

艾纳香油中抗炎成分的筛选及其对炎性因子的影响

蔡亚玲^{1,2}, 廖加美^{1,2}, 彭俊超^{1,2},
高月^{1,2}, 王万林^{1,2}, 易琼², 王鲁^{2*}

¹贵州大学药学院; ²西南特色药用生物资源开发利用教育部工程研究中心, 贵阳 550025

摘要:为了寻找艾纳香油中的抗炎物质, 并研究其对巨噬细胞炎性因子的影响, 本文采用动物炎症模型筛选艾纳香油中具有抗炎活性的部分化合物, 再检测目标化合物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞中相关炎性因子的影响。发现艾纳香油中(-)-芳樟醇、反式-石竹烯抗炎活性最佳, 且不同剂量的(-)-芳樟醇、反式-石竹烯均能抑制 LTB4、PGE2、NO 和 iNOS 炎症介质的产生, 下调 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、5-LOX、FLAP、NF- κ B-p65 的表达。结果表明(-)-芳樟醇、反式-石竹烯是艾纳香油中的重要抗炎物质, 它们可通过抑制多种炎症介质和细胞因子以及 NF- κ B-p65 的表达来发挥抗炎作用。

关键词:艾纳香油; 活性成分; 抗炎机制; RAW264.7 细胞

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)3-0402-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.3.007

Screening of anti-inflammatory substances from *Blumea balsamifera* (L.) DC. oil and their effects on inflammatory factors

CAI Ya-ling^{1,2}, LIAO Jia-mei^{1,2}, PENG Jun-chao^{1,2},
GAO Yue^{1,2}, WANG Wan-lin^{1,2}, YI Qiong², WANG Lu^{2*}

¹College of Pharmacy, Guizhou University; ²Engineering Research Center of the Utilization for Characteristic Bio-Pharmaceutical Resources in Southwest, Ministry of Education, Guiyang 550025, China

Abstract: To find the anti-inflammatory substances in *Blumea balsamifera* oil and study their effects on inflammatory factors of macrophages. In this paper, the anti-inflammatory activities of some compounds in *B. balsamifera* oil were screened by animal inflammatory model, and then the effects of target compounds on related inflammatory factors in RAW264.7 cells stimulated by LPS were detected. The results indicated that the anti-inflammatory activities of (-)-linalool and trans-caryophyllene were the best in *B. balsamifera* oil, and different doses of (-)-linalool and trans-caryophyllene could inhibit the production of LTB4, PGE2, NO and iNOS inflammatory mediators and down-regulate the expression of TNF- α , IL-1 β , COX-2, 5-LOX, FLAP and NF- κ B-p65. The results show that (-)-linalool and trans-caryophyllene are important anti-inflammatory substances in *B. balsamifera* oil, which can exert their anti-inflammatory effects by inhibiting the expression of many kinds of inflammatory mediators, cytokines and NF- κ B-p65.

Key words: *Blumea balsamifera* (L.) DC. oil; active ingredient; anti-inflammatory mechanism; RAW264.7 cell

艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC 为菊科艾纳香属草本植物, 有着温中活血、祛风除湿、缓解伤寒感冒、杀菌止痒、预防关节发炎等功效^[1-3]。艾纳香油作为艾纳香提取艾片的附属产品, 文献报道艾纳香中有 143 个化合物^[4], 实验室前期通过 GC-MS 检测鉴定出有 39 个挥发性的化合物, 也报道艾纳香油

在抗炎方面有着很好的药理活性^[5], 但其抗炎药效的物质基础尚未阐明。本实验旨在对艾纳香油 GC-MS 检测出的含量较高挥发性的化合物抗炎药理学活性进行筛选, 并研究其对巨噬细胞炎性因子的影响, 评价其抗炎效果, 为艾纳香油的深度开发提供理论依据, 同时为中药抗炎作用的研究提供参考依据。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

(-) -龙脑、樟脑、(-)-芳樟醇、反式-石竹烯、黄

收稿日期: 2020-09-07 接受日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金(31760747)

*通信作者 Tel: 86-018985136081; E-mail: wanglu7007@163.com

木素(Absin); α -蒎烯、(+)- α -蒎烯、(-)- α -蒎烯、 β -蒎烯、氧化石竹烯、 α -胡萝卜烯(上海同田生物技术股份有限公司);愈创木酚、 β -丁香酚、1-辛烯-3-醇(Sigma);槲皮素由贵州省生化工程中心分离鉴定,所有化合物纯度 $\geq 98\%$ 。硫酸特布他林片(terbutaline)(阿斯利康制药有限公司,批号:H32022694);醋酸地塞米松(DEX)(遂成药业股份有限公司,批号:H41021038);硫酸阿托品(湖北兴华制药有限公司,批号:20170602);马来酸氯苯那敏、组胺(阿拉丁试剂公司);弗氏完全佐剂(FCA)(Sigma);DMEM高糖培养基、FBS(Gibco);LPS(Sigma,血清型O11:B4);PGE2、TNF- α 、IL-1 β 和LTB4 Elisa试剂盒(武汉基因美生物公司);NO、iNOS Elisa试剂盒(南京建成生物工程研究所);卵清蛋白(OVA)、MTT(Solarbio);BCA蛋白定量试剂盒(康为世纪生物技术公司);RNAPrep Pure Cell/Bacteria Kit、FastKing RT Kit(With gDNase)(天根生物技术公司);PowerUp SYBR Green Master mix(Thermo Scientific);10×RIP-A buffer和蛋白磷酸化—抗NF- κ B-p65(Cell Signaling Technology);NF- κ B-p65、 β -actin、山羊抗兔抗体和山羊抗鼠抗体(ImmunoWay Biotechnology Company);Tyrode台氏液所需药品试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

PHJ-1多功能恒温离体肠管及平滑肌实验槽(成都仪器厂);MADLAB-4C/501H型生物信号采集处理系统(北京众实迪创科技发展有限责任公司);MultiskanGo型全波段酶标仪(美国Thermo Fisher scientific公司);qTOWER实时荧光定量PCR仪、多功能凝胶成像系统(德国Jena公司);小型垂直电泳系统、T100TMThermal Cycler温度梯度PCR仪(美国BIO-RAD公司);UV757CRT紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司)。

1.3 动物和细胞

SPF标准SD大鼠(250 ± 20 g)及昆明小鼠(体重 18 ± 2 g)、健康清洁级成年豚鼠(体重 180 ± 10 g)(动物许可证号:SYXK(渝)2018-0001)来源重庆腾鑫实验动物中心。SPF级动物饲养于SPF级动物实验室,清洁级饲养于普通实验室,试验过程中对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见(2006)》规定。小鼠单核巨噬细胞RAW264.7细胞株,购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

2 方法

2.1 艾纳香油中对慢反应物质(SRS-A)生成抑制和受体阻断的化合物筛选

实验前将吐温-80与化合物1:1混匀、加入三蒸水形成乳化液,参考文献^[6],OVA致敏豚鼠,制备SRS-A,肠管离体固定,组胺定标,待肠管收缩稳定后加入SRS-A及受试药液,只加SRS-A为模型组,特步他林为阳性对照组,槲皮素为天然药物阳性对照组^[7],加50%吐温-80为溶剂组,记录豚鼠回肠活动曲线,每组重复3次,计算其平均收缩幅度。受试药物的药效用回肠收缩幅度抑制率表示,SRS-A生成抑制率=(空白组-药物组)/空白组 $\times 100\%$ 。

肠管处理同上,组胺定标后,各组分别加入Tyrode液(空白组)、50%吐温-80(溶剂组)、各药物(药物组)、特布他林液(阳性组)300 μ L,记录各组药物作用后的肠管因空白组SRS-A引起的回肠收缩高度,与组胺引起回肠收缩的高度进行计量换算,计算出SRS-A的生成抑制率。每组重复3次,用热Tyrode液洗脱3次后再进行其他组测试。SRS-A受体拮抗率=(空白组-药物组)/空白组 $\times 100\%$ 。

2.2 目标化合物小鼠急性毒性试验及对小鼠耳廓肿胀的影响

根据“2.1”筛选结果,筛选5个化合物,经预实验确定100%致死量和0%致死量后,设剂量间距为0.75,按急性毒性试验要求进行,灌胃给药1次,剂量为0.2 mL/20 g体重,14天内观察记录小鼠死亡数量及毒性反应。参考文献^[5]将96只昆明小鼠随机分成8组(详见表3)进行小鼠耳廓肿胀试验。化合物用量选用急性毒性实验的LD₅₀值的1/20^[8],地塞米松^[9](0.02 g/kg)为阳性对照组。耳廓肿胀抑制率=(溶剂组平均肿胀度-试验组平均肿胀度)/溶剂组平均肿胀度 $\times 100\%$ 。

2.3 目标化合物对大鼠佐剂关节炎的影响

将60只SD大鼠随机分为6组(详见图1)。参考文献^[10]并进行调整,用0.1 mL FCA注入左脚掌皮层下致炎,空白组注入0.1 mL 0.9%氯化钠,造模前记录原始足厚度,造模第4天开始测量足肿胀,同时开始灌胃给药1 mL/只,药物按“2.1”方法配制,用量0.18 g/kg,连续灌胃10天,每3天测量一次足肿胀厚度,记录大鼠足掌肿胀程度。

2.4 目标化合物对RAW264.7细胞分泌炎症介质NO、iNOS、LTB4和PGE2的影响

先将RAW264.7细胞100 μ L接种于96孔板中

表 1 qPCR 引物序列及退火温度
Table 1 qPCR primer sequence and TM

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	产物大小 Product size(bp)	退火温度 Annealing temperature(℃)	序列号 Accession No.
TNF- α	GGATCTCAAAGACAAAC ACAGAGCAATGACTCCAAAG	120	59.8	NM_001278601
IL-1 β	GCAACTGTTCCTGAACCTCAACT ATCTTTGGGGTCCGTCAACT	144	60.8	NM_008361
COX-2	GGGCCATGGACTGGACTTAAA TGCAGGTCTCAGGGATGTG	181	60.6	NM_011198
5-LOX	ACTACATCTACCTCACGCCATT GGTGACATCGTAGGAGTCCAC	184	60.4	NM_009662
FLAP	AGCATGAAAGCAAGGCCATA GTACGCATCTACCCAGTTCTG	101	58	NM_009663
p65	GACCTGGAGCAAGCCATTAG CACTGTCACCTGGAAGCAGA	123	60	NM_199267
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATT TGTAGACCAGTGTAGTTGAGA	211	-	NM_008084

(6×10^5 个/mL),采用MTT法检测不同浓度化合物对细胞的毒性,确定用药浓度。又将RAW264.7细胞500 μL接种于24孔板中(6×10^5 个/mL),在37 ℃,5% CO₂培养箱中培养6 h后,设立空白组、模型组(500 ng/mL LPS)、给药组(500 ng/mL LPS + 40、80、120 μg/mL各化合物),每组3个复孔。继续培养12 h后,收集各孔细胞上清液,根据各ELISA试剂盒操作说明书,进行操作,检测细胞分泌NO、iNOS、LTB4和PGE2的含量。

2.5 目标化合物对RAW264.7细胞炎症相关蛋白的TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、5-LOX、FLAP、p65 mRNA表达的影响

RAW264.7细胞2 mL接种于6孔板中(6×10^5 个/mL),在37 ℃,5% CO₂培养箱中培养6 h后,组别设置同“2.4”,继续培养12 h后,按文献^[5]进行RT-qPCR方法进行,引物均由Invitrogen公司合成,引物序列及退火温度详见表1。以GAPDH为内参基因,结果用Ct值表示,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

2.6 目标化合物对RAW264.7细胞核转录因子p65蛋白表达水平的影响

细胞处理及组别设置同“2.4”方法,继续培养12 h后,参考文献^[11]的方法进行Western blot检测p65蛋白表达,以β-actin作为内参,ImageJ软件分析条带灰度值计算蛋白表达量。

2.7 数据统计

所有数据以至少三个独立实验的平均数±标准

差($\bar{x} \pm s$)表示,采用统计分析软件(ANOVA; SPSSv22.0, IBM, USA)进行单因素方差分析,以P<0.05表示差异显著,P<0.01和P<0.001表示差异极显著,说明数据有统计学意义。

3 结果

3.1 艾纳香油中部分化合物对SRS-A生成抑制和受体阻断的筛选结果

水浴槽体系中离体豚鼠肠管在0.1%的药物浓度下,与空白组相比,特布他林、槲皮素、(-)-龙脑、(-)-芳樟醇显著抑制SRS-A的生成(P<0.01)。特布他林、槲皮素、(-)-龙脑、(-)- α -蒎烯、(-)-芳樟醇对SRS-A的受体有显著拮抗抑制作用(P<0.01)。樟脑,反式-石竹烯,1-辛烯-3-醇对SRS-A的生成有抑制作用,但无显著差异(P>0.05),而有文献报道^[12,13]樟脑,反式-石竹烯具有抗炎作用,因此需做进一步验证。综合以上结果,对(-)-龙脑、(-)- α -蒎烯、(-)-芳樟醇、反式-石竹烯、樟脑做进一步筛选,结果详见表2。

3.2 目标化合物的小鼠急性毒性及对小鼠耳廓肿胀的影响结果

根据“3.1”筛选出的结果,进行化合物小鼠急性毒性实验,各化合物半数致死量(LD₅₀)详见表3,毒性大小依次是:(-)- α -蒎烯>(-)-龙脑>樟脑>(-)-芳樟醇>反式-石竹烯。按LD₅₀值的1/20用药,从表3中可看出,与空白组相比,阳性药物DEX以及反式-石竹烯、(-)-芳樟醇组均能显著或极显著抑制因二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀(P<0.05,P<

表2 艾纳香油中化合物对SRS-A生成抑制和受体阻断的筛选结果

Table 2 Screening results of SRS-A production inhibition and receptor blocking by compounds in *B. balsamifera* oil

组别 Group	SRS-A 生成量 Amount of SRS-A generated (U/g)	SRS-A 生成抑制率 SRS-A production inhibition rate(%)	SRS-A 生成量 Amount of SRS-A generated (U/g)	SRS-A 受体拮抗率 SRS-A receptor antagonism rate(%)
空白组 Control	581.395 ± 0.70	-	581.395 ± 1.51	-
溶剂组 Solvent	589.244 ± 1.20	-1.35	590.290 ± 0.40	-1.53
特布他林 Terbutaline	556.854 ± 1.29 **	40.40	280.843 ± 0.84 **	51.70
槲皮素 Quercetin	402.558 ± 8.31 **	30.76	284.186 ± 7.58 **	51.12
(-) -芳樟醇 (-)-Linalool	366.709 ± 4.58 **	36.93	302.866 ± 6.62 **	47.91
(-) -龙脑 (-)-Borneol	391.616 ± 2.76 **	32.64	306.250 ± 4.18 **	47.3
(-) - α -蒎烯 (-)- α -Pinene	556.854 ± 2.04	4.22	418.924 ± 0.42 **	27.95
反式-石竹烯 trans-Caryophyllene	536.395 ± 4.63	7.74	604.866 ± 2.51	-4.04
樟脑 Camphor	566.296 ± 0.74	2.60	594.796 ± 0.59	-2.30
1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	558.697 ± 1.54	3.90	628.901 ± 1.65	-8.17
α -蒎烯 α -Pinene	643.052 ± 1.60	-10.61	721.104 ± 0.50	-24.03
(+) - α -蒎烯 (+)- α -Pinene	670.017 ± 2.32	-15.24	615.895 ± 0.16	-5.93
β -蒎烯 β -Pinene	601.395 ± 3.01	-3.44	669.982 ± 0.32	-15.24
α -胡萝卜烯 α -Humulene	626.889 ± 0.85	-7.82	615.168 ± 2.55	-5.81
氧化石竹烯 Caryophyllene Oxide	681.639 ± 5.30	-17.24	641.174 ± 1.29	-10.28
β -丁香酚 β -Eudesmol	594.558 ± 0.44	-2.26	658.819 ± 0.68	-13.32
愈创木酚 Guaiol	714.424 ± 1.68	-22.88	574.825 ± 0.60	1.13
黄木素 Xanthoxylin	597.581 ± 0.30	-2.78	752.796 ± 2.14	-29.48

注:与空白组相比, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, ** $P < 0.01$.

0.01); (-)-龙脑的抑制率达到 9.02%, 与空白组相比虽无显著差异 ($P > 0.05$), 但相较于樟脑和(-)- α -蒎烯也表现出更好的抑制作用, 且在 SAS-R 生成

抑制和受体拮抗试验中抑制率分别达到 32.64%, 47.3%, 表现出很好的抗炎作用。综合以上结果, 对(-)-龙脑、(-)-芳樟醇、反式-石竹烯做进一步筛选。

表3 目标化合物的小鼠急性毒性及耳廓肿胀实验结果

Table 3 Experimental results of acute toxicity and auricle swelling of target compounds in mice

组别 Group	LD ₅₀ (g/kg)	95% 可信限范围 95% confidence limit	浓度 Concentration (g/kg)	肿胀度 Swelling degree (mg)	抑制率 Inhibition rate (%)
空白组 Control	-	-	-	14.09 ± 1.08	-
溶剂组 Solvent	-	-	-	14.16 ± 2.63	-0.46
地塞米松 Dexamethasone	-	-	0.02	10.15 ± 1.39 **	27.96
(-) - α -蒎烯 (-)- α -Pinene	2.18	1.85-2.54	0.11	14.05 ± 3.59	0.31
(-) -龙脑 (-)-Borneol	2.85	2.41-3.38	0.14	12.82 ± 3.88	9.02
樟脑 Camphor	3.53	2.63-4.44	0.07	14.05 ± 2.00	0.25
(-) -芳樟醇 (-)-Linalool	5.80	4.93-6.86	0.29	9.82 ± 1.97 **	30.30
反式-石竹烯 trans-Caryophyllene	>6.50	>6.50	0.29	12.48 ± 1.27 *	11.41

注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3 目标化合物对大鼠佐剂关节炎的影响结果

根据“3.2”的结果, 我们筛选取(-)-芳樟醇、

(-) -龙脑、反式-石竹烯 3 个化合物进行研究。由图 1 所示, 在相同用药量下, (-)-芳樟醇和反式-石竹烯

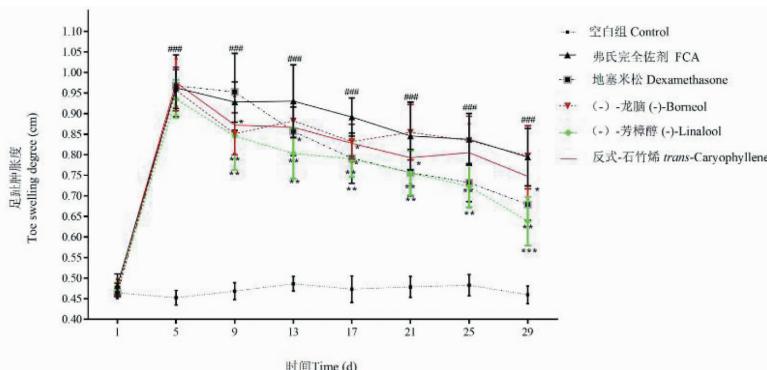


图 1 大鼠佐剂关节炎足趾肿胀情况 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Toe swelling in rats with adjuvant arthritis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

注:与空白组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$;与 FCA 组比较, $^{\ast}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。Note: Compared with control, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$; Compared with FCA, $^{\ast}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

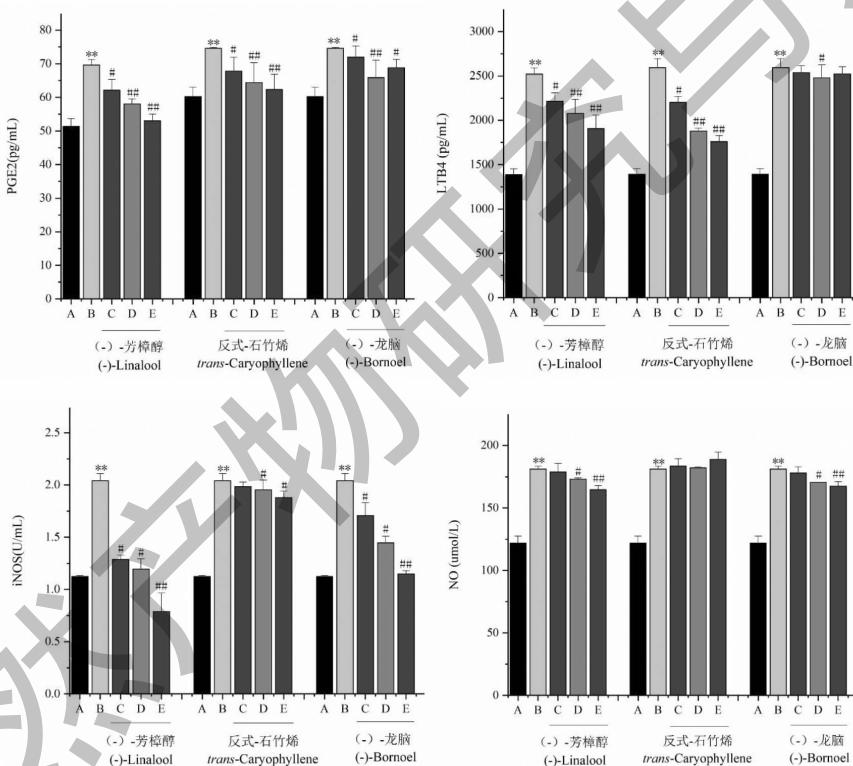


图 2 (-)-芳樟醇、反式-石竹烯、(-)-龙脑对 RAW 264.7

细胞产生 LTB4、PGE2、iNOS、NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of (-)-linalool, trans-caryophyllene and (-)-borneol on the production of LTB4, PGE2, iNOS and NO in RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A:空白对照组;B:LPS 组;C:化合物 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组;D:化合物 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组;E:化合物 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组;与空白组比较, $^{\ast}P < 0.01$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$;与 LPS 组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.01$;下同。Note: A: Control; B: LPS group; C: Compound 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; D: Compound 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; E: Compound 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; Compared with control, $^{\ast}P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$, $^{***}P < 0.001$; Compared with LPS group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.01$; The same below.

组均能显著或极显著降低 FCA 诱发的大鼠足趾肿胀 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中(-)-芳樟醇效果略好

于阳性药物 DEX 组,(-)-龙脑在 9~17 天时显著降低大鼠足趾肿胀 ($P < 0.05$), 但是在 21~29 天时与

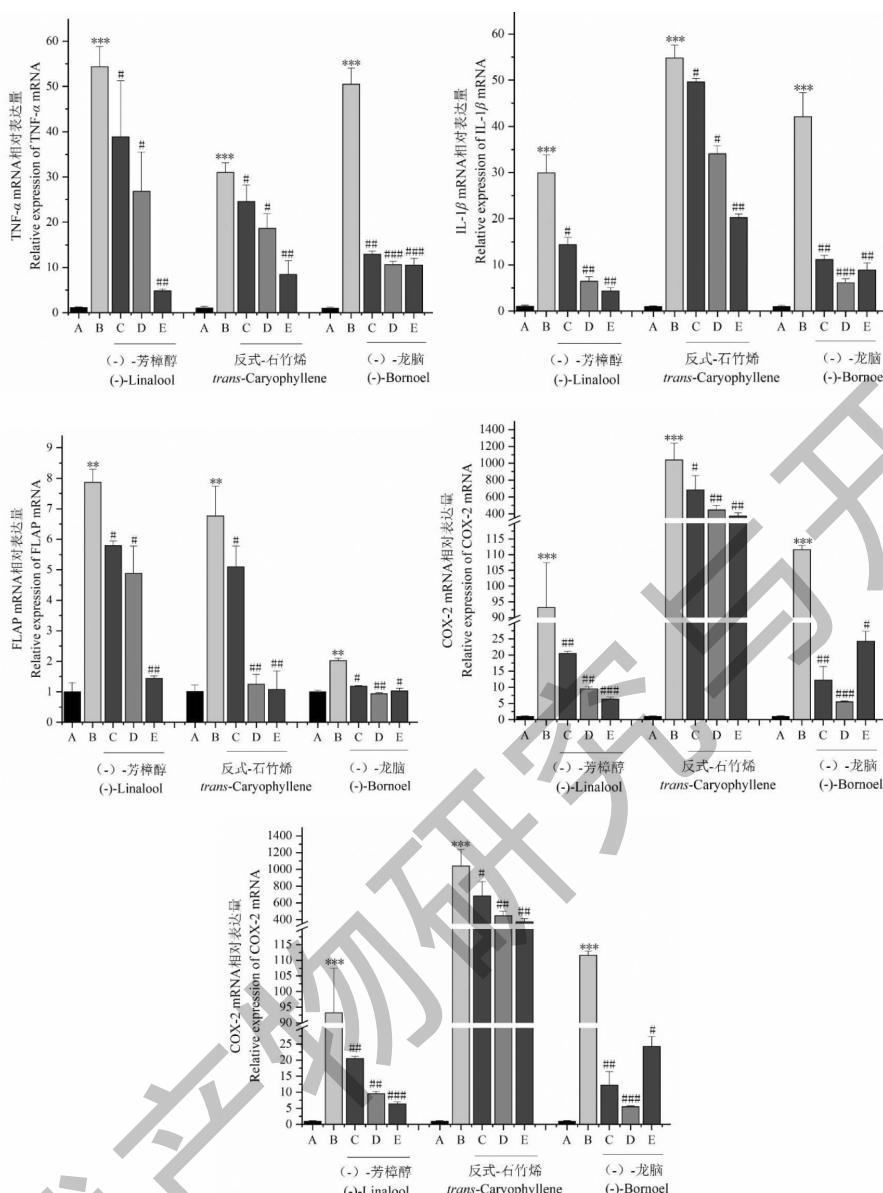


图3 (-)-芳樟醇、反式-石竹烯、(-)-龙脑对 RAW 264.7 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、5-LOX、FLAP mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of (-)-linalool, trans-caryophyllene and (-)-borneol on the expression of TNF- α , IL-1 β , COX-2, 5-LOX and FLAP mRNA in RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

模型组相比,差异不显著($P > 0.05$)。

3.4 目标化合物对 RAW264.7 细胞分泌炎症介质 NO、iNOS、LTB4 和 PGE2 的影响结果

细胞毒性试验结果表明,在 24 h 内 (-)-芳樟醇、(-)-龙脑、反式-石竹烯三个化合物在 0 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内对加与不加 LPS(500 ng/mL) 培养情况下都不影响 RAW264.7 细胞活力。与空白组相比,LPS 能极显著引起 RAW264.7 细胞分泌炎症介质 PGE2、LTB4、NO、iNOS($P < 0.01$)。在一定

浓度作用下,(-)-芳樟醇、反式-石竹烯能剂量依赖性的抑制 LPS 诱导的 PGE2、LTB4、iNOS 的释放($P < 0.05, P < 0.01$);(-)-芳樟醇能剂量依赖性的抑制 LPS 诱导 NO 的分泌($P < 0.05, P < 0.01$),反式-石竹烯不能显著抑制 NO 的分泌($P > 0.05$);(-)-龙脑能剂量依耐性抑制 iNOS、NO 的释放($P < 0.05, P < 0.01$),也能抑制 PGE2、LTB4 的释放($P < 0.05, P < 0.01$),但剂量依耐性不好,结果如图 2 所示。

3.5 目标化合物对 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症相关因子 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、5-LOX、FLAP mRNA 表达的影响结果

与空白组相比, LPS 能显著增加 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、5-LOX、FLAP 等炎症相关因子的 mRNA 表达($P < 0.01, P < 0.001$);(-)-芳樟醇、反式-石竹烯能剂量依赖性的抑制 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、5-LOX、FLAP mRNA 表达($P < 0.05, P < 0.01$);(-)-龙脑也能抑制 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、5-LOX、FLAP mRNA 表达($P < 0.05, P < 0.01$),但不呈现浓度依赖性抑制作用,结果如图 3 所示。

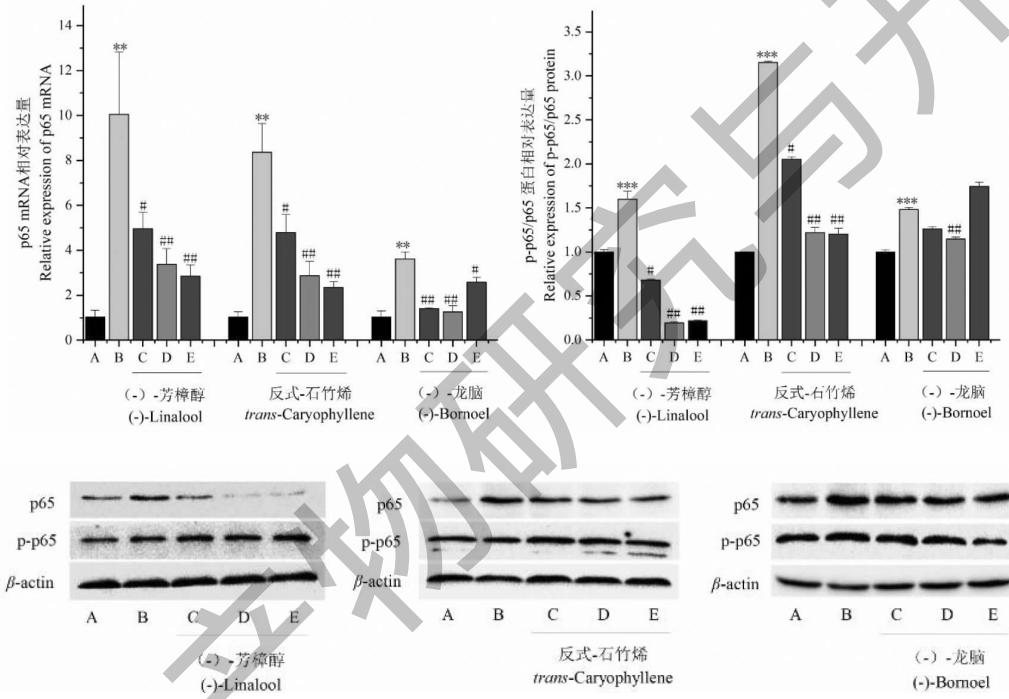


图 4 (-)-芳樟醇、反式-石竹烯、(-)-龙脑对 RAW 264.7 细胞 p65 mRNA 及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

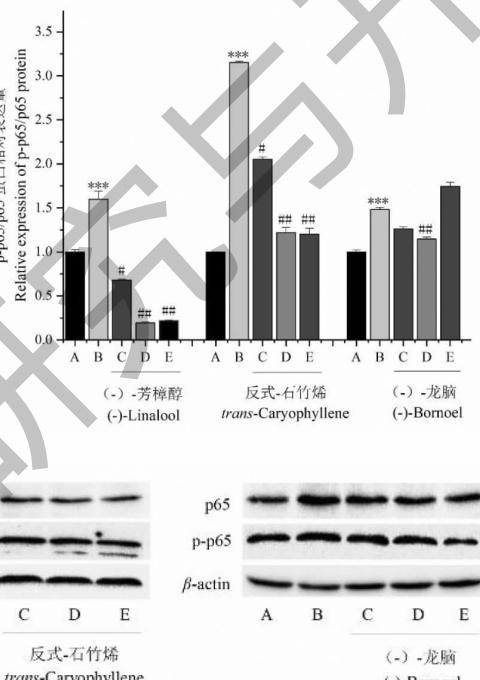
Fig. 4 Effects of (-)-linalool, trans-caryophyllene and (-)-borneol on mRNA and protein expression of p65 in RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

文献及相关数据报道^[4]艾纳香中有 143 个化合物,主要集中在挥发油和黄酮类成分上,有:*L*-龙脑、樟脑、 α -蒎烯、 β -石竹烯、石竹烯氧化物、芳樟醇等,实验室前期通过 GC-MS 检测鉴定出艾纳香油中有 39 个挥发性成分,为了探明这些成分是否具有抗炎活性,作者选取含量在 1% 以上的 14 个挥发性的化合物进行抗炎活性研究。SRS-A 是含多种 LTs 的复合物,属于花生四烯酸(AA)代谢中的脂氧化酶次级产物,可导致支气管炎、肺气肿以及肺源性心脏病等呼吸系统疾病^[14],SRS-A 生成抑制剂和受体阻断

3.6 目标化合物对 LPS 致 RAW264.7 细胞核转录因子 p65 表达水平的影响结果

与空白组相比,LPS 能极显著增加 p65 mRNA 和蛋白的表达以及 p65 磷酸化($P < 0.01$);(-)-芳樟醇、反式-石竹烯均能剂量依赖性的抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 p65 mRNA 和蛋白的表达以及 p65 磷酸化($P < 0.05, P < 0.01$);(-)-龙脑的低、中剂量能抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 p65 mRNA 和蛋白的表达以及 p65 磷酸化,但不呈现浓度依赖性抑制作用,甚至高剂量能促进 p65 的表达,结果如图 4 所示。



剂的研究已成为寻找新型抗炎免疫药的重要方向,因此作者通过离体致敏豚鼠回肠试验初步筛选到(-)-龙脑、(-)- α -蒎烯、(-)-芳樟醇、反式-石竹烯、樟脑等 5 个具有抗炎潜质的化合物。再采用动物急性和慢性炎症模型,进一步筛选到(-)-芳樟醇、反式-石竹烯(-)-龙脑 3 个艾纳香油的重要的抗炎活性成分。至于本研究未涉及,且文献未报道的艾纳香油中其他化合物中是否也具有抗炎活性,这有待进一步深入研究。

AA 作为机体内常见脂肪酸的重要物质,其代谢途径主要以 COX 途径为主,其次是 LOX 途径,能

促进 PG 和 LTs 的释放,其中 12-LOX 则能催化 iNOS 诱导 NO 生成^[15],FLAP 是作为细胞膜的组合蛋白,介导着 LOX 的传递^[16],它们在炎症过程中都起着炎症介质作用,抑制上述产物可减少炎症发生。NF-κB 作为炎症反应的关键信号传导因子,在炎症细胞因子介导的炎症反应中起中心作用,它可以诱导炎症细胞因子(TNF-α、IL-1β 等)的基因表达,使炎性反应级联放大^[17]。NF-κB-p65 是 NF-κB 信号通路中的核心蛋白,过度的炎症反应会导致 NF-κB-p65 的表达增加。本文结果表明,(-)-芳樟醇、反式-石竹烯对这些炎症介质及细胞因子有抑制作用,(-)-龙脑对它们也表现出抑制作用,但剂量依耐性不好。有相关文献报道了它们对 COX-2、iNOS、NO、PGE2 这些炎症介质的抑制作用^[13,18,19],而对 5-LOX、FLAP、LTB4 的研究则较少,因此本研究也对丰富它们的抗炎机制提供了数据。综上结果提示,(-)-芳樟醇、反式-石竹烯是艾纳香油中的重要抗炎物质。

致谢:感谢国家自然科学基金对本项目的支持,感谢贵州大学为我们提供科学实验平台以及良好的学习环境,感谢我的导师王鲁教授,易琼师姐、廖加美、彭俊超、高月、王万林(贵州大学,西南特色药用生物资源开发利用教育部工程研究中心)等同学对本研究的悉心指导和帮助。

参考文献

- 1 Ling GL, Xin PY, Dan W, et al. Research progress on chinese minority medicine of *Blumea balsamifera* L. DC [J]. J Plant Genet Resour(植物遗传资源学报), 2012, 13:695-698.
- 2 Pu L, Qiong CY, Qiang HH. Research progress on chemikal constituents and biological activities of *Blumea balsamifera* (L.) DC [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med(实用中医内科杂志), 2012, 26(13):3-4.
- 3 Xin PY, Chao Y, Xuan H, et al. Chemical constituents of Li minority herb *Blumea balsamifera* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2019, 42(1):91-95.
- 4 Pang Y, Wang D, Fan Z, et al. *Blumea balsamifera*—a phytochemical and pharmacological review [J]. Molecule, 2014, 19:9453-9477.
- 5 Yan XX, Zhen LT, Lin WW, et al. Analysis of chemical constituents and anti-inflammatory activity of *Blumea balsamifera* oil from different sources [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中国新药与临床药理), 2019, 30:1069-1076.
- 6 Gang DJ, Cheng GL, Wen ZZ, et al. Effects of mangiferin on the release of slow reactive substances from lung tissue of guinea pigs[J]. Guangxi J Tradit Chin Med(广西中医药), 2008,,31(3):58-59.
- 7 Ting L, Peng HY, Ping LQ, et al. Study on chemical constituents from root and stem of *Lycium barbarum* L [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:1491-1497.
- 8 Chuang L, Tsai T, Lien T, et al. Ethanolic extract of *Origanum vulgare* suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models [J]. Molecules, 2018, 23(8):1987.
- 9 Jun HT, Shan LS, Yin ZL, et al. Preparation of oroxylum indicum extracts and their anti-bacterial and anti-inflammatory activities [J]. China Anim Husb Vet Med(中国畜牧兽医), 2010, 37:225-228.
- 10 Chang Y, Wu Y, Wang D, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis via attenuating inflammatory responses [J]. Rheumatology, 2011, 50:862-870.
- 11 Li Y, He S, Tang J, et al. Andrographolide inhibits inflammatory cytokines secretion in LPS-stimulated RAW264.7 cells through suppression of NF-κB/MAPK signaling pathway [J]. Evid-Based Compl Alt, 2017:8248142.
- 12 Yin X, Ru WX, Ming TX, et al. Advances in pharmaceutical research of camphor [J]. Lab Med Clin(检验医学与临床), 2009, 6:999-1001.
- 13 Guo K, Mou X, Huang J, et al. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF-κB activation in microglia [J]. J Mol Neurosci, 2014, 54(1):41-48.
- 14 Ritchie DM, Sierchio JN, Capetola RJ, et al. SRSA-mediated bronchospasm by pharmacologic modification of lung anaphylaxis *in vivo* [J]. Agents Actions, 1981, 11:396-401.
- 15 Jian Z, Fen X, Hua H. Research progress on the relationship between lipoxygenase expression and tumor and inflammatory diseases [J]. Chin J Clin Exp Pathol(临床与实验病理学杂志), 2017, 33:666-668.
- 16 Chen WX, Guo JA. NF- κB signal pathway and inflammatory response [J]. Prog Physiol Sci(生理科学进展), 2014, 45(1):68-71.
- 17 Choi J, Jeon H J, Park J, et al. Anti-atherogenic effect of BHB-TZD having inhibitory activities on cyclooxygenase and 5-lipoxygenase in hyperlipidemic mice [J]. Atherosclerosis, 2010, 212(1):146-152.
- 18 Peana AT, Marzocco S, Popolo A, et al. (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpenic compound [J]. Life Sci, 2006, 78(7):723.
- 19 Han L, Yang L, Liu B, et al. Trans-caryophyllene suppresses tumor necrosis factor (TNF α) -induced inflammation in human chondrocytes [J]. Eur Food Res Technol, 2014, 239: 1061-1066.