

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80971

雨生红球藻粉对脂多糖诱导的人口腔上皮角质细胞屏障损伤的改善作用

谢金梅¹ 陈彩炼^{2,3} 张 勇⁴ 郑云剑⁴ 谢 曦^{2,3}

(1. 海南大学食品科学与工程学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 3. 海南大学药学院, 海南 海口 570228; 4. 爱尔发生物科技(嘉兴)有限公司, 浙江 海宁 314400)

摘要: [目的] 探讨雨生红球藻粉(*Haematococcus pluvialis*, *H. pluvialis*)对脂多糖(LPS)诱导的口腔上皮损伤的保护作用。[方法] 检测不同剂量的*H. pluvialis*对人正常口腔上皮角质细胞(HOKs)活力的影响; 测定LPS诱导的HOKs中紧密连接相关蛋白ZO-1和Occludin、线粒体形态、活性氧(ROS)、线粒体膜电位(MMP)、线粒体超氧化物(MitoSOX)和线粒体通透性转换孔(MPTP)的变化。[结果] 与LPS模型组相比, 高剂量*H. pluvialis*显著上调Occludin和ZO-1蛋白表达水平分别至151.56%和170.52% ($P < 0.05$), 并且促进了Occludin和ZO-1蛋白的细胞膜分布。此外, *H. pluvialis*明显改善了LPS诱导的HOKs中产生过量的ROS、MitoSOX、MMP的降低和MPTP增大。[结论] *H. pluvialis*可能通过改善线粒体功能障碍和降低氧化应激水平改善LPS诱导的HOKs屏障损伤, 提示*H. pluvialis*可开发为口腔黏膜屏障修复的功能性食品。

关键词: 雨生红球藻粉; 功能性食品; 上皮细胞屏障功能; 线粒体功能障碍; 氧化应激

Ameliorating effect of *Haematococcus pluvialis* powder on LPS-induced barrier damage in HOK cells

XIE Jinmei¹ CHEN Cailian^{2,3} ZHANG Yong⁴ ZHENG Yunjian⁴ XIE Xi^{2,3}

(1. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;
2. Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;
4. Aierfa Biotechnology Co., Ltd., Haining, Zhejiang 314400, China)

Abstract: [Objective] To investigate the protective effect of *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) powder on lipopolysaccharide (LPS)-induced oral epithelial damage. [Methods] The effects of different doses of *H. pluvialis* on the viability of human oral keratinocytes (HOKs) were assessed. In LPS-induced HOKs, changes in the tight junction-associated proteins ZO-1 and Occludin, mitochondrial morphology, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP), mitochondrial superoxide (MitoSOX), and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) were evaluated. [Results] Compared with the LPS model group, high-dose *H. pluvialis* significantly upregulated the expression levels of Occludin and ZO-1 to 151.56% and 170.52%, respectively ($P < 0.05$), and promoted their membrane localization. In addition, *H. pluvialis* markedly improved LPS-induced excessive ROS and MitoSOX production, the reduction in MMP, and the increase in MPTP in HOKs. [Conclusion] *H. pluvialis* may alleviate LPS-induced barrier damage in HOKs by improving mitochondrial dysfunction and reducing oxidative stress, suggesting its potential as a functional food for

基金项目: 海南省自然科学基金项目(编号: 823RC467, 821MS027, 822MS054); 国家自然科学基金项目(编号: 82360731); 科技人才与平台计划(院士专家工作站, 云南省孙树侠专家工作站, 编号: 202305AF150114)

通信作者: 谢曦(1986—), 女, 海南大学教授, 博士。E-mail: xiexi@hainanu.edu.cn

收稿日期: 2024-09-20 **改回日期:** 2025-06-13

引用格式: 谢金梅, 陈彩炼, 张勇, 等. 雨生红球藻粉对脂多糖诱导的人口腔上皮角质细胞屏障损伤的改善作用[J]. 食品与机械, 2025, 41(9): 137-146.

Citation: XIE Jinmei, CHEN Cailian, ZHANG Yong, et al. Ameliorating effect of *Haematococcus pluvialis* powder on LPS-induced barrier damage in HOK cells[J]. Food & Machinery, 2025, 41(9): 137-146.

oral mucosal barrier repair.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; functional food; epithelial cell barrier function; mitochondrial dysfunction; oxidative stress

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*, *H. pluvialis*)是一种隶属绿藻门红球藻属的淡水藻类。因其富含 β -胡萝卜素、藻蛋白、n-3 不饱和脂肪酸和虾青素等生物活性物质被誉为具有高营养价值的经济微藻^[1-2]。有研究^[3]表明,*H. pluvialis*提取物可以促进细胞再生、减少衰老细胞的堆积和维持机体的平衡。由于*H. pluvialis*具有出色的抗氧化性与抗衰老特性^[4],已被广泛应用于保健品、饲料和化妆品等领域^[5]。

口腔上皮屏障由角质形成细胞组成,其功能完整依赖于细胞—细胞和细胞—基质连接,这是保护口腔组织免受有害物质侵害的屏障^[6]。在细胞—细胞连接中,紧密连接是顶端蛋白复合物,在调节上皮屏障细胞通透性方面发挥重要作用^[7]。上皮屏障的基本成分缺失或结构改变会导致上皮屏障功能失调^[8]。病原微生物及其毒力因子等破坏黏膜上皮可能诱发口腔黏膜多种免疫性疾病损伤的发生,白色念珠菌素诱导上皮屏障钙离子的流入与乳酸脱氢酶的释放会造成细胞上皮屏障损伤^[9-10]。口腔常见细菌主要是变形链球菌、葡萄球菌和乳酸杆菌等,脂多糖是所有这些细菌细胞壁的组成部分,大量存在于患牙周病的牙齿表面引起炎症反应造成口腔屏障损伤^[11]。基于此,采用LPS刺激HOKs作为口腔黏膜屏障损伤细胞模型进行后续研究。

线粒体作为机体重要的产能、储能器官,为糖、脂肪、蛋白质等供能物质提供氧化代谢发生的场所,对机体活动起着重要的调控作用^[7]。Soliman等^[12]研究发现,线粒体功能障碍与各种全身和局部疾病有关,包括牙周炎、口腔癌和颞下颌关节疾病等口腔疾病。Ellakwa等^[13]研究发现,线粒体在口腔炎症性疾病的发病机制和治疗靶向中起着关键作用,强调了它们在细胞机制中的重要作用。线粒体完整性经常受损,结构异常在涉及口腔炎症的情况下很常见^[14]。当线粒体功能发生障碍时,伴随活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生、MMP降低和线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的开放,进而形成恶性循环,最终导致细胞炎症或细胞死亡^[15]。Wang等^[16]研究发现,*H. pluvialis*通过降低细胞内活性氧水平、提高线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)水平和积累糖原来有效延长酵母实际寿命,*H. pluvialis*对口腔细胞中的线粒体是否也具有保护效应值得进一步探索。

*H. pluvialis*在口腔疾病中的保护作用尚未见报道。

基于以上研究背景,研究拟探索*H. pluvialis*是否能改善LPS诱导的HOKs屏障功能障碍,上调上皮屏障相关蛋白水平,并探索*H. pluvialis*对口腔上皮屏障的保护效应是否与改善线粒体功能障碍和降低氧化应激水平有关,旨在为将*H. pluvialis*开发为新型口腔黏膜屏障保护性食品提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

激光共聚焦显微镜:FV3000型,日本奥林巴斯(Olympus)公司;

化学发光成像仪:Amersham Image Quant800型,美国Cytiva公司;

CO₂培养箱:CPY-180型,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1D型,上海泸净医疗器械有限公司;

电转仪:Bio-Rad型,美国Bio-Rad公司;

高速台式冷冻离心机:H1750R型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

口腔专用角质细胞培养基:M1004,上海美湾生物科技有限公司;

脂多糖(LPS):CS0158纯度 $\geq 99\%$,金克隆(北京)生物技术有限公司;

CCK-8试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE)、线粒体通透性转换孔(MPTP)检测试剂盒、MitoSOX Red线粒体超氧化物指示剂、活性氧ROS检测荧光探针:上海碧云天生物技术有限公司;

ROS活性氧检测试剂盒:江苏凯基生物技术股份有限公司;

线粒体提取试剂盒:武汉赛维尔生物有限公司;

ZO-1、Occludin和GAPDH:纯度 $\geq 99\%$,武汉赛维尔生物有限公司。

1.2 样品与细胞株

人正常口腔黏膜上皮角质细胞(HOKs):上海美湾生物科技有限公司;

雨生红球藻粉:云南爱尔发生物技术股份有限公司;

虾青素:纯度 $> 98\%$,成都普瑞法科技开发有限公司。

1.3 方法

1.3.1 雨生红球藻的配制及CCK-8试验 称取适量的雨

生红球藻粉末溶解于 DMSO 溶液中配成质量浓度为 30 mg/mL 的母液备用。将生长状态良好的 HOKs 以 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔。*H. pluvialis* 处理组加入含不同剂量梯度的 *H. pluvialis* (0, 6.0, 12.0, 24.0, 48.0, 96.0, 192.0 $\mu\text{g/mL}$) 的培养基处理 24 h 后弃去原培养基, 每孔加入含 10% CCK-8 试剂的不含血清的培养基, 无细胞的孔做空白对照, 37 °C 孵育 2 h, 在 $A_{450\text{ nm}}$ 测量吸光度, 根据式(1)计算细胞相对活力。

$$v = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

v ——细胞相对活力, %;

A_1 ——*H. pluvialis* 处理组的细胞吸光度;

A_2 ——无细胞孔的吸光度;

A_3 ——对照组细胞吸光度。

1.3.2 细胞传代与种板 HOKs 培养于口腔角质细胞专用培养基中 (37 °C, 5% CO_2)。当 HOKs 密度达到培养瓶面积的 80% 后就可进行传代。细胞用 PBS 洗 3 次, 确保把培养瓶中的代谢产物、死细胞、棉花絮清洗干净。随后加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化液立即置于 37 °C 培养箱内消化 10 min。吸取培养瓶中所有液体并全部转移到 15 mL 离心管中, $1\,000 \times g$ 离心 5 min。结束后, 吸弃上清, 加入 1 mL 培养基重悬细胞, 将细胞吹散至单细胞状态。细胞计数后将 1.5×10^5 个细胞种入 60 mm 细胞培养皿中。虾青素 (astaxanthin, AST) 在治疗炎症领域的效果是公认的^[17], 其在口腔炎症的应用也有报道^[18], 因此以虾青素作为阳性对照探讨雨生红球藻对口腔炎症的影响。试验分组: 正常对照组、LPS 诱导组 (培养基中加入终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS)、LPS+AST (培养基中加入终质量浓度为 12 $\mu\text{g/mL}$ 的 AST)、LPS+*H. pluvialis* (培养基中加入终质量浓度分别为 6, 12, 24 $\mu\text{g/mL}$ 的 *H. pluvialis*), 细胞处理 24 h 后可进行后续试验。

1.3.3 Western blot 试验 HOKs 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 然后浸在裂解缓冲液中, 完全刮除后, 倾斜嵌入水中, 待细胞和液体集中滑落到培养皿边, 用移液器吸取液体, 置于事先标好序号的离心管中, 放置在冰上 30 min。4 °C、 $12\,000 \times g$ 离心 20 min, 再用二喹啉甲酸定量蛋白质浓度, 用聚丙烯凝胶电泳, 随后转移到硝酸纤维素膜上。用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液阻断非特异性结合, 回收封闭液, 置于 4 °C 冰箱内。根据试验所需蛋白的相对分子质量, 将条带剪切好, 背对背分别置于相应做好标记的 10 mL GADPH、ZO-1 和 Occludin 抗体内, GADPH、ZO-1 和 Occludin 与一抗稀释液的比例分别为 1:4 000, 1:

2 000, 1:2 000。4 °C 下孵育过夜, 第 2 天将条带取出并将抗体管放回冰箱内, 在室温下加入 5 mL HRP 二抗孵育 (1:5 000) 1.5 h。靶蛋白—抗体复合物用特超敏 ECL 化学发光试剂盒 (BeyoECL Star) 显像。图像由超灵敏多功能成像仪检测, 并用 Image J 分析处理^[19]。

1.3.4 细胞免疫荧光 细胞在给药处理 24 h 后, 将细胞从细胞培养箱内取出, 用 PBS 洗 3 遍, 加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 固定 15 min。吸弃液体, 室温下干燥 10 min。PBS 清洗 3 遍后用 10% 的山羊血清封闭液封闭 30 min, 吸弃封闭液, 用 PBS 反复清洗 3 遍至干净, 随后在相应的疏水圈中加入 100 μL 用 10% 山羊血清稀释的 Occludin 和 ZO-1 抗体置于 4 °C 冰箱孵育过夜, Occludin 和 ZO-1 与 10% 山羊血清的比例均按 1:200 配制。次日, 在相应的疏水圈中加入 100 μL 带荧光标记的二抗在室温下避光孵育 1 h。二抗与 10% 山羊血清的配比为 1:100。最后每个疏水圈中加入 100 μL DAPI 复染细胞核 15 min, 洗涤后封片并于倒置荧光显微镜下观察。

1.3.5 细胞活性氧检测 将 2×10^4 个 HOKs 接种于 29 mm 的玻璃底小皿中, 待细胞生长状态良好进行分组给药处理 24 h, 加入 1 mL 含 DHE (dihydroethidium, DHE) 终浓度为 45 $\mu\text{mol/L}$ 的新鲜培养液, 在 37 °C 培养箱避光孵育 45 min。细胞核用稀释后的 Hoechst 33342 染液进行复染, 检测缓冲液与 Hoechst 33342 配比为 1:100 配制, 避光孵育 45 min, 于荧光倒置显微镜中观察并拍照获取照片。

1.3.6 透射电镜观察 HOKs 线粒体形态 将 4×10^5 个 HOKs 接种于 100 mm 培养皿中, 待细胞密度至 80% 时进行相应处理。随后加入 2 mL 0.25% 胰蛋白酶消化液立即置于 37 °C 培养箱内消化 10 min, 吸弃培养基加入 PBS 洗涤, $800 \times g$ 离心 10 min 收集细胞, 计数。每次提取需要 5×10^7 个细胞, 加入 1.0 mL 冰预冷的 Lysis Buffer 重悬细胞, 将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内, 冰浴研磨 30~40 次。4 °C、 $12\,000 \times g$ 离心 10 min。线粒体沉淀在管底, 用电镜固定液重悬线粒体沉淀。后续步骤委托武汉赛维尔生物科技有限公司完成。

1.3.7 线粒体通透性转换孔检测 将 2×10^4 个 HOKs 接种于 29 mm 的玻璃底小皿中, 待细胞生长状态良好进行分组给药处理 24 h, 荧光淬灭工作液按照 calcein AM 染色液和 CoCl_2 配比为 100:1 配制, CCCP 阳性对照液的配制按照荧光淬灭工作液和 Ionomycin 配比为 200:1 配制。阳性对照组加入 1 mL 阳性对照液, 其他组各加入 1 mL 荧光淬灭工作液, 37 °C 培养箱避光孵育 1 h。孵育结束后, 更换为预热新鲜培养基在 37 °C 培养箱中避光孵育

30 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。使用稀释后的 Hoechst 33342 染核液复染细胞核 45 min。检测缓冲液与 Hoechst 33342 配比为 1:100 配制。用 PBS 清洗 3 遍, 每皿加入 1 mL 检测缓冲液于倒置荧光显微镜观察捕获图像。

1.3.8 线粒体超氧化物检测 将 2×10^4 个 HOKs 接种于 29 mm 的玻璃底小皿中, 待细胞生长状态良好进行分组给药处理 24 h, 线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) 水平采用 Mitochondrial Superoxide Indicator MitoSOX Red 探针测定。将超氧化物探针工作液用 HBSS 稀释至 $5 \mu\text{mol/L}$ 加入细胞中, 在 37°C 培养箱避光孵育 30 min。细胞核用检测缓冲液稀释的 Hoechst 33342 染色液染色, 在 37°C 培养箱避光孵育 45 min, 检测缓冲液与 Hoechst 33342 配比为 1:100 配制。每皿加入 1 mL 检测缓冲液于共聚焦显微镜下观察拍照。

1.3.9 线粒体膜电位检测 将 2×10^4 个 HOKs 接种于 29 mm 的玻璃底小皿中, 待细胞生长状态良好进行分组给药处理 24 h, 阳性对照组中的细胞用 CCCP ($20 \mu\text{mol/L}$) 在 37°C 培养箱中孵育 30 min。处理结束后, 所有组细胞吸弃培养基, 用 PBS 清洗细胞。随后将细胞孵育于用检测缓冲液稀释的 TMRE 染色工作液中避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤两次, 使用稀释后的 Hoechst 33342 染核液复染细胞核 45 min, 检测缓冲液与 Hoechst 33342 配比为 1:100 配制。用 PBS 反复清洗 3 遍至干净, 每皿加入 1 mL 检测缓冲液于共聚焦显微镜下观察拍照。

1.4 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism 9.1 统计软件作图, 对数据归一化处理后, 绘制成柱形图形式。试验数据采用 IBM SPSS Statistics 23 软件统计分析, 结果以均数士标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析和事后多重比较, $P < 0.05$ 被认为存在统计学差异。

2 结果与分析

2.1 *H. pluvialis* 对 HOKs 活力的影响

根据 LPS 造模时间为 24 h 确定 *H. pluvialis* 诱导细胞的时间为 24 h。给予 6, 12, 24, 192 $\mu\text{g/mL}$ 的 *H. pluvialis* 治疗 24 h 后用倒置显微镜观察 HOKs 形态如图 1 所示, 其中 *H. pluvialis* 剂量为 192 $\mu\text{g/mL}$ 下的细胞状态与正常组并无显著差异。采用梯度剂量设计, 分别以 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96, 192 $\mu\text{g/mL}$ 的 *H. pluvialis* 处理 HOKs 24 h。结果 (图 2) 显示, *H. pluvialis* 在 3~24 $\mu\text{g/mL}$ 剂量区间细胞相对活力有一定的上升趋势, 但该趋势与正常组相比无统计学差异 ($P > 0.05$)。在 48~192 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度区间细胞相对活力与正常组相比有下降趋势, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。有研究证实, *H. pluvialis* 富含 β -胡萝卜素、藻蛋白、n-3 不饱和脂肪酸等生物活性物质^[1], 这些活性物质使其具有出色的抗氧化性和抗衰老特性^[4]。基于前人的研究和试验结果, 推测 *H. pluvialis* 中的活性物质如虾青素、叶黄素和不饱和脂肪酸等对细胞形态和细胞活力具有保护效应。基于 CCK8 试验数据, 选择安全剂量为 6, 12, 24 $\mu\text{g/mL}$ 进行后续试验。

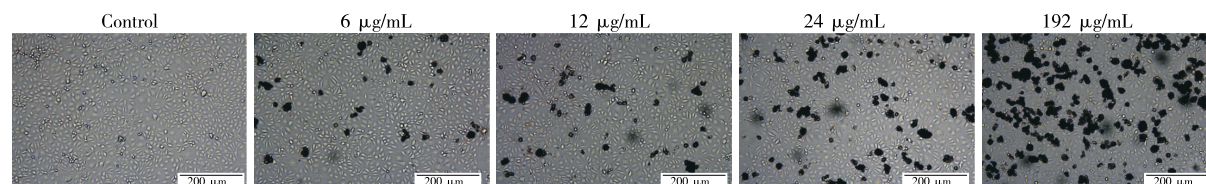


图 1 不同质量浓度的 *H. pluvialis* 诱导 24 h 后 HOKs 的形态变化

Figure 1 Morphological changes of HOKs after *H. pluvialis* induction for 24 h at different concentrations

2.2 *H. pluvialis* 改善 LPS 诱导的 HOKs 屏障功能损伤

紧密连接 (tight junction, TJ) 是由多个蛋白构成的大分子复合物, 聚集在所有上皮细胞和内皮细胞的顶侧膜区域^[7]。TJ 在调节上皮屏障细胞通透性方面发挥重要作用, 其通过调节水、离子和小分子物质的转运, 同时限制大分子和微生物的通过从而创造一个理想的环境, 发挥着重要的屏障和栅栏功能^[20]。Occludin 和 claudin 蛋白家族是跨膜蛋白, 这些跨膜蛋白通过细胞质附着蛋白 ZO 与细胞骨架连接, 形成完整的细胞与细胞之间的紧密连接

结构^[21]。Guo 等^[22]报道 LPS 通过激活 TLR4 信号通路增加细胞与细胞之间紧密连接的通透性; Zou 等^[23-24]研究表明, LPS 下调 ZO-1 和 Occludin 的表达, 从而破坏细胞与细胞之间的紧密连接结构。蛋白质印迹法获得各组灰度条带变化如图 3 所示。由图 4 可知, 与正常组相比, LPS 组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平显著降低, 而 *H. pluvialis* 高剂量组中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达量较 LPS 组分别显著提高 151.56% 和 170.52% ($P < 0.05$)。通过细胞免疫荧光检测 ZO-1 和 Occludin 蛋白的定位与表达。

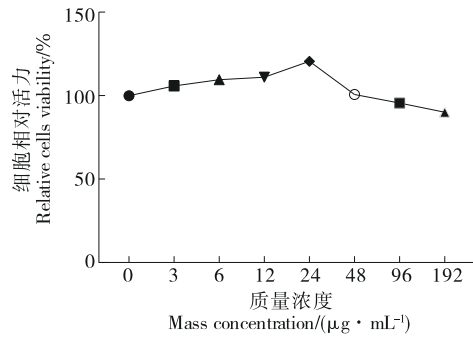


图2 不同质量浓度 *H. pluvialis* 处理 24 h 后 HOKs 的活力
Figure 2 Cell viability of HOKs after *H. pluvialis* treatment for 24 h at different concentrations

如图 5 所示,与正常组相比,模型组 ZO-1 和 Occludin 不能定位于细胞膜上,大部分聚集在细胞质,并且蛋白表达水平显著降低,可能是 LPS 诱导 TJ 通透性增加降低了 TJ 蛋白的膜定位。与模型组相比,*H. pluvialis* 治疗组和 AST 治疗组明显减少了 ZO-1 和 Occludin 在细胞质的聚集,增强了 ZO-1、Occludin 在细胞膜上的定位和表达。然而与虾青素组相比,*H. pluvialis* 低剂量组中 Occludin 蛋白的表达水平较虾青素组高 25.65%。免疫荧光结果观察到 *H. pluvialis* 高剂量中 ZO-1、Occludin 在细胞膜上的定位和表达优于虾青素组,并且在同等剂量下,*H. pluvialis* 组中 Occludin 蛋白比 AST 组能更好地定位在细胞膜上。这些试验结果表明,*H. pluvialis* 可通过增强 ZO-1 和 Occludin 蛋白在细胞膜上的定位和提高蛋白的表达水平来改善 LPS 诱导的 HOKs 屏障功能损伤,且已

有学者^[25]发现 AST 能够改善槟榔碱诱导的 HOKs 屏障功能损伤,进一步证实 AST 是 *H. pluvialis* 中口腔屏障保护作用的主要活性物质。除此之外,*H. pluvialis* 中还含有叶黄素、 β -胡萝卜素和脂肪酸^[26],基于试验结果推测这些成分对口腔屏障损伤也具有一定的保护作用,且可能通过上调 ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达水平,增强 ZO-1 和 Occludin 在细胞膜上的定位来改善 LPS 诱导的 HOKs 屏障功能损伤。

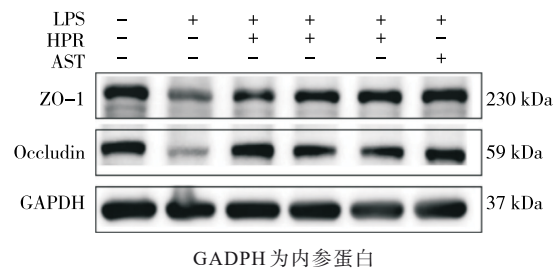


图3 蛋白免疫印迹法检测 HOKs 中紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 表达的变化
Figure 3 Changes in expression of tight junction proteins Occludin and ZO-1 in HOKs by Western blot analysis

2.3 *H. pluvialis* 减轻 LPS 诱导的 HOKs 氧化应激

ROS 作为氧化应激启动的关键因子,也是反映细胞氧化应激水平的直接指标^[27]。口腔中 ROS 的过量产生可能会导致氧化应激和对细胞 DNA、脂质和蛋白质的氧化损伤,从而易患许多口腔和全身性疾病^[28]。龙淳等^[29]研究发现,大黄素能够降低 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞

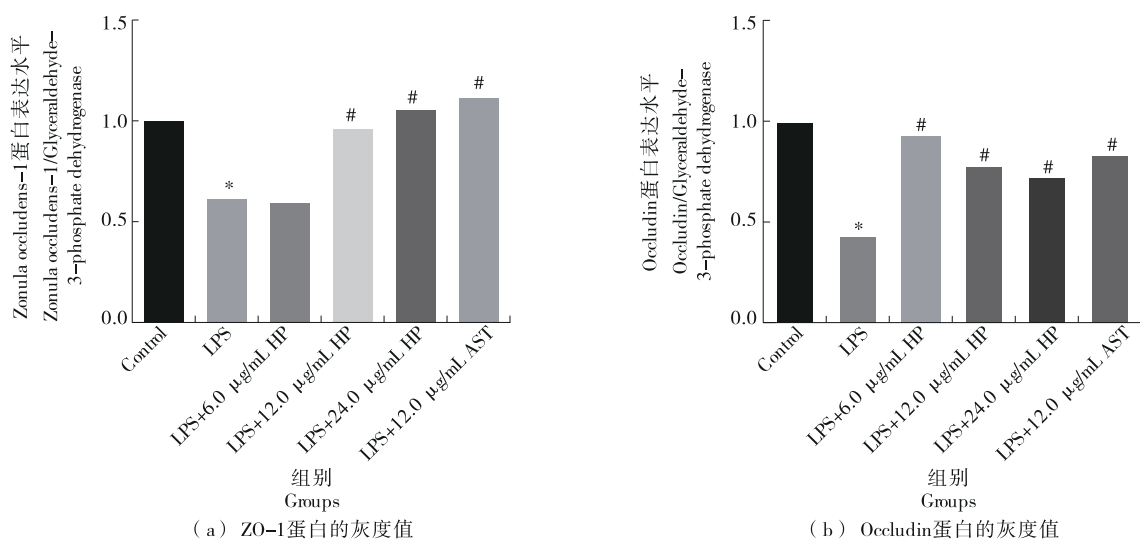


图4 *H. pluvialis* 对 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平的影响
Figure 4 Effect of *H. pluvialis* on the expression levels of Occludin and ZO-1 proteins

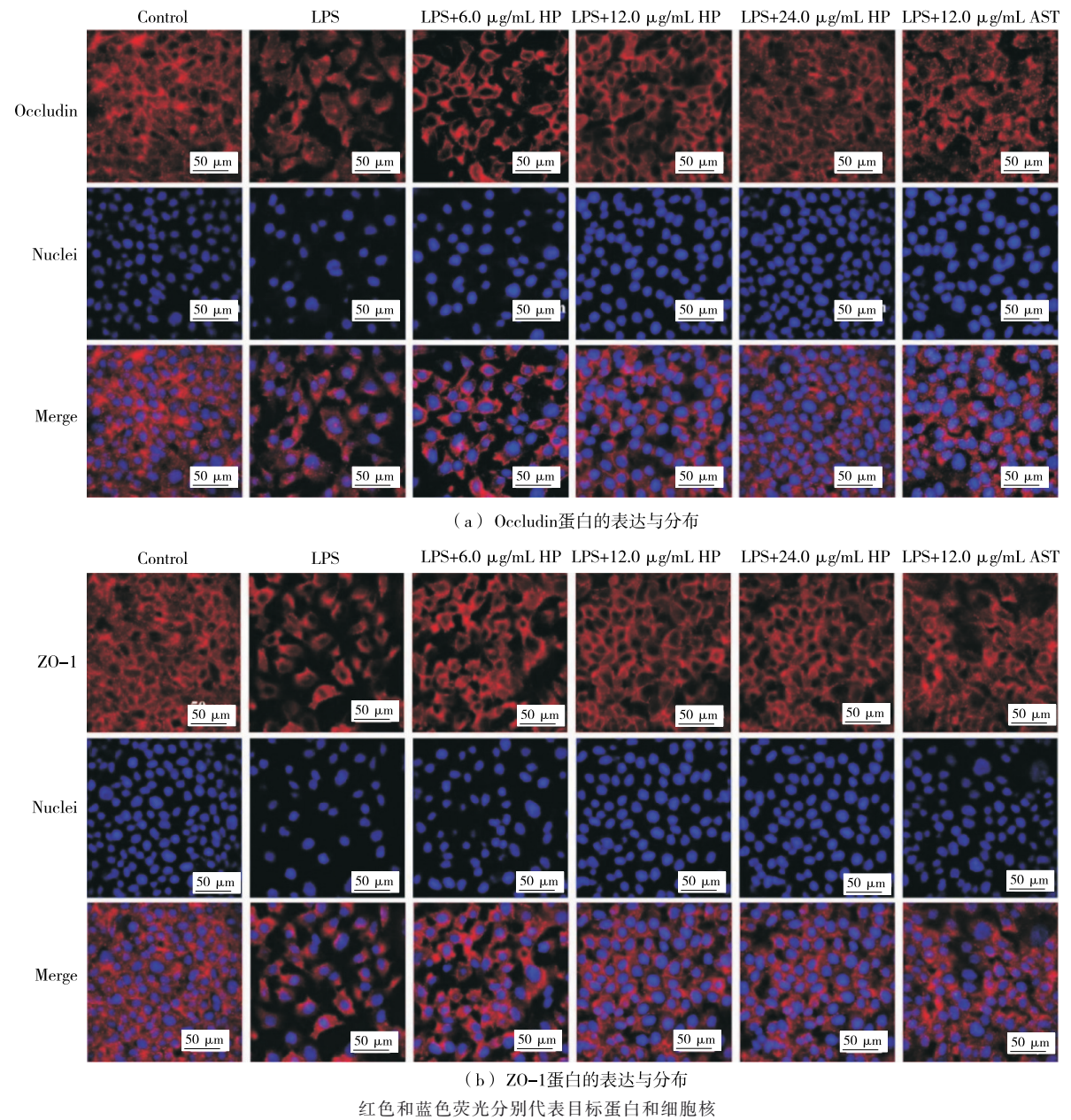


图 5 细胞免疫荧光法测定 Occludin 和 ZO-1 蛋白的表达与分布

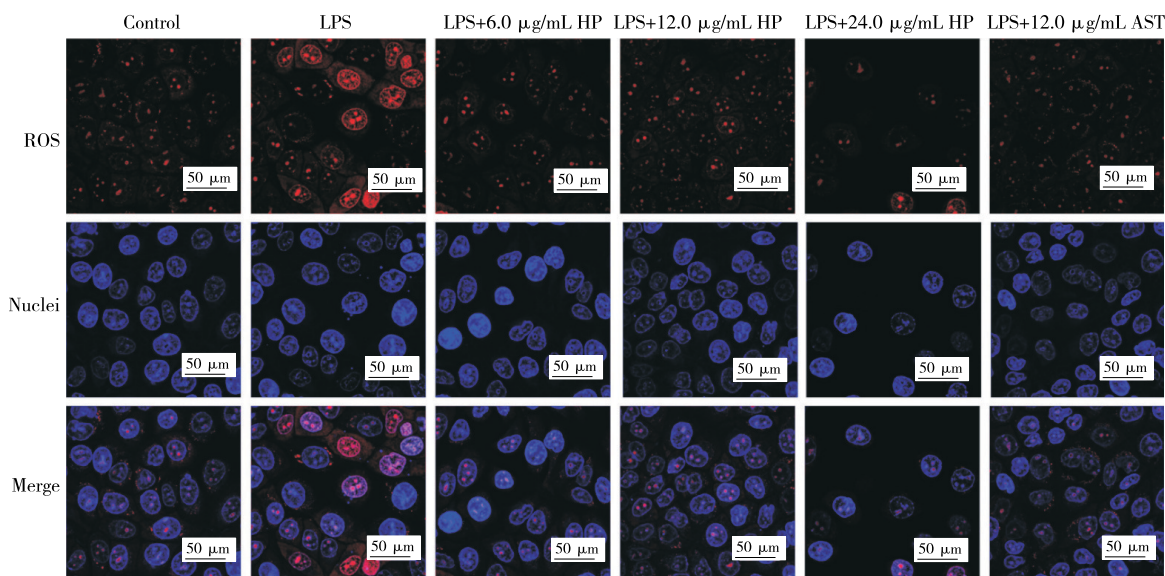
Figure 5 ZO-1 and Occludin protein expression and distribution by immunofluorescence

的氧化应激反应。初毅等^[30]研究发现,金银花提取物可通过增加 SORBS2 减轻 LPS 致心肌细胞氧化应激、凋亡和炎症反应。然而常规抗氧化剂治疗口腔疾病受限于低浓度无局部富集、药物代谢快、在目标部位停留时间短、作用环境复杂等问题,如口腔环境潮湿、牙周袋深,难以达到安全剂量和有希望的治疗效果。近年来许多天然产物已被证明具有抗氧化、抗炎的作用,并能有效调节氧化应激反应^[29]。如图 6 所示,LPS 刺激 HOKs 后氧化应激反应显著增加,与模型组相比,*H. pluvialis* 和

AST 治疗组能够显著有效清除 LPS 刺激产生过多的 ROS。推测 AST 和 *H. pluvialis* 可能通过阻断过氧化物指标二氢乙啶进入细胞核减轻 LPS 诱导产生过多的氧化应激、减少炎症的发生,从而保护细胞免受氧化损伤。

2.4 *H. pluvialis* 改善 LPS 诱导的 HOKs 线粒体功能障碍

线粒体是一种高度动态的细胞器,它不仅以 ATP 的形式提供细胞能量,而且还通过产生低水平的 ROS 来维持细胞内稳态^[31],并且这些过程中的任何一个功能障碍



HP表示 *H. pluvialis* 组;红色和蓝色荧光分别代表ROS和细胞核

图6 通过ROS检测荧光探针标记HOKs的氧化应激

Figure 6 Detection of oxidative stress in HOKs using fluorescent probes labeled with ROS

都可能导致出现病理状态。刘旭芳等^[32]研究表明,线粒体功能障碍所产生的过量ROS会攻击DNA等细胞内大分子以诱导细胞凋亡,并作为第二信使促进炎症介质生成,破坏牙周的软硬组织。线粒体功能障碍的下游产物,如ROS、mtDNA等参与了TLR4和NLR通路的激活、产生级联放大反应、生成大量炎症细胞因子,而这些细胞因子又加强了线粒体功能障碍。Yokoo等^[33]研究表明,氨通过诱导Caco-2细胞中的线粒体功能障碍来损害紧密的连接屏障,提示线粒体功能在细胞屏障保护中的重要地位。付辉等^[34]研究表明,线粒体功能障碍的典型特征是呼吸链功能受损、结构异常、细胞ATP库耗竭、细胞信号传导中断和线粒体衍生的ROS生成增加。如图7所示,在LPS诱导的HOKs中,观察到模型组HOKs线粒体超微结构出现空泡化,线粒体嵴数量减少,MPTP开口增加,导致MMP减少和

mtROS产生增加,提示线粒体功能障碍,这与Bernardi等^[35]的研究结果一致。然而在给予*H. pluvialis*和AST治疗后观察到线粒体结构恢复正常,MPTP开口减少,绿色荧光变亮(见图8)。MMP增加和mtROS产生降低,提示*H. pluvialis*和AST对LPS诱导的线粒体损伤具有较好的保护效应。该保护效应可能是*H. pluvialis*改善屏障功能的机制之一。

3 结论

雨生红球藻和AST都能够改善脂多糖诱导的人正常口腔上皮角质细胞屏障损伤和线粒体功能障碍,提示雨生红球藻和AST对脂多糖诱导的线粒体损伤具有较好的保护效应。该保护效应可能是雨生红球藻改善屏障功能的机制之一,推测雨生红球藻可能通过改善HOKs线粒体功能障碍和降低氧化应激水平进而改善脂多糖诱导的HOKs屏障损伤。该研究结果提示雨生红球藻可开发为

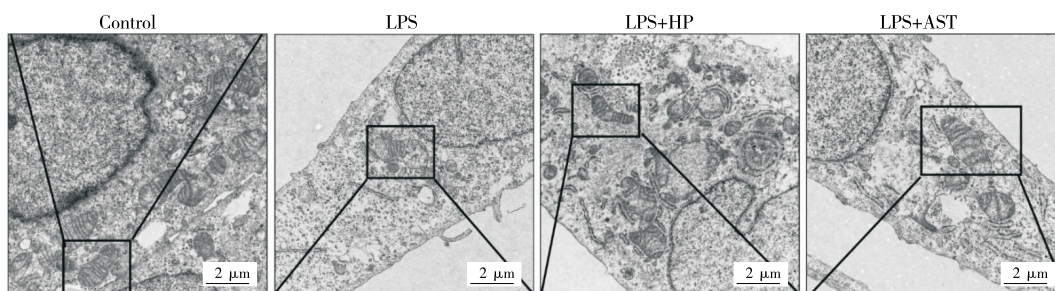
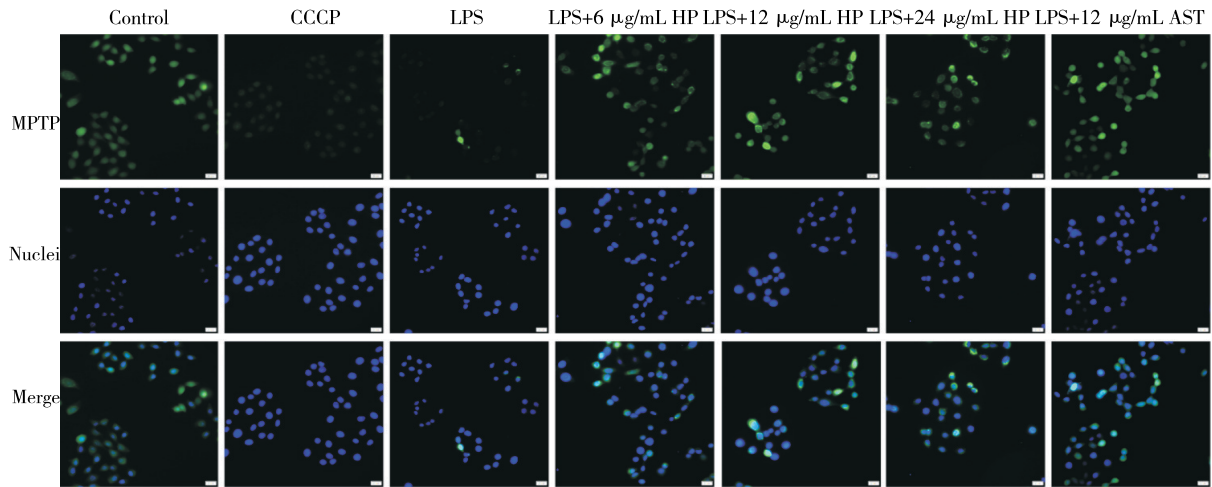


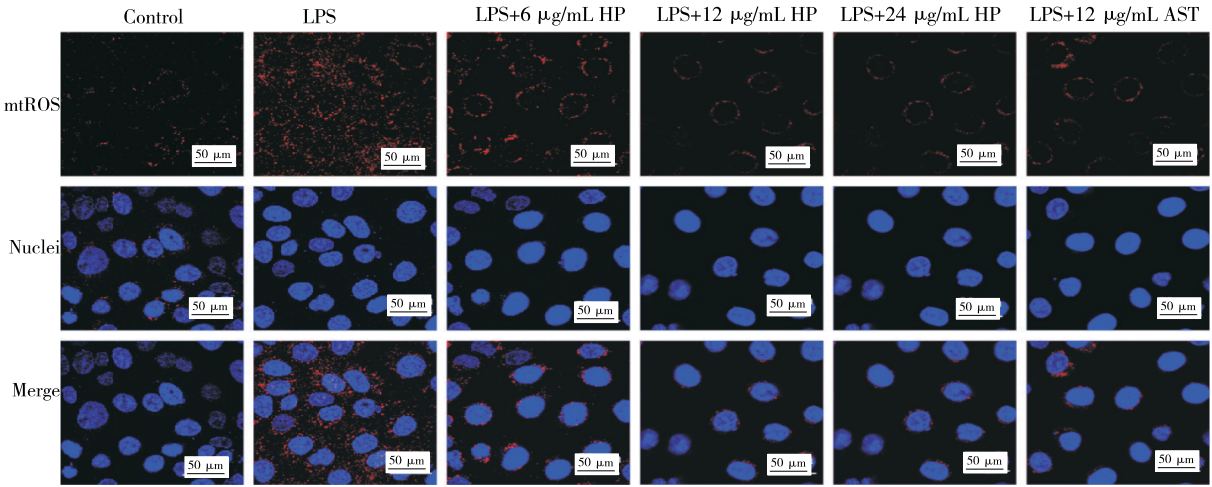
图7 HOKs线粒体的超微结构

Figure 7 Ultrastructure of mitochondria in HOKs



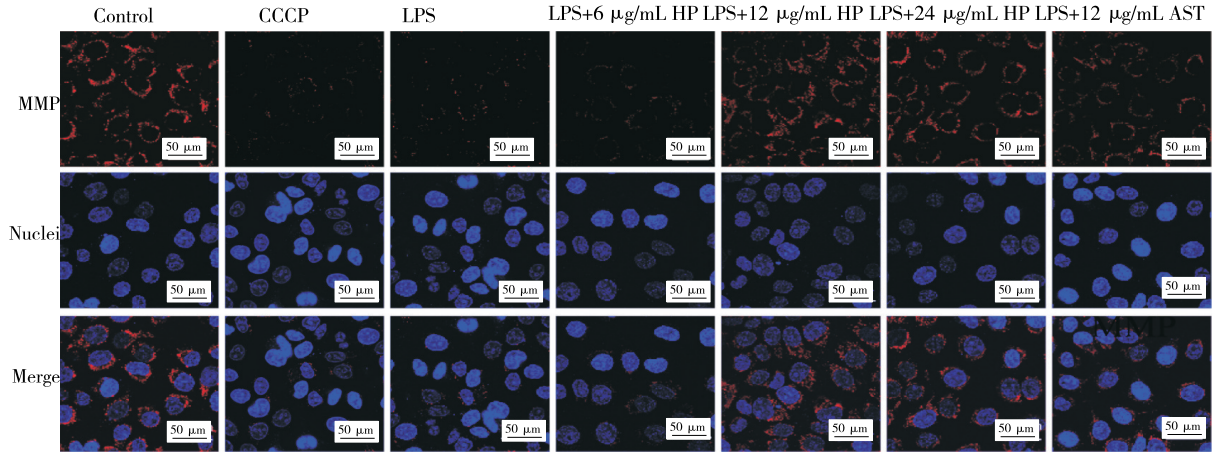
绿色荧光代表MTP，蓝色荧光表示原子核

(a) 线粒体通透性转换孔开放程度



红色和蓝色荧光分别代表mtROS和细胞核

(b) MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide探针标记mtROS



红色荧光强度表示MMP的水平，蓝色荧光表示原子核

(c) 线粒体膜电位

图8 *H. pluvialis*对LPS诱导的HOKs线粒体形态和功能损伤的影响

Figure 8 Effect of *H. pluvialis* on mitochondrial morphology and functional impairment in LPS-induced HOKs

口腔黏膜屏障修复的功能性食品。

参考文献

- [1] XING H L, LI Q Q, ZHAO Y T, et al. Exogenous prolinebooststheco-accumulation of astaxanthin and biomassin stress-induced *Haematococcus pluvialis*[J]. Bioresource Technology, 2023, 369: 128488.
- [2] 王裕玉, 董浩, 孙爱华, 等. 雨生红球藻的营养价值及其在虾蟹饵料中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2022, 45(18): 142-145.
WANG Y Y, DONG H, SUN A H, et al. Research progress on nutritional value of *Haematococcus pluvialis* and its application in shrimp and crab feed[J]. Feed Research, 2022, 45(18): 142-145.
- [3] YIN Z H, WANG M W, ZENG M Y. Novel pickering emulsion stabilized by natural fiber polysaccharide-protein extracted from *Haematococcus pluvialis* residues[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 134: 108048.
- [4] 何宛诗, 郑钦生, 陈小艳, 等. 雨生红球藻新型抗氧化肽的制备纯化、鉴定筛选及其对秀丽线虫抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 116-125.
HE W S, ZHENG Q S, CHEN X Y, et al. Preparation, purification and identification of a novel antioxidant peptide from *Haematococcus pluvialis* and its effect on the antioxidant capacity of *Caenorhabditis elegans*[J]. Food Science, 2023, 44(22): 116-125.
- [5] LI L M, WU Y H, ACHEAMPONG A, et al. Red light promotes autotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* with improved carbonic anhydrase activity and CO₂ utilization[J]. Aquaculture, 2023, 571(1): 739462.
- [6] WANG S S, TANG Y L, PANG X, et al. The maintenance of an oral epithelial barrier[J]. Life Sciences, 2019, 227: 129-136.
- [7] YUAN L, YANG J C, LI Y, et al. Matrine alleviates cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting mitochondrial dysfunction and inflammation via SIRT3/OPA1 pathway[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2022, 26(13): 3 702-3 715.
- [8] WYNS H, PLESSERS E, DE BACKER P, et al. In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2015, 166(3/4): 58-69.
- [9] DESAI J V. *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion[J]. Journal of Fungi, 2018, 4(1): 10.
- [10] PELLON A, SADEGHI NASAB S D, MOYES D L. New insights in *Candida albicans* innate immunity at the mucosa: toxins, epithelium, metabolism, and beyond[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 81.
- [11] WILSON M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis[J]. Science Progress, 1995, 78(1): 19-34.
- [12] SOLIMAN WADAN A H, ABDELSATTAR AHMED M, HUSSEIN AHMED A, et al. The interplay of mitochondrial dysfunction in oral diseases: recent updates in pathogenesis and therapeutic implications[J]. Mitochondrion, 2024, 78: 101942.
- [13] ELLAKWA D E, MUSHTAQ N, KHAN S, et al. Molecular functions of microRNAs in colorectal cancer: recent roles in proliferation, angiogenesis, apoptosis, and chemoresistance[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2024, 397(8): 5 617-5 630.
- [14] DONG Z L, WU L P, HONG H. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis and treatment of oral inflammatory diseases [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(20): 15483.
- [15] CHO K S, KANG S A, KIM S D, et al. Dendritic cells and M2 macrophage play an important role in suppression of Th2-mediated inflammation by adipose stem cells-derived extracellular vesicles[J]. Stem Cell Research, 2019, 39: 101500.
- [16] WANG M, XU P, LIAO L F, et al. *Haematococcus pluvialis* extends yeast lifespan and improves Slc25a46 gene knockout-associated mice phenotypic defects[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2021, 65(24): e2100086.
- [17] MIYACHI M, MATSUNO T, ASANO K, et al. Anti-inflammatory effects of astaxanthin in the human gingival keratinocyte line NDUSD-1[J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2015, 56(3): 171-178.
- [18] CHANG M X, XIONG F. Astaxanthin and its effects in inflammatory responses and inflammation-associated diseases: recent advances and future directions[J]. Molecules, 2020, 25(22): 5 342-5 342.
- [19] 郑冬晓, 陈琳琳, 韦其慧, 等. 褐藻素通过调控 Nrf2/Keap1 通路缓解糖尿病大鼠心肌肥大[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(5): 752-759.
ZHENG D X, CHEN L L, WEI Q H, et al. Fucoxanthin regulates Nrf2/Keap1 signaling to alleviate myocardial hypertrophy in diabetic rats[J]. Journal of Southern Medical University, 2022, 42(5): 752-759.
- [20] RALEIGH D R, MARCHIANDO A M, ZHANG Y, et al. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions[J]. Molecular Biology of the Cell, 2010, 21(7): 1 200-1 213.
- [21] WEVERS N R, DE VRIES H E. Morphogens and blood-brain barrier function in health and disease[J]. Tissue Barriers, 2016, 4(1): e1090524.
- [22] GUO S H, NIGHOT M, AL-SADI R, et al. Lipopolysaccharide regulation of intestinal tight junction permeability is mediated by TLR4 signal transduction pathway activation of FAK and

- MyD88[J]. *Journal of Immunology*, 2015, 195(10): 4 999-5 010.
- [23] ZOU P C, YANG F, DING Y J, et al. Lipopolysaccharide downregulates the expression of ZO-1 protein through the Akt pathway[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2022, 22(1): 774.
- [24] QIN L H, HUANG W, MO X A, et al. LPS induces occludin dysregulation in cerebral microvascular endothelial cells via MAPK signaling and augmenting MMP-2 levels[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2 015: 120641.
- [25] 陈琳琳, 谢金梅, 张榕芮, 等. 虾青素对槟榔碱诱导的口腔上皮损伤的保护效应及机制初探[J/OL]. *现代食品科技*. (2024-09-05) [2025-06-12]. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.10.0993>.
- CHEN L L, XIE J M, ZHANG R R, et al. Research on the protective effect and mechanism of astaxanthin on arecoline induced oral epithelial injury [J/OL]. *Modern Food Science and Technology*. (2024-09-05) [2025-06-12]. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.10.0993>.
- [26] OSLAN S N H, SHOPARWE N F, YUSOFF A H, et al. A review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 256.
- [27] 张磊, 金华, 王东, 等. 清肾颗粒含药血清通过抑制氧化应激介导的 NF- κ B 信号通路减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(7): 1 234-1 245.
- ZHANG L, JIN H, WANG D, et al. Qingshen granule-mediated serum attenuates high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of HK-2 cells via inhibiting oxidative stress-mediated NF- κ B signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2022, 38(7): 1 234-1 245.
- [28] ZUKOWSKI P, MACIEJCZYK M, WASZKIEL D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity[J]. *Archives of Oral Biology*, 2018, 92: 8-17.
- [29] 龙淳, 毕红英, 杨昌珍, 等. 大黄素上调 Sirt2 减轻脂多糖致 RAW264. 7 细胞的氧化应激反应[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40 (13): 1 785-1 790.
- LONG C, BI H Y, YANG C Z, et al. Emodin upregulates the Sirt2 to attenuate LPS-induced oxidative stress response in RAW264.7 cells[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2024, 40(13): 1785-1790.
- [30] 初毅, 代宁, 曹艳杰. 金银花提取物对脂多糖致心肌细胞凋亡、氧化应激和炎症反应的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22(6): 1 027-1 032.
- CHU Y, DAI N, CAO Y J. Effects of honeysuckle extract on lipopolysaccharide-induced cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress and inflammatory response[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease*, 2024, 22(6): 1 027-1 032.
- [31] NOLFI-DONEGAN D, BRAGANZA A, SHIVA S. Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement[J]. *Redox Biology*, 2020, 37: 101674.
- [32] 刘旭芳, 马雨轩, 牛丽娜. 线粒体功能障碍在牙周炎发生、发展及治疗中作用的研究进展[J]. *口腔疾病防治*, 2023, 31 (12): 889-895.
- LIU X F, MA Y X, NIU L N. Research progress on the role of mitochondrial dysfunction in the occurrence, development and treatment of periodontitis[J]. *Journal of Dental Prevention & Treatment for Stomatological Diseases*, 2023, 31(12): 889-895.
- [33] YOKOO K, YAMAMOTO Y, SUZUKI T. Ammonia impairs tight junction barriers by inducing mitochondrial dysfunction in Caco-2 cells[J]. *Faseb Journal*, 2021, 35(11): e21854.
- [34] 付辉, 黄鹤. 线粒体功能障碍在心血管疾病中的作用[J]. *心血管病学进展*, 2020, 41(3): 306-309.
- FU H, HUANG H. Role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease[J]. *Advances in Cardiovascular Diseases*, 2020, 41(3): 306-309.
- [35] BERNARDI P, GERLE C, HALESTRAP A P, et al. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8): 1 869-1 885.