



发酵天山雪莲粗多糖的菌株筛选及护肤功效研究

唐鑫¹, 蔡美君¹, 崔树茂¹, 毛丙永¹, 赵建新¹, 刘光荣², 杨凯业^{2*}

1 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

2 无限极(中国)有限公司, 广东 广州 510000

唐鑫, 蔡美君, 崔树茂, 毛丙永, 赵建新, 刘光荣, 杨凯业. 发酵天山雪莲粗多糖的菌株筛选及护肤功效研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1551-1565.

TANG Xin, CAI Meijun, CUI Shumao, MAO Bingyong, ZHAO Jianxin, LIU Guangrong, YANG Kaiye. Screening of strains for producing *Saussurea involucrata* polysaccharide with skincare efficacy[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1551-1565.

摘要:【目的】利用微生物发酵植物可以提高多糖的产量,并且能够将原有的植物多糖转化成活性更高的新型发酵多糖,本研究围绕天山雪莲的粗多糖,基于发酵后的活菌数、多糖产量和护肤功效进行发酵菌种筛选,旨在获得适宜发酵天山雪莲粗多糖的优良菌株。【方法】利用不同菌株发酵天山雪莲粗多糖,通过平板菌落计数法测定活菌数,采用蒽酮比色法测定发酵液的多糖含量;采用细胞屏障损伤和抗炎模型,利用噻唑蓝(MTT)法检测细胞活率,利用格里斯法检测NO含量,评价发酵多糖在细胞模型中的护肤功效;利用特应性皮炎小鼠模型,分析发酵多糖对皮肤组织表观及经皮失水率、皮肤组织病理及表皮厚度变化和皮肤组织屏障蛋白-丝聚合蛋白的影响,评价发酵多糖在动物模型中的功效。【结果】不同菌株发酵天山雪莲粗多糖后的活菌数和多糖产量差异较大,其中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CCFM1162和165-M1、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) CCFM1073、罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*) CCFM8631、清酒乳杆菌(*L. sakei*) GD17-9的活菌数较高,均不低于 2.0×10^8 CFU/mL;而酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) HN7-A5、干酪乳杆菌 CCFM1073、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9发酵天山雪莲粗多糖的多糖产量较高,达到1.37 g/L以上。综合多糖产量和活菌数,选取干酪乳杆菌 CCFM1073、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9、酿酒酵母 HN7-A5的发酵多糖进行细胞护肤功效评价,结果显示所选菌株的发酵多糖对十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)诱导的HaCaT细胞存活率影响不大,而清酒乳杆菌 GD17-9、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、干酪乳杆菌 CCFM1073、酿酒酵母 HN7-A5的发酵多糖对降低脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的RAW264.7细胞NO含量效果较好,其中清酒乳杆菌 GD17-9、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631的发酵多糖分别降低了81%和71%。结合活菌数、多糖产量、细胞护肤功效评价,选取清酒乳杆菌 GD17-9和罗伊氏乳杆菌 CCFM8631发酵的天山雪莲粗多糖进行动物护肤功效验证,发现罗伊氏乳杆菌 CCFM8631

*Corresponding author. E-mail: kyle.yang@infinitus-int.com

Received: 2022-09-05; Accepted: 2022-12-02; Published online: 2022-12-22

发酵天山雪莲粗多糖功效更好。【结论】综合活菌数、多糖产量以及细胞和动物模型的护肤功效，罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 菌株是发酵天山雪莲粗多糖的最适宜菌株。

关键词：天山雪莲；粗多糖；罗伊氏乳杆菌 CCFM8631；多糖产量；活菌数；护肤功效

Screening of strains for producing *Saussurea involucrata* polysaccharide with skincare efficacy

TANG Xin¹, CAI Meijun¹, CUI Shumao¹, MAO Bingyong¹, ZHAO Jianxin¹, LIU Guangrong², YANG Kaiye^{2*}

¹ School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510000, Guangdong, China

Abstract: [Objective] The microbial fermentation of plant can increase the yield of polysaccharide and transform the original plant polysaccharide into a new fermentative polysaccharide with higher activity. According to the viable count, yield of *Saussurea involucrata* polysaccharide, and skincare efficacy, we conducted strain screening, aiming to obtain a strain suitable for the production of *S. involucrata* polysaccharide. [Methods] Different strains were used to produce *S. involucrata* polysaccharide. The viable count was determined by plate colony counting method, and the content of polysaccharide in the fermentation broth was determined by anthrone colorimetry. The cell models of barrier damage and inflammation were used to evaluate the skincare efficacy of the polysaccharide in cells, with the cell viability measured by MTT method and NO content measured by Griess method. The mouse model of atopic dermatitis was used to evaluate the efficacy of the polysaccharide in animals in terms of skin appearance, trans-epidermal water loss, skin pathology, changes in epidermal thickness, and the barrier protein filaggrin of skin tissue. [Results] There were significant differences in the viable count and yield of crude polysaccharide after fermentation by different strains. The viable counts of *Bacillus subtilis* CCFM1162, *B. subtilis* 165-M1, *Lactobacillus casei* CCFM1073, *L. reuteri* CCFM8631, and *L. sakei* GD17-9 were no less than 2.0×10^8 CFU/mL and higher than those of the other strains. However, *Saccharomyces cerevisiae* HN7-A5, *L. casei* CCFM1073, *L. reuteri* CCFM8631, and *L. sakei* GD17-9 produced more than 1.37 g/L polysaccharide. On the basis of the polysaccharide yield and the viable count, the skincare efficacy of crude polysaccharide from *S. involucrata* fermented by *L. casei* CCFM1073, *L. reuteri* CCFM8631, *L. sakei* GD17-9, and *S. cerevisiae* HN7-A5 was evaluated with cell models. The results showed that the polysaccharides produced by the selected strains had little effect on the survival rate of HaCaT cells induced by sodium lauryl sulfate, while the polysaccharides decreased the NO content in the RAW264.7 cells exposed to lipopolysaccharide (LPS). The polysaccharides produced by *L. sakei* GD17-9 and *L. reuteri* CCFM8631 had better effect, reducing the NO content by 81% and 71%, respectively. According to the viable count, polysaccharide yield, and the skincare efficacy in cell models,

we selected the crude polysaccharides from *S. involucrata* fermented by *L. sakei* GD17-9 and *L. reuteri* CCFM8631 to validate the skincare efficacy in the animal model. The results showed that the crude polysaccharides from *S. involucrata* fermented by *L. reuteri* CCFM8631 had better skincare efficacy. **[Conclusion]** *L. reuteri* CCFM8631 was the most suitable strain for the production of crude polysaccharide from *S. involucrata*, considering the viable count, the polysaccharide yield, and the skincare efficacy in cell and animal models.

Keywords: *Saussurea involucrata*; crude polysaccharide; *Lactobacillus reuteri* CCFM8631; polysaccharide yield; viable count; skincare efficacy

天山雪莲(*Saussurea involucrata*)为菊科风毛菊属多年生草本植物,是新疆特有的名贵中药材,素有“百草之王”和“药中极品”的美称,是十分珍贵的中药资源^[1]。天山雪莲在医药上应用已有数百年的历史,全草入药,具有补肾活血、强筋骨、营养神经、调节异常体液的作用^[2]。研究表明天山雪莲含有多糖、黄酮类、生物碱、酚类、鞣质和多种挥发油等活性成分,具有药理活性的化合物主要集中在黄酮、生物碱和多糖类,其含量高低决定了天山雪莲生物活性的强弱^[3]。雪莲培养物具有抑制非特异性免疫、细胞免疫以及增强体液免疫的功能,即具有免疫调节作用^[4];它的水溶性多糖对氧自由基和羟自由基都具有明显的清除作用,是一种清除自由基的抗氧化剂^[5-8]。在屏障修复方面,复方雪莲烧伤膏是治疗烧伤的药品,具有促感染性烫伤创面、烧伤创面的愈合以及抗炎的功效^[9]。

多糖是由10个以上单糖组成的高分子碳水化合物,在自然界来源广泛,研究表明多糖具有抗氧化、抑菌、抗癌、降血糖等功能^[10]。通过微生物发酵天山雪莲提高多糖产量近几年亦有研究,微生物在生长代谢过程中分泌大量的蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、糖苷酶、淀粉酶、果胶酶等胞外酶,可使植物细胞破裂,细胞间隙增大,加快中药有效成分的溶出,提高中药有效成分的得率。此外,利用微生物的生物转化作用,可以将原有的植物多

糖转化成活性更高的新型发酵多糖^[11]。

天山雪莲多糖在皮肤健康的应用一直被关注,其在皮肤免疫、抗氧化、抗衰老和抗疲劳等方面都有应用;皮肤作为人体的第一道防线,对抵御外界有害因素的损伤以及维持人体内环境的稳态有着至关重要的作用^[12]。皮肤的屏障功能是防止外界物质进入人体和体内水分丢失的主要屏障,而皮肤屏障受损和皮肤免疫应答反应同时发生。皮肤屏障功能受损导致皮肤免疫应答失调,而皮肤免疫应答失调会加重皮肤屏障受损,从而恶性循环。只有维持皮肤屏障的完整性同时促使皮肤免疫应答正常化,才能保证皮肤健康,天山雪莲多糖既可以修复皮肤屏障功能,又能用于调节皮肤免疫^[13]。但是,目前尚无能够有效发酵天山雪莲的原料、提高多糖产量和提升皮肤屏障修复及皮肤免疫调节功效的菌株。因此,本研究利用微生物发酵技术结合动物模型的功能研究,筛选能够提升天山雪莲发酵多糖产量和护肤功效的菌株,这将促进微生物在发酵中草药的应用,也为新型护肤产品的开发提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

1.1.1 中药原料

天山雪莲(*Saussurea involucrata*)粗多糖,佛山市康妮爱伦生物技术有限公司提供。

1.1.2 菌株

菌株来源见表 1。

1.1.3 实验细胞株

HaCaT 细胞、RAW264.7 细胞，来源于武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.1.4 实验动物

实验小鼠 BALB/C，来源于广东省医学实验动物中心，实验动物生产许可证：SCXX(粤)2018-002；实验动物使用许可证：SYXK(粤)2018-0186。

1.1.5 试剂

胰蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、无水葡萄糖、无水乙酸钠、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、柠檬酸氢二铵、 K_2HPO_4 、吐温 80、三氯乙酸、乙醇、浓 H_2SO_4 、葱酮试剂、甲醛、二甲苯、苏木精、伊红、石蜡，国药集团化学试剂有限公司；酵母浸粉 FM528，安琪酵母股份有限公司；十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)，索莱宝生物科技有限公司；脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)，Sigma 公司；高糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清，赛默飞世尔科技有限公司；胰酶，上海麦克林生化科技有限公司；苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；一氧化氮(NO)测试盒、小鼠丝聚蛋白(filaggrin, FLG) 酶联免疫(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒，江苏酶标生物科技有限公司。

表 1 菌株来源

Table 1 Source of the strain

Species	Strains	Source
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sake</i> GD17-9	Food Microbiology Collection Center of Jiangnan University
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCFM237	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCFM8661	
	<i>Lactobacillus casei</i> CCFM1073	
	<i>Lactobacillus helveticus</i> M10	
	<i>Lactobacillus reuteri</i> CCFM8631	
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 165-M1	
	<i>Bacillus subtilis</i> CCFM1162	
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HN7-A5	

1.2 仪器

FE20 型 pH 计、EL3002 型电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；MS 3 basic 型涡旋振荡器，IKA 公司；MLS-3750 型高温高压灭菌锅，SANYO 公司；ZHJH-C1115B 型超净工作台，上海智诚分析仪器制造有限公司；GRP-9080 型隔水式恒温培养箱，上海森信实验仪器有限公司；T&J-Minipod 1L×8 型迷你平行发酵罐，迪必尔生物工程有限公司；KQ-300B 超声清洗机、SCIENTZ-48 高通量组织研磨仪，宁波新芝生物科技股份有限公司；高速冷冻离心机，Eppendorf 公司；UV-2450 紫外分光光度计，岛津公司；Freeze-dryer Lyobeta 5PS 双腔体冻干机，Telstar 公司；大容量冷冻离心机，Beckman 公司；高速冷冻离心机，Eppendorf 公司。

1.3 基于多糖产量筛选发酵天山雪莲粗多糖的适宜菌株

1.3.1 菌株的活化与培养

(1) 菌株活化培养基的配制：

MRS 培养基培养乳杆菌(g/L)：葡萄糖 20，酵母粉 5，胰蛋白胨 10，牛肉膏 10，无水乙酸钠 2， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58， $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.25，柠檬酸氢二铵 2， $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.6，吐温 80 1 mL，pH 6.2–6.4，115 °C 灭菌 20 min。

YPD 培养基-培养酵母菌(g/L)：酵母粉 10，胰蛋白胨 10，葡萄糖 20，pH 6.2–6.4，115 °C 灭菌 20 min。

LB 培养基——培养枯草芽孢杆菌(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, pH 6.2–6.4, 115 °C 灭菌 20 min。

(2) 菌株活化与培养

将置于-80 °C的甘油保菌管取出, 解冻; 用接种环蘸取菌液后在固体培养基上平板划线, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 24–48 h。用接种环从平板上长出的菌落中挑取单菌落, 将其接种到 5 mL、MRS/YPD/LB 液体培养基中, 在 37 °C 恒温培养箱中培养 12–18 h。取 100 μL 再次接种到 5 mL、MRS/YPD/LB 液体培养基中, 培养 12–18 h 后得到活化后的种子液, 活化两代之后可以接入中药原料发酵培养基进行发酵。

1.3.2 天山雪莲粗多糖发酵

(1) 发酵培养基的配制:

乳杆菌发酵培养基(g/L): 天山雪莲粗多糖 30, 酵母浸粉 FM 528 10, 无水乙酸钠 2, MgSO₄·7H₂O 0.58, MnSO₄·H₂O 0.25, 柠檬酸氢二铵 2, K₂HPO₄·3H₂O 2.6, 吐温 80 1 mL, pH 6.2–6.4, 115 °C 灭菌 20 min。

枯草芽孢杆菌发酵培养基(g/L): 天山雪莲粗多糖 30, 酵母浸粉 FM528 10, NaCl 10, pH 6.2–6.4, 115 °C 灭菌 20 min。

酵母发酵培养基(g/L): 天山雪莲粗多糖 30, 酵母浸粉 FM528 10, 胰蛋白胨 10, pH 6.2–6.4, 115 °C 灭菌 20 min。

(2) 天山雪莲粗多糖发酵:

将活化好的乳杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母以 5% 接种量分别接入 1.3.2 中(1)所示的发酵培养基中。乳杆菌、枯草芽孢杆菌在 37 °C 下、pH 控制在 6.0 培养 16 h 后, 采用平板计菌落数法进行活菌计数, 24 h 结束发酵; 酵母在 30 °C 条件下、pH 控制在 6.0 培养 48 h, 进行活菌计数, 同时结束发酵。

1.3.3 多糖提取及测定

将 1.3.2 中(2)的发酵液超声提取(500 W,

10 min, 25 °C), 因超声时间、超声功率、超声温度对发酵后多糖产量影响, 所以做单因素试验来确定最佳超声提取条件; 用蒽酮比色法测定多糖^[14]。

1.4 发酵多糖细胞护肤功效评价

1.4.1 HaCaT 细胞培养

(1) 完全培养基: 90% DMEM 高糖培养基+10%胎牛血清+100 U/mL 青、链霉素。

(2) 细胞培养: 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 HaCaT 细胞, 待细胞达到 90% 融合度时传代培养; 弃去完全培养基, PBS 洗去残余完全培养基, 胰酶消化, 添加完全培养基终止消化, 吹打并收集细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 完全培养基重悬细胞, 传代培养; 取对数生长期且状态良好的细胞用于实验。

1.4.2 RAW264.7 细胞培养

(1) 完全培养基: 90% DMEM 高糖培养基+10%胎牛血清+100 U/mL 青、链霉素。

(2) 细胞培养: 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 RAW264.7 细胞, 待细胞达到 90% 融合时传代培养; 弃去完全培养基, PBS 洗去残余完全培养基, 加入 2 mL 完全培养基, 用细胞刮刀将细胞刮打下来, 吹打均匀收集至离心管, 1 200 r/min 离心 3 min, 收集细胞沉淀, 完全培养基重悬细胞, 传代培养; 取对数生长期且状态良好的细胞用于实验。

1.4.3 MTT 法检测细胞活率

实验分组为阴性对照组、SDS 模型组和多糖样品组, 每组设 3 个重复孔。将 HaCaT 细胞以每孔 5 000 个细胞密度接种于 96 孔板中培养 24 h, 弃去原培养液, 更换含 SDS 50 μg/mL 的完全培养基继续培养 24 h, 更换含未发酵粗多糖和不同发酵粗多糖的完全培养基继续孵育 24 h。

弃去培养液, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)洗去残余培养液, 每孔添加

MTT 工作液 100 μL ，于培养箱中继续孵育 3–4 h，弃去 MTT 工作液，每孔加入 150 μL DMSO 溶液，于振荡器上中速振荡 5 min 后，酶标仪检测 OD_{570} 波长吸光度值。

1.4.4 格里斯检测法检测 NO 含量

细胞培养：将 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中培养，每孔 1×10^5 个细胞，培养 24 h。

LPS 诱导：随机分为阴性对照组、LPS 模型组、多糖干预组。阴性对照组更换完全培养基，模型组和干预组更换含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的完全培养基，继续培养 24 h。

多糖干预：阴性对照组和模型组更换完全培养基，干预组更换含不同浓度待测多糖的完全培养基，继续培养 24 h。

试剂盒检测 NO 含量：分别取各组培养上清 50 μL 于 96 板中，加入格里斯试剂检测 NO 含量。酶标仪检测 OD_{540} 波长吸光度，制作标准曲线，计算 NO 含量。

1.5 发酵多糖动物护肤功效评价：

1.5.1 2,4 二硝基氟苯 (2,4-dinitro fluoro benzene, DNFB) 溶液配制

(1) 0.25% (g/mL) 2,4 二硝基氟苯的成分为 100 mg 2,4 二硝基氟苯、30 mL 丙酮和 10 mL 橄榄油。

(2) 0.20% (g/mL) 2,4 二硝基氟苯的成分为 80 mg 2,4 二硝基氟苯、30 mL 丙酮和 10 mL 橄榄油。

1.5.2 多糖提取物乳膏配制

(1) 配方见表 2。

表 2 多糖提取物乳膏配方

Table 2 Polysaccharide extract cream formula

Add material	Amount added (g)	Effect
Unfermented/Fermented polysaccharides	1.50	The main drug
Squalane sharks	3.90	Oil phase
Emulsifier (Montanov S)	2.10	Surfactant
Glycerin	2.40	Water phase, humectant
Ethyl ester of nipagin	0.03	Preservatives
Distilled water	Volume to 30.00 mL	Solvent

(2) 制备方法。配制油相，成分为 3.9 g 角鲨烷和 2.1 g 乳化剂；配制水相 1，成分为 1.5 g 未发酵/发酵多糖、2.4 g 甘油和 10 g 水；配制水相 2，成分为 0.03 g 尼泊金乙酯和 20 g 水(水需加热至 90 $^{\circ}\text{C}$)。利用水相 1、油相和水相 2 制备乳膏剂，将水相 1 缓慢滴加在油相中，再缓慢滴加水相 2，边加边搅拌。

1.5.3 实验动物分组

实验动物分为空白组(正常小鼠涂抹基质乳膏 4 只/组)、模型组(模型小鼠涂抹基质乳膏 4 只/组)、药物对照组(模型小鼠涂抹基质乳膏和 0.5% 泼尼松龙乳膏 4 只/组)、样品组(模型小鼠涂抹基质乳膏和 5% 多糖提取物乳膏 4 只/组)。

1.5.4 实验动物处理

准备：小鼠于实验前适应性饲养 2 d，随机分组并按分组标记编号。于第一次涂药前 24 h，小鼠背部剃毛，裸露皮肤 2 cm \times 4 cm。

造模：第 1 周致敏，背部剃毛处涂抹 0.25% 2,4 二硝基氟苯 100 μL ，耳部(内外)涂抹 25 μL ，每 3 天涂 1 次，共 2 次；第 2 周激发，背部涂抹 0.2% 2,4 二硝基氟苯 100 μL ，每 3 d 1 次，共 2 次，制成特异性皮炎模型。

给药：于第 2 次致敏后 24 h 开始给药，模型组及空白组涂抹定量乳膏基质，药物对照组涂抹 0.5% 泼尼松龙乳膏，样品组涂抹定量多糖提取物乳膏，每天 2 次，共 8 d。

取材：给药结束后，颈部脱臼处死小鼠。取背部皮肤组织分别于 -80°C 冻存或 4% 多聚甲醛固定备用。

1.5.5 皮肤组织表观及经皮失水率测试方法

于合适的环境条件下(室温 22–24 °C, 湿度 40%–60%, 无阳光直射, 无风)进行皮肤相关生理指标测试, 使用尼康照相机、经表皮失水检测仪分别对皮肤表皮进行表观拍摄及经皮失水率测试^[15]。

1.5.6 皮肤组织病理及表皮厚度变化测试方法

(1) 固定、脱水、透明、浸蜡和包埋。将采集的小鼠皮肤组织在固定剂中固定 20 h, 固定剂主要为甲醛和乙醇。固定好的组织在梯度乙醇(70%、75%、80%、85%、90%、95%、无水乙醇 I、无水乙醇 II)中进行脱水, 各级乙醇中脱水时间为 2 h。采用两步二甲苯透明法进行透明, 透明时间为 1 h。浸蜡在恒温箱中进行, 温度保持在 58–60 °C, 浸蜡 2 h。在进行石蜡包埋时要保证组织块垂直包埋在石蜡中, 确保切片后能观察到准确的小鼠皮肤垂直纵切面。

(2) 切片、摊片、烤片、染色、封片。用切片机进行切片, 然后将切面朝上放入水中摊片(摊片时动作要匀速轻柔, 避免皱褶和产生气泡), 烤片温度为 60 °C, 时间为 30 min, 利用苏木精-伊红染色, 后用加拿大树胶进行封片, 永久保存^[16]。

(3) 在显微镜下观察皮肤组织切片并拍摄; 用图形分析统计软件 IPP6 分别测量每张切片的皮肤厚度^[17]。

1.5.7 皮肤组织屏障蛋白-FLG 测试方法

(1) 样品前处理。称取小鼠背部受损的皮肤组织 0.1 g 剪碎至匀浆管中, 在匀浆管中加入 4 颗小钢珠, 加入 500 μL 1 mmol/mL 的 PMSF, 提前把组织研磨仪里的样品槽放入 4 °C 冰箱预冷 30 min, 将装有样品的匀浆管放入样品槽, 组织研磨仪的工作参数设置为 60 Hz 和 270 s, 匀浆充分, 得到皮肤组织匀浆液, 然后 10 000 r/min

离心 6 min, 收集上清液, 重复 2 次, 上清液–20 °C 保存待测。

(2) 酶标仪检测。加标准品和样品 50 μL /孔到对应微孔中, 然后加抗体工作液 50 μL /孔, 轻轻振荡 5 s 混匀, 37 °C 避光反应 30 min。洗板: 甩干孔中液体, 用工作洗涤液 350 μL /孔充分洗涤 5 次, 每次间隔 30 s, 最后用吸水纸拍干。加酶标记物 100 μL /孔, 37 °C 避光反应 30 min。再次洗板(同上)。显色: 加底物 A 50 μL /孔, 再加底物 B 50 μL /孔, 轻轻振荡 5 min 混匀, 37 °C 避光显色 15 min。终止: 加入终止液 50 μL /孔, 轻轻振荡混匀, 终止反应, 酶标仪于 450 nm 处上机测定每孔 OD 值^[18]。

1.6 数据统计和分析

实验数据采用 SPSS 21.0 分析处理, 以平均值 \pm 标准差表示, 采用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA) (DUNCAN 检验)进行显著性分析, $P < 0.05$ 则认为差异显著; 采用 Origin 2018 软件处理作图, 实验重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同菌发酵天山雪莲粗多糖后的活菌数与多糖产量分析

2.1.1 天山雪莲粗多糖发酵后的活菌数分析

在天山雪莲粗多糖培养基中培养上述 1.1.2 中的 9 株菌, 结果如图 1 所示, 活菌数较高的依次是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CCFM1162 (11×10^8 CFU/mL)、枯草芽孢杆菌 165-M1 (10×10^8 CFU/mL)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) CCFM1073 (6.5×10^8 CFU/mL)、罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*) CCFM8631 (5.3×10^8 CFU/mL)、清酒乳杆菌(*L. sakei*) GD17-9 (2.0×10^8 CFU/mL), 它们的活菌数均不低于 2.0×10^8 CFU/mL, 表明其适合在天山雪莲粗多糖培养基上生长, 也适合发酵天

山雪莲粗多糖。杨君等^[19]的研究结果表明,保加利亚乳杆菌在生地黄、阿胶、绿茶茶叶和党参药液中生长情况良好,培养 24 h 活菌数分别达到(1.3×10^8 – 2.3×10^8) CFU/mL;而嗜热链球菌在绿茶茶叶、阿胶、生地黄、槐花药液中生长良好,培养 24 h 活菌数可达(2.8×10^8 – 5.3×10^8) CFU/mL,这与本研究结果中在天山雪莲粗多糖培养基中生长良好的菌株活菌数相近。此外,本研究中的发酵培养基中是以天山雪莲粗多糖作为唯一碳源,菌株在接种后生长良好,证明菌株可以利用天山雪莲粗多糖为碳源较好地生长增殖。

2.1.2 不同菌株发酵天山雪莲粗多糖后的多糖产量分析

不同菌株在发酵天山雪莲粗多糖后的多糖产量不同。本研究以多糖产量为指标,选取发酵天山雪莲粗多糖的适宜菌株。

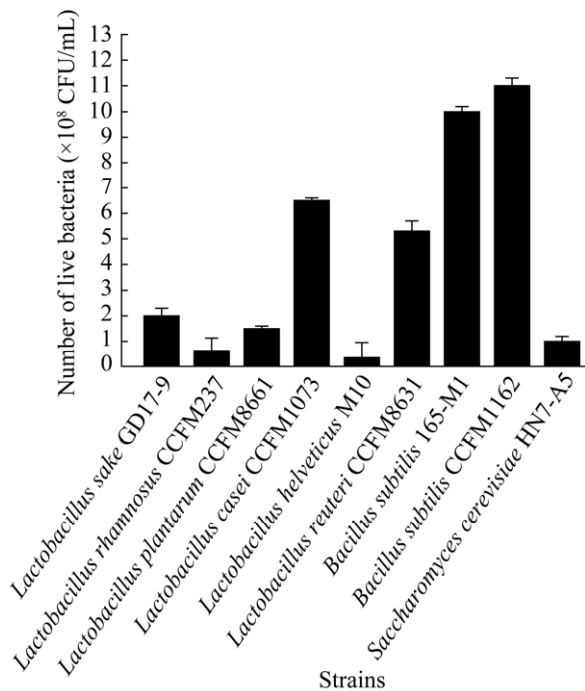


图 1 不同菌株在天山雪莲粗多糖培养基上培养的活菌数

Figure 1 Viable number of different strains cultured on *Saussurea involucreta* crude polysaccharide medium. Data are means \pm standard deviation ($n=3$).

结果如图 2 所示,所有菌株发酵后天山雪莲多糖产量较未发酵的多糖产量都有提升,但不同菌株存在差异,根据发酵多糖产量由高到低依次是酿酒酵母 HN7-A5 (1.62 g/L)、干酪乳杆菌 CCFM1073 (1.47 g/L)、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 (1.43 g/L)、清酒乳杆菌 GD17-9 (1.37 g/L)、枯草芽孢杆菌 165-M1 (1.30 g/L)、植物乳杆菌 CCFM8661 (1.29 g/L)、瑞士乳杆菌 M10 (1.28 g/L)、鼠李糖乳杆菌 CCFM237 (1.28 g/L)、枯草芽孢杆菌 CCFM1162 (1.23 g/L)。其中,酿酒酵母 HN7-A5、干酪乳杆菌 CCFM1073、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9 发酵后的多糖产量超过 1.30 g/L。焦方文等^[20]的研究也指出不同益生菌分解粗多糖的能力存在差异。综合考虑各菌株的活菌数,采用干酪乳杆菌 CCFM1073、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9、酿酒酵母 HN7-A5 发酵天山雪莲粗多糖,并应用于后续的细胞实验。

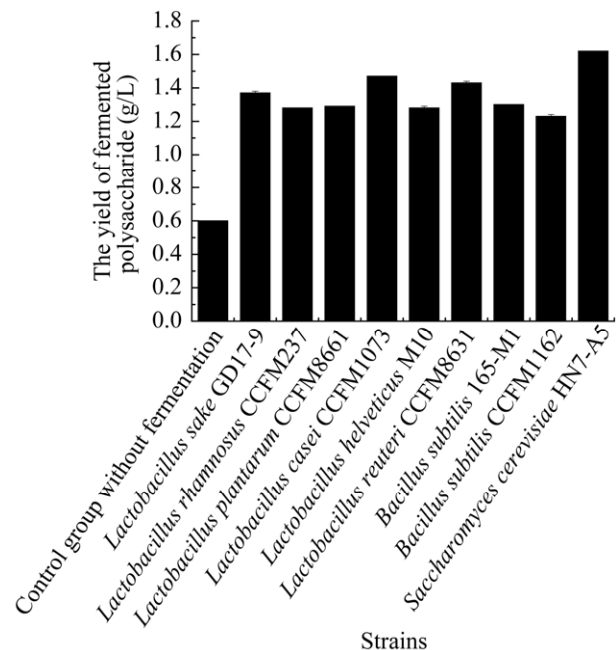


图 2 不同菌株发酵天山雪莲粗多糖的多糖产量

Figure 2 Polysaccharide yield of *Saussurea involucreta* crude polysaccharide fermented by different strains. Data are means \pm standard deviation ($n=3$).

2.2 发酵多糖细胞护肤功效评价结果分析

2.2.1 发酵多糖对 SDS 诱导的 HaCaT 细胞存活率的影响

通过 SDS 处理构建表皮细胞损伤模型, 评价发酵多糖护肤功效实验, 利用细胞存活率评价发酵多糖的效果^[21-22]。

在本研究中, SDS 诱导的 HaCaT 细胞为模型组, 正常细胞为对照组。由图 3 可知, 模型组 HaCaT 细胞经 SDS 作用 24 h 后, 模型组细胞存活率为 64.96%, 与对照组相比, 细胞存活率明显减小, 表明 HaCaT 细胞损伤细胞模型造模成功。与模型组相比, HaCaT 细胞经各菌株发酵的多糖作用 24 h 后, 细胞存活率总体差异不大,

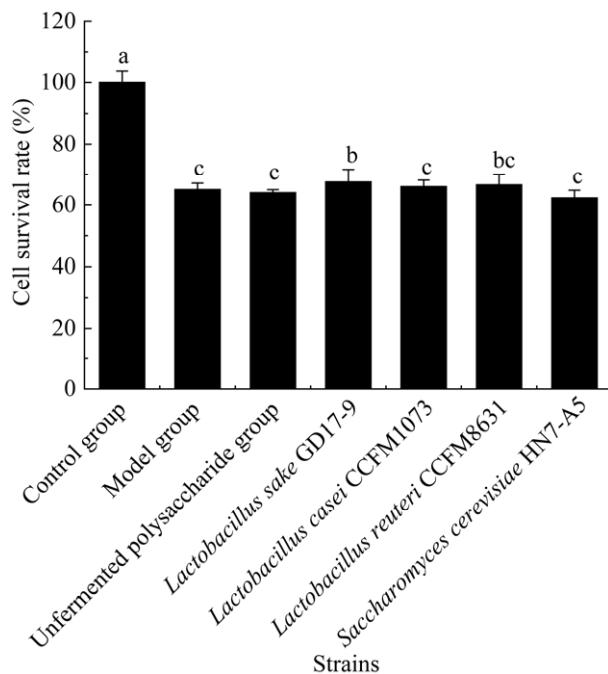


图 3 发酵多糖对 SDS 诱导的 HaCaT 细胞存活率的影响

Figure 3 Effect of polysaccharide from *Saussurea involucrata* on the survival rate of HaCaT cells induced by SDS. Data are means±standard deviation ($n=3$). Different letters represent significant differences in different treatments ($P<0.05$). Control group: Normal cells; Model group: HaCaT cells induced by SDS. The same below.

其中经罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9 的发酵多糖作用 24 h 后细胞存活率与模型组和未发酵多糖组相比略有提高, 表明罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9 等发酵多糖对 SDS 诱导的表皮细胞损伤修复作用不大。

2.2.2 发酵多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量的影响

皮肤组织产生高水平 NO 后, 通过不同途径发挥非特异性宿主防御作用及介导组织损伤、细胞凋亡等病理过程, 进而引起各种炎症性或自身免疫皮肤病的发生^[23]。本研究通过 LPS 处理巨噬细胞构建细胞模型, 评价发酵多糖免疫功能实验, 检测 NO 含量以评价发酵多糖的效果, NO 含量越少则发酵后的天山雪莲粗多糖护肤效果越好^[24]。

结果如图 4 所示, 模型组 RAW264.7 细胞经 LPS 作用 24 h 后, 模型组细胞 NO 含量为 42.859 $\mu\text{mol/L}$, 与对照组相比, NO 含量明显增高, 表明 RAW264.7 炎症损伤细胞模型造模成功。与模型组相比, RAW264.7 细胞经各菌株发酵的多糖作用 24 h 后, NO 含量显著变低, 其中清酒乳杆菌 GD17-9 发酵后的多糖和罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 的效果较好, 清酒乳杆菌 GD17-9、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量分别为 8.192 $\mu\text{mol/L}$ 和 12.608 $\mu\text{mol/L}$ 。相比较模型组 NO 含量, 清酒乳杆菌 GD17-9、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量分别降低了 81% 和 71%。相比较未发酵多糖组 NO 含量 (21.130 $\mu\text{mol/L}$), 清酒乳杆菌 GD17-9、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量分别降低了 61% 和 40%。王淑琪^[25]的研究结果表明 200 $\mu\text{g/mL}$ 的石斛多糖可使 NO 含量显著降低。刘鹏飞^[26]的研究结果也发现 500 $\mu\text{g/mL}$ 的人参多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7

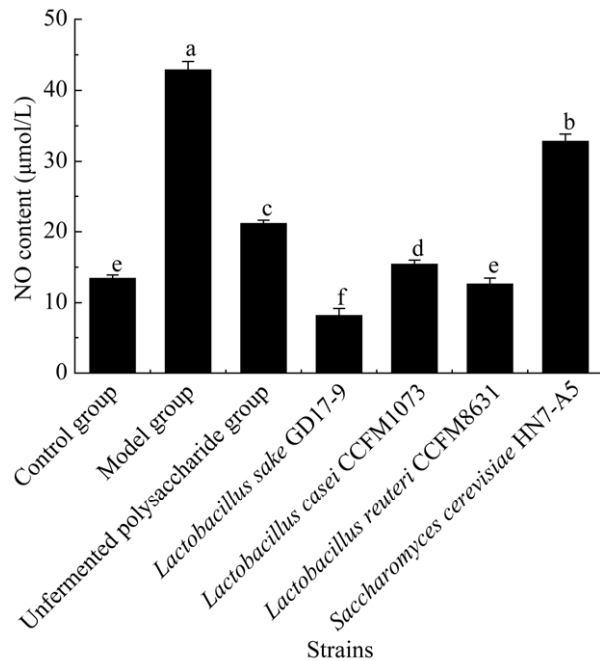


图4 发酵多糖对LPS诱导的RAW264.7细胞NO含量的影响

Figure 4 Effect of polysaccharide from *Saussurea involucrata* on NO content in RAW264.7 cells induced by LPS. Data are means±standard deviation ($n=3$). Different letters represent significant differences in different treatments ($P<0.05$). RAW264.7 cells were induced by LPS in model group and control group.

细胞NO的含量降低了41%。这些研究都表明中药多糖能够降低LPS诱导的巨噬细胞RAW264.7的NO含量,调节细胞免疫。

多糖产量、活菌数、细胞护肤功效评价三者结果表明,发酵天山雪莲粗多糖的较适菌株为罗伊氏乳杆菌CCFM8631、清酒乳杆菌GD17-9,并用于后续动物实验。

2.3 发酵多糖动物护肤功效评价

2.3.1 皮肤表观变化观察

表皮主要由角质形成细胞组成,位于基底层的角质形成细胞经有丝分裂后向上迁移并逐渐分化成熟,依次形成了棘层、颗粒层和位于表皮最外层的角质层^[27]。角质形成细胞作为皮肤屏

障的主要构成成分,对维持皮肤屏障的完整及功能的稳定起到了重要的作用^[28]。

本研究中给正常小鼠涂抹基质乳膏的为空白组,给特异性皮炎小鼠涂抹基质乳膏的为模型组,给特异性皮炎小鼠涂抹特制乳膏1(基质乳膏+0.5%泼尼松龙乳膏)的为药物对照组,给特异性皮炎小鼠涂抹特制乳膏2(基质乳膏+5%多糖提取物乳膏)的为样品组。结果如图5所示,与空白组相比,模型组的皮肤发红,受损明显,表明模型构建成功;与模型组相比,药物对照组的皮肤受损面及受伤程度显著减轻。表观变化结果显示,添加罗伊氏乳杆菌CCFM8631组和清酒乳杆菌GD17-9均比未添加菌株发酵的多糖效果

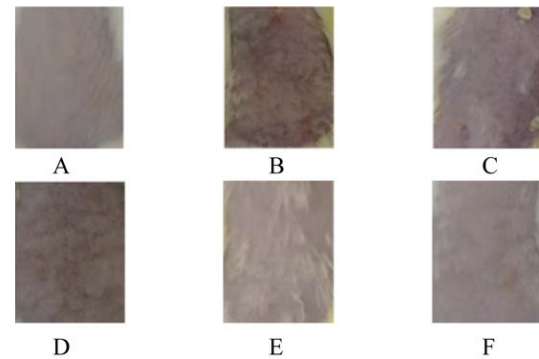


图5 不同样本的表观图片

Figure 5 Apparent pictures of different samples. A: Blank group, matrix cream applied to normal mice. B: Model group, matrix cream applied to atopic dermatitis mice. C: Drug control group, matrix cream and 0.5% prednisolone cream applied to atopic dermatitis mice. D: Sample group, matrix cream+5% unfermented *Saussurea involucrata* polysaccharide extract cream applied to atopic dermatitis mice. E: Sample group, matrix cream+5% *Lactobacillus reuteri* CCFM8631 fermented *Saussurea involucrata* polysaccharide extract cream applied to atopic dermatitis mice. F: Sample group, the mice were treated with matrix cream and 5% *Lactobacillus sake* GD17-9 fermented *Saussurea involucrata* polysaccharide extract cream, and the mice were treated with atopic dermatitis cream.

好, 且相比药物对照组的护肤效果来说大致相同。其中罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 发酵的多糖效果最佳, 即减轻皮肤受损效果最强。

2.3.2 皮肤经皮失水率变化

经皮失水率 (transdermal water loss rate, TEWL) 是评估皮肤水分保护层功能的重要参数, 并已在国际上得到广泛认可。TEWL 可以简单理解为 1 h 内有多少水分从 1 m² 的皮肤表面进入周围的空气中, 皮肤的 TEWL 越高, 则皮肤的屏障功能和自我保护能力越弱; TEWL 值越低, 皮肤水分散失越慢, 皮肤的屏障效果越好^[29]。

如图 6 所示, 与空白组相比, 模型组的 TEWL

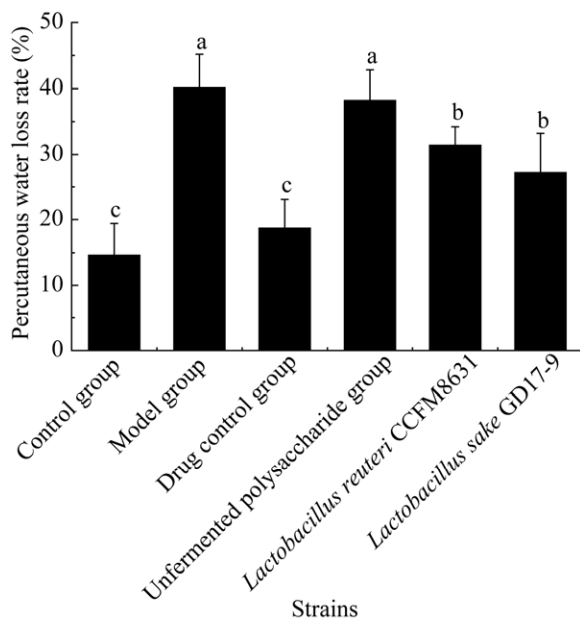


图 6 不同样本的皮肤经皮失水率变化

Figure 6 Changes of skin transdermal water loss rate in different samples. Data are means±standard deviation ($n=3$). Different letters represent significant differences in different treatments ($P<0.05$). Blank group: Normal mice smeared with matrix cream; Model group: Atopic dermatitis mice smeared with matrix cream; Drug control group: Mice with atopic dermatitis smeared with matrix cream and 0.5% prednisolone cream; Sample group: Atopic dermatitis mice were smeared with matrix cream+5% polysaccharide extract cream.

明显偏高, 表明动物皮肤损伤模型构建成功。药物对照组的 TEWL 比模型组的低, 添加罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 和清酒乳杆菌 GD17-9 后的 TEWL 比模型组的低, 也比未发酵多糖的 TEWL 低, 表明经罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 和清酒乳杆菌 GD17-9 发酵的多糖能减缓皮肤水分散失, 对皮肤损伤具有一定的修复效果。王静^[30]的研究通过 UV 照射使得皮肤 TEWL 增加, 然后局部涂抹枸杞提取物有效地降低了 TEWL 值, 表明枸杞提取物也能够改善皮肤的水通透屏障, 维持皮肤组织水合完整, 降低经皮失水率, 同时修复皮肤屏障功能损伤。

2.3.3 皮肤组织病理变化

本研究通过苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin, HE) 观察小鼠皮肤组织, 探索不同发酵条件下的中药多糖对皮肤组织病理的缓解程度, 筛选出缓解效果最为显著的发酵菌株。由于组织或细胞的不同成分对苏木精的亲合力不同及染色性质不一样, 经苏木精染色后, 细胞核及钙盐黏液等呈蓝色, 可用盐酸酒精分化和弱碱性溶液显蓝, 如处理适宜, 可使细胞核着清楚的深蓝色, 胞浆等其他成分脱色。再利用胞浆染料伊红染胞浆, 使胞浆的各种不同成分又呈现出深浅不同的粉红色, 故各种组织或细胞成分与病变的一般形态结构特点均可显示出来。

如图 7 所示, 空白对照组小鼠皮肤组织无明显改变, 各层结构完整, 皮肤组织组表皮层与真皮层界限清晰, 细胞排列整齐; 模型组表皮层明显增厚, 表皮层与真皮层界限模糊不清, 细胞排列紊乱, 并伴有大量炎性细胞浸润。样品组中皮肤组织病理变化均有所缓解, 其中添加罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 后的缓解效果较好。

2.3.4 皮肤组织表皮厚度变化

本研究测定小鼠的表皮厚度,比较清酒乳杆菌 GD17-9 和罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 两种菌株对表皮组织增生的缓解作用。如表 3 所示,与空白对照组(20 μm)相比,模型组(199 μm)表皮厚度明显增加;与模型组相比,所有样品组表皮厚度均有所减小,其中添加清酒乳杆菌 GD17-9 (110 μm)和罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 (98 μm)后的效果显著低于模型组,但效果较未发酵多糖组(50 μm)未有提升。Nam 等^[31]的研究发现 5 种天然草药组成的混合物具有抗特异性皮炎作用,与模型组相比中药混合物局部给药的皮肤组织表皮厚度减显著减少。这与本研究结果

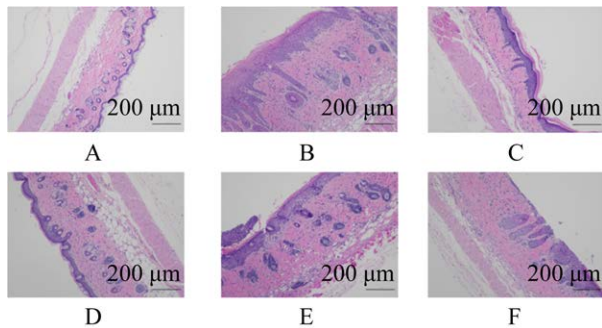


图 7 皮肤组织病理变化(HE 染色)

Figure 7 Histopathological changes of skin (HE staining). A: Blank group, matrix cream applied to normal mice. B: Model group, matrix cream applied to atopic dermatitis mice. C: Drug control group, matrix cream and 0.5% prednisolone cream applied to atopic dermatitis mice. D: Sample group, matrix cream+5% unfermented *Saussurea involucreta* polysaccharide extract cream applied to atopic dermatitis mice. E: Sample group, matrix cream+5% *Lactobacillus reuteri* CCFM8631 fermented *Saussurea involucreta* polysaccharide extract cream applied to atopic dermatitis mice. F: Sample group, the mice were treated with matrix cream and 5% *Lactobacillus sake* GD17-9 fermented *Saussurea involucreta* polysaccharide extract cream, and the mice were treated with atopic dermatitis cream.

表 3 皮肤组织表皮厚度变化

Table 3 Changes of epidermal thickness of skin tissue

Experimental group	Thickness of epidermis (μm)
Blank group	20
Model group	199
Drug control group	52
Unfermented polysaccharide group	50
<i>Lactobacillus reuteri</i>	98
CCFM8631 group	
<i>Lactobacillus sake</i> GD17-9	110

group
Blank group: Normal mice smeared with matrix cream; Model group: Atopic dermatitis mice smeared with matrix cream; Drug control group: Mice with atopic dermatitis smeared with matrix cream and 0.5% prednisolone cream; Sample group: Atopic dermatitis mice were smeared with matrix cream+5% polysaccharide extract cream.

相近,本研究中的 2 种菌株对 DNFB 诱导的表皮组织增生均有一定的缓解作用。

2.3.5 皮肤组织屏障蛋白-FLG 表达的变化

FLG 是一种含组氨酸的蛋白质,由角质形成细胞分泌,其在表皮角质层降解形成的氨基酸小分子具备吸收水分能力,其与水强力结合而达到使角质层保湿的效果,能够维持表皮的水合作用,减少经表皮水分的丢失,能保持表皮角质层的水分含量,并且其降解产物能够维持表皮的这种弱酸性环境并且能够防止外界微生物的入侵,因此角质层中的 FLG 成为评价皮肤屏障功能的一个关键因子^[32]。

如图 8 所示,模型组屏障蛋白 FLG 表达量显著降低,表明屏障功能受损严重。实验组均具有促进 FLG 表达的效果,其中添加罗伊氏乳杆菌(190 $\mu\text{g}/\text{mg}$)和清酒乳杆菌(180 $\mu\text{g}/\text{mg}$)发酵的多糖效果显著,具有一定缓解屏障损伤的作用。Hashimoto 等^[33]的研究也发现低分子量透明质酸可促进 FLG 合成,提高角质层的天然保湿因子,促进角质层保湿作用。

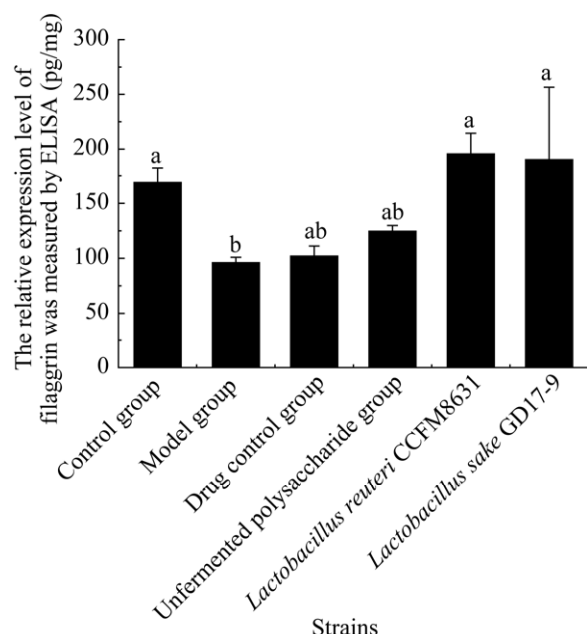


图 8 皮肤组织屏障蛋白 FLG 表达量的变化

Figure 8 Changes in the expression of skin barrier protein FLG. Data are means±standard deviation ($n=3$). Different letters represent significant differences in different treatments ($P<0.05$). Blank group: Normal mice smeared with matrix cream; Model group: Atopic dermatitis mice smeared with matrix cream; Drug control group: Mice with atopic dermatitis smeared with matrix cream and 0.5% prednisolone cream; Sample group: Atopic dermatitis mice were smeared with matrix cream+5% polysaccharide extract cream.

3 结论

本研究分析了 9 种菌株发酵天山雪莲粗多糖后的多糖产量和活菌数, 其中枯草芽孢杆菌 165-M1、枯草芽孢杆菌 CCFM1162、干酪乳杆菌 CCFM1073、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9 的活菌数较高, 均不低于 2.0×10^8 CFU/mL; 而酿酒酵母 HN7-A5、干酪乳杆菌 CCFM1073、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9 发酵天山雪莲粗多糖的多糖产量较高, 达到 1.37 g/L 以上。综合多糖产量和活菌数, 选取干酪乳杆菌 CCFM1073、罗伊氏乳杆菌

CCFM8631、清酒乳杆菌 GD17-9、酿酒酵母 HN7-A5 发酵的多糖进行细胞护肤功效评价, 结果显示发酵多糖对 SDS 诱导的 HaCaT 细胞存活率影响不大, 清酒乳杆菌 GD17-9、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631、干酪乳杆菌 CCFM1073、酿酒酵母 HN7-A5 的发酵多糖对降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量效果较好, 其中清酒乳杆菌 GD17-9、罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 的发酵多糖分别降低了 81% 和 71%。选取清酒乳杆菌 GD17-9 和罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 的发酵多糖进行动物护肤功效评价, 结果显示罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 的发酵多糖护肤功效更好, 即罗伊氏乳杆菌 CCFM8631 是发酵天山雪莲粗多糖的最适宜菌株。

参考文献

- [1] 范文霞, 杨伟鹏, 刘汉石. 天山雪莲细胞培养技术、化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3522-3528.
FAN WX, YANG WP, LIU HS. Research progress on culture technologies, chemical components, and pharmacological activities of *Saussurea involucrata* cells[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(14): 3522-3528 (in Chinese).
- [2] 贾丽华, 郭雄飞, 贾晓光, 魏鸿雁. 天山雪莲的开发与应用[J]. 新疆中医药, 2016, 34(1): 126-128.
JIA LH, GUO XF, JIA XG, WEI HY. Development and application of *Saussurea involucrata*[J]. Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 34(1): 126-128 (in Chinese).
- [3] 王惠康, 林章代, 何侃, 万树文. 新疆雪莲化学成分的研究[J]. 药学学报, 1986, 21(9): 680-682.
WANG HK, LIN ZD, HE K, WAN SW. Study on chemical constituents of *Saussurea involucrata*[J]. Journal of Pharmacy, 1986, 21(9): 680-682 (in Chinese).
- [4] 赵晓玫, 刘雅萍, 王国杰, 刘汉石, 周术涛. 雪莲培养物的抗炎镇痛作用研究[J]. 北方药学, 2012, 9(3): 50.
ZHAO XM, LIU YP, WANG GJ, LIU HS, ZHOU ST. Study on anti-inflammatory and analgesic effects of *Saussurea involucrata* culture[J]. Journal of North Pharmacy, 2012, 9(3): 50 (in Chinese).

- [5] 陈梓, 杨梦楠. 雪莲培养物美白成分作用机理及其在化妆品中的应用[J]. 科技资讯, 2020(33): 169-172.
CHEN Z, YANG MN. Mechanism of whitening components in *Saussurea involucrata* culture and its application in cosmetics[J]. Science & Technology Information, 2020(33): 169-172 (in Chinese).
- [6] 贾景明, 吴春福. 天山雪莲培养物的毒性实验研究[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(3): 52-55.
JIA JM, WU CF. Experimental study on toxicity of *Saussurea involucrata* culture[J]. Journal of Medicine & Pharmacy of Chinese Minorities, 2007, 13(3): 52-55 (in Chinese).
- [7] 赵晓玫, 张柏青, 刘雅萍, 王国杰, 刘汉石, 周术涛. 天山雪莲培养物的抗辐射作用研究[J]. 中外医疗, 2012, 31(6): 26.
ZHAO XM, ZHANG BQ, LIU YP, WANG GJ, LIU HS, ZHOU ST. Study on the anti-radiation effect of *Saussurea involucrata* culture[J]. China & Foreign Medical Treatment, 2012, 31(6): 26 (in Chinese).
- [8] 赵晓玫, 周术涛, 刘雅萍, 王国杰, 刘汉石. 天山雪莲培养物抗疲劳作用的研究[J]. 中外医疗, 2012, 31(7): 30.
ZHAO XM, ZHOU ST, LIU YP, WANG GJ, LIU HS. Study on anti-fatigue effect of *Saussurea involucrata* culture[J]. China & Foreign Medical Treatment, 2012, 31(7): 30 (in Chinese).
- [9] 蔡绍晖, 唐琼, 陈嘉钰, 刘于宾, 朱玲. 复方雪莲烧伤膏促创面愈合、抗炎作用研究[J]. 中成药, 1999(5): 243-245.
CAI SH, TANG Q, CHEN JY, LIU YB, ZHU L. Study on the effect of compound Xuelian burn ointment on wound healing and anti-inflammation[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 1999(5): 243-245 (in Chinese).
- [10] 张晓寒, 张程慧, 于文睿, 薛婉茹, 佟彤, 孙嘉璘, 冯叙桥. 药食同源类植物多糖降血糖功效的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018(14): 3699-3705.
ZHANG XH, ZHANG CH, YU WR, XUE WR, TONG T, SUN JL, FENG XQ. Research advances on the hypoglycemic function of drug and food homologous plant polysaccharides[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018(14): 3699-3705 (in Chinese).
- [11] 于敬, 周晶. 生物酶解技术在中药提取中的应用[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(5): 340-344.
YU J, ZHOU J. Application of biological enzymatic hydrolysis technology to extraction of traditional Chinese medicine[J]. Drugs & Clinic, 2010, 25(5): 340-344 (in Chinese).
- [12] 洪艳. 水母雪莲多糖对小鼠衰老皮肤结构及抗氧化作用的影响[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2020.
HONG Y. Effects of *Saussurea medusa* polysaccharide on aging skin structure and antioxidation in mice[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2020 (in Chinese).
- [13] 李华, 叶暉杰, 李伯勤, 孙祝美. 虫草多糖对皮肤成纤维细胞抗氧化能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 160-162.
LI H, YE CJ, LI BQ, SUN ZM. *Cordyceps* polysaccharides reduce cell oxidative damage in cultured fibroblasts[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010, 16(4): 160-162 (in Chinese).
- [14] 姚立虎, 徐茜. 蒽酮比色法测食品总糖含量的简化研究[J]. 食品工业, 1992(3): 40-42.
YAO LH, XU Q. Simplified study on determination of total sugar content in food by anthrone colorimetry[J]. The Food Industry, 1992(3): 40-42 (in Chinese).
- [15] 陈思璇, 李泓莹, 杨洋, 叶建州. 点阵激光用于痤疮患者的临床治疗对疗效、皮损改善、经表皮失水量、皮肤表面 pH 值、血红素含量的影响观察[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2021, 20(1): 60-62.
CHEN SX, LI HY, YANG Y, YE JZ. Observation on the effect of laser dot matrix in clinical treatment of acne patients on curative effect, skin lesion improvement, transcutaneous water loss, skin surface pH value and heme content[J]. Chinese Journal of Dermatovenereology of Integrated Traditional and Western Medicine, 2021, 20(1): 60-62 (in Chinese).
- [16] 胡国梅, 张瑜, 田敏. 改良病理技术 HE 染色在病理诊断中的应用研究[J]. 中国社区医师, 2021, 37(19): 107-108.
HU GM, ZHANG Y, TIAN M. Study on the application of modified pathological technique HE staining in pathological diagnosis[J]. Chinese Community Doctors, 2021, 37(19): 107-108 (in Chinese).
- [17] 王敏, 张新浩, 杨莉, 李海静, 赵春江. 德州驴皮肤厚度测定方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(13): 98-101.
WANG M, ZHANG XH, YANG L, LI HJ, ZHAO CJ. Study on the measurement method of skin thickness of Dezhou donkey[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(13): 98-101 (in Chinese).
- [18] 陈舟. 高效液相色谱仪、酶标仪和快检仪检测小麦中呕吐毒素的对比分析[J]. 食品安全导刊, 2021(28): 82-83, 85.
CHEN Z. Comparative analysis of detection of vomitoxin in wheat by HPLC, ELISA and rapid

- detection instrument[J]. *China Food Safety Magazine*, 2021(28): 82-83, 85 (in Chinese).
- [19] 杨君, 陈合, 彭丹, 陈杰. 十种中草药对酸乳发酵菌生长的影响[J]. *食品科技*, 2009, 34(3): 17-20.
YANG J, CHEN H, PENG D, CHEN J. Effect of ten kinds of traditional Chinese medicine on the growth of yogurt fermentation bacteria[J]. *Food Science and Technology*, 2009, 34(3): 17-20 (in Chinese).
- [20] 焦方文, 徐有伟, 王集会. 中药麦芽发酵前后总多糖的含量对比研究[J]. *中南药学*, 2016, 14(6): 652-654.
JIAO FW, XU YW, WANG JH. Total polysaccharide content in malt before and after fermentation[J]. *Central South Pharmacy*, 2016, 14(6): 652-654 (in Chinese).
- [21] 刘光荣, 马诗经, 韩萍, 车飙, 林丽, 杜志云. 银耳多糖提取工艺优化及其对 SDS 诱导 HaCaT 细胞损伤的保护作用[J]. *中国食用菌*, 2021, 40(1): 97-102.
LIU GR, MA SJ, HAN P, CHE B, LIN L, DU ZY. Optimization of extracting *Tremella fuciform* polysaccharide and its protection against SDS-induced damage of HaCaT cells[J]. *Edible Fungi of China*, 2021, 40(1): 97-102 (in Chinese).
- [22] PETUSHKOVA NA, RUSANOV AL, PYATNITSKIY MA, LARINA OV, LUZGINA NG. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure[J]. *Biomedical Dermatology*, 2020, 4(8): 25-29.
- [23] 杨敏, 常建民. NO 在皮肤损害中的病理生理作用[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2005, 19(8): 497-499.
YANG M, CHANG JM. Roles of nitric oxide in cutaneous physiology and pathology[J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2005, 19(8): 497-499 (in Chinese).
- [24] 罗传龄, 孙利平, 戚成栋. Lnc-MALAT1 减轻 miR-217 抑制 LPS 诱导的大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(3): 404-408.
LUO CL, SUN LP, QI CD. Lnc-MALAT1 attenuates miR-217 inhibiting LP S-induced inflammatory response in rat alveolar macrophages[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2021, 41(3): 404-408 (in Chinese).
- [25] 王淑琪. 霍山石斛(栽培)抗炎多糖的结构鉴定及活性评价[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2018.
WANG SQ. Structure identification and activity evaluation of anti-inflammatory polysaccharides from *Dendrobium candidum* (cultivated)[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [26] 刘鹏飞. 人参多糖对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞的抑制作用及其机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学硕士学位论文, 2018.
LIU PF. Inhibitory effect of ginseng polysaccharide on LPS-induced peritoneal macrophages in mice and its mechanism[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangzhou University of Chinese Medicine, 2018 (in Chinese).
- [27] 王妍. 羊栖菜多糖促进皮肤屏障功能修复的作用研究[D]. 温州: 温州大学硕士学位论文, 2019.
WANG Y. Effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide on repairing skin barrier function[D]. Wenzhou: Master's Thesis of Wenzhou University, 2019 (in Chinese).
- [28] 崔乐. 基于脂质组学的 SPSS 女性面部标志物筛选及其代谢机制研究[D]. 北京: 北京工商大学硕士学位论文, 2017.
CUI L. Screening of female facial markers based on lipomics by SPSS and its metabolic mechanism[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Technology and Business University, 2017 (in Chinese).
- [29] 谢灵娜. 银耳多糖对特应性皮炎的作用及机理研究[D]. 广州: 广东工业大学硕士学位论文, 2020.
XIE LN. Study on the effect and mechanism of *Tremella fuciformis* polysaccharide on atopic dermatitis[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [30] 王静. 枸杞提取物对 UV 诱导皮肤光损伤的保护作用及机制研究[D]. 广州: 广东工业大学硕士学位论文, 2020.
WANG J. Protective effect and mechanism of *Lycium barbarum* extract on UV-induced skin damage[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [31] NAM YK, MI HK, HA IJ, YANG WM. Derma-Hc, a new developed herbal formula, ameliorates cutaneous lichenification in atopic dermatitis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5): 2359.
- [32] 谭红雁. 柏参氧化锌糊剂对诱导型亚急性湿疹豚鼠抗炎及调控 AQP3、FLG 影响皮肤屏障功能的研究[D]. 成都: 成都中医药大学硕士学位论文, 2020.
TAN HY. Anti-inflammatory effect of ginseng zinc oxide paste on Guinea pigs with induced subacute eczema and the effect of AQP3 and FLG on skin barrier function[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chengdu University of TCM, 2020 (in Chinese).
- [33] HASHIMOTO M, MAEDA K. New functions of low-molecular-weight hyaluronic acid on epidermis filaggrin production and degradation[J]. *The Application of Biopolymers in Cosmetics*, 2021, 8(4): 118.