

医药与日化原料

# 无患子水提液的微生物发酵纯化及无患子 乳酸杆菌发酵液抗痤疮功效

万凯波<sup>1</sup>, 陈殿松<sup>2</sup>, 马铃<sup>2</sup>, 常宽<sup>1</sup>, 王靖<sup>1\*</sup>

(1. 江南大学 化学与材料工程学院 化妆品创新中心, 江苏 无锡 214122; 2. 阿道夫科研创新实验室 广州德谷个人护理用品有限公司, 广东 广州 510000)

**摘要:** 无患子 (*Sapindus mukorossi* Gaertn) 提取液常作为一种天然活性原料添加到洗护产品中, 为推进无患子提取液在日化行业的应用, 采用微生物发酵法对无患子水提液进行纯化, 以多糖质量浓度和皂苷质量分数为指标, 筛选出植物乳酸杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 作为发酵菌株, 制得了无患子乳酸杆菌发酵液 (SF)。从皮脂、炎症和致病菌的过度繁殖 3 个方面, 研究了 SF 的抗痤疮功效。结果显示, 质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$  的 SF 对 SZ95 细胞脂质合成率降低 26.4%, 对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW 264.7 细胞的 NO、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 和活性氧 (ROS) 表达量分别降低了 52.3%、57.5%、56.2% 和 35.9%; 采用二倍稀释法测定了 SF 对痤疮丙酸杆菌、糠秕马拉色菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度分别为 3.125、12.5 和 6.25 g/L; 人体功效评价结果显示, 受试者面部痤疮情况显著改善。

**关键词:** 无患子发酵液; 痤疮; 控油; 抑菌; 抗炎; 医药原料

中图分类号: TQ658; Q815 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 05-1076-08

## Microbial fermentation purification of *Sapindus mukorossi* extract solution and anti-acne effect of *Lactobacillus Sapindus* fermentation broth

WAN Kaibo<sup>1</sup>, CHEN Diansong<sup>2</sup>, MA Ling<sup>2</sup>, CHANG Kuan<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1\*</sup>

(1. Cosmetic Innovation Center, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Adolf Research Innovation Laboratory, Guangzhou Degu Personal Care Products Co., Ltd., Guangzhou 510000, Guangdong, China)

**Abstract:** *Sapindus mukorossi* Gaertn extracts was often added into care products as a natural active raw material. In order to promote the application of *Sapindus mukorossi* Gaertn extracts in daily chemical industry, the water extract was purified by microbial fermentation method. *Sapindus mukorossi* fermentation liquid (SF) was then prepared using *Lactobacillus plantarum* as fermentation strain, which was selected based on polysaccharide mass concentration and saponin mass fraction, and evaluated for its anti-acne performance from the aspects of sebum, inflammation and overgrowth of pathogenic bacteria. The results showed that SF with a mass concentration of 20  $\mu\text{g/mL}$  led to a reduction in the lipid binding rate of SZ95 cells by 26.4%, and NO, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and reactive oxygen (ROS) in RAW 264.7 cells induced by lipopolyaccharide (LPS) by 52.3%, 57.5%, 56.2% and 35.9%, respectively. Moreover, the SF exhibited a minimum inhibitory mass concentration, which were measured by double dilution method, against *Propionibacterium acnes*, *Malassezia furfur* and *Staphylococcus aureus* of 3.125, 12.5 and 6.25 g/L, respectively. Data from the human efficacy evaluation revealed that the facial acne situation was significantly improved.

**Key words:** *Sapindus mukorossi* fermented liquid; acne; sebum control; bacteriostasis; anti-inflammatory; drug materials

收稿日期: 2023-06-01; 定用日期: 2023-07-31; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230437

作者简介: 万凯波 (2000—), 男, 硕士生, E-mail: 2304363730@qq.com。联系人: 王靖 (1988—), 男, 教授, E-mail: jingwang@jiangnan.edu.cn。

无患子 (*Sapindus mukorossi* Gaertn) 是一种落叶大乔木, 在中国福建、海南等地广泛种植, 其果皮部分有去头屑、油脂的功能。在现代合成洗涤剂还未发明之前, 民间将无患子果皮制作成肥皂用于日常的洗涤。无患子果皮中含有丰富的蛋白、多糖、皂苷等<sup>[1]</sup>, 其中皂苷类物质质量分数为 15% 以上, 常作为一种天然植物表面活性剂添加到洗护产品中<sup>[2-3]</sup>。

据报道, 无患子皂苷具有抗炎、抑菌、抗肿瘤等功效<sup>[4]</sup>, 但是目前市面上无患子提取液皂苷纯度低, 大大限制了其功效的发挥。微生物发酵法<sup>[5]</sup>是一种全新的纯化方法, 一些通过物化方法较难除去的大分子物质可通过微生物代谢作用除去, 以达到浓缩有效成分的作用; 此外, 多糖、蛋白等生物大分子物质经过微生物降解后产生的活性肽、寡糖和微生物代谢产物还表现出其他生物活性<sup>[6]</sup>。

本研究拟采用微生物发酵法纯化无患子皂苷, 以无患子水提液作为发酵底物, 利用微生物的代谢作用, 消耗水提液中多糖等物质, 达到纯化皂苷的目的, 筛选菌种并制备无患子植物菌发酵液。同时, 从痤疮的 3 个诱因皮脂、炎症和致病菌的过度增殖为出发点, 考察无患子植物菌发酵液的控油、抗炎和抑菌功效, 以期弥补无患子发酵液在抗痤疮领域研究的不足, 为开发与制备无患子发酵成分相关的化妆品原料提供理论支撑。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

无患子果皮, 福建源容生物科技有限公司; SZ95 细胞株, 由德国柏林自由大学医学院 Zouboulis 教授馈赠; RAW 264.7 细胞株、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、植物乳酸杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 北纳创联生物技术有限公司; 痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、糠秕马拉色菌 (*Malassezia furfur*)、假丝酵母菌 (*Candida bombicola*), 上海保藏生物技术中心; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基、青霉素混合液、胰蛋白酶, 美国 Hyclone 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 质量分数 98%)、二甲亚砜 (DMSO), 上海 Sigma-Aldrich 贸易有限公司; 尼罗红, 北京伊诺凯有限公司; 油酸、亚油酸、米诺环素、蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、柠檬酸三铵、乙酸钠、七水合硫酸镁、硫酸锰、三水合磷酸氢二钾、吐温 80、大豆胨、氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 酵母粉、胰蛋白胨、葡萄糖、可溶性淀粉、L-半胱氨酸盐酸盐, 泰坦科技探索平台; 脂多糖 (LPS)、一氧化氮

(NO)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6)、酶联免疫 (ELISA) 检测试剂盒、活性氧 (ROS) 试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司。以上化学试剂均为分析纯。

面部皮肤检测仪 (VISIA), 北京金宏帆商贸有限责任公司; UV1900/UV1901 紫外-可见分光光度计, 上海赫尔普国际贸易有限公司; HH-1 数显恒温水浴锅, 江苏科析有限公司; Forma3111 细胞培养箱, 美国 Thermo Fisher 仪器公司; Tecan Infinite 200 PRO 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 集团; Synergy H4 多功能酶标仪, 美国 Bio Tek 仪器有限公司; FACS Aria III 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

### 1.2 无患子乳酸菌发酵液的制备

#### 1.2.1 无患子水提液的制备

称取 1 kg 无患子果皮用粉碎机粉碎后, 干燥后粉碎, 筛分 20~40 目粉末, 加入 5 L 去离子水后于 70 °C 提取 5 h, 结束后用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 得到 4 L 无患子水提液。

#### 1.2.2 菌种筛选

植物乳酸杆菌培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母粉 4 g, 柠檬酸三铵 2 g, 乙酸钠 5 g, 七水合硫酸镁 0.2 g, 硫酸锰 0.04 g, 三水合磷酸氢二钾 2 g, 吐温 80 1 g, 无患子水提液 1 L。

枯草芽孢杆菌培养基: 胰蛋白胨 17 g, 大豆胨 3 g, 氯化钠 5 g, 三水合磷酸氢二钾 2.5 g, 无患子水提液 1 L。

假丝酵母菌培养基: 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 无患子水取液 1 L。

分别将植物乳酸杆菌 (ATCC 8014)、枯草芽孢杆菌 (BNCC 194629)、假丝酵母菌 (ATCC 22214) 接种到对应培养基, 于 37 °C、220 r/min 摇床中培养 4 d, 得到发酵液, 并每天测定发酵液的多糖质量浓度和皂苷质量分数, 多糖质量浓度采用蒽酮硫酸法测量; 皂苷质量浓度采用香草醛-浓硫酸法测量<sup>[7]</sup>。按公式 (1) 计算皂苷质量分数:

$$w_G/\% = \frac{\rho_1}{\rho_2} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $w_G$  为皂苷质量分数, %;  $\rho_1$  为皂苷的质量浓度, g/L;  $\rho_2$  为提取液中可溶性固形物质量浓度 (采用烘箱恒重法), g/L。

### 1.3 无患子乳酸杆菌发酵液控油功效测定

#### 1.3.1 SZ95 细胞培养

将保存的 SZ95 细胞株复苏后, 用含质量分数 10% 胎牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素、质量浓度 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。当细胞贴壁生长, 汇合度超 80% 时, 用胰蛋白酶进行消化传代,

取对数生长期细胞用于实验。

### 1.3.2 MTT 法测 SZ95 细胞活力

为了确定无患子乳酸杆菌发酵液 (SF) 和 OL (油酸、亚油酸混合物, 两者物质的量之比 1:1)<sup>[8]</sup> 处理后对细胞生长和活力的毒性作用, 将细胞用不同质量浓度的 SF 和不同浓度的 OL 处理 48 h (实验组), DMEM 高糖培养基作为对照组, MTT 法测定细胞活力。检测时加入质量浓度为 0.5 g/L 的 MTT 工作液, 于 37 °C 避光孵育 4 h, 使用酶标仪测定溶液在 490 nm 处的吸光度 (OD), 每组 3 个复孔。根据公式 (2) 计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{OD}_{490\text{实验}} - \text{OD}_{490\text{调零}}}{\text{OD}_{490\text{对照}} - \text{OD}_{490\text{调零}}} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $\text{OD}_{490\text{实验}}$ 、 $\text{OD}_{490\text{对照}}$ 、 $\text{OD}_{490\text{调零}}$  分别代表样品组、对照组和空板在酶标仪 490 nm 处的吸光度。

### 1.3.3 尼罗红染色法检测 SZ95 细胞内中性脂质

油酸、亚油酸以及棕榈酸等是一类典型的脂质刺激物<sup>[9-10]</sup>, 通过上调过氧化物酶体增殖物激活受体刺激脂肪细胞分化, 促进皮脂细胞脂质的合成<sup>[11-12]</sup>。采用尼罗红染色法定量检测 SZ95 细胞中的脂质, 以 DMEM 高糖培养基作为对照组, OL 作为刺激物模型组, 不同质量浓度 SF 和 160  $\mu\text{mol/L}$  的 OL 共处理为实验组, 孵育 48 h。检测时加入质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  尼罗红工作液, 于 37 °C 黑暗环境中孵育 15 min, 使用酶标仪测定溶液在 485 nm 激发波长、565 nm 发射波长下的荧光强度 (FI), 每组 3 个复孔。按公式 (3) 计算 SF 对 SZ95 细胞脂质的合成率。

$$\text{脂质合成率}/\% = \frac{\text{FI}_{\text{实验}} - \text{FI}_{\text{调零}}}{\text{FI}_{\text{对照}} - \text{FI}_{\text{调零}}} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $\text{FI}_{\text{实验}}$ 、 $\text{FI}_{\text{对照}}$ 、 $\text{FI}_{\text{调零}}$  分别代表实验组、对照组和空板在 485 nm 激发波长、565 nm 发射波长下的荧光强度。

## 1.4 SF 抗炎功效测定

### 1.4.1 RAW 264.7 细胞的培养

将保存的 RAW 264.7 细胞株复苏后, 用质量分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养。当细胞贴壁生长, 汇合度超过 80% 时, 取对数生长期细胞用于实验。

### 1.4.2 MTT 法测 RAW 264.7 细胞活力

为了确定 SF 和 LPS 处理后对细胞生长和活力的毒性作用, 将细胞用不同质量浓度的 SF 和 1  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS 处理 48 h (实验组), DMEM 高糖培养基作为对照组, 并根据公式 (2) 计算细胞存活率。

### 1.4.3 LPS 诱导细胞炎症模型的建立

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的组成成分,

是典型的能够诱导巨噬细胞活化、分泌多种炎症因子的刺激物。首先以炎症介质 NO 的分泌为指标, 建立炎症模型, 考察 SF 的抗炎功效<sup>[13]</sup>。以 DMEM 高糖培养基作为对照组、质量浓度 1  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS 刺激物为模型组、LPS 和不同质量浓度的 SF 为实验组, 培养 24 h 后, 吸取上清液, 按照 NO 试剂盒操作, 测定 NO 浓度。

### 1.4.4 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ROS 含量的检测

细胞分组及加药刺激流程参考 1.4.3 节。加药共孵育 24 h 后, 收集各组上清培养液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测 SF 对细胞释放炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ROS 含量的影响。

## 1.5 SF 抑菌活性测定

### 1.5.1 供试菌种培养基

痤疮丙酸杆菌 (ATCC 6919) 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 葡萄糖 5 g, 氯化钠 5 g, 酵母膏 3 g, 乙酸钠 3 g, 可溶性淀粉 1 g, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 去离子水 1 L。

糠秕马拉色菌 (ATCC 14521) 培养基: 麦芽汁琼脂 60 g, 牛胆汁 20 g, 吐温 40 10 g, 甘油单油酸酯 2.5 g, 去离子水 1 L。

金黄色葡萄球菌 (BNCC 186335) 培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5.0 g, 去离子水 1 L。

用液体培养基将 3 种菌液调整为  $1 \times 10^7$  CFU/mL, 用于传代或实验。抑菌实验需将所用工具、器皿进行高压蒸汽灭菌处理。

### 1.5.2 最小抑菌质量浓度的测定

参照文献[14], 采用二倍稀释法测定最小抑菌质量浓度 (MIC) 值, 以空白培养基作阴性对照, 米诺环素作阳性对照<sup>[15]</sup>, 样品及对照分别作 3 个平行实验。

## 1.6 含无患子发酵产物驻留型产品的功效评价

### 1.6.1 用于功效评价的产品配方

人体功效评价的配方如表 1 所示。

表 1 用于功效评价测试的样品配方  
Table 1 Formulas for efficacy evaluation

	实验组质量分数/%	对照组质量分数/%
1,3-丁二醇	2	2
甘油	2	2
对羟基苯乙酮	0.5	0.5
SF	5	—
水	90.5	90.5

注: 样品配方的总质量为 100 g; “—” 代表未添加。

### 1.6.2 受试者纳入与排除标准

入选标准: 年龄 20~35 岁, 痤疮患者, 无化妆

品过敏史, 无严重系统疾病。

排除标准: 目前已经参加其他临床实验; 2 周内口服和外用其他可能对实验结果产生影响的美容产品(皮质类固醇激素、抗生素、维 A 酸等); 患有皮肤病临床未愈者; 测试区域接受过激光美容或化学换肤。

最终纳入测试的有效人数为 30 人。本研究严格遵循赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki), 所有受试者了解整个实验目的和过程, 并签署知情同意书。

### 1.6.3 测试方法

测试周期为 5 d, 志愿者早晚清洁脸部后, 左脸涂抹适量含 SF 样品(实验组), 右脸涂抹适量不含 SF 的样品(对照组), 按摩至吸收, 每日早晚各一次。测试期间志愿者不得再使用其他护肤品。

### 1.6.4 测试指标

油脂分泌量: 表征面部皮脂含量, 数值越小说明皮肤分泌的油脂越少。

红区百分比(亦称占比): 表征皮肤红度值, 红区占比下降代表抗炎舒缓效果好, 具有痘印修复能力。

面部卟啉值: 通过 VISIA 拍摄受试者面部图像, 利用软件 Image Pro Plus 分析面部卟啉值, 面部卟啉值表征面部微生物的代谢活跃程度。

面部成像: 通过 VISIA 拍摄受试者面部图像, 对比测试前后的图片。

## 1.7 统计学方法

体外细胞实验以及体内实验结果运用 GraphPad Prism8 统计软件的单因素方差分析进行显著性检验。与空白组相比, “\*”代表  $P < 0.05$ , “\*\*”代表  $P < 0.01$ , “\*\*\*”代表  $P < 0.001$ ; 与模型组相比, “#”代表  $P < 0.05$ , “##”代表  $P < 0.05$ , “###”代表  $P < 0.001$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 无患子发酵液的制备

#### 2.1.1 菌株筛选

按 1.2.2 节步骤测试不同菌种下发酵液中多糖质量浓度的变化以及乳杆菌发酵后发酵液中皂苷的质量分数变化, 结果见图 1。

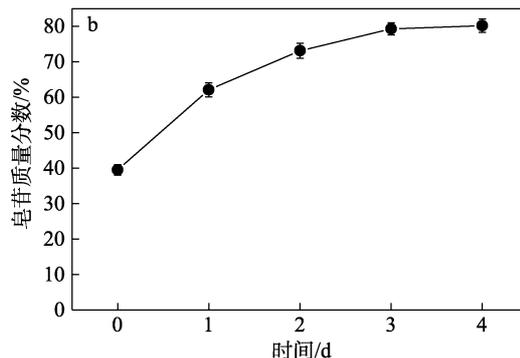
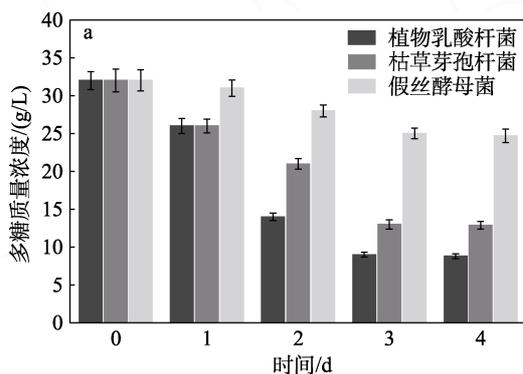


图 1 不同发酵液中多糖质量浓度(a)和 SF 中皂苷质量分数(b)随发酵天数的变化

Fig. 1 Change of mass concentration of polysaccharide (a) and mass fraction of saponin (b) in fermentation solution with fermentation days

菌种是多糖发酵中的关键因素, 菌种的合适与否直接关系到多糖的降解率。如图 1a 所示, 植物乳酸杆菌显示出较高的除糖活性, 发酵 4 d 后多糖的质量浓度从未发酵的 32 g/L 降低到 8 g/L, 皂苷质量分数提高到 80.2% (图 1b), 原因可能是无患子水提液中的糖和蛋白等营养物质被植物乳酸杆菌生长所利用, 而皂苷类成分被利用较少, 因此, 皂苷质量分数明显提高。后续功效测试均使用无患子乳酸菌发酵液。

#### 2.1.2 SF 理化指标

以植物乳酸杆菌为发酵菌株, 发酵 4 d 后, 制得的 SF 为棕红色液体, pH=4.8, 可溶性固形物质量浓度为 58 g/L, 菌落总数  $< 100$  CFU/mL (采用平板计数法), 无致病菌检出。根据化妆品卫生标准 GB 7916—1987, SF 符合化妆品质量要求<sup>[16]</sup>。

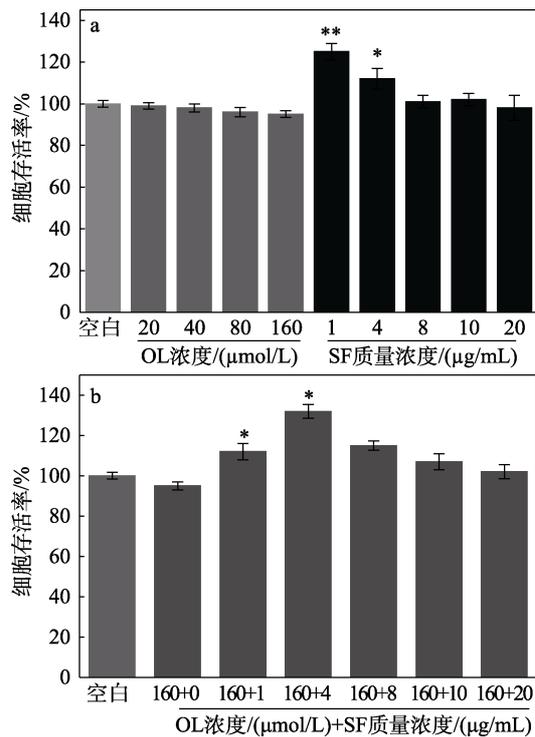
### 2.2 SF 控油功效

在评估 SF 抑制皮脂分泌功效前, 首先采用 MTT 法检测了无患子发酵产物 SF 及造模刺激物 OL 对 SZ95 的细胞毒性, 以避免细胞存活率对后续实验结果的影响, 结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出, 浓度为 20~160  $\mu\text{mol/L}$  的 OL 及质量浓度为 1~20  $\mu\text{g/mL}$  的 SF 以及两者共孵育对 SZ95 均没有显著细胞毒性; 此外, 低质量浓度 SF 对 SZ95 细胞有一定的增殖作用, 这可能是因为发酵滤液中可能含有促进细胞生长的活性成分, 如核苷酸、维生素和肽等, 适宜质量浓度 SF 的添加有助于细胞的生长<sup>[17]</sup>。

皮脂过度分泌是导致痤疮的主要因素之一, 采用 SZ95 模型研究了 SF 抑制皮脂分泌的功效, 结果见图 3a。图 3a 结果显示, SF 能够抑制 SZ95 细胞脂质的合成, 质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$  的 SF 对 SZ95 细胞的脂质合成率降低 26.4%, 且这种抑制作用呈现剂量依赖的趋势。猜测 SF 中高质量分数的无患子皂苷可能是抑制皮脂分泌的主要活性成分。据报道, 人参皂苷 Rb1 能够减轻肥胖小鼠体重<sup>[18]</sup>; 芜菁皂苷可以预防大鼠肥胖<sup>[19]</sup>; 苦瓜皂苷具有缓解秀丽隐线

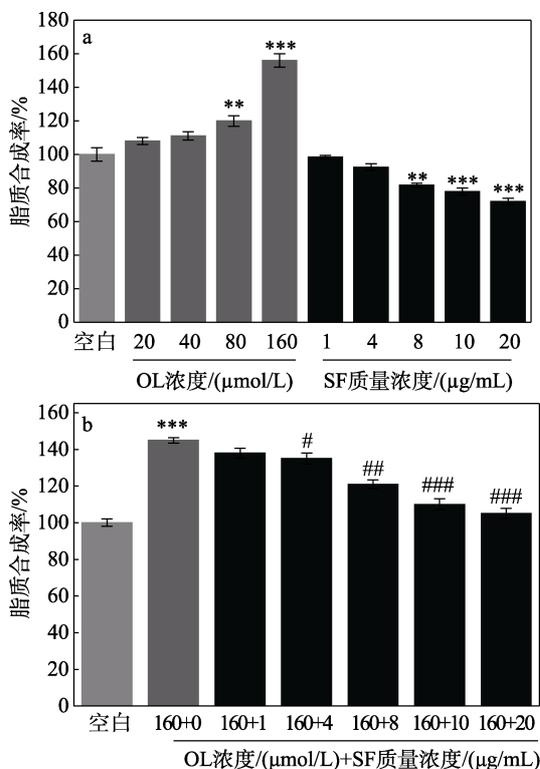
虫脂肪堆积的功效<sup>[20]</sup>。



a—不同质量浓度 SF 和不同浓度 OL 单独孵育 SZ95 细胞毒性；  
b—160  $\mu\text{mol/L}$  OL 和不同质量浓度 SF 共孵育 SZ95 细胞毒性

图 2 SF 及 OL 对 SZ95 细胞存活率的影响

Fig. 2 Effects of SF and OL on viability of SZ95 cells



a—不同质量浓度 SF 和不同浓度 OL 单独处理 SZ95 细胞脂质合成率；  
b—160  $\mu\text{mol/L}$  OL 和不同质量浓度 SF 刺激下的 SZ95 细胞脂质合成率

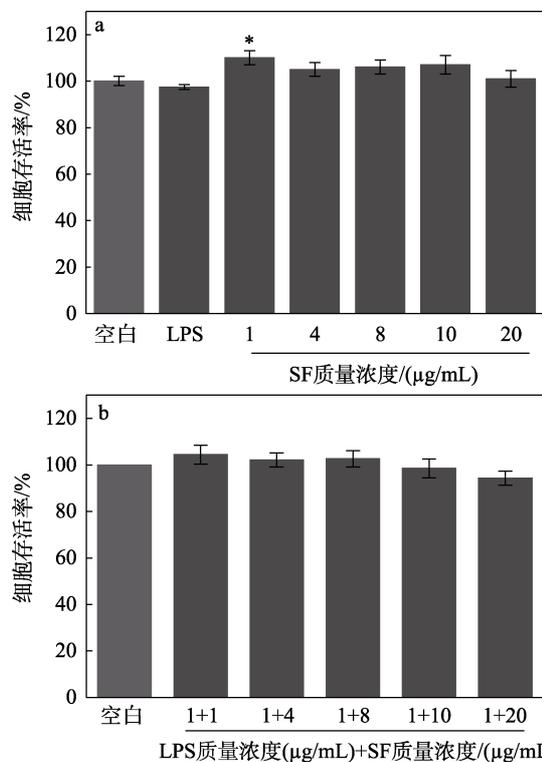
图 3 SF 及 OL 对 SZ95 细胞脂质合成率的影响

Fig. 3 Effects of SF and OL on lipid synthesis in SZ95 cells

本文进一步研究了在 OL 刺激的条件下 SF 对 SZ95 细胞脂质分泌的抑制作用，如图 3b 所示，一定浓度的 OL 能够显著促进 SZ95 细胞脂质合成，浓度为 160  $\mu\text{mol/L}$  的 OL 使 SZ95 细胞脂质合成率增加 48.4%。在浓度为 160  $\mu\text{mol/L}$  的 OL 刺激的条件下，添加不同质量浓度的 SF 测定其对 SZ95 细胞脂质分泌的抑制作用，结果见图 3b。发现 SF 能够有效地缓解 OL 带来的脂质过度合成，质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$  的 SF 对 SZ95 细胞脂质分泌抑制率(脂质合成率从未添加 SF 的 141.4%降为 116.7%)达 24.7% (统计显著性  $P < 0.001$ )。由此推测，SF 抑制皮脂分泌的机理可能是通过下调过氧化物酶体增殖物激活受体，抑制脂质的合成<sup>[21]</sup>。

### 2.3 SF 抗炎功效

研究表明，痤疮的发生与免疫和炎症的发生息息相关<sup>[22]</sup>，过度的免疫反应是造成痤疮患者在皮损组织修复后留下瘢痕的主要原因，抑制炎症反应的发展有利于抑制面部瘢痕的形成<sup>[23]</sup>。本研究采用 RAW 264.7 细胞模型研究了 SF 抑制 LPS (质量浓度 1  $\mu\text{g/mL}$ ) 诱导的炎症水平<sup>[24]</sup>。首先采用 MTT 法检测了 SF 及 LPS 对 RAW 264.7 的细胞毒性，以避免细胞存活率对后续实验结果的影响，结果见图 4。如图 4a 所示，LPS (质量浓度 1  $\mu\text{g/mL}$ ) 以及质量浓度在 1~20  $\mu\text{g/mL}$  的 SF 对 RAW 264.7 均没有细胞毒性。图 4b 显示，LPS 与不同质量浓度 SF 共处理细胞后，细胞存活率仍然大于 90%。



a—LPS 及不同质量浓度 SF 细胞毒性；b—质量浓度 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 及不同 SF 共孵育的细胞毒性

图 4 SF 及 LPS 对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Fig. 4 Effects of SF and LPS on cell viability of RAW 264.7

RAW 264.7 受刺激后可分泌各种炎症介质和促炎细胞因子, 包括 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等。NO 是氧化应激反应的主要介质, 可参与调节炎症反应, 过量的 NO 分泌会与超氧阴离子反应生成过氧亚硝酸盐, 导致局部组织损伤, 进一步加剧炎症<sup>[25]</sup>。如图 5a 所示, 质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 能够诱导 RAW 264.7 大量分泌 NO, 不同质量浓度的 SF 能够缓解 LPS 刺激带来的 NO 水平表达, 说明炎症模型建立成功。

IL-6、TNF- $\alpha$ 、ROS 是典型的炎症细胞因子, 它们的高水平表达会加剧细胞凋亡及组织损伤<sup>[26]</sup>。用试剂盒检测 SF 对 3 种炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-6、ROS) 表达量的影响, 结果如图 5b~d 所示。

与模型组相比, 质量浓度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SF 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 ROS 的水平分别降低了 52.3%、57.5%、56.2%、35.9%, 且这种抑制作用呈剂量依赖性。

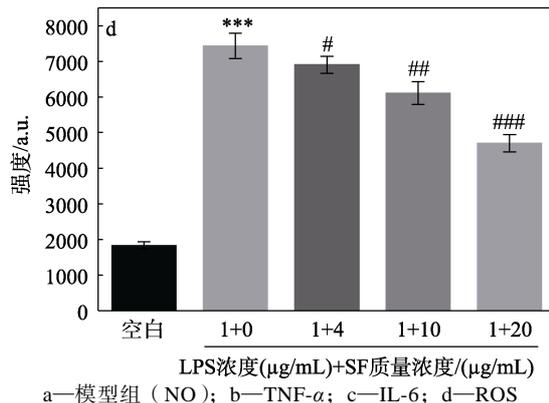
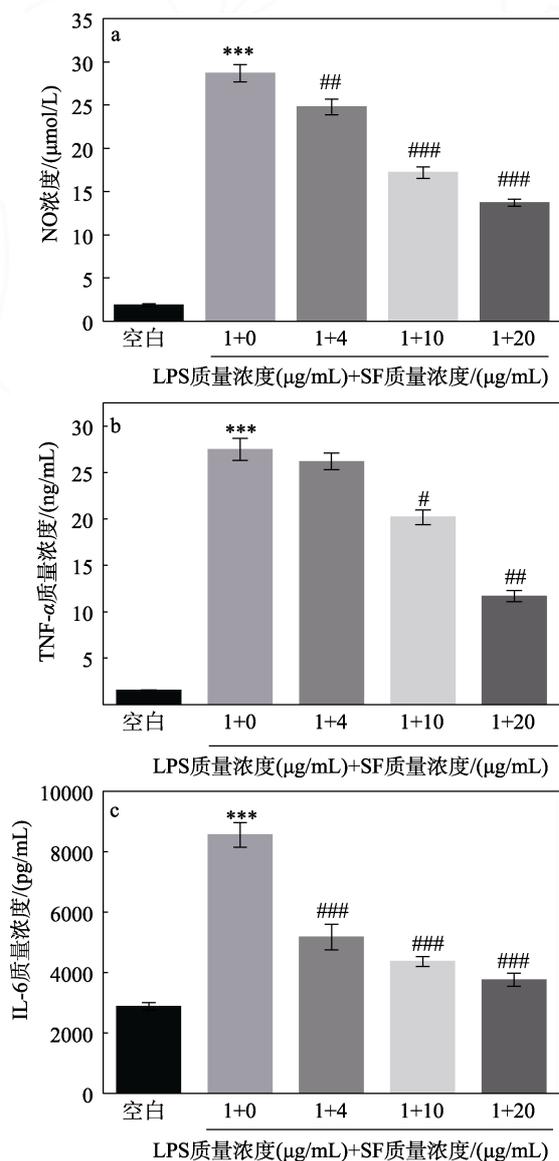


图 5 SF 对炎症因子表达量的影响

Fig. 5 Effect of SF on expression of inflammatory factors

经过 LPS 诱导的 RAW 264.7 炎症模型组, 在 LPS 刺激下产生了 NO 等炎症因子, 而 SF 有效地扭转了此影响, 这可能是由于 SF 中含有的乳酸通过 NF- $\kappa$ B 等信号通路调节炎症因子的水平, 浓度为 10~20 mmol/L 范围内的乳酸已被证明可以调节 LPS 诱导的单核细胞激活<sup>[27]</sup>。

### 2.4 SF 抑菌活性测定

痤疮丙酸杆菌的过度繁殖被认为是痤疮的主要诱因之一, 其可以通过激活促肾上腺皮质激素释放激素使皮脂分泌旺盛, 抑制痤疮丙酸杆菌的过度生长是大多数治疗痤疮的思路和方法。本研究采用二倍稀释法, 测量 SF 的 MIC 值, 结果见表 2。在酶标仪 600 nm 处测定变化值 < 0.05 视为无细菌生长<sup>[10]</sup>。

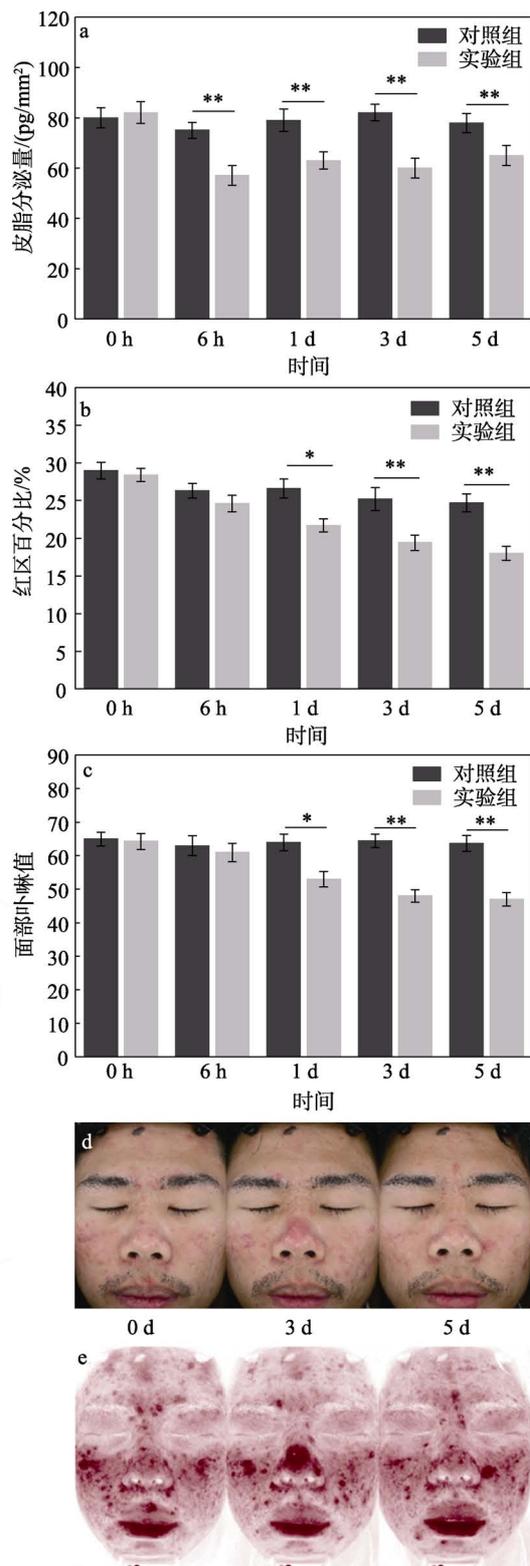
表 2 MIC 值测定结果  
Table 2 Results of determination of MIC values

菌种	MIC/(g/L)	
	米诺环素	SF
痤疮丙酸杆菌	3.125	3.125
金黄色葡萄球菌	0.78	6.25
糠秕马拉色菌	6.25	12.5

由表 2 可知, SF 对 3 种菌的 MIC 值分别为 3.125、6.25、12.5 g/L。结果表明, 在体外抑菌实验中一定浓度的 SF 对真菌及细菌均有一定的抑制作用, 相比于真菌, 对细菌的抑制作用更强。对于痤疮丙酸杆菌, SF 表现出与米诺环素 (阳性对照, 一种经典的抗痤疮药物<sup>[15]</sup>) 相当的抑菌活性。

### 2.5 SF 的人体功效评价

皮肤表面的皮脂量变化可以反映出测试周期内产品的控油效果, 如图 7a 所示, 使用 SF 在 6 h 和 1、3、5 d 后, 实验组志愿者皮脂分泌量相比对照组降低了 24.7%、20.3%、26.9%、17.7%。



a—皮脂分泌量；b—红区百分比；c—面部卟啉值；d—受试者面部变化；e—受试者面部红区变化

图 6 含 SF 产品的人体功效评价

Fig. 6 Human efficacy evaluation of products containing SF

皮肤红区占比越大，说明粉刺越严重，皮肤越敏感。由图 7b 可知，使用 SF 在 6 h 和 1、3、5 d 后，实验组志愿者皮肤红区占比相比对照组降低了 11.1%、15.3%、19.2%、18.5%。经过差异性统计学

分析，实验组仅在 6 h 时皮肤红区与对照组无显著差异。

卟啉是一类由皮肤微生物代谢后产生的物质，在紫外光的激发下会发生荧光，常用于反映面部微生物生长繁殖情况。图 7c 显示，使用 SF 在 6 h 和 1、3、5 d 后，实验组志愿者面部卟啉相比对照组降低了 5.7% 和 17.2%、25.6%、26.3%，实验组仅在 6 h 时皮肤红区与对照组无显著差异。

图 7d、e 展示了志愿者面部痤疮及红区情况。可以看出，随着 SF 使用时间的延长，志愿者“左脸”（实验组）痤疮和红区占比逐渐减少，志愿者“右脸”（对照组）痤疮情况未见改善趋势。上述人体功效评价结果说明，含质量分数 5% SF 的产品具有一定的控油、舒缓、抑菌功效。

### 3 结论

以植物乳酸杆菌为发酵菌株，制得 pH=4.8、可溶性固形物质量浓度为 58 g/L 的 SF，并从痤疮的三大诱因皮脂、炎症和致病菌的过度增殖评估 SF 作为一款抗痤疮原料的潜力。在控油功效评价中，质量浓度为 20 μg/mL 的 SF 对 SZ95 细胞脂质合成率降低 26.4%，OL 刺激下其对脂质分泌抑制率达 24.7%；在抗炎功效评价中，质量浓度为 20 μg/mL 的 SF 有效缓解了 LPS 诱导的炎症因子水平的上升，NO、TNF-α、IL-6 和 ROS 的水平分别降低了 52.3%、57.5%、56.2%、35.9%；SF 对痤疮丙酸杆菌、糠秕马拉色菌和金黄色葡萄球菌表现出较强的抑菌活性，MIC 值分别为 3.125、12.5、6.25 g/L；在人体功效评价中，使用含 SF 产品 5 d 后面部皮脂、红区和卟啉均有显著性改善。

本研究为无患子发酵液在抗痤疮方面的利用提供了依据，为开发发酵成分相关化妆品原料提供了理论支撑。下一步可具体研究 SF 中各组分对应的功效，并深入挖掘其作用机理。

### 参考文献：

- [1] WANG Q (王强). Foam separation and purification of saponin from *Sapindus* and its application in antibacterial detergent[D]. Xiamen University (厦门大学), 2019.
- [2] MUNTAHA S T, KHAN M N. Natural surfactant extracted from *Sapindus mukorossi* as an eco-friendly alternate to synthetic surfactant-A dye surfactant interaction study[J]. Journal of Cleaner Production, 2015(93): 145-150.
- [3] LEI F L (雷发玲), XIAO L (肖蕾), YAO C Y (么春艳), et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of saponin from *Sapindus mukorossi*[J]. Chinese Wild Plant Resources (中国野生植物资源), 2020, 39(7): 9-13.
- [4] YAO W L (姚卫蓉), WU H (伍恒), WEI M P (魏敏平), et al. Analysis on the bioactivity and development of *Sapindus* saponins[J]. China Cleaning Industry (中国洗涤用品工业), 2017(4): 32-36.
- [5] WU H, ZHANG L, WANG N, et al. Extraction and fermentation-based purification of saponins from *Sapindus mukorossi* Gaertn[J].

- Journal of Surfactants & Detergents, 2015, 18(3): 429-438.
- [6] JUNG J, JANG H J, EOM S J, *et al.* Fermentation of red ginseng extract by the probiotic *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P: Ginsenoside conversion and antioxidant effects[J]. Journal of Ginseng Research, 2019, 43(1): 20-26.
- [7] SU X Y (苏曦瑶). Study on extraction and decolorization of *Sapindus Saponins*[D]. Xiamen: Xiamen University (厦门大学), 2017.
- [8] SHEN H C (沈胡驰), YANG L (杨莉), CHEN D S (陈殿松), *et al.* Study on decolorization and oil control of tea saponin[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2022, 52(5): 486-492.
- [9] ZOUBOULIS C C, DEGITZ K. Androgen action on human skin-from basic research to clinical significance[J]. Experimental Dermatology, 2004, 13(4): 5-10.
- [10] ZOUBOULIS C C, SSHAGEN S, ALESTAS T, *et al.* The sebocyte culture: A model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhea, seborrhoea and acne[J]. Archives of Dermatological Research, 2008, 300(8): 397-413.
- [11] WROBEL A, SELTMANN H, FINMMEL S, *et al.* Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2003, 120(2): 175-181.
- [12] IWATA C, AKIMOTO N, SATO T, *et al.* Augmentation of lipogenesis by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  in hamster sebaceous glands: Identification of cytochrome P-450-mediated 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  production[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2005, 125(5): 865-872.
- [13] ISHII M, NAKAHARA T, ARAHO D, *et al.* Glycolipids from spinach suppress LPS-induced vascular inflammation through eNOS and NK- $\kappa$ B signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 91: 111-120.
- [14] ZHANG Z Z. Extraction, separation and bioactivity of total flavonoids from *Fenugreek* seeds[D]. Hefei: Anhui Agricultural University (安徽农业大学), 2021.
- [15] WU Z Q (吴志强), WANG H (王欢), KUANG L (旷翎), *et al.* Clinical characteristics and drug resistance analysis of 86 clinical isolates of *Propionibacterium acnes*[J]. China Journal of Modern Medicine (中国现代医学杂志), 2023, 33(11): 50-56.
- [16] YAN Y Q (闫雅倩), ZHANG Y Z (张玉芝), FU H (付豪), *et al.* Cosmetic efficacy evaluation of *Hemerocallis citrina* Baroni fermentation broth[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(5): 1073-1081.
- [17] WANG F L (王凤楼), CHONG A, LI J (李俊), *et al.* Isolation of Himalayan soil yeast and efficacy of its fermentation filtrate on skin cell[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2022, 52(12): 1314-1319.
- [18] LIN N, CAI D L, JIN D, *et al.* Ginseng panaxoside Rb1 reduces body weight in diet-induced obese mice[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, 68(1): 189-194.
- [19] CHEN Z J (陈志娟), JIANG S P (蒋思萍), FENG C (冯成), *et al.* Anti-obesity and hypolipidemic mechanism of total saponins from *Brassica rapa* L. in high-fat diet induced obese rats[J]. Sichuan Journal of Zoology (四川动物), 2014, 33(2): 279-282.
- [20] LIN C, LIN Y, CHEN Y, *et al.* Effects of *Momordica* saponin extract on alleviating fat accumulation in *Caenorhabditis elegans*[J]. Food & Function, 2019, 10(6): 3237-3251.
- [21] TENG F (滕菲), LI X W (李祥激), LI M (李敏), *et al.* Components and lipid-lowering effect of total saponins from underground part of *Gynostemma pentaphyllum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2022, 47(18): 5022-5031.
- [22] FARRAR M D, INGHAM E. Acne: Inflammation[J]. Clinics in Dermatology, 2004, 22(5): 380-384.
- [23] DRENO B, GOLLNICK H, KANG S, *et al.* Understanding innate immunity and inflammation in acne: Implications for management[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2015, 29(4): 3-11.
- [24] WANG R, WANG N, HAN Y, *et al.* Dulaglutide alleviates LPS-induced injury in cardiomyocytes[J]. ACS Omega, 2021, 6(12): 8271-8278.
- [25] MIN S Y, PARK C H, YU H W, *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic effects of saponarin and its impact on signaling pathways of RAW 264.7, RBL-2H3, and HaCaT cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8431.
- [26] NAGATA J, YOKODERA H, MAEDA G, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies on anti-inflammatory effects of traditional okinawan vegetable methanol extracts[J]. ACS Omega, 2019, 4(13): 15660-15664.
- [27] WATANABE T, NISHIO H, TANIGAWA T, *et al.* Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: Involvement of lactic acid[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2009, 297(3): 506-513.

(上接第 1059 页)

- [24] PROMMUAK C, DE-EKANMKUL W, SHOTIPRUK A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts[J]. Separation & Purification Technology, 2008, 62(2): 444-448.
- [25] ABUDUREHEMAN B. Optimization of flavonoid extraction from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge flowers, and the antioxidant and antibacterial capacity of the extract[J]. Molecules, 2021, 27(3): 139-157.
- [26] GUO W J (郭文娟), WANG N (王娜), WANG N N (王娜娜), *et al.* Ultrasonic-assisted ethanol extraction of flavonoids from hawthorn seed and their antioxidant activity[J]. Fine Chemical (精细化工), 2016, 33(2): 152-156.
- [27] ZHAO T, DING Y, SUN W Z, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Nitraria sibirica* leaf using response surface methodology and their anti-proliferative activity on 3T3-L1 preadipocytes and antioxidant activities[J]. Journal of Food Science, 2023, 22(19): 1750-1765.
- [28] GUO W Q, REN N Q, WANG X J, *et al.* Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2009, 99(3): 1192-1196.
- [29] ASMUNGI A H, GHAZALI N A, ABDUL M S F, *et al.* Optimisation of rheological properties of water-based mud (WBM) with natural additives by using response surface methodology (RSM)[J]. Key Engineering Materials, 2023, 93(9): 939-945.
- [30] YING K C, KEITH M D. Monotone response surface of multi-factor condition: Estimation and bayes classifiers[J]. Journal of Royal Statistical Society, 2023, 2(85): 497-522.
- [31] WANG P (王鹏), WANG Y (王玉), MEI J (梅菊), *et al.* Study on extraction technology of hyperin from *Abelmoschus manihot*[J]. Food and Fermentation Science & Technology (食品与发酵科技), 2021, 57(3): 76-80, 89.
- [32] CAO M M (曹明明), CHE L L (车琳琳), ZHU L W (朱路文). Research progress on the pharmacological action and mechanism of hyperoside[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (辽宁中医药大学学报), 2022, 24(6): 150-155.
- [33] DONG Y F, LI Q, GUO Y H, *et al.* Comparison of physicochemical and *in vitro* hypoglycemic activity of bamboo shoot dietary fibers from different regions of Yunnan[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 9(12): 1-11.
- [34] SUN M X (孙明霞), WANG X (王雪), LI X X (李晓秀), *et al.* Chemical constituents from *Hypericum curvisepalum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2021, 46(15): 3859-3864.
- [35] ZHENG Q M (郑清明), QIN L P (秦路平), ZHENG H C (郑汉臣), *et al.* Quantitative phytochemical analysis of 11 *Hypericum* species growing in China[J]. Journal of Second Military Medical University (第二军医大学学报), 2003, 24(4): 457-459.