DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250819004
引用格式: 李中国, 邓鹏, 乔强, 等. 不同菌株发酵对松花粉组方保护酒精性肝损伤的提升作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 17(4): 167–174.
LI ZG, DENG P, QIAO Q, *et al*. Enhanced therapeutic effect of *Pinus massoniana* pollen-based formula against alcoholic liver injury through fermentation with different strains [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 17(4): 167–174. (in Chinese with English abstract).

不同菌株发酵对松花粉组方保护酒精性肝损伤的提升作用

李中国[1], 邓　鹏[1], 乔　强[2], 鞠　东[2], 尹利端[2], 何志勇[1], 陈　洁[1], 曾茂茂[1*]
(1. 江南大学食品学院, 无锡　214122; 2. 烟台新时代健康产业有限公司, 烟台　264006)

摘　要: 目的　通过优化松花粉(*Pinus massoniana* pollen)复配比例及发酵菌种(羊肚菌、酵母菌), 探究不同发酵组对酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, AFLD)模型的干预效果, 筛选最优护肝配方。**方法**　通过酒精液体饲料构建小鼠 AFLD 模型, 设置空白对照组、模型组、松花粉+桃仁未发酵组、松花粉+桃仁羊肚菌发酵组、松花粉+桃仁+葛根未发酵组、松花粉+桃仁+葛根羊肚菌发酵组、松花粉+桃仁+葛根酵母菌发酵组。干预结束后, 采集血清样本检测甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平; 收集肝脏组织测定肝脏 TG、TC、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量, 并通过苏木精染色进行肝脏病理学分析。**结果**　经不同发酵组干预后, 均表现出一定程度的肝脏保护作用, 效果优于未发酵组。其中松花粉+桃仁+葛根酵母菌发酵组效果最为显著, 其次为松花粉+桃仁羊肚菌发酵组。酵母菌发酵松花粉+桃仁+葛根组血清 TG、TC、ALT、AST、LDL-C 含量分别为(0.62±0.04) mmol/L、(3.13±0.28) mmol/L、(0.68±0.15) U/mL、(2.66±0.31) U/mL、(0.75±0.08) mmol/L, 相比模型组分别降低了 32.61%、31.51%、71.43%、20.60%、54.27%; 血清 HDL-C 含量为(2.17±0.32) mmol/L, 相比模型组提高了 33.13%。其肝脏 TG、TC、MDA 含量分别为(0.09±0.02)、(0.020±0.002)、(0.34±0.03) mmol/gprot, 相比模型组降低了 55.00%、45.95%、37.04%; 其肝脏 GSH 含量为(9.52±3.25) μmol/gprot, 是模型组的 2.15 倍。**结论**　微生物发酵可显著增强松花粉复方组合的护肝功效。其中酵母菌发酵松花粉+桃仁+葛根为最优方案, 其次为羊肚菌发酵松花粉+桃仁, 本研究为开发功能性护肝产品提供实验依据。

关键词: 松花粉; 复配发酵; 酒精性脂肪肝; 抗氧化; 肝损伤

收稿日期: 2025-08-19
基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100204)
第一作者: 李中国(2002—), 男, 硕士, 主要研究方向为食品加工与健康。E-mail: zhongguoli2025@163.com
***通信作者:** 曾茂茂(1982—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工与健康。E-mail: mmzeng@jiangnan.edu.cn

Enhanced therapeutic effect of *Pinus massoniana* pollen-based formula against alcoholic liver injury through fermentation with different strains

LI Zhong-Guo[1], DENG Peng[1], QIAO Qiang[2], JU Dong[2], YIN Li-Duan[2], HE Zhi-Yong[1], CHEN Jie[1], ZENG Mao-Mao[1*]

(1. *School of Food Science and Technology*, *Jiangnan University*, *Wuxi* 214122, *China*; 2. *Yantai New Era Health Industry Co*., *Ltd*., *Yantai* 264006, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the intervention effect of different fermentation groups on the model of alcoholic fatty liver disease (AFLD) by optimising the proportion of turpentine *Pinus massoniana* pollen compound and fermentation strains (morel mushroom and yeast), and to screen the optimal liver protection formula. **Methods** The mouse AFLD model was constructed by alcohol liquid feed, and a blank control group, model group, *Pinus massoniana* pollen+peach kernel unfermented group, *Pinus massoniana* pollen+peach kernel morel fermented group, *Pinus massoniana* pollen+peach kernel morel fermented group, *Pinus massoniana* pollen+peach kernel morel fermented group, *Pinus massoniana* pollen+peach kernel morel fermented group, *Pinus massoniana* pollen+peach kernel morel fermented group, yeast fermented group of kudzu root were set up. At the end of the intervention, serum samples were collected to test the levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C); liver tissues were collected to determine the levels of hepatic TG, TC, malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels, and liver pathology was analyzed by hematoxylin staining. **Results** After the intervention of different fermentation groups, all of them showed a certain degree of hepatoprotective effect, and the effect was better than that of the unfermented group. Among them, the *Pinus massoniana* pollen+peach kernel+kudzu root *Saccharomyces* fermentation group had the most significant effect, followed by the *Pinus massoniana* pollen+peach kernel morel mushroom fermentation group. The serum TG, TC, ALT, AST and LDL-C levels in the yeast-fermented *Pinus massoniana* pollen+peach kernel+*Pueraria lobata* group were (0.62±0.04) mmol/L, (3.13±0.28) mmol/L, (0.68±0.15) U/mL, (2.66±0.31) U/mL and 0.75±0.08 mmol/L, respectively, which were reduced compared with those in the model group, respectively by 32.61%, 31.51%, 71.43%, 20.60% and 54.27%, respectively; and the serum HDL-C content was (2.17±0.32) mmol/L, which was increased by 33.13% compared with the model group. Its liver TG, TC and MDA contents were (0.09±0.02), (0.020±0.002) and (0.34±0.03) mmol/gprot, respectively, which were 55.00%, 45.95% and 37.04% lower compared with that of the model group; its liver GSH content was (9.52±3.25) μmol/gprot, which was 2.15 times higher than that of the model group. **Conclusion** Microbial fermentation can significantly enhance the hepatoprotective efficacy of *Pinus massoniana* pollen compound combination. Among them, yeast-fermented *Pinus massoniana* pollen+peach kernel+*Pueraria lobata* is the optimal solution, followed by yeast-fermented *Pinus massoniana* pollen+peach kernel, and this study provides experimental basis for the development of functional liver protection products.

KEY WORDS: *Pinus massoniana* pollen; compound fermentation; alcoholic fatty liver; antioxidant; liver injury

0 引 言

酒精性脂肪肝病(alcoholic fatty liver disease, AFLD)的典型病理标志是肝细胞脂质蓄积量超过肝脏湿重 5%, 引起肝细胞一系列的病变[1], 其核心发病机制涉及乙醇代谢诱导的氧化应激损伤与脂质代谢紊乱双向失衡[2–3]。乙醇在肝脏代谢过程中消耗大量还原型谷胱甘肽, 同时提高活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成, 引发线粒体功能障碍和脂质过氧化链式反应; 另一方面, 乙醇通过抑制腺苷酸活化蛋白激酶等通路干扰脂肪酸 β-氧化, 共同导致甘油三酯、胆固醇在肝细胞内异常沉积[4–5]。

松花粉(*Pinus massoniana* pollen)作为传统药食同源资源, 凭借其独特的生物活性物质谱备受关注, 其富含多酚类(1.89~3.52 mg/g)、黄酮类(1.61~6.10 mg/g)化合物及多种必需氨基酸[6–8]等活性成分, 在降糖[9]、减肥[10]、抗氧化[11]、延缓衰老[12]、增强免疫力[13]、抗炎[14]及护肝[15–16]

等方面发挥重要作用。已有研究表明松花粉可以通过激活肝脏 Kupffer 细胞增强毒素清除能力, 阻断炎症级联反应[17], 实验人员发现肝损伤细胞模型经不同浓度松花粉提取物的干预后, 显著改善细胞的损伤、氧化应激和凋亡水平[18]。然而, 松花粉细胞壁的孢粉素结构高度耐酸碱、耐高温高压, 导致大部分结合态活性成分无法被肠道有效吸收, 严重制约其生物利用度[19–20]。微生物发酵技术通过多重生物转化途径显著提升松花粉的生物可利用性及功能活性, 微生物通过分泌的胞外酶定向降解松花粉的孢粉素抗性结构, 使细胞壁通透性提升[21], 促进结合态多酚、黄酮等活性成分的溶解释放。微生物代谢将高分子量蛋白质水解为低分子量生物活性肽及游离氨基酸[22], 同时本身可能对多酚、黄酮类物质进行生物转化, 产生活性更强或更易吸收的代谢产物, 从而级联放大护肝功效[23–24]。

本研究旨在探索通过微生物发酵优化松花粉及其组方的护肝功效。在之前研究基础上, 选用酵母菌与羊肚菌对松花粉及其与其他药食同源原料的组方进行发酵处理。通过小鼠酒精脂肪肝动物模型, 进一步筛选可协同提升松花粉肝保护活性的最优发酵菌种复方原料配比方案, 为开发基于松花粉的高效护肝功能产品提供产业化理论基础及关键技术参数。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

破壁松花粉、松花粉+桃仁复合物、松花粉+桃仁羊肚菌发酵产物、松花粉+桃仁+葛根复合物、松花粉+桃仁+葛根羊肚菌发酵产物、松花粉+桃仁+葛根酵母菌发酵产物(烟台新时代健康产业有限公司); 酒精液体饲料(江苏省协同医药生物工程有限责任公司); 甘油三酯(triglyceride, TG)测试盒、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白浓度检测试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司); 还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(兰杰柯科技有限公司); 其他溶剂及试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2　仪器与设备

3K15 冷冻离心机(美国 Sigma 公司); 奥林巴斯 BX51 型光学显微镜(日本奥林巴斯光学仪器设备有限公司); SCIENTZ-50F/A 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技有限公司); G154 蒸汽压力灭菌锅(致微仪器有限公司); Spectra Max 190 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); AX205 型电子分析天平(精度 0.0001 g, 瑞士 MettlerToledo 仪器有限公司)。

1.3　方　法

1.3.1　发酵液的制备

复合发酵组: 取 2 g 破壁松花粉和 2 g 其他药食两用材料(桃仁、葛根)至 250 mL 锥形瓶中, 添加 2.6 g 葡萄糖(20 g/L)和 120 mL 去离子水混匀后巴氏灭菌(中心温度 85 ℃, 保温 30 min)作为发酵基质, 冰浴冷却至室温后, 以体积分数 10%接种量接种, 酵母菌发酵条件: 30 ℃、200 r/min、5 d; 羊肚菌发酵条件: 26 ℃、120 r/min、5 d。发酵结束后巴氏灭菌, 然后以 8000 r/min 离心 5 min, 过滤, 取一部分上清液, –20 ℃保存用于指标检测, 其他冻干备用。

未发酵组: 不同材料水提上清液。

1.3.2　动物实验设计

本研究方案经江南大学实验动物中心伦理委员会批准实施, 审批号为 JN.NO20250113C070033[005], 所有动物实验操作符合江南大学动物管理与使用委员会的规定。SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠(8 周龄, 体重 22 g±2 g), 由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供[许可证 SCXK(浙)2019-0001], 饲养于屏障环境中(温度 20~26 ℃, 湿度 55%~70%), 通过饲喂酒精液体饲料建立小鼠慢性酒精肝损伤模型。动物实验分组如表 1 所示。

表 1　动物实验分组

Table 1　Animal experimental grouping

编号	组别	分组描述
1	空白对照组	灌胃生理盐水
2	疾病模型组	灌胃生理盐水
3	松花粉+桃仁未发酵组	灌胃松花粉+桃仁未发酵产物(400 mg/kg•BW)
4	松花粉+桃仁羊肚菌发酵组	灌胃松花粉+桃仁羊肚菌发酵产物(400 mg/kg•BW)
5	松花粉+桃仁+葛根未发酵组	灌胃松花粉+桃仁+葛根未发酵产物(400 mg/kg•BW)
6	松花粉+桃仁+葛根羊肚菌发酵组	灌胃松花粉+桃仁+葛根羊肚菌发酵产物(400 mg/kg•BW)
7	松花粉+桃仁+葛根酵母菌发酵组	灌胃松花粉+桃仁+葛根酵母菌发酵产物(400 mg/kg•BW)

小鼠适应性喂养后, 第一阶段, 小鼠进行 7 d Lieber-DeCarli 液体基础饲料(表 2)适应性喂养; 第二阶段, 除空白组实验鼠饲喂液体基础饲料外, 其余组液体饲料中酒精浓度以 1%为梯度递增直至 5%; 第三阶段, 使用 Lieber-DeCarli 液体饲料, 其中模型组、阳性对照组和提取物干预组小鼠每天饲喂 Lieber-DeCarli 酒精液体(5%酒精)饲料, 空白组小鼠每天饲喂 Lieber-DeCarli 对照液体(不含酒精)饲料。

松花粉不同发酵物组分及阳性对照组均由生理盐水配置, 采用灌胃方式给药 200 μL, 空白组和模型组小鼠则

灌胃等体积的生理盐水 200 μL, 给药频率为每天一次, 具体给药分组按照表 1 实行, 共 14 d。实验期间小鼠自由饮水。每周测一次体重。实验结束后, 对动物进行异氟烷麻醉、眼眶取血和颈椎脱臼, 收集血液、肝脏等组织样本进行后续分析。将取得的血浆 4 ℃, 4000 r/min 离心 15 min, 取血清保存于–20 ℃, 处死小鼠后解剖取肝脏用生理盐水清洗并称重, 一部分置于 4%多聚甲醛溶液保存, 一部分迅速保存于液氮中。

表 2 小鼠液体饲料热量组成表(%)

Table 2 Calorie composition of liquid feed for mice (%)

热量组成	液体对照饲料	酒精液体饲料
酒精	0	28
脂肪	35	35
蛋白质	18	18
碳水化合物	47	19

1.4 体重及脏器指数测定

实验期间, 每周测定小鼠体重。实验结束时, 称量清洗干净且用滤纸轻轻擦干表面水分的肝脏重量, 计算肝脏指数(肝湿重与体重比值)。

1.5 血清指标测定

采用商业化试剂盒测定, 具体步骤严格按照说明书执行。检测项目为小鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C、ALT、AST 的含量。

1.6 肝脏生化指标测定及组织病理检测

将称重完毕的肝脏取固定部分置于 4%多聚甲醛中固定, 使用梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 苏木精伊红染色后, 于光学显微镜下进行组织病理学观察, 观察肝脏细胞结构。

取剩余肝组织约 0.1 g, 按 1:9 (g:mL)的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水进行匀浆, 于 4 ℃, 2500 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至新的离心管中, 得 10%肝组织匀浆液。根据试剂盒说明书测定小鼠肝脏 TG、TC、GSH、MDA 的含量。

1.7 数据处理

数据用平均值±标准偏差表示, 所有处理重复 3 次。采用 Excel 2016 进行数据分析, 并用 GraphPad Prism 10 作图。使用 Statistics 软件对数据进行显著性分析, P<0.05 为具有显著性差异。

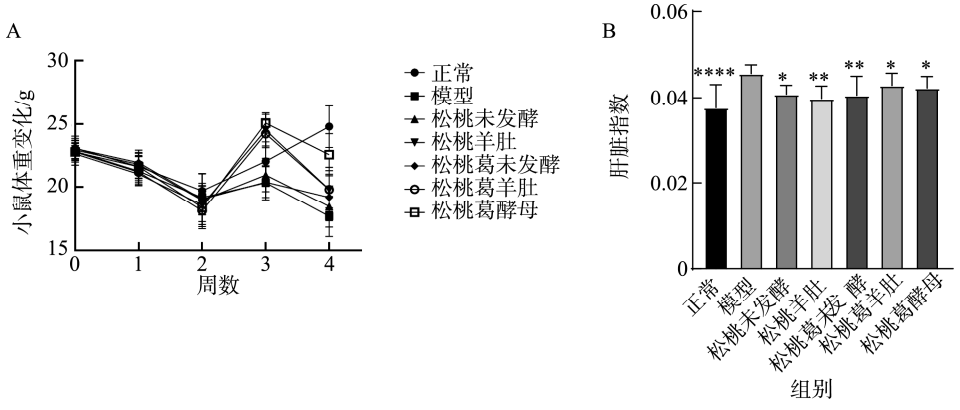
2 结果与分析

2.1 不同发酵产物对小鼠体重及肝指数的影响

通过第一批次动物实验筛选得到羊肚菌发酵松花粉复配桃仁护肝效果较好, 接着设计第二批次动物实验探究将复配比例调整后羊肚菌发酵松花粉复配桃仁产物的护肝效果, 同时补充酵母菌和羊肚菌分别发酵松花粉复配桃仁、葛根干预组, 进一步探究松花粉复配桃仁和葛根是否能强化护肝作用。记录小鼠实验期间体重变化, 结果如图 1A 所示, 随着酒精液体饮食的造模时间增加, 模型组小鼠相比正常组小鼠出现了体重下降, 这一现象可能与酒精摄入导致的机体代谢紊乱有关, 不同产物干预组干预后, 能在不同程度上缓解酒精引起的体重下降。图 1B 显示了各组小鼠肝脏指数的变化情况。与正常组相比, 模型组小鼠肝脏指数显著升高(P<0.0001), 提示其肝脏受损明显。经不同干预产物处理后, 肝脏指数均呈现显著下降趋势(P<0.05), 表明各干预措施在一定程度上改善了肝脏损伤。

2.2 不同发酵产物对小鼠血清相关指标影响

肝脏是机体能量代谢、脂质代谢、胆汁酸合成及酒精代谢等多种生理过程的关键枢纽。大量研究表明, 过量饮酒会导致肝功能障碍, 其中脂质代谢紊乱是酒精性肝病的重要病理特征之一[25]。酒精摄入可促进肝脏中 TC 和 TG 的过度合成, 导致脂质在肝细胞内异常堆积[26]。这种脂质积累不仅加重肝细胞损伤, 还进一步促进酒精性脂肪性肝病向炎症甚至纤维化阶段发展[27]。



注: 与模型组相比, *表示差异显著(P<0.05), **表示差异极显著(P<0.01), ****表示差异高度强极显著(P<0.001), 下同。

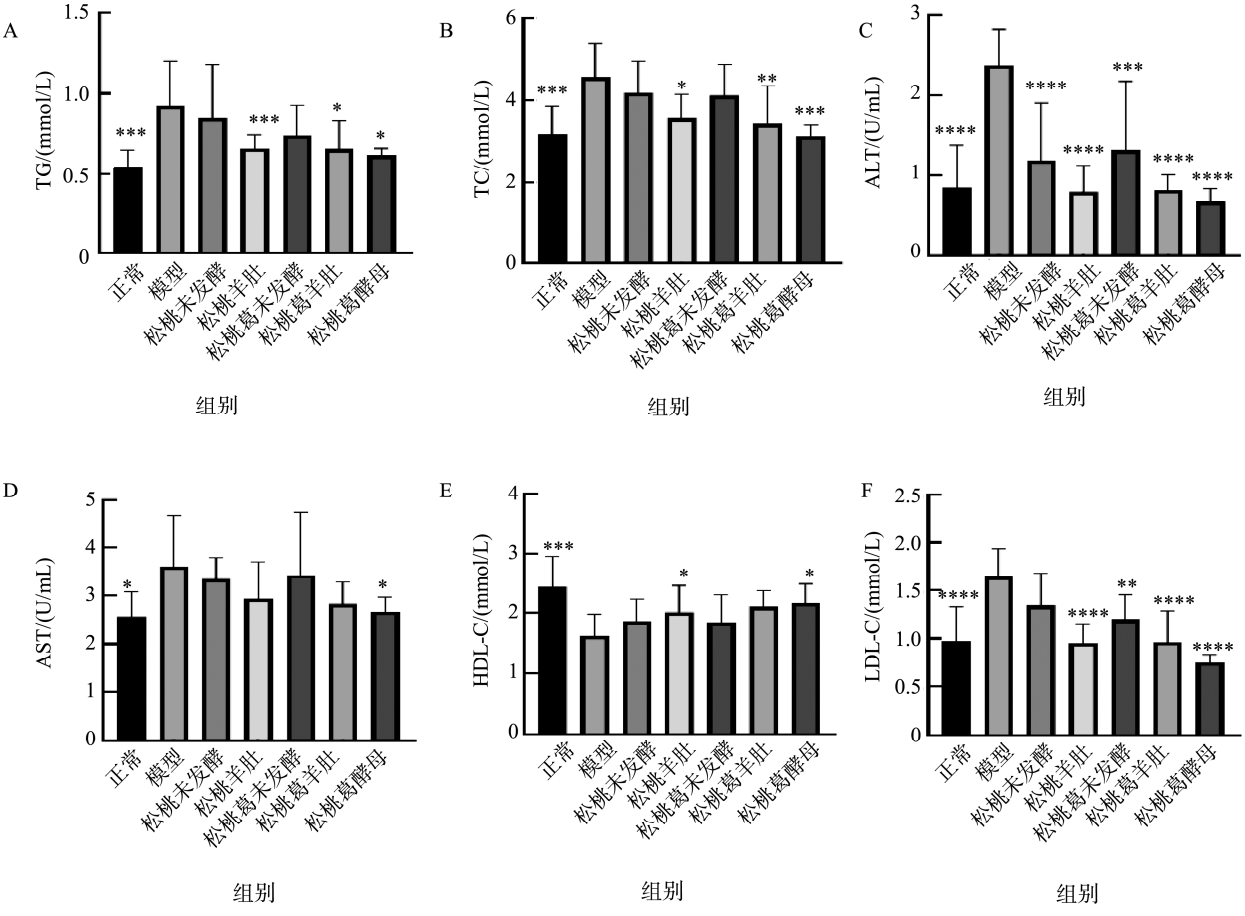
图 1 不同比例优选发酵产物干预后小鼠体重(A)和肝脏指数(B)变化

Fig.1 Changes in body weight (A) and liver index (B) of mice after intervention with different ratios of preferred fermentation products

测定小鼠血清 TC、TG 含量如图 2A~B 所示, 酒精干预后, 模型组相比空白组显著上升(P<0.01), 分别由(0.55±0.10) mmol/L、(3.17±0.67) mmol/L 上升至(0.92±0.28) mmol/L、(4.57±0.82) mmol/L, 经不同产物干预后均有所下调, 且发酵后产物效果优于未发酵产物, 其中羊肚菌发酵松桃组、酵母菌发酵松桃葛组较模型组均能显著下降 TG、TC 含量(P<0.05), 其 TG 含量分别为(0.55±0.08) mmol/L、(0.62±0.04) mmol/L, 相比模型组分别降低了 39.93%、32.61%, TC 含量分别为(3.57±0.58) mmol/L、(3.13±0.28) mmol/L, 相比模型组分别降低了 21.91%、31.51%。

肝脏脂肪沉积的异常增加会诱导肝脏功能损伤, 血清转氨酶 ALT 和 AST 的水平是评价肝脏功能损伤程度的重要标志指标[28–29]。测定小鼠血清 ALT、AST 含量, 结果如图 2C~D 所示, 模型组相比正常组 ALT、AST 显著提高(P<0.05), 分别由(0.85±0.53) U/mL、(2.56±0.51) U/mL 上升至(2.38±2.11) U/mL、(3.61±1.07) U/mL。对于 ALT 含量, 相比未发酵产物, 3 组发酵产物均能显著下调其水平(P<0.01), 其中酵母菌发酵松桃葛组效果最佳(0.68±0.15) U/mL, 相比模型组降低了 71.43%。对于 AST 含量, 所有发酵组效果均优于未发酵组, 但只有酵母菌发酵松桃葛组具有显著性(2.66±0.31) U/mL, 相比模型组降低了 20.60%。表明松花粉复配发酵产物可以减轻酒精对小鼠肝细胞的损伤, 降低血清中 ALT 和 AST 活力, 改善酒精诱导小鼠肝脏损伤的作用。

测定小鼠血清 LDL-C、HDL-C 含量, 结果如图 2E~F 所示。模型组小鼠相比正常组 LDL-C 含量显著提高(P<0.0001), 由(0.98±0.35) mmol/L 提高至(1.64±0.29) mmol/L, 发酵干预组相比未发酵组效果更佳, 其中酵母菌发酵松桃葛组效果最佳, 显著降低至(0.75±0.08) mmol/L (P<0.0001), 相比模型组降低了 54.27%。对于 HDL-C 含量, 模型组相比正常组, 由(2.44±0.51) mmol/L 显著降低至(1.63±0.35) mmol/L (P<0.001), 不同组干预后, 羊肚菌发酵松桃组和酵母菌发酵松桃葛组能显著提高 HDL-C 含量(P<0.05), 分别为(2.22±0.61) mmol/L、(2.17±0.32) mmol/L, 相比模型组提高了 36.35%、33.13%。表明松花粉复配发酵产物能够有效改善小鼠的血脂代谢紊乱, 缓解因酒精性脂肪肝导致的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平异常。



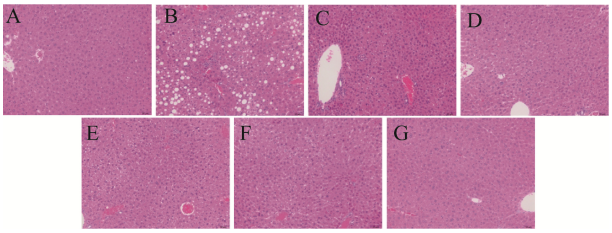
注: 与模型组相比, ***表示差异强极显著(P<0.001), 下同。

图 2　不同比例优选发酵产物干预后小鼠血清相关指标变化

Fig.2　Changes of serum related indexes in mice after intervention with different ratios of preferred fermentation products

2.3 不同发酵产物对小鼠肝脏组织病理的影响

如图 3 所示, A~G 分别为不同组小鼠肝脏病理切片情况。正常组小鼠肝细胞结构完整, 排列有序, 胞浆均匀, 无明显脂质沉积。模型组肝细胞内大量脂肪空泡堆积, 组织结构紊乱, 出现明显脂肪变性。经干预后, 各组均有所改善, 其中发酵松花粉组效果更优, 明显减少脂肪空泡, 改善组织结构, 优于未发酵组的保护效果。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 松桃未发酵; D. 松桃羊肚; E. 松桃葛未发酵; F. 松桃葛羊肚; G. 松桃葛酵母。

图 3 不同比例优选发酵产物干预后小鼠肝脏组织病理结构变化(200×)

Fig.3 Histopathological structural changes in mouse liver after intervention with different ratios of preferred fermentation products (200×)

2.4 不同比例优选发酵产物对小鼠肝脏相关指标影响

对小鼠肝脏组织中 TG、TC 含量进行测定, 结果如图 4A~B 所示, 模型组小鼠 TG、TC 含量相比正常小鼠显著增加 (P<0.0001), 分别由 (0.09±0.04) mmol/gprot、(0.024±0.008) mmol/gprot 显著增加至(0.20±0.03) mmol/gprot、(0.037±0.006) mmol/gprot, 经不同产物干预后, 发酵产物能显著下调 TG、TC 含量(P<0.05), 效果优于未发酵组, 其中酵母菌发酵松桃葛组效果最好, TG、TC 含量分别为 (0.09±0.02) mmol/gprot、(0.020±0.002) mmol/gprot, 相比模型组降低了 55.00%、45.95%。

氧化应激在酒精性肝病的病理进程中发挥了至关重要的作用。研究表明, 长期或过量饮酒可促进 ROS 的过度生成, 并导致机体抗氧化防御系统受损, 从而引发肝细胞氧化损伤和脂质过氧化[30]。GSH 的活性能够反映机体清除活性氧的能力和肝细胞对氧化应激的抵抗程度, MDA 作为脂质过氧化反应的终末代谢产物, 直接反映机体自由基对脂质分子的氧化损伤强度。其细胞毒性特性使其成为评估组织氧化应激水平的关键生物标志物。在肝脏病理研究中, MDA 积累量可定量表征肝细胞膜脂质过氧化损伤程度[31]。

测定小鼠肝脏组织中 GSH 含量, 结果如图 4C 所示, 模型组 GSH 含量 (4.43±2.55) μmol/gprot 相比正常组 (10.97±3.99) μmol/gprot 显著下降(P<0.05), 经不同发酵组干预后, GSH 含量均有所上调, 其中酵母菌发酵松桃葛组效果显著(P<0.05), 其 GSH 显著提高至(9.52±3.25) μmol/gprot, 是模型组的 2.15 倍。

测定小鼠肝脏组织中 MDA 含量, 测定结果如图 4D 所示,

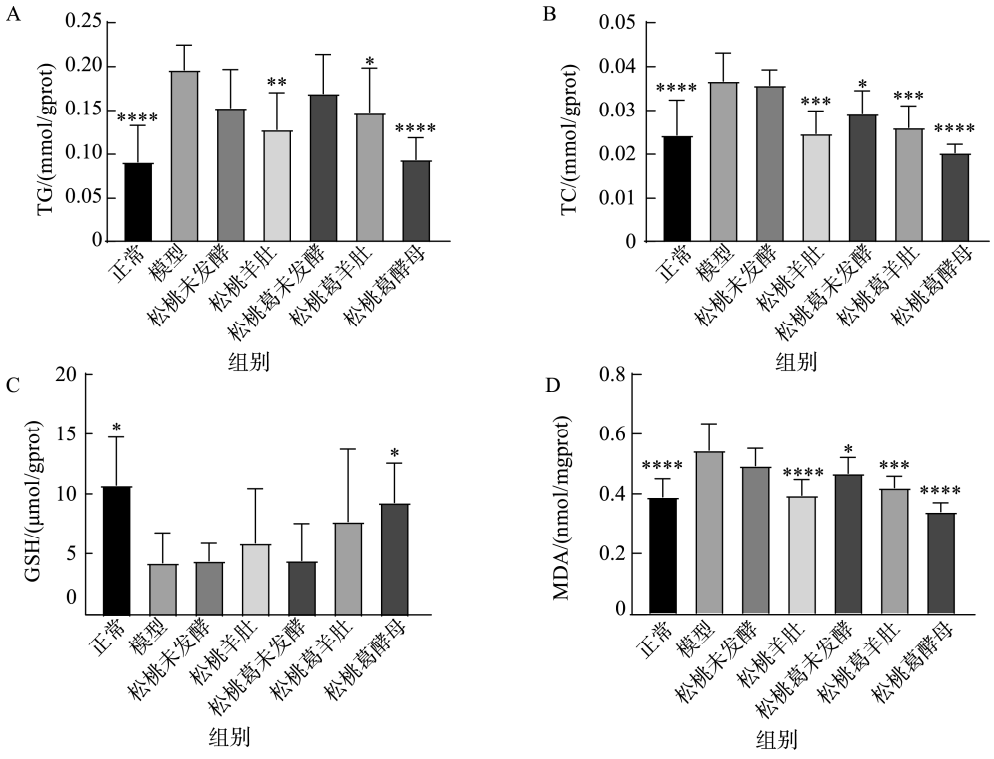


图 4 不同发酵组干预后小鼠肝脏相关指标变化

Fig.4 Changes of liver-related indexes in mice after intervention of different fermentation groups

模型组小鼠肝脏 MDA 含量相比正常小鼠显著升高(P<0.0001), 由(0.39±0.06) mmol/gprot 升高至(0.54±0.09) mmol/gprot, 除松桃未发酵组, 其他干预组均能显著下调MDA 含量(P<0.05), 其中酵母菌发酵松桃葛组 MDA 含量最低, 为(0.34±0.03) mmol/gprot, 相比模型组降低了 37.04%。表明松花粉复配发酵产物可以显著降低 MDA 含量, 同时一定程度上提高 GSH 的活力, 促进自由基的清除、减轻氧化应激所致损伤, 从而改善酒精性脂肪肝诱导的氧化应激。

3　结　论

酒精性脂肪肝的主要病理特征包括脂质代谢紊乱、氧化应激反应和肝细胞损伤。长期酒精过量摄入促进肝脏脂质合成并抑制脂肪酸氧化, 导致血清及肝组织中 TG、TC 水平升高, 伴随 LDL-C 增加和 HDL-C 降低, 从而加剧脂质沉积和血脂异常。酒精代谢过程中产生的过量 ROS 可引发脂质过氧化反应, 造成肝细胞膜结构损伤, ROS 与脂质过氧化产物还可作为上游信号激活 NF-κB 通路, 促进促炎因子如肿瘤坏死因子-α 或白细胞介素-1β 的释放, 从而加重肝细胞坏死与炎症浸润[32]。

在本研究中, 松花粉复配发酵产物通过增强抗氧化防御, 降低 MDA 水平并提高 GSH 含量, 有效缓解酒精诱导的氧化应激, 可能通过激活 Nrf2/Keap1-ARE 信号通路, 进而上调下游抗氧化酶如血红素氧合酶 1、超氧化物歧化酶、GSH 的表达, 提升机体抗氧化防御能力。同时, 发酵过程可能增加了多酚、黄酮等抗氧化活性成分的含量与利用度, 从而进一步强化了自由基清除作用[33–34]。

本研究进一步优化不同复配比例及菌种发酵对松花粉护肝效果的影响。结果显示, 将松花粉与桃仁比例调整后, 发酵产物仍具有良好的护肝作用, 且优于对应未发酵组。在所有发酵组中松花粉+桃仁+葛根酵母菌发酵组效果最好, 其次为松花粉+桃仁羊肚菌发酵组。综合比较, 发酵组整体优于未发酵组, 适宜的复配比例与特定发酵菌种可能通过协同作用改变松花粉及辅料中的多酚类、黄酮类成分的结构与含量, 提高其抗氧化活性与生物利用度, 促进肝脏脂肪分解代谢, 有效缓解酒精性脂肪肝。本研究为开发复合松花粉发酵产品提供理论依据。

参考文献

[1] O'SHEA RS, DASARATHY S, MCCULLOUGH AJ, *et al*. Alcoholic liver disease [J]. Hepatology, 2010, 51(1): 307–328.

[2] WANG X, WANG Y, LIU Y, *et al*. Hepatoprotective effects of sea cucumber ether-phospholipids against alcohol-induced lipid metabolic dysregulation and oxidative stress in mice [J]. Food & Function, 2022, 13(5): 2791–2804.

[3] TSERMPINI EE, PLEMENITAŠ ILJEŠA, DOLŽAN V. Alcohol-induced oxidative stress and the role of antioxidants in alcohol use disorder: A systematic review [J]. Antioxidants, 2022, 11(7): 1374.

[4] LÍVERO FA, ACCO A. Molecular basis of alcoholic fatty liver disease: From incidence to treatment [J]. Hepatology Research, 2016, 46(1): 111–123.

[5] SEITZ HK, BATALLER R, CORTEZ-PINTO H, *et al*. Alcoholic liver disease [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1): 16.

[6] YANG S, WEI K, JIA F, *et al*. Characterization and biological activity of Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharide *in vitro* [J]. PloS One, 2015, 10(3): e0115638.

[7] CHENG Y, WANG Z, QUAN W, *et al*. Pine pollen: A review of its chemical composition, health effects, processing, and food applications [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 599–614.

[8] 程勇. 前处理对松花粉营养活性成分及贮藏稳定性的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
CHENG Y. Effects of pretreatment on nutritional active components and storage stability of pine pollen [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.

[9] 赵可心, 夏凯, 苑鹏, 等. 松花粉提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖脂代谢的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 83–90.
ZHAO KX, XIA K, YUAN P, *et al*. The effect of pine pollen extract on glycolipid metabolism in insulin-resistant HepG2 cells [J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(6): 83–90.

[10] GENG Y, ZHANG H, SONG H, *et al*. Preventing effect on diet-induced obesity of water-extract from masson pine pollen on mice [J]. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2015, 12(5): 14–21.

[11] LEE KH, KIM AJ, CHOI EM. Antioxidant and antiinflammatory activity of pine pollen extract *in vitro* [J]. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2009, 23(1): 41–48.

[12] 周玉蕾. 松花粉粗多糖对小鼠抗疲劳作用的研究[D]. 延边朝鲜族自治州: 延边大学, 2022.
ZHOU YL. Research on the anti-fatigue effect of crude polysaccharides from pine pollen on mice [D]. Yanbian Korean Autonomous Prefecture: Yanbian University, 2022.

[13] GUO F, XUE C, WU C, *et al*. Immunoregulatory effects of Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharide on chicks co-infected with avian leukosis virus and *Bordetella avium* early in ovo [J]. Research in Veterinary Science, 2014, 96(2): 260–266.

[14] 王桐, 于建伟, 杨长军, 等. 松花粉提取物抗炎功效及安全性的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(23): 21–24.
WANG T, YU JW, YANG CJ, *et al*. Study on the anti-inflammatory efficacy and safety of pine pollen extract [J]. Food Research and Development, 2014, 35(23): 21–24.

[15] GÖK HN, GÜL H, GÜLFRAZ M, *et al*. Preclinical study on the hepatoprotective effect of pollen extract of *Pinus brutia* ten. (Red Pine) in mice and phenolic acid analysis [J]. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 18(3): 319.

[16] 黄爱招, 李亦聪, 梁超峰, 等. 松花粉总黄酮对小鼠化学性肝损伤保护效应探析[J]. 世界中医药, 2020, 15(16): 2373–2376.
HUANG AIZ, LI YC, LIANG CF, *et al*. Analysis of the protective effect of total flavonoids from pine pollen on chemical liver injury in mice [J]. World of Traditional Chinese Medicine, 2020, 15(16): 2373–2376.

[17] 谢惠萍, 陈琼瑶, 蒋中仁. 松花粉对酒精性肝损伤的保护功能研究[J].

中国现代医药杂志, 2008, 4: 47–49.
XIE HP, CHEN QY, JIANG ZR. Study on the protective function of pine pollen on alcoholic liver injury [J]. Chinese Journal of Modern Medicine, 2008, 4: 47–49.

[18] 马丹丹. 松花粉水提物的抗酒精肝损伤功能及其提升研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
MA DD. Research on the anti-alcoholic liver injury function and its enhancement of water extract of pine pollen [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.

[19] WIERMANN R, GUBATZ S. Pollen wall and sporopollenin [J]. International Review of Cytology. Academic Press, 1992, 140: 35–72.

[20] CHENG Y, QUAN W, QU T, *et al.* Effects of 60Co-irradiation and superfine grinding wall disruption pretreatment on phenolic compounds in pine (*Pinus yunnanensis*) pollen and its antioxidant and *α*-glucosidase-inhibiting activities [J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128808.

[21] ZHANG Z, CAO HG, CHEN C, *et al*. Effects of fermentation by *Ganoderma lucidum* and Saccharomyces cerevisiae on rape pollen morphology and its wall [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54: 4026–4034.

[22] TAHA S, EL-ABD M, DE-GOBBA C, *et al*. Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures [J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26: 1325–1332.

[23] YANG F, CHEN C, NI D, *et al*. Effects of fermentation on bioactivity and the composition of polyphenols contained in polyphenol-rich foods: A review [J]. Foods, 2023, 12(17): 3315.

[24] 王璇. 发酵法提升松花粉的活性成分及降脂功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
WANG X. Research on enhancing the active components and lipid-lowering function of pine pollen by fermentation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.

[25] GAO B, BATALLER R. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1572–1585.

[26] YOU M, ARTEEL GE. Effect of ethanol on lipid metabolism [J]. Journal of Hepatology, 2019, 70(2): 237–248.

[27] XU J, LAI KKY, VERLINSKY A, *et al.* Synergistic steatohepatitis by moderate obesity and alcohol in mice despite increased adiponectin and p-AMPK [J]. Journal of Hepatology, 2011, 55(3): 673–682.

[28] DONG JH, PING LJ, MENG YY, *et al*. Bifidobacterium longum BL-10 with antioxidant capacity ameliorates lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice by the nuclear factor-*κ*B pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(28): 8680–8692.

[29] WANG GW, ZHANG XL, WU QH, *et al*. The hepatoprotective effects of Sedum sarmentosum extract and its isolated major constituent through Nrf2 activation and NF-*κ*B inhibition [J]. Phytomedicine, 2019, 53: 263–273.

[30] LU Y, CEDERBAUM AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 44(5): 723–738.

[31] 邱萍, 李相, 孔德松, 等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 160–163.
QIU P, LI X, KONG DS, *et al*. New progress in the pathogenesis of alcoholic liver disease [J]. Chinese Journal of Pharmacology, 2014, 30(2): 160–163.

[32] WU D, CEDERBAUM AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage [J]. Alcohol Research & Health, 2003, 27(4): 277–284.

[33] ARTEEL GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease [J]. Gastroenterology, 2003, 124(3): 778–790.

[34] 余建, 潘宇, 苏于芯, 等. 枳椇子发酵液对酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(18): 29–33.
YU J, PAN Y, SU YX, *et al*. Protective effects of ziziphus jujuba fermentation liquid on alcoholic liver injury in mice [J]. Food Research and Development, 2025, 46(18): 29–33.

(责任编辑: 蔡世佳 冯东慧)