA 表达水平显著下调,NF-κB、AP-1、MMP-1 及 MMP-8 mRNA 的表达显著上调($P<0.05$),这可能是导致衰老小鼠皮肤胶原蛋白含量减少、含水率降低的主要原因之一。而饲喂高剂量的荔枝玫瑰酒能显著上调 TGF-β1 和 COl1a1 mRNA 的表达，抑制 NF-κB、AP-1、MMP-1 及 MMP-8 mRNA 的表达水平($P<0.05$)。结果表明,荔枝玫瑰酒改善衰老皮肤状态可能与提高皮肤胶原纤维合成与抑制胶原纤维分解相关基因的表达水平有关。



(a) 转化生长因子-β的mRNA基因 (*TGF-β1*) 表达量　(b) Ⅰ型胶原蛋白前体的mRNA基因 (*COl1a1*) 表达量　(c) Ⅲ型胶原蛋白前体的mRNA基因 (*COl3a1*) 表达量

图 4 皮肤胶原合成基因 mRNA 表达水平

Fig. 4 mRNA expression level of collagen synthesis gene in skin



(a) 核因子激活的B细胞的κ-轻链增强子的mRNA基因(*NF-κB*)表达量

(b) 激活蛋白-1的mRNA基因(*AP-1*)表达量

(c) 基质金属蛋白酶-1的mRNA基因(*MMP-1*)表达量

(d) 基质金属蛋白酶-8的mRNA基因(*MMP-8*)表达量

图 5　皮肤胶原分解基因 mRNA 表达水平

Fig. 5　mRNA expression level of collagen decomposition gene in skin

2.6　荔枝玫瑰酒对小鼠皮肤抗氧化相关基因表达水平的影响

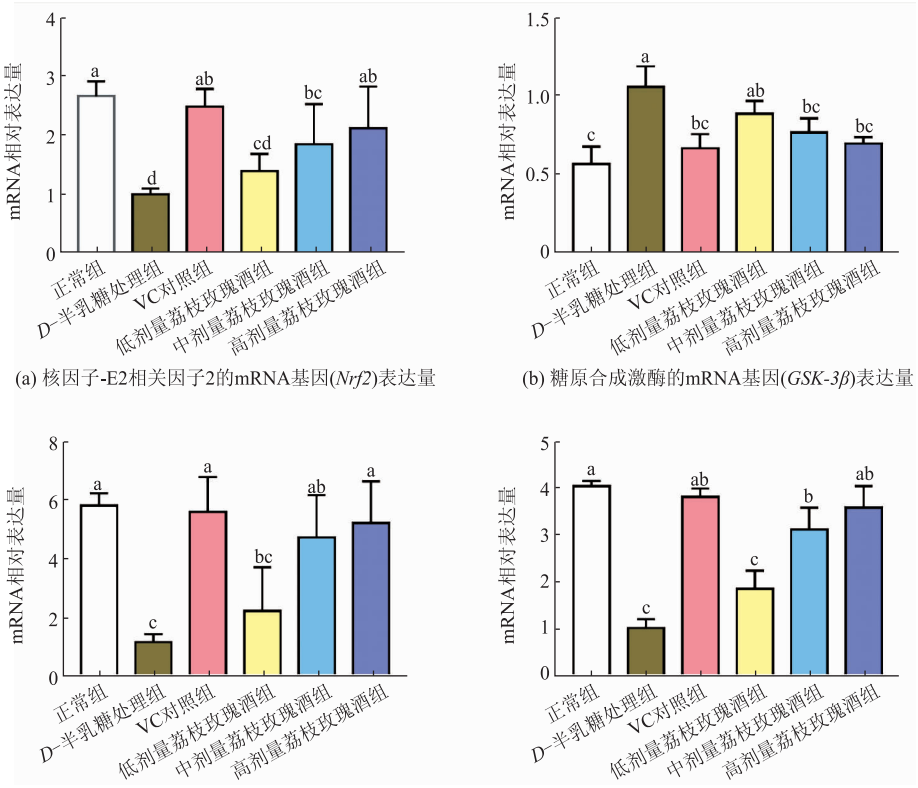
Nrf2/GSK-3β 是细胞内重要的抗氧化信号通路,对胶原蛋白代谢意义重大[21]。正常条件下,活化的核因子-E2 相关因子 2(Nrf2)被 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)抑制[22]。当 ROS 等应激物增加时,促进 Keap1 半胱氨酸残基氧化,诱导 Nrf2 释放与活化,介导 Nrf2 易位至细胞核与抗氧化反应元件结合,启动多种抗氧化酶表达,如血红素加氧酶 1(HO-1)、NADPH 醌氧化还原酶(NQO1)等[23]。GSK-3β 是一种糖原合成激酶,介导 Nrf2 磷酸化,使其被降解,抑制抗氧化信号通路[24]。

与正常组相比,*D*-半乳糖皮下注射显著下调了衰老小鼠皮肤 Nrf2、HO-1 及 NQO1 mRNA 相对表达水平(P<0.05),上调 GSK-3β 相对表达水平(P<0.05)(见图 6),这表明皮肤抗氧化通路被抑制。与之相反,饲喂中、高剂量荔枝玫瑰酒可部分恢复上述基因表达水平,且高剂量效果最好,表明荔枝玫瑰酒的抗氧化保护作用可能与调节抗氧化通路关键因子的基因表达水平有关。

2.7　讨论

皮肤作为机体的第一道屏障,发生衰老的概率与其他组织相比较高[24]。自由基衰老学说认为,当皮肤长期受到紫外线照射、不良生活习惯(如吸烟以及高能量膳食模式等)作用下,自由基大量生成,超出机体所能清除速度时,会造成自由基和抗氧化系统失衡。一方面,过剩的自由基参与细胞内反应,氧化损伤生物膜,导致皮肤干燥松弛和重要性能丧失,加剧皮肤衰老[25-27]。另一方面,炎症因子浸染,通过激活 NF-κB,使 MMPs mRNA 表达增多,降解胶原纤维等,羟脯氨酸生成减少,胶原蛋白断裂紊乱,最终使皮肤硬化衰老[24]。

作者通过构造小鼠衰老模型,初步探讨了荔枝玫瑰酒对衰老皮肤的干预作用。结果表明,饲喂高剂量荔枝玫瑰酒 6 周可部分恢复 *D*-半乳糖诱导的小鼠皮肤含水率(水分质量分数)、羟脯胺酸、胶原蛋白质量分数(P<0.05),支撑皮肤真皮层并且抑制其萎缩、改善胶原纤维含量及胶原束空间密度,降



(a) 核因子-E2相关因子2的mRNA基因(*Nrf2*)表达量　(b) 糖原合成激酶的mRNA基因(*GSK-3β*)表达量

(c) 血红素加氧酶 1的mRNA基因(*HO-1*)表达量　(d) NADPH 醌氧化还原酶的mRNA基因(*NQO1*)表达量

图 6　皮肤抗氧化相关基因 mRNA 表达水平

Fig. 6　mRNA expression level of antioxidant related gene in skin

低皮肤ROS、MDA 和炎性因子含量(P<0.05),显著提高抗氧化能力。可见,适宜剂量的荔枝玫瑰酒具有提高衰老小鼠皮肤抗氧化能力、抑制氧化应激和炎症反应、缓解皮肤衰老的作用。

许多植物活性成分具有调节机体功能、延缓衰老的作用,如多酚、黄酮类物质等。已有研究表明,姜黄素可增加 Nrf2 介导的 NQO1 表达水平[25];有研究者指出荔枝、玫瑰中富含多酚、黄酮类物质并具有较好的抗氧化抗炎能力[26-27]。作者所在实验室前期结果显示,荔枝玫瑰酒较好地保留了荔枝和玫瑰的植物活性成分,其中多酚、黄酮以及单宁等活性成分,分别达到 254.32、430.00、123.25 μg/mL,其中多酚含量显著高于市售的樱桃酒和桑椹红酒,与赤霞珠葡萄酒含量相近[28-31]。同时,体外抗氧化研究显示,荔枝玫瑰酒对自由基的清除能力显著高于荔枝酒、玫瑰酒、葡萄酒和蓝莓酒。植物多酚和黄酮类物质一方面具有良好的抗氧化功能,能够直接清除机体内自由基,另一方面可通过与细胞炎症信号分子结合,激活抗氧化信号蛋白通路,减少炎性因子的浸染及氧化反应导致的皮肤老化[32]。Sarin 等指出在肝损伤小鼠的肝脏细胞中,荔枝中的酚类物质可增加其抗氧化酶活性,减少线粒体 ROS 生成,发挥抗氧化功效[31]。薛丽香等指出,绿茶中EGCG 能降低 UVB 诱发的皮肤炎症, 减少皮肤氧自由基产生,具有保护皮肤的作用[30]。高爱莉等报道,在无毛鼠的光老化实验中,茶多酚可上调 Nrf2 蛋白通路,增加抗氧化酶表达,起到一定的保护皮肤正常生理功能的功效[29]。因此,综合上述研究结果推测,荔枝玫瑰酒延缓小鼠皮肤衰老的功效与其含有丰富的植物活性成分密切相关。

3 结　语

作者研究了一款荔枝玫瑰酒延缓小鼠皮肤衰老的作用。结果显示饲喂高剂量荔枝玫瑰酒可部分改善衰老小鼠皮肤理化性能,增加真皮层厚度和胶原纤维含量,强化衰老小鼠皮肤抗氧化能力;同时通过上调抗氧化基因 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* 和皮肤胶原蛋白合成基因 *TGF-β1* mRNA 表达水平及恢复分

解相关基因 *MMP-1* 及 *MMP-8* mRNA 表达水平,增强胶原蛋白合成能力。荔枝玫瑰酒延缓皮肤衰老的功效可能与其含有丰富的植物活性成分密切相关。

参考文献:

[1] HARMAN D. Aging:a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. **Journal of Gerontology**,1956,11(3):298-300.

[2] SOHAL R S,MOCKETT R J,ORR W C. Current issues concerning the role of oxidative stress in aging:a perspective[J]. **Results and Problems in Cell Differentiation**,2000,29:45-66.

[3] 陈厚彬. 荔枝产业发展报告[J]. 现代农业装备,2018(4):22-24.

[4] BHOOPAT L,SRICHAIRATANAKOOL S,KANJANAPOTHI D,et al. Hepatoprotective effects of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.):a combination of antioxidant and anti-apoptotic activities[J]. **Journal of Ethnopharmacology**,2011,136(1):55-66.

[5] 苏东晓,张瑞芬,张名位,等. 荔枝果肉酚类物质大孔树脂分离纯化工艺优化[J]. 中国农业科学,2014,47(14):2897-2906.

[6] 杨新征,杨德,张跃华. 玫瑰的价值及开发前景[J]. 新疆农业科学,2004(2):110-112.

[7] 赵丹,曹玉峰,丁文玉,等. 玫瑰发酵液的抗氧化及美白功效探究[J]. 食品与机械,2017,33(9):141-145.

[8] 李晓娟,孟君,徐莹,等. 荔枝玫瑰酒的营养成分分析与皮肤抗氧化功效研究[J]. 中国酿造,2020,39(10):96-102.

[9] SCOTT M M D,SAAD A M D,MAURICIO L M M D. Pro:moderate alcohol use is beneficial in nonalcoholic steatohepatitis[J]. **Clinical Liver Disease**,2018,11(2):35-38.

[10] 马忠明. 芦笋醋饮料的研制及其降血脂实验研究[J]. 食品科技,2009,34(7):51-54.

[11] LOPEZOTIN C,BLASCO M A ,PARTRIDGE L ,et al. The hallmarks of aging[J]. **Cell**,2013,153(6):1194-1217.

[12] HOU H,LI B,ZHANG Z,et al. Moisture absorption and retention properties,and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin[J]. **Food Chemistry**,2012,135(3):1432-1439.

[13] TIGGES J. The hallmarks of fibroblast ageing[J]. **Mechanisms of Ageing & Development**,2014,138(1):26-44.

[14] DO T T,BAILEY E C,WANG F,et al. Targeted broadband ultraviolet B phototherapy improves disorders characterized by increased dermal matrix[J]. **The British Journal of Dermatology**,2009,161(6):1405-1407.

[15] FISHER G J,KANG S,VARANI J,et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging[J]. **Archives of Dermatology**,2002,138(11):1462-1470.

[16] VAN BUITEN C B,LAMBERT J D,ELIAS R J. Green tea polyphenols mitigate gliadin-mediated inflammation and permeability *in vitro*[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**,2018,21(3):70-87.

[17] WAN H,YU C,HAN Y,et al. Flavonols and carotenoids in yellow petals of rose cultivar(rosa sun city) a possible rich source of bioactive compounds[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2018,44(15):3133-3143.

[18] 张再超. 高糖及糖基化终末产物减少皮肤成纤维细胞胶原蛋白合成的机制初探[D]. 上海:华东师范大学,2009.

[19] 葛明盖. 810 nm 半导体激光照射对小鼠皮肤胶原影响的机制研究[D]. 上海:第二军医大学,2015.

[20] PANTANO C,REYNAERT N L,VLIET A,et al. Redox-sensitive kinases of the Nuclear Factor-κB signaling pathway[J]. **Antioxidants and Redox Signaling**,2006,8(9/10):1791-1806.

[21] WISDOM R. AP-1:one switch for many signals[J]. **Experimental Cell Research**,1999,253(1):180-185.

[22] BUENDIA I,MICHALSKA P,NAVARRO E,et al. Nrf2-ARE pathway:an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases[J]. **Pharmacology Therapeutics**,2016,157:84-104.

[23] JUNG K A,KWAK M K. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants[J]. **Molecules**,2010,15(10):7266-7291.

[24] 刘晶. 地芝丸延缓皮肤衰老的作用及机制研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2019.

[25] ERLANK H,ELMANN A,KOHEN R,et al. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H_2O_2,semiquinones,and quinones[J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2011,51(12):2319-2327.

[26] ZHANG R,ZENG Q,DENG Y,et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China[J]. **Food Chemistry**,2013,136(3/4):1169-1176.

[27] JAIMAND K,REZAEE M B,ASAREH M H,et al. Determination of flavonoid compounds in *Rosa damascene* Mill[J]. **Journal of Medicinal Plants**,2010,9(36):161-188.
[28] 王昱,何九军,张宗舟. 白肉灵芝水提物对衰老大鼠皮肤的作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(12):2131-2136.
[29] 高爱莉,周欣,江娜,等. Nrf2 及其下游抗氧化因子在茶多酚防御 UVB 致无毛鼠皮肤急性光损伤中的表达及意义[J]. 中国皮肤性病学杂志,2017,31(8):26-29.
[30] 薛丽香,苏旭. 绿茶中多酚抗氧化剂(一)- 表没食子儿茶素 -3- 没食子酸酯降低紫外线 B 诱发的人皮肤炎症反应和白细胞浸润[J]. 国外医学·放射医学核医学分册,1999(6):287.
[31] SARIN N B,PRASAD U S,KUMAR M,et al. Litchi breeding for genetic improvement[M]. Berlin: Springer,2009.
[32] WU S,YANO S,HISANAGA A,et al. Polyphenols from *Lonicera caerulea* L. berry attenuate experimental nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting proinflammatory cytokines productions and lipid peroxidation[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**,2017,61(4):1-20.

科 技 信 息

加拿大允许奶和人造奶油中使用高含量的强化维生素 D

2022 年 2 月 1 日,加拿大卫生部宣布允许生产厂自愿性提高牛奶、羊奶、人造奶油中维生素 D 含量。提高奶和人造奶油中维生素 D 含量会最终成为强制性要求,这将取决于未来相关法规的实施情况。加拿大要求相关牛奶中维生素 D 质量浓度须为 2 μg/dL。相关羊奶中维生素 D 质量浓度须为 2 μg/dL。相关人造奶油中维生素 D 质量分数须为 26 μg/kg。该要求自在加拿大联邦公报上发布之日起生效。

[信息来源]海关总署 .加拿大允许奶和人造奶油中使用高含量的强化维生素 D[EB/OL]. (2022-2-15).http://www.tbtguide.com/xwdt/gwxw/202202/t20220215_1982889.html