



热灭活植物乳杆菌 ATCC 8014 对 UVB 暴露皮肤细胞的抗光老化和抗黑色素生成作用研究

龚淼, 徐京, 郑斌, 闻正顺, 宋燕*, 张晓芳, 孟令婷

浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江 舟山 316022

龚淼, 徐京, 郑斌, 闻正顺, 宋燕, 张晓芳, 孟令婷. 热灭活植物乳杆菌 ATCC 8014 对 UVB 暴露皮肤细胞的抗光老化和抗黑色素生成作用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2681-2698.

GONG Miao, XU Jing, ZHENG Bin, WEN Zhengshun, SONG Yan, ZHANG Xiaofang, MENG Lingting. Anti-photoaging and anti-melanogenesis effects of heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 on UVB-exposed skin cells[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2681-2698.

摘要:【目的】中波紫外(ultraviolet B, UVB)照射是导致皮肤光老化形成和色素沉着的主要环境原因之一。植物乳杆菌是一种广泛研究的益生菌。本研究利用 UVB 照射皮肤细胞[正常人皮肤成纤维细胞(normal human dermal fibroblast, NHDF)和小鼠 B16F10 黑色素瘤细胞], 探讨热灭活植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, LP) ATCC 8014 的抗光老化和抗黑色素生成作用。【方法】以暴露于 UVB 的 NHDF 细胞和小鼠 B16F10 黑色素瘤细胞为研究对象, 用甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法、末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记(terminal-deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)染色分析和 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorofluorescein diacetate DCFH-DA)染色分析实验检测 2 组细胞的细胞活力、DNA 损伤及相对活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 利用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 NHDF 细胞中的 I 型胶原蛋白水平; 通过 NaOH 裂解法和多巴氧化法对 B16F10 细胞黑色素生成和酪氨酸酶活性进行测定; 通过 qRT-PCR 分析和 Western blotting 分析检测光老化和黑色素生成相关基因和蛋白表达水平变化。【结果】(1) LP 抑制 UVB 诱导的 NHDF 和 B16F10 细胞毒性, 这与减少 ROS 介导的细胞 DNA 损伤有关; (2) LP 下调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1、MMP-3 和 MMP-9 (而不是 MMP-2) mRNA 水平[与抑制细

资助项目: 浙江省教育厅省属高校基本科研业务费(2021J011); 浙江海洋大学人才引进科研基金(11135090621, 11135090320)

This work was supported by the Basic Scientific Research Operating Expenses of Zhejiang Provincial Universities (2021J011) and the Special Fund for Introduced Talent to Initiate Scientific Research of Zhejiang Ocean University (11135090621, 11135090320).

*Corresponding author. E-mail: songy@zjou.edu.cn

Received: 2022-10-15; Accepted: 2023-02-27; Published online: 2023-03-03

胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK), p38 (而不是 JNK)/c-Fos (而不是 c-Jun)信号通路有关], 增加 I 型前胶原(procollagen type-1 alpha 1, COL1A1)蛋白水平, 从而提高 I 型胶原蛋白含量;(3) LP 作为自噬诱导剂(增加 LC3-II 和 Beclin 1 蛋白水平以及 LC3-II/LC3-I 比率)抑制酪氨酸酶、酪氨酸相关蛋白(tyrosinase-related protein, TYRP)-1 和 TYRP-2 活性和/或表达(与抑制 PKA/CREB/MITF 信号通路有关), 从而降低黑色素含量。【结论】LP 在 UVB 暴露的皮肤细胞中具有潜在的抗光老化和抗黑色素生成作用。

关键词: 热灭活植物乳杆菌 ATCC 8014; 抗光老化; 抗黑色素生成; 中波紫外(UVB); 皮肤细胞

Anti-photoaging and anti-melanogenesis effects of heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 on UVB-exposed skin cells

GONG Miao, XU Jing, ZHENG Bin, WEN Zhengshun, SONG Yan^{*}, ZHANG Xiaofang, MENG Lingting

College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Ultraviolet B (UVB) irradiation is one of the main environmental causes of skin photoaging and hyperpigmentation. *Lactobacillus plantarum* is a well-studied species of probiotics that can benefit human health. The present study investigated the anti-photoaging and anti-melanogenesis effects of heat-inactivated *L. plantarum* (LP) ATCC 8014 on the skin cells (normal human dermal fibroblast (NHDF) cells and B16F10 murine melanoma cells) exposed to UVB irradiation. **[Methods]** The viability, DNA damage, and reactive oxygen species (ROS) levels of NHDF and B16F10 cells were determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, terminal-deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay, and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), respectively. The level of collagen I in NHDF cells was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The melanin production and tyrosinase activity in B16F10 cells were measured by NaOH lysis method and L-DOPA oxidation method, respectively. qRT-PCR and Western blotting were employed to measure the expression levels of genes and proteins associated with photoaging and melanin production. **[Results]** (1) LP inhibited UVB-induced cytotoxicity by reducing the ROS-mediated DNA damage in NHDF and B16F10 cells; (2) LP down-regulated the mRNA levels of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-9 (rather than MMP-2), relating to inhibit the extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 (rather than JNK)/c-Fos (rather than c-Jun) signaling pathway. It up-regulated the protein level of procollagen type-1 alpha 1 (COL1A1), thereby increasing the content of type I collagen; (3) LP as an autophagy inducer (up-regulating the protein levels of LC3-II and Beclin 1 and increasing the LC3-II/LC3-I ratio) inhibited the activities and/or expression of tyrosinase, tyrosinase-related protein (TYRP)-1, and TYRP-2 by inhibiting the PKA/CREB/MITF signaling pathway, thereby

decreasing the melanin content. **[Conclusion]** LP has potential anti-photoaging and anti-melanogenesis effects on the skin cells exposed to UVB.

Keywords: heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; anti-photoaging; anti-melanogenesis; ultraviolet B (UVB); skin cells

皮肤是人体抵御外部有害因素入侵的主要屏障^[1]。紫外线(ultraviolet, UV)照射(包括 UVA、UVB 和 UVC)是造成皮肤损伤的主要环境因素之一^[2]。其中,中波紫外(ultraviolet B, UVB)辐射是 UV 光谱中对皮肤伤害最大的部分,会导致过早光老化和色素沉着^[3]。目前,一些天然提取物和人工合成化合物,如曲酸、 α -羟基酸、对苯二酚及其衍生物和汞衍生物等,被用作抗光老化和美白产品的活性成分。但是,以上成分要么价格昂贵,要么具有副作用^[4-5]。因此,寻找价格低廉且安全有效的抗光老化和抗黑色素生成的活性物质对预防和减缓 UVB 诱导的皮肤光老化形成和色素沉着具有重要意义。大量研究已证实,皮肤的微生态系统与皮肤健康状况密切相关,通过益生菌调控皮肤微生态成为促进皮肤健康的新手段。然而,使用活性益生菌的安全性仍然是一个有争议的问题。口服活性益生菌的主要风险是易位引起的全身感染,特别是在免疫力较弱的人群中。为了避免以上风险,人们将注意力转向热灭活的益生菌。现有研究表明,热灭活益生菌在保护皮肤健康方面具有与活性益生菌相似的优势,例如促进皮肤伤口愈合和缓解过敏性皮炎^[6-8]。然而,关于热灭活益生菌在抗皮肤光老化和抗黑色素生成中的作用研究较少。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是一种被广泛研究的益生菌菌种^[9]。先前的研究发现,热处理可以导致植物乳杆菌细胞壁破裂,产生菌体成分(如脂磷壁酸、胞外多糖和衍生肽)和代谢物(如蛋白质、有机酸、多酚和类黄酮化合物)^[10-14]。据报道,从植物乳杆菌中分离的脂磷壁酸可以减缓人类皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblast, HDF)

的光老化,抑制小鼠 B16F10 黑色素瘤细胞的黑色素生成^[15-16]。表明热灭活植物乳杆菌可能存在抗光老化和抗黑色素生成的作用,有待进一步研究。

光老化是导致皮肤老化的主要外因,80%以上的面部老化均由光老化引起^[17]。光老化受到多种因素的影响,其中真皮层中 I 型胶原蛋白合成的逐渐减少是皮肤光老化形成的原因之一^[18]。I 型胶原蛋白的前体是 I 型前胶原,可被基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)降解^[19]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activates protein kinases, MAPK)家族蛋白[包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38]参与激活蛋白-1(activates protein-1, AP-1, 包括 c-Jun 和 c-Fos)转录因子的激活,促进 MMPs 表达从而导致光老化^[20]。然而,目前还没有关于 LP 对皮肤光老化形成的影响及相关机制研究。研究发现,热灭活鼠李糖乳杆菌 GG 抑制了人类原始滋养层细胞中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 和蛋白质的表达^[21];降低 TNF- α 水平可以延缓人皮肤中 I 型胶原蛋白的降解,并下调 HDF 细胞中 MMP-1 的表达^[22-23]。Kim 等揭示,硫氧还蛋白相互作用蛋白衍生肽能抑制 RAW 264.7 细胞中的 p38MAPK 和 AP-1 表达^[24],提示 LP 可能通过抑制 MAPK/AP-1 信号传导而增加 I 型胶原蛋白水平,从而发挥抗光老化作用,值得进一步研究。

黑色素的合成主要受酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (tyrosinase-associated protein 1, TYRP-1)和酪氨酸酶相关蛋白 2 (TYRP-2)等黑色素生成酶的调节^[25]。这些黑色

素生成酶的表达通常由小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-related transcription factors, MITF)调节, MITF 诱导黑色素生成的信号通路主要涉及cAMP依赖蛋白激酶(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(reaction element binds to proteins, CREB)轴^[26]。研究发现, B16F10 黑色素瘤细胞中 PKA/CREB 介导的黑色素生成在激活自噬时受到抑制^[27]。LC3 和 Beclin 1 通常被认为是自噬的标志蛋白^[28]。然而, 目前尚无关于 LP 对皮肤黑色素生成的影响及其相关机制的报道。Park 等^[29]发现, 热灭活的植物乳杆菌下调了大鼠肠道中白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1 β)的表达。IL-1 β 分泌减少下调了 HaCaT 细胞中的 MITF 和 TYR/TRP-1 表达, 从而抑制黑色素的生成^[30]。据报道, 灭活的嗜酸乳杆菌 KCCM12625P 能抑制 B16F10 细胞中的 PKA/CREB 信号^[31]。此外, 黄酮类化合物是热灭活植物乳杆菌中的一种代谢物^[10]。Wei 等^[32]发现黄酮类化合物可以上调人单核细胞系 THP-1 中 LC3-II 和 Beclin 1 的表达。以上结果表明, LP 可能通过抑制自噬介导的 PKA/CREB/MITF 信号通路, 降低黑色素生成酶水平(活性或表达), 从而发挥抗黑色素生成作用, 值得进行进一步研究。

因此, 我们假设 LP 可能具有抗光老化和抗黑色素生成的作用。为了证实这一假设, 以暴露于 UVB 照射的正常人皮肤成纤维细胞(normal human dermal fibroblast, NHDF)和小鼠 B16F10 黑色素瘤细胞为研究对象, 探讨 LP 对 I 型胶原蛋白水平和黑色素产生的影响以及潜在的调控机制, 本研究为 LP 作为有效成分应用于抗光老化和美白化妆品中提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

植物乳杆菌 ATCC 8014, 美国菌种保藏中心

(ATCC); NHDF 和 B16F10 细胞, 广东华拓生物科技有限公司; DMEM 培养基和胎牛血清, BBI 生命科学有限公司; MTT 检测试剂盒和一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; DAPI 溶液(即用型), 北京索莱宝科技有限公司; 相对活性氧(reactive oxygen species, ROS)染色试剂盒, 南京建成生物工程研究所; I 型胶原蛋白酶联免疫测试试剂盒, 上海源桔生物科技公司; 引物合成, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PrimeScriptTM RT 和 PrimeScript RT 试剂盒, TaKaRa 公司; p-ERK 抗体(AP0472)、ERK 抗体(A4782)、p-JNK 抗体(AP0276)、JNK 抗体(A4867)、p-p38 抗体(AP0526)、p38 抗体(A4771)、COL1A1 抗体(A1352)、p-c-Fos 抗体(AP0038)、c-Fos 抗体(A0236)、p-c-Jun 抗体(AP0105)、c-Jun 抗体(A0246)、TYR 抗体(A16993)、LC3 抗体(A19665)、Beclin 1 抗体(A7353)、p-PKA 抗体(AP1345)、PKA 抗体(A0798)、p-CREB 抗体(AP0019)、CREB 抗体(A11064)、MITF 抗体(A11649)、 β -actin 抗体(AC038)和 HPR 羊抗兔 IgG 二抗(AS014), 武汉爱博泰克生物科技有限公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器和设备

THZ-82B 气浴恒温振荡器, 金坛市医疗仪器厂; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; FA1004N 分析天平, 上海民桥精密科学仪器有限公司; HH-4S 恒温水浴锅, 上海捷呈实验仪器有限公司; TG20-WS 离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; ZHJH-C1209C 型垂直流超净工作台, 武汉爱斯佩科学仪器有限公司; 二氧化碳培养箱和 MultiskanFC 全自动酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司; CKX41 倒置显微镜, 奥林巴斯; 多功

能荧光酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司生产; T100 PCR 仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 迷你垂直电泳仪, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 化学发光成像系统, ProteinSimple 公司等。

1.3 热灭活植物乳杆菌(LP) ATCC 8014 的准备

LP 制备根据 Shukla 等^[33]的方法进行。将冻干的植物乳杆菌 ATCC 8014 在 MRS 肉汤中 37 °C 培养 24 h, 传代 2 次。离心(4 500 r/min, 5 min), 80 °C 下加热灭活 20 min, 然后将热灭活的菌液涂布在 MRS 琼脂上 37 °C 培养 72 h, 以确认热灭活的有效性。

1.4 细胞培养

NHDF 和 B16F10 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.5 MTT 检测

根据 Ding 等^[34]的方法, 进行 MTT 分析以测定细胞活力。NHDF 和 B16F10 细胞经 LP (1 mg/mL)处理 1 h 后用 UVB 照射(30 mJ/cm²)。孵育 24 h 后, 向细胞中添加 100 μL MTT (2 mg/mL)继续孵育 3 h。弃去培养基及 MTT 试剂, 添加 200 μL DMSO, 振荡混匀后使用酶标仪在 540 nm 处测量吸光度。

1.6 TUNEL 染色分析

根据 Xu 等^[35]的方法, 通过 TUNEL 分析测定细胞 DNA 损伤。用 UVB (30 mJ/cm²)照射 NHDF 和 B16F10 细胞后加入 LP (1 mg/mL)处理 24 h。弃去细胞培养基, 用 4%多聚甲醛固定 25 min 后加入 0.2% Triton X-100 培养 5 min。随后, 向细胞中添加 TUNEL 试剂, 在 37 °C 的黑暗中培养 1 h, 用 PBS 清洗细胞后, 加入 DAPI 试剂在室温下培养 10 min。最后, 用磷酸盐缓冲

液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤细胞 3 次, 用荧光显微镜观察拍照。

1.7 DCFH-DA 染色分析

根据 Hu 等^[36]的方法, 通过 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate DCFH-DA) 染色法测定相对活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平。用 UVB (30 mJ/cm²) 照射 NHDF 和 B16F10 细胞后加入 LP (1 mg/mL) 处理 24 h。然后, 向细胞中添加 DCFH-DA (10 μmol/L), 在 37 °C 下培养 20 min。随后, 在多功能荧光酶标仪下检测荧光强度, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm。将细胞置于荧光显微镜下观察拍照。

1.8 ELISA 检测

根据 Hong 等^[15]的方法, 使用酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 NHDF 细胞中的 I 型胶原蛋白水平。用 UVB (30 mJ/cm²) 照射 NHDF 和 B16F10 细胞后加入 LP (1 mg/mL) 处理 24 h, 收集细胞培养基, 根据生产厂商的说明书测定 I 型胶原蛋白水平。

1.9 黑色素生成和酪氨酸酶活性测定

根据 Liu 等^[37]的方法进行黑色素生成和酪氨酸酶活性测定。用 UVB (30 mJ/cm²) 照射 NHDF 和 B16F10 细胞后加入 LP (1 mg/mL) 处理 24 h。随后, 细胞在 NaOH 溶液 (1 mol/L) 中裂解, 使用酶标仪在 405 nm 处测量每组裂解液中的黑色素总量。此外, 采用多巴氧化法 (L-DOPA) 测定酪氨酸酶活性。培养 24 h 后, 细胞在 RIPA 裂解缓冲液中裂解, 通过离心 (10 000×g, 15 min, 4 °C) 获得上清液。将含有 80 μg 蛋白的细胞上清液和 80 μL L-DOPA (5 mmol/L) 加入 96 孔板中, 在 37 °C 下孵育 30 min。使用酶标仪测量 492 nm 处的吸光度。

1.10 qRT-PCR 分析

根据 Song 等^[38]的方法进行实时荧光定量

PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测。用 UVB (30 mJ/cm²)照射 NHDF 和 B16F10 细胞后加入 LP (1 mg/mL)处理 24 h。使用 RNAiso Plus Kit (TaKaRa)提取总 RNA, 用 PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa)将 RNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 在 T100 PCR 仪上进行 PCR 扩增。结果以 β -actin 为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量, 引物序列见表 1。

1.11 免疫印迹分析

用 UVB (30 mJ/cm²)照射 NHDF 和 B16F10 细胞后加入 LP (1 mg/mL)处理 24 h。Western blotting 分析根据 Song 等^[39]的方法进行。对提取的等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移到 PVDF 膜上并在室温下用 5%脱脂奶封闭 2 h。用相应的一抗(p-ERK、ERK、p-JNK、JNK、p-p38、p38、COL1A1、p-c-Fos、c-Fos、p-c-Jun、c-Jun、TYR、LC3、Beclin 1、p-PKA、PKA、p-CREB、CREB, MITF 和 β -actin 抗体)于 4 °C 孵育过夜后, 加入二抗孵育 2 h。最后, 使用 ECL 发光剂进行显影, 用化学发光成像系统 (ProteinSimple 公司)进行成像, 使用 NIH Image J 1.38 软件对蛋白条带进行定量分析。选择 β -actin

蛋白作为内参蛋白, 目的蛋白信号强度表示为相对于 β -actin 的信号强度, 结果表示为处理组相对于对照组的相对表达。

1.12 统计分析

本研究所得数据均用平均值 \pm 标准差 (means \pm SDs)表示。数据采用 SPSS 23.0 (SPSS Inc.)进行单因素方差分析, 检验处理组之间的差异显著性。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。在相同显著性水平上使用 Pearson 相关性系数法进行分析。

2 结果与分析

2.1 LP 对 NHDF 和 B16F10 细胞活力、DNA 损伤及相对 ROS 水平的影响

LP 对 NHDF 和 B16F10 细胞活力、DNA 损伤和相对 ROS 水平的影响见图 1–3。如图 1A、1B 所示, 与空白组相比, UVB 照射显著降低了 NHDF 与 B16F10 细胞的活力($P < 0.05$)。如图 2A–D 和图 3A–D 所示, 与空白组相比, UVB 照射显著增强了 NHDF 和 B16F10 细胞的 DNA 损伤(TUNEL 阳性细胞率增加)和相对 ROS 水平($P < 0.05$)。LP 可显著逆转 UVB 对 NHDF 和 B16F10 细胞活力、DNA 损伤和相对 ROS 水平的负面影响($P < 0.05$)。

表 1 引物序列表

Table 1 Real-time PCR primer sequences

Gene	Primer sequence (forward) (5'→3')	Primer sequence (reverse) (5'→3')
NHDF cells		
MMP-1	TCTCTT GGA CTCTCCCATCT	AATAAGTACTGGGCTGTTCAGG
MMP-2	GATACCCCTTTGACGGTAAGGA	CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC
MMP-3	GGTGTGGAGTTCCTGATGTT	TGGTCCCTGTGTATCCTTTG
MMP-9	TGTACCGCTATGGTTACACTCG	GGCAGGGACAGTTGCTTCT
β -actin	GGATTCTATGTGGGCGACGA	CGCTCGGTGAGGATCTTCATG
B16F10 cells		
TYR	GTCCACTCACAGGGATAGCAG	AGAGTCTCTGTTATGGCCGA
TYRP-1	ATGGAACGGGAGGACAAACC	TCCTGACCTGGCCATTGAAC
TYRP-2	CAGTTTCCCCGAGTCTGCAT	GTCTAAGGCGCCCAAGAACT
β -actin	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG

MMPs: Matrix metalloproteinases; TYR: Tyrosinase; TYRP: Tyrosinase related protein.

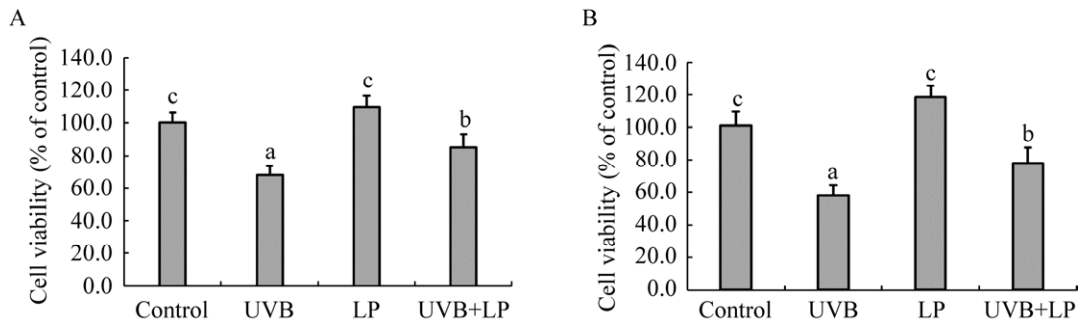


图 1 LP 对 NHDF 细胞(A)和 B16F10 细胞(B)活性的影响

Figure 1 Effects of LP on the viability of NHDF cells (A) and B16F10 cells (B). Results are expressed as the means±SDs ($n=3$). Values having different letters are significantly different ($P<0.05$).

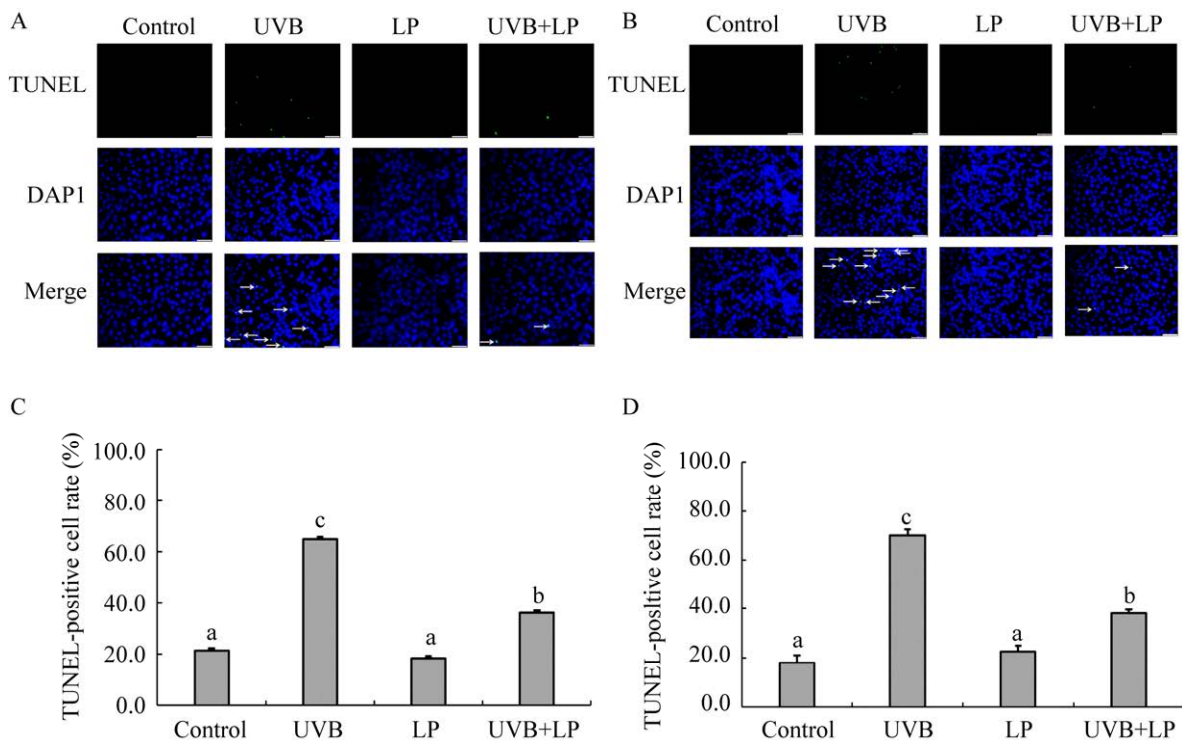


图 2 LP 对 NHDF 细胞(A 和 C)和 B16F10 细胞(B 和 D) DNA 损伤的影响

Figure 2 Effects of LP on DNA damage by TUNEL assay in NHDF cells (A and C) and B16F10 cells (B and D). (A) and (B), photomicrographs (scale bar: 50 μm), white arrows mark green fluorescence. Quantitative analysis of TUNEL-positive cell rate in NHDF cells (C) and B16F10 cells (D). Results are expressed as the means±SDs ($n=3$). Values having different letters are significantly different ($P<0.05$).

2.2 LP 对 NHDF 细胞光老化形成相关参数的影响

LP 对 NHDF 细胞光老化形成相关参数的影

响见图 4。如图 4A 所示, 与空白组相比, UVB 照射显著降低了 NHDF 细胞中 I 型胶原蛋白含量 ($P<0.05$), 而 LP 显著增强了 UVB 导致的 NHDF

细胞中I型胶原蛋白含量的降低。如图 4B-E 所示, 与空白组相比, UVB 照射显著增加了 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 水平以及 p-ERK、p-p38 和 p-c-Fos 蛋白水平($P<0.05$), 而 LP 逆转了 UVB 对 NHDF 细胞的上述负面影响。此外, 与空白组相比, UVB 照射显著降低了 NHDF 细胞的 COL1A1 蛋白水平($P<0.05$), 而 LP 显著增加了 UVB 导致的 NHDF 细胞 COL1A1 蛋白水平的下降($P<0.05$)。ERK、p38、p-JNK、JNK、c-Fos、p-c-Jun 和 c-Jun 蛋白水平在各组间均无显著差异($P>0.05$)。

2.3 LP 对小鼠 B16F10 细胞黑色素生成相关参数的影响

LP 对小鼠 B16F10 细胞中黑色素生成相关参数的影响见图 5。如图 5A-C 所示, 在 B16F10 细胞中 UVB 照射显著提高了黑色素含量、酪氨

酸酶活性以及 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 的 mRNA 水平($P<0.05$), 而 LP 显著降低了 UVB 导致的 B16F10 细胞黑色素含量、酪氨酸酶活性以及 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 mRNA 水平的增强($P<0.05$)。如图 5D、5E 所示, 与空白组相比, UVB 照射显著增加了 B16F10 细胞的 TYR、p-PKA、p-CREB 和 MITF 蛋白水平($P<0.05$), 而 LP 显著降低了 UVB 导致的 B16F10 细胞 TYR、p-PKA、p-CREB 和 MITF 蛋白水平的升高($P<0.05$)。此外, 与空白组相比, UVB 照射显著降低了 B16F10 细胞的 LC3-I、LC3-II、LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin 1 蛋白水平($P<0.05$), 而 LP 显著改善了 UVB 导致的 LC3-I、LC3-II、LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin 1 蛋白水平的降低($P<0.05$)。各组 PKA 和 CREB 蛋白水平无显著差异($P>0.05$)。

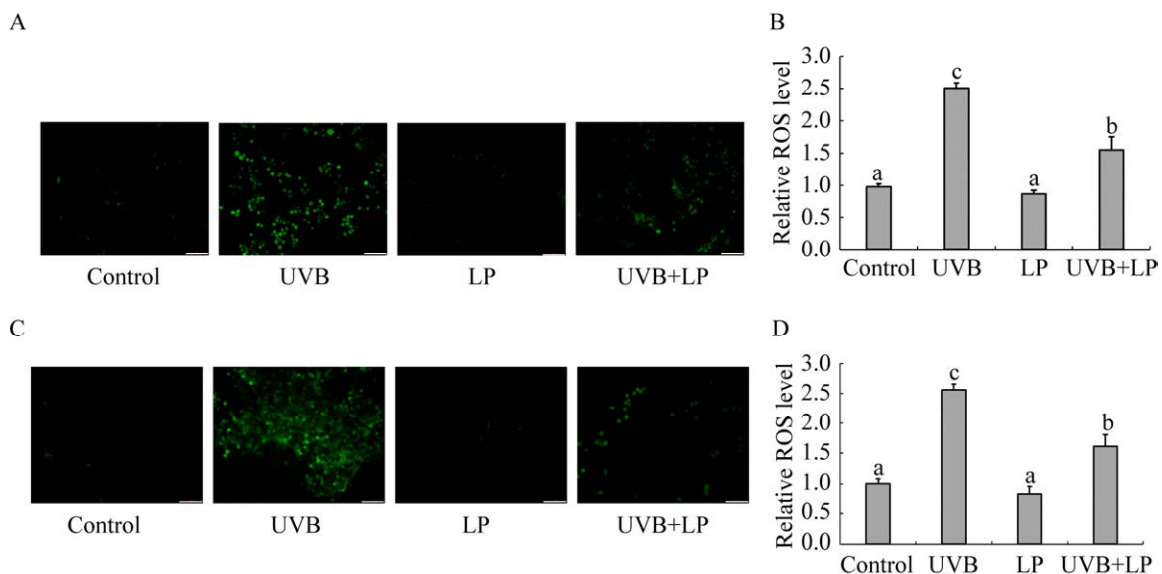


图 3 LP 对 NHDF 细胞(A 和 B)和 B16F10 细胞(C 和 D)中相对 ROS 水平的影响

Figure 3 Effects of LP on relative ROS level in NHDF cells (A and B) and B16F10 cells (C and D). A and C, photomicrographs (scale bar: 100 μ m); B and D, bar diagram. Results are expressed as the means \pm SDs ($n=3$). Values having different letters are significantly different ($P<0.05$).

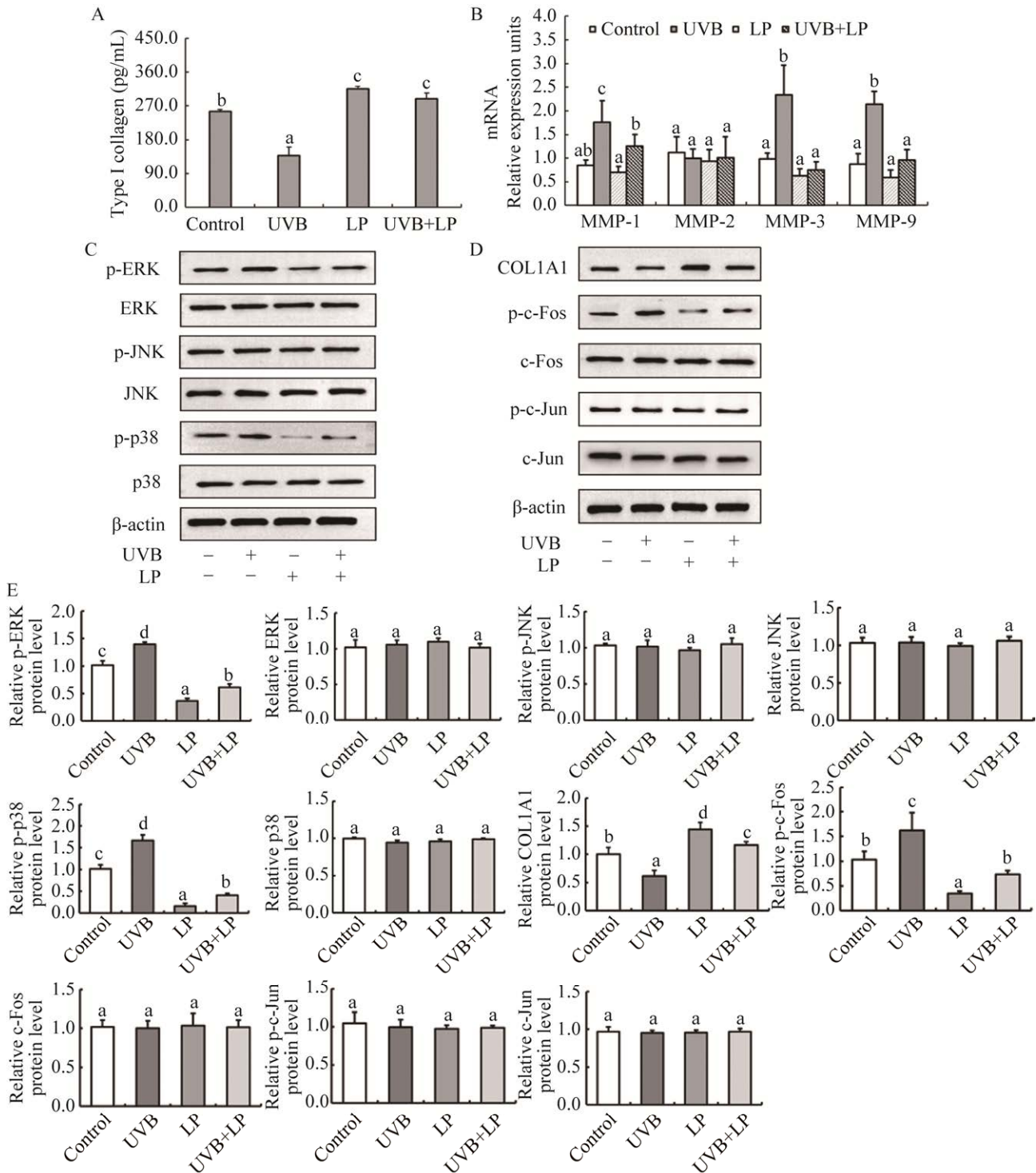


图 4 LP 对 NHDF 细胞中光老化形成相关参数的影响

Figure 4 Effects of LP on photoaging formation-related parameters in NHDF cells. A: Type I collagen content. B: The relative mRNA levels of MMPs. C, D and E: The relative protein levels of p-MAPKs, MAPKs, COL1A1, p-AP-1s, AP-1s. Results are expressed as the means±SDs (n=3). Values having different letters are significantly different (P<0.05).

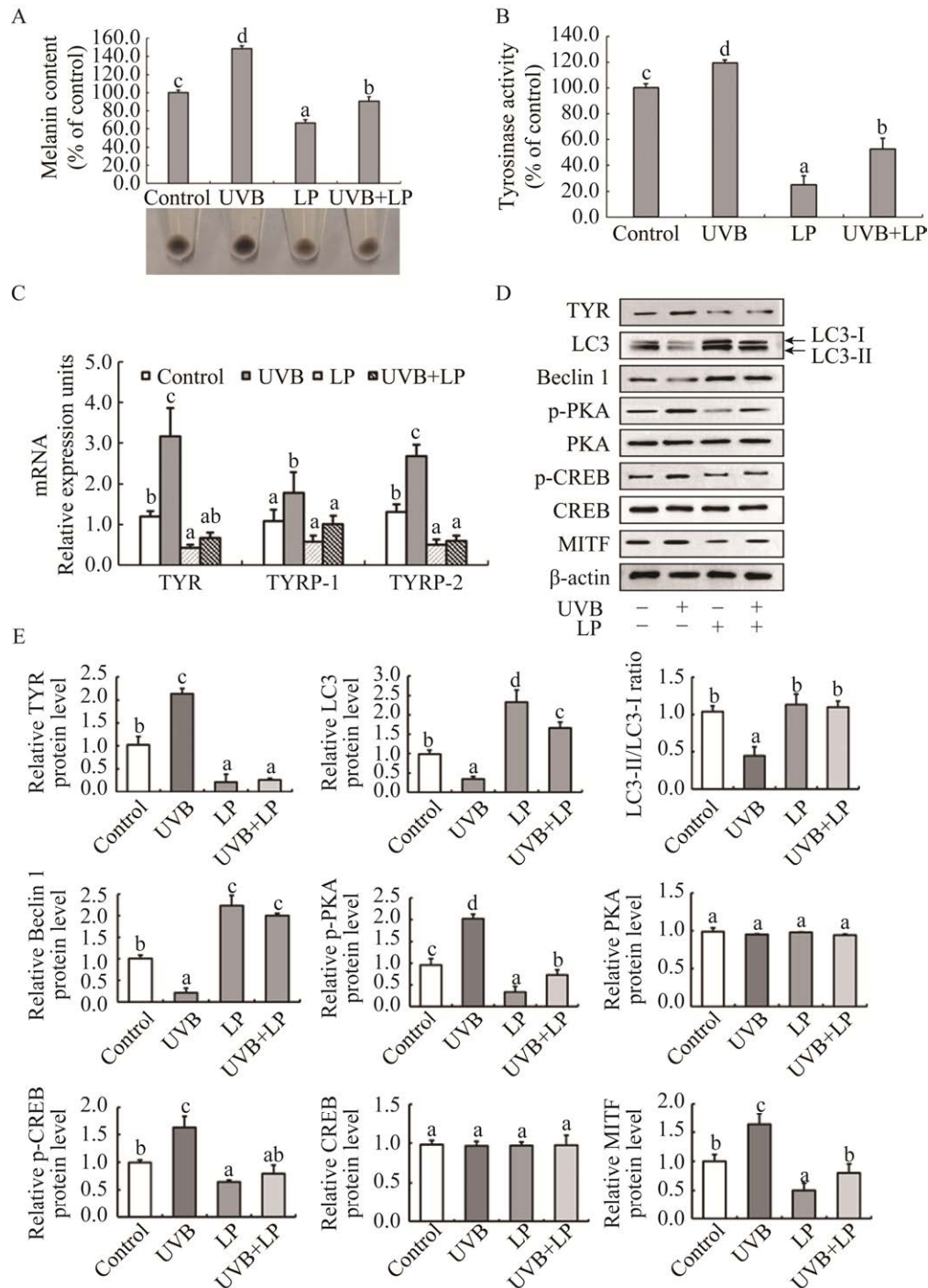


图 5 LP 对 B16F10 细胞黑色素生成相关参数的影响

Figure 5 Effects of LP on melanogenesis-related parameters in B16F10 cells. A: Melanin content. B: Tyrosinase activity. C: The relative mRNA levels of TYRs. D and E: The relative protein levels of TYR, LC3, Beclin 1, p-PKA, PKA, p-CREB, CREB and MITF. Results are expressed as the means±SDs ($n=3$). Values having different letters are significantly different ($P<0.05$).

2.4 抗光老化和抗黑色素生成相关指标的相关性分析

抗光老化和抗黑色素生成相关指标的相关性分析见表 2。如表 2 所示, 在 NHDF 细胞中, p-ERK 和 p-p38 蛋白水平与 p-c-Fos 蛋白水平以及 MMP-1、MMP-3、MMP-9 mRNA 水平呈显

著正相关。在 B16F10 细胞中, p-PKA 蛋白水平与 p-CREB、MITF 和 TYR 蛋白水平, 以及 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 mRNA 水平呈显著正相关; LC3-II 蛋白水平、LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin 1 蛋白水平与 p-PKA、p-CREB 和 MITF 蛋白水平呈显著负相关。

表 2 抗光老化和抗黑色素生成相关指标的相关性分析

Table 2 Correlation coefficient of the anti-photoaging and anti-melanogenesis-related parameters

Independent parameters	Dependent parameters	Correlation coefficients	<i>P</i>
NHDF cells			
p-ERK	p-c-Fos	+0.925	0.000
	MMP-1	+0.653	0.021
	MMP-3	+0.835	0.001
	MMP-9	+0.838	0.001
p-p38	p-c-Fos	+0.927	0.000
	MMP-1	+0.704	0.011
	MMP-3	+0.900	0.000
	MMP-9	+0.903	0.000
B16F10 cells			
p-PKA	p-CREB	+0.961	0.000
	MITF	+0.926	0.000
	TYR (mRNA)	+0.951	0.000
	TYR (protein)	+0.961	0.000
	TYRP-1	+0.836	0.001
	TYRP-2	+0.949	0.000
LC3-II	p-PKA	-0.915	0.000
	p-CREB	-0.891	0.000
	MITF	-0.867	0.000
LC3-II/LC3-I	p-PKA	-0.906	0.000
	p-CREB	-0.931	0.000
	MITF	-0.851	0.000
Beclin 1	p-PKA	-0.945	0.000
	p-CREB	-0.912	0.000
	MITF	-0.881	0.000

3 讨论

光老化形成和色素沉着是长时间暴露于 UVB 辐射所致皮肤损伤的主要特征^[2]。近年来,一些天然和人工合成的化合物被用于改善 UVB 诱导的皮肤光老化形成和色素沉着^[40-41]。然而,这些化合物存在成本高或不安全的缺点。研究发现,热灭活益生菌可以有效改善皮肤健康,且不产生上述负面影响^[7]。因此,本研究中以 UVB 照射的 NHDF 和 B16F10 细胞为研究对象,探讨了 LP 的抗光老化和抗黑色素生成作用。

3.1 LP 抑制 UVB 诱导的 NHDF 和 B16F10 细胞毒性

本研究中,LP 改善了 UVB 导致的 NHDF 和 B16F10 细胞活力降低,表明 LP 可以抑制 UVB 诱导的皮肤细胞毒性。LP 对 UVB 诱导的细胞毒性的保护作用可能与减少 DNA 损伤有关。据报道,UVB 辐射引起的 DNA 损伤可能导致细胞毒性^[42]。研究发现,LP 可以减少 NHDF 和 B16F10 细胞的 DNA 损伤,支持本研究的假设。此外,过多的 ROS 会导致 DNA 氧化损伤^[43]。研究显示,LP 降低了 UVB 诱导的 NHDF 和 B16F10 细胞中 ROS 含量的增加,这表明 LP 降低 DNA 损伤可能与 ROS 含量降低有关,需要进一步研究。

3.2 LP 提高 UVB 暴露 NHDF 细胞中 I 型胶原蛋白含量

光老化是由于皮肤反复暴露于紫外线下而造成的慢性损伤^[44]。I 型胶原蛋白是细胞外基质的主要蛋白质成分,其持续分解会促进皮肤光老化的发生^[45]。COL1A1 是 I 型胶原蛋白的前体,可被 MMPs 降解^[46]。在本研究中,LP 改善了 UVB 导致的 I 型胶原蛋白和 COL1A1 蛋白水平的降低以及 MMP-1、MMP-3、MMP-9 mRNA 水平的上调。此外,MAPK 能激活 AP-1 转录因子,导致 MMPs 表达,从而促进皮肤光老化。

在本研究中,LP 下调了 NHDF 细胞的 p-ERK、p-p38 和 p-c-Fos 蛋白水平。相关分析显示,p-ERK 和 p-p38 蛋白水平与 p-c-Fos 蛋白水平以及 MMP-1、MMP-3、MMP-9 mRNA 水平呈正相关(表 2),表明 LP 降低的 MMPs 表达可能与抑制(ERK, p38)/c-Fos 信号通路有关。以上研究结果表明,LP 可能通过抑制(ERK, p38)/c-Fos 信号通路下调 MMP-1、MMP-3、MMP-9 的 mRNA 水平,导致 COL1A1 蛋白水平上调,进一步提高 NHDF 细胞中 I 型胶原蛋白水平。因此,LP 在 UVB 暴露的皮肤细胞中具有潜在的抗光老化作用。此外,Nam 等^[47]发现,热灭活的韩中大乳球菌可以代谢产生脯氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等。据报道,补充脯氨酸能激活 TGF- β /Smad 信号途径,从而促进鱼鳔胶原蛋白的合成^[48]。Hsieh 等^[49]揭示,热灭活罗伊氏乳杆菌降低了高脂饮食肥胖大鼠的血糖水平。降低 HepG2 细胞中的葡萄糖水平可抑制 NF- κ B 信号通路^[50]。压制 NF- κ B 信号能下调人皮肤成纤维细胞中 MMPs 的表达^[51]。以上结果表明,不同的热灭活益生菌发挥抗光老化作用涉及的信号通路可能不同。

有趣的是,LP 未改变 NHDF 细胞中 MMP-2 mRNA 水平以及 p-JNK 和 p-c-Jun 蛋白水平。首先,LP 降低了 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 (而不是 MMP-2) mRNA 水平。据报道,与正常成纤维细胞相比,患有皮肤松垂症的人皮肤成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 水平的上调倍数明显高于 MMP-2 mRNA 水平^[52]。这一数据表明,与 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 水平相比,UVB 照射下 NHDF 细胞中 MMP-2 mRNA 水平可能更不易受到 LP 的影响,需要进一步研究。其次,LP 降低了 p-ERK 和 p-p38 (而不是 p-JNK)蛋白水平,这可能与瘦素有关。Nam 等^[53]发现,热灭活植物乳杆菌

LRCC5314 下调小鼠附睾脂肪组织中瘦素 mRNA 水平。据报道, 瘦素水平的降低能下调 ATDC5 细胞系中的 p-ERK 和 p-p38 (而不是 p-JNK) 蛋白水平^[54]。因此, 本文推测 LP 可能会降低瘦素水平, 从而下调 NHDF 细胞中的 p-ERK 和 p-p38 (而不是 p-JNK) 蛋白水平, 需要进一步研究。第三, LP 降低了 p-c-Fos (而不是 p-c-Jun) 蛋白水平, 这可能与 p-ERK 蛋白水平降低和 p-JNK 蛋白水平不变有关。Choe 等^[55]揭示, 在小鼠巨噬细胞中, ERK 通过 c-Fos 磷酸化激活 AP-1 转录活性, 而 c-Jun 激活是 JNK 诱导的。在本研究中, LP 降低了 NHDF 细胞中 p-ERK 蛋白水平, 但不影响 p-JNK 蛋白水平, 支持了本研究的假设。然而, 具体原因值得进一步研究。

3.3 LP 降低 UVB 暴露 B16F10 细胞中黑色素含量

色素沉着过度是长时间暴露于 UVB 后皮肤老化的显著特征, 表现为黑色素细胞中的黑色素生成过多^[56]。在本研究中, LP 降低了 UVB 诱导的 B16F10 细胞中黑色素含量增加。此外, 黑色素形成的过程可由黑色素生成酶调节, 如 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2^[57]。在本研究中, LP 降低了 UVB 诱导的 TYR 活性和表达(基因和蛋白表达)以及 TYRP-1 和 TYRP-2 基因表达的增加。以上研究结果表明, LP 可能通过降低黑色素生成酶活性和表达, 减少 B16F10 细胞中黑色素的生成。因此, LP 在 UVB 暴露的皮肤细胞中具有潜在的抗黑色素生成作用。此外, Bajpai 等^[58]的研究表明, 从清酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*) Probio 65 中分离出的胞外多糖具有酪氨酸酶抑制潜力, 表明热灭活益生菌和益生菌细胞裂解物可能通过类似物质发挥抗黑色素生成作用。

MITF 是参与黑色素生成的多种酶的关键转录调控因子^[59]。激活 PKA 可磷酸化 CREB, 从而导致 MITF 表达, 进一步增加黑色素合成^[60]。在

本研究中, LP 下调了 UVB 诱导的 p-PKA、p-CREB 和 MITF 蛋白表达的上调。相关分析表明, p-PKA 蛋白水平与 p-CREB、MITF 和 TYR 蛋白水平以及 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 mRNA 水平呈正相关(表 2), 表明 LP 降低 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 mRNA 水平可能与激活 B16F10 细胞中的 PKA/CREB/MITF 信号通路相关。此外, 自噬激活可通过抑制黑色素瘤细胞中的 PKA/CREB/MITF 信号通路来抑制黑色素生成^[27]。LC3 和 Beclin 1 是 2 个经典的自噬标记物^[61], LC3 诱导自噬体的形成涉及到 LC3-I 向 LC3-II 的转化^[62]。LC3-II 水平和 LC3-II/LC3-I 比值是反映自噬水平的重要指标^[63]。本研究表明, LP 改善了 UVB 诱导的 LC3-II、LC3-II/LC3-I 比率和 Beclin 1 蛋白水平的降低。相关分析表明, LC3-II、LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin 1 蛋白水平与 p-PKA、p-CREB 和 MITF 蛋白水平呈负相关(表 2), 表明 LP 可能通过激活自噬压制 PKA/CREB/MITF 信号, 进一步抑制 B16F10 细胞黑色素生成。此外, Lim 等^[31]发现, 灭活的嗜酸乳杆菌可以通过压制 B16F10 细胞中的 PKA/CREB 信号, 进而下调 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 mRNA 表达和 MITF 蛋白表达。多酚是热灭活益生菌中的一种代谢物^[10]。紫檀芪, 一种天然多酚, 能够通过激活 B16F10 细胞中的自噬信号下调 MITF、酪氨酸酶、TYR、TYRP-1 和 TYRP-2 的表达^[62], 表明热灭活益生菌和益生菌细胞裂解物可能通过相似的信号通路发挥抗黑色素生成作用。

综上所述, LP 在 UVB 暴露的皮肤细胞中具有潜在的抗光老化和抗黑色素生成作用。首先, 在 NHDF 和 B16F10 细胞中, LP 抑制了 UVB 诱导的细胞毒性, 这可能与降低 ROS 介导的 DNA 损伤有关。其次, LP 提高了 UVB 暴露 NHDF 细胞中 I 型胶原蛋白含量, 这可能与抑制(ERK, p38)/c-Fos 信号通路有关。再者, LP 抑制了 UVB 暴露 B16F10 细胞中 TYR、TYRP-1 和 TYRP-2

活性和/或表达,降低黑色素含量,这可能与抑制自噬介导的 PKA/CREB/MITF 信号通路有关。LP 在 UVB 暴露皮肤细胞中潜在的抗光老化和

抗黑色素生成作用如图 6 所示。本研究为 LP 作为潜在的抗光老化和美白活性成分应用于化妆品中提供了科学依据。

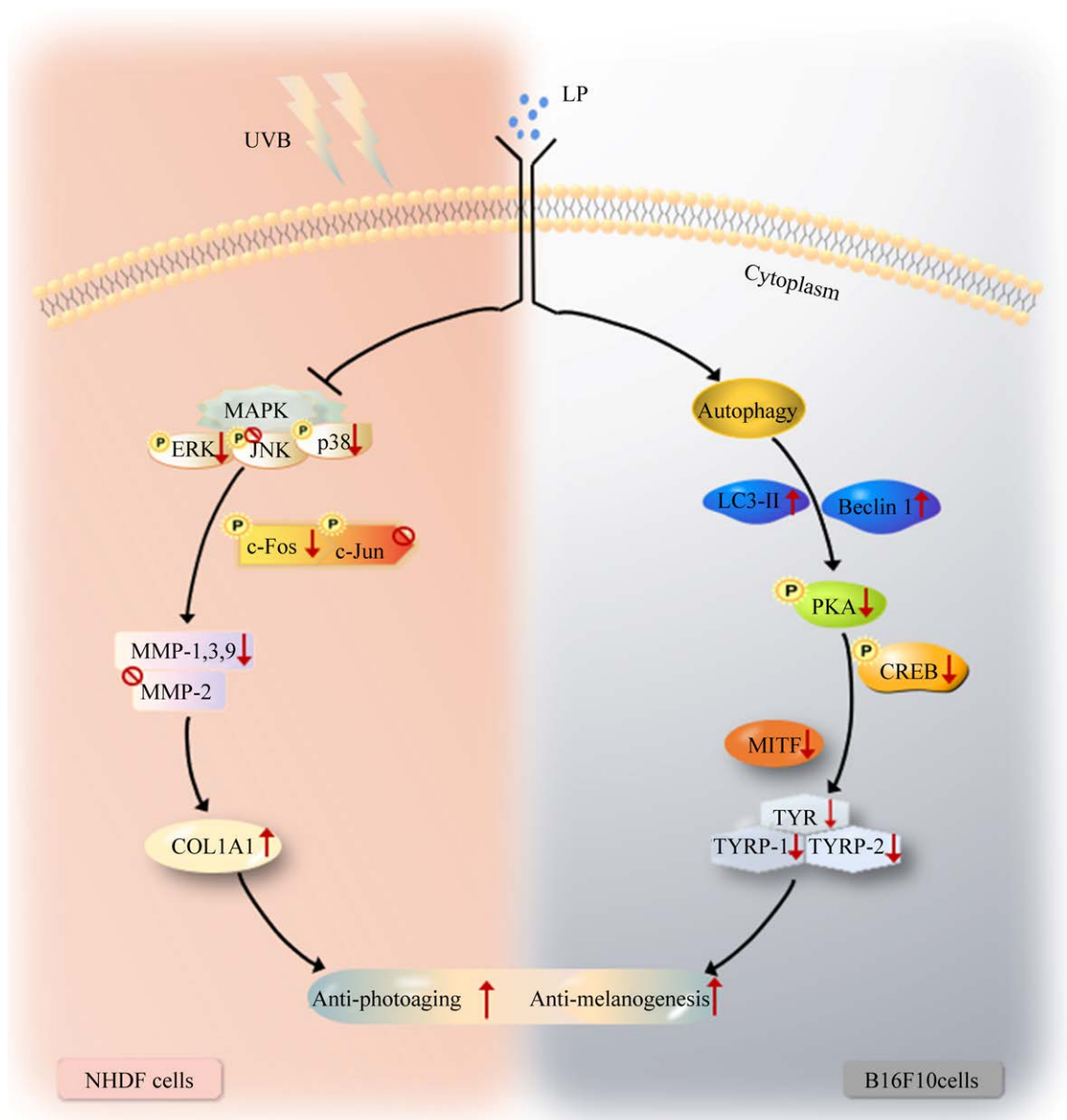


图 6 LP 在 UVB 暴露皮肤细胞中潜在的抗光老化和抗黑色素生成作用

Figure 6 Potential anti-photoaging and anti-melanogenesis effects of LP in UVB-exposed skin cells. Arrows indicate positive regulation and T-bars indicate negative regulation.

参考文献

- [1] LI ZZ, JIANG R, JING CX, LIU JZ, XU XH, SUN LW, ZHAO DQ. Protective effect of oligosaccharides

isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer against UVB-induced skin barrier damage in BALB/c hairless mice and human keratinocytes[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 283: 114677.

- [2] CHOI SY, BIN B, KIM W, LEE E, LEE TR, CHO EG. Exposure of human melanocytes to UVB twice and subsequent incubation leads to cellular senescence and senescence-associated pigmentation through the prolonged p53 expression[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2018, 90(3): 303-312.
- [3] XIAO T, CHEN Y, SONG C, XU S, LIN S, LI M, CHEN X, GU H. Possible treatment for UVB-induced skin injury: anti-inflammatory and cytoprotective role of metformin in UVB-irradiated keratinocytes[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2021, 102(1): 25-35.
- [4] COUTEAU C, COIFFARD L. Overview of skin whitening agents: drugs and cosmetic products[J]. *Cosmetics*, 2016, 3(3): 27.
- [5] KONG R, CUI YL, FISHER GJ, WANG XJ, CHEN YB, SCHNEIDER LM, MAJMUDAR G. A comparative study of the effects of retinol and retinoic acid on histological, molecular, and clinical properties of human skin[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2016, 15(1): 49-57.
- [6] TAVERNITI V, GUGLIELMETTI S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept)[J]. *Genes & Nutrition*, 2011, 6(3): 261-274.
- [7] TSAI WH, CHOU CH, HUANG TY, WANG HL, CHIEN PJ, CHANG WW, LEE HT. Heat-killed lactobacilli preparations promote healing in the experimental cutaneous wounds[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3264.
- [8] KUMAR H, SCHÜTZ F, BHARDWAJ K, SHARMA R, NEPOVIMOVA E, DHANJAL DS, VERMA R, KUMAR D, KUČA K, CRUZ-MARTINS N. Recent advances in the concept of paraprobiotics: nutraceutical/functional properties for promoting children health[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021. DOI: 10.1080/10408398.2021.1996327.
- [9] JIN YJ, PARK YK, CHO MS, LEE ES, PARK DS. New insight and metrics to understand the ontogeny and succession of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* and *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 6029.
- [10] İNCILI GK, KARATEPE P, AKGÖL M, KAYA B, KANMAZ H, HAYALOĞLU AA. Characterization of *Pediococcus acidilactici* postbiotic and impact of postbiotic-fortified chitosan coating on the microbial and chemical quality of chicken breast fillets[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184: 429-437.
- [11] PIQUÉ N, BERLANGA M, MIÑANA-GALBIS D. Health benefits of heat-killed (tyndallized) probiotics: an overview[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(10): 2534.
- [12] AGUILAR-TOALÁ JE, GARCIA-VARELA R, GARCIA HS, MATA-HARO V, GONZÁLEZ-CÓRDOVA AF, VALLEJO-CORDOBA B, HERNÁNDEZ-MENDOZA A. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 75: 105-114.
- [13] VINDEROLA G, SANDERS ME, SALMINEN S. The concept of postbiotics[J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(8): 1077.
- [14] KOBER MM, BOWE WP. The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging[J]. *International Journal of Women's Dermatology*, 2015, 1(2): 85-89.
- [15] HONG YF, LEE HY, JUNG BJ, JANG S, CHUNG DK, KIM H. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* down-regulates UV-induced MMP-1 expression and up-regulates type I procollagen through the inhibition of reactive oxygen species generation[J]. *Molecular Immunology*, 2015, 67(2): 248-255.
- [16] KIM HR, KIM H, JUNG BJ, YOU GE, JANG S, CHUNG DK. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells[J]. *Molecules and Cells*, 2015, 38(2): 163-170.
- [17] FRIEDMAN O. Changes associated with the aging face[J]. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 2005, 13(3): 371-380.
- [18] MEUNIER M, SCANDOLERA A, CHAPUIS E, LAPIERRE L, SANDRÉ J, BRUNNER G, LOVCHIK M, REYNAUD R. The anti-wrinkles properties of sodium acetylated hyaluronate[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2022, 21(7): 2749-2762.
- [19] LI W, LING W, TENG XM, QUAN CX, CAI SN, HU SQ. Effect of advanced glycation end products, extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases on type-I collagen metabolism[J]. *Biomedical Reports*, 2016, 4(6): 691-693.
- [20] SON J, LEE SY. Ursolic acid exerts inhibitory effects on matrix metalloproteinases via ERK signaling pathway[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2020, 315: 108910.

- [21] BLOISE E, TORRICELLI M, NOVEMBRI R, BORGES LE, CARRARELLI P, REIS FM, PETRAGLIA F. Heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates urocortin and cytokine release in primary trophoblast cells[J]. *Placenta*, 2010, 31(10): 867-872.
- [22] NA J, BAK DH, IM SI, CHOI H, HWANG JH, KONG SY, NO YA, LEE Y, KIM BJ. Anti-apoptotic effects of glycosaminoglycans via inhibition of ERK/AP-1 signaling in TNF- α -stimulated human dermal fibroblasts[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 41(5): 3090-3098.
- [23] ÅGREN MS, SCHNABEL R, CHRISTENSEN LH, MIRASTSCHIJSKI U. Tumor necrosis factor- α -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 *ex vivo*[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2015, 94(1): 12-21.
- [24] KIM DO, BYUN JE, SEONG HA, YOON SR, CHOI I, JUNG H. Thioredoxin-interacting protein-derived peptide (TN₁₃) inhibits LPS-induced inflammation by inhibiting p38 MAPK signaling[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 507(1/2/3/4): 489-495.
- [25] MENG ZY, OH S. Antioxidant and antimelanogenic activities of kimchi-derived *Limosilactobacillus fermentum* JNU532 in B16F10 melanoma cells[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 31(7): 990-998.
- [26] LEE WR, SHEN SC, WU PR, CHOU CL, SHIH YH, YEH CM, YEH KT, JIANG MC. CSE1L Links cAMP/PKA and Ras/ERK pathways and regulates the expressions and phosphorylations of ERK1/2, CREB, and MITF in melanoma cells[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2016, 55(11): 1542-1552.
- [27] QOMALADEWI NP, KIM MY, CHO JY. Rottlerin reduces cAMP/CREB-mediated melanogenesis via regulation of autophagy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9): 2081.
- [28] SUNG JY, KIM SG, KIM JR, CHOI HC. SIRT1 suppresses cellular senescence and inflammatory cytokine release in human dermal fibroblasts by promoting the deacetylation of NF- κ B and activating autophagy[J]. *Experimental Gerontology*, 2021, 150: 111394.
- [29] PARK SA, LEE GH, HOANG TH, LEE HY, KANG IY, CHUNG MJ, JIN JS, CHAE HJ. Heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* nF₁ promotes intestinal health in loperamide-induced constipation rats[J]. *PLoS One*, 2021, 16(4): e0250354.
- [30] YANG CY, GUO YN, WU WJ, MAN MQ, TU Y, HE L. UVB-induced secretion of IL-1 β promotes melanogenesis by upregulating TYR/TRP-1 expression *in vitro*[J]. *BioMed Research International*, 2022, 2022: 8230646.
- [31] LIM HY, JEONG D, PARK SH, SHIN KK, HONG YH, KIM E, YU YG, KIM TR, KIM H, LEE J, CHO JY. Antiwrinkle and antimelanogenesis effects of tyndallized *Lactobacillus acidophilus* KCCM12625P[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): 1620.
- [32] WEI J, HUANG LL, LI DM, HE JH, LI YJ, HE F, FANG WR, WEI GN. Total flavonoids of *Engelhardia roxburghiana* wall. leaves alleviated foam cells formation through AKT/mTOR-mediated autophagy in the progression of atherosclerosis[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2021, 18(9): e2100308.
- [33] SHUKLA G, KAMBOJ S, SHARMA B. Comparative analysis of anti-giardial potential of heat inactivated and probiotic protein of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in murine giardiasis[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 12(1): 271-279.
- [34] DING YL, JIRATCHAYAMAETHASAKUL C, LEE SH. Protocatechuic aldehyde attenuates UVA-induced photoaging in human dermal fibroblast cells by suppressing MAPKs/AP-1 and NF- κ B signaling pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(13): 4619.
- [35] XU YF, WANG SZ, MIAO Q, JIN K, LOU LX, YE X, XI Y, YE J. Protective role of hinokitiol against H₂O₂-induced injury in human corneal epithelium[J]. *Current Eye Research*, 2017, 42(1): 47-53.
- [36] HU SH, HUANG JH, PEI SY, OUYANG YJ, DING YF, JIANG L, LU JY, KANG LY, HUANG LH, XIANG H, XIAO R, ZENG QH, CHEN J. *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibits UVB-induced melanogenesis by antagonizing cAMP/PKA and ROS/MAPK signaling pathways[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5): 7330-7340.
- [37] LIU JZ, JIANG R, ZHOU JY, XU XH, SUN Z, LI J, CHEN XN, LI ZZ, YAN XC, ZHAO DQ, ZHENG ZM, SUN LW. Salicylic acid in ginseng root alleviates skin hyperpigmentation disorders by inhibiting melanogenesis and melanosome transport[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 910: 174458.

- [38] SONG D, XU C, HOLCK AL, LIU R. Acrylamide inhibits autophagy, induces apoptosis and alters cellular metabolic profiles[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111543.
- [39] SONG Y, YAN LC, XIAO WW, FENG L, JIANG WD, WU P, LIU Y, KUANG SY, TANG L, ZHOU XQ. Enzyme-treated soy protein supplementation in low protein diet enhanced immune function of immune organs in on-growing grass carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 318-331.
- [40] YEOM SH, GAM DH, KIM JH, KIM JW. Development of ultrasound-assisted extraction to produce skin-whitening and anti-wrinkle substances from safflower seed[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2022, 27(4): 1296.
- [41] JUNG HJ, LEE AK, PARK YJ, LEE S, KANG DW, JUNG YS, CHUNG HY, MOON HR. (2E,5E)-2,5-bis(3-hydroxy-4-methoxybenzylidene) cyclopentanone exerts anti-melanogenesis and anti-wrinkle activities in B16F10 melanoma and Hs27 fibroblast cells[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2018, 23(6): 1415.
- [42] BUGLEWICZ DJ, MUSSALLEM JT, HASKINS AH, SU C, MAEDA J, KATO TA. Cytotoxicity and mutagenicity of narrowband UVB to mammalian cells[J]. *Genes*, 2020, 11(6): 646.
- [43] KIM DJ, IWASAKI A, CHIEN AL, KANG S. UVB-mediated DNA damage induces matrix metalloproteinases to promote photoaging in an AhR- and SP1-dependent manner[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(9): e156344.
- [44] YOSHIMURA T, MANABE C, INOKUCHI Y, MUTOU C, NAGAHAMA T, MURAKAMI S. Protective effect of taurine on UVB-induced skin aging in hairless mice[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 141: 111898.
- [45] QUAN TH, HE TY, KANG S, VOORHEES JJ, FISHER GJ. Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor- β type II receptor/smad signaling[J]. *The American Journal of Pathology*, 2004, 165(3): 741-751.
- [46] QUAN TH, QIN ZP, XIA W, SHAO Y, VOORHEES JJ, FISHER GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging[J]. *The Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2009, 14(1): 20-24.
- [47] NAM Y, KIM J, BAEK J, KIM W. Improvement of cutaneous wound healing via topical application of heat-killed *Lactococcus chungangensis* CAU 1447 on diabetic mice[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2666.
- [48] RONG H, LIN F, LIMBU SM, LIN ZD, BI BL, DOU TF, ZHAO L, WEN XB. Effects of dietary proline on swim bladder collagen synthesis and its possible regulation by the TGF- β /Smad pathway in spotted drum, *Nibea diacanthus*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(5): 1792-1805.
- [49] HSIEH FC, LAN CC E, HUANG TY, CHEN KW, CHAI CY, CHEN WT, FANG AH, CHEN YH, WU CS. Heat-killed and live *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 exhibit similar effects on improving metabolic functions in high-fat diet-induced obese rats[J]. *Food & Function*, 2016, 7(5): 2374-2388.
- [50] PANAH I G, PASALAR P, ZARE M, RIZZUTO R, MESHKANI R. High glucose induces inflammatory responses in HepG2 cells via the oxidative stress-mediated activation of NF- κ B, and MAPK pathways in HepG2 cells[J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2018, 124(5): 468-474.
- [51] JUNG YR, KIM DH, KIM SR, AN HJ, LEE EK, TANAKA T, KIM ND, YOKOZAWA T, PARK JN, CHUNG HY. Anti-wrinkle effect of magnesium lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE: inhibition of MMPs via NF- κ B signaling[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e102689.
- [52] HATAMOCHI A, KURODA K, SHINKAI H, KOHMA H, OISHI Y, INOUE S. Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) expression in cutis laxa fibroblasts: upregulation of *MMP-1*, *MMP-3* and *MMP-9* genes but not of the *MMP-2* gene[J]. *British Journal of Dermatology*, 1998, 138(5): 757-762.
- [53] NAM Y, YOON S, BAEK J, KIM JH, PARK M, HWANG K, KIM W. Heat-killed *Lactiplantibacillus plantarum* LRCC5314 mitigates the effects of stress-related type 2 diabetes in mice via gut microbiome modulation[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 32(3): 324-332.
- [54] BEN-ELIEZER M, PHILLIP M, GAT-YABLONSKI G. Leptin regulates chondrogenic differentiation in ATDC5 cell-line through JAK/STAT and MAPK pathways[J]. *Endocrine*, 2007, 32(2): 235-244.
- [55] CHOE JY, KIM SK. Melittin inhibits osteoclast formation through the downregulation of the RANKL-RANK signaling pathway and the inhibition of interleukin-1 β in murine macrophages[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 39(3): 539-548.

- [56] BRIGANTI S, CAMERA E, PICARDO M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation[J]. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(2): 101-110.
- [57] HAN JH, BANG JS, CHOI YJ, CHOUNG SY. Anti-melanogenic effects of oyster hydrolysate in UVB-irradiated C57BL/6J mice and B16F10 melanoma cells via downregulation of cAMP signaling pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 229: 137-144.
- [58] BAJPAI VK, AHMAD RATHER I, PARK YH. Partially purified exo-polysaccharide from *Lactobacillus sakei* probio 65 with antioxidant, α -glucosidase and tyrosinase inhibitory potential[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2016, 40(3): 264-274.
- [59] HUANG HC, LEE IJ, HUANG C, CHANG TM. Lactic acid bacteria and lactic acid for skin health and melanogenesis inhibition[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2020, 21(7): 566-577.
- [60] FU T, CHAI B, SHI Y, DANG Y, YE X. Fargesin inhibits melanin synthesis in murine malignant and immortalized melanocytes by regulating PKA/CREB and P38/MAPK signaling pathways[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2019, 94(1): 213-219.
- [61] KIM HM, OH S, YANG JY, SUN HJ, JANG M, KANG D, SON KH, BYUN K. Evaluating whether radiofrequency irradiation attenuated UV-B-induced skin pigmentation by increasing melanosomal autophagy and decreasing melanin synthesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10724.
- [62] HSEU YC, VUDHYA GOWRISANKAR Y, WANG LW, ZHANG YZ, CHEN XZ, HUANG PJ, YEN HR, YANG HL. The *in vitro* and *in vivo* depigmenting activity of pterostilbene through induction of autophagy in melanocytes and inhibition of UVA-irradiated α -MSH in keratinocytes via Nrf2-mediated antioxidant pathways[J]. *Redox Biology*, 2021, 44: 102007.
- [63] WAN DF, PAN SS, TONG YS, HUANG Y. Exercise preconditioning promotes autophagy to cooperate for cardioprotection by increasing LC3 lipidation-associated proteins[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 599892.