

益生菌发酵黄芪对 LPS 诱导的人正常结肠上皮细胞 NCM-460 氧化损伤保护作用的机制研究

王萍¹, 王长福², 韩士林¹, 匡海学¹, 王秋红^{1,2*}

¹黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150001;

²广东药科大学 广东省中药饮片规范化炮制工程技术研究中心, 广州 510006

摘要: 探究益生菌发酵黄芪 (fermented Astragali Radix, F-As) 与黄芪 (Astragali Radix, As) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的肠道细胞 NCM-460 氧化损伤的保护作用及其分子机制。利用 MTT 法确定了 LPS、As 和 F-As 的工作浓度; 分别检测并比较了 LPS 组、As + LPS 组和 F-As + LPS 组, 细胞中氧化应激相关指标、抗氧化相关基因在转录水平和蛋白水平表达的变化。与 Con 组相比, LPS 组的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 增加 ($P < 0.01$), 而细胞的存活率、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 以及细胞中的抗氧化基因在转录水平和蛋白水平均显著降低 ($P < 0.01$); 而 As + LPS 组和 F-As + LPS 组, 细胞中的 ROS 和 MDA 水平降低 ($P < 0.01$), 细胞的存活率 GSH、SOD、T-AOC 以及抗氧化基因在转录和蛋白水平得到恢复 ($P < 0.01$), 且与 As + LPS 组相比, F-As + LPS 组恢复得更显著 ($P < 0.05$)。研究结果提示, As 和 F-As 均可以通过激活抗氧化基因的表达, 清除细胞内过多的 ROS 和 MDA, 从而对 LPS 诱导的细胞氧化损伤起到保护作用, 且 F-As 优于 As。

关键词: 黄芪; 益生菌发酵; 脂多糖; NCM-460 细胞; 氧化损伤

中图分类号: R93

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)9-1464-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.9.002

Mechanism of the protective effect of probiotic fermented Astragali Radix on lipopolysaccharide-induced oxidative damage in normal human colon epithelial cell NCM-460

WANG Ping¹, WANG Chang-fu², HAN Shi-lin¹, KUANG Hai-xue¹, WANG Qiu-hong^{1,2*}

¹Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; ²Guangdong Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: This study aims to explore the protective effects and molecular mechanisms of probiotic fermented Astragali Radix (F-As) and non-fermented Astragali Radix (As) on the oxidative damage in lipopolysaccharide (LPS)-induced normal human colon epithelial cell NCM-460. The working concentrations of LPS, As and F-As were determined by MTT assay. The changes of oxidative stress-related indexes and antioxidant-related genes at transcription level and protein level in LPS group, As + LPS group and F-As + LPS group were detected and compared respectively. Compared with the control group, reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) were significantly increased ($P < 0.01$) after treatment of LPS, while cell viability, glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC) and antioxidant-related genes were decreased ($P < 0.01$). Compared with the LPS group, As + LPS group and F-As + LPS group, the content of ROS and MDA were obviously decreased ($P < 0.01$), whereas the content of GSH, SOD, T-AOC and antioxidant-related genes were increased ($P < 0.01$), compared with the LPS group. However, compared with As group, F-As showed a more sig-

收稿日期: 2024-05-23 接受日期: 2024-08-01

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (2018YFC1707100); 2022 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2022]75 号); 黑龙江省教育厅“头雁”团队支持项目 (黑龙江省头雁行动领导小组文件[2019]5 号)

* 通信作者 E-mail: qhwang668@sina.com

nificant effect on enhancing these bio-indicators as mentioned above ($P < 0.05$). The results suggest that both As and F-As can remove excessive ROS and MDA in cells by activating the expression of antioxidant genes, thus playing a protective role in LPS-induced oxidative damage of cells, and F-As is superior to As.

Key words: Astragali Radix; probiotic ferment; lipopolysaccharide; NCM-460 cells; oxidative damage

中药黄芪属于豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或荚膜黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根部^[1]。现代药理学的相关研究中显示,黄芪对有机体具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、参与免疫调节等多种药理作用^[2,3]。而益生菌发酵黄芪更是近些年的研究热点,利用微生物对黄芪有效成分的转化^[4,6],使其真正达到了减毒增效的目的。因此本研究采用植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌复合菌对黄芪提取液进行发酵,制备黄芪发酵液,来探究益生菌发酵黄芪的抗氧化损伤的作用是否得到增强。

肠粘膜上皮细胞是由肠上皮细胞形成,是保护有机体的一道防线,其稳态由动态且严格的上皮细胞迁移和增殖来维持。然而,来源于肠道中革兰氏阴性菌中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可以诱发有机体肠道中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累,肠道中过多的 ROS 会造成膜脂过氧化、细胞氧化损伤、破坏肠屏障,最终导致多组织和多器官的功能障碍^[7,8]。细胞的抗氧化防御系统由超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(catalase)等组成。在细胞中抗氧化防御系统的关键因子为核转录因子红系 2 相关因子 2 (transcription factor nuclear erythroid factor 2-like, NRF2),其被认为是细胞氧化还原平衡的中心。基于 NRF2 在肠道氧化防御体系中的相关研究,越来越多的证据表明通过激活剂或者基因治疗恢复细胞中 NRF2 的水平能够显著减轻 LPS 对正常细胞造成的氧化损伤^[9-11]。因此,本研究中将研究益生菌发酵黄芪对 LPS 造成的肠道上皮细胞损伤的恢复,并分析益生菌发酵黄芪的抗氧化损伤作用是否与 NRF2 激活相关。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Thermo371 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific);F50 型微孔酶标仪(瑞士 Tecan), Mini-PROTEAN 型电泳系统(美国 Bio-RAD);LI-COR 型双色红外荧光成像系统(美国 ODYSSEY)。

1.2 材料与试剂

黄芪饮片由安徽省桐庆霖药业有限公司生产,经广东药科大学王秋红研究员鉴定为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 的干燥根。

黄芪甲苷对照品(纯度 99.99%,批号 MUST-23033111,成都曼斯特生物科技有限公司);生理氯化钠溶液(批号:230726F02,哈尔滨三联药业股份有限公司);正丁醇(AR,批号:20220920)和甲酸(AR,批号:20220810)购自于天津市富宇精细化工有限公司;乙腈(纯度:GR 批号:023636,美国迈瑞达);厌氧产气包(批号:20240108,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司);保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*) (批号:20230601)、植物乳杆菌 LP90 (*Lactobacillus plantarum*) (批号:20230627) (微康益生菌(苏州)股份有限公司);DMEM 细胞培养液(批号:11965092)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) (批号:A5670701)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:YE366111) (美国赛默飞世尔科技公司);ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 反转录试剂盒(批号:012700,东洋纺生物技术有限公司);谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒(批号:10124040220,北京盒子生工科技有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号:20240221,凯基生物有限公司);SOD 检测试剂盒(批号:23306470,白鲨生物科技有限公司);总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒(批号:20230626,南京建成公司);ROS 检测试剂盒(批号:112420210222)、LPS(批号 062722220630,碧云天生物技术公司);NRF2 抗体(批号:00145457)、血红加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1) (批号:00098000)、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1) (批号:10019103)、SOD-1 (批号:00052825)、 α -微管蛋白(α -tubulin) (批号:10004185)、RIPA 细胞裂解液(批号:20031957) (武汉三鹰生物技术有限公司);山羊抗兔 IgG H&L (IRDye[®] 800CW) 预吸附二抗(批号:ab216773)、山羊抗鼠 IgG H&L (IRDye[®]

800CW) 预吸附二抗 (批号: ab216772) (Abcam 公司); 人正常结肠上皮细胞 NCM-460 细胞 (批号: BNCC339288, 北纳创联生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 发酵黄芪的制备

1.3.1.1 复合菌液配制

无菌精密称量保加利亚乳杆菌和植物乳杆菌各 0.01 g, 置于同一 EP 管中, 加入 10 mL 无菌生理盐水, 摇匀, 备用。

1.3.1.2 黄芪提取液的制备

准确称取适量黄芪饮片, 分别加入 8 倍量水, 回流提取 2 次, 1 h/次, 分别留取每次滤液, 最后合并 2 次滤液并浓缩至 1 g/mL, 平均分成两份, 一份作为空白对照组, 一份作为发酵组, 备用。

1.3.1.3 黄芪发酵液制备

将上述两份黄芪提取液, 于 118 °C 高压灭菌 15 min, 放冷后, 发酵组接入 5% 的复合菌液, 摇匀。将未接菌的空白组和发酵组分别放入真空罐中加入厌氧产气包, 密闭, 置于 37 °C 培养箱中, 培养 48 h, 取出, 备用。

1.3.2 黄芪发酵液的药效成分测定

1.3.2.1 黄芪发酵液供试品溶液的制备

分别准确量取空白黄芪提取液和黄芪发酵液 10 mL, 加水饱和正丁醇 50 mL, 摇匀, 放置过夜, 超声 30 min, 弃去下层水液, 将正丁醇蒸干, 残渣加甲醇溶解, 并转移至 5 mL 容量瓶, 定容, 备用^[1,6]。

1.3.2.2 对照品溶液的制备

用甲醇将黄芪甲苷对照品制成 1 mL 含 0.1 mg 的溶液。

1.3.2.3 测定方法

色谱柱: Agilent C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 mm); 柱温: 30 °C; 流动相: 乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 18% A; 10 ~ 32 min, 18% A → 35% A; 32 ~ 40 min, 35% A; 40 ~ 57 min, 35% A → 53% A; 57 ~ 67 min, 53% A → 68% A); 流速: 1 mL/min; 进样量: 15 mL; 后运行 10 min。检测方式: HPLC-二极管阵列检测器 (diode-array detector, DAD)-蒸发光散射检测器 (evaporative light scattering detector, ELSD) 串联检测; DAD 检测器检测波长: 260 nm; ELSD 参数: 增益值为 1, 漂移管温度为: 110 °C, 载气流速为 3.2 L/min^[12]。

1.3.3 细胞培养及 MTT 法检测细胞活力

复苏后的 NCM-460 细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 饱

和湿度的环境下培养, 每隔两天传代一次。取生长汇合率达 80% 的 NCM-460 细胞, 消化并计数, 在 96 孔细胞培养板中加入 100 μL 含有 5 000 个细胞的细胞悬液, 贴壁培养 16 ~ 18 h 后, 孔中加入不同浓度的 LPS, 黄芪提取液 As 及黄芪发酵液 F-As 作用 24 h; 或使用 As, F-As 预处理 2 h 后再加入 LPS, 共同处理细胞 24 h 后, 每孔加入 10 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 避光反应 4 h。加反应结束后吸弃孔中液体, 并在每孔中加入 150 μL 的 DMSO, 使用酶标仪在 490 nm 波长下测得吸光值 (A)。根据所测吸光值按公式进行细胞存活率计算: 细胞存活率 = $(A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.3.4 细胞中 MDA、SOD、GSH 及 T-AOC 水平检测

取生长汇合率达 80% 的 NCM-460 细胞, 消化并计数, 每孔中加入 2 mL 含有 20 000 个细胞的细胞悬液于 6 孔板中。过夜培养后的细胞加入黄芪提取液 As 及黄芪发酵液预 F-As 处理 2 h 后, 加入 LPS 继续作用至 24 h。分别利用 GSH、MDA、SOD 以及 T-AOC 检测试剂盒, 进行细胞中 GSH、MDA、SOD 以及 T-AOC 水平的检测。

1.3.5 荧光显微镜检测细胞 ROS 水平

经处理后的 NCM-460 细胞洗两次后加入 PBS 稀释的 DCFH-DA 荧光探针染色 30 min 后, 并用 PBS 洗细胞两次后, 利用荧光显微镜进行检测并拍照。

1.3.6 实时定量 RT-PCR 检测基因 mRNA 水平表达

利用 Trizol 法提取细胞中的总 RNA, RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 检测, 以 α -tubulin 为内参基因。反应条件如下: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 min, 60 °C 30 s, 40 个循环, 每组实验重复 3 次, 得到 Ct 值, 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的相对表达量。引物序列如表 1 所示。

1.3.7 Western blot 检测蛋白水平表达

收集细胞沉淀, 加入含有 1% 蛋白酶体抑制剂的 RIPA 细胞裂解液, 将样品置于 4 °C 碎冰中裂解 30 min, 随后超声破碎, 离心机 12 000 r/min 离心 15 min。收集上清, BCA 法检测样品的蛋白浓度。按照 1:5 的比例向蛋白样中加入 6 × SDS loading buffer, 100 °C 变性 10 min。使用 8% ~ 10% SDS-PAGE 胶, 进行电泳分离蛋白质, 随后使用 0.22 μm PVDF 膜, 将蛋白于 0.15 mA 恒流湿转 120 min, 脱脂奶粉室温封闭 1 h。一抗 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 加入相应的荧光二抗室温孵育 1 h, 再次用 TBST

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'→3') Sequence of primer (5'→3')
<i>α-tubulin</i>	F:CGGGCAGTGTTCGTAGACTTGG
	R:CTCCTTGCCAATGGTGTACTGC
<i>NRF2</i>	F:CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG
	R:GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
<i>HO-1</i>	F:CCAGGCAGAGAATGCTGAGTTC
	R:AAGACTGGGCTCTCCTTGTGTGC
<i>NQO-1</i>	F:CCTGCCATTCTGAAAGGCTGCT
	R:GTGGTGATGGAAAGCACTGCCT
<i>SOD1</i>	F:CTCACTCTCAGGAGACCATTGC
	R:CCACAAGCCAAACGACTTCCAG

洗膜 3 次。利用 Odyssey 红外荧光扫描仪进行扫描。

1.3.8 数据分析

实验数据用 Graphpad Prism 8 软件进行分析处理,各计量数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用单因素方差比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 发酵对黄芪甲苷含量的影响

试验结果表明,黄芪提取液中黄芪甲苷的含量为 21.82 mg/mL,通过复合益生菌对黄芪提取液进行发酵,得到黄芪发酵液中黄芪甲苷的含量为 29.14 mg/mL,转化率即为 25.12%。黄芪甲苷标准品,黄芪以及发酵黄芪的 HPLC 检测谱图见图 1。

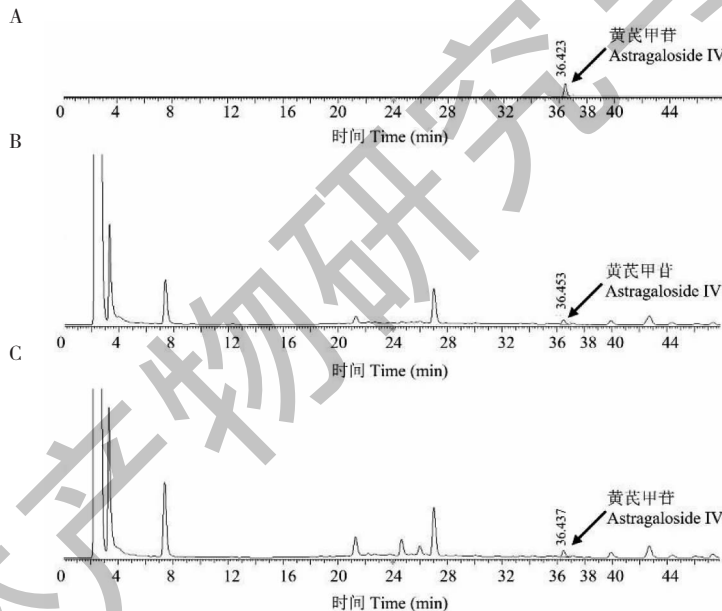


图 1 黄芪甲苷标准品(A)、黄芪(B)和发酵黄芪(C)HPLC 色谱图

Fig. 1 The HPLC chromatograms of reference substance of astragaloside IV (A), Astragali Radix (B) and fermented Astragali Radix (C)

2.2 LPS、As 和 F-As 对 NCM-460 细胞活力的影响

NCM-460 细胞中分别加入浓度为 0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS,MTT 法检测细胞存活率,实验结果表明浓度为 0.5 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 对细胞的存活率几乎没有影响($P > 0.05$),当 LPS 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞的存活率降低($P < 0.01$) (见图 2A)。基于本研究中考察 LPS 对 NCM-460 细胞的氧化损伤的研究,故后续实验中选择 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 浓度。同时检测了 As 和 F-As 对 NCM-460 细胞的影响,实验结

果表明,浓度为 0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 As 和 F-As 均对细胞没有损伤($P > 0.05$) (见图 2B)。后续实验中选择 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 As 和 F-As 进行实验。

基于图 2A 和 2B 的实验结果,我们检测了 As 和 F-As 是否对 LPS 造成的 NCM-460 细胞损伤有保护作用。NCM-460 细胞单独用 LPS 作用 24 h 后,与 Con 组相比,细胞存活率降低($P < 0.01$),而在细胞中预先加入 As 和 F-As 预处理 2 h 后,再加入 LPS 共同作用细胞 24 h 后,相比较于单独加入 LPS 细胞

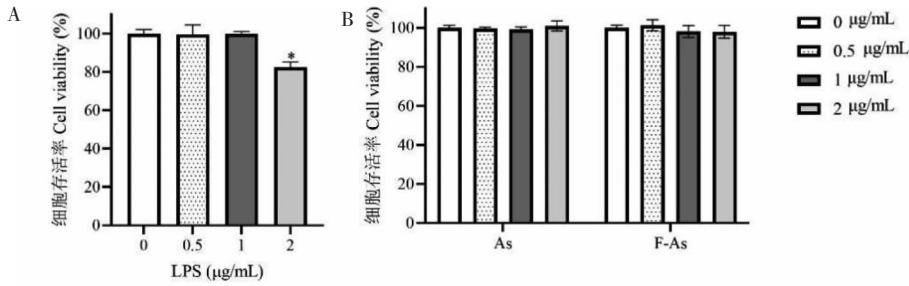


图2 LPS、As及F-As对NCM-460细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of LPS, As and F-As on viability of NCM-460 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与0 µg/mL组相比, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with 0 µg/mL group, * $P < 0.05$ 。

组, NCM-460细胞的存活率得到了提升($P < 0.01$) (见图3)。

2.3 As及F-As对LPS诱导的NCM-460细胞内ROS及MDA含量的影响

DCFH-DA荧光探针用于检测细胞中的ROS,与Con组相比,LPS处理后NCM-460细胞中含有大量的ROS,绿色荧光增强,而在细胞中加入As和F-As预处理后再加入LPS作用细胞24 h, NCM-460细胞中ROS水平显著降低(见图4)。

As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞内MDA含量的影响(见图5)。与Con组相比,LPS处理后NCM-460细胞中MDA水平显著升高($P < 0.01$);而与LPS处理组相比,As与F-As预处理后NCM-460细胞中MDA含量降低($P < 0.01$),F-As组比As组MDA含量降低得更明显($P < 0.05$)。

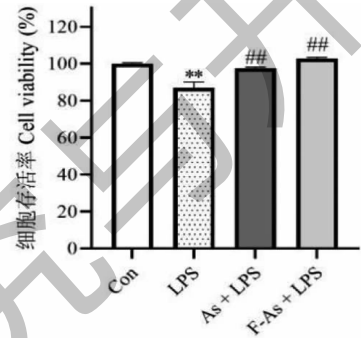


图3 As及F-As预处理对NCM-460细胞的保护作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Protective effects of As and F-As pretreatment on NCM-460 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与Con组比较, ** $P < 0.01$;与LPS组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$. Compared with LPS group, ## $P < 0.01$ 。

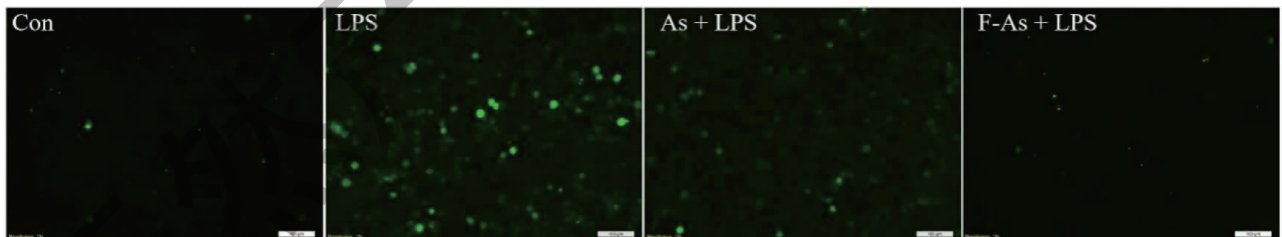


图4 As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞中ROS含量的影响(标尺:100 µm)

Fig. 4 Effect of As, F-As on ROS content in LPS-induced NCM-460 cells (scale bar = 100 µm)

2.4 As及FAs对LPS诱导的NCM-460细胞内GSH、SOD以及T-AOC含量的影响

As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞内GSH、SOD以及T-AOC含量的影响(见图6)。与Con组相比,LPS处理后NCM-460细胞中GSH、SOD以及T-AOC含量显著降低($P < 0.01$);而与单独使用LPS处理的NCM-460细胞组相比,As与F-As预处理后NCM-460细胞中GSH、SOD以及T-AOC活

性得到恢复($P < 0.01$),F-As组比As组恢复得更显著($P < 0.05$)。

2.5 As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞内抗氧化基因在转录及蛋白水平的影

As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞内抗氧化基因转录水平及蛋白水平的影响(见图7和图8)。与Con组相比,LPS处理后NCM-460细胞中抗氧化基因NRF2、HO-1、NQO-1以及SOD-1的表达量

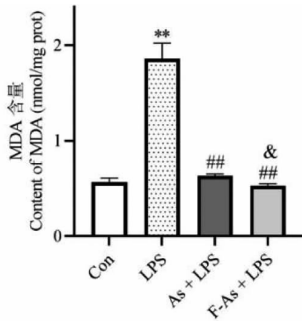


图5 As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞中MDA含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of As, F-As on MDA content in LPS-induced NCM-460 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与Con组比较, ** $P < 0.01$;与LPS组比较, ### $P < 0.01$;与As组比较, & $P < 0.05$,下同。Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$. Compared with LPS group, ### $P < 0.01$. Compared with As group, & $P < 0.05$, the same below.

在转录水平和蛋白水平均显著降低($P < 0.01$);而与LPS组相比,As和F-As预处理后NCM-460细胞中*NRF2*、*HO-1*、*NQO-1*以及*SOD-1*的表达在转录水平和蛋白水平均得到恢复($P < 0.01$);相比于As组,F-As组恢复得更显著($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

包括ROS在内的自由基,在生物体内具有双重作用,通过调节细胞信号转导途径介导病理作用。肠道内的ROS维持在低水平时,对肠道有益,但是肠道内过多的ROS会导致肠道细胞受损^[13,14]。当肠道上皮细胞收到损伤时,其屏障功能受损,导致机体发生氧化应激等反应^[15]。当肠道内ROS的产生速度高于机体内抗氧化物质生成的速度时,过量的ROS会造成DNA损伤,炎症反应等,进而诱发细胞的氧化损伤,导致肠道的慢性炎症等疾病^[16]。因此,寻找合适的植物提取物作为抗氧化应激相关疾病的治疗制剂是现阶段研究的热点。中草药在治疗人类各种疾病中发挥了非常重要的作用,近些年随着微生物发酵技术的快速发展和对草药现代化的深入研究,发酵是中药中最重要的炮制方法之一,利用微生物在不同的条件下发酵中药,以增强其原性或者产生新的效果。中草药的微生物发酵和转化作为生产具有高效药用价值的新方法而被广泛关注,研究中显示益生菌与中草药之间具有一定的协调作用,发酵后提高了中草药的溶解度及生物利用率^[17,18]。除此之外,中草药通过发酵后能够引起植物活性物质比例的改变。发酵后黄芪的活性成分在

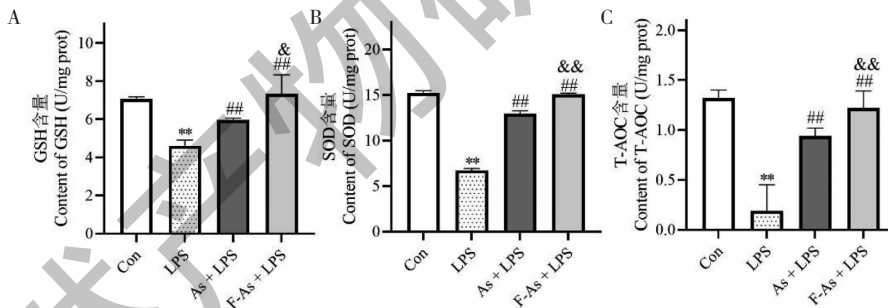


图6 As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞中GSH,SOD以及T-AOC含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of As, F-As on GSH, SOD and T-AOC content in LPS-induced NCM-460 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

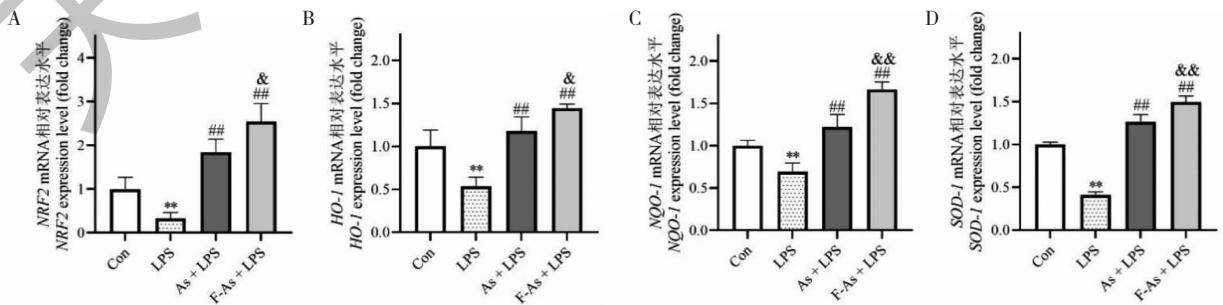


图7 As和F-As对LPS诱导的NCM-460细胞内抗氧化基因转录水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of As, F-As on transcription level of antioxidant-related genes in LPS-induced NCM-460 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

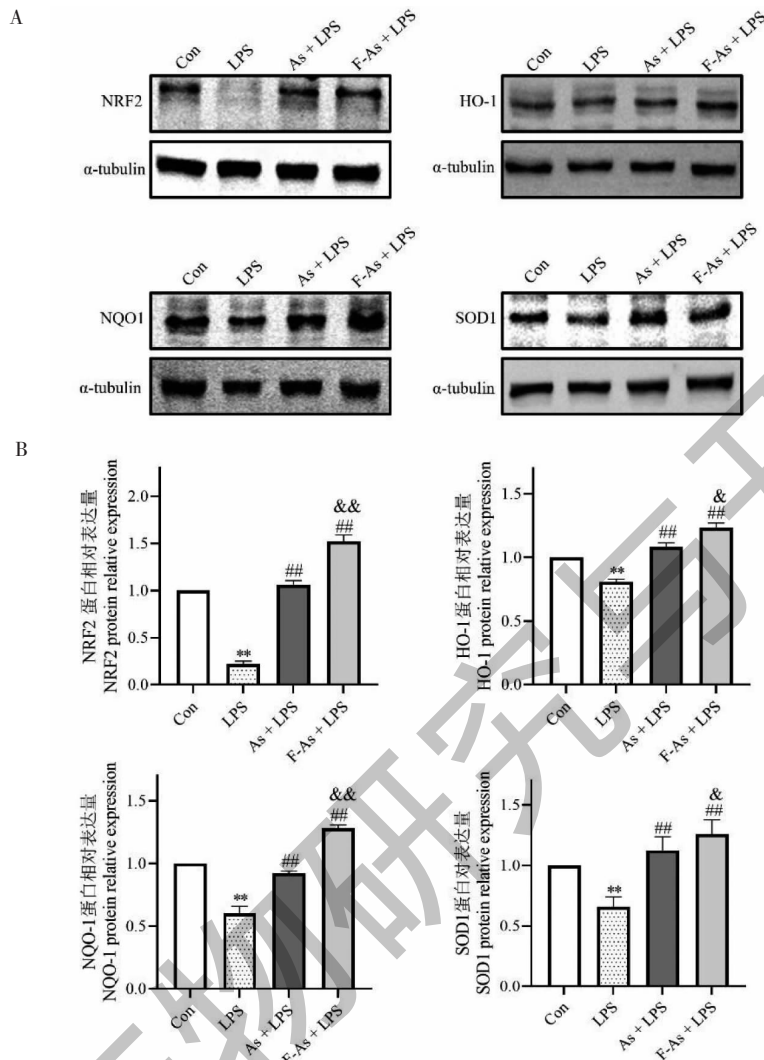


图8 As及F-As对LPS诱导的NCM-460细胞内抗氧化蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of As, F-As on expression level of antioxidant-related proteins in LPS-induced NCM-460 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

体外提前被分解消化,转化成小分子物质,从而提高了有效成分的消化吸收,增强了黄芪的作用效果。且益生菌发酵过程中产生的复合酶能够弥补动物有机体肠道中内源酶活性的不足,促进有机体对黄芪活性成分的消化和吸收,故提高了黄芪有效成分的利用率,最终提高了黄芪的治疗效果^[19,20]。益生菌发酵过程中不单一对黄芪甲苷的产量产生影响,益生菌发酵过程中黄芪甲苷,多糖类成分均会发生变化,在后续的研究中将深入分析保加利亚乳杆菌以及植物乳杆菌 LP90 发酵后对黄芪中活性成分的影响。

在本项研究中,我们通过益生菌发酵黄芪,结果显示,经过益生菌发酵的黄芪中黄芪甲苷的产率提升。相同浓度下,相比于未发酵的黄芪提取液 As

组,经发酵的黄芪提取液 F-As 组显著减弱了由 LPS 引起的肠道细胞 NCM-460 细胞中 ROS 和 MDA 水平的增加,而提升了细胞中抗氧化酶的含量。NRF2 是调节有机体氧化还原稳态的中心因子,正常生理状态下 NRF2 在细胞质中与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1) 在细胞质中结合,此时 NRF2 蛋白处于失活状态。而当细胞受到氧化应激时, NRF2-KEAP1 解离, NRF2 进入细胞核中,激活 HO-1、NQO-1 以及 SOD1 等抗氧化基因活性,以抵抗细胞受到的氧化损伤,维持有机体氧化还原平衡^[21]。本研究中为了比较分析益生菌发酵的黄芪提取液 F-As 与未发酵黄芪提取液 As 对细胞中抗氧化基因及其编码蛋白的影响,我们通过 qRT-PCR 和 Western blot 实验分

别检测了细胞中 *NRF2*、*HO-1*、*NQO-1* 以及 *SOD1* 抗氧化基因在 mRNA 和蛋白水平的变化。结果显示与 LPS 组相比,As 和 F-As 预处理细胞后均能在转录水平和蛋白水平显著上调 *NRF2*、*HO-1*、*NQO-1* 以及 *SOD1*,而相同浓度下,相比于未发酵黄芪提取液 As,经发酵的黄芪提取液 F-As 表现出的抗氧化能力要更强。综上所述,发酵的黄芪提取液与未发酵的黄芪提取液能够更显著激活抗氧化信号通路促进抗氧化基因 *NRF2*、*HO-1*、*NQO-1* 以及 *SOD1* 的表达,对 LPS 诱导的 NCM-460 细胞氧化损伤起到保护作用。

参考文献

- 1 National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science and Technology Press,2015.
- 2 Fu J, Wang ZH, Huang LF, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. *Phytother Res*, 2014, 28: 1275-1283.
- 3 Auyeung KK, Han QB, Ko JK. *Astragalus membranaceus*: a review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44:1-22.
- 4 Chen KY, Gao Y, Hao BC, et al. Progress on probiotic fermentation traditional chinese medicine [J]. *Prog Veter Med (动物医学进展)*, 2019, 40:74-78.
- 5 Guo HW, Wang SL, Shi HT, et al. Preparation method of compound probiotic liquid-state fermented *Astragalus* [J]. *J Henan Agric Sci (河南农业科学)*, 2019, 48:122-133.
- 6 Qin Z. Analysis of main effective components of fermented *Astragalus membranaceus* and effects of polysaccharides on experimental hepatic fibrosis in rats [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University(甘肃农业大学), 2012.
- 7 De Filippis D, Iuvone T, Esposito G, et al. Melatonin reverses lipopolysaccharide-induced gastro-intestinal motility disturbances through the inhibition of oxidative stress [J]. *J Pineal Res*, 2008, 44:45-51.
- 8 Zhang H, Peng A, Yu Y, et al. L-arginine protects ovine intestinal epithelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis through alleviating oxidative stress [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67:1683-1690.
- 9 Liu B, Gao YS, Liu X, et al. Tripartite motif containing 59 mediates protective anti-oxidative effects in intestinal injury through Nrf2 signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124:110896.
- 10 Deng SH, Wu DM, Li L, et al. TBHQ attenuates ferroptosis against 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial cell injury and intestinal mucositis via activation of Nrf2 [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26:48.
- 11 Kim MJ, Jeon JH. Recent advances in understanding Nrf2 agonism and its potential clinical application to metabolic and inflammatory diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:2846.
- 12 Du YQ, Yu QH, Wen Ran, et al. Content determination of 8 components in *Astragalus membranaceus* before and after bidirectional solid fermentation with *Cordyceps kyushuensis* by HPLC-DAD-ELSD [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2020, 31: 2841-2846.
- 13 Jones RM, Luo LP, Ardita CS, et al. Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species [J]. *EMBO J*, 2013, 32: 3017-3028.
- 14 Zhang YJ, Guo J, Qi YH, et al. The prevention of radiation-induced DNA damage and apoptosis in human intestinal epithelial cells by salvanic acid A [J]. *J Radiat Res Appl Sci*, 2014, 7:274-285.
- 15 Husien HM, et al. Protective effects and mechanism of *Moringa oleifera* leaf polysaccharide on ulcerative colitis in mice [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2023, 35: 1659-1668.
- 16 Wang YJ, Chen Y, Zhang XY, et al. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: a review [J]. *J Funct Foods*, 2020, 75:104248.
- 17 Lee HS, Kim MR, Park Y, et al. Fermenting red ginseng enhances its safety and efficacy as a novel skin care anti-aging ingredient: in vitro and animal study [J]. *J Med Food*, 2012, 15:1015-1023.
- 18 Li L, Wang L, Fan WX, et al. The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: a review [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48:899-921.
- 19 Shiferaw Terefe N, Augustin MA. Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60:2887-2913.
- 20 Ran BB, Guo CE, Li WD, et al. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fermentation liquid protects against alcoholic liver disease linked to regulation of liver metabolome and the abundance of gut microbiota [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 101:2846-2854.
- 21 Ge WJ, Zhao KM, Wang XW, et al. iASPP is an antioxidative factor and drives cancer growth and drug resistance by competing with Nrf2 for Keap1 binding [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32:561-573. e6.