

# 复合菌培养物及其活性成分对巨噬细胞的抗炎作用

杨岚<sup>1,2#</sup> 白露露<sup>3#</sup> 徐子萱<sup>1,4</sup> 张小洁<sup>1,4</sup> 杜蕊<sup>5</sup> 崔莹<sup>6</sup> 刘大程<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; <sup>2</sup>农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018;

<sup>3</sup>内蒙古自治区农牧业科学院, 呼和浩特 010000; <sup>4</sup>国家乳业技术创新中心, 呼和浩特 010018;

<sup>5</sup>赤峰市巴林左旗农牧局动物疫病预防控制中心, 赤峰 025450; <sup>6</sup>赤峰市动物疫病预防控制中心, 赤峰 024000)

**摘要** 该文旨在研究复合菌培养物及其有效成分对脂多糖(LPS)诱导的小鼠RAW264.7细胞炎症反应的影响。实验分为7组, 分别为对照组、LPS组、LPS+N-乙酰谷氨酸(NAG)组、LPS+花生四烯酸(ARA)组、LPS+牛磺酸(TAU)组、LPS+有效成分复合物(COMP)(NAG+ARA+TAU)组、LPS+复合菌培养物提取物(CME)组, 利用色谱法测定NAG、ARA和TAU在复合菌培养物中的含量, ELISA、Griess、RT-qPCR法检测炎症因子的蛋白及mRNA的表达情况, Western blot法检测TLR4/NF- $\kappa$ B通路中关键蛋白的表达情况, 细胞免疫荧光法检测转录因子NF- $\kappa$ B亚基P65入核情况。结果显示, NAG、ARA和TAU含量分别为193.60 mg/kg、4.28 mg/kg和129.70 mg/kg; 与LPS组比较, LPS+NAG组、LPS+ARA组、LPS+TAU组、LPS+COMP组和LPS+CME组均不同程度地抑制了炎症因子一氧化氮(NO)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-12(IL-12)以及趋化因子CXCL1的蛋白和mRNA的表达, COMP的效果优于CME; 且各给药组均不同程度地降低了TLR4的表达水平以及P65和I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化水平, 同时抑制了P65的入核, 其中LPS+COMP组的效果优于其他各组。结果表明, CME具有抗炎作用, 而COMP的抗炎作用优于三种有效成分和CME; 且COMP抑制LPS-Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路的效果优于CME。

**关键词** 复合菌培养物; 有效成分; 提取物; 炎症; RAW264.7

## Anti-Inflammatory Effects of Complex Microbial Culture and Its Active Ingredients on Macrophages

YANG Lan<sup>1,2#</sup>, BAI Lulu<sup>3#</sup>, XU Zixuan<sup>1,4</sup>, ZHANG Xiaojie<sup>1,4</sup>, DU Rui<sup>5</sup>, CUI Ying<sup>6</sup>, LIU Dacheng<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology for Animal Diseases of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot 010018, China; <sup>3</sup>Inner Mongolia Autonomous Region Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010000, China;

<sup>4</sup>National dairy Technology Innovation Center, Hohhot 010018, China; <sup>5</sup>Center for Animal Disease Prevention and Control

of Chifeng Balin Left Banner Bureau of Agriculture and Animal Husbandry, Chifeng 025450, China;

<sup>6</sup>Chifeng Center for Animal Disease Prevention and Control, Chifeng 024000, China)

收稿日期: 2025-09-02

接受日期: 2025-12-25

国家重点研发计划(批准号: 2023YFE0100400)、内蒙古自治区直属高校基本科研业务项目(批准号: BR22-11-17)、国家乳业技术创新中心项目(批准号: 2023-JSGG-5)和内蒙古一流学科科研专项(批准号: YLXKZX-NND-012)资助的课题

#共同第一作者

\*通信作者。Tel: 0471-4311295, E-mail: nmglde@163.com

Received: September 2, 2025

Accepted: December 25, 2025

This work was supported by the National Key Research and Development Program (Grant No.2023YFE0100400), the Basic Scientific Research Business Project of Universities Directly under the Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.BR22-11-17), the Project of National Dairy Industry Technology Innovation Center (Grant No.2023-JSGG-5), and the Inner Mongolia First-Class Discipline Research Special Project (Grant No.YLXKZX-NND-012)

#These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-471-4311295, E-mail: nmglde@163.com

**Abstract** This study was conducted to investigate the effects of complex microbial culture and its active ingredients on LPS (lipopolysaccharide)-induced inflammatory response of RAW264.7 cells in mice. Seven groups were established: control group, LPS group, LPS+NAG (*N*-acetylglutamate) group, LPS+ARA (arachidonic acid) group, LPS+TAU (taurine) group, LPS+COMP (active ingredient complex) (NAG+ARA+TAU) group, and LPS+ CME (complex microbial extract) group. The content of NAG, ARA and TAU in the complex microbial culture was determined by chromatography. The levels of inflammatory factors were determined using the ELISA method and Griess method, and their mRNA expression was tested with the RT-qPCR method. The expression of key proteins in the TLR4 (Toll-like receptor 4)/NF- $\kappa$ B (nuclear transcription factor- $\kappa$ B) pathway was tested by the Western blot assay. The cell immunofluorescence method was used to detect the nuclear translocation of the subunit P65 of the transcription factor NF- $\kappa$ B. The results showed that the contents of NAG, ARA and TAU were 193.60 mg/kg, 4.28 mg/kg and 129.70 mg/kg, respectively. Compared with the LPS group, the protein and mRNA expression levels of inflammatory factors, including NO (nitric oxide), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), IL-6, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-12, and CXCL1 [chemokine (C-X-C motif) ligand 1], were inhibited in the LPS+NAG group, the LPS+ARA group, the LPS+TAU group, the LPS+COMP group and the LPS+CME group to different degrees. The effect of COMP was better than that of CME. In these groups, the expression of TLR4 and the phosphorylation levels of P65 and I $\kappa$ B $\alpha$  were reduced to varying degrees, and the nuclear translocation of P65 was also inhibited. The LPS+COMP group reported better effects than the other groups in respect of these indicators. The results revealed that CME had an anti-inflammatory effect, and COMP provided a superior anti-inflammatory effect to the three active ingredients and CME. COMP also inhibited the LPS-TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway more effectively than CME.

**Keywords** complex microbial culture; active ingredients; extract; inflammation; RAW264.7

炎症与动物多种疾病的形成密切相关, 调节炎症反应对于维持健康至关重要。在炎症反应中, TLR4(Toll-like receptor 4)/NF- $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B)信号通路起重要作用, 密切参与免疫细胞的分化、增殖、凋亡和促炎反应, 这些信号通路被激活后会产生肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )等炎性因子<sup>[1]</sup>, 是重要的炎症信号转导通路。复合菌培养物是本课题组研发的一种含有多量酵母菌代谢产物的微生态制剂, 可以通过改善饲料品质、提高动物采食量、调节动物肠道的微生态平衡以提高动物生长性能、免疫<sup>[2-3]</sup>和抗氧化功能<sup>[4]</sup>, 复合菌培养物组成成分的核心是肽类、有机酸、寡糖、氨基酸等多种营养活性物质, 它们之间相互协同、交替发挥作用<sup>[5-6]</sup>。前期通过对复合菌培养物进行非靶向代谢组学研究, 并对代谢产物进行定性分析, 发现*N*-乙酰谷氨酸(*N*-acetylglutamate, NAG)、花生四烯酸(arachidonic acid, ARA)、牛磺酸(taurine, TAU)为复合菌培养物的有效成分, 它们具有抗炎、抗氧化、增强免疫力<sup>[7-13]</sup>等作用。

复合菌培养物产生的代谢产物的成分复杂, 目前对其成分的研究大多集中在酵母细胞壁多糖 $\beta$ -葡聚糖和甘露聚糖<sup>[14]</sup>上, 有关复合菌培养物的有效成分的组成和含量, 以及有效成分之间是否产生相互作用鲜有报道, 并且对于复合菌培养物研究多侧重于实践应用, 其发挥抗炎作用的机制尚不明确, 因此, 本研究检测复合菌培养物有效成分的具体含量并且进行复配; 同时体外建立细胞炎症模型, 比较研究复合菌培养物提取物(complex microbial extract, CME)及有效成分复合物的抗炎作用的效果差异, 为今后进一步研究有关复合菌培养物有效成分的产品奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

小鼠单核-巨噬细胞株 RAW264.7 购于武汉普诺赛生命科技有限公司。复合菌培养物是根据课题组前期研究成果<sup>[15]</sup>, 将 2 株高活性的酵母菌(分别是 XR4 株和 BC 株)按 1:1 的比例混合作为发酵菌种, 接种在由玉米、豆粕、玉米胚芽粕、小麦麸、酵母浸

膏、糖蜜及葡萄糖等原料按比例混合制备的培养基中, 堆积发酵48 h, 在此期间经过翻料工艺和低温烘干工艺, 最终获取得到的。*N*-乙酰谷氨酸、花生四烯酸、牛磺酸购于阿拉丁生物试剂公司。

## 1.2 实验试剂

高糖DMEM培养基购于Gibco公司; 胎牛血清购于ZETA LIFE公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购于Sigma公司; 一氧化氮检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、特超敏ECL化学发光试剂盒、抗荧光封片剂含DAPI均购于上海碧云天生物科技有限公司; RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix购于南京诺唯赞生物科技有限公司; IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12、趋化因子(C-X-C)配体1[chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL1] ELISA反应试剂盒购于睿信生物科技有限公司; TLR4、P65、P-P65、核因子- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha, I $\kappa$ B $\alpha$ )、P-I $\kappa$ B $\alpha$ 、兔源二抗购于武汉三鹰生物技术有限公司。

## 1.3 复合菌培养物提取物的制备

本实验在参考马杰<sup>[16]</sup>、文字萍<sup>[17]</sup>、魏方<sup>[18]</sup>的方法的基础上略有修改, 将蒸馏水改进为超纯水, 将浸提法改为超声波提取法。具体提取方法如下: 取20 g复合菌培养物, 磨碎, 过筛, 置于三角瓶中, 加入200 mL超纯水, 使用超声波振荡器4 °C振荡20 min, 454.52  $\times$ g、4 °C离心10 min, 上清液用0.22  $\mu$ m膜过滤, 可得复合菌培养物提取液, 储存在-80 °C。此时复合菌培养物提取液浓度为100 mg/mL。

## 1.4 超高效液相色谱(ULPC)和气相色谱(GC)法检测*N*-乙酰谷氨酸、花生四烯酸及牛磺酸含量

1.4.1 供试品溶液的制备 准确称取4 g复合菌培养物, 加入40 mL甲醇, 超声提取, 将上清液用固相萃取柱净化<sup>[19]</sup>, 即为*N*-乙酰谷氨酸供试品溶液; 准确称取4 g复合菌培养物, 加入40 mL正己烷, 超声提取, 采用氢氧化钾-甲醇溶液甲基化反应<sup>[20]</sup>, 即为花生四烯酸供试品溶液; 准确称取4 g复合菌培养物, 加入40 mL水, 超声提取, 衍生化反应<sup>[21]</sup>, 即为牛磺酸供试品溶液。

1.4.2 对照品溶液制备 分别称取0.01 g *N*-乙酰谷氨酸标准品、牛磺酸标准品于10 mL棕色容量瓶中, 用超纯水溶解并定容, 制成浓度为1 mg/mL的标准储备液; 称取0.01 g花生四烯酸甲酯标准品于10 mL容量瓶中, 用正己烷溶解并定容, 制成浓度为1 mg/mL

的标准储备液。

1.4.3 色谱条件 *N*-乙酰谷氨酸色谱柱: Waters C 30; 流动相: 甲醇-0.05 %:磷酸水溶液=5:95(体积比); 波长: 215 nm; 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20  $\mu$ L。

花生四烯酸色谱柱: DB 23毛细管柱, 尺寸为30 m $\times$ 250  $\mu$ m $\times$ 0.25  $\mu$ m; 载气: N<sub>2</sub>; 氢气流速: 30 mL/min; 空气流速: 200 mL/min; 尾吹流速: 50 mL/min; 柱温: 采用程序升温, 90 °C保持1 min, 以9 °C/min升温到240 °C保持5 min, 然后以3 °C/min升温到250 °C; 检测器: 火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID), 温度300 °C; 进样量: 1  $\mu$ L。

牛磺酸色谱柱: Waters C 30; 流动相: 乙酸钠缓冲溶液:乙腈=70:30(体积比); 波长: 245 nm; 检测器: 紫外检测器; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20  $\mu$ L。

1.4.4 标准曲线的制备 准确量取*N*-乙酰谷氨酸、花生四烯酸、牛磺酸1.5  $\mu$ g/mL、5  $\mu$ g/mL、10  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ g/mL、50  $\mu$ g/mL、100  $\mu$ g/mL的浓度的系列标准工作液。取上述系列标准品溶液各1  $\mu$ L, 分别进样, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标、溶液浓度为横坐标, 进行线性回归, 得线性方程。

1.4.5 测定方法 用外标法进行定量测定, 根据公式:

$$X = \frac{c \times V \times V_2}{m \times V_1}$$

式中:  $X$ 为样品中*N*-乙酰谷氨酸、花生四烯酸、牛磺酸的含量(mg/kg);  $c$ 为样品中色谱峰面积对应的浓度( $\mu$ g/mL);  $V$ 为样品定容体积(mL);  $V_1$ 为从提取液中分取的体积(mL);  $V_2$ 为提取液稀释体积(mL);  $m$ 为样品质量(g)。

## 1.5 细胞培养

RAW264.7细胞采用5 mL含10%胎牛血清的DMEM培养液, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行相关实验。

## 1.6 CCK8法检测各组细胞活性

将RAW264.7细胞以 $2 \times 10^4$ /孔接种于96孔培养板中, 待细胞生长至80%时, 加入不同浓度的NAG(0、0.306、0.612、1.25、2.5、5、10、20、40 mg/mL)、ARA(0、2.25、4.5、9、18.75、37.5、75、150、300  $\mu$ g/mL)、TAU(0、0.306、0.612、1.25、2.5、5、10、20、40 mg/mL)、有效成分复合物(active ingredient complex, COMP)

(NAG:ARA:TAU=0.590:0.013:0.397)(根据检测细胞活性的结果, 设置浓度梯度 I: 0.306 mg/mL NAG+2.25  $\mu$ g/mL ARA+0.306 mg/mL TAU; 浓度梯度 II: 0.612 mg/mL NAG+18.75  $\mu$ g/mL ARA+0.612 mg/mL TAU; 浓度梯度 III: 2.5 mg/mL NAG+75  $\mu$ g/mL ARA+1.25 mg/mL TAU)、CME(0、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100 mg/mL), 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养24 h后, 每孔加入10  $\mu$ L CCK8溶液, 37 °C孵育1 h。使用酶标仪在波长为450 nm处测定各孔吸光度值。

### 1.7 分组处理

根据上述实验结果, 选择对细胞无毒性且细胞活性最大的浓度, 分为7组: 对照组、LPS组、LPS+NAG组、LPS+ARA组、LPS+TAU组、LPS+COMP组、LPS+CME组; 各组细胞贴壁后, 分别加入 NAG、ARA、TAU、COMP、CME, 培养1 h后, 除对照组外, 均加入1  $\mu$ g/mL LPS, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养24 h。

### 1.8 Griess法检测各组细胞上清液中NO水平

将 RAW 264.7 细胞按照对照组、LPS组、LPS+NAG组、LPS+ARA组、LPS+TAU组、LPS+COMP组、LPS+CME组分组培养, 培养结束后于4 °C、1 000 r/min离心5 min, 收集上清液。按照NO试剂盒说明书进行检测并计算NO含量。

### 1.9 ELISA法检测各组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-12、CXCL1水平

将 RAW 264.7 细胞按照对照组、LPS组、

LPS+NAG组、LPS+ARA组、LPS+TAU组、LPS+COMP组、LPS+CME组分组培养, 培养结束后于4 °C、1 000 r/min离心5 min, 收集上清液。按照ELISA试剂盒说明书检测各因子的含量。

### 1.10 RT-qPCR法检测TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、L-12、CXCL1、iNOS的mRNA表达水平

提取细胞总RNA, 逆转录cDNA, 并以cDNA为模板进行PCR扩增, 反应体系(共20  $\mu$ L): 10  $\mu$ L 2 $\times$  AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 正反引物各0.4  $\mu$ L, 2  $\mu$ L cDNA模板, 7.2  $\mu$ L RNase Free ddH<sub>2</sub>O。反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火/延伸30, 共40个循环。以GAPDH为内参, 采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>方法进行分析, 各基因引物设计见表1。

### 1.11 Western blot检测NF- $\kappa$ B通路相关蛋白表达水平

提取总蛋白, 与5 $\times$  蛋白上样缓冲液混合后, 金属浴使蛋白变性, 电泳分离蛋白, 湿转法将蛋白转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 用一抗稀释液稀释一抗P65(1:5 000)、P-P65(1:750)、I $\kappa$ B $\alpha$ (1:1 500)、P-I $\kappa$ B $\alpha$ (1:750)、TLR4(1:500), 4 °C过夜孵育, 二抗(1:5 000)室温孵育2 h。利用ECL进行显色, 拍照保存, 使用ImageJ软件分析条带灰度值。

### 1.12 细胞免疫荧光检测P65核转移情况

4%多聚甲醛室温固定细胞, 0.2% Triton X-100

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因名称 Genes name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>GADPH</i>	F: CCT CGT CCC GTA GAC ARA ARA TG R: TGA GGT CAR ATG ARA GGG GTC GT
<i>IL-6</i>	F: CAT AGC TAC CTG GAG TAC ATG ARA GAR A R: GAC TCC AGC TTA TCT CTT GGT TGA
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	F: GCT TCA GGC AGG CAG TAT CA R: ARA TGG GAR ACG TCA CAC ACC A
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F: TGA GGA CTG GGT GAG ARA ATG AGC R: ATA GCA RAA TCG GCT GAC GGT
<i>IL-12</i>	F: CTG TCC CCG GGG AGG GTC ATT CCA GTC TCT GGA R: ATC AAT GAA TTC TCA GGC GGA GCT CAG ATA GCC
<i>CXCL1</i>	F: CCC AAA CCG AAG TCA TAG CCA R: GTC AGT TGG ATT TGC CAT TTT
<i>iNOS</i>	F: CAR ACA GGA RAC CTA CCA GCT CAC R: AGC CTG ARA GTC ATG TTT GCC G
<i>TLR4</i>	F: TGA GGA CTG GGT GAG ARA ATG AGC R: CTG CCA TGT TTG AGC ARA TCT CAT

通透, 5%的BSA室温封闭1 h, 一抗(1:500) 4 °C过夜孵育, 二抗(1:100)室温避光孵育1 h, 封片剂(含DAPI)封片。使用荧光显微镜采集图像, ImageJ软件分析对比平均荧光强度。

### 1.13 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.0软件进行数据分析和作图。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用Dunnett多重比较,  $P < 0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 基于色谱法对*N*-乙酰谷氨酸、花生四烯酸及牛磺酸含量的测定

如图1所示, 目标峰与其他组分峰达到完全分离。NAG标准样品的保留时间为5.668 min(图1D); NAG待测样品的保留时间为5.687 min(图1G); ARA准样品的保留时间为33.984 min(图1E); 花生四烯酸待测样品的保留时间为33.919 min(图1H); TAU标准样品的保留时间为6.721 min(图1F); TAU待测样品的保留时间为6.732 min(图1I); 相对偏差均 $< 2.5\%$ , 说明复合菌培养物中存在NAG、ARA、TAU, 满足分析检测要求; NAG、ARA、TAU的标准样品在0~100  $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内, 线性方程分别为 $y = 1.443 1x + 0.846 3$ (图1A)、 $y = 4.424 4x - 25.861 0$ (图1B)、 $y = 10.392 0x + 8.145 0$ (图1C), 浓度与峰面积线性范围良好, 线性相关系数 $R^2$ 均 $< 0.999$ , 可用外标法定量; 根据1.4.4公式, 得出NAG含量为193.60 mg/kg, ARA含量为4.28 mg/kg, 得出TAU含量为129.70 mg/kg, 因此, 根据含量得出在复合物组中NAG、ARA、TAU的比例为0.590:0.013:0.397, 作为接下来实验中复合物组中的有效成分组合比例。

### 2.2 复合菌培养物提取物、三种有效成分及其复合物对RAW264.7细胞活性的影响

与对照组相比, 浓度在12.5 mg/mL以下的CME(图2A)、75  $\mu\text{g/mL}$ 以下的ARA(图2C)以及2.5 mg/mL以下的NAG(图2B)和TAU(图2D)不会抑制RAW264.7细胞的活性( $P > 0.05$ ); 25~100 mg/mL的CME、5~40 mg/mL的NAG和TAU、150~300  $\mu\text{g/mL}$ 的ARA对RAW264.7细胞活性具有抑制作用, 差异极显著( $P < 0.01$ )。COMP浓度梯度I(0.306 mg/mL NAG+2.25  $\mu\text{g/mL}$  ARA+0.306 mg/mL TAU)和COMP浓度梯度II(0.612 mg/mL NAG+18.75  $\mu\text{g/mL}$  ARA+0.612 mg/mL TAU), 对RAW264.7细胞的增殖无影响

( $P > 0.05$ )。COMP浓度梯度III(2.5 mg/mL NAG+75  $\mu\text{g/mL}$  ARA+1.25 mg/mL TAU)对RAW264.7细胞的活性有显著抑制作用( $P < 0.01$ )(图2E)。选择无毒性且细胞活性最佳的浓度, 可以使各组物质发挥最大生物活性根据上述实验结果。因此, 选择浓度为6.25 mg/mL的CME、0.612 mg/mL的NAG、0.612 mg/mL的TAU、18.75  $\mu\text{g/mL}$ 的ARA进行后续实验。

### 2.3 复合菌培养物提取物、三种有效成分及其复合物对NO、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1含量的影响

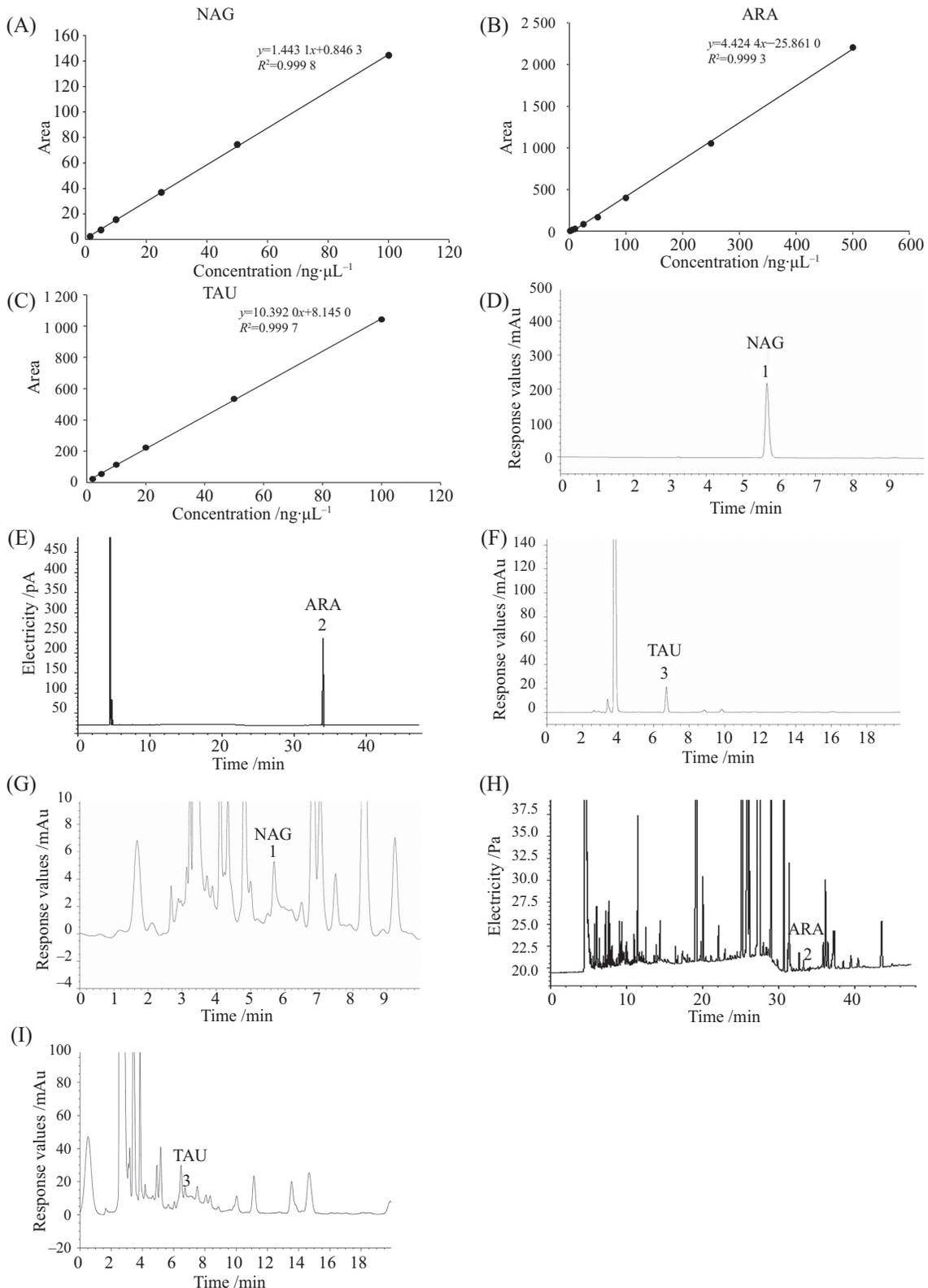
与对照组相比, 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS模型组可以显著刺激RAW264.7细胞NO、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1的释放( $P < 0.01$ , 图3)。与LPS模型组相比, LPS+NAG组、LPS+ARA组、LPS+TAU组、LPS+COMP组、LPS+CME组均不同程度地降低了LPS诱导产生的NO、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1的含量(图3)。LPS+COMP组、LPS+CME组降低NO含量的效果优于其他三种有效成分组, LPS+COMP组降低NO、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1含量的效果优于其他各组。上述结果说明, COMP和CME均可以减少LPS诱导RAW264.7细胞产生的NO、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1的含量, 且COMP的效果优于CME。

### 2.4 复合菌培养物提取物、三种有效成分及其复合物对*i*NOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1 mRNA表达水平的影响

与对照组相比, 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS模型组可以极显著( $P < 0.01$ )刺激RAW264.7细胞*i*NOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1的mRNA表达。与LPS模型组相比, LPS+NAG组、LPS+ARA组、LPS+TAU组、LPS+COMP组、LPS+CME组均不同程度的抑制了LPS诱导产生的*i*NOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1 mRNA的表达(图4)。LPS+COMP组抑制*i*NOS、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1 mRNA表达的效果优于其他各组(图4A、图4C~图4F), LPS+COMP组抑制IL-1 $\beta$  mRNA表达的效果仅次于LPS+NAG组(图4B)。上述结果说明, COMP和CME均可以降低LPS诱导RAW264.7细胞产生的*i*NOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、CXCL1的mRNA表达水平, 且COMP的效果优于CME。

### 2.5 复合菌培养物提取物、三种有效成分及其复合物对TLR4/NF- $\kappa$ B通路中关键蛋白表达的影响

与对照组相比, 1  $\mu\text{g/mL}$ 的LPS刺激RAW264.7

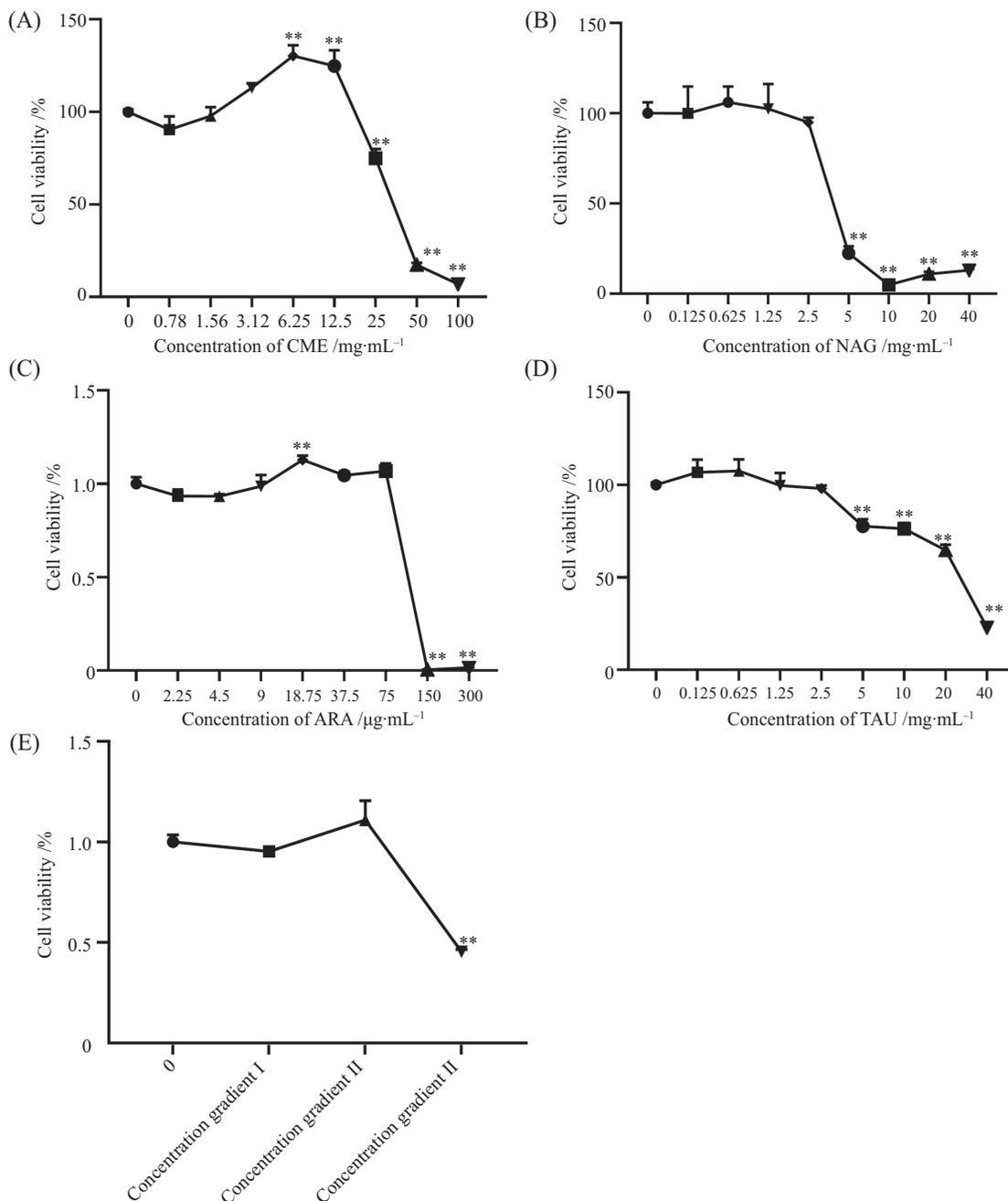


A: *N*-乙酰谷氨酸浓度与峰面积的线性关系; B: 花生四烯酸浓度与峰面积的线性关系; C: 牛磺酸浓度与峰面积的线性关系; D: *N*-乙酰谷氨酸标准品(1 mg/mL); E: 花生四烯酸标准品(1 mg/mL); F: 牛磺酸标准品(20  $\mu$ g/mL); G-I: 复合菌培养物供试品。

A: linear relationship between *N*-acetylglutamic acid concentration and peak area; B: linear relationship between arachidonic acid concentration and peak area; C: linear relationship between taurine concentration and peak area; D: *N*-acetylglutamic acid standard (1 mg/mL); E: arachidonic acid standard (1 mg/mL); F: taurine standard (20  $\mu$ g/mL); G-I: complex microbial culture test samples.

图1 *N*-乙酰谷氨酸、花生四烯酸和牛磺酸色谱图

Fig.1 chromatogram of *N*-acetylglutamic acid, arachidonic acid, and taurine



A: 不同浓度的复合菌培养物提取物对RAW264.7细胞活力的影响; B: 不同浓度的N-乙酰谷氨酸对RAW264.7细胞活力的影响; C: 不同浓度的花生四烯酸对RAW264.7细胞活力的影响; D: 不同浓度的牛磺酸对RAW264.7细胞活力的影响; E: 不同浓度的有效成分复合物对RAW264.7细胞活力的影响。 \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。

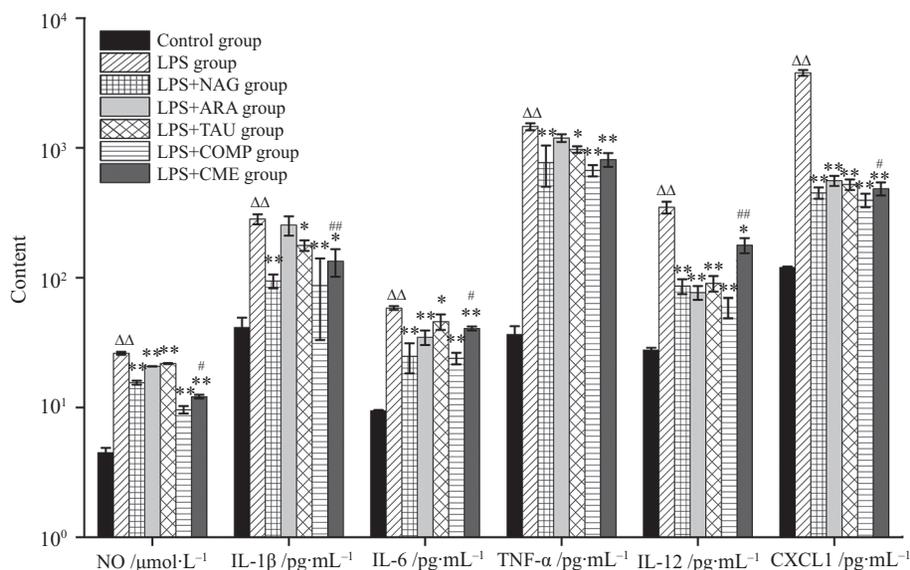
A: effects of different concentrations of CME on RAW264.7 cell viability; B: effects of different concentrations of *N*-acetylglutamic acid on RAW264.7 cell viability; C: effects of different concentrations of arachidonic acid on RAW264.7 cell viability; D: effects of different concentrations of taurine on RAW264.7 cell viability; E: effect of different concentrations of the main ingredient complex on the viability of RAW264.7 cells. \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图2 各组处理对RAW264.7细胞活力的影响

Fig.2 Effects of different treatments on the viability of RAW264.7 cells

细胞后,显著上调了TLR4、P-P65、P-IκBα的蛋白表达水平且差异极显著 ( $P < 0.01$ ); LPS+NAG组、LPS+ARA组、LPS+TAU组、LPS+COMP组、LPS+CME组均不同程度下调了LPS诱导产生TLR4

的蛋白表达水平,以及P65、IκBα的磷酸化水平。LPS+COMP组下调了TLR4的蛋白表达水平及P65和IκBα磷酸化水平,效果优于其他各组(图5)。上述结果说明,COMP、CME有可能通过下调TLR4表达,



△△ $P<0.01$ , 与对照组比较; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与LPS组比较; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , 与LPS+COMP组比较。

△△ $P<0.01$  compared with control group; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with LPS group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with LPS+COMP group.

图3 各组处理对LPS刺激的RAW264.7细胞炎症因子释放的影响

Fig.3 Effects of different treatments on inflammatory factor release in LPS-stimulated RAW264.7 cells

抑制LPS-TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路转导,发挥抗炎的功效,相对于COMP, CME抑制LPS-TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路转导的效果更显著。

## 2.6 复合菌培养物提取物、三种有效成分及其复合物对RAW264.7细胞中P65入核情况的影响

与对照组相比, 1  $\mu$ g/mL的LPS刺激RAW264.7细胞, NF- $\kappa$ B P65荧光强度明显增强, 并且该蛋白由细胞质向细胞核移动; 与LPS组相比, 其他各处理组均不同程度减弱了NF- $\kappa$ B P65的荧光强度(图6A), 且减少了NF- $\kappa$ B P65核转移的数量(图6B)。上述结果提示, COMP、CME以及三种有效成分均能够抑制LPS刺激下NF- $\kappa$ B P65的入核, 从而下调相关炎症因子的释放。

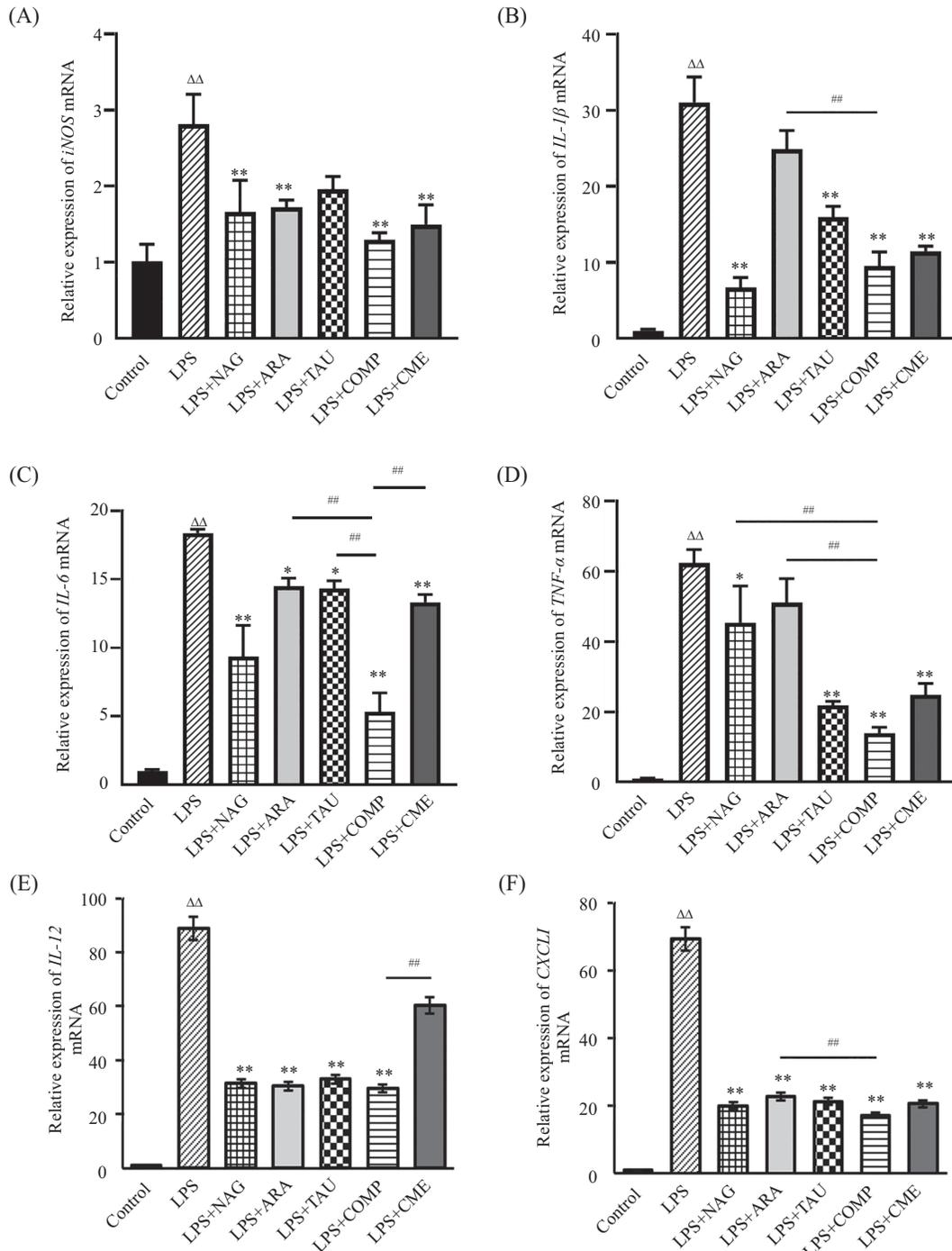
## 3 讨论

复合菌培养物含少量活菌细胞与大量代谢产物, 虽有研究证实酵母培养物或复合菌培养物可促进动物生长、提高免疫力<sup>[21]</sup>, 但对其具体作用机制及有效成分的研究较少。

复合菌培养物作用核心是多营养活性成分协同。当前, 针对炎症这类病因与病理复杂的疾病, 单一成分策略已转向多成分协同, 多成分可形成多靶点效应<sup>[22]</sup>, 而协同关键在单体选择与配比<sup>[23]</sup>。因此, 本研究用高效液/气相色谱法, 测定复合菌培养物中

*N*-乙酰谷氨酸、牛磺酸、花生四烯酸含量, 以期优化配比。*N*-乙酰谷氨酸属有机酸, 用离子交换柱纯化<sup>[19]</sup>, 其作为必需氨基酸精氨酸的合成激活剂, 可促进精氨酸生成<sup>[24]</sup>。其类似物*N*-氨甲酰谷氨酸在饲料中添加量为0.01%~0.1%<sup>[25]</sup>, 本研究测得复合菌培养物中*N*-乙酰谷氨酸含量为193.60 mg/kg(占0.019%), 与市场产品添加量结果相符。花生四烯酸为机体的必需脂肪酸, 需饲料补充以提升动物生产性能、调节生理功能<sup>[26]</sup>, 微生物发酵产物无毒<sup>[27]</sup>。采用正己烷提取以去除极性杂质, 经氢氧化钾-甲醇法甲酯化以保证色谱峰形<sup>[28]</sup>, 测得含量为4.28 mg/kg, 推测该成分来源于原料与微生物发酵过程。牛磺酸具有抗菌抗炎等作用, 广泛用于畜禽养殖<sup>[29]</sup>。用丹磺酰氯柱前衍生可提升灵敏度<sup>[30]</sup>。此前酵母菌中测得其含量112 mg/kg<sup>[31]</sup>, 本研究为129.70 mg/kg, 与此前报道的数据基本相符。综上, 三者比例为0.590:0.013:0.397。

复合菌培养物成分复杂类似“中药”, 科研人员对中药提取物的研究经验丰富<sup>[33-35]</sup>, 故对复合菌培养物进行提取。参考马杰<sup>[16]</sup>、文字萍<sup>[17]</sup>、魏方<sup>[18]</sup>的方法, 改进为超声波提取(穿透力强、低温可保留成分<sup>[36]</sup>), 并选用超纯水为溶剂(避免有机溶剂毒性<sup>[37]</sup>, 防止影响RAW264.7细胞检测)。提取物去除非水溶性物质, 但水对非极性化合物溶解能力较弱, 可能漏提部分成分, 本研究仅为初步探索。



A: *iNOS* mRNA; B: *IL-1β* mRNA; C: *IL-6* mRNA; D: *TNF-α* mRNA; E: *IL-12* mRNA; F: *CXCL1* mRNA.  $\Delta\Delta P < 0.01$ , 与对照组比较;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , 与LPS组比较;  $\#P < 0.01$ , 与LPS+COMP组比较。

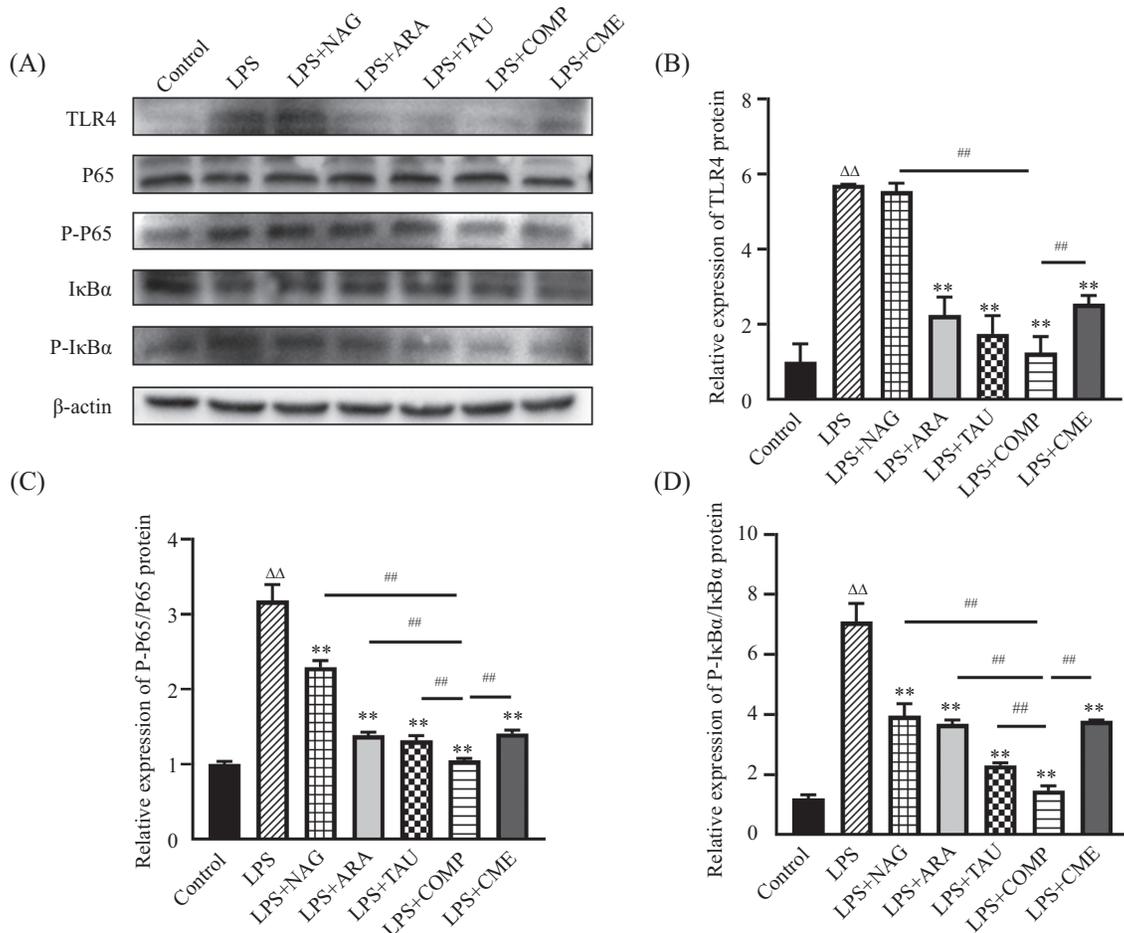
A: *iNO* mRNA; B: *IL-1β* mRNA; C: *IL-6* mRNA; D: *TNF-α* mRNA; E: *IL-12* mRNA; F: *iCXCL1* mRNA.  $\Delta\Delta P < 0.01$  compared with control group;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  compared with control group;  $\#P < 0.01$  compared with LPS+COMP group.

图4 各组处理对LPS刺激的RAW264.7细胞炎症因子mRNA表达的影响

Fig.4 Effects of different treatments on mRNA expression of inflammatory factors in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

LPS与炎症细胞因子密切相关, LPS结合细胞受体(如TLR4), 刺激释放IL-1β、IL-6、IL-12、CXCL1、TNF-α等引发机体的免疫应激。因此, 炎症细胞因子和LPS之间的相互作用在炎症反应中具有关键意义。相关研究显示, N-乙酰谷氨酸类似物

通过激活免疫相关信号通路, 如NF-κB/TLR4通路, 来调节多种免疫细胞的功能<sup>[38]</sup>; 牛磺酸能显著抑制由LPS导致的巨噬细胞NO、IL-6、TNF-α的大量释放<sup>[39-41]</sup>; 花生四烯酸可通过直接与TLR4共受体、髓系分化因子2(myeloid differentiation factor 2, MD2)



A: 各组处理对TLR4/NF-κB通路蛋白表达情况的影响; B: TLR4蛋白相对表达情况; C: P-P65/P65蛋白相对表达情况; D: P-IκBα/IκBα蛋白相对表达情况。ΔΔ $P < 0.01$ , LPS组与对照组比较; \*\* $P < 0.01$ , 与LPS组比较; ## $P < 0.01$ , 与LPS+COMP组比较。

A: effects of different treatments on TLR4/NF-κB pathway protein expression; B: relative expression of TLR4 protein; C: relative expression of P-P65/P65 protein; D: relative expression of P-IκBα/IκBα protein. ΔΔ $P < 0.01$  compared with control group; \*\* $P < 0.01$  compared with LPS group; ## $P < 0.01$  compared with LPS+COMP group.

图5 各组处理对LPS刺激的RAW264.7细胞TLR4/NF-κB通路相关蛋白表达的影响

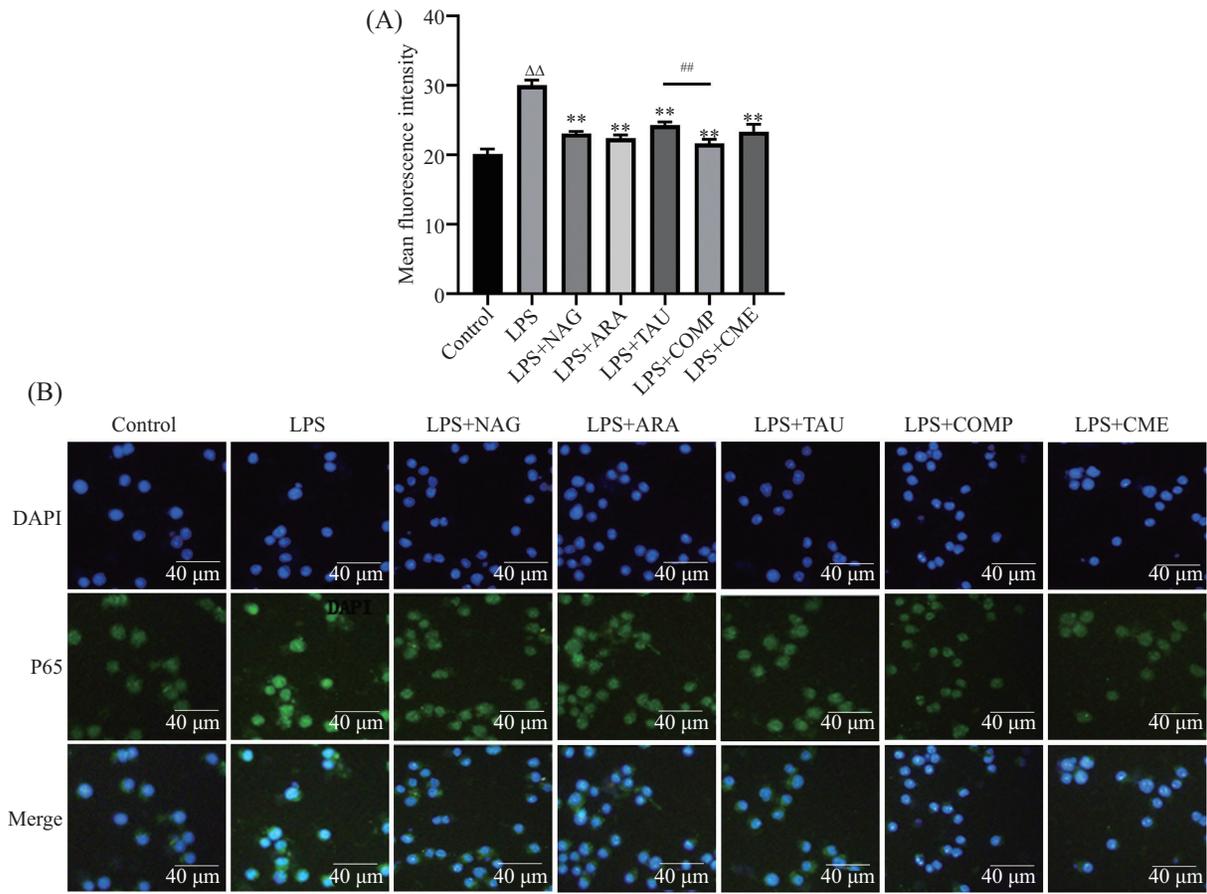
Fig.5 Effects of different treatments on the expression of proteins related to the TLR4/NF-κB pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells

结合,抑制饱和脂肪酸对TLR4促炎信号通路的激活,防止饱和脂肪酸诱导的TLR4复合物、辅助蛋白、促炎细胞因子的形成,抑制LPS诱导的MD2-TLR4相互作用<sup>[42]</sup>,这些发现为花生四烯酸调节炎症的直接机制提供了实验证据,与本研究结果一致。本研究结果表明,三者复合物抗炎效果优于单体及提取物,这可能其类似“中药方剂”的协同作用有关<sup>[43]</sup>,且复合物组直接将三种有效成分进行配比,避免了提取过程中造成的成分以及生物活性损失<sup>[44-45]</sup>。

TLR4广泛存在于巨噬细胞等免疫反应有关的细胞,其介导的炎症信号通路在炎症反应中起关键作用<sup>[46]</sup>,TLR4/NF-κB信号通路密切参与细胞分化、增殖、凋亡和促炎反应,是重要的炎症信号转导通

路<sup>[47]</sup>。在正常生理状态下,NF-κB与IκB结合,外界刺激信号传递到细胞内时,使IκB磷酸化,暴露NF-κB的P65、P50蛋白,NF-κB激活核易位结合靶基因,促进IL-1β和TNF-α等炎症因子的释放<sup>[48-49]</sup>。本研究通过Western blot检测TLR4/NF-κB通路中关键蛋白的磷酸化表达情况,细胞免疫荧光法检测NF-κB亚基P65入核情况。结果显示,与LPS组相比,三种有效成分单体、复合物,以及提取物均可调节LPS-TLR4/NF-κB信号转导通路上游成员,抑制NF-κB的激活、下调TLR4的表达,但有效成分复合物及复合菌培养物提取物是否通过其他信号通路发挥抗炎作用,还有待验证。

综上所述,N-乙酰谷氨酸、花生四烯酸、牛磺



A: 荧光值分析图; B: 免疫荧光图。 $\Delta\Delta P < 0.01$ , 与对照组比较; \*\* $P < 0.01$ , 与LPS组比较; ## $P < 0.01$ , 与LPS+COMP组比较。

A: fluorescence value analysis figure; B: immunofluorescence figure.  $\Delta\Delta P < 0.01$  compared with control group; \*\* $P < 0.01$  compared with LPS group; ## $P < 0.01$  compared with LPS+COMP group.

图6 各组处理对LPS刺激的RAW264.7细胞NF- $\kappa$ B P65核易位的影响

Fig.6 Effects of different treatments on nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 in LPS-stimulated RAW264.7 cells

酸、有效成分复合物及复合菌培养物提取物可经TLR4/NF- $\kappa$ B通路抗炎,且三种有效成分的协同效果优于提取物。但这三种有效成分的协同机制及复合菌培养物中有效成分的完全提取方法,需进一步研究。

#### 4 结论

(1) 复合菌培养物中, *N*-乙酰谷氨酸含量为193.60 mg/kg, 牛磺酸含量为129.70 mg/kg, 花生四烯酸含量为4.28 mg/kg。

(2) 复合菌培养物提取物及有效成分复合物具有抗炎作用,并且有效成分复合物的抗炎效果优于复合菌培养物提取物。

(3) 有效成分复合物及复合菌培养物提取物可能通过TLR4/NF- $\kappa$ B的信号通路,发挥其抗炎作用,并且有效成分复合物抑制LPS-TLR4/NF- $\kappa$ B信号通

路的效果优于复合菌培养物提取物。

#### 参考文献 (References)

- [1] EDA H, SHIMADA H, BEIDLER D, et al. Proinflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , induce expression of interleukin-34 mRNA via JNK- and p44/42 MAPK-NF- $\kappa$ B pathway but not p38 pathway in osteoblasts [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(11): 1525-30.
- [2] 刘世雄, 李冬芳, 郝凌魁, 等. 复合菌培养物及酵母 $\beta$ -葡聚糖对肉羊生长性能与免疫功能的影响[J]. *动物营养学报*(LIU S X, LI D F, HAO L K, et al. The effects of composite bacterial culture and yeast  $\beta$ -glucan on the growth performance and immune function of meat sheep [J]. *Journal of Animal Nutrition*), 2020, 32(7): 3263-73.
- [3] 李冬芳, 刘世雄, 于春微. 复合菌培养物及 $\beta$ -葡聚糖对肉羊抗氧化能力与炎症因子含量的影响[J]. *动物营养学报*(LI D F, LIU S X, YU C W. The effects of composite bacterial culture and  $\beta$ -glucan on antioxidant capacity and inflammatory factor content in meat sheep [J]. *Journal of Animal Nutrition*), 2021, 33(5): 2964-70.

- [4] 崔莹, 李薛强, 于春微. 复合菌培养物对肉羊生长性能、免疫与抗氧化功能的影响[J]. 动物营养学报(CUI Y, LI X Q, YU C W. The effect of composite bacterial culture on the growth performance, immune and antioxidant functions of meat sheep [J]. Journal of Animal Nutrition), 2019, 31(11): 5065-73.
- [5] 杨昕润, BAKER N, 陈东理, 等. 活性酵母与复合酶复合制剂对澳大利亚不同品种奶牛生产性能的影响[J]. 中国畜牧杂志(YANG X J, BAKER N, CHEN D L, et al. The effect of composite preparation of active yeast and complex enzyme on the production performance of different breeds of dairy cows in Australia [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry), 2018, 54(1): 99-102,133.
- [6] LUO Q, YANG L, LIU D, et al. Effect of composite yeast culture on the jejunal barrier function, inflammatory response, and microbial community structure of laying hens during the late stage of egg production [J]. Front Vet Sci, 2024, 11: 1524726.
- [7] ZHANG Y, CHEN H, ZHANG W, et al. Arachidonic acid inhibits inflammatory responses by binding to myeloid differentiation factor-2 (MD2) and preventing MD2/Toll-like receptor 4 signaling activation [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(5): 165683.
- [8] LIAO J, HWANG S H, LI H, et al. Inhibition of chronic pancreatitis and murine pancreatic intraepithelial neoplasia by a dual inhibitor of c-RAF and soluble epoxide hydrolase in LSL-Kras G12D/Pdx-1-Cre mice [J]. Anticancer Res, 2016, 36(1): 27-37.
- [9] 王亚敏, 徐小康, 戎瑞雪. 牛磺酸对小鼠腹腔巨噬细胞功能调节作用的体外研究[J]. 医学研究与教育(WANG Y M, XU X K, RONG R X. *In vitro* study on the regulatory effect of taurine on the function of peritoneal macrophages in mice [J]. Medical Research and Education), 2018, 35(5): 1-6.
- [10] WU C, CAI J, TIAN G, et al. Roles of dietary supplementation with arginine or *N*-carbamylglutamate in modulating the inflammation, antioxidant property, and mRNA expression of antioxidant-related signaling molecules in the spleen of rats under oxidative stress [J]. Anim Nutr, 2018, 4(3): 322-8.
- [11] MO W, WU X, JIA G, et al. Roles of dietary supplementation with arginine or *N*-carbamylglutamate in modulating the inflammation, antioxidant property, and mRNA expression of antioxidant-related signaling molecules in the spleen of rats under oxidative stress [J]. Anim Nutr, 2018, 4(3): 322-8.
- [12] 冯玉祥. *N*-氨甲酰谷氨酸对小鼠免疫功能影响的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [13] DELAPORTE M, SOUDANT P, MOAL J, et al. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Lipids, 2006, 41(6): 567-77.
- [14] WANG H L, CHEN G J, XIANG L, et al. Yeast  $\beta$ -glucan, a potential prebiotic, showed a similar probiotic activity to inulin [J]. Food Funct, 2020, 11(12): 10386-96.
- [15] 郭鹏. 奶牛微生物发酵饲料组方及配套使用技术的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [16] 马杰, 王卓君, 石瑶瑶. 饲料酵母水溶物具有促进草鱼原代肝细胞生长及修复过氧化氢损伤的作用[J]. 中国粮油学报(MA J, WANG Z J, SHI Y Y. The water-soluble yeast in feed has the effect of promoting the growth of primary grass carp liver cells and repairing hydrogen peroxide damage [J]. Chinese Journal of Grain and Oil), 2024, 40(1): 159-66.
- [17] 文字萍, 金清. 饲料提取物对食粪魏氏菌耐酸性的影响[J]. 延边大学农学报(WEN Y P, JING Q. The effect of feed extract on acid tolerance of *Clostridium perfringens* [J]. Journal of Agriculture, Yanbian University), 2023, 45(3): 45-50.
- [18] 魏方. 酿酒酵母培养物和提取物诱导绵羊瘤胃上皮细胞 $\beta$ -防御素-1表达及信号通路的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [19] 李裕. 高效液相色谱紫外检测法测定饲料中 $N$ -氨甲酰谷氨酸的含量[J]. 中国饲料(LI Y. Determination of *N*-aminoglutamic acid content in feed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. Chinese Feed), 2016, 27(17): 413.
- [20] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品添加剂 花生四烯酸油脂(发酵法)[S]: GB 26401-2011, 2011.
- [21] 邢杰, 李松建, 乔林慧, 等. 复合菌培养物及酵母类多糖对羔羊免疫功能影响的研究[J]. 中国预防兽医学报(XING J, LI S J, QIAO L H, et al. Study on the effects of compound bacterial culture and yeast polysaccharides on lamb immune function [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine), 2023, 45(5): 517-22.
- [22] ZHOU X, SETO S W, CHANG D, et al. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: a comprehensive review of methodology and current research [J]. Front Pharmacol, 2016, 7(7): 201-17.
- [23] ZHANG A, SUN H, WANG X. Potentiating therapeutic effects by enhancing synergism based on active constituents from traditional medicine [J]. Phytother Res, 2014, 28(4): 526-33.
- [24] MA Y, ZENG Z, KONG L, et al. Determination of *N*-carbamylglutamate in feeds and animal products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Molecules, 2019, 24(17): 3172.
- [25] WU G, KNABE D A, KIM S W, et al. Arginine nutrition in neonatal pigs [J]. J Nutr, 2004, 134(10 Suppl): 2783S-90S.
- [26] 郑伟, 王勇, 王慧媛, 等. 反刍动物必需脂肪酸营养的研究进展[J]. 饲料博览(ZHENG W, WANG Y, WANG H Y, et al. Research progress on essential fatty acid nutrition for ruminants [J]. Feed Expo), 2015(9): 18-22.
- [27] 吴东, 曹永红. 花生四烯酸在畜禽业中的应用[J]. 兽药与饲料添加剂(WU D, CAO Y H. Application of arachidonic acid in livestock and poultry industry [J]. Veterinary Drugs and Feed Additives), 2007(2): 10-1.
- [28] 唐孝鹏, 苏敏, 张玉良, 等. 油脂中花生四烯酸含量测定[J]. 食品工业科技(TANG X P, SU M, ZHANG Y L, et al. Determination of arachidonic acid content in oils and fats [J]. Food Industry Technology), 2011, 33(12): 465-7.
- [29] MARCIKWICZ J, KONTNY E. Taurine and inflammatory diseases [J]. Amino Acids, 2014, 46(1): 7-20.
- [30] 中华人民共和国农业部. 饲料中牛磺酸的测定 高效液相色谱法[S]. 农业部2483号公告-5-2016, 2016.
- [31] 高剑坤. 对中药研究问题的思考[J]. 现代中医药(GAO J K. Thoughts on research issues in traditional Chinese medicine [J]. Modern Traditional Chinese Medicine), 2021, 41(4): 35-7.
- [32] SPITZE A R, WONG D L, ROGERS Q R. Taurine concentrations in animal feed ingredients; cooking influences taurine content [J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 2003, 87(7/8): 251-62.
- [33] 马玲云, 马双成. 中药标准物质的发展现状与展望[J]. 中国药事(MA L Y, MA S C. The development status and prospects of traditional Chinese medicine reference materials [J]. China Phar-

- maceutical Affairs), 2010, 24(12): 1232-5.
- [34] 张满, 胡旭东, 陶艳艳, 等. 中药提取物调控巨噬细胞极化研究进展[J]. 中国中医药信息杂志(ZHANG M, HU X D, TAO Y Y, et al. Research progress on the regulation of macrophage polarization by traditional Chinese medicine extracts [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine Information), 2019, 26(11): 136-40.
- [35] KIM B, KIM E Y, LEE E J, et al. Panax notoginseng inhibits tumor growth through activating macrophage to M1 polarization [J]. Am J Chin Med, 2018, 46(6): 1369-85.
- [36] 王帅. 扶正化瘀组中中药有效组分的提取分离工艺研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [37] 王文娟, 雒向宁, 马晓军, 等. 8种有机溶剂对人肝癌细胞HePG2及SMMC7721的细胞毒作用[J]. 现代中医药(WANG W J, LUO X N, MA X J, et al. The cytotoxic effects of 8 organic solvents on human liver cancer cells HePG2 and SMMC7721 [J]. Modern Traditional Chinese Medicine), 2013, 33(4): 85-6.
- [38] ZHANG H, ZHANG Y, MA Y, et al. Dietary rumenprotected L-arginine or *N*-carbamylglutamate attenuates fetal hepatic inflammation in undernourished ewes suffering from intrauterine growth restriction [J]. Anim Nutr, 2021, 7(4): 1095-104.
- [39] WARD J, LALLEMAND F, DE WITTE P, et al. Anti-inflammatory actions of a taurine analogue, ethane  $\beta$ -sultam in phagocytic cells, *in vivo* and *in vitro* [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(6): 743-51.
- [40] MOCHIZUKI T, SATSU H, NAKANO T, et al. Regulation of the human taurine transporter by TNF- $\alpha$  and an anti-inflammatory function of taurine in human intestinal Caco-2 cells [J]. Biofactors, 2004, 21(1/2/3/4): 141-4.
- [41] SEABRA V, STACHLEWITZ R F, THURMAN R G. Taurine blunts LPS-induced increases in intracellular calcium and TNF- $\alpha$  production by Kupffer cells [J]. J Leukocyte Biol, 1998, 64(5): 615-21.
- [42] ZHANG Y L, CHEN H J, ZHANG W X. Arachidonic acid inhibits inflammatory responses by binding to myeloid differentiation factor-2 (MD2) and preventing MD2/Toll-like receptor 4 signaling activation [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(5): 165683.
- [43] 张亚刚, 吾满江·艾力. 药物的能量理论和中药有效组份的能量协同作用机制[J]. 中草药(ZHANG Y G, WUMANJIANG·A L. The energy theory of drugs and the energy synergistic mechanism of effective components in traditional Chinese medicine [J]. Chinese Herbal Medicine), 2003, 34(10): 865-8.
- [44] 安小琳. 牡丹种皮中总黄酮提取方法及其抗氧化活性的比较[J]. 山西林业科技(AN X L. Comparison of extraction methods and antioxidant activities of total flavonoids from peony seed coat [J]. Shanxi Forestry Science and Technology), 2024, 53(3): 28-9,49.
- [45] 陈秋. 不同提取方法对西番莲果皮花色苷提取效果的比较与优化[J]. 中国食品工业(CHEN Q. Comparison and optimization of extraction efficiency of anthocyanins from passion fruit peel using different extraction methods [J]. China's Food Industry), 2024, 39(14): 100-2.
- [46] 吴亚楠, 赵鹏翔, 马雪梅. NF- $\kappa$ B研究进展及其与炎症的关系[J]. 安徽农业科学(WU Y N, ZHAO P X, MA X M. Research progress on NF- $\kappa$ B and its relationship with inflammation [J]. Anhui Agricultural Science), 2012, 52(34): 16533-5,601.
- [47] KARIN M, GRETEN F R. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(10): 7.
- [48] SCHEIDEREIT C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappa B activation and transcription [J]. Oncogene, 2006, 25(51): 685-705.
- [49] EDA H, SHIMADA H, BEIDLER D, et al. Proinflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , induce expression of interleukin-34 mRNA via JNK- and p44/42 MAPK-NF-kappaB pathway but not p38 pathway in osteoblasts [J]. Rheumatol Int, 2011, 31(11): 1525-30.