

# 陈皮酚类化合物调控 AHR 和 NF- $\kappa$ B 通路 抗苯并芘诱导的肺上皮细胞损伤

高超<sup>1</sup>, 刘杰<sup>2</sup>, 胡峰霞<sup>3</sup>

(1. 南方医科大学第三附属医院药剂科, 广东广州 510000)

(2. 深圳大学医学部, 广东深圳 518000) (3. 东营市人民医院科教科, 山东东营 257000)

**摘要:** 本文研究了苯并芘 (Bap) 诱发肺上皮细胞炎性损伤的作用机制及陈皮中的酚类化合物的抗炎活性及作用机制。通过从陈皮中分离出来酚类化合物并用于抗 Bap 诱导的人肺上皮 II 型细胞 (A549) 损伤的活性研究, 检测 Bap 对细胞炎症因子、NF- $\kappa$ B、芳基羟受体 (AHR) 通路相关蛋白表达的影响及陈皮酚类化合物对 Bap 造成损伤的保护作用。本文从陈皮中分离得到 6 个酚类化合物, 研究表明, 其中 aspidin BB 可降低 3.74% 由 Bap 诱导的 A549 细胞凋亡。aspidin BB 可抑制 Bap 诱导的 NO 及炎症因子 (IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 分泌, 分别降低了 49.22%、26.79%、37.86% 和 42.94%。Western blotting 结果显示, aspidin BB 可抑制 Bap 诱导的 AHR 和 NF- $\kappa$ B 相关蛋白的激活, 增强 A549 细胞的抗炎作用。因此得出陈皮酚类化合物 aspidin BB 可通过减少 Bap 诱导的炎症因子分泌, 调控 AHR、NF- $\kappa$ B 通路发挥抗炎及抗氧化损伤的功能。

**关键词:** 陈皮; 酚类化合物; 苯并芘; 芳基羟受体(AHR); NF- $\kappa$ B 通路

文章编号: 1673-9078(2021)02-36-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0720

## Pericarpium Citri Reticulatae Phenolic Compounds Regulate AHR and NF- $\kappa$ B Pathways Against Benzopyrene-Induced Lung Epithelial Cell Injury

GAO Chao<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>2</sup>, HU Feng-xia<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, China)

(2. Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518000, China)

(3. Department of Science and Education, Dongying People's Hospital, Dongying 257000, China)

**Abstract:** To study the mechanism of benzo- $\alpha$ -pyrene (Bap) induced inflammatory injury in pulmonary epithelial cells and explore the protective effect of pericarpium citri reticulatae phenolics, the phenolics in pericarpium citri reticulatae was isolated and their anti-inflammatory potency in Bap induced human lung epithelial type II cells (A549) was explored. The expressions of inflammatory factors and the protein expression in NF- $\kappa$ B, aryl hydrocarbon receptor (AHR) pathways were detected, and the protective potency of the phenolics was explored. Six phenolics were isolated and their structures were identified, among which aspidin BB can reduce by 3.74% apoptosis in Bap-induced A549 cell. Further, aspidin BB inhibited the secretion of NO and the inflammatory factors (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) by 49.22%, 26.79%, 37.86% and 42.94% respectively. Western blotting results showed that aspidin BB significantly inhibited the activation of AHR and NF- $\kappa$ B pathways induced by Bap stimuli. The phenolics isolated from the pericarpium citri reticulatae can regulate the AHR and NF- $\kappa$ B pathways to attenuate the inflammatory and oxidant damages induced by the Bap stimuli.

引文格式:

高超, 刘杰, 胡峰霞. 陈皮酚类化合物调控 AHR 和 NF- $\kappa$ B 通路抗苯并芘诱导的肺上皮细胞损伤[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 36-43

GAO Chao, LIU Jie, HU Feng-xia, et al. Pericarpium citri reticulatae phenolic compounds regulate AHR and NF- $\kappa$ B pathways against benzopyrene-induced lung epithelial cell injury [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 36-43

收稿日期: 2020-07-31

作者简介: 高超 (1987-), 女, 药师, 研究方向: 中药药理学

通讯作者: 刘杰 (1986-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学; 胡峰霞 (1967-), 女, 副主任护师, 研究方向: 中药药理学

**Key words:** pericarpium citri reticulatae; phenolics; benzo- $\alpha$ -pyrene; aryl hydrocarbon receptor (AHR); NF- $\kappa$ B pathway

哮喘是一种常见的慢性疾病,在世界范围内,其发病率在过去几十年中持续升高,对社会的经济造成很大的负担。研究显示,环境因素对哮喘的发病率具有很大的影响,其中大气污染是造成儿童及成人哮喘、鼻炎和支气管炎的重要原因<sup>[1]</sup>。苯并芘(Bap)是一种常见的环境污染物,化石燃料和香烟的燃烧、烧烤食物等都会产生大量的苯并芘<sup>[2]</sup>,长期暴露于具有较高浓度的苯并芘的空气中会引起哮喘、鼻炎和支气管炎等呼吸道疾病,进而导致肺功能下降<sup>[3,4]</sup>。

中国传统医学在中、西方医疗保健中均发挥了重要作用,多项科学证据支持使用中药治疗哮喘的有效性。如美国食品和药物管理局所研究的抗哮喘草药干预包括灵芝、苦参和甘草三种中草药的提取物,现已进入临床试验阶段<sup>[5]</sup>;而食物过敏草药配方-2(FAHF-2)已获得FDA研究新药(IND)批准并进入临床试验阶段<sup>[6]</sup>。

对于天然产物的深入研究是发现新药物的重要方式。陈皮(Pericarpium citri reticulatae)为芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的干燥成熟果皮。陈皮味辛、苦,性温,入脾、肺经,具有“理气健脾,燥湿化痰”的功效,主要用于治疗消化系统和呼吸系统疾病,为食管、胃十二指肠等消化道病症最常用的药物,可治疗脘腹胀满、噯气泛酸、恶心呕吐、便秘或腹泻等<sup>[7]</sup>。近年国内外研究人员在橘皮(orange peel)中发现了一些橘类特有的生物类黄酮成分,同时不断改进了黄酮提取的工艺<sup>[8]</sup>,这些橘类黄酮具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等功能<sup>[9-11]</sup>。但陈皮中的酚类生物成分的抗炎的作用却鲜有报道。因此,本文将对陈皮的酚类生物成分进行分离鉴定,并对其抗Bap诱导的肺上皮细胞炎性损伤活性进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

陈皮购于二天堂大药房(广州市,石牌区),由暨南大学药学院陈教授鉴定。文中使用的检测试剂盒、RIPA缓冲液和RNase购于上海碧云天生物科技有限公司。抗体均购自Cell Signaling Technology(CST, USA),其它化学品均购于Sigma或Adamas。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 陈皮有效成分的提取、细胞培养及细胞活性检测

通过超声提取法对陈皮(620 g)酚类活性成分进

行提取,并通过旋转蒸发仪对提取药液进行浓缩,获得陈皮提取物(37 g),于水/二氯甲烷体系萃取。将二氯甲烷组分(8.25 g)硅胶柱层析,用乙酸乙酯-甲醇梯度体系(100:1、10:1、1:1、0:100)洗脱,得到4个组分。将Fr.1(1.24 g)置于硅胶柱上,用二氯甲烷/甲醇梯度溶剂体系(100:5、20:1、1:1、0:100)洗脱,得到5个亚组分。组分1(0.31 g)采用半制备型高效液相色谱法(甲醇-水,40:60;流速:1 mL/min),得到化合物-1(tR 5.2 min)、化合物-2(tR 7.8 min)和化合物-3(tR 11.3 min)。组分2(0.61 g)采用半制备型高效液相色谱法(甲醇-水,30:70;流速:1 mL/min),得到化合物-4(tR 12.2 min),化合物-5(tR 15.5 min)和化合物-6(tR 19.4 min)。通过<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR和ESI-MS分析,鉴定其结构。

A549细胞培养于10% FBS、100 U/mL青霉素、100  $\mu$ g/mL链霉素、2 mM L-谷氨酰胺等配置的DMEM培养基中(37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。

CCK8法测定陈皮酚类化合物对A549细胞的保护作用:将A549细胞( $5 \times 10^3$ 细胞/孔)接种到含有200  $\mu$ L培养基的96孔培养板中,过夜。细胞经Bap(1.0  $\mu$ M)处理1.0 h,再经10  $\mu$ g/mL陈皮酚类化合物孵育12 h,与对照组进行比较,用CCK8试剂盒检测细胞活力。

#### 1.2.2 活性氧(ROS)和促炎细胞因子检测

根据检测试剂盒使用要求,对ROS及相关促炎细胞因子进行检测。将细胞 $5 \times 10^5$ 细胞/孔接种在6孔板中,孵育过夜后,Bap(1.0  $\mu$ M)处理1.0 h,然后用aspidin BB和陈皮提取物(10  $\mu$ g/mL)培养12 h。测量ROS和炎性细胞因子含量。

#### 1.2.3 线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )及细胞凋亡检测

将细胞 $5 \times 10^5$ 细胞/孔接种在6孔板中,孵育24 h,然后Bap(1.0  $\mu$ M)处理1.0 h,然后用aspidin BB、陈皮提取物(10  $\mu$ g/mL)培养12 h,收集细胞,冷PBS洗涤,37  $^{\circ}$ C下用1  $\mu$ g/mL JC-1孵育30 min。去除上清液,使用流式细胞仪检测。

将细胞 $5 \times 10^5$ 细胞/孔接种在6孔板中,孵育24 h,然后Bap(1.0  $\mu$ M)处理1.0 h,然后用aspidin BB、陈皮提取物(10  $\mu$ g/mL)培养12 h,收集细胞Annexin V-FITC/PI孵育,流式细胞仪检测分析细胞状态。

#### 1.2.4 Western blotting实验

细胞( $2 \times 10^6$ /皿)接种于10.0 cm培养皿中培养过夜。Bap(1.0  $\mu$ M)处理1.0 h,然后用aspidin BB和陈皮提取物(10  $\mu$ g/mL)培养12 h,收集细胞,采集



总蛋白，用 Bradford 蛋白测定法测定蛋白质含量。参考文献进行 Western blotting 蛋白分析<sup>[12]</sup>。利用 Image J 软件对蛋白密度进行分析。

1.3 数据处理

用 Graphpad Prism 5 (San Diego, USA) 进行数据分析。通过 Student's *t*-检验进行对照和治疗之间的统计学比较。所有实验至少进行 3 次。数据表示为平均值±标准差 ( $\bar{x}\pm sd$ )。  $p<0.05$  被认为具有统计学意义。

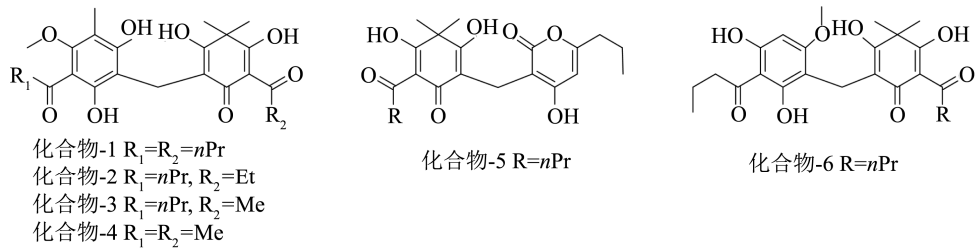


图 1 化合物-1~6 结构式

Fig.1 Structures of compound-1~6

表 1 化合物 1~6 1H、13C NMR 数据 [ $\delta/(\times 10^{-6})$ , J/Hz]

Table 1 Compound 1~6 1H, 13C NMR data [ $\delta/(\times 10^{-6})$ , J/Hz]

| Position | 化合物-1 <sup>a</sup> |            | 化合物-2 <sup>b</sup> |            | 化合物-3 <sup>b</sup> |            | 化合物-4 <sup>b</sup> |            | 化合物-5 <sup>b</sup>  |            | 化合物-6 <sup>b</sup> |            |
|----------|--------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|---------------------|------------|--------------------|------------|
|          | $\delta_H$         | $\delta_C$ | $\delta_H$         | $\delta_C$ | $\delta_H$         | $\delta_C$ | $\delta_H$         | $\delta_C$ | $\delta_H$          | $\delta_C$ | $\delta_H$         | $\delta_C$ |
| 1        | -                  | 112.6      | -                  | 112.7      | -                  | 112.6      | -                  | 112.7      | -                   | 110.9      | -                  | 105.0      |
| 2        | -                  | 163.0      | -                  | 163.0      | -                  | 162.9      | -                  | 163.4      | -                   | 187.7      | -                  | 160.3      |
| 3        | -                  | 107.7      | -                  | 107.8      | -                  | 107.7      | -                  | 108.0      | -                   | 108.1      | -                  | 107.3      |
| 4        | -                  | 159.8      | -                  | 159.9      | -                  | 159.8      | -                  | 159.9      | -                   | 199.6      | -                  | 165.6      |
| 5        | -                  | 109.6      | -                  | 109.7      | -                  | 109.6      | -                  | 109.6      | -                   | 44.7       | 6.09 s             | 92.0       |
| 6        | -                  | 160.4      | -                  | 160.4      | -                  | 160.4      | -                  | 160.6      | -                   | 173.2      | -                  | 160.9      |
| 7        | 3.73 s             | 61.7       | 3.71 s             | 61.7       | 3.73 s             | 61.6       | 3.74 s             | 61.6       | 3.48, 3.34 d (14.9) | 18.5       | 3.99 s             | 56.6       |
| 8        | -                  | 207.0      | -                  | 207.1      | -                  | 207.0      | -                  | 204.2      | -                   | 206.4      | -                  | 206.8      |
| 9        | 3.08 t (7.4)       | 44.4       | 3.06 t (7.4)       | 44.4       | 3.09 t (7.4)       | 44.4       | 2.72 s             | 31.0       | 3.12 t (7.4)        | 43.0       | 3.18               | 46.6       |
| 10       | 1.72               | 18.4       | 1.71 m             | 18.4       | 1.75 m             | 18.3       | -                  | -          | 1.68                | 18.4       | 1.71               | 18.4       |
| 11       | 0.99               | 14.2       | 0.97 t (7.4)       | 14.2       | 0.99 t (7.4)       | 14.1       | -                  | -          | 1.00 t (7.4)        | 14.1       | 1.01 t (7.5)       | 14.2       |
| 12       | 2.14 s             | 9.4        | 2.12 s             | 9.4        | 2.14 s             | 9.4        | 2.14 s             | 9.4        | 1.53 s              | 24.2       | -                  | -          |
| 13       | -                  | -          | -                  | -          | -                  | -          | -                  | -          | 1.47 s              | 25.6       | -                  | -          |
| 1'       | -                  | 111.1      | -                  | 111.1      | -                  | 111.0      | -                  | 111.1      | -                   | 102.1      | -                  | 108.2      |
| 2'       | -                  | 198.8      | -                  | 198.3      | -                  | 198.9      | -                  | 199.0      | -                   | 170.4      | -                  | 187.7      |
| 3'       | -                  | 108.3      | -                  | 108.2      | -                  | 108.6      | -                  | 108.7      | -                   | -          | -                  | 111.4      |
| 4'       | -                  | 187.7      | -                  | 187.7      | -                  | 187.6      | -                  | 187.7      | -                   | 164.8      | -                  | 198.7      |
| 5'       | -                  | 44.4       | -                  | 44.3       | -                  | 44.3       | -                  | 44.5       | 5.97 s              | 102.4      | -                  | 44.3       |
| 6'       | -                  | 172.0      | -                  | 172.0      | -                  | 172.2      | -                  | 172.2      | -                   | 168.9      | -                  | 171.3      |
| 7'       | 3.56 br s          | 17.3       | 3.56 br s          | 17.3       | 3.58 br s          | 17.3       | 3.58 br s          | 17.3       | 2.46 t (7.4)        | 35.6       | 3.54 br s          | 17.0       |
| 8'       | -                  | 206.8      | -                  | 207.7      | -                  | 203.7      | -                  | 203.8      | 1.68                | 20.3       | -                  | 207.7      |
| 9'       | 3.23 t (7.4)       | 43.2       | 3.22 q (7.2)       | 35.0       | 2.74 s             | 29.5       | 2.74 s             | 29.6       | 0.96 t (7.5)        | 13.7       | 3.18               | 43.2       |
| 10'      | 1.73               | 18.2       | 1.15 t (7.2)       | 8.6        | -                  | -          | -                  | -          | -                   | -          | 1.71               | 18.3       |
| 11'      | 0.99               | 14.1       | -                  | -          | -                  | -          | -                  | -          | -                   | -          | 1.01 t (7.5)       | 14.1       |
| 12'      | 1.53 s             | 24.5       | 1.52               | 24.5       | 1.51 s             | 24.5       | 1.52 s             | 24.5       | -                   | -          | 1.50 br s          | 25.1       |
| 13'      | 1.45 s             | 25.5       | 1.45               | 25.5       | 1.46 s             | 25.4       | 1.47 s             | 25.4       | -                   | -          | 1.50 br s          | 24.8       |

注：b 氢谱 500 MHz 碳谱 75 MHz 溶解于氘代氯仿，c 氢谱 500 MHz 碳谱 125 MHz 溶解于氘代氯仿。

## 2 结果与分析

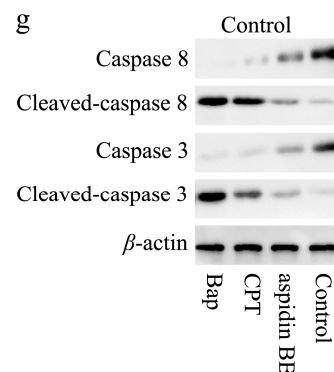
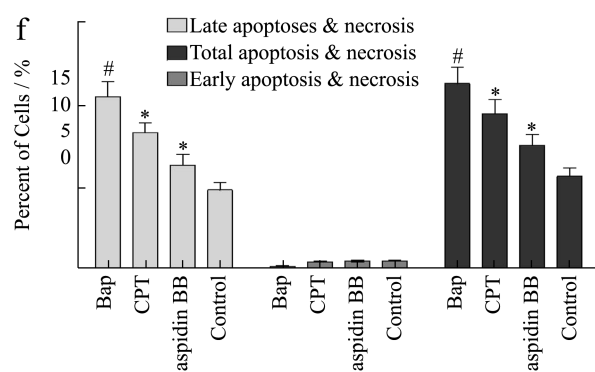
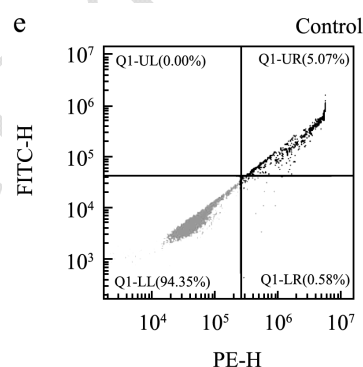
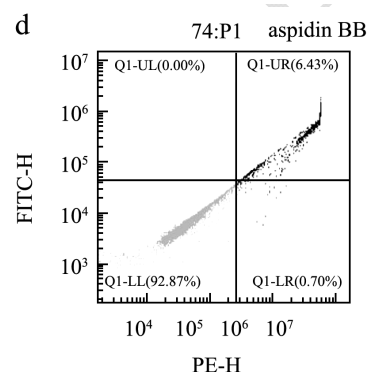
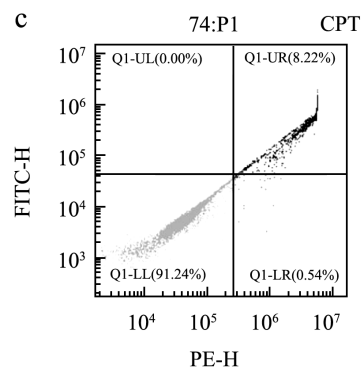
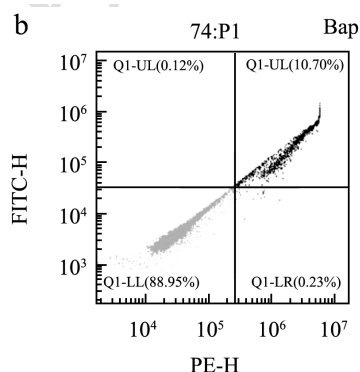
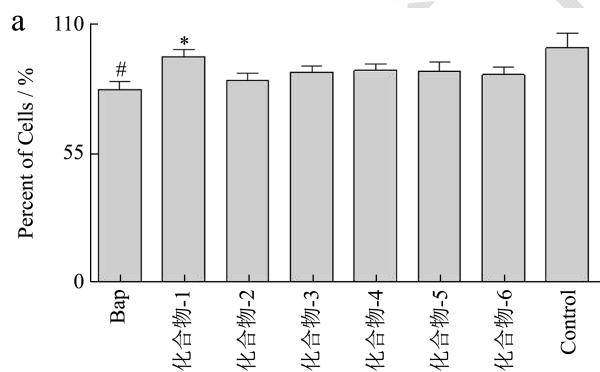
### 2.1 陈皮酚类化合物的分离及鉴定

本实验中我们共分离获得 6 个陈皮酚类化合物, 分别是化合物-1~aspidin BB<sup>[13]</sup>, 化合物-2~aspidin PB<sup>[14]</sup>, 化合物-3~aspidin AB<sup>[15]</sup>, 化合物-4~aspidin AA<sup>[16]</sup>, 化合物-5~phloropyron BB<sup>[17]</sup> 及化合物-6~desaspidin BB, 此 6 个酚类化合物均为首次从陈皮中分离获得 (图 1)。化合物 1H、<sup>13</sup>C NMR 数据总结于表 1 中。

### 2.2 陈皮酚类化合物抗炎活性检测

为避免陈皮酚类化合物对细胞的毒性损伤, 我们用不同浓度的陈皮酚类化合物 (0.005~5.0 mg/mL) 处理 A549 细胞 24 h, 并通过 CCK8 测定细胞活力。结果表明, 低于 1.40 mg/mL, 陈皮酚类化合物对细胞活力无影响 (结果未展示)。

在本实验中, 对照组细胞存活率设为 100%; 与对照组相比, Bap 组细胞存活率降低 17.7% ( $p < 0.05$ ), 而陈皮酚类化合物发挥了较好的保护作用。与 Bap 组相比, 经 10  $\mu$ g/mL 的陈皮酚类化合物处理 12 h 后, A549 细胞存活率分别提高了 13.90%, 3.90%, 7.65%, 8.12%, 7.92% 及 4.31% (图 2a)。我们推测, 陈皮酚类化合物可减轻 Bap 引起的损伤。基于化合物-1 具有最佳抗 Bap 诱导的损伤活性, 接下来我们将以化合物-1 为代表, 继续进行深入的研究。



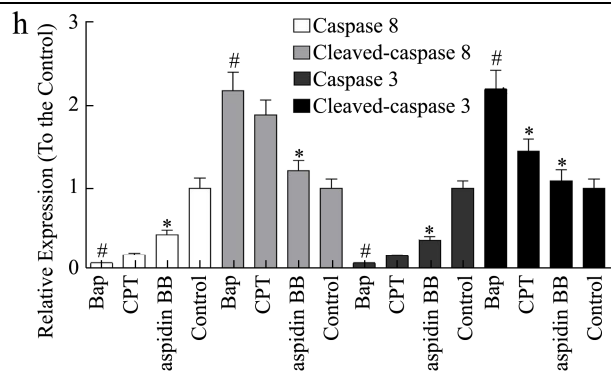


图2 Aspidin BB 减少 Bap 诱导的 A549 细胞凋亡

Fig.2 Aspidin BB reduces Bap-induced apoptosis in A549 cells

注：细胞培养 24 h 后，Bap (1.0  $\mu$ M) 处理 1.0 h，然后用 aspidin BB、陈皮提取物 (CPT-10  $\mu$ g/mL) 培养 12 h，收集细胞 Annexin-V-FITC/PI 染色，流式分析细胞凋亡 (## $p$ <0.01, # $p$ <0.05, 对照组, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05, Bap 组)。

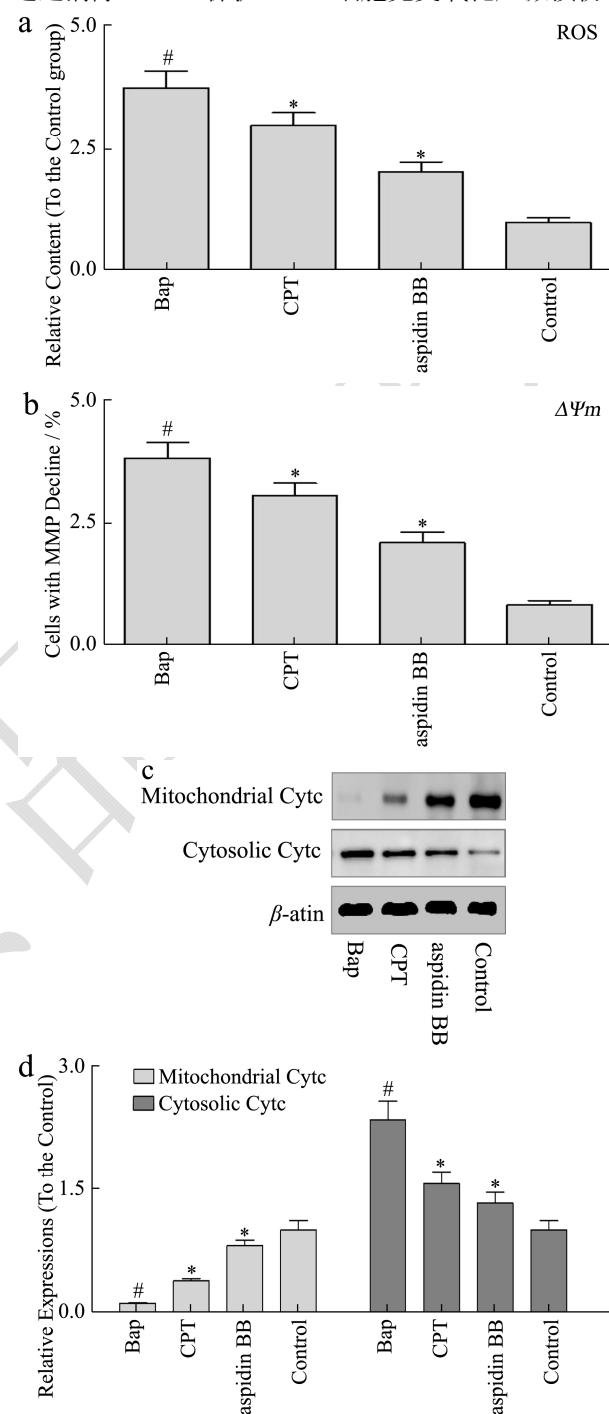
细胞凋亡是一种程序性细胞死亡形式，在细胞凋亡过程中细胞形态会发生显著的变化，如细胞收缩、核碎裂和染色质凝聚等；本实验中，与对照组相比，Bap 组细胞凋亡率为 5.62%。而与 Bap 组相比，陈皮提取物组及化合物-1 (aspidin BB) 治疗组细胞凋亡率分别降低 1.78% 和 3.74% (图 2b~f)；caspase 蛋白是细胞凋亡过程中重要的终末剪切酶，cleaved-caspase 则为 caspase 蛋白的活化形式，在细胞凋亡过程中起到重要作用。因此，本实验中检测了陈皮酚类化合物对 Bap 诱导的 caspase 蛋白激活抑制活性。实验结果显示，Bap 诱导的 caspase-3,8 蛋白激活被 aspidin BB 抑制 (图 2g、h)。可见，细胞凋亡实验为陈皮提取物及 aspidin BB 减弱 Bap 诱导的 A549 细胞损伤提供了直观的证据。

### 2.3 aspidin BB 抗 Bap 诱导的氧化应激活性评价

自由基产生过剩或抗氧化能力下降会导致细胞 DNA 损伤及细胞凋亡<sup>[18]</sup>。在炎症发展过程中，减少 ROS 的生成是减轻炎症损伤的一种潜在策略。将对照组的 ROS 含量设为 1，结果如图 3a 所示。与对照组相比，Bap 组的 ROS 含量升高 2.73 倍 ( $p$ <0.05)。而 Bap 诱导的 ROS 含量升高被 aspidin BB、陈皮提取物明显抑制。aspidin BB、陈皮提取物处理后，ROS 含量分别降低 20.23% ( $p$ <0.05) 和 45.61% ( $p$ <0.05)。

线粒体依赖性途径在细胞氧化应激过程中起着重要作用<sup>[18]</sup>。为了研究 aspidin BB、陈皮提取物抗 Bap 诱导的 A549 细胞氧化损伤的机制，我们检测了细胞  $\Delta\Psi_m$  的变化情况。如图 3b 所示，Bap 处理使  $\Delta\Psi_m$  显著下降 [3.39% (对照组) 下降到 15.30% ( $p$ <0.05)]。经 aspidin BB 处理后， $\Delta\Psi_m$  下降被显著抑制。综上所

述，aspidin BB 降低了细胞内 ROS 的积累，抑制了 A549 细胞的  $\Delta\Psi_m$  下降。进一步证实，aspidin BB 可通过清除 ROS，保护 A549 细胞免受氧化应激损伤。

图3 Aspidin BB 抑制 Bap 诱导的 ROS 生成及  $\Delta\Psi_m$  降低Fig.3 Aspidin BB inhibits Bap-induced ROS production and decreases  $\Delta\Psi_m$ 

注：A549 细胞于 6 孔板中培养 24 h，Bap (1.0  $\mu$ M) 处理 1.0 h，aspidin BB、陈皮提取物 (CPT-10  $\mu$ g/mL) 培养 12 h。检测细胞内的 ROS 和  $\Delta\Psi_m$  及 Western blotting 检测 Cyto c 的表达。所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 (n=3) 表示 (# $p$ <0.05, 对照组, \* $p$ <0.05, Bap 组)。

线粒体功能紊乱会导致细胞色素 c (Cyt c) 从线粒体释放到胞质中, 进而导致细胞抗氧化能力降低。本实验结果显示, Bap 刺激导致细胞质 Cyt c 显著升高, 线粒体 Cyt c 降低 (图 3)。然而, aspidin BB 扭转了 Bap 诱导的细胞质和线粒体 Cyt c 含量的变化。

## 2.4 aspidin BB 对 Bap 诱导的细胞炎症因子分泌的影响

泌的影响

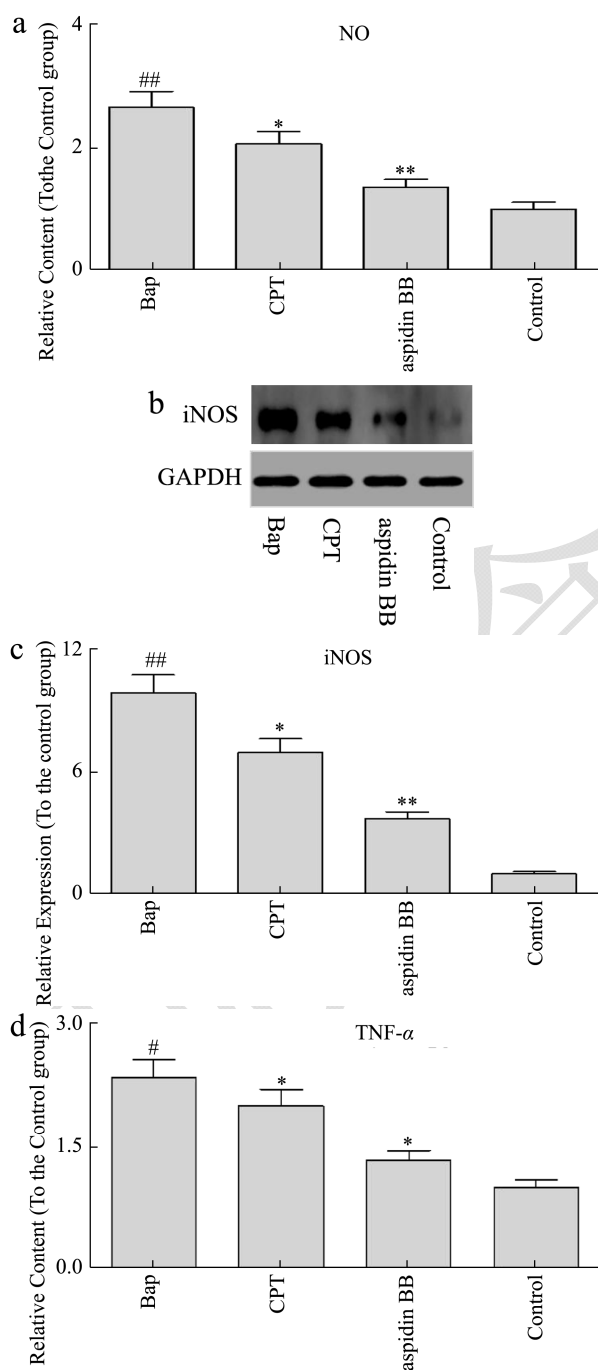


图 4 Aspidin BB 抑制 Bap 诱导的炎症因子分泌及 iNOS 表达  
Fig.4 Aspidin BB inhibits Bap-induced inflammatory factor secretion and iNOS expression

注: A549 细胞 6 孔板中孵育 24 h, Bap (1.0  $\mu$ M) 处理 1.0 h, aspidin BB、陈皮提取物 (CPT-10  $\mu$ g/mL) 培养 12 h。然后 Elisa 检测细胞内的炎症因子变化及 Western blotting 检测 iNOS 的表达变化 (# $p$ <0.05, 对照组, \* $p$ <0.05, Bap 组)。

炎症介质如炎症细胞因子、基质金属蛋白酶 (MMPS)、TNF- $\alpha$  和 NO 的表达可反映炎症的变化情况。研究显示 Bap 诱导的细胞损伤可能是由 NO 的过度产生引起的。过量的 NO 可以通过破坏线粒体电子传递链的功能来诱导细胞损伤<sup>[19]</sup>。为了研究 aspidin BB 在 Bap 诱导的 A549 细胞中是否具有抗炎能力, 我们检测了培养基中的 NO 含量。

如图 4a 所示, 与对照组相比, Bap 刺激显著诱导了 NO 释放 (1.66 倍,  $p$ <0.05)。而陈皮提取物治疗组, NO 含量显著降低。陈皮提取物及 aspidin BB 处理后, NO 含量分别下降 22.91% ( $p$ <0.05) 和 49.22% ( $p$ <0.05)。一氧化氮合酶 (iNOS) 可催化产生一氧化氮, 而细胞可通过上调 iNOS 表达而产生 NO。为了进一步探讨陈皮提取物对 NO 的下调机制, 我们进一步研究了细胞中 iNOS 的表达情况。如图 4c 所示, Bap 刺激显著增加了 iNOS 的表达。然而, 陈皮提取物及 aspidin BB 处理降低了 iNOS 的表达, 这表明陈皮提取物及 aspidin BB 可以通过抑制 iNOS 的表达来降低 NO 的产生。

炎症还表现为炎症细胞因子的表达增加,如 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  可刺激 iNOS 和 NO 的产生。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 与自身免疫性疾病有广泛的关系。此外,过量的细胞因子和 iNOS 介导的 NO 产生与炎症的发生有着密切的关系。因此,我们进一步检测了培养基中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的含量。

如图 4d~f 所示,与对照组相比,Bap 使 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量分别增加了 133%、57.9%和 74.2%。而与 Bap 组相比,陈皮提取物及 aspidin BB 显著降低了 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量。aspidin BB 作用后使 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量降低了 (42.94%,  $p<0.05$ )、(26.79%,  $p<0.05$ ) 和 (37.86%,  $p<0.05$ )。以上实验结果表明,陈皮提取物抑制了 Bap 诱导的 NO 产生,下调了 iNOS 的表达。因此我们推测,陈皮提取物可通过抑制 iNOS 介导的 NO 产生,以及 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等炎症因子的产生来发挥抗炎作用。

## 2.5 aspidin BB 对 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

NF- $\kappa$ B 信号通路在许多慢性炎症性疾病中被激活,也被称为促炎介质(如 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ )的转录因子,控制多种参与炎症的相关基因的表达。研究显示巨噬细胞可通过 NF- $\kappa$ B 信号通路上调 iNOS 表达,从而产生 NO<sup>[20]</sup>。如图 5a、b 所示,与 Bap 组相比,陈皮提取物及 aspidin BB 显著抑制了 Bap 诱导的 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-IKK $\alpha$  及 p-p65 表达。aspidin BB 处理使 Bap 诱导的 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达降低了 51.91% ( $p<0.05$ )。此外,aspidin BB 处理也显著抑制 Bap 诱导的 p-IKK $\alpha$  及 p-p65 的表达 ( $p<0.05$ )。

## 2.6 aspidin BB 抑制 Bap 诱导的芳基羟受体活化

研究表明,AHR 信号通路在调节过敏性哮喘和炎症性疾病中起着重要作用<sup>[21]</sup>。为了确定 aspidin BB 及陈皮提取物是否抑制 Bap 诱导的 AHR 活化。我们检测了 AHR 及其下游主要蛋白 cyp1a1 的表达。结果显示,Bap 刺激使 AHR 及 CYP1A1 的表达显著增加。而 aspidin BB 及陈皮提取物显著抑制了 Bap 诱发的 AHR 信号激活(图 5c、d)。

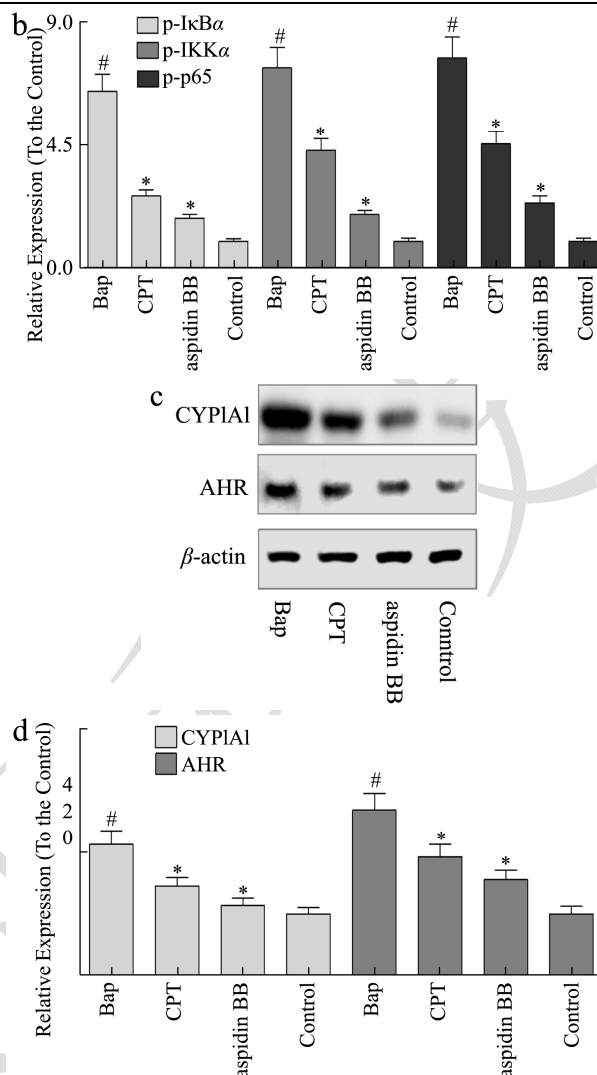
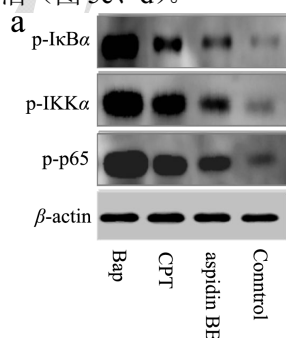


图5 陈皮提取物抑制调控 NF- $\kappa$ B、AHR 信号通路相关蛋白表达

Fig.5 Pericarpium citri reticulatae extract inhibits the expression of proteins associated with NF- $\kappa$ B and AHR signaling pathways

注:细胞( $2\times 10^6$ /皿)接种于 10.0 cm 培养皿中培养过夜。Bap ( $1.0\ \mu\text{M}$ ) 处理 6.0 h,然后用 aspidin BB 和陈皮提取物(CPT- $10\ \mu\text{g/mL}$ )培养 24 h,收集细胞,采集总蛋白,Western blotting 检测 NF- $\kappa$ B、AHR 信号通路相关蛋白的表达变化( $\#p<0.05$ ,对照组,  $*p<0.05$ , Bap 组)。

## 3 结论

本研究发现环境污染物 Bap 暴露会诱发肺上皮细胞氧化应激及炎症因子分泌,激活 NF- $\kappa$ B 和 AHR 信号通路,进而诱发炎症反应。我们分离的陈皮提取物及酚类化合物具有极好的抗 Bap 诱导的氧化损伤及炎症损伤的活性。实验结果显示,aspidin BB 和陈皮提取物抑制了 Bap 诱导的 iNOS 表达及炎症细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等的分泌。进一步研究发现,aspidin BB 和陈皮提取物的抗炎活性可能是基于调节

NF- $\kappa$ B 和 AHR 途径,进而调节炎性细胞因子的表达、增强细胞的抗炎及抗氧化能力。

## 参考文献

- [1] 张进,陈凯鹏,芦爱萍.儿童支气管哮喘与变应性鼻炎的相关性[J].医学综述,2013,19(1):87-89  
ZHANG Jin, CHEN Kai-peng, LU Ai-ping. The correlation between bronchial asthma and allergic rhinitis in children [J]. Medical Review, 2013, 19(1): 87-89
- [2] Guerreiro C B B, Horalek J, De Leeuw F, et al. Benzo(a)pyrene in Europe: ambient air concentrations, population exposure and health effects [J]. Environmental Pollution, 2016, 214: 657-667
- [3] 付文如,陈卫华.耳针戒烟临床应用及机制探讨[J].安徽中医学院学报,2004,2:30-32  
FU Wen-ru, CHEN Wei-hua. The clinical application and mechanism of ear acupuncture for smoking cessation [J]. Journal of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, 2004, 2: 30-32
- [4] 曹淑源,包玉玲,金蕊,等.影响子代哮喘发生的小鼠孕期多环芳烃暴露模型的构建[J].现代预防医学,2018,45(13): 2430-2436  
CAO Shu-yuan, BAO Yu-ling, JIN Rui, et al. Construction of a mouse polycyclic aromatic hydrocarbon exposure model that affects the occurrence of asthma in offspring [J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45(13): 2430-2436
- [5] 温明春,魏春华,马秀兰,等.灵芝、苦参、甘草提取物对儿童哮喘患者气道炎症及 T 辅助细胞相关因子的影响[C]//山东省医学会呼吸病学术会议,2008  
WEN Ming-chun, WEI Chun-hua, MA Xiu-lan, et al. Effects of *Ganoderma lucidum*, *Sophora flavescens* and *Licorice* extract on airway inflammation and T helper cell-related factors in children with asthma [C]// Respiratory Disease Conference of Shandong Medical Association, 2008
- [6] Kattan J D, Srivastava K D, Zhong M Z, et al. Pharmacological and immunological effects of individual herbs in the food allergy herbal formula-2 (FAHF-2) on peanut allergy [J]. Phytotherapy Research, 2008, 22(5): 651-659
- [7] Yu X, Sun S, Guo Y Y, et al. Citri reticulatae pericarpium (Chenpi): botany, ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of a frequently used traditional Chinese medicine [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 220: 265-282
- [8] 吕小健,许引,董攀飞,等.响应面优化超临界 CO<sub>2</sub> 萃取陈皮多甲氧基黄酮研究[J].食品研究与开发,2019,40(11): 16-20  
LYU Xiao-jian, XU Yin, DONG Pan-fei, et al. Response surface optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of polymethoxy flavonoids from tangerine peel [J]. Food Research and Development, 2019, 40(11): 16-20
- [9] Chen X M, Tait A R, Kitts D D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. Food Chemistry, 2017, 218: 15-21
- [10] Liew S S, Ho W Y, Yeap S K, et al. Phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activities of *Citrus sinensis* peel extracts [J]. PeerJ, 2018, 6: e5331
- [11] Pereira C V, Duarte M, Silva P, et al. Polymethoxylated flavones target cancer stemness and improve the antiproliferative effect of 5-fluorouracil in a 3D cell model of colorectal cancer [J]. Nutrients, 2019, 11(2): 326-345
- [12] Kurien B T, Scofield R H. Western blotting: an introduction [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1312: 17-30
- [13] 左丽,王洪庆,陈若芸.阔鳞毛蕨的化学成分研究[J].中草药,2005,2:177-179  
ZUO Li, WANG Hong-qing, CHEN Ruo-yun. Studies on the chemical constituents of *Dryopteris platyphylla* [J]. Chinese Herbal Medicine, 2005, 2: 177-179
- [14] Ito H, Muranaka T, Mori K, et al. Ichthyotoxic phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fragrans* and their anti-tumor promoting activity [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2010, 58(12): 1190-1195
- [15] 李博,朱俊访,邹忠杰,等.香鳞毛蕨化学成分研究[J].中药材,2009,32(8):1232-1233  
LI Bo, ZHU Jun-fang, ZOU Zhong-jie, et al. Study on the chemical constituents of *Dryopteris serrata* [J]. Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(8): 1232-1233
- [16] Sueo H, Osamu I, Isao I. A new acylphloroglucinol of *Dryopteris gymnosora* [J]. Phytochemistry, 1974, 13(3): 655-655
- [17] Äyräs P, Lötjönen S, Widén C-J. Carbon-13 spectral analysis, tautomeric structures and conformations of four two-ring methylene-bridged phloroglucinol derivatives [J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2010, 48(3): 209-213

(下转第 274 页)