

广陈皮挥发油调节 TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 信号通路减轻 LPS 诱导的肺上皮细胞炎症及谱效关系研究

许鸿杰¹, 单保军¹, 单云琪², 孙小明^{2*}, 杨 全^{1,3*}

1. 广东药科大学 中药学院, 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室, 国家中药材产业技术体系广州综合试验站, 广东省南药规范化种植与综合开发工程技术研究中心, 广东 广州 510006
2. 广东药科大学 药学院, 广东 广州 510006
3. 云浮市中药资源种质库管理中心, 广东 云浮 527300

摘要: 目的 探究广陈皮挥发油(GCPVO)调节 Toll 样受体 4 (TLR4)/髓样分化蛋白 88 (MyD88)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)/Caspase-1 信号通路减轻脂多糖(LPS)诱导的肺上皮细胞炎症作用及物质基础。方法 以不同陈化年份(1、3、5、7、9、15 年)广陈皮为研究对象,以电子鼻和气相色谱-质谱法(GC-MS)分别分析鉴别广陈皮粉末、GCPVO 的化学成分及不同陈化年份成分组成特征。建立 LPS 致 BEAS-2B 细胞炎症模型,以细胞中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平,培养液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)蛋白水平为检测指标,评价挥发油对肺上皮细胞炎症的改善作用;采用 Western blotting 法检测 BEAS-2B 细胞中 NLRP3、Caspase-1、TLR4 和 MyD88 蛋白的表达。以药效学数据作为母序列,并以 GC-MS 分析得到不同陈化年份共有成分含量为特征序列,开展谱效关系研究,发现与活性相关的物质。结果 电子鼻结果表明,广陈皮含有更多的硫化合物、甲烷等短链烃类,萜烯,芳香化合物,样品之间的距离相对较远,表明存在显著差异;6 个陈化年份 GCPVO 主要共有成分 12 种,在陈化时间 1~9 年中 β -石竹烯的含量随着年份的增加而降低,而 α -侧柏烯、 α -蒎烯、蒎品烯、月桂烯、D-柠檬烯、松油烯、4-萜烯、2-(甲氨基)苯甲酸甲酯在陈化 3 年广陈皮中相对含量最高。与模型组比较,GCPVO 显著降低 LPS 诱导的 IL-1 β 和 MDA 含量显著升高,提高 SOD 活性,显著降低 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞中炎症相关蛋白 TLR4、MyD88、NLRP3、Caspase-1 的表达水平($P<0.05$ 、 0.01),陈化 3 年样品效果最好。GCPVO 中的化合物 D-柠檬烯、 α -蒎烯、松油烯与改善肺上皮细胞炎症的谱效相关性最高。结论 GCPVO 调节 TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 信号通路减轻 LPS 诱导的肺上皮细胞炎症,D-柠檬烯、 α -蒎烯、松油烯是发挥药效的关键物质。关键词: GC-MS; 电子鼻; 广陈皮; 挥发油; 炎症; 肺上皮细胞; TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 信号通路; D-柠檬烯; α -蒎烯; 松油烯

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)01-0028-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.003

Effect of Guangchenpi volatile oil on lipopolysaccharide-induced inflammation through regulating TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway in pulmonary epithelial cells and their spectrum-effect relationship

XU Hongjie¹, SHAN Baojun¹, SHAN Yunqi², SUN Xiaoming², YANG Quan^{1,3}

1. Guangdong Provincial Research Center on Good Agricultural Practice and Comprehensive Agricultural Development Engineering Technology of Cantonese Medicinal Materials, Guangzhou Comprehensive Experimental Station of China Chinese Materia Medica Industry Technology System, Key Laboratory for Production and Development of Cantonese Medicinal Materials Under State Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. School of Clinical Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
3. Yunfu Traditional Chinese Medicine Resource Germplasm Bank Management Center, Yunfu 527300, China

收稿日期: 2024-07-15

基金项目: 中央本级重大增减支项目(2060302); 云浮市 2021 年中医药(南药)产业人才项目-南药资源创新团队

作者简介: 许鸿杰, 硕士研究生, 主要从事中药资源与开发研究。E-mail: xuhongjie9708@163.com

*通信作者: 杨 全, 博士, 教授, 主要从事中药资源与开发研究。E-mail: yangquan7208@vip.163.com

孙小明, 博士, 副研究员, 主要从事中药物质基础及作用机制研究。E-mail: sunxm@gdpu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the modulation of toll like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation protein 88 (MyD88)/NOD like receptor thermal domain associated protein 3 (NLRP3)/Caspase-1 signaling pathway by Guangchenpi volatile oil (GCPVO) to alleviate lipopolysaccharide (LPS) - induced pulmonary epithelial cell inflammation and its material basis. **Methods** Using aged Guangchenpi from different years (1, 3, 5, 7, 9, 15) as the research object, electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to analyze and identify the chemical composition of Guangchenpi powder and GCPVO, as well as the compositional characteristics of components from different aged years. The BEAS-2B cell model of inflammation was established induced by lipopolysaccharide (LPS). The disturbance of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and interleukin 1 β (IL-1 β) attributed with oxidative stress and inflammation have been evaluated. The expression of the proteins NLRP3, Caspase-1, TLR4 and MyD88 were also detected by Western blotting. Then the spectrum-effect relationship was analyzed by using original data of the content of common peaks and pharmacodynamics indicators. **Results** The results of the electronic nose showed that Guangchenpi contains more sulfur compounds, methane and other short-chain hydrocarbons, terpenes, aromatic compounds, and the samples are relatively distant from each other, indicating significant differences. The main common components of the 6 aged GCPVO were 12, and the content of β -caryophyllene decreased with the increase of aging time from 1 to 9 years, while the relative content of α -pinene, limonene, terpineol, myrcene, *D*-limonene, turpentine, 4-carene, and 2-(methylamino) benzaldehyde was the highest in the aged GCPVO samples aged 3 years. Compared with the model group, GCPVO significantly reduced the content of LPS-induced IL-1 β and MDA, increased the activity of SOD, and significantly reduced the expression levels of inflammation-related proteins TLR4, MyD88, NLRP3, and Caspase-1 in LPS-induced BEAS-2B cells ($P < 0.05, 0.01$), with the aged 3 years sample showing the best effect. The compounds *D*-limonene, α -pinene, and turpentine in GCPVO showed the highest correlation with the anti-inflammatory spectrum in lung epithelial cells. **Conclusion** GCPVO regulates the TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway to alleviate LPS-induced inflammation in lung epithelial cells, and *D*-limonene, α -pinene, and turpentine are the key substances for the drug effect.

Key words: GC-MS; electronic nose; Guangchenpi; volatile oil; inflammation; pulmonary epithelial cells; TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 signal pathway; *D*-limonene; α -pinene; turpentine

广陈皮来源于芸香科柑橘属植物橘的栽培变种茶枝柑 *Citrus reticulata* ‘Chachi’ 的干燥成熟果皮，主产于广东省江门市新会区，具有理气健脾、燥湿祛痰的功效^[1]。广陈皮药食两用，具有独特的香气和味道^[2]，其作为止咳散、五仁丸、二陈汤等方剂的关键组分，具有止咳、抗氧化和抗炎等活性^[3]。然而，市场可见不同陈化年份的广陈皮，其随陈化时间增加，颜色和气味也发生改变。因此，本研究基于止咳化痰传统功效，以不同陈化时间广陈皮挥发油（GCPVO）为样品，探究其通过 Toll 样受体 4（TLR4）/髓样分化蛋白 88（MyD88）/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NLRP3）/Caspase-1 信号通路改善肺上皮细胞炎症的作用机制及其与不同陈化年份的样品间的谱效关系。

广陈皮的化学成分主要有黄酮、挥发油、生物碱、多糖等^[3-4]，挥发油具有抗炎^[5]、抗氧化^[6]、抗癌^[7]、抗焦虑^[8]等作用，是不同陈化年份广陈皮气味差异的物质基础。现代研究表明，其主要挥发性化合物是柠檬烯、 γ -萜品烯、柠檬醛、芳樟醇、 β -石竹烯、 α -蒎烯和 β -蒎烯等^[9]。GCPVO 会随着时间的推移而含量逐渐降低，且不同陈化年份的 GCPVO 的羟自由基清除/还原能力和抗氧化作用与挥发油的

体积分数成正比^[10-11]。也有研究基于 HS-SPME-GC-MS 方法分析陈皮和广陈皮挥发性特征，该方法可用于不同陈化年份广陈皮的鉴别^[12]。除化学成分研究外，还有研究表明广陈皮还可改善过敏性哮喘和急性肺损伤（ALI）等肺部相关炎症^[13-14]。脂多糖（LPS）是内毒素的主要成分，LPS 进入机体后可与细胞表面的 TLR-4 作用靶点结合，通过白细胞介素（IL）-1 和 IL-6 等细胞信号的传导和 MyD88 信号通路的活化，逐级扩大炎症反应，最终导致损伤^[15]。LPS 也能刺激 NLRP3/Caspase-1 介导的细胞焦亡，增加过度炎症反应，增加 IL-1 β 的释放^[16]。本研究聚焦于 TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 信号通路，开展 GCPVO 改善肺上皮细胞炎症的作用机制研究，并通过谱效关系研究揭示物质基础，为 GCPVO 的开发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 药材与主要试剂

不同陈化年份的广陈皮药材购于广东省江门市新会区（同一产地），经广东药科大学杨全教授鉴定为芸香科柑橘属植物橘的栽培变种茶枝柑 *C. reticulata* ‘Chachi’ 的干燥成熟果皮，广陈皮药材均采用自然陈化方式，截至开展实验时，其陈化年份

分别为 1、3、5、7、9、15 年，分别记为 GCP1、GCP3、GCP5、GCP7、GCP9、GCP15。每个年份样品收集 3 个批次开展实验研究。

人肺上皮细胞系 (BEAS-2B, 货号 CL0044) 购自大连美仑生物技术有限公司; DMEM 高糖培养基 (批号 8122191) 购自 Thermo Fisher 公司; 优质胎牛血清 (批号 164210) 购自武汉普诺赛生物技术有限公司; LPS (批号 L2880) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 细胞增殖及毒性检测 (CCK-8) 试剂盒 (批号 MA0218) 购自大连美仑生物技术有限公司; 丙二醛 (MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号 A003-1、A044-1-1) 购自南京建成生物工程研究所; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (批号 JL-13662) 购自上海江莱生物科技有限公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (货号 P0012A) 购自碧云天生物技术有限公司; 蛋白 Marker (货号 26616) 购自美国赛默飞世尔科技公司; NLRP3、Caspase-1、TLR4、MyD88 蛋白一抗 (货号 WL02635、WL03450、WL00196、WL02494) 购自沈阳万类生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶偶联 (HRP) 的山羊二抗 (货号 L3012) 购自于 Signalway antibody 公司; ECL 化学发光底物 (批号 BL520B) 购自中国兰杰柯科技有限公司。

1.2 主要仪器

PEN3 便携式电子鼻 (德国 Airsens 公司); EX125ZH 十万分之一电子天平 (奥豪斯仪器常州有限公司); 7890A 和 5975C 气相色谱质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); SERIES 8000WJ 细胞培养箱 (赛默飞世尔科技公司); 164505 蛋白电泳系统 (美国

Bio-Rad 公司); MulitskanMK3; 酶标仪 (美国赛默飞公司); BCM-1000A 超净工作台 (中国苏州安泰空气技术有限公司); BX53 荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); 5200 Multi 多功能成像系统 (中国天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 挥发油提取

分别称取 10 g 广陈皮粉末, 250 mL 水中浸泡 0.5 h 后采用水蒸气蒸馏法提取 2 h, 收集 GCPVO, 加入适量的无水硫酸钠, 静置脱水, 密封于棕色玻璃瓶中, 置于 -20 °C 保存。GCP1、GCP3、GCP5、GCP7、GCP9、GCP15 的挥发油 (分别记为 GCPVO1、GCPVO3、GCPVO5、GCPVO7、GCPVO9、GCPVO15) 得率依次为 (1.63±0.06)%、(2.23±0.08)%、(1.77±0.06)%、(1.84±0.07)%、(1.71±0.06)%、(1.55±0.03)%。

2.2 电子鼻检测条件

称取不同年份的广陈皮样品 1 g, 过 40 目筛, 置于 250 mL 烧杯中, 双层保鲜膜密封, 室温下 (25 °C) 静置 10 min 后进行测试。测试条件: 采样时间为每组 1 s, 传感器自清洗时间为 80 s, 传感器归零时间为 10 s, 样品准备时间为 5 s, 进样体积流量为 400 mL·min⁻¹, 分析采样时间为 80 s。采用 SIMCA 14.1 软件对数据进行主成分分析 (PCA) 和线性判别分析 (LDA)。具体传感器性能参数描述见表 1。

2.3 GC-MS 分析^[17]

色谱柱 HP-5MS (30 mm×0.25 mm, 0.25 μm), 载气为高纯氮气, 进样量 1 μL, 分流比 50:1。程序升温条件: 柱温 60 °C, 保持 2 min, 以 10 °C·min⁻¹

表 1 传感器性能参数描述

Table 1 Description of sensor performance parameters

阵列序号	传感器名称	性能描述	参考物质	检测限/(mg·L ⁻¹)
R1	W1C	芳香成分, 苯类	甲苯	10
R2	W5S	灵敏度大, 对氮氧化合物很灵敏	二氧化氮	1
R3	W3C	氨水, 对芳香成分灵敏	苯	1
R4	W6S	主要对氢气有选择性	氢气	100
R5	W5C	烷烃芳香成分	丙烷	1
R6	W1S	对甲烷等短链烷烃灵敏	甲烷	100
R7	W1W	对无机硫化物灵敏	硫化氢	1
R8	W2S	对硫化物成分灵敏	一氧化碳	100
R9	W2W	芳香成分, 对有机硫化物灵敏	硫化氢	1
R10	W3S	对烷烃灵敏, 长链烷烃类	甲烷	100

升温至 120 °C, 保持 2 min, 以 5 °C·min⁻¹ 升温至 220 °C, 维持 5 min, 最后以 30 °C·min⁻¹ 升温至 250 °C。电离方式为电子轰击离子源 (EI), 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C, 扫描质量范围 m/z 20~550。

脱水后的挥发油加入 15 倍量的甲醇稀释, 进样量 1 μ L。按照上述色谱条件进行检测。方法编辑器中设定积分方法 (峰面积过滤器调整为 0.1%)。利用 NIST14 谱图数据库对化合物进行检索, 结合分离化合物的保留时间与参考文献的质荷比解析鉴定。采用峰面积归一化法计算 GCPVO 成分, 并进行半定量分析。

2.4 细胞培养

BEAS-2B 细胞使用含有 10%胎牛血清和 1%双抗 (青霉素-链霉素) 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行细胞培养。

2.5 LPS 造模剂量及 GCPVO 给药浓度筛选

BEAS-2B 细胞按每孔 5×10^3 个、100 μ L 接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 0、1、5、10、25、50、100 mg·L⁻¹ LPS 造模 24 h, 按说明书步骤进行 CCK-8 法检测, 反应时间为 60 min, 于 450 nm 波长处测量吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

BEAS-2B 细胞按每孔 5×10^3 个、100 μ L 接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 不同体积分数的 GCPVO (0.005%、0.010%、0.020%) 作用 24 h, 对照组不加药, CCK-8 法检测细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.6 CCK-8 法检测细胞存活率

BEAS-2B 细胞按每孔 5×10^3 个、100 μ L 接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, GCPVO (0.01%) 预给药 4 h 后, 加入 LPS 造模, 质量浓度为 50 mg·L⁻¹, 造模时间为 24 h。对照组不造模不给药, 模型组不给药。CCK-8 法检测细胞存活率。

2.7 GCP 抗氧化能力指标检测

细胞接种、分组、造模及给药同“2.5”项, 离心后取上清, 按试剂盒说明书测定 SOD、MDA 含量, 按 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 IL-1 β 的含量。

2.8 Western blotting 分析

BEAS-2B 细胞按每孔 5×10^3 个接种于 6 孔板, 细胞分组、造模及给药同“2.5”项, 收集 BEAS-2B 细胞, 提取蛋白并测定其浓度, 等量的样本蛋白经

电泳 (10% SDS-PAGE) 分离并转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TLR4 (1:1 000)、MyD88 (1:1 500)、Nlrp3 (1:3 000) 和 Caspase-1 p20 (1:1 000) 抗体分别孵育过夜。二抗 (1:20 000) 室温孵育 1.5 h, 置于凝胶成像仪中, 使用增强型化学发光 (ECL) 试剂盒显影。使用 Image J 软件系统分析各个条带的灰度值。

2.9 谱效关系分析

将“2.6”“2.7”项的药效学数据作为母序列, 以 GC-MS 分析得到不同陈化年份共有成分含量为特征序列。采用灰色关联度方法, 计算灰色相关系数 (www.spsspro.com), 根据母序列与特征序列的相关性, 确定各成分与药理作用的相关性。

2.10 统计分析

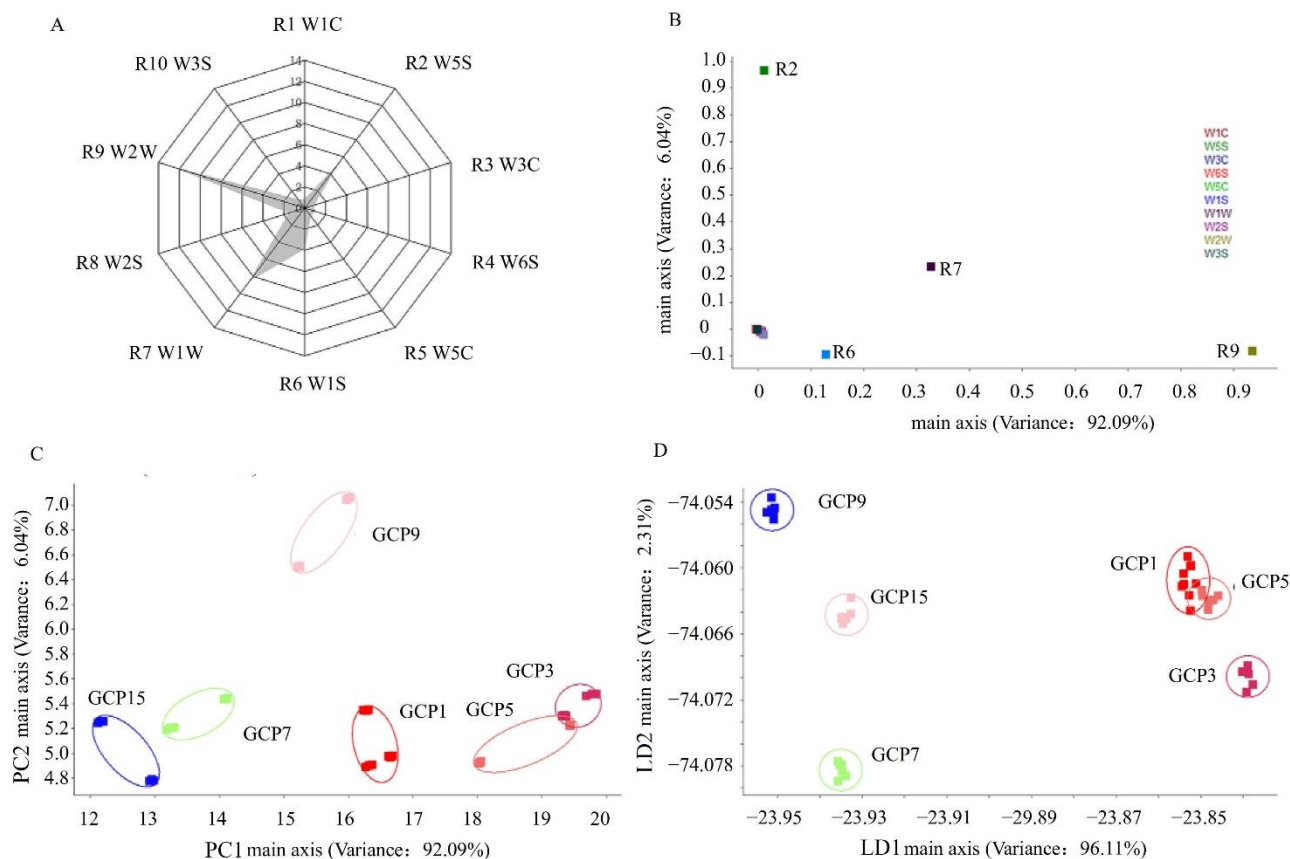
所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism V8.01 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 多样本两两比较采用 Duncan 检验。Origin 软件进行热图分析。

3 结果

3.1 不同陈化年份广陈皮的成分差异特征

电子鼻传感器对不同类型化合物响应强度不同, 传感器 W5S、W1S、W1W 和 W2W 对广陈皮样品表现出较强的响应值 (图 1-A、B), 即广陈皮含有更多的硫化物、甲烷等短链烃类, 萜烯, 芳香化合物。主成分分析结果可见, x 坐标轴表示第 1 主成分 (PC1), y 坐标轴表示第 2 主成分 (PC2), 其中 PC1 和 PC2 的贡献率分别为 92.09%和 6.04% (图 1-C); 另外, 线性判别分析结果显示, x 坐标轴表示线性判别因子一主成分 (LD1), y 坐标轴表示线性判别因子二主成分 (LD2), 其中而 LD1 和 LD2 的方差贡献率分别为 96.11%和 2.31% (图 1-D)。样品之间的距离相对较远, 表明样品之间存在显著差异 (图 1-C、D)。但电子鼻对广陈皮中所含芳香类物质不敏感, 不能代表全部化学信号特征且不能定性和定量地识别这些物质。

采用 GC/MS 对广陈皮挥发性化学成分进行分离和鉴定, 谱图见图 2。6 个陈化年份 GCPVO 主要共有成分 12 种, 相对含量结果见表 2。在陈化时间 1~9 年中 β -石竹烯的含量随着年份的增加而降低; 而 α -侧柏烯、 α -蒎烯、 α -蒎烯、月桂烯、 D -柠檬烯、松油烯、4-萜烯、2-(甲氨基) 苯甲酸甲酯在陈化 3 年广陈皮中相对含量最高。



A-电子鼻响应数据雷达图; B-电子鼻响应数据载荷分析图; C-电子鼻响应数据主成分分析; D-电子鼻响应数据的判别分析。
A-radar diagram of electronic nose response data; B-loading analysis diagram of electronic nose response data; C-PCA principal component analysis of electronic nose response data; D-linear discriminant analysis of electronic nose response data.

图 1 不同陈化年份广陈皮电子鼻响应值的主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of electronic nose response values of Guangchenpi with different aging years

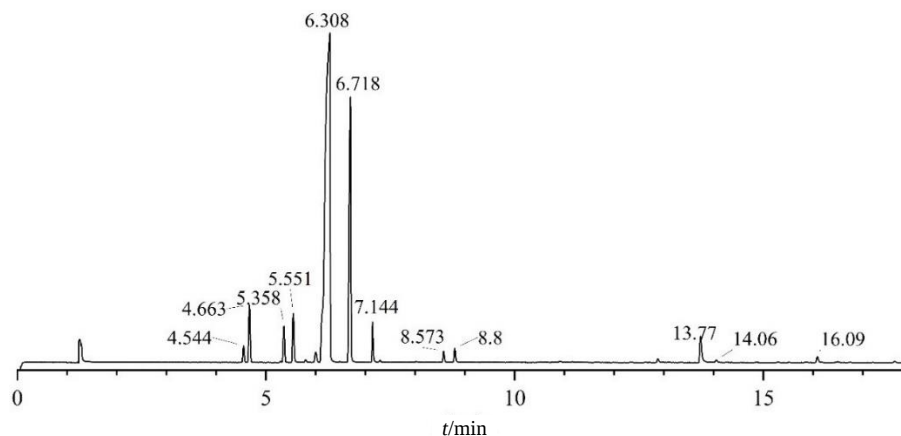


图 2 GCPVO 的 GC-MS 谱图

Fig. 2 GC-MS spectrum of GCPVO

3.2 GCPVO 对 BEAS-2B 细胞活性的影响

结果表明, LPS 质量浓度在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时能显著抑制 BEAS-2B 细胞活性 ($P < 0.01$)。GCPVO 体积分数为 0.020% 时可显著抑制 BEAS-

2B 细胞活性 ($P < 0.01$), GCPVO 体积分数为 0.005%、0.010% 时对细胞活性无明显影响, 见图 3。采用 LPS 质量浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、GCPVO 体积分数 0.01% 进行后续实验。

表 2 GCPVO 化学成分共有峰相对含量
Table 2 GCPVO chemical composition common peak relative content

样品	相对含量					
	α -侧柏烯	α -蒎烯	蒎品烯	月桂烯	D-柠檬烯	松油烯
	($t_R=4.544$ min)	($t_R=4.663$ min)	($t_R=5.358$ min)	($t_R=5.551$ min)	($t_R=6.308$ min)	($t_R=6.718$ min)
GCPVO1	0.52±0.08	2.68±0.39	1.95±0.29	2.12±0.32	64.14±7.57	20.62±2.49
GCPVO3	1.44±0.07	4.42±0.17	3.79±0.19	4.27±0.24	84.25±3.81	30.81±1.41
GCPVO5	0.95±0.03	3.91±0.11	2.95±0.10	2.42±0.10	76.67±1.71	14.79±0.42
GCPVO7	0.81±0.01	3.18±0.03	2.21±0.02	2.55±0.03	61.41±0.56	20.48±0.28
GCPVO9	1.34±0.07	4.25±0.23	2.91±0.16	3.46±0.19	68.93±2.49	23.54±0.87
GCPVO15	1.12±0.12	3.93±0.38	2.49±0.24	3.44±0.33	76.63±5.45	22.22±1.70

样品	相对含量					
	4-萜烯	(-)-4-萜品醇	α -松油醇	2-(甲氨基)苯甲酸甲酯	β -石竹烯	金合欢烯
	($t_R=7.144$ min)	($t_R=8.573$ min)	($t_R=8.800$ min)	($t_R=13.770$ min)	($t_R=14.060$ min)	($t_R=16.090$ min)
GCPVO1	2.79±0.37	1.53±0.20	2.69±0.37	8.81±0.90	1.17±0.11	4.66±0.48
GCPVO3	3.65±0.20	1.17±0.10	1.66±0.14	13.65±0.78	0.89±0.10	1.77±0.15
GCPVO5	1.73±0.08	1.00±0.05	0.91±0.04	3.07±0.10	0.46±0.07	1.33±0.07
GCPVO7	1.76±0.03	0.37±0.00	0.45±0.01	1.43±0.09	0.42±0.02	0.98±0.05
GCPVO9	2.37±0.10	0.43±0.02	0.51±0.02	1.26±0.07	0.23±0.02	0.28±0.03
GCPVO15	2.20±0.16	0.52±0.36	0.85±0.20	2.50±0.21	0.17±0.01	0.51±0.03

相对含量以峰面积 ($\times 10^8$) 计算。
Relative content calculated based on peak area ($\times 10^8$).

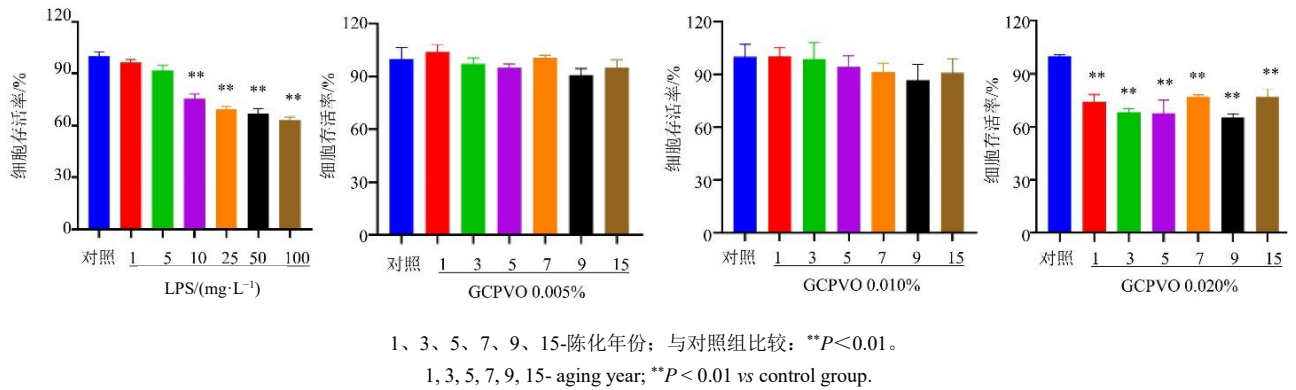


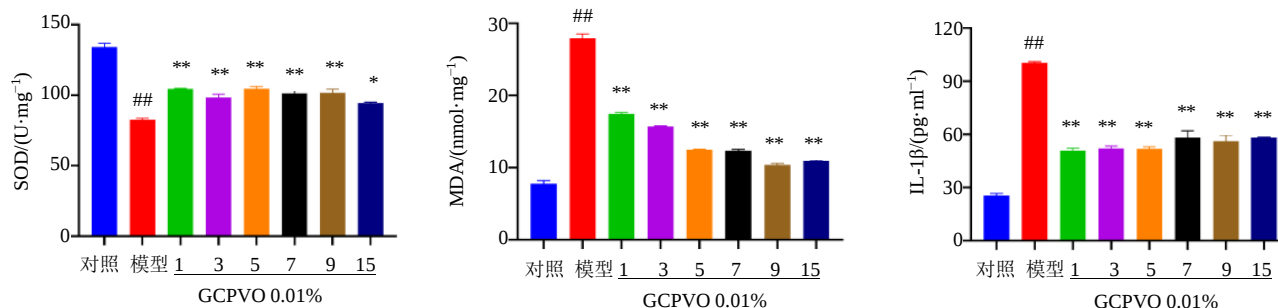
图 3 LPS 和 GCPVO 对 BEAS-2B 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Effect of LPS and GCPVO on viability of BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 GCPVO 改善 BEAS-2B 细胞氧化损伤和炎症反应

LPS 可造成 BEAS-2B 细胞的氧化损伤和炎症反应,如图 4 所示,与对照组比较,经 LPS 诱导后, BEAS-2B 细胞中的 SOD 水平显著下降,MDA 水平显著升高,细胞培养液中 IL-1 β 水平显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,不同年份 GCPVO 组的细胞中 SOD 水平均显著升高,MDA 水平均显著降低, IL-1 β 水平均显著降低 ($P<0.05、0.01$)。

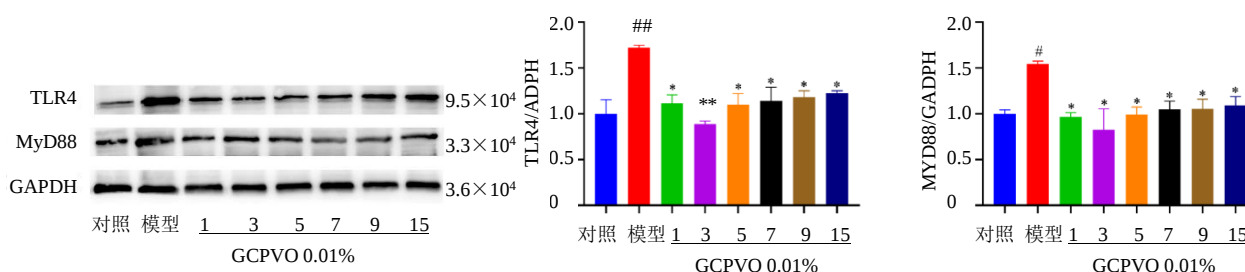
3.4 TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 信号通路在 GCPVO 改善 LPS 诱导的炎症中的作用

TLR4 是 LPS 的受体,在先天免疫中起着重要的作用,TLR4 的激活招募细胞内含有 TIR 结构域的接头蛋白 MyD88,促进炎症因子的产生,激活 NF- κ B 信号通路,导致多种炎症因子的表达^[18]。如图 5 所示,与对照组相比, LPS 诱导的模型组 BEAS-2B 细胞中 TLR4 和 MyD88 蛋白表达显著升高 ($P<0.05、0.01$)。与模型组相比,给予不同年



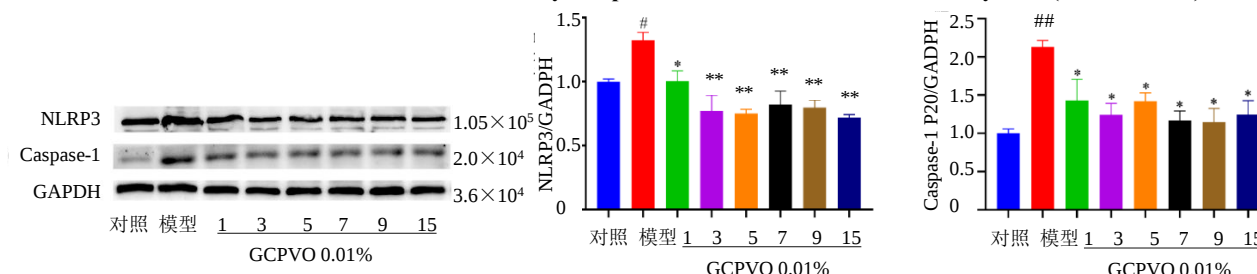
1、3、5、7、9、15-陈化年份；与对照组比较：^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。
1, 3, 5, 7, 9, 15- aging year; ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

图 4 GCPVO 对 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞 SOD、MDA 和 IL-1β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 4 Effects of GCPVO on SOD, MDA and IL-1β in levels of BEAS-2B cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



1、3、5、7、9、15-陈化年份；与对照组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。
1, 3, 5, 7, 9, 15- aging year; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

图 5 GCPVO 对 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞 TLR4 和 MyD88 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 5 Effects of GCPVO on TLR4 and MyD88 proteins in BEAS-2B cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



1、3、5、7、9、15-陈化年份；与对照组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。
1, 3, 5, 7, 9, 15- aging year; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

图 6 GCPVO 对 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 6 Effects of GCPVO on NLRP3 and Caspase-1 proteins in BEAS-2B cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

份 GCPVO (0.01%), TLR4 和 MyD88 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。

细胞焦亡是一种细胞的炎性死亡，是引发机体炎症的关键机制之一。NLRP3 炎症小体可以激活 Caspase-1 炎症反应，促进促炎因子 IL-1β 的释放，从而诱导细胞焦亡^[19]。如图 6 所示，与对照组相比，经 LPS 刺激后，模型组 BEAS-2B 细胞中 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 、0.01)；与模型组相比，不同年份 GCPVO (0.01%) 给药，NLRP3、

Caspase-1 蛋白的表达显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。与陈化 1 年和 3 年以上的样品相比，陈化 3 年的广陈皮具有更优的作用趋势，也为揭示“陈久者良”的理论提供科学依据。

3.5 谱效关系分析

以 LPS 致 BEAS-2B 细胞炎症相关指标为母序列，利用 GC/MS 分析所得的 12 个主要共有特征化合物峰的相对含量计算特征序列，采用灰色关联度分析统计并计算灰色相关系数 (表 3)，相关性最强

的 3 个色谱峰分别为 *D*-柠檬烯、 α -蒎烯和松油烯。如图 7 所示，热图中的颜色与改善炎症的药效强度成正相关关系，*D*-柠檬烯、 α -蒎烯和松油烯在热图

中也是丰度较高的色谱峰，对改善炎症的作用显著。结果表明，*D*-柠檬烯、 α -蒎烯和松油烯可作为 GCPVO 改善肺部炎症活性的潜在质量指标。

表 3 共有峰相对峰面积与药效指标的相关性系数

Table 3 The Correlation coefficient between efficiency index and relative common peak contents											
编号	tr/min	化合物	相关系数							平均相关系数	排名
			MDA	SOD	IL-1 β	TLR4	MyD88	NLRP3	Caspase-1		
1	6.308	<i>D</i> -柠檬烯	0.839	0.903	0.905	0.876	0.888	0.841	0.904	0.879	1
2	4.663	α -蒎烯	0.811	0.873	0.877	0.861	0.868	0.808	0.858	0.851	2
3	6.718	松油烯	0.799	0.861	0.878	0.853	0.860	0.818	0.842	0.844	3
4	5.358	蒎品烯	0.793	0.866	0.838	0.826	0.832	0.808	0.848	0.830	4
5	7.144	4-萜烯	0.809	0.840	0.806	0.789	0.792	0.845	0.838	0.817	5
6	5.551	月桂烯	0.756	0.805	0.837	0.824	0.828	0.771	0.788	0.801	6
7	4.544	α -侧柏烯	0.749	0.784	0.818	0.800	0.806	0.759	0.769	0.784	7
8	8.573	(-)-4-蒎品醇	0.725	0.695	0.665	0.651	0.657	0.673	0.714	0.683	8
9	8.800	α -松油醇	0.710	0.664	0.655	0.633	0.636	0.666	0.660	0.661	9
10	14.060	β -石竹烯	0.698	0.658	0.653	0.630	0.638	0.660	0.660	0.657	10
11	16.090	金合欢烯	0.676	0.654	0.650	0.621	0.628	0.652	0.651	0.647	11
12	13.770	2-(甲氨基)苯甲酸甲酯	0.599	0.577	0.571	0.557	0.561	0.579	0.575	0.574	12

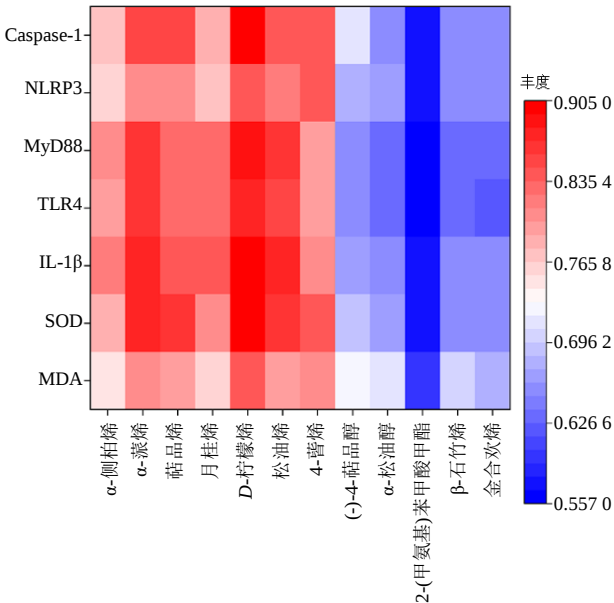


图 7 主要共有峰与药效指标的灰色关联度系数热图
Fig. 7 Heat map of average correlation coefficient between significant common peaks and efficacy indexes

4 讨论

广陈皮具有理气健脾、燥湿化痰功效，临床多用于清除体内痰湿、减轻咳嗽、多痰等症状的治疗^[3]。ALI 是常见的危急重症，其特征是由各种致病因素所导致的肺部炎症和肺水肿^[20]。肺泡上皮

细胞和血管内皮细胞的所构成的天然屏障损伤是引起 ALI 的主要原因^[21]。本研究采用 LPS 诱导肺上皮细胞 BEAS-2B 构建炎症损伤细胞模型，通过氧化损伤指标 MDA 和 SOD 评价 GCPVO 的抗氧化能力，以炎症因子 IL-1 β 为指标考察 GCPVO 的抗炎作用。氧化应激和炎症反应在机体 ALI 的致病过程中起着重要作用^[22]。当肺部受到损伤时会激活促炎反应，促炎细胞因子和其他介质大量分泌，炎症可能导致毛细血管损伤，并进一步破坏肺泡毛细血管屏障，从而促进 ALI 的急性发作^[23]。在机体发生炎症反应时，IL-1 β 被激活，介导局部炎症反应，导致组织或器官损伤^[24]。MDA 和 SOD 作为组织氧化应激损伤的重要指标，SOD 能够及时快速清除机体过量的氧自由基，减轻机体过度氧化应激和炎症反应^[25]。肺上皮细胞膜上的 TLR4 受体识别 LPS 后，胞内下游信号通路分子 MyD88 经过细胞内信号转导激活 NF- κ B 并转位入核，诱导下游炎症蛋白的转录和翻译，促进 NLRP3 的生成^[26]。NLRP3 活化促炎症蛋白酶 Caspase-1，促使 IL-1 β 前体被切割，引发炎症因子的成熟和机体炎症反应^[16,18,24]。研究发现，GCPVO 给药之后，BEAS-2B 细胞内 IL-1 β 和 MDA 的含量明显降低，而 SOD 显著升高，表明 GCPVO 具有抗炎和抑制氧化应激的作用。

为了进一步揭示 GCPVO 改善肺炎的物质基础,本研究结合电子鼻感官评价和 GC-MS 分离分析技术,检测广陈皮样品中的挥发油成分的物质组成。PEN3 型电子鼻已广泛应用在中药材和食品质量研究中,传感器通过响应气体的方式,改变传感器中活性材料导电性,对应不同导电性有不同的响应值^[27]。有 10 种金属氧化物半导体型化学传感元件组成该传感器,每个传感器特异性响应不同的敏感物质,导致响应值的不同^[28]。研究发现,在陈化时间 1~9 年中 β -石竹烯的含量随着年份的增加而降低。而 α -侧柏烯、 α -蒎烯、 α -蒎品烯、月桂烯、*D*-柠檬烯、松油烯、4-萜烯、2-(甲氨基)苯甲酸甲酯在陈化 3 年广陈皮中相对含量最高。因此,本研究以不同陈化年份 GCPVO 的 12 个共有峰为目标,采用灰色关联度方法分析其与药效指标的谱效关系。结果表明,GCPVO 中 *D*-柠檬烯、 α -蒎烯、松油烯是缓解肺炎的主要活性成分。然而,本研究仍需要进一步开展体内药效评价和主要化合物的药理机制研究。

本研究采用体外药效学评价明确了不同陈化年份 GCPVO 调节 TLR4/MyD88/NLRP3/Caspase-1 信号通路减轻 LPS 诱导的肺上皮细胞炎症的关键作用,并采用谱效关系研究明确了药效相关物质,为揭示不同陈化年份广陈皮止咳化痰的物质基础提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Luo Y, Zeng W, Huang K E, et al. Discrimination of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus reticulata* 'Chachi' as well as the *Citrus reticulata* 'Chachi' within different storage years using ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 171: 218-231.
- [2] Wang M, Li X, Ding H, et al. Comparison of the volatile organic compounds in *Citrus reticulata* 'Chachi' peel with different drying methods using E-nose, GC-IMS and HS-SPME-GC-MS [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1169321.
- [3] Yu X, Sun S, Guo Y, et al. *Citri Reticulatae Pericarpium* (Chenpi): Botany, ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of a frequently used traditional Chinese medicine [J]. J Ethnopharm, 2018, 220: 265-282.
- [4] Zheng G, Chao Y, Liu M, et al. Evaluation of dynamic changes in the bioactive components in *Citri Reticulatae Pericarpium* (*Citrus reticulata* 'Chachi') under different harvesting and drying conditions [J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(8): 3280-3289.
- [5] Anandakumar P, Kamaraj S, Vanitha M K. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects [J]. J Food Biochem, 2021, 45(1): e13566.
- [6] Salehi B, Upadhyay S, Erdogan Orhan I, et al. Therapeutic potential of α - and β -pinene: A miracle gift of nature [J]. Biomolecules, 2019, 9(11): 738.
- [7] Mustapa M A, Guswenrivo I, Zuhrotun A, et al. Anti-breast cancer activity of essential oil: A systematic review [J]. Appl Sci, 2022, 12(24): 12738.
- [8] Linck V M, da Silva A L, Figueiró M, et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice [J]. Phytomed, 2009, 16(4): 303-307.
- [9] Gamarra F M C, Sakanaka L S, Tambourgi E B, et al. Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process [J]. Brazil J Chem Eng, 2006, 23(1): 147-151.
- [10] 易伦朝, 梁逸曾, 曾仲大, 等. GC-MS 与交互移动窗口因子分析法(AMWFA)用于 3 种陈皮挥发油成分的比较分析 [J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(9): 1626-1630.
- [11] 崔佳韵, 梁建芬. 不同年份新会陈皮挥发油的抗氧化活性评价 [J]. 食品科技, 2019, 44(1): 98-102.
- [12] Zheng Y Y, Zeng X, Peng W, et al. Study on the discrimination between citri reticulatae pericarpium varieties based on HS-SPME-GC-MS combined with multivariate statistical analyses [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1235.
- [13] 杨静帆, 李敏艳, 秦燕勤, 等. 川陈皮素的药理活性研究进展 [J]. 中医学报, 2023, 38(4): 719-725.
- [14] 何邵波, 黄泽智, 李丽钱. 川陈皮素对哮喘大鼠内质网应激信号通路及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症小体活化的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(4): 528-532.

He S B, Huang Z Z, Li L Q. Effects of nobiletin on endoplasmic reticulum stress signaling pathway and activation of nucleotide binding oligomerization domain-

- like receptor protein 3 inflammatory body in asthmatic rats [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(4): 528-532.
- [15] 任雪, 石凯欣, 张震, 等. 广陈皮中多甲氧基黄酮提取物对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(3): 248-255.
- Ren X, Shi K X, Zhang Z, et al. Protective effects of polymethoxy flavones extract from *Citrus Reticulata* 'Chachi' on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice [J]. J Huazhong Agric Univ, 2021, 40(3): 248-255.
- [16] 兰悦嘉, 孟宪丽, 吴嘉思. 黄芩素调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的焦亡减轻小鼠急性肺损伤作用 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6694-6703.
- Lan Y J, Meng X L, Wu J S. Baicalein alleviates acute lung injury in mice by regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway mediated pyroptosis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6694-6703.
- [17] 陈彤, 曹庸, 刘飞, 等. GC-MS 指纹图谱结合主成分分析法评价不同产地陈皮挥发油的质量 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(2): 217-222, 216.
- Chen T, Cao Y, Liu F, et al. Evaluation of the quality of volatile oil from tangerine peel from different habitats by GC-MS fingerprint combined with principal component analysis [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(2): 217-222, 216.
- [18] Zhou L J, Liu Z J, Wang Z X, et al. Astragalus polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway in vitro and in vivo [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44822.
- [19] Fu J N, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. Annu Rev Immunol, 2023, 41: 301-316.
- [20] 刘泽茹, 宋磊, 李丹. 急性肺损伤实验动物模型的特征和评价方法 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(6): 1100-1102.
- Liu Z R, Song L, Li D. Characteristics and evaluation method of experimental animal model of acute lung injury [J]. Chin J Lab Diagn, 2017, 21(6): 1100-1102.
- [21] Maniatis N A, Kotanidou A, Catravas J D, et al. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury [J]. Vascul Pharmacol, 2008, 49(4/5/6): 119-133.
- [22] 陈杨, 施强强, 金光勇, 等. PKC α -NLRP3 信号通路在小鼠急性肺损伤过度炎症反应中的作用机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(6): 996-1004.
- Chen Y, Shi Q Q, Jin G Y, et al. Mechanism of PKC α -NLRP3 signaling pathway in excessive inflammatory response of acute lung injury in mice [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(6): 996-1004.
- [23] Liu Y H, Zhou J B, Luo Y Y, et al. Honokiol alleviates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via Nrf2 activation *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 127.
- [24] Zhang C, Wang X R, Wang C G, et al. Qingwenzhike prescription alleviates acute lung injury induced by LPS via inhibiting TLR4/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome activation [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 790072.
- [25] Meng L, Li L Y, Lu S, et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. Mol Immunol, 2018, 94: 7-17.
- [26] Rosadini C V, Kagan J C. Early innate immune responses to bacterial LPS [J]. Curr Opin Immunol, 2017, 44: 14-19.
- [27] Wang Q, Li L, Ding W, et al. Adulterant identification in mutton by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometer [J]. Food Contr, 2019, 98: 431-438.
- [28] 李涵, 王艳丽, 范雪花, 等. 电子鼻技术应用于白及其近似饮片快速辨识的可行性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 157-165.
- Li H, Wang Y L, Fan X H, et al. Analysis on feasibility of electronic nose technology for rapid identification of *Bletillae Rhizoma* and its approximate decoction pieces [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(13): 157-165.

[责任编辑 兰新新]