

牛蒡子发酵液的制备及其修复抗氧化活性研究

于子涵, 李琳, 穆雅韬, 张靖萱, 王领^{*}
(齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东济南, 250353)
DOI:10.61369/CDCST.2026010002

摘 要: 为探究牛蒡子发酵液的修复及抗氧化功效, 以人表皮角质形成细胞(HaCaT)为模型, 开展了自由基清除、透明质酸酶抑制、弹性蛋白酶抑制及HaCaT细胞活力测定等实验。结果表明, 牛蒡子发酵液在5%浓度时, 自由基清除率达94.82%, 透明质酸酶活性抑制率达93.87%, 弹性蛋白酶抑制率达82.30%。此外, 0.5%~2%对HaCaT细胞无毒性, 且能显著促进细胞增殖修复。实验证实, 通过酿酒酵母制备的牛蒡子发酵液具有修复及抗氧化效果, 为牛蒡子及发酵技术在化妆品领域的科学开发与应用奠定了基础。

关 键 词: 牛蒡子; 发酵液; 修复; 抗氧化活性

作者简介: 王领, 博士, 副教授, 齐鲁工业大学(山东省科学院)应用化学系主任, 研究方向: 化妆品原料开发及配方应用。E-mail: wwwllnh@126.com。



王领

牛蒡子来源于菊科植物牛蒡(*Arctium lappa* L.)的干燥成熟果实, 又名“大力子”“恶实”等^[1]。《名医别录》载其性寒, 味辛、苦, 归胃、肺经, 具有疏散风热、宣肺利咽、解毒透疹、消肿疮功效, 临床多用于治疗风热咳嗽、疮疡肿毒等症。药理研究发现, 牛蒡子具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及抗糖尿病等作用^[2]。据研究结果显示, 牛蒡子中的多糖能够清除自由基具有较好的抗氧化效果, 同时牛蒡子中含有的多种黄酮氨基酸以及其他成分能够共同起到修复以及抗敏作用^[3-5]。现有提取方法不能够将其中成分尽可能发挥最大效果, 而发酵能使大分子分解为小分子活性物质, 被人体更好的吸收。同时在护肤行业中, 发酵化妆品已成为天然植物提取化妆品之后的又一大热点, 如海蓝之谜、SK-II 神仙水等, 因其具有显著的护肤功效, 深受消费者喜爱^[6]。植物经过发酵后会产生有显著护肤功效的活性物质, 我国拥有丰富的中草药资源, 已有不少研究报道通过中草药的微生物发酵得到护肤功效显著的化妆品原料^[7]。例如, 利用葡萄酒酵母发酵灵芝, 可以得到具有抗衰老和美白功效的灵芝发酵液^[8]。此外, 研究还表明酵母菌发酵茉莉花也能产生显著的美白效果^[9]。然而, 对于牛蒡子发酵的研究相对有限, 其护肤功效尚未完全阐明。牛蒡子发酵产物可能具有潜在的抗氧化、保湿修复和其他护肤特性, 但需要进一步深入研究来确认其效果。

本研究以安徽牛蒡子发酵液为研究对象, 初步研究了发酵液对人表皮细胞(HaCaT)的效果, 为牛蒡子发酵液在化妆品抗氧化、保湿、修复等功效的应用提供一定的实验依据, 同时也为提高牛蒡的利用率提供参考。

1. 实验部分

1.1 实验材料与仪器

牛蒡子粉, 购于亳州大鹏药业有限公司; 透明质酸酶溶液、磷酸氢二钠、一水合柠檬酸、pH6.8的柠檬酸缓冲液、CaCl₂溶液、DMSO、乙酰丙酮溶液、埃尔利希试剂(Ehrlich reagent), 购于国药集团化学试剂有限公司; 酪氨酸酶、左旋多巴、曲酸, 购于上海皓鸿生物医药科技有限公司; DPPH溶液、Hacat人表皮细胞, 购于普诺赛(Procell); 醋酸缓冲液, 购于福州飞净生物科技有限公司; 透明质酸钠溶液, 购于华熙生物科技有限公司; NaOH溶液, 购于天津市恒兴化学试剂有限公司; 无水乙醇, 购于天津市富宇精细化工有限公司; DMEM高糖培养液、PBS缓冲液, 购于常德比克曼生物科技有限公司; 胎牛血清、MTT(5 mg/mL)购于北京兰杰柯科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 牛蒡子发酵液的制备方法

配置好的酵母菌培养基, 121 °C高温灭菌30 min, 冷却后按1:100接种粟酒裂殖酵母种子液, 于30 °C震荡培养箱中, 纱布封口, 200 r/min瓶发酵, 发酵24 h, 将灭菌后的牛蒡子粉按1:20接入锥形瓶中。摇瓶发酵48 h。后121 °C高温灭菌30 min, 离心精滤后得牛蒡子发酵液。

1.2.2 牛蒡子发酵液中黄酮含量的测定

按照试剂盒说明书中的方法配制试剂并绘制标准曲线。取适量的牛蒡子发酵液, 用4 mL的30%乙醇水溶液

稀释溶解并转移至25 mL容量瓶中,加入1 mL的5%亚硝酸钠水溶液,振荡至体系均匀,室温下静置5 min后滴加质量分数为10%的硝酸铝溶液,至体系变色,摇匀并放置5 min;待体系完全反应后加入1 mol/L氢氧化钠水溶液10 mL,振荡至体系完全均一,静置10 min,待络合结束加入30%的乙醇水溶液定容,静置5 min。取适量的待测液转移至比色皿中,30%的乙醇水溶液(不含样品)作为空白对照,用紫外可见分光光度计测定其在510 nm处的吸光度,每个样品平行测定3次,代入标准曲线方程计算样品中总黄酮的浓度^[10]。

1.2.3 牛蒡子发酵液中多糖含量的测定

按照试剂盒说明书中的方法配制试剂并绘制标准曲线。取适量的牛蒡子发酵液稀释至5%,加入蒽酮-硫酸试剂,待反应结束后按试剂盒中标准方法测定并计算多糖含量,最终结果以葡萄糖计。

1.2.4 竹叶发酵液中氨基酸含量的测定

按照试剂盒说明书中的方法配制试剂并绘制标准曲线。取适量的牛蒡子发酵液,加入茚三酮水溶液,按试剂盒中标准方法测定并计算氨基酸含量,最终结果以甘氨酸计。

1.2.5 HaCaT细胞活力测定

按 0.8×10^4 个/孔的接种密度接种角质形成细胞(HaCaT)至96孔板,培养箱(37℃、5% CO₂)中孵育过夜。

待96孔板中细胞铺板率达到40%~60%时进行给药(浓度为0.5%、1%、2%,下同)。空白对照组每孔加入100 μL培养液,实验组每孔加入100 μL细胞液培养24 h后给药,给药完成后将96孔板放置在培养箱(37℃、5%CO₂)中培养24 h。细胞孵育培养24 h后,加入10 μL CCK-8(细胞计数试剂盒),37℃避光孵育2~4 h,孵育结束后,490 nm处读取OD值。

$$\text{细胞存活率} = (OD_{\text{sample}} / OD_{\text{ctr}}) \times 100\%$$

1.2.6 HaCaT细胞划痕实验

实验前用记号笔在6孔板背后,笔标记出3条横线。取对数期HaCaT细胞按 0.8×10^4 个/孔的接种密度接种至6孔板,培养箱(37℃、5% CO₂)中孵育过夜,细胞继续至单层贴壁细胞即可开始实验。实验分两组,空白对照组(CTR)培养基、样品组(Sample),选择测试的化合物,设置3个测试浓度分别为100, 250, 500 μg/mL。给药前使用200 μL的无菌枪头在细胞板中央垂直于marker线均匀划线,PBS洗涤3次,加入新鲜无血清培养基,给药处理继续培养24 h,待到实验结束后拍照。

1.2.7 牛蒡子发酵液 DPPH 自由基清除

实验在96孔板中进行,每组设置三个重复,降低实验误差,无水乙醇调零。将牛蒡子发酵液取适量溶于蒸馏水中,使体系终浓度为0.1%、1%、10%(在体系中的质量百分比以及下文出现的浓度百分比均为质量百分比)。样品组:90 μL样品加入90 μL DPPH溶液(1,1-二苯基-2-苦肟基溶液);对照组:90 μLDPPH溶液中加入90 μL去离子水;空白组:90 μL样品溶液中加入90 μL无水乙醇。避光摇晃10 min,517nm处测试吸光度。

$$\text{清除率} = A_{\text{对照组}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

1.2.8 牛蒡子发酵液邻苯三酚自氧化法抑制超氧阴离子

准确量取体系终浓度为0.1%、1%、10%的牛蒡子发酵液各0.2 mL,加入50 mmol/L pH为8.2的Tris-HCl缓冲液(三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液)4.0 mL,用蒸馏水补充体积至5.8 mL。上述溶液配置好,混合均匀放入恒温25℃水浴锅中加热20 min,取出后立即加入25℃预热过的3 mmol/L邻苯三酚0.2 mL为样品组,摇匀后迅速加入96孔板中,以10 mmol/L HCl作为空白对照,实验组使用10 mmol/LHCl代替邻苯三酚。在420 nm波长处,每间隔1min测试1次吸光值,共反应4 min,平行测定3次^[11]。

邻苯三酚自氧化法超氧阴离子抑制率

$$= (\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0 \times 100\%$$

式中: ΔA_0 为邻苯三酚的自氧化速率;

ΔA 为加入样品溶液后邻苯三酚的自氧化速率。

1.2.9 牛蒡子发酵液水杨酸法测定羟基自由基清除能力实验步骤

将牛蒡子发酵液取适量溶于蒸馏水中,使体系终浓度为0.1%、1%、10%。反应在1.5 mL比色管中进行,配制9 mmol/L FeSO₄, 9 mmol/L的乙醇-水杨酸以及8.8 mmol/L双氧水用于实验。空白对照组:在比色管中依次加入0.1 mL FeSO₄, 0.1 mL乙醇-水杨酸, 1.2 mL的去离子水,最后加入0.1 mL双氧水。样品组:0.1 mL FeSO₄, 0.1 mL乙醇-水杨酸, 0.1 mL不同浓度样品,最后加入0.1 mL双氧水。对照组:0.1 mL FeSO₄, 0.1 mL 9 mmol/L的乙醇-水杨酸, 0.1 mL不同浓度样品, 1.2 mL的去离子水。摇匀,37℃水浴15 min,510 nm处测其吸光度^[12]。

$$\text{羟自由基清除率} = [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100\%$$

式中: A_x 为样品测定吸光度;

A_0 为空白对照;

A_{x_0} 为样品背景。

1.2.10透明质酸酶活性抑制

取0.25 mol/L的CaCl₂溶液0.1 mL和透明质酸酶溶液0.5 mL, 37℃保温培养20 min; 加入浓度分别为0.1%、1%、10%的牛蒡子发酵液0.5 mL, 37℃保温培养20 min; 加入0.5 mL透明质酸钠液37℃保温30 min, 常温放置5 min; 加入0.1mL 0.4mol/L NaOH溶液和0.5 mL乙酰丙酮溶液, 置于沸水浴中加热15 min, 立即用冰水冷却10 min; 加入埃利希试剂10 mL, 并用3.0 mL无水乙醇进行稀释, 放置显色20 min。酶标仪测定517 nm处吸光度。

透明质酸酶活性抑制率

$$=[(A_1-A_2)-(B_1-B_2)]/(A_1-A_2) \times 100\%$$

式中: A_1 为参比溶液吸光值, 用去离子水代替所得试样;

A_2 为参比空白溶液吸光值, 用去离子水代替所得试样, 用醋酸缓冲溶液代替透明质酸酶和透明质酸钠溶液;

B_1 为试样溶液吸光值;

B_2 为试样空白溶液吸光值, 用醋酸缓冲溶液代替透明质酸酶和透明质酸钠溶液。

1.2.11弹性蛋白酶活性抑制

向96孔板中加入85 μL 50 mmol/L Tris-HCL缓冲液(pH=8.0)与15 μL浓度分别为0.1%、1%、10%的样品、25 μL猪胰弹性蛋白酶PPE(0.06 U/mL), PPE溶于Tris-HCL缓冲液(0.05 mol/L, pH=8.0), 在25℃下孵育15 min, 随后加入25 μL 1.015 mmol/L的AAPAN溶液(4-氨基替比林), 25℃下孵育15 min, 在410 nm处测定吸光度值, 弹性蛋白酶溶液和AAPAN溶液均用Tris-HCL的缓冲液配制, 以没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)作为阳性对照, 平行测定3次^[13]。

弹性蛋白酶抑制率

$$=[1-(OD_{\text{样品}}-OD_{\text{样品本底}})/(OD_{\text{空白}}-OD_{\text{空白本底}})] \times 100\%$$

2. 实验结果与讨论

2.1牛蒡子发酵液中主要活性成分测定结果

牛蒡子发酵液中主要成分是黄酮、多酚、氨基酸以及牛蒡多糖, 测得黄酮含量为12.74mg/g, 多酚含量11.33mg/g, 氨基酸含量9.17mg/g, 多糖含量6.81mg/g。与常规的水-乙醇提取方法相比, 如表1所示均有提升。

表1 发酵对成分的影响

成分	醇提 /mg · g ⁻¹	发酵 /mg/g
黄酮	2.82	12.74
多酚	5.78	11.33
氨基酸	4.34	9.17
多糖	6.16	6.81

2.2牛蒡子发酵液清除自由基实验结果

由图1~图3看出, 牛蒡子发酵液对自由基清除有效果, 随着浓度升高, DPPH、羟基自由基清除率, 邻苯三酚自氧化抑制率不断升高。牛蒡子发酵液三个浓度下对DPPH清除率分别为89.7%、92.5%、94.5%。而牛蒡子提取物对DPPH清除率在70%^[15], 发酵液相比其增加了约28.6%。牛蒡子提取物对羟基自由基清除率在50%左右, 经数据显示, 牛蒡子发酵液在三个浓度下的清除率分别65.5%、72.6%、83.1%。在5%浓度下, 羟基自由基清除率增加了约29.1%。但牛蒡子提取物在接近5%浓度时清除率趋于平稳, 而牛蒡子发酵液清除率在10%达到了83.1%。牛蒡子发酵液的三个不同浓度对邻苯三酚自氧化抑制率在32.2%、71.2%、83.1%。因此, 该原料对自由基清除果良好, 且5%左右浓度可作为实现高效清除的适宜参考浓度。

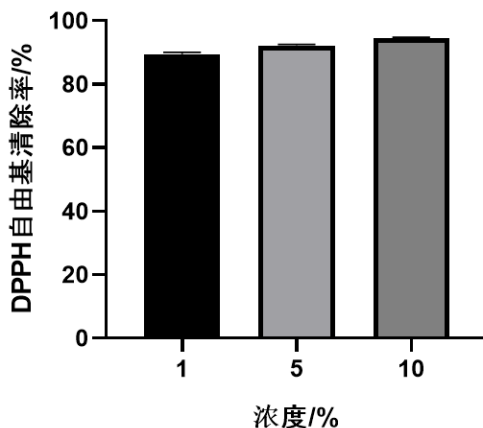


图1 DPPH自由基清除率

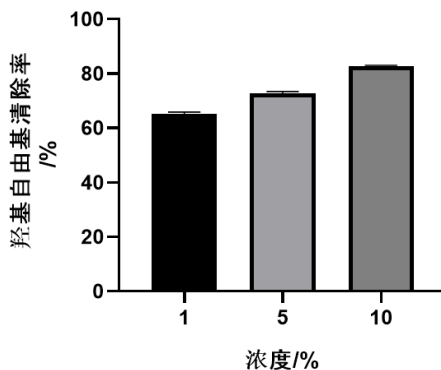


图2 羟基自由基清除率

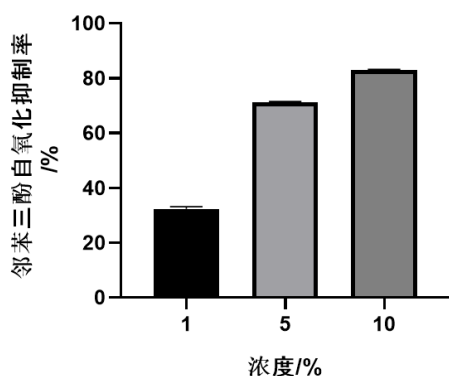


图3 邻苯三酚自氧化抑制率

2.3牛蒡子发酵液对透明质酸酶活性抑制实验结果

由图4可知，牛蒡子发酵液对透明质酸酶活性有较好的抑制效果。随着浓度增加，透明质酸酶活性抑制率不断增加。在三个浓度下分别为88.5%、93.3%、93.7%。浓度在1%~5%之间，抑制率随浓度增加而增加较为明显，但在5%~10%抑制率增加较平缓。因此，5%左右浓度可作为实现高效清除的适宜参考浓度。

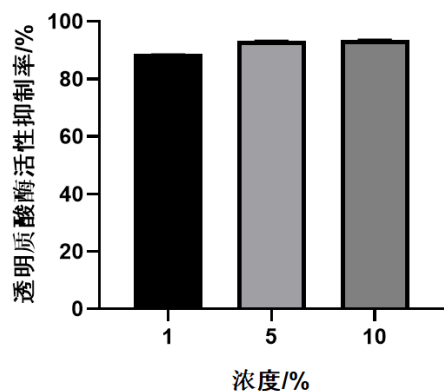


图4 透明质酸酶活性抑制率

2.4牛蒡子发酵液对弹性蛋白酶活性抑制实验结果

如图5所示，随着浓度不断升高，弹性蛋白酶活性抑制率不断升高，在10%浓度达到最高（82.3%）。因此牛蒡发酵液中某些物质能够对弹性蛋白酶活性起到抑制效果，来达到抗氧化效果。

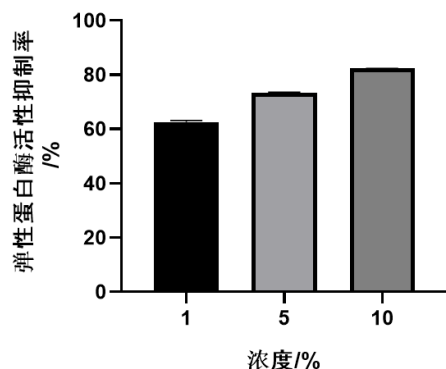


图5 弹性蛋白酶活性抑制率

2.5牛蒡子发酵液的细胞活力测定

结合图6的HaCaT细胞毒性测定结果可见，当受试物浓度分别为0.5%、1%、2%时，HaCaT活力均在90%以上。这一结果表明，在此浓度范围内，受试物对HaCaT角质形成细胞无显著毒性，具有良好的细胞相容性。

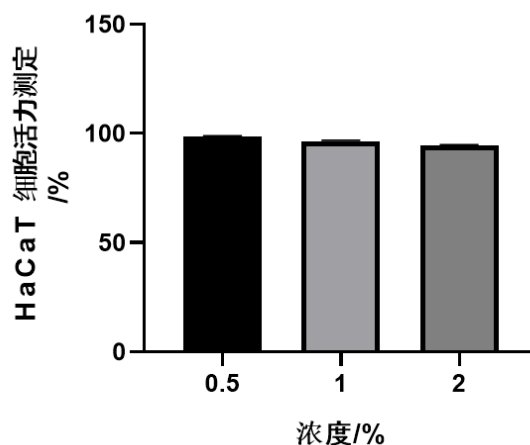


图6 HaCaT细胞毒性测定

2.6牛蒡子发酵液的细胞划痕测定

HaCaT经过不同质量浓度的牛蒡子发酵液处理后24h的细胞迁移或者修复能力如图7（比例尺为1:100，目镜10×，物镜10×）。当细胞迁移或愈合能力小于空白组时，可说明该样品对细胞有良好的增殖效果。可以看

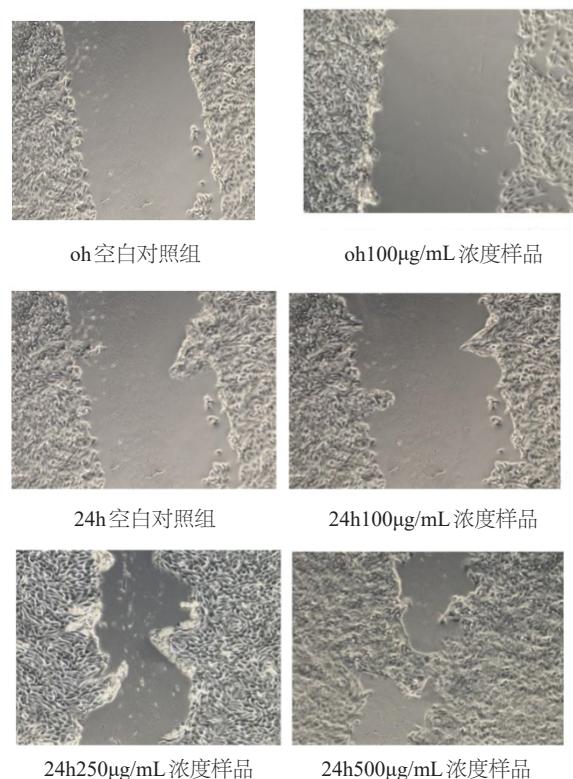


图7 细胞划痕测定

出牛蒡子发酵液对 HFF 细胞具有一定的促进增殖的作用, 尤其添加 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞活力最高。但是同样的质量浓度下牛蒡子醇提取液对 HaCaT 的活性具有较差的增殖作用, 细胞迁移能力均在同等浓度的牛蒡子发酵液之下。与空白对照组相比, 牛蒡子发酵液组划痕愈合效果明显在不断升高。因此, 牛蒡子发酵液对 HaCaT 有一定的细胞增殖修复功效, 并且在测试的浓度范围内细胞增殖效果较好, 并且性能高于牛蒡子醇提取液。综合分析初步判断牛蒡子发酵液作为一种天然的护肤原料具有良好的细胞增殖修复性^[14]。

3. 结论

牛蒡子发酵液在浓度 0.5%、1%、2% 作用于 HaCaT 细胞没有毒性, 同时通过细胞划痕实验了解到细胞迁移能力远超空白组, 说明牛蒡子发酵液具有一定的促进细胞增殖效果。说明牛蒡子具有良好的生物安全性。通过清除自由基实验, 发现牛蒡子发酵液不仅对 O_2^- 存在清除效果, 更对 OH^- 自由基清除存在效果, 说明牛蒡子发酵液存在抗氧化能力, 同时通过透明质酸酶实验以及弹性蛋白酶活性抑制实验, 进一步验证牛蒡子发酵液存在抗氧化能力。另外, 牛蒡子提取液中含有许多成分^[16], 但对于牛蒡子发酵液中具体成分含量还需进一步实验证明。

参考文献

[1] 蔡恩博, 郑小曼, 屠书梅, 等. 牛蒡子起源、分布及开发利用现状 [J]. 人参研究, 2015, 27(2): 63–64.

[2] Vlietinck A J, Brumbyrne D T, Apers S, et al. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection [J]. Planta Med, 1998, 64(2): 97–109.

[3] 龚频, 胡峰瑞, 高浩天, 等. 牛蒡子粗多糖的提取及其体外抗氧化活性研究 [J]. 陕西科技大学学报, 2022, 40(4): 60–67.

[4] Hirose M, Yamaguchi T, Lin C, et al. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats [J]. Cancer Lett, 2000, 155(1): 79–88.

[5] Song YY, Yang YY, Xu L, et al. The bioactive database: A multi-omic database for *Arctium lappa*, a food and medicinal plant [J]. BMC Plant Biol, 2023, 23(1): 86.

[6] Wang DD, Boudraha AS, Swamy MK, et al. *Arctium* species secondary metabolites chemodiversity and bioactivities [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 834.

[7] 胡珊珊. 牛蒡子的化学研究 [D]. 昆明医科大学, 2019.

[8] 叶琳琳, 陈志雄, 阮建成, 等. 竹叶发酵液美白、增强皮肤屏障和抗炎护肤功效研究 [J]. 高校化学工程学报, 2022, 37(4): 561–568.

[9] 赵丹, 许丹妮, 王冬冬, 等. 灵芝发酵液的成分检测及美白与抗衰老功效评价 [J]. 日用化学工业, 2016, 46(4): 226–230, 242.

[10] 尹丹丹, 温新宝, 袁保刚, 等. 牛蒡子提取物的抗氧化活性研究 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2011, 39(04): 201–204+210.

[11] 王永恒, 梁彦会, 孙培冬. 川芎提取物美白双靶点活性研究 [J]. 日用化学工业, 2020, 50(4): 249–254.

[12] 李婕, 温华蔚, 王仲敏. 竹醋液的抗氧化性研究 [J]. 中国口岸科学技术, 2023, 12(12): 75–79.

[13] 周慧伟, 张红霞, 高莉等. 响应面法优化酶解处理制备墨红玫瑰花还原糖的工艺 [J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(07): 46–54.

[14] 葛亮, 施洋, 曾诚, 等. 牛蒡子和毛头牛蒡子体外抑制 Hela 细胞增殖的比较研究 [J]. 新疆中医药, 2017, 35(03): 59–61.

[15] 王君, 张新, 张志萌, 等. 单宁酶处理对牛蒡提取物中抗氧化活性的影响 [J]. 食品科技, 2018, 43(05): 228–231.

[16] 秦智彬, 丁林芬, 李兰, 等. 牛蒡子化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(12): 2050–2055.

Preparation of Fermented Liquid of Burdock Fruit and Its Soothing and Antioxidant Activity

Yu Zi-han, Li Lin, Mu Ya-tao, Zhang Jing-xuan, Wang Ling*

(Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan, Shandong 250353)

Abstract : To investigate the repair and antioxidant effects of fermented *Arctium lappa* L. seed extract, experiments including free radical scavenging, hyaluronidase inhibition, elastase inhibition, and viability determination of human epidermal keratinocytes (HaCaT) were conducted using HaCaT cells as the model. The results showed that at a concentration of 5%, the fermented *Arctium lappa* L. seed extract exhibited a free radical scavenging rate of 94.82%, a hyaluronidase activity inhibition rate of 93.87%, and an elastase inhibition rate of 82.30%. Furthermore, the extract at concentrations ranging from 0.5% to 2% was non-toxic to HaCaT cells and could significantly promote cell proliferation and repair. These experiments confirmed that the fermented *Arctium lappa* L. seed extract prepared using *Saccharomyces cerevisiae* possesses repair and antioxidant effects, which lays a foundation for the scientific development and application of *Arctium lappa* L. and fermentation technology in the cosmetics field.

Keywords : fermented liquid of burdock fruit; fermentation broth; repair; antioxidant activity