

灭活菌体型后生元的体外降血压、降尿酸及降血糖作用

林倩如¹, 邓怡玲², 赵玥明², 何泽琪¹, 乔子骄¹, 刘果¹, 石心茹¹, 陈运娇¹, 肖苏尧¹, 侯艳梅²,
谢奎², 曹庸^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 海普诺凯营养品有限公司, 湖南长沙 410011)

摘要: 后生元对人体具有多种健康助益, 是近年来研究的热点。某市售后生元是以大豆分离蛋白为主要原料开发制备的灭活菌体型后生元产品, 该种原料类型的后生元产品鲜有报道。为了解其生物活性, 研究采用大鼠胸大动脉平滑肌细胞 (VSMC)、人肾小管上皮细胞 (HK-2)、小鼠前脂肪细胞 (3T3-L1) 模型评价其体外降血压、降尿酸、降血糖作用。结果显示, 该后生元产品能够显著抑制血管紧张素-II (Angiotensin II, Ang II) 导致的 VSMC 细胞迁移及氧化应激, 且具有浓度依赖性, 作用质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 迁移率降低 12.44%, 活性氧 (Reactive Oxygen, ROS) 释放量仅为空白组的 86.51%。在 HK-2 细胞模型中, 后生元能极显著降低 HK-2 细胞的尿酸含量, 700 $\mu\text{g/mL}$ 作用下, 尿酸含量降低 30.02%。而在降糖活性评价中, 后生元无法促进胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) 的 3T3-L1 细胞吸收葡萄糖。研究结果表明, 后生元具有显著的降血压、降尿酸生物活性, 这为开发兼具降血压、降尿酸功能性食品或医药保健品提供了理论依据; 细胞水平上, 后生元不具有降血糖功效, 可能需要动物模型进行验证。

关键词: 后生元; 细胞模型; 降血压; 降尿酸; 降血糖

文章编号: 1673-9078(2023)04-19-25

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.1091

Hypotensive, Hypouricemic, and Hypoglycemic Effect of Inactivated Bacterial Postbiotics *in Vitro*

LIN Qianru¹, DENG Yiling², ZHAO Yueming², HE Zeqi¹, QIAO Zijiao¹, LIU Guo¹, SHI Xinru¹, CHEN Yunjiao¹,
XIAO Suyao¹, HOU Yanmei², XIE Kui², CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Hyproca Nutrition Co. Ltd., Changsha 410011, China)

Abstract: Postbiotics have various health benefits for the human body and have become a hot research topic in recent years. A commercially available, inactivated bacteriophage-type postbiotic product has been developed and prepared using soybean protein isolate as the main raw material. The scarcity of reports on such postbiotic products is the motivation for this study. To understand the biological activity of this postbiotic product, in this study, rat thoracic vascular smooth muscle cell (VSMC), human renal tubular epithelial cell (HK-2), and mouse preadipocyte (3T3-L1) models were used to evaluate its *in vitro* hypotensive, hypouricemic, and hypoglycemic properties. The results showed that the postbiotic product could significantly inhibit the migration and oxidative stress of VSMC cells induced by angiotensin II (Ang II) in a concentration-dependent manner, with a 12.44% reduction in migration rate at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, and the release of reactive oxygen species (ROS) being 86.51% of that of the control group. In the HK-2 cell model, the postbiotic significantly reduced the uric acid content of HK-2 cells, with a 30.02% reduction at a concentration of 700 $\mu\text{g/mL}$. In contrast, evaluation of hypoglycemic activity showed that the postbiotic was unable to promote glucose uptake by insulin-resistant (IR) 3T3-L1 cells. The results of this study showed that the postbiotic has considerable hypotensive and hypouricemic biological activity, thus providing a theoretical basis for the development of functional foods or

引文格式:

林倩如, 邓怡玲, 赵玥明, 等. 灭活菌体型后生元的体外降血压、降尿酸及降血糖作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 19-25.

LIN Qianru, DENG Yiling, ZHAO Yueming, et al. Hypotensive, hypouricemic, and hypoglycemic effect of inactivated bacterial postbiotics *in vitro* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 19-25.

收稿日期: 2022-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972078); 中国博士后科学基金面上项目 (2020M672651)

作者简介: 林倩如 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: linqr@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学、天然产物化学, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

medical and health products with hypotensive and hypouricemic effects. At the cellular level, the postbiotic does not exhibit hypoglycemic effects, which need to be verified in animal models.

Key words: postbiotics; cell model; hypotensive; hypouricemic; hypoglycemic

后生元 (Postbiotics) 是一种灭活的益生菌物质, 是指微生物通过代谢活动释放产生的不含微生物的上清液、多肽、胞外多糖、微生物产生的酶、细胞壁水解物、短链脂肪酸和微生物裂解物等物质^[1-3]。根据成分来源的差异, 可将后生元分为灭活菌体型、菌体结构成分型、菌体代谢物型和无细胞混合物型^[4], 它们能够直接或间接对宿主产生有益影响, 具有良好的免疫、改善过敏症、调节胃肠道功能、抗氧化和抗炎等作用^[1,3,5,6]。肠道菌群发酵多糖得到的短链脂肪酸被证实是有效的治疗和预防心血管疾病的后生元^[7,8], 临床证明, 抗性淀粉经过肠道微生物作用产生的纤维物质和短链脂肪酸都能够显著降低高血压患者的血压^[9,10]。除此之外, 后生元物质在代谢疾病中具有重要的调节作用, 尤其是糖尿病和肥胖^[11]。发酵食品在很久之前就被证实能够降低患者血糖^[12], 胆汁酸、吲哚、短链脂肪酸也被证实可以直接或间接调节能量稳态和葡萄糖代谢^[13]; Nakamura 等^[14]也发现乳酸菌 CP1563 的细胞碎片可以替代细胞在体外激活过氧化物酶体增殖活化受体 PPAR α/γ , 并有效调节肥胖小鼠的血脂平衡。因此, 后生元作为单一或辅助预防和治疗病症的天然活性因子具有巨大前景。

大豆分离蛋白是脱脂豆粕加工后, 得到的蛋白含量大于 90% 的蛋白粉, 其营养丰富, 含有人体必需氨基酸, 具有很高的利用价值。研究发现, 大豆蛋白在发酵后会产生多种活性肽, 包括血管紧张素转化酶 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) 抑制肽、抗氧化肽、阿片肽、降胆固醇肽或促进矿物质吸收肽等^[15,16]。本文的实验对象是以大豆分离蛋白、葡萄糖为主要底物, 植物乳酸杆菌、唾液乳杆菌、长双歧杆菌和嗜酸乳杆菌联合发酵后得到的灭活菌体型后生元产品。目前, 以大豆分离蛋白为底物制备的后生元报道较少, 而该产品中含有约 14.48% 的多肽、0.15% 短链脂肪酸, 极大可能具有多种对人体有益的生物活性物质, 但是其具有何种功效并不清楚, 因此本试验拟通过经典、成熟的细胞活性评价模型, 探究其是否具有降血压、降尿酸和降血糖的生物活性, 为其作为功能食品中间体、终端产品的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

VSMC 细胞、HK-2 细胞、3T3-L1 细胞由中国科学院干细胞库提供。

1.2 材料、试剂与设备

某市售后生元产品 (Y CZ), 由爱益森生物科技有限公司提供, 是以大豆分离蛋白、葡萄糖为主要底物, 植物乳酸杆菌、唾液乳杆菌、长双歧杆菌和嗜酸乳杆菌联合发酵后, 离心取上清液, 喷雾干燥得到的产品, 其含有 14.48% 的多肽、0.15% 短链脂肪酸; DMEM 培养基 (11965092)、RPMI 1640 培养基 (11875119)、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, 10270106)、新生牛血清 (Newborn Calf Serum, NCS, 16010159)、抗生素 (15140163)、胰酶 (25200072)、PBS 缓冲溶液 (15140163), Gibico; 地塞米松 (CAS 号: 50-02-2, BR, 99%)、胰岛素 (CAS 号: 12584-58-6, ≥ 27 USP units/mg)、罗格列酮 (Rosiglitazone, Ros, CAS 号: 122320-73-4, HPLC $\geq 98\%$)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (3-Isobutyl-1-Methylxanthine, IBMX, CAS 号: 28822-58-4, $\geq 99\%$)、腺苷 (CAS 号: 58-61-7, HPLC $\geq 99\%$)、黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, XOD, CAS 号: 9002-17-9, BR, 50 u/mg Protein) 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖检测试剂盒、油红 O 染色试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 细胞计数试剂 (Cat. No: HY-K0301, Cell Counting Kit-8, CCK-8)、Ang II (CAS 号: 4474-91-3, 99.34%)、非布司他 (Febuxostat Tablets, FT, CAS 号: 144060-53-7, 99.74%)、DCFH-DA 探针 (CAS 号: 4091-99-0, 99.81%), MedChemExpress; 0.22 μm 尼龙有机滤头 (13 mm), 津腾。

超净工作台 (LVG-4AG-S8)、二氧化碳培养箱 (CCL-170-B-8), ESCO; EnSpire 多功能酶标仪, PerkinElmer; 倒置生物显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; 分析性高效液相 (LC-10ATvp plus), 日本岛津。

1.3 实验方法

1.3.1 降血压生物活性

1.3.1.1 试剂配置

基础培养基: DMEM。

完全培养基: DMEM, 10% FBS (V/V), 1% 抗生素 (V/V)。

模型培养基: DMEM, 1% FBS (V/V), 1% 抗生素 (V/V)。

1.3.1.2 VSMC 细胞培养

细胞完全培养基中培养, 放入 37 °C、5% CO₂ (V/V) 的培养箱中静置培养, 当细胞长至对数期时进行传代^[17]。

1.3.1.3 细胞毒性试验

将细胞培养至对数期, 以每毫升 1×10⁵ 个细胞的密度接种至 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 放入培养箱中培养过夜。弃去旧培养基, 加入 100 μL 浓度为 50~1 000 μg/L 的样品, 样品用完全培养基溶解, 0.22 μm 滤头过滤后稀释。同时设置不添加样品的 control 组, 不添加样品和细胞的调零组, 每组设置 6 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 染色液, 将培养板放入培养箱中孵育 2 h。置于酶标仪上于 450 nm 处测定各孔光密度 (OD) 值, 根据每孔 OD 值按式 (1) 计算样品干预后细胞的存活率。

$$L = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_3 - OD_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

L —细胞存活率, %;

OD_1 —样品孔在 450 nm 处的吸光值;

OD_2 —调零孔在 450 nm 处的吸光值;

OD_3 —control 孔在 450 nm 处的吸光值。

1.3.1.4 划痕试验测定样品对 VSMC 细胞迁移的影响

先用记号笔在 6 孔板背面做好标记, 每孔间隔相等距离 (0.5~1 cm) 水平横向画线, 每孔至少穿过 3 条线。选对数生长期的细胞调整浓度为每毫升 1×10⁵ 个均匀接种于 6 孔板中, 细胞铺满板底后, 更换模型培养基继续培养 24 h。按标记线以垂直方向平均相等距离使用无菌 200 μL 枪头快速划下, PBS 漂洗, 去除漂浮细胞, 然后加入含有终浓度为 1 μmol/L 的 Ang-II 和 100、200 μg/mL 样品的样品处理组, 同时设置 1 μmol/L Ang II 的 model 组、不做处理的 control 组。

使用倒置显微镜观察细胞迁移程度并拍照, 即 0 h 细胞迁移状态。再将细胞放入培养箱中培养 24 h 后取样拍照记录。以上均用显微镜在 4 倍镜下记录细胞迁移状态, 采用 Image J 软件对迁移距离进行分析, 按式 (2) 对细胞划痕率进行计算。

$$H = \frac{L_1 - L_2}{L_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

H —细胞划痕率, %;

L_1 —0 h 划痕宽度;

L_2 —24 h 划痕宽度。

1.3.1.5 样品对 VSMC 细胞 ROS 释放量的影响

将细胞培养至对数期, 以每毫升 1×10⁵ 个细胞的密度接种至 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 放入培养箱中培养过夜。弃去 96 孔板中培养基, 将培养基换成模型培养基培养 24 h。再分别加入 100 μL 含有终浓度为 1 μmol/L 的 Ang-II 和 100、200 μg/mL 样品的培养基, 继续培养 24 h。去除细胞培养基, 加入 100 μmol/L 的 DCFH-DA 探针, 于培养箱内孵育 20 min。用基础培养基洗涤细胞三次, 于 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长荧光酶标仪测定。

1.3.2 降尿酸生物活性

1.3.2.1 试剂配置

基础培养基: RPMI 1640;

完全培养基: RPMI 1640, 10% FBS (V/V), 1% 抗生素 (V/V);

1.3.2.2 细胞培养

HK-2 细胞培养于完全培养基中, 置于恒温恒湿培养箱培养。复苏、培养、传代, 具体操作同 VSMC 细胞。

1.3.2.3 细胞毒性试验

将细胞培养至对数期, 以每毫升 1×10⁵ 个细胞的密度接种至 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 放入培养箱中培养过夜。后续具体操作同 VSMC 细胞。

1.3.2.4 HK-2 细胞高尿酸血症模型的建立

将 HK-2 细胞用完全培养基在细胞培养箱培养, 取处于对数生长期的细胞按照每毫升 1×10⁵ 个细胞的密度接种在 24 孔板上, 细胞培养箱培养 24 h。24 h 后弃去培养基, PBS 洗涤 3 次, control 组、model 组加入新的基础培养基, 阳性对照组加入 30 μmol/L FT 溶液, 给药组加入样品, 放入培养箱中培养。24 h 后 PBS 洗涤 3 次, 模型组和给药组加入用基础培养基配制的浓度为 2.5 mmol/L 的腺苷溶液, 培养箱中孵育 30 h。再在 24 孔板中各孔加入浓度为 0.005 U/mL 的 XOD 溶液, 孵育 8 h 后收集上清液, 液相检测^[18]。

1.3.3 降血糖生物活性

1.3.3.1 试剂配置

完全培养基: DMEM, 10% FBS (V/V), 1% 抗生素 (V/V)。

诱导分化培养基 1: DMEM, 10% NCS (V/V), 1% 抗生素 (V/V), 0.5 mmol/L IBMX, 1 μmol/mL 地塞米松, 10 μg/mL 胰岛素。

诱导分化培养基 2: DMEM, 10% FBS (V/V), 1% 抗生素 (V/V), 10 μg/mL 胰岛素。

1.3.3.2 3T3-L1 细胞培养

3T3-L1 细胞的复苏、培养、传代, 具体操作同

VSMC 细胞。

1.3.3.3 3T3-L1 细胞毒性实验

将细胞培养至对数期，以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种至 96 孔板，每孔加入 100 μL 细胞悬液，放入培养箱中培养 48 h。后续具体操作同 VSMC 细胞。

1.3.3.4 3T3-L1 细胞 IR 模型的建立

使用“鸡尾酒”法诱导 3T3-L1 细胞分化^[19]，先使用完全培养基将 3T3-L1 细胞以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 12 孔板，每孔 1 mL。细胞融合 48 h 后，更换诱导分化培养基 1 刺激分化。48 h 后更换诱导分化培养基 2，之后更换成完全培养基继续培养 2~4 d。当 90% 的细胞呈现“指环状”脂肪细胞时，判断 IR 模型建立成功。

1.3.3.5 分组及处理

将 1.3.3.4 同处理的 IR-3T3-L1 细胞分为不加药的 model 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 阳性药物 Ros 组、样品组 (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 后生元)，同时设置不建模的 control 组，作用 48 h 后，收集培养基检测葡萄糖浓度。

1.3.4 数据分析

所有试验均重复 3 次。数据表示为平均值 \pm 标准差 (SD)。使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 被认为具有显著差异， $P < 0.01$ 被认为具有极显著差异。使用 Prism 8.0.2 制作图表。

2 结果与讨论

2.1 降血压活性评价

2.1.1 VSMC 细胞毒性试验

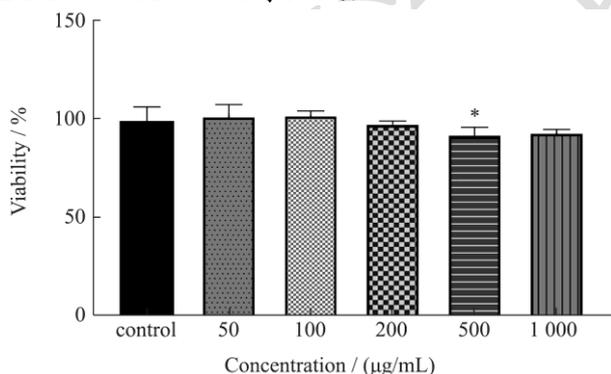


图 1 不同浓度后生元对 VSMC 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of postbiotics on the survival rate of VSMC cells

注：与 control 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。图 5、8 同。

VSMC 细胞经 50~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的后生元处理 24 h，测定吸光值计算细胞存活率。结果如图 1 所示，质量浓度为 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞的存活率均与 control 组无显著性差异 ($P > 0.05$)，分别为 102.27%、102.88%、98.83%，说明实验所用质量浓度在 50~

200 $\mu\text{g/mL}$ 时对 VSMC 细胞是安全的；质量浓度 500 $\mu\text{g/mL}$ 处理细胞时，细胞存活率显著减少 ($P < 0.05$)，降低了 7.53%；质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率也减少了 6.24%，但与 control 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。为减少细胞数量对后续实验造成影响，选择 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 样品质量浓度进行后续降压活性评价，分别记为 PB-L、PB-H。

2.1.2 划痕试验测定样品对 VSMC 细胞迁移的影响

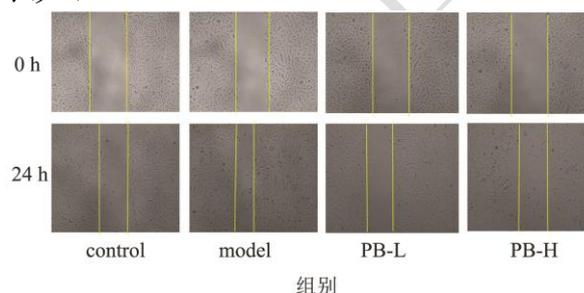


图 2 后生元对 Ang II 诱导的细胞迁移的影响

Fig.2 Effect of postbiotics on Ang II induced cell migration

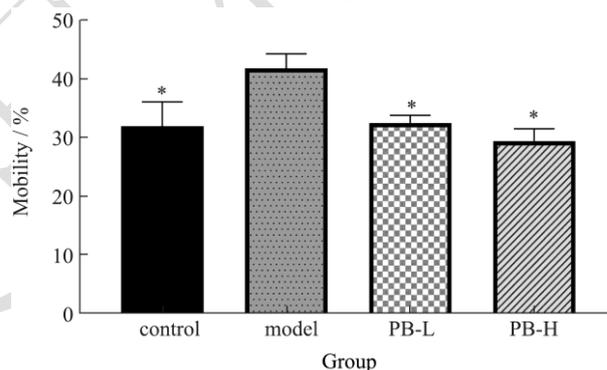


图 3 后生元对 Ang II 诱导的细胞迁移的影响

Fig.3 Effect of postbiotics on Ang II induced cell migration

注：与 model 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。图 4、6、7、10 同。

高血压症等心血管疾病大多数是由 VSMC 细胞的迁移和侵袭所造成，而 Ang II 作为调节血管的关键活性物质可以诱导细胞迁移，因此抑制 Ang II 诱导的 VSMC 细胞过度迁移是预防心血管相关疾病发生和发展的重要途径之一。从图 2 和图 3 可看出，model 组较 control 组的细胞迁移有显著增加，说明建模成功 ($P < 0.05$)。而后生元在 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时对 Ang II 诱导的细胞迁移有显著的抑制作用 ($P < 0.05$)，细胞迁移率相较于 model 组分别降低 9.35% 和 12.44%，说明后生元可以抑制 Ang II 诱导的细胞迁移，且具有浓度依赖性。这与 Qiao 等^[16]的研究结果相似，ACE 抑制肽 FPQYLQYPYP 也能抑制 Ang II 诱导的 VSMC 细胞过度迁移，100 $\mu\text{g/mL}$ 时迁移率为 21%，使细胞恢复正常水平。大豆是 ACE 抑制肽的丰富来源，Shin 等^[20]在韩国大豆酱中分离出了

具有 ACE 抑制活性的多肽 HHL，推测后生元中的大豆分离蛋白发酵后可能产生了具有降压活性的 ACE 抑制肽，从而抑制了 Ang II 诱导的 VSMC 细胞迁移。

2.1.3 样品对 VSMC 细胞活性氧释放量的影响

当机体处于氧化应激状态时，细胞受到损伤，大量的 ROS 的积累会导致 VSMC 细胞的不正常增殖和迁移，从而逐步诱发高血压症。因此，调节细胞活性氧的释放量有助于调节高血压症。从结果（图 4）中可看出，model 组的 ROS 释放量较 control 组显著增多 ($P < 0.05$)，说明造模成功。后生元在 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时对 Ang II 诱导的细胞 ROS 释放量均有抑制作用，且 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时极显著抑制 ($P < 0.01$)，ROS 释放量是 control 组的 86.51%，说明后生元可以减轻 Ang II 诱导的细胞氧化应激的程度，使细胞恢复正常水平。而源于大豆蛋白的血管紧张素转化酶抑制肽 LSW(Leu-Ser-Trp)不显著降低 VSMC 细胞 ROS 的释放量，但通过下调 iNOS 的表达达到抗炎效果，辅助降血压^[21]，后生元可以通过多途径作用达到降血压作用。

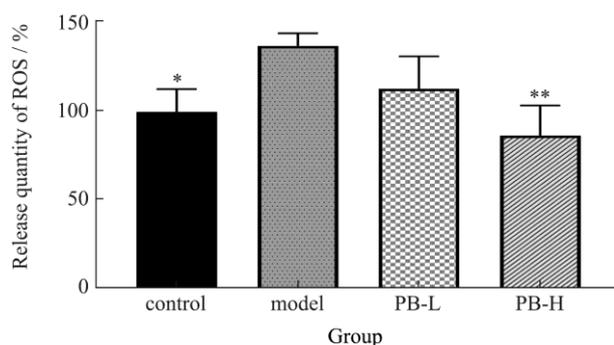


图 4 VSMC 细胞活性氧释放量

Fig.4 ROS release from VSMC cells

2.2 降尿酸活性评价

2.2.1 HK-2 细胞毒性试验

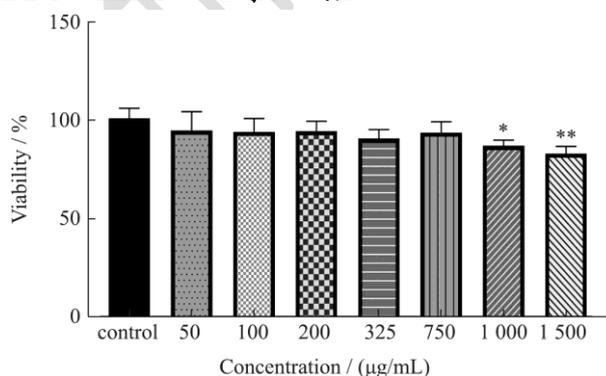


图 5 不同浓度后生元对 HK-2 细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of postbiotics on the survival rate of HK-2 cells

用浓度为 50~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的后生元处理细胞 24 h 后，测定细胞存活率，结果如图 5。后生元样品质量浓度为 50~750 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率与空白组无显著性差异 ($P > 0.05$)，质量浓度为 1 000~1 500 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率显著或极显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01)，为减少细胞数量对实验结果的影响，选择 100、400、700 $\mu\text{g/mL}$ 样品质量浓度进行后续降尿酸活性评价，记为 PB-L、PB-M、PB-H。

2.2.2 高尿酸模型的建立

腺苷是尿酸的前提物质，配合黄嘌呤氧化酶培养 HK-2 细胞，能够促进细胞持续显著产生尿酸。结果如图 6，与 control 组比较，model 组尿酸质量浓度为 0.168 2 mg/mL，极显著增加 ($P < 0.05$)，与文献报道的相似^[22]，说明细胞建模成功。药物进行干预后，尿酸质量浓度降为 0.013 3 mg/mL，进一步说明阳性药物能极显著降低细胞模型尿酸含量 ($P < 0.05$)，该模型是可行。

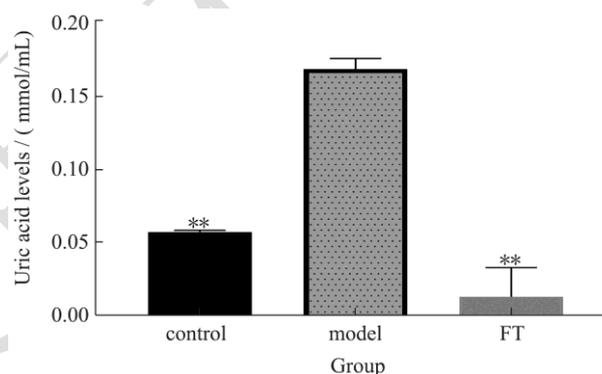


图 6 高尿酸造模验证

Fig.6 High uric acid modeling validation

2.2.3 后生元降尿酸活性评价

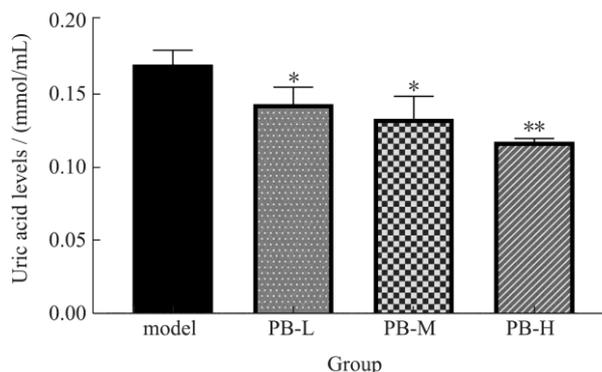


图 7 不同浓度后生元对 HK-2 细胞产生尿酸的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of postbiotics on uric acid production in HK-2 cells

用质量浓度为 100、400、700 $\mu\text{g/mL}$ 的样品干预细胞后，降尿酸结果如图 7 所示。后生元在 100、400 和 700 $\mu\text{g/mL}$ 时与未加样品的 control 组相比，尿酸含量分别下降 16.83%、19.50% 和 30.02%，均有显著性

差异 ($P < 0.05$), 而在 $700 \mu\text{g/mL}$ 时为极显著下降 ($P < 0.01$), 说明后生元在 $100\sim 700 \mu\text{g/mL}$ 时能够降低细胞产生尿酸水平, 具有降尿酸效果, 且具有浓度依赖性。研究发现, 具有降尿酸活性的 LAB 菌株主要通过增加高尿酸模型小鼠的短链脂肪酸的产生相关肠道细菌类群的丰度, 促进短链脂肪酸的产生, 从而抑制血清和肝脏 XOD 活性^[23]。后生元中含有丰富的短链脂肪酸, 其在降尿酸活性中可能起着重要作用。

2.3 降血糖活性评价

2.3.1 3T3-L1 细胞毒性试验

用质量浓度为 $50\sim 2\ 000 \mu\text{g/mL}$ 的后生元处理细胞 24 h 后, 测定吸光值, 计算细胞存活率, 结果如图 8 所示。作用质量浓度在 $50\sim 200 \mu\text{g/mL}$ 范围内时, 3T3-L1 细胞的存活率与空白组比较无显著差异 ($P > 0.05$); 而当质量浓度为 $500\sim 1\ 000 \mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率显著高于空白组 ($P < 0.05$), 说明质量浓度为 $50\sim 1\ 000 \mu\text{g/mL}$ 时, 后生元对 3T3-L1 细胞无毒害作用, 但会促进细胞增殖, 为减少细胞数量对试验结果的影响, 选择 50 、 100 、 $200 \mu\text{g/mL}$ 为低、中、高加样质量浓度, 记为 PB-L、PB-M、PB-H。

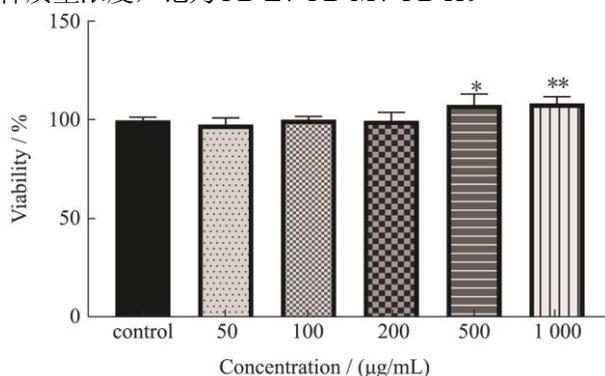


图 8 不同质量浓度后生元对 3T3-L1 细胞存活率的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of postbiotics on the survival rate of 3T3-L1 cells

2.3.2 葡萄糖摄取实验

分化后的 3T3-L1 细胞会形成“指环状”的油滴(见图 9), 且形成 IR 模型, 对葡萄糖的摄取能力会降低。因此培养基中葡萄糖含量越高, 葡萄糖摄取能力越差。如图 10 所示, 空白组、阳性药物 Ros 组的培养基葡萄糖浓度显著低于模型组 ($P < 0.05$), 进一步说明建模成功。但后生元作用后, 细胞培养基的葡萄糖浓度与模型组无显著性差异, 说明后生元不能改善 IR 模型的 3T3-L1 细胞摄取葡萄糖的能力达到机体降糖效果。

在本试验中, 后生元不能减少 3T3-L1 细胞 IR 模型中葡萄糖含量, 从细胞层面说明后生元在此细胞模型中不具有降糖活性。但多项研究表明, 后生元产品

能够调节代谢综合征, 特别是肥胖症和 2 型糖尿病^[11,24]。这些后生元产品主要是通过抑制肠道中的有害菌生长、激发四硫酸盐代谢、调节肠道屏障状态来实现改善代谢功能^[25-27], 而 3T3-L1 细胞 IR 模型摄取葡萄糖能力降低主要是因为细胞的葡萄糖转运蛋白 4 (Glucose Transporter 4, Glu T4) 表达减少, 囊泡转运受阻^[28]。推测后生元对 3T3-L1 细胞-IR 模型无修复作用, 无法促进细胞吸收葡萄糖, 降血糖生物活性需要通过其他体外或体内模型确认。

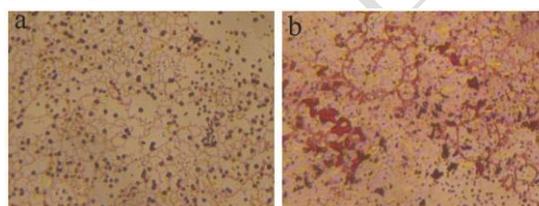


图 9 显微镜下分化后的 3T3-L1 细胞油红 O 染色结果

Fig.9 Microscopic results of oil red O staining of differentiated 3T3-L1 cells

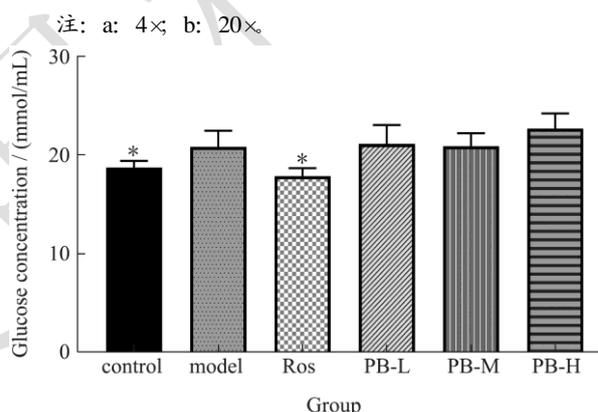


图 10 不同浓度后生元对 3T3-L1 IR 模型细胞摄取葡萄糖的影响

Fig.10 Effect of different concentrations of postbiotics on glucose uptake in 3T3-L1 IR model cells

3 结论

本试验中, 后生元显著抑制 Ang II 导致的 VSMC 细胞迁移, 调节其氧化应激, 使细胞恢复到正常水平, 能够调节由氧化应激导致的血管功能障碍, 具有降血压活性。同时后生元能够显著降低 HK2 细胞的尿酸含量, 具有降尿酸活性。后生元中的多肽和短链脂肪酸可能发挥了重要作用, 具体作用成分需要进一步分析。高尿酸与高血压常常合并存在, 但部分治疗高血压药物不利于高尿酸治疗, 高尿酸药物也存在这种现象, 因此开发兼具降压、降尿酸活性的后生元具有重大意义。

参考文献

- [1] Zolkiewicz J, Marzec A, Ruszczynski M, et al. Postbiotics-A step beyond pre- and probiotics [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8):

- 2189.
- [2] 王婷,彭敏,童雅琴,等.后生元和类生元的研究进展[J].食品研究与开发,2022,3(43):216-224.
- [3] Aguilar-Toalá J E, Garcia-Varela R, Garcia H S, et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 75: 105-114.
- [4] 杭柏林,陈成成,梅贵恒,等.后生元的成分、来源及其功能[J].广东饲料,2022,31(10):40-43.
- [5] 李杨,周湘人,郭薇丹,等.付湘晋后生元的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,16(12):6558-6564.
- [6] 白娜,李周勇,康小红.后生元的研究进展[J].食品科技,2022, 47:20-25.
- [7] Wegh C A M, Geerlings S Y, Knol J, et al. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4673.
- [8] Hsu C N, Hou C Y, Hsu W H, et al. Cardiovascular diseases of developmental origins: preventive aspects of gut microbiota-targeted therapy [J]. Nutrients, 2021, 13(7): 2290.
- [9] Rhys-Jones D, Climie R E, Gill P A, et al. Microbial interventions to control and reduce blood pressure in Australia (MICRoBIA): rationale and design of a double-blinded randomised cross-over placebo controlled trial [J]. Trials, 2021, 22(1): 496.
- [10] Marques F Z, Jama H A, Tsyganov K, et al. Guidelines for transparency on gut microbiome studies in essential and experimental hypertension [J]. Hypertension, 2019, 74(6): 1279-1293.
- [11] Li H Y, Zhou D D, Gan R Y, et al. Effects and mechanisms of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics on metabolic diseases targeting gut microbiota: A narrative review [J]. Nutrients, 2021, 13(9): 3211.
- [12] Cardinali N, Bauman C, Rodriguez Ayala F, et al. Two cases of type 2 diabetes mellitus successfully treated with probiotics [J]. Clinical Case Reports, 2020, 8(12): 3120-3125.
- [13] Cabello-Olmo M, Arana M, Urtasun R, et al. Role of postbiotics in diabetes mellitus: current knowledge and future perspectives [J]. Foods, 2021, 10(7): 1590.
- [14] Nakamura F, Ishida Y, Sawada D, et al. Fragmented lactic acid bacterial cells activate peroxisome proliferator-activated receptors and ameliorate dyslipidemia in obese mice [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(12): 2549-2559.
- [15] Shobako N. Hypotensive peptides derived from plant proteins [J]. Peptides, 2021, 142: 170573.
- [16] Pessione E, Cirrincione S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 876.
- [17] Qiao Z, Wang J, He Z, et al. A novel angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptide derived from goat milk casein hydrolysate modulates angiotensin II-stimulated effects on vascular smooth muscle cells [J]. Front Nutr, 2022, 9: 878768.
- [18] 刘丹,任娇艳,梁明.高尿酸血症细胞模型的构建及其在降尿酸肽筛选中的应用[J].现代食品科技,2017,33(8):72-79.
- [19] Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes [J]. Analytical Biochemistry, 2012, 425(1): 88-90.
- [20] Shin Z I, Y R, Park S A, et al. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(6): 3004-3009.
- [21] Lin Q, Liao W, Bai J, et al. Soy protein-derived ACE-inhibitory peptide LSW (Leu-Ser-Trp) shows anti-inflammatory activity on vascular smooth muscle cells [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 248-253.
- [22] Hou C, Liu D, Wang M, et al. Novel xanthine oxidase-based cell model using HK-2 cell for screening antihyperuricemic functional compounds [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 136: 135-145.
- [23] Ni C X, Li X, Wang L L, et al. Lactic acid bacteria strains relieve hyperuricaemia by suppressing xanthine oxidase activity via a short-chain fatty acid-dependent mechanism [J]. Food & Function, 2021, 12(15): 7054-7067.
- [24] Tang R, Li L. Corrigendum to "modulation of short-chain fatty acids as potential therapy method for type 2 diabetes mellitus" [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2021, 2021: 9756586.
- [25] Liu W, Luo X, Tang J, et al. A bridge for short-chain fatty acids to affect inflammatory bowel disease, type 1 diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease positively: by changing gut barrier [J]. Eur J Nutr, 2021, 60(5): 2317-2330.
- [26] Kamdar K, Khakpour S, Chen J, et al. Genetic and metabolic signals during acute enteric bacterial infection alter the microbiota and drive progression to chronic inflammatory disease [J]. Cell Host Microbe, 2016, 19(1): 21-31.
- [27] Scheithauer T P M, Rampanelli E, Nieuwdorp M, et al. Gut microbiota as a trigger for metabolic inflammation in obesity and type 2 diabetes [J]. Front Immunol, 2020, 11: 571731.
- [28] 张凯艺,朱文娟,谢宁,等.一种自发胰岛素抵抗的 3T3-L1 脂肪细胞模型构建[J].畜牧兽医学报,2019,50(7):1475-1485.