

医药与日化原料

冬凌草发酵液的皮肤抗氧化能力和 细胞炎症修复作用

原勤轩¹, 袁铭潞¹, 由士权², 史豆豆², 李萌¹, 王昌涛^{1*}

[1. 北京工商大学 轻工科学与工程学院, 北京 100048; 2. 北商加美(北京)科技有限公司, 北京 100048]

摘要: 以冬凌草为原料、乳酸菌和酿酒酵母为发酵菌种分别制备了冬凌草乳酸菌和酿酒酵母发酵液, 与直接水提法获得的水提液进行了对比, 通过体外生化实验和细胞实验评价了冬凌草发酵液的抗氧化及抗炎活性。结果表明, 微生物发酵可以提升冬凌草水提样品中的有效成分含量, 其中, 乳酸菌发酵可以显著提升总糖、多肽的质量浓度 ($P<0.001$), 酿酒酵母发酵可以显著提高总蛋白、多肽和黄酮的质量浓度 ($P<0.001$), 冬凌草乳酸菌发酵液的总糖质量浓度提升最为显著, 从(1.714±0.004) g/L 提高至(3.695±0.010) g/L。发酵液对 1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH)、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)阳离子 (ABTS⁺) 和羟基自由基表现出比水提液更强的抗氧化能力, 体积分数分别为 0.704%、0.823%、0.728%的冬凌草水提液、乳酸菌发酵液、酵母发酵液对 DPPH 自由基的清除率均可达 50%以上; 体积分数 100%的冬凌草酵母发酵液对羟基自由基的清除率相当于质量浓度 245 mg/L 的 V_C, 体积分数 10%的冬凌草酵母发酵液对 ABTS⁺ 自由基的清除率相当于浓度 6.36 mmol/L 的 Trolox。由脂多糖 (LPS) 刺激细胞产生炎症反应后, 冬凌草水提液、乳酸菌发酵液、酵母发酵液均能使炎症因子的表达量显著降低, 且两种发酵液的效果较水提液更强, 表现出更加优异的抗炎活性。

关键词: 冬凌草; 发酵; 抗氧化活性; 抗炎; HaCaT; 医药原料

中图分类号: TQ920.6; R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 06-1323-08

Skin antioxidant capacity and anti-inflammatory activities of *Isodon rubescens* fermentation broth

YUAN Qinxuan¹, YUAN Minglu¹, YOU Shiquan², SHI Doudou², LI Meng¹, WANG Changtao^{1*}

[1. College of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beishang Jiamei (Beijing) Technology Co., Ltd., Beijing 100048, China]

Abstract: The *Isodon rubescens* fermentation broths were prepared using lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* as fermentation strains, respectively, compared with the water extract obtained by direct water extraction, and evaluated by biochemical and cell experiments *in vitro* for their antioxidant and anti-inflammatory activities. The results showed that microbial fermentation increased the content of active ingredients in samples extracted by *Isodon rubescens*, among which, lactic acid bacteria fermentation significantly increased the mass concentration of total sugars and peptides ($P<0.001$), while *Saccharomyces cerevisiae* fermentation greatly promoted the contents of total proteins, peptides and flavonoids ($P<0.001$), and the mass concentration of total sugars of the *Isodon rubescens* lactic acid bacteria fermentation broth displayed the most significant increment, from (1.714±0.004) g/L increased to (3.695±0.010) g/L. The fermentation broth showed stronger antioxidant capacity to 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-diazobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) cation (ABTS⁺) and hydroxyl radical than the water extract. The DPPH free radical scavenging rate of water extract, lactic acid bacteria fermentation broth and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation broth with a volume fraction of 0.704%, 0.823% and 0.728%, respectively, could reach more than 50%. The scavenging rate of hydroxyl free radical in the

收稿日期: 2024-12-23; 定用日期: 2025-01-09; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240889

作者简介: 原勤轩 (2001—), 男, 硕士生, E-mail: 19862126087@163.com。联系人: 王昌涛 (1975—), 男, 教授, E-mail: wangct@th.btbu.edu.cn。

Saccharomyces cerevisiae fermentation broth with 100% volume fraction was equivalent to that of V_C with 245 mg/L mass concentration and that of $ABTS^+$ free radical in the *Saccharomyces cerevisiae* fermentation broth with 10% volume fraction with 6.36 mmol/L Trolox. After the inflammatory response of cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS), the expression levels of inflammatory factors were significantly reduced by water extract, lactic acid bacteria fermentation broth and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation broth, with the two fermentation broth showing stronger effects and anti-inflammatory activities than water extract.

Key words: *Isodon rubescens*; fermentation; antioxidant activity; anti-inflammatory; HaCaT; drug materials

冬凌草,学名碎米桠 [*Isodon rubescens* (Hemsl.) H. Hara],又名山荏、六月令、冰凌草、藿香、雪花草、山香草、野藿香花、破血丹等。隶属于木兰纲、唇形目、唇形科、香茶菜属,是一种多年生小灌木,产于中国湖北、四川、贵州、广西、陕西、甘肃、山西、河南、河北、浙江、安徽、江西及湖南等地区。主要生长在海拔 100~2800 m 的山坡、灌木丛、林地、砾石地及路边等地的向阳处^[1]。冬凌草全草在中国古代中医药的临床实践中已有千年历史,最早出现在《神农本草经》中,并在《本草纲目》、《本草拾遗》、《中华本草》和《本草正》等中药学经典著作中有所记载。这些著作描述了冬凌草的药用特性、配伍及剂量等方面的知识^[2]。在河南与贵州等地区,民间将其应用于急慢性咽炎、急性扁桃腺炎、慢性肝炎、气管炎、食道癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌、直肠癌、感冒头痛、风湿筋骨痛、关节痛等疾病的治疗。现代研究表明,冬凌草中活性成分主要包括萜类化合物、生物碱、黄酮、挥发油、糖类、甾体、氨基酸和有机酸等^[3]。从冬凌草中分离得到的化合物具有多种药理作用,包括抗肿瘤、抗菌消炎、抗氧化和免疫增强等作用。目前,冬凌草在治疗急、慢性咽喉炎,扁桃体炎及牙龈炎等疾病中得到了广泛应用,并在临床上作为食管癌、肺癌、结肠癌等癌症的辅助治疗药物^[4]。

从天然动植物中提取活性成分是现代药物科学生产的核心环节,也是人们认识和利用自然资源的重要手段。但天然原料也有其固有的缺陷,如有效成分含量较低、存在某些有害成分、混合物成分复杂,难以分离等。为了得到高质量的提取物以克服上述缺点带来的副作用,人们不断开发各种新型的提取技术,包括微波、超声、酶解等辅助手段,以及它们的联合应用等^[5]。研究表明,利用微生物的自然新陈代谢发酵法提取植物等天然原料中的活性成分,一方面有助于促进原料中活性物质的释放、新的活性衍生物转化与合成,并促进大分子成分分解为小分子;另一方面可以转化有害物质,改善原料安全性,进而降低活性物质脱毒成本^[6]。研究显示,经过植物乳杆菌发酵

的黄精水提液,多糖含量为发酵前的 1.22 倍,总酸含量提升至 2.04 倍^[7];经过酵母发酵的葛根发酵液比直接提取的水提液有更强的抗氧化和抗衰老活性^[8];采用固态发酵法炮制八角枫,可以有效增强其抗炎能力,并改变其有效部位^[9]。目前,对于冬凌草的研究成果大多集中在其单一活性成分的药理学研究或其直接提取物的活性研究,缺乏微生物发酵技术的应用。酿酒酵母具有优良的发酵能力和工业应用基础,能够将植物中的复杂成分转化为更具生物活性的功能成分,同时改善发酵产物的风味和稳定性;乳酸菌具备广泛的食物工业应用、较高的安全性和显著的益生功能,在植物发酵中被广泛使用,能够通过乳酸菌发酵提高发酵体系的功能成分生物利用度。

本文拟使用酿酒酵母和乳酸菌分别发酵冬凌草,检测两种发酵液的活性物质,并与水提液进行对比,评价其抗氧化和抗炎活性。以期填补相关研究领域的不足,为冬凌草活性物质的开发利用提供理论基础。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

冬凌草,北京同仁堂股份有限公司;酿酒酵母,实验室保藏;乳酸菌(保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌混合菌种),北京川秀科技有限公司;酵母膏胨葡萄糖培养基(YPD培养基),广州市百菱生物科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-8 (IL-8)、白介素-6 (IL-6)、白介素-1 β (IL-1 β) Elisa 检测试剂盒、CCK-8,北京百瑞极生物科技有限公司;总糖含量检测试剂盒、Trizol,北京索莱宝科技有限公司;总抗氧化能力检测试剂盒〔2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)法〕、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(强),上海碧云天生物技术有限公司;人永生角质形成细胞(HaCaT),中国检验检疫科学研究所;DMEM 培养基、双抗、胰酶,美国 Gibco 公司;胎牛血清,美国 Hyclone 公司;地塞米松

(Dexamethasone, Dex),辰欣药业股份有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4),北京百瑞极生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH),美国Sigma-Aldrich公司。

Allegra X-30R型冷冻高速离心机,美国Beckman Coulter公司;CKX53型倒置显微镜,日本Olympus公司;Synergy H1型多功能酶标仪,美国Biotek公司;YT-CJ-2D型超净工作台,北京亚泰科隆仪器技术有限公司;聚合酶链反应仪(PCR),上海天能生命科学有限公司;ABI7300型荧光定量PCR仪,美国应用生物系统公司。

1.2 方法

1.2.1 菌液培养

配制酵母膏胨葡萄糖(YPD)培养基(葡萄糖质量分数1.0%、蛋白胨质量分数1.0%、酵母提取物质量分数0.5%),121℃灭菌30 min,冷却至室温,挑取酵母菌接种于YPD培养基,于28℃摇床中180 r/min培养48 h,获得酵母菌液。

1.2.2 冬凌草水提液的制备

参照课题组方案^[10],将冬凌草原料粉碎,将3.0 g原料和297 mL去离子水混合装入锥形瓶中,121℃灭菌30 min,冷却至室温。再110℃灭菌30 min,冷却至室温,4800 r/min离心30 min,然后121℃灭菌30 min,即得冬凌草水提液,记为R1。

1.2.3 冬凌草乳酸菌发酵液的制备

将3.0 g原料和295 mL去离子水混合装入锥形瓶中,121℃灭菌30 min,冷却至室温。将1.0 g乳酸菌溶解在4 mL无菌水中,将溶解好的乳酸菌液接入已灭好菌的料体中(2.5 mL菌液/瓶),摇匀,置于37℃培养箱中静止培养16 h。110℃灭菌30 min,冷却至室温,4800 r/min离心30 min,再次121℃灭菌30 min,即得冬凌草乳酸菌发酵液,记为R2。

1.2.4 冬凌草酿酒酵母发酵液的制备

将3.0 g原料和287 mL去离子水混合装入锥形瓶中,121℃灭菌30 min,冷却至室温。将酵母菌液接入已灭好菌的料体中(10 mL菌液/瓶),摇匀,置于28℃摇床中180 r/min培养48 h。110℃灭菌30 min,冷却至室温,4800 r/min离心30 min,再次121℃灭菌30 min,即得冬凌草酵母发酵液,记为R3。

1.3 表征方法与性能测试

1.3.1 活性物质含量的测定

按照文献^[11]硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定总黄酮含量;总酚含量的测定采用福林-酚还原比色法^[12];多肽含量的测定采用Folin-酚法^[13]。

总蛋白含量的测定按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书进行。

总糖含量的检测按照总糖含量检测试剂盒说明书进行。

1.3.2 体外抗氧化活性实验

DPPH自由基清除实验:参照文献^[14]方法测定冬凌草发酵液及水提液对DPPH自由基的清除能力。

ABTS阳离子(ABTS⁺)自由基清除实验:按照总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS法)说明书进行。

羟基自由基清除实验:参照文献^[15]方法测定冬凌草发酵液及水提液对羟基自由基的清除能力。

1.4 细胞毒性和抗炎活性实验

1.4.1 细胞培养

将HaCaT细胞从液氮中取出,置于37℃水浴锅中迅速溶解。在T₂₅细胞培养瓶中提前吸入5 mL完全培养基(含质量分数10%胎牛血清和质量分数1%青霉素-链霉素的DMEM培养液),再将细胞置于培养瓶。将培养瓶放置37℃恒温培养箱中,观察细胞状态,当细胞贴壁量达到80%~90%时,将培养液倒出。使用2 mL的PBS洗涤两次,加入1 mL胰酶进行消化后,加入2 mL培养基。将细胞离心(2000 r/min, 5 min),进入下一轮传代培养。

1.4.2 细胞毒性测试

将对数生长期良好的细胞以 5×10^3 个/100 μ L的密度接种于96孔板中,单独的DMEM培养基用作空白对照,于37℃、体积分数5%的CO₂恒温培养箱中培养12 h。分别加入不同体积分数的3种样品溶液,每个样品进行8个不同体积分数,每个体积分数进行3个复孔,对照细胞组不做处理,培养24 h。每孔加入10 μ L的CCK-8试剂,于37℃继续孵育2 h,测定450 nm处的吸光度(A)。根据式(1)计算细胞存活率(%):

$$\text{细胞存活率}/\% = (A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100 \quad (1)$$

1.4.3 抗炎活性测试

酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞相关炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达量。取对数期HaCaT细胞,以 6×10^5 个/mL的密度将细胞悬液接种在4 cm细胞培养皿中,每孔加入1 mL细胞悬液,孵箱培养24 h,小心吸去上清。空白组加入DMEM溶液1 mL,除空白孔外其余各孔加入脂多糖(LPS),LPS终质量浓度为800 mg/L,每组样品重复3个平行(测量时3个复孔)。6 h后模型组、实验组加入DMEM溶液1 mL,相应剂量的样品DMEM溶液1 mL;阳性对照组加入地塞米松(Dex)的DMEM溶液1 mL(50 mg/L)。继续培养24 h,吸取上清液,备用。使用100 μ L RIPA裂解液处理细胞,4℃下离心(10000 r/min, 10 min),得到细胞裂解后的溶液。

取 20 μL 细胞裂解后的溶液使用 BCA 试剂盒检测样品中的总蛋白含量；4 cm 细胞培养皿的上清液中各种炎症因子的测定按照 ELISA 试剂盒说明书进行实验操作后，于 450 nm 处测定各吸光度，根据吸光度，计算 TNF-α、IL-6、IL-1β 等炎症因子释放水平，各炎症因子的释放量需要 BCA 含量校正，各炎症因子相对表达量按式 (1) 计算：

$$\text{相对表达量} = \frac{\text{IL-6浓度}}{\text{总蛋白浓度}} \quad (1)$$

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定细胞炎症相关基因表达。采用 TRIzol 法提取组织中的总 RNA。DEPC 水配平 RNA 浓度后，使用反转录试剂盒合成 cDNA，特异性引物序列见表 1。qPCR 检测根据荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作，将反应物混合后在荧光定量 PCR 仪上进行。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物 (正, 反)
TNF-α	AGTGGTGCCAGCCGATGGGTTGT
	GCTGAGTTGGTCCCCCTTCTCCAG
IL-1β	CATGAGCACCTTCTTTTCCT
	TGTACCAGTTGGGGAACCTCT
IL-6	GACAGCCACTCACCTCTTCA
	TTAACCAGGCAAGTCTCCTC
	TTCAGTGGCATCTTCACTGATTCTT
β-actin	CTGAAGCCCCACTCAATCCA
	GCCAAGTCAAGACGGAGGAT

1.5 数据处理

所有实验均进行 3 次重复，每个结果与样本分析 3 次。数据处理使用 Excel 进行，结果以“平均值±标准差”表示。数据分析显著性分析使用 GraphPad Prism 9.5，当 P<0.05 时，认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 活性物质的质量浓度

冬凌草中含有二萜类、三萜类、单萜类、挥发油类、生物碱、黄酮类、甾体类、糖类、有机酸类等多种生物活性化合物^[16]。表 2 为冬凌草发酵液及水提液中活性物质的质量浓度。

从表 2 可以看出，冬凌草乳酸菌发酵液中总糖、多肽的质量浓度均有不同程度的提升 (P<0.001)；而冬凌草酵母发酵液中总蛋白、多肽和黄酮的质量浓度显著增高 (P<0.001)。这说明通过乳酸菌与酿酒酵母进行发酵，能够更好地提高冬凌草的利用率，这也在一定程度上避免了资源的浪费。

表 2 冬凌草发酵液及水提液活性物质的质量浓度
Table 2 Mass concentration of active substances in fermentation broths and water extract of *Isodon rubescens*

活性物质	质量浓度/(g/L)		
	冬凌草水提液	冬凌草乳酸菌发酵液	冬凌草酵母发酵液
总糖	1.714±0.004	3.695±0.010***	0.968±0.001
总蛋白	8.525±0.006	9.003±0.021*	9.386±0.013***
多肽	1.306±0.026	1.876±0.013***	2.179±0.022***
黄酮	0.331±0.002	0.332±0.007	0.348±0.002***
总酚	0.108±0.017	0.110±0.013	0.112±0.010

注：“*”表示冬凌草水提液与冬凌草发酵液数据间差异显著 (P<0.05)；“***”表示冬凌草水提液与冬凌草发酵液数据间差异极显著 (P<0.001)，下同。

2.2 冬凌草发酵液抗氧化活性分析

2.2.1 DPPH 自由基清除能力分析

自由基是指化合物的分子在光热等外界条件下，共价键发生均裂而形成的具有不成对电子的原子或基团。DPPH 自由基是一种稳定的有机自由基，通过检测生物试剂对 DPPH 自由基的清除能力可以表示药物抗氧化性的强弱^[17]。图 1 为不同体积分数冬凌草发酵液及水提液对 DPPH 自由基的清除率。

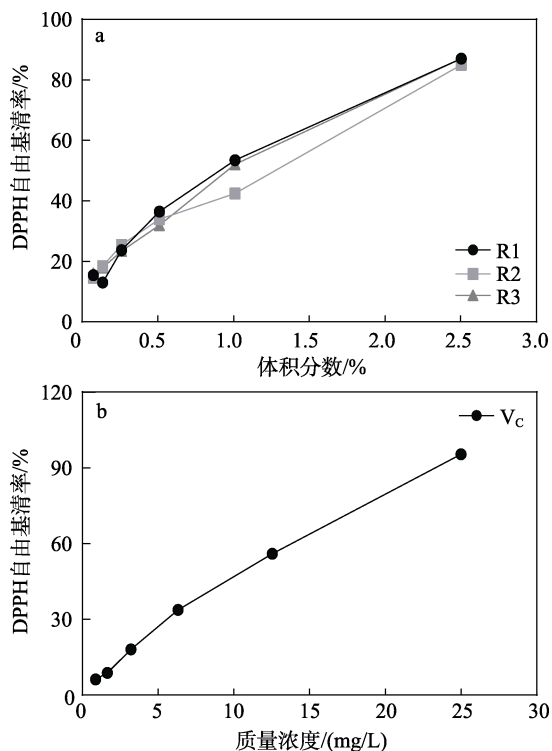


图 1 不同体积分数冬凌草发酵液和水提液 (a)、不同质量浓度 V_c (b) 对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 1 Scavenging rate of DPPH free radical by *Isodon rubescens* fermentation broths with different volume fractions and water extract (a) and V_c with different mass concentrations (b)

从图1可以看出,随着R1、R2、R3的体积分数的增加,3种提取液对DPPH自由基的清除率均呈线性增长(图1a),与质量浓度为20 mg/L V_C 表现出相近的DPPH自由基的清除能力(图1b)。体积分分数分别为0.704%、0.823%、0.728%的R1、R2、R3对DPPH自由基的清除率均>50%。结果表明,不同菌种冬凌草发酵液无明显区别。

2.2.2 羟基自由基清除能力分析

羟基自由基是目前所知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基,其可以通过电子转移、加成以及脱氢等方式与生物体内的多种分子作用,造成糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化性损伤,导致细胞坏死或突变。羟基自由基还与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬等有关,其清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标^[18]。图2为不同体积分分数冬凌草发酵液及水提液对羟基自由基的清除率。

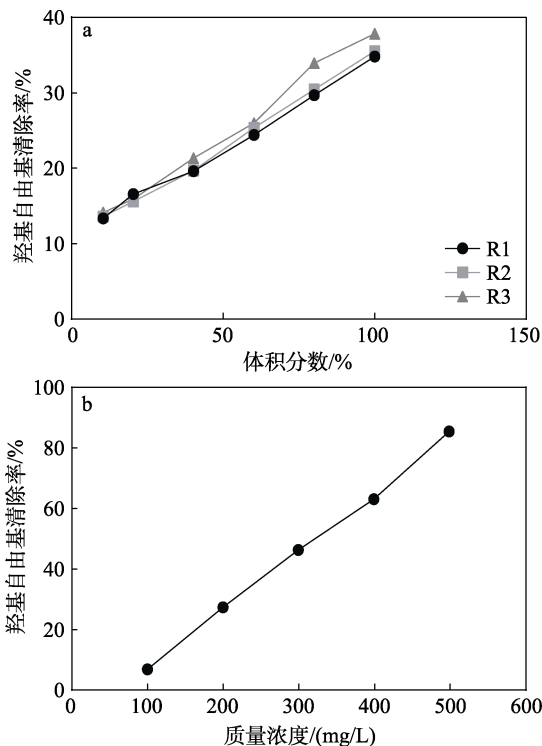


图2 不同体积分分数冬凌草发酵液和水提液(a)、不同质量浓度 V_C (b)对羟基自由基的清除率

Fig. 2 Scavenging rate of hydroxyl radical by *Isodon rubescens* fermentation broths with different volume fractions and water extract (a) and V_C with different mass concentrations (b)

从图2可以看出,随着R1、R2、R3的体积分数的增加,3种提取液对羟基自由基的清除率均呈线性增长(图2a),R3的羟基自由基清除能力略高于另两组实验样品(图2a)。体积分分数100%的R3对羟基自由基的清除率相当于质量浓度245 mg/L的 V_C ,这可能是由于,R3可能通过特定的代谢产物增强其清除自由基的能力。

2.2.3 ABTS⁺自由基清除能力分析

ABTS法快速、简便,与抗氧化剂的生物活性相关性强,因而较为广泛地应用于包括血清在内的生物样品、果蔬类和一些纯物质的抗氧化能力测定^[19]。图3为体积分分数10%的冬凌草发酵液及水提液对ABTS⁺自由基的清除效果。

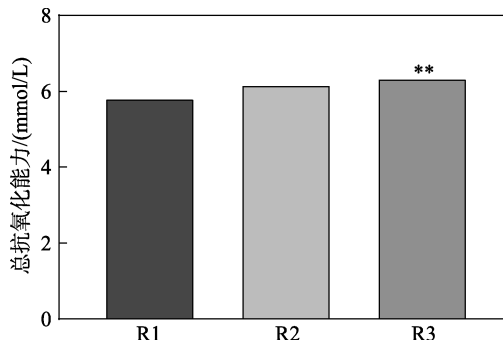


图3 体积分分数10%的冬凌草发酵液及水提液对ABTS⁺自由基的清除率

Fig. 3 Scavenging rate of *Isodon rubescens* fermentation broths and water extract on ABTS⁺ free radical

从图3可以看出,R3较R1的ABTS⁺自由基的清除能力显著提升。表明微生物发酵可以提高冬凌草对ABTS⁺自由基的清除能力,表现出较强的抗氧化活性。体积分分数10%的R2的ABTS⁺自由基的清除率相当于浓度6.19 mmol/L的Trolox;体积分分数10%的R3的ABTS⁺自由基的清除率相当于浓度6.36 mmol/L的Trolox,这可能与发酵过程中产生的活性代谢物有关。

2.3 冬凌草发酵液的细胞毒性分析

图4为不同体积分分数冬凌草发酵液及水提液对HaCaT细胞存活率的影响。

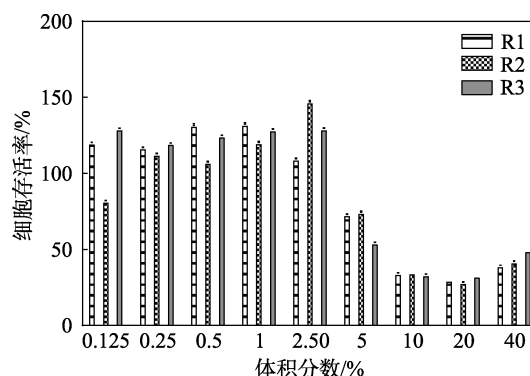


图4 不同体积分分数冬凌草发酵液及水提液对HaCaT细胞存活率的影响

Fig. 4 Effects of different volume fractions of *Isodon rubescens* fermentation broths and water extract on survival rate of HaCaT cells

从图4可以看出,当体积分分数<2.50%时,R1、R2、R3对HaCaT细胞存活率无影响,甚至有增殖

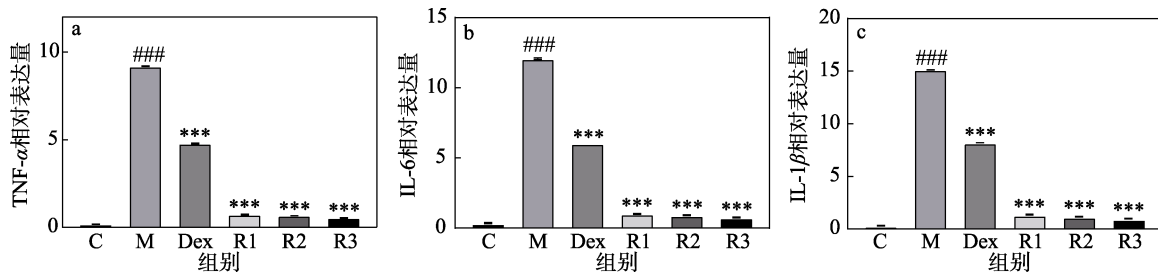
的作用；当体积分数达到 5% 时，R1、R2、R3 均表现出细胞毒性。因此，选用体积分数 2% 的 R1、R2、R3 进行后续细胞实验。

2.4 冬凌草发酵液的抗炎活性分析

2.4.1 对炎症因子蛋白含量的影响

TNF- α 、IL-6、IL-1 β 是最重要的炎症因子，分别负责诱导上皮细胞凋亡、免疫球蛋白生成和 T 细胞分化。TNF- α 作为一种强效的促炎症性因子参与全身炎症，可通过多种信号通路介导炎症反应^[20]；IL-6 作为一种多功能炎症细胞因子，是炎症介质网络

的关键成分^[21]，IL-6 水平的上升与多种自身免疫性疾病、炎症性疾病和肿瘤进展相关^[22]；IL-1 β 在炎症的应答、免疫反应及造血作用等方面发挥着十分重要的作用，较少的 IL-1 β 即可引起 T 细胞的免疫反应，大量的 IL-1 β 释放会促进广泛的炎症反应，进而导致组织损伤^[23]。这些炎症因子的表达量可以直接反映细胞炎症水平。LPS 是一种内毒素，在机体内可诱发炎症细胞浸润、炎症因子释放，引起炎症损伤^[24]。图 5 为使用 ELISA 法检测的炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 在不同条件下 HaCaT 细胞内的蛋白含量。



C 为空白组；M 为模型组；Dex 为阳性对照组（地塞米松）；###代表空白组与模型组间数据差异极显著（ $P < 0.001$ ）

图 5 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的相对表达量

Fig. 5 Relative transcript level TNF- α , IL-6, IL-1 β

从图 5 可以看出，使用质量浓度 800 mg/L 的 LPS 建立炎症刺激模型，与空白对照相比，3 种炎症因子的蛋白含量均有显著性增高。随后加入冬凌草发酵液及水提液处理损伤后的 HaCaT 细胞，3 种炎症因子的蛋白含量均有显著性降低。以上结果表明，冬凌草发酵液具有明显的抗炎作用，能够显著抑制由 LPS 诱导的因子反应，减少 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的产生。特别是，R3 在抑制这些因子方面的效果更加突出，显示出其潜在的抗炎治疗价值。

2.4.2 对炎症因子基因表达的影响

mRNA 为基因转录的中间产物，其含量可以显示细胞中对应基因的表达程度，进而揭示细胞的动

态活动轨迹。丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路与核因子- κ B（NF- κ B）在炎症因子的调控中发挥着重要的作用。研究表明，LPS 诱导的炎症反应通常与 MAPK/NF- κ B 信号通路密切相关。LPS 通过 Toll 样受体 4（TLR4）激活下游的髓样分化因子 88（MyD88）依赖性信号通路，首先引发 MAPK 家族的磷酸化激活。这种激活可进一步促进促炎因子，如 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的转录与表达。同时，LPS 还诱导对应蛋白的磷酸化和降解，释放 NF- κ B 进入细胞核，与促炎基因的启动子结合，从而增强 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平。这些炎症因子通过正反馈机制进一步加剧炎症反应，使 MAPK 和 NF- κ B 信号通路的活性持续增强（图 6）。

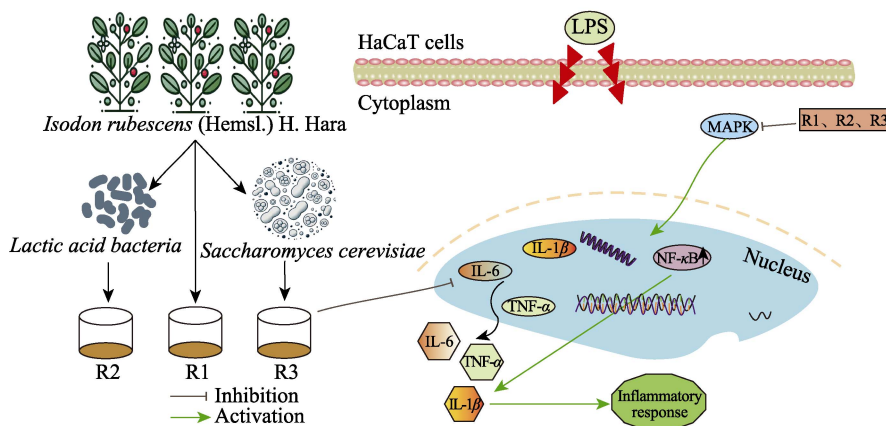
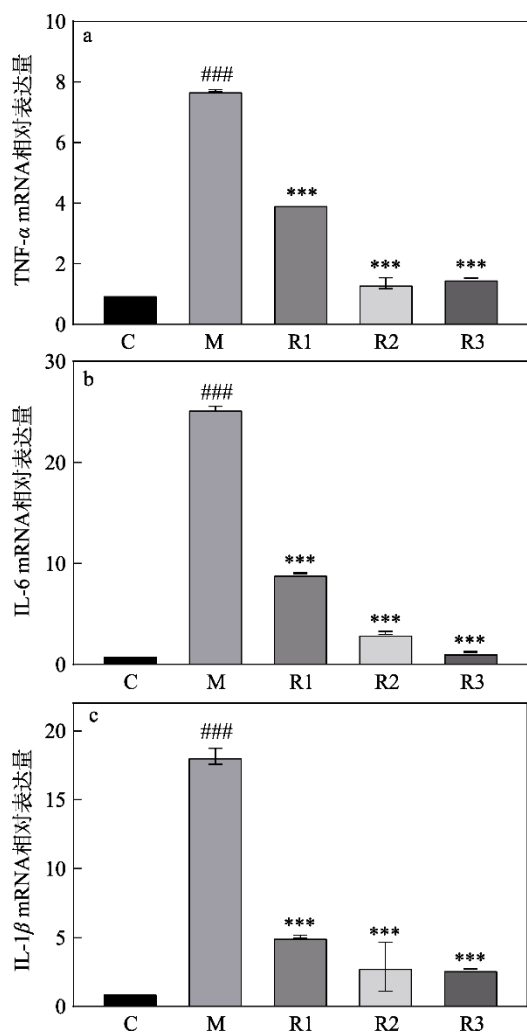


图 6 发酵液通过调控 MAPK/NF- κ B 信号通路抑制 LPS 诱导的炎症反应机制示意图

Fig. 6 Schematic diagram of mechanism of fermentation broth inhibiting LPS-induced inflammatory response by regulating MAPK/NF- κ B signaling pathway

图7为细胞内炎症因子相对表达量检测结果。

图7 细胞内炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量Fig. 7 Relative transcript level of intracellular inflammatory factors TNF- α , IL-6, IL-1 β

从图7可以看出, 经过LPS刺激后, 细胞内3种炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA)的相对表达量显著增加, 使用冬凌草发酵液及水提液处理后, 3种炎症因子的相对表达量显著降低, 且R2和R3的效果均优于R1。表明冬凌草发酵液显著抑制了LPS诱导的活化反应, 降低了TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的mRNA表达水平, 从而证明其具有有效的抗炎作用。这是因为, 酵母和乳酸菌的发酵过程可能通过活化产物的累积, 调节细胞内的信号抑制剂, 进一步抑制因子的表达水平; 此外, R2和R3在抗炎因子的mRNA水平上表现出抑制作用, 这为其作为天然炎症抗炎剂的潜力提供了进一步的证据, 可能为调节因子相关疾病的干预提供了一种新的天然治疗策略。

3 结论

以冬凌草为原料、酿酒酵母和乳酸菌为发酵菌种制备了发酵液, 与直接水提法获得的水提液进行对比, 评价了冬凌草发酵液的抗氧化及抗炎活性。

(1) 微生物发酵可以在一定程度上提升样品中的有效成分含量。糖类、蛋白、多肽和黄酮等物质的含量均有不同程度的提升, 推测是微生物通过自身的新陈代谢作用分解了原料中的部分营养物质, 使大分子物质破碎为小分子, 并进一步促进了植物细胞中原先较难提取的活性物质的溶出。

(2) 通过不同菌种的发酵作用可以提升不同种类的活性物质含量(质量浓度), 乳酸菌可以提升总糖和多肽的含量; 而酵母可以提升蛋白、多肽和黄酮的含量。推测是由于菌种间新陈代谢活动的差异导致了此结果, 而肽段通常是由大分子蛋白破碎而获得, 微生物在生长繁殖过程中, 从植物原料中获取蛋白质作为营养成分, 经过生物反应后蛋白便破碎为小分子肽段, 因而在不同种类的微生物发酵作用中都能观察到多肽含量的升高。

(3) 酵母发酵液的抗氧化效果优于其他样品组, 酵母发酵增加了样品中的黄酮等抗氧化能力较强的活性物质的含量, 进而导致了整体发酵液抗氧化效果的提升。

(4) LPS刺激HaCaT细胞产生炎症反应后, R1、R2、R3均能显著降低炎症因子的相对表达量, 且两种发酵液R2、R3的效果优于水提液, 表现出更加优异的抗炎活性。在转录水平上, 两种发酵液R2、R3对炎症因子的降低能力明显优于水提液R1, 而在蛋白表达水平上, 这种差异相对降低, 酵母发酵液R3的效果只略优于另两组。

本文研究表明, 冬凌草发酵液及水提液含有多种生物活性成分, 有较强的抗氧化及抗炎活性, 且经过不同菌种发酵可以不同程度地提升冬凌草的抗氧化及抗炎能力, 可以作为抗氧化、抗炎功效植物原料进行开发。

参考文献:

- [1] Chinese Academy of Sciences, Editorial Committee of the Flora of China (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志), Volume 66: *Lamiaceae*. (唇形科)[M]. Beijing: Science Press (科学出版社), 1990.
- [2] GAO S Y (高世勇), TANG B Q (唐博琪), WEI X R (魏新瑞), *et al*. Textual research, chemical composition, pharmacological effects and clinical applications of *Rabdosia rubescens*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2023, 54(19): 6533-6554.
- [3] GUO J (郭杰), HAO N (郝楠). Advances in chemical composition and pharmacology of *Rabdosia rubesulata*[J]. Journal of Lanzhou Vocational Technical College (兰州职业技术学院学报), 2021, 38(2): 65-66, 84.

- [4] XIE T (谢涛), YANG Z Q (杨正强), XU W W (徐文武), *et al.* Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of *Rabdosia rabdosia*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2022, 53(1): 317-325.
- [5] XU S Y, HUANG X S, CHEONG K. Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities[J]. Marine Drugs, 2017, 15(12): 388.
- [6] YU X (余霞), HU J F (胡家逢), HUANG X D (黄晓东), *et al.* Research progress on the applications of active substances from fermented plant materials in cosmetics[J]. Modern Food Science and Technology (现代食品科技), 2024, 40(3): 373-378.
- [7] ZHONG C (钟灿), LAO J (劳嘉), ZHOU X (周馨), *et al.* Optimization of *Lactobacillus plantarum* fermentation of *Polygonati rhizoma* and analysis of its active components[J]. Modern Food (现代食品), 2023, 29(17): 101-105.
- [8] ZHAO D (赵丹), WU D (吴迪), LI M (李萌), *et al.* Study on the antioxidant activity of fermented and aqueous-extracted *Pueraria lobata* and their effect on delaying *Caenorhabditis elegans* aging[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2022, 34(4): 639-646.
- [9] MENG Y Y (蒙燕瑶), DU H Z (杜洪志), WANG X B (王小波), *et al.* Comparison of anti-inflammatory effect of Miao medicine *Alangium chinense* before and after fermentation and selection of its effective components[J]. Guizhou Science (贵州科学), 2019, 38(6): 13-17.
- [10] YAN Y Q (闫雅倩), ZHANG Y Z (张玉芝), FU H (付豪), *et al.* Cosmetic efficacy evaluation of *Hemerocallis citrina* Baroni fermentation broth[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(5): 1073-1081.
- [11] WU D (吴迪), LIU P P (刘平平), LI M (李萌), *et al.* Evaluation of antioxidant and anti-aging effect of *Pueraria* water extracts and *Pueraria* fermentation broth *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2019, 40(12): 285-290, 294.
- [12] JIAO S R (焦士蓉), WANG L (王玲), CHEN M X (陈明夏). Study on ultrasonic assisted extraction of total polyphenol from pomegranate peel and antioxidant activity[J]. Journal of Xihua University (Natural Science Edition) (西华大学学报: 自然科学版), 2009, 28(1): 60-62, 80.
- [13] LIN Z (林智). The determination of the protein content in food[J]. Contemporary Chemical Industry (当代化工), 2010, 33(2)6: 224-226.
- [14] ZHANG Y Z (张玉芝), ZHAO D (赵丹), WANG D D (王冬冬), *et al.* Study on the activity of flavonoids in the fermentation broth of Chinese wolfberry branches[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2022, 52(4): 390-395.
- [15] ZHAO D (赵丹), XU D N (许丹妮), WANG D D (王冬冬), *et al.* Analysis of fermentation liquor of *Ganoderma lucidum* and evaluation of its whitening and anti-senility efficacy[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2016, 46(4): 226-230, 242.
- [16] ZHANG W Q (张婉晴), XIA X J (夏小婧). Advances in studies on chemical components and pharmacological effects of *Oridonium*[J]. Yunnan Chemical Technology (云南化工), 2019, 47(10): 17-19, 22.
- [17] PENG C L (彭长连), CHEN S W (陈少薇), LIN Z F (林植芳), *et al.* Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展), 2000, 6: 658-661.
- [18] HAN H Y (韩鹤友), HE Z K (何治柯), ZENG Y E (曾云鹏). Advances in the analysis of hydroxyl radicals in biological samples[J]. Journal of Analytical Science (分析科学学报), 2001, 1: 83-87.
- [19] ZHU Y C (朱玉昌), JIAO B N (焦必宁). Research Progress on ABTS assay in determination of TAA in fruits and vegetables *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2005, 8: 77-80.
- [20] ZHOU P (周平), LUO Y (罗云), XING N (邢娜), *et al.* Research Progress of pathogenesis of atherosclerosis induced by tumor necrosis Factor α [J]. World Chinese Medicine (世界中医药), 2015, 10(8): 1163-1168.
- [21] LIN L Y (林丽艳), ZHANG H Y (张慧云), HE S H (何韶衡). Advance in the research of correlation of IL-6 and its receptors with inflammation diseases[J]. China Tropical Medicine (中国热带医学), 2008, 4: 680-682.
- [22] JIA C C (贾春翠), RAO C M (饶春明), YU L (于雷). Progress in research on biological drugs targeting IL-6 signal pathway[J]. Chinese Journal of Biologicals (中国生物制品学杂志), 2019, 32(9): 1048-1053.
- [23] CUI G D (崔国东), ZHANG X M (张雪梅), CHEN L J (陈立杰). Research progress of mechanism of IL-1 β in acute cerebral ischemia[J]. Journal of Clinical Neurology (临床神经病学杂志), 2015, 28(6): 466-468.
- [24] TANG S X (唐思璇), XIAO F (肖芳). Research progress on lipopolysaccharide-induced pneumonia animal models[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica (中国实验动物学报), 2019, 28(6): 864-869.
- (上接第 1271 页)
- [5] KUANG G K, LIU Y, QIN Y, *et al.* Study on castor oil-based cationic waterborne polyurethane and its application[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2023, 2437: 012030.
- [6] LI Z, ZHAO S J, PANG H W, *et al.* Robust catechol containing cationic waterborne polyurethanes with antibacterial, UV protective, and adhesive properties[J]. Macromolecular Materials and Engineering, 2022, 307: 2100824.
- [7] WANG Y, CHEN R, LI T, *et al.* Antimicrobial waterborne polyurethanes based on quaternary ammonium compounds[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2020, 59(1): 458-463.
- [8] LI J, LU X M, ZOU X, *et al.* Recent advances in microbial metabolic engineering for production of natural phenolic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72: 4538-4551.
- [9] ABD-ALLAH H, RAGAIE M H, ELMOWAFY E. Unraveling the pharmaceutical and clinical relevance of the influence of syringic acid loaded linoleic acid transferosomes on acne[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2023, 639: 122940.
- [10] YUAN Y (袁野), YANG J J (杨建军), WU Q Y (吴庆云), *et al.* Preparation and properties of self-healing waterborne polyurethane based on imine bond and disulfide bond at room temperature[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(12): 2449-2455, 2466.
- [11] ZHANG Z W, PENG P P, WU Q Y, *et al.* Preparation and antibacterial properties of poly(hexamethylene guanidine hydrochloride) modified ionic waterborne polyurethane[J]. Progress in Organic Coatings, 2021, 156: 106246.
- [12] XU Y Q (许雨琴), YANG J J (杨建军), WU Q Y (吴庆云), *et al.* Preparation and application of chitosan-maleic acid/acrylamide double network supramolecular hydrogel[J]. Polymer Materials Science and Engineering (高分子材料科学与工程), 2022, 38(10): 124-132.
- [13] ZHANG Y, ZHANG W B, DENG H H, *et al.* Enhanced mechanical properties and functional performances of cationic waterborne polyurethanes enabled by different natural phenolic acids[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8: 17447-17457.
- [14] MINICH A, LEVARIKI Z, MIKULÁŠOVÁ M, *et al.* Complex analysis of vanillin and syringic acid as natural antimicrobial agents against staphylococcus epidermidis biofilms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23: 1816.
- [15] ZHENG Z H, LIANG D S, DENG H H, *et al.* Castor oil-based, robust, non-leaching and durable antibacterial waterborne polyurethane/polyhexamethylene guanidine composites prepared via an electrostatic self-assembly strategy[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 462: 142060.