

火龙果皮发酵物对脂多糖 诱导 RAW264.7 细胞炎症的缓解作用

李丹倩, 梁嘉怡, 钟晓晴, 王润东, 彭元怀

(岭南师范学院食品科学与工程学院, 广东湛江 524048)

摘要: 本文研究了火龙果皮发酵物 (Fermented *Hylocereus undulatus* peel, FHP) 对脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞炎症的缓解作用及机制。通过干酪乳杆菌 CICC20280 发酵火龙果皮, 制备 FHP。采用 50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ FHP 处理 RAW264.7 细胞, 噻唑蓝比色法确定 FHP 细胞毒性。在此基础上, 将细胞分为对照组、LPS 组及 FHP 处理组, 格里斯试剂法、DCFH-DA 荧光法和 ELISA 分别检测各组细胞培养上清中一氧化氮 (NO)、活性氧 (ROS) 和细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10) 含量; RT-PCR 检测 NF- κB 通路的信号转导元件 *TLR4/MyD88/NF- κB* 及下游炎症因子的表达。结果显示: FHP 作用 RAW264.7 细胞的安全浓度 ≤ 400 $\mu\text{g/mL}$ 。与 LPS 组相比, FHP 呈剂量依赖性地显著 ($p < 0.05$) 抑制细胞分泌 NO、ROS、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6, 平均抑制率 76.40%、提高 IL-10 浓度, 提高率达 173.72%, 同时极显著 ($p < 0.01$) 下调 *TLR4*、*MyD88*、*NF- κB* 及 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* 的表达。综上可知: FHP 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症具有缓解作用, 其抗炎活性通过抑制促炎介质并提高抑炎因子的水平实现, 机制与沉默 NF- κB 通路的信号转导功能有关。

关键词: 火龙果皮发酵物; 干酪乳杆菌; 抗炎活性; 作用机制

文章编号: 1673-9078(2021)05-23-30

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0999

Attenuation of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW264.7 Cells by Fermented *Hylocereus undulatus* Peels

LI Dan-qian, LIANG Jia-yi, ZHONG Xiao-qing, WANG Run-dong, PENG Yuan-huai

(College of Food Science and Engineering Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: To investigate the attenuating effects of fermented *Hylocereus undulatus* peels (FHP) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW264.7 cells, and the mechanisms of attenuation, *Hylocereus undulatus* peels were fermented using *Lactobacillus casei* CICC20280. A methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay was used to determine FHP cytotoxicity at different concentrations (50, 100, 200, 400 and 800 $\mu\text{g/mL}$). The following groups were included: a control group, an LPS-induced inflammation model group, and five groups treated with LPS and different concentrations of FHP. Nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), and cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10) in cell culture supernatants were quantitated using various molecular analysis techniques, including Griess, DCFH-DA fluorescence, and ELISA assays. RT-PCR was used to detect expression of NF- κB pathway components (*TLR4/MyD88/NF- κB*) and pro-inflammatory factors. FHP at concentrations of ≤ 400 $\mu\text{g/mL}$ is non-toxic to RAW264.7 cells. FHP significantly decreases ($p < 0.05$) concentrations of pro-inflammatory factors including NO, ROS, TNF- α , IL-1 β and IL-6, by an average of 76.40%, and increases the concentration of the anti-inflammatory factor IL-10, by an average of 173.72%, in a dose-dependent manner, compared to the LPS-induced inflammation model group. Expression levels of *TLR4*, *MyD88*, *NF- κB* and *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* were significantly down-regulated ($p < 0.01$) by FHP. In summary,

引文格式:

李丹倩, 梁嘉怡, 钟晓晴, 等. 火龙果皮发酵物对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的缓解作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 23-30, +16

LI Dan-qian, LIANG Jia-yi, ZHONG Xiao-qing, et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells by fermented *Hylocereus undulatus* peels [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 23-30, +16

收稿日期: 2020-10-29

基金项目: 广东省教育厅青年创新类人才项目 (2019KQNCX072); 广东省教育厅特色创新类项目 (2020KTSX071); 岭南师范学院高层次人才科研启动项目 (ZL2015); 省级大学生创新创业训练计划项目 (1024)

作者简介: 李丹倩 (1999-), 女, 本科, 研究方向: 食品功能因子; 通讯作者: 王润东 (1991-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全与健康

FHP displays readily detectable attenuating effects on LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells, probably by inhibiting secretion of pro-inflammatory mediators and increasing levels of anti-inflammatory factors, via a mechanism possibly associated with an NF- κ B pathway.

Key words: fermented *Hylocereus undulatus* peel; *Lactobacillus casei*; anti-inflammatory activity; mechanism

炎症是机体受细菌感染或氧化应激后免疫系统产生的防御反应,其发生机制与炎症信号通路和促炎因子相关。当致炎介质与免疫细胞膜上游信号响应元件先天免疫受体4 (toll-like receptor4, TLR4) 结合,经中游信号传递元件髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 和下游信号释放元件核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的转导,可激活 NF- κ B 通路,驱动肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) 基因表达,形成炎症反应^[1,2]。适度的炎症有利于宿主抵御病原体感染,然而,不受控制的炎症会诱发代谢综合征和肝肾损伤^[3]。目前,化学合成的抗炎药物已广泛用于治疗炎症,但长期使用引发脏器功能衰退和胃肠溃疡^[4]。因此,寻找低毒性的天然物质,来避免合成药物的毒副作用尤为迫切。

火龙果 (*Hylocereus undulatus*) 富含黄酮、多糖和多酚等物质,具有较好的保健功能^[5]。火龙果皮是果实加工的副产物,约占整果总重量 33%,它通常被转化为动物饲料或作为废弃物丢弃^[6]。有研究指出果皮中也含有大量的膳食功能因子,具有抗菌、抑炎和抗氧化作用^[7],但是由于果皮细胞壁的构成,采用传统的有机溶剂萃取和超声辅助提取无法使得果皮中活性物质充分溶出,造成提取率低和生物相容性差等问题^[8,9]。目前,利用酵母、真菌和乳酸菌对食品原料进行发酵的研究正在兴起,微生物发酵是提高食品工业副产物再利用的一种综合、环保的新方法^[10,11]。

微生物发酵的本质是利用菌体生长繁殖中释放的多种胞外酶,促进食品的营养功能成分降解,使得原本没有生物活性或活性较弱的前体物质转变为有效成分,从而增加提取物中有效物质的含量^[11]。据报道,乳酸菌发酵大麦^[12]、铁皮石斛^[13]、石榴皮^[14]可促进原料中大分子蛋白质和结合态物质的分解,获得新型小肽和游离态物质。Cheng 等^[15]发现干酪乳杆菌发酵的蓝莓渣对肥胖诱导炎症的缓解作用显著高于未发酵果渣,且具有更高的生物利用率。李倩^[16]通过植物乳杆菌发酵辣木叶制备富含 γ -氨基丁酸,大幅提高辣木叶水提物的抗炎和抗氧化活性。由此可见,果蔬及其下脚料的乳酸菌发酵具有广阔的应用前景。然而,发酵火龙果皮侧重于果醋和酿酒工艺的研究,未见关于火龙果皮发酵物中功能组分及抗氧化/抗炎作用的报道。

本文以干酪乳杆菌 CICC20280 发酵火龙果皮,检

测发酵前后提取物中总酚和黄酮的变化、抗氧化活性的差异,基于脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型,探究火龙果皮发酵物 (Fermented *Hylocereus undulatus* peel, FHP) 对炎症的缓解作用和机制,旨在为火龙果皮资源的综合利用和抗炎功能产品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜火龙果,购于广东省湛江市火龙果产区。整果洗净和晾干后,分离果肉与果皮,把果皮切成 3~5 cm 小块,经冷冻干燥后粉碎过 100 目筛,1 °C 下贮藏备用。乳酸菌菌株:干酪乳杆菌 CICC20280 由广东省微生物研究所丁郁教授馈赠。

脂多糖 (LPS, *Escherichia coli* O55:B5)、噻唑蓝 (MTT),美国 Sigma 公司;二甲基亚砜 (DMSO)、地塞米松 (DEX),青岛海博有限公司;RAW264.7 细胞株,中国科学院(上海)细胞库;RPMI-1640 基础培养基、青链霉素混液、胎牛血清 (FBS) 和磷酸盐缓冲液,美国 Gibco 公司;一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒,美国 Promega 公司;TNF- α /IL-1 β /IL-6 酶联免疫吸附试剂盒、ABTS 试剂盒、FRAP 试剂盒、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光试剂、Trizol RNA 提取剂、HiScript II Q-RT SuperMix for RT-PCR、AceQ Universal SYBR RT-PCR Master Mix,广州齐云生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2D 超净工作台,苏州净化设备工程有限公司;SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机,北京博医仪器公司;Microfuge 20R 低温高速离心机,美国 Beckman 公司;Thermo311 CO₂ 细胞培养箱、MK3 型全自动多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;CFX96 型荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 FHP 制备及活性组分测定

干酪乳杆菌 CICC20280 的活化,将菌株冻干粉接入 MRS 液体培养基,37 °C 厌氧培养 24 h 后,12000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,用无菌生理盐水调整菌

液浓度至 10^7 CFU/mL 作为发酵剂。按照质量: 体积 = 1:1.5, 将火龙果皮粉末与蒸馏水混合, 采用 $80\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min 巴氏杀菌法除去火龙果皮培养基中原始杂菌, 冷却至室温备用。将上述发酵剂以体积分数 5% 添加到无菌的火龙果皮培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧静置培养 42 h 后, 4000 r/min, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 离心 5 min, 收集上清液。以蒸馏水为流动相, 应用聚酰胺柱层析法对上清液初分离纯化, 于真空冷冻干燥, 制成 FHP^[17]。对照组样品的制备除不接种发酵剂外, 其余操作同上。试样中总酚和黄酮的测定参照 Sun 等^[18]建立的方法。

1.3.2 FHP 抗氧化活性测定

通过 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和铁离子还原能力^[18], 对 FHP 的抗氧化活性进行评估。

1.3.3 FHP 抗炎活性测定

1.3.3.1 RAW264.7 细胞培养

取冻存 RAW264.7 细胞, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 1 min, 在无菌操作台内将其移入含 10% 胎牛血清、1% 双抗 (100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素) 的 RPMI-1640 完全培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育, 每隔 24 h 更换培养基, 当细胞融合率达到 80%~90% 对细胞进行传代, 细胞传至 3 代, 用于后续试验。

1.3.3.2 FHP 对 RAW264.7 细胞活力的影响

利用 RPMI-1640 完全培养液将 RAW264.7 细胞浓度调整至 10^6 个/mL, 按照每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 18 h。待细胞贴壁后, 弃掉孔内培养液, 随后每孔加入 100 μL 液体, 依据添加液体的种类, 将细胞分为: 对照组、阳性组和不同质量浓度 FHP 处理组, 分别添加: 完全培养液、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DEX 溶液和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FHP 溶液, 每组设 5 个复孔。培养 24 h 后, 向各孔内加入 100 μL MTT 工作液 (5 mg/mL), 作用 4 h 后弃上清液, 每孔加 100 μL MTT 终止液 (0.1% DMSO), 避光振荡混匀, 于 490 nm 处测定 OD 值, 计算细胞存活率, 确定 FHP 安全浓度。细胞存活率计算公式, 如下:

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{试验孔}-\text{阴性孔}}{\text{阳性孔}-\text{阴性孔}} \times 100\%$$

1.3.3.3 FHP 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞活力的影响

按照 1.3.3.2 操作进行细胞接种, 根据 FHP 安全浓度范围, 设置 7 个试验组: 对照组、阳性组、LPS 模型组和低中高浓度 FHP 组, 分别添加 100 μL : 完全培养液、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DEX、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FHP。阳性组和 FHP 组在添加对应溶液处理细胞 1 h 后, 加入 100 μL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

LPS。各组培养 24 h 后, 按照 1.3.3.2 操作检测 FHP 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞保护效应。

1.3.3.4 FHP 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 NO、ROS、细胞因子及 NF- κ B 通路关键基因的影响

细胞接种、试验分组和受试物添加同 1.3.3.3 操作。

① 格里斯 (Griess) 法检测 RAW264.7 细胞上清中 NO 含量

干预细胞 24 h 后, 4000 r/min, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 5 min, 收集各组上清 50 μL 。向上清中添加等体积 Griess A 和 Griess B 溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 10 min。在 540 nm 处测定各孔 OD 值, 用 NaNO_2 建立标准曲线, 计算样品中亚硝酸钠浓度, 推算细胞培养液中 NO 释放量。

② DCFH-DA 荧光法检测 RAW264.7 细胞上清液中 ROS 含量

同上述操作收集上清后, 在黑暗条件下加入终浓度 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DCFH-DA 荧光试剂, 避光孵育 30 min 后, 以激发波长 488 nm、发射波长 525 nm, 测定上清荧光强度。

③ ELISA 检测 RAW264.7 细胞上清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 含量

同上述操作收集上清。按照 ELISA 试剂盒说明书测定各组上清中细胞因子的浓度。

④ RT-PCR 检测 RAW264.7 细胞 NF- κ B 通路 *TLR4/MyD88/NF- κ B* 及炎症因子基因的表达

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

引物	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
<i>β-actin</i>	F:GGCTGTATTCCCCTCCATCG R:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	104
<i>TLR4</i>	F:AGTCTGAAATTGCTGAGCTCAAAT R:GCGACGTTAAGCCATGGAAG	144
<i>MyD88</i>	F:TGATGCCTTCATCTGCTACTG R:TCCCTCCGACACCTTCTTTCTA	119
<i>NF-κB</i>	F:AGGCCAGTTCTATGGAGCACAGTT R:TTGAGTGCCAGAGGGACATTTCA	158
<i>TNF-α</i>	F:TGCTGTTCTATGACCGCC R:CTTTCAGAGCATCAACGCA	136
<i>IL-1β</i>	F: TTCATCTTTGAAGAAGAGCCCAT R: TCGGAGCCTGTAGTGCAGTT	102
<i>IL-6</i>	F:GTGAGGCTCAACATTGCGCTGTA R:TGTCCAGGCGGTAGAAGATGAAG	128

干预细胞 4 h 后, 4000 r/min, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 弃上清, 收集细胞。使用 Trizol RNA 提取细胞总 RNA, RNA 经纯度和质量浓度检测后, 保留高品质 RNA 样

本。应用反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 采用 10 μ L 反转录体系, 反转录条件为: 37 $^{\circ}$ C、10 min; 95 $^{\circ}$ C、8 s。利用特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 以小鼠 β -actin 为内参基因, 构建 20 μ L 反应体系, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C、25 s; 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、15 s, 循环 40 次; 融解曲线分析: 95 $^{\circ}$ C、15 s; 60 $^{\circ}$ C、30 s, 循环 1 次。引物序列如下表 1。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算待测基因的相对表达量。

1.4 数据统计分析

试验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理, 以平均值 \pm 标准差表示, 满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较运用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD 法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。 $p < 0.05$ 存在显著差异, $p < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 FHP 总酚、黄酮和抗氧化活性

火龙果皮发酵物中总酚含量达 169.26 mg CAE/(g DW)、黄酮为 81.74 mg CAE/(g DW), 不仅显著高于 ($p < 0.05$) 未发酵火龙果皮中的含量, 还远超已报道的榴莲壳^[19]、葡萄皮^[20]和芒果皮^[21]等下脚料中的提取量, 有研究指出乳酸菌通过脱羧和还原反应将食品原料中结合态酚和黄酮转化为游离态^[22]。因此, 乳酸菌

发酵果蔬渣的工艺更适合天然产物的工业化生产。火龙果皮发酵物具有更高的 DPPH/ABTS 自由基清除能力和 Fe^{3+} 金属离子螯合能力, 本研究中干酪乳杆菌 CICC20280 菌株在生长稳定的后期也能产生具有抗氧化活性的物质, 但火龙果皮发酵时长为 42 h, 此时菌体生长刚达到稳定期, 因此, 菌体代谢产生的抗氧化物质质量远远低于火龙果皮发酵后的释放量, 可以忽略其影响。此外, 有研究指出炎症反应释放的促炎因子可以活化巨噬细胞和白细胞等分泌大量的过氧化物自由基, 加重炎症程度, 因此, 天然活性物质通过清除自由基发挥抗氧化作用具有潜在的缓解炎症的功能^[23,24], 据此推断具有抗氧化活性的 FHP 可通过淬灭氧自由基发挥抗炎功效。

2.2 FHP 对 RAW264.7 细胞活力的影响

细胞增殖试验是评估外源化合物细胞毒性的重要依据。由表 3 可知, 以 DEX 组细胞存活率为 100%, FHP 浓度在 100~400 μ g/mL 时, RAW264.7 细胞存活率随浓度增加而上升, 细胞最高存活率达到 99.01%。然而, FHP 浓度低于 100 μ g/mL 或高于 400 μ g/mL 时细胞活力会明显下降, 这表明高浓度 FHP 能导致细胞损伤, 具有细胞毒性。最新研究也证实, 摄入过量的儿茶素(多酚类)会对肝脏细胞造成不可逆损伤^[25], 因此, 质量浓度 100~400 μ g/mL 是研究 FHP 抗炎功效的安全剂量范围。

表 2 火龙果皮提取物的总酚、黄酮和抗氧化活性

Table 2 Main antioxidant components and antioxidant activities in *Hylocereus undulatus* peel extract

火龙果皮提取物	总酚/ [mg CAE/(g DW)]	黄酮/ [mg CAE/(g DW)]	DPPH/ [mmol Trolox/(L·g DW)]	ABTS/ [mmol Trolox/(L·g DW)]	FRAP/ [mmol Trolox/(L·g DW)]
未发酵	73.78 \pm 3.98	11.55 \pm 1.78	1.55 \pm 0.08	0.83 \pm 0.06	2.62 \pm 0.12
发酵	169.26 \pm 4.67*	81.74 \pm 5.33*	1.74 \pm 0.03*	1.04 \pm 0.10*	2.98 \pm 0.07*

注: GAE: 没食子酸; CAE: 芦丁; DW: 干重; Trolox: 抗氧化剂; $FeSO_4$: 硫酸亚铁。*表示同列数据间差异显著 ($p < 0.05$)。

表 3 火龙果皮发酵物对 RAW264.7 细胞活力的影响

Table 3 Effects of fermented *Hylocereus undulatus* peel on the proliferation of RAW264.7 cells

分组	总酚浓度/ $(\mu$ g/mL)	重复数	OD ₄₆₀	细胞存活率/%
阴性对照	\	5	0.188 \pm 0.062	\
DEX 组	\	5	0.285 \pm 0.041 ^a	100.00
FHP 组	50	5	0.234 \pm 0.022 ^c	82.36
	100	5	0.278 \pm 0.034 ^a	97.89
	200	5	0.280 \pm 0.018 ^a	98.45
	400	5	0.282 \pm 0.030 ^a	99.01
	800	5	0.253 \pm 0.041 ^b	90.43

注: DEX: 地塞米松, 抗炎试验的阳性对照物质。同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3 FHP 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌

NO 和 ROS 影响

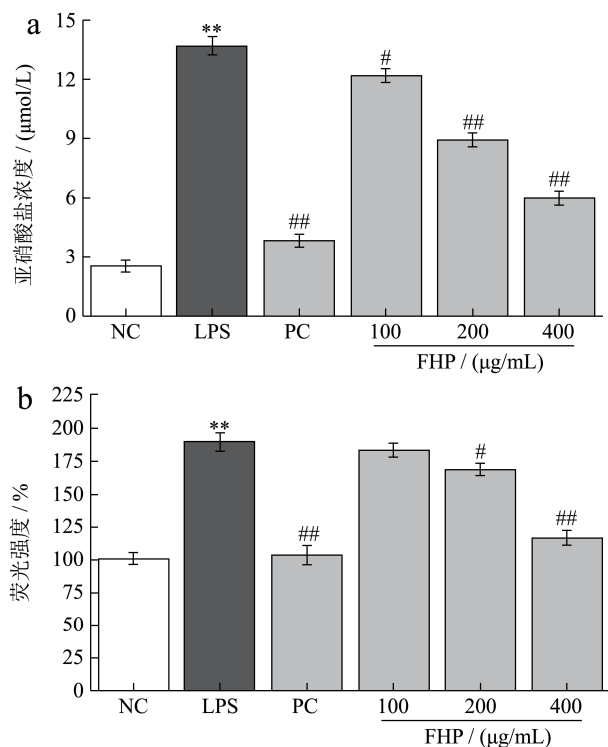


图1 火龙果皮发酵物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 NO 和 ROS 的影响

Fig.1 Effects of fermented *Hylocereus undulatus* peel on NO and ROS in LPS-induced RAW264.7 cells

注: a: NO, b: ROS. NC: 阴性对照组; LPS: 脂多糖处理组; PC: 阳性对照组, 地塞米松; FHP: 不同浓度火龙果皮发酵物处理组。**与阴性对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$), #与 LPS 模型组相比差异显著 ($p < 0.05$), ##差异极显著 ($p < 0.01$)。

NO 作为重要的促炎介质, 其释放量是评价炎症的首要指标^[26]。ROS 伴随炎症反应而产生, 其诱导的细胞氧化损伤会加速炎症进程^[27]。如图 1 所示, 与阴性对照 NC 组相比, 炎症模型 LPS 组 RAW264.7 细胞 NO 和 ROS 的释放量极显著升高 ($p < 0.01$)。与 LPS 组相比, 经不同质量浓度 FHP (100~400 $\mu\text{g/mL}$) 预处理的细胞 NO 释放量均显著减少 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 且呈剂量依赖性; FHP 浓度高于 200 $\mu\text{g/mL}$ 才能显著抑制 ($p < 0.05$) ROS 生成。此外, FHP 浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$, 其抑制 NO 和 ROS 释放的效果分别达到阳性对照 PC 组 85.63%和 88.90%。有研究指出, NO 可与炎性因子相互作用, 其分泌量决定细胞内炎性因子的生物合成能力^[28]。因此, 推测 FHP 先抑制细胞中 NO 生成, 减少 NO 与炎性因子的互动, 进而降

低炎性因子活性。

2.4 FHP 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 的影响

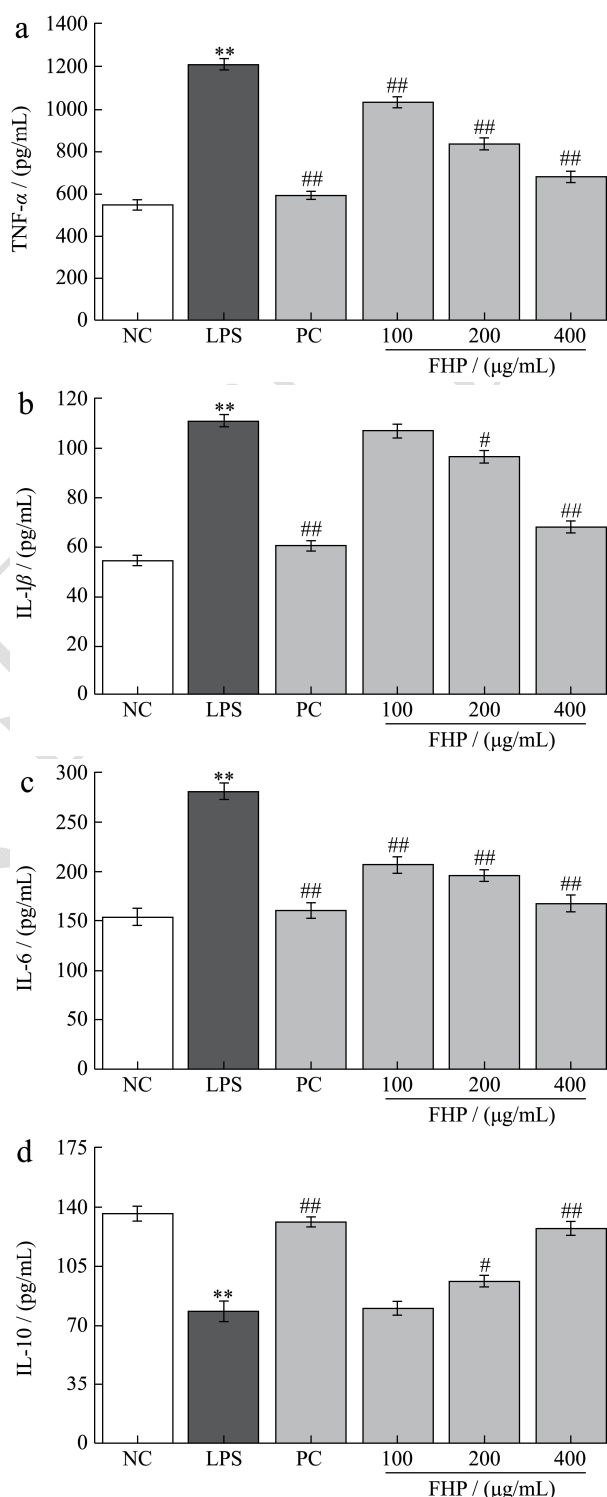


图2 火龙果皮发酵物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞因子生成的影响

Fig.2 Effects of fermented *Hylocereus undulatus* peel on cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells

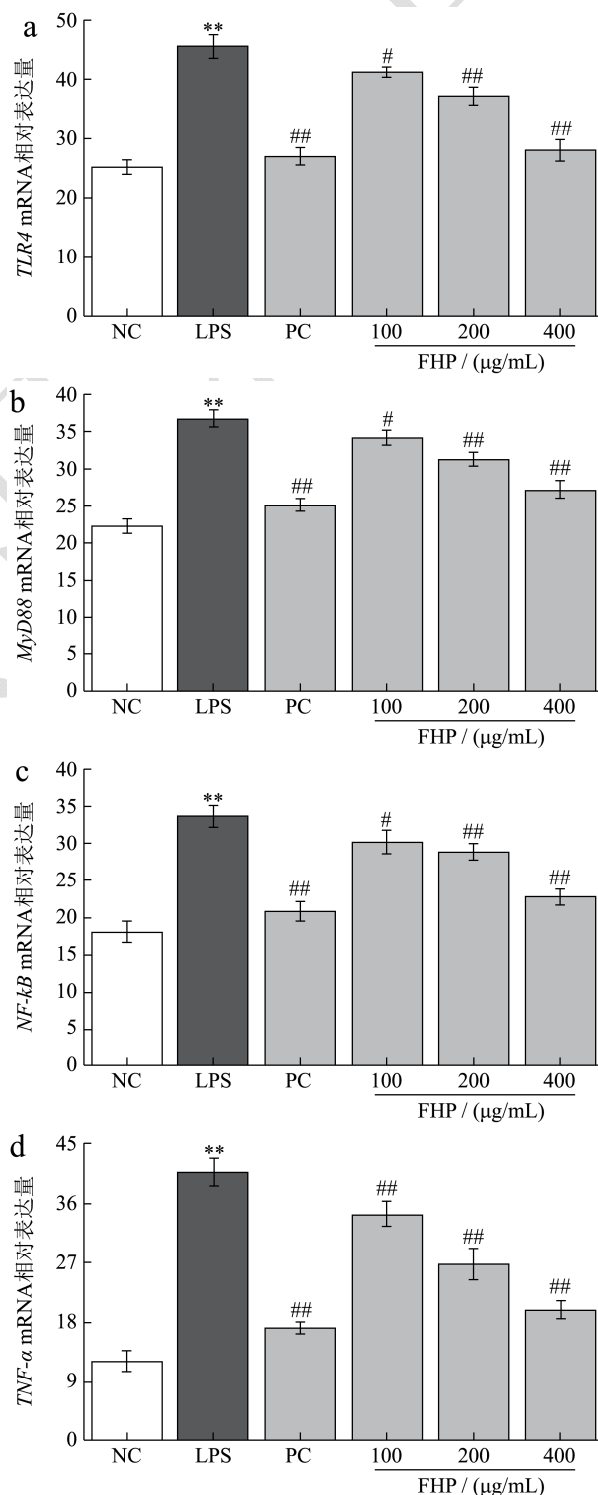
注: a: TNF- α , b: IL-1 β , c: IL-6, d: IL-10. NC: 阴性对照组; LPS: 脂多糖处理组; PC: 阳性对照组, 地塞米松; FHP: 不同浓度火龙果皮发酵物处理组。**与阴性对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$), #与 LPS 模型组相比差异显著 ($p < 0.05$), ##差异极显著 ($p < 0.01$)。

图 2a~d 显示, 与 NC 组相比, LPS 组 RAW264.7 细胞分泌炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 极显著 ($p < 0.01$) 升高, 而抗炎因子 IL-10 浓度极显著降低 ($p < 0.01$), 表明炎症造模成功。与 LPS 组相比, 添加不同浓度 FHP 均极显著抑制 ($p < 0.01$) TNF- α 和 IL-6 的释放, 最大抑制率为 68.92% 和 62.15%。当 FHP 浓度高于 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可显著抑制细胞分泌 IL-1 β , 并提升 IL-10 的释放, 最大提高率为 173.72%。与 PC 组相比, 随着 FHP 浓度的增加, 组间的抗炎功效的差异逐渐减少。此结果与前面促炎介质 NO 和 ROS 对 FHP 的响应规律一致。这也进一步验证了 FHP 是通过抑制 NO 释放、降低 ROS 氧化损伤和提升抗炎因子的多重作用, 缓解细胞炎症反应。

2.5 FHP 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF- κ B 通路及炎症因子合成基因表达的影响

NF- κ B 通路是由关键元件 *TLR4/MyD88/NF- κ B* 介导的细胞感知、转导和表达致炎信号的经典通路, 能够引发 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症物质的“瀑布样”释放, 造成机体炎性损伤, 所以长期以来 NF- κ B 通路相关的功能元件被认为是抗炎物质的主要靶点^[29]。为明确 FHP 抗炎作用机制, 采用 RT-PCR 检测 NF- κ B 通路的信号转导元件及下游炎症因子合成基因的表达。由图 3 可知, LPS 组细胞中 *TLR4/MyD88/NF- κ B* 及 *TNF- α /IL-1 β /IL-6* 的相对表达量极显著 ($p < 0.01$) 高于 NC 组。然而, 经不同质量浓度 FHP 预处理后, 与 LPS 组相比, 细胞 NF- κ B 通路的信号转导基因及下游炎症因子的表达均显著减少 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 且浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ FHP 对细胞 NF- κ B 通路的信号转导功能抑制最佳。有文献指出, 多酚和黄酮类物质可与细胞表面 Toll 样受体竞争结合, 减少致炎物与炎性信号响应元件的接触, 沉默炎症因子合成基因表达^[30], 因此, FHP 抗炎机制可能是其功能组分中的多酚和黄酮结合 TLR4, 抑制 NF- κ B 通路的信号转导功能, 下调炎症因子基因的表达, 从而减少炎症因子的分泌, 缓解机体炎性损伤。炎症对机体的危害主要通过炎性损伤和氧化损伤实现, 其发生机制与 NF- κ B 通路和氧自由基有关^[1,2,29], PC 组地塞米松可与胞内的糖皮质激素受体结合, 转位至细胞核后干扰 NF- κ B 通路, 缓解炎症的机

制已被学者阐明, 且在图 3 中得到验证, FHP 也可影响 NF- κ B 通路, 说明 FHP 与地塞米松有共同的抗炎机制。然而, 这不代表二者抗炎机制完全一致, 在 2.1 研究中证实的 FHP 具有较强抗氧化活性, 能够淬灭活性氧, 减轻了炎症反应中的氧化损伤, 综上 FHP 的抗炎机制与沉默 NF- κ B 通路功能和抗氧化作用密切相关。此外, 最新研究^[17]表明多酚类物质通过“肠道菌群-NF- κ B 通路”的级联途径缓解机体炎症, 因此更多关于 FHP 的抗炎信息可在体内研究中被挖掘。



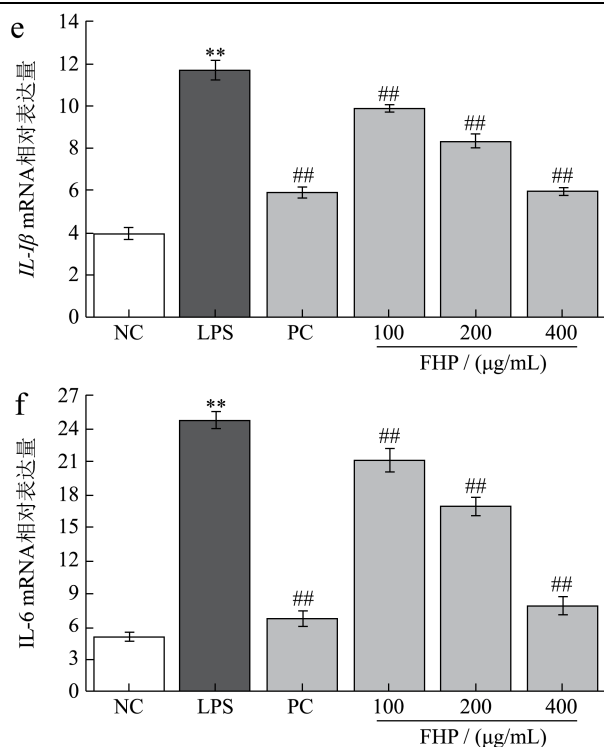


图3 火龙果皮发酵物对LPS诱导的RAW264.7细胞NF-κB通路元件和炎症因子表达的影响

Fig.3 Effects of fermented *Hylocereus undulatus* peel on the genes expression of NF-κB pathway and pro-inflammatory factor in LPS-induced RAW264.7 cells

注: a: *TLR4*, b: *MyD88*, c: *NF-κB*, d: *TNF-α*, e: *IL-1β*, f: *IL-6*. NC: 阴性对照组; LPS: 脂多糖处理组; PC: 阳性对照组, 地塞米松; FHP: 不同浓度火龙果皮发酵物处理组。**与阴性对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$), #与LPS模型组相比差异显著 ($p < 0.05$), ##差异极显著 ($p < 0.01$)。

3 结论

本研究比较了火龙果发酵前后, 提取物中总酚、黄酮和抗氧化活性的变化, 并基于RAW264.7细胞炎症模型探究FHP抗炎作用及机制。结果表明, 火龙果皮经干酪乳杆菌CICC20280发酵后, 总酚、黄酮含量和抗氧化活性显著升高, 且能够有效抑制促炎介质NO和ROS生成, 减少过氧化物引发的早期炎症损伤。FHP在蛋白分泌和基因表达两个层次上显著抑制炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6, 其作用机制是多酚和黄酮类物质通过下调NF-κB通路的关键元件*TLR4/MyD88/NF-κB*的表达, 沉默通路功能实现。文中探讨了FHP功能组分和体外抗炎作用, 而FHP物质分离、结构表征和体内抗炎有待后续的研究。

参考文献

[1] TANG B, LI X C, REN Y L, et al. MicroRNA-29a regulates

lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in murine macrophages through the Akt1/NF-κB pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 360(2): 74-80

[2] Li Y, Zeng Y, Huang Q, et al. Helenalin from *Centipeda minima* ameliorates acute hepatic injury by protecting mitochondria function, activating Nrf2 pathway and inhibiting NF-κB activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119: 109435

[3] Kwon D H, Cha H J, Chio E O, et al. Schisandrin a suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW264.7 macrophages by suppressing the NF-κB, MAPKs and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 264-274

[4] 王旭旭,马领领,马卓云,等.火龙果的功能及其作用机制研究进展[J].*食品工业科技*,2019,40(21):352-360
WANG Xu-xu, MA Ling-ling, MA Zhuo-yun, et al. Research progress on the function of pitaya and its mechanism [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(21): 352-360

[5] Michele U, Rubilene R D A, Carolina G V, et al. Characterization and application of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel powder as a fat replacer in ice cream [J]. *J Food Process Pres*, 2020, 44(5): e14420

[6] Liu W R, Shen Y, Li N, et al. Application of gelatin incorporated with red pitaya peel methanol extract as edible coating for quality enhancement of crayfish (*Procambarus clarkii*) during refrigerated storage [J]. *J Food Quality*, 2019, 1: 1-8

[7] 鲁青,张超凤,严美婷,等.超声波-酶解辅助提取火龙果皮色素的工艺优化[J].*食品研究与开发*,2019,49(17): 68-72
LU Qing, ZHANG Chao-feng, YAN Mei-ting, et al. Optimization of ultrasonic-enzymatic hydrolysis assisted extraction process of pigment from pitaya peel [J]. *Food Research and Development*, 2019, 49(17): 68-72

[8] 胡金梅,吴巧婷,谢晶晶,等.双水相分离火龙果皮中色素和果胶[J].*食品工业科技*,2021,42(2):37-41
HU Jin-mei WU Qiao-ting XIE Jing-jing, et al. Separation of pigment and pectin from pitaya peel by aqueous two-phase system [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(2): 37-41

[9] Braga A R C, Mesquita L M D S, Martins P L G, et al. *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, 69, 162-170

- [10] Madrera R R, Bedrinana R P, Valle B S. Enhancement of the nutritional properties of apple pomace by fermentation with autochthonous yeasts [J]. *Lebensmittel Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 2017, 79: 27-33
- [11] 宋明辉, 桑娜, 乔长晟. 酿酒酵母枸杞发酵物抗氧化性能研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(19): 14-18
SONG Ming-hui, SANG Na, QIAO Chang-sheng. Study on the antioxidant activity of the wolfberry fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(19): 14-18
- [12] 张家艳, 董英, 肖香, 等. 乳酸菌发酵大麦提取物增强肥胖大鼠的肝脏抗氧化能力[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(12): 19-25
ZHANG Jia-yan, DONG Ying, XIAO Xiang, et al. Extract of fermented barley improve liver antioxidative activities in obese rats [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(12): 19-25
- [13] 黄振勇, 张娥珍, 淡明, 等. 乳酸菌发酵对铁皮石斛活性物质含量及其抗氧化能力的影响[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(3): 572-578
HUANG Zhen-yong, ZHANG E-zhen, DAN Ming, et al. Effects of *Lactobacillus* fermentation on active substance and antioxidant activity of *Dendrobium candidum* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(3): 572-578
- [14] 刘晓翠, 殷晓翠, 马娜, 等. 不同乳酸菌复配发酵石榴汁的品质指标分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(17): 48-55
LIU Xiao-cui, YIN Xiao-cui, MA Yuan, et al. Quality index analysis of fermented pomegranate juices fermented by different lactic acid bacterias [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(17): 48-55
- [15] Cheng Y X, Wu T, Tang S X, et al. Fermented blueberry pomace ameliorates intestinal barrier function through the NF- κ B-MLCK signaling pathway in high-fat diet mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 3167-3179
- [16] 李倩, 夏杏洲, 周伟, 等. 辣木叶提取液在发酵过程营养成分及其抗氧化活性的变化[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(1): 110-115
LI Qian, XIA Xing-zhou, ZHOU Wei, et al. Changes of nutritional components and antioxidant activities of *Moringa oleifera* leaf extract during fermentation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(1): 110-115
- [17] Cheng Y X, Wu T, Chu X Q, et al. Fermented blueberry pomace with antioxidant properties improves fecal microbiota community structure and short chain fatty acids production in an *in vitro* mode [J]. *LWT*, 2020, 125: 109260
- [18] Sun Y, Li H Y, Hu J G, et al. Qualitative and quantitative analysis of phenolics in *Tetrastigma hemsleyanum* and their antioxidant and antiproliferative activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(44): 10507-10515
- [19] Ruamsuke P, Namiesnik J, Vearasilp S, et al. Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(7): 2222-2232
- [20] Dabetic N, Todorovic V, Panic M, et al. Impact of deep eutectic solvents on extraction of polyphenols from grape seeds and skin [J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(14): 4830
- [21] 胡会刚, 赵巧丽. 芒果皮渣多酚的提取分离及抗氧化活性分析[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2): 53-62
HU Hui-gang, ZHAO Qiao-li. Extraction, separation and antioxidant activity of polyphenols from mango pomace [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(2): 53-62
- [22] Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, et al. Effect of *Lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice [J]. *Food Chem*, 2018, 250: 148-154
- [23] 王敏, 刘保林, 国旭丹. 槲皮素及其代谢物抑制氧化应激与炎症[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 263-267
WANG Min, LIU Bao-lin, GUO Xu-dan. Quercetin and one of its metabolites inhibit reactive oxygen-species and inflammation [J]. *Food Science*, 2013, 34(15): 263-267
- [24] Samarghandian S, Azimi-nezhad M, Borji A, et al. Effect of crocin on aged rat kidney through inhibition of oxidative stress and proinflammatory state [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(8): 1345-1353
- [25] Younes M, Aggett P, Aguilar F, et al. Scientific opinion on the safety of green tea catechins [J]. *EFSA J*, 2018, 16(4): 5239
- [26] Yang T, Yuk K, Jo I. The role of nitric oxide in mycobacterial infections [J]. *Immune Netw*, 2009, 9(2): 46-52
- [27] Wang C, An Y, Wang Y, et al. Insulin-like growth factor-I activates NF- κ B and NLRP3 inflammatory signalling via ROS in cancer cells [J]. *Mol Cell Probe*, 2020, 52: 101583
- [28] Zhang X, Guo Z, Zhang C, et al. Effect of total flavonoids of astragalus on secretion levels of cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells [J]. *Veter Sci China*, 2015, 45(3): 321-324
- [29] CHUN J, CHOI R J, KHAN S, et al. Alantolactone suppresses inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by downregulating NF- κ B, MAPK and AP-1 via the MyD88 signaling pathway in LPS-activated RAW264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 375-383