

天门冬—红茶—何首乌复合发酵液促进黑素生成的分子机制研究

张燕梅¹, 彭思彤², 康丽¹, 李颖妍¹, 尹捷醇³, 韩娟娟⁴, 李燕龙⁴, 李柔柔^{1,5}, 张太军^{1*}

(1. 广州荃智美肤生物科技研究院有限公司, 广东广州, 510800;

2. 浙江药科职业大学, 浙江宁波, 315599;

3. 郑州轻工业大学, 河南郑州, 450002;

4. 可氏利夫(深圳)生物科技有限公司, 广东深圳, 518000;

5. 广东药科大学, 广东广州, 510006)

DOI:10.61369/CDCST.2025030013)



张燕梅



张太军

摘 要: 头发的颜色由生长期毛囊内部合成的黑素决定, 而黑素细胞的活性和功能受多种因素影响。由天门冬、红茶和何首乌经发酵得到的提取液可能具有促进黑素生成的功效, 但其发挥作用的机制尚未明确。文章研究了天门冬、红茶和何首乌的复合发酵液促进黑素合成及其具体的分子机制。结果表明: 浓度为 1.25~5 mg/mL 的该植物发酵液通过以下两种机制发挥作用: (i) 通过调控 Bcl-2/Bax-Caspase3 信号通路抑制了 H₂O₂ 诱导的 B16 细胞凋亡, 显著提高细胞活性 ($p<0.001$); (ii) 通过 TLR4/p38 MAPK 信号通路激活黑素合成的功能。

关 键 词: 植物发酵液; 黑素; 黑素瘤 B16 细胞; 酪氨酸酶; 信号通路

第一作者简介: 张燕梅, 本科, 就职于广州荃智美肤生物科技研究院有限公司项目工程师, 从事护肤产品配方与工艺研究。E-mail: 452906914@qq.com。

通讯作者简介: 张太军, 工程硕士, 就职于广州荃智美肤生物科技研究院有限公司, 日用化工高级工程师, 从事化妆品新技术、新工艺、新材料研究。E-mail: Davis@ewskin.com。

随着年龄增长, 头发会逐渐表现出黑素合成减少和毛干脱落明显的衰老特征, 最终导致中老年群体普遍出现了头发灰白现象^[1,2]。在头发的生长期, 人类的毛囊黑素细胞合成黑素, 并将黑素小体传递到毛囊的皮质和髓质角质形成细胞中, 由此为头发提供所需的色素。因此, 毛囊黑素细胞的活性决定了头发的颜色, 其合成的真黑素和褐黑素及数量决定了头发的颜色深浅^[3,4]。健康人每天最多 14% 的头发变灰, 且重新生成黑素的速度是头发变灰速度的两倍^[5], 但随着时间的推移, 黑素细胞的功能依然会逐渐下降, 导致白发增多。在压力、紫外照射、辐射和污染物等因素的作用下, 人类衰老的头发基质中的黑素细胞面临的氧化应激压力增加, 而抗氧化能力不足, 发生氧化损伤^[6,7]。这使得黑素生物合成的关键酶(酪氨酸酶)活性降低, 导致了生长期由黑素细胞在毛囊内部合成黑素不足, 加速白发形成^[8]。此外, 伴随年龄增长, 免疫系统功能逐渐衰退, 对外源性及内源性刺激的应答能力显著降低。同时, 人体机能的衰老将伴随着毛囊中黑素合成减少^[9]。综上, 现有研究证实了老年人存在免疫力衰退、黑素细胞活力下降、酪氨酸酶活性降低等因素, 从而造成了黑素合成受阻。

天门冬、红茶和何首乌等植物提取物均具有多种药理活性和生物效应, 研究表明这些植物具有调节黑素合成的潜力。Koike S 等人发现, 黑素细胞具有免疫防御和黑素合成的双重作用: 黑素细胞通过表达 Toll 样受体感知环境刺激, 参与先天免疫应答。随后, Toll 样受体(如 TLR4)的活化可增强黑素合成^[10]。天门冬多糖通过 TLR4-JNK/p38/ERK 信号通路激活免疫应答和先天免疫记忆, 这提示了天门冬可能促进黑素的合成, 但该过程伴随着炎症因子的产生, 会出现皮肤不适等不良反应^[11]。咖啡因可通过促进胰岛素样生长因子的表达, 刺激了毛母质角质形成细胞增殖, 延长了头发生长周期, 有利于生长期(III-VI 期)毛囊黑素的生成。这表明红茶中的咖啡因可能通过此机制发挥作用, 而咖啡因的得率可能因原料的来源、品质等级以及提取工艺的不同而存在显著差异^[12,13]。何首乌通过促进酪氨酸酶和小眼畸形相关转录因子的基因表达和蛋白合成以及激活酪氨酸酶的活性来促进 B16 细胞中黑素的生成^[14]。然而, 何首乌存在肝毒性, 尤其对肝脏的危害较重。例如, 何首乌的 95% 乙醇提取液能够明显抑制人肝脏 L-02 细胞的生长^[15], 可通过特定的生产工艺以消除其可能产生的副作用。



已有证据显示,利用微生物发酵技术制备得到的植物提取液有可能通过增强微生物的代谢活动,并促进微生物分解转化植物提取物中的有毒成分。例如,天南星鲜品具有明显的毒性,经干燥后毒性有所降低,进一步发酵制成胆南星后毒性明显降低,体现了天南星通过“炮制”降低毒副作用^[16]。此外,因为多种胞外酶可由微生物分泌,用于分解构成紧密的细胞壁结构,使细胞之间的空隙变大,为细胞内外的物质扩散提供通道,从而提高植物提取物中活性成分的提取效率^[17,18]。综上所述,天然植物来源的发酵提取液具有更多的次生代谢产物,有助于增强植物提取物功效的亲力和靶向选择性,以提升化妆品原料的综合效能^[19],以满足人们对具有环保、安全、功效等特点的化妆品原料日益增长的需求。

尽管天门冬、何首乌、红茶在促进黑素生成方面均有潜在的功效,但由两种酵母菌联合发酵上述三种植物得到的发酵液对黑素合成相关信号通路 TLR4/p38 MAPK 的影响及具体机制仍未见报道。因此,文章通过体外实验将上述植物复合发酵液冻干粉溶解稀释至一定浓度,作用于小鼠黑素瘤 B16 细胞株,初步探究了其对 B16 细胞的活力、抗凋亡的潜能、酪氨酸酶活性、黑素含量及其调控黑素生成的重要基因和蛋白表达变化的影响,以探索该植物复合发酵液在调节黑素合成方面的细胞与分子生物学机理。本研究以天门冬—红茶—何首乌复合发酵液(植物复合发酵液)为研究对象,旨在为开发改善毛发衰老(包括头发灰白和头皮老化)的功能性产品提供实验依据。

1. 实验部分

1.1 原料及设备

试剂: MTT、L-DOPA, 购于美国 Sigma 公司; DMEM 培养基和胎牛血清, 购于美国 Gibco 公司; EDTA-胰蛋白酶, 购于上海麦克林生化科技有限公司; TritonX-100、CCK8 试剂盒、RNA 提取试剂盒和活性氧检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 青霉素-链霉素双抗溶液、磷酸盐缓冲液(PBS), 阿拉丁生化科技股份有限公司; 植物复合发酵液冻干粉(批号: VFE240427-3; 植物活性成分含量 15%; 溶剂为水), 购于可氏利夫(深圳)生物科技有限公司; Trizol 试剂, 购于天根生化科技(北京)有限公司; RNA 逆转录试剂盒, 翊圣生物科技(上海)股份有限公司; SYBRGreen qPCR Mix, 山东思科

捷生物技术有限公司; qPCR 板和封板膜, 上海希言科学仪器有限公司; 小鼠 GAPDH 酶联免疫检测试剂盒, 深圳子科生物科技有限公司; 小鼠 Caspase-3 酶联免疫试剂盒, 上海西唐生物科技有限公司; 小鼠 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)酶联免疫试剂盒、小鼠 BCL-2 相关 X 蛋白(BAX)酶联免疫检测试剂盒, 上海一研生物科技有限公司; 细胞计数板, 无锡德凡生物有限公司; 脂多糖(LPS, 货号: 60747ES; 来源于大肠杆菌 O55: B5), 上海翊圣生物科技有限公司; Lipofectamine 2000 转染试剂, 赛默飞世尔科技公司; 左旋多巴溶液, Sigma 公司。

细胞: 小鼠黑素瘤 B16 细胞株(货号: YC-A011, 第 2 至 5 代), 购于广州井源生物科技有限公司。

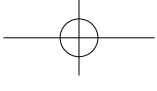
仪器设备: 实时荧光定量 PCR 仪, BioRad 公司; CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; Synergy NEO2 HTS 全能酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; IX51 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 检测植物复合发酵液对 H₂O₂ 刺激作用下 B16 细胞活力的影响

1.2.1.1 CCK8 法检测 B16 细胞活力

将长势良好、长成致密单层的 B16 细胞消化吹散, 采用血球计数板对细胞进行计数, 调节适宜浓度转移至 96 孔板培养, 密度为 5.0×10^3 个/孔, 于 37℃ 且 CO₂ 含量 5.0% 的恒温培养箱中培养 24 h。弃去培养基后, 除了溶剂对照组不接种细胞只添加 200 μL 细胞培养基外, 剩余的密度为 60%~70% 的 B16 细胞株中依次加入 0、50、100、150、200、250、400、600 μmol/LH₂O₂ 于恒温培养箱中培养 24h, 其中浓度 0 μmol/L 的 H₂O₂ 组为空白对照组。弃掉上清, 加入 0.5mg/mL CCK8 工作液, 37℃ 避光孵育 2h。孵育结束后, 利用酶标仪在 450nm 处检测读取 OD 值, 按照以下公式计算。根据细胞活力计算结果, 筛选能显著降低细胞活力 ($p < 0.01$) 且细胞贴壁状态良好(密度 >60%) 的 H₂O₂ 浓度用于后续构建氧化应激模型。以不含 B16 细胞仅添加培养基作为溶剂对照组, 剩余孔均为 60%~70% 的 B16 细胞, 其中 200 μL 细胞培养液作为空白对照组、200 μL 浓度分别为 0.3125mg/mL、0.625mg/mL、1.25mg/mL、2.5mg/mL、5mg/mL、40mg/mL、100mg/mL 系列梯度的测试样品植物复合发酵液作为样品组, 培养 24h 后检测细胞毒性。根据细胞活力计算结果, 筛选细胞活力大于 85% 且细胞形态无明显变化的植物复合发酵液浓度, 以此作为样品



组,添加至培养板后于37℃培养箱处理1h,加入200 μmol/LH₂O₂溶液处理24h,检测细胞活力。

$$\text{B16细胞活力 (\%)} = \frac{\text{OD (样品组)} - \text{OD (溶剂对照组)}}{\text{OD (空白对照组)} - \text{OD (溶剂对照组)}} \times 100\%$$

注:样品组代表添加细胞和待测样品组;空白对照组代表未添加细胞和待测样品组;溶剂对照组代表添加细胞但未添加待测样品组

1.2.1.2 ELISA 法检测植物复合发酵液对 B16细胞的抗凋亡能力测试

取对数生长期的 B16细胞以密度为 6×10^5 个/孔接种于6孔板,设置空白对照组(培养液)、模型组(200 μmol/LH₂O₂溶液)和样品组[在含200 μmol/LH₂O₂溶液的培养基中分别加入低(1.25 mg/mL)、中(2.5 mg/mL)和高(5 mg/mL)三种剂量的植物复合发酵液。除空白对照组外,各孔均加入200 μmol/LH₂O₂溶液,于细胞培养箱中培养24 h。在冰盒上用 RIPA 裂解液裂解细胞10min后,在12000g,4℃条件下离心15min,取上清液备用。取100μL标准品或样品的上清液加入至预包被抗体(GAPDH、Caspase-3、Bcl-2、Bax)的96孔板中,于37℃培养箱中孵育90 min。弃去液体后 PBS洗板3次。各孔加入100μL生物素化抗体工作液,37℃孵育60 min。弃去板内液体,PBS清洗3次。各孔加入100μL HRP 酶结合物工作液,37℃孵育30 min。弃去上清液,洗板3次。每孔加入100μL底物工作液,37℃避光孵育15 min后,加入50μL终止液。5分钟内使用酶标仪测量450 nm处的吸光度。绘制标准曲线,计算 B16细胞内蛋白 GAPDH(内参)、Caspase-3、Bcl-2、Bax 的含量以及与内参相比的各蛋白相对表达量。

1.2.2 检测植物复合发酵液对 B16细胞黑素生成的作用

1.2.2.1 NaOH 裂解法测定 B16细胞内黑素含量

设置空白对照组(细胞培养基)和样品组[低(1.25 mg/mL)、中(2.5 mg/mL)和高(5 mg/mL)剂量的植物复合发酵液],利用 NaOH裂解法来测量 B16细胞中黑素含量。取对数生长期的 B16细胞以密度为 6×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养液体积1.5mL,培养24h。除了空白对照组外,将培养液换成上述浓度的植物复合发酵液,设置3个复孔,继续培养24h。胰酶消化、重悬后将细胞分成两份,分别离心收集细胞沉淀。每孔加入200μL浓度为1 mol/L的 NaOH溶液,80℃水浴加热至黑素颗粒完全溶解。一份在裂解结束后,将溶液冷却至室温,用酸性溶液调节 pH至中性,离心弃去上清液即获得黑素沉淀。另一份混匀

后吸取200μL至96孔板,使用酶标仪测量405 nm波长处的吸光度,平行测定3次,根据以下公式计算黑素的相对含量。

$$\text{黑素的相对含量 (\%)} = \frac{\text{样品组吸光度}}{\text{空白组吸光度}} \times 100\%$$

1.2.2.2 B16细胞内酪氨酸酶活力的测定

试验分组同1.2.2.1,利用 L-多巴氧化法来测量 B16细胞内酪氨酸酶活性。取对数生长期的 B16细胞以密度为 1.0×10^4 个/孔接种于96孔板中,培养液体积200 μL,每个浓度设置5个复孔,培养24h。弃去上清液,PBS清洗两次。每孔加入含1% TritonX-100 的 PBS缓冲液80 μL,迅速置于-80℃低温冰箱1 h。取出置于常温融化,37℃孵育5 min,加入20 μL质量分数为0.5%的左旋多巴,37℃反应6h,于酶标仪测定475 nm 的吸光度,平行测定3次,根据以下公式计算 B16细胞内酪氨酸酶的相对活性。

$$\text{酪氨酸酶的相对活性 (\%)} = \frac{\text{样品组吸光度}}{\text{空白组吸光度}} \times 100\%$$

1.2.3 植物复合发酵液促进酪氨酸酶合成的作用机制探究

1.2.3.1 ELISA 法检测 TLR4、p38 MAPK、Phospho-p38 MAPK、TYR 的蛋白含量

设置了阳性对照组(35μg/mL LPS)和阴性对照组(等量 ddH₂O代替高剂量的植物复合发酵液),其余的空白对照组和样品组和实验方法同1.2.2.1。ELISA 法检测植物复合发酵液对 B16细胞内蛋白 TLR4、p38 MAPK、Phospho-p38 MAPK、TYR 的含量变化,操作步骤同1.2.1.2。

1.2.3.2 TLR4 siRNA 的引物设计与转染效率测定

靶向 B16细胞中 TLR4基因的 siRNA 由上海吉玛制药有限公司设计合成,TLR4 siRNA 序列信息见表1。用100 μL Opti-MEM 培养基将 Lipofectamine™ 2000 稀释成浓度分别为2.5μL和5μL;将 TLR4 siRNA 梯度稀释成浓度分别为25nM、50nM、100nM、150nM、200nM。再将含有2.5μL、5μL的 Lipofectamine™ 2000分别与上述浓度的 TLR4 siRNA 混匀形成转染复合物,滴加至6孔板中,与800μL Opti-MEM 培养基混匀后孵育8h后弃去转染混合物,更换为含10%血清的培养基继续孵育至24h。同时将不含 Lipofectamine™ 2000和 TLR4 siRNA 混合物,作为空白对照组。孵育结束后用 PBS润洗细胞2次后更换为含血清的培养基,采用酶标仪分别在 Ex485nm、Em530nm 条件下检测荧光强度,重复3次。根据以下公式计算相对于空白对照组的转染效率,公式中的 T 为含 TLR4 siRNA 的样品



组平均荧光强度，C为不含 TLR4 siRNA 的空白对照组的平均荧光强度。

$$\text{转染效率 (\%)} = (1 - \frac{T}{C}) \times 100\%$$

表1 TLR4 siRNA的引物序列

种属	正向引物序列	反向引物序列
Mus	UUAGAAGACUG	CUAGUCUUCA
musculus	AAGACUAGAA	GUCUUCUAAACU

1.2.3.3 ELISA 法检测转染 TLR4 siRNA 后 B16 细胞相关蛋白含量

设置取对数生长期的 B16 细胞以密度为 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，培养过夜。弃去培养基，用 PBS 润洗细胞一次后加入不含血清的 Opti-MEM 培养基，将转染混合物（150 nM TLR4 siRNA+5 μ L Lipofectamine 2000+200 μ L Opti-MEM）滴加至培养基中，与 B16 细胞于共培养 8 h，对照组不含转染混合物。弃去转染混合物，更换为含 10% 血清的培养基继续孵育至 24h。不含转染混合物的空白对照组和 TLR4 siRNA 组各有 1 个孔加入高剂量 5 mg/mL 的植物复合发酵液。利用 ELISA 法分别检测各种 TLR4、p38 MAPK、Phospho-p38 MAPK、TYR 的蛋白含量变化，操作步骤同 1.2.1.2。

1.2.3.4 荧光定量 PCR 法检测 TLR4/p38 MAPK 信号通路相关基因的表达

使用 NCBI 和 Primer Blast 分别设计引物 GAPDH（内参基因）、TLR4、TYR、MITF（表 2），将序列由擎科生物公司合成。利用 RNA 提取试剂盒分别提取 1.2.3.2 处理 24h 后的小鼠黑色素瘤 B16 细胞的 RNA。NANO-400A 超微量核酸分析仪检测 RNA 浓度及纯度。根据逆转录试剂盒说明，冰上配制逆转录反应体系。根据逆转录试剂盒上的说明书在 PCR 仪上将 RNA 逆转录为 cDNA 后，冰上配制荧光定量 PCR 反应 (qPCR) 反应体系：在荧光定量 PCR 专用的 96 孔板上取 qPCR SYBR Green 5 μ L，上下游引物各 0.2 μ L，样品的 cDNA 1 μ L，双蒸水 3.6 μ L；Bio-rad 的 RT-PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min，95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，60 $^{\circ}$ C 退火 / 延伸 30 s，40 个循环，重复三次试验。在扩增程序中读取各组的 Ct 值，以不含 TLR4 siRNA 和植物复合发酵液为空白对照组，按照下列公式得到的 $\Delta\Delta Ct$ 值，根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法计算各目的基因 mRNA 的相对表达量。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{样品组目的基因}} - Ct_{\text{样品组内参基因}}) -$$

$$(Ct_{\text{空白对照组目的基因}} - Ct_{\text{空白对照组内参基因}})$$

表2 荧光定量 PCR 的引物序列

基因	种属	正向引物序列	反向引物序列
GAPDH		GAAGGTCGGT	ATAGGCAGCT
		GTGAACGGAT	TCTCCGCATC
TLR4	Mus	GTTCTCTCAT	AGGGACTTTGC
		GGCCTCCACT	TGAGTTTCTGAT
TYR	musculus	ACATGTGATAG	AGGAACCTCT
		TCACTCCAGGG	GCCTGAAAGC
MITF		TTGAGATGCT	AGTTGCTGGC
		CATCCCCTGC	GTCAGCAAGAT

1.2.4 结果统计分析

1) 正态分布检验

采用 IBM SPSS Statistic 26.0 软件进行分析，使用 Shapiro-wilks 检验对数据进行正态分布验证。正态性检验渐进显著性 (双侧) 数值 $p > 0.05$ ，则该系列数据服从正态分布。否则，不服从正态分布。

2) 差异性分析

对数据进行差异性分析，当两组数据同时为正态分布时，使用配对 T 检验分析两组数据间的差异性；当两组数据不同时为正态分布时，使用 Wilcoxon 秩和检验分析两组数据间的差异性。当 $p < 0.05$ 时，表示数据有显著性差异；当 $p < 0.01$ 时，表示数据有极显著性差异；当 $p < 0.001$ 时，表示数据有非常极显著性差异；当 $p > 0.05$ 时，表示数据无统计学差异。

2. 结果与讨论

2.1 浓度为 150~250 μ mol/L 的 H_2O_2 影响 B16 细胞活力

小鼠黑色素瘤 B16 细胞（简称：B16 细胞）中酪氨酸酶的活性较高，能合成黑素，且 B16 细胞比较容易获得，因此被广泛用作黑素合成研究的体外模型。Tang L 等人发现，氧化压力可诱导细胞活力降低、发生凋亡或早衰^[20]。体外实验已证实， H_2O_2 可有效模拟氧化应激条件，诱导角质形成细胞和成纤维细胞的早衰表型，建立细胞衰老模型^[21,22]。为评估 H_2O_2 对 B16 细胞活力的影响，分别以 0、50、100、150、200、250、400 和 600 μ mol/L 的 H_2O_2 处理 B16 细胞 24 h，并以 0 μ mol/L 组作为空白对照。处理 24 h 后，采用 CCK-8 法检测细胞活力，结果如表 3 所示。经 150~250 μ mol/L 的 H_2O_2 处理后的 B16 细胞活力与空白对照组相比，细胞活力显著降低 ($p < 0.001$)，且细胞活力随着 H_2O_2 浓度的升高而显著下降。这与杨红等人发现 200

$\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用于人表皮黑素细胞 60min 后抑制细胞增殖的研究结果相似^[23]。与空白对照组相比,低浓度组(50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2) 的细胞活力均无显著性差异 ($p>0.05$)。然而,高浓度组(400 $\mu\text{mol/L}$ 和 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2) 虽能显著降低细胞活力,但贴壁细胞大量脱落并呈现悬浮状态,细胞密度明显减少,且细胞形态发生改变。因此,浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 降低 B16 细胞活力,但细胞密度仍在 70%~75%,未出现大量细胞脱落死亡,可用于构建 B16 细胞的氧化应激模型。

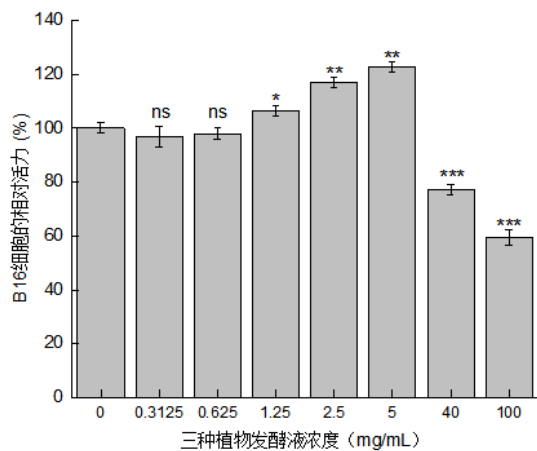
表3 浓度 0~600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 对 B16 细胞活力的影响

组别 H_2O_2 浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0	50	100	150	200	250	400	600
细胞活力 (100%)	100	103.2 ^c	99.3 ^c	74.6 ^b	59.5 ^a	52.9 ^a	23.6 ^a	15.9 ^a

注:与空白对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2) 相比, a 表示 $p<0.001$; b 表示 $p<0.01$; c 表示 $p>0.05$; ns 表示无显著性差异。

2.2 植物复合发酵液对 B16 细胞的安全浓度范围是 0.3125~5mg/mL

将浓度为 0 mg/mL 的植物复合发酵液组设为空白对照组,处理 24h 后,结果如图 1 所示。与空白对照组相比,当浓度为 0.3125~0.625mg/mL 时未表现出显著细胞毒性 ($p>0.05$),1.25mg/mL 组 ($p<0.01$)、2.5 和 5mg/mL 组 ($p<0.001$) 均显著促进细胞增殖。与空白对照组相比,1.25mg/mL 组的当浓度大于 5mg/mL 时,B16 细胞活力小于 85%,显著低于空白对照组,细胞形态发生显著改变。这表明 40 和 100mg/mL 的植物复合发酵液抑制 B16 细胞增殖,表现出显著毒性。因此,基于细胞模型的安全性筛选,后续功效研究选用 0.3125~5 mg/mL 浓度。



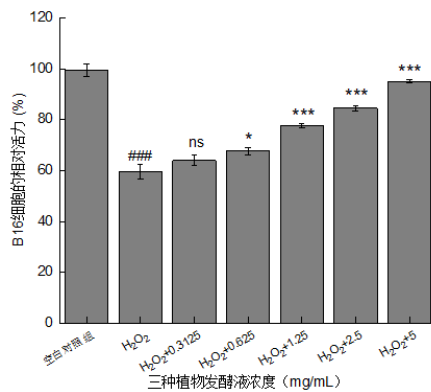
注:与空白对照组(0 mg/mL 植物复合发酵液)相比, ns 表示无显著性差异、* 表示 $p<0.05$ 、*** 表示 $p<0.001$

图1 不同质量浓度的植物复合发酵液对 B16 细胞活力的影响

2.3 植物复合发酵液对 H_2O_2 诱发的 B16 细胞凋亡的保护作用

以不含 H_2O_2 和植物复合发酵液组作为空白对照组,相比之下,200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 溶液与 B16 细胞共培养 24h 后能显著降低细胞活力 ($p<0.001$),表明 H_2O_2 诱导 B16 细胞氧化应激模型成功建立。与模型组相比,除了 0.3125mg/mL 组对 B16 细胞活力无显著影响之外 ($p>0.05$),浓度为 0.625~5mg/mL 的植物复合发酵液作用于 B16 细胞 24h,呈浓度依赖性减少 H_2O_2 引起的 B16 细胞活力降低。在 H_2O_2 相同剂量下,与 0.625、1.25、2.5mg/mL 相比,其中 5mg/mL 浓度的植物复合发酵液对 H_2O_2 引起的 B16 细胞活力降低的保护作用最为显著,表现出更高的存活率(见图 2)。与模型组相比,1.25~5mg/mL 的植物复合发酵液极显著提高 B16 细胞的活力 ($p<0.001$)。

设置低(1.25mg/mL)、中(2.5mg/mL)、高(5mg/mL)剂量组的植物复合发酵液,分别检测其对 H_2O_2 引起的 B16 细胞凋亡的影响,结果见表 4。与空白对照组相比,200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 B16 细胞 24h 后,分别促凋亡相关蛋白 Bax ($p<0.001$)、Caspase-3 ($p<0.01$) 含量显著地增加,而抑凋亡相关蛋白 Bcl-2 的含量显著地减少 ($p<0.01$),这表明 H_2O_2 可能通过诱导细胞凋亡的方式降低了 B16 细胞存活率。当植物复合发酵液的添加量为 1.25~5mg/mL 时, H_2O_2 刺激 B16 细胞产生的促凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 均显著降低 ($p<0.05$),并增加了抑凋亡相关蛋白 Bcl-2 含量,从而抑制细胞凋亡。且高剂量组(5mg/mL) ($p<0.01$) 增加抑凋亡相关蛋白表达的效果优于中、低剂量组(1.25 和 2.5mg/mL) ($p<0.05$)。以上结果表明 1.25~5mg/mL 的植物复合发酵液通过调控 Bcl-2/Bax-Caspase3 信号通路阻抑 H_2O_2 诱导的 B16 细胞凋亡,从而显著提升细胞活力。



注:与空白对照组(B16 细胞+培养基)相比, ### 表示 $p<0.001$; 与模型组(200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2) 相比, ns 表示无显著性差异、* 表示 $p<0.05$ 、*** 表示 $p<0.001$

图2 不同质量浓度的植物复合发酵液减少 H_2O_2 诱发的 B16 细胞活力下降



黑素细胞的数量影响着黑素的含量，故提升其增殖活力有助于缓解白发。自由基理论认为，活性氧自由基（ H_2O_2 等）的过量积累可通过氧化应激途径诱导毛囊细胞损伤、黑素细胞功能障碍、毛囊干细胞耗竭等，这些病理变化共同导致头发衰老表型，包括灰发和脱发。Arck PC等人^[7]将不同年龄段的人体毛囊分离出的黑素细胞经不同浓度的氧化剂处理后，证实了氧化应激能够诱导黑素细胞凋亡，且随年龄增长，黑素细胞对氧化应激的敏感性增加，这提示了衰老个体头发变白的主要机制之一。虽然 H_2O_2 诱导的氧化应激模型被广泛采用，但其存在以下局限性：

（i）体外高浓度 H_2O_2 处理与生理低氧环境存在差异，无法准确地模拟实际的氧化应激条件。（ii）体外实验短期的 H_2O_2 处理难以真实模拟体内慢性氧化应激的生理过程。（iii）细胞活力仅反映体外急性毒性，无法全面评估长期使用或全身暴露下的安全性。因此，后续研究需采用三维器官模型、小鼠的氧化应激模型、动物安全性评价等开展植物复合发酵液在体内对氧化应激的保护作用实验，进一步探究其在改善头发变白的作用。

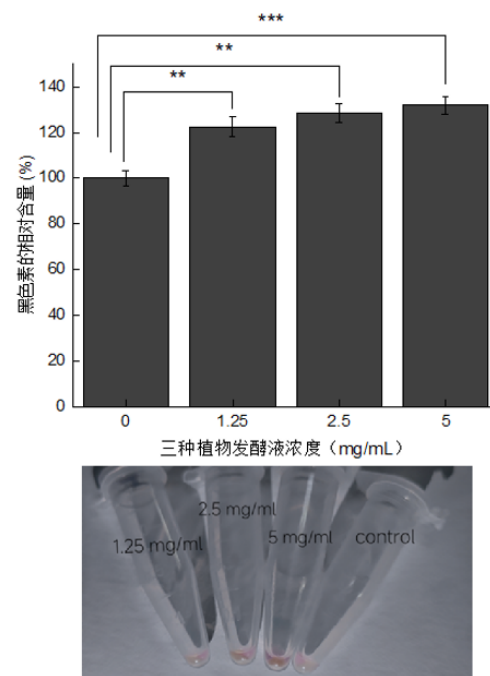
表4 不同质量浓度的植物复合发酵液抑制 H_2O_2 引起的B16细胞促凋亡蛋白的表达

组别	凋亡相关蛋白含量/GAPDH含量		
	Bax	Bcl-2	Caspase-3
空白对照组	1.12 ± 0.12	1.52 ± 0.19	1.03 ± 0.16
H_2O_2	2.14 ± 0.16 ^a	0.79 ± 0.08 ^b	1.58 ± 0.12 ^b
H_2O_2 +1.25 mg/mL	1.82 ± 0.11 ^c	0.90 ± 0.04 ^c	1.32 ± 0.08 ^c
H_2O_2 +2.5 mg/mL	1.76 ± 0.14 ^c	0.96 ± 0.05 ^c	1.29 ± 0.08 ^c
H_2O_2 +5mg/mL	1.64 ± 0.22 ^c	1.16 ± 0.09 ^d	1.23 ± 0.13 ^c

注：与空白对照组（B16细胞+培养基）相比，a表示 $p<0.001$ ；b表示 $p<0.01$ 。与模型组（ $200\text{ }\mu\text{mol/LH}_2\text{O}_2$ ）相比，c表示 $p<0.05$ ；d表示 $p<0.01$ 。

2.4 植物复合发酵液促进B16细胞合成黑素

以未添加植物复合发酵液的组作为空白对照组，植物复合发酵液对B16细胞合成黑素的影响如图3所示。B16细胞经不同质量浓度的植物复合发酵液（1.25、2.5、5 mg/mL）处理24 h后，结果显示，随着发酵液浓度的增加，黑素的合成量逐渐增加。以浓度为0 mg/mL的植物复合发酵液组作为空白对照组实验组呈现显著统计学差异：1.25及2.5 mg/mL组（ $p<0.01$ ）5 mg/mL组（ $p<0.001$ ）。头发的颜色主要由毛囊黑素细胞合成的黑素决定，上述结果表明该植物复合发酵液可能通过促进黑素合成改善白发问题。



注：control表示空白对照组，即0 mg/L的植物复合发酵液。

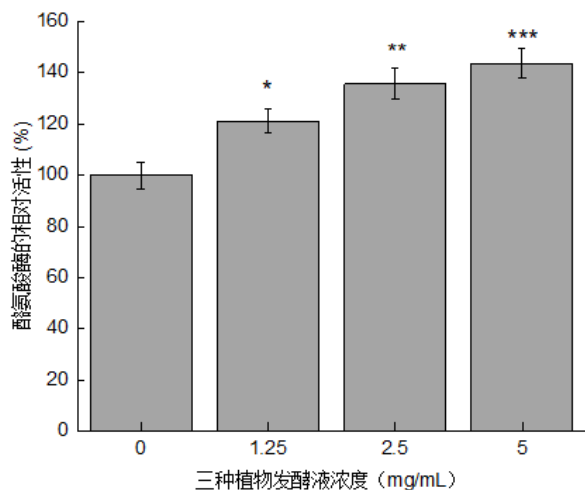
图3 不同质量浓度的植物复合发酵液促进B16细胞合成黑素

尽管B16细胞系因增殖快、稳定性高、操作便捷等优势被广泛应用于黑素合成研究，但其存在明显局限性。具体表现为：二维培养体系无法重现组织的复杂微环境中的细胞-基质相互作用，这种差异可能导致实验结果与人体内实际情况不一致^[24]。此外，小鼠黑素瘤细胞与人毛囊黑素细胞的代谢特性存在物种差异。因此后续研究需采用离体人类毛囊培养模型和动物实验，以系统评估植物复合发酵液对毛囊黑素生成的促进作用，并验证其在体内促进黑素生成的生物学效应。

2.5 植物复合发酵液提高B16细胞中酪氨酸酶的活力和表达量

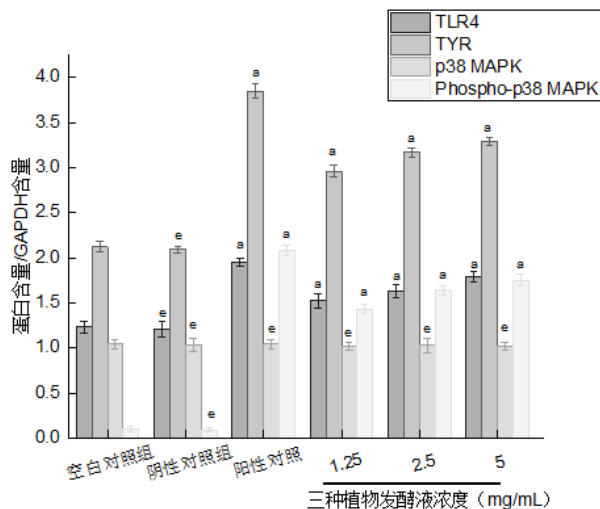
黑素合成是一个多步骤的酶促级联反应过程，其中酪氨酸酶作为关键限速酶，催化黑素合成的起始步骤^[23]。为探究植物复合发酵液的黑素生成作用机制，文章检测了其对B16细胞酪氨酸酶活性的影响（图4）。结果显示，1.25~5 mg/mL植物复合发酵液处理后，酪氨酸酶活性呈现浓度依赖性显著升高（1.25 mg/mL组 $p<0.05$ ；2.5 mg/mL组 $p<0.01$ ；5 mg/mL组 $p<0.001$ ）。基于此，我们进一步分析了TLR4/p38 MAPK信号通路相关蛋白的表达。我们收集了经植物复合发酵液处理后B16细胞的蛋白质，通过ELISA检测B16细胞酪氨酸酶合成通路的相关蛋白TLR4、p38 MAPK、Phospho-p38 MAPK和酪氨酸酶TYR的表达量，结果见图5。与不含植物复合发酵液的空白对照组相比，

阴性对照组（等量 ddH₂O）各相关蛋白的含量均无明显差异，排除溶剂干扰。阳性对照组（35 μg/mL LPS）能显著促进 TLR4 表达（ $p<0.001$ ），与 Ahn 等报道的 LPS 诱导人黑素细胞 TLR4 上调现象一致^[25]。植物复合发酵液（1.25~5 mg/mL）处理 24h 后，TLR4、Phospho-p38 MAPK 及 TYR 表达量呈浓度依赖性增加，5 mg/mL 组达到峰值。Ahn JH 等人证实，TLR4 激活可通过 p38 MAPK 磷酸化促进 TYR 表达及黑素合成^[25,26]。基于上述发现，植物复合发酵液可能通过 TLR4/p38 MAPK 信号通路调控酪氨酸酶活性。



注：与空白对照组（0 mg/mL 植物复合发酵液）相比，*表示 $p<0.05$ 、**表示 $p<0.01$ 、***表示 $p<0.001$

图4 不同质量浓度的植物复合发酵液增加 B16 细胞内的酪氨酸酶活性



注：与空白对照组（B16 细胞+培养基）相比，a 表示 $p<0.001$ ；e 表示 $p>0.05$ 。

图5 不同质量浓度的植物复合发酵液促进酪氨酸酶合成通路的相关蛋白的表达

2.6 B16 细胞中不同浓度 TLR4 siRNA 的转染效率

为筛选高效抑制 TLR4 基因沉默体系，本研究首先评估了不同转染条件的效率（表 5）。结果显示：在 TLR4 siRNA 相同浓度下，5 μL Lipofectamine™ 2000 的转染效率较 2.5 μL 组显著提高（ $p<0.001$ ）。在 Lipofectamine™ 2000 相同浓度下，25~150 nM 的 TLR4 siRNA 呈现浓度依赖性增加，且浓度为 150 nM 的 TLR4 siRNA 组的转染效率最高，均值达 82.1%。200 nM TLR4 siRNA 组的转染效率较 150 nM 组显著降低（ $p<0.001$ ）。因此，采用 5 μL 的 Lipofectamine™ 2000 复合 150 nM 的 TLR4 siRNA 的转染复合物进行后续 siRNA 介导的 TLR4 基因沉默及相关信号通路调控的研究。

表5 不同转染条件下的转染效率

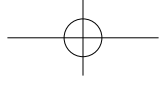
Lipofectamine™ 2000	转染效率 /%				
	25nM	50nM	100nM	150nM	200nM
2.5μL	11.2 ^a	13.5 ^a	28.6 ^a	57.4	49.3 ^a
5μL	15.6 ^b	19.4 ^b	43.9 ^b	82.1	63.7 ^b

注：与 150 nM 的 TLR4 siRNA 相比，当 Lipofectamine™ 2000 为 2.5 μL 时，a 表示 $p<0.001$ ；当 Lipofectamine™ 2000 为 5 μL 时，b 表示 $p<0.01$ 。

2.7 植物复合发酵液通过 TLR4/p38 MAPK 信号途径促进酪氨酸酶的表达

酪氨酸酶合成通路的相关蛋白的检测结果表明：植物复合发酵液能显著地促进 TLR4 蛋白的表达，并激活下游信号分子 p38 MAPK，增强 p38 MAPK 的磷酸化水平，从而促进酪氨酸 TYR 和黑素的合成（ $p<0.001$ ）。为明确 TLR4 在 TLR4/p38 MAPK 信号通路中对黑素合成的调控机制，本研究通过 siRNA 介导的 TLR4 基因沉默，检测了黑素合成相关蛋白的表达变化（图 6）。结果显示：与空白对照组（B16 细胞+培养基）相比，TLR4 siRNA 转染组中 TLR4 蛋白表达受抑制，Phospho-p38 MAPK 及 TYR 蛋白水平同步降低（ $p<0.001$ ）。然而，5 mg/mL 植物复合发酵液可逆转上述抑制效应（ $p<0.001$ vs TLR4 siRNA 组）。

黑素的合成是一个由几种酶催化的复杂过程，涉及多个基因位点编码产物的共同调控^[27]。其中，MITF 基因（小眼畸形相关转录因子）主要通过调控酪氨酸酶（TYR）、酪氨酸酶相关蛋白 1（TYRP1）等黑素合成限速酶相关基因的表达，参与黑素细胞的增殖和黑素合成过程^[28]。为探究 TLR4/p38 MAPK 信号通路是否通过调控 MITF 转录活性影响 TYR 表达，文章采用 qPCR 技术定量分析 TLR4 siRNA 转染后 B16 细胞中 TLR4、MITF 及



TYR的 mRNA 表达水平(图7)结果表明:与空白对照组相比,TLR4 siRNA 转染组中 TLR4 mRNA 表达量下降($p<0.001$),MITF 和 TYR 相关基因的转录水平显著降低($p<0.001$)。这提示 TLR4/p38 MAPK 可能通过调控 MITF 转录影响 TYR 表达。由于本研究仅专注于 TYR 和 MITF 基因的表达量,而细胞信号传导是一个复杂的过程,涉及多个基因和信号通路的交互作用。本研究尚未全面覆盖,因而可能无法全面揭示植物复合发酵液促黑素合成的作用机制。因此后续研究需考虑其他可能参与黑素合成调控的信号通路,如 PI3K/AKT、Wnt/ β -catenin、cAMP/PKA 等^[29]。

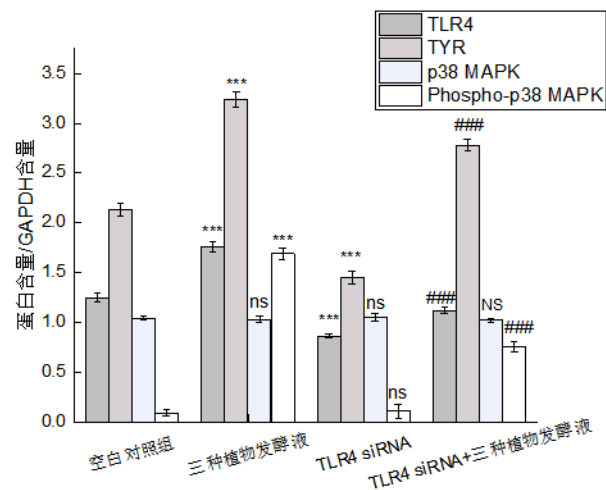
文章的研究结果表明了植物复合发酵液通过调控 TLR4/p38 MAPK 信号通路来增强 MITF 和酪氨酸酶的表达,从而促进黑素合成。尽管文章利用了 siRNA 转染方式特异性地沉默目标基因 TLR4 的表达以验证其对 B16 细胞黑素合成的调控作用。然而,siRNA 介导的基因沉默通常仅能实现瞬时抑制,难以维持长期稳定的基因表达调控。因此,基于上述研究的局限,后续工作将整合多维度基因调控模型,分别建立 TLR4 稳定敲低细胞系和采用 Tyr-CreERT2;TLR4^{fl/fl}小鼠模拟生理性基因缺失模型,以提高干扰靶基因 TLR4 表达的有效性和稳定性,深入地探讨植物复合发酵液对毛囊细胞的黑素合成促进作用的分子机制,以期开发头皮健康和改善白发的化妆品提供实验依据。

现代生物发酵技术不仅有助于富集化妆品原料中的保湿、抗氧化和抗衰老等活性物,还能产生出新的成分,改善化妆品的功效和安全性能^[30]。例如,冶荣等人发现天门冬经发酵后可能富含多酚类/皂苷等活性成分,表现出抗氧化活性^[31]。而且,酵母提取物由于富含核苷酸、蛋白质、氨基酸、糖类及多种微量元素,具有皮肤保湿、促进细胞更新、抗菌、抗氧化、延缓皮肤衰老等生物学效益。此外,含有酵母提取物等天然成分的配方提高了长期的耐受性^[32],在未来的发展中潜力巨大,已成为化妆品领域新的研发方向。

本研究表明,植物复合发酵液通过双重机制调控黑素合成。(i) 抗凋亡途径:通过上调 Bcl-2/Bax 比值并抑制 Caspase-3 活化,增强 B16 细胞存活率($p<0.01$);

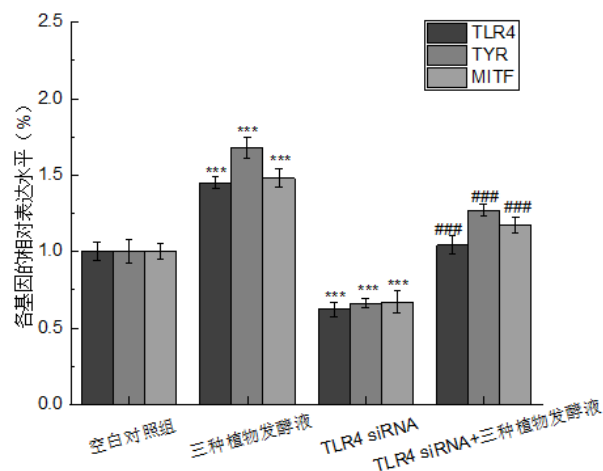
(ii) 黑素合成途径:激活 TLR4/p38 MAPK 信号通路,促进 MITF mRNA 和 TYR 蛋白表达及黑素生成($p<0.001$)。这些效应在毛囊黑素细胞中可能产生协同作

用,其机制包括:维持黑素细胞存活、促进黑素合成及转移,有利于改善头皮和头发健康,以期达到促进毛发色素沉着的效果。基于上述发现,天门冬-红茶-何首乌复合发酵液在白转黑产品中具有潜在的应用价值。



注:与空白对照组(B16细胞+培养基)相比,***表示 $p<0.001$,ns表示 $p>0.05$;与模型组(TLR4 siRNA)相比,NS表示 $p>0.05$,###表示 $p<0.001$

图6 植物复合发酵液下调 TLR4 siRNA 对酪氨酸酶合成通路的相关蛋白的抑制作用



注:与空白对照组(B16细胞+培养基)相比,***表示 $p<0.001$;与 siRNA TLR4 相比,###表示 $p<0.001$

图7 植物复合发酵液下调 siRNA TLR4 对酪氨酸酶合成通路相关基因的抑制作用

3. 结论

本文以天门冬-红茶-何首乌复合发酵液为研究对象,利用体外细胞实验探究其对 H_2O_2 诱发 B16 细胞凋亡的保护作用、提高 B16 细胞酪氨酸酶活性和黑素生成的分子

机制。

(1) 0.625、1.25、2.5、5mg/mL的植物复合发酵液提高了B16细胞的活力,与模型组(200 $\mu\text{mol/LH}_2\text{O}_2$)相比,0.625mg/mL的条件下差异显著;而1.25~5mg/mL的条件下差异非常极显著($p<0.001$)。后续研究采用ELISA法检测凋亡相关蛋白的含量,发现1.25~5mg/mL的植物复合发酵液呈剂量依赖性地减少 H_2O_2 诱导的促凋亡相关蛋白Bax、Caspase-3的表达,并增加了抑制凋亡相关蛋白Bcl-2的表达($p<0.001$),从而抑制B16细胞凋亡。这提示了植物复合发酵液通过Bcl-2/Bax-Caspase3信号通路阻抑 H_2O_2 诱导的B16细胞凋亡,提高细胞的存活率。 H_2O_2 模拟了压力状态下的氧化应激状态,故推测植物复合发酵液拮抗凋亡的潜在机制可能与增强细胞抗氧化能力相关。

B16细胞经1.25、2.5、5 mg/mL不同质量浓度的植物复合发酵液分别处理24 h后,显著地提高黑素合成关键酶酪氨酸酶的活力、TLR4、Phospho-p38 MAPK、TYR的表达量和黑素合成,且与空白对照组(B16细胞+培养基)相比,差异非常极显著($p<0.001$)。

文章利用了RNA干扰技术探究了植物复合发酵液对TLR4/p38 MAPK信号途径的调控作用。结果表明:与TLR4 siRNA转染组相比,B16细胞补充了5 mg/mL植物复合发酵液不仅能明显恢复TLR4、Phospho-p38 MAPK和TYR相关蛋白由于转染了TLR4 siRNA而表达降低的情况($p<0.001$),而且能上调TYR基因及其上游调控因子MITF基因的表达($p<0.001$)。MITF可通过结合TYR基因启动子区域的M-box结构位点,从而激活TYR基因的转录^[29]。综合以上研究发现,1.25~5mg/mL的植物复合发酵液上调了B16细胞表面的Toll样受体4(TLR4)的表达,通过TLR4刺激诱导的p38 MAPK磷酸化实现了小眼畸形相关转录因子(MITF)和酪氨酸酶(TYR)的诱导表达,最终促进了B16细胞黑素的合成。随着人们对天然成分、可持续发展、安全与健康化妆品的需求日益增长,植物复合发酵液有望成为头皮养护和白转黑产品中一种新兴的化妆品原料。

参考文献

[1]Park AM, Khan S, Rawnsley J. Hair Biology: Growth and Pigmentation[J]. Facial Plast Surg Clin North Am. 2018,26(4):415–

424.

[2]Philpott MP. Watching hair turn grey[J]. Elife. 2021,30:1–3.

[3]Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, et al. Hair follicle pigmentation[J]. Invest Dermatol. 2005,124(1):13–21.

[4]Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, et al. Skin melanocytes: biology and development[J]. Postepy Dermatol Alergol. 2013,30(1):30–41.

[5]Rosenberg AM, Rausser S, Ren J, et al. Quantitative mapping of human hair greying and reversal in relation to life stress[J]. Elife. 2021,10:3–29.

[6]Fernandes B, Cavaco-Paulo A, Matamá T. A Comprehensive Review of Mammalian Pigmentation: Paving the Way for Innovative Hair Colour-Changing Cosmetics. Biology (Basel)[J]. 2023,12(2):290.

[7]Arck PC, Overall R, Spatz K, et al. Towards a “free radical theory of graying”: melanocyte apoptosis in the aging human hair follicle is an indicator of oxidative stress induced tissue damage[J]. FASEB J. 2006,20(9):1567–1569.

[8]Tobin DJ, Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. Exp Gerontol[J]. 2001,36(1):29–54.

[9]Keenan CR, Allan RS. Epigenomic drivers of immune dysfunction in aging[J]. Aging Cell. 2019,18(1):2–10.

[10]Koike S, Yamasaki K. Melanogenesis Connection with Innate Immunity and Toll-Like Receptors. Int J Mol Sci. 2020,21(24):9769.

[11]Xie XD, Tang M, Yi SL, et al. Polysaccharide of Asparagus cochinchinensis (Lour.) Merr regulates macrophage immune response and epigenetic memory through TLR4-JNK/p38/ERK signaling pathway and histone modification[J]. Phytomedicine. 2024,124:2–10.

[12]Fischer TW, Herczeg-Lisztes E, Funk W, et al. Differential effects of caffeine on hair shaft elongation, matrix and outer root sheath keratinocyte proliferation, and transforming growth factor- β 2/insulin-like growth factor-1-mediated regulation of the hair cycle in male and female human hair follicles in vitro[J]. Br J Dermatol. 2014,171(5):1031–1043.

[13]曹建蕾. 红茶中咖啡因含量的测定[J]. 化工设计通讯, 2019,(12):50–52.

[14]姜泽群, 吴琼, 徐继敏, 等. 中药何首乌促进黑素生成的作用机理研究[J]. 南京中医药大学学报, 2010,(3):190–192.

[15]张瑞晨, 刘斌, 孙震晓, 等. 何首乌提取物对人正常肝细胞L02周期阻滞及凋亡的影响[J]. 中西医结合学报, 2010,(6):554–560.

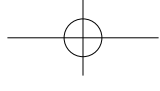
[16]曹杰, 许枏, 高慧, 等. 天南星加胆汁发酵炮制减毒机理研究[J]. 健康女性, 2023,(42):17–20.

[17]李洁, 曾钰, 张明明, 等. 破坏细胞壁蛋白CWP2基因提高重组酿酒酵母 β -葡萄糖苷酶胞外酶活[J]. 微生物学通报, 2020,(3):681–690.

[18]李洋, 黄丹, 杨安全, 等. 植物提取物生物发酵及其产物在化妆品中的应用[J]. 林业工程学报, 2024,(5):1–12.

[19]HUSSAIN A, BOSE S, WANG J H, et al. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines[J]. Food Research International, 2016, 81: 1–16.

[20]Tang L, Jian L, Xiao L, et al. Oxidation levels differentially



impact melanocytes: Low versus high concentration of hydrogen peroxide promotes melanin synthesis and melanosome transfer [J]. *Dermatology*, 2012, 224(2): 145–153

[21] Takata T, Motoo Y, Tomosugi N. Effect of Saikokeishito, a Kampo medicine on hydrogen peroxide induced premature senescence of normal human dermal fibroblasts[J]. *J Integr Med*, 2014, 12(6): 495–503.

[22] 甘聃, 孙静, 杨继国. 荔枝发酵物提高人体皮肤 HaCat 细胞的抗氧化能力及对细胞凋亡的修复作用[J]. *现代食品科技*, 2024, (11): 79–86.

[23] 杨红, 王克玉, 张向红, 等. 过氧化氢对体外培养的黑素细胞形态及功能的影响[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2006, (7): 538–540.

[24] Chung S, Lim GJ, Lee JY. Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture. *Sci Rep*. 2019, 9(1): 780.

[25] Ahn JH, Park TJ, Jin SH, et al. Human melanocytes express functional Toll-like receptor 4[J]. *Exp Dermatol*. 2008, 17(5): 412–417.

[26] Ahn JH, Jin SH, Kang HY. LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes[J]. *Arch Dermatol Res*.

2008, 300(6): 325–329.

[27] Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*. 2000, 14(14): 1712–28.

[28] d'Ischia M, Wakamatsu K, Cicoira F, et al. Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015, 28(5): 520–544.

[29] Serre C, Busuttill V, Botto JM. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. *Int J Cosmet Sci*. 2018, 40(4): 328–347.

[30] 刘雨, 姜明星, 张珂. 发酵技术在化妆品中的应用进展[J]. *发酵科技通讯*, 2022, (2): 124–124.

[31] 冶荣, 马梦璇, 阿曼娜·艾则孜, 等. 天门冬酒的酿制工艺研究[J]. *食品与营养科学*, 2025, 14(3), 484–495.

[32] Tao Z, Yuan H, Liu M, et al. Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol*. 2023, 33(2): 151–166.

Molecular Mechanisms Underlying Melanogenesis Promotion by Asparagus Cochinchinensis-Black Tea-Polygonum Multiflorum Co-Fermentation Extract

Zhang Yan-mei¹, Peng Si-tong², Kang Li¹, Li Ying-yan¹, Yin Jie-chun³, Han Juan-juan⁴, Li Yan-long⁴, Li Rou-rou^{1,5}, Zhang Tai-jun^{*}

(1. Guangzhou Emperor's Wisdom Skin and Biotechnology Institute Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, 510800;

2. Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo, Zhejiang, 315599;

3. Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou, Henan, 450002;

4. KOSLIV (Shenzhen) Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong, 518000;

5. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, 510006)

Abstract : Hair color is determined by melanin synthesized within the hair follicles during the anagen phase. However, the activity and function of melanocytes are influenced by multiple factors. Extracts obtained through the fermentation of *Asparagus cochinchinensis*, black tea, and *Polygonum multiflorum* may promote melanogenesis, but their underlying mechanisms remain unclear. This study aimed to investigate the melanogenic effects of the blended three-plant fermented extract and elucidated its underlying molecular mechanisms via key signaling pathways. The results revealed that the fermented botanical extract (1.25~5mg/mL) exhibited dual protective effects: (i) it attenuated H₂O₂-induced apoptosis in B16 cells by regulating the Bcl-2/Bax-Caspase3 axis, resulting in significantly enhanced cell viability ($p < 0.001$); (ii) it simultaneously promoted melanogenesis through the TLR4/p38 MAPK signaling pathway activation.

Keywords : plant fermented extract; melanin; B16 melanoma cells; tyrosinase; signaling pathway

